

ЛЕКЦІЯ № 3

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

План:

1. Основні методи мікроскопічного аналізу
2. Методи дослідження біологічних об'єктів на тканиновому рівні
3. Принципи і методи гістохімічного фарбування. Основи імуноцитохімічного аналізу

1. Основні методи мікроскопічного аналізу

Діаметр типової клітини тварин становить 10-20 мкм. Тільки з появою удосконалених світлових мікроскопів на початку XIX століття вдалося встановити той факт, що всі тканини тварин і рослин складаються з окремих клітин. Це відкриття, узагальнене в формі клітинної теорії Шлейденом і Шванном в 1838 році, знаменує собою початок клітинної біології.

Будучи надзвичайно малими за розмірами, тваринні клітини до того ж безбарвні і прозорі; отже, відкриття їх основних структур стало можливим завдяки розробці набору барвників в кінці XIX століття. Саме барвники забезпечили достатній контраст для спостереження субклітинних структур.

Схожа ситуація спостерігалася на початку 40-х років XX століття, коли винахід потужного електронного мікроскопа зажадало нових методів збереження і забарвлення клітин. І тільки після того, як вони були розроблені, почала проявлятися вся складність клітинної структури.

В основі мікроскопії як методології досі лежать способи приготування зразка і можливості самого мікроскопа.

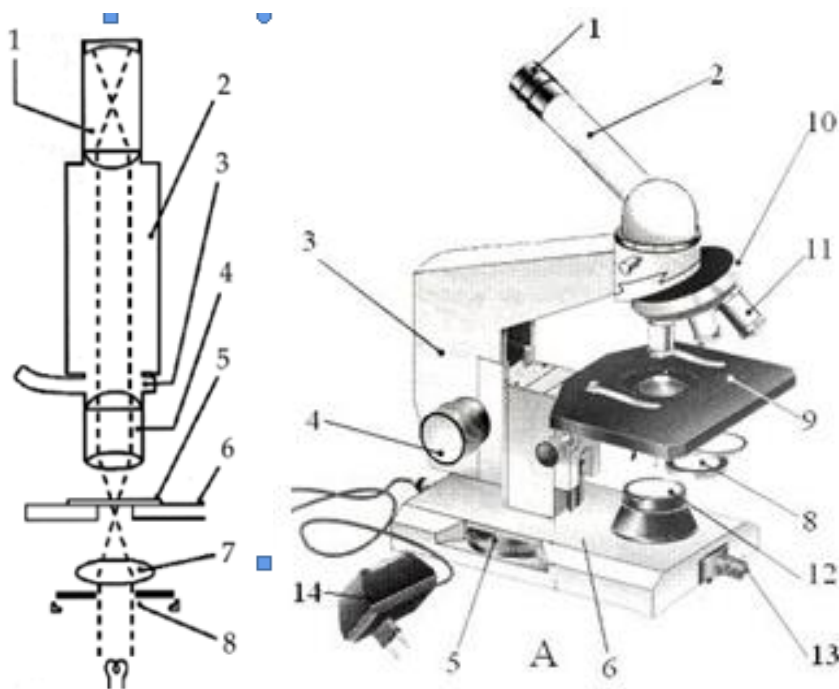
Мікроскоп (від лат. *Micros* - малий і *scopein* - розглядати, спостерігати) - прилад, що дозволяє отримувати збільшене зображення об'єктів і структур, недоступних для людського ока.

Мікроскопічні методи дослідження - способи вивчення різних об'єктів за допомогою мікроскопа.

У практиці медико-біологічних досліджень застосовуються методи **світлової** та **електронної** мікроскопії.

Світлові мікроскопи збільшують об'єкт більш ніж у **1500** разів, а **електронні** мікроскопи - більш ніж у **20 000** разів.

Світлова мікроскопія ґрунтується на законах геометричної оптики і хвильової теорії утворення зображення. Загальна блок-схема світлового мікроскопа:



1 — окуляр, 2 — тубус, 3 — тубусотримувач, 4 — гвинт грубого наведення, 5 — мікрометрний гвинт, 6 — підставка, 8 — конденсор, ірисова діафрагма і світлофільтр, 9 — предметний столик, 10 — револьверний пристрій, 11 — об'єктив, 12 — корпус колекторної лінзи, 13 — патрон з лампою, 14 — джерело електроживлення.



Групи мікроскопів:

- Біологічні (із прохідним світлом);
- Інвертовані (із прохідним світлом);
- Люмінесцентні;
- Поляризаційні (із прохідним світлом);
- Аналізатори зображення;
- Стереоскопічні.

Групи мікроскопів за ступенем складності:

- Навчальні;
- Рутинні;
- Робочі;
- Лабораторні;
- Дослідницькі

Біологічний мікроскоп призначений для спостереження в світлі в світлому полі забарвлених і нефарбованих мазків крові, препаратів кісткового мозку, опадів сечі, клітинних концентратів, тканинних біотипів, гістологічних зрізів в спеціальних камерах і ін. При застосуванні фазово-контрастних пристроїв, конденсорів темного поля і косоого освітлення можливе спостереження мало-контрастних препаратів.

При гематологічному дослідженні мікроскоп дозволяє виробляти:

- Оглядовий перегляд препаратів крові і кісткового мозку,
- Диференціювання клітин крові за формою, структурою ядра і цитоплазми,
- Виявлення нормальних і патологічних еритроцитів,
- Виявлення малодиференційованих і атипичних клітин,
- Підрахунок формених елементів крові,
- Визначення лейкоцитарної формули та ін.

Найбільш поширеними в медико-біологічній практиці є мікроскопи прохідного світла плоского поля.

За допомогою мікроскопів прохідного світла плоского поля можна розглядати прозорі і напівпрозорі об'єкти

Товщина об'єкта для мікроскопів плоского поля має важливе значення, тому що це пов'язано зі здатністю біологічного об'єкта (препарату) до поглинання, відображення та пропускання світла. Безглуздо розглядати в мікроскопі прохідного світла об'єкт, який через свою товщину поглинає 80-90% світла або стільки ж відображає. Крім того, товщина об'єкта повинна бути такою, щоб оптичні елементи мікроскопа (і в першу чергу об'єктив) забезпечили розпізнавання об'єкта і розрішення складових його структур, а також найбільш точне відтворення геометричних параметрів об'єкта в площині в межах поля бачення, а по глибині - в межах глибини різкості об'єктива.

Основні характеристики мікроскопів прохідного світла плоского поля

Характерні ознаки	Обмеження у застосуванні
об'єкт спостереження є спеціально приготований препарат у відповідності із прийнятими методами мікроскопіювання	товщина об'єкта спостереження обмежена
об'єктиви розташовані над препаратом	робоча відстань об'єктива малих збільшень (до 10х) - до 10 мм, середніх збільшень (до 40х) - до 2 мм, великих (до 100х) - до 0,07 мм
джерело світла розташовано під препаратом	великі числові апертури об'єктивів обмежують глибину різкого огляду
максимальна товщина препарату 0,5 мм (або разом із покривним склом)	
об'єктиви розраховані на роботу із покривним та/або без покривного скла товщиною 0,17 мм (максимально 0,5 мм при роботі із камерою Горяєва)	

Біологічні об'єкти (препарати) у мікроскопах прохідного світла плоского поля:

Мікроскопи плоского поля інвертованого типу в основному застосовуються для вивчення культури клітин і тканин *in vitro*. Основна область застосування - біотехнологія, бактеріологія і ін.

Мікроскопи, в яких використовуються різні пристрої, що впливають на зміну фізичних властивостей об'єкта і світла, що пройшло і / або відбилася від об'єкта, складають групу спеціальних мікроскопів.

До них відносяться: люмінесцентні та поляризаційні мікроскопи.

ФЛЮОРЕСЦЕНТНА (ЛЮМІНЕСЦЕНТНА) МІКРОСКОПІЯ.

Явища флюоресценції полягають у тому, що атоми і молекули ряду речовин (прості білки, коферменти, деякі вітаміни і лікарські засоби), поглинаючи короткохвильові промені, переходять у збуджений стан. Зворотний перехід із збудженого стану в нормальний відбувається з випусканням світла, але з іншою, більшою довжиною хвилі.

У флюоресцентній мікроскопії в якості джерел світла для збудження флюоресценції застосовують ртутні або ксенонові лампи надвисокого тиску, що володіють високою яскравістю в області спектра 0,25-0,4 мкм (ближні ультрафіолетові промені) і 0,4-0,5 мкм (синьо-фіолетові промені). Довжина світлової хвилі викликаной флюоресценції завжди більше довжини хвилі збуджувального світла, тому їх поділяють за допомогою світлофільтрів і вивчають зображення об'єкта тільки в світлі флюоресценції.

Розрізняють власну, або первинну, і наведену, або вторинну, флюоресценцію. Будь-яка клітина живого організму має власну флюоресценцію, проте вона часто буває надзвичайно слабкою. Вторинна флюоресценція виникає при обробці препаратів спеціальними барвниками - флюорохромами.

Флюорохроми можуть розподілятися в клітині дифузно або вібірково забарвлювати окремі клітинні структури або певні хімічні сполуки біологічного об'єкта.

Наприклад, при обробці препаратів найчастіше вживається флюорохром акридиновий помаранчевий. В цьому випадку ДНК і її сполуки в клітинах мають яскраво-зелене, а РНК і її похідні - яскраво-червоне свічення. Таким чином, спектральний склад випромінювання несе інформацію про внутрішню будову об'єкта, його хімічний склад. Варіант методу флюоресцентної мікроскопії, при якому і збудження, і випромінювання флюоресценції відбуваються в ультрафіолетовій області спектра, отримав назву методу ультрафіолетової флюоресцентної мікроскопії.

Принцип:

Світло певної хвилі, потрапляючи на об'єкт, змушує частину об'єкта, здатну до люмінесценції, світитися (можна препарат спеціально фарбувати люмінесцируючими барвниками - флюорохромами). Люмінесценція зрушена в довгохвильову частину спектру.

Ефект:

На темному (чорному) тлі спостерігається яскраво світиться зображення об'єкта

За допомогою імунофлюоресценції в люмінесцентному мікроскопі виявляють вірусні антигени і їх концентрацію в клітинах, ідентифікують віруси, визначають антигени і антитіла, гормони, різні продукти метаболізму і т.д ..

У зв'язку з цим люмінесцентну мікроскопію застосовують в лабораторній діагностиці таких інфекцій, як герпес, епідемічний паротит, вірусний гепатит, грип та ін., Використовують в експрес-діагностиці респіраторних вірусних інфекцій, досліджуючи відбитки зі слизової оболонки носа хворих, і при диференціальній діагностики різних інфекцій . У патоморфології за допомогою люмінесцентної мікроскопії розпізнають злоякісні пухлини в гістологічних та цитологічних препаратах, визначають ділянки ішемії м'язи серця при ранніх термінах інфаркту міокарда, виявляють амілоїд в біоптатах тканин і т.д.

ПОЛЯРИЗАЦІЙНА МІКРОСКОПІЯ

Дозволяє вивчати об'єкти дослідження в світлі, утвореному двома променями, поляризованими у взаємноперпендикулярних площинах, тобто в поляризованому світлі. Для цього використовують півчасті поляроїди або призми Ніколя, які поміщають в мікроскопі між джерелом світла і препаратом. Поляризація змінюється при проходженні (або відображенні) променів світла через різні структурні компоненти клітин і тканин, властивості яких неоднорідні. У так званих ізотропних структурах швидкість поширення поляризованого світла не залежить від площини поляризації, в анізотропних структурах швидкість його поширення змінюється в залежності від напрямку світла по поздовжній або поперечній осі об'єкта. Якщо показник заломлення світла вздовж структури більший, ніж в поперечному напрямку, виникає позитивне подвійне променезаломлення, при зворотних взаєминах - негативне подвійне променезаломлення. Багато біологічних об'єктів мають сувору молекулярну орієнтацію, є анізотропними та дають позитивне подвійне заломлення світла. Такими властивостями володіють міофібрили, вії миготливого епітелію, нейрофібрили, колагенові волокна і ін. Зіставлення характеру заломлення променів поляризованого світла і величини анізотропії об'єкту дозволяє судити про молекулярної організації його структури (рис. 2).

Принцип:

Орієнтоване (поляризоване) певним чином світло, потрапляючи на об'єкт, який має здатність до зміни орієнтації світлової хвилі, формує зображення об'єкта. Це зображення побудовано з відповідним об'єкту ступенем зміни орієнтації світла.

Ефект:

На темному тлі спостерігається яскраве чітке кольорове зображення об'єкта з високою роздільною здатністю і контрасту

Поляризаційна мікроскопія є одним з гістологічних методів дослідження, способом мікробіологічної діагностики, знаходить застосування в цитологічних дослідженнях і ін. При цьому в поляризованому світлі можна досліджувати як пофарбовані, так і нефарбовані і нефіксовані, так звані нативні препарати зрізів тканин.

Контрастування

В даний час традиційні методи контрастування зображення об'єкта (зміна різними способами інтенсивності світла, що проходить через об'єкт) реалізуються за допомогою додаткових вузлів, якими мікроскопи комплектуються на вимогу споживача, або які вбудовані в мікроскоп. Це відноситься, наприклад, до методів, в яких реалізується:

- косе освітлення,
- темне поле,
- фазовий контраст,
- диференційно-інтерференційний контраст (поєднання ефекту фазового контрасту і дослідження в поляризованому світлі).

Розглянемо коротко деякі, з наведених вище, методів контрастування мікрооб'єктів.

Метод темного поля

Метод темного поля в основному використовується для вивчення в світлі прозорих неабсорбуючих об'єктів, які неможливо спостерігати методом світлого поля. Найчастіше - біологічних, наприклад бактерій і найпростіших. У відбитому світлі можна також вивчати і непрозорі зразки, наприклад шліфи металів.

Принцип роботи наступний. Світло від освітлювача проходить через спеціальний конденсор темного поля, який формує пучок променів у вигляді порожнього конуса і направляє його на досліджуваний препарат. Основна частина променів проходить повз об'єктива, а зображення формується тільки світлом, розсіяним неоднорідною структурою зразка. В поле зору мікроскопа на темному тлі відображаються світлі ділянки структури препарату і великі частки зі світлими краями, що мають відмінний від навколишнього середовища показник заломлення.

Для проведення досліджень в темному полі необхідно використовувати мікроскопи особливої конструкції або спеціальні темнопольного конденсори, які встановлюються на місце штатного конденсора.

Приклад: Сканування краплі живої крові на **темнопольному мікроскопі:**

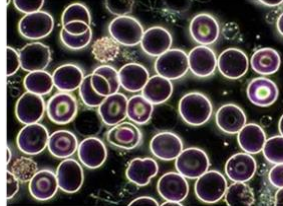
У цьому методі використовується той факт, що протягом близько 20 хвилин після забору окремої краплі крові клітини, що містяться в ній продовжують жити. Тому можна, використовуючи мікроскоп темного поля і працюючи на великому збільшенні, проводити спостереження за станом живої крові.

Конденсор темного поля дає можливість падати світлу на пробу крові з боку. Таким чином, клітини і різні компоненти світяться на темному тлі. Це дає можливість чітко побачити найдрібніші частинки, навіть менше клітини, які можна побачити в звичайний оптичний мікроскоп. Фон - темний, бо світло з конденсора проходить близько об'єктива, а не прямо через нього. Єдине видиме світло - це світло, відбите зі сторони і з поверхні частинок. Те, що видно, це світяться межі клітин або яскраві об'єкти (мікроорганізми, кристали і т.п.) на чорному тлі.

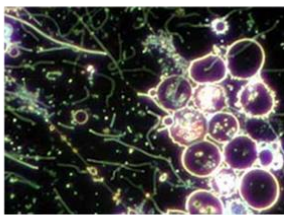


Нормальна кров

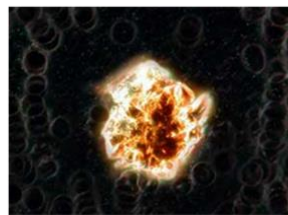
Клітини приблизно однакового розміру, що не склеюються одна з іншою.



Клітини у вигляді мішені. Показують погане засвоєння поживних речовин.



Хондрит: форма палички. Розпад червоних кров'яних клітин і вивільнення альбуміну і глобіну створюють волокнисті білки.



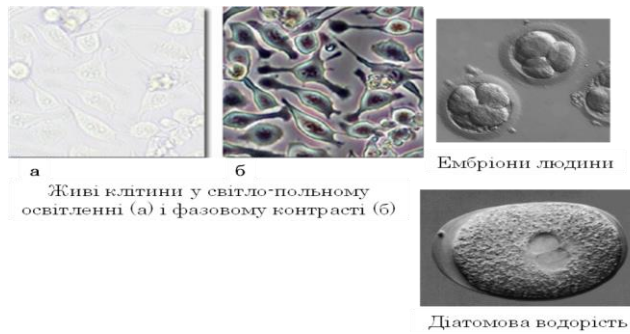
Червоні кристали. Містять актиноміцин і є показником інфекції в нижньому кишечнику.

Метод фазового контрасту

Переваги – можливість досліджувати живі клітини у їх природному стані, не вбиваючи їх та не вдаючись до пов'язування та забарвлення. В результаті динаміка біологічних процесів, що відбуваються у клітині може спостерігатися та фіксуватися із високим контрастом і розрішенням найдрібніших деталей зразку.

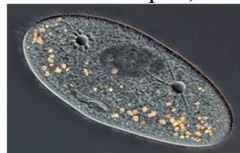
Суть методу : при проходженні світла через живу клітину фаза світлової хвилі змінюється згідно з коефіцієнтом рефракції клітини: світло, що проходить через відносно товсті ділянки клітини, такі, як ядро, затримується, і його фаза відповідно зсувається по відношенню до фази світла, що проходить через відносно тонкі ділянки цитоплазми.

В результаті між променями, що пройшли через об'єкт, і променями світлового фону виникає різниця довжини хвилі. Якщо ця різниця становить не менше $1/4$ довжини хвилі, то з'являється зоровий ефект, при якому темний об'єкт чітко видно на світлому тлі.

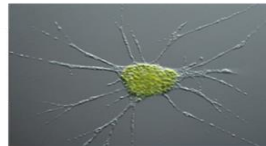


Диференційно-інтерференційний контраст

Інтерференційна мікроскопія вирішує ті ж завдання, що і фазово-контрастна. Але якщо остання дозволяє спостерігати лише контури об'єктів дослідження, то за допомогою інтерференційної мікроскопії можна вивчати деталі прозорого об'єкта і проводити їх кількісний аналіз. Це досягається завдяки роздвоєнню променя світла в мікроскопі: один з променів проходить через частку об'єкта, що спостерігається, а інший повз неї. В окулярі мікроскопа обидва променя з'єднуються і інтерферують між собою. Виникає різниця фаз можна виміряти, визначивши т. О. масу різних клітинних структур. Послідовне вимірювання різниці фаз світла з відомими показниками заломлення дає можливість визначати товщину живих об'єктів і нефіксованих тканин, концентрацію в них води і сухої речовини, вміст білків і т.д. На підставі даних інтерференційної мікроскопії можна побічно судити про проникності мембран, активності ферментів, клітинному метаболізмі об'єктів дослідження.



Інфузорія
тифелька



Дендритна
клітина

Зображення однієї і тієї ж клітини, отримане чотирма способами світлової мікроскопії

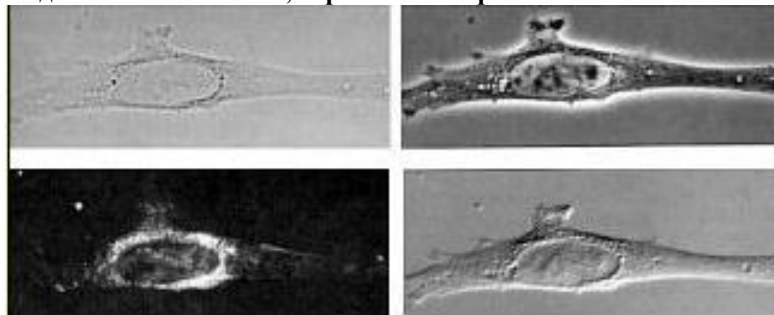


Рис. Фібробласт в культурі тканини при спостереженні за допомогою чотирьох різних типів світлової мікроскопії.

У лівому верхньому кутку - мікроскопія в світлому полі (зображення отримано при прямому проходженні променів через клітину);

Надалі за годинниковою стрілкою:

- Фазово-контрастна мікроскопія;
- Інтерференційна;
- Мікроскопія в темному полі.

Стереоскопічна мікроскопія

Для дослідження об'ємних об'єктів використовують **стереоскопічну** мікроскопію. Конструкція стереоскопічних мікроскопів дозволяє бачити об'єкт дослідження правим і лівим оком під різними кутами. Досліджують непрозорі об'єкти при відносно невеликому збільшенні (до 120 разів). Стереоскопічна мікроскопія знаходить застосування в мікрохірургії, в патоморфології при спеціальному вивченні матеріалу біопсії, операційного та секційного матеріалу, в судово-медичних лабораторних дослідженнях.



Морський хробак

Око креветки

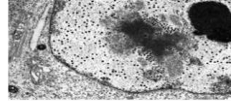
Електронна мікроскопія

Для вивчення на субклітинному і макромолекулярному рівнях структури клітин, тканин мікроорганізмів і вірусів використовують електронну мікроскопію. Вона застосовується в морфології, мікробіології, вірусології, біохімії, онкології, генетики, імунології. Різке підвищення роздільної здатності електронного мікроскопа

забезпечується потоком електронів, що проходять в вакуумі через електромагнітні поля, створювані електромагнітними лінзами. Електрони можуть проходити через структури досліджуваного об'єкта (трансмісійна електронна мікроскопія) або відбиватися від нього (скануюча електронна мікроскопія), відхиляючись під різними кутами, в результаті чого виникає зображення на люмінесцентному екрані мікроскопа. При трансмісійній (просвічуваній) електронній мікроскопії отримують площинне зображення структур (рис.), при скануючій - об'ємне (рис.).

При трансмісійній (просвічуваній) електронній мікроскопії отримують:

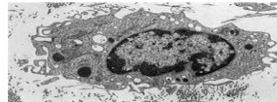
- ✓ **площинне зображення структур**



Специфічні аденовірусні включення в ядрі клітини через 24 години після інфектування аденовірусом



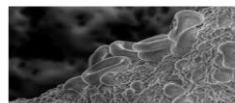
Зріз мітохондрії підшлункової залози



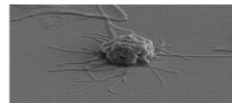
Макрофаг

При скануючій електронній мікроскопії отримують:

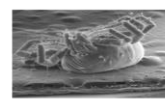
- ✓ **об'ємне**



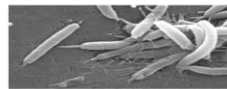
Фібриновий згусток у крові



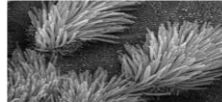
Активований тромбоцит з імобілізованим фібриногеном



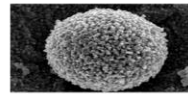
Кліщ



Хелікобактер



Епітелій з трахеї



Пилек рослини

Електронна мікроскопія вимагає спеціальної підготовки об'єктів дослідження, зокрема хімічної або фізичної фіксації тканин і мікроорганізмів. Біопсійний матеріал і секційний матеріал після фіксації зневоднюють, заливають в епоксидні смоли, ріжуть скляними або алмазними ножами на спеціальних ультратомах, що дозволяють отримувати ультратонкі зрізи тканин товщиною 30-50 нм. Їх контрастують і потім вивчають в електронному мікроскопі. У скануючому (растровому) електронному мікроскопі вивчають поверхню різних об'єктів, напильюючи на них у вакуумній камері електронно-щільні речовини, і досліджують так звані репліки, що повторюють контури зразка



Схематично показаний метод приготування репліки з поверхні зразка (підкреслення металом). Товщина шару металу визначається контуром поверхні вихідного зразка.

Для отримання зображення в електронному мікроскопі, що просвічує, використовують електрони, що проходять через зразок, а в скануючому електронному мікроскопі використовуються електрони, що розсіюються або випромінюються поверхнею зразка. В останньому випадку зразок повинен бути зафіксований, висушений і покритий тонкою плівкою важкого металу. Потім зразок сканується дуже вузьким пучком електронів. При цьому оцінюють кількість електронів, що розсіюються при опроміненні послідовних точок металевої поверхні. Отримане значення використовують для контролю інтенсивності другого променя, що рухається синхронно першому і формує зображення на телевізійному екрані. Таким чином відбувається формування єдиного, цілісного і значно збільшеного зображення.

Оскільки масштаби розсіювання електронів визначаються кутом поверхні по відношенню до променя, на зображенні виникають світлі і темні ділянки, що чергуються і створюють враження тривимірності

2. Методи дослідження біологічних об'єктів на тканиновому рівні

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

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.

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 фіксуючі 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.*

Ущільнення матеріалу, необхідне для приготування зрізів, проводиться шляхом просочування попередньо зневодненого матеріалу парафіном, целлоїдин, органічними смолами. Більш швидке ущільнення досягається застосуванням методу заморожування шматочків, наприклад, в рідкій углекислоті.

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

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.

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 кислий барвник - еозин, що забарвлює цитоплазму в рожево-жовтий колір. Виборча спорідненість структур до певних барвників обумовлено їх хімічним складом і фізичними властивостями. Структури, добре забарвлюються кислими 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 (Гетерофільні).

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.

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.

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) штам клітин - популяція однорідних за однією або декількома ознаками диплоїдних клітин, яка зберігає специфічні властивості протягом певного періоду (до 50 пасажів).
- 5) Надалі штам клітин або гине, або перетворюється в стабільну лінію клітин; при цьому нормальний каріотип змінюється гетероплоїдним набором хромосом.

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

При тривалому культивуванні тканинна 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 холоднокровних 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 короточасного 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, матраках Ру або в круглостінних флаконах.

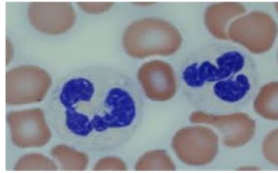
3. Принципи і методи гістохімічного фарбування. Основи імуноцитохімічного аналізу

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.

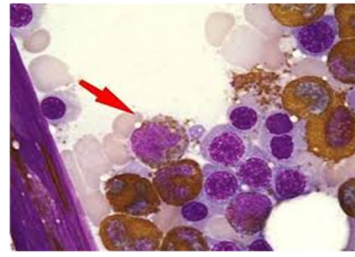
За допомогою різноманітних методів сучасної гістохімії можна судити про особливості функціонування різних тканинних і клітинних структур, визначати характер і темп обмінних процесів в клітинах і тканинах, виявляти ранні прояви захворювань.

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.

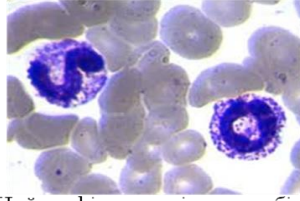
До високоспецифічних відносяться гістохімічні методи виявлення **ферментів**. В їх основу покладено **вплив ферменту на специфічний субстрат в присутності іншої речовини**, що називається захоплюючим агентом (акцептором). З'єднуючись з первинним продуктом ферментативної реакції, акцептор утворює нерозчинний, 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-Гімзе



Нейтрофіли з мієлопероксидазою (барвник бензидин)



Нейтрофіли з катіонними білками (барвник бромфеноловий синій)