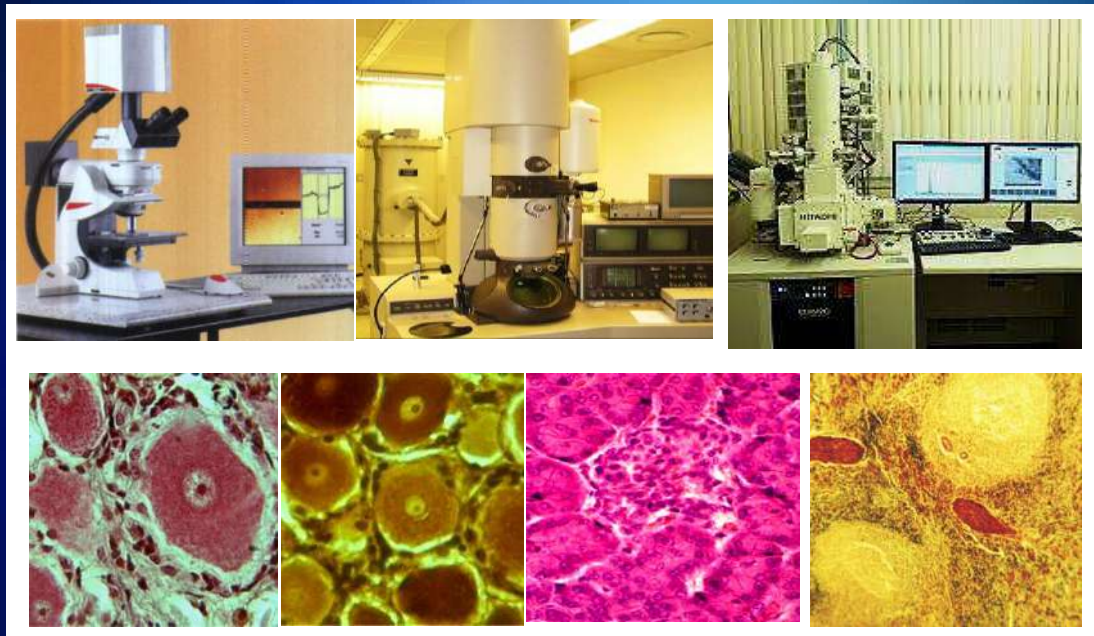


**Л. П. Горальський
В. Т. Хомич
Н. Л. Колеснік**

Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології



Л.П. Горальський
В.Т. Хомич
Н.Л. Колеснік

**ОСНОВИ ГІСТОЛОГІЧНОЇ ТЕХНІКИ
І МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У НОРМІ
ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ**

Житомир
2026



(6.01.1929 – 27.04.2014 рр.)

***Видання посібника присвячене пам'яті видатного
вітчизняного вченого – гістолога та гістохіміка,
заслуженого працівника вищої школи України, академіка,
доктора біологічних наук, професора
Олексія Івановича Кононського***

Міністерство освіти і науки України
Житомирський державний університет
імені Івана Франка

Л.П. Горальський
В.Т. Хомич
Н.Л. Колеснік

**ОСНОВИ ГІСТОЛОГІЧНОЇ ТЕХНІКИ
І МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ У НОРМІ
ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ**

Навчальний посібник

*За редакцією доктора ветеринарних наук,
професора Л.П. Горальського*

Видання шосте, перероблене і доповнене

ЖИТОМИР
2026

УДК: 576. 3. 591. 81: 612. 014. 1

Г-58

*Рекомендовано до друку рішенням Вченої ради
Житомирського державного університету імені Івана Франка
(протокол № 10 від 24.04.2026 р.)*

Р е ц е н з е н т и:

Жила М.І., доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри нормальної та патологічної морфології і судової ветеринарії ЛНУВМБ імені С. З. Гжицького;

Дишлюк Н.В., доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри біоморфології хребетних ім. акад. В. Г. Касьяненко Національного університету біоресурсів і природокористування України;

Романюк Р.К., кандидат біологічних наук, професор, професор кафедри зоології, біологічного моніторингу та охорони природи Житомирського державного університету імені Івана Франка.

Г-58 Горальський Л. П., Хомич В. Т., Колеснік Н. Л. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології : навч. посібник / за ред. Л.П. Горальського. 6-те вид., перероб. і доп. Житомир : Житомирський державний університет імені Івана Франка, 2026. 330 с.

ISBN 978-617-7992-91-1

У посібнику викладені основи гістологічної техніки і описані основні методи гістологічних та гістохімічних досліджень, які використовують у біології, ветеринарній і гуманній медицині.

Посібник рекомендується науково-педагогічним працівникам, аспірантам і магістрантам морфологічних кафедр біологічних факультетів і факультетів ветеринарної та гуманної медицини, спеціалістам морфологічних відділів НДІ та лабораторій, які у своїй роботі використовують гістологічні та гістохімічні методи досліджень.

© Горальський Л.П., 2026

© Хомич В.Т., 2026

© Колеснік Н.Л., 2026

© ЖДУ імені Івана Франка, 2026

ПЕРЕДМОВА

Морфологічно-функціональні дослідження базуються на застосуванні гістологічних і гістохімічних методів, які нині стали невід'ємною частиною не лише наукових розробок, а й повсякденної практики у ветеринарній та гуманній медицині, а також активно використовуються в освітньому процесі. Їхня значущість зумовлена здатністю розкривати тонку організацію та функціональні особливості організму на рівні клітин і субклітинних структур, як у фізіологічному стані, так і за умов розвитку патологій. Отримані завдяки цим методам дані дозволяють лікарям глибше зрозуміти перебіг метаболічних процесів у тканинах і органах, а також виявити механізми порушення внутрішньої рівноваги організму. Саме тому вони відіграють вирішальну роль у встановленні точного діагнозу та визначенні ефективної лікувальної стратегії.

Водночас успішне використання цих методів вимагає від спеціалістів, особливо початківців, не лише загального уявлення про їх можливості, а й чіткого розуміння практичних аспектів їх застосування. Однак нині спостерігається дефіцит доступної методичної літератури з цієї тематики, що й обумовило необхідність створення відповідного навчального матеріалу.

У запропонованому посібнику узагальнено основи гістологічної техніки та подано опис ключових методів гістологічного й гістохімічного аналізу разом із докладними рекомендаціями щодо їх виконання в умовах лабораторій світлової та електронної мікроскопії. Автори не є розробниками наведених методик – вони здійснили їх відбір, впорядкування та частково перевірили на практиці, спираючись на наукові джерела, наведені у бібліографії.

На останнє видання посібника, як і на попередні, надійшли схвальні відгуки від багатьох науковців, спеціалістів ветеринарної і гуманної медицини, які займаються гістологічними та гістохімічними дослідженнями. Вони також пропонували збільшити наклад видання і підготувати електронну версію.

Це видання посібника виправлене і значно доповнене. Воно присвячено пам'яті співавтора попередніх видань, професора Олексія Івановича Кононського.

Електронний варіант посібника розміщений на сайті Житомирського державного університету імені Івана Франка.

ГІСТОЛОГІЧНА ТЕХНІКА І ГІСТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Загальна характеристика основних методів гістологічних досліджень

Основними методами дослідження у гістології є *мікроскопія* – вивчення гістологічних препаратів під мікроскопом. Для мікроскопічного дослідження використовують різноманітні конструкції мікроскопів, які дають можливість вивчати різні параметри гістологічних препаратів. За їх допомогою досліджують мікроскопічну будову клітин, тканин та органів організму людини і тварин. Гістологічні методи досліджень базуються на виготовленні гістологічних препаратів, які аналізують та досліджують за допомогою світлового мікроскопа – *світлова мікроскопія*.

Світлова мікроскопія – найбільш поширений вид мікроскопії, за якого допустима здатність сучасних мікроскопів складає 0,2 мкм, даючи збільшення об'єкта у 2000–2500 разів.

Для більш детального дослідження застосовують електронну (трансмисивну, сканувальну) мікроскопію, яку здійснюють за допомогою електронних мікроскопів. *Електронна мікроскопія* є найбільш сучасним видом мікроскопії, яка має допустиму здатність 0,1–0,7 нм. У результаті електронної мікроскопії отримують електронні фотографії, на яких досліджують будову певних структур організму людини і тварин.

Гістологічні методи досліджень, які базуються на світловій мікроскопії, залежно від стану об'єкта, ділять на *вітальні (прижиттєві)* і *поствітальні* (посмертні). Вітальні методи досліджень дають змогу отримати найбільш повну інформацію про рух, ділення, ріст, руйнування, диференціацію, взаємодію клітин, їх реакцію на дію хімічних і фізіологічних чинників тощо, яка відбувається в клітинах, тканинах, органах у процесі їх життєдіяльності. Поствітальні методи гістологічних досліджень найбільш поширені. Вони базуються на виготовленні постійних гістологічних препаратів і є основою класичних гістологічних методів, які описані в даному посібнику.

На сьогодні класична мікроскопія чітко поєднується зі спеціальними методами світлової мікроскопії – фазово-контрастною, флуоресцентною, ультрафіолетовою, з цитоспектрофотометричним та авторадіографічним методами, методом темно-польової мікроскопії, імуногістохімічними методами.

Фазово-контрастна мікроскопія – метод отримання зображення в оптичних мікроскопах, за якого зсув фаз електромагнітної хвилі трансформується у контраст інтенсивності. Даний метод особливо визнаний у біології, оскільки не потребує попереднього фарбування клітин, за якого вони можуть загинути. Саме тому, *фазово-контрастну мікроскопію* використовують для дослідження безбарвних об'єктів, в тому числі живих клітин і тканин. Її також застосовують для вивчення клітин культури тканин, спостереження механізму дії різних вірусів на клітини тощо.

При фазово-контрастній мікроскопії світлові хвилі, проходячи через безбарвні об'єкти (живі клітини, тканини), зміщуються на величину, яка визначається швидкістю світла, що через них проходить і товщиною досліджуваного матеріалу. Фазово-контрастний мікроскоп трансформує ці невидимі зміщення у зміну амплітуди світлових хвиль, отримуючи чорно-біле зображення, щільність окремих ділянок якого залежить від величини добутку товщини об'єкта на різницю у показниках заломлення світла в ньому і оточуючому середовищі.

Флуоресцентна мікроскопія (флуоресценція), базується на властивості світіння біологічного об'єкта, у наслідок дії на нього променевої енергії. Це метод візуалізації речовини, викликаний особливостями флуорофорів, які здатні світитися за дії на них УФ-випромінювання. За такого дослідження об'єкт розглядають в ультрафіолетових та синіх променях. Флуоресценція буває власною та наведеною, яка визивається особливими барвниками – флуорохромами. Тому, флуоресцентна мікроскопія дає можливість з'ясувати як власну (первинну) флуоресценцію речовин, так і вторинну, завдяки фарбуванню клітинних структур флуорохромами, які при взаємодії з різними компонентами клітин зумовлюють специфічне світіння відповідних структур. Наприклад, флуорохром акридинової оранжевий з ДНК викликає зелене світіння, а з РНК – червоне.

Гістологічна техніка і гістологічні методи досліджень

Пріоритетом флуоресцентної мікроскопії є:

1. Надзвичайно висока чутливість – дані методи виявлення речовин у 1000 разів чутливіші адсорбційних, а наявність флуоресцюючого об'єкту в темному полі надає флуоресцентній мікроскопії особливостей для виявлення та підрахунку в препараті маленьких часточок, у тому числі і окремих мікроорганізмів.

2. Висока специфічність – характерна для всіх методів флуоресцентного аналізу.

3. Чіткість та контрастність люмінісцентно-мікроскопічних зображень.

4. Використання методу для виявлення та дослідження певних речовин не тільки у фіксованих, але й у живих клітинах і тканинах.

5. Практичність проведення кількісних досліджень.

Ультрафіолетова мікроскопія базується на здатності деяких речовин – структурних компонентів живих клітин, мікроорганізмів або ж фіксованих, але не зафарбованих, прозорих у видимому світлі тканин, поглинати УФ-випромінювання з певною довжиною хвилі (400-250 нм). Вона дає змогу досліджувати хімічний склад гістологічних структур. При цьому зображення реєструється на фотоплівці або люмінісцентному екрані.

Цитоспектрофотометричний метод досліджень здатний визначати кількісний уміст речовин у клітинах та їх складових елементів за результатами поглинання ними світлових променів певної довжини хвилі.

Авторадіографічний метод – прецизійний (високоточний) графічний метод дослідження. Він дає змогу з'ясувати та аналізувати локалізацію у клітинах і тканинах речовин, мічених радіоактивними ізотопами. Основою автографічного методу є фотографічний процес, унаслідок якого внесені у клітини ізотопи відновлюють бромисте срібло фотоемульсії, яке покриває зріз. Після проявлення фотоемульсії гістологічні зрізи фіксують, промивають, фарбують, зневоднюють, заводять у бальзам та розглядають за допомогою мікроскопа. Чітко видимі зерна срібла (треки) чорного кольору свідчать про наявність у клітинах і тканинах мічених речовин. За цим методом також виявляють місця синтезу певних речовин, склад білків, шляхи внутрішньоклітинного транспорту, тощо.

Метод темно-польової мікроскопії – це техніка світлової мікроскопії, яка утворює контрастне зображення світлих об'єктів на темному фоні. В об'єктив світлового мікроскопа потрапляє лише розсіяне зразком світло, дозволяючи спостерігати живі, незафарбовані мікроорганізми, внутрішньоклітинні структури і найдрібніші частинки, які невидимі у звичайному світлому полі.

Суть методу полягає у тому, що дрібні часточки, які знаходяться за межами роздільної здатності мікроскопа, стають видимими в променях, що спрямовані під великим кутом і в об'єктив мікроскопа не потрапляють. В об'єктив потрапляє лише світло, відображене від цих часточок, які мають вигляд світлих плям на темному фоні. Цей метод цінним є при дослідженні колоїдів клітини.

Імуногістохімічні методи. Імуногістохімія (ІГХ) – це сучасний високоточний метод морфологічного дослідження тканин, який ґрунтується на реакції антиген-антитіло для виявлення специфічних білків (маркерів) безпосередньо у клітинах. Ці високочутливі методи застосовують для дослідження у тканинах і клітинах специфічних біологічних речовин – білків, гормонів, нуклеїнових кислот, тощо. Спочатку імунізують лабораторну тварину і через деякий час з її крові отримують антисироватку. Антитіла, які знаходяться в її глобуліновій фракції, використовують для виявлення в тканинах відповідних біологічних речовин.

У *патоморфології* метод імуногістохімії дозволяє точно діагностувати типи пухлин, визначати їх походження, стадію та прогнозувати перебіг захворювання, що є критичним для індивідуального підбору.

При застосуванні основного різновиду імуногістохімічного методу – *імунофлуоресценції*, антитіла сироватки хімічним способом з'єднують з флуорохромами та наносять на гістологічні зрізи. Речовини, з якими специфічно прореагували антитіла, виявляються за яскравим світінням у флуоресцентному мікроскопі.

При дослідженні в електронному мікроскопі, до антитіл імунної антисироватки приєднують атом важкого металу або радіоактивний ізотоп. В останньому випадку локалізація комплексу *антиген-антитіло* виявляється шляхом проведення додаткової авторадіографії.

ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Технологія виготовлення гістологічних препаратів включає наступні етапи: відбір матеріалу, фіксацію відібраного матеріалу, промивання фіксованого матеріалу, зневоднення промитого матеріалу, заливку зневодненого матеріалу в ущільнююче середовище, виготовлення зрізів, фарбування отриманих зрізів і подальше заведення їх у тверднуче і прозоре середовище.

Відбір матеріалу

Залежно від походження матеріал досліджень умовно ділять на трупний, боєнський, експериментальний, післяопераційний і біопсійний.

Трупний матеріал відбирають від трупів тварин і людей. При його дослідженні необхідно враховувати причину їх хвороби і смерті.

Боєнський матеріал отримують від тварин, забитих на м'ясокомбінаті, бойні і підприємствах по переробці птиці. При аналізі цього матеріалу потрібно звертати увагу на умови передзабійного утримання тварин і спосіб їх забою. Відбирати матеріал від тварин, які перед забоєм зазнавали тривалого транспортування або перегону не рекомендується.

Експериментальний матеріал отримують від тварин, на яких штучно відтворювали певний патологічний процес або окрему хворобу.

Післяопераційний матеріал відбирають під час хірургічних втручань з метою уточнення діагнозу.

Біопсійний матеріал отримують від живих тварин і людей за допомогою спеціальних інструментів і пристосувань.

При відборі матеріалу необхідно дотримуватись наступних правил:

1. Об'єкти, які підлягають дослідженню повинні бути свіжими. Матеріал від трупів потрібно відбирати в перші години після загибелі тварин.

2. Відбираючи шматочки матеріалу, необхідно враховувати мікроскопічну будову органів або тканин. Так, шматочки нирок та

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

надниркових залоз відбирають з таким розрахунком, щоб у них попали кіркова і мозкова речовини. Для цього розрізи названих органів роблять перпендикулярно до їх поверхні. Матеріал з органів, у яких усі ділянки мають однакову будову (печінка, селезінка, щитоподібна залоза тощо), можна відбирати в будь-якому місці, але при цьому бажано, щоб він включав капсулу. Стінки трубчастих органів (сечовий міхур, шлунок тощо) досліджують на поперечних їх зрізах.

Шматочки кісток необхідно виділяти пилкою, і ні в якому разі не відокремлювати їх щипцями–кусачками, так як при цьому руйнується структура кісткової тканини та деформується кістковий мозок.

3. Матеріал з патологічно змінених тканин (пухлини, виразки тощо) вирізають на межі з нормальними частинами, щоб були захоплені нормальні і змінені ділянки. При поширеному патологічному процесі рекомендується відбирати декілька шматочків: один із найбільш уражених ділянок, інші – на межі з нормальною тканиною.

4. Щоб уникнути небажаного пошкодження тканин, відбирати шматочки матеріалу необхідно тільки гострими інструментами. Як правило, для цього використовують леза, скальпелі та ножиці.

5. Розміри шматочків відібраного матеріалу від компактних органів повинні мати довжину, ширину і товщину від 5 до 15 мм. Від порожнистих органів малого діаметру (кровоносні судини, маткові труби тощо) відрізають шматочки довжиною 10–15 мм. Таку ж довжину і ширину повинні мати шматочки стінки порожнистих органів великого діаметру.

6. До відібраного матеріалу прикріплюють (пришивають) етикетки. Етикетки готують із щільного паперу або картону. На етикетках чорним олівцем пишуть номер об'єкту, дату і місце відбору матеріалу, назву органа або тканини, вид, стать, вік тварини, від якої відібрали матеріал, назву господарства якому належала тварина та інше.

7. Відібраний матеріал переносять у фіксуєчу рідину.

Фіксація матеріалу

Відібраний матеріал для дослідження необхідно якнайшвидше піддати фіксації (консервації). Мета фіксації полягає в тому, щоб припинити посмертні зміни у відібраному матеріалі та по можливості зберегти його тканини в стані, найбільш близькому до прижиттєвого. Розрізняють *фізичні та хімічні* методи фіксації. *Фізичні* методи фіксації використовуються рідко. Вони передбачають швидке заморожування відібраного матеріалу з подальшим його висушуванням у вакуумі. *Хімічні* методи найбільш поширені. При цьому для фіксації використовують хімічні фіксуючі речовини – фіксатори. До фіксаторів пред'являються наступні вимоги:

1. Добра прониклива здатність в тканини.
2. Здатність швидко і енергійно коагулювати або осаджувати білки.
3. Відсутність негативних впливів для подальшої обробки матеріалу.

Фіксатори не тільки денатурують білки, а й стабілізують структури тканин і органів.

Залежно від завдань дослідження фіксацію матеріалу здійснюють у різноманітних фіксуючих рідинах.

При роботі з фіксуючими рідинами необхідно дотримуватись наступних загальних правил:

1. Відібрані шматочки матеріалу, які піддаються фіксації, промивати водою забороняється, особливо при фіксації нервової тканини.
2. Об'єм фіксуючої рідини повинен у 20 і більше разів перевищувати об'єм відібраного для фіксації матеріалу.
3. Використану попередньо фіксуючу рідину не можна застосовувати повторно.
4. Якщо фіксуюча рідина після занурення в неї шматочків матеріалу змінює колір або стає мутною, її потрібно негайно замінити.
5. Шматочки тонкостінних порожнистих органів (шлунок, кишка тощо) перед фіксацією повинні бути закріплені нитками на картоні.
6. Для фіксації використовувати скляний або глиняний посуд.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

7. Не допускати контакту металевих предметів та інструментів з фіксуючими речовинами.

8. Для запобігання прилипання матеріалу до дна банки з фіксатором на нього слід покласти шматок зім'ятої марлі або вати.

9. Під час фіксації необхідно дотримуватись температурного режиму, рН та, особливо, терміну перебування матеріалу у фіксуючій рідині.

10. Процес фіксації вважається завершеним тоді, коли поперечні розрізи шматочків відібраного матеріалу мають рівномірне забарвлення.

Найбільш загальноприйняті фіксуючі речовини та їх застосування

Фіксуючі речовини поділяють на прості та складні (комбіновані), залежно від того, скільки діючих речовин (одна або декілька) перебувають у їх складі.

Прості фіксуючі речовини

Формалін. Формалін є найбільш поширеним фіксатором. Його можна використовувати для гістологічних та гістохімічних досліджень. *Формалін*, який поступає у реалізацію – це 40 %-ий водний розчин *формальдегіду* (альдегід мурашиної кислоти). Він – безбарвний, не горить, добре змішується з водою і спиртом, має різкий специфічний запах і кислу реакцію. При тривалому зберіганні в ньому відбувається полімеризація формальдегіду з утворенням параформу. Останній, у вигляді осаду білого кольору, осідає на дно посуду. При зберіганні формаліну на світлі в ньому утворюється мурашина кислота. Для запобігання утворення параформу і мурашиної кислоти формалін рекомендується зберігати в темному місці при температурі +9⁰ С у скляному, добре закупореному посуді. У випадку утворення осаду параформу до такого формаліну необхідно додати 5–10 %-ий розчин натрію вуглекислого із розрахунку 50 мл на 100 л формаліну. Через декілька діб осад параформу зникне.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Для фіксації матеріалу досліджень використовують *нейтральний* формалін. Для нейтралізації формаліну використовують карбонат кальцію (крейда) або магнію із розрахунку 100 г на 1 л формаліну.

Термін нейтралізації – 24–48 год.

Найчастіше для фіксації матеріалу досліджень застосовують 10–12 %-ий водний розчин формаліну. При цьому 40 %-ий водний розчин формальдегіду (концентрований формалін) приймають за 100 %-ий.

Мінімальний термін фіксації формаліном становить 24 год. Після фіксації формаліном матеріал дослідження обов'язково промивають водопровідною водою.

Спирти. Спирти як фіксатори мають переваги над іншими фіксаторами. Зафіксований ними матеріал не потребує промивання і зневоднення. Внаслідок цього скорочується термін виготовлення гістологічних препаратів. Для фіксації найчастіше використовують етиловий та метиловий спирти. Етиловий спирт (етанол) – безбарвна і горюча рідина, яка добре змішується з водою. У реалізацію поступає, переважно, 96⁰ етиловий спирт, а для фіксації використовують як його, так і абсолютний спирт. *Абсолютний спирт* готують додаючи до 96⁰ спирту безводний мідний купорос із розрахунку 15 г на 100 мл спирту. При цьому ємкість із спиртом періодично струшують. Мінімальний термін виготовлення абсолютного спирту 24 год, а термін фіксації в ньому залежить від щільності матеріалу досліджень – від декількох годин до декількох діб.

Етиловий спирт як фіксатор у гістологічних дослідженнях застосовують нечасто – переважно за відсутності формаліну – і здебільшого для щільних тканин. Використання його для пухких або набряклих тканин не рекомендується, оскільки це призводить до їх значного зморщування. Зазвичай фіксацію етиловим спиртом проводять лише в окремих випадках, зокрема під час виконання реакцій на виявлення заліза, досліджень бактерій, амілоїду, глікогену за Бестом, а також при фарбуванні нервової тканини за Нісслем.

Ця фіксація дозволяє готувати зрізи і на заморожувальному мікротомі. Перед цим шматочки зафіксованого матеріалу промивають у водопровідній воді впродовж 3–6-ти і більше год.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Метиловий спирт використовують для фіксації у 100⁰ міцності. Застосовують його переважно в гематологічній, цитологічній та цитохімічній практиці для фіксації мазків та препаратів-відбитків.

При роботі з метиловим спиртом слід дотримуватися правил використання і зберігання отруйних речовин групи А.

Ацетон. Ацетон використовують як швидкофіксуєчу рідину для скорочення терміну виготовлення гістологічних препаратів. Його застосовують впродовж багатьох років лише для фіксації тканин мозку при діагностиці сказу, а також фіксації матеріалу для гістохімічних досліджень (зокрема – виявлення фосфатаз). Фіксації піддають невеличкі шматочки тканини. Термін фіксації для звичайних досліджень становить 2–3 год при кімнатній температурі, а для виявлення фосфатаз – впродовж доби при температурі 0 +5⁰ С.

Тетраоксид осмію. Тетраоксид осмію OsO₄ часто називають «осмієвою кислотою». Даний фіксатор застосовують у вигляді водневого або буферного 1–2 %-го розчину. Щоб запобігти самовільного його відновлення (при зберіганні), фіксатор готують на 0,1 %-му розчині хромової кислоти. Після цього він у скляному флаконі з добре притертим корком може зберігатися прозорим впродовж кількох років. Для цього використовують абсолютно чистий посуд.

Тетраоксид осмію переважно використовують для фіксації препаратів-відбитків і мазків. Фіксацію рекомендується проводити парами осмію протягом однієї години, а препаратів-відбитків – протягом декількох хвилин. Для цього розчин тетраоксиду осмію наливають у скляну банку з широкою горловиною. Над розчином розміщують препарати і банку закривають притертим корком.

Фіксовані мазки та препарати-відбитки піддають подальшій обробці згідно схеми для заливки у парафін або целоїдин.

Пікринова кислота. Пікринова кислота для фіксації у чистому вигляді через низьку дифузну здатність використовується рідко. Як фіксатор її використовують у вигляді насиченого водного розчину. Для його приготування до 100 мл дистильованої води додають 1,5–2,5 г пікринової кислоти. Розчин придатний для використання впродовж 6-ти місяців.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Насичений розчин пікринової кислоти часто є основою для приготування багатьох комбінованих фіксуючих рідин.

Враховуючи те, що при фіксації об'єкту утворюються внутрішньотканинні осади, які не розчиняються у воді, промивання тканин перед фіксацією потрібно здійснювати у 70⁰-му етиловому спирті. Повне відмивання фіксуючої рідини не обов'язкове, так як її залишки остаточно відмиваються при подальшій гістологічній обробці.

Трихлороцтова кислота. Трихлороцтова кислота викликає денатурацію білків тканини. Це дає можливість зберігати багато органічних і неорганічних речовин, тому вона переважно використовується для фіксації матеріалу, в якому досліджується гістохімія білків та виготовляються контрольні гістологічні препарати.

Використовують фіксатор у вигляді 5–7 %-го водного розчину. Термін фіксації невеличких шматочків – 1–3 год. Промивання матеріалу після фіксації для подальшої обробки здійснюють у 96⁰-му етиловому спирті.

Складні фіксуючі речовини

Суміш Ружа. У суміші Ружа чітко поєднуються фіксуюча властивість формаліну та швидка здатність проникати в тканини оцтової кислоти. Це сприяє запобіганню надмірного зморщування матеріалу.

Склад. Концентрований формалін – 20 мл, льодяна оцтова кислота – 1 мл, дистильована вода – 100 мл.

Застосовують у звичний спосіб, як і при фіксації формаліном. Термін фіксації – 24–72 год.

Рідина Карнуа. Рідина Карнуа є хорошим фіксатором ядер клітин, а також добре зберігає майже всі цитоплазматичні структури. Її використовують як фіксатор для виявлення нуклеїнових кислот, білкових функціональних груп, глікогену, глікозаміногліканів, багатьох ферментів, мінеральних речовин.

Склад. 6 частин абсолютного етилового спирту, 3 частини хлороформу і 1 частина льодяної оцтової кислоти. Основним фіксуючим агентом цієї суміші є етиловий спирт, інші компоненти

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

сприяють швидкому проникненню його в тканини.

Термін фіксації – не більше 5 год при температурі +20–25⁰ С або 18–24 год при температурі +3–5⁰ С.

Після фіксації матеріал швидко переносять в абсолютний етиловий спирт, після чого заливають у парафін або целоїдин.

Суміш Пірсона. При постановці гістохімічних реакцій на наявність ферментів у тканинах, зафіксованих у формаліні, виникають артефакти – дифузія кінцевих продуктів ферментативних реакцій. Цьому можна запобігти додаванням до складу фіксуючої рідини цукрози, у результаті чого в тканинах утворюється осмотичний тиск, близький до прижиттєвого.

Склад. Концентрований формалін – 10 мл, цукроза – 15 г, концентрований розчин аміаку – 1 мл, дистильована вода (рН – 6,7) – 100 мл.

Дана суміш ефективна для фіксації матеріалу, рекомендованого для вивчення холінестераз: ацетилхолінестерази (АХЕ) та псевдохолінестерази (ПХЕ).

Термін фіксації шматочків матеріалу товщиною до 0,5 см – 16–24 год (краще при температурі +3–5⁰ С).

Зафіксований матеріал ріжуть на заморожувальному мікротомі або піддають подальшій обробці для заливки у парафін або целоїдин.

Рідина «суза» за Гейденгайном. У рідині поєднуються фіксуючі властивості сулеми, оцтової кислоти, формаліну, хлориду натрію і трихлороцтової кислоти. Хлорид натрію сприяє формуванню осмотичного тиску в тканинах відібраного матеріалу, аналогічному для їх прижиттєвого стану.

Даний фіксатор використовують для гістологічних і гістохімічних досліджень, зокрема, для фіксації білкових речовин, глікозаміногліканів. Добре фіксує тканини, збагачені водою (ембріональні). Не придатний для фіксації глікогену.

Склад. Сулема – 4,5 г, хлорид натрію – 0,5 г, дистильована вода – 80 мл, трихлороцтова кислота – 2 мл, льодяна оцтова кислота – 4 мл, концентрований формалін – 20 мл.

Термін фіксації матеріалу товщиною 0,1–0,3 см – 1–24 год.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Суміш Буена. До її складу входять пікринова кислота (викликає коагуляцію білків), формальдегід (зворотньо зв'язує білкові функціональні групи) та оцтова кислота (прискорює дифузію фіксаторів).

Склад. Насичений 1,5–2,5 %-ий водний розчин пікринової кислоти – 75 мл, концентрований формалін – 25 мл, льодяна оцтова кислота – 5 мл.

Дана суміш є хорошим фіксатором для виявлення глікогену і глікозаміногліканів. При заміні оцтової кислоти на мурашину суміш Буена можна одночасно використовувати для фіксації і декальцинації невеликих шматочків кісткової тканини.

Термін фіксації – від 12 год до 3-х діб.

Суміш Буена не викликає артефактів при фіксації, і тому матеріал може тривалий час перебувати в ній.

Рідина Орта. Фіксація матеріалу в рідині Орта, порівняно з формаліном, сприяє кращому забарвленню зернистих структур протоплазми.

Склад. Вода дистильована – 100 мл, біхромат калію – 2,5 мл, сульфат натрію – 1 г, концентрований формалін – 10 мл. Останній додають лише безпосередньо перед використанням. Кращий результат можна отримати при заміні сульфату натрію кристалічним ацетатом натрію – 1,6 г.

Термін фіксації матеріалу – 24–48 год. Після промивання у водопровідній воді (24–48 год) матеріал зневоднюють і заливають у парафін або целоїдин. Якщо фіксований матеріал необхідно зберігати тривалий час, так його переносять у 10–15 %-ий розчин формаліну.

Із зафіксованого цією рідиною матеріалу можна готувати зрізи і на заморожувальному мікротомі, попередньо промивши його у водопровідній воді. Якість зрізів буде кращою, якщо після промивання у воді залишити матеріал ще на 24 год у 15–20 %-му розчині формаліну.

Рідина Мюллера. Рідину Мюллера використовують у даний час для фіксації нервової тканини з метою подальшого виявлення в ній мієліну.

Склад. Двохромовокислий калій – 2,5 г, сірчанокислий натрій – 1 г, дистильована вода – 100 мл.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Розчин готують нагріваючи у колбі. Він повинен бути оранжевого кольору і прозорим.

Термін фіксації невеличких шматочків матеріалу при кімнатній температурі 1,5–2 місяці, а при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ (у термостаті) 1–2 тижні. Фіксуочу рідину замінюють щоденно в перші дні фіксації, а потім через кожні 3–4 доби (для запобігання утворення плісняви).

Після закінчення фіксації матеріал ретельно промивають у водопровідній воді впродовж 24–28 год, зневоднюють у спиртах і заливають у парафін чи целоїдин. Промитий матеріал можна деякий час зберігати у $70\text{--}80^{\circ}$ етиловому спирті.

Зберігання матеріалу у фіксуочій рідині Мюллера по закінченню фіксації – недопустиме, так як при тривалому перебуванні в ній він стає крихким і тканини втрачають здатність забарвлюватись.

Рідина Ценкера. Рідину Ценкера як фіксатор використовують, як правило, тільки для цитологічних досліджень (фарбування азур-еозином та по Романовському-Гімза).

Склад. Біхромат калію – 2,5 г, сульфат натрію – 1 г, хлорид ртуті (сулема) – 5 г, вода дистильована – до 10 мл. Кислотність рідини Ценкера дуже висока – рН 2,3. На її зміну сульфат натрію не впливає. Перед використанням у рідину Ценкера можна додати 5 мл льодяної оцтової кислоти або 5–10 мл концентрованого формаліну.

Термін фіксації матеріалу товщиною 0,3 см і менше – від 8 до 24 год (у термостаті при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ – 4–6 год). Після фіксації матеріал промивають у водопровідній воді (24–48 год), зневоднюють у спиртах і заливають у парафін або целоїдин.

Ценкер–формол. Ценкер–формол теж як фіксатор рекомендують для цитологічних досліджень. Використовують для фарбування зрізів гематоксиліном та еозином та за Ван-Гізоном.

Ценкер–формол це 5 %-ий розчин сулеми на рідині Мюллера у суміші з формаліном. Останній додають із розрахунку 5 мл або 10 мл на кожні 95 мл розчину. Формалін додають за необхідністю перед використанням фіксатора.

Термін фіксації матеріалу товщиною 0,3 см і менше – від 8 до 24 год (у термостаті при температурі 37°C – 4–6 год). Після фіксації

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

матеріал промивають у водопровідній воді (24–48 год), зневоднюють у спиртах і заливають у парафін або целоїдин.

Примітка. При використанні фіксаторів, які містять сулему (рідина Ценкера, Ценкер–формол) в ядрах і цитоплазмі клітин матеріалу випадає осад. Для його видалення матеріал переносять на 24 год у 70⁰-ий етиловий спирт. До спирту рекомендують додати кілька крапель спиртового розчину йодату калію, у якому міститься 2 г йоду, 3 г йодату калію, 100 мл 90⁰ етилового спирту. Після цього матеріал переносять у щойно приготовлений 0,25 %-ий розчин тіосульфату натрію для видалення йоду. Термін перебування матеріалу у даному розчині визначається його товщиною (0,5–12 год). Потім матеріал промивають у дистильованій воді, заливають у парафін чи целоїдин або готують з нього зрізи на заморожувальному мікросомі.

Формалінові фіксатори Ліллі. До їх складу входять нітрат свинцю, формалін, дистильована вода, етиловий спирт. Нітрат свинцю забезпечує осад та денатурацію білків тканин. Наявність в суміші формаліну та етилового спирту сприяє рівномірній фіксації матеріалу.

Склад. Використовують два формалінові фіксатори Ліллі.

1. Фіксатор № 1. Нітрат свинцю – 8 г, нерозведений формалін – 10 мл, дистильована вода – 10 мл, 96⁰ етиловий спирт – 80 мл

2. Фіксатор № 2. Нітрат свинцю – 8 г, нерозведений формалін – 10 мл, дистильована вода – 11 мл, 96⁰ етиловий спирт – 79 мл.

Для приготування 100 мл фіксатора нітрат свинцю розчиняють у 3–5 мл дистильованої води, додають етиловий спирт до появи незначного помутніння. Для його зникнення додають решту води, етилового спирту та формаліну.

Формалінові фіксатори Ліллі застосовують у гістохімічних дослідженнях для виявлення глікозаміногліканів і глікопротеїнів. Фіксація матеріалу при низьких температурах майже не викликає деформації структур тканин і максимально зберігає їх прижиттєвий хімічний склад.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Термін фіксації залежить від температури середовища: матеріал товщиною до 0,5 см при температурі +25–30⁰ С фіксують впродовж 24 год, при температурі 0 +5⁰ С – 2–3 доби.

Після фіксації матеріал піддають подальшій обробці: виготовляють зрізи на заморожувальному мікротомі або заливають у парафін чи целоїдин.

Рідина Бекера (кальцій-формол). Додавання до формаліну іонів кальцію стабілізує вміст і локалізацію в тканинах багатьох речовин і, перш за все, ліпідів (особливо фосфатидів) шляхом утворення складних комплексних сполук із хімічними компонентами клітин. Вважають, що хлорид кальцію діє осмотично, запобігаючи дифузії ліпідів із тканин. Крім цього, фіксуюча рідина підвищує проникливість мембран клітин для молекул деяких субстратів – гліцерофосфату, нафтолфосфату. Хлорид кальцію сприяє максимальному збереженню вмісту ліпідів у матеріалі (наприклад, у мозочку – до 90 % від сталої кількості).

Склад. Використовують декілька модифікацій рідини Бекера:

1. Рідина Бекера: безводний хлорид кальцію – 1 г, концентрований формалін – 10 мл, дистильована вода – 90 мл. Термін фіксації – 16–24 год.

2. Рідина Бекера у модифікації Е. Пірса: концентрований формалін – 150 мл, хлорид кальцію (1,3 %-ий розчин) – 850 мл. Термін фіксації – 16–24 год.

3. Рідина Бекера у модифікації Р. Ліллі: безводний хлорид кальцію – 1 г, безводний хлорид кадмію – 1 г, концентрований формалін – 10 мл, дистильована вода – 90 мл. Термін фіксації – 16–24 год.

Зафіксований матеріал промивають водопровідною водою. З нього можна готувати зрізи на заморожувальному мікротомі, або піддавати подальшій обробці для заливки в парафін або целоїдин.

Фіксатор Мак-Мануса. У цьому фіксаторі чітко поєднуються фіксуючі властивості нітрату кобальту, хлориду кальцію та формаліну.

Склад. Нітрат кобальту – 1 г, дистильована вода – 80 мл, 10 %-ий розчин хлориду кальцію – 10 мл, концентрований формалін – 10 мл.

Даний фіксатор є одним з кращих фіксаторів для виявлення загальних ліпідів. Термін фіксації шматочків матеріалу довжиною і товщиною 1–4 мм у фіксаторі Мак-Мануса – 1–5 тижнів. Потім зафіксований матеріал на 24–48 год переносять у 3 %-ий розчин дихромату калію. У подальшому зневоднюють у трьох порціях ацетону (по 0,5 год у кожній) і переносять у розплавлений парафін, після чого проводять заливку.

Фіксатор Шабадаша. У даному фіксаторі поєднана фіксуюча здатність формаліну, нітрату міді, нітрату кальцію та етилового спирту.

Є дві модифікації рідини Шабадаша:

Рідина № 1. 96⁰ етиловий спирт – 100 мл, нітрат міді – 1,8 г, нітрат кальцію – 0,9 г, концентрований формалін – 10 мл.

Рідина № 2. 96⁰ етиловий спирт – 100 мл, нітрат кальцію – 2,6 г, концентрований формалін – 10 мл.

Даний фіксатор є одним з кращих для виявлення глікогену. Застосовується також для фіксації деяких білкових речовин і глікозаміногліканів.

Відібрані невеличкі шматочки матеріалу фіксують впродовж 2–3 год у першій рідині Шабадаша, а потім на 24–48 год переносять у другу рідину Шабадаша або в 96⁰ етиловий спирт.

Після фіксації матеріал заливають у парафін чи целоїдин.

Метод швидкої фіксації матеріалу

Для проведення термінових гістологічних досліджень спеціалісти патоморфологічних лабораторій використовують прискорений метод фіксації відібраного матеріалу. З цією метою його занурюють на 30 сек–1 хв в киплячий 10–12 %-ий водний розчин формаліну. Після фіксації матеріал промивають у водопровідній воді. З нього готують зрізи на заморожувальному мікротомі.

Вибір фіксуючої рідини для фіксації матеріалу

Вибір фіксуючої рідини значною мірою залежить від мети та завдань досліджень, виду матеріалу, хімічних властивостей речовин і терміну виготовлення препаратів.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Так, для виготовлення оглядових гістологічних та гістохімічних препаратів, найкраще використовувати 10–12 %-ий охолоджений розчин нейтрального формаліну, а також фіксуючі рідини Буена. Для проведення цитологічних досліджень в якості фіксаторів рекомендують рідини Буена, Карнуа, Ценкера тощо.

Для виявлення нуклеїнових кислот та білкових сполук в якості фіксуючого засобу найкраще використовувати рідину Карнуа, а в окремих випадках – 10–12 %-ий охолоджений розчин нейтрального формаліну.

Фіксуючими речовинами для виявлення місць локалізації і вмісту загальних ліпідів доцільно використовувати 10–12 %-ий охолоджений розчин нейтрального формаліну та рідину Бекера.

Для фіксації вуглеводів використовують різноманітні фіксуючі речовини. Так, для фіксації глікогену можна рекомендувати рідини Шабадаша, Карнуа і Буена, глікозаміногліканів – формалінові фіксатори Ліллі, Буена тощо.

Фіксацію ферментів здійснюють за допомогою охолодженого ацетону, 10–12 %-го охолодженого розчину нейтрального формаліну, етилового спирту тощо.

Для того, щоб отримати достовірні показники гістохімічної архітекtonіки досліджуваного матеріалу, необхідно його зразки піддавати різним способам фіксації і постановкам гістохімічних реакцій.

Після фіксації матеріал досліджень промивають. Перед промиванням фіксований матеріал, відібраний від звапнованих (мінералізованих) органів (кістки, зуби, тощо), піддають **декальцинації** – видалення із нього солей калію. Без декальцинації з такого матеріалу не можливо виготовити зрізи.

Декальцинація

Для видалення солей кальцію із фіксованого матеріалу використовують мінеральні (азотна, соляна) та органічні (мурашина, трихлороцтова, пікринова) кислоти.

При проведенні декальцинації необхідно дотримуватися наступних правил:

1. Декальцинацію проводять у витяжній шафі при кімнатній температурі.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

2. Декальцинації піддають, по можливості, невеликі і тонкі шматочки відібраного матеріалу (товщиною до 0,5–1 см). Вони декальцинуються швидше, а це, крім економії часу, дає можливість краще зберегти властивість тканин сприймати барвники.

3. Об'єм декальцинуючої рідини повинен у 25–50 разів перевищувати об'єм матеріалу.

4. Декальцинуючу рідину змінюють через кожні 24–48 год і одночасно контролюють (препарувальною голкою) ступінь декальцинації зразків відібраного матеріалу. У декальцинований матеріал препарувальна голка проникає легко.

5. Після закінчення декальцинації шматочки матеріалу, з метою запобігання набухання тканин і часткової нейтралізації, переносять у 5 %-ий розчин алюмо-кальцієвих галунів на 12–24 год.

6. Після галунів матеріал промивають у водопровідній воді.

Мінералізований матеріал досліджень, який містить багато жирової тканини, перед декальцинацією бажано знежирити, витримуючи його декілька діб у 96° і абсолютному спиртах, краще в термостаті при температурі +37–40° С.

Декальцинація азотною кислотою

Азотна кислота – найбільш поширена декальцинуюча речовина. Залежно від щільності матеріалу використовують її розчини різної концентрації, які готують на основі водопровідної води.

Дуже щільні об'єкти (зуби, компактні кістки) декальцинують більш концентрованими розчинами – 10 %-ми і навіть 15 %-ми. Менш щільні об'єкти (губчасті кістки, кальциновані патологічні вогнища) піддають дії менш концентрованих розчинів (3–5 %). Концентровані розчини тут небажані, так як вони викликають сильне набухання тканин.

Декальцинація соляною кислотою

Концентрована соляна кислота для декальцинації майже не застосовується, так як вона різко деформує клітинні структури та значно послаблює здатність тканин сприймати барвники. Її переважно використовують у складі рідини Ебнера: 12–15 %-ий

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

розчин кухонної солі – 200 мл, концентрована соляна кислота (питома маса 1,19) – 4 мл.

До такого розчину під час декальцинації та до її закінчення щоденно додають 1–2 мл соляної кислоти (для підтримання її нормальної концентрації). Соляну кислоту можна не додавати, але для успішної декальцинації необхідно щодобово замінювати декальцинуючий розчин. Кухонна сіль, що міститься в рідині, затримує деформуючу дію соляної кислоти. Після закінчення декальцинації шматочки матеріалу на декілька днів переносять у 12–15 %-ий розчин кухонної солі, який щоденно змінюють.

Декальцинація органічними кислотами

Із органічних кислот для декальцинації найчастіше застосовуються мурашина та трихлороцтова кислоти. Їх перевага полягає в тому, що вони не впливають на процес забарвлення тканин. Водночас вони не придатні для декальцинації матеріалу великого розміру.

Мурашина кислота – з метою декальцинації може застосовуватись у концентрованому стані (безводна кислота), у суміші з 70–96⁰ етиловим спиртом (1:1), або в суміші з 10–15 %-им розчином формаліну (1:1). Після декальцинації, для запобігання сильного набухання тканин, матеріал промивають упродовж декількох днів у 10–15 %-му розчині формаліну, або у 70–96⁰ етиловому спирті, які часто замінюють.

Трихлороцтова кислота найчастіше використовується у вигляді 5–10 %-го водного розчину. Після декальцинації шматочки промивають у 36⁰ етиловому спирті впродовж 3–4 днів при щодобовій його заміні. Промивання у воді – не допускається.

Промивка фіксованого матеріалу

Метою промивання зафіксованого матеріалу є видалення залишків фіксуючих речовин. Залежно від типу фіксатора, для цього використовують або проточну водопровідну воду, або етиловий спирт.

Матеріал, зафіксований формаліном, а також фіксаторами, що містять сулему чи двохромовокислий калій, промивають проточною

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

водою. Для цього застосовують спеціальні корзинки Шафера або фарфорові ступки Файргальда. У лабораторній практиці частіше використовують скляні банки об'ємом 0,5–1 л, які закривають пластиковими кришками з отворами: по краях роблять невеликі отвори діаметром 2–3 мм, а в центрі – один більший (1,5–2 см). У банку поміщають відібрані шматочки матеріалу, етикетки виводять назовні, після чого закривають кришкою. У центральний отвір вставляють гумовий шланг довжиною 25–30 см і під'єднують його до водопровідного крана. Банку розміщують в умивальнику, відкривають кран, і вода постійно надходить у ємність, а її надлишок витікає через отвори в кришці.

Тривалість такого промивання залежить від товщини шматочків матеріалу і становить приблизно 24–48 год.

Матеріал, зафіксований у фіксаторах із вмістом пікринової кислоти, промивають 50° етиловим спиртом, а після фіксації в рідині Карнуа – абсолютним етиловим спиртом. Для цього використовують скляний посуд із притертими корками: у нього поміщають матеріал, заливають спирт потрібної концентрації та щільно закривають. У процесі промивання спирт періодично замінюють новим.

Тривалість процедури також залежить від розмірів зразків і може варіювати від кількох годин до 48 годин.

Наступним етапом виготовлення гістологічних препаратів є зневоднення промитого матеріалу. Якщо ж промивання проводилося абсолютним спиртом, цей етап можна пропустити.

Зневоднення промитого матеріалу

Зневоднення (дегідратацію) промитого матеріалу проводять перед його заливкою в ущільнюючі середовища. Мета зневоднення – видалити воду з тканин матеріалу. Зневоднення здійснюють етиловим спиртом зростаючої міцності. Для цього переважно використовують 50°, 70°, 80°, 90°, 96° і абсолютний спирти. Міцність спиртів визначають за допомогою аерометра-спиртометра.

Готуючи спирти різної міцності за основу переважно беруть 96° спирт. У його 100 об'ємних частинах міститься 96 об'ємних частин абсолютного (безводного) спирту і чотири частини води.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Для приготування *спиртів* необхідної міцності користуються даними, які наведені в *табл. 1*. Вони одержані в результаті наступних розрахунків.

$$1. X = \frac{A \times B}{C}$$

Де: X – кількість спирту вихідної міцності; A – потрібна кількість спирту; B – необхідна міцність спирту; C – міцність спирту на базі якого готується спирт необхідної міцності.

$$2. X = \frac{A \times B}{C}$$

Де: X – мітка на мензурці (циліндрі) до якої необхідно долити воду; A – міцність спирту, на базі якого готується спирт необхідної міцності; B – наявна кількість базового етилового спирту; C – необхідна міцність спирту.

Абсолютний етиловий спирт готують таким способом: до 100 мл 96⁰ спирту додають 15 г безводного мідного купоросу і після збовтування залишають на 24–48 год. Такий абсолютний спирт зберігається постійно з мідним купоросом і використовується по мірі необхідності для фіксації та зневоднення шматочків матеріалу.

Для приготування безводного мідного купоросу беруть хімічно чистий синього кольору мідний купорос і прокалюють у фарфоровій чашці. Під час прокалювання відбувається видалення кристалізаційної води із молекул мідного купоросу (CuSO₄·5H₂O); в результаті чого він переходить у безводну форму білого кольору (CuSO₄). При контакті з водою такий купорос знову поглинає воду і набуває синього кольору. Цей механізм дії є основою при застосуванні мідного купоросу для зневоднення спирту.

Прокалювати мідний купорос можна і в термостаті при температурі +60–70⁰ С впродовж трьох тижнів.

Прокалений мідний купорос зберігають у банці з притертим корком.

Термін обезводнення матеріалу залежить від розмірів його шматочків. У спиртах різної міцності він може тривати від однієї до

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

12 год. Добре зневоднений матеріал плаває на поверхні абсолютного спирту.

Таблиця 1. Приготування спирту необхідної концентрації

Для отримання 100 мл спирту	Необхідно взяти (мл)							
	96 ⁰ спирту	H ₂ O	90 ⁰ спирту	H ₂ O	80 ⁰ спирту	H ₂ O	70 ⁰ спирту	H ₂ O
40 ⁰	42	58	44	56	50	50	57	43
45 ⁰	47	53	50	50	56	44	64	36
50 ⁰	52	48	56	44	63	37	71	29
60 ⁰	63	37	67	33	75	25	86	14
70 ⁰	73	27	78	22	88	12	—	—
80 ⁰	83	17	89	11	—	—	—	—
90 ⁰	94	6	—	—	—	—	—	—

Ущільнення зневодненого матеріалу

Із зневодненого матеріалу не можна виготовити якісні зрізи, так як він не щільний і недостатньо пружний. Крім цього його неможливо прикріпити на мікротомі. Для виготовлення якісних зрізів зневоднений матеріал необхідно ущільнити – просочити ущільнюючими речовинами. Процес ущільнення матеріалу називають заливкою. Для ущільнення, у гістологічній практиці, найбільш часто використовують парафін, целоїдин, парафін-целоїдин і желатин. Як відомо, парафін і целоїдин розчиняються тільки в спеціальних розчинниках (*ксилол, толуол, хлороформ, бензол*). У зв'язку з цим, для успішного ущільнення зневодненого матеріалу його необхідно попередньо просочити цими розчинниками. Крім цього, названі розчинники видаляють етиловий спирт з матеріалу. Процес просочування матеріалу розчинниками парафіну і целоїдину буде описаний нижче – при заливці у ці речовини. Заливку матеріалу в ущільнюючі речовини необхідно проводити у витяжній шафі.

Заливка в парафін

Парафін – це речовина, яка складається із високомолекулярних насичених вуглеводів, стійких по відношенню до лугів та кислот. Очищений парафін не має запаху та смаку. Розчиняється парафін у хлороформі, ксилолі, бензолі, ефірі. Залежно від виду, він має різну температуру плавлення (від $+27^{\circ}$ до $+62^{\circ}$ С). Парафін, який плавиться при температурі нижче $+50^{\circ}$ С, називають м'яким парафіном, а вище цієї температури – твердим. Залежно від умов охолодження парафін може мати вигляд грубокристалічної білої маси або напівпрозорої аморфної.

Підготовка парафіну

Для заливки матеріалу застосовують аморфні види парафіну, які мають температуру плавлення $+52$ – 56° С. Тому, якщо працюють із кристалічними видами парафіну, його попередньо гомогенізують перед використанням, тобто надають аморфності та пластичності шляхом повторного сильного нагрівання на водяній бані або у кип'ячій воді та швидкого охолодження у холодній воді. Не рекомендується нагрівати парафін на вогні, тому що він при цьому сильно підгорає, а при охолодженні – різко жовтіє.

Гомогенність парафіну – важлива умова, від якої залежить товщина зрізів. Для надання більшої пластичності парафіну в нього додають 5 % очищеного бджолиного воску та декілька крапель скипидару. Для видалення газів з парафіну його нагрівають у термостаті при температурі $+70^{\circ}$ С у відкритому посуді впродовж кількох діб.

Процес заливки матеріалу в парафін

Після зневоднення шматочки матеріалу спочатку переносять у суміш 96° спирту (або абсолютного) і ксилолу (1:1) на 1–3 год, а згодом – у чистий ксилол. Для цього використовують дві порції ксилолу, витримуючи у кожній матеріал від 30 хв до 2–3 год, залежно від типу тканин і товщини шматочків. Критерієм показника достатньої обробки матеріалу цією речовиною є просвітлення (прояснення) його шматочків. Перетримувати матеріал у ксилолі не

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

рекомендується, так як це призводить до його крихкості, ламкості та до деформації тканин.

Крім ксилолу можна використовувати толуол і хлороформ.

Ксилол і толуол за своїм хімічним складом дуже близькі. Обидва є гомологом бензолу. Температура кипіння їх від $+110^{\circ}$ до $+144^{\circ}$ С. Однак, ксилол – менш токсичний, ніж толуол. Тому техніка обробки матеріалу з використанням толуолу, така ж, як і при роботі з ксилолом.

Хлороформ, як і ксилол та толуол, добре змішується із спиртами і в той же час легко розчиняє парафін. Тому матеріали оброблені цими речовинами, у подальшому легко просочуються парафіном.

Однак, при використанні хлороформу термін перебування матеріалу у сумішах – інший, у ньому можна залишати об'єкти дослідження, без особливого пошкодження для них – навіть до 48 год.

Для кращого просочування парафіном матеріал з ксилолу переносять у суміш ксилолу з парафіном (1:1) на 1–3 год і не більше (у термостаті при температурі $+37^{\circ}$ С).

При використанні хлороформу шматочки матеріалу з нього переносять у суміш хлороформу з парафіном (1:1) на 2–3 год (можна залишити і на більший термін) при температурі $+35$ – 40° С (у термостаті).

Для виготовлення сумішей парафіну з розчинниками його попередньо розплавляють.

Після проведеної роботи використану суміш зберігають у застиглому стані.

Із суміші ксилолу або хлороформу з парафіном шматочки матеріалу переносять у розплавлений парафін. Він повинен бути в термостаті з температурним режимом на $+2$ – 3° С більшим від точки плавлення парафіну ($+54$ – 55° С). Просочування об'єктів у парафіні відбувається у двох порціях, зазначених, як парафін №1 та парафін №2.

Спочатку матеріал переносять у парафін №1 на 0,5 – 2,5 год, потім нагрітим пінцетом матеріал перекладають у парафін №2 на 0,5–1–1,5 год. Загалом в обох парафінах шматочки матеріалу витримують від 1–2 до 4 год, залежно від щільності об'єкту.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Витримування матеріалу в двох порціях парафіну необхідно для того, щоб повністю звільнити його від ксилолу або хлороформу, а також від домішок, які змінюють пластичність парафіну, надаючи йому крихкості. Парафін №1 можна використовувати впродовж тривалого часу. Для цього його краще зберігати у розплавленому стані (у термостаті).

Після витримування матеріалу в парафіні №2 його переміщують у попередньо виготовлені паперові ванночки або в фарфорові чашечки. Ванночки, довжиною 2,5 см, шириною і висотою 1,5 см готують із щільного паперу. Перед розміщенням у них матеріалу, їх дно або дно чашечок змащують гліцерином і зберігають у тому ж термостаті де знаходиться парафін №2. Шматочки матеріалу із парафіну №2 нагрітим анатомічним пінцетом орієнтують у належному положенні та переносять у ванночки. При цьому етикетки матеріалу виводять за краї ванночки. Матеріал у ванночках повністю заливають парафіном №2, або запасним розплавленим парафіном, який знаходиться у цьому термостаті. Після цього ванночки з матеріалом переносять з термостату на робочий стіл для остигання (затвердіння) парафіну (3–6 год). Для прискореного остигання парафіну користуються водопровідною водою. Для цього ванночки з матеріалом ставлять у кювету невеликого розміру і заповнюють її водою. При цьому слідкують, щоб рівень води не перевищував висоти ванночки. Після утворення на поверхні парафіну плівки остигання, кювету можна поставити під проточну водопровідну воду.

Остиглий парафін виймають із ванночки, відвертаючи папір від його поверхні. Якщо матеріал був залитий у фарфорові чашечки, – його вирізають разом із парафіном нагрітим скальпелем. Товщина парафіну навколо матеріалу повинна бути не менше 2 мм.

Отримані блоки (матеріал з парафіном) приклеюють на дерев'яні брусочки. Брусочки, довжиною 2,5 см, шириною – 1,5 і товщиною 1,0 см бажано вирізати із твердих порід дерева. Перед приклеюванням до них блоків їх необхідно попередньо виварити у 25 %-му розчині соди і обробити етиловим спиртом з ефіром (1:1). Блоки приклеюють до брусочків наступним чином: від них відокремлюють етикетки, і їх дані (або тільки номер) пишуть на одній із поверхонь брусочка. Краще це робити чорним маркером.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

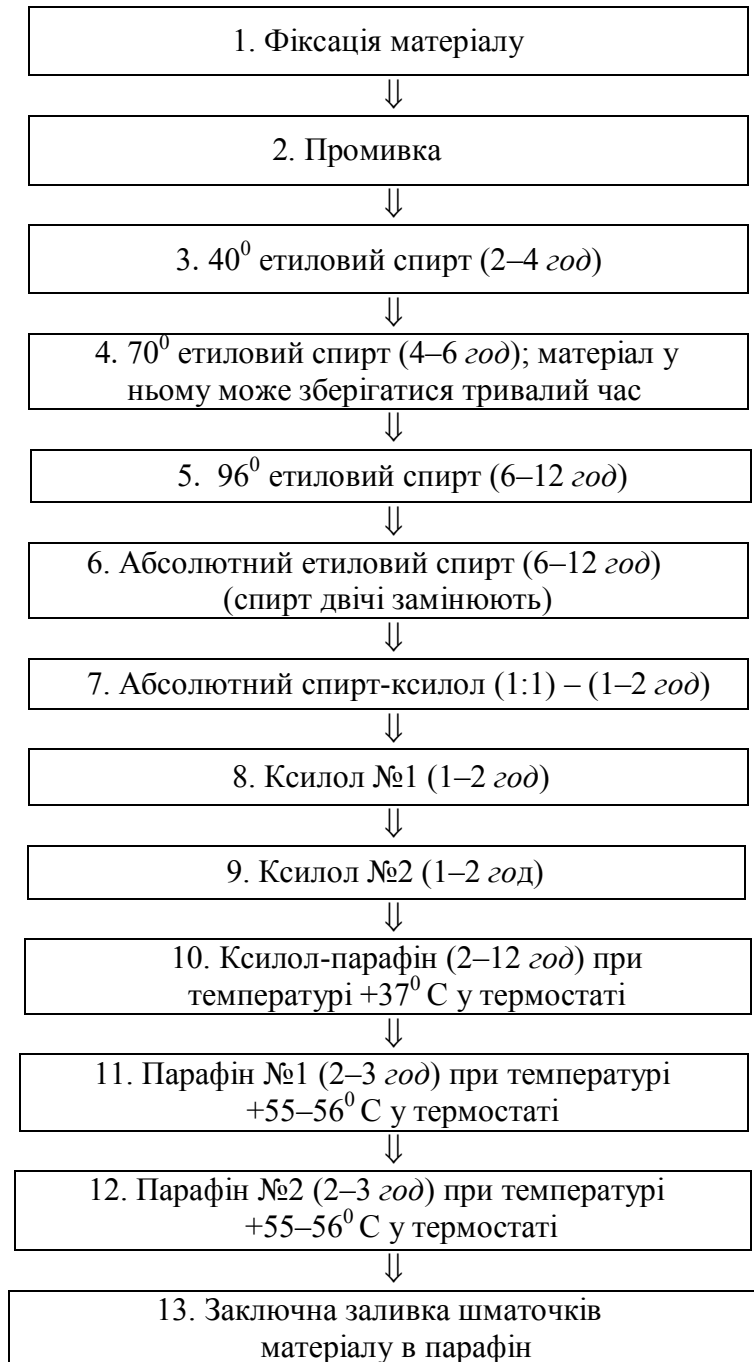
Блок розміщують на протилежній поверхні брусочка і між ними вставляють кінець попередньо нагрітого шпателя. При цьому парафін плавиться. Кінець шпателя виймають, а блок притискають до брусочка. Якщо краї блока виступають над краями брусочка – їх відрізають нагрітим скальпелем. Користуючись нагрітим шпателем або скальпелем, блоку надають форму зрізаної чотирикутної піраміди. При виконанні цієї операції, необхідно не допускати контакту нагрітих інструментів із залитим матеріалом.

Схеми для заливки шматочків матеріалу в парафін

Схема № 1. Заливка матеріалу в парафін

I. Фіксація	Формалін 10-15 %-ий (24 год) Спирт-формалін (24 год) Рідина Карнуа (2-4 год) Спирт 96-100 ⁰ (12-24 год) ↓ Промивка у воді (24-48 год) ↓	Ценкер-формол (8-12-24 год) Рідина Орта (24-48 год) Рідина Рего (24-48 год) ↓ Промивка у воді (24-48 год) ↓
II. Зневоднення	Спирт 96 ⁰ (24 год) ↓ Спирт абсолютний або 96 ⁰ (24 год) ↓	
III. Заливка в парафін	Спирт-хлороформ (6-12 год) або спирт-ксилол (1-3 год). Цей етап обробки можна пропустити ↓ Хлороформ (6-12 год і більше), або ксилол (1-3-6 год) ↓ Хлороформ-парафін або ксилол-парафін при температурі +37 ⁰ С (2-3 год) ↓ Парафін I при температурі +54 ⁰ С (1,5-2,5 год) ↓ Парафін II при температурі +54 ⁰ С (1,5-2,5 год) ↓ Охолодження у воді ↓ Наклеювання блоків на брусочки	

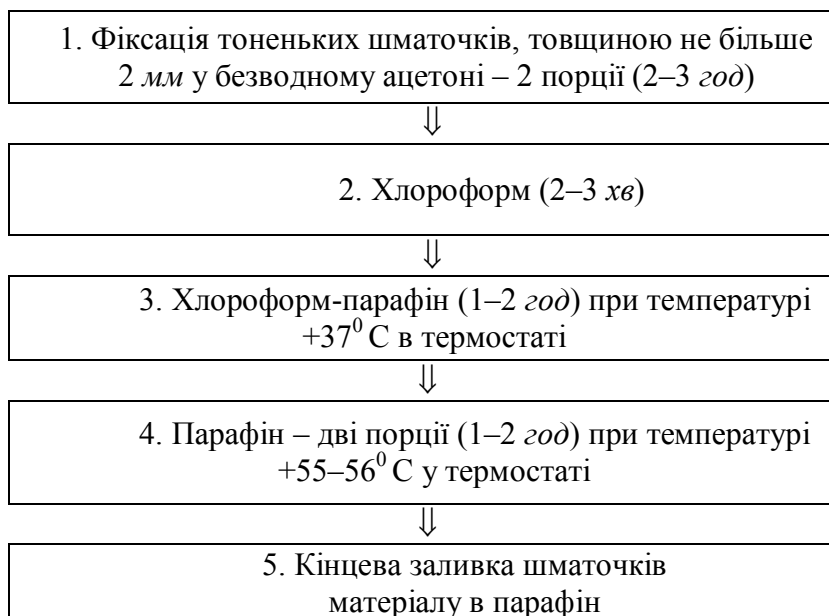
Схема №2. Заливка матеріалу в парафін, рекомендована для шматочків, які мають поверхню не більше 1 см² і товщину не більше 3–5 мм



**Схема № 3. Методика швидкої заливки
маленьких шматочків матеріалу в парафін**

I. Фіксація	Рідина Карнуа (2–4 год) або спирт 96–100 ⁰ (3–4 год) ↓
II. Зневоднення	Спирт абсолютний або 96 ⁰ (3–4 год) ↓
III. Заливка в парафін	Хлороформ при температурі +37 ⁰ С (1–2 год) ↓ Хлороформ-парафін при температурі +37 ⁰ С (0,5–1 год) ↓ Парафін I при температурі +54 ⁰ С (1 год) ↓ Парафін II при температурі +54 ⁰ С (0,5–1 год) ↓ Охолодження, вирізання блоків і приклеювання їх на брусочки

**Схема № 4. Методика швидкої заливки матеріалу
в парафін при фіксації в ацетоні**



Заливка матеріалу в целоїдин

Целоїдин – це термопластичний матеріал, який складається з мононітроцелюлози, динітроцелюлози і камфори. Вогненебезпечний. Використовують у виробництві рентгенівських, фото- та кіноплівок. У гістологічній техніці використовують як ущільнююче середовище для просочування ним шматочків матеріалу та виготовлення целоїдинових блоків. Целоїдин, який надходить у реалізацію має вигляд тоненьких смужок або плиток, які розчиняються у багатьох органічних розчинниках. Целоїдин можна отримати із деяких видів рентгенівських плівок, обробляючи їх впродовж 30-ти хв 40 %-им розчином КОН або NaOH. Таку плівку попередньо промивають у проточній воді, очищують від емульсії, висушують, ріжуть на маленькі шматочки. Потім промивають у кількох порціях хлороформу, знову висушують і використовують як звичайний целоїдин.

Розчинником для целоїдину є суміш абсолютного етилового спирту та диетилового ефіру (1:1). Розчиняється целоїдин повільно впродовж кількох діб. Щоб процес відбувався швидше, целоїдин витримують 24 год в абсолютному спирті і після цього до нього додають ефір.

Спочатку готують густий розчин целоїдину, потім частину його розводять сумішшю абсолютного спирту з ефіром (1:1) і отримують рідкий целоїдин. Розчин целоїдину готують у банках з широкою горловиною і притертими корками.

Розливаючи розчини целоїдину у робочий посуд, необхідно ретельно протирати шийки банок бавовняною або лляною тканиною.

Схема заливки матеріалу в целоїдин

1. Зневоднити матеріал у 50⁰, 60, 70, 80, 96⁰ і абсолютному етиловому спиртах (дві порції) по 24 год в кожному.
2. Перенести матеріал у суміш абсолютного етилового спирту і диетилового ефіру (1:1) на 24 год.
3. Просочити матеріал у 2 %-му розчині целоїдину – 2–7 діб.
4. Просочити матеріал у 4 %-му розчині целоїдину – 3–7 діб.
5. Просочити матеріал у 10 %-му розчині целоїдину – 3–7 діб.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

6. Ущільнити матеріал. У фарфорові чашечки налити 10 %-ий розчин целоїдину, перекласти в нього матеріал і закрити чашечки склом. Термін ущільнення – 2–4 доби.

7. Вирізати целоїдинові блоки (облямівка целоїдину по периметру матеріалу повинна бути 2 мм) і помістити їх у 70⁰ етиловий спирт. В останньому блоки витримують до тих пір, поки вони не набудуть щільності твердої гуми.

8. Приклеїти блоки на дерев'яні брусочки. Для цього потрібно нанести на брусочок кілька крапель суміші етилового спирту та ефіру, потім 10 %-го розчину целоїдину і приклеїти блок.

9. Блоки етикують і зберігають у 70⁰ етиловому спирті.

Заливка матеріалу у целоїдин має низку переваг перед заливкою у парафін. Головною із них є те, що повільне просочування тканин матеріалу целоїдином без застосування високих температур максимально зберігає мікроструктуру клітин. При заливці у парафін матеріал зморщується.

Недоліки методу: тривалість заливки матеріалу, проблема отримання серійних зрізів, лімітування часу зберігання блоків.

Цей метод доцільно застосовувати для заливки матеріалу, структури якого при цьому легко розшаровуються: трубчасті органи, очне яблуко, ембріональний матеріал тощо.

Схеми для заливки шматочків матеріалу в целоїдин

Схема № 5. Методика швидкої заливки маленьких шматочків (до 2 мм) матеріалу в целоїдин

I. Фіксація	Рідина Карнуа (2–4 год) або спирт 96–100 ⁰ (3–4 год) ↓
II. Зневоднення	Спирт абсолютний або 96 ⁰ (3–4 год) ↓
III. Заливка в целоїдин	Целоїдин густий 10 % (12–18 год) на ніч ↓ Приклеювання на брусочки і підсушування на повітрі (20–60 хв) ↓ Ущільнення в хлороформі (30–60 хв) ↓ Зберігання у 70 ⁰ спирті

Схема № 6. Заливка матеріалу в целоїдин

I. Фіксація	Формалін 10–15 %-ий (24 год) Спирт-формалін (24 год) Рідина Карнуа (2–4 год) Спирт 96-100 ⁰ (12–24 год) ↓ Промивка у воді (24–48 год) ↓	Ценкер-формол (8–12–24 год) Рідина Орта (24–48 год) Рідина Рего (24–48 год) ↓ Промивка у воді (24–48 год) ↓
II. Зневоднення	Спирт 96 ⁰ (24 год) ↓ Спирт абсолютний або 96 ⁰ (24 год) ↓	
III. Заливка у целоїдин	Суміш спирту з ефіром (6–24 год): можна пропустити ↓ Целоїдин рідкий 4–5 %-ний (2–4 доби) ↓ Целоїдин густий 10 %-ний (1–2 доби) ↓ Ущільнення целоїдину (2–3 доби) ↓ Приклеювання целоїдинових блоків на брусочки і зберігання у 70 ⁰ спирті	

Заливка матеріалу в целоїдин-парафін

Метод придатний для багатьох тканин і перш за все таких, які при парафіновій заливці легко зморщуються (мезенхіма, слизова оболонка матки, яйцепроводу, тканини очного яблука тощо), та для крихких тканин. Суть такої заливки полягає у тому, що матеріал спочатку заливають у целоїдин, а потім – у парафін. Із залитого таким чином матеріалу можна отримати досить тонкі зрізи (1–3 мкм), які придатні для цитохімічних досліджень.

Для цієї заливки рекомендується використовувати м'який парафін із температурою плавлення 50–52⁰ С.

Ця заливка не придатна для виготовлення препаратів з вивчення ліпідів.

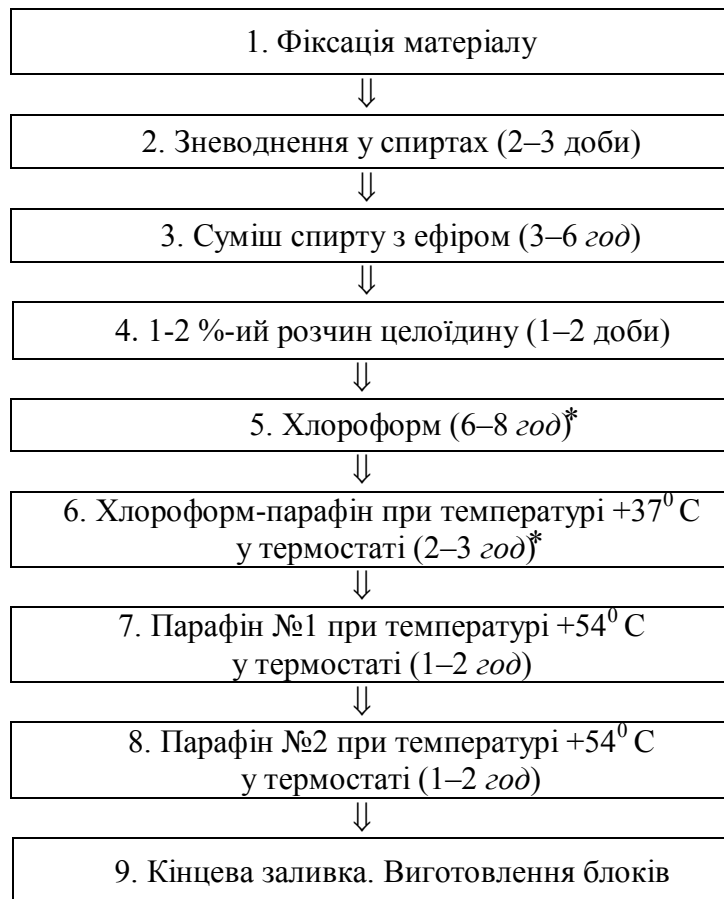
Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Її можна рекомендувати для отримання препаратів, у яких виявляються нуклеїнові кислоти, білки, білкові функціональні групи, амінокислоти, деякі мінеральні речовини.

Найбільш прості методи целоїдин-парафінової заливки наведені в схемах № 7 і 8.

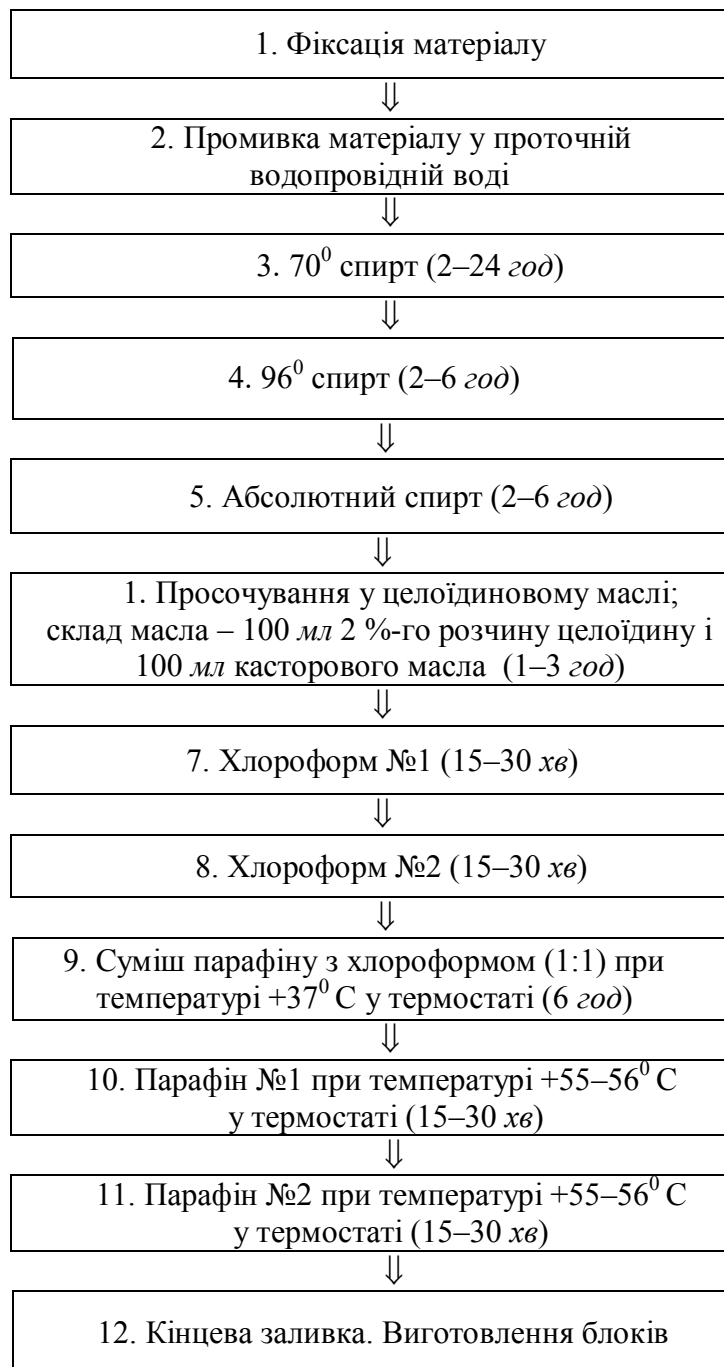
Схеми для заливки шматочків матеріалу в целоїдин-парафін

Схема № 7. Заливка шматочків матеріалу в целоїдин-парафін



* – шматочки матеріалу перед внесенням у хлороформ висушують фільтрувальним папером.

**Схема № 8. Заливка шматочків матеріалу
в целоїдин-парафін**



Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Для приготування 2 %-го розчину целоїдину беруть 100 мл суміші абсолютного етилового спирту і диетилового ефіру (1:1) і додають до неї 2 г целоїдину. Шматочки матеріалу перед внесенням у хлороформ висушують фільтрувальним папером.

Заливка матеріалу в желатин

Заливку в желатин застосовують переважно в тих випадках, коли матеріал дослідження неможливо залити в інші середовища (парафін, целоїдин), а його фізичні властивості не дають змоги готувати зрізи на заморожувальному мікротомі. Тому ця заливка, як правило, застосовується для ущільнення шматочків матеріалу, який містить багато волокнистої сполучної тканини (яєчники, матка, трубчасті органи травного каналу тощо). Також цю заливку застосовують для вивчення у тканинах локалізації та вмісту різних ліпідів, багатьох мінеральних речовин та деяких ферментів. Використовують її для ущільнення ембріонального матеріалу і для проведення простих гістологічних досліджень. Разом з цим заливка у желатин значно поступається перед заливкою матеріалу в парафін та целоїдин і не може бути рекомендована, як основна для гістологічних досліджень.

Приготування розчинів для заливки матеріалу в желатин

Для заливки використовують прозорий харчовий желатин і з нього готують два розчини: 12,5 і 25 %-ий на 1 %-ній карболовій воді (дистильованій). Спочатку готують 25 %-ий розчин. Для цього беруть потрібну кількість желатину, дрібно його нарізають, висипають у банку з широкою горловиною, заливають відповідною кількістю карболової води і ставлять у термостат (при температурі 37⁰ С) до розчинення. Після цього частину приготовленого желатину розводять теплою 1 %-ою карболовою водою (1:1) і таким чином отримують 12,5 %-ий розчин. Краще готувати розчин із желатину в невеликих об'ємах і в міру необхідності.

Допускається зберігання розчинів желатину в прохолодному місці. Просочування матеріалу проводять у термостаті при температурі +37⁰ С.

Методика заливки матеріалу в желатин

1. Із зафіксованого в рідині Беккера або 10 %-му розчині нейтрального формаліну матеріалу беруть невеличкі шматочки (до 0,5 см) і промивають у проточній водопровідній воді впродовж 18–24 год.
2. Матеріал після промивання переносять у 12,5 %-ий розчин желатину на 3–20 год при температурі +37⁰ С.
3. Після цього матеріал поміщають у 25 %-ий розчин желатину на 3–20 год при температурі +37⁰ С.
4. У ванночки наливають 25 %-ий розчин желатину і в нього швидко перекладають матеріал.
5. Ванночки охолоджують у холодній воді.
6. Вирізають невеликі блоки із таким розрахунком, щоб навколо шматочка матеріалу була облямівка желатину товщиною 2–3 мм.
7. Ущільнюють блоки в 20–25 %-му розчині формаліну – 24 год.
8. Зберігають блоки в 10 %-му розчині формаліну.
9. Із блоків готують зрізи на заморожувальному мікротомі.

Желатинові зрізи фарбують так само, як і інші зрізи, виготовленні на заморожувальному мікротомі. Заводять зрізи у гліцерин, гліцерин-желатин. Можна заводити їх у бальзам, попередньо зневоднюючи у спиртах і просвітлюючи в карбол-ксилолі та ксилолі.

Якщо гістохімічні методи потребують видалення желатину із зрізів, то це здійснюють шляхом обробки їх 10 %-им розчином КОН впродовж 10 хв. Перед постановкою гістохімічної реакції зрізи промивають у водопровідній воді.

Виготовлення зрізів

Загальна характеристика мікротомів

Виготовлення зрізів, які після фарбування вивчають за допомогою світлового мікроскопа, досягається шляхом нарізання шматочків матеріалу на спеціальних приладах, що називаються мікротомами.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Є два основні типи мікротомів. На мікротомах першого типу готують зрізи із парафінових і целоїдинових блоків. Вони можуть бути *полозкові* (ковзаючі) (рис. 1, 2) та *барабанні* (ротаційні) (рис. 3, 4). Такі мікротоми можуть мати програмні режими для виготовлення та вирівнювання зрізів з автоматичним їх нарізанням (рис. 5). Для полегшення роботи та збільшення кількості виготовлення зрізів на сьогодні використовують комбіновані (рис. 6) та вібраційно-лезові (рис. 7) моделі мікротомів.

Комбінована модель мікротомів поєднує лінійний горизонтальний рух ручного приводу (як у ковзаючому мікротомі) при вертикальному переміщенні зразка (як в ротаційному).

Мікротоми другого типу – *заморожувальні*. На них готують зрізи із замороженого матеріалу. До складу мікротомів обов'язково входять такі компоненти: станина, тримач ножа, механізм мікроподачі, тримач блока, мікротомний ніж і механізм, який забезпечує рух тримача ножа. Залежно від модифікації мікротомів, ці компоненти можуть мати різне розміщення або доповнюватись додатковими.

Станина найбільш масивний компонент мікротома. Вона надає стійкості мікротому і до неї кріпляться всі інші його компоненти. Тримач ножа фіксує мікротомний ніж і регулює його нахил.

Тримач блока фіксує блок в певному положенні.

Механізм мікроподачі забезпечує автоматичну подачу блока разом з його тримачем до мікротомного ножа для отримання зрізів заданої товщини.

Мікротомним ножем нарізаються зрізи. Його рух, разом з тримачем забезпечує відповідний механізм (полозки, барабан).

Заморожувальний мікротом має спеціальний пристрій для заморожування матеріалу – металевий столик. Заморожування досягається за допомогою вуглекислоти, яка по спеціальному шлангу надходить в порожнину столика від балону. В даний час широкого поширення у гістологічній практиці набули заморожувальні мікротоми з термоелектричним столиком із селеновим випрамлячем. Робота цього столика базується на використанні термоелектричного ефекту Ж. Пельтьє. Перед початком виготовлення зрізів на заморожувальних мікротомах обов'язково необхідно ознайомитись з правилами роботи з ними і дотримуватись їх.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

На сьогодні для гістологічних та гістохімічних досліджень в Україні випускають заморожувальні мікротомки марки – МЗ-2.

Для одержання зрізів із замороженого матеріалу використовують також *мікротом-кріостати* (рис. 8). У них мікротом розташований у морозильній камері. Мікротом-кріостати є незамінними для одержання зрізів із свіжомороженого матеріалу з метою експрес діагностики біопсійного матеріалу, для постановки на них гістохімічних реакцій з подальшим виявленням активності ферментів, місць локалізації нуклеїнових кислот, білків, ліпідів, сполук, що швидко руйнуються тощо.



Рис. 1. Полосковий мікротом «Leica SM 2000 R».



Рис. 2. Ротаційний (вдосконалена модель механічного ротаційного мікротому) мікротом «HistoCore BIOCUT».



Рис. 3. Автоматичний мікротом «Microtome A 550»



Рис. 4. Моторизований ротаційний мікротом (призначений для точного і швидкого виготовлення зрізів) «HistoCore MULTICUT».



Рис. 5. Автоматичний ротаційний мікротом (призначений для повністю автоматичного виготовлення зрізів) «HistoCore AUTOCUT».



Рис. 6. Вібраційний лезовий мікротом «Leica VT 1000 S».



Рис. 7. Мікротом-криостат «МК100» для виготовлення заморожувальних зрізів.



Рис. 8. Мікротом-криостат «МС 5050» для виготовлення заморожувальних зрізів.

Мікротомні ножі

Для виготовлення зрізів використовують мікротомні ножі. Вони мають різноманітну довжину, форму сторін та шліф (кут леза).

Довжина ножів може бути від 8 до 25 см. Найкоротші ножі (8–10 см) придатні тільки для нарізання матеріалу на заморожувальному мікротомі. Усі інші застосовують для різання целоїдинових і парафінових блоків. Ножі, залежно від їх довжини ділять на малі (13 см), середні (17–20 см) і великі (25 см і більше).

За формою клину ножі є прямі (обидві поверхні ножа плоскі), плоскоувігнуті (одна поверхня плоска, друга – увігнута) та подвійноувігнуті (рис. 9). Прямі ножі часто називають парафіновими,

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

так як вони найбільш зручні для різання парафінових блоків. Плоскоувігнуті ножі використовують для нарізання целоїдинових блоків. При необхідності тим чи іншим ножем можна різати будь-які об'єкти.

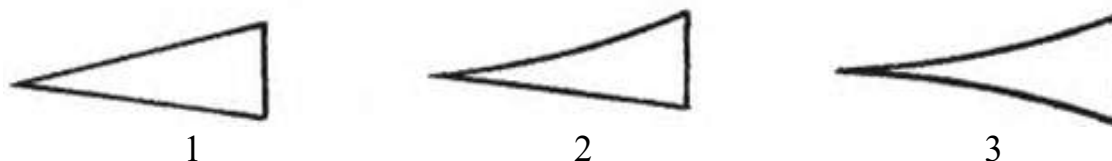


Рис. 9. Мікротомні ножі: 1 – прямий; 2 – плоскоувігнутий; 3 – подвійноувігнутий.

Під шліфом ножа розуміють кут перетину леза. Кут леза залежить від ступеня увігнутості однієї або двох поверхонь ножа. Шліф має суттєве значення, так як від його величини залежить і кут загострення ріжучого краю ножа, який і визначає ріжучі властивості останнього. Чим тонший шліф, тим гостріший кут ріжучого краю ножа. Завдяки цьому можна отримати тонші зрізи.

Розрізняють три види шліфів: дуже тонкі (ножі групи «а») і грубі (ножі групи «в» і «с») (рис. 10).

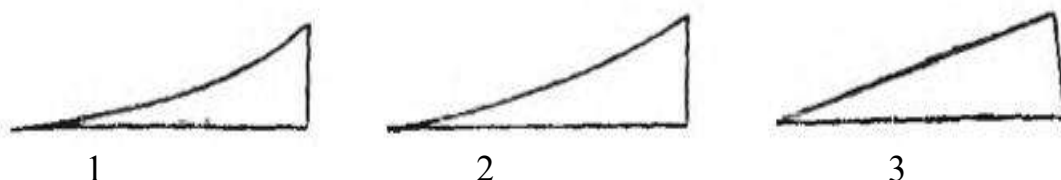


Рис. 10. Мікротомні ножі з різними шліфами: 1 – ніж групи «а»; 2 – ніж групи «в»; 3 – ніж групи «с».

Слід мати на увазі, що мікротомні ножі з різними шліфами мають різну ступінь загартування. Найм'якшими є ножі з тонким шліфом (група «а»). У зв'язку з цим вони швидше затуплюються, і тому ними слід користуватися з великою обережністю. Ці ножі використовують тільки для різання м'яких об'єктів, залитих у целоїдин.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

У всіх інших випадках рекомендується працювати з більш товстими і жорсткими ножами груп «в» і «с». При цьому необхідно знати, що ножі групи «в» переважно плоскоувігнуті (як і ножі групи «а») частіше використовуються для різання целоїдинових блоків, ножі групи «с» – плоскі і застосовуються переважно для різання парафінових блоків. Це пов'язано з тим, що парафін швидше затуплює ножі, ніж целоїдин, і тому для різання блоків, залитих у парафін, необхідно використовувати твердіші ножі.

Більшість коротких ножів для заморожувальних мікротомів відносять до прямих ножів категорії «с». Разом з тим серед них зустрічаються і плоскоувігнуті – групи «в».

Після роботи, ніж необхідно акуратно очистити від залишків парафіну, целоїдину, спирту і насухо протерти м'якою тканиною. Зберігають ножі у спеціальних коробках (футлярах). Не допускається доторкання леза до стінок футляра.

Не рекомендується залишати ножі на мікротомі та категорично забороняється класти їх на робочий стіл. Для тривалого зберігання ножів їх необхідно вкрити тонким шаром нейтрального вазеліну.

Для виготовлення будь-яких зрізів (заморожених, парафінових, целоїдинових) мікротомний ніж закріплюють у зажимі під гострим кутом до горизонтальної площини. Ніж правильно буде різати тільки тоді, якщо він щоразу підходить до блоку своїм ріжучим краєм. Це забезпечується певним його нахилом (*рис. 11.1.*). При сильному горизонтальному положенні ніж буде спрямовуватись до блоку не краєм леза, а кутом, утвореним площинами загострення і основного клину (*рис. 11.2.*). За такого положення ножа зрізи отримати неможливо, так як блок піддається сильному стисканню і може зірватись з брусочка. Непридатний для виготовлення зрізів і дуже сильний нахил ножа. У цьому випадку ніж буде зіскріблювати, а не різати об'єкт (*рис. 11.3.*).

Кут нарізання утворюється перетином верхньої горизонтальної площини блоку з нижньою площиною ножа. Найкращим для виготовлення зрізів є кут різання, який становить 15° .

Критерієм правильної установки мікротомного ножа є отримання рівних зрізів заданої товщини.

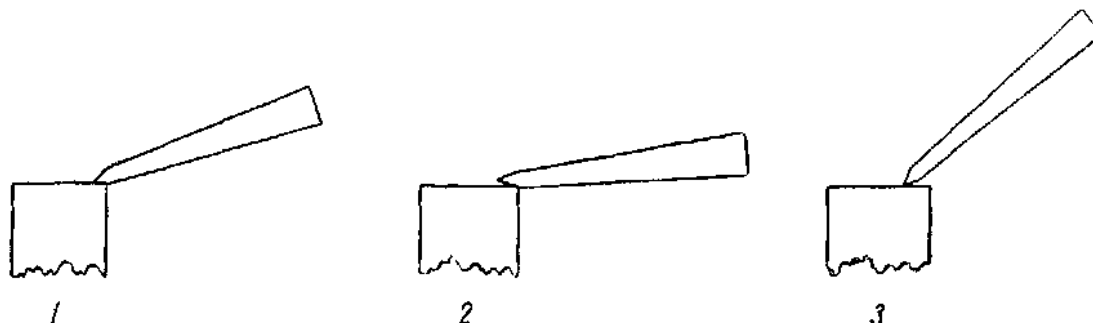


Рис. 11. Можливі положення мікротомного ножа під час роботи: 1 – правильне положення (кут різання 15°); 2 – неправильне положення (ніж підходить до блоку під кутом, який утворився площинами загострення і основою клину); 3 – неправильне положення (сильно крутий нахил ножа).

Для отримання тонких, без дефектів зрізів важливе значення має гострота ножа. Саме тому мікротомні ножі потрібно регулярно **загострювати і правити**. При використанні тупих ножів, ножів із зазублинами, отримані зрізи будуть мати багато дефектів.

Перед виготовленням зрізів ножі слід правити за допомогою паска з наждачною мастикою. Якщо ніж – затуплений і на ньому є зазублини, його необхідно загострювати.

Загострення мікротомних ножів умовно можна поділити на три етапи:

1. Ліквідація грубих дефектів леза.
2. Ретельне точіння.
3. Виправлення.

При наявності на лезі ножа глибоких зазублин їх необхідно ліквідувати шляхом точіння на спеціальному камені (мармур, граніт) або на скляній пластинці з наждачним порошком. Після цього ножі ретельно загострюють на цьому ж камені або на скляній пластинці, які вкривають алмазним порошком або пастою. Необхідно знати, що для загострення ножа на камені можна використовувати олію, керосин або воду.

Перед початком заточування на камені необхідно до стрижня ножа приєднати ручку, а на обух ножа марки «3» – надіти насадку, або так звану жолобоподібну напрямну (обушок) (рис. 12).

Необхідно знати, що загострення мікромомного ножа потрібно робити за допомогою одного і того ж самого «обушка».

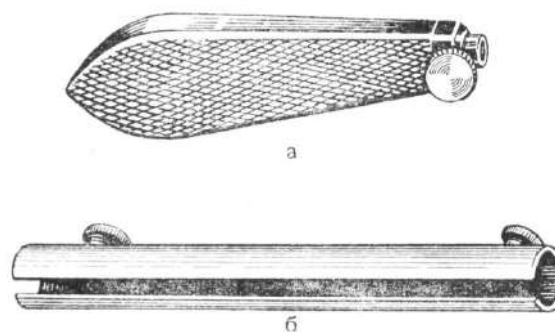


Рис. 12. Ручка (а) та обушок (б) для загострення мікромомного ножа.

При загостренні та правці мікромомних ножів марки «1» і «2» використовують дротяний напрямляч для загострення плоскої сторони.

Залежно від набутих навиків камінь загострення можна тримати в лівій руці або закріплювати на робочому столі.

Мікромомний ніж з ручкою беруть у праву руку і кладуть його усією площиною леза (ріжучою частиною вперед) на попередньо змазаний брусок каменя для загострення (рис. 13). Лезо ножа ведуть у косому напрямку, щоб по поверхні бруска провести всю довжину ножа. Потім ніж перевертають через спинку і ведуть аналогічно – тільки іншою стороною (рис. 14). Необхідно знати, що при загостренні ніж повинен вільно прилягати до поверхні бруска.

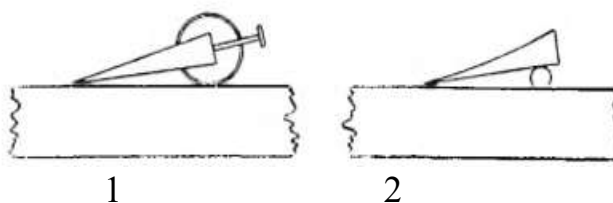


Рис. 13. Положення ножів на бруску для загострення: 1 – прямий ніж з жолобоподібним напрямлячем; 2 – плоско-увігнутий ніж із дротяним напрямлячем.

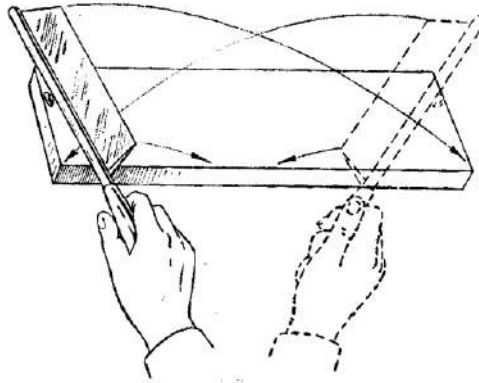


Рис. 14. Схема загострення мікротомного ножа

Якість загострення мікротомних ножів контролюють під мікроскопом при малому збільшенні.

Правку мікротомних ножів здійснюють на спеціальних каменях або за допомогою шкіряного паска із спеціальною пастою. Найчастіше для цього використовують зелену пасту ГОІ, яка є сумішшю оксиду хрому, парафіну, стеарину, олеїнової кислоти і керосину. На пасок наносять тоненький шар пасти, при правці ніж ведуть спинкою уперед. Повертання ножа на іншу сторону здійснюється через його спинку.

Для загострення і правки мікротомних ножів використовують також ряд спеціальних автоматичних приладів, технологія роботи та правила користування якими, викладені в інструкціях, що додаються до них.

Виготовлення зрізів на заморожувальному мікротомі

На цьому мікротомі, як було відмічено, готують зрізи із замороженого матеріалу, який може бути свіжий або зафіксований. Зафіксований матеріал попередньо промивають у воді.

Виготовлення зрізів із замороженого матеріалу має певні переваги над їх виготовленням із матеріалу, залитого в парафін або целоїдин.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

1. Швидкість виготовлення гістологічних препаратів у зв'язку з відсутністю потреби тривалої заливки матеріалу. Тому цю методику частіше застосовують при проведенні термінових досліджень.

2. На зрізах, виготовлених шляхом заморожування, можна вивчати ті ж самі речовини і структури, що і на зрізах виготовлених із матеріалу, залитого у парафін або целоїдин.

3. У зрізах виготовлених на заморожувальних мікротомах, не відбувається зморщування і денатурації тканин матеріалу.

4. На заморожувальних мікротомах можна отримати великі за прощеною зрізи.

Недоліки виготовлення зрізів на заморожувальних мікротомах.

1. Неможливість отримання тонких зрізів. Мінімальна товщина зрізів, які отримують на заморожувальних мікротомах становить 10 мкм.

2. Неможливо готувати серії зрізів.

3. Зрізи із замороженого матеріалу, який містить багато пухкої волокнистої тканини, приготувати не просто.

Зрізи виготовляють наступним чином. На поверхню столика для замороження кладуть вологу підкладку з фільтрувального паперу. Потім на неї наносять декілька крапель дистильованої води. В останню кладуть невеличкий шматочок матеріалу, з якого будуть виготовляти зрізи. Після заморожування матеріалу (3–4 хв) готують зрізи заданої товщини. Перші зрізи відкидають, а інші пензликом переносять у чашку Петрі, наповнену дистильованою водою, фізіологічним розчином або інкубаційним середовищем. Зрізи у воді розправляються. Попередньо, під дно чашки кладуть папір чорного кольору і етикетки. У деяких випадках зрізи наносять безпосередньо на знежирені предметні стекла.

Для приклеювання зрізів (якщо не ставлять реакцію на білки) на предметні стекла попередньо наносять тонкий шар суміші яєчного білка і гліцерину (1:1).

При виготовленні зрізів не допускається перемерзання матеріалу, тому що вони будуть крихкими. При недостатньому заморожуванні виготовлені зрізи також будуть неякісними.

Надзвичайно важливим для вивчення багатьох речовин є виготовлення зрізів із свіжозамороженого матеріалу за допомогою

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

мікротом-кріостату. На цьому апараті отримують зрізи товщиною 10–15 *мкм*, які не скручуються і щільно прилягають до предметного скла без застосування клейких речовин.

Із зрізів виготовлених на заморожувальному мікроскопі, готують гістологічні і гістохімічні препарати.

Виготовлення парафінових зрізів

Парафінові зрізи готують із матеріалу залитого у парафін. Для виготовлення зрізів використовують полозкові або ротаційні мікроскопи. Брусочок з блоком, якому попередньо була надана форма чотирикутної пірамідки із зрізаною вершиною, закріплюють у тримачі блока (об'єктотримачі). У спеціальний тримач вставляють і закріплюють мікроскопний ніж. Підбирають кути різання і нахилу ножа. Механізмом мікроподачі підіймають або опускають блок до поверхні ножа. Рухами мікроскопного ножа зрізають з вершини блока парафін до тих пір, поки в зрізи почне потрапляти матеріал. Після цього, за допомогою механізму мікроподачі, задають певну товщину зрізів і готують їх. Рух мікроскопного ножа повинен бути плавним і швидким. Якщо матеріал залитий якісно, правильно підібрані кути різання і нахилу мікроскопного ножа, лезо якого гостре, – то зрізи розташовуються на поверхні ножа у вигляді рівної стрічки (*рис. 15, а*).

При неправильному обрізанні блоку зрізи мають неправильні контури (*рис. 15, б, в*), а при наявності зазублин ножа – рвуться (*рис.15, г*). За допомогою полозкового мікроскопу можна отримати зрізи мінімальної товщини (1–2 *мкм*).

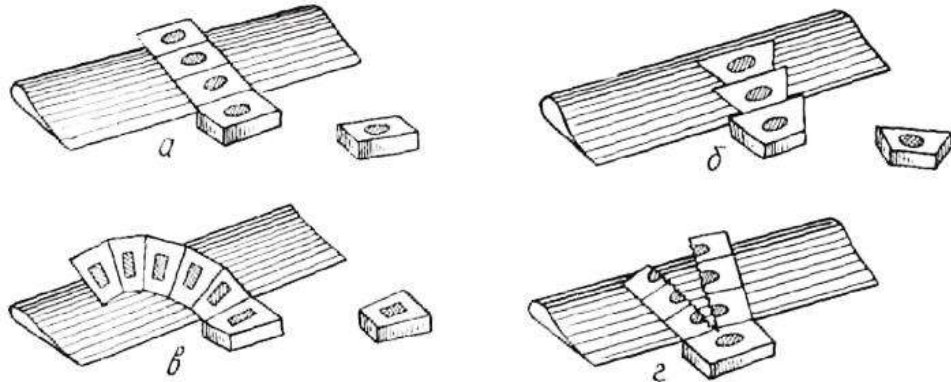


Рис. 15. Зразки отримання зрізів із парафінових блоків: а – зрізи у вигляді стрічки; б, в – зрізи з неправильними контурами; г – рвані зрізи.

При виготовленні зрізів можливі деякі похибки, які можна своєчасно виявити і ліквідувати (табл. 2).

Таблиця 2. Ймовірні похибки та їх ліквідація при виготовленні зрізів

Похибки при виготовленні зрізів	Причина недоброякісних зрізів
Зрізи кришаться	Об'єкт погано просочився парафіном; твердий парафін; великий кут нахилу мікромного ножа; низька температура навколишнього середовища; повільне охолодження парафіну при заливці
Зрізи сильно деформуються і погано розправляються	Досить висока температура навколишнього середовища; парафін дуже м'який
Матеріал погано ріжеться або зовсім не ріжеться	Сильне ущільнення матеріалу при фіксації і зневодненні
Зрізи скручуються	Висока температура навколишнього середовища; малий кут нахилу мікромного ножа; м'який парафін
Поперечний зріз матеріалу неоднорідний	Погане зневоднення

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

Отримані зрізи знімають з ножа м'яким пензликом або препарувальною голкою (не торкаючись ножа) і переносять у теплу (40°C) прокип'ячену воду поверхнею, яка прилягала до ножа. У теплій воді зрізи розправляються. Після чого їх переносять на предметні стекла.

Підготовка предметних стекел і нанесення на них зрізів

Предметні стекла миють у теплому мильному розчині, промивають дистильованою водою, висушують у термостаті та знежирюють у суміші етилового спирту й ефіру (1:1). У цій же суміші їх можна зберігати. Стекла, що вже використовувалися, попередньо витримують в органічних розчинниках.

Після обробки стекла виймають пінцетом, не торкаючись руками, і висушують при кімнатній температурі. Одну їхню поверхню покривають клейкою сумішшю (яєчний білок із гліцерином у співвідношенні 1:1). Перед приготуванням білок фільтрують: його збивають до піни та пропускають через зволожений дистильованою водою фільтрувальний папір впродовж 24 год. Для запобігання псуванню до суміші додають кристал тимолу або камфори. Невелику краплю клею на поверхню стекла та наносять скляною паличкою та рівномірно розподіляють пальцем, попередньо обробленим етиловим спиртом. Для закріплення білка, стекла 2–3 рази проводять над полум'ям спиртівки.

Для наклеювання парафінових зрізів на предметні стекла хороший ефект має така суміш: свіжа сироватка крові – 15 мл; дистильована вода 10 мл; 5 %-ий розчин формаліну – 6 мл. Після приготування суміш фільтрують.

Переносять зрізи на предметні скельця наступним чином (рис. 16). Один кінець скла занурюють під кутом у воду, під зріз. Обережно його підіймають. При цьому зріз залишається на склі. Під час цієї маніпуляції зріз притримують на поверхні скла препарувальною голкою, не торкаючись нею до матеріалу.

Тримаються добре зрізи і на предметних стеклах, які не вкриті клейкою речовиною. Для цього від них відбирають воду (промокають) фільтрувальним папером, складеним у декілька шарів.

Предметні скельця зі зрізами поміщають у термостат ($t^{\circ} +36^{\circ}\text{C}$) на 6 год.

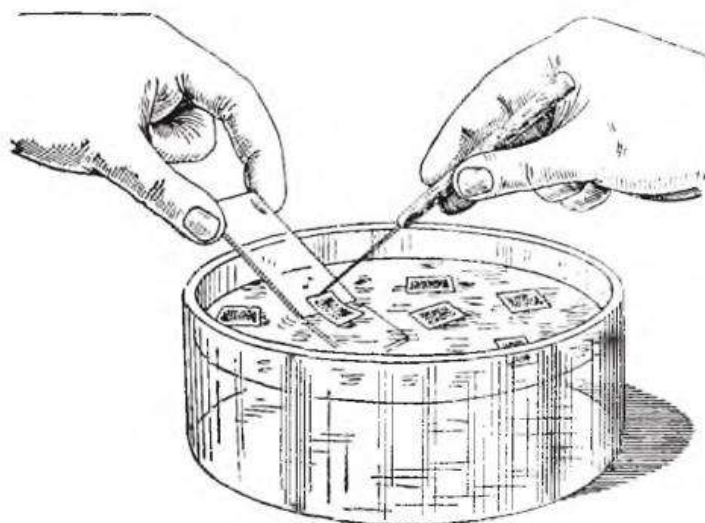


Рис. 16. Технологія перенесення парафінових зрізів з води на предметні стекла.

Для проведення окремих гістохімічних досліджень (виявлення глікогену, багатьох ферментів, мінеральних речовин) перебування зрізів у воді – небажане. Тому зрізи з мікромомного ножа відразу переносять на предметні стекла.

Методика нанесення парафінових зрізів на предметні стекла сухим способом

Цим методом користуються, коли заборонене змочування парафінових зрізів водою, наприклад, при виявленні глікогену за методом Бреста. Парафінові зрізи обережно переносять із мікромомного ножа на предметні стекла та розправляють пензликом і препарувальною голкою. Потім розгладжують м'яким пензликом, намагаючись усунути всі складки, і щільно притискають фільтрувальним папером, складеним у кілька шарів і змоченим 96% етиловим спиртом. Слід стежити, щоб під склом не залишалося повітряних бульбашок. Після цього стекла обережно нагрівають над полум'ям спиртівки, не доводячи парафін до розплавлення. Зрізи, нанесені таким способом, можна одразу без спеціального попереднього висушування, піддавати подальшій обробці. Недоліком методу є те, що тонкі зрізи легко ушкоджуються і важко розправляються.

Методика нанесення парафінових зрізів на предметні стекла за допомогою нагрітого міцного спирту

Отримані зрізи з мікротомного ножа обережно переносять у чашку Петрі, наповнену 60–70–80⁰ етиловим спиртом, нагрітим до температури 45–50⁰ С. Парафінові зрізи можна переносити у посуд із холодним спиртом, який потім із зібраними у ньому зрізами ставлять у термостат за температури 45–50⁰ С і залишають там до моменту розправлення зрізів. Посуд зі спиртом повинен бути прикритий кришкою. Не можна користуватися для збирання парафінових зрізів 90–96⁰ спиртом, тому що вони у ньому легко тонуть. Розправлені зрізи поміщають на предметні стекла, попередньо змазані білком з гліцерином, даючи можливість стекти спирту. Підсушують зрізи на предметних стеклах складеним у 3–4 шари фільтрувальним папером і висушують у термостаті за температури 37–40⁰ С.

Виготовлення целоїдинових зрізів та видалення з них целоїдину

Целоїдинові зрізи готують із залитого матеріалу на полозкових і ротаційних мікротомах. Методика їх виготовлення така ж, як і парафінових зрізів. При цьому є і певні особливості.

Ніж та матеріал регулярно змочують 70⁰ етиловим спиртом за допомогою м'якого пензлика. При необхідності зрізи на лезі ножа розправляють легким натиском пензлика. Розправлені зрізи поміщають у чашку Петрі, заповнену 70⁰ етиловим спиртом. У деяких випадках для нормального розправлення зрізи можна перенести із 70⁰ етилового спирту у дистильовану воду, де вони вирівнюються внаслідок різкої зміни поверхневого натягу. Для монтування зрізів на предметні стекла та видалення целоїдину **О.І. Кононський** (1976) рекомендує методику Рубашкіна-Максимова:

1. Предметні стекла споліскують у 96⁰ етиловому спирті.
2. Наносять на стекла тоненький шар білка-гліцерину.
3. Переносять зрізи із чашки Петрі на стекла.

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

4. Швидко підсушують їх фільтрувальним папером.
 5. На зріз наносять декілька крапель 96⁰ етилового спирту і через 2–3 хв підсушують фільтрувальним папером.
 6. Зрізи заливають олією гвоздики або її замінниками на 5–20 хв до повного розчинення целоїдину.
 7. Розчин зливають, а зрізи підсушують за допомогою фільтрувального паперу.
 8. На кожний зріз наносять кілька разів по 2–3 краплі 96⁰, а потім абсолютного етилового спирту.
 9. Поміщають зрізи на 10 хв у суміш 96⁰ етилового спирту з ефіром (1:1).
 10. Проводять їх через спирти знижуючої міцності (абсолютний, 96⁰ та 70⁰).
 11. Підсушують зрізи фільтрувальним папером.
 12. Промивають їх у воді 5–10 хв і проводять відповідну гістохімічну реакцію або проводять гістологічні дослідження.
- У гістологічній та гістохімічній практиці часто використовують целоїдинові зрізи без нанесення їх на предметні стекла, так як сам целоїдин має властивості клею. При цьому здійснюють наступні дії:
1. Целоїдинові зрізи м'яким пензликом, змоченим у етиловому спирті, переносять у 70⁰ етиловий спирт.
 2. Зрізи переносять у 50⁰ етиловий спирт.
 3. Після видалення целоїдину в спиртах зрізи переносять у дистильовану воду.
 4. Після промивання у воді на зрізах проводять відповідні гістохімічні реакції або гістологічні дослідження.

Виготовлення целоїдин-парафінових зрізів

Методика виготовлення зрізів із матеріалу, залитого в целоїдин-парафін, аналогічна парафіновій. При цьому мікротомний ніж та блок для нарізання зрізів змочують 30⁰ етиловим спиртом (м'яким пензликом). Виготовлені зрізи поміщають на предметні стекла за допомогою пензлика, змоченого спиртом. Стекла попереднього змащують кількома краплями суміші білка і гліцерину. Зрізи розправляються при температурі 50–60⁰ С, після чого їх витримують у термостаті при температурі 37⁰ С впродовж однієї доби.

Виготовлення желатинових зрізів

Виготовляють зрізи на заморожувальному або полозковому мікротомах. Технологія виготовлення на полозковому мікротомі відбувається у кілька етапів:

1. Желатиновий блок приклеюють до дерев'яного брусочка густим 25 %-им розчином желатину.
2. Переносять блок у 25 %-ий розчин формаліну на 12–24 год. для ущільнення.
3. Закріплюють блок в об'єктотримачі.
4. Виготовляють зрізи.
5. М'яким пензликом зрізи переносять у 30⁰ етиловий спирт.
6. Зрізи наносять на підготовлені предметні стекла.
7. Підсушують їх фільтрувальним папером.
8. Висушують їх у термостаті при температурі +37⁰ С упродовж 10–20 хв.
9. Промивають висушені зрізи у теплій воді при температурі +37⁰ С.
10. Ставлять відповідну гістохімічну реакцію або проводять гістологічні дослідження.

Фарбування зрізів

Метою фарбування зрізів для гістологічних досліджень є диференціація в них структур клітин і тканин, які мають здатність сприймати певні барвники (зафарбовуватись у певний колір). Зафарбовані структури чітко виділяються при світловій мікроскопії. Якість фарбування залежить від якості барвника, фізико-хімічних властивостей об'єкта дослідження і його попередньої підготовки до фарбування.

Перед фарбуванням зрізів, виготовлених із матеріалу, який був ущільнений парафіном або целоїдином, їх необхідно видалити із зрізів. Для цього використовують розчинники для парафіну та целоїдину (ксилол, хлороформ, бензол, тощо). Один із розчинників наливають в скляну баночку (50–100 мл) і занурюють в нього кінець предметного скла із зрізом на 1–2 хв, після цього предметне скло із зрізом послідовно переносять у баночки із 70⁰ і 96⁰ спиртами на 1–2 хв для видалення розчинника. Залежно від методу фарбування, характеру

розчину барвника (водний, спиртовий) предметні стекла із зрізами промивають у дистильованій воді або безпосередньо фарбують.

Процес фарбування гістологічних об'єктів може відбуватися внаслідок адсорбції барвників тканинами, і взаємодії барвників і тканин (хімічні реакції), а також внаслідок адсорбції і взаємодії барвників і тканин.

Характеристика барвників

Для фарбування гістологічних зрізів застосовують різні барвники, які за походженням поділяють на **натуральні** та **штучні (синтетичні)**. Натуральні барвники можуть бути рослинного походження (наприклад, гематоксилін) або тваринного походження (наприклад, кармін). Залежно від здатності певних структур тканин сприймати барвники, їх поділяють на основні (ядерні), кислі (цитоплазматичні), нейтральні та індиферентні.

Основні (ядерні) барвники – основи або їхні солі, що фарбують структури з кислотними залишками нуклеїнових та інших кислот. Здатність тканин до сприйняття таких барвників називають **базофілією**.

Кислі (цитоплазматичні) барвники – кислоти або їхні солі, що фарбують структури клітин і міжклітинної речовини, які містять основи. Такі структури називають **ацидофільними** або **оксифільними**.

Нейтральні барвники – суміші основних і кислих барвників. Приклади: фарба Романовського-Гімзи, Нейтральрот та інші.

Індиферентні барвники – розчиняються лише в певних середовищах і дозволяють виявляти специфічні речовини. Приклади: судани, шарлахром.

Барвники також класифікують за **хімічною будовою**, наприклад: азобарвники, хінонімідні та інші.

Основні барвники

У гістологічній практиці найбільш часто використовують основні барвники: гематоксилін, кармін та анілінові (метиленава

синька, тіонін, толуїдиновий блакитний, метиловий зелений, основний фуксин, метиловий фіолетовий та інші).

Гематоксилін – найбільш поширений барвник. Його виготовляють із ефірного екстракту кампешевого (сандалового, фіалкового) дерева. У реалізацію гематоксилін надходить у вигляді кристалічного порошку бурого кольору. Він добре розчиняється у спирті і погано у воді. Фарбуючою речовиною гематоксиліну є продукт його окиснення – гематеїн. Процес окиснення гематоксиліну в гістологічній практиці називають дозріванням. Цей процес триває 2–4 тижні і більше. У реалізації є і готовий гематеїн. Виготовлені на його основі фарби не потребують дозрівання. На основі гематоксиліну виготовляють наступні гематоксилінові фарби: Ерліха, Бомера Делафільда, Ганзена, Майера, Караці, Вейгерта, Генденгайма та інші.

Гематоксилін Ерліха готують наступним чином. У скляну банку з широкою горловиною наливають 100 мл 96⁰ або абсолютного спирту, в якому розчиняють 2 г гематоксиліну. До розчину додають 100 мл дистильованої води, 100 мл гліцерину, 10 мл льодяної оцтової кислоти і 3 г алюмо-калієвих галунів. Горловину банки обв'язують марлею і ставлять банку на світло (на підвіконня) для дозрівання гематоксиліну (1–3 міс). Фарба з дозрілим гематоксиліном має червоно-фіолетовий колір. Після дозрівання фарбу зберігають у закритому посуді, а перед застосуванням фільтрують. Зрізи фарбують у гематоксиліні Ерліха впродовж 3–15 хв.

Гематоксилін Бомера готують наступним чином. Беруть 40 г простих алюмо-калієвих або алюмо-аміачних галунів і розчиняють їх при нагріванні в 400 мл дистильованої води. Після охолодження розчин фільтрують у скляну банку з широкою горловиною. До профільтрованого розчину додають 20 мл 10 %-го спиртового розчину гематоксиліну (на 96⁰ етиловому спирті) і горловину банки обв'язують марлею. Дозріває ця фарба 2–3 тижні, при цьому її колір змінюється від блідо- до темно-фіолетового. Дозрілу фарбу фільтрують, а для запобігання утворенню цвілі додають кілька кристаликів тиміну або камфори. Забарвлюються зрізи цією фарбою впродовж 5–10 хв.

Гематоксилін Делафільда має кращі фарбуючі властивості, ніж Гематоксилін Бомера. Його готують таким чином. При нагріванні, в 400 мл дистильованої води розчиняють 60 г алюмо-аміачних галунів. Після охолодження розчин фільтрують у скляну банку з широкою

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

горловиною і додають до нього 40 мл 10 %-го спиртового розчину гематоксиліну (на 96⁰ спирті). Горловину банки обв'язують марлею і ставлять банку на світло для дозрівання гематоксиліну. Через чотири доби фарбу фільтрують і додають до неї 100 мл гліцерину та 100 мл метилового спирту. Останній можна замінити 96⁰ етиловим спиртом. Фарбу знову залишають на світлі впродовж 3–4 діб, після чого її знову фільтрують.

Гематоксилін Делафільда набуває високих фарбувальних властивостей через 1–2 місяці після приготування. Перед фарбуванням його обов'язково фільтрують. Фарбують зрізи у гематоксиліні Делафільда протягом 3–10 хв.

Гематоксилін Ганзена не потребує дозрівання, так як при його приготуванні добавляють окиснювач.

Спосіб його приготування. До 200 мл свіжого гематоксиліну Бомера додають 3 мл 5 %-го водного розчину марганцевокислого калію. Отриманий розчин нагрівають до кипіння і швидко охолоджують у холодній воді (у фарфоровому посуді). Гематоксилін Ганзена готують не більше чим на 6 місяців. Перед фарбуванням його фільтрують. Зрізи забарвлюють цим гематоксиліном протягом 2–3 хв.

Гематоксилін Майера готують наступним чином. У 1 л дистильованої води розчиняють 1 г гематоксиліну, 0,2 г йодату натрію та 50 г калієвих галунів. До розчину додають 50 г хлоралгідрату і 1 г лимонної кислоти. Приготовлена фарба не потребує дозрівання і зберігається тривалий час. Щоб запобігти утворенню у ній цвілі, в неї додають декілька кристаликів тимолу або камфори. Термін фарбування зрізів – 10–20 хв.

Гематоксилін Караці також не потребує дозрівання. С.С. Вайль рекомендує наступний пропис виготовлення цієї фарби. У 100 мл дистильованої води розчиняють 5 г калієвих галунів, 2–3 кристалики йодноватистого калію і 0,1 г гематоксиліну. В розчин добавляють 25 мл гліцерину. Перед фарбуванням гематоксилін Караці фільтрують. Термін фарбування зрізів у ньому 5–20 хв.

Гематоксилін Вейгерта готують з двох розчинів (Вейгерт I та Вейгерт II) безпосередньо перед використанням. Це пов'язано з тим, що готова фарба, в зв'язку з наявністю у ній сильних окиснювачів, швидко псується. Розчин *Вейгерта I* – це 1 %-ий розчин гематоксиліну в 96⁰ етиловому спирті. *Розчин Вейгерта II* готують

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

наступним чином. До 95 мл дистильованої води додають 4 мл офіціального розчину півторахлористого заліза (офіціальный розчин півторахлористого заліза – це 50 %-ий розчин водного хлорного заліза) і 1 мл хлористоводневої (соляної) кислоти. Цей розчин можна використовувати 3–4 місяці. Перед фарбуванням розчини змішують (1:1). Отримана фарба має темно-фіолетовий колір та інтенсивно забарвлює зрізи впродовж 3–5 хв.

Гематоксилін Гейденгайма (залізний) передбачає виготовлення двох розчинів. *Перший розчин* – це 3 %-ий водний розчин залізних галунів (протрава). *Другий розчин* готують, розчиняючи в 10 мл 96⁰ етилового спирту 0,5 г гематоксиліну. До цього розчину додають 90 мл дистильованої води. Другий розчин повинен дозріти протягом 1 місяця. Перед фарбуванням його розводять дистильованою водою (1:1).

Гематоксилінові фарби забарвлюють структури клітин і тканин (базофільні) у синьо-фіолетовий колір. При цьому часто спостерігається дифузне забарвлення й інших структур (не базофільних). Для його виведення користуються спеціальними розчинами. А сам процес виведення називається *диференціюванням*. В якості диференціюючої речовини найчастіше використовують 1 %-ий розчин хлористоводневої кислоти або хлористоводневого етилового спирту. Термін диференціювання 3–30 сек. Після диференціювання зафарбовані зрізи промивають у підключеній дистильованій воді. Для цього у воду додають декілька крапель нашатирю.

Кармін отримують із жирового тіла і яєчного жовтка комах кошенілі. Це кристалічний порошок червоного кольору, який не розчиняється в ефірі та етиловому спирті. У воді кармін розчиняється тільки після додавання в неї калійних галунів або сірчанокислого алюмінію. Кармін фарбує ядра клітин, гіаліновий хрящ, слиз, тощо. Його також використовують для виявлення глікогену.

Для забарвлення ядер використовують наступні фарби на основі карміну:

1. Галуновий кармін Гренахера. У 100 мл дистильованої води розчиняють 5 г калійних або аміачних галунів. До отриманого розчину додають 1 г карміну і кип'ятять 20 хв. Після охолодження розчин фільтрують і для попередження утворення цвілі до нього додають декілька кристаликів тимолу або камфори. Зрізи фарбують у

цьому карміні 5–20 хв і диференціюють їх у 1 %-му розчині хлористоводневої кислоти. Після диференціювання зрізи промивають у воді.

2. Літієвий кармін Орта. До 100 мл насиченого водного розчину калію вуглекислого додають 2,5 г карміну і кип'ятять. Охолоджений розчин фільтрують. Тривалість фарбування зрізів у карміні Орта від 10–15 до 30 хв. Після фарбування зрізи піддають диференціюванню у 1 %-му розчині хлористоводневої кислоти.

Кармін фарбує ядра в червоний колір.

Анілінові барвники у вигляді розчинів використовують переважно для фарбування ядер клітин. Після фарбування зрізи диференціюють у 1 %-му розчині хлористоводневої кислоти.

Кислі барвники

Серед кислих барвників найбільш часто в гістологічній практиці використовують еозин, фуксин кислий, пікринову кислоту.

Еозин об'єднує групу синтетичних барвників, які отримують внаслідок бромовання (йодування для еритрозину) флюоресцину. В реалізацію він поступає у вигляді порошка червоного кольору, який добре розчиняється у воді і етиловому спирті. Реалізується еозин різних марок і назв: «еозин натрію», «еозин калію», «еозин екстра В», та інші. Для фарбування використовують 0,1 – 1 % водні або спиртові розчини еозину. Спиртові розчини готують на 40⁰–96⁰ етиловому спирті. Тривалість забарвлення зрізів еозином залежить від концентрації його розчинів і коливається від 5 сек до 2–3 хв. Після забарвлення зрізи промивають у воді.

Еозин фарбує цитоплазму клітин у червоний колір різних відтінків. Його застосовують для фарбування зрізів разом з гематоксиліном.

Фуксин – це аніліновий барвник. Розрізняють основний і кислий фуксин.

Кислий фуксин – це порошок темно-синього кольору, який добре розчиняється у воді. Його використовують для фарбування зрізів замість еозину. Для фарбування застосовують 1 %-ий водний розчин кислого фуксину. У гістологічній практиці кислий фуксин часто використовують для фарбування зрізів разом з іншими барвниками.

Пікринова кислота – кристалічна речовина жовтого кольору, яка розчиняється у воді та етиловому спирті. Для фарбування використовують слабкі водні розчини пікринової кислоти. Термін фарбування – 2–3 хв.

Частіше пікринову кислоту використовують для приготування пікрофуксину. Останній застосовують для фарбування за Ван Гізоном. Пікрофуксин готують наступним чином. У 100 мл дистильованої води розчиняють 1,2 г пікринової кислоти. До цього розчину додають 10 мл 1 %-го водного розчину кислого фуксину.

Нейтральні барвники

Фарба Романовського-Гімзи надходить у реалізацію у готовому стані. Використовують її для фарбування мазків крові. Перед фарбуванням розводять – 1–2 краплі фарби в 1 мл дистильованої води.

Нейтральрот (нейтральний червоний) – порошок чорно-зеленого кольору, який легко розчиняється у воді. Зафарбовує у червоний колір ядра клітин, речовину Ніссля, лімфоцити, плазматичні клітини, глікозаміноглікани та інше.

Індиферентні барвники

Судани – група барвників, які розчиняються у жирах, ацетоні та спиртах. Використовують їх для виявлення жирів і жироподібних речовин. Судани є червоні (судан III, судан IV) і чорні (судан чорний V). Реалізують їх у вигляді порошку.

Шарлахрот використовується також для виявлення жирів. Це порошок буро-червоного кольору, який розчиняється у спиртах, хлороформі, нейтральних жирах, жирних кислотах і в рідкому та розплавленому парафіні.

Технологія фарбування

Фарбувати зрізи на предметних стеклах можна шляхом їх перенесення у фарбу (фарби) або шляхом нанесення фарби на них. У першому випадку фарбу наливають у широкі скляні ємності невеликої висоти. Для фарбування зрізів шляхом нанесення барвника на зріз використовують кювети, ексикатори і скляні палички. На ексикатор

(кювет) кладуть паралельно скляні палички, кінці яких з'єднують гумовими трубками. На паличках розміщують предметні стекла із зрізами (рис. 17).

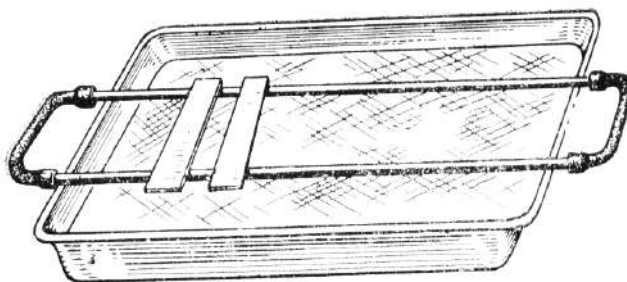


Рис. 17. Пристосування для розміщення гістозрізів для фарбування їх шляхом нанесення барвника на зріз.

Після цього на зріз за допомогою піпетки наносять краплями фарбу. Якщо фарбування потребує тривалого часу, то для запобігання випаровування фарби, ділянку розміщення зрізу накривають чашечкою. Подібний ефект можна отримати, помістивши ці предметні скельця у чашку Петрі із змоченою у воді ватою. В чашці відбувається зволоження повітря, і це зменшує випаровування фарби. Фарбування вільно плаваючих зрізів, як і за попередньої підготовки, здійснюють у бюксах.

Після фарбування зрізи промивають у воді та зневоднюють в етиловому спирті зростаючої міцності (70⁰, 96⁰, абсолютний). У кожній порції зрізи витримують 1–2 хв. Зневоднені зрізи просвітляють у ксилолі (2–3 хв) і переносять на 1–2 хв у карбол-ксилол. Останній запобігає загниванню зрізів. Його готують, додаючи у 100 мл ксилолу кілька кристалів карболової кислоти. Після цього залишки ксилолу з предметного скла видаляють фільтрувальним папером, і зрізи заключають (поміщають) у прозоре середовище, що твердне.

Заведення зрізів

Заведення зрізів у середовище є кінцевим етапом виготовлення постійного гістологічного препарату. Мета його – зберігання гістопрепаратів у доступному для мікроскопії вигляді. У гістологічній практиці для заведення зрізів використовують бальзам, полістирол,

гліцерин-желатин, гліцерин та інші. Вибір середовищ визначається багатьма чинниками – властивістю речовин, які вивчаються, та методами гістологічних та гістохімічних досліджень.

Заведення зрізів у бальзам

Бальзам – це затверділа смола хвойних дерев, яка добре розчиняється в органічних розчинниках, зокрема ксилолі, толуолі та бензолі. У гістології найчастіше застосовують канадський, ялицевий і сибірський кедровий бальзами. Найпоширенішим є канадський бальзам, оскільки він добре просвітлює зрізи, є прозорим, має показник заломлення світла, близький до скла, і швидко висихає.

Готують бальзам так: його шматочки поміщають у скляний посуд і заливають розчинником (найкраще ксиололом) так, щоб він лише покривав матеріал. Розчинення відбувається при кімнатній температурі впродовж кількох діб. Щоб прискорити процес, посуд ставлять у термостат із температурою приблизно +37–40 °С.

Після повного розчинення регулюють густину, додаючи розчинник або даючи йому частково випаруватися. Оптимальна консистенція повинна нагадувати рідкий мед.

Краплю бальзаму наносять на край зрізу і в неї під гострим кутом до поверхні предметного скла ставлять край накривного скельця. Останнє тримають за краї великим і вказівним пальцями руки. Повільно, за допомогою препарувальної голки, опускають накривне скельце на краплю бальзаму, яка рівномірно розподіляється між зрізом і скельцем, прикріплюючи останнє до зрізу і предметного скла (*рис. 18*). При виконанні цієї операції, яка потребує відповідних навиків, слідкують, щоб під накривне скельце (у бальзам) не потрапило повітря, пухирці якого видні під світловим мікроскопом (*рис. 19*). Для видалення пухирців повітря на накривне скельце кладуть важки.

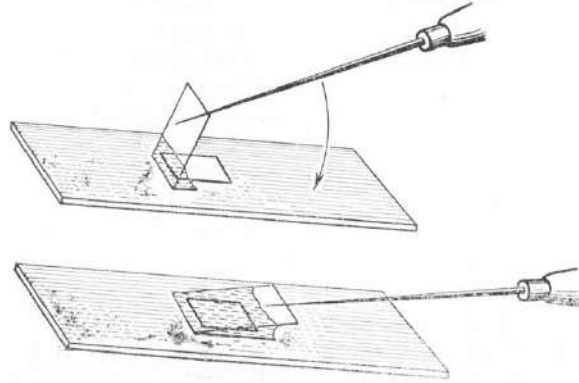


Рис. 18. Заведення гістологічних зрізів.

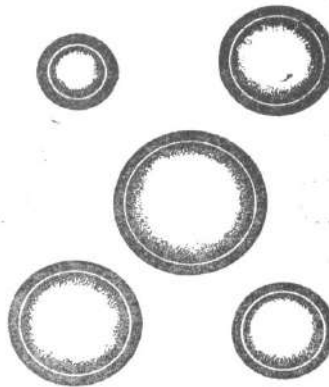


Рис. 19. Пухирці повітря у полі зору мікроскопа.

Заведення зрізів у полістирол

Для виготовлення полістиролу використовують прозорі шматочки пластмаси, які добре розчиняються в органічних розчинниках (ксилолі, толуолі, бензолі). Готують 30 %-ий розчин полістиролу у ксилолі (толуолі). Зберігають його в посудині з притертим корком. Якщо розчин полістиролу набуває густої консистенції, до нього додають невелику кількість ксилолу (толуолу). Для того, щоб плівка на зрізах була міцною і еластичною, у розчин додають пластифікатор – дибутилсебацинат. Методика заведення

Технологія виготовлення гістологічних препаратів

зрізів наступна. На зріз наносять за допомогою скляної палички краплю полістиролу, яка рівномірно розподіляється на його поверхні. Через 30–40 хв полістирол застигає. При заведенні зрізів у полістирол слідкують щоб в нього не потрапляли домішки пилу.

Заведення зрізів у гліцерин-желатин

Гліцерин-желатин застосовують для заведення зрізів у тих випадках, коли речовини, які виявляють при гістохімічних дослідженнях, розчиняються в органічних розчинниках при зневодненні і просвітленні (ліпіди, ферменти, тощо).

Для приготування гліцерин-желатину беруть одну частину харчового желатину, дрібно його нарізають і заливають шістьма частинами дистильованої води і залишають на 1–2 год для набухання. Потім додають 5–6 частин гліцерину, 0,1 частину кристалічної карболової кислоти і розчиняють суміш при нагріванні (на водяній бані), постійно перемішуючи і не доводячи до кипіння. Після охолодження гліцерин-желатин застигає. Для заведення зрізів його кожний раз підігрівають до розплавлення (+30–35° С). Технологія заведення така ж, як і технологія заведення у бальзам.

Заведення зрізів у гліцерин

Гліцерин використовують відразу після монтування зрізів на предметні стекла, пропускаючи етапи зневоднення і просвітлення.

Гліцерин має властивість змішуватися з водою у будь-якому співвідношенні. Щоб максимально зберегти не ушкодженими мікроструктури тканин, зрізи спочатку обробляють сумішшю, яка складається із однакових частин гліцерину і дистильованої води (1:1). Потім зрізи переносять у концентрований розчин гліцерину у воді (2:1), а тоді вже поміщають у чистий гліцерин. Зрізи накривають накривними скельцями, а залишок гліцерину видаляють за допомогою фільтрувального паперу.

МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ ЗРІЗІВ ДЛЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Загальні методи фарбування

Загальні методи фарбування зрізів використовують для виготовлення оглядових гістопрепаратів. На останніх вивчають мікроскопічну будову органів і тканин у нормі та при патології. Серед загальних методів фарбування гістозрізів найчастіше використовують методи фарбування їх гематоксиліном та еозином і за Ван-Гізеном.

Фарбування целоїдинових і заморожених зрізів гематоксиліном та еозином

Для фарбування цих зрізів найбільш часто використовують гематоксилін Еріха, Бомера або Караці, спиртовий або водний розчин еозину. Виготовлені зрізи наклеюють на предметні стекла. Їх також можна фарбувати в чашечках. Заморожені зрізи перед фарбуванням необхідно знежирити. Для знежирення використовують 96⁰ етиловий спирт або карбол-ксілол. Термін знежирення у спирті триває від 20 хв до однієї доби (чим довше тим краще). Знежирення в карбол-ксілолі відбувається значно швидше. Для цього зрізи поміщають на 2–3 хв у 96⁰ етиловий спирт. Після цього їх переносять у карбол-ксілол (1 частина розплавленої кристалічної карболової кислоти на 4–5 частин ксілола) на 30 сек до просвітлення. В подальшому зрізи знову поміщають на 2–3 хв у 96⁰ етиловий спирт, а потім – у дистильовану воду.

Целоїдинові зрізи звільняють від ущільнюючого середовища (целоїдину). Для цього їх поміщають у ксілол на 2–3 хв, проводять через 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (по 2 хв у кожному) і поміщають у дистильовану воду.

Методика фарбування:

1. Предметні стекла із зрізами переносять з води у гематоксилін на 0,5–5 хв. Термін фарбування залежить від якості та зрілості гематоксиліну.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

2. Промивають зрізи у водопровідній воді до тих пір, поки з них перестане відходити гематоксилін (2–5 хв). При цьому воду бажано два рази змінити.

3. При необхідності (перифарбування гематоксиліном) зрізи диференціюють до тих пір, поки вони не набудуть червонуватого кольору (3–30 сек).

4. Переносять зрізи на 2–5 хв у водопровідну воду. В останній вони змінюють колір на синій.

5. Зрізи поміщають у 0,5–1 %-ий розчин еозину на 1–2 хв.

6. Промивають зрізи у дистильованій воді 0,5–1 хв.

7. Зневоднюють зрізи в етиловому спирті зростаючої міцності (70⁰, 96⁰). У кожній порції спирту витримують 1–2 хв.

8. Просвітлюють зрізи в карбол-ксилолі (2–3 хв) і заводять у бальзам.

Результати фарбування. Ядра клітин зафарбовані в синій колір, а цитоплазма – в рожево-червоний.

Фарбування парафінових зрізів гематоксиліном та еозином

Після виготовлення зрізів їх наклеюють на предметні стекла. Зрізи можна фарбувати і в чашечках. Для фарбування переважно використовують гематоксилін Караці і водний розчин еозину.

Методика фарбування:

1. Зрізи депарафінують у ксилолі (2–3 хв), переносять на 2 хв у спирти послідовно зниженої міцності (96⁰ та 70⁰) і поміщають у дистильовану воду на 2–3 хв.

2. Зрізи переносять у гематоксилін Караці на 5–15 хв.

3. Споліскують їх у дистильованій воді (1–3 сек).

4. Переносять зрізи у водопровідну воду на 5–10 хв.

5. При необхідності зрізи диференціюють (3–5 сек).

6. Зрізи переносять у 0,1 %-ий водний розчин еозину на 0,5–2 хв.

7. Швидко споліскують їх у дистильованій воді.

8. Зневоднюють зрізи в спиртах зростаючої міцності (70⁰, 96⁰). У кожній порції їх витримують 1–2 хв.

9. Просвітлюють зрізи в карбол-ксилолі (2–3 хв).

10. Заводять зрізи в бальзам.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Результати фарбування. Ядра клітин зафарбовані в синій колір, а цитоплазма – в рожево-червоний.

Фарбування зрізів за Ван-Гізоном

Цим методом фарбують парафінові і целоїдинові зрізи на предметних стеклах. Фарбування товстих заморожених зрізів не завжди приводить до бажаних результатів. Для фарбування використовують гематоксилін Вейгерта і пікрофуксин. Фарбування краще проводити шляхом нанесення барвників на зріз.

Методика фарбування:

1. Зрізи звільняють від ущільнюючого середовища (целоїдин, парафін) у ксилолі (2–3 хв).
2. Переносять зрізи в 96⁰ етиловий спирт, затим у 70⁰ (по 2–3 хв у кожному).
3. Промивають зрізи у водопровідній воді 2 хв.
4. На зрізи наносять щойно виготовлений гематоксилін Вейгерта (на 2–5 хв).
5. Промивають зрізи у двох порціях водопровідної води.
6. На зрізи наносять щойно приготовлений пікрофуксин (на 2–3 хв).
7. Швидко споліскують зрізи у дистильованій воді.
8. Зневоднюють зрізи у двох порціях 96⁰ етилового спирту (по 1–2 хв у кожній порції).
9. Просвітлюють зрізи в карбол-ксилолі (2–3 хв).
10. Заводять зрізи в бальзам.

Результати фарбування. Ядра клітин забарвлені в чорний колір, а цитоплазма – в жовтий. Колагенові волокна мають червоний колір, а еластичні – жовтий. М'язова тканина забарвлена в жовтий колір, а нервова – в жовтувато-сірий.

При фарбуванні за Ван-Гізоном можна проводити і диференціювання зрізів при перефарбовуванні їх гематоксиліном Вейгерта таким же чином, як і при забарвленні гематоксиліном та еозином.

Для фарбування за Ван-Гізоном, як виняток, можна використовувати гематоксилін Ерліха, Делафільда. При цьому для

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

отримання хороших результатів необхідно дотримуватись наступних вимог:

1. Гематоксилін Ерліха, Делафільда повинен бути достатньо «дозрілим», не менше 5–6 місяців.
2. Зрізи потрібно витримувати у розчині барвника впродовж 10–20 хв.
3. Після забарвлення зрізи ретельно промивають у воді.

Спеціальні методи фарбування

Спеціальні методи фарбування зрізів використовують для диференціації у них окремих тканин (м'язової, нервової) і волокон (колагенових, еластичних, ретикулярних) волокнистої сполучної тканини.

Фарбування колагенових волокон

Найбільш поширеними методами, які застосовують у гістологічній практиці для фарбування колагенових волокон, є методи за Ван-Гізоном, Маллорі, Масоном та фарбування азокарміном за Гейдейгайном.

Для фіксації матеріалу використовують переважно хромосулемові рідини (рідину Ценкера та Ценкер-формол), рідше формалін.

Для фарбування за названими методами придатні будь-які зрізи, але найкращі – парафінові, товщиною 5–10 мкм. Фарбувати зрізи можна на предметних стеклах або в чашечках.

Фарбування за методом Маллорі

Для фарбування за цим методом у якості барвника використовують розчинні у воді препарати анілінового синього у комбінації з кислим фуксином та препаратом оранж G.

Аніліновий синій (Anilinblau) – фенілпрозанілін – не розчинний у воді та розчинний у спирті барвник. У гістологічній техніці застосовують, головним чином, препарати анілінового синього, розчинені у воді шляхом їх сульфуровання. У торговельну мережу барвник надходить у вигляді солей натрію, амонію або кальцію під

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

різними назвами (Alkaliblau, Wasserblau, Methylblau, Chinablu, Bleu de Lyon).

Методика фарбування:

1. Зрізи поміщають на 2–3 хв у ксилол.
2. Проводять їх через 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (у кожній порції по 2 хв).
3. Переносять зрізи у дистильовану воду на 2–3 хв.
4. Фарбують зрізи 0,1 %-им водним розчином кислого фуксину впродовж 2–3 хв.
5. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді. Якщо барвник наносили на зріз, то його тільки зливають.
6. Для фіксації фуксину зрізи переносять у 1 %-ий водний розчин фосфорно-молібденової кислоти на 2–5 хв. Якщо зрізи фарбують у чашечках, їх переносять у цей розчин користуючись тільки скляними голками.
7. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.
8. Фарбують зрізи у щойновиготовленому розчині наступного складу:

Аніліновий синій (водорозчинний) – 0,5 г,
Оранж G – 2 г,
Щавелева кислота (кристалізована) – 2 г,
Дистильована вода – 100 мл.

Виготовлений розчин нагрівають до кипіння, охолоджують і фільтрують. Термін фарбування зрізів – 1–2 хв.

9. Промивають зрізи у дистильованій воді впродовж 0,5–1 хв.
10. Диференціюють їх у 96⁰ спирті 3–5 хв і більше, контролюючи при цьому за допомогою мікроскопа появу в них волокнистих структур (колагенові волокна).
11. Проводять зрізи через абсолютний спирт (2 хв), просвітлюють у ксилолі або карбол-ксилолі (2 хв) та заводять у бальзам.

Результати фарбування: колагенові волокна забарвлені в темно-синій колір; ядра, еритроцити та еластичні волокна – в червоний; амілоїд, гіалін та слиз – у синій; м'язова тканина – в оранжевий; нейроглія – у фіолетово-червоний колір.

Фарбування за Гендейгайном

Для отримання за цим методом препаратів високої якості необхідно перед заливкою матеріалу в парафін обов'язково його промити у проточній воді впродовж 24–48 год, незалежно від виду фіксатора.

Методика фарбування:

1. Зрізи звільнюють від парафіну ксилолом (2–3 хв).
2. Переносять їх у 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (по 2 хв у кожній порції).
3. Промивають зрізи у дистильованій воді впродовж 3–5 хв.
4. Фарбують зрізи розчином азокарміну в закритому посуді при температурі +50–60⁰ С (у термостаті) впродовж 1–2 год. Після цього посуд із зрізами охолоджують при кімнатній температурі впродовж 5–10 хв.

Приготування розчину азокарміну: 0,1 г азокарміну «G¹» розчиняють у 100 мл дистильованої води і нагрівають до кипіння. Потім розчин охолоджують і фільтрують (обов'язково через пухкий фільтр). До фільтрованого розчину (на 100 мл) додають 1 мл льодяної оцтової кислоти. Можна використовувати і азокармін «Б», він краще розчиняється у воді, ніж азокармін «G¹», і його застосовують у вигляді 0,5–1 %-го водного розчину.

5. Промивають зрізи у дистильованій воді.
6. Диференціюють зрізи в аніліновому спирті (1 мл анілінової олії на 100 мл 96⁰ спирту) до того часу, поки в їх клітинах не з'являться ядра. При цьому зрізи, які мали темно-червоний колір, світлішають. Диференціювання може тривати 10–30 хв і більше. Це явище можна прискорити шляхом додавання до анілінового спирту дистильованої води. Контроль диференціації здійснюють за допомогою мікроскопу.
7. Для відмивання аніліну зрізи переносять на 0,5–1 хв у 1 %-ий оцтовокислий спирт (96⁰).
8. Промивають зрізи в дистильованій воді впродовж 0,5 хв.
9. Переносять їх на 1–3 год у 5 %-ий водний розчин фосфорновольфрамової кислоти (для протравлення сполучної тканини). Якщо зрізи фарбують у чашечках, їх переносять у цей розчин скляними голками.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

10. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.

11. Забарвлюють зрізи у розчині анілін-блау-оранжі впродовж 1–3 год.

Приготування розчину анілін-блау-оранж:

Аніліновий спирт (водорозчинний) – 0,5 г;

Оранж G – 2 г;

Дистильована вода – 100 мл;

Льодяна оцтова кислота – 8 мл.

Розчин нагрівають до кипіння, охолоджують і фільтрують.

Для фарбування використовують розчини, попередньо розведені в 2–3 рази дистильованою водою. Такий розчин добре зберігається.

12. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.

13. Диференціюють їх у 96⁰ спирті (контролювати під мікроскопом) до чіткого виявлення волокон синього кольору).

14. Проводять зрізи через абсолютний спирт (2 хв), просвітлюють у ксилолі (2 хв) і заводять у бальзам.

Результати фарбування: колагенові та ретикулярні волокна забарвлені в синій колір; м'язова тканина – в оранжевий або червоний; еритроцити та ядра клітин – у червоний; слиз – у синій; нейроглія – у червонуватий колір.

Фарбування за Массоном

Матеріал для фарбування за цим методом найкраще фіксувати в ценкер-формолі. Для фарбування придатні не тільки парафінові, а й целоїдинові зрізи.

Методика фарбування:

1. Зрізи звільнюють від парафіну або целоїдину ксилолом (2–3 хв).

2. Переносять їх у 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (по 2 хв у кожному).

3. Поміщають зрізи на 2–3 хв у дистильовану воду.

4. Фарбують зрізи гематоксиліном Вейгерта 5–7 хв.

5. Диференціюють зрізи 0,5 %-им солянокислим спиртом (15–30 сек).

6. Промивають зрізи у водопровідній воді (10–20 хв).

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

7. Фарбують зрізи впродовж 2–5 хв у розчині наступного складу:

Фуксин кислий – 1 г;

Оцтова кислота (льодяна або концентрована) – 1 мл;

Вода дистильована – 200 мл.

8. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.

9. Обробляють зрізи 1 %-ою фосфорно-молібденовою кислотою (5–15 хв) до різкого просвітлення сполучної тканини. При цьому орієнтуються по адвентиції судин за допомогою мікроскопа при малому збільшенні. При фарбуванні зрізів в чашечках – зрізи у розчин цієї кислоти переносять скляними голками.

10. Не промиваючи зрізи у воді (тільки злити з них розчин кислоти), поміщають їх у розчин анілінового синього на 1–2 хв (запобігти перефарбуванню зрізів). При роботі на предметних стеклах на зріз наносять лише декілька крапель фарби.

Приготування фарби: 2 г водорозчинного препарату анілінового синього розчиняють у 100 мл киплячої дистильованої води і відразу ж додають 2,5 мл оцтової кислоти (концентрованої або льодяної). Розчин охолоджують і фільтрують.

11. Промивають зрізи у водопровідній воді, до тих пір, доки відходитиме з них фарба (приблизно 0,5 хв).

12. Диференціюють зрізи в 1 %-му водному розчині оцтової кислоти впродовж 10–30 хв. Контроль диференціювання проводять за допомогою мікроскопа, користуючись сильним джерелом штучного освітлення. Диференціювання закінчують після виділення темно-синьої волокнистої основи, а також інших тканинних структур.

13. Проводять зрізи через 96⁰ та абсолютний спирти (по 2 хв у кожному), просвітлюють у ксилолі (2 хв) і заводять у бальзам.

Результати фарбування: ядра клітин забарвлені в чорний або синій колір; цитоплазма – в рожевий або червоний; колагенові та ретикулярні волокна – в темно-синій; фібрин і еритроцити – у червоний; волокниста глія – у рожевий.

Фарбування еластичних волокон

При фарбуванні еластичних волокон використовують не тільки їх специфічні барвники, а й барвники, які чітко фарбують ядра клітин. Для цього найбільш часто використовують літєсвий кармін Орта.

Фарбування резорцин-фуксином Вейгерта

Фіксацію матеріалу для виявлення еластичних волокон за цим методом бажано здійснювати в абсолютному спирті. Непогані результати можна отримати і після фіксації його у формаліні.

Для фарбування придатні парафінові, целоїдинові та заморожені зрізи.

Методика фарбування:

1. Парафінові і целоїдинові зрізи звільняють від парафіну і целоїдину ксилолом (2–3 хв).
2. Переносять їх у 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (на 2 хв у кожний).
3. Поміщають зрізи у водопровідну воду на 3 хв.
4. Зрізи фарбують літєвим карміном Орта впродовж 10–15 хв.
5. Зрізи (не промиваючи у воді) переносять у 1 %-ий солянокислий спирт (70⁰) на 5–15 хв і більше. Цей спирт фіксує фарбу в ядрах клітин і одночасно вимиває її з інших структур (диференціює).
6. Зрізи споліскують у водопровідній воді та у 70⁰ етиловому спирті.
7. Переносять зрізи у профільтрований розчин резорцин-фуксину (фуксиліну) на 20–30 хв.

Технологія приготування фуксиліну:

У фарфорову чашку наливають 200 мл дистильованої води і розчиняють у ній 2 г основного фуксину та 4 г резорцину. Розчин нагрівають до кипіння і додають до нього 25 мл 50 %-го розчину водного хлорного заліза ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, жовто-бурого кольору). Розчин кип'ятять 5 хв і фільтрують. Фільтрат виливають, а фільтр з осадом висушують, знімають з лійки і кладуть у чашку, в якій кип'ятили розчин. У цей же посуд, де міститься фільтр, наливають 200 мл 96⁰ етилового спирту і обережно нагрівають до кипіння на водяній бані. Потім чашку знімають з водяної бані і обережно пінцетом зчищають з фільтру залишки фарби у спирт, після цього фільтр викидають. Спиртовий розчин фарби охолоджують і фільтрують у градуйований циліндр, доводячи об'єм до 200 мл 96⁰ етиловим спиртом і додають 4 мл концентрованої соляної кислоти (питома маса 1,16–1,19).

Фуксилін придатний для використання впродовж 1,5–2 місяців.

8. Зрізи промивають у водопровідній воді 1–2 хв.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

9. Диференціюють їх у 1 %-му солянокислому або 96⁰-му етиловому спирті. Диференціювання закінчують, коли на зрізі, при мікроскопії, виявляється сітка еластичних волокон (приблизно через 3–5 хв).

10. Зрізи проводять через 70⁰ і 96⁰ етиловий спирт (по 2 хв), просвітлюють у карбол-ксилолі (2–3 хв), ксилолі і заводять у бальзам.

Результати фарбування: ядра клітин забарвлені в червоний колір, еластичні волокна – в темно-синій.

Фарбування фуксиліном у модифікації Харта

Для фарбування використовують не чистий фуксилін, а його 5 %-ий розчин, приготовлений на 1 %-му солянокислому спирті (70⁰). Цей розчин називають рідиною Харта.

Методика фарбування:

1. Парафінові і целоїдинові зрізи звільняють від парафіну і целоїдину ксилолом (2–3 хв).

2. Переносять зрізи у 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (на 2 хв у кожний).

3. Зрізи поміщають у водопровідну воду на 2–3 хв.

4. Зрізи фарбують літєвим карміном Орта 10–15 хв.

5. Зрізи переносять у попередньо профільтровану рідину Харта на 18–24 год. У зв'язку з тим, що рідина Харта виготовлена на солянокислому спирті, зрізи після літєвого карміну не потребують диференціювання.

6. Промивають зрізи у водопровідній воді 2–3 хв.

7. Зневоднюють зрізи у 96⁰-ному та абсолютному етиловому спирті (по 2 хв у кожному), просвітлюють у ксилолі (2–3 хв) та заводять у бальзам.

Результати фарбування такі ж, як і при фарбуванні попереднім методом.

Фарбування орсеїном за методом Унна-Тенцера

Для фіксації матеріалу можна використовувати етиловий спирт і формалін. Для фарбування придатні парафінові, целоїдинові, желатинові та заморожені зрізи.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Методика фарбування:

1. Парафінові і целоїдинові зрізи звільняють від парафіну і целоїдину ксилолом (2–3 хв).
2. Переносять зрізи у 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (по 2 хв у кожному).
3. Поміщають зрізи у водопровідну воду на 2–3 хв.
4. Зрізи фарбують літєвим карміном Орта 5–15 хв.
5. Зрізи переносять у розчин орсеїну на 18–24 год при кімнатній температурі, або на 2–3 год у термостат при температурі +37–40⁰ С.

Приготування розчину орсеїну:

Орсеїн – 1 г;
Концентрована соляна кислота – 1 мл;
Спирт етиловий 96⁰ (або абсолютний) – 100 мл.

Обробку зрізів солянокислим спиртом після літєвого карміну пропускають, оскільки розчин орсеїну готується на соляній кислоті.

6. Промивають зрізи у водопровідній воді 2–3 хв.
7. Диференціюють зрізи 1 %-им солянокислим спиртом (на 70⁰ етиловому спирті) впродовж 2–5 хв. Диференціацію контролюють за допомогою мікроскопа. Її припиняють тоді, коли з'являться чіткі контури еластичних волокон.
8. Промивають зрізи у водопровідній воді 2–3 хв.
9. Проводять зрізи через 96⁰ і абсолютний етиловий спирт (по 2 хв у кожному), просвітлюють у карбол-ксилолі (2–3 хв), ксилолі та заводять у бальзам.

Результати фарбування: еластичні волокна забарвлені у червоно-бурий колір.

Імпрегнація ретикулярних волокон

Імпрегнація (від лат. *Impregnatio*) – просочування шматочків (зрізів) дослідного матеріалу розчинами деяких солей (срібла, свинцю, золота, кобальту, кадмію тощо) або оксидів (осмію) для виявлення певних гістологічних структур.

Імпрегнацію ретикулярних волокон здійснюють за методами Більшовського і Фута. Метод Фута є лише модифікацією методу Більшовського, але якісно перевершує його. Так, завдяки застосуванню марганцевокислого калію, ядра клітинних елементів або

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

зовсім не піддаються імпрегнації, або імпрегнуються частково. Проте, за обома методами, ретикулярні волокна імпрегнуються у чорний колір.

Для фіксації матеріалу використовують 15–20 %-ий розчин формаліну. Після фіксації шматочки матеріалу промивають у проточній воді (24–48 год), а потім декілька годин – у дистильованій воді.

Для імпрегнації придатні парафінові, целоїдинові, желатинові та заморожені зрізи. Кращі результати отримують на заморожених та желатинових зрізах.

Загальні правила імпрегнації матеріалу сріблом

При імпрегнації сріблом необхідно дотримуватися наступних правил:

1. Реактиви мають бути хімічно чистими, зокрема кристалічне азотнокисле срібло повинно мати абсолютно біле забарвлення (рожевий або сірий колір свідчить про непридатність).

2. Абсолютно чистими повинні бути скляний посуд та допоміжне обладнання. Для миття скляного посуду найкраще використовувати розчин такого складу:

Двохромовоокислий калій – 100 г;
Вода гаряча – 1000 мл;
Неочищена сірчана кислота – 100 мл.

Для приготування цього розчину спочатку розчиняють у гарячій воді двохромовоокислий калій, потім розчин охолоджують і тільки після цього доливають в нього сірчану кислоту. Доливають кислоту обережно і обов'язково у витяжній шафі. При цьому розчин сильно нагрівається і набуває темно-коричневого кольору.

У цьому розчині скляний посуд у тому числі і предметні стекла витримують 2–3 доби, потім промивають у проточній воді (2–3 доби) і споліскують у дистильованій воді. Після цього предметні стекла протирають лляною тканиною і зберігають у 96⁰ етиловому спирті, або в спирт-ефірі (1:1).

Розчин для миття скляного посуду можна використовувати повторно до того часу, доки він не набуде зеленого кольору.

3. Для приготування розчинів азотнокислого срібла слід користуватися дистильованою або бідистильованою водою.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

4. Працювати необхідно тільки зі скляними голками, окремими для кожного реактиву. Можна при роботі обмежитись і однією голкою, але тоді її кожен раз необхідно ретельно промивати в дистильованій воді, яку потрібно часто змінювати, а голки витирати чистою серветкою.

5. Одночасно можна піддавати імпрегнації невелику кількість зрізів, які повинні бути відокремленими і розправленими.

Необхідно мати на увазі, що зрізи після імпрегнації мають схильність до сильного зморщення при зневодненні їх спиртами, а тому процедуру заведення зрізів у бальзам здійснюють дещо по-іншому, а саме: виймають зріз із води на добре вимите предметне скло. Щоб приклеїти зрізи, стекла попередньо обробляють білком з гліцерином. На предметному склі зріз розправляють, ретельно видаляють воду навколо нього і ставлять препарат вертикально для підсихання на 2–5 хв. Тільки після цього зрізи можна обробляти спиртами і просвітлювати у ксилолі (карбол-ксилолі) та заводити у бальзам.

Імпрегнація сріблом за методом Фута

Приготування аміачного срібла. Готують 10 %-ий водний розчин азотнокислого срібла. На кожні 5 мл цього розчину додають 4–5 крапель 40 %-го водного розчину NaOH. При цьому утворюється темно-бурий осад гідрату окису срібла. Його розбавляють 25 %-им нашатирним спиртом. Розчин нашатирного спирту додають обережно краплями. Спочатку додають 5–7 крапель, а потім по одній. Після кожної доданої краплі розчин струшують і вичікують 20–40 і більше сек, перш ніж знову додати наступну краплю. Не можна переливати жодної краплі нашатирного спирту, тому краще не домагатися повного розчинення осаду. На 5 мл 10 %-го AgNO_3 потрібно приблизно 15–20 крапель розчину нашатирного спирту (залежно від калібру піпетки). Розчинення проводять у градуйованому циліндрі. Цей процес проходить досить повільно і триває 5–10 хв. Після того, як залишився незначний осад, розчин аміачного срібла розводять дистильованою водою, доводячи до об'єму 20 мл. Після цього його фільтрують. Для імпрегнації використовують щойно виготовлений розчин. Вдало виготовлений розчин повинен мати слабкий запах аміаку.

Методика імпрегнації:

1. Парафінові і целоїдинові зрізи звільняють від парафіну і целоїдину ксилолом (2–3 хв).
2. Після цього ці зрізи проводять через 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (по 2 хв у кожному) і переносять у дистильовану воду на 2–3 хв. В цю воду поміщають желатинові і заморожені зрізи.
3. Зрізи переносять у 0,25 %-ий водний розчин марганцевокислого калію на 5–10 хв (можна і більше).
4. Споліскують зрізи у водопровідній воді.
5. Зрізи переносять у 5 %-ий розчин щавелевої кислоти на 15–30 хв, до їх побіління.
6. Ретельно промивають зрізи у великій кількості дистильованої води (20–30 хв).
7. Зрізи переносять у 2 %-ий розчин азотнокислого срібла на 48 год (тримають у темному місці або загортають посуд з розчином у чорний папір).
8. Швидко (3–5 сек) їх промивають (по одному) у дистильованій воді.
9. Переносять зрізи в щойно виготовлений і профільтрований розчин аміачного срібла на 15–30 хв. Зрізи у ньому набувають коричневого кольору.
10. Промивають зрізи (по одному) у дистильованій воді (5–10–15 сек). Досить швидке промивання у воді призводить у подальшому (при наступній обробці зрізів у формаліні) до швидкого і надзвичайно сильного їх потемніння. Для запобігання цьому необхідно адаптувати матеріал і, проводячи по одному зрізу через формалін, встановити оптимальний термін промивання. Інколи вигідною є промивання у воді впродовж однієї хвилини і навіть більше.
11. Переносять зрізи у 5 %-ий розчин формаліну (на водопровідній або дистильованій воді) на 15–30 хв.
12. Зрізи ретельно промивають у водопровідній воді.
13. Поміщають зрізи у 0,5–1 %-ий розчин хлорного золота на 5–10 хв. Після використання цей розчин зливають у робочий посуд для повторного застосування. Слід мати на увазі, що такий розчин хлорного золота – непридатний для імпрегнації заморожених зрізів, оскільки в ньому вони сильно зморщуються. У зв'язку з цим можна користуватися слабшими розчинами, наприклад, з розрахунку одна

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

крапля 1 %-го хлорного золота на 1–2 мл дистильованої води. У таких слабких розчинах зрізи можуть перебувати до однієї години і більше, доки вони набудуть сірого кольору.

14. Промивають зрізи у водопровідній воді (10–15 хв).

15. Переносять зрізи у 5 %-ий водний розчин гіпосульфїту на 2–3 хв і більше (препарати при цьому будуть світлішими і якіснішими). Контроль здійснюють за допомогою мікроскопа, промиваючи зрізи кожного разу у воді.

16. Ретельно промивають зрізи у водопровідній воді (від кількох годин до однієї доби) і наклеюють їх на предметні стекла.

17. Ядра клітин дофарбовують (за бажанням) карміном або гематоксиліном. У останньому випадку можна диференціювати 1 %-им солянокислим спиртом.

18. Проводять зрізи через 70⁰ і 96⁰ етиловий спирт (у кожному 2 хв), просвітлюють у карбол-ксилолі та ксилолі (по 2 хв) і заводять у бальзам.

Імпрегнацію сріблом за методом Фута можна комбїнувати з іншими методами фарбування (гематоксиліном та еозином, за Ван-Гїзоном тощо).

Необхідною умовою чїткого забарвлення тканин різними барвниками є ретельне їх промивання у водопровідній воді (до однієї доби) після завершення імпрегнації.

Розчин марганцевокислого калїю, щавелевої кислоти і гіпосульфїту готують на дистильованій воді.

Спрощена імпрегнація сріблом за методом Фута

Якісні та чїткі результати на заморожених зрізах можна отримати при більш простій модифїкації імпрегнації сріблом за методом Фута. При цьому обробку зрізів 2 %-им азотнокислим сріблом не проводять. Зрізи після обробки марганцевокислим калїєм, щавелевою кислотою і ретельного промивання у дистильованій воді відразу переносять у свіжий розчин амїачного срібла на 5–10 хв. Потім процес імпрегнації проводять починаючи з пункту 10 описаного вище методу Фута. Обробку у формалїні скорочують до 2–3 хв.

При імпрегнації зрізів за методом Фута і його модифїкацією часто імпрегнуються і ядра клітин. Для запобїгання цього

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

використовують більш концентровані розчини марганцевокислого калію (1–5 %). При цьому стійкість заморожених зрізів знижується.

Імпрегнація сріблом за методом Більшовського

Матеріал для дослідження фіксують у 15–20 %-му розчині формаліну. Після фіксації його промивають у проточній (24–48 год), а потім декілька годин – у дистильованій воді.

Для імпрегнації найбільш придатні тонкі заморожені та желатинові зрізи. При необхідності можна використовувати парафінові та целоїдинові зрізи, які попередньо звільняють від ущільнюючих середовищ.

Зрізи поміщають у дистильовану воду. Після цього їх переносять у 2 %-ий розчин азотнокислого срібла на 24–48 год (у темряві).

Подальша обробка зрізів – аналогічна такій за методом Фута. Є лише деякі несуттєві відмінності щодо концентрації формаліну (у даному випадку застосовують 20 %-ий розчин формаліну). Крім того, рекомендується користуватися слабо підкисленим хлорним золотом (2–3 краплі 1 %-го хлорного золота і 2–3 краплі льодяної оцтової кислоти на 10 мл дистильованої води), залишаючи у ньому зрізи на 10–20 хв, до тих пір, доки вони набудуть сірого або фіолетового відтінку.

Дофарбовувати ядра клітин не потрібно.

Для запобігання сильної імпрегнації ядер, рекомендується користуватися щойно зафіксованим матеріалом (після 24–48-годинної фіксації у нейтральному формаліні).

Обробка зрізів хлорним золотом за методом Більшовського – більш бажана, ніж за методом Фута, особливо по відношенню до товстих зрізів. Золочення надає препаратам контрастності та стійкості. При відсутності хлорного золота і при наявності різко імпрегнованих (темних) препаратів, необхідно звернути увагу на термін перебування зрізів у розчині гіпосульфїту. Його можна збільшити від 0,5 до 1–2 год, контролюючи під мікроскопом через кожні 10–15 хв появу бажаної різкості імпрегнації.

Слід пам'ятати, що тривале перебування зрізів у розчині гіпосульфїту призводить до різкого ослаблення імпрегнації.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Парафінові зрізи обробляють так само як і заморожені. Целоїдинові зрізи потребують більш тривалого (до 3–4 діб) перебування у 2 %-му розчині азотнокислого срібла. Результати імпрегнації парафінових і целоїдинових зрізів будуть дещо гіршими, ніж заморожених.

Спрощена імпрегнація за методом Більшовського

Цей метод придатний для імпрегнації заморожених зрізів.

1. Зрізи після фіксації та промивання у дистильованій воді переносять у 96⁰ етиловий спирт на 5–10 хв.
2. Промивають їх у водопровідній та дистильованій воді (по 10–15 хв у кожній).
3. Зрізи переносять у 10 %-ий AgNO₃ при температурі +37–40⁰ С (у темряві) на 10–20 хв.
4. Швидко промивають їх у дистильованій воді.
5. Зрізи переносять у профільтрований розчин аміачного срібла на 5–10 хв (технологія приготування розчину така ж, як і за методом Фута). Потім їх швидко промивають (по одному) у дистильованій воді. Далі зрізи обробляють відповідно до пункту 11 описаного вище методу Фута.

Фарбування поперечно-посмугової м'язової тканини

Фарбують поперечно-посмуговану м'язову тканину (скелетну і серцеву) гематоксиліном та еозином. Але кращі результати отримують фарбуючи її методом Гейденгайма.

Матеріал фіксують у ценкер-формолі.

Для фіксації беруть шматочки матеріалу товщиною 0,2–0,3 см. Термін фіксації при кімнатній температурі – від 8 до 24 год, а в термостаті при температурі +37⁰ С – 4–6 год. Після фіксації матеріал промивають 24–48 год у проточній воді, зневоднюють в етиловому спирті і заливають у будь-яке ущільнююче середовище. Виготовлені зрізи можна наклеювати на предметні стекла.

Методика фарбування:

1. Парафінові і целоїдинові зрізи звільняють від ущільнюючих середовищ ксилолом (2–3 хв).
2. Їх переносять у 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (на 2 хв у кожний).
3. Поміщають зрізи на 3 хв у водопровідну воду.
4. Звільнюють зрізи від осаду сулеми. Для цього їх переносять у люголівський розчин (кристалічний йод – 1г, йодистий калій – 2 г, дистильована вода – 300 мл), який зберігають у темному посуді або в 50–70⁰ етиловий спирт, підфарбований настоякою йоду до червоного кольору, на 10–30 хв і більше. Зрізи при цьому стають жовтими. Видалення осаду контролюють за допомогою мікроскопу, для чого зрізи кожний раз споліскують у воді. Після цього зрізи переносять на 2–3 хв у 0,25 %-ий розчин гіпосульфиту до повного знебарвлення.
5. Промивають зрізи в дистильованій воді (15–30 хв).
6. Переносять зрізи на 3–18 год у 2,5 %-ий водний розчин (на дистильованій воді) залізо-амонійних галунів, для протрави.
7. Зрізи ретельно промивають у водопровідній воді (1–2 год), часто змінюючи її. Їх можна промивати і у проточній воді (20–30 хв).
8. Споліскують зрізи в дистильованій воді.
9. Переносять зрізи на 24–36 год у щойно виготовлений і профільтрований робочий розчин гематоксиліну. Розчин готують за 3–5 тижнів до фарбування (для дозрівання). Його склад: гематоксилін – 1 г, абсолютний або 96⁰ етиловий спирт – 10 мл, вода дистильована – 90 мл. Він має світло-коричневий колір, який поступово змінюється на темно-коричневий. Якщо розчин швидко стає червоним – він не придатний для фарбування. Із зрілого розчину, перед фарбуванням, готують робочий розчин. Для цього його розводять дистильованою водою (1:1).
10. Споліскують зрізи у великій кількості водопровідної і дистильованої води.
11. Диференціюють зрізи в 2,5 %-му водному розчині (на дистильованій воді) залізо-амонійних галунів. Диференціювання контролюють за допомогою мікроскопа. Для цього зрізи через кожні 2–3 хв виймають з розчину і споліскують у дистильованій воді. Диференціювання закінчують тоді, коли ядра м'язових волокон і клітин волокнистої сполучної тканини зафарбовані в чорний колір (в такий же колір фарбуються і еритроцити), а самі м'язові волокна – у

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

сіро-синій колір. На м'язових волокнах повинна чітко виділятися поперечна смугастість.

12. Зрізи ретельно промивають у великій кількості водопровідної води (від декількох годин до доби).

13. Проводять зрізи через 96⁰ і абсолютний етиловий спирт (по 2 хв у кожному), просвітлюють у карбол-ксилолі (2–3 хв) і заводять у бальзам.

Результати фарбування: Ядра клітин і волокон зафарбовані в чорний колір, а м'язові волокна – в сіро-синій.

Слід відмітити, що процес контролю диференціювання зрізів (п. 11) потребує значних навиків. При їх недостатності зрізи рекомендується диференціювати в розчині залізо-амонійних галунів більш низької концентрації (0,5–1 %).

Фарбування нервової тканини

Для фарбування нервової тканини найчастіше використовують наступні методи: метод Ніссля для виявлення базofilьних структур нервових клітин; методи Маркі і Вейгерта та їх модифікації для мієлінових оболонки; сріблення за Гольджі, Рамон-і-Кахалю та Більшовському-Грос у різних модифікаціях, які дають найбільш повну картину про форму і розміри клітин, їх відростки, нейрофібрилярний апарат, а також різноманітні синапси і нервові закінчення. Для оцінки патоморфологічних змін при дослідженні нервової тканини застосовують загальні гістологічні методи.

Фарбування за Нісслем

Фарбування за Нісслем використовують для виявлення хромотофільної (базофільної) речовини (гранулярна ендоплазматична сітка) та ядер нервових клітин. Стан вищеназваних структур дає можливість оцінювати функціональну активність нейронів. Одночасно цей метод дає змогу виявляти і клітини нейроглії.

Товщина шматочків матеріалу не повинна перевищувати 0,3–0,4 см.

Матеріал найкраще фіксувати у 96⁰ етиловому спирті впродовж 5–8-ми тижнів. Одночасно при цьому матеріал знежирюється. Для повного його знежирення спирт декілька разів замінюють (через

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

кожні 3–5 діб). Процес знежирення контролюють, змінюючи спирт, в якому знаходиться матеріал з водою. Якщо матеріал повністю знежирений, суміш не мутніє.

Крім 96⁰ етилового спирту для фіксації також використовують суміш спирту з формаліном (10 %-ий розчин формаліну на 96⁰ етилового спирту). Фіксують матеріал у цій суміші 1–2 доби. Потім його переносять у 96⁰ етиловий спирт для знежирення (див. вище).

Для фарбування найбільш придатні тонкі целоїдинові та парафінові зрізи. Парафінові зрізи наклеюють на предметні стекла.

Перед заливкою матеріалу в парафін або целоїдин його поміщають в абсолютний спирт, а перед заливкою у целоїдин – ще і в спирт-ефір (1:1). Цим досягається краще зневоднення і знежирення матеріалу. До того ж целоїдинові зрізи перед фарбуванням, з цією ж метою, витримують у 96⁰ етилового спирту 1–2 доби у термостаті при температурі +37–40⁰ С.

Барвники: толуїдинова синька, тіонін, крезилловий фіолетовий (крезилвіолет) у водних розчинах (на дистильованій воді); перші два барвники у розведенні 1:1000, останній – 0,5 %-ий.

Розчин барвників використовують для фарбування після повного розчинення фарби (на третю добу). Перед фарбуванням їх обов'язково фільтрують. Для фільтрації використовують не щільний фільтрувальний папір.

Методика фарбування:

1. Парафінові зрізи звільнюють від парафіну ксилолом (2–3 хв), проводять через 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт (2 хв у кожному) і переносять у водопровідну воду на 3 хв. У воду, яка знаходиться в чашечці переносять і целоїдинові зрізи, які зберігали у 96⁰ етилового спирту.

2. Целоїдинові зрізи переносять у чашечку з одним названих вище розчинів барвника. На парафінові зрізи, які наклеєні на предметні стекла наносять барвник. Фарбування проводять при нагріванні. Для цього чашечку і предметні стекла з барвником обережно підігрівають над полум'ям спиртівки до появи перших пухирців. При цьому зрізи повинні мати надзвичайно інтенсивний темно-синій або фіолетовий колір (перифарбовані). При недостатньому їх зафарбовуванні повторюють підігрівання. Для

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

отримання кращих результатів зрізи після нагрівання іноді залишають у розчині барвника на деякий час (0,5–1 год і більше, при кімнатній температурі). Целоїдинові зрізи у розчині барвника залишають у тій же чашечці, у якій відбувалось нагрівання, а парафінові – переносять у чашки Петрі (зрізами донизу, підкладаючи під них сірники).

Окрім того, зрізи можна фарбувати при кімнатній температурі впродовж 12–48 год. Позитивні результати дає фарбування у термостаті при температурі +37–40⁰ С.

3. Промивають зрізи у проточній воді (1–2 хв).

4. Диференціюють парафінові зрізи у 96⁰, а целоїдинові в абсолютному етиловому спирті. При цьому зрізи знебарвлюються і набувають блідо-синього кольору. Контроль диференціювання здійснюють за допомогою мікроскопа. Його закінчують тоді, коли з'являться чіткі контури і структури клітин (ядра, зернистість).

5. Висушують зрізи фільтрувальним папером та просвітлюють їх у ксилолі (2–3 хв).

6. Зрізи заключають у бальзам.

Результати фарбування: Базофільні структури нервових клітин мають синій колір.

Препарати, забарвлені за Нісслем, мають здатність до знебарвлення на світлі, тому їх краще зберігати у темному місці.

Імпрегнація нервової тканини

Імпрегнація за методом Більшовського

Для вивчення мікроскопічної будови нервової тканини частіше застосовують імпрегнацію її азотнокислим сріблом.

Метод Більшовського застосовують для виявлення нейрофібрил нейронів та осьових циліндрів нервових волокон. Матеріал фіксують у 10–12 % розчині нейтрального формаліну протягом 2–3 тижнів. Після фіксації його промивають 24 год проточною водою. Після цього переносять на 2–3 год у дистильовану воду (воду змінюють 4–5 разів). Зрізи, товщиною 5–10 мкм готують на заморожувальному мікротомі. Допускається заливка матеріалу в желатин. Виготовлені зрізи переносять в дистильовану воду на 1–2 год.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Для імпрегнації використовують: 1. 10–12 %-ий розчин нейтрального формаліну. 2. 20 %-ий розчин нейтрального формаліну. 3. 2 %-ий розчин азотнокислого срібла. 4. Розчин аміачного срібла: до 5 мл 10 %-го розчину азотнокислого срібла додають 4–5 крапель 40 %-го водного розчину NaOH, при цьому утворюється темно-бурий осад гідроксиду срібла. Для його розчинення спочатку додають 6–8 крапель 25 %-го розчину NH₄OH, а згодом, для повного розчинення осаду, обережно струшуючи пробірку (через кожні 20–40 сек) додають лише по одній краплі NH₄OH. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 20 мл. Розчин використовують щойно виготовлений та профільтрований. 5. 1 %-ий розчин хлорного золота. 6. 5 %-ий розчин гіпосульфїту.

Методика імпрегнації:

1. Переносять зрізи в 2 %-ий розчин азотнокислого срібла на 24–48 год (у темряві).
2. Зрізи швидко промивають (по одному) у дистильованій воді (2–3 сек).
3. Переносять зрізи в щойно виготовлений та профільтрований розчин аміачного срібла на 5–20 хв (зрізи набувають коричневого відтінку і одночасно розправляються).
4. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді (по одному зрізу).
5. Переносять зрізи у 20 %-ий розчин нейтрального формаліну (5–10 хв). У зв'язку з відновленням срібла у формаліні, зрізи швидко темніють і набувають темно-бурого забарвлення.
6. Промивають зрізи у водопровідній воді (10–20 хв).
7. Обробляють зрізи розчином хлорного золота (1–3 краплі 1 %-го хлорного золота на 5 мл дистильованої води) впродовж 1–2 год, поки вони не набудуть сіруватого або фіолетового відтінку. Обробка хлорним золотом сприяє кращому виявленню нервових структур.
8. Промивають зрізи у проточній воді (5–10 хв).
9. Переносять зрізи у розчин гіпосульфїту на 1–2 хв (у випадку різкої імпрегнації зрізи можна тримати у цьому розчині і довше – (3–5 хв)).

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

10. Промивають зрізи у проточній воді (до 24 год).
11. Зневоднюють у 96⁰ і абсолютному етиловому спирті (по 2 хв у кожному).
12. Просвітлюють їх у карбол-ксилолі та ксилолі (по 2–3 хв у кожному) .
13. Заводять зрізи в бальзам.

Результат імпрегнації: Нейрофібрили і осьові циліндри імпрегнуються у чорний колір на сіруватому тлі.

Примітка. Метод потребує виключно чистих реактивів та чистого посуду. Користуватися при виконанні досліджень необхідно тільки скляними паличками, які часто замінюють.

Імпрегнацію за даним способом можна покращити попередньою обробкою зрізів піридином. При цьому зрізи перед перенесенням у розчин азотнокислого срібла додатково обробляють піридином впродовж 24–48 год і багаторазово промивають їх у воді до зникнення запаху піридину.

Тотальна імпрегнація за Більшовським

Використовують для імпрегнації нейрофібрил нейронів.

Шматочки матеріалу товщиною 2–4 мм фіксують у 10–12 %-му розчині нейтрального формаліну впродовж 48 год.

Методика імпрегнації:

1. Зафіксований матеріал, без попереднього промивання, переносять у 2 %-ий розчин азотнокислого срібла на 1–8 діб залежно від величини шматочка матеріалу.
2. Поміщають матеріал на 0,5–6 год у розчин аміачного срібла (методика приготування аміачного срібла така, як і за попереднім методом).
3. Швидко промивають матеріал у дистильованій воді (2–3 сек).
4. Переносять шматочки матеріалу на 12–24 год у 20 %-ий розчин формаліну.
5. Швидко заливають його у парафін.
6. Виготовляють зрізи, депарафінують їх та заводять у бальзам.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Результат імпрегнації: Нейрофібрили імпрегнуються у чорний колір на сіруватому тлі.

Тотальна імпрегнація за Рамон-і-Кахалем

Використовують для імпрегнації нейрофібрил у малих та середніх нервових клітинах.

Методика імпрегнації:

1. Щойно відібрані шматочки матеріалу товщиною 3–4 мм поміщають на 3–5 діб у 0,75–3 %-ий розчин азотнокислого срібла при температурі +30–35⁰ С (у термостаті).

2. Промивають матеріал впродовж однієї хвилини у дистильованій воді.

3. Переносять його на 24 год (для відновлення срібла) у розчин наступного складу:

- 100 мл дистильованої води;
- 1–2 г пірогаллової кислоти або гідрохінону;
- 5 мл нейтрального формаліну.

4. Ретельно промивають матеріал впродовж 1 хв у дистильованій воді та заливають у целоїдин, або проводять через спирти зростаючої міцності і заливають у парафін.

5. Виготовляють зрізи і заводять їх у бальзам.

Примітка. Застосування 0,75 %-го розчину азотнокислого срібла використовують для імпрегнації матеріалу від ембріонів або новонароджених, 3 %-го розчину – від дорослих тварин.

Результати імпрегнації. Нейрофібрили імпрегнуються у чорний колір.

Тотальна імпрегнація за Рамон-і-Кахалем

Використовують для імпрегнації нейрофібрил у великих нервових клітин.

Свіжий матеріал фіксують у абсолютному етиловому спирті із додаванням 5–10 крапель нашатирного спирту впродовж 24 год.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Методика імпрегнації:

1. Шматочки матеріалу промивають впродовж 1–2 хв у дистильованій воді.

2. Переносять їх на 3–5 діб у 1 %-2 %-4 %-ий розчин азотнокислого срібла при температурі +30–35⁰ С (у термостаті).

3. Шматочки матеріалу швидко промивають у дистильованій воді і поміщають на 24 год у розчин наступного складу:

- 100 мл дистильованої води;
- 2 г пірогалової кислоти або гідрохінону;
- 5 мл нейтрального формаліну.

4. Ретельно промивають шматочки матеріалу в дистильованій воді та заливають їх у целоїдин, або проводять через спирти зростаючої міцності і заливають у парафін.

5. Готують зрізи і заводять їх у бальзам.

Примітка. Застосування розчинів азотнокислого срібла різної концентрації (1 %-, 2 %-, 4 %-ий розчин), залежить від товщини шматочків матеріалу та від терміну перебування матеріалу в розчині азотнокислого срібла.

Результати імпрегнації. Нейрофібрили імпрегнуються у чорний колір.

Метод Грос-Більшовського-Лаврентьєва

Цей метод використовують для виявлення периферійних нервів і нервових закінчень.

Шматочки матеріалу товщиною до 0,3 см фіксують упродовж однієї години у розчині наступного складу: а) концентрований нейтральний формалін; б) 96⁰ етиловий спирт; в) 1 %-ий розчин миш'яковистої кислоти. Усі складові частини розчину беруть порівну. Миш'яковиста кислота розчиняється погано, тому її готують завчасно за кілька діб і краще у термостаті при температурі +37⁰ С. Розчин готують в міру необхідності.

Після фіксації у цьому розчині матеріал додатково фіксують у 20 %-му розчині нейтрального формаліну – від кількох діб до 3–4-х тижнів. Оптимальний термін фіксації у формаліні встановлюють експериментальним способом. Після фіксації матеріал споліскують у дистильованій воді. Із зафіксованого матеріалу готують зрізи на

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

заморожувальному мікротомі і поміщають їх на 1–2 хв у воду, в якій споліскували матеріал перед заморожуванням.

Методика імпрегнації:

1. Зрізи переносять на 5–10 хв у 20 %-ий розчин азотнокислого срібла (можна і на 30 хв).

2. Зрізи почергово переносять у баночки (4) з 20 %-им розчином формаліну, приготовленого на водопровідній воді. При цьому розчин формаліну стає мутним. В останній баночці помутніння розчину не відбувається. Помутніння розчину залежить від вмісту хлоридів у водопровідній воді. Якщо концентрація хлоридів незначна, помутніння не буде. У такому випадку до розчину формаліну необхідно додати хлористий натрій (один маленький кристалик на 1 л розчину). Процедура проведення зрізів через розчин формаліну займає біля 10 хв.

3. Із останньої порції розчину формаліну зрізи переносять в розчин аміачного срібла, налитий у скляний посуд такого розміру, щоб він вільно поміщався на предметному столику мікроскопу (ємністю приблизно 5–10 мл). Перед перенесенням зрізів в аміачний розчин срібла до нього додають 25 %-ий нашатирний спирт (1–15 крапель). Необхідна кількість спирту встановлюється експериментальним способом і залежить від матеріалу, а точніше – від тривалості його фіксації та обробки в азотнокислому сріблі; чим довше оброблялись зрізи в розчині AgNO_3 , тим більше потрібно додати нашатирного спирту. Процес імпрегнації волокон контролюють при малому збільшенні мікроскопу. Спочатку зрізи жовтіють, а потім імпрегнуються послідовно в оранжевий, бурий і, нарешті, чорний колір.

Розчин аміачного срібла готують наступним чином: до 1–2 мл 20 %-го азотнокислого срібла додають краплями 25 %-ий нашатирний спирт, до тих пір, доки не розчиниться коричнево-бурий осад при сильному струшуванні. Розчин нашатирного спирту додають дуже обережно. Краще довести розчинення осаду тільки до стадії опалесценції розчину.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Одночасно можуть імпрегнуватися ядра різних клітин, проте завжди слабкіше, ніж нервові волокна і нейрони. Ядра інших клітин імпрегнуються дуже рідко, що свідчить про недостатню кількість нашатирного срібла, яке додається в аміачне срібло. Тому, проводячи наступні зрізи, до розчину аміачного срібла (беруть обов'язково нову порцію) доливають нашатирного срібла на 2–3 краплі більше, ніж до попереднього.

4. Коли мікроскопічне дослідження засвідчить достатньо різку імпрегнацію нервових елементів, зрізи переносять у розведений нашатирний спирт (1 частина 25 %-го нашатирного спирту і 2 частини дистильованої води) на 10–15 хв.

5. Ретельно промивають їх дистильованою водою впродовж кількох годин (можна залишати на ніч).

6. Переносять зрізи у розчин хлорного золота (1–2 краплі 1 %-го розчину хлорного золота на 2–3 мл дистильованої води) на 0,5–1 год і більше до набуття ними сіро-стального або фіолетового відтінку.

7. Не промиваючи зрізи переносять у 5 %-ий розчин гіпосульфїту на 5–10 хв.

8. Ретельно промивають їх (кілька годин) у дистильованій воді, багаторазово замінюючи її.

9. Промиті зрізи, за бажанням, підфарбовують різними барвниками.

10. Зрізи зневоднюють, просвітляють і заводять у бальзам.

При проведенні досліджень за цим методом велике значення має якість формаліну, водопровідної води, азотнокислого срібла, а також чистота посуду і температура повітря. У холодному приміщенні процес імпрегнації відбуваються повільніше. Методика потребує певних навиків, особливо на етапах сріблення. Переносять зрізи тільки скляними голками.

Результати імпрегнації. Нерви та їх закінчення імпрегнуються у чорний колір.

Метод імпрегнації за Більшовським-Грос у модифікації В.В. Купріянова

Метод використовують переважно для дослідження спинно-мозкових вузлів у ембріонів.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Методика імпрегнації:

1. Після фіксації шматочки матеріалу промивають у проточній воді 2–3 год.
2. Зрізи готують на заморожувальному мікротомі і переносять у дистильовану воду.
3. Зрізи поміщають у 70⁰ етиловий спирт на 20 хв (або більш тривалий час). Спирт денатурує білки, сприяє їх аргірофілії та викликає незначні порушення у нативній структурі білка.
4. Зрізи швидко промивають у дистильованій воді.
5. Із дистильованої води їх переносять у 20 %-ий розчин азотнокислого срібла (на 5 хв і більше). Термін перебування зрізів у цьому розчині можна скоротити шляхом постійного переміщення зрізів за допомогою скляної палички та проведення імпрегнації у темряві.
6. Зрізи проводять через 2–3 порції підігрітого до +70⁰ С 1 %-го розчину формаліну, доки в розчині не зникнуть білі пластівці (хмаринки).
7. Зрізи швидко промивають у дистильованій воді, а надлишок вологи з них забирають фільтрувальним папером.
8. Зрізи переносять у розчин аміачного срібла на 2–3 хв (*приготування аміачного срібла див. на с. 96*). Перед використанням його фільтрують у темний скляний посуд з притертим корком.
9. Зрізи переносять у нагрітий 0,5 %-ий розчин формаліну, в якому відбувається імпрегнація препарату. При цьому розчин із зрізами поміщають в термостат (температура +37⁰ С). Розчин формаліну готують на водопровідній воді, яку попередньо відстоюють 1–2 доби.
10. Процес імпрегнації зрізів припиняють шляхом перенесення їх в аміачну воду.
11. Препарати зневоднюють і заводять у бальзам.

Імпрегнація за методом Кахаля-Фаровського

Метод застосовують для імпрегнації нервових клітин, осьових циліндрів нервових волокон та нервових закінчень. Імпрегнація відбувається у шматочку матеріалу.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Матеріал (шматочки органів) товщиною 0,3–0,5 см фіксують у 80⁰ етиловому спирті протягом однієї доби. До спирту додають мурашину кислоту (при фіксації мозку) або концентровану оцтову (льодяну) кислоту (при фіксації нервів, нервових волокон) із розрахунку 30 крапель на кожні 50 мл спирту.

Після цього товщину шматочків матеріалу зменшують до 0,2–0,3 см (шляхом перерізання гострим лезом) і поміщають їх на добу в 85⁰ етиловий спирт.

Методика імпрегнації:

1. Матеріал переносять на дві доби у розчин 96⁰ етилового спирту і 25 %-го нашатирного спирту (1 мл розчину нашатирного спирту на кожні 50 мл 96⁰ етилового спирту).

2. Переносять шматочки матеріалу в дистильовану воду і тримають в ній до тих пір, поки вони не потонуть (3–6 год). Воду змінюють 3–4 рази.

3. Висушують матеріал фільтрувальним папером і переносять його у безводний піридин на 1–2 доби (залежно від товщини матеріалу). Працюють з піридином за умов надійної герметизації посуду або у витяжній шафі.

4. Промивають матеріал спочатку в проточній воді (24 год), потім – у дистильованій (3–6 год).

5. Шматочки матеріалу переносять на 1–2 тижні (залежно від їх товщини та щільності) у 2–3 %-ий розчин азотнокислого срібла і поміщають у термостат при температурі +37⁰ С. Розчин азотнокислого срібла за цей термін замінюють 2–3 рази. Перед перенесенням шматочків у нову порцію розчину його попередньо підігрівають до температури +37⁰ С.

6. Матеріал швидко промивають у дистильованій воді і переносять у щойно приготовлений проявник такого складу:

Пірогалова кислота (пірогалол або 1–2–3 – триоксибензол) – 2–4 г;

Вода дистильована – 100 мл;

Формалін нейтральний – 10 мл.

Проявник готують наступним чином. Спочатку розчиняють у дистильованій воді пірогалову кислоту. Розчин пірогалової кислоти повинен бути прозорим і майже безбарвним. Якщо він стає бурим або коричневим – його не використовують. Після цього до розчину

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

додають формалін. Пірогалову кислоту можна замінити гідрохіноном (3 з).

Для приготування проявника на базі гідрохінону спочатку його розчиняють у дистильованій воді, а потім додають формалін. Розчин гідрохінону має бути цілковито прозорим і безбарвним. При додаванні до нього формаліну він не повинен втрачати ці властивості.

Слід знати, що гідрохінон розчиняється у воді довше, ніж пірогалова кислота. Для прискорення цього процесу розчин слабо підігрівають.

Перемістивши шматочки матеріалу з дистильованої води у проявник, стає видно, що останній мутніє і темнішає. Для попередження цього, шматочки матеріалу, після споліскування у дистильованій воді, добре споліскують у одній порції проявника, а потім переносять їх у другу порцію (основну). На один шматочок матеріалу готують 20–25 мл розчину проявника.

Тримають шматочки матеріалу у пірогаловому проявнику 1–2 доби, а у гідрохіноновому – 3 доби. Процес відновлення здійснюють на світлі (при роботі з гідрохіноновим проявником – у темряві).

7. Проводять матеріал через спирти і заливають у целоїдин. Щоб уникнути при цьому зайвих втрат сполук срібла, Б.А. Фаровський пропонує швидко проводити шматочки матеріалу через спирт і рідкий целоїдин (70–80⁰ спирт – 0,5–1 год; 96⁰ спирт – 3 год; абсолютний спирт – 12 год; рідкий целоїдин – 8–24 год; густий целоїдин – 24 год, ущільнення у свіжій порції густого целоїдину – 2–3 доби).

8. Готують зрізи, проводять їх через спирти, карбол-ксилол, ксилол і заводять у бальзам.

При перенесенні шматочків матеріалу необхідно користуватися тільки скляними предметами.

Результати імпрегнації. Нервові клітини, осьові циліндри нервових волокон і нервові закінчення імпрегнуються у темно-коричневий або чорний колір.

Модифікація методу Грос-Більшовського за Кампосом

Дану модифікацію застосовують для виявлення периферичних нервів і нервових закінчень. Вона відрізняється своєю простотою від

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

усіх інших методів імпрегнації нервових волокон та закінчень, сріблом.

Матеріал фіксують у 10 %-му нейтральному формаліні не менше 24 год при температурі $+37^{\circ}\text{C}$, або декілька діб при кімнатній температурі.

Зафіксований матеріал промивають у проточній воді 1–2 год, а потім 6–12 год – у дистильованій воді. На заморожувальному мікротомі готують зрізи товщиною 20–30–60 мкм та поміщають їх у дистильовану воду.

Методика імпрегнації:

1. Зрізи переносять у 20 %-ий розчин азотнокислого срібла (у темряві) на 5–10 год. Для матеріалу пухкої консистенції термін обробки в азотнокислому сріблі зменшують.

2. Швидко (2–3 сек) промивають зрізи у дистильованій воді (по одному зрізу).

3. Зрізи послідовно (тричі) проводять через 1 %-ий розчин формаліну (на водопровідній воді), загальний термін перебування у яких складає 2–3 хв. Розчини формаліну замінюють при перших же ознаках помутніння. Різке помутніння формаліну свідчить про дуже жорстку воду.

4. Зрізи переносять на 2 хв у щойно виготовлений розчин аміачного срібла за методом Грос-Більшовського-Лаврентьєва. Його готують наступним чином. У маленьку чашечку наливають 1–2 мл 20 %-го розчину азотнокислого срібла, до якого потім додають краплями 25 %-ий розчин нашатирного спирту до повного розчинення осаду, що утворився (*див. спосіб Грос-Більшовського-Лаврентьєва*). Після повного розчинення осаду додають нашатирний спирт із розрахунку 1–2 краплі на 1 мл розчину для досягнення слабкої імпрегнації ядерних елементів інших тканин. Найбільш оптимальну кількість додатково доданого нашатирного спирту визначають експериментальним способом. Чашечку із розчином срібла тримають закритою.

5. Швидко проводять по одному зрізу через 2–3 чашечки, які містять по 10–15 мл 0,5 %-го розчину формаліну і витримують в останній порції 0,5–1 хв. При цьому зрізи набувають світло-коричневого або жовтого кольору. Якщо цей процес не відбувся, то

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

зрізи переносять у 1 %-ий, або 2 %-ий розчин формаліну. У розчинах формаліну зрізи можуть ставати чорними. Для запобігання цього концентрацію формаліну знижують до 0,1 %. Розчини формаліну швидко псуються (мутніють), особливо у першій чашечці. У зв'язку з цим, їх необхідно постійно змінювати.

6. Після того, як зрізи набули необхідного відтінку, їх переносять у водопровідну воду на 30 хв.

7. Зрізи промивають у дистильованій воді.

8. Переносять зрізи у розчин хлорного золота (2 краплі 1 %-го розчину хлорного золота на 5 мл дистильованої води). Витримують зрізи у цьому розчині до того часу, поки вони не набудуть сіро-фіолетового кольору.

9. Поміщають зрізи в 5 %-ий розчин гіпосульфїту на 1–2 хв.

10. Промивають їх у дистильованій воді.

11. Проводять зрізи через спирти, ксилол і заводять їх у бальзам.

Результати імпрегнації. Нервові волокна і закінчення імпрегнуються у темно–коричневий або чорний колір.

Фарбування мієлінових оболонок нервових волокон

Для фарбування мієлінових оболонок нервових волокон запропоновано низку методів, які в основному є модифікаціями методу Вейгерта. Метод Вейгерта базується на тому, що мієлін при тривалій обробці хромовими і мідними солями втрачає властивість розчинятися у спирті та ефірі, внаслідок чого матеріал (шматочки мозку або нерви) можна заливати у целоїдин. Внаслідок такої обробки утворюються сполуки, які разом з гематоксиліном набувають властивостей барвників.

Метод Вейгерта і його модифікації запропоновані для фарбування мієлінових оболонок нервових волокон *тільки* у нормі.

**Фарбування мієлінових оболонок за
оригінальним методом Вейгера**

Перед фарбуванням матеріал фіксують у 10–15 %-му розчині формаліну, або в рідині Орта.

Методика фарбування:

1. Зафіксовані шматочки матеріалу переносять у 4–5 %-ий розчин двохромовокислого калію або у рідину Мюллера (для протрави). Термін перебування шматочків матеріалу у хромових рідинах залежить від їх товщини. Так, при товщині шматочків 0,3–0,5 см та кімнатній температурі він може тривати від 6–8 до 12 тижнів, а у термостаті при температурі +37⁰ С – 2–4 тижні. Рідину замінюють 1–3 рази на тиждень.

2. Відмивають хромові солі з матеріалу в 70⁰ етиловому спирті (у темряві), щодобово його замінюючи, поки він перестане забарвлюватися.

3. Проводять матеріал через спирти і заключають у целоїдин.

4. Виготовляють зрізи.

5. Переносять зрізи у 3–4 %-ий водний розчин оцтовокислої міді на 12–24 год (розчинність оцтовокислої міді в 100 мл води: 7,2 г – у холодній і 20 г – у гарячій). При достатньому перебуванні матеріалу у хромових рідинах обробка розчином оцтовокислої міді – не обов'язкова. Оцтовокисла мідь тільки підсилює забарвлення мієлінових оболонок, але зрізи стають більш крихкими.

6. Промивають зрізи у водопровідній воді і фарбують їх у літєвому або залізного гематоксиліну впродовж 12–24 год.

Приготування літєвого гематоксиліну. До 100 мл дистильованої води додають 10 мл 10 %-го спиртового розчину гематоксиліну. За добу до використання додають ще 1 мл насиченого водного розчину вуглекислого літію. Якщо спиртовий розчин гематоксиліну зберігався тривалий час, то фарбу використовують відразу після додавання вуглекислого літію. Розчин вуглекислого літію можна не додавати, але при цьому матеріал погано сприймає забарвлення.

Приготування залізного гематоксиліну. Готують два розчини:

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Розчин № 1.

10 %-ий (основний) спиртовий розчин гематоксиліну – 10 *мл*;
Спирт 96⁰-ий – 90 *мл*.

Розчин № 2.

Офіційний розчин півторахлористого заліза – 4 *мл*;
Дистильована вода – 96 *мл*.

Його готують перед використанням.

Офіційний розчин півторахлористого заліза це 50 %-ий розчин водного хлорного заліза ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, жовто-бура маса).

Перед використанням обидва розчини змішують у рівних об'ємах.

Розчини літєвого і залізного гематоксилінів швидко руйнуються, тому їх готують у невеликій кількості в міру необхідності.

Основний спиртовий розчин (розчин № 1), який необхідний для приготування залізного гематоксиліну, використовують після 6–12-ти місяців з часу його приготування.

7. Зрізи, забарвлені тим чи іншим гематоксиліном, ретельно промивають у водопровідній воді і диференціюють у розчині наступного складу:

Червона кров'яна сіль – 2,5 *г*;

Бура – 2 *г*;

Дистильована вода – 100 *мл*.

Для більш повільної диференціації розчин рекомендується розводити в 2–3 рази дистильованою водою. Диференціювання контролюють за допомогою мікроскопу (промиваючи зрізи кожен раз у воді). Його закінчують тоді, коли виявиться різниця між майже незабарвленою сірою речовиною та забарвленою у чорний колір білою речовиною.

Термін диференціювання залежить від часу перебування зрізів у гематоксиліні, а також від їх товщини (приблизно 20–40–60 *хв* і більше).

8. Зрізи промивають у водопровідній воді впродовж кількох годин, краще з додаванням на кожні 200–400 *мл* води 1–2 *мл* насиченого водного розчину вуглекислого літію.

9. Зрізи проводять через спирти, ксилол і заводять у бальзам.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Результати фарбування. Мієлінові волокна зафарбовані в темно-синій колір. Ділянки перероджених мієлінових волокон залишаються незабарвленими, або мають жовтуватий колір.

Метод прискореного забарвлення мієлінових оболонок за Вейгертом

Шматочки матеріалу товщиною до 1 см фіксують у 10–15 %-му розчині формаліну впродовж кількох діб.

Методика фарбування:

1. Шматочки зафіксованого матеріалу переносять у розчин Вейгера № 1 наступного складу:

Двохромовоокислий калій – 5 г;
Фтористий хром (флуорохром) – 2 г;
Дистильована вода – 100 мл.

Розчиняють при кип'ятінні, потім охолоджують і фільтрують. Термін перебування шматочків у розчині – 4–6 діб (краще при температурі +36⁰ С).

Флуорохром – це дрібнокристалічний порошок зеленого кольору. Його можна замінити хромовими галунами [KCr(SO₄)₂].

2. Відмивають хромові солі у 70⁰ етиловому спирті, зневоднюють і заключають у целоїдин (див. пункт 2 та 3 першого способу Вейгера).

3. Готові целоїдинові блоки (наклеєні на дерев'яні брусочки) переносять у розчин Вейгера № 2 наступного складу:

Фтористий хром (флуорохром) – 2,5 г;
Дистильована вода – 100 мл.

Розчиняють при нагріванні. Довівши розчин до кипіння, знімають його з вогню й додають 5 мл льодяної оцтової кислоти, після чого, часто помішуючи, додають ще 5 г нейтральної оцтової кислоти міді.

Обробляють блоки в розчині Вейгера № 2 впродовж 24 год. при температурі +37⁰ С. Замість цілих блоків можна обробляти і целоїдинові зрізи (6–24 год). Застосування розчину Вейгера № 2 не є обов'язковим.

4. Блоки (або зрізи) переносять у 70⁰-ий спирт на 12 год.

5. Наступна обробка зрізів відбувається за схемою першого методу Вейгера (починаючи з пункту б).

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Результати фарбування такі ж, як і при оригінальному методі Вейгерта.

Слід відмітити, що в методах Вейгерта, у зв'язку з використанням подвійного протравлення, матеріал стає крихким. Тому якість заливки матеріалу в целоїдин повинна бути дуже високою.

Фарбування мієлінових оболонок за методом Вейгерта-Паля

Шматочки матеріалу фіксують у рідині Мюллера або в 10–15 %-му розчині формаліну чи в рідині Орта.

Методика фарбування:

1. Шматочки матеріалу переносять у 4–5 %-ий розчин двохромовокислого калію або у рідину Мюллера (*див. пункт 1 оригінального методу Вейгерта*).

2. Матеріал промивають у воді. Якщо для досліджень використовують швидкий метод Вейгерта, друге протравлення матеріалу пропускають.

3. Зневоднюють матеріал у спиртах та заключають його в целоїдин.

4. Готують зрізи.

5. Фарбують зрізи в залізному або краще літієвому гематоксиліні Вейгерта впродовж 24–48 год (*див. пункт 6 оригінального методу Вейгерта*).

Якщо целоїдинові зрізи після хромування набули не коричневого, а зеленуватого кольору, їх перед фарбуванням обробляють (2–3 год) у 2–3 %-му розчині двохромовокислого калію або в 0,5–1 %-му розчині хромової кислоти.

6. Зафарбовані зрізи ретельно промивають у водопровідній воді (1–2 год). Бажано до води додати розчин вуглекислого літію (1–2 мл насиченого водного розчину вуглекислого літію на 200 мл води).

7. Зрізи переносять у щойно виготовлений 0,25 %-ий розчин марганцевокислого калію на 20–30 сек (можна затримати до 3–5 хв).

8. Швидко промивають їх у воді і диференціюють у щойно виготовленому розчині наступного складу:

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Щавлева кислота – 1 г;
Сірчаноокислий калій (Kalii sulfurosi – K₂SO₃) – 1 г;
Вода дистильована – 200 мл.

Диференціювання відбувається швидко і займає близько 2–3 хв. При цьому зрізи весь час переміщують препарувальною голкою. Уважно контролюють процес диференціювання. Сіра речовина повинна бути повністю безбарвною. Якщо ж вона залишається коричневою, то зрізи знову переносять у розчин марганцевокислого калію і повторюють диференціювання.

9. Зрізи промивають у водопровідній воді (1 повністю 2 год), зневоднюють, просвітлюють у карбол-ксилолі, ксилолі та заводять у бальзам.

Результати фарбування. Мієлінові оболонки зафарбовані в темно-синій, майже чорний колір.

Недоліком цього методу є швидке диференціювання, внаслідок чого тонкі мієлінові волокна можуть знебарвлюватись.

Фарбування мієлінових оболонок за методом Кульчицького

Шматочки матеріалу товщиною до 0,5 см фіксують у 10 – 15 %-му розчині формаліну або в рідині Орта.

Методика фарбування:

1. Матеріал піддають хромуванню у 4–5 %-му розчині двохромовокислого калію або у рідині Мюллера впродовж 4 – 6 тижнів. Рідину замінюють 1–2 рази на тиждень.
2. Відмивають хромові солі з матеріалу у 70⁰ спирті (у темряві), щодобово замінюючи його, доки він перестане забарвлюватися.
3. Проводять матеріал через спирти і заключають у целоїдин.
4. Готують зрізи.
5. Зрізи забарвлюють у гематоксиліні Кульчицького:
10 %-ий спиртовий розчин гематоксиліну (після дозрівання) – 10 мл;
2 %-ий розчин оцтової кислоти (на дистильованій воді) – 90 мл.

Якщо спиртовий розчин гематоксиліну був щойно виготовленим, то для фарбування він придатний не раніше, як через тиждень. Тривалість фарбування целоїдинових зрізів – 12–24 год.

6. Промивають зрізи у дистильованій воді 0,5–1 хв.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

7. Зрізи диференціюють у розчині наступного складу:

1 %-ий розчин червоної кров'яної солі – 10 мл;

Насичений водний розчин вуглекислого

літію (1,52 %-ий при $t + 20^{\circ}\text{C}$) – 100 мл.

Процес диференціювання зрізів відбувається повільно (6–12 і навіть 24 год). Його контролюють за допомогою мікроскопу. Розчин для диференціювання у міру забарвлення замінюють.

8. Ретельно промивають зрізи у водопровідній воді (1–2 год).

9. Проводять зрізи через спирти, ксилол і заводять у бальзам.

Результати фарбування. Мієлінові оболонки забарвлені в синьо-чорний колір.

Перевагою цього методу є те, що процес диференціювання відбувається повільно. Внаслідок цього знебарвлення тонких нервових волокон не відбувається.

За цим методом фарбується мієлін і на заморожених зрізах виготовлених із матеріалу, зафіксованого у формаліні. У цьому випадку замороженні зрізи перед фарбуванням піддають хромуванню впродовж 3–6 год у 1–2 %-й хромовій кислоті.

Фарбування мієлінових оболонок за методом Кульчицького-Вольтерса

Метод Вольтерса є комбінацією двох методів: Н.К. Кульчицького (фарбування) і Паля (диференціювання).

Методика фарбування:

1. Шматочки матеріалу спочатку обробляють за методом Н.К. Кульчицького, включаючи фарбування зрізів оцтовокислим гематоксиліном (див. пункти 1–5 методу Н.К. Кульчицького).

2. Після фарбування гематоксиліном целоїдинові зрізи ретельно промивають у водопровідній воді, а потім обробляють за методом Паля, тобто переносять їх у 0,25 %-ий розчин марганцевокислого калію на 20–30 сек, знову промивають у воді і диференціюють у розчині щавелевої кислоти і сірчанокислого калію (див. пункти 7–9 методу Вейгерта-Паля).

Результати фарбування. Мієлінові оболонки зафарбовані в синьо-чорний колір.

Метод має такі ж недоліки, як і метод Вейгерта-Паля.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Імпрегнація нервової тканини за методом Гліса

Матеріал фіксують у 10–15 %-му розчині формаліну і заливають його в парафін або целоїдин.

Методика фарбування:

1. Парафінові зрізи звільняють від парафіну ксилолом (2–3 хв), проводять через 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт і поміщають у воду. В останню переносять і целоїдинові зрізи.

2. Зрізи переносять у 20 %-ий розчин азотнокислого срібла на 2 год за кімнатної температури до набуття ними коричневого забарвлення.

3. Зрізи обробляють відновлюючим реагентом Наута (400 мл бідистильованої води, 45 мл 96⁰ етилового спирту, 13,5 мл 10 %-го формаліну і 13,5 мл 1 %-ої оцтової кислоти) впродовж 10 хв.

4. Зрізи переносять у 5 %-ий розчин аміачного срібла приготовленого на 80⁰ етиловому спирті, на 15 хв.

5. Промивають їх в абсолютному етиловому спирті – 10 сек.

6. Відновлюють (два рази замінюючи) у розчині наступного складу: 400 мл 10 %-го розчину формаліну, 50 мл 96⁰ етилового спирту, 20 мл 1 %-ої оцтової кислоти впродовж 10 хв.

7. Зрізи промивають у водопровідній воді.

8. Фіксують у 5 %-му тіосульфаті натрію – 3 хв.

9. Промивають у водопровідній воді, зневоднюють у спиртах, просвітляють у ксилолі і заводять їх у бальзам.

Тотальна імпрегнація периферійних нервів за методом Ренсона

Шматочки матеріалу (нерви) фіксують протягом 48 год у рідині наступного складу: 96⁰ етиловий спирт – 100 мл; нашатирний спирт – 1 мл. Після фіксації його промивають 2–3 год у дистильованій воді.

Методика імпрегнації:

1. Шматочки матеріалу переносять у піридин на 24–48 год (у витяжній шафі).

2. Поміщають їх на 24 год у проточну воду.

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

3. Переносять матеріал у бідистильовану воду на 4 год (через кожну годину воду міняють).
4. Матеріал поміщають у 2 %-ий розчин азотнокислого срібла в темряві на 7–10 діб (у термостаті за температури +37⁰ С).
5. Промивають його у дистильованій воді впродовж 30 хв.
6. Проявляють у рідині наступного складу: пірогалова кислота – 4 г, формалін нейтральний – 10 мл, дистильована вода – 90 мл. Шматочки матеріалу витримують у цій рідині до 48 год, на світлі.
7. Промивають матеріал у дистильованій воді (10 хв).
8. Проводять його через спирти: 70⁰ (1–2 год), 96⁰ (24 год, спирт міняють двічі) та абсолютний (24 год, спирт міняють двічі).
9. Заливають матеріал у парафін.
10. Готують зрізи товщиною 15–20 мкм.
11. Наклеюють їх на предметні стекла.
12. Проводять депарафінування зрізів і заводять їх у бальзам.

Результати імпрегнації. Нерви мають темно–коричневий або чорний колір.

Фарбування мієлінових нервових волокон у заморожених зрізах за методом Соколянського

Метод – надзвичайно простий для виконання і широко використовується. Він дає можливість виявити і дегенеративні мієлінові волокна.

Автором запропоновано дві методики: першу – для отримання оглядових препаратів, другу – для виявлення волокон у стані дегенерації.

Методика фарбування волокон для отримання оглядових препаратів

Матеріал фіксують впродовж 2–3 діб у 15 %-му розчині формаліну (можна користуватися матеріалом, який знаходився у формаліні рік і навіть більше). Після фіксації і промивання з нього готують заморожуючі зрізи товщиною 20–30 мкм, які переносять на 10 хв у 80⁰ етиловий спирт.

|

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Методика фарбування:

1. Зрізи поміщають у насичений (приблизно 12 %-ий) водний розчин двохромовокислого калію на 2–3 доби (у термостаті за температури $+37-40^{\circ}\text{C}$).

2. Промивають їх у воді і переносять у гематоксилін Кульчицького на 1–2 год за температури $+37-40^{\circ}$ (*приготування гематоксиліну див. пункт 5, фарбування мієлінових оболонок за методом Кульчицького*).

3. Переносять зрізи, міняючи етап промивання у воді, у мюлеровську рідину на 2–3 хв.

4. Зрізи промивають у воді і обробляють за методом Паля, тобто переносять їх у 0,25 %-ий розчин марганцевокислого калію, потім промивають у воді і диференціюють у розчині щавелевої кислоти і сірчанокислого калію (*див. пункти 7–9 методу Вейгерта-Паля*).

Результати фарбування. Нервові волокна зафарбовані в темно-синій колір.

Методика фарбування для виявлення волокон у стані дегенерації

Матеріал готують так, як і для отримання оглядових препаратів.

Методика фарбування:

1. Зрізи товщиною 5–10 мкм переносять у насичений водний розчин двохромовокислого калію на 3–5 і більше діб.

2. Промивають їх у воді і переносять у гематоксилін Кульчицького на 4–6 год за температури $+50-60^{\circ}\text{C}$ або на 48 год за температури 40°C . Далі зрізи обробляють згідно п. 3, 4 першої методики.

Результати фарбування. Нервові волокна у стані дегенерації мають нехарактерне забарвлення.

При фарбуванні зрізів за цими методиками і для одержання хороших результатів необхідно дотримуватись таких умов: а) зрізи повинні бути чітко розправленими під час перебування їх у двохромовокислому калії і в гематоксиліні; б) зрізи промивають у воді після перебування їх у двохромовокислому калії до моменту повного відходження жовтої фарби.

Імпрегнація елементів макроглії (астроглії)

Крім нервових клітин (нейроцитів), в органах нервової системи знаходяться і нейрогліальні клітини (гліоцити). У зрілій центральній нервовій системі (ЦНС) існують чотири типи гліальних клітин: астроцити, олігодендроцити, епендимоцити та мікроглія.

Нейрогліальні клітини (астроглія) виявляються у всіх відділах мозку, найбільше їх у білій речовині. Це сукупність зірчастих гліальних клітин (астроцитів) у центральній нервовій системі, що виконують опорну, трофічну, розмежувальну та регуляторну функції. Астроцити забезпечують нейрони енергією, формують гематоенцефалічний бар'єр, контролюють іонний баланс та беруть участь у синаптичній передачі. Вони є найчисленнішими клітинами глії, підтримуючи роботу мозку в нормі та при патологіях. Їх відростки формують сітку, в петлях якої містяться нейрони. Кінцеві відростки астроцитів підходять до кровоносних судин, ізолюючи їх від нейронів.

Найважливішими функціями астроглії є: *структурна* – астроцити формують сітку, що підтримує нейрони, і утворюють гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), регулюючи транспорт речовин із крові; *трофічна* – забезпечують нейрони енергією, зокрема лактатом; *регуляція синапсів* – астроцити беруть участь у синаптичній передачі, вивільняючи та захоплюючи нейротрансмітери (наприклад, глутамат, ГАМК); *імунна відповідь* – у разі пошкоджень мозку (ішемія, травми) астроцити активуються (астрогліоз), синтезуючи цитокіни та сприяють репарації тканин, хоча це може викликати і негативні ефекти при хронічному запаленні.

Найкращим способом виявлення астроцитів, є імпрегнація їх хлорним золотом.

Фіксація матеріалу:

Щойно відібраний матеріал, фіксують у спеціально приготовленому *бромистому фіксаторі* наступного складу:

- Абсолютний нейтральний формалін – 14 мл
- Бромистий амоній – 2 г
- Дистильована вода – 100 мл

Методи фарбування зрізів для гістологічних досліджень

Фіксують матеріал у цьому розчині впродовж 2–8 діб (не більше). Можна фіксувати і в 10–15%-му розчині формаліну. Після фіксації матеріал ретельно промивають у водопровідній воді.

Для роботи придатні заморожені зрізи.

Методика імпрегнації:

1. Готують зрізи на заморожувальному мікротомі (товщина зрізів 20–30 мкм).

2. Зрізи безпосередньо з мікротомного ножа переносять у бромистий фіксатор і витримують їх у термостаті за температури 37° С впродовж 2 діб.

3. Зрізи швидко промивають у дистильованій воді та поміщають їх у свіжевиготовлену імпрегнуювальну суміш на 4–8 год наступного складу:

1. 1%-ий розчин хлорного золота – 10 мл;
2. 5%-ий розчин сулеми кристалічної – 8 мл;
3. Дистильована вода – 50 мл.

Примітка. Посуд у якому знаходяться зрізи має бути з темного скла або ж імпрегнацію проводять у затемненому місці. Зрізи в імпрегнуювальній суміші повинні знаходитись відокремлено і в розправленому вигляді. У 24 мл імпрегнуювальної суміші має бути 5–8 зрізів. Зміщувати зрізи паличкою заборонено. У процесі імпрегнації зрізи набувають коричневого кольору з червоним відтінком.

4. Зрізи поміщають (для фіксації золота) у 10 %-ий розчин гіпосульфїта на 15–20 хв. Зрізи у цьому розчині розправляються (в імпрегнуючій суміші вони були дещо зжатыми), світлішають і набувають фіолетового кольору).

5. Зрізи промивають у 40–50° спирті, швидко проводять через абсолютний спирт, провітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результати імпрегнації. Астроцити з відростками набувають червоно-фіолетового, сіро-фіолетового, коричневого (залежно від терміну імпрегнації) кольору.

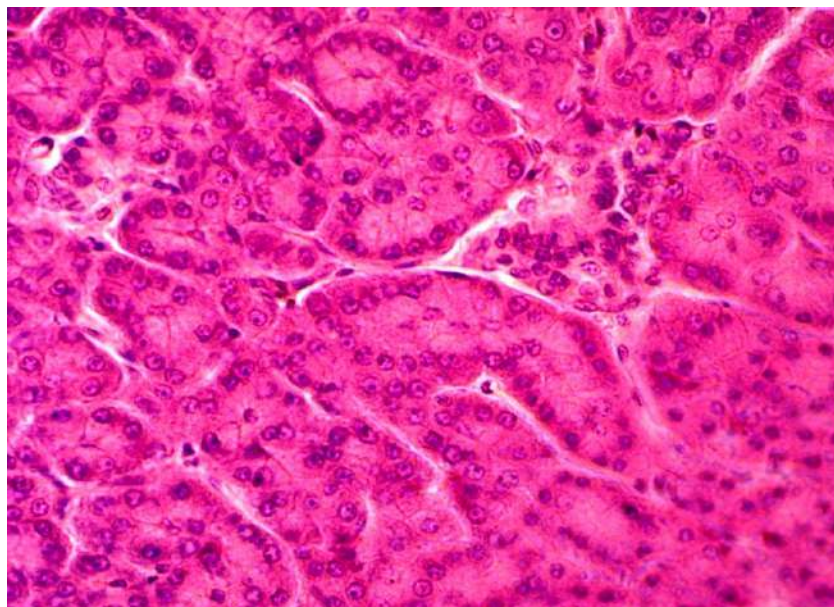


Рис. 20. Фрагмент мікроскопічної будови підшлункової залози кота свійського. Гематоксилін та еозин. $\times 400$.
Препарат Л.П. Горальського.

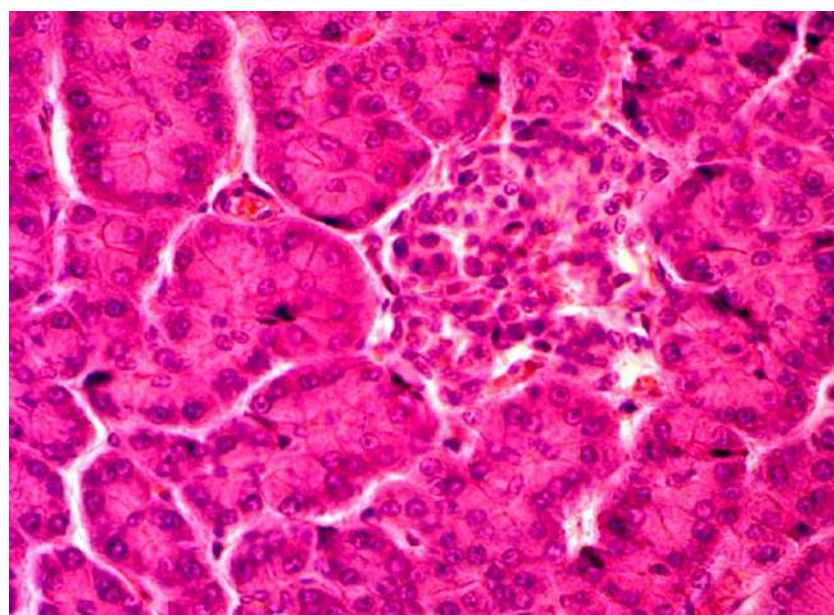


Рис. 21. Фрагмент мікроскопічної будови підшлункової залози кота свійського. Гематоксилін та еозин. $\times 600$.
Препарат Л.П. Горальського.

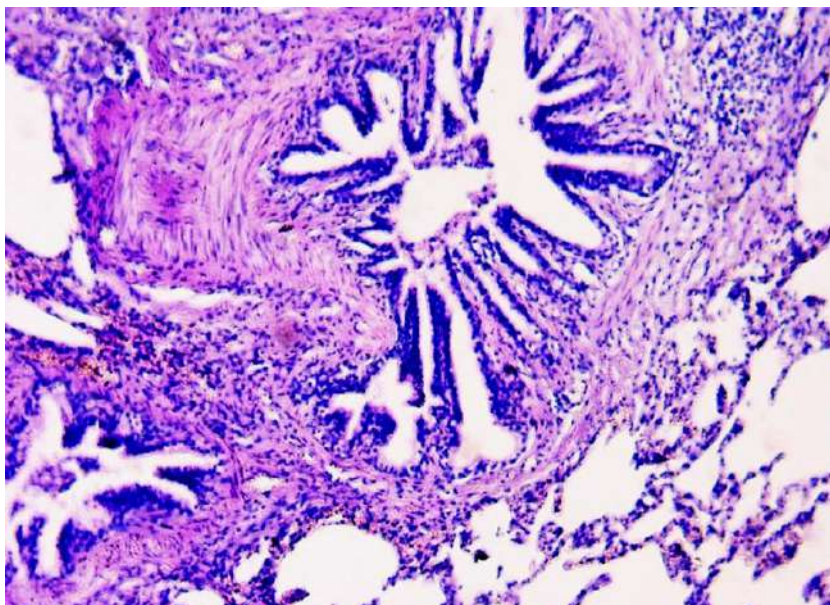


Рис. 22. Мікроскопічна будова легень собаки свійського. Гематоксилін та еозин. X 120. Препарат Л.П. Горальського.

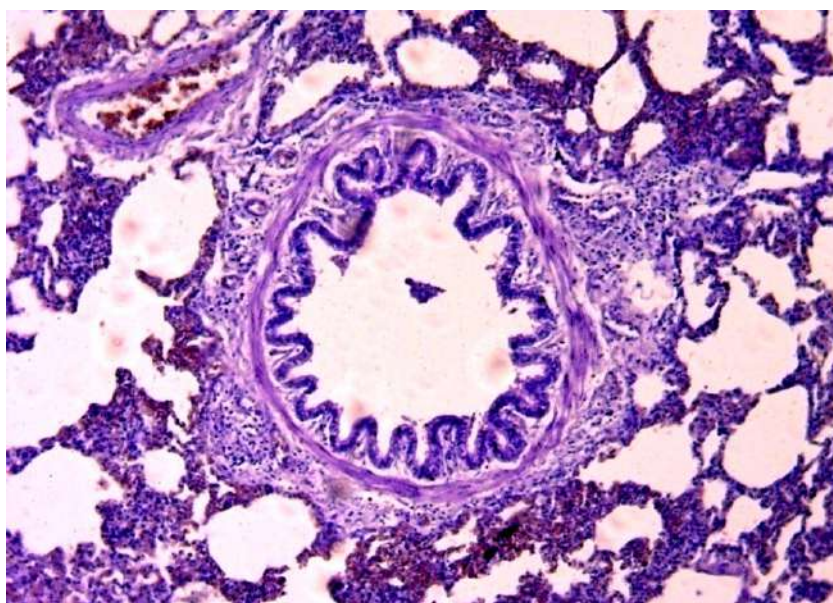


Рис. 23. Мікроскопічна будова легень свині свійської. Гематоксилін та еозин. X 120. Препарат Л.П. Горальського.

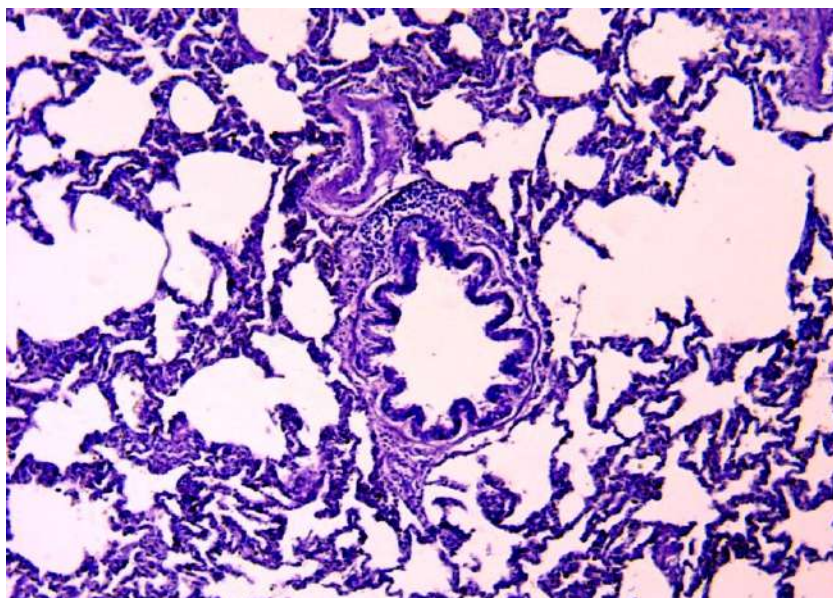


Рис. 24. Мікроскопічна будова легенів свині свійської. Гематоксилін та еозин. X 120. Препарат Л.П. Горальського.

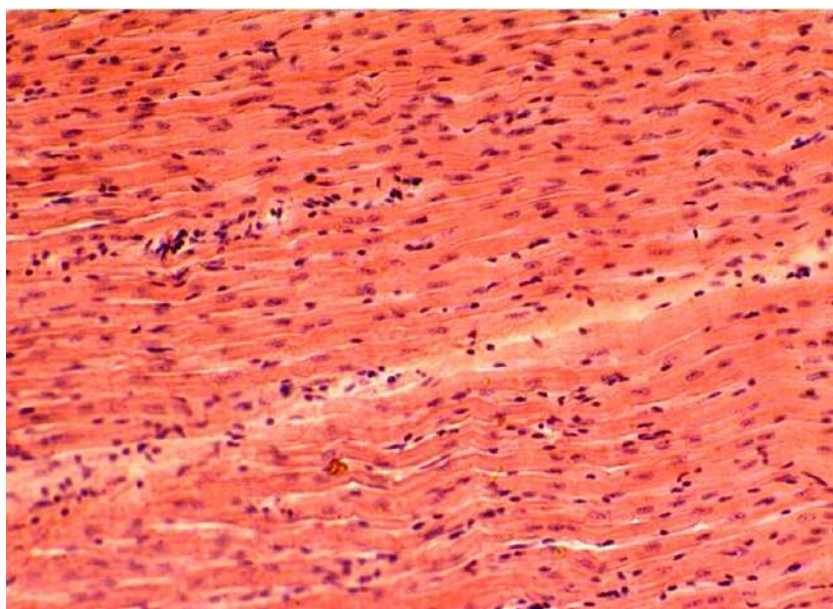


Рис. 25. Мікроскопічна будова міокарда правого шлуночка серця бика свійського. Гематоксилін та еозин. X 120. Препарат Л.П. Горальського.

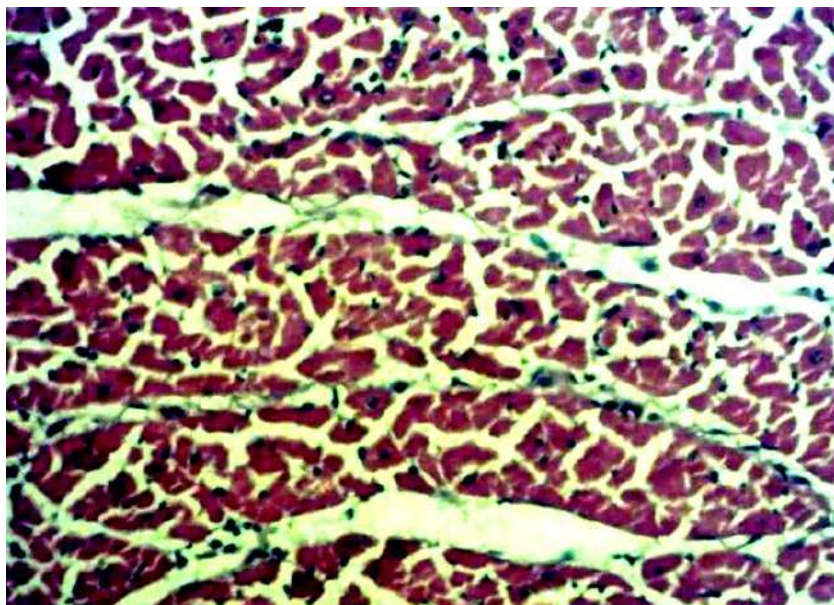


Рис. 26. Мікроскопічна будова міокарда лівого шлуночка серця лисиці звичайної (поперечний зріз). Гематоксилін та еозин. X 280. Препарат Л.П. Горальського.

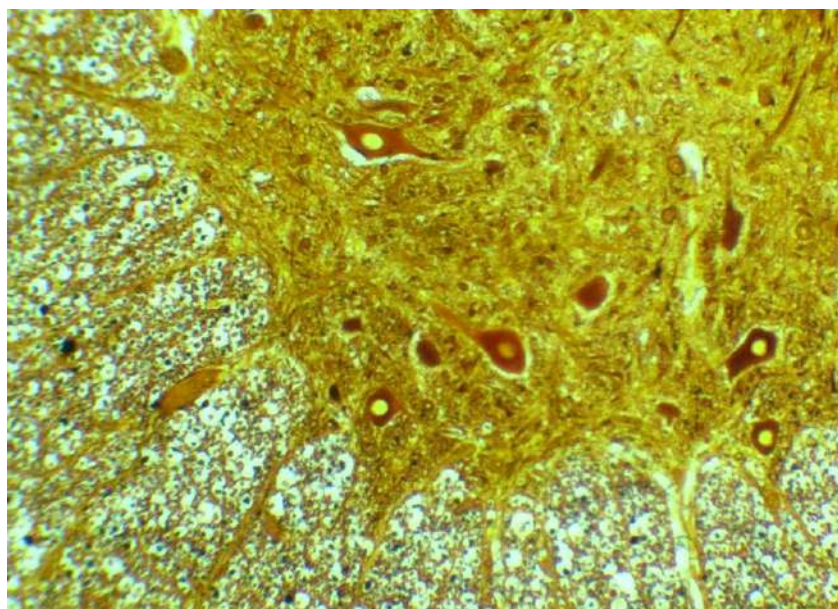


Рис. 27. Мікроскопічна будова поперечного зрізу спинного мозку собаки свійського. Рамон-і-Кахаль. X. 100. Препарат Н.Л. Колеснік.

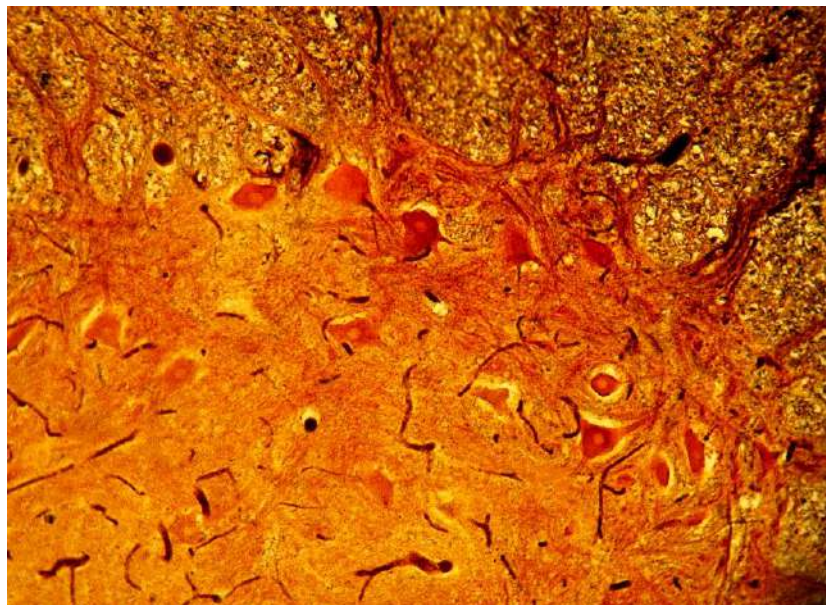


Рис. 28. Скупчення ефекторних нейронів у спинному мозку собаки свійського. Рамон-і-Кахаль. X. 120. Препарат Н.Л. Колеснік.

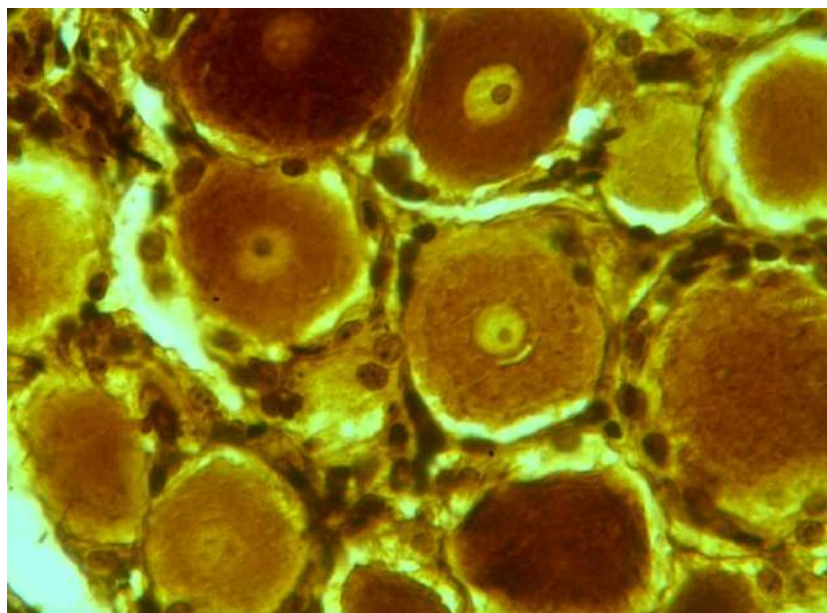


Рис. 29. Фрагмент мікроскопічної будови спинномозкового вузла собаки свійського. Рамон-і-Кахаль. X 320. Препарат Н.Л. Колеснік.

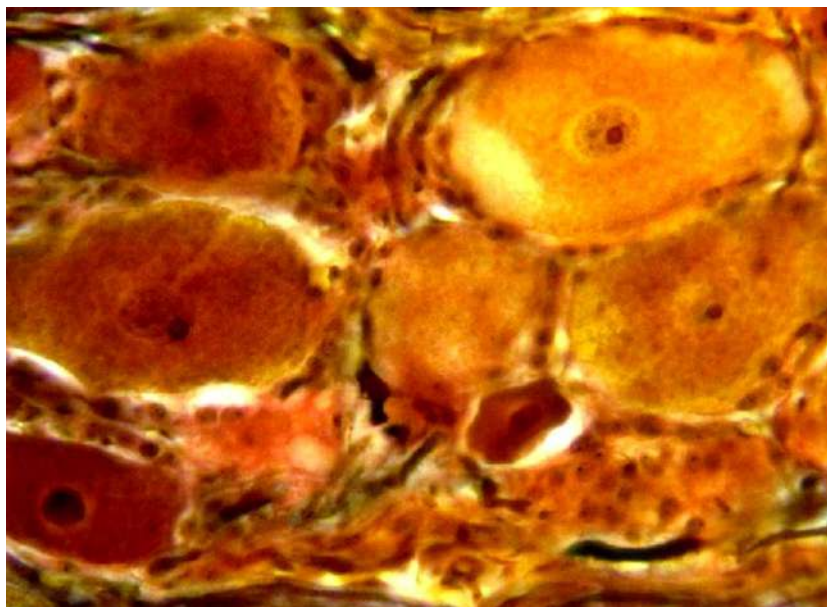


Рис. 30. Нейрони спинномозкового вузла собаки свійського.
Більшовський-Грос. X 320. Препарат Н.Л. Колеснік.

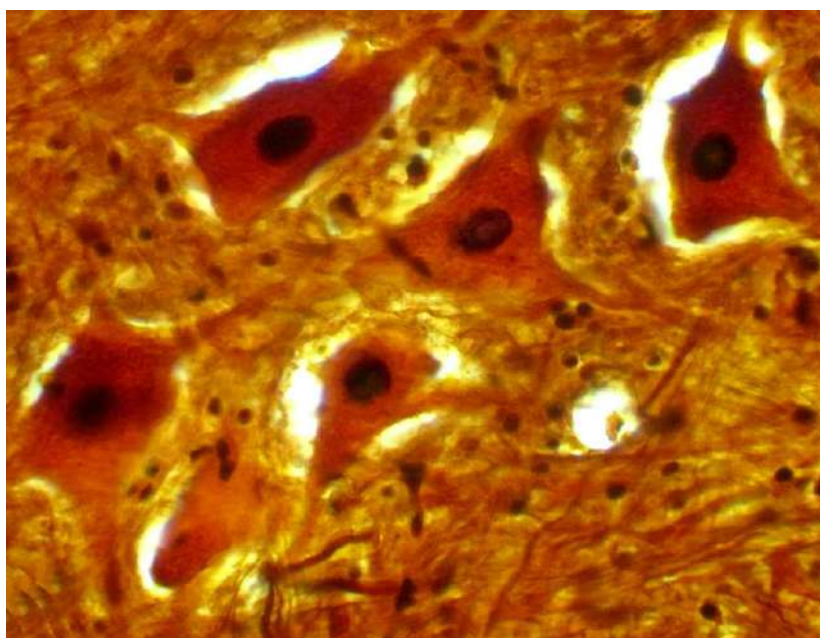


Рис. 31. Мультиполярні нейрони спинного мозку собаки свійського.
Більшовський-Грос. X 400. Препарат Н.Л. Колеснік.

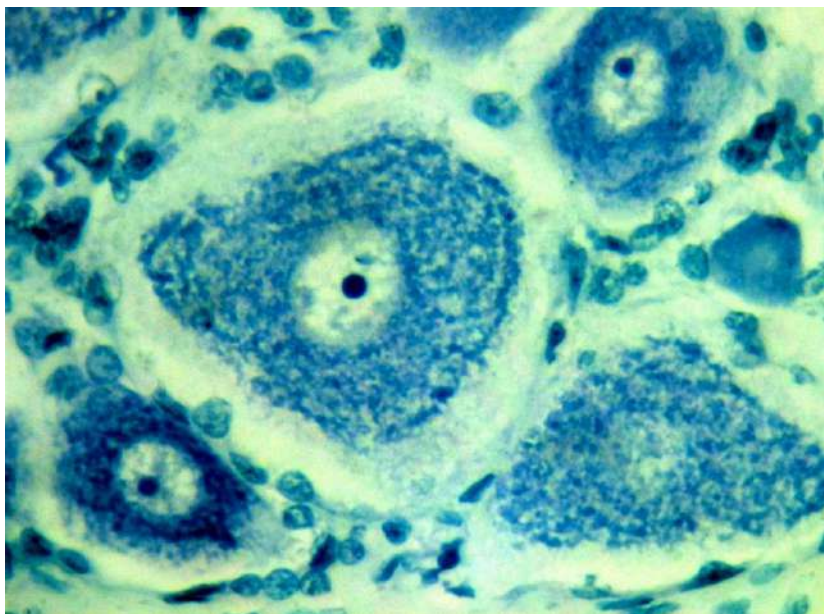


Рис. 32. Хроматофільна речовина в нейронах спинномозкового вузла собаки свійського. Нісль. X 400. Препарат Н.Л. Колеснік.

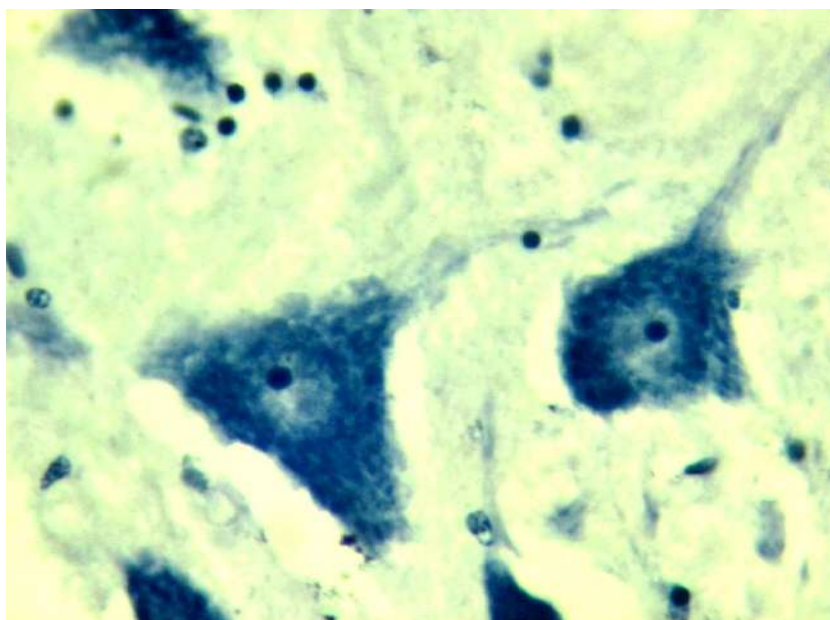


Рис. 33. Хроматофільна речовина в нейронах спинного мозку собаки свійського. Нісль. X 400. Препарат Н.Л. Колеснік.

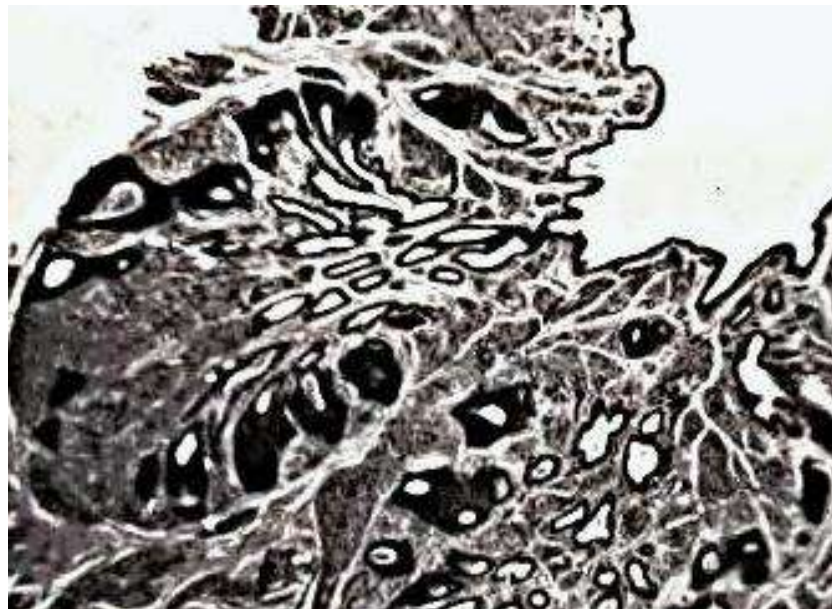


Рис. 34. Мікроскопічна будова піднебінного мигдалика семимісячного плода бика свійського. Гематоксилін та еозин. X 16. Препарат. В.Т. Хомича.



Рис. 35. Ретикулярні волокна піднебінного мигдалика шестимісячного плода бика свійського. Імпрегнація азотнокислим сріблом. X 56. Препарат. В.Т. Хомича.

ГІСТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Гістохімічні методи використовують для дослідження хімічного складу клітин, їхніх структур і міжклітинної речовини у тканинах організму людини й тварин за різних умов – у нормі, при захворюваннях, функціональних змінах і в процесі старіння. Порівняно з класичними гістологічними підходами, вони дають змогу значно швидше виявляти функціональні та вікові зміни в клітинах, що важливо для точної оцінки морфологічних особливостей і відмежування нормальних структур від патологічних.

Основне завдання гістохімії полягає у вивченні хімічного складу клітинних елементів і процесів обміну речовин у них. На відміну від мікрохімічних методів, вона не лише визначає наявність певних сполук, а й встановлює їх точне розташування в клітині або тканині.

В основі цих методів лежать специфічні хімічні реакції, під час яких утворюються нерозчинні сполуки, що відкладаються в певних ділянках клітини чи міжклітинної речовини. Ці продукти добре помітні під мікроскопом і відрізняються від інших компонентів. За допомогою гістохімічних досліджень виявляють білки, амінокислоти, нуклеїнові кислоти, ліпіди, вуглеводи, а також активність ферментів. Результати можуть бути кількісно оцінені за допомогою морфометричних і спектрофотометричних методів із подальшою математичною обробкою.

Нуклеїнові кислоти

Нуклеїнові кислоти – ДНК і РНК – важливі органічні сполуки, що забезпечують життєві процеси в організмі. Вони були відкриті Ф. Мішером у ХІХ столітті. Разом із білками ці сполуки формують нуклеопротеїди – важливі структурні компоненти клітин. При їх розщепленні утворюються азотисті основи (пуринові та піримідинові), пентози та фосфорна кислота.

Раніше помилково вважали, що існують окремі «тваринні» та «рослинні» нуклеїнові кислоти. Тваринна нуклеїнова кислота вперше була отримана із тимуса. При її гідролізі утворюються дві пуринові основи – аденін і гуанін та дві піримідинові – цитозин і тимін,

дезоксирибоза та фосфорна кислота. Ця нуклеїнова кислота і була названа тимонуклеїною кислотою, пізніше – **дезоксирибонуклеїною** кислотою (ДНК).

При гідролізі нуклеїнової кислоти іншого типу, отриманої із дріжджів, виявили пуринові (аденін, гуанін) та піримідинові (тимін, урацил) основи, а також рибозу і фосфорну кислоту. Ця нуклеїнова кислота була названа **рибонуклеїною** кислотою (РНК).

Використання методів цитохімії та фракціонування клітинних структур показало, що обидві нуклеїнові кислоти є обов'язковими компонентами тваринних і рослинних клітин.

Подальші дослідження довели, що обидва типи нуклеїнових кислот (ДНК, РНК) присутні в усіх живих клітинах є обов'язковими компонентами тваринних і рослинних клітин, і, разом із білками утворюють єдину функціональну систему, з функціонуванням якої пов'язана їх життєдіяльність.

Значна кількість нуклеїнових кислот у клітині перебуває у комплексних сполуках з білками (гістонами, протамінами, менша – з альбумінами і глобулінами), утворюючи дезоксирибонуклеопротеїди (ДНП) та рибонуклеопротеїди (РНП).

ДНК зосереджена переважно в ядрі клітини та відіграє ключову роль у збереженні й передачі спадкової інформації, особливо під час клітинного поділу. РНК, яка локалізується в ядерці та цитоплазмі, забезпечує процес синтезу білків.

Структуру ДНК у вигляді подвійної спіралі описали Дж. Уотсон і Ф. Крик у 1953 році. Вона складається з двох ланцюгів нуклеотидів, з'єднаних за принципом комплементарності: аденін – тимін, гуанін – цитозин. Кожний ланцюг молекули ДНК складається із 10 нуклеотидів.

РНК, на відміну від ДНК, має один ланцюг, у якого нуклеотиди з'єднані між собою за допомогою залишків фосфорної кислоти.

Існує три основні типи РНК: матрична (інформаційна), рибосомальна та транспортна. Перша – *інформаційна РНК* переносить генетичну інформацію від ДНК і регулює синтез білків. Вона складає близько 5 % усієї РНК клітини, має близьку до ДНК будову, зчитує інформацію з неї і здійснює контроль за синтезом білка. Молекула інформаційної РНК має від 100 до 6000 залишків

нуклеотидів. Друга – *рибосомальна РНК* входить до складу рибосом. Вона складає 80 % усієї РНК клітини. Третя – *транспортна РНК* транспортує амінокислоти до місця синтезу білка. Вона представлена більше ніж 20-ма різновидами, характерними для кожної амінокислоти і складає близько 15 % усієї РНК клітини та бере участь у перенесенні окремих амінокислот до місця синтезу клітинного білка, тобто до рибосом. Різні види РНК, в основному, синтезуються в ядрі, потім через пори ядерної оболонки переміщуються у цитоплазму, в якій і виконують синтетичну, структурну та інформаційну функції.

Більшість гістохімічних методів, що застосовуються для дослідження нуклеїнових кислот, базуються на реакціях між спеціальними реагентами та продуктами їх попереднього розщеплення.

Виявлення нуклеїнових кислот за методом Ейнарсона

Для фіксації матеріалу використовують рідину Карнуа, 96⁰ етиловий спирт, 10–12 %-ий розчин нейтрального формаліну. Бажано уникати фіксаторів, що містять у своєму складі ртуть і хром.

Для постановки реакції за даним методом придатні парафінові та заморожені зрізи.

Цей метод є важливим у гістохімічних дослідженнях. Він дає можливість сумарно виявляти ДНК і РНК на гістопрепаратах та є придатним для цитоспектрофотометричних досліджень.

При фарбуванні зрізів галоціанін-хромовими галунами (ГХГ) утворюється стійке забарвлення, яке не змінюється навіть при зневодненні зрізів спиртами. Характерною особливістю цього методу є властивість тканини інтенсивно сприймати барвник. Галоціанін-хромовими галунами можна фарбувати зрізи при рН від 0,8 до 4,3. Перефарбування не допускається. При зменшенні рН інтенсивність забарвлення зменшується, але специфічність зростає, досягаючи максимуму при рН 1,5–1,75.

Принцип виявлення ДНК та РНК ґрунтується на застосуванні галоціаніну – барвника оксазинового ряду. При кип'ятінні його з галунами утворюється хромовий крапlak галоціаніну у вигляді трьох

комплексів: лак-катіон, лак-гідроксид та лак-сульфат. Взаємодіючи із нуклеїновими кислотами, лак-катіон утворює сольові зв'язки із залишками фосфорної кислоти нуклеотидів. Такий комплекс забарвлюється у темно-синій колір. Результати цитофотометричних досліджень показали, що кожний мононуклеотид зв'язується з однією молекулою барвника, в результаті чого утворюється комплексна сполука, за локалізацією якої і визначають місце знаходження нуклеїнових кислот, у даному разі ДНК.

Реактиви:

1. Розчин галоціанін-хромових галунів (ГХГ): 5 г хромових галунів розчиняють у 100 мл дистильованої води, додають 0,15 г галоціаніну, змішують струшуючи. Розчин поступово нагрівають до кипіння і кип'ятять 5–10 хв. Після цього охолоджують, фільтрують і доводять його об'єм дистильованою водою до 100 мл, рН розчину – до 1,64. Розчин придатний упродовж 1–3 тижнів.

2. Розчин РНК-ази або ДНК-ази (використовують для приготування контрольних розчинів): розчиняють РНК-азу на бідистильованій воді із розрахунку 1 мл РНК-ази на 1 мл води. Розчиняють кристалічну ДНК-азу в 0,0025 М розчині $MgSO_4$ із розрахунку 1 мл ДНК-ази на 1 мл розчину; або розчиняють кристалічну ДНК-азу у 0,01 М трис-буфері (рН 7,6) із розрахунку 2 мл ДНК-ази на 100 мл розчину. Перед використанням розводять дистильованою водою (1:5).

3. Буферна суміш: її готують за допомогою даних приведених у таблиці 3, в якій показано, скільки потрібно додати до 40 мл розчину ГХГ (див. п. 1) 1 М розчину HCl або $NaOH$, щоб отримати необхідний показник рН реактиву для виявлення нуклеїнових кислот.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до дистильованої води.

2. Зрізи переносять у розчин барвника (ГЖГ) на 48 год при кімнатній температурі.

3. Зрізи промивають у проточній і дистильованій воді.

4. Зневоднюють зрізи у спиртах зростаючої міцності.

5. Просвітлюють зрізи у ксилолі і заводять їх в бальзам.

Результати реакції. Нуклеїнові кислоти забарвлені у сіро-блакитний колір. Залежно від значення рН забарвлюються й інші

Гістохімічні методи досліджень

речовини. На зрізах, попередньо оброблених розчином РНК-ази або ДНК-ази, відповідні нуклеїнові кислоти не виявляються у місцях типової локалізації.

Таблиця 3. Показники розрахунків для приготування реактиву з необхідним рН для виявлення нуклеїнових кислот

Кількість 1 М НСІ (мл), яку необхідно додати до 40 мл розчину ГХГ, щоб отримати необхідний показник рН	рН	Кількість 1 М NaOH (мл), яку необхідно додати до 40 мл розчину ГХГ, щоб отримати необхідний показник рН	рН
10	0,83	0	1,64
9	0,90	1	1,84
8	0,92	2	2,16
7	0,94	3	2,90
6	1,02	4	3,42
5	1,10	5	3,76
4	1,14	6	3,98
3	1,18	7	4,07
2	1,29	8	4,18
1	1,44	9	4,27
0	1,64	10	4,35

Виявлення нуклеїнових кислот за методом Ейнарсона у модифікації Л. Горальського

Для фіксації матеріалу використовують рідину Карнуа, 96⁰ етиловий спирт, 10–12 %-ий розчин нейтрального формаліну. Бажано уникати фіксаторів, що містять у своєму складі ртуть і хром.

Для постановки реакції за даним методом придатні парафінові та заморожені зрізи.

Метод має важливе значення в гістохімічних дослідженнях, оскільки дає змогу сумарно виявляти ДНК і РНК на гістологічних препаратах та є придатним для проведення цитоспектрофотометричних досліджень.

Принцип виявлення нуклеїнових кислот – аналогічний попередньому методу і ґрунтується на застосуванні галоціаніну – барвника оксазинового ряду (*див. метод Ейнарсона; с. 124*).

Перевага цього методу виявлення нуклеїнових кислот над попереднім полягає в тому, що шляхом нагрівання кожного стекла з барвником і зрізом, продовж 5–10 хв над полум'ям спиртівки до появи пухирців, зменшується термін виготовлення гістологічних препаратів, унаслідок прискорення інтенсивності абсорбування барвників – взаємодії реактивів з продуктами гідролізу.

Реактиви:

1. Розчин галоціанін-хромових галунів (ГХГ).
2. Розчин РНК-ази або ДНК-ази.
3. Буферна суміш.

Примітка: Приготування реактивів (*див. метод Ейнарсона; с. 125*).

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до дистильованої води.

2. На скло зі зрізом наносять 5–15 крапель розчину барвника (ГЖГ) і поступово підігривають його над полум'ям спиртівки до відходження пару із барвника (5–10 хв). При цьому предметне скло утримують пінцетом. Потім підігривання припиняють і залишають розчин барвника на зрізі ще на 20–25 хв.

3. Зрізи промивають у проточній і дистильованій воді.

4. Зневоднюють зрізи у спиртах зростаючої міцності.

5. Просвітлюють зрізи у ксилолі і заводять їх у бальзам.

Результати реакції. Нуклеїнові кислоти забарвлені у сіро-блакитний колір. Залежно від значення рН, забарвлюються й інші речовини. На зрізах, попередньо оброблених розчином РНК-ази або ДНК-ази, відповідні нуклеїнові кислоти не виявляються у місцях типової локалізації.

Окреме виявлення ДНК та РНК сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Браше

Для фіксації шматочків матеріалу використовують рідину Карнуа, 10 %-ий розчин нейтрального формаліну, інші фіксатори.

Для роботи придатні свіжозаморожені та парафінові зрізи, мазки та препарати-відбитки.

Встановлено, що піронін G у суміші з метиловим зеленим забарвлює РНК ядерець і цитоплазми у червоний колір, а метиловий зелений забарвлює ДНК хромосом у зелений колір. Це стало основою для створення гістохімічного методу окремого виявлення у клітині РНК та ДНК і багатьох його модифікацій. Так, дані методи дозволили виявляти окремо ДНК і РНК на одному і тому ж препараті.

Цей метод широко використовується у багатьох гістохімічних лабораторіях світу. З його допомогою встановлена участь нуклеїнових кислот у синтезі білка, рості та розвитку клітин, виконанні клітинами специфічних функцій, виникненні пухлин, патогенезі багатьох хвороб людини і тварин.

Принцип виявлення вивчений недостатньо. Прийнято вважати, що реакція метилового зеленого і піроніну з двома нуклеїновими кислотами базується на базofilії структур та зумовлена наявністю у складі молекул ДНК та РНК залишків фосфорної кислоти. При виникненні забарвлення ДНК і РНК основне місце належить процесу адсорбції, який відбувається при структурній відповідності між аміногрупами молекул барвника і фосфорними групами полінуклеотидних ланцюгів.

За результатами досліджень встановлено, що піронін у клітині вступає в реакцію із вільною або легко зв'язаною із білками РНК, утворюючи забарвлене комплексне з'єднання піроніну з РНК.

Реактиви: Придатні два піроніни – Q та Y. Метиловий зелений потрібно очистити від домішок метилового фіолетового. Для цього 0,2 г барвника розчиняють у 100 мл хлороформу, перемішують і залишають на 24 год. Потім струшують і фільтрують. Осад метилового зеленого на фільтрі промивають хлороформом до тих пір, доки не зникне синьо-фіолетовий відтінок. Осад висушують та використовують для приготування розчинів.

1. Розчин А – змішують 17,5 мл 5 %-го водного розчину піроніну і 10 мл 2 %-го водного розчину метилового зеленого у 250 мл дистильованої води.

2. Розчин Б – ацетатний буфер Уолпола з рН 4,8 (*приготування див. ст. 232*).

3. Робочий розчин – перед постановкою реакції змішують рівні об'єми розчинів А і Б. Термін зберігання робочого розчину – у межах тижня.

4. Контрольний розчин – розчиняють кристалічну РНК-ази на бідистильованій воді із розрахунку 1 мл РНК-ази на 1 мл води.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.

2. Контрольні зрізи поміщають у розчин РНК-ази на 1 год при температурі +37⁰ С.

3. Дослідні та контрольні зрізи фарбують робочим розчином – від 10 хв до 24 год.

4. Промивають зрізи у дистильованій воді впродовж кількох секунд.

5. Просушують зрізи фільтрувальним папером.

6. Швидко зневоднюють зрізи в ацетоні.

7. Переносять зрізи у суміш ксилолу і ацетону (1:1) на 30–60 сек.

8. Промивають зрізи у суміші ацетону і ксилолу (1:10).

9. Просвітляють зрізи у чистому ксилолі (двічі замінюючи ксилол).

10. Заводять зрізи у канадський бальзам або синтетичне середовище.

Результати. Структури, що містять РНК, забарвлені у червоний колір, ядерний хроматин – у зелений, синьо-зелений або пурпурово-зелений. Контрольні препарати не забарвлюються піроніном, ДНК хроматину виявляється у вигляді часточок зеленого кольору, або синьо-зелених утворень; на характер забарвлення впливає ступінь очищення і якість метилового зеленого.

Примітка: Для деяких тканин, зокрема нервової, зневоднення зрізів краще проводити у спиртах зростаючої міцності.

Фарбування сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Курника

Для фіксації матеріалу використовують рідину Карнуа, 80⁰ етиловий спирт, холодний ацетон, 10 %-ий розчин нейтрального формаліну.

Для роботи придатні парафінові, щойно заморожені та ліофілізовані зрізи.

Модифікація Курника дає можливість отримати якісну передачу кольорів.

Принцип виявлення. Інтенсивність і характер забарвлення препарату визначається ступенем полімеризації нуклеїнових кислот. Так, РНК забарвлюється піроніном у 5 разів інтенсивніше, ніж високополімерна ДНК, і в 6 разів сильніше, ніж комплекс ДНК з гістоном.

Реактиви: 1. Очищений хлороформом метиловий зелений від домішок метилового фіолетового (*див. попередній метод*). 2. 2 %-ий водний розчин піроніну Y. 3. Робочий розчин – змішують 7,5 мл розчину метилового зеленого, 12,5 мл розчину піроніну і 30 мл дистильованої води. 4. Абсолютний *n*-бутанол. 5. Кедрова олія. 6. Розчин РНК-ази (1 мг ферменту на 1 мл бідистильованої води).

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.

2. Контрольні зрізи переносять на 1 год у розчин РНК-ази при температурі +37⁰ С (термостат).

3. Контрольні та дослідні зрізи фарбують у робочому розчині впродовж 5 хв.

4. Висушують зрізи фільтрувальним папером.

5. Зневоднюють зрізи в абсолютному *n*-бутанолі (двічі по 5 хв).

6. Просвітлюють зрізи у ксилолі (4–5 хв).

7. Поміщають зрізи у кедрову олію на 5 хв.

8. Заводять зрізи у терпенову смолу.

Результати. Хроматин забарвлений у блакитно-зелений колір, РНК ядерець і цитоплазми – у яскраво-червоний.

Фарбування сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Унна

Для фіксації матеріалу використовують рідину Карнуа або рідину Карнуа з 1 %-ою оцтовою кислотою, рідину Ценкера, 10 %-ий розчин нейтрального формаліну – фіксація впродовж 4–16 год.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи.

Метод простий. Наявність у складі реактивної суміші фенолу сприяє кращій взаємодії барвників з молекулами нуклеїнових кислот, особливо у грубоволокнистих тканинах, наприклад, у окісті, де він виконує «протравлюючу» функцію.

Принцип виявлення такий, як і в методі Браше.

Реактиви. Метилловий зелений очищують від домішок метилового фіолетового хлороформом (*див. метод Браше*).

1. Робочий розчин: метилловий зелений – 0,15 г, піронін – 0,25 г; 96⁰ етиловий спирт – 2,5 мг; гліцерин – 20 мг; кристалічний фенол – 0,5 г; дистильована вода – до 100 мл. 2. Розчин РНК-ази (*див. метод Браше*).

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до дистильованої води.

2. Контрольні зрізи обробляють розчином РНК-ази впродовж 1 год при температурі +37⁰ С.

3. Дослідні та контрольні зрізи переносять у робочий розчин на термін від 10 хв до 24 год.

4. Висушують зрізи фільтрувальним папером.

5. Швидко зневоднюють зрізи в абсолютному ацетоні.

6. Промивають зрізи у суміші ацетону і ксилолу (9:1).

7. Переносять зрізи на кілька секунд у суміш ацетон-ксилол (1:1).

8. Проводять зрізи через 10 %-ий розчин ацетону на ксилолі.

9. Просвітлюють зрізи у ксилолі (двічі замінюючи ксилол) і заводять у бальзам.

Результати: Структури клітин, що містять РНК, забарвлені піроніном у яскраво-червоний колір, ДНК – у синьо-зелений. Найкращі результати отримані на матеріалі нервової тканини (спинний мозок та спинно-мозкові вузли).

Виявлення нуклеїнових кислот акридиновим оранжевим

Для роботи придатні щойно виготовлені препарати-відбитки, зрізи із тканини, виготовлені у мікротомі-кріостаті та наклеєні на предметні стекла.

Матеріал можна фіксувати у суміші оцтової кислоти та етилового спирту.

Встановлено, що після фарбування зрізів тканин акридиновим оранжевим і наступним їх вивченням за допомогою люмінесцентного мікроскопа у цитоплазмі і ядечках клітин виявляються флуоресцентні речовини червоного, а в ядрі – зеленого кольору. Перші з них руйнуються РНК-азою.

Принцип виявлення ґрунтується на здатності нуклеїнових кислот взаємодіяти з молекулами акридинового оранжевого. В результаті утворюється комплекс барвника з нуклеїновою кислотою, який може на початку поглинати ультрафіолетові промені, потім випромінювати світлову енергію у вигляді червоної або зеленої люмінесценції.

Реактиви: 1. 0,1 %-ий розчин акридинового оранжевого у дистильованій воді. 2. Вихідний розчин Кребса-Рінгера: 0,9 %-ий розчин NaCl (0,154 M) – 80 частин; 1,15 %-ий розчин KCl (0,154 M) – 4 частини; 0,11 M розчин CaCl₂ – 3 частини; 2,11 %-ий розчин KН₂РO₄ (0,154 M) – 1 частина; 3,82 %-ий розчин MgSO₄·7H₂O – 1 частина.

Перед використанням рН вихідного розчину Кребса-Рінгера доводять до 6-6,5, додаючи 0,1 M розчин Na₂НРO₄. Після цього виготовляють робочий розчин: до 9 частин вихідного розчину додають 1 частину розчину акридинового оранжевого.

Постановка реакції:

1. На зрізи або препарати-відбитки наносять кілька крапель робочого розчину на 15 хв і більше.
2. Підсушують зрізи або препарати-відбитки фільтрувальним папером.
3. Наносять на зрізи або препарати-відбитки розчин Кребса-Рінгера.
4. Накривають препарати накривним скельцем.
5. Вивчають одержані препарати за допомогою люмінесцентного мікроскопа при синьому кольорі.

Результати. Місця локалізації ДНК визначаються за зеленою, РНК – за червоною люмінесценцією. Сполучнотканинні волокна люмінесцують зеленим кольором.

Виявлення ДНК

Існує ряд методів, за допомогою яких визначається локалізація і вміст ДНК. Місцями типової локалізації ДНК є каріоплазма, хромосоми і ядерця.

Метод Фельгена-Росенбека

Для фіксації матеріалу придатні всі фіксатори, крім суміші Буена.

Для роботи використовують парафінові, целоїдинові та заморожені зрізи; мазки і препарати-відбитки.

Цей метод дає змогу проводити якісні та кількісні дослідження ДНК. Використання цього методу дало можливість встановити закон постійної кількості ДНК у хромосомному наборі різних клітин окремих видів тварин і рослин, допомогло довести, що синтез ДНК у клітині відбувається під час інтерфази – підготовчого періоду клітин до поділу шляхом мітозу.

Принципи виявлення. Початковою стадією реакції є гідролітичне розщеплення дезоксирибонуклеопротеїду на білок і нуклеїд. Нуклеїд розщеплюється до білка і ДНК. Молекула ДНК поступово руйнується до мононуклеотидів – аденілової, гуанілової, цитодилової і тимидилової кислот під впливом, зазвичай, 1 н. розчину HCl. Потім проходить розщеплення зв'язків між основами, дезоксирибозою і фосфорною кислотою.

Реактиви: 1. 1 н. розчин HCl. 2. Реактив Шиффа за прописом де Томазі: 1 г основного фуксину розчиняють у 200 мл кип'ячої дистильованої води, 5 хв струшують, охолоджують до +50⁰С і фільтрують. До фільтрату додають 20 мл 1 н. розчину HCl. Знову розчин охолоджують до +25⁰С і додають до нього 1 г піросульфату натрію (Na₂S₂O₅) або калію (K₂S₂O₅). Розчин залишають у темряві на 14–24 год. Потім додають до нього 2 г активованого вугілля, 1 хв струшують. Розчин фільтрують і зберігають у холодильнику при

температурі $0 +4^{\circ}\text{C}$. Перед використанням розчин повинен мати кімнатну температуру. 3. Сульфатна вода – до 5 мл 10 %-го розчину піросульфату калію або натрію, додають 5 мл 1 н. розчину HCl і добавляють дистильовану воду до 100 мл. При цьому використовують тільки щойно виготовлену воду. 4. Розчини для додаткового фарбування: 0,5 %-ий водний розчин стійкого зеленого, 0,5 %-ий спиртовий розчин стійкого зеленого, 1 %-ий водний розчин світло-зеленого, 0,5 %-ий розчин малахітового зеленого.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) до води.
2. Промивають зрізи у холодному 1 н. розчині HCl .
3. Переносять зрізи в 1 н. розчин HCl нагрітий до $+60^{\circ}\text{C}$ (на відповідний термін) для гідролізу (*див. примітку*).
4. Переносять зрізи у реактив Шиффа на 0,5–1 год.
5. Висушують зрізи фільтрувальним папером.
6. Промивають зрізи у сульфатній воді (тричі по 2 хв).
7. Промивають зрізи у проточній воді.
8. При необхідності, дофарбовують зрізи одним із додаткових барвників (1 %-им водним розчином стійкого зеленого).
9. Зневоднюють зрізи у спиртах.
10. Просвітлюють зрізи у суміші спирт-ксилол (1:1) і у ксилолі (двічі замінюючи його).
11. Заводять зрізи у канадський бальзам, полістирол або інші середовища.

Результати: ДНК забарвлена в червонувато-пурпуровий колір (додаткове фарбування сприяє контрастності зрізу). Цей метод (реакція Фельгена) використовують для вивчення різних стадій поділу клітин і підрахунку індексу мітозів. Нервові клітини характеризуються слабо вираженою реакцією Фельгена, особливо великі рецепторні нейрони спинномозкових вузлів.

Примітка. При гідролізі потрібно враховувати характер і термін фіксації матеріалу. Так, якщо матеріал фіксували у розчині формаліну, термін кислотного гідролізу становить 8 год, формаліну-сулеми – 8, рідині Рего – 14, Карнуа – 8, Карнуа у модифікації Ліллі – 6, Суза – 18, Ценкера – 5, Буен-Аллена – 22, Флемінга – 16, дихромат-

оцтовій кислоті – 14 год, насиченому розчині пікринової кислоти – 15–30 хв.

Реакція Фельгена з гідразидом нафтоїної кислоти за Пірсом

Для фіксації матеріалу використовують різноманітні фіксатори і способи підготовки тканин.

Цей метод дозволяє уникнути деяких артефактів, що мають місце при використанні реактиву Шиффа.

Принцип виявлення. У результаті м'якого гідролізу, проведеного в 1 н. розчині HCl, молекула ДНК розщеплюється на мононуклеотиди, які гідролізуються до пуринових та піримідинових основ, дезоксирибози і фосфорної кислоти.

Реактиви: 1. 1 н. розчин HCl. 2. 0,1 %-ий розчин гідразиду 2-окси-3-нафтоїної кислоти у 50⁰ етиловому спирті, що містить 5 % оцтової кислоти. 3. Розчин діазотированого *o*-дианізидину: 50 мг стійкого синього В розчинити у 50 мл 0,1 М фосфатному буферному розчині з рН – 7,4.

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до дистильованої води.
2. Швидко їх промивають у холодному 1 н. розчині HCl.
3. Проводять гідроліз у 1 н. розчині HCl при температурі +60⁰ С з врахуванням фіксації матеріалу (*див. попередній метод*).
4. Промивають зрізи у холодному 1 н. розчині HCl.
5. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.
6. Промивають зрізи у 50⁰ етиловому спирті.
7. Поміщають зрізи у розчин гідразиду нафтоїної кислоти на 3–6 год при температурі +22⁰ С.
8. Промивають зрізи у 50⁰ етиловому спирті (тричі по 10 хв).
9. Промивають зрізи у дистильованій воді.
10. Переносять зрізи у щойно виготовлений розчин стійкого синього В при 0⁰ С і рН 7,4 на 1–3 хв.
11. Зневоднюють зрізи в спиртах.

12. Просвітлюють зрізи в ксилолі і заводять у бальзам або полістирол.

Результати. ДНК забарвлена у синьо-пурпуровий колір. Білкові сполуки можуть забарвлюватися у рожево-червоний колір.

Примітка. Контрольні препарати перед кислотним гідролізом (пункт 2 у методах Фельгена-Россенбека і Пірса) обробляють розчином ДНК-ази. Його можна готувати кількома способами:

а) розчиняють кристалічну ДНК-азу у 0,0025 М розчині $MgSO_4$ із розрахунку 1 мг ДНК-ази на 1 мл розчину;

б) розчиняють кристалічну ДНК-азу у 0,01 М трис-буфері (рН 7,6) із розрахунку 2 мг ДНК-ази на 100 мл розчину. Перед використанням розводять дистильованою водою (1:5).

Зрізи, мазки або препарати-відбитки інкубують у відповідному розчині ДНК-ази при температурі 37⁰ С впродовж 1–24 год (залежно від природи дослідного матеріалу). У подальшому застосовують звичайну обробку препарату, передбачену відповідними методиками.

Білки

Білки – це високомолекулярні органічні сполуки, утворені з амінокислот, які є основною складовою всіх живих організмів. Життєдіяльність будь-якого організму безпосередньо пов'язане з білковим обміном. У тваринному організмі білки виконують численні життєво важливі функції: формують структури клітин, виступають каталізаторами біохімічних реакцій, забезпечують захист, транспортування речовин, беруть участь у енергетичних процесах і передачі спадкової інформації. Саме з білками пов'язані такі ключові прояви життя, як подразливість, рух, ріст, розвиток, розмноження, саморегуляція та адаптація до умов середовища, а також процеси синтезу і розщеплення речовин.

За складом білки поділяють на прості та складні. Прості білки (протеїни) складаються виключно з амінокислот. Серед них виділяють альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, а у рослин також глутеліни й проламіни. Складні білки (протеїди) містять, окрім білкової частини, ще й небілковий компонент – так звану простетичну групу. Залежно від її природи розрізняють різні типи складних білків: нуклеопро-
теїди

(з нуклеїновими кислотами), глікопротеїди (з вуглеводами), ліпопротеїди (з ліпідами), фосфопротеїди (з залишками фосфорної кислоти) та хромопротеїди, у складі яких є пігменти.

Хромопротеїди, своєю чергою, поділяють на кілька груп: білки з вмістом заліза (наприклад, гемоглобін, міоглобін, цитохроми, каталаза, пероксидаза), дихальні пігменти крові безхребетних, що містять залізо або мідь, а також білки, пов'язані з рибофлавіном (вітаміном В₂). У рослин до цієї групи належать білки, пов'язані з хлорофілом. До складних білків також відносять ферменти, які мають білкову частину та активний небілковий компонент – кофермент.

На сьогодні відомо понад дві тисячі видів білків, виділених із організмів тварин, рослин, людини, а також мікроорганізмів і вірусів. Вони характеризуються значною молекулярною масою (наприклад, від десятків тисяч до сотень мільйонів), добре розчиняються у воді та утворюють колоїдні системи. Під впливом солей можуть випадати в осад (висолювання), а під дією кислот, лугів, солей важких металів, деяких органічних речовин або високої температури – зазнавати денатурації. За своїми хімічними властивостями білки є амфотерними електролітами, оскільки у складі їх молекул містяться як карбоксильні так і амінні групи.

Сучасні гістохімічні методи дозволяють визначати локалізацію білків у клітинах, тканинах і внутрішньоклітинних структурах. За їх допомогою встановлюють якісний склад білків, досліджують етапи їх синтезу та переміщення в межах клітини й організму, а також оцінюють їхню хімічну активність і наявність функціональних груп.

Виявлення загальних білків

Загальні (сумарні) білки в тканинах представлені різноманітними протеїнами та протеїдами. Їх кількість залежить від багатьох факторів: походження тканини, її функцій, віку організму, ступеня диференціювання клітин, еволюційного рівня організму, умов існування та функціонального стану.

Кількість барвника, що зв'язується з білками під час гістохімічного дослідження, прямо пропорційна їх вмісту в тканині.

Це правило лежить в основі більшості цито- та гістохімічних методів і узгоджується із законом Бугера-Ламберта-Бера.

Метод Бонхега

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин формаліну та рідину Карнуа.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Метод базується на фарбуванні клітин і тканин бромфеноловим синім та застосовується у біохімічних дослідженнях. У гістохімічних зрізах кількість зв'язаного барвника – пропорційна вмісту в них білків.

Принцип виявлення. У результаті гістохімічної реакції між барвником та субстратом у місцях концентрації білків виникає важкорозчинна комплексна сполука бромфенолового синього з білком, як наслідок прояву іонного хімічного зв'язку та адсорбції.

Реактиви: 1. Залежно від мети досліджень застосовують розчини барвника: а) 1 %-ий розчин бромфенолового синього, насиченого сулемою; б) 0,05 %-ий розчин бромфенолового синього, приготовленого на 1 %-му розчині сулеми в 2 %-му розчині оцтової кислоти. 2. 0,5 %-ий водний розчин оцтової кислоти.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.

2. Поміщають зрізи у розчин бромфенолового синього на 2 год при кімнатній температурі.

3. Промивають зрізи у 0,5 %-му водному розчині оцтової кислоти впродовж 5 хв.

4. Промивають їх у трет-бутанолі.

5. Просвітлюють зрізи у ксилолі і заводять у канадський бальзам або полістирол.

Результат. Локалізацію білкових сполук визначають за темно-синім забарвленням.

Виявлення білків розчином амідочорного 10 В

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин формаліну та рідину Карнуа.

Для роботи придатні парафінові та щойнозаморожені зрізи.

Амідочорний 10 В застосовують у біохімії при вивченні електрофорезних фракцій білків, у гістохімічній практиці – при вивченні білків тканин і клітин.

Принцип виявлення. У процесі хімічної взаємодії реактиву та білків відбуваються явища фізичного (адсорбція) та хімічного (утворення іонних хімічних зв'язків) характеру.

Виникнення забарвлення пов'язане з утворенням іонних зв'язків між кислотними групами молекул барвника та основними групами білків (аміногрупами лізину, гуанідиною групою аргініну та імідазольним кільцем гістидину). Різні білки зв'язують різну кількість молекул барвника.

Реактиви: 1. Робочий розчин: 0,2 г амідочорного 10 В і 100 мл льодяної оцтової кислоти розчиняють у 900 мл хімічно чистого метанолу. 2. 1 %-ий розчин оцтової кислоти (готують на 70⁰-му етиловому спирті).

Постановка реакції:

1. Якщо зрізи парафінові, то їх потрібно депарафінувати (ксилолом).
2. Зрізи (мазки, препарати-відбитки) поміщають на 2–10 хв у розчин барвника.
3. Диференціюють зрізи 1 %-им розчином оцтової кислоти.
4. Зневоднюють зрізи у спиртах.
5. Просвітлюють їх у ксилолі і заводять у канадський бальзам або полістирол.

Результат. Сумарні білки забарвлені у різні кольори – від чорного до червоного. І. В. Шуст вважає, що основні білки забарвлюються у блакитний колір різної інтенсивності, кислі – у чорний, коричневий і червоний кольори.

Виявлення основних і кислих білків

Прояв основних властивостей білків зумовлений переважанням у їх складі молекул аміногруп над карбоксильними. Типовими представниками таких білків є різні види протамінів і гістонів.

У молекулах кислих білків кількість карбоксильних груп переважає амінні. Вони побудовані головним чином із моноамінодикарбонових амінокислот (аспарагінової, глютамінової). Прояв кислих властивостей складних білків, наприклад, фосфопротеїдів, зумовлений наявністю в їх молекулах залишків мінеральних кислот.

Виявлення основних і кислих білків за методом Мікель-Кальво

Для фіксації матеріалу, відібраного відразу після забою або загибелі тварин, використовують 12 %-ий розчин нейтрального формаліну або рідину Карнуа.

Для досліджень придатні заморожені та парафінові зрізи.

Принцип виявлення: Головну роль у виявленні відіграє адсорбція та взаємодія барвника з молекулами білків через їх функціональні групи. Залежно від переважання у молекулах білків тих чи інших функціональних груп, буде й різне забарвлення – від темно-синього до жовтого.

Реактиви: 1. Робочий розчин: готують 0,1 %-ий розчин бромтимолового синього на суміші абсолютного етанолу (7 частин) та оцтової кислоти (3 частини), рН 2,4. 2. 1 %-ий спиртовий розчин оцтової кислоти: у 100 мл 70⁰ етилового спирту розчинить 1 мл льодяної оцтової кислоти.

Постановка реакції:

1. Заморожені або депарафінові (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) зрізи поміщають на 2–10 хв у робочий розчин.
2. Диференціюють зрізи в 1 %-му спиртовому розчині оцтової кислоти.
3. Зневоднюють їх у спиртах або ацетоні.
4. Просвітлюють зрізи в ксилолі і заводять у канадський бальзам або полістирол.

Результати. Основні білки забарвлені у блакитні і сині кольори, кислі – у червоний, жовтий і зелений кольори.

Виявлення ліпопротеїдів

Ліпопротеїди – це складні білкові комплекси, у яких білкова частина поєднана з небілковим компонентом – ліпідами. До складу цієї простетичної групи можуть входити різні жироподібні речовини: нейтральні жири, стерини, фосфоліпіди, цереброзиди, жирні кислоти, каротиноїди, а також жиророзчинні вітаміни (А, D, Е, К) та інші сполуки. Якщо у такому комплексі переважає білкова складова, його називають ліпопротеїдом; у випадку, коли домінують ліпіди, вживають термін протеоліпід.

Значення ліпопротеїдів для організму є надзвичайно вагомим. Вони є ключовими компонентами клітинних мембран і входять до складу більшості внутрішньоклітинних структур, зокрема рибосом, ендоплазматичної сітки, мітохондрій, лізосом, апарату Гольджі та мікротілець. Окрім структурної ролі, окремі представники цих сполук беруть участь у важливих фізіологічних процесах: забезпечують механізми згортання крові (наприклад, тромбопластин), відіграють роль у сприйнятті світла (родопсин), а також залучені до імунних реакцій організму.

Виявлення ліпопротеїдів за методом Карміхала

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин формаліну, рідину Бекера, Карнуа, Флемінга, Ліллі тощо.

Для роботи придатні парафінові або заморожені зрізи та препарати-відбитки.

Метод базується на можливості реагування ліпопротеїдів із розчином, в якому наявний гідрокінон (джерело протонів та електронів), хлорид кобальту і сіль тетразолію.

Реактиви: 1. 0,1 М розчин гідрокінону. 2. Основний розчин: 0,25 мл 0,2 М трис-буфера з рН 8,1 (див. ст. 225) змішують з 3 мл 0,5 М розчину CoCl_2 , фільтрують, додають 25 мл 0,1 %-го розчину 3-(4,5-диметилтіазоліну-1,2) 2,5-дифенілтетразолію броміду або хлориду, 25 мл трис-буферу (рН – 8,1) і 40 мл дистильованої води.

Зберігають в холодильнику. 3. Робочий розчин: перед використанням змішують 0,25 мл 0,1 М розчину гідрохінону з 15 мл основного розчину.

Постановка реакції:

1. Заморожені або депарафіновані (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) зрізи поміщають на 90 хв у робочий розчин.
2. Зрізи промивають впродовж кількох хвилин у дистильованій воді.
3. Зрізи заводять у гліцерин-желатин.

Результат: Ліпопротеїди виявляються у вигляді світло-сірих або синьо-чорних включень. Реакція краще виражена на зрізах, які виготовлені із ліофілізованого або щойно замороженого матеріалу, гірше – на зрізах, які виготовлені з тканин, зафіксованих у формаліні, найгірше – на парафінових зрізах.

Визначення білкових функціональних груп

Білкові молекули, крім базових карбоксильних (–COOH) і аміногруп (–NH₂), містять широкий спектр інших функціональних груп, які визначають їхні унікальні хімічні й фізіологічні властивості. Серед них: карбоксильні групи аспарагінової та глутамінової кислот, аміногрупи лізину, гуанідинова група аргініну, індольна група триптофану, імідазольна гістидину, гідроксильні групи серину й треоніну, фенольна тирозину, сульфгідрильна цистеїну, дисульфідні містки цистину, тіоетерна метіоніну, а також аліфатичні ланцюги й ароматичне кільце фенілаланіну.

Ці функціональні елементи визначають тривимірну структуру білків та їхню біологічну активність, зокрема в ферментах, де вони відіграють ключову роль у каталізі та специфічності реакцій. Значна частина цих груп піддається виявленню за допомогою сучасних гістохімічних методів, що дозволяє простежити їх локалізацію й функціональний стан у клітині.

Виявлення NH₂- груп, зв'язаних з білками

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин формаліну, рідину Карнуа, Ценкера та 85⁰ етиловий спирт.

Для роботи придатні щойно заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1. 0,5 %-ий розчин нінгідрину на абсолютному етанолі. 2. Реактив Шиффа за прописом де Томазі: 1 г основного фуксину розчиняють у 200 мл кип'яченої дистильованої води, 5 хв струшують, охолоджують до $+50^{\circ}\text{C}$ і фільтрують. До фільтрату додають 20 мл 1 н. розчину HCl . Знову розчин охолоджують до $+25^{\circ}\text{C}$ і додають до нього 1 г піросульфїту натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) або калію ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Розчин залишають у темряві на 14–24 год, після чого додають 2 г активованого вугілля, 1 хв збовтують і фільтрують. Зберігають розчин у холодильнику при температурі 0 – $+4^{\circ}\text{C}$. Перед використанням розчин повинен мати кімнатну температуру. 3. Сульфатна вода: до 5 мл 10 %-го розчину піросульфїту калію або натрію додають 5 мл 1 н. розчину HCl і доливають дистильовану воду до 100 мл. Використовують тільки щойно виготовлений розчин.

Постановка реакції:

1. Якщо зрізи парафінові, їх депарафінують (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) і доводять до води.
2. Поміщають зрізи у розчин нінгідрину на 16–20 год.
3. Промивають їх у проточній воді впродовж 2–5 хв.
4. Переносять зрізи в реактив Шиффа на 15–60 хв.
5. Промивають зрізи в сульфатній воді впродовж 2–4 хв.
6. Промивають зрізи в проточній воді впродовж 10 хв.
7. Зневоднюють зрізи у спиртах.
8. Просвітлюють їх у карбол-ксилолі та ксилолі і заводять у канадський бальзам або синтетичне середовище.

Результат. Локалізація аміногруп визначається забарвленням від рожево-чорних до червоно-фіолетових кольорів.

Примітка: Перед зневодненням зрізи можна фарбувати гемалауном Майера (фарбування ядер), промити проточною водою та диференціювати в 1 %-му спиртовому розчині оцтової кислоти. У деяких випадках нінгідрин замінюють 1 %-им розчином алаксона.

Виявлення сульфгїдрильних груп за Барнетом і Зелігманом

Матеріал фіксують у рідині Карнуа, суміші Буена, 85° етиловому спирті, 10 %-му розчині формаліну.

Для роботи придатні щойно заморожені та ліофілізовані тканини; парафінові та заморожені зрізи.

З активністю SH-груп пов'язані життєвоважливі функції організму: поділ клітин, дихання, мембранний транспорт, енергетичний обмін тощо. Концентрація сульфгідрильних груп змінюється у тканинах і клітинах при багатьох процесах (інфекційних, інвазійних, променевої хвороби). Такі групи є «місцями атаки» токсинів і отрут. Вони містяться в цистеїні, глутатіоні, коферменті А, відновленій формі ліпоевої кислоти та відновлених залишках цистину. Відомо більше 100 ферментів, молекули яких містять SH-групи. Сульфгідрильні групи мають високу реакційну здатність і вступають у більшість реакцій: іонізації, ацетилювання, фосфорилування, окиснення, алкилювання, утворення меркаптидів, водневих зв'язків і комплексів з перенесенням заряду. Вони беруть участь у створенні вторинної і третинної структури білкових молекул за рахунок взаємодії з іншими групами.

Реактиви: 1. Розчин ДДД: 25 мг ДДД (2,2'-диоксі-6,6'-динафтілдисульфід) розчиняють у 35 мл 0,1 М веронал-ацетатного буферу, рН 8,5 (див. ст. 226) і додають 15 мл абсолютного етилового спирту. 2. 0,01 %-ий розчин оцтової кислоти (рН – 4,0–4,5). 3. Розчин солі діазонію: 50 мг стійкого синього В розчиняють у 50 мл суміші (0,1 М фосфатний буфер). Буферний розчин повинен мати рН – 7,4 (див. ст. 228).

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх на 1 год в розчин ДДД при температурі 50⁰ С.
3. Охолоджують зрізи до кімнатної температури.
4. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.
5. Промивають їх у 0,01 %-му розчині оцтової кислоти.
6. Проводять екстракцію вільних нафтолів, проводячи зрізи через ряд спиртів зростаючої міцності (50⁰, 70⁰, 96⁰, абсолютний етиловий спирт), промивають у суміші абсолютного етанолу та ефіру (1:1) і завершують цей процес у ефірі (по 5 хв у кожній рідині).
7. Промивають зрізи у дистильованій воді.
8. Переносять зрізи у щойно виготовлений розчин діазонію на 2 хв при кімнатній температурі.
9. Промивають зрізи у проточній та дистильованій воді впродовж 2–4 хв.

Гістохімічні методи досліджень

10. Заводять зрізи у гліцерин-желатин або їх зневоднюють, просвітлюють у ксилолі та заводять у кандидатський бальзам або синтетичне середовище.

Результат. Місце локалізації виявляють за широкою гамою кольорів – від рожевого до темно-синього. Синє забарвлення свідчить про високу концентрацію сульфгідрильних груп, червоне або рожеве – про незначний їх вміст у тканинах і клітинах.

Приготування контрольних препаратів

Для приготування контрольних препаратів при вивченні гістохімії білкових сполук використовують методи, які умовно можна поділити на три групи: використання протеолітичних ферментів, застосування речовин, які блокують білкові функціональні групи та приготування контрольних препаратів без проведення через розчини, які визначають кольорову реакцію за відповідного методу. Пропонуємо деякі основні методи.

Обробка розчином пепсину

Пепсин є ферментом, який продукують головні клітини залоз слизової оболонки дна шлунка. Розщеплює переважну більшість білків (крім муцинів, кератинів, фібрину) до альбумоз, пептонів, а при тривалій дії – до поліпептидів, дипептидів і амінокислот. Активно діє на роз'єднання зв'язків між α -карбоксільними групами моноамінодикарбонових та аміногрупами ароматичних амінокислот. Оптимальне значення рН для пепсину становить 1,2–2. Один грам кристалічного ферменту за дві години розщеплює біля 50 кг денатурованого яєчного білка.

Для фіксації матеріалу придатні різні фіксуючі речовини. **Для роботи використовують** парафінові зрізи та препарати-відбитки.

Приготування розчину. У потрібному об'ємі 0,01 н. розчину НСІ (рН–1,6) розчиняють необхідну кількість кристалічного препарату пепсину із розрахунку, щоб 1 мл містив 2 мг пепсину.

Постановка реакції:

1. Зрізи або препарати-відбитки доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.

2. Поміщають їх у розчин ферменту на 2–3 год при температурі +37⁰ С.
3. Промивають препарати водою.
4. Паралельно ставлять відповідну гістохімічну реакцію.

Обробка розчином трипсину

Трипсин є ферментом, який продукують клітини підшлункової залози. Бере участь у розщепленні більше 30 % усіх пептидних зв'язків білків. Оптимальне значення рН для трипсину становить 7,8. Активно розщеплює пептидні зв'язки, які утворені карбоксильними групами аргініну і лізину. У процесі гідролітичного розщеплення пептидних сполук під впливом трипсину утворюються пептиди та незначна кількість амінокислот.

Для фіксації матеріалу придатні рідина Карнуа та інші фіксуючі речовини. Для роботи використовують препарати-відбитки або парафінові зрізи.

Приготування розчину. В 0,05 М фосфатному буфері (рН – 8,9) розчиняють очищений трипсин із розрахунку 0,1 мг трипсина на 1 мл буферу. Іноді використовують інший розчин: в 0,05 М боратний буфер додають 0,2 мг ферменту на 1 мл буферу.

Постановка реакції:

1. Зрізи або препарати-відбитки доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх у розчин трипсину на 15–60 год при температурі +37⁰ С (термостат).
3. Промивають у воді.
4. Паралельно ставлять відповідну гістохімічну реакцію на білкові речовини.

Результат. На контрольних препаратах розщеплюється велика кількість білків, у першу чергу гістони. Вони виводяться із тканин і не забарвлюються.

Блокування аміногруп

Є багато способів блокування аміногруп: дезамінування, нітробензолування, ацетилювання тощо. Дезамінування легко відбувається під дією азотної кислоти.

Постановка реакції:

1. Зрізи або препарати-відбитки доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх у суміш, яка складається із рівних частин 10 %-го розчину оцтової кислоти та 5 %-го розчину нітрату натрію на 18–24 год при температурі + 4⁰ С.
3. Промивають препарати у воді.
4. Ставлять відповідну гістохімічну реакцію.

Результат. На контрольних препаратах не буде забарвлення, типового для аміногруп.

Блокування карбоксильних груп

Блокування карбоксильних груп досягається застосуванням метанолу, диметилсульфату, метиліодату і діазометану.

Постановка реакції (застосування метанолу):

1. Зрізи або препарати-відбитки доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх на 2–3 доби в 0,1 н. розчин соляної кислоти в абсолютному метанолі.
3. Промивають препарати у воді.
4. Ставлять відповідну гістохімічну реакцію.

Результат. На контрольних препаратах не буде забарвлення, типового для COOH-груп.

Блокування сульфгідрильних груп

Для блокування *сульфгідрильних* груп застосовують чимало речовин: йод, йодацетат, малеїнамід, меркаптиди тощо. Найбільш доступним є блокування розчином йоду.

Постановка реакції:

1. Зрізи або препарати-відбитки доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх на 4 год у водний розчин йоду (3,8 мг йоду і 32 мг KI розчиняють у 100 мл води, рН доводять 0,01 н. розчином HCl до 3,2).
3. Промивають препарати у воді.

4. Ставлять відповідну гістохімічну реакцію.

Результат. Контрольні препарати не містять сульфгідрильних груп порівняно з дослідними.

Ліпіди

Ліпіди – це фракції тваринних і рослинних тканин, які не розчиняються у воді, але добре розчиняються в органічних розчинниках, таких як ацетон, етанол, діетиловий ефір, бензол, ксилол, толуол, бензин і хлороформ. Вони виконують численні життєво важливі функції. У тваринному організмі ліпіди є основним джерелом енергії: при повному розщепленні 1 г жиру виділяється близьк 9,3 ккал, що майже вдвічі перевищує енергетичний вихід білків та вуглеводів. Крім того, ліпіди виконують структурну роль, входячи до складу клітинних мембран і різноманітних біологічних комплексів. Вони також важливі для метаболізму і захисту організму, оскільки здатні розчиняти жиророзчинні вітаміни (А, D, Е, К) і служать попередниками гормонів, жовчних кислот та інших біологічно активних речовин. Ліпіди беруть участь і в водному обміні: при окисненні 100 г жиру утворюється понад 100 г води.

У тканинах ліпіди знаходяться як у вільній формі, так і в складі комплексних сполук із білками, вуглеводами, вітамінами та іншими речовинами. Залежно від хімічного складу їх поділяють на *прості* та *складні*. **Прості** ліпіди формуються із залишків спиртів (наприклад, гліцерину або циклічних спиртів) і вищих жирних кислот; до них належать нейтральні жири та воски. **Складні** ліпіди, крім жирових компонентів, містять у своїй молекулі додаткові речовини: азотисті основи, залишки вуглеводів або похідні ортофосфорної кислоти – це, наприклад, фосfolіпіди, гліколіпіди та ліпопротеїди.

Нейтральні жири є складними ефірами гліцерину і жирних кислот і бувають *насиченими* та *ненасиченими*. **Насичені** жири у хімічному відношенні більш активні, оскільки за місцем подвійного зв'язку до них може приєднуватися інша хімічна речовина. **Ненасичені** жирні кислоти, які мають більше одного подвійного зв'язку, в організмі не синтезуються і тому називаються незамінними (лінолева і ліноленова кислоти, що входять до складу вітаміну F, та арахідонова).

Виявлення ліпідів

Гістохімічне виявлення ліпідів і подібних до них речовин є важливим діагностичним методом для оцінки різних патологічних процесів, включаючи жирові дистрофії, запальні реакції та новоутворення. У тканинах організму людини й тварин ліпіди часто наявні в складі комплексів з білками, вуглеводами та іншими речовинами, а не у чистому вигляді.

Для їхньої ідентифікації використовують різноманітні барвники, зокрема судан III, судан IV, судан чорний B, сульфат нільського блакитного (нільблаусульфат) та осмії. Вони дозволяють як повністю, так і частково визначити наявність жироподібних речовин та диференціювати різні їхні типи.

Виявлення загальних ліпідів

У клітинах і тканинах окремі ліпіди рідко виявляються у чистому вигляді. Вони знаходяться у складі біокомплексних сполук. Це обумовлено тим, що ліпіди в органах і тканинах, зокрема, стерини і стериди, фосфатиди, сульфатиди і гліколіпіди разом з білками, вуглеводами, вітамінами тощо утворюють комплексні сполуки.

Для виявлення загальних ліпідів у тканинах найчастіше застосовують судан чорний B. Цей барвник має високу специфічність до ліпідних сполук і складається з десяти фракцій, основною з яких є синя. Судан чорний B практично не взаємодіє з нейтральними жирами; тому, якщо останніх у тканині немає, барвник переважно зв'язується з фосфоліпідами.

Виявлення загальних ліпідів за методом Лізона

Для фіксації матеріалу використовують рідину Бекера, формалін, формалінові суміші.

При роботі використовують заморожений матеріал.

Метод застосовується для вивчення гістохімії і цитохімії багатьох тканин у нормальному і патологічному стані.

Реактиви: 1. 70⁰ етиловий спирт. 2. Насичений розчин судану чорного B на 70⁰ етиловому спирті. Перед постановкою реакції судан чорний B потрібно профільтрувати. 3. 30⁰ етиловий спирт.

Постановка реакції:

1. Заморожені зрізи промивають у дистильованій воді.
2. Промивають їх у 70⁰ етиловому спирті (30 сек).
3. Переносять зрізи у розчин судану чорного В на 20–30 хв.
4. Промивають зрізи у 30⁰ етиловому спирті (30 сек).
5. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді та заводять у гліцерин-желатин або гліцерин.

Результати. Ліпіди забарвлюються від чорного до темно-синього кольору. Забарвлюються також і фосфоліпіди. Добре фарбується мієлін і нервові волокна. Можуть виявлятися і синапси.

Виявлення загальних ліпідів суданом чорним В за Мак-Манусом

Для фіксації матеріалу використовують фіксатор Мак-Мануса, рідину Бекера, формалін.

Матеріал заливають у парафін.

Необхідно пам'ятати, що ліпіди добре розчиняються в органічних розчинниках, які використовують для проведення матеріалу при заливці у парафін. Для запобігання таких явищ відразу після фіксації невеличких шматочків матеріалу (1–4 мм) у фіксаторі Мак-Мануса (1–5 тижнів) їх переносять на 24–48 год у 3 %-ий розчин дихромату калію. Потім зневоднюють у ацетоні (тричі по 0,5 год) і переносять у розплавлений парафін, після чого проводять заливку (згідно з методикою заливки у парафін).

Реактиви: 1. 70⁰ етиловий спирт. 2. Насичений розчин судану чорного В на 70⁰ етиловому спирті. Перед постановкою реакції судан чорний В потрібно профільтрувати. 3. Галуновий кармін (див. ст. 64).

Постановка реакції:

1. Зрізи депарафінують (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) і доводять до води.
2. Промивають їх у 70⁰ етиловому спирті.
3. Переносять у розчин судану чорного В на 30 хв. Якщо матеріал не піддавався хромуванню, термін фарбування можна продовжити до 16 год, навіть за температури 60⁰ С (для щільних тканин).
4. Промивають зрізи у 70⁰ етиловому спирті.

5. Швидко промивають зрізи у водопровідній воді.
6. Забарвлюють зрізи галуновим карміном упродовж 16 год.
7. Зрізи швидко промивають у дистильованій воді і заводять у гліцерин-желатину.

Результат. Ліпіди забарвлені у чорно-синій, сірий та чорний колір, ядра карміном – у червоний. Ліпопротеїди і деякі ліпіди можуть забарвлюватися у коричнево-чорний колір.

Виявлення загальних ліпідів методом фарбування зрізів ацетильованим суданом чорним В

Для фіксації матеріалу використовують рідину Бекера та формалін.

Придатні для роботи заморожені зрізи та препарати-відбитки.

Судани різного виробництва відрізняються між собою співвідношенням червоно-оранжевої та синьої фракцій. Окремі фракції негативно впливають на якість гістохімічних реакцій. Фарбування зрізів ацетильованим суданом чорним В сприяє зникненню артефактів, типових для звичайних методів: червоне та червоно-оранжеве забарвлення.

Реактиви: 1. Ацетильований судан: 1 г судану чорного В розчиняють у 100 мл диетилового ефіру, фільтрують, фільтрат доводять до кипіння. Потім до нього додають 0,5 мл оцтового ангідриду на 20 мл дистильованої води і кип'ячать у колбі із зворотним холодильником 20 хв. Суміш охолоджують, фільтрують, фільтрат переносять у лійку і кілька разів домішки екстрагують холодною водою. Після випарювання диетилового ефіру утвориться осад ацетильованого судану чорного В – частинки чорного кольору. 2. Насичений розчин барвника: у 70⁰ етиловому спирті розчинити необхідну кількість судану чорного В до насичення. 3. 70⁰ етиловий спирт.

Постановка реакції:

1. Заморожені зрізи або препарати-відбитки поміщають у пари формаліну на 2–5 хв.
2. Переносять їх у насичений розчин барвника до 30 хв.
3. Диференціюють у 70⁰ етиловому спирті.
4. Сушать фільтрувальним папером.
5. Заводять препарати у гліцерин-желатин.

Результат. Ліпіди забарвлені у чорно-синій колір та чорний.

Виявлення зв'язаних ліпідів методом екстракції за Спангофом

Для роботи використовують матеріал, який відібраний відразу ж після загибелі або забою тварин.

Для роботи використовують матеріал заморожені зрізи.

Принцип виявлення зв'язаних ліпідів полягає у послідовній обробці зрізів групою розчинів, завдяки чому видаляються вільні ліпіди. Залишаються лише зв'язані ліпіди у вигляді біокомплексних сполук. Вони і виявляються фарбуванням суданом.

Реактиви: 1. 0,14 М розчин NaCl. 2. 0,4 М розчин NaCl. 3. 0,7 М розчин NaCl. 4. 1 М розчин NaCl. 5. Насичений розчин судану чорного В у 70⁰ етиловому спирті. 6. 70⁰ етиловий спирт.

Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають на 30 хв при температурі +4⁰ С у 0,14 М розчин NaCl.

2. Переносять їх на 12 год у 0,4 М розчин NaCl при температурі +4⁰ С і рН 7 (збовтати).

3. Поміщають зрізи на 30 хв у 0,7 М розчин NaCl (при тих же умовах).

4. Поміщають зрізи на 5 год в 1М розчин NaCl при температурі +4⁰ С і рН –4.

5. Переносять зрізи у розчин судану чорного В на 8–10 хв.

6. Промивають їх в 70⁰ етиловому спирті.

7. Промивають у дистильованій воді.

8. Зрізи заводять у гліцерин-желатин.

Результат. Зв'язані ліпіди забарвлені суданом у чорний та чорно-сірий колір.

Виявлення зв'язаних ліпідів шляхом застосування розчину судану чорного В у ацетоні за методом Беренбаума

Для фіксації матеріалу використовують рідину Бекера, формалін, рідини Ценкера, Карнуа.

Матеріал заливають у парафін.

Після тривалого промивання у воді та висушування на гарячому повітрі багато структур тканин здатні забарвлюватися суданом чорним В, розчиненим в ацетоні. Причиною цього явища є демаскування зв'язаних ліпідів.

Принцип виявлення зв'язаних ліпідів полягає у тому, що тривале промивання зрізів у воді сприяє видаленню вільних ліпідів та демаскуванню зв'язаних.

Реактиви: 1. 2 %-ий розчин судану чорного В на абсолютному ацетоні.

Постановка реакції:

1. Зрізи депарафінують (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт).
2. Промивають їх у проточній воді (12–14 год).
3. Споліскують у абсолютному ацетоні.
4. Переносять зрізи у розчин барвника на 1–24 год при температурі +37⁰ С.
5. Промивають зрізи у ксилолі (5–10 хв).
6. Заводять зрізи в канадський бальзам або синтетичне середовище.

Результат. Зв'язані ліпіди забарвлені у чорний та чорно-сірий колір. На препаратах виявляються гранули нейтрофілів, тромбоцити, амілоїд.

Виявлення нейтральних і кислих ліпідів за Кайном

Для фіксації матеріалу використовують рідину Бекера.

Для роботи використовують заморожені зрізи.

Припускають, що розчин сульфату нільського блакитного забарвлює жири у червоний колір, холестерин і його ефіри – рожево-блакитний, фосфатиди і цереброзоїди – блакитний, жирні кислоти та їх солі – у темно-синій.

Реактиви: 1. Розчин дихромату калію: 5 г дихромату калію і 1 г хлориду кальцію (безводного) розчиняють у 100 мл дистильованої води. 2. 1 %-ий водний розчин сульфату нільського блакитного. 3. 0,02 %-ий водний розчин сульфату нільського блакитного. 4. 1 %-ий розчин оцтової кислоти. 5. Насичений розчин судану чорного В на 70⁰ етиловому спирті.

Постановка реакції:

1. Шматочки матеріалу поміщають у розчин дихромату калію на 18 год (процедура не обов'язкова).
2. Промивають матеріал у проточній воді впродовж 2 год.
3. Виготовляють зрізи на заморожувальному мікротомі.
4. Зрізи поділяють на три групи: першу групу фарбують насиченим розчином судану чорного В; другу – 1 %-им розчином сульфату нільського блакитного; третю – 0,002 %-им розчином сульфату нільського блакитного за температури 60⁰ С упродовж 5 хв.
5. Зрізи, які містяться у розчині судану чорного В, піддають фарбуванню за методикою Лізона (*див. с. 149*); зрізи, забарвлені розчинами сульфату нільського блакитного, швидко промивають у дистильованій воді при температурі 60⁰ С.
6. Диференціюють зрізи в 1 %-му розчині оцтової кислоти.
7. Заводять їх у гліцерин-желатин.

Результат. Препарати, забарвлені суданом чорним В, є контролем, оскільки містять сумарні ліпіди. Низькі концентрації барвника (0,02 %) забезпечує високу ступінь дисоціації оксазинсульфату, звільнення значної кількості оксазину та їх взаємодію з ліпідами.

Порівняти зрізи на препаратах другої і третьої групи і, якщо вони ідентичні, провести їх гістохімічний аналіз. Нейтральні ліпіди (жири, холестерин-ефіри, стероїди, вищі спирти) забарвлені у червоний або рожевий колір, а кислі ліпіди у блакитний або синій колір.

***Виявлення нейтральних ліпідів суданом III
за методом Дадді***

Для фіксації матеріалу використовують рідину Бекера, формалін.

Придатні для роботи заморожені зрізи.

Судан III – нейтральна азофарба. Є ще судани іншого складу, які позначають цифрами I, II, IV. Вони мають ті ж самі властивості, що і судан III.

Реактиви: 1. 50⁰ етиловий спирт. 2. 70⁰ етиловий спирт. 3. Насичений розчин судану на 70⁰ етиловому спирті: у колбу з

притертим корком поміщають 0,2–0,3 г судану III, заливають його 100 мл гарячого 70⁰ етилового спирту, перемішують і обережно кип'ятять на пісочній або водяній бані впродовж кількох хвилин. Охолоджують, фільтрують, зберігають у колбі з притертим корком.

Постановка реакції:

1. Заморожені зрізи промивають у дистильованій воді.
2. Промивають їх у 50⁰ етиловому спирту впродовж кількох хвилин.
3. Зафарбовують зрізи насиченим розчином судану (10–25 хв, залежно від температури в приміщенні).
4. Промивають у 50⁰ етиловому спирті.
5. Промивають у дистильованій воді.
6. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. Локалізацію нейтральних ліпідів визначають за червоно-оранжевим або оранжево-жовтим забарвленням.

Примітка. У практиці для виявлення нейтральних ліпідів у якості барвника, крім насиченого розчину судану III на 70⁰ етиловому спирті, використовують лужний судан за Герксгеймером наступного складу:

1. Абсолютний етиловий спирт (або 96⁰) – 70 мл.
2. 10 %-ий розчин їдкою натрію – 20 мл.
3. Дистильована вода – 10 мл.
4. Судан III, до насичення розчину при кип'ятінні на водяній бані.

Такий розчин має кращу фарбувальну здатність порівняно з насиченим розчином судану на 70⁰ етиловому спирті. Лужний судан забарвлює жири і ліпоїди впродовж 3–5 хв. Після нього дуже добре забарвлюються гематоксиліном ядра (дія луку).

Виявлення нейтральних ліпідів суданом III та суданом IV

Для фіксації матеріалу використовують рідину Бекера, 12 %-ий розчин формаліну.

Придатні для роботи заморожені зрізи.

Встановлено, що суміш судану III та судану IV забарвлює ліпіди краще, ніж кожний барвник окремо. Метод широко використовується у морфологічних та гістохімічних дослідженнях.

Обидва судани добре розчиняються в органічних розчинниках. Процес фарбування заснований на екстрагуванні молекул судану III і

судану IV із розчину ацетону з етиловим спиртом, у якому вони розчиняються гірше, ніж у нейтральних ліпідах.

Реактиви: 1. Розчин барвників: однакову кількість судану III та судану IV (по 0,25–0,35 г на 100 мл) змішують і розчиняють у суміші ацетону з 70⁰ етиловим спиртом (1:1). Розчин витримують упродовж кількох діб до дозрівання. Після цього його фільтрують на холоді або відбирають піпеткою надосадову рідину. Необхідно працювати із закритими бюксами. 2. 70⁰ етиловий спирт. 3. 50⁰ етиловий спирт. 4. Гематоксилін Ерліха (*див. с. 62*). 5. 0,5 %-ий розчин соляної кислоти у 50⁰ етиловому спирті.

Постановка реакції:

1. Заморожені зрізи промивають у дистильованій воді.
2. Промивають їх у 70⁰ етиловому спирті.
3. Фарбують розчином барвника (1 хв).
4. Промивають зрізи у 70⁰ етиловому спирті.
5. Промивають зрізи у дистильованій воді.
6. Дофарбовують зрізи розведеним розчином гематоксиліну Ерліха (1:4).
7. При необхідності диференціюють солянокислим етиловим спиртом.
8. Промивають зрізи у дистильованій воді, в яку додають кілька крапель нашатирного спирту.
9. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. Нейтральні ліпіди забарвлюються у різні кольори від оранжевого до оранжево-червоного, ядра клітин – у сині.

Проведення гістохімічного контролю для виявлення ліпідів

Однією із основних властивостей ліпідів є їх здатність розчинятися в органічних розчинниках. Ця властивість використовується для диференціації ліпідів від інших сполук, а також для ідентифікації окремих груп ліпідів у тканинах і клітинах. При постановці гістохімічних реакцій необхідно на певній кількості зрізів (препаратів-відбитків) ставити контрольні дослідження шляхом їх попередньої обробки відповідними органічними розчинниками. Вибір розчинника визначається метою дослідження, ліпідним складом

Гістохімічні методи досліджень

об'єкту та методом гістохімічних досліджень. Пропонуємо основні методи гістохімічного контролю.

Екстракція ліпідів за Кейлігом

Для роботи використовують нефіксований матеріал.
Придатні для роботи заморожені зрізи.

Екстракція ліпідів базується на їх здатності по-різному розчинятися у різних розчинниках. Так, у холодному ацетоні екстрагуються гліцериди, стерини і стериди, деякі кетостероїди.

Нагрітий ацетон екстрагує цереброзоїди, нагрітий диетиловий ефір – лецитини і кефаліни, нагрітий метанол-хлороформ – усі ліпіди.

Реактиви: Використовують хімічно чисті органічні розчинники (ацетон, диетиловий ефір, метанол і хлороформ). Для приготування контрольних препаратів можна використовувати групу органічних розчинників у послідовності, наведеній вище, або, залежно від мети дослідження, – одним із них.

Для приготування розчину метанол-хлороформ беруть однакову кількість обох розчинників і змішують їх.

Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають на 24 год у холодний ацетон (розчинник замінюють тричі через 3, 8 та 12 год).

2. Переносять їх у нагрітий ацетон на добу (розчин заміняти тричі у ті ж самі терміни).

3. Зрізи поміщають у нагрітий диетиловий ефір на добу (тричі заміняти розчинник).

4. Поміщають зрізи в нагрітий метанол-хлороформ на добу (тричі заміняти розчинник).

5. Зрізи фарбують відповідним методом.

Результат. Залежно від розчинника, на препараті не виявляються ті чи інші групи ліпідів.

Екстракція ліпідів за Бекером

Для фіксації матеріалу використовують суміш Буена.

Придатні для роботи заморожені зрізи.

Для екстракції ліпідів використовують піридин, який є

оптимальним розчинником майже для усіх ліпідів тканин і клітин тваринних і рослинних організмів.

Реактиви: 1. Хімічно чистий піридин. 2. Реактиви для фарбування суданом чорним В.

Постановка реакції:

1. Зрізи товщиною 10–15 мкм промивають у 96⁰ етиловому спирті.
2. Переносять їх у піридин на 30 хв при температурі +17–22⁰ С.
3. Зрізи обробляють піридином при температурі +60⁰ С упродовж однієї доби.
4. Промивають зрізи у проточній воді (2 год).
5. Зрізи фарбують суданом чорним В за методом Лізона.

Результат. На препаратах, оброблених піридином, ліпіди не виявляються. Піридин викликає деформацію тканин.

Вуглеводи

Вуглеводи – це органічні сполуки, що виконують численні життєво необхідні функції: енергетичну та структурну, слугують резервними і захисними речовинами, беруть участь у підтриманні форми та опори, а також у детоксикації та інших процесах. Разом із білками та ліпідами вони належать до найважливіших компонентів живих організмів.

Як основне джерело енергії вуглеводи покривають більшість потреб організму. При середньому добовому витрачанні енергії близько 3000 ккал, 55 % її забезпечують вуглеводи, 30 % – жири, а 15 % – білки. Крім енергетичної ролі, вуглеводи входять до складу складних молекул: нуклеїнових кислот, глікозаміногліканів, глікопротеїнів і гліколіпідів, які виконують критично важливі функції. Наприклад, ДНК зберігає генетичну інформацію, РНК регулює синтез білка, а інші вуглеводні компоненти формують клітинні мембрани, сполучну і нервову тканини.

Вуглеводи поділяють на *прості* (моносахариди) і *складні* (полісахариди). **Моносахариди** можуть перебувати у вільному стані або утворюватися при гідролізі полісахаридів і синтетично. Це

кристалічні, добре водорозчинні речовини, оптично активні, більшість із яких мають солодкий смак і проявляють реакційну здатність, характерну для альдегідів і кетонів. Молекули моносахаридів мають один вуглецевий ланцюг і не підлягають гідролізу. За числом атомів вуглецю їх поділяють на тріози, тетрози, пентози, гексози, гептози, октози, нонози тощо, причому особливе біологічне значення мають пентози та гексози.

Складні вуглеводи включають олігосахариди, гомо- та гетерополісахариди. **Олігосахариди** складаються з 2–10 залишків моносахаридів. Залежно від кількості залишків їх називають дисахаридами, трисахаридами, тетрасахаридами, пентасахаридами, гексасахаридами тощо. Вони добре розчиняються у воді, кристалізуються, мають солодкий смак і піддаються кислотному чи ферментативному гідролізу. Найбільш поширені серед дисахаридів – мальтоза, сахароза і лактоза.

Полісахариди – це молекули, що містять більше десяти залишків моносахаридів. **Гомополісахариди** (наприклад, крохмаль, глікоген, клітковина, інсулін) побудовані з однакових моносахаридних залишків, з'єднаних оксигенними містками. Гетерополісахариди, або глікозаміноглікани, у вільному стані майже не виявляються й здебільшого поєднані з білками, формуючи протеоглікани, у яких вуглеводна частина становить 95–98 %. Вони є ключовими компонентами сполучної тканини, слизових секретів та синовіальної рідини. **Гетерополісахариди** поділяються на сульфатовані й нессульфатовані, виконуючи важливу структурну і функціональну роль у тканинах.

Виявлення глікогену за методом Шабадаша

Для фіксації матеріалу використовують рідини Шабадаша, Карнуа.

Для досліджень придатні парафінові та целоїдинові зрізи. Так як глікоген швидко зникає із клітин після загибелі або забою тварин (у зв'язку з розчиненням його у тканинних рідинах), шматочки матеріалу для дослідження потрібно відбирати як можна найшвидше. Товщина їх не повинна перевищувати 0,2 см.

Обмін глікогену порушується при багатьох хворобах: гепатитах, цукровому діабеті, міозитах тощо.

Реактиви: 1. Розчин періодату: перед постановкою реакції готують 0,01 М розчин KIO_4 або $Na IO_4 \cdot 3H_2O$ на бідистильованій воді (банку обгорнути темним папером). Для отримання орієнтованих препаратів концентрацію періодату знижують (0,003, 0,002 та 0,001 М) зі зменшенням часу інкубації у ньому до 7–10 хв. 2. **Реактив Шиффа:** 1 г основного фуксину розчиняють в 200 мл кип'ячої дистильованої води, охолоджують до $+50^{\circ}C$, додають 20 мл 1н. розчину HCl , знову охолоджують до $+25^{\circ}C$ та додають 1 г сухого гідросульфїту натрію. Перед додаванням HCl суміш фільтрують. Ставлять банку з притертим корком у темне місце і через добу розчин використовують (він повинен бути безбарвним або мати палевий колір). Реактив Шиффа краще готувати за прописом де Томазі (*див. метод Фельгена-Россенбека на ДНК; с. 130*). 3. Сірниста вода: до 200 мл дистильованої води додають 10 мл 10 %-го розчину гідросульфїту натрію та 10 мл 1н. HCl . Готують перед постановкою реакції. 4. 0,5 %-ий розчин світлового зеленого.

Постановка реакції:

1. Депарафіновані (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) зрізи промивають у дистильованій воді.
2. Переносять їх у розчин періодату на 20–25 хв.
3. Промивають у воді (тричі по 3 хв).
4. Поміщають зрізи у реактив Шиффа на 20–25 хв.
5. Промивають їх сульфатною водою (тричі по 3–4 хв).
6. Зрізи промивають кілька разів у дистильованій воді 10–15 хв.
7. Дофарбовують їх світловим зеленим або іншим барвником.
8. Ретельно промивають зрізи у воді.
9. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітляють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Глікоген забарвлений в інтенсивний фіолетово-вишневий колір, мукоїди та глікопротеїди – червонуватий.

Примітка. Необхідно користуватися тільки хімічно чистим посудом та скляними паличками. Не можна працювати з металевими гачками або голками. Потрібно знайти оптимальну концентрацію

періодату для постановки реакції. Фарбування зрізів у реактиві Шиффа здійснювати у темряві.

Виявлення глікогену за допомогою Шифф-йодної кислоти (ШЙК) по Мак-Манусу

Для фіксації матеріалу використовують рідину Шабадаша, Карнуа, абсолютний етиловий спирт, 10 %-ий розчин формаліну.

Для досліджень застосовують парафінові, целоїдинові і заморожені зрізи та препарати-відбитки.

Метод ґрунтується на властивості йодної кислоти окиснювати спиртові групи.

Реактиви: 1. 0,5 %-ий водний розчин йодної кислоти. 2. Реактив Шиффа (*див. метод Фельгена-Россенбека на ДНК; с. 133*). 3. Розчин целестинового блакитного Р: в 50 мл дистильованої води розчиняють 2,5 г залізоамонійових галунів, через 12–14 год додають 0,25 г целестинового блакитного Р, кип'ятять впродовж 3 хв, фільтрують і додають 7 мл гліцерину. 4. Гематоксилін Майєра (*див. с. 63*). 5. Солянокислий спирт: до 100 мл 70⁰ етилового спирту додають 0,25–0,5 мл концентрованої соляної кислоти.

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять до води.
2. Переносять їх у розчин йодної кислоти на 2–5 хв.
3. Промивають у дистильованій воді 10–15 хв.
4. Поміщають у реактив Шиффа на 10–15 хв.
5. Двічі промивають зрізи у проточній воді 5–15 хв.
6. Дофарбовують ядра целестиновим блакитним Р 2–3 хв.
7. Зрізи поміщають у розчин гематоксиліну Майєра на 2–3 хв.
8. При необхідності диференціюють у солянокислому спирті.
9. Промивають зрізи у водопровідній воді 10–15 хв.
10. Зневоднюють у спиртах.
11. Просвітлюють у ксилолі.
12. Заводять зрізи у бальзам або синтетичне середовище.

Результат. Глікоген забарвлений у темно-червоний колір, глікопротеїди і глікозаміноглікани – у різні відтінки пурпурового кольору.

Виявлення глікогену за методом Беста

Для фіксації матеріалу використовують рідини Шабадаша, Карнуа, Буена, абсолютний етиловий спирт.

Для досліджень придатні парафінові, целоїдинові і заморожені зрізи.

Шматочки матеріалу для фіксації відбирають якнайшвидше. Товщина їх не повинна перевищувати 0,2 см. Необхідно враховувати, що після фіксації матеріалу в абсолютному етиловому спирті у ньому зберігається 90 % глікогену, а в рідині Карнуа – 76 %.

Необхідно запобігати контакту шматочків матеріалу з водою або водними розчинами як до, так і після фіксації. Тому краще всього шматочки матеріалу заливати у целоїдин, так як у ньому глікоген втрачає свою властивість розчинятися у воді. При заливці матеріалу у парафін, коли на окремих етапах обробки має місце контактування зрізів з водою, можливі деякі втрати глікогену. Щоб попередити такі втрати, парафінові зрізи наклеюють сухим способом (*див. с. 57*), або вологим, але замість теплої води використовують підігрітий спирт (*див. с. 58*). Крім того, для попередження втрат глікогену, парафінові зрізи перед фарбуванням необхідно целоїдинувати. З цією метою їх спочатку звільняють від парафіну (обробляють ксилолом і 96⁰ етиловим спиртом), після цього, пропускаючи воду, переносять на 1–2 хв у спирт-ефір (1:1), а потім – у посуд з 1–2 %-им розчином целоїдину також на 1–2 хв. Виймають препарати із розчину целоїдину і вичікують, поки на ньому утвориться тоненька плівка (приблизно через 15–30 сек). Після цього препарати переносять на декілька хвилин у 70–80⁰ спирт (для ущільнення зрізів). Целоїдиновані таким чином препарати переносять у воду і забарвлюють за Бестом, як і целоїдинові; втрати глікогену при цьому зводяться до нуля.

Реактиви: 1. Розчин карміну: 2 г карміну, 1 г карбонату калію та 5 г хлориду калію розтирають у ступці, додають 60 мл дистильованої води. Отриману суміш кип'ятять впродовж 5 хв (на малому вогні). Фарба при цьому сильно піниться і набуває

темно-червоного кольору. Після охолодження і фільтрування додають 20 мл 10 %-го нашатирного спирту.

Необхідно зауважити, що повне розчинення карміну (окремі його сорти) інколи настає тільки після додавання нашатирного спирту і то не відразу, а впродовж 1–2 год. Отриманий розчин зберігають у холодильнику в темному скляному посуді з притертим корком. Термін зберігання 1–2 місяці. Перед використанням суміш фільтрують і додають 10 %-ий нашатирний та метиловий спирти у наступних пропорціях:

Основний (профільтрований) розчин карміну Беста – 2 частини;
Нашатирний спирт (10 %-ий) – 3 частини;
Метиловий спирт – 3 частини.

Розведений розчин для фарбування має темно-червоний колір, він прозорий і може зберігатися декілька діб; допускається повторне його використання. 2. Розчин для диференціювання: змішують 5 мл абсолютного етилового спирту, 4 мл метанолу і 10 мл дистильованої води. 3. Солянокислий спирт (*див. реакцію ШІК; с. 161*).

Постановка реакції:

1. Зрізи проводять через ряд спиртів до дистильованої води.
2. Зафарбовують їх гематоксиліном Ерліха.
3. Промивають у воді.
4. Диференціюють у солянокислому спирті.
5. Промивають у воді.
6. Зафарбовують зрізи розчином карміну. Термін фарбування залежить від якості карміну і коливається від 10–15 хв до 1–2 год.
7. Не промиваючи у воді, зрізи поміщають у розчин для диференціювання. Термін диференціювання залежить від якості карміну. В одних випадках він визначається секундами (10–30 сек), в інших – хвилинами (до припинення відходження барвника). Процес диференціювання контролюють за допомогою мікроскопа.
8. Промивають зрізи у 80⁰ етиловому спирті.
9. Зневоднюють їх у абсолютному етиловому спирті.
10. Просвітлюють у ксилолі.
11. Заводять зрізи у бальзам або в інші синтетичні середовища. Дозволяється використовувати карбол-ксилол.

При роботі з целоїдинованими зрізами, целоїдинову плівку можна видалити, особливо якщо вона сильно зафарбувалась карміном. Для видалення целоїдину, забарвлений карміном препарат (після диференціювання і обробки 96⁰ спиртом) переносять у посуд із сумішшю спирту з ефіром (1:1) на 2–3 хв, потім – в абсолютний спирт, ксилол і заводять у бальзам.

Результат. Глікоген виявляють за яскраво-червоним забарвленням, ядра клітин – за синім. Кармін може забарвлювати слиз, фібрин, кісткову тканину та деякі інші структури. При уважному аналізі гістопрепаратів диференціювання глікогену від інших утворень не викликає великих труднощів.

Виявлення глікогену за методом Байєра (із застосуванням фуксинсірністої кислоти)

Для фіксації матеріалу використовують рідини Шабадаша, Карнуа, Буена, абсолютний етиловий спирт.

Для досліджень використовують парафінові і целоїдинові зрізи. Проте реакцію краще ставити на парафінових зрізах, після їх депарафінування. При використанні целоїдинових зрізів, їх не наклеюють на предметні стекла, а поміщають у стаканчик.

Ця гістохімічна реакція базується на обробці зрізів хромовою кислотою, яка викликає хімічні зміни глікогену та інших полісахаридів.

За яскравістю кольорової реакції цей метод не поступається методу Беста.

Реактиви: 1. 4 %-ий розчин хромової кислоти. 2. Розчин фуксинсульфатної кислоти (див. метод Фельгена-Россенбека на ДНК; с. 133). 3. Сульфатна вода (вода, яка містить SO₂). Беруть 200 мл дистильованої води, додають 10 мл 10 %-го розчину біосульфату натрію та 10 мл нормального розчину соляної кислоти. Сульфатна вода кожний раз готується свіжа та повинна мати характерний запах SO₂. 4. Гематоксилін Майєра або Делафільда, Брьомера, Ерліха. 5. Солянокислий спирт.

Постановка реакції:

1. Депарафіновані та целоїдинові зрізи обробляють щойно виготовленим 4 %-им розчином хромової кислоти (у темряві),

Гістохімічні методи досліджень

впродовж 1 год. Необхідно чітко дотримуватися термінів хромовання зрізів, тому що при більш тривалій дії хромової кислоти реакція на глікоген буде негативною.

2. Промивають їх у проточній воді терміном до 5 хв.

3. Зрізи переносять у безбарвний розчин фуксинсульфатної кислоти на 10–15 хв (у темряві).

4. Зрізи промивають у сульфатній воді (тричі по 3–5 хв).

5. Промивають у проточній воді 10–15 хв і більше.

6. Фарбують зрізи одним із гематоксилінів.

7. Промивають їх у воді (при необхідності – диференціюють у солянокислому спирті).

8. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Можна використовувати карбол-ксилол. При бажанні целоїдинову плівку видаляють сумішню етилового спирту з ефіром.

Результати. Глікоген виявляють за червоно-фіолетовим забарвленням, ядра клітин – за синім. Крім глікогену, таким кольором забарвлюються слизові клітини, гіалінова субстанція, колоїд щитоподібної залози та гіпофізу. Їх диференціювання відносно глікогену не викликає труднощів.

Виявлення кислих глікозаміногліканів за Хейлом

Для фіксації матеріалу використовують рідину Карнуа, 10 %-ий розчин формаліну. Використовують і свіжий матеріал.

Для досліджень придатні парафінові та заморожені зрізи.

Сульфатовані глікозаміноглікани широко розповсюджені в природі, в організмі входять до складу багатьох тканин. Виявляються частіше за межами клітин, так як вони є одним із головних компонентів міжклітинної речовини.

Метод широко використовується у нормальній та патологічній гістохімії.

Реактиви: 1. Реактив Хейла: у кип'ячу дистильовану воду краплями додають 10 %-ий розчин FeCl_3 (від 8 до 12 мл на 100 мл води), суміш охолоджують і поміщають в діалізатор (або у целофановий мішечок) на 2–3 доби. Воду замінюють через 4–6 год до зникнення у фільтраті іонів Cl^- (проба з AgNO_3). Додають 2М розчин оцтової кислоти з таким розрахунком, щоб гідроксид заліза та оцтова

Гістохімічні методи досліджень

кислота були у співвідношенні 1:1. 2. 2 М розчин оцтової кислоти.
3. 0,5–1 %-ий розчин гексаціано – (II) феррату калію на 1 %-му розчині соляної кислоти.

Постановка реакції:

1. Депарафіновані зрізи (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) доводять до води.
2. Поміщають їх у реактив Хейла на 20–30 хв при кімнатній температурі.
3. Промивають зрізи у розчині оцтової кислоти впродовж 2–3 хв (при цьому розчин замінюють 2–3 рази).
4. Зрізи переносять у розчин гексаціано-(II) феррату калію на 15 хв.
5. Промивають їх у воді.
6. Зневоднюють зрізи у спиртах.
7. Просвітляють зрізи у ксилолі і заводять у бальзам.

Результати. Структури, які містять сульфатовані глікозаміноглікани, забарвлені у синій колір.

Примітка. При необхідності, зрізи перед зневодненням дофарбовують еозином, нейтральним червоним або кислим фуксином.

Виявлення сульфатованих глікозаміногліканів альціановим синім за Стідменом

Для фіксації матеріалу використовують рідини Карнуа, Ценкера, суміш Буена. Можна використовувати і свіжий матеріал.

Для досліджень придатні парафінові та заморожені зрізи.

Реактиви: 1. Барвник – 0,1 %-ий розчин альціанового синього у 3 %-му розчині оцтової кислоти. 2. Гематоксилін Ерліха або 1 %-ий розчин нейтрального червоного. 3. 1 %-ий розчин етилового спирту.

Постановка реакції:

1. Депарафіновані зрізи (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) доводять до води.
2. Поміщають їх у розчин барвника на 10–30 сек.
3. Промивають зрізи у дистильованій воді.

Гістохімічні методи досліджень

4. Дофарбовують зрізи гематоксилином Ерліха або 1 %-им розчином нейтрального червоного.
5. Диференціюють зрізи у 1 %-му розчині етилового спирту.
6. Промивають їх у водопровідній воді.
7. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Результат. Сульфатовані глікозаміноглікани забарвлені в синьо-зелений колір, ядра клітин – темно-синій або темно-червоний.

Примітка. При використанні 1 %-го розчину нейтрального червоного пункти 5 та 6 опустити.

Проведення гістохімічного контролю для виявлення полісахаридів

Вірогідність постановки гістохімічних реакцій перевіряється методом порівняння дослідних препаратів з контрольними. Вибір контролю визначається властивістю органа, тканини або клітин, властивостями речовин, які вивчаються та методом гістохімічного дослідження.

Застосування діастази за Ліллі

Для фіксації матеріалу використовують різноманітні фіксуючі речовини.

Для досліджень придатні парафінові зрізи.

З метою проведення гістохімічного контролю використовують діастазу солоду. У гістохімічну практику фермент введений для постановки контролю при вивченні глікогену.

Реактиви: 1. Розчин діастази (1:1000) на 0,8 %-му розчині NaCl. 2. 1 %-ий розчин целоїдину на суміші абсолютного етилового спирту і диетилового ефіру (50:50). 3. 80⁰ етиловий спирт. 4. Реактиви відповідного методу (Шабадаша, Беста, Мак-Мануса, Байєра).

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх у розчин діастази на 30–40 хв при температурі +35–45⁰ С.
3. Зрізи промивають у дистильованій воді.
4. Зневоднюють їх у спиртах або розчинах ацетону і ксилолу.
5. Переносять зрізи в 1 %-ий розчин целлоїдину на 1–2 хв.
6. Підсушують їх на повітрі 1–2 хв.
7. Поміщають зрізи у 80⁰ етиловий спирт на 5–10 хв.
8. Ставлять відповідну гістохімічну реакцію (*див. методи Шабдаша, Беста, Мак-Мануса, Байєра*).

Результат. На зрізах, попередньо оброблених діастазою, глікоген не виявляється.

Ферменти

Ферменти (ензими) – це білкові речовини, що прискорюють біохімічні реакції, без яких неможливе нормальне функціонування організму. Саме ферменти першими реагують на порушення обміну речовин, які згодом проявляються морфологічними змінами клітин і тканин і стають помітними лише при стандартному гістологічному дослідженні.

Їхня роль надзвичайно широка: ферменти забезпечують травлення і засвоєння поживних речовин, синтез структурних і функціональних компонентів тканин та рідин, регулюють ріст і розмноження, беруть участь у згортанні крові, обміні речовин та численних інших життєво важливих процесах. Більшість ферментів локалізується всередині клітин, виняток становлять ферменти травного тракту та ті, що виконують специфічні функції у крові та інших рідинах організму. Їхня активність використовується і в медицині для виробництва лікарських препаратів.

За міжнародною класифікацією, ферменти поділяють на шість класів: оксидоредуктази – каталізують окисно-відновні реакції); трансферази – каталізують реакції переносу груп; гідролази – каталізують реакції гідролізу; ліази – каталізують приєднання груп до подвійних зв'язків або відщеплення груп з утворенням подвійного

зв'язку; ізомерази – каталізують реакції ізомеризації; лігази (синтетази) – каталізують реакції конденсації двох молекул, пов'язані з розщепленням пірофосфатного зв'язку у молекулі АТФ або аналогічного трифосфату.

Кожен фермент має унікальний номер у міжнародній системі, що точно визначає його клас, підклас, підпідклас і порядковий номер у підпідкласі. Наприклад, 1.2.3.1 означає оксидоредуктазу, для якої донором водню є альдегід, акцептор – Оксиген, і це перший фермент у своєму підпідкласі.

Ферменти вражають високою специфічністю до субстратів і функціонують лише за оптимальних умов температури та *pH*. У гістохімічних дослідженнях фермент виявляють через продукт його взаємодії із субстратом, а не безпосередньо. Для точного визначення локалізації ферменту продукт повинен бути нерозчинним, інакше дифузія спотворює результати. Інтенсивність забарвлення продукту прямо корелює з активністю ферменту: темніша зона – вища активність, світліша – нижча. Якщо продукт не забарвлюється, застосовують додаткове фарбування для його візуалізації.

Особливу увагу гістохімія приділяє ферментам перших трьох класів. Зокрема, оксидоредуктази каталізують окисно-відновні реакції, які лежать в основі клітинного дихання. Процес включає послідовне дегідрування субстратів і перенесення протонів та електронів через внутрішньоклітинні переносники з утворенням води та запасанням енергії у вигляді макроергічних сполук через фосфорилування. Основними субстратами оксидоредуктаз є вуглеводи, їхні метаболіти, жирні кислоти, гліцерин та інші сполуки. Основна внутрішньоклітинна локалізація цих ферментів – мітохондрії, де вони забезпечують енергетичне забезпечення клітини.

Клас оксидоредуктаз

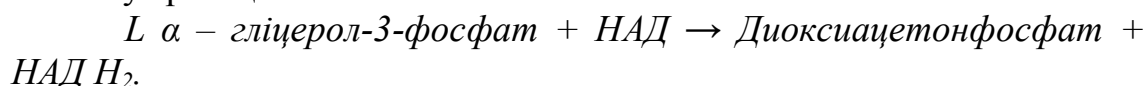
До даного класу відносяться ферменти, які каталізують окисно-відновні реакції, які лежать в основі біологічного окиснення. Процес складається із послідовних та взаємопов'язаних реакцій дегідрування і перенесення відєднаних протонів і електронів через ряд

переносників з утворенням кінцевого продукту реакції – води. У результаті цього клітини отримують у вигляді макроергічних сполук запаси хімічної енергії, тому що клітинне дихання пов'язане з фосфорилуванням. Субстратами можуть бути вуглеводи, продукти їх розпаду, жирні кислоти, гліцерин тощо.

Основним місцем внутрішньоклітинної локалізації оксидоредуктаз є мітохондрії.

Виявлення α – гліцерофосфатдегідрогенази

Системна назва ферменту – α -гліцерол-3-фосфат: НАД (нікотинамідаденіндинуклеотид) – оксидоредуктаза, шифр 1.1.1.8, каталізує реакцію:



Фермент міститься у багатьох тканинах тварин та людини.

Для роботи придатні зрізи із свіжого матеріалу, виготовлені на мікротом-кріостаті або заморожувальному мікротомі.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: 0,1 мл 1 М розчину DL-гліцерофосфату натрію, нейтралізованого 0,1 М розчином HCl, 0,1 мл 0,1–1 М розчину НАД, 0,1 мл 0,1 М розчину ціаніду натрію, 0,25 мл 0,2 М трис-буферу (pH – 6,8–7,0), 0,25 мл розчину нітро-СТ (1 мг на 1 мл), долити дистильованою водою до 1 мл, додати 75 мг полівінілпірролідону (мол. маса 11 тис.). 2. Рідина Беккера (кальцій-формол) або 10 %-ий розчин хлориду натрію на 10 %-му розчині формаліну (формалін-сольовий розчин).

Постановка реакції:

1. Виготовляють зрізи.
2. На кожний зріз наносять 0,1–0,2 мл (2–4 краплі) інкубаційного середовища та інкубують впродовж 5–30 хв при температурі +37⁰С на відкритому повітрі.
3. Переносять зрізи в рідину Беккера або в формалін-сольовий розчин на 10 хв.

4. При необхідності зрізи можна дофарбовувати галуновим карміном (розведеним 1:10) або 0,5 %-им водним розчином метилового зеленого, попередньо екстрагованого хлороформом.

5. Зрізи заводять у гліцерин-желатин.

Результати. Місце розміщення ферменту виявляється за червоним (моноформаза) або синім (диформаза) осадом. Фермент виявляється в поперечно-посмугованій м'язовій тканині, нервовій тканині, пухлинах тощо.

Виявлення лактатдегідрогенази за Гесом, Скарпеллі та Пірсом

Системна назва ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ) – L-лактат: НАД-оксидоредуктаза, шифр – 1.1.1.27. Кофактором є цинк, фермент каталізує реакцію:

L-лактат + НАД → Піруват + НАД Н₂. Лактатдегідрогеназа – один із найважливіших ферментів анаеробного та аеробного розщеплення вуглеводів.

Міститься у різних тканинах тварин та мікробах, окислює 1,2-оксимonoкарбонoві кислоти, з НАДФ реагує повільно.

Для роботи придатні зрізи виготовлені із свіжозамороженого матеріалу.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: 0,1 мл 1 М розчину DL-лактату натрію, 0,1 мл 0,1–1 М розчину НАД, 0,1 мл 0,1 М розчину ціаніду натрію, 0,25 мл 0,06 М фосфатного буферного розчину (рН – 6,8–7,0), 0,25 мл розчину нітро-СТ (1 мг на 1 мл), доливають дистильованою водою до 1 мл, додають 75 мг полівінілпірролідону (мол. маса 11 тис.). 2. 10 %-ий розчин хлориду кальцію або хлориду натрію на 10 %-му розчині формаліну.

Постановка реакції:

1. Виготовляють зрізи.
2. На кожний зріз наносять 0,1–0,2 мл (2–4 краплі) інкубаційного середовища та інкубують впродовж 5–30 хв при температурі +37° С.
3. Переносять зрізи для фіксації у 10 %-ий розчин хлориду кальцію або хлориду натрію на 10 %-му розчині формаліну на 10 хв.

Гістохімічні методи досліджень

4. При необхідності зрізи дофарбовують галуновим карміном (розведеним 1:10) або 0,5 %-им водним розчином метилового зеленого, попередньо екстрагованого хлороформом.

5. Зрізи заводять у гліцерин-желатин.

Результати. Локалізацію ЛДГ визначають за червоним та синім осадами формазанів.

Виявлення малатдегідрогенази за Гесом, Скарпеллі та Пірсом

Системна назва ферменту малатдегідрогеназа (МДГ) – L-малат: НАД – оксидоредуктаза, шифр 1.1.1.37; каталізує реакцію: $L\text{-малат} + \text{НАД} \rightarrow \text{Оксалоацетат} + \text{НАД}\cdot\text{H}_2 + 2e$, окислює 2-оксидикарбонові кислоти.

Малатдегідрогеназа – один із ферментів, який бере участь у функціонуванні циклу трикарбонових кислот Кребса.

Фермент міститься у багатьох тканинах тварин, людини, рослин, виявляється у дріжджах, бактеріях.

Для роботи придатні зрізи із свіжої тканини виготовлені на мікромом-кріостаті або заморожувальному мікромомі.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: до 0,1 мл 1 М розчину L-малату натрію або L-яблучної кислоти, рН довести до 7, додаванням 0,2 М трис-буферу (рН – 6,8–7), додають 0,1 мл 0,1–1 М розчину НАД або НАДФ; 0,1 мл 0,1 М розчину цитрату натрію, 0,25 мл розчину нітро-СТ (1 мг на 1 мл), доливають дистильованою водою до 1 мл, додають 75 мг полівінілпірролідону. 2. 10 %-ий розчин хлориду кальцію або хлориду натрію на 10 %-му розчині формаліну.

Постановка реакції:

1. Виготовляють зрізи.

2. На кожний зріз наносять 0,1–0,2 мл (2–4 краплі) інкубаційного середовища та інкубують впродовж 5–30 хв при температурі +37⁰ С на відкритому повітрі.

3. Переносять зрізи для фіксації у 10 %-ий розчин хлориду кальцію або хлориду натрію на 10 %-му розчині формаліну на 10 хв.

4. При необхідності зрізи дофарбовують галуновим карміном (розведеним 1:10) або 0,5 %-им водним розчином метилового зеленого, попередньо екстрагованого хлороформом.

5. Зрізи заводять в гліцерин-желатин (чистий або суміш, що містить 0,5 %-ий розчин ацетату кобальту).

Результат. Локалізацію ферменту МДГ визначають за випаданням осаду моно- (червоний) та ди- (синій) формаганів.

Найбільш виражена реакція за наявності в інкубаційному середовищі НАД.

***Виявлення сукцинатдегідрогенази за Нахласом,
Валькером та Зелігманом***

Системна назва ферменту сукцинатдегідрогенази (СДГ) – сукцинат: (акцептор)-оксидоредуктаза, за хімічними властивостями – флавінопротеїд, молекула містить залізо, у складі активного центру є сульфгідрильні групи. Шифр сукцинатдегідрогенази – 1.1.1.37; каталізує реакцію:



Сукцинатдегідрогеназа відноситься до найбільш розповсюджених ферментів. Вона є одним із центральних ферментів циклу трикарбонових кислот Кребса. Міститься у всіх клітинах тварин, дріжджах, бактеріях. Локалізація і діяльність сукцинатдегідрогенази тісно пов'язана з функціонуванням мітохондрій, де СДГ, наприклад, у нервових клітинах становить 75 % від усієї ферментної активності.

Існує багато методів виявлення СДГ, заснованих на застосуванні різних тетразолів. Крайні результати отримані при застосуванні нітро – СТ.

Для роботи придатні зрізи із свіжої тканини, виготовлені на мікротом-кріостаті або заморожувальному мікротомі.

Реактиви: 1. Забуферний розчин сукцинату натрію: змішують рівні об'єми 0,2 М фосфатного буферного розчину (рН – 7,6) та 0,2 М розчину сукцинату натрію. 2. Інкубаційне середовище: до 10 мл забуференого розчину сукцинату натрію додають 10 мл водного розчину нітро-СТ з концентрацією 1 мг/мл. М. Берстон рекомендує перед приготуванням інкубаційного середовища необхідну кількість тетразолію розчинити у декількох краплях етилового спирту. 3. Сольовий розчин – 0,85 %-ий розчин NaCl. 4. Формалін-сольовий розчин – готують 10 %-ий розчин формаліну на сольовому розчині. 5. 15 %-ий розчин етилового спирту.

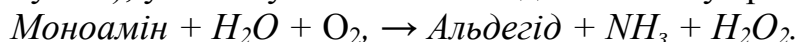
Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають в інкубаційне середовище на 5–20 хв при температурі +37⁰ С (термостат).
2. Зрізи промивають у сольовому розчині.
3. Переносять їх у формалін-сольовий розчин на 10 хв.
4. Зрізи промивають у 15 %-му розчині етилового спирту впродовж 5 хв.
6. Зрізи заводять у гліцерин-желатин (можна зневоднити в спиртах або розчинах ацетону у ксилолі, просвітлити у ксилолі і завести у бальзам або полістирол).

Результат. Осад моно- та диформагану свідчить про наявність та локалізацію СДГ. Висока концентрація ферменту виявляється у різноманітних структурах нервової системи і, перш за все, у нервових клітинах.

Виявлення моноамінооксидази за Келле та Вальку

Шифр моноамінооксидази 1.4.3.4. Діє на –СН – NH₂ – групу донорів, акцептором є O₂, тривіальна назва – моноамінооксидаза (МАО), системна назва – моноамін: O₂-оксидоредуктаза (дезамінуюча), у молекулі міститься мідь. Каталізує реакцію:



Діє на первинні, вторинні і третинні аміни.

Фермент міститься у багатьох тканинах тварин, людини, рослин. Бере участь в знешкодженні отруйних амінів, руйнуванні надлишку адреналіну та норадреналіну, дезамінуванні серотоніну та тираміну. Фермент локалізується у мітохондріях. Чимало його міститься у слизовій кишечника, печінці, мозку, легенях, шкірі.

Для роботи придатні зрізи із свіжої тканини, виготовлені на мікромом-кріостаті або заморожувальному мікромомі.

Реактиви: А. Висхідні розчини. 1. 0,1 М розчин солянокислого гідразину. 2. 40 %-ий розчин сульфату натрію, рН якого доведено до 8,6 шляхом додавання NaOH. 3. 0,2 М фосфатний буферний розчин. 4. Гідразид 2-окси-3-нафтоїної кислоти. 5. 0,1 М розчин фосфату ізонікотиніл-2-ізопропілгідразину (Марсиліду). 6. 0,1 М розчин солянокислого триптаміну. 7. 1 н. розчин NaOH.

В. Робочі розчини. 1. Середовище для попередньої інкубації: 3 мл води, 1,5 мл солянокислого гідразину, 8 мл фосфатного буферного розчину, 7,5 мл розчину сульфату натрію (рН довести до 7,6). 2. Контрольне середовище для попередньої інкубації: такий же склад, як і в пункті першому, крім того ще додають 0,15 мл Марсиліду. 3. Розчин для промивання: 4,5 мл води, 3 мл фосфатного буферного розчину, 7,5 мл розчину сульфату натрію. 4. Інкубаційне середовище: 4,35 мл води, 0,15 мл розчину NaOH, 3 мл фосфатного буферного розчину, 7,5 мл сульфату натрію; нагрівають до 80–90⁰ С, насичують гідрозином нафтоїної кислоти, охолоджують, фільтрують, після чого додають 1 мл розчину триптаміну. 5. Контрольне інкубаційне середовище: такий же склад, як і у попередньому пункті, але крім того додають 0,15 мл Марсиліду. 6. Проявник: 300 мг стійкого синього В розчиняють в 10 мл води, змішаної з 5 мл фосфатного буферного розчину (рН –7,4), фільтрують і відразу використовують. 7. 10 %-ий розчин формаліну.

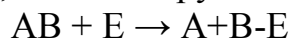
Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають на 1 год при температурі 22⁰ С у середовище для попередньої інкубації.
2. Зрізи промивають у розчині сульфату натрію.
3. Зрізи промокають фільтрувальним папером та поміщають у інкубаційне середовище на 2 год, пропускаючи через нього Оксиген.
4. Промивають зрізи у воді.
5. Поміщають їх у проявник на 3 хв.
6. Знову промивають зрізи у воді.
7. Переносять їх у 10 %-ий розчин формаліну.
8. Контрольні зрізи піддають таким же процедурам, інкубуючи у відповідних розчинах.
9. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

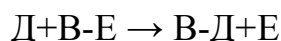
Результат. Наявність лілово-синього забарвлення свідчить про локалізацію ферменту моноаміноксидази. Контрольні зрізи, інкубовані у середовищах, які містять Марсилід, не забарвлюються. Не забарвлюються зрізи, які інкубувалися в середовищі, що не містять субстрат.

Клас трансфераз

До даного класу відносяться ферменти, що каталізують реакції внутрішньомолекулярного та міжмолекулярного переносу окремих атомів, атомних груп:



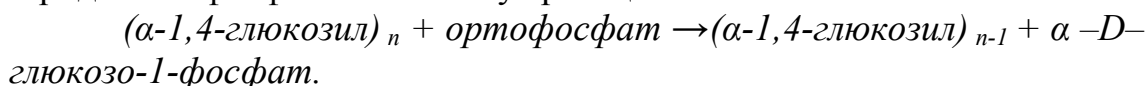
або



Їм належить провідна роль у проміжному обміні речовин. Клас трансфераз поділяють на вісім підкласів. Так, ферменти, які беруть участь в перенесенні одновуглеводних груп (2.1), альдегідних або кетонних залишків (2.2), ацилтрансферази (2.3), глікозилтрансферази (2.4), ферменти, які здійснюють перенесення алкільних або споріднених їм груп (2.5), азотисних груп (2.6), груп, які містять фосфор (2.7) та сірку (2.8).

Виявлення фосфорилази за методом Текеучі

Шифр фосфорилази 2.4.1.1, тривіальна назва – α -глюканфосфорилаза, системна назва – α -1,4-глюкан: ортофосфат-глюкозилтрансфераза, простетична група представлена піридоксальфосфатом. Каталізує реакцію:



Крім глікогену може діяти на крохмаль, інсулін та інші полісахариди.

Фермент широко розповсюджений у природі і, перш за все, в тканинах тварин ссавців.

Для роботи придатні зрізи із свіжої тканини, виготовлені на мікротом-кріостаті або заморожувальному мікротомі.

Реактиви: 1. Інкубаційний розчин: в 15 мл дистильованої води розчиняють 50 мл глюкозо-1-фосфату (калієва сіль), 10 мг аденозин-5-фосфату, 2 мг глікогену, додають 10 мл 0,1 М ацетатного буферного розчину (рН – 5,6–6), 1 краплю інсуліну. 2. Інкубаційний розчин для контрольних зрізів: такий же склад, як і в пункті першому, але без додавання глюкозо-1-фосфату. 3. Розчин Люголя: 2 г йодиду калію розчиняють в 5 мл води, додають 1 г йоду, доливають водою до 300 мл.

Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають у відповідне інкубаційне середовище на 2–3 год при температурі +37⁰ С.
2. Переносять зрізи на кілька хвилин у розчин Люголя.
3. Зрізи заводять в гліцерин, в якому є невелика кількість розчину Люголя.

Результат. Місця розташування ферменту забарвлені у червонувато-синій та темно-синій колір. На контрольних зрізах забарвлення відсутнє.

Клас гідролаз

До даного класу відносяться ферменти, які здійснюють каталітичну дію (розщеплення та синтез багатьох речовин) за участю води: $R_1R_2 + H_2O \rightleftharpoons R_1H + R_2OH$.

Відомо понад 170 гідролаз, які залежно від субстрату діляться на дев'ять підкласів: гідролази, які діють на складноефірні зв'язки (3.1), глікозидні сполуки (3.2), ефірні зв'язки (3.3), пептидні зв'язки – пептид-гідролази (3.4), С – N-зв'язки (3.5), С – N-кисотно-ангідридні зв'язки (3.6), С – С-зв'язки (3.7), галогенні зв'язки (3.8), С – N- зв'язки (3.9).

Особливої уваги заслуговують гідролази, які діють на складноефірні зв'язки або естерази. Вони поділяються на шість підкласів: гідролази ефірів карбонових кислот (3.1.1), тілових ефірів (3.1.2), фосфомоноефірів (3.1.3), фосфодиефірів (3.1.4), трифосфомоноефірів (3.1.5), сульфоефірів (3.1.6).

Виявлення «неспецифічної естерази»

У гістохімічних дослідженнях часто застосовують реакції на виявлення «неспецифічної естерази» (НЕ). Така реакція дає можливість виявити групу естераз – аліестеразу, С-естеразу, ацетилхолінестеразу (АХЕ) та холінестеразу.

Аліестераза (карбоксилестераза, В-естераза), має шифр – 3.1.1.1, систематична назва – гідролаза карбонових кислот. Каталізує реакцію:

Гістохімічні методи досліджень

Ефір карбонової кислоти + H₂O → Спирт + Карбонова кислота

Аліестераза сконцентрована у фракції мікросом (від 46 до 70 %).

C-естераза (ацетилестераза) має шифр – 3.1.1.6, систематична назва – гідролаза оцтових ефірів. Каталізує реакцію:

Ефір оцтової кислоти + H₂O → Спирт + Оцтова кислоти.

Локалізація ферменту пов'язана у значній мірі з лізосомами та мікросомальною фракцією.

Виявлення «неспецифічної естерази» за методом Нахласа, Зегільмана та Гоморі

Для роботи придатні зрізи із свіжої тканини, фіксованої в охолоджену до +2–4⁰ С розчині 10 %-го формаліну. Зрізи виготовляють на мікротом-кріостаті або заморожувальному мікротомі.

Реактиви: 1. Інкубаційний розчин: 20 мг α – нафтилацетату розводять в 0,25 мл хімічно чистого ацетону, потім додають 20 мл фосфатного буферного розчину (рН–7,4), струшують (до зникнення помутніння), додають 20 мг міцного синього В (можна іншу сіль діазонію), швидко фільтрують. 2. 10⁻⁵М розчин езерину на фосфатному буферному розчині (рН – 7,4). 3. Фосфоро-органічний інгібітор Е-600 (розведення 1:6000).

Постановка реакції:

1. Шматочки матеріалу розміром 3–4 мм промивають у проточній та дистильованій воді.
2. Виготовляють зрізи.
3. Зрізи промивають у воді.
4. Наклеюють їх на предметні стекла.
5. Висушують за допомогою вентилятора.
6. На зрізи наносять інкубаційне середовище на 10 хв.
7. Промивають зрізи в кількох порціях води (можна 12 год).
8. Заводять зрізи у гліцерин-желатин (можна зневоднити у спиртах, просвітлити у ксилолі і завести у бальзам).

Результати. Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту визначають за осадом червоно-синього кольору.

Диференціальне виявлення аліестерази. Частину зрізів поміщають у розчин езерину на 30 хв за температури $+37^{\circ}\text{C}$, при цьому відбувається інактивація ацетилестерази. Частину зрізів поміщають у розчин E-600, а частину в фосфатний буферний розчин (рН $-7,4$) на 30 хв. Усі три групи зрізів промивають у воді впродовж 5 хв і ставлять реакцію на неспецифічну естеразу (див. метод постановки реакції). Фермент, інгібований розчином езерину, є холінестеразою, а фермент, інгібований розчином E-600, є аліестеразою.

Диференціальне виявлення ацетилестерази. Частину зрізів залишають на деякий період на предметних стеклах при температурі $0-4^{\circ}\text{C}$ для фіксації. Піддати обробці за описаним вище методом. Локалізація ацетилестерази в мікроструктурах визначається за наявністю дискретних гранул.

Виявлення «неспецифічної естерази» α – нафтилацетатом у модифікації Е. Пірса

Для роботи придатні заморожені зрізи із свіжого матеріалу, фіксованого в охолоджену до $+2-4^{\circ}\text{C}$ розчині 10 %-го формаліну або парафінові зрізи, виготовлені із матеріалу попередньо фіксованого в холодному ацетоні.

Реактиви: 1. Інкубаційний розчин: 10 мг α – нафтилацетату розводять в 0,25 мл хімічно чистого ацетону, потім додають 20 мл 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН $-7,4$), струшують (до зникнення помутніння), додають 50–100 – міцного синього В, добре струшують, фільтрують на зрізи. 2. Гематоксилін Майєра.

Постановка реакції:

1. Заморожені зрізи наклеюють на предметні стекла (парафінові – доводять (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) до води, промивають) та висушують.

2. На зрізи наносять інкубаційне середовище на 1–1,5 хв.

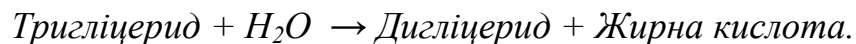
3. Промивають зрізи у проточній воді 2 хв.

4. Забарвлюють зрізи гематоксиліном Майєра впродовж 4–6 хв.
5. Промивають їх у проточній воді 30 хв.
6. Заводять зрізи в гліцерин-желатин.

Результат. Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту визначають за чорним забарвленням, ядра клітин забарвлені в темно-синій колір.

Виявлення ліпази

Системна назва ферменту ліпаза – гідролаза ефірів гліцерину. Активність ферменту пов'язана з наявністю в інкубаційному середовищі іонів Ca^{2+} . Шифр ферменту 3.1.1.3. Каталізує реакцію:



Ліпаза відноситься до гідролаз ефірів карбонових кислот. Міститься у тканинах тварин, особливо у підшлунковій залозі, рослинах та бактеріях

Для виявлення ліпаз застосовують «твіни» – складні ефіри жирних кислот (луаринової, пальмітинової, стеаринової та олеїнової) і гекситів (сорбіту та маніту).

Виявлення ліпази за методом Гоморі (метод «твін»)

Для роботи придатні заморожені зрізи із свіжої тканини, фіксованої в охолодженому до $+2-4^{\circ}\text{C}$ розчині 10 %-го формаліну або парафінові зрізи виготовлені із тканини попередньо фіксованої у холодному ацетоні.

Реактиви: 1. Вихідні речовини: «Твін»-60 («Твін»-80 – для («істинної ліпази») – 5 %-ий розчин; буферні розчини – трис-(оксиметил)-амінометановий 0,5 М (рН – 7,2–7,4) або 0,2 М веронал-ацетатний або гідрокарбонатний; хлорид кальцію – 10 %-ий розчин; тимол – для консервації субстрата та буферних розчинів. 2. Інкубаційне середовище – один із буферних розчинів – 5 мл, хлорид кальцію – 2 мл, розчин «Твін» – 2 мл, дистильованої води – 40 мл, декілька кристаликів тимолу. 3. 1 %-ий розчин $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. 4. Розчин $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. 5. 1 %-ий водний розчин еозину.

Постановка реакції:

1. Заморожені зрізи наклеюють на предметні стекла (парафінові – доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води, промивають) та висушують на повітрі.
2. Зрізи поміщають у інкубаційне середовище на 3–12 год при температурі +37⁰ С.
3. Промивають зрізи у дистильованій воді.
4. Переносять їх у розчин нітрату свинцю на 15 хв.
5. Промивають у проточній воді 5 хв.
6. Переносять зрізи у розведений розчин сульфід амонію на 1–2 хв.
7. Промивають зрізи у дистильованій воді.
8. Фарбують зрізи еозином 5 хв.
9. Промивають їх у проточній та дистильованій воді.
10. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результати. Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту визначають за наявністю коричнево-чорного осаду сульфід амонію на гістоструктурах препарату.

Виявлення ліпази-естерази за Мартиновим

Для роботи придатні заморожені зрізи із свіжого матеріалу, фіксованого в охолодженому до 2–4⁰ С розчині 10 %-го формаліну або парафінові зрізи, виготовлені із тканини попередньо фіксованої у холодному ацетоні.

Реактиви: 1. Основний розчин: беруть необхідний об'єм 2 %-го розчину «Твін» 40 на 0,2 %-му розчині CaCl₂ (цей розчин виготовлений на веронал-ацетатному буферному розчині з рН–4,7), додають до нього декілька кристаликів тимолу, дають «дозріти» 48 год при температурі +37⁰ С, фільтрують через фільтр Зейтца. 2. Інкубаційне середовище: до 30 мл 0,05 М веронал-ацетатного буферного розчину (рН – 7,0–7,2) додають 2–3 мл 0,2 %-го розчину CaCl₂, 10–20 мл гліцерину, 2–4 мл основного розчину, кристалик тимолу. 3. 1 %-ий розчин Pb (NO₃)₂. 4. Розведений розчин (NH₄)₂S. 5. 1 %-ий водний розчин еозину.

Постановка реакції:

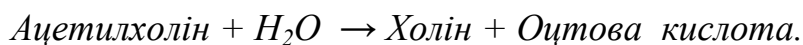
1. Заморожені зрізи наклеюють на предметні стекла (парафінові – доводять до води, промивають) та висушують на повітрі.
2. Зрізи поміщають у інкубаційне середовище на 3–12 год при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ (термостат).
3. Промивають зрізи у воді.
4. Переносять їх у розчин нітрату свинцю на 15 хв.
5. Промивають у проточній воді 5 хв.
6. Переносять зрізи у розчин сульфід амонію на 1–10 хв.
7. Промивають у дистильованій воді.
8. Фарбують еозином 5 хв.
9. Промивають зрізи у проточній та дистильованій воді.
10. Заводять у гліцерин-желатин.

Результати. Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту визначають за наявністю коричнево-чорного осаду сульфід свинцю на гістоструктурах препарату.

Виявлення холінестераз

Розрізняють дві холінестерази – ацетилхолінестераза (АХЕ) та псевдохолінестераза (ПХЕ).

Ацетилхолінестеразу часто називають «істинною холінестеразою». Системна назва АХЕ – ацетилхолін-ацетилгідролаза, шифр – 3.1.1.7. Каталізує реакцію:



Фермент міститься у багатьох тканинах, зокрема у нервовій. Він діє на різноманітні ефіри оцтової кислоти, каталізує реакцію переносу ацтилу. АХЕ бере участь у передачі нервового імпульсу, розщеплюючи ацетилхолін на холін та оцтову кислоту.

Псевдохолінестеразу часто називають «несправжньою холінестеразою». Системна назва ПХЕ – ацилхолін-ацилгідролаза, шифр – 3.1.1.8. Каталізує реакцію:



Фермент міститься у багатьох тканинах тварин і людини. Розщеплює ефіри холіну та інші речовини.

Виявлення холінестерази за методом Жеребцова

Для роботи придатні заморожені зрізи із свіжого матеріалу, фіксованого у 10 %-му розчині нейтрального формаліну впродовж 4–6 год.

Реактиви: 1. Вихідні розчини: а) ацетатний буферний розчин – 24 мл 0,1 М розчину ацетату натрію, 12 мл 0,1 н. розчину оцтової кислоти (рН–5); б) ацетатний буферний розчин – 39 мл 0,1 М розчину ацетату натрію; 1 мл 0,1 н. розчину оцтової кислоти (рН–6,2); в) 3,75 %-ий розчин гліцину на дистильованій воді; г) 0,1 М розчин сульфату міді; д) розчин ацетилтіохолініодиту – 15 мг субстрату розчиняють в 0,78 мл води, додають 0,26 мл 0,1 М розчину сульфату міді, центрифугують 10–15 хв (кількість обертів на хвилину 3500–4000), поверхневий шар використовують (його достатньо для двох порцій середовища по 5 мл); е) розчин бутирилтіохоліну – 18,5 мг субстрату і зробити все так, як у попередньому пункті. 2. Інкубаційне середовище для дослідних зрізів: 25 мл буферного розчину з рН–6,2 (для всіх тканин, моторних закінчень – рН–5); 1,9 мл води; 0,1 мл розчину сульфату міді та 0,4 мл розчину ацетилтіохолініодиту. 3. Інкубаційне середовище для виявлення ПХЕ: 2,5 мл буферного розчину (рН–6,2); 1,9 мл води; 0,1 мл розчину гліцину; 0,1 мл розчину сульфату міді; 0,4 мл розчину бутирилтіохоліну. 4. 0,5 %-ий розчин сульфіді амонію. 5. Інгібітор: готують 0,1 М основний розчин диізопропілфторфосфату в пропіленгліколі, після чого розводять у дистильованій воді до концентрації 10^{-7} – 10^{-6} М.

Постановка реакції:

1. Шматочки матеріалу промивають у воді.
2. Виготовляють зрізи.
3. Поміщають зрізи у воду, додавши нейтральний формалін (9:1), фіксують упродовж 30 хв.
4. Промивають зрізи у воді 20–30 хв, поміщають на предметні стекла та висушують їх на повітрі 10–15 хв.
5. Поміщають зрізи у відповідні інкубаційні середовища (з ацетилтіохоліном та бутирилтіохоліном). Частина зрізів промивають у

Гістохімічні методи досліджень

воді, поміщають у розчин дізопропілфторфосфату на 30 сек, промивають у воді, половину із них поміщають у перше, половину – у друге інкубаційне середовище.

6. Споліскують усі чотири серії зрізів у воді (декілька хвилин).

7. Переносять їх у розчин сульфід у амонію на 3–5 хв.

8. Промивають у проточній воді 5–10 хв.

9. Заводять зрізи у гліцерин-желатин (можна зневоднити у спиртах, просвітлити у ксилолі, завести в бальзам).

Результат. У місцях розташування ферментів випадають темно-коричневі осадки сульфід у міді, фон – безбарвний або блідо-жовтий. Перша група зрізів містить АХЕ, друга – ПХЕ, третя – АХЕ, так як інгібітор повністю переважає ПХЕ, а активність АХЕ знижена до 40 %. На четвертій групі зрізів реакція, видима на препаратах другої групи, пригнічена інгібітором.

Примітка. Вихідні розчини зберігають у холодильнику. Розчин інгібітору зберігають у темному місці та запобігають від попадання його на шкіру.

Виявлення холінестерази за методом Гоморі

Для фіксації шматочків матеріалу застосовують рідину Беккера або 10–12 %-ий охолоджений розчин формаліну.

Придатні заморожені зрізи із свіжої тканини.

Виявлення холінестерази за методом Гоморі набагато простіше порівняно з методом Жеребцова.

Реактиви: 1. Основний розчин: 0,3г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,375 г гліцину; 1 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,75 г малеїнової кислоти; 30 мг 4 %-го розчину NaOH ; 179 мл 40 %-го (насиченого) водного розчину Na_2SO_4 (суміш зберігається тривалий час, рН біля 6). 2. Інкубаційне середовище: 20 мг ацетилтіохолінію розчиняють у декількох краплях води, після чого додають 10 мл основного розчину. 3. Насичений розчин сульфату натрію. 4. Розбавлений розчин (0,5 %-ий) сульфід у амонію. 5. Ядерний барвник.

Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають у інкубаційне середовище на 10–60 хв при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ (у термостаті).

2. Тричі промивають їх насиченим розчином сульфату натрію.

Гістохімічні методи досліджень

3. Переносять зрізи у розчин сульфиду амонію на 2 хв.

4. Якщо необхідно, фарбують їх ядерним барвником, після чого промивають у проточній та дистильованій воді.

5. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту АХЕ визначають за наявністю коричневого осаду сірнистої міді.

Примітка. Контрольні зрізи поміщають на 30 хв у 10^{-6} М розчин дізопропілфторфосфату у насиченому розчині сульфату натрію, потім інкубують в інкубаційному середовищі, яке містить таку ж концентрацію інгібітора. Псевдохолінестераза (ПХЕ) зникає повністю, ацетилхолінестераза (АХЕ) – на 40 %.

Виявлення лужної фосфомоноестерази

Системна назва ферменту – фосфогідролаза моноєфірів ортофосфорної кислоти, тривіальна назва – лужна фосфатаза (ЛФ), шифр – 3.1.3.1. Активується іонами двовалентних металів (особливо магнію та кальцію), містить цинк (0,15 %). Каталізує реакцію:

Моноєфір ортофосфорної кислоти + H₂O → Спирт + H₃PO₄,
каталізує реакції трансфосфорилування.

Фермент бере участь в обміні нуклеотидів, білків, ліпідів, вуглеводів. Міститься у тканинах тварин і людини. Нездатність організму синтезувати лужну фосфатазу призводить до гіпофосфатії, яка проявляється деформацією кісток, остеопорозом тощо.

Є декілька гістохімічних методів виявлення лужної фосфатази.

Виявлення лужної фосфомоноестерази за методом Гоморі-Такаматчу

Для фіксації шматочків матеріалу використовують 10–12 %-ий охолоджений розчин нейтрального формаліну, ацетон, 80⁰ етиловий спирт. Термін фіксації 12–24 год.

Придатні заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: 0,6 г гліцерофосфату (β- або суміші α + β-) натрію, 1 г хлориду кальцію, 0,5 г вероналу (краще – медуналу), 100 мл дистильованої води, 0,5 мл хлориду

магнію, зберігають у холодильнику, при помутнінні фільтрують. 2. 1–2 %-ий розчин хлориду кальцію або нітрату кальцію. 3. 2 %-ий розчин нітрату кобальту (можна хлорид, ацетат, сульфід кобальту) 4. 0,5–1 %-ий розчин сульфиду амонію.

Постановка реакції:

1. Зафіксовані шматочки тканин (2–3 мм) зневоднюють у 96⁰ і абсолютному етиловому спирті 12–24 год, поміщають двічі у ксилол, заливають у парафін, виготовляють зрізи (можна готувати заморожені зрізи із матеріалу, зафіксованого в охолодженому розчині формаліну або етиловому спирті).

2. Зрізи депарафінують (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) і доводять до води.

3. Переносять їх на 1–6 год в інкубаційне середовище при температурі +37⁰ С.

4. Промивають зрізи у розчині хлориду кальцію 1–2 хв.

5. Промивають у розчині нітрату кобальту 5 хв.

6. Промивають чотири рази у дистильованій воді.

7. Переносять у розчин сульфиду амонію на 2–5 хв.

8. Промивають у проточній воді 10 хв.

9. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі (можна спочатку у карбол-ксилолі), заводять у бальзам.

Результат. Місця локалізації ферменту визначаються за темно-коричневим осадом сульфиду кобальту.

Примітка. Контрольні зрізи інкубують у середовищі, в якому відсутній гліцерофосфат натрію. Краще використовувати свіжий матеріал.

**Виявлення лужної фосфомоноестерази
методом азопоєднання**

Фіксацію шматочків матеріалу проводять у 10–12 %-му розчині нейтрального формаліну впродовж 16–24 год.

Придатні щойно заморожені або парафінові зрізи.

За методом Гоморі-Такаматчу можливі артефакти, зумовлені дифузією кінцевих продуктів реакції. Метод азопоєднання такі недоліки усуває.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: в 20 мл 0,1 М трис-буферу (рН=10) розчиняють 10–20 мг α – нафтилфосфату натрію,

додають 20 мг стійкого синього В, ретельно перемішують, фільтрують необхідний об'єм для зрізів. 2. Гематоксилін Майєра.

Постановка реакції:

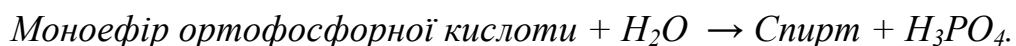
1. Виготовляють зрізи (парафінові доводять до води), фіксований матеріал перед цим промивають 30–40 хв.
2. Заморожені зрізи поміщають на предметні стекла (без застосування клеючих речовин).
3. Висушують їх на повітрі впродовж 1–3 год.
4. Переносять зрізи в інкубаційне середовище на 15–60 хв за температури 37⁰ С (термостат).
5. Промивають у проточній воді 1–3 хв.
6. Дофарбовують зрізи гематоксиліном 4–6 хв.
7. Промивають у проточній воді 30–60 хв.
8. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. У місцях локалізації ферменту випадають осадки темно-синього кольору.

Примітка. Депарафінування зрізів краще здійснювати петролейним ефіром, потім – абсолютним ацетоном. Метод чутливий до мінімальної кількості ферменту, тому немає необхідності у приготуванні контрольних препаратів, появу забарвлення можна контролювати і зупинити в необхідний момент.

Виявлення кислої фосфомоноестерази (фосфатази)

Системна назва ферменту – фосфогідролаза моноєфірів ортофосфорної кислоти, шифр – 3.1.3.2. Вважають, що є декілька видів кислої фосфатази (КФ). Фермент широко розповсюджений у природі. Каталізує реакцію:



Міститься у тканинах тварин, людини, рослин, дріжджах, бактеріях, каталізує реакції трансфосфорилування. Клітинна локалізація пов'язана з лізосомами.

Є декілька гістохімічних методів виявлення КФ. Приведемо окремі із них.

Виявлення кислій фосфомоноестерази за методом Гоморі

Для фіксації шматочків матеріалу застосовують 4 %-ий кальцій-формол, 10–12 %-ий охолоджений розчин формаліну, холодний ацетон. Останній використовують при заливці матеріалу в парафін. **Придатні** заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: у 500 мл 0,05 М ацетатного буферного розчину (рН=5) розчиняють 0,6 г нітрату свинцю і додають 50 мл 3 %-го розчину гліцерофосфату натрію, поміщають у термостат при температурі +37⁰ С на 24 год, фільтрують і додають дистильовану воду (5 % до початкового об'єму). Зберігають у холодильнику (навіть декілька місяців). 2. 1–2 %-ий розчин оцтової кислоти. 3. 0,5 %-ий розчин сульфід амонію. 4. 1 %-ий розчин еозину.

Постановка реакції:

1. Шматочки матеріалу (3–4 мм) фіксують в охолоджену розчині формаліну або кальцій-формолі упродовж 0,5–24 год.
2. Промивають їх у воді 30–60 хв.
3. Виготовляють заморожені зрізи, парафінові доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
4. Зрізи переносять у інкубаційне середовище при температурі +37⁰ С (від 15 хв до 24 год).
5. Промивають їх у дистильованій воді.
6. Переносять їх на декілька хвилин у розчин оцтової кислоти.
7. Споліскують у дистильованій воді.
8. Переносять зрізи у розчин сульфід амонію на 2–5 хв.
9. Промивають у проточній воді.
10. При необхідності зрізи дофарбовують розчином еозину 5 хв.
11. Промивають у дистильованій воді.
12. Заводять зрізи у гліцерин-желатин або в канадський бальзам.

Результат. Місця локалізації ферменту виявляють за наявністю осаду темно-коричневого кольору. Багато ферменту виявляється у пухлинах.

Примітка. Для приготування інкубаційного середовища беруть β-гліцерофосфат натрію або суміш α + β (1:1). Окремі автори

не рекомендують заливати матеріал у парафін, так як при цьому процесі активність кислої фосфатази зменшується на 95 %.

Виявлення кислої фосфомоноестерази за методом Берстона

Для фіксації шматочків матеріалу застосовують холодний ацетон або здійснюють ліофільне сушіння.

Придатні парафінові зрізи.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: розчиняють біля 5 мг фосфату нафтолу AS – В1 в 0,25 мл диметилформаміду або диметилсульфоксиду, додають 25 мл дистильованої води, потім – 35 мг солі діазонію (стійкого червоного GG або червоно-фіолетового LB), дві краплі 10 %-го розчину $MnCl_2$, струшують та фільтрують.
2. Гематоксилін Майєра.

Постановка реакції:

1. Зрізи депарафінують та доводять (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) до води.
2. Зрізи переносять в інкубаційне середовище (від 30 хв до 8 год).
3. Промивають їх у проточній воді.
4. Дофарбовують розчином гематоксиліну.
5. Промивають у проточній воді.
6. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. У місцях локалізації ферменту випадає гомогенний осад азобарвника, колір якого змінюється від червоного до червоно-коричневого або синьо-чорного (залежно від солі діазонію).

Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази)

Є декілька різновидів АТФ-ази. Шифр АТФ-ази міозину – 3.6.1.3, різних тканин – 3.6.1.4. Перший фермент активується іонами кальцію, другий – іонами магнію. Обидва ферменти каталізують перебіг реакції:



Вважають, що АТФ-аза приймає участь у доставці АТФ для продовження протікаючих процесів обміну речовин. Виявляється в

мітохондріях та лізосомах, бере участь у реакціях окиснювального фосфорилування.

***Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази)
за методом Падікула і Германа***

Для постановки реакції використовують свіжий матеріал.
Придатні заморожені зрізи.

Основою для розроблення методу були роботи Гоморі з гістохімічного виявлення ферменту.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: змішують 20 мл 0,1 М розчину медіналу (2,062 %-го), 10 мл 0,18 М розчину хлориду кальцію (1,998 %-го), 30 мл дистильованої води, 152 мг дивонатрієвої солі АТФ, після цього додають 0,1 М розчин NaOH до рН–9,4, доводять загальний об'єм водою до 100 мл. 2. 1 %-ий розчин CaCl₂. 3. 2 %-ий розчин CoCl₂. 4. 0,5–1 %-ий розчин сульфід амонію.

Постановка реакції:

1. Виготовляють зрізи.
2. Зрізи поміщають у інкубаційне середовище (від 5 хв до 3 год) при температурі +37⁰ С (термостат).
3. Промивають зрізи у трьох порціях хлориду кальцію.
4. Переносять їх на 3 хв у розчин хлориду кобальту.
5. Промивають у дистильованій воді.
6. Переносять у розчин сульфід амонію.
7. При необхідності дофарбовують зрізи розчином карміну або еозину.
8. Заводять зрізи у гліцерин-желатин або зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Результат. У місцях локалізації ферменту випадають осадки сульфід кобальту чорного або сірого кольору.

Примітка. Контрольні препарати поміщають у розчин *n*–хлормеркурибензоату (2,5·10⁻³ М) на декілька хвилин.

**Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази)
за методом Вахштейна-Мейзеля**

Для постановки реакції використовують свіжий матеріал. Придатні заморожені зрізи. Шматочки матеріалу можна попередньо фіксувати у 10 %-му холодному розчині нейтрального формаліну.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: 20 мл 10–25 %-го розчину динатрієвої солі АТФ, 20 мл 0,2 М трис-НСІ-буферу (рН–7,2), 3 мл 2 %-го розчину нітрату свинцю, 5 мл 0,1 М розчину сульфату магнію, 2 мл дистильованої води. 2. 1 %-ий розчин сульфиду амонію.

Постановка реакції:

1. Виготовляють зрізи.
2. Поміщають їх у інкубаційне середовище на 5–60 хв.
3. Споліскують у дистильованій воді.
4. Переносять у розчин сульфиду амонію.
5. Споліскують у дистильованій воді.
6. Заводять зрізи в гліцерин-желатин.

Результат. У місцях локалізації ферменту випадають осадки коричнево-чорного кольору.

Гормони

Гормони (від грецького *hormao* – «приводжу в рух, збуджую») – це біологічно активні речовини органічної природи, що синтезуються залозами внутрішньої секреції або спеціалізованими клітинами тканин. Вони транспортуються кров'ю до клітин-мішеней, де регулюють широкий спектр метаболічних, морфологічних та фізіологічних процесів. Слід зауважити, що гормони не обмежуються продукцією класичних ендокринних залоз: наприклад, інсулін і глюкагон підшлункової залози можуть вироблятися й у нервових закінченнях, а простагландини і гістамін – у різних тканинах організму.

За хімічною природою гормони ссавців поділяють на три основні групи: білкові та пептидні гормони, які складаються з ланцюгів амінокислот; похідні амінокислот, включаючи катехоліни та тиреоїдні гормони; стероїдні гормони, синтезовані із холестерину, що відзначаються ліпофільною природою та здатністю проникати крізь клітинні мембрани.

Додатково виділяють гормоноподібні речовини або

гуморальні фактори (гістамін, простагландини, тромбоксани), які виробляються не класичними залозами, а у різних клітинах тканин і беруть участь у локальній регуляції фізіологічних процесів.

Найбільш прийнятна класифікація гормонів – за органами та структурами їх синтезу: статеві гормони (тестостерон, естрогени, прогестерон) – регулюють розвиток і функції репродуктивної системи, а також формування вторинних статевих ознак; гормони надниркових залоз (кіркової та мозкової речовини) – впливають на обмін речовин, водно-сольовий баланс та стрес-реакції; гормони щитоподібної та прищитоподібної залоз – визначають обмін йоду, кальцію та розвиток скелетної системи; гормони підшлункової залози (інсулін, глюкагон) – координують вуглеводний, білковий і ліпідний обмін; гормони тимуса, гіпофіза та епіфіза – регулюють ріст, імунний статус, циркадні ритми та метаболічні процеси.

Відомо близько 50 основних гормонів, кожен із яких має специфічний спектр дії на різні біохімічні та фізіологічні процеси організму. Вони можуть перебувати у вільному стані або бути зв'язаними з білками-переносниками, що впливає на їх біодоступність та тривалість дії.

Гормони реалізують регуляторну функцію переважно через модуляцію активності ферментів: активація або інгібування каталізаторів здійснюється через вторинні сигнальні системи, зокрема циклічні АМФ та ГМФ, що забезпечує точне управління обміном речовин. Порушення синтезу або деградації гормонів проявляється змінами концентрації біологічно активних речовин у крові, сечі та інших рідинах і може призводити до розвитку ендокринної патології, такої як гіпо- чи гіперфункція залоз.

Залежно від поставленого завдання, дослідження можуть включати: одноразове визначення концентрації гормонів та їх метаболітів; динамічне спостереження змін рівня гормонів у крові та виділення їх із сечею; оцінку впливу терапевтичних засобів, фізіологічного навантаження та функціональних змін організму.

Гормони кіркової речовини (кори) надниркових залоз

Гормони кіркової речовини надниркових залоз поділяють на чотири основні групи: *глюкокортикоїди* (кортизон, кортикостерон,

Гістохімічні методи досліджень

гідрокортикостерон) – регулюють вуглеводний і білковий обмін, стимулюють мобілізацію енергії та адаптаційні реакції; мінералокортикоїди (альдостерон, дезоксикортикостерон) – контролюють водно-електролітний баланс і артеріальний тиск; **андрогени** (тестостерон, дегідроепіандростерон, андростендіон) – сприяють росту тіла, синтезу білків та формуванню вторинних статевих ознак у самців; естрогени та прогестерон – відповідальні за

Фенілгідразина реакція на виявлення кортикоїдів

Для фіксації шматочків матеріалу застосовують рідину Беккера.

Придатні заморожені зрізи.

Реактиви: 1. Розчин гідрозину: 5 г фенілгідрозину, 10 мл льодяної оцтової кислоти, 40 мл дистильованої води.

Постановка реакції:

1. Зрізи промивають у воді 2–3 год.
2. Поміщають їх у розчин фенілгідрозину на 3–4 год.
3. Промивають у дистильованій воді.
4. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. У місцях локалізації кортикоїдів виявляється жовте забарвлення. При мікроскопії препаратів бажано користуватися синім або зеленим фільтром.

Примітка. Можна застосовувати насичений розчин 2,4-динітрофенілгідрозин в 1 н. розчині соляної кислоти. Тоді, починаючи з другого пункту вище описаного методу на виявлення кортикоїдів, постановку реакції здійснюють наступним чином: 2. Зрізи поміщають на 24 год у розчин динітрофенілгідрозину при температурі $0+4^{\circ}\text{C}$. 3. Споліскують їх в 1 н. розчині соляної кислоти. 4. Споліскують у дистильованій воді. 5. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

У місцях локалізації кортикоїдів виявляється жовто-оранжеве забарвлення.

Виявлення α -кетогруп кортикоїдів за Канолкаром

Для постановки реакції використовують свіжий матеріал.

Придатні заморожені зрізи.

Реактиви: Розчин Ліллі: 9 мл аніліну, 8 мл концентрованої

Гістохімічні методи досліджень

соляної кислоти, змішують, струшують, додають 100 мл дистильованої води. 2. 5 %-ий розчин FeCl_3 . 3. Реактив Шиффа (*див. с. 133*). 4. Дисульфідна вода: змішують 5 мл 10 %-го розчину $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ та 5 мл 1 н. розчину HCl в 100 мл дистильованої води.

Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають у розчин Ліллі на 20 хв.
2. Промивають їх у дистильованій воді 1–3 хв.
3. Переносять зрізи у розчин хлориду заліза на 30 хв за температури 50°C .
4. Промивають у дистильованій воді.
5. Поміщають у реактив Шиффа на 20 хв.
6. Промивають у дистильованій воді (тричі по 2 хв).
7. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. Виявляються дві групи гормонів кори надниркових залоз – глюкокортикоїди та мінералокортикоїди. Вони забарвлені у червоний колір. Андрогени, екстрогени та прегнандіол не виявляються.

Гормони мозкової речовини надниркових залоз

Клітини мозкової речовини надниркових залоз виробляють два гормони – адреналін та норадреналін. Вони сприяють посиленню серцевої діяльності, розширенню судин серця, зіниці, посиленню глікогенолізу, активізації окиснювальних процесів та газового обміну. Гормони трапляються у вільному і зв'язаному (з білками) станах. Частина реакцій, за допомогою яких виділяються і виявляються ці гормони, базуються на властивості останніх енергійно відновлювати оксиди хрому, срібла, осмію тощо.

Хромафінна реакція на адреналін та норадреналін за Хіларпом і Хьокфельтом

Для постановки реакції використовують свіжий нефіксований матеріал.

Придатні заморожені зрізи.

Після перебування шматочків матеріалу мозкової речовини надниркових залоз у дихроматі калію або хромовій кислоті в багатьох клітинах з'являється темно-коричнєве забарвлення. Такі клітини

називають феохромними, а тканину, яка здатна відновлювати оксиди хрому – хромафінною.

Реактиви: Хромова суміш: змішують 10 об'ємів 5 %-го розчину $K_2Cr_2O_7$ та один об'єм розчину K_2CrO_4 (рН–5,6).

Постановка реакції:

1. Зрізи поміщають у хромову суміш на 10 год.
2. Переносять їх у дистильовану воду на 30–60 хв, воду тричі міняють.
3. Зрізи заводять у гліцерин–желатин. Можна зневоднювати у спиртах, просвітлювати у ксилолі та заводити у бальзам.

Результат. Хромафінна речовина забарвлюється від темно-коричневого до жовтого кольору. Клітини, які містять адреналін, набувають темно-коричневого, норадреналін – жовтого та жовто-коричневого кольору.

Виявлення норадреналіну за Хілларпом і Хьокфельтом

Для постановки реакції використовують свіжий матеріал.

Придатні заморожені зрізи.

За даними Хілларпа і Хьокфельта, після окиснення KIO_4 (рН – 5–6) норадреналін через декілька хвилин перетворюється у темний пігмент, а адреналін – через одну добу. Можлива інтрацелюлярна дифузія норадреналіну. Метод можна використовувати одночасно з попереднім, так як він допоможе віддиференціювати локалізацію норадреналіну та адреналіну.

Реактиви: 1. 10 %-ий розчин KIO_4 . 2. 10 %-ий розчин формаліну.

Постановка реакції:

1. Шматочки тканини товщиною 0,5 мм поміщають у розчин періодату калію на 16 год.
2. Переносять їх у дистильовану воду на 2 год.
3. Виготовляють зрізи товщиною 10–20 мкм.
4. Зрізи промивають у дистильованій воді.
5. При необхідності, фарбують ядра ядерними барвниками.
6. Зрізи наносять на предметні стекла.
7. Зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Гістохімічні методи досліджень

Результат. Клітини, які містять норадреналін, набувають коричневого кольору. Адреналін виявляється через 20–24 год.

Люмінісцентний метод виявлення норадреналіну за Ерьонке

Для постановки реакції використовують свіжий матеріал. **Придатні** заморожені зрізи.

Автором запропонованого методу встановлено кореляцію між інтенсивністю люмінісценції клітин мозкової речовини надниркових залоз і вмістом у них норадреналіну.

Принцип виявлення норадреналіну ґрунтується на тому, що після перебування матеріалу в формаліні клітини мозкової речовини надниркових залоз набувають якості жовто-зеленої флуоресценції.

Реактиви: Розчин формаліну: 1 об'єм концентрованого формаліну, 5 об'ємів 2 %-го розчину хлориду кальцію, 4 об'єми дистильованої води.

Постановка реакції:

1. Виготовляють заморожуючі зрізи, товщиною до 50 мкм.
2. Поміщають їх у розчин формаліну на 2–6 год.
3. Промивають у дистильованій воді.
4. Зрізи наносять на предметні стекла.
5. Досліджують за допомогою люмінесцентного мікроскопу.

Результат. Цитоплазма клітини, які містять норадреналін, набуває жовто-зеленої люмінісценції. Такі клітини переважно розташовані групами.

Гормони гіпофіза

Гіпофіз – залоза внутрішньої секреції. Разом з нейроендокринними ядрами гіпоталамуса формує єдину морфофізіологічну систему, яка регулює обмін речовин в організмі людини і тварин. Гіпофіз побудований із двох часток, різних за походженням, будовою і функціями: аденогіпофіза і нейрогіпофіза. В аденогіпофізі продукуються гормони: соматотропний, фолікулостимулюючий, лютетінізуючий, лактотропний, тиротропний, адренокортикотропний, ліпотропний, гонадотропний і меланотропний. У нейрогіпофізі всмоктуються в кров гормони, з

діяльністю яких пов'язане скорочення м'язової тканини матки (окситоцин) та регуляція тиску крові (вазопресин).

***Виявлення клітин аденогіпофіза
за методом Ландінга та Холла***

Для фіксації матеріалу використовують 10–12 %-ий розчин нейтрального формаліну. ***Після фіксації*** матеріал заливають у парафін.

У дистальній частці аденогіпофіза виявляються різні типи клітин, які різняться за своєю формою, величиною, властивістю забарвлення та хімічної організації. Припускають, що кожний тип клітин виробляє свій характерний гормон. Краще інших вивчені три типи залозистих клітин: хромофобні (їх вважають резервними, камбіальними, такі клітини становлять 50–60 % від усіх клітин), ацидофільні (еозинофільні, або оксифільні, становлять 30–35 % від усіх клітин) та базофільні (становлять 4–10 % від усіх клітин). Соматотропний і лактотропний гормони синтезуються в ацидофільних клітинах, а тиротропний і гонадотропний гормони – у базофільних. Крім названих вище клітин, виділяють ще проміжні клітини, в яких синтезується адренокортикотропний гормон.

Реактиви: 1. Веронал-ацетатний буферний розчин (рН–9,2) (*приготування, див. с. 226*). 2. 0,1%-ий розчин стійкого синього В, виготовлений на цьому ж буферному розчині. 3. 2 %-ий розчин HNO_3 кислоти, виготовлений також на цьому ж буферному розчині. 4. 1 %-ий розчин йодату натрію в 0,5 %-ій азотній кислоті. 5. Розчин сульфату-лейкотионіну за Ван Дейном: розчиняють 0,5 г тіоніну в 250 мл дистильованої води, кип'яють 5 хв, охолоджують, об'єм доводять до попереднього рівня, додають 250 мл третбутанолу (температура плавлення $+25^{\circ}\text{C}$), переносять у посуд з корком, струшують, залишають на 24 год при температурі $+25^{\circ}\text{C}$, потім на 48 год при температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Термін зберігання такого розчину 45 діб.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) до води.
2. Споліскують їх у веронал-ацетатному буферному розчині.

3. Поміщають у розчин стійкого синього В на 15 хв при температурі 0°C .
4. Промивають у буферному розчині.
5. Проводять реакцію азотосполучення: поміщають зрізи в розчин HNO_3 кислоти на 15–30 сек.
6. Промивають у проточній воді 2 хв.
7. Обробляють зрізи розчином йодату натрію 10 хв при температурі $+20\text{--}25^{\circ}\text{C}$.
8. Промивають у проточній воді 5 хв.
9. Переносять зрізи в сульфат-лейкотионіну на 2 год.
10. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Результат. Базофільні клітини забарвлені у синій колір, ацидофільні – коричневий, хромофобні не забарвлюються. Синє забарвлення пов'язано з наявністю у клітинах ШІК – позитивних речовин. Коричнєве забарвлення з'являється у результаті реакції діазосполучення реактивів з білками, які багаті тирозином.

Пігменти

Термін «*пігменти*» об'єднує широку групу речовин, здебільшого ендogenousного походження, які відрізняються хімічними властивостями, зокрема реакцією на кислоти, луги, жиророзчинні розчинники, солі металів (заліза, срібла) та барвники, а також мають різні мікроструктурні характеристики. У гістохімічному плані відмінності між пігментами менш виражені. Пігменти, що містяться в тканинах тварин, зазвичай поділяють на п'ять основних груп: меланін, ліпофусцин, гемосидерин, гематоїдин та малярійний пігмент.

За походженням усі пігменти можна розділити на *гематогенні* та *автогенні*. До першої групи належать продукти розпаду гемоглобіну, такі як гемосидерин, гематоїдин, гематопорфін, білірубін, білівердин та малярійний пігмент. Автогенні пігменти утворюються у процесах метаболізму і старіння клітин і включають меланін, каротиноїди (ліпохроми), а також пігменти накопичення – ліпофусцини та хромоліпіди. Існують також інші класифікації пігментів, які враховують їх хімічну структуру та функціональні властивості.

Гістохімічні методи досліджень

Фізіологічне значення пігментів надзвичайно важливе. Рослинні пігменти, такі як хлорофіл, бактеріохлорофіл і деякі каротиноїди, відіграють ключову роль у фотосинтезі, забезпечуючи перетворення сонячної енергії у хімічну. У тварин гемоглобін і міоглобін, що за будовою подібні між собою, зв'язують Оксиген та доставляють його до тканин у міру потреби. Меланін шкіри захищає організм від шкідливого ультрафіолетового опромінення, тоді як меланін сітківки виступає як природний світлофільтр, регулюючи проникнення світла.

Патологічні зміни пігментації можуть бути маркерами різних захворювань. Наприклад, жовта пігментація характерна для уремії та мікседеми. Порушення пігментного обміну спостерігаються при хворобі Аддісона, пігментній кропивниці, хворобі Гоше, а також під час вагітності. Дисфункції залізовмісних пігментів, зокрема гемосидерину, проявляються при інфекційній анемії коней.

Таким чином, пігменти виконують як фізіологічні функції, так і слугують індикаторами патологічних процесів, а гістохімічні методи дозволяють детально вивчати їх локалізацію, хімічні властивості та зміни в тканинах при різних захворюваннях.

Виявлення меланінів за методом Ліллі

Для фіксації матеріалу використовують 10–12 %-ий розчин нейтрального формаліну та рідину Карнуа.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Меланіни переважно виявляються в епідермісі, волоссі, волосяних фолікулах та у меланомах шкіри. У нервовій тканині людини і тварин (особливо у жуйних) виявляється нейромеланін. Пігмент має різноманітне забарвленням – чорне, коричневе, жовте і навіть фіолетове.

Реактиви: 1. 2,5 %-ий розчин сульфату заліза $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. 2. 1 %-ий розчин гексаціано-(III) феррату калію в 1 %-му розчині оцтової кислоти. 3. 1 %-ний розчин оцтової кислоти. 4. Суміш пікринова кислота – фуксин за Ван-Гізеном (100 мг кислого фуксину розчиняють у 100 мл насиченого розчину пікринової кислоти).

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх у розчин сульфату заліза на 1 год.
3. Промивають у дистильованій воді (4 рази її змінюють).
4. Переносять зрізи у розчин гексаціано-(III) феррату калію на 30 хв.
5. Промивають їх у розчині оцтової кислоти.
6. При необхідності дофарбовують сумішню *пiкринова кислота–фуксин* упродовж 5 хв (використовувати розчин гематоксиліну для дофарбовування зрізів забороняється).
7. Зневоднюють зрізи у 96⁰ та абсолютному спиртах (двічі замінюючи кожний), просвітлюють у спирт-ксилолі і в двох змінах ксилолу та заводять у синтетичне середовище.

Результат. Меланіни шкіри, судинної оболонки ока та м'якої мозкової оболонки, нейромеланін і трихоксантин забарвлені в темно-зелений колір, фон – блідо-зеленуватий або безбарвний. У випадку дофарбовування гістосрізів за Ван-Гізеном, пігмент набуває червоного забарвлення, цитоплазма – коричневого або жовтого.

Виявлення ліпофусцинів за методом Шморля

Для фіксації матеріалу використовують 10–12 %-ий розчин нейтрального формаліну.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи.

Ліпофусцини часто називають пігментами зношування або старіння. Їх багато у нервових клітинах людей похилого віку і у старих тварин. Ліпофусцини утворюються із ліпідів і ліпопротеїдів при окисненні. Розчинні в органічних розчинниках.

Реактиви: 1. Розчин гексаціано-(III) феррату калію: змішують три частини 1 %-го розчину хлориду заліза та одну частину щойно виготовленого 1 %-го розчину гексаціано-(III) феррату калію.
3. 1 %-ий розчин нейтрального червоного.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх у розчин гексаціано-(III) феррату калію на 5–30 хв.

Гістохімічні методи досліджень

3. Промивають у проточній воді.
4. При необхідності зрізи піддають диференціюванню (суміш 1 %-го розчину їдкого калію в 50⁰ етиловому спирті).
5. Зрізи промивають у 70⁰ етиловому спирті.
6. Промивають у дистильованій воді.
7. Фарбують розчином нейтрального червоного 3 хв.
8. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам або синтетичне середовище.

Результат. Пігменти забарвлені в інтенсивно темно-синій колір.

Примітка. Можуть забарвлюватися SH-групи, що знижує специфічність методу. Забарвлюється і меланін.

Диференціювання меланінів від ліпофусцинів за методом Хуека

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин формаліну, етиловий спирт та рідину Карнуа.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Реактиви: 1. Насичений розчин сульфату нільського блакитного. 2. 3–10 %-ий розчин пероксиду водню.

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх у розчин барвника на 30 хв.
3. Промивають у дистильованій воді.
4. Переносять у розчин пероксиду водню до 24 год.
5. Промивають у водопровідній воді.
6. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

Результат. Ліпофусцини забарвлені у синій колір, меланіни – безбарвні.

Виявлення жовчних пігментів за методом Штейна

Для фіксації матеріалу використовують 70⁰ або 90⁰ етиловий спирт.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Жовчні пігменти є продуктами розпаду гемоглобіну та інших гемовмісних білків. У процесі окиснення спочатку утворюється

білівердин, потім білірубін, мезобілірубін, уробіліноген. Із уробіліногену утворюється уробілін і стеркобіліноген, а також стеркобілін. Власне жовчними пігментами є білірубін та білівердин. Білівердин – пігмент зеленого кольору, з ним пов'язане забарвлення жовчі. Білірубін має червонувато-жовтий колір. Обидва жовчні пігменти за хімічними властивостями є кислотами, утворюють із лужноземельними металами солі, нерозчинні у воді. Порушення обміну цих пігментів спостерігається при жовтяницях (паренхіматозній, гемолітичній, обтураційній), а у тварин ще й при фасціольозі та інших хворобах печінки.

Метод Штейна розрахований на сумарне виявлення жовчних пігментів у тканинах хворого організму.

Реактиви: 1. Розчин Люголя: 2 г йодиду калію розчиняють у 5 мл дистильованої води, додають 1 г йоду і розводять водою до об'єму 300 мл. 2. Настойка йоду: 10 г йоду розчиняють у 100 мл 96⁰ етилового спирту. 3. Робочий розчин йоду: 2 частини розчину Люголя змішують з 1 частиною настойки йоду. 4. 5 %-ий водний розчин тіосульфату натрію.

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх у робочий розчин йоду на 12–18 год.
3. Промивають у проточній воді 5 хв.
4. Переносять зрізи у розчин тіосульфату на 30 сек.
5. Промивають у воді.
6. Зневоднюють зрізи в абсолютному ацетоні, просвітлюють у ксилолі і заводять у канадський бальзам.

Результат. Жовчні пігменти забарвлені в темно-зелений колір. Інтенсивність перебігу реакцій пов'язують з наявністю невеликих гранул пігментів (золотисто-жовтий колір пігментів поступово переходить в оливково-коричневий).

Примітка. Зрізи можна дофарбовувати гематоксиліном або карміном Майєра 3–18 год (після 5-го пункту). Кармін забарвлює ядра клітин у червоний колір, а пігменти – у темно-зелений.

**Виявлення гемоглобіну за методом
Слонімського-Ланінського**

Матеріал фіксують у спеціальному фіксаторі: в 100 мл дистильованої води розчиняють 2,5–4 г гексаціано-(III) феррату калію та 10–20 мл концентрованого формаліну.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Гемоглобін – червоний залізовмісний пігмент крові людини та більшості тварин. Виконує функцію переносу Оксигену від легенів до тканин та вуглекислого газу від тканин у легені. За хімічною природою – хромопротеїд, який складається з білка глобіну, частка якого становить 96 % від маси гемоглобіну та небілкового компоненту – гему (4 %) утворює основну масу еритроцитів. Молекула гемоглобіну складається із 4-х субодиниць-мономерів, які мають молекулярну масу 16500-17000. Усі чотири залишки гему розташовані на поверхні молекули і доступні для взаємодії з Оксигеном. У капілярах легень гемоглобін окиснюється і перетворюється в оксигемоглобін, у тканинах віддає Оксиген та приєднує вуглекислоту, перетворюючись у карбогемоглобін. У кожному еритроциті міститься біля 280 млн. молекул гемоглобіну. В організмі людини щодоби утворюється біля 8 г гемоглобіну (червоний кістковий мозок). Обмін гемоглобіну порушується при анеміях, obturaційній жовтяниці, лейкозах тощо.

Реактиви: 1. Фіксатор: в 100 мл дистильованої води розчиняють 2,5–4 г гексаціано-(III) ферату калію та 10–20 мл нейтрального формаліну. 2. Розчин бензидину: 0,1–0,2 г бензидину розчиняють в 2–3 мл 96⁰ етилового спирту, додають 2 мл 4 %-го розчину пергідролу та 1 мл розчину бензидину в льодяній оцтовій кислоті (0,1–0,2 г розчинити в 2–3 мл кислоти). 3. 70⁰ етиловий спирт. 4. Контрастний барвник (метиловий зелений, сафранін тощо).

Постановка реакції:

1. Матеріал фіксують впродовж 15–24 год.
2. Промивають його в проточній воді 24 год.
3. Заливають у парафін або парафін – целоїдин.
4. Виготовляють зрізи.
5. Зрізи депарафінують (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) та доводять до води.

6. Переносять зрізи у розчин бензидину (контроль забарвлення здійснюють під мікроскопом).

7. Зрізи фарбують контрастним барвником.

8. Промивають у воді.

9. Швидко зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у канадський бальзам.

Результат. У місцях розміщення гемоглобіну випадає коричневий осад.

Виявлення гемосидерину за Перлсом

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин формаліну, рідину Карнуа та 70⁰ етиловий спирт.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Гемосидерин – похідний гемоглобіну. Вважають, що він складається із білка, з'єданого з гідроксидом заліза. Продукується у місцях крововиливів клітинами ретикуло-ендотеліальної системи. Відкладається переважно в макрофагах (сидероцитах), а також і в міжклітинній речовині. Колір – від золотисто-жовтого до буровато-коричневого. Багато гемосидерину виявляється у шкірі (власне шкіра) при травмах, укусах, інтоксикаціях, деяких інфекційних хворобах.

Реактиви: 1. Розчин гексаціано-(II) феррату калію: змішують рівні частини 10 %-го розчину гексаціано-(II) феррату калію і 20 %-го розчину соляної кислоти. 2. Фарбуючий розчин: 0,1 г ядерного стійкого червоного розчиняють у 100 мл гарячого 5 %-го розчину сульфату алюмінію, суміш охолоджують та фільтрують.

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.

2. Переносять їх у розчин гексаціано-(II) феррату калію на 30 хв.

3. Промивають у дистильованій воді.

4. Переносять зрізи у фарбуючий розчин на 2–3 хв.

5. Промивають у воді.

6. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Гемосидерин забарвлений у синій колір, ядра клітин – у червоний.

Реакція на берлінську лазурь (за Перлсом)

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин формаліну, 96⁰ або абсолютний етиловий спирт.

Для роботи придатні заморожені, парафінові, целоїдинові зрізи.

Реакція дає змогу виявити тільки частину залізовмісних пігментів і особливо тих, у яких залізо знаходиться у вигляді окисних сполук.

Реактиви: 1. 1 %-ий розчин соляної кислоти. 2. 2 %-ий розчин жовтої кров'яної солі – $K_4Fe(CN)_6$. 3. Галуновий кармін (*приготування див. с. 64*).

Постановка реакції:

1. Зрізи (парафінові доводять до води) поміщають у посуд з дистильованою водою.

2. Зрізи переносять (скляними голками) у свіжу суміш двох вищевказаних розчинів із розрахунку: 1–2 краплі 2 %-го розчину жовтої кров'яної солі на 1 мл 1 %-ої соляної кислоти на 15–20 хв, до посиніння.

3. Промивають зрізи у дистильованій воді 5–10 хв.

4. Дофарбовують їх галуновим карміном (10–20 хв).

5. Промивають у воді, проводять через спирти, карбол-ксилол, ксилол і заводять у бальзам.

Результат. Гемосидерин забарвлений у синій колір, ядра клітин – у червоний.

Примітка. Матеріал повинен бути свіжим. Шматочки тканин і органів краще фіксувати в абсолютному або 96⁰ етиловому спирті. Можна фіксувати і в нейтральному формаліні, розбавляючи його тільки дистильованою водою. При застосуванні формаліну не рекомендується затримувати у ньому зразки тканини більше 1–2 діб. Матеріал, фіксований формаліном, потребує швидкої обробки, а при необхідності тривалого зберігання його слід перенести у абсолютний або 96⁰ етиловий спирт.

При дослідженні матеріалу необхідно дотримуватися наступних правил:

1. Для роботи використовують тільки дистильовану воду, вільну від сполук заліза. На ній же готуються і всі необхідні реактиви.

Гістохімічні методи досліджень

2. Скляний посуд повинен бути ретельно вимитим, його споліскують у дистильованій воді та спирті.

3. Під час роботи користуються скляними голками (металеві предмети недопустимі).

Виявлення амілоїду за методом Бенхольда

Для фіксації матеріалу (придатний тільки свіжий матеріал) використовують 10 %-ий розчин формаліну, рідину Карнуа та 70⁰ етиловий спирт.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи.

Амілоїд – білкова речовина глобулінової природи, яка відкладається при деяких хворобах у тканинах нирок, печінки, селезінки тощо. За первинного амілоїдозу уражається серцевий м'яз, вторинного – нирки, надниркові залози, печінка, селезінка. Амілоїди відкладаються у стінках кровоносних та лімфатичних судин, у стромі органів за напрямком ретикулярних волокон. Амілоїдоз викликається багатьма інфекційними та паразитарними хворобами (туберкульозом, плазмодіозом).

Реактиви: 1. 1 %-ий розчин конго червоного. 2. Насичений розчин карбонату літію. 3. 80⁰ етиловий спирт. 4. Гематоксилін Майєра (*приготування див с. 63*).

Постановка реакції:

1. Зрізи (парафінові доводять до води) поміщають у розчин барвника (парафінові – на 15–20, заморожені – на 1–2 хв).

2. Зрізи переносять у розчин карбонату літію на 0,5–15 хв.

3. Диференціюють їх у 80⁰ етиловому спирті (до зникнення відходження барвника).

4. Споліскують у воді.

5. При необхідності зрізи дофарбовують гематоксиліном Майєра.

6. Промивають у воді.

7. Зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Результат. Амілоїд забарвлений у цегляно-червоний колір.

Гістохімія металів

Метали, як хімічні елементи, відіграють важливу роль у фізіології організму людини і тварин. Вони беруть участь у нормальному функціонуванні клітин, тканин і органів, забезпечуючи структурну цілісність окремих органів (кістки, зуби), регуляцію обміну речовин, нервово-м'язову збудливість, перенесення Оксигену тощо. Дефіцит чи надлишок їх в організмі призводить до його патології.

Гістохімічне виявлення металів у тканинах людини і тварин ґрунтується на реакціях утворення забарвлених нерозчинних сполук (хелатів) в результаті взаємодії їх іонів зі специфічними реактивами. Внаслідок цього, в місцях локалізації металів, утворюються кольорові комплекси або нерозчинні сполуки, які можна візуалізувати за допомогою світлової мікроскопії.

Виявлення кальцію

Кальцій (Ca) є одним із найважливіших хімічних елементів живих організмів. Його маса в організмі людини та тварин класу ссавці становить близько 2% від усієї їх маси тіла та 40 %- маси мінеральних речовин. Майже 99% кальцію знаходиться в скелеті у вигляді нерозчинних сполук. Решта його частина міститься у зубах, м'яких тканинах та внутрішньотканинній рідині, у вигляді іонів, солей, комплексних сполук.

Кальцій виконує багато регуляторних та структурних функцій. Тому, порушення його балансу в організмі (збільшення або зменшення), в свою чергу, призводить до порушення залежних від цього елементу функцій.

Відкладення солей (сполук) кальцію в тканинах (біологічна кальцифікація), як процес, поділяють на фізіологічну (в кістковій тканині) та ектопічну (кальциноз). Позаскелетну (ектопічну) кальцифікацію у свою чергу ділять на кальцифікацію м'яких тканин та серцево-судинну. Кальциноз (утворення відкладень солей кальцію в м'яких тканинах або органах, у яких солі в нерозчиненому стані не повинні виявлятися), як патофізіологічний та метаболічний синдром, відомий також під назвою – звапнування (кальцифікація).

Виявлення кальцію алізариновим червоним

Алізариновий червоний – барвник із групи антрахінонів. Антрахінон (9,10-антацендіон) – представник класу хінонів. Практично нерозчинний у воді, розчинний в органічних розчинниках. Застосовується, як напівпродукт у синтезі барвників.

У гістології антрахінон використовують для виявлення місць локалізації кальцію в тканинах шляхом зв'язування з кальцієм через процес хелатування. Така реакція утворює комплекс – алізарин-кальцій з подвійним променезаломленням. Під світловим мікроскопом видно, що сполуки кальцію забарвлені в яскраво-червоний колір.

Реакція не є абсолютно специфічною для кальцію, оскільки інші метали (магній, марганець, залізо, барій і стронцій) можуть реагувати з цим барвником. Але це не впливає на результат забарвлення, оскільки ці метали (їх сполуки) не містяться у достатній концентрації у біологічних тканинах, щоби проявитися таким забарвленням.

Даний метод використовують для виявлення місць локалізації сполук кальцію в тканинах або судинній системі. Окрім того, його можна використовувати для встановлення росту та розвитку кісток, остеопорозу або кісткового мозку при вивченні клітинної сигналізації, експресії генів, диференціації мезенхімальних стовбурових клітин в остеогенному напрямку.

Для фіксації матеріалу використовують 10%-ий розчин формаліну та 70⁰ етиловий спирт.

Для роботи придатні парафінові або заморожені зрізи.

Реактиви: 1. Розчин алізаринового червоного: до 2 г Alizarin Red S (С.І. 58005) додають 100 мл дистильованої води та добре перемішують. Водневий показник (рН) доводять до величини 4,1-4,3 додаючи 10% NH₄OH. Рівень рН є критичним для якісного проходження реакції, тому перед використанням, необхідно готувати свіжий розчин або перевіряти рН не рідше 1 разу на місяць. 2. Ацетон (100%). 3. Ацетон-Ксилол: Ацетон (1:1).

Постановка реакції:

1. Зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх у розчин Alizarin Red Solution на 0,5–5 хв, контролюючи реакцію під мікроскопом (зазвичай достатньо 2 хв).

3. Промивають у дистильованій воді.
4. Зневоднюють зрізи у спиртах та в ацетоні (до 20 занурень), потім ацетон-ксилолі (1:1) (до 20 занурень).
4. Просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Сполуки кальцію (крім оксалату) забарвлені в оранжево-червоний колір (з подвійним променезаломленням).

Виявлення кальцію нітратом срібла за методом Ван-Косса

Принцип виявлення сполук кальцію нітратом срібла базується на реакції відновлення іонів срібла та осаджуванням, у якій іони срібла вступають у реакцію з фосфатом кальцію у кислому середовищі речовини. За додаткового підсвічування відбувається фотохімічна деградація фосфату срібла у срібло, локалізація якого виразно визначається. Метод не є специфічним саме для кальцію.

Для фіксації матеріалу використовують 10%-ий розчин нейтрального формаліну та 96⁰ етиловий спирт.

Для роботи придатні парафінові або заморожені зрізи.

Реактиви: 1. 1-3% -ий розчин азотнокислого срібла (на дистильованій воді). 2. 5% - вий розчин гіпосульфїту натрію (на дистильованій воді).

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰ і 70⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають зрізи в 1-3% -ий розчин азотнокислого срібла (на 20 хв при УФ-освітленні, або на 0,5-1 год при освітленні 60-100 Вт лампою).
3. Промивають зрізи у дистильованій воді.
4. Поміщають зрізи на 1-2 хв у 5% - вий розчин гіпосульфїту натрію (видалення срібла, що не прореагувало).
5. Промивають зрізи у дистильованій воді (тричі змінюючи воду).

Гістохімічні методи досліджень

6. За потреби (для чіткої диференціації ядер) зрізи дофарбовують ядерним міцним червоним барвником, галуновим карміном або сафраніном.

7. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Кальцій виявляється у вигляді осаду чорного або чорно-коричневого кольору, ядра забарвлені в червоний колір, цитоплазма – в рожевий.

Виявлення кальцію за методом Пірса

Для фіксації матеріалу використовують 10%-ий розчин формаліну, рідину Карнуа, суміш Бекера.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Реактиви: 1% розчин сульфатної кислоти.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи депарафінують і переносять в ацетон на 10–30 сек.
2. Висушують зрізи на відкритому повітрі.
3. Наносять на зрізи декілька крапель розчину сульфатної кислоти.
4. Хід реакції контролюють під мікроскопом.
5. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Кристалогідрат сульфату кальцію спочатку має вигляд тоненьких голочок, потім призм та пластинок.

Виявлення магнію

Магній (Mg) в організмі людини і тварин знаходиться у вигляді фосфатів, карбонатів та фторидів. Основними місцями його локалізації є: кістки, зуби, м'язи, серце, печінка, нирки, кров.

Магній є життєво необхідним мікроелементом, що бере участь у понад 300 біохімічних реакціях, забезпечуючи функціонування м'язової, нервової та серцево-судинної систем. Він також регулює рівень цукру, кров'яний тиск, синтез білка, морфофункціональний стан кісток та покращує сон, діючи як природний розслаблювач.

Виявлення магнію за методом Пірса

Для фіксації матеріалу використовують 10%-ий розчин нейтрального формаліну, рідину Карнуа.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1% розчин 4-*n*-нітробензол-азо-1-нафтолу на 5% розчині NaOH (рН=12,2). 2. Розбавлений розчин NaOH.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰, 70⁰, 40⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають зрізи у розчин барвника на 30 хв.
3. Промивають зрізи лужним розчином
4. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Сполуки магнію зафарбовані в яскраво-синій колір.

Виявлення заліза

Залізо (Fe) – це життєво необхідний мікроелемент, що входить до складу гемоглобіну та міоглобіну, забезпечуючи транспорт Оксигену до тканин, енергетичний обмін, імунітет та функціонування ендокринної системи.

Тривалий дефіцит заліза призводить до залізодефіцитної анемії. Надлишок заліза також небезпечний і може токсично впливати на печінку, нирки та серце.

Виявлення заліза за методом Перлса

Для фіксації матеріалу використовують 10%-ий розчин нейтрального формаліну.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1. 2%-ий розчин HCl. 2. 2 %-ий розчин K₄[Fe(CN)₆]. 3. 1%-ий водний розчин нейтрального червоного або карміну.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰, 70⁰, 40⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають зрізи у суміш НСІ і гексаціану-(II) ферату калія (1:1) на 30-60 хв.
3. Промивають зрізи у дистильованій воді – 5-10 хв.
4. Дофарбовують ядра нейтральним червоним або карміном – 3-5 хв.
5. Споліскують зрізи у дистильованій воді.
6. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Залізо зафарбоване в темно-синій колір, ядра – в червоний.

Виявлення міді

Мідь (Cu) є життєво важливим мікроелементом, який необхідний для кровотворення, синтезу колагену, енергетичного обміну, функціонування нервової системи та антиоксидантного захисту, підтримки імунітету та пігментації.

Нестача міді може призвести до анемії, депігментації волосся, затримки росту, дерматозів, атрофії серцевого м'яза та порушення діяльності нервової системи.

Надмірне надходження міді (токсичність) може спричинити захворювання нирок, печінки тощо.

Виявлення міді за використання бензидину

Для фіксації матеріалу використовують 10%-ий розчин нейтрального формаліну.

Для роботи придатні парафінові зрізи.

Реактиви: 1. Робочий розчин: у 5 мл дистильованої води розчиняють 10 мг солянокислого бензидину і 30 мг тіоцінату амонія.
2. 1%-ий розчин нейтрального червоного.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰, 70⁰, 40⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають зрізи у робочий розчин на 5-10 хв.

3. Споліскують зрізи у дистильованій воді.
4. Дофарбовують зрізи нейтральним червоним – 15 хв.
5. Споліскують зрізи у дистильованій воді.
6. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі та заводять у бальзам.

Результат. Локалізації міді визначається за синім забарвленням.

Виявлення цинку

Цинк (Zn) є критично важливим мікроелементом, який необхідний для функціонування понад 100 ферментів, що регулюють обмін органічних речовин, імунної системи, забезпечення росту і репродукції організмів та синтезу білків. Він також сприяє регенерації тканин.

Дефіцит цинку призводить до численних хвороб людини і тварин.

Виявлення цинку за методом Менделя та Бредлі

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин нейтрального формаліну.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1. 10 %-ий розчин нітропрусиду натрія. 2. 1–5 %-ий розчин сульфату калію.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰, 70⁰, 40⁰ етиловий спирт) до води.
2. Поміщають зрізи у розчин нітропрусиду натрія на 15–20 хв, за температури 50°C.
3. Промивають зрізи у проточній воді 15 хв.
4. Накривають зрізи накривним скельцем, під яке наносять краплі розчину сульфату калію.

Результат. Локалізація цинку визначається за червоним забарвленням.

Виявлення кобальту

Кобальт (Co) є життєво необхідним мікроелементом, що депонується в печінці та м'язах. Він бере участь у кровотворенні, синтезі вітаміну B₁₂, білковому та вуглеводному обміні.

Виявлення кобальту за методом Ліллі

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин нейтрального формаліну.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1. Розчин версена або трилону В – 10 %-ий у 1 %-му розчині Na₂CO₃. 2. 1 %-ий розчин пероксиду водню.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰, 70⁰, 40⁰ етиловий спирт) до води і промивають їх у дистильованій воді.

2. На зрізи наносять на 15 хв розчин версену.

3. Додають до зрізів декілька крапель пероксиду водню.

4. Накривають зрізи накривним скельцем і досліджують під мікроскопом.

Результат. Кобальт забарвлений у блакитний або фіолетовий колір.

Виявлення свинцю

Свинець (Pb), це високотоксичний важкий метал, який не відіграє жодної позитивної біологічної ролі в організмі людини і тварин. Він є загально визнаним токсином, який справляє значний негативний вплив на їх здоров'я.

Свинець накопичується в кістках, крові, нервовій системі та м'яких тканинах, викликаючи незворотні ураження нервової системи, ниркову недостатність, анемію, серцево-судинні захворювання, анемію, шлунково-кишкові розлади та порушення репродуктивних функцій.

Основна частина свинцю, яка надходить в організм тварин і людини (до 90 %), депонується у кістковій тканині, де може акумулюватися у значних кількостях внаслідок тривалого періоду напіввиведення (5–20 років). У інших тканинах і крові обмін свинцю

перебігає значно швидше, тривалість його перебування у них після надходження в організм не перевищує декількох діб.

Виявлення свинцю з використанням родизонату натрію

Для фіксації матеріалу використовують 10 %-ий розчин нейтрального формаліну.

Для роботи придатні заморожені та парафінові зрізи. Кісткову тканину піддають декальцинації.

Реактиви: 1. 5 %-ий розчин сульфатної кислоти, з наявністю 5-10 %-го розчину Na_2SO_4 . 2. 0,2 %-ий розчин родизоната натрію в 1%-ому розчині CH_3COOH . 3. Концентрований формалін (40 %-ий розчин формальдегіду). 4. 0,1 %-ий розчин світлового зеленого SF на 1%-му розчині оцтової кислоти.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96° , 70° , 40° етиловий спирт) до води.

2. Зрізи переносять у щойно приготовлений розчин родизонату натрію на 30-60 хв. За використання нефіксованої тканини (зрізи виготовлені на заморожувальному мікротомі), до розчину родизонату натрію додають концентрований формалін (для отримання 10%-го розчину формаліну).

3. Споліскують зрізи у дистильованій воді.

4. Дофарбовують їх світловим зеленим.

5. Заводять зрізи у гліцерин-желатину.

Результат. Солі свинцю забарвлені в яскраво-червоний колір.

Виявлення миш'яку

Миш'як (Арсен) (As) – природний хімічний елемент – важкий метал, сталюого кольору. Він трапляється у воді, ґрунті та деяких харчових продуктах. Попри природне походження, миш'як у неорганічній формі є високотоксичною речовиною (канцероген), яка здатна викликати серйозні порушення здоров'я.

Гістохімічні методи досліджень

Використовують миш'як у вигляді неорганічних сполук у стоматології для девіталізації пульпи та у промисловості (напівпровідники, сплави). Основні діючі речовини – миш'яковистий ангідрид.

В організмі міститься біля 0,008-0,02 мг % миш'яку. Він знаходиться у шкірі і волоссі (0,6 мг %), нігтях (0,17 мг %), щитоподібній залозі (0,013 мг %), печінці (0,011 мг %).

Сполуки миш'яку прискорюють розпад гексозодифосфатів, стимулюють реакції гліколізу та пригнічують дихання еритроцитів. Вони можуть накопичуватися при отруєннях, лейкозах, поліцитемії, деяких пухлинах.

Потрапляючи в організм, миш'як може викликати ураження шкіри, нервової системи, шлунково-кишкового тракту, печінки, унаслідок чого відбуваються головні болі, роздратування, судоми, блювота, діарея. Смертельна доза миш'яку – 50-100 мг.

Виявлення миш'яку за методом Кастела

Матеріал фіксують у 10 %-му водному розчині нейтрального формаліну впродовж 5-7 діб.

Придатні парафінові зрізи.

Реактиви – 10 %-ий розчин формаліну, з наявністю $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Постановка реакції:

1. Шматочки матеріалу поміщають у фіксуючу речовину на 5–7 діб.
2. Промивають у проточній воді – 24 год.
3. Зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заливають у парафін.
4. Готовлять зрізи.
5. Висушують зрізи і, після їх депарафінації, заводять у канадський бальзам.

Результат. Гранули зеленого кольору, свідчать про локалізацію миш'яку.

Примітка. Для контрастності зрізи дофарбовують гематоксиліном та еозином, галуновим карміном або основним фуксином.

Виявлення стронцію

Стронцій (Sr) – сріблясто-білого кольору метал, що належить до лужноземельних металів. Він м'який, пластичний, хімічно активний та швидко окиснюється на повітрі.

Стронцій у природі знаходиться в основному у вигляді мінералів – целестину та стронціаніту. При нагріванні у повітрі, він горить з утворенням окису і нітриду (Sr_3N_2) стронцію. Порошкоподібний стронцій має властивість до самозаймання. Він погано реагує з водою з виділенням водню, утворюючи гідроксид стронцію $Sr(OH)_2$.

За температури вище $300-400^\circ C$, стронцій взаємодіє з воднем, азотом, фосфором, сіркою, вуглецем і галогенами. Слабко реагує з концентрованими азотною та сульфатною кислотами і активно – з неконцентрованими (розбавленими) кислотами. За температури вище $500^\circ C$ і тиску 15 МПа реагує з Оксигеном, утворюючи пероксид стронцію SrO_2 .

Уміст стронцію в організмі залежить від дози проникнення його у тканини, віку, статі та виду тварин. Багато стронцію відкладається у зонах активного росту кісток. Лише незначна кількість стронцію ($0,001-0,1\text{ мг}$ на 1 кг тканини) є нормальною допустимою складовою частиною організму. Стронцій бере участь в осифікації (остеогенезі) кісток. Він є антагоністом магнію.

Небезпеку для організму людини і тварин являє **радіоактивний стронцій – 90** (радіостронцій). Він є небезпечним радіоактивним ізотопом (продукт ділення урану), який накопичується у кістковій тканині (заміщаючи кальцій), зумовлюючи кумулятивну дію у

клітинах, тканинах та органах, спричиняючи променеву хворобу і рак.

Виявлення стронцію за методом Уотерхаузена

Матеріал фіксують у 10 %-му розчині нейтрального формаліну впродовж 5-7 діб.

Придатні заморожені та парафінові зрізи.

Реактиви: 1. 0,2 %-ий водний розчин родизонату натрію. 2. 3 %-ий розчин дихромату натрію або ж калію. 3. 10 %-ий розчин нейтрального формаліну на 70° - му етиловому спирті. 4. Фосфатний буферний розчин ($pH=7$).

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰, 70⁰, 40⁰ етиловий спирт) до води.

2. Зрізи поміщають у розчин дихромату на декілька хвилин.

3. Зрізи переносять в розчин родизонату натрію (заморожувальні зрізи за температури 37° С, депарафіновані – при 60° С), термін інкубації – 1 – 2 год.

4. Швидко зрізи промивають у дистильованій воді або у фосфатному буферному розчині.

5. Зневоднюють зрізи у спиртах, прояснюють у ксилолі і заводять у бальзам або синтетичне середовище.

Результат. Осад стронцію забарвлений у яскраво-червоний колір.

Виявлення ртуті

Ртуть (Hg) – метал сріблясто-білого кольору. Він легко рухомий і при ударі поділяється на дрібні кульки. Ртуть у 13,5 разів важча за воду, її температура плавлення – 38,87 ° С. Вона активно випаровується за кімнатної температури: її пари ядовиті, спричиняють гострі та хронічні отруєння. Як хімічний елемент, її використовують

Гістохімічні методи досліджень

у приладах (термометрах, барометрах), лампах та амальгамах, потребуючи при тім правил безпечного користування.

Пари ртуті не мають запаху і кольору, при вдиханні вражають нервову систему, нирки, печінку, статевий апарат. Гостре отруєння супроводжується металевим привкусом, нудотою та біллю. Ртуть блокує сульфгідрильні групи ферментів.

Як нормальна складова частина організму, ртуть міститься в крові (0,15-0,2 мг %), спинномозковій рідині (0,8 мг %). Вона накопичується у печінці, нирках, щитоподібній залозі (2-5 мг на 100 г свіжої тканини).

Виявлення ртуті за методом Ломбардо

Матеріал фіксують у 10 %-му розчині нейтрального формаліну впродовж 5-7 діб.

Придатні парафінові зрізи.

Реактиви – Сірководнева вода.

Постановка реакції:

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96⁰, 70⁰, 40⁰ етиловий спирт) до води.
2. Зрізи поміщають у сірководневу воду.
3. Промивають зрізи у воді.
4. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам або синтетичне середовище.

Результат. Осад ртуті забарвлений у чорний колір.

Виявлення калію

Калій (K) – активний лужний метал, сріблясто-білого кольору. Він дуже м'який, легкоплавкий і швидко окиснюється на повітрі. Із-за високої хімічної активності у природі знаходиться тільки у вигляді сполук.

В організмі калій знаходиться у вигляді хлоридів, фосфатів, карбонатів і сульфатів в іонізувальному стані і у вигляді сполук з білками і продуктами обміну. Калій входить до складу буферних систем, бере участь у регуляції осмотичного тиску, скороченні м'язових волокон, каталізує дію деяких ферментів (АТФ-ази, піруваткінази). З діяльністю іонів K^+ пов'язана проникність клітинних мембран, так як він являється складовою частиною натрій-калієвого «насоса». Іони калію беруть участь у походженні і проведенні біоелектричного потенціалу у нервових клітинах і м'язах.

Іони K^+ впливають на синтез білків і тісно пов'язані з вуглеводним обміном.

Уміст калію в організмі тварин знаходиться в межах 0,22 – 0,33 %, у тілі людини – біля 150 г. Калій в основному знаходиться у клітинах (560-620 мг %) і у міжклітинній речовині (15,5-21 мг %). Найбільше калію міститься у тканинах нирок (510 мг %), шкірі та м'язах (до 400 мг %), мозку (340-360 мг %).

При багатьох хворобах відбувається пригнічення реакції гліколізу, клітинного ділення, окиснювального фосфорилування, що призводить до порушення проникності клітинних мембран, виходу калію із клітин і часто заміні його натрієм. Це і є причинного загибелі клітин, унаслідок збільшення у них осмотичного тиску і руйнування мембран.

Виявлення калію за методом Поппена, Грина і Вренна

Придатні заморожені зрізи зі свіжої тканини, виготовлені у мікроскоп-кріостаті, або ж на заморожувальному мікроскопі з ножом глибокого охолодження.

Реактиви: 1. Інкубаційне середовище: в 50 мл дистильованої води розчиняють 1,25 г нітрату кобальту, додають 12,5 мл льодяної оцтової кислоти, 210 мл 66%-го розчину нітрату натрію (на дистильованій воді), суміш струшують і випускають повітря до зникнення запаху азотної кислоти (реактив зберігається у холодильнику) 2-4 місяці. Перед використанням інкубаційне середовище фільтрують. 2. 0,5 %-ий розчин сульфід амонію

Постановка реакції:

1. Виготовляють заморожені зрізи.

2. Поміщають зрізи в інкубаційне середовище (від 30 хв до декількох годин).
3. Зрізи промивають у льодяній оцтовій кислоті (двічі).
4. Зрізи поміщають на предметні стекла і висушують на відкритому повітрі.
5. Поміщають зрізи у розчин сульфиду амонія на 3-5 хв.
6. Промивають у водопровідній воді.
7. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у канадський бальзам.

Результат. Солі калію забарвлені у чорний колір.

Примітка. Контрольні препарати перед інкубацією поміщають на 1-3 год у дистильовану воду. Можна використовувати парафінові зрізи, товщиною 5-7 мкм, виготовлені з матеріалу фіксованого у 10%-му розчині формаліну або 96°-му етиловому спирті.

Розчини для гістохімічних досліджень

Для виготовлення гістохімічних препаратів використовують розчини різноманітних речовин. **Розчин** – це фізико-хімічна система, яка складається з двох або більше компонентів. Основний компонент, що переважає за об'ємом або масою, називають розчинником, тоді як інші речовини, рівномірно розподілені в ньому, є розчинними речовинами.

За фізичним станом розчинника розчини поділяються на газоподібні, рідкі та тверді. Крім того, розчини класифікують за розмірами частинок розчинених речовин: *істинні* розчини – розмір частинок менше 1 нм; *колоїдні* розчини – частинки від 1 до 100 нм; *механічні суміші (суспензії та емульсії)* – частки понад 100 нм.

Істинні розчини поділяються на *молекулярно-дисперсні* (неелектроліти) та *іонно-дисперсні* (електроліти). У молекулярно-дисперсних системах розчинена речовина представлена молекулами (наприклад, глюкоза або сечовина), тоді як у іонно-дисперсних – іонами (соляна кислота, їдкий натрій, кухонна сіль).

Тканини та клітини самі по собі є колоїдними системами, що можуть перебувати у стані гелю або золю. Багато реактивів, зокрема барвники та субстрати, готують у формі колоїдних розчинів. Під час проведення гістохімічних реакцій у місцях локалізації досліджуваних речовин формуються зафарбовані структури, які можна розглядати як локальні суспензії. Наприклад, осад сульфїду свинцю при виявленні кислї фосфомоноестерази є типовим прикладом такої системи.

Розчини також різняться за концентрацією, яка визначає вміст розчиненої речовини у певному об'ємі або масі розчинника. Розчини з високим вмістом розчинної речовини, близьким до максимально можливого, називають *концентрованими*, однак це поняття відрізняється від терміна насичений розчин. *Насиченим* розчином вважають систему, у якій за даних умов розчинник не здатний розчинити більше речовини. Наприклад, у 100 мл води можна розчинити 50 г натрієвої селїтри – це концентрований розчин, але він ще не насичений, бо при 20 °С вода здатна розчинити до 87,5 г цієї речовини. Розчини з меншим вмістом розчинної речовини, ніж у насиченому стані, називають *ненасиченими*, а з більшим – *перенасиченими*.

Способи вираження концентрації розчинів

Процентна концентрація. Такі розчини часто використовуються у гістохімічній практиці. Процентна концентрація показує, скільки грамів розчиненої речовини міститься у 100 г розчину. Наприклад, для приготування 10 %-го розчину кухонної солі необхідно взяти 10 г хлориду натрію і розчинити у 90 г води. Якщо розчинена речовина є кристалогідратом, то при розрахунках необхідно враховувати кристалізаційну воду. Наприклад, необхідно приготувати 80 г 10 %-го розчину глауберової солі із $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$. Перш за все визначаємо кількість безводної солі, яку необхідно взяти для приготування 80 г 10 %-го розчину: $x_1 = 80 \cdot 0,1 = 8 \text{ г}$. Потім визначаємо грам-молекулярну масу безводної солі та кристалогідрату: для безводної солі вона становить 142 г, для кристалогідрату – 322 г. Складаємо пропорцію – $142 : 8 = 322 : x_2$, звідки

$$x_2 = \frac{322 \cdot 8}{142} = 18,14 \text{ г}$$

Щоб дізнатися, скільки потрібно взяти води для приготування заданої кількості розчину, необхідно від 80 г відняти 18,14 г, що становить 61,86 г. Таким чином, для приготування 80 г 10 %-го розчину глауберової солі необхідно взяти 18,14 г кристалогідрату і додати 61,86 г води.

Молярна концентрація. Грам-молекула, або моль – це кількість грамів речовини, яка дорівнює її молекулярній масі. Молярна концентрація виражається кількістю грам-молекул, або молей розчиненої речовини в 1 л розчину. Розрізняють одно- (1 М), дво- (2 М), деци- (0,1 М), санти- (0,01 М) молярні розчини. Так, в одномолярному розчині кількість розчиненої речовини становить 1 моль на 1 л, у децимолярному – десяту частину грам-молекули і т. д.

Наприклад, необхідно приготувати 500 мл 0,01 М розчину $K_2Cr_2O_7$. Грам-молекулярна маса $K_2Cr_2O_7$ становить 297 г. Один відсоток від цієї цифри становить 2,94 г. Отже, для приготування 1 л 0,01 М розчину дихромату калію потрібно взяти наважку 2,94 г. Якщо потрібно приготувати 500 мл такого розчину, то складаємо пропорцію: $1000 : 500 = 2,94 : x$, звідки

$$x = \frac{2,94 \cdot 500}{1000} = 1,47 \text{ г}$$

Дихромат калію (2,94 г) висипаємо у мірну колбу і до позначки 500 мл доливаємо дистильовану воду.

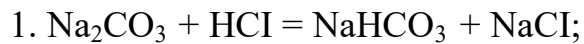
Нормальна концентрація. Нормальна концентрація виражається кількістю грам-еквівалентів (ГЕ) розчиненої речовини в 1 л розчину. Грам-еквівалент хімічного елементу дорівнює частці від ділення атомної маси елементу на його валентність. Наприклад, грам-еквівалент (атомна маса 55,847) двохвалентного заліза дорівнює 27,92 г, трьохвалентного – 18,62 г. Грам-еквівалент кислоти дорівнює її грам-молекулярній масі, розділеній на грам-еквівалент її основи. Наприклад, для фосфорної кислоти грам-еквівалент дорівнює $98 : 3 = 32,7 \text{ г}$. Грам-еквівалент основи дорівнює грам-молекулярній масі, поділеної на валентність металу. Наприклад, для гідроксиду барію

Гістохімічні методи досліджень

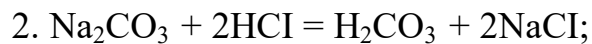
грам-еквівалент дорівнює $171,38 : 2 = 85,69$ г. Грам-еквівалент солі дорівнює її грам-молекулярній масі, поділеній на добуток числа атомів металу і валентності. Так, для сульфату заліза (III) грам-еквівалент дорівнює :

$$\frac{400}{2 \cdot 3} = 66,7 \text{ г}$$

Величина грам-еквіваленту може визначатися хімізмом реакції, в яку вступають речовини. Так, карбонат натрію із соляною кислотою реагує по різному, що впливає на величину грам-еквіваленту солі:



$$\text{ГЕ Na}_2\text{CO}_3 = 106 : 1 = 106 \text{ г.}$$



$$\text{ГЕ Na}_2\text{CO}_3 = 106 : 2 = 53 \text{ г.}$$

Є одно- (1 н.), пів- (0,5 н.), деци- (0,1 н.), санти- (0,01 н.) нормальні розчини та інші. Для приготування розчину відповідної *нормальності* необхідно зважити певну кількість речовини, висипати її у мірну колбу, розчинити у невеликій кількості води і розвести водою до мітки. Наприклад, для приготування 1 л 0,01 н. розчину хлориду барію спочатку визначають його грам-молекулярну масу: ГМ $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 244$ г. Потім визначають грам-еквівалент солі: $\text{ГЕ BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 244 : 2 = 122$ г. Після цього визначають кількість речовини, яку необхідно взяти для приготування 0,01 н. розчину: $122 \text{ г} \cdot 0,01 = 1,22$ г. У колбу висипають наважку, додають невелику кількість води, а після розчинення речовини доливають водою до мітки 1000 мл.

Приготування буферних розчинів

При постановці більшості гістохімічних реакцій необхідно створити середовище з певним значенням рН. Це не випадково, оскільки в тканинах і клітинах різні процеси метаболізму відбуваються при відповідних його значеннях. Незначне відхилення рН у кислу або лужну сторону порушує реакції обміну і навіть викликає патологічні процеси (алкалоз або ацидоз).

Основними властивостями буферних розчинів є те, що їх рН порівняно мало змінюється при розведенні нейтральним розчинником (водою); на рН не впливає температура зовнішнього середовища; рН буферних розчинів не змінюється при додаванні до них невеликої кількості сильних кислот або лугів; для кожної буферної системи характерна буферна ємність, яка визначається кількістю 0,1 *n*. HCl або NaOH, яку необхідно додати до 1 л буферного розчину, щоб змістити його рН на ± 1 .

Значення буферних розчинів у постановці гістохімічних реакцій надзвичайно велике. Тканини, відібрані для дослідження, перебувають в особливих умовах: до них не надходять поживні речовини і Оксиген, не виводяться продукти обміну, саме тому змінюється рН. Фіксація матеріалу сприяє збереженню прижиттєвого стану тканин і клітин. Для виявлення окремих речовин, особливо ферментів, за допомогою буферних розчинів створюються необхідні умови для нормального перебігу хімічних реакцій.

Для приготування буферних розчинів необхідно використовувати дистильовану та бідистильовану воду. Особливу увагу необхідно звернути на молекулярну масу і наявність кристалізаційної води у речовинах. Значення рН потрібно контролювати рН-метром, потенціометром або колориметром.

Приготування трис-буфера Мак-Мануса і Мауера

Вихідні розчини: *A*. 0,2 М розчин триоксиметиламінометану (24,3 г триоксиметиламінометану розчиняють дистильованою водою у 1000 мл). *B*. 0,1 М розчин соляної кислоти.

Спосіб приготування: для того, щоб отримати розчин з потрібним значенням рН, необхідно взяти за даними таблиці № 4 відповідну кількість розчинів *A* і *B* та дистильованої води:

Гістохімічні методи досліджень

*Таблиця № 4. Приготування трис-буфера Мак-Мануса і
Мауера з відповідним рН*

рН	А	В	Н ₂ О	рН	А	В	Н ₂ О
7,19	25	45	30	8,23	25	22,5	52,5
7,36	25	42,5	32,5	8,32	25	20	55
7,54	25	40	35	8,41	25	17,5	57,5
7,66	25	37,5	37,5	8,51	25	15	60
7,77	25	35	40	8,62	25	12,5	62,5
7,87	25	32,5	42,5	8,74	25	10	65
7,96	25	30	45	8,92	25	7,5	67,5
8,05	25	27,5	47,5	9,10	25	5	70
8,14	25	25	50				

Приготування веронал-ацетатного буферного розчину Міхаеліса

Вихідні розчини: основний розчин – у 500 мл дистильованої води розчиняють 9,714 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ і 14,714 г барбітурату. А. До 5 мл основного розчину додають 2 мл 8,5 %-го розчину хлориду натрію. В. 0,1 н. розчин соляної кислоти.

Спосіб приготування: взяти 7 мл розчину А, додати необхідну кількість розчину В та дистильованої води із розрахунку (18 мл – В) (див. таблицю № 5).

*Таблиця № 5. Приготування веронал-ацетатного буферного
розчину Міхаеліса з відповідним рН*

рН	В	рН	В	рН	В	рН	В
2,62	16	4,66	10	7,25	5,5	8,66	0,75
3,20	15	4,93	9	7,42	5	8,9	0,5
3,62	14	5,32	8	7,66	4	9,16	0,25
3,88	13	6,12	7	7,90	3	9,64	0
4,13	12	6,75	6,5	8,18	2		
4,33	11	6,99	6	8,55	1		

**Приготування фосфатного буферного розчину за
Ф.Л. Калініним, В.П. Лобовим, В.А. Жидковим**

Вихідні розчини: А. 0,2 М розчин гідрофосфату натрію (35,61 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 1000 мл води або 71,64 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 1000 мл води); В. 0,2 М розчин дигідрофосфату натрію (27,6 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 1000 мл води або 31,21 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 1000 мл води).

Спосіб приготування: змішують розчини А та В, користуючись даними таблиці №6.

**Приготування фосфатного буферного
розчину за Спангофом**

Вихідні розчини: А. 0,06 М розчин гідрофосфату натрію (розчиняють у 1000 мл води 11,876 г солі). В. 0,06 М розчин дигідрофосфату калію (розчиняють у 1000 мл води 9,078 г солі).

Спосіб приготування: для приготування 100 мл буферного розчину з відповідним рН необхідно змішати розчини А і В, користуючись даними таблиці №7.

**Таблиця № 6. Приготування фосфатного буферного розчину за
Ф.Л. Калініним, В.П. Лобовим, В.А. Жидковим з відповідним рН**

рН	А	В	рН	А	В
8,45	95	5	11,14	50	50
8,79	90	10	11,39	49	51
9,22	80	20	11,92	45	55
9,56	70	30	12,21	40	60
9,98	60	40	12,48	30	70
10,32	55	45	12,66	20	80
10,90	61	39	12,77	10	90

Гістохімічні методи досліджень

Таблиця № 7. Приготування фосфатного буферного розчину за Спангофом з відповідним рН

рН	А	В	рН	А	В
5,4	3,1	96,9	6,8	50	50
5,6	5	95	7	61	39
5,8	8	92	7,2	72	28,2
6	12	88	7,4	80,8	19,2
6,2	18,5	81,5	7,6	87	13
6,4	26,2	73,8	7,8	91,5	8,5
6,6	36	64	8	94,5	5,5

Приготування буферного розчину бура – NaOH за М. Берстоном

Вихідні розчини: А. 0,05М розчин бури (19,05 г бури розчиняють в 1 л води). В. 0,2 М розчин NaOH.

Спосіб приготування: до 50 мл розчину А додають Х мл розчину В. Доводять до об'єму 200 мл дистильованою водою (табл. № 8).

Таблиця №8. Приготування буферного розчину бура – NaOH за М. Берстоном з відповідним рН

рН	Х	рН	Х
9,28	0	9,7	29
9,35	7	9,8	34
9,4	11	9,9	38,6
9,5	17,6	10,0	43
9,6	23	10,1	46

Приготування какодилатного буферного розчину за Берстоном

Вихідні розчини: А. 0,2 М розчин какодилату натрію (42,8 г $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ на 1000 мл води). В. 0,2 М розчин соляної кислоти.

Спосіб приготування: для отримання розчину з відповідним рН необхідно взяти 50 мл розчину А, додати Х мл розчину В і довести до об'єму 200 мл дистильованою водою (табл. № 9).

Гістохімічні методи досліджень

Таблиця №9. Приготування какодилатного буферного розчину за Берстоном з відповідним рН

рН	Х	рН	Х	рН	Х
7,4	2,7	6,4	18,3	5,6	39,2
7,2	4,2	6,2	23,8	5,4	43,0
7,0	6,3	6,0	29,6	5,2	45,0
6,8	9,3	5,8	34,8	5,0	47,0
6,6	13,3				

Приготування фосфатного буферного розчину Зеренсена

Вихідні розчини: А. 0,1 н. розчин гліцину та кухонної солі (у рівній кількості). В. 0,1 н. розчин NaOH. Для приготування 1000 мл 0,1 н. розчину беруть 7,507 г гліцину, 5,845 г NaCl, 4 г NaOH.

Спосіб приготування: для приготування 100 мл буферного розчину (необхідно враховувати температуру навколишнього середовища та самих розчинів) відповідного рН, необхідно змішати розчини А та В, користуючись даними *таблиці № 10*.

Таблиця №10. Приготування фосфатного буферного розчину Зеренсена з відповідним рН

рН			А	В	рН			А	В
18 ⁰ С	24 ⁰ С	30 ⁰ С			18 ⁰ С	24 ⁰ С	30 ⁰ С		
8,58	8,45	8,32	95	5	11,31	11,14	10,97	50	50
8,93	8,79	8,67	90	10	11,57	11,39	11,22	49	51
9,36	9,22	9,08	80	20	12,10	11,92	11,74	45	55
9,71	9,56	9,42	70	30	12,40	12,21	12,03	40	60
10,14	9,98	9,83	60	40	12,67	12,48	12,29	30	70
10,48	10,32	10,17	55	45	12,86	12,66	12,47	20	80
11,07	10,90	10,74	51	49	12,97	12,77	12,57	10	90

Гістохімічні методи досліджень

Приготування буферної суміші Уолпола

Вихідні розчини: А. 1 н. розчин ацетату натрію. В. 1 н. розчин соляної кислоти.

Спосіб приготування: для приготування буферної суміші з відповідним рН беруть 50 мл розчину А та певну кількість розчину В (відп. до таблиці № 11) і доливають водою до 250 мл.

Таблиця № 11. Приготування буферної суміші Уолпола з відповідним рН

рН	В	рН	В	рН	В
0,65	100	1,99	52,5	3,79	42,5
0,75	90	2,32	51	3,95	40
0,91	80	2,64	50	4,19	35
1,09	70	2,72	49,72	4,39	30
1,24	65	3,09	48,5	4,58	25
1,42	60	3,29	47,5	4,76	20
1,71	55	3,49	46,25	4,92	15
1,85	53,5	3,61	45	5,20	10

Приготування 1 М ацетат-солянокислого розчину за Спангофом

Вихідні розчини: А. 1 М розчин ацетату натрію (136,09 г солі розчиняють у 1000 мл дистильованої води). В. 1 н. розчин соляної кислоти.

Спосіб приготування: для приготування 100 мл буферного розчину з відповідним рН змішують певну кількість розчинів А і В. Об'єм доводять до 100 мл дистильованою водою, користуючись при цьому даними таблиці № 12.

Гістохімічні методи досліджень

Таблиця №12. Приготування 1 М ацетат-солянокислого розчину за Спангофом з відповідним рН

рН	А	В	Н ₂ О	рН	А	В	Н ₂ О
0,65	20	40	40	3,49	20	18,5	61,5
0,91	20	32	48	3,61	20	18	62
1,24	20	26	54	3,79	20	17	63
1,42	20	24	56	3,95	20	16	64
1,71	20	22	58	4,19	20	15	65
1,99	20	21	59	4,39	20	12	68
2,32	20	20,5	59,5	4,58	20	10	70
2,64	20	20	60	4,76	20	8	72
3,09	20	19,5	60,5	4,92	20	6	74
3,29	20	19	61	5,20	20	4	76

Приготування цитратно-фосфатного буферного розчину за Мак-Ільвейном

Вихідні розчини: А. 0,2 М розчин гідрофосфату натрію (35,61 г солі розчиняють в 1000 мл води). В. 0,1 М розчин лимонної кислоти (21,01 г кислоти розчиняють в 1000 мл води)

Спосіб приготування: для приготування 200 мл відповідного буферного розчину з необхідним значенням рН змішують певну кількість розчинів А і В згідно даних *таблиці № 13*.

Гістохімічні методи досліджень

Таблиця №13. Приготування цитратно-фосфатного буферного розчину за Мак-Ільвейном з відповідним рН

рН	А	В	рН	А	В
2,2	4	196	5,2	107,2	98,8
2,4	12,4	187,6	5,4	111,5	88,5
2,6	21,8	178,2	5,6	116	84
2,8	31,7	168,3	5,8	120,9	79,1
3	41,1	158,9	6	126,3	73,7
3,2	49,4	150,6	6,2	132,2	67,8
3,4	57	143	6,4	138,5	61,5
3,6	64,4	135,6	6,6	145,5	54,5
3,8	71	129	6,8	154,5	45,6
4	77,1	122,9	7	164,7	35,3
4,2	82,8	117,2	7,2	173,9	26,1
4,4	88,2	111,8	7,4	181,7	18,3
4,6	93,5	106,5	7,6	187,3	12,7
4,8	98,6	101,4	7,8	191,5	8,5
5	103	97	8	194,5	5,5

Приготування ацетатного буферного розчину Уолпола

Вихідні розчини: А. 0,1 М розчин оцтової кислоти (6,005 г льодяної оцтової кислоти на 1000 мл води). В. 0,1 М розчин ацетату натрію (13,609 г солі на 1000 мл води).

Спосіб приготування: для приготування 100 мл відповідного буферного розчину з необхідним значенням рН змішують певну кількість розчинів А і В (відп. до даних таблиці № 14).

Таблиця № 14. Приготування ацетатного буферного розчину Уолпола з відповідним рН

рН	А	В	рН	А	В
3,6	92,5	7,5	4,8	40	60
3,8	88	12	5	29,5	70,5
4	82	18	5,2	21	79
4,2	73,5	26,5	5,4	14,5	85,5
4,4	63	37	5,6	9,5	90,5
4,6	51	49			

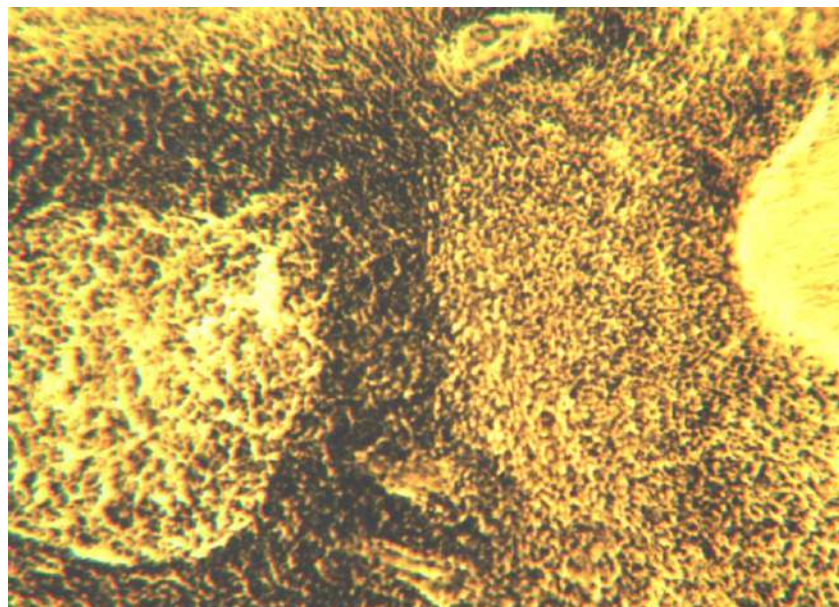


Рис. 36. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у селезінці бика свійського. Ейнарсон. X 56.
Препарат Л.П. Горальського.

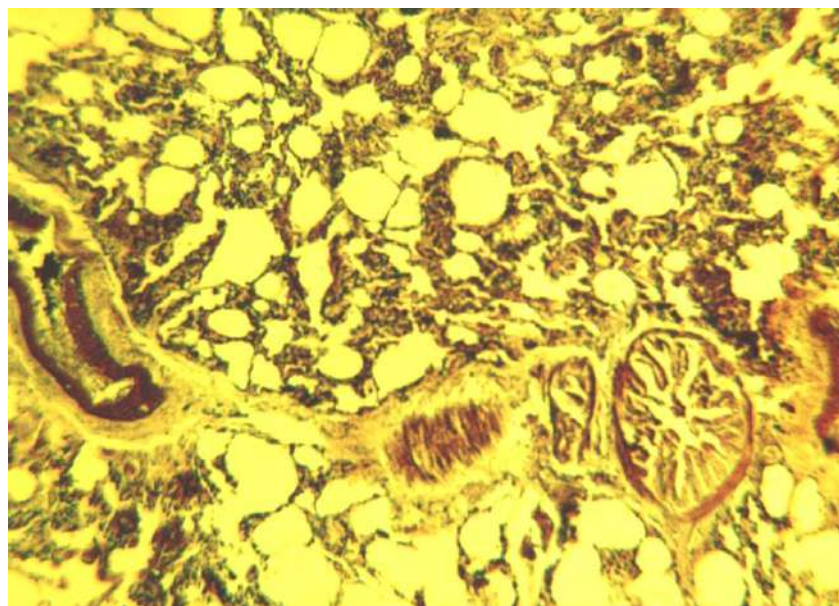


Рис. 37. Локалізація та розподіл загальних білків у легенях бика свійського. Амідочорний 10 В. X 56.
Препарат Л.П. Горальського.

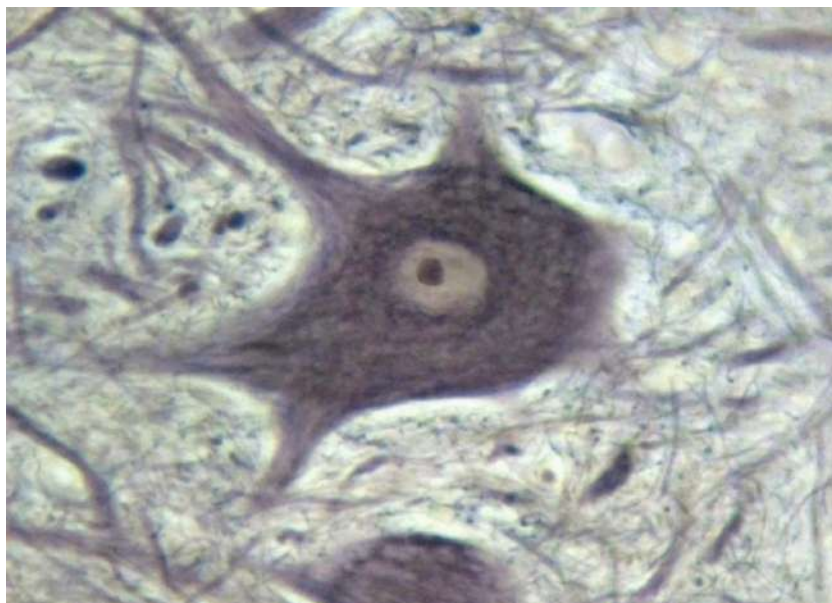


Рис. 38. Розподіл загальних білків у нейроні спинного мозку собаки свійського. Амідочорний 10 В. X 400.
Препарат Н.Л. Колеснік.

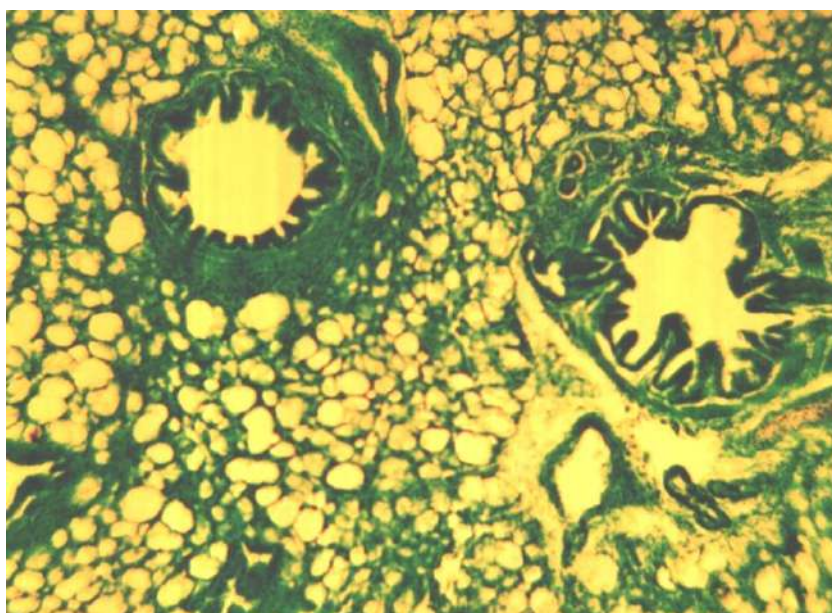


Рис. 39. ШІК-позитивні речовини у легенях бика свійського. ШІК-реакція.
X 56. Препарат Л.П. Горальського.

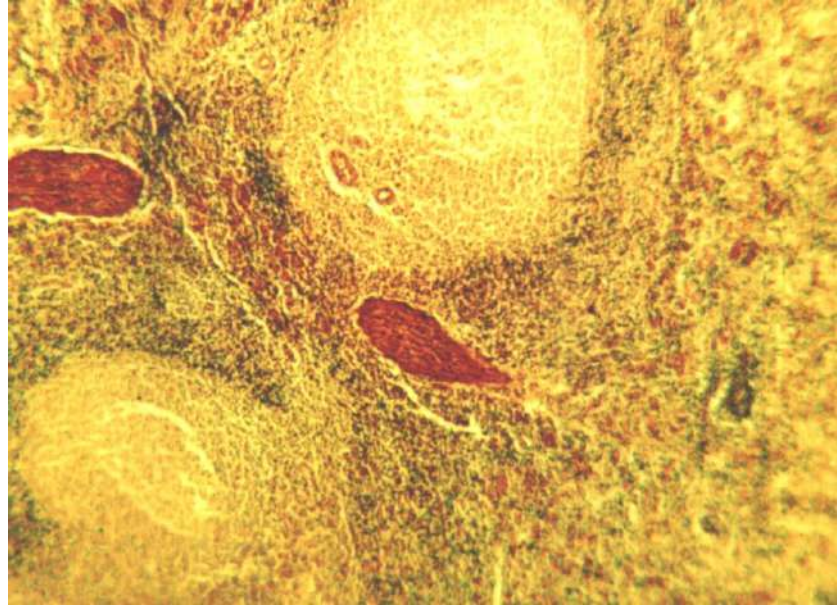


Рис. 40. Локалізація та розподіл білкових речовин у селезінці бика свійського. Мікель-Кальво. X 56.
Препарат Л.П. Горальського.

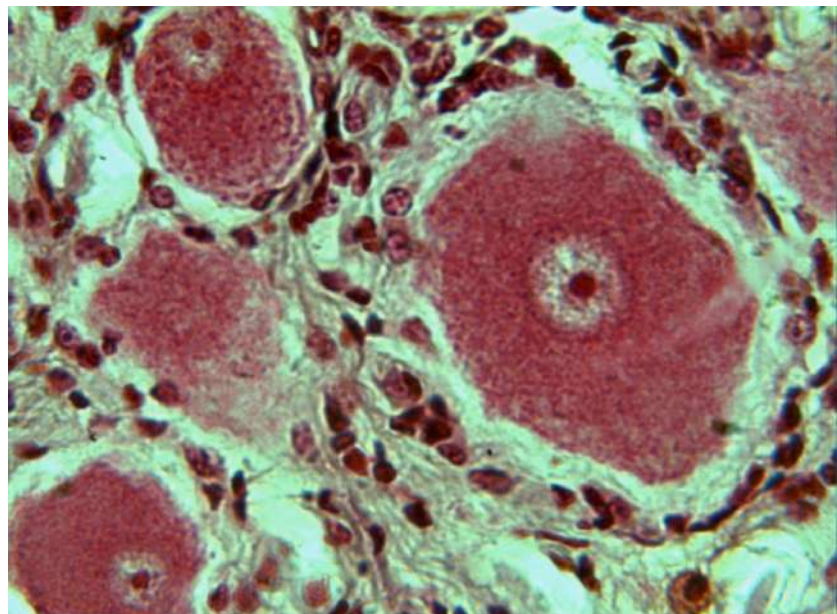


Рис. 41. Розподіл та локалізація нуклеїнових кислот у нейронах спинномозкового вузла собаки свійського. Браше. X 400.
Препарат Н.Л. Колеснік.

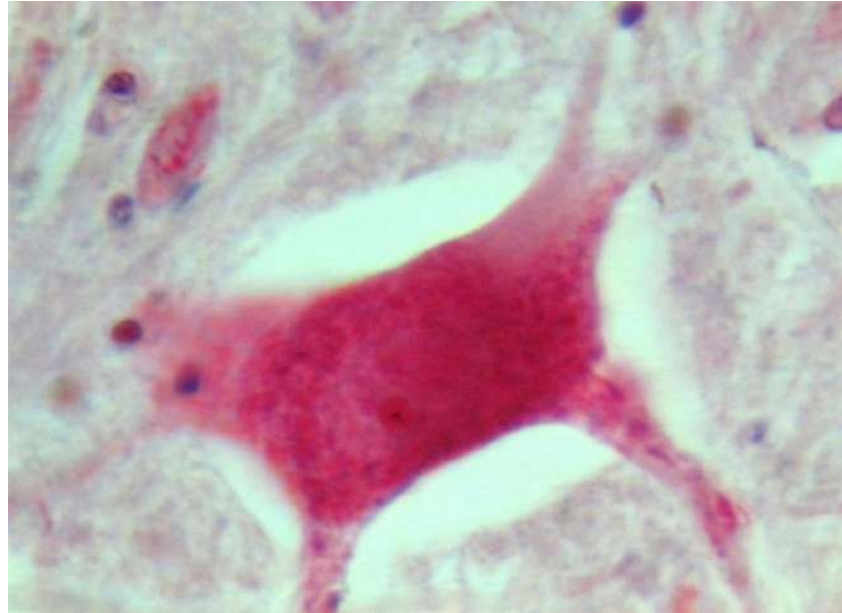


Рис. 42. Розподіл та локалізація нуклеїнових кислот у нейроні спинного мозку собаки свійського. Браше. X 400.
Препарат Н.Л. Колеснік.



Рис. 43. Локалізація та розподіл «загальних» білків у міокарді бика свійського. Амідочорний 10 В. X 400.
Препарат Л.П. Горальського.

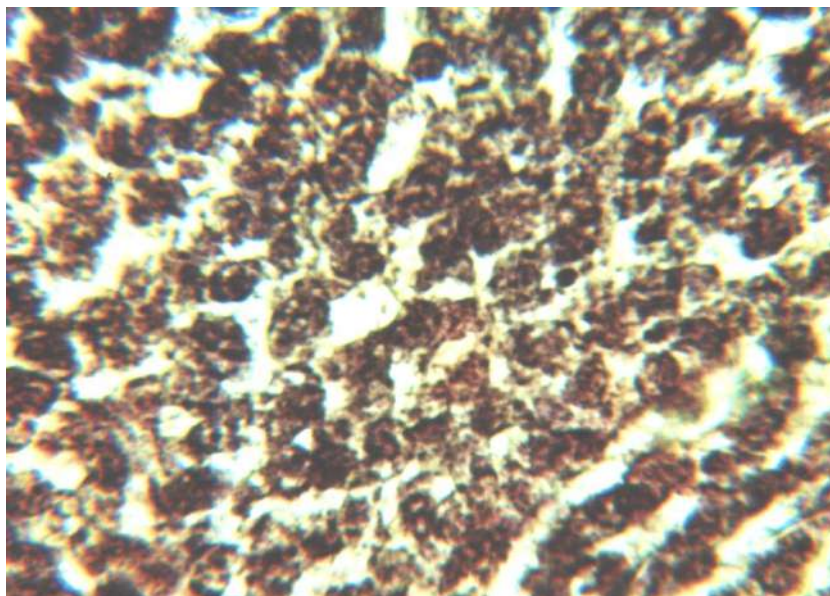


Рис. 44. Локалізація та розподіл загальних білків у гепатоцитах печінки бика свійського. Амідочорний 10 В. X 400.
Препарат Л.П. Горальського.

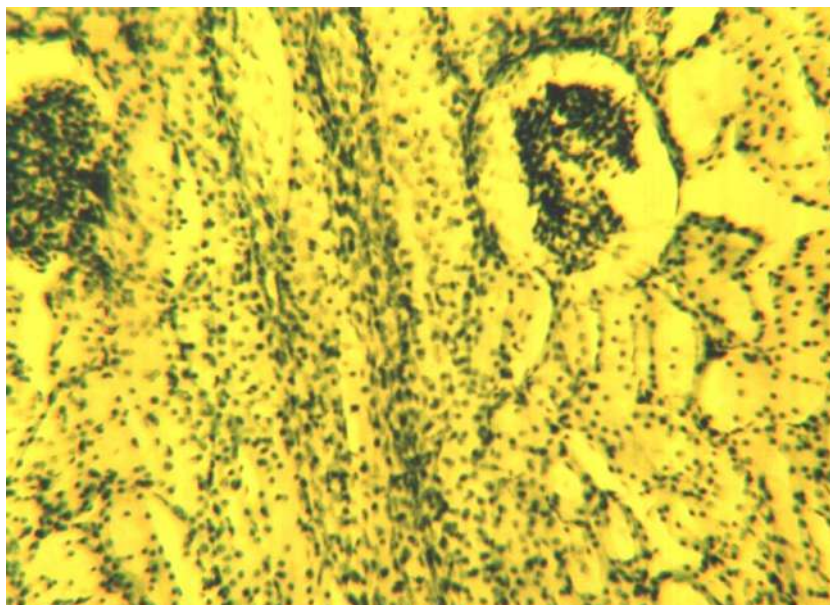


Рис. 45. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у нирках бика свійського. Ейнарсон. X 280.
Препарат Л.П. Горальського.

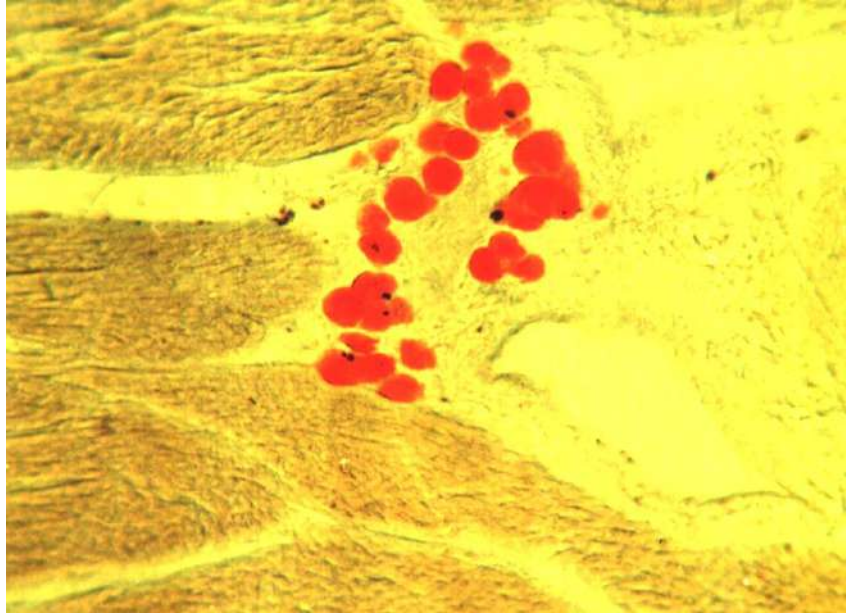


Рис. 46. Ліпіди у міокарді бика свійського. Кей та Уайхед. X 56.
Препарат Л.П. Горальського.

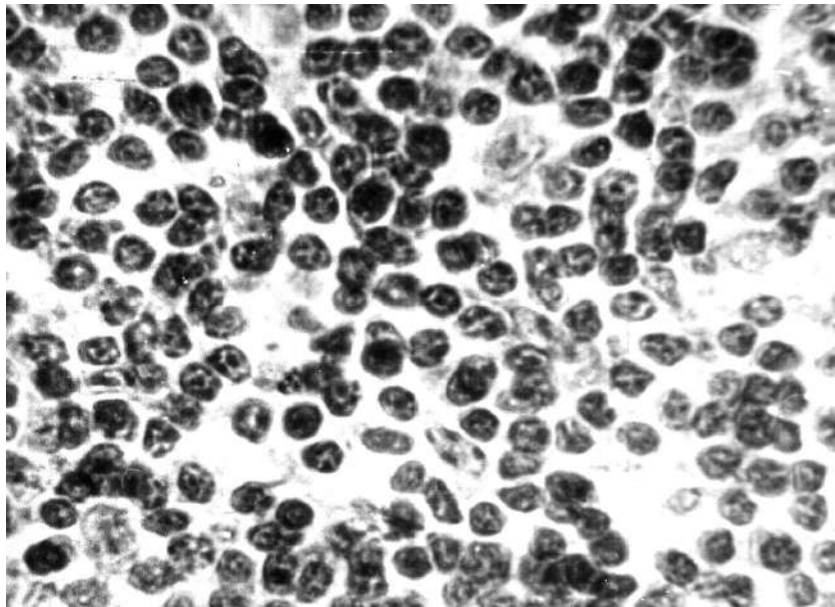


Рис. 47. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у клітинах
мантійної зони лімфатичного вузлика лімфовузла бика свійського.
Браше. X 900. Препарат Л.П. Горальського.

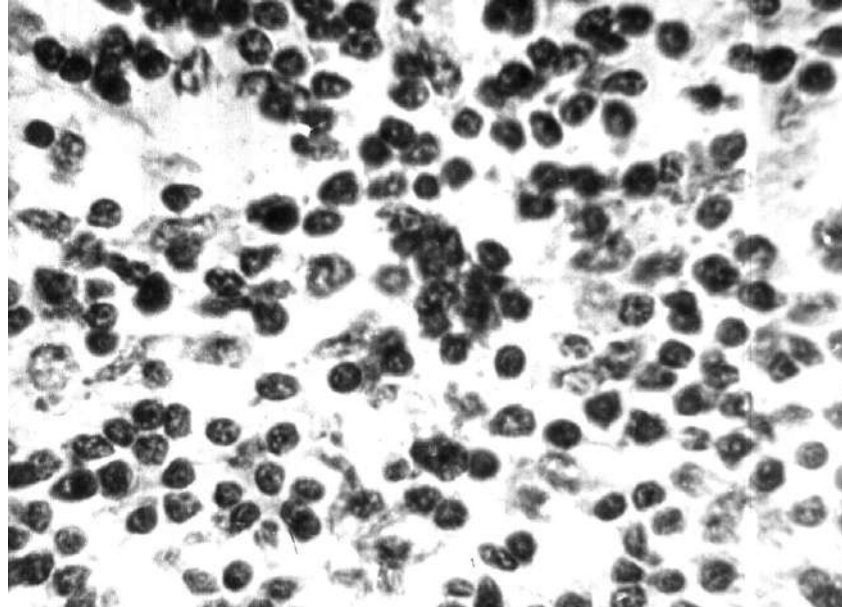


Рис. 48. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у клітинах лімфатичного вузлика селезінки бика свійського.
Браше. X 630. Препарат Л.П. Горальського.

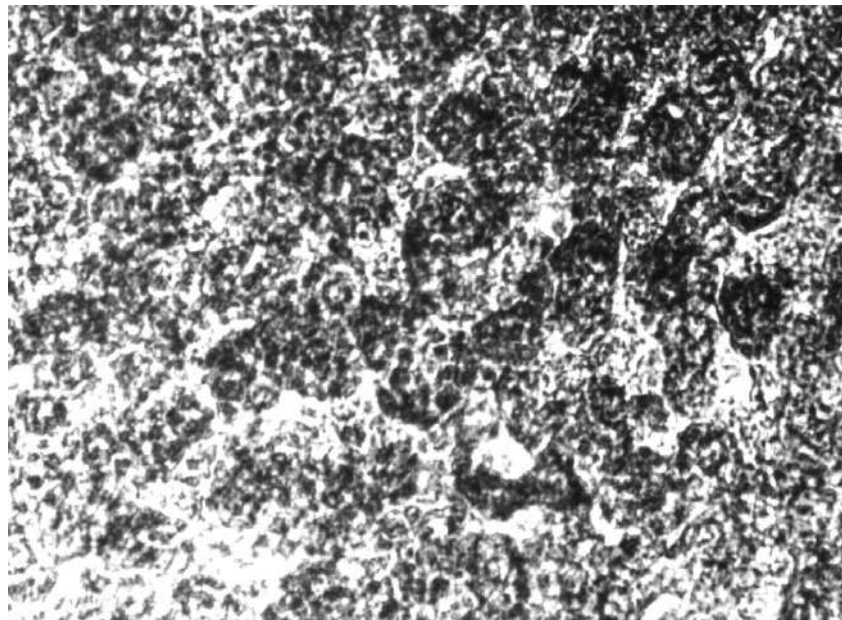


Рис. 49. Ліпіди у гепатоцитах печінки бика свійського.
Кайн. X 400. Препарат Л.П. Горальського.

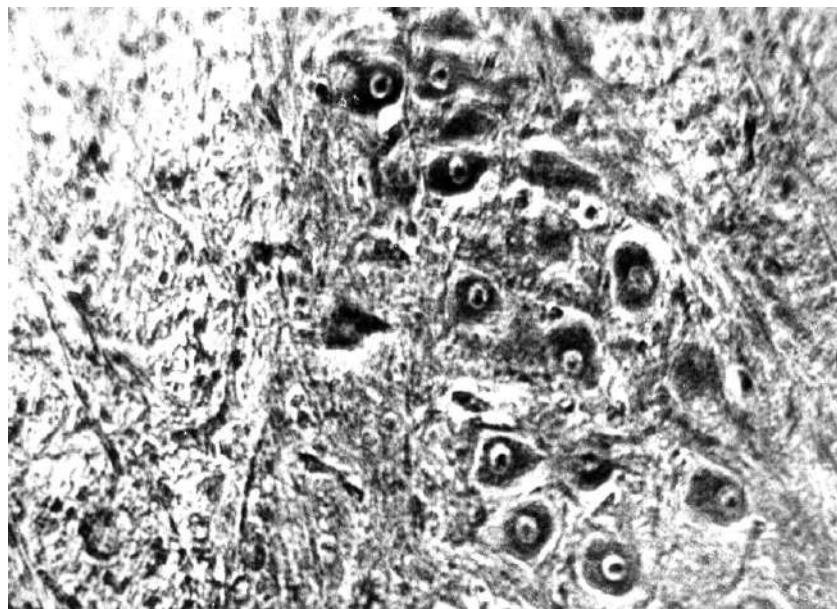


Рис. 50. Локалізація та розподіл загальних білків у нейрон-гліальних структурах спинного мозку курки швейської. Амідочорний 10 В. X 80. Препарат Л.П. Горальського.



Рис. 51. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у нейронах спинного мозку курки швейської. Ейнарсон. X. 400. Препарат Л.П. Горальського.

ФАРБУВАННЯ КЛІТИН КРОВІ

Фарбування клітин крові застосовують для їх диференціації і визначення вмісту окремих їх різновидів у периферичній крові та органах кровотворення. Фарбувати ці клітини можна в мазках крові, у препаратах-відбитках органів кровотворення і в їх зрізах. Матеріал для виготовлення зрізів попередньо заливають у парафін або целоїдин. При виготовленні препаратів і фарбуванні клітин крові необхідно чітко дотримуватись наступних вимог:

1. Матеріал для дослідження повинен бути свіжим.
2. Фіксувати матеріал досліджень для виготовлення зрізів найкраще в ценкер-формолі. Для цієї мети можна використати і рідину Орта.
3. Товщина зрізів не повинна перевищувати 5 мкм. При роботі з целоїдиновими зрізами целоїдин видаляють (*див. с. 58*).
4. Посуд для барвників, дистильованої води, предметні стекла та накривні скельця повинні бути абсолютно чистими.
5. Для приготування (розведення) барвників та промивання препаратів використовують свіжу дистильовану воду. Перед використанням її кип'ятять (3–5 хв), охолоджують і щільно закривають. Оптимальна рН води при цих дослідженнях становить 6,8–7,0.
6. Фарбувальні розчини готують перед використанням. Слідкують, щоб у них не утворився осад. Останній також не повинен бути під час фарбування безпосередньо на препаратах. Поява осаду робить фарбу непридатною для використання і свідчить про її низьку якість, а також низьку якість дистильованої води і підготовленого посуду.
7. Приготовлені фарбувальні розчини не можна струшувати. Не можна і пересовувати або переставляти посуд, у якому відбувається фарбування. Все це призводить до випадання барвників у осад.
8. Фарбування проводять у чашці Петрі, на скляних паличках. Фарбувати можна і в іншому лабораторному посуді.
9. Для запобігання передчасного вицвітання зафарбованих препаратів використовують ксилол високої якості, який не містить кислоти.

Фарбування клітин крові

10. При заведенні зрізів у бальзам використовують тонкі (не товстіші 0,17 мм) накривні скельця.

11. При мікроскопії виготовлених препаратів користуються імерсійними середовищами.

Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення за Романовським-Гімзою

Методика фарбування:

1. Депарафіновані або звільнені від целоїдину зрізи на предметних стеклах ретельно промивають у дистильованій воді і переносять у чашку Петрі або інший лабораторний посуд (стаканчики).

2. Приготування фарбувального розчину. Його проводять у градуйованому циліндрі, з розрахунку 1–2–3 краплі фарби Романовського-Гімзи на 1 мл дистильованої води (кількість крапель фарби у кожному випадку краще визначати дослідним шляхом). Циліндр один раз перевертають для розмішування розчину, і готовий розчин виливають у посуд, у якому знаходяться зрізи. При цьому фарбувальний розчин повинен повністю покривати зрізи. Перевіряють відсутність осаду, при його наявності готують нову порцію фарбувального розчину (при цьому посуд ретельно миють).

3. Зрізи у фарбувальному розчині залишають на 18–24 год при кімнатній температурі або на 1–2 год у термостаті при температурі +37⁰ С.

4. Ретельно промивають зрізи у водопровідній воді. Вони повинні бути перефарбовані, темно-синього кольору.

5. Диференціюють зрізи у підкисленій оцтовою кислотою воді (із розрахунку 2–3 краплі міцної або льодяної оцтової кислоти на 200 мл води), допоки з них будуть відходити хмаринки синьої фарби (азур) і вони набудуть слабо-рожевого кольору. Цей процес відбувається швидко.

6. Ретельно промивають зрізи у дистильованій воді та проводять заключне диференціювання 96⁰ етиловим спиртом. Якість диференціювання контролюють за допомогою мікроскопа. При цьому клітинні елементи крові повинні чітко виділятися. Добре диференційовані зрізи мають блідо-синій колір з бузковим відтінком.

Фарбування клітин крові

7. Диференційовані зрізи швидко проводять через абсолютний спирт, віджимають фільтрувальним папером, просвітлюють ксилолом і заводять у бальзам.

Примітка. При виготовленні гістопрепаратів клітин крові не можна користуватися карбол-ксилолом, креозотом та аніліновим маслом.

Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення азур II-еозином

Методика фарбування:

1. Депарафіновані або звільнені від целоїдину зрізи на предметних стеклах ретельно промивають у дистильованій воді і переносять у чашку Петрі або інший лабораторний посуд.

2. Готують основні фарбувальні розчини азуру II та еозину водного, кожний із розрахунку 1 г барвника на 1000 мл дистильованої води. Ці розчини досить стійкі і зберігають свої фарбувальні властивості тривалий час (місяці) за умови зберігання їх у темному місці.

3. Перед початком роботи із основних фарбувальних розчинів готують робочий розчин. Для цього до 12 мл розчину еозину, доливають 90 мл дистильованої води та додають 10 мл розчину азуру II. Обережно погойдуючи посуд, перемішують отриманий розчин, який набуває темно-фіолетового кольору. Приготовлений робочий розчин виливають у посуд зі зрізами. При цьому слідкують за наявністю осаду.

4. Термін фарбування зрізів при кімнатній температурі – 18–24 год, а у термостаті при температурі +37⁰С – 1–2 год.

В подальшому зафарбовані зрізи обробляють так, як і при фарбуванні за Романовським-Гімзою (пп. 4–7).

Слід відмітити, що методика фарбування клітин крові в зрізах органів кровотворення азур II-еозином – примхлива. Її якість в основному залежить від якості дистильованої води, на якій готуються фарбувальні розчини.

Враховуючи можливість невдачі бажано одночасно запускати в роботу декілька зрізів.

Азур-еозинові препарати – нестійкі і при зберіганні на світлі поступово знебарвлюються.

Фарбування клітин крові

Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення піридин-азур-еозином за С.П. Алфєєвою

Запропонований метод забарвлення є менш примхливим порівняно з іншими методами фарбування азур-еозиновими сумішами. Піридин разом з еозин-азуром надає більш різноманітних відтінків і сприяє кращому зберіганню забарвлення на зрізах.

Матеріал для виготовлення зрізів заливають у целоїдин. Нанесені на предметні стекла зрізи звільняють від целоїдину і перед фарбуванням зберігають у 70–75⁰ спирті.

Методика фарбування:

1. Переносять зрізи з етилового спирту в дистильовану воду і промивають їх у ній 2–3 хв.
2. Поміщають зрізи у 0,25 %-ий розчин марганцевокислого калію на 15 хв.
3. Споліскують зрізи у дистильованій воді.
4. Переносять зрізи у 5 %-ий розчин щавлевої кислоти на 5 хв.
5. Ретельно промивають зрізи у водопровідній воді (15–20 хв).
6. Предметні стекла із зрізами ставлять (у вертикальному положенні) у стаканчики з фарбувальною сумішшю на 4–24 год.

Склад фарбувальної суміші:

Еозин водний (1:1000) – 13 мл;

Дистильована вода – 7 мл;

Азур II (1:1000) – 5 мл;

Піридин чистий (у якості протрави) – 6 крапель.

Автор запропонованої фарбувальної суміші відмічає, що співвідношення між її складовими частинами може змінюватися залежно від об'єкту дослідження, якості його фіксації, тривалості та способу зберігання. Суміш придатна до вживання впродовж декількох діб. Перед використанням її необхідно струшувати, але не фільтрувати. Якщо азур дає слабе забарвлення, так до фарбувальної суміші додають його ще декілька крапель.

7. Зрізи швидко споліскують у воді.

8. Диференціюють зрізи у слабо підкисленій оцтовою кислотою воді (1 крапля оцтової кислоти на 30 мл дистильованої води) доки

Фарбування клітин крові

вони не набудуть рожевого відтінку. Термін диференціювання залежить від тривалості фарбування та свіжості барвника.

9. Зрізи споліскують у дистильованій воді.

10. Диференціюють зрізи у 96⁰ етиловому спирті, допоки перестане відходити синя фарба (азур).

11. Зрізи двічі пропускають через абсолютний етиловий спирт, провітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Фарбування клітин крові в її мазках і препаратах-відбитках органів кровотворення за Романовським-Гімзою

Перед фарбуванням мазки крові і препарати-відбитки фіксують у метиловому спирті (5–6 хв) або у 96⁰ етиловому спирті (10–15 хв). Для цього їх поміщають у стаканчик зі спиртом. Після фіксації препарати виймають зі спирту пінцетом, ставлять їх вертикально на фільтрувальний папір, для випаровування спирту.

Методика фарбування:

1. Готують робочий розчин фарби Романовського-Гімзи. Для цього 15–20 крапель фарби Романовського-Гімзи (яка поступає у реалізацію) добавляють до 10 мл дистильованої води.

2. Зафіксовані мазки або препарати-відбитки поміщають у чашку Петрі і на них піпеткою наносять робочий фарбувальний розчин. Термін фарбування залежить від якості фарби і коливається від 15 до 30 хв.

3. Зафарбовані препарати ретельно промивають у дистильованій воді і висушують фільтрувальним папером.

Результати фарбування: ядра клітин – бузкового кольору, зернистість базофілів – темно-фіолетового, еозинофілів – червоного, нейтрофілів – рожевого, кров'яні пластинки – бузкові, цитоплазма лейкоцитів – синя.

Зафарбовані мазки крові і препарати-відбитки можна заводити у бальзам.

Фарбування клітин крові

Фарбування клітин крові в її мазках і препаратах-відбитках органів кровотворення за Папенгеймом

Перевага цього методу фарбування над попереднім полягає у тому, що мазки крові і препарати не потрібно фіксувати, так як фіксатор входить до складу одного з барвників.

Методика фарбування:

1. Мазки крові або препарати-відбитки поміщають у чашку Петрі.

2. На препарати наносять піпеткою фарбу Май-Грюнвальд (розчин еозину та метиленової синьки на метиловому спирті і гліцерині). Термін фарбування 3 хв.

Розчин фарби Май-Грюнвальд є у торговельній мережі. При її відсутності 61,0 г сухого порошку Май-Грюнвальд розчиняють у 100 мл абсолютного метилового спирту і 50 мл гліцерину.

3. Не зливаючи фарбу, на препарати наносять дистильовану воду (3 хв).

4. Фарбу зливають, препарати промивають у дистильованій воді.

5. Наносять на препарати піпеткою робочий розчин фарби Романовського-Гімзи (1 мл фарби на 10 мл дистильованої води). Термін фарбування – 28–30 хв.

6. Фарбу зливають, і препарати промивають у дистильованій воді.

7. Висушують препарати фільтрувальним папером.

Результати фарбування такі, як і при користуванні фарби Романовського-Гімзи.

Зафарбовані мазки крові та препарати-відбитки можна заводити у бальзам.

ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ

Фарбувати бактерії можна на зрізах і мазках. Останній спосіб фарбування широко використовується у бактеріологічній практиці. При підготовці матеріалу для досліджень, при підготовці барвників і виготовленні препаратів необхідно дотримуватись наступних вимог:

1. Матеріал для досліджень найкраще фіксувати в абсолютному або 96⁰ етиловому спирті. Для фіксації можна використовувати також формалін і фіксуючі розчини, які містять сулему. При фарбуванні бактерій не можна користуватись карболовим спиртом.

2. Матеріал досліджень рекомендується заливати у парафін. Рідше використовують целоїдин і заморожений матеріал.

3. Зрізи для забарвлення бактерій повинні бути максимально тонкими. Перед виготовленням зрізів із замороженого матеріалу його необхідно промити в проточній воді впродовж декількох годин (поки шматочки матеріалу не опустяться на дно банки).

4. Перед фарбуванням зрізів із них видаляють ущільнюючі середовища (парафін, целоїдин).

5. Усі насичені спиртові розчини барвників (метиленового синього, генціанового фіолетового, кристалічного фіолетового, тіоніну та основного фуксину) готують використовуючи абсолютний або 96⁰ етиловий спирт із розрахунку 1г барвника на 10 мл спирту.

Розчини готують завчасно, для настоювання.

6. Для фільтрації фарбувальних розчинів не використовувати щільний фільтрувальний папір – у ньому затримується барвник.

7. При зневодненні забарвлених препаратів (перед просвітленням і заведенням у бальзам) обов'язково використовують абсолютний етиловий спирт. Просвітлюють зрізи тільки чистим ксилолом (толуолом).

8. Для кращого зберігання препаратів рекомендується при їх виготовленні використовувати ксилол, який не містить кислоти, і нейтральний бальзам.

9. При заведенні зрізів у бальзам використовують тонкі накривні скельця (не товстіші 0,17 мм).

10. При світловій мікроскопії виготовлених препаратів користуються імерсійним середовищем.

Фарбування бактерій

Фарбування бактерій метиленовим синім Льюфлера

Методика фарбування:

1. Зрізи поміщають у робочий розчин метиленового синього (або його наносять на них) на 5–10 хв. Для приготування робочого розчину метиленового синього необхідно 30 мл профільтрованого насиченого його спиртового розчину змішати з 100 мл 0,01 %-го розчину їдкого калію. Робочий розчин перед використанням повинен дозрівати впродовж одного місяця у термостаті при температурі +37⁰ С у добре закритому скляному посуді.
 2. Після фарбування зрізи добре споліскують у водопровідній воді.
 3. Диференціюють зрізи у 0,5 %-му водному розчині оцтової кислоти – 3–5–10 сек.
 4. Зрізи промивають у водопровідній воді та контролюють за допомогою мікроскопа якість диференціювання. Критерієм достатнього диференціювання є чітке виділення клітин.
 5. Зрізи швидко проводять через 96⁰ та абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.
- Результати фарбування:** бактерії зафарбовані у темно-синій колір, ядра клітин – у світло-синій, а сполучна тканина – у червоний.

Фарбування бактерій карболовим тіоніном Ніколя

Методика фарбування:

1. Зрізи поміщають у робочий розчин карболового тіоніну на 5–10 хв і більше. Для приготування робочого розчину карболового тіоніну необхідно змішати 1 частину насиченого спиртового розчину тіоніну з 10 частинами 1 %-го водного розчину карболової кислоти.
2. Зафарбовані зрізи споліскують у водопровідній воді.
3. Диференціюють зрізи у 96⁰ етиловому спирті, під контролем мікроскопу, поки не з'являться чіткі тканинні структури, приблизно 1–2 хв.
4. Швидко проводять зрізи через 96⁰ і абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

Фарбування бактерій

При роботі з целоїдиновими зрізами целоїдин можна не видаляти.

Результати фарбування: бактерії забарвлені у темно-синій колір.

Фарбування бактерій за Грам-Вейгертом

Фарбування бактерій за цим методом найкраще проводити на парафінових зрізах.

Методика фарбування:

1. Зрізи поміщають у літієвий кармін Орта на 5–10 хв.

Літієвий кармін Орта готують наступним чином. До 100 мл 1,52 %-го водного розчину вуглекислого літію додають 2,5 г карміну, кип'ялять 5–10 хв, охолоджують і фільтрують.

2. Переносять зрізи в 1 %-ий солянокислий спирт (70⁰) на 5 хв і більше – чим довше, тим краще.

3. Зрізи промивають у водопровідній воді 1–2–3 хв.

4. На зрізи кладуть фільтрувальний папір так, щоб його краї не виступали за межі предметного стекла (це запобігає утворенню осадів барвника безпосередньо на зрізі).

5. На фільтрувальний папір, у ділянці зрізів, наносять насичений спиртовий розчин генціанового або кристалічного фіолетового на 5–10 хв.

Для успішного фарбування бактерій часто застосовують розчин кристалічного фіолетового. Для його отримання насичений спиртовий розчин кристалічного фіолетового розбавляють у 2–3 рази 2 %-ю карболовою водою.

6. Після закінчення фарбування барвник зливають і знімають із зріза обережно фільтрувальний папір. Останню процедуру проводять споліскуючи препарат у водопровідній воді.

7. Зрізи споліскують у водопровідній воді 15–30 сек (можна і довше).

8. Обробляють (наносячи на зрізи або опускаючи їх в нього) слабким розчином Люголя 2–3 хв.

Фарбування бактерій

Склад розчину Люголя:

Йод кристалічний – 1 г;
Йодистий калій – 2 г;
Дистильована вода – 300 мл.

Розчин Люголя зберігають у темному посуді або у темному приміщенні.

9. Зливають розчин Люголя, а зрізи швидко підсушують фільтрувальним папером, складеним у декілька шарів.

10. Диференціювання проводять аніліновим маслом, наносячи його на зрізи, і закінчують тоді, коли перестане із зрізів відходити синя фарба, а зрізи із темно-синього набудуть червоного кольору. Під час диференціювання предметні стекла весь час погойдують.

11. Ретельно звільняють зрізи від анілінового масла ксилолом, застосовуючи його багато разів та комбінуючи з віджиманням фільтрувальним папером.

12. Зрізи заводять у бальзам.

Результати фарбування: грампозитивні бактерії забарвлені у темно-синій колір, а ядра клітин – у червоний.

Примітка. Слід знати, що при цьому методі фарбування забарвлюється і фібрин. Для більш чіткого його виявлення при диференціюванні необхідно застосовувати суміш анілінового масла і ксилолу (2:1). При цьому також забарвлюються і грампозитивні бактерії. Для забарвлення бактерій за цим методом часто не використовують літєвий кармін Орта. У такому разі фарбування починають з генціанового або кристалічного фіолетового. Після диференціювання аніліновим маслом такі зрізи набувають блідо-жовтого або сіруватого відтінку.

Фарбування мікобактерій туберкульозу карбол-фуксином Ціля

Найбільш успішно зафарбовуються мікобактерії туберкульозу за цим методом у матеріалі, ущільненому парафіном.

Фарбування бактерій

Методика фарбування:

1. Зріз вкривають фільтрувальним папером, так щоб його краї не виступали за краї предметного стекла. Це пов'язано з тим, що карбол-фуксин утворює великий осад, який може забруднити зріз.

2. На фільтрувальний папір, у ділянці зрізу, наносять розчин карбол-фуксину. Його готують попередньо добавляючи до однієї частини насиченого спиртового розчину фуксину 10 частин 5 %-го водного розчину карболової кислоти. Підігривають предметне скло в ділянці розташування зрізу над полум'ям спиртівки до відходження пару із барвника (1–2 хв). При цьому предметне скло утримують пінцетом. Потім підігрівання припиняють і залишають фарбу на зрізі ще на 20–25 хв.

3. Зливають фарбу і обережно знімають із зрізу фільтрувальний папір (при споліскуванні у воді).

4. Диференціюють зріз 1 %-им солянокислим спиртом (на 70⁰ етиловому спирті) до блідо-рожевого відтінку.

5. Промивають зріз у водопровідній воді.

6. Підфарбовують зріз метиленовим синім Лефлера 15–30 сек. Для цього можна використовувати галунові гематоксиліни. Після них зрізи обов'язково диференціюють 0,5–1 %-им солянокислим спиртом і ретельно промивають у воді.

7. Споліскують зріз у воді і швидко проводять його через спирт, ксилол та заводять у бальзам.

Результати фарбування: Мікобактерії туберкульозу забарвлені у червоний колір, ядра клітин – у синій.

Примітка. Для просвітлення зрізів не можна використовувати ніяких інших речовин, крім ксилолу або толуолу.

Фарбування мікобактерій туберкульозу за Шморлем

Методика фарбування:

1. Зрізи забарвлюють у гематоксиліні Делафільда або Ерліха впродовж 20–30 хв.

2. Затим ретельно промивають їх у воді 30 хв.

3. Промиті зрізи фарбують карболовим фуксином 0,5–1 год при температурі +37⁰ С (у скляному посуді).

Фарбування бактерій

4. Знебарвлюють їх 1 %-им солянокислим спиртом (близько 1 хв).
 5. Промивають зрізи у 70⁰ етиловому спирті (2–3 хв).
 6. Споліскують у воді.
 7. Переносять зрізи у слабкий водний розчин вуглекислого літію (1 частина 1,52 %-го водного розчину вуглекислого літію на 10 частин водопровідної води).
 8. Промивають зрізи у воді (5–10 хв).
 9. Проводять зрізи через спирти, ксилол і заводять у бальзам.
- Результати фарбування:** мікобактерії туберкульозу забарвлені в червоний колір, ядра клітин – у синій.

Імпрегнація мікробів сріблом за Левадіті

Найчастіше цей метод використовують для виявлення лептоспир.

Матеріал досліджень (шматочки товщиною 2–3 мм) фіксують у 10–12 %-му водному розчині формаліну впродовж 24–48 год.

Методика виготовлення препаратів:

1. Зафіксований матеріал переносять на 24 год в 90–96⁰ етиловий спирт.
2. Промивають матеріал у дистильованій воді до тих пір, поки шматочки не опустяться на дно (але не менше 2–3 год). Воду при цьому замінюють 1–2 рази.
3. Переносять матеріал у 1–3 %-ий водний розчин азотнокислого срібла на 3–6 діб. Процес імпрегнації сріблом здійснюють у термостаті при температурі +37⁰ С (у посуді із темного скла). Розчин азотнокислого срібла готують на свіжій дистильованій воді із розрахунку близько 15 мл на один шматочок матеріалу.
4. Після імпрегнації матеріал споліскують у дистильованій воді (2–5 хв).
5. Переносять матеріал у щойно приготовлений розчин (проявник) такого складу:
 - Пірогалова кислота (пірогалол) –2–4 г;
 - Вода дистильована –100 мл;
 - Формалін концентрований – 10 мл.

Фарбування бактерій

Розчин готують із розрахунку 20–25 *мл* на один шматочок матеріалу. Матеріал витримують у цьому розчині 24–48 *год* при кімнатній температурі в темному місці або ж у посуді із темного скла.

При перекладанні шматочків матеріалу в проявник, останній швидко темніє і стає мутним. Для запобігання цього явища необхідно шматочки після промивання у дистильованій воді спочатку добре промити у невеликій порції проявника і тільки після цього, як вони стануть чорними, перенести їх у основну частину проявника.

6. Промивають матеріал у дистильованій воді впродовж 1–2 *год* і заливають його у парафін.

7. Із парафінових блоків готують максимально тонкі зрізи (із їх глибоких шарів) і наносять на предметні стекла. Після висушування із зрізів видаляють парафін (ксилолом) і заводять їх у бальзам.

Результати імпрегнації. Мікроби чорного кольору, а оточуючі їх тканини – буровато-жовтого.

Примітка. Виготовлені препарати зберігають у темному місці. При імпрегнації шматочків нервової тканини, крім мікробів імпрегнуються також нервові волокна, що призводить до значних труднощів диференціації мікроорганізмів.

СВІТЛОВА МІКРОСКОПІЯ

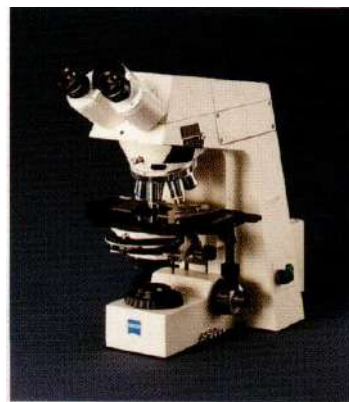
Світлова мікроскопія є основним способом дослідження гістологічних, гістохімічних і цитологічних препаратів. Її здійснюють за допомогою світлового мікроскопа (*рис. 49*). В нашій країні найбільш поширені мікроскопи, які виготовляють у Німеччині і Японії (*рис. 50*). Частина із них мають пристрої для фотографування, відео- і кінозйомки (*рис. 51*) та систему аналізу об'єктів досліджень (*рис. 52*). Існує багато типів і моделей світлових мікроскопів, але всі вони мають єдиний план будови (*рис. 53*).



Рис. 49. Світловий мікроскоп «OLYMPUS СК 20».



а

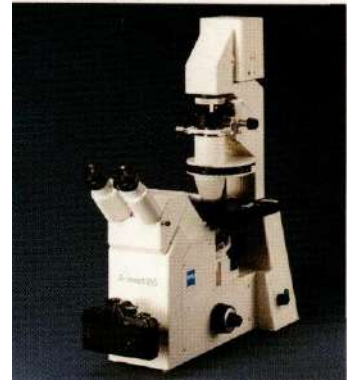


б

Світлова мікроскопія



В



Г

Рис. 50. Світлові мікроскопи фірми «Carl Zeiss»: а – «Axioskop»; б – «AxioPlan»; в – «AxioPhot»; г – «Axiovert 135».



Рис. 51. Світловий мікроскоп
«OLYMPUS OPTICAL CO GMBH».

Світлова мікроскопія

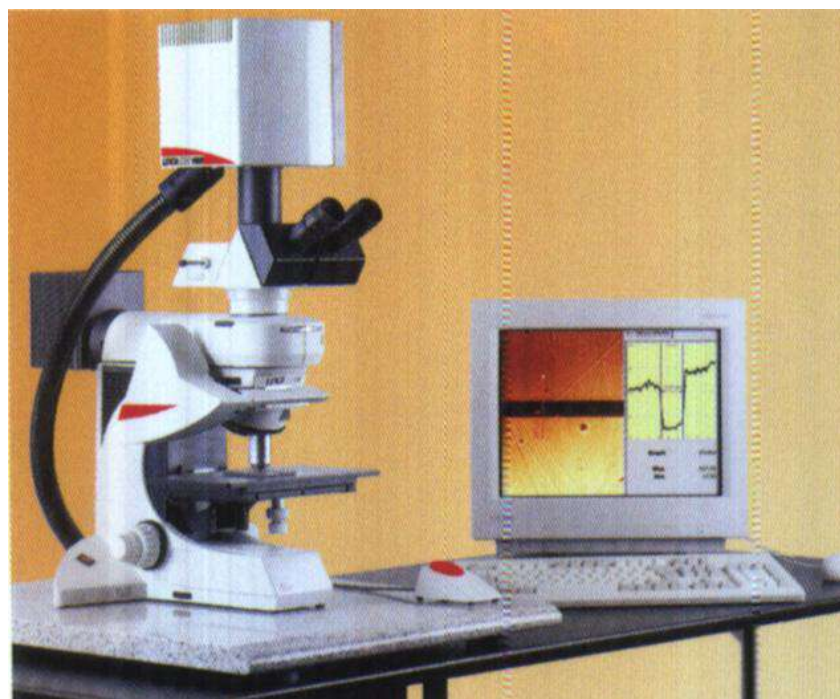


Рис. 52. Конфокальна мікроскопна система «Leica ICM 1000»

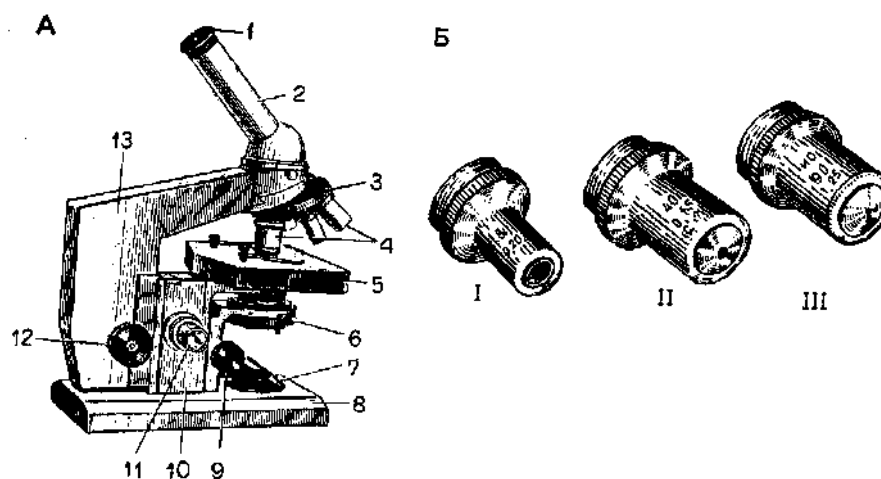


Рис. 53. Загальний вид світлового мікроскопу (А) та його об'єктиви (Б): 1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – револьвер; 4 – об'єктиви; 5 – предметний столик; 6 – конденсор; 7 – дзеркало; 8 – підставка; 9 – гвинт конденсору; 10 – коробка мікромеханізму; 11 – мікрометричний гвинт; 12 – макрометричний гвинт; 13 – тубусоутримувач; I, II, III – об'єктиви малого, великого та імерсійного збільшення.

Будова світлового мікроскопа

Світловий мікроскоп складається з трьох частин: механічної, оптичної і освітлювальної. Окремі автори останні дві частини мікроскопа об'єднують в одну – оптичну.

Механічна частина представлена штативом, револьвером, предметним столиком, макро- і мікрогвинтами. Штатив об'єднує всі частини мікроскопа. В ньому розрізняють підставку, тубусоутримувач і тубус. Підставка (основа мікроскопа) має переважно прямокутну форму. Вона надає стійкості мікроскопу. Зверху до неї нерухомо кріпиться коробка з механізмом точного фокусування (МТФ). Він представлений мікрогвинтом. Його рукоятки (рукоятка), залежно від конструкції мікроскопа, можуть бути по боках коробки або знаходитися в підставці. Тубусоутримувач (колонка штативу) рухомо з'єднується з коробкою МТФ. У його нижній частині, з боків, розташовані рукоятки макрогвинта (кремальєри). За його допомогою тубусоутримувач підіймається або опускається. Цим досягається грубе фокусування мікроскопа. Верхній кінець тубусоутримувача називається головкою. До неї приєднується тубус і револьвер.

Тубус має циліндричну форму і з'єднується з тубусоутримувачем за допомогою гвинта. В його верхній кінець вставляється окуляр. Нижній кінець тубуса – розширений і називається футляр призми. Призма змінює вертикальне положення пучка світлових променів на похиле (45°) і спрямовує його до окуляра. Револьвер рухомо з'єднаний з головкою. На ньому є чотири отвори для об'єктивів.

Предметний столик знаходиться на кронштейні, який з'єднаний з коробкою МТФ. На його верхній поверхні є отвір над яким розміщують гістопрепарат і гнізда для його фіксаторів (затискувачів). З боків предметного столика є гвинти, за допомогою яких столик можна переміщувати навколо своєї осі і по двох, взаємно перпендикулярних, площинах. Завдяки рухам предметного столика досягається центрування необхідного на гістопрепараті місця.

До складу **оптичної частини** мікроскопа входять об'єктиви і окуляри – системи скомбінованих лінз.

Світлова мікроскопія

Об'єктиви ділять на чотири категорії: малого збільшення (8х або 10х), середнього (20х), великого (40х) і дуже великого (90х). Серед них виділяють сухі (8х, 20х, 40х) та імерсійні (90х). Як імерсійне середовище використовують кедрову олію.

Окуляри також ділять на окуляри малого збільшення (5х або 7х), середнього (10х) і великого (15х).

Збільшення об'єкта дослідження визначають помножуючи збільшення об'єктива на збільшення окуляра.

Освітлювальна частина мікроскопа представлена дзеркалом, освітлювачем, діафрагмою та кільцем для світлофільтра.

Дзеркало розташоване над передньою частиною підставки і з'єднане з коробкою МТФ. Воно має увігнуту і плоску поверхні. При звичайному освітленні користуються увігнутою поверхнею, а при спеціальному – плоскою. В більшості сучасних світлових мікроскопах дзеркала немає. У них джерело світла безпосередньо знаходиться в основі мікроскопа.

Освітлювач (конденсор) знаходиться під предметним столиком. Він рухомо з'єднаний з коробкою МТФ. Підіймають або опускають освітлювач за допомогою гвинта, рукоятка якого розташована на правій стороні його кронштейна. Головною частиною освітлювача є лінза (лінзи). Завдяки їй освітлювач концентрує світлові промені на об'єкті дослідження.

Освітленість об'єкта дослідження регулюється за допомогою діафрагми. У сучасних світлових мікроскопах використовують ірис-діафрагму. Вона складається із системи тонких кривих пластинок, які заходять одна на одну і вправлені в кільце, з'єднане з нижньою поверхнею освітлювача. Збоку на кільці є ричажок діафрагми, зміщенням якого регулюється отвір діафрагми. Під діафрагмою розташоване кільце світлофільтра, яке за допомогою шарніра рухається в горизонтальній площині. В кільце вставляються світлофільтри. При мікроскопії (залежно від природи джерела світла) використовують матові безколірні або матові сині світлофільтри.

Правила роботи з мікроскопом

1. Поставити мікроскоп на столі, відступивши від його краю на ширину долоні. Опустити конденсор і відкрити діафрагму.

2. Обертаючи револьвер за ходом годинникової стрілки, встановити над отвором предметного столика об'єктив малого збільшення. При цьому чути клацання фіксатора. Поворотом рукоятки макрогвинта за ходом годинникової стрілки (від себе) опустити тубусоутримувач так, щоб кінець об'єктива був на відстані 1,0 см від поверхні предметного столика.

3. Освітити поле зору. Дивлячись в окуляр лівим оком, великим і вказівним пальцями обох рук спрямувати дзеркало на джерело світла так, щоб поле зору мікроскопа було рівномірно і яскраво освітленим.

4. Покласти на предметний столик предметне скло з препаратом, накритим скельцем догори. При цьому препарат необхідно розташувати над отвором предметного столика. Зафіксувати предметне скло затискувачами. Обертаючи рукоятку макрогвинта до себе або від себе, добитися чіткості зображення. При малому збільшенні мікроскопа необхідно розглянути весь препарат, зміщуючи його положення пальцями рук.

5. Розглядаючи препарат при малому збільшенні, відшуковують на ньому ділянки, які необхідно розглянути при великому збільшенні мікроскопа. Ці ділянки (ділянку) центрують в поле зору мікроскопа і переводять його на велике збільшення. Для цього обертають револьвер за ходом годинникової стрілки і вставляють об'єктив великого збільшення над отвором предметного столика. Коли об'єктив займе правильне положення, почується клацання фіксатора. Освітлювач піднімають до рівня предметного столика.

6. Під час вивчення препарату при великому збільшенні мікроскопа чіткість зображення регулюють мікрогвинтом, обертаючи його рукоятку не більше, ніж на півоберту на себе або від себе.

7. Перед тим, як зняти препарат з предметного столика, необхідно перевести мікроскоп на мале збільшення. Після цього, підтримуючи препарат лівою рукою, правою відводять затискувачі і знімають препарат.

Проводячи мікроскопію препаратів, необхідно пам'ятати: в окуляр мікроскопа потрібно дивитись тільки лівим оком, а праве при цьому повинно бути відкритим; зображення в мікроскопі обернене.

МОРФОМЕТРИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В ГІСТОЛОГІЇ

В сучасній морфології використовується багато різноманітних методів досліджень. Особливе місце серед них займають морфометричні дослідження (кількісна морфологія). Доведено високу їх ефективність для оцінки структурно-функціонального стану тварин і людини на організменному, органному, тканинному та клітинному рівнях в нормі і при патології. Морфометричні дослідження (морфометрія) дають змогу досліднику чітко та достовірно аналізувати кількісні зміни структур організму тварин у процесі його індивідуального розвитку, при дії на нього різноманітних факторів зовнішнього середовища, кормових добавок тощо. Ці дослідження показують взаємозв'язок і взаємозалежність кількісних змін окремих структур організму тварин на різних етапах його розвитку та неоднакових функціональних станах.

Морфометрія у медицині включає в себе вимірювання тіла тварин і людини та окремих його частин, органометрію, гістометрію, цитометрію та каріометрію. У гістологічній практиці використовують переважно гістометрію, цито- і каріометрію та рідше органометрію.

Органометрію використовують для визначення діаметру кровоносних та лімфатичних судин, товщини нервів та нервових волокон, розмірів нервових вузлів, розмірів органів зародка та дрібних тварин.

Гістометрією користуються для встановлення розмірів гістологічних структур та визначення їх площі в органі або в його окремих ділянках.

Цито- і каріометрію використовують для визначення розмірів клітин та їх ядер, для встановлення ядерно-цитоплазматичного відношення, а також для підрахунку кількості клітин.

Для одержання достовірних даних, які б характеризували певну ознаку об'єкту дослідження в нормі (діаметр ядер, кількість клітин, площу тканин тощо) матеріал для вимірювання (органи для виготовлення зрізів, препаратів-відбитків, кров для виготовлення мазків) відбирають від 5–6 індивідумів (мінімум від 3–4). Від кожного відібраного органа рекомендується виготовити 5 парафінових або

Морфометричні дослідження в гістології

целоїдинових блоків для приготування зрізів або 5 препаратів відбитків. З кожного блоку готують не менше 5 зрізів. З кожної порції крові роблять 3–5 мазків.

Інструменти та прилади для вимірювання

Для вимірювання структур тканин і органів, а також для визначення їх площі використовують світлові мікроскопи МБС-1, МБС-2, МБД-15, МБД-16 та інші, а також окуляр-мікрометри і окулярну квадратно-сіткову вставку (сітку). Окуляр-мікрометри бувають двох типів. Перший це окулярна лінійка (рис. 54), другий – гвинтовий окуляр-мікрометр.

Перед вимірюванням об'єктів необхідно визначити ціну поділки окуляр-мікрометру (скільки *мкм* становить одна поділка) при різних збільшеннях мікроскопу. Для цього використовують об'єкт-мікрометр. Останній має вигляд предметного скла на яке нанесена лінійка з ціною поділки 10 *мкм*. Об'єкт-мікрометр поміщають на предметний столик мікроскопу (фірменим знаком вверх) і добиваються чіткого зображення поділок його лінійки. В окуляр вмонтовують окулярну лінійку, вставляють його в тубус і проєктують окулярну лінійку на лінійку об'єкт-мікрометра. Підраховують скільки поділок лінійки окуляр-мікрометра співпадає з кількістю поділок лінійки об'єкт-мікрометра (рис. 55).

Для визначення ціни поділки окуляр-мікрометра користуються наступною формулою:

$$A = \frac{B}{V} \cdot 10$$

- де: А – ціна поділки окуляр-мікрометра (*мкм*);
Б – підрахована кількість поділок на лінійці об'єкт-мікрометра;
В – відповідна їм кількість поділок лінійки окуляр-мікрометра;
10 – величина однієї поділки об'єкт-мікрометра у *мкм*.

Наприклад, при визначенні ціни поділки окуляр-мікрометра при збільшенні мікроскопа (ок.7, об. 8) на 20 поділок окуляр-мікрометра припадає 43 поділки об'єкт-мікрометра. Для визначення ціни поділки

Морфометричні дослідження в гістології

окуляр-мікрометра (А) необхідно 43 поділити на 20 та помножити на 10.

Отже:

$$A = \frac{43}{20} \cdot 10 = 21,5 \text{ мкм}$$

Таким чином, ціна поділки окуляр-мікрометра при цьому збільшенні мікроскопа становить 21,5 мкм.

Гвинтовий окуляр-мікрометр вставляється безпосередньо в тубус мікроскопу. Він складається із окуляра, який має вмонтовану лінійку з ціною поділки 10 мкм і механічну частину. Остання представлена барабаном з поділками, який дозволяє переміщувати подвійний штрих на крайні поверхні (крапки) об'єкта вимірювання.

Слід відмітити, що точність вимірювання гвинтовим окуляр-мікрометром вища, ніж звичайним. При цьому реєструються не тільки цілі одиниці вимірів, а й їх десяті та соті частки.

Визначення ціни поділки лінійки окуляр-мікрометра рекомендується проводити у центральній частині поля зору мікроскопа. При вимірюванні користуються еталонними одиницями вимірювання (мкм, мм) вираженими в числах.

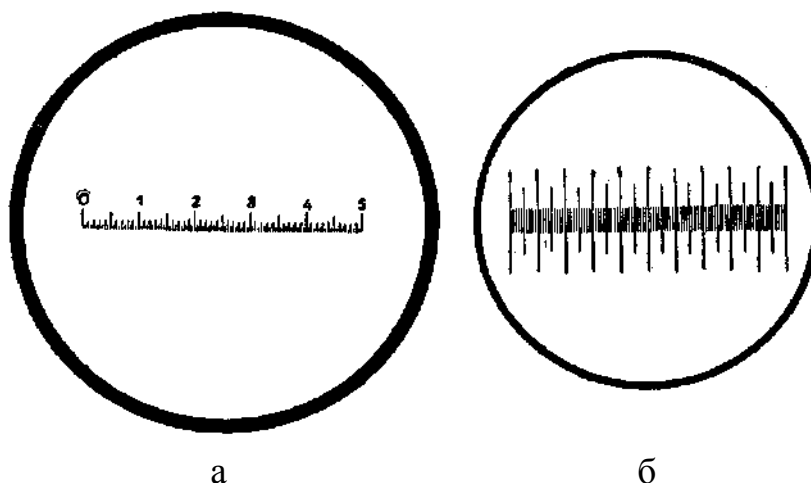


Рис. 54. Мікрометричні лінійки: а – лінійка окуляр-мікрометра (5 мм поділено на 50 частин); б – лінійка окуляр-мікрометра при великому збільшенні (1 мм поділено на 100 частин).

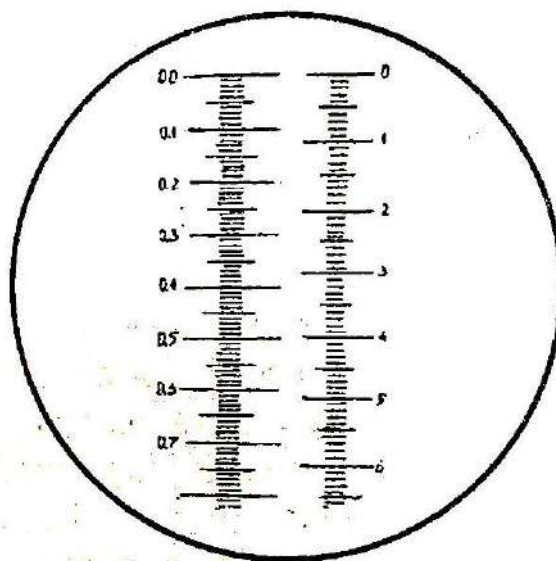


Рис. 55. Проекція поділок лінійки окуляр-мікрометра на лінійку об'єкт-мікрометра.

При проведенні морфометричних досліджень трапляються помилки. Причинами їх є неухважність особи, яка проводить вимірювання, несправність приладів та інструментів, якими проводиться вимірювання. У зв'язку з цим, для вимірювання необхідно використовувати справні та стандартизовані інструменти і прилади. При вимірюванні одного і того ж самого об'єкта (діаметр ядра клітин тощо) одержані результати за своєю величиною завжди близькі. Якщо вони різко відрізняються один від одного – це вказує на помилку дослідника. Від них звільняються повторними вимірюваннями.

Техніка вимірювання

Для вимірювання лінійних розмірів об'єктів використовують світлові мікроскопи і окуляр-мікрометри. Препарат (зрізи, препарат-відбитки, мазки крові) поміщають на предметний столик і добиваються чіткого зображення об'єкту вимірювання в окуляр-мікрометрі. Лінійку окуляр-мікрометр суміщають з об'єктом вимірювання і підраховують скільки її поділок співпадає з ним. Знаючи ціну поділки при цьому збільшенні мікроскопа, вираховують розмір об'єкта вимірювання.

При вимірюваннях користуються наступними прийомами. Товщину стінки трубчастих органів, її оболонки та шарів, товщину волокнистих структур вимірюють, розташовуючи лінійку окуляр-мікрометра поперек по відношенню до них. Довжину волокнистих структур вимірюють, суміщаючи лінійку окуляр-мікрометра з їх поздовжнім напрямком. Діаметр круглих або кулястих об'єктів (клітин крові, ниркових тілець, лімфоїдних вузликів, ядер клітин тощо) вимірюють, суміщаючи окулярну лінійку мікрометра з їхньою середньою частиною. Таким же чином вимірюють діаметр трубчастих органів. Лінійні розміри об'єкта овальної форми визначають, вимірюючи їх довжину та найбільшу ширину. При вимірюванні об'єктів плоскої форми, стовпчастої, кубічної (епітеліоцити) встановлюють їх висоту і довжину (ширину).

Для отримання достовірних результатів вимірювання вище названих об'єктів необхідно провести не менше 30 вимірів на одному зрізі, препарат-відбитку або мазку крові.

Кількість окремих об'єктів досліджень підраховують у зрізах (ниркові тільця, лімфоїдні вузлики, часточки органів тощо), у препаратах-відбитках і мазках крові (клітини крові) в 4–5 полях зору мікроскопа одного зрізу. При підрахуванні клітинних елементів в одному полі зору мікроскопа налічують від 50 до 200 клітин.

Для визначення площі, яку займають в органі або його частках і часточках окремі гістоструктури (тканини, частки і часточки, речовини і зони часточок, структурно-функціональні одиниці органів, паренхіма і сполучнотканинна строма, кровоносні та лімфатичні судини тощо) та її співвідношення, використовують окулярні квадратно-сіткові вставки (сітки). Сітка має 64 однакових квадратів. Площа одного квадрату неоднакова при різних збільшеннях мікроскопа. Для її визначення користуються даними про довжину сторони квадрата при збільшеннях мікроскопа, які є в інструкції. Визначення площі проводять на її одиниці виміру ($мм^2$). При цьому враховують місця пересічення ліній квадратів (крапки), які співпадають з об'єктом дослідження.

Визначення об'єму клітин та їх ядер

Ядра клітин на гістологічних зрізах переважно мають еліпсоподібну форму. В зв'язку з цим, найкращим способом кількісної

Морфометричні дослідження в гістології

оцінки величини ядра клітини є обчислення їх об'єму на основі того, що ядро є еліпсоїдним утвором.

Уявивши, що ядро є еліпсоїд, – можна визначити його об'єм за такою формулою:

$$V = \frac{\pi}{6} \times A \times B^2$$

де V – об'єм ядра;

π – 3,14;

A – довжина ядер;

B – ширина ядер (К.Ташке, 1980).

Скоротливі або типові серцеві міоцити (кардіоміоцити) міокарда серця на гістопрепаратах, зафарбованих за методом Гейденгайма, на поздовжньому зрізі мають форму прямокутника, на поперечному – округлу. Уявивши, що кардіоміцит циліндричної форми, – можна визначити його об'єм за такою формулою:

$$V_k = \pi \times (B/2)^2 \times A$$

де: V_k – об'єм кардіоміоцита;

π – 3,14; B – ширина (діаметр) кардіоміоцита;

B/2 – радіус кардіоміоцита;

A – довжина кардіоміоцита (Л. Горальський, 2024)

Для визначення об'єму клітин (ядер) рекомендується використовувати розрахунки *таблиці № 15*. По периферії горизонтальної та вертикальної ліній вказані цифрові показники (довжина та ширина) клітин чи ядер, місце пересічення цифрових показників є об'ємом (мкм^3) досліджуваного об'єкта.

Ядерно-цитоплазматичне відношення (ЯЦВ) визначають за наступною формулою:

$$\text{ЯЦВ} = \frac{\text{Об'єм ядра}}{\text{Об'єм клітин} - \text{Об'єм ядра}} \quad (\text{К.Ташке, 1980; Л. Горальський, 2024}).$$

Таблиця 15. Розрахунки об'єму ядер та клітин (мкм³) за формулою $V = \Pi/6 \times A \times B^2$ (К.Ташке, 1980)

	4	4,2	4,4	4,6	4,8	5	5,2	5,4	5,6	5,8	6	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8	8,2	8,4	8,6	8,8	9	9,2	9,4	9,6	9,8	10			
4	33,5																																4	
4,2	35,2	38,8																																4,2
4,4	36,9	40,6	44,6																															4,4
4,6	38,5	42,5	46,6	51,0																														4,6
4,8	40,2	44,3	48,7	53,2	57,9																													4,8
5	41,9	46,2	50,7	55,4	60,3	65,5																												5
5,2	43,6	48,0	52,7	57,6	62,7	68,1	73,6																											5,2
5,4	45,2	49,9	54,7	59,8	65,1	70,7	76,5	82,4																										5,4
5,6	46,9	51,7	56,8	62,0	67,6	73,3	79,3	85,5	92,0																									5,6
5,8	48,6	53,6	58,8	64,3	70,0	75,9	82,1	88,6	95,2	102																								5,8
6	50,3	55,4	60,8	66,5	72,4	78,5	84,9	91,6	98,5	106	113																							6
6,2	51,9	57,3	62,8	68,7	74,8	81,2	87,8	94,7	102	109	117	125																						6,2
6,4	53,6	59,1	64,9	70,9	77,2	83,8	90,6	97,7	105	113	121	129	137																					6,4
6,6	55,3	61,0	66,9	73,1	79,6	86,4	93,4	101	108	116	124	133	142	151																				6,6
6,8	57,0	62,8	68,9	75,3	82,0	89,0	96,3	104	112	120	128	137	146	155	165																			6,8
7	58,6	64,7	71,0	77,6	84,4	91,6	99,1	107	115	123	132	141	150	160	169	180																		7
7,2	60,3	66,5	73,0	79,8	86,9	94,2	102	110	118	127	136	145	154	164	174	195	198																	7,2
7,4	62,0	68,3	75,0	82,0	89,3	96,9	105	113	122	130	139	149	159	169	179	190	201	212																7,4
7,6	63,7	70,2	77,0	84,2	91,7	99,5	108	116	125	134	143	153	163	173	184	195	206	218	230															7,6
7,8	65,3	72,0	79,1	86,4	94,1	102	110	119	128	137	147	157	167	178	189	200	212	224	236	248														7,8
8	67,0	73,9	81,1	88,6	96,5	105	113	122	131	141	151	161	172	182	194	215	217	229	242	255	268													8
8,2	68,7	75,7	83,1	90,9	98,9	107	116	125	135	144	155	165	176	187	199	210	223	235	248	261	275	289												8,2
8,4	70,4	77,6	85,2	93,1	101	110	119	128	138	148	158	169	180	192	203	226	228	241	254	268	281	296	310											8,4
8,6	72,0	79,4	87,2	95,3	104	113	122	131	141	151	162	173	184	196	208	221	233	247	260	274	288	303	318	333										8,6
8,8	73,7	81,3	89,2	97,5	106	115	125	134	144	155	166	177	189	201	213	236	239	252	266	280	295	310	325	341	357									8,8
9	75,4	83,1	91,2	99,7	109	118	127	137	148	159	170	181	193	205	218	231	244	258	272	287	302	317	333	349	365	382								9
9,2	77,1	85,0	93,3	102	111	120	130	140	151	162	173	185	197	210	223	246	250	264	278	293	308	324	340	356	373	390	408							9,2
9,4	78,8	86,8	95,3	104	113	123	133	144	154	166	177	189	202	214	228	281	255	270	284	299	315	331	347	364	381	399	417	435						9,4
9,6	80,4	88,7	97,3	106	116	126	136	147	158	169	181	193	206	219	232	246	261	275	290	306	322	338	355	372	389	407	425	444	463					9,6
9,8	82,1	90,5	99,3	109	118	128	139	150	161	173	185	197	210	224	237	251	266	281	296	313	328	345	362	380	397	416	434	453	473	493				9,8
10	83,8	92,4	101	111	121	131	142	153	164	176	188	201	214	228	242	257	271	287	302	319	335	352	369	387	405	424	443	463	483	503	524			10
	4	4,2	4,4	4,6	4,8	5	5,2	5,4	5,6	5,8	6	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8	8,2	8,4	8,6	8,8	9	9,2	9,4	9,6	9,8	10			

Сучасні комп'ютеризовані морфометричні установки, що використовуються для проведення морфометричних досліджень, забезпечують високу точність вимірювань та об'єктивність результатів.

Вони включають мікроскоп, цифрову фото-відеокамеру та комп'ютер (рис. 56). Цифрову відеокамеру встановлюють на тубус мікроскопа та підключають до комп'ютера через USB-порт. За її допомогою можна отримувати мікрофотографії, які надалі сканують, переводять у цифровий формат і зберігають у пам'яті комп'ютера як зображення.

Для управління процесом зйомки мікропрепаратів та збереження зображень, створені спеціальні комп'ютерні програми, наприклад, Score Photo. Збережені цифрові мікрофотографії можуть бути використані для проведення морфометричних вимірів на них, з допомогою відповідних морфометричних програм (наприклад, ImageJ, Scion Image) тощо.

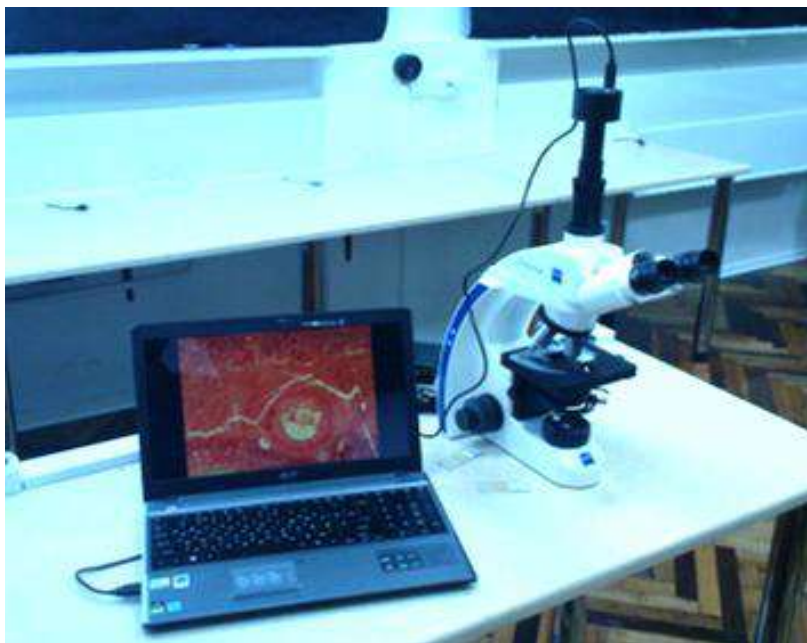


Рис. 56. Морфометрична установка фірми «Zeiss»

Техніка проведення морфометричних вимірів за допомогою програми ImageJ

ImageJ – це комп'ютерна програма для морфометричних вимірювань, яка є однією з найпопулярніших і широкоживаних програм морфометричного аналізу. Вона є потужним інструментом для обробки зображень і дозволяє працювати як з дво-, так і з тривимірними зображеннями, отриманими за допомогою різних

Піктограма № 1 (у вигляді прямокутника) призначена для виділення прямокутного фрагмента мікрофотографії, піктограма № 2 (у вигляді кола) – для виділення округлого чи овального фрагмента мікрофотографії. Піктограми № 3 і № 4 дозволяють обводити замкнуті контури мікроскопічних структур будь-якої форми: піктограма № 3 (у вигляді багатокутника) дозволяє створювати обведення багатокутної форми, піктограма № 4 (у вигляді «серця») дозволяє створювати обведення довільної форми. Піктограма № 5 (у вигляді лінії) служить для створення незамкнених прямолінійних чи криволінійних обведень контурів мікроскопічних об'єктів при вимірюванні їхніх лінійних розмірів.

Натиснувши на червоний трикутник під піктограмою № 5, відкривається меню, у якому можна обрати спосіб лінійного обведення: Straight Lines (Пряма лінія), Segmented Lines (Ламана лінія) або Freehand Lines (Довільна лінія).

Піктограма № 6 призначена для вимірювання кутів, а піктограма № 7 дозволяє створювати точкові обведення. Найчастіше застосовуються такі способи обведення: полігональне (багатокутне), вільне та різновиди лінійного (піктограми 3, 4 і 5).

Існує також можливість змінити колір лінії обведення. Для цього потрібно вибрати пункт меню Edit (Редагування) / Options (Параметри) / Colors (Кольори) та у вікні, що відкриється, обрати бажаний колір.

Інші піктограми призначені для роботи з зображеннями. Розглянемо найпоширеніші з них. Піктограма № 9 дозволяє додавати написи на мікрофотографії у вигляді текстових фрагментів, а піктограми № 16, 17, 18 та 19 використовуються для нанесення позначок на мікрофотографії у вигляді точок, ліній, стрілок тощо. Ці інструменти за функціоналом нагадують відповідні інструменти програми Photoshop.

Піктограма № 10 застосовується для збільшення масштабу мікрофотографії, що корисно при роботі з дуже дрібними структурами. Інша піктограма № 10 дозволяє переміщувати різні ділянки мікрофотографії в межах її вікна, що зручно, якщо розміри зображення перевищують розмір екрану, а зменшувати масштаб небажано через дрібні деталі.

Піктограма № 21 відкриває додаткове меню з іншими піктограмами та функціями.

Перед початком роботи з програмою ImageJ необхідно виконати її калібрування, оскільки цей етап є обов'язковим для коректного проведення подальших вимірювань.

Для цього за допомогою команди File (Файл) / Open (Відкрити) відкривають мікрофотографію еталонної фігурки (рис. 58, а). Еталонну фігурку необхідно заздалегідь сфотографувати з використанням морфометричної установки.

З цією метою на предметний столик мікроскопа встановлюють об'єкт-мікрометр, у полі зору знаходять фігурку, яка за формою та розмірами найбільш відповідає мікроскопічним структурам, що підлягатимуть вимірюванню, після чого виконують її фотографування за допомогою фото-відеокамери морфометричної установки.

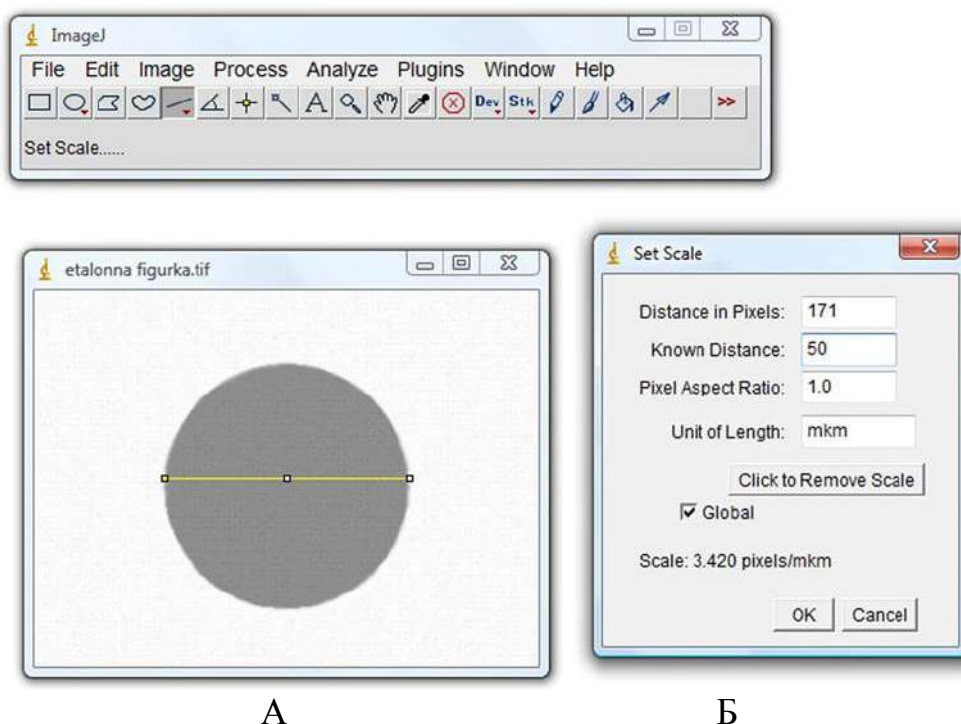


Рис. 58. Калібровка програми ImageJ за допомогою еталонної фігурки.

Збільшення мікроскопа та роздільна здатність цифрового зображення мають повністю відповідати тим параметрам, які будуть використані при отриманні мікрофотографій досліджуваних об'єктів. Далі, застосувавши інструмент прямолінійного обведення (піктограма № 5), проводять лінію вздовж діаметра, висоти або ширини еталонної фігурки (жовта лінія на рис. 58, а). У наведеному прикладі використано круглу фігурку та обведено діаметр.

Після цього в головному меню обирають Analyze (Аналіз) / Set Scale (Задати масштаб). У вікні, що відкриється, програма автоматично визначає довжину обведеної лінії в пікселях у полі Distance in Pixels (Відстань у пікселях) (у нашому прикладі – 171 піксель, рис. 58, б).

З формуляра, що додається до об'єкт-мікрометра, необхідно взяти реальне значення діаметра еталонної фігурки в одиницях системи СІ та ввести його в поле Known Distance (Відома відстань) (у нашому прикладі – 50 мкм). У полі Unit of Length (Одиниця довжини) слід зазначити відповідну одиницю вимірювання, наприклад мікрометри.

Після введення цих даних програма автоматично обчислює коефіцієнт перерахунку – кількість пікселів, що відповідають одному мікрометру. Це значення відображається в полі Scale (Масштаб) (у нашому прикладі – 3,420 пікселя на мікрометр). Щоб програма зберегла встановлений масштаб і використовувала його під час морфометричних вимірювань експериментальних об'єктів, необхідно встановити позначку в полі Global (Застосувати глобально) та підтвердити вибір, натиснувши кнопку ОК.

Після завершення калібрування необхідно визначити морфометричні параметри, які планується вимірювати. Для цього в головному меню обирають Analyse (Аналіз) / Set Measurements (Задати параметри вимірювань).

У вікні, що відкриється, відображається перелік морфометричних показників, доступних для вимірювання в програмі ImageJ. Потрібно встановити позначки навпроти тих параметрів, які будуть використовуватися в роботі.

Так, у разі вимірювання площі перерізу певної мікроскопічної структури слід обрати параметр Area (Площа). Для визначення лінійних розмірів (діаметра, довжини, ширини, висоти, а також довжини звивистих ліній тощо) вибирають параметр Perimeter (Периметр). Якщо планується оцінка оптичної щільності всього мікропрепарата або окремої мікроскопічної структури, необхідно встановити параметр Integrated Density (Інтегральна щільність). Після вибору потрібних параметрів натискають кнопку ОК.

Після цього можна переходити безпосередньо до виконання морфометричних вимірювань. Для цього відкривають файл з зображенням, на якому необхідно провести вимірювання мікроскопічних структур. Залежно від обраних параметрів та морфологічних особливостей об'єктів дослідження (форма, розташування тощо) вибирають відповідний спосіб обведення їх контурів за допомогою піктограм № 1–№ 5 (див. рис. 57).

Після обведення контуру об'єкта в головному меню обирають Analyse (Аналіз) / Measure (Виміряти). Після виконання першого виміру на екрані з'являється вікно з результатами морфометричних розрахунків (Results). За необхідності позначити виконане обведення використовують команду Analyse (Аналіз) / Label (Мітка).

Після завершення всіх вимірювань отримані числові дані копіюють у програму для подальшого аналізу, наприклад Excel або Statistica.

**Біометрична обробка цифрових показників
результатів досліджень**

Для аналізу одержаних цифрових показників використовують статистико-математичні методи їх обробки. Статистичну обробку проводять за допомогою спеціальних комп'ютерних програм.

Наприклад, математичну обробку цифрових результатів досліджень проводять з використанням програмного пакету Statistica 7.0 програмного забезпечення (StatSoft, Талса, США), а порівняння відмінності показників між величинами – методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з використанням поправки Бонферроні.

При відсутності останніх рекомендуємо їх обробляти за Е. Монцевічюте-Ерінгене. Проведемо цю обробку на прикладі товщини кардіоміоцитів великої рогатої худоби і овець. Товщину кардіоміоцитів підраховували у 10 зрізах. Середні значення товщини цих клітин у кожному зрізі приведені в *табл. 16*. Їх визначали шляхом ділення суми одержаних показників на їх кількість.

**Таблиця 16. Статистична обробка цифрового матеріалу
за Е. Монцевічюте-Ерінгене**

№ п/п	велика рогата худоба		вівці	
	товщина кардіоміоцитів (мкм)	відхилення від середнього показника	товщина кардіоміоцитів (мкм)	відхилення від середнього показника
1	13	+1	11	+1
2	11	-1	9	-1
3	10	-2	9	-1
4	12	0	10	0
5	14	+2	9	-1
6	10	-2	8	-2
7	12	0	11	+1
8	13	+1	12	+2
9	13	+1	10	0
10	12	0	11	+1
сума	120	10	100	10
середнє значення	12		10	

Морфометричні дослідження в гістології

Знаходимо середнє значення товщини кардіоміоцитів у великій рогатій худоби та овець шляхом ділення суми на кількість показників. У великій рогатій худоби середнє значення (М) = 12. Визначаємо відхилення кожної варіанти від середньої величини показника.

Наприклад: $13 - 12 = +1$; $11 - 12 = -1$; $10 - 10 = 0$ і т.д.

Вказані відхилення додають, не враховуючи при цьому знаків «-» або «+». Загальна сума відхилень складає у 1-й колонці (велика рогата худоба) – 10, у другій (вівці) – 10 (табл. 16).

Таблиця 17. Константи К для середніх помилок

Число варіант	Константа К	Число варіант	Константа К	Число варіант	Константа К	Число варіант	Константа К
3	0,2904	33	0,0067	63	0,0025	93	0,0014
4	0,1809	34	0,0064	64	0,0025	94	0,0014
5	0,1253	35	0,0062	65	0,0024	95	0,0014
6	0,0934	36	0,0059	66	0,0024	96	0,0014
7	0,0731	37	0,0056	67	0,0023	97	0,0013
8	0,0592	38	0,0054	68	0,0023	98	0,0013
9	0,0492	39	0,0052	69	0,0022	99	0,0013
10	0,0418	40	0,0050	70	0,0022	100	0,0013
11	0,0360	41	0,0048	71	0,0021	101	0,0012
12	0,0315	42	0,0047	72	0,0021	150	0,00062
13	0,0278	43	0,0045	73	0,0020	200	0,00065
14	0,0248	44	0,0043	74	0,0020	250	0,00032
15	0,0223	45	0,0042	75	0,0019	300	0,00024
16	0,0202	46	0,0040	76	0,0019	350	0,00019
17	0,0184	47	0,0039	77	0,0019	400	0,00016
18	0,0169	48	0,0038	78	0,0018	450	0,00013
19	0,0156	49	0,0037	79	0,0018	500	0,000107
20	0,0144	50	0,0036	80	0,0018	550	0,000097
21	0,0133	51	0,0035	81	0,0017	600	0,000085
22	0,0124	52	0,0034	82	0,0017	650	0,000076
23	0,0116	53	0,0033	83	0,0017	700	0,000068
24	0,0109	54	0,0032	84	0,0016	750	0,000061
25	0,0102	55	0,0031	85	0,0016	800	0,000055
26	0,0096	56	0,0030	86	0,0016	850	0,000050
27	0,0091	57	0,0029	87	0,0016	900	0,000046
28	0,0086	58	0,0029	88	0,0015	950	0,000043
29	0,0082	59	0,0028	89	0,0015	1000	0,000040
30	0,0079	60	0,0027	90	0,0015		
31	0,0074	61	0,0027	91	0,0015		
32	0,0070	62	0,0026	92	0,0015		

Для того, щоб визначити помилку середнього арифметичного ($M \pm m$), суму відхилень множать на константу (К). Величина константи залежить від кількості показників (табл. 17).

При 10 варіантах (показників) константа становить 0,0418. Для визначення помилки середнього арифметичного (m) товщини кардіоміоцитів у ВРХ необхідно 10 (відхилення від середнього показника) помножити на 0,0418 (константу). Отже, $10 \times 0,0418 = 0,418$, що являє собою помилку середнього арифметичного у ВРХ. У овець помилка середнього арифметичного буде така ж сама.

Розраховані таким чином показники записують у таблицю наступної форми (табл. 18).

Таблиця 18. Морфометричні показники товщини кардіоміоцитів у жуйних (мкм)

ВРХ	Вівці	Різниця (d)	Критерій вірогідності (td)
$x \pm m$	$x \pm m$		
$12 \pm 0,418$	$10 \pm 0,418$	2	3,38

Різниця показує, що товщина кардіоміоцитів у великої рогатої худоби відносно того ж показника у овець – більша. Але про це можна стверджувати тільки тоді, коли ця різниця буде достовірною, тобто, у простіших випадках критерій достовірності буде дорівнювати трьом або більше трьох. Для визначення критерію достовірності використовують наступну формулу:

$$td = \frac{d}{md}$$

td – критерій достовірності (у даному випадку різниці);

d – різниця;

md – помилка вибіркової різниці.

Із усіх значень, приведених у цій формулі, залишається невідомим лише помилка різниці – md. Для її визначення необхідно поставити під корінь помилку першого середнього арифметичного у квадраті $(0,418)^2$ та додати помилку другого середнього арифметичного у квадраті $(0,418)^2$:

$$md = \sqrt{0,418^2 + 0,418^2} = \sqrt{0,174724 + 0,174724} = \sqrt{0,349448} = 0,591$$

Отже: d (різниця) = 2;

md (помилка вибіркової різниці) = 0,591;

td (критерій достовірності) – невідомий (?).

Морфометричні дослідження в гістології

З наведених даних – критерій достовірності різниці (td) наступний:

$$td = \frac{d}{md} = \frac{2}{0,591} = 3,384$$

Якщо величина td більше за 3, різниця товщини кардіоміоцитів у ВРХ відносно овець дійсно є. Вона достовірна ($P_2 = 0,99$, якщо критерій достовірності нижче ніж 3, наприклад – 2,10, тоді необхідно встановити, на якому порозі вірогідності вона може вважатися достовірною. Для цього використовують таблицю Стьюдента (табл. 19).

Таблиця 19. Значення критерію достовірності за Стьюдентом-Фішером при трьох рівнях вірогідності P і різних числах ступенів свободи

Число ступенів свободи (n)	Рівень вірогідності (P)			Число ступенів свободи (n)	Рівень вірогідності (P)		
	0,95	0,99	0,999		0,95	0,99	0,999
	значення				значення		
5	2,57	4,03	6,86	21	2,08	2,83	3,82
6	2,45	3,71	5,96	22	2,07	2,82	3,79
7	2,37	3,50	5,41	23	2,07	2,81	3,77
8	2,31	3,36	5,04	24	2,06	2,80	3,75
9	2,26	3,25	4,78	25	2,06	2,79	3,73
10	2,23	3,17	4,59	26	2,06	2,78	3,71
11	2,20	3,11	4,44	27	2,05	2,77	3,69
12	2,18	3,06	4,32	28	2,05	2,76	3,67
13	2,16	3,01	4,22	29	2,05	2,76	3,66
14	2,15	2,98	4,14	30	2,04	2,75	3,65
15	2,13	2,95	4,07	35-39	2,03	2,72	3,59
16	2,12	2,92	4,02	40-44	2,02	2,70	3,55
17	2,11	2,90	3,97	45-60	2,02	2,66	3,50
18	2,10	2,88	3,93	70-100	1,98	2,63	3,39
19	2,09	2,86	3,88	120 i >	1,96	2,58	3,29
20	2,09	2,85	3,85				

Число ступенів свободи визначають за сумою кількості показників у кожній групі та відніманням 2-х показників ($n + n_1 - 2$). При 20 показниках у 2-х групах тварин число ступенів свободи буде: $10 + 10 - 2 = 18$. Достовірність різниці в даному випадку – згідно з таблицею, значення критерію достовірності дорівнює 2,10 і вписується у перший поріг (0,95) безпомилкових прогнозів.

Морфометричні дослідження в гістології

Якщо критерій достовірності є нижчим ніж 2,10 (наприклад – 1,50), то в такому випадку різниця вважається недостовірною, тобто вона об'єктивно не існує. У таких випадках говорять лише про тенденцію до збільшення або зменшення даних показників.

Одиниці довжини, маси і об'єму у гістологічних дослідженнях

Таблиця 20. Одиниці довжини у гістологічних дослідженнях

№ п/п	Одиниці виміру	Скорочені позначення одиниць		Розміри одиниць
		На укр. мові	Латинськими буквами	
1	Метр	<i>м</i>	m	1 м
2	Дециметр	<i>дм</i>	dm	10 ⁻¹ м
3	Сантиметр	<i>см</i>	cm	10 ⁻² м
4	Міліметр	<i>мм</i>	mm	10 ⁻³ м
5	Мікрометр	<i>мкм</i>	μm	10 ⁻⁶ м
6	Нанометр	<i>нм</i>	nm	10 ⁻⁹ м
7	Ангстрем	<i>Å</i>	Å	10 ⁻¹⁰ м

Таблиця 21. Одиниці маси у гістологічних дослідженнях

№ п/п	Одиниці виміру	Скорочені позначення одиниць		Розміри одиниць
		На укр. мові	Латинськими буквами	
1	Кілограм	<i>кг</i>	kg	1 кг
2	Грам	<i>г</i>	g	1 г
3	Дециграм	<i>дг</i>	dg	10 ⁻¹ г
4	Сантиграм	<i>сг</i>	cg	10 ⁻² г
5	Міліграм	<i>мг</i>	mg	10 ⁻³ г
6	Мікрограм	<i>мкг</i>	μg	10 ⁻⁶ г
7	Нанограм	<i>нг</i>	ng	10 ⁻⁹ г

Таблиця 22. Одиниці об'єму рідин та газів у гістологічних дослідженнях

№ п/п	Одиниці виміру	Скорочені позначення одиниць		Розміри одиниць
		На укр. мові	Латинськими буквами	
1	Літр	<i>л</i>	l	1 л
2	Мілілітр	<i>мл</i>	ml	10 ⁻³ л

ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ

Загальна характеристика методу електронної мікроскопії

Електронна мікроскопія у даний час набула поширення у науковій роботі. За її допомогою, в основному, вивчають ті ж об'єкти, що і за допомогою світлової мікроскопії. Але електронна мікроскопія має переваги над світловою, оскільки вона дає можливість виявляти та досліджувати субмікроскопічні складові клітин і тканин, яких не видно під світловим мікроскопом.

Принцип роботи електронного мікроскопа подібний такому світлового. В останньому, для одержання зображення та його збільшення, використовують пучок світлових променів, які неоднаково поглинаються різними ділянками об'єкта дослідження, і систему лінз. У електронному мікроскопі, для формування зображення, застосовують потік електронів, який рухається з великою швидкістю і неоднаково розсіюється у різних ділянках об'єкта вивчення, а велика кратність його збільшення досягається малою довжиною хвилі електронів (*табл. 23*).

Розрізняють два основні напрями електронної мікроскопії: *трансмісійну* (просвічуючу) (ТЕМ) та *сканувальну* (SEM). Вони ґрунтуються на використанні відповідних типів електронних мікроскопів (*рис. 59, 60*) і дають якісно різну інформацію про об'єкт дослідження.

У трансмісійному електронному мікроскопі пучок електронів проходить через об'єкт дослідження і зображення останнього на екрані, відповідно і на фотоплівці, є площинне. У сканувальному електронному мікроскопі сфокусований пучок електронів переміщується (рухається) по поверхні об'єкта дослідження, внаслідок чого його зображення на екрані об'ємне. Тобто за допомогою сканування такого зразка здійснюється трьохвимірна візуалізація зображень з високою роздільною здатністю. Після цього зображення забарвлюються автоматично або вручну.

Для успішного проведення цих досліджень використовують спеціальну технологію приготування препаратів. Фіксацію матеріалу проводять дуже швидко (його ріжуть на шматочки товщиною не більше 0,5–1 мм у краплі фіксатора). Фіксуючі речовини (глутаральдегід, формальдегід, перманганат калію, оксид осмію) використовують у водних розчинах з фізіологічним значенням рН. Для того, щоб електронний промінь пройшов через гістологічний зріз, товщина його не повинна перевищувати 0,1 мкм (1000 Å). Тому в якості ущільнюючого середовища використовують не парафін, а епоксидні смоли (аралдит, епон), поліефірні смоли (вестропал W),

Електронна мікроскопія

глікольметакрилат. Ці речовини дозволяють отримувати тонкі якісні зрізи без пошкоджень структур тканини на спеціальних приладах – ультрамікроскопах, які працюють в автоматичному режимі (рис. 61). Зрізи тонші за 500 Å, мають сірі кольори, товщиною 500–600 Å – сріблясто-сірі (найбільш поширені), 600–900 Å – сріблясті, 900 – 1200 Å – золотисті.

Таблиця 23. Порівняльні властивості світлового та електронних мікроскопів

№ п/п	Показники	Світловий мікроскоп	Трансмісійний електронний мікроскоп	Сканувальний електронний мікроскоп
1	Джерело випромінювання	Світло	Електрони	Електрони
2	Довжина хвилі	400-700 нм	Наприклад, 0,005 нм при 50кВ	Наприклад, 0,005 нм при 10-30кВ
3	Максимальне корисне збільшення	X 1500	X 250000 (на екрані)	До ×100 000 – ×200 000 (залежно від типу приладу)
4	Максимальна роздільна здатність: - практична, - теоретична	200-500 нм, 200 нм	0,5 нм, 0,2 нм	3–10 нм 1–2 нм
5	Лінзи	Скляні (кварцеві для ультрафіолетового випромінювання)	Електромагніти	Електромагніти
6	Об'єкт	Живий, або не живий. Звичайно лежить на предметному склі	Неживий, зневоднений, відносно малий або тонкий. Утримується на сіточці у вакуумі	Неживий або фіксований біологічний матеріал; зневоднений, висушений; розміщується на предметному столику у вакуумі
7	Поширені барвники	Кольорові	Містять важкі метали, які відбивають електрони	Не застосовують; використовують напilenня важких металів (золото, платина, паладій)
8	Зображення	Майже завжди кольорове	Чорно-біле	Чорно-біле, псевдооб'ємне (тривимірне), відображає рельєф поверхні

Виготовлені зрізи переносять за допомогою пінцета на спеціальну сітку в краплю ацетону. Далі сітку витримують у розчинах важких металів для посилення контрастності, фарбують, промивають і підсушують у чашках Петрі. Зберігають у спеціальних контейнерах.



Рис. 59. Трансмісійний електронний мікроскоп «Wikiwand».



Рис. 60. Сканувальний електронний мікроскоп «Magellan XHR SEM».



Рис. 61. Ультрамикротом для біології і промисловості «Leica ULTRACUT R».

Методика підготовки матеріалу для трансмісійної електронної мікроскопії

Для трансмісійної мікроскопії *підготовку* матеріалу для досліджень проводять наступним чином:

1. Швидко відбирають матеріал.
2. Фіксують його в 2–4 %-му розчині глутаральдегіду впродовж однієї години.
3. Промивають матеріал буферним розчином (рН 7,3–7,4) тричі по 30 хв.
4. Постфіксують його в 1 %-му розчині тетраоксиду осмію впродовж 1–2 год.
5. Промивають матеріал буферним розчином тричі по 30 хв.
6. Зневоднюють у спиртах зростаючої міцності (70⁰, 90⁰, абсолютному) по 10 хв, абсолютним – двічі по 15 хв.
7. Просочують матеріал середовищем для заливки, яке складається із епоксидних смол (до 24 год).
8. Заливають матеріал епоксидними смолами з додаванням каталізатора і поміщають його в термостат (при +60⁰ С) для полімеризації (до 24 год).
9. Загострюють і ріжуть блоки.
10. Фарбують зрізи:
 - а) напівтонкі зрізи забарвлюють метиленовим синім;
 - б) ультратонкі зрізи контрастують розчином уранилацетату (1–2 год), а потім розчином цитрату свинцю (20–30 хв) тощо.

Технологія виготовлення зрізів з органів і тканин для електронно-мікроскопічних досліджень

Відбір і фіксація матеріалу для досліджень

У трансмісійній електронній мікроскопії, як і у світловій, відбір і фіксація матеріалу мають першочергове значення для отримання високоякісних препаратів.

Матеріал для досліджень відбирають від щойновбитих або померлих об'єктів. Можна використовувати і біопсійний матеріал. Відібраний матеріал поміщають на фільтрувальний папір, який попередньо змочують фіксатором. Із матеріалу гострим лезом вирізають шматочки товщиною 1 мм і довжиною до 5 мм. Відібрані шматочки матеріалу поміщають у фіксатор.

Вимоги до фіксації матеріалу для електронної мікроскопії є аналогічними до таких світлової мікроскопії: необхідно зупинити посмертні зміни та забезпечити збереження тканин у стані, максимально наближеному до прижиттєвого.

Фіксатор повинен мати такі властивості:

1. Швидко проникати у відібраний матеріал.
2. Зберегти клітини, її структури і структури міжклітинної речовини у стані, максимально близькому до прижиттєвого.
3. Запобігти переміщенню у клітинах структур і макромолекул внаслідок осмотичних явищ.
4. Максимально зберегти різноманітні внутрішньоклітинні макромолекули.

Фіксатор не повинен викликати зморщування клітин і їх набряк, тобто по відношенню до клітин він повинен бути ізотонічним. Як відомо, для більшості клітин і плазми крові ссавців осмотичний тиск становить $0,3 M$ та є ізотонічним. Саме тому, склад найбільш поширених фіксаторів підбирається таким чином, щоб концентрація речовин у середовищі відповідала $0,3 M$.

Найбільш поширеним на сьогодні є фіксатори, до складу яких входить OsO_4 , що дуже повільно проникає у тканини. У зв'язку з цим, термін фіксації матеріалу становить 1–1,5 год. Оптимальні його терміни залежать від типу тканин, розмірів шматочків матеріалу, концентрації фіксуючої рідини, буферного розчину, що використовується.

OsO_4 перш за все взаємодіє з ліпідами у місці подвійного зв'язку. При взаємодії з білками OsO_4 сприяє утворенню подвійних зв'язків між їх молекулами та між РН- та PS-групами. Нуклеїнові кислоти і вуглеводи майже не взаємодіють з OsO_4 , якщо вони не зв'язані з білками. При тривалій фіксації в OsO_4 продукти реакцій багатьох білків і ліпідів легко розчиняються у воді і можуть видалятися. Тому бажано фіксувати зразки тканин у цьому фіксаторі не тривалий час.

Поширеним фіксатором є також глутаральдегід. Оптимальний термін фіксації у ньому – 3–4 год. У глутаральдегіді краще зберігається цитоплазма та мембранні структури клітин. Більш повною є фіксація білків та вуглеводів. За властивістю зберігати тонкі клітинні структури глутаральдегід є найкращим фіксатором. Однак, ліпідні молекули не стабілізуються при фіксації глутаральдегідом. Тому для їх збереження потрібна додаткова фіксація в OsO_4 . У зв'язку з цим, найбільш розповсюдженою є подвійна фіксація: спочатку в глутаральдегіді, потім – у OsO_4 . Завдяки цьому поєднуються переваги обох фіксаторів.

Фіксація в OsO₄. Найбільш поширеним є осмієвий фіксатор Паладе. Для його приготування використовуються основні розчини А та Б.

Розчин А – веронал-ацетатний буфер:

5,5 – диетилбарбітурат натрію – 14,7 г;

ацетат натрію – 9,7 г;

бідистильована вода – до 500 мл.

Розчин Б – 2 %-ий розчин OsO₄. Цей розчин готують наступним чином: у хімічно чистий темний скляний посуд наливають необхідну кількість бідистильованої води. Її об'єм залежить від вмісту в ампулі OsO₄. Ретельно промивають ампулу з кристалами OsO₄, роблять на ній надріз і її вміст висипають у посуд з водою та розмішують скляною паличкою. Процес розчинення OsO₄ відбувається впродовж 24 год. Одержаний розчин повинен бути прозорим і жовтуватим. У холодильнику він зберігається тривалий час. Для кращого зберігання розчину необхідно до нього додати хромовий ангідрид (із розрахунку два кристалики величиною з сірникову голівку на 100 мл розчину). Його можна також розлити у скляні ампули, запаяти їх та зберігати у холодильнику.

Склад фіксатору:

буферний розчин – 5 мл;

0,1 М розчин HCl – 5 мл;

дистильована вода – 2,5 мл;

2 %-ний розчин OsO₄ – 12,5 мл.

Фіксатор Паладе повинен мати рН 7,4. Якщо цей показник зміщений у кислу сторону, то до фіксатора додають декілька крапель розчину 5,5-диетилбарбітурату натрію, а якщо у лужну – кілька крапель 0,1 М розчину HCl.

Існує декілька модифікацій фіксатора Паладе. Так, для підвищення у ньому осмотичного тиску рекомендується до його складу додати 4,5 %-ий розчин цукрози. З метою вирівнювання осмотичного тиску фіксуєної рідини і підданої для фіксації тканини, у фіксатор Паладе додають розчини солей натрію, калію і кальцію. Слід зазначити, що додавання цих солей може призводити до вимивання окремих речовин із тканин.

Для приготування другої модифікації фіксатора Паладе використовують основні розчини А та Б.

Розчин А:

ацетат натрію – 9,7 г;
5,5-диетилбарбітурат натрію – 14,7 г;
бідистильована вода – до 500 мл.

Розчин Б:

хлорид натрію – 40,3 г;
хлорид калію – 2,1 г;
хлорид калію безводний – 0,9 г;
бідистильована вода – до 500 мл.

Склад фіксатора:

розчин А – 5 мл;
розчин Б – 1,7 мл;
0,1 М розчин HCl – 5,5 мл;
бідистильована вода – 0,3 мл;
2 %-ий розчин OsO₄ – 12,5 мл.

Фіксатор повинен мати рН 7,2. Для підкислення використовують 0,1 М розчин HCl, а для підлужування – 0,28 М розчин 5,5-диетилбарбітурат натрію (14,7 г у 500 мл води).

Застосування фіксатора Паладе – обмежене. Це пов'язано з тим, що розчин OsO₄ на веронал-ацетатному буфері не зберігає у тканинах багато важливих речовин. У зв'язку з цим Millonig запропонував фіксатор із OsO₄ на фосфатному буфері. Цей буфер нетоксичний, має фізіологічне значення рН (7,4) та характеризується високою буферною ємністю. Застосування осмієвого фіксатора на фосфатному буфері запобігає вимиванню білків, зберігає глікоген та фібрилярні структури, забезпечує більш рівномірну фіксацію усієї тканини. Тривалість фіксації – 1–1,5 год. Для приготування цього фіксатора використовують основні розчини А, Б, В, Г.

Розчин А – 1,5 %-ий розчин NaH₂PO₄ · H₂O.

Розчин Б – 5,5 %-ий розчин NaOH.

Розчин В – 5,4 %-ий розчин глюкози.

Розчин Г – 49,5 мл розчину А та 10,8 мл розчину Б.

(Розчини А та Б можуть зберігатися впродовж семи діб і більше, розчин В швидко псується навіть при температурі 4⁰ С).

Склад фіксатора:

розчин Г – 20 мл;
розчин В – 5 мл;
2 %-ий розчин OsO₄ – 25 мл.

Даний фіксатор має рН – 7,3, яке залишається стабільним при зберіганні фіксатора в холодильнику впродовж кількох тижнів.

Фіксація у глутаральдегіді

Фіксацію матеріалу глутаральдегідом потрібно проводити при кімнатній температурі. Термін фіксації коливається від 2 до 4 год. Він залежить від розмірів шматочків відібраного матеріалу та його властивостей. На процес фіксації впливає і якість глутаральдегіду.

У 25 % концентрації він може окиснюватися і полімеризуватися. Продукти цих процесів негативно впливають на його фіксуючу здатність і рН. У зв'язку з цим, 25 %-ий розчин глутаральдегіду попередньо нейтралізують CaCO_3 . Для цього у розчин глутаральдегіду на $\frac{1}{3}$ об'єму додають CaCO_3 і поміщають на дві доби у холодильник. Нейтралізований розчин слід очистити від продуктів полімеризації глутаральдегіду.

Методи очищення глутаральдегіду

Очищають глутаральдегід від домішок продуктів полімеризації активованим вугіллям і перегонкою у вакуумі.

Перший метод

До 200 г глутаральдегіду додають 40 г активованого вугілля і енергійно струшують. Одержану суміш фільтрують у вакуумі. процедуру повторюють тричі. При цьому кожний раз додають по 20 % активованого вугілля. Вихід чистого продукту становить 10–15 %.

Другий метод

Цей метод очистки глутаральдегіду є більш ефективним. Використовуючи його, одержують глутаральдегід кращої якості. При цьому вихід чистого продукту є більшим.

У круглу колбу ємністю 500 мл, при зниженому тиску (2 кПа) і температурі 60–65⁰ С переганяють 250 мл глутаральдегіду. Перші 20 мл дистилату не використовують, а до частини, яка залишилась після вакууму, повільно доливають рівний об'єм дистильованої води (t +70–75⁰ С). Розчин змішують на магнітній мішалці в атмосфері азоту і розливають в ампули (на 5 мл), які заповнені азотом. Ампули зберігають у світлонепрониклому контейнері при температурі +3–4⁰ С.

Глутаральдегідні фіксатори на фосфатному буфері

Їх є декілька модифікацій, які відрізняються складом фосфатного буферу та об'ємом 25 %-го розчину глутаральдегіду.

Фіксатор №1

Склад: 25 %-ий розчин глутаральдегіду – 2 мл; фосфатний буфер – 23 мл.

Фосфатний буфер готують із розчинів розчин А і Б.

Розчин А – 0,1 М розчин $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; розчин Б – 0,1 М розчин KH_2PO_4 . До 70 мл розчину А доливають 30 мл розчину В, рН доводять 7,2–7,4.

Фіксатор №2

Склад: 25 %-ий розчин глутаральдегіду – 8 мл; Розчин А – 32 мл

Фосфатний буфер (Моллонінга) готують із розчинів А і В. Розчин А – 5,1 %-ий розчин $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, розчин Б – 5,5 %-ий розчин NaOH .

При приготуванні фіксатора, його рН доводять до 7,3–7,4 шляхом доливання розчину Б і 50 мл дистильованої води.

Глутаральдегідний фіксатор на какодилатному буфері

Склад: 25 %-ий розчин глутаральдегіду – 4 мл; 0,2 М розчин какодилатного натрію.

Какодилатний буфер готують, розчиняючи у дистильованій воді 10,7 г какодилату натрію. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 250 мл. Додаючи до нього 1 М розчин HCl , доводять рН до 7,3–7,4 і доливають 50 мл дистильованої води.

Для промивання матеріалу після фіксації у глутаральдегіді можна використовувати какодилатний буфер при концентрації речовини 0,3 моль наступного складу (табл. 25).

Фіксація матеріалу досліджень

Шматочки матеріалу товщиною 1 мм занурюють піпеткою у виготовлений фіксатор глутаральдегіду на 2–4 год. Потім промивають у буферному розчині (табл. 25) 2–3 рази впродовж 10 хв. Після цього матеріал дофіксують 2 %-им розчином OsO_4 впродовж 1,5 год.

Таблиця 25. Склад какодилатного буферу

Компоненти	Молярність	Необхідна кількість, мл	Молярна концентрація після розведення до 100 мл
Какодилат	0,2	50	0,20
HCl	0,1	8	0,016
Цукроза	2,0	4,2	0,084
Вода	–	37,8	–

Зневоднення матеріалу для досліджень

Для повного видалення води із матеріалу і запобіганню руйнування клітин його проводять через етиловий спирт зростаючої міцності

Зневоднення матеріалу в етиловому спирті рекомендується проводити за наступною схемою:

50⁰ – 10 хв;

70⁰ – 10 хв;

Абсолютний спирт – 10 хв;

Абсолютний спирт (два рази замінити) по – 15 хв.

На заключному етапі зневоднення замість абсолютного етилового спирту можна використовувати абсолютний ацетон, (зневоднений мідним купоросом). Але при цьому слід пам'ятати, що він екстрагує значну кількість ліпідів.

Зневоднення і просочування матеріалу ущільнюючим середовищем необхідно здійснювати в одному і тому ж посуді. Для цього використовують конусоподібні пробірки або пеніцилінові флакони, об'єм яких повинен бути не більшим 10 см³.

При проведенні цих маніпуляцій розчин необхідно кожний раз виливати із флаконів, слідкуючи за тим, щоб не видалити матеріал. Оскільки завжди залишається частина попереднього розчину, то його рекомендується відбирати піпеткою, слідкуючи за тим, щоб у них не потрапив матеріал.

Ущільнення (залівка) матеріалу для досліджень

Після зневоднення матеріал необхідно ущільнити. Речовини, які використовують для цієї мети, повинні мати наступні властивості:

1. Мати достатньо низьку в'язкість у мономерному стані, яка необхідна для вільного просочування матеріалу.

2. Повністю змішуватися з речовиною, у якій проводилось зневоднення (етиловий спирт).

3. Мати постійний об'єм до і після полімеризації.

4. Бути зручними для виготовлення ультратонких зрізів із полімеризованого матеріалу.

5. Не впливати на якість зображення об'єкта.

6. Бути стійкими до електронного опромінення у полімеризованому стані.

Найкращими середовищами для залівки матеріалу є епоксидні смоли аралдит та епон, поліефірна смола вестопал і водорозчинні середовища аквон, глікометакрилат тощо. Серед них найбільш часто

використовують *аралдит*, якого існує декілька різновидів. Для полімеризації аралдиту використовують ущільнювач та каталізатор (табл. 26).

Таблиця 26. Речовини, які використовують для полімеризації аралдиту (А.Ф. Киселева та ін., 1983)

Назва	Еквівалент	Призначення
Аралдит CI 212	Аралдит 502	Смола для заливки
Додецил янтарного ангїдриду	HI 964 (раніше 964B) DDSA	Ущільнювач
Тридиметиламіно-метилфенол ¹	DI 064 (раніше 964C) DMP 30	Каталізатор
Бензилдиметиламін ¹	DI 062 BDMA	Каталізатор
Надикметиловий ангїрид 1,2 – епоксіпропан	NMA : MNA Оксид пропилену	Ущільнювач. Полегшує проникнення середовища для заливки

Примітка: ¹ – взаємозамінюючі речовини.

Заливка матеріалу в аралдит

Просочування в аралдиті проводять у кілька етапів з поступовим заміщенням етилового спирту аралдитом.

Готують суміш наступного складу:

Аралдит – 1 частина;
Ущільнювач HI 964 або 964B – 1 частина;
Етиловий спирт – 2 частини.

Спочатку аралдит і ущільнювач ретельно змішують упродовж 1 год і більше за допомогою магнітної мішалки при температурі +48⁰С. Потім додають етиловий спирт і знову ретельно перемішують.

Матеріал витримують у цьому розчині впродовж 1–6 год при температурі +48⁰С. Потім матеріал при тій же температурі переносять у чисту суміш аралдит-ущільнювач. Термін просочування у ній м'якого матеріалу – 2–3 год, твердого – 24 год.

Наступним етапом є проведення (2–3 рази) матеріалу через заключний розчин (при кімнатній температурі) наступного складу:

аралдит – 1 частина;
ущільнювач HI 964 – 1 частина;
каталізатор DI 064 – 2,5 %;
пластифікатор – 5 %.

Розчин з каталізатором і пластифікатором готують при кімнатній температурі. Ступінь його полімеризації залежить від ретельності перемішування складових компонентів і точного дотримання вказаних співвідношень. Посуд із середовищем для заливки ставлять на магнітну мішалку і перемішують упродовж 2 год. Потім у вакуумному термостаті відсмоктують пухирці повітря, які є у розчині (10–15 хв при тиску 98 кПа). Об'єкти можна заливати у желатинові або поліетиленові капсули, попередньо встановлені в дерев'яний штатив. Залежно від кількості об'єктів, розчином заповнюють необхідну кількість таких капсул. Дану операцію можна проводити за допомогою пастерівської піпетки, на широкому кінці якої закріплена гумова груша. Матеріал краще поміщати у капсули тоненькою паличкою із бамбука. Він поступово опускається на дно капсули. Полімеризація відбувається при температурі +48⁰С впродовж двох діб. Ступінь полімеризації необхідно періодично контролювати.

Заливка в аралдит за методом Б. Уиклі

Матеріал поміщають на 2–6 год у епоксипропан. Після цього його переносять у суміш для заливки на 2–34 год (при кімнатній температурі). Потім матеріал поміщають на 24 год у щойно приготовлене середовище для полімеризації (при температурі 60⁰С).

Існують два варіанти запропонованого методу:

Варіант I. Робочий розчин містить однакові об'єми аралдиту та ущільнювача. Їх необхідно ретельно змішати при температурі +50–60⁰С і звільнити від пухирців повітря, помістивши на 20–30 хв у вакуумний термостат. Цей розчин – стійкий і його можна зберігати при кімнатній температурі впродовж багатьох тижнів.

Склад середовища для заливки:

Робочий розчин – 20 мл;

Каталізатор – 0,4 мл;

Пластифікатор (дибутилфталат) – 0,6 мл.

Заливаючи матеріал у середовище, можна отримати блоки середньої твердості.

Варіант II. До складу робочого розчину входять 10 частин аралдиту і 7 частин ущільнювача.

Для приготування середовища для заливки необхідно змішати відповідний розчин із 1,5–2 %-им каталізатором.

При заливці матеріалу в це середовище одержують блоки середньої твердості. Для того, щоб блоки були більш м'які або тверді, необхідно змінити об'єм ущільнювача у запасному розчині.

Заливка матеріалу в епон

Заливку здійснюють у наступній послідовності: 1. Із абсолютного етилового спирту матеріал переносять у безводний ацетон (двічі по 15-20 хв). 2. Готують робочий розчин епону: на 100 мл смоли епон 812 додають 89 мл ущільнювача NMA, або 136 мл ущільнювача DDSA. 3. Переносять матеріал на 3–4 год у суміш: ацетон – робочий розчин у співвідношенні 1:1 і 1:2. 4. Готують розчин епону для заливки, додаючи до робочого розчину 1,5–2 %-ий розчин каталізатора ДМР-30. Розчин ретельно перемішують. 5. Заповнюють необхідну кількість капсул розчином для заливки і переносять у них матеріал, який самостійно через 10–30 хв опускається на дно. 6. Полімеризація.

Полімеризацію проводять за наступною схемою: а) впродовж 12 год при температурі $+35^{\circ}\text{C}$; б) впродовж наступних 12 год при температурі $+45^{\circ}\text{C}$; в) впродовж наступних 12 год при температурі $+60^{\circ}\text{C}$. Блоки можна різати уже наступної доби.

Отримання блоків різної щільності досягається зміною ущільнювачів. При використанні ущільнювача DDSA отримують м'які блоки, а при використанні NMA – щільні. У зв'язку з цим, запропоновано виготовляти два розчини. Перший із них складається з епону та ущільнювача DDSA, другий – із епону та ущільнювача NMA.

Для того, щоб одержати блоки середньої твердості, необхідно змішати 7 частин першого розчину і 3 частини другого. До кожних 10 мл цього розчину додають 0,2 мл каталізатора ДМР-30.

Заливка матеріалу у вестопап W

У вестопап рекомендується заливати твердий матеріал. Слід відмітити, що одержані блоки з цього середовища теж дуже тверді. У зв'язку з тим, що вестопап не розчиняється в етиловому спирті, матеріал для досліджень необхідно зневоднювати у розчинах ацетону висхідної концентрації. У 30 %, 50 і 75 %-их розчинах – по 15 хв, у 90 %-му розчині ацетону – 30 хв і в абсолютному ацетоні – 30 хв.

Для приготування даного середовища до вестопапу W додають 1 %-ий третинний бутилпарбензоат (ініціатор) та 0,5 %-ий нафтенат

кобальту (активатор). Ініціатор і активатор **заборонено змішувати** один з одним, так як їх суміш надзвичайно **вибухонебезпечна**.

Просочування матеріалу здійснюють за наступною схемою:

1. Безводний ацетон-вестопал W (3:1) – 30 хв.
2. Безводний ацетон-вестопал W (1:1) – 30 хв.
3. Безводний ацетон-вестопал W (1:3) – 30 хв.

Для заливки матеріал переносять у капсулу з вестопалом W. Полімеризація відбувається впродовж 12–24 год при температурі $+60^{\circ}\text{C}$.

Миття посуду

Скляний посуд, який використовують для проведення фіксації матеріалу, необхідно ретельно вимити. Для цього використовують розчин наступного складу:

- Біхромат калію – 100 г;
- Концентрований розчин H_2SO_4 – 250 мл;
- Вода дистильована – 750 мл.

При виготовленні розчину, сірчану кислоту необхідно додавати до водного розчину біхромату калію, а не навпаки. Термін перебування посуду у розчині становить 1–2 доби. Після цього посуд необхідно ретельно відмити від кислоти і залишити на деякий час у дистильованій воді. Посуд, у якому знаходилися ущільнюючі середовища, звільняють від них, так як вони не розчиняються у розчинниках. Після цього його мийуть в етиловому спирті або ацетоні, а потім промивають дистильованою водою.

Ультрамiкротомування

Для отримання якісних ультратонких зрізів велике значення має підготовка блоків. Якщо розміри залитих у смолу матеріалу більші, ніж ріжуча поверхня скляного ножа, то це не дозволяє отримати якісні зрізи. Крім цього, при виготовленні зрізів з великої поверхні створюється додаткова вібрація, яка впливає на їх якість. У межах залитого матеріалу виділяють окремі ділянки, які необхідно досліджувати у першу чергу. Це потребує попереднього загострення блоків.

Загострюють блоки за допомогою лез для гоління, використовуючи для контролю мікроскопи МБС–9, МБС–10. Блок вставляють у тримач і закріплюють його в ньому так, щоб 1/3 його залишалася зверху.

Акуратно зрізають желатинову капсулу і під кутом 45° до довгої осі загострюють блок у формі чотирьохгранної піраміди з плоскою вершиною (рис. 62). Висота піраміди повинна становити не менше 2–3 мм. Вона є опорою для зрізаної поверхні і запобігає вібрації блоку.

Якщо структура матеріалу не потребує попередньої орієнтації для визначення точної ділянки ультратомування, то в такому випадку вершину піраміди слід зробити мінімальною. Дві сторони піраміди повинні бути паралельні, і одна – більша іншої, а бокові грані – розміщуватись від кутом $60\text{--}70^\circ$ (рис. 62).

Якщо структура матеріалу не однорідна, то вибір ділянки для ультрамікротомування найчастіше встановлюється на напівтонких (до 1 мкм) зрізах, зроблених з поверхні всього препарату.

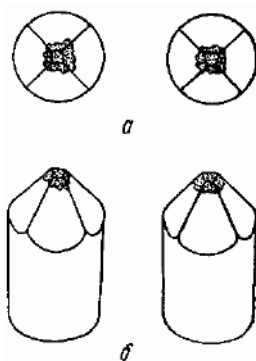


Рис. 62. Блоки загострені для ультратонкого нарізання:
а – вигляд зверху; б – вигляд збоку
(А.Ф. Кисельова та ін., 1983).

Технологія виготовлення скляних ножів

Для ультрамікротомування використовують, переважно, скляні ножі. Найбільш зручними із них є ножі, виготовлені із дзеркального скла товщиною 4–6 мм, яке не має внутрішніх дефектів і не потребує при розколюванні значних фізичних зусиль. Зі сторони ребра таке скло повинно мати світло-зелений або жовтуватий відтінок. Але єдиним надійним критерієм якості скла є його ріжуча здатність.

Скляні ножі використовують для ультрамікротомування відразу ж після їх виготовлення і до тих пір, поки не зруйнується їх ріжучий край.

Для того, щоб зламати скло, необхідно мати роликівий склоріз, спеціальні плоскопаралельні щипці, лінійку.

Відібране скло ретельно миють, споліскують дистильованою водою і висушують. Після висушування його ріжуть на прямокутні або квадратні кусочки відповідних розмірів, з яких виготовляють ножі. Запропоновано декілька способів виготовлення ножів. Найбільш розповсюдженим із них є спосіб виготовлення ножів вручну. Він має два варіанти.

Варіант перший. Скляну пластинку 20 x 20 см розколюють на смужки довжиною 20 см і шириною 2,5 см. Для цього по середині протилежних сторін пластинки роблять короткі (2–3 см) насічки склорізом. Під насічками з двох сторін кладуть сірники і натисканням на кінці скла його розколюють. Більша частина розколу скла повинна бути гладенькою, не мати поздовжніх смуг і зазублин. Половину пластинки, що залишилася, розколюють аналогічно. Так отримують вісім скляних смужок. При цьому шість скляних смужок мають двосторонні гладенькі робочі поверхні, які придатні для виготовлення ножів. Потім береться така смужка і на відстані 2,5 см від її торцевої грані роблять надріз довжиною 10 мм. Смужку скла кладуть горизонтальною поверхнею на стіл таким чином, щоб край скла з надрізом мав випуск. За допомогою плоскопаралельних щипців (плоскогубців) здійснюють відколювання торцевої ділянки скла. Потім здійснюють наступний надріз таким чином, щоб отримати квадрат 2,5x2,5 см. Розмір такого надрізу становить 4–6 мм. Квадрат відколюють і з нього виготовляють ніж. Необхідно слідкувати за тим, щоб відколювання скла відбувалось строго в горизонтальній площині.

Варіант другий. Квадратне скло, довжина сторін якого має 10 см, розколюють навпіл; половинки знову розколюють навпіл, і так – до тих пір, доки не отримають квадрати, довжина сторін яких становитиме 2,5 см. Із кожного такого кусочка, розколовши його по діагоналі, отримують один скляний ніж. Для того, щоб легко розколоти скло, від його краю за допомогою склорізу роблять короткий прямий надріз. Для першого розлому такий надріз довжиною 1,25 см проводиться по лінійці склорізом під прямим кутом до краю скла та рівно посередині однієї із його сторін. Потім щипцями, рівномірно і повільно посилюючи тиск, надавлюють на місце надрізу (рис. 63, А). Для отримання прямого розлому, необхідно стежити за тим, щоб передній край щипців розміщувався перпендикулярно лінії надрізу. Поступове рівномірне натискання забезпечує повільний регульований розкол. Скло повинне розколотися на дві рівні частини.

За цим методом виготовлення ножів краї вільного розколу більш гладенькі порівняно з краями розколу, який іде за надрізом (рис. 63, Б). Якщо надріз зроблений через усе скло, від одного краю до іншого, то в такому разі розкол пройде за лінією надрізу. При цьому по краям розколу будуть маленькі зазублини від самого склорізу.

Наступні розколи скла роблять таким же чином, до отримання квадратних кусочків зі стороною 2,5 см. Здійснюючи кожний розкол, необхідно переконатись у тому, що сторона скла з «вільним розколом» розміщена напроти щипців (рис. 63, В). Отже, всі квадратики скла, отримані таким методом, будуть мати не менше двох гладеньких сторін під прямим кутом.

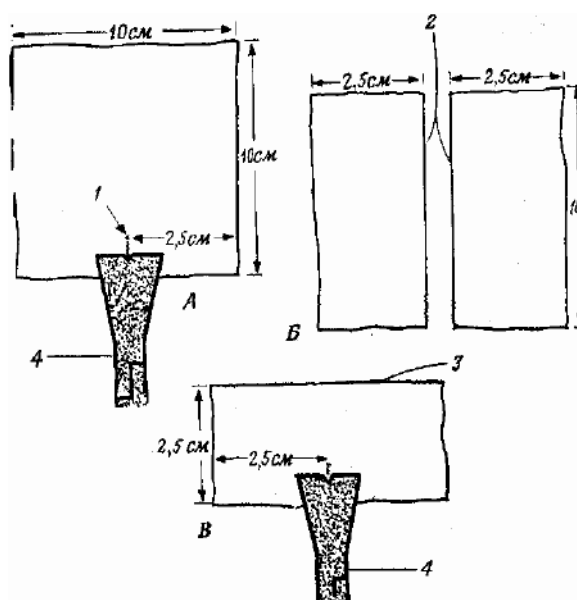


Рис. 63. Виготовлення квадратних кусочків скла зі стороною 2,5 см.

А. Положення щипців за первинного розколу скла. Б. Отримання «вільного розколу» при виготовленні скляних ножів. В. Положення щипців при наступних розколах скла. 1 – лінія надрізу; 2 – місце вільного розколу; 3 – поверхня вільного розколу на стороні, протилежній щипцям; 4 – щипці.

Виготовити квадратне скла зі стороною, рівною 2,5 см, відносно просто. Значно складніше отримати придатний для роботи ніж, розколовши такий квадрат по діагоналі. Навіть незначне відхилення надрізу від діагоналі квадрату призводить до порушення форми краю ножа. Теж саме відбувається, якщо щипці розміщуються не чітко по діагоналі і не по центру надрізу.

Діагональний розкол здійснюють за допомогою щипців по надрізу, який проводять лінійкою, відступаючи приблизно на 1 мм від

«чистого кута» квадрату (рис. 64, А). Передній край щипців слід встановити приблизно посередині довжини надрізу (рис. 64, Б). Потім ними повільно і поступово відколують скло. У результаті цього, останнього, розколу ми отримуємо два кусочки скла, один із яких має гострий ріжучий край і буде слугувати ножем, інший бракується (рис. 64, В).

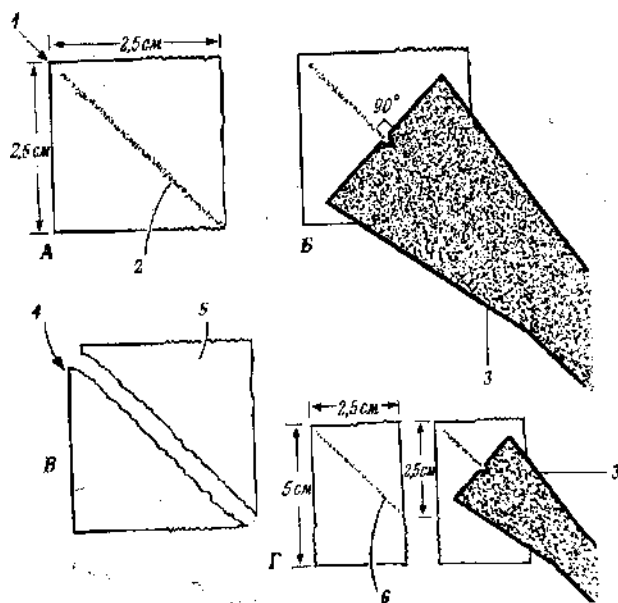


Рис. 64. Виготовлення ножа із квадратного кусочка скла зі стороною 2,5 см: А. Положення лінії надрізу. Б. Положення щипців. В. Нож, отриманий після розколу, вигляд з боку. Г. Положення останнього діагонального надрізу при використанні прямокутних кусочків скла. 1 – «чистий кут»; 2 – лінія надрізу; 3 – щипці; 4 – ріжучий край ножа; 5 – частина, яка бракується; 6 – лінія надрізу.

Оцінка якості скляного ножа

Якість скляних ножів контролюють під мікроскопом. Для цього, цілком достатньо 20-кратне збільшення. Велике збільшення (до 400 разів) необхідне у тих випадках, коли потрібно отримати найбільш тонкі зрізи для досліджень. Край якісного ножа повинен бути тоненьким і прямим, та не повинен мати зазублин і нерівностей. Ні на передній, ні на задній стороні ножа не має бути ліній надрізу, які ідуть вгору під напрямком до ріжучого краю.

Оцінка якості ножа показана на рис. 65.

Для ультрамікромінування виготовляють декілька ножів, які використовують протягом робочого дня. Їх зберігають у вертикальному положенні у спеціальному тримачі. За його відсутності ножі приклеюють пластиліном у чашці Петрі.

Маленький шип Великий шип

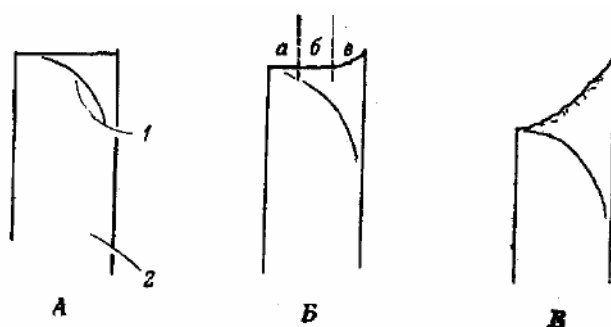


Рис. 65. Оцінка скляного ножа. А. Майже ідеальний ніж. Б. Придатний для різання ніж з невеликим шипом: а – ділянка, яка повинна бути використана для різання; б – ділянка, яка використовується для попереднього обрізання блоків; в – зазубрена ділянка. В. Непридатний для різання ніж з великим шипом. 1 – лінія тиску; 2 – лицева сторона ножа.

Ножі, які зберігаються більше однієї доби, не придатні для отримання ультратонких зрізів, їх можна використовувати тільки для виготовлення напівтонких (до 1 мкм) зрізів. Перед тим, як встановити ніж на мікротомі, на нього необхідно закріпити ванночку для зрізів. Її роблять із смужок вузького лейкопластиру (25–30 мм). Шматочки лейкопластиру наклеюють таким чином, щоб верхній край смужки був не вище леза ножа і становив з ним кут 90° . Нижню частину лейкопластиру заливають розплавленим парафіном або воском. Зразки моделей ванночок для скляних ножів показані на рис. 66. При закріпленні ванночок слідкують, щоб не пошкодити лезо ножа парафіном (воском) або лейкопластиром.

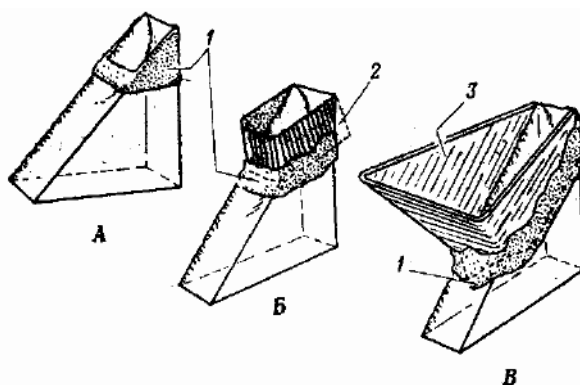


Рис. 66. Ванночки для скляних ножів. А. Ванночка для зрізів товщиною 1 мкм: на ніж наноситься товстий шар воску. Б. Ванночка для ультратонких зрізів, виготовлена із смужки. В. Металева ванночка для ультратонких зрізів; 1 – віск; 2 – шматок смужки, який відрізається; 3 – металева ванночка.

Алмазні ножі. Вперше для ультрамікротомії застосував алмазні ножі Fernandes-Moran Н. (1953). Термін використання алмазного ножа значно довший, ніж скляних. Такі ножі більш придатні для різання твердого матеріалу. Затуплені алмазні ножі можна гострити, і тому вони можуть бути придатними впродовж кількох років. Але висока вартість цих ножів перешкоджає їх широкому застосуванню.

Технологія виготовлення зрізів

Виготовлення напівтонких (до 1 мкм) зрізів. Напівтонкі зрізи виготовляють для попереднього перегляду залитих зразків матеріалу і вибору в них найбільш придатної ділянки для виготовлення ультратонких зрізів. Крім того, їх використовують для дослідженні матеріалу гістохімічними або цитохімічними методами.

Матеріали: 10 %-ий розчин ацетону, приготовлений на дистильованій воді; два шприци з довгою голкою (для наливання і відбору рідини із ванночки); флакончик для злиття розчину ацетону, відібраного із ванночки; спиртівка; яєчний білок; тоненький пензлик; чисті предметні стекла.

Для отримання напівтонких зрізів загострюють блок, захопивши усю поверхню об'єкта. Блок встановлюють у тримач мікротому. Ніж закріплюють з вертикальним кутом нахилу – 47° . У ванночку наливають 10 %-ий розчин ацетону. Ручною подачею підводять об'єкт до ножа або навпаки, спостерігаючи за тим, щоб сторона поверхні об'єкту була паралельною до ножа. Встановлюють на мікротомі автоматичну подачу (за направленням до ножа) – 1 мкм. Після кожного підймання і опускання блока виготовляються зрізи товщиною 1 мкм, які попадають у ванночку з 10 % ацетоном. Зрізи із ванночки тоненьким пензликом переносять у краплю ацетону, яка попередньо нанесена на предметне скло. Для випаровування розчину ацетону скло (швидко) проводять 10–15 разів над полум'ям спиртівки. При цьому зрізи щільно приклеюються до скла. Можна приклеїти зрізи й іншим способом. Для цього предметне скло вкривають тонким шаром яєчного білка. Наносять на нього краплю води, в яку переносять зрізи. Висушують на столику з підігрівом. Після цього зрізи фарбують для дослідження за допомогою світлового мікроскопа. Наводимо найбільш простий метод фарбування зрізів.

На зріз, який знаходиться на предметному склі, наносять 2 краплі 1 %-го водного розчину метиленової синьки і 2 краплі 1 %-го

водного розчину бури. Проводять скло 10–12 разів над полум'ям спиртівки, не допускаючи закипання розчину барвника. Потім обережно промивають під струменем теплої водопровідної води, висушують і розглядають під мікроскопом.

Виготовлення ультратонких зрізів

Матеріали: 10 %-ий розчин ацетону, приготовлений на дистильованій воді; два шприци з довгою голкою (для наливання і відбору рідини з ванночки); флакон для злиття розчину ацетону відібраного з ванночки; флакон з хлороформом, у корок якого встановлена скляна або дерев'яна паличка; вія, закріплена на кінці сірника воском або парафіном (для маніпуляцій із зрізами, які містяться на поверхні розчину ацетону у ванночці); два тоненько загострених пінцети для захоплення сіточок; дві чисті чашки Петрі з покладеним на дно фільтрувальним папером для розташування опорних сіток; кілька контейнерів для зберігання опорних сіток з нанесеними на них зрізами.

Міцно закріплюють блок у тримачі, а тримач – на мікротомі та усувають можливі джерела вібрації.

Ніж закріплюють, встановивши кут нахилу від 3 до 7⁰ (кут утворює передня сторона ножа з вертикальною площиною). Перевіряють паралельність ножа і лівої поверхні блоку. Необхідно уникнути отримання перших товстих зрізів, так як це може зіпсувати ріжучу частину ножа. Коротку сторону блоку розміщують паралельно краю ножа. У ванночці з 10 %-им розчином ацетону встановлюють оптимальний рівень меніску. Високий меніск призводить до того, що ацетон стікатиме по краю ножа і тоді його необхідно замінити. При низькому меніску зрізи не будуть потрапляти на поверхню рідини.

На якість зрізів впливає швидкість руху блока відносно нерухомого ножа. Підбирають її, враховуючи щільність матеріалу та необхідну товщину зрізів. Для отримання зрізів товщиною 40– 80 нм використовують повільний, рівномірний темп руху блока, а для виготовлення більш тонких зрізів – швидкий. Якщо відбувається зжимання зрізів, то ніж слід замінити на гострий. Але зжаті зрізи можна частково виправити, якщо над ними потримати скляну паличку, змочену хлороформом. Сліди вібрації на зрізах у вигляді горизонтальної посмугованості, крім раніше вказаних причин, можуть бути зумовлені занадто великим кутом нахилу ножа або тим, що блок – не загострений у формі правильної піраміди.

Електронна мікроскопія

Визначення товщини зрізів. Після того, як зрізи розрівнялися, можна приблизно визначити їх товщину за кольором у відбитому світлі (табл. 27; 28).

Таблиця 27. Характеристика зрізів для трансмісійної електронної мікроскопії

Колір зрізу	Товщина зрізу, <i>нм</i>	Оцінка зрізу
Сірий	49	Придатні для роботи, що потребує високої роздільної здатності
Сріблясто-сірий	64	
Сріблястий	64-92	Придатні для звичайної роботи
Сріблясто-золотистий	125	
Золотистий	125-128	
Червонувато-золотистий	135-166	Зрізи проглядаються в електронному мікроскопі, але роздільна здатність знижена
Пурпуровий	200	
Синій	230	
Жовтий	264	
Жовто-зелений	278	

Таблиця 28. Характеристика зрізів для трансмісійної електронної мікроскопії

Колір зрізу	Товщина зрізу, <i>нм</i>
Сріблясто-сірий	50-60
Сріблястий	60-90
Золотистий	90-120
Темно-золотистий	120-150
Пурпуровий	150-190
Блакитний	190-240
Зелений	240-280

Найбільш придатними для дослідження при високій роздільній здатності є зрізи товщиною 50–90 *нм*, для роботи при меншій роздільній здатності – товщиною 90–150 *нм*.

Підготовка опорних сіток. Мідні опорні сітки, які випускаються для електронної мікроскопії, і які надходять у реалізацію, забруднені і потребують попереднього очищення. Для цього їх поміщають на 2–3 *хв* у концентрований розчин соляної кислоти, потім ретельно промивають у воді, етиловому спирті, ацетоні і висушують у захищеному від пилу місці. Якість очищення сіток контролюють за допомогою світлового мікроскопа (при великому збільшенні).

Виготовлення плівок-підкладок. Перед тим, як розмістити на опорні сітки надзвичайно тонкі зрізи (50–80 *нм*) на них слід нанести

плівки-підкладки. Товщина таких плівок не перевищує 20 нм. Вони прозорі і не збільшують кутового розсіювання електронів. При дослідженні більш товстих зрізів, на опорні сітки плівки-підкладки не наносяться. У цьому разі їх роль виконує ущільнююче середовище, в яке залитий об'єкт.

Серед плівок найпоширенішими є колодієві (нітроцелюлозні), формварові (полівінілформаль) та вуглецеві.

Колодієву плівку готують наступним чином. Спочатку готують 0,5 %-ий розчин колодію в амілацетаті, який зберігають у закритому посуді. У розчин занурюють у вертикальному положенні предметне скло. Після цього його виймають і дають можливість стекти надлишку колодію з нього на фільтрувальний папір. Скло підсушують упродовж 10 хв, тримаючи його у вертикальному положенні. Потім у чашку діаметром 20 см наливають дистильовану воду. Очищають поверхню води від частинок пилу. Для цього у воду добавляють кілька крапель 2 %-го розчину колодію на амілацетаті. Розчинник поступово випаровується, і на поверхні води утворюється тонка плівка з колодію, яка адсорбує частинки пилу. Після цього плівку знімають препарувальною голкою з поверхні води. Лезом бритви підрізають колодієву плівку на краю скла. Скло під кутом 30° повільно занурюють у чашку з дистильованою водою. У воді плівка колодію відділяється від скла.

Товщину плівки визначають за її кольором. Сама тонка плівка має сірий або сріблясто-сірий колір, товста плівка – золотистий колір. На тонку плівку кладуть очищені сітки. Їх необхідно класти однією поверхнею – матовою або відполірованою. Кожну сітку необхідно легенько притиснути до плівки пінцетом. Після цього на плівку з сіткою поміщають шматочок паперу (безворсинчастий), підіймають його і витягують з води разом з сіткою і плівкою та поміщають у чашку Петрі та висушують.

Технологія виготовлення плівок із формвару така сама, як із колодію. Для цієї мети використовують 0,3–1 %-ий розчин свіжого формвару на дихлоретані або хлороформі. Плівки із формвару міцні, їх товщину можна регулювати зміною концентрації формвару.

Перенесення зрізів на опорні сітки. Після скупчення у ванночці ножа кількох зрізів, їх переносять на опорну сітку. Для цього опорну сітку беруть тонким пінцетом і опускають на зрізи. Якщо зрізи плавають по одному, їх попередньо збирають вією в одне місце і розміщують у певній послідовності. Сітку знімають з поверхні рідини разом зі зрізами і краплею розчину. Їх повертають так, щоб крапля була зверху. Знизу під сітку підводять край фільтрувального паперу і

звільняють від розчину. При цьому зрізи щільно розташовуються на поверхні сітки.

Фарбування ультратонких зрізів

Як ми відмітили вище, зображення об'єкта досліджень у електронному мікроскопі формується за рахунок розсіювання електронів, внаслідок проходження їх через різні за щільністю його ділянки. Більшість хімічних елементів, які входять до складу тканин об'єкта, мають невелику відносну атомну масу і тому не можуть забезпечити достатнє розсіювання електронів, щоб сформувати на люмінісцентному екрані зображення. Слід відмітити, що фіксація матеріалу в O_5O_4 забарвлює тканини і збільшує контрастність зображення. Але O_5O_4 взаємодіє, в основному, з ліпідами і білками, тому інші структури не контрастуються нею. У зв'язку з цим для формування у тканинних структурах додаткової щільності використовують солі важких металів (уран, свинець, вісмут тощо), які утворюють комплекси з негативно зарядженими групами тканинних структур (*табл. 29*). Найбільш часто для цього використовують солі свинцю і урану.

Для фарбування препаратів використовують смужку із органічного скла з невеликими заглибинами. У кожену таку заглибину наливають барвник і поміщають у нього сітку (зрізами вниз). Для запобігання доступу повітря смужку скла накривають товстим склом. Для фарбування можна використовувати також зубопротезний віск або парафін. У них роблять заглибини і поміщають у чашку Петрі, яку тримають закритою впродовж усього періоду фарбування.

Методика фарбування зрізів цитратом свинцю

Метод фарбування зрізів цитратом свинцю є одним із найпоширеніших способів свинцевого контрастування. Він забезпечує чисте та чітке виявлення клітинних структур і за умови дотримання необхідних запобіжних заходів не супроводжується утворенням осаду.

Склад барвника:

нітрат свинцю – 1,33 г;
цитрат натрію $Na_3(C_6H_5O_2)$ – 1,76 г;
дистильована вода – 30 мл.

Приготування барвника. В колбу ємністю 50 мл наливають дистильовану воду і додають нітрат та цитрат свинцю і залишають на 30 хв, періодично струшуючи, щоб бути впевненим у повному переході усього нітрату свинцю у цитрат. Потім додають 8 мл 1 М розчину NaOH і доводять об'єм розчину до 50 мл дистильованою водою. Розчин перемішують, струшуючи колбу.

Значення рН барвника повинно бути 12 ± 1 . Барвник стійкий упродовж 6 місяців; вважають, що при цьому відбувається його «дозрівання». Термін фарбування – 5–30 хв. Сітки промивають перед і після фарбування у 0,02 М розчині NaOH, а потім – дворазово тоненькою цівкою дистильованої води.

Методика ефективного подвійного фарбування при звичайних лабораторних дослідженнях

Сітки переносять у 2 %-ий водний розчин ураніацетату на 15 хв або 2 %-ий розчин ураніацетату на 70⁰ етиловому спирті – на 10 хв. Після цього пінцетом беруть за край сітки і багаторазово опускають її у дистильовану воду (до 50 разів). Відбирають фільтрувальним папером залишки води. Обережно (швидко) промивають сітки 0,02 М розчином NaOH. Фарбують цитратом свинцю за методом Рейнольдса при кімнатній температурі. Знову промивають 0,02 М розчином NaOH. Промивають дистильованою водою. Тримавши сітку за край пінцетом, багаторазово (50–100 разів) опускають її у воду. Висушують фільтрувальним папером і зберігають у спеціальних контейнерах для сіток.

Цей метод застосовують для контрастування більшості тканин, але є і більш специфічні методи, які дозволяють вибірково виявляти внутрішньоклітинні структури. Це виявлення РНК-вмістимих структур, полісахаридів, глікопротеїдів тощо.

**Таблиця 29. Важкі метали, які застосовують у електронній мікроскопії
для збільшення контрасту**

Назва	Відносна атомна маса	Розчин для фарбування	Концентрація	Середовище	Групи, які реагують з барвником	Вплив на контраст зображення, ступінь збільшення контрасту
Осмій	190	OsO ₄ , забарвлює у процесі фіксації	1 %	Водні буферні розчини	C-S і полярні групи ліпідів; SH-групи білків	Білки +, ліпіди (фосфоліпідні мембрани, ліпідні включення, секретини) ++
Уран	238	Уранілацетат	1-2 % водний розчин, насичений розчин у 50 % етиловому спирті	Вода, 50 ⁰ етиловий або метиловий спирт	PO ₄ -групи нуклеїнової кислоти, а також білки	Нуклеїнова кислота (хроматин, рибосоми) +++, білки ++
Свинець	207	Свинець при високих значеннях рН і в наявності хелатоутворюючих агентів	Приблизно 1 %	Вода з додаванням стабілізуючих речовин та лугів	Відновлений осмій. OH-групи вуглеводів, РНК	Ліпопротеїдні мембрани +++, білки +, глікоген ++, рибонуклеопротеїд +++
Вольфрам	184	Фосфорновольфрамова кислота при рН 3 і вище. Фосфорновольфрамова кислота при рН 3 і нижче.	1 % 1 % в етанолі, 5 % у воді	Соляна або хромова кислота Абсолютний етанол або вода	Полісахариди і глікопротеїди (ОН – групи). Білки і нуклеопротеїди	Імітує реакцію ШІК Забарвлює білки, особливо колаген

Методика виявлення РНК-вмістних структур

Матеріал фіксують у глутаральдегіді впродовж 1 год і заводять в епон або глікольметакрилат.

Схема фарбування зрізів матеріалу, залитого в епон:

1. Поміщають зрізи у 5%-ий водний розчин ураніацетату – 1 хв.
2. Промивають їх у дистильованій воді.
3. Поміщають зрізи в 0,2 М розчин етилендіамінтетраоцтової кислоти – 30 хв.
4. Промивають у дистильованій воді.
5. Фарбують зрізи цитратом свинцю за методом Рейнольдса – 1 хв.

Схема фарбування зрізів матеріалу, заведеного у глікольметакрилат:

Перед розміщенням зрізів сітка повинна бути вкрита формваром або колодієвою плівкою.

1. Поміщають зрізи в 0,5 %-ий водний розчин ураніацетату – 1 хв.
2. Промивають їх у дистильованій воді.
3. Поміщають зрізи в 0,2 М розчин етилендіамінтетраоцтової кислоти на дистильованій воді при рН 7,0 – 1–2 хв.
4. Промивають їх у дистильованій воді.
5. Фарбують зрізи цитратом свинцю за методом Рейнольдса – 1 хв.

Це так зване «регресивне фарбування», при якому хроматин «відбілюється» під дією етилендіамінтетраоцтової кислоти, тоді як структури, які містять РНК, залишаються зафарбованими.

Методика підготовки матеріалу для сканувальної електронної мікроскопії

Підготовка матеріалу для сканувальної електронної мікроскопії є важливим етапом морфологічного дослідження, від якого залежить збереження природного рельєфу поверхні об'єкта та інформативність отриманих зображень. На відміну від трансмісійної електронної мікроскопії, при сканувальній мікроскопії досліджують переважно поверхневу організацію зразків. Методика спрямована на максимальне збереження просторових взаємовідношень структур збереження природної ультраструктурної організації поверхні та отримання інформативних мікрофотографій.

Відбір і фіксація матеріалу для досліджень

Матеріал для дослідження відбирають швидко для попередження автолізу та постмортальних змін.

Шматочки тканини повинні бути невеликих розмірів (приблизно 1–2 мм товщиною), що забезпечує швидке та рівномірне проникнення фіксуючих розчинів. При дослідженні поверхневих структур допускається використання фрагментів із природною поверхнею без попереднього зрізання.

Первинну фіксацію здійснюють у розчині глутаральдегіду 2,5 % на 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,2–7,4). Фіксацію проводять при температурі 4 °С протягом 2–4 год (*див. ст. 285*). Метою цього етапу є стабілізація білкових структур, пригнічення ферментативних процесів і збереження мікрорельєфу поверхні. Після первинної фіксації матеріал ретельно промивають 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,2–7,4) у 2–3 змінах по 10–15 хв для видалення залишків фіксатора, що можуть спричиняти утворення артефактів. Після цього матеріал дофіксують 1 % розчином OsO₄, приготовленому на тому самому фосфатному буфері (0,1 М; рН 7,2–7,4), протягом 1–2 год при температурі 4 °С. Осмії фіксує ліпідні компоненти біологічних мембран, підвищує контрастність і додатково стабілізує поверхневі структури.

Зневоднення матеріалу для досліджень

Зневоднення матеріалу здійснюють шляхом послідовного проведення зразків через спирти зростаючої концентрації. Тривалість експозиції на кожному етапі становить 10–15 хв. На завершальному етапі як перехідну рідину використовують абсолютний ацетон.

Сушіння

Зразки матеріалу повинні бути обов'язково сухими, щоб бути сумісними з вакуумом мікроскопа, оскільки сканування поверхні здійснюється електронним пучком в умовах високого вакууму. Наявність молекул води порушуватиме вакуум і, відповідно, зображення. Це також призведе до великої деформації або руйнування структур при дослідженні безпосередньо під електронним мікроскопом.

Для збереження природної просторової організації об'єкта застосовують метод сушіння у критичній точці (*critical point drying*), який попереджує дію поверхневого натягу і деформацію тканин. За відсутності відповідного обладнання допускається вакуумне

висушування, однак воно може супроводжуватися частковими артефактами. Для автоматизації цього етапу підготовки зразків може використовуватися, наприклад, установка Leica EM CPD300 – автоматична система сушіння в критичній точці.

Монтаж зразка

Висушені об'єкти закріплюють на металевих предметних столиках (стабах) за допомогою провідних вуглецевих клеїв або двобічних вуглецевих стрічок. Після цього необхідно забезпечити надійний електричний контакт зразка з основою для ефективного відведення електричного заряду.

Напилення провідного шару

Оскільки біологічні об'єкти є діелектриками, їх поверхню покривають тонким провідним шаром металу (золота, платини, паладію або сплаву золото–паладій) у вакуумній камері методом іонного або катодного напилення. Металізація запобігає накопиченню електричного заряду, підвищує якість сигналу та контрастність зображення.

Дослідження у мікроскопі

Підготовлений зразок поміщають у камеру сканувального електронного мікроскопа, вторинні та відбиті електрони, що виникають унаслідок взаємодії пучка з поверхнею, реєструються детекторами і перетворюються у зображення рельєфу.

Отже, принцип підготовки матеріалу для трансмісійної і сканувальної електронної та світлової мікроскопіє майже однаковий, проте є ряд відмінностей (*табл. 24*).

Електронна мікроскопія

Таблиця 24. Відмінності в підготовці матеріалу для світлової та електронної мікроскопії

№ п/п	Обробка	Для світлового мікроскопу	Для трансмісійного мікроскопу	Для сканувального мікроскопу
1	Фіксація	Формалін, етанол, різноманітні суміші.	Глутаральдегід або суміш глутаральдегіду та осьмієвої кислоти (OsO ₄).	Глутаральдегід (для постфіксації часто використовують тетраоксид осмію (OsO ₄)).
2	Зневоднення	Ряд розчинів етанолу зростаючої міцності.	Ряд розчинів етанолу зростаючої міцності.	Ряд розчинів етанолу або ацетону зростаючої міцності.
3	Заливка	Парафін, целоїдин, желатин.	Епоксидні смоли (аралдит, епон).	Не використовують (матеріал після зневоднення піддають сушінню).
4	Виготовлення зрізів	Мікротомом. Зрізи товщиною 5-10 мкм і більше.	Ультрамикротом. Зрізи товщиною 10-20 нм.	Не проводять (досліджують поверхню зразка, закріплюючи його на предметному столику).
5	Забарвлення	Кольорове.	Чорно-біле.	Зображення поверхні.

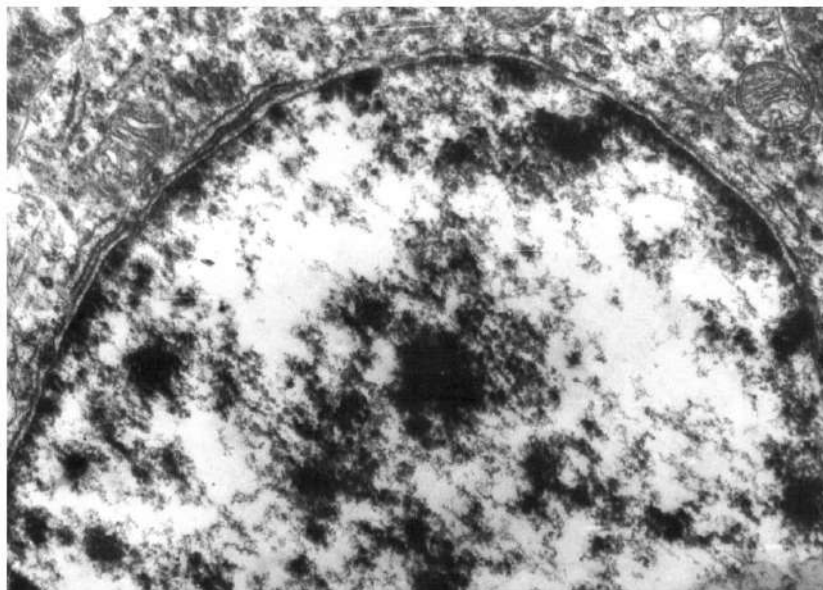


Рис. 67. Трансмійна електронна мікрофотографія частини мотонейрону спинного мозку курки свійської. X 10000.
Препарат Л.П. Горальського.

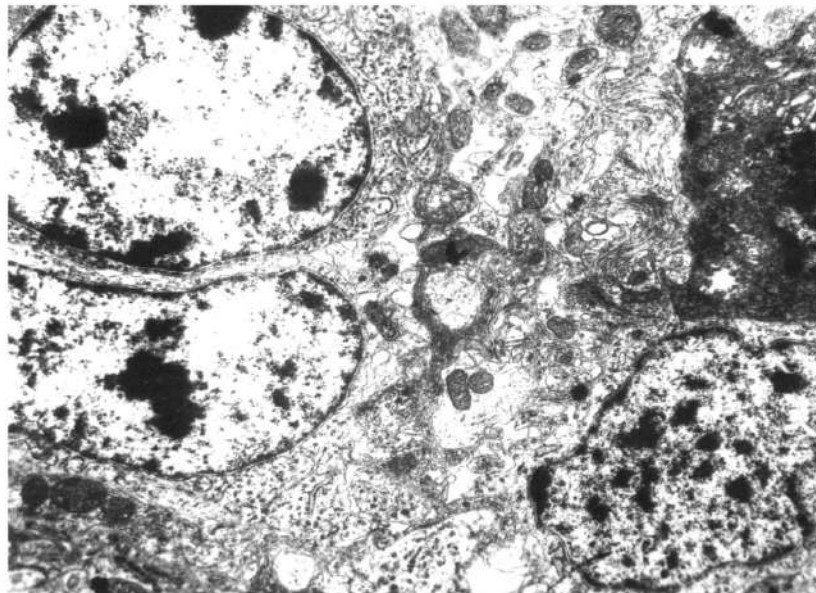


Рис. 68. Трансмійна електронна мікрофотографія нейрон-гліального комплексу у спинному мозку курки свійської. X 3000.
Препарат Л.П. Горальського.

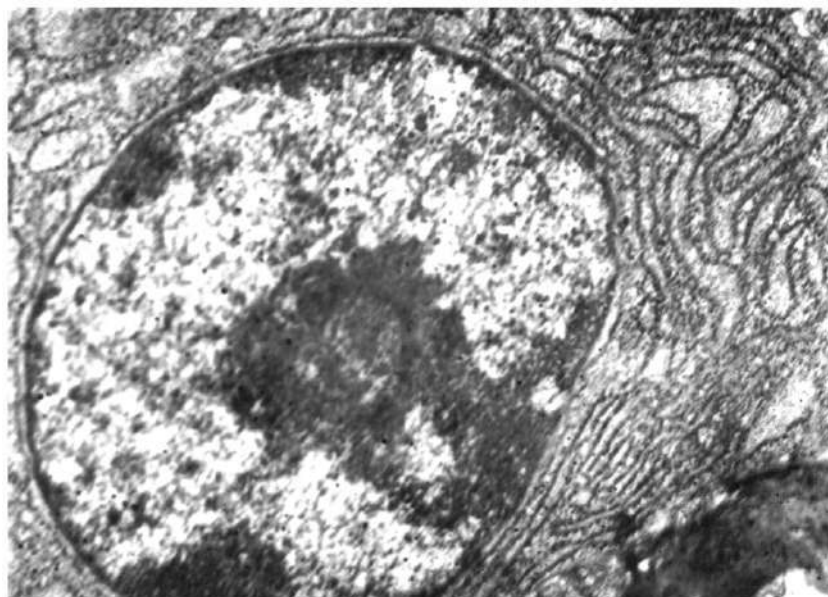


Рис. 69. Трансмiсійна електронна мікрофотографія мотонейрону спинного мозку курки свійської. X 10000.
Препарат Л.П. Горальського.

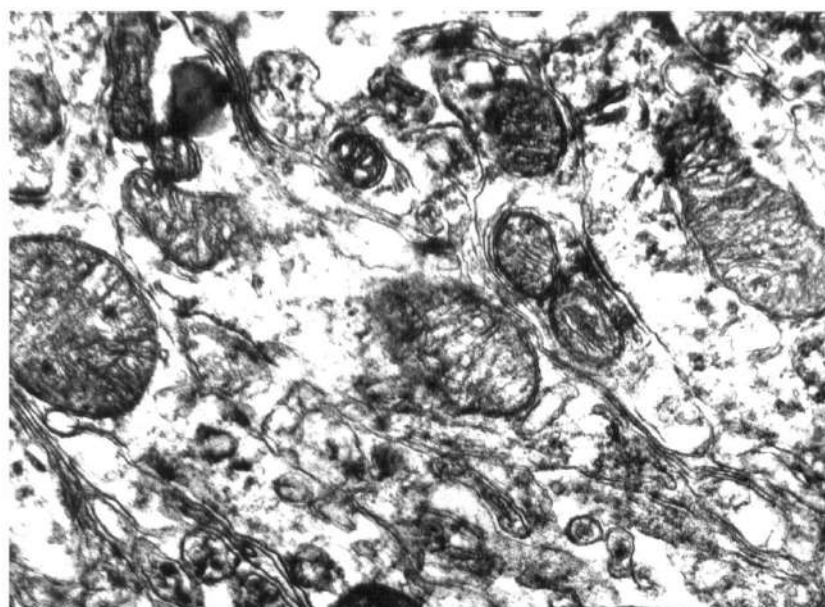


Рис. 70. Трансмiсійна електронна мікрофотографія мітохондрій нейронів спинного мозку курки свійської. X 13000.
Препарат Л.П. Горальського.

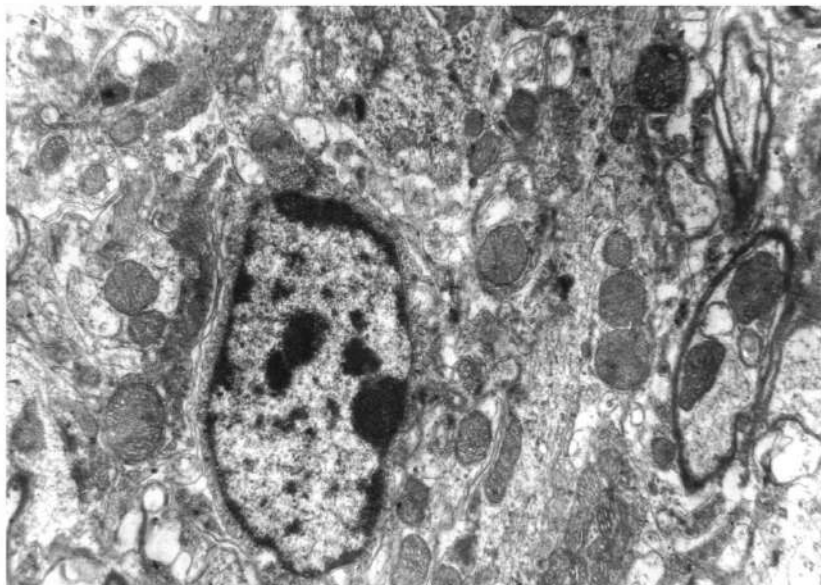


Рис. 71. Трансмiсійна електронна мікрофотографія мотонейрону спинного мозку курки свійської. X 7000. Препарат Л.П. Горальського.

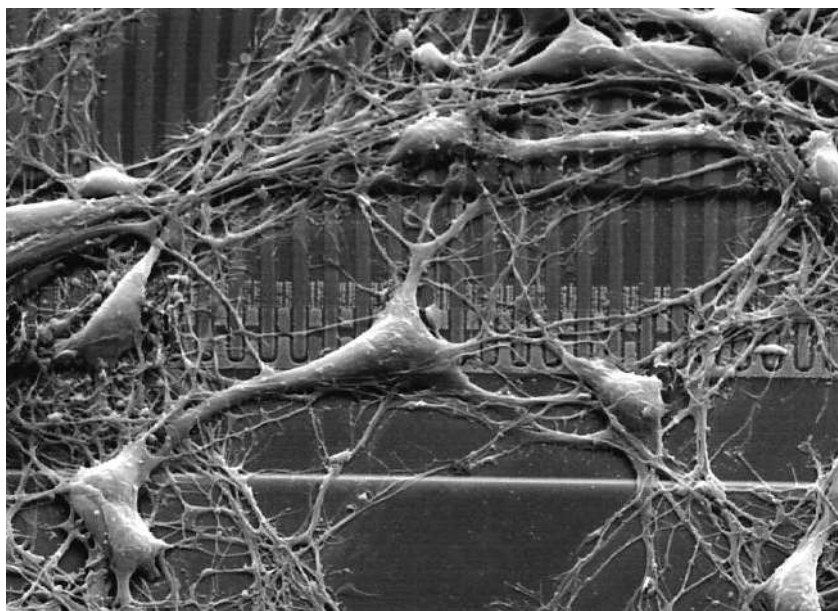


Рис. 72. Сканувальна електронна мікрофотографія нейронів гіпокампу щура. X 10000. (С. Вассанеллі, 2000).



Рис. 73. Трансмійна електронна мікрофотографія лімфокапіляра глотки бика свійського . X 10000. Препарат. В.Т. Хомича.



Рис. 74. Трансмійна електронна мікрофотографія лімфоцитів лімфокапіляра глотки бика свійського . X 10000.
Препарат. В.Т. Хомича.

Література

1. Багмут О.Г. Основи просвічувальної електронної мікроскопії : навчальний посібник для студентів технічних спеціальностей. Харків : НТУ «ХПІ», 2025. 262 с. [Електронний ресурс] URL.: <https://repository.kpi.kharkov.ua/server/api/core/bitstreams/71481a0d-8dc8-4f99-b596-037f26fafad1/content> (дата звернення: 12.02.2026)
2. Баринов Е.Ф., Чайковський Ю.Б., Сулаєва О.М., Ніколенко О.Г., Делій В.Ю. Спеціальна гістологія і ембріологія внутрішніх органів : навч. посібник. Київ : Медицина, 2013. 472 с.
3. Варенюк І.М., Держинський М.Е. Методи цито-гістологічної діагностики : навчальний посібник. Київ : Інтерсервіс, 2019. 256 с.
4. Вахнюк Т.В. Гістологія з технікою гістологічних досліджень : навчальний посібник. Київ : Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2018. 256 с.
5. Волков К. С. Ультраструктура основних компонентів органів, систем організму. Тернопіль: Укрмедкнига, 1999. 102 с.
6. Горальський Л.П. Фізико-хімічні методи в патоморфології. Фізико-хімічні методи досліджень. *Наукові статті науково-методичного семінару*. Рівне, 1998. С. 61-63.
7. Горальський Л.П. Морфологічні та гістохімічні методи в біології та ветеринарній медицині. *Вісник Полтавського державного сільсько-господарського інституту*. Полтава, 2000. № 3. С. 19–20.
8. Горальський Л.П. Морфологічні методи досліджень : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2003. 87 с.
9. Горальський Л.П. Морфометричні дослідження в гістології : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2003. 19 с.
10. Горальський Л.П. Кропивницький Ф.І. Відбір патологічного матеріалу для лабораторних досліджень від загинуваних та забитих тварин : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2003. 16 с.
11. Горальський Л.П. Гістохімічне виявлення нуклеїнових кислот : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2004. 22 с.
12. Горальський Л.П. Гістохімічне виявлення білків : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2004. 18 с.
13. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології : навч. посіб. Житомир : Полісся, 2005. 288 с.

14. Горальський Л.П., Гуральська С.В. Гістохімічне виявлення ліпідів : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2006. 19 с.

15. Горальський Л.П. Фарбування клітин крові : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2006. 9 с.

16. Горальський Л.П. Гістохімічне виявлення ферментів : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2007. 25 с.

17. Горальський Л.П. Гістологічні методи досліджень у нормі та при патології : методичні рекомендації. Житомир : Державний агроекологічний університет, 2007. 72 с.

18. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Сокульський І. М., Гуральська С.В., Колеснік Н.Л. Довідник з цитології, ембріології та гістології свійських тварин. Житомир : ЖНАЕУ, 2018. 260 с.

19. Горальський Л. П., Хомич В. Т., Кононський О. І. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи дослідження у нормі та при патології : навч. посіб. Житомир : ЖНАЕУ, 2019. 286 с.

20. Горальський Л.П., Рагуля М.Р., Костюк В.К., Сокульський І.М. Визначення об'єму кардіоміоцитів та їх ядерно-цитоплазматичного відношення : науково-методичні рекомендації. Київ : Науково-методичний центр вищої та фахової передвищої освіти, 2024. 32 с

21. Дзержинський М.Е., Варенюк І.М. Навчальний посібник для лабораторних занять з великого морфометричного спецпрактикума для студентів кафедри цитології, гістології та біології розвитку. Київ : Фітосоціоцентр, 2006. 83 с.

22. Дзержинський М.Е., Пазюк Л.М., Бузинська Н.О., Варенюк І.М., Вороніна О.К. Навчальний посібник до лабораторного спецпрактикуму із загальної гістології. Київ : ВПЦ «Київський університет», 2005. 94 с.

23. Дзержинський М.Е., Скрипник Н.В., Островська Г.В. [та ін.]. Загальна цитологія і гістологія : підручник. Київ : ВПЦ «Київський університет», 2010. 575 с.

24. Зербіно Д.Д., Багрій М.М., Боднар Я.Я., Діброва В.А. Патоморфологія та гістологія: атлас [гістологія, патоморфологія, цитоморфологія]. Вінниця : Нова Книга, 2016. 800 с.

25. Кононський О.І. Гістохімія. Київ : Вища школа, 1976. 278 с.

26. Луцик О.Д., Іванова А.Й., Кабак К.С. [та ін.]. Гістологія людини : підручник. Київ : Книга-плюс, 2013. 584 с.

27. Луцик О.Д., Чайковський Ю.Б., Барінов Е.Ф. [та ін.]. Гістологія. Цитологія. Ембріологія : підручник. Вінниця : Нова Книга, 2018. 592 с.
28. Методи та засоби мікроскопії: моногр. / В.С. Антонюк, Г.С. Тимчик, Ю.Ю. Бондаренко та ін. Київ : НТУУ "КПІ", 2013. 336 с.
29. Новак В.П., Бевз О.С., Мельниченко А.П. Цитологія, гістологія, ембріологія : підручник. Львів : Магнолія, 2024. 436 с.
30. Новак В.П., Ільницький М.Г., Бевз О.С., Мельниченко А.П. Атлас гістологічних препаратів. Цитологія, загальна ембріологія, загальна гістологія : навч. посібник. Ч.1. Біла Церква, 2023. 42 с.
31. Пат. 105982 Україна, МПК G01N 1/30. Спосіб виготовлення гістологічних зрізів для виявлення нуклеїнових кислот / Горальський Л. П., Сокульський І. М., Гуральська С. В., Колеснік Н. Л. Бюл. №13. 2014.
32. Пат. 157425 Україна, МПК G01N1/00 G01N33/48. Спосіб визначення об'єму соматичних клітин у ссавців / Л.П. Горальський, І.М. Сокульський, Н.Л. Колеснік, Р.К. Романюк, О.В. Павлюченко, М.Р. Рагуля. 2024. [Електронний ресурс] URL.: [https://iprop-ua.com/inv/kkdzyi2p/](https://iprop.ua.com/inv/kkdzyi2p/) (дата звернення: 12.02.2026)
33. Пішак В.П., Федонюк Л.Я., Зажаєва В.В, Чала К.М., Чернікова Г.М. Гістологія з основами гістологічної техніки. Київ : Кондор. 2016. 400 с.
34. Хомич В.Т. Лекції з цитології, ембріології та гістології свійських тварин : навч. посібник. Київ : Аграр Медіа Груп, 2012. 296 с.
35. Хомич В.Т., Левчук В.С., Горальський Л.П., Ших Ю.С., Калиновська І.Г. Міжнародна ветеринарна анатомічна номенклатура : навч. посібник. Житомир : Полісся, 2012. 390 с.
36. Хомич В.Т. Мазуркевич Т.А., Дишлюк Н.В., Стегней Ж. Г., Усенко С.І. Міжнародна ветеринарна гістологічна номенклатура. Київ : НУБіП, 2019. 276 с.
37. Azad M., Avin A. Scanning electron microscopy (SEM): A review. 2018. 9 с.
38. Bachmann L., Salperes M.M. Absolute sensitiviti of electron microscope radioautography. *J. Cell. Biol.* 1967. № 33. P. 299-305.
39. Blue Histology. School of Anatomy and Human Biology – The University of Western Australia. [Електронний ресурс] URL.:<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/default.htm>. (дата звернення: 12.02.2026)
40. Casali C., Siciliani S., Zannino L., Biggiogera M. Histochemistry for nucleic acid research: 60 years in the European Journal of

Література

Histochemistry. *Eur J Histochem*. 2022 Apr 20;66(2):3409. [Електронний ресурс] URL.:10.4081/ejh.2022.3409. (дата звернення: 12.02.2026)

41. Carson F., Cappellano Ch.H. *Histotechnology, A Self-Instructional Text*. 4th edition. American Society for Clinical Pathology, 2014. 368 p.

42. *Confocal microscopy Leica TCS SP 5. User Manual*. Mannheim, 2005. 166 p.

43. Culling C.F.A., Allison R.T., Barr W.T. *Cellular Pathology Technique*. Butterworth-Heinemann, 2014. 650 p.

44. Dabbs D.J. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 5th edition. Elsevier, 2018. 944 p.

45. Dudek R.W. *High-Yield Histopathology (High Yield Series)*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 328 p.

46. Horwood D. Fixatives and fixation: a review. *Histochem. and Citochem.*, 1969. 1. P. 323-360.

47. Lillie R.D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. McGraw Hill Book Company. New York, 1965. 942 p.

48. Pearse E. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. London : Churchill, 1953. 530 p.

49. Tașcă C. *Introducere in morfologia cantitativa cito-histologica*. Bucuresti : Editura Academiei Republicii Socialiste România, 1980. 192 p.

50. Vernon-Parry K. Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review* 13.4. 2000. 44 c.

Предметний показчик

А

Авторадіографія 8
Аденогіпофіз 197
Азотна кислота 24
Аміачне срібло 83, 96
Амілоїд 205
Аралдит 288, 289
Ацетон 15, 297, 298

Б

Бактерії (фарбування) 247-249
Бальзам 68
Барвники 61, 65
Бензол 28
Білки 136, 138, 139, 140
Білкові функціональні групи 142, 143
Біометрія 272
Біопсійний матеріал 10
Боєнський матеріал 10

В

Відбір матеріалу 10
Вибір фіксуєчої рідини 22
Виготовлення зрізів 51
Виготовлення зрізів на заморожувальному мікротомі 52
Виготовлення парафінових зрізів 54
Виготовлення целоїдинових зрізів 58
Виготовлення целоїдин-парафінових зрізів 59
Вуглеводи 158

Г

Гематоксилін 62, 63, 64
Гемоглобін 203
Гемосидерин 204, 205
Гіпофіз 196
Гістологічна техніка 6

Гістологічні методи досліджень 6-9
Гістологічні препарати 10
Гістометрія 254
Гістохімічні методи 122
Гліцерин 70
Гліцерин-желатин 70
Гормони 191, 192, 194-196
Глутаральдегід 285, 286

Д

Декальцинація 23
Декальцинація азотною кислотою 24
Декальцинація органічними кислотами 25
Декальцинація соляною кислотою 24

Е

Електронна мікроскопія 6, 277
Експериментальний матеріал 10
Еозин 65

Ж

Желатин 40, 41, 60
Жовчні пігменти 201

З

Загальні методи фарбування 71
Залізний гематоксилін 103
Залізо 211
Заливка матеріалу в желатин 40
Заливка матеріалу в парафін 29
Заливка матеріалу в целоїдин 35

Заливка матеріалу в целоїдин-парафін 37
Зрізи 52, 54, 56, 57, 58, 59, 60
Зрізи (напівтонкі) 297
Зрізи (ультратонкі) 298, 301
Зневоднення 26, 281, 298
Заведення зрізів 67
Заведення зрізів у бальзам 68
Заведення зрізів у гліцерин 70
Заведення зрізів у гліцерин-желатин 70
Заведення зрізів у полістирол 69

I

Імпрегнація 81, 82
Імпрегнація нервової тканини 91, 93-95, 97, 100, 109, 112
Імпрегнація ретикулярних волокон 81, 83, 85-87
Індиферентні барвники 66
Імуногістохімічні методи 8

K

Калій 219, 220
Кальцій 207-110
Карбоксильні групи 147
Каріометрія 260
Кармін 64, 65
Кислі барвники 65
Клеюча речовина (ячний білок, сироватка крові) 56
Клітина 264
Кобальт 214
Кортикоїди 193
Кров (фарбування) 241-246
Ксилол 28, 29

Л

Ліпіди 148-157
Ліпопротеїди 141
Ліпофусцин 200, 201
Літєвий гематоксилін 103

M

Магній 210, 211

Меланін 199, 201
Метали 207
Метод темно-польової мікроскопії 9
Миш'як 215, 216
Мідь 212
Мієлінові нервові волокна (фарбування) 102, 103, 105-108, 110, 111
Мікобактерії (фарбування) 250, 251
Мікроби (імпрегнація) 252
Мікротом 41
Мікротом барабанний (ротаційний) 42, 44, 45
Мікротом заморожувальний 42, 43.
Мікротом-кріостат 43, 46, 47
Мікротом полозковий (ковзаючий) 42, 43.
Морфометрія 260
Мурашина кислота 25
М'язова тканина 87

N

Надниркові залози 192, 194
Нейтральні барвники 66
Нервова тканина 89, 91
Ножі алмазні 297
Ножі мікротомні 47-52.
Ножі скляні 292, 295, 297
Норадреналін 194-196
Нуклеїнові кислоти 122, 124, 126, 128, 130-133, 135

O

Одиниці довжини 276
Одиниці маси 276
Одиниці об'єму 276
Органічні кислоти 25
Органометрія 260
Основні барвники 65

П

Парафін 29, 57
Пепсин 145
Пігменти 198
Підготовка предметних
стекол 56
Пікринова кислота 15, 66
Плівки-підкладки 299
Полістирол 69
Предметні стекла 56, 57, 58
Промивка фіксованого
матеріалу. 25

Р

Рідина Бекера (кальцій-
формол) 21
Рідина Карнуа 16
Рідина Мюллера 18
Рідина Орта 18
Рідина «суза» за Гейденгайном
17
Рідина Ценкера 19
Розчини 221
Розчини (буферні) 224-232
Ртуть 218, 219

С

Світлова мікроскопія 6, 254-
259
Світловий мікроскоп 257-259,
278
Свинець 214
Сітки (опорні) 299, 300
Сканувальний мікроскоп 277,
278, 280, 304
Соляна кислота 24
Спирти 14, 26, 27
Спирт абсолютний 14, 26.
Спирт етиловий 14, 26-28
Спирт метиловий 14
Стронцій 217, 218
Судани 66
Сульфгідрильні групи 147

Суміш Буена 17
Суміш Пірсона 17
Суміш Ружа 16

Т

Тетраоксид осмію 15
Технологія фарбування 66
Толуол 28
Трансмісійний мікроскоп
277-279, 281
Трипсин 146
Трихлороцтова кислота 16,
25

Трупний матеріал 10

У

Ультрамیکротомування 291
Ультрафіолетова
мікроскопія 7
Ущільнення (залівка)
матеріалу 28, 281, 288-290

Ф

Фазово-контрастна
мікроскопія 6
Фарбування зрізів 60, 66,
71-74, 76-80
Фіксація матеріалу 12, 22,
283, 285
Фіксуєчі речовини 13, 16
Фуксин. 65
Фіксатор Мак-Мануса 21
Фіксатор Шабаша 22
Флуоресцентна
мікроскопія 7
Формалін 13
Формалін концентрований
13
Формалін нейтральний 13
Формальдегід 13
Формалінові фіксатори
Ліллі 20
Фіксуєчі речовини 16

Предметний показчик

Х

Характеристика мікротомів 41
Характеристика барвників 61
Хлороформ 28, 30

Ц

Целоїдин 35, 36, 59
Целоїдин-парафін 37
Ценкер-формол. 19
Цинк 213

Цитоспектрофотометрія 7
Цитометрія 260

Ш

Шарлах рот 66

Я

Ядро клітини 264, 265
Ядерно-цитоплазматичне
відношення 265

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	5
РОЗДІЛ I. ГІСТОЛОГІЧНА ТЕХНІКА	
I ГІСТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	6
Загальна характеристика основних методів гістологічних досліджень.....	6
РОЗДІЛ II. ТЕХНОЛОГІЯ ВИГОТОВЛЕННЯ	
ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ	10
Відбір матеріалу.....	10
Фіксація матеріалу.....	12
Найбільш загальноприйняті фіксуючі речовини та їх застосування.....	13
Прості фіксуючі речовини	13
Складні фіксуючі речовини.....	16
Метод швидкої фіксації матеріалу.....	22
Вибір фіксуючої рідини для фіксації матеріалу.....	22
Декальцинація.....	23
Декальцинація азотною кислотою.....	24
Декальцинація соляною кислотою.....	24
Декальцинація органічними кислотами.....	25
Промивка фіксованого матеріалу.....	25
Зневоднення промитого матеріалу.....	26
Ущільнення зневодненого матеріалу.....	28
Заливка в парафін.....	29
Підготовка парафіну.....	29
Процес заливки матеріалу в парафін.....	29
Схеми для заливки шматочків матеріалу в парафін.....	32
Заливка матеріалу в целоїдин.....	35
Схеми для заливки шматочків матеріалу в целоїдин.....	36
Заливка матеріалу в целоїдин-парафін.....	37
Схеми для заливки шматочків матеріалу в целоїдин-парафін.....	38
Заливка матеріалу в желатин.....	40
Приготування розчинів для заливки матеріалу в желатин.....	40
Методика заливки матеріалу в желатин.....	41
Виготовлення зрізів.....	41
Загальна характеристика мікротомів.....	41
Мікротомні ножі.....	47

Виготовлення зрізів на заморожувальному мікротомі.....	52
Виготовлення парафінових зрізів.....	54
Підготовка предметних стекол і нанесення на них зрізів.....	56
Методика нанесення парафінових зрізів на предметні стекла сухим способом.....	57
Методика нанесення парафінових зрізів на предметні стекла за допомогою нагрітого міцного спирту.....	58
Виготовлення целоїдинових зрізів та видалення з них целоїдину.....	58
Виготовлення целоїдин-парафінових зрізів.....	59
Виготовлення желатинових зрізів.....	60
Фарбування зрізів.....	60
Характеристика барвників.....	61
Основні барвники.....	61
Кислі барвники.....	65
Нейтральні барвники.....	66
Індиферентні барвники.....	66
Технологія фарбування.....	66
Заведення зрізів.....	67
Заведення зрізів у бальзам.....	68
Заведення зрізів у полістирол.....	69
Заведення зрізів у гліцерин-желатин.....	70
Заведення зрізів у гліцерин.....	70
РОЗДІЛ III. МЕТОДИ ФАРБУВАННЯ ЗРІЗІВ ДЛЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	71
Загальні методи фарбування.....	71
Фарбування целоїдинових і заморожених зрізів гематоксиліном та еозином.....	71
Фарбування парафінових зрізів гематоксиліном та еозином.....	72
Фарбування зрізів за Ван-Гізоном.....	73
Спеціальні методи фарбування.....	74
Фарбування колагенових волокон.....	74
Фарбування за методом Маллорі.....	74
Фарбування за Гендейгайном.....	76
Фарбування за Массоном.....	77
Фарбування еластичних волокон.....	78
Фарбування резорцин-фуксином Вейгерта.....	79

Фарбування фукселіном у модифікації Харта.....	80
Фарбування орсеїном за методом Унна-Тенцера.....	80
Імпрегнація ретикулярних волокон.....	81
Загальні правила імпрегнації матеріалу сріблом.....	82
Імпрегнація сріблом за методом Фута.....	83
Спрощена імпрегнація сріблом за методом Фута.....	85
Імпрегнація сріблом за методом Більшовського.....	86
Спрощена імпрегнація за методом Більшовського.....	87
Фарбування поперечно-посмугової м'язової тканини.....	87
Фарбування нервової тканини.....	89
Фарбування за Нісслем.....	89
Імпрегнація нервової тканини.....	91
Імпрегнація за методом Більшовського.....	91
Тотальна імпрегнація за Більшовським.....	93
Тотальна імпрегнація за Рамон-і-Кахалем.....	94
Тотальна імпрегнація за Рамон-і-Кахалем.....	94
Метод Грос-Більшовського-Лаврентьєва.....	95
Метод імпрегнації за Більшовським-Грос у модифікації В.В. Купріянова.....	97
Імпрегнація за методом Кахаля-Фаровського.....	98
Модифікація методу Грос-Більшовського за Кампосом.....	100
Фарбування мієлінових оболонок нервових волокон.....	102
Фарбування мієлінових оболонок за оригінальним методом Вейгерта.....	103
Метод прискореного забарвлення мієлінових оболонок за Вейгертом.....	105
Фарбування мієлінових оболонок за методом Вейгерта-Паля.....	106
Фарбування мієлінових оболонок за методом Кульчицького.....	107
Фарбування мієлінових оболонок за методом Кульчицького-Вольтерса.....	108
Імпрегнація нервової тканини за методом Гліса.....	109
Тотальна імпрегнація периферійних Нервів за методом Ренсона.....	109
Фарбування мієлінових нервових волокон у заморожених зрізах за методом Соколянського.....	110

Методика фарбування волокон для отримання оглядових препаратів.....	110
Методика фарбування для виявлення волокон у стані дегенерації.....	111
Імпрегнація елементів макроглії (астроглії).....	112
РОЗДІЛ IV. ГІСТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	122
Нуклеїнові кислоти.....	122
Виявлення нуклеїнових кислот за методом Ейнарсона.....	124
Виявлення нуклеїнових кислот за методом Ейнарсона у модифікації Л. Горальського.....	126
Окреме виявлення ДНК та РНК сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Браше.....	128
Фарбування сумішшю метилового зеленого з піроніном за методою Курника.....	130
Фарбування сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Унна.....	131
Виявлення нуклеїнових кислот акридиновим оранжевим.....	132
Виявлення ДНК.....	133
Метод Фельгена-Росенбека.....	133
Реакція Фельгена з гідрозидом нафтойної кислоти за Пірсом.....	135
Білки.....	136
Виявлення загальних білків.....	137
Метод Бонхега.....	138
Виявлення білків розчином амідочорного 10 В.....	139
Виявлення основних і кислих білків.....	140
Виявлення основних і кислих білків за методом Мікель-Кальво.....	140
Виявлення ліпопротеїдів.....	141
Виявлення ліпопротеїдів за методом Карміхала.....	141
Визначення білкових функціональних груп.....	142
Виявлення NH ₂ – груп, зв'язаних з білками.....	142
Виявлення сульфгідрильних груп за Барнетом і Зелігманом.....	143
Проготування контрольних препаратів.....	145
Обробка розчином пепсину.....	145
Обробка розчином трипсину.....	146
Блокування аміногруп.....	146

Блокування карбоксильних груп.....	147
Блокування сульфгідрильних груп.....	147
Ліпіди.....	148
Виявлення ліпідів.....	149
Виявлення загальних ліпідів.....	149
Виявлення загальних ліпідів за методом Лізона.....	149
Виявлення загальних ліпідів суданом чорним В за Мак-Манусом.....	150
Виявлення загальних ліпідів методом фарбування зрізів ацетильованим суданом чорним В.....	151
Виявлення зв'язаних ліпідів методом екстракції за Спангофом.....	152
Виявлення зв'язаних ліпідів шляхом застосування розчину судану чорного В в ацетоні за методом Беренбаума.....	152
Виявлення нейтральних і кислих ліпідів за Кайном.....	153
Виявлення нейтральних ліпідів суданом III за методом Дадді.....	154
Виявлення нейтральних ліпідів суданом III та суданом IV.....	155
Проведення гістохімічного контролю для виявлення ліпідів.....	156
Екстракція ліпідів за Кейлігом.....	157
Екстракція ліпідів за Бекером.....	157
Вуглеводи.....	158
Виявлення глікогену за методом Шабаша.....	159
Виявлення глікогену за допомогою Шифф-йодної кислоти (ШЙК) по Мак-Манусу.....	161
Виявлення глікогену за методом Беста.....	162
Виявлення глікогену за методом Байєра (із застосуванням фуксинсірністої кислоти).....	164
Виявлення кислих глікозаміногліканів за Хейлом.....	165
Виявлення кислих глікозаміногліканів алціановим синім за Стідменом.....	166
Проведення гістохімічного контролю для виявлення полісахаридів.....	167
Застосування діастази за Ліллі.....	167
Ферменти.....	168
Клас оксидоредуктаз.....	169

Виявлення α -гліцерофосфатдегідрогенази.....	170
Виявлення лактатдегідрогенази за Гесом, Скарпеллі та Пірсом.....	171
Виявлення малатдегідрогенази за Гесом, Скарпеллі та Пірсом.....	172
Виявлення сукцинатдегідрогенази за Нахласом, Валькером та Зелігманом.....	173
Виявлення моноамінооксидази за Келле та Вальку.....	174
Клас трансфераз.....	176
Виявлення фосфорилази за методом Текеучі.....	176
Клас гідролаз.....	177
Виявлення «неспецифічної естерази».....	177
Виявлення «неспецифічної естерази» за Методом Нахласа, Зегільмана та Гоморі.....	178
Виявлення «неспецифічної естерази» α -нафтилацетатом у модифікації Е. Пірса.....	179
Виявлення ліпази.....	180
Виявлення ліпази за методом Гоморі (метод «твін»).....	180
Виявлення ліпази-естерази за Мартиновим.....	181
Виявлення холінестераз.....	182
Виявлення холінестерази за методом Жеребцова.....	183
Виявлення холінестерази за методом Гоморі.....	184
Виявлення лужної фосфомоноестерази.....	185
Виявлення лужної фосфомоноестера за методом Гоморі-Такаматчу.....	185
Виявлення лужної фосфомоноестерази методом азопоєднання.....	186
Виявлення кислої фосфомоноестерази (фосфатази).....	187
Виявлення кислої фосфомоноестерази за методом Гоморі.....	188
Виявлення кислої фосфомоноестерази за методом Берстона.....	189
Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази).....	189
Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази) за методом Падікула і Германа.....	190
Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази) за методом Вахштейна-Мейзеля.....	191
Гормони.....	191
Гормони кіркової речовини (кори) надниркових залоз.....	192
Фенілгідразинова реакція на виявлення кортикоїдів.....	193

Виявлення α -кетогруп кортикоїдів за Канолкармом.....	193
Гормони мозкової речовини наднирників.....	194
Хромафінна реакція на адреналін та норадреналін за Хілларпом і Хьокфельтом.....	194
Виявлення норадреналіну за Хілларпом і Хьокфельтом.....	195
Люмінісцентний метод виявлення норадреналіну по Ерьонке.....	196
Гормони гіпофіза.....	196
Виявлення клітин аденогіпофіза за методом Ландінга та Холла.....	197
Пігменти.....	198
Виявлення меланінів за методом Ліллі.....	199
Виявлення ліпофусцинів за методом Шморля.....	200
Диференціювання меланінів від ліпофусцинів за методом Хуека.....	201
Виявлення жовчних пігментів за методом Штейна.....	201
Виявлення гемоглобіну за методом Слонімського-Лапінського.....	203
Виявлення гемосидерину за Перлсом.....	204
Реакція на берлінську лазурь (за Перлсом).....	205
Виявлення амілоїду за методом Бенхольда.....	206
Гістохімія металів.....	207
Виявлення кальцію.....	207
Виявлення кальцію алізариновим червоним.....	208
Виявлення кальцію нітратом сріба за методом Ван-Косса.....	209
Виявлення кальцію за методом Пірса.....	210
Виявлення магнію.....	210
Виявлення магнію за методом Пірса.....	211
Виявлення заліза.....	211
Виявлення заліза за методом Перлса.....	211
Виявлення міді.....	212
Виявлення міді за використання бензидину.....	212
Виявлення цинку.....	213
Виявлення цинку за методом Менделя та Бредлі.....	213
Виявлення кобальту.....	214
Виявлення Кобальту за методом Ліллі.....	214
Виявлення свинцю.....	214
Виявлення свинцю з використанням родизонату натрію.....	215

Виявлення миш'яку.....	215
Виявлення миш'яку за методом Кастела.....	216
Виявлення стронцію.....	217
Виявлення стронцію за методом Уотерхаузена.....	218
Виявлення ртуті.....	218
Виявлення ртуті за методом Ломбардо.....	219
Виявлення калію.....	219
Виявлення калію за методом Поппена, Грина і Вренна.....	220
Розчини для гістохімічних досліджень.....	221
Способи вираження концентрації розчинів.....	222
Приготування буферних розчинів.....	224
Приготування трис-буфера Мак-Мануса і Мауера.....	225
Приготування веронал-ацетатного буферного розчину Міхаеліса.....	226
Приготування фосфатного буферного розчину за Ф.Л. Калініним, В.П. Любовим, В.А. Жидковим.....	227
Приготування фосфатного буферного розчину за Спангофом.....	227
Приготування буферного розчину бура NaOH за М. Берстоном.....	228
Приготування какодилатного буферного розчину за Берстоном.....	228
Приготування фосфатного буферного розчину Зеренсена.....	229
Приготування буферної суміші Уолпола.....	230
Приготування 1 М ацетат-солянокислого розчину за Спангофом.....	230
Приготування цитратно-фосфатного буферного розчину за Мак-Ільвейном.....	231
Приготування ацетатного буферного розчину Уолпола.....	232
РОЗДІЛ V. ФАРБУВАННЯ КЛІТИН КРОВІ.....	241
Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення за Романовським-Гімзою.....	242
Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення азур II-еозином.....	243
Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення піридин-азур-еозином за С.П. Алфєєвою.....	244
Фарбування клітин крові в її мазках і препарат-відбитках органів кровотворення за Романовським-Гімзою.....	245

Фарбування клітин крові в її мазках і препаратах- відбитках органів кровотворення за Папенгеймом.....	246
РОЗДІЛ VI. ФАРБУВАННЯ БАКТЕРІЙ.....	247
Фарбування бактерій метиленовим синім Льюфлера.....	248
Фарбування бактерій карболовим тіоніном Ніколя.....	248
Фарбування бактерій за Грам-Вейгертом.....	249
Фарбування мікобактерій туберкульозу карбол-фуксином Ціля.....	250
Фарбування мікобактерій туберкульозу за Шморлем.....	251
Імпрегнація мікробів сріблом за Левадіті.....	252
РОЗДІЛ VII. СВІТЛОВА МІКРОСКОПІЯ.....	254
Будова світлового мікроскопа.....	257
Правила роботи з мікроскопом.....	259
РОЗДІЛ VIII. МОРФОМЕТРИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ В ГІСТОЛОГІЇ.....	260
Інструменти та прилади для вимірювання.....	261
Техніка вимірювання.....	263
Визначення об'єму клітин та їх ядер.....	264
Техніка проведення морфометричних вимірів за допомогою програми ImageJ.....	267
Біометрична обробка цифрових показників результатів досліджень.....	272
Одиниці довжини, маси і об'єму у гістологічних дослідженнях.....	276
РОЗДІЛ IX. ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ.....	277
Загальна характеристика методу електронної мікроскопії.....	277
Методика підготовки матеріалу для трансмісійної електронної мікроскопії.....	281
Технологія виготовлення зрізів з органів і тканин для електронно-мікроскопічних досліджень.....	281
Відбір і фіксація матеріалу для досліджень.....	281
Фіксація у глутаральдегіді.....	285
Методи очищення глутаральдегіду.....	285
Глутаральдегідні фіксатори на фосфатному буфері.....	285
Глутаральдегідні фіксатори на какодилатному буфері.....	286
Фіксація матеріалу досліджень.....	286
Зневоднення матеріалу для досліджень.....	287
Ущільнення (залівка) матеріалу для досліджень.....	287
Залівка матеріалу в аралдит.....	288

Заливка в аралдит за методом Б. Уиклі.....	289
Заливка матеріалу в епон.....	290
Заливка матеріалу у вестопап W.....	290
Миття посуду.....	291
Ультрамiкротомування.....	291
Технологія виготовлення скляних ножів.....	292
Оцінка якості скляного ножа.....	295
Технологія виготовлення зрізів.....	297
Виготовлення ультратонких зрізів.....	298
Фарбування ультратонких зрізів.....	301
Методика фарбування зрізів цитратом свинцю.....	301
Методика ефективного подвійного фарбування при звичайних лабораторних дослідженнях.....	302
Методика виявлення РНК-вмістимих структур.....	304
Методика підготовки матеріалу для сканувальної електронної мікроскопії.....	304
Відбір і фіксація матеріалу для досліджень.....	305
Зневоднення матеріалу для досліджень.....	305
Сушіння.....	305
Монтаж зразка.....	306
Напилення провідного шару.....	306
Дослідження у мікроскопі.....	306
Література.....	312
Предметний показчик.....	316

Наукове видання

**ЛЕОНІД ПЕТРОВИЧ ГОРАЛЬСЬКИЙ
ВОЛОДИМИР ТИМОФІЙОВИЧ ХОМИЧ
НАТАЛІЯ ЛЕОНІДІВНА КОЛЕСНІК**

**ОСНОВИ ГІСТОЛОГІЧНОЇ ТЕХНІКИ
І МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ
У НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ**

ПОСІБНИК

Макетування та дизайн обкладинки
Н.Л. Колеснік

Роздруковано з оригіналу макета автора 10.03.2026
Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Зам. № 215. Ум. друк. арк. 19,29
Наклад 100 прим.

Віддруковано з готового оригінал-макета автора
Видавець та виготівник ПП «Свро-Волинь»
м. Житомир, вул. Крошенська буд. 45, кв. 34
Свідоцтво серія ДК №7208 від 07.12.2020.



Горальський Леонід Петрович

Доктор ветеринарних наук, професор, заслужений Діяч науки і техніки України, академік АНВО України

Шифр наукової спеціальності: 16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин.

Напрями наукових інтересів: Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології

E-mail: goralsky@ukr.net



Хомич Володимир Тимофійович

Доктор ветеринарних наук, професор, заслужений працівник ветеринарної медицини України, академік АНВО, відмінник освіти України.

Шифр наукової спеціальності: 16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин.

Напрями наукових інтересів: Морфологія, кровопостачання та іннервація органів кровотворення та імуногенезу свійських ссавців і птахів у постнатальному періоді онтогенезу.

E-mail: khomich-305@ukr.net



Колеснік Наталія Леонідівна

Кандидат ветеринарних наук, доцент.

Шифр наукової спеціальності: 16.00.02 – патологія, онкологія і морфологія тварин.

Напрями наукових інтересів: Розвиток, морфологія та гістохімія органів тварин у нормі та при патології.

E-mail: natacha_kolesnik@ukr.net

