

УДК: 611-018.2:615.36
© Минигазимов Р.С., 2011

МЕТОДОЛОГИЯ ТРЕХМЕРНОЙ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ Минигазимов Р.С.

БГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава» г. Уфа

Минигазимов Р.С. Методология трехмерной световой микроскопии // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 183-186.

Представлены методы трехмерной световой микроскопии пленочных препаратов биологических оболочек в диапазоне 60-600 кратных оптических увеличений. Для этого исследуемым структурам предварительно придается светоотражательная способность восстановлением импрегнированного в них нитрата серебра в металлическое состояние. Исследование препаратов проводится при одностороннем косом падающем освещении с помощью традиционных микроскопов. Разработаны способы подготовки препаратов для исследования рельефа поверхности и для исследования трехмерных форм коллагеновых волокон. Препараты хранятся и исследуются во влажном незаключенном состоянии.

Ключевые слова: световая микроскопия, способы освещения, окраска препаратов.

Минигазимов Р.С. Методология тривимірної світлової микроскопії // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 183-186.

Представлені методи тривимірної світлової микроскопії плівкових препаратів біологічних оболонок в діапазоні 60-600 кратних оптичних збільшень. Для цього досліджувані структури заздалегідь надається светоотражальна здатність відновленням імпрегнированного в них нітрату срібла в металевий стан. Дослідження препаратів проводиться при односторонньому косому освітленні, що падає, за допомогою традиційних микроскопів. Розроблені способи підготовки препаратів для дослідження рельєфу поверхні і для дослідження тривимірних форм коллагенових волокон. Препарати зберігаються і досліджуються у вологому неукладеному стані.

Ключові слова: світлова микроскопія, способи освітлення, забарвлення препаратів.

Minigazimov R.S. The methodology of three-dimensional light microscopy // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 183-186.

The methods of three-dimensional light microscopy of film preparations of biological coats in the range 60-600 multiple optical increase were described. The researched preparations receive the reflective ability after the restoration of silver nitrate impregnated in them in the metallic state. The study of preparation is carried out in case of unilateral oblique light with the help of traditional microscopes. The methods for the manufacture of preparations for the study of the surface relief and the three-dimensional structure of collagen fibers has been developed. The preparation are stored and examined in the humid free condition.

Key words: light microscopes, methods of lighting, painting of preparations.

Большой интерес представляет изучение интимальной поверхности биологических оболочек, ее рельефа и рельефообразующих структур. Традиционное исследование гистологических препаратов основано на светооптической микроскопии прозрачных окрашенных срезов или пленок просвечиванием снизу («сзади» объекта). При этом исследуется внутреннее содержание селективно окрашенных структур. Понятие «рельеф» не имеет материального содержания. Оно является трехмерным геометрическим образом, формой некой границы раздела сред. Отметим очевидное методологическое противоречие в идеологии микроскопии формы (рельефа) поверхности различных структур на просвет, как «исследование внутреннего строения» границы раздела сред.

В данной работе речь идет не о бинокулярном трехмерном зрении, не о бинарных стереомикроскопах, а об обычных микроскопах «плоского поля» (классификация микроскопов по О. В. Егоровой, 2000) с одинарными объективами 6-50-кратных увеличений. В них, при применении 10- 25-кратных окуляров, реализуется приемлемый гистологический – тканевой уровень увеличения. Бинарные стереомикроскопы, оснащенные двойными оптическими системами, реализуют бинокулярное трехмерное изображение объектов, но не реализуют гистологический уровень увеличения и для микроскопии гистологических препаратов не применяются. Целью наших разработок является возможность получения 60-600-кратно оптически увеличенного монокулярного (как в фото- и видеокамерах) трехмерного изображения формы биологических структур с помо-

щью традиционных микроскопов, разработанных и используемых как микроскопы плоского, двумерного, поля зрения. «В этих микроскопах возможно наблюдение объемного изображения в пределах 100-200 мкм по высоте за счет особых способов освещения» - О. В. Егорова (2000). К сожалению, такую глубину резкого изображения имеют объективы только до 2-х кратного увеличения. В литературных источниках нет работ по разработке и реализации трехмерной микроскопии с помощью микроскопов «плоского поля». Современная классификация световых микроскопов не предусматривает подобное их применение.

Для получения трехмерного изображения гистологических структур необходимо добиться визуализации последовательности расположения их по трем осям пространства. Визуальная оценка последовательности расположения структур по оси Y и X, расположенных во фронтальной плоскости объектива, совершается в плоскости гистологического препарата. При микроскопии на просвет освещение объекта «сзади» формирует «обратную» тень, то есть задние, глубинные структуры объекта отбрасывают тень на передние, поверхностные его структуры. При таком освещении невозможна зрительная оценка последовательности расположения отдельных структур по оси Z вглубь препарата, в направлении объектив – источник света, что, в свою очередь, приводит к потере зрительного восприятия объемности микроскопической картины. К тому же микроскопическая картина при освещении на просвет обычно является «негативным» изображением, то есть исследуемые структуры являются более темными на свет-

лом поле зрения. Такая микроскопия в какой-то степени напоминает «театр теней» полупрозрачных объектов, если сопоставить поле зрения микроскопа с плоским театральным экраном.

Визуализировать взаиморасположение и изменение формы выявляемых структур по оси Z можно созданием эффектов естественного наружного освещения. Во-первых, передние структуры при этом заслоняют освещение задних структур. Во-вторых, передние и боковые поверхности исследуемых объектов имеют различную яркость освещения, обусловленную их разной ориентацией к источнику света и наблюдателю. В-третьих, передние структуры формируют видимые «прямые» - отбрасываемые спереди назад - тени. Эти эффекты могут быть созданы при освещении гистологического препарата «спереди» - со стороны объектива, то есть микроскопией гистологического препарата в падающем свете. Носителем информации о структуре препарата является отраженный от него в объектив свет (микроскопия в падающем отраженном свете). Соответственно, препарат должен быть изготовлен для получения картины светоотражения красителей исследуемых структур. При этом светоотражающая поверхность препарата или отдельных его структур заслоняет и затеняет глубже лежащие структуры. Чтобы была заметна световая тень, падающая от поверхности расположенных структур, она должна быть направлена косо к плоскости поля зрения и выходить за контуры этих структур. При этом затемняется одна из боковых сторон исследуемой структуры. Боковое освещение должно быть односторонним, чтобы тень, созданную одним источником света не освещать другим источником. Когда поверхность препарата имеет равномерную светоотражательную способность, картина градиента освещенности поверхности препарата зависит от угла наклона участков поверхности к источнику света, то есть получаемое изображение является детерминированной формой поверхности объекта. Микроскопическая картина при отраженной световой микроскопии является «позитивной» - исследуемые светоотражающие структуры являются более светлыми, чем окружающее их «темное поле зрения».

Для микроскопии гистологических препаратов в падающем свете исследуемые структуры препарата должны обладать светоотражательной способностью. Хорошей светоотражательной способностью обладают металлы, а наилучшей среди них - серебро, коэффициент светоотражения которого достигает 95% [5]. Для традиционной световой микроскопии на про-свет разработано множество способов окраски различных структур гистологических препаратов растворами солей серебра. На начальном этапе такой окраски серебро импрегнируется в препарат в виде водных растворов его солей. На завершающем этапе окраски проводится восстановление ионов серебра, осажденного на аргентофильных структурах.

В свою очередь, методы восстановления импрегнированного серебра соответствуют технологии «реакции серебряного зеркала». Так, добавление к аммиачному раствору азотнокислого серебра нескольких капель формальдегида или раствора глюкозы приводит к восстановлению ионов серебра в растворе в металлическое серебро [1].

Таким образом, для трехмерной световой микро-

скопии люминальной поверхности гистологических препаратов необходимо создание двух условий:

- Придание светоотражательной способности люминальной поверхности гистологических препаратов.
- Тенеобразующее освещение препарата со стороны объектива.

Нами разработан способ изготовления пленочных препаратов для исследования рельефа люминальной поверхности биологических оболочек, в частности, синовиальной мембраны, в формировании поверхности которой, наряду с синовиоцитами, участвует и межклеточное вещество.

Известные способы импрегнации серебра обеспечивают селективное выявление отдельных элементов тканей (сосуды, нервы, коллагеновые волокна), которые обычно не участвуют в формировании люминальной поверхности оболочек. При этом восстановление серебра не доводится до придания им светоотражательной способности, не импрегнируются поверхностные структуры, что, в совокупности, не позволяет получить достоверную картину рельефа поверхности препаратов в отраженном свете.

Серебрение поверхности препарата нами осуществляется на основе тотальной (неселективной) импрегнации всех структур, участвующих в формировании этой поверхности. Для этого импрегнация серебра в препарат проводится в виде 10% раствора азотнокислой его соли, не обладающей избирательным осаждением на отдельных структурах. Восстановление серебра проводится 0,01% водным раствором аскорбиновой кислоты. Обычно применяемые формалин и глюкоза не восстанавливают серебро из азотнокислой его соли в металлическое состояние. Аскорбиновая кислота обладает более выраженными восстанавливающими свойствами [2]. Изготовленные предположенным способом [3] препараты приобретают матово-зеркальный вид, свидетельствующий о качественном и полноценном восстановлении импрегнированного серебра. При этом поверхность препарата приобретает хорошую светоотражательную способность.

Рельеф поверхности такого препарата исследуется с помощью микроскопов плоского поля в отраженном свете при одностороннем косом падающем освещении от источника света, устанавливаемого выше уровня поверхности предметного столика. При этом рельеф поверхности визуализируется в трехмерном изображении (рис. 1). Изменение азимута освещения, поворотом столика микроскопа, позволяет уточнить особенности строения деталей поверхности, имеющих сложные асимметричные формы. Изменения азимута освещения позволяют избежать последствия «азимутального эффекта» [8].

При изучении рельефа поверхности брюшины и плевры обнаруживаются различной формы, размерности, ориентации и регулярности возвышения и углубления. Наиболее характерной особенностью рельефа поверхности серозных оболочек (СО) является его «базисная» регулярная волнистость. Трудно интерпретировать картину этой волнистости без трехмерного изображения совокупной поверхности подпокровных коллагеновых волокон (КВ), пространственных взаимоотношений между смежными волокнами и конформационных вариантов строения отдельных КВ.

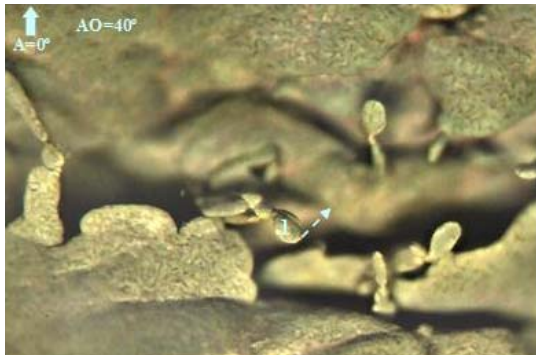


Рис. 1. Рельеф поверхности синовиальной мембраны коленного сустава человека. Трехмерная световая микроскопия, серебрение поверхности. Азимут освещения (АО), равный 40° , (обозначен стрелкой от вершины ворсинки (1) к началу ее тени) определен по часовой стрелке от условного нулевого азимута $A=0^\circ$. Об. 12,5. Ок. 12,5.

Общие принципы формирования объемного изображения поверхности пленочного препарата в микроскопах плоского поля, приемлемы и для поверхностей отдельных его структур, расположенных в толще препарата, в частности, поверхности подпокровных КВ.

Для получения трехмерного изображения подпокровных КВ пленочного препарата СО, необходимо:

- придать КВ СО светоотражающую способность,
- применить микроскопы плоского поля с детализацией изображения до уровня 25 - 50-кратных объективных увеличений,
- применить тенеобразующее падающее освещение (под углом порядка 70° - 85° к оси объектива),
- визуализировать светоотражение подпокровных КВ (путем ликвидации заслоняющего светоотражения вышележащих мезотелиальных клеток и базальной мембраны),
- микроскопию проводить на влажных, не заключенных между стеклами препаратах
- хранить препараты в незаключенном влажном состоянии.

Нами установлено, что трехмерную световую микроскопию можно успешно проводить на влажных, не заключенных между стеклами, препаратах. Для этого, серебрённые пленочные препараты расправляют в плоской чашке с дистиллированной водой и переносят на предметное стекло для микроскопии. При этом исключаются бликообразование покровного стекла и трудоемкие процедуры заключения препаратов в балъзам, не лимитируется площадь препарата и размеры предметных стекол, толщина препарата. Можно проводить микроскопию оболочек с двух сторон, к примеру, диафрагмальную плевро и диафрагмальную брюшину, переворачивая цельный (интактный) фрагмент диафрагмы размерами до 5×20 см. Очень важно, что можно дополнительно расправлять (поправлять) интересные участки препарата, можно его дополнительно красить, промывать, применять микроинструменты. Для получения на поверхности препарата тонкого равномерного смачивающего слоя воды, его необходимо обезжиривать в 96% спирте в течение 30 минут перед процедурой серебрения.

Нами также установлено, что импрегнированные серебром препараты можно хранить в затемненной склянке с дистиллированной водой с добавлением этилового спирта до 40% неограниченное время. Им-

прегнированное серебро обеспечивает стерильность воды и препарата при многократной его микроскопии.

- Микроскопия незаключенных препаратов проводится с помощью объективов, рассчитанных для работы без покровных стекол. Таковыми являются эпиобъективы микроскопов плоского поля падающего света [2]. Подобные микроскопы оснащены 6-50-кратными эпи-объективами, увеличение которых достаточно для визуализации конформационных вариантов строения КВ. Микроскопия осуществляется при табельной эпи-системе освещения и преобразованием его в одностороннее косое падающее освещение, краевым перекрыванием части светового потока до поворотного зеркала, смещением ползунка-держателя светофильтров.

- Открытие доступа к падающему свету и визуализация светоотражения подпокровных КВ, расположенных под слоем мезотелиальных клеток и под базальной мембраной осуществляется в два этапа: Первый этап - десквамация мезотелиальных клеток по Ранвье [7]. Для этого, нефиксированные пленочные препараты помещают на 6 часов в «изолирующий» клетки эпителия 30% спиртовой раствор с последующей промывкой 10 минут в проточной воде. Второй этап - девизуализация базальной мембраны, осуществляется дозированным вымыванием аммиачного раствора нитрата серебра с поверхности препарата дистиллированной водой в течение 2 минут перед процедурой восстановления импрегнированного серебра. Аммиачное серебро из базальной мембраны удаляется намного быстрее, чем из подпокровных КВ, что, по-видимому, связано небольшим диаметром ее коллагеновых фибрилл.

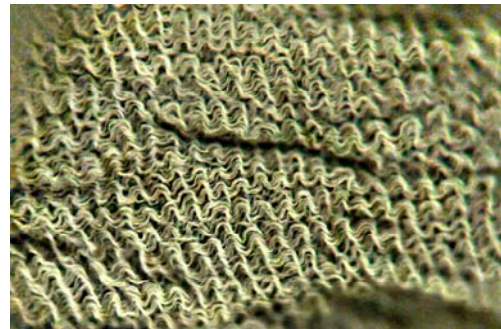


Рис. 2. Правого вращения спиралевидные коллагеновые волокна (КВ) поверхностного волнистого слоя перикарда человека. Трехмерная световая микроскопия, серебрение КВ. Об. 12,5. Ок. 12,5.

- Придание светоотражательной способности КВ осуществляется селективной импрегнацией их аммиачным раствором азотнокислого серебра, способом, основанным на общепринятом методе импрегнации серебром по Бильшовскому и на модификации его по Гомори [7]. Для этого, фиксированные формальным пленочные препараты, после десквамации мезотелиальных клеток и обезжиривания, сенсibilизируются в 10% растворе нитрата серебра и помещаются в аммиачный раствор азотнокислого серебра на 30 минут. После процедуры девизуализации базальной мембраны препараты переносятся на 30 секунд в 1% раствор формалина на дистиллированной воде для восстановления серебра в металлическое состояние - до придания препаратам серого оттенка. Остановка восстановления серебра производится в аммиачной воде. Готовые препараты исследуются и хранятся во влажном незаключенном состоянии [4].

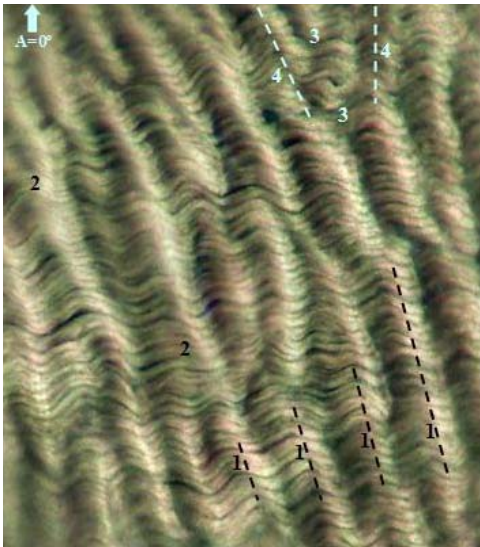


Рис. 3. Совокупная поверхность коллагеновых волокон (КВ) поверхностного волнистого слоя (ПВС) перикарда человека. 1 – линии фронтов синусоидального профиля волн ПВС при синхронности параметров спиралей смежных КВ. 2, 3 – фигуры дивергенции-конвергенции волн. 4 – расхождение фронтов волн по $A=0^\circ$. Трехмерная световая микроскопия, серебрение КВ. Об. 25. Ок. 12,5.



Рис. 4. Подпокровные коллагеновые волокна (КВ) брющины, покрывающей матку. 1 – одиночные КВ. 2 – пучки КВ. 3 – переплетённые пучки КВ. Трехмерная световая микроскопия, серебрение КВ. Об. 25. Ок. 12,5.

Смежные спиралевидные КВ, синхронизированные по направлению, фазе и радиусу вращения, по углу спирализации и длине шага спиралей, придают регулярную волнистость всему ПВС СО. Волнистость складывается из регулярных волн синусоидального профиля с зеркально симметричными гребнями и впадинами. Фронты подобных волн (линии, проведенные по верхушкам волн) располагаются параллельно друг к другу и по нормали к оси спиралей КВ (см. рис. 3, пунктирные линии по цифрам 1), длина волн (λ) равняется длине шага спиралей (λ_s), высота волн (h) равняется двум радиусам (r) спира-

лей. Для подобных волн перикарда (рис. 3, 1), $\lambda = \lambda_s = 41,08 \pm 0,54 \mu\text{м}$, $h = 2r = 12,55 \pm 0,69 \mu\text{м}$.

На рис. 2, КВ ПВС перикарда с $\Delta\varphi \neq 0$ ($\Delta\varphi$ – фазовое смещение спиралей КВ) формируют регулярные волны с узкими гребнями и широкими впадинами – волны асимметричного синусоидального профиля с превалированием длины профиля впадины волны над длиной профиля ее гребня. Для подобных волн перикарда $h = 2r$, $\lambda < \lambda_s$, так, при $\Delta\varphi = 10^\circ - 30^\circ$, $\lambda = 32,21 \pm 0,37 \mu\text{м}$. Это связано с отклонением фронтов волн от нормали к оси спиралей КВ.

На протяжении фронта, волны расходятся и сходятся, формируя фигуры дивергенции и конвергенции волн (ФДКВ). Эти ФДКВ являются локусами начала и окончания волн, то есть, каждой волне соответствуют две подобные фигуры. Формирование новой волны связано с появлением нового ряда спиралей у смежных КВ на протяжении фронта этой волны. Фигура дивергенции волн является переходной зоной появления, пошагового роста и становления дополнительной спирали в ряду КВ на протяжении данной фигуры. В фигуре дивергенции волн происходит удлинение КВ на длину шага одной спирали, а вектор дивергенции волн является направлением расширения площади поверхности ПВС и самой СО путем дискретного удлинения КВ на величину, равную λ . Последовательно расположенные фигуры дивергенции волн (рис. 3, 3) меняют направление фронтов смежных волн (рис. 3, 4), в виде дивергенции их в направлении клиновидного расширения площади поверхности по $A=0^\circ$. Вследствие того, что материальным содержанием волн является участок континуума КВ ПВС, каждой волне соответствует определенный участок площади ПВС, равный площади проекции (S) данной волны, рассчитываемой как $S = \lambda \times l$, где l – длина фронта волн. Появление или исчезновение волн, количество их и протяженность по фронту детерминировано соответствующим расширением или сужением площади поверхности. Изменение площади поверхности (ΔS) равно суммарной площади проекции волн, участвующих в этом процессе, то есть $\Delta S = \lambda \times \Sigma l$, где Σl – суммарная длина фронтов этих волн. Волны ПВС, в отличие от волн, имеющих направление распространения, являются статическими элементами, поэтому фигура дивергенции волн в обратном направлении является фигурой конвергенции волн, как и расширение площади поверхности в обратном направлении соответствует ее сужению.

Подпокровные КВ брющины матки (рис. 4) имеют иное – сетчатое строение и не формируют обособленный ПВС.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Глинка Н.А. Общая химия. А., 1977
2. Егорова О.В. С микроскопом на «ты». СПб.: «Интермедика», 2000.
3. Миннигазимов Р.С. Способ исследования рельефа поверхности гистологических препаратов. Патент на изобретение RU № 2270446 С1 от 20.02.2006. БИПМ №5. С.469.
4. Миннигазимов Р.С., Вагапова В.Ш., Мухаметшина Г.Р. Способ исследования рельефообразующих структур биологических оболочек. Патент на изобретение RU № 2413943 С1 от 10.03.2011. БИПМ №7. С.357.
5. Оленин С.С., Фадеев Г.Н. Неорганическая химия. М., 1979.
6. Пирс Э. Гистохимия. М., 1962, с. 210.
7. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М. 1953.
8. Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. Микроскопы. А. 1969.

Надійшла 15.09.2011 р.
Рецензент: доц. В.М.Волошин