ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

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

После выпуска первой промышленной модели просвечивающего (трансмиссионного) электронного микроскопа ЭМ прошла большой путь развития и позволила перейти на качественно новый уровень изучения материи. ЭМ нашла широкое применение в морфологии, микробиологии, вирусологии, биохимии, онкологии, медицинской генетике, иммунологии. Благодаря ЭМ раскрыта субмикроскопическая структура клеток, открыт ряд неизвестных ранее клеточных органелл, таких как лизосомы, рибосомы, эндоплазматический ретикулум, микротрубочки, цитоскелет, структуры, специфичные для отдельных видов клеток. ЭМ позволила понять многие тонкие механизмы развития болезней, в том числе на ранних этапах их возникновения, еще до появления чёткой клинической симптоматики.

ЭМ все шире применяется для ранней диагностики заболеваний, а также для выявления этиологии информационных процессов. Её используют в онкологии для определения гистогенеза опухолей, что имеет важное значение в лечении и прогнозе онкологического заболевания. В нефрологии исследования с помощью ЭМ материала, полученного при пункционной биопсии, позволяет выявить ранее морфологические изменения структур пачек, диагностировать форму гломерулонефрита и т.п. При ЭМ пунктатов печени удается провести дифференциальную диагностику гепатитов, гепатозов и других заболеваний печени, определить активность процесса и нередко его этиологию.

Исследования строения материи на субклеточном и макромолекулярном уровнях сдерживаются возможностями разрешающей способности электронных микроскопов. Использование ЭМ в сочетании с другими методами, например, с авторадиографией, гистохимическими, иммунологическими, обусловило появление электронной авторадиографии, электронной гистохимии, иммунной электронной микроскопии (электронной иммуноморфологии) и других. Это позволило значительно расширить информацию, получаемую с помощью ЭМ, наблюдать структурное выражение течения биохимических процессов в клетке, что, в свою очередь, подтвердило один из основных методологических принципов современной биологии – диалектическое единство структуры и функции.

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

В ЭМ, как правило, используют химическую фиксацию с помощью фиксаторов, обладающих стабилизирующими свойствами. Универсального для любых тканей фиксатора не существует, поэтому в зависимости от задачи конкретного исследования применяют соответствующие фиксаторы. При выборе химических фиксаторов исходят из их способности коагулировать белки (спирты, ацетон, некоторые кислоты, соли тяжелых металлов и др.) либо стабилизировать липиды и гели (четырехокись осмия, глутаровый альдегид, формалин, двухромовоксильный калий и др.).

Для исследования берут биопсийный материал или материал от трупа человека или животных вскоре после наступления смерти. Существуют оптимальные сроки взятия различных тканей и клеток, обычно исчисляемые минутами. Чем раньше ткань помешают в фиксатор, тем более достоверные данные получают о прижизненной структуре клеток. Фиксаторы обладают различной скоростью проникновения в ткань: от этого зависит возможная величина объекта исследования. Так, четырехокись осмия и глутаровый альдегид проникают в ткань на 0,1-0,5 мм примерно за 1 - 1,5 часа, но для некоторых тканей оно может быть увеличено до 4 часов или до 20-30 мин. В отдельных случаях допускается в течение одних суток. Наибольшее распространение получила фиксация материала в глутаровом альдегиде с последующей дофиксацией в четырехокиси осмия. Глутаровый альдегид лучше, чем четырехокись осмия фиксирует белки, но хуже стабилизирует липиды, что и обуславливает использования обоих фиксаторов как дополняющих друг друга.

Для избирательной фиксации отдельных субклеточных структур используют более специфические фиксаторы (перманганат калия, двухромовокислый калий и др.). Качество фиксации в значительной степени зависит от рН и осмотического давления фиксирующего раствора. Оптимальным является рН 7,2-7,4, что соответствует физиологическим параметрам. Поэтому применяют буферные растворы. Чаще применяют фосфатные или какодилатный буферы. Физиологическое осмотическое давление создают путем добавления осмотически активных веществ, например сахарозы или некоторых солей.

Имеется несколько методов химической фиксации: перфузионный, когда фиксатор вводят в ток крови, фиксация на месте, когда фиксатор вводят в ткань до ее иссечения, метод погружения иссеченных кусочков ткани в фиксатор. Для замедления аутолитических процессов, протекающих в иссеченных кусочков ткани до полной их фиксации, последнюю проводят при температуре 2-5 градусов.

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

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

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

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

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

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

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

При использовании метода замораживания-высушивания кусочки ткани помещают в хладагенты (пропан, изопентан или фреон), охлажденные до -150˚, и в клетках мгновенно прекращаются обменные процессы. При этом в ткани не успевают образовываться кристаллы льда, и поэтому субклеточные структуры не разрушаются, а вода переходит в стекловидное состояние. Затем в высоком вакууме (10-6 –10-7 мм рт.ст.) происходит сублимация, после чего в ткани специальным образом заливают замороженные метакрилаты, аралдит или вестопал В. Однако, не всегда удается достаточно быстро равномерно заморозить ткань, а, следовательно, полностью избежать образования кристаллов льда, которые при повышение температуры повреждают внутриклеточные структуры. Возникают и другие трудности, приводящие к появлению артефактов. Поэтому, чаще применяют разновидность этого метода: замораживание-замещение. После замораживания воду, перешедшую в стекловидное состояние, удаляют, помещая ткань в обезвоживающие вещества при низкой температуре. В этих условиях спирт и ацетон мало влияют на структуру клеток. Метод криоскалывания (замораживание-травление) позволяет избежать возникновения химической реакции при обработке тканей. Фрагменты тканей замораживают в хладагенте со скоростью превышающей 1000˚ в 1 с. Объект помещают в вакуумную камеру и тем или иным способом раскалывают или разрывают. На поверхности скола наносят платиноуглеродное покрытие (реплику). Затем реплику очищают от органических остатков в растворе сильного окислителя, промывают в воде и помещают на сеточку для электронной микроскопии.

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

Для изучения поверхности изолированных клеток и тканей служит сканирующая (растровая) ЭМ. Одним из основных условием приготовления объекта для сканирующей ЭМ является необходимость сохранения соответствующего поверхностного натяжения клеток во избежание их деформации. Поверхность изучаемой ткани промывают сбалансированными изотоническими забуференными солевыми растворами или безбелковыми культуральными средами с рН 7,3-7,4, подогретыми до температуры 37˚. Для фиксации обычно применяют изотонический раствор глутаровоальдегида с последующей дофиксацией четырехокисью осмия. Ткань обезвоживают в спиртах или ацетонах, а затем высушивают методами замораживания-высушивания или перехода критической точки. Последний основан на использовании такого физического явления как возникновение при определенных условиях критического состояния равновесия пара и жидкости. При этом методе ткань оказывается в газовой среде (т.е. высушенной), что позволяет избежать повреждающего действия поверхностного натяжения. Для достижения высоких степеней разрешения повышают электропроводность объекта, напыляя на него тяжелые металлы: золото, платину, серебро или их сплавы.

Применяется также метод ионной бомбардировки в вакууме пластинки металла ионами инертного газа. «Выбитые» атомы металла оседают на поверхности объекта исследования. Для выявления внутритканевых и внутриклеточных структур применяют механические, термические, химические и другие методы.

Для ЭМ микробов применяют сходные методы с учетом строения микробов их размеров, осмотического давления и др. Особый подход осуществляется при ЭМ вирусов. Изучение структур вирусов затруднено из-за малых размеров и слабой рассеивающей способности вириона. На первых этапах ЭМ вирусов эта трудность преодолевалась оттененением частиц при испарении тяжелых металлов в вакууме. Вплоть до конца 50-ых годов 20 века методика оттенения вирусных частиц была основной при изучении вирусов в суспензиях. Чаще для этой методики использовали уран 238, платину, палладий или сплавы платины с палладием. Наибольшее распространение получил сплав платины с палладием в соотношении 4:1. Зная заданный угол оттенения, по длине образующейся тени определяют высоту вирусной частицы и ее диаметр. Оттенение металлами исследуемого объекта при сочетании с криогенными методиками (замораживание-высушивание) позволяет получить важную информацию при изучении структуры вириона изометрических вирусов.

Широкое распространение получила методика негативного контрастирования вирусов с помощью вольфрамофосфорной кислоты (Н3РW12О40), которая при подщелачивании едким калием или едким натрием (от значения рН 2,0 до рН 7,0) изменяется и после нанесения препарата на вирус создает зону высокого рассеивания электронов, в результате чего выявляются морфологические признаки вируса.

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

Структура генома вирусов изучается с помощью модифицированной в 1959 году Клейштейном и Лангом методики оттенения линейных макромолекул тяжелыми металлами, которые испаряются с В-образным катодов под углом в 5-10˚.

Условием, позволяющим изучить нуклеиновые кислоты, и особенно однонические (поперечный размер 1-1,1 нм), является связывание их с основными белками, т.к. при этом образующийся нуклеопротеид имеет диаметр до 18 нм в двунитчатых структурах и до 15 нм – в однонитчатых. В качестве такого белка чаще используют цитохром С. Помещенная на подложку нуклеиновая кислота в белковом чехле имеет самый причудливый контур, и возможность увидеть ее на всем протяжении осуществима только в том случае, если во время оттенения металлами будет совершен хотя бы один поворот сетки с объектом для напыления на 360˚. Лучшие результаты достигаются при длительном оттенении (до 10 минут) сплавом платины с палладием и многократном поворачивании напыленной сетки на вращающемся столике.

Многочисленные модификации методики Клейшмидта и Ланга позволяют получать данные не только о длине генома, но изучать и степень гомологии генома различных вирусов, локализовать вставку того или иного гена в состав гибридных молекул, исследовать гибридные молекулы нуклеиновых кислот.

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

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

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

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

Конъюгация белка с антителом возможна с помощью различных бифункциональных агентов, наибольшее распространение среди которых получили 3,4-толуендиизоцианат и ксиленметадиизоцеанат. Иммунная электронная микроскопия с помощью антител, меченных ферритином, эффективна для выявления экстрацеллярных антигенов микробов в инфицированных тканях, в том числе вирусных антигенов на поверхности клетки, а также поверхностных антигенов в клетке. Вместе с тем эта методика в ряде случаев неэффективна, например, если необходимо исследовать внутриклеточные объекты, антигены микробов внутри клетки, что имеет место, в первую очередь, при вирусных инфекциях. Это обусловлено тем, что молекулярный вес (масса) антител, меченных ферритином, около 800 тыс., и поэтому проихождение их через плазматическую мембрану клетки невозможно, а антитела, меченные ферритином, проникшие через нее путем эндоцитоза не вступают в контакт со специфическим антигеном. Поэтому основная масса исследований, связанная с выявлением внутриклеточных антигенов с помощью антител, меченных ферритином, выполнена при разрушении плазматической мембраны путей замораживания-оттаивания или обработки комплиментом. Замена ферритина низкомолекулярными соединениями, содержащими ртуть, йод, не нашла широкого применения из-за низкой специфичности метода.

С конца 60-ых годов 20-го века в иммунологии применяется иммуннопероксидазная методика ЭМ для обнаружения антигенов внутри и на поверхности клеток. Перексидаза, используемая для метки антител, позволяет получить наилучший эффект по сравнению с другими ферментами (фосфотазы, некоторые оксидазы) благодаря более низкому молекулярному весу (около 40 тыс) и устойчивости к различным гистологическим процедурам. Антитела, меченные пероксидазой, проникают в клетку и связываются с гомологичным антигеном. Конъюгирование антител с ферментом осуществляется рядом бифункциональных агентов, среди которых наиболее доступным является глутаровый альдегид. После того как произошла связь антитела с соответствующим антигеном, локализация фермента выявляется после контакта его с соответствующим субстратом – бензидином, а-нафтолом, смесью а-нафтола, с р-ферментом. В присутствии перекиси водорода образуется продукт с более выраженной рассеивающей способностью электронов по сравнению с окружающими структурами.