**Лабораторное занятие№ 1.**

Тема: Методы приготовления препаратов для количественных цитохимических исследований (препараты-мазки, отпечатки, пленочные препараты). Фиксаторы, используемые в количественной цитохимии.

**Учебные вопросы занятия:**

1. Методы приготовления препаратов для световой микроскопии. Виды микропрепаратов.
2. Основные этапы приготовления гистологического препарата.
3. Световая микроскопия. Техника микроскопирования в световых микроскопах.
4. Особенности микроскопии в ультрафиолетовых лучах, фозовоконтрастная микроскопия, микроспектрометрия, цитофотометрия, интерференционная и люминисцентная микроскопия.
5. Метод темного поля. Цейтраферная микросъемка.
6. Электронные микроскопы просвечивающего и сканирующего типов. Мегавольтная электронная микроскопия.
7. Дифференциальное центрифугирование. Авторадиография.
8. Цитохимические методы исследования.
9. Методы исследования живых клеток.

**Место проведения занятия** – Лаборатория экооксикологии ком. 318. база кафедры биоразнообразия и биорусурсов.

**Материально-лабораторное обеспечение: гистологическая** лаборатория с наличием реактивов и оборудования, слайды, таблицы, муляжи, гистологические микропрепараты, микроскопы, плазменные панели, ноутбук, презентация занятия.

**1.При подготовке к данному занятию**

Необходимо проработать рекомендованную литературу по дисциплине. При этом необходимо обратите внимание на следующее:

а)существует определенный порядок приготовления гистологических микропрепаратов клеток, органов и тканей,

б)для исследования структур организма используются различные виды микроскопов, цитохимические методики и методы исследования живых культур

При необходимости воспользуйтесь аннотацией (приложение 1).

**Приложение №1.**

Основным объектом исследования являются гистологические препараты, приготовленные из фиксированных структур. Препарат может представлять собой ***мазок*** (например, мазок крови, костного мозга, слюны, спинномозговой жидкости и др.), ***отпечаток*** (например, селезенки, тимуса, печени), ***пленку*** из ткани (например, соединительной или брюшины, плевры, мягкой мозговой оболочки), тонкий ***срез.*** Наиболее часто для изучения используется срез ткани или органа. Гистологические препараты могут изучаться без специальной обработки. Например, приготовленный мазок крови, отпечаток, пленка или срез органа могут сразу рассматриваться под микроскопом. Но вследствие того, что структуры имеют слабый контраст, они плохо выявляются в обычном световом микроскопе и требуется использование специальных микроскопов (фазово-контрастные и др.). Поэтому чаще применяют специально обработанные препараты: фиксированные, заключенные в твердую среду и окрашенные.

Процесс изготовления гистологического препарата для световой и электронной микроскопии включает следующие основные этапы:

а) взятие материала и его фиксация,

б) уплотнение материала,

в) приготовление срезов,

г) окрашивание или контрастирование срезов.

Для световой микроскопии необходим еще один этап — заключение срезов в бальзам или другие прозрачные среды.

***Фиксация*** обеспечивает предотвращение процессов разложения, что способствует сохранению целостности структур. Это достигается тем, что взятый из органа маленький образец либо погружают в фиксатор (спирт, формалин, растворы солей тяжелых металлов, осмиевая кислота, специальные фиксирующие смеси), либо подвергают термической обработке. Под действием фиксатора в тканях и органах происходят сложные физико-химические изменения. Наиболее существенным из них является процесс необратимой коагуляции белков, вследствие которого жизнедеятельность прекращается, а структуры становятся мертвыми, фиксированными. Фиксация приводит к уплотнению и уменьшению объема кусочков, а также к улучшению последующей окраски клеток и тканей.

***Уплотнение материала***, необходимое для приготовления срезов, производится путем пропитывания предварительно обезвоженного материала парафином, целлоидином, органическими смолами. Более быстрое уплотнение достигается применением метода замораживания кусочков, например, в жидкой углекислоте.

Приготовление срезов происходит на специальных приборах — микротомах (для световой микроскопии) и ультрамикротомах (для электронной микроскопии). Смотри ссылку - приборы для изготовления срезов.

***Окрашивание срезов*** (в световой микроскопии) или напыление их солями металлов (в электронной микроскопии) применяют для увеличения контрастности изображения отдельных структур при рассматривании их в микроскопе. Методы окраски гистологических структур очень разнообразны и выбираются в зависимости от задач исследования.

**Гистологические красители** (по химической природе) подразделяют на ***кислые, основные и нейтральные***. В качестве примера можно привести наиболее употребительный основной краситель гематоксилин, который окрашивает ядра клеток в фиолетовый цвет, и кислый краситель — эозин, окрашивающий цитоплазму в розово-желтый цвет. Избирательное сродство структур к определенным красителям обусловлено их химическим составом и физическими свойствами. Структуры, хорошо окрашивающиеся кислыми красителями, называются оксифильными, а окрашивающиеся основными — базофильными. Например, цитоплазма клеток чаще всего окрашивается оксифильно, а ядра клеток – окрашиваются базофильно. Структуры, воспринимающие как кислые, так и основные красители, являются нейтральными (гетерофильными). От окраски следует отличать импрегнацию — ***специальный метод***, основанный на способности определенных участков клеток и тканей восстанавливать тяжелые металлы (например, серебра, золота, осмия) из их солей и за счет этого приобретать интенсивную окраску. Некоторые ткани можно рассмотреть, используя ***специальные красители***. Так, например, для выявления эластических волокон применяют такие специальные красители, как пикрофуксин или орсеин.

Окрашенные препараты обычно обезвоживают в спиртах возрастающей крепости и просветляют в ксилоле, бензоле, толуоле или некоторых маслах. Для длительного сохранения обезвоженный гистологический срез заключают между предметным и покровным стеклами в канадский бальзам или другие вещества. Готовый гистологический препарат может быть использован для изучения под микроскопом в течение многих лет.

**Артефакт** (от лат. Artefactum - искусственно сделанное) - процесс или образование, несвойственные организму в норме и вызываемые самим методом его исследования. В микроскопии к артефактам относят, например, образования, появляющиеся в тканях или клетках в ходе обработки препарата (заливки, изготовления срезов, фиксации, окраски. В рентгенодиагностике артефакты обнаруживаются на снимках в виде посторонних теней, возникающих, например, в результате технических погрешностей при обработке плёнок или неправильном их хранении.

**Микроскоп** - это устройство, предназначенное для наблюдения и регистрации изображений мелких объектов, невидимых невооружённым глазом. Процесс использования микроскопа называют микроскопией. Во всех областях науки и практики широко используются различные типы микроскопов: оптические, электронные, акустические, голографические. Для специальных исследований служат следующие виды микроскопов: поляризационные, люминесцентные, интерференционные, фазово-контрастные, стереоскопические, проекционные, рентгеновские, инфракрасные, телевизионные и др.

**Световая микроскопия**.

***Микроскопирование*** — основной метод изучения препаратов — используется уже более 300 лет. Современные микроскопы представляют собой разнообразные сложные оптические системы, обладающие высокой разрешающей способностью и позволяющие изучать очень тонкие детали строения клеток и тканей. Чем меньше длина световой волны, тем меньше разрешаемое расстояние и тем меньшие по размерам структуры можно видеть в препарате (т.е. выше «разрешение» микроскопа). Понятие «увеличение микроскопа» относится к его оптической системе и выражается в произведении увеличений объектива и окуляра. Однако «разрешение» микроскопа зависит от характеристик объектива и не зависит от окуляра.

Для изучения гистологических препаратов чаще применяют обычные световые микроскопы различных марок, когда в качестве источника освещения используют естественный или искусственный свет. Минимальная длина волны видимой части спектра света соответствует примерно 0,4 мкм (фиолетовый спектр). Следовательно, для обычного светового микроскопа разрешаемое расстояние равно приблизительно 0,2 мкм, а общее увеличение (произведение увеличения объектива на увеличение окуляра) достигает 2000 раз.

**Ультрафиолетовая микроскопия** - разновидность световой микроскопии. В ультрафиолетовом микроскопе используют более короткие ультрафиолетовые лучи с длиной волны около 0,2 мкм. Разрешаемое расстояние здесь составляет приблизительно 0,1 мкм. Полученное в ультрафиолетовых лучах невидимое глазом изображение преобразуется в видимое с помощью регистрации на фотопластинке или путем применения специальных устройств (т.к. люминесцентный экран, или электронно-оптический преобразователь).

**Фазово-контрастная микроскопия**. Этот метод служит для получения контрастных изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при обычных методах микроскопирования. Для изучения препаратов в обычном световом микроскопе необходимая контрастность структур достигается с помощью окрашивания. Метод фазового контраста обеспечивает необходимую контрастность изучаемых неокрашенных структур за счет специальной кольцевой диафрагмы, помещаемой в конденсоре, и так называемой фазовой пластинки, находящейся в объективе. Такая конструкция оптики микроскопа дает возможность преобразовать не воспринимаемые глазом фазовые изменения прошедшего через неокрашенный препарат света в изменение его амплитуды, т.е. яркости получаемого изображения. Повышение контраста позволяет видеть все структуры, различающиеся по показателю преломления. Разновидностью метода фазового контраста является метод фазово-темнопольного контраста, дающий негативное по сравнению с позитивным фазовым контрастом изображение.

**Микроспектрометрия** базируется на измерении с субмикронным пространственным разрешением и анализе в каждой точке сканируемого объекта полных спектров флуоресценции.

**Цитофотометрия** - один из методов количественной цитохимии, позволяющий определять химический состав клеток в гистологическом препарате по поглощению света клетками. Через препарат пропускают монохроматическое излучение (свет) в виде пучка, диаметр которого соизмерим с диаметром клетки или внутриклеточной структуры.

**Интерференционная микроскопия**, метод исследования структуры различных, главным образом биологических, объектов и измерения их сухой массы, толщины и показателя преломления. Интерференционная микроскопия основана на интерференции света и осуществляется с помощью интерференционного микроскопа. Метод интерференционного контраста (интерференционная микроскопия) состоит в том, что каждый луч раздваивается, входя в микроскоп. Один из полученных лучей направляется сквозь наблюдаемую частицу, другой — мимо неё по той же или дополнительной оптической ветви микроскопа. В окулярной части микроскопа оба луча вновь соединяются и интерферируют между собой.

**Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия**. Явления флюоресценции заключаются в том, что атомы и молекулы ряда веществ, поглощая коротковолновые лучи, переходят в возбужденное состояние. Обратный переход из возбужденного состояния в нормальное происходит с испусканием света, но с другой, большей длиной волны. В флюоресцентном микроскопе в качестве источников света для возбуждения флюоресценции применяют ртутные или ксеноновые лампы сверхвысокого давления, обладающие высокой яркостью в области спектра 0,25—0,4 мкм (ближние ультрафиолетовые лучи) и 0,4—0,5 мкм (сине-фиолетовые лучи). Длина световой волны вызванной флюоресценции всегда больше длины волны возбуждающего света, поэтому их разделяют с помощью светофильтров и изучают изображение объекта только в свете флюоресценции. Различают собственную, или первичную, и наведенную, или вторичную, флюоресценцию. Любая клетка живого организма обладает собственной флюоресценцией, однако она часто бывает чрезвычайно слабой. Вторичная флюоресценция возникает при обработке препаратов специальными красителями — флюорохромами. Таким образом, спектральный состав излучения несет информацию о внутреннем строении объекта, его химическом составе. Вариант метода флюоресцентной микроскопии, при котором и возбуждение, и излучение флюоресценции происходят в ультрафиолетовой области спектра, получил название метода ультрафиолетовой флюоресцентной микроскопии.

Кроме перечисленных методов, для специальных целей применяются микроскопия в темном поле при изучении живых объектов, в падающем (отраженном) свете для рассмотрения толстых объектов, поляризационная микроскопия для изучения архитектоники гистологических структур – в поляризованном свете.

В учебных видеофильмах широко используются специальные виды съемок - **цейтрафер** (замедленная съемка) и рапид (ускоренная съемка ). Эти виды специальных съемок дают возможность рассмотреть на экране те процессы или явления, которые не доступны для прямого восприятия человеческим глазом. ***Цейтраферная киносъемка*** - покадровая съемка с заданными интервалами времени медленно протекающих процессов: рост кристаллов, раскрытие бутонов цветов и т. п. В зависимости от характера и длительности изучаемого процесса кинонаблюдение за ним может длиться от нескольких часов до нескольких суток и даже недель. Съемка производится автоматически, с помощью цейтраферного устройства, которое включает осветительные приборы и кинокамеру с необходимой задержкой через точно рассчитанные интервалы времени.

**Электронный микроскоп просвечивающего типа** - прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 106 раз, благодаря использованию, в отличие от оптического микроскопа, вместо светового потока пучка электронов. Разрешающая способность электронного микроскопа в 1000÷10000 раз превосходит разрешение светового микроскопа и для лучших современных приборов может быть меньше одного ангстрема. Для получения изображения в электронном микроскопе используются специальные магнитные линзы, управляющие движением электронов в колонне прибора при помощи магнитного поля.

**Сканирующие электронные микроскопы** - класс микроскопов для получения изображения поверхности и её локальных характеристик. В общем случае позволяет получить трёхмерное изображение поверхности (топографию) с высоким разрешением.

 **Мегавольтная электронная микроскопия**, основанная на применении приборов с ускоряющим напряжением 1-3 млн. вольт, позволяет просматривать образцы тканей большой толщины (1-10 мкм)

Строение и состав органоидов клетки изучают с помощью **метода** **центрифугирования**. Измельченные ткани с разрушенными клеточными оболочками помещают в пробирки и вращают в центрифуге с большой скоростью. Метод основан на том, что различные клеточные органоиды имеют разную массу и плотность. Более плотные органоиды осаждаются в пробирке при низких скоростях центрифугирования, менее плотные - при высоких. Суть метода фракционирования (дифференциального центрифугирования) клеток заключается в получении из клеток изолированных структурных компонентов. Основан на разных скоростях осаждения этих компонентов при вращении гомогенатов клеток в ультрацентрифугах. Данный метод сыграл и играет очень важную роль в изучении химического состава и функциональных свойств субклеточных элементов — прежде всего, органелл.

**Авторадиоавтография** — важный информативный метод, позволяющий изучать распределение в клетках и тканях веществ, в состав которых искусственно введены радиоактивные изотопы. Введенный в организм животного (или в среду культивирования клеток) изотоп включается в соответствующие структуры (например, меченый тимидин — в ядра клеток, синтезирующих ДНК). Применение меченных тритием предшественников нуклеиновых кислот (тимидина, аденина, цитидина, уридина) позволило выяснить многие важные аспекты синтеза ДНК, РНК и клеточных белков.

**Гисто- и иммуноцитохимические методы**. В их основе лежит применение химических реакций для выявления распределения химических веществ в структурах клеток, тканей и органов. Современные гистохимические методы позволяют обнаруживать аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, различные виды углеводов, липидов и др. Для выявления специфических белков используют иммуноцитохимические реакции. Для этого получают специфические сыворотки, содержащие антитела (например, против белка микротрубочек — тубулина). Далее химическим путем соединяют эти антитела с флюорохромом (или другим маркером). Если меченые антитела нанести на гистологический срез, они вступают в соединение с соответствующими белками клетки и возникает специфическое свечение, видимое в люминесцентном микроскопе. Современные иммуноцитохимические методы, помимо флюорохромов, используют другие самые разнообразные специфические маркеры, позволяющие качественно и количественно оценивать содержание в клетке исследуемых соединений. Модификацией рассматриваемого метода является введение меченых антител в цитоплазму живых клеток с помощью микроманипуляторов.

Широко используют **метод культуры клеток и тканей**, который состоит в том, что из одной или нескольких клеток на специальной питательной среде можно получить группу однотипных животных или растительных клеток и даже вырастить целое растение. С помощью этого метода можно получить ответ на вопрос, как из одной клетки образуются разнообразные ткани и органы организма.

**Прижизненное (витальное) окрашивание** в микроскопии — окрашивание организмов или живых препаратов их тканей для повышения контраста при наблюдении под микроскопом. Прижизненная окраска позволяет наблюдать одновременно строение и функционирование организмов, клеток и тканей. Иногда витальным окрашиванием называют также введение красителя в живой организм, с дальнейшим его умерщвлением и приготовлением микропрепарата. Ряд методов витального окрашивания микроорганизмов разработан и применяется в микробиологии.

**Рекомендуемая литература:**

ЛИТЕРАТУРА: Основная:

1. Ченцов, Ю.С. Введение в клеточную биологию: Учебник для вузов /Ю.С.Ченцов. – М.: ИКУ «Академкнига», 2005. – 495 с.
2. Верещагина, В.А. Основы общей цитологии: Учебное пособие для студентов высш.учеб. заведений /В.А.Верещагина. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 176 с.
3. Гистология /Под ред. Афанасьева.- М.: Медицина, 2001.
4. Лекции.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

* + - 1. Гистология. Атлас для практических занятий: учеб. пос. / Н.В. Бойчук, P.P. Исламов, С.Л. Кузнецов, Ю.А. Челышев.- М.: ГЭОТАР-Медиа 2008.-160с. ( ЭБС «Консультат студента»)
			2. Гистология. /под. ред. Э.Е. Улумбекова, Ю.А.Челышева.-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.-160с. (ЭБС «Консультат студента»).
			3. Руководство по гистологии: в 2-х т./ под редакцией Р.К. Данилова.- 2-е изд.- СПб: СпецЛит, 2010.- Т.1 (ЭБС «Консультант студента»).
			4. Руководство по гистологии: в 2-х т./ под редакцией Р.К. Данилова.- 2-е изд.- СПб: СпецЛит, 2010.- Т.2 (ЭБС «Консультант студента»).
			5. Мирзоян Э.Н. Развитие основных концепций эволюционной гистоло­гии . - М: Наука, 1980.
			6. Сравнительная гистология: Учебник / Под ред. О.Г. Строевой. – СПб: Изд-во С. –Петерб. Ун-та, 2000. – 520 с.