

**ФГОУ ВПО «КАЗАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ имени Н.Э. БАУМАНА»**

ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ ПРИРОДНЫХ СИСТЕМ АН РТ

В.И. Белявский, Р.И. Замалетдинов, О.С. Анисина, Р.И. Михайлова

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА
В ЗООЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Учебно-методическое пособие

Казань
ООО «Фолиантъ»
2007

УДК 59 (077)
ББК 28.66
П75

Печатается по решению ученого совета факультета биотехнологии и стандартизации ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» от 27 июня 2007 г., протокол № 6.

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор кафедры гистологии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» **В.И. Усенко**

доктор биологических наук, профессор кафедры зоологии беспозвоночных ФГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина», академик Международной педагогической академии **Ф.М. Соколина**

В.И. Белявский, Р.И. Замалетдинов, О.С. Анисина, Р.И. Михайлова.

П75 Применение микротом-криостата в зоологических исследованиях (учебно-методическое пособие). – Казань: Фолианть, 2007. – 72 с. Под редакцией доктора сельскохозяйственных наук Михайловой Р.И.
ISBN 978-5-94990-010-9

Учебно-методическое пособие представляет собой адаптированный на базе кафедры зоологии ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» сборник рекомендаций по использованию микротом-криостата в зоологических исследованиях. Наряду с общими рекомендациями в пособии подробно описаны конкретные примеры проведения исследований с помощью микротом-криостата. Издание адресовано всем интересующимся вопросами микроскопических исследований в зоологии и, в первую очередь, начинающим исследователям – студентам и аспирантам.

УДК 59 (077)
ББК 28.66

ISBN 978-5-94990-010-9

© В.И. Белявский, Р.И. Замалетдинов,
О.С. Анисина, Р.И. Михайлова, 2007
© Оформление. ООО «Фолианть», 2007

ВВЕДЕНИЕ

Развитие современной науки диктует применение интегрального сочетания различных методологических подходов и методов решения конкретных задач. Основные методики микроскопических исследований достаточно подробно изложены в специализированных изданиях. Однако большинство из них были выпущены ограниченным тиражом и превратились в раритеты, малодоступные большинству исследователей. Одновременно возникает проблема полноты изложения методических нюансов в литературе – в большинстве методических пособий весь процесс проведения конкретного исследования со всеми особенностями и тонкостями обычно не представлен, а ограничен общими замечаниями.

Выпуск специализированных пособий, оптимизированных на местах специалистами различного профиля, облегчает выполнение задачи особенно начинающим исследователям (студентам и аспирантам). Настоящее издание представляет собой одну из попыток такого рода обобщений по многолетнему опыту использования микротом-криостата МК-25 для исследований различных тканей беспозвоночных и позвоночных животных на кафедре зоологии Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана (бывший КВИ).

Приготовление срезов на замораживающем микротоме широко применяется в зоологических исследованиях, когда требуется изучить объект в течение короткого промежутка времени. Экономия времени достигается тем, что срезы изготавливаются из фиксированного органа без длительной заливки их в парафин или целлоидин, а иногда из свежего, нефиксированного материала.

Замороженные срезы изготавливаются и в тех случаях, когда требуется выявить жиры и жироподобные вещества, которые при заливке в целлоидин или парафин подвергаются действию спирта, эфира или ксилола и не сохраняются.

Первый микротом-криостат был создан в Дании. Его впервые применили Линдстрем Ланг и Могенсон в 1938 году в своих исследованиях в области количественной гистохимии. Для химического анализа и гистологического изуче-

ния они использовали парные, последовательно полученные замороженные срезы.

Первоначально низкая температура в криостате поддерживалась при помощи кусков сухого льда, а от этого до использования современных рефрижераторных установок оставался один шаг.

В 1951 году Кунс, Ледюк и Каплан ввели ряд технических усовершенствований. Ими были использованы более мощные холодильные установки. В боковые стенки криостата для работы на микротоме встроены рукава с перчатками. Внутри криостат был снабжен освещением и вентилятором для циркуляции охлаждающего воздуха при изготовлении срезов. Создано оригинальное устройство «стеклянное окно», которое помещается на нож и служит для предотвращения скручивания срезов при резке. Воздух в камере сохраняли сухим с помощью силикогеля, помещенного в мешочки, которые заменяли раз в неделю. Заряд статического электричества, возникающий в микротоме, отводили посредством цепи, соединяющей криостат с соседней стенкой, заземленной через двигатель. Такое устройство микротомов-криостатов характерно практически и для всех современных моделей.

На кафедре зоологии КГАВМ исследования проводились на микротоме-криостате МК-25 (рис. 1). Данный аппарат представляет собой закрытую холодильную камеру, где поддерживается заданная пониженная температура (от -5 до -25°C). Постоянство температуры обеспечивается путем работы компрессора, который автоматически запускается при повышении температуры воздуха в камере. Термореле находится справа, рядом с ртутным термометром. В этой камере находится микротом, который позволяет получать срезы толщиной до 25 микрон. Слева находится подставка с блоками, на которые примораживаются кусочки ткани. Для предупреждения конденсации влаги в камере криостата слева помещается коробка с силикогелевыми шариками. Доступ в камеру при работе криостата осуществляется через специальные отверстия в корпусе аппарата, расположенные на передней панели. Для изоляции холодного воздуха внутри камеры от внешней среды отверстия закрыты резиновыми рукавами.

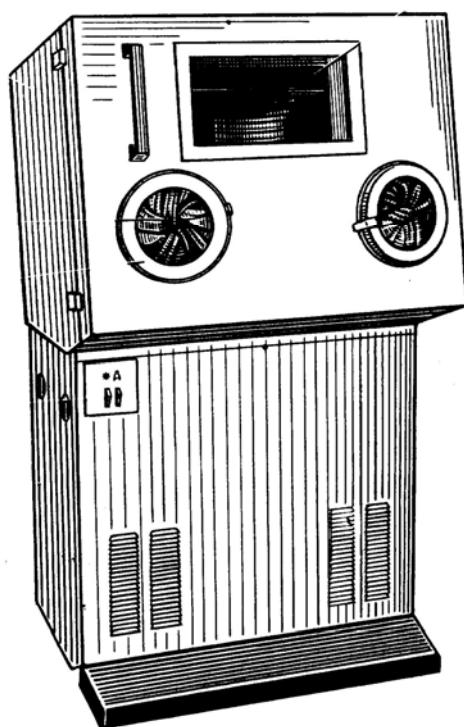


Рисунок 1. Общий вид микротом-криостата МК-25

Первые исследования с применением микротом-криостата на кафедре зоологии были начаты под руководством профессора Н.А. Голиковой в 80-х годах прошлого столетия (Н.А. Голикова, В.И. Белявский, 1984) при комплексном изучении жирового тела медоносной пчелы. В 1986 году началась работа по изучению нервной системы медоносной пчелы (О.С. Анисина, 1994; 1996). Для исследования нервной ткани был использован метод импрегнации серебром, применение которого предпочтительно на замороженных срезах. Эти исследования были предприняты в связи с распространившимся в то время заболеванием пчел – варроатозом.

С 2002 года ведутся работы по исследованию возрастной структуры популяций амфибий и рептилий с использованием скелетохронологического метода, который основан на исследовании слоистой структуры костей животных по срезам, полученным на замораживающем микротоме (Р.И. Замалетдинов и др., 2005).

За эти годы был накоплен значительный опыт применения микротом-криостата в зоологических исследованиях различной направленности. В данном

пособии наряду с общим описанием той или иной методики были по возможности учтены все методические нюансы, вскрытые авторами в ходе проведения собственных исследований. Это позволит начинающему исследователю в ходе работы избежать лишних затрат времени и средств и получить максимально удовлетворительный результат.

Предлагаемое методическое пособие построено так, что в первой части даются общие рекомендации по проведению исследований, где наряду с описанием методик, реактивов и инструментов обращается внимание на технику безопасности и профилактику заболеваний, которые могут возникнуть у исследователей в ходе работы на микротоме-криостате. Вторая часть посвящена описанию методик на примере собственных наработок авторов. Основными направлениями исследований, описанных в пособии, являются морфология, гистология, гистохимия жирового тела и головного мозга перепончатокрылых насекомых (на примере медоносной пчелы), а также скелетохронологический метод исследования возраста и скорости роста наземных позвоночных (земноводных и пресмыкающихся).

Отдельно представлен краткий словарь специальных терминов, которые используются в работе. Это облегчит процесс освоения методов исследования и позволит избежать неоправданных потерь времени.

В представляемой работе мы максимально полно старались осветить все рассматриваемые вопросы, но отдаем себе отчет, что возможны некоторые пробелы. Авторы будут искренне признательны за все критические замечания, высказанные в их адрес.

Представляемое на суд читателей издание является не только плодом трудов составителей пособия. Полученные результаты – это еще и итог многочисленных консультаций, научных дискуссий и обычных разговоров со многими коллегами, которым авторы выражают свою искреннюю благодарность. Особую признательность авторы выражают своим учителям – Н.А. Голиковой (КГАВМ им. Н.Э. Баумана, г. Казань), Э.М. Смириной (ИБР РАН им. Н.К. Кольцова, г. Москва). Без участия этих людей не был бы получен опыт работы, изложенный в данном пособии. Авторы также благодарны С.М. Окуловой (ИнЭПС АН РТ) и Б.Ф. Тамимдарову (КГАВМ им. Н.Э. Баумана) за ценные замечания при обсуждении рукописи издания.

ЧАСТЬ I

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ

Прежде чем приступить к работе, необходимо соответствующим образом подготовить рабочее место исследователя. Для гистологических исследований желательно иметь лабораторный стол. При его отсутствии может быть использован любой стол (желательно с ящиками) с рабочей поверхностью не менее 60×120 см. Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из влагостойкого материала. Лучше всего для этих целей подходит настольное толстое стекло. Можно приспособить линолеум, пластик или клеенку. Участок стола, предназначенный для изготовления препаратов, необходимо покрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9×12 см) листы белой и черной бумаги. Этим создается соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными и неокрашенными объектами. Под оставшейся свободной поверхностью стекла размещают прописи наиболее часто используемых растворов и методик. Нельзя использовать органическое стекло, так как оно подвержено воздействию химических растворов и на нем легко появляются царапины.

Для удобного расположения реактивов, растворов, посуды следует иметь двухъярусную полку. Такое простое приспособление значительно увеличит рабочую площадь стола и позволит быстро находить все необходимые предметы. Полка устанавливается перед исследователем (вдоль заднего края стола), или сбоку в зависимости от расположения стола по отношению к источнику дневного света.

Достаточная освещенность рабочего места является одним из важнейших требований, так как изготовление гистологических препаратов требует значительного напряжения зрения. Необходимо максимально использовать дневной свет. Лучше ставить рабочий стол около окна. Если же такой возможности нет, то следует обеспечить хорошее искусственное освещение. Однако даже при достаточном дневном свете рабочее место должно быть оснащено специальным осветителем к микроскопу или настольной лампой (с наклоняющейся верхней частью) для обеспечения постоянной освещенности препаратов при микроскопировании, так как изменение освещенности неблагоприятно сказывается на восприятии цвета препарата, и затрудняет оценку качества его окраски. Наш

опыт показывает, что наименее утомительным для глаз является белый свет галогеновых ламп.

Рабочий стол должен всегда находиться в порядке и не быть загроможденным, для чего необходимо рядом со столом установить емкость для слива жидкостей и корзину для мусора. На рабочем месте и в помещении не должно быть пыли, поскольку она, оседая на препараты, реактивы, посуду, приборы, вызывает искажение результатов (О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий, 1971).

Фиксация материала. Любое гистологическое или гистохимическое исследование начинается со сбора и фиксации материала.

Общие правила фиксации для всех типов тканей принципиально не отличаются друг от друга. Для фиксации используют только чистую посуду; лучше, если посуда будет широкогорлой. Перед погружением кусочков в фиксатор недопустимо обмывать их водой. Объем фиксирующей жидкости, куда погружают материал, должен быть в 20-40 раз больше объема фиксируемых кусочков. На дно сосуда помещают тонкий слой стеклянной ваты. Этим достигается равномерное омывание всего исследуемого материала. Для лучшего пропитывания кусочков фиксатором размеры их должны быть не более 10-15 мм в длину, 5-10 мм в ширину и 3-4 мм в толщину. Фиксирующую жидкость необходимо незамедлительно сменить, если после погружения материала она поменяла цвет, помутнела или потемнела. Повторное ее использование нежелательно; ее следует готовить непосредственно перед употреблением.

Выбор фиксатора определяется целью исследования, видом материала, химическими свойствами изучаемого вещества и временем, которым располагает исследователь. Правильно выбранный фиксатор может способствовать лучшему поглощению тканью красителя.

Все фиксирующие средства делятся на фиксирующие вещества, или простые фиксаторы, и фиксирующие смеси, или сложные фиксаторы. Такое деление основано на том, является ли действующим началом одно вещество или несколько веществ. В наших исследованиях использовались только простые фиксаторы или не использовались вообще (определение возраста амфибий и рептилий).

Простые фиксаторы – различные обезвоживающие вещества (этиловый, метиловый спирт, ацетон), соли тяжелых металлов (сулема, хлорид платины и др.), кислоты (уксусная, трихлоруксусная, сульфосалициловая, пикриновая, осмиевая) и формальдегид. Наиболее употребляемыми являются этиловый спирт и особенно формальдегид – дешевое и универсальное фиксирующее средство, в частности, его водный раствор – формалин. Другие фиксаторы относительно редко применяются в гистологической технике.

Формалин (формол) представляет собой 40% водный раствор формальдегида. Это – бесцветная жидкость с резким запахом. В практической работе исходный раствор формальдегида (40 %) обычно принимают за 100 % и из него готовят необходимые растворы. Для фиксации широко используются 20 %, 10 % и 5 % растворы формалина, что соответствует 8 %, 4 %, и 2 % растворам формальдегида. Растворы готовят перед самой фиксацией в водопроводной воде или физиологическом растворе. В наших исследованиях применялся преимущественно формалин в разведении 1:9, т.е. 4 % раствор формальдегида.

Формалин очень быстро проникает в ткани и хорошо их фиксирует. В течение 24-48 часов кусочки хорошо уплотняются и из них можно делать срезы на замораживающем микротоме. После фиксации материал можно проводить через спирты возрастающей крепости и заливать в целлоидин или парафин.

При консервации кусочков материала в формалине их можно сохранять годами. Если материал вследствие длительного хранения стал слишком плотным, его можно смягчить в 10 % растворе лимонной кислоты, приготовленным на дистиллированной воде. При длительном хранении в формалине в материале могут образоваться темно-коричневые пигментные зерна в результате взаимодействия, например, гемоглобина с формалином. Чтобы избежать этого, материал после фиксации необходимо тщательно промывать в проточной воде.

Даже доброкачественный формалин имеет слабо кислую реакцию, так как всегда содержит примеси муравьиной кислоты, ацетона и метилового спирта. При общих методах обработки материала это не оказывает особого влияния на ход окрашивания, однако при некоторых методах, например при серебрении, формалин необходимо нейтрализовать. Для нейтрализации формалин наливают в темную банку, на дно которой насыпают порошкообразный мел (углекислый кальций – CaCO_3) или магнезию (углекислый основной магний –

$3\text{MgCO}_3\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) из расчета 100 г порошка на 1000 мл неразведенного формалина. Многократное повторное взбалтывание через несколько часов или через сутки обеспечивает достаточную нейтрализацию. Периодически степень нейтрализации формалина следует проверять индикаторной бумагой.

Под воздействием света в формалине образуется муравьиная кислота, поэтому его необходимо хранить в посуде из темного стекла в защищенном от света месте. Кроме этого, формальдегид склонен к полимеризации и выпадению в осадок в крепких растворах в условиях низких температур. Поэтому его лучше хранить в теплом помещении, а в случае полимеризации – разводить горячей водой или подогревать небольшими порциями на огне и обязательно в вытяжном шкафу.

Работая с растворами формалина, надо соблюдать осторожность, так как пары формалина вызывают раздражение слизистых оболочек глаз, носа, гортани и трахеи. Смачивание кожи формалином оказывает дубящий эффект, а при повторных частых контактах вызывает сухую экзему.

Использование формалина в качестве фиксатора материала в скелетохронологических исследованиях нежелательно, поскольку в результате получаются препараты, которые сложно интерпретировать в виду их низкого качества. В данном случае наиболее оптимальным является заготовка высушенных костей, предварительно очищенных от мягких тканей.

Подготовка материала и изготовление срезов. Прежде чем получить срезы необходимо провести предварительную подготовку материала. В ряде случаев важно промыть в проточной воде фиксированный материал в течение нескольких часов (при исследовании возраста животных скелетохронологическим методом после предварительной декальцинации костей).

Часто перед изготовлением срезов предварительно кусочки ткани помещают в желатин. В таких случаях удобно использовать бумажные кораблики (рис. 2).

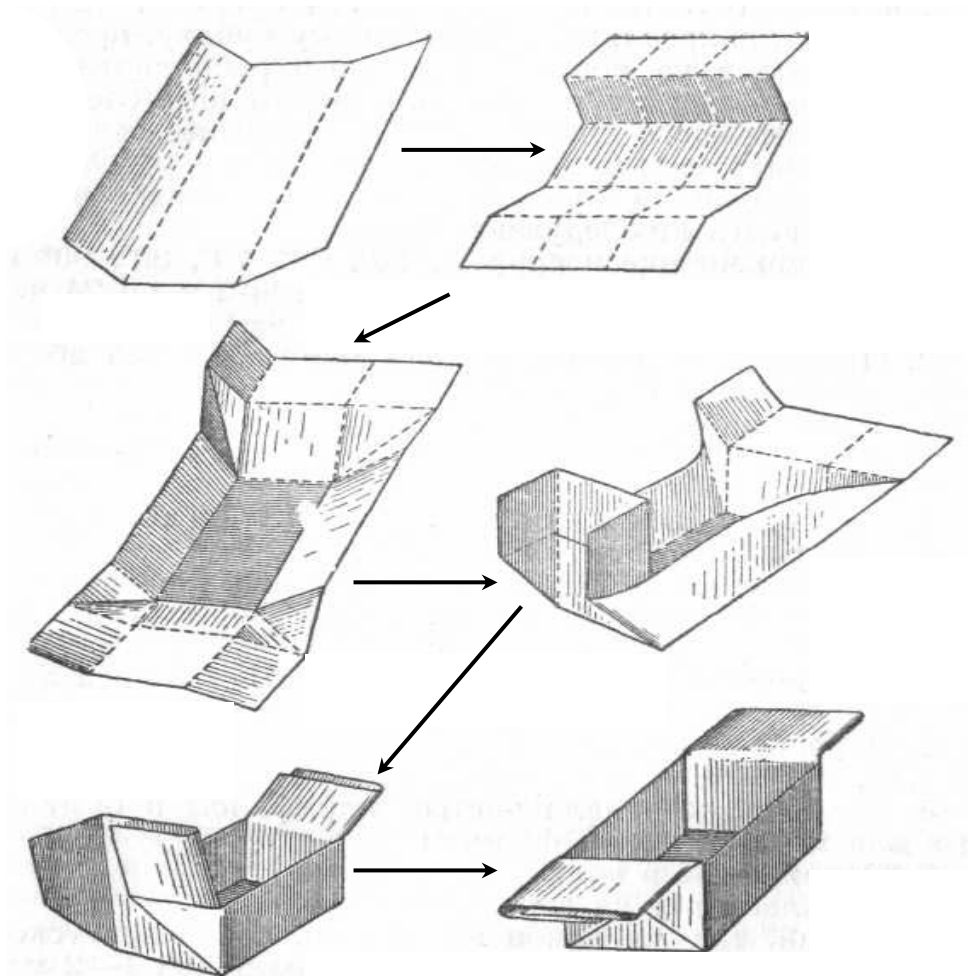


Рисунок 2. Схема изготовления бумажного кораблика (по В.Г. Елисееву, 1967)

Ответственным моментом является приморозка материала к блоку. Перед приморозкой кусочка ткани необходимо приморозить к блоку подложку – фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой.

Сама приморозка кусочка объекта не представляет особой сложности. Необходимо учитывать только то, что для дальнейшего анализа примораживать ткань следует строго определенным образом. Например, в скелетохронологических исследованиях кость необходимо примораживать только перпендикулярно плоскости блока. При изготовлении срезов головного мозга насекомых учитывается положение неудаленных остатков хитиновой кутикулы. Объект надо примораживать так, чтобы он был обращен свободной от кутикулы поверхностью к ножу.

Некоторая сложность при изготовлении срезов может возникнуть при подводе блока к ножу. Для упрощения этой операции мы используем в своих исследованиях небольшое зеркальце, которое помещается внутрь морозильной камеры микротом-криостата. Таким образом, можно видеть, насколько близко следует подводить блок к ножу. Важно придерживаться правила – получать срезы постепенным приближением объекта к ножу с помощью механизма подачи. Это позволяет избежать откалывания кусочков исследуемой ткани.

Несколько первых срезов, как правило, выбрасывают. Последующие срезы собирают на предметное стекло или в банку с дистиллированной водой или физиологическим раствором, для чего их с помощью пипетки смывают с ножа в банку или переносят шпателем. Снимать срезы с ножа можно сразу по нескольку штук (можно снимать их кисточкой или пальцем, но при смывании они меньше повреждаются). В воде срезы быстро расправляются.

Замороженные срезы в процессе дальнейшей обработки легко повреждаются. Поэтому особо нежные объекты наклеивают на специально подготовленные предметные стекла (см. стр. 42) и всю дальнейшую обработку проводят уже на стеклах.

Качество срезов зависит прежде всего от степени замораживания кусочка ткани. Если срезы при резании размазываются на ноже (получается соскоб, а не срез), значит кусочек недостаточно заморожен. В таком случае нужно продолжить заморозку объекта. Если кусочек переморожен, срезы легко крошатся, и цельного среза со всей пластинки получить не удастся. В этом случае нужно выждать некоторое время, проверяя контрольными срезами, насколько оттаял кусочек. При изготовлении большого количества срезов время от времени приходится дополнительно замораживать кусочек. Качество получаемых срезов удобно оценивать под микроскопом, обращая внимание на наличие цельности среза или выкрошивание его частиц и образование борозд на поверхности среза (из-за плохой заточки ножа).

При резке на замораживающем микротоме срезы могут скручиваться, ломаться, а бритва скользить по блоку и плохо резать. Это возникает из-за того, что ткань переморожена, необходимо ее разморозить и снова слегка заморозить. Чаще всего достаточно, не размораживая, согреть поверхность блока пальцем.

Окраска срезов. В неокрашенном срезе можно различать только элементы отличающиеся друг от друга различным преломлением световых лучей. Однако большинство деталей препарата одинаково преломляет свет, поэтому в неокрашенном срезе рассмотреть их не удастся. Для того чтобы отчетливо видеть под микроскопом строение органа, тонкий срез, сделанный с помощью микротомы, необходимо подвергнуть обработке красящими веществами.

По химическим свойствам все красящие вещества разделяются на три группы: основные, кислые и нейтральные.

Основные красители представляют собой соли оснований; гистологические структуры, окрашивающиеся этими красителями, получили название базофильных, т. е. имеющих сродство к основным краскам.

Кислые красители – кислоты и соли кислот; образования, окрашивающиеся ими, называются оксифильными.

Нейтральные красители представляют собой соединения солей кислот и оснований.

Различают прогрессивные и регрессивные способы окрашивания. При прогрессивном окрашивании срез сразу же приобретает нужную степень (тон) окраски. При регрессивной окраске красители окрашивают срез более интенсивно, чем это необходимо, переокрашивают его. Такие переокрашенные срезы затем дополнительно обрабатывают особым веществом, которое ослабляет окраску до желаемого тона. В одних случаях красители сразу окрашивают срез без предварительной обработки последнего (в большинстве случаев это имеет место при прогрессивном окрашивании), в других (чаще это регрессивное окрашивание) срез перед окраской необходимо обработать другим неокрашивающим веществом – протравой, после чего хорошо воспринимается и сам краситель.

В зависимости от того, какие структуры желают выявить на срезе, применяют простые или сложные методы окрашивания.

В первом случае срез окрашивают одним красителем; очень часто применяется, например, окраска железным гематоксилином, который четко выявляет ядра и различные базофильные структуры в протоплазме. При сложной окраске срез окрашивают двумя или более красителями, выявляющими различные структуры. Так, при необходимости выявить мышечные клетки и волокна соединительной ткани препарат окрашивают тремя красящими веществами: гема-

токсилином выявляют ядра, пикриновой кислотой – протоплазму мышечных клеток и фуксином – коллагеновые волокна соединительной ткани. В большинстве случаев применяют сложные методы окрашивания.

Целлоидиновые и замороженные срезы, не наклеенные на стекло, переносят в дистиллированную воду на 2-5 минут. Вся дальнейшая обработка срезов (окрашивание и заключение) производится в небольших стеклянных баночках – бюксах (рис. 3). Бюксы должны быть снабжены соответствующими этикетками.

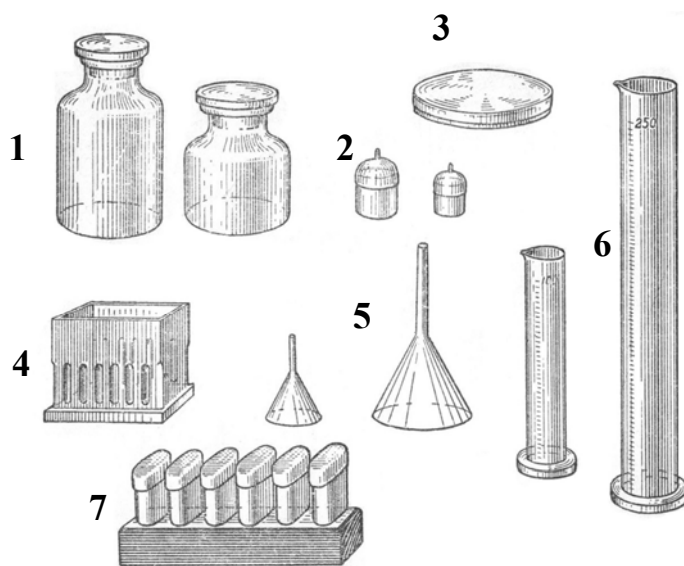


Рисунок 3. Посуда, необходимая для оборудования рабочего места (по В.Г. Елисееву, 1967 с нашими дополнениями). 1-широкогорлые банки с притертой крышкой; 2-бюксы различных размеров; 3-чашка Петри; 4-кювета; 5-воронки; 6-мерные цилиндры; 7-биологические стаканчики в штативе.

Переносить срезы из одного бюкса в другой следует с большой осторожностью. Это делают с помощью препаровальных игл и тонких металлических шпателей. В ряде случаев, например при импрегнации серебром, применение металлических инструментов недопустимо. В этом случае используются стеклянные инструменты. Срез подхватывают загнутым концом стеклянной палочки и быстро переносят в следующий бюкс. При перенесении среза в некоторые растворы (абсолютный спирт, карбол-ксилол) на нем остается складка, несколько затрудняющая его дальнейшую обработку, поэтому лучше пользоваться

ся шпателем. Изогнутый конец шпателя правой рукой осторожно подводят под срез и, слегка придерживая последний концом иглы на шпателе, извлекают из бюкса. Чтобы не повредить срез следует прикасаться иглой лишь к его краю, а для целлоидиновых срезов — к той части среза, где нет объекта.

Дальнейшую подготовку препаратов (освобождение от примесей, окраску, просветление и заключение), как наклеенных на стекло, так и не наклеенных, производят одинаково. Разница заключается лишь в том, что первые обрабатывают в биологических стаканчиках, вторые – в бюксах или в часовых стеклах (рис. 3).

Срезы освобождают от примесей осадка фиксатора в тех редких случаях, когда их очень много. С этой целью готовят смесь 1 % раствора едкого калия (КОН) и 80 % спирта в соотношении 1:100 и переносят в нее срезы на 10 минут; затем срезы промывают в дистиллированной воде, в 80 % спирте, в проточной воде и окрашивают различными красящими веществами. Выбор их в каждом отдельном случае зависит от задач, поставленных перед исследователем, и условий предварительной обработки среза.

Чаще всего применяется окраска гематоксилин-эозином (гематоксилин окрашивает ядерные структуры, а эозин – протоплазму клеток). В зависимости от задачи исследования этот метод окрашивания сочетают с другими. Если, например, перед исследователем стоит задача выяснить наличие и распределение в органе жира, применяется судан III, красный шарлах и др. одновременно ядра клеток окрашивают гематоксилином. При выявлении различных межклеточных структур, например коллагеновых и эластиновых волокон их окрашивают анилиновым синим и орсеином. Перед заключением срезы обычно просветляют. Для этого пользуются различными просветляющими жидкостями, которые делают окрашенные срезы прозрачными и окончательно их обезвоживают. Обычно для просветления употребляют карбол-ксилол, карбол-толуол или карбол-скипидар, различные масла – гвоздичное, каепутовое, бергамотовое; при некоторых специальных методиках (например, при выявлении жира) просветление производят в глицерине. Наиболее часто применяемый для просветления карбол-ксилол готовят, растворяя 1 часть кристаллической карболовой кислоты в 3 частях ксилола (толуола или скипидара). Этот раствор имеет слабый красновато-желтый оттенок. Перед просветлением препарат нужно тщательно обез-

водить, так как ксилол не смешивается с водой и обезвоженный срез мутнеет. Срез обрабатывают в течение 3-5 минут в 70 % спирте, затем 3-5 минут в 96 % (при работе с различными маслами необходимо еще и обезвоживать в абсолютном спирте).

В карбол-ксилоле просветление среза продолжается около 3 минут. Окрашенный срез становится при этом прозрачным как стекло. В том случае, если срез при перенесении в карбол-ксилол помутнел (появились матовые непрозрачные участки), необходимо вернуться к обработке спиртом. Недостаточно обезвоженные срезы вновь переносят на несколько минут в карбол-ксилол. Следует иметь в виду существенный недостаток карбол-ксилола и карбол-толуола: быстро и хорошо просветляя срезы, эти жидкости вызывают некоторое их сморщивание, поэтому для просветления иногда применяют перечисленные выше масла (для целлоидиновых срезов не применяют гвоздичное масло, так как оно растворяет целлоидин).

Карбол-ксилол и карбол-толуол оказывают влияние на окраску среза при длительном хранении препарата, поэтому срезы перед заключением отмывают в чистом ксилоле или толуоле в течение 1-2 минут.

Подготовка стекол. Предметные и покровные стекла необходимо подготовить заранее.

Хорошие предметные стекла должны быть бесцветными, без трещин и царапин. Перед использованием предметные стекла необходимо обезжирить. Обычно используют новые стекла, которые обрабатывают в специальной смеси. Для ее приготовления берется 100 г двуххромовокислого калия, который растворяется в 1 л горячей воды. После остывания в раствор вливается примерно 100 мл серной кислоты (можно неочищенную). Кислоту наливают осторожно (обязательно в вытяжном шкафу), смесь сильно нагревается и приобретает темно-коричневый цвет. В этом растворе предметные стекла и стеклянную посуду выдерживают 2-3 дня, а затем промывают в проточной воде и вытирают льняной салфеткой, удерживая их за края. На хорошо обезжиренном предметном стекле вода должна растекаться ровным слоем, а не собираться в капли.

Обработанные таким образом стекла можно хранить в 96 % спирте или в смеси спирта с эфиром в соотношении 1:1. Возможно вторичное использование стекол после предварительной их очистки и приведенной выше подготовки.

Самыми лучшими покровными стеклами являются наиболее тонкие из них, которые легко сгибаются, особенно это важно, если препарат изучается с помощью иммерсионной системой микроскопа.

Заключение срезов. Заключение срезов преследует цель сохранения препарата в доступном для микроскопирования виде. Для этого срезы помещают между двумя стеклами в каплю канадского (или пихтового сибирского) бальзама, который представляет собой раствор смолы в ксилоле или толуоле. При некоторых специальных методах, например при выявлении жира, вместо бальзама применяют глицерин-желатин. В некоторых исследованиях используются временные препараты, заключенные в глицерин (фиксация срезов костей при использовании скелетохронологического метода). Глицерин не фиксирует покровное стекло. Для его укрепления края можно покрыть валиком из расплавленного воска, парафина или менделеевской замазки. Ее готовят по следующей прописи: в металлической посуде расплавляют 125 г желтого воска и, помешивая, понемногу добавляют 500 г канифоли, затем также постепенно добавляют прокаленную мумию (минеральная краска коричневатого-красного цвета; состоит в основном из безводной окиси железа – Fe_2O_3), - в количестве 200 г, 3-5 г льняного масла; варят до исчезновения пены. Сохраняют в виде плотной массы; перед употреблением подогревают. Выбранный фиксированный материал берут шпателем и фиксируют все четыре угла покровного стекла. Затем фильтровальной бумагой удаляют излишек глицерина и протирают углы препарата 50-70 % спиртом. После этого все четыре стороны покровного стекла можно покрыть тушью, воском или менделеевской замазкой. Подготовленные таким образом препараты хранят только в горизонтальном положении.

Канадский или пихтовый бальзам также готовят заранее; сухой бальзам растворяют в ксилоле или толуоле до консистенции жидкого меда (растворение идет медленно; его можно значительно ускорить, пользуясь термостатом). Растворенный бальзам сохраняют в герметичных банках.

Предметное стекло с наклеенным на него срезом извлекают из ксилола, быстро просушивают с обратной стороны и по краям чистой сухой салфеткой и, положив на стол, наносят на срез каплю канадского бальзама. Все эти манипуляции выполняют как можно быстрее, не давая срезу просохнуть. Ненаклеенные целлоидиновые и замороженные срезы извлекают из ксилола следующим образом: одной рукой опускают предметное стекло в бюкс под углом к его стенке, а другой при помощи препаровальной иглы или стеклянной палочки (загнутой или с закругленным концом) расправляют срез и осторожно подтягивают его на середину предметного стекла.

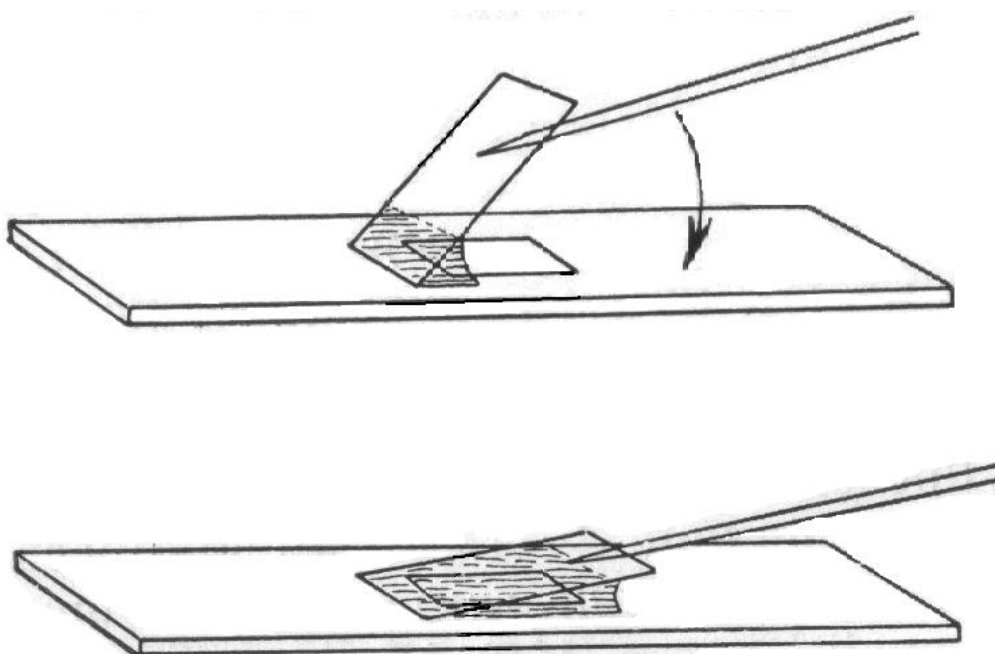


Рисунок 4. Схема заключения препарата под покровное стекло
(по Д. Кисели, 1962).

Сразу после нанесения капли канадского бальзама на срез, его нужно закрыть покровным стеклом. При этом следует сначала приложить к предметному стеклу одно ребро покровного стекла, а затем медленно опустить последнее, наблюдая за тем, чтобы срез был в центре (рис. 4). Канадского бальзама должно быть достаточно для того, чтобы между покровным и предметным стеклом не было видимых пузырьков воздуха, и вместе с тем не столь много, чтобы бальзам растекался по предметному стеклу вокруг покровного. Если канадского бальзама было взято недостаточно и между стеклами осталось боль-

шое воздушное пространство, а препарат необходимо сохранить, можно нанести на предметное стекло каплю бальзама у того края покровного стекла, где имеется воздух; бальзам сейчас же затечет под стекло.

Заключение срезов начинают с менее ценных или ненужных. Накрывать срезы покровным стеклом нужно осторожно, чтобы избежать образования пузырьков воздуха. Изготовленный препарат рекомендуется в начале просмотреть при слабом увеличении микроскопа. Иногда в препарате встречаются примеси в виде хлопчатобумажных, шерстяных или шелковых волокон, тогда необходимо проверить, насколько чисты покровные и предметные стекла или растворы, в которых происходила обработка срезов. Установив причины загрязнения, нужно устранить их и лишь после этого обрабатывать следующие препараты.

Приготовленные гистологические препараты сохраняют на специальных лотках в горизонтальном положении до тех пор, пока бальзам не затвердеет (около 24 часов). На это время сверху на покровное стекло ставят грузики общей массой около 35-40 г. Затем препараты можно держать вертикально в коробках.

Проведение измерений. Часто в гистологической практике необходимо определить размеры различных клеток или отдельных частей тканей. Для измерения клеток пользуются «объект-микрометром» и «окуляр-микрометром» (рис. 5 и 6).



Рисунок 5 . Схема делений объект-микрометра
(по Ф.М. Соколиной, П.А. Писареву, 2001)

В начале необходимо определить кратность увеличения оптики микроскопа, с которым вы работаете. Далее для измерения объекта необходимо установить объектив с определенной кратностью. На столик микроскопа следует положить «объект-микрометр», а обычный окуляр заменить на «окуляр-микрометр». После этого производится подсчет – сколько делений «окуляр-

микрометра» уместится на 10 делениях «объект-микрометра». Цена деления «объект-микрометра» стандартна и равна 0,01 мм (вся шкала делений составляет 1 мм).

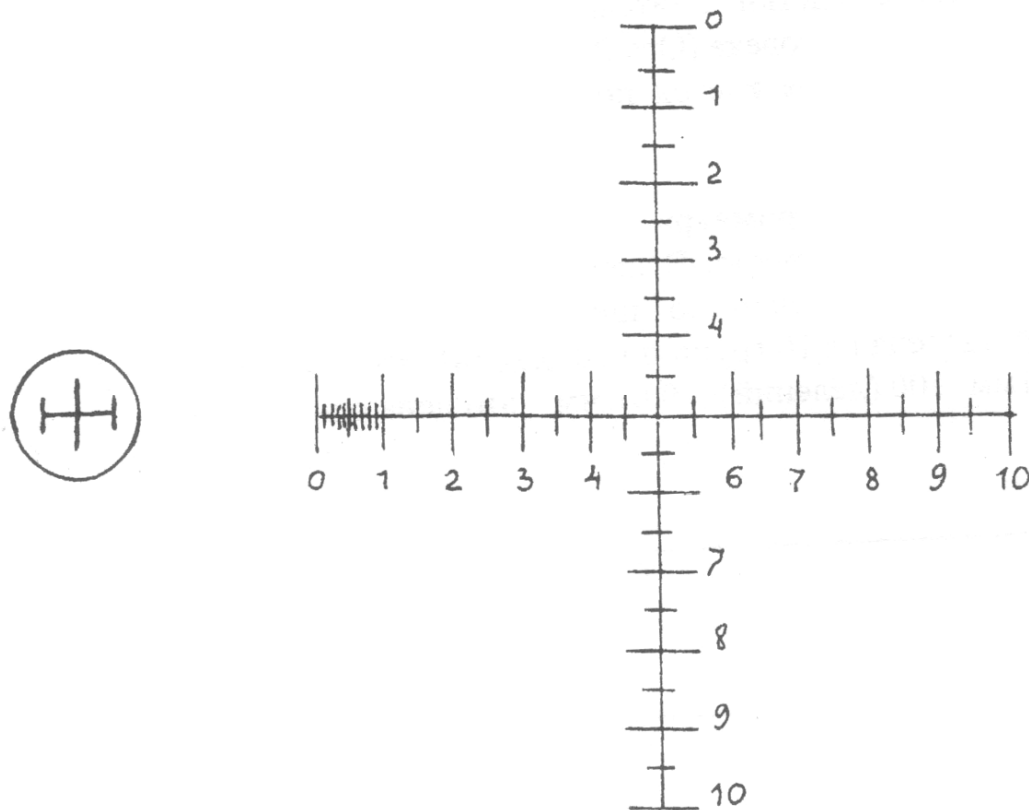


Рисунок 6. Схема расположения делений окуляр-микрометра
(по Ф.М. Соколиной, П.А. Писареву, 2001)

Например, 7 делений объект-микрометра покрываются 52 делениями окуляр-микрометра. 1 деление объект-микрометра равно 10 мк. Получается, что 1 деление окуляр-микрометра = $70/52 = 1,3$ мк. Эта величина должна быть вычислена для каждого увеличения отдельно. Соответствующим образом проводится пересчет размеров объекта.

Измерение клеток и участков ткани рекомендуется проводить на объектах, залитых в парафин с температурой плавления 47°C (Б. Ромейс, 1953). Если с помощью криостата срезы получают с залитой в желатин ткани, то при фиксации естественные размеры клеток значительно изменяются, особенно при подсушивании блока перед приготовлением срезов. Результаты таких измере-

ний могут быть использованы только при расчете индексов или для оценки ядерно-плазменного отношения.

Техника безопасности при работе на микротоме-криостате. Часто увлеченные жадой познания исследователи забывают о мерах предосторожности и собственном здоровье. При работе на микротоме-криостате необходимо помнить о технике безопасности. Для удовлетворительной работы на протяжении долгого времени необходимо соблюдать ряд правил:

- устанавливать нож только при открытой дверце камеры до запуска микротомы;
- включать криостат только при закрытой двери камеры;
- исключить контакт с ножом при включенном криостате;
- исключить открытие дверцы камеры до окончания работы криостата;
- после завершения работы полностью выключить питание криостата;
- после прекращения работы нож микротомы для предупреждения коррозии помещать в теплое полотенце;
- после очередного сеанса работы дверцу рабочей камеры необходимо открыть для просушки.

При изготовлении срезов руки исследователя находятся в среде с пониженной температурой. Переохлаждение рук может привести к нежелательным последствиям. Чтобы их избежать, необходимо применять профилактические меры. Во-первых, работать в теплой одежде и обуви. Во-вторых, руки должны быть защищены от холода перчатками из натуральной ткани с обрезанными для удобства работы кончиками пальцев. Для этой цели можно использовать обычные хлопчатобумажные рабочие перчатки. В-третьих, рекомендуется работать на криостате не более 10-15 минут, после чего делать перерывы продолжительностью не менее пяти минут. В перерывах между сеансами работы рекомендуется провести легкую разминку для разогрева рук; пить горячий чай, желательно с лимоном. В-четвертых, для профилактики ревматизма, на ночь, в период обработки материала на криостате, мы рекомендуем делать йодное колечко на запястье каждой руки. Утром, если такое колечко исчезает и не оставляет следов, обработку запястья йодом следует повторить.

Эффективным профилактическим средством является прием на ночь по 0,25 г. аспирина, который обладает противовоспалительным и противоревматическим действием. Аспирин нужно принимать в растворенном виде, после еды. Большую пользу принесет прием поливитаминных препаратов в период работы на криостате.

Соблюдение элементарных требований личной безопасности позволит работать на криостате на протяжении длительного времени без ущерба для здоровья.

ЧАСТЬ II

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА В ЗООЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Одним из основных объектов исследования на кафедре зоологии КГАВМ является медоносная пчела (*Apis mellifera* L., 1758). Изучение медоносной пчелы представляет большой интерес в научном и практическом отношении в связи с ее ролью в жизни человека. Медоносные пчелы совершают 80-90 % всей работы по опылению сельскохозяйственных растений, повышают урожайность культур на 25-40 %. Продукты пчеловодства благотворно влияют на организм человека, и задачи отрасли состоят в том, чтобы обеспечить население целебным медом, медицину – маточным молочком, прополисом, пчелиным ядом и цветочной пылью, а промышленность – воском, который применяется более чем в 40 отраслях народного хозяйства. В понимании биологии пчелиной семьи с точки зрения повышения продуктивности сельскохозяйственного производства определенную роль играют и исследования морфологии отдельных тканей пчел. Для этих исследований на кафедре зоологии применяется микротом-криостат.

Другим важным вопросом, решаемым с помощью микротом-криостата на кафедре зоологии КГАВМ, является изучение демографической структуры популяций амфибий и рептилий. Познание механизмов самоподдержания популяции представляет собой ключевой аспект сохранения биологического разнообразия и дает начальную информацию по микроэволюционным процессам, происходящим в популяциях, обитающих в разных условиях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РАЗВИТИЯ ЖИРОВОГО ТЕЛА ПЧЕЛЫ И ХАРАКТЕРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В НЕМ ОБЩИХ ЛИПИДОВ

Одним из показателей физиологического состояния пчелиной семьи является степень развития жирового тела у отдельных пчел. По степени развития жирового тела и массы брюшка можно судить о запасах резервных веществ в теле медоносной пчелы (R. Lotmar, 1935; А. Маурицио, 1958; М.В. Жеребкин, Я.Л. Шагун, 1971; В. Кепеня, 1971), составить прогноз продолжительности

жизни пчел (А. Маурицио, 1958) и результатов зимовки пчелиных семей (В.И. Белявский, 1985).

Относительная простота визуального определения степени развития жирового тела объясняет популярность применения этого метода в научных исследованиях, связанных с использованием медоносных пчел в сельскохозяйственном производстве.

Клеточный состав жирового тела пчелы изучался многими авторами (Г.А. Кожевников, 1900; Р. Шовен, 1953; В. Boehm, 1961). Однако, динамика изменений соотношения структурных элементов в жировом теле пчел в зимний период их жизни, особенно в зависимости от качества корма пчел, изучена недостаточно (С.П. Циколенко, 2004). До настоящего времени слабо изучен характер распределения жировых запасов в жировом теле зимних пчел.

Для решения этих вопросов важно использовать интегральный подход к оценке жирового тела, сочетающий макроскопическую и микроскопическую его оценку.

Методика визуальной оценки жирового тела пчелы. А. Маурицио (1958) выявила у медоносных пчел и описала пять степеней развития жирового тела (рис. 7-15 по В.И. Белявскому).

- 1 степень. Жировое тело не развито: оно настолько прозрачно, что через него ясно просвечивает хитин спинного панциря (рис. 7).
- 2 степень. Жировая ткань однослойная, плоская. Клетки голубовато-белые, полупрозрачные без отчетливо видимых включений.
- 3 степень. Жировая ткань однослойная, с несколькими складками. Клетки белые, округлые, без хорошо заметных включений (рис. 8, 12).
- 4 степень. Жировая ткань многослойная, складчатая. Клетки круглые, с хорошо выраженными включениями.
- 5 степень. Жировая ткань многослойная, с многочисленными складками. Клетки большие, круглые, желтого цвета, заполненные включениями (рис. 9, 13).

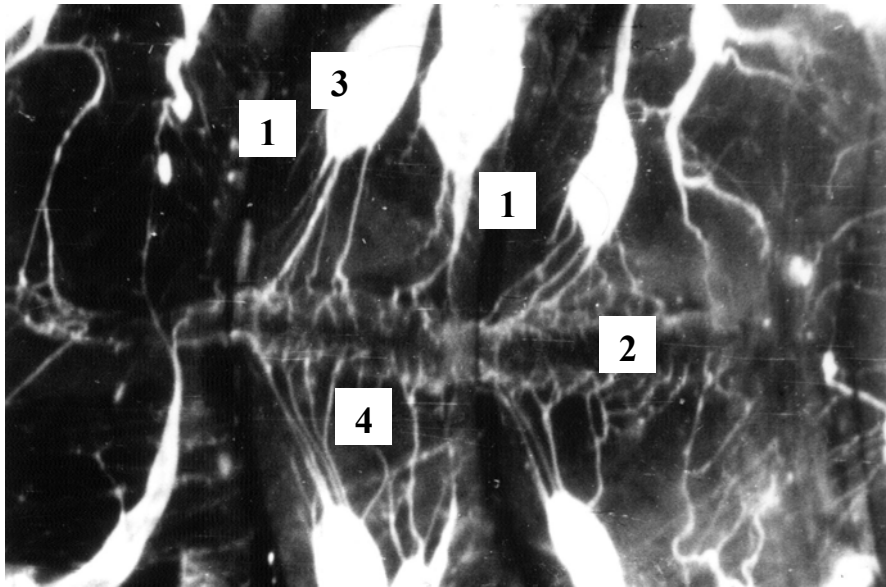


Рисунок 7. Жировое тело осенне-зимней пчелы в первой степени его развития. Перикардиальная зона. Условные обозначения: 1 - прозрачное жировое тело (просвечивает хитин); 2 - камера сердца; 3 - малые воздушные мешки; 4 - трахеи

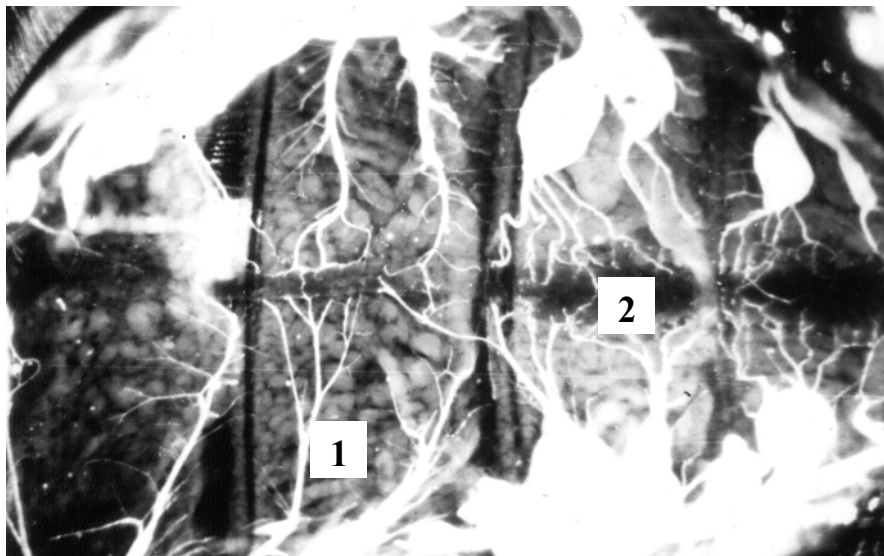


Рисунок 8. Жировое тело осенне-зимней пчелы в третьей степени его развития. Перикардиальная зона. Условные обозначения: 1 - однослойное складчатое жировое тело; 2 - камера сердца

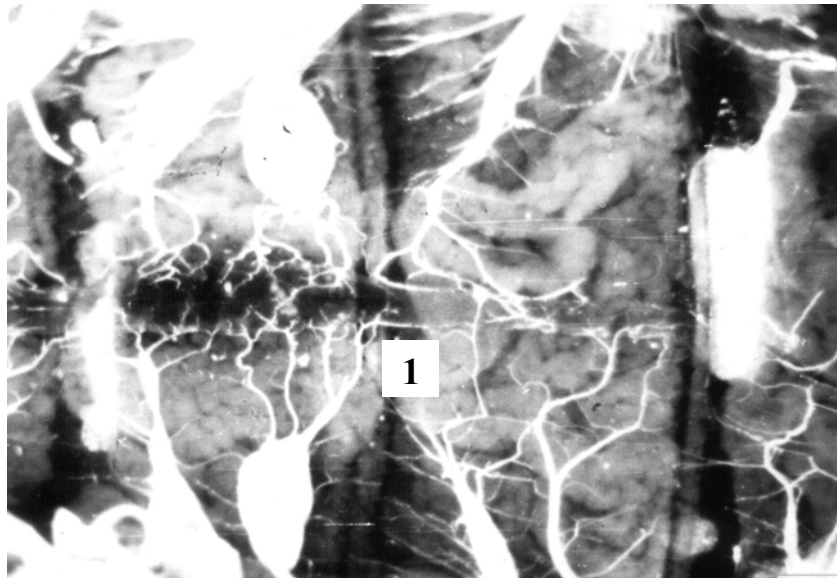


Рисунок 9. Жировое тело осенне-зимней пчелы в пятой степени его развития. Перикардальная зона. 1 - многослойное складчатое жировое тело

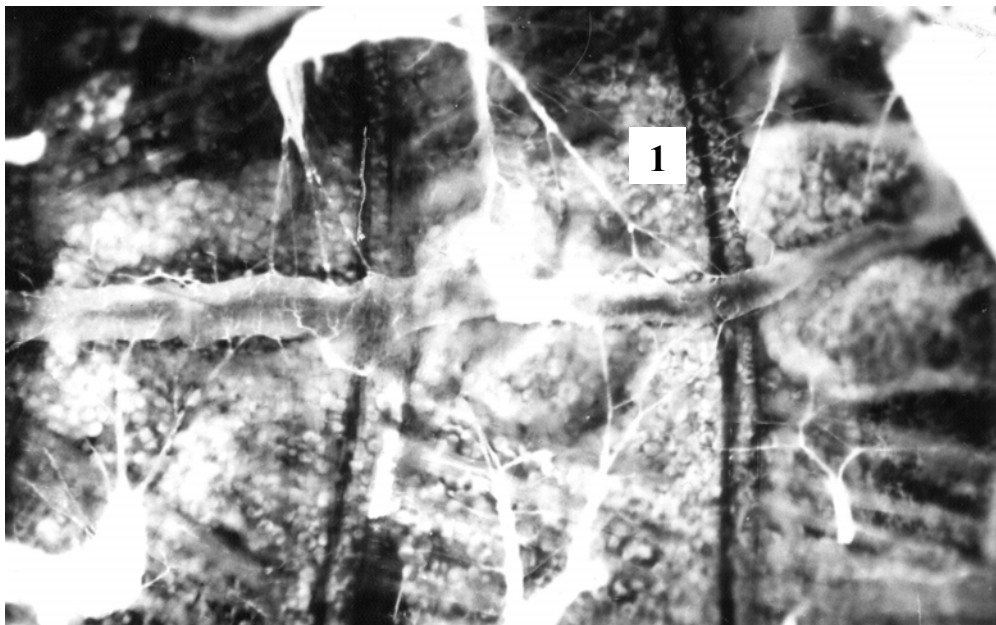


Рисунок 10. Жировое тело осенне-зимней пчелы в состоянии «расхода» («расходное» жировое тело). Перикардальная зона. 1 - жировые клетки, прозрачные в центре

Позднее нами (Н.А. Голикова, В.И. Белявский, 1984) была обнаружена еще одна стадия развития жирового тела – «расходное» жировое тело (рис. 10, 14), характерное для пчел из зимнего клуба, находящегося во втором периоде

годового жизненного цикла пчелиной семьи по С.В. Жданову (1961), называемом «зимним размножением».

«Расходное» жировое тело может быть складчатым и многослойным, но клетки, его составляющие, заметно мельче. Они прозрачные в центре и белые (или голубовато-белые) по периметру. Внешне жировое тело напоминает завитки овчины («шубу»).

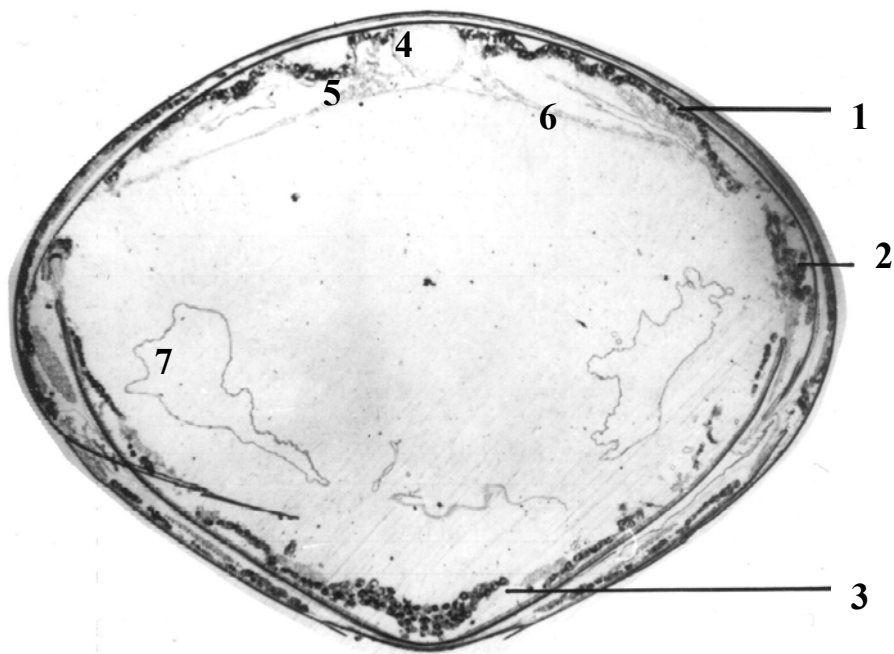


Рисунок 11. Поперечный срез брюшного отдела тушки брюшка пчелы. Окраска суданом черным В. Условные обозначения: 1 - перикардиальное жировое тело; 2 - латеральное жировое тело; 3 - стернитное жировое тело; 4 - сердце; 5 - перикардиальные клетки; 6 - спинная диафрагма; 7 - воздушные мешки

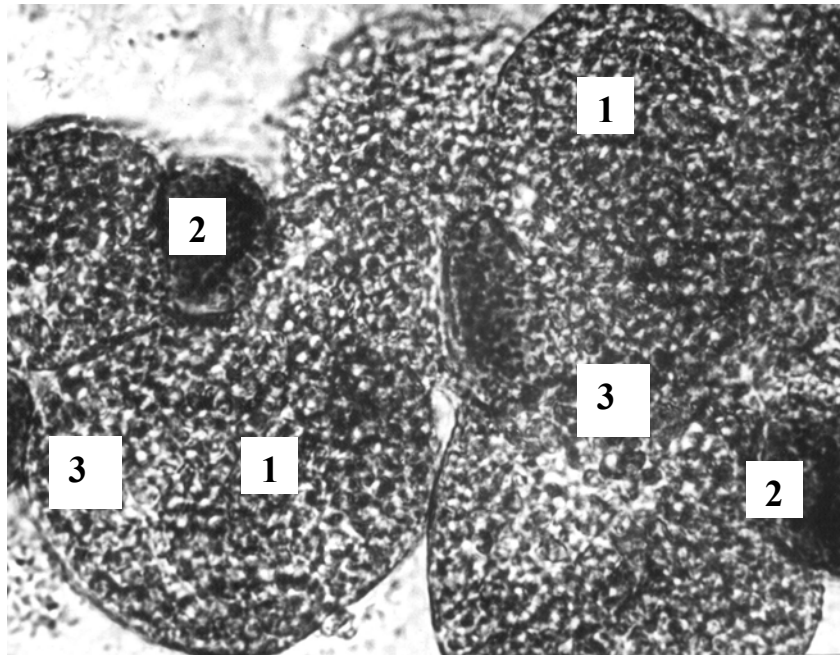


Рисунок 12. Жировое тело осенне-зимней пчелы в третьей степени его развития. Перикардальная зона. Окраска суданом черным В. Условные обозначения: 1 - жировые клетки; 2 - эритроциты; 3 - «каталисомы» в виде «колечек» и «шапочек»

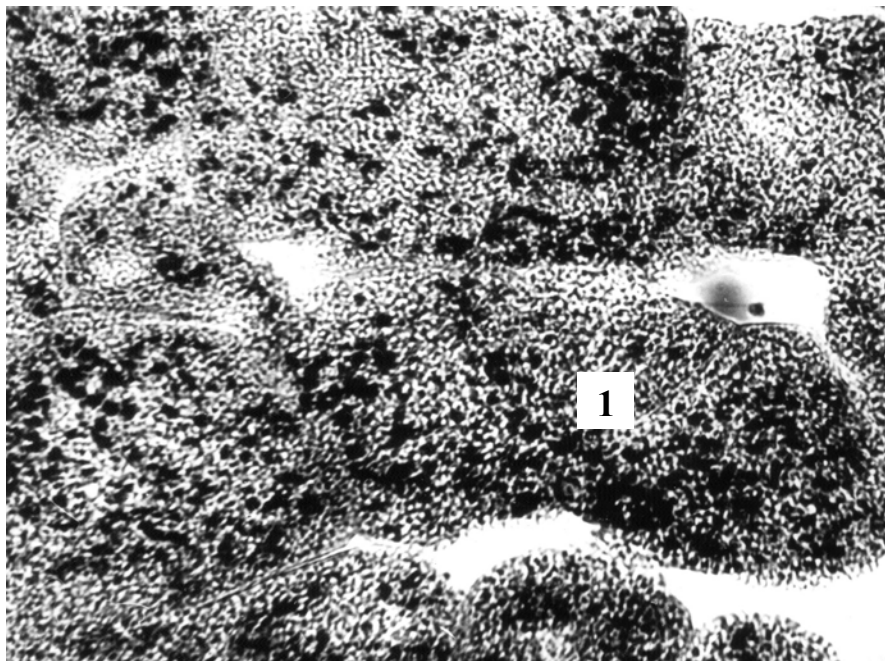


Рисунок 13. Жировое тело осенне-зимней пчелы в пятой степени его развития. Перикардальная зона. Окраска суданом черным В. 1 - жировые капли

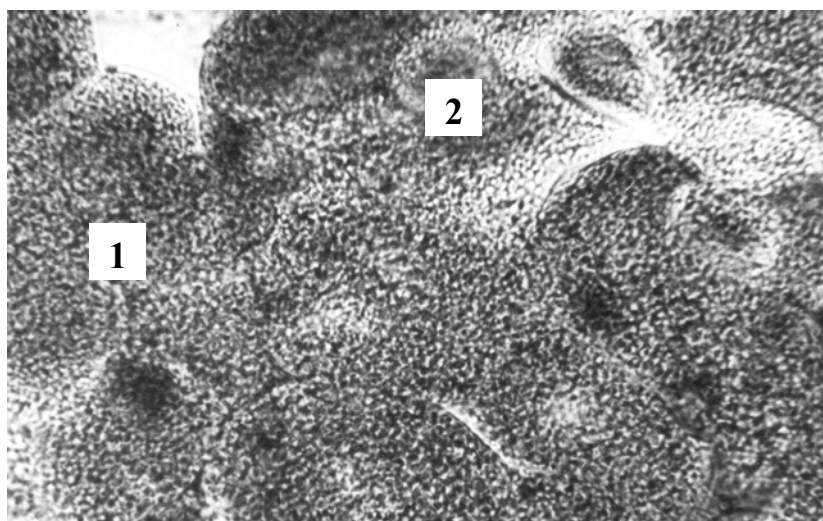


Рисунок 14. Жировое тело осенне-зимней пчелы в состоянии «расхода» («расходное» жировое тело). Перикардиальная зона. Окраска суданом черным В.

Условные обозначения: 1 - жировые клетки; 2 – эноциты

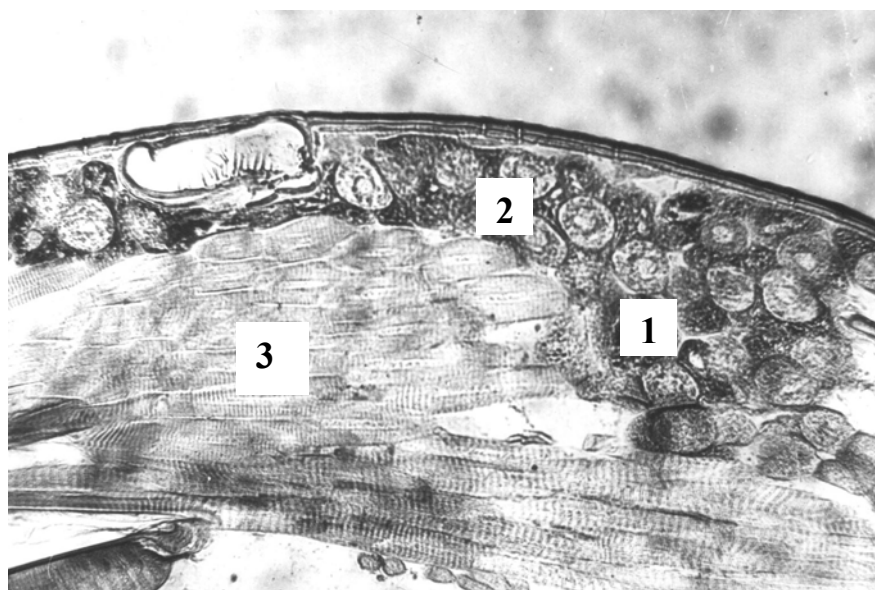


Рисунок 15. Латеральное жировое тело пчелы. Окраска суданом черным В. Ус-

ловные обозначения: 1 – жировые клетки; 2 – эноциты; 3 – мышцы

Для работы по определению степени развития жирового тела необходимо подготовить рабочее место: инструмент (препаровальные стеклянные иглы, глазные ножницы, анатомический пинцет, булавки), увеличительные приборы (микроскоп МБС-9 и осветитель ОИ-19), восковой столик (его можно изготовить, залив в чашку Петри расплавленный воск слоем не более 1 см), посуду

для физиологического раствора и пипетку.

Подготовка материала. Пчел, взятых из улья в коническую колбу для исследования, следует усыпить хлороформом и поместить в холодильник, в камеру с температурой +8 - +10 °С, откуда доставать по одной для оценки степени развития их жирового тела.

У пчелы сначала необходимо отстричь голову, затем удалить кишечник. Для этого большим и указательным пальцем левой руки удобно удерживать грудь пчелы. Затем анатомическим пинцетом, находящимся в правой руке, зажать последний сегмент брюшка и медленно вытаскивать кишечник, следя за тем, чтобы все отделы (по порядку их появления снаружи: ректальная, тонкая, средняя кишки, зоб и пищевод) оказались за пределами брюшка. Лучше, если при этом пчела удерживается вертикально, а кишечник вытягивается вниз, тогда под действием своей тяжести он извлекается без обрывов. Все то, что осталось от пчелы (грудной отдел и брюшко без последнего сегмента и кишечника) следует уложить дорзальной стороной вниз на восковой столик и булавками зафиксировать грудь пчелы в воске. Затем глазными ножницами надо сделать два продольных разреза брюшка в области границ тергита и стернита, а пластинку из стернитов отстричь. С помощью стеклянных игл следует удалить воздушные мешки и крупные трахеи, закрывающиеся под ними по центру сердце и посегментно расположенное по его бокам перикардальное жировое тело брюшного отдела пчелы. Мы для такой работы использовали микроскоп МБС-9 с осветителем ОИ-19. Дальнейшую работу проводили в отраженном свете. Обычно, если все выше перечисленное сделано быстро, то при 24-кратном увеличении (окуляр 6^x, объектив 4^x) в поле зрения видно пульсирующее сердце, границы брюшка и жировое тело пчелы.

С целью упрощения определения степени развития жирового тела пчелы, описание степеней можно представить в виде таблицы (табл. 1).

Характеристика жирового тела пчел по степеням развития
(по А. Маурицио, 1958) с нашими дополнениями
(Н.А. Голикова, В.И. Белявский, 1985)

Степень развития жирового тела	Признаки				
	Ткани		Клеток		
	Количество слоев	Наличие складок	Форма	Цвет	Наличие включений
1	Жировое тело не развито, прозрачное, сквозь тело просвечивает хитин				
2	Один	-	х	Голубовато-белый	-
3	Один	+	Округлая	Белый	-
4	Много	+	Округлая	Белый	+
5	Много	+	Круглая	Желтый	+
«Расходное»	Много	+	Круглая	Голубовато-белый, белый по периметру (в центре клетки прозрачные)	х

х - нет сведений

Фиксация. В нашем случае при изготовлении препаратов для общего обзора и для изучения материала на жир лучше всего использовать 10 % раствор нейтрального формалина (Г.И. Роскин, 1946; Г.А. Кононский, 1976), так как он не изменяет расстояний между молекулами в состоянии золя, сохраняет их адсорбирующую способность по отношению к воде и красителям. Особенно важно, что этот фиксатор на водной основе хорошо сохраняет жиры в объекте.

Применение для фиксации излишне кислого формалина, без предшествующей нейтрализации, может отразиться на способности тканей воспринимать окраску, поэтому формалин следует нейтрализовать (см. стр. 9).

После этого можно приготовить рабочий раствор фиксатора: 10 мл неразбавленного нейтрального формалина смешать с 90 мл проточной воды (раствор формалина 1:9 или иначе 10 %).

Для фиксирования брюшко необходимо поместить в 10 % раствор нейтрального формалина, залитый в отдельные емкости (ими могут быть пенициллиновые флаконы с капроновыми крышками). Соотношение объемов объекта и фиксатора 1:30 (Е.Н. Павловский, 1957). Внутри флакона должна быть этикетка, написанная графитовым карандашом, содержащая необходимые сведения. Например, пчелиная семья № 1, брюшко, степень развития ЖТ (жирового тела) – 5, 10 % нейтральный формол, дата.

Цельные тушки брюшка пчелы можно фиксировать для приготовления замороженных препаратов и изучения тотальной топографии жирового тела и соотношения его форменных элементов в разных зонах (перикардальной, латеральной или стернитной).

Тергитную часть тушки брюшка следует зафиксировать с целью изучения перикардального жирового тела только после визуальной оценки степени его развития.

Из-за обилия трахей тушки брюшка обычно плавают на поверхности фиксатора, поэтому не все участки жировой ткани бывают нормально зафиксированы.

Для обеспечения равномерной и быстрой пропитки тушки пчелы фиксатором достаточно обработать их нейтральным формалином в условиях небольшого вакуума в течение 15 минут. Для этого помещают флакончики с тушками пчел в фиксаторе в герметично закрывающуюся стеклянную банку, в крышку которой встроен вентиль для соединения с помощью шланга с вакуум-насосом Комовского. Д. Кисели (1962) рекомендует использовать вакуумный насос с величиной конечного вакуума 0,1 мм ртутного столба. Признак заполнения трахейной системы фиксатором - появление пузырьков воздуха при создании слабого вакуума и опускание тушки брюшка пчелы на дно сосуда с раствором формалина при нормализации давления в сосуде. Дальнейшее хранение фикси-

рованных тушек обычно осуществляют в той же этикетированной посуде в 10 % растворе нейтрального формалина.

Промывка. Промывка в проточной водопроводной воде в течение трех часов освобождает тушки от формалина (см. стр. 39). Увеличение времени промывки может привести к мацерации тканей объекта.

По завершении промывки тушку брюшка надо провести через 1 % карболовую воду. Это необходимо для того, чтобы концентрация карболовой кислоты (фенола) при последующей заливке тушки в желатин не понижалась.

Заливка объекта в желатин и приготовление блока. Перикардальное жировое тело (рис. 11) на большом протяжении не имеет связи с гиподермой, оно как бы «свободно». Из-за этого наши первые попытки получения срезов на микротоме-криостате были неудачными: срез был не цельным, а фрагментарным.

При изучении объектов, легко распадающихся при резке на замораживающем микротоме, и изучении жировых, и липидных включений рекомендуется заливка объекта в желатин (Б. Ромейс, 1953; Г.А. Кононский, 1976).

Из раствора фенола брюшко следует перенести сначала в 12,5 % желатин и поставить в термостат при температуре + 37 °С в приспособление для создания слабого вакуума. Если брюшко пчел через 1 час после постановки в желатин не тонуло, то с помощью насоса Комовского мы создавали слабый вакуум – до появления пузырьков воздуха на поверхности желатина и оставляли исследуемые объекты в термостате на сутки. По истечении суток материал переносили из 12,5 % раствора желатина в 25 % раствор на неделю (цельное брюшко) или на двое суток (стернитная зона брюшка). После этого каждую тушку перекладывали в свой бумажный кораблик (рис. 2), на котором карандашом были написаны: № пчелиной семьи, дата и степень развития жирового тела. Для изучения жирового тела требуются поперечные срезы, поэтому необходимо изготовить высокий бумажный кораблик. В него наливают небольшой слой желатина и в течение 5-10 минут дают ему слегка застыть в помещении, затем помещают на уплотнившийся слой желатина тушку пчелы спинкой вниз, доливают кораблик доверху 25 % раствором желатина.

Мы дубили желатиновые блоки в 10 % растворе формалина согласно общепринятой методике (Б. Ромейс, 1953). Но в нашем случае дубленые блоки после их промывки и замораживания резались плохо, крошились. Поэтому для уплотнения блока мы помещали кораблики на 5-10 минут на верхнюю полку холодильника, после чего их извлекали, подсушивали в течение 3-5 часов на воздухе, освободив блок от бумажного кораблика. Готовый к резанию блок не пристает к рукам (Б. Ромейс, 1953).

Получение срезов. Перед примораживанием блока к заранее замороженной основе мы сначала примораживали смоченную водой фильтровальную бумагу, а затем к ней примораживали желатиновый блок. Б. Ромейс (1953) рекомендует после первого замораживания блок разморозить и затем сразу же снова заморозить, чтобы блок резался лучше. В нашем случае хорошие результаты получались при резании подсушенных желатиновых блоков, замороженных до -20 - -21°C . При этом мы наблюдали равномерное побеление блока.

Нож хорошо и правильно режет только в том случае, если он подходит к блоку своим режущим краем под определенным углом. Считается, что лучшим является угол резки примерно 15° . В нашем случае желатиновый блок при температуре заморозки -21°C лучше резался при угле $12-13^{\circ}$.

При изготовлении срезов жирового тела пчелы необходимо учитывать наличие в их покровах хитина. Если плотность пропитывающей среды меньше плотности хитина, то резание со стороны хитина в сторону жирового тела приводит к тому, что хитин крошится и разделяет жировое тело на фрагменты. Фрагментарное жировое тело после его окраски сложно изучать.

Повысить качество получаемых срезов удавалось за счет определенной установки объекта по отношению к ножу. Блок с залитым в нем объектом (тергитной частью брюшка - «корытцем») мы примораживали к столику так, чтобы нож сначала резал жировое тело, а потом хитин.

Хорошие топографические результаты были получены при применении длительного (до 5 ч) подсушивания желатиновых блоков с объектом (рис. 11).

Если качество получаемых срезов низкое, следует выяснить причины, сделать об этом запись в дневнике и искать пути исправления ситуации. В нашем случае этими путями были создание слабого вакуума при фиксации и про-

питка объекта, применение высушивания желатинового блока вместо его дублирования в формалине, изменение толщины среза, изменение наклона ножа.

Обычно в зарубежных криостатах для препятствия скручиванию среза параллельно оправе ножа в зоне резания объекта располагают расправляющую пластину (Х. Луппа, 1980). Мы для этой цели используем колонковую кисточку № 2. В этом случае правая рука подает нож на блок, а левая поворачивает кисточку, положенную на начало среза по оси в направлении движения часовой стрелки («от себя»). Требуется определенный навык, поэтому необходимо потренироваться на ненужных блоках, записывая в дневник условия, при которых достигнуты лучшие результаты.

Очень важно определить ориентиры зоны резания. Для обеспечения сопоставимости результатов отбирали срезы только из зоны третьего тергита брюшка, так как именно здесь мы обычно определяли степень развития жирового тела каждой исследуемой пчелы.

Готовые срезы удобно переносить бумажным совочком из кальки в охлажденный бюкс с крышкой, этикеткой и 10 % раствором нейтрального формалина. На бюкс мы одевали пенопластовый «чехол», чтобы стенки бюкса не нагревались от руки и к ним не прилипали готовые срезы. В этой посуде с фиксатором можно хранить собранные срезы до их окрашивания.

Окрашивание срезов. В тканях и клетках отдельные липиды в чистом виде встречаются сравнительно редко. Обычно они находятся в виде биоконплексных соединений и механических смесей, в которых один липид взаимно растворен в других.

Для выявления общих или суммарных липидов чаще всего используют окрашивание срезов растворами судана черного В, который обладает высокой специфичностью к выявлению липидных соединений (Г.А. Кононский, 1976). Судан черный В почти не растворяется в нейтральных жирах, поэтому при отсутствии их в тканях считают, что краситель в основном связан с фосфатидами. А.И. Кононский (1976) рекомендует этот метод и отмечает, что принцип выявления липидов при окрашивании по Лизону основан на растворении красителей в липидах.

Замороженные срезы надо промыть в дистиллированной воде, сполоснуть в 70 % этаноле в течение 30 секунд, перенести в раствор судана черного В на 5-30 минут, снова промыть в 30 % этаноле, сполоснуть в дистиллированной воде и заключить в глицерин или глицерин-желатин. Насыщенный раствор судана черного В готовят на 70 % этаноле из расчета 0,1-0,2 г сухого красителя на 100 мл спирта раствор доводят до кипения и охлаждают, перед использованием фильтруют.

Липиды при окраске приобретают черно-серый цвет. Хорошо окрашиваются миелин, проводящие пути центральной и периферической нервной системы. Выявляются синапсы на моторных нейронах спинного мозга.

Время окрашивания различных тканей определяется эмпирически. Наш опыт окрашивания жирового тела пчелы показал, что передерживание объекта в судане черном В не опасно. Срезы органов, богатых фосфатидами окрашиваются в течение 1-3 минут. При окрашивании на жир срезы жирового тела пчелы мы оставляли на сутки и более в растворе красителя и получали слегка перекрашенные срезы, которые затем дифференцировали в 70 % спирте и получали контрастные четкие картины расположения жира в клетке и общей топографии (рис. 11). Поскольку судан черный В окрашивает фосфолипиды, то на срезе после окраски хорошо просматриваются «черные» форменные элементы жирового тела – липоциты и эноциты, и поперечнополосатая мускулатура стенки сердца и межсегментная мускулатура (рис. 15), клетки восковой железы и их ядра; в серый цвет окрашивались гиподерма и перикардимальные клетки. Ядра липоцитов (жировых клеток), в отличие от ядер эноцитов, суданом черным В не прокрашиваются (рис. 12-14), что позволяет судить о различиях в функциональной активности этих клеток. Четкую окраску оболочек эноцита и его ядра можно использовать при характеристике ядерно-плазменного отношения, что позволит связать возрастные функциональные особенности пчел и их физиологическое «старение» (В.И. Белявский, 1985).

При микроскопировании важно правильно составить описание, которое может помочь в дальнейшем выявить особенности и закономерности. Описание следует проводить подробно.

При изучении полученных препаратов в дневнике отмечают № стекла, название краски и рисуется схема расположения срезов. Самый простой способ

– нарисовать схему: квадрат покровного стекла, а в нем место обнаружения цели. Другой способ – поставить точку тушью на предметном стекле рядом с местом углового скоса объектива большого увеличения (объект в это время должен быть виден в центре поля зрения). Лучшим способом является изучение под микроскопом препаратов, закрепленных в специальном устройстве СТ-12, препаратоводителе, позволяющем передвигать препарат по предметному столику микроскопа в двух взаимоперпендикулярных направлениях и считывать координаты. Две шкалы перемещений позволяют быстро устанавливать искомый объект в центре поля зрения, если координаты его были ранее (при первом изучении срезов) записаны в дневнике.

Заключение препаратов в глицерин-желатин. После окрашивания срезы нельзя обезвоживать и заключать в бальзам, так как ксилол, на котором готовят бальзам, растворит и жиры. Поэтому окрашенные срезы заключают в глицерин или в глицерин-желатин, которые хорошо просветляют препарат и не растворяют жиров.

Готовят глицерин-желатин так: берут 5 г мелко нарезанного чистого пищевого желатина, заливают 30 мл дистиллированной воды и оставляют на 2-3 часа набухать. Затем добавляют 30-35 г глицерина и 0,5 г кристаллической карболовой кислоты, растворяют и, постоянно помешивая, нагревают на водяной бане. Так как при сильном и продолжительном нагревании желатин теряет способность затвердевать после охлаждения, то приготовленную смесь не следует доводить до кипения. После нагревания ее профильтровывают в горячем виде через влажную стеклянную вату. Для заключения срезов в смесь, последняя должна быть нагрета до $+30 - +35^{\circ}\text{C}$.

Каплю расплавленного глицерин-желатина стеклянной палочкой наносят на окрашенный срез и быстро покрывают стеклом. Важно, чтобы капля не была крупной; при избытке среды препарат трудно рассматривать под иммерсией.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Пчелы являются общественными насекомыми. Для них характерны сложные поведенческие реакции, сложные взаимодействия внутри пчелиной

семьи, различные способы передачи и восприятия информации. Это возможно благодаря совершенной нервной системе и, прежде всего, головному мозгу. Надглоточный ганглий представляет собой важнейшую часть головного мозга. Степень его развития неодинакова у разных насекомых; чем больше относительный размер, тем сложнее поведение того или иного насекомого. Так, например, у пчелы его объем составляет 1/174 объема тела, а у жука-плавунца – всего 1/420 (М.С. Гиляров, 1969).

Исследование головного мозга пчелы при использовании замораживающего микротомы было предпринято нами в рамках комплексного исследования влияния на нервную систему медоносной пчелы опасного и широко распространенного в настоящее время клеща гемофага *Varroa jacobsoni*, вызывающего заболевание пчел – варроатоз (О.С. Анисина, 1994; 1996).

Традиционно для исследования нервной системы применяются методы импрегнации солями металлов. Предпочтительнее использовать замороженные срезы, изготовленные из нефиксированной ткани, или желатиновые срезы.

Для исследования головного мозга пчелы необходимы: глазные ножницы для удаления хитина, предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, емкости из темного стекла для сохранения растворов, мерная посуда для приготовления растворов, пипетки, биологические стаканчики, бюксы, чашки Петри, микроскоп, дистиллированная вода, азотнокислое серебро, формалин, хлорное золото, гипосульфит, едкий натрий, аммиак.

Фиксация материала. Для успешной фиксации необходимо, чтобы фиксирующая жидкость в 20-40 раз превышала объем исследуемого материала, кусочки материала не должны соприкасаться, находясь в одной посуде. Фиксатор должен равномерно покрывать исследуемый материал со всех сторон; для этого на дно банки кладут слой стеклянной ваты или марлю.

Для серебрения и гистохимических исследований можно использовать фиксатор кальций-формол по Бэкеру, который состоит из хлористого кальция (безводного) – 1 г, формальдегида (40 %) – 10 мл, дистиллированной воды – 90 мл (Р. Лилли, 1969).

При фиксации пчел в кальций-формоле по Бэкеру фиксатор плохо проникает внутрь из-за несмачиваемости хитина водными растворами. Трахейная

система пчелы, как правило, не заполняется фиксирующей жидкостью, и пчела плавает на ее поверхности. Поэтому при сборе материала в полевых условиях покрывали плавающих пчел слоем марли, а затем при фиксации в лабораторных условиях применяли вакуум. Фиксированный материал помещали в холодильник. При пониженной температуре происходит замедление или полное прекращение аутолиза, благодаря чему лучше сохраняются тонкие структуры. Фиксированный материал можно хранить в холодильнике до момента его использования.

Головной мозг пчелы заключен в прочную хитиновую капсулу, которая значительно затрудняет резку объекта на микротоме. Кусочки хитина деформируют и разрывают нервную ткань. Наибольшую трудность представляет работа с выходящими пчелами по сравнению с куколками. После фиксации материала мы удаляли глазными ножницами насколько это возможно фронтальную и дорзальную части хитиновой капсулы. При заливке отмечали поверхность, освобожденную от хитина, и для нарезки блок устанавливали так, чтобы нож микротомы входил в него со свободной стороны.

У куколок среднего возраста хитин мягче, чем у выходящих пчел, поэтому при работе с ними капсулу можно не снимать. Куколки раннего возраста имеют мягкую белую хитиновую кутикулу, которая не препятствует изготовлению срезов на микротоме.

Промывка. Промывка обеспечивает очищение материала от фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей. Головной мозг пчелы, фиксированный в кальций-формоле, мы промывали в проточной воде в течение нескольких часов. Для этого брали банку емкостью 1 л, обвязывали ее марлей. Через отверстие в марле на дно сосуда пропускали резиновый шланг, который присоединяли к водопроводному крану. Материал в банку помещали в марлевых мешочках или можно завязать горлышко банки марлей, через нее вставить воронку и поставить под кран.

Заливка в желатин. Для растворения желатина необходимо приготовить карболовую воду: в 100 мл дистиллированной воды при постоянном взбалтывании растворить 1 г карболовой кислоты. Можно использовать для растворе-

ния желатина 1 % тимоловую воду (1 г тимола растворяют в 100 мл дистиллированной воды при температуре +50⁰С с последующим фильтрованием). Однако, для растворения желатина лучше использовать 1 % карболовую воду, она лучше подавляет рост микробов.

Измельченный или порошкообразный желатин смешивается в соотношении 1:3 (1 часть желатина на 3 части жидкости) с 1 % карболовой или тимоловой водой, далее при помешивании в течение 20 минут идет набухание, затем растворяют на водяной бане при температуре +37⁰С и фильтруют через воронку в термостате. Часть полученного 25 % раствора желатина смешивается с равным количеством карболовой воды для получения 12,5 % раствора желатина. Растворы желатина лучше готовить по мере необходимости, хранить застывшим в холодильнике в плотно закрытой посуде. Многократное нагревание раствора желатина не рекомендуется, перед хранением лучше расфасовать его на объемы необходимые для однократного использования.

Промытые кусочки материала помещаются для пропитывания в 12,5 %, затем в 25 % раствор желатина при температуре +37⁰С. Для улучшения заполнения трахейной системы пчелы раствором желатина и ускорения пропитки мы применяли вакуум, откачивая несколько раз воздух до погружения тушек пчел на дно сосуда. Для этого можно изготовить в лабораторных условиях простейший вакуум-термостат (Д. Кисели, 1962). Необходимо взять стеклянную банку с металлической винтовой крышкой, лучше низкую, с широким горлом, чтобы в нее было легко ставить и извлекать несколько мелких емкостей с раствором желатина или другой средой. В крышке делается отверстие, которое закрывают резиновой пробкой, с вставленной в нее стеклянной трубкой. На стеклянную трубку надевают резиновый шланг от вакуумной установки, его вводят в термостат через вентиляционное отверстие или отверстие, предназначенное для термометра. Во втором случае термометр помещают внутрь термостата. Термостат должен иметь стеклянную дверку, так как необходим визуальный контроль за температурой и состоянием пропитываемого материала. При создании вакуума среда начинает вспениваться, тушки пчел всплывают на поверхность. В этот момент необходимо прекратить откачку воздуха, иначе тушки вместе с пеной выпадут из своих емкостей. Если дно банки не полностью заполнено, то при открывании ее, после завершения вакуумной обработки, находящиеся в ней

емкости могут упасть, а содержимое разлиться. Необходимо заполнить дно пустой посудой, ватой или другим уплотнителем.

После пропитывания следует заливка; для нее необходимы формочки. Мы применяли «кораблики», сделанные из бумаги (рис. 2). Преимущество бумажных форм в том, что их можно сделать любого размера и нанести необходимую маркировку.

Материал должен быть равномерно окружен заливочной средой, поэтому сначала на дно кораблика наливают небольшое количество 25 % желатина (примерно на половину объема). На застывший желатин выкладывают объект, заливают оставшимся желатином, препаровальной иглой придают необходимое положение кусочкам материала и охлаждают. Охлаждение можно проводить в большой чашке с холодной водой. Сначала охлаждают дно кораблика, затем постепенно погружают в воду. Когда желатин застынет, кораблик погружают в воду целиком и удерживают в ней 5-10 минут. Преждевременное погружение ведет к смешиванию желатина с водой. Охлаждать желатин можно в холодильнике. Из затвердевшего желатина мы вырезали блоки, которые подсушивали на воздухе.

Для закрепления блока на столик микротомы помещали кусочек смоченной фильтровальной бумаги или немного жидкого раствора желатина.

Если желатиновый блок в день изготовления не использован, то его 1-2 недели и даже более можно хранить в плотно закрытой посуде. Для более длительного хранения необходимо поместить его в формалин в разведении 1:9 (4% раствор формальдегида). Перед резкой на замораживающем микротоме блоки нужно отмыть от формалина в проточной воде в течение 10-15 минут. Следует помнить, что хранение блока в формалине уплотняет желатин и делает его ломким и формалиновая обработка не дает возможности полностью удалить желатин из срезов.

Заливка исследуемого материала в желатин имеет положительные и отрицательные стороны. Низкая температура исключает возможность перегревания тканей и обеспечивает сохранность структур и чувствительных к температуре веществ. Этот метод рекомендуется при исследовании жиров, липидов, оксидаз, эмбриологических исследованиях, а также органов, богатых соединительной тканью, в нейростологических исследованиях и т. д.

Основной недостаток желатина – способность сильно закрашиваться различными красителями, и перед окрашиванием срезов его стремятся удалить. При изготовлении срезов для импрегнации серебром не следует пользоваться формалиновой фиксацией блоков. Желатиновые срезы лучше всего собирать в дистиллированную воду, после чего переносить их на предметные стекла, обработанные белком.

Для хорошего приклеивания срезов подготовленное предметное стекло покрывается тонким слоем белка с глицерином. Для приготовления белка с глицерином свежий яичный белок (без примеси желтка) взбивается шпателем и выливается в воронку с фильтром, смоченным дистиллированной водой. Фильтрация продолжается около 24 часов. К профильтрованному белку обычно доливается равный объем глицерина, размешивается и добавляется один кристаллик тимола для предупреждения загнивания.

На сухое обезжиренное предметное стекло стеклянной палочкой наносится маленькая капля белка с глицерином и пальцем тщательно размазывается тонким слоем (руки должны быть вымыты, а палец обработан спиртом). Нанесенный на стекло слой белка с глицерином свертывается при слабом нагревании (+50 - +60 °С); нижняя часть стекла проводится 2-3 раза над пламенем спиртовки.

После наклеивания желатиновых срезов на стекла, накладывали несколько смоченных полосок фильтровальной бумаги, по размеру соответствующих предметному стеклу. На 3-4 сложенных вместе предметных стекла мы ставили сверху грузик и помещали на 10 минут в термостат при +37 °С. Затем предметные стекла с полосками бумаги ставили отвесно в емкости с дистиллированной водой при +37 - +40 °С. Полоски бумаги соскальзывают со срезов, желатин растворяется. Если срез слишком долго остается погруженным в теплую воду, то он всплывает. То же происходит, если полоски фильтровальной бумаги были слишком влажными или пребывание в термостате было слишком кратковременным (Б. Ромейс, 1953).

Импрегнация аммиачным серебром. Это один из классических методов исследования нервной ткани. Он предполагает следующее: 1) срезы помещаются на 24 часа в 2 % раствор азотнокислого серебра; 2) быстро промываются

дистиллированной водой (2-3 секунды); 3) помещаются в свежеприготовленный раствор аммиачного серебра на 10-20 минут. Срезы должны принять в этом растворе желтоватый оттенок; 4) быстро проводятся через 2-3 чашки с дистиллированной водой; 5) восстанавливаются в формалине, не содержащем кислоты (1:4 части обычной воды) в течение 10 минут. Срезы быстро окрашиваются в шиферно-серый цвет; 6) промываются в обычной воде 15 минут; 7) золотятся в разбавленном растворе хлорного золота (3-5 капель 1 % раствора желтого хлорного золота на 10 см³ дистиллированной воды), пока коричневый тон препарата не переходит в серый или серо-фиолетовый; 8) фиксируются 1-2 минуты в 5 % растворе гипосульфита; 9) тщательно промываются в воде (1-2 часа).

Правильное приготовление раствора аммиачного серебра имеет большое значение для получения хорошего результата. В мензурку со стеклянной пробкой, которая используется только для приготовления раствора серебра, надо отмерить 10 см³ 10 % раствора азотнокислого серебра и прибавить 5 капель 40 % едкого натрия; образуется коричнево-черный осадок окиси серебра. При постоянном взбалтывании, к раствору серебра необходимо прибавлять по каплям аммиак до тех пор, пока от осадка не останется несколько крупинок. Вначале можно прибавлять по 3-5 капель, когда облачка осадка начнут разрыхляться, необходимо прибавлять каплю за каплей, после каждой капли нужно взбалтывать раствор и выждать 10-20 секунд, прежде чем прибавить следующую. Необходимо избегать избытка аммиака. Полученный объем надо довести дистиллированной водой до 20 см³. Раствор содержит аммиачную окись серебра и аммиачный нитрат серебра; его следует готовить непосредственно перед употреблением, так как он быстро становится непригодным, и держать плотно закрытым.

Многочисленные современные методы импрегнации серебром весьма несовершенны. Как и многие другие методы в гистологической технике он применяется эмпирически, и сущность процесса импрегнации еще мало изучена. Что касается импрегнации серебром ретикулиновых волокон, то здесь главное значение принадлежит цистинсодержащим белкам. Г.В. Орловская и А.А. Тустановский (1954) дали анализ реакций, составляющих процесс импрегнации по Бильшовскому в модификации Фута. Они показали, что реакция сульфгидриль-

ных групп белков является центральной в развитии явления аргирофилии. Способность ретикулиновых волокон пропитываться серебром может быть также связана и с жирами, и с полисахаридами. По данным А.А. Тустановского и Г.В. Орловской (1953), окисление углеводного компонента ретикулина и коллагена периодатом вызывает резкое усиление аргирофилии белково-углеводных комплексов. Известно также, что материал, залитый в желатин, импрегнируется лучше, чем заключенный в парафин. Г.В. Орловская с соавторами (1959) на основе материалов, полученных с помощью электронного микроскопа, установила, что ретикулиновые волокна состоят из фибрилл, заключенных в бесструктурное вещество (матрикс), и гистохимические свойства их обусловлены бесструктурным веществом, а не фибриллярным компонентом.

Как показывает практика, даже тщательное соблюдение всех условий серебрения (чистота посуды и реактивов, качество воды и пр.) не гарантирует хороших результатов. Несовершенство методов серебрения и, в первую очередь, элементов нервной ткани, объясняется тем, что здесь имеют значение многие факторы: качество формалиновой фиксации, промывка в водопроводной воде, сложные физико-химические процессы, происходящие при пропитывании тканей растворами серебра, многообразие свойств самой нервной ткани и пр. Эти факторы трудно учитывать и регулировать. По этой причине для адекватной трактовки морфологических картин импрегнированной нервной ткани требуется постоянная практика и сравнительный анализ. Характер отложения серебра в клетках может быть самым различным и отражать различные функциональные состояния структур нервной ткани (рис. 16).

Результаты импрегнации серебром в значительной мере зависят от степени овладения этим методом.

Сложности регулирования процессов серебрения являются основанием для того, чтобы пускать в обработку одновременно большое количество срезов, из которых потом отбирают наилучшие.

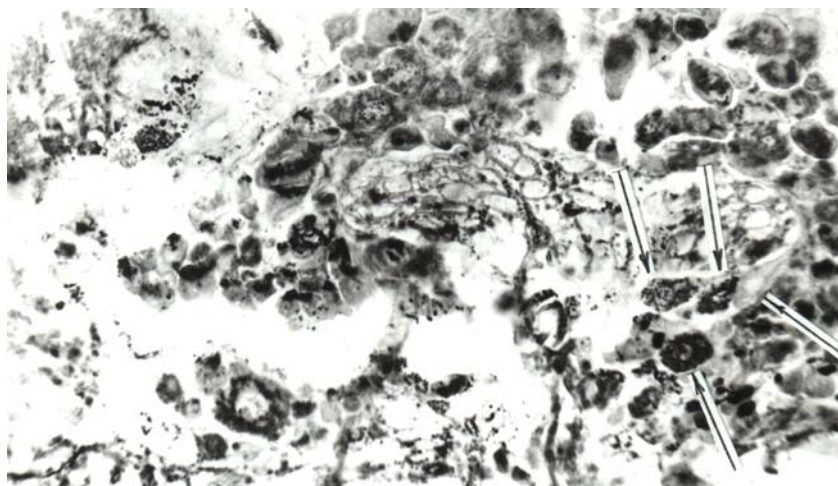


Рисунок 16. Нейроны центрального тела с различной степенью аргирофилии.
Окраска по Бильшовскому (по О.С.Анисиной, 1996)

Частые дефекты серебрения определяют необходимость использования средств для исправления переимпрегнированных препаратов. Наиболее доступными являются следующие: 1) 0,25 % раствор марганцовокислого калия; 2) 2 % персульфат аммония; 3) смесь 5 % раствора гипосульфита и 20 % красной кровяной соли (из расчета 1-2 капли красной кровяной соли на 5-10 мл гипосульфита). Все эти реактивы готовят на дистиллированной воде. Обработка обычно проводится очень быстро, в течение 5-10-20 секунд, однако в некоторых случаях может занимать и больше времени. Срезы становятся более светлыми, поскольку обработка сопровождается извлечением части восстановленного серебра и ослаблением фона (Г.А. Меркулов, 1969).

Просветление срезов. В результате просветления срезы становятся однородными в отношении преломления света. Полное обезвоживание препарата - обязательное условие для просветления и заключения его в смолы. После окрашивания водными красителями обезвоживание препаратов проводят спиртами постепенно возрастающей крепости (спиртовый ряд, например, 60-, 80-, 96 % по 1-2 минуте в каждом). Ниже представлена таблица разбавления спиртов (табл. 2).

Таблица разведения спирта до необходимой концентрации

Концентрация (%)	Исходные растворы, мл			
	96% спирт	вода	90% спирт	Вода
40	42	58	44	56
45	47	53	50	50
50	52	48	56	44
60	63	37	67	33
70	73	27	78	22
80	83	17	89	11
90	94	6	-	-

По оригинальной версии серебрения Бильшовского (Б. Ромейс, 1953) рекомендуется дальнейшую обработку проводить в карбол-ксилоле. Д. Кисели (1962) пишет, что обезвоживание в абсолютном спирте не очень эффективно, так как влага, содержащаяся в воздухе, может снизить степень обезвоживания. В этом случае срезы после ксилола и толуола мутные, непрозрачные. Для полноценного обезвоживания он рекомендует пользоваться после 96 % спирта карбол-ксилолом, который готовят следующим образом. Кристаллическую карболовую кислоту расплавляют в термостате при температуре $+56^{\circ}\text{C}$, затем смешивают с ксилолом или бензолом в соотношении 1:4. Этот раствор имеет слабый красновато-желтый оттенок. Б. Ромейс (1953) рекомендует брать раствор меньшей концентрации (10 г фенола на 100 см^3 ксилола), но чаще его менять. Это оказывает менее вредное воздействие на кожу рук исследователя, а также щадит препараты.

Недостаток карбол-ксилола заключается в разрушении некоторых красителей, поэтому мы не рекомендуем держать в нем срезы более 2-3 минут. Далее срезы необходимо тщательно промыть ксилолом или бензолом. Карбол изменяет двоякое преломление веществ, поэтому противопоказано применение карбол-ксилола для поляризационно-оптических исследований.

При переносе из 96 % спирта в карбол-ксилол ненаклеенные на стекло срезы необходимо тщательно расправлять, так как последние быстро уплотняются, сморщиваются, скручиваются и расправить их при наклейке невозможно.

В своей практике мы успешно проводили обезвоживание срезов в 2-3 порциях абсолютного спирта, в каждой из них срезы держали по 3-5 минут. Для удаления спирта срезы проводили через 2-3 порции чистого ксилола или толуола.

Если обезвоживание проделано недостаточно тщательно, то при переносе предметного стекла в ксилол появляется беловатое помутнение. В таком случае препарат кладется в новую порцию абсолютного спирта. Необходимо следить, чтобы перед переносом в ксилол на верхних краях предметного стекла, не погружающихся в жидкость, не было следов воды. Предметные стекла следует переносить в различные жидкости по одному. Иногда для ускорения процесса стекла, приложенные спинка к спинке, переносят парами. Обычно это не рекомендуется, так как жидкость, находящаяся между стеклами, полностью не вытесняется. Жидкость из предыдущей емкости не должна переходить в следующую; перед каждым погружением обратную сторону предметного стекла и свободные края быстро протирают сухой марлевой салфеткой.

Просветление срезов проводят в вытяжном шкафу и ограничивают контакт жидкости с кожей.

Заключение срезов. Для заключения срезов после серебрения мы пользовались канадским бальзамом. Канадский или пихтовый бальзам готовят заранее; сухой бальзам растворяют в ксилоле или толуоле до консистенции свежего меда (растворение идет медленно; его можно значительно ускорить, пользуясь термостатом). Для хранения бальзама пользуются специальными широкогорлыми склянками, закрывающимися притертыми колпачками. Поверхность шлифа слегка смазывают глицерином. Внутри склянки помещают тонкую стеклянную палочку, с помощью которой бальзам извлекается по капле. При отсутствии специальной посуды можно пользоваться пенициллиновым флаконом. В резиновой крышке флакона прокалывается отверстие, через которое до самого дна вставляется стеклянная глазная палочка. При загустении в бальзам доливают растворяющую жидкость и доводят до нужной консистенции.

Предметное стекло с наклеенным на него срезом извлекают из ксилола, быстро подсушивают с обратной стороны и по краям сухой салфеткой и наносят каплю канадского бальзама. Это необходимо выполнять быстро, не давая срезу подсохнуть. При заключении в бальзам следует избегать попадания пузырьков воздуха под покровное стекло. Для этого на край среза кладут каплю бальзама, очищенное покровное стекло ставят на предметное под углом 45° , бальзам растекается по краю покровного стекла. Покровное стекло медленно опускается так, чтобы срез был в центре его. Бальзама должно быть достаточно, чтобы между стеклами не было пузырьков воздуха, и не так много, чтобы он вытекал за границы покровного стекла. Если бальзам не заполнил все пространство под покровным стеклом, то можно нанести его на предметное стекло у края покровного и он затечет под стекло.

СКЕЛЕТОХРОНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД В ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЗЕМНОВОДНЫХ И ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ

При решении проблемы сохранения биологического разнообразия важным аспектом является изучение экосистем и систем различных групп организмов. Первостепенную роль в этом играет исследование механизмов, определяющих динамику численности популяций и скорость их оборота и изучение демографии конкретных популяций. Естественно, что при исследовании демографической структуры популяций животных основным моментом является возможность точного определения возраста особей.

В настоящее время известны три основных методических подхода к исследованию возраста амфибий и рептилий: распределение животных по размерно-возрастным классам; метод массового мечения с последующим отловом; скелетохронологический метод.

Первый метод основан на положении о том, что амфибии и рептилии являются животными, которые растут на протяжении всей жизни, то есть их можно классифицировать как животных с «бесконечным» ростом – (М.В. Мина, Г.А. Клевезаль, 1976). На основании этого положения в традиционных под-

ходах исследования демографической структуры популяций и роста амфибий и рептилий достаточно долго господствовал метод определения возраста особей по размерам тела (А.Г. Банников, 1950; П.В. Терентьев, 1950). Данный подход дает возможность в относительно короткие сроки собрать информацию о размерно-возрастной структуре исследуемой популяции. При этом подходе, как правило, можно выделить три размерно-возрастных класса (группы) животных: juvenes, subadultus, adultus.

Надежным методом для исследования демографии популяций амфибий и рептилий является массовое индивидуальное мечение особей с повторным отловом. Метод достаточно прост и не требует какого-либо специального оборудования. Мечение животных проводят в полевых условиях. Наиболее распространенные методы мечения: ампутация дистальных фаланг пальцев по определенной схеме, нанесение цветных меток у ящериц или надрезы брюшных щитков у змей. Для бесхвостых амфибий и ящериц может быть использована схема мечения, предложенная Мартовым (В. Martof, 1953) (см. рис. 17 а). Суть метода заключается в последовательной ампутации дистальных фаланг пальцев животных в определенной последовательности, где каждый палец является соответствующим схеме мечения номером. При помощи такого метода стационарными исследованиями удалось выявить продолжительность жизни ряда видов (В.И. Гаранин, 1969). Однако работа по определению максимальной продолжительности жизни этим методом является очень трудоемкой и требует длительных стационарных исследований. Подобный подход неприменим при исследовании экологии хвостатых амфибий в связи с высокой регенерационной способностью их конечностей.

Наибольшее распространение в настоящее время получил метод определения абсолютного возраста по слоям, образующимся в регистрирующих структурах. У амфибий и рептилий регистрирующей структурой является костная ткань. Данный метод основан на сезонных изменениях темпов роста животных. Так, в течение периода активного роста в костях животных формируются широкие слои костной ткани, а в период остановки, например, в период зимней спячки, формируются узкие линии, называемые в русскоязычной литературе линиями склеивания (линиями покоя), а в англоязычной – resting lines. Этот метод позволяет определить с высокой точностью не только абсолютный

возраст особи, но и скорость линейного роста (Э.М. Смирин, 1983). В настоящее время определение возраста скелетохронологическим методом проведено на нескольких сотнях видов земноводных и пресмыкающихся.

Существуют три основных способа выявления годовых слоев в кости:

1. Просветление плоских костей, шлифов или неокрашенных срезов в просветляющих жидкостях (например, в глицерине).
2. Изготовление тонких шлифов лобных костей.
3. Изготовление окрашенных срезов декальцинированных костей.

При просветлении костей трудности в определении возраста возникают чаще (особенно при просветлении плоских костей, которые с возрастом становятся толще). Изготовление тонких шлифов технически очень трудоемко. Наилучшие результаты дает третий метод – изготовление окрашенных срезов декальцинированных костей.

Наиболее удобным и результативным способом является получение срезов на замораживающем микротоме. Срезы можно получать на обычном санном микротоме, пользуясь методикой заливки кости в парафин или воск, но в этом случае продолжительность процедуры получения срезов и их окраски будет больше.

Сбор и хранение материала. Материал для скелетохронологических исследований можно получить при проведении полевых работ или из музейных коллекций. Наилучшие результаты достигаются при исследовании сухих костей, предварительно очищенных от мягких тканей.

В качестве объекта исследования могут быть использованы как плоские, так и трубчатые кости. Обычно исследователи предпочитают работать с трубчатыми костями в связи с тем, что на получаемых срезах лучше видны линии склеивания.

Для подбора наиболее подходящей кости и ее участка надо собрать срезы из большого числа костей от одной или нескольких особей. От каждой кости срезы следует брать из нескольких участков; в проходящем свете под микроскопом отобрать лучшие срезы. Как правило, срезы делают перпендикулярно продольной оси роста кости. Иногда для исследований используют продольные срезы трубчатых костей. Выбираются для работы срезы, на которых картина,

была как можно более контрастна, а линии склеивания резкими. С трубчатых костей поперечные срезы надо делать из середины диафиза кости, где самый широкий слой периостальной кости и минимальна площадь костномозговой полости. При работе с подвздошными костями для анализа используют участок около тазового сочленения, уростиль – около сочленения с крестцовым позвонком. У змей обычно используются кости черепа или тело позвонка (Аль-Завахра, 1992).

Удобнее работать с крупными костями – бедренными, голенью и др. Возможно прижизненное определение возраста, поскольку в фалангах пальцев бесхвостых амфибий и ящериц также формируется слоистая структура (Э.М. Смирин, 1989). Последняя фаланга, несущая коготь, для этих целей непригодна. Для получения корректных результатов необходимо использовать фаланги одного и того же пальца у всех исследуемых особей. Можно совместить эту процедуру с мечением амфибий путем ампутации фаланг пальцев. Мы в наших исследованиях используем предпоследнюю дистальную фалангу четвертого пальца, по несколько измененной схеме индивидуального мечения. При оценке возраста животных по фалангам пальцев мы рекомендуем применять модернизированную нами схему классического мечения с целью использования для дальнейшей работы фаланги одного пальца у всех особей (рис. 17 б). Номера 1-7 проставляются на левой задней лапке: с 1 по 4 - путем отрезания одного пальца, имеющего соответствующий номер; с 5 по 7 – ампутацией пары пальцев (например, $4 + 2 = 6$). Аналогичным образом можно сочетать ампутацию разных пальцев. На правой задней лапке проставляются номера от 8 до 56. Соответственно максимальное число, отмечаемое на правой задней лапке будет $56 + 32 = 88$. Наибольшая цифра, которая может быть получена при таком способе мечения будет $12\ 672 + 1\ 056 + 88 + 7 = 13\ 823$.

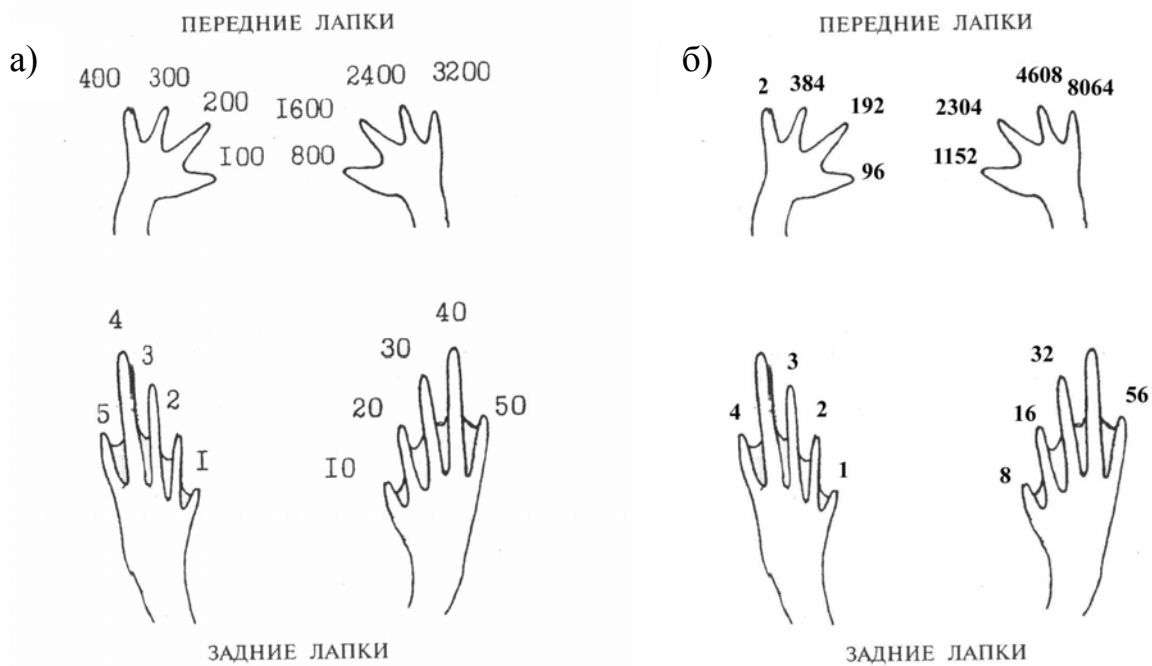


Рисунок 17. Схема мечения бесхвостых амфибий а) по В. Martof (1953); б) с нашими добавлениями (Р.И. Замалетдинов, И.З. Хайрутдинов, 2006).

Пояснения см. в тексте.

Часто в качестве материала используют кости, хранящиеся в этиловом спирте. Качество препаратов, полученных из такого материала ниже, чем при работе с засушенными костями. При использовании костей, хранящихся в фиксирующих жидкостях, перед декальцинацией необходимо предварительно их промыть в проточной водопроводной воде. Для исследования не пригодны кости, отбеленные пергидролем.

Для корректной оценки возрастной структуры популяции желательно иметь материал по всем размерным группам животных, собранных на протяжении всего периода активности. Желательно взять единовременно большую выборку, в которой присутствуют все возрастные классы. При использовании сухих костей, удобным способом хранения является аналог чешуйной книжки, которую используют для аналогичных целей ихтиологи (И.Ф. Правдин, 1966). На отдельной странице записываются все основные характеристики особи: дата и место поимки, вид, пол, размерные характеристики. В нижней части страницы делается небольшой конверт, куда укладываются кости. Подобный способ

хранения позволяет избежать путаницы при дальнейшей камеральной обработке и анализе материала.

Считается (Н. Husser, 1958 цит. по Г.А. Лада и А.С. Соколову, 1999), что четвертый палец задних конечностей играет ведущую роль при прыжке, и ряд авторов не рекомендует ампутировать этот палец для сохранения жизнеспособности особи. Однако, использование фаланги именно этого пальца наиболее приемлемо при определении возраста, в связи с его большими размерами по сравнению с остальными.

Для решения возникшего противоречия мы при использовании модернизированной классической схемы применили некоторые усовершенствования, направленные на снижение травматизма животных. Главной проблемой является скорейшая остановка кровотечения и дезинфекция раны (при ампутации фаланг происходит неизбежное повреждение кровеносных сосудов, что в ряде случаев может привести к гибели животного от потери крови или инфекции). Мы в своих исследованиях с успехом применяли тампоны, смоченные нафтезином. Неоднократные факты повторного отлова меченых особей, в том числе и по прошествии нескольких лет, свидетельствуют о том, что подобные приемы мечения вполне применимы для зеленых лягушек.

Необходимое оборудование. Для работы необходимо наличие следующих реактивов: азотная или соляная кислота (концентрация не более 5%), кислый гематоксилин Эрлиха (готовится по основной прописи, см. стр. 55), дистиллированная вода и глицерин. Требуемое лабораторное оборудование достаточно простое и доступное: банки для декальцинации (объем зависит от размеров объекта), тонкие глазные пинцеты, предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, чашки Петри разного диаметра, бюксы, фильтровальная бумага, кисточки, пипетки, пластмассовые или стеклянные стаканчики с мелкими отверстиями в дне и боковых стенках (дно может быть затянуто мельничным газом), бинокляр и микроскоп.

Декальцинация костей. Для декальцинации рекомендуют использовать растворы азотной или соляной кислоты малой концентрации (4-5 %). Мы

обычно используем раствор азотной кислоты концентрацией 2-3 %. При работе с мелкими костями (с фалангами пальцев) приемлема такая концентрация.

Перед декальцинацией подготовленную кость (очищенную от мягких тканей и, если кость хранилась в фиксирующей жидкости, промытую в проточной воде) необходимо упаковать в конверт, сделанный из мельничного газа. К конверту пришивается обычная нитка, к которой прикрепляется этикетка с информацией о кости (номер особи, дата поимки, размеры тела, пол). Объем раствора кислоты должен в 10 раз превышать объем объекта декальцинации. Сроки декальцинации зависят от размера кости и варьируют от 2-3 часов (фаланги пальцев мелких особей) до 1-2 суток (трубчатые кости крупных экземпляров). При декальцинации более суток раствор необходимо менять ежедневно. Декальцинацию можно считать законченной, если кость эластична на изгиб и легко, без хруста режется лезвием бритвы. Если после проведения декальцинации кость будет крошиться, то ясной картины слоистой структуры мы не получим. В таком случае необходимо снова провести декальцинацию.

При резке крупных костей срезы можно поместить в стаканчик с отверстиями на дне в бюксе с дистиллированной водой и всю дальнейшую проводку вести в этом стаканчике (Э.М. Смирин, 1989). Рабочий раствор кислоты необходимо ежедневно менять и тщательно промывать стаканчик после каждого экземпляра, чтобы в отверстиях не оставалось срезов.

После декальцинации кости нужно промыть в проточной водопроводной воде в течение нескольких часов. Можно несколько раз опустить конверт с костью в емкость с обычной водопроводной водой (в этом случае необходимо менять воду не реже 1 раза в час). Для крупных костей эта процедура может быть увеличена до 24 часов, для мелких костей (фаланги пальцев) достаточно 10-12 часов. После этого можно считать кость подготовленной к дальнейшей обработке.

Изготовление срезов. Необходимым условием получения качественных срезов является правильная установка кости на блок. Срезы должны проходить перпендикулярно длинной оси кости. При использовании трубчатых костей этот участок расположен в месте, где проходит отверстие для кровеносного сосуда. Это отверстие обычно находится в самом центре диафиза трубчатых кос-

тей, где наиболее широк слой периостальной кости (периост) и самая узкая эндостальная полость (эндост) (рис. 18). После примораживания необходимо нарастить ледяную рубашку вокруг кости, постепенно добавляя маленькими каплями дистиллированную воду. Толщина срезов обычно равняется 20-25 мк. Получить срезы такой толщины можно во время работы компрессора криостата.

Срезы снимаются с ножа тонкой волосистой кисточкой из мягкого меха (беличья или колонковая). При снятии среза необходимо слегка вращать кисточку на себя для того, чтобы срез не упал. Затем срез помещается на предметное стекло. Одновременное перемещение серии срезов (двух и более) на стекло не всегда оправдано, поскольку в этом случае последние срезы могут «сминать» предыдущие и слипаться с ними; их не всегда удастся затем расправить. После того, как на стекле окажется целый ряд срезов для надежности их необходимо зафиксировать. Это делается «припаиванием» срезов путем нагревания обратной стороны стекла пальцем.

Окраска. Для окраски срезов мы используем кислый гематоксилин Эрлиха. Он готовится следующим образом: 2 г порошка гематоксилина необходимо растворить в 100 см³ 96 % спирта, добавить 100 см³ дистиллированной воды, 100 см³ чистого глицерина, 3 г алюмокалиевых квасцов и 10 см³ ледяной уксусной кислоты. Раствор следует оставить на 14 дней в сосуде, прикрытом бумажным колпачком; периодически раствор необходимо взбалтывать, а затем закрыть пробкой. Раствор считается готовым, если он имеет темно-красный тон (обычно через 1-2 мес.). Чем дольше хранится раствор, тем он лучше окрашивает срезы. Раствор, бывший в употреблении, можно использовать повторно, но перед этим его необходимо профильтровать.

Для окраски обычной пипеткой на срезы, расположенные на предметном стекле, наносится капля краски. Краска должна полностью закрывать все срезы на стекле.

Продолжительность окрашивания зависит от качества краски, что определяется опытным путем, и размеров исследуемых срезов. Если используется новая, только что приготовленная краска, то время окрашивания увеличивается. Если краска хранится несколько лет, то время окраски уменьшается. Продолжительность окраски срезов фаланг пальцев бесхвостых амфибий в наших ис-

следованиях составляла 4-7 минут. Для определения времени окраски лучше предварительно попробовать покрасить 1-2 среза, которые не будут использоваться для анализа (как правило, их выбирают из тех, что сделаны с концов кости), а после промывки рассмотреть под микроскопом. Удовлетворительным временем окраски мы считаем такое, после которого срез приобретает темно-синий, но не сине-черный цвет.

Для экономии краски, ближе к концу времени окраски, рекомендуется отсосать ее излишки при помощи очень тонкой пипетки или шприцем с тонкой иглой. Краску затем лучше перелить в отдельную емкость; можно ее снова использовать, предварительно профильтровав. Остатки лишней краски следует удалить, прижав к предметному стеклу кусочек фильтровальной бумаги.

После окраски проводится промывка полученных срезов. Для этого нужно удалить излишки краски фильтровальной бумагой (накрыть срезы сверху). Затем опустить стекло с окрашенными срезами в большую чашку Петри с дистиллированной водой. Препаровальной иглой с загнутым Г-образным концом или зубным зондом такой же формы нужно осторожно смыть в воду те срезы, которые остались на стекле.

Самой ответственной операцией является отбор наиболее подходящих срезов; его лучше всего проводить под биноклем. Отбираются срезы, сделанные из участков, где наиболее широк слой периостальной кости. Для трубчатых костей этот участок очень хорошо виден даже под небольшим увеличением бинокля. Такие срезы характеризуются наличием заметной «вмятины» на одной из сторон (рис. 18). Это след отверстия кровеносного сосуда. Необходимо ориентироваться на этот участок, но отбирать надо срезы с максимальной площадью периостальной кости. Иногда отверстие канала в середине диафиза отсутствует, тогда просто выбирают срезы наименьшие по диаметру, но с наибольшей шириной периостальной костной ткани.

Отобранные срезы помещаются в другую чашку Петри с водопроводной водой. Дальнейшая промывка может проходить двумя способами: либо заменой воды путем отсасывания ее пипеткой, либо переносом срезов в другую чашку Петри с новой порцией воды. Мы используем в основном второй вариант; он более простой, но требует осторожности при переносе срезов. Проводить эту операцию необходимо не менее 3-5 раз.

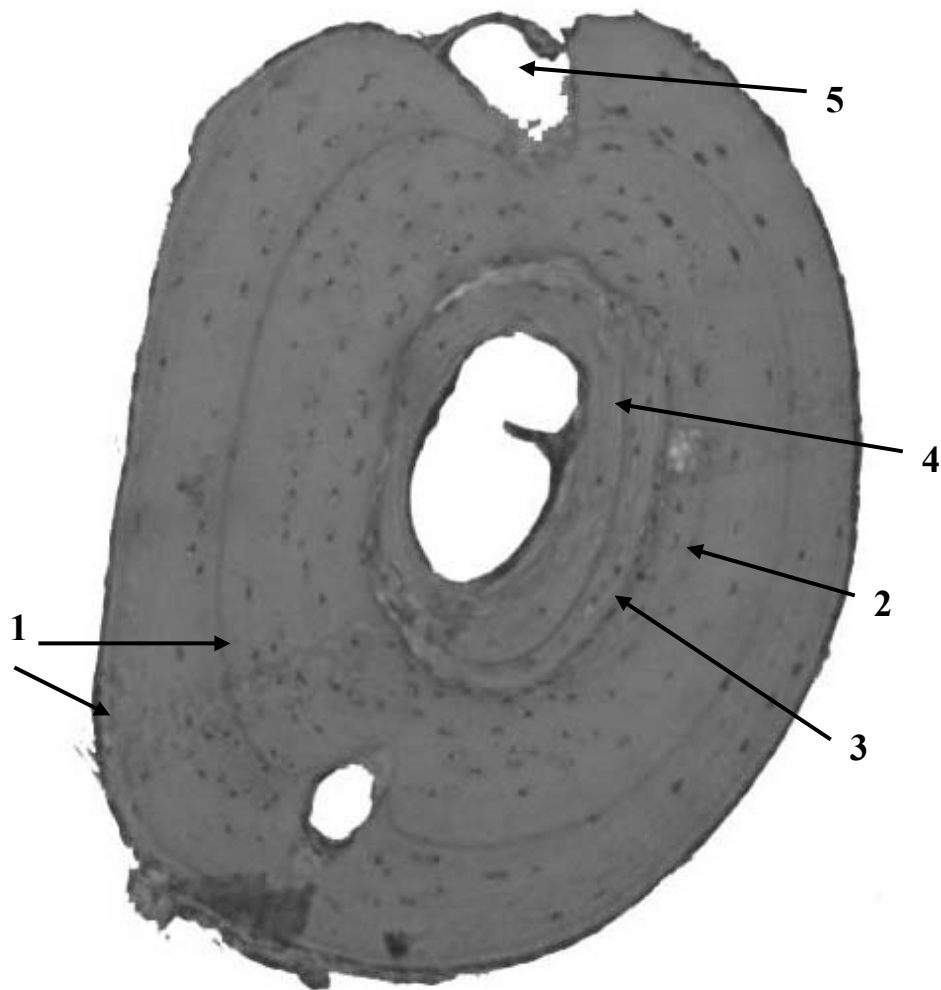


Рисунок 18. Внешний вид поперечного среза кости фаланги пальца прудовой лягушки. Условные обозначения: 1 - линии склеивания; 2 - частично резорбированная линия склеивания; 3 - граница эндостальной полости; 4 - линия, отложенная внутри эндостальной полости; 5 - канал кровеносного сосуда

Следующим этапом подготовки является проводка через растворы глицерина. В методических руководствах рекомендуют использовать растворы глицерина трех возрастающих концентраций (25, 50 и 75 %); растворы наносят на три предметных стекла (Э.М. Смирин, 1989; Г.А. Лада, А.С. Соколов, 1999). Мы для этих целей используем плошку для определения группы крови, на которой глицерин не растекается.

Из чашки Петри осторожно препаровальной иглой в первый раствор переносятся все отобранные срезы костей. Затем таким же образом в той же по-

следовательности переносятся срезы во второй, а затем в третий растворы. В каждом из растворов они должны находиться не менее 5 минут. После этого срезы помещают на предметное стекло в каплю чистого глицерина и для лучшей сохранности покрывают покровным стеклом.

Полученные таким способом препараты являются временными. Для длительного хранения и перевозки их нужно накрывать сверху покровными стеклами большого диаметра, «посаженными» на канадский бальзам. Препараты следует хранить в горизонтальном положении. Для этого можно использовать как фабричные коробочки или доски для хранения, так и самодельные. Для перевозки мы используем коробки сделанные из гофрированного картона.

Таблица 3

Перечень наиболее обычных дефектов при получении окрашенных срезов и путей их устранения (по Г.А. Клевезаль, 1988)

Дефект	Причина и способ устранения
Срезы рваные в средних частях, после окрашивания есть яркие (красноватые) пятна	Ткань не полностью декальцинирована; увеличить время декальцинации или чаще менять раствор
Срез окрашен неравно, есть слабоокрашенные пятна	Ткань после декальцинации плохо промыта; увеличить время и качество промывки; возможно, что объем рабочего раствора красителя не полностью покрывает срезы и его нужно увеличить
Нет контрастного выявления слоев, а срез как бы запачкан краской с поверхности	Сменить рабочий раствор красителя; профильтровать основной раствор перед употреблением; тщательно споласкивать срезы до и после окрашивания дистиллированной водой; проверить качество дистиллированной воды

Окраска препаратов сохраняется примерно в течение одного-двух лет, затем выцветает.

Если в ходе работы обнаруживаются некоторые артефакты, свидетельствующие о нарушении методики необходимо исправить ошибки и добиться получения качественных препаратов. В таблице 3 представлены некоторые артефакты, их причины и способы устранения.

Определение возраста. На препаратах, окрашенных гематоксилином Эрлиха, широкие слои костной ткани, сформированные в периоды активного роста – более светлые, тогда как линии склеивания соответствующие зимним задержкам роста, видны в виде темных узких линий (рис. 18).

Определение возраста не ограничивается простым подсчетом линий склеивания. Рост кости в толщину происходит аппозиционно со стороны периоста. У большинства современных видов амфибий и рептилий фауны России, в кости отсутствуют настоящие остеоны, поэтому не происходит внутренняя перестройка костной ткани и связанная с ней вставочная резорбция (А.В. Румянцев, 1958). Очевидно, что образующиеся в плоских костях слои, сохраняются в течение всей жизни животного. В длинных костях, имеющих внутреннюю полость, со стороны эндоста происходят процессы резорбции, в результате которых частично или целиком могут исчезнуть первые слои. Темп резорбции различен у разных видов и непостоянен в течение жизни особи. После наступления половой зрелости, в связи с общим замедлением роста, снижаются или вообще прекращаются процессы резорбции, и линии склеивания, не резорбированные ко времени наступления половой зрелости и сформированные после нее, очевидно, сохраняются в течение всей жизни животного.

Для правильного определения возраста для каждого вида должно быть установлено число слоев, которое успевает резорбироваться к моменту наступления половой зрелости. Для определения количества линий склеивания подвергающихся резорбции, существуют два пути. Первый – индивидуальное мечение лягушек, начиная с момента окончания их метаморфоза, и слежение за ними до взрослого состояния (для выполнения этой крайне трудоемкой работы необходимо не менее трех – четырех лет). Второй путь – сопоставление размеров кости в поперечном сечении у сеголеток или особей, перезимовавших один раз, с величиной костномозговой полости и с диаметром кости, ограниченной первой видимой целиком линией склеивания, при необходимости, то и после-

дующими линиями у полувзрослых и взрослых животных (Э.М. Смирин, А.Н. Макаров, 1987).

Таблица 4

Ширина костномозговой полости и кости в середине диафиза фаланги четвертого пальца правой задней конечности прудовых лягушек
(по Р.И. Замалетдинову и др., 2005)

пол	показатель	D* костно-мозговой полости с эндостальным кольцом	D* кости, ограниченной			D кости у особей старше 5 лет	D кости у сеголеток (M±m / lim)	D кости у годовиков без учета ♂♂** (M±m / lim)
			1-й линии склеивания.	2-й линии склеивания.	3-й линии склеивания.			
♂♂	M±m / Lim (n)	19,95± 0,47 / 18,3- 24,52 (n=16)	22,05± 1,40 / 19,85- 27 (n=5)	25,32± 2,17 / 20,05- 35,47 (n=7)	29,31± 2,21 / 29,13- 35,57 (n=2)	37,09± 0,78 / 35,19- 39,23 (n=5)	13,77± 0,66 / 10,8 - 16,35 (n=14)	20,97± 0,41 / 18,8 - 23,7 (n=19)
♂♂**	M±m / Lim (n)	14,95± 1,35 / 12,3-21,5 (n=18)	23,05± 1,4 / 18,85- 25 (n=3)	24,44± 1,26 / 21- 31,65 (n=7)	- - - -	- -		
♀♀	M±m / Lim (n)	21,48± 1,04 / 17,3-26,5 (n=22)	22,87± 0,73 / 18,85- 25,65 (n=7)	26,57± 0,48 / 22,3- 29,44 (n=7)	31,32± 1,03 / 27,13- 38,57 (n=2)	41,54± 3,51 / 26,15- 51,8 (n=6)		

* все измерения представлены в делениях окуляр-микрометра;

** отмечены самцы, у которых резорбция линий склеивания прекратилась после первой зимовки (на втором году жизни).

Мы рекомендуем брать единовременную выборку, состоящую из всех возрастных групп: сеголетки, полувзрослые и взрослые особи. У самых мелких экземпляров, которые зимовали один раз, необходимо измерять диаметр или площадь сечения кости. Под понятием «диаметр» в данном случае подразумевается средняя величина измерений большой и малой полуосей. Понятие «площадь» в данном случае обозначает произведение величин большой и малой полуосей. У полувзрослых животных необходимо измерять еще и величину костномозговой полости; у половозрелых особей необходимо проводить измерение костномозговой полости и величины кости, ограниченной первой видимой целиком линией склеивания. Полученные данные усредняются, и сопоставляются диаметры кости у сеголеток, у годовиков и однолеток с диаметром эндоста взрослых особей (табл. 4). Ошибка такого способа не превышает ± 1 год.

Работу по установлению темпа резорбции надо проводить очень тщательно, исследуя как можно больше препаратов из разных костей, поскольку иногда лишь на некоторых срезах можно увидеть около самого края костномозговой полости небольшие участки резорбирующейся линии склеивания.

Одновременно с процессом резорбции в трубчатых костях, со стороны эндоста со временем начинает откладываться эндостальная костная ткань, в которой также имеются слои. Как правило, граница между периостальной и эндостальной костью хорошо видна, и ее легко отличить от линии склеивания: она намного грубее, толще линии склеивания, часто извилистая. Иногда на препаратах по этой границе происходит расслоение кости. Часто эндостальная кость откладывается не симметрично по кругу, а преимущественно с одной стороны. Слои в эндостальной зоне кости тесно примыкают друг к другу и видны менее отчетливо, чем в периостальной зоне.

Мы рекомендуем определять возраст по слоям, подсчитывая число линий склеивания в периостальной зоне кости с учетом возможной резорбции первоначально отложенных слоев.

Наряду с годовыми линиями склеивания, на срезах могут быть заметны дополнительные линии, которые образуются под влиянием летнего похолодания, засухи, недостатка пищи, болезни и так далее. На срезе они выглядят менее четкими, местами прерывистыми и обычно хорошо отличаются от годовых линий. Вероятно, влияния таких факторов как летнее похолодание, засуха, бес-

кормица, сильные оттепели зимой, болезни и т. д. отражаются на физиологическом состоянии животных и, возможно, вызывают задержку роста. Эта задержка фиксируется в кости в виде дополнительных линий (By J. Castanet, E. Smirina, 1990).

Если картина на окрашенных срезах представляется исследователю недостаточно четкой не нужно давать точное определение возраста, лучше дать его приблизительную оценку его, например, 3-4 года.

Субъективность оценки возраста животных. Важным моментом при проведении работы по определению возраста является оценка субъективности каждого конкретного исследователя. Субъективность подсчета слоев считается основным недостатком метода по сравнению с методами, основанными на измерениях каких-либо структур (В.С. Смирнов, 1984). Субъективность подсчета слоев предопределяет ошибку оценки возраста, и минимизировать субъективность подсчета особенно трудно в тех случаях, когда нет материала от особей известного возраста и нельзя оценить прямым путем, какие слои считать годовыми и какова ошибка определения возраста. Таким образом, при подсчете годовых слоев для определения возраста можно выделить две задачи. Во-первых, это определить степень субъективности подсчета слоев и тем самым косвенно оценить возможность ошибок при определении возраста, что можно сделать на любом материале, а во-вторых, определить реальную величину ошибки при определении возраста, имея в распоряжении материал от особей известного возраста (Г.А. Клевезаль, 1988).

Проверку необходимо проводить с более опытным оператором. Но обычно это весьма затруднительно. Для оценки субъективности и воспроизводимости результатов определения возраста Г.А. Клевезаль с соавторами (1981) предложила оригинальный метод, который многие ученые, в том числе и мы, используют в своих исследованиях. Необходимо классифицировать рассматриваемую выборку по четкости слоев. Четкость слоев, их пригодность для подсчета оцениваются по 5-ти балльной системе: 5 – слои четкие, их подсчет затруднений не вызывает; 4 – слои легко разграничить, но полной уверенности в оценке их числа нет; 3 – слои удастся выделить только предположительно, воз-

можно несколько оценок их числа; 2 – слои для подсчета можно выделить с большим трудом; 1 – аргументированную оценку числа слоев дать невозможно.

Целесообразно сопровождать оценкой пригодности слоев каждую частную оценку возраста и характеризовать выборку средним или модальным значением оценок пригодности. Это позволяет проводить внутривидовые и межвидовые сравнения характера ростовых слоев. Сопоставление оценки возраста разными операторами лучше проводить по показателю сходства r распределений этих оценок по Л. А. Животовскому (1982) (Г.А. Клевезаль, 1988).

$$r = \sqrt{p_1q_1} + \sqrt{p_2q_2} + \dots + \sqrt{p_mq_m} ,$$

где p и q — доля особей с данным баллом оценки пригодности в первой и второй сравниваемых выборках, а $1...m$ — представленные в выборке баллы (категории) пригодности.

При полном сходстве распределений оценок пригодности в двух выборках $r = 1$. Значимость различий оценивается по величине I , которая распределена как χ^2 с числом степеней свободы $df = m - 1$

$$I = \frac{8N_1N_2}{N_1+N_2} \left(1-r - \frac{p_0q_0}{4} \right)$$

где N – число особей, соответственно, в первой и второй выборках, p_0 — сумма долей особей категорий пригодности, представленных в первой выборке и не представленных во второй, q_0 – сумма долей особей категорий пригодности, представленных во второй выборке и не представленных в первой. На основании полученных результатов можно судить о «качестве» определения возраста тем или иным оператором по сравнению с «опытным» специалистом.

Часто сравнивать «правильность» определения возраста не представляется возможным. В таком случае речь идет уже о стандартизации ошибки, получаемой оператором. Используя описанный выше прием можно стандартизировать ошибку любого оператора. Для этой цели оценку возраста каждого препарата из выборки следует проводить несколько раз с периодичностью повтора 1

раз в 2-3 месяца. Если статистической разницы в оценках обнаружено не будет, то можно утверждать, что ошибка оценки стандартна и результаты исследования достоверны.

КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Аргиофилия – способность тканевых структур импрегнироваться серебром при применении соответствующего восстановителя.

Артефакт – несвойственное наблюдаемому объекту явление, приводящее к искажению результатов исследований. При микроскопической методике исследования артефакт возникает вследствие нарушения методики забора материала, приготовления среза, особенно его фиксации и окраски, при использовании неправильно подготовленной посуды и т.д.

Базофилия – свойство структурных компонентов клетки окрашиваться основными красителями. Интенсивная базофилия хроматина зависит от наличия в ней дезоксирибонуклеиновой кислоты, а в цитоплазме базофильными являются структуры, содержащие рибонуклеиновую кислоту, мукополисахариды, белки и другие соединения. Базофилия характерна для активно растущих, интенсивно синтезирующих белок клеток.

Выходящая пчела – нарождающаяся пчела, которая закончила свое развитие в запечатанной ячейке сота, прогрызает восковую крышечку и выходит из ячейки.

Диафиз – центральная часть (тело) длинной (трубчатой) кости.

Импрегнация – пропитывание.

Липоциты – клетки жирового тела.

Объект-микрометр – это металлическая пластинка размером с предметное стекло. В центре пластинки находится круглое отверстие в которое вставлено стекло со шкалой деления. Длина шкалы 1 мм. Она разделена на 10 групп по 10 делений, то есть всего 100 делений. $1\text{мм}:100\text{ (делений)} = 0,01\text{ мм}$ - это цена одного деления (рис. 6).

Оксифильный – окрашивающийся кислыми красителями. Свойство структурных компонентов клетки окрашиваться кислыми красителями.

Окуляр-микрометр – это окуляр, на линзу которого нанесены две шкалы деления (рис. 5). Они расположены взаимно перпендикулярно. Обе шкалы имеют по 100 делений.

Периост – надкостница, двуслойная соединительнотканная оболочка. Наружный плотный фиброзный слой ее укрепляет кость, увеличивает ее упру-

гие свойства и несет в себе сосуды и нервы, связанные с глубжележащими сосудами и нервами всей кости. Внутренний слой содержит большое количество клеток – остеобластов, за счет которых идет рост.

Резорбция – разрушение.

Склерит – часть кутикулярного кольца (скелетной основы) сегмента груди или брюшка насекомого.

Стернит – склерит в виде брюшного полукольца кутикулы сегмента груди или брюшка насекомого.

Тергит – склерит в виде спинного полукольца кутикулы сегмента груди или брюшка насекомого.

Эндост (эндостальная полость) – слой, выстилающий костномозговую полость кости, полости губчатой кости и гаверсовы каналы.

Эноциты – крупные клетки, располагающиеся среди клеток жирового тела.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аль-Завахра Худа Авад. Змеи Татарстана. Дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1992. – 130 с.
2. Анисина О.С. Микроморфология и гистохимия головного мозга медоносной пчелы в онтогенезе и при варроатозе. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Казань, 1996. – 19 с.
3. Анисина О.С. Морфогенез головного мозга медоносной пчелы //Межвуз. сборник научн. трудов КГВИ «Физиологические аспекты ветеринарии и зоотехнии». - Казань, 1994. – С. 60-63.
4. Банников А.Г. Возрастной состав популяции и его динамика у *Bombina bombina* L. // Докл. АН СССР (Нов. серия). 1950. т. 9. вып. 5. – С. 53-55.
5. Белявский В.И. Морфогистохимический анализ возрастных и сезонных изменений жирового тела медоносной пчелы. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1985. – 22 с.
6. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1971. – 271 с.
7. Гаранин В.И. Продолжительность жизни амфибий в природе // Природа. № 4. 1969. –С.35-38.
8. Гиляров М.С. Основные сведения о насекомых //Жизнь животных. – М.: Просвещение, 1969. – Т. 3. – С. 157-196.
9. Голикова Н.А., Белявский В.И. Морфология и гистохимия жирового тела осенне-зимних пчел //Научные труды КВИ. – Казань, 1984. – С. 105-112.
10. Жданов С.В. Периоды в годовом цикле пчелиной семьи //XVIII Международный конгресс по пчеловодству. – М.: Колос, 1961. - С. 36-43.
11. Жеребкин М.В., Шагун Я.Л. О некоторых физиологических изменениях в организме медоносных пчел при подготовке их к зиме //Уч. записки Ин-та пчеловодства. Вестник. 1971. № 20. – С. 1-57.
12. Животовский Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам //Фенетика популяций. – М.: Наука, 1982. – С. 38-44.
13. Замалетдинов Р.И., Белявский В.И., Михайлова Р.И. Особенности размерно-возрастной структуры популяции и скорости полового созревания у прудо-

- вой лягушки *Rana lessonae* //Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных. – Саранск, 2005. – С. 73-78.
14. Замалетдинов Р.И., Хайрутдинов И.З. Модификации метода прижизненного мечения амфибий и рептилий в популяционных исследованиях //Актуальные вопросы герпетологии и токсинологии. –Тольятти, 2006. Вып. 9. – С. 66–72.
 15. Кепеня В. Влияние осенней подкормки на качество пчел //XXIII Международный конгресс по пчеловодству. – М., 1971. – С. 370.
 16. Кисели Д. Практическая микротехника и гистохимия. – Изд. акад. наук: Венгрия: Будапешт, 1962. – 399 с.
 17. Клевезаль Г.А. Регистрирующие структуры млекопитающих в зоологических исследованиях. – М.: Наука, 1988. – 288 с.
 18. Клевезаль Г.А., Груе Х., Мина М.В. Способ оценки пригодности регистрирующих структур для подсчета слоев при определении возраста животных // Зоол. журн. 1981. Т. LX.. Вып. 12. – С. 1869-1877.
 19. Кожевников Г.А. Материалы к естественной истории пчелы //Изв. об-ва любителей естествознания. Тр. зоол. отд. XIV. 1900. – С. 1-144.
 20. Кононский Г.А. Гистохимия. – Киев: Выща школа, 1976. – 278 с.
 21. Лада Г. А., Соколов А. С. Методы исследования земноводных: научно-методическое пособие. – Тамбов, 1999. – 75 с.
 22. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
 23. Луппа Х. Основы гистохимии. – М.: Мир, 1980. – 343 с.
 24. Маурицио А. Кормление пыльцой и жизненные процессы у медоносной пчелы //Новое в пчеловодстве. – М., 1958. – С. 372-444.
 25. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. – Л.: Медицина, 1969. – 422 с.
 26. Мина М.В., Клевезаль Г.А., 1976. Рост животных. – М.: Наука. – 291 с.
 27. Орловская Г.В., Тустановский А.А. О химических основах метода аргирофильной окраски. Арх. пат. 1954. Т. XXI. Вып. I, – С. 13-22.
 28. Орловская Г.В., Тустановский А.А., Зайдес А.Л. Компоненты аморфного вещества ретикулиновых волокон и их роль в гистохимических реакциях. Арх. пат. 1959. Т. XXI. Вып. 7. – С. 23-32.

29. Основы гистологии и гистологической техники. Под общ. ред. Елисеева В.Г. – М.: Медицина, 1967. – 267 с.
30. Павловский Е.Н. Методы ручного анатомирования насекомых. – М.-Л. ЗИН АН СССР, 1957. – 45 с.
31. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. – М.: Пищевая промышленность, 1966. – 376 с.
32. Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Иностранная литература, 1953. – 718 с.
33. Роскин Г.И. Микроскопическая техника. – М.: Сов. наука, 1946. – 289 с.
34. Румянцев А.В. Опыт исследования эволюции хрящевой и костной ткани. – М., Изд-во АН СССР, 1958. – 376 с.
35. Смирин Э.М., Макаров А.Н. Об установлении соответствия числа слоев в трубчатых костях у амфибий возрасту особей // Зоол. журн. 1987. Т. LXVI. Вып. 4. – С. 599-604.
36. Смирин Э.М., Методика определения возраста амфибий и рептилий по слоям в кости // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. – Киев, 1989. – С. 144-153.
37. Смирин Э.М., Прижизненное определение возраста и ретроспективная оценка размеров тела серой жабы (*Bufo bufo*) // Зоол. ж. 1983. Т. LXII. №. 3. – С. 437-444.
38. Смирнов В.С. О точности определения возраста при подсчете слоев цемента у волков // Регистрирующие структуры к определению возраста млекопитающих: Тез. докл. Всесоюз. конф. – М., 1984. – С. 63-64.
39. Смирнов В.С. Сравнение двух методов определения возраста, используемых для анализа возрастной структуры волка // Исследования актуальных проблем териологии. – Свердловск, 1983. – С. 79-82.
40. Соколина Ф.М., Писарев П.А. Учение о клетках и тканях (часть 1 – цитология). – Казань, 2001. – 57 с.
41. Таранов Г.Ф. Анатомия и физиология медоносных пчел. – М.: Колос, 1968. – 344 с.
42. Таранов Г.Ф. Биология пчелиной семьи. – М.: Госиздат. с.-х. лит., 1961. – 336 с.
43. Терентьев П. В. Лягушка. – М.: Советская наука, 1950. – 344 с.

44. Тустановский А.А, Орловская Г.В. О специфичности аргирофилии белковых образований соединительной ткани. Арх. пат. 1953. Т. XV. Вып. 3. – С. 32-44.
45. Циколенко С.П. Морфофункциональные изменения в организме медоносных пчел в период зимовки и в условиях защищенного грунта после корректирующих подкормок. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. –Уфа, 2004. – 22 с.
46. Шовен Р. Физиология насекомых. – М.: ИЛ, 1953. – 494 с.
47. Boehm B. Beziehungen zwischen Fettkörper, Oenocyten und Wachstumentwicklung bei *Apis mellifica* L. // Naturwissenschaften, 1961. 48. № 21. – S. 675-676.
48. Castanet By J., Smirina E. Introductions to the skeletocronological method in amphibians and reptiles // Annales des Sciences Natuelles Zoologie. 1990. 13 Serie. vol. 11. pp. – P. 191-196.
49. Esteban M., Garcia-Paris M., Castanet J. Use of bone histology in estimating the age of frogs (*Rana perez*) from a warm temperate climate area // Can. J. Zool. 74. 1996. – P. 1914-1921.
50. Hausser H. Markicrimgen an Amphibian // Vierteljahrh. Naturf. Ges. Zurich. 1958. Bd. 103. – S. 304-320.
51. Kulkarni J.T., Pancharatna K. Age related changes in ovarian follicular kinetics in the Indian skipper frog *Rana cyanophlyctis* (Sehn.) // J. Biosci. Vol. 21. № 5. 1996. – P. 699-710.
52. Lotmar R. Untersuchungen uber den Eisenstoffwechsel der Insekten, besonders der Honigbiene // Rev. Suisse. Zool. 1938. 45. – S. 237-271.
53. Martof B. Territoriality in the green frog *Rana clamitans* // Ecology. 1953. V. 34. № 1. – P. 165-174.
54. Smirina E.M. Age determination and Longevity in Amphibians // Gerontology. 1994. 40. – P. 133-146.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ЧАСТЬ I	
ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ	7
ЧАСТЬ II	
ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА В ЗООЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	23
Определение степени развития жирового тела пчелы и характера распределения в нем общих липидов	23
Исследование головного мозга медоносной пчелы	37
Скелетохронологический метод в демографических исследованиях природных популяций земноводных и пресмыкающихся	48
КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	65
ЛИТЕРАТУРА	67

Владимир Иванович Белявский
Ренат Ирекович Замалетдинов
Ольга Сергеевна Анисина
Регина Ипполитовна Михайлова

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА
В ЗООЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

Учебно-методическое пособие

Редактор Р.И. Михайлова
Компьютерная верстка и дизайн Р.И. Замалетдинов
Корректурa авторов

Подписано в печать 12.07.2007. Формат 60x84/16. Усл. печ. л. 4,5
Тираж 150 экз. Заказ 160-07

ООО «Фолиантъ». 420052 Казань, ул. Дементьева, 1а, т. 292-27-25
Отпечатано в типографии ООО «Фолиантъ»