

Л. П. ГОРАЛЬСЬКИЙ. В. Т. ХОМИЧ  
О.І. КОНОНСЬКИЙ

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

*Навчальний посібник  
(видання третє, виправлене і доповнене)*

За редакцією доктора ветеринарних наук, професора  
Л. П. ГОРАЛЬСЬКОГО

ЖИТОМИР «ПОЛІССЯ» 2015

УДК: 576. 3. 591. 81: 612. 014. 1

*Рекомендовано Міністерством аграрної політики України  
як навчальний посібник для підготовки в аграрних  
вищих навчальних закладах II-IV рівнів акредитації  
з напрямку 1305 «Ветеринарна медицина»  
(протокол № 18-1-1-13/355) від 28.03.2005*

Р е ц е н з е н т и:

**Б.В. Борисевич**, д-р вет. наук, професор  
(Національний аграрний університет),

**Б.В. Криштофорова**, д-р вет. наук, професор  
(Кримський державний агротехнологічний університет)

**Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський;**  
Г67 За редакцією Л.П.Горальського. Основи гістологічної тех-  
ніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при  
патології. Навчальний посібник. Видання третє, виправлене і  
доповнене.— Житомир: «Полісся», 2015. — 286 с.  
ISBN 978-966-655-793-6

У посібнику викладені основи гістологічної техніки і описані основні  
методи морфофункціональних досліджень, які широко використовуються  
у біології, ветеринарній і гуманній медицині.

Посібник рекомендується студентам факультетів ветеринарної меди-  
цини, спеціалістам морфологічних відділів лабораторій ветеринарної меди-  
цини, науковцям-морфологам, які в своїй роботі використовують мор-  
фофункціональні методи досліджень.

**УДК: 576. 3. 591. 81: 612. 014. 1**

ISBN 978-966-655-793-6

© Л.П. Горальський, 2015  
© В.Т. Хомич, 2015  
© О.І. Кононський, 2015

## ПЕРЕДМОВА

Морфофункціональні методи досліджень в даний час набули широкого застосування не тільки у науково-дослідній роботі, а й у практичній діяльності спеціалістів ветеринарної і гуманної медицини. Їх також використовують і в навчальній роботі. Такий інтерес до цих методів не випадковий. За їх допомогою одержують знання про будову і функції організму тварин і людини на різних рівнях його структурної організації як в нормі, так і при патології. Ці знання дають змогу практичним лікарям аналізувати особливості метаболічних процесів, які відбуваються у клітинах, тканинах та органах і призводять до порушення гомеостазу організму при патології. Вирішальне значення вони мають для постановки і уточнення діагнозу та розроблення тактики лікування хворих.

Для ефективного використання морфофункціональних методів і одержання за їх допомогою достовірних результатів, спеціалістам, особливо початківцям, необхідні не тільки дані про окремі методи та їх можливості, а й знання методик їх використання. Так склалося, що у нашій країні в даний час методична література з цих питань стала бібліографічною рідкістю. У зв'язку з цим виникла необхідність у її виданні.

У даному посібнику описані основи гістологічної техніки і основні морфофункціональні методи досліджень та методики їх виконання, які проводяться у гістологічних лабораторіях та лабораторіях електронної мікроскопії. Автори посібника не є авторами описаних ними методів. Вони запозичили і систематизували їх із видань, які приведені у списку літератури. При цьому, більшість із них — апробовані ними.

Посібник такого плану вперше видається українською мовою. У зв'язку з цим його авторський колектив з вдячністю сприйме критичні зауваження і побажання не лише щодо змісту посібника, а й стилю його написання.

**Автори**

## ГІСТОЛОГІЧНА ТЕХНІКА І ГІСТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### Загальна характеристика основних методів гістологічних досліджень

За допомогою гістологічних методів досліджень вивчають будову клітин, тканин і органів організму тварин. Ці методи досліджень передбачають виготовлення гістологічних препаратів, які аналізують за допомогою світлового мікроскопа, — **світлова мікроскопія**. Сучасні світлові мікроскопи дають збільшення об'єкта у 2000—2500 разів. Для більш глибокого їх вивчення використовують **електронну мікроскопію**, яка здійснюється за допомогою відповідного мікроскопа. В результаті електронної мікроскопії отримують електронні мікрофотографії, на яких і вивчають будову певних структур організму тварин.

Гістологічні методи досліджень, які базуються на світловій мікроскопії, залежно від стану об'єкта ділять на *поствітальні* і *вітальні*. Поствітальні (посмертні) методи гістологічних досліджень — найбільш поширені. Вони, як було відмічено вище, передбачають виготовлення постійних гістологічних препаратів і формують основу класичних гістологічних методів, які описані в даному посібнику. Крім класичних гістологічних методів досліджень є й спеціальні методи світлової мікроскопії. До них відносять наступні методи: фазово-контрастна мікроскопія, флуоресцентна мікроскопія, ультрафіолетова мікроскопія, цитоспектрофотометричний і авторадіографічний методи, метод темно-польової мікроскопії та імуногістохімічні методи.

**Фазово-контрастна мікроскопія** використовується для вивчення прозорих безбарвних об'єктів, зокрема живих клітин і тканин. Світлові хвилі, проходячи через таке середовище, зміщуються на величину, яка визначається товщиною матеріалу і швидкістю світла, що через нього проходить. Фазово-контрастний мікроскоп перетворює ці незримі зміщення у зміну амплітуди світлових хвиль. Одержують при цьому чорно-біле зображення, щільність окремих ділянок якого залежить від вели-

чини добутку товщини об'єкта на різницю у показниках заломлення світла в ньому і оточуючому середовищі.

**Флуоресцентна мікроскопія.** Флуоресценція — це світіння об'єкта, визване променевою енергією. При такому дослідженні об'єкт розглядають в ультрафіолетових і синіх променях. Флуоресценція буває власною і наведеною. Остання визивається особливими барвниками — *флуорохромами*. Тому флуоресцентна мікроскопія дає змогу вивчити 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. Так, наприклад, флуорохром акридиноий оранжевий з ДНК дає зелене світіння, а з РНК — червоне.

Перевагами флуоресцентної мікроскопії є:

1. Висока чутливість, тому що даний метод виявлення речовин у 1000 разів чутливіший адсорбційних, а наявність флуоресцюючого об'єкта в темному полі надає флуоресцентній мікроскопії надзвичайної зручності для виявлення та підрахунку в препараті маленьких часточок, у тому числі й окремих мікроорганізмів.

2. Висока специфічність.

3. Чіткість та контрастність люмінесцентно-мікроскопічних картин.

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

5. Зручність у проведенні кількісних досліджень.

6. У багатьох випадках — простота методичних прийомів та доступність придбання реактивів.

**Ультрафіолетова мікроскопія** ґрунтується на використанні коротких ультрафіолетових променів довжиною хвилі 0,2 мкм. Вона дає можливість досліджувати хімічний склад гістологічних структур. При цьому зображення реєструється на фотоплівці або люмінесцентному екрані.

**Цитоспектрофотометричний** метод досліджень дає змогу визначити кількісний вміст речовин у клітині та їх складових елементів за результатами поглинання ними світлових променів певної довжини хвилі.

**Авторадіографічний** метод дозволяє аналізувати локалізацію у клітинах і тканинах речовин, мічених радіоактивними ізотопами. В основі методу лежить фотографічний процес. Внесені у клітини ізотопи відновлюють бромисте срібло фотоемulsії, що покриває зріз. Після проявлення фотоемulsії гістозріз фіксують, промивають, забарвлюють, зневоднюють, заводять у бальзам і розглядають за допомогою мікроскопа. Добре видимі зерна срібла (треки) чорного кольору свідчать про локалізацію у клітинах і тканинах мічених речовин. Методом авторадіографії також виявляють місця синтезу певних речовин, склад білків, шляхи внутрішньоклітинного транспорту.

**Метод темно-польової мікроскопії** полягає в тому, що дрібні часточки, які лежать за межами дозволеної здатності мікроскопа, стають видимими в променях, що йдуть під великим кутом і в об'єктив мікроскопа безпосередньо не потрапляють. В об'єктив потрапляє лише світло, відбите від цих часточок. Останні мають вигляд світлих плям на темному фоні. Цей метод є цінним при вивченні колоїдів клітини.

**Імуногістохімічні методи.** Ці високочутливі методи застосовуються при дослідженні 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, що містяться в її глобуліновій фракції, використовують для виявлення в тканинах відповідних біологічних речовин.

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

При дослідженнях 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.

**Названі вище методи** різняться за чутливістю (найменш чутлива — цитоспектрофотометрія, високочутлива — авторадіо-

графія) та займають широкий спектральний діапазон (від рентгенівської до інфрачервоної областей спектру).

За допомогою *вітальних* (прижиттєвих) методів досліджень вивчають рух крові в кровоносних судинах, міграцію лейкоцитів, ріст кровоносних і лімфатичних капілярів (методи із застоюванням “прозорих камер” і “мікроскопів ілюмінаторів”). Для вивчення процесів росту, поділу і руху клітин та їх реакцію на дію хімічних і фізичних чинників широко використовують методи *прижиттєвого вивчення культур клітин і тканин*.

*Метод мікрохірургії (мікрургії)* використовується для проведення досліджень на клітинах, тканинах і зародках. За допомогою мікрооперацій можна, наприклад, видалити з клітини ядро, перенести його з однієї клітини до іншої, перемістити частину клітин зародка, з'єднати бластомери зиготи, яка дробиться і т. д. Такі операції здійснюються за допомогою особливого приладу — мікроманіпулятора. До його складу входить мікроскоп і система важелів плавного регулювання. До важелів приєднуються мініатюрні інструменти — скляні капіляри, голки, гачки тощо.



## 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, забійний, експериментальний, післяопераційний і біопсійний.

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

**Забійний матеріал** отримують від тварин, забитих на м'ясокомбінаті, бойні і підприємствах з переробки 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 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 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 потрібно випилювати 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 значному патологічному ураженні рекомендується брати декілька шматочків: один із найбільш уражених ділянок, інші — на межі з нормальними.

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, які виготовляють із щільного паперу або картону. На етикетках чорним олівцем пишуть номер об'єкта, дату і місце відбору матеріалу, назву органа або тканини, вид, стать, вік тварини, від якої взяли 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 у тому, щоб припинити посмертні зміни у відібраному матеріалі та по можливості зберегти його тканини в стані, найбільш близькому до прижиттєвого. Розрізняють *фізичні* і *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 інтенсивно 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 задач 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 сурово 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.

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 роднаковий колір.

### **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-відсотковий 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. Для деполімеризації параформу рекомендують два способи:

1) помістити розчин формаліну в термостат на 24 год при температурі +54-56°C (Кононський О. І., 1976);

2) додати до формаліну 5-10 %-ий розчин натрію вуглекислого із розрахунку 50 мл на 100 л формаліну. Через декілька днів осад параформу зникне (Берім М. Г., 1972).

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 +9° С у скляному, добре закупореному, посуді.

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, 96<sup>0</sup> етиловий спирт, а для фіксації використовують як його, так і абсолютний спирт. Абсолютний спирт готують додаючи до 96<sup>0</sup> спирту безводний мідний купорос із розрахунку 15 г на 100 мл спирту. При цьому ємкість із спиртом періодично збовтують. 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 фіксує речовину для гістологічних досліджень використовують рідко (за відсутності формаліну) та тільки для щільних тканин. Пухкі тканини або тканини в стані набряку фіксувати в етиловому спирті не рекомендується, так як вони при цьому сильно зморщуються. Фіксація етиловим спиртом, як правило, застосовується в окремих випадках, наприклад, при постановці реакції на виявлення заліза, при дослідженні на бактерії, амліюїд, глікоген по Бесту і фарбуванні по Ніслю.

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

Метиловий спирт використовують для фіксації у 100<sup>0</sup> 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 швидкофіксуючу рідину для скорочення терміну виготовлення гістологічних препаратів. Його застосовують упродовж багатьох років лише для фіксації головного мозку при діагностиці сказу, а також фіксації матеріалу для гістохімічних досліджень (зокрема — виявлення фосфатаз). Фіксації піддають невеличкі шматочки органів. Термін фіксації для звичайних досліджень становить 2—3 год при кімнатній температурі, а для виявлення фосфатаз — впродовж доби при температурі 0 +5 °С.

**Тетраоксид осмію.** Тетраоксид осмію ( $\text{OsO}_4$ ) часто називають «осміевою 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 упродовж кількох років. Для цього використовується 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 препарат-відбитки піддають подальшій обробці згідно із схемою 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.

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

Враховуючи те, що при фіксації об'єкта утворюються внутрішньотканинні осадки, які не розчиняються у воді, промиван-

ня тканин перед фіксацією потрібно здійснювати у 70<sup>0</sup>-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 96<sup>0</sup>-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 звичайно, 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 сприяють швидкому проникненню його в тканини.

Термін фіксації — не більше 5 год при температурі +20—25 °С або 18—24 год при температурі +3—5 °С. Після фіксації матеріал швидко переносять у абсолютний етиловий спирт, затим — заливають у парафін або целоїдин.

**Суміш Пірсона.** При постановці гістохімічних реакцій на наявність ферментів у тканинах, зафіксованих у формаліні, ви-

никають артефакти — дифузія кінцевих продуктів ферментативних реакцій. Цьому можна запобігти додаванням до складу фіксуєної 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, призначеного для вивчення холінестераз: ацетилхолінестерази (АХЕ) та псевдохолінестерази (ПХЕ).

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

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

**Рідина «суза» за Гейденгайном.** У рідині поєднуються фіксуєні 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.

**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-ти 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 цитоплазми.

*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 потрібно зберігати деякий час, то його переносять у 10—15%-ий розчин формаліну.

Із зафіксованого цією рідиною матеріалу можна готувати зрізи і на заморожувальному мікротомі, попередньо промивши тканину 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.* Двохромовоокислий калій — 2,5 г, сірчаноокислий натрій — 1 г, дистильована вода — 100 мл.

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 °С (у термостаті) 1—2 тижні. Фіксує рідину замінюють щоденно у 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 в спиртах і заливають у парафін чи целоїдин. Промитий матеріал можна деякий час зберігати у 70—80° етиловому спирті.

Зберігання матеріалу у фіксуєчій рідині Мюллера по закінченні фіксації — недопустиме, так як при тривалому перебуванні в ній він стає крихким, і тканина втрачає властивість забарвлюватись.

**Рідина Ценкера.** Рідина Ценкера є хорошим фіксатором і використовується, 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 °С — 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 є хорошим фіксатором для цитологічних досліджень. Використовують для фарбування зрізів гематоксиліном та еозином та за методом Ван—Гізон.

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 °С — 4—6 год). Після фіксації матеріал промивають у водопровідній воді (24—48 год), зневоднюють у спиртах і заливають у парафін або целоїдин.

**П р и м і т к а.** 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 70<sup>0</sup>-ий етиловий спирт. До спирту рекомендують додати декілька крапель спиртового розчину йодату калію, в якому міститься 2 г йоду, 3 г йодату калію, 100 мл 90<sup>0</sup> етилового спирту. Після цього матеріал переносять у щойно приготовлений 0,25%-ий розчин тіосульфату натрію для видалення йоду. Термін перебування матеріалу в 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 мікротомі.

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

*Склад.* Використовують два формалінові фіксатори Ліллі.

Фіксатор № 1. Нітрат свинцю — 8 г, концентрований формалін — 10 мл, дистильована вода — 10 мл, 96° етиловий спирт — 80 мл.

Фіксатор № 2. Нітрат свинцю — 8 г, концентрований формалін — 10 мл, дистильована вода — 11 мл, 96° 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 зникнення помутніння 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.

Термін фіксації залежить від температури середовища: матеріал товщиною до 0,5 см при температурі +25—30 °С фіксують упродовж 24 год, при температурі 0 +5 °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 йонів кальцію стабілізує вміст і локалізацію у 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. Хло-

рид кальцію сприяє максимальному збереженню вмісту ліпідів у матеріалі (наприклад, у мозочку — до 90% від вихідної 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 у парафін або целоїдин.

**Фіксатор Мак-Мануса.** У цьому фіксаторі чітко поєднуються фіксуєчі 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 Шабаша.** У фіксаторі поєднана фіксуєча здатність формаліну, нітрату міді, нітрату кальцію та етилового спирту.

Є дві модифікації рідини Шабаша:

Рідина № 1. 96<sup>0</sup> етиловий спирт — 100 мл, нітрат міді — 1,8 г, нітрат кальцію — 0,9 г, концентрований формалін — 10 мл.

Рідина № 2. 96<sup>0</sup> 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 протягом 2—3 год у першій рідині Шабадаша, а потім на 24—48 год переносять у другу рідину Шабадаша або у 96<sup>0</sup> етиловий спирт. У процесі роботи фіксатор декілька разів замінюють.

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 мікросомі.

### **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.

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 можна рекомендувати 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 рекомендува-

ти рідини Шабаша, 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 кальцію. 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.

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 апомо-кальцієвих галунів на 12—24 год.

6. Після галунів матеріал промивають у водопровідній воді. Мінералізований матеріал досліджень, який містить чимало

жирової тканини, перед декальцинацією бажано знежирити, витримуючи його кілька 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 розпушення 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 розчин кухонної солі — 200 *мл*, концентрована соляна кислота (питома маса 1,19) — 4 *мл*.

До такого розчину під час декальцинації та до її закінчення щодобово 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 діб 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—96<sup>0</sup>-им етиловим спиртом (1:1), або у суміші з 10—15%-им розчином формаліну (1:1). Після декальцинації, для запобігання сильного набухання тканин, матеріал промивають упродовж декількох діб у 10—15%-му розчині формаліну, або у 70—96<sup>0</sup>-му етиловому спирті, які часто замінюють.

**Трихлороцтова кислота** найчастіше використовується у вигляді 5—10%-го водного розчину. Після декальцинації шматочки промивають у 96<sup>0</sup>-му етиловому спирті впродовж 3—4 діб при щодобовій його заміні. Промивання водою — не допускається.

### **Промивання фіксованого матеріалу**

Мета промивання (промивки) фіксованого матеріалу — це видалення з нього фіксуючих речовин. Залежно від виду фіксатора, промивання здійснюють проточною водопровідною водою або етиловим спиртом.

Проточною водопровідною водою промивають матеріал, зафіксований формаліном, а також фіксаторами, у складі яких були сулема або двохромовокислий калій. Промивання проводять у спеціальних корзинках Шафера або фарфорових ступках Файргальда. Практично, у гістологічних лабораторіях для промивання матеріалу водою використовують скляні банки ємністю 0,5—1 л, горловини яких закривають пластиковими кришками. Попередньо, в останніх, за їх периметром, роблять отвори діаметром 2—3 мм, а в центрі — отвір діаметром 1,5—2 см. У банку кладуть шматочки відібраного матеріалу, а їх етикетки виводять за краї банки і після цього її закривають кришкою з отворами і в центральний отвір вставляють кінець гумового шлангу відповідного діаметру і довжиною 25—30 см. Банку ставлять в умивальник і другий кінець гумового шлангу з'єднують з патрубком водопровідного крану. Останній відкривають — і банка заповнюється водою, надлишок якої видаляється через отвори у кришці.

Термін промивання проточною водопровідною водою залежить від товщини відібраних шматочків матеріалу. Він коливається від 24 до 48 год.

Матеріал фіксований речовинами, які містять пікринову кислоту, промивають 50<sup>0</sup> етиловим спиртом, а фіксований рі-



диною Карнуа — абсолютним етиловим спиртом. Для промивання використовують скляний посуд з притертим корком. У посуд кладуть шматочки відібраного матеріалу, наливають етиловий спирт відповідної міцності та закривають корком. Періодично спирт замінюють новими його порціями. Термін промивання також залежить від величини шматочків матеріалу. Він може бути від декількох до 48 год.

Наступним етапом виготовлення гістологічних препаратів є зневоднення промитого матеріалу. Якщо матеріал промивали абсолютним спиртом, то цей етап виготовлення препаратів можна пропустити.

### Зневоднення промитого матеріалу

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

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

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 96<sup>0</sup> 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 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), в результаті чого він переходить у безводну форму білого кольору ( $\text{CuSO}_4$ ). 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 у термостаті при температурі +60—70 °С впродовж трьох тижнів.

Прокалений мідний купорос зберігають у банці з притертим корком.

Термін зневоднення матеріалу залежить від розмірів його шматочків. У спиртах різної міцності він може тривати від однієї до 12 год. Добре зневоднений матеріал плаває на поверхні абсолютного спирту.

**Таблиця 1. Приготування спирту необхідної міцності**

Для отримання 100 мл спирту	Необхідно взяти (мл)							
	96 <sup>0</sup> спирту	H <sub>2</sub> O	90 <sup>0</sup> спирту	H <sub>2</sub> O	80 <sup>0</sup> спирту	H <sub>2</sub> O	70 <sup>0</sup> спирту	H <sub>2</sub> O
40 <sup>0</sup>	42	58	44	56	50	50	57	43
45 <sup>0</sup>	47	53	50	50	56	44	64	36
50 <sup>0</sup>	52	48	56	44	63	37	71	29
60 <sup>0</sup>	63	37	67	33	75	25	86	14
70 <sup>0</sup>	73	27	78	22	88	12	—	—
80 <sup>0</sup>	83	17	89	11	—	—	—	—
90 <sup>0</sup>	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 у 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 розчини. Заливку матеріалу у 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  $+62^{\circ}\text{C}$ ). Парафін, який плавиться при температурі нижче  $+50^{\circ}\text{C}$ , 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  $+52$ — $56^{\circ}\text{C}$ . 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 досить 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  $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$  у відкритому посуді впродовж кількох діб.

### *Заливка матеріалу в парафін*

Після зневоднення шматочки матеріалу спочатку переносять у суміш 96<sup>0</sup> 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 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  $+144\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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, так як хлороформ діє набагато м'якше, і в 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  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

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'єкта.

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, роблячи його крихким. 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 у 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 перекладають 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 застигання (затвердіння) парафіну (3—6 год). Для прискореного застигання парафіну користуються водопровідною водою. Для цього ванночки з матеріалом ставлять у кювету невеликого розміру і наливають

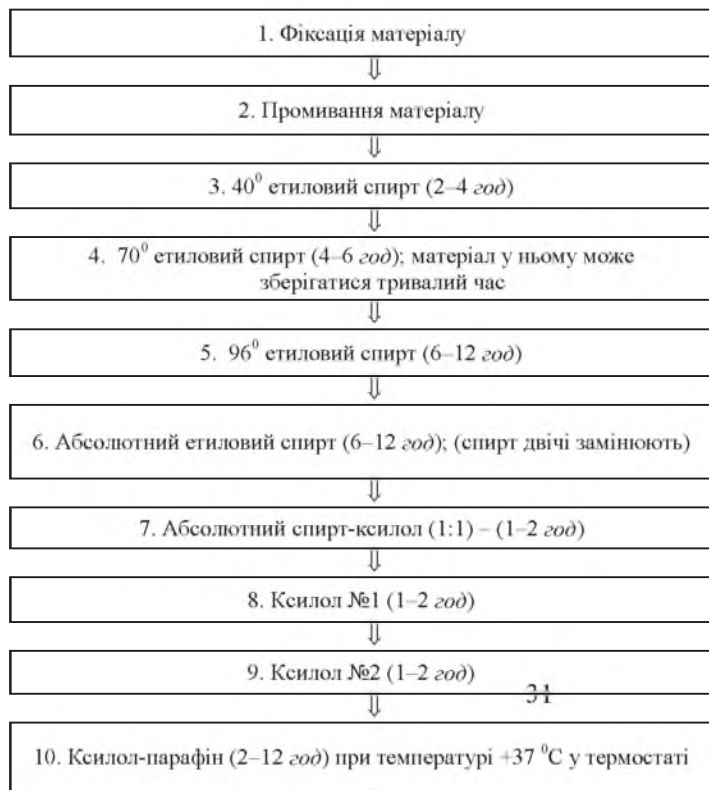
у неї воду. При цьому слідкують, щоб рівень води не перевищував висоти ванночки. Після утворення на поверхні парафіну плівки застигання, кювету можна поставити під проточну водопровідну воду.

Застиглий 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 чорною тушшю. 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 заливки шматочків матеріалу в парафін

Схема №1. Заливка матеріалу в парафін, рекомендована для шматочків, які мають поверхню не більше  $1\text{ см}^2$  і товщину не більше 3—5 мм (Г.І. Роскін та Л.Б. Левінсон, 1957)



**Схема №2. Заливка матеріалу в парафін  
(Г.А. Меркулов, 1961)**



**Схема №3. Методика швидкої заливки  
маленьких шматочків матеріалу в парафін  
(Г.А. Меркулов, 1961)**

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

**Схема №4. Методика швидкої заливки матеріалу  
в парафін при фіксації в ацетоні  
(Г.А. Меркулов, 1961)**

1. Фіксація	Формалін 10–15% (24 год) або спирт-формалін (24 год) (не більше 2 порції) (8–12–24 год)
I. Фіксація	Спирт-формалін (24 год) або Рідина Карнуа (2–4 год) (24 год) або Рідина Рета (24–48 год)
	2. Хлороформ (20–30 хв) (24–48 год)
	Промивка у воді ↓
3. Хлороформ-парафін	(20–30 хв) при температурі +37 <sup>0</sup> С в термостаті (24–48 год) ↓
II. Зневоднення	4. Парафін – дві порції (1–2 год) при температурі +55–56 <sup>0</sup> С у термостаті (24 год) або Спирт абсолютний або 96 <sup>0</sup> (24 год)
	5. Фіксація матеріалу в парафін
III. Заливка у парафін	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 <sup>0</sup> С (2–3 год) ↓
	Парафін I при температурі +54 <sup>0</sup> С (1,5–2,5 год) ↓
	Парафін II при температурі +54 <sup>0</sup> С (1,5–2,5 год) ↓
	Охолодження у воді або в снігу ↓
	Наклеювання блоків на брусочки

## Заливка матеріалу в целоїдин

Целоїдин — це термопластичний матеріал, який складається з мононітроцелюлози, динітроцелюлози і камфори. Вогне-небезпечний. 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 фото, кіно- та рентгенівських плівок, обробляючи їх упродовж 30-ти хв 40%-им розчином КОН або NaOH. Таку плівку 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 цей 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 в робочий посуд, необхідно ретельно протирати шийки банок бавовняною або льняною тканиною.

### *Схема заливки матеріалу в целоїдин*

1. Зневоднити матеріал у 50<sup>0</sup>, 60, 70, 80, 96<sup>0</sup> і абсолютному етиловому спирті (дві порції) по 24 год у кожному.
2. Перенести матеріал у суміш абсолютного етилового спирту і диетилового спирту (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.
6. Ущільнити матеріал. У фарфорові чашечки налити 10 %-ий розчин целоїдину, перекласти у нього матеріал і закрити чашечки годинниковим склом. Термін ущільнення — 2—4 доби.
7. Вирізати целоїдинові блоки (облямівка целоїдину по пе-

риметру матеріалу повинна бути 2 мм) і помістити їх у 70<sup>0</sup> 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 70<sup>0</sup> етиловому спирті.

**Заливка матеріалу в 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.

Разом з тим, даний метод необхідно приміняти для заливки матеріалу, структури якого при цьому легко розшаровуються: рубчасті органи, очне яблуко, ембріональний матеріал тощо.

### Схеми заливки шматочків матеріалу в целоїдин

Схема №5. Заливка матеріалу в целоїдин (Г.А. Меркулов, 1961)

I. Фіксація	Формалін 10–15%-ий (24 год) Спирт-формалін (24 год) Рідина Карнуа (2–4 год) Спирт 96–100 <sup>0</sup> (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 <sup>0</sup> (24 год) ↓ Спирт абсолютний або 96 <sup>0</sup> (24 год) ↓	
III. Заливка в целоїдин	Суміш спирту з ефіром (6–24 год): можна пропустити ↓ Целоїдин рідкий 4–5%-ий (2–4 доби) ↓ Целоїдин густий 10%-ий (1–2 доби) ↓ Ущільнення целоїдину (2–3 доби) ↓ Приклеювання целоїдинових блоків на брусочки і зберігання у 70 <sup>0</sup> -му спирті	

**Схема №6. Методика швидкої заливки маленьких шматочків  
(до 2 мм) матеріалу в целоїдин (Г.А. Меркулов, 1961)**

**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), і 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.

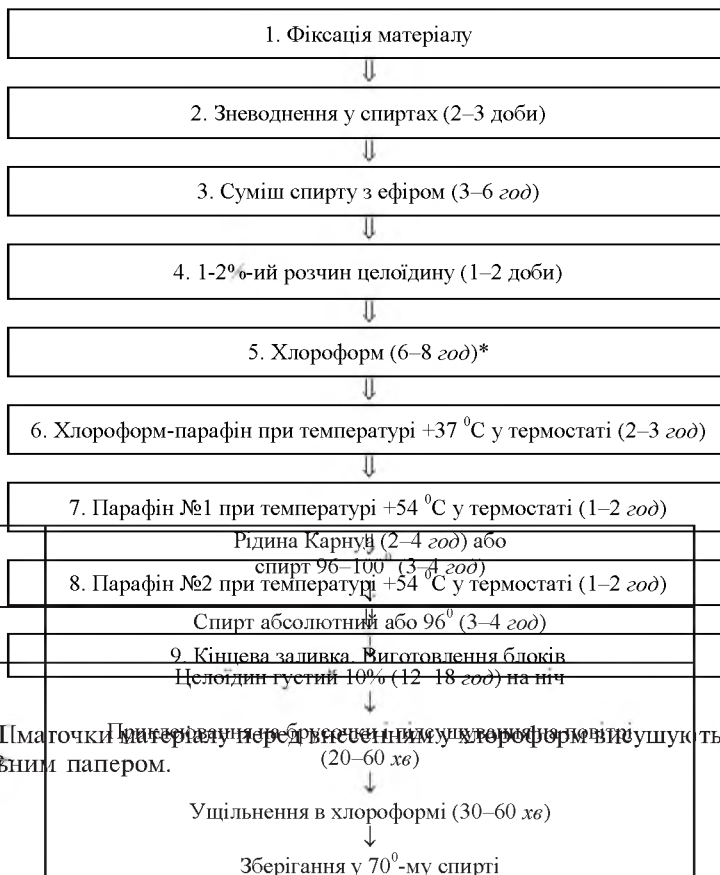
Для цієї заливки рекомендується використовувати м'який парафін із температурою плавлення +50—52 °С.

Ця заливка — не придатна для виготовлення препаратів з вивчення ліпідів. Її можна рекомендувати для отримання препаратів, у яких виявляються нуклеїнові кислоти, білки, білкові функціональні групи, амінокислоти, деякі мінеральні речовини.

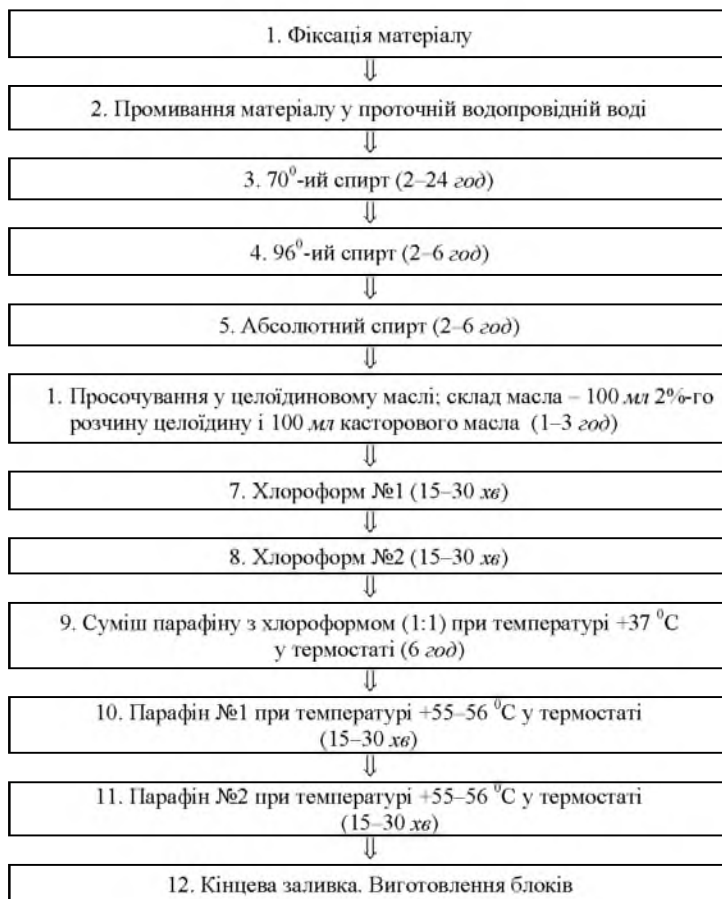
**Найбільш прості** методи целоїдин-парафінової заливки наведені в схемах №7 і 8.

## Схеми заливки шматочків матеріалу в целоїдин-парафін

Схема №7. Заливка шматочків матеріалу в целоїдин-парафін  
(Г.А. Меркулов, 1961)



**Схема №8. Заливка шматочків матеріалу в целоїдин-парафін  
(О.І. Кононський, 1976)**



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**

Заливка у желатин застосовується переважно у тих випадках, коли матеріал дослідження не можливо залити у 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 чимало 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 беруть прозорий харчовий желатин і з нього готують два розчини: 12,5 і 25%-ий на 1%-ій 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 + 37 °С) до розчинення. Після цього частину приготованого желатину розводять теплою 1%-ою карболовою водою (1:1) і таким чином отримують 12,5%-ий розчин. Краще готувати розчин із желатину в невеликих кількостях і в міру необхідності.

Допускається зберігання розчинів желатину в прохолодному місці. Просочування матеріалу проводять у термостаті при температурі +37 °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 перекладають у 12,5%-ий розчин желатину на 3—20 год при температурі +37 °С.

3. Після цього матеріал поміщають у 25%-ий розчин желатину на 3—20 год при температурі +37 °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 з розрахунком, щоб навколо шматочка матеріалу була облямівка желатину товщиною 2—3 мм.

7. Ущільнюють блоки у 20—25%-му розчині формаліну — 24 год.

8. Зберігають блоки у 10%-му розчині формаліну.

9. Із блоків готують зрізи на заморожувальному мікротомі.

Желатинові зрізи фарбують так само, як і інші зрізи, виготовлені на заморожувальному мікротомі. Заводять зрізи у гліцерин, гліцерин-желатин. Можна заводити їх у бальзам, попередньо зневоднюючи у спиртах і просвітлюючи у 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 апаратах, що називаються мікротомами.

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 (ротатійні) (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 полозковому мікротомі) при вертикальному переміщенні зразка (як в ротатійному).



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 у 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).

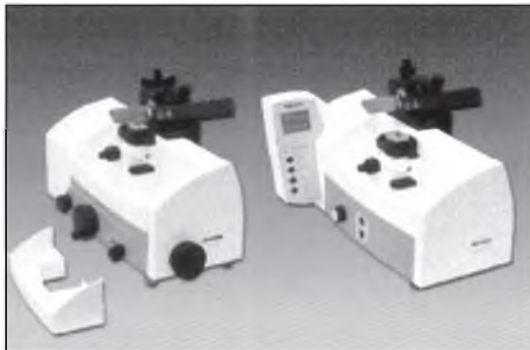
Заморожувальний мікротом має спеціальний пристрій для заморожування матеріалу — металевий столик. Заморожування досягається за допомогою вуглекислоти, яка по спеціальному шлангу надходить в порожнину столика від балону. В даний час широкого поширення у гістологічній практиці набули заморожувальні мікротоми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

На сьогодні для гістологічних та гістохімічних досліджень в Україні випускають заморожувальні мікротоми 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 свіжозамороженого 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 мікромом „Leica SM 2000 R”.



A.

B.

*Рис.2.* Полосковий мікромом. А. „НМ 430” (ручний); В. „НМ 450” (електромеханічний). Товщина зрізів 1–60 мкм.



*Рис.3.* Ротаційний мікромом „НМ 325” з ручним приводом і системою подачі зрізів. Для виготовлення зрізів із матеріалу, залитого у парафін (товщина зрізів 0,5–60 мкм).



*Рис.4.* Ротаційний мікромом „НМ 340 Е” з електромеханічною системою подачі зразка матеріалу та ручним ріжучим приводом. Має три швидкості подачі матеріалу. Товщина зрізів 0,5–100 мкм.



*Рис.5.* Ротаційний мікромом „НМ 360” з автоматичним приводом і системою подачі зрізів. Забезпечений програмними режимами для виготовлення та вирівнювання зрізів (товщина зрізів 0,25—60 *мкм*).



*Рис.6.* Ротаційний і полозковий мікромом „НМ 200 — Ergostar”.



*Рис. 7.* Вібраційний лезовий мікромом „Leica VT 1000 S”.



*Рис. 8.* Мікромом-криостат „Leica CM 1850” для виготовлення заморожувальних зрізів.

### Мікротомні ножі

Для виготовлення зрізів застосовують різні ножі. Вони мають різноманітну довжину, форму сторін та шліф (кут лева).

Довжина ножа може бути від 8 до 25 см. Найкоротші ножі (8—10 см) придатні тільки для різання 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, 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.

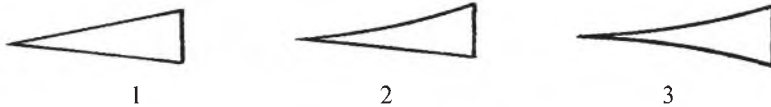


Рис. 9. Мікротомні ножі: 1 — прямий; 2 — плоскоувігнутий; 3 — подвійноувігнутий.

Під шліфом ножа розуміють кут перетину лева. Кут лева 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).

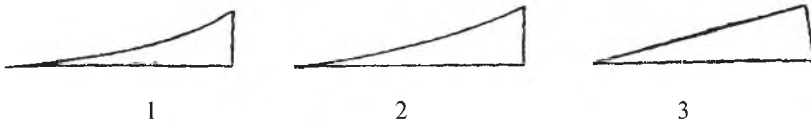


Рис. 10. Мікротомні ножі з різними шліфами: 1 — ніж групи "а"; 2 — ніж групи "в"; 3 — ніж групи "с".

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.

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, ніж целоїдин, затуплює ножі, і тому для різання блоків, залитих у парафін, слід використовувати твердіші ножі.

Більшість коротких ножів для заморожувальних мікротомів відносять до прямих ножів категорії "с". Разом з цим 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, щоб лезо ножа торкалося 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 підходити до блока 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 зірватися з брусочка. Непридатний для виготовлення зрізів і дуже сильний нахил ножа. У цьому випадку ніж буде зіскоблювати, а не різати об'єкт (*рис.11./3./*).

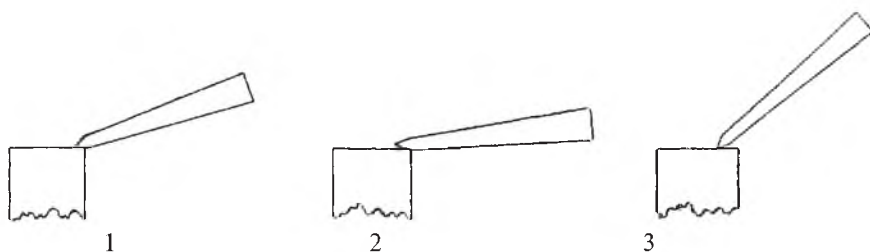


Рис.11. Можливі положення мікротомного ножа під час роботи:

- 1 — правильне положення (кут різання  $15^{\circ}$ );
- 2 — неправильне положення (ніж підходить до блока під кутом, який утворився площинами загострення і основою клину);
- 3 — неправильне положення (сильно крутий нахил ножа).

Кут різання утворюється перетином верхньої горизонтальної площини блока з нижньою площиною ножа. Найкращим для виготовлення зрізів є кут різання, який становить  $15^{\circ}$ .

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

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

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

Загострення мікротомних ножів умовно можна поділити на три етапи:

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

При наявності на лезі ножа глибоких зазубрин 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 загострення на камені необхідно до стрижня ножа приєднати ручку, а на спинку ножа марки “3” — насадити насадку, або так званий жолобоподібний напрямляч “обушок” (рис.12). Слід знати, що загострення мікромомного ножа потрібно робити за допомогою одного і того ж самого “обушка”.

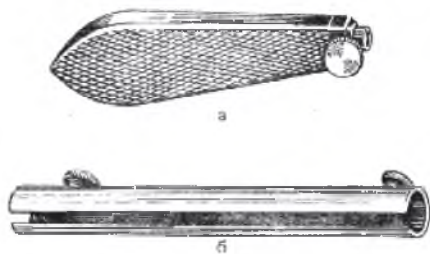


Рис.12. Ручка (а) та «обушок» (б) для загострення мікромомного ножа.

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 змащений 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.

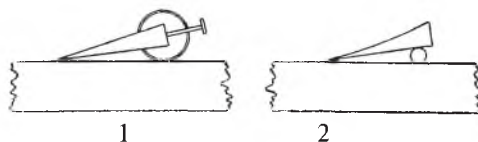


Рис.13. Положення ножів на бруску для загострення:  
1 — прямий ніж з жолобоподібним напрямлячем;  
2 — плоскоувігнутий ніж з дротяним напрямлячем.

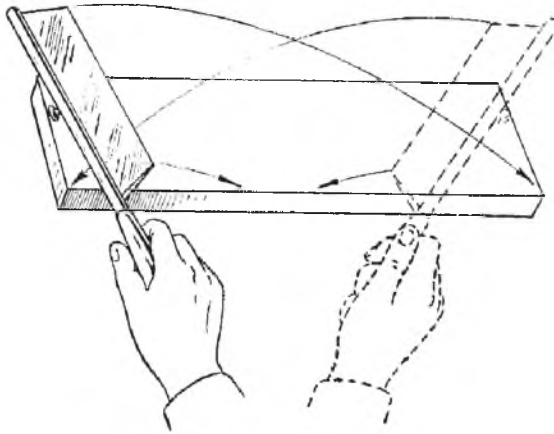


Рис.14. Схема загострення мікротомного ножа.

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 тонкий шар пасту, 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.

1. Швидкість виготовлення гістологічних препаратів у зв'язку з відсутністю потреби тривалої заливки матеріалу. Тому що

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 площею 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 прокладку із 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.

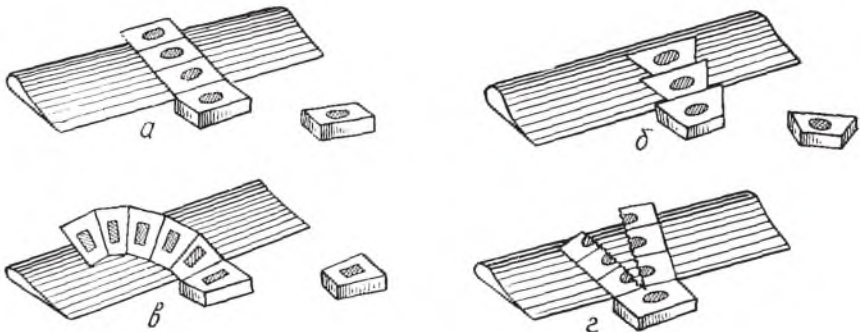
Надзвичайно важливим для вивчення багатьох речовин є виготовлення зрізів із свіжозамороженого матеріалу за допомогою мікротом-кріостату. На цьому апараті отримують зрізи то-

вщиною 10-15 *мкм*, які не скручуються і щільно прилягають до предметного скла без застосування клейких речовин.

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

### **Виготовлення парафінових зрізів**

Парафінові зрізи готують із матеріалу, залитого в парафін. Для виготовлення зрізів використовують полозкові або ротаційні мікромомі. Брусочок з блоком, якому попередньо була надана форма чотирикутної призми із зрізаною вершиною, закріплюють у тримачі блока (об'єктотримачі). У спеціальний тримач вставляють і закріплюють мікромомний ніж. Підбирають кути різання і нахилу ножа. Механізмом мікроподачі підіймають або опускають блок до поверхні ножа. Рухами мікромомного 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 мікромомного ножа повинен бути плавним і швидким. Якщо матеріал залитий якісно, правильно підібрані кути різання і нахилу мікромомного ножа, лезо якого гостре, — то зрізи розташовуються на поверхні ножа у вигляді рівної стрічки (рис. 15, *а*).



*Рис. 15.* Зразки отримання зрізів із парафінових блоків (за В. Г. Єлисеєвим 1956): *а* — зрізи у вигляді стрічки; *б, в* — зрізи з неправильними контурами; *г* — рвані зрізи.

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

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

**Таблиця 2. Імовірні 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 мікротомного 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 обезводненні.
Зрізи скручуються	Висока температура навколишнього середовища; малий кут нахилу мікротомного ножа; м'який парафін.
Поперечний зріз матеріалу — неоднорідний	Погане зневоднення.

Отримані зрізи знімають з ножа м'яким пензликом або препарувальною голкою (не торкаючись ножа) і переносять у теплу (40 °С) 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, які не були в ужитку, миють у теплому мильному розчині, потім промивають дистильованою водою, висушують у термостаті і знежирюють у суміші етилового спирту та ефіру (1:1). У цій же суміші їх можна зберігати. Стекла, які були в ужитку, попередньо витримують в органічних розчинах.

Із суміші стекла витягують пінцетом, не торкаючись до них пальцями, і висушують при кімнатній температурі. Одну поверхню висушеного скла вкривають клейкою речовиною — суміш яєчного білка з гліцерином (1:1). Яєчний білок перед виготов-

ленням суміші фільтрують. Для цього його збивають (збовтують) до утворення піни і фільтрують через фільтрувальний папір, попередньо змочений дистильованою водою, протягом 24 год. У клейку суміш, для попередження процесів гниття, додають кристалик тимолу або камфори. Маленьку краплю клейкої суміші на поверхню скла наносять скляною паличкою і розмазують пальцем, який попередньо обробляють етиловим спиртом. Для звертання білка предметні стекла проносять 2—3 рази 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 стекла 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.

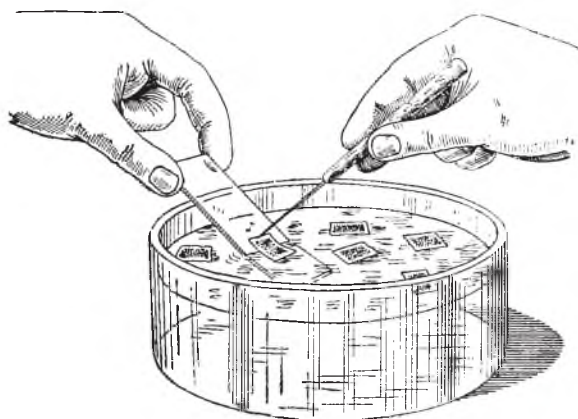


Рис. 16. Технологія перенесення парафінових зрізів з води на предметні стекла.

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 стекла зі зрізами поміщають у термостат (+36 °С) на 6 год.

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

### ***Методика нанесення парафінових зрізів на предметні стекла сухим способом***

Цим методом користуються у тих випадках, коли методика не допускає змочування водою парафінових зрізів, як, наприклад, при виявленні глікогену за методом Беста.

Парафінові зрізи обережно переносять з мікротомного ножа на предметні стекла. На останніх їх обережно розправляють, користуючись пензликом та препарувальною голкою. Потім ретельно розгладжують м'яким пензликом, стараючись, по можливості, розправити всі складки, а потім сильно притискають до предметного скла складеним у декілька разів фільтрувальним папером, який змочують 96<sup>0</sup> стилевим спиртом. Звертають увагу на те, щоб під склом не було міхурців повітря. Потім такі предметні стекла обережно нагрівають над полум'ям спиртівки, не доводячи парафін до розплавлення. Нанесені таким чином на предметні стекла зрізи можна відразу, без спеціального попереднього висушування, піддавати подальшій обробці. Недоліком такого методу є лише те, що тоненькі 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—80<sup>0</sup> стилевим спиртом, нагрітим до температури +45—50 °С. Парафінові зрізи можна переносити у посуд із холодним спиртом, який потім із зібраними у ньому зрізами ставлять у термостат за температури +45—50 °С і залишають там до моменту розправлення зрізів. Посуд зі спиртом повинен бути прикритий кришкою. Не можна користуватися для збирання парафінових зрізів 90—96<sup>0</sup> 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 рази фільтрувальним папером і висушують у термостаті за температури +37—40 °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 70<sup>0</sup> етиловим спиртом за допомогою м'якого пензлика. При необхідності зрізи на лезі ножа розправляють легким натиском пензлика. Розправлені зрізи поміщають у чашку Петрі, заповнену 70<sup>0</sup> етиловим спиртом. У деяких випадках для нормального розправлення зрізи можна перенести із 70<sup>0</sup> етилового спирту в 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 96<sup>0</sup> етиловому спирті.
2. Наносять на стекла тоненький шар білка-гліцерину.
3. Переносять зрізи із чашки Петрі на стекла.
4. Швидко підсушують їх фільтрувальним папером.
5. На зріз наносять кілька крапель 96<sup>0</sup> 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 96<sup>0</sup>, а потім абсолютного етилового спирту.
9. Поміщають зрізи на 10 хв у суміш 96<sup>0</sup> етилового спирту з ефіром (1:1).
10. Проводять їх через спирти знижуючої міцності (абсолютний, 96<sup>0</sup> та 70<sup>0</sup>).
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 70<sup>0</sup> етиловий спирт.
2. Зрізи переносять у 50<sup>0</sup> 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 30<sup>0</sup> етиловим спиртом (м'яким пензликом). Виготовлені зрізи поміщають на предметні стекла за допомогою пензлика, змоченого спиртом. Стекла попередньо змащують кількома краплями суміші білка і гліцерину. Зрізи розправляються при температурі +50—60 °С, після чого їх витримують у термостаті при температурі +37 °С впродовж однієї доби.

### ***Виготовлення желатинових зрізів***

Виготовляють зрізи на заморожувальному і полозковому мікротомі. 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 у об'єктотримачі.
4. Виготовляють зрізи.
5. М'яким пензликом зрізи переносять у 30<sup>0</sup> етиловий спирт.
6. Зрізи наносять на підготовлені предметні стекла.
7. Підсушують їх фільтрувальним папером.
8. Висушують їх у термостаті при температурі +37 °С упродовж 10—20 хв.

9. Промивають висушені зрізи у теплій воді при температурі +37 °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 розрізняються за допомогою світлового мікроскопу. 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 із парафіну та целоїдину (ксилол, хлороформ, бензол тощо). Один із розчинників наливають в скляну баночку (50—100 мл) і занурюють у нього кінець предметного скла із зрізом на 1—2 хв, після цього предметне скло із зрізом послідовно переносять у баночки із 70° і 96° 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 використовують різноманітні барвники. Залежно від походження, їх ділять на натуральні і штучні (синтетичні). Натуральні барвники бувають рослинного (гематоксилін) і тваринного походження (кармін). За фарбуючою спроможністю певних структур сприймати барвники останні ділять на основні (ядерні), кислі (цитоплазматичні), нейтральні та індіферентні.

**Основні барвники** — це основи або їх солі. Вони фарбують структури, які містять кислотні залишки нуклеїнових та інших

кислот. Здатність певних структур сприймати основні барвники називають базофілією.

**Кислі барвники** за хімічною природою — це кислоти або їх солі. Вони фарбують структури клітин і міжклітинної речовини, до складу яких входять основи. Структури, які фарбуються кислими барвниками, називають ацидофільними (оксифільними).

**Нейтральні барвники** представляють собою суміші, які містять основні і кислі барвники. Прикладом таких барвників є фарба Романовського-Гімза, Нейтральрот та інші.

**Індиферентні барвники** характеризуються тим, що вони здатні розчинятися тільки в певних речовинах, виявляючи їх. До таких барвників належать судани, шарлахром та інші.

Барвники також класифікують залежно від їх хімічної будови (азобарвники, хінонімідні та інші).

### **Основні барвники**

У гістологічній практиці найбільш часто використовують основні барвники: гематоксилін, кармін та анілінові (метилена синька, тіонін, толудіновий 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 порошка 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 Деллафільда, Ганзена, Майєра, Караці, Вейгерта, Генденгайна та інші.

**Гематоксилін Ерліха** готують таким чином. У скляну банку з широкою горловиною наливають 100 мл 96<sup>0</sup> 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 підві-

коння) 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 протягом 3—15 хв.

**Гематоксилін Бомера** готують так. 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 96° 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 і до неї, для попередження утворення цвілі, додають декілька кристаликів тимолу або камфори. Забарвлюються зрізи цією фарбою протягом 5—10 хв.

**Гематоксилін Делафільда** має кращі фарбувальні 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 горловиною і додають до нього 40 мл 10 %-го спиртового розчину гематоксиліну (на 96° 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 96° 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 додають окиснювач.

Спосіб його приготування. До 200 мл 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 Ган-

зена готують не більш як на 6 місяців. Перед фарбуванням його фільтрують. Зрізи забарвлюють цим гематоксиліном протягом 2—3 хв.

**Гематоксилін Майєра** 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 в ній цвілі, у 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 додають 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, у зв'язку з наявністю у ній сильних окиснювачів, швидко псується. Розчин *Вейгерта I* — це 1%-ий розчин гематоксиліну в 96° етиловому спирті. *Розчин Вейгерта II* готують 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 протягом 3—5 хв.

**Гематоксилін Гейденгайна (залізний)** передбачає виготовлення двох розчинів. *Перший розчин* — це 3%-ий водний розчин залізних галунів (протрава). *Другий розчин* готують, розчиняючи в 10 мл 96° 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 ба-

зофільних). 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 підлученій дистильованій воді. Для цього у воду додають декілька крапель нашатию.

**Кармін** отримують із жирового тіла і яєчного жовтка комах кошенилі. Це кристалічний порошок червоного кольору, який не розчиняється у ефірі та етиловому спирті. У воді кармін розчиняється тільки після додавання в неї калійних галунів або сірчаноокислого 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'ячать 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. Літисвий кармін Орта.** До 100 *мл* насиченого водного розчину калію вуглекислого додають 2,5 *г* карміну і кип'ячать. 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 у 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 порошку 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%-ні водні або спиртові розчини еозину. Спиртові розчини готують на 40°—96° 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 приміняють 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 Гізон. 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-Гімза** надходить у реалізацію у готовому стані. Використовують її для фарбування мазків крові. Пе-



ред фарбуванням розводять — 1—2 краплі фарби в 1 мл дистильованої води.

**Нейтральрот** (нейтральний червоний) — порошок черно-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 чорний (судан чорний V). Реалізують їх у вигляді порошку.

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

### **Технологія фарбування**

Фарбувати зрізи на предметних стеклах можна шляхом їх перенесення у фарбу (фарби) або шляхом нанесення фарби на зріз. У першому випадку фарбу наливають у широкі скляні ємкості невеликої висоти. Для фарбування зрізів шляхом нанесення барвника на зріз використовують кювети, ексикатори і скляні палочки. На ексикатор (кювет) кладуть паралельно скляні палочки, кінці яких з'єднують гумовими трубками. На паличках розміщують предметні стекла із зрізами (рис. 17).

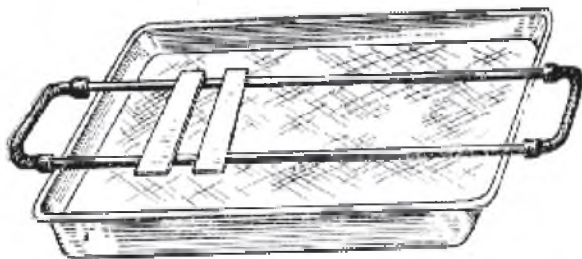


Рис.17. Пристосування для розміщення гістозрізів для фарбування їх шляхом нанесення барвника на зріз.



Після цього на зріз за допомогою піпетки наносять краплями фарбу. Якщо фарбування потребує тривалого часу, то для запобігання випаровування фарби ділянку розміщення зрізу накривають маленьким годинниковим скельцем або чашечкою. Подібний ефект можна отримати, помістивши ці предметні стекла 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 або на годинникових скельцях.

Після фарбування зрізи промивають у воді та зневоднюють в етиловому спирті зростаючої міцності (70<sup>0</sup>, 96<sup>0</sup>, абсолютний). У кожній порції зрізи витримують 1—2 *хв*. Зневоднені зрізи просвітлюють у ксилолі (2—3 *хв*) і переносять на 1—2 *хв* у карбол-ксилол. Останній запобігає загніванню зрізів. Його готують, додаючи у 100 *мл* ксилолу декілька кристалів карболової кислоти. Після цього залишки ксилолу з предметного скла видаляють фільтрувальним папером, і зрізи заводять (поміщають) у тверднуче і прозоре середовище.

### **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 застигла смола хвойних дерев. Він добре розчиняється у ксилолі, толуолі і бензолі. У гістологічній роботі переважно використовують наступні сорти бальзаму: канадський, ялицевий і сибірський кедровий. Серед них найбільш уживаним є канадський бальзам. Він добре просвітлює зрізи, прозорий, його показник заломлення світла майже такий, як і в скла, швидко висихає. Готують його наступним чином. Шматочки бальзаму поміщають у скляний посуд і заливають їх роз-

чинником (краще ксилолом). Розчинник повинен тільки вкривати бальзам. Останній розчиняється у ксилолі, при кімнатній температурі, декілька діб. Для прискорення цього процесу посуд з бальзамом переносять у термостат (температура  $+37-40^{\circ}\text{C}$ ).

Після розчинення бальзаму готують розчин бажаної густоти, додаючи при цьому до базового розчину розчинник або дають можливість останньому випаруватись з нього. Густина готового бальзаму повинна відповідати густині рідкого меду.

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. 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.

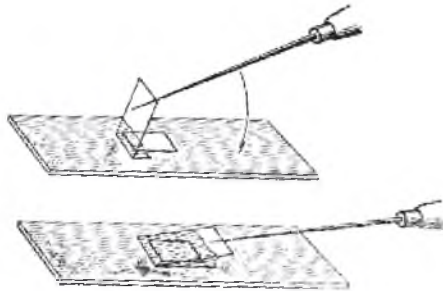


Рис. 18. Заведення гістологічних зрізів.



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 у 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 — дибутилсебацінат. Методика закладення 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 у нього не потрапляли домішки пилу.

### ***Вміщення 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 частини 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 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, за Ван—Гізон.

### *Фарбування целоїдинових і заморожених зрізів гематоксиліном та еозином*

Для фарбування цих зрізів найбільш часто використовують гематоксилін Ерліха, Бомера або Караці, спиртовий або водний розчин еозину. Виготовлені зрізи наклеюють на предметні стекла. Їх також можна фарбувати у чашечках або у годинниковому склі. Заморожені зрізи перед фарбуванням необхідно знежирити. Для знежирення використовують 96<sup>0</sup> етиловий спирт або карбол-ксілол. Термін знежирення у спирті триває від 20 хв до однієї доби (чим довше — тим краще). Знежирення у карбол-ксілолі відбувається значно швидше. Для цього зрізи поміщають на 2—3 хв у 96<sup>0</sup> 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 96<sup>0</sup> етиловий спирт, а затим — у дистильовану воду.

Целоїдинові зрізи звільняють від ущільнюючого середовища (целоїдину). Для цього їх поміщають у ксілол на 2—3 хв, проводять через 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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.

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 (перекрашування гематоксиліном) зрізи диференціюють до тих пір, поки вони не набудуть червоного 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 (70°, 96°). 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 — у рожево-червоний.

### ***Фарбування парафінових зрізів гематоксиліном та еозином***

Після виготовлення зрізів їх наклеюють на предметні стекла. Зрізи можна фарбувати і в чашечках або годинниковому склі. 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 знижуючої міцності (96°, 70°) 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 у спиртах зростаючої міцності (70°, 96°). У кожній порції їх витримують 1—2 хв.

9. Просвітлюють зрізи у карбол-ксилолі (2—3 хв).

10. Заводять зрізи у бальзам.

**Результати фарбування.** Ядра клітин зафарбовані у синій колір, а цитоплазма — у рожево-червоний.

### **Фарбування зрізів за Ван-Гізон**

За цим методом фарбують парафінові і целоїдинові зрізи на предметних стеклах. Фарбування товстих заморожених зрізів не завжди приводить до бажаних наслідків. 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 етиловий спирт знижуючої міцності (96<sup>o</sup>, 70<sup>o</sup>) на 2—3 хв.
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 96<sup>o</sup> етилового спирту (по 1—2 хв у кожній порції).
9. Просвітлюють зрізи у карбол-ксилолі (2—3 хв).
10. Заводять зрізи у бальзам.

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

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

Для фарбування за Ван-Гізон, як виняток, можна використовувати гематоксилін Ерліха, Делафільда. При цьому для 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-Гізон, Маллорі, Масоном та фарбування азокарміном за Гейденгайном.

Для фіксації матеріалу використовують переважно хромосулему 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 у чашечках і годинниковому склі.

### **Фарбування за способом 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) — фенілрозанілін — 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 різними назвами (Alkaliblau, Wasserblau, Methylblau, Chinablau, Bleu de Lyon).

#### *Методика фарбування:*

1. Зрізи поміщають на 2—3 хв у ксилол.
2. Проводять їх через 96° і 70° 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 в шойновиготовленому 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 96<sup>0</sup> спирті 3—5 хв і більше, контролюючи при цьому за допомогою мікроскопа появу в них волокнистих структур (колагенові волокна).
11. Проводять зрізи через абсолютний етиловий спирт (2 хв), просвітлюють у ксилолі або карбол-ксилолі (2 хв) та заводять у бальзам.

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

### **Фарбування за Гейденгайном**

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 звільняють від парафіну ксилолом (2—3 хв).
2. Переносять їх у 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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—60 °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 “G<sup>1</sup>” 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 “G<sup>1</sup>”, 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 96° 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 (96°).

8. Промивають зрізи у дистильованій воді впродовж 0,5 хв.

9. Переносять їх на 1—3 год у 5%-ий водний розчин фосфорно-вольфрамової кислоти (для протравлення сполучної тканини). Якщо зрізи фарбують у чашечках, їх переносять у цей розчин скляними голками.

10. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.

11. Забарвлюють зрізи у розчині анілін-блау-оранж упродовж 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 у 2—3 рази дистильованою водою. Такий розчин добре зберігається.

12. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді.

13. Диференціюють їх у 96<sup>0</sup> спирті (контролювати під мікроскопом) до чіткого виявлення волокон синього кольору.

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

**Результати фарбування.** Колагенові та ретикулярні волокна забарвлені у 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 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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).

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 у 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 (запобігати перефарбуванню зрізів). При роботі на предметних стеклах на зріз наносять лише декілька крапель фарби.

*Приготування фарби:* 2 г водорозчинного 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 відходить 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 96<sup>0</sup> та абсолютний спирти (по 2 хв у кожному), просвітлюють у ксилолі (2 хв) і заводять у бальзам.

**Результати фарбування.** Ядра клітин забарвлені у чорний або синій колір; цитоплазма — у рожевий або червоний; колагенів та ретикулярні волокна — у 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 літєвий 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 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт (на 2 хв у кожний).
3. Поміщають зрізи у водопровідну воду на 3 хв.

4. Зрізи фарбують лігесвим карміном Орта впродовж 10—15 хв.

5. Зрізи (не промиваючи у воді) переносять у 1%-ий солянокислий спирт (70°) 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 70° етиловому спирті.

7. Переносять зрізи у профільтрований розчин резорцин-фуксину (фукселіну) на 20—30 хв.

*Технологія приготування фукселіну:*

У фарфорову чашку наливають 200 мл дистильованої води і розчиняють в 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 96° етилового спирту і обережно нагрівають до кипіння на водяній бані. Потім чашку знімають з водяної бані і обережно пінцетом зіскоблюють з фільтра залишки фарби у спирт, після цього фільтр викидають. Спиртовий розчин фарби охолоджують і фільтрують у градуйований циліндр, доводячи об'єм до 200 мл 96° етиловим спиртом і додають 4 мл концентрованої соляної кислоти (питома маса 1,16—1,19).

Фукселін придатний для використання впродовж 1,5 — 2 місяців.

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

9. Диференціюють їх у 1%-му солянокислому або 96°-му етиловому спирті. Диференціювання закінчують, коли на зрізі, за допомогою мікроскопа, виявляється сітка еластичних волокон (приблизно через 3—5 хв).

10. Зрізи проводять через 70° і 96° етиловий спирт (по 2 хв), просвітлюють у карбол-ксилолі (2—3 хв), ксилолі і заводять у бальзам.

**Результати фарбування.** Ядра клітин забарвлені у червоний колір, еластичні волокна — у темно-синій.

### **Фарбування фукселіном у модифікації Харта**

Для фарбування використовують не чистий фукселін, а його 5%-ий розчин, приготований на 1%-му солянокислому спирті (70°). 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 96° і 70° 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 96° 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.

#### *Методика фарбування:*

1. Парафінові і целоїдинові зрізи звільняють від парафіну і целоїдину ксилолом (2—3 хв).
2. Переносять зрізи у 96° і 70° 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—40 °С.

Приготування розчину орсеїну:

Орсеїн — 1 г;

Концентрована соляна кислота — 1 мл;

Спирт етиловий 96<sup>0</sup> (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 70<sup>0</sup>-му 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 96<sup>0</sup> 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 Фути. Метод Фути є лише модифікацією методу Більшовського, але якісно перевершує його. Так, завдяки застосуванню марганцевокислого калію, ядра клітинних елементів або 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 водопровідній 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:

Двохромовокислий калій — 100 г;

Вода гаряча — 1000 мл;

Неочищена сірчана кислота — 100 мл.

Для приготування цього розчину спочатку розчиняють у гарячій воді двохромовокислий калій, потім розчин охолоджують і тільки після цього доливають у 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 96<sup>0</sup> 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.

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

5. Одночасно можна піддавати імпрегнації невелику кількість зрізів, які повинні лежати у вільному стані і розправленому вигляді.

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 Фути*

**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 збовтують 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  $\text{AgNO}_3$  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 96° і 70° 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 марганцево-кислого 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 у шойно 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 вигідним 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 1 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 гіпосульфіту 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 70<sup>0</sup> і 96<sup>0</sup> 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 комбінувати з іншими методами фарбування (гематоксиліном та еозином, за Ван-Гізон тощо).

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

Розчин марганцевокислого калію, щавелевої кислоти і гіпосульфіту готують на дистильованій воді.

### ***Спрощена імпрегнація сріблом за методом Фута***

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

При імпрегнації зрізів за методом Фута і його модифікацією часто імпрегнуються і ядра клітин. Для запобігання цього 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 водопровідній (24—48 год), а потім декілька годин — у дистильованій воді.

Для імпрегнації найбільш придатні тонкі заморожені та желатинові зрізи. При необхідності можна використовувати па-

рафінові 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 слабопідкисленим 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 гіпосульфіту. 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 гіпосульфіту призводить до різкого ослаблення імпрегнації.

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 96° 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  $\text{AgNO}_3$  при температурі  $+37-40^\circ\text{C}$  (у темряві) на 10—20 хв.

4. Швидко промивають їх у дистильованій воді.

5. Зрізи переносять у профільтований 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. Обробляють далі зрізи, починаючи з пункту №11 описаного вище методу Фута.

### **Фарбування поперечно-посмугової м'язової тканини**

Фарбувати поперечно-посмуговану м'язову тканину (скелетну і серцеву) можна гематоксиліном та еозином. Але кращі результати отримують фарбуючи її за методом Гейденгайна.

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  $+37^\circ\text{C}$  — 4—6 год. Після фіксації матеріал промивають 24—48 год у проточній водопровідній воді, зневоднюють у 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  $96^\circ$  і  $70^\circ$  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 у  $50-70^\circ$  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 гіпосульфїту до повного знебарвлення.

5. Промивають зрізи у 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 у 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 — 1г, абсолютний або 96° 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 у 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 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 96° і абсолютний етиловий спирт (по 2 хв у кожному), просвітлюють у карбол-кислоті (2—3 хв) і заводять у бальзам.

**Результати фарбування.** Ядра клітин і волокон зафарбовані у чорний колір, а м'язові волокна — у сіро-синій.

Слід відмітити, що процес контролю диференціювання зрізів (п. 11) потребує значних навиків. При їх недостатності зрізи рекомендується диференціювати у 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 базофільних структур нервових клітин; методи Маркі і Вейгерта та їх модифікації для мієлінових оболонок; сріблення за Гольджі, Рамон-і-Кахалем та Більшовським-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 хроматофільної (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 нейроглиї.

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

Матеріал найкраще фіксувати у 96° етиловому спирті впродовж 5—8-ми тижнів. Одночасно при цьому матеріал знежирюється. Для повного його знежирення спирт декілька разів замінюють (через кожні 3—5 днів). Процес знежирення контролюють, змінюючи спирт, в якому знаходиться матеріал з водою. Якщо матеріал повністю знежирився, то ця суміш не мутніє.

Крім 96° етилового спирту для фіксації також використовують суміш спирту з формаліном (10%-ий розчин формаліну на 96° етиловому спирті). Фіксують матеріал у цій суміші 1—2 доби. Потім його переносять у 96° 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 фар-



буванням, з цією ж метою, витримують у 96<sup>0</sup> етиловому спирті 1—2 доби в термостаті при температурі +37—40 °С.

**Барвники:** толуїдинова синька, тіонін, крезиліовий 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 звільняють від парафіну ксилолом (2—3 хв), проводять через 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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 96<sup>0</sup> етиловому спирті.

2. Целоїдинові зрізи переносять у чашечку з одним з 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 (перфарбовані). При недостатньому їх зафарбовуванні повторюють підігрівання. Для отримання хороших результатів зрізи після нагрівання іноді залишають у розчині барвника ще 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—40 °С.

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

4. Диференціюють парафінові зрізи у 96<sup>0</sup>, а целоїдинові в абсолютному етиловому спирті. При цьому зрізи знебарвлюються і набувають блідо-синього кольору. Контроль диференціювання здійснюють за допомогою мікроскопа. Його закінчу-



ють 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 заводять 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 осевих циліндрів нервових волокон.

Матеріал фіксують у 10—12%-му 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 у дистильовану воду на 1—2 год.

**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 NH<sub>4</sub>OH, а згодом, для повного розчинення осаду, обережно струшуючи пробірку (через кожні 20—40 сек) додають лише по одній краплі NH<sub>4</sub>OH. 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 гіпосульфіту.

### *Методика імпрегнації:*

1. Переносять зрізи у 2%-ий розчин азотнокислого срібла на 24—48 год (у темряві).
2. Зрізи швидко промивають (по одному) у дистильованій воді (2—3 сек).
3. Перенесуть зрізи у 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).
10. Промивають зрізи у проточній воді (до 24 год).
11. Зневоднюють у 96° 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 у бальзам.

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

**П р и м і т к а.** 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 дів 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. Перенесуть 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.

***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 дів у 0,75–3 %-ий розчин азотнокислого срібла при температурі +30–35 °С (у термостаті).

2. Промивають матеріал упродовж однієї хвилини у дистильованій воді.

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

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

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

5. Виготовляють зрізи і заводять їх у бальзам.

**П р и м і т к а.** Застосування 0,75% розчину азотнокислого срібла використовують для імпрегнації матеріалу від ембріонів або новонароджених, 3%-ий розчин — від дорослих тварин.

**Результати імпрегнації.** Нейрофібрили імпрегнуються у чорний колір.

### ***Тотальна імпрегнація за Рамон-і-Кахалем***

Використовують для імпрегнації нейрофібрил у великих нервових клітинах.

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

#### ***Методика імпрегнації:***

1. Шматочки матеріалу швидко промивають упродовж 1—2 хв у дистильованій воді.

2. Переносять їх на 3—5 діб у 1%- 2%- 4%-ий розчин азотнокислого срібла при температурі +30—35 °С (у термостаті).

3. Шматочки матеріалу швидко промивають у дистильованій воді і поміщають на 24 год у розчин такого 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.

**П р и м і т к а.** Застосування розчинів азотнокислого срібла різної концентрації (1%- 2%- 4%-ий розчин) залежить від товщини шматочків матеріалу та від терміну перебування матеріалу у 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 такого складу: а) концентрована-

ний нейтральний формалін; б) 96° 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 днів і краще у термостаті при температурі +37 °С. Розчин готують в міру необхідності.

Після фіксації у цьому розчині матеріал додатково фіксують у 20%-му розчині нейтрального формаліну — від кількох днів до 3—4-х тижнів. Оптимальний термін фіксації у формаліні встановлюють експериментальним способом. Після фіксації матеріал споліскують у дистильованій воді. Із матеріалу готують зрізи на 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, приготованого 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 у розчин аміачного срібла, налитий у скляний посуд (годинникове скло) такого розміру, щоб воно вільно поміщалось на предметному столику мікроскопу (ємністю приблизно 5—10 мл). Перед перенесенням зрізів у 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  $\text{AgNO}_3$ , 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 збовтуванні. Розчин нашатирного спирту додають дуже обережно. Краще довести розчинення осаду тільки до стадії опалесценції розчину.

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 гіпосульфїду 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, просвітлюють 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 гірше. 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 спинномозкових вузлів у ембріонів.

### *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 70° 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 палочки та проведення імпрегнації у темряві.

6. Зрізи проводять через 2—3 порції підігрітого до 70 °С 1%-го розчину формаліну до тих пір, 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. 94*). 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 у термостат (температура +37 °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-Фаворського*

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

Матеріал (шматочки органів) товщиною 0,3—0,5 см фіксують у 80° 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 85° етиловий спирт.

#### *Методика імпрегнації:*

1. Матеріал переносять на дві доби у розчин 96° етилового спирту і 25%-го нашатирного спирту (1 мл розчину нашатирного спирту на кожні 50 мл 96° 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 у 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 +37 °С. Розчин азотнокислого срібла за цей термін замінюють 2—3 рази. Перед перенесенням шматочків у нову порцію розчину його попередньо підігрівують до температури +37 °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 концентрований (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 додають формалін. Пірогалову кислоту можна замінити гідрохіноном (3 г).

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. Фаворський пропонує швидко проводити шматочки матеріалу через спирт і рідкий целоїдин (70—80° спирт — 0,5—1 год; 96° 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 периферійних нервів і нервових закінчень. Вона відрізняється своєю простотою від усіх інших методів імпрегнації нервових волокон та закінчень сріблом.

Матеріал фіксують у 10%-му нейтральному формаліні не менше 24 год при температурі +37 °С, або декількох 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 в 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 даного 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

ють у останній порції 0,5—1 хв. При цьому зрізи набувають світло-коричневого або жовтого кольору. Якщо цей процес не відбувся, то зрізи переносять у 1%-ий, або 2%-ий розчин формаліну. У розчинах формаліну зрізи можуть ставати чорними. Для запобігання цьому явищу концентрацію формаліну знижують до 0,1%. Розчини формаліну швидко псуються (мутніють), особливо у першій чашечці. В 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 у 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 Вейгерта**

Перед фарбуванням матеріал фіксують у 10—15%-му розчині формаліну, або у 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 в 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 +37 °С — 2—4 тижні. Рідину замінюють 1—3 рази на тиждень.

2. Відмивають хромові солі з матеріалу в 70<sup>0</sup> етиловому спирті (у темряві), щоденно його замінюючи, поки він перестане забарвлюватися.

3. Проводять матеріал через спирти і заливають 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 в хромових рідинах обробка розчином оцтовокислої міді — не обов'язкова. Оцтовокисла мідь тільки підсилює забарвлення м'ялинових оболонок, але зрізи стають більш крихкими.

6. Промивають зрізи у водопровідній воді і фарбують їх у літєвому або залізного гематоксиліні 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 сприйматиме забарвлення.

**Приготування залізного гематоксиліну.** Готують два розчини:

Розчин №1. 10%-ий (основний) спиртовий розчин

гематоксиліну — 10 мл;

Спирт етиловий 96<sup>0</sup> — 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 літійового 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-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.

Строки диференціювання залежать 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.

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

**Результати фарбування.** Мієлінові волокна зафарбовані у 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 Вейгерта №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 +36 °С).

Флуорохром — це дрібнокристалічний порошок зеленого кольору. Його можна замінити хромовими галунами  $[\text{KCr}(\text{SO}_4)_2]$ .

2. Відмивають хромові солі у 70° етиловому спирті, зневоднюють і заливають у целоїдин (див. пункт 2 та 3 першого методу Вейгерта).

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

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

Розчиняють при нагріванні. Довівши розчин до кипіння, знімають ємкість з вогню і додають до розчину 5 мл льодяної оцтової кислоти, а потім, часто помішуючи, — ще й 5 г нейтральної оцтовокислої міді.

Обробляють блоки в розчині Вейгерта №2 впродовж 24 год при температурі +37 °С. Замість цілих блоків можна обробляти і целоїдинові зрізи (6—24 год). Застосування розчину Вейгерта №2 не є обов'язковим.

4. Блоки (або зрізи) переносять у 70° спирт на 1—2 год.

5. Наступна обробка зрізів відбувається за схемою першого методу Вейгерта (починаючи з пункту 6).

**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 у 10—15%-му розчині формаліну чи у рідині Орта.

### *Методика фарбування:*

1. Шматочки матеріалу переносять у 4—5%-ий розчин дво-хромовоокислого 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 заливають його в целоїдин.

4. Готують зрізи.

5. Фарбують зрізи в залізному або краще в літєвому гемато-ксиліні 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 двохромовоокислого калію, або у 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 марганцевоокислого 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:

Щавелева кислота — 1 г;

Сірчаноокислий калій

(Kalii sulfurosi —  $K_2SO_3$ ) — 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 марганцевоокислого калію і повторюють диференціювання.

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

**Результати фарбування.** Мієлінові оболонки зафарбовані у 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 у рідині Орта.

#### *Методика фарбування:*

1. Матеріал піддають хромуванню у 4–5%-му розчині дво-хромовоокислого калію або у рідині Мюллера впродовж 4–6 тижнів. Рідину замінюють 1–2 рази на тиждень.

2. Відмивають хромові солі з матеріалу у 70° етилоаому спирті (у темряві), щоденно замінюючи його, доки він перестане забарвлюватись.

3. Проводять матеріал через спирти і заливають 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 щойновиготовленим, 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.

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 у 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 хромованню впродовж 3—6 год у 1—2%-ій 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 метод 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 у синьо-чорний колір.

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

### ***Імпрегнація нервової тканини за методом Гліса***

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

#### ***Методика фарбування:***

1. Парафінові зрізи звільняють від парафіну ксилолом (2—3 хв), проводять через 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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 96<sup>0</sup> 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, приготованого на 80° етиловому спирті, на 15 хв.
5. Промивають їх у абсолютному етиловому спирті — 10 сек.
6. Відновлюють (два рази замінюючи) у розчині наступного складу: 400 мл 10%-го розчину формаліну, 50 мл 96° 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, просвітлюють 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: 96° 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.
3. Переносять матеріал у бідистильовану воду на 4 год (через кожну годину воду міняють).
4. Матеріал поміщають у 2%-ий розчин азотнокислого срібла, у темряві, на 7—10 діб (у термостаті за температури +37 °С).
5. Промивають його в 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: 70° (1—2 год), 96° (24 год, спирт міняють двічі), 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 в стані дегенерації.

**Методика фарбування волокон  
для отримання оглядових препаратів**

Матеріал фіксують упродовж 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 80° етиловий спирт.

**Методика фарбування:**

1. Зрізи поміщають у насичений (приблизно 12%-ий) водний розчин двохромовокислового калію на 2—3 доби (у термостаті за температури +37—40 °С).

2. Промивають їх у воді і переносять у гематоксилін Кульчицького на 1—2 год за температури +37—40 °С (приготування гематоксиліну див. пункт 5, фарбування мієлінових оболонок за методом Кульчицького).

3. Переносять зрізи, минаючи 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 марганцевокислового калію, потім промивають у воді і диференціюють у розчині щавелевої кислоти і сірчанокислового 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.

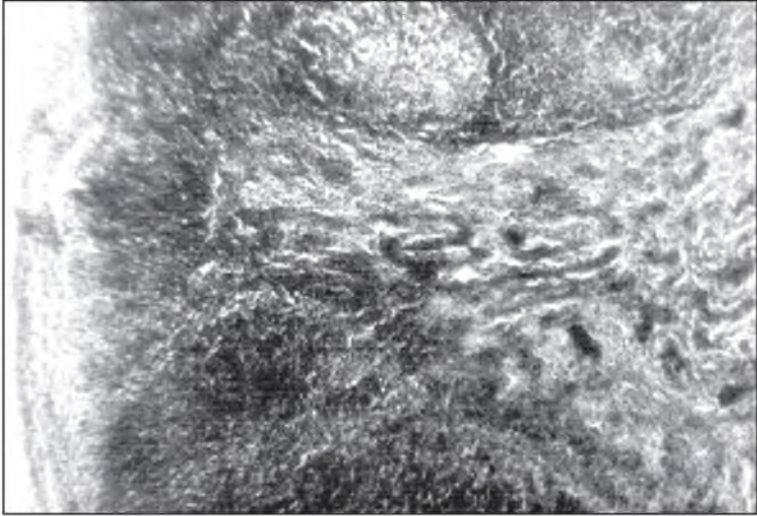
#### ***Методика фарбування:***

1. Зрізи товщиною 5—10 *мкм* переносять у насичений водний розчин двохромовоокислого калію на 3—5 і більше діб.

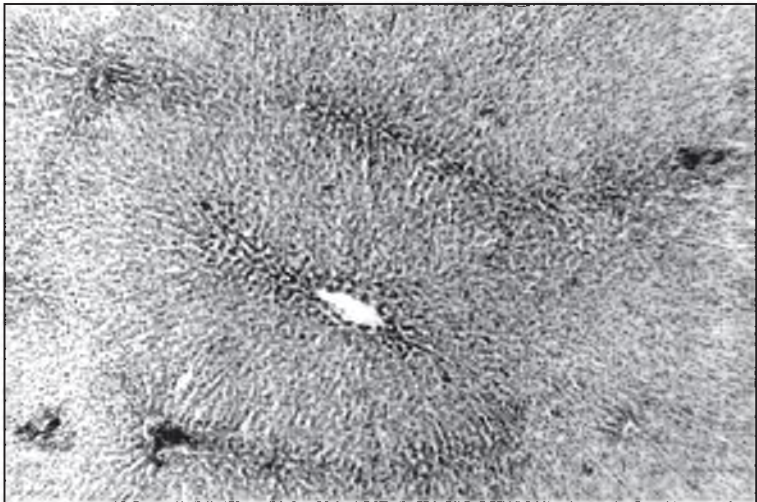
2. Промивають їх у воді і переносять у гематоксилін Кульчицького на 4—6 *год* за температури +50—60 °С або на 48 *год* за температури + 40 °С. Затим зрізи обробляють згідно з п. 3,4 першої методики.

***Результати фарбування.*** Нервові волокна в стані дегенерації мають нехарактерне забарвлення.

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

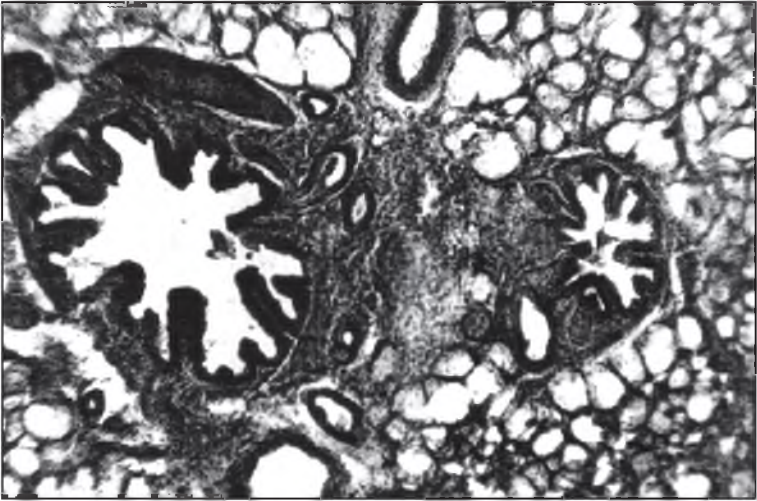


*Рис.20.* Мікроскопічна будова лімфатичного вузла великої рогатої худоби. Гематоксилін та еозин. X 56. Препарат Л.П. Горальського.

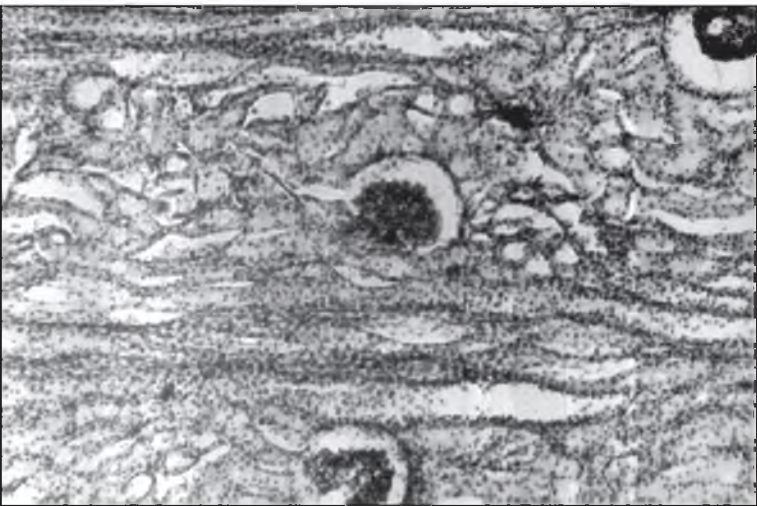


*Рис.21.* Мікроскопічна будова печінки великої рогатої худоби. Гематоксилін та еозин. X 56. Препарат Л.П. Горальського.

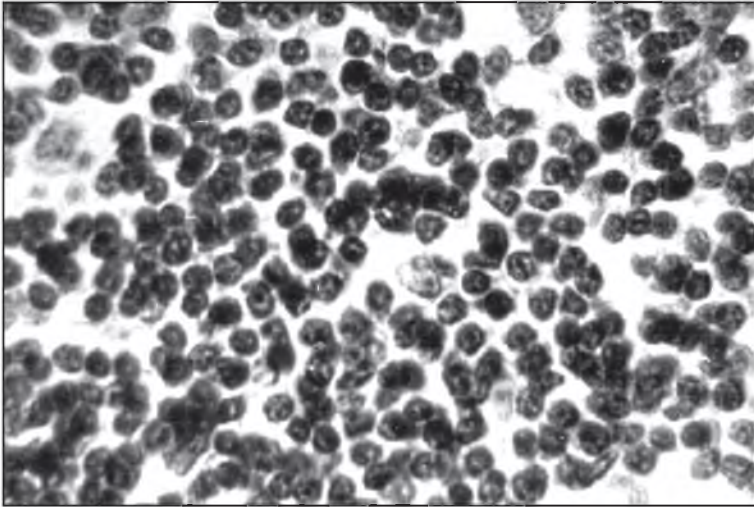




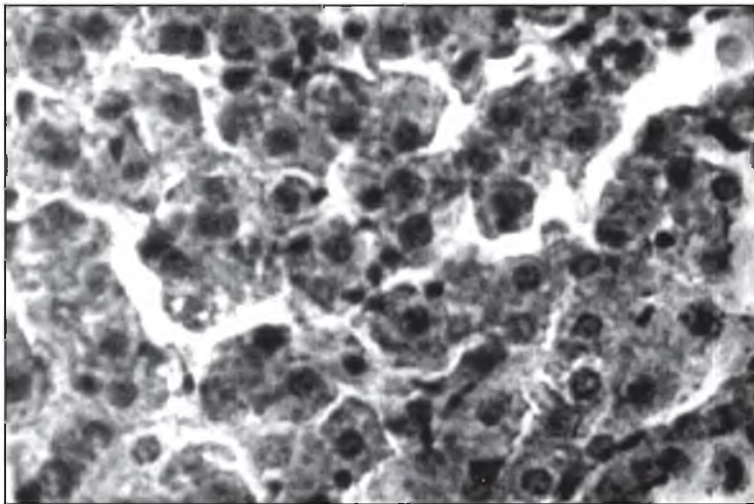
*Рис.22.* Мікроскопічна будова легень великої рогатої худоби.  
Гематоксилін та еозин. X 80. Препарат Л.П. Горальського.



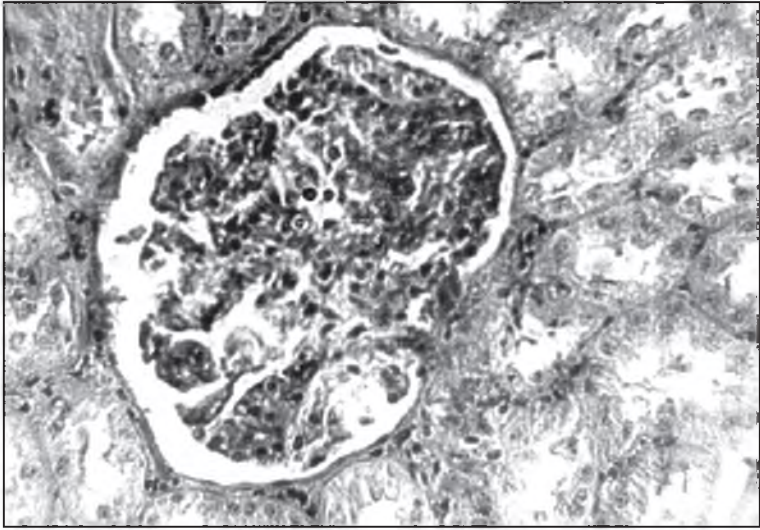
*Рис.23.* Мікроскопічна будова нирки великої рогатої худоби.  
Гематоксилін та еозин. X 280. Препарат Л.П. Горальського.



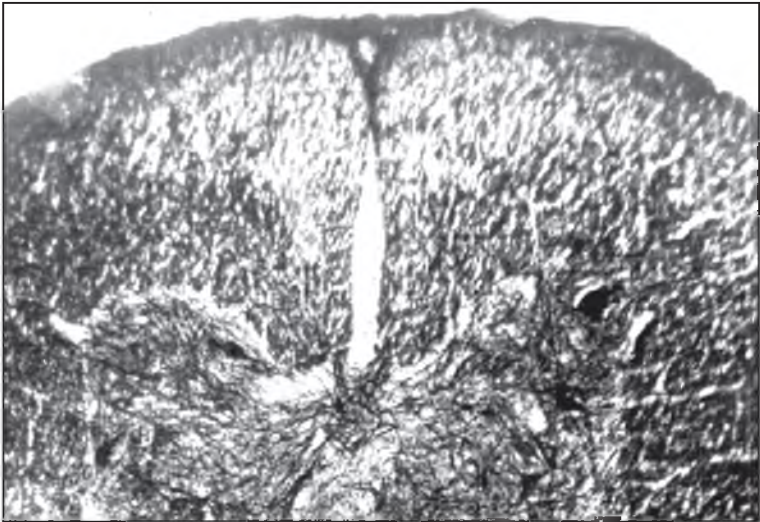
*Рис.24.* Фрагмент мікроскопічної будови мантійної зони лімфоїдного вузлика лімфовузла великої рогатої худоби. Гематоксилін та еозин. X 900. Препарат Л.П. Горальського.



*Рис.25.* Мікроскопічна будова печінки великої рогатої худоби. Гематоксилін та еозин. X 600. Препарат Л.П. Горальського.

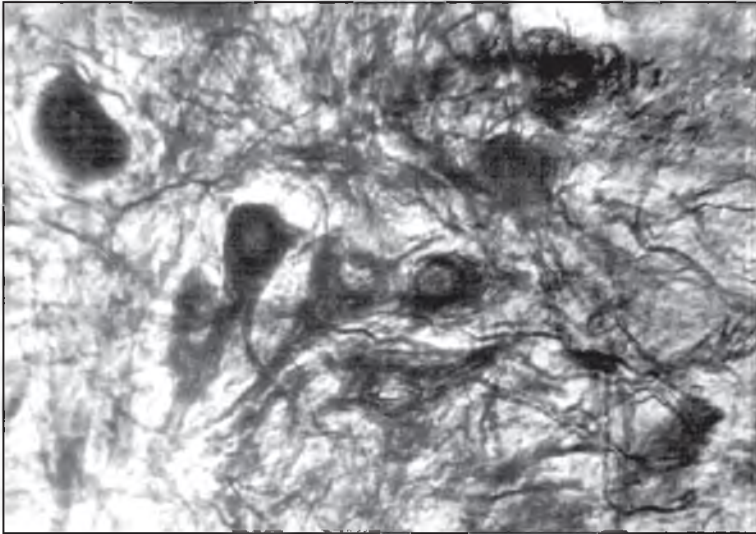


*Рис.26.* Фрагмент мікроскопічної будови нирки великої рогатої худоби. Гематоксилін та еозин. X 600. Препарат Л.П. Горальського.

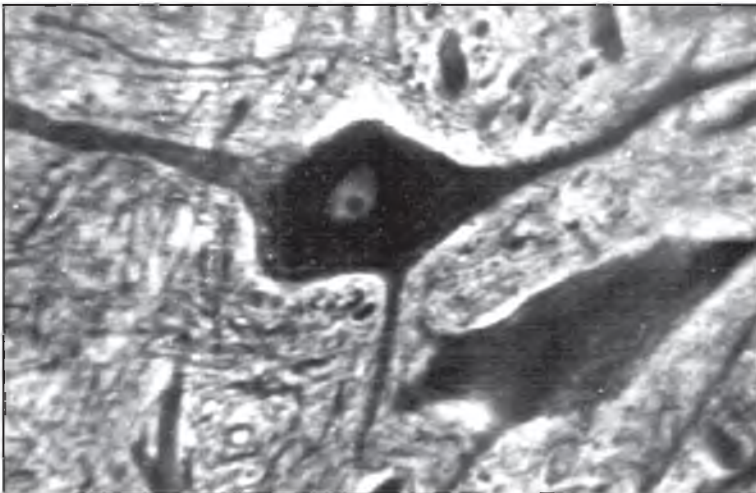


*Рис.27.* Мікроскопічна будова поперечного зрізу спинного мозку. Рамон-і-Кахаль. X. 56. Препарат Л.П. Горальського.

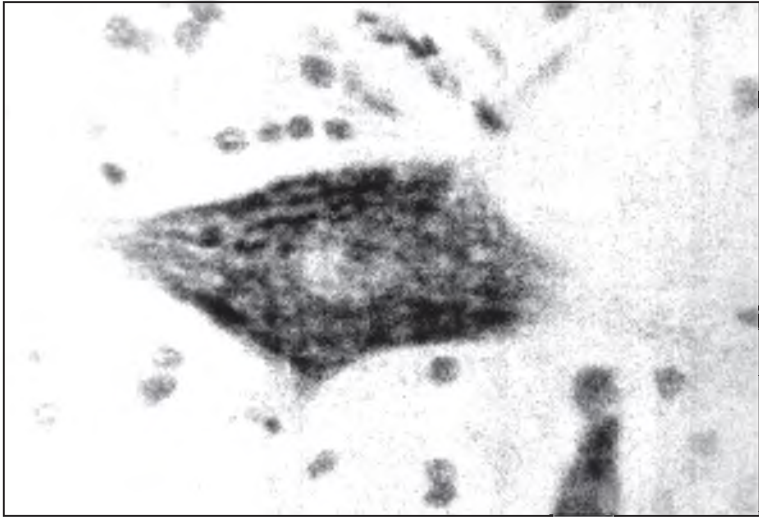




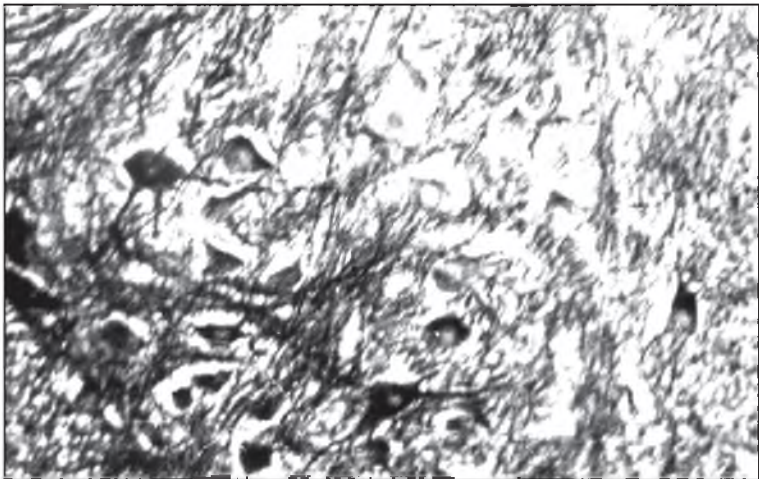
*Рис.28.* Скупчення ефекторних нейроцитів у спинному мозку.  
Рамон-і-Кахаль. X. 140. Препарат Л.П. Горальського.



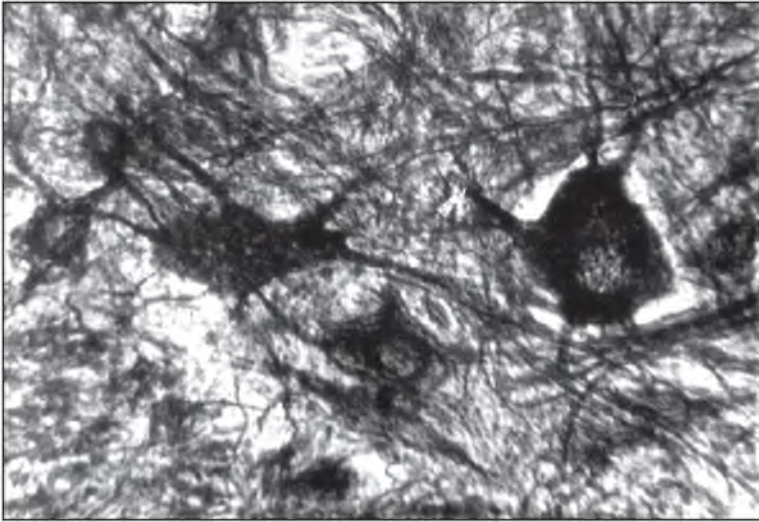
*Рис.29.* Мікроскопічна будова мультиполярного нейрону  
спинного мозку. Більшовський-Грос. X 400.  
Препарат Л.П. Горальського.



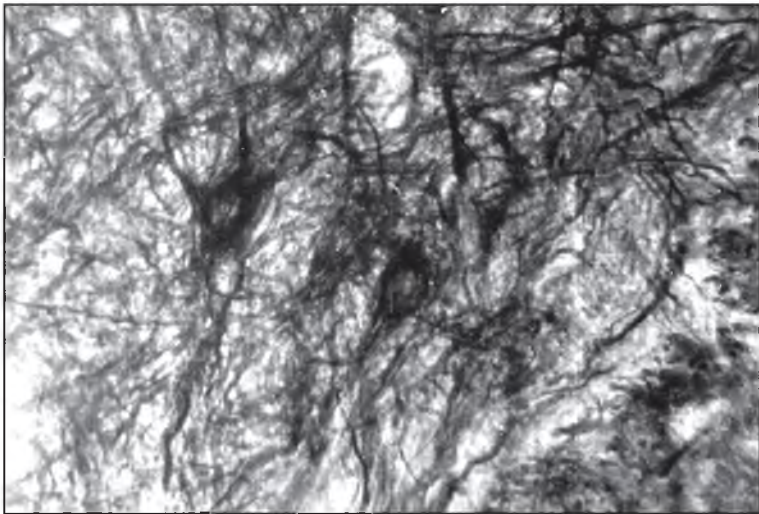
*Рис.30.* Розташування хроматофільної речовини в ефекторному нейроциті спинного мозку. Ніссль. X 600. Препарат Л.П. Горальського.



*Рис. 31.* Скупчення нейроцитів у вентральних рогах сірої речовини спинного мозку. Рамон-і-Кахаль. X. 56. Препарат Л.П. Горальського.



*Рис.32.* Мікроскопічна будова нейронів спинного мозку. Рамон-і-Кахаль. X 400. Препарат Л.П. Горальського.



*Рис.33.* Мікроскопічна будова ефекторних нейронів спинного мозку. Рамон-і-Кахаль. X 140. Препарат Л.П. Горальського.

## **ГІСТОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

За допомогою гістохімічних методів визначають хімічну природу клітин, їх окремих складових частин і міжклітинної речовини тканин різних органів тваринних організмів у нормі, при патології, різних функціональних станах та у віковому аспекті. Цито- та гістохімічні методи досліджень можуть значно швидше, ніж гістологічні, зафіксувати в тканинах і клітинах вікові та функціональні зміни, що надзвичайно важливо для об'єктивної інтерпретації морфологічних змін, а також аналізу відмінностей нормальних мікроструктур від патологічно змінених.

Тому завданням гістохімії є вивчення хімічного складу і обміну речовин структурних елементів організму. Порівняно з мікрохімічними, гістохімічні методи повинні не тільки виявляти хімічні речовини, а й визначити їх локалізацію (топографію) у клітинах і тканинах.

Гістохімічні методи ґрунтуються на використанні специфічних хімічних реакцій, внаслідок яких утворюються нерозчинні продукти синтезу, що локалізуються у певних місцях клітини чи міжклітинної речовини і які чітко видимі під мікроскопом та відрізняються від інших клітинних компонентів. Цими методами виявляють у певних структурах тканин амінокислоти, білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди, активність ферментів, тощо. Продукти реакцій аналізують кількісно. При цьому використовують різні методи морфометрії, цитоспектрофотометрії, цитоспектрофлуориметрії, з наступною математичною обробкою матеріалу.

### **Нуклеїнові кислоти**

Нуклеїнові кислоти ДНК та РНК — важливі органічні сполуки, з якими пов'язані усі основні процеси існування матерії. Відкриті вони Ф. Мішером у 1869 р. Нуклеїнові кислоти разом з білками є важливими складовими частинами клітинних структур усіх організмів. Встановлено, що нуклеїнові кислоти є простетичними групами складних білків-нуклеопротеїдів. При гі-



дролізі нуклеїнових кислот виявлені пуринові та пірамідинові основи, пентози та фосфорна кислота.

Довгий час вважали, що існує два типи нуклеїнових кислот — тваринна і рослинна. Тваринна нуклеїнова кислота вперше була отримана із тимуса. При її гідролізі утворюються дві пуринові основи — аденін і гуанін та дві піримідинові основи — 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. У будь-якій живій клітині нуклеїнові кислоти і білки складають єдиний структурно-функціональний комплекс, з роботою якого пов'язана їх життєдіяльність. Значна кількість нуклеїнових кислот у клітині перебуває у комплексних сполуках з білками (гістонами, протамінами, менше — з альбумінами і глобулінами), утворюючи дезоксирибонуклеопротеїди (ДНП) та рибонуклеопротеїди (РНП).

Встановлено, що ДНК переважно локалізується в ядрі, РНК — в ядерці і цитоплазмі. Досліджено зв'язок нуклеїнових кислот з синтезом білка, при цьому виявлено, що при діленні клітин — ДНК концентрується у хромосомах. Доведено, що ДНК бере участь у передачі спадкової інформації і є матеріальним субстратом спадковості. Біосинтез білків здійснює РНК.

Дж. Уотсон і Ф. Крик у 1953 році створили структурну модель ДНК. Ними показано, що молекула ДНК складається із двох спіральних ланцюгів нуклеотидів, з'єднаних між собою водневими зв'язками, причому аденін зв'язується з тиміном, гуанін — з цитозином. Кожен спіральний тяж молекули ДНК складається із 10 нуклеотидів.

Молекула РНК представляє собою лінійну спіраль, у якій нуклеотиди з'єднані між собою за допомогою залишків фосфорної кислоти.

Встановлено три види РНК: інформаційну, рибосомальну і транспортну. *Інформаційна*, або матрична РНК складає близько 5% усієї РНК клітини, має близьку до ДНК будову, знімає інформацію з неї і здійснює контроль за синтезом білка. Молекула інформаційної РНК має від 100 до 6000 залишків нуклеотидів.

*Рибосомальна РНК* складає 80% усієї РНК клітини та сконцентрована у рибосомах. *Транспортна РНК* 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.

Застосування більшості гістохімічних методів при вивченні нуклеїнових кислот ґрунтується на взаємодії реактивів з продуктами гідролізу.

### ***Виявлення нуклеїнових кислот за методом Ейнарсона***

***Для фіксації матеріалу*** використовують рідину Карнуа, 96<sup>0</sup> етиловий спирт, 10—12%-ий розчин нейтрального формаліну. Бажано уникати тих 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 крапляк 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 місцезнаходження 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 збовтуючи. 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 препаратів): 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 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, 96° і 70° етиловий спирт) до дистильованої води.

2. Зрізи переносять у розчин барвника (ГХГ) 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 у бальзам.

**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

**Результати реакції.** Нуклеїнові кислоти забарвлюються 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 встановлено 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. Метилловий 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 збовтують 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. с. 205*).

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-азу на бідистильованій воді із розрахунку 1 мл РНК-ази на 1 мл води.

#### **Постановка реакції:**

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води.

2. Контрольні зрізи поміщають у розчин РНК-ази на 1 год при температурі +37<sup>0</sup>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. Просвітлюють зрізи у чистому ксилолі (двічі замінюючи ксилол).

10. Заводять зрізи у канадський бальзам або синтетичне середовище.

**Результати.** Структури, що містять РНК, забарвлюються 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.

**П р и м і т к а:** 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, 80° етиловий спирт, холодний ацетон, 10%-ий розчин нейтрального формаліну.

**Для роботи придатні** парафінові, щойнозаморожені та ліофілізовані зрізи.

Модифікація Курника дає можливість отримати якісну передачу кольорів.

**Принцип виявлення.** Інтенсивність і характер забарвлення препарату визначається ступінню полімеризації нуклеїнових кислот. Так, РНК забарвлюється піроніном у 5 разів інтенсивніше, ніж високополімерна ДНК, і у 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 У. 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, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води.

2. Контрольні зрізи переносять на 1 год у розчин РНК-ази при температурі +37 °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 забарвлюється у голубувато-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; 96<sup>0</sup> 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, 96<sup>o</sup> і 70<sup>o</sup> етиловий спирт) до дистильованої води.
2. Контрольні зрізи обробляють розчином РНК-ази впродовж 1 год при температурі +37 °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 мікротані-ксилолі (двічі міняючи ксилол) і заводять у бальзам.

**Результати.** Структури клітин, що містять РНК, забарвлюються піроніном у яскраво-червоний колір, ДНК — у синьо-зелений. Найкращі результати отримані на матеріалі нервової тканини (спинний мозок і ганглії).

### ***Виявлення нуклеїнових кислот акридиновим оранжевим***

***Для роботи придатні*** щойновиготовлені препарати-відбитки, зрізи із тканин, виготовлені у мікромомі-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 ядерецях 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 CaCl<sub>2</sub> — 3 частини; 2,11%-ий розчин KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (0,154 M) — 1 частина; 3,82%-ий розчин MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 1 частина.

Перед використанням рН вихідного розчину Кребса-Рінгера доводять до 6-6,5, додаючи 0,1 M розчин Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 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 нуклеоплазма, хромосоми і ядерця.

### ***Метод Фельгена-Росенбека***

**Для фіксації матеріалу** придатні усі 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.

**Принцип виявлення.** Початковою стадією реакції є гідролітичне розщеплення дезоксирибонуклеопротейду 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 збовтують, охолоджують до +50 °С і фільтрують. До фільтрату додають 20 мл 1 н. розчину HCl. Знову розчин охолоджують до +25 °С і додають до нього 1 г піросульфату 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. Потім додають до нього 2 г активованого вугілля, 1 хв збовтують. Розчин фільтрують і зберігають у холодильнику при температурі 0 +4 °С. Перед роботою розчин повинен мати кімнатну температуру. 3. Сульфатна вода — беруть 5 мл 10%-го розчину піросульфату калію або натрію, додають 5 мл 1 н. розчину HCl і додають дистильовану воду до 100 мл. При цьому використовують тільки шойно 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 світлового 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 °С (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 світлового 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 забарвлюється у 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 фіксувався 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-оцтової кислоти — 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 50<sup>0</sup> етиловому спирті, що містить 5% оцтової кислоти. 3. Розчин діазотированого *o*-дианізідину: 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, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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 +60 °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 50° етиловому спирті.
7. Поміщають зрізи у розчин гідрозиду нафтоїної кислоти на 3—6 год при температурі +22 °С.
8. Промивають зрізи у 50° етиловому спирті (тричі по 10 хв).
9. Промивають зрізи у дистильованій воді.
10. Переносять зрізи у щойно виготовлений розчин стійкого синього В при 0 °С і рН 7,4 на 1—3 хв.
11. Зневоднюють зрізи у спиртах.
12. Просвітлюють зрізи у ксилолі і заводять у бальзам або полістирол.

**Результати.** ДНК забарвлюється 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 +37 °С впродовж 1—24 год (залежно від природи дослідного матеріалу). У подальшому застосовують звичайну обробку препарату, передбачену відповідними методиками.

## Білки

*Білки* — високомолекулярні органічні сполуки, що побудовані з амінокислот. Вони є найбільш важливою складовою частиною всіх організмів. Життя будь-якого організму пов'язане з обміном білків. У організмі тварин білки виконують ряд життєво важливих функцій: структурну, каталітичну, захисну, транспортну, енергетичну, беруть участь у передачі спадковості тощо. З діяльністю білків пов'язані основні прояви життя — подразливість, скорочення, ріст, розвиток, розмноження, саморегуляція, адаптація до зовнішнього середовища, усі реакції анаболізму і катаболізму тощо.



Залежно від складу, білки поділяються на прості і складні. *Прості* білки (протеїни) — це високомолекулярні органічні сполуки, побудовані виключно з амінокислот. Прості білки за властивостями поділяються на альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, а в рослинах, окрім того, є глутеліни і проламіни. *Складні* білки (або протеїди) є сполуками білків з речовинами небілкової природи (простетична група). Залежно від хімічної природи простетичної групи, серед складних білків розрізняють нуклеопротеїди (простетичною групою є нуклеїнові кислоти), глікопротеїди (роль простетичної групи виконують вуглеводи), ліпопротеїди — сполуки білків із ліпідами, фосфопротеїди — білки, які мають залишок фосфорної кислоти, хромопротеїди — простетичною групою є пігментні сполуки. Останні в свою чергу діляться на:

- білки, що містять залізо (цитохроми, гемоглобін, міоглобін, каталаза, пероксидаза та ін.);

- дихальні пігменти крові безхребетних (гемоеритрини), які містять залізо і мідь;

- білки, простетичною групою яких є рибофлавін (вітамін B<sub>2</sub>).

Рослини містять хромопротеїд, простетичною групою яких є хлорофіл. До складних білків належать також ферменти, які складаються з білкової та активної небілкової (кофермент) частин.

Загалом відомо більше 2000 білків, отриманих із тварин, рослин, людини, а також мікроорганізмів і вірусів.

Білки мають високу молекулярну масу (РНК-аза — 13700, білок вірусу грипу — 322000000), добре розчиняються у воді, утворюють колоїдні розчини (золі і гелі), висолюються під дією нейтральних солей, а після дії сильних кислот, лугів, солей, важких металів, алкалоїдних реактивів, деяких органічних кислот і високої температури — денатурують. У хімічному відношенні білки представляють собою амфотерні електроліти, оскільки у складі їх молекул завжди є вільні карбоксильні та амінні групи.

Сучасні гістохімічні методи досліджень білків дають можливість виявити їх локалізацію у тканинах, клітинах та інтрацелюлярних структурах. За допомогою гістохімічних методів визначають якісний склад багатьох білків, вивчають окремі сторони біосинтезу білкових молекул та переміщення їх у клітині, тканині та органах, визначають реакційну здатність білків, виявляють у них активність окремих функціональних груп.

## ***Виявлення загальних білків***

Загальні, або сумарні білки в тканинах людини, тварин і рослин представлені різними видами протеїнів і протеїдів. Вміст білків у клітинах і тканинах визначається багатьма чинниками: їх походженням, специфікою функцій, зрілістю організму, а також тканин і клітин, місцем тварини у філогенетичному ряду, умовами перебування, функціональним станом тощо.

Кількість гістохімічних барвників, зв'язаних з білками, пропорційна їх вмісту у тканинах. Це типово для більшості методів, що використовуються у цито- та гістохімії і знаходяться у відповідності 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 у 2%-му розчині оцтової кислоти. 2. 0,5%-ий водний розчин оцтової кислоти.

#### **Постановка реакції:**

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96° і 70° 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 70<sup>0</sup> етиловому спирті).

#### **Постановка реакції:**

1. Якщо зрізи — парафінові, їх потрібно депарафінувати (ксилол).

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 забарвлюються 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 аміні. Вони побудовані головним чином із моноамінодикарбонових амінокислот (аспарагінової, глютамінової). Прояв кислих властивостей складних білків, наприклад фосфопротейдів, 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 70° етилового спирту розчинити 1 мл льодяної оцтової кислоти.

#### **Постановка реакції:**

1. Заморожені або депарафінові (ксилол, 96° і 70° 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 у ксилолі і заводять у канадський бальзам або полістирол.

**Результати.** Основні білки забарвлюються у блакитні і сині кольори, кислі — у червоний, жовтий і зелений кольори.

## Виявлення ліпопротеїдів

*Ліпопротеїди* — складні білки, молекули яких складаються із протеїну і простетичної групи. У складних білках простетичною групою можуть бути ліпіди (нейтральні жири, стерини, фосфати, переброзиди), жирні кислоти, каротини, вітаміни А, Д, Е, К та інші. Якщо у складі молекули більше білкової частини, їх називають ліпопротеїдами. Якщо кількість ліпідів значно переважає білкову частину, їх називають протеоліпідами.

Значення ліпопротеїдів велике. Їх молекули складають основу клітинних мембран, рибосом, ендоплазматичної сітки, мітохондрій, лізосом, комплексу Гольджі та мікротілець. Окремі ліпопротеїди беруть участь у таких життєво важливих процесах, як згортання крові (тромбопластин), зір (родопсин), імунітет та ін.

### *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 присутній гідрохінон (джерело протонів та електронів), хлорид кобальту і сіль тетразолію.

**Реактиви:** 1. 0,1 М розчин гідрохінону. 2. Основний розчин: 0,25 мл 0,2 М трис-буфера з рН 8,1 (див. с. 200) змішують з 3 мл 0,5 М розчину  $\text{CoCl}_2$ , фільтрують, додають 25 мл 0,1% розчину 3-(4,5-диметилгіазоліну-1,2) 2,5-дифенілтетразолію броміду або хлориду, 25 мл трис-буфера (рН 8,1) і 40 мл дистильованої води. Зберігають у 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, 96° і 70° етиловий спирт) зрізи поміщають на 90 хв у робочий розчин.

2. Зрізи промивають упродовж 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 щойнозамороженого матеріалу, гірше — на зрізах, які виготовлені з тканин, зафіксованих у формаліні, найгірше — на парафінових зрізах.

### **Визначення білкових функціональних груп**

Білки, крім карбоксильних (COOH) та аміногруп (NH<sub>2</sub>), містять й інші функціональні групи, чим визначаються різні властивості білкової молекули. До них відносяться карбоксильні групи аспарагінової і глютамінової кислот, аміногрупи лізину, гуанідинова група аргініну, індольна група триптофану, імідазольна група гістидину, гідроксильна група серину і треоніну, фенольна група тирозину, сульфгідрильна група цистеїну, дисульфідна група цистину, тіоефірна група метіоніну, алифатичні ланцюги інших амінокислот та ароматичне кільце фенілаланіну. Важлива роль таких груп проявляється у структурі та функції ферментів. Деякі білкові групи можна визначити гістохімічно.

#### ***Виявлення NH<sub>2</sub>-груп, зв'язаних з білками***

**Для фіксації матеріалу** використовують 10%-ий розчин формаліну, рідину Карнуа, Ценкера та 85<sup>0</sup> етиловий спирт.

**Для роботи придатні** щойнозаморожені 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 збовтують, охолоджують до +50 °С і фільтрують. До фільтрату додають 20 мл 1 н. розчину HCl. Знову розчин охолоджують до +25 °С і додають до нього 1 г піросульфату натрію (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) або калію (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). 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 °С. 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 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 у реактив Шиффа на 15—60 хв.
5. Промивають зрізи у сульфатній воді впродовж 2—4 хв.
6. Промивають зрізи у 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 Майєра (фарбування ядер), промити проточною водою та диференціювати в 1%-му спиртовому розчині оцтової кислоти. У деяких випадках нінгідрин замінюють 1%-им розчином алаксонау.

### ***Виявлення сульфгідрильних груп за Барнетом і Зелігманом***

**Матеріал фіксують** у рідині Карнуа, суміші Буєна, 85° етиловому спирті, 10%-му розчині формаліну.

**Для роботи** придатні щойнозаморожені 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 у цистеїні, глутатіоні, коферменті А, відновленій формі ліпоєвої 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<sup>1</sup>-диоксі-6,6<sup>1</sup>-динафтилдисульфід) розчиняють у 35 мл 0,1 М веронал-ацетатного буферу, рН 8,5 (див. с. 200) 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. с. 201).

**Постановка реакції:**

1. Зрізи доводять (ксилол, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх на 1 год в розчин ДДД при t<sup>0</sup> +50 °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 (50<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup>, 96<sup>0</sup>, 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 щойновиготовлений розчин діазонію на 2 хв при кімнатній температурі.
9. Промивають зрізи у проточній та дистильованій воді впродовж 2-4 хв.
10. Заводять зрізи у гліцерин-желатин або їх зневоднюють, просвітлюють у ксилолі та заводять у канадський 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 переважно 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 б-карбоксильними 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, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх у розчин ферменту на 2—3 год при температурі +37 °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, 96°, 70° етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх у розчин трипсину на 15—60 год при температурі +37 °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 чимало способів блокування аміногруп: дезамінування, нітробензолування, ацетилювання тощо. Дезамінування легко відбувається під дією азотної кислоти.

### **Постановка реакції:**

1. Зрізи або препарати-відбитки доводять (ксилол, 96°, 70° 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 + 4 °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, метилідату і діазометану.

### **Постановка реакції (застосування метанолу):**

1. Зрізи або препарати-відбитки доводять (ксилол, 96°, 70° етиловий спирт) до води.
2. Переносять їх на 2—3 доби у 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, 96<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води.

2. Переносять їх на 4 год у водний розчин йоду (3,8 мг йоду і 32 мг КІ розчиняють у 100 мл води, рН доводять 0,01 н. розчином НСІ до 3,2).

3. Промивають препарати у воді.

4. Ставлять відповідну гістохімічну реакцію.

**Результат.** Контрольні препарати не містять сульфгідрильних груп порівняно з дослідними.

### **Ліпіди**

*Ліпідами* називають фракції тваринних і рослинних тканин, які не розчиняються у воді та розчиняються в органічних розчинниках (ацетон, етанол, диетиловий ефір, бензол, ксилол, толуол, бензин, хлороформ). Ліпіди виконують багато життєво важливих функцій. Так, в організмі тварин вони є основними енергетичними сполуками: при повному розпаді 1 г жиру виділяється 9,3 ккал енергії, що удвічі більше порівняно з вуглеводами і білками. Окрім того, ліпіди виконують структурну функцію, оскільки є компонентами клітинних мембран і різних біологічних комплексів. Важлива захисна та метаболічна функція ліпідів: вони є розчинниками вітамінів А, Е, D, К та інших сполук, попередниками біологічно активних речовин — гормонів, вітамінів, жовчних кислот. Їм належить важлива роль і в обміні води (при окисненні 100 г ліпідів утворюється 107,1 г води).

У тканинах і клітинах ліпіди зустрічаються як у вільному стані, так і у вигляді комплексних сполук з білками, вуглеводами, вітамінами та іншими речовинами.

За своїм складом ліпіди поділяються на дві основні групи — прості і складні. Молекули простих ліпідів утворюються із залишків спиртів (гліцерину, вищих або циклічних) та вищих жирних кислот. До них належать нейтральні жири і воски. *Складні ліпіди*, окрім простих жирів, у своїй молекулі містять

інші речовини: азотисті основи, залишки вуглеводів, похідні ортофосфорної кислоти. Складними ліпідами є фосфоліпіди, гліколіпіди і ліпопротеїди.

Нейтральні жири — це складні ефіри триатомного спирту гліцерину і жирних кислот; вони є насичені і ненасичені. Насичені нейтральні 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***

На практиці виявлення ліпідів та жироподібних речовин в органах і тканинах є досить важливим тестом для постановки діагнозу захворювань різної етіології. Так, жироподібні речовини необхідно виявляти не тільки при вивченні жирових дистрофій, але й при різних запальних і новоутворюючих процесах.

В організмі людини і тварин зустрічаються ліпіди і різні жироподібні речовини. Для їх виявлення є чимало різноманітних фарб (судан III, судан IV, судан чорний B, сульфат нільського блакитного — нільблаусульфат, осмій тощо) та методів. Вони дають можливість повністю або частково виявити жироподібні речовини і диференціювати їх між собою.

### ***Виявлення загальних ліпідів***

У тканинах і клітинах окремі ліпіди рідко зустрічаються у чистому вигляді. Вони виявляються у складі біокомплексних сполук. Така закономірність обумовлена тим, що ліпіди в органах і тканинах, зокрема, стерини і стериди, фосфатиди, сульфатиди і гліколіпіди разом з білками, вуглеводами, вітамінами та іншими речовинами утворюють комплексні сполуки. Для виявлення загальних, або сумарних ліпідів частіше використовують фарбування зрізів або препаратів-відбитків розчинами судану чорного B, який володіє високою специфічністю до ліпідних сполук. Барвник має 10 фракцій, основу якого складає синя фракція. Судан чорний B майже не розчиняється у нейтральних жирах, тому за відсутності їх у тканинах вважають, що барвник, в основному, зв'язаний з фосфатидами.

### ***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. 70<sup>0</sup> етиловий спирт. 2. Насичений розчин судану чорного В на 70<sup>0</sup> етиловому спирті. Перед постановкою реакції судан чорний В потрібно профільтрувати. 3. 30<sup>0</sup> етиловий спирт.

#### **Постановка реакції:**

1. Заморожені зрізи промивають у дистильованій воді.
2. Промивають їх у 70<sup>0</sup> етиловому спирті (30 сек).
3. Переносять зрізи у розчин судану чорного В на 20—30 хв.
4. Промивають зрізи у 30<sup>0</sup> етиловому спирті (30 сек).
5. Швидко промивають зрізи у дистильованій воді та заводять у гліцерин-желатин або гліцерин.

**Результат.** 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. 70<sup>0</sup> етиловий спирт. 2. Насичений розчин судану чорного В на 70<sup>0</sup> етиловому спирті. Перед постановкою реакції судан чорний В потрібно профільтрувати. 3. Галуновий кармін (див. с. 62).

### **Постановка реакції:**

1. Зрізи депарафінують (ксилол, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) і доводять до води.

2. Промивають їх у 70<sup>0</sup> 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 +60 °С (для щільних тканин).

4. Промивають зрізи у 70<sup>0</sup> 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-желатин.

**Результат.** Ліпіди забарвлюються 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.

**Придатті** 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'ятять у колбі із зворотним холодильником 20 хв. Суміш охолоджують, фільтрують, фільтрат переносять у лійку і кілька разів домішки екстрагують холодною водою. Після випаровування диетилового ефіру утвориться осадок ацетильованого судану чорного В — частинки чорного кольору. 2. Насичений розчин барвника: у 70<sup>0</sup> етиловому спирті розчинити необхідну кількість судану чорного В до насичення. 3. 70<sup>0</sup> 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 70<sup>0</sup> етиловому спирті.
4. Сушать фільтрувальним папером.
5. Заводять препарати у гліцерин-желатин.

**Результат.** Ліпіди забарвлюються у чорно-синій колір та чорний.

### ***Виявлення зв'язаних ліпідів методом екстракції за Спангофом***

**Для роботи** використовують матеріал, який взятий відразу ж після загибелі або забою тварин.

Для роботи використовують 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 70<sup>0</sup> етиловому спирті. 6. 70<sup>0</sup> етиловий спирт.

### **Постановка реакції:**

1. Зрізи поміщають на 30 хв при температурі +4 °С у 0,14 М розчин NaCl.

2. Переносять їх на 12 год в 0,4 М розчин NaCl при температурі +4 °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 у 1М розчин NaCl при температурі +4<sup>0</sup>С і рН—4.

5. Переносять зрізи у розчин судану чорного В на 8—10 хв.

6. Промивають їх у 70<sup>0</sup> етиловому спирті.

7. Промивають у дистильованій воді.

8. Зрізи заводять у гліцерин-желатин.

**Результат.** Зв'язані ліпіди забарвлюються 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, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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 +37 °С.
5. Промивають зрізи у ксилолі (5—10 хв).
6. Заводять зрізи у канадський бальзам або синтетичне середовище.

***Результат.*** Зв'язані ліпіди забарвлюються 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 70<sup>0</sup> 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 +60 °С впродовж 5 хв.

5. Зрізи, які містяться у розчині судану чорного В, піддають фарбуванню за методикою Лізона (*див. с. 141*); зрізи, забарвлені розчинами сульфату нільського блакитного, швидко промивають у дистильованій воді при температурі +60 °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%) забезпечують 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) забарвлюються у червоний або рожевий колір. Кислі ліпіди забарвлюються 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. 50<sup>0</sup> етиловий спирт. 2. 70<sup>0</sup> етиловий спирт. 3. Насичений розчин судану на 70<sup>0</sup> етиловому спирті: у колбу з при-

тертим корком поміщають 0,2—0,3 г судану III, заливають його 100 мл гарячого 70° 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 50° етиловому спирту впродовж кількох хвилин.
3. Зафарбовують зрізи насиченим розчином судану (10—25 хв, залежно від температури в приміщенні).
4. Промивають у 50° етиловому спирті.
5. Промивають у дистильованій воді.
6. Заводять зрізи у гліцерин-желатину.

**Результат.** Локалізацію нейтральних ліпідів визначають за червоно-оранжевим або оранжево-жовтим забарвленням.

**П р и м і т к а.** У практиці для виявлення нейтральних ліпідів у якості барвника, крім насиченого розчину судану III на 70° етиловому спирті, використовують *лужний судан за Герксгеймером* наступного складу:

1. Абсолютний етиловий спирт (або 96°) — 70 мл.
2. 10%-ий розчин їдкового натрію — 20 мл.
3. Дистильована вода — 10 мл.
4. Судан III, до насичення розчину при кип'ятінні на водяній бані.

Такий розчин має більш високі фарбуючі властивості порівняно з насиченим розчином судану на 70° етиловому спирті. Лужний судан забарвлює жири і ліпоїди впродовж 3—5 хв. Після нього дуже добре забарвлюються гематоксиліном ядра (дія лугу).

#### ***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 70<sup>0</sup> етиловим спиртом (1:1). Розчин дозріває впродовж кількох днів. Після цього його фільтрують на холоді або відсмоктують піпеткою надосадкову рідину. Необхідно працювати із закритими бюксами. 2. 70<sup>0</sup> етиловий спирт. 3. 50<sup>0</sup> етиловий спирт. 4. Гематоксилін Ерліха (див. с. 59). 5. 0,5%-ий розчин соляної кислоти у 50<sup>0</sup> етиловому спирті.

#### **Постановка реакції:**

1. Заморожені зрізи промивають у дистильованій воді.
2. Промивають їх у 70<sup>0</sup> етиловому спирті.
3. Фарбують розчином барвника (1 хв).
4. Промивають зрізи у 70<sup>0</sup> етиловому спирті.
5. Промивають зрізи у дистильованій воді.
6. Дофарбовують зрізи розведеним розчином гематоксиліна 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 об'єкта та методом гістохімічних досліджень. Пропонуємо основні методи гістохімічного контролю.

### **Екстракція ліпідів за Кейлігом**

**Для роботи використовують** незафіксований матеріал. **Придатні** для роботи заморожені зрізи.

Естракція 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 замінити тричі у ті ж самі терміни).

3. Зрізи поміщають у нагрітий диетиловий ефір на добу (тричі замінити розчинник).

4. Поміщають зрізи у нагрітий метанол-хлороформ на добу (тричі замінити 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 96° етиловому спирті.
2. Переносять їх у піридин на 30 *хв* при температурі +17—22 °С.
3. Зрізи обробляють піридином при температурі +60 °С впродовж 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* — органічні речовини, які в організмі виконують цілий ряд життєвоважливих функцій: енергетичну, структурну, резервну, захисну, опорну, детоксикаційну та інші. Вони, разом з білками та ліпідами, є найважливішими сполуками живих організмів.

Вуглеводи є основним енергетичним джерелом, забезпечуючи більшу частину потреби організму в енергії. При середньому рівні енерговитрат 3000 ккал за добу вуглеводи утворюють 55% енергії, жири — 30% та білки — 15 %.

Вуглеводи беруть участь в утворенні складних хімічних сполук, до яких належать нуклеїнові кислоти, глікозаміноглікани, глікопротеїни, гліколіпіди. Ці сполуки відіграють важливу роль у організмі тварин. Так, наприклад, ДНК є генетичним матеріалом, РНК бере участь у біосинтезі білка. Інші речовини, що містять вуглеводи, є складовими частинами клітинних мембран, сполучної та нервової тканини.

Вуглеводи поділяють на *прості (моносахариди)* і *складні (полісахариди)*.

Прості вуглеводи зустрічаються у вільному стані, крім того, їх отримують при гідролізі полісахаридів та штучно. Це кристалічні речовини, добре розчинні у воді, оптично активні, більшість мають солодкий смак, вступають у реакції, характерні для альдегідів та кетонів.

Молекули моносахаридів мають один вуглецевий ланцюг, і всі вони не підлягають гідролізу. Залежно від кількості атомів вуглецю, що входять до складу молекули моносахаридів, їх по-

діляють на тріози, тетрози, пентози, гексози, гептози, октози, нонози і т. д. Найбільше значення мають пентози та гексози.

Із складних вуглеводів у свою чергу виділяють три групи: олігосахариди, гомополісахариди (глікани) та гетерополісахариди.

*Олігосахариди* — це група вуглеводів, молекули яких містять від 2 до 10 залишків молекул моносахаридів. Якщо з'єднується два залишки, то така сполука називається дисахаридом, якщо три — трисахаридом, чотири — тетрасахаридом, п'ять — пентасахаридом, шість — гексасахаридом і т. д. Вони добре розчинні у воді, легко кристалізуються, солодкі на смак, вступають у реакції, характерні для альдегідо- і кетоспиртів, а також вуглеводів, властивих до кислотного та ферментного гідролізу. Найбільший інтерес представляють ди-, три- і тетрасахариди. Із числа дисахаридів найбільш поширеними у природі є мальтоза, сахароза і лактоза.

Молекули складних вуглеводів, що містять у собі більше десяти залишків моносахаридів, називаються полісахаридами. Вони поділяються на гомо- і гетерополісахариди.

До гомополісахаридів належить клітковина, крохмаль, глікоген, інсулін тощо. Гомополісахариди побудовані із залишків молекул моносахаридів, з'єднаних між собою кисневими містками.

Гетерополісахариди (глікозаміноглікани) у вільному стані зустрічаються рідко. Як правило, вони з'єднані з білками (протеоглікани). У молекулі протеогліканів вуглеводна частина становить 95—98 %. Вони є основними компонентами сполучної тканини, слизових секретів, входять до складу синовіальної рідини тощо. Гетерополісахариди ділять на сульфатовані і не сульфатовані.

### ***Виявлення глікогену за методом Шабадаша***

***Для фіксації матеріалу*** використовують рідини Шабадаша, Карнуа.

***Для досліджень*** придатні парафінові та целюдинові 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  $\text{KIO}_4$  або  $\text{Na IO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  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 у 200 мл кип'ячої дистильованої води, охолоджують до +50 °С, додають 20 мл 1н. розчину  $\text{HCl}$ , знову охолоджують до +25 °С та додають 1 г сухого гідросульфїту натрію. Перед додаванням  $\text{HCl}$  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. 125—126). 3. Сірниста вода: до 200 мл дистильованої води додають 10 мл 10%-го розчину гідросульфїту натрію та 10 мл 1н.  $\text{HCl}$ . 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 забарвлюється в інтенсивний фіолетово-вишневий колір, мукоїди та глікопротеїди — червонуватий.

**П р и м і т к а.** 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 слід здійснювати у темряві.

### ***Виявлення глікогену за допомогою Шифф-йодної кислоти (ШЙК) по Мак-Манусу***

***Для фіксації матеріалу*** використовують рідини Шабадаша, Карнуа, абсолютний етиловий спирт, 10%-ий розчин формаліну.

***Для досліджень*** використовують 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. 125—126*). 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'ялять упродовж 3 хв, фільтрують і додають 7 мл гліцерину. 4. Гематоксилін Майєра (*див. с. 61*). 5. Солянокислий спирт: до 100 мл 70<sup>0</sup> 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 забарвлюється у темно-червоний колір, глікопротеїди і глікозаміноглікани — у різні відтінки пурпурового кольору.

### ***Виявлення глікогену за методом Беста***

***Для фіксації матеріалу*** використовують рідини Шабадаша, Карнуа, Буєна, 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 у 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 в парафін, коли на окремих етапах обробки має місце контактування зрізів з водою, можливі деякі втрати глікогену. Щоб попередити такі втрати, парафінові зрізи наносять на предметні стекла сухим способом (див. с. 55), або вологим, але замість теплої води використовують підігрітий спирт (див. с. 55). Крім того, для попередження втрат глікогену, парафінові зрізи перед фарбуванням необхідно целоїдинувати. З цією метою їх спочатку звільняють від парафіну (обробляють ксилолом і 96° 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—80° 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, 1г карбонату калію та 5 г хлориду калію розтирають у ступці, додають 60 мл дистильованої води. Отриману суміш піддають кип'ятінню 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 для фарбування розчин має темно-червоний колір, він прозорий і може зберігатися декілька днів; 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 ШЙК; с. 152*)

#### **Постановка реакції:**

1. Зрізи проводять через ряд спиртів до дистильованої води.
2. Зафарбовують їх гематоксилином 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—30 сек), у інших — хвилинами (до припинення відходження барвника). Процес диференціювання контролюють за допомогою мікроскопа.
8. Промивають зрізи у 80° 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 парафіновими зрізами целоїдинову плівку можна видалити, особливо якщо вона сильно зафарбувалась карміном. Для видалення целоїдину, забарвлений карміном препарат (після диференціювання і обробки 96° спиртом) переносять у посуд із сумішшю 96° етилового 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 особливих труднощів.

### ***Виявлення глікогену за методом Байєра (із застосуванням фуксинсірністої кислоти)***

***Для фіксації матеріалу*** використовують рідини Шабдаша, Карнуа, Буена, абсолютний етиловий спирт.

***Для досліджень*** використовують парафінові і целоїдинові зрізи. Проте реакцію краще ставити на парафінових зрізах, після їх целоїдинування. При використанні целоїдинових зрізів, їх не наносять 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. 125—126*). 3. Сульфатна вода (вода, яка містить  $\text{SO}_2$ ). Беруть 200 мл дистильованої води, додають 10 мл 10%-го розчину біосульфїту натрію та 10 мл нормального розчину соляної кислоти. Сульфатна вода кожний раз готується свіжа та повинна мати характерний запах  $\text{SO}_2$ . 4. Гематоксилін Майєра або Делафільда, Брьомера, Ерліха. 5. Солянокислий спирт.

#### **Постановка реакції:**

1. Депарафіновані та целоїдинові зрізи обробляють щойновиготовленим 4%-им розчином хромової кислоти (у темряві), 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 водопровідній 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 целодинову плівку видаляють сумішшю етилового спирту з ефіром.

**Результат.** Глікоген виявляють за червоно-фіолетовим забарвленням, ядра клітин — за синім. Крім глікогену, таким кольором забарвлюються слизові клітини, галінова субстанція, колоїд щитовидної залози та гіпофізу. Їх диференціювання відносно глікогену не викликає труднощів.

### ***Виявлення сульфатованих 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 у природі, в організмі входять до складу багатьох тканин. Зустрічаються частіше за межами клітин, являючись 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  $\text{FeCl}_3$  (від 8 до 12 мл на 100 мл води), суміш охолоджують і поміщають в далізатор (або в целофановий мішечок) на 2—3 дні. Воду замінюють через 4—6 год до зникнення у фільтраті іонів  $\text{Cl}^-$  (проба з  $\text{AgNO}_3$ ). Додають 2М розчин оцтової кислоти з таким розрахунком, щоб гідроксид заліза та оцтова 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, 96° і 70° 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 поміщають 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.

**Результат.** Структури, які містять сульфатовані глікозаміноглікани, забарвлюються 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. Депарафінові зрізи (ксилол, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) доводять до води.

2. Поміщають їх у розчин барвника на 10—30 сек.

3. Промивають зрізи у дистильованій воді.

4. Дофарбовують зрізи гематоксиліном Ерліха або 1%-им розчином нейтрального червоного.

5. Диференціюють зрізи в 1%-ому розчині етилового спирту.

6. Промивають їх у водопровідній воді.

7. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

**Результат.** Сульфатовані глікозаміноглікани забарвлюються у 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 Лілі*

*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. 80° етиловий спирт. 4. Реактиви відповідного методу (Шабадаша, Беста, Мак-Мануса, Байера).

#### **Постановка реакції:**

1. Зрізи доводять (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх у розчин діастази на 30—40 хв при температурі +35—45 °С.
3. Зрізи промивають у дистильованій воді.
4. Зневоднюють їх у спиртах або розчинах ацетону і ксилолу.
5. Переносять зрізи в 1%-ий розчин целоїдину на 1—2 хв.
6. Підсушують їх на повітрі 1—2 хв.
7. Поміщають зрізи у 80° етиловий спирт на 5—10 хв.
8. Ставлять відповідну гістохімічну реакцію (*див. методи Шабадаша, Беста, Мак-Мануса, Байера*).

**Результат.** На зрізах, попередньо оброблених діастазою, глікоген не виявляється.

## **Ферменти**

*Ферменти (ензими)* — білкові речовини, які є каталізаторами різних біохімічних реакцій, що лежать в основі життєдіяльнос-

ті організму. Тому ранні етапи порушення обміну речовин, які у подальшому призводять до морфологічних змін мікроструктур та виявляються звичайними гістологічними методами, відбуваються якраз у сфері діяльності ферментів.

Значення ферментів — велике. Вони беруть участь у травленні та засвоєнні поживних речовин, в утворенні структурних та функціональних компонентів тканин і рідин організму, рості та відтворенні, згортанні крові та багатьох інших біологічних процесах. Ферменти розташовані переважно всередині клітин, за винятком травних і тих, які виконують специфічні функції у крові та інших біологічних рідинах. Вони широко використовуються при виготовленні багатьох лікарських речовин.

Згідно з міжнародною класифікацією, ферменти ділять на шість класів: 1-й — оксидоредуктази (каталізують окисно-відновні реакції), 2-й — трансферази (каталізують реакції переносу груп), 3-й — гідролази (каталізують реакції гідролізу), 4-й — ліази (каталізують приєднання груп до подвійних зв'язків або відщеплення груп з утворенням подвійного зв'язку), 5-й — ізомерази (каталізують реакції ізомеризації), 6-й — лігази-синтеази (каталізують реакції конденсації двох молекул, пов'язані з розщепленням пірофосфатного зв'язку у молекулі АТФ або аналогічного трифосфату).

Міжнародна система нумерації ферментів тісно пов'язана з їх класифікацією. Кожний фермент має індивідуальний номер, або шифр. Шифр кожного ферменту містить цифри, розділені крапками, і складається за наступним принципом: перша цифра вказує, до якого із шести головних класів ферментів відноситься даний фермент; друга цифра вказує на підклас; третя — підпідклас; четверта — порядковий номер ферменту в даному підкласі.

Таким чином, чотири цифри чітко визначають тип ферменту і його місце. Наприклад, 1.2.3.1. означає оксидоредуктазу, для якої донором водню є альдегід; даний фермент займає перше місце у своєму підкласі, у якому акцептором є  $O_2$ .

Ферменти володіють суворою специфічністю до речовин, на які вони впливають (субстрат), і проявляють активність при певних умовах температури і реакції (рН) середовища (нейтральне, кисле, лужне).

Гістохімічні дослідження ферментів мають свої специфічні особливості: а) у процесі гістохімічної реакції виявляється не сам фермент, а продукт, який утворюється у результаті взаємодії ферменту з субстратом (речовиною, на яку діє даний фермент); б) для визначення дійсної локалізації ферменту в мікроструктурах необхідно, щоб продукт його діяльності був осадженим у вигляді нерозчинної сполуки, у протилежному випадку в результаті дифузії буде отримана неправдива локалізація.

Таким чином, методи гістохімічного вивчення ферментів базуються на виявленні їх активності, тобто дії по відношенню до застосованих субстратів. При цьому в результаті реакції між ферментами і субстратом утворюються забарвлені сполуки, які вказують місце локалізації активного ферменту. Чим більша кількість продукту утвориться в результаті взаємодії ферменту і субстрату, тим темнішою буде структура і, відповідно, вища активність ферменту. І, навпаки, чим слабкіше забарвлення, тим активність ферменту нижча. Якщо утворений продукт реакції не забарвлюється, тоді для його виявлення застосовують додаткове забарвлення (світлооптичний метод).

На сьогодні розроблено чимало гістохімічних методів виявлення ферментів, перерахувати яких немає можливості. Найбільш широке розповсюдження у гістохімії отримали методи визначення активності ферментів перших трьох класів. Тому в даному розділі будуть описані тільки деякі із них, найбільш важливі та необхідні для гістохімічних досліджень.

### **Клас оксидоредуктаз**

До даного класу відносяться ферменти, які каталізують окисно-відновні реакції, що лежать в основі біологічного окиснення. Процес складається із послідовних та взаємопов'язаних реакцій дегідрування і перенесення від'єднаних 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 $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогенази**

Системна назва ферменту —  $\alpha$ -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 заморожуючому 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 (рН — 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).

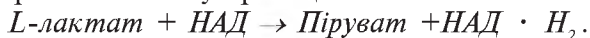
#### **Постановка реакції:**

1. Виготовляють зрізи.
2. На кожний зріз наносять 0,1—0,2 мл (2—4 краплі) інкубаційного середовища та інкубують упродовж 5—30 хв при температурі +37 °С на відкритому повітрі.
3. Переносять зрізи у рідину Беккера або у 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.

**Результат.** Місце розміщення ферменту виявляється за червоним (моноформазан) або синім (диформазан) осадом. Фермент виявляється у 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:



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 піаніду 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.
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 червоними та синіми 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 мікротом-кріостаті або заморожувачу мікротомі.

**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 упродовж 5—30 хв при температурі +37 °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 у 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) формазанів.

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 властиво-

стями — флавінопротеїд, молекула містить залізо, у складі активного центру є сульфгідрильні групи. Шифр сукцинатдегідрогенази — 1.1.1.37; каталізує реакцію:

*Сукцинат + Акцептор → Фумарат + Відновлений акцептор.*

Сукцинатдегідрогеназа відноситься до найбільш розповсюджених ферментів. Вона є одним із центральних ферментів циклу трикарбонних 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.

Є чимало методів виявлення СДГ, основаних на застосуванні різних тетразолів. Кращі результати отримані при застосуванні нітро — СТ.

*Для роботи* придатні зрізи із свіжої тканини, виготовлені на мікротом-кріостаті або заморожуючому 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 +37 °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.

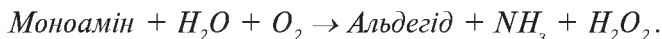
6. Зрізи заводять у гліцерин-желатин (можна зневоднити в спиртах або розчинах ацетону в ксилолі, просвітлити у ксилолі і завести у бальзам або полістирол).

**Результат.** Осад моно- та диформазану свідчить про наявність та локалізацію СДГ. Висока концентрація ферменту ви-

являється 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—NH<sub>2</sub>— групу донорів, акцептором є O<sub>2</sub>, тривіальна назва — моноамінооксидаза (МАО), системна назва — моноамін: O<sub>2</sub>-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 у знешкодженні ядовитих 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 мікротом-кріостаті або заморожуючому мікротомі.

**Реактиви:** А. **Вихідні 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. Гідрозид 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—90 °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 22 °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 кисень.

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.

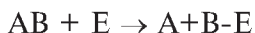
8. Контрольні зрізи піддають таким же процедурам, інкубуючи у відповідних розчинах.

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 у середовищі, що не містять субстрат.

### **Клас трансфераз**

До даного класу відносяться ферменти, що каталізують реакції внутрішньомолекулярного та міжмолекулярного переносу окремих атомів, атомних груп:



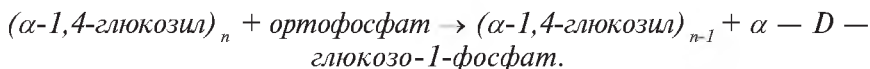
або



Їм належить провідна роль у проміжному обміні речовин. Клас трансфераз поділяють на вісім підкласів. Так, ферменти, які беруть участь у пересенні 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 — б-глюкан-фосфорилаза, системна назва — б-1,4-глюкан: ортофосфат-глюкозилтрансфераза, простетична група представлена піридоксальфосфатом. Каталізує реакцію:



Крім глікогену, може діяти на крохмал, інсулін та інші полісахариди.

Фермент широко розповсюджений у природі і, перш за все, у 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 у 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 +37 °С.
2. Переносять зрізи на кілька хвилин у розчин Люголя.
3. Зрізи заводять у 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:  $R_1R_2 + \text{НОН} \rightleftharpoons R_1\text{Н} + R_2\text{ОН}$ .

Відомо понад 170 гідролаз, які, залежно від субстрату, діляться на дев'ять підкласів: гідролази, які діють на складно-

ефірні 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-кислотно-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 складноєфірні зв'язки або естерази. Вони поділяються на шість під-підкласів: гідролази ефірів карбонових кислот (3.1.1), тіолових ефірів (3.1.2), фосфомоноєфірів (3.1.3), фосфодиефірів (3.1.4), трифосфомоноєфірів (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:

*Ефір карбонової кислоти + H<sub>2</sub>O → Спирт + Карбонова кислота*

Аліестераза сконцентрована у фракції мікросом (від 46 до 70%).

**С-естераза** (ацетилестераза) має шифр — 3.1.1.6, систематична назва — гідролаза оцтових ефірів. Каталізує реакцію:

*Ефір оцтової кислоти + H<sub>2</sub>O → Спирт + Оцтова кислота.*

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 у охолодженому до +2—4 °С розчині 10%-го формаліну. Зрізи виготовляють на мікротом-кріостаті або заморожувальному мікротомі.

**Реактиви:** 1. Інкубаційний розчин: 20 мг б — 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.  $10^{-5}$ М розчин езерину на фосфатному буферному розчині (рН — 7,4). 3. Фосфорорганічний інгібітор E-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 у кількох порціях води (можна 12 год).
8. Заводять зрізи у гліцерин-желатин (можна зневоднити у спиртах, просвітити у ксилолі і завести у бальзам).

**Результат.** 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” $\alpha$ -нафтилацетатом у модифікації Е. Пірса**

**Для роботи** придатні заморожені зрізи із свіжого матеріалу, фіксованого в охолодженому 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 б-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 мг міцного синього В, добре струшують, фільтрують на зрізи. 2. Гематоксилін Майєра.

#### **Постановка реакції:**

1. Заморожені зрізи наносять 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.

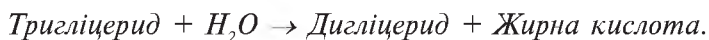
5. Промивають їх у проточній воді 30 хв.

6. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

**Результат.** Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту визначають за чорним забарвленням, ядра клітин забарвлюються у темно-синій колір.

### ***Виявлення ліпази***

Системна назва ферменту ліпаза — гідролаза ефірів гліцерину. Активність ферменту пов'язана з наявністю в інкубаційному середовищі іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Шифр ферменту 3.1.1.3. Каталізує реакцію:



Ліпаза відноситься до гідролаз ефірів карбонових кислот. Міститься у тканинах тварин, зокрема 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 охолоджену до +2—4 °С 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  $Pb(NO_3)_2$ . 4. Розчин  $(NH_4)_2S$ . 5. 1%-ий водний розчин еозину.

#### **Постановка реакції:**

1. Заморожені зрізи наносять на предметні стекла (парафінові — доводять (ксилол, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води, промивають) та висушують на повітрі.

2. Зрізи поміщають у інкубаційне середовище на 3—12 год при температурі +37 °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.

**Результат.** Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту визначають за наявністю коричнево-чорного осаду сульфід свинцю на гістоструктурах препарату.

#### **Виявлення ліпази-естерази за Мартиновим**

**Для роботи** придатні заморожені зрізи із свіжого матеріалу, фіксованого в охолодженому до 2—4 °С розчині 10%-го формаліну або парафінові зрізи, виготовлені із тканини попередньо фіксованої у холодному апетоні.

**Реактиви:** 1. Основний розчин: беруть необхідну кількість 2%-го розчину “Твін” 40 на 0,2%-му розчині  $CaCl_2$  (цей розчин виготовлений на веронал-ацетатному буферному розчині з рН-4,7), додають до нього декілька кристаликів тимолу, дають “дозріти” 48 годин при температурі +37 °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  $CaCl_2$ , 10—20 мл гліцерину, 2—4 мл основного розчину, кристалик тимолу. 3. 1%-ий розчин  $Pb(NO_3)_2$ . 4. Розведений розчин  $(NH_4)_2S$ . 5. 1%-ий водний розчин еозину.

### **Постановка реакції:**

1. Заморожені зрізи наносять 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 °С (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 у 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.

**Результат.** Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту визначають за наявністю коричнево-чорного осаду сульфід у 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 ацетилу. 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. 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 сульфиду амонію. 5. Інгібітор: готують 0,1 М основний розчин дізопропілфторфосфату 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 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 (кілька хвилин).

7. Переносять їх у розчин сульфиду 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 у бальзам).

**Результат.** У місцях розташування ферментів випадають темно-коричневі осадки сульфиду 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 зберігати у холодильнику. Розчин інгібітору оберігати від світла та запобігати від попадання його на тіло.

### ***Виявлення холінестерази за методом Гоморі***

**Для фіксації** шматочків матеріалу застосовують рідину Беккера або 10—12%-ий охолоджений розчин формаліну.

**Прідатні** заморожені зрізи із свіжої тканини.

Виявлення холінестерази за методом Гоморі набагато простіше порівняно з методом Жеребцова.

**Реактиви:** 1. *Основний розчин:* 0,3 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 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  $\text{NaOH}$ ; 179 мл 40%-го (насиченого) водного розчину  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (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) сульфиду амонію. 5. Ядерний барвник.

#### **Постановка реакції:**

1. Зрізи поміщають у інкубаційне середовище на 10—60 хв при температурі +37 °С (термостат).

2. Тричі промивають їх насиченим розчином сульфату натрію.

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.

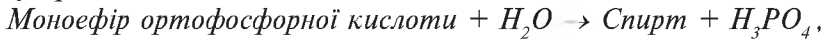
5. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

**Результат.** Локалізацію та інтенсивність реакції на виявлення ферменту АХЕ визначають за наявністю коричневого осаду сірнистої міді.

**Примітка.** Контрольні зрізи поміщають на 30 хв в  $10^{-6}$  М розчин діізопропілфторфосфату у насиченому розчині сульфату натрію, потім інкубують у 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:



каталізує реакції трансфосфорилування.

Фермент бере участь у обміні нуклеотидів, білків, ліпідів, вуглеводів. Міститься у тканинах тварин. Нездатність організму синтезувати лужну фосфотазу призводить до гіпофосфатії, яка проявляється деформацією кісток, остеопорозом тощо.

Є декілька гістохімічних методів виявлення ЛФ.

### **Виявлення лужної фосфомоноестерази за методом Гоморі-Такаматчу**

**Для фіксації** шматочків матеріалу використовують 10—12%-ий охолоджений розчин нейтрального формаліну, ацетон, 80° етиловий спирт. Термін фіксації 12—24 год.

**Придатні** заморожені та парафінові зрізи.

**Реактиви:** 1. Інкубаційне середовище: 0,6 г гліцерофосфату ( $\beta$ - або суміші  $\alpha + \beta$ -) натрію, 1 г хлориду кальцію, 0,5 г вероналу (краще — мединалу), 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 матеріалу (2—3 мм) зневоднюють у 96° і абсолютному етиловому спирті 12—24 год, поміщають двічі у ксилол, заливають у парафін, виготовляють зрізи (можна готувати замороженні зрізи із матеріалу, зафіксованого в охолоджену розчині формаліну або етиловому спирті).

2. Зрізи депарафінують (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) і доводять до води.

3. Переносять їх на 1—6 год в інкубаційне середовище при температурі +37 °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 сульфід 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 сульфід кобальту.

**Примітка.** Контрольні зрізи інкубують у середовищі, в якому відсутній гліцерофосфат натрію. Краше використовувати свіжий матеріал.

### **Виявлення лужної фосфомоноестерази методом азопоєднання**

**Фіксацію шматочків** матеріалу проводять у 10—12%-му розчині нейтрального формаліну впродовж 16—24 год.

**Придатні** щойнозаморожені або парафінові зрізи

За методом Гоморі-Такаматчу можливі артефакти, зумовлені дифузією кінцевих продуктів реакції. Метод азопоєднання такі недоліки усуває.

**Реактиви:** 1. Інкубаційне середовище: у 20 мл 0,1 М трис-буферу (рН —10) розчиняють 10—20 мг б-нафтилфосфату натрію, додають 20 мг стійкого синього В, ретельно перемішують, фільтрують необхідну кількість 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 наносять 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 +37 °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.

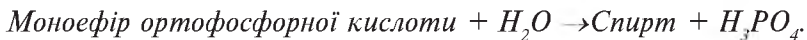
8. Заводять зрізи у гліцерин-желатин.

**Результат.** У місцях локалізації ферменту випадають осадки темно-синього кольору.

**П р и м і т к а.** 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 кислій фосфомоноестерази (фосфатази)**

Системна назва ферменту — фосфогідролаза моноєфірів ортофосфорної кислоти, шифр — 3.1.3.2. Вважають, що є декілька видів кислій фосфатази (КФ). Фермент широко розповсюджений у природі. Каталізує реакцію:



Міститься у тканинах тварин, рослин, дріжджах, бактеріях, каталізує також реакції трансфосфорилування. Клітинна локалізація пов'язана з діяльністю лізосом.

Є декілька гістохімічних методів виявлення КФ. Приведемо окремі із них.

### **Виявлення кислій фосфомоноестерази за методом Гоморі**

**Для фіксації** шматочків матеріалу приміняють 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 свин-

цю і додають 50 мл 3%-го розчину гліцерофосфату натрію, поміщають у термостат при температурі +37 °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 сульфїду амонїю. 4. 1%-ий розчин еозину.

#### **Постановка реакції:**

1. Шматочки матеріалу (3—4 мм) фіксують у охолоджену розчині формалїну або кальцій-формол упродовж 0,5—24 год.

2. Промивають їх у воді 30—60 хв.

3. Виготовляють заморожені зрізи, парафінові доводять (кислот, 96° і 70° етиловий спирт) до води.

4. Зрізи переносять у інкубаційне середовище при температурі +37 °С (від 15 хв до 24 год).

5. Промивають їх у дистильованій воді.

6. Переносять на кілька хвилин у розчин оцтової кислоти.

7. Споліскують у дистильованій воді.

8. Переносять зрізи в розчин сульфїду амонїю 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 у 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 (Д. Кисели, 1962) 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 близько 5 мг фосфату нафтолу AS — В1 в 0,25 мл диметилформамїду 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<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води.

2. Зрізи переносять у 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 йонами кальцію, другий — йонами магнію. Обидва ферменти каталізують перебіг реакції:



Вважають, що АТФ-аза приймає участь у доставці АТФ для продовження протікаючих процесів обміну речовин. Виявляється у 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 створення 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 двонат-

рієвої 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 CaCl<sub>2</sub>. 3. 2%-ий розчин CoCl<sub>2</sub>. 4. 0,5—1%-ий розчин сульфиду амонію.

**Постановка реакції:**

1. Виготовляють зрізи.
2. Зрізи поміщають у інкубаційне середовище (від 5 хв до 3 год) при температурі +37 °С (термостат).
3. Промивають зрізи у трох порціях хлориду кальцію.
4. Переносять їх на 3 хв у розчин хлориду кобальту.
5. Промивають у дистильованій воді.
6. Переносять у розчин сульфиду амонію.
7. При необхідності дофарбовують зрізи розчином карміну або еозину.
8. Заводять зрізи у гліцерин-желатин або зневоднюють їх у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

**Результат.** У місцях локалізації ферменту випадають осадки сульфиду кобальту чорного або сірого кольору.

**П р и м і т к а.** Контрольні препарати поміщають у розчин *n*- хлормеркурибензоату ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  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.

Основою для створення методу були роботи Гоморі. Достовірність результатів підтверджено біохімічними методами.

**Реактиви:** 1. Інкубаційне середовище: 20 мл 125 мг %-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 у гліцерин-желатин.

**Результат.** У місцях локалізації ферменту випадають осаді коричнево-чорного кольору.

## Гормони

*Гормони* (від грецької *hormao* — приводжу в рух, збуджую) — це органічні речовини, які виробляються залозами внутрішньої секреції, транспортуються кров'ю до клітин-мішеней і активно впливають на їх метаболічні, морфологічні та фізіологічні процеси. Слід відмітити що гормони синтезуються не тільки ендокринними залозами, а й в поодиноких ендокриноцитах органів та тканин. Так, гормони підшлункової залози (інсулін, глюкагон) утворюються також і в нервових закінченнях.

Гормони ссавців за хімічною будовою поділяють на три великі групи:

- білки та пептиди;
- похідні амінокислот;
- стероїди.

В окрему групу, як правило, виділяють так звані гормони або гуморальні фактори, які утворюються не в ендокринних залозах, а в багатьох тканинах організму (гістамін, простагландини тощо).

Найбільш прийнятна класифікація гормонів за органами, де вони синтезуються: статеві (самця та самок), гормони кіркової та мозкової речовини надниркових залоз, щитоподібної, прищитоподібної, підшлункової залоз, тимуса, гіпофіза, епіфіза.

На даний момент відомо близько 50-ти різних гормонів, кожний з яких впливає на різні прояви обміну речовин. Гормони знаходяться як у вільному, так і зв'язаному стані.

Регуляторна дія гормонів на обмін речовин реалізується через механізм активації або інгібування ферментів і, як правило, відбувається за допомогою системи циклічної АМФ чи циклічної ГМФ.

Кожному гормону властивий чітко визначений свій метаболізм, порушення якого проявляється у змінах концентрації речовин у біологічних рідинах і може бути причиною ендокрин-

ної патології. У гуманній та ветеринарній медицині зустрічаються гормональні порушення, пов'язані з гіпо- і гіперфункцією ендокринних залоз, які призводять до виникнення хвороб.

Залежно від поставленого завдання, існують різні підходи до вивчення гормонів. У деяких випадках обмежуються одно-разовим визначенням окремих гормонів та їх метаболітів. Більш повна уява про характер гормональних порушень дає вивчення концентрації гормону в крові та виділення його з сечею, у динаміці розвитку захворювань, при впливах лікувальних речовин та різних функціональних навантаженнях. Для виявлення локалізації гормонів в органах і тканинах існують гістохімічні методи.

### **Гормони кіркової речовини (кори) надниркових залоз**

За фізіологічною дією гормони кіркової речовини надниркових залоз поділяють на чотири групи: глюкокортикоїди, мінералокортикоїди, андрогени та естрогени. Гормони першої групи (кортизон, кортикостерон, гідрокортикостерон) беруть участь у регуляції вуглеводного та білкового обміну. Мінералокортикоїди (альдостерон, дезоксикортикостерон) здійснюють регуляцію мінерального та водного обмінів. З діяльністю гормонів третьої групи (андростендіон, оксиандростерон, дегідророепіандростерон, тестостерон тощо) пов'язано виникнення вторинних статевих ознак у самців, синтез білків, ріст тіла. Гормони четвертої групи (естроген, прогестерон) виробляються у невеликих кількостях і беруть участь у розвитку вторинних статевих ознак у самок.

### ***Фенілгідразинова 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.

**П р и м і т к а.** Можна застосовувати насичений розчин 2,4—динітрофенілгїдрозин в 1 н. розчині соляної кислоти. Тоді, починаючи з другого пункту вищеописаного методу на виявлення кортикоїдів, постановку реакції здійснюють наступним чином: 2. Зрізи поміщають на 24 год у розчин динітрофенілгїдрозину при температурі 0 +4 °С. 3. Споліскують їх у 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 $\alpha$ -кетогруп кортикоїдів за Канолкаром***

**Для постановки реакції** використовують свіжий матеріал.

**Придатні** заморожені зрізи.

**Реактиви:** 1. Розчин Ліллі: 9 мл аніліну, 8 мл концентрованої соляної кислоти, змішують, струшують, додають 100 мл дистильованої води. 2. 5%-ий розчин FeCl<sub>3</sub>. 3. Реактив Шиффа (див. с. 125—126). 4. Дисульфідна вода: змішують 5 мл 10%-го розчину K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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 °С.
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 забарвлюються 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 по-

силенню серцевої діяльності, розширенню судин серця, зни-  
ці, посиленню глікогенолізу, активізації окиснювальних про-  
цесів та газового обміну. Гормони зустрічаються у вільному і  
зв'язаному (з білками) станах. Чимало реакцій, за допомогою  
яких виділяються і виявляються гормони, базуються на влас-  
тивості останніх енергійно відновлювати оксиди хрому, срібла,  
осмію тощо.

### ***Хромафінна реакція на адреналін та норадреналін за Хілларпом і Хьокфельтом***

***Для постановки реакції*** використовують свіжий нефіксова-  
ний матеріал.

***Придатні*** заморожені зрізи.

Після перебування шматочків матеріалу мозкової речовини  
надниркових залоз у дихроматі калію або хромовій кислоті у  
багатьох клітинах з'являється темно-коричневе забарвлення.  
Такі клітини називають феохромними, а тканину, яка здатна  
відновлювати оксиди хрому — хромафінною.

**Реактиви:** Хромова суміш: змішують 10 об'ємів 5%-го розчи-  
ну  $K_2Cr_2O_7$  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 три-  
чі 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 адрена-  
лін, 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 вико-



ристовувати одночасно з попереднім, так як він допоможе відиференціювати локалізацію норадреналіну та адреналіну.

**Реактиви:** 1. 10%-ий розчин КЮ<sub>4</sub>. 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.

**Результат.** Клітини, які містять норадреналін, набувають коричневого кольору. Адреналін виявляється через 20—24 год.

**Люмінесцентний метод виявлення норадреналіну за Ерьонке**

*Для постановки реакції* використовують свіжий матеріал. *Придатні* заморожені зрізи.

Автором запропонованого методу встановлено кореляцію між інтенсивністю люмінесценції 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 наднирників 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 клітин, які містять норадреналін, набуває властивостей жовто-зеленої люмінесценції. Такі клітини переважно розташовані групами.

## Гормони гіпофіза

*Гіпофіз* — залоза внутрішньої секреції. Разом з нейроендокринними ядрами гіпоталамуса формує єдину морфофізіологічну систему, яка регулює обмін речовин у організмі людини і тварин. Гіпофіз побудований із двох часток, різних за походженням, будовою і функціями: аденогіпофіза і нейрогіпофіза. У аденогіпофізі продукуються гормони: соматотропний, фолікулостимулюючий, лютеїнізуючий, лактотропний, тиротропний, адренкортикотропний, 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 частині 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 адренкортикотропний гормон.

**Реактиви:** 1. Веронал-ацетатний буферний розчин (рН-9,2) (*приготування, див. с. 200*) 2. 0,1%-ий розчин стійкого синього В, виготовлений на цьому ж буферному розчині. 3. 2%-ий розчин Н-кислоти, виготовлений також на цьому ж буферному розчині. 4. 1%-ий розчин йодату натрію у 0,5%-ій азотній кислоті. 5. Розчин сульфату-лейкотионіну за Ван Дейном: розчиняють 0,5 г тіоніну в 250 мл дистильованої води, кип'ятять 5 хв,

охолоджують, об'єм доводять до попереднього рівня, додають 250 *мл* третбутанолу (температура плавлення +25 °С), переносять у посуд з корком, струшують, залишають на 24 *год* при температурі +25 °С, потім на 48 *год* при температурі +4 °С. Термін зберігання такого розчину 45 днів.

#### **Постановка реакції:**

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> 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°С.

4. Промивають у буферному розчині.

5. Ставлять реакцію азотосполучення: поміщають зрізи у розчин Н-кислоти на 15—30 *сек*.

6. Промивають у проточній воді 2 *хв*.

7. Обробляють зрізи розчином йодату натрію 10 *хв* при температурі +20—25 °С.

8. Промивають у проточній воді 5 *хв*.

9. Переносять зрізи у сульфат-лейкотионіну на 2 *год*.

10. Зневоднюють зрізи у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

**Результат.** Базофільні клітини забарвлюються у синій колір, ацидофільні — коричневий, хромофобні не забарвлюються. Синє забарвлення пов'язано з наявністю у клітинах ШІК — позитивних речовин. Коричневе забарвлення з'являється у результаті реакції діазосполучення реактивів з білками, які багаті тирозином.

## **Пігменти**

Термін “*пігменти*” включає цілу групу речовин, головним чином ендogenousного походження, що різняться за своїм відношенням до кислот, лугів, розчинників жирів, реакцій на залізо, солей срібла та барвників, і які мають різні мікроморфологічні ознаки. У гістохімічному відношенні пігменти між собою різняться мало. Всі пігменти, які містяться у тканинах тварин, поділяють на п'ять груп: меланін, ліпофусцин, гемосидерин, гематоїдин та малярійний. Крім того, всі пігменти можна поділити на гематогенні та автогенні. До перших відноситься ге-

моглобін і його похідні (гемосидерин, гематоїдин, гематопорфін, білірубін, білівердин, малярійний пігмент). До других відносять лабільні каротиноїди (ліпохроми) і пігменти зношування (старіння) (ліпофусцини, хромоліпіди), а також меланін. Існують і інші класифікації пігментів.

Значення пігментів — надзвичайно велике. Рослинні пігменти (хлорофіли, бактеріохлорофіл та деякі каротиноїди) беруть участь у фотосинтезі. Гемоглобін та міоглобін, які за хімічною будовою близькі між собою, здатні зв'язувати кисень і віддавати його при необхідності. Меланін шкіри виконує захисну функцію проти дії ультрафіолетового випромінювання, меланіни сітківки є своєрідними світлофільтрами. Патологічна пігментація виникає при багатьох хворобах. Так, жовта пігментація характерна для уремії, мікседеми. Порушення пігментного обміну спостерігається за хвороби Аддісона, пігментній крапивниці, хворобі Гоше, при вагітності. Порушення залізовмісного пігментного обміну гемосидерину спостерігається за інфекційної анемії коней.

### ***Виявлення меланінів за методом Лілі***

**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 володіє різноманітним забарвленням — чорним, коричневим, жовтим і навіть фіолетовим.

**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%-ий розчин оцтової кислоти. 4. Суміш *пikринова кислота—фуксин* за Ван-Гізона (100 мг кислого фуксину розчиняють в 100 мл насиченого розчину пікринової кислоти).

#### **Постановка реакції:**

1. Зрізи доводять (ксилол, 96° і 70° етиловий спирт) до води.
2. Поміщають їх у розчин сульфату заліза на 1 год.
3. Промивають у дистильованій воді (4 рази її міняють).
4. Переносять зрізи у розчин гексаціано-(III) феррату калію на 30 хв.

5. Промивають їх у розчині оцтової кислоти.

6. При необхідності дофарбовують сумішшю *пiкринова кислота—фуксин* упродовж 5 хв (використовувати розчин гематоксиліну для дофарбовування зрізів забороняється).

7. Зневоднюють зрізи у 96<sup>0</sup> та абсолютному спиртах (двічі замінюючи кожний), просвітлюють у спирт-ксилолі і у двох змінах ксилолу та заводять у синтетичне середовище.

**Результат.** Меланіни шкіри, судинної оболонки ока та м'якої мозкової оболонки, нейромеланін і трихоксантин забарвлюються у темно-зелений колір, фон — блідо-зеленуватий або безбарвний. У випадку дофарбовування гістосрізів за Ван-Гізона, 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 щойновиготовленого 1%-го розчину гексаціано-(III) феррату калію. 2. 1%-ий розчин нейтрального червоного.

#### **Постановка реакції:**

1. Парафінові зрізи доводять (ксилол, 96<sup>0</sup> і 70<sup>0</sup> етиловий спирт) до води.

2. Переносять їх у розчин гексаціано-(III) феррату калію на 5—30 хв.

3. Промивають у проточній воді.

4. При необхідності зрізи піддають диференціюванню (суміш 1%-го розчину ідкого калію в 50<sup>0</sup> етиловому спирті).

5. Зрізи промивають у 70<sup>0</sup> 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 забарвлюються в інтенсивно темносиній колір.

**П р и м і т к а.** 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, 96° і 70° 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 забарвлюються у синій колір, меланіни — безбарвні.

### ***Виявлення жовчних пігментів за методом Штейна***

**Для фіксації** матеріалу використовують 70° або 90° етиловий спирт.

**Для роботи** придатні парафінові зрізи.

Жовчні пігменти є продуктами розпаду гемоглобіну та інших гемовмістимих 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 96° 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, 96° і 70° 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 у темно-зелений колір. Інтенсивність перебігу реакцій пов'язують з наявністю невеликих гранул пігментів (золотисто-жовтий колір пігментів поступово переходить у оливково-коричневий).

**П р и м і т к а.** Зрізи можна дофарбовувати гематоксиліном або карміном Майєра 3—18 год (після 5-го пункту). Кармін забарвлює ядра клітин у червоний колір, пігменти забарвлені у темно-зелений.

**Виявлення гемоглобіну  
за методом Слонімського-Ланінського**

**Матеріал** фіксують у спеціальному фіксаторі: у 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 залізовмістний пігмент крові людини та більшості тварин. Виконує функцію переносу кисню від легень 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%). Становить основну масу еритроцитів. Молекула гемоглобіну складається із 4-х субди-

ниць-мономерів, які мають молекулярну масу 16500—17000. Усі чотири залишки гему розташовані на поверхні молекули і доступні для взаємодії з киснем. У капілярах легень гемоглобін окиснюється і перетворюється в оксигемоглобін, у тканинах віддає кисень та приєднує вуглекислоту, перетворюючись у карб-гемоглобін. У кожному еритроциті міститься майже 280 млн. молекул гемоглобіну. В організмі людини щодоби утворюється близько 8 г гемоглобіну (червоний кістковий мозок). Обмін гемоглобіну порушується при анеміях, обтураційній жовтяниці, лейкозах тощо.

**Реактиви:** 1. Фіксатор: у 100 мл дистильованої води розчиняють 2,5—4 г гексаціано-(III) феррату калію та 10—20 мл нейтрального формаліну. 2. Розчин бензидину: 0,1—0,2 г бензидину розчиняють в 2—3 мл 96° етилового спирту, додають 2 мл 4%-го розчину пергідролю та 1 мл розчину бензидину в льодяній оцтовій кислоті (0,1—0,2 г розчинити в 2—3 мл кислоти). 3. 70° етиловий спирт. 4. Контрастний барвник (метиловий зелений, сафранін тощо).

**Постановка реакції:**

1. Матеріал фіксують упродовж 15—24 год.
2. Промивають його у проточній воді 24 год.
3. Заливають у парафін або парафін—целюдин.
4. Виготовляють зрізи.
5. Зрізи депарафінують (ксилол, 96° і 70° 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 70° етиловий спирт.

**Для роботи** додатні парафінові зрізи.



**Гемосидерин** — похідний гемоглобіну. Вважають, що він складається із білка, з'єданого з гідроксидом заліза. Виробляється 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. Чимало 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, 96° і 70° 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 забарвлюється у синій колір, ядра клітин — у червоний.

**Реакція на берлінську лазур (за Перлсом)**

**Для фіксації** матеріалу використовують 10%-ий розчин формаліну, 96° або абсолютний етиловий спирт.

**Для роботи** придатні заморожені, парафінові, целоїдинові зрізи.

Реакція дає змогу виявляти тільки частину залізовмісних пігментів і особливо ті, в яких залізо перебуває 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. 62).

**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-кислор, ксилор і заводять у бальзам.

**Результат.** Гемосидерин забарвлюється у синій колір, ядра клітин — у червоний.

**П р и м і т к а.** Матеріал повинен бути свіжим. Шматочки тканин і органів краще фіксувати в абсолютному або 96<sup>0</sup> етиловому спирті. Можна фіксувати і у 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 96<sup>0</sup> 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.

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 70<sup>0</sup> 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%-ний розчин конго червоного. 2. Насичений розчин карбонату літію. 3. 80° етиловий спирт. 4. Гематоксилін Майера (*приготування див с. 61*).

#### **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 80° етиловому спирті (до зникнення відходження барвника).

4. Споліскують у воді.

5. При необхідності зрізи дофарбовують гематоксиліном Майера.

6. Промивають у воді.

7. Зневоднюють у спиртах, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

**Результат.** Амілоїд забарвлюється у цегляно-червоний колір.

### **Розчини для гістохімічних досліджень**

Для виготовлення гістохімічних препаратів користуються розчинами різних речовин. *Розчин* — це фізико-хімічна система, яка складається з двох і більше компонентів. Один з компонентів переважає і називається розчинником, інші рівномірно розподіляються у розчиннику і є розчинними речовинами. Залежно від агрегатного стану розчинника розчини поділяють на газоподібні, рідкі та тверді. За розмірами частинок розчинених речовин є три типи розчинів: істинні (розмір частинок до 1 *нм*), колоїдні (від 1 до 100 *нм*) та механічні суміші — суспензії і емульсії (розмір частинок більше 100 *нм*). Істинні розчини поділяють на молекулярно-дисперсні (неелектроліти) та іонно-дисперсні (електроліти) системи. У молекулярно-дисперсних системах розчинна речовина перебуває у вигляді молекул (наприклад, розчини глюкози та сечовини), у йонно-дисперсних — у вигляді йонів (наприклад, розчин соляної кислоти, їдкого натрію, кухонної солі).

Тканини і клітини є своєрідними колоїдними системами, які можуть перебувати в стані “гель” або “золь”. Багато реактивів, особливо барвники та субстрати, застосовують у вигляді колоїдних розчинів. При постановці гістохімічних реакцій у місцях локалізації речовин, що вивчаються, виникають зафарбовані структури, які можна віднести до суспензій (наприклад, осад сульфїду свинцю при виявленні кислї фосфомоноестерази).

Розчини відрізняються між собою концентрацією — ваговим або об’ємним вмістом розчинених речовин у визначеній кількості розчину. Розчин, у якому міститься значна кількість розчинної речовини, близької до насичення, називають концентрованим. Поняття “концентрований” необхідно відрізнити від “насичений”. Насиченим розчином є такий розчин, у якому міститься максимально можлива кількість розчиненої речовини за даних умов. Наприклад, якщо у 100 мл води розчинити 50 г натрієвої селїтри, отримаємо концентрований розчин. Його не можна називати насиченим, так як за температури 20 °С у такому ж об’ємі води розчиняється 87,5 г селїтри. Розчини, концентрація яких менша щодо насиченого розчину, називають ненасиченими. Розчини, концентрація яких більша (при тій же температурі) відносно насиченого розчину, називають 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 його 2,94 г. Якщо потрібно приготувати 500 мл такого розчину, то складаємо пропорцію:  $1000 : 500 = 2,94 : x$ , звідки

$$X = \frac{2,94 \cdot 500}{1000} = 1,47 \text{ г.}$$

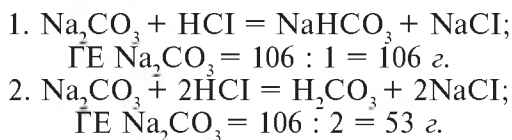
Дихромат калію (2,94 г) висипаємо у мірну колбу і до позначки 500 мл доливаємо дистильовану воду.

**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  $98 : 3 = 32,7$  г. Грам-еквівалент основи дорівнює грам-молекулярній масі, поділеної на валент-

ність металу. Наприклад, для гідроксиду барію 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:

$$\frac{400}{2 \times 3} = 66,7 \text{ г.}$$

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:



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 долити воду до мітки. Наприклад, для приготування 1 л 0,01 н. розчину хлориду барію спочатку визначають його грам-молекулярну масу:  $\text{ГМ BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 244$  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 наважки доливають воду до мітки 1000 мл.

### Приготування буферних розчинів

При постановці більшості гістохімічних реакцій необхідно створити середовище з певним значенням рН. Це не випадково, оскільки у 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 роз-

чинником (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 ємкість, яка визначається кількістю 0,1 н. НСІ або NaOH, яку необхідно додати до 1 л буферного розчину, щоб змістити його рН на  $\pm 1$ .

Значення буферних розчинів у постановці гістохімічних реакцій надзвичайно велике. Тканини, відібрані для дослідження, перебувають у особливих умовах: до них не надходять поживні речовини і кисень, 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: *А.* 0,2 М розчин триоксиметиламінометану (24,3 г триоксиметиламінометану розчиняють дистильованою водою у 1000 мл). *В.* 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 А і В та дистильованої води:

***Таблиця № 4. Приготування трис-буфера Мак-Мануса і Мауера з відповідним рН***

рН	А	В	H <sub>2</sub> O	рН	А	В	H <sub>2</sub> O
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**

### **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.

**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



### 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 № 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 бора — NaOH за М. Берстоном

рН	Вихідні розчини: А. 0,05 М розчин бори (19,04 г бори розчинено в 400 мл води)	В. 0,2 М розчин NaOH (7,25 г NaOH розчинено в 100 мл води)	рН	А	В
2,62	1,6	98,4	8,66	0,75	
3,20	1,93	98,07	7,42	5	
3,62	5,32	94,68	4	9,16	0,25
3,88	8,12	91,88	3	9,64	
4,13	12	88	2		
4,33	15	85	1		

Таблиця №8. Приготування буферного розчину бора — 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).

**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 <sup>0</sup> С	24 <sup>0</sup> С	30 <sup>0</sup> С			18 <sup>0</sup> С	24 <sup>0</sup> С	30 <sup>0</sup> 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

**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.

**Таблиця №12. Приготування 1 М ацетат-солянокислого розчину  
за Спангофом з відповідним рН**

рН	А	В	H <sub>2</sub> O	рН	А	В	H <sub>2</sub> O
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 з даними *таблиці № 13*.

**Таблиця №13. Приготування цитратно-фосфатного буферного розчину за Мак-Гільвейном 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

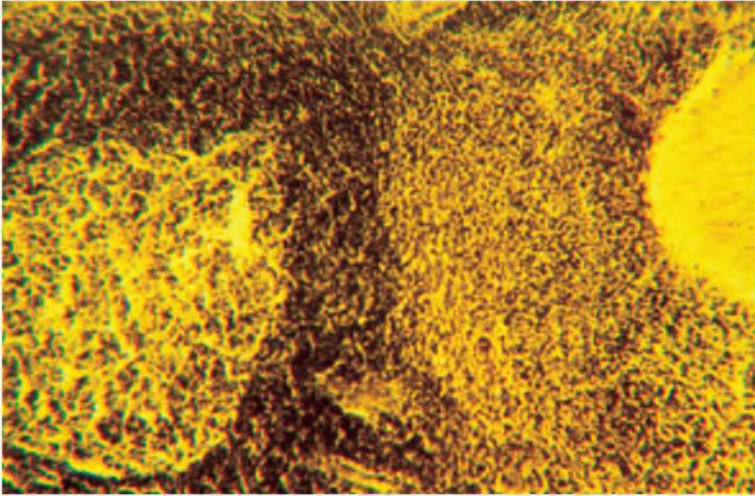
***Приготування ацетатного буферного розчину Уолпола***

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).

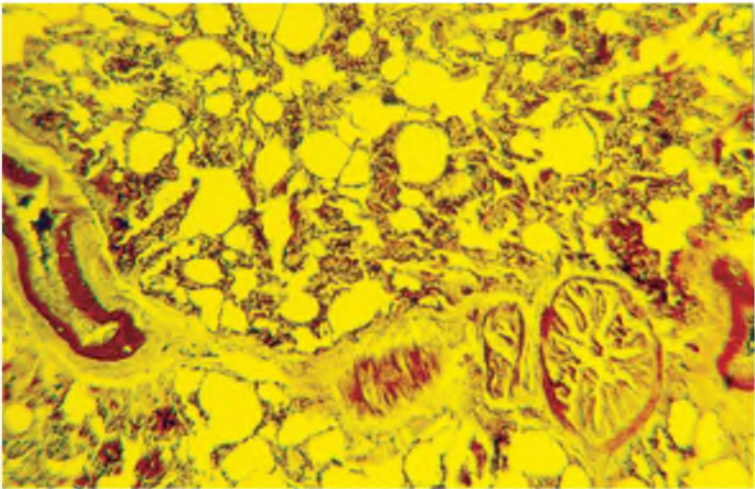
Спосіб приготування: для приготування 100 *мл* відповідного буферного розчину з необхідним значенням рН змішують певну кількість розчинів А і В (відп. до даних *таблиці № 14*).

**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.34. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у селезінці великої рогатої худоби. Ейнарсон. X 56. Препарат Л.П. Горальського.*



*Рис.35. Локалізація та розподіл "загальних" білків у легенях великої рогатої худоби. Шуст. X 56. Препарат Л.П. Горальського.*



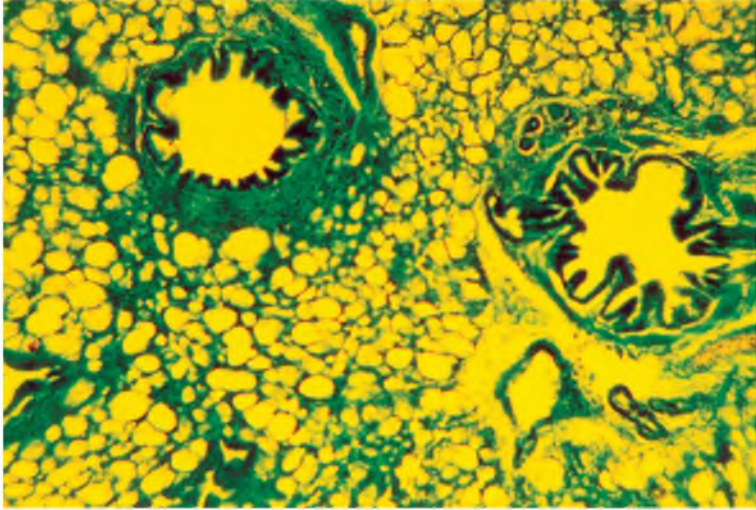


Рис.36. ШІК-позитивні речовини в легенях великої рогатої худоби. ШІК-реакція. X 56. Препарат Л.П. Горальського.

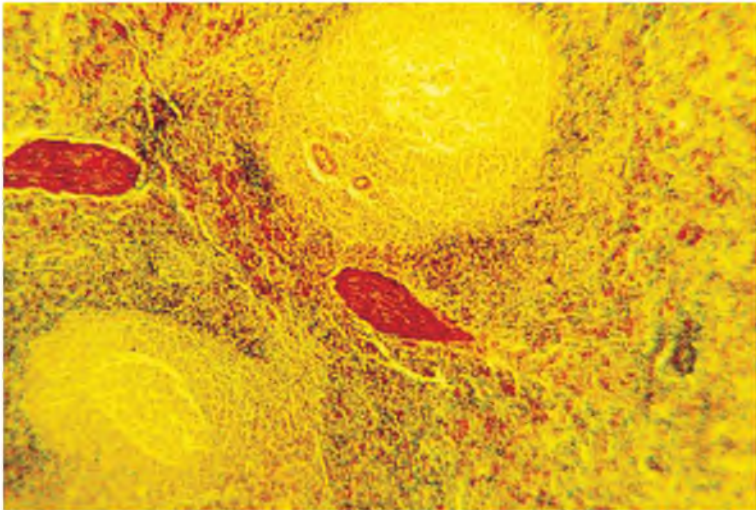


Рис.37. Локалізація та розподіл білкових речовин у селезінці великої рогатої худоби. Мікель-Кальво. X 56. Препарат Л.П. Горальського.

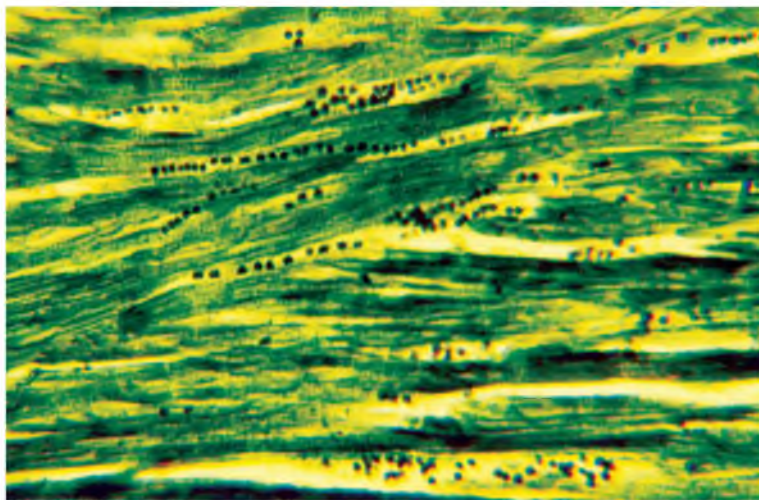


Рис.38. Локалізація та розподіл "загальних" білків у міокарді великої рогатої худоби. Шуст. X 400. Препарат Л.П. Горальського.

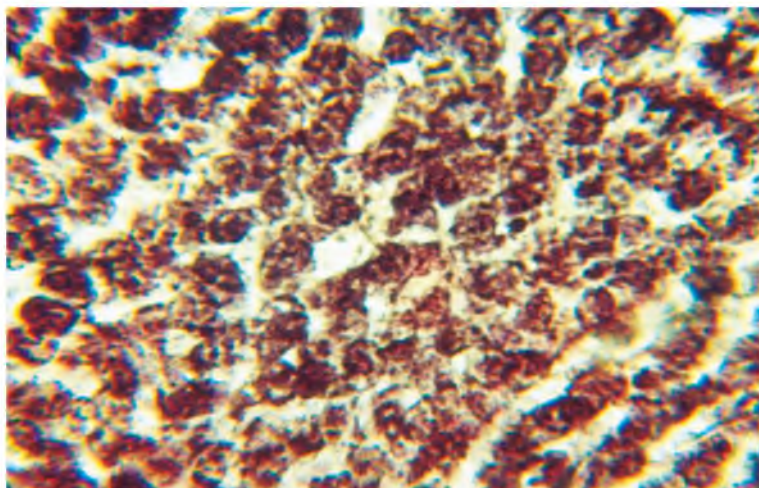
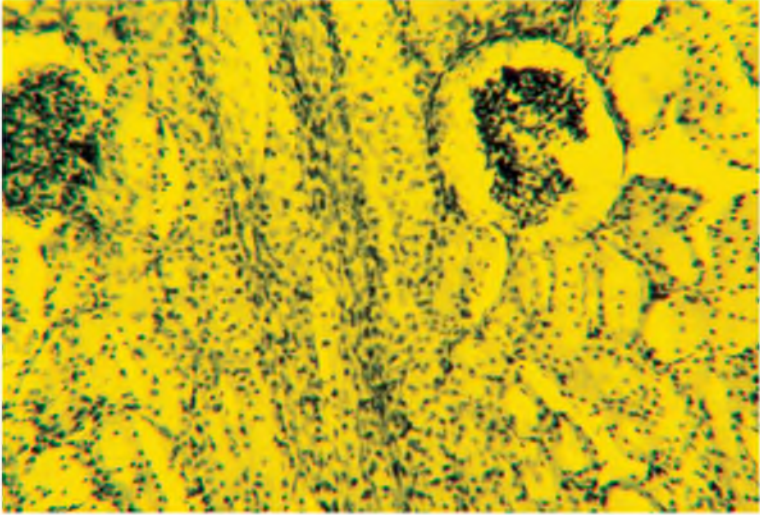
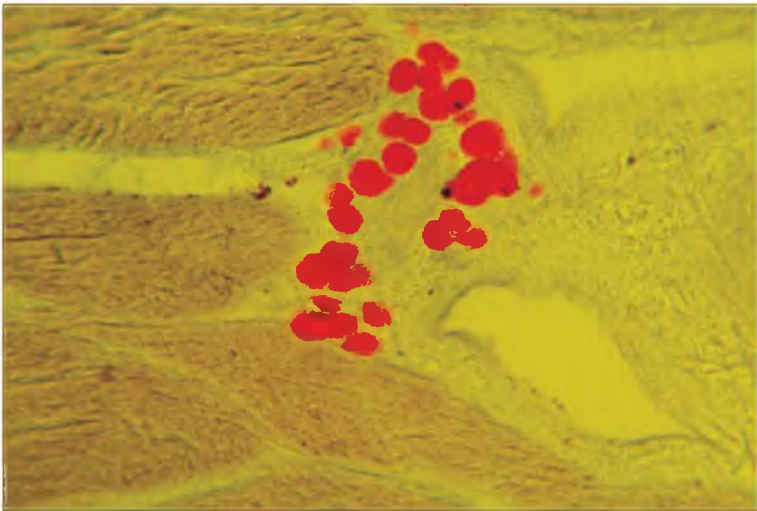


Рис.39. Локалізація та розподіл загальних білків у гепатоцитах печінки великої рогатої худоби. Шуст. X 400. Препарат Л.П. Горальського.

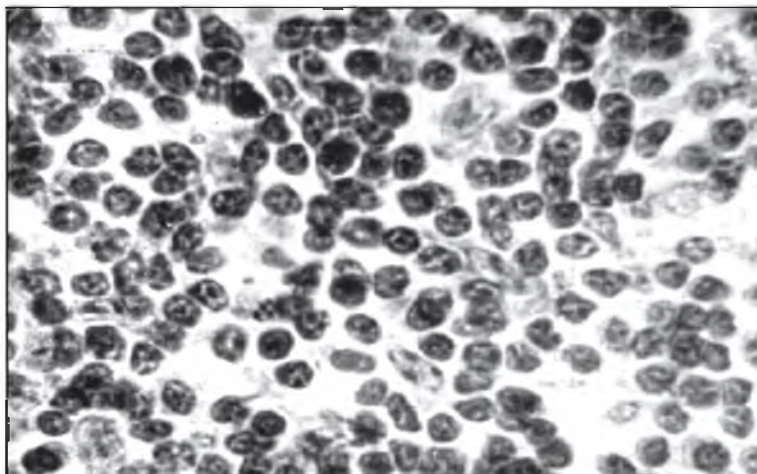


*Рис.40. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у нирках великої рогатої худоби. Ейнарсон. X 280. Препарат Л.П. Горальського.*

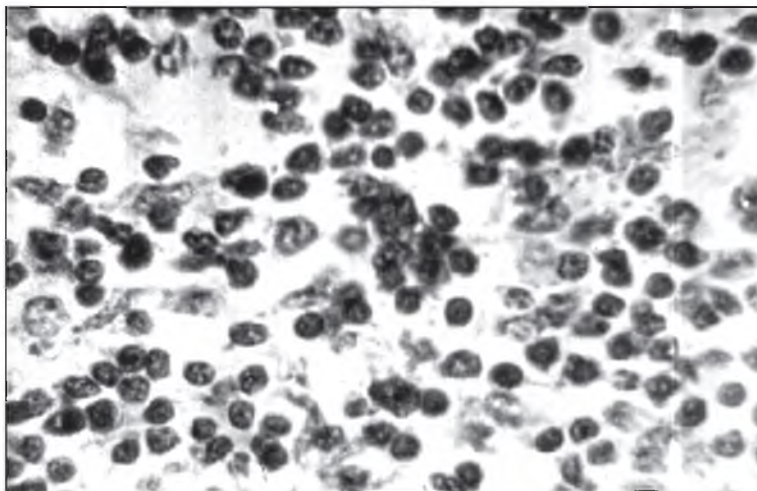


*Рис.41. Ліпіди в міокарді великої рогатої худоби. Кей та Уайхед. X 56. Препарат Л.П. Горальського.*





*Рис.42. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у клітинах мантійної зони лімфатичного вузлика лімфовузла великої рогатої худоби. Браше. X 900. Препарат Л.П. Горальського.*



*Рис.43. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот у клітинах лімфатичного вузлика селезінки великої рогатої худоби. Браше. X 630. Препарат Л.П. Горальського.*

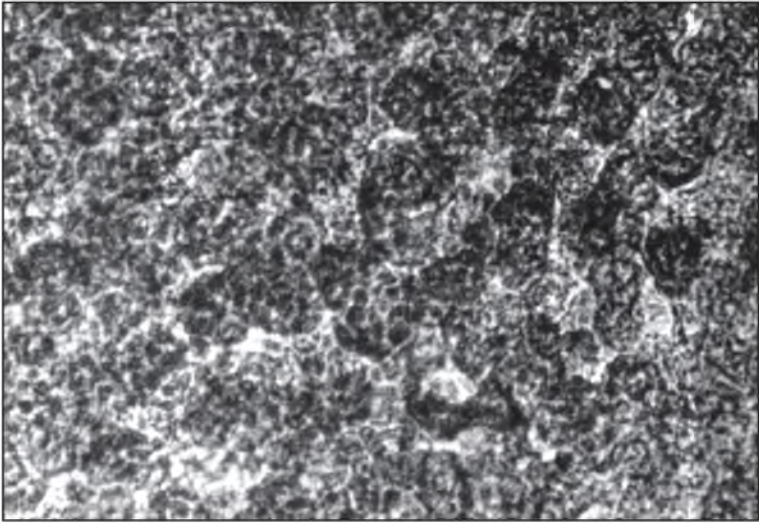


Рис.44. Ліпиди у гепатоцитах печінки великої рогатої худоби.  
Кайн. X 400. Препарат Л.П. Горальського.

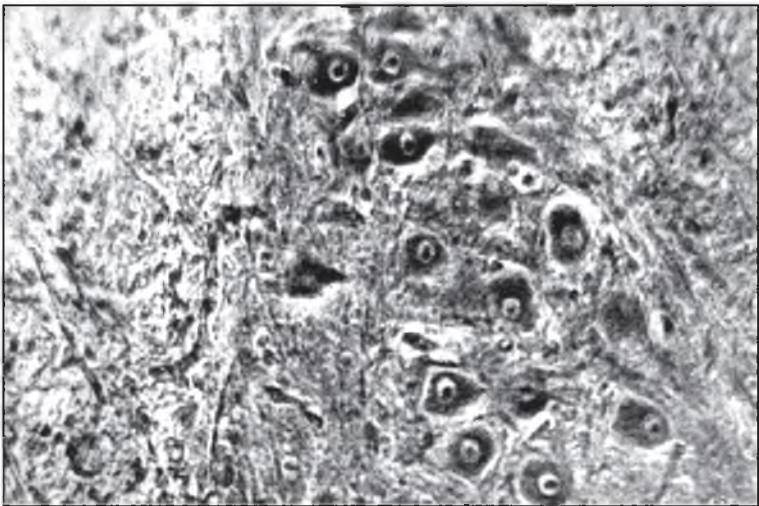


Рис.45. Локалізація та розподіл "загальних" білків  
у нейрон-гліальних структурах спинного мозку. Шуст. X 80.  
Препарат Л.П. Горальського.



Рис.46. Локалізація та розподіл нуклеїнових кислот  
у нейронах спинного мозку. 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 у 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. 56*).
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 роботою її кип'ячать (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 збовтувати. 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 або на сірниках. При цьому зрізи повинні бути направлені вниз. Фарбувати можна і в іншому лабораторному посуді.

9. Для запобігання передчасного вицвітання зафарбованих препаратів використовують ксилол високої якості, який не містить кислоти.

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-Гімза***

#### *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 (станчачики).

2. Приготування фарбувального розчину. Його проводять у градуйованому циліндрі, з розрахунку 1—2—3 краплі фарби Романовського-Гімза 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 +37 °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 96° 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.

7. Диференційовані зрізи швидко проводять через абсолютний спирт, висушують 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 із зрізами. При цьому слідкують за наявністю осаду.

4. Термін фарбування зрізів при кімнатній температурі — 18—24 год, а у термостаті при температурі +37 °С — 1—2 год.

В подальшому зафарбовані зрізи обробляють так, як і при фарбуванні за Романовським-Гімза (*пп.* 4—7).

Слід відмітити, що методика фарбування клітин крові у 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 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—75<sup>0</sup> спирті.

#### ***Методика фарбування:***

1. Переносять зрізи з етилового спирту в дистильовану воду і промивають їх в 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 щавелевої 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'єкта дослідження, якості його фіксації, тривалості та способу зберігання. Суміш придатна до вживання впродовж декількох днів. Перед використанням її необхідно збовтати, але не фільтрувати. Якщо азур дає слабе забарвлення, то до фарбувальної суміші додають його ще кілька 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 вони не набудуть рожевого відтінку. Термін диференціювання залежить від тривалості фарбування та свіжості барвника.

9. Зрізи споліскують у дистильованій воді.

10. Диференціюють зрізи у 96<sup>0</sup> етиловому спирті, допоки перестане відходити синя фарба (азур).

11. Зрізи двічі пропускають через абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

### ***Фарбування клітин крові в її мазках і препаратах — відбитках органів кровотворення за Романовським-Гімза***

Перед фарбуванням мазки крові і препарат-відбитки фіксують у метиловому спирті (5—6 хв) або у 96<sup>0</sup> 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 з тим, щоб випарувався спирт.

#### ***Методика фарбування:***

1. Готують робочий розчин фарби Романовського-Гімза. Для цього 15—20 крапель фарби Романовського-Гімза (яка поступає в реалізацію) додають до 10 мл дистильованої води.

2. Мазки або препарати-відбитки поміщають у чашку Петрі і на них пінеткою 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 в її мазках і препаратах-відбитках органів кровотворення за Папенгеймом***

Перевага цього методу фарбування над попереднім полягає в 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-Гімза (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 фарбою Романовського-Гімза.

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 96<sup>0</sup> 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 промивати у 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 96<sup>0</sup> етиловий спирт із розрахунку 1 г 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 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 +37 °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 96° та абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

***Результати фарбування.*** Бактерії зафарбовані в 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. Забарвлені зрізи споліскують у водопровідній воді.

3. Диференціюють зрізи у 96° етиловому спирті, під контролем мікроскопу, поки не з'являться чіткі тканинні структури, приблизно 1—2 хв.

4. Швидко проводять зрізи через 96° і абсолютний етиловий спирт, просвітлюють у ксилолі і заводять у бальзам.

При роботі з целоїдиновими зрізами целоїдин можна не видаляти.

**Результат фарбування.** Бактерії забарвлені у темно-синій колір.

### ***Фарбування бактерій за Грам-Вейгертом***

Забарвлювання бактерій за цим методом найкраще проводити на парафінових зрізах.

#### ***Методика фарбування:***

1. Зрізи поміщають у літєвий кармін Орта на 5—10 хв.

Літєвий кармін Орта готують наступним чином. До 100 мл 1,52%-го водного розчину вуглекислого літію додають 2,5 г карміну, кип'ячать 5—10 хв, охолоджують і фільтрують.

2. Переносять зрізи в 1%-ий солянокислий спирт (70°) 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 скла (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 у нього) слабким розчином Люголя 2—3 хв.

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 забарвлюються мікобактерії туберкульозу за цим методом у матеріалі, ущільненому парафіном.

#### ***Методика фарбування:***

1. Зрізи вкривають фільтрувальним папером, так щоб його краї не виступали за краї предметного скла. 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 додаючи до однієї частини насиченого спиртового розчину фуксину 10 частин 5%-го водного розчину карболової кислоти. Підігрівають 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 70° 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 спирти, ксилол та заводять у бальзам.

**Результати фарбування.** Мікобактерії туберкульозу забарвлюються 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 +37 °С (у скляному посуді).

4. Знебарвлюють їх 1%-им солянокислим спиртом (близько 1 хв).

5. Промивають зрізи у 70° етиловому спирті (2—3 хв).

6. Споліскують у воді.

7. Переносять зрізи в 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 через спирти, ксилол і заводять у бальзам.

**Результати фарбування.** Мікобактерії туберкульозу забарвлені у 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 у 90—96<sup>o</sup> 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 міняють 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 +37 °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 шойно приготовлений розчин (проявник) такого складу:

Пірогалова кислота (пірогалол) — 2—4 г;

Вода дистильована — 100 мл;

Формалін концентрований — 10 мл.

Розчин готують із розрахунку 20—25 мл на один шматочок матеріалу. Матеріал витримують у цьому розчині 24—48 год при кімнатній температурі у темному місці або ж у посуді із темного скла.

При перекладанні шматочків матеріалу у проявник, останній швидко темніє і стає мутним. Для запобігання цьому явищу слід: 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.

**П р и м і т к а.** 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, гистохімічних і цитологічних препаратів. Її здійснюють за допомогою світлового мікроскопа (рис. 47). У нашій країні найбільш поширені мікроскопи, які виготовляють у Росії, Німеччині і Японії (рис. 48). Частина із них мають пристрої для фотографування, відео- і кінозйомки (рис. 49) та систему аналізу об'єктів досліджень (рис. 50). Існує чимало типів і моделей світлових мікроскопів, але всі вони мають єдиний план будови (рис. 51).



Рис.47. Світловий мікроскоп „OLYMPUS CK 20”.



а.



б.



В.



Г.

Рис.48. Світлові мікроскопи фірми "Carl Zeiss": а – "Axioskop"; б – "Axioplan"; в – "Axiophot"; г – "Axiovert 135".



Рис.49. Світловий мікроскоп „OLYMPUS OPTICAL CO GMBH”.

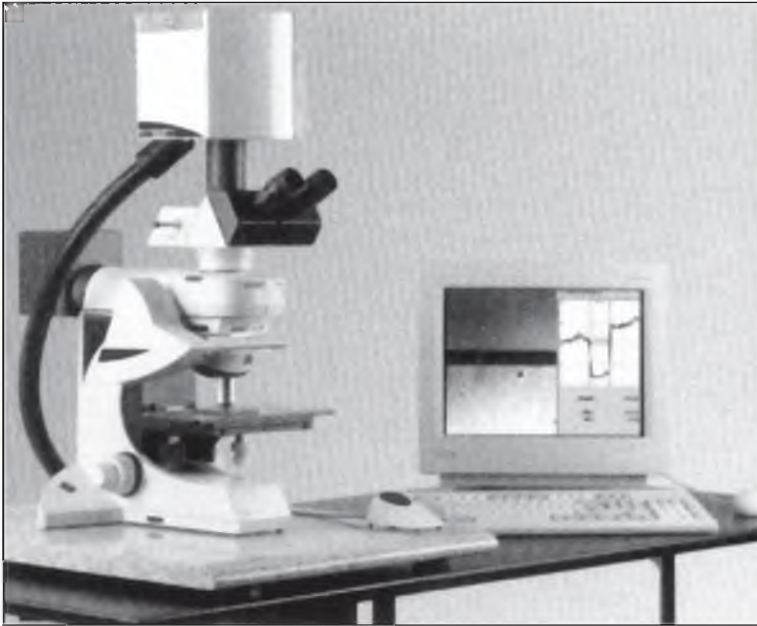


Рис.50. Конфокальна мікроскопна система „Leica ICM 1000”.

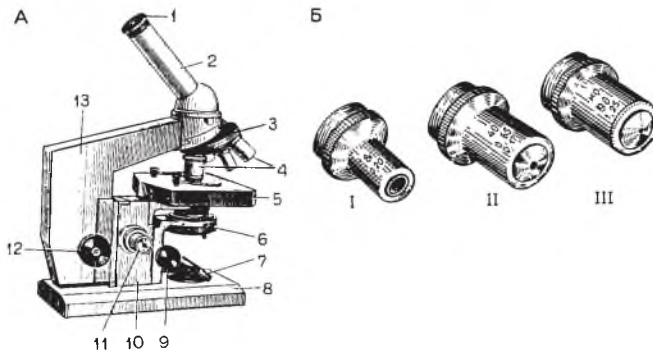


Рис.51. Загальний вид світлового мікроскопу (А) та його об'єктиви (Б): 1 — окуляр; 2 — тубус; 3 — револьвер мікроскопу; 4 — об'єктиви; 5 — предметний столик мікроскопу; 6 — конденсор; 7 — дзеркало; 8 — основа мікроскопу; 9 — гвинт конденсору; 10 — коробка мікрометричного механізму; 11 — мікрометричний 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 підковоподібну чи 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. В 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 головою. До неї приєднуються 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 ( $45^\circ$ ) і спрямовує його до окуляра. Револьвер рухомо з'єднаний з головою. 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.

Об'єкти 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 є різні: 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 мікроскопів дзеркала немає. У них джерело світла безпосередньо поміщається 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. В 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 збіль-



шення. При цьому чути клацання фіксатора. Поворотом рукоятки макроговинта за ходом годинникової стрілки (від себе) опустити тубсоутримувач 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, накривним скельцем догори. При цьому препарат необхідно розташувати над отвором предметного столика. Зафіксувати предметне скло затискувачами. Обертаючи рукоятку макроговинта 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 вивчити при великому збільшенні мікроскопа. Ці ділянки (ділянку) центрують у поле зору мікроскопа і переводять його на велике збільшення. Для цього обертають револьвер за ходом годинникової стрілки і вставляють об'єktiv великого збільшення над отвором предметного столика. Коли об'єktiv 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 на організменному, органному, тканинному та клітинному рівнях у 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 засвідчують взаємозв'язок і взаємозалежність кількісних змін окремих структур організму тварин на різних етапах його розвитку та неоднакових функціональних станах.

Морфометрія у ветеринарній медицині включає в себе вимірювання тіла тварин та окремих його частин, органометрію, гістометрію, цитометрію та каріометрію. У гістологічній практиці використовують переважно гістометрію, цито- і каріометрію та рідше органометрію.

**Органометрію** використовують при визначенні діаметра кровоносних та лімфатичних судин, товщини нервів та нервових волокон, розмірів нервових вузлів, розмірів органів зародка та дрібних тварин.

**Гістометрію** користуються при встановленні розмірів гістологічних структур та визначенні 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'єкта 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 тварин (мінімум від 3—4). Від кожного відібраного органа рекомендується виготовити 5 парафінових або целоїдинових блоків для приготування зрізів або 5 препаратів-відбитків. З кожного блока готують не менше 5 зрізів. З кожної порції крові (окремої тварини) 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. 52), другий — гвинтовий окуляр-мікрометр.

Перед вимірюванням об'єктів необхідно визначити ціну поділки окуляр-мікрометра (скільки *мкм* становить одна поділка) при різних збільшеннях мікроскопа. 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 мікроскопа (фірменим знаком ввєрх) 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. 53).

***Для визначення ціни поділки*** окуляр-мікрометра користуються наступною формулою:

$$A = \frac{B}{V} \times 10$$

де: А — ціна поділки окуляр-мікрометра (*мкм*), В — підрахована кількість поділок на лінійці об'єкт-мікрометра, V — 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 окуляр-мікрометра (А) необхідно 43 поділити на 20 та помножити на 10.

Отже:

$$A = \frac{43}{20} \times 10 = 21,5 \text{ мкм}$$

Таким чином, ціна поділки окуляр-мікрометра при цьому збільшенні мікроскопа становить 21,5 мкм.

Гвинтовий окуляр-мікрометр вставляється безпосередньо в тубус мікроскопа. 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.

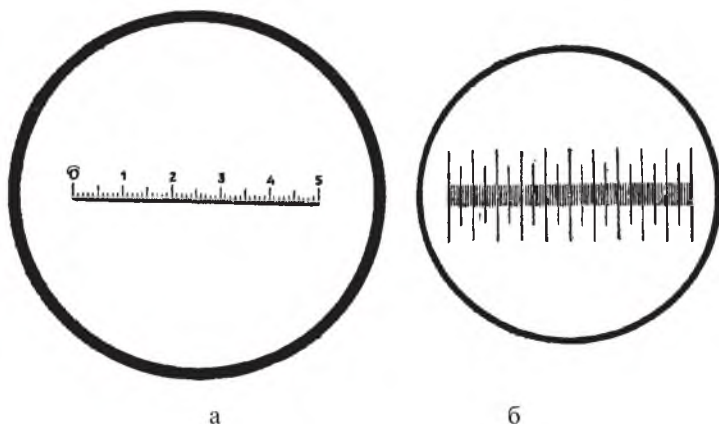


Рис.52. Мікрометричні лінійки: а — лінійка окуляр-мікрометра (5 мм поділено на 50 частин); б — лінійка окуляр-мікрометра при великому збільшенні (1 мм поділено на 100 частин).

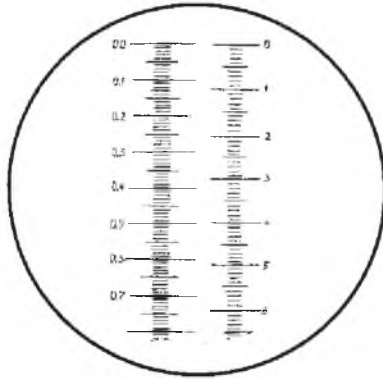


Рис.53. Проекція поділок лінійки окуляр-мікрометра на лінійку об'єкт-мікрометра.

При проведенні морфометричних досліджень трапляються помилки. Причинами їх є неухважність особи, яка проводить вимірювання, несправність приладів та інструментів, якими проводиться вимірювання. В 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'єкта вимірювання в окуляр-мікрометрі. Лінійку окуляр-мікрометра 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

волоконистих структур вимірюють, суміщаючи лінійку окуляр-мікромметра з їх поздовжнім напрямком. Діаметр круглих (кулястих) об'єктів (клітини крові, ниркові тільця, лімфоїдні вузлики, ядра клітин тощо) вимірюють, суміщаючи лінійку окуляр-мікромметра з їх середньою ділянкою. 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 їх співвідношення, використовують окулярні квадратно-сіткові вставки (сітки). Сітка має 64 однакових квадрати. Площа одного квадрата — 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 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 клітин,  $\Pi$  — 3,14,  $A$  — довжина ядер,  $B$  — ширина ядер; (К. Ташке, 1980).

Дану формулу застосовують і для визначення об'єму клітин, які мають еліпсоїдну форму.

Для визначення об'єму клітин (ядер) рекомендується використовувати показники *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:

$$\text{ЯЦВ} = \frac{\text{Об'єм ядра}}{\text{Об'єм клітин} - \text{об'єм ядра}}$$

(К. Ташке, 1980).

### ***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. За відсутності останніх рекомендуємо їх обробляти за Е. Монцевічюте-Ерінгене. Проведемо цю обробку на прикладі товщини кардіоміоцитів великої рогатої худоби і овець. Товщину кардіоміоцитів підраховували в 10 зрізах. Середні значення товщини цих клітин у кожному зрізі приведені в *табл. 16*. Їх визначали шляхом ділення суми одержаних показників на їх кількість.

Знаходимо середнє значення товщини кардіоміоцитів у великої рогатої худоби та овець шляхом ділення суми на кількість показників. У великої рогатої худоби середнє значення ( $M$ )=12. Визначаємо відхилення кожної варіанти від середньої величини показника.

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	

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).

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).

Різниця показує, що товщина кардіоміоцитів у великій рогатій худобі відносно того ж показника у овець — більша. Але це можна стверджувати тільки тоді, коли ця різниця буде достовірною, тобто у простіших випадках критерій достовірності буде

**Таблиця 17. Константи  $K$  для середніх помилок**

Число варіант	Константа $K$	Число варіант	Константа $K$	Число варіант	Константа $K$	Число варіант	Константа $K$
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		

**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

дорівнювати трьом або більше трьох. Для визначення критерія достовірності використовують наступну формулу:

$$td = \frac{d}{md}$$

td — критерій достовірності (у даному випадку різниці); d — різниця; md — помилка вибіркової різниці.

Із всіх 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 (?).

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 від 3 (наприклад — 2,10), тоді необхідно встановити, на якому порозі вірогідності вона може вважатися достовірною. Для цього використовують таблицю Стьюдента (*табл. 19*).

Число ступенів свободи визначають за сумою кількості показників у кожній групі та відніманням 2-х показників ( $n+n_1-2$ ).

При 20-ти показниках у 2-х групах тварин число ступенів свободи буде:  $10+10-2=18$ . Достовірність різниці у даному випадку — згідно з таблицею, значення критерію достовірності дорівнює 2,10 і вписується у перший поріг (0,95) безпомилкових прогнозів.

Якщо критерій достовірності є нижчим від 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.

**Таблиця 19. Значення критерію достовірності за Стюдентом-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 і >	1,96	2,58	3,29
20	2,09	2,85	3,85				

## Одиниці довжини, маси і об'єму у гістологічних дослідженнях

Таблиця 20. Одиниці довжини в гістологічних дослідженнях

№ п/п	Одиниці виміру	Скорочені позначення одиниць		Розміри одиниць
		Укр. мовою	Латин. мовою	
1	Метр	<i>м</i>	m	1 м
2	Дециметр	<i>дм</i>	dm	10 <sup>-1</sup> м
3	Сантиметр	<i>см</i>	cm	10 <sup>-2</sup> м
4	Міліметр	<i>мм</i>	mm	10 <sup>-3</sup> м
5	Мікрометр	<i>мкм</i>	μm	10 <sup>-6</sup> м
6	Нанометр	<i>нм</i>	nm	10 <sup>-9</sup> м
7	Ангстрем	А	Е	10 <sup>-10</sup> м

Таблиця 21. Одиниці маси в гістологічних дослідженнях

№ п/п	Одиниці виміру	Скорочені позначення одиниць		Розміри одиниць
		Укр. мовою	Латин. мовою	
1	Кілограм	<i>кг</i>	kg	1 кг
2	Грам	<i>г</i>	g	1 г
3	Дециграм	<i>дг</i>	dg	10 <sup>-1</sup> г
4	Сантиграм	<i>сг</i>	cg	10 <sup>-2</sup> г
5	Міліграм	<i>мг</i>	mg	10 <sup>-3</sup> г
6	Мікрограм	<i>мкг</i>	μg	10 <sup>-6</sup> г
7	Нанограм	<i>нг</i>	ng	10 <sup>-9</sup> г

Таблиця 22. Одиниці об'єму рідин та газів у гістологічних дослідженнях

№ п/п	Одиниці виміру	Скорочені позначення одиниць		Розміри одиниць
		Укр. мовою	Латин. мовою	
1	Літр	<i>л</i>	l	1 л
2	Мілілітр	<i>мл</i>	ml	10 <sup>-3</sup> 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 досліджувати структури 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*).

Електронні мікроскопи є трансмісійні (*рис. 54*) і скануючі. У трансмісійному електронному мікроскопі потік електронів проходить через об'єкт дослідження і зображення останнього на екрані, відповідно і на фотоплівці, є площинне. У скануючому електронному мікроскопі потік (пучок) електронів переміщається (рухається) по поверхні об'єкта дослідження, внаслідок чого його зображення на екрані об'ємне.

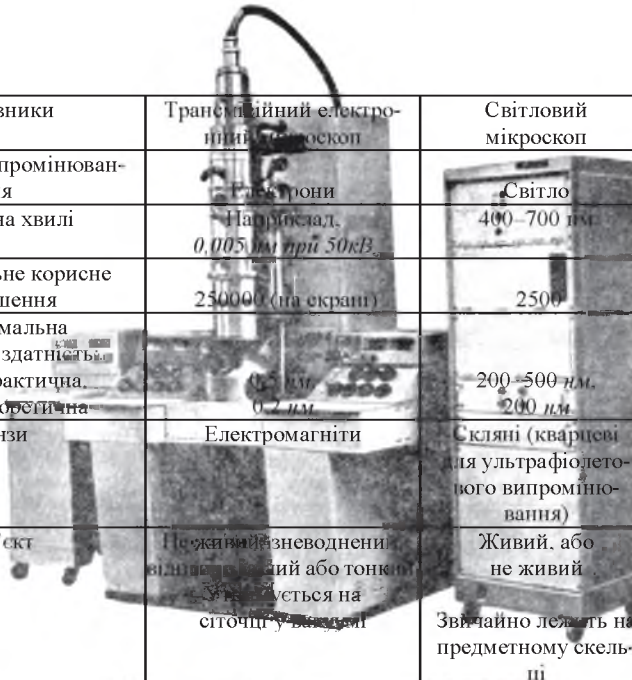
Підготовка матеріалу для проведення електронної трансмісійної і скануючої мікроскопії відрізняється. У цьому посібнику викладена найбільш поширена методика підготовки матеріалу для електронної трансмісійної номенклатури.

Для успішного проведення цих досліджень застосовують спеціальну техніку приготування препаратів. Фіксацію матеріалу проводять дуже швидко (його ріжуть на шматочки товщиною, шириною і довжиною не більше 0,5—1 мм у краплі фіксатора). Фіксуючі речовини (глутаральдегід, формальдегід, перманганат калію, оксид осмію) використовують у водних розчи-



**Таблиця 23. Порівняльні властивості світлового та електронного мікроскопів (Л.С. Гольдин, 1963).**

нах з фізіологічним значенням рН. Для того, щоб електронний пучок пройшов через гістологічний зріз, товщина його не повинна перевищувати 0,1 мкм (1000 Е). Тому в якості ущільнюючого середовища використовують не парафін, а епоксидні смоли (араддит, епон), поліефірні смоли (вестропал W), глікольметакрилат. Ці речовини дозволяють отримувати тонкі якісні зрізи без пошкоджень структур тканини на спеціальних приладах — ультрамікротомах, які працюють у автоматичному режимі (рис. 55). Зрізи, тонші за 500 Е, мають сірі кольори; товщиною 500—600 Е — сріблясто-сірі (найбільш поширені); 600—900 Е — сріблясті; 900—1200 Е — золотисті. Виготовлені зрізи переносять за допомогою пінцета на спеціальну сітку в краплю ацетону. Далі сітку витримують у розчинах важких металів для посилення контраст-



№ п/п	Показники	Трансмісійний електронний мікроскоп	Світловий мікроскоп
1	Джерело випромінювання	Електрони	Світло
2	Довжина хвилі	Наприклад, $0,005 \text{ нм}$ при $50 \text{ кВ}$	$400 - 700 \text{ нм}$
3	Максимальне корисне збільшення	$250000$ (на екрані)	$2500$
4	Максимальна роздільна здатність – практична – теоретична	$0,5 \text{ нм}$ $0,2 \text{ нм}$	$200 - 500 \text{ нм}$ $200 \text{ нм}$
5	Лінзи	Електромагніти	Скляні (кварцеві для ультрафіолетового випромінювання)
6	Об'єкт	Не живий, зневоднений, відшліфований або тонкий Містяться на сіточці у вакуумі	Живий, або не живий Звичайно лежать на предметному скельці
7	Поширені барвники	Містять іони металів, які відбивають електрони	Кольорові
8	Зображення	Чорно-білі	Майже завжди кольорове

Рис. 54. Трансмісійні електронні мікроскопи

ності, фарбують, промивають і підсушують у чашках Петрі. Зберігають у спеціальних контейнерах.



Рис. 55. Ультрамiкромом для бiологiї i промисловостi „Leica ULTRACUT R”.

**Пiдготовку матерiалу для електронно-мiкроскопiчних дослiд-жень проводять наступним чином:**

1. Швидко вiдбирають матерiал.
2. Фiксують його у 2—4%-му розчинi глутаральдегiду впродовж однiєї години.
3. Промивають матерiал буферним розчином (рН 7,3—7,4) тричі по 30 хв.
4. Постфiксують його в 1%-му розчинi тетраоксиду осмiю впродовж 1—2 год.
5. Промивають матерiал буферним розчином тричі по 30 хв.
6. Зневоднюють у спиртах зростаючої мiцностi (70<sup>0</sup>, 90<sup>0</sup>, абсолютному) по 10 хв, абсолютним — двiчі по 15 хв.
7. Просочують матерiал середовищем для заливки, яке складається iз епоксидних смол (до 24 год).

8. Заливають матеріал епоксидними смолами з додаванням каталізатора і помічають його у термостат (при  $+60^{\circ}\text{C}$ ) для полімеризації (до 24 год).

9. Загострюють і ріжуть блоки.

10. Фарбують зрізи:

а) напівтонкі зрізи забарвлюють метиленовим синім;

б) ультратонкі зрізи контрастують розчином ураніацетату (1—2 год), а потім розчином цитрату свинцю (20—30 хв) тощо.

Таким чином, принцип підготовки матеріалу для електронної і світлової мікроскопії — майже однаковий, проте є ряд відмінностей (табл. 24).

**Таблиця 24. Відмінності у підготовці матеріалу для світлової та трансмісійної електронної мікроскопії (Л.С. Гольдин, 1963)**

№ п/п	Обробка	Для світлового мікроскопа	Для електронного мікроскопа
1	Фіксація	Як для електронного мікроскопа або, наприклад, 99 частин етанолу та одна частина льодяної оцтової кислоти, або 70% етанолу (але у цьому випадку відбувається стискування тонких структур). Для фіксації використовують формалін, різноманітні суміші тощо.	Часто використовується глутаральдегід або суміш глутаральдегіду та осмієвої кислоти ( $\text{OsO}_4$ ). $\text{OsO}_4$ також забарвлює ліпиди і, відповідно, мембрани у чорний колір. Маленькі шматочки матеріалу фіксуються швидше, у них краще зберігаються тонкі структури.
2	Зневоднення	Ряд розчинів етанолу або пропанолу зростаючої міцності.	Ряд розчинів етанолу або пропанолу зростаючої міцності.
3	Заливка	Парафін.	Смола, наприклад аралдит, епон.
4	Виготовлення зрізів	Стальний ніж. Використовується мікротом. Зрізи товщиною 5–10 $\mu\text{m}$ і більше.	Алмазний або скляний ніж. Використовується ультратом. Зрізи товщиною 10–20 $\text{nm}$ .
5	Забарвлення	Кольорове (відбивають видиме світло).	Важкі метали, наприклад сполуки осмію, урану, свинцю (відбивають електрони).

## **Технологія виготовлення зрізів з органів і тканин для електронно-мікроскопічних досліджень**

### **Відбір і фіксація матеріалу для досліджень**

У електронній мікроскопії, як і у світловій, відбір і фіксація матеріалу мають першочергове значення для отримання високоякісних препаратів.

Матеріал для досліджень відбирають від щойновбитих тварин. Можна використовувати і біопсійний матеріал. Відібраний матеріал поміщають на фільтрувальний папір, який попередньо змочують фіксатором. Із матеріалу гострим лезом вирізають шматочки товщиною 1 мм. Для кращого просочування фіксатором їм надають видовжену форму. Відібрані шматочки матеріалу поміщають у фіксатор.

Вимоги до фіксації матеріалу електронної мікроскопії такі ж, як і для світлової. Це — припинення посмертних змін і збереження стану тканин, максимально наближеним 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. Запобігати переміщенню у клітинах структур і макромолекул внаслідок осмотичних явищ.
4. Максимально зберегати 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  $\text{OsO}_4$ , що дуже повільно проникає у тканини. У зв'язку з цим, термін фіксації матеріалу становить 1—1,5 год. Оптимальні його строки залежать від типу тканин, розмірів шматочків матеріалу, концентрації фіксуючої рідини, буферного розчину, що використовується.

$\text{OsO}_4$  перш за все взаємодіє з ліпідами у місці подвійного зв'язку. При взаємодії з білками  $\text{OsO}_4$  сприяє утворенню подвійних зв'язків між їх молекулами та між РН- та PS-групами. Нуклеїнові кислоти і вуглеводи майже не взаємодіють з  $\text{OsO}_4$ , якщо вони не зв'язані з білками. При тривалій фіксації в  $\text{OsO}_4$  продукти реакцій багатьох білків і ліпідів легко розчиняються

у воді і можуть видалятися. Тому бажано фіксувати зразки тканин не довго.

Поширеним фіксатором є також глутаральдегід. Оптимальний термін фіксації у ньому — 3—4 год. У глутаральдегіді краще зберігаються 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  $\text{OsO}_4$ . У зв'язку з цим, найбільш розповсюдженою є подвійна фіксація: спочатку в глутаральдегіді, потім — у  $\text{OsO}_4$ . Завдяки цьому поєднуються переваги обох фіксаторів.

**Фіксація в  $\text{OsO}_4$ .** 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  $\text{OsO}_4$ .* Цей розчин готують наступним чином. У хімічно чистий темний скляний посуд наливають необхідну кількість бідистильованої води. Її об'єм залежить від вмісту в ампулі  $\text{OsO}_4$ . Ретельно промивають ампулу з кристалами  $\text{OsO}_4$ , роблять на ній надріз і її вміст висипають у посуд з водою та розмішують скляною паличкою. Процес розчинення  $\text{OsO}_4$  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 фіксатора:*

буферний розчин — 5 мл;  
0,1 М розчин  $\text{HCl}$  — 5 мл;  
дистильована вода — 2,5 мл;  
2%-ий розчин  $\text{OsO}_4$  — 12,5 мл.

Фіксатор Паладе повинен мати рН 7,4. Якщо цей показник зміщений у кислу сторону, то до фіксатора додають кілька кра-

пель 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% розчин цукрози (J. Caulfield, 1957). З метою вирівнювання осмотичного тиску фіксуєної рідини і підданої для фіксації тканини, у фіксатор Паладе додають розчини солей натрію, калію і кальцію (F. Sjostrand, 1953). Слід зауважити, що додавання цих солей може зумовити вимивання деяких 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 OsO<sub>4</sub> — 12,5 мл.

Фіксатор повинен мати рН 7,2. Для його підкислення використовують 0,1 М розчин HCl, а для підлужування — 0,28 М розчин 5,5-диетилбарбітурату натрію (14,7 г у 500 мл води).

Примінення фіксатора Паладе — обмежене. Це пов'язано з тим, що розчин OsO<sub>4</sub> на веронал-ацетатному буфері не дозволяє зберігати у тканинах багато важливих речовин. У зв'язку з цим, Millonig (1962) запропонував фіксатор із OsO<sub>4</sub> на фосфатному буфері. Цей буфер нетоксичний, має фізіологічне значення рН (7,4) та характеризується високою буферною ємкістю. Застосування осмієвого фіксатора на фосфатному буфері запобігає вимиванню білків, зберігає глікоген та фібрилярні структури, забезпечує більш рівномірну фіксацію усєї ткани-



ни. Тривалість фіксації — 1—1,5 год. Для приготування цього фіксатора використовують основні розчини А, Б, В, Г.

Розчин А — 1,5%-ий розчин  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Розчин Б — 5,5%-ий розчин  $\text{NaOH}$ .

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 днів і більше, розчин В швидко псується навіть при температурі  $+4^\circ\text{C}$ ).

#### **Склад фіксатора:**

розчин Г — 20 мл,

розчин В — 5 мл,

2%-ий розчин  $\text{OsO}_4$  — 25 мл.

Даний фіксатор має рН 7,3. Воно 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 окиснюватись і полімеризуватись. Продукти цих процесів негативно впливають на його фіксуєчу здатність і рН. У зв'язку з цим, 25%-ий розчин глутаральдегіду попередньо нейтралізують  $\text{BaCO}_3$ . Для цього у розчин глутаральдегіду на  $\frac{1}{3}$  об'єму додають  $\text{BaCO}_3$  і поміщають на 2 доби у холодильник. Нейтралізований розчин слід очистити від продуктів полімеризації глутаральдегіду.

#### **Методи очищення глутаральдегіду (P. Anderson, 1967)**

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 круглій колбі ємкістю 500 *мл*, при зниженому тиску (2 кПа) і температурі +60—65 °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 ( $t^0$  +70—75 °С). Розчин змішують на магнітній мішалці в атмосфері азоту і розливають в ампули (на 5 *мл*), які заповнені азотом. Ампули зберігають у світлонепроникному контейнері при температурі +3—4 °С.

### *Глутаральдегідні фіксатори на фосфатному буфері*

Їх є декілька модифікацій, які відрізняються складом фосфатного буферу, його об'ємом і об'ємом 25%-го розчину глутаральдегіду.

#### **Фіксатор №1**

Склад: 25%-ий розчин глутаральдегіду — 2 *мл*; фосфатний буфер — 23 *мл*.

Фосфатний буфер готують із розчинів 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . До 70 *мл* розчину А доливають 30 *мл* розчину Б, рН доводять до 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 Б. 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  $\text{NaOH}$ .

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 (D. Sabatini et. al., 1963) готують, розчиняючи у дистильованій воді 10,7 г какодилату натрію. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 250 *мл*. Додаючи до

ного 1М розчин НСІ, 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).

Таблиця 25. Склад какодилатного буфера

### 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<sub>4</sub> впродовж 1,5 год.

Компоненти	Молярна концентрація	Необхідна кількість, мл	Молярна концентрація після розведення до 100 мл
Какодилат	0,2	50	0,29
НСІ	0,1	8	0,016
Цукроза	2,0	4,2	0,084
Вода	доїмності.	37,8	—

**Зневоднення матеріалу** в етиловому спирті рекомендується проводити за наступною схемою:

- 50° — 10 хв,
- 70° — 10 хв,
- Абсолютний — 10 хв,
- Абсолютний (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 см<sup>3</sup>.

При проведенні цих маніпуляцій розчини 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 в них не потрапив матеріал.

### **Ущільнення (залівка) матеріалу для досліджень**

Після зневоднення матеріал необхідно ущільнити. Речовини, які використовують для цієї мети, повинні характеризуватися наступними властивостями:

1. Мати достатньо низьку в'язкість у мономерному стані, що необхідно для вільного просочування матеріалу.
2. Повністю змішуватися з речовиною, у якій проводилось зневоднення (етилловий 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, глікометаакрилат тощо. Серед них найбільш часто використовують аралдит (A.Glanert та інші, 1956), якого існує декілька різновидів. Для полімеризації аралдиту використовують ущільнювач та каталізатор (*табл. 26*).

**Таблиця 26. Речовини, які використовують для полімеризації аралдиту (А.Ф. Киселева и др., 1983)**

Назва	Еквівалент	Призначення
Аралдит CI 212	Аралдит 502	Смола для залівки
Додецил янтарного ангїдриду	HI 964 (раніше 964B) DDSA	Ущільнювач
Триметиламіно-метилфенол <sup>1</sup>	DI 064 (раніше 964C) DMP 30	Каталізатор
Бензилдиметиламін <sup>1</sup>	DI 062 BDMA	Каталізатор
Надикметиловий ангїдрид 1,2- епоксіпропан	NMA : MNA Оксид пропилену	Ущільнювач. Полегшує проникнення середовища для залівки

**П р и м і т к а:** <sup>1</sup> — взаємозамінюючі речовини.

### *Заливка в аралдит за А. Glanert і співаєт. (1958)*

Просочування в аралдиті проводять у кілька етапів з поступовим заміщенням етилового спирту аралдитом.

*Готують суміш наступного складу:*

Аралдит — 1 частина,  
Ущільнювач НІ 964 або 964В — 1 частина,  
Етиловий спирт — 2 частини.

Спочатку аралдит і ущільнювач ретельно змішують упродовж 1 год і більше за допомогою магнітної мішалки при температурі +48 °С. Потім додають етиловий спирт і знову ретельно перемішують.

Матеріал витримують у цьому розчині впродовж 1—6 год при температурі +48 °С. 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 заплочний розчин (при кімнатній температурі) наступного складу:

аралдит — 1 частина,  
ущільнювач НІ 964 — 1 частина,  
каталізатор ДІ 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 у 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 переміщати у капсули тоненькою паличкою із бамбука. Він поступово опускається на дно капсули. Полімеризація відбувається при температурі +48 °С впродовж двох діб. Ступінь полімеризації необхідно періодично контролювати.

### ***Заливка в аралдит за методом Б. Уиклі (1975)***

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 +60 °С).

Існують два варіанти запропонованого методу:

**Варіант I.** Запасний розчин містить однакові об'єми аралдиту та ущільнювача. Їх необхідно ретельно змішати при температурі +50—60 °С 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:

Запасний розчин — 20 мл,

Каталізатор — 0,4 мл,

Пластифікатор (дибутилфталат) — 0,6 мл.

Заливаючи матеріал у це середовище, можна отримати блоки середньої твердості.

**Варіант II.** До складу запасного розчину входять 10 частин аралдиту і 7 частин ущільнювача.

Для приготування середовища для заливки необхідно змішати запасний розчин із 1,5—2%-им каталізатором.

При заливці матеріалу в це середовище теж одержують блоки. Для того, щоб блоки були більш м'які або тверді, необхідно змінити об'єм ущільнювача у запасному розчині.

### ***Заливка в епон за методом J. Luft (1961)***

Заливку здійснюють у наступній послідовності: 1. Із абсолютного етилового спирту матеріал переносять у безводний ацетон (двічі по 15—20 хв). 2. Готують запасний 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 — запасний розчин у співвідношенні 1:1 і 1:2. 4. Готують розчин епону для заливки, додаючи до запасного 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 самотійно через 10—30 хв опускається на дно. 6. Полімеризація.

Полімеризацію проводять за наступною схемою: а) впродовж 12 год при температурі +35 °С; б) впродовж наступних 12 год при температурі +45 °С; в) впродовж наступних 12 год при температурі +60 °С. Блоки можна різати уже наступного дня.

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, J. Luft (1961) запропонував виготовляти два запасних 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 у вестопал W за методом А. Ryter, Е. Kellenberger (1958)*

У вестопал рекомендується заливати твердий матеріал. Слід відмітити, що одержані блоки з цього середовища — теж дуже тверді. У зв'язку з тим, що вестопал не розчиняється в етиловому спирті, матеріал для досліджень необхідно зневоднювати у розчинах ацетону висхідної концентрації. У 30%, 50 і 70%-их розчинах — по 15 хв, у 90%-му розчині — 30 хв і в абсолютному ацетоні — 30 хв.

Для приготування даного середовища до вестопалу 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 °С.



### *Миття посуду*

Скляний посуд, який використовувався 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 — 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 у етиловому спирті або ацетоні, а потім промивають дистильованою водою.

### *Ультрамiкротомування*

Для отримання якісних ультратонких зрізів велике значення має підготовка блоків. Якщо розміри залитого 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 або МБС-10. Блок вставляють у тримач і закріплюють його у ньому так, щоб 1/3 його залишалася зверху.

Акуратно зрізають желатинову капсулу і під кутом  $45^\circ$  до довгої осі загострюють блок у формі чотиригранної піраміди з плоскою вершиною (рис. 5б). 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 ультрамiкротомування, то у такому випадку вершину піраміди слід зробити мінімальною.

Дві сторони піраміди повинні бути паралельні, і одна — більша іншої, а бокові грані — розміщуватись від кутом  $60-70^{\circ}$  (рис. 56).

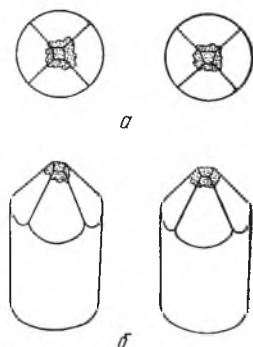


Рис.56. Блоки загострені для ультратонкого нарізання:  
а — вигляд зверху; б — вигляд збоку.  
(А.Ф. Киселёва и др., 1983).

Якщо структура матеріалу не однорідна, то вибір ділянки для ультрамікротомування найчастіше встановлюється на напівтонких (до 1 мкм) зрізах, зроблених з поверхні всього препарату.

### **Технологія виготовлення скляних ножів**

Для ультрамікротомування використовують, переважно, скляні ножі. Найбільш зручними із них є ножі, запропоновані Н. Latta, Z. Hartman (1950). Їх виготовляють 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 роликочий скло-різ, 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 виго-

товляють ножі. Запропоновано декілька способів виготовлення ножів. Найбільш розповсюдженим із них є спосіб виготовлення ножів вручну. Він має два основні варіанти.

**Варіант перший.** Скляну пластинку 20 x 20 см розколюють на смужки довжиною 20 см і шириною 2,5 см. Для цього (В.И. Бирюзова и др., 1963) 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. Велика частина розколу скла повинна бути гладенькою, не мати поздовжніх смуг і зазубрин. 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. Величина такого надрізу становить 4—6 мм. Квадрат відколують і з нього виготовляють ніж. Необхідно слідкувати за тим, щоб відколювання скла відбувалось строго в горизонтальній площині.

**Варіант другий.** Квадратний листок скла (Cameron D.A., 1956), сторона якого має приблизно 10 см, розколюють навпіл; половинки знову розколюють навпіл, і так — до того часу, поки не отримають 16 квадратних кусочків, сторони яких мають 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 розколу 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. 57, А). Для отримання прямого розколу, 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. 57, Б). Якщо надріз зроблений через усе скло, від одного краю до іншого, то в такому разі розкол пройде за лінією надрізу. У такому випадку, по краях розколу будуть маленькі зазубрини 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. 57, В). Отже, всі квадратики скла, отримані таким методом, будуть мати не менше двох гладеньких сторін під прямим кутом.

Виготовити квадратне скло 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. Те ж саме відбувається, якщо щипці розміщуються не чітко по діагоналі і не по центру надрізу.

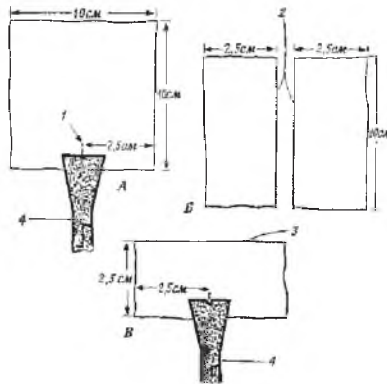


Рис.57. Виготовлення квадратних кусочків скла зі стороною 2,5 см. А. Положення щипців за первинного розколу скла.

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. (Б. Уикли, 1975).

Діагональний розкол здійснюють за допомогою щипців по надрізу, який проводять лінійкою, відступаючи приблизно на 1 мм від “чистого кута” квадрату (рис. 58, А). Передній край щипців слід встановити приблизно посередині довжини надрізу (рис. 58, Б). Потім ними повільно і поступово відколюють 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. 58, В).

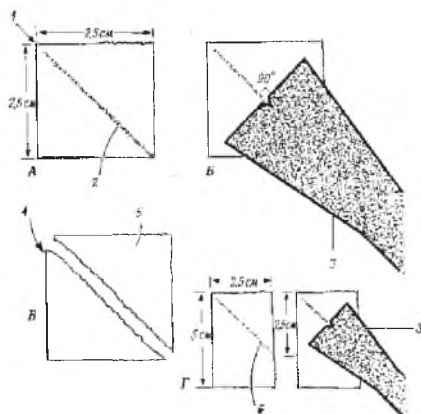
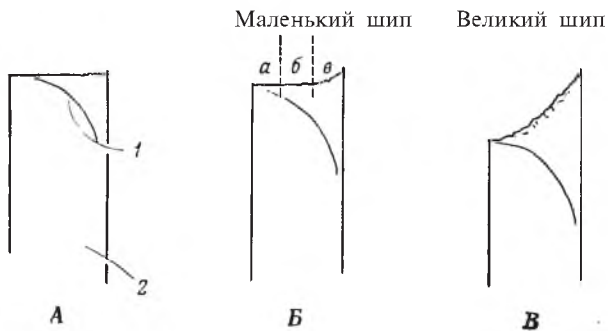


Рис.58. Виготовлення ножа із квадратного кусочка скла зі стороною 2,5 см: А. Положення лінії надрізу. Б. Положення щипців. В. Ніж, отриманий після розколу, вигляд збоку. Г. Положення останнього діагонального надрізу при використанні прямокутних кусочків скла. 1 — “чистий кут”; 2 — лінія надрізу; 3 — щипці; 4 — ріжучий край ножа; 5 — частина, яка бракується; 6 — лінія надрізу.  
(Б. Уикли, 1975).

### Оцінка якості скляного ножа

Якість скляних ножів контролюють за допомогою мікроскопа. Для цього цілком достатнє 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 зазубрин і перівностей. 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. 59*.



*Рис.59. 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 — лицьова сторона ножа.*

*(А.Ф. Киселёва и др., 1983).*

Для ультрамікротомування виготовляють декілька пожив, які використовують протягом робочого дня. Їх зберігають у вертикальному положенні у спеціальному тримачі. За його відсутності ножі приклеюють пластиліном у чашці Петрі.

Ножі, які зберігаються більше однієї доби, не придатні для отримання ультратонких зрізів, їх можна застосовувати тільки для виготовлення напівтонких (до 1 *мкм*) зрізів. Перед тим, як встановити ніж на мікротомі, на ньому 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. 60*. При закріпленні ванночок слідкують, щоб не пошкодити лезо ножа парафіном (воском) або лейкопластиром.

**Алмазні ножі.** Вперше для ультрамікротомії застосував алмазні ножі Fernandes-Moran Н. (1953). Термін використання алмазних пожив значно довший, ніж скляних. Такі ножі більш при-

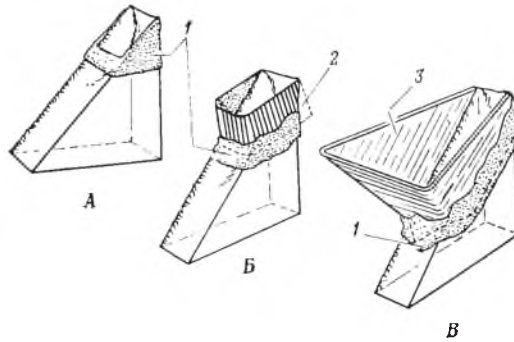


Рис.60. Ванночки для скляних поживів. А. Ванночка для зрізів товщиною 1 мкм: на ніж наноситься товстий шар воску. Б. Ванночка для ультратонких зрізів, виготовлена із смужки. В. Металева ванночка для ультратонких зрізів; 1 — віск; 2 — шматок смужки, який відрізається; 3 — металева ванночка. (Б. Уикли, 1975).

датні 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 дослідження 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; яечний білок; тоненький пензлик; чисті предметні стекла.

Для отримання напівтонких зрізів загострюють блок, захопивши усю поверхню об'єкта. Блок встановлюють у тримачі мікротому. Ніж закріплюють на мікротомі з вертикальним кутом нахилу — 47°. У ванночку наливають 10%-ий розчин ацетону. Ручною подачею підводять об'єкт до ножа, спостерігаючи

за тим, щоб сторона поверхні об'єкта була паралельною до ножа. Встановлюють на мікротомі автоматичну подачу (за направленням до ножа) — 1 мкм. Після кожного підймання і опускання блока утворюються 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 до скла й іншим способом. Для цього предметне скло вкривають тонким шаром яєчного білка. Наносять на нього краплю води, в яку переносять зрізи. Висушують на століку з підігрівом. Після цього зрізи фарбують для дослідження за допомогою світлового мікроскопа. Наводимо найбільш простий метод фарбування зрізів, який запропонував D. Philpott (1966).

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 7° (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.

**Визначення товщини зрізів.** Після того, як зрізи розрівнялися, можна приблизно визначити їх товщину за кольором у відбитому світлі.

Визначення товщини зрізів за їх кольором — за Л.С. Гольдин (1963) (табл. 27).

**Таблиця 27. Характеристика зрізів для електронно-мікроскопічних досліджень**

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	

За даними D. Williams (1968), товщина зрізів визначається за такими показниками (табл. 28).

**Таблиця 28. Характеристика зрізів  
для електронно-мікроскопічних досліджень**

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 випускають 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 найбільш поширені колодієві (нітроцелюлозні), формварові (поліфінілформаль) та вуглецеві.

Колодієву плівку готують наступним чином. Спочатку готують 0,5%-ий розчин колодію в амілацетаті, який зберігають у закритому посуді. У цей 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. Очищують поверхню води від частинок пилу. Для цього у воду додають 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. На скло дихають під кутом 30°, повільно його 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 легенько притискують до плівки пінцетом. Після цього на плівку з сіткою поміщають шматочок паперу (безворсинчастий), піднімають його і витягують з води разом з сіткою та плівкою, переносять у чашку Петрі і 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 всією в одне місце і розміщують у певній послідовності. Сітку знімають з поверхні рідини разом із зрізами і краплею розчину. Її повертають так, щоб крапля була зверху. Знизу під сітку підводять край фільтрувального паперу і забирають розчин. 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 скла-

ду тканин об'єкта, мають невелику відносну атомну масу і тому не можуть забезпечити достатнє розсіювання електронів, щоб сформувати на люмінесцентному 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 виготовляють 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 цитратом свинцю за Рейнольдсом (1963)***

Це — найбільш розповсюджений метод фарбування свинцем. Він дає чисті, чітко виявлені клітинні структури і, якщо здійснюють необхідні запобіжні заходи, не утворює осаду.

Склад барвника:

нітрат свинцю — 1,33 г,

цитрат натрію ( $Na_3(C_6H_5O_2) \cdot 2H_2O$ ) — 1,76 г,

дистильована вода — 30 мл.

***Приготування барвника.*** В колбу ємкістю 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, перевертаючи колбу.

Значення рН барвника повинно бути  $12 \pm 1$ . Барвник стійкий впродовж 6 місяців; вважають, що при цьому відбувається його “дозрівання”. Термін фарбування — 5—30 хв. Сітки про-

Таблиця 29. Важкі метали, які застосовують у електронній мікроскопії для збільшення контрасту (Б. Уикли, 1975).

Назва	Відносна атомна маса	Розчин для фарбування	Концентрація	Середовище	Групи, які реагують з барвником	Вплив на контраст зображення, ступінь збільшення контрасту
Осмій	190	$\text{OsO}_4$ , забарвлює у процесі фіксації	1%	Водні буферні розчини, пари при фарбуванні зрізів	C-S і поліарні групи ліпідів; SH-групи білків	Білки +, ліпиди (фосфоліпідні мембрани, ліпідні включення, секрет) ++
Уран	238	Уранілацетат	1-2 % водний розчин, насичений розчин у 50 % етиловому спирті	Вода, 50 <sup>0</sup> етиловий або метиловий спирт	PO <sub>4</sub> -групи нуклеїнової кислоти, а також білки	Нуклеїнова кислота (хроматин, рибосоми) +++ білки ++
Свинць	207	Свинць при високих значеннях рН і в присутності 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 хромово-кислота Абсолютний етанол або вода	Полісахариди і глікопротеїди (OH-групи). Білки і нуклеопротеїди	Імітує реакцію ШІЖК  Забарвлює білки, особливо колаген

мивають *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 у 2%-ий розчин ураніацетату на 70° 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. Тримаючи 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.

### ***Методика виявлення РНК-вмістимих структур (А. Mouneron, W. Bernhard, 1969)***

Матеріал фіксують у глутаральдегіді впродовж 1 год і заливають у 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 у 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, залитого у глікольметакрилат:*

Перед розміщенням зрізів сітка повинна бути вкрита формваром або колодієвою плівкою.

1. Поміщають зрізи у 0,5%-ий водний розчин ураніацетату — 1 хв.
2. Промивають їх у дистильованій воді.
3. Поміщають зрізи у 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, що містять РНК, залишаються забарвленими.

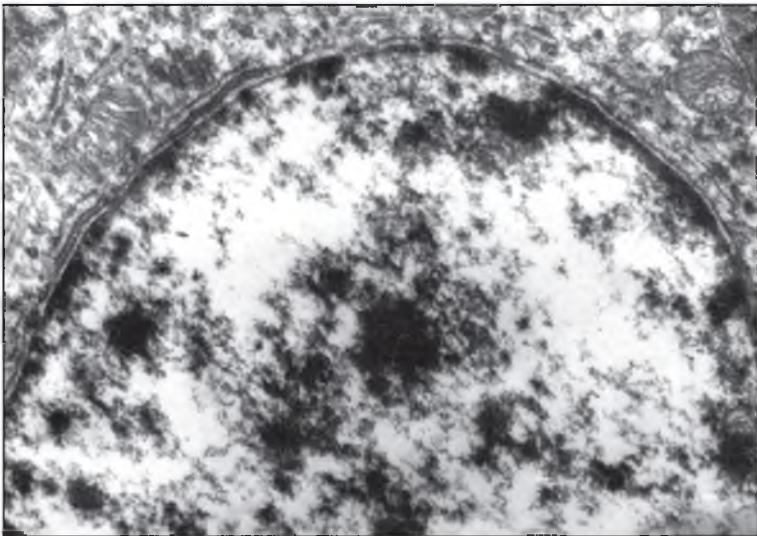


Рис.61. Ультраструктура частини мотонейрону спинного мозку.  
Х 10000. Препарат Л.П. Горальського.



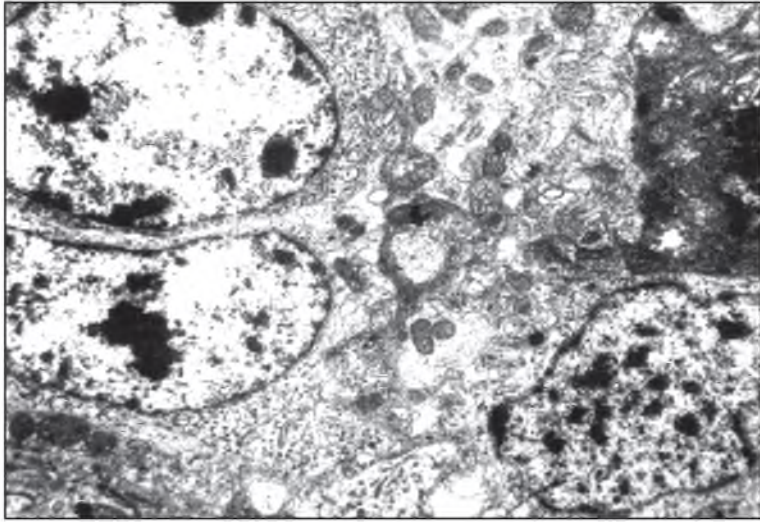


Рис.62. Ультраструктурна організація нейрон-гліального комплексу у спинному мозку. X 3000. Препарат Л.П. Горальського.

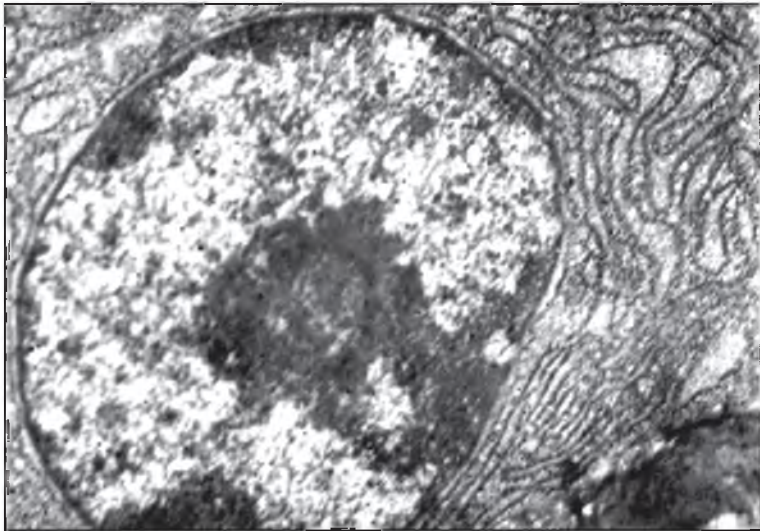


Рис.63. Ультраструктура частини мотонейрону спинного мозку. X 10000. Препарат Л.П. Горальського.



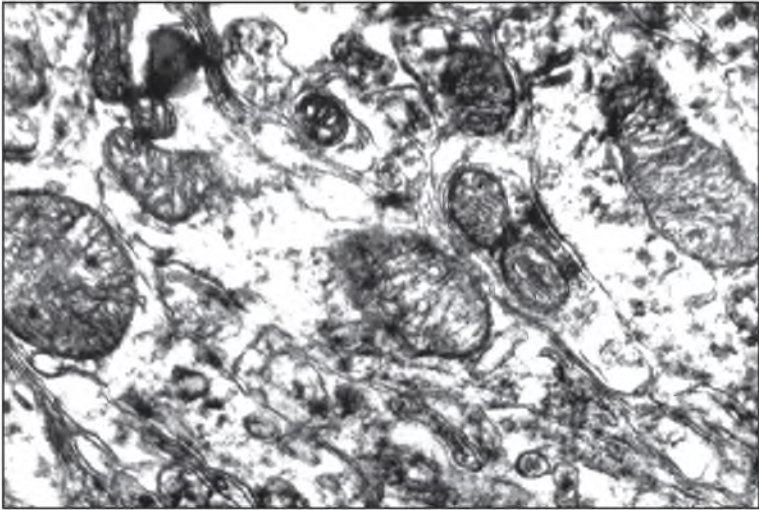


Рис.64. Ультраструктура мітохондрій нейроцитів спинного мозку.  
*X 13000. Препарат Л.П. Горальського.*

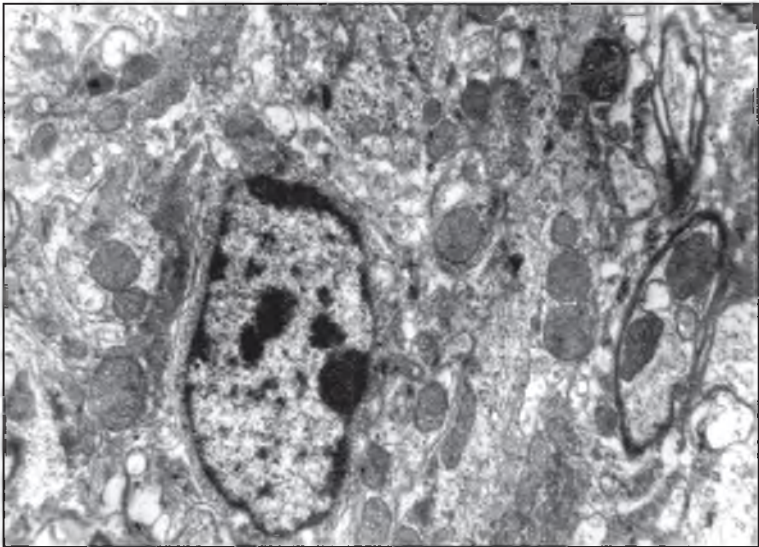


Рис.65. Ультраструктура мотонейрону спинного мозку. *X 7000.*  
*Препарат Л.П. Горальського.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Автандилов Г.Г.* Морфометрия в патологии. — М.: Медицина, 1973. — 248 с.
2. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия / Руководство. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
3. *Барский В.Е., Иванов В.Б.* Люминесцентнохимический метод определения концентрации белка // Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки. М.-Л. — “Наука”, 1964. — С. 157.
4. *Берим Н. Г.* Химическая защита растений. — Л.: Колос, Ленингр. отделение, 1972. — 328 с.
5. *Берстон М.* Гистохимия ферментов. — Пер. с английского; Под ред. и с предисловием проф. В.В. Португалова. — М.: И-во “Мир”, 1965. — 446 с.
6. *Вайль С.С.* Руководство по патологической технике. — 3-е изд. — Л.: Медгиз, 1947. — 264 с.
7. *Волкова О.В. Елецкий Ю.К.* Основы гистологии и гистологической техники. — М.: Медицина, 1971. — 272 с.
8. *Гольдин Л.С.* Основы гистологической техники электронной микроскопии. М.: “Мед. литературы”, 1963. — 257 с.
9. Гистологические методы исследования / Я.Е. Хесин, Н.Г. Хрущов, В.И. Белькевич (и др.). — БМЭ в 30 томах. — 3-е изд. — Т. 6. — М. 1977. — С. 62—68.
10. *Горальський Л.П.* Фізико-хімічні методи в патоморфології // Фізико-хімічні методи досліджень. — Наукові статті науково-методичного семінару. — Рівне, 1998. — С. 61—63.
11. *Гореликов П.Л.* Методы количественной цитохимии. М., 1980. — 23 с.
12. *Гореликов П.Л.* Теоретические и практические возможности метода цитофотометрии. М., 1982. — 31 с.
13. *Добин М.А., Кокуричев П.И.* Практикум по ветеринарной патологической анатомии и вскрытию. — Л.: Колос, 1975. — С. 276—283.
14. *Кононский А.И.* Гистохимия. — Киев: Вища школа, 1976. — 278 с.
15. *Кисели Д.* Практическая микротехника и гистохимия. — Будапешт: Изд. Академии Наук Венгрии, 1962. — 269 с.
16. *Лилли Р.* Патогистологическая технология и практическая гистохимия. — М.: Мир, 1969. — 645 с.
17. *Лихачов Н.А.* Новый способ замораживания тканей для микромирования // Арх. патол. — 1957. — Т. 19. — № 7. — С. 76.
18. *Луппа Х.* Основы гистохимии. — М.: Мир, 1980. — 343 с.

19. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. — Л.: Медицина, 1969. — 423 с.
20. Морфофункциональные методы исследования в норме и при патологии / Киселёва А.Ф., Житников А.Я., Кейсевич Л.В. и др. — Киев: Здоровье, 1983. — 168 с.
21. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. — Пер. со 2-го англ. изд; Под ред. и с предисл. проф. В.В. Португалова. — М.: Изд-во иностран. лит-ры, 1962. — С. 20—70.
22. Ромейс Б. Микроскопическая техника. — М.: Изд-во иностран. лит-ры, 1953 — 436 с.
23. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. — М.: Советская наука, 1957. — 467 с.
24. Серов В.В. Гистохимические методы исследования. — БМЭ в 30 томах. — 3-е изд. — Т.6. — М., 1977. — С. 78.
25. Ташке К. Введение в количественную цито- гистологическую морфологию. — Бухарест: из-во АН СССР, 1980. — 191 с.
26. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. — М.: Мир, 1975. — 324 с.
27. Pollister A.W., Ornstein L. The photometric chemical analysis. — In: "Analytical cytology". R.S. Mellors (Ed.), 11 ed. N.Y. Brakiston Book Co. — P. 43.
28. Bachmann L., Salperes M.M. Absolute sensitiviti of electron microscope radioautography. — J. Cell. Biol., 1967, 33. — P. 299—305.
29. Horwood D. Fixatives and fixation: a revien. — Histochem. and Citochem., 1969. — 1. — P. 323—360.

## Зміст

Передмова .....	3
<i>Розділ I. Гістологічна техніка і гістологічні методи досліджень .....</i>	<i>5</i>
Загальна характеристика основних методів гістологічних досліджень .....	5
<i>Розділ II. Технологія виготовлення гістологічних препаратів .....</i>	<i>9</i>
Відбір матеріалу .....	9
Фіксація матеріалу .....	11
Найбільш загальноприйняті фіксуючі речовини та їх застосування .....	12
Прості фіксуючі речовини .....	12
Складні фіксуючі речовини .....	15
Метод швидкої фіксації матеріалу .....	21
Вибір фіксуючої рідини для фіксації матеріалу .....	21
Декальцинація .....	22
Декальцинація азотною кислотою .....	23
Декальцинація соляною кислотою .....	23
Декальцинація органічними кислотами .....	23
Промивання фіксованого матеріалу .....	24
Зневоднення промитого матеріалу .....	25
Ущільнення зневодненого матеріалу .....	27
Заливка в парафін .....	27
Підготовка парафіну .....	27
Процес заливки матеріалу в парафін .....	28
Схеми для заливки шматочків матеріалу в парафін .....	31
Заливка матеріалу в целоїдин .....	34
Заливка матеріалу в целоїдин-парафін .....	36
Заливка матеріалу в желатин .....	39
Приготування розчинів для заливки матеріалу в желатин .....	39
Методика заливки матеріалу в желатин .....	39
Виготовлення зрізів .....	40
Загальна характеристика мікротомів .....	40
Мікротомні ножі .....	46
Виготовлення зрізів на заморожувальному мікротомі .....	50
Виготовлення парафінових зрізів .....	52
Підготовка предметних стекол і нанесення на них зрізів .....	53
Методика нанесення парафінових зрізів на предметні стекла сухим способом .....	55

Методика нанесення парафінових зрізів на предметні стекла за допомогою нагрітого міцного спирту .....	55
Виготовлення целоїдинових зрізів та видалення з них целоїдину .....	56
Виготовлення целоїдин-парафінових зрізів .....	57
Виготовлення желатинових зрізів .....	57
<b>Фарбування зрізів .....</b>	<b>58</b>
Характеристика барвників .....	58
Основні барвники .....	59
Кислі барвники .....	63
Нейтральні барвники .....	63
Індиферентні барвники .....	64
Технологія фарбування .....	64
Заведення зрізів .....	65
Заведення зрізів у бальзам .....	65
Заведення зрізів у полістирол .....	67
Заведення зрізів у гліцерин-желатин .....	67
Заведення зрізів у гліцерин .....	67
 <i>Розділ III. Методи фарбування зрізів</i>	
<i>для гістологічних досліджень .....</i>	<i>69</i>
Загальні методи фарбування .....	69
Фарбування целоїдинових і заморожених зрізів гематоксиліном та еозином .....	69
Фарбування парафінових зрізів гематоксиліном та еозином .....	70
Фарбування зрізів за Ван-Гізон .....	71
Спеціальні методи фарбування .....	72
Фарбування колагенових волокон .....	72
Фарбування за способом Маллорі .....	72
Фарбування за Гейденгайном .....	73
Фарбування за Массоном .....	75
Фарбування еластичних волокон .....	76
Фарбування резорцин-фуксином Вейгерта .....	76
Фарбування гістозрізів фукселином у модифікації Харта .....	78
Фарбування орсеїном за методом Унна-Тенцера .....	78
Імпрегнація ретикулярних волокон .....	79
Загальні правила імпрегнації матеріалу сріблом .....	80
Імпрегнація сріблом за методом Фута .....	81
Спрощена імпрегнація сріблом за методом Фута .....	83
Імпрегнація сріблом за методом Більшовського .....	83
Спрощена імпрегнація за методом Більшовського .....	84
Фарбування поперечно-посмугової м'язової тканини .....	85
Фарбування нервової тканини .....	87
Фарбування за Нісслем .....	87

Імпрегнація нервової тканини .....	89
Імпрегнація за методом Більшовського .....	89
Тотальна імпрегнація за Більшовським .....	91
Тотальна імпрегнація за Рамон-і-Кахалем .....	91
Тотальна імпрегнація за Рамон-і-Кахалем .....	92
Метод Грос-Більшовського-Лаврентьєва .....	92
Метод імпрегнації за Більшовським-Грос у модифікації В. В. Купріянова .....	95
Імпрегнація за методом Кахаля-Фаворського .....	96
Модифікація методу Грос-Більшовського за Кампосом .....	98
Фарбування мієлінових оболонки нервових волокон .....	99
Фарбування мієлінових оболонки за оригінальним методом Вейгерта .....	99
Метод прискореного забарвлення мієлінових оболонки за Вейгертом .....	101
Фарбування мієлінових оболонки за методом Вейгерта-Паля ..	102
Фарбування мієлінових оболонки за методом Кульчицького ...	104
Фарбування мієлінових оболонки за методом Кульчицького-Вольтерса .....	105
Імпрегнація нервової тканини за методом Гліса .....	105
Тотальна імпрегнація периферійних нервів за методом Ренсона .....	106
Фарбування мієлінових нервових волокон у заморожених зрізах за методом Соколянського .....	107
Методика фарбування волокон для отримання оглядових препаратів .....	107
Методика фарбування для виявлення волокон у стані дегенерації .....	108
<i>Розділ IV. Гістохімічні методи досліджень .....</i>	<i>116</i>
Нуклеїнові кислоти .....	116
Виявлення нуклеїнових кислот за методом Ейнарсона .....	118
Окреме виявлення ДНК та РНК сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Браше .....	120
Фарбування сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Курника .....	122
Фарбування сумішшю метилового зеленого з піроніном за методом Унна .....	123
Виявлення нуклеїнових кислот акридиновим оранжевим .....	124
Виявлення ДНК .....	125
Метод Фельгена-Росенбека .....	125
Реакція Фельгена з гідразидом нафтоїної кислоти за Пірсом ..	127
Білки .....	128
Виявлення загальних білків .....	130

Метод Бонхега .....	130
Виявлення білків розчином амідочорного 10 В .....	131
Виявлення основних і кислих білків .....	132
Виявлення основних і кислих білків за методом Мікель-Кальво .....	132
<b>Виявлення ліпопротеїдів .....</b>	<b>133</b>
Виявлення ліпопротеїдів за методом Карміхала .....	133
<b>Визначення білкових функціональних груп .....</b>	<b>134</b>
Виявлення NH <sub>2</sub> -груп, зв'язаних з білками .....	134
Виявлення сульфгідрильних груп за Барнетом і Зелігманом .....	135
<b>Приготування контрольних препаратів .....</b>	<b>136</b>
Обробка розчином пепсину .....	137
Обробка розчином трипсину .....	137
Блокування аміногруп .....	138
Блокування карбоксильних груп .....	138
Блокування сульфгідрильних груп .....	139
<b>Ліпіди .....</b>	<b>139</b>
Виявлення ліпідів .....	140
Виявлення загальних ліпідів .....	140
Виявлення загальних ліпідів за методом Лізона .....	141
Виявлення загальних ліпідів суданом чорним В за Мак-Манусом .....	141
Виявлення загальних ліпідів методом фарбування зрізів ацетильованим суданом чорним В .....	142
Виявлення зв'язаних ліпідів методом екстракції за Спангофом .....	143
Виявлення зв'язаних ліпідів шляхом застосування розчину судану чорного В у ацетоні за методом Беренбаума .....	144
Виявлення нейтральних і кислих ліпідів за Кайном .....	144
Виявлення нейтральних ліпідів суданом III за методом Дадді ..	145
Виявлення нейтральних ліпідів суданом III та суданом IV .....	146
Проведення гістохімічного контролю для виявлення ліпідів ...	147
Екстракція ліпідів за Кейлігом .....	148
Екстракція ліпідів за Бекером .....	148
<b>Вуглеволи .....</b>	<b>149</b>
Виявлення глікогену за методом Шабадаша .....	150
Виявлення глікогену за допомогою Шифф-йодної кислоти (ШЙК) по Мак-Манусу .....	152
Виявлення глікогену за методом Беста .....	152
Виявлення глікогену за методом Байера (із застосуванням фуксинсірнистої кислоти) .....	155
Виявлення сульфатованих глікозаміногліканів за Хейлом .....	156
Виявлення сульфатованих глікозаміногліканів альціановим синім за Стідменом .....	157



Проведення гістохімічного контролю для виявлення полісахаридів .....	158
Застосування діастази за Ліллі .....	158
<b>Ферменти .....</b>	<b>158</b>
<b>Клас оксидоредуктаз .....</b>	<b>160</b>
Виявлення $\alpha$ -гліцерофосфатдегідрогенази .....	161
Виявлення лактатдегідрогенази за Гесом, Скарпеллі та Пірсом .....	162
Виявлення малатдегідрогенази за Гесом, Скарпеллі та Пірсом .....	162
Виявлення сукцинатдегідрогенази за Нахласом, Валькером та Зелігманом .....	163
Виявлення моноамінооксидази за Келле та Вальку .....	165
<b>Клас трансфераз .....</b>	<b>166</b>
Виявлення фосфорилази за методом Текеучі .....	167
<b>Клас гідролаз .....</b>	<b>167</b>
Виявлення “неспецифічної естерази” .....	168
Виявлення “неспецифічної естерази” за методом Нахласа, Зегільмана та Гоморі .....	168
Виявлення “неспецифічної естерази” $\alpha$ -нафтилацетатом у модифікації Е. Пірса .....	169
Виявлення ліпази .....	170
Виявлення ліпази за методом Гоморі (метод “твін”) .....	170
Виявлення ліпази-естерази за Мартиновим .....	171
Виявлення холінестераз .....	172
Виявлення холінестерази за методом Жеребцова .....	173
Виявлення холінестерази за методом Гоморі .....	174
Виявлення лужної фосфомоноестерази .....	175
Виявлення лужної фосфомоноестерази за методом Гоморі-Такаматчу .....	175
Виявлення лужної фосфомоноестерази методом азопоєднання .....	176
Виявлення кислої фосфомоноестерази (фосфатази) .....	177
Виявлення кислої фосфомоноестерази за методом Гоморі .....	177
Виявлення кислої фосфомоноестерази за методом Берстона ...	178
Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази) .....	179
Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази) за методом Падікула і Германа .....	179
Виявлення аденозинтрифосфатази (АТФ-ази) за методом Вахштейна-Мейзеля .....	180
<b>Гормони .....</b>	<b>181</b>
<b>Гормони кіркової речовини (кори) надниркових залоз .....</b>	<b>182</b>
Фенілгідразинова реакція на виявлення кортикоїдів .....	182
Виявлення $\alpha$ -кетогруп кортикоїдів за Канолкаром .....	183

Гормони мозкової речовини надниркових залоз .....	183
Хромафінна реакція на адреналін та норадреналін	
за Хілларпом і Хьокфельтом .....	184
Виявлення норадреналіну за Хілларпом і Хьокфельтом .....	184
Люмінесцентний метод виявлення норадреналіну	
за Ерьонке .....	185
Гормони гіпофіза .....	186
Виявлення клітин аденогіпофіза	
за методом Ландінга та Холла .....	186
Пігменти .....	187
Виявлення меланінів за методом Ліллі .....	188
Виявлення ліпофусцинів за методом Шморля .....	189
Диференціювання меланінів від ліпофусцинів	
за методом Хуека .....	190
Виявлення жовчних пігментів за методом Штейна .....	190
Виявлення гемоглобіну	
за методом Слонімського-Лапінського .....	191
Виявлення гемосидерину за Перлсом .....	192
Реакція на берлінську лазур (за Перлсом) .....	193
Виявлення амілоїду за методом Бенхольда .....	194
Розчини для гістохімічних досліджень .....	195
Способи вираження концентрації розчинів .....	196
Приготування буферних розчинів .....	198
Приготування трис-буфера Мак-Мануса і Мауера .....	199
Приготування веронал-ацетатного буферного	
розчину Міхаеліса .....	200
Приготування фосфатного буферного розчину	
за Ф.Л. Калініним, В.П. Лобовим, В.А. Жидковим .....	200
Приготування фосфатного буферного розчину за Спангофом ..	201
Приготування буферного розчину бура — NaOH	
за М. Берстоном .....	201
Приготування какодилатного буферного розчину	
за Берстоном .....	201
Приготування фосфатного буферного розчину Зеренсена .....	202
Приготування буферної суміші Уолпола .....	202
Приготування 1 М ацетат-солянокислого розчину	
за Спангофом .....	203
Приготування цитратно-фосфатного буферного розчину	
за Мак-Ільвейном .....	203
Приготування ацетатного буферного розчину Уолпола .....	204
<i>Розділ V. Фарбування клітин крові .....</i>	<i>212</i>
Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення	
за Романовським-Гімза .....	213

Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення азур II-еозином .....	214
Фарбування клітин крові у зрізах органів кровотворення піридин-азур-еозином за С.П. Алфеевою .....	215
Фарбування клітин крові в її мазках і препаратах-відбитках органів кровотворення за Романовським-Гімза .....	216
Фарбування клітин крові в її мазках і препаратах-відбитках органів кровотворення за Папенгеймом .....	217
<i>Розділ VI. Фарбування бактерій</i> .....	218
Фарбування бактерій метиленовим синім Льюфлера .....	219
Фарбування бактерій карболовим тіоніном Ніколя .....	219
Фарбування бактерій за Грам-Вейгертом .....	220
Фарбування мікобактерій туберкульозу карбол-фуксином Ціля .....	221
Фарбування мікобактерій туберкульозу за Шморлем .....	222
Імпрегнація мікробів сріблом за Левадіті .....	223
<i>Розділ VII. Світлова мікроскопія</i> .....	225
Будова світлового мікроскопа .....	228
Правила роботи з мікроскопом .....	229
<i>Розділ VIII. Морфометричні дослідження в гістології</i> .....	231
Інструменти та прилади для вимірювання .....	232
Техніка вимірювання .....	234
Визначення об'єму клітин та їх ядер .....	235
Біометрична обробка цифрових показників результатів досліджень .....	237
Одиниці довжини, маси і об'єму у гістологічних дослідженнях .....	242
<i>Розділ IX. Електронна мікроскопія</i> .....	243
Загальна характеристика методу електронної мікроскопії .....	243
Технологія виготовлення зрізів з органів і тканин для електронно-мікроскопічних досліджень .....	247
Відбір і фіксація матеріалу для досліджень .....	247
Фіксація у глутаральдегіді .....	251
Методи очищення глутаральдегіду (P. Anderson, 1967) .....	251
Глутаральдегідні фіксатори на фосфатному буфері .....	252
Глутаральдегідний фіксатор на какодилатному буфері .....	252
Фіксація матеріалу досліджень .....	253
Зневоднення матеріалу для досліджень .....	253
Ущільнення (залівка) матеріалу для досліджень .....	254
Залівка в аралдит за A.Glanert і співавт. (1958) .....	255
Залівка в аралдит за методом Б. Уиклі (1975) .....	256

Заливка в епон за методом J. Luft (1961).....	256
Заливка у вестопап W за методом A. Ryter, E. Kellenberger (1958) .....	257
Миття посуду.....	258
Ультрамiкротомування .....	258
Технологiя виготовлення скляних ножiв .....	259
Оцiнка якостi скляного ножа .....	262
Технологiя виготовлення зрiзiв .....	264
Виготовлення ультратонких зрiзiв. ....	265
Фарбування ультратонких зрiзiв.....	258
Методика фарбування цитратом свинцю за Рельнольдсом (1963) .....	259
Методика ефективного подвійного фарбування при звичайних лабораторних дослідженнях .....	271
Методика виявлення РНК-вмістимих структур (A. Mouneron, W. Bernhard, 1969) .....	271
Лiтература .....	275

Л.П. Горальський,  
В.Т. Хомич,  
**О.І. Кононський**

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

*Навчальний посібник*

Редактор *Л. М. Козак*  
Обкладинка – *О.Л. Федорчук*  
Технічний редактор *М. М. Сухова*  
Коректор *Н. Л. Данилюк*  
Комп'ютерна верстка та обробка – *Т. М. Безверха*

Формат 60x84/16. Папір офсетний. Гарнітура NewtonС.  
Друк офсетний. Умовн. друк. арк. 16,74. Обл.-вид. арк. 14,75.  
Тираж прим. 300. Зам. 1454.

Комунальне книжково-газетне видавництво «Полісся».  
10008 Житомир, вул. Шевченка, 18а.

*Свідоцтво про внесення до Державного реєстру:  
серія ЖТ №5 від 26.02.2004 року.*