МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Р.С.Минигазимов, В.Ш.Вагапова, Г.Р.Мухаметшина, 2015
УДК 578.63

Р.С.Минигазимов, В.Ш.Вагапова, Г.Р.Мухаметшина

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ТРЕХМЕРНЫХ РЕЛЬЕФООБРАЗУЮЩИХ СТРУКТУР СЕРОЗНЫХ ОБОЛОЧЕК В СВЕТОВОМ МИКРОСКОПЕ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.Ш.Вагапова), Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Разработаны методы трехмерной визуализации пленочных гистологических препаратов с помощью традиционных плоскопольных микроскопов. Предварительно исследуемым структурам придается светоотражательная способность восстановлением импрегнировавшего их нитрата серебра. Микроскопию препаратов проводят в отраженном падающем тенеобразующем освещении. Разработаны способы подготовки препаратов для исследования рельефа клеточной поверхности, пограничной мембраны мезотелия и подпокровных коллагеновых волокон. Препараты хранят и исследуют во влажном состоянии.

Ключевые слова: *гистологические препараты, импрегнация солями серебра, световая микроскопия, микроскопия в отраженном свете*

Серозные оболочки (СО), покрывающие органы и окружающие серозные полости, часто становятся ведущим звеном в развитии патологии органов жизнеобеспечения. Большой интерес представляет изучение их поверхности, трехмерных форм ее рельефообразующих структур. Понятие «рельеф» не имеет материального содержания. Он является трехмерным геометрическим образом, формой границ раздела сред. Традиционные светооптические гистологические исследования посвящены изучению внутреннего строения, материального содержания объекта при микроскопии его срезов. При этом форма исследуемых структур проявляется в виде двухмерных контуров их сечений в пределах глубины резкого изображения микроскопа. Микроскопия геометрии объекта на просвет наталкивается на такое методологическое противоречие, как исследование «внутреннего строения» границ раздела сред.

Бинокулярная трехмерная микроскопия с помощью стереомикроскопов не обеспечивает гистологический уровень увеличения. Он реализуется в традиционных световых микроскопах — микроскопах «плоского поля» по классификации микроскопов фирмы Карл Цейсс (Германия) [1]. Классификация плоскопольных микроскопов не предусматривает визуализацию в них трехмерного изображения гистологических препаратов.

Цель данной работы — изучить возможности трехмерной визуализации рельефообразующих структур СО в традиционных плоскопольных микроскопах.

Мотивация работы исходит из общности основных принципов формирования трехмерного изображения в различных оптических приборах. В частности, в фотоаппарате трехмерное изображение природных объектов создается частью внешнего «падающего» освещения, отраженной от их поверхности в объектив фотоаппарата.

Хорошей светоотражательной способностью обладают металлы, а наилучшей среди них — серебро. Разработаны множество способов окраски (импрегнации) гистологических препаратов солями серебра. На начальном этапе такой окраски препарат импрегнируется серебром в виде водных растворов его солей. На завершающем этапе окраски проводится восстановление ионов серебра, осажденного на препарате. В свою очередь, методы восстановления введенного серебра соответствуют технологии «реакции серебряного зеркала» [4]. Так, добавление к аммиачному раствору нитрата серебра нескольких капель формальдегида или раствора глюкозы приводит к восстановлению ионов серебра в растворе в металлическое серебро.

Трехмерная световая микроскопия, естественно, предполагает визуализацию поверхности исследуемых объектов гистологических препаратов по трем координатным осям. В падающем со стороны наблюдателя (объектива) освещении визуализируется взаиморасположение этих объ-

Сведения об авторах:

Минигазимов Рамил Султанович (e-mail: minramil2012@yandex.ru), *Вагапова Василя Шарифьяновна*, *Музаметшина Гульфия Рамиловна*, кафедра анатомии человека, Башкирский государственный медицинский университет, 450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3

ектов по координатной оси Z — передние объекты заслоняют задние. Также повышения и понижения уровня рельефа поверхности препарата при боковом (одностороннем косом падающем — тенеобразующем) освещении формируют собственные и падающие тени, выявляющие геометрию исследуемой поверхности по оси Z. Увеличение угла наклона падающего света (до 70–85° к оси объектива) позволяет получать свето-теневую картину пологих склонов рельефа поверхности. Оценка взаиморасположения отдельных объектов по координатным осям X и Y происходит в плоскости поверхности препарата. При равномерной светоотражательной способности объекта градиент освещенности его поверхности зависит от угла наклона отдельных ее участков к источнику света, т.е. получаемое изображение определяется формой поверхности объекта**.** Любое изображение трехмерного объекта является его двухмерной проекцией на плоскости. Трехмерное восприятие плоской картины связано с наличием в ней признаков пространственной перспективы по координатной оси Z. Она при отраженной световой микроскопии сводится только к светотеневым эффектам, так как под микроскопом передние и задние равновеликие структуры не отличаются видимыми размерами.

На основе вышеизложенных выкладок, задачи данного исследования сводятся к импрегнации пленочных препаратов солями серебра с целью придания им светоотражательной способности и их микроскопии с помощью плоскопольных микроскопов в падающем тенеобразующем освещении.

Для придания светоотражательной способности препаратам нами были адаптированы несколько способов восстановления нитрата серебра из его растворов. Наиболее простой из них — осаждение серебра на поверхности пленочных препаратов [2]. Для этого препарат помещали на 10 мин в 5% раствор нитрата серебра. Восстановление серебра на поверхности препарата проводили добавлением нескольких капель 0,01% водного раствора аскорбиновой кислоты, обладающей выраженными восстанавливающими свойствами [6]. Изготовленные этим способом препараты приобретали матово-зеркальный вид и хорошую светоотражательную способность. Препараты можно заключать в бальзам или хранить в незаключенном, влажном состоянии. Рельеф поверхности препаратов можно исследовать с помощью как бинокулярных стереомикроскопов, так и плоскопольных микроскопов в падающем тенеобразующем освещении, создаваемом, к примеру, переносным источником света, устанавливаемым выше уровня поверхности столика микроскопа. Изменение угла падения и направления («угла азимута») освещения позволяет уточнять геометрию пространственно ориентированных структур и избежать последствий «эффекта азимута» [6].

Разработан также метод «послойной» визуализации рельефообразующих структур СО [3]. Он основан на окрашивании пленочных препаратов путем импрегнации аммиачным раствором нитрата серебра по Бильшовскому в модификации Гомори [5]. Различия разных вариантов изготовления препаратов заключаются в следующем: 1 — для визуализации рельефа клеточной поверхности импрегнируются интактные, фиксированные в формалине пленочные препараты (*рис. 1*); 2 — для визуализации рельефа поверхности пограничной мембраны мезотелия пленочные препараты импрегнируются после предварительной десквамации мезотелиальных клеток (*рис. 2*); 3 — для визуализации субмезотелиальных коллагеновых волокон пленочные препараты импрегнируются после предварительной десквамации мезотелиальных клеток, предотвращая импрегнацию пограничной мембраны (*рис. 3*).

Этапы изготовления пленочных препаратов СО для исследования пространственной организации их поверхностного волнистого коллагенового слоя (вариант 3) следующие: 1) удаление мезотелиальных клеток по Ранвье [5] экспозицией

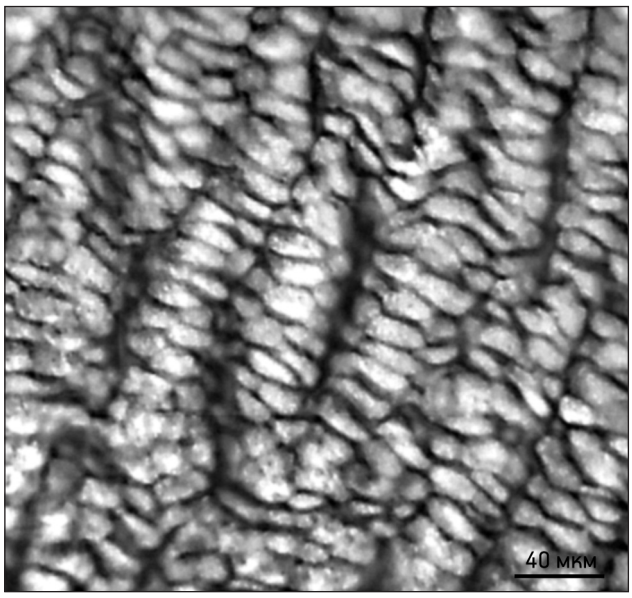

Рис. 1. Волнистость интимальной поверхности диафрагмальной плевры.

Импрегнация солями серебра мезотелиальных клеток. Микроскоп Вертивал (Карл Цейсс, Германия), падающее тенеобразующее освещение. Длина масштабного отрезка соответствует длине статических волн поверхности. Об. 25, ок. 12,5

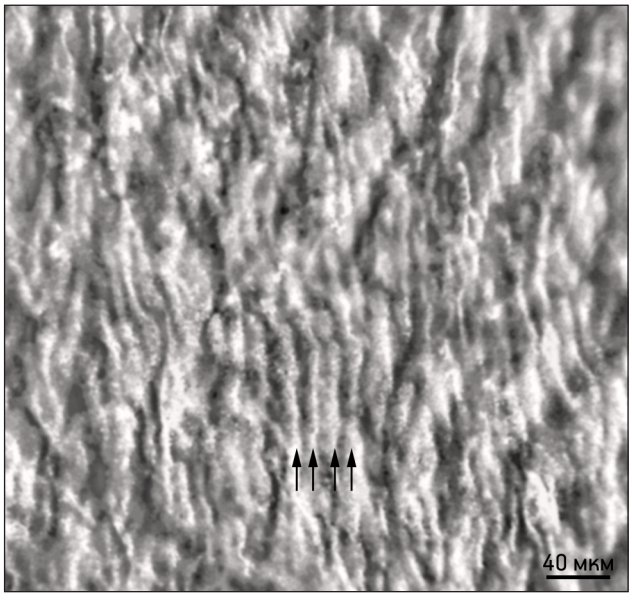

Рис. 2. Волнистость пограничной мембраны мезотелия брюшины, покрывающей тонкую кишку.

Стрелки — гребни четырех смежных волн вдоль их фронтов. Собственная волнистость пограничной мембраны наслаивается на более крупную волнистость. Импрегнация солями серебра пограничной мембраны. Микроскоп Вертивал (Карл Цейс, Германия), падающее тенеобразующее освещение

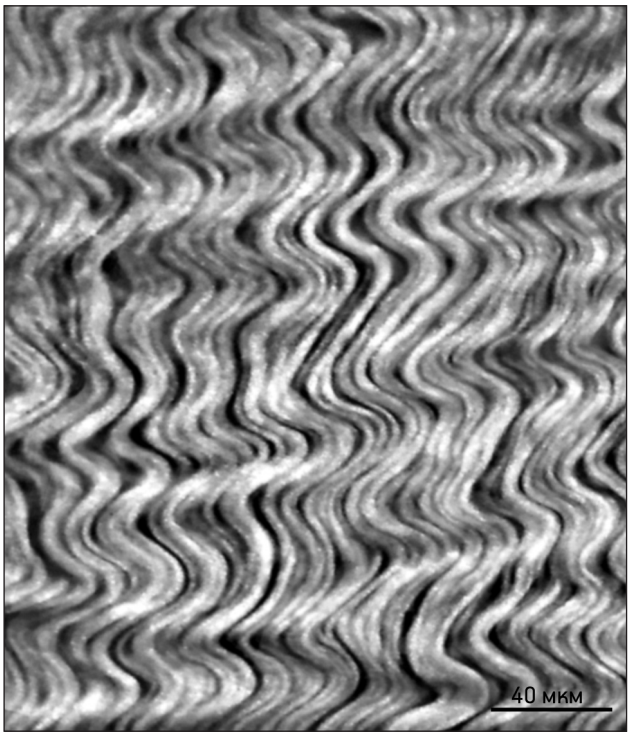

Рис. 3. Поверхностный волнистый коллагеновый слой перикарда.

Импрегнация солями серебра коллагеновых волокон. Микроскоп Вертивал (Карл Цейс, Германия), падающее тенеобразующее освещение. Об. 25, ок. 12,5

нефиксированных препаратов в течение 6 ч в «изолирующем» клетки эпителия 30% спиртовом растворе; 2) обезжиривание препаратов в 96% спирте в течение 6 ч; 3) фиксация препаратов в 10% формалине, промывка их в проточной воде, сенсибилизация в 10% растворе нитрата серебра, промывка в дистиллированной воде; 4) далее экспозиция препаратов в 20% аммиачном растворе нитрата серебра в течение 30 мин, промывка в течение 1 мин в сменяемой дистиллированной воде для вымывания аммиачного раствора нитрата серебра из пограничной мембраны. Серебро из тонких коллагеновых фибрилл пограничной мембраны вымывается быстрее, чем из подлежащих коллагеновых волокон. Для восстановления серебра препараты переносят на 30 с в 1% раствор формалина (до придания препаратам серого оттенка). Остановку восстановления серебра производят в аммиачной воде.

Было установлено, что трехмерную световую микроскопию можно проводить на влажных препаратах [3]. Степень их прозрачности достаточна для микроскопии поверхностных структур. Предварительное обезжиривание обеспечивает равномерное распределение воды по поверхности препарата. При подобной подготовке препаратов исключаются трудоемкие процедуры заключения их в бальзам, образование бликов на покровном стекле, не лимитируются толщина и площадь препарата. Препараты можно исследовать с двух сторон, дополнительно окрашивать, тонкие пленки — исследовать одновременно на просвет. Изготовленные препараты хранят в затемненной склянке в 40% спиртовом растворе [3], серебро обеспечивает многолетнюю сохранность препарата. Для микроскопии препараты расправляют в плоской чашке с дистиллированной водой и переносят на предметное стекло. Микроскопию влажных препаратов проводят с помощью объективов, рассчитанных для работы без покровных стекол. Таковыми являются эпиобъективы микроскопов плоского поля падающего света [1]. Подобные микроскопы обеспечивают хорошую детализацию изображения в пределах 6–25 (50)-кратных увеличений объекта и 6–25-кратных — окуляра. Преобразование табельной круговой эпи-системы освещения в одностороннее косое падающее освещение осуществляют краевым перекрыванием части светового потока до поворотного зеркала смещением ползунков-держателей светофильтров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова О.В. С микроскопом на «ты». СПб.: Интермедика, 2000.

2. Патент на изобретение RU № 2270446 C1. Способ исследования рельефа поверхности гистологических препаратов / Р. С. Минигазимов. Заявка от 07.10.2004 г. БИПМ. 2006. № 5. С. 469.

3. Патент на изобретение RU № 2413943 C1. Способ исследования рельефообразующих структур биологических оболочек / Р. С. Минигазимов, В. Ш. Вагапова, Г. Р. Мухаметшина. Заявка от 26.06.2009 г. БИПМ. 2011. № 7. С. 357.

4. Пирс Э. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962.

5. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1953.

6. Скворцов Г. Е., Панов В. А., Поляков Н. И., Федин Л. А. Микроскопы. Л.: Машиностроение, 1969.

Поступила в редакцию 19.12.2014
Получена после доработки 07.05.2015

VISUALIZATION OF THREE-DIMENSIONAL RELIEF STRUCTURES OF SEROUS MEMBRANES WITH A LIGHT MICROSCOPE

R. S. Minigazimov, V. Sh. Vagapova, G. R. Mukhametshina

Methods for three-dimensional visualization of histological film preparations were developed using traditional flat-field microscopes. Preliminarily, the structures examined acquired the light reflecting ability by the reduction of silver nitrate impregnating them. Microscopy of preparations is carried out in reflected incident tenebrous illumination. The methods of processing of preparations for the study of cell surface relief, limiting membrane of the mesothelium and subsurface collagen fibers. Preparations are stored and examined in the wet state

Key words: *histological preparations, impregnation with silver salts, light microscopy, reflected light microscopy*

Department of Human Anatomy, Bashkir State Medical University, Ufa