

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Межотраслевой научно-технический комплекс
«Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»
Оренбургский филиал

Государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Оренбургская государственная медицинская академия»

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Рекомендовано Ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет» в качестве учебника для студентов, обучающихся по программам высшего профессионального образования по специальности 200402.65 Инженерное дело в медико-биологической практике и по направлению подготовки 201000.62 Биотехнические системы и технологии

Оренбург
2013

УДК 61.01:57.08(075.8)
ББК 51с6я73+28.7с6я73
М54

Рецензент – профессор, доктор биологических наук А.М. Русанов

Авторы: В.Н.Канюков, А.А. Стадников, О.М. Трубина, А.Д. Стрекаловская

М54 Методы исследования в биологии и медицине: учебник /
В.Н.Канюков, А.А. Стадников, О.М. Трубина, А.Д.
Стрекаловская; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург: ОГУ,
2013. – 192с.

В учебнике на конкретных примерах с применением действующих методик, необходимого оборудования раскрываются цели и задачи исследований, проводимых в биологии и медицине, их формы, методы, технологии и принципы их организации.

Учебник предназначен для студентов, обучающихся по направлению подготовки дипломированных специалистов 200400 Биомедицинская техника по специальности 200402.65 Инженерное дело в медико-биологической практике и направлению подготовки бакалавров 201000.62 Биотехнические системы и технологии по профилю Инженерное дело в медико-биологической практике, изучающих дисциплины «Методы медико-биологических исследований», «Медицинские приборы, аппараты и системы» и «Основы биотехнических систем».

УДК 61.01:57.08(075.8)
ББК 51с6я73+28.7с6я73

© Канюков В.Н.
Стадников А.А.
Трубина О.М.,
Стрекаловская А.Д., 2013
© ОГУ, 2013

Содержание

Введение	5
1 Краткая характеристика основных методов микроскопического анализа	6
1.1 Световая микроскопия	7
1.2 Электронная микроскопия	17
2 Методы исследования биологических объектов на тканевом уровне	21
2.1 Культура ткани	21
2.2 Культивирование тканей по Лазаренко Ф.М.	24
2.3 Гистологические методы	25
3 Цитологические методы исследования	29
3.1 Востребованность клинической цитологии	29
3.2 Световая микроскопия	33
3.3 Принципы работы основных типов световых микроскопов	36
3.4 Подготовка гистологического материала к изготовлению срезов для светооптического исследования	50
3.5 Виды цитологических исследований	52
4 Электронная микроскопия	55
4.1 Подготовка микропрепарата для изучения	55
4.2 Специальные методы электронной микроскопии биологических объектов	57
5 Сканирующая зондовая микроскопия	71
6 Принципы и методы гистохимического окрашивания	77
6.1 Фракционирование клеток	77
6.2 Гистохимия белковых соединений	80
6.3 Гистохимия углеводов	82
6.4 Гистохимия липидов	92
6.5 Гистохимия пигментов	105
6.6 Основы иммуноцитохимического анализа	112

6.7 Радиоавтографические методы исследования.....	135
7 Микробиологические методы исследования.....	142
7.1 Клиническая лабораторная аналитика как исследовательский арсенал лабораторной медицины	150
7.2 Организация лабораторной микробиологической службы. Микробиологическая лаборатория.....	155
7.3 Методы микробиологической диагностики.....	166
7.4 Микробиологическое наблюдение за внешней средой.....	169
7.5 Цель и задачи микробиологических исследований.....	173
7.6 Этапы микробиологических исследований.....	179
7.7 Клиническая микробиология	180
8 Контрольные вопросы.....	190
Список использованных источников	191

Введение

В учебнике «Методы исследования в биологии и медицине» представлены систематизированные данные по основным разделам исследований с учетом последних достижений в области биологии и медицины.

Для начинающих исследователей очень важно иметь представление о методах исследования в биологии и медицине, поскольку именно на первых шагах к их изучению больше всего возникает вопросов именно методологического характера. Знание и изучение методов исследования является важной составляющей доказательной базы в современной биологии и медицине. Материал учебника изложен последовательно, в соответствии с программой изучения данной дисциплины. Основное внимание уделено часто используемым методам исследования, таким как электронная и световая микроскопия; цитологические, гистохимические, иммуноцитохимические и микробиологические виды исследований.

В написании учебника приняли участие доктора медицинских и биологических наук. Коллектив авторов стремился к краткости, лаконичности и доступности излагаемого материала. Каждый раздел иллюстрирован фотографиями, рисунками, схемами и таблицами в соответствии с содержанием, по которым будет легко представить и запомнить каждый из методов. Материал изложен в удобной последовательности для лучшего усвоения.

Данный учебник предназначен для студентов, аспирантов и преподавателей биологических, медицинских ВУЗов, и поможет больше узнать о методах исследования в биологии и медицине, даст ответы на многие вопросы и обеспечит необходимыми знаниями по данной дисциплине.

1 Краткая характеристика основных методов микроскопического анализа

Микроскопия (МКС) – изучение объектов с использованием микроскопа.

МКС подразделяется на несколько видов:

- оптическая микроскопия,
- электронная микроскопия,
- многофотонная микроскопия,
- рентгеновская микроскопия или рентгеновская лазерная микроскопия,

отличающиеся использованием электромагнитных лучей с возможностью рассмотрения и получения изображений микроэлементов вещества в зависимости от разрешающей способности приборов (микроскопов).

До создания рентгеновских микроскопов работали с оптическими приборами, использующими лучи видимого света, так как и глаз работает в оптическом диапазоне длин волн. Соответственно, оптические микроскопы не могли иметь разрешения менее полупериода волны опорного излучения (для видимого диапазона длина волн от 0,4 до 0,7 мкм, или от 400 до 700 нм) с возможным максимальным увеличением в 2000 раз.

Получение изображений микрочастиц осуществляется путём использования соответствующих оптических систем – микроскопов.

Степень проникновения в микромир, его изучение зависит от возможности рассмотреть величину микроэлемента, от разрешающей способности прибора.

Если уже достигнут предел величины объекта, выше которого его границы сливаются из-за дифракции лучей, и на изображении границы нельзя различить, дальнейшее увеличение изображения исследуемой частицы теряет смысл.

В оптической микроскопии в настоящее время сделан прорыв, в результате которого преодолен фундаментальный рэлеевский критерий, заключающийся в том, что минимальный размер различимого объекта несколько меньше длины волны используемого света и принципиально ограничен дифракцией излучения. Это был предел возможному в оптической микроскопии. До недавнего времени нельзя было

преодолеть барьер, позволяющий различать структуры с расстоянием между элементами до 0,20 мкм.

Тем не менее выдающаяся последняя разработка оптической системы наноскопа с оптическим разрешением 10 нм расширило диапазон оптической микроскопии – наноскопии до десятков нанометров, что по сравнению с 0,20 мкм в 20 раз сократило расстояние между различаемыми элементами. (Например, размер белковых молекул, из которых состоит наш организм, колеблется от 3 до 10 нм).

Человеческий глаз представляет собой естественную оптическую систему, характеризующуюся определённым разрешением, т. е. наименьшим расстоянием между элементами наблюдаемого объекта (воспринимаемыми как точки или линии), при котором они ещё могут быть отличены один от другого. Для нормального глаза при удалении от объекта на т. н. расстояние наилучшего видения ($D = 250$ мм), среднестатистическое нормальное разрешение составляет 0,176 мм. Размеры микроорганизмов, большинства растительных и животных клеток, мелких кристаллов, деталей микроструктуры металлов и сплавов и т. п. значительно меньше этой величины. Для наблюдения и изучения подобных объектов и предназначены оптические микроскопы различных типов.

1.1 Световая микроскопия

Световая микроскопия обеспечивает увеличение до 2 – 3 тысяч раз, цветное и подвижное изображение живого объекта, возможность микрокиносъёмки и длительного наблюдения одного и того же объекта, оценку его динамики и химизма.

Основными характеристиками любого микроскопа являются разрешающая способность и контраст. Разрешающая способность - это минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом отдельно. Разрешение человеческого глаза в режиме наилучшего видения равно 0,2 мм.



Рисунок 1 – Световой микроскоп

Контраст изображения - это различие яркостей изображения и фона. Если это различие составляет менее 3 – 4 %, то его невозможно уловить ни глазом, ни фотопластинкой; тогда изображение останется невидимым, даже если микроскоп разрешает его детали. На контраст влияют как свойства объекта, которые изменяют световой поток по сравнению с фоном, так и способности оптики уловить возникающие различия в свойствах луча.

Возможности светового микроскопа (рис. 1) ограничены волновой природой света. Физические свойства света – цвет (длина волны), яркость (амплитуда волны), фаза, плотность и направление распространения волны изменяются в зависимости от свойств объекта. Эти различия и используются в современных микроскопах для создания контраста.

Увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. У типичных исследовательских микроскопов увеличение окуляра равно 10, а увеличение объективов – 10, 45 и 100.

Соответственно, увеличение такого микроскопа составляет от 100 до 1000. Некоторые из микроскопов имеют увеличение до 2000. Еще более высокое увеличение не имеет смысла, так как при этом разрешающая способность не улучшается. Напротив, качество изображения ухудшается.

Числовая апертура используется для выражения разрешающей способности оптической системы или светосилы объектива. Светосила объектива – интенсивность света, приходящаяся на единицу площади изображения, приблизительно равна квадрату NA. Величина NA составляет примерно 0,95 для хорошего объектива. Микроскоп обычно рассчитывают таким образом, чтобы его полное увеличение составляло около 1000 NA. Если между объективом и образцом ввести жидкость (масло или, что бывает реже, дистиллированную воду), то получится «иммерсионный» объектив с величиной NA, достигающей 1,4, и с соответствующим улучшением разрешения.

Методы световой микроскопии (освещения и наблюдения) выбираются (и обеспечиваются конструктивно) в зависимости от характера и свойств изучаемых объектов, так как последние, как отмечалось выше, влияют на контрастность изображения.

Метод светлого поля в проходящем свете применяется при изучении прозрачных препаратов с включенными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами и деталями. Это могут быть, например, тонкие окрашенные срезы животных и растительных тканей, тонкие шлифы минералов и т. д. В отсутствие препарата пучок света из конденсора, проходя через объектив, даёт вблизи фокальной плоскости окуляра равномерно освещенное поле. При наличии в препарате абсорбирующего элемента происходит частичное поглощение и частичное рассеивание падающего на него света, что и обуславливает появление изображения. Возможно применение метода и при наблюдении неабсорбирующих объектов, но лишь в том случае, если они рассеивают освещающий пучок настолько сильно, что значительная часть его не попадает в объектив.

Метод косо́го освещения – разновидность предыдущего метода. Отличие между ними состоит в том, что свет на объект направляют под большим углом к

направлению наблюдения. Иногда это помогает выявить «рельефность» объекта за счёт образования теней.

Метод светлого поля в отражённом свете применяется при исследовании непрозрачных отражающих свет объектов, например шлифов металлов или руд. Освещение препарата (от осветителя и полупрозрачного зеркала) производится сверху, через объектив, который одновременно играет и роль конденсора. В изображении, создаваемом в плоскости объективом совместно с тубусной линзой, структура препарата видна из-за различия в отражающей способности её элементов; на светлом поле выделяются также неоднородности, рассеивающие падающий на них свет.

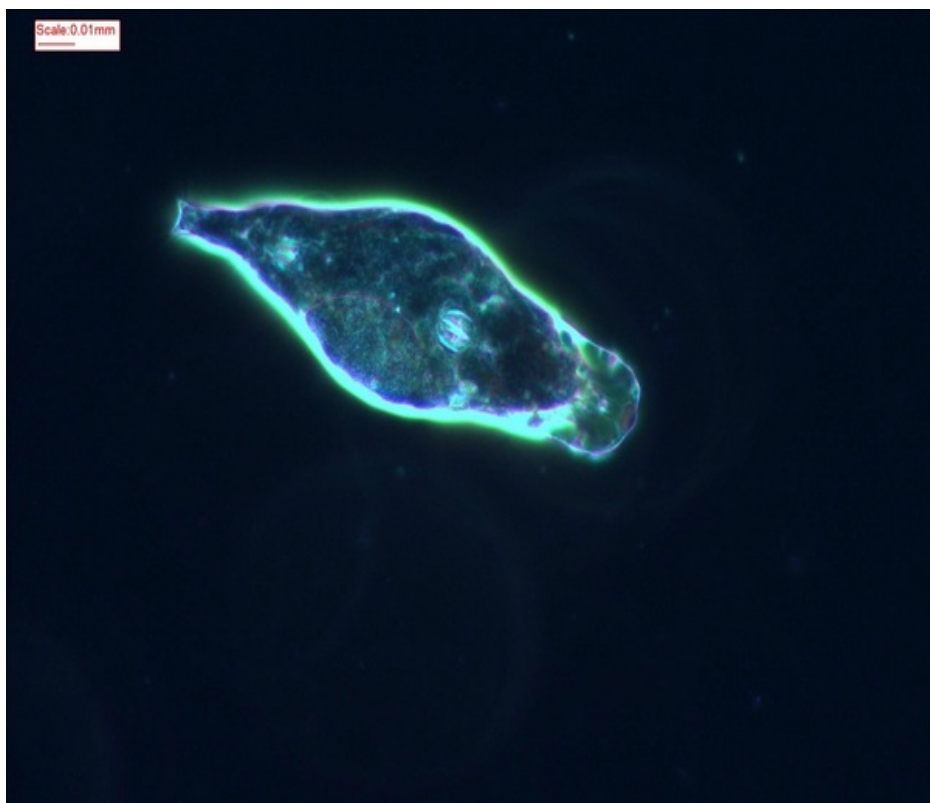


Рисунок 2 – Метод темного поля

Метод темного поля и его разновидности:

Метод тёмного поля (рис. 2) в проходящем свете используется для получения изображений прозрачных неабсорбирующих объектов, которые не могут быть

видны, если применить метод светлого поля. Зачастую это биологические объекты. Свет от осветителя и зеркала направляется на препарат конденсором специальной конструкции – т. н. конденсором тёмного поля. По выходе из конденсора основная часть лучей света, не изменившая своего направления при прохождении через прозрачный препарат, образует пучок в виде полого конуса и не попадает в объектив (который находится внутри этого конуса). Изображение в микроскопе формируется при помощи лишь небольшой части лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата внутрь конуса и прошедшими через объектив. Темнопольная микроскопия основана на эффекте Тиндаля, известным примером которого служит обнаружение пылинок в воздухе при освещении их узким лучом солнечного света. В поле зрения на тёмном фоне видны светлые изображения элементов структуры препарата, отличающихся от окружающей среды показателем преломления. У крупных частиц видны только светлые края, рассеивающие лучи света. Используя этот метод, нельзя определить по виду изображения, прозрачны частицы или непрозрачны, больший или меньший показатель преломления они имеют по сравнению с окружающей средой.

Проведение темнопольного исследования: предметные стекла должны быть не толще 1,1 – 1,2 мм, покровные 0,17 мм, без царапин и загрязнений. При приготовлении препарата следует избегать наличия пузырьков и крупных частиц. Эти дефекты будут видны ярко светящимися и не позволят наблюдать препарат. Для темнопольной микроскопии применяют более мощные осветители и максимальный накал лампы.

Настройка темнопольного освещения в основном заключается в следующем:

- 1) устанавливают свет по Келеру;
- 2) заменяют светлопольный конденсор темнопольным;
- 3) на верхнюю линзу конденсора наносят иммерсионное масло или дистиллированную воду;
- 4) поднимают конденсор до соприкосновения с нижней поверхностью предметного стекла;
- 5) объектив малого увеличения фокусируют на препарат;

б) с помощью центровочных винтов переводят в центр поля зрения светлое пятно (иногда имеющее затемненный центральный участок);

7) поднимая и опуская конденсор, добиваются исчезновения затемненного центрального участка и получения равномерно освещенного светлого пятна.

Если этого сделать не удастся, то надо проверить толщину предметного стекла (обычно такое явление наблюдается при использовании слишком толстых предметных стекол – конус света фокусируется в толще стекла).

После правильной настройки света устанавливают объектив нужного увеличения и исследуют препарат.

В основе метода ультрамикроскопии лежит тот же принцип – препараты в ультрамикроскопах освещаются перпендикулярно направлению наблюдения. При этом методе можно обнаружить (но не «наблюдать» в буквальном смысле слова) чрезвычайно мелкие частицы, размеры которых лежат далеко за пределами разрешающей способности наиболее сильных микроскопов. При помощи иммерсионных ультрамикроскопов удаётся зарегистрировать присутствие в препарате частиц с размером до 2×10^{-9} м. Но их форму и точные размеры с помощью этого метода определить невозможно. Их изображения представляются наблюдателю в виде дифракционных пятен, размеры которых зависят не от размеров и формы самих частиц, а от апертуры объектива и увеличения микроскопа. Так как подобные частицы рассеивают очень мало света, то для их освещения требуются чрезвычайно сильные источники света, например, угольная электрическая дуга. Ультрамикроскопы применяются в основном в коллоидной химии. С помощью ультрамикроскопа можно показать, что в растворе, внешне однородном, находятся частицы более крупные, чем обычные молекулы; можно, кроме того, приблизительно определить и средние размеры коллоидных частиц путем их подсчета в известном объеме раствора. Но нельзя прямо получить сведений о размерах и форме частиц, так как частицы на самом деле не видны - они слишком малы, чтобы их можно было различить в микроскоп. Разрешающая сила микроскопа ограничена длиной волны применяемого света, причем минимальное разрешаемое расстояние составляет половину длины волны света.

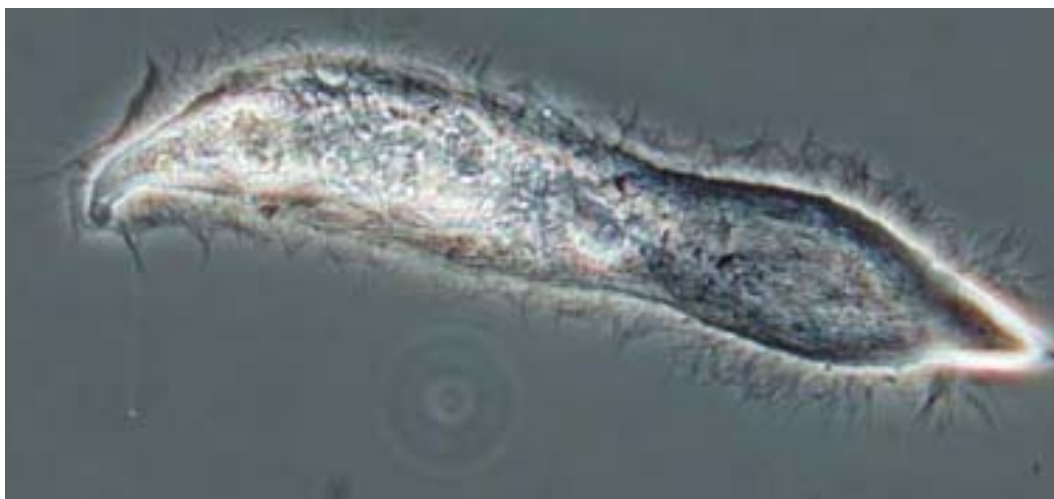


Рисунок 3 – Метод фазового контраста

Метод фазового контраста (рис. 3) и его разновидность (метод «аноптрального» контраста) предназначен для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов, невидимых при наблюдении по методу светлого поля. К таковым относятся, например, живые неокрашенные животные ткани. Суть метода в том, что даже при очень малых различиях в показателях преломления разных элементов препарата световая волна, проходящая через них, претерпевает разные изменения по фазе (приобретает т. н. фазовый рельеф). Невоспринимаемые непосредственно ни глазом, ни фотопластинкой, эти фазовые изменения с помощью специального оптического устройства преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения яркости («амплитудный рельеф»), которые уже различимы глазом или фиксируются на фоточувствительном слое. Иными словами, в получаемом видимом изображении распределение яркостей (амплитуд) воспроизводит фазовый рельеф. Получаемое таким образом изображение называется фазово-контрастным.

Фазово–контрастное устройство может быть установлено на любом световом микроскопе и состоит из:

- 1) набора объективов со специальными фазовым пластинками;
- 2) конденсора с поворачивающимся диском. В нем установлены кольцевые диафрагмы, соответствующие фазовым пластинкам в каждом из объективов;

3) вспомогательного телескопа для настройки фазового контраста.

Настройка фазового контраста заключается в следующем:

1) заменяют объективы и конденсор микроскопа на фазовые (обозначенные буквами Ph);

2) устанавливают объектив малого увеличения. Отверстие в диске конденсора должно быть без кольцевой диафрагмы (обозначенной цифрой «0»);

3) настраивают свет по Келеру;

4) выбирают фазовый объектив соответствующего увеличения и фокусируют его на препарат;

5) поворачивают диск конденсора и устанавливают соответствующую объективу кольцевую диафрагму;

6) вынимают из тубуса окуляр и вставляют на его место вспомогательный телескоп. Настраивают его так, чтобы были резко видны фазовая пластинка (в виде темного кольца) и кольцевая диафрагма (в виде светлого кольца того же диаметра). С помощью регулировочных винтов на конденсоре совмещают эти кольца. Вынимают вспомогательный телескоп и вновь устанавливают окуляр.

Благодаря применению этого способа микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается, и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст).

Фазово-контрастная микроскопия применяется также для изучения клеток культуры ткани, наблюдения действия различных вирусов на клетки и т. п. В этих случаях часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики – инвертированные микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор – сверху.

Поляризационная микроскопия – это метод наблюдения в поляризованном свете для микроскопического исследования препаратов, включающих оптически анизотропные элементы (или целиком состоящих из таких элементов). Таковыми являются многие минералы, зёрна в шлифах сплавов, некоторые животные и растительные ткани и пр. Оптические свойства анизотропных микрообъектов

различны в различных направлениях и проявляются по-разному в зависимости от ориентации этих объектов относительно направления наблюдения и плоскости поляризации света, падающего на них. Наблюдение можно проводить как в проходящем, так и в отражённом свете. Свет, излучаемый осветителем, пропускают через поляризатор. Сообщенная ему при этом поляризация меняется при последующем прохождении света через препарат (или отражении от него). Эти изменения изучаются с помощью анализатора и различных оптических компенсаторов. Анализируя такие изменения, можно судить об основных оптических характеристиках анизотропных микрообъектов: силе двойного лучепреломления, количестве оптических осей и их ориентации, вращении плоскости поляризации, дихроизме.

Метод интерференционного контраста (интерференционная микроскопия) состоит в том, что каждый луч раздваивается, входя в микроскоп. Один из полученных лучей направляется сквозь наблюдаемую частицу, другой – мимо неё по той же или дополнительной оптической ветви микроскопа. В окулярной части микроскопа оба луча вновь соединяются и интерферируют между собой. Один из лучей, проходя через объект, запаздывает по фазе (приобретает разность хода по сравнению со вторым лучом). Величина этого запаздывания измеряется компенсатором. Можно сказать, что метод интерференционного контраста сходен с методом фазового контраста – они оба основаны на интерференции лучей, прошедших через микрочастицу и миновавших её. Как и фазово-контрастная микроскопия, этот метод дает возможность наблюдать прозрачные и бесцветные объекты, но их изображения могут быть и разноцветными (интерференционные цвета). Оба метода пригодны для изучения живых тканей и клеток и применяются во многих случаях именно с этой целью. Главное отличие интерференционной микроскопии от метода фазового контраста – это возможность измерять разности хода, вносимые микрообъектами. Метод интерференционного контраста часто применяют совместно с другими методами микроскопии, в частности с наблюдением в поляризованном свете. Его применение в сочетании с микроскопией в ультрафиолетовых лучах позволяет, к примеру, определить содержание

нуклеиновых кислот в общей сухой массе объекта. К интерференционной микроскопии относятся также методы использования микроинтерферометров.

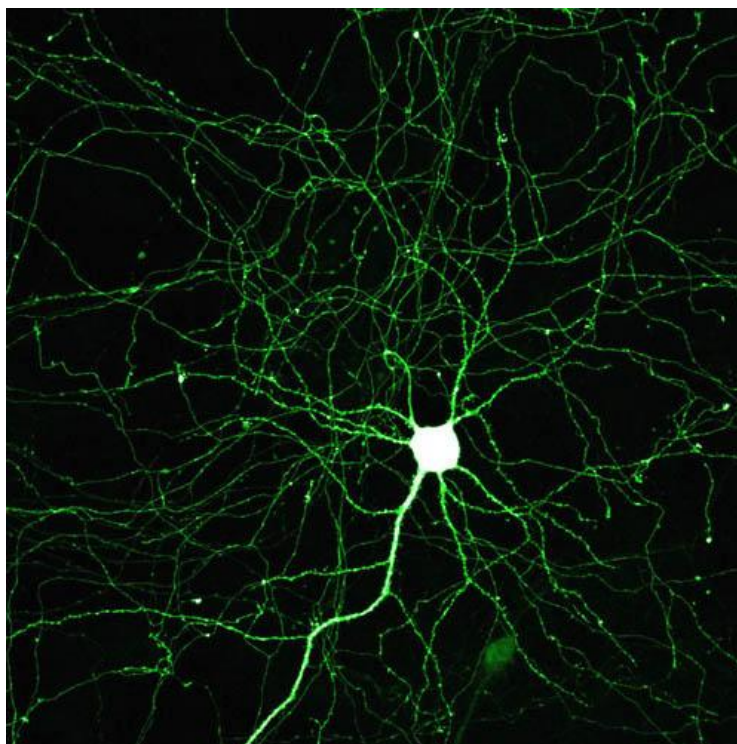


Рисунок 4 – Метод исследования в свете люминесценции

Метод исследования в свете люминесценции (люминесцентная микроскопия, или флуоресцентная микроскопия (рис. 4) состоит в наблюдении под микроскопом зелено-оранжевого свечения микрообъектов, которое возникает при их освещении сине-фиолетовым светом или не видимыми глазом ультрафиолетовыми лучами. В оптическую схему микроскопа вводятся два светофильтра. Один из них помещают перед конденсором. Он пропускает от источника – осветителя излучение только тех длин волн, которые возбуждают люминесценцию либо самого объекта (собственная люминесценция), либо специальных красителей, введённых в препарат и поглощённых его частицами (вторичная люминесценция). Второй светофильтр, который установлен после объектива, пропускает к глазу наблюдателя (или на фоточувствительный слой) только свет люминесценции. В люминесцентной микроскопии используют освещение препаратов как сверху (через объектив,

который в этом случае служит и конденсором), так и снизу, через обычный конденсор. Наблюдение при освещении сверху иногда называют «люминесцентной микроскопией в отражённом свете» (этот термин условен – возбуждение свечения препарата не является простым отражением света). Его часто используют совместно с наблюдением по фазово-контрастному методу в проходящем свете. Метод нашел широкое применение в микробиологии, вирусологии, гистологии, цитологии, в пищевой промышленности, при исследовании почв, в микрохимическом анализе, в дефектоскопии. Такое многообразие применений объясняется очень высокой цветовой чувствительностью глаза и высокой контрастностью изображения самосветящегося объекта на тёмном нелюминесцирующем фоне. Кроме того, информация о составе и свойствах исследуемых веществ, которую можно получить, зная интенсивность и спектральный состав их люминесцентного излучения, имеет огромную ценность.

1.2 Электронная микроскопия

В электронной микроскопии для построения изображения вместо световых лучей используется пучок электронов. Это позволяет увеличить разрешающую способность электронного микроскопа по сравнению со световым в несколько тысяч раз (рис. 5).

Первый работоспособный прототип электронного микроскопа был построен в 1932 году Э. Руска и М. Кнолль; в 1986 году за эту разработку Руски, вместе с другими разработчиками электронных микроскопов, была присуждена Нобелевская премия по физике. Серийное производство электронных микроскопов было начато в конце 30-х годов.

Электронный микроскоп (рис. 6) - прибор, позволяющий получать изображение объектов с максимальным увеличением до 10^6 раз, благодаря использованию вместо светового потока пучка электронов с энергиями 30-200 кэВ и более.

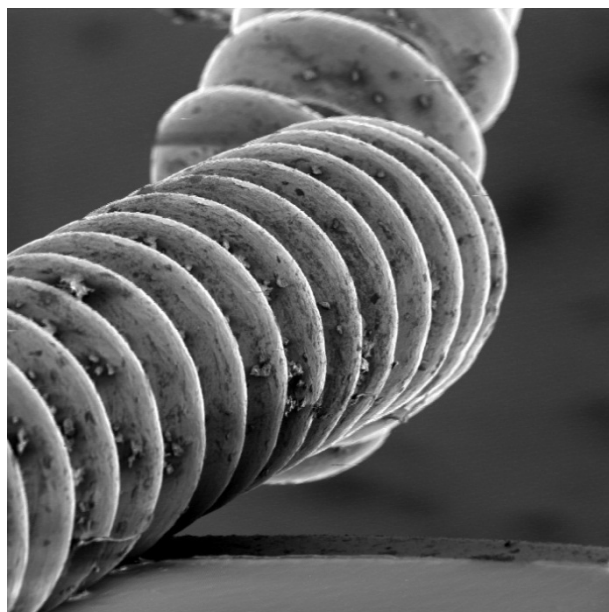


Рисунок 5 – Пример работы электронного микроскопа



Рисунок 6 – Электронный микроскоп

Разрешающая способность электронного микроскопа в 1000-10000 раз превосходит разрешение светового микроскопа и для лучших современных приборов может составлять несколько ангстрем. Для получения изображения в электронном микроскопе используются специальные магнитные линзы, управляющие движением электронов в колонне прибора при помощи магнитного поля.

Сферы применения электронных микроскопов:

1) полупроводники и хранение данных:

- редактирование схем;
- метрология 3D;
- анализ дефектов;
- анализ неисправностей;

2) биология и биологические науки:

- криобиология;
- локализация белков;
- электронная томография;
- клеточная томография;
- крио-электронная микроскопия;
- токсикология;
- биологическое производство и мониторинг загрузки вирусов;
- анализ частиц;
- фармацевтический контроль качества;
- 3D изображения тканей;
- вирусология;
- стеклование;

3) научные исследования:

- квалификация материалов;
- подготовка материалов и образцов;

- создание нанопрототипов;
- нанометрология;
- тестирование и снятие характеристик устройств;
- исследования микроструктуры металлов;

4) промышленность:

- создание изображений высокого разрешения;
- снятие микрохарактеристик 2D и 3D;
- макрообразцы для нанометрической метрологии;
- обнаружение и снятие параметров частиц;
- конструирование прямого пучка;
- эксперименты с динамическими материалами;
- подготовка образцов;
- судебная экспертиза;
- добыча и анализ полезных ископаемых;
- химия/нефтехимия.

Электронная микроскопия широко применяется в биологических и медицинских исследованиях. Разработаны многочисленные методики фиксации, заливки и получения ультратонких срезов тканей и исследования объемных образцов. Электронная микроскопия позволяет выявить не только компоненты клетки и детали строения мембран, органелл, таких как митохондрии, эндоплазматическая сеть, рибосомы, вакуоли, но и является расширенным методом выявления вирусов, что не позволяет уровень световой микроскопии. С помощью электронного микроскопа можно снимать электронограммы и наблюдать картины дифракции от выделенных участков образца.

Таким образом, применение электронной микроскопии для изучения живых тканей позволяет получить представление о тонком строении клеток и межклеточных структур в норме и при различных патологических процессах. Главным результатом этих исследований следует считать установление мембранного принципа строения различных составных элементов клеток.

2 Методы исследования биологических объектов на тканевом уровне

2.1 Культура ткани

Культура ткани (эксплантация), метод длительного сохранения и выращивания в специальных питательных средах клеток, тканей, небольших органов или их частей, выделенных из организма человека, животных и растений. Основан на методах выращивания культуры микроорганизмов, обеспечивающих асептику, питание, газообмен и удаление продуктов обмена культивируемых объектов. Одно из преимуществ метода тканевых культур – возможность наблюдения за жизнедеятельностью клеток с помощью микроскопа.

Первые опыты по культуре животных тканей были проведены немецким биологом В. Ру, которому удалось в 1885г. в течение нескольких дней поддерживать развитие нервной пластинки (зачатка центральной нервной системы) куриного эмбриона в теплом солевом растворе. Однако лишь предложенная американским биологом Р. Гаррисоном в 1907г. воспроизводимая техника послужила основой для развития этого метода. Культивируя в сгустках лимфы небольшие кусочки нервной трубки эмбриона лягушки, он через несколько недель наблюдал образование нервных волокон.

Французский хирург и патофизиолог А. Каррель, сумевший в течение 34 лет сохранять у штамма клеток сердца куриного эмбриона способность к активным делениям, доказал таким образом, что животные клетки могут неограниченно долго расти в культуре *in vitro* (то есть в пробирке, в искусственных условиях).

Стерильная культура требует оптимальных контролируемых условий окружающей среды и соответствующий каждому объекту состав питательной среды, состоящий порой из 20 и более компонентов (макро- и микроэлементов, углеводов, витаминов, регуляторов роста, аминокислот, агар-агара и др.). Основные методы культуры ткани были разработаны на модельных растениях (табак, морковь, петуния и др.).

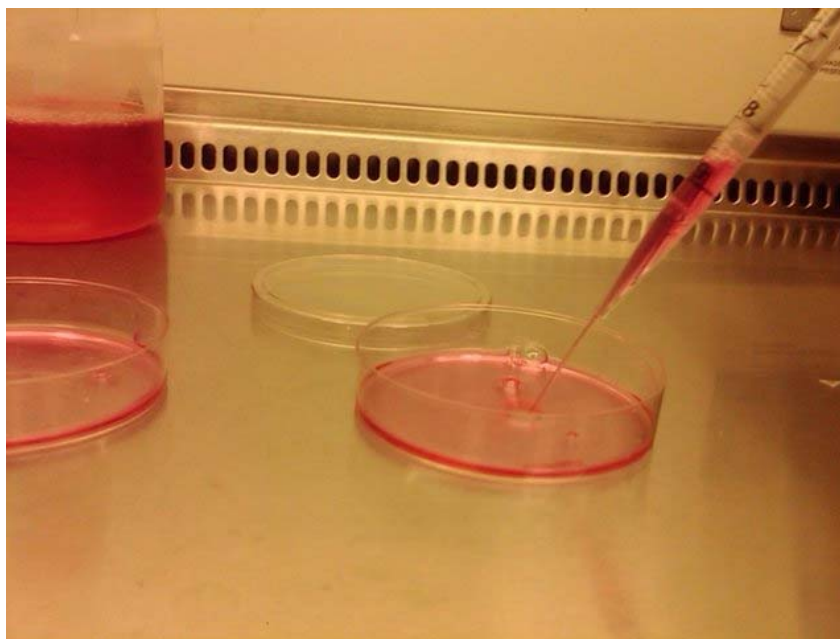


Рисунок 7 – Среда для роста клеток

Животные клетки выращивают *in vitro* либо прикрепленными к подходящей подложке, либо суспендированными в жидких питательных средах (рис. 7). Для масштабного выращивания клеток используют реакторы для промышленного культивирования микроорганизмов.

Различают 3 типа культуры клеток: первичные культуры, получаемые практически из любого органа и существующие лишь до первого пересева; диплоидные культуры, чаще получаемые из эмбриональных тканей и сохраняющие до 50 пересевов диплоидный набор хромосом, которые затем трансформируются в постоянные (перевиваемые) гетероплоидные культуры, существующие вне организма десятки лет. В отличие от культуры клеток, задачей культуры органов, осуществляемой с применением жидких или твердых сред в стеклянных капиллярах, на покровных стеклах и нитроцеллюлозных фильтрах, на агаре и т. п., является сохранение нормальной структуры тканей и нормального их развития.

Культуру животных тканей применяют для изучения механизмов роста и дифференцировки клеток, гистогенеза, межтканевых и межклеточных взаимодействий, обмена веществ и т. п. Культуры животных клеток являются важными продуцентами многих клеточных продуктов, например, противовирусного

агента интерферона. На них выращивают вирусы для их идентификации и получения вакцин. Клеточные культуры часто применяют при тестировании и изучении механизма действия лекарственных и косметических средств, пестицидов, консервантов и т. п.

Методы культуры клеток нашли широкое применение для реконструкции различных тканей и органов. Так, культура клеток кожи используется для заместительной терапии при ожогах, культура клеток эндотелия - для реконструкции стенок сосудов. Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования, хранения и слияния клеток, что, в свою очередь, вызвало становление новой области науки – генетики соматических клеток. Органные культуры используются при изучении закономерностей развития органов, для изучения способов сохранения жизнеспособности изолированных органов, предназначенных для трансплантации.

Идея о возможности культивирования растительных клеток была высказана еще в конце XIX – начале XX вв. немецкими учеными Х. Фехтингом, С. Рехингером и Г. Габерландтом. Однако лишь в 1922 г. американскому исследователю В. Роббинсу удалось в течение нескольких недель культивировать корневые меристемы томатов. Начало же успешному развитию метода культуры клеток и тканей растений положили работы Р. Готре (Франция) и Ф. Уайта (США), показавших в 30-е годы способность каллюсных культур к неограниченному росту. Американский ученый Ф. Стюард, работая с культурой изолированной флоэмы моркови, получил из нее в 1958г. целые растения. Значительный вклад в развитие культуры клеток и тканей растений в нашей стране внесли исследования Р. Г. Бутенко и ее сотрудников, использовавших эти методы для изучения физиологии растительных клеток и морфогенеза растений.

Культивирование растительных клеток и тканей *in vitro* проводят на агаризованных либо жидких питательных средах, содержащих в качестве одного из основных компонентов фитогормоны. Разработаны способы выращивания отдельных клеток. Изменяя условия культивирования, прежде всего концентрацию и соотношение различных гормонов, можно либо длительно поддерживать

неорганизованный рост каллюсной ткани, либо индуцировать в ней образование различных органов. Клетка из практически любой ткани растения, в отличие от животной клетки, способна в условиях *in vitro* к делению и дифференцировке с последующим формированием целого растения. Важным этапом в развитии методов культуры клеток растений явилась разработка в 1960г. профессором Ноттингемского университета Э. Коккингем (Великобритания) метода ферментативного изолирования протопластов, которые оказались способными в асептической культуре к регенерации в целое растение. Изолированные протопласты, по выражению американского исследователя А. Галстона, вывели растительную клетку из «деревянной тюрьмы» и открыли перспективы различных манипуляций с ней – клеточной инженерии.

Культура клеток, тканей и органов растений используется для выращивания клеточной биомассы растений, прежде всего лекарственных, с целью получения из нее ценных соединений, в генетико-селекционной работе, а также для изучения фундаментальных проблем физиологии и генетики растений, фитопатологии, онтогенеза растений и др. Для сохранения генофонда растений созданы банки меристемных тканей, хранящихся в условиях криоконсервации.

2.2 Культивирование тканей по Лазаренко Ф.М.

Лазаренко Федор Михайлович (1888 - 1953) – известный гистолог и эмбриолог, доктор биологических наук, член-корреспондент АМН СССР (рис. 8).

Получив звание профессора за проводимые научные исследования, с 1930 г. заведовал кафедрой гистологии Оренбургского сельскохозяйственного, а затем медицинского институтов. Является организатором Оренбургского отделения Всесоюзного общества анатомов, гистологов и эмбриологов. Разработал метод культивирования тканей и органов в организме. Подготовил 6 докторов и 25 кандидатов наук.



Рисунок 8 – Лазаренко Федор Михайлович

Метод культивирования тканей по Лазаренко – способ культивирования тканей в асептическом воспалительном очаге в организме, сущность которого состоит в помещении кусочков органа от одного животного в искусственно создаваемый воспалительный очаг в подкожной клетчатке другого животного.

2.3 Гистологические методы

Гистологические методы исследования применяются для изучения строения и функции клеток и тканей человека, животных и растительных организмов в норме, патологии и эксперименте. Основой гистологических методов исследования является гистологическая техника – комплекс методических приемов, используемых при изготовлении препаратов клеток и тканей для их микроскопического исследования. Микроскопическое изучение клеток и тканей может проводиться двумя основными путями в зависимости от состояния исследуемого объекта:

исследование живых клеток и тканей, исследование неживых клеток и тканей, сохраняющих структуру благодаря специальным приемам фиксации.

Изучение живых объектов – витальное (суправитальное) – дает возможность наблюдать физиологические процессы в клетках и тканях, их прижизненное строение. Оно проводится на клетках, свободно взвешенных в жидкой среде (клетках крови, эпителиальных клетках соскобов и др.), а также на культурах клеток и тканей, выращенных на специальных питательных средах. Объектом прижизненного наблюдения могут быть тонкие, прозрачные тканевые пленки (брыжейка, плавательная перепонка). В экспериментальных исследованиях используется метод биологических окон (вживление прозрачных камер) и изучение тканевых имплантатов в естественной прозрачной среде, например в передней камере глаза животных. В зависимости от поставленной задачи при витальных исследованиях применяются различные специальные методы микроскопии: темнопольная, фазово-контрастная, флюоресцентная, поляризационная, ультрафиолетовая. Витальные гистологические методы применяются в основном для биологических и медико-биологических исследований. Их широкое применение ограничено большими техническими трудностями, связанными со свойствами переживающих тканей. В медицинских исследованиях, особенно в практике патолого-анатомических лабораторий, используются методы исследования фиксированных объектов.

Цель фиксации сохранить прижизненную структуру клеток и тканей путем быстрого воздействия на них химическими агентами, предотвращающими развитие посмертных изменений. Выбор метода фиксации зависит от задач исследования и особенностей фиксируемого материала. Так, для выявления тонких клеточных структур применяют фиксирующие смеси, содержащие соли тяжелых металлов (например, сулему). Лучшим фиксатором для цитологических целей служит четырехокись осмия, часто используемая при электронной микроскопии. Универсальным фиксатором является формальдегид, применяемый в виде 10 % раствора формалина. Чтобы фиксация была равномерной и полной, кусочки ткани должны быть небольшими, а объем фиксирующей жидкости – во много раз

превосходить объем фиксируемого материала. По окончании фиксации кусочки обычно промывают в воде или спирте. Твердые компоненты тканей (например, отложения солей кальция) удаляют с помощью методов декальцинации.

Наиболее быстрым и простым способом приготовления среза ткани, применяемым обычно при экспресс-диагностике, является замораживание кусочка и получение срезов ткани на замораживающем микротоме. Однако при этом трудно получить достаточно тонкие срезы, а также срезы с мелких объектов и распадающихся тканей. Поэтому кусочки тканей, как правило, заливают в уплотняющие среды – парафин или целлоидин.

Фиксированную ткань обезвоживают в спиртах возрастающей крепости, проводят через промежуточный растворитель (ксилол или толуол для парафина, спирт-эфир для целлоидина) и пропитывают парафином или целлоидином. Заливка в парафин позволяет получить более тонкие срезы (от 5–8 до 1–2 мкм), чем заливка в целлоидин.

Срезы для микроскопического исследования приготавливают с помощью санного или роторного микротомов. Сверхтонкие срезы (толщиной от 90–100 до 5–15 нм), необходимые для электронно-микроскопических исследований, готовят на ультратоме. Ультратомы используют и в световой микроскопии для получения полутонких срезов.

Приготовленные срезы окрашивают (рис. 9) для четкого выделения структур клеток и тканей, которые по-разному воспринимают красители. Основные красители – красящие основания и их соли (метиленовый синий, толуидиновый синий, азуры, гематоксилин, бисмарк коричневый) – окрашивают так называемые базофильные структуры (ядра клеток, основное вещество соединительной ткани). Кислые красители – красящие кислоты и их соли (пикриновая кислота, эозин, эритрозин) – окрашивают ацидофильные, или оксифильные структуры (цитоплазму клеток, коллагеновые, эластические волокна). От окраски следует отличать импрегнацию – специальный метод, основанный на способности определенных участков клеток и тканей восстанавливать тяжелые металлы (например, серебра, золота, осмия) из их солей и за счет этого приобретать интенсивную окраску.



Рисунок 9 – Автоматический аппарат для окрашивания

Приготовление гистологического препарата завершается заключением его в среды, обеспечивающие сохранность структур объекта, его окраски и прозрачности. Наиболее часто для этих целей применяют органические смолы, например, канадский бальзам.

Одним из основных условий, определяющих пригодность гистологических препаратов к микроскопическому исследованию, является их прозрачность. Кроме того, препараты должны быть защищены от высыхания и загрязнения. Все это обеспечивается просветлением и заключением в специальные среды, которые можно подразделить на смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, поливиниловый спирт, желатин) и не смешивающиеся с водой (ксилол, толуол, их смеси с фенолом, эфирные масла).

Смешивающиеся с водой просветляющие вещества одновременно являются средой для заключения и приготовления постоянных препаратов.

3 Цитологические методы исследования

3.1 Востребованность клинической цитологии

Цитология (греч. κύτος – «вместилище», здесь: «клетка» и λόγος – «учение», «наука») – раздел биологии, изучающий живые клетки, их органоиды, их строение (рис. 10), функционирование, процессы клеточного размножения, старения и смерти.

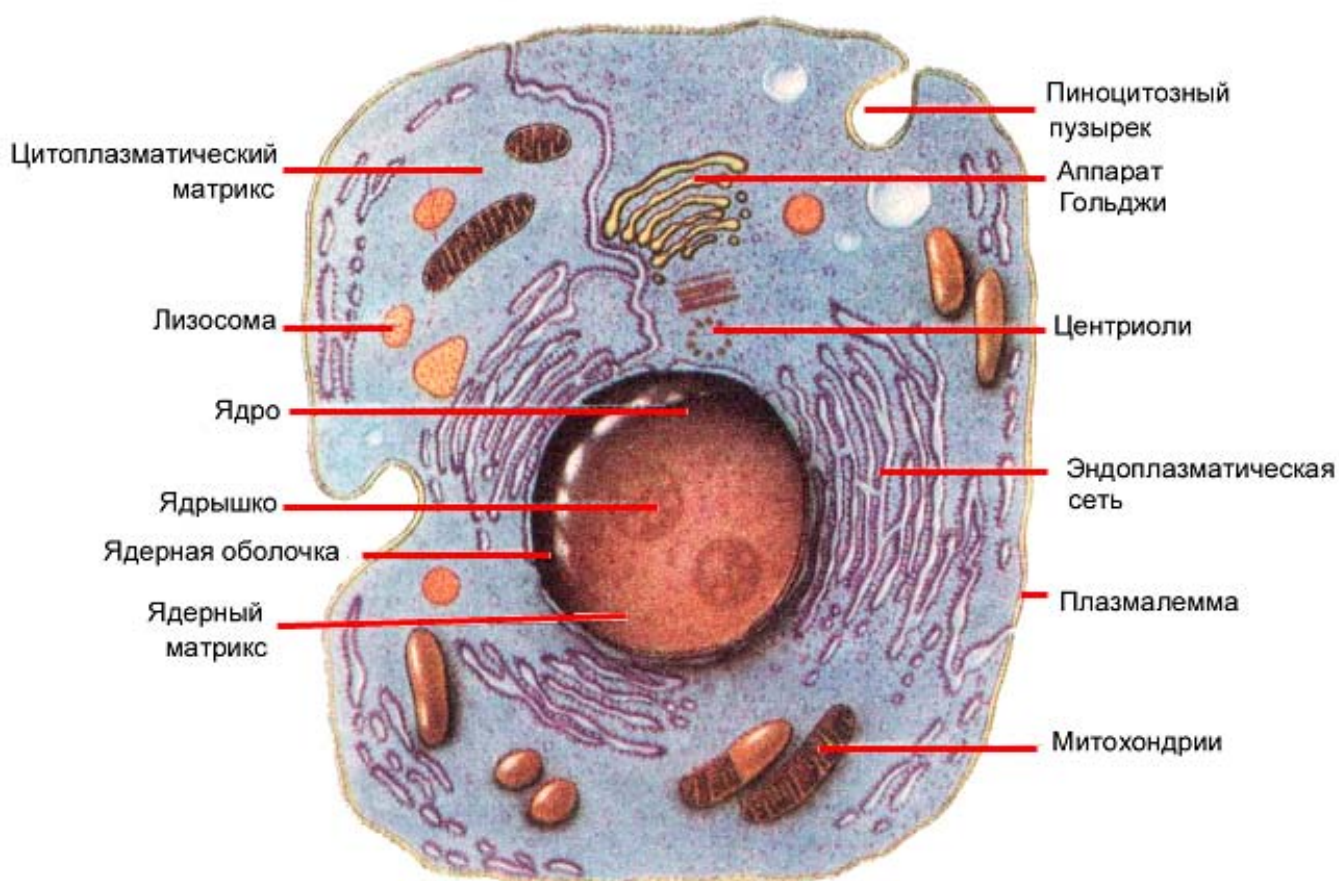


Рисунок 10 – Клетка, основа живой материи

Термин «клетка» впервые употребил Роберт Гук в 1665 г., при описании своих «исследований строения пробки с помощью увеличительных линз». В 1674 г. Антони ван Левенгук установил, что вещество, находящееся внутри клетки,

определенным образом организовано. Он первым обнаружил клеточные ядра. На этом уровне представление о клетке просуществовало еще более 100 лет.

Изучение клетки ускорилось в 1830-х годах, когда появились усовершенствованные микроскопы. В 1838 – 1839 гг. ботаник Маттиас Шлейден и анатом Теодор Шванн практически одновременно выдвинули идею клеточного строения организма. Т. Шванн предложил термин «клеточная теория» и представил эту теорию научному сообществу. Возникновение цитологии тесно связано с созданием клеточной теории – самого широкого и фундаментального из всех биологических обобщений. Согласно клеточной теории, все растения и животные состоят из сходных единиц – клеток, каждая из которых обладает всеми свойствами живого.

Важнейшим дополнением клеточной теории явилось утверждение знаменитого немецкого натуралиста Рудольфа Вирхова, что каждая клетка образуется в результате деления другой клетки.

В 1870-х годах были открыты два способа деления клетки эукариот, впоследствии названные митоз и мейоз. Уже через 10 лет после этого удалось установить главные для генетики особенности этих типов деления. Было установлено, что перед митозом происходит удвоение хромосом и их равномерное распределение между дочерними клетками, так что в дочерних клетках сохраняется прежнее число хромосом.

Перед мейозом хромосом также удваивается, но в первом (редукционном) делении к полюсам клетки расходятся двуххроматидные хромосомы, так что формируются клетки с гаплоидным набором, число хромосом в них в два раза меньше, чем в материнской клетке. Было установлено, что число, форма и размеры хромосом – кариотип – одинаково во всех соматических клетках животных данного вида, а число хромосом в гаметах в два раза меньше. Впоследствии эти цитологические открытия легли в основу хромосомной теории наследственности.

Самым древним и, вместе с тем, наиболее распространенным методом изучения клетки является микроскопия. Можно сказать, что и начало изучения клетки было положено изобретением светового оптического микроскопа.

Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около 1/10 мм. Это означает, что если вы смотрите на две линии, которые находятся друг от друга на расстоянии меньше 0,1 мм, они сливаются в одну. Чтобы различить структуры, расположенные более тесно, применяют оптические приборы, например, микроскоп. Но возможности светового микроскопа не безграничны. Предел разрешения светового микроскопа задается длиной световой волны, то есть оптический микроскоп может быть использован только для изучения таких структур, минимальные размеры которых сопоставимы с длиной волны светового излучения. Лучший световой микроскоп имеет разрешающую способность около 0,2 мкм (или 200 нм), то есть примерно в 500 раз улучшает человеческий глаз. Теоретически построить световой микроскоп с большим разрешением невозможно.

Многие компоненты клетки близки по своей оптической плотности и без специальной обработки практически не видны в обычный световой микроскоп. Для того, чтобы сделать их видимыми, используют различные красители, обладающие определенной избирательностью.

В начале XIX в. возникла потребность в красителях для окрашивания текстильных тканей, что в свою очередь вызвало ускоренное развитие органической химии. Оказалось, что некоторые из этих красителей окрашивают и биологические ткани и, что было уж совсем неожиданно, часто предпочтительно связываются с определенными компонентами клетки. Использование таких избирательных красителей дает возможность более тонко исследовать внутреннее строение клетки.

Для проведения микроскопических исследований большую часть тканей перед окраской фиксируют. После фиксации клетки становятся проницаемыми для красителей, а структура клетки стабилизируется. Одним из наиболее распространенных фиксаторов в ботанике является этиловый спирт.

Фиксация и окрашивание – не единственные процедуры, используемые для приготовления препаратов. Толщина большинства тканей слишком велика, чтобы их сразу можно было наблюдать при высоком разрешении. Поэтому выполняют тонкие срезы на микротоме. В этом приборе использован принцип хлебoreзки. Для растительных тканей изготавливают чуть более толстые срезы, чем для животных,

поскольку клетки растений обычно крупнее. Толщина срезов растительных тканей для световой микроскопии около 10 мкм – 20 мкм. Некоторые ткани слишком мягкие, чтобы из них сразу же можно было получить срезы. Поэтому после фиксации их заливают в расплавленный парафин или специальную смолу, которые пропитывают всю ткань. После охлаждения образуется твердый блок, который затем режется на микротоме. Правда, для растительных тканей заливка применяется значительно реже, чем для животных. Это объясняется тем, что растительные клетки имеют прочные клеточные стенки, составляющие каркас ткани. Особенно прочны одревесневшие оболочки. Однако заливка может нарушить структуру клетки, поэтому применяют еще и другой метод, где эта опасность уменьшена - быстрое замораживание. Здесь можно обойтись без фиксации и заливки. Замороженную ткань режут на специальном микротоме (криотоме).

Замороженные срезы, приготовленные таким способом, имеют явное преимущество, поскольку в них лучше сохраняются особенности естественной структуры. Однако их труднее готовить, а присутствие кристаллов льда все же нарушает некоторые детали. Микроскопистов всегда беспокоила возможность потери и искажения некоторых компонентов клетки в процессе фиксации и окраски. Поэтому полученные результаты проверяют другими методами.

Заманчивой представлялась возможность исследовать под микроскопом живые клетки, но так, чтобы более отчетливо проявились детали их строения. Такую возможность дают особые оптические системы: фазово-контрастный и интерференционный микроскопы. Хорошо известно, что световые волны, подобно волнам воды, могут интерферировать друг с другом, увеличивая или уменьшая амплитуду результирующих волн. В обычном микроскопе, проходя через отдельные компоненты клетки, световые волны меняют свою фазу, хотя человеческий глаз этих различий не улавливает. Но за счет интерференции можно преобразовать волны, и тогда разные компоненты клетки можно отличить друг от друга под микроскопом, не прибегая к окрашиванию. В этих микроскопах используют два пучка световых волн, которые взаимодействуют (налагаются) друг на друга,

усиливая или уменьшая амплитуду волн, поступающих в глаз от разных компонентов клетки.

3.2 Световая микроскопия

Световые микроскопы – доступные, простые и удобные аналитические приборы (рис. 11).

Микроскопы проходящего света состоят из опорного штатива, на оптической оси которого последовательно смонтированы источник света и устройство для его юстировки, полевая диафрагма для ограничения размеров пучка света, конденсор для фокусировки пучка света на микрообъект, встроенная в конденсор апертурная диафрагма для регулирования освещенности препарата, столик для закрепления и перемещения препарата с микрообъектом, а также для фокусировки оптической системы на препарате, фотонасадка. В микроскопах отраженного света между конденсором и объективом помещается полупрозрачный opak-иллюминатор, позволяющий через один объектив освещать микрообъект и наблюдать его в отраженном свете. Увеличение микроскопа равно произведению увеличению объектива и окуляра. Увеличение (например, 10x) обозначается на боковой поверхности объектива и в верхней части окуляра. Смена увеличения достигается путем смены объективов и окуляров, однако в некоторых современных моделях возможно также плавное изменение увеличения. Для предварительного просмотра микропроб живописи в отраженном свете, определения ее структуры и примерного состава, а также для приготовления пробы к дальнейшему исследованию и ее микрохимического анализа применяются бинокулярные микроскопы с увеличением до 100x. Они обладают большим полем зрения, а расстояние между объективом и микропробой удобно для препаративной работы. Наличие источника света позволяет работать по методу косого освещения.

Для детального анализа компонентов микропробы наиболее удобны и эффективны поляризационные микроскопы для проходящего и для отраженного света. Эти микроскопы снабжены светосильной оптикой высокого качества,

специальным осветителем и бинокляром, что позволяет получать яркое и четкое стереоизображение при увеличениях до 1000х по методу светлого и темного полей в обычном и поляризованном свете. Обычно микроскопы укомплектованы фотоаппаратом для фиксации микроскопического изображения на фотопленку 35 мм.

Классификация световых микроскопов:

Классификация световых микроскопов связана с геометрическими параметрами объекта и его изображения, а также с физическими явлениями, связанными с волновой природой света, которые реализуются в конструкции микроскопа.



Рисунок 11 – Световой микроскоп

Световые микроскопы делятся на микроскопы плоского поля (двухмерное изображение объекта) и стереоскопические (объемное или трехмерное изображение объекта).

Парк современных микроскопов для медико-биологических исследований включает в себя следующие основные группы:

- биологические микроскопы (микроскопы проходящего света);

- инвертированные биологические микроскопы (инвертированные микроскопы проходящего света);
- люминесцентные микроскопы;
- поляризационные микроскопы проходящего света;
- анализаторы изображения;
- стереоскопические микроскопы.

По степени сложности каждую группу можно разделить на:

- учебные;
- рутинные;
- рабочие;
- лабораторные;
- исследовательские.

Биологический микроскоп предназначен для наблюдения в проходящем свете в светлом поле окрашенных и неокрашенных мазков крови, препаратов костного мозга, осадков мочи, клеточных концентратов, тканевых биотипов, гистологических срезов в специальных камерах и др. При применении фазово-контрастных устройств, конденсоров темного поля и косо́го освещения возможно наблюдение малоконтрастных препаратов.

При гематологическом исследовании микроскоп позволяет производить:

- обзорный просмотр препаратов крови и костного мозга;
- дифференцирование клеток крови по форме, структуре ядра и цитоплазмы;
- обнаружение нормальных и патологических эритроцитов;
- выявление малодифференцированных и атипичных клеток;
- подсчет форменных элементов крови;
- определение лейкоцитарной формулы и др.

Наиболее распространенными в медико-биологической практике являются микроскопы проходящего света плоского поля. С помощью микроскопов проходящего света плоского поля можно рассматривать прозрачные и

полупрозрачные объекты. Традиционно в отечественной литературе эти микроскопы называют биологическими микроскопами, несмотря на то, что они в равной степени могут с успехом применяться в других областях науки и техники. Толщина объекта для микроскопов плоского поля имеет важное значение, т.к. это связано со способностью биологического объекта (препарата) к поглощению, отражению и пропусканию света. Бессмысленно рассматривать в микроскопе проходящего света объект, который из-за своей толщины поглощает 80-90% света или столько же отражает. Толщина объекта должна быть такой, чтобы оптические элементы микроскопа (в первую очередь объектив) обеспечили распознавание объекта и разрешение составляющих его структур, а также наиболее точное воспроизведение геометрических параметров объекта в плоскости в пределах поля видения, а по глубине - в пределах глубины резкости объектива.

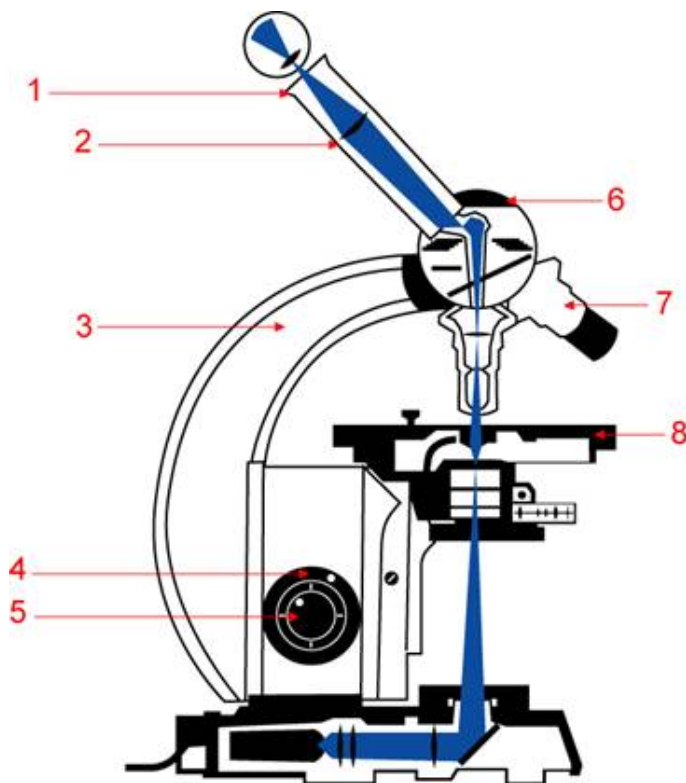
3.3 Принципы работы основных типов световых микроскопов

Основными частями светового микроскопа (рис. 12) являются объектив и окуляр, заключенные в цилиндрический корпус – тубус. Большинство моделей, предназначенных для биологических исследований, имеют в комплекте три объектива с разными фокусными расстояниями и поворотный механизм, предназначенный для их быстрой смены – турель, часто называемую револьверной головкой. Тубус располагается на верхней части массивного штатива, включающего тубусодержатель. Чуть ниже объектива находится предметный столик, на который устанавливаются предметные стекла с исследуемыми образцами.

Резкость регулируется с помощью винта грубой и точной настройки, который позволяет изменять положение предметного столика относительно объектива.

Для того чтобы исследуемый образец имел достаточную для комфортного наблюдения яркость, микроскопы снабжаются еще двумя оптическими блоками – осветителем и конденсором. Осветитель создает поток света, освещающий исследуемый препарат. В классических световых микроскопах конструкция

осветителя (встроенного или внешнего) предполагает низковольтную лампу с толстой нитью накала, собирающую линзу и диафрагму, изменяющую диаметр светового пятна на образце.



- 1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – держатель; 4 – винт грубой фокусировки;
5 – винт точной (микрометрической) фокусировки;
6 – револьверная головка; 7 – объектив; 8 – предметный столик.

Рисунок 12 – Устройство светового микроскопа

Конденсор, представляющий собой собирающую линзу, предназначен для фокусировки лучей осветителя на образце. Конденсор также имеет ирисовую диафрагму (полевую и апертурную), с помощью которой регулируется интенсивность освещения.

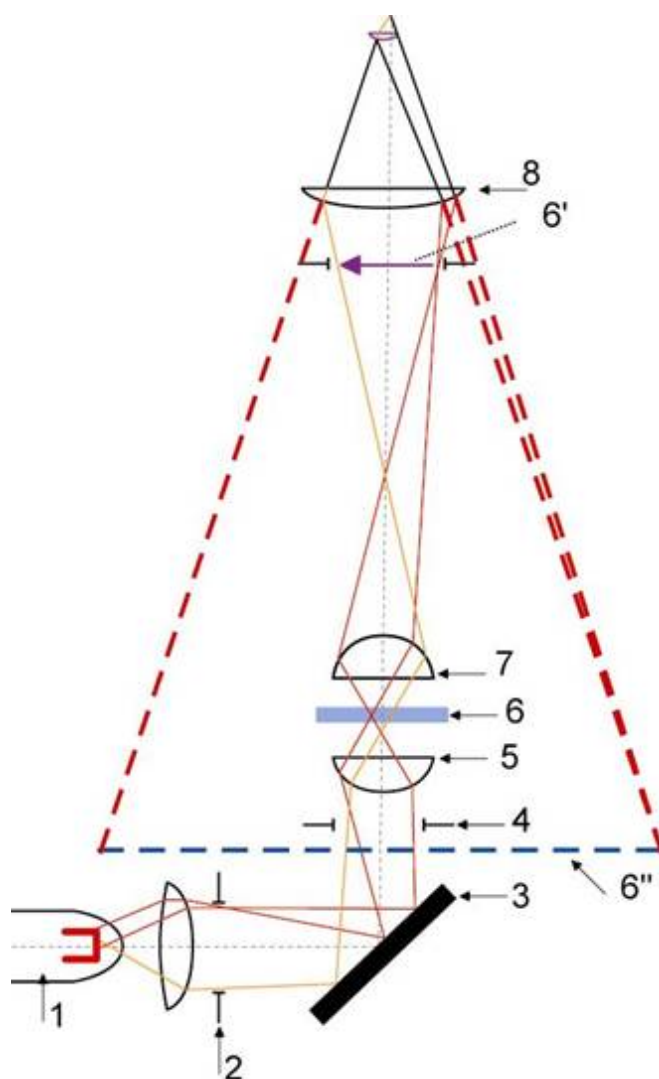
При работе с пропускающими свет объектами (жидкостями, тонкими срезами растений и т. п.), их освещают проходящим светом – осветитель и конденсор располагаются под предметным столиком. Непрозрачные же образцы нужно освещать спереди. Для этого осветитель располагают над предметным столиком, и

его лучи с помощью полупрозрачного зеркала направляются на объект через объектив.

Осветитель может быть пассивным, активным (лампа) или состоять из обоих элементов. Самые простые микроскопы не имеют ламп для подсветки образцов. Под столиком у них располагается двустороннее зеркало, у которого одна сторона плоская, а другая – вогнутая. При дневном освещении, если микроскоп стоит у окна, получить довольно неплохое освещение можно при помощи вогнутого зеркала. Если же микроскоп находится в темном помещении, для подсветки используются плоское зеркало и внешний осветитель.

Увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива и окуляра. При увеличении окуляра равном 10 и увеличении объектива равном 40 общий коэффициент увеличения равен 400. Обычно в комплект исследовательского микроскопа входят объективы с увеличением от 4 до 100. Типичный комплект объективов микроскопа для любительских и учебных исследований (x 4, x10 и x 40), обеспечивает увеличение от 40 до 400.

Разрешающая способность – другая важнейшая характеристика микроскопа, определяющая его качество и четкость формируемого им изображения. Чем больше разрешающая способность, тем больше мелких деталей можно рассмотреть при сильном увеличении. В связи с разрешающей способностью говорят о «полезном» и «бесполезном» увеличении. «Полезным» называется предельное увеличение, при котором обеспечивается максимальная детализация изображения. Дальнейшее увеличение («бесполезное») не поддерживается разрешающей способностью микроскопа и не выявляет новых деталей, зато может негативно повлиять на четкость и контраст изображения. Таким образом, предел полезного увеличения светового микроскопа ограничивается не общим коэффициентом увеличения объектива и окуляра - его при желании можно сделать сколь угодно большим, - а качеством оптических компонентов микроскопа, то есть, разрешающей способностью.



- 1 – осветитель; 2 – ирисовая полевая диафрагма; 3 – зеркало;
 4 – ирисовая апертурная диафрагма; 5 – конденсор; 6 – препарат;
 6' – увеличенное действительное промежуточное изображение препарата, образуемое объективом; 6'' – увеличенное мнимое окончательное изображение препарата, наблюдаемое в окуляре;
 7 – объектив; 8 – окуляр.

Рисунок 13 – Оптическая схема микроскопа

Микроскоп включает в себя три основные функциональные части:

1. Осветительная часть предназначена для создания светового потока, который позволяет осветить объект таким образом, чтобы последующие части микроскопа предельно точно выполняли свои функции. Осветительная часть

микроскопа проходящего света расположена за объектом под объективом в прямых микроскопах и перед объектом над объективом в инвертированных. Осветительная часть включает источник света (лампа и электрический блок питания) и оптико-механическую систему (коллектор, конденсор, полевая и апертурная регулируемые диафрагмы).

2. Воспроизводящая часть предназначена для воспроизведения объекта в плоскости изображения с требуемым для исследования качеством изображения и увеличения (т.е. для построения такого изображения, которое как можно точнее и во всех деталях воспроизводило бы объект с соответствующим оптике микроскопа разрешением, увеличением, контрастом и цветопередачей).

Воспроизводящая часть обеспечивает первую степень увеличения и расположена после объекта до плоскости изображения микроскопа. Воспроизводящая часть включает объектив и промежуточную оптическую систему.

Современные микроскопы последнего поколения базируются на оптических системах объективов, скорректированных на бесконечность. Это требует дополнительного применения так называемых тубусных систем, которые параллельные пучки света, выходящие из объектива, «собирают» в плоскости изображения микроскопа.

3. Визуализирующая часть предназначена для получения реального изображения объекта на сетчатке глаза, фотопленке или пластинке, на экране телевизионного или компьютерного монитора с дополнительным увеличением (вторая степень увеличения).

Визуализирующая часть расположена между плоскостью изображения объектива и глазами наблюдателя (камерой, фотокамерой).

Визуализирующая часть включает монокулярную, бинокулярную или тринокулярную визуальную насадку с наблюдательной системой (окулярами, которые работают как лупа). Кроме того, к этой части относятся системы дополнительного увеличения (системы смены увеличения); проекционные насадки, в том числе дискуссионные для двух и более наблюдателей; рисовальные аппараты;

системы анализа и документирования изображения с соответствующими согласующими элементами (фотоканал).

Препарат представляет собой предметное стекло, на котором располагается объект, который специально определенным способом (технология приготовления препарата: микротомирование, окраска и др.) готовится для наблюдения под микроскопом. Объект может быть покрыт защитным покровным стеклом.

Изображение объекта – это воспроизводимое с помощью микроскопа изображение объекта, которое получается в процессе наложения двух изображений, которые сформированы за счет явлений дифракции (первичное изображение) и интерференции (вторичное изображение) светового потока, прошедшего через объект.

Основные приемы подготовки микроскопа к наблюдению микрообъектов главным образом связаны с настройкой правильной системы освещения.

Осветительные системы и настройка осветителей проходящего света. Осветительные системы отечественных микроскопов подобных рутинным микроскопам серии БИОЛАМ и МИКМЕД-1 состоят из осветительного двухстороннего зеркала с плоской и вогнутой отражающими поверхностями, а также конденсора с ирисовой апертурной диафрагмой.

Вогнутое зеркало увеличивает размер источника света и его рекомендуется применять при малых увеличениях объектива, когда требуется осветить большое поле в плоскости предмета, а также в тех случаях, когда источником света является солнце (естественное освещение).

Световой поток от источника света попадает на зеркало, с помощью которого направляется в конденсор. Далее пучек света конденсором равномерно освещает плоскость препарата. Конденсор создает такой световой конус, который обеспечивает заполнение светом входного отверстия (апертуру) объектива.

Вместо зеркала могут применяться накладные осветители (ОИ-32М и ОИ-35) или встроенные в основание осветительные системы (рис. 14).



Рисунок 14 – Накладные осветители ОИ-32М и ОИ-35

Осветитель состоит из двух частей: собственно источника света и линзового коллектора, который увеличивает размер нити лампы и проектирует ее в плоскость апертурной диафрагмы конденсора.

Для получения изображения объекта с той разрешающей способностью, которую обеспечивает микроскоп необходимо хорошо знать его устройство и прежде всего, уметь правильно проводить настройку микроскопа.

Настройка микроскопа связана с правильным освещением плоскости предмета, иными словами необходимо выставить нить лампы (источник света) и все оптические элементы вдоль оптической оси микроскопа.

Для получения равномерно освещенного поля в плоскости предмета в процессе работы с искусственным светом целесообразно в конденсоре устанавливать матовое стекло. При этом следует помнить, что матовое стекло уменьшает световой поток приблизительно на 30 % .

Настройка освещения современных зарубежных и отечественных микроскопов (общие манипуляции)

В новом поколении отечественных и зарубежных микроскопов в качестве источника света используются галогенные лампы. Центрировка и настройка (фокусировка) нити лампы в плоскость апертурной диафрагмы конденсора

производится на заводе-изготовителе. Поэтому настройку освещения по Келеру необходимо производить следующим образом:

1) с помощью механизма грубой и точной фокусировки получить резкое изображение объекта (сфокусироваться на объект);

2) прикрыть полевую диафрагму, расположенную на основании микроскопа;

3) открыть апертурную диафрагму конденсора;

4) с помощью фокусирующего механизма конденсора добиться резкого изображения краев полевой диафрагмы;

5) с помощью центрировочных винтов конденсора привести в центр поля зрения микроскопа изображение полевой диафрагмы;

6) раскрыть полевую диафрагму до размера поля зрения микроскопа;

7) открыть апертурную диафрагму конденсора по выходному зрачку объектива для чего вместо окуляра поставить точечную диафрагму (или дополнительный микроскоп МИР-4) и, наблюдая за ярким пятном в микроскопе, открыть или прикрыть апертурную диафрагму в размер этого пятна. Настройка освещения микроскопа завершена.

Настройка освещения с различными типами конденсоров.

Общая подготовка к работе (настройка освещения по Келеру):

1) в окулярные трубки вставить соответствующие окуляры. В случае бинокляра раздвинуть окулярные трубки по глазной базе. Выставить «0» по шкале диоптрийной наводки левой окулярной трубки;

2) вернуть в револьверное устройство объективы в порядке возрастания увеличения по часовой стрелке 10x – 40x – 100x. У отечественных микроскопов серии БИОЛАМ Р, С, Д и МИКМЕД 1 объектив малого увеличения ввинчивается в гнездо, около которого имеется красная точка, которая располагается справа от объектива;

3) в специальную откидную оправу под конденсором положить матовое стекло (светофильтр).

Настройку микроскопа с осветительным зеркалом рекомендуется проводить в следующей последовательности:

1) установить источник света (настольную лампу) на расстоянии около 25 см прямо перед микроскопом;

2) нить лампы направить в центр зеркала с плоской отражающей поверхностью;

3) наблюдая в зеркало, спроектировать нить лампы в центр плоскости закрытой апертурной диафрагмы конденсора;

4) с помощью зеркала при необходимости привести яркое пятно от источника света в центр поля зрения микроскопа;

5) раскрыть апертурную диафрагму конденсора;

6) установить препарат на предметный столик и зафиксировать его положение с помощью специальных лапок (клемм) или в препаратодателе;

7) поворотом револьверной головки включить сухой объектив 10x (или 40x);

8) с помощью рукояток грубой и точной фокусировки сфокусироваться на резкое изображение объекта;

9) с помощью рукоятки фокусировки конденсора поднять его до положения наибольшей яркости освещения в плоскости предмета;

10) ввести рассеивающую пластинку (матовое стекло, светофильтр), которая устанавливается в откидную оправу, расположенную под конденсором;

11) если объект недостаточно контрастный целесообразно изменить интенсивность света с помощью апертурной диафрагмы конденсора для чего немного ее прикрыть;

12) яркость освещения объекта отрегулировать только диафрагмой конденсора (не рекомендуют с этой целью менять положение конденсора);

При работе с накладными осветителями типа ОИ-32М, ОИ-35 необходимо поступать следующим образом:

1) снять зеркало с микроскопа;

2) установить в отверстие на основании микроскопа накладной осветитель;

3) при работе с осветителем ОИ-32М обязательно положить на коллекторную линзу матовое стекло. Далее повторяются операции по пунктам 9-12 настройки с осветительным зеркалом.

При работе с осветителем ОИ-35 необходимо учитывать, что с помощью его можно провести настройку по Келеру, поэтому необходимо соблюдать следующий порядок настройки микроскопа. Отдельно от микроскопа произвести предварительную настройку осветителя:

- 1) открыть полностью полевую диафрагму осветителя;
- 2) положить на выходное отверстие осветителя тонкую белую бумагу;
- 3) с помощью рукоятки, которая двигает коллектор вдоль оптической оси осветителя, сфокусировать нить лампы (добиться резкого изображения нити на листе бумаги);
- 4) с помощью центрировочных винтов патрона лампы и ее разворота в патроне добиться расположения нити точно по центру отверстия с равномерным освещением витков спирали лампы;
- 5) установить осветитель на основании микроскопа таким образом, чтобы он принял устойчивое положение;
- 6) открыть полностью апертурную диафрагму конденсора;
- 7) прикрыть полевую диафрагму осветителя;
- 8) убрать из хода лучей нижнюю линзу конденсора (линзу большого поля);
- 9) с помощью фокусирующего механизма конденсора добиться резкого изображения краев прикрытой полевой диафрагмы в поле зрения микроскопа;
- 10) с помощью регулировочных винтов при зеркале осветителя привести изображение полевой диафрагмы осветителя в центр поля зрения микроскопа;
- 11) открыть полевую диафрагму в размер поля зрения;
- 12) открыть апертурную диафрагму конденсора по выходному зрачку объектива для чего вместо окуляра поставить точечную диафрагму (или дополнительный микроскоп МИР-4) и, наблюдая за ярким пятном в микроскопе, открыть или прикрыть апертурную диафрагму в размер этого пятна;
- 13) установить в конденсоре при необходимости линзу большого поля;
- 14) ввести светофильтр или матовое стекло (при необходимости). Микроскоп готов к работе.

При встроенном осветителе настройка освещения проводится аналогично рассмотренной для настройки с осветителем ОИ-32М или ОИ-35.

Работа с объективом масляной иммерсии:

- 1) вывести из хода лучей сухой объектив;
- 2) на препарат капнуть иммерсионного масла (желательно иммерсионным маслом немного смазать фронтальную линзу объектива);
- 3) ввести в ход лучей иммерсионный объектив (100хМИ), зафиксировать его положение в револьверной головке;
- 4) опустить объектив до соприкосновения с каплей иммерсионной жидкости, затем, наблюдая в микроскоп, с помощью рукояток грубой и точной фокусировки, производят настройку на резкость.

Настройка микроскопа с конденсором косоугольного освещения

Принцип действия конденсора основан на смещении (децентрировке) осветительного пучка относительно оптической оси микроскопа за счет перемещения и разворота ирисовой апертурной диафрагмы конденсора на фиксированную величину.

Настройка микроскопа и работа на нем аналогична для микроскопов с различными типами освещения:

а) предварительная подготовка:

- 1) установить «0» по шкале перемещения апертурной диафрагмы перпендикулярно оптической оси конденсора;
- 2) раскрыть апертурную диафрагму;
- 3) вставить конденсор в гнездо вместо штатного конденсора и закрепить;
- 4) установить на предметный столик объект и закрепить его;
- 5) сфокусировать микроскоп на объект;
- 6) настроить бинокулярную насадку, если работа ведется с ней;
- 7) настроить освещение в соответствии с применяемым осветителем (желательно, реализующего метод Келера), пользуясь конденсором как обычно;

б) настройка:

- 1) сместить диафрагму конденсора с центрального положения;

2) нить лампы все время должна быть спроектирована в плоскость апертурной диафрагмы конденсора и заполнять ее;

3) вращать апертурную диафрагму вокруг оси конденсора до получения наиболее контрастного изображения;

4) вставить точечную диафрагму или дополнительный микроскоп МИР-4, который предварительно настроить на изображение. При правильно настроенном микроскопе будет наблюдаться следующая картина: темный серп апертурной ирисовой диафрагмы конденсора заполняет часть выходного зрачка микрообъектива. При работе с объективами больших увеличений (от 20x и выше) следует применять конденсор с $A=1,4$; с объективами 10x и ниже – конденсором с $A=0,3$.

Настройка микроскопа с конденсором темного поля.

Принцип действия основан на создании полого светового конуса, который прямо в объектив не попадает, при этом свет, диффузно рассеянный частицами объекта, проходит в объектив.

Настройка микроскопа аналогична для микроскопов с различными типами освещения. Рассмотрим настройку на микроскопе отечественного производства:

а) предварительная подготовка:

1) использовать в качестве источников света для микроскопа с конденсором темного поля осветители (ОИ-32, ОИ-35);

2) приготовить препарат на нормальном предметном стекле толщиной 0,8 - 1,2 мм;

3) установить препарат на предметном столике микроскопа и закрепить его;

4) настроить освещение (желательно по Келеру) со светлупольным конденсором, входящим в комплект микроскопа (типа БИОЛАМ Р, С, Д);

5) заменить обычный конденсор темнопольным и закрепить его;

б) настройка:

1) опустить конденсор и нанести на верхнюю линзу конденсора каплю иммерсионной жидкости (кедровое масло или дистиллированная вода);

2) поднять конденсор до такого положения, при котором капля иммерсионной жидкости соприкоснется с предметным стеклом и распространится по нему;

3) сфокусировать микроскоп на объект вращением рукоятки грубой и точной фокусировки. При этом в поле зрения должно появиться светлое кольцо с темным пятном посередине или только светлое пятно;

4) поднять конденсор до появления светлого пятна (если форма светлого пятна или кольца неправильная, значит, капля иммерсионной жидкости мала);

5) вывести пятно в центр поля зрения с помощью винтов конденсора;

6) проверить правильность настройки конденсора, для чего вынуть окуляр, вставить точечную диафрагму или дополнительный микроскоп МИР-4, который предварительно настроить на изображение. При правильно настроенном микроскопе будет наблюдаться следующая картина: темный диск, заполняющий все поле зрения и тонкая полоска света по диаметру выходного зрачка микрообъектива (должно быть перекрыто $\sim 9/10$ зрачка).

При работе с иммерсионными объективами для уменьшения апертуры объектива (для получения приведенной выше картины) внутрь него необходимо вложить специальную диафрагму, имеющуюся в наборе конденсора темного поля. Если объектив имеет ирисовую диафрагму внутри объектива (кольцо с накаткой и маркировка на корпусе объектива, например, объектив 90x1,25 -0,60 МИ, шифр 06М-90), то, вращая кольцо, можно достичь необходимого перекрытия света непрозрачным диском выходного зрачка. При смене объектива конденсор дополнительно настраивают центрировочными винтами, выставляя непрозрачный диск концентрично относительно выходного зрачка объектива, как описано выше.

Можно получить эффект темного поля путем несложной переделки обычного конденсора. Для этого необходимо в плоскость апертурной диафрагмы конденсора (или в откидное гнездо под конденсором) установить пластину с непрозрачным центральным диском. Для каждого объектива этот диск должен быть разного размера, в зависимости от величины выходного зрачка объектива. Этот же эффект может быть получен и с конденсором от фазового устройства КФ-4, если подобрать

темное внутреннее кольцо конденсора таким образом, чтобы оно закрывало выходной зрачок объектива, как было указано выше.

Настройка микроскопа с фазово-контрастным устройством.

Для настройки метода фазового контраста необходимо обеспечить совмещение фазового кольца объектива с изображением светопропускающего кольца конденсора.

При работе с отечественным фазово-контрастным устройством на микроскопе серии БИОЛАМ Р, С, Д или МИКМЕД-1 рекомендуется применять осветители типа ОИ-35. Для исследования методом фазового контраста готовят влажные препараты типа «раздавленная капля». Желательно для этой цели отбирать тонкие предметные стекла. Для длительного наблюдения покровное стекло по краям окантовывается вазелином.

Настройка фазово-контрастного устройства:

1) заменить конденсор микроскопа специальным фазово-контрастным конденсором и установить его таким образом, чтобы при подъеме фронтальная линза находилась на уровне предметного столика. Включить диафрагму в револьвере конденсора на маркировку «О»;

2) обычные объективы заменить фазовыми;

3) поместить препарат на предметный столик микроскопа;

4) сфокусироваться на резкое изображение объекта;

5) установить освещение по Келеру, как изложено выше, после чего в положении осветительной лампы, зеркала и конденсора никаких изменений не допускается;

6) вместо окуляра вставить вспомогательный микроскоп. Перемещая окуляр вспомогательного микроскопа внутри тубуса, получить четкое изображение фазового кольца объектива. В этом положении окуляр вспомогательного микроскопа фиксируется винтом;

7) вращая револьвер конденсора, включить нужную кольцевую диафрагму, в результате чего в окуляре помимо фазового темно-серого кольца объектива появится изображение светлого кольца диафрагмы конденсора;

8) вращая центрировочные винты конденсора, совместить изображение светового кольца конденсора с темным фазовым кольцом объектива. Микроскоп готов к работе.

3.4 Подготовка гистологического материала к изготовлению срезов для светооптического исследования

Для постановки развернутого гистологического диагноза решающее значение имеет качество обработки материала. Кроме того, важно исследовать не только саму опухоль, но и орган, в котором она расположена, для выявления фоновых изменений, что облегчает понимание развития опухолевого процесса. Для приготовления препаратов, пригодных для светооптической микроскопии, биопсийный или операционный материал должен пройти три основных этапа обработки (рис. 15): фиксацию, заливку и окраску.



Рисунок 15 – Современные технологии для гистологических исследований

Фиксация. Первым этапом обработки образцов тканей является фиксация. Для качественной фиксации материала необходимо вырезать кусочки исследуемой ткани толщиной от 3 до 5 мм. Наиболее распространенной и универсальной является фиксация в 10 % нейтральном формалине в течение 10-24 часов. При изучении трепанобиопсий подвздошной кости с целью состояния костного мозга, материал в течение 1,5-2 часов фиксируется в жидкости Карнуа: спирт абсолютный - 6 частей, хлороформ - 3 части, уксусная кислота (ледяная) - 1 часть.

Заливка. Фиксированные кусочки исследуемой ткани, после дегидратации, погружаются в очищенный, гомогенизированный парафин. Использование парафина является достаточным для получения срезов толщиной 5 мкм, необходимых для светоптической микроскопии. В последние годы в гистологической практике нашли применение специальные смолы (метакрилаты). При погружении в них практически отсутствует артефакт сморщивания исследуемой ткани. Кроме того, этот метод позволяет получить полутонкие срезы, а также позволяет изготавливать гистологические препараты костной ткани без предварительной декальцинации. При погружении в парафин материала при остеогенных опухолях и трепанобиопсий необходима предварительная декальцинация. Это осуществляется различными методами с использованием органических и неорганических кислот. Одним из оптимальных методов является декальцинация в жидкости де Кастро. Для приготовления 100 мл декальцинирующей жидкости необходимо: хлоралгидрат - 5 г, спирт абсолютный - 30 мл, азотная кислота концентрированная - 8 мл, вода дистиллированная - 57 мл.

Окрашивание. Для подавляющего большинства диагностических светоптических исследований используются простые окраски: гематоксилин-эозин, азурII-эозин, Ван Гизон, судан, импрегнация азотнокислым серебром, ПАС-реакция. В тех случаях, когда на основании простых методов окрашивания не удается установить полноценный цитологический или гистологический диагноз, используются методы электронной микроскопии, иммуноцитохимии и иммуногистохимии.

3.5 Виды цитологических исследований

Цитологическое исследование основано на изучении с помощью микроскопа особенностей строения клеток, клеточного состава органов тканей, жидкостей организма в норме и при патологических процессах. Оно широко применяется для диагностики различных заболеваний. При цитологическом исследовании, в отличие от гистологического, требуется значительно меньшее количество материала (отдельные клетки, их комплексы), из которого можно в течение нескольких минут приготовить цитологический препарат (мазок, отпечаток). Цитологическое исследование предпочтительнее в тех случаях, когда невозможна или нежелательна биопсия, при необходимости детального изучения особенностей структуры клеток, быстрого получения результата (например, при обследовании больного в условиях поликлиники). С помощью цитологического исследования оценивают состояние тканей; гормональную активность у женщин; наличие опухолевых клеток; изменения гормонального статуса под влиянием гормональной терапии и многое другое. Его широко применяют для решения диагностических задач – установления природы патологического процесса, выявления метастазов опухоли или ее прорастания в окружающие ткани и т.п.

Различают цитологическое исследование (таблица 1):

- эксфолиативного материала: мокрота, моча, сок предстательной железы, смывы из различных органов во время эндоскопии, а также из шейки и полости матки, выделения из молочных желез, соскобы и отпечатки с эрозированных или язвенных поверхностей, свищей, ран, жидкость из суставных и серозных полостей, цереброспинальная и амниотическая жидкость;
- пунктатов: материала, полученного при аспирационной диагностической пункции, преимущественно тонкой иглой;
- отпечатков с удаленных тканей, например, поверхности свежего разреза оперативно удаленной или взятой для гистологического исследования ткани.

Таблица 1 - Виды цитологических исследований

Название исследования	Клинический материал	Срок исп.
1	2	3
Лейшман 1 препарат	соскоб эпителия из эндоцервикса / экзоцервикса	5 р.д.
Лейшман 2 препарата		5 р.д.
Папаниколау 1 препарат	соскоб эпителия из эндоцервикса/ экзоцервикса	5 р.д.
Папаниколау 2 препарата		5 р.д.
Цитологическая диагностика поражения кожи, исследование соскобов и отпечатков эрозий, ран, свищей	соскоб, мазок-отпечаток, пунктат, отделяемое (на стекле)	5 р.д.
Цитологическая диагностика заболеваний щитовидной железы	мазок-отпечаток, пунктат (на стекле)	5 р.д.
Цитологическая диагностика заболеваний мочеполовой системы	мазок-отпечаток, пунктат (на стекле)	5 р.д.
Цитологическая диагностика заболеваний молочной железы	соскоб, мазок-отпечаток, пунктат, отделяемое (на стекле)	5 р.д.
Исследование аспирата полости матки	аспират полости матки, мазок-отпечаток с ВМС (на стекле)	5 р.д.
Исследование асцитической, плевральной, синовиальной жидкости, ликвора, содержимого кист	асцитическая, плевральная, синовиальная жидкость, ликвор, содержимое кист	5 р.д.

Продолжение таблицы 1

1	2	3
Исследование материала, полученного при оперативных вмешательствах	мазок-отпечаток, пунктат (на стекле)	5 р.д.
Исследование пунктата лимфатических узлов	мазок-отпечаток, пунктат (на стекле)	5 р.д.
Исследование мокроты и мочи на атипичные клетки	мокрота, моча	5 р.д.
Исследование эндоскопического материала	мазок-отпечаток (на стекле)	5 р.д.

Цитологическое исследование не требует больших материальных затрат, недороги реактивы и оборудование. Все вышеизложенное позволяет широко использовать метод как для морфологической верификации в условиях поликлиники, так и для проведения массовых профилактических осмотров, выбора групп риска с последующим систематическим наблюдением за лицами входящими в группы риска.

Вместе с тем, в отличие от классических лабораторных методов, которые, как правило, являются количественными, клиническая цитология носит описательный характер. Последнее сближает цитологию с другим морфологическим методом — гистологией.

В медицине цитологическая диагностика исследуется на основании изучения морфологии клеток и цитохимических реакций. Применяется в онкологии (для распознавания злокачественных и доброкачественных опухолей), в гематологии (для диагностики заболеваний и оценки эффективности их лечения), в гинекологии (как с целью диагностики онкологических заболеваний, так и для определения беременности), для распознавания многих заболеваний органов дыхания, пищеварения, мочевого выделения, нервной системы и т.д., и оценки результатов их лечения.

4 Электронная микроскопия

4.1 Подготовка микропрепарата для изучения

Микропрепарат (рис. 16, 17) – предметное стекло с расположенным на нем объектом, подготовленным для исследования под микроскопом. Сверху объект обычно накрывается тонким покровным стеклом. Размеры предметных стекол (25x75 мм) и их толщина стандартизированы, это облегчает хранение препаратов и работу с ними.

Различают постоянные препараты, в которых объект, накрытый покровным стеклом, заключён в канадский бальзам или другую прозрачную твердеющую среду, и временные, в которых заливка производится в глицерин-желатин, либо объект помещается в физиологический раствор или просто в воду. Постоянные препараты могут сохраняться без изменений многие десятилетия.



Рисунок 16 – Микропрепараты и покровные стекла



Рисунок 17 – Старая коробка микропрепаратов с размещенными на нем разными образцами в образовательных целях

В зависимости от характера исследуемого объекта, используются различные типы препаратов:

- тотальные препараты. Приготавливаются из мелких организмов или небольших их частей. Часто требуют дополнительной обработки в просветляющих растворах. Обезвоженные тотальные препараты могут заключаться в постоянные среды;

- мазки. Применяются в гематологии при изучении крови, для изучения бактерий и простейших. Могут приготавливаться из тканевых элементов;

- влажные мазки фиксируют, не давая исследуемому материалу высохнуть. Затем препарат готовят так же, как наклеенные на стекло срезы;

- сухие мазки высушивают не фиксируя;

- срезы изготавливаются из фиксированных и залитых в пластический материал (парафин, акрил) объектов на микротоме. Для быстрого получения срезов без длительной процедуры обезвоживания применяют замораживающий микротом;

- шлифы приготавливаются из материалов, не поддающихся резке на микротоме. Используются преимущественно в петрографии.

Происхождение микропрепарата берет начало в использовании слоновой кости или обычной кости в качестве подставки под образцы, которые помещались между дисками прозрачной слюды. Подобная конструкция была популярной в викторианской Англии, пока Королевское Микроскопическое Общество не представило стандартизированное предметное стекло микроскопа.

4.2 Специальные методы электронной микроскопии биологических объектов

Электронная микроскопия (ЭМ) – метод морфологического исследования объектов с помощью потока электронов, позволяющих изучить структуру этих объектов на макромолекулярном и субклеточном уровнях.

Она нашла широкое применение в морфологии, микробиологии, вирусологии, биохимии, онкологии, генетике, иммунологии. Резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа обеспечивается потоком электронов, проходящих в вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами. Электроны могут проходить через структуры исследуемого объекта (трансмиссионная электронная микроскопия) или отражаться от них (сканирующая электронная микроскопия), отклоняясь под разными углами, в результате чего возникает изображение на люминесцентном экране микроскопа (рис. 18). При трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии получают плоскостное изображение структур, при сканирующей – объемное.

Следует отметить, что электронная микроскопия, как динамично развивающаяся отрасль современной науки и технологии, включает в себя не только анализ веществ, материалов и биологических объектов. Значительные усилия ученых направлены на разработку и усовершенствование электронных и других корпускулярных микроскопов (например, протонного) и приставок к ним, методов пробоподготовки, изучение механизмов формирования изображения при взаимодействии образца с электронами, способов сбора и обработки информации, которую можно получить с помощью микроскопа.



Рисунок 18 – ПЭМ-125К высокоразрешающий просвечивающий электронный микроскоп для фундаментальных исследований

Сочетание электронной микроскопии с другими методами, например с радиоавтографией, гистохимическими, иммунологическими методами исследования, позволяет проводить электронно-радиоавтографические, электронно-гистохимические, электронно-иммунологические исследования. Это позволило значительно расширить информацию, получаемую с помощью ЭМ, наблюдать структурное выражение течения биохимических процессов в клетке, что, в свою очередь, подтвердило один из основных методологических принципов современной биологии – диалектическое единство структуры и функции.

На основании результатов, полученных с помощью МЭ (максимальное разрешение которых для биологических объектов 12 – 6А, а увеличения до 800 –

1200 тыс.) выявлена субмикроскопическая структура клеток, открыт ряд неизвестных ранее клеточных органелл, таких как: лизосомы, рибосомы, эндоплазматический ретикулум, микротрубочки, цитоскелет, структуры, специфичные для отдельных видов клеток, выявлены некоторые макромолекулы, например ДНК. ЭМ позволила понять многие тонкие механизмы развития болезней, в том числе на ранних этапах их возникновения, еще до появления чёткой клинической симптоматики.

ЭМ все шире применяется для ранней диагностики заболеваний, а также для выявления этиологии информационных процессов. Её используют в онкологии для определения гистогенеза опухолей, что имеет важное значение в лечении и прогнозе онкологического заболевания.

В нефрологии исследования с помощью ЭМ материала, полученного при пункционной биопсии, позволяют выявить ранее морфологические изменения структур пачек, диагностировать форму гломерулонефрита и т.п. При ЭМ пунктатов печени удается провести дифференциальную диагностику гепатитов, гепатозов и других заболеваний печени, определить активность процесса и нередко его этиологию.

Трансмиссионная микроскопия реализуется с помощью трансмиссионных (просвечивающих) электронных микроскопов, в которых тонкопленочный объект просвечивается пучком ускоренных электронов с энергией 50-200 кэВ. Электроны, отклоненные атомами объекта на малые углы и прошедшие сквозь него с небольшими энергетическими потерями, попадают в систему магнитных линз, которые формируют на люминесцентном экране (и на фотопленке) светлопольное изображение внутренней структуры. При этом удается достичь разрешения порядка 0,1 нм, что соответствует увеличениям до $1,5 \times 10^6$ раз. Рассеянные электроны задерживаются диафрагмами, от диаметра которых в значительной степени зависит контраст изображения. При изучении сильно рассеивающих объектов более информативны темнопольные изображения.

Разрешение и информативность ТЭМ-изображений во многом определяются характеристиками объекта и способом его подготовки. При исследовании тонких

пленок и срезов биологических тканей контраст возрастает пропорционально их толщине, но одновременно снижается разрешение. Поэтому применяют очень тонкие (не более 0,01 мкм) пленки и срезы, повышая их контраст обработкой соединений тяжелых металлов (Os, U, Pb и др.), которые избирательно взаимодействуют с компонентами микроструктуры (химическое контрастирование).

Сканирующая электронная микроскопия. Метод сканирующей (растровой) электронной микроскопии позволяет изучать трехмерную картину поверхности клетки. Электронный луч, сжатый магнитными линзами в тонкий (1-10 нм) зонд, сканирует поверхность образца, формируя на ней растр из несколько тысяч параллельных линий. Возникающее при электронной бомбардировке поверхности вторичные излучения (вторичная эмиссия электронов, оже-электронная эмиссия и др.) регистрируются различными детекторами и преобразуются в видеосигналы, модулирующие электронный луч в электронно-лучевой трубке (ЭЛТ). Развертки лучей в колонне растрового электронного микроскопа (РЭМ) и в ЭЛТ синхронны, поэтому на экране ЭЛТ появляется изображение, представляющее собой картину распределения интенсивности одного из вторичных излучений по сканируемой площади объекта. Увеличение РЭМ определяется как $M = L/l$, где L и l - длины линий сканирования на экране ЭЛТ и на поверхности образца. Основной режим работы РЭМ - регистрация вторичных электронов (ВЭ). Поскольку интенсивность эмиссии ВЭ сильно зависит от угла падения электронного луча на поверхность, получаемое изображение весьма близко к обычному макроскопическому изображению рельефа объекта, освещаемого со всех сторон рассеянным светом.

Эмиссия ВЭ отличается наибольшей интенсивностью по сравнению с другими вторичными излучениями. Кроме того, в этом режиме достигается максимальное разрешение.

Благодаря огромной глубине фокуса сканирующего микроскопа, которая значительно больше, чем у просвечивающего, получается почти трехмерное изображение исследуемой поверхности.

Разрешающая способность этого типа приборов несколько ниже, чем у просвечивающих электронных микроскопов, но уже сейчас выпускаются приборы с разрешением 3-5 нм.

С помощью растровой электронной микроскопии можно получить информацию о химическом составе в тех или иных участках клеток. Так, метод рентгеноспектрального микроанализа основан на идентификации и количественной оценке содержания химических элементов по спектрам характеристического рентгеновского излучения, возникающего при взаимодействии первичных электронов с атомами объекта. Для получения такой информации, конечно, объекты не следует покрывать слоем металла, как при обычном методе сканирующей электронной микроскопии.

Более того, объект нужно подготовить так, чтобы не было потери или дополнительного внесения элементов. Для этого используют быстро замороженные и высушенные в вакууме объекты.

Одним из основных условий приготовления объекта для сканирующей ЭМ является необходимость сохранения соответствующего поверхностного натяжения клеток во избежании их деформации. Для достижения высоких степеней разрешения повышают электропроводность объекта, напыляя на него тяжелые металлы: золото, платину, серебро или их сплавы.

Высоковольтная микроскопия. В последнее время начинают применять методы высоковольтной (вернее, сверхвысоковольтной) микроскопии. Сконструированы приборы с ускоряющим напряжением 1-3 млн. вольт. Это очень дорогие приборы, что сдерживает их широкое применение. Преимущество этого класса электронных микроскопов не в том, что на них можно получить более высокое разрешение (при более короткой длине волны электронов), а в том, что при высокой энергии электронов, которые меньше поглощаются объектом, можно просматривать образцы большой толщины (1-10 мкм).

Использование высоковольтной ЭМ (до 3 МВ) позволяет получить сведения о 3-х мерной структуре клеток. При подготовке к исследованию живых членистоногих их обездвигивают с помощью эфирного или хлороформного наркоза

в дозах, не вызывающих последующей гибели, и помещают в вакуумную камеру МЭ. В современной ЭМ широко применяют методы цитохимии, включая автордиографию. Дополнительное использование стереоскопической съемки позволяет получить информацию о трехмерной организации внутриклеточных структур с высоким их разрешением (около 0,5 нм).

Методы подготовки биологических объектов к изучению с помощью ЭМ.

ЭМ требует специальной подготовки объектов изучения, от которой в значительной мере зависят возможности метода. В соответствии с целями исследования методика такой подготовки может быть различной. Однако непременным условием для любых электронно-микроскопических исследований является фиксация тканей или микробов с максимальным сохранением их прижизненного строения. Существуют два принципиально различных способа фиксации: химический и физический, каждый из которых имеет различные варианты.

Химическая фиксация. В ЭМ, как правило, используют химическую фиксацию с помощью фиксаторов, обладающих стабилизирующими свойствами. Универсального для любых тканей фиксатора не существует, поэтому в зависимости от задачи конкретного исследования применяют соответствующие фиксаторы. При выборе химических фиксаторов исходят из их способности коагулировать белки (спирты, ацетон, некоторые кислоты, соли тяжелых металлов и др.) либо стабилизировать липиды и гели (четырёхокись осмия, глутаровый альдегид, формалин, двуххромовокислый калий и др.). Имеется несколько методов химической фиксации: перфузионный, когда фиксатор вводят в ток крови, фиксация на месте, когда фиксатор вводят в ткань до ее иссечения, метод погружения иссеченных кусочков ткани в фиксатор. Для замедления аутолитических процессов, протекающих в иссеченных кусочках ткани до полной их фиксации, последнюю проводят при температуре 2-5 градусов.

Для исследования берут биопсийный материал или материал от трупа человека или животных вскоре после наступления смерти. Существуют

оптимальные сроки взятия различных тканей и клеток, обычно исчисляемые минутами.

Чем раньше ткань помещают в фиксатор, тем более достоверные данные получают о прижизненной структуре клеток. Фиксаторы обладают различной скоростью проникновения в ткань: от этого зависит возможная величина объекта исследования. Так, четырехокись осмия и глутаровый альдегид проникают в ткань на 0,1 – 0,5 мм примерно за 1 – 1,5 часа, но для некоторых тканей оно может быть увеличено до 4 часов или до 20–30 мин. В отдельных случаях допускается в течение одних суток. Наибольшее распространение получила фиксация материала в глутаровом альдегиде с последующей дофиксацией в четырехокиси осмия. Глутаровый альдегид лучше, чем четырехокись осмия фиксирует белки, но хуже стабилизирует липиды, что и обуславливает использование обоих фиксаторов как дополняющих друг друга.

Для избирательной фиксации отдельных субклеточных структур используют более специфические фиксаторы (перманганат калия, двуххромовокислый калий и др.).

Качество фиксации в значительной степени зависит от рН и осмотического давления фиксирующего раствора. Оптимальным является рН 7,2–7,4, что соответствует физиологическим параметрам. Поэтому применяют буферные растворы. Чаще применяют фосфатные или какодилатный буферы. Физиологическое осмотическое давление создают путем добавления осмотически активных веществ, например, сахарозы или некоторых солей.

Обезвоживание ткани. После фиксации необходимо осуществить обезвоживание ткани. Этот процесс должен быть относительно быстрым, постепенным и вместе с тем обеспечить максимально полное удаление воды из образца, что достигается проведением подлежащей исследованию ткани через батарею спиртов или ацетонов восходящей концентрации (от 30 % до 100 %) в течение одного часа.

Заливка тканей в заливочные среды. Следующим важным этапом подготовки материала для ЭМ является заливка (заклучение) тканей в заливочные среды с

целью получения блока, обладающего оптимальным сочетанием твердости и эластичности, позволяющим приготовить тонкий срез ткани (толщиной не менее 100 нм), через который может пройти электронный луч. Первыми заливочными материалами были метилметакрилат и бутилметакрилат. В настоящее время они почти не применяются, т.к. токсичны и легко возгоняются под пучком электронов, что приводит к выраженным артефактам и загрязнению электронного микроскопа. Наиболее широко для заливки тканей используют эпоксидные смолы, в основном аралдит и эпон, часто применяемые совместно. Менее распространены полиэфирные смолы (вестопал), водорастворимые заливочные смеси, из которых чаще пользуются гликольметакрилатом и дуркупаном. Однако не одна заливочная среда не является химически инертной и в какой-то степени оказывает влияние на ткань: это необходимо учитывать при интерпретации результатов микрокопирования.

В последние годы широкое применение нашла заливка в так называемые компаунды, т.е. в смесь определенных веществ: основу (мономера); отвердителя, придающего образуемому полимеру прочность и твердость; пластификатора, обеспечивающего эластичность и упругость полимера; инициатора, диссацирующего с образованием свободных радикалов; ускорителя, который, взаимодействуя с мономером, освобождает активные дополнительные радикалы; катализатора, способствующего началу реакции полимеризации. В практике обычно используют компаунд, состоящий из основы, отвердителя, пластификатора и катализатора, роль которого может играть ускоритель или инициатор. Имеется достаточно большое количество способов пропитки ткани заливочными средствами. Процесс пропитки обычно протекает при комнатной температуре или в термостате при температуре 30 °С в течение 48 часов. Затем кусочки ткани переносят в маркированные желатиновые капсулы или специальные формы, наполненные заливочной смесью. Для полимеризации смеси капсулы на 48 часов помещают в термостат при температуре 60 °С. В результате полимеризации образуется блок, обладающий соответствующими свойствами.

Химические методы фиксации и заливки материала имеют ряд недостатков. Так, при их использовании происходят химические изменения макромолекулярной структуры клеток: при фиксации и обезвоживании клеток и ткани теряют некоторые вещества: при взаимодействии ткани, фиксатора и заливочной среды может меняться локализация внутриклеточных структур. Поэтому интенсивно разрабатываются физические методы приготовления ткани для ЭМ и особенно гистохимии и цитохимии.

Физические методы фиксации биоматериала. Большая часть этих методов основана на очень быстром замораживании кусочков ткани.

Метод замораживания-высушивания. При использовании метода замораживания-высушивания кусочки ткани помещают в хладагенты (пропан, изопентан или фреон), охлажденные до минус 150 °С, и в клетках мгновенно прекращаются обменные процессы. При этом в ткани не успевают образовываться кристаллы льда, и поэтому субклеточные структуры не разрушаются, а вода переходит в стекловидное состояние. Затем в высоком вакууме (10⁻⁶ – 10⁻⁷ мм рт.ст.) происходит сублимация, после чего в ткани специальным образом заливают замороженные метакрилаты, аралдит или вестопал В. Однако не всегда удается достаточно быстро равномерно заморозить ткань, и полностью избежать образования кристаллов льда, которые при повышении температуры повреждают внутриклеточные структуры. Возникают и другие трудности, приводящие к появлению артефактов. Поэтому, чаще применяют разновидность этого метода: замораживание-замещение. После замораживания воду, перешедшую в стекловидное состояние, удаляют, помещая ткань в обезвоживающие вещества при низкой температуре. В этих условиях спирт и ацетон мало влияют на структуру клеток.

Метод криоскальвания (замораживание-травление) позволяет избежать возникновения химической реакции при обработке тканей. Фрагменты тканей замораживают в хладагенте со скоростью превышающей 1000 °С в 1 с. Объект помещают в вакуумную камеру и тем или иным способом раскалывают или разрывают. На поверхности скола наносят платиноуглеродное покрытие (реплику).

Затем реплику очищают от органических остатков в растворе сильного окислителя, промывают в воде и помещают на сеточку для электронной микроскопии.

Метод оттенения. Для исследований поверхности биологических тканей используют и метод оттенения. Наибольшее распространение получил метод приготовления реплик путем напыления в вакуумной камере углерода на поверхность образца тканей. Для контрастирования образовавшейся реплики на нее под острым углом напыляют электронно-плотные вещества (платину или платиноиридиевый сплав). При этом количество атомов металла значительно больше на той стороне контуров образца, которая ближе к источнику напыления: при исследовании в электронном микроскопе она выглядит неконтрастной. Противоположная поверхность контура имеет мало атомов металла: в электронном микроскопе она контрастна и как бы оттеняет неконтрастную поверхность контура. Метод отражения позволяет рассчитать высоту контуров исследуемого объекта, так как известен угол напыления, длина тени и увеличения, при котором производилось фотографирование реплики в электронном микроскопе.

Получение срезов тканей. Для получения ультратонких срезов толщиной от 30 до 50 нм используются стеклянные или алмазные ножи. Алмазные ножи долговечнее стеклянных, но из-за высокой стоимости они не получили широкого распространения.

К задней стороне ножа прикрепляют специальную ванночку и устанавливают на ультратом, в ванночку наливают 10 % раствор этилового спирта и 10 % раствор ацетона на дистиллированной воде. В подвижном держателе ультратома закрепляют блок с тканью. Резка блока осуществляется за счет поступательного движения стержня держателя, а подъем и опускание держателя относительно режущей кромки ножа обеспечиваются электронной схемой. Обычно в начале изготавливают так называемые тонкие срезы толщиной 1 мкм, изучая которые, выбирают интересующий исследователя участок. Сориентируя соответствующим образом полутонкий срез и блок, проводят заточку блока с таким расчетом, чтобы на вершине образовавшейся пирамиды находился необходимый участок. Затем изготавливают ультратонкие срезы толщиной от 30 до 50 нм. Из ванночки срезы

переносят на металлические сетки. Для констатирования срезов применяют вещества с большим атомным весом, такие как соли тяжелых металлов, естественно рассеивающие электроны. Ионы некоторых из этих веществ могут образовывать связи с кислородом и присоединятся к фосфатным группам нуклеиновых кислот. Другие, особенно уранилацетат, помимо этого, действуют как универсальные красители. Свинец связывается с комплексами ткани и осмиевыми факторами. Обычно проводят контрастирование ультратонких срезов или сочетают контрастирование кусочков и ультратонких срезов ткани, после чего изучают в электронном микроскопе.

Особенности ЭМ исследования вирусов.

Для ЭМ микробов применяют сходные методы с учетом строения микробов их размеров, осмотического давления и др. Особый подход осуществляется при ЭМ вирусов. Изучение структур вирусов затруднено из-за малых размеров и слабой рассеивающей способности вириона. На первых этапах ЭМ вирусов эта трудность преодолевалась оттенением частиц при испарении тяжелых металлов в вакууме. Вплоть до конца 50-х годов XIX века методика оттенения вирусных частиц была основной при изучении вирусов в суспензиях. Чаще для этой методики использовали уран 238, платину, палладий или сплавы платины с палладием. Наибольшее распространение получил сплав платины с палладием в соотношении 4:1. Зная заданный угол оттенения, по длине образующейся тени определяют высоту вирусной частицы и ее диаметр. Оттенение металлами исследуемого объекта при сочетании с криогенными методиками (замораживание-высушивание) позволяет получить важную информацию при изучении структуры вириона изометрических вирусов.

Широкое распространение получила методика негативного контрастирования вирусов с помощью вольфрамфосфорной кислоты (H₃PW₁₂O₄₀), которая при подщелачивании едким калием или едким натрием (от значения pH 2,0 до pH 7,0) изменяется и после нанесения препарата на вирус создает зону высокого рассеивания электронов, в результате чего выявляются морфологические признаки вируса.

Развитию знаний о структуре вириона способствовали криогенные методики. Один из простейших вариантов таких методик заключается в следующем: сетки с подложкой и находящимися на них вирусами после нанесения контрастирующего раствора помещают в сжиженный пропан (t минус $150\text{ }^{\circ}\text{C}$) или переохлажденный азот (t минус $200\text{ }^{\circ}\text{C}$). Дальнейшее высушивание образца при t минус $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в глубоком вакууме способствует сохранению трехмерной организации вириона. Исключение в этих условиях деформирующей роли сил поверхностного натяжения воды привело к пересмотру точки зрения, что форма вириона у липидосодержащих вирусов обладает высокой лабильностью. Более сложные криогенные методики, применяемые в электронной микроскопии (например, криоскалывание), также внесли заметный вклад в развитие представлений о структуре вирионов, особенно об имеющих липопротеидную оболочку.

Структура генома вирусов изучается с помощью модифицированной в 1959г. Клейштейном и Лангом методики оттенения линейных макромолекул тяжелыми металлами, которые испаряются с W-образным катодом под углом в 5° - 10° .

Условием, позволяющим изучить нуклеиновые кислоты, и особенно однонитчатые (поперечный размер 1-1,1 нм), является связывание их с основными белками, т.к. при этом образующийся нуклеопротеид имеет диаметр до 18 нм в двунитчатых структурах и до 15 нм – в однонитчатых. В качестве такого белка чаще используют цитохром С.

Помещенная на подложку нуклеиновая кислота в белковом чехле имеет самый причудливый контур, и возможность увидеть ее на всем протяжении осуществима только в том случае, если во время оттенения металлами будет совершен хотя бы один поворот сетки с объектом для напыления на 360° . Лучшие результаты достигаются при длительном оттенении (до 10 минут) сплавом платины с палладием при многократном поворачивании напыленной сетки на вращающемся столике.

Многочисленные модификации методики Клейшмидта и Ланга позволяют получать данные не только о длине генома, но изучать и степень гомологии генома

различных вирусов, локализовать вставку того или иного гена в состав гибридных молекул, исследовать гибридные молекулы нуклеиновых кислот.

Общая информация о морфогенезе вирусов получена с помощью ультратонких срезов вирусов. Техника получения ультратонких срезов вирусов не отличается от общепринятой.

В последние годы возрастает удельный вес ЭМ как экспресс-метода или диагностики вирусных инфекций. Особенно велика роль метода иммунной микроскопии, позволяющего установить родовую принадлежность вируса.

Иммунная ЭМ сыграла решающую роль на первых этапах исследования инфекционного гепатита (гепатита А), а также вирусных гастроэнтеритов и внесла существенный вклад в изучение гепатита В.

Теоретические основы иммуноморфологии на светооптическом уровне разработаны в 1942г. Кунсом с сотрудниками, которые впервые показали, что в молекулу антитела можно ввести некоторые вещества, не нарушая существенно их специфичности. Развитие этой идеи позволило в 1959г. Зингеру разработать иммуноморфологический метод на электронномикроскопическом уровне, основанный на использовании антител, меченных ферритином. Ферритин-белок с высоким содержанием железа, в котором атомы металла организованы в 4 субъединицы, расположены близко друг к другу, что обеспечивает высокое рассеивание электронов при ЭМ и четкое выявление молекулы.

Конъюгация белка с антителом возможна с помощью различных бифункциональных агентов, наибольшее распространение среди которых получили 3,4-толуендиизоцианат и ксиленметадиизоцеанат. Иммунная электронная микроскопия с помощью антител, меченных ферритином, эффективна для выявления экстрацеллярных антигенов микробов в инфицированных тканях, в том числе вирусных антигенов на поверхности клетки, а также поверхностных антигенов в клетке. Вместе с тем эта методика в ряде случаев неэффективна, например, если необходимо исследовать внутриклеточные объекты, антигены микробов внутри клетки, что имеет место, в первую очередь, при вирусных инфекциях. Это обусловлено тем, что молекулярный вес (масса) антител, меченных

ферритином, около 800 тыс., и поэтому прохождение их через плазматическую мембрану клетки невозможно, а антитела, меченные ферритином, проникшие через нее путем эндоцитоза не вступают в контакт со специфическим антигеном. Поэтому основная масса исследований, связанная с выявлением внутриклеточных антигенов с помощью антител, меченных ферритином, выполнена при разрушении плазматической мембраны путей замораживания-оттаивания или обработки комплиментом. Замена ферритина низкомолекулярными соединениями, содержащими ртуть, йод, не нашла широкого применения из-за низкой специфичности метода.

С конца 60-х годов XX века в иммунологии применяется иммуннопероксидазная методика ЭМ для обнаружения антигенов внутри и на поверхности клеток. Пероксидаза, используемая для метки антител, позволяет получить наилучший эффект по сравнению с другими ферментами (фосфотазы, некоторые оксидазы) благодаря более низкому молекулярному весу (около 40 тыс) и устойчивости к различным гистологическим процедурам.

Антитела, меченные пероксидазой, проникают в клетку и связываются с гомологичным антигеном. Конъюгирование антител с ферментом осуществляется рядом бифункциональных агентов, среди которых наиболее доступным является глутаровый альдегид. После того как произошла связь антитела с соответствующим антигеном, локализация фермента выявляется после контакта его с соответствующим субстратом – бензидином, а-нафтолом, смесью а-нафтола, с р-ферментом. В присутствии перекиси водорода образуется продукт с более выраженной рассеивающей способностью электронов по сравнению с окружающими структурами.

Таким образом, благодаря электронной микроскопии исследуются молекулярные механизмы, лежащие в основе биологических процессов. Последние достижения в технологии электронной микроскопии и визуализации позволяют играть все более важную роль в прогрессе нанотехнологий.

5 Сканирующая зондовая микроскопия

Сканирующая зондовая микроскопия - это метод исследования поверхности, основанный на взаимодействии микрозонда (кантилевера в случае АСМ) с поверхностью образца.

Одной из наиболее распространенных разновидностей «сканирующей зондовой микроскопии» является атомно-силовая микроскопия.

Атомно-силовой микроскоп (АСМ, англ. AFM - atomic-force microscope) - сканирующий зондовый микроскоп высокого разрешения. Используется для определения рельефа поверхности с разрешением от десятков ангстрем вплоть до атомарного. АСМ один из удивительнейших приборов. Он был изобретен сотрудниками ИВМ в 1986 году. С его помощью можно рассматривать отдельные атомы на поверхности.

В связи с этим неоспоримым достижением стало открытие 1982 году (момент опубликования в Phys. Rev. Lett.) Генрихом Рорером и Гердом Биннигом метода сканирующей туннельной микроскопии, которая положила начало развитию сканирующей зондовой микроскопии. Работая над микроскопическими исследованиями роста и электрических свойств тонких диэлектрических слоев в лаборатории ИВМ в Рюмликоне в Швейцарии, авторы думали использовать туннельную спектроскопию. В то время были известны работы Янга о полевом излучающем микроскопе, Томпсона по туннелированию в вакууме с управляемым остриём, так что мысль о способности измерения с помощью эффекта туннелирования не только спектроскопических свойств поверхности, но и её рельефа, была основана на трудах немалого количества исследователей.

Атомно-силовая микроскопия - один из видов сканирующей зондовой микроскопии, основанный на ван-дер-ваальсовских взаимодействиях зонда с поверхностью образца.

Принцип действия атомного силового микроскопа (рис. 19) основан на использовании сил атомных связей, действующих между атомами вещества. На малых расстояниях (около одного ангстрема, Å - единица измерения расстояний,

равная $1 \cdot 10^{-10}$ м) между двумя атомами действуют силы отталкивания, а на больших – силы притяжения. Совершенно аналогичные силы действуют и между любыми сближающимися телами. В сканирующем атомном силовом микроскопе такими телами служат исследуемая поверхность и скользящее над ней острие (кантилевер, зонд). Величина этих сил возникающая между атомами подложки и острия экспоненциально зависит от расстояния образец-игла. Отклонения зонда при действии близко расположенных атомов регистрируются при помощи измерителя наноперемещений; в частности, используют оптические, ёмкостные или туннельные сенсоры. На рисунке 19 приведена схема работы атомно-силового микроскопа с оптической системой регистрирующей отклонения зонда. Система обратной связи считывает и записывает положение кантилевера по-вертикали в соответствующей точке на поверхности, практически прошупывая поверхность, определяет его рельефность.

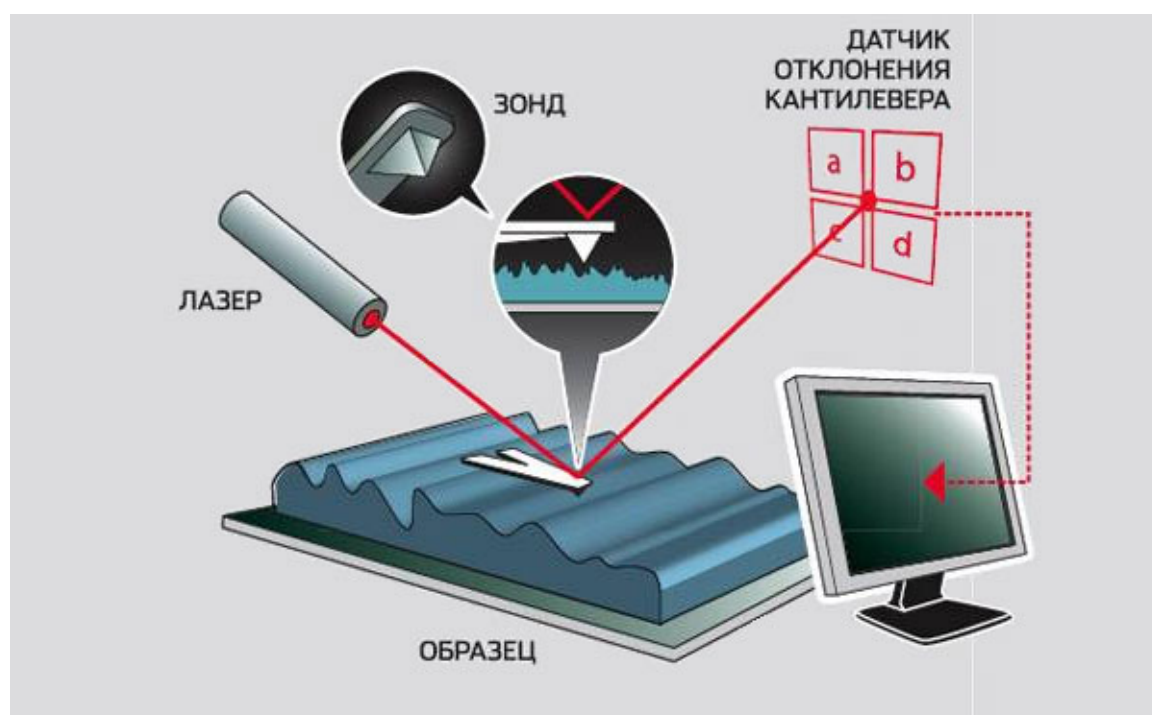


Рисунок 19 – Схема работы атомно-силового микроскопа

АСМ позволяет получить трёхмерный рельеф поверхности. Кроме того, непроводящая поверхность, рассматриваемая с помощью АСМ, не требует

нанесения проводящего металлического покрытия, которое часто приводит к заметной деформации поверхности, как при применении сканирующего туннельного микроскопа. Кроме того, большинство режимов АСМ могут быть реализованы не только в воздухе, но и в жидкости. Данное обстоятельство открывает возможность изучения биомакромолекул и живых клеток. АСМ в состоянии обеспечить реальное атомное разрешение в условиях сверхвысокого вакуума. Сверхвысоковакуумный АСМ по разрешению сравним со сканирующим туннельным микроскопом и просвечивающим электронным микроскопом. Однако, как и все этом мире ничто не идеально, и к недостатку АСМ можно отнести небольшой размер поля сканирования. Другая проблема заключается в том, что при высоком разрешении качество изображения определяется радиусом кривизны кончика зонда, что при неправильном выборе зонда приводит к появлению артефактов на получаемом изображении.

Атомный силовой микроскоп может использоваться для определения микрорельефа поверхности любых веществ, как проводящих, так и непроводящих; с его помощью можно наблюдать всевозможные несовершенства структуры, локализованные на изучаемых поверхностях, например, дислокации или заряженные дефекты, а также всяческие примеси. Кроме этого, АСМ позволяет выявить границы различных блоков в кристалле, в частности доменов. В последнее время с помощью атомного силового микроскопа физики стали интенсивно изучать биологические объекты, например, молекулы ДНК и другие макромолекулы, главным образом для целей чрезвычайно перспективного направления – биомолекулярной технологии. Интересно, что АСМ позволяет решать не только прикладные задачи, но и глобальные проблемы фундаментальной физики. В частности, определив с его помощью поведение межатомных сил и константы взаимодействий между атомами поверхности и острия, можно сделать довольно точные заключения о существовании или отсутствии новых фундаментальных взаимодействий и даже о структуре физического вакуума.

Разрешающая способность данного метода составляет примерно 0,1-1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали.

Кантилевер (от англ. cantilever - консоль, балка)- одна из основных составных частей сканирующего зондового микроскопа представляет собой массивное прямоугольное основание, размерами примерно $1,5 \times 3,5 \times 0,5$ мм, с выступающей из него балкой (собственно кантилевером), шириной порядка 0,03 мм и длиной от 0,1 мм до 0,5 мм. На нижнем конце кантилевера располагается игла (рис. 20), взаимодействующая с образцом. Радиус острия иглы промышленных кантилеверов находится в пределах от 5 нм до 90 нм, лабораторных - от 1 нм.

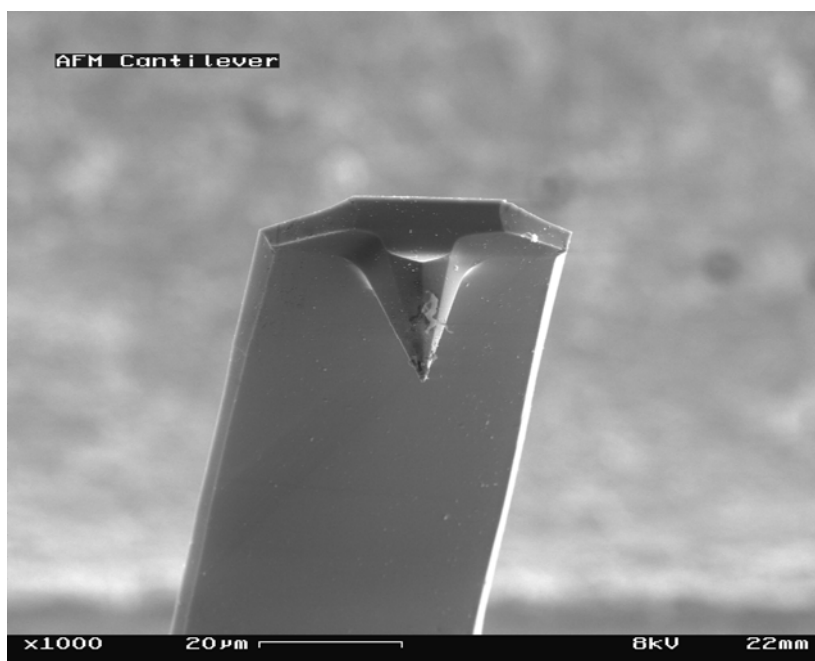


Рисунок 20 – Изображение кантилевера NCS16

Верхняя сторона кантилевера над иглой является зеркальной для отражения лазерного луча. В некоторых случаях для улучшения отражающей способности кантилевера на него напыляют тонкий слой алюминия. По своей структуре кантилевер чаще всего представляет собой монокристалл кремния или нитрида кремния. Игла также может быть из кремния, нитрида кремния или алмаза.

Кантилеверы разделяются на жёсткие и мягкие, - по длине балки, а характеризуется это резонансной частотой колебаний кантилевера. Процесс сканирования микрозондом поверхности может происходить как в атмосфере или

заранее заданном газе, так и в вакууме, и даже сквозь плёнку жидкости. СЗМ измеряет как нормальное к поверхности отклонение зонда (субангстремное разрешение) так и латеральное - одновременно. Для детектирования отклонения используется полупроводниковый лазер с длиной волны 670 нм и оптической мощностью 0,9 мВт. Лазерный луч направляется на обратную к по отношению к поверхности сторону кантилевера (на самый кончик), которая покрыта специальным алюминиевым зеркальным слоем для наилучшего отражения, и отраженный луч попадает в специальный четырёхсекционный фотодиод. Таким образом, отклонения кантилевера приводят к смещению луча лазера относительно секций фотодиода, - изменение разностного сигнала с фотодиода и будет показывать амплитуду смещения кантилевера в ту или иную сторону. Такая система позволяет измерять отклонения лазера в угле $0,1^\circ$, что соответствует отклонению кантилевера на угол 2×10^{-7} рад.

Сканирование поверхности может происходить двумя способами, - сканирование кантилевером и сканирование подложкой. Если в первом случае движения вдоль исследуемой поверхности совершает кантилевер, то во втором относительно неподвижного кантилевера движется сама подложка. Для сохранения режима сканирования, - кантилевер должен находиться вблизи поверхности, - в зависимости от режима, - будь то режим постоянной силы, или постоянной высоты, существует система, которая могла бы сохранять такой режим во время процесса сканирования. Для этого в электронную схему микроскопа входит специальная система обратной связи, которая связана с системой отклонения кантилевера от первоначального положения. Уровень связи (рабочая точка) кантилевер-подложка задается заранее, и система обратной связи отрабатывает так, чтобы этот уровень поддерживался постоянным независимо от рельефа поверхности, а сигнал, характеризующий величину отработки и является полезным сигналом детектирования.

Образец (поверхность) и кантилевер сближаются с помощью шагового двигателя до тех пор пока поверхность и кантилевер не начнут взаимодействовать,

что приведёт к такому смещению лазерного луча на секциях фотодиода, а значит к такому разностному току, что обратная связь прекратит сближение.

Кантилевер непосредственно связан с четырёхобкладочной пьезотрубкой, подавая напряжение на противоположные обкладки, можно соответственно менять изгиб трубки, а значит и область сканирования кантилевера (горизонтальное отклонение пьезотрубки) вдоль соответственно оси абсцисс и оси ординат. Внутри трубки находится также пьезоэлемент, который отвечает за смещение кантилевера вдоль нормали к поверхности, то есть оси аппликат. При сканировании поверхности задается рабочая точка, физический смысл которой есть величина выдвижения пьезотрубки по отношению к максимальной амплитуде (обычно около 50 %). Обратная связь обрабатывает величину выдвижения пьезотрубки для поддержания режима (постоянной силы или постоянной высоты, в случае СТМ - постоянного туннельного тока) сканирования. В случае сканирования подложкой такая система присоединена к подложке.

Таким образом, сканирующий зондовый микроскоп способен обеспечить реальное атомное разрешение в условиях сверхвысокого вакуума при отсутствии вибраций. Сверхвысоковакуумный сканирующий зондовый микроскоп по разрешению сравним с просвечивающим электронным микроскопом.

Основными преимуществами сканирующей зондовой микроскопии являются:

- высокая локальность;
- возможность использования зонда для модификации поверхности объекта;
- возможность использования не только в вакууме, но и на воздухе, и в жидкой среде.

Основными недостатками сканирующей зондовой микроскопии являются:

- сильная зависимость результатов от формы и природы зонда;
- низкая скорость, обусловленная механической системой сканирования;
- искажения латеральных расстояний и углов.

6 Принципы и методы гистохимического окрашивания

6.1 Фракционирование клеток

В цитологии широко применяют различные методы биохимии, как аналитические, так и препаративные. В последнем случае можно получить в виде отдельных фракций разнообразные компоненты и изучать их химический состав, ультраструктуру и свойства. В настоящее время в виде чистых фракций получают практически любые клеточные органеллы и структуры: ядра, ядрышки, хроматин, ядерные оболочки, плазматическую мембрану, вакуоли эндоплазматического ретикулума, его рибосомы, рибосомы гиалоплазмы, аппарат Гольджи, митохондрии, их мембраны, пластиды, пероксисомы, микротрубочки и т.д., и т.п. В последнее время получены чистые фракции центриолей и ядерных пор (рис. 21).



Рисунок 21 – Схема фракционирования клетки

Получение клеточных фракций начинается с общего разрушения клетки, с ее гомогенизации. Затем из гомогенатов уже можно выделять фракции. Одним из основных способов выделения клеточных структур является дифференциальное (разделительное) центрифугирование. Принцип его применения в том, что время для осаждения частиц в гомогенате зависит от их размера и плотности: чем больше частица или чем она тяжелее, тем быстрее она осядет на дно пробирки. Чтобы ускорить этот процесс оседания, используют ускорения, создаваемые центрифугой. При центрифугировании раньше всего и при небольших (1-3 тыс. g) ускорениях оседают ядра и неразрушенные клетки; при 15-30 тыс. g оседают крупные частицы, митохондрии, состоящие из митохондрий, мелких пластид, пероксисом, лизосом и др., при 50 тыс. g оседают микросомы, фрагменты вакуолярной системы клетки. При повторном дробном центрифугировании этих смешанных подфракций можно получить чистые фракции. Так, при разделении митохондриальной подфракции получают отдельно митохондрии, лизосомы, пероксисомы. При разделении микросом можно получить фракцию мембран аппарата Гольджи, фрагментов плазматической мембраны, вакуолей, гранулярного ретикулума. В случаях более тонкого разделения фракций используют центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, что позволяет хорошо разделить компоненты, даже незначительно отличающиеся друг от друга по удельной массе.

Полученные фракции, прежде чем их анализировать биохимическими способами, необходимо проверить на чистоту с помощью электронного микроскопа.

Получение отдельных клеточных компонентов дает возможность изучать их биохимию и функциональные особенности. Так можно создать бесклеточную систему для рибосом, которые будут синтезировать белок по заданной экспериментатором информационной РНК, выделенные митохондрии в подобранных условиях могут осуществлять синтез АТФ, на выделенном хроматине при участии соответствующих ферментов может происходить синтез РНК и т.д.

В последнее время применяются бесклеточные системы для воссоздания клеточных надмолекулярных структур. Так, используя очищенные от гранул желтки, экстракты цитоплазмы яиц земноводных или яиц морских ежей, можно

получить ядра с ядерной оболочкой из введенной в эту бесклеточную систему чужеродной ДНК (например, ДНК бактериофага). Такая ДНК связывается с белками-гистонами, которые есть в избытке в таком экстракте, образуется хроматин (дезоксирибонуклеопротеид), который покрывается двойной мембранной оболочкой, несущей даже ядерные поры. Такие модельные системы помогают изучать тонкие, интимные процессы, например, транспорт макромолекул из цитоплазмы в ядро и наоборот. В цитоплазматических экстрактах яиц земноводных и иглокожих такие ядра могут периодически делиться путем митоза. Эти модели внесли огромный вклад в расшифровку природы регуляции клеточного цикла.

Большой вклад в биологию клетки вносят методы клеточной инженерии. Было найдено, что различные живые клетки могут сливаться друг с другом, если специальными способами обработать их плазматические мембраны. Так можно слить эритроцит курицы и лимфоцит человека. При этом получается двуядерная клетка, гетерокарион, в котором происходит активация ядра куриного эритроцита. Если гетерокарион образуется из близкородственных клеток (например, мыши и хомячки), то при вступлении их в митоз хромосомы могут объединиться в одну метафазную пластинку. После разделения такой клетки получится истинно гибридная клетка. Другие приемы позволяют конструировать клетки из разных по происхождению ядер и цитоплазмы. Так, разрушив актиновый компонент цитоскелета и подвергнув клетки центрифугированию можно клетку разделить на две части: ядро с узким ободком цитоплазмы - кариопласт и на оставшуюся часть цитоплазмы - цитопласт. Затем, используя разные кариопласты и цитопласты, можно создавать разные комбинации реконструированных клеток.

Методы клеточной инженерии широко применяются не только в экспериментальной биологии, но и в биотехнологических целях. Например, при получении моноклональных антител используются клеточные гибриды между лимфоцитами иммунизированных животных и интенсивно размножающимися клетками миеломы. Полученные первичные дикарионы образуют истинные гибридные клетки, которые интенсивно размножаются за счет генома опухолевых миеломных клеток, и одновременно выделяют большое количество антител, за счет

работы генома иммунизированных лимфоцитов. Этот прием позволяет получать большое число гибридных клеток, вырабатывающих большие количества необходимых антител.

6.2 Гистохимия белковых соединений

Белки – природные полимеры аминокислот, входящие в состав подавляющего большинства клеточных и тканевых структур. С ним связаны пластические, энергетические, транспортные и ферментные процессы. Поэтому гистохимическое их выявление имеет важное значение для характеристики изменений, происходящих в клетках и тканях (как в норме, так и в патологии).

Из существующих методов наибольшее распространение получил метод суммарного выявления белков по Даниелли, который удачно модифицирован советским гистохимиком М. Г. Шубичем (1963).

Выявление белков (суммарное) по методу Даниелли (в модификации М. Г. Шубина) (фиксаторы Карнуа, Бродского, 10 % нейтральный формалин).

Сущность метода состоит в том, что гистологические препараты (рис. 22) сначала подвергают действию трис-диазония розанилина (основного фуксина), который реагирует с многими аминокислотными остатками тканевых белков. Для усиления окраски их обрабатывают Н-кислотой, которая соединяется с реакционноспособными группами трис-диазония, уже связанного с белками. Интенсивность окраски определяется концентрацией белков в той или иной гистологической структуре.

Рабочие растворы. Двунормальный раствор хлористоводородной кислоты. К 20 мл концентрированной хлористоводородной кислоты (плотность 1,19) добавляют 80 мл дистиллированной воды.

Раствор основного фуксина. Растворяют 4 г основного фуксина (марка «для фуксинсернистой кислоты») в 100 мл раствора хлористоводородной кислоты (раствор можно хранить длительное время).

Водный раствор нитрита натрия. Растворяют 4 г нитрита натрия (NaO_2) в 100 мл дистиллированной воды (раствор можно хранить в холодильнике).

Основной раствор трисдиазония. В пробирку наливают 2 мл раствора основного фуксина и затем по каплям при постоянном покачивании пробирки добавляют 2 мл раствора нитрата натрия. Смесь в течение 30 – 60 с приобретает соломенно-желтый цвет.

Рабочий раствор трисдиазония. Добавляют 0,5 мл основного раствора трисдиазония к 100 мл дистиллированной воды, предварительно забуференной добавлением 20 мл ацетатвероналового или другого буфера pH 7,9 (рабочий раствор трис-диазония сохраняется в течение нескольких часов).

Насыщенный раствор Н-кислоты. Растворяют 1 г Н-кислоты в 50 мл ацетатвероналового или другого буфера pH 9,2.



Рисунок 22 – Гистологическая батарея

Метод окрашивания (парафиновые срезы):

- 1) довести срезы до воды;
- 2) поместить в рабочий раствор трис-диазония на 10-20 мин (более точное время инкубации подбирают опытным путем);
- 3) промыть в дистиллированной воде;

4) промыть в трех сменах ацетатвероналового или другого буфера рН 9,2 по 2 мин в каждой;

5) перенести в насыщенный раствор Н-кислоты на 15 мин;

6) тщательно промыть в дистиллированной воде;

7) обезвредить, просветлить и заключить в бальзам.

Результат. Гистологические структуры окрашиваются в красно-фиолетовый цвет различной интенсивности.

6.3 Гистохимия углеводов

Биологическая роль углеводов многообразна. В организме они выполняют опорные и энергетические функции, некоторые углеводы являются составными частями биологически важных соединений (АТФ, циклической АМФ, нуклеиновых кислот, гепарина, витамина С и др.).

Гликопротеиды, как специфический компонент иммуноглобулинов, играют важную роль в иммунных механизмах, определяя антигенную активность сывороточных и клеточных факторов. Кроме того, продукты расщепления углеводов используются для синтеза практически всех классов соединений в живой клетке.

Классификация углеводов. В живой клетке углеводы существуют в форме моно-, олиго- и полисахаридов. В гистологических препаратах они сохраняются практически только в виде полисахаридов: только полисахариды могут быть с достоверностью выявлены гистохимически. Правда, возможно также гистохимическое выявление глюкозы и витамина С.

Общепринятой классификации полисахаридов не существует. Для практических гистохимических целей достаточно разделить полисахариды на гомо- и гетерополисахариды.

Гомополисахариды построены из остатков молекул моносахаридов, главным образом пентозы и гексозы, соединенных между собой кислотными мостиками. Гомополисахаридами являются крахмал, инулин, клетчатка, гликоген. К ним с

определенными оговорками можно также отнести хитин и полигалактуроновую кислоту.

Гетерополисахариды разделяют на гликозаминогликаны (ГАГ) и гликопротеины. К кислым гликозаминогликанам относят гиалуроновую кислоту, молекула которой построена из остатков глюкуроновой и уксусной кислот и гексозамина; хондроинин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дерматан-сульфат, кератан-сульфат, гепаритин-сульфат, гепарин, молекулы которых содержат остатки гексозамина, глюкуроновой или уроновой кислот, серной и уксусной кислот в различных сочетаниях. В тканях кислые ГАГ, кроме гепарина, находятся в соединении с белками. Такие комплексы, в которых к белковому стержню присоединены полисахаридные цепи, носят название «протеогликаны». Все эти соединения входят в состав матрикса соединительной ткани, крови, синовиальной жидкости, слизи.

Гликопротеины являются белками, к молекуле которых ковалентно присоединены олигосахариды: гексозы, гексозамины, сиаловые кислоты, фукозы и др. Такие соединения являются составной частью клеточных мембран, слизистых секретов желез, сывороточных белков, ферментов, гормонов, «неколлагеновых белков» соединительной ткани и т.д.

Гистохимическая идентификация углеводов. Выявление углеводов основано, как правило, на методах общего анализа химических групп. Используются методы окисления, метахроматическое окрашивание основными красителями, реакции связывания коллоидных металлов, выявление базофилии, окрашивание кармином, реакции блокирования и превращения реакционноспособных групп, методы ферментативного гидролиза, радиоавтографию, иммуногистохимию.

Методы окисления 1,2-гликолей до альдегидов. Реакция Шифф-йодной кислотой (ШИК-реакция). Метайодная кислота селективно окисляет и расщепляет $C=C$ -связи не только в 1,2-окси-, но также в 1-окси-2-амино-1-окси-2-алкиламино- и 1-окси-2-кетогруппах.

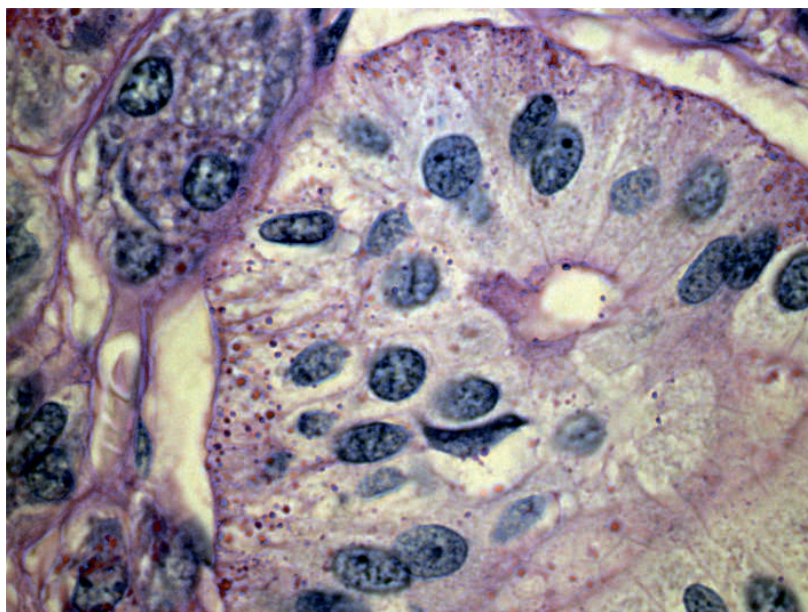


Рисунок 23 – Пример метода окисления 1,2-гликолей до альдегидов

В результате этого образуется одна кетогруппа или две альдегидные группы, как, например, в глюкозе. Альдегидные группы реагируют с реактивом Шиффа (фуксин-сернистой кислотой) точно так же, как и в реакции Фельгена. С помощью этого метода (рис. 23) выявляют все соединения, содержащие оксигруппы, которые в результате окисления метайодной кислоты могут превращаться в альдегидные группы. Однако в гистологических срезах практически лишь гликоген и гликопротеины, сохраняющиеся в достаточных количествах, могут быть выявлены с помощью ШИК-реакции. Гликоген можно дифференцировать от гликопротеинов путем переваривания в амилазе или диастазе.

Для окисления -С-С-связей в полисахаридах предпринимались попытки использовать, помимо одной кислоты, другие окислители-хромовую кислоту, перманганат калия, тетраацетат натрия и т.д. Наиболее удачной является модификация ШИК-реакции, предложенная А.Л. Шабдашем (1949):

1) материал фиксируют в 10 % формалине, жидкостях Карнуа, Ценкера, заливают в парафин;

2) депарафинированные срезы доводят до дистиллированной воды;

3) при комнатной температуре срезы окисляют от 0,5 % до 1 % водным раствором орто- или метайодной кислоты в течение 2-10 мин.

Окисление можно также проводить по Шабадашу в 0,001 – 0,01 М метапериодате калия или натрия в течение 7-25 мин.

Раствор хранят в темноте. Рабочую концентрацию этого раствора и продолжительность инкубации в ней подбирают в зависимости от объекта;

4) промывают в дистиллированной воде 10 мин;

5) помещают срезы в реактив Шиффа на 10-30 мин при комнатной температуре в темноте.

Реактив Шиффа по Грауманну: 0,5 г парарозанилина (парафуксин, свободный от акридина, стандартный) полностью растворяют в 15 мл 1 н. соляной кислоты без нагревания при помешивании и доводят до 85 мл дистиллированной водой с растворенными в ней 0,5 г пиросульфита калия; прозрачный интенсивно-красный раствор, помещенный в темноту в сосуде с плотно прилегающей пробкой, в течение 24 ч приобретает желтоватый оттенок, его встряхивают 2 мин с 0,3 г активированного угля (порошок) и затем дважды фильтруют.

Такой раствор готов к использованию и его можно хранить в сосудах коричневого цвета с пришлифованной пробкой по крайней мере в течение 2 мес.

Срезы промывают сернистой водой (600 мл дистиллированной воды + 30 мл 10 % пиросульфита калия + 30 мл 1 н. соляной кислоты) три раза по 2 мин.

Сернистую воду можно также готовить (непосредственно до проведения реакции) по рекомендации А.Л. Шабадаша следующим образом: к 200 мл дистиллированной воды добавить 10 мл 10 % раствора натрия гидросульфита и 10 мл 1 N раствора соляной кислоты.

Тщательно промывают в проточной и дистиллированной воде, ядра можно докрасить 0,5 % светлым зеленым или кислым гемалауном.

Обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации, заключают в бальзам.

Результат: углеводы, содержащие гексозу, окрашиваются в красно-лиловый цвет, гликоген – в более интенсивный темно-красный.

Контроль: расщепление гликогена амилазой или диастазой, реакция ацетилирования для блокирования гидроксильных групп.

Примечание: необходимо пользоваться химически чистой посудой, стеклянными палочками; нельзя работать с металлическими крючками или иголками; окрашивание срезов в реактиве Шиффа следует проводить в темноте.

Радиоавтография, определение, история. Метод радиоавтографии основан на введении в исследуемый объект соединения, «меченого» радиоактивным атомом и выявлении места его включения путем фотографической регистрации излучения. Основой получения изображения является воздействие ионизирующих частиц, образующихся при распаде радиоактивного атома, на ядерную фотоэмульсию, содержащую кристаллы галоидного серебра.

Открытие метода радиоавтографии напрямую связано с открытием явления радиоактивности. В 1867г. было опубликовано первое наблюдение о влиянии солей урана на галогениды серебра (Niepce de St.Victor). В 1896г. Генри Беккерель наблюдал засвечивание фотопластинки солями урана без предварительной экспозиции на свету. Этот эксперимент считается моментом открытия явления радиоактивности. Радиоавтографию применительно к биологическому материалу впервые использовали Лакассань и Латтье в 20-х годах прошлого века; гистологический блок от различных органов животных после введения им изотопов прижимали плоской стороной к рентгеновской пластинке и экспонировали. Заранее получали гистологический срез и подвергали стандартной процедуре окраски. Полученный автограф изучали отдельно от среза. Этот метод позволяет оценить интенсивность включения изотопа в биологический образец. В сороковых годах Леблон использовал радиоавтографию для демонстрации распределения изотопа иода в срезах щитовидной железы.

Первые попытки сочетать радиоавтографию с электронной микроскопией были сделаны в 50-е годы. Электронно-микроскопическая радиоавтография представляет собой частный случай обычной радиоавтографии, при котором также подсчитываются зерна серебра и учитывается их распределение. Особенность метода состоит в применении очень тонкого слоя эмульсии. В настоящее время достигнуто

разрешение около 50 нм, что в 10-20 раз выше в сравнении со световой микроскопией.

В настоящее время метод радиоавтографии дополнен возможностью автоматической оценки количества зерен серебра с помощью видеоанализаторов. Часто для усиления сигнала метки (как правило это изотопы с высокими энергиями) применяются различные виды сцинтиляторов, нанесенные на пластины (усиливающий экран с фосфорным покрытием), или импрегнированные в эмульсию (РРО) – в таком случае излучение фотонов засвечивает обычную фотопластину или фотопленку.

Фотографический принцип получения изображения, фотоэмульсии. В радиографическом исследовании роль детектора ядерных распадов выполняет фотоэмульсия, в которой при прохождении ионизирующей частицы остается скрытое изображение, выявляемое затем в процессе проявки, аналогично обработке обычной фотопленки.

Фотоэмульсия представляет из себя взвесь микрокристаллов галоидного серебра в желатине. Микрокристаллы имеют дефекты в структуре, называемые центрами чувствительности. Согласно модели Гэрни-Мотта эти нарушения ионной решетки кристалла способны захватывать электроны, высвободившиеся при прохождении α - или β -частицы в зоне проводимости кристалла, в результате чего ион превращается в атом. Образовавшееся скрытое изображение может быть выявлено с помощью процедуры, в результате которой активированные кристаллы галоидного серебра превращаются в зерна металлического серебра (этот процесс называется химической проявкой). В качестве проявителя может быть использован любой агент с достаточной восстанавливающей активностью (типично в фотографии и автордиографии используются метол, амидол или гидрохинон). После проявления экспонированных кристаллов остальные микрокристаллы галоидного серебра удаляют из эмульсии при помощи фиксатора (обычно - гипосульфит). Ядерные фотоэмульсии характеризуется разрешающей способностью (зернистостью) и чувствительностью. Первая определяется размером микрокристаллов соли серебра и обратно пропорциональна последней.

Фотоэмульсия характеризуется пониженной чувствительностью к видимому свету, но работа с ней, тем не менее, должна производиться в темноте, чтобы исключить появление артефактов.

Эмульсия может наноситься на препарат в виде готовой пленки с подложкой или погружением препарата в разогретую жидкую эмульсию – таким образом, получается тонкий равномерный слой, который проявляется обычным способом. Перед нанесением эмульсии для световой микроскопии препарат обычно окрашивают требуемой гистологической окраской, но более бледно, чем обычно, чтобы сделать возможным подсчет зерен серебра на всех участках. Определенное время препарат экспонируют, затем проявляют.

Изотопы, используемые в радиоавтографии. В радиоавтографии в зависимости от целей исследования и доступных материалов возможно применение различных изотопов. Изображение, создаваемое ионизирующей частицей на ядерной фотоэмульсии зависит от энергии частицы и типа ее взаимодействия с веществом.

α -частицы, испускаемые одинаковыми радиоактивными ядрами обладают одинаковой энергией (E) и одинаковой длиной пробега (R), связанными следующим соотношением:

$$R = k \cdot E^{3/2}, \quad (1)$$

где k – константа, характеризующая среду, в которой распространяются частицы.

Величина пробега частиц в среде определяется ее плотностью и элементарным составом. Соотношение Брега-Климена позволяет по величине пробега α -частиц в воздухе (R_0) оценить пробег в веществе с атомной массой A и плотностью d :

$$R = 0,0003 \cdot (R_0 / d) \cdot A^{1/2}. \quad (2)$$

Поскольку ионизирующая способность α -частиц очень высока, это облегчает фотографическую регистрацию распределения изотопа, а так же позволяет использовать для регистрации неэмульсионные материалы. След α -частиц, испускаемых одним источником, на автографах выглядит как пучок прямолинейных отрезков, обычно длиной от 15 мкм до 50 мкм, исходящих из одной точки, что позволяет точно локализовать участок включения радиоактивной метки. Однако, α -частицы испускаются изотопами с большими атомными номерами, что ограничивает возможность их применения в качестве биологической метки.

Треки α -частиц часто наблюдаются в гистологических радиоавтографах как артефакт – результат собственного излучения изотопов, находящихся в предметном стекле.

β -излучение характеризуется непрерывным спектром начальной энергии частиц – от нуля до определенной для каждого изотопа E_{\max} . Формы спектра существенно отличаются. Так, наиболее вероятная энергия частиц, излучаемых тритием составляет $1/7$ от E_{\max} , ^{14}C – около $1/4$, ^{32}P – около $1/3$. Максимальная энергия β -излучения различных изотопов меняется в пределах от 18 кэВ до 3.5 МэВ – в гораздо более широких пределах, чем альфа излучения. Как правило, максимальная энергия выше у короткоживущих изотопов.

Прохождение β -частиц и моноэнергетических электронов через вещество сопровождается двумя основными типами взаимодействия. При взаимодействии с орбитальным электроном частица может передать ему энергию, достаточную для ионизации атома (удаления электрона с орбиты). В редких случаях эта энергия настолько велика, что можно наблюдать трек освобожденного электрона. Из-за равенства масс частицы и электрона происходит отклонение от первоначального движения. Взаимодействие второго типа, с атомными ядрами, приводит к возникновению тормозного рентгеновского излучения. Хотя последнее и не регистрируется эмульсией, акт взаимодействия частицы с ядром может быть обнаружен по резкому излому траектории.

Многokратное взаимодействие с орбитальными электронами приводит к искривлению траектории, которая обычно выглядит как извилистая линия, особенно в конечной части, когда скорость частицы падает, а ионизирующая способность возрастает. Длина траектории заметно превышает расстояние от начальной до конечной точки трека – пробег. По этой причине даже для моноэнергетических электронов характерно наличие спектра пробегов, ограниченного сверху R_{\max} , характерным для данного излучения. Из-за более низких ионизационных потерь β -частицы регистрируются с большими сложностями, чем α -частицы. Они не образуют сплошных треков (кроме самого мягкого излучения трития – однако в этом случае мала вероятность прохождения более чем через один кристалл эмульсии), плотность и число проявленных кристаллов варьируют в различных пределах. Пробег β -частицы в другом элементе может быть оценен по формуле:

$$R = R_{Al} \cdot (Z/A)_{Al} / (Z/A). \quad (3)$$

В широком диапазоне значений E_{\max} максимальный пробег связан с максимальной энергией соотношением

$$R_m^0 = 412 \cdot E_{\max}^{1,265 - 0,0954 \cdot \ln E_{\max}}. \quad (4)$$

Различие в пробегах, ионизационной способности и плотности проявленных эмульсионных кристаллов у частиц с различной энергией может быть использовано для дискриминации распределения элементов, если их изотопы существенно отличаются по E_{\max} , как в случае с тритием и ^{14}C . Дискриминацию распределения двух изотопов осуществляют с помощью нанесения на образец двух эмульсионных слоев, первый слой регистрирует преимущественно мягкое излучение, второй – жесткое. Согласно некоторым работам различные изотопы могут быть надежно выделены по размеру проявленных эмульсионных кристаллов – кристаллы,

затронутые β -частицей трития, обладающей большей ионизационной способностью, имеют большие размеры.

Электроны внутренней конверсии образуются при поглощении γ -кванта с очень низкой энергией излучения и удалении электрона с внутренней оболочки атома. Эти электроны подобны мягким β -частицам, но в отличие от последних являются моноэнергетическими. Наличие электронов внутренней конверсии позволяет использовать такие изотопы как ^{125}I .

В настоящее время чаще всего используются изотопы, излучающие β -частицы. Как правило, для метки в гистологических исследованиях используется тритий. Первые автографы с использованием трития были изготовлены еще в 50-е годы, однако широкое его применение началось после того, как в Брукхэвенской лаборатории был получен меченый тритием тимидин. Поскольку водород входит в состав всех органических веществ, то, используя тритий, можно получать самые разные соединения, несущие радиоактивную метку. Чем меньше энергия испускаемой частицы, тем короче трек, оставляемый ей при движении в фотоэмульсии и тем точнее можно локализовать расположение меченого атома. Длина пробега β -частиц трития около 1-2 мкм, наиболее вероятная энергия 0,005 МэВ, а трек состоит в большинстве случаев из одного зерна серебра, что позволяет локализовать источник излучения не только в относительно крупных клеточных структурах, таких как ядро, но и в отдельных хромосомах.

Введение «меченых» метаболитов в организм позволяет проследить включение изотопа в клетки тканей животного, что дает возможность исследовать самые разные биохимические процессы в живом организме.

Получение абсолютных данных – концентрации меченого вещества в изучаемом объекте редко бывает целью радиоавтографического исследования, для этого необходимо знание ряда условий, определение которых затруднено.

Поэтому количественные радиоавтографические исследования обычно проводят путем сравнения концентрации зерен серебра над исследуемым объектом и контролем, при этом контрольные данные удобно принимать за единицу, или 100 %.

6.4 Гистохимия липидов

Собирательный термин «липиды» охватывает жиры (т.е. триглицериды) и жироподобные вещества растительного и животного происхождения. Это преимущественно неполярные соединения, основным компонентом которых являются жирные кислоты. Липиды нерастворимы или плохо растворимы в воде, но хорошо растворяются в типичных жирорастворителях: бензине, хлороформе, четыреххлористом углероде, ацетоне, эфире, петролейном эфире, горячем спирте и т.п. Не все липиды растворимы в указанных растворителях одинаково, на этом основаны дифференциальная экстракция липидов и выявление их с помощью жирорастворимых красителей.

С учетом гистохимических свойств и химической структуры липиды делят на простые (нейтральные жиры, воски, стериды) и сложные (фосфолипиды, цереброзиды, ганглиозиды, сульфолипиды).

Гистохимическая идентификация липидов. Гистохимическое выявление липидов возможно с помощью физических и химических методов. К физическим относятся методы экстракции, поляризационная микроскопия и окрашивание жирорастворимыми красителями, к химическим – подавляющее большинство гистохимических методов выявления липидов, направленных, главным образом, на определение активных функциональных групп.

Экстракция липидов. В основе методов экстракции липидов лежат законы растворимости, известные из аналитической органической химии. Их необходимо также учитывать при подготовке тканей для проведения гистохимического анализа липидов. Первые потери водорастворимых липидов происходят уже при фиксации в альдегидах или тетраоксиде осмия и продолжаются в процессе обезвоживания и заливки. После первичной фиксации в тетраоксиде осмия вымываются, главным образом, насыщенные липиды. Особенно велики суммарные потери липидов в тканях, фиксированных в альдегидах. После двойной фиксации в альдегидах и тетраоксиде осмия достигается хорошая стабилизация структур, содержащих ненасыщенные липиды. Наибольшие потери липидов наблюдаются во время

пропитки ткани парафином и эпоксидными смолами, но их можно уменьшить путем более быстрого обезвоживания и замены этанола на ацетон.

Стабилизация липидов может быть значительно усилена путем добавления к альдегидной фиксирующей смеси хлорида кальция, как, например, в кальций-формоле по Бейкеру или при использовании хроматов, способных окислять ненасыщенные липиды, как в фиксаторе Элфтмана, содержащем бихромат калия и сулему. Хорошо сохраняются фосфолипиды при фиксации с одновременным обезвоживанием в ацетоне с 0,65 % хлоридом магния.

Управляя процессом экстрагирования липидов и применяя его в сочетании с методами окрашивания, гистохимия обеспечивает контроль специфичности окрашивания и дифференцированно выявляет различные липидные фракции.

Экстракция липидов по Кейлигу позволяет провести разделение четырех фракций липидов, при этом тонкие, нефиксированные кусочки ткани обрабатывают четырьмя растворителями:

- холодным ацетоном (удаляет глицериды, холестерин, холестериды и кетостероиды);
- горячим ацетоном (удаляет цереброзиды);
- горячим эфиром (удаляет лецитины и кефалины);
- горячим метанол-хлороформом (удаляет все липиды).

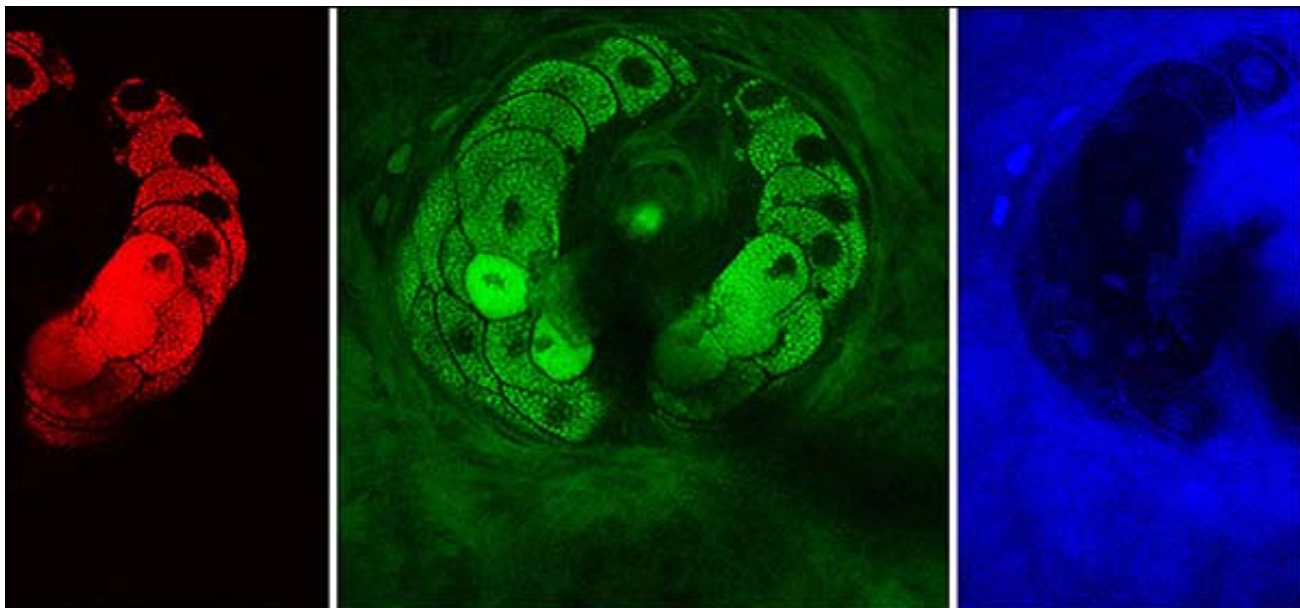
Применяют по три порции каждого растворителя, сменяя их соответственно через 3,3 и 12 ч. Для горячих растворителей можно использовать аппарат Сокслета или более простой прибор. После экстракции кусочки ткани промывают водой, и криостатные срезы окрашивают раствором судана черного В в 70 % спирте. Следует помнить, что при использовании этого метода не удастся полностью исключить диффузию, что затрудняет точную локализацию липидов, однако все же они остаются в срезе и окрашиваются Суданом.

Экстракция пиридином по Бейкеру обеспечивает удаление всех липидов. Ее проводят на тонких кусочках ткани, фиксированных слабым раствором фиксатора Буэна в течение 20 ч. После фиксации их следует промыть в спирте для удаления пикриновой кислоты, обработать пиридином сначала при комнатной температуре 30

мин, затем при 60 °С 20 ч, промыть в проточной воде в течение 2 ч, перенести в бихромат-кальциевый раствор (5 % бихромат калия и 1 % хлорид кальция на дистиллированной воде) и окрасить материал Суданом и черным В или любым другим жировым красителем.

Разработаны приемы липидной экстракции, обеспечивающие хорошую ультраструктурную сохранность ткани для целей электронно-микроскопической гистохимии.

Поляризационная микроскопия липидов. В нативном состоянии большинство нейтральных липидов находится в жидком состоянии и не дает двойного лучепреломления в поляризованном свете; это свидетельствует об их аморфном (изотропном) состоянии. Однако при охлаждении нейтральные липиды переходят в анизотропное состояние и могут образовывать двоякопреломляющие кристаллы. При поворачивании предметного столика поляризационного микроскопа с исследуемым препаратом на 360° можно отметить четыре положения, при которых интенсивность прошедшего света минимальна. Подобным образом ведут себя все липиды. Если же в препарате выявляется анизотропный эффект мальтийского креста, то можно сделать вывод о присутствии фосфатидов, цереброзидов или эфиров холестерина. В целом же возможности этого метода ограничены.



Слева липиды; ядра клеток, лишённые липидов, представляются чёрными. В средней части изображения проявляются структуры, богатые белками. Справа показано распределение воды.

Рисунок 24 – Флуоресцентная микроскопия с эффектом вынужденного комбинационного рассеяния

Флуоресцентная микроскопия липидов. Небольшая часть липидов обладает собственной, или первичной, флюоресценцией в ультрафиолетовом свете (рис. 24). Липопигменты светятся желтым или желто-зеленым светом, липиды с растворенным каротином дают зеленую флюоресценцию, так же как и стероидные гормоны, но зеленая флюоресценция последних меняется во времени. Практическое значение имеет выявление витамина А.

Методы вторичной флюоресценции, в основе которых лежит растворение флюоресцирующих веществ (флюорохромов) в липидах тканей, позволяют устанавливать присутствие липидов в клетках и тканях точнее, чем многие другие методы. С этой целью использовали ряд флюоресцирующих красителей, в том числе метиленовый синий, тиофлавин, родамин В, бенгальский розовый, фосфин 3R, бензпирен и др. Возможность применения водных растворов таких красителей

обеспечивает сохранность самых мелких капелек жира. С помощью этого метода выявляют липиды и липопротеиды в очень низких концентрациях. Особенно это относится к флюорохромированию бензпиреном. Этот высокочувствительный метод позволяет выявлять липиды в тонких структурах, входящих в состав липопротеидных комплексов или тонкодисперсных образований.

Выявление бензпиреном по Бергу:

1. Материал фиксируют в формалине или кальций-формоле. Срезы толщиной 10 мкм получают на замораживающем микротоме.

2. Обрабатывают срезы в течение 20 мин раствором бензпирен-кофеина (к 100 мл насыщенного отфильтрованного 1,5 % раствора кофеина в воде добавляют 0,002 г 3,4 бензпирена; раствор выдерживают 2 дня при 37 °С, отфильтровывают и разводят равным объемом дистиллированной воды. Оставляют на 2 ч и вновь фильтруют. Колбу с раствором плотно закрывают и помещают в темное место; в таком виде его можно хранить несколько месяцев).

3. Срезы быстро промывают в дистиллированной воде.

4. Закljučают под покровное стекло с водой и сразу же исследуют под флюоресцентным микроскопом.

Результат: липиды выделяются своей синей или бело-синей флюоресценцией.

П р и м е ч а н и е - Этот метод не позволяет дифференцировать липиды разных классов; цвет флюоресценции – от сине-зеленой до бело-синей и бело-желтой, по-видимому, зависит от концентрации липидов.

Флюорохромирование липидов фосфином 3R по Фольку-Попперу:

Флюорохром - фосфин 3R – обуславливает яркую серебристо-белую флюоресценцию, которую легко отличить от естественной флюоресценции тканей, даже не пользуясь контрольными препаратами сравнения.

1. Материал фиксируют в кальций-формоле. Срезы толщиной 10 мкм готовят на замораживающем микротоме.

2. Срезы помещают в дистиллированную воду, затем обрабатывают 0,1 % водным раствором фосфина 3R.

3. Быстро промывают в дистиллированной воде.

4. Заключают в 90 % глицерин или дистиллированную воду, исследуют под флюоресцентным микроскопом.

Результат: липиды, включая эфиры холестерина, дают серебристо-белую флюоресценцию. Исключение составляют жирные мыла и холестерин.

Окраска жирорастворимыми красителями. Для всех жировых красителей единственным общим признаком является отсутствие солюбилизирующих сульфогрупп (SO₃H) или карбоксильных (COOH)-групп. Это диазокрасители, в основном красного цвета.

Судан черный В обладает более выраженными, чем суданы III и IV, красящими свойствами, хотя он может давать и гораздо более слабое окрашивание белков и кислых ГАГ.

Окраска Суданом черным по Лизону:

1) материал фиксируют в кальций-формоле, готовят срезы на замораживающем микротоме или заливают в поливакс;

2) промывают срезы в 70 % спирте;

3) окрашивают Суданом черным (насыщенный раствор Судана В в 70 % спирте, профильтрованный перед использованием) 20 - 30 мин;

4) промывают в 70 % спирте 30 с;

5) быстро промывают в дистиллированной воде;

6) окрашивают 1 % ядерным прочным красным 1 мин;

7) быстро промывают в дистиллированной воде и закладывают в глицерин-желатин или глицерин.

Результат: липиды окрашиваются в цвета от черного до темно-синего, ядра – в красный цвет; окраску воспринимают так-же фосфолипиды.

Для контроля неспецифического окрашивания за счет адсорбции используют экстракцию ацетоном или этанолом.

Гистохимическое выявление фосфолипидов. Для гистохимического выявления фосфолипидов наиболее пригодны методы с использованием кислого гематеина. По методу Бейкера ткани после фиксации в кальций-формоле

подвергают длительному хромированию в бихромат-кальциевой смеси, в результате чего фосфолипиды образуют нерастворимые комплексы с хромом. Эти комплексы реагируют с кислым гематеином, который получают при окислении гематоксилина метайодатом натрия. Связанный с фосфолипидами хром, взаимодействуя с кислым гематеином, образует соединение хром-гематеин темно-синего цвета.

Окраска фосфолипидов кислым гематеином Бейкера в модификации Бухвалова:

1) кусочки размером 2 – 4 мм фиксируют в 2 сменах ацетона с 0,65 % раствором хлорида магния по 60 мин;

2) помещают в ксилол – 2 смены по 5 – 10 мин;

3) переносят в горячий парафин – 2 смены по 30 мин;

4) заливают в парафин и получают срезы;

5) срезы проводят через ксилол – 2 смены по 5 мин;

6) помещают в ацетон с 0,65 % раствором хлорида магния – 2 смены по 5 мин;

7) переносят в дистиллированную воду – 2 смены по 1 мин;

8) помещают срезы в 5 % раствор бихромата калия при 60°C на 4 ч;

9) промывают в нескольких сменах дистиллированной воды;

10) помещают срезы при температуре 37°C на 0,5 – 5 ч в раствор кислого гематеина (50 мг кристаллического гематоксилина растворяют в 50 мл 0,1 % раствора метайодата натрия при нагревании до кипения, охлаждают и добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты);

11) промывают в дистиллированной воде;

12) дифференцируют при комнатной температуре в 0,25 % водных растворах дибората натрия, декагидрата и гексациано-феррата калия 18 ч;

13) промывают в дистиллированной воде;

14) обезвоживают в 2 сменах ацетона с 0,65 % хлоридом магния по 5 мин;

15) проводят через 2 смены ксилола по 5 мин и заключают в бальзам;

16) результат: фосфолипиды окрашиваются в черно-синие тона.

Окраска железным гематоксилином по Элледеру и Лойде для выявления фосфолипидов:

- 1) срезы получают на замораживающем микротоме;
- 2) срез А в сухом состоянии обрабатывают 10 мин при температуре от 0 °С до 4 °С абсолютным ацетоном и высушивают на воздухе. Срез Б при комнатной температуре обрабатывают 10 мин смесью хлороформа с метанолом, а затем быстро промывают в ацетоне и дистиллированной воде;
- 3) срезы А и Б фиксируют в кальций-формоле (5 – 10 мин), а затем промывают в дистиллированной воде;
- 4) оба среза окрашивают смесью растворов I (3 части) и II (1 часть) 6-8 мин;
- 5) раствор I: 298 мл дистиллированной воды + 2 мл концентрированной соляной кислоты + 2,5 г дихлорида железа гексагидрата + 4,5 г сульфата железа гептагидрата;
- 6) раствор II: 1 г гематоксилина растворяют при слабом нагревании в 100 мл дистиллированной воды;
- 7) промывают в дистиллированной воде, затем несколько раз в 0,2 % растворе соляной кислоты;
- 8) хорошо промывают в проточной воде;
- 9) заключают под покровное стекло в глицерин-желатин или после обезвоживания в ацетоне и просветления в ксилоле – в бальзам.

Результат: фосфолипиды окрашиваются в темно-синий цвет. Их можно идентифицировать, лишь сравнив с окрашиванием срезов, обработанных ацетоном и смесью хлороформа с метанолом; последние не должны давать окрашивания, обусловленного присутствием липидов.

Можно использовать также замороженные срезы тканей, фиксированных в формалине. Перед экстракцией ацетоном такие срезы следует подсушить. Продолжительность экстракции в смеси хлороформа с метанолом после фиксации в формалине должна составлять 1 – 2 ч. С помощью обработки срезов гидроксидом натрия после экстракции ацетоном удастся выявить сфингомиелин. Плазмалогены можно удалять с помощью гидролиза в 1 % водном или солянокислом растворе

сулемы в течение 10 мин. Преимуществом этого метода являются быстрота и надежность.

Выявление ненасыщенных липидов. Для гистохимического выявления важна легкая окисляемость ненасыщенных липидов. Продуктом окисления непредельных связей липидов, проводимого с помощью надмуравьиной или надуксусной кислоты, в большинстве случаев являются альдегидные группы, которые могут быть выявлены с помощью реактива Шиффа.

Непредельные связи в липидах ответственны также за восстановление тетраоксида осмия и за превращение его в диоксид осмия (осмиевую чернь).

На связывание тетраоксида осмия, по-видимому, влияет также ориентация липидных молекул в тканях. На этом принципе основан тест Марчи с тетраоксидом осмия на дегенерирванный миелин. Механизм реакции Марчи был детально изучен Adams, который разработал метод одновременного выявления нормального и дегенерированного миелина с помощью тетраоксида осмия и α -нафтиламина.

По Adams, гидрофобные липиды дегенерированного миелина окрашиваются в черный цвет в результате восстановления оксида осмия до его тетраоксида.

Гидрофильные липиды нормального миелина окрашиваются в красный цвет в связи с образованием хелата осмий- α -нафтиламина. Таким образом, этот метод позволяет различать три типа липидов: ненасыщенные гидрофобные (черный цвет), ненасыщенные гидрофильные (красный цвет) и насыщенные (бесцветные). К первому типу относятся олеиновая кислота, триолеин и олеат холестерина, ко второму – лецитин, кефалин, сфингомиелин и цереброзид, к третьему – стеариновая кислота, тристеарин, стеарат холестерина и холестерин.

Если перед реакцией по Адамсу провести гидролиз в 2 н. гидроксида натрия при 37°C в течение 1 ч, то окрашиваются только устойчивые к щелочному гидролизу липиды, из которых наиболее важным в биологическом отношении является сфинго-миелин; также, по-видимому, окрашивается кефалин В.

Окраска с применением тетраоксида осмия и α -нафтиламина по Адамсу:

1) материал фиксируют в кальций-формоле, срезы толщиной от 10 мкм до 15 мкм получают на замораживающем микротоме;

- 2) обрабатывают свободноплавающие срезы 18 мин в смеси, в состав которой входят 1 часть 1 % тетраоксида осмия и 3 части 1 % перхлората калия;
- 3) промывают в дистиллированной воде 10 мин;
- 4) срезы монтируют на покровные стекла;
- 5) обрабатывают 10 - 20 мин при 37 °С насыщенным водным раствором α -нафтиламина (готовят путем добавления анафтил-амин к дистиллированной воде и последующего фильтрования после нагревания до 40 °С);
- 6) промывают в дистиллированной воде 5 мин;
- 7) окрашивают 2 % альциановым синим в 5 % уксусной кислоте от 15 до 60 с (под контролем микроскопии);
- 8) заключают в глицерин-желатин.

Результат: фосфолипиды окрашиваются в оранжево-красный цвет, эфиры холестерина и триглицериды - в черный.

П р и м е ч а н и е - Гидрофобные липиды, окрашенные в черный цвет, во многих случаях могут маскировать имеющиеся в тканях фосфолипиды. В результате гидролиза свободноплавающих срезов в 2 н. растворе гидроксида натрия в течение 1 ч при 37 °С глицерофосфолипиды вымываются, а устойчивые к действию щелочи сфингомиелины сохраняются и окрашиваются в оранжевый цвет. Этот метод выявления надежен лишь при условии предварительной фиксации срезов в абсолютном ацетоне.

Выявление холестерина. Для гистохимического выявления холестерина применяют метод Адамса с хлорной кислотой и нафтохиноном, а также метод Шульцта. В основе последнего лежит окисление холестерина до оксихолестерина под действием ультрафиолетового излучения (в первоначальном варианте) или аммонийных квасцов. Хотя с помощью реакции Шульцта выявляют не только холестерин и его эфиры, метод можно считать достаточно специфичным.

Модифицированная реакция Шульцта для выявления холестерина и его эфиров:

- 1) материал фиксируют в кальций-формоле 2 – 3 дня в холодильнике. Срезы толщиной от 20 мкм до 30 мкм получают на замораживающем микротоме;
- 2) свободноплавающие срезы промывают в нескольких сменах дистиллированной воды 24 ч;

3) срезы помещают на 7 дней при 37 °С в забуференный раствор железоаммонийных квасцов [2,5 % раствор железоаммонийных квасцов (фиолетовые кристаллы) в 0,2 М ацетатном буфере, рН 3,0; окончательная величина рН раствора около 2,0];

4) срезы промывают в 0,2 М ацетатном буфере - 3 смены по 1ч;

5) промывают в дистиллированной воде;

6) переносят в 5 % раствор формалина на 10 мин, а затем монтируют на предметные стекла, осторожно давая жидкости стечь, просушивают фильтровальной бумагой;

7) на покровное стекло наносят одну каплю, смеси равных частей химически чистых уксусной и серной кислот (серную кислоту осторожно, по каплям, добавляют к уксусной кислоте, при этом колбу лучше охлаждать на ледяной бане);

8) перевернутое предметное стекло со срезом осторожно кладут на покровное и слегка прижимают так, чтобы жидкость равномерно распределилась по срезу;

9) препарат сразу же исследуют под микроскопом.

Результат: холестерин и его эфиры через несколько секунд приобретают сине-зеленое окрашивание, через 30 – 60 мин цвет меняется на синий.

Свободный холестерин и другие 3 β -оксистерины могут быть выявлены также на ультраструктурном уровне благодаря их способности образовывать нерастворимые в воде соединения с дигитоксином. Эту реакцию проводят одновременно с альдегидной фиксацией или после нее.

Выявление плазмалогенов. Плазмалогены, или ацетальфосфатиды, - это модифицированные глицерофосфатиды, содержащие ненасыщенный ацеталь с альдегидом. Природа этих альдегидных групп, которые высвобождаются из плазмалогенов под действием сулемы или мягкого кислотного гидролиза, точно неизвестна. В основе метода Фельгена и Фойта лежит выявление реактивом Шиффа высших альдегидов, высвобождаемых из плазмалогенов после непродолжительного воздействия сулемы. Этот же принцип реакции использован в реакции Хайеса.

Плазмалевая реакция по Хайесу:

- 1) материал фиксируют в кальций-формоле 3-6 ч. Срезы получают на замораживающем микротоме;
- 2) срезы прикрепляют к предметному стеклу;
- 3) обрабатывают в 1 – 5 % растворе сулемы 10 мин;
- 4) промывают в 3 сменах дистиллированной воды;
- 5) помещают срезы в реактив Шиффа на 20 мин;
- 6) промывают срезы в 3 сменах сернистой воды по 1 мин;
- 7) промывают в проточной воде 20 мин;
- 8) заключают под покровное стекло в глицерин-желатин.

Результат: в срезах, обработанных сулемой, плазмалогены окрашиваются в красно-фиолетовый цвет.

Контрольные срезы после п. 2 переносят непосредственно в реактив Шиффа; эти срезы, не обработанные раствором сулемы, должны оставаться неокрашенными.

П р и м е ч а н и е - Появление красноватого окрашивания – признак псевдоплазмалевой реакции, обусловленной окислением ненасыщенных липидов. Высвобождаемые в результате гидролиза липиды блокируются с помощью соответствующих реакций сочетания. Реактив Шиффа можно заменить фенилгидразином.

От плазмалевой реакции следует отличать псевдоплазмалевую реакцию тканевых и клеточных компонентов, окрашиваемых реактивом Шиффа при различных условиях.

Химическая природа соединений, дающих псевдоплазмалевую реакцию, неизвестна. Lison выделяет две группы таких соединений. К первой относятся соединения, окрашиваемые реактивом Шиффа без предварительной обработки, содержащиеся в эластиновых волокнах, миелине, некоторых клетках гипофиза, цитоплазме яйцеклеток и нервных волокнах. Во вторую группу входят соединения, реагирующие с реактивом Шиффа после предварительной обработки. В первую очередь это липиды, легко окисляемые йодной кислотой и некоторыми другими слабыми окислителями.

Обычная формалиновая фиксация подавляет плазмалевую реакцию. Интенсивность последней, наоборот, увеличивается при продолжительной фиксации формалином.

Выявление жирных кислот и триглицеридов. Для гистохимического выявления жирных кислот существуют два подхода: образование солей красителя в реакциях жирных кислот с некоторыми основными красителями и омыление жирных кислот солями металлов. Более интенсивно разрабатывается второй подход.

В методе Хольцингера ионы меди, связываемые жирными кислотами, выявляются рубеановодородной кислотой, которая образует с ними окрашенное комплексное соединение.

Выявление жирных кислот по Хольцингеру:

1) срезы нефиксированного материала получают на замораживающем микротоме;

2) обрабатывают 0,05 % водным раствором ацетата меди 3 – 5 ч;

3) промывают в 2 сменах 0,1% раствора динатриевой соли ЭДТА при pH 7,1 по 10с;

4) промывают в дистиллированной воде;

5) обрабатывают в течение 10 мин в 0,1 % растворе рубеановодородной кислоты в 70% спирте (100 мл рубеановодородной кислоты растворяют в 70 мл абсолютного спирта при легком нагревании, после охлаждения раствор доводят до 100 мл дистиллированной водой);

6) промывают несколько минут в 70 % спирте, а затем в дистиллированной воде;

7) окрашивают (в случае необходимости) ядерным прочным красным;

8) заключают в глицерин-желатин.

Можно обезводить в спиртах возрастающей концентрации, провести через ксилол и заключить в бальзам.

Результат: жирные кислоты окрашиваются в зеленовато-черный цвет.

Реакция омыления лежит также в основе метода Адамса для выявления жирных кислот триглицеридов. При этом эфирные связи триглицеридов сначала

расщепляются липазой, а затем высвободившиеся жирные кислоты переводятся в осадок в виде нерастворимых кальциевых мыл.

С целью электронно-микроскопического выявления проводят обмен оснований с образованием свинцовых мыл. Для обнаружения продуктов гистохимической реакции в световой микроскопии препарат обрабатывают раствором сульфида аммония с образованием коричневого осадка сульфида свинца. Специфичность этой реакции может быть проконтролирована с помощью ингибиторов липазы: 0,01 М растворов цинка, свинца, меди и ЭДТА.

Выявление триглицеридов по Адамсу:

1) маленькие кусочки ткани фиксируют в течение 4 ч при 4 °С в 3 % глутаровом альдегиде на 0,067 М какодилатном буфере (рН 7,4);

2) промывают в 7,5 % сахарозе на буфере в течение 18 ч;

3) срезы толщиной 50 мкм получают на замораживающем микротоме;

4) срезы инкубируют в течение 30 мин в среде, в состав которой входят 50 мг панкреатической липазы, 10 мл 2 % раствора хлорида кальция, 15 мл 0,2 М трис-буфера (рН 7,0) и 25 мл дистиллированной воды;

5) тщательно промывают в дистиллированной воде;

6) помещают срезы на 15 мин в 1 % раствор нитрита свинца;

7) промывают в дистиллированной воде;

8) дополнительно фиксируют в 1 % растворе тетраоксида осмия в течение 18 ч;

9) Обезвоживают, заключают.

Результат: в участках прохождения реакции выявляются оптически плотные игольчатые кристаллы свинцового мыла.

6.5 Гистохимия пигментов

Термин «пигменты» охватывает группу веществ, поглощающих свет в видимом спектре и наблюдаемых в неокрашенных клетках и тканях. Под это определение подходят вещества различного происхождения, состава и

функционального назначения. По происхождению пигменты можно разделить на экзогенные (в частности, угольная или известковая пыль, отложения металлов, химиотерапевтических веществ и др.) и эндогенные. Эндогенные пигменты разделяют на гематогенные (например, гемоглобин и его производные) и негематогенные, или аутогенные (например, меланин и жировые пигменты – липофусцины и каротиноиды).

В гистохимическом отношении пигменты мало различаются. Несмотря на то, что химический состав ряда пигментов выяснен не до конца, гистохимически их можно выявить с достаточно высокой степенью надежности, тем более что большинство из них имеет характерную тканевую локализацию.

Выявление гемосидерина и гемоглобина.

Гемосидерин – железосодержащий пигмент, образующийся из гемоглобина в результате внутриклеточных превращений.

Для выявления гемоглобина пригодна реакция псевдопероксидазы с бензидином, а идентификация гемосидерина основана на определении содержащегося в нем железа с помощью реакции Перлса с кислым ферроцианидом.

Кроме того, гемосидерин дает положительную ШИК-реакцию, обусловленную его нахождением в белково-полисахаридном комплексе. Резко положительна реакция этого комплекса с тетразолием после бензотирования.

Выявление гемоглобина бензидином по Пикворту:

- 1) материал фиксируют в формалине, заливают в парафин;
- 2) депарафинированные срезы доводят до воды;
- 3) промывают в метаноле;
- 4) перевернутое стекло со срезом помещают в раствор бензидина (0,2 г бензидина и маленький кристаллик нитропрусида натрия растворяют в 15 мл метанола, добавляют 4 капли ледяной уксусной кислоты и встряхивают) в чашке для окрашивания на 5-10 мин;
- 5) смывают бензидин озонированным эфиром (50 мл 3 % перекиси водорода, 100 мл метанола и 50 мл эфира);
- 6) помещают срез на 10 мин в свежую порцию озонированного эфира;

- 7) Промывают в проточной воде 10-15 мин;
- 8) Докрашивают ядра в 1 % водном растворе нейтрального красного 3 мин;
- 9) Промывают, обезвоживают в спиртах, просветляют в ксилоле и заключают в дистрен-дибутил-ксилол.

Результат: гемоглобин и некоторые «оксидазные» гранулы лейкоцитов окрашиваются в темно-синий цвет, ядра – в красный.

Трехцветный метод выявления билирубина, гемосидерина и липофусцина по Гпеннеру:

- 1) срезы толщиной 10 мкм готовят в криостате, наклеивают на стекла и подсушивают при комнатной температуре;
- 2) погружают на 5 мин в 2 % раствор гексацианоферрата калия;
- 3) обрабатывают 20 мин свежеприготовленной смесью равных частей 2% гексацианоферрата калия и 5% уксусной кислоты;
- 4) ополаскивают в проточной воде и обрабатывают в течение 15 мин 3 % раствором бихромата калия с рН 2,2;
- 5) промывают в воде;
- 6) окрашивают свежепрофильтрованным раствором жирового красного-О в изопропанол 20 мин;
- 7) промывают в проточной воде в течение 5 мин;
- 8) заключают в сироп Апати.

Результат: липофусцины окрашиваются в оранжево-красный цвет, гемосидерин – в синий, билирубин – в темный изумрудно-зеленый.

П р и м е ч а н и е - Гемосидерин растворяется в кислотах, поэтому для его выявления не следует применять кислые фиксаторы.

Выявление желчных пигментов.

Желчные пигменты, как и гемосидерин, являются продуктом разложения гемоглобина и других железосодержащих белков. Основные желчные пигменты – билирубин и биливердин – обладают кислотными свойствами и образуют со щелочноземельными металлами соли, не растворимые в воде. Их идентификация возможна с помощью окраски метиленовым синим, реакций Гмелина и Штейна.

Реакция Гмелина основана на окислении билирубина азотной кислотой, а реакция Штейна – на окислении его йодом. Метод Штейна позволяет выявить все желчные пигменты.

Реакция с йодом на желчные пигменты по Штейну:

- 1) материал фиксируют в формалине или спирте, заливают в парафин;
- 2) депарафинированные срезы доводят до воды;
- 3) обрабатывают 12 – 18 ч йодным реактивом (2 части раствора Люголя и 1 часть 10 % раствора йода на 96 % спирте);
- 4) промывают в проточной воде 5 мин;
- 5) обесцвечивают 5 % раствором тиосульфата натрия 30 с;
- 6) промывают и докрашивают квасцовым кармином Майера 3 – 18 ч;
- 7) промывают в воде, обезвоживают абсолютным ацетоном, просветляют в ксилоле и заключают в бальзам.

Результат: желчные пигменты окрашиваются в темно-зеленый цвет, ядра – в красный.

Выявление меланина.

Меланин имеет сложную полимерную структуру и обычно окрашен в черно – коричневый цвет, хотя имеются и другие оттенки – до желтого и даже фиолетового. Как правило, он встречается в форме гранул – меланосом – в клетках тканей эктодермального происхождения – в эпидермисе, волосах, волосяных фолликулах, меланомах кожи, пигментном эпителии радужки, сетчатке. В нервной системе присутствует разновидность меланина – нейромеланин.

Меланин синтезируется в промеланосомах через окисление тирозина до ДОФА при участии тирозиназы и пероксидазы. На этом основаны методы специфического контрастирования и электронно-микроскопического гистохимического выявления промеланосом по положительной реакции на тирозиназу.

Выявление меланина основано на его способности образовывать комплексы с ионами двухвалентного железа, которые легко обнаруживаются

гексацианоферратом калия в реакции турнбулевой сини. На этом принципе основан метод Лили.

«Железный» метод выявления меланина по Лили:

- 1) материал фиксируют в различных смесях, заливают в парафин;
- 2) депарафинированные срезы доводят до воды;
- 3) помещают в 2,5 % раствор сульфата железа гептагидрата на 60 мин;
- 4) промывают в 4 сменах дистиллированной воды по 5 мин;
- 5) помещают в 1 % раствор гексацианоферрита (III) калия в 1 % уксусной кислоте на 30 мин;
- 6) промывают в 1 % уксусной кислоте;
- 7) при желании докрашивают пикрофуксином по Ван-Гизону;
- 8) проводят через спирт возрастающей концентрации и ксилол, заключают в бальзам.

Результат: меланин окрашивается в темно-зеленый цвет на бесцветном фоне; такой же цвет имеет гемосидерин.

Меланин, как и липофусцин, обладает способностью восстанавливать раствор аммиачного серебра. На этом основан принцип электронно-микроскопического гистохимического выявления промеланосом и меланосом по Мисиме. Раздельное выявление меланина и липофусцина возможно по их разному окрашиванию нильским синим. Кроме того, липофусцин в отличие от меланина дает видимую собственную флюоресценцию в ультра-фиолетовом свете.

Импregnация серебром промеланосом и меланосом по Мисиме:

- 1) маленькие кусочки ткани фиксируют в 10 % формальдегиде на фосфатном буфере (рН 7,4) в течение 1 ч при 4 °С;
- 2) тщательно промывают в дистиллированной воде;
- 3) инкубируют в растворе аммиачного серебра 40 - 60 мин при 58 °С;
- 4) промывают в нескольких сменах дистиллированной воды;
- 5) кусочки ткани помещают на 1 - 2 мин в раствор трихлорида золота (5 мл 6 % тиосульфата натрия смешивают с 5 мл 6 % тиоцианата аммония и добавляют по каплям 2 % раствор трихлорида золота до образования розовато-красного осадка).

6) кусочки ткани помещают сразу в 0,6 % раствор тиосульфата натрия на 8 мин;

7) тщательно промывают в дистиллированной воде;

8) дополнительно фиксируют в 0,6 % забуференном растворе перманганата калия или в 1 % забуференном растворе тетраоксида осмия (рН 7,4) 1 ч при 4 °С;

9) обезвоживают и заливают.

Результат: серебрятся меланосомы и премеланосомы.

Гранулярные отложения металлического серебра выявляются и в тех премеланосомах, в которых меланин не образуется (у альбиносов).

Выявление липофусцина и меланина с применением нильского синего по Лили:

1) материал фиксируют в любом фиксаторе, заливают в парафин;

2) депарафинированные среды доводят до воды;

3) окрашивают в течение 20 мин 0,05 % раствором нильского синего А в 1 % серной кислоте;

4) промывают в проточной воде 10 – 20 мин;

5) можно также быстро ополоснуть в 1 % растворе серной кислоты и обезводить в 4 порциях абсолютного ацетона;

6) заключают после пункта 3 в глицерин-желатин или после п. 4 проводят через ксилол и заключают в синтетическую среду.

Результат: если обработка включала пункты 4 и 6, то липофусцины окрашиваются в темно-синий или зеленый цвет, меланин – в темно-зеленый; при обработке с включением пунктов 5 и 6 меланин окрашивается в темно-зеленый цвет, а липофусцины сохраняют свою первоначальную окраску.

Метод дифференцировки меланина от липофусцина по Хуэку:

1) материал фиксируют в любом фиксаторе, заливают в парафин;

2) депарафинированные срезы помещают в дистиллированную воду;

3) срезы окрашивают свежеприготовленным насыщенным водным раствором нильского синего 30 мин;

4) промывают в дистиллированной воде;

5) обесцвечивают 10 % перекисью водорода 24 ч;

- 6) промывают в проточной воде;
- 7) заключают в глицерин–желатин.

Результат: липофусцин окрашивается в синий цвет, меланин в результате обработки перекисью водорода обесцвечивается.

Выявление жировых пигментов. Наряду с липофусцином к жировым пигментам относятся гемофусцин, цероид, псевдомеланин, железосодержащие липопигменты и каротиноиды.

Липофусцин обладает выраженной базофилией и сильной восстанавливающей способностью, на чем основана реакция Шморля - основная реакция на липофусцин. Липофусцин окрашивается также нильским синим.

Выявление кислотоустойчивых липофусцинов по Цилю – Нильсену.

- 1) материал фиксируют в различных смесях, заливают в парафин;
- 2) депарафинированные срезы доводят до дистиллированной воды;
- 3) окрашивают срезы в течение 3 ч при 60 °С в растворе карбол-фуксина (10 г основного фуксина + 50 г фенола + 100 мл спирта + 1000 мл дистиллированной воды);
- 4) промывают в проточной воде;
- 5) дифференцируют в 1 % солянокислом спирте до тех пор, пока эритроциты не станут розовыми;
- 6) промывают в дистиллированной воде;
- 7) докрасивают в железных квасцах или 0,5 % растворе толуидинового синего.
- 8) промывают в проточной воде;
- 9) обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации, проводят через ксилол, заключают в бальзам.

Результат: кислотоустойчивые липофусцины окрашиваются в ярко-красный цвет, а липопропротеиды приобретают красноватый оттенок; ядра окрашиваются в темно-синий или синий цвет.

Примечание - Из-за базофилии липофусцинов слишком сильная докраска обуславливает развитие темно-красного окрашивания.

В присутствии фенола растворимость красителей в липидах повышается.

Метод Шморля для выявления липофусцина:

1) материал фиксируют в формалине, заливают в парафин или получают срезы на замораживающем микротоме;

2) срезы промывают в дистиллированной воде;

3) помещают срезы на 5 – 20 мин в реакционную смесь [3 части 1 % раствора дихлорида железа смешивают с 1 частью 1 % раствора гексацианоферрата (III) калия; смесь используют в течение 30 мин после приготовления];

4) срезы хорошо промывают в проточной воде. В особенно важных случаях рекомендуется проводить микроскопию срезов, заключенных в воду;

5) быстро обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации, проводят через ксилол, заключают в бальзам.

Результат: липофусцин и меланин окрашиваются в темно-синий цвет.

Кроме того, положительную реакцию дают аргентаффиновые гранулы, а также ткани, содержащие активные SH-группы.

Примечание. После пункта 4 можно провести окрашивание ядер 1 % нейтральным красным в течение 3 мин.

6.6 Основы иммуноцитохимического анализа

Идея локализации антигенов в тканях с помощью антител впервые была реализована в начале 40-х гг. Впоследствии иммуноцитохимические методы стали широко применяться в молекулярной клинической диагностике, а с середины 70-х гг., после открытия моноклональных антител, их роль еще более возросла.

Иммуноцитохимические методы позволяют локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые компоненты (антигены), основываясь на их связывании с антителами. Место связывания определяют при помощи меченых антител или методом вторичного мечения. Использование такого подхода для выявления патологии на клеточном уровне позволяет детально исследовать функции и химический состав клеток и сопоставлять полученные результаты с известными

морфологическими данными, что дает возможность глубже проникнуть в суть патологического процесса.

Использование антител лежит в основе исследований самых разных молекулярных образований: структурных компонентов клетки, клеточных продуктов (гормонов, ферментов, иммуноглобулинов), рецепторов на клеточной поверхности и т. д. Большинство антител связываются с компонентами и продуктами нормальных клеток, но некоторые специфичны в отношении антигенов, характерных для раковых клеток. Такие антитела использовались в качестве маркеров при исследовании процессов дифференцировки и трансформации клеток злокачественных новообразований. Однако наивно полагать, что с помощью антител можно прямо идентифицировать раковые клетки, скорее антитела лишь указывают на изменения картины генной экспрессии.

Выбор иммуноцитохимического метода.

Из всего многообразия иммуноцитохимических методов (ИЦХ), играющих важную роль в молекулярной клинической диагностике, нужно выбрать один, наиболее приемлемый для данной лаборатории. При этом выборе возникают следующие вопросы; как готовить, фиксировать и обрабатывать препараты тканей? Какие антитела и какую систему иммунодетекции использовать? Такое разнообразие методов дает большие преимущества при проведении научных исследований, но их использование в диагностических целях сопряжено с рядом ограничений, и выбор оказывается не таким уж большим. Выбирая тот или иной иммуноцитохимический метод для рутинной диагностики, учитывают следующие факторы:

1. Чувствительность.

Чувствительный метод позволяет выявлять даже небольшие количества антигена при минимальном фоновом окрашивании. Это зависит от avidности, аффинности и титра первых антител, а также от чувствительности метода детекции. Конечно, для точной диагностики лучше пользоваться высокочувствительными методами, но при выборе приходится учитывать их стоимость и быстроту.

2. Достоверность и воспроизводимость результатов.

При рутинном тестировании гораздо важнее воспроизводимость результатов, чем чувствительность метода. Так, простой метод, который состоит из небольшого числа процедур и использует обычные реактивы, дает меньше ошибок.

3. Стоимость.

С учетом стоимости реактивов и оборудования, а также времени, затрачиваемого на тестирование, иммуноцитохимические анализы могут быть довольно дорогими. Снизить их стоимость без ухудшения результатов может тщательный предварительный отбор.

4. Универсальность.

Метод должен быть пригоден для анализа всех типов тканей и их препаратов.

5. Возможность автоматизации и окрашивания партий препаратов.

6. Безопасность. Выбор метода может зависеть и от личных предпочтений исследователя.

Изготовление препаратов

Как правило, в диагностических лабораториях для анализа используют кусочки ткани, фиксированные формалином, залитые в парафин и нарезанные с помощью стеклянного ножа. Эта схема применяется десятки лет и была разработана исходя из того, что гистопатологи используют для диагностики исключительно морфологические критерии.

Для иммуноцитохимиков, которых интересуют биологические характеристики препарата, она может оказаться неприемлемой. Главная проблема состоит в том, что при заливке в парафин и последующем изготовлении срезов могут разрушиться как раз те компоненты ткани, которые хотят исследовать. Так, возможна полная или частичная утрата этих компонентов, их химические изменения, маскирование антигена. Совершенство системы иммуномечения или уникальность первых антител не имеют значения, если антиген утрачен или не доступен для антитела.

Следовательно, важно помнить, что круг антигенов, которые можно выявить на парафиновых срезах уже, чем на замороженных. Поэтому решение вопроса о том, фиксировать или замораживать препарат, зависит от выявляемых антигенов.

Тканевые срезы

Изготовление препаратов. Процедура фиксации или замораживания препаратов для ИЦХ должна быть очень быстрой, чтобы максимально сохранить антигенные компоненты и морфологию ткани и не допустить лизиса клеток, приводящего к потере и диффузии антигенов.

Большинство хирургических биоптатов, если они хранятся нефиксированными в течение 24 ч при температуре 4 °С, остаются интактными. Очень маленькие биоптаты, которые исследуют в нефиксированном виде, необходимо предохранять от высыхания. Их транспортируют, завернув в смоченную солевым раствором марлю или поместив в специальную среду. ИЦХ-методами можно исследовать также образцы ткани, полученные при аутопсии, при этом чем быстрее начат анализ, тем лучше результаты. Ряд антигенов, например, некоторые онкогенные белки или факторы роста, сохраняют целостность только при немедленном замораживании препарата.

Качество срезов. При любом способе приготовления срезы должны быть ровными, достаточно тонкими, однородными по толщине; помещать их нужно на чистые предметные стекла. Надорванные или «жатые» срезы должны быть отбракованы, поскольку все эти неоднородности затрудняют интерпретацию результатов.

Прикрепление срезов к предметным стеклам. Серьезной проблемой является потеря тканевых срезов во время окрашивания. Вероятность потерь высококачественных и достаточно сухих срезов меньше, но при работе с некоторыми тканями и длительных исследованиях она остается весьма высокой. В таких случаях можно покрывать стекла специальными адгезивами, не влияющими на последующие процедуры.

Обычно при работе со срезами, приготовленными методом замораживания – высушивания, и с парафиновыми срезами, которые легко отделяются от подложки, мы покрываем стекла желатиной с алюмохромовыми квасцами. Плохо прилипают к стеклу ткани, подвергнутые кислотной декальцификации или недостаточно хорошо обработанные. Если срезы предварительно обрабатывают протеолитическими

ферментами, то желатинового покрытия может оказаться недостаточно для прочного прилипания срезов. В таких случаях можно использовать более сильные адгезивы, например поли-L-лизин или органосилан.

Покрытие предметных стекол желатиной с алюмохромовыми квасцами.

1. Растворяют 2,5 г желатины в 500 мл дистиллированной воды, нагревая раствор до 50 °С при постоянном помешивании.

2. После растворения желатины добавляют 0,25 г алюмохромовых квасцов и хорошо перемешивают раствор.

3. Охлаждают раствор до комнатной температуры и хранят его при 4 °С.

4. Перед использованием нагревают раствор до 60 °С и фильтруют в химический стакан.

5. Погружают в раствор чистые предметные стекла, не касаясь их поверхностей. Вынимают стекла, помещают их на подставку и сушат в термостате при 60 °С не менее 1 ч. После охлаждения стекла можно хранить в коробках при комнатной температуре.

Криостатные срезы

Криостатные срезы лучше других подходят для выявления широкого спектра антигенов, однако при этом необходимо, чтобы образцы тканей были получены и хранились соответствующим образом, а в ходе фиксации и приготовления срезов не нарушилась морфология ткани и сохранились антигены.

1. Замораживание и хранение образцов.

Идеальными для получения криостатных срезов являются образцы ткани размером не более 10 x 10 x 5 мм, маркированные и быстро замороженные в жидком азоте. Иногда для ускорения замораживания применяют изопентан, охлажденный в жидком азоте. Большинство лабораторий пренебрегают этим приемом, однако если есть опасность физической деформации ткани (например, мышечной), такая процедура может оказаться весьма полезной. Замороженные образцы следует хранить в жидком азоте или в морозильнике при минус 70 °С, а во время приготовления срезов температура не должна превышать минус 20 °С. Необходимо

иметь в виду, что при длительном хранении образцов ткани при низкой температуре происходит их усыхание.

Замороженные ткани лучше всего держать в плотно закрытых пластиковых флаконах. Кусочек ткани помещают во флакон таким образом, чтобы его не пришлось размораживать перед приготовлением срезов, и заливают средой, обеспечивающей оптимальные условия разрезания при данной температуре (optimal cutting temperature, OCT, Miles Scientific, UK). Затем флакон маркируют, быстро замораживают и оставляют на хранение. Этот способ позволяет избежать отбора неоправданно больших образцов тканей и свести к минимуму их усыхание. По мере необходимости образцы вынимают из морозильника и сразу же помещают в криостат для приготовления срезов. Когда температура повысится до минус 20 °С, кусочек ткани вместе с заливочной средой вынимают из флакона и закрепляют в держателе с соответствующей OCT. Чтобы не возникало проблем с выниманием ткани, лучше не пользоваться круглодонными флаконами с резьбой; оптимальными являются полиэтиленовые флаконы объемом 2,5 мл фирмы Kartell, UK. После приготовления срезов оставшийся кусочек ткани вновь помещают во флакон, заливают OCT и хранят в жидком азоте.

2. Приготовление срезов

Чаще всего работают со срезами толщиной от 4 мкм до 6 мкм. Приготовленные срезы помещают на стекло и высушивают на воздухе при комнатной температуре не менее 30 мин, а при температуре 4 °С – до 24 ч. Если срезы не окрашены, то стекла заворачивают в алюминиевую фольгу попарно, срезами наружу, и помещают в холодильник. При минус 20 °С срезы можно хранить месяцы и даже годы. Когда понадобится проводить иммуноцитохимический анализ, стекла вынимают из холодильника, не разворачивая фольгу до тех пор, пока стекла не прогреются до комнатной температуры. Это позволяет избежать скапливания на стеклах конденсата, заметно изменяющего морфологию ткани. Подобным способом с небольшими модификациями можно готовить замороженные срезы любых тканей. Иногда уменьшают время высушивания, чтобы сохранить особенно неустойчивые антигены. Определенные трудности возникают при приготовлении срезов

трепанобиоптатов костного мозга, которые применяют при исследовании лейкозов и других гематологических нарушений. Если костный мозг гиперклеточный, то образцы можно обрабатывать точно так же, как другие ткани, и резать обычным стальным ножом. Твердую костную ткань - если она присутствует в образце в большом количестве - лучше удалить, поскольку она не представляет интереса для анализа.

Спикулы, пронизывающие костный мозг, обычно хорошо режутся, хотя и при более низкой температуре. Чтобы срезы получались более качественными, кусочек ткани следует ориентировать под прямым углом к режущей кромке ножа. Это особенно важно, когда для получения срезов хорошего качества требуется прочное их прилипание к стеклу и когда срезы делают острым лезвием бритвы. Использование агентов, удаляющих из тканей кальция, необязательно и может только ухудшить их антигенные свойства и морфологию. Разработанный метод удаления кальция требует продолжительного времени и не очень удобен для диагностических исследований. Если не удастся получить удовлетворительные срезы, то лучше использовать для ИЦХ-анализа «столбики» трепанобиоптатов. Их готовят, как любые другие цитологические препараты, но, конечно, до замораживания трепанобиоптата. Когда нужны более толстые замороженные срезы, можно использовать свободно плавающие срезы, сделанные на замораживающем микротоме. Окрашивание таких срезов улучшает их проницаемость для антител, но при этом может понадобиться дополнительная обработка срезов, например, детергентами.

Не следует делать замороженные срезы, если имеются хоть какие-то подозрения на присутствие в ткани инфекционных агентов. Таких агентов можно выявить окрашиванием фиксированных и заключенных в парафин тканей, и если они обнаружены, то необходимо провести дезинфекцию или вообще отказаться от приготовления срезов. При исследовании тканей больных, инфицированных ВИЧ или другими вирусами, образцы обрабатывают β -проприолактоном, который инактивирует вирусы, не влияя на антигенные свойства ткани.

Фиксация

Как показывает наш опыт, наилучшим фиксатором замороженных срезов является абсолютный ацетон; фиксацию проводят при комнатной температуре или при 4 °С.

Срезы погружают в ацетон на 10 мин, а затем высушивают на воздухе. Антитела или блокирующие вещества наносят непосредственно на сухой срез. Для лучшего сохранения морфологии ткани и некоторых антигенов разработано несколько альтернативных способов с использованием смеси периодата натрия, лизина и параформальдегида.

Ценность такой обработки состоит в том, что при этом можно транспортировать ткани до их фиксации.

Приготовление замороженных срезов для иммуноцитохимического анализа.

1. Делают криостатные срезы быстрозамороженных кусочков тканей толщиной 5 мкм и высушивают их на воздухе. Если в течение суток срезы не будут окрашены, заворачивают предметные стекла в фольгу, надписывают и хранят при минус 20 °С. По мере надобности вынимают стекла из холодильника, разворачивая фольгу только после того, как стекла прогреются до комнатной температуры.

2. Указывают на стеклах названия антител, используемых для мечения.

3. В течение 10 мин фиксируют срезы на стеклах в ацетоне при комнатной температуре.

4. Высушивают стекла на воздухе. Антитела наносят прямо на сухой срез.

Парафиновые срезы

Как мы уже говорили, тканевые антигены могут утрачиваться на каждом этапе приготовления парафиновых срезов. И все же с помощью рутинных гистологических методов удается выявить достаточно большое число антигенов, что позволяет решать многие важные диагностические проблемы. Чтобы добиться лучшего окрашивания препаратов, следует иметь в виду несколько моментов.

1 Фиксация.

Наиболее удобными гистологическими фиксаторами, позволяющими сохранить морфологию ткани, являются растворы на основе формалина. К

сожалению, они отрицательно влияют на сохранность антигенов, особенно при длительной фиксации, но пока какой-либо замены формалину при проведении рутинных гистологических исследований не найдено. Если есть возможность получать свежие образцы ткани, то лучше использовать фиксаторы, наиболее подходящие для ИЦХ, например периодат-лизин-параформальдегид (ПЛП) и ПЛП-бихромат.

Однако это предполагает, что специалист по молекулярной диагностике заранее знает, какие именно исследования ему предстоит проводить, а это бывает нечасто. Полагают, что одни антигены формалин разрушает полностью, число других при таком способе фиксации снижается незначительно, третьи маскируются. Один из способов расширения круга антигенов, поддающихся выявлению в фиксированных формалином и заключенных в парафин тканях, состоит в применении более чувствительного метода детекции, позволяющего обнаруживать даже незначительные количества антигенов. Другой подход заключается в обработке срезов протеолитическими ферментами до их иммуноокрашивания. Прежде чем рассматривать этот метод, стоит вкратце остановиться на механизме фиксации тканей формалином. В его основе лежит образование метиленовых мостиков между аминокетильными группами белков. Такое поперечное сшивание может маскировать те участки молекул, которые должны были бы связаться с антителами; именно для разрушения сшивок срезы и обрабатывают ферментами.

Обработка протеолитическими ферментами.

Для этой цели используют несколько ферментов. Среди них:

- трипсин;
- протеаза;
- пепсин;
- протеиназа;
- проназа;
- фицин.

Выбор фермента зависит от:

- времени фиксации;

- характера фиксирующего агента;
- выявляемого антигена.

Ферментативная обработка необходима не всегда. Она неприемлема, если нужно выявить антигены, разрушающиеся при протеолизе. В любом случае ее следует проводить с осторожностью, поскольку слишком длительная инкубация срезов с ферментом ухудшает качество окрашивания и изменяет морфологию ткани. Кроме того, для лучшей повторяемости результатов необходимо помнить следующее:

- нужно использовать свежеприготовленные растворы, а фермент добавлять в предварительно прогретый раствор;
- прежде чем наносить на предметные стекла раствор с ферментом, их необходимо прогреть до нужной температуры;
- для прогрева растворов и их хранения лучше использовать водяную баню, а не термостат.

Обработка протеолитическими ферментами парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином.

Материалы:

- раствор трипсина: 0,1 % (в/о) трипсин типа II (ICN Biochemicals 150213) в 0,1 % CaCl₂, pH 7,8 (pH доводят с помощью 0,1 % NaOH или 2 % HCl). Прежде чем добавлять трипсин, прогревают раствор CaCl₂ до 37 °С не менее 15 мин в водяной бане. Трипсин хранят при 4 °С;
- раствор протеазы; 0,0125 % (в/о) бактериальная протеаза типа -XXIV (Sigma P-8038) в буфере 50 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,6 (ТСБ) при 37 °С. Протеазу хранят в сухом виде при температуре ниже 0 °С. Прежде чем добавлять ее, буфер прогревают не менее 15 мин в водяной бане;
- раствор пепсина: 0,4 % (в/о) пепсин (Sigma P-7012) в 0,01 M HCl, pH 2,0.

Методика:

1) готовят по обычной методике гистологические срезы толщиной от 4 мкм до 5 мкм. Высушивают их при 37 °С в течение ночи или при 60 °С в течение 1 ч. Надписывают стекла, указывая наносимые на срезы антитела;

- 2) удаляют парафин со срезов в трех сменах ксилола, по 2 мин в каждой смене;
- 3) проводят срезы через батарею спиртов, 100 %, 100 %, 70 %, по 2 мин в каждом;
- 4) тщательно промывают срезы водопроводной водой, а затем споласкивают в дистиллированной воде;
- 5) прогревают срезы в дистиллированной воде при 37 °С в течение 5-10 мин;
- 6) стряхивают со стекол воду и помещают их в раствор трипсина, протеазы или пепсина;
- 7) останавливают ферментативную обработку, опустив стекла со срезами в дистиллированную воду, а затем в ТСБ.

Антитела и блокирующий раствор следует наносить на влажные, а не на сухие срезы.

Продолжительность протеолитической обработки зависит от перечисленных выше факторов. Кроме того, иногда нужно учитывать и длительность фиксации ткани. Поэтому для каждого из антител необходимо проводить пробные обработки, с тем, чтобы подобрать оптимальные условия протеолиза в тканях, приготовленных обычным способом. Если условия приготовления отличались от стандартных, требуются дополнительные предварительные исследования.

При фиксации тканей отличными от формалина фиксирующими агентами протеолиз может оказаться необязательным благодаря другому механизму фиксации. Более того, обработка ферментами может быть даже противопоказана. Так, при фиксации агентом Карнуа фермент полностью изменяет морфологию ткани. Поэтому при проведении молекулярно-диагностических тестов следует помечать кусочки тканей, не фиксированных формалином, особенно если предполагается провести ИЦХ-анализ.

2 Выбор блока ткани. Лучше всего окрашиваются свежefиксированные, маленькие или среднего размера кусочки (блоки) ткани. Кроме того, для их окраски требуется меньше реактивов. Когда имеется большой блок ткани, но предполагается

исследовать лишь его часть или если ткань гомогенна, следует разрезать блок на несколько кусочков, удобных для работы.

3 Высушивание срезов. При высокой температуре или длительном нагревании антигены могут денатурировать. Обычно для высушивания при 37 °С достаточно 8-24 ч. Если требуется провести срочный анализ, можно прогреть срезы при 60 °С в течение 15-60 мин. При выявлении особенно нестабильных антигенов высушивание лучше проводить при комнатной температуре.

4 Депарафинирование. Как и при всех способах окрашивания, очень важно полностью удалить со срезов парафин и соответствующие растворители. Если на срезах останутся следы парафина, то не все антитела смогут проникнуть в ткань и срез окрасится неравномерно.

Парафин удаляют в трех сменах ксилола, по 2 мин в каждом. Если используются растворители на основе эфирных масел цитрусовых, то стекла выдерживают в них дольше. Перед тем как промыть срезы водой, их следует провести через три смены спиртов (100 %, 100 %, 70 %), по 2 мин в каждой.

5 Хранение блоков тканей. Блоки, залитые в парафин, хорошо хранятся при комнатной температуре. На устойчивых к формалину антигенах такое хранение не сказывается или сказывается очень незначительно. Можно привести примеры целого ряда успешных исследований блоков ткани, зафиксированных 30 лет назад или хранящихся даже более 150 лет.

6 Декальцификация. Приготовление качественных срезов осложняется наличием в тканях, особенно в костной, солей кальция, которые желательно удалить после фиксации. Для этого имеется широкий выбор реактивов, различающихся по своей способности влиять на сохранность антигенов. Как правило, большинство антигенов сохраняется в присутствии хелатирующих веществ. Приемлема и непродолжительная обработка некоторыми кислотами.

Альтернативные методы получения срезов

Разработан ряд методов получения срезов, позволяющих сохранить гистологические свойства тканей в такой же степени, как в фиксированном формалином материале, и их антигенный состав - как в криостатных срезах. Помимо

методов, в которых используются альтернативные фиксаторы, представляет интерес метод лиофилизации.

1 Срезы, полученные из лиофилизованных блоков Ткани замораживают, лиофилируют и заключают в парафин. Срезы таких блоков можно готовить так же, как срезы любого парафинового блока. Поскольку фиксация и обработка растворителями не проводится, в залитой в парафин ткани сохраняется значительно больше антигенов и не изменяется морфология.

При резке таких парафиновых блоков требуется особая осторожность, поскольку ткани становятся хрупкими. Готовые срезы плавают в ванночке с водой (но не со спиртом) при температуре от 25°C до 28 °C. Срезы можно осторожно расправить на прогретом столике, а затем подсушить при температуре 37 °C. Залитые в парафин блоки ткани можно хранить при комнатной температуре, однако в случае длительного хранения лучше держать их при температуре от минус 20°C до 4 °C. Аналогично, если срезы не будут использованы сразу после высушивания, их хранят при минус 20 °C точно так же, как замороженные срезы.

2 Срезы, заключенные в смолу. Долгое время считалось, что для проведения ИЦХ нельзя использовать срезы тканей, заключенных в гликольметакрилат (ГМА). Однако оказалось, что при соответствующих модификациях этого метода в тканях сохраняется достаточно много антигенов. Результаты получаются лучше, если образцы обрабатывают при низкой температуре. Имеют значение также типы используемых фиксатора, смолы, катализаторов и пластификаторов. В связи с небольшой толщиной получающихся срезов лучше применять высокочувствительные методы детекции, а также обрабатывать срезы протеолитическими ферментами.

Мазки

Иммуноцитохимические методы - полезное подспорье для идентификации клеток крови и тканевых жидкостей, а также для исследования препаратов, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ).

Изготовление препаратов. Препараты для ИЦХ могут быть трех типов:

1) отпечатки;

2) мазки, полученные подходящими цитологическими или гематологическими методами;

3) препараты, полученные центрифугированием клеточных суспензий. Последний метод предпочтителен, когда в распоряжении исследователя имеются биологические жидкости с небольшим количеством клеток, жидкости, полученные методом ТАБ или содержащие много белка, который нужно отмыть перед иммуноокрашиванием.

Центрифугирование материала, полученного методом ТАБ:

1) собирают материал, полученный при тонкоигольной аспирационной биопсии, в среду RPMI (Gibco, UK);

2) центрифугируют при 600 g в течение 5 мин;

3) удаляют супернатант и ресуспендируют осадок в 3 мл этой среды;

4) с помощью лабораторной центрифуги (например, cytopspine machine фирмы Shandon, UK) при скорости 550 об/мин наносят суспензию на предметные стекла (из 3 мкл суспензии получают 12 препаратов, по 250 мкл на препарат);

5) высушивают стекла и, если не требуется срочного окрашивания, хранят их при минус 20 °С завернутыми в алюминиевую фольгу.

Аналогичные процедуры, за исключением п. 1, можно использовать при работе с другими цитологическими жидкостями.

Если в образце содержится много сывороточных белков, желательно промыть клетки еще раз, т. е. повторить пункты 2 и 3.

Когда концентрация клеток в образцах велика и, особенно, когда образуются агрегаты, затрудняющие приготовление мазков, заключают клеточный препарат в агар, фиксируют формалином, проводят через парафин и готовят срезы, как с случае парафиновых блоков. Иногда (аспираты костного мозга или препараты ТАБ) формируют из клеток «шарик», заключают его в ОСТ, замораживают и готовят криостатные срезы. Заметим, что препараты из некротизированных тканей и препараты с большим содержанием эритроцитов или со следами мокроты, как правило, малопригодны для проведения иммуноцитохимического анализа.

Фиксация. Для исследования клеточных мазков с помощью ИЦХ используют следующие фиксаторы:

- ацетон;
- эфир/спирт;
- метанол;
- ацетон/фосфатно-солевой буфер (ФСБ);
- этанол;
- ацетон /ФСБ/формалин;
- формалин;
- ацетон/цитратный буфер.

Тип реактива и продолжительность обработки зависят от природы исследуемых антигенов. Наш опыт показывает, что лучше остановиться на несложном универсальном методе с одинаковым режимом обработки всех цитологических препаратов. Мы фиксируем препараты в смеси ацетон: метанол (1:1, о/о) в течение 90 с или – для лучшего сохранения морфологии – в смеси ацетон: метанол: формалин (19:19:2, о/о). После фиксации предметные стекла промываем в двух сменах триса или ФСБ не менее 5 мин.

Не следует фиксировать влажные препараты, поскольку продолжительное воздействие спиртовых растворов может повлиять на антигенные свойства тканей.

Изготовление цитологических препаратов для иммуноцитохимии.

1. Высушенные на воздухе мазки или препараты, полученные центрифугированием клеточных суспензий, обрабатывают рутинным способом. Если их не предполагается окрасить в течение суток, стекла заворачивают в фольгу, надписывают и хранят при минус 20 °С. По мере надобности вынимают стекла из холодильника, не разворачивая фольги, пока они не прогреются до комнатной температуры.

2. Помечают на стеклах, какие антитела используются. С помощью алмазного маркера, стеклографа или специального иммуноцитохимического карандаша (Dako) обводят препарат в кружок.

3. Фиксируют препараты в смеси ацетон : метанол (50:50) при комнатной температуре в течение 2 мин.

4. Промывают стекла в ТСБ, рН 7,6, в течение 2 мин. Перед нанесением на препарат антител или блокирующей сыворотки удаляют излишки буфера.

Первые антитела

В распоряжении исследователей имеется богатый выбор антител к антигенам тканей человека. Многие из них уже давно используются для диагностики, другие лишь недавно охарактеризованы и только вводятся в практику. Заинтересованный читатель найдет многочисленные примеры их использования в работах.

Выбор антител для целей диагностики зависит от того, какую именно патологию предполагается выявить. Другой важный критерий – стоимость. Необходимо также учитывать специфичность и титр антитела, его сродство (аффинность) к антигену-мишени.

Проверка антител

Если вы только приступаете к работе с данным антителом, необходимо:

1) определить специфичность антитела; для этого полезно использовать блоки замороженных или заключенных в парафин тканей;

2) определить подходящую рабочую концентрацию (разведение) для используемой системы иммуномечения;

3) выбрать режим фиксации и обработки ткани, включая протеолиз; лучше использовать фиксаторы, наиболее употребительные в данной лаборатории.

Хранение антител и работа с ними

К антителам, имеющимся в продаже, прилагается инструкция, в которой указаны условия их хранения, оптимальные для поддержания активности. Не обязательно хранить все антитела при 4 °С, некоторые из них лучше держать при минус 20 °С, разлив препарат после предварительного анализа свойств антител в подходящие емкости. С одной стороны, хранение при 4 °С может отрицательно сказаться на целостности антител, а с другой – повторное замораживание и оттаивание препарата приводит к еще более быстрому их разрушению.

Системы иммуномечения

Разрабатывая и совершенствуя системы иммуномечения, преследуют две цели:

- 1) повышение чувствительности методов визуализации сайтов связывания антител с антигенами;
- 2) создание более универсальных методов.

Для этого можно использовать более легко обнаруживаемые метки или применять методику связывания с каждым антигеном большего количества метки.

Выбор системы иммуномечения

Наиболее простая процедура состоит в непосредственной конъюгации метки с антителом (или антителами) к данному антигену и нанесении конъюгата на срез в один прием прямым методом.

Этот метод довольно прост, но не очень чувствителен; кроме того, при работе с данной антисывороткой можно использовать только один метод. Известен и другой, более совершенный непрямой метод. В этом случае тканевые срезы инкубируют с немечеными первыми антителами, а затем – со вторыми, мечеными антителами к видам – донорам первой антисыворотки. Такой метод позволяет использовать одно меченое антитело с большим числом первых антител при условии, что последние происходят от одного вида. Поскольку с первым антителом связывается целый ряд антител из второй антисыворотки, чувствительность метода возрастает. Чувствительность можно также повысить, используя третий компонент, меченое антитело к виду - донору второй антисыворотки. Это так называемый трехэтапный, или усиленный непрямой метод.

Разработаны и другие системы иммуномечения. Одни из них используются довольно часто, другие – только в исследовательских целях, но представляют несомненный интерес для молекулярной клинической диагностики.

Пероксидаза – антипероксидаза (ПАП) и щелочная фосфатаза – антищелочная фосфатаза (ЩФАЩФ)

В этих двух методах используется растворимый иммуноферментный комплекс, который образуется благодаря сродству меченого фермента к «своему» антителу.

Чтобы второе антитело (так называемое антитело-мостик) могло обеспечить связывание первого антитела с антителом комплекса, необходимо, чтобы последнее происходило от того же донора, что и первое. Антитела-мостики должны присутствовать в избытке, чтобы после их связывания с первыми антителами их второй Fab-участок оставался свободным для связывания с антителами комплекса.

Оба эти метода обладают такой же чувствительностью, как любой трехэтапный метод; их чувствительность можно повысить, вновь нанося второй и третий слои.

Продолжительность этих инкубаций может быть меньшей, чем для первых стадий, а наслаивание антител можно проводить столько раз, сколько нужно для оптимального окрашивания. Пользуясь методом ЩФАЩФ, мы обычно проводим два цикла окрашивания, а для антигенов, присутствующих в ткани в малых количествах, – три или четыре цикла.

Авидин-биотиновые и стрептавидин-биотиновые системы

В основе этих методов лежит сродство авидина и стрептавидина к небольшому белку биотину, четыре молекулы которого связываются с одной авидиновой (или стрептавидиновой) молекулой. Обычно эти системы применяются в ИЦХ одним из двух способов: на последнем этапе используется либо меченый авидин, либо комплекс между меченым биотином и авидином.

Оба метода достаточно чувствительны и обычно в них используются меченые ферменты. Стрептавидиновый метод имеет то преимущество перед авидиновым, что изоэлектрическая точка стрептавидина близка к нейтральной, а, следовательно, неспецифическое связывание стрептавидина с заряженными группами в тканях практически отсутствует.

Поскольку стрептавидин - это белок, а не гликопротеин, он не связывается с тканевыми лектинами. Что касается авидина, то он связывается не только с эндогенными ферментами, но и с эндогенным биотином, что создает особенно

серьезные проблемы при работе со срезами печени и почек, в первую очередь с замороженными, но не заключенными в парафин тканями. Такое связывание блокируют 20-минутной инкубацией срезов в 0,1 % авидине и последующей 20-минутной инкубацией в 0,01 % биотине. Имеются сообщения и о неспецифическом связывании авидина с поверхностными антигенами гепатоцитов, инфицированных вирусом гепатита В.

Выбор метки

Метка необходима для визуализации места связывания антигена с антителом.

Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ)

Флуоресцентные красители не нашли широкого применения в молекулярной клинической диагностике в основном из-за невозможности приготовления стабильных препаратов, необходимости использования флуоресцентного микроскопа и проблем с установлением корреляции между наблюдаемой картиной и морфологией. Однако благодаря своей чувствительности и простоте ФИТЦ-метод часто используют как в прямых, так и в непрямых системах детекции иммуноглобулинов, в частности при диагностировании буллезных поражений или гломерулонефропатий.

Пероксидаза хрена. При иммуномечении широко используются конъюгаты антител и других реагентов с пероксидазой хрена (ПХ). Сам по себе этот фермент невидим, но его легко визуализировать с помощью простых гистохимических процедур, в которых используются H_2O_2 в качестве субстрата и следующие колориметрические реактивы:

- 3,3-диаминобензидин;
- 3-амино-9-этилкарбазол;
- 4-хлор-1-нафтол;
- *n*-фенилендиаминпирокатехол;
- тетраметилбензидин;
- гомованиловая кислота;
- нафтолпиронин.

В присутствии диаминобензидина (ДАБ) образуется нерастворимый в органических растворителях продукт. Это позволяет заключать препараты в синтетические среды и стабилизировать их, чем и объясняется популярность данного хромогена. Цвет конечного продукта реакции с ДАБ можно усилить или изменить с помощью различных солей тяжелых металлов. Такой способ повышает чувствительность метода и применяется при двойном мечении.

Усиливающие реактивы можно либо добавлять в раствор ДАБ, либо дополнительно обрабатывать ими препараты после инкубации с ДАБ.

Одна из проблем, возникающих при работе с ПХ, конъюгированной с антителами, состоит в том, что при этом визуализируется и эндогенный фермент тканей, например ПХ, содержащаяся в эритроцитах, полиморфноядерных лимфоцитах и макрофагах.

В большинстве случаев эндогенный фермент удается удалить, предварительно обработав препараты следующими реактивами:

- 3 % пероксидом водорода в дистиллированной воде в течение 5-10 мин или 0,3-0,6% метанолом в течение 10-30 мин;
- подкисленным спиртом;
- 0,01 % фенилгидразином в течение 30 мин;
- азидом натрия;
- цианидом натрия;
- феррицианидом калия;
- 1 % нитроферрицианидом в метаноле;
- пикриновой кислотой.

Если необходима срочная окраска препаратов, то после протеолиза и перед окрашиванием с помощью иммунной метки мы обрабатываем препараты 3 % H_2O_2 в течение 5 мин. Если позволяет время и окрашивается целая партия препаратов, то используется 30-минутная обработка 0,6 % H_2O_2 в 80 % метаноле. В обоих случаях для удаления из срезов следов эндогенной пероксидазы их можно повторно обработать блокирующими растворами. Такие растворы могут неблагоприятно влиять на тканевые антигены, особенно в замороженных срезах и мазках. Чтобы

избежать этого, уменьшают время инкубации с H_2O_2 или обрабатывают препараты пероксидом после инкубации их с первым антителом. Однако, как показывает наш опыт, ни один из этих способов не обеспечивает полной сохранности морфологии тканей. Часто эндогенный фермент обнаруживается в виде темно-коричневых гранул и его легко отличать от светло-коричневых пятен пероксидазы в системе иммуномечения, однако это не решает проблемы, когда исследуемые клетки содержат слишком много эндогенного фермента.

Можно попытаться использовать в качестве субстрата *p*-фенилендиаминпирокатехол (ФДП), поскольку он выявляет только ферменты растительного происхождения, в том числе пероксидазу хрена. Однако широкое использование этого реактива в качестве альтернативы ДАБ ограничивается нестабильностью его растворов.

Другой подход состоит в выявлении эндогенного фермента с помощью одного субстрата, а иммуномеченой пероксидазы – с помощью реактива другого цвета. Для рутинных измерений эта процедура слишком сложна, поэтому при большом содержании эндогенного фермента и невозможности его устранения лучше использовать альтернативное мечение.

Возможно, в будущем для пероксидазы будут использоваться и другие субстраты – либо в качестве альтернативы ДАБ, либо для двойного мечения.

Выявление пероксидазы хрена

Метод 1. Диаминобензидин (ДАБ)¹

1. Промывают срезы в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
2. Растворяют 25 мг 3,3-диаминобензидинтетрахлорида (ДАБ) в 50 мл ТСБ, рН 7,6. Непосредственно перед использованием этого раствора добавляют к нему 160 мкл 3 % пероксида водорода (10 объемов), хорошо перемешивают и либо погружают предметные стекла в сосуд с раствором, либо отфильтровывают раствор на стекла, лежащие в инкубационном лотке².

¹ ДАБ получают от BDH (продукт под кодовым номером 13033). NB! Есть данные, что ДАБ обладает канцерогенными свойствами, поэтому при работе с ним нужно соблюдать меры предосторожности, например, надевать маску и резиновые перчатки.

² Если окрашивание производится в сосуде Коплина или специальной емкости, то в одной смене раствора можно инкубировать две партии препаратов, а затем заменять раствор.

3. Инкубируют препараты 3 - 5 мин при комнатной температуре.
4. Тщательно промывают стекла в проточной воде.
5. Окрашивают препараты гематоксилином, дифференцируют и промывают в проточной воде по Скотту до получения синей окраски.
6. Высушивают препараты и заключают срезы в иммерсионную среду DPX (Дерех). Пероксидаза выявляется в виде гранул коричневого цвета.

Метод 2. 3-амино-9-этилкарбазол (АЭК)

1. Промывают срезы в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
2. Готовят два раствора для инкубации препаратов:
 - 3-амино-9-этиленкарбазол 10 мг, Диметилформамид 2,5 мл.
 - H_2O_2 (10 объемов) 0,2 мл, 0,2 М ацетатный буфер, рН 5,0 50 мл.Смешивают эти два раствора и фильтруют на срезы. Инкубируют препараты до 20 мин при комнатной температуре.
1. Тщательно промывают в дистиллированной воде.
2. Слегка контрастируют водным раствором гематоксилина (например, фирмы Mayer), дифференцируют до получения синей окраски, но не в подкисленном спирте, поскольку он растворяет АЭК.
3. Пероксидаза выявляется под водной иммерсией в виде гранул кирпично-красного цвета.

Метод 3. 4-хлор-1-нафтол

1. Промывают срезы в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
2. Готовят раствор для инкубации препаратов:
 - растворяют 30 мг 4-хлор-1-нафтола в 0,25 мл абсолютного этанола;
 - добавляют 100 мл 0,05 М ТСБ, рН 7,6, к которому добавлено 50 мкл 30 % H_2O_2 , и хорошо перемешивают;
 - перед использованием этот раствор фильтруют.
3. Инкубируют препараты до 20 мин при комнатной температуре (контролируя окрашивание под микроскопом).
4. Тщательно промывают препараты в дистиллированной воде.

5. При необходимости контрастируют препараты. Пероксидаза выявляется под водной иммерсией в виде гранул темно-синего цвета.

Щелочная фосфатаза (ЩФ)

Несмотря на то, что щелочная фосфатаза используется в иммуноцитохимии не так широко, как пероксидаза хрена, она занимает в иммуноцитохимических тестах важное место. На практике необязательно блокировать эндогенный фермент до инкубации препаратов с антисывороткой. Это можно сделать, добавив левамизол в концентрации 1 – 5 мМ прямо в среду, в которой растворен субстрат, поскольку кишечный фермент теленка, используемый в системе иммунодетекции, устойчив к действию левамизола. Однако в некоторых тканях, например, в тканях пищеварительного тракта и плаценты, полностью блокировать активность эндогенного фермента бывает трудно. Когда не нужно проводить предварительную инкубацию, те антигены, которые могут разрушаться в процессе блокирования пероксидазы в замороженных срезах и мазках, легко обнаруживаются. Следует отметить, что растворы субстрата при работе со щелочной фосфатазой более сложные, чем в случае ДАБ, а окрашенные срезы нужно заключать в водную среду. Прекрасные и хорошо воспроизводимые результаты получаются с двумя растворами субстрата, приготовление которых описано в протоколе 2.7. Раствор с новым фуксином/нафтол-AS-BI-фосфатом дает достаточно стабильную окраску, позволяющую заключать препараты в синтетическую среду, хотя при длительном хранении возможно их выцветание.

Субстраты для выявления ЩФ

Метод 1

1. Растворяют в стеклянной пробирке 2 мг нафтол-АВ-МХ-фосфата (N-4875, Sigma) в 0,2 мл диметилформамида (ДМФ).
2. Добавляют к этому раствору 9,8 мл 0,1 М триса, pH 8,2.
3. Добавляют 10 мкл 1 М левамизола (L-9756, Sigma).
4. Непосредственно перед употреблением добавляют 10 мг быстрого красного TR™ (F-1500, Sigma), тщательно перемешивают и отфильтровывают на

препараты. Для метода двойного мечения удобна синяя окраска препарата, поэтому заменяют быстрый красный TR на быстрый синий ВВ.

Метод 2

1. Готовят два раствора:

– в стеклянную пробирку с 0,5 мл свежеприготовленного 4 % (в/о) нитрита натрия добавляют 0,2 мл 5 % нового фуксина (CI 42520, R. Lamb) в 2М HCl, встряхивают 1 мин (1);

– в другой пробирке растворяют 50 мг нафтол-AS-BI-фосфата (N-2250, Sigma) в 0,6 мл ДМФ (2).

2. К 100 мл 0,05М трис-HCl, pH 8,4—8,7, добавляют реактивы в такой последовательности:

- 100 мкл Ш левамизола
- содержимое пробирки (1)
- содержимое пробирки (2)

3. Тщательно перемешивают и отфильтровывают прямо на препараты.

6.7 Радиоавтографические методы исследования

Метод радиоавтографии основан на введении в исследуемый объект соединения, «меченого» радиоактивным атомом и выявлении места его включения путем фотографической регистрации излучения. Основой получения изображения является воздействие ионизирующих частиц, образующихся при распаде радиоактивного атома, на ядерную фотоэмульсию, содержащую кристаллы галоидного серебра.

Открытие метода радиоавтографии напрямую связано с открытием явления радиоактивности. В 1867г. было опубликовано первое наблюдение о влиянии солей урана на галогениды серебра. В 1896г. Генри Беккерель наблюдал засвечивание фотопластинки солями урана без предварительной экспозиции на свету. Этот эксперимент считается моментом открытия явления радиоактивности. Радиоавтографию применительно к биологическому материалу впервые

использовали Лакассань и Латтье в 20-х годах прошлого века; гистологический блок от различных органов животных после введения им изотопов прижимали плоской стороной к рентгеновской пластинке и экспонировали. Заранее получали гистологический срез и подвергали стандартной процедуре окраски. Полученный автограф изучали отдельно от среза. Этот метод позволяет оценить интенсивность включения изотопа в биологический образец. В сороковых годах Леблон использовал радиоавтографию для демонстрации распределения изотопа иода в срезах щитовидной железы.

Первые попытки сочетать радиоавтографию с электронной микроскопией были сделаны в 50-е годы.

Электронно-микроскопическая радиоавтография представляет собой частный случай обычной радиоавтографии, при котором также подсчитываются зерна серебра и учитывается их распределение. Особенность метода состоит в применении очень тонкого слоя эмульсии. В настоящее время достигнуто разрешение около 50 нм, что в 10-20 раз выше в сравнении со световой микроскопией.

В настоящее время метод радиоавтографии дополнен возможностью автоматической оценки количества зерен серебра с помощью видеоанализаторов. Часто для усиления сигнала метки (как правило, это изотопы с высокими энергиями) применяются различные виды сцинтиляторов, нанесенные на пластины (усиливающий экран с фосфорным покрытием), или импрегнированные в эмульсию (РРО) – в таком случае излучение фотонов засвечивает обычную фотопластину или фотопленку.

Фотографический принцип получения изображения, фотоэмульсии.

В радиографическом исследовании роль детектора ядерных распадов выполняет фотоэмульсия, в которой при прохождении ионизирующей частицы остается скрытое изображение, выявляемое затем в процессе проявки, аналогично обработке обычной фотопленки.

Фотоэмульсия представляет взвесь микрокристаллов галоидного серебра в желатине. Микрокристаллы имеют дефекты в структуре, называемые центрами чувствительности.

Согласно модели Гэрни-Мотта эти нарушения ионной решетки кристалла способны захватывать электроны, высвободившиеся при прохождении α - или β -частицы в зоне проводимости кристалла, в результате чего ион превращается в атом. Образовавшееся скрытое изображение может быть выявлено с помощью процедуры, в результате которой активированные кристаллы галоидного серебра превращаются в зерна металлического серебра (этот процесс называется химической проявкой). В качестве проявителя может быть использован любой агент с достаточной восстанавливающей активностью (типично в фотографии и автордиографии используются метол, амидол или гидрохинон). После проявления экспонированных кристаллов остальные микрокристаллы галоидного серебра удаляют из эмульсии при помощи фиксатора (обычно - гипосульфит). Ядерные фотоэмульсии характеризуется разрешающей способностью (зернистостью) и чувствительностью. Первая определяется размером микрокристаллов соли серебра и обратно пропорциональна последней.

Фотоэмульсия характеризуется пониженной чувствительностью к видимому свету, но работа с ней, тем не менее, должна производиться в темноте, чтобы исключить появление артефактов.

Эмульсия может наноситься на препарат в виде готовой пленки с подложкой или погружением препарата в разогретую жидкую эмульсию – таким образом получается тонкий равномерный слой, который проявляется обычным способом. Перед нанесением эмульсии для световой микроскопии препарат обычно окрашивают требуемой гистологической окраской, но более бледно, чем обычно, чтобы сделать возможным подсчет зерен серебра на всех участках. Определенное время препарат экспонируют, затем проявляют.

Разрешающая способность и погрешности метода, ошибки метода

Под разрешающей способностью понимают степень точности с которой можно определить локализацию в препарате радиоактивного вещества («метки»). Разрешающая способность метода в данном случае ограничена двумя факторами.

Геометрическая ошибка – в связи с тем, что испускаемая частица может быть направлена под любым углом к поверхности фотослоя. Следовательно, зерно серебра в фотослое может быть расположено не точно над радиоактивным атомом, а более или менее смещено в зависимости от направления движения частицы и длины пробега (энергии).

Фотоошибка возникает в связи с тем, что зерно серебра, состоящее из тысяч атомов металла намного больше, чем радиоактивный атом. Таким образом, о локализации меньшего объекта приходится судить исходя из положения большего.

При использовании трития, характеризующегося малой энергией (пробегом) испускаемых частиц и ядерных фотоэмульсий с низкой зернистостью разрешающая способность метода радиоавтографии лежит в пределах разрешающей способности оптических систем – 1 мкм. Таким образом, эти ошибки не имеют существенного влияния на получаемый результат.

Для достижения лучшего разрешения необходимо уменьшать толщину среза, слоя эмульсии и расстояние между ними. Препарат следует немного недоэкспонировать.

Эффект автоабсорбции. Число зерен серебра зависит от степени поглощения излучения клеточными структурами, благодаря малому пробегу и малой энергии β -частиц, их абсорбция в тканях достаточно велика, что может приводить к потере метки, поэтому важное значение приобретает вопрос о толщине срезов. Показано, что число зерен серебра пропорционально радиоактивности ткани только при толщине среза не более 5 мк.

Относительное число β -частиц, прошедших сквозь слой поглотителя толщиной x может быть оценено по закону Бэра:

$$N_x / N_0 = e^{-m \cdot x}, \quad (5)$$

где m – коэффициент поглощения - величина, обратная толщине слоя, при прохождении которого число частиц уменьшается в e раз.

Величину коэффициента поглощения можно приближенно оценить по величине R_m (максимальный пробег), известной для всех изотопов, с помощью соотношения $R_m = 10$, справедливого для не слишком жестких излучений.

Фон и артефакты: Ошибку в измерения могут вносить так же механические воздействия – царапины, трещины эмульсии, ведущие к образованию скрытого изображения и фоновое излучение, которое необходимо учитывать при обработке радиоавтографов. Фон учитывают подсчетом числа зерен серебра на пустом участке препарата. Ошибки так же вносятся в результате гистологической обработки срезов – проводки по спиртам (дегидратации), заключения в парафин, окраски. Эти процедуры могут влиять на размеры и соотношения клеточных структур.

Радиационный эффект меченых метаболитов: Благодаря малой энергии излучения тритий вызывает в клетке значительную ионизацию, намного превышающую радиационный эффект β -частиц углерода. Вследствие этого при продолжительном действии меченого соединения, например, 3H-тимидина происходит разрушение и гибель клеток, приводящие к остановке роста тканей. В первую очередь нарушается сперматогенез. Имеются данные о мутагенном и канцерогенном действии меченых метаболитов. Наблюдаемые цитологические изменения заключаются в нарушении прохождения клетками митотического цикла, изменении ploидности клеток и появлении хромосомных aberrаций. Но, по-видимому, повреждающее действие изотопа на клетки может заметным образом сказываться на результатах исследования лишь в условиях длительного эксперимента.

Количественная оценка радиоактивности

Как правило, в эксперименте определяют не абсолютное, а относительное количество включившегося изотопа. Степень включения метки можно оценить двумя способами – денситометрически – что более применимо к макроавтографам и прямым подсчетом зерен серебра над объектами. Эта трудоемкая процедура в

настоящее время может быть выполнена с помощью компьютера. Цифровой снимок гистологического препарата обрабатывается специальным программным обеспечением, с целью автоматически выделить на нем клетки и клеточные структуры и подсчитать количество зерен серебра. Если встает вопрос о количественной оценке – необходимо привлекать понятие эффективности. Чаще всего под эффективностью понимают число зерен серебра, образующихся при регистрации одного радиоактивного распада. На эффективность метода влияют многие факторы, в первую очередь толщина объекта и эмульсии.

В исследованиях с помощью сцинтиляционного счетчика была найдена высокая корреляция между средним числом распадов в минуту и количеством зерен серебра. По данным Ханта образование одного зерна в применявшейся в эксперименте эмульсии соответствует 5,8 радиоактивных распадов, т.е. эффективность метода составляет 17,8 %.

Для количественной оценки трития в макроскопических препаратах могут быть использованы образцы со стандартной активностью, которые монтируются на том же автографе.

Точна оценка радиоактивности сравниваемых биологических объектов очень сложна.

Примеры исследований методом автордиографии

Классический пример радиоавтографического исследования – это работа по изучению накопления ^{32}P в ДНК клеток корня конского боба. В этом эксперименте было впервые показано деление митотического цикла на четыре периода (митоз - М, G1- пресинтетический период, S – синтез ДНК, премитотический период G2), что период синтеза ДНК занимает ограниченную часть интерфазы, будучи отделен во времени от начала и окончания митоза. Данные Говард и Пелка позднее нашли подтверждение в более точных экспериментах с применением специфического предшественника ДНК – ^3H -тимидина.

Методы оценки синтеза белка. Наиболее распространенными предшественниками для оценки общего белкового синтеза в радиоавтографических исследованиях служат ^3H -лейцин, ^3H -метионин, ^3H -фенилаланин.

Например, с использованием лейциновой метки изучался синтез общего белка в головном мозге крыс первых недель постнатального развития. Для изучения синтеза гистонов и их влияния на регуляцию транскрипции используют основные аминокислоты 3H-лизин и 3H-аргинин, для изучения синтеза кислых белков - 3H-триптофан.

Плотность включения аминокислотной метки соответствует интенсивности синтеза белка, а, следовательно, отражает функциональную активность нейрона.

Радиоавтографический метод позволяет сравнивать особенности синтеза белка в различных тканях животных при экспериментальном воздействии, позволяет проследить динамику изменений на уровне отдельных типов клеток и клеточных структур (ядро, тело клетки, отростки нейрона – аксональный транспорт).

Радиоавтографическим методом также были получены данные о полуконсервативном механизме редупликации хромосом, асинхронность синтеза ДНК в разных участках хромосомы, изучение организации хромосом.

В настоящее время радиоавтографический метод часто используется для изучения мозга в работах с использованием радиолигандов к определенным рецепторам. Таким образом, построены карты распределения различных рецепторов в структурах мозга животных и человека.

Радиоавтографический метод также используется для визуализации гелей в биохимии и в сочетании с иммунологическими методами (РИА).

7 Микробиологические методы исследования

Микробиология – наука о живых организмах, невидимых невооруженным глазом (микроорганизмах): бактерии, археобактерии, микроскопические грибы и водоросли, часто этот список продляют простейшими и вирусами. В область интересов микробиологии входит их систематика, морфология, физиология, биохимия, эволюция, роль в экосистемах а также возможности практического использования.

Разделы микробиологии: бактериология, микология, вирусология и т. д. Существуют различные виды микробиологии: медицинская, ветеринарная, пищевая, санитарная, промышленная, фармацевтическая и др.

За несколько тысяч лет до возникновения микробиологии как науки человек, не зная о существовании микроорганизмов, широко применял природные процессы, связанные с брожением, для приготовления кумыса и других кисломолочных продуктов, получения алкоголя, уксуса, при мочке льна.

Люди издревле знали о многих процессах, вызываемых микроорганизмами, однако не знали истинных причин вызывающих эти явления. Отсутствие сведений о природе таких явлений не мешало делать наблюдения и даже использовать ряд этих процессов в быту. Ряд философов и естествоиспытателей делали умозрительные заключения о причинах тех или иных явлений. При этом наиболее близко к открытию микромира подошел Джироламо Фракасторо, предположивший, что инфекции вызывают маленькие тельца, передающиеся при контакте и сохраняющиеся на вещах больного. Однако в то время невозможно было удостовериться в правильности его идей и распространение получили совершенно иные гипотезы. Бактериальную природу инфекционных заболеваний многие учёные продолжали отвергать и после революционных открытий Пастера и Коха. Так, в 1892 году Макс Петтенкофер, уверенный в том, что холеру вызывают миазмы, выделяемые окружающей средой, и пытаясь доказать свою правоту, проглотил при свидетелях-медиках культуру холерных вибрионов и не заболел.

Возможность изучения микроорганизмов возникла лишь с развитием оптических приборов. Первый микроскоп был создан ещё в 1610г. Галилеем. В 1665г. Роберт Гук впервые увидел растительные клетки. Однако 30-кратного увеличения его микроскопа не хватило, чтобы увидеть простейших и тем более бактерии. По мнению В. Л. Омелянского «первым исследователем, перед изумлённым взором которого открылся мир микроорганизмов, был учёный иезуит Афанасий Кирхер, автор ряда сочинений астрологического характера», однако обычно первооткрывателем микромира называют Антони ван Левенгука.

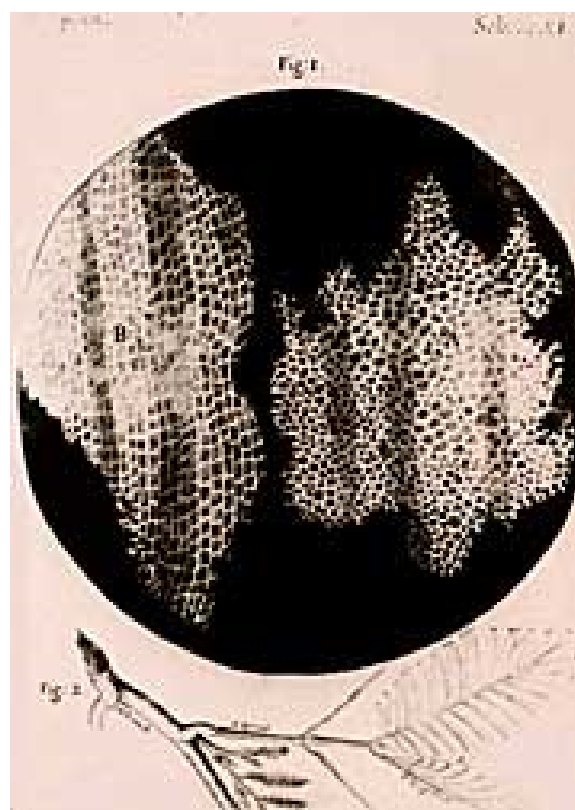
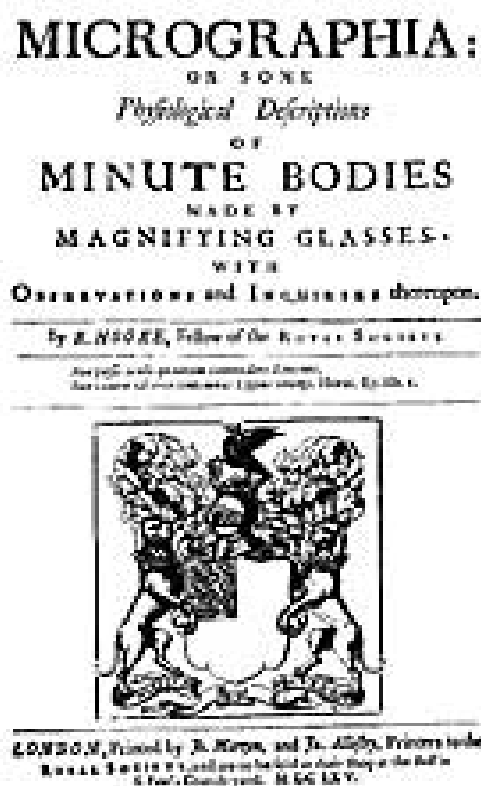


Рисунок 25 – Открытие клетки (Роберт Гук 1665г.)

В своём письме Лондонскому Королевскому обществу он сообщает как 24 апреля 1676г. микроскопировал каплю воды и даёт описание увиденных там существ, в том числе бактерий. Левенгук считал обнаруженных им микроскопических существ «очень маленькими животными» и приписывал им те же особенности строения и поведения, что и обычным животным. Повсеместное

распространение этих «животных» стало сенсацией не только в научном мире. Освоив ремесло шлифовальщика, Левенгук стал очень искусным и успешным изготовителем линз. Устанавливая свои линзы в металлические оправы, он соорудил микроскоп (рис. 26) и с его помощью проводил самые передовые по тем временам исследования. Левенгук демонстрировал свои опыты всем желающим, в 1698г. его даже посетил Пётр I.

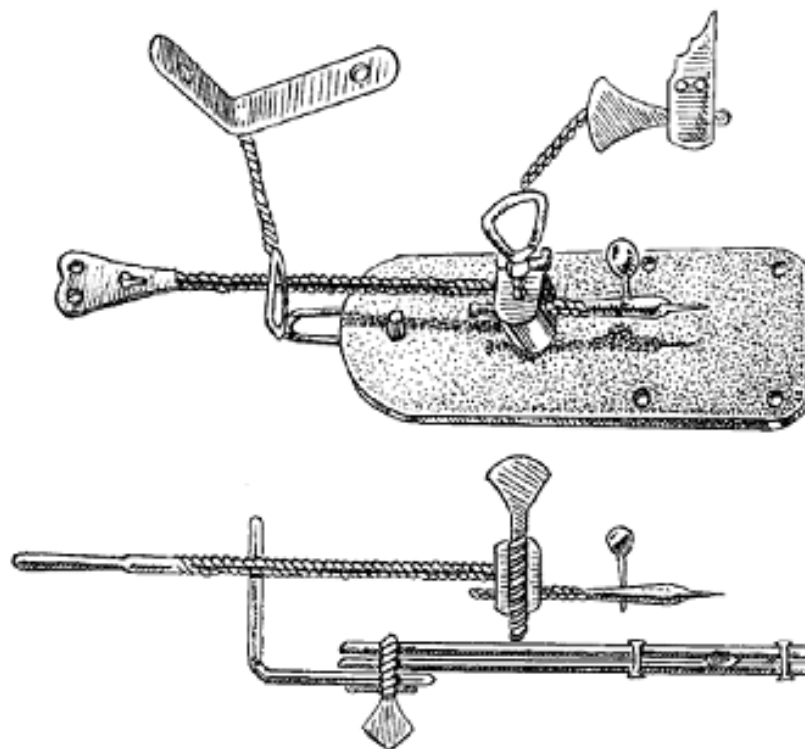


Рисунок 26 – Микроскоп Левенгука

Между тем, наука в целом ещё не была готова к пониманию роли микроорганизмов в природе. Система теорий возникла тогда лишь в физике. Во времена Левенгука отсутствовали представления о ключевых процессах живой природы, так, незадолго до него в 1648г. Ван Гельмонт, не имея никакого понятия о фотосинтезе, заключил из своего опыта с ивой, что растение берёт питание только из дистиллированной воды, которой он его поливал. Более того, даже неживая материя ещё не была достаточно изучена, состав атмосферы, необходимый для понимания того же фотосинтеза, будет определён лишь в 1766-1776гг. Поэтому

неудивительно, что «животным» Левенгука не нашлось место нигде, кроме как в коллекции курьёзов.

В течение следующих 100-150 лет развитие микробиологии проходило лишь с описанием новых видов. Видную роль в изучении многообразия микроорганизмов сыграл Отто Фридрих Мюллер, который к 1789г. описал и назвал по линеивской биномиальной номенклатуре 379 различных видов. В это время было сделано и несколько интересных открытий. Так, в 1823г. была определена причина «кровоточения» просфор – бактерия, названная *Serratia marcescens*. Также следует отметить Христиана Готтфрида Эренберга, описавшего множество пигментированных бактерий, первые железобактерии, а также скелеты простейших и диатомовых водорослей в морских и лиманных отложениях, чем положил начало микропалеонтологии. Именно он впервые объяснил окраску воды Красного моря развитием в ней цианобактерий *Trichodesmium erythraeum*.

Он, однако, причислял бактерий к простейшим и рассматривал их вслед за Левенгуком как полноценных животных с желудком, кишечником и конечностями.

В России одним из первых микробиологов был Л. С. Ценковский, описавший большое число простейших, водорослей и грибов и сделавший вывод об отсутствии резкой границы между растениями и животными. Им также была организована одна из первых Пастеровских станций и предложена вакцина против сибирской язвы.

Высказывались в это время и смелые гипотезы, например врач-эпидемиолог Д. С. Самойлович был убеждён в том, что болезни вызываются именно микроорганизмами, однако тщетно пытался увидеть в микроскоп возбудитель чумы - возможности оптики тогда ещё не позволяли это сделать. В 1827г. итальянец А. Басси обнаружил передачу болезни шелковичного червя при переносе микроскопического гриба. Ж. Л. Л. Бюффон и А. Л. Лавуазье связывали брожение с дрожжами, однако общепринятой оставалась чисто химическая теория этого процесса, сформулированная в 1697г. Г. Э. Шталем. Для спиртового брожения, как для любой реакции, Лавуазье и Л. Ж. Гей-Люссаком были посчитаны стехиометрические соотношения. В 1830-х Ш. Каньяр де Латур, Ф. Кютцинг и Т. Шванн независимо друг от друга наблюдали обилие микроорганизмов в осадке и

плёнке на поверхности бродящей жидкости и связали брожение с их развитием. Эти представления наткнулись на резкую критику со стороны таких видных химиков как Фридрих Вёлер, Йёнс Якоб Берцелиус и Юстус Либих.

Тем не менее, вопрос о причинах брожения, тесно связанный с вопросом о спонтанном самозарождении жизни, стал первым успешно решённым вопросом о роли микроорганизмов в природе.

Франц Шульц после стерилизации сосуда с настоем пускал туда воздух, пропущенный через карболовую кислоту, и не наблюдал развития там микроорганизмов. Чтобы избежать возражений, что кислота тоже лишает воздух жизненной силы, Шрёдер и фон Душ в 1854г. пропускали воздух через хлопковый фильтр, а в 1860г. Гофман и независимо от него в 1861г. Шевре и Пастер показали, что нет необходимости и в фильтре, – достаточно изогнуть соединяющие сосуд с атмосферой трубки, чтобы в нём после стерилизации не «зарождалась» жизнь. Так принцип «всё живое из живого» окончательно победил в биологии. Используя представления о невозможности самозарождения жизни, Луи Пастер в 1860-х годах показал, что стерилизация делает брожение невозможным, таким образом, было доказано участие в нём микроорганизмов. Кроме того, это стало открытием новой формы жизни – анаэробной, не требующей кислорода, а иногда даже гибнущей под его воздействием.

Постепенно складывалось и осознание особого положения микромира в живой природе. В начале XIX века микроорганизмы причислялись к червям. В 1866г. Эрнст Геккель впервые выделил их в отдельное царство *Protista*. Затем Ф. Кон в 1875г., изучая синезелёные водоросли, отграничил их от растений и объединил их с бактериями как наиболее простых из существующих организмов. К концу XIX века стало ясно, что протисты, объединяемые по своим микроскопическим размерам, существенно различаются между собой. Они были разделены на «высшие» (простейшие, микроскопические грибы и водоросли, дрожжи) и «низшие» (бактерии и синезелёные водоросли). Лишь в 1930-х годах после новых открытий в строении клетки Э. Шаттон предложил термины эукариоты

и прокариоты. Отсекаются и приписываемые микроорганизмам «уникальные» свойства, одним из которых была способность самозарождаться.

Другим был их плеоморфизм, то есть нераспространение на бактерии закона Линнея о постоянстве видов. Её появление было вызвано бедностью внешних форм бактерий при богатстве физиологических и биохимических свойств, отчего и казалось, что одна та же бактерия проявляет себя по-разному. Особую роль в опровержении этой теории также сыграл Кон.

1880-е и 1890-е гг. ознаменовались для микробиологии всплеском числа открытий. Во многом это было связано с подробной разработкой методологии. Прежде всего, здесь следует отметить вклад Роберта Коха, создавшем в конце 1870-х – начале 1880-х гг. ряд новых методов и общих принципов ведения исследовательской работы. Пастер использовал для выращивания микроорганизмов жидкие среды, содержащие все элементы, находимые в живых организмах. Жидкие среды, однако, были недостаточно удобны. Так, сложно было выделить колонию, происходящую от одной живой клетки («чистая культура»), в связи с чем, можно было изучать только обогащённые самой природой культуры. Лишь в 1883г. Э. Христианом Гансеном была получена первая чистая культура дрожжей, полученная методом висячей капли. Твёрдые среды впервые использовались для изучения грибов, где необходимость чистых культур также была обоснована. Для бактерий твёрдые среды применял Кон во Вроцлаве зимой 1868/69гг., однако только в 1881г. Роберт Кох положил начало широкому применению желатиновых и агаровых пластинок.

Кох ввёл в применение методы окраски бактерий (ранее использованные в ботанике) и микрофотографию. Публикации Коха содержали в себе методики, принятые микробиологами всего мира. Вслед за ним началось развитие и обогащение методологии, так в 1884г. Ганс Христиан Грам использовал метод дифференцирующего окрашивания бактерий (Метод Грама), С. Н. Виноградский в 1891г. применил первую элективную среду. За следующие годы было описано больше видов, чем за все предыдущее время, выделены возбудители опаснейших

заболеваний, обнаружены новые процессы, производимые бактериями и неизвестные в других царствах природы.

В изучении жизнедеятельности микроорганизмов следует отметить вклад Луи Пастера. Он же вместе с Робертом Кохом стоят в истоках учения о микроорганизмах как возбудителях заболеваний. Экологическую роль и многообразие микробиологических процессов показали Бейеринк и С. Н. Виноградский.

Техническая микробиология изучает микроорганизмы, используемые в производственных процессах с целью получения различных практически важных веществ: пищевых продуктов, этанола, глицерина, ацетона, органических кислот и др.

Огромный вклад в развитие микробиологии внесли русские и советские учёные: И. И. Мечников, Д. И. Ивановский, Н. Ф. Гамалея, Л. С. Ценковский, С. Н. Виноградский, В. Л. Омелянский, Д. К. Заболотный, В. С. Буткевич, С. П. Костычев, Н. Г. Холодный, В. Н. Шапошников, Н. А. Красильников, А. А. Ишменецкий и др.

Большая роль в развитии технической микробиологии принадлежит С. П. Костычеву, С. Л. Иванову и А. И. Лебедеву, которые изучили химизм процесса спиртового брожения, вызываемого дрожжами. На основании исследований химизма образования органических кислот мицелиальными грибами, проведённым В. Н. Костычевым и В. С. Буткевичем, в 1930г. в Ленинграде было организовано производство лимонной кислоты. На основе изучения закономерностей развития молочнокислых бактерий, осуществлённого В. Н. Шапошниковым и А. Я. Мантейфель, в начале 1920-х годов в СССР было организовано производство молочной кислоты, необходимой в медицине для лечения ослабленных и рахитичных детей.

В. Н. Шапошников и его ученики разработали технологию получения ацетона и бутилового спирта с помощью бактерий, и в 1934г. в Грозном был пущен первый в СССР завод по выпуску этих растворителей. Труды Я. Я. Никитинского Ф. М. Чистякова положили начало развитию микробиологии консервного

производства и холодильного хранения скоропортящихся пищевых продуктов. Благодаря работам А. С. Королёва, А. Ф. Войткевича и их учеников значительное развитие получила микробиология молока и молочных продуктов.

Частью технической микробиологии является пищевая микробиология, изучающая способы получения пищевых продуктов с использованием микроорганизмов. Например, дрожжи применяют в виноделии, пивоварении, хлебопечении, спиртовом производстве; молочнокислые бактерии – в производстве кисломолочных продуктов, сыров, при квашении овощей; уксусно-кислые бактерии – в производстве уксуса; мицелиальные грибы используют для получения лимонной и других пищевых органических кислот и т. д. К настоящему времени выделились специальные разделы пищевой микробиологии: микробиология дрожжевого и хлебопекарного производства, пивоваренного производства, консервного производства, молока и молочных продуктов, уксуса, мясных и рыбных продуктов, маргарина и т. д.

К методам исследования любых микроорганизмов относят:

- метод микроскопии: световая, фазово-контрастная, темнопольная, флуоресцентная, электронная;
- метод культивирования на питательных средах;
- метод биопроб на живых организмах;
- метод полимеразной цепной реакции;
- реакции по типу «антиген-антитело»;
- метод ИФА.

Цель медицинской микробиологии – глубокое изучение структуры и важнейших биологических свойств патогенных микробов, взаимоотношения их с организмом человека в определенных условиях природной и социальной среды, совершенствование методов микробиологической диагностики, разработка новых, более эффективных лечебных и профилактических препаратов, решение такой важной проблемы, как ликвидация и предупреждение инфекционных болезней.

7.1 Клиническая лабораторная аналитика как исследовательский арсенал лабораторной медицины

Объектом изучения лабораторной медицины является биологическая жидкость или другой биологический материал, проба которого изъята из организма для того, чтобы изучить ее состав и определить, не изменен ли он по сравнению с нормой. Исследования, которые требуется провести при этом, столь же сложны, как и сам состав биологического материала.

Исследовательский арсенал лабораторной медицины складывался постепенно: от простейших органолептических методов оценки физических качеств биологических жидкостей самими врачами к аналитическим технологиям, все более глубоко проникающим в многокомпонентный состав и природу взаимодействия отдельных компонентов материалов и требующим специальных профессиональных знаний, умений, технического оснащения. Этот процесс шел на стыке сложного взаимопроникновения развивающихся фундаментальных наук - физики, химии, биологии - и клинической медицины, имевшей поначалу сугубо эмпирический характер, т.е. основанной на наблюдениях врачей-лечителей.

Первые исследовательские приемы в отношении биожидкостей были описаны в древних трактатах китайской и индийской медицины, а затем в наблюдениях Гиппократов и Авиценны. Оценивался цвет мочи, а при тех состояниях, которые впоследствии были распознаны как сахарный диабет, и вкус мочи. Состояние жидкостей в организме было даже положено в основу теоретических концепций «гуморальной патологии», бытовавшей в древнегреческой медицине.

Новый этап в развитии лабораторных технологий был положен Левенгуком, который с помощью изобретенного им оптического устройства, получившего название «микроскоп», оказался способен наблюдать микроорганизмы и клетки человеческой крови. Полуфантастический период средневекового увлечения алхимией стал в определенной мере платформой для последующего возникновения и развития серьезных химических представлений.

Парацельс воспринял для медицины, а это, в свою очередь, послужило М. В. Ломоносову основанием для его знаменитого постулата: «Врач без довольного знания химии совершен быть не может». Химические знания, приложенные к познанию процессов в организме человека, стали фундаментом биохимии человека или медицинской (клинической) биохимии.

Микроскоп и химическая колба впоследствии были избраны символами лабораторной профессии.

Одним из основоположников клинической химии, по-видимому, можно считать Бойля, который в 1684 г. опубликовал статью об исследовании крови человека. Вслед за тем Лангриш описал изменения крови больных с лихорадкой. Изобретение Дюбоском и Гоппе-Зейлером в начале XIX века первых исследовательских приборов для физиологической и патологической химии положило начало широкому исследованию химического состава биологических жидкостей человека в интересах диагностики патологических состояний. С тех пор оснащение исследований биологических жидкостей человека с помощью различных приборов стало мощным средством восприятия лабораторной медициной достижений физики и ее прикладных отраслей по мере их открытия и изобретения. Как об этом можно судить по появлению в конце 30-х начале 40-х годов XIX века руководств и периодических изданий по химическим и микроскопическим исследованиям при патологии человека, это время явилось периодом становления клинической лабораторной диагностики.

Наблюдения Пастера, Коха, Листера стали исходным пунктом для формирования клинической микробиологии, т.е. науки о микроорганизмах, которые могут быть причиной патологических состояний организма человека.

И. И. Мечников гениально оценил, наблюдавший им факт скопления лейкоцитов вокруг места повреждения ткани как проявление механизма защиты организма, что заложило основы современной иммунологии.

Таким образом, к концу XIX века сложился тот круг наук и присущих им исследовательских приемов, которые на протяжении XX века бурно развивались и ширились, обретая очертания современной лабораторной медицины.



Рисунок 27 – Клинические образцы на чашках Петри

Объектами исследований, проводимых в клинической лаборатории, служат образцы (рис. 27) биологических материалов, взятых у обследуемых пациентов: крови, мочи, спинномозговой жидкости, слюны, пота, семенной, плевральной, перикардальной, асцитической, синовиальной жидкости, соскобы со слизистых оболочек, пунктаты и биоптаты тканей различных органов. В этих образцах современная клиническая лаборатория способна определять наличие и количественное содержание обширного круга эндогенных и экзогенных компонентов:

- собственных клеточных элементов организма обследуемого (клеток крови, клеток тканей);
- эндогенных химических компонентов метаболических процессов в организме (субстратов, метаболитов, ферментов, коферментов, различных регуляторных веществ);
- биологических факторов распознавания, защиты и аутоагрессии (антигенов, антител, цитокинов);
- носителей генетической информации (молекул нуклеиновых кислот, определенных последовательностей нуклеотидов, генов);
- экзогенных химических компонентов (токсинов, спиртов, металлов, следовых элементов, лекарств);

– экзогенных организмов(бактерий, вирусов, грибков, паразитарных организмов в разных стадиях их жизненного цикла).

Наряду с отдельными компонентами клиническая лаборатория изучает и их сочетания и взаимоотношения, что дает представление о деятельности определенных физиологических механизмов и систем, среди которых системы метаболизма различных классов органических и минеральных веществ, система кроветворения, свертывающая и противосвертывающая системы, системы антигенов гистосовместимости и дифференцировки, система иммунной защиты, системы нервной, гуморальной и нейрогуморальной регуляции.

В настоящее время в поле зрения лабораторной медицины находится несколько тысяч компонентов биологических материалов, исследование которых представляет интерес для диагностики тех или иных форм патологии человека.

На основе заимствованных из фундаментальных наук представлений и знаний в рамках лабораторной медицины сложились довольно хорошо очерченные субдисциплины:

- клиническая биохимия;
- клиническая лабораторная иммунология с аллергологией;
- клиническая лабораторная гематология (включая гемоцитологию и коагулологию);
- клиническая цитология (эксфолиативная и пункционная);
- клиническая молекулярная биология с лабораторной диагностической генетикой;
- клиническая лабораторная паразитология;
- клиническая микробиология (включая бактериологию, вирусологию и микологию);
- клиническая лабораторная токсикология;
- лабораторный фармакокинетический контроль (мониторинг) лекарственной терапии.

Каждая из лабораторных субдисциплин является мостиком от соответствующей медико-биологической науки к практике лабораторного дела.

В содержании любой субдисциплины можно выделить три основных раздела. Это своего рода опоры каждого из мостов от теории к клинической лабораторной практике.

Первый из них представляет собой комплекс знаний о биологической и химической природе, основных свойствах, месте в организме человека, структурных и функциональных особенностях, роли в процессах жизнедеятельности и патологических процессах, закономерной связи тех или иных аналитов с определенными патологическими состояниями.

Клиническая патобиология. Разнородные по биологической и химической природе компоненты требуют для своей детекции и количественного измерения достаточно обширного арсенала аналитических способов и средств. Аналитические возможности современной клинической лаборатории опираются на широкий круг физических, химических, биологических приемов, а также на применение разнообразных препаративных и аналитических (автоматических) устройств.

Комплекс знаний и умений, позволяющих с требуемой точностью осуществлять детекцию и количественное измерение соответствующих компонентов (аналитов) в биологических материалах человека, представляет собой клиническую лабораторную аналитику.

Интеграция знаний и умений, позволяющих использовать обнаружение и определение тех или иных аналитов для получения информации о состоянии организма обследуемого пациента и выявления у него отклонений от нормы, о наличии или отсутствии предполагаемого клиницистом патологического процесса, о течении болезни и эффективности проводимого лечения, составляет существо клинической лабораторной диагностики. Этот раздел лабораторных субдисциплин находится и особенно тесной связи с постоянно развивающейся сферой клинической медицины в целом и отдельных ее областей - клинической диагностикой, являясь для нее важным источником ценной объективной информации о пациенте.

Таким образом, лабораторная медицина представляет собой общую прикладную сферу ряда медико-биологических наук, питаемую их теоретическими и методическими достижениями и претворяющую их исследовательский потенциал

в практически применимую в клинике информацию о конкретном пациенте в его конкретном состоянии. Современный технологический арсенал лабораторной медицины складывался постепенно как отражение общего прогресса исследовательских возможностей науки: от общего к все более частному, от поверхностного к все более глубокому проникновению в процессы, происходящие в организме.

Биологический материал, биологическая жидкость представляют собой сложную многокомпонентную смесь веществ и клеток различного состава и строения, играющих ту или иную роль в жизнедеятельности организма и, следовательно, способных отразить нарушения определенных метаболических процессов, быть маркерами патологии.

Физико-химической сущностью современных аналитических методов является использование взаимодействия физических факторов и химических веществ с клеточными элементами и молекулами для их идентификации и количественного измерения, наряду с физико-биологическими методами, использующими для тех же целей физические методы и сочетания с биологическими свойствами специфических реагентов (ферментов, цитокинов, рецепторов, антигенов, антител).

Поскольку целью исследования является обнаружение и количественное определение того или иного вещества или клетки, аналитические задачи состоят в разделении биологической смеси, выделении из нее интересующего исследователя компонента (аналита) и его детекции или измерении его количества.

7.2 Организация лабораторной микробиологической службы. Микробиологическая лаборатория

В зависимости от назначения микробиологические лаборатории могут быть бактериологическими, паразитологическими, микологическими, вирусологическими, иммунологическими и специальными (для диагностики особо опасных инфекций).



Рисунок 28 – Бактериологическая лаборатория

Бактериологические лаборатории (рис. 28) как самостоятельные структурные единицы организуются при санитарно-эпидемиологических станциях (СЭС), в инфекционных больницах, больницах общего типа, некоторых специализированных стационарах (в туберкулезных, ревматологических, кожно-венерологических) и в поликлиниках.

Бактериологические лаборатории при СЭС исследуют на общую бактериальную загрязненность, а также на зараженность условно патогенной и патогенной микрофлорой объекты внешней среды: воздух, воду, почву продукты питания; проводят обследование организованных коллективов и отдельных лиц на носительство патогенных бактерий кишечной группы, коринебактерий дифтерии, коклюша, паракоклюша, менингококка. Работа микробиологической лаборатории в комплексе с другими отделами СЭС имеет определенную задачу – оздоровление окружающей среды и снижение заболеваемости населения.

Бактериологические лаборатории при лечебно-профилактических учреждениях выполняют анализы, необходимые для постановки и уточнения диагноза инфекционного заболевания, способствуя правильному выбору специфического лечения и определению сроков выписки больного из инфекционной

больницы. Предметом для исследования в бактериологических лабораториях являются:

- выделения из организма человека: моча, кал, мокрота, гной, а также кровь, спинномозговая жидкость и трупный материал;
- объекты внешней среды: вода, воздух, почва, продукты питания, смывы с предметов инвентаря, рук и т. п.

*Помещение микробиологической лаборатории и оборудование
рабочего места*

Специфика микробиологических работ требует, чтобы помещение, отведенное под лабораторию, было изолировано от больничных палат, жилых комнат, пищевых блоков.

В состав микробиологической лаборатории входят:

- лабораторные комнаты для бактериологических исследований и подсобные помещения;
- автоклавная или стерилизационная для обеззараживания отработанного материала и зараженной посуды;
- моечная, оборудованная для мытья посуды;
- средоварочная для приготовления, розлива, стерилизации и хранения питательных сред;
- виварий для содержания подопытных животных;
- материальная для хранения запасных реактивов, посуды, аппаратуры и хозяйственного инвентаря.

Примерный план микробиологической лаборатории изображен на рисунке 29.

Данный план приведен для лаборатории, работающей с небольшим количеством образцов. План не включает следующие помещения:

- комната отдыха персонала и приема пищи;
- комната для работы с документацией и литературой;
- кабинет заведующего;
- туалет.

Перечисленные подсобные помещения как самостоятельные структурные единицы входят в состав крупных бактериологических лабораторий. В небольших лабораториях средоварочную и стерилизационную объединяют в одной комнате; специальное помещение для содержания подопытных животных отсутствует.

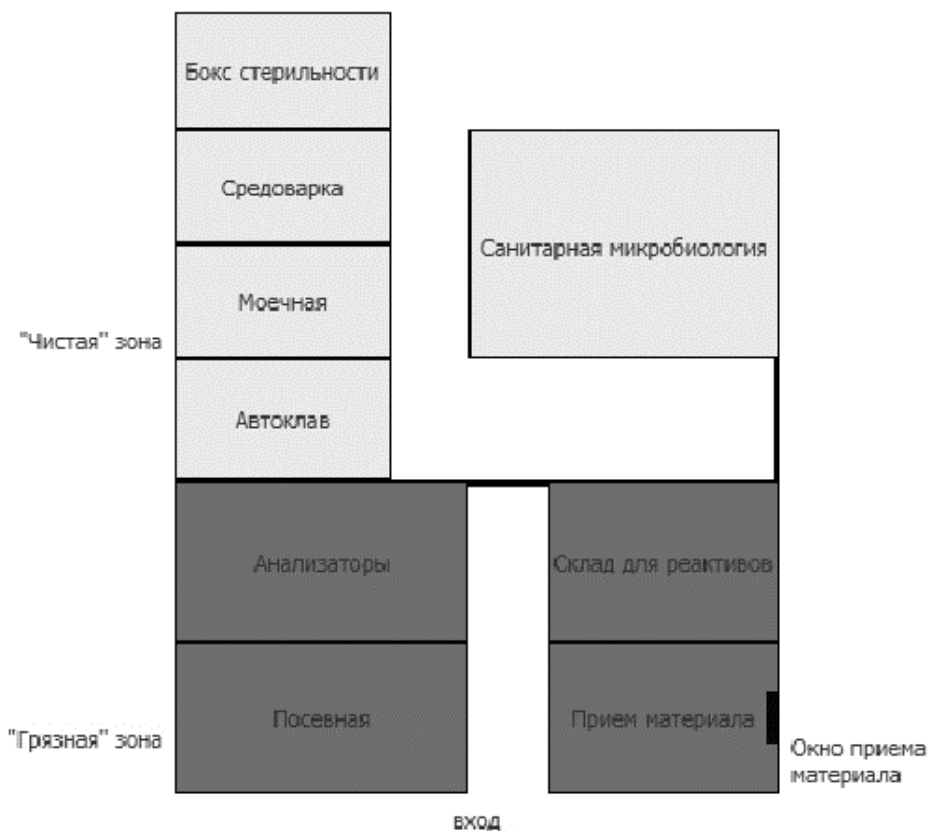


Рисунок 29 – Примерный план микробиологической лаборатории

Под лабораторные комнаты, в которых производят все бактериологические исследования, отводят наиболее светлые, просторные помещения. Стены в этих комнатах на высоту 170 см от пола окрашивают в светлые тона масляной краской. Пол покрывают релином или линолеумом. Такого рода отделка позволяет пользоваться при уборке помещения дезинфицирующими растворами.

В каждой комнате должна быть раковина с водопроводной подводкой и полкой для бутылки с дезинфицирующим раствором.

В одной из комнат оборудуют застекленный бокс с предбоксником для выполнения работ в асептических условиях. В боксе ставят стол для производства

посевов, табурет, над рабочим местом монтируют бактерицидные лампы. В предбоксник помещают шкаф для хранения стерильного материала. Лабораторное помещение оборудуется столами лабораторного типа, шкафами и полками для хранения необходимой при работе аппаратуры, посуды, красок, реактивов.

Очень большое значение для работы имеет правильная организация рабочего места врача – бактериолога и лаборанта. Лабораторные столы устанавливают около окон. При размещении их нужно стремиться к тому, чтобы свет падал спереди или сбоку от работающего, лучше с левой стороны, но ни в коем случае не сзади. Желательно, чтобы комнаты для проведения анализов, особенно для микроскопирования, имели ориентацию окон на север или северо-запад, так как для работы необходим равный рассеянный свет. Освещённость поверхности столов для работы должна быть 500 лк. Для удобства дезинфекции поверхность лабораторных столов покрывают пластиком, а каждое рабочее место на нем – зеркальным стеклом.

За каждым сотрудником лаборатории закрепляют отдельное рабочее место площадью 150х60 см. Все рабочие места оборудуют предметами, необходимыми для повседневной работы.

Правила работы и поведения в лаборатории

Особенностью бактериологических работ является постоянное соприкосновение сотрудников лаборатории с заразным материалом, культурами патогенных микробов, заражёнными животными, кровью и выделениями больного. Поэтому все сотрудники бактериологической лаборатории обязаны соблюдать следующие правила работы, которые обеспечивают стерильность в работе и предупреждают возможность возникновения внутрилабораторных заражений:

В помещения бактериологической лаборатории нельзя входить без специальной одежды – халата и белой шапочки или косынки. Нельзя вносить в лабораторию посторонние вещи. Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнее платье на халат. В помещении бактериологической лаборатории категорически запрещается курить, принимать пищу, хранить продукты питания.

Весь материал, поступающий в лабораторию, должен рассматриваться как инфицированный.

При распаковке присланного заразного материала необходимо соблюдать осторожность: банки, содержащие материал для исследования, при получении обтирают снаружи дезинфицирующим раствором и ставят не прямо на стол, а на подносы или в кюветы.

Переливание жидкостей, содержащих патогенные микробы, производят над сосудом, наполненным дезинфицирующим раствором.

О случаях аварии с посудой, содержащей заразный материал, или проливания жидкого заразного материала надо немедленно сообщать заведующему лабораторией или его заместителю. Мероприятия по обеззараживанию загрязнённых патогенным материалом платья, частей тела, предметов рабочего места и поверхностей осуществляют немедленно.

При исследовании заразного материала и работе с патогенными культурами микробов необходимо строго соблюдать общепринятые в бактериологической практике технические приемы, исключая возможность соприкосновения рук с заразным материалом.

Зараженный материал и ненужные культуры подлежат обязательному уничтожению, по возможности в тот же день. Инструменты, использованные в работе с заразным материалом, тотчас после их употребления дезинфицируют, как и поверхность рабочего места.

При выполнении бактериологических работ нужно строго следить за чистотой рук: по окончании работы с заразным материалом их дезинфицируют. Рабочее место в конце дня приводят в порядок и тщательно дезинфицируют, а заразный материал и культуры микробов, необходимые для дальнейшей работы, ставят на хранение в запирающийся рефрижератор или сейф.

Работники бактериологической лаборатории подлежат обязательной вакцинации против тех инфекционных болезней, возбудители которых могут встретиться в исследуемых объектах.

Уборка лабораторного помещения

Микробиологическую лабораторию необходимо содержать в чистоте. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку помещений лаборатории. Обеспечить полную стерильность лаборатории очень трудно и это не всегда необходимо, но значительно снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях в лабораторных помещениях возможно. Это достигается путём применения на практике методов дезинфекции, то есть уничтожения возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды.

Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории обрабатывают пылесосом и протирают различными дезинфицирующими растворами. Обработка пылесосом обеспечивает освобождение предметов от пыли и удаление с них значительного количества микроорганизмов.

Установлено, что при 4-х кратном проведении щёткой пылесоса по поверхности предмета с него удаляется примерно 47 % микроорганизмов, а при 12-кратном – до 97 %.

В качестве дезинфицирующих растворов чаще всего применяют 2-3 %-ный раствор соды (бикарбонат натрия) или лизола (препарат фенола с добавлением зелёного мыла), 0,5-3 %-ный водный раствор хлорамина и некоторые другие дезинфектанты.

Воздух в лаборатории наиболее просто дезинфицировать проветриванием. Продолжительная вентиляция помещения через форточку (не менее 30-60 минут) приводит к резкому снижению количества микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом помещения. Более эффективный и наиболее часто применяемый способ дезинфекции воздуха – облучение УФ-лучами с длиной волны от 200 до 400 нм. Эти лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызывать гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов.

Перечень оборудования для комплексного оснащения микробиологической и бактериологической лаборатории (таблица 2).

Таблица 2 - Перечень оборудования для комплексного оснащения микробиологической и бактериологической лаборатории

№ п/п	Оборудование	Кол-во
1	2	3
«Грязная» зона. Прием анализов		
1	Инкубатор GI2-2 общего назначения, производства Sheldon, США, 55 л	1
2	Дозатор для мыла, пластиковый	1
3	Дозатор для дезинфицирующего раствора	1
4	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	1
Рабочая комната (посевная)		
1	Ламинарный шкаф II класса защиты (Kojair, Финляндия) на 1 рабочее место для посева материала, KR 130 Biowizard Standard	1
2	СО2-инкубатор с HEPA-фильтром с водяной рубашкой, производства Sheldon, США (модель 3502-2)	1
3	Холодильный шкаф, 400 л	1
4	Дозатор электронный 1-канальный Transferpette electronic , 20-200 мкл, шаг 0,2 мкл, BRAND, Германия	3
5	Прибор для отбора проб воздуха с программным управлением	1
6	Инкубатор GI7-2 общего назначения, производства Sheldon, США, 189 л	2
7	Лабораторная настольная центрифуга Z 206 А, с пластиковыми вкладышами на 1500 - 3000 тыс/оборотов, производства Hermle Labortechnik, Германия	1

Продолжение таблицы 2

1	2	3
8	Ламинарный шкаф II класса защиты (Kojair, Финляндия) KR-100 BW SL, для посева на грибы	1
9	Дозатор для мыла, пластиковый	1
10	Дозатор для дезинфицирующего раствора	1
11	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	1
12	Микроскоп	1
13	Кондиционер	1
Рабочая комната (микробиологические анализаторы)		
1	Анализатор бактериологический	1
2	Анализатор культур крови	1
3	Инкубатор GI6-2 общего назначения, производства Sheldon, США, 164 л	2
4	Инкубатор GI2-2 общего назначения, производства Sheldon, США 55 л	2
5	Микроскоп стереоскопический	1
6	Стандартный инкубационный контейнер на 15 -18 чашек	3
7	Большой инкубационный контейнер на 30-33 чашки	1
8	Холодильный шкаф, 400 л	1
9	Низкотемпературный морозильник UF440-86E, производства Snijders Scientific, Голландия 440 л вертикальный	1
10	Дозатор для мыла, пластиковый	1
11	Дозатор для дезинфицирующего раствора	1
12	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	1
13	Микроскоп	1
14	Кондиционер	1
«Чистая» зона. Автоклавная		
1	Автоклав VX 100 с вертикальной загрузкой для стерилизации посуды и чистых материалов, жидкостей в открытых сосудах, производства Systec GmbH, Германия.	1

Продолжение таблицы 2

1	2	3
2	Автоматический автоклав DX 90 с горизонтальной загрузкой, для стерилизации жидких сред производства Systec GmbH, Германия.	1
3	Автоматический автоклав DX 90 2D проходной производства Systec GmbH, Германия.	1
4	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	2
Моечная/стерилизационная		
1	Посудомоечная лабораторная машина	1
2	Мойка лабораторная, нерж. сталь	1
3	Сухожаровой шкаф/суховоздушный стерилизатор CE3F-2 с принудительной конвекцией, производства Sheldon, США, 85 л	1
4	Сухожаровой шкаф/суховоздушный стерилизатор CE5F-2 с принудительной конвекцией, производства Sheldon, США, 142 л	1
5	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	1
6	Дозатор для мыла, пластиковый	1
7	Дозатор для дезинфицирующего раствора	1
8	Кондиционер	1
Средоварочная		
1	Автоматическая средоварка MediaPrep 10 с автоматическим разливочным модулем Systec GmbH, Германия	1
2	Лабораторные электронные весы до 400г, точность до 0,01г	1
3	Вытяжной шкаф со встроенной варочной поверхностью на 2 конфорки, с освещением, дополнительными электрическими розетками.	1
4	Аквадистиллятор	1
5	Водяная баня	1
6	pH-метр	1
7	Холодильный шкаф, 400 л	1

Продолжение таблицы 2

1	2	3
8	Ламинарный шкаф II класса защиты (Kojair, Финляндия) KR-200 BW GL на 2 рабочих места для розлива питательных сред, с цельной заглубленной столешницей, с электророзеткой.	1
9	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	1
10	Дозатор для мыла пластиковый	1
11	Дозатор для дезинфицирующего раствора	1
12	Кондиционер	1
Бокс		
1	Ламинарный шкаф II класса защиты (Kojair, Финляндия) на 2 рабочих места для посева материала на стерильность KR-170 BW GL	1
2	Инкубатор GI12-2 общего назначения, 2 камеры по 170 л, производства Sheldon, США	1
3	Дозатор для мыла, пластиковый	1
4	Дозатор для дезинфицирующего раствора	1
5	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	2
Санитарная микробиология		
1	Ламинарный шкаф II класса защиты KR-170 BW GL (Kojair, Финляндия) на 2 рабочих места, для посева материала на стерильность	1
2	Микроскоп люминесцентный	1
3	Микроскоп	1
4	Дозатор для мыла пластиковый	1
5	Дозатор для дезинфицирующего раствора	1
6	Рециркулятор настенный для помещений «высокого риска»	1
Дополнительно		
1	Тележка внутрикорпусная с 2 решетчатыми металлическими полками	5
2	Контейнеры для транспортировки биоматериала	40

Продолжение таблицы 2

1	2	3
3	Сумки термостаты для транспортировки биоматериала	6
4	Емкости для обработки и дезинфекции перчаток, пипеток, насадок	1

7.3 Методы микробиологической диагностики

Основу микробиологической диагностики инфекционных заболеваний составляют микроскопические, микробиологические, биологические, серологические и аллергологические методы.

Микроскопические методы включают приготовление мазков и препаратов для микроскопирования. В большинстве случаев результаты микроскопических исследований носит ориентировочный характер (например, определяют отношение возбудителей к окраске), так как многие микроорганизмы лишены морфологических и тинкториальных особенностей. Тем не менее, микроскопией материала можно определить некоторые морфологические признаки возбудителей (наличие ядер, жгутиков, внутриклеточных включений и т.д.), а также установить факт наличия или отсутствия микроорганизмов в присланных образцах.

Микробиологические методы – «золотой стандарт» микробиологической диагностики, так как результаты микробиологических исследований позволяют точно установить факт наличия возбудителя в исследуемом материале. Идентификацию чистых культур (до вида микроорганизма) проводят с учетом морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, токсигенных и антигенных свойств микроорганизма. Большинство исследований включает определение чувствительности к антимикробным препаратам у выделенного возбудителя. Для эпидемиологической оценки роли микроорганизма проводят внутривидовую идентификацию определением фаговаров, биоваров, резистентваров и т.д.

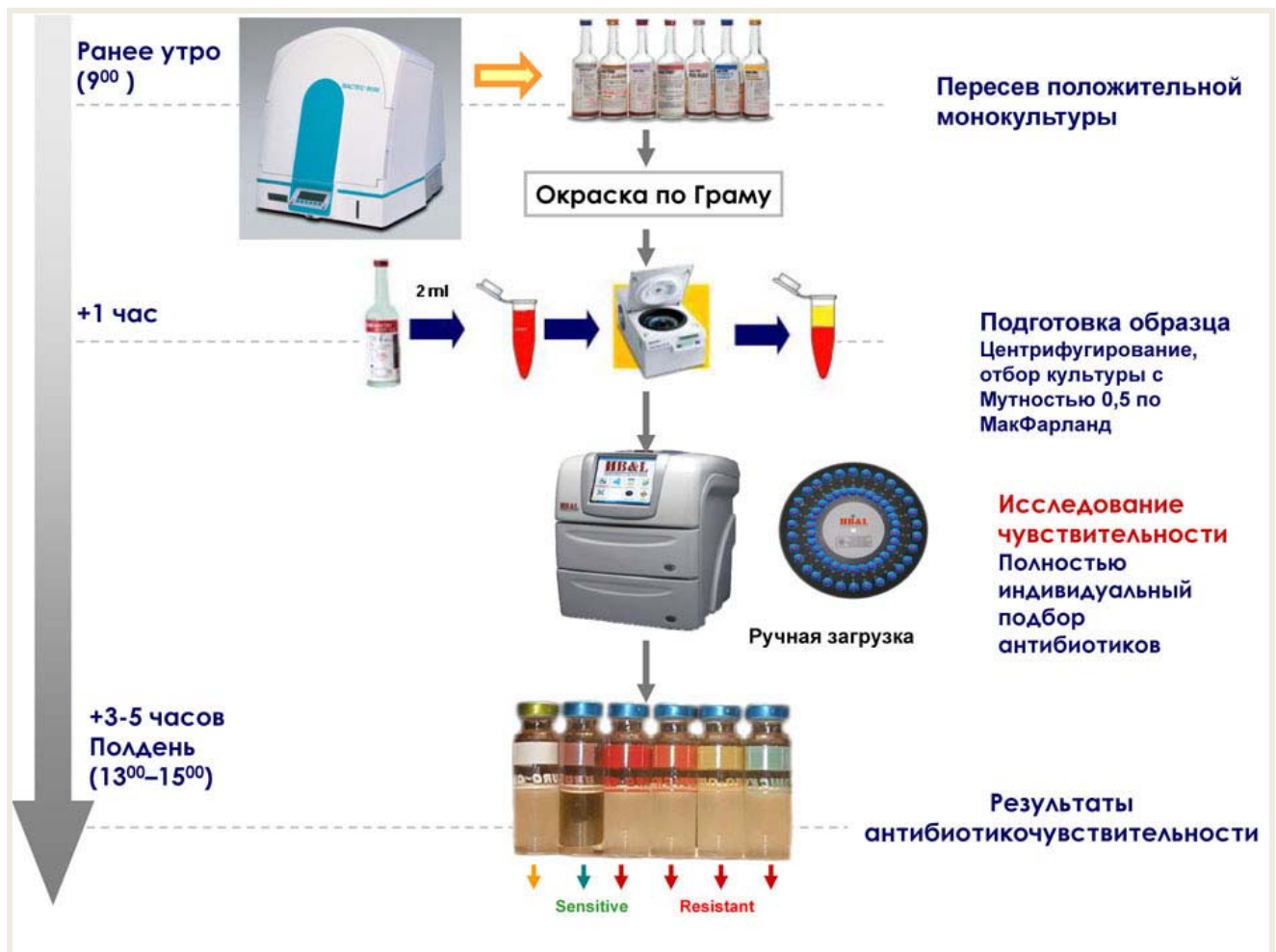


Рисунок 30 – Метод Грама

Биологические методы направлены на определение наличия токсинов возбудителя в исследуемом материале и на обнаружение возбудителя (особенно при незначительном исходном содержании в исследуемом образце). Методы включают заражение лабораторных животных исследуемым материалом с последующим выделением чистой культуры патогена, либо установлением факта присутствия микробного токсина и его природы. Моделирование экспериментальных инфекций у чувствительных животных – важный инструмент изучения патогенеза заболевания и характера взаимодействий внутри системы микроорганизм-макроорганизм. Для проведения биологических проб используют только здоровых животных определённой массы тела и возраста. Инфекционный материал вводят внутрь, в дыхательные пути, внутривенно, внутримышечно,

внутрикожно и подкожно, в переднюю камеру глаза, через трепанационное отверстие черепа, субокципитально (в большую цистерну головного мозга). У животных прижизненно забирают кровь, экссудат из брюшины, после гибели – кровь, кусочки различных органов, СМЖ, экссудат из различных полостей.

Серологические методы выявления специфических Ат и Аг возбудителя – важный инструмент в диагностике инфекционных заболеваний. Особую ценность они имеют в тех случаях, когда выделить возбудитель не представляется возможности. При этом необходимо выявить повышение титров Ат, в связи с чем исследуют парные образцы сыворотки, взятые в интервале 10-20 суток (иногда этот интервал может быть более длительным). Ат обычно появляются в крови на 1-2-ю неделю заболевания и циркулируют в организме относительно долго, что позволяет использовать их выявление для ретроспективных эпидемиологических исследований. Определение классов Ig четко характеризует этапы инфекционного процесса, а также может служить косвенным прогностическим критерием. Особое значение имеют методы выявления микробных аллергенов (Аг). В значимых количествах они появляются уже на самых ранних сроках, что делает их идентификацию важным инструментом экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, а количественное их определение в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии.

Аллергологические методы многих возбудителей обладают сенсibiliзирующим действием, что используют для диагностики инфекционных заболеваний, а также при проведении эпидемиологических исследований. Наибольшее распространение нашли кожно-аллергические пробы, включающие внутрикожное введение Аг с развитием реакции ГЗТ. Кожные пробы нашли применение в диагностике таких заболеваний как сар, мелиодиоз, бруцеллез. Наиболее известна проба на Манту, используемая как для диагностики туберкулеза, так и для оценки невосприимчивости организма к возбудителю.

7.4 Микробиологическое наблюдение за внешней средой

Безусловно, развитие промышленности и сельского хозяйства требует внимательного серьезного отношения общества к изменению состояния окружающей среды. В то же время и человеческая цивилизация нуждается в защите от неблагоприятных внешних воздействий, вызываемых естественными факторами, а также от последствий необдуманной деятельности самого человека.

Объективная информация о состоянии окружающей природной среды позволяет сориентировать общество на рациональное ведение народного хозяйства. Поэтому вполне закономерно, что важнейшей частью деятельности человека, как субъекта общества является контроль за его взаимоотношениями с природой, направленными на сохранение гармонии как с самой природой (биосферный уровень), так и с порожденным ею обществом (ноосферный уровень).

Вследствие этого появились специальные службы, оперативно отслеживающих изменения, происходящие в природе и обществе, – настоятельная необходимость, тесно связанная с высоким уровнем общественного развития, а также с уровнем сознания отдельных граждан.

На территории нашей страны общегосударственная служба наблюдений и контроля за уровнем загрязнения окружающей природной среды была создана еще в СССР в 1973г. Она возникла на базе Госкомгидромета, обладающего наблюдательными, научно-исследовательскими и оперативными полномочиями и выполняющего свои функции под контролем органов, принадлежащих различным министерствам и ведомствам. В РФ правопреемником созданной службы с 2004г. является Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, осуществляющая те или иные выше названные функции. Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды фактически призвана выполнять функции так называемой общенациональной системы, обеспечивающей полноценный мониторинг.

Под мониторингом окружающей природной среды понимают систему, включающую регулярные длительные наблюдения за ее состоянием в пространстве

и времени и своевременные предупреждения о создающихся критических ситуациях, вредных и опасных для здоровья людей и других живых организмов. В этой связи следует вспомнить о трагедии, произошедшей в конце сентября 2002г. в Северной Осетии, когда сход ледника в Кармадонское ущелье привел к большим человеческим жертвам. Возможно, что этой трагедии можно было бы избежать, если бы систематически проводились абсолютно обязательные в гляциологии наблюдения в населенных районах, тем более за столь подвижным ледником, сход которого и ранее приводил к печальным последствиям.

Объекты и уровневый характер наблюдениями за состоянием природной среды

При осуществлении мониторинга объектами наблюдения служат практически все природные среды: воздух, вода и почва. В то же время различают мониторинг жизнедеятельности человека и фоновый мониторинг, объединяющий все ранее названные объекты наблюдения. При этом исследования их состояния включают не только стационарные наблюдения, но и количественно-качественные изменения, позволяющие судить о динамике распространения благоприятных или негативных процессов, протекающих в этих средах.

Систематические наблюдения за окружающей природной средой ведутся функционально объединенными физическими и юридическими лицами, осуществляющими деятельность в области гидрометеорологии, климатологии, гелиогеофизики, эпидемиологии и т.д.

Различают три уровня наблюдения за состоянием окружающей природной среды:

1) импактный (повышенный). Осуществляется в местах интенсивного антропогенного вмешательства на ограниченной территории;

2) фоновый (глобальный). Характеризует состояние окружающей природной среды в тех местах Земли, которые значительно удалены от источника загрязнения или эпидемиологической опасности;

3) региональный. Занимает промежуточное положение между импактным и фоновым уровнями, типичен для обширных территорий, охваченных хозяйственной деятельностью.

Достоверная информация о состоянии окружающей среды складывается из данных, получаемых от организаций, входящих в состав Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, последовательно представляющих на вышестоящий уровень подготовленную информацию:

1) контрольно-измерительная сеть, включающая пункты наблюдения, станции и лаборатории, в которых осуществляются первичные наблюдения за состоянием окружающей среды и производится обработка и обобщение получаемых материалов;

2) территориальные и региональные центры, проводящие обобщение и анализ материалов, характеризующих состояние окружающей среды, и дающие местные прогнозы;

3) НИИ отраслевых министерств и ведомств, оценивающие состояние окружающей среды в национальном или глобальном масштабах;

4) федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, осуществляющая необходимую координацию деятельности всех низовых уровней и планирующая их дальнейшую работу.

Информация об изменениях в окружающей природной среде по степени срочности делится на три категории:

1) экстренная информация. Характеризуется тем, что возникает благодаря появлению в окружающей природной среде резких аномалий, образуемых в результате технологических нарушений, сопровождающихся выбросом вредных веществ в окружающую среду, а также вследствие неожиданного изменения гидрометеорологических условий, в частности при изменении уровня воды в природных водоемах. В этих случаях информация немедленно поступает во все местные и региональные организации, а в конечном итоге – на уровень Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, где

принимаются соответствующие решения о ликвидации последствий техногенных или природных аномалий;

2) оперативная информация. Обычно охватывает месячный период наблюдений за состоянием окружающей природной среды лабораториями, пунктами и станциями наблюдения непосредственно на местах. Анализ полученных ими данных передается в НИИ соответствующих министерств и ведомств и далее поступает в Федеральную службу по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. Эта категория информации подлежит опубликованию местными органами по гидрометеорологии и контролю природной среды в регулярно выпускаемых бюллетенях;

3) режимная информация. Отражает общее состояние окружающей природной среды и содержит анализ причин и следствий происходящих изменений. Охватывает годовой период наблюдений. Такая информация положена в основу специальных ежегодников и обзоров, включающих долгосрочные прогнозы по оптимизации использования природных ресурсов и рациональному хозяйствованию.

Критерии качества окружающей среды

Критерии, характеризующие состояние окружающей среды, вводятся с целью получения наиболее объективной оценки ее качества. Вследствие этого вводится ряд специальных понятий, которыми в той или иной степени пользуются специалисты различного профиля:

1) норма загрязнения – максимальная концентрация веществ, содержащихся в среде или поступивших в нее, допускаемая нормативными актами;

2) оптимальное количество загрязнений – количество выброшенных в окружающую среду отходов, уравновешенное, с одной стороны, предельной стоимостью выбросов, а с другой – предельными социальными издержками;

3) пиковая концентрация – максимальная концентрация загрязнителя (поллютанта) в окружающей среде, установившаяся за обусловленный отрезок времени;

4) летальная доза – минимальное количество ядовитого вещества, попадающего в организм и приводящего к смертельному исходу;

5) предельно допустимая концентрация (ПДК) – установленный в законодательном порядке норматив содержания в окружающей среде вредного вещества, практически не влияющего на здоровье человека и не вызывающего неблагоприятных экологических последствий.

Для оценки состояния окружающей среды этим понятием пользуются чаще всего. В законодательном порядке установлены ПДК для огромного количества веществ: в почве - для 50, в атмосферном воздухе ~ для 500, в воде хозяйственного и бытового назначения ~ для 1000;

6) предельно допустимое поступление (ПДП) – количество вредного вещества или неблагоприятного фактора, поступившего на определенную площадь в единицу времени, в концентрации, не превышающей установленную ПДК;

7) предельно допустимый выброс или сброс (ПДВ или ПДС) – количество загрязняющего вещества или неблагоприятного фактора за единицу времени, превышение которого ведет к катастрофическим изменениям в природной среде и поэтому опасно для здоровья человека.

7.5 Цель и задачи микробиологических исследований

После открытия микроорганизмов прошло три столетия, и наука, занимающаяся их изучением – микробиология – заняла достойное место среди других биологических и медицинских наук. Микроорганизмы широко распространены в природе. Они находятся в воздухе, почве, пище, на окружающих нас предметах, на поверхности и внутри нашего организма. Такое широкое распространение микробов свидетельствует об их значительной роли в природе и жизни человека. Микроорганизмы обуславливают круговорот веществ в природе, осуществляют расщепление органических соединений и синтез белка. С помощью микроорганизмов происходят важные производственные процессы: хлебопечение, производство ферментов, гормонов, антибиотиков и других веществ.

Наряду с полезными микроорганизмами существует группа патогенных микробов – возбудители различных заболеваний человека, животных, растений.

Микроорганизмы были открыты в конце VIII века, но микробиология как наука сформировалась только в начале XIX века, после гениальных открытий французского ученого Луи Пастера.

В связи с огромной ролью и задачами микробиологи не может справиться со всеми вопросами в пределах одной дисциплины и в следствие этого происходит ее дифференцировка в различные дисциплины.

Общая микробиология – изучает морфологию, физиологию, биохимию микроорганизмов, их роль в круговороте веществ и распространение в природе.

Техническая микробиология – входит изучение микробов участвующих в производстве антибиотиков, спиртов, витаминов, также разработка методов защиты материалов от воздействия микроорганизмов.

Сельскохозяйственная микробиология - изучает роль и значение микробов в формировании структуры почвы, ее плодородия, минерализация и питание растений.

Ветеринарная микробиология – изучает возбудителей заболеваний у животных, разрабатывает методы специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний.

Медицинская микробиология – рассматривает свойства патогенных и условно - патогенных микробов, их роль в развитии инфекционного процесса и иммунного ответа, разрабатывает методы лабораторной диагностики и специфической профилактики и терапии инфекционных заболеваний.

Вирусология – изучает неклеточные микробы – вирусы, их природу, химический состав, взаимоотношение с клеткой хозяина, механизмы внутриклеточного паразитизма и т.д.

Важнейшими задачами медицинской микробиологии, вирусологии, иммунологии является дальнейшее изучение роли отдельных видов патогенных агентов в этиологии и патогенезе различных заболеваний людей, в том числе в возникновении опухолей, а также механизмов формирования наследственного и приобретенного иммунитета, разработка методов лечения и профилактики инфекционных заболеваний при помощи иммунологических и

химиотерапевтических средств и методов специфической диагностики в том числе экспресс-методов.

Цель микробиологических исследований – установить факт наличия или отсутствия возбудителя в организме больного и на объектах окружающей среды.

Задачи микробиологических исследований – идентифицировать микроорганизмы в исследуемом материале, определить их видовую принадлежность, морфологические, биохимические, токсигенные и антигенные свойства, а также установить чувствительность выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам. Несмотря на то, что проведение микробиологических исследований относится к компетенции микробиологов, каждый врач, имеющий дело с инфекционными заболеваниями, должен знать, как и когда необходимо отбирать материал для исследований, на какие исследования его направлять и как интерпретировать полученные результаты.

Основной задачей микробиологического исследования пульмонологических больных является выявление этиологии острого и обострения хронического заболевания с целью определения этиотропной терапии и контроля за ее эффективностью.

В настоящее время существуют две гипотезы, или точки зрения, по вопросу об этиологии воспалительных заболеваний легких. Согласно одной эти заболевания полиэтиологичны; возбудителем их может быть большая группа микроорганизмов вирусной, микробной и грибковой природы, как вегетирующих в верхних дыхательных путях и ротовой полости, так и проникающих из внешней среды.

Основанием для такого представления служит выделение из бронхиального секрета ассоциаций ряда микроорганизмов, общих с микрофлорой верхних дыхательных путей и ротовой полости, а также хорошо известная связь воспалительного процесса в легких с патологическими изменениями в носоглотке.

Однако в последнее десятилетие эта концепция подвергается серьезной критике, так как до настоящего времени дискутируется вопрос о роли вирусов в возникновении острых и обострении хронических воспалительных заболеваний легких, развитию которых часто предшествует острая респираторная вирусная

инфекция. Роль вирусов как непосредственных возбудителей воспаления в респираторном отделе легкого большинством авторов отрицается. Вместе с тем, наблюдаемый при острых респираторных вирусных инфекциях комплекс патологических изменений (угнетение клеточных и гуморальных факторов иммунитета, цитоцидное и сенсибилизирующее действие, нарушение очистительной функции бронхиального дерева и т. д.) снижает резистентность организма, создает благоприятные условия для размножения и проникновения в ткани легкого различных микроорганизмов и развития бактериального инфекционного процесса. Поэтому даже при отсутствии специфического вирусного поражения легких острая респираторная инфекция может провоцировать развитие эндо- и экзогенного бактериального бронхо-легочного процесса. Эта точка зрения на роль острых респираторных вирусных инфекций является практически общепризнанной, и она должна определять тактику пульмонолога при профилактике и диагностике данного заболевания.

Микроорганизмы, и в первую очередь бактерии, распространены в природе гораздо шире, чем другие живые существа. Благодаря исключительному разнообразию усвоения питательных веществ, малым размерам и легкой приспособляемости к различным внешним условиям бактерии могут быть обнаружены там, где отсутствуют другие формы жизни.

Сложные взаимоотношения микроорганизмов со средой, которые обуславливают их размножение, развитие и выживание, изучает специальная биологическая наука – экология.

Но существует и медицинская наука – санитарная микробиология, которая также занимается изучением микроорганизмов и процессов, вызываемых ими в окружающей среде. Основной задачей санитарной микробиологии является предупреждение возникновения инфекционных заболеваний, т. е. осуществление постоянного контроля за водой, воздухом, почвой, пищевыми продуктами и т. д. с целью выявления патогенных микроорганизмов, либо выявление санитарно-показательных микроорганизмов, которые являются косвенными показателями зараженности окружающей среды. Санитарно-показательные микроорганизмы – это

постоянные обитатели поверхностей и полостей тела человека и животных, выделяющихся из организма теми же путями, что и патогенные. Поэтому, чем больше выявлено санитарно-показательных микроорганизмов, тем большая вероятность попадания в объекты внешней среды патогенных микроорганизмов.

Для каждого объекта внешней среды имеются определенные санитарно-показательные микроорганизмы – критерии оценки по бактериологическим показателям. Например, в отношении кишечных инфекций роль таких индикаторов принадлежит кишечным палочкам – постоянным обитателям кишечника человека и животных.

Санитарно-бактериологические исследования проводятся в строгом соответствии со специальными государственными общесоюзными стандартами, приказами, методическими рекомендациями, правилами, которые позволяют дать оценку соответствия выявленной в окружающей среде микрофлоры гигиеническим требованиям. В нормативных документах отражены правила отбора проб, количество материала, условия транспортировки, методы и цель исследования, а также критерии оценки полученных результатов.

Распространение микроорганизмов в природе, роль в круговороте веществ.

Все живое на Земле, происшедшее когда-то из неживой материи и качественно отличающееся от последней, находится в теснейшей связи с мертвой природой. Существует постоянное равновесие и взаимосвязь между живой и неживой природой, происходит непрерывная цепь превращений вещества и энергии на земной поверхности, непрерывный процесс созидания и разложения органического вещества.

Этот непрерывный процесс составляет малый биологический круговорот, составляющий часть большого, абиогенного (безжизненного) круговорота, который изучается геохимией и геологией.

В биологический круговорот вовлечены атомы всех химических элементов, составляющих живое вещество. Из них особенно важно рассмотреть круговорот углерода, азота, серы и фосфора.

Зеленые растения и автотрофные микроорганизмы строят органические соединения своего тела, пользуясь только минеральными формами углерода (углекислота атмосферы) и минеральными формами азота (аммиачные и азотно-кислые соли). Они осуществляют первичный синтез органических веществ на Земле из простых неорганических соединений.

Единственным источником углеродного питания для зеленых растений является углекислота. Зеленые растения благодаря солнечной энергии превращают углекислоту, не имеющую никакой энергетической ценности, в углеводы, белки и жиры, имеющие исключительную энергетическую ценность. Все земное царство является огромным аккумулятором солнечной энергии, которую оно переводит в скрытую энергию своих сложных органических соединений.

Подсчитано, что зеленые растения ежегодно извлекают из атмосферы 150-ю часть всего количества углекислоты атмосферы. Следовательно, лет через пятьдесят вся углекислота могла бы быть переведена в органические соединения растительных и животных организмов. Исчезновение углекислоты сделало бы невозможной жизнь растений, а следовательно, и животных на Земле. Но в действительности этого не наблюдается. Общеизвестно, что содержание углекислоты в атмосфере постоянно и равняется 0,03 %. Это постоянство обуславливается тем, что в природе одновременно происходят и обратные процессы – обогащения атмосферы углекислотой. Одновременно с синтезом органического вещества в природе идет разложение органического вещества до неорганических соединений, таких как CO_2 , H_2O , NH_3 , H_2S и др.

То же самое можно сказать и в отношении азота. Растения не могут усваивать свободный азот из атмосферы и азот, связанный в органических соединениях. Они усваивают только минерализованные азотные соединения – аммонийные и азотнокислые соли. В пахотном слое 1 га почвы содержится 600 кг азота, но усвояемые формы для растений составляют только 1 %. Такое количество усвояемого азота не обеспечило бы и одного хорошего урожая.

Таким образом, жизнь на Земле возможна только при непрерывном разложении органического вещества, синтезированного растениями и животными.

Эта грандиозная переработка всех отмерших остатков растительного и животного царства осуществляется микроорганизмами. В ходе своей жизнедеятельности они производят минерализацию органических веществ – белков, жиров, углеводов – с образованием в конечном итоге углекислоты, воды, аммиака, нитратов, неорганических соединений серы и фосфора, усвояемых растениями. Эти вещества вовлекаются в новый круговорот. Чем энергичнее протекают процессы разложения органических веществ, тем больше развивается органическая жизнь, быстрее осуществляется круговорот веществ в природе.

Такая колоссальная работа микроорганизмов обуславливается их чрезвычайно широким распространением в природе, чрезвычайной быстротой размножения, разнообразием типов их питания и ферментных систем.

7.6 Этапы микробиологических исследований

Первый этап любого микробиологического исследования составляет правильный выбор материала для исследования. Его определяют свойства возбудителя и патогенез вызываемого им заболевания. При поражениях отдельных органов и систем целесообразно отбирать материал соответствующей локализации. При отсутствии поражений исследуют кровь, а затем отбирают образцы с учётом клинической картины заболевания и доступности материала для исследования. Так, при лихорадке неясного генеза первоначально проводят посев крови; затем, при появлении симптомов более конкретных проявлений, например, пневмонии проводят забор мокроты.

Образцы следует забирать до назначения антимикробной терапии, с соблюдением правил асептики для предупреждения загрязнения материала. Каждый образец следует рассматривать как потенциально опасный. При заборе, транспортировке, хранении и работе с ним необходимо соблюдать правила биологической безопасности. Материал собирают в объёме достаточном для всего комплекса исследований. Микробиологические исследования следует начинать немедленно после поступления образца в лабораторию.

Выбор материала для исследования должен соответствовать характеру инфекционного процесса. Так, например, при установлении этиологии пневмонии материалом должна быть мокрота, а не слюна, а при раневых инфекциях отделяемое следует забирать из глубины раны, а не с её поверхности.

7.7 Клиническая микробиология

В течение последней четверти века возрос удельный вес заболеваний, вызванных условно-патогенными бактериями (УПБ). Эта микробная популяция считалась нормальным обитателем кожи, слизистых верхних дыхательных путей, гениталий, кишечника. В здоровом организме она поддерживает необходимый баланс между препятствующей проникновению инфектанта барьерной (микробиологической) и защитной (иммунологической) реакциями системы антиинфекционной резистентности (САЙР). Оба эти аспекта находятся в постоянной взаимосвязи и взаимозависимости.

Клиническая микробиология - наука, изучающая взаимоотношения, складывающиеся между макро- и микроорганизмами в норме, при патологии в динамике патологического процесса с учетом проводимой терапии до констатации клиницистом состояния клинического или полного выздоровления.

Задачи клинической микробиологии:

- 1) изучение биологии и роли УПМ в этиологии и патогенезе ГВЗ человека;
- 2) разработка и использование методов микробиологической диагностики, специфической терапии и профилактики микробных заболеваний, встречающихся в неинфекционных стационарах;
- 3) исследование микробиологических аспектов проблем внутрибольничной инфекции (ВБИ), дисбактериоза, лекарственной устойчивости микробов;
- 4) микробиологическое обоснование и контроль за антимикробными мероприятиями в больничных стационарах.

В настоящее время в перечне врачебных специальностей выделена бактериология. Если клиническая микробиология будет работать как отдельное

структурное подразделение, то в штат лаборатории помимо врачей-бактериологов целесообразно включать иммунологов-серологов, врачей лечебников химио - и иммунотерапевтов.

Врачи бактериологи исследуют обсемененность очага воспаления, слизистых верхних дыхательных путей, гениталий, кишечника; проводят контроль за возможным развитием госпитальной инфекции; определяют отношение к антибиотикам выделенных микроорганизмов.

Следует особо подчеркнуть, что иммунологи - серологи лабораторий существенным образом отличаются от клинических иммунологов. Клинические иммунологи определяют иммунный статус больных с воспалительными процессами, вызванными УПБ, без учета природы и особенностей возбудителя, состояния факторов микробиологического аспекта САЙР, проводимой антибактериальной терапии. Иммунологи – серологи лаборатории выдают ответ лечащему врачу с учетом возможного влияния перечисленных выше факторов.

Специалисты химио- и иммунотерапевты должны обязательно быть врачами-лечебниками по образованию. В клинику они выходят, имея полную информацию о больном, которую можно получить в результате проведенных иммуно – микробиологических исследований. Совместно с клиницистами они разрабатывают рациональные схемы антибактериальной и иммунотерапии больного.

Приготовление растворов и питательных сред для первичного посева. В большинстве лабораторий среды готовят на местах. По этой причине конечный результат анализа и срок его выдачи в клинику зависят, в конечном итоге, от лаборанта-средовара. В России отсутствует промышленное производство дисков с современными антибиотиками, закупаемыми за рубежом и широко используемыми в клинической практике.

Диагностический процесс в клинической микробиологии складывается из четырех основных этапов:

- формулировка задачи и выбор метода исследования;
- выбор, взятие исследуемого материала, его хранение и транспортировка;
- проведение исследований; анализ полученных результатов.

Следует обратить внимание на то, что из четырех указанных этапов только один, да и то не всегда, полностью ложится на персонал лаборатории. Формулировка задачи исследования является прерогативой лечащего врача. В выборе метода исследования, вида исследуемого материала функции врача-микробиолога сугубо консультативные.

Взятие и транспортировку материала, чаще всего, осуществляет персонал лечебного учреждения и только в особых случаях - персонал лаборатории. Анализ полученных результатов проводится совместно лечащим врачом и врачом микробиологом, однако право и обязанность постановки диагноза больному принадлежат лечащему врачу. Поэтому ответственность за успех микробиологического исследования не может быть возложена исключительно на лабораторию.

Достоверность и клиническая значимость получаемой информации определяется согласованностью действий лечащего врача и врача-микробиолога. Согласованные действия возможны только на основе взаимопонимания, когда обе стороны понимают потребности друг друга и трудности, которые возникают при решении своей составляющей общей задачи каждым из них.

Методы лабораторной диагностики заболеваний инфекционной природы

Методы, основанные на выявлении инфекционных агентов (бактерий, грибов, вирусов, простейших и т.д.):

1) микроскопические методы (в том числе, бактериоскопический), базирующиеся на прямом наблюдении возбудителя в патологическом материале с помощью различных приемов микроскопии;

2) культуральные методы (в том числе, бактериологический), главной составляющей которых является культивирование возбудителя на питательных средах, в организме лабораторных животных или на культурах тканей с целью выделения его в чистой культуре и последующей идентификации;

3) методы, позволяющие обнаружить в исследуемом материале продукты, синтезированные микроорганизмами (например, летучие жирные кислоты при

диагностике инфекций, обусловленных неспорообразующими анаэробами или токсин, при диагностике ботулизма);

4) иммунологические методы поиска антигенов возбудителей в исследуемом материале;

5) генетические методы, основанные на обнаружении нуклеиновых кислот возбудителя в пробе.

Методы выявления активного иммунного ответа, чаще всего нарастания титра антител к возбудителю (серодиагностика) или сенсibilизации (аллергодиагностика).

Неспецифические лабораторные тесты, по характеру отклонения которых можно заподозрить патологические изменения, характерные для инфекционных процессов определенной этиологии (например, изменение активности трансаминаз при вирусных гепатитах).

Перечень лабораторных анализов, выполняемых в лаборатории клинической микробиологии:

– кал на кишечные патогенные микроорганизмы с определением антибиотикочувствительности;

– кал на кампилобактерии;

– кал на золотистый стафилококк с определением чувствительности к антибиотикам;

– кал на кишечный дисбиоз (дисбактериоз):

– бифидобактерии;

– лактобактерии;

– кишечная палочка;

– энтерококки;

– стафилококки;

– клостридии;

– дрожжеподобные грибы;

– условнопатогенная флора;

- посев отделяемого урогенитального тракта:
 - на гонорею;
 - на уреоплазмы и микоплазмы;
 - на микроценоз влагалища;
 - на микрофлору и чувствительность к антибиотикам;
 - на дрожжевые грибы;
 - на анаэробы;
- кровь на тифо-паратифозную группу бактерий;
- желчь на тифо-паратифозную группу бактерий;
- моча на тифо-паратифозную группу бактерий;
- исследование на микрофлору с определением чувствительности к антибиотикам следующего клинического материала:
 - посев крови;
 - посев цереброспинальной жидкости (ликвор);
 - посев с определением степени бактериурии;
 - посев отделяемого влагалища;
 - посев мазков из зева;
 - посев мазков из носа;
 - посев отделяемого синусов;
 - посев отделяемого глаз;
 - посев отделяемого ушей;
 - посев мокроты;
 - посев раневого отделяемого;
 - посев грудного молока;
 - посевы из закрытых полостей.

Точная этиологическая диагностика многих форм инфекционной патологии, таких как Кулихорадка, гастроэнтероколиты и многих других крайне затруднена или даже невозможна без проведения комплекса лабораторных исследований. В связи с этим переоценить значение лабораторных методов в диагностике

невозможно. В то же время нельзя забывать, что результат лабораторного исследования не является «истиной в последней инстанции» и диагноз больному ставит в конечном счете врач-клиницист на основании всего комплекса многообразной информации, включающего как данные объективных методов исследования, так и жалобы больного, анамнез и т.д.

Данный методический подход базируется на принципах фундаментальной и прикладной гистологии, включая цитологию.

Гистология (от греч. *ἵστίον* – ткань и греч. *Λόγος* – знание, слово, наука) – раздел биологии, изучающий строение тканей живых организмов. Обычно это делается рассечением тканей на тонкие слои и с помощью микротомы. В отличие от анатомии, гистология изучает строение организма на тканевом уровне.

Гистология человека – раздел медицины, изучающий строение тканей человека.

Гистопатология – это раздел микроскопического изучения поражённой ткани, является важным инструментом патоморфологии (патологическая анатомия), так как точный диагноз рака и других заболеваний обычно требует гистопатологического исследования образцов.

Гистология судебно-медицинская – раздел судебной медицины, изучающий особенности повреждений на тканевом уровне.

Следует заметить, что Нобелевскую премию 1906 года в физиологии или медицине присудили двум гистологам, Камилло Гольджи и Сантьяго Рамон-и-Кахалю. Они имели взаимно-противоположные воззрения на нервную структуру головного мозга в различных рассмотрениях одинаковых снимков.

В XX веке продолжалось совершенствование методологии, что привело к формированию гистологии в её нынешнем виде. Современная гистология тесно связана с цитологией, эмбриологией, медициной и другими науками. Гистология разрабатывает такие вопросы, как закономерности развития и дифференцировки клеток и тканей, адаптации на клеточном и тканевом уровнях, проблемы регенерации тканей и органов и др. Достижения патологической гистологии широко

используются в медицине, позволяя понять механизм развития болезней и предложить способы их лечения.

Данная классическая методика предполагает следующий алгоритм действий лаборанта-гистолога (цитолога):

1. Фиксация (от лат. *fixatio* – закрепление) – фрагмент ткани обрабатывают с помощью жидкости-фиксатора, в роли которого чаще всего выступает формалин, реже – спирты, пикриновая кислота и др. Такая обработка предотвращает распад клеток и разрушение структуры ткани под действием собственных ферментов клеток и процессов гниения, таким образом сохраняя прижизненную структуру и делая возможным изучение ткани. Принцип действия фиксирующих жидкостей основан на быстрой гибели клеток и коагуляции белка. Наиболее распространенный тип фиксации – иммерсионная фиксация (от лат. *immersio* – погружение), при которой фрагмент ткани целиком погружается в раствор; в экспериментальных условиях также используют перфузионную фиксацию (от лат. *perfusio* – вливание), при которой фиксатор вводят через сосудистую систему. При этом используют как технический формалин (марка ФМ ГОСТ 1625-89), так и подготовленный («забуференный» формалин), который отличается большей стабильностью – не образуется белый осадок, свойственный техническому формалину при температуре ниже 40 °С.

2. Проводка – процесс дегидратации (обезвоживания) фрагмента ткани и пропитки его парафином. Этот этап обеспечивает уплотнение ткани, которое, в свою очередь, необходимо для получения срезов (если ткань будет излишне мягкой, то при микротомировании она будет «сминаться», образуя складки, разрывы и другие артефакты, делающие ее непригодной к изучению). Традиционно проводку осуществляли путем последовательного погружения ткани в растворы ксилола и этилового спирта, однако такой метод имеет ряд существенных недостатков: трудоемкость, длительность (до четырех суток), испарение реагентов в воздух лаборатории (что небезопасно для сотрудников лаборатории, так как ксилолы образуют взрывоопасные паровоздушные смеси, вызывают острые и хронические поражения кроветворных органов, при контакте с кожей – дерматиты), а также

нестабильное качество получаемой ткани, зависящее от человеческого фактора, а именно действий лаборанта. Для решения проблем такого рода лаборатории используют альтернативные реагенты, такие как изопропанол, являющийся нетоксичным, а также аппараты – гистопроцессоры, имеющие закрытый контур и таким образом не допускающие испарений в воздух лаборатории. Путем использования гистопроцессоров также можно значительно уменьшить время проводки по сравнению с ручным методом (до одного часа при использовании гистопроцессора Xpress 120) за счет применения вакуум-инфильтрационной и микроволновой методик.

3. Заливка – процесс создания блока, достаточно твердого, чтобы быть пригодным для резки (микротомирования). Выполняется путем заливки фрагмента ткани жидким парафином, целлоидином, пластмассой или специальными средами для заливки. Затем залитую ткань остужают до затвердевания блока. Целлоидин в настоящее время практически не используется; чистый парафин также обладает рядом недостатков, делающих его непригодным для исследования – при его затвердевании образуются кристаллы, уменьшающие его объем на 5-10 %, что, в свою очередь, ведет к деформации ткани, а также из-за кристаллической структуры он легко крошится при резке. Поэтому чаще всего для изготовления блоков пользуются специальными заливочными средами, представляющими собой смесь парафинов с присадками в виде рисового, пчелиного воска или полимеров. Эти присадки придают парафину эластичность, что не дает ему крошиться при резке. Чтобы создать гомогенную среду для заливки, воск и парафин расплавляют, охлаждают и тщательно перемешивают, повторяя всю процедуру 5-10 раз. Это достаточно трудоемкий процесс, качество получаемой среды нестабильно, поэтому некоторые лаборатории пользуются готовыми средами для заливки, изготовленными в заводских условиях и не требующих дополнительной гомогенизации.

4. Резка, или микротомирование, представляет собой изготовление тонких срезов на специальном приборе – микротоме. Толщина срезов, предназначенных для

световой микроскопии, не должна превышать от 4 мкм до 5 мкм, для электронной – от 50 нм до 60 нм.

5. Окрашивание срезов позволяет выявить структуру ткани за счет неодинакового химического сродства различных элементов ткани к гистологическим красителям. Например, окраска гематоксилином и эозином позволяет выявить кислые структуры ткани, такие как ДНК и РНК, за счет их связывания с гематоксилином, имеющим щелочную реакцию, и цитоплазму клеток, которая связывается с эозином (Основная статья – окраска гематоксилином и эозином). Перед окрашиванием выполняется монтирование среза на предметное стекло. Для избежания формирования складок срез после микротомирования помещают на поверхность подогретой воды, где он расправляется, а потом уже на стекло. Окрашивание, как и все остальные стадии процесса изготовления гистологического препарата, может выполняться вручную и автоматически. Различают традиционное окрашивание и иммуногистохимическое.

6. Заключение срезов представляет собой помещение окрашенного среза, монтированного на предметном стекле, под покровное стекло с использованием среды для заключения, имеющий коэффициент преломления, близкий к таковому у стекла – канадский бальзам, полистирол, специальные среды для заключения. Заключенный препарат можно хранить достаточно длительное количество времени (исключение – при использовании полистирола препарат постепенно теряет прозрачность, а сам полистирол трескается).

В своей совокупности классические гистологические методики предполагают ныне реализацию следующих методических подходов:

- световая микроскопия;
- фазово-контрастная микроскопия;
- темнопольная микроскопия;
- интерференционная микроскопия;
- поляризационная микроскопия;
- люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия;
- ультрафиолетовая микроскопия;

- электронная микроскопия;
- атомно-силовая микроскопия.

Современные методы серодиагностики позволяют определить концентрацию в сыворотке иммуноглобулинов отдельных классов определенной специфичности. Когда первый контакт с микроорганизмом индуцирует иммунный ответ, первыми появляются IgM. Титры IgM быстро нарастают и достигают максимума, а затем относительно быстро снижаются. IgG появляются позже, но дольше сохраняются в высоких титрах.

При повторном контакте с тем же антигеном (вторичный иммунный ответ) IgM вырабатываются в незначительном количестве, реакция гуморального иммунитета проявляется прежде всего увеличением титров IgG. В связи с этим по соотношению IgM и IgG можно отличить первичный иммунный ответ – острое заболевание от вторичного – рецидив или повторное заражение. Кроме того, о различиях в характере вырабатываемых иммуноглобулинов при первичном и вторичном иммунных ответах следует помнить при оценке результатов, полученных с помощью некоторых современных иммунологических методов, например ИФА. Большинство выпускаемых тест-систем для серодиагностики в ИФА позволяют определить титр IgM или IgG. Соответственно и лаборатория сообщает врачу не титр антител вообще, а титр иммуноглобулинов соответствующего класса. В зависимости от конкретной клинической ситуации интерпретация высоких или низких титров IgM и IgG будет отличаться. В частности, низкие титры или отсутствие IgM не всегда можно расценивать как факт, свидетельствующий в пользу отсутствия заболевания.

8 Контрольные вопросы

- 1 Дайте краткую характеристику основных методов микроскопического анализа.
- 2 В чем заключается метод темного поля?
- 3 Где используется электронная микроскопия?
- 4 Назовите специальные методы электронной микроскопии биологических объектов.
- 5 В чем заключается метод культивирования тканей по Ф.М. Лазаренко?
- 6 Какие гистологические методы исследования Вы знаете?
- 7 Назовите цитологические методы исследования.
- 8 Классификация световых микроскопов.
- 9 Принцип работы светового микроскопа.
- 10 В чем заключается принцип работы сканирующей зондовой микроскопии?
- 11 Сущность метода выявления белков по Даниелли.
- 12 Биологическая роль углеводов, классификация.
- 13 Какие методики срезов Вы знаете?
- 14 Перечислите методы микробиологической диагностики.
- 15 Назовите методы гистохимического окрашивания.
- 16 Назовите цели и задачи микробиологического исследования.
- 17 Какие методы лабораторной диагностики заболеваний инфекционной природы Вы знаете?
- 18 Укажите методы исследования биологических объектов на тканевом уровне.
- 19 Назовите этапы микробиологических исследований.

Список использованных источников

- 1 Автандилов, Г. Г., Медицинская морфометрия: руководство / Г.Г. Автандилов. - М. : Медицина, 1990. – 382 с.
- 2 Артишевский А.А., Гистология с техникой гистологических исследований: Учеб. пос. / А.А.Артишевский, А.С.Леонтьук, Б.А.Слука. –Минск:Высш. шк.,1999 . -236 с.
- 3 Афанасьев Ю.И., Гистология./ Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А., Котовский Е.Ф. - М. : Медицина, 2002. - 744 с.
- 4 Быков В. Л., Гистология, цитология и эмбриология. Атлас./ Быков В. Л., Юшканцева С. И. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013 г. - 296 с.
- 5 Верещагина В. А., Цитология. / Верещагина В. А. - М. : Академия, 2012. – 176 с.
- 6 Кузнецов С. Л., Гистология, цитология и эмбриология. / Кузнецов С. Л., Мушкамбаров Н. Н. - М. : Медицинское информационное агентство, 2012. – 640 с.
- 7 Коротяев А. И., Медицинская микробиология, иммунология и вирусолог / Коротяев А. И., Бабичев С. А. – СПб. : СпецЛист, 2008. – 767 с.
- 8 Меньшиков В.В., Клиническая лабораторная аналитика. Том 2. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. / Меньшиков В.В. - М. : Лабинформ-РАМЛД, 1999. -352 с.
- 9 Меньшиков В.В., Клинико-лабораторные аналитические технологии и оборудование./ Меньшиков В.В. - М. : Академия, 2007 – 240 с.
- 10 Поздеев О.К., Медицинская микробиология. / Поздеев О.К. - М.: Геотар-мед, 2004. – 768 с.
- 11 Семченко, В. В., Гистологическая техника : учебное пособие для студ. мед. вузов / В. В. Семченко, С. А. Барашкова, В. Н. Артемьев. - 2-е изд., стереотип. - Омск : Изд-во Омской гос. мед. акад., 2003. - 144 с.
- 12 Свищева Т. Я., Перспективная диагностика. Биорезонансная, световая, темнопольная, люминесцентная. / Свищева Т. Я. - М. : Диля, 2006. – 370 с.

- 13 Ченцов Ю.С., Введение в клеточную биологию. / Ченцов Ю.С. - - М.: ИКЦ «Академкнига», 2004. - 495 с.