**ҚАЗІРГІ ЗАМАНҒЫ БИОЛОГИЯДАҒЫ**

**ЦИТОГИСТОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУ ӘДІСТЕРІ**

**1 ЛЕКЦИЯ.**

 Пәннің мақсаты – цитологиялық және гистологиялық құрылымдарды оқытудың негізгі әдістерімен таныстыру. Материалды дайындау,оны бекіту(фиксациялау), кесінділер дайындау және оларды бояу әдістерін микроскоп арқылы зерттеуді үйрету сұрақтары қарастырылады. Сонымен қатар клетканың құрамының сақталуын және ұлпаның химиялық құрамын зерттейтін гистохимиялық сұрақтар қарастырылады және клетка құрылымындағы, клетка типтеріндегі, ұлпаның арнайы компоненттеріндегі химиялық заттарды оқшаулап бөліп алу әдістері қарастырылады.

Гистологиялық материалдарды өңдеу әдістері келесі этаптардан тұрады: 1) материалды алу;

1. материалды бекіту (фиксациялау);

3) материалға сіңдіру(пропитка);

 4) кесінді дайындау;

5) материалды бояу.

 **МАТЕРИАЛДЫ АЛУ НЕМЕСЕ ДАЙЫНДАУ**

Ұлпаларды және ағзаларды (орган) микроскопиялық зерттеу барысында ең маңыздысы материалды алу техникасы болып табылады. Материалды алу барысындағы негізгі ереже гистологиялық зерттеу жасау кезінде қателіктер жібермеу қажет.

* Ағзалар (орган) бөліктерін өткір пышаөпен немесе бритвамен кесіп алу керек;
* Ұлпалардың жиырылып қалмауы үшін қайшыны пайдалануға болмайды;
* Бөліктерді мыжуға, бетін қыруға, сүртуге болмайды, әсіресе шырышты және ұйыма қабатын; серозную оболочки.
* Бөліктерді қалыңдығы 0,5-1 см., және көлемі әр түрлі (әдетте 1-1,5 см.) осындай түрлі мөлшердегі есептеумен болуы мүмкін, нәтижесінде алынатын кесінді стандарттық жабынды әйнекке толығымен дұрыс орналасуы керек. Ұлпаның тереңдігіне фиксатордың баяу біртіндеп енуіне байланысты зерттеуге алынатын кесінді бөлігі қалың болмауы тиіс;
* Бөліктер бірден өңдеу (фиксация) сұйықтығына салынады. Өңдеу алдында бөліктерді сумен шаюға болмайды.

**МАТЕРИАЛДЫ ӨҢДЕУ (ФИКСАЦИЯ)**

Материалды өңдеу - ұлпаның құрылымының реттелуі мен оның тығыздалуын қамтамасыз етеді. Бұл мақсатта орындалудың екі әдісі бар:

1. Материалды консервілеуде терең ұзақ уақытқа мұздату әдісі;
2. Химилық өңдеу әдісі.

**Ұлпаны консервілеу әдісі**

1. **Леофильді құрғату әдісі (мұздату-құрғату)** Бұл әдіс бойынша - ұлпадағы физикалық және химиялық өзгерістердің болуына ұшыратпайтын химиялық өңдеу мен ұлпаны сусыздандыру әдісін пайдаланбай -ақ, мұздату әдісі арқылы толықтай тіршілік процесін тоқтатуға мүмкіндік болады. Осы әдістің негізінде тез ерігіш заттарда толығымен немесе барлыңы да шеттейді. Бұл әдістің нәтижесінде ұлпадан судың шығуы - еш заттың жоғалмауы және араласпауынсыз өтеді, сонымен қатар ұлпаның құрылымында денатурациялану болмайды.

Бірақ техикалық қиыншылықтар болады. Бұл әдіс үш этаптан тұрады:

1. Ұлпаны мұздату;
2. Мұздатылған ұлпадан судың шығуы немесе сублимациясы
3. Құрғатылған ұлпаға парафиннің сіңуі

**Ұлпаны мұздату**

Ұлпаны тездетіп мұздату арқылы - тіршілік циклінің толықтай тоқтатылуына және ұлпаның құрылымының қалыпты болып қалуға мүмкіндік береді. Химиялық және морфологиялық өзгерістер болмайды. Ұлпаның кесіндісі немесе тіліндісі арнайы сұйықтықта өтеді, мысалы изопентадда, н-пентанда немесе фреонда, әсіресе 1800С-тағы сұйық азотта салқындату.Осының нәтижесінде көп уақытқа және ұлпадағы судың тереңдетіліп мұздатылуы өтеді. Мұндай жағдайда мұздатылған ұлпаның құрамын бұзатын ірі мұз криссталдары қалыптаспайды. Көптеген ұсақ мұз кристалдарының бірқалыпты жайылуы, керісінше ұлпаның құрылымының сақталуына әкеледі. Ірі көлемдегі кесінділерді мұздатуға да болмайды.

**Ұлпаны құрғату.**

Құрғату процесі 2 фазадан тұрады: негізгі құрғату және қорытынды құрғату. *Негізгі құрғату* процесі кезінде ұлпадағы кристалдық мұз түріндегі су(98-99 % ұлпадағы барлық су) құрғатылады немесе сорғиды. Қалған ылғалдылық (2-4%) жоғарғы температурада *қорытынды құрғату* кезінде кеуіп кетеді.

Негізгі құрғату процесінің нәтижесі температура мен қысымға байланысты. Құрғату ұзақтығы температура режиміне байланысты: мұздатылған ұлпадағы біршама жоғарғы температура бу қысымының жоғары болуына әкеледі, бұл жағдайда тезірек құрғау әдісі жүреді. Құрғату процесі кезінде материалдың еріп кетуін тудырмау қажет, себебі ол ұлпа құрылымының араласып кетуіне әкеледі.

Құрғату температурасын таңдау барысында, клеткадағы және клеткааралық аймақтағы ерітіндінің концентрациясындағы тұздың мөлшеріне байланысты мұздатылу нүктесінен шығарылады. Судың булануы нәтижесінде, құрғатылу процесі кезіндегі тұздың концентрациясы әруақытта жоғарылайды, мұздатылу нүктесі төмендейді.

Тұздың концентрациясына байланысты ерітіндінің мұздатылуының минимальді температурасы эфтективтік нүкте ретінде анықталады. эвтектическая точка. Практикалық жағынан бұл нуктедегі су ерітіндідегі заттармен қаныққан. Құрғатудың оптимальді режимі, тек парафинге құйғанға дейінгі ұлпадағы температура деңгейі эфтектикалық нүктеден төмен болған жағдайда жүзеге асады. Арнайы температура интервалы -450С тан -550С-қа дейін. Органикалық емес тұзға бай ағзалар -550С – та құрғатылады. 45 пен -600С тан жоғары температурада вакуум 10 – 3 мм рт. ст. қажет.

Эвтектикалық нүктеден төмен құрғату процесі кезіндегі ұлпаның температурасын - салқындату қоспасының көмегі арқылы немесе Пельтеье элементі арқылы реттеп отырады. Салқындатқыш қоспа ретінде - ацетон қоспасы – құрғақ мұз, спирт – құрғақ мұз, этилоксалат – көмірқышқыл, нонан – изопропилдік эфир, сонымен қатар қатты көмірқышқыл газын қолданылады. Алдыңғы екі қоспаның температурасын құрғақ мұздың дозасымен реттеп отыруға болады.

**Құрғатылған ұлпаны құю әдісі (Заливка)**

Құрғатылған материалды келесідей құю ортасына отырғызуға болады: парафин, поливаксы (мысалы, акваффин, карбовакс 1000, 1500, 4000), целлоидин, және парафинмен целоидиннің қосындысы. Поливаксада құю (карбо және оксид-ваксы) әдісін липидтерді зерттеуде қолданылады, ал парафиндік құю кезінде олардың жоғалып кетуі немесе араласып кетуі мүмкін. Табиғи емес смолдар, мысалы, метакрилат, құрғатылған ұлпаны құю әдісінде біршама тиімсіз болып табылады, себебі ұлпа құрылымының бұзылуына әкеледі.

Құрғатылған зерттеу обьектісінің сіңірілуі құрғатылуға арналған аппаратта немесе арнайы құю ортасы бар арнайы (сосуде) сорғығыш аппаратта жүргізіледі. Құрғатылуға арналған аппаратқа құю барысында парафинді сорғыш сулы буда (баня) қыздырылады. Екінші әдіс кезінде ұлпа құрғатудан кейін бөлме температурасына дейін ериді де материалдың жылжып кетпеуі орын алады.

Құйылған парафиндік блоктарды ауаның қоздырғыштарынан қорғау үшін Cacl2 эксикаторында сақтау қажет. Блоктардытоңазытқышта сақтау кезінде ферменттік активтілік бірнеше аптаға сақталады.

**Құрғатылған ұлпаны кезекті келесі өңдеу әдісі**

Мұздатылған жағдайдағы құрғатылған обьектілерден кесінді дайындау барысында, сумен кесінді байланысын толық болдырмау керек, сонымен қатар кесіндінің ауамен байланысын да қысқарту қажет. Бұл жадай кесінді ( лентасын) құрғақ заттық шыныға отырғызу кезінде орындалады. Парафинде лентаны (кесіндіні) тегістеу алдын ала қыздырылған заттық шыныда (пинцет) қысқыштың көмегі арқылы өтеді, қажет болса кесіндіні кисточкамен тегістейді. Тегістегіш орта ретінде жылы минералды майды қолдануға болады.

Парафиннен бөліп алу ксилолда, петролейнді эфирде немесе изопентанда жүргізіледі. Содан кейін еріткіш жоғалып кетеді және сол жоғалып кету тек булану әдісі арқылы өтеді, құрғатылған және парафиннен бөлініп алынған кесінді ары қарай өңдеуге дайындалады. Бұл өңдеудің 3 варианты бар:

1. Ұлпа кесінділерін реакциялық қоспаға орналастыру. Реакция нәтижесінде зерттелетін зат ерімейтін өнім болады.
2. Сулы ерітіндіге ұлпаны орналастыру алдында оны құрғақ қңдеу әдісінен өткіземіз (мысалы, қыздыру немесе бумен өңдеу арқылы)
3. Сіңірілген ұлпа кесіндідегі гистохимиялық бөліп алу әдісінің жүргізілуі (мысалы, радиоавтография)
4. **Мұздату – құрғату әдістерін қолдану мүмкіншіліктері**

 Бұл әдістің қолданылуы, тек қана төмен концентрациядағы ұлпада болатын заттардың жоғалып кетпеуін және ұлпадағы жұқа құрылымдардың нақты сіңірілуі үшін қажет. Соған қарамастан, бұл әдіс радиоавтографилық зерттеулерде көрінетін цитофотометрияда және ультракүлгін сәуледе, рентгендік гистоспекторграфияда, электорнды микроскопияда қолданылады.

 Нерв жүйесіндегі биогендік аминдердің сіңірілуін зерттеуде мұздату–құрғату әдісі нақты үлкен жетістікке жетті. Биогендік аминдер санының біршама бөлінуі – жұқа өскіндерде ақырын, асықпай құрғату кезінде жүзеге асқан.

1. **Мұздату жағдайындағы орналастыру әдісі**

Алдымен мұздатылған материалды температурасы -20 дан -50 0С-қа дейінгі (немесе төмен) өңдейтін немесе сіңірілетін сұйықтыққа орналастырады, мысалы, этанол, метанол, эфир, хлороформ, ацетон, гликоль немесе этанол қоспасы бар ацетон. Екі жақты диффузия нәтижесінде судың мұзға айналып сұйықтыққа орналастырылуы жүреді. Орналастырылатын сұйықтық мұзды ерітетін орта болып табылады. Ұлпаны ерітетін суға орналастыру процесі бірнеше күн жүреді. Орналастыру сусыз ортада өтетіндіктен, ұлпаның сіңірілуі немесе құрғатылуы болады. Бұл процесс соңына дейін тек, егер қайтадан мұздатылған сұйықтыққа орналастыру кезінде ғана жүреді.

 Бл процесс ұлпа кесіндісі орналастырылған сұйықтықта сіңірілгеннен кейін ғана (3-4 күннен соң) аяқталды деуге болады. Мұздатылған жағдайдағы орналастыру ұзақтығы процестің өтуіне байланысты ерітінді түрі тандалғанына және температураға байланысты. Келесі парафинде немесе басқа ортада өңдеу жоғары температурада жүргізіледі. Келесі құрылымның бұзылуын болдырмау үшін суық ортадан жылы ортаға ауысу кезінде (-20 дан -500С-қа) дейінгі температурада орналастыру жүргендіктен, 75 %-тік спиртке орналастырады және содан кейін біртіндеп температураны бөлме температурасына дейін жоғарылатады. Осыдан кейін абсолютті этанол арқылы кәдімгі жай сіңірілу және парафинге өңдеу жүргізіледі.

 Бұл әдістің маңыздылығы сол, алдыңғы әдістерге қарағанда қарапайым. Кемшілігі, бұл әдіс табиғи жағынан алғанда -800С-қа жуық температурада тоқтайды немесе жай жүретін химиялық өңдеуден өтеді. Осыдан басқа, құрғатылу және өңдеу кезінде пайдаланылатын орта төмен температура кезінде де сұйық болып қала береді.

 Осы айтылған әдіс гликоген мен клетка органеллаларының жақсы сақталуын қамтамасыз етеді. Орналастыру процесі кезіндегі заттардың жоғалуы да болмайды. Бұл әдіс гидролитикалық және қышқылданатын ферменттер, мысалы сілтілер, қышқыл фосфотаза, АТФаза, 5-нуклеотидаза, аминопептидаза, түрлі дегидрогеназалар мен диофоразаларды бөліп алуда жүргізіледі.

1. **Мұздатылған кесіндіні алу әдісі**

 Бұл әдісте обьекті кесуге өте ыңғайлы болып саналады, себебі ұлпадағы судың мұзға айналуынан тиімді жүргізіледі. Құрылымның сақталуы үшін, шешуші мәселе - тездетіп мұздату және мұз кристалдарына айналу өте маңызды болып табылады. Мұздату әдісі ереже бойынша, баллоннан кішкене тесік арқылы өтетін сұйық көмірқышқылдың булануы процесі кезіндегі жылуды өткізгеннен кейін ғана жүргізіледі.

 Шамамен бірдей қалыңдықтағы мұздатылған кесіндіні дайындау әдісі, арнайы көмірқышқылгазы арқылы қосымша мұздатылған пышақтың көмегімен жүзеге асады. Мұздатылған пышақпен дайындалған кесіндіні инкубациялық немесе өідейтін ортаға отырғызады, немесе дистилденген суға, немесе заттық шыныға отырғызады. Пышақтағы кесіндіні заттық шыныға ауыстыру үшін , тек пышақтағы жабысқан кесіндіні ғана отырғызуға болады. Алдағы өңдеу жұмыстарын жүргізу кезіндегі сұйықтықта ортаның беткі қабатындағы жайылудан соң, кесіндіміз кейде ұсақ фрагменттерге тарап кетуі мүмкін. Осындай жағдайды болдырмау үшін, инкубациялық ортаға 7,5 % поливинилпирролидон және 1-2 тамшы Твин 20 немесе Твин 40- ты қосу керек. Бөлмедегі ауаның ылғалдылығы және жоғары температурада қиыншылықтар туындайды. Мұндай қажеттілік кесу кезінде бірден сыртқы факторлардың әсерінен болады.

1. **Криостатты пайдалану әдісі**

Бұл әдіс алдыңғы әдісті толықтыру болып табылады. Обьектіні кесу жұмысы температурасы (-10 нан -30 0С-қа) дейінгі реттелетін термикалық жабық (изолированный) камерада өтеді. Бұл кесіндінінің келесі құрылымының еріп кетпеуін е жол бермейді. Тұрақты әр кезде кесіндіні дайындау жағдайы түрлі қалыңдықтағы және түрлі көлемдегі сериялық кесінділер алуға мүмкіндік жасайды. Арнайы криостаттарда толығымен лабораториялық жағдайдағы жануарлардың кесіндісін дайындауға болады. Алынатын кесіндінің қалыңдығы 10-40 мкм-ге тең болады.

**2 ЛЕКЦИЯ**

**ХИМИЯЛЫҚ ӨҢДЕУ**

Химиялық өңдеудің мақсаты - «өлтіру», арқылы мүмкіндігінше тірі кезіндегідей құрылымдық жағдайын реттеу. Бірақ химиялық өңдеудің нәтижесінде ұлпада басқа клетка заттары енеді. Олар клетка компоненттерімен байланыс орнатады да, оның құрылымындағы заттарының өзгеруіне әкеледі. Сонымен қатар өңдеу процесі бояғыштармен байланысты және де содан кейін клеткаларының боялатын топтарын босатады .

Цайгер өңделетін заттарды: ақуыздардың тұнбалары (осадители) (каогуляторы) мен липидтердің реттеуіштеріне (стабилизаторы) бөледі. *Ақуыздардың каогуляторларына:* спирт, ацетон, пикринді және уксус қышқылдары, ауыр метал тұздары, мысалы сулема жатады. Бұл өңдеуіштер қатты гидратациядан болған маскировкаға дейінгі болған құрылымдардың көрінуіне жағдай жасайды. Олар сонымен қатар, құрылымдық компоненттердің конгломерациясын тудыра отырып, көрінбей қалған заттардың субмикроскопиялық көлемінің құрылымын, субмикроскопиялық эквивалентті сипатына дейін ауыстыра алады.

*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.

**Өңдеуге әсер ететін факторлар**

**pH**

pH өңдейтін қоспа өңдеу процесіне өзінің әсерін тигізеді. Сутегі иондарының концентрациясы оның ұлпадағы тұрақты деңгейіне (шамамен pH 7,2) сәйкес келуі керек. Қышқыл ерітінділер клетканың ультрақұрылымын бұзады. Өңдегіш ортаның көп бөлігі қышқыл дық реакция береді. pH өңдеуішінің нейтральді деңгейге жетуі, оның өңдегіш қызметін нашарлатады. Қышқылдық өңдеу кезінде электронды микроскпияға қарағанда, жарық микроскопиясына құрылымның бұзылуы аз әсер етеді.

**Изотония**

Изотондық ұлпа ортасында ерітінді өңдеуіштерін қолдану, ұлпаның ісіп кетуін немесе сморщиваниені ыдырауы тиіс, бірақ оларды толық жойып жібермейді. Жарық оптикасымен зерттеу кезінде бұл мәселе маңызды емес, бірақ электронды микроскопияда керісінше болады. Ұлпадағы өңдегіш осмостық қысымның болмай қалуы, цитоплазматикалық вакуольдің және цитоплазманың негізгі заттарының құрылымына біршама кедергі туғызады. Мұндай жағдайда сахароза ерітіндісі пайдалы болып саналады. Ұлпаның жағдайына қарамастан, көбінесе 7,5 %-дық сахароза ерітіндісі қолданылады.

**Температура**

Көбінесе суық температурада ( 0 ден +40С-қа) өңдеу жұмыстары жүргізіледі. Осының негізінде мынадай қорытындылар шығады:

**1)** Тоңазытқыш жағдайындағы температурада ферменттік процесстер бірден бәсеңдейді; соған байланысты бөлме температурасындағы аутолиз процесі өңдеу жұмыстарымен салыстырғанда қиындайды. (подавляются)

**2)** Төменгі температураның әсерінен өңделінетін заттың диффузиясының жылдамдығы айтарлықтай өзгереді.

 Суықта өңдеу әдістері - энзимогистохимиялық зерттеу кезінде жарық микроскописы және электронды микроскопиялық деңгейінде де негізгі бір бөлімі болып қарастырылады. Жарық оптикалық деңгейіндегі заттардың гистохимиялық бөліп алуын қарастыратын болсақ, бұл кезде әдетте бөлме температурасында өңдеу қолайлы болып табылады.**Перфузиямен өңдеу**

Аутолитикалық процестердің бірден тоқтататылуына тек суықта өңдеу әдісі арқылы ғана, сонымен қатар заттың қанайналу жүйесін перфузиялау арқылы өңдеуге болады. Перфузия қысымын дұрыс қалыптастыру 10-20 минутта өтеді. Келесі болатын өңдеу әдістері - кішкене ұлпа кесіндісін сол өңделетін ортаға енгізу, тоңазытқыш температурасында 24 сағат бойы заттарды және тіршілік ету өміршеңдігін қалпына келтіруге болады. Перфузиямен өңдеу әдісі көп уақытты қажет етпейді және өте ыңғайлы болып саналады.

**Буда өңдеу әдісі**

Ұлпаның отырғызу қарқындылығы буда өңдеу кезінде реттеледі. Келесідей өңдеу агенттерін ұсынуға болады: формальдегид, акролеин, глутаральдегид, төртқышқылды осмия, глиоксильді қышқыл, хромилхлорид және этанол.

**Кейбір өңдегіш заттарды пайдалану мүмкіншіліктері**

**және әсер ету сипаты**

Өңдеу кезіндегі болатын процесстерді келесідей реттеп жазуға болады:

1. Тұнбаға түсіп, айқындалып тұратын клетка компоненттері мен көрінбейтін тұздардың қалыптасуы (пикринді қышқыл, формальдогид).
2. Ұлпа құрылымындағы компоненттер құрамының химиялық жиырылуы.(сшивание)
3. Зарядтардың өзгеруі, яғни клетка компоненттрерін құрайтын изоэлектрикалық нүктелер
4. Клетка компоненттерінің химилық өзгерістері
5. Заттардың хиимялық бұзылуы немесе ыдырау нәтижесінде болған химиялық байланыстардың санының өзгеруі
6. Ыдырау (Сморщивание) немесе ісіну нәтижесіндегі ұлпада болағн өзгерістер ( этанол немесе ацетон әсерінен болған кезде)
7. Белок құрылымының екіншілік немесе үшіншілік бұзылуының нәтижесінде гі ферменттік активтіліктің өзгерістері

Өңдеуші зат ретінде пайдаланатын заттар жөніндегі сипаты гистохимиялық зерттеулер нәтижесінің интерпретациясына қажет.

**Альдегидтер**

Альдегидтер өңдеу процестері кезінде құрылымның сақталып қалуына қажеттті көлденең байланыстар туғызады.

**1.Формальдегид.** Көршілес пептидтікбайланыстың арасында көпір жасап тұрады. Осылайша , формальдегид полимерлейтін өңдегіш зат болып саналады.

*Ол өзінің сутегі атомының әсерінен оксиметильді комплеккс түзеді:*

RH+CH2O ↔RCH2(OH)

*Содан кейін басқа сутегі атомының әсерінен метилендік көпір қалыптасады (- CH2-):*

RCH2(OH)+HR'↔R-CH2-R' +H2O

 Метилендік көпір гидролитикалық тотығуға( расшеплению) ұшырауы мүмкін. Формальдегидтің тұрақтандыру көрінісі ақуыздағы терең байланыстардың әсерінен көлденең жиырылуының қалыптасуынан анықталады. Формальдегид барлық аминотоптар қатарымен, аминдік және пептидтік қышқылдарға әсер етуі де немесе әсер етпеуі де мүмкін.

*Әсер ететін реакциялары:* аминдік-, иминдік-, гуадиндік, гидроксидтік, сульфигидрилдік топтармен, сонымен қатар аминдік және пептидтік қышқылдарымен де әсер етуі болады.

*Әсер етпеуші реакциялар:* тирозиннің ароматтық сутегісімен, трипотофанмен, фенилаланинмен, гистидинмен.

 Формальдегидті пайдалану барысында бұл фиксатор ақуыздардағы изоэлектрикалық нүктені қышқылдыққа жылжытады, ол метилденген бос аминдік топтардың болуымен түсіндіріледі.

**2. Глутаральдегид.**  Ұлпа мен клетка құрылымын сақтап тұрады.

H2C // CH2-CHO

 CH2-CHO глутаральдегид

Әсер ету механизмі оның тұрақты көлденең жиырылуының **(сшивание)** тұрақтылығы құрылымынң сақталуын қамтамасыз етеді. Одан басқа да, бұл фиксатордық қасиеттері - көпірлер қалыптастыру арқылы көршілес аминдік топтардың арасындағы бос орындарды толықтырып тұрады.

 Глутаральдегидтен басқа да электронды микроскопияда пайдаланатын негізгі диальдегидтер де өте жақсы жиырылу агенттері болып табылады. Диальдегитерде өңдеу процесі кезінде моноальдегидтерге қарағанда ақуыздардағы активті топтармен ғана әсер етпейді, сонымен қатар біруақытта молекуларарлық кқпір қалыптастырады.

 Өзінің құрылымды сақтауына байланысты альдегидтер келесідей реттеліп оранласуы мүмкін:

1. Өте жақсы өңдегіш қасиеттері бар альдегидттер: глутаральдегид, акролеин;
2. Қанағаттандырарлық өңдегіш қасиеттері бар альдегидтер: глиоксаль, метакролеин, кротональдегид, формальдегид;
3. Біршама қанағаттандырарлық өңдегіш қасиеттері бар альдегидтер: оксиадипинальдегид, пирувальдегид, ацетальдегид.

Бірақ альдегидтердің құрылымды сақтау қасиеттері ферменттік активтілікті сақтап қалу қасиетін әркезде реттеп отырмайды. Жақсы өңдегіш ретінде ферменттердің тұрақтылығы мен құрылымның сақталуын айқындап тұратын глутаральдегид болып саналады.

Глутаральдегидпен жұмыс жасау кезінде келесі мәселелерге көңіл бөлу қажет:

1. Глутаральдегид ерітіндісінде басқа қоспалар болмау керек, стандарттық ерітінділерді пайдалану ұсынылады;
2. Глутаралдьдегидпен және басқа да альдегидтермен pH деңгейінің физиологиялық оптимальді өңделуін қажет ететін жұмыстар жасаған уақытта, фосфатты және какодилантты буферлердің қөмегімен жүргізу қажет.
3. Ұлпаға глутаральдегидтің енуінің ақырын аз жылдамдықта өтуіне байланысты және түрлі қалыптасатын аймақтардың пайда болмауы үшін өңделетін кесінді қалыңдығы 2 мм-ге тең болуы керек. Келесі өңдеу уақытын (0 ден +40С-та 2-4 сағатта) перфузияның (10-30 мин) көмегі арқылы жақсы нәтижеге жетуге болады. Материалдың реттелуі мен жақсы контрастирования үшін забуферендік 1-2 % OsO4 ертітіндісінде өңдеу керек.

**Осмидің төртқышқылдануы**

Осмидің төрқышқылдануы клетканың субмикроскопиялық құрылымының жақсы сақталуын қамтамасыз етеді. Отырғызылатын өңдеу әдісі негізінен ақуыздарға когуляттайтын емес, (желатинизировать) еріту әсерімен байқалады. Осмидің төртқышқылдануы белоктармен немесе олардың аминқышқылдық топтарымен әсер етеді және әсіресе липидтермен жақсы байқалады.

Осмидің төртқышқылдануына қара тұнбаның қалыптасуымен болатын OsO4 қалпына келтіретін қаныққан липидтер ғана әсер етеді. Осмидің төртқышқылдануы өңдеуінен кейін липидтер сусыз ортада жақсы ери алмай қалады.

Осмимен өңдеуден кейінгі клеткадағы немесе ұлпадағы зерттеу кезіндегі қараю немесе тұнбаға түсу, ұлпадағы осмидің бір бөлігінің қайта қалпына келуімен түсіндіріледі. Осның нәтижесінде OsO4 активті констрасттайтын зат болып табылады.

*OsO4-ті пайдалау кезінде мынадай келесі мәліметтерге көңіл бөлу керек:*

1. OsO4-те өңдеу уақытының ұзақтығы тотығудың нәтижесінде тұрақты диэфирдің еруіне әкелуі мүмкін.
2. Ең алдымен NH2 топтарының бұзылуы немесе блоктау нәтижесінде OsO4 ұлпадағы ақуыздың изоэлектрикалық нүктесін қышқылдық ортаға жылжытады.
3. OsO4 биогенді аминдерге тотықсыздандыру әсерін тигізеді, бірақ полисахаридтерге және нативтік нуклеин қышқылдарына әсер етпейді.

Осмидің төртқышқылдануын негізінен ультраструктуралық және ультрагистохимиялық зерттеулер кезінде пайдаланады. OsO4-тік өңделу әсері мысалы, глутаральдегидпен бірге басқа да өңдегіш заттардың комбинациясы нәтижесінде қарқынды жүреді.

**Хромдық қышқылдар және хроматтар**

 Хромдық қышқылдар және калий хроматтары қанықпаған май қышқылдарын тотықсыздандырып, липидтердің реттелуіне әкеледі. Тотықсызданған липидтер тотықпсызданбағандарға қарағанда май қоспаларында аз ериді.

**Мыс тұздары. ( ртуть)**

 Мыс тұздары үшін келесі реакциялар жүреді:

1. Ақуыз топтарының қышқылдануы реакциясы, әсіресе карбоксильдермен және гидроксильдермен .
2. Нуклепротеидтердің фосфор қышқылымен байланысы
3. Күміс пен мыс атомдары арасындағы берік байланысты қалыптастыруға әкелетін SH- топтардың ұқсастығы (сродство)

Осылардың негізінде мыс ерітіндісімен өңдеу қышқыл топтар мен SH- топтардың гистохимиялық бөліну кезінде, сонымен қатар нуклеин қышқылдарының бөлінуінде де пайдалануға болмайды.

Құрамында мыс бар заттармен өңдеуді пайдалану кезінде, олардың басыннан алдымен ұлпаға тез еніп кетуін, содан кейін өте қиын аймақтар қалыптастыруын ескеру қажет. Соған байланысты өңдеу жұмыстарына өте кішкене кесінділерді алу керек. Өңдегіш қоспаларда мыс сулема (мыс хлориді) түрінде пайдаланылады. Әдетте Ценкер және Хелли бойынша сулеманы мұздық сірке қышқылында, спирттегі сулеманы, Гайденгайн бойынша сулема қоспасын, пикринді ұышқыл – сулеманы қоспаларды пайдаланады.

**Этанол және ацетон**

Этанол және ацетон эффектінің өңдеуіші негізінде - олардың ақуыз гидратациясы деңгейіне әсер етуі болып саналады. Судың жоғалуы нәтижесінде ақуыз молекулалары сөлшері жағынан азаяды және плазматикалық компонентте каогуляция жүреді.

Осылайша, этанол және ацетон тұрақты ақуыз тұндырғыш болып табылады:

1. Жақын молекуларалық ағысты салыстырмалы түрде үдететін ақуыздың тұрақты диэлектрикалық төмендеуі;
2. Ақуыз молекуласынан алдында шектетілген топтарды жақындату нәтижесінде жаңа стереохимиялық байланысты тудыру;
3. Ақуыздың активті топтарына әсер етудің жоғалуы

Этанол және ацетон активті топтарға соншама көңіл бөлетіндей әсер етпейді, оларды ақуыздардың гистохимиялық зерттеуінде пайдалануға ұсынылады. Ұлпаны ыдыратуды (сморщивание) суықта өңдеуге немесе уксус қышқылын қосу арқылы азайтуға болады. Әдетте этанолды жоғары концентрацияда уксус қышқылының немесе уксус қышқылы мен хлороформның (Карнуа) қоспасында пайдаланылады.

**Қышқылдар**

Қышқылдар (уксус, уксустық үш хлорлы, пикринді, азотты) гидролиз процесі кезінде гетерополярлық валентті байланыстарда және гидратация жағдайының нашарлануына әсер етеді. Олар ұлпаға өте тез енеді және өзіне тән «ыдырау алды өңдеуді» (префиксация) тудырады. Өңдеуіш ретінде таза қышқылдарды пайдалану дұрыс. Бірақ өңделетін ортаға қоспа ретінде өздерінің жылытуын (смягчающие) тудырады, ұлпаның ыдырауына (припятствия) жасайды, соған байланысты басқа өңдеуіш қоспалардың компоненттеріне қарағанда ұлпаға тез енеді.

**3 ЛЕКЦИЯ**

**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 деігейіндегідей, химиялық реакцияларға түсу кезінде өзгерістер тудырады.Формальдегидті пайдалануға болмайды, себебеі ол реакцияға түсетін топтарды блоктайды, (блокирует) осылайша нуклейн қышқылдарының бояуларын нашарлатады. Құрылымның жақсы сақталуын қамтамасыз ететін этанол-уксус қышқылы және Карнуа тәрізді қыщқыл өұдегіш 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 ЛЕКЦИЯ**

**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.