

Лекція 3

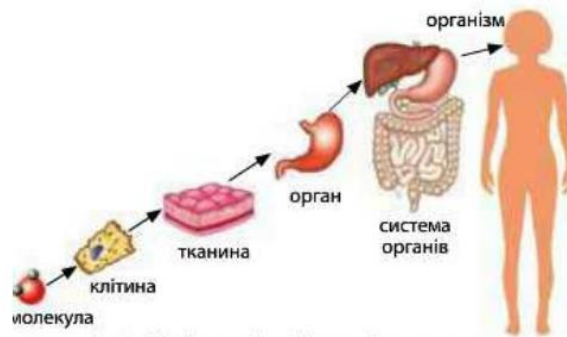
Тема: Методи дослідження біологічних об'єктів на тканьовому рівні

План:

1. Методи дослідження біологічних об'єктів на тканьовому рівні
2. Культура тканин
3. Принципи і методи гістохімічного фарбування. Основи імуноцитохімічного аналізу

1. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ НА ТКАНЬОВОМУ РІВНІ

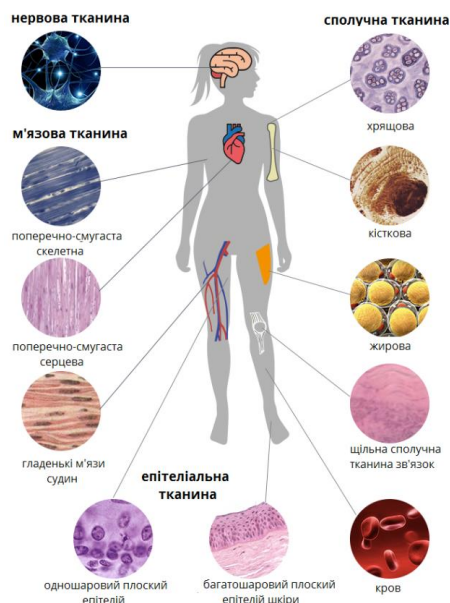
Організм людини і тварин являє собою цілісну систему, в якій можна виділити ряд ієрархічних рівнів організації живої матерії: клітини - тканини - органи - системи органів



Іл. 1. Рівні організації організму людини

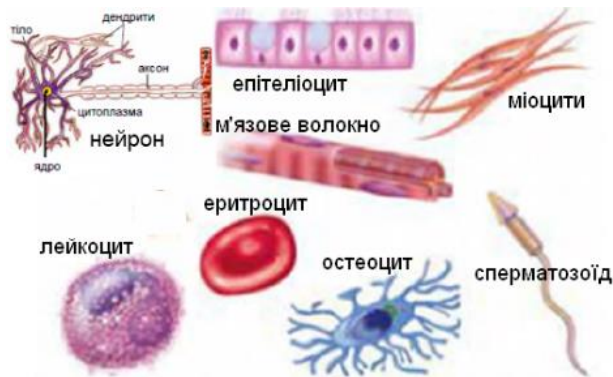
Гістологія - наука про будову, розвиток і життєдіяльність тканин тварин організмів.

Тканини представляють собою систему клітин і неклітинних структур, які об'єдналися і спеціалізувалися в процесі еволюції для виконання найважливіших функцій в організмі. Для кожної з основних тканинних систем характерні властиві саме їм особливості будови, розвитку і життєдіяльності.



Цитологія - наука про розвиток, будову і життєдіяльність клітин.

Цитологія становить необхідну частину гістології, так як клітини є основою розвитку і будови тканин.



Головними етапами цитологічного і гістологічного аналізу є вибір об'єкта дослідження, підготовка його для вивчення в мікроскопі, застосування методів мікроскопіювання, а також якісний і кількісний аналіз зображень.

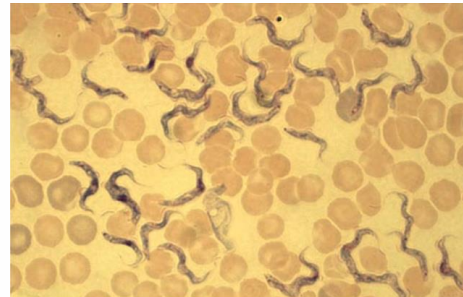
Об'єктами дослідження служать живі і мертві (фіксовані) клітини і тканини, і їх зображення, отримані в світлових і електронних мікроскопах.

Основним об'єктом дослідження є гістологічні препарати, приготовлені з фіксованих структур. Препарат може являти собою мазок (наприклад, мазок крові, кісткового мозку, слини, спинномозкової рідини та ін.), відбиток (наприклад, селезінки, тимуса, печінки), плівку з тканини (наприклад, сполучної або очеревини, плеври, м'якої мозкової оболонки), тонкий зріз. Найбільш часто для вивчення використовується зріз тканини або органу. Гістологічні препарати можуть вивчатися без спеціальної обробки. Наприклад, приготований мазок крові, відбиток, плівка або зріз органу можуть відразу розглядатися під мікроскопом. Але внаслідок того, що структури мають слабкий контраст, вони погано виявляються в звичайному світловому мікроскопі і потрібне використання спеціальних мікроскопів (фазово-контрастні і ін.). Тому частіше застосовують спеціально оброблені препарати: фіксовані, укладені в тверде середовище і пофарбовані.

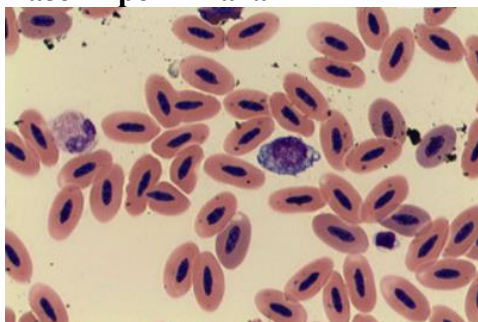
Мазок крові у нормі



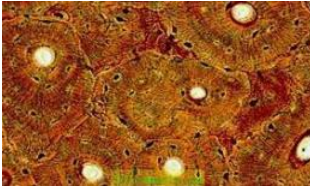
Мазок крові хворого на трипаносомоз



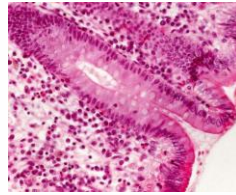
Мазок крові птаха



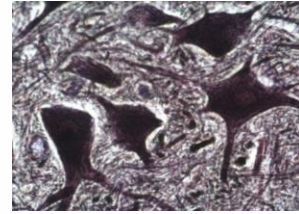
Кісткова тканина



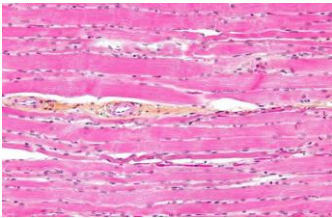
Залозиста тканина



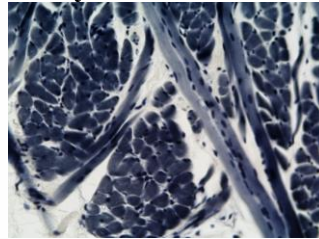
Нервова тканина



Посмугована тканина



Посмугована тканина



Процес виготовлення гістологічного препарату для світлової та електронної мікроскопії включає наступні основні етапи:

1. взяття матеріалу і його фіксація,
2. ущільнення матеріалу,
3. приготування зрізів,
4. фарбування або контрастування зрізів.

Для світлової мікроскопії необхідний ще один етап - укладання зрізів в бальзам або інші прозорі середовища.

Фіксація забезпечує запобігання процесів розкладання, що сприяє збереженню цілісності структур. Це досягається тим, що взятий з органу маленький зразок або занурюють в фіксатор (спирт, формалін, розчини солей важких металів, осмієва кислота, спеціальні фіксуєчі суміші), або піддають термічній обробці. *Під дією фіксатора в тканинах і органах відбуваються складні фізико-хімічні зміни. Найбільш істотним з них є процес незворотної коагуляції білків, внаслідок якого життєдіяльність припиняється, а структури стають мертвими, фіксованими. Фіксація призводить до ущільнення і зменшення обсягу шматочків, а також до поліпшення наступного фарбування клітин і тканин.*

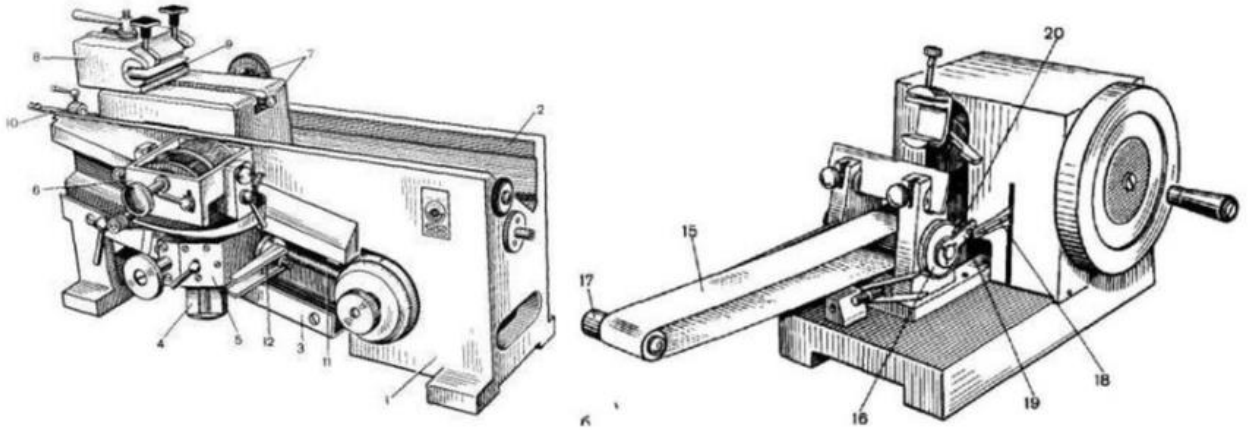
Зневоднення здійснюється шляхом послідовного унесення шматочка тканини в спирти зростаючих концентрацій для видалення з нього води. Воно необхідне для виконання наступного етапу обробки матеріалу - його заливки (**ущільнення**)

Ущільнення матеріалу, необхідне для приготування зрізів, проводиться шляхом просочування попередньо зневодненого матеріалу парафіном, целоїдином, органічними смолами. Більш швидке ущільнення досягається застосуванням методу заморожування шматочків, наприклад, в рідкій вуглекислоті. В результаті заливки після охолодження парафіну або полімеризації пластмаси шматочок тканини (блок) стає досить щільним для отримання тонких зрізів при різанні.

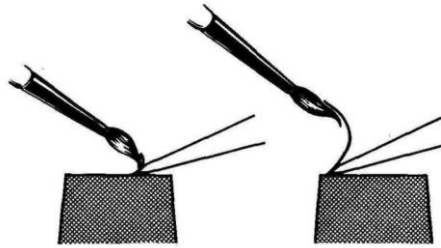
Приготування зрізів відбувається на спеціальних приладах - мікротомів (для світлової мікроскопії) і ультрамикротомів (для електронної мікроскопії).

Здійснюється за допомогою особливих сталевих ножів - бритв. При цьому зазвичай отримують зрізи залитого в парафін або інше середовище матеріалу товщиною 5-7 мкм (в оптимальному варіанті - серійні, тобто наступні один за іншим у вигляді безперервної стрічки).

Санний мікромом (МС-2) і ротаційний мікромом для парафінових зрізів (МПС-2)



При різанні великих блоків і твердого матеріалу зрізи часто закручуються. Однак цього можна уникнути шляхом притримування і підведення зрізу пензликом за передній його край в процесі різання.



Депарафінування зрізів перед фарбуванням:

Ксилол1	10-15 хв, можна в термостаті при 37 ⁰ С
Ксилол2	3-5 хв
Спирт 100%-1	1-2 хв
Спирт 100%-2	сполоснути
Спирт 96%-1	сполоснути
Спирт 96%-2	сполоснути
Дистильована вода	2 зміни

Фарбування зрізів (в світловій мікроскопії) або напилення їх солями металів (в електронній мікроскопії) застосовують для збільшення контрастності зображення окремих структур при розгляданні їх під мікроскопом.

Зазвичай проводиться після їх приклеювання на предметне скло і видалення з них парафіну (Депарафінування). Фарбування дозволяє виявити різні структурні компоненти тканин і клітин завдяки їх неоднаковій спорідненості до гістологічним барвників

Гістологічні барвники (по хімічній природі) підрозділяють на кислі, основні і нейтральні. Як приклад можна привести найбільш уживаний барвник гематоксилін, який забарвлює ядра клітин в фіолетовий колір, і кислотний барвник -еозін, що забарвлює цитоплазму в рожево-жовтий колір. Вибірча спорідненість структур до певних барвників обумовлено їх хімічним складом і фізичними властивостями. Структури, добре забарвлюються кислотними барвниками, називаються Оксифільні, а забарвлюються основними - базофільними. Наприклад, цитоплазма клітин найчастіше забарвлюється Оксифільні, а ядра клітин - фарбуються базофільно.

Структури, що сприймають як кислі, так і основні барвники, є нейтрофільними (гетерофільними).

Пофарбовані препарати зазвичай зневоднюють в спиртах зростаючої концентрації і прояснюють в ксилолі, бензолі, толуолі або деяких маслах. Для тривалого збереження зневоднений гістологічний зріз укладають між предметним і покривним склами в канадський бальзам або інші речовини. Готовий гістологічний препарат може бути використаний для вивчення під мікроскопом протягом багатьох років.

Приклади забарвлення:

Забарвлення гематоксилін-еозином

1.

- а) Найпоширеніший метод забарвлення.
- б) Поєднує основний і кислий барвники
- в) Тому дозволяє виявити майже всі клітини і багато неклітинні структури.

2. При цьому

- ядра фарбуються гематоксиліном, тобто набувають синьо-фіолетовий колір,
- а цитоплазма фарбується еозином в жовтуваторожевий колір.



Препарат - зріз тонкої кишки. Забарвлення гематоксилін-еозином

- а) На знімку видно кишкові ворсинки(1): вони знаходяться на внутрішній поверхні тонкої кишки. б) Ворсинки покриті одним шаром епітеліальних клітин. в) Ядра (2) цих клітин - фіолетового, а цитоплазма (3) - рожевого кольору.

Забарвлення мазків за Романовським

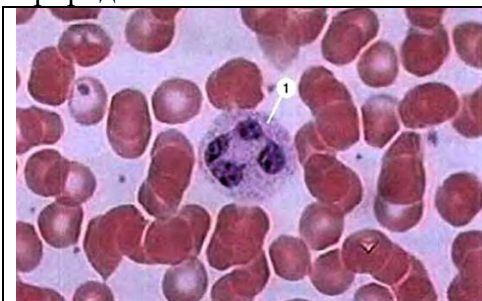
1. Застосовується для фарбування мазків крові і червоного кістково гомозку. Тут теж використовуються 2 барвника:

основний - АЗУР II, що забарвлює базофільні структури в темно синій колір, і **кислий** - еозин, що фарбує оксифільні структури в ярокорожевий колір.

2. Відмінності від приготування зрізів такі:

- фіксацію мазків проводять чистим метанолом;
- фарбування продовжують всього 30-45 хв, а не кілька годин;
- для взяття під покривне скло використовують кедрове масло, а не канадський бальзам.

3. В результаті еритроцити набувають рожевий колір, цитоплазма більшості лейкоцитів - блакитний або синій колір, цитоплазматичні гранули забарвлюються в залежності від їх природи.



Препарат - мазок крові
Серед численних еритроцитів видно: лейкоцит (1) з дуже дрібною нейтрофільною (фіолетоворожевою) зернистістю в цитоплазмі, а також на багато дрібніші тромбоцити.

Забарвлення залізним гематоксиліном (за методом Генденгайна)

1. Препарат попередньо обробляють залізо-амміачними квасцями, а потім обробляють гематоксиліном.
2. Структури набувають коричнево-сірий колір.
3. Добре виявляються структури ядра, межі клітин, м'язові волокна.

Препарат - зріз язика. У м'язових волокнах видно ядра (1) і виразна поперечна смугастість.



Препарат - зріз язика. У м'язових волокнах видно ядра (1) і виразна поперечна смугастість.

2. КУЛЬТУРА ТКАНИН

Метод тривалого зберігання у живому стані клітин, тканин, невеликих органів або їх частин, що виділені з організму людини, тварин або рослин

Ізольований шматочок тканини або органу, який використовується для культивування поза організмом, називається експлантатом. Культура клітин росте поза організмом без утворення тканин.

У біол. дослідженнях частіше застосовують **одношарові** к. т. - популяції клітин, що ростуть на поверхні твердого субстрату (скло, метал, пластмаса) у вигляді безперервного шару, і **суспензійні** К. т., в яких клітини зберігають життєздатність або розмножуються зваженими в поживному середовищі.

Одношарові



Суспензійні



Залежно від ступеня пристосування до умов культивування розрізняють **п'ять типів культур клітин**:

- 1) первинна культура клітин, що отримується з тканин або органів, узятих безпосередньо з організму (культура вважається первинною до тих пір, поки її не пересіяли), лінія клітин - первинна культура з часу отримання субкультури (пересіву);
- 2) стабільна лінія клітин - клітини, здатні розмножуватися (пересіватися) *in vitro* до нескінченності;
- 3) лінія диплоїдних клітин - лінія клітин, в якій не менше 75% клітин зберегли нормальний вихідний каріотип;
- 4) штамп клітин - популяція однорідних за однією або декількома ознаками диплоїдних клітин, яка зберігає специфічні властивості протягом певного періоду (до 50 пасажів).

5) Надалі штамп клітин або гине, або перетворюється в стабільну лінію клітин; при цьому нормальний каріотип змінюється гетероплоїдним набором хромосом.

У первинних к. т. зберігається тканнна специфічність клітин. Цим пояснюється морфологічна неоднорідність таких к. т..

При тривалому культивуванні тканнна специфічність клітин виражена слабо, тому клітини багатьох ліній подібні між собою.

При культивуванні найбільш вибагливі к.т. теплокровних тварин, найменш - к. т. рослин.

Для вирощування культур, крім факторів харчування, необхідні відповідні температура, осмотичний тиск, рН, іонний і газовий склад середовища.

Для клітин більшості ссавців і птахів оптимальна t 36- 38 ° С, для клітин комах і холонокровних хребетних - 20-25 ° С. Для клітин ссавців і птахів оптимальний осмотичний тиск при t 38 ° С - 7,6 атм. Клітини більшості тварин добре ростуть при рН 7,0-7,3. Оптимальна концентрація O_2 к. т. близька до змісту його в повітрі.

У живильному середовищі повинні бути присутніми іони натрію, калію, кальцію, магнію, хлориди, фосфати і глюкоза. Потреба в поживних речовинах визначається характером к. т. Для тривалого зростання і розмноження клітин ссавців потрібно щонайменше 13 амінокислот, вітаміни групи В і сироватка крові.

Середовища для короткочасного культивування к. т. можуть містити менше поживних речовин, в їх склад не входить сироватка. Поживні середовища, які забезпечують зростання к. т., називаються **ростовими**; середовища, що забезпечують збереження життєздатності к. т., - **підтримуючими**.

Первинні культури отримують з клітин, виділених з тканин за допомогою протеолітичних ферментів (частіше трипсину). Їх, як правило, вирощують у середовищі, що складається з сольового розчину Ерла або Хенкса, 0,5% гідролізату лактальбуміну, 0,1% глюкози і 5-10% сироватки крові великої рогатої худоби.

Для вирощування лінії клітин і штаму клітин використовують синтетичні середовища, що містять амінокислоти, вітаміни і збагачені сироваткою (середовище Ігла і ін.) і ін. важливими метаболітами (середовище 199 і ін.). Такі ж середовища застосовують при тривалому культивуванні тканин і органів зародків. К. т. вирощують в скляних, пластмасових або металевих судинах різної форми і ємності. Одношарові культури частіше вирощують в скляних пробірках, матрацах Ру або в круглостінних флаконах.

3. Принципи і методи гістохімічного фарбування. Основи імуноцитохімічного аналізу

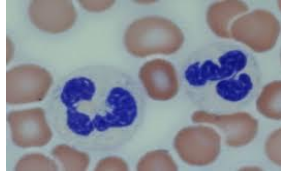
Гістохімічні методи дослідження - методи ідентифікації хімічних речовин в гістологічних зрізах. Складовою частиною г. м. д. є цитохімічні методи, що виявляють хімічні речовини в клітинах приготованих мазків і відбитків. В основі г. м. д. лежить з'єднання принципів і методів хімічного аналізу з принципами та методами морфологічного вивчення клітин і тканин, що використовуються в цитології і гістології.

За допомогою різноманітних методів сучасної гістохімії можна судити про особливості функціонування різних тканнних і клітинних структур, визначати характер і темп обмінних процесів в клітинах і тканинах, виявляти ранні прояви захворювань.

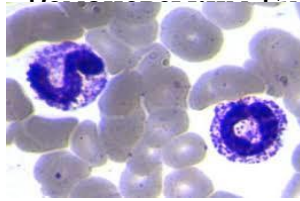
Неодмінною умовою проведення г. м. д., особливо при виявленні ферментів і інших речовин білкової природи, є збереження структури тканин і клітин в стані, близькому до того, яке є в живому організмі. Це досягається отриманням зрізів свіжозаморожених тканин за допомогою ножа глибокого охолодження і кріостату, а також використанням ліофільної сушки. Деякі г. м. д., наприклад виявлення вуглеводневих сполук, можна проводити після спеціальної фіксації тканин і заливки в парафін.

До високоспецифічних відносяться гістохімічні методи виявлення **ферментів**. В їх основу покладено **вплив ферменту на специфічний субстрат в присутності іншої**

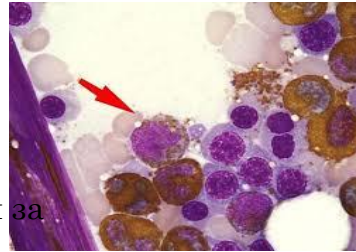
речовини, що називається захоплюючим агентом (акцептором). З'єднуючись з первинним продуктом ферментативної реакції, акцептор утворює нерозчинний, зазвичай забарвлений, осад - кінцевий продукт реакції, який маркує місце дії ферменту. Як акцептори застосовують іони металів, солі діазонію та інші сполуки. Оцінка результатів гістохімічних реакцій, заснована на виборчому фарбуванні структур або випаданні пофарбованого продукту реакції, може бути не тільки якісною, але і кількісною при використанні цито-спектрофотометрії. Можлива також візуальна напівкількісна оцінка інтенсивності фарбування в балах.



Нейтрофіли – фарбування за
Романовським-Гізе



Нейтрофіли з катіонними білками
(барвник бромфеноловий синій)



Нейтрофіли з мієлопероксидазою
(барвник бензидин)