1. **Сандық цитохимия әдістері**

Цитология бөлімі - *цитохимия* пәні клетканың химиялық құрамының құрылысын, олардың түзілуін, клеткадағы таралуы мен белсенділігін және оның қызметінің өзгеруіне байланысты химиялық қосылыстардың өзгеріп отыруын зерттейді. Цитохимияның негізгі жетістіктерінің бірі – [нуклеин қышқылдарының](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B8%D0%BD_%D2%9B%D1%8B%D1%88%D2%9B%D1%8B%D0%BB%D0%B4%D0%B0%D1%80%D1%8B) ақуыз молекуласын [синтездеудегі](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B8%D0%BD%D1%82%D0%B5%D0%B7%D0%B4%D0%B5%D1%83%D1%96%D1%88) генетикалық рөлін анықтау.

Клетканың белсенді қызметіне байланысты ақуыздың өзгеріске ұшырау себептерін және олардың зат айналымындағы рөлін зерттеу де [цитохимияның](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B8%D1%82%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%8F) үлесіне тиеді.

Клетка бөліктерін әр түрлі түске бір мезетте бояйтын түрлі бояулар коспалары қолданылады. Осындай бояуларды пайдалана отырып, тек клеткалардың морфологиялық айқын суреттемесіне қоса оның химиялық кұрлымы жайлы мағлұматтар алуға болады. Химиялық заттарды анықтайтын бояуларға гистохимиялық және цитохимиялық бояулар жатады. Цитохимиялық талдау әдістері өте көп. Цитохимиялық реакцияға мысал ретінде ДНҚ-ға қолданатын кең таралған Фельген реакциясын айтуға болады. Маңыздылығы, тек ДНҚ-да спецификалық қышқылдық гидролизден кейін, дезоксирибоза пуриндердің ұсақталуынан альдегидті топтар пайда болады. Бұл топтар арнайы индикатормен, Шифф реактивымен қызыл түс береді. Бұл бояу арқылы ДНҚ-ны, оның санын анықтайды. Жеке амин қышқылдарымен (тирозин, триптофан, аргенин т.б.) реакциялар арқылы белоктардың таралуын анықтауға болады. Липидтер мен майлар жасушаларда жақсы еритін арнайы бояуларды айқындайды.

**Пуриндік негіздер**

Өсімдік және жануарлар организмдегі зат алмасу процесінде пуринді негіздер бір қатар өнімдер түзеді, соның ішінде маңызды орын алатын зәр қышқылы.

Пиримидинді негіздері нуклеин қышқылдарының құрамындағы цитозин, урацил және тимин- пиримидин туындылары болып табылады.

 **Тимин цитозин урацил**

Пурин және пиримидин негіздері өсімдік және микроорганизмдердің өсуін арттырады.

Нуклеин қышқылдарының екі түрі болады. Олар дезоксирибонуклеин қышқылы (ДНҚ) және рибонуклеин қышқылы (РНҚ). ДНҚ мен РНҚ құрамында айырмашылықтар бар. ДНҚ – ядро құрамында болса, ал РНҚ цитоплазма құрамында болады. ДНҚ-де пурин негізінен –аденин мен гуанин, пиримидин негіздерінен тимин мен цитозин, пентозадан дезоксирибоза болады. РНҚ-де пурин негізінен –аденин мен гуанин, пиримидин негіздерінен урацил мен цитозин, пентозадан рибоза болады.

Цитохимиялық реакциялар арқылы ферменттерді анықтауға болады. Бұл реакцияның жалпы принципі - [микроскоп](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%BF) арқылы [белокты](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B5%D0%BB%D0%BE%D0%BA) ферменттердің өздері емес, өнімдердің белсенділіктерін анықтайтын таралу аймақтары көрінеді.

**Пероксидазалар** - [оксидоредуктазалар](https://kk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%9E%D0%BA%D1%81%D0%B8%D0%B4%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%82%D0%B0%D0%B7%D0%B0&action=edit&redlink=1) тобына жататын [ферменттер](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82). [Сутегі тотығы](https://kk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%A1%D1%83%D1%82%D0%B5%D0%B3%D1%96_%D1%82%D0%BE%D1%82%D1%8B%D2%93%D1%8B&action=edit&redlink=1) немесе [органикалық тотықтардың](https://kk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%9E%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BB%D1%8B%D2%9B_%D1%82%D0%BE%D1%82%D1%8B%D2%9B%D1%82%D0%B0%D1%80&action=edit&redlink=1) көмегімен [полифенолдардың](https://kk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D1%84%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%BB&action=edit&redlink=1), [аминдердің](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%B4%D0%B5%D1%80), майлы қышқылдардың, [цитохромдардың](https://kk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%A6%D0%B8%D1%82%D0%BE%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B4%D0%B0%D1%80&action=edit&redlink=1) т. б. қосылыстардың тотығуын шапшандатады. Тыныс алу процесінде маңызды орын алады. Хромогенді субстраттармен түсті реакция жасауда қолданылады. Цитохимиялық және иммунохимиялық талдауларда негізгі кұрал ретінде қолданылады. Әсіресе коньюгаттар құрамындағы [антиденелермен](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B4%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D1%80) иммуноферменттік талдау жасауда көп қолданылады. Ең жиі қолданылатын Пероксидазалар [ақжелкек](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D2%9B%D0%B6%D0%B5%D0%BB%D0%BA%D0%B5%D0%BA) тамырынан алынады.

**Цитофотометрия** - әдісі арқылы [цитохимиялық](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B8%D1%82%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%8F) реакцияның салдарынан пайда болған өнімдердің санын анықтауға болады. Оның негізінде химиялық заттардың белгілі бір толқын ұзындығын қабылдау қасиеттеріне байланысты сандық мөлшерін анықтауға болады. Объектінің жарықты сіңіруі заттың [концентрациясына](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F) пропорциянал болатындығы анықталды. Алыңған заттың жарықты қабылдау дәрежесін бағалау арқылы оның мөлшерін анықтауға болады. Мұндай зерттеулер үшін цитофотометрия құралы қолданылады, оның объективінде жарық ағынының интесивтілігін тіркейтін өте сезімтал фотометр орналасқан. Өлшенетін құрылымның көлемі мен мөлшерін біле тұра, алыңған заттың концентрациясы мен дәл мазмұнын анықтауға болады. Цитофотометрияның [Фельген реакциясынан](https://kk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%A4%D0%B5%D0%BB%D0%B3%D0%B5%D0%BD_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F%D1%81%D1%8B&action=edit&redlink=1) кейін жасушадағы [ДНҚ](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D2%9A)  санын анықтау әдісі жиі қолданылады. Мұнда ДНҚ-ның өзі емес, ДНҚ мазмұнына пропорционал фуксиннің қызыл түске боялған түрі фотометрленеді.

Стандартты түрмен жұтылудың көлемін салыстыра отырып, [ДНҚ-ның](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D2%9A) граммдағы санының дәл мағынасын табуға болады.

[Биохимиялық](https://kk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B8%D0%BE%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%8F) әдістермен салыстырғанда клеткадағы ДНҚ мөлшерін цитофотометриямен дәлірек анықтауға болады. Сандық көрсеткішті жарық қабылдайтын объектілермен және заттармен қатар, сандық бағаны жарық шығаратындар да алады. Арнаулы белоктарды анықтау үшін [флоуресценцияланған](https://kk.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%A4%D0%BB%D0%BE%D1%83%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D3%99%D0%B4%D1%96%D1%81%D1%96&action=edit&redlink=1) антиденелер пайдаланылған имуннохимиялық реакциялар қолданылады.

Цитохимиялық әдістер түрлі заттардың клеткада орналасуын және арнаулы кұралдар арқылы олардың санын анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдісте тұрлі реактивтерді қолданып, клетканың кұрамындағы заттарга сапалық химиялық реакциялар жүргізеді. Белоктарды, нуклеин қышқылдарьн, майларды, көмірсуларды, гормондарды, витаминдерді, ферменттерді, металдарды, т.б, анықтайтын әдістер бар. Цито және гистохимиялық әдістер мұздатылған кесінділерді бояу кезінде жиі қолданьлады, алайда парафинді кесінділерді де бояуға пайдалануга болады. Қазіргі кезде сапалық тәсілдермен бірге ұлпалар мен клеткалардағы түрлі заттардың мөлшерін анықтайтын сандық цито-гистохимиялық әдістер қодданылып жүр. Липидтерді зерттеген кезде бекітілген ұлпаны парафиндеуге болмайды, себебі спирттер арқылы өткізген кезде липидтер ериді. Сондықтан оны криостатта мұздатылған күйде кесу керек. Этил спиртінде сусыздандыру ұлпаның көлемін кемітеді. Ұлпаларды қолдан өсіру әдісі
Ұлпалар мен клеткаларды қолдан өсіріп, зерттеуді организмнен тыс және организмнің өзінің құрамында жүргізуге болады. Ұлпалар мен клеткаларды қолдан өсіру әдісінде клеткалар мен ұлпаларды стерилдік жағдайда арнаулы қоректік ортада шыны камераларда организмнен тыс өсіреді. Осы кезде клеткалар тірі клеткалардың негізгі касиеттерін ұзақ уақыт (10 жылға дейін, тіпті одан да көп) сақтайды. Тірі клеткаларды кинопленкаға түсіріп алуға да болады. Өсімдікгер ұлпаларын бірінші болып қолдан өсіргендер - неміс гистологі Фехтинг (1892), неміс ботанигі Рехтингер (1893) және неміс ботанигі Габерландт (1902), ал жануарлар үлпаларын американдық Гаррисон (1907) және американдық биолог Каррель (1911) өсірген.

Микрохирургия немесе микрургия әдісі

Тірі клеткаларды зерттеу мақсатыңда микрохирургия немесе микрургия әдісінде қолданады. Микроманипулятор деп аталатын кұралмен клетканы кеседі, ішінен бөлікгерін шыгарып алады. Операцияның барысын микроскоп арқылы байкайды. Микрохирургиялық құралдар өте кішкентай шыны қармақтар, инелер, капиллярлар. Микроманипуляцияны арнаулы камераларда жүргізеді.

Рентгенструктуралық талдау әдісі

Рентгенструктуралық талдау әдісі рентген сәулелердің дифракция құбылысына негізделген цитоплазма мен ядроның кұрамына кіретін белоктардың, нуклеин қышқылдарының және баска заттар молекулаларының құрылысын зерттеу үшін қолданылады. Бұл тәсіл молекулалардың кеңістіктегі орналасуын анықтауға, олардың аракашықтықгарын өлшеуге мүмкіндік береді

1. **Ядрошық, ядро және цитоплазмадағы ұлпалар мен мүшелердің әр түрлі клеткаларындағы РНҚ мөлшерін, сандық қатынасын және локализациясын анықтау**

**РНҚны Браше әдісі бойынша анықтау** (фиксаторлар – Карнуа, Бродский және Ценкердыкі)**.**

 Бұл әдістің негізі – кейбір негіздік бояғыштардың нуклеин қышқылдарына таңдамалы қосылуында (нағыз әдісте – пирониннің РНҚға және метилді жасылдың ДНҚға).

 Гистохимиялық реакцияларды бастамай тұрып, метилді жасылды тазарту қажет, өйткені сатылымда бар препарат құрамында үнемі метилді күлгін қоспа болады, ал ол болса бояу нәтижесін дұрыс бермейді. Ол үшін метилді жасылдың сулы ерітіндісіне хлороформ қосады (немесе амил спирті) және, ыдысты жауып, күштеп шайқайды. Қоспа біраз уақыт тыныштықта тұрған соң онда екі қабат анық байқалады – күңгірт жоғарғы, ол бояғыштың сулы ерітіндісі, және төменгі күлгін – хлороформ, метилді күлгінге боялған. Ерітіндіні аздап төгіп, оған қайта хлороформды қосып, бүкіл процедураны қайта қайталайды. Жууды хлороформ күлгін түске боялуын тоқтатқанша жалғастыра береді. Жуылған және құрғатылған препарат ұзақ уақыт бойы сақтала алады.

 **Жұмыс ерітінділері.**

Ерітінді А: 5% пирониннің сулы ерітіндісі 17,5 мл, 2% метилді жасылдың ерітіндісі 10 мл, 250 мл дистилденген су.

Ерітінді Б: 0,5 М ацетатты буфер рН 4,8 мәндегі.

Қолданбас бұрын А және Б ерітінділерінің бірдей көлемін араластырады (бір аптадан артық сақтамау керек).

Әдіс:

1. 5-7 мкм қалыңдықты парафинді кесінділерді депарафиндеу.
2. Метилді жасылдың–пиронин ерітіндісіне салу (100 мин-тан 20 сағ дейін).
3. Бірнеше секунд ішінде дистилдинген суда шаю.
4. Фильтр қағазымен құрғату.
5. Абсолютті ацетон, ацетон мен ксилолдың бірдей мөлшеріндегі қоспасынан, ацетонның ксилолдағы 10% ерітіндісі арқылы өткізу.
6. Ксилолдың екі порциясында жарықтандыру және бальзамға қатыру.

Нәтиже. Ядрошық РНҚсы және цитоплазма қанық қызыл түсті, ядро хроматині жасыл немесе көк-жасыл.

 Боялудың спецификалығын тексеру мақсатында РНҚға бақылау гистохимиялық реакцияны жүргізеді. Ол үшін арнайы өңдеу арқылы кесінділерден РНҚны жояды, осыдан соң метилді көкпен–пиронинмен жоғарыдағы схема бойынша бояуды жүргізеді.

Нәтиже. Пиронинмен бояу жүрмейді, метилді жасылмен – әлсіз.

РНҚны жоюдың ең жақсы әдісі болып кесінділерді 2-3 сағ ішінде 560С температурада рибонуклеаза ферментімен өңдеу. Рибонуклеаза қол астында жоқ болса, кесінділерді 10% суық хлор қышқылына (НСІО4) 3-6 сағ сала отырып, РНҚ экстракциясын жүргізуге болады.

**ДНҚны Фельген әдісі арқылы анықтау.**

Әдіс ДНҚ молекуласын ыдырататын өнімдердің түссіз фуксинкүкірт қышқылымен әрекеттесе отыра (Шифф реактиві) қызылкүрең (пурпурный) түске ие кешен түзеді. Осындай жолмен, гистохимиялық реакцияның өнімінің локализациясы ДНҚның орналасуын анықтайды, ал боялу деңгейі – оның концентрациясын.

 *Ерітінділерді дайындау.*

*Шифф реактиві.* Негіздік фуксиннің 1 г 200 мл қайнап жатқан дистилденген суға ерітеді және, ерітінідісі бар ыдысты шайқай отыра, 5 мин қайнатады. Сосын ішіндегі сұйықтықты 500С дейін суытып, ерітіндіні сүзеді, 10 мл 1N HCl ерітіндісін қосып, 250С дейін суытады, осыдан соң 1 г натрий (Na2 S2 O5) немесе калий (K2 S2 O5)метабисульфитін қосып, қараңғыда қалдырады. 18-24 сағ кейін ерітіндіге 2 г белсендірілген көмір себеді, 1 мин шайқайды, сүзіп, 0-40С температурада қараңғыда сақтайды. Шиффтің дайын реактиві түссіз немесе ашық сары түске ие. Ерітіндінің қызаруы оның ыдырауы мен қолданысқа жарамсыздығы туралы айтады.

 Есте сақтайтын жәйт, кейде сатылымға толық емес тазаланған негіздік фуксин түседі. Сондықтан, егер дайындалған ерітінді қойылған талаптарға сай келмесе, жаңа партиядан негіздік фуксинді алып, қайта реактив дайындау керек.

*Бірнормальді хлорсутек қышқылының ерітіндісі.* 10 мл концентрленген хлорсутек қышқылына (тығыздығы 1,19) 90 мл дистилденген су қосады. Ерітінді ұзақ уақыт сақталады.

*Кесінділерді жууға арналған күкіртқышқылды су.* 5 мл 10 % калий бисульфитіне (K2 S2 O5) 5 мл 1NHCl ерітіндісін қосып, дистилденген сумен 100 мл дейін жеткізеді. Калий бисульфиті ерітіндісін 7 күн пайдалануға болады, күкіртқышқылды суды қолданардың алдында дайындап, бір рет қана пайдаланады.

Әдіс:

1. Қалыңдығы 5-7 мкм парафинді кесінділерді депарафиндеп, суға дейін жеткізеді.
2. Суық 1NHCl-мен жылдам шайып жіберу.
3. 1NHCl-ға 600С кезінде 6 мин салу (стақанды су моншасына салады).
4. Суық 1NHCl-мен жылдам шайып жіберіп, кейін дистилденген суда шаю.
5. Шифф реактивіне 40-60 мин салу.
6. Фильтр қағазымен құрғатып және жаңа дайындалған күкіртқышқылды судың үш порциясында әрқайсында 1-2 мин шаю керек.
7. Құбыр суында 10 мин дейін шаю.
8. Сусыздандырып, жарықтандырып, бальзамға қатыру.

Нәтиже. ДНҚсы бар ядроның аймақтары қызғылт түске боялады.

**Белоктарды анықтау (суммалық).**

Белоктар – аминқышқылдардың табиғи полимерлері, көптеген клеткалық немесе ұлпалық құрылымға кіреді. Онымен пластикалық, энергетикалық, транспорттық және ферменттік процесстер байланысты. Сондықтан, оларды гистохимиялық анықтау клеткалар мен ұлпаларда жүріп жатқан өзгерістерді анықтауға жәрдемдеседі.

 Бар әдістердің ішінде кең таралғаны – Даниелли бойынша белоктарды анықтау, ол кеңестік гистохимик М.Г.Шубичпен сәтті модификацияланған.

**Даниелли әдісі бойынша белоктарды анықтау (суммалық).**

(Карнуа, Бродский фиксаторлары, 10% бейтарап формалин).

Бұл әдісте гистологиялық препараттарды алдымен розанилин трис-диазоний (негіздік фуксин) әсеріне ұшыратады, ол ұлпалық белоктардың көптеген аминқышқылдық қалдықтарымен реакцияласады. Бояуды күшету үшін оларды Н-қышқылмен өңдейді, ал ол қышқыл белоктармен байланысқан реакцияға қабілетті трис-диазониймен байланысады. Бояу қанықтылығы ұлпаның құрамындағы белоктың концентрациясымен анықталады.

*Жұмыс ерітінділері.*

 Екінормальді (2N) хлорсутек қышқылының ерітіндісі. 20 мл концентрленген хлорсутек қышқылына 80 мл дистилденген су қосады.

 Негіздік фуксин ерітіндісі. 4 г негіздік фуксинді 100 мл 2N хлорсутек қышқылында ерітеді.

 Натрий нитритінің сулы ерітіндісі. 4 г натрий нитритін (NaO2) 100 мл дистилденген суда ерітеді (ерітіндіні тоңазытқышта сақтауға болады).

 Трис-диазонийдің негіздік ерітіндісі. Пробиркаға 2 мл негіздік фуксин ерітіндісін құяды және, пробирканы шайқап тұрып, 2 мл натрий нитраты ерітіндісін тамшылатып құяды. Қоспа 30-60 сек ішінде сабан түстес сары түске ие болады.

 Трис-диазонийдің жұмыс ерітіндісі. Трис-диазонийдің негіздік ерітіндісінің 0,5 мл алдын ала 20 мл ацетатвероналды немесе рН 7,9 басқа буфермен буферленген дистилденген судың 100 мл-не қосады.

 Н-қышқылдың қаныққан ерітіндісі. Н-қышқылдың 1 г-ын 50 мл ацетовероналды немесе рН 7,9 басқа буферде ерітеді.

*Бояу әдісі (парафинді кесінділер).*

1. Кесінділерді суға дейін жеткізу.
2. Трис-диазонийдің жұмыс ерітіндісіне 10-20 мин салу.
3. Дистилденген суда шайып тастау.
4. Ацетатвероналды немесе рН 9,2 басқа буфердің әрқайсысында 2 минуттан үш ауысымында шаю.
5. Н-қышқылдың қаныққан ерітіндісіне 15 мин салу.
6. Дистилденген суда жақсылап шаю.
7. Сусыздандырып, жарықтандырып, бальзамға қатыру.

*Нәтиже.*Гистиологиялық құрылымдар қанықтығы әртүрлі қызыл-күлгін түске боялады.

**Полисахаридтерді анықтау (қышқыл және бейтарап).**

 Полисахардтер – жоғарымолекулалы қанттар, организм ұлпаларында таза түрінде де (гликоген), басқа заттармен байланысқан түрде де кездеседі (мукополисахаридтер, мукопротеидтер, гликопротеидтер). Гликоген организмдегі қант резерві болып табылады және негізінен бауыр және бұлшықеттерде кездеседі. Мукополисахаридер – құрамында компонент ретінде гексозамин бар полисахаридтер. Олар организмдегі шырышты заттардың компоненттері болып келеді, сондықтан осындай атауға ие болған (лат. mucus –шырыш).

 Мукополисахаридтерді бейтарап және қышқыл деп бөледі. Соңғысы жануар организмінде өте кең тараған, оларды өз алдына жай (гиалурон қышқылы) және күрделі (мукоитинкүкірт және хондроитинкүкірт қышқылы, гепарин) деп бөледі. Белокпен берік байланысқан мукополисахаридтерді мукопротеидтер немесе гликопротеид деп атайды.

 Табиғаты полисахарид заттар қалыпты физиологиялық процесстерді қамтамасыз етеді және патологиялық процесстерде, әсіресе дәнекер ұлпасының ауруларымен байланысты процесстерде алғашқы орынға ие. Сондықтан түрлі полисахаридті компоненттердің өзгеру динамикасын зерттеу зерттеу практикасында үлкен маңызға ие.

**Реакция – шифф-йодтық қышқыл ( ШИҚ-реакция).**

 Полисахаридті компоненті бар заттар гистохимиясының негізінде ШИҚ-реакция жатыр.

 Осы реакция көмегімен гликогендерді, мукопротеидтерді, гликопротеидтер және гликолипидерді анықтауға болады.

*Жұмыс ерітінділері.*

Шифф реактиві (дайындау әдісін жоғарыдан қараңыз).

Күкіртті су. 200 мл дистилденген суға 4 мл концентрленген НСІ қосу керек. 25 мл дистилденген суда 4 г сусыз натрий сульфитін еріту қажет. Екі ерітіндіні қосу керек.

 Перйодат ерітіндісі. 1 г калий перйодатын немесе 2,5 г натрий перйодатын 100 мл дистилденген суда ерту керек.

*Әдіс* (Шабадаш фиксаторы, спирт, формалин, Карнуа сұйықтығы, Ценкер сұйықтығы; парафинге құю, мұздатылған кесінділер).

1. Қалыңдығы 5-7 мкм кесінділерді депарафиндеп, суға дейін жеткізу.
2. Йод қышқылы ерітіндісіне 5-10 мин салу немесе натрий/калий перйодатына 20-30 мин салу.
3. Дистилденген судың екі-үш порциясында (3-5 минуттан) йод қышқылының қалдықтарынан арылу үшін шаю.
4. Шифф реактивіне 10-20 мин салу.
5. Жаңа дайындалған күкіртті судың үш порциясында өңдеу (1-2 минуттан).
6. Құбыр суында 10 мин бойы жуып, дистилденген сумен шаю.
7. Сусыздандырып, жарықтандырып, бальзамға қатыру керек (егер ядроны бояу қажет болса, алтыншы сатыдан кейін кесінділерді гематоксилинмен бояйды).

*Нәтиже.* Табиғаты полисахаридті зат қызылкүрең немесе қызғылт түске енеді. Бейтарап мукополисахаридтер әдетте қызылкүрең түсті болады, ал гликоген – күңгірттеу.

Ескертпе. Шифф реактивімен өңдеуді жақсы қымталатын, қара қағазға оралған биологиялық стақандарда жүргізу керек. Реактивтің бір порциясын көп рет қолдануға болады (қызғылт түс пайда болғанша).

Бест әдісі бойынша гликогенді карминмен анықтау.

(фиксаторлар – Буэн, Карнуа, спирт, формалин).

*Жұмыс ерітінділері.*

Карминнің негіздік ерітіндісі. 60 мл дистилденген суда 2 г карминді, 1 г калий карбонатын және 5 г калий хлоридін еріту. Алынған ерітіндіні 5 мин бойы қайнатып, суытып және сүзу керек. Кейін фильтратқа 20 мл 28% аммиак ерітіндісін қосу керек. 0-40С тоңазытқышта ерітінді 3 ай ішінде жарамды болып табылады.

 Бояу үшін кармин ерітіндісі. 8 мл негізгі ерітіндіні, 12,5 мл аммиакты (тығыздық 0,88) және 24 мл метанолды құйып араластыру. (ерітінді 1-2 апта жарамды).

 Дифференцировка үшін Бест ерітіндісі. 8 мл абсолютті спиртке 4 мл метанол және 10 мл дистилденген суды қосу керек.

*Бояу әдісі (парафинді кесінділер).*

1. Кесінділерді абсолютті спиртке дейін жеткізу.
2. 1% целлоидин ерітіндісіне 2-5 мин салып қою.
3. Ауада кептіру.
4. Спирттер арқылы суға дейін жеткізу.
5. Эрлих гемалаунымен 5 мин бояу.
6. Суда шайып, ядроларды бояуды 1% қышқылданған спиртте диффиренцирлеу.
7. Дистилденген сумен шаю.
8. Бояу үшін карминді ерітіндіге 15-30 мин салу.
9. Бест ерітіндісінде 5-10 секундтан бірнеше минутқа дейін бояғыш бұлтшалары шығуын қойғанша дифференцирлеу.
10. 80% спиртте жуу.
11. Сусыздандырып, жарықтандырып, бальзамға қатыру керек.

Целлоидинді кесінділерді бояу кезінде алғашқы үш сатыдан секіріп кетеді, өйткені олар кесінділерді целлоидинді қорғау үшін арналған.

*Нәтиже.*Ядролар күңгірт көк, гликоген қанық қызыл.

**Қышқыл мукополисахаридтерді анықтау.**

Қышқыл мукополисахаридтерді Гале (Хэйл) әдісі бойынша анықтау. Коллоидинді темір ерітіндісі. 100 мл қайнап тұрған дистилденген суға араластырып тұрып 8-12 мл 10% темір хлоридінің ерітіндісін құю керек; ерітінді түсі қоңырдан күңгірт қызылға дейін ауысады. Одан НСІ жою үшін диализді жүргізеді.

 Сірке қышқылы ерітіндісі – 2М.

Калий гексацианоферраттың қышқылданған ерітіндісі – сары қан тұзы және НСІ.

*Әдіс.*

1. 5-7 мкм қалыңдықты кесінділерді депарафиндеп, суға дейін жеткізу.
2. Диализденген темір хлоридінің және 2М сірке қышқылыныңбірдей көлемдерін құйю керек. Осы ерітіндіге кесінділерді 10-15 мин салу.
3. Дистилденген судың бірнеше порциясында жақсылап шаю.
4. Жаңадан дайындалған сарғыш қан тұзымен 10 мин ішінде шаю.
5. Дистилденген суда шаю.
6. Ядроларды ядролық бояғыштардың бірімен бояу (ашудасты кармин, гематоксилин және т.б.).
7. Сусыздандырып, жарықтандырып, бальзамға қатыру.

*Нәтиже.* Қышқыл мукополисахаридтер көк түске боялған, ядролары – қызыл.

**Қышқыл мукополисахаридтердің дифференцировкасы.**

 Қышқыл мукополисахаридтер оң ШИҚ-реакция бермейді, алайда альцианды көкпен, коллоидты темірмен боялады және метахроматикалық бояу береді.

 Қышқыл мукополисахаридтерді сульфаттанбаған (гиалурон қышқылы және хондроитин) және сульфаттанған (А, В, С хондроитинсульфаттары, кератосульфат, гепаринсульфат, гепарин).

 Гиалуронидазамен өңдеу. Депарафинденген және суға дейін жеткізілген кесінділерді 370С тестикулярлы гиалуронидазада инкубирлейді,

**Майлар мен липидтерді бояу.**

«Липид» деген термин жинақтық термин. Онымен майды бөліп алатын ерітінділермен экстрагирленетін барлық майтәрізді заттар белгіленеді.

 Бояу әдісінің негізінде тек физикалық процестер жатыр. Оның мәні – майларды бояйтын заттар оларда жықсы ериді және сондықтан ерітіндіден липидке жеңіл өтеді.

 Судан ІІІ-пен бояу. Майды анықтаудың кең таралған әдісі болып табылады.

 Бояғыш ерітіндісін дайындау. 100 мл ыстық 70% спиртке 0,2-0,3 г судан ІІІ-тің ұнтағын себеді, бірнеше рет шайқайды және термостатқа (580С) бірнеше сағатқа салады. Кейін суытып, сүзеді.

Әдіс.

1. Мұздатылған кесінділерді (жаңа немесе формалинде бекітілген формалиннен) бірнеше минутқа судан 50% спиртке салады.
2. Бояғыштың спиртті ерітіндісіне 15-30 мин-қа салады (бюксті жабық қалдыру керек).
3. 50% спиртте жылдам шайып жібереді.
4. Дистилденген суда жуады.
5. Ядроларды қышқыл гемалаунмен бояйды.
6. Жуады және желатин немесе глицерин-желатинге қатырады.

*Нәтиже.* Майлы заттар қанық сарғыш-қызыл түсті, ядролар – көк. Препараттар салыстырмалы тез түссізденеді, сондықтан зерттеуді кейінге қалдыру ұсынылмайды.

 Шарлахпен бояу. Бояғыштар: 50 мл ацетон және 50 мл 70% спирт қоспасына 0,2-0,3 г шарлах қосады. Жақсылап жауып, шайқайды. Алынған ерітіндіні қолданбас бұрын сүзеді.

*Әдіс.*

1. Мұздатылған кесінділерді жаңа немесе формалинде бекітілген формалиннен 50% спиртке 2-4 мин-қа салады.
2. Бояғыш ерітіндісінде 2-3 мин бояйды.
3. 70% спиртте жылдам шайып жібереді.
4. Суда жуады.
5. Ядроларды қышқыл гемалаунмен бояйды.
6. Суда жуады және желатин немесе глицерин-желатинге қатырады.

*Нәтиже.* Майлы заттар қанық сарғыш-қызыл түсті, ядролар – көк.

**Темірді турнбуленді көктің пайда болуымен анықтау.**

Темір ұлпаларда бос күйінде де (бейорганикалық), органикалық заттармен байланысқан түрде де (эритроцит гемоглобині) кездеседі.

 Әдіс темір сульфиді мен калий гексационо-ферратының арасындағы химиялық реакцияға негізделген. Соның нәтижесінде турнбуленді көк пайда болады. Реакция спецификалық, сенімді, препараттар берік.

*Әдіс.*(фиксация формалинмен, абсолютті спиртпен, кесінділер мұздатылған, парафинді, целлоидинді).

1. Кесінділерді дистилденген судан аммоний сульфидінің 10% ерітіндісне 1-24 сағ салады.
2. Дистилденген судың бірнеше порциясында жақсылап жуу керек.
3. 20% калий гексациано-ферраттың және 1% хлорсутек қышқылының бірдей мөлшерінен дайындалған қоспасына 10-20 мин салу.
4. Дистилденген суда жақсылап шаю.
5. Ядроларды карминмен бояу.
6. Жуу, сусыздандыру, жарықтандыру және бальзамға қатыру.

*Нәтиже.*Темір бар аймақ қанық көк түске боялған, ядролар қызыл.

**3 Дәріс. Цито және гистохимияда өңдеуіштерді пайдалану**

**Ақуыздар**

Ақуыздардың қалпына келуін реттеу негізінен мұздату–құрғату өңдеу әдістерінде жақсы өтеді.Ақуыздар бұл жағдайда біршама денатурацияланады. Ақуыздардың қалпына келу үшін химиялық өңдеуіштердің ішінде көбінесе этанол қоспасы жарамды, себебі олар активті ақуыз топтарымен аз әсерлеседі. Формальдегидтің маңыздылығын зерттеу қиындау, біресе оның ақуыздармен реакциясы жақсы зерттелген; сол сияқты тағы да бұл реакциялар көңіл аударарлық болып саналады. Құрамында пикринді қышқылы немесе ауыр металдары бар өңдегіш қоспалар (мысалы, Ценкера, Буэна, Суза) ақуыздардың гистохимиясында қолданылуға болады.

Тіршілік циклыың сіңірілуіне сәйкес келетін гликогеннің адекватты өңделуі өте қиындатылған. Бұл жағдай гликогеннің әр түрлі түрлерінің тез ерігіштігімен түсіндіріледі. Әдеттегі гистологиялық өңдеу кезінде кесіндіде жоғары молекулалы гликогеннің үлкен молекулалары ғана сақталады, ал кіші деңгейдегі гликогендер полимеризациясында тез жуылып кетеді. Гликогеннің жоғалып кетуін және оның байланысу артефактыларынан қашу үшін пробаның алдын ала өңдеуішін дұрыс таңдау қажет.

 **Нуклейн қышқылдары**

Нуклейн қышқылдары түрлі полимерлі пішінде (формада) болады. Өңделетін заттар полимеризация деңгейіндегідей, химиялық реакцияларға түсу кезінде өзгерістер тудырады.Формальдегидті пайдалануға болмайды, себебі ол реакцияға түсетін топтарды блоктайды, (блокирует) осылайша нуклейн қышқылдарының бояуларын нашарлатады. Құрылымның жақсы сақталуын қамтамасыз ететін этанол-уксус қышқылы және Карнуа тәрізді қыщқыл өңдегіш қоспалар болып табылады . Содан басқа олар, ақуыздар мен нуклейн қышылдарының байланысын біртіндеп жояды және осылайша негізгі бояғыштардың жақсы боялуымен реакцияға түсетін қышқылдардың санын көбейтеді. Бірақ қышқыл қоспасындағы өңдеу ұзақтығы біртіндеп РНҚ-ны, содан соң ДНҚ-ның шеттетілуіне әкеледі. Көбінесе, көлемі 2-3 мм- ден тұратын Карнуа өңдеуішіндегі 2 сағаттағы 20С–та өңделу әдісі қолданылады.

**Липидтер**

Липидтерді өңдеу үшін көбінесе липидтердің физикалық қасиеттерін өзгерте алатын (еріту, дисперсия, алғашқы флуросценция және т.б.) формальдегитдер пайдаланылады. Өңдеу кезінде липидтердің шайылуы және біртіндеп еруі мүмкін, әсіресе фосфолипидтер, липидтер мен белоктардың арасындағы комплекстердің қалыптасуын тудыратын электролиттер болатындықтан Ca, Co,немесе Cd өңделетін иондардың қоспасын азайтуға болады. Соған байланысты құрамында формальдегид және кальцийі бар Бейкер өңдеуіш қоспасы липидтердің гистохимиясында кеңінен қолданылады. Карбовакс немесе этиленгликоль бар өңдеуішке сіңірілу процесінде ұлпаны құю кезінде, липидтерді формальдегидпен өңдеу барысында барынша липидтердің еруін тудырады. Басқа да липидтерді әсіресе фосфолипидтерді шаюдың басқа да мүмкіншілігтері парафинге құю барысында пайдаланатын органикалық ерітінділерде өңдеуде бихромат қоспасын қосу болып саналады. Жоғары температурада ұзақ хромдалу прафинге құю кезінде нейтральді майларпдың сақталуын қамтамасыз етеді. Жалпы липидтерді формальдегидпен өңдеу кезіндегі толықтырулар бихроматтар және сулема ерітіндісінің қоспасында ұлпаларды өңдеу болып табылады.

**Ферменттер**

Ең алғашқы кезден-ақ , гидролитикалық ферменттерді гистохимиялық бөліп алу үшін өңдеуге суық ацетон немесе этанолды алғын, себебі бұл екі сұйықтық та ферменттердің біршама ғана инактивациясын тудырады. Келесі парафинге құю кезінде сіңірілу процесі құю температурасына қарағанда ферменттің активтілігіне аз деңгейде әсер етеді. Гистохимиялық бөлінетін активтілік кейбір гидролитикалық ферменттерде, әсіресе фосфотаза құю кезіндегі температура +50 0С-тан төмен болмағанда, парафинге сіңірілу 30 мин (вакуумға құю кезі) уақытта өтеді.

 Гидролитикалық ферменттердің активтілігінің қанағаттанарлықтай сақталуы - 7,5 % - тік сахароза қосылатын, забуференді формалин (4%) қоспасында ғана болады, содан кейін сахароза мен гуммиарабиком қоспасында өңделеді.

 Цитохромоксидаза активтілігінің жақсы сақталуы тек мұздату-құрғатылу өңдеу әдісінде ғана болады. Сукцинатдегидрогеназа суық ацетонда да жақсы реттеледі.

 Еритін және байланысқан дегидрогеназаларды формальдегидтің төмен концентрациясында (0,7-2%) қңдеу кезінде реттеуге болады. Еритін дегидрогеназалардың реттелуі сонымен қатар жалғастырылмайтын өңдеу кезінде глутаральдегидтің забуференді ертінідісінің көмегімен жүзеге асуы мүмкін.

 Ферменттерді ультраструктуралық зерттеулер кезінде өңдеу үшін моно- және диальдегидтердің маңызы өте зор. Біршама инактивирлеу қасиет глиоаксальда болады, оксиадипинальдегид немесе адипинальдегид болса, онда 6%-дық глутаральдегид өткір инактивация тудырады. Осылайша, глутаральдегидтің көмегі арқылы құрылымының жақсы сақталуы ферменттік активтілік шығынымен сипатталды. Глутаральдегид концентрациясын 1,5 - 3%-ға дейін төмендету арқылы инактивация деңгейін азайтуға болады. Моноальдегидтер–метакролеин, кротанальдегид және акролеин - электронды-гистохимиялық деңгейдегі феорментативтік активтілікті бөліп алу кезінде әсер етуі онша маңызды емес.

**ФЕРМЕНТТЕР МЕН КЕЙБІР ЗАТТАР КЛАСЫНЫҢ ГИСТОХИМИЯСЫ**

**Ақуыздар**

Ақуыздарды гистохимиялық жолмен бөліп алу екі түрлі тәсілмен жүргізіледі:

1. Оның жалпы биологиялық және физика-химиялық қасиеттері бойынша;
2. Аминқышқылдары және арнайы маманданған химиялық топтары бойынша.
3. **Ақуыздардың физика-химиялық және биологиялық қасиеттерінің негізіндегі сипаттамасы**.

Бұд топқа келесі әдістер жатады:

***А) Иммунохимиялық әдістер***

***Б) Радиоавтографиялық әдістер***

***В) Түрлі ерітінділерге түсуіне байланысты әдістер***

***Г) Ферменттік шашырау (расщепления)әдісі***

 **А) Иммунохимиялық әдістер**

Антиген – антидене арнайы маманданған реакцияны пайдалану кезінде- флуросцеинмен танбаланған антидене реакциясының микроскоп арқылы арнайы ақуыздары бөліп алынады.

**Б) Радиоавтографиялық әдістер**

Бұл әдісте метаболитикалық активті ақуыздар аминоқышқылдардың тритимен таңбалану әдісінің әсерінен кейін бөліну жүреді.

**В) Түрлі ерітінділерге түсуіне байланысты әдістер**

Бұл әдіс түрлі иондардың күші және pH-тың тұзды ертінділерімен ақуыздарды экстрагирлеуге негізделген. Ферменттің әсер етуі - ақуыз өнімдерінің шашырауынан немесе микроскопиялық зерттеу кезіндегі ферменттік әсер етуге негізделген гистологиялық препараттағы субстраттың өзгеруімен түсіндіріледі. Осы екінші жолы гистохимиялық әдісте пайдалануға ыңғайлы болып саналған. Препараттағы болатын субстраттың өзгерісі ақуыз молекуласындағы реакцияға тусетін топтардың бөлініп алынуына бағытталған бояу әдісі арқылы, сонымен қатар забуферендік ерітіндімен бояу арқылы да бағаланады. Осыдан басқа да гисто-физикалық әдістер(мысалы, интерференционды немесе полярланған микроскопия) пайдаланылады.

1. **Ақуыздарды бөліп алудағы арнайы гистохимиялық әдістер**

Ақуыздарды гистохимиялық бөліп алу әдісі аминқышқылдардағы реакцияға түсуші топтарға негізделген. Гистохимиялық әдіс арқылы ақуыздар құрылысына жіктеліп тұрған аминқышқылдарды бөліп алуға болады. Қарапайым аминқышқылдары және төмен молекулалы ақуыздар өңдеу және құю процесі кезінде ұлпадан бөлінеді. Бұл әдістер аминқышқылдарының құрамы жайында, аминқышқылдарының реттелуі жайлы және ақуыз молекулаларының көлемі мен орналасуы жайлы ақпараттармен қамтамасыз етпейді. Ақуызды идентификациялау үшін бұл әдістер тек қана, бөлініп алатын жоғары концентрациядағы реакцияға түсетін топтардың болуымен және осы арнайы маманданған ақуыздың сипатының белгілері ретінде қызмет етуі мүмкін. Кератинтәрізді құрылымдар үшін дисульфидтік топтардың жоғары концентрациясы тән. Жалпы ақуызды зерттеу үшін соңында аминдік- және карбоксильдік топтармен аяқталатын бөліп алу әдістері ұсынылады.

Бояу реакциясының көмегі арқылы келесідей реакцияға түсетін топтар мен ақуыздардағы амиқышқылдарды бөліп алу мүмкіншілігі болады:

1. Соңғы аминдік топтар а- аминдік қышқыл (-CH2-CHNH2.COOH)
2. Соңғы немесе бүйіріндегі карбоксильдік топтар ( COOH)
3. Цистеиннің сульфигидрильдік топтары (-SH)
4. Цистиннің десульфидтік топтары (-S-S)
5. Триптофанның индольдік конфигурациясы
6. n-тирозиннің фенольдік конфигурациясына бюайланысқан
7. аргининнің гуанидильдік топтары
8. гистидиннің имидазольдық топтары

**ЖАЛПЫ АҚУЫЗДЫ БӨЛІП АЛУ ӘДІСТЕРІ**

Жалпы ақуыздарды бөліп алудағы нақты әдіс Динитрофторбензолмен (ДНФБ-реакция) бөліп алу әдісі болып табылады. ДНФБ бос аминотоптардың санымен лизин аминотоптарымен, тирозиннің фенолдік ОН топтарымен және гистидиннің имидазольдық топтарымен әсер етеді. Бұл кездегі тирозинмен және гистидинмен қалыптастырушы ретінде комплекс түссіз, бұл реакция бос аминқышқылдарымен денитрофенолдың (сарғыш) тәрізді боялуына әкеледі. ДНФБ кезінде ақуыз арқылы түссіз комплекстерді көру этанол ерітіндісіндегі сілтінің қалпына келу реакциясы арқылы жүзеге асады. Нәтижесінде келесі реттегі комплексті диазоттау реакция негізінде нафтолмен немесе нафтол-күміс қышқылымен азобояғыш комплекс түзіледі.

 ДНФБ реакциясынан басқа, ақуыздарға морфологиялық сараптама жүргізу үшін нақты топтама реакциялар ретінде тетразонимен Даниели, Прис, Лизон бойынша реакциясын, сонымен қатар Берстон бойынша нитробензоилхлоридімен реакциясын да пайдалануға болады.

**РЕАКЦИЯҒА ТҮСКІШ АРНАЙЫ ТОПТАРДЫ ЖӘНЕ АМИНҚЫШҚЫЛДАРДЫ БӨЛІП АЛУ ӘДІСІ**

1. **Аминтоптарды бөліп алу реакциясы**

Соңғы аминқышқылдарының аминдік топтары Тхлорамин немесе натрий гипохлориті, аллоксан, нингидрид арқылы тотықсыздандырғыш дезаминдену нәтижесінде Шифф реактиві арқылы бөлінетін альдегидтерге айналады.

1. **Карбоксил топтарының ақуыздарымен байланысты бөліп алу реакциялары**

Пиридиндегі ақуызбен байланысты уксус ангидридімен өңдеу нәтижесінде ациламидо-карбоксильдік топтары өз кезегінде гидрозид 2–окси-3 нафтойн қышқылы карбонильдік топтарындағы реагентпен әсер ететін кетондарға айналады.Гидразид өз кезегінде өткір В көгімен реакцияға түсу нәтижесінде айқын көрінеді.

R\*CONH\*CH2 COOH + CH3 CO\*O\*OC\*CH3→R\*CONH\*CH2COCH3 +CH3COOH+CO2

Бірақ, уксустық ангидридпен ең алдымен, бүйіріндегі карбоксильді топтарға әсер етеді. Уксустық ангидридпен өңдеу нәтижесінде пиридиннің бүйіріндегі тармақта карбоксильдік топтармен аралас ангидридтер пайда болады. Келесі этапта аралас ангидридтер 2-окси-3- нафтойлы қышқылдың гидразидпен әсерлесуі болады.

**4 . Дәріс. НУКЛЕЙН ҚЫШҚЫЛДАРДЫ БӨЛІП АЛУ**

РНҚ-ның ДНҚ-дан ерекшелігі әрқашанда жалғыз тізбекті түрде болады. Ереже бойынша, ДНҚ клетка ядросында орналасады, митохондрия мен пластидетерде де аздап кездеседі. РНҚ негізінен көбінесе, микросомды фракциядағы күйінде болады (эндоплазматикалық ретикулуммен байланысты Паллада түйіршіктері).

Нуклейн қышқылдарын гистохимиялық бөліп алу кезінде келесідей принциптер қолданылады:

* 1. УФ-сәулесін жұту арқылы пуриндік және пиримидиндік негіздерді бөліп алу;
	2. Көмірсулы компоненттерді бөліп алу;
	3. Фосфор қышқылын бөліп алу;
	4. Базофильдің бөлінуі;
	5. Арнайы маманданған ферменттік және химиялық экстрация әдісі арқылы бөліп алу.

**УФ-сәулесін жұту арқылы пуриндік және пиримидиндік негіздерді бөліп алу**

 Сандық және сапалық ДНҚ мен РНҚ-ны бөліп алу үшін, УК-сәулесін жұту әдісі арқылы қолданылуға негізделген, пуриндік және пиримидиндік негіздердің гетероциклдік сақина негізінде УК-сәуле ұзындығы 260 нм толқында жұтылады. Бұл қиын да көп еңбекті қажет ететін әдіс болып табылады. Бірақ оның көмегі арқылы, бірден ДНҚ мен РНҚ ның дифференциалды бөліп алуды жүргізуге болмайды.

**Көмірсулы компоненттерді бөліп алу реакциясы**

**Фельген реакциясы.**

Бұл әдіс әлсіз гидролиздің нәтижесінде өңделетін препаратта 1н. HСl әсер етуі арқылы C1-дезоксирибоза атомымен байланысты пуриндік негіздердің ыдырауына негізделген. Соған қарамастан қалыптасқан реакцияға түскіш альдегидті топтар Шифф реактивімен қышқылға төзімді қызылда –қызыл-күлгін түсті бояғыштар береді. Гидролиз жағдайын нақты қадағалау кезінде дезоксирибозаның фосфатты көпірі бұзылмайды, барлық байланыстар қышқылдық қасиеті мен ерімеу процесін сақтап қалады. Қышқылдық гидролиз нәтижесінде РНҚ рибозасынан альдегидтердің қалыптасуы болмайды, бұл кезде практикалық тұрғыдан алғанда, кесіндідегі РНҚ толығымен шайылып кетеді. Фельген реакциясы бойынша дұрыс жұргізу кезінде РНҚ толығымен боялмайды. Бос альдегидтік топтар (плазмали) бақылау тәжірибесінде Шифф реактивімен өңдеу кезінде және тұз қышқылды гидролиз нәтижесінде бөліп алуға болады. Бұл процесс кезінде гидролиз нәтижесінде босаған пентозаның альдегидті топтарын ажыратуғаболады. « Плазмалендік реакция» деп аталатын шындық тек мұздатылған кесінділерде ғана кездеседі.

Фельген реакциясының нәтижесі ол пайдаланылатын қңдеуіш қоспаларға және гидролиз процесінің ұзақтығына байланысты. Өте ұзақ уақытағы гидролиз С3 және С5 эфирлік фосфатты қоспалардың ыдырауына және содан кейін еритін нуклеотидитердің қалыптасуына әкеледі. Түрлі өңдеуіш қоспалар үшін гидролиз процесінің ұзақтығы келесі кестеде көрсетілген:

|  |  |
| --- | --- |
| Нейтральды формалин  | 8 мин. |
| Карнуа  | 8 мин. |
| 80%-тік этанол  | 5 мин. |
| Формалин – этанол – уксус қышқылы | 7 мин. |
| Буэну-Аллен бойынша пикриндік қышқыл ерітіндісі  | 22 мин. |
| Ценкер | 5 мин. |
| Ньюкомер (өсімдік ұлпасы) | 10 мин. |
| Ньюкомер (жануар ұлпасы) | 20 мин. |

**2. БАО пайдалану арқылы флуорохромирлеу**

Бұл Фельген бойынша модифицирленген реакциясында, парарозанилиннің орнына флуорохром БАО [бис-(4-аминофенил)-1,3,4-оксадиазол] пайдаланылады. Гидролиз процесін түрлі температурада және түрлі НCl концентрациясында жүргізуге болады. Клетка ядросы мен цитоплазмасының арасындағы жоғары контрасты жетістіктер мен сапалы зерттеу үшін, 1 н. НCl +60оС температурадағы гидролиз көмегі арқылы қолдануға болады. Флуорохромирлеу үшін БАО орнына концентрациясы 0,2% тік аурамин О пайдаланылады.

**3. Фельген реакциясы– күміс – метенамин.**

Гидролизден кейін 1М лимон қышқылында гидролиз уақтысында, кесіндіде метанамин-күміс ерітіндісінде анық қара түспен боялған ДНҚ дамиды. Жақсы нәтиже әдеттегі тұз қышқылды гидролизде +60оС та болады

**4. Турчини әдісі.**

Бұл әдісте жұмсақ немесе әлсіз гидролизден кейін 1н. HCl арқылы метилтриоксифлуореномен жүреді. Осыған қарамастан, ніклейн қышқылдарының көмірсулы компоненттері флуреононамен әсер ету арқылы боялған (ДНҚ – күлгін, РНҚ – сары қызғылт байланыстар түзеді.

**Фосфор қышқылын бөліп алу реакциясы**

**1. Қышқылды гидролиз арқылы фосфор қышқылын гистохимиялық бөліп алу.** Бұл Фосфатиты ДНҚ топтарын, молибдат аммониясы бар қышқылдық гидролиз көмегі арқылы бөліп алуға негізделген әдіс.Фосфомолибдат аммониініңтұнбасы реакцияның екінші этапында бензидиннен молибден көгіне дейін қалпына келеді.Реакция нәтижесіндегі дамитын диффузды көк бояу анық локализация қалыптастыруға мүмкіндік бермейді.

**2. Негізгі бояуыштармен фосфор қышқылын бөліп алу.** Негізгі бояуыштар кері зақымдалған фосфатты топтармен бір немесе бірнеше тандаулы түстер береді. Соған қарамастан, нуклейн қышқылдарын бояу әдістерінің біреуі де абсолютті мамандалған болып саналмайды, сол себептен бөлінетін қышқылдық топтар нуклейн қышқылына жататындығын анықтайтын бақылау реакцияларын жүргізу керек

**1.Тиазиндік бояуыштармен бояу.**

Бұл топтың бояуыштарына метилен көгін ұсынуға болады. Ол тезерігіш бояуыш құрамында азур мен метилен күлгін қоспасы болуы мүмкін. Забуференді ерітіндіде метилен көгімен бояу жақсы нәтижелер береді. Бірақ рН 3 тен 5-ке дейін тек нуклейн қышқылдары емес, сонымен қатар қышқыл мукополисахараидтерде боялады. Оларды Нуклеазамен бақылау тәжірибелерінің көмегімен бөліп алуға болады.

Метилен көгінен басқа, pH 4,0-6,0 кезіндегі РНҚ байланысатын толуидинді көгі пайдаланылады. Акролеин және толуидинді көгін қолдану арқылы, Федер және Вольфа әдісінің көмегімен, түрлі екі топтың нуклейн қышқылдарын бояуды (ДНҚ – күнгірт-көк, РНҚ – ашық-қызыл түсті) алуға болады. Крезильді күлгін РНҚ мен бірге pH 4.2 кезде әсер етеді, сондықтан РНҚ-ң цитофтометриялық санын анықтау кезінде ғана қолданылады.

**2.Хромдық квасца-галоцианин комплексімен бояу**

Бұл қарапайым әдістің нәтижесінде екі нуклейн қышқылы да күнгірт-көк түске боялады. Бояудың ерекшелігі рН ертіндісінің бояуышына байланысты. При значениях рН деңгейі 1,5 тен 1,7 ге дейінгі ол нулейн қышқылдарымен салыстырғанда біршама жоғары. Сулы ерітіндідегі галлоцианин катион түрінде болады. Хромдық квасца-галлоцин комплексімен бояу жаңа боялатын заттардың пайда болуына әкеледі. Хромдық квасца-галлоцин комплексімен нуклейн қышқылдарының байланысы негізінен хромға тәуелді. Нуклейн қышқылдарымен катион бояуыштарының қарым-қатынасы нуклейн қышқылдарының әрбір фосфатты тобы бояуыштың бір молекуласымен байланысады. Хромдық квасца-галлоцин комплексі нуклейн қышқылдарымен байланысуы өте берік, мықты. Бұл әдіс сандық цитофотометрияны анықтау үшін пайдаланылады, сонымен қатар стехиометриялық қарым-қатынастағы субстратпен байланысады.

**3.Тандаулы ДНҚ және РНҚ бөліп алу үшін метилді жасыл-пиронинмен бояу.**

Бұл әдісте бір кесіндіде, бір уақытта ДНҚ- да , РНҚ да бөлініп алынады. Айтылған әдісте, бояуыштармен бояу кезінде, нуклейн қышқылдарымен бояуыштардың электростатистикалық қарым-қатынасымен емес, түрлі деңгейдегі екі нуклейн қышқылдарының полимеризациясымен түсіндіріледі. ДНҚ-ның молекуласы көлемі бойынша көбінесе метилдік жасылмен байланысады, сонда РНҚ-ның полимеризацияланған молекуласы пирониларды жинап алады. Осындай нақты анықталған мүмкіншіліктерден соң, деполимеризациядан кейін ДНҚ пиронинмен боялады.

**Химиялық экстракция және арнайы мамандалған ферменттердің көмегі арқылы нуклейн қышқылдарын бөліп алу.** Нуклейн қышқылдарын гистологиялық кесіндіден 2 түрлі әдіспен жоюға болады:

1. Ферменттердің қатысуы арқылы;
2. Химиялық экстракция арқылы :

Бірақ екі әдіс те біршама кемшіліктер бар, көбінесе ферменттер әдісіне көңіл бқлуге болады.Ферментке әсер ететін факторлар (ерітіндідегі ферменттер концентрациясы, ерітіндідегі ферменттер, температура, рН және т.б.), ең алдымен өңдеудің ұлпаға әсер етуін қарастыру қажет.

**Нуклейн қышқылдарын электронномикроскопиялық бөліп алу.**

 Бұл әдіс жаңадан құрастырылып жатыр. Зерттеушінің еркінде болатын әдістер ДНҚ мен РНҚны ультраструктуралық бөліп алуды жүргізу, негізінен контрастриование қабылдауының түрлі көмегі арқылы: олар алынатын нәтиженің анық болмауына байланысты. ДНҚ мен РНҚ уранилацетат және свинц цитратының көмегі арқылы жақсы контрасталынуы өтеді. Нуклейн қышқылдары мен ақуыздардың көмегі тәрізді жолдармен контрастированиенің мамандануын салыстырмалы түрде жоғарылатуға болады.

**5 Дәріс Көмірсуларды гистохимиялық бөліп алу**

Ұзақ уақыт жас клетка мен ұлпа құрамын зерттеу үшін тек классикалық әдістерді ғана қолданып келеді. Оның негізінде ұнтақталған ұлпа (гомогенат) алынған, бұлыңғырлау анықталған химиялық заттар жатады. Өзінің біршама сапасына қарамастан, бұл әдіс жас клетка мен ұлпа әртүрлі құрамаларының қандай химиялық заттармен шектелетіні туралы мағлұматты толық түсіндіріп бере алмады. Клеткалар мен ұлпа химиялық заттардың микроқұрылымын анықтау әдісімен түгелдей іздеу нәтижесі, ақырында гистохимсиялық әдістердің ашылуына әкеп соқты. Бұл әдістер гистологиялық және биохимиялық әдістердің біріктіріліп өткізілуіне негізделген болатын.

Гистологиялық реакция кезінде жас клетка құрамына кіретін неорганикалық және органикалық заттар, әртүрлі реактивтермен химиялық реакцияға түсіп түзелген өнімдердің боялу реакциясын түзеді. Көптеген гистохимиялық реакциялардың негізіне мынадай жалпы (гистохимиялық) принциптер жатады:

* Белгілі химиялық топтар осы немесе басқа бояғыштармен боялады, мысалы, ортофосфатты топ (пиронин, толуидинді көк т.б.) РНК-ы бояйды.
* Бояғышты жас клетка құрылысының құрамына кіретін белгілі субстратта ерітеді. Мысалы, жас клетка қосындылардың май тамшыларының суында еруіне негізделледі.
* Кейбір химиялық жас клетка құрамалары, дезоксирибонуклейн қышқылы (ДНК) сияқты, полисахаридтерге бояғыштық әсер ете алмайды. Бұл жағдайларда олардың топтарын реакционды- белсенді жағдайда ауыстыру жағдайына жүгінеді. Сонымен бірге лейкоқосылысты фуксин әрекет ете алатын альдегид топшаларын бөліп алады, сөйтіп құрылған өнім реациясы түзіледі.
* Кейбір жас клетка құрамаларының орналасуын анықтау үшін көпсатылы аралық реакцияға және боялмаған реакция жүргізуге жүгінеді. Мысалы, ферменттерді гистохимиялық бояу кезінде қолдану реакциялары.

Бұл әдіс зерттеу тәжірибесінде кең таралды. Қазіргі уақытта ешбір морфологиялық зертхана гистохимиялық әдіссіз жұмыс жасамайды.

**Буферлі ерітінділер.** Организм клеткаларындағы ферменттердің қатысуымен жүретін химиялық процестер, кейбір жағдайларды керек етеді, оның ішінде ортаның рН маңызды орын алады. Бұрыннан белгілі алынған ерітіндінің қышқылдығы Н+ ионының қоюлығына байланысты, ал оның сілтілігі ОН- ионының қоюлығына байланысты екендігі бұрыннан белгілі жағдай.

Тұрақты температурада түзілген оң теріс иондардың – көлемі де тұрақты келеді. Бір көрсеткішті біліп алып, екіншісін анықтауға болады. Осыған орай, химияда ерітіндіге қышқылды және сілтіні белгілеуге сутектік көрсеткіш арқылы рН, теріс белгімен алынған логарифмде Н+ ионын күшімен белгілеуге ұсынды.

Түрлі ферменттер өзінің белсенділігін көрсету үшін рН-ң әр белгісін керек етеді. Сілтілі фосфатазаға қолайлы рН 9,0 болса, қышқыл фосфатазаға сәйкес рН 5,0 болады.

Гистохимиямен ферменттердің белсенділігін көрсеті үшін жақсы жағдай жасау керек, ол үшін жетілдіру ортасында берілген ферменттерге қолайлы рН белгісі сақталу қажет.Бұл жағдайды жетілдіру ортасында буферлі қосылысты берілген рН белгісімен бірге енгізумен орындалады. Көптеп таралған буферлі ерітінді болып фосфатты, ацетатты және трис буфер саналады.

**Буферлі ерітінді дайындау.** Буферлі қосылысты жасау үшін мынаны еске алу қажет: ерітінді күшінің реактивтігін анықтау үшін молярлы және нормальды деген түсінік қолданылады.

Ерітінді молярлығы (М) – 1 литр ерітінді құрамындағы заттардың грамм – моль мөлшері. Берілген заттағы грамм-моль молекулалық салмағы, граммен белгіленген.

Нормальды (N) – 1 литр ерітіндідегі грамм-эквивалентті мөлшері. Грамм-эквивалент – берілген зат мөлшері, берілген реакциядағы 1 грамм сутегідегі химиялық тепе-теңдігі. Сондықтан:

Қышқылдарға: М (грамм молекула) М

N=(NН2SО4 = )

Н- мөлшері 2

Сілтілерге:

М (грамм молекула) М

N=(Nва(ОН)2 = )

ОН тобының мөлшері 2

Тұздарға:

М (грамм молекула) М

N=NfеСl3= )

Металл санының саны және оның валенттілігі 3

Фосфатты буфер (рН6,0-8,0).

Ерітінділер: А –0,2 МКН2РО4 (13,6 г тұз 1 литр дистильденген суда).

100 мл буфер алу керек рН-қа А және Б ерітінділерін 3-ші кестеді көрсеткендей құю қажет.

Ацетатты буфер (рН 3,6 – 5,6).

Ерітінділер А – 0,2 М КН2РО4 (13,6 г тұз 1 литр дистилденген суда);

Б – 0,2 М Nа2НРО4 (31,2 г Nа 2НРО4 х 22Н2О 1 литр дистилденген суда).

100 мл буфер алу керек рН-қа А және Б ерітінділерін 3-ші кестеде көрсеткендей құю қажет.

Ацетатты буфер (рН 3,6-5,6).

Ерітінділер А – 0,5 N СН3СООН (30 мл мұзды сірке қышқылына 970 мл дистилденген сумен толтыру);

Б – 0,5 NСН3СООН (61 грамм тұзды 1 л дистилденген суда, еріту).

Ерітіндіге А және Б мөлшері 4-ші кестеде көрсетілгендей құю.

Кесте 3.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| РН | 6,0 | 6,5 | 7,0 | 7,2 | 7,4 | 7,6 | 8,0 |
| Мөлшер (мл) |  |  |  |  |  |  |  |
| А | 87,9 | 68,7 | 48,8 | 27,4 | 18,2 | 11,5 | 3,1 |
| Б | 12,1 | 331,3 | 51,2 | 75,6 | 81,8 | 88,5 | 96,9 |

Кесте 4.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| РН | 3,6 | 3,8 | 4,0 | 4,2 | 4,4 | 4,6 | 4,8 | 5,0 | 5,2 | 5,4 |
| Мөлшер (мл) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| А | 185 | 176 | 164 | 147 | 126 | 102 | 80 | 59 | 42 | 29 |
| Б | 15 | 24 | 36 | 53 | 74 | 98 | 120 | 141 | 158 | 171 |

Трис – буфер (рН 7,2-9,0)

Ерітіндіге А – 0,2 М трис (оксиметил) аминометан (24,3 грамм тұз 1 л дистилденген суда);

Б – 0, 1 NНСl.

Ерітіндіге А және Б мөлшері 5-ші кестеде көрсетілгендей құйып, 100 мл-ге дейін дистилденген сумен толтыру.

Кесте 5

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| РН | 7,2 | 7,4 | 7,6 | 7,8 | 8,0 | 8,5 | 9,0 |
| Мөлшер (мл) |  |  |  |  |  |  |  |
| А | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Б | 43 | 40 | 35,7 | 30,6 | 25 | 12 | 5 |
| Дистилденген су | 32 | 35 | 39,3 | 44,4 | 50 | 63 | 70 |

Бастапқы ерітінділер және буферлі қоспалардың өзі де ұзақ уақыт сақталады. Қателеспеу үшін қолдану алдында буферлі ерітінділердегі дайындалған рН-ты тексеру қажет. Жуықтап тексеру индикаторлы қағаз арқылы, ал анығырақ тексеру арнайы аспап – потенциометр (рН – метр) көмегі арқылы жүзеге асады.

**6 Дәріс Көмірсуларды гистохимиялық бөліп алу Жалғасы**

Көмірсулар құрамына көміртегі, сутегі және оттегі атомдары кіреді. Жасушалар құрамында күрделі органикалық қосылыстар 1% мөлшерінде болады. Көмірсулардың қарапайымы – моносахаридтер. Моносахаридке жүзім қанты – глюкоза, жеміс шырынында және балда көп мөлшерде кездесетін фруктоза, нуклин қышқылдары мен АТФ-ның құрамына кіретін рибоза мен дезоксирибоза т. б. жатады. Моносахаридтер – суда жақсы еритін жағымды, тәтті дәмі бар түссіз заттар.

Көмірсулар құрамына көміртегі, сутегі және оттегі атомдары кіреді. Жасушалар құрамында күрделі органикалық қосылыстар 1% мөлшерінде болады. Көмірсулардың қарапайымы – моносахаридтер. Моносахаридке жүзім қанты – глюкоза, жеміс шырынында және балда көп мөлшерде кездесетін фруктоза, нуклин қышқылдары мен АТФ-ның құрамына кіретін рибоза мен дезоксирибоза т. б. жатады. Моносахаридтер – суда жақсы еритін жағымды, тәтті дәмі бар түссіз заттар.

 **7 Дәріс Липидтерді гистохимиялық бөліп алу**.

Липидтерді өңдеу үшін көбінесе липидтердің физикалық қасиеттерін өзгерте алатын (еріту, дисперсия, алғашқы флуросценция және т.б.) формальдегитдер пайдаланылады.Өңдеу кезінде липидтердің шайылуы және біртіндеп еруі мүмкін, әсіресе фосфолипидтер, липидтер мен белоктардың арасындағы комплекстердің қалыптасуын тудыратын электролиттер болатындықтан Ca, Co,немесе Cd өңделетін иондардың қоспасын азайтуға болады. Соған байланысты құрамында формальдегид және кальцийі бар Бейкер өңдеуіш қоспасы липидтердің гистохимиясында кеңінен қолданылады. Карбовакс немесе этиленгликоль бар өңдеуішке сіңірілу процесінде ұлпаны құю кезінде, липидтерді формальдегидпен өңдеу барысында барынша липидтердің еруін тудырады. Басқа да липидтерді әсіресе фосфолипидтерді шаюдың басқа да мүмкіншілігтері парафинге құю барысында пайдаланатын органикалық ерітінділерде өңдеуде бихромат қоспасын қосу болып саналады. Жоғары температурада ұзақ хромдалу прафинге құю кезінде нейтральді майлардың сақталуын қамтамасыз етеді. Жалпы липидтерді формальдегидпен өңдеу кезіндегі толықтырулар бихроматтар және сулема ерітіндісінің қоспасында ұлпаларды өңдеу болып табылады.

 *Липидтерді реттеуіштерге:* төртқышқылды осмия, альдегидтер (формальдегид, глутаральдегид) және арнайы шектеуі бар калий бихроматы жатады. Қатты қарқынды липидтердің реттелуі - экранда көрінетін бояуыш топтарының және соған байланысты боялатын реакцияларының нашарлауына әкеледі. Өңдегіш зат, тек кесіндіні көлденең бекіту арқылы боялатын құрылымға біршама әсер еткенде ғана құрылымын жақсы сақтай алады. Өңдегіш зат, әдетте забуференді ерітінді немесе қоспа түрінде ғана қолданылады. Қоспаны дайындау барысында, әрбір өңдеуішті өзіндік қызметіне қарап қолдану қажет. Қоспаның өңдегіш арнайы компоненттері ұлпаны әртүрлі жылдамдықта ыдыратады(диффундирует). Егер қоспада қышқыл компонент көп болса, онда ол ұлпаға бәрінен бұрын еніп кетеді. Осылайша, ұлпаға алдымен басқа өңдегіш компоненттердің бөлек әсер етуі жүретінтіктен, бұл компоненттің арнайы әсері шектетіледі.

*Липидтерді реттеуіштерге:* төртқышқылды осмия, альдегидтер (формальдегид, глутаральдегид) және арнайы шектеуі бар калий бихроматы жатады. Қатты қарқынды липидтердің реттелуі - экранда көрінетін бояуыш топтарының және соған байланысты боялатын реакцияларының нашарлауына әкеледі. Өңдегіш зат, тек кесіндіні көлденең бекіту арқылы боялатын құрылымға біршама әсер еткенде ғана құрылымын жақсы сақтай алады.

Өңдегіш зат, әдетте забуференді ерітінді немесе қоспа түрінде ғана қолданылады. Қоспаны дайындау барысында, әрбір өңдеуішті өзіндік қызметіне қарап қолдану қажет. Қоспаның өңдегіш арнайы компоненттері ұлпаны әртүрлі жылдамдықта ыдыратады. Егер қоспада қышқыл компонент көп болса, онда ол ұлпаға бәрінен бұрын еніп кетеді. Осылайша, ұлпаға алдымен басқа өңдегіш компоненттердің бөлек әсер етуі жүретінтіктен, бұл компоненттің арнайы әсері шектетіледі.

**8 Дәріс Ферменттердің гистохимиялық бөліп алу**

Ең алғашқы кезден-ақ , гидролитикалық ферменттерді гистохимиялық бөліп алу үшін өңдеуге суық ацетон немесе этанолды алғын, себебі бұл екі сұйықтық та ферменттердің біршама ғана инактивациясын тудырады. Келесі парафинге құю кезінде сіңірілу процесі құю температурасына қарағанда ферменттің активтілігіне аз деңгейде әсер етеді. Гистохимиялық бөлінетін активтілік кейбір гидролитикалық ферменттерде, әсіресе фосфотаза құю кезіндегі температура +50 0С-тан төмен болмағанда, парафинге сіңірілу 30 мин (вакуумға құю кезі) уақытта өтеді.

Ең алғашқы кезден-ақ , гидролитикалық ферменттерді гистохимиялық бөліп алу үшін өңдеуге суық ацетон немесе этанолды алғын, себебі бұл екі сұйықтық та ферменттердің біршама ғана инактивациясын тудырады. Келесі парафинге құю кезінде сіңірілу процесі құю температурасына қарағанда ферменттің активтілігіне аз деңгейде әсер етеді. Гистохимиялық бөлінетін активтілік кейбір гидролитикалық ферменттерде, әсіресе фосфотаза құю кезіндегі температура +50 0С-тан төмен болмағанда, парафинге сіңірілу 30 мин (вакуумға құю кезі) уақытта өтеді.

Гистохимиялық әдістер мұздатылған кесінділерді бояу кезінде жиі қолданылады, бірақ та парафинді кесінділерді де пайдалануға болады. Соңғы жылдары гистохимиялық тәсілдерді электронды микроскопиялық әдіспен бірге жүргізу, болашағы мол жаңа бағыттың — электронды гистохимияның дамуына әкеліп соқты.

**9 Дәріс Ферменттерді гистохимиялық бөліп алу Жалғасы**

Фермент – белокты зат, ол организмдегі түрлі химиялық реакцияларды тездетуші. Химиялык реакциялардың жүрісін тездетушілерді катализаторлар деп атайды. Ферменттерді және олар катализдейтін реакцияларды зерттейтін биохимия бөлімі энзимология деп аталады. Фермент қатысатын процестермен адам өте ерте кездерден бері таныс: қантгы ашыту, нан пісіру, тері илеу, сүттен тағымдар жасау. Фермент катысуымен жүретін процестерді зерттеуде Л.Пастер, Бухнер, И.П.Павлов, Л.Михаэлис пен М.Ментен жүмыстарының маңызы зор. Ферменттер адамның, жануарлар, өсімдіктер ұлпаларында және микроорганизмдерде синтезделіп жасалады.

Ферменттің атқаратын қызметі. Ферменттер өз әсерін өте аз мөлшерде катализаторға ұқсас жүргізеді. Фермент өзінің әсер етуші заты – субстратпен (S) ферменттік реакция жүргенде ферментсубстраттық кешен (аралық зат) түзеді. Бұл кешеннің қызметі өте күрделі, ол субстрат пен фермент молекулалары конформациясы мен энергиясын және химиялық байланыстарын өзгертеді. Реакция өткен соң фермент-субстраттық кешен жаңа қалыпқа ауысып, фермент-реакция өнімі кешеніне айналады. Содан кейін ол фермент және реакция өніміне (Р) жекеленіп бөлінеді: S + E → S·E → EP → E + P Ферменттердің ка-та-ли-здік ерекшелігіне келесі қа-си-ет-тері жатқызылады: а) Фермент өздігінен жаңа ре-ак-ция жүргізбейді. Ол тек тер-модинамикалық мүмкін реакци-яны ғана жүргізеді. Реакция барысында активтендіру энергиясы төмендейді. Реакцияның үлкен кедергі энергиясын сатылап бөліп, төмендету және активтендіру энергиясын жоғарлату арқылы реакция жылдамдығын жоғарлатады. б) Фермент басталған реакцияның бағытын өз бетінше өзгерте алмайды. Ол бір ғана реакция өнімі түзілуі бағытында жұмыс істейді. Бұлар тотығу-тотықсыздану реакцияларын катализдейтін ферменттер. Осы топқа кіретін ферменттер сутегі атомдарын немесе электрондарды қосып алу немесе бөліп шығару арқылы жүретін реакцияларды жылдамдатады. Оксидоредуктаза класының ферменттерінің активті орталығының құрамына кофакторлар – көбінесе НАД, НАДФ, ФАД, ФМН және металл иондары кіреді. Трансфераза.Гидролаза
Ферменттерді бөліп алу. Ферменттер адамның, жануарлар, өсімдіктер ұлпаларында және микроорганизмдерде синтезделіп жасалады. Ферментті бөліп алу үшін, ол көп кездесетін материалды /шикізатты/ тандап алу керек. Бөлініп алынған фермент өзінің активтілігімен бағаланады. Сүтқоректілердің тіндері мен ағзаларынан ферменттерді бөліп алу технологиясы. Клетка құрамынан ферментті сәтті бөліп алу үшін материалды субклеткалық құрылымға дейін ұсақтау керек (гомогенизация): өзінің құрамында көптеген жеке-дара ферменттері бар лизосома, митохондрий, ядроға және т.б дейін. Ферменттерді бөліп алуда ақуыз денатурациясын болдырмайтын жағдайдағы барлық оперцияларға ерекше көңіл аударады, өйткені ол әрқашан ферменттікті белсенділіктің жоғалуымен байланысты. Бұған қорғаныс қоспаларының, жиі SH-бар байланыстардың (цистеин, глютатион, меркаптоэтанол, цистеамин, дитиотреитол және т.б.) болуы әсер етеді. Ферментті бөліп алудың барлық кезеңдерінде төмен температураны сақтап тұру керек, өйткені жоғары температурада олар биологиялық белсенділігін жоғалтады. Ферменттердің нативті қасиеті сақталатын глицеринмен экстракция, сондай-ақ, -10о С – ден жоғары емес температурада құрамында ферменттері тіндерді не олардан шыққан вытяжкаларды тұндыру мен тез сусыздандырудан тұратын ацетонды ұнтақ әдісі тән. Ары қарай ферменттерді тазалау үшін ион алмастырушы хроматография, молекулярлы тор, электрофорез және әсіресе изоэлекрофокустау әдісі қолданылады. Адсорбционды әдіс модификациясының бірі-аффинді хроматография, мұнда фермент таңдамалы түрде өзара әрекет ететін зат адсорбен қызметін атқарады. Нәтижесінде тек осы бір фермент адсорбентпен бағанада ұсталынып қалады, ал қалған қосымша ақуыздар ерітіндіде қалады. Сосын оқшауланған фермент бағанадан бөліп алынады. Бұл технология трипсин, химотрипсин, рибонуклеаза, гиалуронидаза, тималин, цитохром С, панкреатин және де тағы басқа жануар табиғатының ферменттерін бөліп алғанда пайдаланылады

**10 Дәріс Пигменттердің гистохимиясы**

**Пигменттер** (лат. pіgmentum — бояу), биологияда — ағза ұлпасы құрамында болатын боялған заттар. Пигменттердің түсі күн спектрінің әр түрлі сәулесін сіңіретін хромофор тобына байланысты анықталады. Пигменттердің ағза тіршілігінде, әсіресе фотобиология процесінде маңызы зор.Жануарлар мен өсімдіктер ағзасында порфирин, каротиноид Пигменттері көп мөлшерде кездеседі.

Пигменттер химияда — пластмасса, резина, қағаз, т.б. бояуда, баспахана мен құрылыс бояуларын дайындауда қолданылатын түрлі-түске боялған химиялық қосылыстар. Пигменттер бейорганик. және органик. түрлерге бөлінеді. Бейорганикалық Пигменттер табиғи, минералды, синтетик. болып бөлінеді. Оларға: өтпелі металдардың (Fe, Co, Cr, т.б.) оксидтері, тұздары, кешенді қосылыстар, түсті металдардың (Al, Cu, Zn, Fe, Nі) ұнтақтары, құймалар (қола, латунь), күйе жатады. Органикалық Пигменттер — әр түрлі химиялық құрылысты синтетик. бояғыш заттар. Олардың ішіндегі негізгілері — азопигменттер мен азолактар. Пигменттер боялған материалдың көптеген қасиеттерін (коррозияға төзімділігін, әсемділігін, т.б.) жақсартады. Пигменттерді алуда табиғи шикізатты үгіту (мысалы, темір жосасын алуда), сулы ерітінділерді химиялық тұндыру (литопон алу), т.б. әдістер қолданылады

**11 Дәріс Биогенді аминдердің гистохимиясы**

Адамның, жануарлардың, өсімдіктердің және кейбір бактериялардың организмінде аминқышқылдардың декарбоксилденуінен тузілген протеиногенді азот құрамды органикалық байланыстар тобы.

1.этаноламиндер – холин, ацетилхолин 2.полиэтилендиаминдер – путресцин, кадаверин

 3.полиаминдер - спермин

 4.имидазолилалкиламиндер - гистамин 5.фенилалкиламиндер – мескалин, тирамин 6.катехоламиндер - адреналин, норадреналин мен дофамин

 7.индолилалкиламиндер Глутаматдекарбоксилаза - жоғары специфи- калық фермент. Бас миының сұр затының жасу шаларында қызмет етеді.

Глутамин қышқыл 2. Серотонин - жүйке ұлпасында өндіріледі. Бас ауруларының кейбір түрлері сақиана (мигрень) серотониннің артық мөлшерде өндірілуіне байланысты

2. Серотонин - жүйке ұлпасында өндіріледі. Бас ауруларының кейбір түрлері сақиана (мигрень) серотониннің артық мөлшерде өндірілуіне байланысты. Серотонин тамырдарды тарылтады, қанның ұюын реттеуге қатысады. Антиаллергия- лық

3. Гистамин - медиатор болып табылады және жүйке жасушалары мен (тучный) жасушаларында кездеседі. Күшті тамыр кеңейткіш әсерге қабілетті. Гистамин секреторлық гранулаларда сақталады және қанға ұлпаның зақымдалған кезінде (соққы, күю және т.б.) секреттеледі. Ол көп мөлшерде қабыну ошақтарында бөлінеді. Гистамин аллергиялық реакциялардың дамуында маңызды роьді атқарады. Гистаминге арналған рецепторлардың екі типі белгілі: H1 және H2.

Бұл ферментке абсолюттік субстраттық әсерлесу ерекшелігі тән гистидинді гистаминге айналдырады:



4. *Ацетилхолин* – вегетативті жүйке жүйесінің қоздырушы медиаторы. Бронх, асқазан, ішектердің, сілекей және мұрынжұтқыншақ бездерінің секрециясының жоғарлауы. Бұлшықетінің жиырлуы (тонусы мен моторика -сының жоғарлауы).

Сериндекарбоксилаза - сериннен ацетилхолин түзілуінің бірінші реакциясын катализдейді.

5. *Путресцин (диаминобутан)* - өлік уы болып табылады.

 Орнитиндекарбоксилаза – жоғары специфика- лық фермент. Орнитиннің путресцинге айналуы реакциясын катализдейді:

6. *Спермин және спермидин -*  биогендік полиамин- дер тобына жатқызылады. Полиамндерді ағзаға енгізгенде дене температурасы және қан қысымы төмендейді.

 Қатерлі ісік ауруларында полиаминдердің секреттелуінің кенет жоғарлайтыны және олардың зәр құрамында экскреттелуі анықталған

Путресцинге пропиламин қалдығын қосу нәтижесінде одан спермин және спермидин түзіледі, құрамында 3 (сперминде) немесе 4 (спермидинде) имино- немесе амино топтары болады

7. *Дофамин катехоламиндер* –норадреналин мен адреналиннің алғызаты болып табылады. Алғазат ретіндегі қызметтен басқа дофамин өзіне тән спецификалық қызметті де атқарады

Фенилаланин аминоқышқылы тотығу нәтижесін- де сақинасына екі ОН – тобын қосып диоксифе- нилаланинге (ДОФА) айналады. Одан ароматтық аминоқышқылдар декарбоксилазасы әсерінен дофамин түзіледі.

**12 Дәріс Неорганикалық заттардың цито - гистохимиялық бөлінуі**

Соңғы жылдары халықтың салауатты өмір сүруіне көп көңіл бөлінуде. Табиғаттағы өзгерістер және қоршаған ортаның әсері жайлы зерттеу жұмыстары жүргізілуде.  Топырақ, ауа, су – тіршілік  көзі екендігі белгілі.  Ендеше, тіршілікке әсер етуші биогенді элементтер жайындағы ғылыми-жобалы жұмыстарды өзекті зерттеулердің қатарына жатқызуға болады.

Соңғы жылдарда әлемдік жаһандану үрдісінде табиғатта тепе-теңдік жағдайында сақталып  тұрған кейбір химиялық элементтердің адам ағзасында бірден көбейе түсуі және ағза үшін маңызы бар элементтер мөлшерінің кеміп кетуі байқалуда. Химиялық элементтердің барлығы да  тиісті мөлшерден артық болса немесе азайып кетсе адам ағзасына кері әсер ететіні анықталған. Химиялық элементтердің табиғатта таралу жағдайларына жасалған зерттеулер бойынша жердің массасының шамамен 50%-ын оттек, 25%-дан астамын кремний құрайды. Он сегіз элемент  — оттек, кремний, алюминий, темір, кальций, калий, натрий, магний, сутек, титан, көміртек, хлор, фосфор, күкірт, азот, марганец, фтор, барий – жер массасының 99,8%-ын құраса, ал қалған  0,2%-ы барлық басқа элементтердің үлесіне тиеді.

Органикалық қосылыстар – бұл көмірсутектер (көміртегі мен сутегінің қосылыстары) және олардың туындылары.  Көміртегі элементінің ерекше қасиеттеріне байланысты, органикалық қосылыстардың түрлері сан алуан. Қазіргі уақытта синтетикалық және табиғи органикалық заттардың 20 миллионнан аса түрлері белгілі, сондай-ақ олардың саны күннен күнге артуда. Қосылыстардың органикалық және бейорганикалық болып бөліну критерииі ретінде олардың элементтік құрамы алынады.

Органикалық қосылыстарға құрамында көміртегісі бар химиялық заттар жатады, мысалы:

Органикалық  қосылыстар бейорганикалық қосылыстардан бірнеше ерекшеліктермен айырылады:

көбінде барлық органикалық қосылыстар жанады немесе тотықтырғыштармен қыздырғанда СО2 бөліп, оңай ыдырайды (бұл белгіге қарап зерттелетін заттың органикалық қосылысқа жататындығын анықтауға болады);

органикаық қосылыстардың молекулаларында көміртегі Периодтық жүйедегі кез келген элементпен байланыса алады;

органикалық молекулаларда тізбекпен жалғанған көміртегі атомдарының тәртібі  сақталады (ашық немесе тұйық);

көптеген органикалық қосылыстардың молекулалары тұрақты иондарға диссоцияланбайды;

органикалық қосылыстардың реакциялары өте баяу жүреді және де көбінесе аяғына дейін жүрмейді.

 Адамдардың шаруашылық қызметі қазіргі кезде биосфераның ластаушылардың негізгі көзі болып отыр. Табиғи ортаға күн сайын, сағат сайын өнеркәсіптің газ тәріздес, сұйық және қатты қалдықтары түсіп отырады.Осы қалдықтардағы әр түрлі химиялық заттар ауаға, суға және топыраққа түсіп, бір трофикалық екіншісіне өте отырып, соңынан адам организіміне келіп түседі. Бүкіл жер шарында осы ластаушы заттардың түспеген жері жоқ деп айтуға болады. Тіпті ешқандай өнеркәсіп орындары жоқ Антарктиданы алайық. Бұл жерде адамдар кішігірім ғылыми станцияларда тұрып, ғылыми бақылаулар ғана жасайды/ Қазіргі кезде ауаны ластайтын улы заттардың 150- ден астамы белгілі. Бұл заттар ауада күн сәулесінің әсерімен бір-бірімен реакцияға түсіп, жаңа қосындылар түзеді.
Өнеркәсібі дамыған елдерде ауаны ластаушы улы заттың бірі күкірттің қостотығы коксхимия зауыттарымен, тау- кен өндіру және целлюлоза- қағаз өнеркәсіптерінің жұмысы нәтижесінде ауаға шығарылады. Олар ауада ылғалдың әсерінен күкірт қышқылына айналады. Құрамында күкірт қышқылы бар тұман немесе ылғалды ауа адамның, жануарлардың тыныс жолдарының кілегей қабаттарына, терісіне әсер етеді және өсімдік те көп зардап шегеді. Ауадағы күкіртсутек адам организмін улап қана қоймайды, сонымен қатар адамдардың жүйке ауруларын туғызады.
Ауадағы фторлы сутек өте улы. Азық- түліктің құрамындағы фторлысутек адамды, жануарларды құстырып өте жаман ауру туғызады. Хлорлысутек пластмасса қалдықтарын жаққанда пайда болады. Осы газбен тыныс алғанда адамның жолдарының  кілегейлі қабығын зақымдап, өкпенің ісік ауруын туғызады.

Канцерогендік заттар, канцерогендер (латынша cancer – қатерлі ісік және грекше genes – тудырушы) – организмде қатерлі ісік ауруларын және әр түрлі қатерлі және қатерсіз ісіктерді туғызушы химиялық қосылыстар. Канцерогендік заттар туралы алғашқы түсінік 18 ғасырда Англияда пайда болған. Сол кезде Англияда жылу жүйелері үшін тас көмір пайдаланған. Ағылшын дәрігері Г.Потт ластанған үй пештерінің мұржаларын тазалайтын адамдардың денесінде тас көмір шайырының қалдықтары қалатынын байқаған (1775). Ол 15 – 20 жыл өткен соң адам терісінде қатерлі ісік пайда болатынын дәлелдеп, шайыр құрамында қатерлі ісік туғызушы зат бар екенін анықтаған. 20 ғасырдың басында ғалымдар осы тас көмір шайырын жануарлардың денесіне жағып тәжірибе жасаудың нәтижесінде, олардың терісінде қатерлі ісік ауруы пайда болатынын дәлелдеген. Кейін зерттеу жұмысын жүргізген ғалымдар осы тас көмір шайырының құрамынан – 3,4-бензпирен мен әр түрлі көп циклді ароматты көмірсутек тапқан. Қазіргі кезде 1000-нан аса канцерогендік хим. заттар белгілі. Бұл заттардың құрылысы алуан түрлі келеді. Сондай-ақ, ол заттардың ерекшелігі – зат алмасу процесінен кейін организмде қатерлі ісік тудыратын қасиетінің болуы. Табиғатта жиі кездесетін канцерогендік заттар түрлері: 1, 7, 12-диметилбензантрацен; 3,4-бензпирен; 20-метилхолантрен, т.б.; бояуға пайдаланатын химиялық канцерогендік заттар 2-нафтил-амин, 2-амино-флуорен, 4-аминодифенил, т.б.; аминды топтары бар алифат циклды нитроазоқосылыстары (диметил-нитрозамин, диэтилнитрозоамин, И-метил-, И-нитро-, И-нитрозогуанидин, т.б.); өсімдіктердегі зат алмасу процестерінің бұзылуынан пайда болатын улы зат (афлотоксиндер), кейбір саңырауқұлақтар (циказин, сафрол, т.б.); гетероциклді ароматтық көмірсутегі бар заттар (1,2,5,6-ди-бензакридин, т.б.); төртхлорлы көмірсутегі, этионин, уретан, эпоксид, кейбір ауыр металдар, т.б. Хим. канцерогендер клетканың ядросына, оның бөліну, өніп-өсу аппараттарына (ДНҚ, РНҚ) тікелей әсер етеді. Канцерогендік заттардың зиянды әрекеттері (ісік туғызғыш қасиеттері) организмдегі биохимиялық алмасу процесінен соң бір тәуліктен кейін байқалады. Олар ядроның ДНҚ, РНҚ-ларымен химиялық реакцияға түсіп, биологиялық әсері өзгертілген нуклеин қышқылының жеке бөлініп шығуына жағдай жасайды. Бұл өзгертілген генетикалық аппарат организмнің жүйелі түрде реттеп отыратын тойтарыс күштеріне бағынбайды, клеткалар дамылсыз бөлініп, өніп-өсе беретін патологиялық қасиетке (яғни ісік клеткасына) ие болады.

1981 жылы Францияның Лион қаласында қатерлі ісіктің пайда болу себептерін зерттеуші халықараық сарапшылар атмосфера ауаның 32 түрлі химиялық және физикалық Канцерогендік заттармен ластануының өкпе қатерлі ісігімен сырқаттануға тікелей қатысы бар екендігін анықтаған. Олардың қатарына асбест құрамындағы крокидолит пен хризотил, күкірт, азот, көміртектің қос және шала тотықтары, сынап, күшәлә, қыша газы, никель, хром, ванадий, кадмий, бериллий, висмут қоспалары, қорғасынды альдегид, ароматты көп циклды көмірсутектері (бензапирен, толуидин), радиоактивті элементтер, ауыр радон газы, нитраттар мен нитриттер, т.б. жатады. Атмосфера ауаның аталмыш канцерогендік газды-аэрозольді заттармен ластануының негізгі көздері мыналар: өндіріс орындары мен кәсіпорындар (асбест, хром, уран, әр түрлі түсті металдарды өндіретін өндіріс орындары, металлургиялық, мұнай өңдеуші заттар, т.б.); жылу жүйесіне пайдаланатын органик. отындар (тас көмір, мазут т.б.); жол құрылысына пайдаланатын битум мен асфальттың құрамындағы көмірсутек шайырлары; автокөліктер мен ұшақтар отынының қалдықтары; органикалық минералдық тыңайтқыштар. Канцерогендік заттардың организмге зиянды әсерін болдырмау үшін олардың табиғатта таралуын анықтап, алдын-алу шараларын дұрыс жүргізу керек. Ол үшін ауаның, судың және топырақ жамылғысының өндіріс қалдықтарымен ластануына жол бермей, азық өнімдері мен ауыз суға Канцерогендік заттардың еніп кетпеуін қадағалау қажет.

**13 Дәріс Радиоавтография**

Радиоавтография әдісі - клеткалардағы қарқынды процестердің синтетикалық динамикасын анықтайтын негізгі әдістердің бірі. Радиоавтография әдісінің молекулалық гибридизация тәсілі нуклеин қышқылдарының түрлері, нуклеотидтердің кезектесуін анықтауда пайдаланылады. Ол үшін препаратқа нуклеин қышқылымен білгіленген еріткішті жағады, хромосома мен ядро құрамындағы ДНҚ денатурацияланады. ДНҚ-ң ренатурацияланған процесінде еріткіштегі белгіленген нуклеин қышқылымен препараттағы ДНҚ учаскесінде молекулалы гибрид түзіледі.

Нуклеин қышқылдарының молекулалы гибридизация әдісі геннің орналасуын дәл анықтайды. Сонымен қатар флоурохроммен боялуға қолданылады. Мысалы: егер ерекшеленген ядролық ДНҚ-ны флоурохроммен байланыстырса, ДНҚ ренатурациясынан кейін, флуоресценсиясы интерфазалық клетканың ядрошықтарда көрінеді. Сонымен клеткада ДНҚ тізбектерінің көруге болады. Бұл тәсіл Fish әдісі (флуоресценттік in situ гибридизация) деп аталады

Жұмыс істеу принципі қарапайым.

Радиоавтография әдісі клеткадағы зат алмасу үдерісін зерттеуде қолданылады. Ол үшін фосфор, көміртегі, сутегі ра-диоактивті элементтер немесе олардың қосындылары пайдала¬нылады. Зерттеліп отырған ортаға немесе ағзаға метаболизм үдерісі кезінде, клеткалармен сіңірілетін радиоактивті изотоп енгізіледі. Изотоптардың радиоактивті сэулеленуі салдарынан олардың орныққан жерін анықтауға болады. Бүл эдісті қолдану кезінде клеткалардың жүқа кесінділерін үлбірге салады. Ра-диоактивті изотоптар бар жерлерде үлбір қараяды.

Изотопты енгізгеннен кейін біраз уақыт өткеннен соң, яғни метаболизмнің белгілі бір кезеңдері өткеннен кейін препарат даярланады. Заттардың таралуы нақты анықталады. Заттардың тек қана клеткада емес, сондай-ақ клетка мембраналарына орналасуларын анықтауда бұл эдістің мэні зор.

Жасушаларды авторагенографиялық зерттеуде, атомдар біреуі радиоактивті изотоппен алмастырылған ортада макромолекулалық қосылыстардың (мысалы, аминқышқыл немесе нуклеотид) бірінің предшественник енгізіледі. Мысалы, 12С орнына 14С атомы енгізіледі, сутектің орнына - тритий 3Н және тб. Синтез процессі барысында биополимерге предшественниктің көзделген молекуласы енеді. Фотоэмульсия көмегімен оның клеткадағы орнын тіркеуге болады. Егер қабаттағы немесе кесектегі жасушалар фотоматериалдармен эмульсиямен жабылған болса, онда изотоптың ыдырауы нәтижесінде әртүрлі бағытта кездейсоқ түрде ұшатын бөлшектер сезімтал фотолайзер аймағына түсіп, онда күмістің бромды түйірлерін белсендіреді. Ең көп әсер ету уақыты: i. мұндай таңбаланған клетканы фотоматериалдармен байланыстыру кезінде AgBr астықтары көбірек болады. Зақымданудан кейін дайындықты көрсету керек, ал күміс тек жарықтандырылған түйіршіктерде қалпына келтіріледі, ал препаратты бекітіп, жарықтандырылмаған AgBr түйіршіктері еріеді. Нысанды жабатын түйіршіктердің массасының нәтижесінде, тек B-сәулеленуімен белсендірілгендер қалады. Микроскопты осындай препараттар арқылы қарап, олардың үстіне фотоэмульсия қабаты сақталады, зерттеуші таңбаланған зат бар жерлерге қарама-қарсы орналасқан күміс астықтардың орналасуын анықтайды.

Бұл әдіс шектеулерге ие: оның дәлдігі AgBr дәндерінің мөлшеріне және бөлшектердің энергиясына байланысты болады. Астық мөлшері неғұрлым көп болса, онда изотоптың орналасуы неғұрлым дәл болып табылады. Бөлшектің энергиясын неғұрлым жоғары болса және оның диапазоны қаншалықты ұзағырақ болса, ыдырайтын жерінен AgBr дәндерінің белсендірілуі орын алады. Осылайша, радиотрафия әдісі үшін арнайы жұқа ӛсімді фотоэмульсиялар (0,2-0,3 мкм) және б-бөлшектердің энергиясын аз энергиямен, негізінен сутегі изотопымен, тритиймен (3H) изотоптар қолданылады. Тритийді биологиялық макромолекулалардың кез-келген прекурсорларымен белгілеуге болады: нуклеотидтер, амин қышқылдары, қант, май қышқылдары. Сондай-ақ бұлшық еттерінің гормондарын, антибиотиктерді, ингибиторларды және басқаларды радиографиялық зерттеу үшін қолданылады. Радиографиялық түрде суда еритін қосылыстарды зерттеу мүмкін емес, өйткені судағы ерітінділермен (түзету, көрініс және т.б.) жасушаларды емдеу кезінде олардың жоғалуы мүмкін. Әдістің тағы бір шектеуі - бұл заттардың жеткілікті жоғары шоғырлануы, өйткені экспозиция уақыты радиоактивті заттардың төмен концентрациясы артып, ғарыштық сәулеленудің арқасында жарықтандырылған AgBr түйіршіктерінің фонының артуы артады.

Гибридизация (молекулалық) — будандастыру, молекулалық будандастыру. Нуклеин қышқылының УІІГО жағдайында бір-бірімен комплементарлы қосылуы. Генетикалық карта жасау және нуклеин қышқылын алу үшін қолданылады. Тіпті диагноз қоятын әдістерге де жатады.

Нуклеин қышқылдарының молекулалы гибридизация әдісі геннің орналасуын дәл анықтайды. Сонымен қатар флоурохроммен боялуға қолданылады. Мысалы: егер ерекшеленген ядролық ДНҚ-ны флоурохроммен байланыстырса, ДНҚ ренатурациясынан кейін, флуоресценсиясы интерфазалық жасушаның ядрошықтарда көрінеді. Сонымен клеткада ДНҚ тізбектерінің көруге болады. Бұл тәсіл Fish әдісі (флуоресценттік in situ гибридизация) деп аталады.

**14 Дәріс Иммуногистохимия**

Иммуногистохимиялық зерттеулер (талдаулар) — ұлпаларда ізделінетін заттардың ең нақты анықталуын қамтамасыз ететін ұлпаларды микроскопиялық зерттеу әдісі және осы жағдайда антиген ретінде қызмет атқаратын заттарды анықтауға бағытталған спецификалық антиденелермен кесінділерді маркерлеуді өңдеуге негізделген. Микроскопиялық зерттеу үшін клетканың ұлпалық компоненттері спецификалық антиденелер көмегімен бояу тәсілі алғаш рет А. Coons 1941 жылы ұсынылған болатын; кейіннен флуоресцентті бояғыштармен емес, ферментермен таңбаланған антиденелер жасалды.

 ***Тікелей иммуногистохимиялық әдіс***

Тікелей иммуногистохимиялық әдіс – маркерленген антиденелердің анықталатын затпен тікелей байланысы кезіндегі спецификалық реакцияға негізделген (сур. 1).

***Жанама иммуногистохимиялық әдіс***

Жанама иммуногистохимиялық әдіс – сезімтал болып табылады, себебі маркерленбеген бастапқы антиденелердің анықталатын антигенге (анықталатын затпен) байланысып, содан кейін табылған затты екіншілік таңбаланған антиденелермен анықтайды, ал бұл кезде бастапқы антиденелер екінші антигендерге қызмет етеді. (сур. 2).

**Антиденелердің маркировкалаудың тәсілдері**

* Антиденелердің маркировкасы келесідей заттардың топтарының бірімен байланыстыру арқылы жүзеге асады:
* флуоресцентты бояғыштар (родамин, флуоресцеин);
* ферменттер (сілтілі фосфатаза, хрен пероксидазасы) — әрі қарай гистохимиялық жолмен анықталады;
* электронды-тығыз бөлшектер (коллоидты алтын, ферритин).

**Практикалық қолданылуы**

* жекелеген маркерлік белгілері бойынша әртүрлі типтердің клеткаларын идентификациялауда;
* синтетикалық және секреторлық процестерді зерттеуде;
* оларға сай келетін гормондар мен рецепторларды анықтауда.

**15 Дәріс Сандық гистохимия**

Қазіргі кезде сапалық тәсілдермен бірге ұлпалар мен клеткалардағы түрлі заттардың мөлшерін анықтайтын **сандық гистохимиялық әдістер** қолданылып жүр Гистохимиялық әдістер мұздатылған кесінділерді бояу кезінде жиі қолданылады, бірақ та парафинді кесінділерді де пайдалануға болады. Соңғы жылдары гистохимиялық тәсілдерді электронды микроскопиялық әдіспен бірге жүргізу, болашағы мол жаңа бағыттың — электронды гистохимияның дамуына әкеліп соқты.

Биологиялық жүйелердің қүрылысы мен функциясы жөніндегі толық мәліметтерді алу үшін құрылымдарды тірі күйінде зерттеу керек. Гистохимиялық әдістер мұздатылған кесінділерді бояу кезінде жиі қолданылады, бірақ та парафинді кесінділерді де пайдалануға болады. Соңғы жылдары гистохимиялық тәсілдерді электронды микроскопиялық әдіспен бірге жүргізу, болашағы мол жаңа бағыттың — электронды гистохимияның дамуына әкеліп соқты.