

ГИСТОЛОГИЯ ДЛЯ ИХТИОЛОГОВ

ОПЫТ И СОВЕТЫ



Издательство ВНИРО

Федеральное агентство по рыболовству

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии» (ФГУП «ВНИРО»)

Federal Agency for Fisheries

Federal State Unitary Enterprise «Russian Federal Research
Institute of Fisheries and Oceanography» (FSUE «VNIRO»)



**E.V. Mikodina, M.A. Sedova, D.A. Chmilevsky,
A.E. Mikulin, S.V. Pyanova, O.G. Poluektova**

HISTOLOGY FOR ICHTHYOLOGISTS

Experience and Advice

Moscow VNIRO Publishing 2009

**Е.В. Микодина, М.А. Сегова, Д.А. Чмилевский,
А.Е. Микулин, С.В. Пьянова, О.Г. Полуэктова**

ГИСТОЛОГИЯ ДЛЯ ИХТИОЛОГОВ

Опыт и советы

Москва Издательство ВНИРО 2009

Редакционный совет ФГУП «ВНИРО»:

д-р биол. наук А.Н. Макоедов, д-р биол. наук М.К. Глубоковский,

д-р биол. наук О.Ф. Гриценко, д-р биол. наук Е.В. Микодина

Научный редактор: д-р биол. наук Е.В. Микодина

Рецензенты: д-р биол. наук Г.И. Рубан; д-р биол. наук Е.Н. Кузнецова

Science Editor: E.V. Mikodina, Doctor of Biological Sciences

Reviewers: G.I. Ruban, Doctor of Biological Sciences;

E.N. Kuznetsova, Doctor of Biological Sciences

Микодина Е.В., Седова М.А., Чмилевский Д.А.,

Микулин А.Е., Пьянова С.В., Полуэктова О.Г.

M57 Гистология для ихтиологов: Опыт и советы. — М.: Изд-во ВНИРО. — 2009. — 112 с.

В книге описаны классические и современные методы приготовления гистологических препаратов различных тканей, органов гидробионтов. В их основу положены результаты и опыт многолетних исследований авторов. Большое внимание уделено принципиально новой методике приготовления гистологических препаратов на основе гисторезины (гистопласта). Отдельные главы посвящены гистохимическим методам и электронной микроскопии. Описаны фиксаторы, используемые для изучения *in toto* строения гидробионтов в раннем онтогенезе. Представлен комплекс современных приборов и технических средств, которые позволяют значительно ускорить работу.

Предназначена для гистологов и гистохимиков, работающих в ихтиологии и гидробиологии, а также для студентов и аспирантов, применяющих гистологические методы исследования.

Mikodina, E.V., Sedova M.A., Chmilevsky D.A., Mikulin A.E.,

Pyanova S.V., Poluektova O.G.

Histology for Ichthyologists: Experience and Advice. — М.: VNIRO Publishing. — 2009. — 112 p.

In the book the classical and modern methods of histological specimen preparation from different tissues and organs of hydrobionts are described. They are based on the results and experience of the long-term investigations conducted by the authors. The great attention is paid to principally new method of histological specimen preparation on the basis of historesin (histoplast). Special chapters are devoted to the histochemical methods and electronic microscopy. Fixators used for study *in toto* of hydrobiont structure in the early ontogenesis are described. The complex of modern devices and technical means speeding the work substantially is presented.

The book is directed to histologists and histochemists working in the field of ichthyology and hydrobiology and for students and postgraduates using the histological methods in their research.

© Mikodina, E.V., 2009

© VNIRO Publishing, 2009

© Микодина Е.В., 2009

© Издательство ВНИРО, 2009

.....

Сколько много микроскоп нам тайностей открыл...

М.В. Ломоносов

Введение

В России, как в теоретической ихтиологии, так и в прикладных рыбохозяйственных работах, традиционно применяются гистологические методы исследования. В течение нескольких столетий гистология существовала как самостоятельная наука о строении, развитии и морфологических особенностях жизнедеятельности органов и тканей животных и растений. Со временем гистология из описательной науки превратилась в инструмент исследования. В настоящее время гистологические методы позволяют решать многие теоретические и практические задачи, встающие перед исследователями.

С середины прошлого века гистологические методы исследования стали широко применять в ихтиологии для решения обширного круга научных и прикладных рыбохозяйственных задач, связанных с контролем за состоянием популяций рыб в природных водоемах, определения полового состава промысловых уловов, установления промысловой меры, изучения влияния новых интенсивных биотехнологий, при воспроизводстве разных видов рыб на рыбоводных заводах, диагностике патологий, оценке физиологической полноценности выращиваемой молодежи и прогнозирования возможных изменений возрастной структуры нерестовой части популяций под влиянием антропогенных факторов.

Ихтиологи-гистологи. Первое, опубликованное в 1919 г., довольно полное микроскопическое исследование на рыбах было выполнено американским ученым Тернером [Turner, 1919], объектом исследования которого был желтый окунь (*Perca flavescens*).

Основоположником «ихтиологической» гистологии в России, несомненно, можно назвать В.А. Мейена, который еще в начале прошлого века [1939], используя гистологические методы исследования, впервые описал весь годовой цикл изменений яичников костистых рыб.

Работы профессора МГУ С.И. Кулаева по гаметогенезу рыб, выполненные в 30 — 40-е годы XX века, заложили основы дальнейшего исследования по изучению воспроизводительной системы у самцов рыб. Основываясь на своих результатах, С.И. Кулаев впервые ввел в шкалу зрелости гонад цитологические показатели, а именно особенности строения половых клеток. До сих пор предложенная им шкала зрелости применяется в рыбохозяйственных исследованиях и практической работе. С.И. Кулаев большое внимание уделял морфологии половых клеток на разных стадиях развития, но световой микроскоп, использовавшийся в то время, не позволял выявить все детали строения этих клеток. Дальнейшие исследования на уровне световой и, особенно — электронной микроскопии, позволили получить в последней трети XX века новые оригинальные данные.

В России в настоящее время имеется несколько гистологических школ, представители которых традиционно работают в области классической ихтиологии и рыбном хозяйстве.

Московская школа. По ведомственной принадлежности гистологов московской школы можно условно разделить на три группы: университетскую, академическую и прикладную науку.

В Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова в первую очередь гистологические работы проводятся ихтиологами. На **кафедре ихтиологии Биологического факультета** проводятся исследования с применением метода гистологии по тонкому строению зрелых гамет — ооцитов и спермиев рыб, в том числе, на разных стадиях гаметогенеза, а также изучаются изменения структуры органов и тканей в норме и при внешних гормональных воздействиях. Они выполнены на многих видах карпообразных, сомообразных, камбалообразных, зубатковых. Большое внимание уделяется ольфакторной системе, особенностям строения которой также изучают на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях. Школу гистологов кафедры ихтиологии МГУ составляют: канд. биол. наук А.П. Макеева, канд. биол. наук Н.Г. Емельянова, д-р биол. наук А.Б. Бурлаков, д-р биол. наук Г.В. Девицына, Л.С. Червова, а также их аспиранты и студенты.

На других кафедрах Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (гистологии, цитологии, эмбриологии, зоологии беспозвоночных) также работают гистологи, исследования которых связаны с изучением различных проблем рыбного хозяйства. Ученые: д-р биол. наук, профессор А.Б. Цетлин, канд. биол. на-

ук М.А. Ланге, О.В. Бурлакова и другие ученые исследуют разнообразные аспекты нормы и патологии у рыб и беспозвоночных животных.

Гистологические исследования многие годы проводятся в **Институте проблем экологии и эволюции РАН (ИПЭЭ РАН)**, ихтиологи которого исторически теснейшим образом связаны с кафедрой ихтиологии МГУ. Прежде всего, это сотрудники лаборатории Экологии низших позвоночных, в первую очередь, — группа Экологии и морфологии онтогенеза рыб, а также — лаборатории Эволюционной гистологии, Проблем эволюционной морфологии и Кабинет электронной микроскопии. Классические методы гистологии и электронной микроскопии в институте активно разрабатывали такие ихтиологи: д-р биол. наук Б.В. Кошелев, канд. биол. наук Н.В. Акимова (гаметогенез осетровых и его нарушения), канд. биол. наук К.В. Марков, канд. биол. наук В.В. Рубцов, чл.-корр. РАН Э.И. Воробьева (ультраструктура яйцевых оболочек рыб в норме и патологии), д-р биол. наук Т.П. Евгеньева (структура патологий мышечной ткани осетровых рыб, гистогенез и регенерация тканей позвоночных животных) и д-р биол. наук М.М. Калашникова (ультраструктура клеток печени).

Прикладное направление гистологии рыб традиционно разрабатывает **Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)**. Эти работы в институте получили развитие, начиная с начала 70-х годов, и, в первую очередь, связаны с изучением гаметогенеза ценных промысловых видов рыб, а также с оценкой результатов различных экспериментальных исследований (радиологических, физиологических). В частности, с помощью гистологического метода было изучено влияние инкорпорированных радионуклидов на развитие половых желез рыб в условиях лабораторного эксперимента и на естественных полигонах, а также особенности развития гонад при различных температурах, при использовании интенсивных технологий, на разных этапах жизненного цикла рыб, проходящих в водной среде при различной солености воды. В проводимых исследованиях используются методы электронной и сканирующей трансмиссионной микроскопии, с помощью которых изучают особенности строения поверхности икринок в планктоне с целью их идентификации. Институт имеет хорошо оснащенную современными приборами гистологическую лабораторию на базе лаборатории прикладной физиологии и морфологии гидробионтов отдела воспроизводства и культивирования гидробионтов, а также электронный сканирующий микроскоп.

К гистологам ВНИРОвской школы относятся ученые: канд. биол. наук Э.А. Воронина, канд. биол. наук М.А. Седова, О.П. Филиппова, канд. биол. наук К.В. Метальникова, д-р биол. наук, профессор Е.В. Микодина, О.Г. Полуэктова, канд. биол. наук В.А. Захалева, канд. биол. наук Н.В. Пукова, канд. биол. наук С.В. Пьянова, А.В. Карлышева. В институте изучают цитоморфологическое строение тканей и органов: осетровых, лососевых, кефалевых, окуневых, тресковых, камбаловых и многих других видов рыб. Важнейшими исследованиями являются работы по особенностям созревания и размножения рыб. Изучение с помощью гистологических методик динамики созревания половых желез рыб и особенностей размножения позволяет выявить патологические процессы в течение гаметогенеза, нарушения морфологии гонад, влияющие на воспроизводительную способность популяций рыб и, в конечном счете, на состояние запаса. Гистологические исследования входят в работы по приоритетным направлениям деятельности института: биоресурсы, аква- и марикультура, технология, а также при эколого-токсикологических исследованиях.

Считаем важным подчеркнуть, что в становление школы гистологов ВНИРО внесли свой неоценимый методический вклад гистологи Ленинградской школы, в частности сотрудники БИНИИ ЛГУ лаборатории экспериментальной ихтиологии под руководством д-ра биол. наук Г.М. Персова, в которой также ученые ВНИРО проходили стажировки.

Санкт-Петербургская (Ленинградская) школа. К этому направлению гистологов относятся ученые разных институтов северной столицы — **кафедры ихтиологии и гидробиологии СПбГУ, ГосНИОРХа, Центральной лаборатории по воспроизводству водных биоресурсов, Института Цитологии, Института Эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова**, которые внесли свой уникальный вклад в изучение половых циклов, а также тонкого строения и особенностей функционирования гипофиза, гипоталамуса, щитовидной железы и других нейроэндокринных органов. Это такая плеяда ученых, работавшая на кафедре ихтиологии и гидробиологии СПбГУ под руководством д-ра биол. наук, проф. Н.Л. Гербельского, как д-р биол. наук, проф. Б.Н. Казанский, д-р биол. наук, проф. И.А. Баранникова, И.В. Яковлева, И.И. Лапицкий, В.З. Трусов, А.Г. Конрадт, Н.А. Буцкая, Т.И. Фалеева и многие другие. Позднее И.А. Баранникова создала собственную школу гистологов, среди которых такие широко известные в России и за рубежом ученые, как кандидаты биол. наук И.И. Са-

енко, Е.Б. Моисеева, В.П. Дюбин, И.Г. Мурза, О.Л. Христофоров, О.С. Буковская, Т.Б. Семенова, К.Д. Краснодембская. Широкую известность получили исследования д-р биол. наук А.Л. Поленова, и его учеников, например д-ра биол. наук П.Е. Гарлова. Особого упоминания заслуживают гистологи **лаборатории экспериментальной ихтиологии в БИНИИ СПбГУ (ЛГУ)**. Это, прежде всего д-р биол. наук Г.М. Персов, работавший в 70-е годы над различными аспектами раннего развития и функции гонад у рыб. В его книге «Дифференцировка пола у рыб» [1975] детально описаны процесс миграции и концентрации первичных половых клеток, закладка гонад и их анатомическая и цитологическая дифференцировка у тихоокеанских лососей. Школу Г.М. Персова составляют его ученики и последователи, сотрудники кафедры ихтиологии и гидробиологии — д-р биол. наук профессор Л.С. Краюшкина, д-р биол. наук Д.А. Чмилевский, кандидаты биол. наук О.Ф. Сакун, М.Н. Чистова, К.Е. Федоров, Е.В. Гуреева-Преображенская, О.В. Зеленников, Г.Л. Травкина, Ю.К. Кузнецов. Многие годы И.Г. Мурзой и О.Л. Христофоровым детально изучались, описаны и проиллюстрированы строение половых желез и гамет атлантических лососей на разных стадиях развития, что нашло отражение в их книге «Определение степени зрелости гонад и прогнозирование возраста достижения половой зрелости у атлантического лосося и кумжи» [1991].

Северная школа. Гистологические исследования рыб из водоемов Европейского севера России были развиты в отраслевых рыбохозяйственных НИИ — **Полярный НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии (ПИНРО)** и **СевПИНРО**, в академических — **Мурманский морской биологический институт (ММБИ) КНЦ РАН**. Исследования проводили такие ученые, как Г.П. Мажирин, С.А. Оганесян, В.М. Зеленков, В.В. Семенов. В последние годы в этих институтах гистологические лаборатории практически утрачены и работы выполняются сторонними соисполнителями. К этим институтам примыкает **Атлантический НИИ рыбного хозяйства и океанографии (АтлантНИРО)**, где также трудятся гистологи, наибольшую известность среди которых имеют кандидаты биол. наук Е.И. Алексеева и Ф.Е. Алексеев.

Южная школа. Гистологические исследования широко проводились в академических и прикладных институтах, расположенных в южных регионах — **Институт биологии южных морей (ИНБЮМ)**¹ национальной академии наук Украины и **Южный ин-**

¹ Ныне принадлежит НАН Украины.

ститут рыбного хозяйства и океанографии (ЮгНИРО)¹. Наиболее известными трудами по гистологии гонад морских видов рыб являются монографии д-ра биол. наук ИНБЮМ А.С. Овен — «Особенности оогенеза и характер нереста морских рыб» [1976] и «Специфика развития половых клеток морских рыб в период размножения как показатель типа нереста и реакции на условия среды обитания» [2004], где большое внимание уделено развитию и созреванию половых клеток у рыб в нерестовый период, в том числе при антропогенном загрязнении. В ней описаны и иллюстрированы микрофотографиями разные типы оогенеза и соответствующие им типы икрометания у морских рыб Черного моря. Эти книги являются настольными пособиями для ученых, исследующих гаметогенез морских рыб. В **Южном НИИ рыбного хозяйства и океанографии (ЮгНИРО)** также работало много гистологов, изучавших структуру и функцию репродуктивной системы рыб, как половых желез, так гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы. Широко известны работы кандидатов биол. наук М.Г. Таликиной, Е.Б. Моисеевой, А.Б. Золотницкого.

Дальневосточная школа. На Дальнем Востоке России гистологические исследования проводят в **Камчатском НИИ рыбного хозяйства и океанографии (КамчатНИРО)** и **Дальневосточном государственном университете (ДВГУ)**. В Дальневосточном государственном университете гистологов-ихтиологов представляют д-р биол. наук профессор В.Н. Иванков и его школа. На основании оригинальных данных по морфологии и цитохимии яйцеклеток предложен принципиально новый подход в выявлении родственных отношений рыб. Изучено строение яйцеклеток и их оболочек у рыб ряда систематических групп: сельдеобразных, лососеобразных, карпообразных, сомообразных, трескообразных, окунеобразных, скорпенообразных, камбалообразных. Показано, что каждой систематической группе рыб свойственна своя организация яйцеклеток. Исследования, проводимые во второй половине XX века проф. В.Н. Иванковым с коллегами, отражены в нескольких книгах с микрофотографиями, в том числе «Строение яйцеклеток и систематика рыб» [1987], «Морфология гамет животных» [2000], «Репродуктивная биология рыб» [2001]. Изучению морфологии и тонкой структуры органов обоняния у рыб посвятила свои многолетние исследования М.А. Дорошенко.

Основы гистологических исследований в КамчатНИРО заложили М.Я. Иевлева, изучавшая особенности строения и развития

¹ «АзЧерНИРО», ныне принадлежит Украине.

половых желез тихоокеанских лососей в морской период их жизни, и М.Н. Николаева, работавшая с лососями в речной период. Ныне в этом институте методом гистологии владеют кандидаты биол. наук Т.И. Толстяк и С.Б. Городовская.

В отраслевых бассейновых научно-исследовательских институтах — **Сахалинском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (СахНИРО)** и **Магаданском научно-исследовательском институте рыбного хозяйства и океанографии (МагаданНИРО)**, гистологические методы исследований используются крайне мало в связи с устаревшей приборно-технической базой и малым количеством специалистов. Тем не менее, потребность в этих исследованиях имеется, что вынуждает институты искать помощи у гистологов ВНИРО. Так, руководство МагаданНИРО обращалось во ВНИРО с просьбой о подготовке для института специалистов-гистологов.

Наличие справочной и методической литературы.

До настоящего времени настольными книгами каждого исследователя-гистолога являются несколько методических изданий, устаревших с точки зрения рекомендуемого оборудования и излишне подробные с точки зрения потребностей ихтиологии. Это — вышедшая в 1953 г. монография Б. Ромейса — «Микроскопическая техника», наиболее популярная и дважды переизданная книга Г.И. Роскина [1951] и ее дополненное и расширенное издание, подготовленное Г.И. Роскиным и Л.Б. Левинсоном «Микроскопическая техника» [1957], а кроме этого «Гистохимия» Э. Пирса [1962], «Патогистологическая техника и практическая гистохимия» Р. Лилли [1969]. Наиболее современным изданием можно считать методическое пособие кандидатов биол. наук М.А. Вальной и Д.Н. Кавтарадзе «Микротехника. Правила, приемы, искусство эксперимента» [1993], Однако оно является скорее учебником для студентов и также ориентировано на устаревшее оборудование середины XX века. При электронномикроскопических исследованиях в качестве наиболее популярных методических пособий используются «Электронная микроскопия для начинающих» Б. Уикли [1975] и «Электронная гистохимия» Г. Гайгера [1974]. Из иностранных пособий можем рекомендовать книгу I. Wolf [1954]. В этих книгах описаны общие методы и приемы гистологической обработки проб различных живых (животных и растительных) объектов.

Так как предметом изучения специалистов рыбохозяйственной науки являются водные животные — рыбы и промысловые беспозвоночные, в их работе используются специфические мето-

ды и их модификации, применяемые для гистологического изучения органов и тканей именно этих объектов. Однако, используемые в этих случаях методы, незнакомы широкому кругу исследователей, а для их освоения недостаточно краткого описания методов, приводимых в разных статьях. В данном случае требуется подробное описание используемых методик. Но и это условие не является достаточным. В качестве практического дополнения необходимы стажировки сотрудников, которые смогут перенять у специалистов все тонкости непростых методов гистологии и электронной микроскопии, применяемых в рыбохозяйственных исследованиях.

Чтение гистологических препаратов является еще одной непростой проблемой в данном методе. Как правило, гистологи в этом случае ориентируются на свой опыт или прибегают к консультациям коллег, что не всегда реально. Наиболее удобным способом для проверки правильности определения тех или иных гистологических структур на готовом препарате является использование специализированных атласов, что на настоящий момент также проблематично. Российский гистолог может рассчитывать на «Атлас по гистологии и эмбриологии» И.В. Алмазова и Л.С. Сутулова [1978], который имеет свои недостатки. В 2000-х годах появился ряд новых Атласов органов и тканей, ориентированных на потребности медицины [Кюнель, 2006; Самусев, Смирнов, 2006].

Во всех остальных случаях гистолог-ихтиолог может рассчитывать лишь на иллюстрированные статьи и монографические издания. В качестве таковых можем рекомендовать следующие наиболее известные книги:

- «Труды лаборатории основ рыбоводства». Т. II. Под редакцией проф. Н.А. Гербильского, 1949;
- О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий «Основы гистологии с гистологической техникой», 1971.
- Г.М. Персов «Дифференцировка пола у рыб», 1975;
- Л.С. Овен «Особенности оогенеза и характер нереста морских рыб», 1976;
- Б.В. Кошелев «Экология размножения рыб», 1984;
- Э.И. Воробьева, В.В. Рубцов, К.П. Марков «Влияние внешних факторов на микроструктуру оболочек икры рыб», 1986;
- И.Г. Мурза, О.Л. Христофоров «Определение стадий зрелости гонад и прогнозирование возраста достижения половой зрелости у атлантического лосося и кумжи (Методические указания)», 1991;
- А.П. Макеева «Эмбриология рыб», 1992;

- «Проблемы репродуктивной биологии в трудах профессора С.И. Кулаева и его последователей», 1998;
- А.А. Дроздов, В.Н. Иванков «Морфология гамет животных», 2000;
- Т.П. Евгеньева «Патология мышечной ткани осетровых рыб», 2000;
- М.М. Калашникова «Ультраструктурные аспекты приспособительных особенностей клеток печени позвоночных», 2003;
- Н.В. Акимова, В.Б. Горюнова, Е.В. Микодина, М.П. Никольская, Г.И. Рубан, С.А. Соколова, В.Г. Шагаева, М.И. Шатуновский «Атлас нарушений в гаметогенезе и развитии молоди осетровых», 2004;
- М.А. Дорошенко «Гистофизиология органов обоняния у рыб», 2004;
- Л.С. Овен. «Специфика развития половых клеток морских рыб в период размножения как показатель типа нереста и реакции на условия среды обитания», 2004;
- В. Кюнель «Цветной атлас по цитологии, гистологии и микроскопической анатомии», 2006;

Кроме этого, существует множество статей, иллюстрированных гистологическими микрофотографиями и электронограммами, ссылки на которые читатель может найти в списке цитированной литературы, данном в конце настоящего издания, и приведенных выше книгах. Они, безусловно, будут полезны начинающему гистологу-ихтиологу.

Авторы заранее приносят свои извинения всем ученым, на чьи работы нет ссылок в данном издании. Его целью является методические рекомендации по гистологической обработке, а не создание обобщающей библиографии по гистологии.

Все вышеизложенные предпосылки привели к идее о необходимости создания во ВНИРО отраслевого Центра по обучению методам гистологии специалистов из других рыбохозяйственных институтов. Подготавливаемая к изданию монография — «Гистология для ихтиологов», является одним из необходимых условий работы во ВНИРО такого обучающего Центра. После окончания стажировок, обученные специалисты, будут иметь в наличие современное методическое пособие, адаптированное к современным задачам изучения рыбохозяйственных объектов и отражающее возможности нового приборного обеспечения.

Авторы выражают надежду, что в ближайшем будущем им удастся создать и Атлас по гистологии.

Благодарности. Авторы приносят свою глубокую благодарность всем коллегам, принимавшим участие в ряде совместных работ и являющихся соавторами в предыдущих публикациях, из которых взяты ряд микрофотографий гистологических срезов в качестве иллюстраций к данной книге.

Мы также благодарим сотрудников ООО «Митэла» за неоценимую помощь в выборе нового оборудования для гистологической лаборатории ВНИРО с оптимальным соотношением цены и качества.

Существенная часть материалов, положенных в основу данной книги, получена при финансовой поддержке Государственного комитета по рыболовству и его правопреемника — Федерального агентства по рыболовству, в период с 1998 г. по настоящее время.

Авторы особенно признательны дирекции ФГУП «ВНИРО» за современное оснащение гистологической лаборатории и предоставленную возможность публикации данной книги в «Издательстве ВНИРО». Сотрудникам «Издательства ВНИРО», принимавшим участие в редакционной подготовке, верстке, художественному оформлению рукописи и издании книги, наша отдельная благодарность.

1. Классический метод изготовления гистологических препаратов на основе парафина

Процесс приготовления препаратов на основе парафина для гистологических исследований проходит ряд этапов: фиксация материала, промывка от фиксатора, обезвоживание, пропитка парафином, заливка в парафин, резка парафиновых блоков на микротоме, окраска срезов, фотографирование и, наконец, цитоморфометрический анализ и описание готовых препаратов. Ниже мы приводим описание основных приемов, используемых на различных этапах изготовления гистологических препаратов.

Фиксация материала для гистологической обработки

Процесс приготовления препаратов начинается с очень важного этапа — фиксации материала. Существуют как простые фиксаторы — формальдегид (формалин), этиловый и метиловый спирты, ацетон, соли тяжелых металлов (сулема, двуххромовокислый калий), кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, осмиевая), альдегиды (формальдегид, глютаровый альдегид), так и различные фиксирующие смеси.

Смеси разделяют на 4 группы по основным действующим компонентам:

1. Фиксаторы, содержащие сулему — жидкость Ценкера, жидкость Шаудина, сулема с уксусной кислотой, фиксатор Суза.
2. Фиксаторы, содержащие осмиевую кислоту — жидкость Флемминга, жидкость Шампи.
3. Этанол и смеси его содержащие — жидкость Карнуа, спирт-формол, формалин-спирт-уксусная кислота (ФСУ).
4. Фиксаторы, содержащие пикриновую кислоту — жидкость Буэна, смесь ван-Лезувена [Роскин, Левинсон, 1957].

Цель фиксации — сохранение тканевых структур в том состоянии, в каком они находились в момент погружения тканей в фиксирующую жидкость и одновременное их предохранение от дальнейших разрушений. Не существует фиксаторов, которые бы полностью сохраняли существующие при жизни микроскопические структуры. Однако чем быстрее и глубже воздействует фиксатор на ткань, чем меньше изменений претерпевает тканевая структура при фиксации, тем лучше считается фиксирующая жидкость.

Нами в работе в основном используется 4%-ный раствор формальдегида (1 часть 40% формалина¹ разводят 9 частями воды). Преимущество формалина состоит в том, что он быстро и равномерно проникает в ткани, сохраняет форму, окраску и структуру исследуемого объекта, долгое время сохраняет свойства объекта (несколько лет), его удобно использовать в полевых условиях. Положительные и отрицательные качества формалина и других фиксаторов будут изложены ниже (см. разд. 5. Фиксаторы, используемые... О некоторых свойствах фиксаторов).

Следует обратить внимание еще на один превосходный фиксатор, применяемый в гистологической практике — смесь Буэна (жидкость Буэна, Буэн).

Приготовление смеси Буэна. Смешать 15 частей насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, 5 частей 40%-ного формалина и 1 часть ледяной уксусной кислоты.

Эта смесь хорошо фиксирует эпителиальные ткани и их производные, соединительную и мышечную ткань. Продолжительность фиксации 2—24 ч в зависимости от величины объекта; затем материал переносят в 70—80° спирт (для удаления пикриновой кислоты), который сменяют 2—3 раза. Однако объект, фиксированный в жидкости Буэна, в дальнейшем (см. разд. 1. Классический метод... Проводка и заливка в парафин) не пропитывается полностью целлоидином и при резке парафиновых блоков крошится. Нам пришлось отказаться от этого фиксатора, но если проводку вести без целлоидина — лучшего фиксатора не найти.

В ряде случаев в гистологии для фиксации тканей используется жидкость Серра, которая одновременно является и просветля-

¹ Неверно говорить «40%-ный формалин» — это сленг. Достаточно сказать просто «формалин», так как формалином называется 40%-ный водный раствор формальдегида. Иногда также такой неразбавленный формалин называют 100%-ный формалин. Также неверно говорить «4%-ный формалин», так как, на самом деле, это — 10%-ный формалин. Правильно говорить «4%-ный раствор формальдегида».

ющим раствором (см. разд. 5. Фиксаторы, используемые... Просветляющие составы).

Проводка и заливка в парафин

После фиксации объекта в формалине, многие авторы советуют промыть его под струей водопроводной воды, а затем объект постепенно обезвоживают в спиртах и других дегидратирующих веществах и смесях [Ромейс, 1953; Роскин, Левинсон, 1957; Валовая, Кавтарадзе, 1993]. Для этой цели используют этиловый или бутиловый спирты. Данный этап часто называют «проводкой». Многолетняя практика показала, что последовательную проводку в этаноле или других спиртах с увеличивающейся концентрацией (набор «восходящих» спиртов, или «батарея») можно начинать без предварительной промывки. Однако после фиксации в смеси Буэна объект обязательно необходимо промывать 70–80° спиртом (водой нельзя) [Роскин, 1951], пока объект не потеряет желтоватый оттенок (правда, совсем его убрать невозможно).

Набор восходящих спиртов и обезвоживающих веществ (или батарею) составляют в зависимости от характера обрабатываемого материала: проводка с бутанолом; проводка через целлоидин-касторовое масло. Например, семенники, яичники на ранней стадии зрелости и печень можно проводить через бутаноловую батарею, а икру на IV и V стадиях зрелости лучше через батарею с целлоидин-касторовым маслом.

Проводка с бутанолом

Обезвоживание объекта (проводку материала) часто рекомендуют начинать с 40° спирта, однако, исходя из нашего опыта, проводку можно начинать с 70° спирта и далее с повышением концентрации через 10°. После проводки через спирты, объект переносят в смеси спирта с бутанолом, а затем в чистый бутанол (табл. 1).

Для приготовления спиртов более слабой концентрации обычно используют 96° спирт путем прибавления нужного количества воды (табл. 2).

Обезвоживание проводят в маленьких бюксах с притертыми крышечками (рис. 1). Количество налитого в них спирта должно в 10–20 раз превышать объем объекта. Повторное использование спиртов нежелательно, поскольку при дегидратировании объектов их концентрация снижается.

Таблица 1. Проводка с бутанолом

Батарея	Соотношение спирта и бутанола	Экспозиция, мин
70° этанол		35
80° этанол		35
90° этанол		35
82° спирт + бутанол	3:1	35
96° спирт + бутанол	1:3	35
100° спирт + бутанол	1:1	35
Бутанол-I		35
Бутанол-II		35
Парафин-I		Ночь
Парафин-II		45
Парафин-III		45

Таблица 2. Приготовление спиртов различной концентрации

Для получения 100 мл спирта	Объем, мл	
	96° спирт	вода
40°	42	58
45°	47	53
50°	52	48
60°	63	37
70°	73	27
80°	83	17
90°	94	6

После бутанола кусочки ткани необходимо промокнуть на фильтровальной бумаге. Затем перенести их в расплавленный парафин и поместить на ночь в термостат, отрегулированный на 56 °С, для пропитки. Заключаемый в парафин кусочек, берут разогретым над пламенем спиртовки пинцетом, иначе при помещении в расплавленный парафин холодного пинцета парафин его облепит и окажется невозможным отделить объект от пинцета и поместить в парафин.

Утром продолжить пропитку, для чего объекты нагретым над спиртовкой глазным пинцетом перенести во вторую смену парафина, затем — в третью. Пропитку парафином следует проводить в открытых фарфоровых тигельках, где он остывает медленнее, чем в стеклянной посуде. Использование трех порций пропиточного парафина необходимо для удаления из ткани остатков бутанола, который изменяет пластичность парафина, делая его хрупким.



Рис. 1. Общий вид батареи для обезвоживания:
1 — фиксированных объектов; 2 — обезвоживания-оводнения
готовых срезов на предметных стеклах

Приготовление парафина. Технический парафин, с которым чаще всего имеют дело гистологи, представляет собой грубокристаллическую массу, крошащуюся при разломе.

При однократном нагревании и последующем охлаждении он остается хрупким. Для приготовления пластичного парафина его многократно нагревают (до 10 раз) на водяной бане или в термостате с последующим резким охлаждением (например, помещая в кристаллизатор, заполненный снегом, льдом или холодной водой). Для того чтобы увеличить пластичность парафина, к нему обычно добавляют 5–10 % пчелиного воска и манипуляции с нагреванием повторяют еще несколько раз.

Готовый парафин следует хранить в фарфоровом стакане с ручкой в термостате при 56 °С. В него можно добавлять парафиновые обрезки и стружку, образующихся при вырезании блоков и приготовлении срезов, и использовать многократно. Со временем парафин становится более пластичным.

Проводка через целлоидин-касторовое масло

Ихтиологам часто приходится работать с объектами, в которых присутствует большое количество желтка или жира. Они очень сильно уплотняются в процессе фиксации и во время дальнейшей проводки. В таком случае, хорошие результаты дает применение касторового масла. В качестве промежуточной среды следует применять хлороформ (табл. 3).

Таблица 3. Проводка с целлоидин-касторовым маслом

Батарея	Экспозиция	Примечание
70° этанол	1 ч	
80° этанол	1 ч	
90° этанол	1 ч	
96° этанол	1 ч	
Бутанол-I	1 ч	Перед загрузкой в бутанол-кусочек промокнуть на фильтровальной бумаге
Бутанол-II	1 ч	
Целлоидин-касторовое масло	От 1 до 2-х сут	
Касторовое масло	От 2-х до 3-х сут	После касторового масла промокнуть на фильтровальной бумаге
Хлороформ-I	1 ч	
Хлороформ-II	1 ч	
Хлороформ-парафин (каша 1:1)	На ночь	Погрузить вечером перед уходом с работы и оставить в термостате при 37 °С в закрытых боксах
Парафин-I	45 мин	Оставить в открытых тигельках, в термостате при 56 °С
Парафин-II	45 мин	Оставить в открытых тигельках, в термостате при 56 °С

После обезвоживания во второй перемене бутанола (бутанол-II) материал переносят в смесь целлоидина с касторовым маслом (целлоидин-касторовое масло).

Приготовление целлоидин-касторового масла. 2 г сухого целлоидина растворить в 100 см³ смеси 100° спирта с эфиром (1:1) и добавить 100 см³ касторового масла.

Существуют и другие вариации методики проводки исследуемого материала через целлоидин-касторовое масло, например, приведенные в табл. 4 и 5. Эти проводки рекомендуем для довольно крупных кусочков материала; для обработки мелких образцов экспозиция в каждом растворе уменьшается вдвое.

Через двое суток после пропитки в касторовом или анилиновом масле кусочки помещают в чистое касторовое масло на дли-

**Таблица 4. Проводка с целлоидин-касторовым маслом
(модификация 1)**

Батарея	Экспозиция	Примечания
70° этанол	Неограниченное время	Хорошо отмывается пикриновая кислота после фиксации в смеси Буэна
80° этанол	2—3 ч	
90° этанол	На ночь	Погрузить вечером, перед уходом с работы
96° этанол-I	3 ч	
96° этанол-II	3 ч	
100° этанол*	3 ч	
Целлоидин-касторовое масло	От 1 до 7-ми сут	После касторового масла промокнуть на фильтровальной бумаге
Хлороформ-I	1 ч	
Хлороформ-II	1 ч	
Хлороформ-парафин («каша» 1:1)	На ночь	Погрузить вечером перед уходом с работы и оставить в термостате при 37 °С в закрытых бюксах
Парафин-I	30—60 мин	Оставить в открытых тигельках, в термостате при 56 °С
Парафин-II	30—60 мин	Оставить в открытых тигельках, в термостате при 56 °С
* Приготовление 100° этанола (абсолютный спирт) см. стр. 37.		

тельное время (от 2 до 3 сут). Затем следуют две смены хлороформа, смесь хлороформ-парафин в соотношении 1:1 (хлороформовая «каша») и далее пропитка парафином (время экспозиции см. табл. 3, 4, 5). Для некоторых тканей (например, гонады самок на IV—V стадии зрелости) необходимо увеличить время экспозиции в «каше» до 3-х дней. Следует помнить, что масло не смешивается с парафином и поэтому требуется тщательное его удаление в хлороформе.

Перед заливкой в парафин яйцеклетки можно выдерживать 5—6 сут в другом масле — анилиновом, что также приводит к смягчению объекта.

**Таблица 5. Проводка с целлоидин-касторовым маслом
(модификация 2)**

Батарея	Экспозиция	Примечания
70° этанол	3 ч	
80° этанол	3 ч	
90° этанол	6 ч	
96° этанол	6 ч	
100° I этанол	3 ч	
100° II этанол	3 ч	
Целлоидин-касторовое масло*	От 1 до 3-х сут	После касторового масла ополоснуть в смеси спирт – эфир
Хлороформ-I	3 ч	
Хлороформ-II	3 ч	
Хлороформ-парафин (каша 1:1)	На ночь	Погрузить вечером перед уходом с работы и оставить в термостате при 37 °С в закрытых бюксах
Парафин-I	1 ч	Оставить в открытых тигельках, в термостате при 56 °С
Парафин-II	1 ч	Оставить в открытых тигельках, в термостате при 56 °С

Заливка в парафин

Относительно небольшие объекты заливают в часовые стекла. Для более крупных используют специальные самодельные формочки из бумаги (рис. 2), которые называют «кораблики».

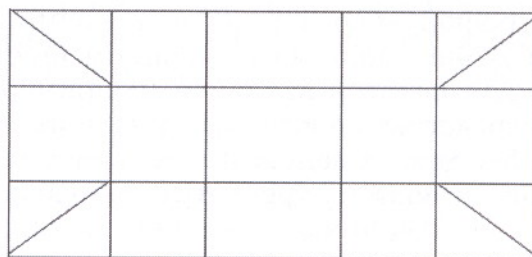


Рис. 2. Схема приготовления бумажной формочки («кораблика») для заключения объекта в парафин

Из находящейся в термостате «каши» фрагменты ткани переносят в «кораблик» с помощью пинцета, подогретого на спиртовке, и заливают вынутым из термостата, находящимся при 56 °С, парафином. Затем этим же пинцетом или нагретой на спиртовке препаровальной иглой плавными движениями разгоняют пузырьки вокруг заключаемого в парафин объекта. С краю, в еще жидкий парафин, вставляют пергаментную этикетку с номером объекта, которая при застывании парафина не теряется от объекта (рис. 3).



Рис. 3. Залитый в парафин объект — готовый «кораблик»

После проведения процедуры заливки формочки с парафином помещают в кристаллизатор или в ванночку, в которые наливают воду комнатной температуры. Плавание формочки в воде обеспечивает равномерное застывание парафина с заключенным в него объектом. После застывания парафина рекомендуют выдержать залитый объект в течение как минимум одних суток.

Из затвердевшего парафина вырезают блоки в форме параллелепипеда и насаживают на деревянный кубик размером 2 × 2 × 2 см. (возможны и другие размеры брусочков, удобные для вас). Для этого наносят несколько капель расплавленного парафина на одну из поверхностей кубика, к которому, не допуская застывания парафина, быстро плотно прижимают вырезанный парафиновый блок с залитым объектом. Технически эта процедура выглядит так: обрезки и стружку парафина подцепляют нагретым скальпелем и держат над пламенем спиртовки до расплавления парафина, а затем быстро этот расплав выливают на поверхность кубика и приклеивают блок.

Однако опыт показывает, что приклеенный таким образом блок, под нажимом микротомного ножа при резке может оторваться от кубика, поэтому для его укрепления на кубике к месту соединения нижней части блока с кубиком дополнительно со всех сторон наносят немного расплавленного парафина «горкой». Парафиновую «горку» у нижней части блока делают также, расплавляя парафиновую стружку над пламенем спиртовки. Минимально через 2, ч после застывания парафина можно приступать к резке блока.

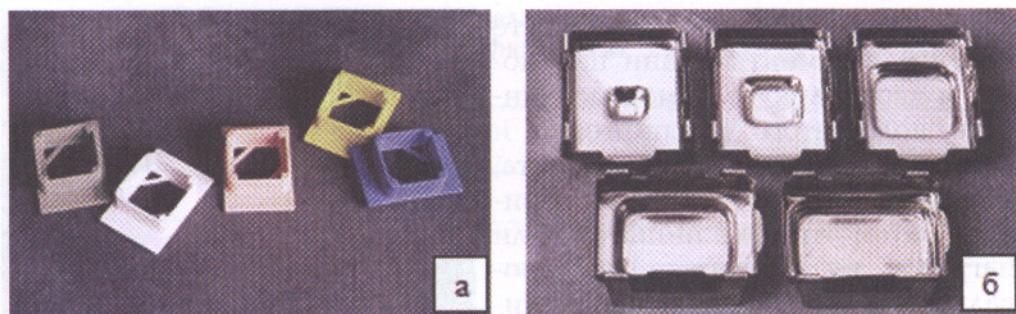


Рис. 4. Готовые заливочные кольца (а) и кюветы (б) для заливочной станции

В настоящее время производители гистологического оборудования предлагают для заливки объекта в парафин специальные готовые заливочные кюветы с кольцами, которые позволяют не насаживать объект на брусочек (рис. 4). После затвердения парафина кольца сразу можно фиксировать в держателе микротомы и приступать к резке.

Резка блока на микротоме и приготовление парафиновых срезов

Перед началом резки парафиновых блоков готовят предметные и покровные стекла. Их моют, высушивают и помещают в раствор спирто-эфирной смеси (1:1). Приступая к резке, достают из склянки несколько стекол, протирают их досуха и раскладывают на чистую фильтровальную бумагу. На край предметного стекла капают куриный белок и, предварительно опустив в спирто-эфирную смесь мизинец для обезживания, равномерно размазывают белок по всей поверхности стекла. Затем на стекло помещается 2—3 капли дистиллированной воды.

Срезы собираются в виде ленты на лезвии ножа микротомы и затем тонкой кисточкой их переносят на предметное стекло, покрытое белком, выполняющего роль клея. После монтажа срезов на дистиллированную воду, предметные стекла переносят на нагревательный столик для расправления срезов и подсушивания (важно не пересушить, так как появляются трещины на срезах).

Для подготовки препарата к окраске необходимо провести депарафинирование — освобождение от парафина (табл. 6).

Таблица 6. Обработка срезов до окраски (депарафинирование)

Батарей	Экспозиция, мин	Примечание
Ксилол-I	10	При переносе стекол из одной жидкости в другую им дают хорошо стечь, протирают тыльные стороны фильтровальной бумагой, чтобы по возможности не загрязнять реактивы. После обработки 50 стекол заливают свежие реактивы.
Ксилол-II	10	
96° этанол-I	5	
96° этанол-II	5	
70° этанол	5	
Вода	5	

Приготовление белка. Белок куриного яйца взбить до получения пены, дать отстояться и затем фильтровать через влажный бумажный фильтр (воронку закрыть от пыли, т.к. фильтрация происходит очень медленно). Можно оставить на ночь в холодильнике. В отфильтрованный белок добавить равное количество глицерина и 1–2 кристаллика тимола.

Подготовка предметного стекла. На краю стекла с помощью крупной наждачной шкурки или шлифовального станочка нанести небольшую полоску шлифа, на которой удобно написать карандашом номер исследуемого объекта (в продаже также бывают предметные стекла уже с готовым шлифом на одном краю). Стекла тщательно помыть и обезжирить в смеси спирт — эфир (1:1), находящейся в склянке с притертой крышкой, в течение нескольких дней.

Спиртоэфирная смесь весьма летучая, а хлороформ — наркотизирующее вещество. В связи с этим ее хранят в широкогорлой склянке объемом 1–2 л с притертой пробкой, а после помещения в нее стекол для обезжиривания сверху крышки часто надевают резиновую перчатку для большей герметичности.

Окраска и заключение препаратов в заливочные среды

Немаловажную роль при приготовлении гистологических препаратов играет процесс окрашивания. Гистологические красители делятся на четыре группы: животного происхождения (например, кармин), растительного происхождения (гематоксилин), минерального происхождения (каменноугольные краски — анилиновые, ализариновые) и синтетические. Красители и время экспозиции подбираются эмпирическим путем. Часто для изучения микроскопической структуры тканей бывает недостаточно окрашивания

срезов одной какой-то краской. В таком случае применяется комбинированный метод окрашивания, который состоит в применении двух — трех красящих веществ: например, одно окрашивает ядро, а другое — цитоплазму и ее компоненты. При этом каждая из этих двух красок может окрашивать различные части клеток. Комбинированное окрашивание срезов может проводиться или одномоментно, когда реактив составлен из комбинации нескольких красок, или путем последовательной окраски среза отдельными красками. В последнем случае окраска ядер обычно предшествует окраске цитоплазмы.

После формалиновой фиксации хорошие результаты дает комбинированный метод окрашивания — «Гематоксилин-эозин» (табл. 7). Этот относительно простой метод окрашивания позволяет выявить структурные компоненты ядра, которые содержат нуклеиновые кислоты. Избирательное окрашивание цитоплазмы и цитоплазматических образований, позволяет выявить ряд особенностей, облегчающих изучение структуры ткани. Практика показала, что во многих случаях препарат лучше передержать в гематоксилине с тем, чтобы прокрасились все структуры ткани. Лишняя краска затем смывается водопроводной водой, и препарат дифференцирует

Таблица 7. Окрашивание гематоксилин-эозином

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
Гематоксилин (по Эрлиху)	10	Экспозиция в зависимости от «возраста» гематокислина
Вода водопроводная	10	Проточная
Спирт солянокислый	0,5	Можно обойтись без него
Вода водопроводная	10	Промывать тонкой струйкой под краном до синего цвета
Эозин	5	Вместо эозина можно использовать выше указанные красители
96° этанол-I	5	
96° этанол-II	5	
100° этанол	5	Абсолютный спирт следует менять каждые 20 — 30 стекол
Ксилол-ацетон (2:1)	5	
Ксилол-III	10	
Ксилол-IV	10	
Бальзам		

ся до светло-голубого цвета. Дифференцировать можно солянокислым спиртом, пикриновым спиртом (к двум частям насыщенного водного раствора пикриновой кислоты прибавляют 1 часть 96° спирта) или 1—3%-ным раствором железосаммиачных квасцов.

Как видно из табл. 7, после докраски эозином (или другими красителями) срезы тщательным образом обезживаются спиртами восходящей концентрации. Если обезживание в спиртах будет проведено недостаточно, то на готовом препарате появляется слабая дымка, которая образуется за счет следов воды. После абсолютного спирта препараты просветляются в смеси ксилол — ацетон, затем в двух сменах ксилола.

На готовый препарат наносят 2—3 капли заливочной среды и аккуратно опускают покровное стекло, предварительно обезжиренное в смеси спирт — эфир. Из заливочных сред самым популярным у отечественных гистологов является канадский бальзам. Препараты, заключенные в канадский бальзам, не изменяются в течение многих лет и даже десятилетий. В последние годы мы перешли на пихтовый бальзам, который является неплохим заменителем канадскому бальзаму. Однако он обладает рядом недостатков: во-первых, плохо затвердевает, во-вторых, он имеет кислую реакцию, что ведет к выцветанию красителей и, в-третьих, происходит кристаллизация смол, причем через короткое время после изготовления препаратов. Гистологи Санкт-Петербургского университета для заключения готовых препаратов применяют даммаровый лак¹.

Результаты окраски срезов гонад микижи и тихоокеанских лососей, окрашенных гематоксилин-эозином приведены в Приложении.

В некоторых случаях хорошие результаты дают другие методы окрашивания, например, окраска трехцветным методом Массона (табл. 8), железным гематоксилином по Гейденгайну (табл. 9) или азановым методом по Гейденгайну (табл. 10).

Трехцветный метод Массона хорошо выявляет коллаген, а также различные протоплазматические структуры.

¹ Даммаровый лак изготавливается из Даммара (также дамар или даммер), который получают из смолистых выделений деревьев Юго-Восточной и Восточной Азии. Смола выделяется из дерева в мягком вязком состоянии. Этот высоко ароматический продукт теряет свой аромат после высыхания смолы, при этом формируется прозрачный, ломкий, бледно-желтый слой. Даммара хорошо растворима в спирте. Раствор даммары в хлороформе или ксилоле используется, чтобы сохранять тонкие биологические срезы для микроскопической экспертизы. Даммаровый лак, используемый в гистологии, представляет собой жидкость соломенного цвета, которая с течением времени может приобрести янтарные оттенки.

Таблица 8. Окрашка трехцветным методом Массона

Батарея	Экспозиция	Примечание
Протрава (5%-ный раствор железоммонийных квасцов)	24 ч	Чтобы ускорить процесс, можно провести протраву в термостате при температуре 50 °С в течении 30 мин
Гематоксилин (по Массону)	10 мин	
Вода водопроводная	10 мин	Проточная
Дифференциация	1 – 5 мин	Одним из предложенных растворов
Дистиллированная вода	10 мин	
Смесь: кислый фуксин — 1 г, уксусная кислота — 1 см ³ , дистиллированная вода — 200 см ³	5 мин	
Дистиллированная вода		Ополоснуть
1%-ная фосфорно-молибденовая кислота	5 мин	
Насыщенный раствор анилинового синего в 2,5%-ной уксусной кислоте	2 мин	Капнуть на стекло
Дистиллированная вода		Ополоснуть
1%-ная уксусная кислота	5 мин	
Абсолютный спирт, подкисленный уксусной кислотой 1:1000	10 мин	
Ксилол-III	10 мин	
Ксилол-IV	10 мин	
Бальзам		

Приготовление гематоксилина по Массону. 1 г гематоксилина растворить в 80 см³ дистиллированной воды (немного нагревая), затем прибавить 10 см³ 96° спирта и 10 г глицерина. Гематоксилин должен «созреть» несколько дней.

Азановый метод по Гейденгайну используется для окрашивания соединительной ткани и яичников, а также для выявления различных типов железистых клеток в гипофизе.

Таблица 9. Окраска железным гематоксилином по Гейденгайну

Батарей	Экспозиция	Примечание
Протрава (3%-ные железо-аммонийные квасцы)	12 – 24 ч	Протравливание можно ускорить (1 – 2 ч), проводя его в термостате при температуре 45 – 50 °С
Дистиллированная вода		Ополоснуть
Гематоксилин (железный)	12 – 24 ч	Окрашивание можно ускорить, проводя его в термостате при температуре 45 – 50 °С
Дистиллированная вода		Ополоснуть
1%-ный раствор железоаммонийных квасцов		Дифференцировать под микроскопом
Проточная вода	15 – 60 мин	
96° этанол-I	5 мин	
96° этанол-II	5 мин	
100° этанол	5 мин	Абсолютный спирт следует менять через каждые 20 – 30 стекол
Ксилол-ацетон (2:1)	5 мин	
Ксилол-III	10 мин	
Ксилол-IV	10 мин	
<i>Бальзам</i>		

Результат: зерна хроматина, ядрышки, различные гранулы, центросомы и другие клеточные органеллы окрашиваются в черный цвет. Если надо особо выявить плазматические или волокнистые структуры, препарат можно докрасить (после промывки проточной водой) зозином (0,1%-ный р-р, 3 – 5 мин).

Таблица 10. Окраска азановым методом по Гейденгайну

Батарей	Экспозиция	Примечание
Азокармин	45 – 60 мин	В термостате, в плотно закрытой стеклянной посуде при температуре 50 – 60 °С, затем охладить в течении 10 мин
Дистиллированная вода		Ополоснуть
Спиртовой раствор анилина (1 см ³ анилинового масла на 1000 см ³ 90° спирта)		Капнуть на стекло, до четкого выявления ядер

Батарея	Экспозиция	Примечание
Уксусный спирт (1 см ³ ледяной уксусной кислоты на 100 см ³ 96° спирта)	0,5 – 1 мин	
5%-ная фосфорно-вольфрамовая кислота	1 – 3 ч	
Дистиллированная вода		Ополоснуть
Смесь: оранже-С, анилиновый синий, уксусная кислота	1 – 3 ч	
Водопроводная вода	3 – 5 мин	Проточная вода
90° этанол	10 мин	
100° этанол	10 мин	
<i>Бальзам</i>		

Для изучения соединительной ткани часто используется трехцветный метод Маллори (табл. 11).

Таблица 11. Трехцветный метод Маллори

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
0,1%-ный кислый фуксин	3	
Дистиллированная вода		Ополоснуть
1%-ная фосфорно-молибденовая кислота	3 – 5	
Дистиллированная вода		Ополоснуть
Смесь Маллори	2	
Дистиллированная вода		Ополоснуть
96° этанол		Дифференцировать под микроскопом
100° этанол	5	
Ксилол-III	5	
Ксилол-IV	5	
<i>Бальзам</i>		

Приготовление смеси Маллори. 0,5 г анилинового синего водорастворимого, 2 г оранже G и 2 г щавелевой кислоты растворить в 100 мл дистиллированной воды, нагреть до кипения. Охладить и профильтровать.

При исследовании гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС) для выявления клеток, вырабатывающих нейротропные гормоны, используются полихромные методики окрашивания, часто состоящие из комбинации нескольких методов окраски. Чтобы выявить нейросекреторные клетки гипоталамических ядер, а также для идентификации секреторных клеток гипофиза (гонадотропоциты, тиреотропоциты, соматотропоциты) применяют методику окраски паральдегид-фуксином (ПАФ) по Гомори-Габу с докраской азаном по Гейденгайну (табл. 12).

Таблица 12. Окраска паральдегид-фуксином (ПАФ) для выявления нейросекреторного материала по Гомори-Габу

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
Окисляющая смесь	1 – 2	
Бисульфит натрия или калия	1 – 2	До полного обесцвечивания срезов
Водопроводная вода	10	Проточная
ПАФ	1 – 10	Контролировать под микроскопом
Солянокислый спирт	1 – 5	Контролировать под микроскопом
Дистиллированная вода	5	

После этого производят докраску азаном по Гейденгайну (см. табл. 10). Можно докрашивать смесью Хелми (см. методика окраски по Хелми-Дыбану). Для этого после окраски ПАФ красят смесью Хелми в течение 1 мин, споласкивают в 0,2%-ном растворе уксусной кислоты, затем проводят через спирты и ксилол до заключения в канадский бальзам.

Для выявления гонадотропоцитов и соматотропоцитов в аденогипофизе, применяют окраску реактивом Шиффа с докраской оранжевым G (табл. 13).

Для выявления соматотропоцитов, тиреотропоцитов, гонадотропоцитов, а также эритрозинофильных клеток аденогипофиза используется окраска по Cleveland-Wolf (табл. 14).

Для выявления адренокортикотропоцитов используется методика окраски аденогипофиза свинцовым гематоксилином по McCon-pail (табл. 15). Для этой окраски рекомендуется фиксация в 4%-ном растворе формальдегида.

Таблица 13. Окраска реактивом Шиффа с докраской оранжевым G

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
Периодная кислота или периодат калия или натрия	10	
Проточная вода (водопроводная)	10	
Дистиллированная вода	1	
Реактив Шиффа	30—60	Контролировать под микроскопом
2%-ный раствор бисульфита натрия или калия		Быстро ополоснуть
Водопроводная вода	5—10	Под проточной водой, до покраснения срезов
Дистиллированная вода	5	
Оранжевый G	10	
Дистиллированная вода	1,5	
96° этанол-I	5	
96° этанол-II	5	
100° этанол	5	Абсолютный спирт следует менять каждые 20—30 стекол
Ксилол-ацетон (2:1)	5	
Ксилол-III	10	
Ксилол-IV	10	
Бальзам		

Приготовление азокармина. Существует два вида азокармина: **В** и **Г**.

Азокармин **В** легко растворяется в воде. Употребляется в 0,25—1 %-ном растворе, на 100 см³ которого прибавляют 1 см³ ледяной уксусной кислоты. Обычно рекомендуют более трудно растворимый азокармин **Г**: 0,1 %-ный водный раствор последнего вскипятить, затем охладить и отфильтровать через неплотный фильтр. Приготовленный раствор подкислить (1 см³ ледяной уксусной кислоты на 100 см³ раствора красителя).

Приготовление смеси анилинового синего — оранже G.

0,5 г анилинового синего и 2 г оранже **G** растворить в 100 см³ дистиллированной воды, прибавить 8 см³ ледяной уксусной кислоты, вскипятить и после охлаждения отфильтровать. Для окрашивания этот основной раствор разбавить 1—3-кратным количеством дистиллированной воды. Можно окрашивать в основном растворе в течение 10 мин.

Таблица 14. Окраска аденогипофиза по Cleveland-Wolf

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
1%-ный эритрозин	10 – 30	
Дистиллированная вода		Ополоснуть
Оранжевый G	15	
Дистиллированная вода	5	
Анилиновый синий	3 – 5	
Дистиллированная вода	5 – 10	
Спирт 96°	5	
Спирт 96°	5	
Спирт 100°	5	Абсолютный спирт следует менять каждые 20 – 30 стекол
Ксилол-ацетон (2:1)	5	
Ксилол-III	10	
Ксилол-IV	10	
<i>Бальзам</i>		

Таблица 15. Окраски аденогипофиза свинцовым гематоксилином по McConnail

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
Свинцовый гематоксин	1 – 5 ч	
Водопроводная вода	10 – 30 мин	Промывать проточной водой
Спирт 96°	5	
Спирт 96°	5	
Спирт 100°	5	Абсолютный спирт следует менять каждые 20 – 30 стекол
Ксилол-ацетон (2:1)	5	
Ксилол-III	10	
Ксилол-IV	10	
<i>Бальзам</i>		

Приготовление гематоксилина по Эрлиху. 2 г гематоксилина растворить в 100 см³ 96° спирта и добавить 100 см³ дистиллированной воды, 100 см³ химически чистого глицерина, 3 г калийных квасцов и 10 см³ уксусной кислоты. Краситель должен «созревать» примерно 14 дней. Прибавляя к раствору сильные окислители (йодноватокислый калий, перманганат или перекись водорода и т.п.), можно этот процесс значительно ускорить, т.е. должно произойти окисление гематоксилина в гематеин. Например, добавляя на этот объем 1–2 г перманганата калия, мы ускоряем процесс «созревания» на 4–6 дней (увеличивать дозу не желательно, т.к. дальнейшее окисление гематеина приводит к образованию бурых лаков, для окраски уже не пригодных). Готовый раствор необходимо профильтровать.

Приготовление железного гематоксилина по Гейденгайну. 0,5 г гематоксилина растворить в 10 мл 96° спирта, добавить 90 мл дистиллированной воды. Раствор должен созревать в течение месяца. Перед употреблением его необходимо развести 1:1 дистиллированной водой. Раствор сохраняет долгое время красящие свойства. Можно использовать свежеприготовленный раствор, при этом препарат окрашивается в голубовато-серые цвета. Чем старше раствор красителя, тем более черные тона он дает. Для более быстрого получения «созревшего» раствора гематоксилина необходимо 1 г гематоксилина растворить в 95 мл дистиллированной воды, после чего добавить 5 мл жидкой карболовой кислоты. Либо можно к 100 мл свежеприготовленного красителя добавить 1 каплю 2,5 %-ного раствора железоаммонийных квасцов. При появлении осадка жидкость следует профильтровать.

Приготовление протравы. Приготовить 3 %-ный водный раствор железоаммонийных квасцов. Пригодны только светло-фиолетовые кристаллы. Если кристаллы крошатся и приобрели желтовато-бурый цвет, для приготовления протравы они непригодны.

Приготовление эозина. Имеются различные марки эозина, некоторые растворяются только в спирте (желательно в 90°), другие — в воде. Обычно употребляют растворы от 0,1 до 1 %. Для лучшего окрашивания смешивается спиртовой и водный растворы 1:1. При дальнейшей обработке препарата, окрашенного спиртовым раствором эозина, краситель извлекается спиртом, а из препарата окрашенного в водном растворе эозина, краситель извлекается водой. Так как после эозина препарат промывается водой, а затем помещается в спирт, смешанный раствор эозина подходит лучше всего. Если препарат неокрашен эозином, следует дольше промывать водой.

Оранжевый Г. Употребляют для окраски препаратов в 0,5–1 %-ных водных растворах. При переокрашивании избыток красителя легко удалить, промывая препарат под струей воды.

Пикриновая кислота. Несколько капель концентрированного водного раствора пикриновой кислоты на 15–20 см³ дистиллированной воды. Окрашивает протоплазму в нежный желтый цвет и употребляется в слабых водных растворах.

Приготовление 100° этанола (абсолютный спирт). Приготавливается из 96° спирта действием безводного медного купороса, который высушивается в сушильном шкафу. Прокаленный медный купорос должен иметь вид бледно-голубого порошка. Готовый купорос всыпать в бутылку с притертой крышкой примерно на четверть ее объема и залить 96° спиртом. Безводный медный купорос следует менять 2–3 раза через день. Рекомендуются хранить абсолютный спирт в бутылки, на дно которой насыпан слой безводного медного купороса. Таким же образом можно приготовить абсолютный спирт при помощи пищевого желатина, который дешевле и менее вреден. Перед заливкой спиртом желатин необходимо просушить в сушильном шкафу. Для равномерного просушивания желатин несколько раз перемешивается. Важно не пересушить, иначе он начинает слипаться.

Приготовление паральдегид-фуксина (ПАФ). Растворить 1 г основного фуксина в 200 мл кипящей воды, кипятить 1 мин, остудить и профильтровать. При комнатной температуре добавить 2 мл концентрированной HCl и 2 мл паральдегида, раствор оставить созревать. Следить за степенью созревания капиллярным методом на фильтровальной бумаге — капнуть каплю раствора на фильтровальную бумагу, при этом кроме одного контура капли появляется второй окрашенный ободок. Когда в ободке исчезнет красный оттенок фуксина (обычно на 4–5-й день), профильтровать раствор. Высушить фильтр с осадком (можно в термостате при 36° C), фильтрат при изготовлении красителя не используется. Из полученного осадка приготавливается основной раствор: 250 г сухого осадка растворить в 25 мл 70° спирта и добавить 0,3 мл ледяной уксусной кислоты. Основной раствор хранить в склянке с притертой пробкой в холодильнике. Для приготовления рабочего раствора к 25 мл основного раствора добавляют 75 мл 70° спирта и подкисляют его 1 мл ледяной уксусной кислоты.

Приготовление окисляющей смеси. Окисляющая смесь и бисульфит натрия (или калия) необходимы для обесцвечивания срезов образцов, зафиксированных в смеси Буэна. Для приготовления смеси к 10 мл 2,5 %-ного р-ра KMnO_4 добавляют 10 мл 5 %-ного H_2SO_4 и 60 мл дистиллированной воды. Смесь готовить перед употреблением каждый раз заново.

Приготовление солянокислого спирта. К 100 мл 100° спирта прибавить 0,5 мл концентрированной соляной кислоты.

Приготовление периодной кислоты. Периодная кислота применяется для окисления перед окраской реактивом Шиффа. Готовится периодная кислота разными способами: а) 0,5–0,8 % -ный р-р периодной кислоты ($\text{HJO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); б) 1 % -ный р-р $\text{KJO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (или $\text{NaJO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в 1н р-ре H_2SO_4 ; в) 1 г $\text{KJO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 0,5 мл 70 % -ного р-ра HNO_3 и добавляют 100 мл воды; г) 400 мг $\text{KJO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 45 мл воды и добавляют 10 мл 0,2М уксусной кислоты.

Приготовление реактива Шиффа. (см. разд. 3. Гистохимические методы исследования. Гистохимия нуклеопротеидов).

Приготовление оранжевого G. После окраски реактивом Шиффа препарат докрашивают 1–2 % -ным раствором оранжевого G в 2 % -ном р-ре фосфорно-молибденовой кислоты.

Приготовление красящих растворов для окраски по Cleveland-Wolf:

1. 2 % -ный р-р оранжевого G в 1 % -ном р-ре фосфорно-молибденовой кислоты.

2. Приготовление анилинового синего: 1 г водорастворимого анилинового синего растворить в 100 мл дистиллированной воды и добавить 1 мл ледяной уксусной кислоты.

Приготовление свинцового гематоксилина. 2 г гематоксилина растворить в 10 мл 96° спирта. Смешать со 100 мл стабилизированного раствора свинца, добавить 100 мл водопроводной воды. Смесь фильтруют и используют через полчаса. Так как раствор неустойчив, рекомендуется приготавливать количество, необходимое в данный момент для окраски.

Для стабилизированного раствора свинца приготовить 5 % -ный р-р азотнокислого свинца на водопроводной воде. Добавить равный объем насыщенного раствора уксуснокислого аммония, приготовленный на водопроводной воде (достаточно растворить примерно 100 г в 100 мл воды). Профильтровать, добавить 2 мл 40 % -ного формалина из расчета на каждые 100 мл отфильтрованного раствора. Стабилизированный раствор свинца может храниться долго.

Приготовление смеси Хелми. В 100 мл дистиллированной воды растворить 0,25 г светового зеленого; 1 г оранжевого G; 0,5 г хромотропа 2Р; 0,5 г фосфорно-молибденовой кислоты и добавить 1 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор можно хранить длительное время.

На рис. 5–8 приведены примеры окрашивания различными красителями и смесями препаратов гонад разных видов рыб. На рис. 9 — окраска аденогипофиза пестрой зубатки. На рис. 10 — микросрезы печени пиленгаса, стерляди и кеты. На рис. 11 — примеры фотографий срезов, сделанные при использовании зеленого светофильтра.

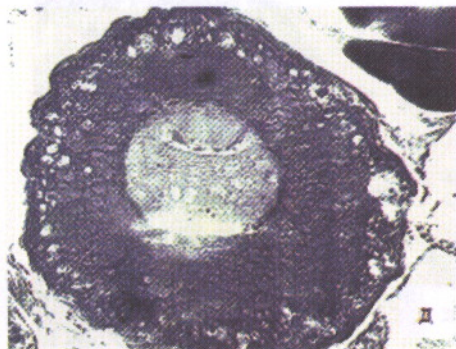
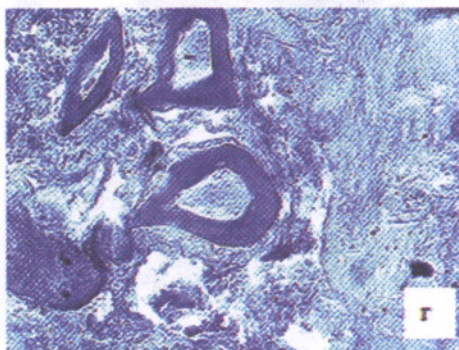
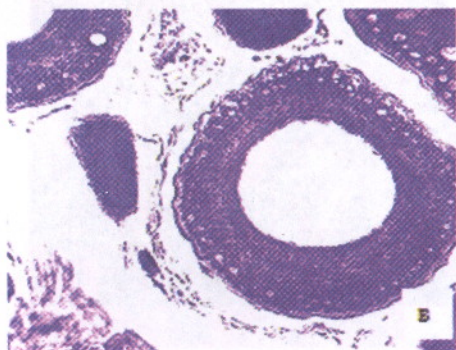
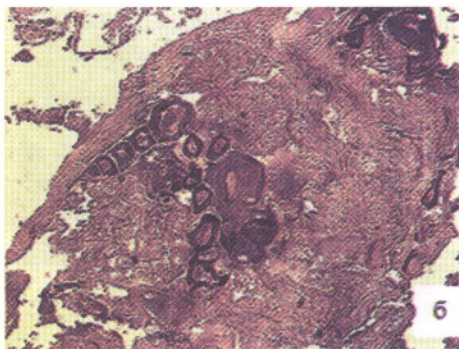
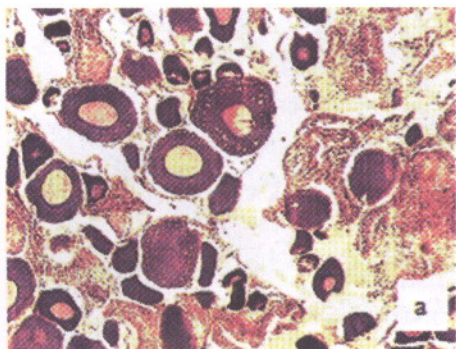


Рис. 5. Окраска гонад самок гижигинско-камчатской сельди (*Clupea pallasii*):
 а, г — норма, гематоксилин-эозин; б, е — аномальные самки, гематоксилин-эозин;
 в — норма, гематоксиллин; г — аномальные самки, гематоксиллин.
 Ув.: а, б — ок.10 х об.10; в-е — ок.10 х об.40

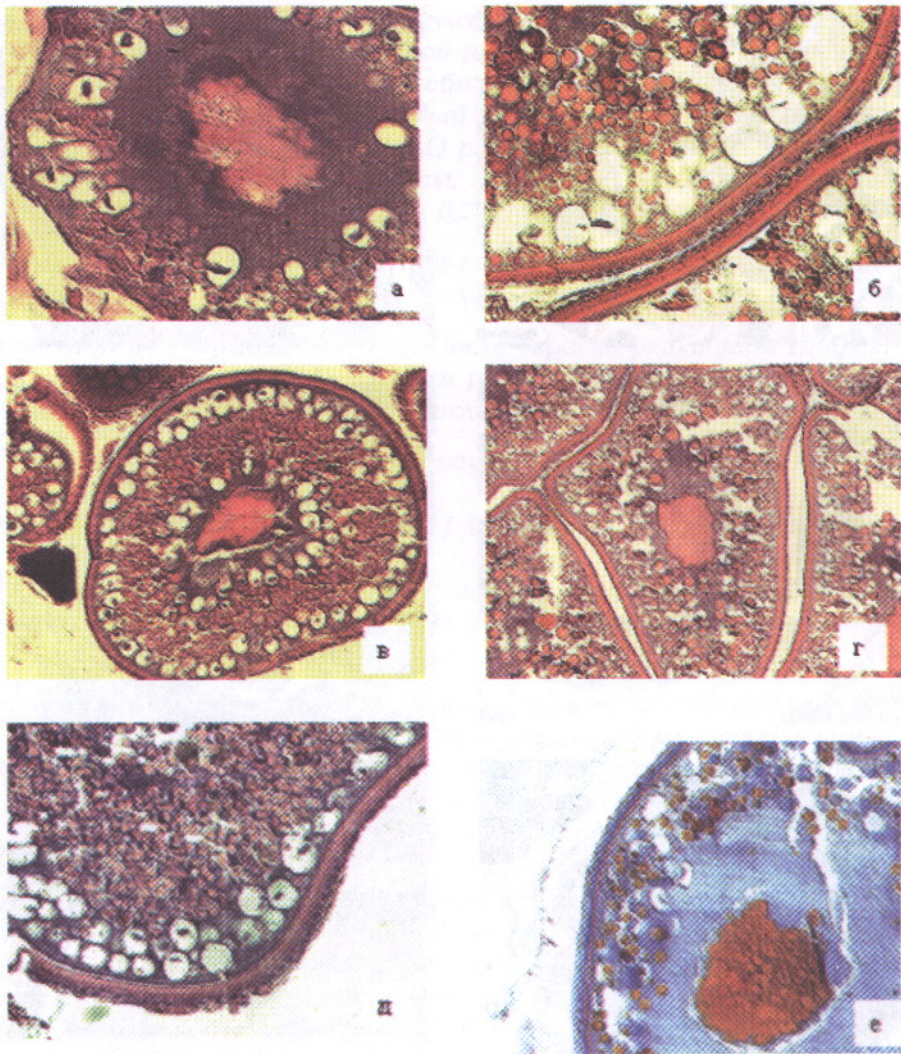


Рис. 6. Яичники сельди оз. Большой Вилюй: *а-г* — гематоксилин-эозин; *г* — гематоксилин-оранж G; *е* — азан по Гейденгайну.
Ув.: *а, б, г, е* — ок.10 х об.40; *в, г* — ок.10 х об.20

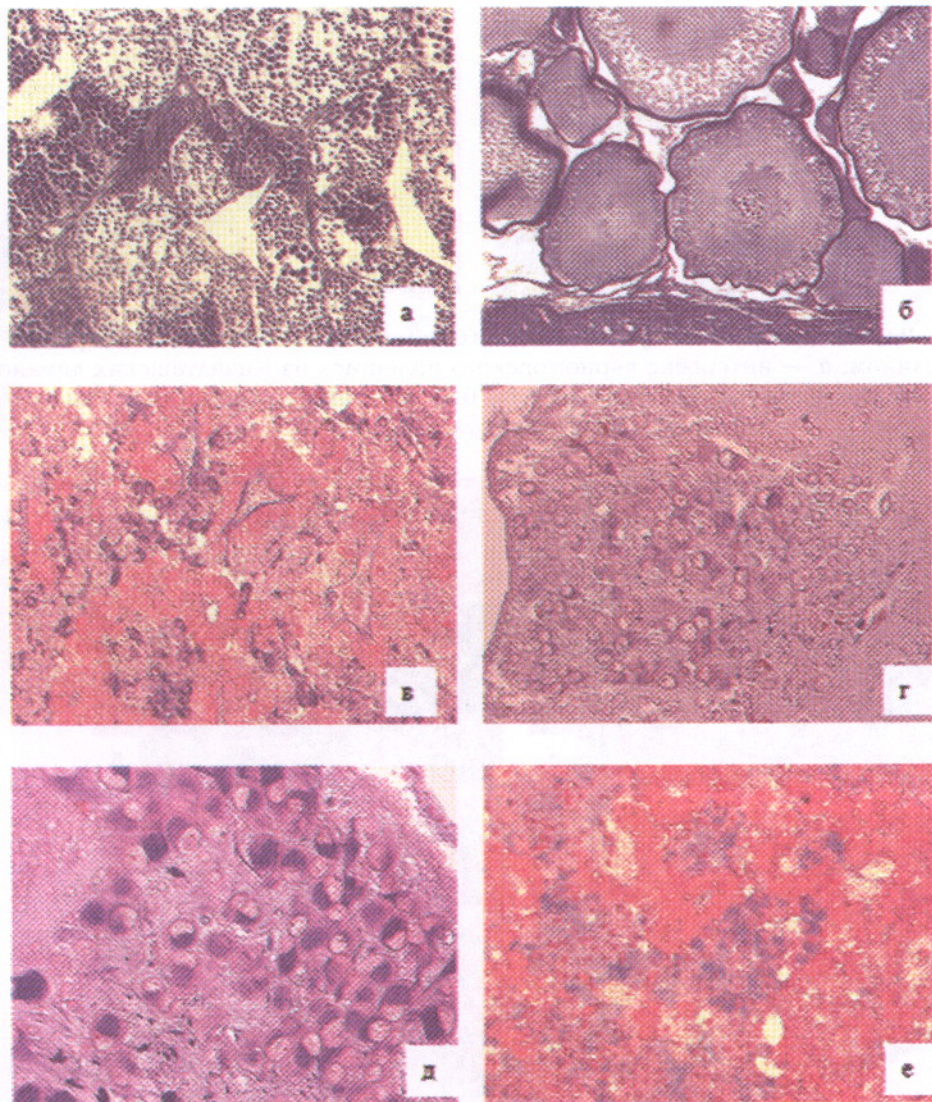


Рис. 7. Окраска железным гематоксилином по Гейденгайну:
 а — семенник минтая (*Theragra chalcogramma*). Ув.: ок.10 х об.40;
 б — яичник пестрой зубатки (*Anarchichas minor*). Ув.: ок.10 х об.20
 Окраска паральдегид-фуксином с докраской азаном по Гейденгайну:
 в, г — нейросекреторные клетки преоптического ядра пестрой зубатки;
 д, е — аденогипофиз пестрой зубатки. Ув.: ок.10 х об.40

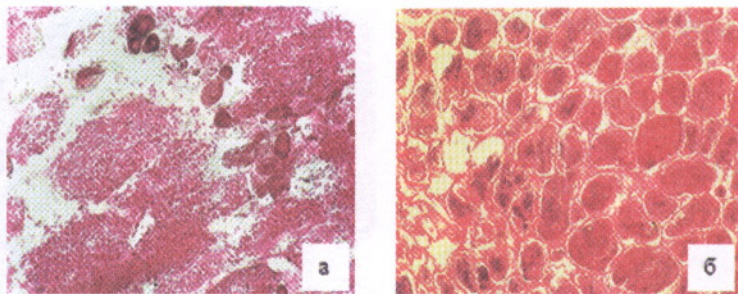


Рис. 8. Поперечные срезы гонад пиленгаса (*Liza haematocheila*), окраска эозином: *а* — интерсекс черноморского пиленгаса из Кизилташских лиманов IV стадии зрелости. Ув.: ок.10 х об.10; *б* — семенник черноморского пиленгаса из Крымского побережья. Ув.: ок.10 х об.40

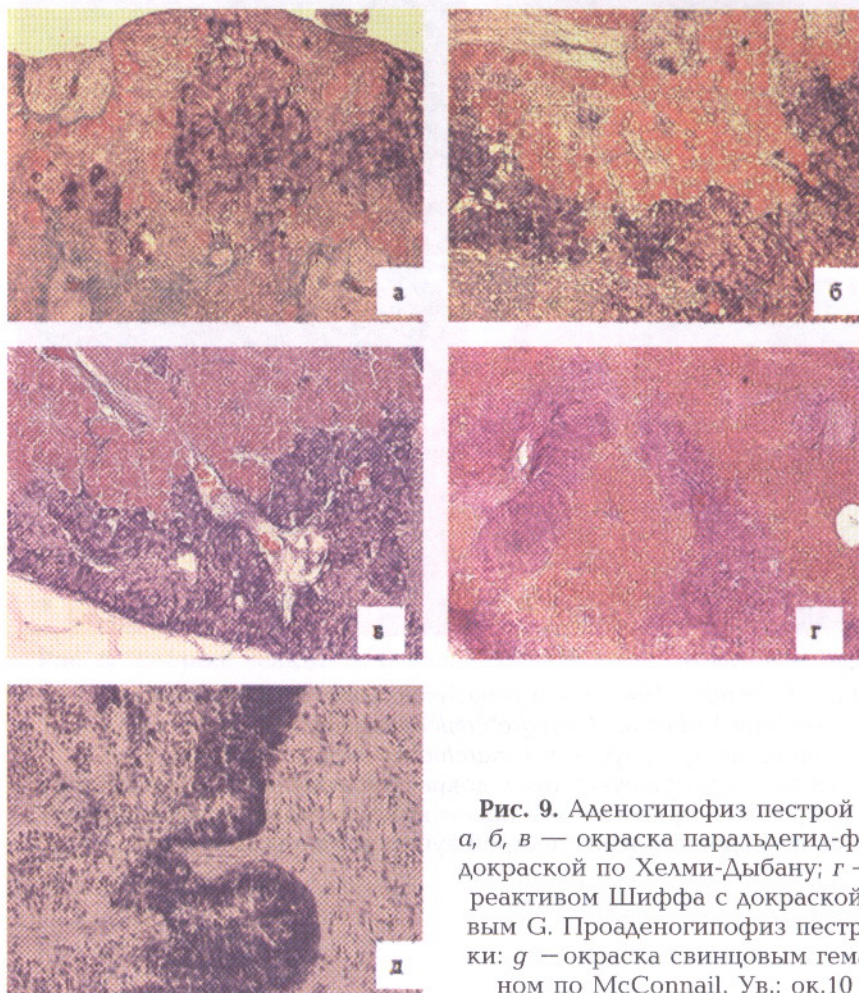


Рис. 9. Аденогипофиз пестрой зубатки: *а, б, в* — окраска паральдегид-фуксином с докраской по Хелми-Дыбану; *г* — окраска реактивом Шиффа с докраской оранжевым G. Проаденогипофиз пестрой зубатки: *д* — окраска свинцовым гематоксилином по McConnail. Ув.: ок.10 х об.40

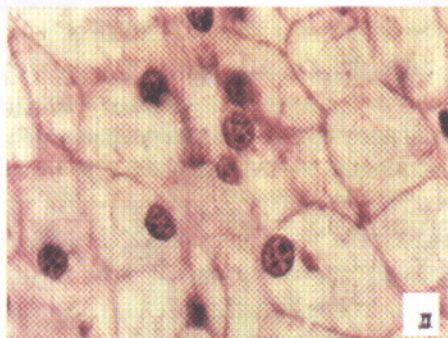
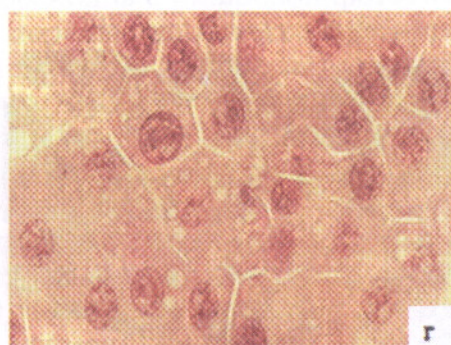
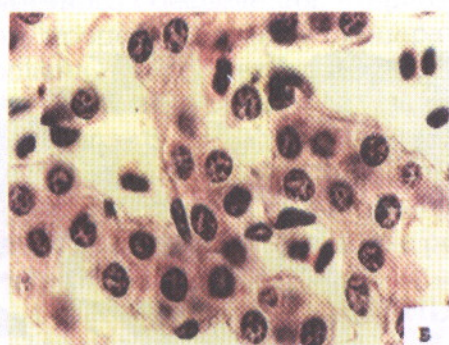
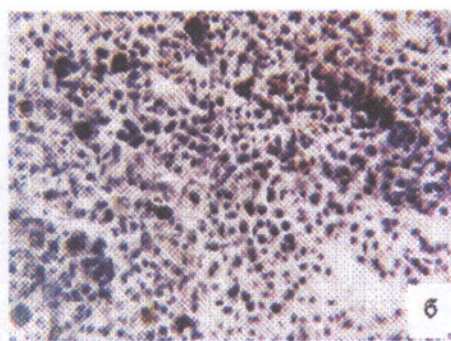
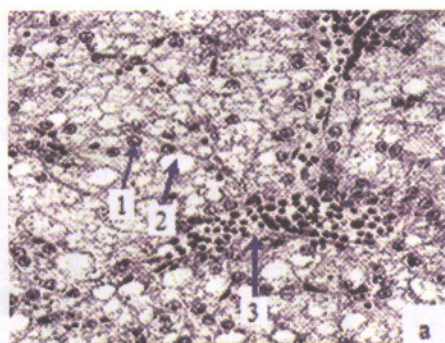


Рис. 10. Поперечные срезы печени: *а* — стерлядь (*Acipenser ruthenus*):
 1 — нормальный гепатоцит, 2 — жировая вакуоль, замещающая гепатоцит,
 3 — кровеносный сосуд, окраска гематоксилин-эозином. Ув.: ок.10 х об.40;
б — здоровая печень черноморского пиленгаса, окраска гематоксилин-
 эозином. Ув.: ок.10 х об.100; *в* — здоровая печень кеты (*Oncorhynchus keta*).
 Ув.: ок.10 х об.25; *г* — мелкокапельная жировая дистрофия печени кеты;
д — крупно-капельная жировая дистрофия печени кеты.
 Ув.: ок.10 х об.40

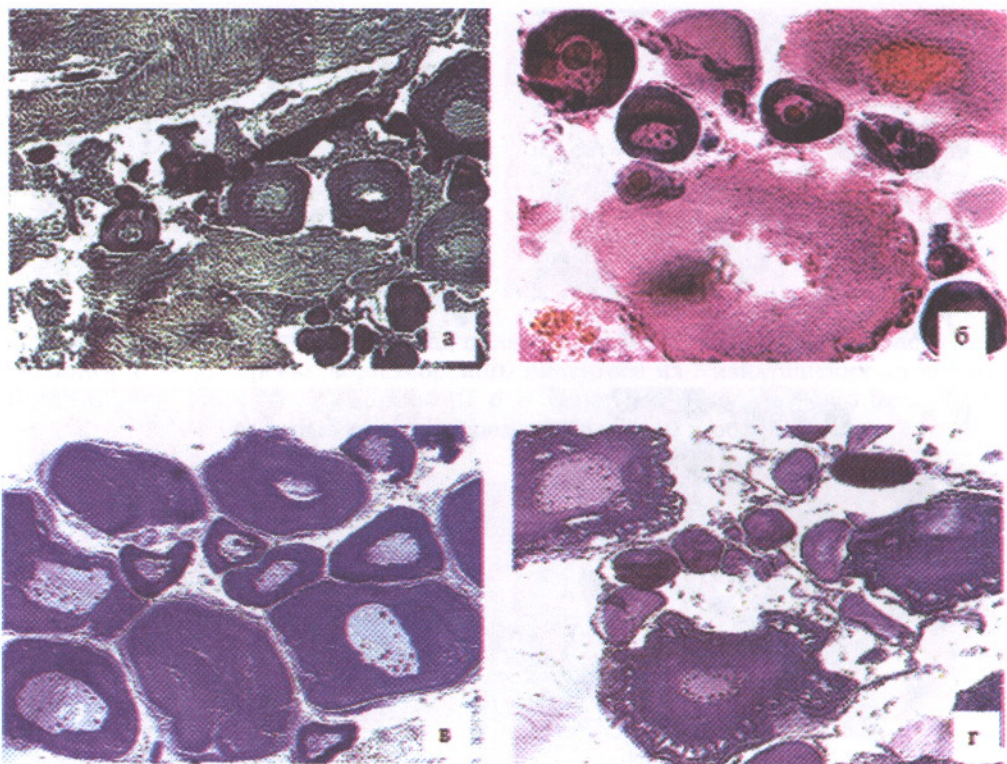


Рис. 11. Окраска гонад самок разных видов рыб с использованием зеленого светофильтра: *а* — аномальные участки с соединительно-тканными элементами в гонаде азовского пиленгаса, гематоксилин-эозин; *б* — гигантские ядрышки в яичнике пиленгаса из Кизилташских лиманов Черного моря, эозин; *в* — беринговоморский минтай, гематоксилин; *г* — беринговоморский минтай, гематоксилин-эозин. Ув.: ок.10 х об.40

Цитоморфометрический анализ и фотографирование готовых препаратов

Приготовленные гистологические препараты являются основным материалом для различного рода исследований, среди которых немаловажную роль играет цитоморфометрический анализ.

До появления современной техники для измерений микрообъектов использовали насадку на микроскоп с окуляр-микрометром, цена деления которого определяется по калибровочной шкале. При этом размер измеряемого объекта на срезе (мкм) определяется по формуле:

$$D = \frac{10 \cdot (II - I)}{\beta},$$

где D — размер объекта; β — линейное увеличение микроскопа;

$$\beta = \frac{чг(ОМ)}{0,01 \cdot чг(КШ)},$$

где $чг$ — число делений; $ОМ$ — окуляр-микрометр; $КШ$ — калибровочная шкала для Olympus.

С появлением световых микроскопов нового поколения с превосходной оптикой, управляемых компьютером с помощью программного обеспечения, стереомикроскопов с цифровой фотокамерой, процесс изучения препаратов перешел на качественно новый уровень. Микрофотографии с гистологических срезов делаются с помощью микроскопа с автоматической видеокамерой Leica DMLS или Olympus CH-2. Программа фотографирования микропрепаратов DC Viewer, соединена с программой редактирования изображений Photoshop 7 (в последние годы появились новые модифицированные версии программы редактирования — Photoshop 8 и др. версии).

В настоящее время во ВНИРО имеется компьютерный аналитический комплекс (см. разд. 7. Современные приборы в гистологии), в состав которого входят:

- микроскоп LEICA DMLS с окуляром (увеличением $\times 10$) и объективами, увеличивающими в $\times 5$; $\times 10$; $\times 20$; $\times 40$; $\times 100$ раз;
- цифровая видеокамера;
- персональный компьютер последнего поколения;
- программа получения цифровых фотографий;
- программа обработки цифрового изображения OPTIMAS 6.0.

Программа OPTIMAS представляет собой мощный инструмент для получения, обработки и анализа изображений. Для фотографирования микропрепаратов используют программу DC Viewer, соединенную с программой редактирования изображений Photoshop 7 или разных версий.

Система OPTIMAS работает на Windows NT 4.0, Windows 95, Windows 98 или более поздних версий. Она действует оптимально на компьютерах, основанных на Pentium или лучших моделях.

Графический интерфейс Windows обеспечивает широкое разнообразие инструментов и команд меню, при помощи которых можно:

- выводить изображения, полученные непосредственно с микроскопа, а также изображения, сохраненные на диске в любом графическом формате (из множества доступных);

- выводить несколько изображений одновременно в отдельных графических окнах;
- получать последовательность изображений и анализировать изображения в сравнении с другими;
- улучшать изображения, вручную или с помощью фильтров и других автоматических методов, чтобы подчеркивать определенные свойства и исправлять недостатки, такие как помехи.

Эта программа позволяет проводить математический, статистический и оптический анализ объектов. В нашей практике используются функции измерения диаметров ооцитов, ядра и ядрышек, подсчет числа клеток в поле зрения, измерение площади объектов и другое.

Хранение готовых препаратов

При хранении готовые препараты должны быть защищены от света и пыли. До недавнего времени использовались обычные коробки с зубчатыми деревянными рейками. В настоящее время для хранения используются специальные шкафы, где легко и быстро можно отыскать нужный препарат для повторного просмотра (см. разд. 6. Современные приборы в гистологии).

2.

Особенности изготовления серийных гистологических препаратов

Световая микроскопия не всегда позволяет получить полное и правильное представление о структуре объектов исследования, т.к. заключение об этом осуществляют на основе изучения лишь части объекта (среза толщиной несколько микрометров).

Для более полного представления об особенностях трехмерного строения объекта рекомендуем использовать серийные срезы. Это весьма трудоемкий метод, требующий тщательности и наработанного временем навыка. Методика приготовления серийных срезов объектов, залитых в парафин, в последнее время претерпела модификации в связи с использованием иных заливочных сред [Туркевич, 1967].

Качественно новым материалом, лучше сохраняющим структуру тканей и клеток, стала гисторезина (гистовакса, гистопласт). Применение этого материала позволяет использовать технологически более усовершенствованный и ускоренный метод. Общая длительность гистологической обработки составляет 4 дня. При этом традиционно наиболее трудоемкая часть — окраска срезов — укоряется до 30 с на 1 стекло, а время всего процесса растянуто только из-за длительности проводки. Данная методика позволяет увеличить количество обрабатываемого материала при оптимизации качества прокрашивания клеточных структур и снижении затраченных усилий. Современные реактивы и техника позволяют изготавливать более тонкие серийные срезы, чем при ранней парафиновой методике (от 1 мкм). Заливочная среда быстро затвердевает, а готовые препараты устойчивы к выцветанию.

В России в течение ряда лет гисторезина успешно применяется в медицинских лабораториях, но в практике ихтиологии пока еще не использовалась. Опыт зарубежных исследователей в этой области подтверждает широкие возможности его применения в

ихтиологии. В частности, сотрудники ВНИРО освоили этот метод в гистологической лаборатории Бергенского института морских исследований в Норвегии (рис. 12).



Рис. 12. Лаборатория гистологии в Бергенском институте морских исследований (БИМИ), Норвегия. А — вытяжной шкаф. Б — рабочее место гистолога: микротом, столик для расправления гистологических срезов

Метод используют для учета резорбирующихся клеток путем прямого визуального подсчета числа нормальных и резорбирующихся ооцитов. Он не вполне точен, т.к. основан на субъективных оценках. Для этой цели обычно используют также необычайно трудоемкий способ — визуальный подсчет количества атретических клеток на серийных гистологических срезах.

Гистологический метод «развертки изображения» впервые был применен в отделе морфологии человека Королевского медицинского центра Ноттингемского университета (Англия) для стерео нейрогистологического анализа [Mayhew, 1991].

Этот метод позволяет оценить динамику и относительную интенсивность атрезии вителлогенных ооцитов ранних стадий. Он был использован на атлантическо-скандинавской весенне-нерестующей сельди *Clupea harengus*, треске *Gadus morhua* [Kjesbu et al, 1998], камбале *Solea solea* [Witthames, Greer Walker, 1995], анчоусе *Engraulis mordax* [Hunter, Macesewicz, 1985]. Эти работы обуслов-

лены тем, что в последние годы появилась проблема подсчета плодовитости из-за резорбции ооцитов при вителлогенезе. Результаты получают при использовании стереологического метода «развертки изображения», который оценивает относительную интенсивность ранних стадий резорбции вителлогенных ооцитов. При его использовании для определения потенциальной плодовитости особую трудность представляет выявление характерных особенностей ранних атретических ооцитов по сравнению с нормальными ооцитами. По принятой в БИМИ шкале [Hunter, Macsewicz, 1985] атретические ооциты условно разделяются на 4 прогрессирующие стадии резорбции: α , β , γ и δ . Процесс резорбции начинает выявляться с мельчайших разрывов в наружной яйцевой оболочке — хорионе.

На ранней α -стадии длина разрывов хориона небольшая, и фолликулярные клетки вокруг яйцевой оболочки начинают проникать в цитоплазму ооцита. На поздней α -стадии атрезии длина разрывов в хорионе вдвое превышает его ширину, число желтковых гранул уменьшается, а к концу стадии хорион полностью резорбируется. На β -стадии атрезии у ооцита полностью отсутствуют и хорион, и желточные гранулы, γ и δ — прогрессирующие стадии резорбции. Для удобства классификации и стандартизации подсчитывают только атретические ооциты первой части α -стадии [Witthames, Walker, 1995].

Методика подсчета показателя интенсивности атрезии на микросрезах сельди по методу «развертки изображения»

1. На предметное стекло кладут только один срез. Шаговое расстояние между срезами должно составлять $1/3$ от диаметра наименьших вителлогенных ооцитов в каждой пробе яичника (в зависимости от вида рыб оно меняется). Так, если диаметр ооцитов сельди равен 320 мкм, то для подсчета берется каждый 80-й срез, а для одной пробы всего используется 11 срезов яичника (табл. 15).

2. Изображения готовых серийных срезов печатают попеременно сначала на листе белой бумаги, затем на прозрачной пленке.

3. Атретические клетки — это новые, более мелкие ооциты, появляющиеся и на бумажном отпечатке, и на следующем за ним прозрачном отпечатке. Чтобы их найти, накладывают прозрачный лист на бумажный отпечаток и сверяют все клетки на двух срезах.

4. Все повторяющиеся клетки помечают галочками. Вновь появившиеся клетки отмечают и проверяют структуру под микроскопом, действительно ли у них присутствуют признаки резорбции.

5. Резорбирующиеся клетки обводят как на бумаге, так и на пленке, накладывая ее на лист бумаги. Ранние атретические клетки помечают как EA (от англ. early atretic).

Количество вителлогенных и α -атретических ооцитов подсчитывают на не перекрывающихся зонах микрофотографий гистологических срезов с фиксированным увеличением. Общее число подсчитываемых ооцитов в поле зрения должно превышать 150 на каждом срезе. Необходимое увеличение варьирует вместе с размерами среза яичника так, чтобы весь срез попал в поле зрения.

На микросрезе яичника атлантическо-скандинавской весенне-нерестующей сельди, использованном для подсчета атретических ооцитов, делают специальные обозначения (рис. 13). Следовательно, всего на фотографии среза видно 9 новых клеток, из них 5 атретических клеток на поздней α -стадии и 1 ооцит на ранней α -стадии атрезии.

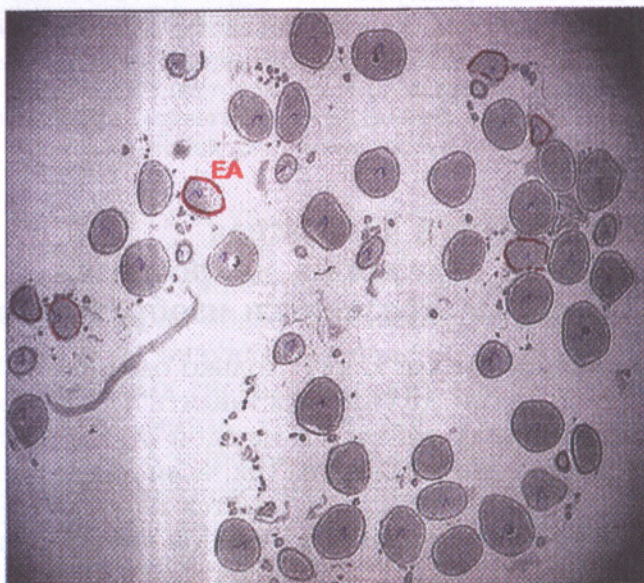


Рис. 13. Яичник атлантическо-скандинавской весенне-нерестующей сельди в преднерестовом состоянии. Подсчет атретических ооцитов. Галочками помечены клетки, повторяющиеся на двух серийных срезах. EA — ранняя α -стадия атрезии ооцита. Красным контуром обведены атретические клетки на поздней α -стадии

После выявления резорбирующихся ооцитов α -стадии их подсчитывают. Пример рабочего протокола, который используют для расчета частоты атрезии, приведен в табл. 16.

Таблица 16. Протокол подсчета частоты атрезии у атлантическо-скандинавской весенне-нерестующей сельди

Номер рыбы	Дата вылова	Номер стекла	Толщина среза, мкм	Номер среза	Кол-во атретических клеток		Общее кол-во новых клеток
					ранней α-стадии	поздней α-стадии	
61	17/02	1	4	1	1	6	7
		2	4	80	1	7	8
		3	4	160	1	4	5
		4	4	240	1	1	3
		5	4	320	1	1	3
		6	4	400	1	2	3
		7	4	480	1	1	2
		8	4	560	1	1	2
		9	4	640	1	3	4
		10	4	720	1	5	9
		11	4	800	2	2	4
Сумма						30	44

Относительная интенсивность атрезии (A) определяется как процентное отношение атретических вителлогенных ооцитов к сумме нормальных и атретических ооцитов, подсчитанных на гистологических срезах по следующей формуле:

$$A = \frac{N1}{N + N1} \cdot 100\%,$$

где A — относительная интенсивность атрезии; N — число нормальных ооцитов; $N1$ — число атретических ооцитов.

Частота атрезии (n) определяется как процентное отношение числа самок с резорбированными ооцитами в яичнике к общему числу самок:

$$n = \frac{Na}{N} \cdot 100\%,$$

где n — частота атрезии; Na — число самок с атрезией ооцитов в яичниках; N — общее число самок.

Проводка с гисторезиной

Весь процесс проводки и окраски препаратов проводить строго под вытяжным шкафом.

Для данной методики используются специальные реактивы: гисторезина фирм LEICA и Kulzer (Германия); этанол с добавлением 2%-ного 4-метил-2-пентанола; препарат для приклеивания покровных стекол Mountex (Швеция), состоящий из смеси 60%-ного ксилен, акрила и полиэтилметакрила. Гистологические пробы фиксируют в 3,6%-ном фосфат-буферном растворе формальдегида. Однако также можно использовать подобные реактивы отечественного производства.

Гисторезина, или гистовакса, или гистопласт (Tehnovit 7100) — это смесь высокоочищенного парафина и полимерных добавок с температурой плавления 56 — 58 °С. Готовая смесь называется базовая активированная резина (далее БАР).

Пластиковые баночки с пробями на этапе проводки устанавливаются рядами между резиновыми держателями на столике-мешалке для оптимального перемешивания и пропитывания проб растворами. Проводка с гисторезиной представлена в табл. 17.

Таблица 17. Проводка с гисторезиной

Номер шага	Процесс	Батарея	Экспозиция, ч	Примечания
1	Дегидратация	70° этанол	На ночь	737 мл спирта на 1000 мл воды
2		90° этанол	1	947 мл спирта на 1000 мл воды
3		90° этанол	1	
4		96° этанол	1	
5	Фильтрация	БАР + 95° этанол (1:1)	2	(X2)
6		БАР	24	(X1)
7		БАР	24	

Приготовление базовой активированной резины (БАР). 1 г активатора высыпать в 100 мл базовой гисторезины и перемешать в течение 5 мин на магнитной мешалке. Смесь X1 использовать в 6 и 7 шаге (каждый раз пробы заливать свежей неиспользованной смесью). Смесь X2 использовать в шаге 5, затем слить, отфильтровать

через фильтровальную бумагу и оставить в вытяжном шкафу на ночь для испарения этанола. После этого она вновь готова к повторному использованию в следующей серии проводки. Используется только 2 раза.

Полимеризация

Приготовление полимеризующей смеси. Гисторезина и готовый отвердитель смешать в соотношении 15:1 и залить в пластиковые кассеты.

В кассеты с готовой полимеризующей смесью поместить кусочки тканей и затем формы охлаждать на плитке с температурой $+4^{\circ}\text{C}$ до следующего дня (плитку необходимо включить заранее для достижения нужной температуры).

Закрепление блоков на деревянных брусочках и приготовление серийных срезов

На застывший гисторезиновый блок, находящийся в пластиковой кассете, пипеткой нанести склеивающую смесь и немедленно приложить деревянный кубик. Через 15 мин гисторезиновые блоки освободить от кассет. Деревянные кубики с приклеенными блоками заложить в эксикатор, который на 70% заполнен глицерином (для достижения относительной влажности 50—55%).

Приготовление склеивающей смеси. В пластиковой чашке быстро перемешать небольшое количество закрепляющей смеси (жидкости Tehnovit 3040 и желтого порошка Tehnovit 3040) до сметанообразной консистенции. Смесь застывает за 1 мин, поэтому приготавливается каждый раз новая в необходимом объеме.

Срезы толщиной 4 мкм, полученные с помощью микротомы, пинцетом или кисточкой опустить «плавать» в широкую чашку с дистиллированной водой, в которую добавлено 2—3 капли хлористого аммония. После расправления на поверхности воды, срез разместить на покровном стекле и подсушить на горячей плитке при 105°C в течение 1—2 мин. В отличие от парафиновых срезов, для закрепления которых необходимо смазать стекло жидким белком (см. выше), гисторезиновые срезы легко и быстро закрепляются при расплавлении пластика на горячей плитке.

Окраска и заключение препаратов

На влажное стекло с расплавленным срезом пипеткой нанести готовый краситель — толуидиновый голубой, и сразу промыть под струей горячей водопроводной воды. Окрашенный препарат подсушить на нагревательном столике при температуре 60 °С.

На рис. 14 приведены микрофотографии срезов яичников атлантической трески, атлантичеко-скандинавской весенне-нерестующей сельди и семенника атлантичеко-скандинавской сельди, окрашенных толуидиновым голубым.

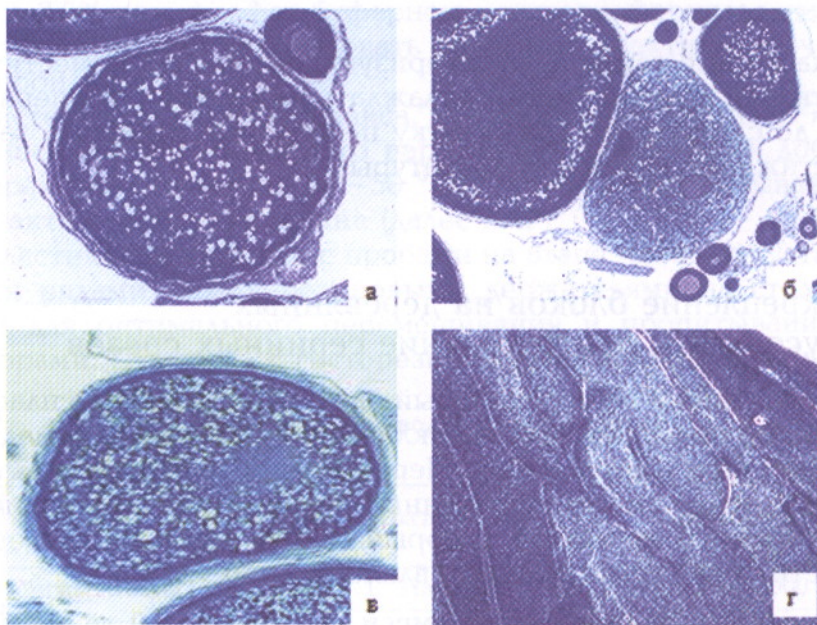


Рис. 14. Срезы гонад, полученных с использованием гисторезины. Окраска толуидиновым голубым: а, б — яичники атлантической трески (*Gadus morhua*). Ув.: об.10 х ок.40; в — яичник атлантичеко-скандинавской весенне-нерестующей сельди (*Clupea harengus*). Ув.: ок.10 х об.40; г — семенник атлантичеко-скандинавской сельди. Ув.: ок.10 х об.20

Приготовление красителя толуидинового голубого. К 1 %-ному раствору тетрабората соды добавить концентрированный краситель толуидинового голубого до получения 2 %-ного раствора, который затем необходимо отфильтровать.

Закрепление покровного стекла на срезе. На срез нанести 1—2 капли геля Mountex и быстро накрыть покровным стеклом. Для равномерного расплавления геля по всему срезу сверху положить груз и оставить его на ночь.

3.

Гистохимические методы исследования

Использование гистохимических методов дает возможность выявить локализацию различных химических веществ в клетке. Являясь пограничной областью между биохимией и гистологией, гистохимия значительно расширяет возможности последней, позволяя с определенной степенью точности охарактеризовать химический состав клеточных структур и его изменения в связи с процессами дифференцировки клеток в ходе онтогенеза организма или различными нарушениями развития, связанными с влиянием экологических факторов среды на естественные популяции рыб или при их искусственном выращивании. Наибольший прогресс это направление исследований получило во второй половине прошлого столетия.

В настоящем разделе рассматриваются относительно простые гистохимические методики, описанные ранее в хорошо известных руководствах [Пирс, 1962; Роскин, Левинсон, 1957; Кисели, 1962; Малый практикум по цитологии, 1977; Луппа, 1980]. При проведении исследований на рыбах многие из них хорошо опробованы, модифицированы нами и неоднократно использовались научными сотрудниками кафедры ихтиологии и гидробиологии, цитологии и гистологии, лаборатории ихтиологии Биологического института Санкт-Петербургского университета, лаборатории морфологии клетки Института цитологии РАН и других научных и учебных учреждений.

Гистохимия нуклеопротеидов

Способы фиксации

Наилучшими фиксаторами для выявления нуклеопротеидов являются жидкости Карнуа (96–100° спирт — 6 частей, хлоро-

форм — 3 части, легяная уккусная кислота — 1 часть) и Серра (формалин — 6 частей, хлороформ — 3 части, легяная уккусная кислота — 1 часть). Хорошие результаты наблюдаются при фиксации кусочков ткани охлажденным раствором, имеющим температуру 4 °С. Время фиксации — 1 ч. Далее кусочки ткани переложить в абсолютный спирт и через хлороформ-парафин заключить в парафин по стандартной методике или переложить в 70° спирт, если необходимо длительное сохранение материала, либо в случае трудно режущихся объектов, после абсолютного спирта переложить кусочки в целлоидин-касторовое масло. Следует отметить, что после фиксации в жидкостях Карнуа и Серра наилучшим образом происходит обработка яичников рыб IV и V стадии зрелости, резка которых на микротоме обычно доставляет большие трудности.

Окраска срезов

Для окраски на нуклеопротеиды можно рекомендовать: реакцию Фёльгена, окраску метиловым зеленым-пиронином по Унна, смесь галлоцианин-хромовые квасцы.

Реакция Фёльгена. Указанная реакция является специфичной для выявления ДНК. При особой подготовке материала можно проводить фотометрирование. Срезы депарафинируют и через ряд спиртов убывающей концентрации доводят до воды. Затем окрашивают по следующей схеме, приведенной в табл. 18.

Приготовление реактива Шиффа (для реакции Фёльгена):

- 1) налить в колбу 200 см³ воды и довести до кипения;
- 2) колбу с огня снять и засыпать 1 г основного фуксина для приготовления фуксинсернистой кислоты;
- 3) затем смесь прокипятить 5 мин, держа колбу над плиткой;
- 4) отфильтровать в сухую банку с притертой пробкой и остудить до 50 °С;
- 5) к приготовленному раствору добавить 20 см³ 1н соляной кислоты и остудить до 25 °С;
- 6) добавить 1 г сухого метабисульфита натрия или калия — NaHSO_3 или KHSO_3 ;
- 7) колбу обернуть в черную бумагу и поставить в холодильник. Через сутки или более цвет раствора становится белым или желтоватым. Это означает, что раствор готов к употреблению.

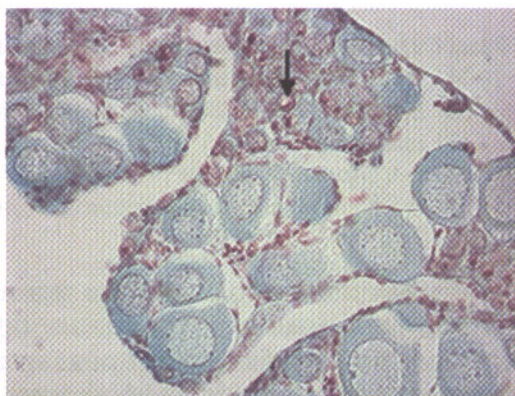
Приготовление сернистых вод. В 200 см³ дистиллированной воды растворить 1 г метабисульфита натрия или калия и добавить 10 см³ 1н соляной кислоты. Раствор готовится непосредственно перед употреблением.

Таблица 18. Постановка реакции Фёльгена

Батарей	Экспозиция, мин	Примечания
1н соляная кислота		Ополоснуть (при комнатной температуре)
Гидролиз в 1н соляной кислоте	7–10	Проводят в стеклянном стакане на водяной бане (или в термостате), при температуре 60 °С оптимальное время экспозиции определяется экспериментально
Дистиллированная вода		Ополоснуть
Реактив Шиффа	60	
Сернистые воды	2	В 3 разных сосудах с сернистой водой держат препарат по 2 мин
Проточная вода	10–30	
Дистиллированная вода	2	
0,1%-ный раствор светлого зеленого	1–2 с	Оптимальное время определяется экспериментально
Далее проводка по спиртам возрастающей концентрации, ксилол и заключение в бальзам или даммаровый лак		

Результат: ядра всех клеток обнаруживают красно-фиолетовую окраску, а цитоплазма — светло-зеленую (рис. 15). В ооцитах фазы раннего превителлогенеза хромосомы и околядрышковый хроматин обнаруживают слабую реакцию. Далее реакция хромосом ламповых щеток на ДНК не выявляется, что объясняется сильной деспирализацией нитей ДНК.

Рис. 15. Реакция Фёльгена: поперечный срез гонад самок карпа (*Cyprinus carpio*) — ядра фолликулярных и соединительнотканых клеток, а также ядра ооцитов ранней профазы мейоза (стрелка) окрашивается в красный цвет, цитоплазма превителлогенных ооцитов в бледно-зеленый.
Ув.: ок.10 х об.40



Окраска метиловым зеленым-пиронином по Унна. Для выявления ДНК и РНК хороший результат дает окраска метиловым зеленым-пиронином. Депарафинированные и доведенные до воды срезы окрасить по приведенной схеме (табл. 19).

Таблица 19. Окраска метиловым зеленым-пиронином по Унна

Батарея	Экспозиция, мин	Примечания
Метиловый зеленый-пиронин	20	
Дистиллированная вода		Ополоснуть и промокнуть на фильтровальной бумаге
Бутиловый спирт	5	
Бутиловый спирт	5	
<i>Затем проводка через ксилол, заключение в бальзам или даммаровый лак</i>		

Результат: структуры, содержащие ДНК, окрашиваются в зеленый цвет, а РНК — в розовый (рис. 16).

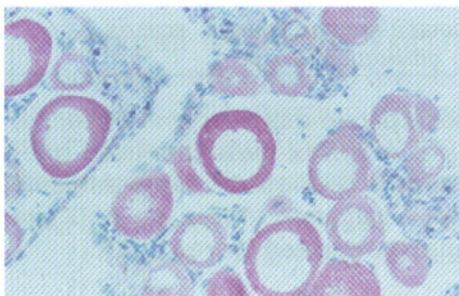


Рис. 16. Окраска метиловым зеленым-пиронином по Унна. Поперечный срез гонад самок: цитоплазма превителлогенных ооцитов и ядрышки окрашиваются в розовый цвет, ядра фолликулярных клеток и ооцитов ранней профазы мейоза — в зеленый.
Ув.: ок.7 х об.100

Приготовление раствора метилового зеленого-пиронина:

- 1) метиловый зеленый — 0,15 г;
- 2) пиронин — 0,25 г;
- 3) спирт 96° — 2,5 см³;
- 4) глицерин — 20 см³;
- 5) 0,5 % -ный водный раствор карболовой кислоты до 100 см³.

Наилучшее окрашивание происходит при pH раствора 4,4—4,6. Метиловый зеленый содержит примесь метилового фиолетового, поэтому его необходимо предварительно очистить. Для этого в делительную воронку с хлороформом поместить определенное количество метилового зеленого. Метиловый фиолетовый растворяется в хлороформе и его сливают. Процедуру проводят 3—4 раза. Затем

раствор отфильтровать через бумажный фильтр. Оставшийся порошок является очищенным метиловым зеленым. В дальнейшем его используют для приготовления окраски.

Контролем для указанной окраски служит предварительная обработка срезов раствором рибонуклеазы (*для его приготовления используют кристаллическую рибонуклеазу, которую растворяют в пропорции 1 мг рибонуклеазы на 1 мл воды*). Полученный раствор вскипятить, т.к. рибонуклеаза является термостабильным ферментом. Затем его нанести пипеткой на депарафинированные и доведенные до воды срезы (вокруг срезов необходимо предварительно насухо вытереть). Срезы поместить во влажную камеру при температуре 37 °С на 3—4 ч. Контролем служат срезы, на которые таким же образом нанесена дистиллированная вода, и содержащиеся в таких же условиях. Аналогичное воздействие оказывает обработка 1н соляной кислотой в течение 5—10 мин при 60 °С, как при гидролизе для реакции Фельгена. Обработка 5%-ной трихлоруксусной кислотой при 90 °С в течение 15 мин удаляет РНК и ДНК. При указанных обработках РНК удаляется и поэтому цитоплазма клеток окрашивается в бледно-розовый цвет или бесцветна.

Выявление ДНК и РНК смесью галлоцианин-хромовые квасцы:

1. Депарафинированные и доведенные до воды срезы окрашивают в растворе галлоцианин-хромовые квасцы 24—48 ч;
2. Дифференцировка в дистиллированной воде.

Приготовление галлоцианин-хромовых квасцов. 0,15 г галлоцианина вскипятить в 10 мл 5%-ных хромовых квасцов; после охлаждения раствор отфильтровать и довести дистиллированной водой до 100 мл. Затем готовый раствор подкислить 1н соляной кислотой до pH 1,64.

Результат: ядра и цитоплазматические структуры, содержащие РНК, окрашиваются в темно-синий или черный цвет. При определенной обработке препараты можно фотометрировать.

Гистохимия белков

Для выявления на гистологических срезах белков материал фиксируют в 10%-ном нейтральном формалине или в жидкости Буэна. Окраску производят разными способами, например на основные и суммарные белки используют прочный зеленый (табл. 20), в других случаях — бромфеноловый синий (табл. 21) или краситель Макарова.

Таблица 20. Окраска прочным зеленым на основные и суммарные белки по Олферту и Гешвинду

Батарея	Экспозиция, мин	Примечания
<i>Депарафинировать срезы</i>		
5%-ная трихлоруксусная кислота	15	Для удаления нуклеиновых кислот обезпарафиненные срезы подвергают гидролизу при температуре 90 °C
0,1%-ный раствор прочного зеленого	30	На основные белки должно быть pH 8,0–8,2; на суммарные белки pH 2,0–2,2
Проточная вода	60	
<i>Далее проводка через спирты возрастающей концентрации и ксилол, заключение в канадский бальзам или даммаровый лак</i>		

Результат: на суммарные белки окрашиваются все клеточные структуры. Характер окраски на основные белки такой же, как при проведении реакции Фельгена (рис. 17).



Рис. 17. Окраска прочным зеленым на основные и суммарные белки (по Олферту и Гешвинду): участок гонады мозамбикской тиляпии (*Tilapia mossambica*): ядра соединительнотканых клеток и ядра первичных половых клеток окрашиваются на основные белки. Ув.: ок.7 х об.100

Таблица 21. Окраска бромфеноловым синим

Батарея	Экспозиция, мин	Примечания
Депарафинированные срезы окрашивают в 1%-ном растворе бромфенолового синего, насыщенного HgCl_2	120	При комнатной температуре
0,5%-ная уксусная кислота	5	
Бутиловый спирт	5	
<i>Далее проводка через спирты возрастающей концентрации и ксилол, заключение в канадский бальзам или даммаровый лак</i>		

Результат: белки окрашиваются в темно-синий цвет.

Приготовление красителя (Макаров П.В., 1959):

- 1) приготовить 0,2 %-ный раствор прочного зеленого в дистиллированной воде — 100 мл;
- 2) отдельно приготовить два раствора:
 - первый раствор — к 150 мл дистиллированной воды по каплям добавляется уксусная кислота при постоянном помешивании. Периодически часть раствора отливают, разбавляя вдвое и контролируют pH, доведя его до pH 2,0–2,2 (pH контролируется pH-метром);
 - второй раствор — к 150 мл дистиллированной воды добавить небольшое количество NaOH при постоянном помешивании. Периодически часть раствора отливают, разбавляя вдвое, и контролируют pH, доведя его до pH 8,0–8,2 (pH также контролируется pH-метром);
- 3) к 50 мл 0,2 %-ного раствора первоначально приготовленного красителя, добавить 50 мл первого раствора и получаем 0,1 %-ный раствор прочного зеленого с pH 2,0–2,2 для выявления суммарных белков;
- 4) к 50 мл 0,2 %-ного раствора первоначально приготовленного красителя добавить 50 мл второго раствора и получаем 0,1 %-ный раствор прочного зеленого с pH 8,0–8,2 для выявления основных белков.

Гистохимия полисахаридов

Фиксацию объекта проводят в жидкостях Буэна или Карнуа (по методу лаборатории ихтиологии Биологического института Санкт-Петербургского университета). Этот метод используют для выявления особенностей морфологии клеток, тканей, подкрашивания ядер и цитоплазмы после ШИК (PAS)-реакции, а также автографов, так как используемые затем красители не закрашивают эмульсию.

Для окраски на гликоген и нейтральные полисахариды применяют ШИК (PAS)-реакцию с докраской ядер гематоксилином Майера (табл. 22), для выявления кислых мукополисахаридов, используют окраску альциановым синим по Стивдмену.

Приготовление гематоксилина Майера. В 1000 мл дистиллированной воды растворить 1 г гематоксилина, прибавить 0,2 г йодноватокислого натрия (NaJO_3) и 50 г калийных квасцов (ХЧ). Растворить при многократном помешивании до сине-фиолетового цвета раствора. Затем добавить 50 г хлоралгидрата и 1 г кристаллической лимонной кислоты. Получается раствор фиолетового цвета, который годен для немедленного употребления и длительное время хорошо сохраняется в закрытом сосуде.

Таблица 22. ШИК (PAS)-реакция и окраска гематоксилином Майера

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
Срезы депарафинировать		
0,1%-ный раствор KJO_4	15	При комнатной температуре
Дистиллированная вода		Ополоснуть
1н HCl		На короткое время
Реактив Шиффа	30	При комнатной температуре
Сернистые воды	2	4 раза по 2 мин
Проточная вода	10 – 30	
Подкраска ядер гематоксилином Майера	15 – 30	Время экспозиции определяется экспериментально
Дистиллированная вода	1	
Проточная вода	30 – 60	Время экспозиции определяется экспериментально
0,5 – 1%-ный раствор эозина	1 – 2 с	
<i>Далее проводка через спирты возрастающей концентрации и ксиол, заключение в канадский бальзам или даммаровый лак</i>		

Результат: цитоплазма соматических клеток и все полисахаридные включения окрашиваются в красный цвет, зерна гликогена в темно-фиолетовый, а ядрышки и цитоплазма ооцитов и ядра всех клеток — в синий (рис. 18, 19).

Окраска для выявления кислых мукополисахаридов приведена в табл. 23.

Таблица 23. Окраска альциановым синим по Стилдену для выявления кислых мукополисахаридов

Батарея	Экспозиция, мин	Примечания
<i>Депарафинированные срезы довести до воды</i>		
0,1%-ный альциановый синий	10 – 30 с	
Дистиллированная вода		Промыть
Гематоксин Майера	5 – 10	
Проточная вода	30	
<i>Далее проводка через спирты возрастающей концентрации и ксиол, заключение в канадский бальзам или даммаровый лак</i>		

Результат: кислые мукополисахариды окрашиваются в синий цвет.

Рис. 18. ШИК (PAS)-рекция. Вителлогенный ооцит клариевого сома (*Clarias batrachus*): фолликулярный эпителий интенсивно окрашивается на полисахариды. Ув.: ок.10 х об.40

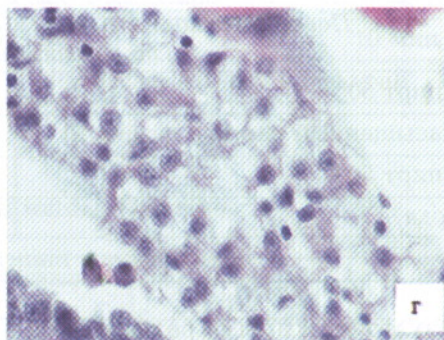
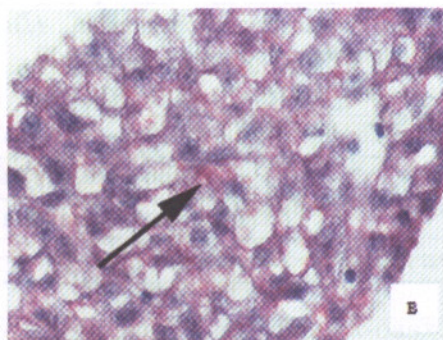
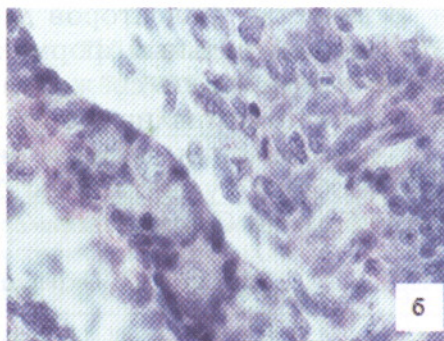
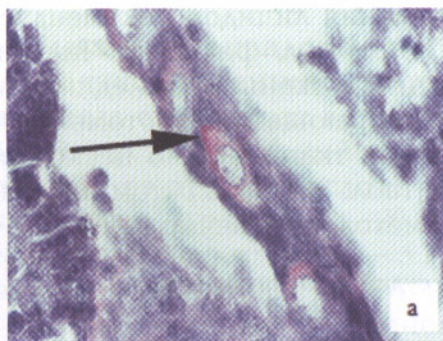
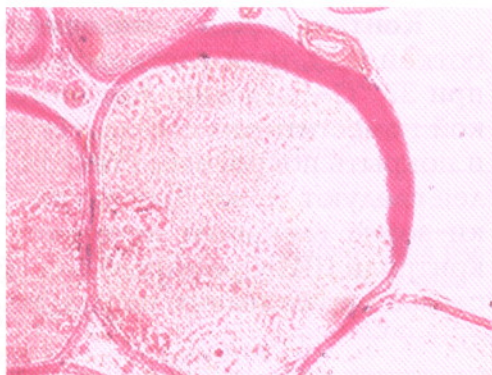


Рис. 19. Продольный срез гонады односуточной личинки мозамбикской тилапии: *а* — выявляются глыбки гликогена (стрелка) в цитоплазме первичных половых клеток; *б* — глыбки гликогена исчезают после обработки амилазой слюны. Ув.: ок.7 х об.100. Участок печени односуточной личинки мозамбикской тилапии: *в* — в гепатоцитах выявляются глыбки гликогена (стрелка), окрашенные в фиолетовый цвет; *г* — после обработки амилазой слюны гликоген исчезает. Ув.: ок.7 х об.100

Контроль. Для выявления гликогена часть срезов перед обработкой 0,1%-ным раствором KJO_4 обрабатывают амилазой слюны при 37 °С — 15 мин. Для этого в чашку Петри с влажной подложкой поместить два стекла. На одно из них пипеткой нанести слюну и покрыть покровным стеклом, другое стекло не обрабатывать. Далее следуют те же процедуры. В результате проведенной обработки зерна гликогена исчезают. Можно провести дополнительный контроль ШИК-реакцией без обработки периодатом калия. В этом случае окрашивания наблюдаться не будет.

Гистохимия липидов

В качестве фиксаторов для выявления липидов рекомендуем: 10%-ный нейтральный формалин, Са-формол, фиксатор Чиаччио, можно использовать свежемороженную ткань. В последнем случае срезы приготавливают на замораживающем микротоме.

Для выявления липидов окрашивать ткани можно несколькими способами: суданом III по Дадди (табл. 24), сульфатом нильского голубого по Смитсу (табл. 25) или методом Чиаччио (табл. 26).

Таблица 24. Окрашивание суданом III по Дадди

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
<i>После фиксации в 10 %-ном формалине, срезы готовят на замораживающем микротоме</i>		
Спирт 50°	5—15	
Насыщенный раствор судана III	20—25	
Спирт 50°		Быстро ополоснуть
Вода		Дистиллированная
<i>Заключение в глицерин или глицерин-желатин</i>		

Результат: жиры окрашиваются в оранжево-желтый цвет. Ввиду того, что окраска жира сравнительно быстро выцветает, препарат надо исследовать, как можно быстрее после приготовления.

Приготовление красителя. Насыщенный раствор судана III в 70° спирте ставят в термостат при температуре 37 °С на 24—48 ч. Время от времени раствор нужно взбалтывать. Затем его фильтруют и хранят в банке с притертой пробкой.

Таблица 25. Окрашивание сульфатом нильского голубого по Смити

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
<i>Срезы приготавливаются на замораживающем микротоме</i>		
1%-ный водный раствор нильского голубого	5	При температуре 60 °С
Дифференцировать в 1%-ной уксусной кислоте	10 – 20	При температуре 60 °С до получения равномерной окраски срезов чистого тона
Дистиллированная вода		Ополоснуть
<i>Заключение в глицерин или глицерин-желатин</i>		

Результат: нейтральные жиры окрашиваются в красный цвет, кислые липиды — в синий.

Выявление липидов по методу Чиаччио. Маленькие кусочки материала фиксируют в течение 24 – 48 ч в смеси: 5 %-ный водный раствор двуххромовокислого калия — 80 см³, формалин — 20 см³, ледяная уксусная кислота — 5 см³ (фиксатор Чиаччио).

Проводка фиксированного материала и заключение в парафин осуществляется по схеме (табл. 26).

Готовые срезы окрашивают двуххромовокислым калием, суданом III или суданом черным (табл. 27).

Таблица 26. Проводка по методу Чиаччио

Батарея	Экспозиция
Хромировать в 3%-ном двуххромовокислом калии	5 – 8 сут
Промыть в проточной воде	1 сут
Провести через спирты восходящей концентрации	1 сут
Абсолютный спирт	1 – 2 ч
Ксилол	10 мин
<i>Провести заливку в парафин</i>	

Таблица 27. Окраска по методу Чиаччио

Батарея	Экспозиция, мин	Примечание
Спирт 70°	10	
Раствор судана III или судана черного	30 – 60	При температуре 30°
Спирт 50°		Ополоснуть
Дистиллированная вода		Ополоснуть
<i>Заключение в глицерин</i>		

Результат: липиды окрашиваются суданом III в оранжево-желтый цвет или в черный — суданом черным.

4. Электронная микроскопия при исследовании ихтиологических объектов

Просвечивающая электронная микроскопия

Электронную микроскопию разделяют на трансмиссионную (или просвечивающую) и сканирующую (или растровую). В ихтиологии электронная микроскопия используется для изучения органов и тканей рыб и других гидробионтов на разных стадиях их онтогенеза. Это развивающиеся ооциты и выметанные яйца, их оболочки, эмбрионы и их зачаточные структуры (например отолиты), различные органы и ткани рыб в разные периоды их жизненного цикла. Электронная микроскопия находит применение и в экспериментальной ихтиологии, например для изучения изменения структур клеток после различных внешних воздействий.

Электронная микроскопия отличается от световой микроскопии по ряду подходов и имеет свои преимущества. Например толщина ультратонких срезов составляет около 300 мкм, полутонких срезов — 700 мкм. Немаловажный выигрыш дает степень разрешения электронного микроскопа. Если наибольшее разрешение, которое можно достигнуть с помощью светового микроскопа, равно приблизительно 2000 нм, то в трансмиссионном электронном микроскопе при особых условиях может быть достигнуто минимальное разрешение — 2 нм.

Методические подходы по фиксации объектов для электрономикроскопического изучения, его обезвоживанию, заключению в заливочные среды, приготовлению срезов отличаются от световой микроскопии, прежде всего тем, что используемые реактивы являются сильнодействующими ядами (глутаровый¹ альдегид, четырех-

¹ В русскоязычной литературе обычно слово «глутаровый» пишут через «у», однако, следуя правилам латинской грамматики, буква «u» после мягкой согласной «l» также смягчается, так что произносится это слово как «глутаровый». Далее мы везде будем использовать написание этого слова в соответствие с тем, как оно читается по-латыни — «глутаровый».

окись осмия, цитрат свинца, уранилацетат¹ и др.), а также тонкой работой с миниатюрными фрагментами объектов. Все это требует в работе большой осторожности и неукоснительного соблюдения правил техники безопасности. Именно в связи с этим, для электронной микроскопии используют специальные миниатюрные инструменты: пинцеты, скальпели, заливочные формочки, формваровые сеточки-подложки, контейнеры для их хранения, на которые монтируют ультратонкие срезы (рис. 20). При подготовке к резке ультратонких срезов вначале для ориентировки готовят полутонкие срезы, которые временно монтируют на обычных предметных стеклах, окрашивают толуидиновым синим и после просмотра выбрасывают.

При фиксации пойкилотермных объектов для электронной микроскопии важен рН фиксатора, который должен быть не менее 7,0 и не более 8,0. Для морских холодноводных объектов можно использовать отфильтрованную морскую воду, обладающую высокой буферностью и требуемым рН.

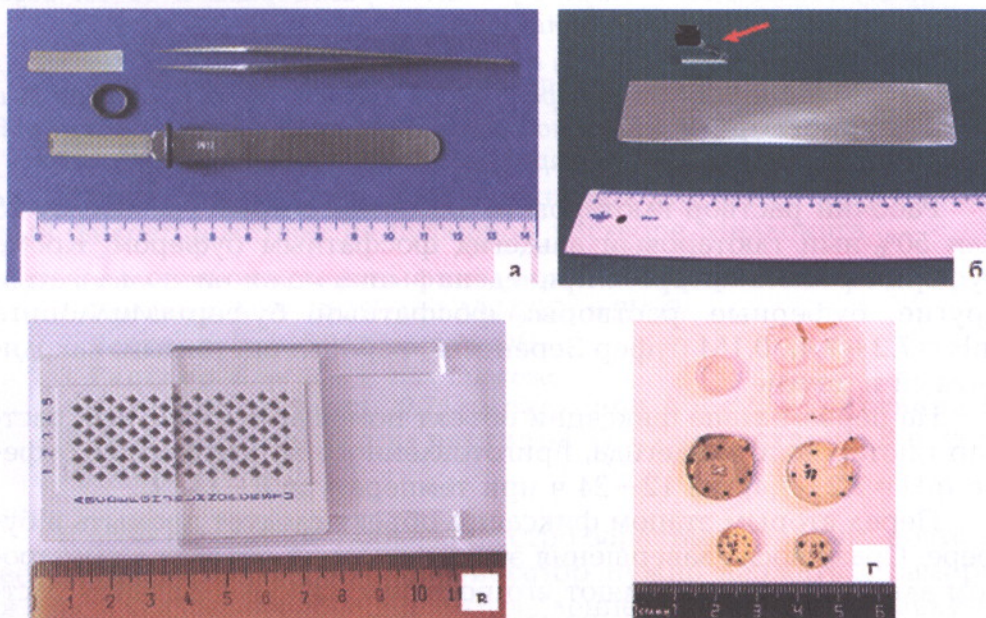


Рис. 20. Специальные миниатюрные инструменты для электронной микроскопии: а — пинцет для электронной микроскопии; б — стеклянный нож (сверху) по сравнению со стандартным микротомным ножом; в — контейнеры для хранения ультратонких срезов; г — формочки для заливки объектов

¹ Радиоактивное вещество.

Для трансмиссионной электронной микроскопии объект величиной около $1-3 \text{ мкм}^3$, при объеме фиксатора в 10 раз превышающем объем объекта, фиксируют в два этапа:

- 1 — фиксация в глютаровом альдегиде;
- 2 — постфиксация в четырехокиси осмия.

Глютаровый альдегид выпускается промышленностью в темных флаконах в виде 25%- или 50%-ного раствора. Перед работой его разводят фосфатным буфером под тягой, используя автоматические пипетки или, в крайнем случае, обычную пипетку с грушей. Фосфатный буфер нестойкий, поэтому его и рабочий раствор глютарового альдегида готовят непосредственно перед употреблением.

Приготовление фиксатора. В различных руководствах вначале рекомендуют неразведенный 25 %-ный (или 50 %-ный) раствор глютарового альдегида нейтрализовать BaCO_3 до pH 5,6–6,9–7. Затем эту прозрачную жидкость разводят фосфатным буфером в соотношении 1:9. Для приготовления буфера вначале готовят два исходных раствора А и Б:

- **раствор А:** 0,89 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 50 мл воды (2,26 %-ный раствор);
- **раствор Б:** 0,68 г KH_2PO_4 растворить в 50 мл воды.

Для получения фосфатного буфера с pH 7,2 сливают 70 мл **раствора А** и 25 мл **раствора Б**, затем постепенно добавляя каплями **раствор Б** довести его pH до 7,2, контролируя процесс с помощью pH-метра.

Рабочий раствор глютарового альдегида готовят, разбавляя 25 или 50%-ный глютаровый альдегид фосфатным буфером. Кроме буфера, пропись которого приведена выше, можно использовать и другие буферные растворы: фосфатный буфер Миллонига (pH = 7,2–7,4), 0,1М буфер Зеренсена, веронал-ацетатный, какодилатный и другие.

На первом этапе фиксации объект помещают в 2,5%-ный раствор глютарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (pH = 7,2–7,4), на 12–24 ч при температуре 8–14 °С.

Перед вторым этапом фиксации объект следует промыть в буфере. Сразу после завершения этапа фиксации объекта в глютаровом альдегиде осуществляют его постфиксацию в 1–2%-ном растворе четырехокиси осмия (OsO_4) — 1–2 ч. Четырехокись осмия — желтоватые кристаллы, выпускаемые в запаянных ампулах (рис. 21), причем последние помещены в дополнительные металлические контейнеры, маркированные символом «череп и кости» — смертельно ядовитое вещество. Кристаллы осмия не извлекают из ампулы, а надпилив ее, помещают в кислотницу с несколько меньшим объемом воды, чем требуется для получения нужной концен-

трации. После растворения кристаллов, доливают воду до заранее нанесенной метки.

Ниже приводится пропись приготовления осмиевого фиксатора на веронал-ацетатном буфере.

Приготовление осмиевого фиксатора на веронал-ацетатном буфере.

1. **Запасной буферный раствор А**, состоит из:

14,7 г вероната натрия (5,5-диэтилбарбитулат натрия);

9,7 г ацетата натрия;

500 мл дистиллированной воды.

2. **Запасной 1%-ный водный раствор четырехоксида осмия — раствор Б:**

1 г четырехоксида осмия;

100 мл дистиллированной воды.

3. **Осмиевый фиксатор:**

5 мл запасного буферного раствора А;

+ 5 мл 0,1М HCl;

+ 2,5 мл дистиллированной воды;

+ 12,5 мл запасного раствора Б (1%-ного водного раствора четырехоксида осмия).

Иногда, а некоторые ученые считают это наилучшим, осмиевый фиксатор готовят на буферном растворе Миллонига.

Приготовление осмиевого фиксатора на буфере Миллонига:

1. **Раствор А** — 4,52 %-ный $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$;

2. **Раствор Б** — 5,04 %-ный NaOH;

3. **Раствор В** — 10,8 %-ная глюкоза;

4. **Раствор Г** — слить 20,75 мл раствора А и 4,25 мл раствора Б.

Фиксатор: слить 22,5 мл раствора Г; 2,5 мл раствора В и 25 мл 1%-ного OsO_4 .

В этом фиксаторе глюкоза быстро зарастает грибами, поэтому ее нужно готовить свежую. Фиксатор нужно держать в замороженном состоянии, а перед употреблением оттаять. Промывку от фиксатора в этом случае также нужно проводить в буфере Миллонига.

Приготовление буфера Миллонига:

1. **Раствор А** — 2,26 %-ный $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$;

2. **Раствор Б** — 2,52 %-ный NaOH;

3. **Раствор В** — 5,4 %-ная глюкоза;



Рис. 21. Запаянная ампула с четырехокисью осмия дополнительно упаковывается в металлический контейнер

4. Раствор Г — *слить 41,5 мл раствора А и 8,5 мл раствора Б.*
Буферный раствор: 45 мл раствора Г и 5 мл раствора В.

Промывку объекта следует проводить на холоде, после чего довести температуру раствора до комнатной температуры и залить спиртом.

Иногда можно использовать осмиевый фиксатор на буфере с сахарозой, для приготовления которого 4%-ный раствора OsO_4 необходимо развести до 2%-ного водой, далее слить в соотношении 1:1 с сахарозой на фосфатном буфере (0,1М фосфатный буфер + + 3,423 г сахарозы на 50 мл воды). В этом случае отмывать фиксатор также фосфатным буфером с сахарозой, приготовленным как указано выше. Отмывку производить не менее 2-х часов в 3—5 сменах. Последнюю смену буфера выставить в помещении с комнатной температурой. Когда температура буфера сравняется с комнатной, можно начинать замену буфера спиртами, т.е. обезвреживать.

Приготовление 0,1М буфера Зеренсена:

1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ — 3,582 г на 100 мл раствора;
2. KH_2PO_4 — 1,361 г на 100 мл раствора;
3. *Слить: 70 мл Na_2HPO_4 и 30 мл KH_2PO_4 . pH буферной смеси 7,0—7,2.*

Приготовление какодилатного буфера:

1. **Раствор А** — 0,2М *натриумкакодилат* на 500 мл раствора, содержащего 2,14 г *какодилата* (на 125 мл — 0,534 г *какодилата*);
2. **Раствор Б** — 0,2н HCl .

Буфер готовят, добавляя в **раствор А** по 2—3 капли **раствора Б**, до получения pH 7,2—7,4.

Приготовление 0,05М Трис- HCl буфера. Вначале необходимо приготовить 0,2М *раствор триса*: в 1 л дистиллированной воды растворить 24,33 г *триса*.

Для приготовления 0,05М Трис- HCl буфера для работы при разных температурах, руководствуются табл. 28.

Для осмиевого фиксатора трис-буфер не подходит, а для глютарового — его можно использовать.

Быстрое приготовление 0,1М фосфатного буфера с определенным pH. Приготовление буферных растворов с определенным pH зачастую у не биохимиков может вызывать затруднения, в связи с чем ниже приводится таблица для упрощенного приготовления 0,1М фосфатного буфера по следующей схеме:

Приготовить два запасных раствора X и Y:

X — 0,2М NaH_2PO_4 (27,58 г/л);

Y — 0,2М Na_2HPO_4 (28,38 г/л).

Таблица 28. Составление 0,05M
Трис-HCl буфера

pH при температуре		0,1н HCl, мл	0,2M Tris, мл
23 °C	37 °C		
8,05	7,90	27,5	25
7,96	7,82	30,0	25
7,87	7,73	32,5	25
7,77	7,63	35,0	25
7,66	7,52	37,5	25
7,54	7,40	40,0	25
7,36	7,22	42,5	25
7,20	7,05	45,0	25

Для получения буфера необходимого pH, достаточно слить два запасных раствора по выбранным в таблице объемам (табл. 29).

Все склянки с готовыми запасными растворами должны быть предварительно маркированы соответствующими этикетками и хранится с большой предосторожностью. Раствор осмиевого фиксатора хранят в кислотнице, т.е. склянке с двумя притертыми крышками *in vitro nigro* (темного цвета) в отдельном холодильнике¹. При отсутствии темной склянки, прозрачную склянку плотно оборачивают черной бумагой.

После осмиевой фиксации объект приобретает черный цвет. Его можно хранить в течение нескольких месяцев, для этого, как правило, объект переносят в маленькую пробирку с 70° этанолом, приплотняют кусочком ваты и складывают в склянку большей емкости, заполненную этим же спиртом.

Непосредственно перед дальнейшей обработкой зафиксированные кусочки споласкивают в двух сменах фосфатного буфера или дистиллированной воды. Затем зафиксированные объекты обезживают в спиртах восходящих концентраций и ацетоне по 3—10 мин (табл. 30).

¹ Буферный раствор четырехокси осмия — бесцветная жидкость со специфическим запахом, сильно испаряется, вследствие чего окружающие стенки холодильника приобретают черный налет.

Таблица 29. Составление фосфатного
буфера с требуемым pH

pH	X 0,2M NaH ₂ PO ₄ , мл	Y 0,2M Na ₂ HPO ₄ , мл	Объем, мл
6,2	81,5	18,5	Разбавить до 200,0
6,3	77,5	22,5	
6,4	73,5	26,5	
6,5	68,5	31,5	
6,6	62,5	37,5	
6,7	56,5	43,5	
6,8	51,0	49,0	
6,9	45,0	55,0	
7,0	39,0	61,0	
7,1	33,0	67,0	
7,2	28,0	72,0	
7,3	23,0	77,0	
7,4	19,0	81,0	
7,5	16,0	84,0	
7,6	13,0	87,0	
7,7	9,5	90,5	

Таблица 30. Проводка — обезвоживание объекта для электронной микроскопии

Обезвоживающий агент	Количество смен	Экспозиция, мин
50° этанол	1	10
70° этанол	1	10* или ночь
70° этанол	1	10
80° этанол	1	10
96° этанол	1	10
100° этанол	1	10
100° этанол	2	15
Абсолютный ацетон	1	10
Абсолютный ацетон	1	40

Примечание. *В проводку включают контрастирование объекта 1,5%-ным раствором уранилацетата, приготовленным в 70° спирте

Далее объект пропитывают в 2-х сменах смеси ацетона и заливочной среды, например ЭПОН-812: «ацетон : эпон» в соотношении 2:1 и 1:2. После помещения объекта в эту смесь осуществляют тщательное перемешивание около 2-х ч; в целом в каждой пропитывающей смеси объекты выдерживают по 3 ч. Для того чтобы не перемешивать смесь вручную, можно использовать укрепленный в штативе маленький моторчик с прикрепленной к нему стеклянной палочкой.

Далее производят однократную пропитку чистой заливочной средой, в процессе которой рекомендуют установить сосуд с объектом в пропитывающей смеси на вращающийся в разных направлениях столик, что сооружают вручную или используют готовую установку. Этот этап способствует улетучиванию остатков ацетона. После перемешивания дальнейшую пропитку производят в термостате при температуре 37 °С в течение 2—4 ч.

В качестве заливочной среды используют эпоксидные смолы — ЭПОН-812, Аралдит 502 или Аралдит М (рис. 22), куда переносят объекты после пропитки смесью «ацетон : заливочная среда». Обычно рекомендуют использовать свежеприготовленную заливочную среду, полимеризация которой осуществляется при температуре 37 °С в течение 20—24 ч, а затем еще 3-е сут — при температуре 60 °С.

После пропитки объекта его заключают в заливочную среду, например на основе ЭПОН-812, которая составляется из нескольких компонентов (табл. 31).

Все остальные приемы при приготовлении заливочной среды из Аралдита такие же, как описано для ЭПОН-812.

Свежеприготовленную заливочную среду любой прописи заливают в специальные формочки, туда же переносят пропитанный объект (см. рис. 20). Формочки для заливки имеют небольшой размер (1—1,5 см). Они могут быть фабричного изготовления из плас-



Рис. 22. Эпоксидные смолы: а — ЭПОН-812; б — Аралдит 502, Аралдит М

Таблица 31. Приготовление заливочной эпоновой среды по Портеру

Наименование компонента	Концентрация	Количество
Эпоксидная смола ЭПОН-812	Неразведенный	2,4 мл
Ускоритель полимеризации BDM или DMP (тридиметиламинофенол)	2%-ный	0,1 мл
Уплотнитель I DDSA (додецилантарный ангидрид)	Неразведенный	1,5 мл
Уплотнитель II MNA (надикметилловый ангидрид)	Неразведенный	1,0 мл

Приготовление заливочной среды на основе Аралдит:

1. *Araldite 502* или *Araldite M* — 27 мл;
2. *DDSA* — 23 мл;
3. *DMP* — 1,5–2% от общего объема.

тика, фольги. Мы использовали также пустые блистерные формы из-под таблетированных лекарств. Полимеризацию залитых эпоксидными смолами блоков проводят в течение суток в термостате при температуре 37 °С с продолжением процесса в течение последующих 2-х сут при 60 °С.

Из залитых в смолы объектов выпиливают лобзиком пирамидки, ориентируют объект под микроскопом, контролируя процесс просмотром полутонких срезов, окрашенных толуидиновым синим. После ориентировки объекта, пирамидки с находящимся на ее вершине объектом закрепляют в специальные держатели и режут на ультрамикротоме типа III LKB стеклянным ножом (см. рис. 20). Отличительной особенностью ультрамикротомирования является то, что в процессе резки не нож движется относительно заключенного в заливочную среду объекта, как при световой микроскопии, а держатель с пирамидкой автоматически движется относительно

неподвижно закрепленного ножа. В хорошо оснащенных лабораториях электронной микроскопии резку объектов осуществляет специально обученный штат специалистов, как например в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Готовую ленту ультратонких срезов помещают на специальные круглые сетки, на которые нанесена формваровая подложка. После этого срезы можно окрашивать. В электронной микроскопии используют двойное окрашивание (контрастирование) срезов. Обычно первое контрастирование — уранилацетатом, включают в проводку объекта при его обезвоживании. Второе окрашивание — цитратом свинца, проводят после того, как готовые ультратонкие срезы помещены на формваровую подложку. Их предварительно промывают в 3-х сменах дистиллированной воды, которую затем удаляют прикосновением края сеточки к фильтровальной бумаге. Все манипуляции проводят держа сеточку со срезами специальным пинцетом для электронной микроскопии (см. рис. 20) за ее ободок, не касаясь собственно срезов. Затем срезы, размещенные на сеточке с формваровой подложкой, контрастируют цитратом свинца по Рейнольдсу [Гайгер, 1974; Уикли, 1975].

Приготовление цитрата свинца по Рейнольдсу. *К 10 мл дистиллированной воды добавить 0,01–0,04 г цитрата свинца, затем налить 0,1 мл 10М раствора NaOH, сосуд закрыть и энергично встряхнуть.*

Окрашивание производят в чашке Петри, на дно которой капают каплю контраста и кладут на поверхность этой капли подложку со срезами так, чтобы сторона со срезами касалась красителя. Расположенные таким образом срезы окрашивают в течение 10 мин при комнатной температуре под тягой в присутствии насыщенного раствора NaOH для поглощения CO_2 из воздуха. Окрашенные срезы промывают, быстро окунув их 20 раз в 2–3 смены дистиллированной воды.

Для изучения полученных препаратов используют просвечивающие электронные микроскопы, например HU-III или HU-III фирмы «Hitachi» при ускоряющем напряжении 75 кВ или JEM-100B фирмы «Jeol» при ускоряющем напряжении 80 кВ. Рабочие увеличения трансмиссионных электронных микроскопов варьируют от 4000х до 40000х.

Все манипуляции с глутаровым альдегидом и четырехокисью осмия в лабораторных условиях проводят строго под вытяжным шкафом. В экспедиционных условиях работают на открытом воздухе вдали от людей.

Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующий (растровый) электронный микроскоп как бы восполняет пробелы в исследовании объекта с помощью оптической и просвечивающей электронной микроскопией, т.к. дает возможность прямого наблюдения поверхности твердых тел, не пропускающих электроны. Большим преимуществом растрового микроскопа является широкий диапазон электронно-оптического увеличения, высокая разрешающая способность, большая глубина резкости, которая почти в 300 раз больше по сравнению со световым микроскопом.

Методика подготовки объектов для изучения в растровом электронном микроскопе, используемая нами при изучении ихтиологического материала, несколько отличается от изучения других биологических объектов или минералов. В ее основу нами были положены методы, использовавшиеся ранее другими исследователями. Все перечисленные выше методы в процессе работы с конкретным материалом были нами модифицированы.

Объекты для изучения в сканирующем электронном микроскопе можно фиксировать в 2,5%-ном растворе глютарового альдегида с постфиксацией 1%-ным раствором четырехокси осмия, как это делают для просвечивающей электронной микроскопии. Мы также используем для фиксации 10%- и 4%-ные растворы формальдегида. Для фиксации морских видов формальдегид можно готовить не на фосфатном буфере, а на морской воде (жидкость Барбагалла), обладающей аналогичной буферной емкостью, но не разрушающейся подобно данному буферу. Этот способ был предложен В.В. Петрунякой [1979].

Считают, что наилучшая продолжительность фиксации объекта составляет не менее суток. Далее зафиксированный материал отмывают в 3-х сменах дистиллированной воды по 1 ч в каждой смене. Затем объекты обезживают в этаноле возрастающих концентраций по следующей схеме (табл. 32):

Обезвоженные объекты высушивают в приборе для высушивания в критической точке — НСР-I, в котором промежуточной жидкостью является ацетон, рабочей — жидкий CO_2 . Высушивание объектов в критической точке не изменяет нативных структур их поверхности, в связи с тем, что в этом приборе полностью снимаются силы поверхностного натяжения, деформирующие объект. Сравнительное изучение в сканирующем электронном микроскопе объектов, высушенных в критической точке, замороженных на замораживающем столике и высушенных в лиофилизаторе, пока-

Таблица 32. Обезвоживание объекта
в этаноле

Батарея	Экспозиция, мин
Спирт 56°	5
Спирт 60°	5
Спирт 70°	5
Спирт 80°	5
Спирт 96°	5
Спирт 100° I	5
Спирт 100° II	5
Абсолютный ацетон*	3–5
Абсолютный ацетон	3–5
Примечание. *Абсолютный ацетон готовят, положив на дно склянки шарики силикагеля.	

увеличениях. В связи с этим, в последующем мы проводили напыление в ионном напылителе IB3 фирмы «Eiko». Объекты напыляли в течение 3-х мин при ионном токе 6 мА, что соответствует толщине покрытия 150 нм при давлении остаточных газов 0,1 мм рт. ст. При напылении объектов, как золотом, так и палладием — 150 нм, является минимальной толщиной покрытия для обеспечения максимального стока заряда с поверхности объекта и повышения коэффициента вторичной эмиссии.

Подготовленные таким образом объекты изучают в сканирующем (растровом) электронном микроскопе марок HSM-2A или JSM-35 фирм «Hitachi», «Jeol» или «Amray» (рис. 23) при ускоряющем напряжении соответственно 20 и 25 кВт. Снимки объектов делают с помощью регистрирующих фотокамер различных марок, например «Mamya».

В заключение необходимо отметить, что так или иначе в процессе электронномикроскопических исследований «чувство» метода и объекта приходит к исследователю постепенно. Следующий качественный этап ведет его к модификации методов. Желаем исследователям удачи на этом пути.

Пользуясь случаем, мы отдаем дань глубокого уважения ныне покойному профессору кафедры ихтиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова С.Г. Соину, горячо поддерживавшему идею использования электронной микроскопии для изучения

зывает идентичность их поверхностных структур и полное соответствие наблюдаемому *in vivo* [Микодина, 1979].

Высушенные пробы приклеивают к объектному столику специальным клеем или лаком для ногтей. Подготовленные таким образом объекты напыляют золотом или палладием в вакуумном испарителе HUS-4 с предварительным напылением в течение 30 с тонкого (50 нм) слоя углерода. Использование этого метода напыления при работе с ихтиологическими объектами выявило ряд его недостатков, в частности их заряджение при просмотре на больших



Рис. 23. Сканирующий электронный микроскоп «Amray» с приставкой для определения микроэлементного состава объекта

ихтиологических объектов более 25 лет тому назад. Особая благодарность В.С. Соиной, некоторые приемы по электронной микроскопии которой легли в основу используемого нами метода. Мы ориентировались также на методические рекомендации В.В. Рубцова [Малый практикум по цитологии, 1977].

Искренняя благодарность и сердечная признательность коллективу межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, особенно ее заведующему — Г.Н. Давидовичу и его первому помощнику А.Г. Богданову. Без их помощи, советов и поддержки не мог быть достигнут настоящий уровень автора, как электронного микроскописта, и вряд ли было возможно появление данного раздела монографии.

Объекты электронномикроскопического исследования в ихтиологии

Электронно-микроскопическому исследованию подвергают различные органы и ткани рыб, а также овулировавшие и развивающиеся икринки и личинки рыб — объектов аква- и марикультуры.

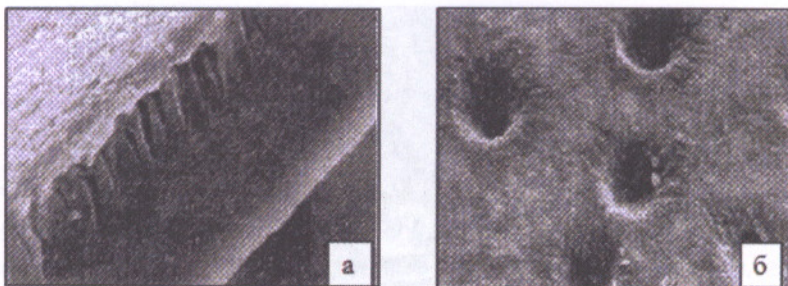


Рис. 24. Ультраструктурные особенности поверхности и внутреннего строения оболочек овулировавших икринок севрюги *Acipenser stellatus*:
 а — каналцы хориона (сканирующий электронный микроскоп, ув. 1000);
 б — множественные микропиле, ув. 300 [Воробьева, Марков, 1999]

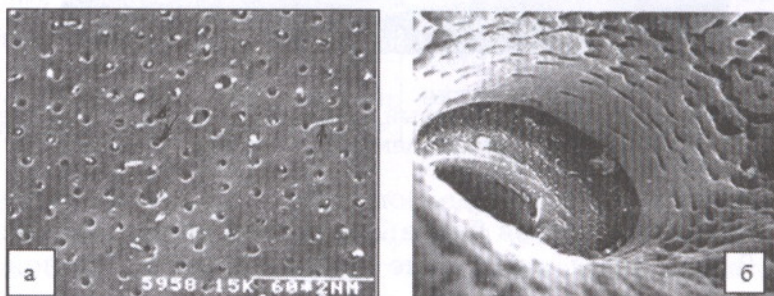


Рис. 25. Ультраструктурные особенности поверхности и внутреннего строения оболочек икринок: а — полосатого окуня *Morone saxatilis*;
 б — микропиле икринки белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes) до активации (сканирующий электронный микроскоп, ув. 7800) [Микодина, Стребкова, 1998]

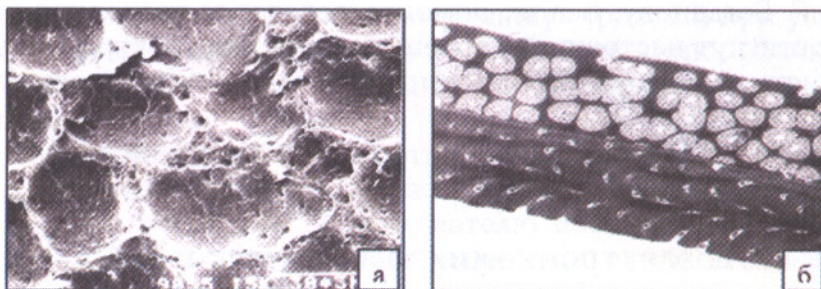


Рис. 26. Ультраструктурные особенности поверхности и внутреннего строения оболочек, трансмиссионный электронный микроскоп:
 а — балтийской салаки с порами. Ув. 1700; б — корейской востробрюшки, срез яйцевой оболочки. Ув. 5000 [Микодина, 1987]

туры. Метод позволяет оценивать качество икры, полученной как в процессе спонтанного нереста, так и при его стимуляции, а также контролировать адекватность протекания завершающих этапов созревания яйцеклеток [Микодина, Стребкова, 1998]. Кроме этого, с помощью электронной микроскопии проводится идентификация икринок рыб в процессе изучения ихтиопланктона из промысловых и малоисследованных, но перспективных в промысловом отношении регионов Мирового океана. Это возможно потому, что ультраструктура поверхности яйцевых оболочек икринок рыб является общепризнанным систематическим критерием [Riehl, Schulte, 1977; Макеева, Микодина 1977; Микодина, Макеева, 1980; Воробьева и др., 1986; Микодина, 1987; Olivar and Fortuño, 1991; Воробьева, Марков, 1999; Микодина, Пукова, 2002].

На рис. 24 – 26 приводятся электронограммы поверхности икринок различных видов промысловых рыб: севрюги, полосатого окуня и других.

.....

5. Фиксаторы, используемые для изучения *in toto* строения икринок, личинок и мальков рыб и других гидробионтов

В ихтиологии часто необходимо изучение структур мелких объектов (развивающихся икринок, личинок, мальков). К таким структурам относятся миотомы, отолиты, кровеносная, пищеварительная и нервная системы, включая отделы мозга, форма и расположение пигментных клеток и т.д.

В связи с этим необходимы специальные методы обездвиживания организма, его фиксации, усиления (экспансии пигментных клеток) или ослабления (контракции пигментных клеток) окраски, увеличения контрастности и прозрачности структур тела.

О некоторых свойствах фиксаторов

Наиболее часто для фиксации гидробионтов используют водные растворы формальдегида и различные растворы на его основе. Для предварительной фиксации применяют 10%-ный формальдегид (1 часть 40%-ного формальдегида (100%-ный формалин) на 3 части воды) с последующим хранением объекта в 4%-ном формальдегиде [Гайер, 1974]. Недостатком этих фиксаторов является набухание объектов, устраняемое введением в состав фиксирующей смеси гипертонических растворов различных солей, сахара, глицерина [Кононский, 1976]. Эти фиксаторы вызывают также побеление глаз объекта, слизи и других частей тела из-за образования «сшивок» между формальдегидом и рядом веществ объекта, что затрудняет работу с мелким объектом (рисование, подсчет миотомов и пр.). Для лучшей сохранности липидов объекта в фиксирующую смесь на основе формалина добавляют кальций [Вакег, 1958]. При использовании фиксаторов на основе альдегидов, как правило, естественный цвет объекта не сохраняется. В одних слу-

чаях причиной этому является наличие в растворе фиксатора кислорода и плохая герметизация препарата, приводящие например к исчезновению цвета каротиноидных пигментов, в других — прямое воздействие формальдегида на структуры пигментных клеток, в частности гуанофоров, в-третьих — окраска маскируется слоем побелевшей слизи.

Другими часто используемыми бальзамирующими веществами являются 80—85° этанол и реже ацетон. В спиртах и ацетоне объект теряет воду, а, следовательно, и объем. Липиды и жирорастворимые пигменты экстрагируются из объекта в спирт или ацетон. Происходит побеление тканей объекта из-за денатурации белков.

Все химические фиксирующие вещества К. Цейгер [Zeiger, 1960] подразделяет на две основные группы: стабилизаторы липидов и коагуляторы белков. К первой группе относятся: четырехокись осмия, двуххромовокислый калий, формальдегид и высшие альдегиды [Гайер, 1974]. Ко второй группе относятся: спирты, ацетон и другие родственные им вещества. Механизмы фиксирующего действия этих веществ изложены в ряде монографий [Пирс, 1962; Кононский, 1976]. Представители второй группы являются растворителями каротиноидных пигментов, а также нарушают целостность белково-пигментных комплексов. Следует отметить, что осмиевая (четыреокись осмия) и пикриновая кислоты крайне медленно диффундируют в объект. Весьма быстро диффундируют в ткани альдегиды и ряд кислот, такие как трихлоруксусная кислота, уксусная кислота и другие. Однако кислоты смещают рН в область низких значений. При этом их соли не обладают должным бальзамирующим действием, в связи с чем они требуют значительно бо́льших концентраций, что само по себе увеличивает осмотичность раствора. Соли, в том числе и бензоат натрия, по нашим данным, при концентрациях, вплоть до близких к насыщению, не блокируют активность пищеварительных ферментов, что приводит к мацерации органов внутренней полости рыб и личинок. Среди альдегидов есть закономерность — чем больше молекулярная масса альдегида, тем меньше скорость его диффузии в тело объекта. Формалин также не является идеальным бальзамирующим агентом, хотя ряд его недостатков могут быть устранены. Так способность формальдегида образовывать связи типа мостиков между соседними цепями белков служит причиной успешного применения его в качестве полимеризующего фактора в процессе фиксации тканей. Однако формалин вступает в реакцию с аминогруппой гуанина, образуя имины, что приводит к исчезновению гуанинового блеска покровов рыб. Непосредственное участие в

процессе фиксации белков формальдегидом принимают следующие группы: амино-, имино- и амидогруппы, пептидная, гуанидиновая, гидроксильная и карбонильная группы, SH-группа, и, наконец, ароматические кольца. Большую роль в образовании формальдегидных мостиков между отдельными группировками в белках играет пространственное их размещение и pH среды. Большинство связей формальдегида с аминокислотами лабильно, т. е. при отмывке объекта эти связи распадаются. Единственной необратимой реакцией является реакция формалина с атомом водорода ароматических колец триптофана, тирозина, фенилаланина и гистидина. По-видимому, в тканях после фиксации формалином и отмывки водой в связанном с белками состоянии остается не менее 2,6% формальдегида [Пирс, 1962].

При содержании формальдегида менее 0,2%, объект сгнивает. Недостатками применения формалина являются: побеление слизи на поверхности рыб и помутнение глаз. Первое можно исправить, удалив слизь с поверхности рыбы еще до ее помещения в фиксатор. Для восстановления прозрачности глаз и иных структур используют просветляющие вещества.

Способы, применяемые для быстрого изменения окраски рыб

При изучении постэмбриологического материала (личинок, мальков) существует две проблемы. Первая — усиление экспансии пигментных клеток, что необходимо при определении видовой принадлежности личинок в ихтиопланктоне. Вторая — усиление контракции пигментных клеток при изучении структур расположенных ниже пигментного слоя кожи. Следовательно, необходимо создание методов регулирующих интенсивность самой окраски объекта до начала процесса ее фиксации. В нее входят задачи усиления естественной окраски объекта или ослабление яркости и насыщенности цвета отдельных пигментных клеток для выявления тонов или структур, замаскированных ими. Эта проблема сводится к поиску методов искусственной регуляции процессов экспансии и контракции различных пигментных клеток.

Изменить окраску рыб, их мальков и личинок можно за счет искусственной экспансии или контракции меланина в меланофорах.

Надежные результаты дают химические методы усиления или ослабления окраски. Принцип действия химических веществ, из-

меняющих окраску, основан на воздействии их на мембранные структуры меланофоров, приводящие к изменению адгезивности между киноплазмой, содержащей гранулы пигментов (например меланина), и поверхностной мембраной меланофора.

Установлено, что 0,03—0,1%-ный водный раствор глютарового альдегида значительно усиливает красные, желтые и зеленые тона при умеренном усилении черной окраски. Максимальное усиление окраски наступает через 20 мин. Однако при этих концентрациях, даже после отмывки от него водой, глютаровый альдегид вызывает покоричневение тканей тела и исчезновение гуанинового блеска. Более того, раствор глютарового альдегида не удаляет слизь с поверхности тела рыбы. Однако он хорошо контрастирует внутренние структуры объекта.

Экспансии меланофоров способствуют многие поверхностно-активные вещества [Строганов, 1962]. В качестве эффективного вещества, осуществляющего экспансию меланофоров, нами предложен раствор акриламида [Микулин, 1998; 2000; 2005]. Для пресноводных рыб и их молоди максимальная экспансия меланофоров наступает в 4—7%-ном водном растворе акриламида. При этом 7%-ный раствор акриламида одновременно удаляет слизь с поверхности тела рыбы. 4%-ный раствор акриламида плохо удаляет слизь с поверхности тела рыб. Для морских рыб этот раствор готовится на морской воде, а для донных морских рыб, с большим слизиотделением, концентрация акриламида должна быть увеличена до 10%. Для стабилизации пигментов, при дальнейшей проводке в растворы с акриламидом, нужно добавить 0,5—1 г тиомочевины на 100 мл раствора [Obata, Matano, 1953].

Контракцию меланофоров можно получить в присутствии двухвалентных и особенно одновалентных катионов [Кольцов, 1940а, б]. Использование NaCl для этих целей не пригодно, поскольку при концентрациях, вызывающих контракцию меланофоров, исчезает блеск гуанофоров. Наилучшие результаты были получены при использовании KNO_3 в концентрации 3,5%. Для одновременного удаления слизи оптимален раствор, включающий: 4%-ный раствор акриламида, 0,5%-ный раствор тиомочевины и 3,5%-ный раствор KNO_3 .

Обездвиживание живых объектов

Для обездвиживания объектов можно включать в состав этого раствора анестезирующие вещества, используемые в рыбоводной

практике [Климонов, Никоноров, Витвицкая, 1995]. Мы применяли для этих целей менокаин [Král, Borovička, 1986] или смесь менокаина с хинальдином в концентрациях по 10 мг/л [Микулин и др., 1990], а также MS-222.

Особое значение анестетики приобретают при фиксации беспозвоночных. Анестезирующие вещества, используемые для рыб, типа менокаин и ему родственные по действию, мало пригодны для беспозвоночных. Так для обездвиживания и расправки морских ангелов — *Clione limacina* (Крылоногие моллюски) предпочтительнее использовать 96° этанол в количестве 4 мл на 100 мл морской воды. Для обездвиживания кишечнорастных оптимален 1–20%-ный раствор $MgCl_2$ на морской воде [Валовая, Кавтардзе, 1993].

Одним из новых природных анестетиков, применяемых для рыб, является гвоздичное масло [Kouřil et al., 2003]. Его можно применять и для обездвиживания личинок и мальков рыб с продолжительным периодом (несколько часов) сохранения их живыми в неподвижном состоянии. Для этих целей гвоздичное масло можно использовать в количестве 1–2 капли его маслянистого раствора на 1 литр воды. После добавления гвоздичного масла в воду эту смесь следует энергично взболтать.

Просветляющие составы

Для просветления изучаемых объектов используются различные масла, например кедровое или пихтовое. Однако употребление масел требует предварительного обезвоживания объекта, что искажает его структуры. Применяют также водорастворимые вещества, такие как глицерин, растворы различных сахаров. Последние сильно обезвоживают объект, в результате чего искажаются его форма и мелкие структуры. Наиболее известным и употребительным просветляющим раствором для развивающихся икринок и личинок рыб является жидкость Серра. В ее состав входят 6 частей этилового 96 или 100° спирта, 3 части 40%-ного формалина и 1 часть ледяной уксусной кислоты, которую лучше добавлять перед употреблением.

В качестве вещества восстанавливающего, поддерживающего или усиливающего прозрачность структур фиксируемого объекта нами [Микулин, 1998] предложен N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД). Для поддержания нормальной прозрачности объек-

та, достаточно его наличия в составе фиксатора в количестве 0,1–0,2%. Для повышения или восстановления прозрачности, например после долгого хранения объекта в формалине, его концентрацию можно повысить до 0,8%. Интересной особенностью воздействия ТЕМЭД на структуры глаз рыб является то, что в присутствии формалина прозрачность глаз сохраняется лучше, чем в его отсутствии, более того, формальдегида должно быть в этом растворе не менее 2,4%, но и не более 4%. Следует учитывать, что в присутствии ТЕМЭД у раствора рН смещается в щелочную сторону и его необходимо подкислить.

Использование фиксирующих смесей на основе формальдегида с включением в его состав ТЕМЭД позволяет сохранять естественную прозрачность эмбриологического материала, в частности, личинок рыб [Микулин, 1990]. Введение в состав фиксирующих смесей повышенных концентраций ТЕМЭД с одновременным применением гистологических красителей и веществ, контрастирующих различные структуры объекта [Пирс, 1962] существенно улучшает качество эмбриологических исследований.

Еще одной положительной стороной совместного нахождения формальдегида и ТЕМЭД в фиксирующем растворе является усиление за счет них жесткости структур фиксируемого объекта. Одинаково жесткие структуры можно получить совместным воздействием на них ТЕМЭД и формальдегида в концентрациях соответственно: 3 и 1%; 1 и 5%; 0,5 и 10%; 0,1 и 20%, причем жесткость структур тела объекта возрастает уже в первые 1–5 мин.

Для эмбриологических исследований объектов с малопрозрачными покровами или тканями создан [Микулин, 1998] просветляющий раствор следующего состава: 10 мл 40 %-ного раствора формальдегида; 0,6 г ЭДТА; 0,15 мл ТЕМЭД на 90 мл дистиллированной воды. Увеличивая или уменьшая содержание ТЕМЭД в этом растворе, можно достичь необходимой прозрачности структур личинок и мальков. Так, повышение содержания ТЕМЭД в данном растворе до 0,8 мл, позволяет восстанавливать прозрачность объекта даже после его длительного хранения в спирте или формалине.

6.

Современные приборы в гистологии

В последние годы появился комплекс приборов для изготовления гистологических препаратов (рис. 27, 28). В комплект современной гистологической лаборатории входят:

- автоматическая система для проводки тканей;
- двублоковая заливочная станция;
- автомат для заточки микротомных ножей;
- санный микротом с автоматической ретракцией;
- автоматическая система для окраски;
- автомат для заключения препаратов под покровные стекла;
- водяная баня и нагревательный столик;
- компьютерный аналитический комплекс «Optimas».

Это позволяет проводить гистологические исследования быстрее и на качественно новом современном методическом уровне. Полученные материалы используются при разработке новых подходов к прогнозированию численности рыб, расчетов величины общих допустимых уловов (ОДУ) и объемов ресурсного обеспечения процесса искусственного воспроизводства.

Автоматическая система для проводки тканей карусельного типа Microm STR 120 позволяет провести в течение четырех часов 60 объектов. Проводка и пропитка парафином (или гисторезиной) проходит в режиме регулируемого давления, с установкой определенной скорости перемешивания (см. рис. 27, б). Автомат для гистологической обработки тканей предлагает ряд возможностей программирования для фиксирования и обезвоживания гистологических проб с помощью реактивов и для их последующей инфильтрации с помощью парафина. Система управления позволяет программировать до 10 различных используемых программ (табл. 33).



Рис. 27. Гистологическая лаборатория ВНИРО:

а — общий вид; *б* — автоматическая система для проводки тканей карусельного типа; *в* — двублоковая заливочная станция; *г* — автомат для заточки микротомных ножей (стрелка), термостат; *д* — нагревательный столик для расправления микросрезов, санный микротом с автоматической установкой ретракции

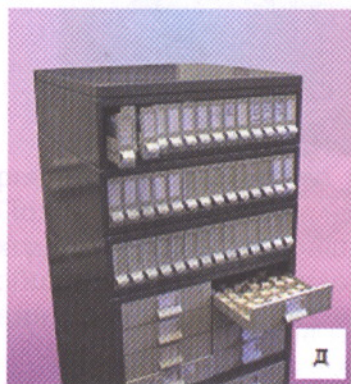
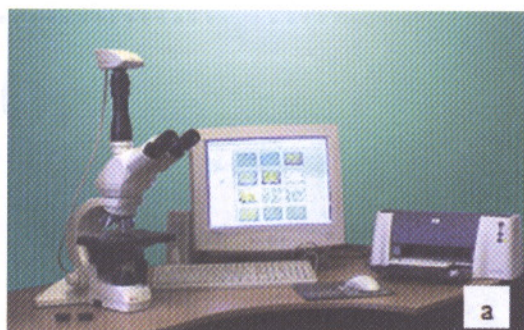


Рис. 28. Гистологическое оборудование: *а* — компьютерный аналитический комплекс «Optimas» для изучения и анализа изображения гистологических срезов органов и тканей; *б* — цифровая видеокамера; *в* — автоматическая система для окраски; *г* — автомат для заключения препаратов под покровные стекла; *д* — система хранения готовых гистологических препаратов и парафиновых блоков; *е* — нагревательный столик и водяная баня

Таблица 33. Пример используемой программы

Сосуд с реактивом, №	Реактив	Экспозиция, мин	Скорость перемешивания, об/с
1	Формалин 4%	2	60
2	Формалин 4%	2	60
3	Спирт 96°	30	70
4	Спирт 96°	30	70
5	Спирт 96°	40	70
6	Спирт 100°	40	70
7	Спирт 100°	40	70
8	Спирт 100° + ксилол	20	70
9	Ксилол-I	30	70
10	Ксилол-II	30	60
11	Парафин-I	60	60
12	Парафин-II	60	60

В зависимости от исследуемого материала, в стаканах меняются реактивы, экспозиция, скорость перемешивания.

Заливочная станция Microm: ЕС 350-1, ЕС 350-2 для изготовления парафиновых блоков, состоит из станции заливки парафином (или гисторезиной) и охлаждающей платы (см. рис. 27, в). Встроенный фильтр обеспечивает постоянный поток парафина, регулируемый по интенсивности.

Автомат для заточки микротомных ножей Microm KS 185 (см. рис. 27, г — стрелка) используется для получения высокоточной и качественной режущей кромки препарата. Этот станок позволяет увеличить производительность заточки, исключить утомительную работу по ручной правке микротомных ножей, обеспечивает восстановление шлифовальных пластин.

Санний и ротационный микротомы, которые гистологи всего мира использовали полвека назад для получения тонких срезов, также претерпели существенные изменения. Современные микротомы Microm HM 440 E полностью моторизованы, с автоматической установкой ретракции, цифровым дисплеем, возможностью

установки дополнительного микроскопа и осветителя, с установкой классических и одноразовых ножей, которые дают возможность изготавливать срезы толщиной 0,5—60 мкм (см. рис. 27,г).

Компьютерный аналитический комплекс «Optimas» для изучения и анализа изображения гистологических срезов органов и тканей. Комплекс включает модульное программное обеспечение и новейшее микроскопное оборудование для оптимального решения множества задач по анализу и обработке изображения (см. рис. 28,а).

Автоматическая система для окраски препаратов HMS 70 обеспечивает быструю окраску либо по простой программе, либо по сложной — окраске, например с одновременной окраской гематоксилином и эозином (см. рис. 28,в). В зависимости от программы обеспечивается окраска минимум до 200 препаратов в час.

Автомат для заключения препаратов под покровные стекла. Корзины могут содержать каждая 19 или 30 предметных стекол. Операторное управление легко осуществляется с помощью сенсорной панели. С устройством могут быть использованы покровные стекла длиной 40, 50 и 60 мм. Допускает использование различных типов имеющихся в продаже заключающих сред. Объем помещаемой на предметное стекло среды можно регулировать по ходу работы. Этот автомат позволяет максимально упростить и ускорить процесс заключения препаратов под покровные стекла (см. рис. 28,г).

Водяная баня и нагревательный столик для расправления парафиновых срезов Hi 1220 Zeiss позволяют расправлять и закреплять срезы на предметном стекле (см. рис. 28,е).

7.

Приемы и методы используемые во ВНИРО

Работая на современном оборудовании, весь процесс приготовления гистологических препаратов, описанный нами выше, происходит быстрее и качественнее.

Кусочки ткани, фиксированные в 4%-ном формальдегиде, помещают в кассеты (рис. 29) и закладывают в специальную корзину, которая опускается в стакан, предназначенный для проводки материала. Затем на дисплее автомата для гистологической обработки тканей (см. рис. 27,б), в зависимости от структуры исследуемой ткани, выставляется та или иная программа (см. табл. 33).

После завершения проводки кассеты с материалом переносятся в теплую часть заливочной станции (см. рис. 27,в). Заливку объекта парафином производят в специальные готовые заливочные кюветы с кольцами (см. рис. 4,а, в), которые позволяют не насаживать объект на брусочек. После затвердения парафина на охлаждающей плате готовый блок сразу можно фиксировать в держателе микротомы и приступать к резке. Перед началом резки парафиновых блоков готовятся предметные и покровные стекла (см. стр. 26). Резка парафиновых блоков осуществляется на санном микротоме с автоматической установкой ретракции и цифровым дисплеем, получая срезы толщиной 3—6 мкм (см. рис. 27,г). Для подготовки препарата к окраске проводится их депарафинирование — освобождение от парафина, и оводнение (см. табл. 6).

В лаборатории прикладной физиологии и морфологии гидробионтов ВНИРО имеются все вышепе-

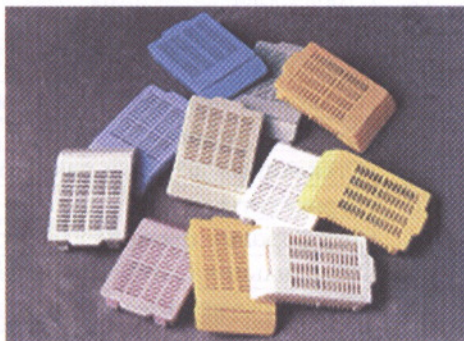


Рис. 29. Кассеты для закладки исследуемой ткани при проводке через карусель

речисленные приборы (см. разд. 6. Современные приборы в гистологии), кроме системы для окраски препаратов и автомата для заключения препаратов под покровные стекла. Учитывая, что в гистологии существует большое разнообразие методов окрашивания, которые позволяют увидеть и проанализировать интересующую структуру или гистологический объект (прежде всего это связано с целью работы), мы решили отказаться от этих приборов и окраску проводим по схемам, описанным выше (см. разд. 1. Классический метод изготовления...).

Технические и химические средства обеспечения гистологических работ

Таблица 34. Лабораторное стекло и инструменты

Номер п/п	Наименование	Кол-во, шт.
1.	Бюксы разного размера	100
2.	Венчик	1
3.	Гистологические стаканы с надевающейся свободной крышкой для окраски	40
4.	Гистологические стаканы с притертой крышкой	200
5.	Колбы огнеупорные	5
6.	Ножницы	5
7.	Пинцеты: анатомический, хирургический, глазной	по 5
8.	Пипетки мерные	5
9.	Пластиковые контейнеры на 30, 50 мл с завинчивающимися крышками для фиксации объектов	1000
10.	Покровные стекла	15000
11.	Предметные стекла со шлифом	5000
12.	Препаровальные иглы	6
13.	Простоквашница	1 – 2
14.	Скальпели	5
15.	Склянки с притертой пробкой для хранения спиртов на 2 л	10
16.	Стаканы мерные	5
17.	Стеклянные воронки разного размера	5
18.	Термостаты на 37 °С и на 56 °С	1
19.	Фарфоровые стаканы для расплавления и фильтрации парафина	5
20.	Холодильник бытовой с морозильной камерой	1
21.	Цилиндры мерные	3
22.	Часовые стекла	10
23.	Чашки Петри (большие и маленькие)	по 10
24.	Эксикатор	1
25.	Электроплитка	1

Таблица 35. Реактивы для гистологии

Номер п/п	Наименование реактивов	Номер п/п	Наименование реактивов
1.	4-метил-2-пентанол	28.	Метиловый зеленый
2.	Азокармин G	29.	Метиловый спирт
3.	Азотнокислый свинец	30.	Оранж-Г
4.	Акрил	31.	Паральдегид
5.	Активированный уголь	32.	Парафин
6.	Анилин	33.	Периодная кислота $\text{HJO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
7.	Анилиновое масло	34.	Периодат калия $\text{KJO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (или периодат натрия $\text{NaJO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
8.	Анилиновый синий	35.	Перекись водорода
9.	Ацетон	36.	Перманганат калия
10.	Бисульфит натрия или калия	37.	Пикриновая кислота
11.	Бутанол	38.	Полиэтилметакрил
12.	Гематоксилин	39.	Пчелиный воск
13.	Глицерин	40.	Световой зеленый
14.	Голубой толуидиновый	41.	Серная кислота
15.	Даммаровый лак	42.	Соляная кислота конц.
16.	Желатин	43.	Спирт солянокислый
17.	Железоаммонийные квасцы	44.	Тимол
18.	Иодноватокислый калий	45.	Уксусная кислота
19.	Калийные квасцы	46.	Формальдегид
20.	Канадский бальзам; пихтовый бальзам	47.	Фосфорновольфрамовая кислота
21.	Карболовая кислота	48.	Фосфорномолибденовая кислота
22.	Кармин	49.	Хлороформ
23.	Касторовое масло	50.	Хромотрон 2Р
24.	Кислый фуксин	51.	Целлоидин
25.	Ксилол	52.	Эозин
26.	Ледяная уксусная кислота	53.	Эритрозин
27.	Медицинский эфир	54.	Этиловый спирт

Таблица 36. Реактивы для гистохимии

Номер п/п	Наименование реактивов	Номер п/п	Наименование реактивов
1.	Альциановый синий	11.	Пиронин
2.	Бромфеноловый синий	12.	Прочный зеленый
3.	Галлоцианин	13.	Рибонуклеаза
4.	Гидроксид натрия NaOH (от 2 мг на 1 р-р)	14.	Са-формол
5.	Двуххромовокислый калий	15.	Судан III
6.	Индикаторные бумажки pH 2,0 – 10,0	16.	Трихлоруксусная кислота 5% (ТХУ)
7.	Карболовая кислота	17.	Фуксинсернистая кислота
8.	Лимонная кислота крист.	18.	Хлоралгидрат (от 50 мг на 1 р-р)
9.	Метабисульфит натрия или калия (NaHSO ₃)	19.	Хлорид ртути HgCl ₂
10.	Нильский голубой, водн. р-р	20.	Хромовые квасцы

**Таблица 37. Реактивы
для электронной микроскопии**

Номер п/п	Наименование реактивов
1.	Глютаровый альдегид
2.	Лак для ногтей прозрачный
3.	Толуидиновый голубой
4.	Уранилацетат
5.	Фосфатный буфер
6.	Цитрат свинца (по Рейнольду)
7.	Четырехокись осмия, 1% р-р
8.	Эпоксидная смола ЭПОН-812
9.	Аралдит 502 или Аралдит М

**Таблица 38. Реактивы для гистологии
с использованием гисторезины**

Номер п/п	Наименование реактивов
1.	Гисторезина Tehnovit
2.	Смесь Mountex (60% ксилена, акрил, полиметакрил)
3.	Формальдегид
4.	Закрепляющая жидкость Tehnovit 3040
5.	Желтый порошок Tehnovit 3040
6.	Тетраборат соды
7.	Хлористый аммоний
8.	Глицерин

Литература

- Акимова Н.В., Горюнова В.Б., Микодина Е.В., Никольская М.П., Рубан Г.И., Соколова С.А., Шагаева В.Г., Шатуновский М.И. 2004. Атлас нарушений в гаметогенезе и развитии молоди осетровых. М.: Изд-во ВНИРО. 121 с.
- Алмазов И.В. и Сутулов Л.С. 1978. Атлас по гистологии и эмбриологии. М.: Медицина. 543 с.
- Валовая М.А., Кавтарадзе Д.Н. 1993. Микротехника. Правила, приемы, искусство. Эксперимент. М.: Изд-во МГУ. 240 с.
- Волкова О.В., Елецкий Ю.К. 1971. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. 271 с.
- Воробьева Э.И., Рубцов В.В., Марков К.П. 1986. Влияние внешних факторов на микроструктуру оболочек икры рыб. М.: Наука. 108 с.
- Воробьева Э.И., Марков К.П. 1999. Ультраструктурные особенности икры у представителей *Acipenseridae* в связи с биологией размножения и филогении // Вопросы ихтиологии. Т.39. Вып. 2. С. 197–209.
- Гайер Г. 1974. Электронная гистохимия. М.: Мир. 488 с.
- Гербильский Н.Л. 1949. Труды лаборатории основ рыбоводства. Л.: Трансжелдориздат. Т.2. С. 5–28.
- Дорошенко М.А. 2004. Гистофизиология органов обоняния морских рыб: Моногр. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 226 с.
- Дроздов А.А., Иванков В.Н. 2000. Морфология гамет животных. Значение для систематики и филогенетики. М.: Круглый год. 453 с.
- Евгеньева Т.П. 2000. Патология мышечной ткани осетровых рыб. М. Россельхозакадемия. 102 с.
- Иванков В.Н. 1987. Строение яйцеклеток и систематика рыб. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 160 с.
- Иванков В.Н. и др. 2001. Репродуктивная биология рыб. Владивосток: Изд-во ДВГУ. 230 с.
- Калашникова М.М. 2003. Ультраструктурные аспекты приспособительных особенностей клеток печени позвоночных. М.: Россельхозакадемия. 194 с.
- Кисели Д. 1962. Практическая микротехника и гистохимия. М.: Мир. 399 с.
- Климонов В.О., Никоноров С.И., Витвицкая Л.В. 1995. Справочник по применению анестезирующих веществ в рыбоводстве. М.: ТОО «Мединор». 170 с.
- Кольцов Н.К. 1940а. Гормональная регуляция меланофоров // Докл. АН СССР. Т.28. Вып.6. С. 548–553.

- Кольцов Н.К. 1940б. Нервная регуляция меланофоров // Докл. АН СССР. Т.28. Вып.5. С. 463–469.
- Кононский А.И. 1976. Гистохимия. Киев: Вища школа. 276 с.
- Кошелев Б.В. 1984. Экология размножения рыб. М.: Наука. 307 с.
- Кюнель В. 2006. Цветной атлас по цитологии, гистологии и микроскопической анатомии. М.: Изд-во «Астрель». 534 с.
- Лилли Р. 1969. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир. 645 с.
- Луппа Х. 1980. Основы гистохимии. М.: Мир. 399 с.
- Макаров П.В. 1959. Окраска прочным зеленым // Тр. сан. гиг. ин-та. Т.43. С. 47–63.
- Макеева А.П. 1992. Эмбриология рыб. М.: МГУ. 216 с.
- Макеева А.П., Микодина Е.В. 1977. Строение яйцевых оболочек карповых рыб и некоторые данные об их химической природе // Научные доклады высшей школы. Сер. Биологические науки. №9. С. 60–64.
- Малый практикум по цитологии. 1977. М.: МГУ. 287 с.
- Мейен В.А. 1939. К вопросу о годовом цикле изменений яичников костистых рыб // Изв. АН СССР. Сер. биол. №3. С. 389–420.
- Микодина Е.В. 1979. Микроструктура яйцевых оболочек костистых рыб разных экологических групп. Дисс... канд. биол. наук. М.: МГУ. 196 с.
- Микодина Е.В. 1987. О структуре поверхности оболочек икринок костистых рыб // Вопр. ихтиологии. Т.27. Вып.1. С. 106–113.
- Микодина Е.В., Стребокова Т.П. 1998. Морфофизиологические особенности созревания самок полосатого окуня *Morone saxatilis*, выращенных в бассейнах с морской водой // Рыбное хозяйство. Сер. Аквакультура: Информ. пакет ВНИЭРХ. Вып.5. С. 1–21.
- Микодина Е.В., Макеева А.П. 1980. Строение и некоторые свойства яйцевых оболочек пресноводных пелагофильных рыб // Вопросы ихтиологии. Т.20. С. 298–306.
- Микодина Е.В., Пукова Н.В. 2002. Методические рекомендации по изучению фенотипических признаков семенников у дальневосточных лососей. М.: Экономика и информатика. 94 с.
- Микулин А.Е. 1990. Фиксация икры и личинок рыб с сохранением их естественной окраски // Водные ресурсы и экология гидробионтов. Сборник научных трудов ВНИИПРХ. М.: ВНИИПРХ. Вып. 59. С. 136–140.
- Микулин А.Е. 1998. Приоритетные технологии в пищевой промышленности // Тезисы докладов научно-технической конференции. Вып.1. С. 58–59.
- Микулин А.Е. 2000. Способ консервации гидробионтов с сохранением их естественной окраски // Авторск. свид. № 98120239/14(022299).
- Микулин А.Е. 2005. Сохранение естественной окраски гидробионтов: Теория и методы. М.: ВСХИЗО. 153 с.
- Мурза И.Г., Христофоров О.Л. 1991. Определение стадий зрелости гонад и прогнозирование возраста достижения половой зрелости у атлантического лосося и кумжи // Методические указания. Л.: ГосНИОРХ. 102 с.
- Овен Л.С. 1976. Особенности оогенеза и характер нереста морских рыб. Киев: Наукова думка. 131 с.

- Овен А.С. 2004. Специфика развития половых клеток морских рыб в период размножения как показатель типа нереста и реакции на условия среды обитания. М.: Изд-во ВНИРО. 188 с.
- Персов Г.М. 1975. Дифференцировка пола у рыб. Л.: Изд-во ЛГУ. 148 с.
- Петруняк В.В. 1979. Сравнительное распределение и роль каротиноидов и витамина А в тканях животных. Участие полиенов в механизмах накопления и транспорта кальция // Журн. Эволюц. биохимии и физиологии. Т.15. №1. С. 112—119.
- Пирс Э. 1962. Гистохимия. М.: Иностранная литература. 962 с.
- Проблемы репродуктивной биологии в трудах профессора С.И. Кулаева и его последователей: Сб. ст. М.: Изд-во МГУ. 348 с.
- Пьянова С.В., Кчесбу У.С. 2004. Состояние репродуктивной системы и резорбция ооцитов у норвежской весенне-нерестующей сельди *Clupea harengus* // Проблемы репродукции и раннего онтогенеза морских гидробионтов (г. Мурманск, 2—4 ноября 2004 г.) Мурманск: ММБИ КНЦ РАН. С. 102—106.
- Ромейс Б. 1953. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература. 648 с.
- Роскин Г.И. 1951. Микроскопическая техника. М.: Советская наука. 478 с.
- Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. 1957. Микроскопическая техника. М.: Советская наука. 478 с.
- Сакун О.Ф., Буцкая Н.А. 1968. Определение стадий зрелости и изучение половых циклов рыб. Мурманск. Изд-во ПИНРО. 48 с.
- Самусев Р.П., Смирнов А.В. 2006. Атлас по цитологии, гистологии и эмбриологии: учебное пособие для студентов высш. мед. учеб. заведений. М.: Изд-во Онйко : Изд-во Мир и Образование. 400 с.
- Строганов Н.С. 1962. Экологическая физиология рыб. М.: Изд-во МГУ. Т.1. 444 с.
- Туркевич Н.Г. 1967. Реконструкция микроскопических объектов по гистологическим срезам. М.: Медицина. 175 с.
- Уикли Б. 1975. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир. 275 с.
- Фрайштат Д.М. 1980. Реактивы и препараты для микроскопии. Справочник. М.: Химия. 479 с.
- Baker J.R. 1958. Principles of biological microtechnique. London. New York: Methuen and Co. Ltd. 104 p.
- Hunter J.R. and Macesewicz B.J. 1985. Rates of atresia in the ovary captive and wild northern anchovy, *Engraulis mordax* // Fish. Bull. Vol.83 N2. P. 119—136.
- Kjesbu O.S., Witthames P.R., Solemdal P, Greer Walker M. 1998. Temporal variations in the fecundity of Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*) in response to natural changes in food and temperature // Journ. Sea Researches. N40. P. 303—321.
- Kouřil J., et al. 2003. Effects of temperature on sensitivity of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) to clove oil as anaesthetic // Reports and Abstracts of the International Symposium «Cold Water Aquaculture: Start in the XXI century». М.: Rosinformagrotekh. P. 111.
- Král J., Borovička A. 1986. Vysledky vyvoe noveho anestetika pro ryby // Reprodukce a genetika ryb. S. 210—214.
- Mayhew T.M. 1991. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure // Journ. of neurocytology. V.21. P. 313—328.

- Obata Y, Matano K. 1953. A New Method to make Specimens of Fishes // Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries. V.18. N11. P. 3–6.
- Olivar M.-P., Fortuño J.-M. 1991. Guide to Ichthyoplankton of the Southeast Atlantic (Benguela Current Region) // Sci. Mar. V.55 (1). 383 p.
- Takashima F. Hibiya T. (eds.) 1995. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Tokyo / Stuttgart, Kodansha / G. Fischer Verlag. 195 p.
- Turner C.L. 1919. The seasonal Cycle in the Spermary of the Perch // J. Morph. V.32. N3.
- Witthames P.R. and Walker G. 1995. Determinacy of fecundity and oocyte atresia in sole (*Solea*) from the Channel, the North Sea and the Irish Sea // Aquat. Liv. Res. Vol.8. N1. P.91 – 109.
- Wolf J. 1954. Mikroskopicka technika. Opticka i elektronova pro biologicke ucely. Brno. 652 c.
- Zeiger R. 1960. Probleme der Fixation in Licht- und Elektronenmikroskopie // Vierter internationaler Kongress fur Elektronenmikroskopie. Verhandlungen. Bd.11. S. 17.

Предметный указатель

А

- Абсолютный спирт 23, 31, 34, 35, 37, 56
- Автомат для заключения препаратов под покрывное стекло 86, 88, 90
- Автомат для заточки микротомных ножей 86, 87, 89
- Автоматическая система для окраски 86, 88, 90
- Автоматическая система для проводки тканей 86, 87
- Аденогипофиз, окраска 33, 38, 41, 42
 - реактивом Шиффа 33, 34
 - по Cleveleland-Wolf 33, 35
 - по McConnail 33, 35
- Адренокортикотропоциты 33
- Азановый метод по Гейденгайну 30, 31
- Азокармин 34
- Акриламид 83
- Альдегиды 17, 66, 68, 74, 75, 80, 81, 83
- Альциановый синий по Стидмену 61, 62, 94
- Аммоний 38, 53
 - уксуснокислый 38
 - хлористый 53
- Анестезирующие в-ва 83, 84
- Анилиновое масло 22, 23
- Анилиновый синий 32, 34, 35, 38, 93
- Анилиновый синий — оранж G (смесь) 34
- Аралдит 72, 73
- Ацетат натрия 69
- Ацетон 17, 29, 71, 72, 75, 81

Б

- Бальзам
 - канадский 29, 33
 - пихтовый 29, 84
- Бальзамирующие в-ва 81
- Батарей 19, 21
- Белки 59, 61, 81, 82
- Белок куриный 26, 27, 53
 - приготовление 27

Бензоат натрия 81

Блок

гисторезиновый 53, 89

парафиновый 17, 18, 21, 25, 26, 89, 91

эпоксидный 73

Бромфеноловый синий 59, 60

Бумажные формочки для заливки («кораблик») 24, 25

Бутиловый спирт 19

Буфер веронал-ацетатный 68, 69

Буфер Зеренсена 68, 70

Буфер какодилатный 68, 70

Буфер Трис-HCl 70, 71

Буфер фосфатный 68, 70, 71

Буферный р-р Миллонига 68, 69

Буферный р-р четырехокси осмия 68, 71

Буэн фиксатор 18

В

Веронал натрия 69

Видеокамера 45

Вителлогенные ооциты 48—51

Водяная баня 86, 90

Выявление ДНК (реакция Фельгена) 56, 57

Выявление ДНК и РНК смесью галлоцианин-хромовыми квасцами 59

Выявление ДНК и РНК (по Унна) 58

Г

Галлоцианин-хромовые квасцы 56, 59

Гвоздичное масло 84

Гейденгайна-азановый метод 29—31, 33, 40, 41

железный гематоксилин по Гейденгайну 29, 36, 41

Гематоксилин 28, 36, 39, 44, 61, 62, 90, 93

по Гейденгайну 36, 41

по Майеру 61, 62

по Эрлиху 28, 36

Гематоксилин-оранж G 40

Гематоксилин свинцовый 42

Гематоксилин-эозин 28, 29, 39, 40, 43, 44

Гепатоцит 43

Гистологические методы 7, 9, 10, 13, 48

Гистохимические методы 55

Гистовакса см. Гисторезина

Гистопласт см. Гисторезина

Гисторезина 47, 52

Гистохимия белков 59, 61

Гистохимия липидов 64

Гистохимия нуклеопротеидов 38, 55

Гистохимия полисахаридов 61

Гликоген 61, 63

Глютаровый альдегид 17, 66, 68, 74, 75, 83, 94
Гомори-Габу 33
Гуаниновый блеск 81, 83

Д

Даммаровый лак 29
Депарафинирование срезов (освобождение от парафина) 26, 27, 56, 58, 91
Двуххромовокислый калий 17, 65, 81
ДНК и РНК — выявление 56—59

Ж

Желатин 37
Железный гематоксилин см. Гематоксилин железный
Железоаммиачные квасцы 29
Железоаммонийные квасцы 31, 36
Жидкость
 Барбагалла 75
 Буэна 17, 18, 59, 61
 Карнуа 17, 55, 56, 61,
 Серра 18, 56, 84
 Флемминга 17
 Ценкера 17
 Шампи 17
 Шаудина 17
 Technovit 3040 53
Жировая дистрофия печени 43

З

Заливка 37, 52, 72, 73
 в парафин 17—19, 23—26, 89, 91
 в гисторезину (гистопласт) 52
Заливочные кюветы и кольца 26, 91
Заливочные среды 27, 29, 47, 66, 72
Заливочная среда на основе Аралдита 72, 73
Заливочная эпоновая среда по Портеру 73
Заливочная станция 86, 89, 91
Зеренсен см. Буфер Зеренсена

И

Изготовление парафинового блока см. Блок
Изменение окраски рыб 80-83
Измерение микрообъектов 44, 46
Инструменты для электронной микроскопии 45, 67
Интенсивность атрезии 48, 49, 51

К

Какодилат 68, 70
Калийные квасцы 36, 61

Канадский бальзам 29, 33
Карболовая кислота 36, 58
Карнуа фиксатор (жидкость) 17, 55, 56, 61
Кассеты для заливки парафином 53, 91
Касторовое масло 21, 22
«Каша» хлороформовая 23
Квасцовый гематоксилин см. Гематоксилин
Кедровое масло 84
Кислота периодная см. Периодная кислота
Кислоты 17
Кислотница 68, 71
Коагуляторы белков 81
Компьютерный аналитический комплекс 45, 46, 88, 90
Контрастирование объекта 74, 83, 85
Ксилол 27—35, 60, 62, 65, 89
Кюветы и кольца для заливки парафином 26, 91

Л

Лак даммаровый см. Даммаровый лак
Ледяная уксусная кислота 34, 37, 38, 56, 65, 84
Лимонная кислота 61
Липиды 64, 65, 80

М

Майер 61, 62
Макаров (краситель) 61
Маллори метод трехцветной окраски 30, 32
Масло
 анилиновое 22, 23
 гвоздичное 84
 кедровое 84
Массона трехцветный метод окрашивания 29, 30
Медный купорос 37
Меланофоры 82, 83
Менокаин 84
Метиловый зеленый 58, 59
Метиловый зеленый-пиронин по Унна 56, 58, 59
Метод «развертки изображения» 48—51
Микроскоп электронный 66, 67, 74—77
Микротом 17, 26, 48, 53, 56, 86
 замораживающий 64
 ротационный (ротаторный) 89
 санный 87, 89
Микротомные ножи 25, 26, 67, 73, 74, 86, 87, 89, 90
Милониг см. Буферный р-р
Мукополисахариды 61, 62
McConnail 33, 35, 42
MS-222 84

Н

Нагревательный столик 26, 48, 54, 86—88, 90

Напыление объектов 76

Насыщенный раствор 18, 29, 38, 64, 74

Натриумкаодилат 70

Нейтральные полисахариды 61, 62

О

Обезвоживание 17, 76, 86

при окрашивании 21, 26, 29

при электронной микроскопии 66, 70, 71, 74—76, 84

препарата после фиксации 19, 21, 22

Обездвиживание объекта 80, 83, 84

Обезжиривание предметных и покровных стекол 27, 29

Окрашивание

азановым методом по Гейденгайну 29—31, 33, 40, 41

альциановым синим по Стилдену 62

бромфеноловым синим 59, 60

выявление липидов по методу Чиаччио 64, 65

гематоксилин-эозином 40, 43, 44

железным гематоксилином по Гейденгайну 29, 31, 36, 41

трехцветным методом Маллори 30, 32

трехцветным методом Массона 29, 30

паралдегид-фуксином (ПАФ) по Гомори-Габу 33, 42

прочным зеленым на основные

и суммарные белки по Олфурту и Гешвинду 59—61

по Хелми-Дыбану 33, 42

по Cleveland-Wolf 33, 35, 38

по McConnail 33, 35

реактивом Шиффа с докраской оранжевым G 33, 34, 42

реакция Фельгена 56, 57

метилловым зеленым пиронином по Унна 56, 58, 59

сульфатом нильского голубого по Смит 64, 65

суданом III по Дадди 64

Шик (PAS)-реакция с докраской гематоксилином Майера 61—63

эозином 42, 44

Окисляющая смесь 37

Окуляр-микрометр 44, 45

Оранжевый G (Оранж G) 33, 34, 36, 38, 40

Осмиевая кислота 17, 81

Осмиевый фиксатор 68—71

Основные и суммарные белки 59—61

П

Паральдегид 37

Паральдегид-фуксин (ПАФ) 33, 37, 41

приготовление 37

окраска по Гомори-Габу 33, 42

Парафин 17—20, 47, 52, 56

приготовление 21

заливка 23—26, 65, 86, 89, 91
депарафинирование 26, 27, 56, 58, 59, 91
Парафиновый блок см. Блок
Периодат калия 64
Периодная кислота 34, 38, 93
Пикриновая кислота 17, 18, 29, 37, 81
Пихтовое масло (бальзам) 84
Подсчет клеток 46, 48—51
Полимеризующая смесь 53
Приготовление целлоидин-касторового масла 22
Портер 37
Продаденогипофиз 42
Проводка 18, 19, 47, 65, 74, 83, 86, 91
 с бутанолом 19, 20
 с гисторезиной 52, 53
 с целлоидин-касторовым маслом 21, 22
Просветляющие средства 18, 19, 29, 82, 84, 85
Просвечивающий электронный микроскоп 74, 75
Протрава 36

Р

Разведение спиртов 20
Расправление парафиновых срезов 26, 48, 53, 54, 90
Рейнольдс см. Цитрат свинца
РНК 58, 59
Рибонуклеаза 59

С

Серра 18, 56, 84
Сернистые воды 56
Свинцовый гематоксилин, приготовление 38
Сканирующий (растровый) электронный микроскоп 9, 66, 75, 76
Смесь анилиновый синий — оранж G 34, 40
Смесь Буэна см. Жидкость Буэна
Смесь ван-Лезувена 38
Смесь Хелми 38
Смит 64, 65
Соляная кислота 37, 56, 59
Соляно-кислый спирт см. Спирты
Спирт
 абсолютный 29, 37, 56
 бутиловый 19, 58
 метиловый 17
 пикриновый 29
 приготовление 20
 спирт-формол 17
 соляно-кислый 29, 37
 этиловый 17, 19, 84
 этаноловый 19, 52, 71, 75, 81, 84

Спиртоэфирная смесь 27
Стабилизаторы липидов 81
Стекло
 обезжиривание 27, 29
 покровное 26, 29, 53, 54, 64, 86, 90
 предметное 21, 26, 27, 49, 67, 90
 часовое 24
Стеклянный нож 67, 73
Стереологический метод «развертки изображения» 49
Стидмен см. Окрашивание
Судан III по Дадди см. Окрашивание
Сулема 17
Сульфат нильский голубой по Смиту см. Окрашивание
Суза фиксатор по Гейденгайну 17

Т

ТЕМЭД (N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин) 84, 85
Тимол 27
Тиомочевина 83
Толуидиновый
 голубой 54
 синий 67, 73
Трансмиссионный электронный микроскоп 74
Трехцветный метод окрашивания см. Окрашивание
Трис 70
Трис-HCl буфер 70
Трихлоруксусная кислота 17, 59, 60, 81

У

Уксусная кислота 17, 18, 33, 36, 38, 61, 81
Уксуснокислый аммоний 38
Унна см. Окрашивание
Ультрамикротомирование 73, 74
Ультратонкие срезы 73, 74
Уранилацетат 74

Ф

Фельген см. Окрашивание
Фиксаторы 17, 18, 64, 71, 80, 81
Фиксатор Суза 17
Фиксатор Чиаччио 65
Формалин см. Формальдегид
Формалин-спирт-уксусная кислота (ФСУ) 17
Формальдегид 17, 18, 33, 52, 59, 64, 65, 75, 80–82, 84, 85, 89, 91, 93, 94
Формваровая подложка 74
Формол см. Формалин
Фосфатный буфер см. Буфер фосфатный
 составление буфера с требуемым pH 70, 71
Фосфорно-молибденовая кислота 38

Фосфорно-молибденовый гематоксилин по Маллори см. Окрашивание
Фуксин 36, 37, 56
Фуксинсернистая кислота 56

Х

Хелми-Дыбан см. Окрашивание
Хелми смесь см. Смесь Хелми
Хинальдин 84
Хлороформ 55, 56, 58
Хлороформовая «каша» 23
Хранение препаратов 46, 88
Хромовые квасцы 59

Ц

Целлоидин-касторовое масло 19, 21, 22, 56
Цитрат свинца 67, 74
по Рейнольдсу 74

Ч

Четырехокись осмия 68
Чиаччио см. Окрашивание

Ш

Шик (PAS)-реакция см. Окрашивание
Шифф см. Окрашивание

Щ

Щавелевая кислота

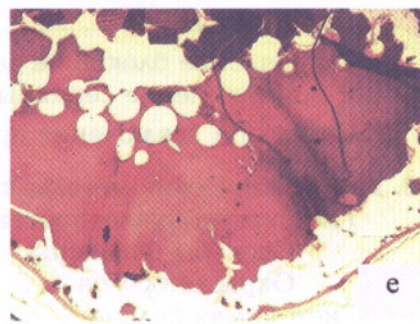
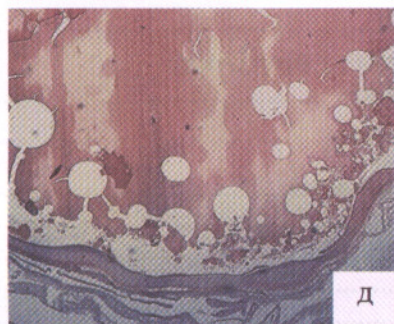
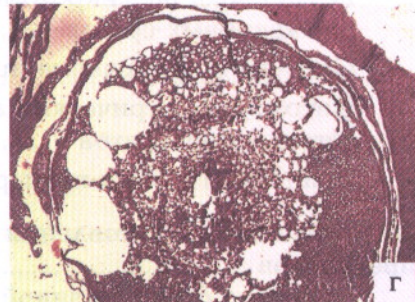
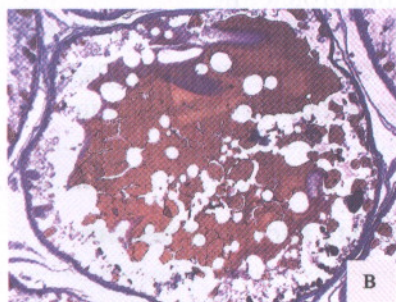
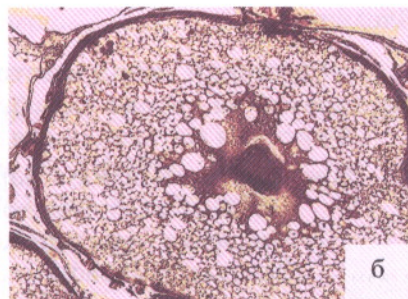
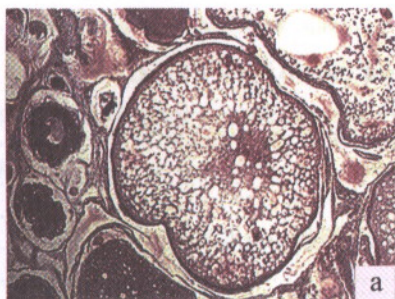
Э

Электронная микроскопия 66, 67, 75
Эозин 29, 36, 42, 44, 90, 93
окраска 42
приготовление 36
Эпоксидные смолы 72
ЭПОН-812 72, 73
Эпоновая среда по Портеру 73
Эрлих, приготовление 28, 36
Этанол см. Спирты
Этиловый спирт 19
Эфир 27

Я

Яды 66, 67

Приложение



Поперечные срезы яичников разных стадий зрелости микижи (*Parasalmo mykiss*) и тихоокеанских лососей рода *Oncorhynchus*.
Окраска гематоксилин-эозином

III ранняя стадия зрелости. Вакуолизация цитоплазмы, наличие мелких гранул желтка в отдельных вакуолях, центрально расположенное ядро: *а* — микижа, *б* — нерка (*O. nerka*). Ув.: ок.10 × об.10.

III–IV стадия зрелости. Желточные глобулы укрупняются и сливаются в однородную массу, жировые капли диффузные: *в* — кета (*O. keta*), *г* — кижуч (*O. kishutch*). Ув.: ок.10 × об.10.

IV стадия зрелости, фаза А. Желточные гранулы слиты в единую однородную массу, жировые капли укрупненные и диффузные: *г* — горбуша (*O. gorbuscha*), *е* — чавыча (*O. tschawyscha*). Ув.: ок.10 × об.5.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	7
1. Классический метод изготовления гистологических препаратов на основе парафина	17
Фиксация материала для гистологической обработки	17
Проводка и заливка в парафин	19
Проводка с бутанолом	19
Проводка через целлоидин-касторовое масло	21
Заливка в парафин	24
Резка блока на микротоме и приготовление парафиновых срезов	26
Окраска и заключение препаратов в заливочные среды	27
Цитоморфометрический анализ и фотографирование готовых препаратов	44
Хранение готовых препаратов	46
2. Особенности изготовления серийных гистологических препаратов	47
Проводка с гисторезиной	52
Полимеризация	53
Закрепление блоков на деревянных брусочках и приготовление серийных срезов	53
Окраска и заключение препаратов	54
3. Гистохимические методы исследования	55
Гистохимия нуклеопротеидов	55
Способы фиксации	55
Окраска срезов	56
Гистохимия белков	59
Гистохимия полисахаридов	61
Гистохимия липидов	64
4. Электронная микроскопия при исследовании ихтиологических объектов	66
Просвечивающая электронная микроскопия	66
Сканирующая электронная микроскопия	75
Объекты электронномикроскопического исследования в ихтиологии	77
5. Фиксаторы, используемые для изучения in toto строения икринок, личинок и мальков рыб и других гидробионтов	80
О некоторых свойствах фиксаторов	80

Способы, применяемые для быстрого изменения окраски рыб	82
Обездвиживание живых объектов	83
Просветляющие составы	84
6. Современные приборы в гистологии	86
7. Приемы и методы используемые во ВНИРО	91
Технические и химические средства обеспечения гистологических работ	92
Литература	95
Предметный указатель	99
Приложение	107

CONTENT

Introduction	7
1. Classical method of histological specimen preparation on the paraffin basis	17
Fixation of material for histological processing	17
Tissue processing and paraffin-embedding	19
Processing with butanol	19
Processing through the mix of celloidin and castor oil	21
Paraffin-embedding	24
Slicing of block on microtome and preparation of paraffin sections	26
Staining and embedding of specimens into covering substances	27
Cytomorphometric analysis and photography of prepared specimens	44
Storage of prepared specimens	46
2. Peculiarities of serial histological specimens preparation	47
Processing with historesin	52
Polymerization	53
Fixation of blocks on fillets and preparation of serial sections	53
Staining and embedding of specimens	54
3. Histochemical research methods	55
Histochemistry of nucleoproteids	55
Methods of fixation	55
Staining of sections	56
Histochemistry of proteins	59
Histochemistry of polysaccharides	61
Histochemisrty of lipids	64
4. Electron microscopy for ichthyologic objects study	66
Transmission electron microscopy	66
Raster electron microscopy	75
Objects of electron microscopy study in ichthyology	77
5. Fixators used for study in toto the structure of eggs, larva, juveniles and other hydrobionts	80
On some properties of fixators	80
Methods used for fast change in fish coloration	82

Immobilization of living objects	83
Clearing mixtures	84
6. Modern equipment for histology	86
7. Histological methods used at VNIRO	91
Technical and chemical facilities for histological analysis	92
References	95
Alphabetical subject index	99
Appendix	107

**Микодина Екатерина Викторовна, Седова Марина Александровна,
Чмилевский Дмитрий Алексеевич, Микулин Александр Евгеньевич,
Пьянова Светлана Владимировна, Полуэктова Оксана Георгиевна**

Гистология для ихтиологов

Опыт и советы

Заведующая редакцией *Г.П. Короткова*
Художественный редактор *В.В. Веселова*
Технический редактор *Л.И. Филатова*
Корректор *Е.Н. Гаврилова*
Компьютерная верстка *Л.И. Филатовой*

Подписано в печать 22.06.2009 г. Формат 70 × 100¹/₁₆.
Печ. л. 7,0. Тираж 300 экз. Заказ № 1105.

Издательство ВНИРО
107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

Тел.: (499) 264–65–33
Факс: (499) 264–91–87

Отпечатано в ППП «Типография «Наука»
121099, Москва, Шубинский пер., 6



Мы покупаем оборудование в ООО «Митэла»

Дирекция ВНИРО и авторы выражают благодарность ООО «Митэла», с помощью которой выбрана и приобретена часть оборудования современной гистологической лаборатории ВНИРО.

«Митэла» является официальным дилером ведущих мировых производителей медицинского оборудования («Carl Zeiss», «Microm», «Geuder», «Heine», «Humfrey»). Поставляемое ООО «Митэла» оборудование дает возможность работать на современном уровне. Оно прекрасно зарекомендовало себя в таких крупных научных и лечебных учреждениях России, как ЦКБ при Управлении делами Президента (г. Москва), Московский научно-исследовательский онкологический институт им. Герцена (г. Москва), НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург), НИИ онкологии, ВКНЦ РАМН, НИИ ревматологии, Офтальмологический Центр «Эксимер», Центры судебно-медицинской экспертизы, Центр микроскопической ЛОР-хирургии (г. Ярославль), Институт усовершенствования врачей — кафедра ЛОР-болезней и др.

ООО «Митэла» поставляет гистологическое оборудование по ценам производителя, дает заводские гарантии, сопровождает покупку квалифицированным сервисным обслуживанием, постоянным и оптовым покупателям предоставляет скидки.