

Глава 3

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГИСТОЛОГИИ И ЭМБРИОЛОГИИ

3.1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ГИСТОЛОГИИ

Методы исследования в гистологии включают приготовление гистологических препаратов и их изучение с помощью световых или электронных микроскопов. Гистологические препараты представляют собой мазки, отпечатки органов, пленочные препараты, тонкие срезы кусочков органов, окрашенные тем или иным красителем (исследуются также нативные — неокрашенные срезы), помещенные на предметное стекло, заключенные в бальзам и покрытые тонким покровным стеклом. Толщина срезов составляет микрометры (мкм) в световой микроскопии и нанометры (нм) и ангстремы в электронной (в 1 мм = 1000 мкм; 1 мкм = 1000 нм; 1 нм = 10 ангстрем).

Для изготовления гистологического препарата необходимо после взятия материала произвести его фиксацию в том или ином фиксаторе (формалине, спирте, а для электронной микроскопии — в глутаровом альдегиде и четырехокиси осмия). Делается это для предотвращения процессов аутолиза (самопереваривания, распада) и сохранения структуры органа, близкой к прижизненной. Далее следуют этапы обезвоживания кусочка органа в спиртах возрастающей концентрации и в ксилоле и уплотнения тканей, что необходимо для изготовления тонких срезов. Для придания кусочку органа еще большей плотности и гомогенности (однородности), обеспечивающей высококачественную резку, проводят его заливку в органическую среду — парафин, целлоидин (для световой микроскопии) и органические смолы (эпон, аралдит, дуркупан) — для электронно-микроскопического исследования.

Существуют также физические способы фиксации материала, наиболее распространенным из которых является быстрое замораживание кусочка органа в жидком азоте (точка кипения $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для резки замороженного материала используют специальные приборы — криостаты, или замораживающие микротомы. Следует помнить, что от техники фиксации и качества фиксатора зависит присутствие в препарате так называемых артефактов (изменения в строении тканей и органов, возникшие в результате манипуляций при изъятии органа, влияния использованных жидкостей, сред для заливки и др.). Например, при применении спиртовой фиксации печени в клетках наблюдается феномен «убегания гликогена», нарушается естественное расположение гранул гликогена в цитоплазме гепатоцита (см. рис. 3.4).

Приготовление гистологических срезов осуществляется с применением микротомов и специальных стальных ножей. Толщина срезов, предназначенных

для световой микроскопии, не должна превышать 4–5–7 мкм, для электронной — 50–60–100 нм (такие ультратонкие срезы изготавливают на специальном приборе ультратоме, используя стеклянные или алмазные ножи и автоматический режим резки).

После получения срезов их помещают на предметные стекла, далее следуют этапы освобождения срезов от заливочной среды (при световой микроскопии) и окраски для придания срезам контрастности. При комбинированном окрашивании гистологических препаратов часто употребляется сочетание гематоксилина (основный краситель) с эозином

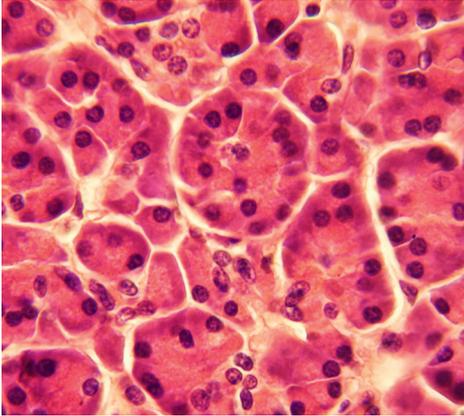


Рис. 3.1. Общая морфология клетки: ацинусы поджелудочной железы; микрофотография, окраска гематоксилином и эозином (увеличение среднее)

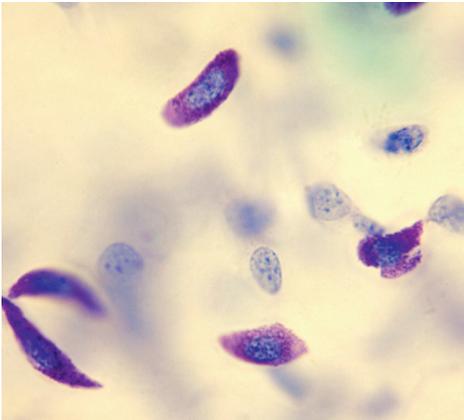


Рис. 3.2. Тучные клетки: окраска гранул тучной клетки отличается от синего цвета красителя тионина (явление метахромазии); микрофотография (увеличение большое)

эозина (основный краситель) с эозином (кислый краситель). Те структуры, которые окрашиваются кислыми красителями, называются *ацидофильными* или *оксифильными*. Так, эозин (кислый краситель) окрашивает цитоплазму дифференцированных клеток в розовый цвет. Напротив, основной (щелочной) раствор гематоксилина окрашивает ядра, содержащие ДНК и РНК, в сине-фиолетовый цвет (рис. 3.1).

Если цитоплазма клетки, например, окрашивается гематоксилином, то это явление называется *базофилией*. Восприятие цитоплазмы как кислых, так и основных красителей характеризуется как *нейтрофилия*. Существует также явление *метахромазии*: в этом случае структура окрашивается в цвет, отличный от цвета используемого красителя (рис. 3.2). Например, тионин, водный раствор которого имеет фиолетовый цвет, окрашивает гранулы тучных клеток в тона, близкие к красной части спектра.

Полихромная окраска при использовании более двух красителей дает многоцветную картину, так как в срезе органа различные гистологические структуры воспринимают разные красители (рис. 3.3).

Также существует большой набор красителей, которые специфически выявляют структуры клетки (например, митохондрии) или вещества, вырабатываемые клеткой (например, секреты, включения и др.). При этом процедура обработки усложняется

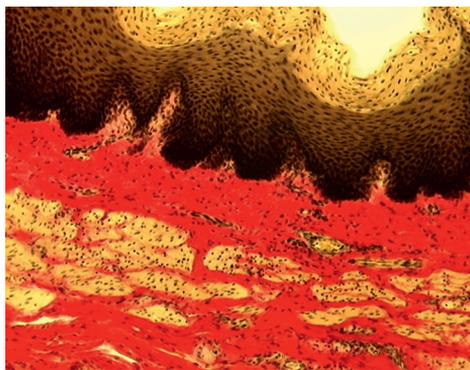


Рис. 3.3. Полихромное окрашивание кожи смесью пикриновой кислоты и кислого фуксина с докраской ядер гематоксилином. Ядра клеток окрашиваются в темно-коричневый или фиолетово-черный цвет, коллагеновые волокна — в красный цвет, цитоплазма мышечных клеток — в желтый цвет, эпителиальных клеток — в коричнево-желтый цвет; микрофотография (увеличение среднее)

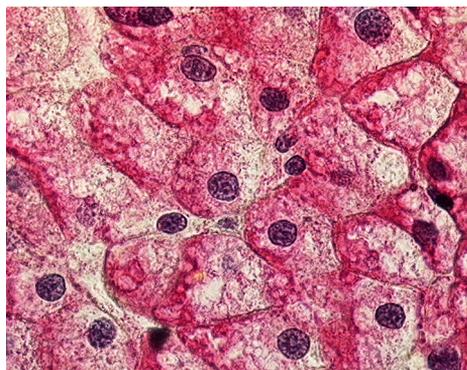


Рис. 3.4. Выявление полисахаридов с помощью реакции Шиффа с периодной кислотой: гликоген в клетках печени окрашивается в красный цвет различных оттенков; наблюдается феномен «убегания» гликогена к одному из полюсов клетки, что является артефактом фиксации материала; микрофотография (увеличение большое)

и становится многоэтапной, что, например, характерно для постановки гистохимической реакции на гликоген (рис. 3.4). Можно вводить в организм животного нейтральные красители и наблюдать клетки, которые их поглощают (рис. 3.5).

В нейрогистологии широко используется импрегнация (пропитывание) солями серебра. Это позволяет выявить отростки и связи нейронов между собой (рис. 3.6). Существует много специальных методик выявления отдельных

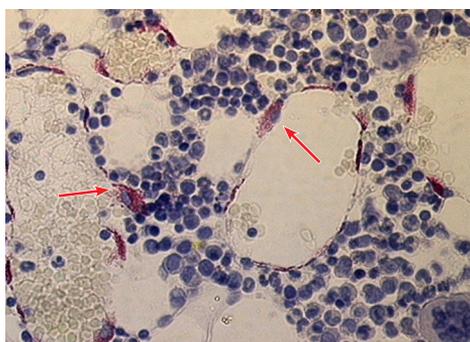


Рис. 3.5. Поглощение нейтрального красного (стрелки) макрофагами красного костного мозга; микрофотография, окраска гематоксилином (увеличение среднее)

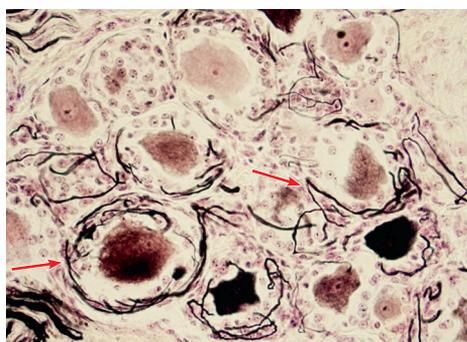


Рис. 3.6. Выявление гистологических элементов чувствительного ганглия нервной системы методом импрегнации азотнокислым серебром: выявляются нервные волокна (стрелки) и нейрофибриллы в периферической нервной системе; микрофотография (увеличение большое)



Рис. 3.7. Мазок клеток шейки матки: 1 — мелкие столбчатые клетки шейки матки; 2 — полигональные клетки влагалищной части шейки матки; микрофотография, окраска гематоксилином и эозином (увеличение среднее) (по В.И. Новику, 2013)

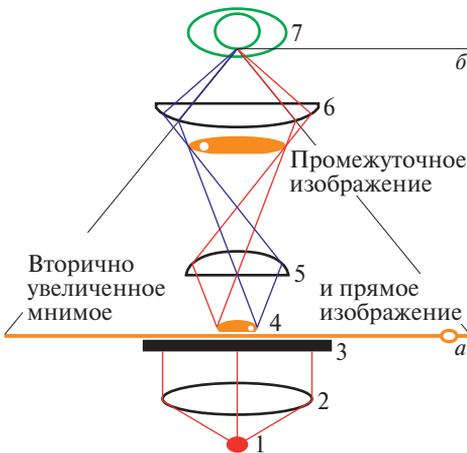


Рис. 3.8. Схема микроскопа и ход лучей в нем (пояснения в тексте): 1 — осветитель; 2 — конденсор; 3 — предметный столик; 4 — поле зрения в микропрепарате; 5 — линза объектива; 6 — линза окуляра; 7 — глаз наблюдателя; а—б — расстояние наилучшего видения

химических веществ в клетке, а также количественного анализа их содержания (см. ниже).

В клинической цитологии широко распространен метод исследования соскобов, смывов, отпечатков с поверхности слизистых оболочек различных органов (клетки полости рта могут использоваться для анализа ДНК; эпителиоциты шейки матки — для ранней диагностики рака). С помощью тонкой пункционной иглы можно брать участки органа (мышцы, печени, щитовидной железы и др.) и получать на предметном стекле мазки клеток. Полученный материал после быстрой фиксации и окрашивания служит для уточнения диагноза заболевания или объема оперативного вмешательства, например, при операции на органах брюшной полости. Мазки эпителиоцитов шейки матки используются для ранней диагностики рака при ежегодном обследовании женщин репродуктивного возраста (рис. 3.7).

По окончании окрашивания срезы заключают в консервирующие среды (канадский, кедровый бальзамы) и накрывают покровным стеклом. В таком состоянии препараты сохраняются долгие годы.

Основным методом гистологического исследования клеток, тканей и органов является *световая микроскопия* (рис. 3.8, 3.9). В световом микроскопе для освещения объекта используются лучи видимого спектра в области 0,38–0,77 мкм, а в электронном микроскопе длины волн электромагнитных колебаний потока электронов (0,0056 нм). Современные световые микроскопы позволяют получать разрешение порядка 0,2 мкм (предел разрешения светового микроскопа — это наименьшее расстояние, при котором две рядом расположенные точки видны как отдельные).

Оптическая система микроскопа включает объектив и окуляр, назначение которых — давать увеличенное изображение предмета. Конденсор и зеркало предназначены для освещения препарата (см. рис. 3.8).

С помощью линзы (5) объектива получается действительное увеличенное и перевернутое промежуточное изображение структуры (4), которое находится в фокусе объектива. Это промежуточное изображение регистрируется линзой окуляра (6) и преобразуется во вторично увеличенное мнимое и прямое изображение, которое расположено от глаза (7) на расстоянии наилучшего видения (*a — б*). Предельное (полезное) увеличение светового микроскопа составляет 1000. Дальнейшее возрастание увеличения (больше предельного) не приведет к появлению более мелких, ранее неразличимых при предельном увеличении микроскопа деталей, а только увеличит контуры изображения и ухудшит общую микроскопическую картину. В учебных целях чаще используются малое (окуляр $\times 10$ и объектив $\times 8$) и среднее (окуляр $\times 10$ и объектив $\times 40$) увеличения (см. рис. 3.9).

Световая микроскопия имеет несколько разновидностей: фазово-контрастная, поляризационная, темнопольная, интерференционная и др.

Фазово-контрастная микроскопия — метод изучения клеток в световом микроскопе, снабженном фазово-контрастным устройством. Благодаря смещению фаз световых волн в микроскопе такой конструкции повышается контрастность структур исследуемого объекта, что позволяет изучать живые клетки или неокрашенные препараты (рис. 3.10).

Микроскопия в темном поле. Здесь используется специальный темнопольный конденсор. Последний не пропускает прямые лучи, а только косые. Общий фон при этом темный, а клетки или кристаллы (например, мочевой кислоты) отражают свет. Наблюдатель видит светлые контуры клетки на фоне темного поля (рис. 3.11).

Поляризационная микроскопия. В микроскопах этого типа световой пучок разделяется на два луча, поляризованных во взаимно перпендикулярных плоскостях. Проходя через структуры ткани со строгой ориентацией молекул, лучи запаздывают друг относительно друга вследствие неодинакового их преломления.

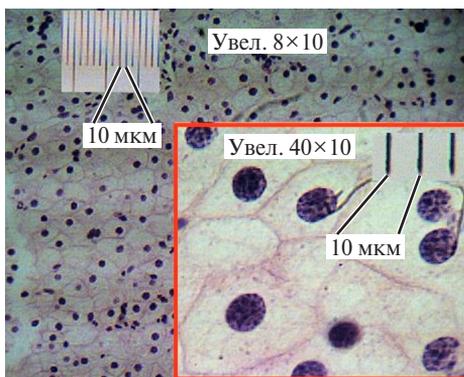


Рис. 3.9. Светооптическая картина при различных увеличениях микроскопа; микрофотография гистологического препарата при различных увеличениях микроскопа (расстояние между двумя штрих-полосками равно 10 мкм, или 0,01 мм)



Рис. 3.10. Секреторные включения в бокаловидных клетках; микрофотография, фазовый контраст (увеличение большое) (по А.С. Ростовщикову)

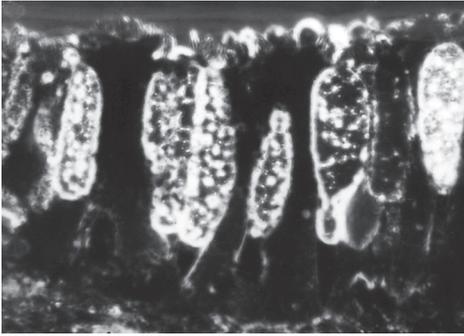


Рис. 3.11. Секреторные включения в бокаловидных клетках; микрофотография, темное поле (увеличение большое) (по А.С. Ростовщикову)

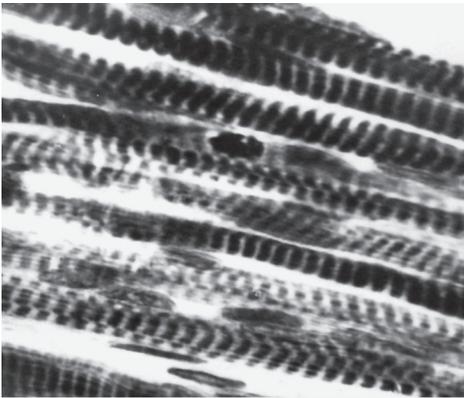


Рис. 3.12. Поляризационная микроскопия; микропрепарат с докраской ядер гематоксилином, саркоплазма не окрашена, видны анизотропные (темные) и изотропные (светлые) диски в мышечном волокне скелетной мускулатуры (увеличение среднее)

Возникающий при этом сдвиг фаз является показателем двойного лучепреломления клеточных структур (таким способом были исследованы, например, миофибриллы, рис. 3.12).

Интерференционная микроскопия.

В интерференционном микроскопе падающие на объект световые пучки раздваиваются — один пучок проходит через объект, другой — идет мимо. При последующем воссоединении пучков возникает интерференционное изображение объекта. По сдвигу фаз одного пучка относительно другого можно судить о концентрациях различных веществ в исследуемом объекте. Метод интерференции также используется для определения толщины гистологического среза, что необходимо в количественной гистохимии.

Люминесцентная (от лат. *lumen* — свет), или *флюоресцентная* (от лат. *fluor* — течение) *микроскопия* — метод гистологического анализа с помощью люминесцентного или конфокального микроскопов, в котором регистрируется явление люминесценции (флюоресценции, холодного свечения) веществ при действии на них коротковолновых лучей (ультрафиолетового света, рентгеновских лучей, воздействие лазерного излучения). Некоторые биологические соединения, присутствующие в клетках, характеризуются спонтанной флюоресценцией при попадании на клетку

ультрафиолетовых лучей. Для выявления же большинства других соединений клетки обрабатываются специальными флюорохромами (флюоресцеином, акридином оранжевым, корифосфином). С помощью флюорохромов исследуют, например, содержание в клетках нуклеиновых кислот. При окраске акридином ДНК дает красно-зеленое свечение, а РНК — оранжевое. Этот метод микроскопии нередко комбинируют с фазово-контрастным освещением объекта.

Люминесцентный микроскоп широко используется также для изучения иммунофлюоресценции (рис. 3.13).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. В качестве осветителя используется лазерный луч (рис. 3.14). В отличие от обычного светового

микроскопа в оптической схеме конфокального микроскопа существует специальная диафрагма (конфокальная, или софокусная), расположенная в плоскости промежуточного изображения (см. рис. 3.14).

Все внефокусные лучи, которые снижают контраст изображения, отсекаются конфокальной диафрагмой (сравните с рис. 3.8). Однако эта диафрагма пропускает только те световые лучи, которые исходят из небольшой области объекта, находящейся в фокусе объектива.

Полное изображение объекта в микроскопе формируется при применении сканирующего устройства, которое последовательно сканирует всю толщину препарата. Информация о плотности объекта по каждой линии сканирования через электронное оптическое устройство передается в компьютер, где специальная программа осуществляет трехмерную реконструкцию исследуемого объекта. Таким образом, конфокальный микроскоп дает информацию о форме клеток, цитоскелете, структуре ядра, хромосом и о локализации в них отдельных генов. Изображение, получаемое с помощью конфокального микроскопа, является не «оптическим», а цифровым, сам микроскоп является дорогостоящим, требует сложной настройки. В люминесцентном варианте конфокальной микроскопии необходимо иметь набор флюорохромов для выявления структурных компонентов клетки.

Ультрафиолетовая микроскопия — метод изучения клеток с помощью микроскопов, в которых для освещения объекта используют ультрафиолетовые лучи (длина волны которых равна 210–275 нм). Такие микроскопы имеют большую, чем обычные световые

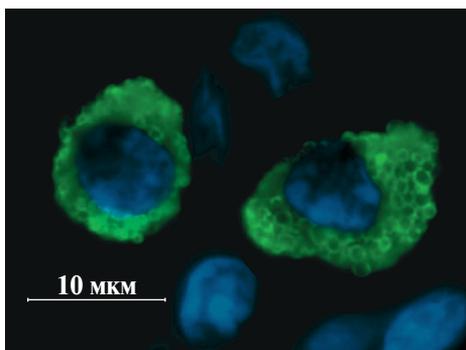


Рис. 3.13. Иммунофлюоресценция фермента триптазы в гранулах тучных клеток с использованием Alexa Fluor 488 (зеленое свечение); ядра клеток окрашены красителем DAPI (синее свечение); микрофотография (увеличение большое) (по Д.А. Атякшину)

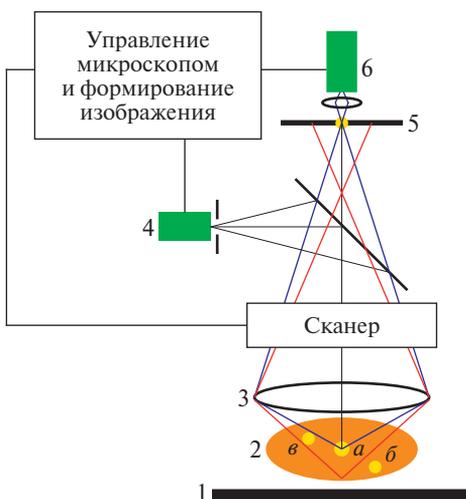


Рис. 3.14. Схема конфокального микроскопа и ход лучей в нем: 1 — предметный столик; 2 — объект исследования; 3 — объектив; 4 — источник лазерного излучения; 5 — конфокальная диафрагма; 6 — фотоприемное устройство; точка «а» находится в фокусе объектива, флюоресценция из данной точки попадает на фотоприемное устройство (синие линии); остальные лучи (красные линии) отсекаются конфокальной диафрагмой; точки «б» и «в» находятся вне фокуса

микроскопы, разрешающую способность. Для наблюдения за объектом требуется специальная аппаратура — электронно-оптический преобразователь, который предохраняет орган зрения от действия ультрафиолетовых лучей.

Электронная микроскопия. В электронных микроскопах используют пучок электронов, длина электромагнитной волны которых в 100 000 раз короче длины волны видимого света (рис. 3.15). Разрешающая способность электронного микроскопа в сотни и тысячи раз превышает обычные оптические приборы и равна 0,5–1 нм, а современные мегавольтные электронные микроскопы дают увеличение до 1 000 000 раз. В составе микроскопа также имеются конденсорная, объективная и проекционная линзы, только электромагнитные (см. рис. 3.15). В процессе подготовки к электронно-микроскопическому исследованию ткани (клетки) подвергаются контрастированию солями свинца, которые по-разному связываются с гистологическими элементами. Возникает неодинаковая электронная плотность структур.

В просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе (ТЭМ) пучок электронов, проходя структуры с различной электронной плотностью, попадает на флюоресцирующий экран, где формируется плоскостное изображение объекта. Последнее регистрируется на фотопленке или

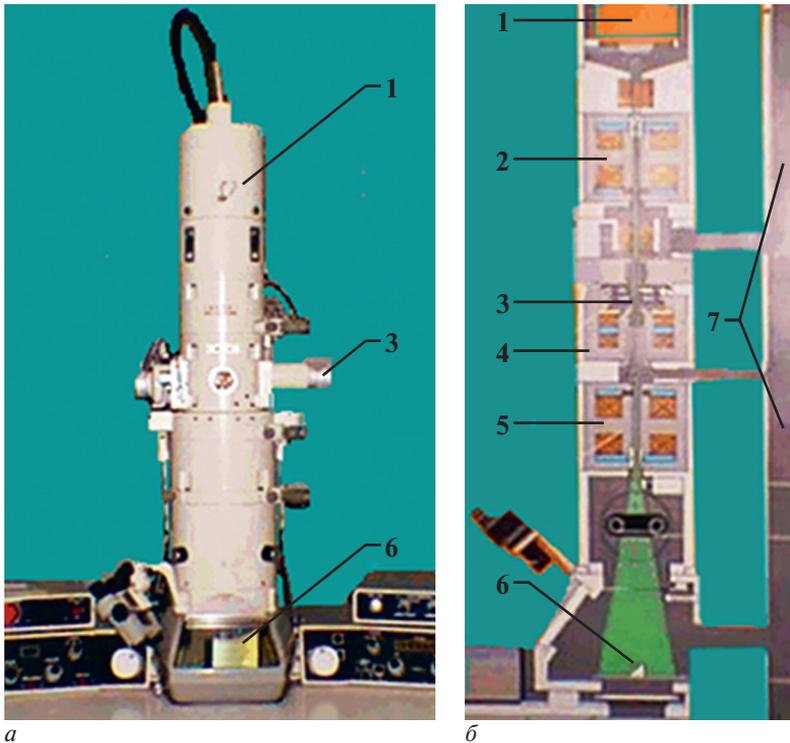


Рис. 3.15. Электронный микроскоп, внешний вид (а) и схема устройства (б): 1 — колонна микроскопа; 2 — конденсорная линза; 3 — камера для ввода объекта исследования в колонну с глубоким вакуумом; 4 — объективная линза; 5 — проекционная линза; 6 — экран для наблюдения; 7 — система для создания вакуума

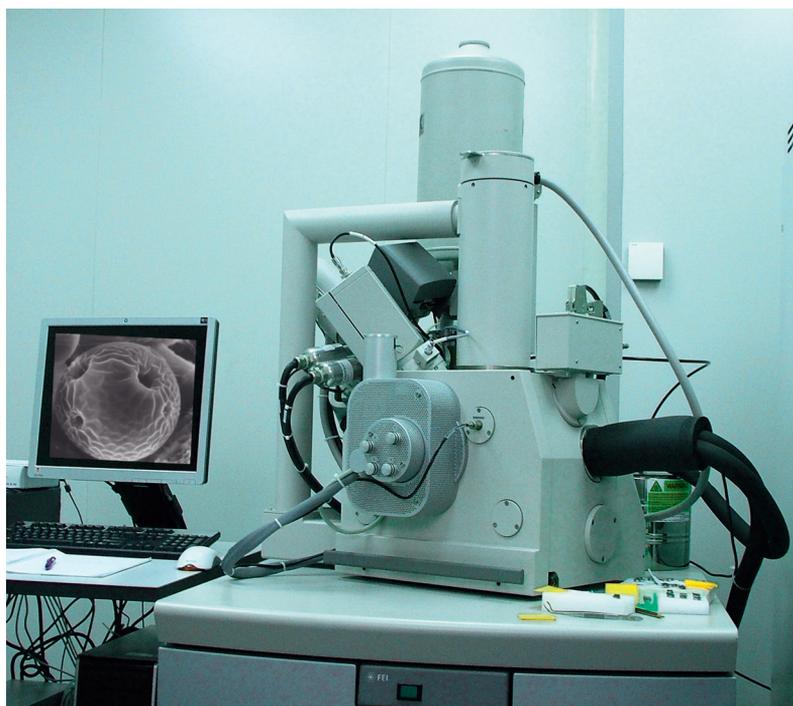


Рис. 3.16. Внешний вид сканирующего электронного микроскопа

оцифровывается и передается на экран монитора. С помощью электронных микроскопов получены многочисленные данные об ультраструктуре клеток и тканей. Разновидностью электронной микроскопии является сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), которая позволяет изучать поверхностные структуры клеток и тканей (рис. 3.16). Подготовленные для исследования клетки и ткани предварительно обрабатываются металлами путем напыления в вакууме.

Пучок сфокусированных электронов (электронный зонд) скользит по поверхности клетки, возникают обратно-рассеянные электроны, которые регистрируются высокочувствительным полупроводниковым детектором и преобразуются в цифровое изображение, позволяющее изучать поверхность клетки (рис. 3.17).

Среди моделей электронных микроскопов существуют приборы, которые позволяют работать с фиксированными, но необезвоженными биологическими объектами (вирусы, бактерии, гистологические элементы, тканевые жидкости и др.). При этом исследователь получает качественное изображение объекта, работая с низкими ускоряющими напряжениями, которые не вызывают структурные изменения, например, поверхности клетки, органелл, волокнистых структур межклеточной среды (рис. 3.17, в).

Цитоспектрофотометрия — метод изучения химического состава клетки, основанный на избирательном поглощении теми или иными веществами

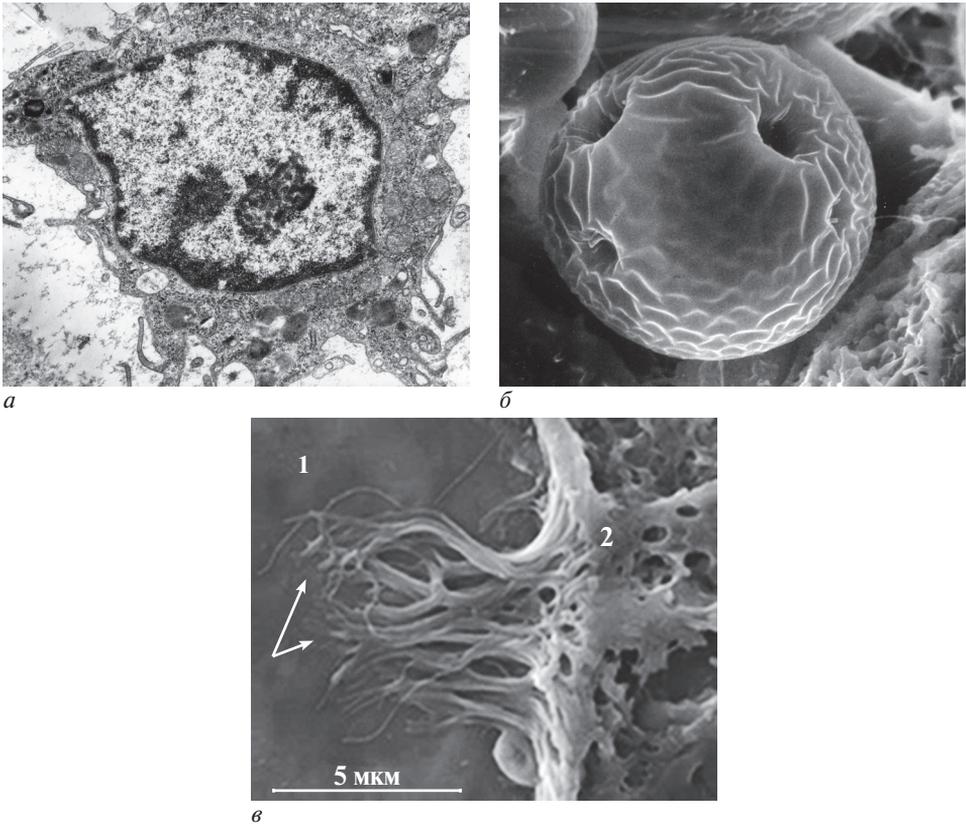


Рис. 3.17. Ультраструктура макрофага в просвечивающем (*a*) и сканирующем (*б*) электронных микроскопах; *в* — фрагмент поперечного сечения каналца внутрияичниковой сети (*rete ovarii*) в сканирующем электронном микроскопе. 1 — просвет каналца; 2 — реснитчатый эпителиоцит; стрелки — реснички на апикальной поверхности эпителиоцитов каналца (по Н.В. Шевлягиной)

лучей с определенной длиной волны. По интенсивности поглощения света, которая зависит от концентрации вещества, производится количественное определение его содержания в клетке. Например, для оценки количества ДНК в ядре клетки используется фуксин (рис. 3.18). Гистологический препарат предварительно обрабатывается раствором соляной кислоты, после чего возможно количественное связывание молекул фуксина с ДНК. Далее следует количественная оценка оптической плотности ДНК-фуксина методами сканирования, много- или одноволновой цитоспектрофотометрии при длине световой волны 576 нм. Произведение оптической плотности ДНК-фуксина и площади (объема) ядра отражает величину содержания ДНК в ядре. Метод является относительным, и поэтому необходим стандарт плоидности ДНК, например гаплоидное ядро сперматозоида, диплоидное ядро малого лимфоцита и др. С помощью данного метода изучается полиплоидизация ядер клеток в гистогенезе и при регенерации.

Радиоавтография — важный информативный метод, позволяющий изучать распределение в клетках и тканях веществ, в состав которых искусственно введены радиоактивные изотопы (^3H , ^{14}C , ^{32}P и др.). Введенный в организм животного (или в среду культивирования клеток) изотоп включается в соответствующие структуры (например, меченый тимидин — в ядра клеток, синтезирующих ДНК). Метод основан на способности включенных в клетки изотопов восстанавливать бромистое серебро фотоэмульсии, которой покрывают срезы ткани или клетки.

Образующиеся после проявления фотоэмульсии зерна серебра (треки) служат своего рода автографами, по локализации которых судят о включении в клетку примененных веществ (рис. 3.19). Применение меченных тритием предшественников нуклеиновых кислот, белков (тимидина, уридина, глицина) позволило выяснить многие важные аспекты синтеза ДНК, РНК и клеточных белков. В настоящее время в экспериментальной гистологии метод практически не используется.

Гисто- и иммуноцитохимические методы. В их основе лежит применение химических реакций для выявления распределения химических веществ в структурах клеток, тканей и органов. Современные гистохимические методы позволяют обнаруживать аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, различные виды углеводов, липидов и др. Для выявления специфических белков используют иммуноцитохимические реакции (именно иммуноцитохимия заменила в экспериментальной биологии автордиографию). Для постановки иммуноцитохимической реакции необходимы специфические сыворотки, содержащие антитела (например, против белка микротрубочек — тубулина). Далее химическим путем соединяют эти антитела с флюорохромом (или другим маркером). Если меченые антитела нанести на гистологический срез, они вступают в соединение с соответствующими белками клетки (антигенами) и возникает специфическое свечение, видимое в люминесцентном микроскопе. Современные



Рис. 3.18. Обработка препарата по Фельгену для цитоспектрофотометрии ДНК-фуксина; микропрепарат, цитоплазма не окрашена (увеличение большое)



Рис. 3.19. Радиоавтография с использованием меченного по тритию тимидина: мазок изолированных щелочной диссоциацией кардиомиоцитов; над ядрами некоторых кардиомиоцитов обнаруживаются зерна восстановленного серебра — треки (стрелка), что означает синтез ДНК в ядре. Микропрепарат, окраска гематоксилином и эозином (увеличение большое)

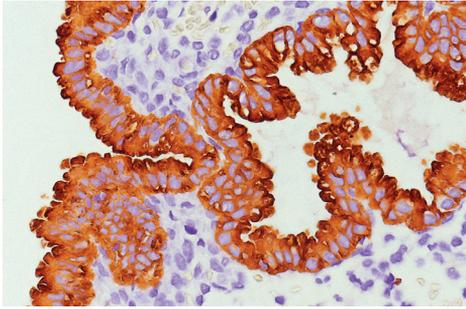


Рис. 3.20. Иммуноцитохимическая реакция на специфический цитокератин в эпителиоцитах матки; микропрепарат с докраской ядер гематоксилином (увеличение среднее)

иммуногисто- и цитохимические методы, помимо флюорохромов, используют другие, самые разнообразные специфические маркеры (пероксидаза хрена, коллоидное золото и др.), позволяющие качественно и количественно оценивать содержание в клетке исследуемых соединений (рис. 3.20).

Модификацией рассматриваемого метода является введение меченых антител в цитоплазму живых клеток с помощью микроманипуляторов.

Метод культуры клеток, тканей заключается в выращивании клеток и тканей вне организма в искусственных питательных средах (в условиях

in vitro). Для получения изолированных клеток производят предварительную обработку материала ферментами трипсином или коллагеназой. Метод позволяет изучать реакции клеток на различные воздействия, механизмы регуляции пролиферации, дифференцировки и гибели. Большое значение данный метод имеет для эмбриологических и цитофизиологических исследований, а также для трансплантации эмбриональных клеток при лечении врожденных и приобретенных дефектов обмена веществ.

Микроскопическая хирургия клетки — совокупность методических приемов, осуществляемых с помощью специального прибора — микроманипулятора. Этот прибор позволяет производить различного рода тончайшие операции на клетке (введение веществ, удаление или пересадка структурных компонентов клетки, нанесение уколов, разрезов и пр.) и нашел широкое применение в эмбриологии.

Цейтрафферная, или замедленная, микрокино- или видеосъемка — изучение живых клеток. Такой способ позволяет проследить за медленно протекающими изменениями клеток. Для реализации метода необходим инкубатор для поддержания клеток в живом состоянии и микроскоп с видеокамерой, объединенный с инкубатором.

Метод фракционирования (дифференциального центрифугирования) клеток. Его суть заключается в получении из клеток изолированных структурных компонентов. Основан на разных скоростях осаждения этих компонентов при вращении смеси компонентов клеток (гомогенатов) в ультрацентрифугах. Данный метод сыграл и играет очень важную роль в изучении химического состава и функциональных свойств субклеточных элементов — прежде всего, органелл.

Следует отметить, что здесь приведены лишь самые основные, необходимые для гистологического образования врачей всех профилей методы гистологического анализа. Существуют многие десятки других методов, с которыми можно ознакомиться в специальной гистологической и цитологической литературе.

3.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ЭМБРИОЛОГИИ

Существует множество методов исследования, среди которых выделяются следующие.

Наблюдение за живыми зародышами с применением кино- и видеосъемки (используется в эксперименте). Для этого применяется специальная микрофото-(видео-)установка, объединенная с термокамерой, в которой развивается зародыш. Например, при изучении развития куриного эмбриона в скорлупе проделывается окошечко, которое закрывается прозрачной пластинкой. Данный метод позволил проследить и уточнить динамику изменения формы и размеров зародышей в процессе развития.

Метод изучения фиксированных срезов зародышей с помощью световой и электронной микроскопии, гисторадиоавтографии, гисто- и иммуноцитохимии (см. выше). С применением этих методов была получена важная информация о клеточной и тканевой дифференцировке в развитии эмбрионов и плодов.

Метод маркировки, предложенный в 1925 г. В. Фогтом (1888–1941), позволяет изучать перемещения клеток в развивающемся зародыше. Для этого применяются нетоксичные для зародышей маркеры (например, нейтральный красный, частицы древесного угля), а также антитела к определенным белкам. При применении антител используется их свойство соединяться с флюоресцирующим красителем и белками зародыша. С помощью флюоресцентной микроскопии прослеживается распределение красителя и исследуется динамика белкового синтеза в развивающихся тканях зародыша.

Методы микрохирургии разрабатывались в начале XX в. представителями школы Г. Шпемана (1869–1941). Они включали: снятие оболочек яиц животных, пересадку частей одного зародыша другому и др. Данные методы используются также для изучения последствий разрушения (например, с помощью лазерного луча) частей зародыша или его отдельных клеток. Трансплантацию как разновидность микрохирургии используют для выявления путей миграции клеток и источников развития тканей. При этом пересаживают участок зародыша, например перепела, в тот же участок куриного зародыша на место удаленного участка. Ядра клеток перепела имеют характерную структуру и поэтому отличаются по распределению хроматина от такового в ядрах клеток зародыша курицы.

Эксплантация — иссечение небольшого участка зародыша и выращивание его на искусственной среде. С помощью этого метода можно получать информацию об источниках развития тканей из данного участка зародыша и выявлять гистогенетические закономерности развития.

Трансплантация ядер — метод, позволяющий клонировать зародышей. Например, пересадка ядер из клеток эпителия кишки головастика шпорцевой лягушки в икринку лягушки, ядро которой было инактивировано ультрафиолетовым лучом, привела к появлению новых особей (опыты Гердон). Данные опыты заложили основу клонирования высших позвоночных и способствовали появлению (в 1997 г.) знаменитой овцы Долли. Подобные эмбриологические эксперименты убедительно показали, что ядра соматических клеток

содержат полный набор генетической информации для развития нового организма.

Новейшим достижением экспериментальной эмбриологии явилась разработка *метода экстракорпорального оплодотворения*. Пересадка зародышей, зачатых в пробирке, в матку составляет основу лечения бесплодия. В 1973 г. Л. Шеттлз (США) извлек преовуляторную яйцеклетку из яичника бесплодной женщины и оплодотворил ее сперматозоидами мужа. Так было положено начало технике пересадки зародышей человека с целью лечения бесплодия. Однако только в 1978 г. в Великобритании в результате успешной пересадки в матку бесплодной женщины зародыша человека на стадии 8 бластомеров (после 2,5 сут культивирования) появился первый в мире «пробирочный» ребенок массой 2700 г.

Контрольные вопросы

1. Основные принципы изготовления гистологических препаратов для разных видов микроскопирования.
2. Структура клетки и метод микроскопии, позволяющий выявить эту структуру и изучить ее функциональную активность.
3. Методы изучения развития живого организма.