**ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ**

С.М. Шалғымбаева, Ж.С. Омарова, Г.Б. Джумаханова

**МИКРОТЕХНИКА НЕГІЗДЕРІ**

(ӘДІСТЕМЕЛІК ОҚУ ҚҰРАЛЫ)

**Алматы**

«Қазақ университеті»

2020

**ӘОЖ 611-018(075.32)**

С.М. Шалғымбаева, Ж.С. Омарова, Г.Б. Джумаханова. Биологтарға арналған микротехникалық әдістер/. Әдістемелік оқу құралы/ -Алматы: Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, 2020. 71 бет.

Бұл әдістемелік құрал ең қарапайым да, оңай микроскоптық техниканың әдістерін көрсетіп, тотальды және гистологиялық препараттарды жасап үйретіп, жануарлардың және өсімдіктердің анатомиясы мен морфологиясын жарық микроскопиясын қолдану арқылы зерттеуге арналған. Бұл әдістеме биологиялық, медициналық, мал дәрігерлік, агрономиялық, зоотехникалық жоғары оқу орындарының студенттеріне, магистранттарына, оқытушыларына, мектеп мұғалімдеріне, медицина, ветеринария саласында қызмет ететін мамандарға ұсынылады.

Рецензенттер:

Ботаника және фитоинтродукция институтының ғылыми хатшысы, аға ғылыми қызметкер, б. ғ.к. Э.С. Саметова

Ботаника және фитоинтродукция институты, микология және альгология зертханасының меңгерушісі, б.ғ.к. С.Б. Нурашов

Қазақ Ұлттық Аграрлық Университетінің, «Биологиялық қауіпсіздік» кафедрасының қауымдастырылған профессоры, в.ғ.к. А.С. Ибажанова

**МАЗМҰНЫ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Кіріспе | 5 |
| 1. | Жұмыс орнын дайындау | 6 |
| 1.1 | Микротехника жұмысына арналған материалдар мен реактивтер. Зертханалық ыдыстар мен құралдар | 7 |
| 1.2 | Химиялық заттар мен реактивтер | 10 |
| 1.3 | Реактивтермен және қышқылдармен жұмыс істеген уақытта қауіпсіздік техниканы сақтау | 11 |
| 1.4 | Микротехникаға қатысты материалдарды дайындау. Материалдарды фиксациялау немесе бекіту | 11 |
| 1.5 | Химиялық ыдыс пен шыныны тазалау және дайындау | 14 |
| 1.6 | Тұтас және тұрақты препараттар жасау | 14 |
| 1.6.1 | Diplostomidae метацеркарийлерінен тотальді препараттар әзірлеу | 15 |
| 1.6.2 | Ересек трематодалар мен олардың құрттарынан тотальді препараттар жасау | 15 |
| 1.6.3 | Паразиттер денесінен тұрақты препараттар дайындау | 16 |
| 1.6.4 | Романовский - Гимза әдісімен қанның ірі тамшысындағы паразиттерді бояу | 16 |
| 1.6.5 | Материалдан кәдімгі бояулар арқылы препараттар жасау | 17 |
| 1.6.6 | Гельминттерден тұрақты боялған препарат жасау | 18 |
| 1.6.7 | Алдын ала бекітілген тұрақты боялған гельминт препаратын дайындау | 18 |
| 1.7 | Ұлпаларды гистологиялық препараттар жасауға дайындау | 19 |
| 1.7.1 | Дегидратация | 19 |
| 1.7.2 | Парафин сіңдіру | 21 |
| 1.7.2.1 | Парафин дайындау | 22 |
| 1.7.2.2 | Парафинді нысандарды блоктарға құю | 22 |
| 1.7.3 | Целлоидинге сіңдіру және құю. Целлоидин сұйықтығын дайындау | 24 |
| 1.7.3.1 | Кесінділерді целлоидиндеу | 24 |
| 1.7.3.2 | Целлоидинді-парафинге сіңдіру | 25 |
| 1.8 | Декальцинация туралы мағлұмат | 25 |
| 1.8.1 | Калций жою сұйықтықтары | 26 |
| 1.8.2 | Жаңа жасалған препараттарды байқау | 26 |
| 1.9 | Гистологиялық препаратты жасау | 26 |
| 1.9.1 | Микротомдармен жұмыс жасау | 26 |
| 1.9.2 | Микротом кесінділерін жасау | 27 |
| 1.9.2.1 | Кесінділер келесі әрекеттер тізбегі арқылы алынады | 27 |
| 1.10 | Гистологиялық препараттарды бояу | 32 |
| 1.10.1 | Парафинді гистологиялық кесіндіні целлоиттау | 33 |
| 1.10.2 | Желатинді кесінділерді өңдеу және бояу ерекшеліктері | 34 |
| 1.11 | Бояуға пайдаланылатын сұйықтықтарды дайындау | 34 |
| 1.12 | Бояу әдістері | 36 |
| 1.13 | Жаңа жасалған сұйықтық 2 % бура. Жіктеліп алынған, декальцинация және недекальцинация сүйек ұлпасын бояу әдістері. | 41 |
| 1.13.1 | Сүйек ұлпасын және сүйек арналарын көру немесе шығару. | 41 |
| 1.13.2 | Сүйектің өсуін және дамуын зерттеу | 42 |
| 1.14 | Гистохимия негіздері және әдістері | 42 |
| 1.14.1 | Браше әдісі бойынша рибонуклейн қышқылын анықтау | 44 |
| 1.14.2 | Бест әдісі бойынша гликогенді карминмен табу | 46 |
| 2. | ВНИРО мамандарының ихтиологтарға ұсынған гистология әдісі | 48 |
| 2.1 | Бутанол мен дегидратация | 48 |
| 2.2 | Парафинмен құю | 51 |
| 2.3 | Препараттарды бояу | 52 |
| 2.4 | Препараттарды бекіту | 52 |
| 2.5 | Дайын препараттарды сақтау | 52 |
| 3. | Ботаникалық гистологиялық препараттарды жасау әдісі | 53 |
| 3.1 | Материалды фиксациялау | 53 |
| 3.2 | Материалды ағын суда жуу | 56 |
| 3.3 | Материалды дегидратациялау және оны парафинге салу | 57 |
| 3.4 | Микротомдық препараттарды бояу | 60 |
| 3.5 | Бальзаммен кесінділерді жабу | 62 |
| 3.6 | А.И. Михальцова бойынша объектерді спирттерден өткізбей, сіңдірмей және парафинге салмай, парафин блоктарын жасау және т.б. | 62 |
|  | Қолданылған әдебиет | 68 |
|  | Қазақша-орысша сөздік | 70 |

**КІРІСПЕ**

Биоалуантүрлілік және биореурстар кафедрасында зертханалық сабақтар кезінде студенттердің өзіндік жұмыстарын жеңілдету және жақсы ұйымдастыру үшін, сондай-ақ курстық және дипломдық жұмыстарды орындау үшін осы әдістемелік нұсқаулық жазылған. Анатомиялық және цитоэмбриологиялық зерттеулерде ең көп қолданылатын және кең таралған микротом препараттарын жасау техникасына басты назар аударылады. Сонымен қатар уақытша дайындайтын препараттар туралы ақпарат беріледі. Сапалы гистологиялық препараттарды алу, зертханалық процесті ұйымдастыруды, барлық кезеңдерді қатаң стандарттауды қажет етеді. Гистологиялық техникада көптеген әртүрлі технологиялық өзіне тән ерекшеліктері бар. Бұл нұсқаулық, гистологиялық препараттарды жасауға байланысты процестердің негізі жайлы түсінік қалыптастырады. Авторлар тұрақты және тұтас (тотальді) препараттар дайындау үшін, материалды өңдеу әдістеріне қатысты жалпы тәсілдерді, келтірді. Алайда жануарлардың жеке ұлпаларының құрылымы мен қызметіне байланысты зерттеу әдістемеде біраз өзгерістер жасауды және микроскопиялық техникамен жұмыс жүргізуді негізгі әдістерін нақтылауды қажет етеді. Ботаникалық микротехника бөлімі вегетативті және генеративті өсінділер мен көпжылдық шөптердің тамырларының ұлпаларына қатысты микроскопиялық зерттеудің әдістері мен негізделген.

Бұл әдістемелік оқу құралы алдын шығарылған «Микротехника негіздері» атты оқу құралын қайта өңдеп, қосымша әдістер енгізіп, толықтырылған нұсқа болып табылады.

**1. Жұмыс орнын дайындау**

Жұмыстың тиімді және сапалы болуы, мақсатқа сай алдын ала ұйымдастырылған жұмыс орнына байланысты. Зертханалық ыдыстарды, құрал-саймандарды, керекті ерітінділер мен реактивтерді дұрыс дайындау, аз уақыт ішінде көп жұмысты оңай атқаруға мүмкіндік береді (1-сурет).

**[](https://4.bp.blogspot.com/-mX-6xp99Hl8/VgFIbj5NyUI/AAAAAAAAANY/SArRkiRyTfI/s1600/F1_%D0%BB%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B8%D1%8F.jpg)**

1-сурет. Дайындық жұмыстарын жүргізуге арналған жұмыс орны.

**Жұмыс үстелі.** Гистологиялық жұмыс үшін қолданылатын, өндірісте шығарылатын зертханалық үстелдердің бірнеше түрі болады. Арнаулы үстелдер болмаған жағдайда, кез-келген, көлемі 60 х 120 см-кем емес, жәшікті, үстел ретінде пайдалана беруге болады. Үстелдің беті арнаулы жабынмен жабылмаса, су өткізбейтін материалдың бірімен қаптап қойған жөн. Осы мақсатқа сай келетін үстел үсті немесе терезелік қалың шыны. Линолеумді, пластикті немесе кәдімгі пленканыда қолдануға болады. Үстелдің препараттар дайындауға арналған жерін шынымен жауып, астына кішірек (9 х 12 см) ақ және қара қағаздарды қойып қойған дұрыс. Осылай боялған (ақ парақ) және боялмаған (қара парақ) қағаздарды пайдалану жұмысты әжептеуір жеңілдетеді.

Сонымен қатар, екі параққа да заттық шынының нұсқасын сызып, жабынды шынының орны мен көлемін көрсетіп қойған жөн. Осы қарапайым тәсіл заттық шыныға препаратты ыңғайлы орналастыруға мүмкіндік береді. Шынының астына қолданыста көбірек болатын ерітінділер мен әдістердің қолжазбасын да орналастыру керек. Үстелдің бетін органикалық шынымен жабуға болмайды, ондай шынылар ерітінділердің зиянды әсеріне ұшырайды, беті тез сызылып қалады, мөлдірлігін жоғалтады. Реактивтер, ерітінділер және ыдыстар тұратын керекті құралдарды қолайлы орналастыру үшін арнайы жасалған екі қабатты сөре қажет. Осындай сөре үстелдің жұмыс атқарылатын аумағын едеуір ұлғайтып, керекті заттарды тез табуға мүмкіндік береді. Сөрені жұмыс істеуші адамның алдына не жанына күн сәулесінің бағытын ескере отырып орналастырады. Жұмыс орнының жарықпен жеткілікті мөлшерде қамтамасыз етілуі маңызды талаптардың бірі, әйтпесе гистологиялық препараттарды әзірлеу көз талдыратын іс. Мұндай жұмыстарға күндізгі жарықты барынша пайдалану үшін үстелді терезенің алдына қою керек.

Күндізгі жарық жеткіліксіз болса, жұмыс орынды жасанды жарықпен қамтамасыз ету керек. Жарық жеткілікті жағдайда да микроскоптар мен препараттарды қарау үшін арнайы жарықтандырғыштар мен үстел үсті шамдары болуы керек. Металдан жасалған құралдар мен шыны ыдыстарды бөлек жәшіктерде сақтайды, электр қондырғылары өшіріліп қойылуы тиіс.

**1.1 Микротехника жұмысына арналған материалдар мен реактивтер. Зертханалық ыдыстар мен құралдар**

- Шаналы микротом МС-2. Микротомның негізгі бөліктері- 1-станина, 2- көтеру механизмі, 3- кесекше (блок) ұстағыш, 4- пышақтар және 5- пышақ ұстағыш; (2-сурет)



2-сурет. Микротомның құрылысы.

- Микротом пышақтары (3-сурет).



3-сурет. Микротом пышақтарының схемасы (А,В,С). А - көп таралған түрі, Б - кесінділердің тізбегін алу үшін, С - целлоидин кесекшелерін кесу үшін.

- Заманауи микротомдар арнайы бірнеше рет қолдануға арналған, қайралатын және бір рет қолдануға арналған микротом пышақтарымен жабдықталған (4-сурет).

|  |  |
| --- | --- |
| Нож для микротома микротомное лезвие СССР купить в Москве | Хобби и отдых |  АвитоА | Держатель-адаптер одноразовых микротомных лезвий с пружинно-прижимным  механизмом быстрой смены лезвия (клавиша)Ә |

4-сурет. Микротом пышақтарының түрлері (А,Ә). А - бірнеше рет қолдануға арналған микротом пышағы, Ә - бір рет қолдануға арналған микротом пышақтары

- Кесінділерді жаятын қызуы +40°С көтерілетін үстелше;

- Қызуы +100°С жететін термостат;

- Гистологиялық препараттарды қоятын жұқа тақтайдан немесе картоннан жасалған планшеттер;

- Мөлшері мен пішіні әртүрлі қысқыштар: анатомиялық (қысқыштарының ұштары жалпақ және кертілген), хирургиялық (қысқыштардың ұштары үшкір, домалақ арнайы, жіңішке, имектелген);

- Скальпельдер (ұштары түзу, жіңішке және иілген);

- Препараттық инелер (кесінділерді жылжытуға және іліп алуға арналған түзу немесе иілген, тұтқалы);

- Скальпельдер (ұштары түзу, жіңішке және иілген);

- Препараттық инелер (кесінділерді жылжытуға және іліп алуға арналған түзу немесе иілген, тұтқалы);

- Корнцанг - ұзын тұтқалы қысқыш;

- Сыйымдылығы әртүрлі, аузы үлкен тығыз тығынды (50-ден 200 мл) көлемді, әртүрлі ерітіндіні құюға арналған гистологиялық тізбекті құрастыру үшін қолданылады;

- Үлкендеу банкілер: ұлпа кесінділерін фиксатор сұйықтықтарында сақтау, фиксациялау, заттық шыныларды таза ұстау, бейтарап формалинді дайындау және басқа мақсатта қолданылады. Банкіге ұлпаға спирт, ацетон және басқа сұйықтықтарды құймас бұрын, тығынның тығыздығын тексеру керек. Бұл үшін тығынның ішкі жағына эфир жағып, банкіні жауып тексерсе жеткілікті. Егер тығын жақсы жабылған болса, эфирдің иісі сыртқа сезілмейді;

- Бюкстер: кішілеу, диаметрі мен биіктігі әртүрлі, қақпақты шыны стакандар (5-сурет).



5-сурет. 1, 2 - Бюкстер, 3 - Петри табақшалары, 4, 5 - диаметрі мен биіктігі әртүрлі өлшемді шыны стакандар

Бұлар гистологиялық препараттарды әзірлеуде сиректеу қолданылады. Биологиялық кіші стакандар: домалақ, сопақ немесе төрт бұрышты болып келеді

- Хеллендейл ыдысы: төртбұрышты, қақпағы бар шыны ыдыс (6-сурет).



6-сурет. Гистологиялық препараттарды бояуға арналған Хеллендейл ыдысы.

Оның ішкі жағында қарама-қарсы бекітілген заттық шыны қойылатын кетіктер бар. Олар шыныға жапсырылған бірнеше кесіндіні бір мезгілде бояу үшін қолданылады;

- Петри табақшалары: қақпақты, кең, жалпақ шыны табақшалар. Олар әртүрлі жұмыстарды жасауға қолданылады;

- Өлшеуіш ыдыстар: цилиндрлер, мензуркалар (сыйымдылығы 10-нан 250-500 мл), көлемдері әртүрлі ұралар;

- Химиялық стакандар: қақпақсыз, сыйымдылығы 50-100 мл болып келетін домалақ шынылар;

- Колбалар (жалпақ табанды қолбалар) сыйымдылығы 500 мл-ден 2 л- ге

- Қалың шыныдан жасалған дөңгелек терең, сыйымдылығы әртүрлі табақшалар.

- Кәдімгі тамызғыштар (дәрі тамызуға арналған) кесінділерге әртүрлі бояулармен сұйықтықтарды тамызу үшін қолданылады;

- Қырлы (сыйымдылығы 0,1 - 10 мл) тамызғыштар;

- Ерітінділер дайындау кезінде әртүрлі сұйықтықтың мөлшерін өлшеп алу үшін қолданылады;

- Сағат шынылары (диаметрі әртүрлі, микроскоппен бақылап отыруды қажет ететін жүйке ұлпаларын зерттеу кезінде және басқа жағдайда) суда қалқып жүрген кесінділерді салуға қолданылады;

- заттық шыны-өлшемі 76 х 26 мл, қалыңдығы 1-2 мм тұрақты препараттарды дайындау кезінде гистологиялық кесінділерді орналастыруға арналған тік бұрышты пластина;

- Жабынды шыны - көлемдері әртүрлі жұқа (қалыңдығы 0,15-0,2 мл) келген пластиналар. Заттық шыныға орналастырылған өңделген кесінділерді жабу үшін қолданылады;

- Монокулярлы микроскоп, кесінділердің бояуын бақылау үшін қолданылады.

Зертханалық ыдыстарды дұрыс этикеткалау және орналастырудың маңызы зор. Жұмыс кезінде ыдыстардағы заттарды шатастырып алмау үшін, алдын-ала қажетті таза ыдысты таңдап алып, мақсатқа сай этикеткалау және орналастыру керек. Ыдыстарды дер кезінде этикеткалауға ерекше көңіл бөлу керек. Жұмыстарды меңгеру үшін, ыдыстарға заттарды құймас бұрын, оған құйылатын заттың атын жазып қоюды әдетке айналдыру маңызды. Бұл заңдылықты орындамау жұмысқа кедергі келтіретін жағдай.

**1.2 Химиялық заттар мен реактивтер**

1. Формалин - формальдегиттің 40% су ерітіндісі. Кесінділерді фиксациялау мақсатында қолдану үшін сол 40% формалинге он есе көп су қосу керек.

2.96% спирт (этанол) - әртүрлі күшінде қолданылып, ағзаларды дегидратациялау үшін және гистологиялық препараттарды бояу кезінде пайдаланылады.

3. Ксилол - органикалық еріткіш, кесіндіні түссіздендіреді және гистологиялық препаратардың парафинін ерітеді. Кейде оны хлороформмен немесе бензолмен алмастыруға болады.

4. Парафиннің бірнеше түрлері болады: 45-54°С-та ерітілетін жұмсағы, 58-60°С-та ерітілетін қаттысы бар, көбінесе сатылатыны осы түрі. Парафинді бірнеше рет ерітіп және суытып алса, ол бір ыңғайланып пайдалануға сапалырақ болып тұрады.

5. Ара балауызы - парафинге (5-10%) ара балауызын қосса, жұмсақ және үгітілмейтін болады.

6. Бутилді, немесе изо-бутилді спирт-ағза кесінділерін дегидратациялау үшін 100° этанолдың орнына қолдануға болады.

7. Эфир - гистологиялық прапараттарды целлоидтағанда және Никифоров қоспасын этанол + эфир (1:1) әзірлегенде целлоидин-парафинді блок құйғанда пайдаланылады.

8. Канадалық бальзамы - гистологиялық препараттарды және тұтас нысандардан тұрақты препарат жасағанда қолданылады. Жасанды бальзамға пермаунт және полистирол жатады.

9. Пикрин қышқылы - бекіткіш дайындау кезінде керек болады: 40-50 гр. құрғақ қышқылды 1 л. ыстық (70° дейін) дистилденген суға ерітеді (Буэн сұйықтығы).

10. Сірке қышқылы (мұзды 100%) басқа реактивтермен ғана бекіткіштер дайындауға керек. Кейбір гистологиялық препараттарды бояғанда оның 1-2% сұйықтығы саралау үшін пайдаланылады.

Микротехника жұмысында әрқашанда керек болатындар: күкірт, тұз, азот қышқылдары, темір-амоний ашудасы, фосфорлы-молибден қышқылы, калий көктемірродисты, целлоидин, сүзгіш қағаз, таза дәке және майлық, тотияйын, вазелин, майсана (касторовое) майы. Мына бояулар: кармин, гематоксилин, суда еритін эозин, негізгі фуксин, альцианды көк, ашық жасыл, G - оранж, ұнтақ түрінде шығарылады да, мұқият жабылған ыдыста көп уақыт сақтауға жарайды.

**1.3 Реактивтермен және қышқылдармен жұмыс істеген уақытта қауіпсіздік техниканы сақтау**

Ксилолмен, парафинмен, хлороформмен және бутил спиртімен жұмыс жасағанда белгілі бір сақтық шараларын сақтау керек, өйткені бұл заттардың буларымен ингаляциялау ағзаға зиянды.

Медициналық қолғабынсыз жұмыс істегенде, ол қолға тамса, тері қатайып кетеді, ал жиі қолданған кезде құрғақ экзема дамуы мүмкін. Формалинмен, ауасын желдетіп отыратын бөлмеде немесе ауа тартатын шкафтың ішінде ғана жұмыс істеуге болады. Формалин көзге тиген жағдайда оны бірнеше рет жақсылап сумен жуу керек.

Реактивтермен жұмыс істеген кезде міндетті түрде қауіпсіздік техникасын сақтау керек. Зертханалық ыдыстарды дұрыс этикеткалау және дұрыс орналастыру қажет, кейбір реактивтерді темір шкафта ғана, не болмаса шыны қоңыраудың астында, ауа тартатын шкафта ұстауға болады. Микротом пышағымен жұмыс істегенде сақ болу керек. Жұмыс кезінде дененің бір жері кесілсе, ұзақ уақыт жазыла қоймайды.

**1.4 Микротехникаға қатысты материалдарды дайындау.**

**Материалдарды фиксациялау немесе бекіту.**

Материалдарды фиксация дегеніміз (лат. «фикус» қатты, мықты, өзгермейтін) материалды өңдеу кезеңінде, объектінің тіршілік процестерінің ағымын тез тоқтатуға мүмкіндік береді және клеткалар мен ұлпалардың тірі организмерде болған құрылымын өзгертпей сақтайды. Тұрақты күйде сақтаумен қатар, фиксациялайтын қоспалар объектілердің кесуге кажет тығыздылығын жоғарылатып, препараттар бояуын жеңілдетеді. Егер фиксация дұрыс жасалынбаса ол түзетілмейді, сол себептен фиксациялаудың негізгі ережелерін сақтау керек.

**Формалин.** Жиі қолданылатын - 10 % ерітіндісі. Ол 40% формалиннің 1 бөлігіне 9 бөлік су қосқанда шығатын қоспа. Формалинде құмырсқа қышқылы болуы мүмкін, оны жою үшін қара түсті ыдысқа формалин құйып, оған ұнтақталған қалыңдығы 1-2 см борды (СаСО) салып, қатты сілкіп жіберу керек. Сол қышқыл 24 сағаттың ішінде борға сіңеді (бейтараптау процессі).

Ірі нысандарды фиксациялау үшін, мысалы жануарды тұтас сақтау керек болғанда, қолданылатын формалиннің күші жоғарырақ болуы керек. Сол үшін формалиннің бір бөлігіне 4 бөлік су қосу керек. Жануардың ішкі қуысына формалинді инъекция түрінде жіберген соң, фиксациялау уақыты 24 сағаттан кем болмауы керек.

Әр фиксатордың көлемі бекітілетін материалдан 20-40 еседей артық болуы тиіс. Пайызы жоғары формалинде материалды көп уақыт сақтауға болмайды, жас ұлпаның протоплазма құрылымы өзгереді. Күшті фиксаторды 1-2 күннен кейін (1:9) формалин сұйықтығына ауыстыру керек.

Ұсақ нысандарды, паренхимді кесінділерді (бауыр, бүйрек), және жамылғы - бұлшықет ұлпалары (ас қорыту жолы), тек 10% формалинде бекітіледі. Бұл кесінділердің көлемі 1 х 1 см-ден аспауы керек. Фиксациялау уақытының ұзақтығын 2-3 сағаттан ұзаққа созуға да болады.

Формалинді, кесінділер керек уақытта, басқа да фиксациялаушы сұйықтықпен өзгертуге болады.

**Буэн сұйықтығы.** Бұл сұйықтық ең жақсы фиксаторға жатады, ұлпаға өте тез сіңетін болғандықтан, онымен эмбриондарды фиксациялауға да, препарат дайындауға да өте қолайлы. Буэн сұйықтығында фиксацияланған ұлпа өте жақсы боялады.

Буэн сұйықтығының құрамы:

1.Суға қаныққан пикрин қышқылы - 15 см3;

2. 40 % формалин - 5 см3;

З. Мұзды сірке қышқылы - 1см3;

Бұл сұйықтықтар қолдану кезінде ғана араластырылады. Фиксациялау уақыты нысанның көлеміне қарай 2 - 24 сағатқа дейін барады. Фиксациялау біткен соң нысанды 70° спиртте бірнеше рет ауыстырып, сары түс жойылғанша шайып барып сақтау керек.

**Формалин - этил спирті.** Бұл фиксатор, басқа фиксаторларда еріп кететіндіктен, зерттеулер кезінде сирек қолданылады. Ол гликогенді, муцинді, зәр қышқылын, темірді, кальцийді жақсы сақтайды. Фиксациялау уақыты 24-48 сағат.

**Дюбоск-Бразиль фиксаторы.** Қатты хитинді жабыны бар омыртқасыз жануарларға осы фиксаторды қолданған қолайлы. Бұл фиксатор Буэн сұйықтығына ұқсас. Оның құрамы:

1) 150 мл 80° этил спирті;

2) 1 грамм пикрин қышқылы;

3) 60 мл 40 % формалин;

4) 15 мл мұзды сірке қышқылы;

Көрсетілген сұйықтықтарды қолдану кезінде ғана араластырады. Фиксациялау уақыты нысанның көлеміне қарай 2-24 сағатқа дейін барады. Фиксациялау біткен соң нысанды 90° спиртте сақтау керек.

**Карнуа қоспасы.** Буынаяқтыларды және омыртқалы жануарлардың мүйізді жабындарын өте жақсы бекітеді. Құрамы:

1) Абсолютті спирт - 6 бөлім;

2) Хлороформ - 3 бөлім;

3) Мұзды сірке қышқылы - 1 бөлім.

Бұл сұйықтық ұлпаға өте тез сіңеді, сол себептен, ұсақ кесінділер үшін фиксациялау уақыты 0,5 - 1 сағаттан аспау керек, ал ірі кесінділер үшін 3 сағат жеткілікті болады. Бұл сұйықтықта материал көп уақыт жататын болса, ұлпалар тығыздалып және өзгеріп кетеді. Бұл жағдайда әсіресе коллагенді және дәнекерлі ұлпалар төзімсіздеу. Фиксациялау біткен соң нысанды 70% спиртте сақтау керек.

**Шаудин фиксаторы.** Бұл омыртқасыз жануарларды өте жақсы бекітеді.

Құрамы:

1) қаныққан сулема сұйықтығы - 50 мл;

2) абсолютті спирт - 25 мл;

3) мұздық сірке қышқылы 100 мл бекіткішке бір екі тамшы.

Термостаттың 60° - 70° С жылылығында фиксациялау уақыты 0,5 - 2 сағатқа дейін болу керек. Ал жағынды сол температурада 10-15 минутта бекиді.

**Абсолютті спирт дайындау.** Микротехника жұмысында және фиксатор дайындау кезінде спирттердің әртүрлі күшін пайдалану керек. Әдетте ректификат спиртінің құрамына 96 % таза спирт, 4 % су болады. Абсолюттік спиртті (100 %) алу үшін, құрамындағы судың көлемін жоюымыз қажет. Көп қолданылатын әдістердің бірі күкірт қышқылының көмегімен дегидратациялау. Осы әдіс бойынша тотыяйын купоросының кристалдық су молекуласы шығарылады да, түсі өзгереді. 10 г әбден ұнтақталған купоросты 100 мл спиртке сеуіп, таза шыныға құйып, таза сүртілген қақпақ жабады да, соның үстіне 96°-тағы таза спиртті құяды. Содан соң шыныдағы спиртті ұнтақ ерігенше шайқаймыз. Бұл әдісті 1-2 күн аралығында қайталап тұру қажет. Суға араласқан ұнтақтың әсерінен, ол шөлмектегі спирт қою көк түске айналады. Спирттердің әртүрлі қоюлығын дайындау кестесі:

Судан Ажыратуға арналған спирттің күші, 100 мл

ажыраты

лған 95° 90° 85° 80° 75° 70° 65° 60° 55° 50°

спирттің

күштілігі

90° 6,41

85° 13,3 6,56

80° 20,9 13,8 6,8

75° 29,5 21,9 14,5 7,2

70° 39,1 31,0 23,1 15,3 7,6

65° 50,2 41,5 33,1 24,7 16,4 8,1

60° 63,0 53,6 44,5 35,4 26,5 17,6 8,7

55° 78,0 68,9 58,0 48,1 38,8 28,6 19,0 9,5

50° 95,8 84,7 73,9 63,0 52,4 41,7 331,2 20,5 10,3

45° 117,6 105,3 93,3 81,4 69,5 37,8 46,1 34,5 22,9 11,4

Бұл дұрыс дегидратациялауға жатпайды, сол себепті спиртті басқа ыдысқа құйып, бұл процесті, ашық көк түске боялғанша қайталай береді.

Сусыздандырылған спиртті сүзіп, басқа ыдысқа өзгертеді де, аузын жақсылап бекітеді.

**1.5 Химиялық ыдыс пен шыныны тазалау және дайындау.**

Препараттарды жасар алдында химиялық ыдыс пен шыныны жылы сабынды сумен жақсылап жуып, майын кетіру керек. Ыдысты және әйнекті суық ағынды сумен шайған соң, дистилденген сумен шайып кептіреді. Ыдыс пен әйнек қатты ластанған болса, хромпик ерітіндісінде тазалау қажет. Хромпик жасау үшін 100 мл биохроматқа 1000 мл ыстық су құяды. Ерітінді жылығаннан кейін оған ақырындап байытылған 100 мл күкірт қышқылын қосады. Ыдысты осы ерітіндіге 2-3 күн салып қояды. Осы процесті резеңке қолғаппен, термостатта істеу керек. Майдан тазаланған ыдысты ағынды суды жуып, дистильденген суға шайып кептіреді. Төсеніш және жабынды шыныларды бірдей көлемді спирт және эфирі (Никифоров қоспасы) бар банкаға немесе бюкске салады. Қолданар алдында шыныны таза зығыр шүберегімен сүртеді.

**1.6 Тұтас және тұрақты препараттар жасау**

**Тұрақты препараттарды әзірлеу.** Соңғы кездері көбіне миксоспорийлерден глицерин-желатинді препараттар дайындайды.

Зерттелуші дененің мүшелерінен жағынды жасап, паразиттің вегетативті кезеңдегі немесе споралары көрінген жағдайда жағындысы глицерин- желатинге салынады. Ол үшін заттық шыныдан ақырындап жабынды шыныны алып, жағындысын жоғары қаратып қойып қояды. Жағынды кепкен соң, скальпельдің ұшымен глицерин-желатиннің кішкене кесегін алып, спиртовка жалынында балқығанша қыздырады. Шамалы кебіңкіреген жағындыға глицерин-желатиннің 1-2 тамшысын тамызады. Тамшының шетіне бұрын алынып қойылған жабынды шыныны препараттық инемен ақырын жақындатып глицерин-желатинге салады. Жабынды шыны астында ауа көпіршіктері қалмауы тиіс. Глицерин-желатин қалың болып кетпеу үшін препараттық иненің сырт жағымен жабынды шыныны инемен ептеп басып та қояды. Кесіндіні ұзақ мерзімге сақтау үшін, құрғап кетпеуі үшін жабынды шынының шеттеріне ағаш таяқшаның көмегімен канифольді балауызды (кедр (балқарағай) немесе канадалық бальзамы да болады) жағады.

Паразиттің тіршілік циклын зерттеуге жағындылар әзірлеу керек. Дайын жағындыны шыныда қалған ірі су тамшылары кепкен соң, 1-2 минутқа абсолютті метилді спиртте (метанол) бекітеді. Содан кейін жағындыларды Романовский бояуымен бояйды. Бояу уақыты неғұрлым тез өтсе, соғұрлым боялу да көрнектірек болады, Бекітілген жағындыларды 2 сағатқа бояғыштың 2% ерітіндісіне салып қояды. Жағындылар әлсіздеу боялып, немесе ұзақ сақтау кезінде түссізденіп қалса, қайта бояуға болады. Ол үшін жағындыларды алдын-ала 70° тұз қышқылында ұстап толық ағартып, ағынды суда жуып, арықарай жоғарыда келтірілген әдіспен бояйды.

**1.6.1 Diplostomidae метацеркарийлерінен тотальді препараттар әзірлеу.**

Өткір қайшымен айналасын қиып алып, көз алмасын шығарып, заттық шыныға қояды, көзді кесіп, шыны тәрізді дене мен көз бұршағын бөліп алып, МБС микроскопымен қарайды. Көз бұршағын екі заттық шынының арасына қыстырып, ортасында «ақ ядро» көрінгенше жаншып, МБМ пен қарайды. Шыны тәрізді денені де компресс тәсілімен көреді. Заттық шынының біреуін алып тастап, препараттық иненің көмегімен және ұшы имек шыны таяқшаның көмегімен метацеркарийді бөліп алып, 2-3 сағатқа сүзілген тоған суына салып қояды. Одан кейін судан тірі метацеркарийлерді алып, таяз қысқа пробиркаға ауыстырып, 15-20 минутқа сірке қышқылды кармин құяды. Карминді пробиркамен жинап алып (70°) тұз қышқылды спирт қосады. Мүшелердің боялуын МБС пен қарап анықтайды.

Гельминттерді 70°,80°, 90° және 96°спирттердің әрқайсысында 10 мин. ұстап сусыздандырады. Метацеркарийлерді диметилфталатта ағартады. Ол үшін гельминттерді ақырын, алдын-ала 96°спирт және диметилфталат құйылған бюкске салады. түссіздендіру басында, метацеркарийлер спирттің жоғарғы қабаты мен диметилфталаттың төменгі қабатында көрінеді. түссіздендіру біткен соң, гельминттер бюкстің түбіне түскен соң, жіңішке тамызғымен заттық шыныға ауыстырады. Екінші заттық шыныға бальзам жағып, 5-6 метацеркарийді препараттық инемен орналастырады да, МБС арқылы жаншуын бақылап, жабынды шынымен жабады. Препаратты этикеткалайды.

**1.6.2 Ересек трематодалар мен олардың құрттарынан тотальді препараттар жасау.**

Гельминт цистасын шырыштан тазалап, заттық шыныдағы тамшы суға салады. Заттық шыныны қарапайым препараттық және арнайы Судариков инелерімен МБС-қа қойып, сыртқы және цистаның ішкі қабаттарын ақырын кесіп, құртты бөліп алады. Трематодтардың ересек және личинкасын фиксациялау бірыңғай тәсілмен жүргізіледі. Алдымен заттық шыныны 60-70°С суда (буланғанша) қыздырып, қимылсыздандырады. Гельминттерді заттық шынылардың арасына салып, Петри табақшасына түсіреді. Оған 10-20 минутқа 70°-ты спирт құяды. Осылай бекітілген трематодтарды бекіткішке ұзақ сақтауға болады. Тотальді препарат дайындау үшін гельминттерді дистилденген сумен жуып, бекіткішті толық кептіреді (0,5-2 сағатта). Жуылған гельминттерді ашудасты карминмен бояйды. Бояу уақыты гельминттердің көлеміне және қабаттарының қалыңдығына қарай 10 мин. 30-60 мин. дейін. Жақсы боялған гельминттерді сумен жуып, тұз қышқылды спирт құяды, МБС арқылы жіктелу деңгейін байқайды.

**1.6.3 Паразиттер денесінен тұрақты препараттар дайындау.**

Дененің үстінен алынған паразиттер түсірілген шыныға 1 тамшы 1 % аммиак ерітіндісін қосып, суын сорғыш қағазбен сорып алып, МБС-ке жайғастырып, паразиттерді түзетеді. Глицерин-желатинді (скальпелдің ұшымен) қоспасы балқығанша спирт шамының жалынында қыздырып, паразит тұрған шыныға тамызады.

Тамшының шетіне таза жабынды шыныны ұстап, ақырын, препараттық ине көмегімен глицерин-желатин тамшысына салады, ауа қалып қоймауын қадағалайды. МБС арқылы препараттық иненің сырт жағымен жабынды шыныны аздап басады. Осы арқылы глицерин-желатиннің қабаты азайып, паразиттердің қысылмай жатуына жағдай жасалады да, құрттың хитинді құрылысының жақсы көрінуін қамтамасыз етеді.

Препаратты ұзақ мерзімге сақтау үшін, жабынды шынының шеттеріне жіңішке ағаш таяқшамен, құрғап кетуден сақтайтын балауыз бен канифолдың тұратын арнайы жұқа қабатын жағады. Заттық шынының бір шетіне паразиттің иесінің атын, алынған күні, мүше мен материалдың түрі және ауланған жері жазылған этикетка жапсырылады. Осы әдіспен желбезек пен қанаттардан, мұрын ойпатынан және ауыз қуысынан алынған паразиттерден тұрақты препараттар жасайды.

Дененің инфузория табылған жерлерінен жағындылар жасап, Петри табақшасына салып, ластанып қалмау үшін жауып қояды. Хиолдонелл мен триходин табылса құрғақ жағынды жасайды. Дайын жағындыларды бөлме температурасында құрғатады. Басқа Петри табақшасына (3/4 көлемді) дистилденген су құяды.

**1.6.4 Романовский - Гимза әдісімен қанның ірі тамшысындағы паразиттерді бояу.**

Қан жағындыларын дайындаудың бірнеше әдісі бар. Әдісті таңдау - қойылған мәселелерге байланысты. Қан торшаларын жіктеп есептеу және дәл ажырату үшін ихтиопаталогияда Паппенгейм бойынша құрама бояу әдісін қолданады.

Ыдыстар мен құрал-жабдықтар: алдын-ала дайындалып, майсыздандырылған құрғақ заттық шынылар, Киев аппараты, қарапайым қарындаш.

Реактивтер: Май-Грюнвальд ерітіндісі, Романовский бойынша азур - эозиннің жұмыс ерітіндісі, рН-6,81—ге тең дистилденген су. Суды фосфатты буферлермен бейтараптайды.

Анықтау барысы. Сол қолдың бас бармағымен екінші саусақтың арасына майсыздандырылған заттық шыныны алады. Пастер тамызғысы мен оған қанның аз ғана тамшысын ағызады. Оң қолдың аталған саусақтарының арасына бүйірінен ұстап, шыныны алып, 45°-тық бұрышпен заттық шыныға қойып, сырт жағымен тамшыға жылытады да, тамшының жан-жаққа тарап аққанын бақылайды. Шыныны жылжыта қозғалтып, алға жүргізеді, қан жағынды болып, заттық шыныда бірқалыпты жағылуы қажет. Этикеткалайды. Жағындыларды бояғыш аппаратың штативтеріне қойып, ауада кептіреді. Құрғақ жағындыларды Май- Грюнвальд ерітіндісі бар аппараттың кюветіне батырады. 5 минут өткен соң жағындыларды алып, рН-6,81-ге тең дистильденген сумен 1-2 минут жуады.

1) Қан тамшысын жақсылап жуылған заттық шыны ұшына тамызып алып, басқа шынының қабырғасымен жағады да, кептіреді.

2) Кепкен жағындыны 2 өлшемді метилді не 96° этилді спиртте бекітеді, 1-ші өлшемінде 3-5 мин, 2-ші өлшемінде 10-15 мин.

3) Романовский-Гимза бояуымен 30-50 мин бояйды.

4) Аққан су мөлдір болғанша шаяды да кептіреді.

5) Кепкен кесіндіге ксилол тамшысын тамызып, ағартып, бальзамдайды.

6) Нәтиже: протоплазма - күлгін көгілдір, ядролар – қызыл түсті.

**1.6.5 Материалдан кәдімгі бояулар арқылы препараттар жасау.**

Қанның құрғақ жағындылары Гимза қоспасымен боялады. Жағындыны бояр алдында ерітіндіні дистилденген сумен суытып 10-30 (метилді спиртпен бекітілсе) мин., немесе 1-1,5 (басқа бекіткіштер қоданылса) сағаттай ұстайды. Ерітіндіден жинала беретін тұнбаларды ластанбау үшін заттық шынының жағынды жағына төмен қаратып қойған жөн. Осыдан кейін препаратты сумен жуып кептіреді.

Шырышты спорофиттердің және басқа дымқыл қарапайымдылардың жағындыларын Гейденгай бойынша дайындалған темірлі гемотаксилинмен бояу ең дұрыс нәтиже береді. Ол үшін, жағындыны алдымен темір-аммиакты ашудастың 2,5-3% -дық ерітіндісінде өңдеу қажет.

Препарат жасау төмендегідей жолмен жүргізіледі. Жағындыны дистилденген сумен 2,5%- ашудас ерітіндісіне 2-8 сағатқа салып, кейін 1-2 минуттай сумен қайталап шаяды. Содан кейін жағындыны гемотаксилин ерітіндісінде 6-24 сағ. ұстайды. Қара түске боялған жағындыны ағынды сумен шайып, 1% ашудас етітіндісімен өңдейді. Өңдеу кезінде бояудың толық еруін микроскоптың ортаңғы үлкейткішімен бақылайды. Бояудың сәтті шығуы цитоплазманың көгілдір көрінісінің негізінде ядро суретінің көгілдір құрышқа ұқсас көрінісінің негізінде ядро суретінің нақты бояуымен сипатталады. Өңдеу үдірісінің жағымды нәтижесі шыққан бетте жағындыны Петри табақшасына ауыстырып, ағындыны суда 30 мин. жақсылап жуады. Ағынды су құбыры болмаған жағдайда жағындыны суға салып, бірнеше рет ауыстыра отырып 2 сағ. ұстайды. Жуылған жағындыны күші жоғарылай түсетін спирттерде (70%і, екі рет 96%, 100%) сусыздандырып, ксилолмен ағартып, бір тамшы Канадалық балзамын жағып бекітеді.

Паразиттерді қарапайым ғана жүйелеп ажырату үшін жағындыларды 1% метиленді көктің ерітіндісінде 30 мин. бірнеше сағ. бойы бояса да жуып, сосын сусыздандырып, бальзам жағып бекітеді.

Шырышты спорофиттерді тамшы суда, не спиртте боямай-ақ анықтауға болады. Йодтың әлсіз ерітіндісінде Люголь ерітіндісінде өңдегенде, Мухbolidaeнің амеба тәрізді ұрығында Myxosomatidaege болмайтын йодты көпіргіші табылады.

Сорғыш құрттарды боямай, микроскоптың немесе үлкейткіш шынының көмегімен, жабынды шыныны міндетті түрде бастырыңқырап, глицерин-желатинге бекітеді.

Бекітілген сорғыш таспа және скребнилар ашудасты карминнің сулы ерітіндісінде бояу ыңғайлы. Бояр алдында құрттарды бірнеше сағ. (бір түнге тастап кеткен тіпті жақсы) суда тұрғаны дұрыс. Боялу мерзімі бояудың жетілуіне, фиксациялау уақытының ұзақтығына және алдын-ала сумен жуылып тазартуына байланысты. Жаңа дайындалған кармин ерітіндісінде ұсақ құрттар 1,5-2 мин. боялып үлгереді. Боялған құрттарды сумен жауып, қышқылдандырылған 70% -дық спирт пен (100 мл суға 10 тамшы буланып тұрған тұз қышқылын қосады), үлкейткіш шынының көмегімен, саралайды. Тұтас нысандарды бояуды және саралауды сағат шыныларында немесе солонкаларда жүргізген өте қолайлы. Төменгі жағынан күшті жарық түсіре отырып, ұлғайтқыш шынымен қараған кезде, нысандар бояу ішінде өте жақсы көрінеді.

Саралап боялған нысандарды 70%-ды спиртте 2 рет ауыстыра отырып, 20-40 мин. жуып-шайып, 5-10 мин. абсолютті спиртке салады. Содан соң спиртті төгіп, не пипеткамен (нысандар ұқсас болса) сорып алып, үстіне қалампыр немесе бергамот майын құяды. Көбірек боялып, кейін асықпай сараланған нысандар түссіздендіруші затқа инемен не жақсы ұшталған шырпымен алып салуға болады.

Ағартылған нысанды ортасына канадалық бальзамы тамызылған заттық

шыныға орнатып, үстіне жабынды шыны жабады. Скребниларды бояр алдында екі жеріне жіңішке инемен шаншып қойған жөн. Оларда, жұмыр құрттар сияқты, боялмай-ақ байытылған сүт қышқылы ерітіндісінің ішінде жақсы зерттеледі.

Жұмыр құрттардың қалың қабығынан бояу өтпейді. Оларды 70% спирттен немесе формалиннен алып глицеринге не сүт қышқылына салып толық ағартады. Құрттардың ұсақтары өте тез, ал ірілері 2-3 күн ішінде ағарады. Ағартылған құрттарды заттық шыныға салып, жабынды шынымен шетін вазелинмен немесе канифоль майымен майлап, құрт жатқан ортаны құрғап кетпеуден сақтайды. Зерттеулерден кейін нысандарды сүт қышқылының қалдықтарынан сумен жуып тазартып, қайтадан Барбагалли сұйықтығына салып қояды.

Паразиттік шаянтәрізділерді әдетте глицеринде немесе спиртте бояусыз зерттеуге болады.

**1.6.6 Гельминттерден тұрақты боялған препарат жасау:**

1) Ірі цестодалардың гермофродитты буындарын суда 1-3 күн ұстап, содан кейін лактат карминге 4-6-12 сағат (0,1-0,3 г карминды 50% 100 мл сүт қышқылына) салады.

2) Дәкемен байланған ыдысты 1 сағ. ағын сумен жуады.

3) Жуылған стробилді керек бөлімдерге бөліп заттық шыныға салады, 6-12 сағат кептіріп бальзамдайды.

**1.6.7 Алдын ала бекітілген тұрақты боялған гельминт препаратын дайындау.**

Бұл әдістеме майда трематодтармен турбеляриаларға арналған:

1) Жаңа алынған гельминттерді 4-12 сағат суда ұстайды (нысан-көлем-

байланыс).

2) Гельминттерді төсеніш шыныға қойып, басқа шынымен жауып жіппен байлайды.

3) Препаратты 70% этанолда 1-2 сағ., ал ірі болса 6-12 сағ. бекітеді.

4) Фиксациялау біткен соң гельминтті шешіп, лактат карминмен бояйды. Уақыты көлеміне қарай (30мин. -1сағ.).

5) Бояудың қалдықтарын этанол және хлорлы сутекті қышқылымен өңдейді.

б. Дегидратация үшін 80% спирттен бастап әрқайсысында 5-7 мин ұстайды.

7) Ксилолда 2 рет ағартады (1-2 мин. ғана).

8) Бальзамға салу (бекіту).

**1.7 Ұлпаларды гистологиялық препараттар жасауға дайындау**

Парафинге сіңіру және құю. Алдымен зерттеліп жатқан затты бекіткіш

қалдығынан тазартып, жақсылап жуу керек. Бұл әдіс зерттеліп жатқан затты, бекіткіш қалдықтарынан толық тазартуды көздейді. Затты бекіту үшін әртүрлі қоюлықтағы ерітінділер қолданылатындықтан, (құрамында хром, формалин, осми қышқылы және басқа) ағза кесінділерін сумен 5-24 сағ. жуу қажет. Содан соң оларды парафинге қатыру үшін сусыздандырып, құрғату керек.

**1.7.1 Дегидратация**

Бұл әдісті жүргізу үшін, кеңірек әрі қақпағы тығыздалып жабылатын стакандарды этикеткалап, оған күштілігі жоғарылай (50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 2 өлшем 96° және 100°) түсетін спиртті құю қажет. Пайыздық спиртті алдын ала дайындап алу қажет (7-сурет).



7-сурет. Қақпағы тығыздалып жабылатын стакандар (парафин құюға, дегидратацияға және түссіздендіруге) пайдаланылады.

Бір рет қолданған спиртті, бірнеше рет қолданбаған дұрыс. Оларды міндетті түрде ауыстырып тұру қажет.

Толық дегидратация үшін, материал жоғарыда көрсетілген спирттердің әрқайсысынан өткізіп, барлығы 12-24 сағат ішінде құрғатылуы қажет.

Кейбір ұлпа кесінділердің мөлшеріне қарай дегидратация уақыты:

Ұлпа Спиртің күштілігі Уақыт (мин)

Паренхиматозды Этил спирті 70° 20

(бауыр,өкпе,бүйрек) Этил спирті 80° 20

ұлпалар,көлемі1х1 Этил спирті 90° 20

Этил спирті 96°бірінші порция 20

Этил спирті 96°екінші порция 20

Абсолютті(изобутил немесе 20

изопропил спирті) 100°бірінші порция 15

Абсолютті (изобутил немесе

изопропил спирті) 100°екінші порция 15

Түссіздендіру:

Ксилол І бірінші порция 15

Ксилол ІІ екінші порция 15

Парафин сіңдіру:

Парафин І бірінші порция 1сағ.

Парафин ІІ екінші порция 1сағ.

Парафин-воск 1сағ.

Бұлшықет ұлпаны Этил спирті7 0° 30мин

дегидратация, Этил спирті 80° 30мин

көлемі1х1см. Этилспирті 90° 30мин

Этил спирті 96°бірінші порция 30мин

Этил спирті 96°екінші порция 30мин Абсолютті (изобутил немесе

изопропил спирті) 100°бірінші порция 20 мин Абсолютті (изобутил немесе

изопропил спирті) 100°екінші порция 20 мин Түссіздендіру:

Ксилол І бірінші порция 15

Ксилол ІІ екінші порция 15

Парафин сіңдіру:

Парафин І бірінші порция 1сағ.

Парафин ІІ екінші порция 1сағ.

Парафин-воск 1сағ.

Аталық гонадалар - Этил спирті 70° 40мин

көлемі1х1см, Этил спирті 80° 40мин

эмбриондар көлемі Этил спирті 90° 40мин мм -ден сантиметр- Этил спирті 96°бірінші порция 40мин ге дейін. Этил спирті 96°екінші порция 40 мин Аналық гонадаларға Абсолютті (изобутил немесе

-целлоидиндеу әдісі изопропил спирті) 100° бірінші порция 20 мин қолданылады. Абсолютті (изобутил немесе

(әдіс21бетте) изопропил спирті) 100° екінші порция 20мин

Түссіздендіру:

Ксилол1 15мин

Ксилол ІІ екінші порция 15 мин Парафин сіңдіру:

Парафин І 1сағ.

Парафин ІІ екінші порция Парафин- 1сағ. воск 1сағ.

Желбезектер,көлемі Этил спирті 70° 30мин

1х1см Этил спирті 80° 30мин

Этил спирті 90° 30мин

Этил спирті 96°бірінші порция 30мин

Этил спирті 96°екінші порция 30 мин Абсолютті (изобутил немесе

изопропил спирті) 100° бірінші порция 20 мин Абсолютті (изобутил немесе

изопропил спирті) 100° екінші порция 20 мин Түссіздендіру:

Ксилол І бірінші порция 15мин

Ксилол ІІ екінші порция 15 мин Парафин сіңдіру:

Парафин І бірінші порция 1сағ.

Парафин ІІ екінші порция 1сағ.

Парафин-воск 1сағ.

**1.7.2 Парафин сіңдіру**

Барлық кейінгі дайындық нысандарды қамтамасыз ететін жағдайларды жасауға бағытталған, оларды парафинге тікелей салу. Бұл проесс 2 кезеңде жүзеге асырылады: 1-кезең. Объектідегі су спиртпен ауыстырылады бұл процес дегидратация деп аталады. Толық сусызданған кесінділерге парафин сіңдіру үшін, олардың құрамынан спиртті толық кетіру керек. Бұл процесс материалдың сулы ортадан екіншісіне ауысуы оның құрамы мен концентрациясының күрт өзгеруінсіз біртіндеп жүруі керек дегенді білдіреді. Әйтпесе, бекітілген материалдың клеткалары мен ұлпаларының құрылымы бұзылуы мүмкін.

2-кезең. Спиртпен жақсы араластырылатын және парафинді ерітуге қабілеті бар, соңғысымен толығымен алмастыратын аралық ортаға алмасу. Зерттеліп жатқан объектен спиртті шығарып тастайтын хлороформ, бензол, толуол, ксилол, көмір қышқылы, күкірт қышқылы тағы басқалары жатады. Көбінесе хлороформ мен бензолды көп қолданады, ал толуол мен ксилол материалды қаттылау қуырыңқырап жіберіп, қатқылдау етеді. Хлороформ ластанып кетпеуін және құрамында судың болмауын қадағалау керек.

Спиртті жою үшін материалды абсолютті спирт пен хлороформның (1:1) қоспасына 1-3 сағ. салып, содан кейін таза хлороформда ұстайды. Мұнда кесінділер басында жүзіп жүреді де, кейін батыңқырап тұрады. Спиртті жою процесінде хлороформды 1-3 сағ. арасында 2-3 рет ауыстырып тұрған да жөн. Бөлшектердің көлемі кішірек (1 х 1) болса, оны хлороформда 30 мин. артық ұстамау қажет.

Спирті жойылған соң кесінділерді термостат ішіндегі, алдын-ала ерітіліп, дайындалған парафиндердің 2-3 мөлшеріне салып, 3-4 сағ. уақытта сіңіреді.

**1.7.2.1 Парафин дайындау**

Тазартылған парафин үлкен молекулярлы көміртегіден тұрады. Парафиннің бірнеше түрі болады.

1) Жұмсақ 45-54°С-да ерітілетін.

2) Қатты 58-60°-С-да ерітілетін. Препарат қоршаған орта температурасының төменгі жағдайында әзірленсе, 48-50°С ерігіш парафинді қолданған дұрыс болады. Парафиннің нақтылы ерігіштігі белгісіз болса, оны анықтап білуге де болады.

Оны балқуы нашар парафиннен келесі жолмен алуға болады. Парафинді 1-2 см бөлшектерге кесіп, термостаттың үстіңгі бөлігіне 2 қабатты дәкеге салып, іліп қояды (темп. 58°С-60°С). Оның жартысы еріп, ыдысқа аққаннан кейін, дәкеде ерімейтін бөлігі ғана қалады, сөйтіп жұмсақ парафиннің бірыңғай фракциясын алады. Серпімділігін көбейту үшін парафинге шамамен 0,5% ара балауызын қосу керек. Парафинді еріту термостатта немесе ыстық суда жүргізіледі. Отта немесе электр пешінде ерітсе, ол қатты сарғайып кетеді.

Парафинді сіңдіру уақытында ағза кесінділері ксилол немесе хлороформнан ажырайды, сөйтіп бірінші өлшемдегі парафин құрылымында қалады, екінші таза парафинге салуға мәжбүр етеді. Ал ең соңында парафин кесінділерін парафинді балауызда сіңіреді.

**1.7.2.2 Парафинді нысандарды блоктарға құю**

Парафин сіңірген кесінділерді блоктарға құяды. Нысандар кішкене болса, сағат шынысына құюға болады, тек оның түбіне глицерин жағу керек. Одан ірі нысандарды, көлемі олардан 4-5 есе үлкен қалыпқа құяды.

Бейнелердің бағдары гистологиялық зерттеудің мақсаттарына сәйкес жүзеге асырылады және кесу барысында дайындалады. Паренхиматозды мүшелерді қалыптың түбіне біркелкі жолақпен салу керек, сонда барлық қабаттар мен мүшенің капсуласы кесілген жерге түседі. Қуыс мүшелерді, теріні қырымен қою керек, сонда кесіндінің барлық қабаттары көрінеді. Ол үшін қалыпты парафинмен толтырғаннан кейін оны 2-3 секунд ішінде салқындату платформасына жіберіп, содан кейін ғана үлгіні орналастыру ыңғайлы. Қаңқа бұлшықетінің жалпы құрылымдарының ең маңыздысы көлденеңінен кесілген бұлшық ет болып табылады. Белгілеу өрісі және заманауи микротомдардың қысқыштары бар ауа көпіршіктерінің жиналуына жол бермейтін стандартталған гистологиялық қалыптарды қолдану ыңғайлы шешім болып табылады (8-сурет).



8-сурет . Парафинді құюға арналған пластикалық қалыптар

Нысандарды парафинді қалыптарға құю жұмысын термостаттың жанында істеу керек. Керекті су құйылған Петри табақшасын, қалыптарды, спирт шамын, препараттық инені дайындап алады. Ауа көпіршіктерін болдырмау үшін қыздырылған қалақшамен дұрыстап ерітіп тұру керек. Парафин-воск аз болса парафин қату уақытында ортасында шұңқыр пайда болып, нысандар жабылмай қалуы мүмкін. Қалыптағы нысандарды пластикалық сақиналармен жабу керек (9-сурет). Қалыпқа құйылған нысан суық суы бар шыныда толық қатқанша тұрады. Қалыптағы сақина этикеткаланады. Этикеткаға жануардың түрі, немесе ағзасы, блоктың саны және құйған уақыты жазылуы керек. Осындай блоктар өте көп уақыт сақтауға жарамды.



9-сурет. Парафинді қалыптардың бетін жауып бекітуге арналған пластикалық сақиналар.

Материал өте ұсақ болса, оны жоғалтып алмау үшін, келесі әдісті қолдануға болады.

1. Центрифуга пробиркасына материалды салып, оған фиксациялаушы сұйықтықты құйып, центрифугаға салады. Материалды бояу қажет болмаса, оны жуған соң, күштілігі жоғарылайтын спирт тізбегінен өткізіп, ағартып, әр сұйықтықта центрифугаға 1-2 мин. салып, парафинге құяды. Сағат әйнегіне ерітілген парафинді құйып, оны қатырады. Содан кейін парафиннің ортасына шұңқыр жасап, пробиркаға құяды. Ксилол өте аз болуы керек. Осы сағат шынысын термостатқа қою қажет, сонда қалған ксилол ұшып кетеді де, парафин ериді. Содан кейін шыныны суық суға қояды да, парафин қатқан уақытта, кесекшені кесіп алып, қалыпқа салып, этикеткалау керек.

2. Ұсақ нысандарды кесекшеге құю үшін шыны түтікшелерді пайдалануға болады. Бір жағын жұқа капрон немесе планктон торымен байлап, екінші жағынан нысанды құю керек. Фиксациялау, жуу, дегидратация, түссіздендіру жұмыстары лайықты сұйықтықтарда өткізіледі. Парафинге сіңіруді термостатта өткізіп, уақыты біткенше суық суда ұстау керек. Парафинді түтікшелерден алу үшін оны аздап жылытады, сол уақытта ол нысанмен бірге сыртқа түседі. Материалды алып, қалыпқа орналастырып бетін сақинамен жауып, этикетка жабыстыру керек.

Жоғарыда айтылған жұмыстардан жақсы нәтиже алу үшін, барлық кезеңдерді нақтылы тіркеп, көрінген нәтижелерге ұқыпты талдау жасап отырған дұрыс. Нысанды спирттерге салмас бұрын, оған көлемі мен пішін беріп, артық және зақымданған жерлерін кесіп алып тастайды. Сапасы жоғары гистологиялық препарат дайындау үшін, зерттеліп жатқан ағзаның жұқа кесіндісі алынуы қажет, сондықтан да оны тиісті ортаға құю қажет. Сол кезде нысан жақсы әрі жұқа кесіледі. Егер негізгі принциптерді білмесе, қажетті әдістерді дұрыс қарастырмаса, материалдар кесуге келмей қалады. Болмаса кесілген жұқа қабаты сапасыз болып шығуы мүмкін. Бұл шарттарды орындау үшін материалға парафин, целлоидин немесе желатин сіңіріп қояды.

**1.7.3 Целлоидинге сіңдіру және құю. Целлоидин сұйықтығын дайындау**

Нағыз целоидин дегеніміз коллоидты нитроклетчатканың жоғарғы сорты, ол қалайыдан жасалған ыдыста желатин тәрізді, жартылай мөлдір түсті түрінде сатылады. Бұл пластинкаларды қолданар алдында ұсақтап, сүзгіш қағаздар арасында t=+37°+40° құрғатып, абсолютті спиртке, спирт - эфир (1:1) қосып, сұйықтық жасау керек: бірінші өлшемі қоюлығы ара балындай, (8-10%), ал екінші глицерин қоюлығындай (4-5%) сұйықтық жасалады. Ол үшін қою целлоидин сұйықтығына (8-10%), абсолютті спирт және эфир қосу керек (1:1). Целлоидиннің еруі өте көп уақыт алады, сол үшін оны бірінші абсолютті спиртте бөрттіріп алып (24 сағат), содан кейін эфир қосса еруі тездетіледі.

Целлоидин дайындағанда абсолютті спиртпен бірдей 96°, және 2% карбол қышқылымен (96° спиртте дайындалған) қолдануға болады.

**1.7.3.1 Кесінділерді целлоидиндеу**

Бұл әдісті мезенхимды ағзалар мен кесу уақытында үгітіліп кететін ағзаларға (трахея, тері т.б.) қолдануға болады.

Ағза кесінділерін дегидратация күштілігі жоғарылай түсетін спирттерде өтеді, содан соң 96° спирт-эфир (1:1) қоспасына ұзақтығы 6-24 сағаттай салып қояды.

Сызба түрінде көрсету:

1 Ағза кесінділерін ағынды суда жуу 24сағ.

2 Күші өсе түсетін спирттерде дегидратация 12-24сағ.

3 2 өлшем абсолютті спирт 12-24сағ.

4 Спирт-эфирде(1:1) 4-20сағ.

5 2% целоидин сұйығында 2-6күн

6 4-6% целоидинде 2-6күн

7 Қою 8-10%- целоидинде 2-7күн

Целоидин сіңіп болған соң кесінділерді хлороформ арқылы тығыздандырып, келесі кезеңде 70° спирт құйып, сол спирттің ішінде сақтауға болады.

Целоидиндеу кестесі.

1. Фиксациялау 1.Формалин10-15% 24сағ.

2.Спирт формалин 24сағ.

3.Карнуа сұйықтығы 2-4сағ.

4.Спирт 96°-100° 12-24сағ.

5.Ценкер-формол 8-12-24сағ.

6.Ортасұйықтығы 24-48сағ.

7.Регосұйықтығы 24-48сағ.

8. Ағынды суда жуу 24-48сағ.

2.Дегидратация 2.1.Спирт 96° 24сағат

2.2. 96°, 100° карбольды спирт 24сағ.

3.Целоидин құю 3.1.Спирт-эфир қоспасы 6-24сағ.

3.2. 4-5% целлоидин 2-4күн

3.3. 10% целлоидин 1-2күн

3.4. Целлоидинде тығыздалған 2-3 күн

целлоидинды кесекшелерді қалыпқа жабыстырып 70° спиртте сақтау

Екі сызбадағы уақыттың әртүрлі болуы ағза кесінділерінің көлеміне және өлшеміне байланысты болғандықтан, уақытты тәжірибе жолымен таңдаған дұрыс.

**1.7.3.2 Целлоидинді-парафинге сіңдіру**

Бұл әдістің бірнеше түрлері болады, жуу мен дегидратация жұмыстары стандартты болып келеді. Ал спирт- эфирден кейін материалдың сіңіруі 1-3 күн 2% целлоидинмен тең мөлшерлі майсана майы (касторовое) бар қоспада жүреді. Келесі кезеңде әрбір сағат сайын 3 рет хлороформды ауыстырып отырып, ағза кесінділерінен майсана майын жою. Одан кейін материал парафин сіңіру және құю стандартты әдіс бойынша жүргізіледі.

**1.8 Декальцинация туралы мағлұмат**

Материал сүйек пен тіс ұлпаларынан тұрса, оны әкті тұздардан айыру үшін, декальцинация жүргізіледі. Бұл үшін сүйек кесіндісін қышқылмен өңдейді. Негізінен азот қышқылын пайдаланылады. Нысанды 50 см3 жаңа жасалған 5% қышқылға байлап, 12-24 сағатқа салып қояды. Декальцинация **т**біткен соң сумен шайып, дегидратациялауды бірнеше өлшемді спиртпен (96°) жүргізіп, парафинге сіңіртіп, қалыпқа құяды.

Декальцинацияның жеңіл өтуіне Буэн ерітіндісінің, ішінде сірке және пикрин қышқылының болуы ықпал етсе, әлсіздендіру үшін 7% азот қышқылы колданылады.

Жақсы декальцинация ерітінділеріне органикалық қышқылдар: 5, 10, 15% құмырсқа мен үшхлорлы сірке қышқылдары жатады. Сарыуызы, кератині және хитині бар материалды целлоидинді майсана майы және парафинмен құяды. Нысан бекітілген соң спиртте сусыздандырылады, содан соң тең көлемді 2% целлоидин мен майсана майы ерітінділерінде (1-2 күн) ұстайды. Келесіде оны 37°С температурада, 3-6 сағат 2 мөлшерлі хлороформда ұстайды. Нысанды 2-3 сағатқа хлороформ-парафин қосындысына салады. Парафиннің екі өлшемінде, үшінші парафин-воскта 1-2 сағат сіңіртіп, қалыпқа құяды.

**1.8.1 Калций жою сұйықтықтары**

Шаффер бойынша азот қышқылы кальцийді тез және жақсы кетіретін сұйықтық болып саналады. Көбіне оның 5-7% су ерітіндісін пайдаланған дұрыс. Сұйықтықты дайындау үшін 5-7,5 см3 химиялық таза байытылған азот қышқылына 100 см3-ге дейін дистилденген су қосады.

Ең тығыз сүйектің кальцийі де 10 сағаттың ішінде жойылып кетеді. Декальцинацияланған **с**үйектің ісінуін басу үшін 24 сағатқа 5% күкірт қышқыл натрий немесе литий сұйықтығына салады немесе іледі. Тек осыдан кейін оны 24-48 сағатқа ағынды суда шайып жуады. Қоюлығы бұдан жоғары немесе төмен сұйықтықты қолдану қауіпті.

**1.8.2 Жаңа жасалған препараттарды байқау**

Жаңа препаратты байқау үшін лабиринтті-торлы сүйектен, сүйектік қабаттан кесінді алады. Зерттеуді риген сұйықтығында, көп жағдайда тионин қосылған метилен көк немесе нейтральды қызыл индифференті сұйықтықта жүргізіледі. Осы тәсілмен сүйектің арналарын жақсы зерттеуге болады.

Зерттеуді басынан бастап жүргізу үшін сүйекті өте майда немесе жіңішке бөліктерге кесіп бөлшектейді де, дискіде айналып тұрған пышаққа үнемі физиологиялық ерітінді құйып отырады.

**1.9 Гистологиялық препаратты жасау**

**1.9.1 Микротомдармен жұмыс жасау**

Микротом-арнайы механикалық құрал, олардың маркалары көп, ең жиі қолданатын ол шаналы микротом (10-сурет). Ол гистологиялық кесінділерді белгілі жұқалықта кесіп дайындауға арналған. Біздің өндірісте микротомдардың 3 түрі шығарылады.

1. Парафинді және целлоидинді кесінділер алуға арналған шаналы немесе циркулярлы микротом МС-2.

2. Парафинді материалдардың тізбектік кесіндісін жасайтын роторлы микротом.

3. Алдыңғы микротомдарға ұқсас, дегенмен өзіне тән ерекшеліктері мен конструкциялары және ережелері бар, мұздатқыш микротом.

|  |  |
| --- | --- |
| Laboratorium :: Микротом МС-2 Микротом санный, с подвижным ножом | H:\WP_20140416_019.jpg |
| А | Ә |
| 10-сурет. Микротомдар. **А –** шаналы МС-2, **Ә –** ТЕХНОМ МЗП -01. | |

Негізгі микротом бөліктері - станина (денесі), көтеру механизмі, блокты бекітіп ұстайтын механизм, пышақтар және пышақты бекітіп ұстайтын механизм (пышақ ұстағыш). Станина микротомның көлемді негізі, оған басқа бөлшектер жасалған. Оған пышақтың жүзін ауыстырып тұратын пышақ ұстағыш бекітілген. Көтеру механизмі - үш деңгейлі призмадан тұрады, арнайы түзеткішке қойылған. Ол призманы көтеретін бұрандамен оралған ұстатқыш - сыртқы және ішкі кесетін жақтаулардан тұрады.

**1.9.2 Микротом кесінділерін жасау**

Кез келген типтегі (айналмалы және сырғымалы) микротомалардан кесінділер алудың жалпы алғышарты - пышақтың объектіге қатысты перпендикуляр орналасуы және әр кесілгеннен кейін олардың арасындағы қашықтықтың өзгеруі. Ол үшін блок, ішіндегі объектімен бірге, микротомның арнайы құрылғымен қысылып, блок қажетті күйге келтірілгеннен кейін, қозғалыссыз бекітіледі. Микротомдық үстел микрометриялық бұранда арқылы осылай жалғасады, бұл екіншісінің қозғалысы үстелді ығысуына, демек блокқа, қатаң анықталған қашықтыққа әкеледі.

**1.9.2.1 Кесінділер келесі әрекеттер тізбегі арқылы алынады:**

1. Пышақты ұстағышқа салып, сырғытпаны пышақпен бірге артқа қарай жылжытып және микротомның берілуін қажетті микрон санына қою керек. Сол жағына пышақты қойып, блокты және қорапты арнайы гистологиялық кесінділерге арналған жылытқыш үстелшеге қойыңыз, оның түбі қара қағазбен жабылған. Оң жағында қылқалам, ине және майлық қою керек.
2. Микротомдық үстелдегі блокты заттың ұзын жағы пышаққа параллель болатындай етіп қысыңыз, оны блоктың жоғарғы жағы пышақпен жанасатын деңгейде орнатыңыз және оны қозғалмайтын етіп бекітіңіз. 3. Сырғытпаға пышақты бекітіп оны арытқа қарай жылжытыңыз. Сырғытпа пышақты өзіңізге қарай жылжытыңыз. Жолда көтерілген блокпен кездесіп, пышақ блоктан парафинді кесіп алады, ал кесінді оның бетіне түседі. Қозғалыстың тегістігі және жұмсалған күштің біртектілігін сақтай отырып, пышақты тез жүргізу керек, ол тәжірибеге байланысты қалыптасады.
3. Содан кейін сырғытпаны қайтадан тоқтағанша артқа қарай итеріп, және қайтадан автоматты түрде кесінді қалыңдығы бойынша блокты көтеріңіз. Екінші кесу жасау үшін сырғытпаны өзіңізге қарай жылжыту және т.б. Әрбір жаңа кесінді пышақта қалады, алдыңғы бөлігін итеріп, лента тәрізді тізбектеледі. Пышақтың қозғалысы жақсы лента алу үшін жеткілікті жылдам болуы керек. Микротомдық үстелдегі блокты заттың ұзын жағы пышаққа параллель болатындай етіп қысыңыз, оны блоктың жоғарғы жағы пышақпен жанасатын деңгейде орнатыңыз және оны қозғалмайтын етіп бекітіңіз.
4. 10-30 кесіндіден тұратын лентаны пышақтан жұмсақ қылқаламмен алып, қара түбі бар қорапқа ауыстырып, күңгірт жағын жоғары қаратып қатаң дәйектілікпен қою керек, яғни, кесінділер пышақтың үстіне жататын жағдайдағыдай. Лентаның соңында объектіні орналастыру кезінде блокқа жабыстырылған сандық белгіні қою керек. Қақпақтары жабық мұндай қораптарда кесінділердің сақталуы бірнеше күнге созылуы мүмкін, әсіресе оларды тоңазытқышқа салса.

*Микротом кесінділерін алу кезінде келесі ережелерді сақтау қажет:*

1. Пышақ өткір және дұрыс өңделген болуы керек (егер жұқа шашты пышаққа әкеліп үрлеген кезде, оны қырқатындай өткір болуы керек). Жұмысты бастамас бұрын пышақты ұстатқышқа дұрыстап қойған жөн.
2. Пышақ бекітілген кезінде оның беткі қабаты парафин блогының шеттеріне параллель және пышақтың қозғалу бағытына перпендикуляр болу керек. Пышақтың көлбеу бұрышы сынақ учаскелерінде алдын-ала анықталады. Егер көлбеу тым тік болса, пышақ блоктың үстіңгі бетін тырнауды бастайды, ал егер мәні жеткіліксіз болса, пышақ артқа жылжытқанда блоктың алдыңғы шеті мыжылып қалады (11-сурет)



11-сурет. Парафинді блокты кесу техникасы.

Пышақ пен микротомның барлық бөліктері өте таза ұсталуы керек. Пышақ қажет болған жағдайда жеңіл қозғалыспен екі жағынан жұмсақ ксилолмен ылғалдандырылған шүберекпен сүртіледі. Қозғалмалы бөліктерде парафин қалдықтары мен шаңдары болмауы керек, машина майымен немесе вазелин майымен жақсы майлануы керек. Әр кесуден кейін микротом мұқият тазаланып, қақпақпен жабылады. Жақсы сүртілген пышақты, ілулі күйінде қабырғаға тигізбей арнайы ағаш футлярда сақтайды.

Парафин кесінділерінің сапасы жоғары болу үшін олардың қалыңдығы маңызды. Тамыр меристемаларының анатомиялық препараттары үшін қалыңдығы 7-8 мкм кесінділерді кесу ыңғайлы, меристема өркендері 9-10 мкм, ұрық тұқымдары 6-7 мкм. Эмбриологиялық мақсаттар үшін кесінділердің қалыңдығы 10-15 мкм болуы мүмкін.

**Кесінделерді заттық шыныға жабыстыру**

Микротом арқылы жасалынған кесінділерді бояудан бұрын заттық шыныға жабыстыру керек.

Микротомды препараттар үшін қалыңдығы 1-1,2 мм заттық шынылар қолданылады, шынының бір жағында ені 1-1,5 см қарапайым графит қарындашпен жазылатын, ешқандай сұйықтықта жуылмайтын жазбаға арналған орын бар. Заттық шынылар өте таза және майсыз болуы керек. Мұны істеу үшін оларды щеткамен және ыстық сумен, сабынмен мұқият жуу керек. Содан кейін оларды салқын сумен шайып, 3:1 немесе 4:1 қатынасында концентрлі күкірт қышқылымен (хром қышқылымен) калий дихроматының қаныққан сулы ерітіндісіне салады. Күкірт қышқылын сумен кез-келген пропорцияда араластырғанда жылу көп бөлініп, сұйықтық көлемінің қысылуы жүреді. Осыған байланысты күкірт қышқылын суға аса сақтықпен құю қажет. Жақсы жуылған және мүлдем таза заттық шыныларға ақуыз немесе басқа желімсіз парафиннің бөліктері жабыстырылуы мүмкін.

*Ақуыздарды дайындау.* Тауық ақуызы тең көлемдегі глицеринмен біріктіріліп, жақсылап шайқалғаннан кейін бүктелген қағаз сүзгісі арқылы сүзіледі. Сүзу өте баяу жүреді, бірнеше күн бойы, сондықтан шұңқыр (воронка) жоғарыдан жабылуы керек. Ақуыздың глицеринмен қоспасына және ол сүзілетін ыдысқа фенолдың немесе тимолдың (кез-келген антисептикалық) кристалы қосылады. Сүзілген ақуыз пайдалануға дайын. Ол пенициллин флакондарына құйылады. Олардың әрқайсысының тығынына шыны таяқша салынған төменгі жағымен ол құйылған сұйықтыққа тиіп тұрады.

*Кесінділерді заттық шыныға келесі ретпен жабыстыру ыңғайлы:*

1. Таза заттық шынының шетіне шыны таяқшаны екі рет жеңіл тигізіп, ақуызды тамызу керек және пипеткамен тазартылған (дистилденген) судың бірнеше тамшысын заттық шынының бүкіл бетіне біркелкі жағу керек. Саусақ әуелі тазаланып спирт-эфирде майсызданған болуы керек. Этикеткаға орын қалдырып, ақуызды шынашақпен шыныға жағу керек.
2. Заттық шынының бір шетіне қарапайым қарындашпен мұқият этикетка жазу керек. Ол бөлшек түрінде жазылады, онда заттық шынының реттік нөмірін және фиксация санын көрсетеді. Қалған жерге кесіндінің қалыңдығын және медианалық кесінді координаттарын жазыңыз.
3. Кесілген парфинді кесінділердің бөлімдерін суға мұқият түсіріп, олардың беткі жағымен препараттық ине немесе жақсы суланған қылқыламмен тартып, заттық шыныға орналастырады (12-сурет). Кесінділер жылтыр жағымен төмен орналасуы керек. Бір заттық шыныға бір немесе екі жабынды шыныны алып жатқан аймаққа сәйкес келетін кесінділерге салуға болады. Заттық шыныға кесінділерді қатаң реттілікпен бірінен соң бірін қатарлатып орналастыру керек (13-сурет).

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| 12-сурет. Парафинді кесінділерді заттық шыныға жұмсақ қылқаламмен жылы судан тартып алу. | 13-сурет. Парафинді кесінділерді заттық шыныға жапсыру. |

1. Көбінесе, препараттың басталуы жоғарғы бұрышта болады, демек, алғашқы кесінді сонда салынып, ал келесілері төменге келтіріліп салынады. Бұл бірінші қатарды жасайды, оның ұзындығы жабынды шынының ұзындығынан сәл аз болуы керек. Бір қатардағы бөлімдердің санын санап, кесінділердің бүкіл парафин лентасын скальпельмен бірдей аймақтарға бөліп, оларды заттық шыныға бүйір жағының ұзындығына перпендикуляр етіп орналастырыңыз.
2. Микротомнан алынған кесінділер әрдайым біршама қысылған және мыжылған болады. Сапалы препараттарды жасау үшін оларды түзету керек. Ол үшін кесінділерді салғаннан кейін, заттық шыныны спиртовкамен өте мұқият қыздыру керек, суы қызған кезде көлемін көбейтіп, кесінді жайылып тұратын етіп. Судың температурасы парафиннің балқу температурасынан сәл төмен болуы керек, оны жұмсартатын, бірақ, ерітпейтіндей, әйтпесе препарат бұзылуы мүмкін. Сонымен қатар, парафинге қатырылған кесінділерді жаю үшін температурасы 40°С- дейін көтерілетін арнайы жылытқыш үстелше қолданылады (14-сурет).



14-сурет. Арнайы гистологиялық кесінділерге арналған жылытқыш үстелше.

Оған бетінде орналасқан кесінділер бар заттық шыныны қояды. Үстелшенің жылуы арқылы шыныда қалған бір тамшы су жылып парафин кесінділерін жаяды. Үстелше болмаған жағдайда қайнаған суды пайдалануға болады. Су суып қалмау үшін астын отпен жылытып отыру керек.

1. Препараттарды түзету үшін жеткілікті болған кезде және су суыған кезде, заттық шыныны сәл еңкейтіп, артық суды оның бұрышынан төгіп тастаңыз.
2. Кесінділердің орналасуын инемен мұқият реттеңіз, оларды мұқият және тығыз етіп қатар қойыңыз. Бөлімдер ұзына бойы және көлденең бағытта бір-біріне параллель болуы керек, содан кейін оларды микроскоп арқылы қарау оңайырақ болады.
3. Заттық шыныны фильтр қағазымен тазалап, оны саусақ жастықшаларымен қысып және мүмкіндігінше тезірек арнайы трафареттегі көзілдірікті 37-400С температурасы бар термостатқа қою керек. Егер судағы парафин қатып қалған күйде, бөлме температурасында буланса, онда суды алып тастағаннан кейін шыны мен парафинің арасында жарықтар пайда болады, олар препараттарды бояу кезінде кетуі мүмкін.
4. Су термостатта буланған кезде, жұмсартылған парафин пайда болған бос жерлерді толтырады және кесінділер шынаға мықтап жабысады. Кептіру 5-7 күнге созылады. Кептіруден кейін кесінділер жарықта толығымен біркелкі мөлдір болуы керек (объектінің болуына байланысты ұлпалар ескерілмейді).
5. Кептіруден кейін кесінділер жарықта толығымен біркелкі мөлдірлікке ие болуы керек (объектінің болуына байланысты ұлпалар ескерілмейді). Шынының артқы жағының шағылысқан жарықтарында кесінділерде жеңіл жарық айна жарқырауы болмауы керек. Жарқырау кесіндімен заттық шынының арасында ауаның болуын көрсетеді. Кейінгі операцияларда олар қабыршақтанып кетеді, оны түзету үшін желімделген кесінділерді 40-500 спиртте 2-3 минутқа батырып, термостатта 40°C температурада қайтадан кептіру керек. Кесінділері бар заттық шынылар қажет болған жағдайда шаңнан қорғалған жерде шексіз сақталуы мүмкін.

**1.10 Гистологиялық препараттарды бояу**

Гистологиялық препарат микроскоппен қарағанда жарықты жақсы өткізетін және барлық құрылымын толық сақтаған болуы қажет. Препарат кірленбеуін және зақымданбауын қадағалап арнайы бояу үшін арналған ыдыстарды пайдалану керек.

Клетканың әртүрлі бөліктері және клетка аралық элементтер бояу түрлерін әрқалай қабылдайды. Препараттарды бояу физико-химиялық процестерге негізделген. Алдымен физиканың диффузды (ену), адсорбция (үстіртін сіңіру) және абсорбция (терең сіңу) құбылыстарын байқауға болады. Клетканың тығыздығы мен бояудың шашырауы маңызды емес. Гистологияда бояулар 3 түрге: негізгі, бейтарап және қышқылдық деп бөлінеді.

1. Негізгі бояулар клетка мен ұлпалардың құрылымдарын, құрамында ДНҚ бар ядроның хроматинин, құрамында РНҚ бар ядрошықты бояу үшін қолданылады, Осыдан базофильді деген атау шыққан.

2. Қышқылды бояулар - бөлшектерді бояу үшін (эозинофильді лейкоциттердің түйіршіктерін, клетка цитоплазмасын және т.б.) қолданылады. Осыдан оксифилді атауы шыққан. Бұл топқа эозин, эритрозин, қышқылды фуксин, қызыл конго және т.б. бояулар кіреді.

3. Бейтарап бояулар сулы қышқылды ерітінділер мен негізгі бояулардың

қосылуынан пайда болады. Бұл топқа су, эозинді қышқылды метилен көк және т.б. жатады. Бояудың сапалы және біркелкі болуы фиксациялауға да байланысты екенін естен шығармау керек. Ол үшін бояу заңдылықтары мен әдістемелерін қатаң сақтау керек. Гистологияда қолданылатын бояулар - табиғи және жасанды болып бөлінеді. Гистологиялық бояуларды бірнеше түрге: негізгі, бейтарап (нейтральные), қышқыл. Негізгі бояулар базофильді деп аталады (гематоксилин, тионин, кармин, метилді жасыл (метиловый зеленый) т.б. Бейтарап бояуға: судан III, судан IV, метилен көк (метиленовый синий), қыщқыл бояуға: эозин, қышқыл фуксин, конго қызыл (конгорот), эритрозин жатады.

Барлық гистологиялық бояу әдістерін негізгі екі топқа бөлуге болады. Бірінші шолу-зерттеліп отырған нысанға жалпы шолу жасау. Зерттеп отырған арнайы мүшелерді немесе жас клетка элементтерін бояу. Екінші топтық әдістерді қолдану өте күрделі және ерекше бекіту әдістерін пайдалануды талап етеді. Гистологиялық кесінділерді бояған кезде жақсы нәтиже алу үшін, төмендегі ережелерді ұстану қажет:

- Бояулар таза болуы керек, кез-келген бояғыш затты қолданар алдында сүзгіштен өткізу керек, сулы ерітінді тек дистилденген судан жасалады.

Алдымен төмен байытылған бояумен, кейін жоғары байытылған бояумен бояу керек. Бұл әдісті қолдану пайдалы.

- Кесінді жасау мен бояу талаптарын қатаң сақтау керек.

Кесіндіні боямас бұрын арнайы өңдеуден өткізген жөн. Парафин түссіз болмағандықтан, бояу процессін қиындатады, сондықтан оны кесіндіден бөліп алу керек. Бұл үшін кесіндіні парафиннен ажырату керек, ал осы процесті *депарафинизация* деп атайды. Ол үшін кесінді парафинін ерітіп, спиртпен сусыздандырып, суда шаяды. Іс жүзінде ол былай жүреді, биологиялық стакандарға белгілі бір ерітінділерді құйып, этикетка жапсырылады.

Депарафинизация мен дегидратацияны мынадай ретпен орындайды:

I Ксилол (бензол, толуол) - 2 мин

II Ксилол (бензол, толуол) - 2 мин

I Абсолютті спирт - 2 мин

II Абсолютті спирт - 2 мин

І 96°-ты спирт - 2 мин

ІІ 96°-ты спирт - 2 мин 90°-ты спирт - 2 мин 80°-ты спирт - 2 мин 70°-ты спирт - 2 мин

Дистилденген су - 10 мин.

**1.10.1 Парафинді гистологиялық кесіндіні целлоиттау**

Кесіндіні сақтау үшін, оның парафинін жартылай ерітіп целлоидтау әдісін қолдану керек. Целлоидин мен заттық шынының бетін жұқа қабыршақ түрде жабады, сөйтіп кесінді шыныға мықтап жабысып тұрады.

Әдістің жүргізу жолы:

І Ксилол(бензол,толуол) - 2мин

ІІ Ксилол(бензол, толуол) - 2мин

І Абсолютті спирт - 2мин

ІІ Абсолютті спирт - 2мин

Спирт - 2мин

2% целлоидинде - 2 мин, одан кейін артық целлоидинды ағызып, шынының артқы жағын сүртіп алу керек

Этилді спиртке 80°-ты - 2 мин, целлоидин тығыздалу үшін

Дистилденген су - 10мин

Таңдамалы бояу жүргізу Әр бояудың өз әдісін қолдану керек.

Бальзаммен жабар кезде целлоидин қабыршағын ерітіп тастау керек. Ол үшін шыныны абсолютті спирттен кейін спирт-эфирде 3-5 мин. ұстау керек. Боялған кесінділерді бальзаммен қатырып, үстінен жабынды шынымен жабады (15-cурет). Осы екі шыны арасындағы боялған ағза кесіндісін гистологиялық кескін (препарат) деп атайды.

15-сурет. Боялған кесінділерді бальзаммен қатырып үстінен жабынды шынымен жабу.

**1.10.2 Желатинді кесінділерді өңдеу және бояу ерекшеліктері**

Желатиннен бөліп алып, сәл қышқылданған дистилденген суға салады да, 37°қа дейін қыздырады.

Қатырылған кесінділерді алдын-ала өңдемей, дистилденген суға жинайды. Алдын ала өңдеуді және бояуды заттық шыныға жабыстырылған немесе суда қалқып жүрген кесінділерге қолдануға болады. Бірінші жағдайда биологиялық стакандарды, арнайы кюветтерді, биік бюкстарды пайдаланады. Шыныға отырғызылған кесіндіні үшбұрыш қып отырғызады. Ал қалқып жүрген кесінділерге сағат шынылары қолданылады. Кесінді келесі өңдеулерден өткен кезде шыныдан түсіп қалатын болса, түзеуге болады. Бұл үшін кесіндіні судан алып 70° және 96° спиртке салады, кейін шыныны 0,5 - 1% целлоидин ерітіндісіне салып алып, аздап кептіріп, 70° спиртке салады.

Осыдан заттық шыны мен кесіндінің бетін жұқа целлоидинді қабыршақ жабады да, кесінді шыныға мықтап жабысып қалады. Бұл әдістерден соң кесіндіні дистилденген суда шәйіп, бояйды.

Кесіндіні сулы бояғыш заттармен бояғанда дистилденген суды пайдаланып, ал спирттік бояулармен жұмыс істегенде күшті спирттен бояғыш ерітіндіге салады. Кесінді керекті түске боялған соң, сумен шаяды. Егер бояуы артық болса, кесіндіні сумен керекті түс пайда боялғанша шаяды.

**1.11 Бояуға пайдаланылатын сұйықтықтарды дайындау**

**Эрлих қышқыл гематоксилины.** 96° спирттің 100 мл-де 2 гр гематоксилинді ерітіп, үстіне 100 мл дистилденген су қосады, бұған 100 мл таза глицерин мен 3 грамм калий ашудасын (химиялық таза) және 10 мл мұзды сірке қышқылын қосады да, жарық жерде 14 күнге қойып қояды. Құрамына ауаның мүлдем кірмеуі үшін, мойыны кең ыдыстың аузын дәкемен жауып қойған жөн. Ыдыстың ауызы қатты тығындалып жабылса бояудың қасиеті ұзақ мерзім сақталады.

**Бемер гематоксилины.** 10 мл 100° спиртке 1 г гематоксилин кристалын және 10% 200 мл суда ерітілген, сүзілген калий ашудасын қосады. Ерітіндіні 4-5 апта жарық көзіне қояды. Бояу ерітіндісін қолданар алдында, әр дайым сүзіп отыру керек. Ол біраз уақыттан соң бұзыла бастайды.

**Майер қышқыл гемалаунын дайындау.** 1000 мл дистилденген суға 1 г гематоксилин, 0,2 иодты қышқыл натриді (NaJO3) және 50 г (химиялық таза) калий ашудасын қосып, барлығы еріп біткенше үздіксіз араластырып отыру керек. Бұл сұйықтық көкшіл-күлгін түске боялады. Кейін 50 г хлоралгидратын және 1 г кристалды түрдегі лимон қышқылын қосқанда, бояу түрі күлгін-қызыл түске айналады. Химиялық таза ыдыста бояу өз қасиетін ұзақ уақыт сақтайды.

Бұндай гемотоксилиннің тез тотықсыздану қасиетіне байланысты осы әдісті көп созбай, бірден қолдануға жарайтыны, оның өте маңызды жағы болып табылады.

**Маллори бояуын дайындау.** 0,5 г анилин көкке 2 г оранж G және 2 г щавель қышқылын қосып, осының бәрін 100 мл дистилденген суда ерітіп, қайнату керек. Суыған соң, сүзіп көп уақыт сақтауға болады. Бояуды қолданар кезде тағы қайнатып сүзгіден өткізу керек.

**Гейденгайн бойынша темір гематоксилинін дайындау.** Темірлі гематоксилинімен бояу, жоғарыда айтылған, гематоксилин ерітінділерінің түрлерімен бояудан айырмашылығы бар. Темірлі гематоксилиннің тек ядроны ғана бояп қоймай, цитоплазмалық және торша аралық құрылымдарды да бояу қабілеттілігі бар. Бояу алдында кесіндіні ашудас ерітіндісінде шәйіп алады. Келесі өңдеулер кезінде қара темір гематейінді жылтыр түс пайда болады. Кесіндіні саралағаннан соң, ол қайта ерітіндіге кетеді.

**Бояу ерітінділерін әзірлеу. Темір ашудасты ерітінді.** 10 г темір ашудасты 100 мл дистилденген суда ерітеді. Темір ашудасының тек ашық қызғылт кристалын пайдалану керек. Сары, жасыл, ақшыл кристаллдарды қолданбаған жөн.

**Гематоксилин ерітіндісі.** 1 г гематоксилинді 96° спирттің 10 мл-де ерітіп, үстіне 100 мл дистилденген су қосады да, 4-5 аптаға ауа және күн сәулесі жеткілікті болатын жерге қояды. Бұл уақыт аралығында ерітіндінің түсі ашық-қоңыр түстен қою-қоңыр түске ауысады. Ерітіндіні қолданар алдында өлшеп алып, сонша дистилденген су құяды. Гематоксилин ерітіндісін тез арада дайындау үшін, жоғарыда айтылған әдіспен дайындалған ерітіндіге 0,1 г йодты қышқыл натриді (NaJO3) қосады, бұл қышқыл гематоксилинді гематейн қылып тез тотықсыздандырады және дайындалғаннан кейін 1 сағаттан соң қолдануға болады.

Гематейннен бояу ерітіндісін дайындау. Бұл бояу екі бөліктен тұрады:

- 50 мл 96° этилді спиртте 1 г гематейнді ерітеді.

- 1 л дистилденген суда 5 г (химиялық таза) калий ашудасын ерітеді. Екі ерітіндіні де химиялық ыдысқа құйып, сүзеді және 1-3 тимол кристалын қосады. Ерітінді мықтап жабылған ыдыста жақсы сақталады.

**Эозинді дайындау.** 100 мл дистилденген суда 0,1 бояғыш затты ерітеді.

**Вейгерт темірлі гематоксилинін дайындау:** Бұл бояу екі бөліктен тұрады:

- 1 г гематоксилинді 100 мл 96° этилді спиртте ерітеді.

- 4 мл 1,5 хлорлы темірге 1 мл тұз қышқылын және 95мл дистилденген суды қосады немесе 1,16 хлорлы темірге 1 мл тұз қышқылын және 98 мл дистилденген суды калий ашудасын ерітеді. Екі ерітіндінің мөлшерін бірдей (1:1) етіп, бір химиялық ыдысқа құйып қолдануға болады.

**Гроат гематоксилинін дайындау:** Бұл бояу да екі бөлімнен тұрады:

- 1г гематоксилинді 100 мл 96° этилді спиртте ерітеді.

- 50 мл дистилденген суға 1 г (химиялық таза) темір ашудасын, ерітіп оған 0,8 мл байытылған күкірт қышқылын қосу керек. Екі ерітіндіні сүзіп, мөлшерін бірдей қылып (1:1), бір химиялық ыдысқа құйып бір сағаттан кейін ғана қолдануға болады. Сақтау мерзімі үш айдан аспау керек.

**Массон бояуын дайындау:**

1. Массон А (фуксин-пунц) - 0,1 г қышқыл фуксин +0,2 г пунц S + 300 мл су. Барлық қоспа ерігенде 0,6 мл мұздық сірке қышқылын қосу керек.

2. Массон В (Оранж G және фосфорлы молибден қышқылы қоспасы), оранж G 2 г 1-5 г фосфорлы молибден қышқылы +100 мл дистилденген су қосу.

3. Массон С (ашық көк). 0,1-0,2 г ашық көкке 200 мл 2% сірке қышқылын қосу керек.

**Караци гематоксилины.** Кейбір жазбаларда және орыс транскрипцияларында Карачи деп жазылады.

Дистилденген су 400мл

Алюмокалийлы ашудас 25г

Кристалды гематоксилин 0,5г

Глицерин 100мл

Йодты қышқыл калий (KJO3) 0,03г

+25° температурада 1-2 сағаттан бірнеше күнге дейін қолданбай сақтаса, бұл қоспа мөлдір емес, шие-көк түсті бояуға дайын сұйықтық болып шығады. Сақтау уақыты ұзарса, оның бояу шамасы да көтеріледі. Бояуы бар химиялық ыдысты дәкеге оралған мақта тығын жасап жауып қойса, өте көп сақталады. Бояу көгеріп кетпеу үшін аздап тимол кристалын қосу керек.

**1.12 Бояу әдістері**

Бояу алдында жұмыс орнын дайындап алады, үстелдегі артық құралдарды алып тастап, микроскопты орнатады. Белгілі бір ерітінді түрлеріне байланысты ыдыстарды ретпен қойып, жабынды шыныларды және тағы басқа құрал жабдықтарды даярлайды. Кейін ғана барып бояуға кіріседі.

**Кесінділерді гематоксилин-эозинмен бояу тәсілі.** Бұл әдіс гистологиялық тәжірибеде кеңінен қолданылып келе жатыр. Бояуды белгілі бір ретпен орындау керек. Бояу нәтижесі, әдіспен қатар кесіндінің құрамына да байланысты. Қандай бояу әдісі қолданылсада, ең бірінші міндет парафинді еріту.

Депарафинизация:

І Ксилол (бензол, толуол) - 2 мин

ІІ Ксилол (бензол, толуол) - 2 мин

І Абсолютті спирт - 2 мин

ІІ Абсолютті спирт - 2 мин

І 96°-ты спирт - 2 мин

ІІ 96°-ты спирт - 2 мин

90°-ты спирт - 2 мин

80°-ты спирт - 2 мин

70°-ты спирт - 2 мин

Дистилденген су - 10 мин

Содан кейін кесінді бар шыныны дистилденген судан алып, жан- жағында қышқыл болса, сүртіп құрғатады, бір-бірлеп орналастырып, бояу ерітіндісін тамызғышпен құяды. Бояу кесіндіні түгелімен жауып тұруы тиіс. 2 минуттан кейін, бояуды төгіп, оны дистилденген суға салады. Қалған екі шыны ыдысты 4-6 минуттан соң гематоксилиннен алады. Осы жұмыстардан соң, шыны ыдыстың астын құрғатып сүртіп, микроскоптың кіші үлкейткішімен қарайды. Боялу кезінде кесінді суда қалқып жүрген болса, препараттық ине арқылы бірнешеуін бояуға салып немесе төменгі бюкске қойып, аздаған уақыттан соң бояудан немесе бюкстан алады да, дистилденген суда шаяды, содан соң таза шыныға салып микроскоппен қарайды.

Бояу жолы:

Гематоксилин мен бояу 1-5 мин

Су мен шайқау 2 мин

Ағынды суда жуу 10 мин

Эозин(0,1%) 1-10 мин

Сумен шайқау

Дегидратация, түссіздендіру және бальзамға бекіту:

70°-ті спирт 2 мин

80°-ті спирт 2 мин

90°-ті спирт 2 мин

I 96°-ті спирт 2 мин

II 96°-ті спирт 2 мин

I Абсолютті спирт 2 мин

II Абсолютті спирт 2 мин

I Ксилол (бензол,толуол) 2 мин

II Ксилол (бензол,толуол) 2 мин Бальзам тамызып, жабынды шыны жабыстыру.

Нәтижелері: ядро ашық күлгін түске боялатын болса - кесінді дұрыс боялмаған, ядро - күңгірт - күлгін, цитоплазма да боялған болса - кесінді қатты боялған, ядро - қызыл-күлгін түсті және ядрошық, хроматиндер анық көрініп, цитоплазмасы ашық түсті, боялмаған болса - бояу дұрыс жүргізілген.

Гематоксилин - табиғи бояу, ол суда, спиртте және глицеринде жүргізіледі. Гематоксилин ерітіндісі негіздік қасиеттерге ие, ядро құрылымдарын анық көрсетеді. Бірақ гематоксилиннің өзі боямайды, бояушы оның өнімі - гематейн. Эозин - жасанды бояу, суда не спиртте ериді, қышқылдық қасиетке ие, ұлпаның цитоплазмасын қызғылт түске бояйды. Гематоксилинмен боялған кесіндіні дистилденген суда жақсылап шайып, үстіне эозин ерітіндісін тамызады. Бояу уақытының маңызы зор, мерзімі 1- 4-5 минутқа дейін созылады.

Қорытынды:

1. Цитоплазма қызғылт немесе сарғыш түске боялған - препарат анық боялмаған.

2. Жалпы түсі қызыл, микроқұрылымдар және ядроның шекаралары анық көрінбейді - препарат қатты боялған.

3. Жалпы көрінісінің түсі қызғылт сары түсті, ядросы анық көрінген - препарат жақсы, дұрыс боялған.

Эозинмен бояу біткен соң, бояуды флаконға қайта құяды, кесіндіні дистилденген суда шаяды, спирттермен, карбол-ксилолмен, ксилолмен шайып, бальзаммен жабады. Эозинді суда және күші төмен спиртте шайған уақытта оңай кетеді, сондықтан кесіндіні бұндай сұйықтықта шайған кезде тез жүргізген дұрыс болады, тек 96° және 100° спиртте 1-2 минут ұстайды. Кесінді эозинмен қатты боялған болса, онда артық бояуларды шайып тастау керек. Эозиннің бояу қасиеттерін күшейту үшін сірке қышқылын пайдалану керек. Ядроны қызыл түске, цитоплазманы жасыл және сары түске бояйтын бояулар түрлерін кездестіруге болады.

**Полихромды Массон бояуы.**

1. Кесіндінің парафинін жою.

2. Дистилденген суда жуу - 10 мин.

3. Гроата гематоксилинімен бояу - 2-5 мин.

4. Ағынды суда жуу - 5 мин.

5. Фуксин-пунц қоспасында бояу:

- Массон А-5мин

- 1-2 % сірке қышқылында шаю.

- Массон Б - 5мин.

- 1-2% сірке қышқылында шаю.

- Массон С - 5мин.

- 1-2% сірке қышқылында шаю,

Дегидратация, түссіздендіру, бальзам тамызып, жабынды шынымен жабу.

Қорытынды: Қоңыр-қара түсті ядро, қызғыш-қызыл цитоплазма, сары эритроциттер, кілегей мен дәнекер ұлпа жасыл түсті.

**Майер гемалауны мен бояу.**

Бояудың мерзімді уақытын білу керек. Кесінділерді дистилденген суда 3-5 мин жуып, кейін құбыр суының астында күлгін түс пайда болғанша шаяды. Осыдан кейін, кесіндіні қайтадан 3-5 минутқа дистилденген сумен жуады. Ядроны гематоксилинмен бояудың жоғарыда айтылған классикалық әдісінен басқа, әдісі де бар. Ядросы боялған кесіндіні дистилденген сумен шайғаннан соң, 1-6 секундқа 70° спиртке салады да, микроскоппен қарайды. Ядроны гематейнмен және қышқылды Майер гемалаунымен бояғанда да осындай әдіспен жүргізеді, бірақ кесіндіні жақсылап жуу керек, әйтпесе қышқылдың аз мөлшері қалса да, бояуды бұзады.

**Гейденгайн бойынша бояу.** Бояуды жүргізу. Алдын-ала өңдеу.

I Ксилол (бензол, толуол) - 2 мин

II Ксилол (бензол, толуол) - 2 мин

I Абсолютті спирт - 2мин

II Абсолютті спирт - 2 мин

I 96°-ті спирт - 2 мин

II 96°-ті спирт - 2 мин

90°-ті спирт - 2 мин

80°-ті спирт - 2 мин

70°-ті спирт - 2 мин

Дистилденген су - 10 мин.

Дистилденген судағы кесіндіні 2,5 проценттік темір ашудасына ауыстырып, 3-12 сағатқа қойып қояды. Бояу. Кесіндіні дистилденген суда шайған соң, түсі қарайғанға шейін сумен араластырылған гематоксилинге 1- 36 сағатқа салады. Мезгілі жіктеліп, өңделуі бояу кезеңінің ең маңызды уақыты. Боялған кесіндіні 2-3 өлшем дистилденген суда жуады да темір ашудасты ерітіндіге салады. Сараптаманы микроскоп арқылы жүргізеді. Бұл үшін кесіндіні дистилденген суда шайып, қарайды. Егер өңдеу тез жүрсе, онда темір ашудасының күшін төмендету керек, ол үшін дистилденген су қосады. Бояудың керекті түсін алған соң, кесіндіні құбырдың ағынды суында жуу керек, оның ұзақтығы 10-12 минут. Кейін дистилденген суда шаяды, кептіреді, бальзамдаумен аяқтайды. Кесіндіні тез арада Гейденгайнның темір гематоксилинімен шапшаң бояу үшін Гурвич әдісін пайдаланады. Дистилденген судан кесіндіні алып, сүзгіш қағаз арқылы суын сіңіріп алып, 2,5% темір ашудасын тамызады. Шынының төменгі жағын бу пайда болғанша спирт шамды жағып ұстайды да, аздап суытады, бұл істі 2-3 рет қайталайды. Бұдан кейін ашудасты төгеді, гематоксилин тамызып, бу пайда болғанша тағы қыздырады. Бояуды кесінді де көк-қара түс пайда болғанша пайдаланады. Дистилденген сумен шаяды, үстіне ашудасты құяды, содан соң микроскоппен қарайды. Кесіндінің саралануы біткен кезде дистилденген сумен шайып, кептіріп, спирттерде сусыздандырып, ксилолда ағартып бальзамдаумен аяқтайды. Этикетка жасауды заттық шыныға кесіндіні жабыстырғаннан соң істейді. Этикетканы арнайы қарындашпен жазады, әсіресе бұқтырылған сиямен жазған қолайлы. Сиямен жұмыс істегенде керекті заңдылықтарды сақтау керек.

**Маллори бояу әдісі.**

1. Кесінділердің парафинін жою.

2. 0,1% қышқыл фуксинде бояу - 3 мин.

3. Дистилденген суда жуу - тез.

4. 1% форфорлы-молибден қышқылында бекіту -3-5 мин.

5. Ағынды суда жуу -5 мин.

6. Маллори қоспасында бояу - 2 мин.

- Суда шаю.

- 96° спирте саралау.

- Абсолютті спиртте - 2 мин.

- Ксилол - 2мин.

- Бальзам тамызып шыны мен жабу.

Қорытынды: коллаген, торлы және дәнекер ұлпалары қара-көк түсті; эритроциттер сары-қызыл түсті, ет талшықтары айқын-сарғыш; нейроглия және ганглиозды жас торшалар-күлгін; хроматин қызылдан қоңыр-сарыға дейін.

Буэн және Ценкер бекіткіштерінен кейін кесінділер өте жақсы боялады. Егер материал формалинде бекітілген болса, кесінділерді бояу алдында, 3% калий бихроматында 20 минут ұстаған дұрыс болады.

Ван-Гизон альциан көмегімен бояу.

1. Кесіндінің парафинін жою.

2. Вейгерт гематоксилинімен бояу 5-7 мин.

3. Ағынды суда жуу - 10 мин.

4. Альциан көгімен бояу (0,1 г альциан көгін 100 мл 2% сірке қышқылында еріту) 1-2 мин.

5. Сүзгіш қағазбен құрғату.

6. Пикрофуксинмен бояу (1% су қышқыл фуксинге суға 1:10 мөлшерінде қаныққан пикрин қышқылын қосу керек.

7. 96° этил спиртінде шаю.

8. Дегидратация, ксилолда түссіздендіру, бальзамға салып қатыру.

Қорытынды: қоңыр-қара -ядро, дәнекер ұлпалары - қызыл, бұлшық еттер сап-сары, кілегей – көгілдір түске боялады.

**Ван-Гизон әдісімен дәнекер ұлпаларын және бұлшық еттерді бояу.**

1. Кесіндінің депарафиницациялануы.

2. Вейгерт гематоксилинімен бояу 2-5 мин.

3. Дистилденген сумен жуу мен бастап, ағынды суда жуу -10 мин (ағынды су болмаса суды 2-3 рет ауыстыру керек).

4. Пикрофуксинмен бояу (5-10 мл 1% су қышқылы фуксинді суға 100 мл қаныққан пикрин қышқылын қосу керек (1:10). Сүзгіш қағазға бояуды тамызғанда қан түсті болу керек.

5. Кесінділерді тез дистилденген суда (5-10 сек) шайып жіберу керек.

6. 96° этил спиртінде шаю.

7. Абсолютті спиртте дегидратациялау.

8. Ксилолда түссіздендіру.

9. Боялған кесінділерді бальзамға қатырып, үстінен жабынды шынымен жабу.

Қорытынды: коллагенды ұлпалар -қып-қызыл, ет және эластикалық талшықтар - күңгірт-сары немесе жасыл-сары, ядро - қызыл, қара.

**Сүйек ұлпаларын бояу әдістері.**

Кесіндіні бояу үшін араластырылған гематоксилин керек. Делафильда гематоксилині сүйек денешіктерін өте анық бояйды. Бехердің енгізген бояуымен хлорлы алюминий жасауға болады. Дайындау үшін 0,1 г галленнаны 100 см қайнатылған 5 % хлорлы алюминийге және 15 минут қайнатып құяды. Суығаннан кейін 100 см-ге дейін толтырады да, сүзіп (1:5) араластырады, сөйтіп 12-24 сағат бойы боялады.

Нәтижелер: судың сұйықтығында галенн сүйекті 24 сағатта бояйды, метахроматты қара қызғылт түске, ал басқаларын қоңыр-күлгін түске.

**1.13 Жаңа жасалған сұйықтық 2 % бура. Жіктеліп алынған, декальцинация және недекальцинация сүйек ұлпасын бояу әдістері.**

Бұл әдістерге екі топ жатады. Біреуінде толық декальцинация болады, ал екіншісінде кальцилі тұздар ыдырамайды, немесе кейбір бөлігі ғана ыдырайды. Бұған Бокк бойынша гемалаун - эозин бояуын қолданады. Мюллер сұйықтығында кесіндіні формалинге ұстау керек. Эбнер бойынша декальцинация 5% азот қышқылында немесе 5 % калий ашудасында өтеді. Ағын суда шаю 24-4-28 сағат. Құрғату үшін 2 % целлоидинге 10-14 күнге немесе оның 4 % ерітіндісіне салады, 4-6 күнге ұстайды, содан соң төгеді, қалыңдығы 5-10 мкм кесінділер 12-18 г сұйық гематоксилинде боялады. Сұйықтықты әр кезде қайта дайындайды. Сұйықтық 0,1 г гематоксилинде, 10 см абсолютті спирттен, 6:20 г калийлік ашудас сұйықтығы, 200 мл дистилденген су қосады. Сұйықтық: 1 г калий перманганатын 16 мл дистилденген сумен араластырады. Материалды кесу әксіздендірудің әдістеріне байланысты емес. Эрес бойынша парафиннен 1 % қышқыл фуксинмен ажыратады. Содан кейін сумен тез арада шаяды, сүзілген сумен кептіреді, сусыздандырады, және тұзды қышқыл спиртте саралайды. Тұзды қышқыл спиртті дайындау үшін 97 см–абсолютті спирт 3 см тұзды қышқыл алады. Саралаудың ұзақтығы 1-2 сағат, сосын абсолютті спиртте шайып, ксилол арқылы ағартып, бальзаммен жабу керек.

Нәтижесі: кальциден тұратын ұлпалар - аса қызыл, ядросы - қызыл, дәнекер және бұлшық ет ұлпалары -ашық-қызыл.

**1.13.1 Сүйек ұлпасын және сүйек арналарын көру немесе шығару**

Сүйек денешіктері көп жағдайда, қатты боялғаннан кейін ғана көрінеді. Материал Гелли сұйықтығымен боялған жағдайда Делафильды гематоксилині қолданылады. Шморлю бойынша бекітілгенде тионин пикрин қышқылымен де істеледі. 3% азот қышқылымен және декальцинация Мюллер сұйықтығымен немесе Эбнер бойынша 5 % азот қышқылымен іске асады. Қатырылған кесінділерді алдымен 10 минут суда ұстайды, сосын карбон -тионинімен бояйды, одан кейін сумен шаяды, судан пикрин қышқылына 30-60 секундқа салады, тағы шайып саралаған соң 70° спиртке, 96° спиртке карбол-ксилол және бальзамға ауыстырады. Бояуы дұрыс болмаса, 1-2 тамшы тионинді тамызады.

Нәтижесі: сүйектің беті қоңыр түске боялады, ал ұлпалар қызылға боялады.

**1.13.2 Сүйектің өсуін және дамуын зерттеу**

Бұл процессті зерттеу үшін сүт қоректілердің эмбрионының түтікше сүйегін үшхлорлы уксус араластырған Гелли Буэн сұйықтығы бойынша бекітеді. Цитологиялық зерттеулер үшін Флеминг сұйықтығына оның майда бөлшектерін бекітеді. Ал Шаффер бойынша екі еселенген гематоксилин - конго қызыл бояуымен де бояуға болады. Ол үшін Мюллер сұйықтығымен, формалинмен немесе Гелидің аралас сұйықтығында бекітеді. Азот қышқылымен кальцийді жойып, жуып, сусыздандырып, бояп, дистилденген суда шайып, жоғары айтылып кеткен стандартты әдістерді қолданып препарат жасайды.

**1.14 Гистохимия негіздері және әдістері**

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 құрылымдарының қандай химиялық заттармен шектелетіні туралы мағлұматты толық түсіндіріп бере алмады. Клеткалар мен ұлпа химиялық заттардың микроқұрылымын анықтау әдісімен түгелдей іздеу нәтижесі, ақырында гистохимииялық 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 негізделеді.

- Кейбір химиялық жас клетка құрылымы, 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-ы 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 көрсету 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.

**Нуклейн қышқылдарын табу**

Нуклейн қышқылдары әрбір жануарлар мен өсімдіктердің ұлпаларының тіршілік әрекетінде өте зор қызмет атқарады.

Рибонуклейн қышқылы (РНК) ақуыз түзелуін, ал дезоксирибонуклейн қышқылы (ДНК) - тұқым қуалау белгілерін сақтау және беру қызметін атқарады. Біріншісі цитоплазма мен ядрода, екіншісі ядродағы хроматинде орналасады. Нуклейн қышқылын гистохимиялық жолмен алудың бірнеше тәсілі бар, бірақ көп таралған Браше (РНК-ы алу үшін) және Фельген (ДНК-ы алу үшін) әдістері.

Дизоксирибонуклейн қышқылын Фельген әдісі бойынша алу (әртүрлі бекіткіштер қолданылады, бірақ ең жақсысы Карнуа қоспасы және ценкер сұйықтығы, парафинге құю қажет).

Әдістің мағынасы мынада: ДНК молекуласы түссіз фуксин күкірт қышқылымен әрекеттеніп, ыдырап, пурпур бояуы бар жиынтық түзеді. Түзілген өнімнің орналасуын гистологиялық реакциямен анықтағанда бояудың тығыздығы - оның қоюлығын көрсетеді.

**Ерітіндіні дайындау**

Шифф реактиві. 1 г фуксин негізін 200 мл қайнатылған дистилденген суда ерітеді, және оны түтікше ерітіндімен мезгіл-мезгіл араластырып, 5 минут қайнатады. Содан кейін 50°-қа дейін суытып, ерітіндіні сүзеді. 20 мл 1 NH Cl ерітіндісін қосады да, 25°-қа дейін салқындатады, содан кейін 1 гр натрий бисульфитін немесе (N2S2О5), калий бисульфитін (К2S2О5), қосады да қараңғы жерге қояды, 18-24 сағаттан кейін ерітіндіге 2 гр белсендірілген көмірді сеуіп, 1 минуттай араластырады, сүзеді және 0-4°-та қараңғы жерде сақтайды. Шифф реактиві түссіз немесе ашық сары түсті болады.

Тұз қышқылының бір нормальды ерітіндісі 1NHCl10 мл байытылған тұз қышқылына 90 мл дистилденген су қосады. Ерітіндіні узақ уақыт сақтауға болады.

Препаратты жууға арналған күкірт қышқылды су 10% 5 мл калий бисульфитіне (К2S2О5) 1 N 5 мл НС1 ерітіндісін және 100 мл дистилденген су қосады. Калий бисульфитті ерітіндісін 7 күн ішінде қолдана беруге болады, күкірт қышқылды суды қолдану алдында ғана дайындап, бір рет қана қолданады.

Әдіс:

- Қалыңдығы 5-7 мкм парафинді кесіндіні депарафинизациялау және суға дейін жақындату.

- 1NНС1 тез шаю.

- 60° 1NНС1 (Су моншасына) салу 6 минутқа.

- 1N салқын НС1-да тез шаю, содан кейін дистилденген суда шаю.

- Шифф реактивінде 40-60 мин ұстау.

- Сүзгіш қағазбен құрғатып, үш өлшемді жаңа дайындалған күкірт қышқылы суының әрқайсысында 1-2 мин шаю.

- Құбыр суында 10 минутқа дейін жуу.

- Дегидратация, түссіздендіру және бальзам мен жабу.

Нәтижесі. Ядродағы ДНҚ-сы бар аймақтар қызыл-пурпурлы түске боялады (цитоплазмасы ашық жасыл).

**1.14.1 Браше әдісі бойынша рибонуклейн қышқылын анықтау**

Гистохимиялық реакцияны бастамас бұрын, метилді жасыл мен тазалау қажет. Ол үшін метилді жасылдың сулы ерітіндісіне хлороформ қосып, түтікті жауып, қатты шайқайды. Қоспаны тұндырған соң, одан анық 2 қабатты - үстіңгі қоңыр бояудың сулы ерітіндісін және төменгі көгілдір - хлороформ, метилді көгілдірге бояғанын байқауға болады. Хлороформ көгілдір түске боялғанын тоқтатқанша шаю керек. Тазаланған және кептірілген кесіндіні ұзақ уақыт сақтауға болады.

Жұмысшы ерітіндіні дайындау.

Ерітінді А: 5 % пиронин су ерітіндісі 17,5 мл, 2%-і 10 мл жасыл метилді су ерітіндісі, 250 мл дистилденген су.

Б ерітіндісі: 0,5 моляр ацетат буфер рН-4,8.

Қолдану алдында А және Б ерітінділерін бірдей мөлшерде қосады.

Әдіс:

- Қалыңдығы 5-7мкм парафинді кесіндіні депарафинизациялау және суға дейін жақындату.

- Пиронин-метилді жасыл ерітіндісіне салу.

- Дистилденген суда бірнеше секунд ішінде жуу.

- Сүзгіш қағазбен құрғату.

- Абсолютті ацетоннан: ацето+ксилол, (10% ацетон ксилолда) тез өткізу.

- 2 өлшем ксилолдан өткізу.

- Бальзамға отырғызу.

Нәтижесі. РНҚ ядрошығы мен цитоплазма - ашық қызыл түсті, ядроның хроматины - жасыл, көк -жасыл.

**Шифф-йодты қышқыл реакциясы (ШИК - реакциясы).** Полисахаридті құрама құрайтын заттың гистологиялық негізінде, Шифф- йодты қышқыл реакциясы (ШИК - реакциясы) жатады.

Осы реакцияның көмегімен гликогенді, мукопротеидті, гликопротеидті, гликолепидті (бөліп) табуға болады.

Жұмысшы ерітінді.

1. Шифф реактиві.

2. Күкіртті су. 200 мл дистилденген суға 4 мл байытылған НС1 қосу. 25 мл дистилденген суға 4 гр сусыз натрий сульфитін еріту. Екі ерітіндіні қосу.

3. Периодат ерітіндісі: 1 гр периодат калийді 100 мл дистилденген суда немесе 2,5 гр периодат натрийде еріту.

Әдіс:

- Қалыңдығы 5-7 мкм парафинді кесіндіні депарафинизациялау және суға дейін жақындату.

- 5-10 минутқа йод қышқылына батыру.

- Дистилденген судың 3 өлшемінде мұқият жуу -3-5минут.

- 10-20 минут Шифф реактивіне орналастыру.

- Жаңа дайындалған күкірт суының үш өлшемінде өңдеу.

- 10 минут құбыр суында жуып, дистилденген суда шаю.

- Сүзгіш қағазбен құрғату.

- 2 өлшем абсолютті спирттерден 1 минуттан өткізу.

- 2 өлшем ксилолдан 1 минуттан өткізу.

- Бальзаммен жабу.

Нәтижесі. Полисахаридті зат пурпурлы-ақшыл көк-қызыл түске боялған. Бейтарап мукополисахарид әдетте -пурпур қызыл, гликоген-қаралау болады.

**ШИК оң реакциясын беретін заттардың саралануы.** ШИК оң реакциясын гликогеннен басқа,табиғаты полисахарид заттар тобынан: гликолипид, гликопротеидті, мукопротиид және кейбір көміртегі емес: фосфолипид, липопротеид және кейбір липидтер береді. Сондықтан зерттелетін ұлпаларда қандай заттар бар екендігін анықтау үшін, ШИК-реакциясын жүргізу керек.

Гликогеннің ыдырауы. Дайын диастаза немесе сілекейдегі фермент препараттарын алады.

Біріншісінде 0,1%-ті 0,02 М фосфатты буфердегі диастаз ерітіндісіне рН 6,0-0,8% байытылған қайнаған тұз қосады, екіншісінде - бірнеше текше сілекейді жинап, стаканда сүзіп алады.

Әдіс:

- Қалыңдығы 5-7 мкм парафин кесіндісін депарафинизациялау және суға дейін жақындату.

- Екі кесінді диастаз ерітіндісіне немесе (жинаған сілекейге) салып, 37°-тық термостатқа 30-60 минутқа қояды, қалғанын суда қалдырады.

- Кесінділерді қалған өңделмеген кесінділермен дистилденген суда жуып, ШИК реакциясын әдісте сипатталғандай анықтайды.

- 10-20 минут Шифф реактивіне орналастыру.

- Жаңа дайындалған күкірт суының үш өлшемінде өңдеу.

- 10 минут құбыр суында жуып, дистилденген суда шаю.

- Сүзгіш қағазбен құрғату.

- 2 өлшем абсолютті спирттерден 1 минуттан өткізу.

- 2 өлшем ксилолдан 1 минуттан өткізу.

- Бальзаммен жабу.

Нәтижесі.

1. Ферменті бар (бақылау) сұйықтыққа салынған кесінділер боялмаса, қалған кесінділерде гликогеннің болуын көрсетеді, ШИК оң реакциясы сол ұлпаларда гликогеннің болғанын дәлелдейді.

2. Барлық кесінділер бірдей болып боялса гликогеннің жоқ болуын көрсетеді, бірақ басқа зат бар екенін бояу дәлелдейді.

3. Тексерілетін (бақылау) кесінділердің бояуы қалған кесінділерге қарағанда нашар болса, онда ШИК оң материалдардың жартысында гликогеннің болғаны.

**1.14.2 Бест әдісі бойынша гликогенді карминмен табу**

Бұл бояу гистохимияда өте сирек қолданылады. Өте жақсы боялады.

Кармин ерітіндісінің негізі 60 мл дистилденген суға 2 гр карминді еріту, 1 гр көмірқышқыл және 5 гр хлорлы калий. Алынған ерітіндіні 5 минут қайнату, суыту және сүзу. Содан кейін сүзбеге 20 мл 28% аммиак ерітіндісін қосу. Ерітіндіні 0-4° тоңазытқышта 3 айға дейін сақтауға болады.

Бояуға арналған кармин ерітіндісі. 8 мл. Негізгі ерітінді 12,5 мл аммиак

және 24 мл метанол қосу.

Бест ерітіндісінің мүшеленуі (өңдеу үшін). 8 мл абсолютті спиртке 4 мл метанол және 10 мл дистилденген су қосу.

Бояу әдісі.

- Қалыңдығы 5-7 мкм парафинді кесінді депарафинизациялау және суға дейін жеткізу.

- 1% целоидин сұйықтығына 2-5 минутқа салу.

- Ауада кептіру.

- Күштілігі өсе түсетін спирттермен жүргізіп суға дейін жеткізу.

- Суда шаю.

- 10-20 минут Шифф реактивіне орналастыру.

- Эрлих гемалауынымен бояу - 5мин.

- Суда шаю және 1% қышқылданған спиртте ядроның саралануы жақсы болу үшін шаю.

- Дистилденген суда шаю.

- Кармин ерітіндісінде 15-30 мин бояуға қою.

- Бест ерітіндісінде 5-10 секундтан бірнеше минутқа дейін ұстап, бояудың түсі кеткенше өңдеу.

- 80° спиртте шаю.

- Дегидратациялап, түссіздендіріп, бальзам мен жабу.

Нәтижесі. Ядро - қою көк, гликоген ашық қызыл.

**Мукополисахаридтерді анықтау және ерекшелеу.** Қышқыл мукополисахаридтердің болуын Гале (Хейла) әдісі бойынша анықтауға болады (мұзды қатырылған кесінділер) бекіткіштер: формалин, Карнуа сұйықтығы, парафинге құю).

1. Коллоидты темір сұйықтығы. 100 мл қайнаған дистилденген суға, араластырып тұрып 8-12 мл 10% хлорлы темір сұйықтығын қосу керек. Сұйықтық қоңыр түске айналады. НС1 жою үшін диализ үшін өткізу керек.

2. Сұйықтығы -2М сірке қышқылы.

3. Ферроцианид калийдің қышқылданған сұйықтығы - сары қан тұзы және НС1.

Бояу әдісі.

-Қалыңдығы 5-7 мкм парафинді кесіндіні депарафинизациялау және тек абсолютті спиртке дейін жүргізу.

- 2 м диализ темірмен сірке қышқылының мөлшерінде құю. Кесіндіні 10-15 мин осы ерітіндіге қою.

- Дистилденген судың 3 өлшемінде мұқият жуу 3-5минут.

- Жаңа дайындалған сары қанды тұзда 10 минут ұстау.

- Дистилденген суда шаю.

- Ядроларды кармин ашудасында немесе гематоксилин арқылы бояу.

- Дегидратациялап, түссіздендіріп, бальзам мен жабу.

Нәтижесі. Ядро - қызыл түске боялады, қышқыл мукополисахаридтер көк түске боялады.

**2. ВНИРО МАМАНДАРЫНЫҢ ИТИОЛОГТАРҒА ҰСЫНҒАН ГИСТОЛОГИЯ ӘДІСІ**

Балықтардың мүшелерінің гистологиялық препараттарын дайындаудың заманауи әдістері сипатталған.

**2.1 Бутанол мен дегидратация**

Дегидратацияны 10° -тан кейін концентрациясының жоғарылауымен 70° спиртен бастау керек. Спирттер арқылы өткізгеннен кейін, мүшелерді бутанолмен спирт қоспасына салады, содан кейін таза бутанолға ауыстырады (1-кесте).

1-кесте. **Материалдарды дегидратациялап, парафинді блок дайындау процессіне арналған батареялар**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Батарея** | **Спирт пен бутанолдың қатынасы** | **Уақыт** |
| 70° этанол |  | 35 |
| 80° этанол |  | 35 |
| 90° этанол |  | 35 |
| 70°этанол+бутанол | 3:1 | 35 |
| 80°этанол+бутанол | 1:3 | 35 |
| 90°этанол+бутанол | 1:1 | 35 |
| Бутанол I |  | 35 |
| Бутанол II |  | 35 |
| Парафин I |  | түн |
| Парафин II |  | 45 |
| Парафин III |  | 45 |

Спирттерді қайта қолдану тиімсіз, өйткені, олардың концентрациясы, объектілерді дегидратациялау барысы төмендейді. Бутанолдан кейін мүшенің кесінділерін сүзгі қағазға түсіру керек. Содан кейін балқытылған парафинге ауыстырып және сіңіру үшін бір түнге 56°C температурасында орнатылған термостатқа салу керек. Парафинге салынған мүшелер спиртшамының жалынына қыздырылған пинцетпен алынады, әйтпесе суық пинцет балқытылған парафинге салынған кезде парафин оған жабысып қалады және мүшелерді пинцеттен бөліп алып, оны парафинге орналастыру мүмкін болмайды. Таңертең сіңдіруді жалғастырыңыз, ол үшін термостатта тұрған бірінші парафиндегі мүшелерді спиртшамының жалынына қыздырылған пинцетпен, екінші парафинге содан кейін үшіншіге ауыстыру керек. Парафинді сіңдіруді шыны ыдыстарға қарағанда баяу салқындатылатын ашық фарфор тигельдерінде жүргізу керек. Парафинді сіңдіру барысында парафиннің үш бөлігін қолдану ұлпадағы бутанолдың қалдықтарын кетіру үшін қажет. Парафиннің құрамында бутанол көп болып кетсе парафиннің жұмсақтығы өзгеріп, сынғыш болып кетеді.

**Целлоидин - майсана майы арқылы дегидратациялау**

Ихтиологтарға көбіне сарыуыз немесе май мөлшері көп заттармен жұмыс жасауға тура келеді. Олар фиксациялау процесінде және одан әрі дегидратациялау кезінде өте тығыз болады. Бұл жағдайда майсана майын қолдану жақсы нәтиже береді. Хлороформды аралық орта ретінде пайдалану керек (кесте 2).

**Целлоидин - майсана майы арқылы дегидратациялау**

Кесте 2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Батарея** | **Экспозиция** | **Ескерту** |
| 70о этанол | 1 сағат |  |
| 80о этанол | 1 сағат |  |
| 90о этанол | 1 сағат |  |
| 96о этанол | 1 сағат |  |
| Бутанол I | 1 сағат | Бутанолға салмас бұрын, оны фильтр қағазымен құрғату керек |
| Бутанол II | 1 сағат |  |
| Целлоидин **-** майсана майы | 1 сағаттан екі күнге дейін |  |
| Майсана майы | 2 күннен 3 күнге дейін | Майсана майынан кейін фильтр қағазымен құрғату керек. |
| Хлороформ I | 1 сағат |  |
| Хлороформ II | 1 сағат |  |
| Хлороформ –парафин (қосындысы 1:1) | Түнге қалдыру керек | жұмыстан шығар алдында, кешке, 37°С температурада термостатта жабық ыдыста қалдыру керек. |
| Парафин I | 45 мин | 56°C температурада термостатта ашық тигельдерде қалдырыңыз |
| Парафин II | 45 мин | 56°C температурада термостатта ашық тигельдерде қалдырыңыз |

Бутанолдың екінші өзгеруінде дегидратациядан кейін (бутанол II) материал целлоидиннің майсана майымен (целлоидин-кастор майы) қоспасына ауысады.

**Целлоидин - майсана майы арқылы дегидратациялау**

**(модификация 1)**

Кесте 3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Батарея** | **Экспозиция** | **Ескерту** |
| 70о этанол | шектеусіз уақыт | Буэн қоспасында бекітілгеннен кейін Пикрин қышқылы жақсы жуылады |
| 80о этанол | 2-3 сағат |  |
| 90о этанол | Түнге қалдыру керек | жұмыстан шығар алдында кешке салып қою керек |
| 96о этанол I | 3 сағат |  |
| 96о этанол II | 1 сағат | Бутанолға салмас бұрын, оны фильтр қағазымен құрғату керек |
| 100о этанол | 1 сағат |  |
| Целлоидин **-** майсана майы | 1 сағаттан 7 күнге дейін | Майсана майынан кейін фильтр қағазымен құрғату керек |
| Хлороформ I | 1 сағат |  |
| Хлороформ II | 1 сағат |  |
| Хлороформ –парафин (қосындысы 1:1) | Түнге қалдыру керек | жұмыстан шығар алдында, кешке, 37°С температурада термостатта жабық ыдыста қалдыру керек. |
| Парафин I | 30-60 мин | 56°C температурада термостатта ашық тигельдерде қалдырыңыз |
| Парафин II | 30-60 мин | 56°C температурада термостатта ашық тигельдерде қалдырыңыз |

**Целлоидин - майсана майы арқылы дегидратациялау**

**(модификация 2)**

Кесте 4

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Батарея** | **Экспозиция** | **Ескерту** |
| 70о этанол | 3 сағат |  |
| 80о этанол | 3 сағат |  |
| 90о этанол | 6 сағат |  |
| 96о этанол | 6 сағат |  |
| 100о этанол I | 3 сағат |  |
| 100о этанол II | 3 сағат |  |
| Целлоидин **-** майсана майы | 1 күннен 3 күнге дейін |  |
| майсана майы | 2 күннен 3 күнге дейін | Майсана майынан кейін спирт-эфирде шаю керек |
| Хлороформ I | 3 сағат |  |
| Хлороформ II | 3 сағат |  |
| Хлороформ –парафин (қосындысы 1:1) | Түнге қалдыру керек | жұмыстан шығар алдында, кешке, 37°С температурада термостатта жабық ыдыста қалдыру керек. |
| Парафин I | 1 сағат | 56°C температурада термостатта ашық тигельдерде қалдырыңыз |
| Парафин II | 1 сағат | 56°C температурада термостатта ашық тигельдерде қалдырыңыз |

**2.2 Парафинмен құю**

Сағаттар шынысына ұсақ заттар құйылады, ал үлкендері үшін арнайы гистологиялық қалыптар қолданылады. Қазіргі уақытта гистологиялық жабдық өндірушілер затты парафинге құюға арналған қазықтары бар арнайы дайын кюветтерді құюды ұсынады, бұл затты блокқа салмауға мүмкіндік береді.

Парафин қатайғаннан кейін сақиналарды бірден микротомның блок ұстағышына бекітіп, препарат кесуге болады. Парафин блоктарынан алынған кесінділер бояуға дайындалып, парафиннен тазарту жүргізіледі – депарафинизация (5-кесте).

**Бояуға дайындалған препараттарды депарафинизациялау**

кесте 5

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Батарея** | **Экспозиция, мин** | **Ескерту** |
| Ксилол I | 10 | Заттық шыныларды бір ортадан екіншісіне ауыстыру кезінде, мүмкіндігінше реагенттерді ластамау үшін, олардың артқы жағын фильтр қағазымен сүрту арқылы жақсы құрғату керек. 50 заттық шыныны өңдегеннен кейін жаңа реагенттермен ауыстыру кажет. |
| Ксилол II | 10 |
| 96о этанол I | 5 |
| 96о этанол II | 5 |
| 70о о этанол | 5 |
| су | 5 |

* 1. **Препараттарды бояу**

Микропрепараттарды бояу - бұл ұлпа құрылымдарын визуализациялау және оларды кейіннен зерттеу үшін қажетті қадам. Бұл үдеріс қолмен немесе автоматты мультистейлердің көмегімен жүзеге асырылады.

**2.4 Препараттарды бекіту**

Дайын препаратқа 2-3 тамшы канадалық бальзамды тамызып, алдын ала дайындалған жабу шыныны мұқият түсіреді. Пайдаланатын орталардың ішінен канадалық бальзам ең танымал болып табылады, өйткені ондағы препараттар көптеген жылдар бойы өзгермейді. Қазіргі уақытта Biomaunt сияқты синтетикалық монтаждау ортасын да жиі пайдаланады.

**2.5 Дайын препараттарды сақтау**

Ұзақ уақыт сақтау үшін арнайы шкафтар қолданылады, онда сіз қайтадан қарау үшін қажетті препаратты оңай және жылдам таба аласыз. Дайын өнімді сақтау.

1. **БОТАНИКАЛЫҚ ГИСТОЛОГИЯЛЫҚ ПРЕПАРАТТАРДЫ ЖАСАУ ӘДІСІ**

Ботаникалық препараттарды дайындау - қойылған міндеттерге байланысты, оның ішінде қандай препараттар дайындау керек - уақытша немесе тұрақты.

Микротомды препараттар дайындау процессы бір қатар жұмыстардан тұрады: фиксация, жуу, дегидратациялау, парафинға қую, микротомды кесінді жасап заттық шыныға жапсыру, препараттарды бояу, бальзаммен жабу.

**Жабдықтар:**

микроскоптар, роторлы микротом немесе шаналы микротомға арналған бір реттік пышақтар, пышақтың бір реттік ұстағышы, сағаттар, петри табақшалары, көзілдірік шынылары, щеткалар, бөлшектейтін инелер, қыздырғыш үстел, пинцет, ұстағыштар, спираль, пипеткалар, термостат, көбік блоктары.

**Реактивтер:**

Қолдануға дайын бояғыштар: акридин қызыл (Acridinrot), акрифлавин (Acriflavin), астер көк (Astrablau), толуидин көк (Toluidinblau), альций жасыл (Alciangruen), хризоидин (Chrysoidin). Дистилденген су, әр түрлі концентрациядағы этил спирті (70%, 50%, 30%), изопропил спирті 99,7%, формалин (40%), мұздық сірке қышқылы (99,5%), эвпаралды ортаға орналастыру (16-сурет).

[](https://3.bp.blogspot.com/-GP1uQzmSw0E/VgFIxtlitZI/AAAAAAAAANg/7EF6PbZy0Eg/s1600/F2_%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D0%BB%D0%B8.jpg)

16-сурет. Тұрақты препараттарды (бояғыштар, реактивтер және т.б.) жасауға арналған жинақ

**3.1 Материалды фиксациялау**

1. Фиксатор әрқашан жаңа болып тұру керек. Қоспалар материалды фиксациялау алдында дайындалу керек, шыны ыдыстар таза болу керек.
2. Фиксатор жылы болмау керек, ал жаз уақытында күннен сақтау, сонымен қатар қара түсті шыныны пайдалану қажет.
3. Фиксатордың көлемі фиксацияланған көлемнен 10-15 есе жоғарғы болу керек. Фиксатор сұйқтықтың мөлшері аз болса тегіс сіңуіне кедергі болады, және де өсімдік шырынымен сұйылтылса оның белсенді концентрациясы төмендейді.
4. Фиксацияға арналған материал жаңа алынған болуы керек және олар құрғақ немесе ылғалды болмауы маңызды. Өсімдіктердің мүшелерінің тургор жағдайын сақтау үшін фиксациялау алдында сулау қажет. Өсімдіктен бөліну және оны фиксациялап қоспаға салу уақытын қысқарту қажет, сол себептен фиксациялау, әдетте, жергілікті жерде жасалады.
5. Өсімдіктерді бүтін фиксациялауға болмайды, оларды кішкене, мөлшері 0,5 -1 см. бритвамен кесіп, керек емес жабындарды және ұлпаларды шешіп алып микротоммен өңдеу үшін дайындау керек.
6. Фиксациялау уақытында нысан ұлпаларынан ауаны шығару қажет, себебі ол фиксатор қоспалардың тегіс сіңіуіне кедергі келтіреді. Шыны ыдыстың түбіне түскен нысанның фиксаторы сіңген көрсеткіші болады. Ауаны жою үшін фиксатор бар ыдысты бірнеше рет сілку керек.
7. Ұсынылған фиксация уақытын сақтау қажет.
8. Фиксациялау кезінде фиксациялайтын материалға этикетка жасау қажет.

**Фиксаторлар**

Ботаникалық микротехникада пайдаланатын фиксаторлар екі топқа бөлінеді: сулы және спиртты. Сулы фиксатор ең жиі қолданылады: Навашин қоспасы, Флеминг қоспасы, Модилевский қоспасы, Карнуа қоспасы, Яковлев қоспасы, Чемберлен қоспасы.

**Навашин қоспасы**

Хром қышқылы – 1% , 10 бөлік

Формалин 16%, 4 бөлік

Мұзды сірке қышқылы – 1 бөлік

1% хром қышқылын жасау үшін 780 мг хром ангидридын (Cro2) 99 мл дистилленген су мен араластырады.

40% формалиннен 16% жасау үшін 100 мл 40% формалинге 150 мл су қосу керек немесе 40 мл 4% формалинге 60 мл Н2О қосады.

Навашин қоспасында объект 24 сағат ұстау керек. Осы қоспада ұсақ, жеңіл-1% нысандарды фиксациялауға ыңғайлы, әсіресе сабақтардың жоғарғы жақтарына, тамырларға және эмбриологиялық объектілерге арналған. Қоспа жұмсақ әрекет етеді және клеткалардың құрылымына, ұлпалардың морфологиялық ерекшеліктеріне әсер етпейді, әрі қарай Гейденгайн гематоксилинімен жақсы боялады. Навашин сұйықтығын қолдану (оның ұлпаларға баяу сіңгеніне байланысты) міндетті түрде объектіден ауаны шығаруды қажет етеді және де ұзақ уақыт ағынды су астында үздіксіз шаюды талап етеді. Хромо-формалин қоспаларын пайдаланғанда алғашқы шарт - олардың балғындығы болады. Бұл қоспа пайданалар алдында жасалу керек, егер де хром және сірке қышқылын ерте араластырса формалинді тек қолданар кезінде қосу керек. Сол себептен қоспаны 1,2 материал бөлігіне дайындау қажет. Егер қоспа жасыл немесе күлгін түсті болса ол фиксациялауға жарамайды. Хром қышқылының қоспасы.

Көрсету үшін қара стаканды немесе қосалқы қағазды ораған шыныда сақтау керек.

**Флеминг қоспасы (бонн қоспасы)**

Хром қышқылы 1% - 25 мл

Осмий қышқылы 2% - 5 мл

Мұздық сірке қышқылы - 10мл

Дистилинген су - 60мл

Эмбриологиялық материалды фиксациялау үшін қолайлы және ядро структурасын, клеткалардың бөліну кезіндегі хромосомаларды зерттеу үшін ең жақсы фиксатор болып саналады.

**Модилевский сүйықтығы**

Хром қышқылы 1% - 9 бөлік

Сірке қышқылы 5% - 2 бөлік

Екі хромқышқыл калий 5% - 2 бөлік

Формалин 16%

Фиксациялау ұзақтығы - қараңғыда 24 сағат. Фиксатордың компоненттерін фиксациялауға дейін бірден араластырмайды. Фиксатор жұмсақ, ол клеткалардың құрылысын жақсы сақтайды.

**Спиртті фиксаторлардан ең жиі қолданатындары келесі:**

**Карнуа сұйықтығы**

Спирт 96% - 6 бөлік

Хлороформ –3 бөлік

Мұзды сірке қышқылы – 1 бөлік

Сұйытқышта нысан шамамен 2 са. бойы орналасады (егер нысанның қалыңдығы 1,2 мм) немесе 3,6 сағатты (нысанның қалыңдығы 3,5 мм) құрайды.

Үлкен заттарды бір түнге қалтыруға болады. Көлемді эмбриональды материалды фиксациялауға Карнуа сұйықтығы ыңғайлы (бүршіктер, аналық, гүл шоғырлар). Ол нысанның ішкі бөлігіне тез енеді, сондықтан ауа соруды және ағынды су астында үздіксіз шаюды қажет етпейді. Бірақ Карнуа қоспасы неғұрлым жақсы фиксатор болып табылады, өйткені объектінің ішкі бөлігіне тез енуі оның қысылуына және кішіреюіне ықпал етеді. Сонымен қатар, Карнуа қоспасы сіңген соңт кейінгі ұлпалар гематоксилинмен нашар боялады.

**Яковлев қоспасы**

Дистилинген су - 60мл

Спирт 96% - 30мл

Мұздық сірке қышқылы - 4мл

Формалин 40%- 6мл

Бұл фиксатор қатты құрылымдарға, әсіресе дәндерге ыңғайлы (бірақ міндетті түрде суға 24 сағатқа салып қою керек). Бұл қоспадағы материал ұзақ уақыт сақталуы мүмкін, бірақ оны фиксациялағаннан кейін ағын суда ұзақ уақыт тазалау қажет.

**Чемберлен сүйықтығы**

Спирт 70% - 90 бөлік

Формалин 40%- 5 бөлік

Мұздық сірке қышқылы - 5 бөлік

Фиксациялау ұзақтығы 12-16 сағат бірақ онда материалды ұзақ мерзімгеде қалдыруға болады. Бұл фиксатор цитологиялық және эмбриологиялық зерттеулерде кеңінен қолданылады ол өз әрекетінде Карнуа фиксаторы (жұмсақ) мен Навашин қоспасы (қатты) арасындағы аралық орынды алады.

**3.2 Материалды ағын суда жуу**

Фиксатордың үлкен жиынтығының құрамына көптеген токсиканттар енеді, оларды ұзақ уақыт пайдаланса материалдың сапасына теріс әсер етеді. Сонымен қатар фиксацияланатын сұйықтықтың компоненттері (формалин), ұзақ экспозиция кезінде ұлпалардың қалыңдауы мен сынғыштығы пайда болады. Су қондырғыларына фиксацияланған нысандар ағын суда 12 - 24 сағ. ішінде жуылады. Спирте фиксацияланатын заттарға фиксацияланған заттарды кем дегенде 1-2 сағ. ішінде 70% спирттің 2-3 порциясында жуады. Оны парафинге құймас бұрын материалды этикеткалап, арнайы шыны түтікке (диаметрі 1-2 см, ені 4-5 см болатын) мұқият салады, оның төменгі шеті дәкемен байланған. Содан кейін түтіктің жоғарғы ұшын байлайды. Түтіктер болмаған кезде материал жіптермен байланған екі қабатты дәке майлықтарымен жуылады. Шыны түтіктер немесе дәке түйіндері воронка салынған стаканға беріледі, стакан ағынның астына воронка арқылы еніп, олардың арасындағы саңылау арқылы немесе стаканның шүмегінен ағып кететін етіп орналастырылған. Судың бұл қозғалысы арқылы материалды төменнен жоғары қарай жүретін ағындармен үздіксіз жуу қамтамасыз етіледі.

**3.3 Материалды дегидратациялау және оны парафинге салу**

Барлық кейінгі дайындық, нысандарды қамтамасыз ететін жағдайларды жасауға бағытталған, оларды парафинге тікелей салуға болады. Бұл екі кезеңде жүзеге асырылады: біріншіден, объектідегі су спиртпен ауыстырылады, ол кейіннен аралық ортаға (хлороформ немесе ксилолға) алмастырылады спиртпен жақсы араластырылатын және парафинді ерітуге қабілеті бар, соңғысымен толық алмастыратын. Объектідегі суды ауыстыру процесі *дегидратация* деп аталады. Бұл процесс материалдың сулы ортадан екіншісіне ауысуы оның құрамы мен концентрациясының күрт өзгеруінсіз біртіндеп жүруі керек дегенді білдіреді. Әйтпесе, фиксацияланған материалдың клеткалары мен ұлпаларының құрылымы бұзылуы мүмкін. Материалды судан парафинге біртіндеп ауыстыру үшін 10 градус аралықта 10% -дан абсолюттік 100% -ға дейін концентрациясы жоғарылайтын судың спиртпен қоспаларының жиынтығы жасалады. Дегидратация процесі келесі схема бойынша ыңғайлы түрде жүзеге асырылады:

|  |  |
| --- | --- |
| Спирттің қажетті концентрациясы, градусы | Материалдың тұру уақыты, минут |
| 10 | 10 |
| 20 | 20 |
| 30 | 30 |
| 40 | 30 |
| 50 | 30 |
| 60 | 30 |
| 70 | 30 |
| 90 | 60 |
| 96 - I | 60 |
| 96- II | 60 |
| 100-I | 60 |
| 100-II | 60 |

70% спиртте материал ұзақ уақыт сақталуы мүмкін. Материалдарды спирттерде жүргізуді үзуге болмайды және тек схемада көрсетілгенен басқа спирттерде қалдыру ұсынылмайды. Материалды әр түрлі спирттерден өткізген кезде материалды бір ыдыстан екінші ыдысқа ​​өткізбестен, спирт концентрациясы мен спирті құйып алып, жоғары концентрациясын құю арқылы өзгерту керек, тек сол бір ыдысты пайдаланып материал ыдыстан құйған уақытта ​​спиртпен бірге төгіліп кетпес үшін, воронканы нейлон немесе дәкемен салфеткамен жабу арқылы жүзеге асырылады. Материалдарды спирттерден өткізу үшін арнайы ыдыстарды қолдану қажет.

Спирттер арқылы көп мөлшерде материал өткеннен кейін олар ластанып, концентрациясы төмендейді, сондықтан оларды мезгіл-мезгіл жаңа спирттермен алмастырады. Жоғары концентрациясы бар спирттерді жиі ауыстыру қажет (70 - 100%). Жұмыс ыңғайлы болу үшін кестені пайдаланып алдын ала қажетті концентрациядағы спирттердің жиынтығы дайындалады. Парафин сіңіруге дейінгі спирттерден өткізу келесі кезеңі ол спирттерге оңай араласатын және парафинді ерітуге қабілетті, сондай-ақ ол еріген кезде булануға қабілетті ортаға ауыстырудан тұрады. Мұндай заттарға ксилол, бензол, толуол, хороформ жатады.

**Абсолютті спирттен кейін өткізу процесі келесі схема бойынша жалғасады:**

Қоспа I (75% абсолютті спирт және 25% хлороформ), 1 сағат 30 мин.

Қоспа II (50% абсолютті спирт және 50% хлороформ),1 сағат 30 мин.

Қоспа III (25% абсолютті спирт және 75% хлороформ),1 сағат 30 мин.

Тазахлороформ І.-1 сағат 30 мин.

Таза хлороформ II.-1 сағат 30 мин.

Қажет болған жағдайда II және III қоспаларда, материал 24 сағ. және одан да көп уақытқа қалдыруға болады. Материал қоспаның бес бөлігін өткізгеннен кейін, I қоспасы төгіліп, II қоспасы өз орнын алады. III қоспа қайтадан дайындалады.

Нысанды спирт және хлороформның жаңа қоспасына ауыстырған кезде алдымен сұйықтықтың бетіне қалқып шығады, содан кейін шынының түбіне батуы керек. Егер зат батып кетпесе, ол хлороформмен нашар қаныққан. Материалды осы ерітіндіде ұзақ мерзімге қалдыру ұсынылады. Таза хлороформда материал әрқашан бетінде қалқып жүреді.

Жақсы дегидратацияланудың индикаторы материалды II және III қоспаға және таза хлороформға ауыстырған кезде лайланбау болып табылады. Хлороформмен жақсы қаныққан кезде нысандар мөлдір болатынын есте ұстаған жөн. Нысандарда мөлдір емес жерлердің пайда болуы фиксатордың немесе фиксациялануға қатысты ақаулықтарды көрсетеді. Жұмыстың соңғы кезеңі - хлороформды парафинмен толық ауыстыру. Процесс хлороформның булануына негізделген, оның орнына балқытылған парафин ұлпаға енеді. Булану өте тез жүрмеуі керек, әйтпесе парафин ұлпаларға еніп үлгермейді, нысандар кішірейіп және парафинмен мүлдем қанықпауы мүмкін. Бұл жағдай материалдық зиянның ең көп таралған себебі болып табылады.

**Парафинді нысанға сіңірту арнайы тізбектерден тұрады**

1. Аз мөлшерде хлороформ қақпағы жақсы ұнтақталған шыны ыдыстарға құйылады және қақпағы жақсы жабылатын ыдыс алынуы керек. Сұйықтық деңгейі материалдан 2-4 мм жоғары болуы керек.
2. Бөтелкені аздап еңкейтіп, қабырғаға аздап балқытылған, бірақ ыстық емес парафин құю керек, ол сұйықтықтың бүкіл бетін жұқа қабатпен жабуы керек.
3. Парафин қатып қалған кезде сұйықтықтың үстінде материалдан тығын жасайды, бұл еріткіштің тез булануына жол бермейді.
4. Бюкстер тығыз жабылып, термостатқа + 400С температурада бір тәулікке қойылады.
5. Бір күнде хлороформды буландыруға кірісуге болады. Алдымен қақпақты сәл ашып, бөтелкелерді температурасы + 600С термостатқа қойю керек. Хлороформ буланған кезде материал балқытылған парафинмен сіңдіріледі, егер ол бөтелкеде жеткіліксіз болса, толтыруға болады. Еріткіштің толық жоғалуы оған тән иіс пен дәмнің болмауымен анықталады. Егер булану кешіктірілсе, онда парафинді төгіп, орнына тазасын құю керек. Хлороформның булануының максималды дәлдікпен өндірілуін анықтау. Ереже бойынша, әдетте булану 5-тен 8 күнге дейін созылады. Материалды термостатта ұзақ уақыт ұстау қажет емес, оны мерзімінен бұрын алып тастау керек, өйткені бұл оны микротомда кесуге жарамсыз етеді.
6. Балқытылған парафиндегі материал таза хлорофомдағыдай біртекті және мөлдір болуы керек. Еріткіш парафиннен, демек, заттан толығымен жойылған кезде, материал термостаттан алынып, толтырылады. Құю дегеніміз - балқытылған парафин затпен және этикеткамен бірге қалыпқа құйылады, ол қату керек.

Материалды парфинмен тазарту жетістігі көбіне парафиннің сапасына байланысты. Ол біртекті, аморфты, таза, ұшпа қоспасыз және белгілі бір балқу температурасына ие болуы керек (+50-540С). Жоғары балқу температурасы қаттылықпен, төмен балқу температурасы парафиннің жұмсақтығымен байланысты. Коммерциялық парафин тез арада жұмысқа жарамсыз, өйткені ол жоғарыда аталған қасиеттерге ие емес. Жоғары сапалы парафинді алу үшін 1 кг парафинге 30 граммға дейін ара балауызын қосып қақпағы ашық қайнаған дистилденген суда 5-7 күн қайнатады. Суды күн сайын жаңадан ауыстырады. Қайнау температурасында парафинді механикалық қоспалардан эмаль ваннасына тазарту үшін ыстық воронка арқылы (воронка суық болса парафин қатып қалады) сүзеді, оның қабырғаларына глицерин жағылады. Қатқан парафинді 10х10 см өлшемді таяқшаларға кеседі.

Парафинмен жұмыс істеу кезінде белгілі бір ережелерді сақтау керек: балқытылған парафинді суық суға тамып кетуден ғана емес, сонымен қатар оның буларынан да қорғау керек, сондықтан онымен жұмыс жасағанда онымен дем алмауға тырысу керек.

**3.4 Микротомдық препараттарды бояу**

Микротомдық препараттарды бояу процесі, бояу әдісіне қарамастан, үш кезеңнен тұрады:

1. Депарафинизациялау және препараттарды суға аралық орта арқылы жеткізу.

2. Бояу және дұрыс боялмаған препаратты қайта бояуға болады.

3. Дегидратациялау және канадалық бальзаммен немесе синтетикалық Biomaunt-пен жабу.

Барлық заттық шынылардағы препараттар сұйықтыққа батып тұру қажет, оған қақпағы бар шаныларды (биіктігі 8-10 см және диаметрі 4-6 см) пайдалануға болады. Сұйықтық деңгейі шыныда тұрған препараттағы кесінділер деңгейіне сәйкес келуі керек, оларды толығымен жауып.

Кесінділерді бояуға арналған шыныларды тәртіп бойынша, тиісті жазулармен белгілеп, қатаң түрде орналастырады. Препаратарды бір ортадан екінші ортаға ауыстыру оларды бір бөтелкеден екінші бөтелкеге ​​ауыстырған кезде өтеді.

**Бұл жағдайда келесі шарттар орындалуы керек:**

1. Заттық шыныларды сұйықтығы бар ыдысқа жазылған жағымен ​​жоғары орналастыру керек.
2. Дайындаған кесінділерді шыны қабырғасына қарайтын жағында орналастыры керек.
3. Бір ортадан екінші ортаға ауыстыру кезінде алдыңғы ортаның қалдықтарын шыныдан барынша мұқият тазарту керек. Ол үшін заттық шынының артқы жағын фильтр қағазымен жақсылап сүртіңіз. Содан кейін шыны бетін бірнеше рет препарат ерітіндісі бар тамызғыштан шайып және кесінділер жоқ бетін ақырын сорғыш (фильтровальная) қағазбен құрғату керек.
4. Барлық уақытта кесінділердің кеуіп кетпеуін қадағалау керек, бұл олардың бозаруы арқылы бірден байқалады, содан кейін оларды дереу тамшылатып ылғалдандыру керек.
5. Заттық шыныны тек жазуы бар жерінен пинцетпен ғана ұстау қажет. Микротом кесінділері бар препараттар жақсылап кептірілгеннен кейін ғана боялуы керек. Депарафинизация, сондай-ақ қарама-қарсы процесс (онымен сіңіру) аралық орталарды қолдана отырып, біртіндеп жүреді. Еріткіш ретінде хлороформ, ксилол және бензол қолданылады. Хлороформды қолдану өте ыңғайлы. Аралық орта - әр түрлі концентрациядағы спирттер. Реагенттердің шамадан тыс ластануын болдырмау үшін алдын-ала препаратқа хлороформ тамызып парафинді ерітеміз. Ерітуді тездету үшін спиртшам жалынының үстінен препараттарды жұмсақ етіп қыздыру жиі қолданылады. Бірнеше минуттан кейін хлороформ ағып кетеді, препаратты тамызғыштан бірнеше рет жуып, заттық шыныны хлороформ 1-ге түсіреді, содан кейін ережелерді мұқият сақтай отырып, проводка келесі схема бойынша жүзеге асырылады:

Хлороформ I - түнге қалтырған дұрыс

Хлороформ II - 10 мин.

Спирт 96% I – 5-10 мин.

Спирт 96% II -5-10 мин.

Дистилденген су (екі рет ауыстыру) 5 мин.

Ботаникалық микротехнологияда кеңінен қолданылатын, әсіресе өсінділер мен тамырлардың меристемаларын зерттегенде жақсы нәтиже беретін, жан-жақты - Гейденгайн гематоксилинмен бояу әдісі.

**Гейденгайн гематоксилинмен бояу әдісі.**

1. Жоғарыда сипатталғандай препаратты тазартылған суға салу керек.

2. Темір аммоний алюминийі 4% - 4-6 сағ.

Қолданылатын темір-аммоний алюминийінің ерітінділері бояудан біраз уақыт бұрын дайындалады, өйткені оларды ұзақ уақыт сақтауға болмайды.

3. I - II дистилленген сумен шаю.

4. Гематоксилин 8-12 сағ. (түнде мүмкін).

5. Микроскоппен қарап отырып 2% темір-аммоний алюминийіндегі дифференциация.

6. Суды 1 сағат бойы ағызу.

7. I –II- Тазартылған суды шаю.

Барлық келесі кезеңдер кесінділерді бальзамға салмас бұрын құрғатуға бағытталған.

8. Спирт 96% III 10- 15 мин.

9. Спирт 96% IV 10- 15 мин.

10. Бутил спирті I 10- 15 мин.

11. Бутил спирті II 10- 15 мин.

12. Ксилол I 10- 15 мин.

13. Ксилол II 10- 15 мин. (түнге қалдыруға болады).

14. Канадалық бальзаммен жабу.

**3.5** **Бальзаммен кесінділерді жабу**

1. Ксилолдан препаратты алып, заттық шыныда орналасқан кесіндісі бар жағын ксилолмен шайып, артқы жағын фильтр қағазымен сүрту.

2. Препаратты таза фильтр қағазына салып, кесінділерге 1-2 тамшы бальзам жағу.

3. Жабынды шыныны пинцетпен алып, жоғарғы жиегін кесінділер бойымен көлбеу етіп, жоғарғы жиекті препараттық инемен тіреу керек. Ине бойымен сырғанай отырып, жабынды шыны заттарға біртіндеп түсіп, канадалық бальзам олардың арасындағы барлық кеңістікті алады. Жабынды шыныны дөңес жағын жоғары қаратып қою керек. Бұл жағдайда әйнекті электр шамына бағыттаған кезде оның спиральдары айқын көрінеді.

4. Пинцетпен немесе дайындық инесінің ағаш сабының ұшымен сәл басып, артық бальзамды және бар болса, ауа көпіршіктерін алу.

5. Дайындықтарды трафареттерге көлденең күйде кептіруге салу. Әдетте олар 37-40°C температурасында темостатта кептіріледі. Олар баяу кебеді, тек 2-3 күннен кейін оларды көруге болады.

6. Кептірілген препараттарды шынылардың астынан шыққан артық бальзамнан ксилолмен тазалап, жазуды тексергеннен кейін оларды қарауға қолайлы деп санауға болады.

Орнатылған препарат каталогтағы келесі нөмірдің астына енгізіледі, онда бояу әдісі, дайындықта тұрған бекіту журналының нөмірі көрсетіледі.

Қажетті материалдардың, құрал-саймандардың, қорапшалардың және реактивтердің тізімі.

**3.6 А.И. Михальцова бойынша объектерді спирттерден өткізбей, сіңдірмей және парафинге салмай, парафин блоктарын жасау және т.б.**

Жабдықтар: микроскоптар, қолмен цилиндрлік микротом немесе шаналы микротомға арналған бір реттік пышақтар, пышақтың бір реттік ұстағышы, сағаттар, петриден жасалған ыдыстар, зат пен қақпақ көзілдірігі, щеткалар, бөлшектейтін инелер, қыздырғыш үстел, пинцет, ұстағыштар, спираль, пипеткалар, термостат, көбік блоктары, сәбіз тамырлары (17 сурет).

Нысан таңдау және дайындау: жинау, кесу, бекіту.

Нысандар : сабақтар, немесе жапырақтар және т.б.

Материал алудың екі әдісі бар:

1) Ұзындығы шамамен 2 см болатын сабақтар, сабақтардың кесектерін кесіп алып, оларды бірден 5-7 күн фиксаторға салу.

2) Микротомға кесу процедурасының алдында сабақтар мен жапырақтардың бөліктерін кесіп тастап, содан кейін фиксацияға жіңішке көлденең қималарды салу.

Ұсынылатын фиксатор - FAA: этил спирті 96% - 100 мл.; формалин - 7 мл., мұздық сірке қышқылы - 7 мл. Материалды осы фиксаторда бір аптаға дейін сақтауға болады, содан кейін этил спиртімен шайып, 70% этил спиртін салу керек.

[](https://4.bp.blogspot.com/-jy-8Z1gRQYY/VgFKoJzMPpI/AAAAAAAAAN4/CXPU76iErYw/s1600/F5_%D0%BC%D0%B8%D0%BA%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%BE%D0%BC_%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%B2%D0%B8%D1%8F.jpg)

17-сурет. Қолмен жасалынған микротома және жүздер. Белгілеулер:

1 - микровинтті бөлігі бар қолмен жасалған микротом; 2 - бір реттік қалақтарға арналған ұстағыш; 3 - ғылыми жұмыс үшін бір жақты пышақ.

**Бояуға материал дайындау.**

Фиксацияланбаған жаңа материал:

бөлімдерді FAA бекіткішке 15-20 мин. орналастыру керек.

• Бөлімдерді 70% этанолмен 3 мин. ішінде шаю керек.

• бөлімдерді 50% этанолмен 3 мин. шаю керек.

• бөлімдерді 30% этанолмен 3 мин. шаю керек.

• бөлімдерді тазартылған суда шайып, бояу кезеңіне дейін сол жерде қалдыру керек. (18-сурет)

[](https://1.bp.blogspot.com/-WlIQ2WWgczw/VgFPOlcEYAI/AAAAAAAAAPA/d7p6i3VO_hQ/s1600/F13_%D1%84%D0%B8%D0%BA%D1%81%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F.jpg)

18-сурет. Жаңа өсімдік материалынан кесінділерді фиксациялау

**Препараттарды бояу**

Өсімдіктердің микроскопиялық талдауға арналған тұрақты препараттар өндірісінде аралас түс маңызды рөл атқарады. Бұл анатомиялық ерекшеліктерін неғұрлым егжей-тегжейлі зерттеу үшін бір препаратта әр түрлі ұлпаларды анықтауға мүмкіндік береді. Бояу белгілі бір клеткалық құрылымдардың әр түрлі бояғыштарға әр түрлі жақындығына негізделген [Барыкина және басқалар, 2004]. Осылайша, қышқыл реакциямен лигнификацияланған клетка қабырғалары негізгі бояғыштармен, ал лигнирленбеген клетка қабықшалары - қышқылмен жақсы боялған. Ереже бойынша, өсімдіктердің біріккен түсі екі түрлі түсті, екі қарама-қарсы бояғышты қолдану арқылы алынған.

Уолкер [Ваккер, 2006] өсімдік объектілерінің кесінділерін бояу үшін келесі бояғыш ерітінділерді қолдануды ұсынды: акридин қызыл (50% этанолдағы ерітінді 1%), акрифлавин (тазартылған судағы 1% ерітінді), астра көк (тазартылған судағы 1% ерітінді)). Акридин қызыл және акрифлавин де фторхромдар болып табылады. Бұл жаңа әдістің артықшылығы лигирленген қабықшалары бар клеткалардың түсінің қанықтылығы және флуоресцентті сәулелендіргіштің көмегімен препараттарды зерттеуге мүмкіндік береді.

Көптеген зерттеушілер үшін бұл әдісті қолданудың қиындығы үш бояғышты бірінен соң бірін жағудан және қажетті түсті дифференциациядан тұрады. Бұл әдіс тізбекке салынған және парафинге салынған заттарды бояуға ұсынылды.

**Өсімдіктердің полихромды бояу әдісін өзгерту бірқатар жағымды жақтарға ие:**

1. материалды фиксациялауға және орналастыруға арналған реактивтерді үнемдеу;

2. тұрақты микропрепараттар жасау үшін уақытты айтарлықтай үнемдеу;

3. ағзаға зиянды ксилолды тұрақты препараттарды өндіру процесінен шығару;

4. әдістің қол жетімділігі.

Уокердің бояуының өзгертілген әдісі - №1 микс. Барлық бояғыштар алдын-ала араласады. Бөлімдер сағат шыныларына орналастырылады, оған бояғыш ерітінділер құйылады, бояғыштардың тамшысын есептейді: акридин қызыл (1% ерітінді 50% этанол), акрифлавин (тазартылған судағы 1% ерітінді), астра көк (тазартылған судағы 1% ерітінді).

Акридинді қызыл, акрифлавинді, астраблованы қолданатын полихромды бояу әдісін 2006 жылы Уокер жариялады, әдіс парафинге салғаннан кейін бөлімдерді бояу үшін ұсынылады

**Эцольдке сәйкес аралас бояу [Эцольд, 1983]**

Бұл 2 % сірке қышқылындағы 3 бояғыштың қоспасы: негізгі фуксин (1:10 000), сафранин (1: 2500), ақшыл көк (1: 1000).

2002 жылы Эцольд бояу әдісін өзгертті және сафранинді хризоидинмен алмастыруды ұсынды [Эцольд, 2002]. Бұл қоспаны қолдану да оңай және ұзақ сақталады.

Бір кесіндіге 1-2 тамшыдан тамызып, кесіндіді бояғыштар қоспасында 15 мин. ұстау керек, қалған бояғыштардан шайып, содан кейін уақытша дайындық (боялған препаратты бір тамшы суға шыны табаққа салып, қақпақты жауып микроскоптың төмен ұлғайтқышымен қарап, содан кейін үлкен ұлғайтқыштармен қарау керек) жасау керек.

Содан кейін бұл бояғыштар бір-бірімен араластырылып, тазартылған су қосу керек. Бұл қоспаға кесінділер орналастырылады.

Бояу реакциясын жеделдету үшін сағат шынысын спирт шамының отында бірнеше секунд бойы 50-60ºС дейін қыздырып, содан кейін бояу процесі бөлме температурасында немесе жылыту үстелінде 15-20 минутқа дейін тұру керек.

Содан кейін бояғыш ерітіндісі тазартылады және кесінділер таза суда бірнеше рет жуылады, кесінді артық бояғыштардан таза жуылып болғанға дейін.

Түстерді дифференциалдау процесі - артық бояуды кетіру. Бұл процесс тұз қышқылымен қышқылданған 70% этанолда 10-50 секунд ішінде жүреді (уақыт көптеген факторларға байланысты). Бұл процедура стереомикроскоп арқылы тікелей бақылауда жүзеге асырылуы керек. Дифференциалдау процесін қышқылдандырылған дистилденген сумен жүргізуге болады, бірақ бұл процесс уақыт бойынша ұзағырақ болады.

Бұл процесс ең маңызды және эмпирикалық жолмен таңдалады ...

**Материалды дегидратациялау:**

100% изопропил спирті қолданылады.

- 10 сек. изопропанолда - ерітіндінің өзгеруі;

- 30 сек. жаңа изопропанолда - ерітіндінің өзгеруі;

- 3 мин. жаңа изопропанолда - ерітіндінің өзгеруі;

- 5 минут. жаңа изопропанолда - ерітіндінің өзгеруі

Келесі қадамға дайындалу кезінде бөлімдер изопропанолда қалдырылады.

**Препараттарды бекіту**

Егер бекіту ортасы канадалық бальзам немесе пихта сияқты балзам болса, онда изопропил спиртін ксилолмен ауыстыру керек (желдету туралы ұмытпаңыз!).

Егер бекіту ортасы Эпарал болса, онда бұл орта изопропил спиртімен үйлесімді.

Бұрын дайындалған (майсыздандырылған, жуылған) заттық шынының бекіту ортасына 1-2 тамшы тамызып, алдын-ала таңдалған жақсы кесінділерді жұмсақ жіңішке қылқаламмен салып, оларды заттық шыныға сәл басып, бөлімдерді қажет етіп орналастырып, заттық шынымен жабу керек (есіңізде болсын, жабынды шыны оның ортасына батыру арқылы оның шетіне қою керек, содан кейін шыныны ауа көпіршіктері пайда болмайтындай етіп ақырын түсіріңіз).

Жабынды шыныны қылқаламның артқы жағымен сәл басып, оған аз салмақ салып және препаратты шаң жоқ жылы жерге қояды. Әдетте бекіткіш құралдар шамамен 5-7 күн ішінде кебеді.

Содан кейін дайын препаратты жылыту үстеліне немесе термостатқа орналастырады. Орнату кесіндісі құрғағаннан кейін, жабынды шыныға түскен артық заттарды пышақпен мұқият кесуге болады. Дайындаған препаратты қарау керек, мәтіні бар тұрақты этикетканы жапсыру керек: нысанның атауы, жиналған жері және боялған күні, зерттеу әдісі, препарат жасаған адамның аты - жөні және т.б. (19, 20 сурет).

[](https://1.bp.blogspot.com/-ICLDldIrpuY/VgFVXbdhwcI/AAAAAAAAAQk/NNLgJrzGiGs/s1600/1.JPG)

19-сурет. Дайын тұрақты препарат

[](https://4.bp.blogspot.com/-7WnV_ah0fow/VgFVt_OQNKI/AAAAAAAAAQs/rtu2W6HreR0/s1600/1_1.jpg)

20-сурет. Дайын тұрақты препараттың секторы. Berberis vulgaris (кәдімгі бөріқарақат) сабағын кесу.

Боялған өсімдіктердің микроскопиялық зерттеуі, өсімдіктерді полихроматикалық бояудың жаңа әдісімен модификациялаудың, бірқатар жағымды жақтары бар деген қорытынды жасауға мүмкіндік береді:

1. материалды фиксациялауға және орналастыруға арналған реактивтерді үнемдеу;

2. тұрақты микропрепараттар жасау үшін уақытты айтарлықтай үнемдеу;

3. ағзаға зиянды ксилолды тұрақты препараттарды жасау процесінде енгізбеу;

4. әдістің қол жетімділігі.

**Қолданылған әдебиет**

1. Быховская-Павловская И.Е. Паразитологические исследования рыб. М.: АН СССР. 1952. 62с.

2. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии и гистологической техники. 2-е изд. М.: Медицина, 1982.

3. Евгеньева Т.П. Гистологические методы в экспериментальной зоологии. Изд-во «Наука». 38с.

4. Генис Д.Е. Медицинская паразитология. М.: Медицина, 1991.

5. Лабораторный практикум по болезням рыб. Под ред. Проф. В.А. Мусселиус. М.: Легкая промышленность 1983. 294 с.

6. Иванов А.В., Полянский Ю.И., Стрелков А.А. Большой практикум позоологии беспозвоночных. Учебное пособие. Часть І. 1981. М.: Высшая школа. 1983. 493 с.

7. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.:Мир.1969.

8. Меркулов Г.А. Курс патологической техники. 5-е изд. Л.: Медицина. 1969.

9. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М.: Мир. 1962.

10. Практикум по гистологии, цитологии и эмбриологии. Учебное пособие. /Под.ред. Юриной Н.А., Радосиной А.И. М.: УДН, 1989. 253 с.

11. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Мир. 1953.

12. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М. 1957

13. Хегай И.В., Кобегенова С.С. Методическое руководство по курсу

«Основы микротехники» Алматы. Қазақ университеті. 1999.

14. Микодина Е.В., Седова М.А., Чмилевский Д.А., Микулин А.Е., Пьянова С.В., Полуэктова О.Г. Гистология для ихтиологов: Опыт и советы. – М.: Изд-во ВНИРО. – 2009. – 112 с.

15. Барыкина Р.П. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. - М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.

16. Михальцов А.И. Модификация нового метода полихромной окраски тканей растений. Природные ресурсы, биоразнообразие и перспективы естественнонаучного образования: Материалы международной научно-практической конференции, посвящённой памяти И. В. Бекишевой – учёного и педагога. Омск, 2012. – с. 57 – 59

17. А.И. Михальцова "Краткое руководство по изготовлению постоянных препаратов в области анатомии растений" <http://microcosmos555.blogspot.ru/>

18. Etzold H. Einekontrastreiche, simultane Mehrfach färbung fürpflanzen anatomische Präparate: Fuchsin-Safranin-Astrablau // Mikrokosmos, Jg. 72, 1983, S. 213-219.

19. Etzold H. Simultanfärbung von Pflanzenschnittenmit Fuchsin, Chrysoidin und Astrablau // Mikrokosmos. Jg. 91, 2002, S. 316-322.

20. Wacker R. Eineneue und einfache Method ezurpolychromatischen Anfärbung von Paraffinschnitten pflanzlicher Gewebefür Durchlicht- und Fluoreszenz mikroskopie // Mikrokosmos Heft. 2006, № 4. S. 210-212.

**Қазақша-орысша сөздік**

1. Түссіздендіру - просветление

2. Белок (ақуыз) - белок

3. Ағза - орган

4. Ашудас - квасцы

5. Әдіс - метод

6. Байытылған - концентрированный

7. Гистологиялық препарат - гистологический препарат

8. Гистологиялық кесінді - гистологический срез

9. Жағынды - мазок

10. Жабынды шыны - покровное стекло

11. Жапсыру - наклеивание

12. Жүргізу - проводка

13. Кесекше - блок

14. Құю - заливка

15. Қылқалам - кисточка

16. Қоюлық - концентрация

17. Нысан - объект

18. Ұлпа - ткань

19.Өңдеу - обработка

20. Препараттық ине - препаровальная игла

21. Сіңдіру, сіңіру - пропитывание

22. Дегидратациялау - обезвоживание

23. Саралау -дифференцировка

24. Заттық шыны - предметное стекло

25. Кесінділер - кусочки

26. Тізбек - батарея (спиртов)

27. Уақытша - тотальный

28. Тұрақты - постоянный

29. Тәсіл - способ

30. Дымқыл - мокрый