

# SPIS TREŚCI

---

<b>Od autorów</b>	13
<b>1. Mikroskopy świetlne</b>	15
1.1. Budowa mikroskopu świetlnego	15
1.1.1. Zespół mechaniczny	15
1.1.2. Zespół optyczny	17
1.2. Teoria mikroskopu	20
1.2.1. Powstawanie obrazu mikroskopowego	20
1.2.2. Powiększenie całkowite mikroskopu	20
1.2.3. Zdolność rozdzielcza mikroskopu	21
1.3. Specjalne odmiany mikroskopów świetlnych	23
1.3.1. Ciemne pole	23
1.3.2. Mikroskop polaryzacyjny	24
1.3.3. Mikroskop fazowo-kontrastowy	25
1.3.4. Mikroskop interferencyjny	27
1.3.5. Kontrast interferencyjno-różnicowy (optyka Nomarskiego)	27
1.3.6. Mikroskop fluorescencyjny	28
1.3.7. Mikroskop konfokalny	30
1.3.8. Mikroskop dwufotonowy	32
1.3.9. Mikroskop odwrócony	32
1.3.10. Mikroskop cyfrowy	33
1.4. Rejestracja obrazu mikroskopowego	34
1.4.1. Mikrofotografia	34
1.4.2. Wideomikroskopia	35
1.4.3. Mikroskopia wirtualna	35
<b>2. Mikroskopy elektronowe</b>	37
2.1. Zasady optyki elektronowej	37
2.2. Transmisyjny mikroskop elektronowy	40
2.2.1. Działo elektronowe	41
2.2.2. Kondensator	42
2.2.3. Soczewka obiektywowa	42
2.2.4. Soczewki projekcyjne	42
2.2.5. Stolik przedmiotowy	42
2.2.6. Ekran luminescencyjny	43

2.2.7. System fotograficznej rejestracji obrazu	43
2.2.8. Zespół pomp próżniowych	44
2.2.9. Pulpit sterowniczy	44
2.3. Wysokonapięciowy mikroskop elektronowy	45
2.4. Skaningowy mikroskop elektronowy	45
2.5. Niskonapięciowy mikroskop elektronowy	47
2.6. Mikroanalizator rentgenowski	47
<b>3. Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie świetlnym</b>	<b>49</b>
3.1. Rodzaje preparatów mikroskopowych	49
3.2. Pobieranie materiału	50
3.3. Utrwalanie	51
3.3.1. Cele utrwalania	51
3.3.2. Rodzaje utrwalaczy	52
3.3.3. Metody utrwalania	52
3.3.4. Chemiczne podstawy procesu utrwalania	54
3.3.5. Oddziaływanie mikrofal na tkankę	55
3.3.6. Wypłukiwanie utrwalacza	55
3.4. Odwadnianie	55
3.5. Płyny pośrednie	56
3.6. Zatapianie w parafinie	56
3.6.1. Formowanie bloczków	57
3.6.2. Alternatywna technika parafinowa: opracowanie materiału bez rozpuszczalników organicznych za pomocą mikrofal (ang. <i>microwave paraffin processing</i> )	58
3.6.3. Zalety i ograniczenia techniki parafinowej	58
3.7. Zatapianie w celoidynie	59
3.8. Zatapianie w żywicach	59
3.8.1. Zatapianie w żywicach akrylowych	60
3.8.2. Zatapianie w żywicach epoksydowych	60
3.9. Krojenie skrawków	60
3.9.1. Mikrotomy	60
3.9.2. Zasady krojenia	62
3.9.3. Krojenie skrawków parafinowych	63
3.9.4. Krojenie skrawków celoidynowych	64
3.9.5. Krojenie skrawków z żywicy akrylowych	65
3.9.6. Krojenie skrawków z żywicy epoksydowych	65
3.10. Barwienie	65
3.10.1. Przygotowanie skrawków do barwienia	65
3.10.2. Barwienie barwnikami kwaśnymi i zasadowymi	66
3.10.3. Barwienie przyżyciowe	67
3.10.4. Impregnacja związkami metali	67
3.10.5. Bejcowanie	67
3.10.6. Różnicowanie	68
3.10.7. Płukanie	68
3.11. Zamykanie preparatów	68

3.12. Automatyzacja procesów opracowania materiału do badań mikroskopowych	69
3.13. Przygotowanie tkanek zmineralizowanych do badań mikroskopowych	70
3.13.1. Technika szlifów	70
3.13.2. Technika skrawków	71
3.14. Przepisy praktyczne	73
3.14.1. Utrwalacze	73
3.14.2. Odwadnianie	74
3.14.3. Zatapianie w parafinie	75
3.14.4. Zatapianie w celoidynie	76
3.14.5. Zatapianie w żywicy akrylowej Histo-cryl	77
3.14.6. Barwienie hematoksyliną i eozyną	77
3.14.7. Barwienie trichromem Massona	78
3.14.8. Barwienie włókien sprężystych rezorcyno-fuksyną	78
3.14.9. Impregnacja srebrem włókien kratkowych (metoda Gomoriego)	79
3.14.10. Barwienie rozmazów krwi i szpiku metodą Maya-Grünwalda i Giemsy	80
3.14.11. Barwienie wymazów pochwowych metodą Papanicolaou	80
<b>4. Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie elektronowym</b>	<b>83</b>
4.1. Utrwalanie pierwotne	83
4.1.1. Rodzaje utrwalaczy	83
4.1.2. pH utrwalacza	84
4.1.3. Osmolarność utrwalacza	84
4.1.4. Temperatura utrwalania	84
4.1.5. Wypłukiwanie utrwalacza	84
4.2. Osmowanie (utrwalanie wtórne)	85
4.3. Odwadnianie	85
4.4. Zatapianie	85
4.4.1. Zatapianie w żywicach epoksydowych	85
4.4.2. Zatapianie w żywicach akrylowych	86
4.5. Krojenie skrawków	86
4.5.1. Przygotowanie bloczka do krojenia (trymowanie)	86
4.5.2. Ultramikrotomy	87
4.5.3. Przygotowanie noża szklanego	88
4.5.4. Krojenie i ocena grubości skrawków	89
4.6. Montowanie skrawków	90
4.7. Kontrastowanie skrawków	90
4.8. Specjalne techniki przygotowania materiału do badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym	91
4.8.1. Technika barwienia negatywowego	91
4.8.2. Technika cieniowania metalami	92
4.8.3. Technika replik	92
4.8.4. Technika mrożenia i łamania (ang. <i>freeze-fracture</i> )	93

4.9. Przygotowanie materiału do badań w skaningowym mikroskopie elektronowym	95
4.9.1. Suszenie w punkcie krytycznym	95
4.9.2. Napylanie próżniowe	95
4.9.3. Technika odlewów mikrokorozyjnych	97
4.10. Przepisy praktyczne	97
4.10.1. Utrwalacze	97
4.10.2. Odwadnianie	98
4.10.3. Zatapanie w żywicy Epon 812	98
4.10.4. Zatapanie w żywicy Araldite	99
4.10.5. Barwienie skrawków półcienkich do celów mikroskopii świetlnej	99
4.10.6. Barwienie (kontrastowanie) skrawków ultracienkich do celów mikroskopii elektronowej	100
<b>5. Technika mrożeniowa</b>	<b>101</b>
5.1. Zamrażanie materiału	101
5.1.1. Fizyczne podstawy zamrażania materiału biologicznego	101
5.1.2. Zamrażanie w ciekłych gazach	102
5.1.3. Zamrażanie dwutlenkiem węgla	103
5.1.4. Zamrażanie w kriostacie	103
5.1.5. Krioprotekcja	104
5.2. Przechowywanie zamrożonego materiału	104
5.3. Krojenie skrawków z zamrożonego materiału	104
5.3.1. Kriostat	104
5.3.2. Krioultramikrotom	106
5.4. Mrożenie z substytucją (podstawianiem)	107
5.5. Liofilizacja	107
5.5.1. Fizyczne podstawy procesu liofilizacji	107
5.5.2. Przebieg procesu liofilizacji	108
5.5.3. Przygotowanie materiału liofilizowanego do badań mikroskopowych	109
5.5.4. Zastosowanie liofilizacji	109
<b>6. Podstawy klasycznej histochemii</b>	<b>111</b>
6.1. Reakcje histochemiczne	111
6.1.1. Podstawy reakcji histochemicznych	111
6.1.2. Typy reakcji histochemicznych	112
6.2. Przygotowanie materiału do badań histochemicznych	112
6.2.1. Utrwalanie	113
6.2.2. Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie świetlnym	113
6.2.3. Przygotowanie materiału do badań w transmisyjnym mikroskopie elektronowym	114
6.3. Wykrywanie białek	114
6.4. Wykrywanie cukrowców	115
6.4.1. Reakcja PAS (ang. <i>Periodic Acid-Schiff</i> )	115
6.4.2. Wykrywanie kwaśnych glikozoaminoglikanów błękitem alcjanowym	116

6.4.3. Wykrywanie kwaśnych glikozoaminoglikanów żelazem koloidalnym	116
6.4.4. Metachromazja	117
6.5. Wykrywanie lipidów	117
6.6. Wykrywanie kwasów nukleinowych	118
6.6.1. Reakcja Feulgena	118
6.6.2. Metoda Bracheta	118
6.6.3. Metody fluorescencyjne	119
6.7. Wykrywanie amin biogennych	120
6.8. Wykrywanie wybranych składników patologicznych	120
6.8.1. Hemosyderyna i złogi żelaza	120
6.8.2. Lipofuscyny	121
6.8.3. Amyloid	121
6.9. Wykrywanie enzymów	121
6.9.1. Reakcja histoenzymatyczna	122
6.9.2. Reakcja precypitacji z kationami metali (reakcja Gomoriego)	122
6.9.3. Reakcja sprzęgania do związków azowych	123
6.9.4. Reakcja indygogenna	123
6.9.5. Reakcja utleniania lub redukcji substratu	123
6.10. Reakcje kontrolne	124
6.11. Przepisy praktyczne	125
6.11.1. Reakcja PAS	125
6.11.2. Reakcja Feulgena	126
6.11.3. Wykrywanie białek błękitem bromofenolowym	126
6.11.4. Barwienie lipidów Sudanem III i IV	127
6.11.5. Fluorescencyjna metoda wykrywania amin biogennych	127
6.11.6. Wykrywanie fosfatazy alkalicznej metodą sprzęgania	127
6.11.7. Wykrywanie kwaśnych hydrolaz lizosomowych metodą sprzęgania	128
6.11.8. Wykrywanie dehydrogenaz	129
6.11.9. Wykrywanie peroksydaz	129
6.11.10. Metoda „score”	130
<b>7. Podstawy immunohistochemii</b>	<b>131</b>
7.1. Antygen i przeciwciało	131
7.2. Otrzymywanie i oczyszczanie przeciwciał do badań immunohistochemicznych	133
7.2.1. Otrzymywanie przeciwciał poliklonalnych	133
7.2.2. Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych	134
7.3. Znakowanie przeciwciał	136
7.3.1. Znakowanie fluorochromami	136
7.3.2. Znakowanie enzymami	137
7.3.3. Znakowanie ferrytyną	138
7.3.4. Znakowanie koloidalnym złotem	139
7.4. Przygotowanie materiału do badań immunohistochemicznych	139
7.4.1. Utrwalanie	139
7.4.2. Zatapianie	140

7.4.3. Naklejanie skrawków	140
7.4.4. Odsłanianie miejsc antygenowych	141
7.5. Wykonanie reakcji immunohistochemicznej	141
7.5.1. Mikroskopia świetlna	141
7.5.2. Mikroskopia elektronowa	142
7.6. Typy reakcji immunohistochemicznych	143
7.6.1. Reakcja bezpośrednia	143
7.6.2. Reakcja pośrednia dwuetapowa	144
7.6.3. Reakcja z mostkiem immunoglobulinowym i kompleksem enzym-antyenzym	145
7.6.4. Reakcja z białkiem A	147
7.6.5. Reakcja z awidyną i biotyną	147
7.6.6. Reakcja z łańcuchami polimerowymi	149
7.6.7. Wzmocnienie reakcji za pomocą tyramidów	149
7.6.8. Jednoczesne wykrywanie kilku antygenów	151
7.7. Reakcje kontrolne	151
7.8. Wykrywanie reszt cukrowcowych za pomocą lektyn	152
7.9. Przepisy praktyczne	154
7.9.1. Pośrednia reakcja immunofluorescencyjna na skrawkach parafinowych	154
<b>8. Hybrydyzacja <i>in situ</i></b>	<b>157</b>
8.1. Wytwarzanie i rodzaje sond	158
8.2. Znakowanie sond	159
8.3. Przygotowanie materiału do hybrydyzacji <i>in situ</i>	160
8.3.1. Utrwalanie	160
8.3.2. Zatapanie	160
8.3.3. Permeabilizacja	160
8.3.4. Zapobieganie reakcjom nieswoistym	161
8.4. Hybrydyzacja	162
8.4.1. Denaturacja kwasów nukleinowych	162
8.4.2. Hybrydyzacja i wpływające na nią czynniki	162
8.5. Wykrywanie sond związanych z tkanką	163
8.6. Reakcje kontrolne	163
8.7. Łańcuchowa reakcja polimerazy <i>in situ</i> ( <i>in situ</i> PCR)	164
8.8. Metoda PRINS	165
<b>9. Fluorescencyjne metody badania żywych komórek</b>	<b>167</b>
9.1. Znaczniki organelli komórkowych	167
9.2. Znaczniki wewnątrzkomórkowego stężenia jonów i potencjału elektrycznego	168
9.3. Metoda FRET	169
9.4. Białka fluoryzujące	170
9.4.1. Białka fluoryzujące jako znaczniki białek wewnątrzkomórkowych	170
9.4.2. Białka fluoryzujące jako wskaźniki ekspresji genów	171
9.4.3. Białka fluoryzujące jako znaczniki linii komórkowych	172

<b>10. Podstawy autoradiografii</b>	173
10.1. Założenia techniki autoradiograficznej	173
10.2. Zastosowanie autoradiografii	174
10.3. Izotopy promieniotwórcze stosowane w autoradiografii	175
10.4. Wprowadzanie znakowanych substancji do komórek i tkanek	175
10.5. Przygotowanie preparatu autoradiograficznego (autoradiogramu)	176
10.5.1. Technika emulsji zdzieranej	176
10.5.2. Technika emulsji płynnej	176
10.6. Ekspozycja	177
10.7. Wywołanie autoradiogramu	178
10.8. Procedura histologiczna towarzysząca autoradiografii	178
10.9. Zdolność rozdzielcza autoradiogramów	178
10.10. Tło	179
10.11. Reakcje kontrolne	180
10.12. Opracowanie i ocena wyników	180
10.13. Wyposażenie pracowni autoradiograficznej	181
<b>11. Hodowla komórek i tkanek</b>	183
11.1. Klasyfikacja i terminologia	183
11.2. Ustalane linie komórkowe	184
11.3. Pożywki i warunki hodowli	184
11.4. Metodyka hodowli	186
11.5. Kontrola żywotności komórek w hodowli	187
11.6. Transformacja komórek	188
11.7. Agregacja i segregacja komórek	188
11.8. Fuzja i hybrydyzacja komórek	189
11.9. Hodowla fibroblastów, leukocytów i limfocytów	189
11.10. Zastosowanie hodowli komórek i tkanek	190
11.11. Przepisy praktyczne	191
11.11.1. Zakładanie hodowli fibroblastów	191
11.11.2. Zakładanie hodowli leukocytów	191
11.11.3. Ocena żywotności komórek	191
<b>12. Analiza ilościowa preparatów mikroskopowych</b>	193
12.1. Densytometria i fluorymetria	194
12.1.1. Fizyczne podstawy densytometrii	194
12.1.2. Metodyka pomiarów densytometrycznych i fluorymetrycznych	195
12.1.3. Urządzenia stosowane w densytometrii i fluorymetrii	196
12.2. Cytometria przepływowa	196
12.2.1. Fizyczne podstawy pomiaru cytometrycznego	197
12.2.2. Budowa cytometru	197
12.2.3. Przygotowanie komórek do pomiarów cytometrycznych	199
12.2.4. Zastosowanie badań cytometrycznych	200
12.3. Morfometria	201
12.3.1. Planimetria	201

12.3.2. Stereologia	201
12.3.3. Tradycyjne narzędzia stosowane w badaniach morfometrycznych	202
12.4. Komputerowa (cyfrowa) analiza obrazu	202
12.4.1. Przekształcanie obrazu mikroskopowego w formę cyfrową	203
12.4.2. Przetwarzanie obrazu cyfrowego	204
12.4.3. Analiza morfometryczna wybranych obiektów	208
12.4.4. Analiza fotometryczna wybranych obiektów	208
12.4.5. Urządzenia do komputerowej analizy obrazu	208
12.4.6. Przygotowanie preparatów do automatycznych pomiarów ilościowych	209