МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГИСТОЛОГИИ,

ЦИТОЛОГИИ И ЭМБРИОЛОГИИ

Для прогресса гистологии, цитологии и эмбриологии большое значение имеет внедрение достижений физики и химии, новых методов смежных наук — биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии.

Современные методы исследования позволяют изучать ткани не только как единое целое, но и выделять из них отдельные типы клеток для изучения их жизнедеятельности в течение длительного времени, выделять отдельные клеточные органеллы и составляющие их макромолекулы (например, ДНК), исследовать их функциональные особенности.

Такие возможности открылись в связи с созданием новых приборов и технологий — различных типов микроскопов, компьютерной техники, рентгеноструктурного анализа, применения метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), радиоактивных изотопов и авторадиографии, электрофореза и хроматографии, фракционирования клеточного содержимого с помощью ультрацентрифугирования, разделения и культивирования клеток, получения гибридов; использования биотехнологических методов — получения гибридом и моноклональных антител, рекомбинантных ДНК и др.

Таким образом, биологические объекты можно изучать на тканевом, клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Несмотря на внедрение в естественные науки разнообразных биохимических, биофизических, физических и технологических методов, необходимых для решения многих вопросов, связанных с жизнедеятельностью клеток и тканей, гистология в основе своей остается морфологической наукой со своим набором методов. Последние позволяют охарактеризовать процессы, происходящие в клетках и тканях, их структурные особенности.

Главными этапами цитологического и гистологического анализа являются выбор объекта исследования, подготовка его для изучения в микроскопе, применение методов микроскопирования, качественный и количественный анализ изображений.

Объектами исследования служат живые и фиксированные клетки и ткани, их изображения, полученные в световых и электронных микроскопах или на телевизионном экране дисплея. Существует ряд методов, позволяющих проводить анализ указанных объектов.

Методы микроскопирования гистологических препаратов

Основными методами изучения биологических микрообъектов являются световая и электронная микроскопия, которые широко используются в экспериментальной и клинической практике.

Микроскопирование — основной метод изучения микрообъектов, используемый в биологии более 300 лет. С момента создания и применения первых микроскопов они постоянно совершенствовались. Современные микроскопы представляют собой разнообразные сложные оптические системы, обладающие высокой разрешающей способностью. Размер самой маленькой структуры, которую можно видеть в микроскопе, определяется наименьшим разрешаемым расстоянием (do), которое в основном зависит от длины волны света (λ) и длины волн электромагнитных колебаний потока электронов и др. Эта зависимость приближенно определяется формулой do = 1/2λ Таким образом, чем меньше длина волны, тем меньше разрешаемое расстояние и тем меньшие по размерам микроструктуры можно видеть в препарате. Для изучения гистологических препаратов применяют разнообразные виды световых микроскопов и электронные микроскопы.

**Световая микроскопия.** Для изучения гистологических микрообъектов применяют обычные световые микроскопы и их разновидности, в которых используются источники света с различными длинами волн. В обычных световых микроскопах источником освещения служит естественный или искусственный свет. Минимальная длина волны видимой части спектра равна примерно 0,4 мкм. Следовательно, для обычного светового микроскопа наименьшее разрешаемое расстояние равно приблизительно 0,2 мкм (d0 = ½ \* 0,4 мкм = 0,2 мкм), а общее увеличение (произведение увеличения объектива на увеличение окуляра) может быть 1500—2500.

Таким образом, в световом микроскопе можно видеть не только отдельные клетки размером от 4 до 150 мкм, но и их внутриклеточные структуры — органеллы, включения. Для усиления контрастности микрообъектов применяют их окрашивание. *Ультрафиолетовая микроскопия.* Это разновидность световой микроскопии. В ультрафиолетовом микроскопе используют более короткие ультрафиолетовые лучи с длиной волны около 0,2 мкм. Разрешаемое расстояние здесь в 2 раза меньше, чем в обычных световых микроскопах, и составляет приблизительно 0,1 мкм (d0 = ½ \* 0,2 мкм =0,1 мкм). Полученное в ультрафиолетовых лучах невидимое глазом изображение преобразуется в видимое с помощью регистрации на фотопластинке или путем применения специальных устройств (люминесцентный экран, электронно-оптический преобразователь).

*Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия.* Явления флюоресценции заключаются в том, что атомы и молекулы ряда веществ, поглощая коротковолновые лучи, переходят в возбужденное состояние. Обратный переход из возбужденного состояния в нормальное происходит с испусканием света, но с большей длиной волны. В флюоресцентном микроскопе в качестве источников света для возбуждения флюоресценции применяют ртутные или ксеноновые лампы сверхвысокого давления, обладающие высокой яркостью в области спектра 0,25—0,4 мкм (ближние ультрафиолетовые лучи) и 0,4—0,5 мкм (сине-фиолетовые лучи). Длина световой волны флюоресценции всегда больше длины волны возбуждающего света, поэтому их разделяют с помощью светофильтров и изучают изображение объекта только в свете флюоресценции. Различают собственную, или первичную, и наведенную, или вторичную, флюоресценцию. Любая клетка живого организма обладает собственной флюоресценцией, однако она часто бывает чрезвычайно слабой.

Первичной флюоресценцией обладают серотонин, катехолами-ны (адреналин, норадреналин), содержащиеся в нервных, тучных и других клетках, после фиксации тканей в парах формальдегида при 60—80 **°С** (метод Фалька).

Вторичная флюоресценция возникает при обработке препаратов специальными красителями — флюорохромами.

Существуют различные флюорохромы, которые специфически связываются с определенными макромолекулами (акридин оранжевый, родамин, флюоресцеин и др.). Например, при обработке препаратов чаще всего употребляется флюорохром акридиновый оранжевый. В этом случае ДНК и ее соединения в клетках имеют ярко-зеленое, а РНК и ее производные — ярко-красное свечение. Таким образом, спектральный состав излучения несет информацию о внутреннем строении объекта и его химическом составе. Вариант метода флюоресцентной микроскопии, при котором и возбуждение, и излучение флюоресценции происходят в ультрафиолетовой области спектра, получил название метода *ультрафиолетовой флюоресцентной микроскопии.*

*Фазово-контрастная микроскопия.* Этот метод служит для получения контрастных изображений прозрачных и бесцветных живых объектов, невидимых при обычных методах микроскопирования. Как уже указывалось, в обычном световом микроскопе необходимая контрастность структур достигается с помощью окрашивания. Метод фазового контраста обеспечивает контрастность изучаемых неокрашенных структур за счет специальной кольцевой диафрагмы, помещаемой в конденсоре, и так называемой фазовой пластинки, находящейся в объективе. Такая конструкция оптики микроскопа дает возможность преобразовать не воспринимаемые глазом фазовые изменения прошедшего через неокрашенный препарат света в изменение его амплитуды, т.е. яркости получаемого изображения. Повышение контраста позволяет видеть все структуры, различающиеся по показателю преломления. Разновидностью метода фазового контраста является метод *фазово-темнопольного контраста,* дающий негативное по сравнению с позитивным фазовым контрастом изображение.

*Микроскопия в темном поле.* В темнопольном микроскопе только свет, который дает дифракцию структур в препарате, достигает объектива. Происходит это благодаря наличию в микроскопе специального конденсора, который освещает препарат строго косым светом; лучи от осветителя направляются сбоку. Таким образом, поле выглядит темным, а мелкие частицы в препарате отражают свет, который далее попадает в объектив. Разрешение этого микроскопа не может быть лучше, чем у светлопольного микроскопа, так как используется такая же длина волны. Но здесь достигается больший контраст. Он используется для изучения живых объектов, авторадиографических объектов, например зерен серебра, которые выглядят светлыми на темном поле. В клинике его применяют для изучения кристаллов в моче (мочевая кислота, оксалаты), для демонстрации спирохет, в частности treponema pallidum, вызывающей сифилис и др.

*Интерференционная микроскопия.* Разновидностями фазово-контрастного микроскопа являются интерференционный микроскоп, который предназначен для количественного определения массы ткани, и дифференциальный интерференционный микроскоп (с оптикой Номарского), который специально используют для изучения рельефа поверхности клеток и других биологических объектов.

В интерференционном микроскопе пучок света от осветителя разделяется на два потока: один проходит через объект и изменяет по фазе колебания, второй идет, минуя объект. В призмах объектива оба пучка соединяются и интерферируют между собой. В результате строится изображение, в котором участки микрообъекта разной толщины и плотности различаются по степени контрастности. Проведя количественную оценку изменений, определяют концентрацию и массу сухого вещества.

Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы позволяют изучать живые клетки. В них используется эффект интерференции, возникающий при комбинации двух наборов волн, который создает изображение микроструктур. Преимуществом фазово-контрастной, интерференционной и темнопольной микроскопии является возможность наблюдать клетки в процессе движения и митоза. При этом регистрация движения клеток может производиться с помощью цейтраферной (покадровой) микрокиносъемки.

**Поляризационная микроскопия.** Поляризационный микроскоп является модификацией светового микроскопа, в котором установлены два поляризационных фильтра — первый (поляризатор) между пучком света, и объектом, а второй (анализатор) между линзой объектива и глазом. Через первый фильтр свет проходит только в одном направлении, второй фильтр имеет главную ось, которая располагается перпендикулярно первому фильтру, и он не пропускает свет. Получается эффект темного поля. Оба фильтра могут вращаться, изменяя направление пучка света. Если анализатор повернуть на 90° по отношению к поляризатору, то свет проходить через них не будет. Структуры, содержащие продольно ориентированные молекулы (коллаген, микротрубочки, микрофиламенты), и кристаллические структуры (в клетках Лейдига) при изменении оси вращения проявляются как светящиеся. Способность кристаллов или паракристаллических образований к раздвоению световой волны на обыкновенную и перпендикулярную к ней называется двойным лучепреломлением. Такой способностью обладают фибриллы поперечнополосатых мышц.

*Электронная микроскопия.* Большим шагом вперед в развитии техники микроскопии были создание и применение электронного микроскопа (см. рис. 1, Б). В электронном микроскопе используется поток электронов с более короткими, чем в световом микроскопе, длинами волн. При напряжении 50000 В длина волны электромагнитных колебаний, возникающих при движении потока электронов в вакууме, равна 0,0056 нм. Теоретически рассчитано, что разрешаемое расстояние в этих условиях может быть около 0,002 нм, или 0,000002 мкм, т.е. в 100 000 раз меньше, чем в световом микроскопе. Практически в современных электронных микроскопах разрешаемое расстояние составляет около 0,1—0,7 нм.

В настоящее время широко используются трансмиссионные (просвечивающие) электронные микроскопы (ТЭМ) и сканирующие (растровые) электронные микроскопы (СЭМ). С помощью ТЭМ можно получить лишь плоскостное изображение изучаемого микрообъекта. Для получения пространственного представления о структурах применяют СЭМ, способные создавать трехмерное изображение. Растровый электронный микроскоп работает по принципу сканирования электронным микрозондом исследуемого объекта, т. е. последовательно «ощупывает» остро сфокусированным электронным пучком отдельные точки поверхности. Для исследования выбранного участка микрозонд двигается по его поверхности под действием отклоняющих катушек (принцип телевизионной развертки). Такое исследование объекта называется сканированием (считыванием), а рисунок, по которому движется микрозонд, — растром. Полученное изображение выводится на телевизионный экран, электронный луч которого движется синхронно с микрозондом.

Главными достоинствами растровой электронной микроскопии являются большая глубина резкости, широкий диапазон непрерывного изменения увеличения (от десятков до десятков тысяч раз) и высокая разрешающая способность.

*Электронная микроскопия по методу замораживания — скалывания* применяется для изучения деталей строения мембран и межклеточных соединений. Для изготовления сколов клетки замораживают при низкой температуре (—160°С). При исследовании мембраны плоскость скола проходит через середину бислоя липидов. Далее на внутренние поверхности полученных половинок мембран напыляют металлы (платина, палладий, уран), изучают их с помощью ТЭМ и микрофотографии.

*Метод криоэлектронной микроскопии.* Быстро замороженный тонкий слой (около 100 нм) образца ткани помещают на микроскопическую решетку и исследуют в вакууме микроскопа при -160°С.

*Метод электронной микроскопии «замораживание — травление»* применяют для изучения внешней поверхности мембран клеток. После быстрого замораживания клеток при очень низкой температуре блок раскалывают лезвием ножа. Образующиеся кристаллы льда удаляют путем возгонки воды в вакууме. Затем участки клеток оттеняют, напыляя тонкую пленку тяжелого металла (например, платины). Метод позволяет выявлять трехмерную организацию структур.

Таким образом, методы замораживания — скалывания и замораживания — травления позволяют изучать нефиксированные клетки без образования в них артефактов, вызываемых фиксацией.

Методы контрастирования солями тяжелых металлов позволяют исследовать в электронном микроскопе отдельные макромолекулы — ДНК, крупных белков (например, миозин). При негативном контрастировании изучают агрегаты макромолекул (рибосомы, вирусы) либо белковые филаменты (актиновые нити).

*Электронная микроскопия ультратонких срезов, полученных методом криоулътра-микротомии.* При этом методе кусочки тканей без фиксации и заливки в твердые среды быстро охлаждают в жидком азоте при температуре —196 °С. Это обеспечивает торможение метаболических процессов клеток и переход воды из жидкой фазы в твердую. Далее блоки режут на ультрамикротоме при низкой температуре. Такой метод приготовления срезов обычно используют для определения активности ферментов, а также для проведения иммунохимических реакций. Для выявления антигенов применяют антитела, связанные с частицами коллоидного золота, локализацию которого легко выявить на препаратах.

*Методы сверхвысоковольтной микроскопии.* Используют электронные микроскопы с ускоряющим напряжением до 3 000 000 В. Преимущество этих микроскопов в том, что они позволяют исследовать объекты большой толщины (1—10 мкм), так как при высокой энергии электронов они меньше поглощаются объектом. Стереоскопическая съемка позволяет получать информацию о трехмерной организации внутриклеточных структур с высоким разрешением (около 0,5 нм).

*Рентгеноструктурный анализ.* Для изучения структуры макромолекул на атомарном уровне применяют методы с использованием рентгеновских лучей, имеющих длину волны около 0,1 нм (диаметр атома водорода). Молекулы, образующие кристаллическую решетку, изучают с помощью дифракционных картин, которые регистрируют на фотопластинке в виде множества пятен различной интенсивности. Интенсивность пятен зависит от способности различных объектов в решетке рассеивать излучение. Положение пятен в дифракционной картине зависит от положения объекта в системе, а их интенсивность свидетельствует о его внутренней атомной структуре.

Методы исследования фиксированных клеток и тканей

Исследование фиксированных клеток и тканей**.** Основным объектом исследования являются гистологические препараты**,** приготовленные из фиксированных структур. Препарат может представлять собой мазок (например, мазок крови, костного мозга, слюны, цереброспинальной жидкости и др.), отпечаток (например, селезенки, тимуса, печени), пленку из ткани (например, соединительной или брюшины, плевры, мягкой мозговой оболочки), тонкий срез. Наиболее часто для изучения используется срез ткани или органа. Гистологические препараты могут изучаться без специальной обработки. Например, приготовленный мазок крови, отпечаток, пленка или срез органа могут сразу рассматриваться под микроскопом. Но вследствие того, что структуры имеют слабый контраст, они плохо выявляются в обычном световом микроскопе и требуется использование специальных микроскопов (фазово-контрастные и др.). Поэтому чаще применяют специально обработанные препараты.

Процесс изготовления гистологического препарата для световой и электронной микроскопии включает следующие основные этапы: 1) взятие материала и его фиксация, 2) уплотнение материала, 3) приготовление срезов, 4) окрашивание или контрастирование срезов. Для световой микроскопии необходим еще один этап — заключение срезов в бальзам или другие прозрачные среды (5). **Фиксация** обеспечивает предотвращение процессов разложения, что способствует сохранению целостности структур. Это достигается тем, что взятый из органа маленький образец либо погружают в фиксатор (спирт, формалин, растворы солей тяжелых металлов, осмиевая кислота, специальные фиксирующие смеси), либо подвергают термической обработке. Под действием фиксатора в тканях и органах происходят сложные физико-химические изменения. Наиболее существенным из них является процесс необратимой коагуляции белков, вследствие которого жизнедеятельность прекращается, а структуры становятся мертвыми, фиксированными. Фиксация приводит к уплотнению и уменьшению объема кусочков, а также к улучшению последующей окраски клеток и тканей.

Уплотнениекусочков**,** необходимое для приготовления срезов, производится путем пропитывания предварительно обезвоженного материала парафином, целлоидином, органическими смолами. Более быстрое уплотнение достигается применением метода замораживания кусочков, например в жидкой углекислоте.

Приготовлениесрезов производится на специальных приборах — *микротомах* (для световой микроскопии) и *ультрамикротомах* (для электронной микроскопии).

Окрашиваниесрезов (в световой микроскопии) илинапылениеихсолямиметаллов (в электронной микроскопии) применяют для увеличения контрастности изображения отдельных структур при рассматривании их в микроскопе. Методы окраски гистологических структур очень разнообразны и выбираются в зависимости от задач исследования. Гистологические красители подразделяют на кислые, основные и нейтральные. В качестве примера можно привести наиболее известный основной краситель азур II, который окрашивает ядра в фиолетовый цвет, и кислый краситель — эозин, окрашивающий цитоплазму в розово-оранжевый цвет. Избирательное сродство структур к определенным красителям обусловлено их химическим составом и физическими свойствами. Структуры, хорошо окрашивающиеся кислыми красителями, называются *оксифильными* (ацидофильными, эозинофильными), а окрашивающиеся основными — *базофильными.* Структуры, воспринимающие как кислые, так и основные красители, являются *нейтрофилъными* (гетерофильными). Окрашенные препараты обычно обезвоживают в спиртах возрастающей крепости и просветляют в ксилоле, бензоле, толуоле или некоторых маслах. Для длительного сохранения обезвоженный гистологический срез заключают между предметным и покровным стеклами в канадский бальзам или другие вещества. Готовый гистологический препарат может быть использован для изучения под микроскопом в течение многих лет. Для электронной микроскопии срезы, полученные на ультрамикротоме, помещают на специальные сетки, контрастируют солями марганца, кобальта и др., после чего просматривают в микроскопе и фотографируют. Полученные микрофотографии служат объектом изучения наряду с гистологическими препаратами.

Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей

Для изучения химического состава биологических структур — локализации веществ, их концентрации и динамики в процессах метаболизма применяют специальные методы исследования.

Цито- и гистохимические методы. Эти методы позволяют выявлять локализацию различных химических веществ в структурах клеток, тканей и органов — ДНК, РНК, белков, углеводов, липидов, аминокислот, минеральных веществ, витаминов, активность ферментов. Эти методы основаны на специфичности реакции между химическим реактивом и субстратом, входящим в состав клеточных и тканевых структур, и окрашивании продуктов химических реакций. Для повышения специфичности реакции часто применяют ферментативный контроль. Например, для выявления в клетках рибонуклеиновой кислоты (РНК) часто используют галлоцианин — краситель с основными свойствами, а наличие РНК подтверждают контрольной обработкой рибонуклеазой, расщепляющей РНК. Галлоцианин окрашивает РНК в сине-фиолетовый цвет. Если срез предварительно обработать рибонуклеазой, а затем окрасить галлоцианином, то отсутствие окрашивания подтверждает наличие в структуре рибонуклеиновой кислоты. Описание многочисленных цито- и гистохимических методов дается в специальных руководствах.

В последние годы сочетание гистохимических методов с методом электронной микроскопии привело к развитию нового перспективного направления — электронной гистохимии. Этот метод позволяет изучать локализацию различных химических веществ не только на клеточном, но и на субклеточном и молекулярном уровнях. Для изучения макромолекул клеток используют очень чувствительные методы с применением радиоактивных изотопов и антител, позволяющие обнаружить даже небольшое содержание молекул (менее 1000).

Радиоактивные изотопы при распаде ядра испускают заряженные частицы (электроны) или излучение (например, гамма-лучи), которые можно зарегистрировать в специальных приборах. Радиоактивные изотопы используют в методе радиоавтографии. Например, с помощью радиоизотопов 3Н-тимидина исследуют ДНК ядра, с помощью 3Н-уридина — РНК.

Метод радиоавтографии. Этот метод дает возможность наиболее полно изучить обмен веществ в разных структурах. В основе метода лежит использование радиоактивных элементов (например, фосфора — 32Р, углерода — 14С, серы — 35S, водорода — 3H) или меченных ими соединений. Радиоактивные вещества в гистологических срезах обнаруживают с помощью фотоэмульсии, которую наносят на препарат и затем проявляют. В участках препарата, где фотоэмульсия соприкасается с радиоактивным веществом, происходит фотореакция, в результате которой образуются засвеченные участки (треки). Этим методом можно определять, например, скорость включения меченых аминокислот в белки, образование нуклеиновых кислот, обмен йода в клетках щитовидной железы и др.

**Методы иммунофлюоресцентного анализа. Применение антител.** Антитела — защитные белки, вырабатываемые плазмоцидами (производными В-лимфоцитов) в ответ на действие чужеродных веществ (антигенов). Количество различных форм антител достигает миллиона. Каждое антитело имеет участки для «узнавания» молекул, вызвавших синтез этого антитела. В связи с высокой специфичностью антител в отношении антигенов они могут быть использованы для выявления любых белков клетки. Для выявления локализации белков антитела окрашивают флюоресцирующими красителями, а затем клетки изучают с помощью флюоресцентной микроскопии. Антитела можно использовать также для изучения антигенов на ультраструктурном уровне с помощью электронного микроскопа. Для этого антитела метят электронно-плотными частицами (микросферы коллоидного золота). Для усиления специфичности реакции применяют моноклональные антитела, образуемые линией клеток, — клонами, полученной методом гибридом из одной клетки. Метод гибридом позволяет получать моноклональные антитела с одинаковой специфичностью и в неограниченных количествах.

Методы иммунофлюоресцентного анализа широко и эффективно используются в современной гистологии. Эти методы применяются для изучения процессов дифференцировки клеток, выявления в них специфических химических соединений и структур. Они основаны на реакциях антиген — антитело. Каждая клетка организма имеет специфический антигенный состав, который главным образом определяется белками. Продукты реакции можно окрашивать и выявлять в люминесцентном микроскопе, например выявление актина и тубулина в клетке с помощью метода иммунофлюоресцентного анализа.

Современные методы исследований позволяют проводить анализ химического состава различных структурных компонентов клеток, как фиксированных, так и живых. Изучение отдельных внутриклеточных структур стало возможным после разработки технологий фракционирования клеточного содержимого.