

Министерство сельского хозяйства РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования «Ярославская
государственная сельскохозяйственная академия»
(ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА»)

Кафедра «Биотехнология»



Т.К. Тимакова, Е.А. Флёрва, Е.А. Заботкина

**МЕТОДЫ СВЕТОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ
МИКРОСКОПИИ
В БИОЛОГИИ И ВЕТЕРИНАРИИ**

Учебно-методическое пособие

**Ярославль
2014**

УДК 57.086.2:681.723+619:681.723
ББК 28.0:22.338+28.0:22.34:48:22.338+48:22.34
Т 41

Учебно-методическое пособие предназначено для подготовки кадров высшей квалификации по программам подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению подготовки 06.00.01 «Биологические науки».

Учебно-методическое пособие подготовлено заведующей кафедрой биотехнологии, доцентом, кандидатом ветеринарных наук Тимаковой Т.К., доцентом кафедры биотехнологии, кандидатом биологических наук Флёровой Е.А., ведущим научным сотрудником лаборатории токсикологии и физиологии водных животных ИБВВ РАН, кандидатом биологических наук Заботкиной Е.А.

Учебно-методическое пособие рассмотрено и одобрено на заседании кафедры биотехнологии 25.11.2013 (протокол № 4) и Ученого совета технологического факультета ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА» 17.12.2013 (протокол № 10).

Рецензенты: доктор биологических наук Корнева Ж.В.
(ФГБУН Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН);
кандидат биологических наук Костерин Д.Ю.
(ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА»).

Тимакова, Т.К.

Т 41 Методы световой и электронной микроскопии в биологии и ветеринарии [Текст] : учебно-методическое пособие / Т.К. Тимакова, Е.А. Флёрова, Е.А. Заботкина. – Ярославль: Изд-во ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА», 2014. – 72 с.
ISBN 978-5-98914-129-6

В учебно-методическом пособии представлены теоретические сведения об устройстве и принципах работы различных типов микроскопов, особенностях методических приемов микроскопического исследования.

УДК 57.086.2:681.723+619:681.723
ББК 28.0:22.338+28.0:22.34:48:22.338+48:22.34

ISBN 978-5-98914-129-6 © ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА», 2014
© Тимакова Т.К., Флёрова Е.А., Заботкина Е.А., 2014

Содержание

Введение.....	4
1 Световая микроскопия.....	5
1.1 История развития представлений о световой микроскопии.....	5
1.2 Устройство светового микроскопа.....	7
1.3 Виды микроскопии.....	14
1.3.1 Стереоскопическая микроскопия.....	14
1.3.2 Фазово-контрастная микроскопия.....	15
1.3.3 Темнопольная микроскопия.....	18
1.3.4 Поляризационная микроскопия.....	19
1.3.5 Интерференционная микроскопия.....	20
1.3.6 Люминесцентная микроскопия.....	21
1.3.7 Микроскопия с помощью бесконтактных объективов.....	22
1.4 Методы приготовления препаратов для светопольного микроскопического исследования в проходящем свете.....	23
1.4.1 Срезы органов.....	23
1.4.2 Мазки крови и отпечатки органов.....	35
1.4.3 Тотальные препараты.....	38
2 Практические работы.....	39
Работа 1 Правила работы со световым микроскопом.....	39
Работа 2 Методика изготовления, окрашивания и цитологического анализа мазка, мазка-отпечатка.....	40
Работа 3 Подсчет форменных элементов крови.....	42
Работа 4 Методика изготовления пленочного препарата.....	44
Работа 5 Чтение мазков и гистологических срезов.....	45
3 Электронная микроскопия.....	49
3.1 История электронной микроскопии.....	49
3.2 Устройство электронного микроскопа.....	50
3.3 Подготовка биологических объектов для электронной микроскопии.....	55
3.4 Специальные методы приготовления материала.....	60
3.5 Подготовка биологических объектов для сканирующей электронной микроскопии.....	61
4 Практические работы.....	62
Работа 1 Правила работы с электронным микроскопом.....	62
Работа 2 Методика подготовки материала для электронной микроскопии и чтение цитологических препаратов.....	63
Список использованных источников.....	69

Введение

Создание новых моделей микроскопов, улучшение качества их оптических систем, разработка новых способов наблюдения, основанных на различных физических принципах формирования изображения, во многом способствовали развитию современных представлений о структурно-функциональной организации всего живого. Микроскопия проникла во все области биологии. Поэтому современные методы микроскопии являются важной методологической и методической базой биологических исследований, позволяющей комплексно подойти к решению задач, связанных с описанием структуры и функционированием биологических объектов на разных уровнях организации живого.

Теоретические основы световой и электронной микроскопии являются фундаментом для планирования и реализации работ на живых системах микроуровня. Известно, что результативность микроскопических исследований зависит от многих факторов. К ним, прежде всего, следует отнести необходимость применения эффективных способов наблюдения, рациональный подбор модели микроскопа, умение квалифицированно пользоваться им и готовить нужные по качеству препараты для изучения биологических объектов. Каждый из этих факторов может иметь решающее значение. По этой причине овладение методами микроскопии возможно лишь на основе обобщенных представлений об особенностях методических приемов микроскопического исследования.

Данное пособие предназначено для подготовки кадров высшей квалификации по программам подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки» и призвано познакомить аспирантов с особенностями использования современной микроскопической техники для изучения биологических объектов.

1 Световая микроскопия

1.1 История развития представлений о световой микроскопии

Сегодня трудно представить себе научную деятельность человека без микроскопа. Микроскоп широко применяется в большинстве лабораторий медицины, биологии и ветеринарии, геологии и материаловедения. С использованием микроскопа происходит разработка и внедрение новых препаратов, делаются научные открытия.

Микроскоп (от греческого *mikros* – малый и *skopeo* – смотрю) – оптический прибор для получения увеличенного изображения мелких объектов и их деталей, не видимых невооруженным глазом.

Глаз человека способен различать детали объекта, отстоящие друг от друга не менее чем на 0,08 мм. С помощью светового микроскопа можно видеть детали, расстояние между которыми составляет до 0,2 мкм или 200 нм.

Изобретение микроскопа, столь важного для всей науки прибора, обусловлено, прежде всего, влиянием развития оптики. Некоторые оптические свойства изогнутых поверхностей были известны еще Евклиду (300 лет до н.э.) и Птолемею (127-151 гг.), однако их увеличительная способность не нашла практического применения. Лишь в XVI веке Леонардо да Винчи и Мауролико показали, что малые объекты лучше изучать с помощью лупы.

Первый микроскоп с 3-10 кратным увеличением был создан в 1595 г. Захариусом Йансеном (*Z. Jansen*). Изобретение заключалось в том, что он смонтировал две выпуклые линзы внутри одной трубки, тем самым заложив основы для создания сложных микроскопов (рисунок 1). Фокусировка на исследуемом объекте достигалась за счет выдвигного тубуса. Это был настоящий прорыв в области микроскопии.

В XVI веке датские, английские и итальянские исследовательские приборы постепенно начали свое развитие, закладывая фундамент современной микроскопии.

Быстрое распространение и совершенствование микроскопов началось после того, как Галилей в 1609 г. (*G. Galilei*), совершенствуя сконструированную им зрительную трубу, стал использовать ее как своеобразный микроскоп, изменяя расстояние между объективом и окуляром.

В 1625 г. членом римской «Академии зорких» (*Akademia deilincei*) И. Фабером был предложен термин «микроскоп».

Первые успехи, связанные с применением

микроскопа в научных биологических исследованиях, были достигнуты Гуком (*R. Hooke*), который первым описал растительную клетку (1665 г.) (рисунок 2).



Рисунок 1 – Первый световой микроскоп [19]

Голландец Левенгук (А. Van Leenwenhoek) в период с 1673 по 1677 гг. с помощью микроскопа, увеличивающего в 270 раз, обнаружил и зарисовал сперматозоиды, впервые увидел кровеносные тельца, движение крови в капиллярных сосудах хвоста головастика, полосатости мускулов. Он открыл инфузории, описал одноклеточные водоросли, увидел границу между животным и растительным миром.

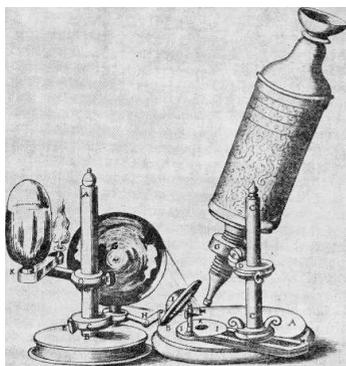


Рисунок 2 – Микроскоп Гука с приспособлением для освещения [7]

В 1668 г. Е. Дивини, присоединив к окуляру полевую линзу, создал окуляр современного типа. В 1673 г. Ян Гавелий ввел микрометрический винт, а Гертель предложил под столик микроскопа поместить зеркало. Таким образом, микроскоп стали монтировать из тех основных деталей, которые входят в состав современного биологического микроскопа (рисунок 3).

В 1824 г. громадный успех микроскопа дала простая практическая идея Саллига, воспроизведенная французской фирмой Шевалье. Объектив, раньше состоявший из одной линзы, расчленен на части, теперь его изготавливают из многих ахроматических линз. Таким образом умножено число параметров, дана возможность исправления ошибок системы, впервые возможно говорить о настоящих больших увеличениях – в 500 и даже 1000 раз. Граница предельного видения передвинулась от двух к одному микрону. Микроскоп Левенгука оставлен далеко позади.



Рисунок 3 – Первый световой микроскоп с полевой линзой, микрометрическим винтом и зеркалом [19]

В 70-х годах XIX века Е. Аббе (E. Abbe) и его ученики, работающие при фирме Цейсса, описали теорию микроскопа и вообще оптических приборов, выработали систему измерений, определяющих качество микроскопа.

Труды английского оптика Дж. Сиркса (1893 г.) положили начало интерференционной микроскопии. В 1903 г. Р. Жигмонди (R. Zsigmondy) и Х. Зидентопф (H. Siedentopf) создали ультрамикроскоп, в 1911 г. М. Саньяком (M. Sagnac) был описан первый двухлучевой интерференционный микроскоп, в 1935 г. Ф. Зернике (F. Zernicke) предложил использовать метод фазового контраста для наблюдения в микроскопах прозрачных, слабо рассеивающих свет объектов.

Большой вклад в разработку проблем теоретической и прикладной оптики, усовершенствование оптических систем микроскопа и микроскопической техники внесли М.В. Ломоносов, И.П. Кулибин, Л.И. Мандельштам, Д.С. Рождественский, А.А. Лебедев, С.И. Вавилов, В.П. Линник, Д.Д. Максудов и др. [7, 19, 23, 30, 32].

1.2 Устройство светового микроскопа

Световая микроскопия основывается на законах геометрической оптики и волновой теории образования изображения. Общая блок-схема светового микроскопа показана на рисунке 4.

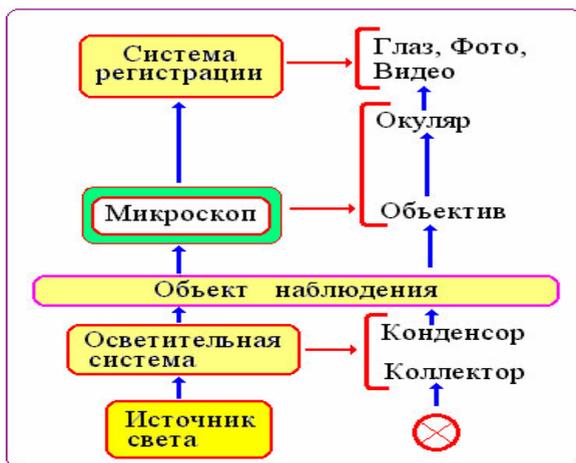


Рисунок 4 – Общая блок-схема светового микроскопа

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.

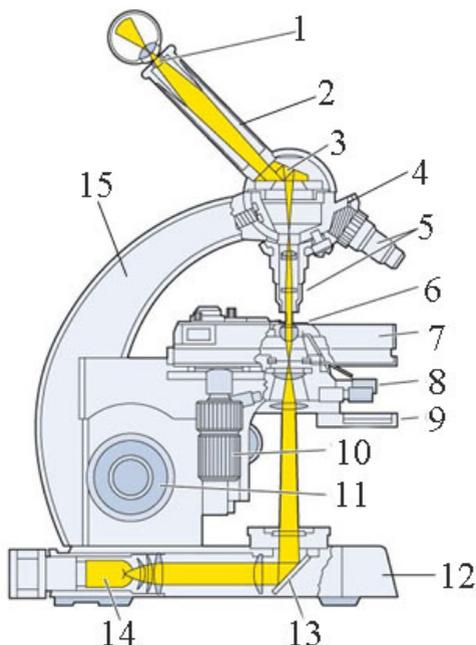
Световые микроскопы делятся на микроскопы плоского поля (двухмерное изображение объекта) и *стереоскопические* (объемное или трехмерное изображение объекта). Парк современных микроскопов для ветеринарно-биологических исследований включает в себя следующие основные группы:

- 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 следующие группы:

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

С конструктивно-технологической точки зрения микроскоп плоского поля состоит из трех частей: механической, оптической, электрической.

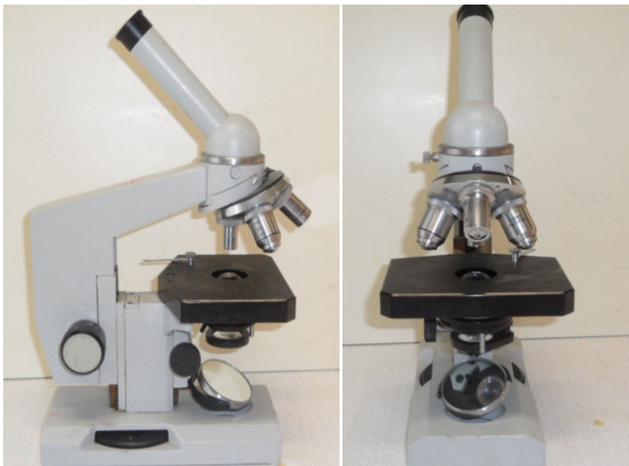


- 1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – призма; 4 – револьверное устройство; 5 – объективы;
6 – микропрепарат; 7 – предметный стол; 8 – конденсор; 9 – светофильтр;
10 – управление предметным столом; 11 – фокусирующий механизм; 12 – подставка;
13 – зеркало; 14 – источник света; 15 – тубусодержатель.

Рисунок 5 – Схема расположения основных частей микроскопа

Механическая система микроскопа состоит из штатива, который включает в себя основание (подставку) и тубусодержатель.

Основание (подставка) – это часть микроскопа, на которой крепится весь прибор (рисунок 5). В простых микроскопах, например Биолам (рисунок 6 а), на основание устанавливают осветительные зеркала или накладные осветители. В микроскопе Микомед-6 (рисунок 6 б) осветительная система встроена в основание.



А



Б

Рисунок 6 – Внешний вид светового микроскопа:
А – микроскоп Биолам; Б – микроскоп Микомед-6

Подставка – это основание микроскопа.

Тубусодержатель (рисунок 5) представляет собой блок, часть конструкции микроскопа, на котором закрепляются:

1) тубус или трубка – цилиндр, в который сверху вставляют окуляры. Тубус подвижно соединен с головкой тубусодержателя, его фиксируют

стопорным винтом в определенном положении. Ослабив стопорный винт, тубус можно снять;

2) узел смены объективов (рисунок 5), имеющий следующие варианты исполнения – револьверное устройство (рисунок 6 а, б), резьбовое устройство для ввинчивания объектива, «салазки» для безрезьбового крепления объективов с помощью специальных направляющих;

3) фокусируемый механизм грубой и точной настройки микроскопа на резкость – механизм фокусируемого перемещения объективов или столиков (рисунок 5). Винт точной настройки (микрометрический винт) служит для незначительного перемещения объектива на расстояния, измеряемые микрометрами. Полный оборот микрометрического винта поднимает или опускает объективы на 100 мкм, а поворот на одно деление – на 2 мкм. Во избежание порчи микрометрического механизма разрешается крутить винт точной настройки в одну сторону не более чем на половину оборота. Винт грубой настройки используют для значительного перемещения объектива с целью фокусировки объекта при малом увеличении;

4) предметный столик, предназначенный для крепления или фиксации в определенном положении объекта наблюдения (рисунок 5). Столики бывают неподвижные, координатные и вращающиеся (центрируемые и нецентрируемые); в середине столика имеется круглое отверстие, в которое входит фронтальная линза конденсора. На столике находятся две пружинистые клеммы – зажимы, закрепляющие препарат;

5) узел крепления фокусируемого и центровочного перемещения конденсора. Конденсор можно поднять или опустить при помощи винта, вращающего зубчатое колесо, входящее в пазы рейки с гребенчатой нарезкой;

6) узел крепления сменных насадок (визуальных, фотографических, телевизионных, различных передающих устройств).

Оптическая система. Оптические узлы и принадлежности обеспечивают основную функцию микроскопа – создание увеличенного изображения объекта с достаточной степенью достоверности по форме, соотношению размеров составляющих элементов и цвету. Кроме этого, оптика должна обеспечивать такое качество изображения, которое отвечает целям исследования и требованиям методик проводимого анализа.

Основными оптическими элементами микроскопа являются оптические элементы, образующие осветительную (в том числе конденсор), наблюдательную (окуляры) и воспроизводящую (в том числе объективы) системы микроскопа.

Объективы предназначены для построения микроскопического изображения в плоскости изображения с соответствующим увеличением, разрешением элементов, точностью воспроизведения по форме и цвету объекта исследования. Объектив состоит из металлического цилиндра с вмонтированными в него линзами, число которых может быть различным. Общее число линз в сложном объективе может достигать до 14 (например, это может относиться к планахроматическому объективу с увеличением 100х и числовой апертурой 1,40). Увеличение объектива обозначено на нем цифрами.

Стандартные увеличения объективов: 3,5; 4; 8; 10; 20; 40; 60; 90; 100. На микроскопе Микомед-6 встроены следующие объективы: 4; 10; 40; 100 (рисунок 6 б). На микроскопе Биолам-8; 20; 40; 90 (рисунок 6 а). В учебных целях используют обычно объективы $\times 8$, $\times 10$, $\times 20$ и $\times 40$.

Классификация объективов значительно сложнее классификации микроскопов. Объективы разделяются по принципу расчетного качества изображения, параметрическим и конструктивно-технологическим признакам, а также по методам исследования и контрастирования.

По принципу расчетного качества изображения объективы могут быть:

- ахроматическими;
- апохроматическими;
- объективами плоского поля.

Ахроматические объективы рассчитаны для применения в спектральном диапазоне 486-656 нм. Исправление любой аберрации (ахроматизация) выполнено для двух длин волн. В этих объективах устранены сферическая аберрация, хроматическая аберрация положения, кома, астигматизм и частично – сферохроматическая аберрация. Изображение объекта имеет несколько синевато-красноватый оттенок.

Апохроматические объективы имеют расширенную спектральную область, и ахроматизация выполняется для трех длин волн. При этом, кроме вышеперечисленных нарушений оптической системы, исправляются вторичный спектр и сферохроматическая аберрация, благодаря введению в схему линз из кристаллов и специальных стекол. По сравнению с ахроматами, эти объективы обычно имеют повышенные числовые апертуры, дают четкое изображение и точно передают цвет объекта. Следует отметить, что некоторые объективы обладают промежуточным качеством изображения – это полуапохроматы или микрофлюары.

Объективы плоского поля (планообъективы) имеют исправленную кривизну изображения по полю, что обеспечивает резкое изображение объекта по всему полю наблюдения. Потребность в подобного типа объективах возрастает, однако они достаточно дороги из-за оптической схемы, реализующей плоское поле изображения, и применяемых оптических сред. Поэтому рутинные и рабочие микроскопы комплектуются более экономичными объективами.

По параметрическим признакам объективы делятся на:

1) объективы с конечной длиной тубуса (например, 160 мм) и объективы, скорректированные на длину тубуса «бесконечность»;

2) объективы малых (до 10x), средних (до 50x), больших (более 50x) и сверхбольших увеличений (свыше 100x);

3) объективы малых (до 0,25), средних (до 0,65), больших (более 0,65) числовых апертур, а также объективы с увеличенными (по сравнению с обычными) числовыми апертурами (например, специальные объективы для люминесцентных микроскопов);

4) объективы с увеличенными (по сравнению с обычными) рабочими расстояниями, а также с большими и сверхбольшими рабочими расстояниями (для работы в инвертированных микроскопах);

5) объективы, обеспечивающие наблюдение в пределах нормального линейного поля (до 18 мм), широкопольные объективы (до 22,5 мм) и сверхширокопольные объективы (более 22,5 мм);

6) объективы стандартные (45 мм, 33 мм) и нестандартные по высоте.

По обеспечению методов исследования и контрастирования объективы можно разделить на:

1) объективы, работающие с покровным и без покровного стекла;

2) объективы проходящего и отраженного света (безрефлексные);

3) люминесцентные объективы;

4) поляризационные объективы;

5) фазовые объективы (имеющие фазовый элемент – полупрозрачное кольцо внутри объектива);

6) объективы ДИК (DIC), работающие по методу дифференциально-интерференционного контраста (поляризационные с призменным элементом);

7) эпиобъективы (объективы отраженного света, предназначенные для обеспечения методов светлого и темного поля, имеют в конструкции специально рассчитанные осветительные эпи-зеркала);

8) иммерсионные (числовая апертура объектива доходит до 1,4) и безымерсионные объективы (числовая апертура объектива не превышает 1,0).

Иммерсия (*от лат. immersio – погружение*) – жидкость, заполняющая пространство между объектом наблюдения и специальным иммерсионным объективом (конденсором и предметным стеклом). В основном применяются три типа иммерсионных жидкостей: масляная иммерсия (МИ/Oil), водная иммерсия (ВИ/W) и глицериновая иммерсия (ГИ/Glyc), причем последняя в основном применяется в ультрафиолетовой микроскопии. Иммерсия используется в тех случаях, когда требуется повысить разрешающую способность микроскопа или её применения требует технологический процесс микроскопирования. При этом происходит: повышение видимости за счет увеличения разности показателя преломления среды и объекта; увеличение глубины просматриваемого слоя, который зависит от показателя преломления среды. Кроме того, иммерсионная жидкость может уменьшать количество рассеянного света за счет исчезновения бликов от объекта. При этом устраняются неизбежные потери света при его попадании в объектив.

Маркировка объективов.

Данные о каждом объективе маркируются на его корпусе с указанием параметров, представленных на рисунке 7.

На объектив также может наноситься дополнительная буквенная маркировка, если он используется при различных методах исследования и контрастирования: фазовый – Ф (Ph2 – цифра соответствует маркировке на специальном конденсоре или вкладыше), поляризационный – П (Pol), люминесцентный – Л (L), фазово-люминесцентный – ФЛ (PhL), метод темного поля, дифференциально-интерференционный контраст – ДИК (DIC).



1 – маркировка типа оптической коррекции: плахромат (Plan);
2 – увеличение $\times 100$; 3 – числовая апертура 1,25; 4 – тип иммерсионной жидкости:
масляная иммерсия (Oil); 5 – корректировка на длину тубуса «бесконечность»; 6 – толщина
покровного стекла.

Рисунок 7 – Маркировка объектива, микроскоп Микомед-6

Окуляр устроен намного проще объектива. Он состоит из 2-3 линз, вмонтированных в металлический цилиндр. Между линзами расположена постоянная диафрагма, определяющая границы поля зрения. Нижняя линза фокусирует изображение объекта, построенное объективом в плоскости диафрагмы, а верхняя служит непосредственно для наблюдения. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. Окуляры не выявляют новых деталей строения, и в этом отношении их увеличение бесполезно. Таким образом, окуляр, подобно лупе, дает прямое, мнимое, увеличенное изображение наблюдаемого объекта, построенное объективом.

Для определения общего увеличения микроскопа следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра.

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.

Зеркало служит для направления света через конденсор и отверстие предметного столика на объект. Оно имеет две поверхности: плоскую и вогнутую. В лабораториях с рассеянным светом используют вогнутое зеркало.

Электроосветитель устанавливается под конденсором в гнездо подставки.

Конденсор состоит из 2-3 линз, вставленных в металлический цилиндр. При подъеме или опускании его с помощью специального винта соответственно конденсируется или рассеивается свет, падающий от зеркала на объект.

Ирисовая диафрагма расположена между зеркалом и конденсором. Она служит для изменения диаметра светового потока, направляемого зеркалом через конденсор на объект, в соответствии с диаметром фронтальной линзы объектива и состоит из тонких металлических пластинок. С помощью рычажка их можно то соединить, полностью закрывая нижнюю линзу конденсора, то развести, увеличивая поток света.

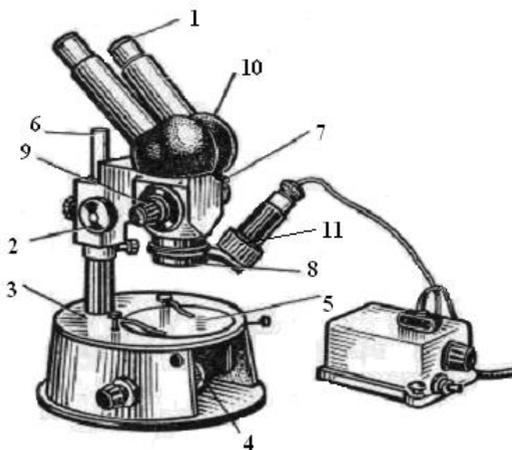
Кольцо с матовым стеклом или светофильтром уменьшает освещенность объекта. Оно расположено под диафрагмой и передвигается в горизонтальной плоскости [12, 16, 21, 26].

1.3 Виды микроскопии

Микроскопия – совокупность методов наблюдения и исследования объектов с использованием микроскопа.

1.3.1 Стереоскопическая микроскопия

Это метод изучения прямых и объемных изображений объектов в проходящем или отраженном свете. Для получения объемных изображений используются стереоскопические микроскопы, которые имеют большое рабочее расстояние (расстояние от покровного стекла до фронтальной линзы), примером таких микроскопов может служить микроскоп МБС-1 (рисунок 8).



1 – окуляр; 2 – винт грубой наводки; 3 – подставка; 4 – зеркало; 5 – предметный столик;
6 – стойка; 7 – оптическая головка; 8 – объектив; 9 – рукоятка переключения увеличения;
10 – бинокулярная насадка; 11 – лампа.

Рисунок 8 – Устройство микроскопа МБС-1

Основная часть микроскопа – оптическая головка. В нижнюю ее часть вмонтирован объектив, состоящий из системы линз, которые можно переключать при помощи рукоятки и этим менять увеличение. Увеличения объектива обозначены цифрами на рукоятке – х 0,6, х1, х2, х4, х7. На корпусе головки имеется точка. Для установки нужного увеличения объектива необходимо цифру на рукоятке совместить с точкой на корпусе головки.

На верхнюю часть головки установлена бинокулярная насадка. Окуляры имеют увеличения х6, х8, х12,5. Для установки удобного для глаз расстояния между окулярами нужно раздвинуть или сдвинуть тубусы.

К задней стенке корпуса головки прикреплен кронштейн с реечным механизмом передвижения. Подъем и опускание корпуса головки осуществляется вращением винта. Кронштейн надет на стойку, прикрепленную к подставке.

Для работы в проходящем свете в корпус подставки вмонтирован отражатель света с зеркальной и матовой поверхностями. С передней стороны корпуса имеется окно для доступа дневного света. Для искусственного освещения предназначена лампа, которую вставляют или в отверстие с задней стороны корпуса (для проходящего света), или в кронштейн, укрепленный на объективе (для отраженного света).

Столик установлен в круглом окне на верхней поверхности корпуса подставки. Он может быть либо стеклянным (при проходящем свете), либо металлическим – с белой и черной поверхностями (при отраженном свете) [26].

1.3.2 Фазово-контрастная микроскопия

Это метод получения изображений в оптических микроскопах, при котором сдвиг фаз электромагнитной волны трансформируется в контраст интенсивности. Фазово-контрастную микроскопию открыл Фриц Цернике, за что получил Нобелевскую премию за 1953 г.

Голландский физик, математик и химик Фриц Цернике в 1930 г. начал работать в области оптики. В этом же году он открыл фазово-контрастный метод. В течение 1930-1940-х гг. Цернике внёс свой вклад и в другие вопросы оптики, в то время как фазово-контрастный метод не был замечен широкими кругами учёных. Новый метод оставался вне поля зрения научного сообщества вплоть до Второй мировой войны, когда во время немецкой оккупации Голландии открытие Цернике было использовано для создания первых фазово-контрастных микроскопов. В течение войны многие производители стали выпускать фазово-контрастные микроскопы, которые широко применялись в биологических и медицинских исследованиях.

Фазово-контрастная микроскопия позволяет изучать живые и неокрашенные объекты за счёт повышения их контрастности. При прохождении света через окрашенные объекты происходит изменение амплитуды световой волны, а при прохождении через неокрашенные – фазы световой волны, что используют для получения высококонтрастного изображения в фазово-контрастной и интерференционной микроскопии. Для

повышения контрастности фазовые кольца покрывают металлом, поглощающим прямой свет, не влияя на сдвиг фазы. В оптической системе микроскопа применяют специальный конденсор с револьвером диафрагм и центрирующим устройством; объективы заменяют на иммерсионные объективы-апохроматы.

Принцип метода: в заднюю фокальную плоскость объектива вводится пластинка, создающая два эффекта: изменение фазы света нулевого порядка дифракции по отношению к другим порядкам и снижение интенсивности света нулевого порядка и в результате – уравнивание его с другими порядками (рисунок 9).

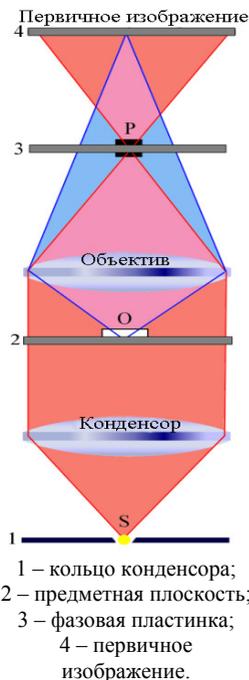


Рисунок 9 – Схема фазово-контрастного микроскопа

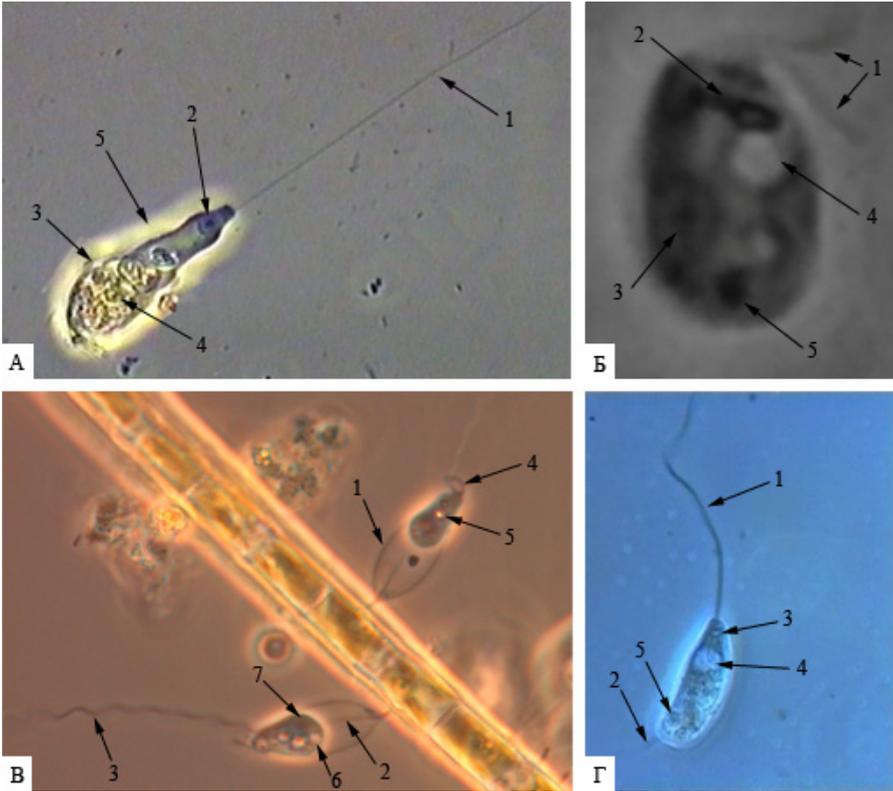
В отличие от опорного света, рассеянный на образце предметный свет в областях, изображённых синим, минует фазовую пластинку, таким образом, длина его оптического пути другая.

В современных микроскопах пластинка содержит кольцевое отверстие, которое отличается по толщине от остальной части пластинки и покрыто тонким слоем серебра для частичного поглощения светового потока от нулевого максимума. Для того чтобы свет попадал в фазовое кольцо, в передней фокальной плоскости конденсора, то есть в плоскости, сопряженной с задней фокальной плоскостью объектива, устанавливается кольцевое отверстие. Глядя в фазовый телескоп, который вставляется вместо окуляра и фокусируется на заднюю фокальную плоскость объектива, эти два кольца нужно подобрать по размерам и совместить.

Изображение в фазово-контрастном микроскопе создается в результате интерференции световых пучков, относительная фаза которых была изменена светособирающим устройством. Таким образом, изображение представляет собой карту разностей длин оптических путей между деталями препарата или между препаратом и фоном. Клетка и ее органеллы будут казаться темными на более светлом фоне.

Поскольку коэффициенты преломления белковых растворов зависят от их концентраций, то изображение в фазово-контрастном микроскопе представляет собой также и карту концентраций или масс белков и других компонентов протопласта.

В нижеприведенном случае, когда изображение клеток темнее фона, говорят о «положительном» фазовом контрасте. Подбором фазовой пластинки в объективе можно добиться «отрицательного» фазового контраста, когда оптически более плотные части клетки будут светлее фона, однако такой вариант в настоящее время на практике не используется.



А – одноклеточная анаэробная амёбофлагеллята *Breviata anathema*: 1 – длинный передний жгутик; 2 – ядро, расположенное в передней части клетки; 3 – небольшие стекловидные псевдоподии; 4 – цитоплазматические включения в задней части клетки; 5 – побочный эффект (гало-эффект) метода фазового-контраста в виде светового ореола, возникающего на границе структур, в особенности при исследовании объектов толщиной более 10 мкм.

Б – пресноводная гетеротрофная (бесцветная) криптофитовая водоросль (криptomonата) *Gonio monastruncata*, имеющая уплощенную клетку: 1 – два слегка неравных жгутика на переднем конце клетки; 2 – околоротовое углубление (перистом) и батарея стрекательных оргanelл нападения и защиты – эжктосомы; 3 – ядро; 4 – сократительная вакуоль, которая локализована в центральной части клетки; 5 – пищеварительная вакуоль, локализованная в задней части клетки.

В – пресноводный гетеротрофный жгутиконосец *Bicosoe calacustris*: 1 – клетки жгутиконосца, находящиеся в прозрачном тонкостенном органическом домике и прикрепленные к водоросли *Melosira*; 2 – задний жгутик, прикрепляющий клетку ко дну домика; 3 – передний свободный жгутик, который за счет своего биения создает ток жидкости, притягивающий пищевые частицы (бактерий) к протоплазматическому выросту клетки – губе, где происходит ее поглощение; 4 – губа; 5 – светопреломляющие гранулы (включения); 6 – сократительные вакуоли; 7 – пищеварительные вакуоли.

Г – пресноводная гетеротрофная (бесцветная) эвгленовая водоросль (эвгленид) *Peranemado lichonema*, имеющая метаболическое тело клетки, покрытое плотной пелликулой: 1 – длинный передний жгутик, за счет которого организм ползает; 2 – более короткий и тонкий задний жгутик, погруженный в бороздку, проходящую вдоль брюшной стороны клетки; 3 – базальные тельца жгутиков, прикрепленные ко дну небольшой цилиндрической глотки – цитостоме; 4 – крупное ядро в ядрышком, локализованное в передней части клетки; 5 – пищеварительная вакуоль, локализованная в задней части клетки.

Рисунок 10 – Изображение, полученное с помощью фазово-контрастного микроскопа (фотографии предоставлены к.б.н. Тихоненковым Д.В.)

Стоит отметить, что побочным эффектом применения метода фазового контраста являются световые ореолы, возникающие на границе структур. Этот эффект (гало-эффект) может привести, в особенности на толстых пробах, к невозможности интерпретации изображения, так как световые ореолы многократно накладываются друг на друга (рисунок 10 а). По этой причине фазовый контраст рекомендуется только для очень тонких образцов, как правило, не толще 10 мкм [4, 12, 27].

1.3.3 Темнопольная микроскопия

Это вид оптической микроскопии, в которой контраст изображения увеличивают за счет регистрации только света, рассеянного изучаемым образцом. Основан на эффекте, который достигается освещением объекта полым конусом света, внутренняя апертура которого должна превосходить числовую апертуру применяемого объектива.

Таким образом, ни один прямой луч не попадает в объектив: при отсутствии объекта поле зрения микроскопа будет темным, а при его наличии – контрастный светлый объект будет виден на темном фоне в отраженном или рассеянном (диффузно отраженном) свете.

Для создания темного поля в биологическом микроскопе применяют: щелевой метод; упрощенный метод, связанный с одновременным диафрагмированием осветительной апертуры конденсора

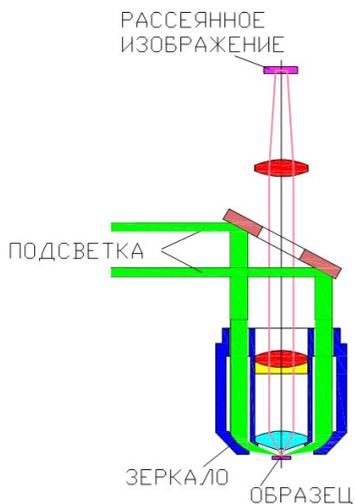


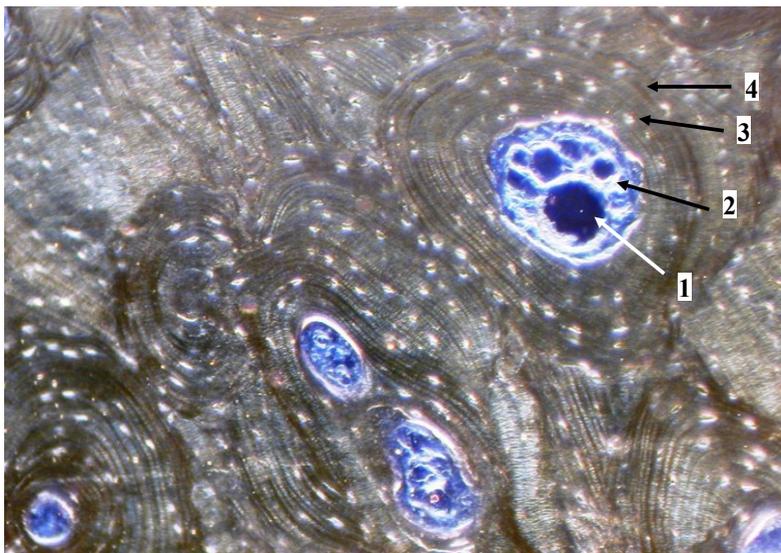
Рисунок 11 – Схема темнопольной микроскопии в падающем свете

и выходной апертуры объектива, при этом объектив должен иметь ирисовую диафрагму или вкладыш, которые позволяют уменьшать выходное отверстие объектива, приближая его к осветительной апертуре, оптимальной для получения эффекта темного поля; специальный конденсор темного поля.

При использовании метода темного поля регистрируются даже незначительные различия в преломляющей способности участков препарата (рисунок 12). В некоторых случаях при работе с темнопольными конденсорами и заранее приготовленными препаратами возникают трудности. Причина состоит в том, что расстояние до вершины конуса падающего света слишком мало, чтобы эта вершина могла оказаться внутри образца, который смонтирован на толстом стекле. В такой ситуации не остается ничего другого, как поискать относительно редкий тип фокусируемого темнопольного конденсора.

В противном случае придется перезаключать препарат, используя более тонкое предметное стекло.

Подсветка образца осуществляется сбоку. Изображение создается светом, рассеивающимся на неоднородностях образца (рисунок 11).



1 – кровеносный сосуд; 2 – главный канал; 3 – остеоцит; 4 – канал.

Рисунок 12 – Изображение костной ткани, полученное с помощью темнопольного микроскопа [14]

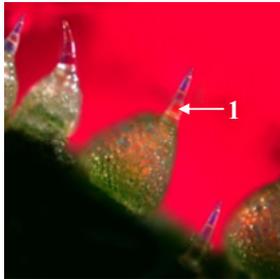
Другое ограничение метода темнопольной микроскопии состоит в том, что в поле зрения оказывается слишком много деталей, таких как пузырьки воздуха или инородные частицы, которые ухудшают изображение. Таким образом, данный метод лучше всего использовать для изучения мелких дискретных структур, достаточно удаленных друг от друга.

Метод исследования в темном поле впервые был предложен австрийскими учеными Р. Зигмонди и Р. Зидентопфом в 1903 г. [4, 24].

1.3.4 Поляризационная микроскопия

Впервые микроскоп для наблюдения объектов в поляризованном свете был создан английским оптиком Г. Сорби в 1850 г. Основным отличием от обычного микроскопа является наличие двух поляризационных фильтров. Первый фильтр (называемый обычно поляризатором) устанавливается перед конденсором, благодаря чему объект на предметном столике освещается поляризованным светом. За объективом располагается второй фильтр (анализатор), плоскость поляризации которого повернута на 90° относительно

первого. Если на столике микроскопа нет препарата, то изображение остается совершенно темным. Препарат, способный поворачивать плоскость поляризации проходящего света, будет виден в микроскоп, т.к. «повернутый» образцом свет частично пропускается анализатором (рисунок 13).

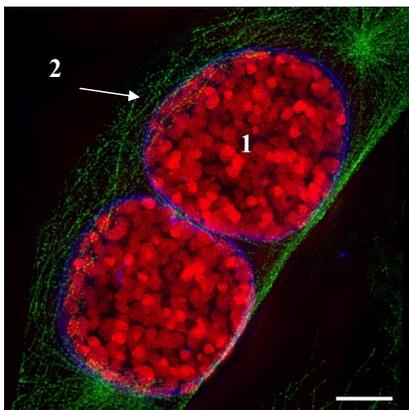


1 – трихомы (волоски) на коже незрелого огурца (увеличение 800х).

Рисунок 13 – Изображение, полученное с помощью поляризационного микроскопа [35]

В основе принципа действия поляризационных микроскопов лежит получение изображения исследуемого объекта при его облучении поляризованными лучами, которые, в свою очередь, должны быть получены из обычного света с помощью специального прибора – поляризатора. В сущности, при прохождении поляризованного света через вещество или отражении света от него, меняется плоскость поляризации света. В результате этих процессов на втором поляризационном фильтре выявляются излишние затемнения. Некоторые объекты дают специфичные реакции, как например, двойное лучепреломление в жирах. Некоторые объекты способны поворачивать направление колебаний проходящего поляризованного света. Это характерно в первую очередь для полимеров, например, волокон коллагена [4].

1.3.5 Интерференционная микроскопия



Деление клетки. 1 – красным цветом отмечено ДНК; 2 – зеленым волокна структурных белков.

Рисунок 14 – Изображение, полученное с помощью интерференционного микроскопа [31, 36]

Объединяет принципы фазово-контрастной микроскопии и поляризационной микроскопии и применяется для получения контрастного изображения неокрашенных объектов. Специальная интерференционная оптика (оптика Номарского) нашла применение в микроскопах с дифференциальным интерференционным контрастом.

С помощью интерференционной микроскопии можно описать структуру таких клеточных органоидов, как митохондрии. Ранее это можно было осуществить только с помощью электронных микроскопов, но в этом случае описание происходило на мертвых клетках. Новое поколение световых микроскопов произвело

революцию в биологии, позволив ученым описывать работу живых клеток на субклеточном уровне организации [31, 36].

1.3.6 Люминесцентная микроскопия

Применяется для наблюдения флуоресцирующих (люминесцентных) объектов. В люминесцентном микроскопе свет от мощного источника проходит через два фильтра. Один фильтр задерживает свет перед образцом и пропускает свет длины волны, возбуждающей флуоресценцию образца. Другой фильтр пропускает свет длины волны, излучаемой флуоресцирующим объектом. Таким образом, флуоресцирующие объективы поглощают свет одной длины волны.

Конфокальный лазерный микроскоп – световой флуоресцентный микроскоп с электронной системой обработки изображения. Источником света является лазер, но есть и обычная галогеновая лампа. Современные микроскопы обычно моторизированные, автоматизированные и имеют программы, которые управляют выбором многих важных параметров.

Термин «конфокальная» означает «софокусная»: в плоскости, оптически сопряженной с фокальной плоскостью объектива, находится конфокальная диафрагма. Использование лазера позволяет отсекаать фоновое свечение образца, что повышает резкость и соответственно – разрешение самого образца.

Наиболее часто встречающейся задачей для конфокальной микроскопии является изучение структуры клеток и их органоидов благодаря их высокому разрешению и контрасту, например, цитоскелета, ядра, хромосом, или даже локализации в них отдельных генов. Исследуется колокализация в клетке двух и более веществ, например белков. Такое изучение помогает понять, существует ли причинно-следственная связь между ними. Предварительно белки метятся антителами с разными флуорохромами.

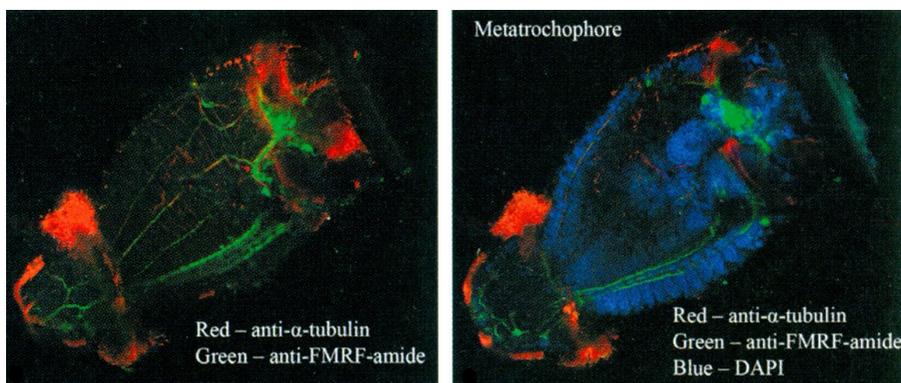


Рисунок 15 – Иммуноцитохимическое окрашивание тотальных препаратов морских беспозвоночных. Маркеры структур: красный – anti- α -tubulin mouse; зеленый – anti-FMRF – amide rabbit; синий – DAPI, nuclear dye [5]

В обычный микроскоп трудно разобрать, находятся ли они рядом или один под другим. Конфокальная микроскопия позволяет это сделать. Записав в памяти компьютера серию оптических срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов. Еще одна задача – исследование динамических процессов, происходящих в живых клетках. Например, движение ионов кальция и других веществ через клеточные мембраны [5, 12, 28].

1.3.7 Микроскопия с помощью бесконтактных объективов

В последнее время созданы микроскопы, позволяющие исследовать объекты при помощи длиннофокусных, широкодиапазонных вариообъективов, с помощью которых можно рассматривать объекты с увеличением от 0 до 5000, меняя угол обзора, с возможностью 2- и 3D симуляции изображения. Эти микроскопы характеризуются встроенными программами измерения изображений и выводом на экран компьютера как изображения, так и измерений (рисунок 16).

Цифровой микроскоп VHX-1000E с комплексом для анализа 2D и 3D изображений предназначен для проведения современных микроисследований биологической направленности в области цитологии, гистологии, морфологии, систематики и этологии гидробионтов в связи с непрерывным ростом требований к совершенствованию методов исследований с целью обеспечения более объективных, точных и воспроизводимых научных результатов.

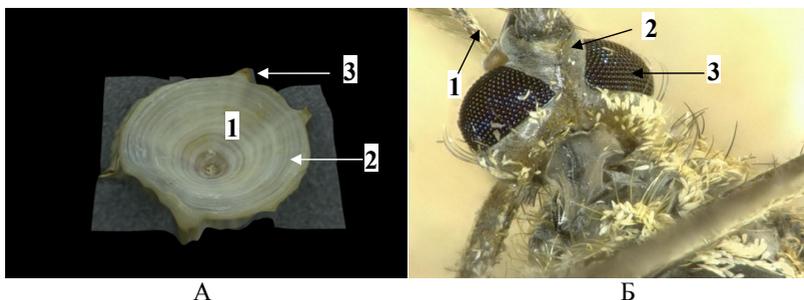


1 – моноблок; 2 – столик прямого света; 3 – столик проходящего света.

Рисунок 16 – Внешний вид светового микроскопа Keyence VHX-1000E

Использование цифровых зум-объективов с большим рабочим расстоянием, глубиной резкости, разрешающей способностью и изменяемым

углом наблюдений позволяет проводить исследование живых и фиксированных биологических объектов на современном уровне, недоступном при применении обычных оптических и электронных микроскопов. Поставляемый в комплекте комплекс анализа 2D и 3D изображений значительно расширяет возможности по документированию, созданию баз данных и оперативной передаче информации, а также ускоряет и удешевляет процесс фотографирования и видеосъемки исследуемых организмов и их структур по сравнению с обычными видео- и фотометодами (рисунок 17).



А – 3D реконструкция позвонка рыбы: 1 – тело позвонка; 2 – годовые кольца; 3 – отростки позвонка; Б – 3D реконструкция головы комара: 1 – усик, 2 – лоб; 3 – фасеточный глаз.

Рисунок 17 – Изображения, полученные с помощью микроскопа Keyence VHX-1000E

1.4 Методы приготовления препаратов для светопольного микроскопического исследования в проходящем свете

По характеру взятого материала различают следующие виды гистологических препаратов:

- 1) срезы органов (толщиной 5-15 нм);
- 2) мазки (крови, костного мозга и т.д.) и отпечатки (например, селезёнки, печени);
- 3) плёнки (брюшины, мягкой мозговой оболочки) или тотальные препараты.

1.4.1 Срезы органов

Живые биологические объекты гидратированы, т.е. содержат большое количество воды, подвижные белковые молекулы, липиды, сахара, множество мелких молекул и ионов, заключенных в цитоплазматические мембраны. Для изучения структуры тканей, соответствующей прижизненному состоянию, или выявления патологии необходимо приготовить препарат. Получение срезов органов обычно включает 4 этапа: взятие и фиксация материала, обезвоживание

и уплотнение материала, приготовление срезов, окрашивание препаратов и заключение в консервирующую среду.

Взятие и фиксация материала. Из соответствующего органа вырезают небольшие кусочки (0,5 x 1 x 1см) и погружают их в фиксатор (формалин, метанол, хромовую кислоту, тетраоксид осмия, жидкость Буэна, фиксатор Карнуа и т.д.) – обычно на 24 ч. Фиксация производится для предупреждения процессов аутолиза (самопереваривания) тканей. Это достигается путём денатурации (коагуляции) белков. Основным, широко применяемым фиксатором служит формалин, представляющий собой 40% раствор формальдегида. Формальдегид – это газ, растворимый в воде до концентрации 40% по массе, каким он и поступает в продажу под названием «Формалин». В гистологической практике используют 10% раствор формалина, что соответствует 4% формальдегиду. Из формальдегида готовят нейтральный (забуференный до pH 7,0) 10% формалин. Для этого в банку с 40% формалином засыпают карбонат кальция или магния либо смесь этих солей из расчета 100 г на 1 л формалина. Для получения 10% нейтрального формалина через 24 ч. к 1 части 40% нейтрального формалина добавляют 9 частей водопроводной воды. Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20°C. Если на дне банки с 40% формалином образовался осадок белого цвета (параформальдегид), то его можно растворить, подогрев до 70-80°C (в вытяжном шкафу!), и использовать для фиксации.

После фиксации образцы промывают. Цель этой процедуры – освободить исследуемый объект от излишнего количества фиксатора. Способ промывания зависит от методики фиксации. Например, после фиксирующих смесей, содержащих пикриновую кислоту, дихлорид ртути, трихлоруксусную кислоту, применяют этиловый спирт разной концентрации. После фиксации в формалине, в жидкостях, содержащих хром, осмиевую кислоту, обычно употребляют воду. В большинстве случаев промывку кусочков тканей производят в проточной водопроводной воде. Среднее время промывания 20-24 ч.

Затем образцы обезвоживают. Начиная с этого этапа и до самого конечного момента приготовления гистологического препарата, следует строго придерживаться правила постепенного воздействия применяемых веществ на исследуемые ткани. После промывания кусочки подвергают дальнейшему уплотнению путем обезвоживания в спиртах увеличивающейся концентрации. Для проведения процедуры приготавливают необходимое количество бюксов или стаканчиков с притертыми крышками, этикетируют их и заливают спиртами: 50, 60, 70, 80 и 96% (по два стаканчика), 100% (два стаканчика). Такой последовательный ряд сосудов получил название гистологической батареи. Спирты нужной крепости приготавливают заранее по специальной таблице разведения (таблица 1) из 96% спирта.

100% (абсолютный спирт) готовят следующим образом. Обычный спирт – ректификат содержит 96% чистого спирта и 4% воды. Для того чтобы получить абсолютный спирт, необходимо извлечь воду. Наиболее распространенным способом является обезвоживание при помощи прокаленного медного купороса (сульфата меди).

Таблица 1 – Приготовление спиртов различной концентрации

Для получения 100 мл спирта	Нужно взять, мл							
	96% спирт	H ₂ O	90% спирт	H ₂ O	80% спирт	H ₂ O	70% спирт	H ₂ O
30%	32	68	33	69	37	64	43	58
40%	42	58	44	56	50	50	57	43
45%	47	53	50	50	56	44	64	36
50%	52	48	56	44	63	37	71	29
60%	63	37	67	33	75	25	86	14
70%	73	27	78	22	88	12	-	-
80%	83	17	89	11	-	-	-	-
90%	94	6	-	-	-	-	-	-

В основе этого метода лежит свойство сульфата меди отдавать и присоединять молекулы воды, меняя при этом свой цвет (прокаленный сульфат меди имеет вид серовато-белого порошка, который по мере присоединения воды приобретает синюю окраску).

Насыпав порошок прокаленного медного купороса (примерно 10 г на 100 мл спирта) в чистую стеклянную бутылку с притертой пробкой, наливают туда же 96% спирт. Затем бутылку встряхивают до равномерного распределения порошка. Подобную процедуру повторяют на протяжении 1-2 дней. По мере поглощения воды порошок приобретает синюю окраску. Однократная обработка, как правило, не дает обезвоживания, поэтому спирт переливают в другой сосуд, содержащий свежую порцию сульфата меди. Подобную процедуру повторяют до тех пор, пока осадок не перестанет приобретать голубой цвет. Обезвоженный спирт отфильтровывают в чистую посуду, которую плотно закрывают. Желательно проверить pH абсолютного спирта, так как после обработки сульфатом меди он может стать слегка подкисленным. Для нейтрализации достаточно прибавить небольшое количество карбоната кальция (CaCO₃).

Если в лаборатории нет фабричного порошка безводного сульфата меди, то его можно приготовить самим, прокалив кристаллическую соль над огнем в широкой фарфоровой чашке (до тех пор, пока из синих кристаллов не образуется белый порошок). Для равномерного прокаливания необходимо перемешивать купорос стеклянной палочкой. Нельзя допускать почернения (особенно заметного по краям чашки), свидетельствующего о перекаливании. Таким же путем обрабатывают медный купорос, оставшийся после обезвоживания спирта.

Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 ч. в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от их количества. При использовании автомата для заливки количество спиртов увеличивают, а при проведении кусочков по спиртовой батарее вручную их осторожно промокают фильтровальной бумагой или салфеткой из марли, что позволяет реже менять спирты в батарее.

Для получения тонких (до 6 мкм) гистологических срезов необходимо фиксированный и промытый материал залить в плотную среду, предварительно пропитав ею кусочки тканей. В зависимости от способа растворения все заливочные среды разделяют на растворимые в органических растворителях и водорастворимые. К первым относятся парафин, пластические полимеры на основе парафина, целлоидин, ко вторым – желатин, полиэтиленгликоли, полиэферы, некоторые метакрилаты и т.д.

Заливка в парафин позволяет получать гистологические срезы больших размеров (гистотопографические срезы), например, срезы всего органа (матки, почки) или его значительной части (доли легкого). Заливку проводят вручную, и для нее требуется дополнительное время на всех этапах. Объекты заливают в парафин или парапласт, имеющие температуру плавления 56-58°C. Пропитанные парафином кусочки ткани выкладывают в специальные формочки и заливают расплавленным в термостате или на водяной бане при 60°C парафином, в который добавлено 1-3% воска. Для получения парафиновых блоков нужной формы используют различные приспособления. К ним относятся самодельные бумажные коробочки, на дно которых выкладывают кусочки, а рядом к боковой стенке ставят этикетку номером снаружи; металлические Г-образные угольники или разъемные формочки, которые перед употреблением смазывают глицерином и помещают на нагретую металлическую пластинку, выполняющую роль дна формочек. Применяют также различные пластмассовые коробочки и формы, в частности, используемые в микробиологии, особенно при заливке мелких объектов, таких как материал пункционных биопсий. Раскладывание кусочков в формочки и их ориентирование нужно проводить быстро теплым пинцетом. Если материала для заливки много и он быстро остывает, то можно использовать парафин, подогретый на водяной бане до 60°C. Для охлаждения формочки с материалом рекомендуют помещать в воду при 10-18°C, но не погружать в нее. При застывании парафина поверхность блока стягивается, и в нем образуется кратерообразное углубление. Это нужно учитывать при заливке кусочков и в дальнейшей работе с блоками. Парафин должен на 3-4 мм выступать над поверхностью блока, если предстоит монтировать его на деревянную колодку. Возможны также заливка блока большим количеством парафина и резка без использования деревянных колодок, с успехом применяемая даже на санном микротоме.

В большинстве руководств рекомендуют после подравнивания и удаления лишнего парафина наклеивать блоки на деревянные бруски с помощью подогретого на спиртовке металлического шпателя или скальпеля. Затем для обеспечения более прочного приклеивания основания блок оплавливают с четырех боковых сторон тем же горячим шпателем или скальпелем.

Изготовление срезов. После того как парафиновые кубики готовы, их необходимо нарезать на множество тоненьких пластинок, то есть получить гистологические срезы. Кубики вставляют в специальный прибор – микротом, служащий для приготовления срезов.

Микротомы – это приборы, с помощью которых получают срезы тканей, залитых в различные среды, а также замороженных и нефиксированных. Микротомы позволяют получать гистологические срезы различной толщины. По принципу действия различают санные, ротационные, замораживающие микротомы, а также криостаты и вибраторы.

Санные микротомы характеризуются горизонтальным движением ножа и вертикальным подъемом блокодержателя (рисунок 18). Их с успехом используют для резки объектов, залитых в целлоидин, целлоидин-парафин и парафин. Основные части микротома располагаются на специальных салазках, отсюда происходит его название. Принцип работы санного микротома заключается в том, что при обратном ходе ножа ножевые салазки толкают стержень со шкалой регулятора подачи, вызывая его перемещение. Движение стержня передается на тягу, которая с помощью «собачки» поворачивает храповик. Вращение храповика передается микровинту, который с помощью разъемной гайки перемещает салазки с блоком вверх. С каждым срезом блок поднимается все выше на расстояние, соответствующее толщине среза. После того как блокодержатель достигнет высшей точки, с помощью разъемной гайки надо опустить салазки с механизмом в крайнее нижнее положение. Существуют другие разновидности санных микротомов с различными вариантами способов подачи, зажимов для ножей и т.д.



Рисунок 18 – Санний микротом

Ротационные микротомы предназначены для резки парафиновых блоков, с их помощью можно получать серийные срезы. Важнейшая часть ротационного микротома – механизм микроподачи, который включает в себя храповик, дифференциальный механизм, микровинт, лимб, косозубую передачу и кулачок. Приводной механизм при повороте вала с помощью «собачки» поворачивает на заданное количество зубьев храповик, на оси которого находится зубчатое колесо, передающее через шестерню вращение микровинту. Винт перемещает каретку подачи объектодержателя. Толщина срезов устанавливается поворотом лимба.

Объектодержатель ротационного микротома – винтовой зажим, вмонтированный в шаровую оправу каретки подачи. Шарнирный механизм позволяет подать блок под любым углом. Объектодержатель фиксируется в зажиме специальной рукояткой.

Держатель для ножа – массивная подставка с двумя вертикальными стойками, в которые вмонтированыдвигающиеся держатели, приспособленные для установки ножа под нужным углом. Фиксация ножа осуществляется

винтами. В передне-заднем направлении нож перемещается по специальным направляющим с помощью винта. Постепенно, приближая нож к объекту и одновременно поворачивая колесо подачи, подравнивают площадь резания, а затем нож фиксируют.

Ротационные микротомы снабжены специальной транспортной лентой, на которую с ножа попадает полоска (серия) срезов. На ленте их разделяют препаративными иглами и производят дальнейшие манипуляции. Снимать срезы с ножа ротационного микротома можно кисточкой или препаративной иглой (рисунок 19).



Рисунок 19 – Ротационный микротом

Замораживающие микротомы используют для резки не залитых, но фиксированных объектов, материала, залитого в желатин и водорастворимые пластмассы. Особенно широко применяются замораживающие микротомы для изготовления препаратов при исследовании материала срочных биопсий. По своей конструкции замораживающие микротомы относятся к микротомам санного типа, но в их устройстве есть некоторые особенности. Станина имеет приспособление для крепления к столу. Нож устанавливают под нужным углом в подвижной ручке с помощью одного или двух зажимов. Автоматическая подача осуществляется при каждом размахе ручки с ножом через систему рычагов. Замораживающий столик снабжен приспособлением для подачи полупроводниковых элементов.

Криостаты, вибраторы. С развитием гистохимии ферментов и иммуноморфологии возникла необходимость в обработке нефиксированного материала, которая была реализована с помощью специальных приборов – криостатов. Позднее появились криокиты и вибраторы.

Криостат – специализированная холодильная камера с установленным в ней микромомом, в которой имеются отверстия для рук, люминесцентная лампа и смотровое стекло. Надежная изоляция позволяет поддерживать в криостате температуру от -5 до -25°C . Отрицательными моментами при работе с криостатом являются значительное переохлаждение рук оператора, недостаточная освещенность рабочего поля, а также невозможность ориентировать объект относительно кромки ножа. Эти недостатки практически устранены в криостатах зарубежного производства, управление которыми вынесено за пределы морозильной камеры. В них можно отдельно регулировать температуру объекта и ножа. Через 3-5 мин. после включения прибора достигается низкая температура, причем охлаждение возможно до -65°C , что предотвращает образование кристаллов в тканях.

Как уже было отмечено выше, для получения гистологических срезов применяют специальные микротомные ножи, различающиеся по форме, длине и углу сечения лезвия. По форме они представляют собой сложной стальной клин, у которого режущий край имеет дополнительную клиновидную заточку. Длина ножа может составлять от 8 до 50 см.

По конфигурации лезвия различают три группы микротомных ножей: А, В и С. У микротомных ножей, относящихся к группе А, одна поверхность ровная, а другая вогнутая (их называют плоско-вогнутыми с большой кривизной вогнутой поверхности). Эти ножи чаще всего изготовлены из мягкой или относительно мягкой стали и предназначены для резки объектов, залитых в целлоидин. Ножи, относящиеся к группе В, называются плоско-вогнутыми, но кривизна вогнутой поверхности у них значительно меньше, чем у ножей группы А. Они изготовлены из более твердой стали, используют их для приготовления целлоидиновых и целлоидин-парафиновых срезов.

У ножей, относящихся к группе С, обе поверхности клинка плоские. Их изготавливают из твердой стали и применяют для резки объектов, залитых в парафин, а также для получения срезов на замораживающем микротоме.

Кроме того, для приготовления парафиновых и полутонких срезов на микротомах и ультратомах используют металлические магнитные лезвия и стеклянные ножи. Металлическое магнитное лезвие (одноразовый нож) позволяет получить срезы с 50-60 парафиновых блоков, затем лезвие меняют.

Уход за микротомами и микротомными ножами. Все скользящие поверхности микротомов должны быть чистыми и смазаны тонким слоем машинного или вазелинового масла. При постоянной работе на микротоме все скользящие поверхности необходимо один раз в неделю протирать тряпочкой, смоченной бензином или толуолом, и смазывать. После окончания работы на микротоме объектодержатель и станину очищают от остатков парафина, предварительно вынув микротомный нож и убрав его в футляр. Микротомные ножи никогда не оставляют в микротоме или на рабочем столе! Замораживающие микротомы и криостаты через 30 мин. после выключения вытирают насухо и винтовую подачу смазывают вазелиновым маслом.

Резание парафиновых блоков на санном микротоме. Парафиновый блок, наклеенный на деревянную колодку или без нее (с большим слоем

парафина), зажимают в объектодержатель. Установив нужный угол наклона ножа (оптимальный 13-15°) в зависимости от плотности ткани, медленно подводят нож к блоку, регулируют его высоту до соприкосновения с ножом. Сначала выравнивают поверхность блока, установив микрометрическую шкалу на получение толстых (20-25 мкм) срезов, затем шкалу переводят на 6-8 мкм и приступают к резанию материала. Как правило, нож располагается перпендикулярно, но возможно также получение срезов (особенно с более плотных объектов) ножом, который установлен под углом к станине микротомы.

Срезы с блока осторожно снимают с помощью сухой или смоченной в спирте кисточки, используют также изогнутую препаровальную иглу или скальпель. Срезы обычно переносят в коробку, дно которой выстлано бумагой черного цвета, и укладывают матовой стороной вверх. После получения нужного количества срезов рядом с ними кладут блок или этикетку с номером. Удобнее сразу обработать 20-30 блоков, а затем приступить к монтажу срезов на предметные стекла.

Изготовление препаратов. Часто срезы наклеивают на предметное стекло непосредственно с ножа. Для этого их переносят в склянку с теплой (35-40°С) дистиллированной или кипяченой водой, а затем вылавливают на предметные стекла, которые предварительно обезжиривают и натирают белком с глицерином. Срезы приклеивают на предметное стекло блестящей, обращенной к ножу стороной. Небольшие складочки на срезе можно расправить, осторожно дотрагиваясь до них углом согнутой препаровальной иглы.

Можно расправлять срезы непосредственно на стекле с помощью специального приспособления для сушки и расправления парафиновых срезов. Для этого на предметное стекло пипеткой наносят каплю воды и в нее опускают срез. Стекло со срезом помещают на нагреваемый столик прибора, где срез постепенно расправляется. После удаления избытка воды пипеткой или фильтровальной бумагой стекло со срезом подсушивают и одновременно срез плотно фиксируется на предметном стекле. На нагреваемом столике прибора помещается одновременно 45 предметных стекол, при его использовании не требуется дальнейшего просушивания стекол со срезами в термостате. Имеются специальные импортные ванночки для расправления срезов и переноса их на стекло. В них постоянно поддерживается оптимальная температура воды 38°С.

Продолжительность просушивания срезов в термостате при 37°С 6-12 ч. В случае необходимости проведения срочной окраски срезы можно поместить на 10-15 мин. в термостат при 56°С до начала плавления парафина, что способствует лучшей фиксации среза на предметном стекле. Однако при этом несколько затрудняется депарафинирование: требуется применение дополнительной порции ксилола и увеличение продолжительности депарафинирования.

Существует сухой способ приклеивания срезов к стеклу, который пригоден только для срезов отличного качества. На предметное стекло, смазанное тонким слоем белка с глицерином, помещают срез, аккуратно

расправляют его препаровальной иглой или скальпелем и слегка подогревают на спиртовке или нагреваемом столике.

Предметные стекла, применяемые для получения гистологических препаратов, необходимо предварительно подготовить. Исключение составляют готовые к использованию и специально упакованные импортные предметные стекла.

Предметные стекла моют в теплой мыльной воде или кипятят в 2-3% растворе гидрокарбоната натрия, затем ополаскивают горячей водой и промывают в течение нескольких часов в проточной воде. Вымытые стекла протирают чистой хлопчатобумажной тканью и на несколько дней помещают в смесь Никифорова: 96% спирт и эфир (1:1). Обезжиренные стекла извлекают пинцетом из этой смеси, протирают чистой тканью и складывают в коробочку.

Для обезжиривания предметных стекол используют также хромовую смесь, в состав которой входят 100 г бихромата калия, концентрированной серной кислоты и 1000 мл горячей воды. Бихромат калия растворяют сначала в горячей воде, затем раствор охлаждают и после этого по стеклянной палочке осторожно по каплям добавляют серную кислоту. Стекла выдерживают в хромовой смеси 2-3 дня, а затем тщательно промывают в проточной воде в течение 1-2 дней.

Предметные стекла также хорошо обезжириваются в крепком растворе соляной кислоты. Через несколько суток их промывают проточной водой и высушивают.

Качество обезжиривания можно проверить, капнув на предметное стекло воду из пипетки: по обезжиренному стеклу вода растекается тонким слоем, а не собирается в каплю.

Для лучшей фиксации срезов на стекле его предварительно смазывают смесью белка с глицерином. Свежий яичный белок взбивают и фильтруют через крупнопористый фильтр, смоченный дистиллированной водой, затем размешивают с равным объемом глицерина и добавляют несколько кристаллов тимола. Смесь хранится в течение нескольких месяцев. Применяют также смесь, в состав которой входят 15 мл сыворотки крови, 5 мл дистиллированной воды и 6 мл 5% формалина. После фильтрации смесь готова к нанесению на предметные стекла. Ее использование дает лучшие результаты, чем применение яичного белка, так как при окрашивании не образуется фон.

Разработан способ фиксации среза к предметному стеклу без предварительного натирания последнего белком с глицерином. В ванночку с теплой дистиллированной водой капают несколько капель жидкого казеинового клея и перемешивают. В полученную мутноватую жидкость опускают срезы, расправляют препаровальной иглой и вылавливают на чистое обезжиренное стекло. Этот способ дает неизменно хороший эффект и вокруг среза отсутствует окрашенный фон, как это часто бывает при применении белка [1, 2, 9, 20, 22].

Окрашивание препаратов и заключение в консервирующую среду.

Перед окрашиванием образцы освобождают от парафина, проводя по батарее растворителей: ксилол, спирт 100%, 96%, 80%, 70%, 60%, вода (по 2-5 мин.).

(Этот ряд кончается водой в том случае, если затем используется водорастворимый краситель.). Для окрашивания предметные стёкла со срезами помещают на короткое время в раствор красителя, промывают водой, обрабатывают раствором другого красителя (если таковой используется тоже) и вновь промывают водой. Препарат опять обезжоживают (проводя по батарее спиртов с возрастающей концентрацией), а затем просветляют (в карбол-ксилоле и ксилоле) – для удаления лишней краски. Наконец, на препарат наносят каплю канадского бальзама (в случае среза) или кедрового масла (на мазки крови) и накрывают покровным стеклом.

Все красители, используемые в гистологической технике, подразделяются на три типа: кислые, основные, нейтральные, индифферентные (таблица 2) [1, 2, 3, 9, 11, 20].

Таблица 2 – Типы красителей и окрашиваемые структуры

Тип красителя	Пример	Окрашиваемые структуры
Кислые красители	Кислоты и кислые соли: эозин, кислый фуксин.	Окрашиваемые структуры называются оксифильными (имеющими сродство к кислым красителям). Это белковые компоненты цитоплазмы и неклеточные структуры (коллагеновые волокна).
Основные красители	Основные соли: гематоксилин, азур 2, кармин.	Красящиеся структуры – базофильные (сродство к основным красителям). Это структуры, богатые нуклеиновыми или иными кислотами ядра, рибосомы, аморфный компонент межклеточного вещества.
Нейтральные красители	Смесь двух красителей: основного (азур 2) и кислого (эозин).	Структуры, воспринимающие кислые красители, окрасятся эозином; пример – специфические гранулы в эозинофильных лейкоцитах. Ядра всех клеток окрашиваются азуром 2.
Индифферентные красители	Судан III, судан IV.	Суданом окрашиваются жировые капли (в которых он растворяется).

Существует большое количество разных способов окраски для выявления различных структур, представленные в таблицах 3–6 [1, 2, 3, 9, 11, 20].

Таблица 3 – Общие методы окраски

Окраска гематоксилин-эозином	Самый распространённый метод окраски, сочетающий основной и кислый красители, поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие нечеточные структуры. Ядра приобретают сине-фиолетовый цвет, цитоплазма – желтовато-розовый цвет.
Окраска железным гематоксилином (по методу Генденгайна)	Препарат предварительно обрабатывают (протравляют) железоаммиачными квасцами, а потом обрабатывают гематоксилином. Структуры приобретают коричневатосерый цвет. Хорошо выявляются структуры ядра, границы клеток, мышечные волокна.

Таблица 4 – Выявление нечеточных структур соединительной ткани

Окраска по методу Ван Гизона	Краситель – смесь растворов пикриновой кислоты и кислого фуксина. Коллагеновые волокна (содержащиеся в межклеточном веществе соединительной ткани) окрашиваются в ярко-красный цвет, а элементы других тканей (например, мышечные волокна) – в жёлтый цвет.
Окраска по методу Маллори	Краситель является трёхцветным: это смесь кислого фуксина, анилинового синего, оранжевого G, а также двух кислот. Коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-синий цвет; многие другие структуры (ядра, мышечные волокна, эритроциты) – в оранжевый или красный цвет.
Импрегнация серебром	Препарат обрабатывают аммиачным раствором серебра, а затем – восстановителями. В итоге, выделяющееся серебро осаждается на определённых волокнах соединительной ткани. Ретикулярные (агрирофильные) волокна приобретают чёрный цвет, коллагеновые волокна – коричневый, ядра клеток – светло-коричневый.
Окраска орсеином	Эластические волокна соединительной ткани окрашиваются в тёмно-красный цвет; остальные структуры – в слабо-розовый цвет
Окраска гематоксилин-пикрофуксином	Эластические волокна окрашиваются пикриновой кислотой в жёлтый цвет, коллагеновые волокна – в красный цвет, ядра клеток окрашиваются гематоксилином в тёмно-фиолетовый цвет.
Окраска по методу Шморля	Используется для окраски костей и дентина. Предварительно кусочки материала подвергают декальцинации (с помощью кислоты), а затем выдерживают в растворе алюмокалиевых квасцов. Краситель – раствор тионина. Стенки костных полостей и канальцев (высланные сетью коллагеновых волокон) окрашиваются в тёмно-коричневый цвет; остальной фон – светло-коричневый.

Таблица 5 – Окраска клеток соединительной ткани и крови

Окраска азур 2 – эозином	Базофильные элементы окрашиваются азуром 2 в тёмно-синий, а оксифильные – в светло-красный цвет.
Окраска мазков по методу Романовского	Краситель – тот же, что и в предыдущем случае (азур 2 – эозин). Отличия же от приготовления срезов таковы: фиксацию мазков проводят чистым метанолом; окрашивание продолжают всего 30-45 мин, а не 12-14 ч.; для заключения под покровное стекло используют кедровое масло, а не канадский бальзам. Эритроциты приобретают бледно-красный цвет, цитоплазма лейкоцитов – голубой или синий цвет, цитоплазматические гранулы окрашиваются в зависимости от их природы.

Таблица 6 – Выявление элементов нервной системы

Импregnация нитратом серебра	Особенности предварительной обработки препарата. Фиксацию материала в формалине проводят не менее 7 дней. Уплотнение образца осуществляют не путём заливки в парафин (или целлюлозу), а путём замораживания. Срез готовят на специальном замораживающем микротоме. При окрашивании срез последовательно обрабатывают растворами азотнокислого серебра, формалина, аммиачного серебра. Элементы нервной системы (волокна, клетки и т.д.) окрашиваются в чёрный цвет, окружающие ткани – в светло-коричневый цвет.
Окраска толуидиновым синим по методу Ниссля	Толуидиновый синий окрашивает умеренно базофильные соединения в синий цвет. С его помощью в цитоплазме нервных клеток обнаруживаются глыбки базофильного вещества (т.н. субстанция Ниссля).
Окраска метиловым зелёным – пиронином по методу Браше	Метод служит для выявления РНК. Как и предыдущий метод, относится к гистохимическим методам исследования. Поэтому подробнее описывается ниже.

Гистохимические методы основаны на специфической реакции между химическим реактивом и определённым компонентом препарата. Образующийся продукт реакции имеет окраску, отличную от окраски исходного реактива (таблица 7) [1, 2, 3, 9, 11, 20].

Таблица 7 – Гистохимические методы исследования

1	2
РНК	Реакция Браше. Реактив (смесь двух красителей: метилового зелёного и пиронина). Пиронин специфически окрашивает РНК в красный цвет. Поэтому на препарате ядрышки (в составе ядра) рибосомы и богатые участки цитоплазмы имеют красный цвет. Другие структуры ядра (помимо ядрышек) – зелёные. Обычно делают и контрольный препарат, который перед окрашиванием обрабатывают рибонуклеазой.
ДНК	Реакция Фельгена. Основной реактив – фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа). ДНК-содержащие структуры окрашиваются в пурпурно-красный цвет.
Белки	Используются различные реакции, в том числе: с бром-феноловым синим (у белков – темно-фиолетовая окраска); со смесью нингидрин-реактив Шиффа (белки приобретают красный цвет).
Полисахариды	ШИК-реакция. Реактив – Шифф Периодная кислота. Периодат способствует образованию в субстрате альдегидной группы, которая взаимодействует с реактивом Шиффа. На препарате ШИК-положительные компоненты (например, гранулы гликогена) имеют темно-красный цвет.
Гликозамин-гликаны	Реакция с толуидиновым синим. При взаимодействии толуидинового синего с веществами, содержащими много кислотных групп, наблюдается метахромазия – изменение окраски с синей на фиолетовую и красную. Подобным свойством обладают, в частности, компоненты аморфного вещества соединительной ткани – гликозамингликаны (являющиеся, как известно, гетерополисахаридами с высоким содержанием кислотных радикалов).
Нейтральный жир	Реакция с суданом III (о которой уже упоминалось). Капли жира в жировой клетке окрашиваются в яркий оранжево-красный цвет благодаря растворению в них красителя.

1.4.2 Мазки крови и отпечатки органов

Мазок, как и отпечаток – достаточно «узкоспециализированный» препарат. Мазки используют для исследования жидких тканей, то есть крови, лимфы, ликвора. Отпечатки органов часто используют при изучении кроветворных органов рыб (головной и туловищной почки, селезенки и печени).

Особенности приготовления и окрашивания мазков мы рассмотрим на примере приготовления мазка крови для подсчета лейкоцитарной формулы.

Правильно сделанный и хорошо окрашенный мазок крови является совершенно необходимым условием для получения достоверных результатов

при изучении морфологических особенностей кровяных клеток и подсчете лейкоцитарной формулы.

Мазок крови должен отвечать следующим требованиям:

1) начинаться на 1 см от начала предметного стекла и кончаться на расстоянии 2-3 см от его противоположного края, общая длина мазка должна охватывать $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ стекла;

2) быть равномерной толщины, а не волнообразным, хороший мазок толще всего вначале, затем постепенно истончается и заканчивается в виде следа («вид щеточки»);

3) слой крови не должен достигать краев стекла, между ним и краем стекла всегда должно быть несколько миллиметров свободного пространства.

Мазки, превышающие $\frac{3}{4}$ длины предметного стекла, бывают очень толстыми. В них эритроциты лежат густым слоем, прижаты друг к другу и образуют монетные столбики, что мешает исследователю рассмотреть их морфологию. Мазки (короче $\frac{1}{2}$ предметного стекла) слишком тонкие: лейкоциты лежат очень редко и деформированы. Если отсутствует свободный от мазка край предметного стекла (что бывает при большом диаметре шлифовального стекла), то большие клетки перемещаются к краю мазка, вследствие чего неравномерно распределяются в нем.

В волнообразном мазке распределение клеток крови также неправильное – толстые участки содержат больше лимфоцитов, тонкие – больше моноцитов и сегментоядерных клеток.

Предметные стекла, на которых будут делаться мазки крови, должны быть хорошо обезжирены и промыты по схеме, описанной для подготовки предметных стекол при изготовлении гистологических срезов.

К капле крови прикасаются предметным стеклом так, чтобы оно не касалось пальца. Капля крови переходит на стекло. Для того чтобы мазок был величиной в $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ предметного стекла, капля должна быть диаметром 2-5 мм. Предметное стекло берут в левую руку большим, указательным и средним пальцами так, чтобы капля крови была сверху. Шлифованное стекло, которым будут делать мазок, ставят под углом 30-45° на расстоянии 1-2 мм перед каплей, держа его большим и указательным пальцами правой руки. Шлифованное стекло сдвигают назад так, чтобы оно коснулось капли крови и капля растеклась в углу между шлифованным и предметным стеклом (движение назад помогает также убрать лишнюю кровь, если капля была слишком большой). Затем быстрым движением руки вперед делают мазок. Нужно, чтобы при приготовлении мазка большой и указательный пальцы правой руки скользили по краям предметного стекла и создавали необходимую опору для равномерного наложения слоя крови. Шлифованное стекло должно быть уже, чем предметное, чтобы края предметного стекла были свободны от мазка.

Если ширина шлифованного стекла такая же, как и предметного, то углы у шлифованного стекла отламывают, укорачивая на 1-2 мм. Шлифованное стекло можно заменить покрывным.

Приготовление хорошего мазка крови, хотя и не является трудным делом,

требует определенного навыка. Следует помнить, что неверно приготовленный мазок приводит к грубым ошибкам в результатах исследований. Качество мазка является до некоторой степени «аттестатом» работы.

Приготовленные указанным способом мазки крови подсушивают, затем фиксируют с помощью метилового спирта (3-5 мин.), или абсолютного спирта (100%) (10-15 мин.), или 96% спирта (20-25 мин.), или ацетона (5 мин.). Наилучшие результаты дает все же фиксация мазков метиловым спиртом. Фиксирующие жидкости денатурируют белки клетки при сохранении их прижизненной структуры, а также закрепляют мазки на стеклах. Нефиксированные мазки легко смываются.

Фиксирующие жидкости наливают в достаточном количестве на стекла или стекла с мазками погружают в банку с фиксатором. После фиксации и высушивания мазков приступают к их окрашиванию. Обычно применяют метод Романовского-Гимзы. Краситель Романовского-Гимзы состоит из щелочной (азур II) и кислой (эозин) частей. Азур II окрашивает структуры клеток в яркосиний цвет, а эозин в розово-красный. Щелочные части клеток связываются и окрашиваются кислыми красителями, а кислые – щелочными.

Рабочий раствор красителя получают разведением готового раствора дистиллированной водой (1-2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды). Для хорошего окрашивания мазка имеют значение качество красителя, реакция и температура воды. Очень важно, чтобы дистиллированная вода, в которой растворяют краситель, имела нейтральную реакцию. Если реакция кислая, то слабым действием щелочного элемента красителя белые кровяные элементы окрашиваются плохо, а препарат становится красным. Если вода имеет щелочную реакцию, то слабеет действие кислого элемента краски, лейкоциты окрашиваются слишком интенсивно и препарат делается синим. Реакцию воды проверяют посредством гематоксилиновой пробы. В 4-5 мл воды бросают крупинку гематоксилина. Если вода имеет щелочную реакцию, то окрасится ранее 3-й минуты. Если окрашивание наблюдается через 5 мин. или совсем не происходит, то вода имеет кислую реакцию. Если же вода окрашивается через 1-4 мин. в розово-фиолетовый цвет, то она нейтральна и годна к употреблению. При кислой реакции воды в нее прибавляют по каплям 1% раствор карбоната натрия, пока гематоксилиновая проба не станет характерной для нейтральной воды. При щелочной реакции добавляют по каплям 1% раствор уксусной кислоты.

Для того чтобы правильно оценить результаты пробы, стаканчик с водой нужно ставить на лист белой бумаги.

Окраску мазков производят по методу Романовского-Гимзы следующим образом. Перед окраской нужно предварительно проверить качество красителей, окрасив и просмотрев несколько мазков для того, чтобы установить время, лучшее для окраски. Рабочий раствор краски готовят непосредственно перед окраской. Препарат помещают мазком вниз на 2 стеклянные (деревянные) палочки, положенные на дно чашки Петри. Краску подливают под препарат. Окрашивают 20-40 мин. Затем мазок промывают под струей воды, сушат и микроскопируют.

При окраске мазков крови по методу Романовского-Гимзы эритроциты окрашиваются в бледно-розовый цвет, ядра клеток – в сине-фиолетовый, гранулы эозинофилов – в ярко-красный, базофилов – в синий, цитоплазма лимфоцитов и моноцитов – в голубой цвет [3, 11, 13, 15].

1.4.3 Тотальные препараты

Тотальным препаратом называют препарат целой, ненарушенной ткани, части органа, органа или даже организма. Термин «тотальный препарат» означает, что это не срез.

Препараты такого типа широко распространены в эмбриологии, поскольку хороши для исследования строения стадий развития эмбриона.

На тотальном препарате особенно удобно рассматривать прозрачные и обладающие небольшой толщиной ткани, органы и организмы. Примером тотального препарата могут быть участки сальника, брыжейки или мягкой мозговой оболочки, растянутые на предметном стекле. Для приготовления такого препарата иссекают подлежащий исследованию участок пленки и во избежание образования складок перед фиксацией накаливают в расправленном состоянии на восковую подушку. По окончании фиксации материал отмывают от фиксатора, окрашивают и обезвреживают. Препараты часто требуют дополнительной обработки в просветляющих растворах. Обезвреженные тотальные препараты могут заключаться в постоянные среды.

Тотальные препараты также готовятся из мелких организмов или небольших их частей, например, ворсинки хориона и ланцетника.

Пленки для гистологических исследований клеток, участвующих в воспалительном процессе, могут быть приготовлены «искусственно». Для этого в коже подопытного животного делается надрез, куда вставляется покровное стекло. На месте инородного тела возникает воспаление. По прошествии некоторого времени стекло осторожно вынимают и исследуют пленку налипших на него клеток воспаления [1, 2, 3, 11, 13, 15].

2 Практические работы

Работа 1 Правила работы со световым микроскопом

Цель работы: ознакомиться с правилами его работы.

Оборудование: микроскоп, готовый микропрепарат.

Правила работы с микроскопом [21].

При работе с микроскопом необходимо соблюдать операции в следующем порядке:

- 1) работать с микроскопом следует сидя;
- 2) микроскоп осмотреть, вытереть от пыли мягкой салфеткой объективы, окуляр, зеркало или электроосветитель;
- 3) микроскоп установить перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать;
- 4) открыть полностью диафрагму, поднять конденсор в крайнее верхнее положение;
- 5) работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения;
- 6) опустить объектив 8 в рабочее положение, т.е. на расстояние 1 см от предметного стекла;
- 7) установить освещение в поле зрения микроскопа, используя электроосветитель или зеркало. Глядя одним глазом в окуляр и пользуясь зеркалом с вогнутой стороной, направить свет от окна в объектив, а затем максимально и равномерно осветить поле зрения. Если микроскоп снабжен осветителем, то подсоединить микроскоп к источнику питания, включить лампу и установить необходимую яркость горения;
- 8) положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы изучаемый объект находился под объективом. Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4-5 мм;
- 9) смотреть одним глазом в окуляр и вращать винт грубой наводки на себя, плавно поднимая объектив до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив. Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины;
- 10) передвигая препарат рукой, найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа;
- 11) если изображение не появилось, нужно повторить все операции пунктов 6, 7, 8, 9;
- 12) для изучения объекта при большом увеличении сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на 40х, поворачивая револьвер так, чтобы он занял рабочее положение. При помощи микрометрического винта добиться хорошего изображения объекта. На коробке микрометрического механизма имеются две риски, а на микрометрическом винте – точка, которая

должна все время находиться между рисками. Если она выходит за их пределы, ее необходимо вернуть в нормальное положение. При несоблюдении этого правила микрометрический винт может перестать действовать;

13) по окончании работы с большим увеличением установить малое увеличение, поднять объектив, снять с рабочего столика препарат, протереть чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его полиэтиленовым пакетом и поставить в шкаф.

Задания:

1) изучить устройство и принцип работы механической системы светового микроскопа;

2) изучить устройство и принцип работы оптической системы светового микроскопа;

3) изучить устройство и принцип работы осветительной системы светового микроскопа;

4) подготовить микроскоп для микрофотографирования объекта, используя искусственное освещение;

5) подготовить микроскоп для микрофотографирования объекта, используя естественное освещение;

6) добиться четкости, контрастности и яркости изображения объекта, используя настройки соответствующих систем микроскопа при микрофотографировании на малом и большом увеличении.

Контрольные вопросы:

1) перечислить функции, которые выполняет световой микроскоп;

2) перечислить элементы механической системы светового микроскопа;

3) перечислить элементы оптической системы светового микроскопа;

4) перечислить элементы осветительной системы светового микроскопа;

5) назвать преимущества и недостатки световой микроскопии;

6) перечислить возможные пути увеличения разрешающей способности светового микроскопа;

7) назвать теоретический предел разрешающей способности светового микроскопа;

8) перечислить основные требования, предъявляемые к объекту микрофотографирования;

9) перечислить порядок работы с иммерсионными объективами.

Работа 2 Методика изготовления, окрашивания и цитологического анализа мазка, мазка-отпечатка

Цель работы: овладеть навыками изготовления, окрашивания и цитологического анализа мазка, мазка-отпечатка

Занятие проводится с использованием лабораторных животных (рыб).

Оборудование и реактивы: световой микроскоп, железный лоток, марля, ножницы хирургические, предметное стекло, стекло со шлифованными

гранями для изготовления мазков, скальпель, фильтровальная бумага, гепарин, 96° спирт, краситель Романовского-Гимза.

Задания:

- 1) отработать методику взятия крови у рыбы;
- 2) отработать методику приготовления и окрашивания мазка крови;
- 3) отработать методику приготовления и окрашивания мазка-отпечатка;
- 4) провести дифференциальный цитологический анализ клеток крови по мазку и оформить результаты анализа в рабочей тетради;
- 5) провести дифференциальный цитологический анализ клеточного состава в мазке-отпечатке и оформить результаты анализа в рабочей тетради.

Методика забора крови и изготовления мазка.

Работа производится в паре. Первому студенту взять рыбу за жабры и поднять над лотком. Второму студенту взять одной рукой рыбу за хвостовой плавник, второй – браншами ножниц очистить хвостовую часть туловища от чешуи. Затем протереть бранши ножниц и обработанный участок марлей, смоченной гепарином. Отрезать хвостовой плавник на месте сращивания чешуи. После появления крови поднести предметное стекло к хвостовой вене и поместить 1 каплю на предметное стекло. Стекло со шлифованными гранями подвести к капле крови под углом 45° таким образом, чтобы оно коснулось крови.

Методика окрашивания мазка.

Уложить предметное стекло с мазком на столик. Высушить мазок при комнатной температуре (3-5 мин.). Нанести на мазок фиксатор – 96% этанол (10-15 мин). Окрасить мазок красителем Романовского-Гимза (10-15 мин).

Промыть срез в проточной воде 1-2 минуты, промокнуть фильтровальной бумагой.

Результат: ядра лейкоцитов окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, цитоплазма в розовый; гранулы лейкоцитов от интенсивно-красного до фиолетового цвета.

Методика изготовления и окрашивания мазка-отпечатка.

Рыбу декапитировать хирургическими ножницами. Вскрыть брюшную полость и поместить селезенку в чашку Петри. Селезенку рассечь скальпелем и осторожно осушить поверхность разреза фильтровальной бумагой. Обезжиренным стеклом коснуться поверхности разреза. Мазок высушить на воздухе, нанести фиксатор и окрасить по Романовского-Гимза.

Результат: ядра лейкоцитов окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, цитоплазма в розовый; гранулы лейкоцитов от интенсивно-красного до фиолетового цвета.

Контрольные вопросы:

- 1) объяснить значение гепарина в методике изготовления мазков крови;
- 2) раскрыть понятие «фиксатор» и объяснить его значение;
- 3) перечислить необходимые реактивы для окрашивания мазков и мазков отпечатков;

- 4) перечислить основные параметры, используемые для цитологического анализа;
- 5) объяснить значение «соотношение лейкоцитов» при цитологическом анализе.

Работа 3 Подсчет форменных элементов крови

Цель работы: овладеть навыками подсчета форменных элементов крови с помощью камеры Горяева.

Занятие проводится с использованием лабораторных животных (рыб) и культуры микроводоросли хлореллы (штамм ИФР № С-111).

Оборудование и реактивы: световой микроскоп, железный лоток, марля, ножницы хирургические, камера Горяева, капилляр, покровное стекло, скальпель, фильтровальная бумага, гепарин, 96%, натрия хлорид, уксусная кислота, 1%-ный раствор метиленового синего.

Методика забора крови у рыб проводится аналогично описанию в работе 2. Кровь из хвостовой вены необходимо сцедить в пробирку.

Камера Горяева – приспособление, предназначенное для подсчета количества клеток в заданном объёме жидкости. Предложена русским врачом, профессором Казанского университета Горяевым Н.К. (1875-1943). Представляет собой толстое предметное стекло (рисунок 20), с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой (рисунок 21), которая имеет площадь 9 мм^2 . На ней нанесено 225 больших квадратов (15 рядов по 15 больших квадратов в каждом), разграфленных вертикально, горизонтально, крест-накрест и неразграфленных. Каждый из 25 больших квадратов разделен на 16 маленьких квадратиков. Площадь маленького квадрата составляет $1/400 \text{ мм}^2$, а объем камеры над ним $1/4000 \text{ мкл}$. Размеры малых делений клетки сетки составляют $0,05 \text{ мм}$, а больших – $0,2 \text{ мм}$. При этом сетка нанесена на площадку (участок стекла), расположенный на $0,1 \text{ мм}$ ниже, чем две соседние площадки. Эти площадки служат для притирания покровного стекла. Если на боковые полоски наложить и притереть шлифованное покровное стекло до появления Ньютоновых колец (радужных колец), то над средней полоской образуется шелевидное пространство высотой $1/10 \text{ мм}$. В результате объем жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки Горяева, составляет $0,004 \text{ мкл}$ [9].

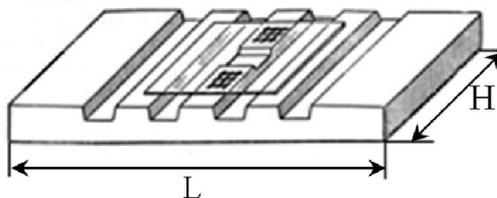


Рисунок 20 – Камера Горяева. Предметное стекло: $L = 76 \text{ мм}$, $H = 25 \text{ мм}$

Методика подсчета эритроцитов.

В сухую чистую пробирку внести 8 мл 0,9% раствора натрия хлорида и капиллярной пипеткой 0,02 мл крови. Предварительно кончик пипетки вытереть, кровь выдуть на дной пробирки, а пипетку тщательно промыть верхним слоем жидкости. Содержимое пробирки хорошо перемешать, получится разведение крови 1:400. Камера и покровное стекло должны быть вымыты и насухо вытерты. Покровное стекло притереть к камере так, чтобы появились радужные кольца. Далее взять каплю разведенной крови из пробирки и заполнить ею камеру, нанося к краю покровного стекла. Капля разведенной крови попадает под стекло в щелевидное пространство и заполняет камеру. Выждав 2-3 мин., подсчитать эритроциты под микроскопом при объективе $\times 8$ и окуляре $\times 15$ в левом верхнем большом квадрате (разделенном на 16 маленьких квадратов), а затем еще в 4 больших квадратах по диагонали сетки (всего в 5 больших квадратах).

Подсчет клеток в большом квадрате начинают с левого верхнего маленького квадратика, а далее переходя во 2, 3 и 4-й квадратик (рисунок 22). После верхнего ряда считают эритроциты в нижерасположенном ряду, начиная с 1-го правого квадратика и т.д. Эритроциты внутри маленьких квадратиков, а также на верхней левой сторонах большого квадрата учитывают, а эритроциты на нижней и правой сторонах не учитывают.

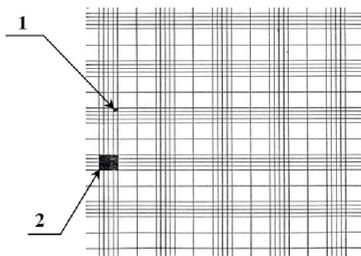
Количество эритроцитов определяют по формуле:

$$X = \frac{AB}{BG} = 10\,000 \cdot 4, \quad (1)$$

где X – количество эритроцитов в 1 мкл крови; А – число эритроцитов, подсчитанное в 5 больших квадратах; В – степень разведения крови (200); G – количество маленьких квадратиков в 5 больших квадратах ($16 \cdot 5 = 80$); Г – объем счетной камеры над маленьким квадратиком ($1/4000$ мкл).

Для определения числа эритроцитов в 1 л крови пользуются формулой:

$$X = A \cdot 10^{10}. \quad (2)$$



1 – малый и 2 – большой квадраты.

Рисунок 21 – Сетка камеры Горяева: номинальный размер стороны счетной сетки – 3 мм; площадь сетки – 9 мм^2 ; номинальный размер глубины камеры – 0,1 мм

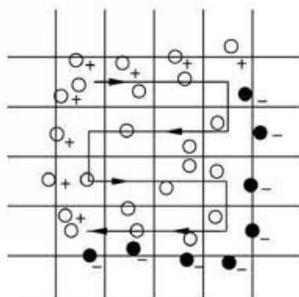


Рисунок 22 – Порядок подсчета эритроцитов в большом квадрате счетной камеры Горяева

Методика подсчета лейкоцитов.

При подсчете лейкоцитов в капилляр набрать кровь до метки «0,5», а затем до метки «11» набрать жидкость Тюрка (3%-ный раствор уксусной кислоты – 100 мл, 1%-ный раствор метиленового синего – 1 мл). Получается разведение крови 1:20. Встряхнуть капилляр 1-2 мин. Уксусная кислота разрушает эритроциты, а метиленовый синий окрашивает лейкоциты. Выпустить первые 3 капли на ватку (или фильтрованную бумажку), а следующей каплей заполнить счетную камеру.

Через 2-3 мин. после оседания лейкоцитов на дно камеры начинают подсчет клеток, который проводят под микроскопом при объективе $\times 8$ и окуляре $\times 15$ в 100 больших квадратах, не имеющих дополнительных линий и расположенных по сетке Горяева группами по 4 квадрата.

Количество лейкоцитов определяется по формуле:

$$X = \frac{AB}{BG} = 50 \cdot 4, \quad (3)$$

где X – количество лейкоцитов в 1 мкл крови; А – число лейкоцитов, подсчитанное в 100 больших квадратах; Б – степень разведения крови (20); В – количество маленьких квадратиков в 100 больших квадратах ($100 \cdot 16 = 1600$); Г – объем счетной камеры над маленьким квадратиком ($1/4000$ мкл).

Для определения числа лейкоцитов в 1 литре крови используют формулу:

$$X = A \cdot 5 \cdot 10^7. \quad (4)$$

Методика подсчета клеток хлореллы с помощью камеры Горяева.

Для подсчета клеток хлореллы в мерную пипетку набирают 1 мл суспензии. Разводят набранное количество в 100 мл дистиллированной воды и с помощью стеклянной палочки перемешивают получившийся раствор. Далее с помощью пипетки заполняют камеру так, чтобы не было пузырьков. Клетки хлореллы подсчитывают под микроскопом при объективе $\times 8$ и окуляре $\times 15$ в 4 больших квадратах 10 раз.

Количество клеток определяют по формуле:

$$X = \frac{AB}{BG} = 10\,000 \cdot 4, \quad (5)$$

где X – количество клеток в 1 мкл суспензии; А – число клеток, подсчитанное в 4 больших квадратах; Б – степень разведения суспензии (100); В – количество маленьких квадратиков в 4 больших квадратах ($16 \cdot 4 = 64$); Г – объем счетной камеры над маленьким квадратиком ($1/4000$ мкл) [3, 15].

Работа 4 Методика изготовления пленочного препарата

Цель работы: овладеть навыками изготовления пленочного препарата

Оборудование и реактивы: ножницы, препаровальные иглы, предметные стекла, гематоксилин Майера.

Задания:

- 1) изготовить и окрасить пленочный препарат;
- 2) произвести цитологический анализ клеточного состава в пленочном препарате;

3) результаты цитологического анализа оформить в рабочей тетради.

Методика изготовления и окрашивания пленочного препарата.

Выделить у рыбы брыжейку и поместить в чашку Петри с дистиллированной водой. Слить воду, расправить брыжейку и подкрасить ее гематоксилином Майера (2-3 мин.). Промыть в проточной воде (2-3 мин.). Пленку достать и расправить на предметном стекле.

Используя световой микроскоп при объективах x20 и x40, зарисовать в рабочей тетради изображение гистологического препарата, произвести его анализ.

Контрольные вопросы:

1) перечислить виды препаратов, использующихся для цитологического анализа;

2) назвать отличительные признаки мазка, мазка-отпечатка, первичной культуры клеток *in vitro*;

3) перечислить требования, предъявляемые к препарату для микроскопии в проходящем свете;

4) охарактеризовать физические методы фиксации;

5) перечислить последовательность этапов работы по визуализации и анализу изображения с помощью комплекса оптико-структурного анализа;

6) раскрыть основные преимущества и недостатки витального метода изучения живых объектов;

7) раскрыть основные преимущества и недостатки метода изучения фиксированных объектов.

Работа 5 Чтение мазков и гистологических срезов

Цель работы: овладеть навыками чтения гистологических препаратов, идентификации различных типов их окрашивания.

Занятие проводится с использованием гистологических препаратов, предоставленных преподавателем, рисунков срезов и мазков, представленных в пособии (рисунки 23–28).

Оборудование: световой микроскоп, гистологические препараты.

Задания:

1) в рабочей тетради зарисовать изображения гистологических срезов и мазков;

2) указать, к какому типу тканей относятся изображения мазков и гистологических срезов;

3) описать особенности окрашивания гистологических препаратов;

4) указать тип красителей, используемых при окрашивании;

5) описать особенности пробоподготовки материала для получения гистологических препаратов.

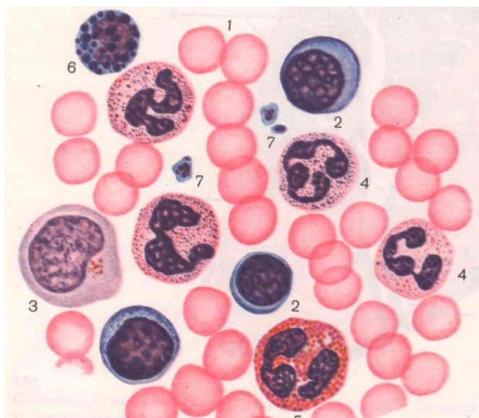
Контрольные вопросы:

- 1) охарактеризовать химические методы фиксации;
- 2) перечислить типы красителей и окрашиваемые структуры;
- 3) перечислить особенности специфических реакций между химическим реактивом и определённым компонентом препарата при гистохимических методах исследования.



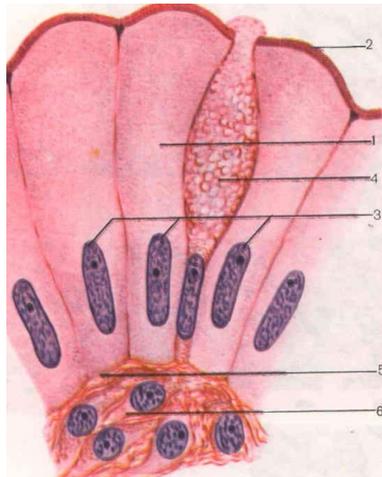
1 – эритроцит; 2 – лимфоцит; 3 – моноцит; 4 – гранулоцит; 5 – тромбоцит.

Рисунок 23 – Кровь лягушки (мазок). Окраска гематоксилин-эозином x400 [2]



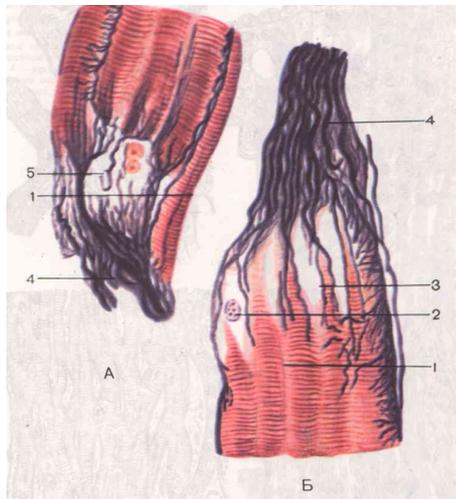
1 – эритроцит; 2 – лимфоцит; 3 – моноцит; 4 – нейтрофильный гранулоцит;
5 – эозинофильный гранулоцит; 6 – базофильный гранулоцит; 7 – тромбоцит.

Рисунок 24 – Мазок крови человека. Окраска по Романовскому-Гимза x900 [2]



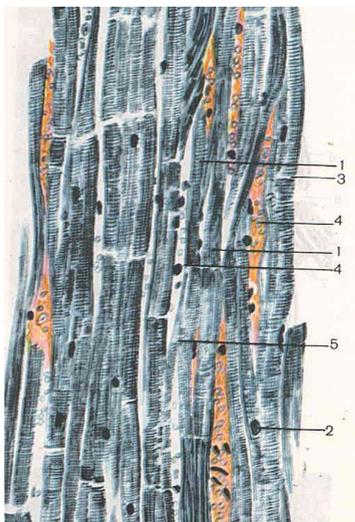
1 – эпителиальные клетки цилиндрической формы; 2 – всасывающая каемка; 3 – ядра эпителиальных клеток; 4 – бокаловидная железистая клетка; 5 – базальная мембрана; 6 – соединительная ткань.

Рисунок 25 – Однослойный цилиндрический каемчатый эпителий ворсинки тонкой кишки. Окраска гематоксилин-эозином х600



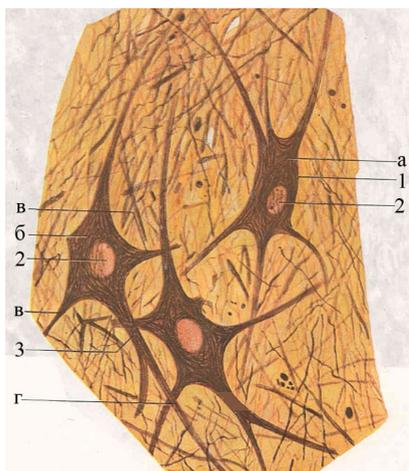
А – волокно в состоянии сокращения; коллагеновые фибриллы внутри волокна закручены спиральками; Б – волокно в расслабленном состоянии; коллагеновые фибриллы внутри волокна прямые. 1 – сарколемма; 2 – ядро мышечного волокна; 3 – саркоплазма; 4 – сухожилие; 5 – сухожильный пучок внутри мышечного волокна.

Рисунок 26 – Два продольных разреза сухожильных концов сегментных мышечных волокон рыбы бычка. Окраска по Маллори х1500 [2]



1 – сердечные мышечные волокна; 2 – ядро сердечной мышечной клетки (миоцита);
 3 – вставочный диск; 4 – прослойки соединительной ткани с кровеносными сосудами;
 5 – анастомоз между двумя мышечными волокнами.

Рисунок 27 – Поперечнополосатая мышечная ткань сердца (продольный разрез). Окраска железным гематоксилином x280 [2]



1 – тело клетки: а – нейроплазма; б – нейрофибриллы; 2 – ядро; 3 – отростки клетки;
 в – дендриты; г – нейрит.

Рисунок 28 – Нейрофибриллы в нервных клетках передних рогов спинного мозга. Импрегнация серебром по Кахалу x900 [2]

3 Электронная микроскопия

3.1 История электронной микроскопии

Электронный микроскоп как прибор был изобретен в 1930-х годах. Возможность его создания основывается на 3 достижениях в области физики: открытии электрона, установлении волновой природы частиц и отклоняющего действия электромагнитных полей на заряженные частицы. В первые два десятилетия XX века были созданы и необходимые технические предпосылки. Промышленные лаборатории, работавшие над электронно-лучевым осциллографом, дали вакуумную технику, стабильные источники высокого напряжения и тока, хорошие электронные эмиттеры. В 1931 г. Р. Руденберг подал патентную заявку на просвечивающий (трансмиссионный) электронный микроскоп, а в 1932 г. М. Кнолль и Э. Руска построили первый такой микроскоп, применив магнитные линзы для фокусировки электронов (рисунок 29). Этот прибор был прешественником современного электронного микроскопа (Э. Руска стал лауреатом Нобелевской премии по физике за 1987 г. за его разработку).



Рисунок 29 – Первый промышленный трансмиссионный микроскоп, созданный М. Кнолль и Э. Руска в 1932 г.

В 1935 г. был создан сканирующий электронный микроскоп. В 1938 г. Руска и Б. фон Боррис построили прототип промышленного электронного микроскопа для фирмы «Сименс-Хальске» в Германии; этот прибор позволил достичь разрешения 10 нм. Растровый электронный микроскоп в его нынешней форме был изобретен в 1952 г. Чарльзом Отли. Первый серийный сканирующий электронный микроскоп появился в 1964 г.

В настоящее время насчитывается несколько десятков промышленных изготовителей электронных микроскопов, десятки тысяч приборов используются в лабораториях всего мира в различных отраслях науки и техники.

Широчайшее применение метод электронной микроскопии нашел в медицине и биологии (морфологии, микробиологии, вирусологии, биохимии, онкологии, генетике, иммунологии). Он позволяет исследовать структуры клеток, тканей микроорганизмов и вирусов на субклеточном и макромолекулярном уровнях. Сочетание электронной микроскопии с другими методами, например, с радиоавтографией, гистохимическими, иммунологи-

ческими методами исследования, позволяет проводить электронно-радио-автографические, электронно-гистохимические, электронно-иммунологические исследования [5, 29].

3.2 Устройство электронного микроскопа

Электронный микроскоп позволяет рассмотреть строение очень мелких структур, невидимых в световом микроскопе, например, тилакоид в хлоропластах. Его разрешающая способность в 400 раз больше, чем у светового микроскопа. Это достигается за счет потока электронов вместо видимого света. Различают два типа электронных микроскопов: трансмиссионный (просвечивающий) (рисунок 30) и сканирующий (дающий объемное изображение микропрепаратов) (рисунок 31).

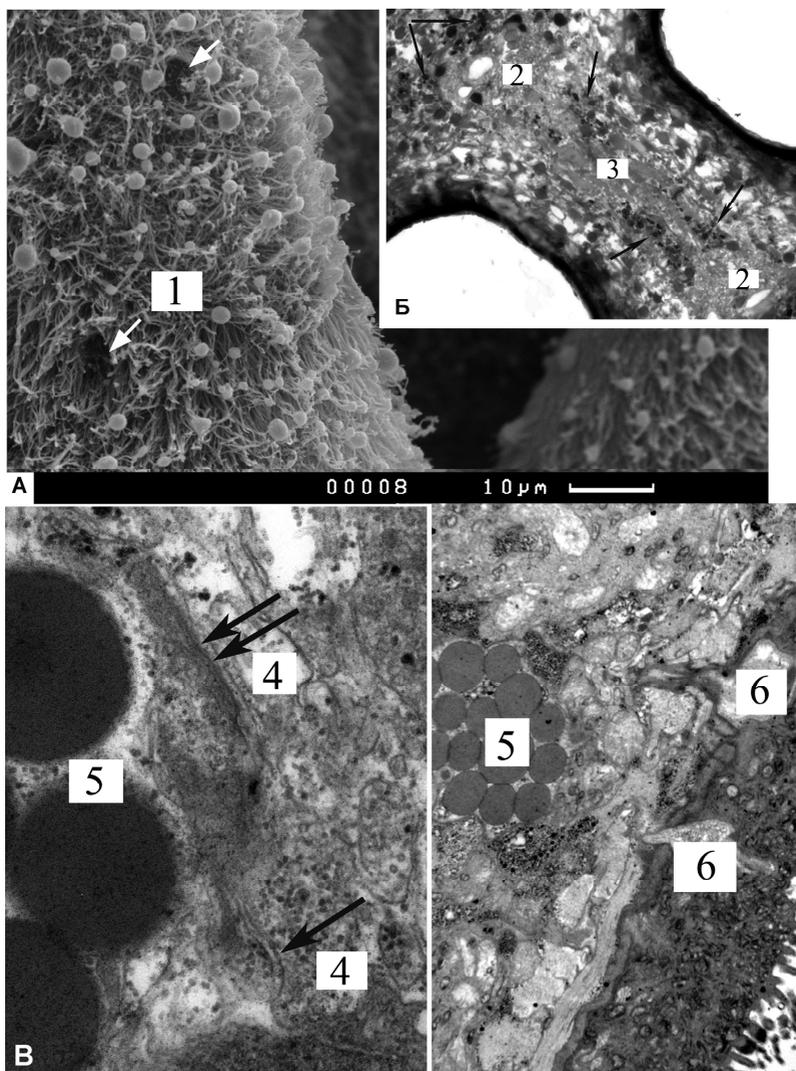


Рисунок 30 – Трансмиссионный электронный микроскоп Jem 1011



Рисунок 31 – Сканирующий электронный микроскоп JEOL, JSM-6510LV Scanning Electron Microscope

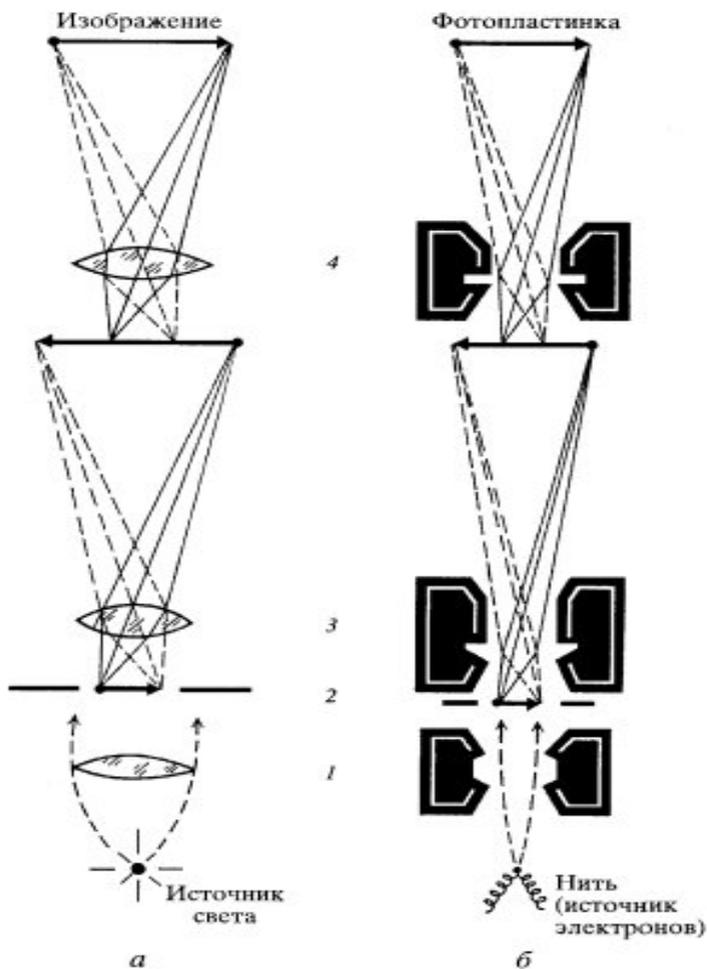
Различие между трансмиссионным и сканирующим электронными микроскопами заключается в методе фиксации электронов при их контакте с объектом: электроны могут проходить через структуры исследуемого объекта (трансмиссионная электронная микроскопия, ТЭМ) или отражаться от них (сканирующая электронная микроскопия, СЭМ), отклоняясь под разными углами, в результате чего возникает изображение на люминесцентном экране микроскопа. При трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии получают плоскостное изображение структур, при сканирующей – объемное (рисунок 32).



1 – поры фронтальных желез в тегументе; 2 – поперечный срез железы в области нейропилей мозга; 3 – в области нейронов центральной комиссуры; 4 – нервные отростки; 5 – секреторный проток в тегументе ботрии; 6 – сенсорные органы.

Рисунок 32 – Изображение строения и иннервации фронтальной железы *D. ditremum*, полученное (А) с помощью СЭМ, (Б, В) с помощью ТЭМ [6]

Как показано на рисунке 33, принципиальная схема электронного микроскопа подобна световому.



1 – конденсорная линза; 2 – объект; 3 – объективная линза; 4 – окуляр, проекционная линза.

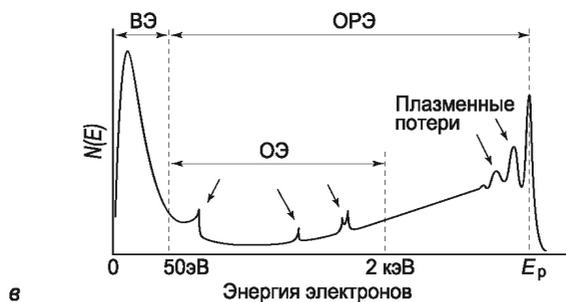
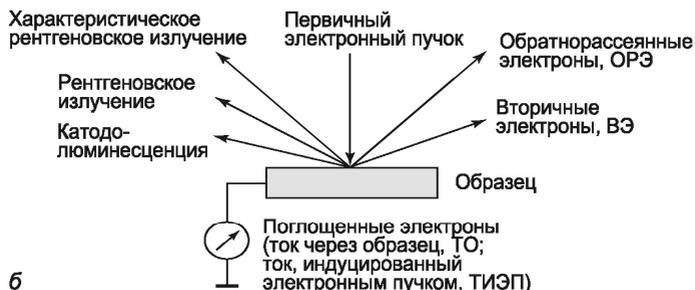
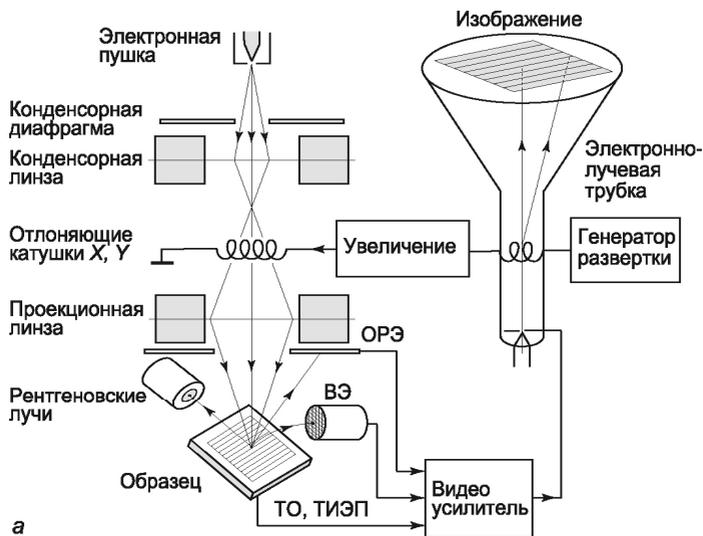
Рисунок 33 – Сравнение хода лучей и общей конструкции светового (а) и электронного (б) микроскопов

Основная часть микроскопа представляет собой полый цилиндр (колонку микроскопа), из которого откачан воздух для того, чтобы не было взаимодействия электронов с молекулами газов и окисления вольфрамовой нити накаливания в катode электронной пушки. Между катодом и анодом

подается высокое напряжение (от 50 до 200–5000 кВ), что служит причиной ускорения электронов. В центре анода есть отверстие, проходя через которое электроны формируют пучок, идущий вниз по колонке микроскопа. Линзы электронного микроскопа представляют собой электромагниты, поле которых может изменять путь электронов (как стеклянные линзы изменяют путь фотонов). В конденсорной линзе пучок электронов фокусируется и попадает на объект, с которым электроны взаимодействуют, отклоняются, рассеиваются, поглощаются или проходят без изменения. Электроны, прошедшие через объект, фокусируются объективной линзой, которая формирует увеличенное первичное изображение объекта. Так же как в световом микроскопе, объективная линза определяет его основные показатели. Первичное изображение увеличивается проекционной линзой и проецируется на экран, покрытый люминесцентным слоем, светящимся при попадании на него электронов. Вместо светящегося экрана изображение можно поместить на фотопластинку и получить снимок. В современных микроскопах в вакуумную колонку помещается цифровая камера, которая проецирует изображение с экрана непосредственно на монитор компьютера.

Напряжение, которое используется для ускорения электронов в большинстве просвечивающих (трансмиссионных) электронных микроскопов, достигает 50–150 кВ. При напряжении в 50 кВ электрон обладает длиной волны в $0,05 \text{ \AA}$, и в этом случае теоретически можно было бы получить разрешение в $0,025 \text{ \AA}$ ($d \sim 0,5\lambda$). Однако в современных конструкциях электронных микроскопов достигается разрешение около 1 \AA из-за недостаточной стабильности напряжения, стабильности тока линз, неоднородности металла магнитных линз и других несовершенств прибора.

Сканирующий электронный микроскоп отличается от просвечивающего способом улавливания отражающихся от объекта лучей (рисунок 34) [5, 8, 29].



а – схема работы сканирующего электронного микроскопа; б – типы сигналов, генерируемых при облучении поверхности пучком первичных электронов; в – энергетический спектр электронов, испускаемый образцом, облучаемым электронами с энергией E_p .

Рисунок 34 – Принцип работы сканирующего электронного микроскопа

3.3 Подготовка биологических объектов для электронной микроскопии

Исследование биологических объектов методом электронной микроскопии включает те же позиции, что и для световой микроскопии: взятие материала, его фиксация, обезвоживание, заливка в среду, резка и окрашивание. Отличия заключаются в особенностях подготовки материала для атаки их пучком электронов.

Взятие материала. Для электронной микроскопии рекомендуют как можно более быстрый отбор материала у забитых животных, для предотвращения посмертных изменений. Для сохранения органов в живом состоянии до переноса в фиксатор, охлажденных животных необходимо препарировать в холодном физиологическом растворе, соответствующем тоничности внутренней среды животного. Объем проб для фиксации не должен превышать 1 мм³.

Фиксация. Цель фиксации – сохранить структуру ткани в состоянии, близком к прижизненному. Фиксатор для ЭМ должен быстро проникать в ткани, сохранять третичную структуру белков; его pH, молярность и ионный состав должны быть близкими к показателям межклеточной жидкости. Наиболее широко используются глутаральдегид, формальдегид, четырехокись осмия и акролеин. Каждый из них имеет свои положительные и отрицательные черты. В настоящее время в электронной микроскопии как для трансмиссионной, так и растровой микроскопии применяется двойная фиксация: глутаровым альдегидом и затем тетраокид осмия с добавлением дубильной кислоты.

Первичная фиксация – 1-1,5 часа в 2,5% глутаральдегиде на 0,1M фосфатном или какодилатном буфере при pH 7,2-7,4, затем постфиксация 1 час в 1% четырехокси осмия на том же буфере. **Внимание!!! Оба вещества относятся к чрезвычайно ядовитым, вызывают сильные ожоги слизистых оболочек глаз и дыхательных путей. Все работы проводятся строго под тягой, при температуре 4°C.**

Приготовление 0,1 M Na-Na фосфатного буфера, pH 7,2-7,4 происходит по следующей схеме.

Готовят маточные растворы: А) 0,2 M раствор NaH_2PO_4 27,58 г/л; Б) 0,2 M раствор Na_2HPO_4 28,38 г/л. Для получения pH 7,2 следует смешать: 28 мл раствора А и 72 мл раствора Б; pH 7,3–23 мл раствора А и 77 мл раствора Б; pH 7,4–19 мл раствора А и 81 мл раствора Б. Для любой из предложенных схем полученный объем раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой.

Для приготовления 1% четырехокси осмия готовят маточный раствор (4%). Для этого ампулу с твердой четырехокисью осмия сначала тщательно моют, разбивают на чистом пергаменте и высыпают все вместе с осколками в колбу с дистиллированной водой. Маточный раствор хранят в холодильнике в плотно закрытой темной колбе, обернутой бумагой, для предотвращения доступа света. Маточный раствор 4% OsO_4 разводят до 1% рабочего раствора промывочным буфером непосредственно перед началом фиксации материала. Промывочный буфер готовят следующим образом. К

исходному 0,1 М буферу pH 7,2-7,4 добавляют сахарозу. Расчет: 1,7 г сахарозы на 100 мл буфера.

Перед обезвоживанием в течение 30 мин. проводится отмывка материала от фиксатора тем же промывочным буфером, который использовался для приготовления фиксаторов. Смену буфера следует произвести дважды через каждые 15 мин.

Обезвоживание проводится в батарее спиртов возрастающей концентрации (30%, 50%, 70% 80%, 90%, 96%, 100%) с шагом 10 мин. Образцы в каждой концентрации спирта обезвоживают двукратно. Приготовление спиртов приведено в таблице 1. Для лучшего обезвоживания пробы после проводки в 70% спирте следует оставить на 12 ч., затем еще раз произвести двукратную смену спирта этой концентрации.

После обезвоживания материала в спиртах проводится замена обезвоживающей среды на растворитель для заливочной среды. Это обеспечивается двукратным проведением материала через смесь абсолютный ацетон: спирт 100% в соотношении 1:1 в течении 30 мин. Затем материал перемещают в абсолютный ацетон, дегидратация повторяется дважды с интервалом в 15 мин.

Для приготовления 100% ацетона в фарфоровой ступке предварительно прокаливают CaCl_2 до достижения соли воздушного рассыпчатого состояния. Затем соль остужают и переносят в емкость с притертой крышкой, добавляю ацетон (маркировка хч или чда) из расчета 10 мл соли на 100 мл раствора. Смесь оставляют на 12 часов. Перед применением ацетон отфильтровывают.

Заливка. Существует большой набор заливочных сред с различными свойствами: эфиры акриловых смол, полиэфирные смолы, эпоксидные смолы, смолы на основе меламина. Заливочные среды должны иметь низкую вязкость, хорошо проникать в ткани, хорошо смешиваться с дегидратантами, полимеризоваться с малой усадкой, хорошо резаться, минимально рассеивать электроны после полимеризации, оставаться стабильными под электронным пучком, обеспечивать хорошее контрастирование тканей и доступность реагентов для иммуно- и гистохимических реакций. Смолы в жидком состоянии обладают высокой вязкостью, поэтому приготовление смолы требует определенного навыка.

Из эпоксидных смол наиболее широко используются Эпон 812, Араалит М, их смеси и смола Сперра.

Заливка материала в смолы проводится по стандартной процедуре, которая заключается в постепенной пропитке образца заливочной средой до полной замены растворителя смолой, а затем в полимеризации смолы (таблицы 8, 9) [5, 18].

Для получения однородной смеси необходимо соблюдать следующие правила: посуда для приготовления смеси должна быть абсолютно сухой, без пылевых частиц; наливать отдельные компоненты смолы нужно медленно, тонкой струйкой; смешивать компоненты нужно медленно, чтобы, во-первых, не разбить полимерные цепи, а во-вторых, не взбить пену; важно, чтобы полученная смесь была абсолютно однородной по цвету.

Таблица 8 – Стандартные заливочные смеси Эпона и Аралдита

Название компонента	Аралдит, мг (г)	Эпон			Эпон + Аралдит, мл (г)
		а	б	в	
Аралдит	19,0 (22,0)	-	-	-	12,0 (14,0)
Эпон	-	20,0 (24,0)	20,0 (24,0)	20,0 (24,0)	20,0 (24,0)
ДДСА	21,0 (21,0)	22,0 (22,0)	16,0 (16,0)	9,0 (9,0)	50,0 (50,0)
МНА	-	5,0 (6,0)	8,0 (10,0)	12,0 (15,0)	-
БДМА	1,2 (1,3)	1,4 (1,5)	1,3 (1,5)	1,2 (1,4)	2,5 (2,6)
ДФФ*	0,6 (0,6)	-	-	-	0,4 (0,4)

Примечание: * – только для Аралдита 502 и Аралдита МУ753; а – мягкие, б – средней твердости, в – твердые.

Таблица 9 – Стандартная схема заливки в смесь смол Эпон-Аралдит

№ п/п	Этап	Длительность
1	Обезвоживание в 100% ацетоне	2x15 мин.
2	Инфильтрация смесью смолы и ацетона (1:2)	18-24 ч.
3	Инфильтрация смесью смолы и ацетона (1:1)	18-24 ч.
4	Инфильтрация смесью смолы и ацетона (2:1)	18-24 ч.
5	Инфильтрация полной заливочной смесью смолы	1 ч.
6	Полимеризация при 45°C	24 ч.
7	Полимеризация при 60°C	48 ч.

Для заливки обычно используют полиэтиленовые или желатиновые капсулы, на которые наносится маркировка пробы для предотвращения анонимности проб. Образцы ориентируются в капсулах в конце заливки, и капсулы помещаются в термостат при определенной температуре (рисунок 35).

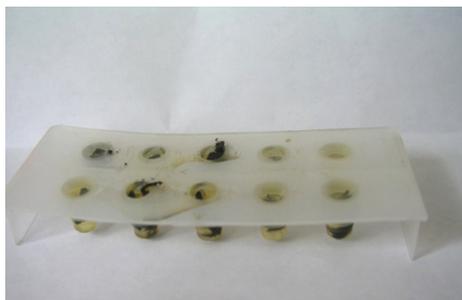
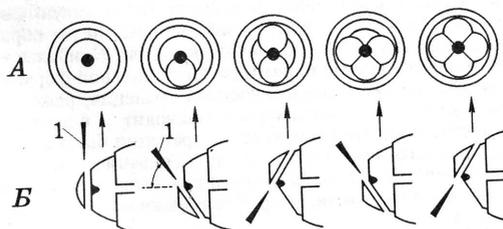


Рисунок 35 – Полиэтиленовые капсулы для заливки

Резка блоков. Пучок электронов проникает через объекты толщиной не более 0,1 мкм. Для получения качественных снимков материала, из залитых проб необходимо получить ультратонкие срезы толщиной до 100 нм.

Для получения срезов блоки с образцами затачивают в виде пирамидки на конце блока (рисунок 36).

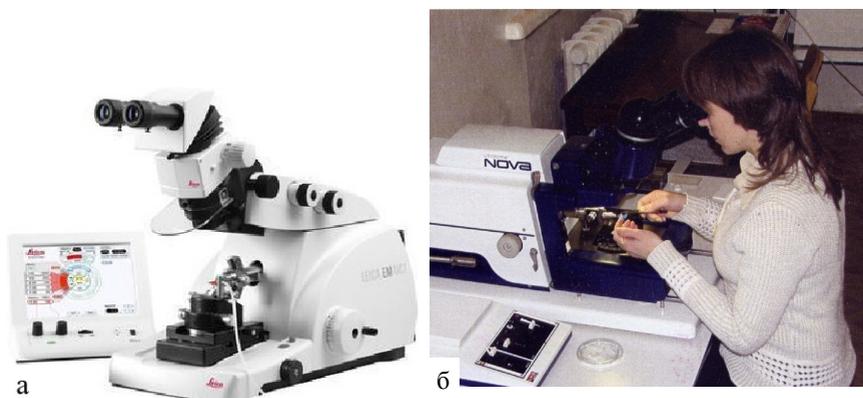


1 – лезвие бритвы.

Рисунок 36 – Заточка пирамидки для ультратомии:

А – вид сверху, Б – вид сбоку

Заточенный блок помещают в блокодержатель специального прибора для резки ультратонких срезов – ультратома (рисунок 37) [5, 18, 25].



а – ультрамикротом фирмы Leica [33]; б – ультрамикротом фирмы Nova (фотография предоставлена заведующим ЦКП ЭМ ИБВВ РАН С.И. Метелевым).

Рисунок 37 – Ультрамикротомы

Для приготовления срезов используют стеклянные или алмазные треугольные ножи, радиус режущего края которых равен 2 нм. Оптимальная толщина получаемых срезов – 200-300Å.

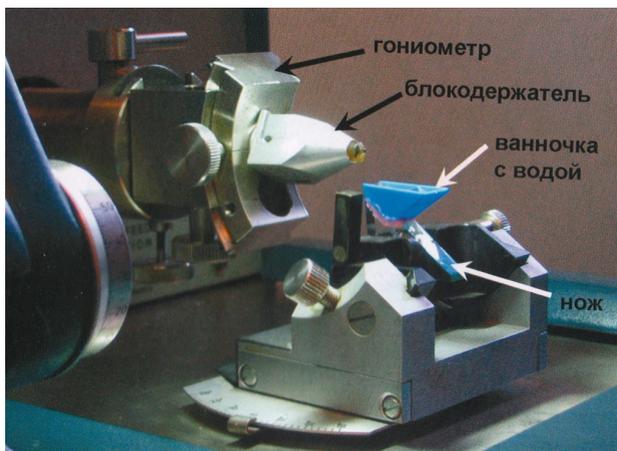


Рисунок 38 – Расположение гониометра, блокодержателя, ванночки с водой и ножа в ультрамикротоме [5]

Площадь получаемых ультратонких срезов обычно очень мала ($0,1-1 \text{ мм}^2$), поэтому все операции идут под микроскопическим контролем. Срезы из-под ножа попадают в пластиковые ванночки с водой (рисунок 38).

Далее срезы собирают на специальные сеточки для электронной микроскопии, имеющие определенное количество отверстий на дюйм (от 50 до 400), либо бленды, покрытые пленками-подложками из формвара (рисунок 39).

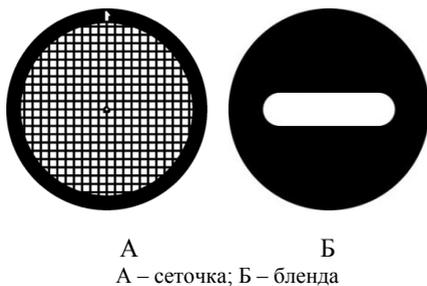


Рисунок 39 – Подложки для ультратонких срезов [34]

Максимальное разрешение электронного микроскопа реализуется только при исследовании металлов или кристаллических решеток. На биологических объектах такого разрешения получить не удастся из-за низкой контрастности объекта. Биологические объекты в основном содержат углерод и, следовательно, мало контрастны. Показано, что минимальная толщина биологического объекта с плотностью около 1 г/см^3 , выявляемого при ускоряющем напряжении в электронном микроскопе 50 кВ , равна 50 \AA .

Контраст биологических объектов можно повысить, используя тяжелые металлы или их соли.

Контрастирование корпускулярных объектов. Одним из широко распространенных методов контрастирования биологических объектов является химическое – искусственное увеличение электронной плотности структур клетки. Оно может быть позитивным (усиление плотности исследуемых структур по сравнению с фоном) или негативным (увеличение плотности фона).

Позитивное контрастирование. Частичное контрастирование срезов происходит еще на этапе фиксации четырехокисью осмия, так как этот фиксатор содержит атомы электронно-плотного металла осмия Os. Усилить неспецифический контраст срезов можно водными растворами уранилацетата (атомы урана U) и цитрата свинца (Pb). Уранилацетат реагирует в основном с фосфатными, карбоксильными и аминогруппами, хорошо проникает в ткани. Цитрат свинца связывается с отрицательно заряженными компонентами (гидроксильные и фосфатные группы).

Возможно контрастирование срезов с фосфорно-вольфрамовой кислотой (в зависимости от pH окрашивает полисахариды и гликопротеины или нуклеопротеиды и коллаген).

Негативное контрастирование. Этот способ окраски срезов обеспечивает высокое разрешение при исследовании биологических макромолекул и изолированных клеточных структур. Фон становится более электронно-плотным по сравнению с объектом, заполняет поры и неровности поверхности объекта. Основные красители – фосфорно-вольфрамовая кислота или уранилформиат (урановая соль муравьиной кислоты).

Негативное контрастирование широко применяется при изучении вирусов, ферментных комплексов мембран. Нитчатые молекулы нуклеиновых кислот этим методом выявляются плохо из-за их малой толщины.

Техника изготовления ультратонких срезов позволяет применять цитохимические приемы на уровне электронной микроскопии: в данном случае необходимо, чтобы продукты реакции были электронно-плотными. Кроме того, реакции не должны приводить к появлению артефактных картин уже на ультраструктурном уровне. В электронно-микроскопических исследованиях оказалось возможным применить методы радиоавтографии. В этом случае используются сверх тонкозернистые эмульсии (величина гранул около 0,02 – 0,06 мкм). Недостатком этого метода является очень большое время экспозиции, в некоторых случаях достигающее нескольких месяцев [5, 8, 29].

3.4 Специальные методы приготовления материала

Возможны методы приготовления ультратонких срезов без фиксации и заливки клеток в твердые пластмассы. Это **методы криоультрамикротомии**, т.е. получение срезов с замороженных тканей, моментально охлажденных до температуры жидкого азота (-196°C). При этом происходит одномоментное торможение всех метаболических процессов, вода из жидкой фазы переходит в твердую, но не кристаллическую, ее молекулярная структура беспорядочна

(стекловидное состояние). Такие твердые блоки при температуре жидкого азота можно резать на ультратонкие срезы (нож при этом также охлажден). Полученные срезы используют для выявления активности ферментов, проведения иммунохимических реакций, ферментативного переваривания и т.п.

Для проведения иммунохимических исследований используют антитела, связанные с частицами коллоидного золота, локализация которого на препаратах указывает места расположения антигена.

Для изучения структуры различных мембранных компонентов клетки используется **метод замораживания – скальвания**. Он заключается в том, что объект сначала быстро замораживают жидким азотом, а затем при той же температуре переносят в специальную вакуумную установку. Там замороженный объект механическим способом скальвается охлажденным ножом. При этом обнажаются внутренние зоны замороженных клеток. В вакууме часть воды, перешедшей в стекловидную форму, возгоняется («травление»), а поверхность скола последовательно покрывается тонким слоем испаренного углерода, а затем металла. Таким образом с замороженного и сохраняющего прижизненную структуру материала получают реплику с его скола. Затем, уже в условиях комнатной температуры, ткань или клетки растворяют в кислотах, но пленка-реплика при этом остается целая, ее изучают под электронным микроскопом. Этот метод имеет два преимущества: изучают реплики со сколов нативных образцов; исследуют рельеф поверхности мембран клетки, что невозможно при других методах. Этот метод позволил увидеть, что и на поверхности, и в толщине клеточных мембран располагаются глобулы интегральных белков, а мембраны не однородны по своей структуре.

Метод получения реплик с микрорельефа образца широко применяется при изучении фибриллярных компонентов клетки. Так, при изучении цитоскелета клеток культуры ткани или форменных элементов крови клетки обрабатывают детергентами для того, чтобы растворить все мембраны. Это приводит к тому, что из клетки вымываются все компоненты, кроме фибриллярных белковых компонентов цитоскелета и матрикса ядра. Такие препараты затем фиксируются, обезвоживаются и специальным образом сушатся. Вслед за этим сухие препараты напыляются углеродом и контрастируются распылением тяжелых металлов, после чего такая реплика снимается со стекла, на котором росли клетки, и просматривается под трансмиссионном электронном микроскопе [18].

3.5 Подготовка биологических объектов для сканирующей электронной микроскопии

Сканирующая (растровая) электронная микроскопия позволяет изучать трехмерную картину поверхности клетки. При сканирующей электронной микроскопии тонкий пучок электронов (зонд) пробегает по поверхности объекта и полученная информация передается на электронно-лучевую трубку. Изображение может быть получено в отраженных или вторичных электронах. При этом методе фиксированный и специальным образом высушенный объект

покрывается тонким слоем испаренного металла (чаще всего золота), отражаясь от которого электроны попадают в приемное устройство, передающее сигнал на электронно-лучевую трубку. 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.

Сканирующая электронная микроскопия подразделяется на низко- и высоковакуумную.

Микроскопия в низком вакууме позволяет рассматривать предметы без длительной предварительной подготовки (высушивания и напыления углеродом или золотом). Несомненными ее преимуществами являются наименее травмирующая поверхность предметов обработка, сокращенное время подготовки. Минус – ограничения по увеличению, электромагнитные помехи при электризации образца в процессе исследования, ограничения по объектам исследования (мгновенное высыхание в луче объектов с мягкими оболочками).

Просмотр объектов в высоком вакууме при высоком напряжении (более 15 кВ) предусматривает предварительную подготовку объектов.

Первые 3 этапа отбор материала, фиксация и обезвоживание до крепости спирта 70% совпадают с подготовкой материала для трансмиссионной электронной микроскопии. Затем материал доводят до абсолютного ацетона и в нем помещают в установку для сушки методом критической сушки. Высушенные образцы монтируют на смотровые столики и напыляют атомарным золотом. После этого образцы готовы для просмотра [18].

4 Практические работы

Работа 1 Правила работы с электронным микроскопом

Цель работы: изучить устройство, ознакомиться с правилами работы и техникой безопасности при работе с электронным микроскопом.

Задания:

- 1) изучить устройство и принцип работы электронного микроскопа (стр. 50-54);
- 2) изучить правила техники безопасности при работе с электронным микроскопом.

Правила техники безопасности при работе с электронным микроскопом:

- 1) к работе с электронным микроскопом допускаются лица, не имеющие медицинских противопоказаний и прошедшие инструктаж (не реже 1 раза в год);

2) работать на электронном микроскопе рекомендуется не более 4 часов в смену;

3) электронный микроскоп по величине применяемых ускоряющих напряжений (60-80-100 кВ) и тока пучка (5-100 мкА) является установкой повышенной опасности и источником неиспользуемого рентгеновского излучения;

4) подготовка электронного микроскопа к работе – включение, юстировка и настройка систем – производится только ответственным лицом – инженером лаборатории;

5) лица неэлектротехнического персонала, в дальнейшем называемые операторами, могут работать на электронном микроскопе только под контролем ответственного лица;

6) оператор электронного микроскопа должен хорошо знать пульт управления прибора и основной принцип действия;

7) при внезапном отключении напряжения немедленно выключить тумблер ускоряющего напряжения и накал катода;

8) при прекращении подачи воды в систему охлаждения выключить ускоряющее напряжение и накал катода. Поставить в известность руководителя центра.

Контрольные вопросы:

1) перечислить функции, которые выполняет трансмиссионный электронный микроскоп;

2) перечислить функции, которые выполняет сканирующий электронный микроскоп;

3) перечислить основные элементы системы трансмиссионного электронного микроскопа;

4) перечислить основные элементы системы сканирующего электронного микроскопа;

5) назвать преимущества и недостатки электронной микроскопии;

6) назвать теоретический предел разрешающей способности электронного микроскопа;

7) перечислить правила работы за электронным микроскопом;

8) перечислить основные требования, предъявляемые к объекту микроскопирования.

Работа 2 Методика подготовки материала для электронной микроскопии и чтение цитологических препаратов

Цель работы: изучить порядок подготовки тканей для работы на электронном микроскопе, овладеть навыками чтения микрофотографий, полученных с помощью трансмиссионного и сканирующего микроскопов.

Занятие проводится с использованием микрофотографий, предоставленных преподавателем и представленных в пособии.

Задания:

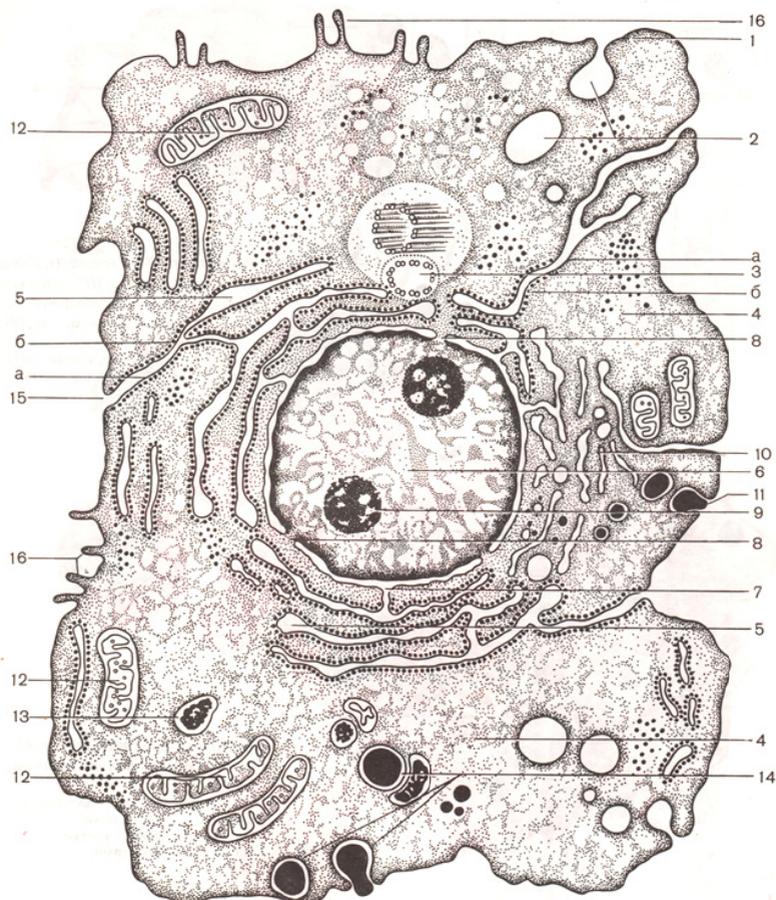
1) изучить особенности подготовки тканей для работы на трансмиссионном и сканирующем микроскопах (стр. 55-60);

2) в рабочих тетрадах зарисовать краткую схему подготовки биологических объектов для электронной микроскопии. Обозначить основные отличия подготовки материала для трансмиссионной и сканирующей микроскопии;

3) в рабочей тетради зарисовать схему ультрамикроскопического строения животной клетки, на схеме подписать все органоиды и включения клетки (рисунок 40);

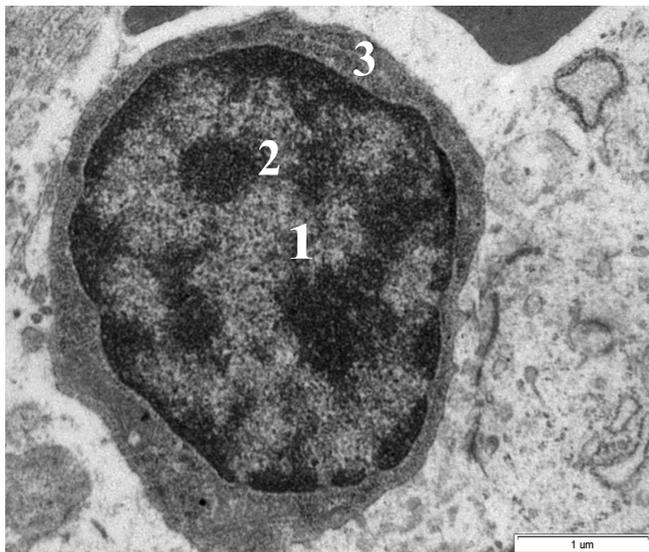
4) в рабочей тетради описать предложенные микрофотографии клеток: указать к какому типу тканей относятся клетки, перечислить органоиды и включения, обнаруженные на микрофотографиях, описать особенности их контрастирования и расположения в клетках (рисунки 41-45);

5) указать, с помощью какого типа электронных микроскопов получены микрофотографии клеток.

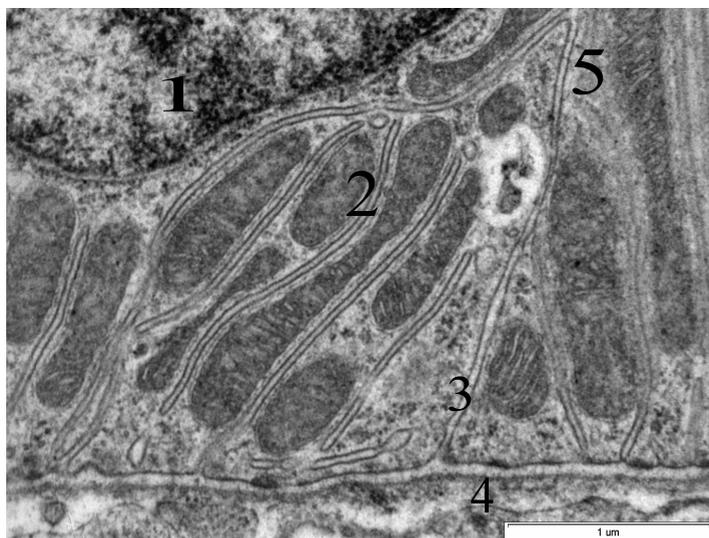


- 1 – оболочка клетки; 2 – пиноцитозные пузырьки; 3 – клеточный центр;
 4 – гиалоплазма; 5 – гранулярная эндоплазматическая сеть; а – альфа-цитомембрана;
 б – рибосомы; 6 – ядро; 7 – связь перинуклеарного пространства с полостями,
 образованными альфа-цитомембранами; 8 – ядерные поры; 9 – ядрышко;
 10 – внутриклеточный сетчатый аппарат (комплекс Гольджи); 11 – секторные вакуоли;
 12 – митохондрии; 13 – лизосомы; 14 – последовательные стадии фагоцитоза;
 15 – связь клеточной оболочки с альфа-цитомембранами; 16 – микроворсинки.

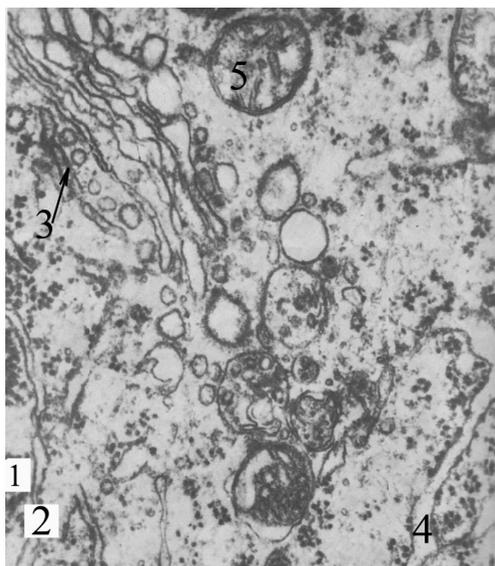
Рисунок 40 – Схема ультрамикроскопического строения животной клетки [2]



1 – ядро; 2 – ядрышко; 3 – цитоплазма.
Рисунок 41 – Лимфоцит щуки

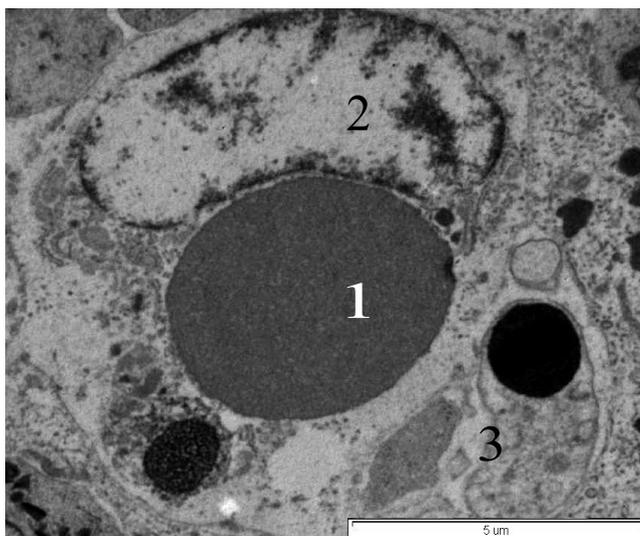


1 – ядро; 2 – ядрышко; 3 – цитоплазма; 4 – базальная мембрана;
5 – эндоплазматический ретикулум.
Рисунок 42 – Эпителиоцит дистального канальца щуки



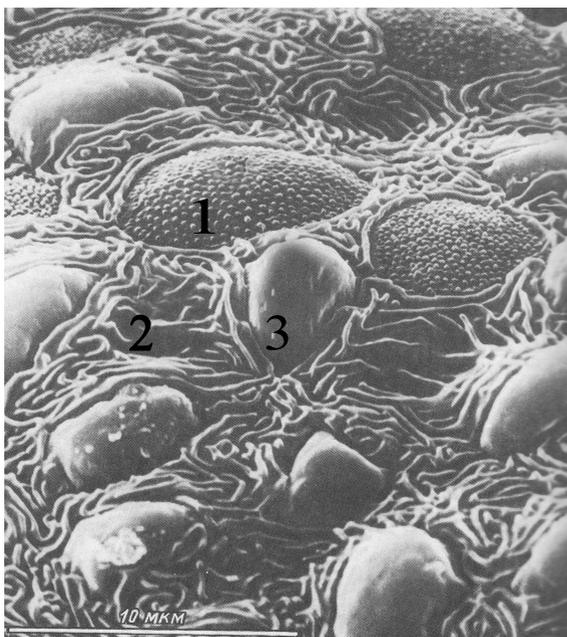
1 – ядро; 2 – ядерная оболочка; 3 – комплекс Гольджи; 4 – гранулярная эндоплазматическая сеть; 5 – митохондрия.

Рисунок 43 – Нервные клетки из теменной области коры головного мозга крысы [2]



1 – фагосома; 2 – ядро; 3 – цитоплазма.

Рисунок 44 – Макрофаг плотвы



1 – хлоридная клетка; 2 – респираторная клетка; 3 – гранула слизи.
Рисунок 45 – Поверхность эпителия филамента жабр окуня [17]

Контрольные вопросы:

- 1) перечислить основные этапы заливки материала для трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии;
- 2) перечислить органоиды и включения, характерные для клеток животного организма, указать их функции;
- 3) назвать особенности ультраструктуры клетки, входящей в состав крови, эпителиальной и нервной тканей животного организма;
- 4) перечислить особенности микрофотографий, полученных с помощью трансмиссионного и сканирующего микроскопов.

Список использованных источников

1. Акмаев, И.Г. Руководство по гистологии (частная гистология органов и тканей) [Текст]: в 2 т. / И.Г. Акмаева, В.Л. Быкова, О.В. Волкова. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2001. – 735 с.
2. Алмазов, И.В. Атлас по гистологии и эмбриологии [Текст] / И.В. Алмазов, Л.С. Сутулов. – М.: Медицина, 1978. – 544 с.
3. Афанасьев, Ю.И. Гистология, цитология и эмбриология [Текст]: учеб. для мед. вузов / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский и др. – М.: Медицина, 2001. – 743 с.
4. Балабаева, И.В. Оптическая микроскопия в исследовании структуры и функций биологических объектов. Часть 1. Широкопольная оптическая микроскопия [Текст]: учебно-методическое пособие / И.В. Балабаева, Е.А. Сергеева, А.Р. Катичев. – Нижний Новгород: Нижегородский университет, 2012. – 58 с.
5. Бисерова, Н.М. Методы визуализации биологических ультраструктур. Практическое руководство для биологов [Текст] / Н.М. Бисерова. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. – 104 с.
6. Бисерова, Н.М. Строение и иннервация фронтальных желез сколекса плероцеркоида *Diphyllobothrium ditremum* (Cestoda: Diphyllobothriidae) [Текст] / Н.М. Бисерова, А.А. Кемаева // Мат. V всероссийской конференции с международным участием по теоретической и морской паразитологии. – Светлогорск, 2008. – С. 38-42.
7. Боголюбов, А.Н. Роберт Гук (1635-1703) [Текст] / А.Н. Боголюбов. – М.: Наука, 1984. – 164 с.
8. Власов, А.И. Электронная микроскопия [Текст]: учеб. пособие / А.И. Власов, К.А. Елсуков, И.А. Косолапов. – М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2011. – 168 с.
9. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой [Текст] / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1971. – 272 с.
10. Егорова, О.В. С микроскопом на «ты». Шаг в XXI век [Текст] / О.В. Егорова. – М.: Репро ЦЕНТР М, 2006. – 408 с.
11. Жаров, А.В. Морфологические исследования в ветеринарных лабораториях (диагностика, исследование сырья и продукции): Методическое руководство [Текст] / А.В. Жаров. – М.: Московская академия ветеринарной медицины и биотехнологии, 2003. – 71 с.
12. Золотарев, А.Г. Световая микроскопия микроорганизмов. Практическое руководство [Текст] / А.Г. Золотарев, Е.В. Пименов, Д.А. Девришов. – М.: Агровет, 2013. – 288 с.
13. Козловская, Л.В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования [Текст] / Л.В. Козловская, А.Ю. Николаев. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1984. – 282 с.
14. Костная ткань – темнопольная микроскопия [Электронный ресурс]. – режим доступа: <http://molbiol.ru/forums/index.php?act=ST&f=71&t=104719> (дата обращения 02.01.2014).

15. Кузнецов, С.Л. Руководство-атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии [Текст] / С.Л. Кузнецов, Н.Н. Мушкамбаров, В.Л. Горячкина. – М.: Медицинское информационное агентство, 2002. – 374 с.
16. Кэррил, Ф.М. Как работать со световым микроскопом [Текст] / Ф.М. Кэррил, (перевод с англ. и под ред. И.Я. Барского, М.М. Аптинова), С.А. Бабушкин. – М.: Вест Медика, 2010. – 112 с.
17. Матей, В.Е. Жабры пресноводных костистых рыб: Морфофункциональная организация, адаптация, эволюция [Текст] / В.Е. Матей. – СПб.: Наука, 1996. – 204 с.
18. Миронов, А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине [Текст] / А.А. Миронов, Я.Ю. Комиссарчик, В.А. Миронов. – СПб.: Наука, 1994. – 400 с.
19. Рождественский, Д.С. Избранные труды [Текст] / Д.С. Рождественский. – М.-Л.: Наука, 1964. – 349 с.
20. Саркисов, Д.С. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов [Текст] / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
21. Сахаров, А.В. Руководство к лабораторным занятиям по биологии клетки [Текст] / А.В. Сахаров, А.А. Макеев. – Новосибирск: НГПУ, 2008. – 54 с.
22. Семченко, В.В. Гистологическая техника [Текст]: учебное пособие / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.Н. Ноздрин, В.Н. Артемьев. – 2-е изд., стереотип. – Омск: Омская медицинская академия, 2003. – 152 с.
23. Соболев, С.Л. История микроскопа и микроскопических исследований в России в XVIII веке [Текст] / С.Л. Соболев. – М.: АН СССР, 1949. – 606 с.
24. Темнопольная микроскопия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/> (дата обращения: 02.01.2014).
25. Ультратом Leica EM UC7 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.mikrol.ru/products/electron-microscope-sample-preparation/industrial-materials/ultramicrotomy/details/product/leica-em-uc7-1/index.php> (дата обращения: 07.01.2014).
26. Устройство и основные части оптического микроскопа [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://altami.ru/pages/main_parts1.html (дата обращения: 02.01.2014).
27. Фазово-контрастная микроскопия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/> (дата обращения: 02.01.2014).
28. Штейн, Г.И. Конфокальная микроскопия: мифы и реальность [Текст] / Г.И. Штейн // Школа-семинар «Конфокальная микроскопия в биологии и медицине». – Москва – Звенигород, 2005. – С. 1–6.
29. Электронный микроскоп [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_colier/6641/ЭЛЕКТРОННЫЙ (дата обращения: 07.01.2014).

30. Bradbury, S. The evolution of the microscope [Text] / S. Bradbury – N.Y.: Pergamon Press, 1967.
31. Bourzacon, K. Life Left in Light. Light microscopes make a comeback [Electronic resource] / K. Bourzacon // MIT Technology Review. 19 – 2008. URL: <http://www.technologyreview.com/article/410637/life-left-in-light>.
32. Clay, R.S. The history of the microscope [Text] / R.S. Clay, T.H. Court – L.: Charles Griffin and Co. Ltd., 1932.
33. Designed for perfect sectioning at Room Temperature and Cryo Leica EM UC7 [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.mikrol.ru/products/electron-microscope-sample-preparation/industrial-materials/ultramicrotomy/details/product/leica-em-uc7-1/index.php> (date of treatment: 02.01.2014).
34. G200 Square Mesh [Electronic resource]. – Access mode: http://www.2spi.com/catalog/grids/square-mesh_200.php (date of treatment: 07.01.2014).
35. Norman, C. International Science & Engineering Visualization Challenge. [Text] / C. Norman // Science. – V. 335. – 2012. – P. 525.
36. По науке: конкурс визуализации [Электронный ресурс] // Популярная механика. – Режим доступа: <http://www.popmech.ru/blogs/post/4575-po-nauke-konkurs-vizualizatsii/> (дата обращения: 07.01.2014).

Учебное издание

*Татьяна Константиновна Тимакова
Екатерина Александровна Флёрва
Елена Анатольевна Заботкина*

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

для подготовки кадров высшей квалификации по программам подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки»

МЕТОДЫ СВЕТОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В БИОЛОГИИ И ВЕТЕРИНАРИИ

Начальник редакционно-издательского отдела Е.А. Богословская
Технический редактор Е.И. Кудрявцева
Художественный редактор Т.Н. Волкова
Редактор Е.А. Богословская

Подписано в печать 24.03.2014.
Формат 60 x 84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Печать ризографическая.
Усл. печ. л. 4,5. Тираж экз. Заказ № 12.

Издательство ФГБОУ ВПО «Ярославская государственная
сельскохозяйственная академия».
150042, г. Ярославль, Тутаевское шоссе, 58.

Отпечатано в типографии
ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА».
150042, г. Ярославль, Тутаевское шоссе, 58.

ISBN 978-5-98914-129-6



9 785989 141296