

611.018

С-568

СОВРЕМЕННЫЕ  
МЕТОДЫ И ТЕХНИКА  
МОРФОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ

МЕДГМЗ 1955

17

611.018  
С-568

# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И ТЕХНИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Под редакцией  
Чл.-корр. АМН СССР  
проф. Д. А. ЖДАНОВА



кр. к.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ  
МЕДГИЗ  
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ • 1955

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Советская морфология должна участвовать морфологическими методами в разработке актуальных проблем здравоохранения, направленных на профилактику и лечение важнейших заболеваний, укрепление здоровья и удлинение продолжительности жизни трудящихся нашей страны и содействовать дальнейшему развитию животноводства.

Новые задачи, стоящие перед советской морфологией, требуют развития новых методов и техники морфологических исследований.

Посвященный этому вопросу пленум правления Всесоюзного научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов, состоявшийся в июне 1953 г. в Ленинграде, показал, что наши анатомы, гистологи и эмбриологи владеют передовыми методами и новаторской техникой исследования.

Новые методы исследования, с успехом примененные в нормальной морфологии, должны распространиться и в смежные области науки: в первую очередь, в область патологической морфологии человека и животных и в практику клинической диагностики.

В настоящий сборник, в составлении которого приняли участие докладчики июньского пленума правления ВНОАГЭ 1953 г., имеющие наибольший опыт в развитии и применении новых методов и техники морфологического исследования в СССР, включены статьи, где дана краткая характеристика новых методов и техники морфологического исследования, подводятся критические итоги их применения в цитологии, гистологии и анатомии, указаны различные направления использования их в научной работе, предложены соображения о дальнейшем их усовершенствовании и развитии.

Статьи сопровождаются библиографией, которая должна помочь исследователю глубже познакомиться с интересующим его методом.

Сборник открывается статьями о новой советской оптической аппаратуре и о путях ее дальнейшего усовершенствования на основе творческого содружества советских физиков-оптиков и инженеров с морфологами. Показана плодотворность применения электронной микроскопии для динамического изучения периодических субмикроскопических структур.

Важнейшей для медицины задачей является морфологическая конкретизация биохимических процессов, происходящих в тканях, и выяснение того, как эти процессы приурочены к клеточным и неклеточным структурам живого вещества в осуществлении специфических функций, как распределяются в тканях ферментноактивные вещества и субстраты их действия. Эти вопросы освещены в статьях о новых методах гистохимического исследования, о методах ультрафиолетовой и люминесцентной микроскопии, создающих возможность микрхимического анализа на живых объектах, и о методе радиоавтографии, позволяющем определять локализацию радиоактивных веществ в тканях организма. Если учесть, что почти все элементы, участвующие в обмене веществ, в настоящее время можно получить в виде радиоактивных изотопов, становится ясным значение этого метода для исследования динамики различнейших клеточных и неклеточных структур тканей и органов.

Большой интерес для морфологов представляет усовершенствование и разработка новых методов изучения строения нервной системы. В ряде статей приведена техника прижизненной избирательной окраски нервных элементов метиленовой синью, новый метод импрегнации нервной ткани свинцовыми солями, а также методы гистохимического изучения нервных клеток и волокон.

Стереоморфологическое изучение конструкции органов является важнейшим условием правильного понимания взаимоотношений строения и функции органов в целостном организме в различных условиях существования. В одной из статей представлен критический обзор разработанных отечественными учеными макро- и микроскопических методов исследования конструкции органов. В сборнике показаны успехи советских анатомов в развитии рентгеновских методов исследования строения тела живого человека.

Советским морфологам в целях развития физической культуры и спорта и повышения производительности промышленного и сельскохозяйственного труда следует активнее, чем до сих пор, изучать движения тела человека. Этому должен помочь обзор методов исследования движений тела человека.

Хотя настоящий сборник и не может претендовать на исчерпывающую полноту, он показывает плодотворность инициативы советских морфологов, которые в содружестве с физиками, химиками и инженерами разрабатывают новые методы и технику морфологических исследований. Сборник должен помочь анатомам, гистологам и эмбриологам еще активнее разрабатывать новые методы и более совершенную и скоростную технику исследования на основе новейших успехов советской физики, химии и техники.

*Д. Жданов*

## НОВАЯ СОВЕТСКАЯ ОПТИЧЕСКАЯ АППАРАТУРА ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Н. Т. ШЕЛАЕВ*  
(Ленинград)

Цель настоящей статьи — ознакомить широкие круги анатомов, гистологов и эмбриологов с новейшей аппаратурой микроскопии, выпускаемой в настоящее время и намечаемой к выпуску в ближайшие годы оптико-механической промышленностью.

В послевоенные годы отечественная промышленность не только заменила устаревшую аппаратуру микроскопии более новой, отвечающей современным требованиям, но и значительно расширила ее номенклатуру. Были созданы многочисленные приборы, могущие обеспечить новые области исследования.

В настоящее время промышленностью выпускаются 15 типов различных микроскопов и установок — биологические (монокулярные и бинокулярные), стереоскопические, ультрафиолетовые, сравнительные, фотографические, микропроекторные и киносъёмочные микроскопы, работающие как в проходящем, так и в отраженном свете.

Для этих микроскопов выпускаются 17 типов принадлежностей в виде фотографических камер, различных осветительных систем, главным образом для освещения объектов в проходящем свете, различные окулярные насадки, облегчающие работу экспериментатора, специальные, в частности нагревательные, столики, которые значительно расширяют область применения микроскопов. Освоены производством 94 различных типа объективов и окуляров, в том числе: ахроматические объективы для тубусов 160 и 190 мм (27); апохроматические для тубуса 160 мм (10), планахроматические для тубуса 160 мм (5); зеркально-линзовые кварцевые (6); фотографические и проекционные (4); окуляры Гюйгенса, компенсационные, ортоскопические, фотографические, кварцевые (39) и гомали (3).

## I. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОСКОПЫ

### 1. Микроскоп МБИ-1 (рис. 1)

Микроскоп МБИ-1 является средней моделью биологического микроскопа и предназначается для исследования различных прозрачных объектов в проходящем свете в светлом

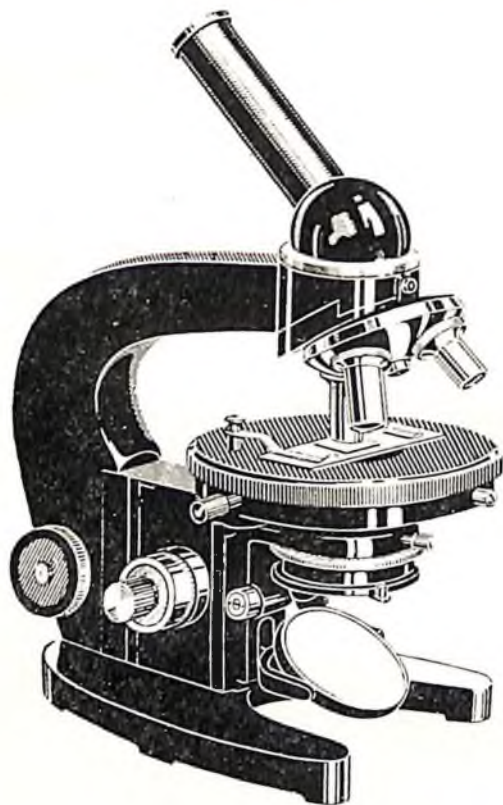


Рис. 1. Биологический микроскоп МБИ-1.

поле; при применении конденсора темного поля ОИ-13 возможно исследование объектов в темном поле.

Микроскоп имеет наклонный монокулярный тубус для визуального наблюдения, 4-гнездный объективный револьвер на салазках и низко расположенные барашки грубой и микрометрической подачи.

Предметный столик вращается с центрирующим устройством.

В качестве осветительной системы применен обычный съемный конденсор (апертура 1,2) с ирисовой диафрагмой

и оправой для светофильтров и вращающееся плоско-вогнутое зеркало.

Прилагаемый к микроскопу набор ахроматических объективов для тубуса 160 мм ( $8 \times 0,20$ ,  $40 \times 0,65$  и  $90 \times 1,25$ ) и окуляров Гюйгенса ( $7^x$ ,  $10^x$  и  $15^x$ ) обеспечивает увеличение от  $56^x$  до  $1350^x$ . К микроскопу прилагается прямой сменный тубус для фотографирования, который вставляется вместо монокулярного наклонного визуального тубуса для установки насадных микрофотонасадок типа МФН-1.

## 2. Микроскоп дорожный МБИ-4

Микроскоп МБИ-4 предназначен для исследований в области медицины, биологии, ботаники, зоологии и т. п. в дорожных (экспедиционных) условиях. По конструкции, оптическим свойствам и набору оптики он почти не отличается от микроскопа МБИ-1. Основное отличие заключается в измененной конструкции башмака и предметного столика, которые имеют меньшие размеры, обеспечивающие простую (без разборки) укладку микроскопа. Кроме того, столик микроскопа не вращается и не имеет механизма центрировки.

Для удобства переноски и транспортировки микроскоп и все принадлежности к нему укладываются в чемодан небольших размеров.

Вес в укладке (чемодане) 5 кг 715 г. Габариты чемодана (футляра)  $268 \times 225 \times 112$  мм.

## 3. Микроскоп исследовательский МБИ-2 (рис. 2)

Микроскоп МБИ-2 является моделью исследовательского биологического микроскопа и предназначается для научной работы в области медицины, биологии, бактериологии, ботаники и др.

Прилагаемый к микроскопу комплект апохроматических объективов для тубуса 160 мм ( $10 \times 0,30$ ,  $20 \times 0,65$ ,  $60 \times 1,0 \div 0,7$  и  $90 \times 1,30$ ) и окуляров компенсационных ( $5^x$ ,  $7^x$ ,  $10^x$ ,  $15^x$  и  $20^x$ ) дает возможность получать общее увеличение микроскопа от  $75^x$  до  $1350^x$ .

Микроскоп МБИ-2 снабжается специальным револьвером с тремя конденсорами: апланатическим с  $A = 1,4$ , темного поля и очковым и панкратической системой для плавного изменения апертуры апланатического конденсора в пределах от 0,16 до 1,4, которая устанавливается по апертуре применяемого объектива.

Таким образом, микроскоп МБИ-2 обеспечивает наблюдение и исследование объектов в проходящем свете в светлом и темном полях.

Кроме этого, микроскоп МБИ-2 отличается от других

моделей системой освещения. В нем осветительная система вмонтирована в основание — башмак микроскопа. Освещение осуществляется от специальной электрической лампочки 8 в 20 *вт*, питаемой от осветительной сети 127 или 220 в через понижающий трансформатор ТР-8 127—220/8 в. Оптическая система вместе с панкратикой и апланатическим конденсором

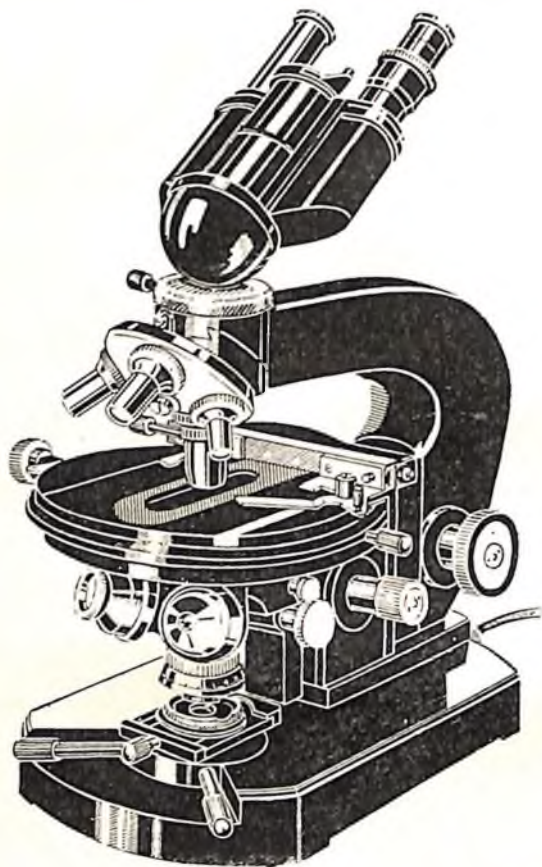


Рис. 2. Биологический исследовательский микроскоп МБИ-2.

рассчитана по принципу нормального освещения. Полевая диафрагма имеет центрирующее устройство, а апертурная — поперечное смещение и вращение для получения косо го освещения. Для визуального наблюдения микроскоп МБИ-2 снабжается наклонной бинокулярной насадкой типа АУ-12, имеющей собственное увеличение 1,5<sup>x</sup>, а для фотографирования — прямым сменным тубусом. Кроме того, микроскоп имеет 4-гнездный объективный револьвер на салазках и предметный столик с крестообразным перемещением и центрирующим устройством.



#### 4. Микроскоп исследовательский МБИ-3 (рис. 3)

Микроскоп МБИ-3 является моделью исследовательского биологического микроскопа и предназначается для изучения различных прозрачных объектов в проходящем свете в светлом поле в области медицины, биологии, бактериологии, ботаники и др. При применении конденсора темного поля ОИ-13 или ОИ-10 возможно исследование объектов в темном поле.

Прилагаемый к микроскопу комплект объективов апохроматов для тубуса 160 мм ( $10 \times 0,30$ ;  $20 \times 0,65$ ,  $60 \times 1,0 \div 0,7$  и  $90 \times 1,30$ ) и окуляров компенсационных ( $5^{\times}$ ,  $7^{\times}$ ,  $10^{\times}$ ,  $15^{\times}$  и  $20^{\times}$ ) дает возможность получать общее увеличение микроскопа от  $75^{\times}$  до  $1350^{\times}$ .

Микроскоп снабжен специальным сменным апланатическим конденсором ОИ-14 с апертурой 1,4 и 0,4 и вращающимся плосковогнутым зеркалом. Апертурная диафрагма конденсора может перемещаться на  $\pm 10$  мм от оси конденсора и вращаться вокруг нее, чем обеспечивается возможность наблюдения объектов в прямом и косом освещении.

Для визуального наблюдения микроскоп МБИ-3 снабжается наклонной бинокулярной насадкой, имеющей собственное увеличение  $1,5^{\times}$ , а для фотографирования — прямой насадкой с выдвигаемым тубусом.

Кроме того, микроскоп имеет 4-гнездный объективный револьвер на салазках, предметный столик с крестообразным перемещением и центрирующим устройством и низко расположенные барашки грубой и микрометричной подачи.

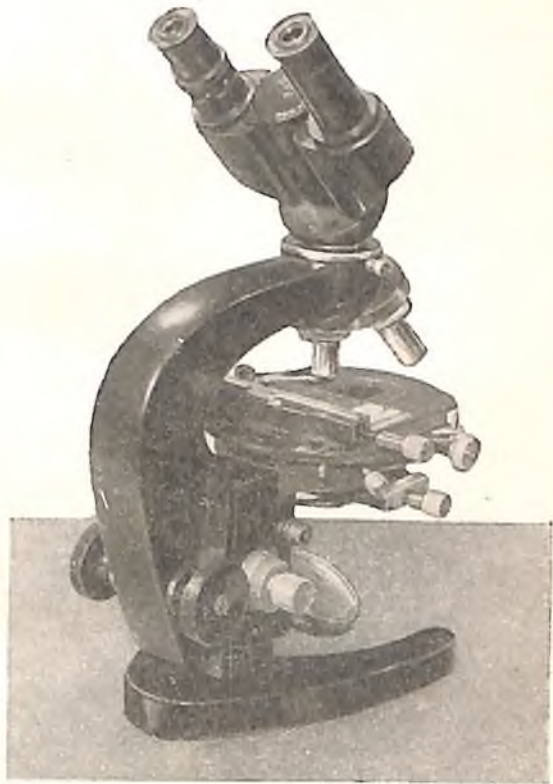


Рис. 3. Биологический исследовательский микроскоп МБИ-3.

Таким образом, микроскоп МБИ-3 равноценен по оптической характеристике микрооптики микроскопу МБИ-2, а по конструкции штатива — микроскопу МБИ-1.

#### 5. Микроскоп универсальный исследовательский МБИ-6 (рис. 4)

Микроскоп МБИ-6 является универсальным исследовательским микроскопом с постоянной фотокамерой. Он позволяет



Рис. 4. Универсальный исследовательский микроскоп МБИ-6.

производить визуальное исследование и фотографирование объектов в проходящем свете в светлом и темном полях и с фазовым контрастом, а также в отраженном свете в светлом и темном полях.

Оптика микроскопа позволяет иметь следующие увеличения.

В проходящем свете — при визуальном наблюдении от  $14\times$  до  $1800\times$ ; при фотографировании на пленочную камеру — от  $20\times$  до  $1510\times$  и при фотографировании на камеру  $9 \times 12$  см от  $35\times$  до  $2520\times$ . В отраженном свете — при визуальном наблюдении от  $36\times$  до  $1900\times$ ; при фотографировании на пленочную камеру — от  $51\times$  до  $1600\times$  и при фотографировании на камеру  $9 \times 12$  см — от  $90\times$  до  $2660\times$ .

К микроскопу прикладываются две сменные фотокамеры: пленочная типа „Киев“ с размерами кадра  $24 \times 36$  мм и пластиночная с размером снимка  $9 \times 12$  см. В процессе фотографирования на пленочную камеру можно производить одновременную наводку на резкость при наблюдении за объектом через визуальный тубус. Наводка на резкость при работе с камерой  $9 \times 12$  см производится по матовому стеклу.

В качестве источника света используется кинолампа К-30, 170 *вт*, 17 *в*, питаемая от сети переменного тока напряжения 127—220 *в* через трансформатор ТР-17.

Микроскоп установлен на удобном для работы столе, имеющем амортизационное устройство и ящики для укладки принадлежностей.

Кроме внешнего оформления, особенность конструкции этого микроскопа состоит в следующем.

1. Переход со светлого на темное поля осуществляется при помощи передвижения рамки с оптикой на осветителе отраженного света с одного крайнего положения на другое и открытием апертурной диафрагмы.

2. Головка микроскопа состоит из визуального бинокулярного и фотографического тубусов. Ход лучей в визуальном тубусе может быть прямым, когда исследуют объект только визуально (в этом случае свет полностью направлен в визуальный тубус.) При фотографировании на пленочную камеру лучи света в визуальный тубус попадут лишь после прохождения их через фотографический окуляр, разделительную кубическую призму и дополнительную оптическую систему, при этом в визуальный тубус света попадает только 10%, а остальные 90% — на пленку фотокамеры. Таким образом, при фотографировании на пленочную камеру возможно одновременно через визуальный тубус наводить изображение на резкость и производить наблюдение за объектом. Это особенно важно при фотографировании живых микроорганизмов.

При фотографировании на пластиночную фотокамеру  $9 \times 12$  см разделительная кубическая призма выводится из хода лучей и свет в этом случае полностью направляется на пластинку.

3. Осветительная система микроскопа рассчитана на применение четырех сменных конденсоров: апланатического АП-1,4 с панкратической системой, аналогичной применяемой на микроскопе МБИ-2 без револьверного устройства; конденсора

темного поля ОИ-13; комбинированного светло-темнопольного конденсора ОИ-10 апертура 0,7 с большим (до 10 мм) рабочим расстоянием и очкового конденсора. Эта конструкция осветительной системы позволяет исследовать объекты или в виде микроскопического среза, или в виде живых микроорганизмов, находящихся в подвешенной капле или в кюветах.

4. Конструкция крепления позволяет опускать предметный столик, помимо грубой подачи, еще до 100 мм при снятых конденсоре и наружных узлах осветительной системы. Таким образом, конструкция допускает устанавливать большие по высоте объекты при исследовании их в отраженном свете.

Помимо этого, конструкция допускает использование 4 типов предметных столиков: круглого с крестообразным перемещением объекта с центрирующим устройством, круглого скользящего для наблюдения и фотографирования быстродвигающихся микроорганизмов, круглого нагревательного столика ТС-2, поддерживающего постоянную температуру микроорганизма в пределах от комнатной до 70°, и большого прямоугольного столика для установки крупных объектов.

5. Для микроскопов изготавливается большой набор высококачественной микрооптики: объективы ахроматические и апохроматические как сухие, так и с масляной и водной иммерсией и объективы для фазового контраста. Кроме того, микроскоп снабжается планахроматическими объективами для проходящего света, применяемыми главным образом при фотографировании для получения резкого изображения снимка по всему полю зрения.

Микроскоп МБИ-6 выпущен промышленностью в опытной серии по заказу Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. К микроскопу разрабатывается специальный осветитель для наблюдения объектов в свете флуоресценции. Это приспособление значительно повысит эксплуатационные свойства микроскопа.

## 6. Микроскоп сравнения МС-51 (рис. 5)

Сравнительный метод исследования объектов не является новым. Им пользуются при обычных исследованиях, когда сравнивают фотографические снимки микрообъектов или исследуемый объект с уже известным на двух рядом расположенных микроскопах.

Микроскоп МС-51 является специальной моделью микроскопа для исследования методом сравнения двух объектов путем визуального наблюдения или фотографирования. Сравнимые объекты одновременно видны в поле зрения микроскопа.

Оптика его, состоящая из объективов-ахроматов  $3,7 \times 0,11$ ;  $9 \times 0,2$ ;  $40 \times 0,65$  и  $90 \times 1,25$  и специальных окуляров  $7\times$  и  $15\times$ ,

обеспечивает наблюдение прозрачных объектов в проходящем свете при увеличении от  $36\times$  до  $1800\times$ , непрозрачных объектов в отраженном свете при увеличениях от  $36\times$  до  $180\times$  и фотографирование их при увеличении в первом случае от  $14\times$  до  $720\times$  и во втором — от  $14\times$  до  $72\times$ .

Освещение непрозрачных объектов производится теми же осветителями ОИ-7, которые предназначены для освещения объекта в проходящем свете, но с дополнительными насадками.

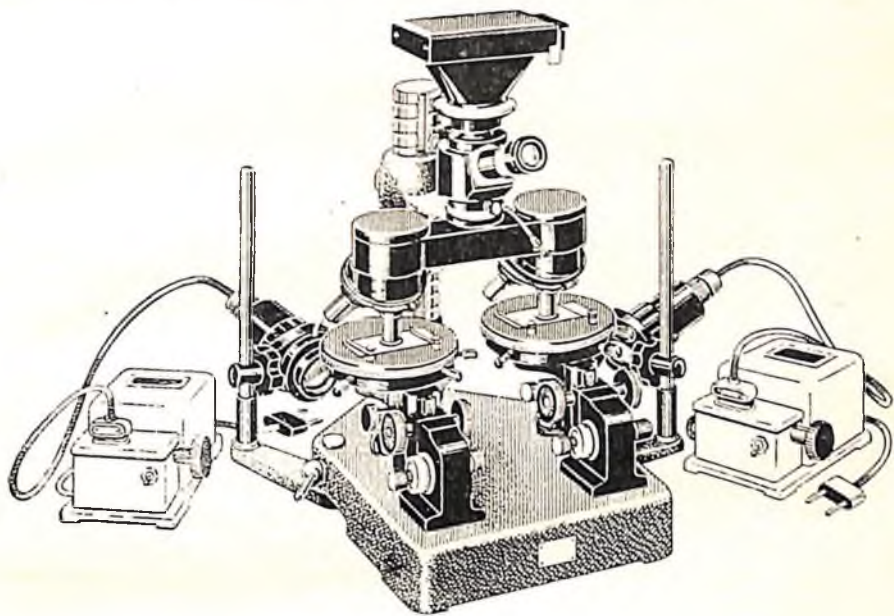


Рис. 5. Микроскоп сравнения МС-51.

Микроскоп МС-51 состоит из основания, на котором установлены два корпуса (правый и левый) с осветительными системами, механизмами грубого и микрометрического движений и двумя предметными столиками, тубусодержателем с тубусом, перемещающимся по вертикальной колонке, закрепленной на основании микроскопа. В нижней части тубуса закреплены два 4-гнездных револьвера для объективов.

Принцип работы микроскопа основан на сведении при помощи призм тубуса в поле зрения окуляра двух изображений от двух объективов. Изображение от одного объекта располагается на одной половине поля зрения окуляра, а изображение второго — на другой. Таким образом обеспечивается удобное одновременное наблюдение и сравнение двух объектов.

Освещение объектов при наблюдении как в проходящем, так и в отраженном свете осуществляется от двух освети-

тельных ламп мощностью 20 *вт*, питание которых производится от общей сети через два понижающих трансформатора ТР-8, 127--220/8 *в*. Для уравнивания степени освещенности объектов трансформаторы снабжены реостатами.

Для фотографирования микроскоп МС-51 снабжается микрофотонасадкой типа МФН-1 с фотокамерой и кассетами для стеклянных фотопластинок размером 6,5 × 9 см.

Наблюдение за объектом в процессе исследования и наведения изображения на резкость на пластинке при фотографировании производится через наблюдательную трубку микрофотонасадки.

## II. СТЕРЕОСКОПИЧЕСКИЕ МИКРОСКОПЫ

### 1. Микроскоп МБС-1

Микроскоп МБС-1 является моделью стереоскопического микроскопа, дающей прямое и объемное изображения рассматриваемого предмета как в проходящем, так и в отраженном свете.

Микроскоп предназначен главным образом для препаровальных работ, а также для исследования различных объемных предметов и живых организмов, причем работы могут вестись как при искусственном освещении, так и при естественном (дневном) свете.

Микроскоп МБС-1 обеспечивает наблюдение объектов при увеличениях от 3,5<sup>x</sup> до 119<sup>x</sup> в поле зрения, соответственно от 39 до 1,9 мм. Свободное расстояние микроскопа при всех увеличениях остается постоянным и равно 64 мм.

Микроскоп состоит из штатива в виде круглого плоского основания и колонки, на которой крепится кронштейн с оптической головкой. Оптическая головка может перемещаться в вертикальной плоскости при помощи кремальерного механизма для наводки на резкость и вращаться вместе с кронштейном на колонке.

Штатив своим основанием устанавливается на горшкообразную подставку, в которую вмонтирована осветительная система проходящего света, состоящая из конденсора, плоского зеркала и экрана.

Оптическая головка состоит из корпуса, на нижней части которого закреплена оправа с постоянным объективом, и барабана с четырьмя парами линз „галилеевской системы“, вращающегося внутри корпуса при помощи барашков. Постоянный объектив и „галилеевская система“ дают увеличение 0,6<sup>x</sup>, 1<sup>x</sup>, 2<sup>x</sup>, 4<sup>x</sup> и 7<sup>x</sup>.

На корпусе головки устанавливается бинокулярная насадка, на которую вставляются специальные парные широкоугольные окуляры 6<sup>x</sup>, 8<sup>x</sup>, 12,5<sup>x</sup> и 17<sup>x</sup>.

На оправе постоянного объектива шарнирно закреплен кронштейн с оправой коллектора осветителя отраженного света. Патрон лампочки вставляется либо в осветитель отраженного, либо проходящего света, вмонтированный в горшкообразную подставку. Лампочка осветителей мощностью 20 *вт* питается от трансформатора ТР-8, работающего от сети переменного тока 127—220/8 *в*.

Для обеспечения удобного положения рук исследователя при производстве препаровальных работ микроскоп снабжен двумя специальными подлокотниками.

## 2. Микроскоп МБС-2 (рис. 6)

Отличие микроскопа МБС-2 от микроскопа МБС-1 состоит только в конструкции штатива.

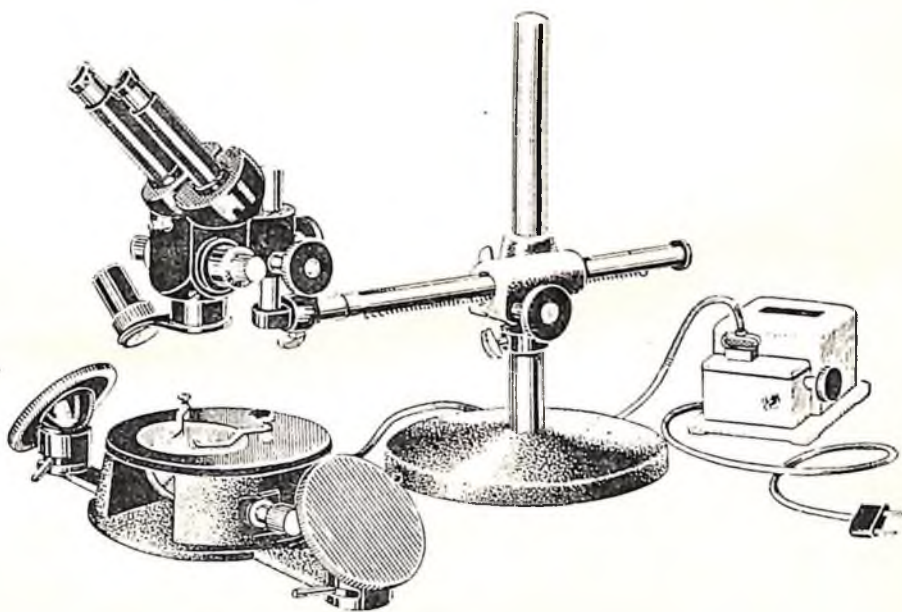


Рис. 6. Стереоскопический микроскоп МБС-2.

Оптическая головка его закреплена на универсальном штативе, который позволяет установить оптическую головку прибора в различное положение, удобное для наблюдателя при исследовании предметов разной формы.

Для удобства исследования при помощи кремальерного механизма можно плавно перемещать горизонтальную штангу вместе с установленной на ней оптической головкой.

### III. УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЕ МИКРОСКОПЫ

До последнего времени ультрафиолетовую микроскопию стремились использовать только для повышения разрешающей способности микроскопа, что возможно благодаря более короткой длине волны ультрафиолетовых лучей. В частности, фирмой Цейсс была создана сложная установка для фотографирования в ультрафиолетовых лучах при помощи специальных объективов кварцевых монохроматов, которые были рассчитаны для волны определенной длины.

По другому пути пошли наши советские ученые и инженеры. Доктор технических наук Е. М. Брумберг предложил метод «цветной трансформации», при помощи которого значительно расширились возможности исследования объектов в ультрафиолетовых лучах. Новый метод позволяет не только повысить разрешающую способность микроскопа, но и вести качественный микрохимический анализ. Были созданы специальные зеркально-линзовые объективы, скорректированные для широкой области спектра.

На базе этого метода были разработаны универсальный исследовательский ультрафиолетовый микроскоп МУФ-1, ультрафиолетовый микроскоп МУФ-2 и упрощенный ультрафиолетовый микроскоп МУФ-3. Микроскоп МУФ-1 был снят с производства в 1951 г. после выпуска более упрощенного микроскопа МУФ-2, который до настоящего времени вместе с зеркально-линзовыми объективами находится на серийном производстве. Микроскоп МУФ-3 ставится в 1955 г. в производстве.

#### 1. Ультрафиолетовый микроскоп МУФ-2 (рис. 7, 8)

Микроскоп МУФ-2 является моделью ультрафиолетового микроскопа, предназначенного для исследования различных прозрачных и непрозрачных микрообъектов в ультрафиолетовых лучах в области длин волн от 400 до 250 м $\mu$ , а также в видимом свете.

Кроме того, он может быть использован и в качестве люминесцентного микроскопа для препаратов, люминесцирующих при возбуждении их ультрафиолетовыми лучами в проходящем и отраженном свете.

Микроскоп МУФ-2 позволяет производить исследования биологических, бактериологических и других неконтрастных препаратов, не подвергая их окрашиванию и действию реактивов, что особенно важно при наблюдении живых организмов.

Он снабжен кварцевыми зеркально-линзовыми объективами  $10 \times 0,10$ ;  $40 \times 0,50$ ;  $65 \times 0,80$ ,  $F2,5A0,80$ ;  $F4A0,50$  для наблюдения и фотографирования препаратов в ультрафиолетовых лучах, объективами-ахроматами  $10 \times 0,30$  и  $90 \times 1,25$  для исследова-



дования в видимом проходящем свете, а также набором окуляров как для визуального наблюдения —  $4\times$ ,  $7\times$ ,  $10\times$  и  $15\times$ , так и для фотографирования —  $8\times$ .

Увеличения микроскопа:

1) при фотографировании в проходящих ультрафиолетовых лучах — от  $60\times$  до  $48\times$ , в отраженных ультрафиолетовых лучах — от  $60\times$  до  $460\times$ ;

2) при фотографировании в видимом проходящем свете — от  $70\times$  до  $1350\times$ ;

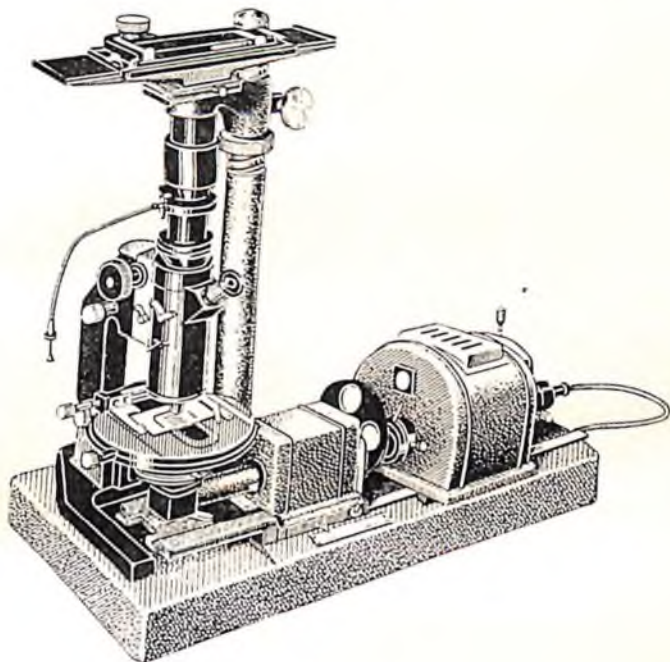
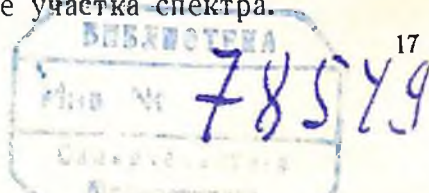


Рис. 7. Ультрафиолетовый микроскоп МУФ-2.

3) при наблюдении на люминесцирующем экране: в проходящих ультрафиолетовых лучах — от  $190\times$  до  $865\times$ , в отраженных ультрафиолетовых лучах — от  $295\times$  до  $827\times$ .

Особенности ультрафиолетового микроскопа по отношению к обычному биологическому заключаются в следующем:

а) вместо обычной лампочки накаливания в качестве источника ультрафиолетовых лучей применяются ртутные кварцевые лампочки слабого, высокого и сверхвысокого давления. Лампочка ПРК-4, наполненная парами ртути под небольшим давлением, способна интенсивно излучать лучи длиной волны от 250 до 300 м $\mu$  ультрафиолетового спектра и очень слабо — с большой длиной волны того же участка спектра.



Лампочка СВДШ-250-3, наполненная парами ртути под сверхвысоким давлением, способна излучать очень интенсивно лучи длинноволнового участка ультрафиолетового спектра 300—400  $\mu$  и едва заметно в короткой его части.

Новая лампочка типа СВД-120А высокого давления довольно активно излучает лучи широкого участка ультрафиолетового спектра от 250 до 400  $\mu$ . Она рекомендуется для применения во всех ультрафиолетовых микроскопах;

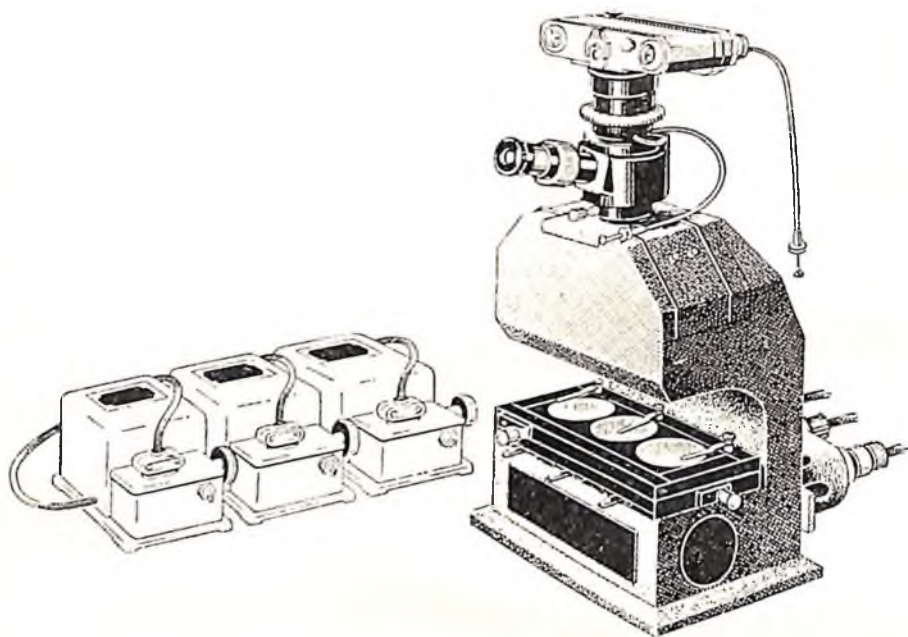


Рис. 8. Хромоскоп МУФ-2х.

б) вместо обычной стеклянной оптики, которая не пропускает лучи среднего и коротковолнового участков ультрафиолетового спектра, используются кварцевая и флуоритовая оптики или оптика, изготовленная из фтористого лития. По этой же причине в микрообъективах, работающих в ультрафиолетовой области спектра, широко применяются зеркальные сферические отражатели вместо обычных линзовых систем;

в) для выделения узкой линии ультрафиолетового спектра применяются специальные фильтры, либо изготовленные из специального стекла, или жидкостные, или газонаполненные обычно бромом и хлором кварцевые кюветы;

г) препараты, облучаемые ультрафиолетовыми лучами, остаются невидимыми при наблюдении их через кварцевую оптику (кроме собственной люминесценции препарата). Сетчатка глаза не воспринимает волновые колебания лучей в

области средней и короткой части ультрафиолетового спектра. Более того, действие этих лучей вредно отражается на органе зрения, особенно губительно действие концентрированных лучей, исходящих из окуляра (в зрачке выхода).

Для того, чтобы невидимое изображение сделать видимым, на ультрафиолетовом микроскопе имеется специальное визуальное устройство, так называемый „люминесцентный преобразователь“.

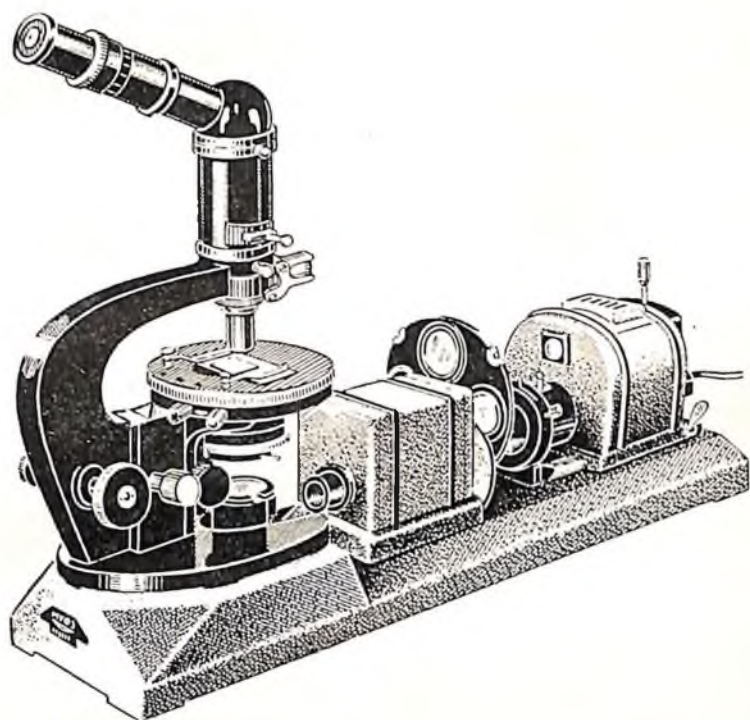


Рис. 9. Упрощенный ультрафиолетовый микроскоп МУФ-3.

Он состоит из специальных выключающихся оптической кварцево-флуоритной системы, флуоресцирующего экрана и обычного микроскопа из стеклянной оптики, которая концентрирует изображение объекта на флуоресцирующем экране, и это изображение в виде флуоресценции на экране рассматривается обычным микроскопом. Люминесцентный преобразователь помещается в тубусе микроскопа. Это — визуальный способ „цветной трансформации“.

Фотографический способ заключается в следующем. Над тубусом микроскопа установлена особая трехпольная фотографическая камера с пластинкой  $6,5 \times 18$  см. На ней производят последовательно трехкратное фотографирование

одного и того же места препарата на 3 участках ультрафиолетового спектра (например, 360, 313 и 280—250 м $\mu$ ). Этот негатив переснимают контактным способом еще раз на пластинку 6,5  $\times$  18 см, которую уже с позитивным серым изображением объекта устанавливают на предметный столик хромоскопа МУФ-2\* (рис. 8).

Под столик хромоскопа под каждым снимком вставляют светофильтры (красный, синий и зеленый), например, под снимок 360 м $\mu$  устанавливают красный светофильтр, под снимок 313 — синий и под снимок 280—250 — зеленый (такая установка является условной, допускается и другая комбинация).

Три изображения позитивного снимка сводят в одно цветное изображение в поле зрения хромоскопа, которое затем либо рассматривается визуально, либо фотографируется на цветную пленку фотокамеры обычным способом.

## 2. Ультрафиолетовый микроскоп упрощенный МУФ-3:

(рис. 9)

Микроскоп МУФ-3 отличается от микроскопа МУФ-2 отсутствием устройств для фотографирования. Наблюдение объектов производится только визуально в проходящих ультрафиолетовых лучах на флуоресцирующих экранах и в видимом свете.

Микроскоп МУФ-3 находится в опытном производстве по заказу Московского государственного университета.

## IV. ФОТОКИНОПРОЕКЦИОННЫЕ УСТАНОВКИ

### 1. Универсальная фотографическая установка ФМН-2

(рис. 10 а, б, в)

Прибор ФМН-2 является универсальной установкой для фотографирования макрообъектов репродукционных работ и фотографирования микрообъектов под микроскопом.

Прилагаемый к установке набор фотообъективов микропланаров с фокусами 40, 65 и 100 мм и корректор с фокусом 150 мм обеспечивают вместе с растяжением меха фотокамеры 9  $\times$  12 см получение снимков макрообъектов в масштабе от 0,5\* до 20\*.

Масштаб снимка микрообъектов обеспечивается микрооптикой используемого микроскопа.

Установка дает возможность производить следующие фотографические работы.

а. Фотографирование макрообъектов в проходящем свете. Прозрачные макрообъекты, установленные на малом или большом макростолике, освещаются сосредоточенным светом электролампы накаливания 170 *вт* 17 *в*

основного осветителя. Мощный световой поток направляется и концентрируется на объект оптической системой, вмонтированной в основание установки, на которой закрепляются съемные макростолы. Степень освещенности и контрастность изображения на матовой пластинке зеркальной насадки регулируются накалом лампочки при помощи автотрансформатора ТР-17, а также закрытием апертурной диафрагмы. Вели-

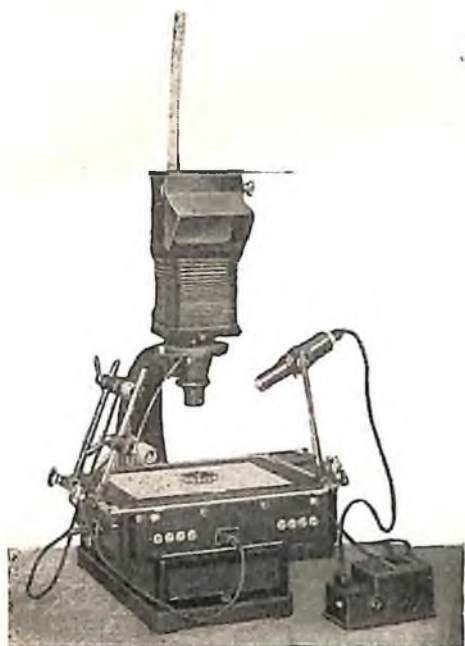


Рис. 10 а. Универсальная фотографическая установка ФМН-2 (фотографирование макрообъектов при софитном освещении).

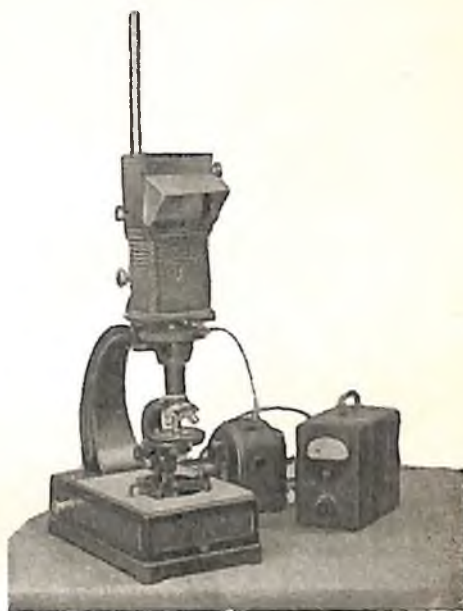


Рис. 10 б. Универсальная фотографическая установка ФМН-2 (фотографирование микрообъектов в проходящем свете под микроскопом).

чина освещенного кружка на объекте регулируется перемещением линз макростолыка и открытием полевой диафрагмы основного осветителя. Наводка на резкость производится путем перемещения макростолыка и фотообъектива по вертикали.

б. Фотографирование макрообъектов при софитном освещении (рис. 10 а). Софитный стол размером  $18 \times 24$  см устанавливается на основании, с которого предварительно снимают макростолык.

На боковых штангах стола шарнирно закрепляются от одной до четырех софитных лампочек мощностью 50 в с рефлекторами и один или два осветителя направленного света от ламп 20 вт. Эти осветители служат для боковой подсветки объекта, для получения более резкого его изображения.

киносъемке — от  $5,5\times$  до  $900\times$ , при фотографировании на пленку  $24 \times 36$  мм — от  $9\times$  до  $900\times$ .

2) в отраженном свете в светлом и темном полях с увеличениями при визуальном наблюдении — от  $45\times$  до  $3,800\times$ , при

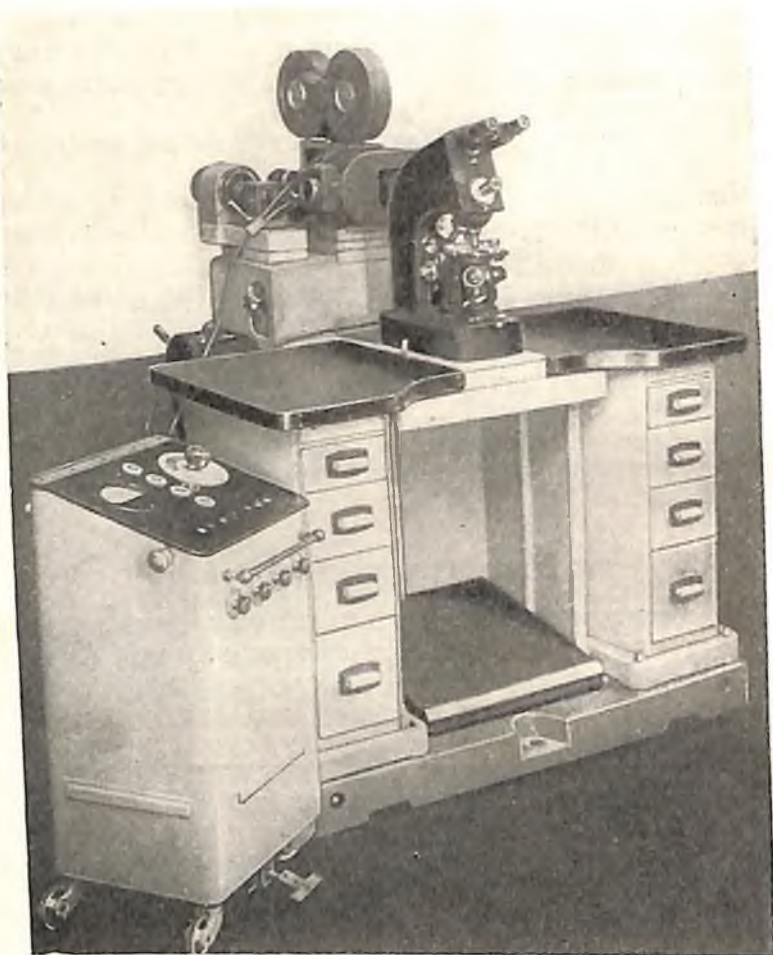


Рис. 11. Микрокиноустановка МКУ-1 (вид спереди).

фотографировании на пленку  $24 \times 36$  мм — от  $22,5\times$  до  $950\times$ , при киносъемке — от  $35\times$  до  $950\times$ .

Для плавного изменения увеличения микроскоп снабжен панкратическим окуляром с переменным увеличением от  $0,66\times$  до  $2,67\times$ . В процессе кино- и фотосъемки можно вести одновременное наблюдение за объектом и производить наводку на резкость изображения на пленке фото- и кинокамеры через наблюдательный тубус.

Для исследования и киносъемки быстропротекающих процессов (движение крови в сосудах, движение простейших организмов в среде и т. п.) привод кинокамеры (механизм времени контактного типа) позволяет производить непрерывную съемку со скоростями от 1 кадра в 3 секунды до 75 кадров в секунду.

Киносъемка медленно протекающих процессов (прорастание семян, деление клеток и т. п.) производится методом покадровой съемки через интервал от  $2\frac{1}{2}$  секунд до 3 часов 20 минут один кадр.

Экспозиция при непрерывной киносъемке меняется от  $\frac{1}{2600}$  до 1,4 секунды в зависимости от скорости съемки и открытия obturатора. Экспозиция при покадровой съемке меняется от  $\frac{1}{28}$  до 1,4 секунды в зависимости от скорости вращения и открытия obturатора.

Кинокамера типа КСМ-2 имеет лупу для наблюдений за композицией кадра. Размер кадра  $22 \times 18$  мм. Камера снабжена двумя грейферами для нормальной съемки до 30 и быстроходной — для съемки до 70 кадров в секунду. На перфорацию пленки проектируется циферблат часов.

Фотокамера, установленная на микроскопе, — пленочная типа „Киев“ с размером кадра  $24 \times 36$  мм.

В качестве источников света используются электролампа накаливания 17 в 170 вт и ртутная лампа СВДШ-250-3.

В осветительной системе поставлена заслонка, преграждающая ход световому пучку и работающая синхронно с кинокамерой.

Микроскоп и кинокамера помещены на отдельных литых основаниях, которые закреплены на общей чугунной плите, устанавливаемой на специальный фундамент. На этой плите находятся два боковых стола, имеющие ящики для укладки принадлежностей. Плита при монтаже заделывается в специальный фундамент или массивный пол, которые не подвержены внешним сотрясениям.

Передвижной пульт позволяет осуществлять управление установкой с любого удобного для оператора места.

Установка МКУ-1 снабжается большим набором микрооптики для проходящего и отраженного света с масляной и водной иммерсией, для светлого и темного полей и для фазового контраста.

Микрокиноустановка спроектирована и изготовлена по специальному заказу Московского государственного университета.

### 3. Микропроекционная установка МПР-1 (рис. 12)

Микропроекционная установка МПР-1 является передвижным микропроектором и предназначена для демонстрации на экране микропрепаратов и макродиапозитивов в лекционных залах и аудиториях.

Набор оптики, постоянно вмонтированный в револьверном устройстве установки, обеспечивает возможность получения 9 ступеней увеличения в пределах от  $39\times$  до  $3900\times$  на экране размером 1750 мм, расположенном на расстоянии 3,5 м от вертикальной оси окуляра.

В установках вся основная микрооптика и осветительные линзы постоянно вмонтированы на дисках револьверного устройства. Это сделано с целью быстрого перехода с одного увеличения на другое, причем с подключением объектива синхронно

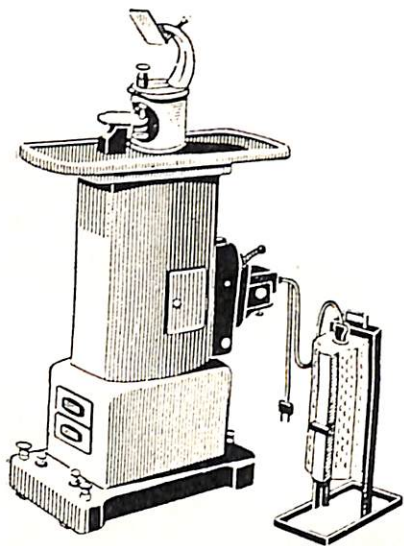


Рис. 12. Микропроекционная установка МПР-1.

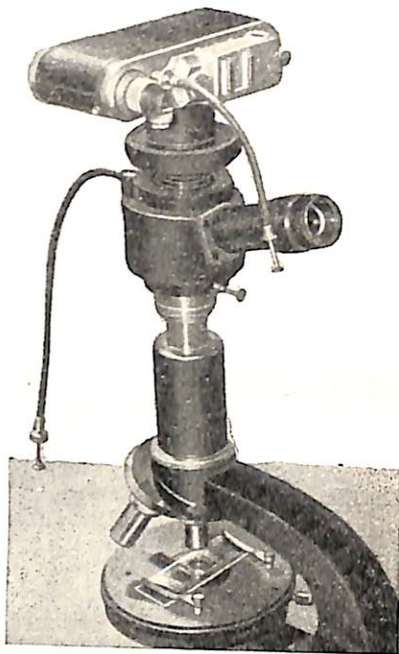


Рис. 13. Микрофотонасадка МФН-1 с камерой МФК-3.

с ним подключается и соответствующая ему осветительная система.

В верхнем диске револьверного устройства вмонтировано шесть объективов, из которых четыре являются микрообъективами-планахроматами ( $3,5 \times 0,10$ ;  $9 \times 0,20$ ;  $20 \times 0,40$  и  $40 \times 0,65$ ), работающими вместе с тремя сменными проекционными окулярами на длине тубуса 160 мм, и два проекционных объектива с фокусами 40 и 92 мм.

Микрообъекты и диапозитивы макрообъектов освещаются дуговой лампой, работающей на переменном и постоянном токе.

Установка состоит из основания с плитой, на которой помещены ролики для передвижения установки, кожуха со столом и микроскопа с проекционным зеркалом. В кожухе на основании установлена оптическая скамья с осветительной системой и с фонарем дуговой лампы, который вынесен наружу.



Микроскоп, кроме 2 дисков револьверного устройства, имеет вращающийся 4-местный предметный столик с крестообразным перемещением и микрометрическим движением по вертикали на 1,8 мм.

Установка разрабатывалась и изготавливалась по заказу Московского государственного университета.

## V. ПРИНАДЛЕЖНОСТИ К МИКРОСКОПАМ

Промышленностью освоено производство 14 принадлежностей к биологическим микроскопам, большинство которых уже в достаточной степени известно широкому кругу потребителей.

К таким принадлежностям относятся следующие.

Рисовальный аппарат РА-4, несколько модернизированный аппарат РА-1 довоенного выпуска.

Осветители для микроскопирования ОИ-7 и несколько улучшенный ОИ-9.

Осветитель для наблюдения объектов в отраженном свете ОИ-1.

Конденсор темного поля ОИ-13 с апертурой 1,2, который заменил устаревший конденсор ОИ-2 с апертурой 1,0.

Конденсор ОИ-14 светлого поля с устройством для косоого освещения препаратов, который вставляется в микроскопы типа М-9, МБИ-1 и МБИ-3 на место обычного конденсора.

Демонстрационная окулярная насадка АУ-14 для одновременного наблюдения за объектом двумя экспериментаторами.

Ниже приводим краткое описание принадлежностей, которые недостаточно известны широкому кругу потребителей и которые недавно начали выпускаться промышленностью.

Фотографические камеры (рис. 13). Фотографическая насадка МФН-1 с камерами МФК-1, МФК-2 и МФК-3.

Микрофотонасадка применяется к микроскопам различных типов (МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3 и др.) и служит для фотографирования наблюдаемых в микроскоп объектов. По своему конструктивному оформлению микрофотонасадка является универсальной и приспособленной для работы на всех штативах микроскопов, имеющих наружный диаметр окулярной трубки 25 мм.

Микрофотонасадка состоит из двух основных частей: а) собственно микрофотонасадки МФН-1 и б) микрофотокамеры МФК-1 с размером снимка  $6,5 \times 9$  см, или МФК-2 с размером снимка  $9 \times 12$  см, или МФК-3 — пленочной — с размером кадра  $24 \times 36$  мм.

Собственно микрофотонасадка МФН-1 состоит из корпуса с откидывающейся призмой, фотозатвора со спусковым тросиком, визуальной трубки для наблюдения с диоптрийным

механизмом для установки окуляра на резкость сетки трубки в пределах  $\pm 5$  диоптрий, фланца для крепления съемной фотокамеры и зажимного устройства для крепления насадки на тубусе микроскопа.

Положение плоскости изображения объекта на сетке визуальной трубки согласовано с плоскостью изображения объекта на фотопластинке, поэтому наводка на резкость изображения объекта на фотопластинке производится через визуальную трубку.

Микрофотокамеры МФК-1 и МФК-2 имеют защелки для крепления металлических накладных кассет размером соответственно  $6,5 \times 9$  и  $9 \times 12$  см с резьбовой гайкой для крепления камеры на фотонасадке.

Микрофотокамера МФК-3 представляет собой несколько измененный фотоаппарат „Зоркий-3“ и имеет а) экспозиции моментальные от  $\frac{1}{25}$  до  $\frac{1}{1000}$  секунды, б) экспозиции продолжительные от 1 до  $\frac{1}{25}$  секунды, в) длительные выдержки В и Д.

Камера работает на нормальной киноплёнке. Размер кадра  $24 \times 36$  мм. Кассета позволяет получать до 36 снимков при непрерывном фотографировании.

Фазово-контрастное устройство КФ-1 (рис. 14). Принадлежности фазового контраста КФ-1 представляют собой набор из специальных объективов, конденсора и вспомогательного микроскопа и предназначены для работы с биологическими микроскопами МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4, М-9 и М-10; они служат для исследования мало-контрастных объектов, невидимых в микроскопе при обычных условиях наблюдения.

Основной частью принадлежностей фазового контраста являются специальные ахроматические фазовые микрообъективы, обеспечивающие возможность совместно с кольцевыми диафрагмами, установленными в револьверном диске перед конденсатором, наблюдения методом фазовых контрастов.

Фазовые объективы, как и обычные, рассчитаны для тубуса длиной 160 мм и для работы с покровными стеклами толщиной 0,17 мм. В отличие от обычных они имеют на одной из внутренних поверхностей линз так называемое фазовое кольцо определенных размеров. На колпачке таких объективов, помимо обычной гравировки, выгравирована еще буква „Ф“.

Фазовые объективы употребляются совместно с обычными окулярами Гюйгенса (или компенсационными) и позволяют получать общее увеличение до 1350 раз.

При выключенных кольцевых диафрагмах конденсора фазовые объективы могут быть использованы, как обычные.

Состав принадлежностей: 1) набор фазовых ахроматических микрообъективов:  $10 \times 0,30$ ;  $20 \times 0,40$ ;  $40 \times 0,65$  и  $90 \times 1,25$  (масляная иммерсия); 2) фазовый конденсор (А — 1,2) с дисковым револьвером с кольцевыми диафрагмами, механизмом для центрировки и ирисовой диафрагмой (вставляется вместо

обычного конденсора); 3) вспомогательный микроскоп для центрировки кольцевых диафрагм (на время центрировки вставляется вместо окуляра).

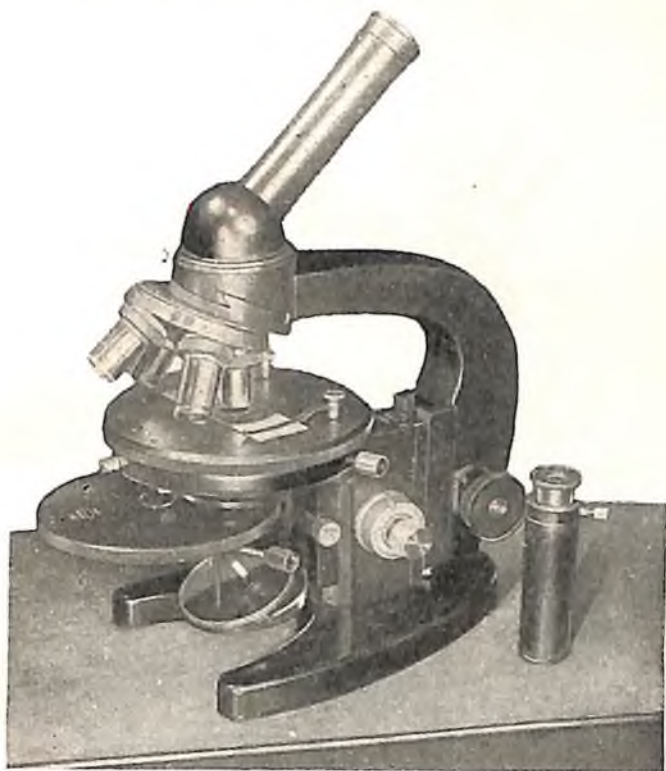


Рис. 14. Фазовоконтрастное устройство КФ-1 на микроскопе МБИ-1.



Рис. 15. Конденсоры.

*а* — темного поля ОИ-13; *б* — светлого и темного полей ОИ-10; *в* — прямого и косого освещения ОИ-14.

Конденсор светлого и темного полей ОИ-10 (рис. 15). Конденсор светлого и темного полей благодаря наличию большого свободного расстояния (до 10 мм) дает возможность вести наблюдения и препаровальные работы над

живыми организмами, находящимися в увлажнительной камере, и предназначается для получения светлого или темного поля при освещении объектов проходящим светом. Он вставляется в гильзу осветительного столика микроскопа на место обычного конденсора. Темное поле применяется в тех случаях,

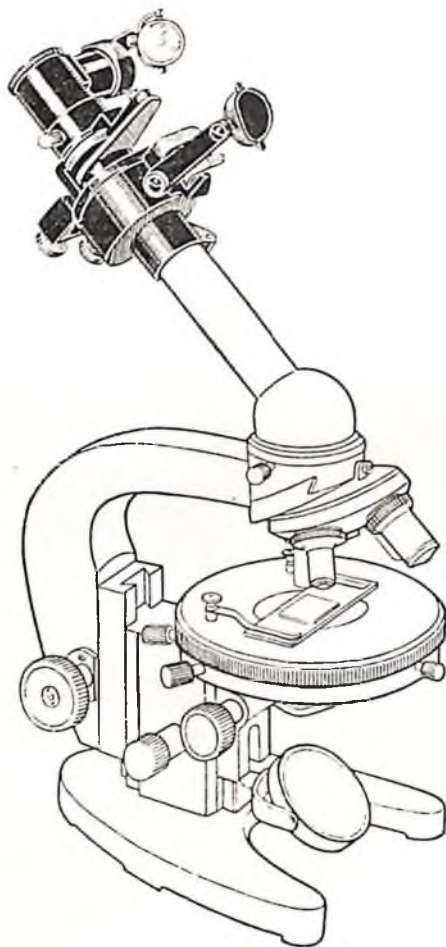


Рис. 16. Спектральная насадка АУ-16.

когда объекты из-за их малой контрастности не могут быть обнаружены при освещении их в светлом поле.

Апертура конденсора светлого поля — 0,6; темного поля — 0,7; свободное расстояние составляет до 10 мм.

Спектральная насадка АУ-16 (рис. 16). Спектральная окулярная насадка предназначается для качественного исследования спектров люминесценции, излучаемых отдель-

ными структурами объектов и спектров поглощения различных участков препарата в области длин волн от 0,4 до 0,75  $\mu$ .

Спектральная окулярная насадка устанавливается на окулярную трубу тубуса микроскопа. Определение границ областей испускания, поглощения и пропускания исследуемых объектов может производиться либо непосредственно по шкале длин волн, либо методом сравнения при одновременном наблюдении спектров двух веществ.

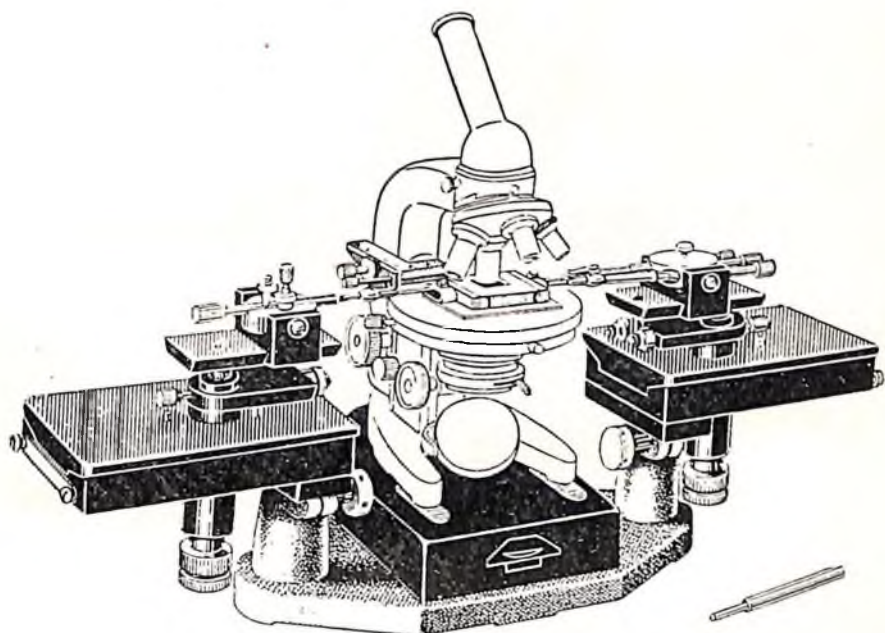


Рис. 17. Микроманипулятор ММ-1.

При отведенной в сторону спектральной части насадка может быть использована как обыкновенный компенсационный  $7\times$  окуляр.

Микроманипулятор ММ-1 (рис. 17). Микроманипулятор ММ-1 предназначен для различных препаровочных работ под микроскопом. Он позволяет с помощью специальных инструментов производить под увеличением изъятие вещества из объекта, прокол, расщепление, срез и другие операции.

Микроманипулятор приспособлен для работы с микроскопами М-9, МБИ-1, МБИ-3 и им подобными. Рабочий инструмент, кроме установочных положений, имеет следующие перемещения:

1) в продольном направлении с качанием в поперечном направлении; 2) вертикальные — грубую на 1,16 мм и точную — на 0,15 мм за один оборот барашка; 3) сведение и разведение игл двойного иглодержателя в горизонтальной плоскости.

В состав комплекта входит специальный конденсор ОИ-10. Нагревательный столик ТС-2 (рис. 18). Столик ТС-2 применяется при исследовании живых объектов, требующих

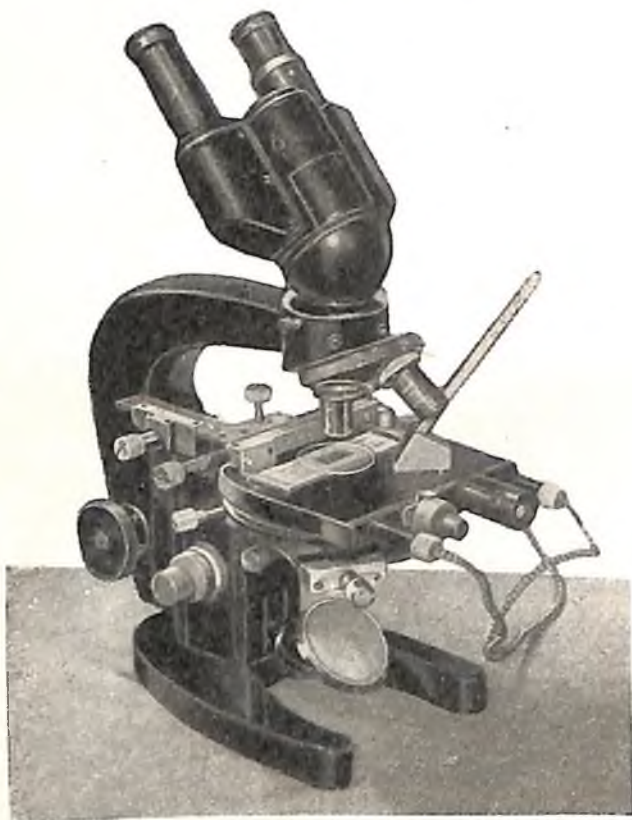


Рис. 18. Нагревательный столик ТС-2 на микроскопе МБИ-3.

поддержания определенной температуры в пределах от комнатной до  $+70^{\circ}$ . Он устанавливается вместо обычного крестообразного предметного столика КС-1 (съёмной части) и не требует никаких дополнительных перестроек при замене. Электрический нагревательный элемент столика питается от сети постоянного и переменного тока напряжением 100—127 в.

Постоянство температуры на поверхности столика поддерживается в пределах  $1^{\circ}$  и осуществляется автоматическим замыканием и размыканием нагревательного элемента от сети электрического тока при помощи биметаллической пружины, которая одновременно служит и регулятором температуры.

МИКРООПТИКА

Объективы микроскопа по оптической конструкции и характеру исправления aberrаций разделяются на группы: а) ахроматы, б) планахроматы, в) апохроматы, г) зеркально-линзовые, д) специальные.

У объективов-ахроматов для широкого пучка лучей исправлена сферическая aberrация и выполнено условие синусов. Хроматическая aberrация устранена только для двух цветов: красного  $c$  (длина волны  $\lambda = 656,3 \text{ м}\mu$ ) и синего  $F$  (длина волны  $\lambda = 486 \text{ м}\mu$ ), поэтому изображение имеет некоторую окраску.

У апохроматов же хроматическая aberrация исправлена для многих цветов, и они дают почти бесцветное изображение. Как ахроматы, так и апохроматы имеют значительную кривизну поля, вследствие чего при резком изображении в центре края остаются размытыми.

У планахроматов хорошо исправлена кривизна, и они дают отчетливое изображение по всему полю.

У зеркально-линзовых объективов aberrации исправлены как для видимой, так и для ультрафиолетовой областей спектра в пределах длин волн от 225 до 700  $\text{м}\mu$ . Они дают бесцветное изображение, но по резкости уступают линзовым апохроматам.

**Объективы-ахроматы для наблюдения и фотографирования препаратов в проходящем видимом свете**  
(длина тубуса 160 мм, толщина покровного стекла 0,17 мм)

№ п/п.	Шифр	Система	Увеличение	Апертура	Рабочее расстояние в мм
1	ОМ-30	Сухой	1 <sup>x</sup>	0,03	32,02
2	ОС-37	"	1,5 <sup>x</sup>	0,05	74,6
3	ОМ-12	"	3,7 <sup>x</sup>	0,11	27,7
4	ОМ-32	Масляная иммерсия	90 <sup>x</sup>	1,25	0,36
5	ОМ-22	Водная иммерсия	6 <sup>x</sup>	0,11	35,0
6	М-42 <sup>1</sup>	Сухой	8 <sup>x</sup>	0,20	9,19
7	ОМ- 5	"	10 <sup>x</sup>	0,30	7,77
8	ОМ-27 <sup>1</sup>	"	20 <sup>x</sup>	0,40	1,8
9	МШ	"	40 <sup>x</sup>	0,65	0,77
10	ОМ-14 <sup>1</sup>	"	60 <sup>x</sup>	0,85	0,41
11	ОМ-23	Водная иммерсия	40 <sup>x</sup>	0,75	2,11
12	М-101 <sup>1</sup>	Масляная иммерсия	90 <sup>x</sup>	1,25	0,32
13	ОМ-24 <sup>3</sup>	"	90 <sup>x</sup>	1,25—0,6	0,32
14	Ф-ОМ-5 <sup>2</sup>	Сухой	10 <sup>x</sup>	0,30	7,77
15	Ф-ОМ-27 <sup>2</sup>	"	20 <sup>x</sup>	0,40	1,80
16	Ф-МШ <sup>2</sup>	"	40 <sup>x</sup>	0,65	0,77
17	Ф-М-101 <sup>2</sup>	Масляная иммерсия	90 <sup>x</sup>	1,25	0,32
18	Ф-ОМ-23 <sup>2</sup>	Водная иммерсия	40 <sup>x</sup>	0,75	2,11

Объективы-ахроматы применяются для биологических микроскопов.

Местом соединения объектива с микроскопом является стандартная резьба 36 ниток на 1 дюйм.

<sup>1</sup> Имеют гравировку „Ш“, могут работать в поляризационных микроскопах.

<sup>2</sup> Могут работать лишь с устройством для наблюдения методом фазового контраста.

<sup>3</sup> Имеют ирисовую диафрагму для работы в темном поле.

**Объективы-ахроматы для наблюдения и фотографирования препаратов  
в отраженном видимом свете**

№ п/п.	Шифр	Система	Увеличе-ние или фокус	Апертура	Рабочее рассто-яние в мм	Тубус	Примечание
1	ОМ-12М	Сухой	4,7 <sup>x</sup>	0,11	25,9	190	В светлом и темном полях
2	ОМ-13 <sup>1</sup>	"	9 <sup>x</sup>	0,20	8,7	190	
3	ОМ-6	"	12 <sup>x</sup>	0,30	7,5	190	
4	ОМ-8 <sup>1</sup>	"	21 <sup>x</sup>	0,40	1,9	190	
5	ОМ-9 <sup>1</sup>	"	40 <sup>x</sup>	0,65	0,66	190	
6	ОМ-10 <sup>1</sup>	Масляная им- мерсия	95 <sup>x</sup>	1,25	0,11	190	
7	ОХ-331,2	Сухой	33,1 <sup>x</sup>	0,12	18,9	∞	
8	ОС-39	"	25,02	0,13	24	∞	
9	ОХ-231,2	"	23,17	0,17	6,2	∞	
10	ОС-40	"	13,89	0,30	5,71	∞	
	ОХ-141,2	"	13,89	0,30	5,71	∞	
11							
12	ОС-41	"	8,16	0,37	2,78	∞	
13	ОХ-51,2	Масляная им- мерсия	5,99	0,65	0,96	∞	
14	ОХ-61,2	Сухой	6,16	0,65	0,87	∞	
15	ОС-43	"	4,25	0,60	0,76	∞	
16	ОС-42	"	4,25	0,50	0,76	∞	
17	ОХ-41,2	"	4,0	0,75	0,32	∞	
18	ОХ-31,2	Масляная им- мерсия	2,77	1,25	0,44	∞	

**Эпиобъективы**

№ п/п.	Шифр	Система	Увеличе-ние или фокус	Апертура	Рабочее рассто-яние	Тубус	Примечание.
1	ОЭ-9	Сухой	9 <sup>x</sup>	0,20	5,25	190	Место соедине- ния с микро- скопом — резьба 4М 27×0,75 и направляю- щий цилиндр Ø 28,5 мм
2	ОЭ-21	"	21 <sup>x</sup>	0,40	1,9	190	
3	ОЭ-40	"	40 <sup>x</sup>	0,65	0,66	190	
4	ОЭ-95	Масляная иммер- сия	95 <sup>x</sup>	1,0	0,46	190	
5	ОЭ-6	Сухой	6,16	0,65	0,87	∞	
6	ОЭ-8	"	8,16	0,37	2,6	∞	
7	ОЭ-14	"	13,89	0,30	5,71	∞	
8	ОЭ-23	"	23,17	0,17	6,2	∞	
9	ОЭ-3Т	Масляная имме р- сия	2,79	1,0	0,65	∞	

Местом соединения объектива с микроскопом является стандартная резьба 36 ниток на 1 дюйм.

<sup>1</sup> Имеют за резьбой объектива 36 ниток на 1 дюйм направляющий ци- линдр диаметром 21×1.

<sup>2</sup> Имеют гравировку „Л“, могут работать в поляризаационных микроскопах.



Эпиобъективы применяются для исследования непрозрачных препаратов. Эпиобъективы позволяют производить наблюдения как в светлом, так и темном полях, для чего в конструкции их предусмотрено параболическое зеркало.

### Объективы-апохроматы для наблюдения и фотографирования препаратов в проходящем видимом свете

(длина тубуса 160 мм, толщина покровного стекла 0,17)

№ п/п	Шифр	Система	Увеличе-ние	Апертура	Рабочее расстояние в мм	Примечание
1	ОС-6	Сухой	6 <sup>x</sup>	0,15	7,18	С коррекционной оправой
2	ОМ-18		10 <sup>x</sup>	0,30	5,17	
3	ОМ-21		20 <sup>x</sup>	0,65	0,94	
4	ОМ-16		40 <sup>x</sup>	0,95	0,4	
5	ОМ-15	Масляная иммерсия	60 <sup>x</sup>	1,0 ÷ 0,7	0,44	Для работы в темном поле
6	ОС-60	То же	60 <sup>x</sup>	1,40	0,33	
7	ОМ-25	Водная иммерсия	70 <sup>x</sup>	1,25	0,37	Работает с устройством для получения фазового контраста
8	Ф-ОМ-25	То же	70 <sup>x</sup>	1,23	0,37	
9	ОМ-20	Масляная иммерсия	90 <sup>x</sup>	1,30	0,32	
10	ОС-90	То же	90 <sup>x</sup>	1,40	0,27	

Объективы-апохроматы применяются для ответственных исследований на микроскопах.

Местом соединения объектива с микроскопом является стандартная резьба 36 ниток на 1 дюйм.

Объективы ОМ-16, ОМ-25 и Ф-ОМ25 имеют коррекционную оправу для исправления ошибок изображения, вызываемых изменением толщины покровного стекла от 0,10 до 0,20 мм.

### Объективы-апохроматы для наблюдения и фотографирования препаратов в отраженном свете

(длина тубуса ∞)

№ п/п.	Шифр	Система	Фокусное расстояние	Апертура	Рабочее расстояние в мм	Примечание
1	ОС-16	Сухой	15,7	0,30	4,9	Светлое и темное поля
2	ОС-8		8,37	0,65	0,87	
3	ОС-4	Масляная иммерсия	4,3	0,95	0,22	Темное поле
4	ОС-3Т		2,77	1,0	0,58	
5	ОС-3		То же	2,79	1,30	

**Объективы-ахроматы для наблюдения и фотографирования препаратов  
в отраженном видимом свете**

№ п/п.	Шифр	Система	Увеличе- ние или фокус	Апертура	Рабочее рассто- яние в мм	Тубус	Примечание
1	ОМ-12М	Сухой	4,7 <sup>x</sup>	0,11	25,9	190	В светлом и темном полях
2	ОМ-13 <sup>1</sup>	"	9 <sup>x</sup>	0,20	8,7	190	
3	ОМ-6	"	12 <sup>x</sup>	0,30	7,5	190	
4	ОМ-8 <sup>1</sup>	"	21 <sup>x</sup>	0,40	1,9	190	
5	ОМ-9 <sup>1</sup>	"	40 <sup>x</sup>	0,65	0,66	190	
6	ОМ-10 <sup>1</sup>	Масляная мерсия	95 <sup>x</sup>	1,25	0,11	190	
7	ОХ-331,2	Сухой	33,1 <sup>x</sup>	0,12	18,9	∞	
8	ОС-39	"	25,02	0,13	24	∞	
9	ОХ-231,2	"	23,17	0,17	6,2	∞	
10	ОС-40	"	13,89	0,30	5,71	∞	
11	ОХ-141,2	"	13,89	0,30	5,71	∞	
12	ОС-41	"	8,16	0,37	2,78	∞	
13	ОХ-51,2	Масляная мерсия	5,99	0,65	0,96	∞	
14	ОХ-61,2	Сухой	6,16	0,65	0,87	∞	
15	ОС-43	"	4,25	0,60	0,76	∞	
16	ОС-42	"	4,25	0,50	0,76	∞	
17	ОХ-41,2	"	4,0	0,75	0,32	∞	
18	ОХ-31,2	Масляная мерсия	2,77	1,25	0,44	∞	

**Эпиобъективы**

№ п/п.	Шифр	Система	Увеличе- ние или фокус	Апертура	Рабочее рассто- яние	Тубус	Примечание.
1	ОЭ-9	Сухой	9 <sup>x</sup>	0,20	5,25	190	Место соедине- ния с микро- скопом — резьба 4М 27 × 0,75 и направляю- щий цилиндр ∅ 28,5 мм
2	ОЭ-21	"	21 <sup>x</sup>	0,40	1,9	190	
3	ОЭ-40	"	40 <sup>x</sup>	0,65	0,66	190	
4	ОЭ-95	Масляная иммер- сия	95 <sup>x</sup>	1,0	0,46	190	
5	ОЭ-6	Сухой	6,16	0,65	0,87	∞	
6	ОЭ-8	"	8,16	0,37	2,6	∞	
7	ОЭ-14	"	13,89	0,30	5,71	∞	
8	ОЭ-23	"	23,17	0,17	6,2	∞	
9	ОЭ-3Т	Масляная иммер- сия	2,79	1,0	0,65	∞	

Местом соединения объектива с микроскопом является стандартная резьба 36 ниток на 1 дюйм.

<sup>1</sup> Имеют за резьбой объектива 36 ниток на 1 дюйм направляющий ци-  
линдр диаметром 21 × 1.

<sup>2</sup> Имеют гравировку „Л“, могут работать в поляризационных микроскопах.

Эпнобъективы применяются для исследования непрозрачных препаратов. Эпнобъективы позволяют производить наблюдения как в светлом, так и темном полях, для чего в конструкции их предусмотрено параболическое зеркало.

### Объективы-апохроматы для наблюдения и фотографирования препаратов в проходящем видимом свете

(длина тубуса 160 мм, толщина покровного стекла 0,17)

№ п/п	Шифр	Система	Увеличение	Апертура	Рабочее расстояние в мм	Примечание
1	ОС-6	Сухой	6 $\times$	0,15	7,18	С коррекционной оправой
2	ОМ-18	"	10 $\times$	0,30	5,17	
3	ОМ-21	"	20 $\times$	0,65	0,94	
4	ОМ-16	"	40 $\times$	0,95	0,4	
5	ОМ-15	Масляная иммерсия	60 $\times$	1,0÷0,7	0,44	Для работы в темном поле
6	ОС-60	То же	60 $\times$	1,40	0,33	Работает с устройством для получения фазового контраста
7	ОМ-25	Водная иммерсия	70 $\times$	1,25	0,37	
8	Ф-ОМ-25	То же	70 $\times$	1,23	0,37	
9	ОМ-20	Масляная иммерсия	90 $\times$	1,30	0,32	
10	ОС-90	То же	90 $\times$	1,40	0,27	

Объективы-апохроматы применяются для ответственных исследований на микроскопах.

Местом соединения объектива с микроскопом является стандартная резьба 36 шток на 1 дюйм.

Объективы ОМ-16, ОМ-25 и Ф-ОМ25 имеют коррекционную оправу для исправления ошибок изображения, вызываемых изменением толщины покровного стекла от 0,10 до 0,20 мм.

### Объективы-апохроматы для наблюдения и фотографирования препаратов в отраженном свете

(длина тубуса  $\infty$ )

№ п/п.	Шифр	Система	Фокусное расстояние	Апертура	Рабочее расстояние в мм	Примечание
1	ОС-16	Сухой	15,7	0,30	4,9	Светлое и темное поля
2	ОС-8	"	8,37	0,65	0,87	
3	ОС-4	"	4,3	0,95	0,22	Темное поле
4	ОС-3Т	Масляная иммерсия	2,77	1,0	0,58	
5	ОС-3	То же	2,79	1,30	0,2	

Объективы-апохроматы применяются для ответственных исследований непрозрачных объектов.

За резьбой имеется направляющий цилиндр диаметром  $21 \times 1$ .

Местом соединения объектива с микроскопом является стандартная резьба 36 ниток на 1 дюйм.

**Объективы-планахроматы для наблюдения и фотографирования препаратов в проходящем видимом свете**

(толщина покровного стекла 0,17 мм, длина тубуса 160 мм)

№ п/п.	Шифр	Система	Увеличение	Апертура	Рабочее расстояние в мм	Примечание
1	ОМ-3	Сухой	3,5x	0,10	24,85	Работает со специальным окуляром 7x (шифр АМ-7) Зеркально-линзовый
2	ОМ-2		9x	0,20	13,84	
3	ОМ-31		20x	0,40	0,58	
4	ОМ-29		40x	0,65	1,62	
5	ОМ-26	Масляная иммерсия	90x	1,20	42	

Эти объективы-планахроматы применяются в биологических и поляризационных микроскопах, главным образом для фотографирования и микропроекции.

Местом соединения объектива с микроскопом является резьба 36 ниток на 1 дюйм.

**Объективы зеркально-линзовые (кварцевые) для наблюдения и фотографирования препаратов в ультрафиолетовых лучах**

**I. В проходящем свете**

(толщина покровного кварцевого стекла 0,17 мм, длина тубуса 160 мм)

№ п/п.	Шифр	Система	Увеличение	Апертура	Рабочее расстояние в мм
1	ОК-10	Сухой	10x	0,10	13,0
2	ОК-40		40x	0,50	1,6
3	ОК-65	Глицериновая иммерсия	65x	0,80	0,65
4	ОК-90		То же	90x	1,20

**II. В отраженном свете**

(длина тубуса ∞)

№ п/п.	Шифр	Система	Фокус	Апертура	Рабочее расстояние в мм
1	ОК-2	Глицериновая иммерсия	2,5	0,80	0,49
2	ОК-4		Сухой	4,0	0,50

Эти объективы применяются главным образом в ультрафиолетовых микроскопах.

Местом соединения объектива с микроскопом является стандартная резьба 36 ниток на 1 дюйм.

**Фотообъективы для макросъемки**  
(специального назначения)

№ п/п.	Шифр	Относительное отверстие	Фокусное расстояние в мм	Крепление к прибору
1	ОП-15	1:4,5	40	36 ниток на 1 дюйм
2	ОП-16	1:4,5	65	4M 33 × 0,75
3	ОП-17	1:4,5	100	5M 45 × 0,75
4	ОФ-111	1:6,3	150	5M 45 × 0,75

**Окуляры ортоскопические**

№ п/п.	Шифр	Увеличение	Поле зрения
1	АМ-18	12,5х	16
2	АМ-19	17х	13,6
3	АМ-20	28х	6,5

Ортоскопические окуляры применяются со слабыми и средними объективами-ахроматами.

Место соединения окуляра с микроскопом — цилиндр диаметром 23,2 мм.

**Окуляры Гюйгенса**

№ п/п.	Шифр	Увеличение	Поле зрения	Примечание
1	АМ-4	4х	24	Со сменными сеткой и шкалой, с диоптрийной установкой
2	АМ-6	4х	24	
3	АМ-30	4х	20	С удаленным зрачком
4	АМ-31	7х	18	
5	М-7	7х	18	
6	АМ-11	7х	18	
7	АМ-11 <sup>а</sup>	7х	18	Со сменными сеткой и шкалой, с диоптрийной установкой
8	М-10	10х	14	С сеткой или со шкалой, с диоптрийной установкой
9	АМ-10	10х	14	
10	М-11	15х	8	

Окуляры Гюйгенса применяются для визуального наблюдения со слабыми и средними объективами-ахроматами.

Окуляры АМ-10 применяются только для поляризационных микроскопов. Имеют фиксирующий винт.

Место соединения окуляра с микроскопом — цилиндр диаметром 23,2 мм.

### Окуляры компенсационные

№ п/п.	Шифр	Увеличение	Поле зрения	Примечание
1	АМ-25	3 <sup>x</sup>	20	С удаленным зрачком
2	АМ-24	4 <sup>x</sup>	20	
3	АМ-12	5 <sup>x</sup>	23	
4	АМ-13	7 <sup>x</sup>	18	Со сменными сеткой и шкалой, с диоптрийной установкой
5	АМ-26	7 <sup>x</sup>	18	
6	АМ-14	10 <sup>x</sup>	13	Работает совместно с объективом-планахроматом 40 × 0,65 (шифр ОМ-29)
7	АМ-27	15 <sup>x</sup>	11	
8	АМ-16	20 <sup>x</sup>	9	
9	АМ-17	30 <sup>x</sup>	6	
10	АМ-50	50 <sup>x</sup>	3,6	
11	АМ-7	7 <sup>x</sup>	18	

Эти окуляры применяются с объективами-апохроматами и сильными ахроматами. Компенсируют хроматизм увеличения.

Место соединения окуляра с микроскопом — цилиндр диаметром 23,2 мм.

### Фотоокуляры

№ п/п.	Шифр	Увеличение	Поле зрения	Примечание
1	АМ-32	6,5 <sup>x</sup>	16	Работают преимущественно с объективами МЩ и ОМ-9
2	АТ-18	7 <sup>x</sup>	18	Специальный для МС-51
3	АТ-18 <sup>a</sup>	7 <sup>x</sup>	18	
4	АМ-33	10 <sup>x</sup>	13,4	Специальный для МС-51 Комплект специальный для МС-51
5	АТ-35	10 <sup>x</sup>	16	
6	АТ-36	15 <sup>x</sup>	12	
7	АТ-36 <sup>c</sup>	15 <sup>x</sup>	12	
8	АТ-37 <sup>c</sup>	15 <sup>x</sup>	12	
9	АТ-14	18 <sup>x</sup>	9,5	

Фотоокуляры применяются преимущественно для фотографии во всех микроскопах. Могут быть использованы при визуальном наблюдении.

Место соединения окуляра с микроскопом — цилиндр диаметром 23,2 мм.

### Окуляры кварцевые

№ п.п.	Шифр	Увеличение	Поле зрения
1	АМК-1	8 <sup>x</sup>	15
2	АМК-3	8,4 <sup>x</sup>	15,6
3	АМК-2	8,6 <sup>x</sup>	14
4	АМК-4	8,2 <sup>x</sup>	14

Кварцевые окуляры применяются при фотографировании в ультрафиолетовом микроскопе.

Место соединения окуляра с микроскопом — цилиндр диаметром 23,2 мм.

### Окуляры широкоугольные

№ п.п.	Шифр	Увеличение	Поле зрения	Примечание
1	АМ-21	5 <sup>x</sup>	23	Со сменными сеткой и шкалой, с диоптрийной установкой
2	АМ-23	8 <sup>x</sup>	21	
3	АШ-6	6 <sup>x</sup>	24	Со сменными сеткой и шкалой, с диоптрийной установкой
4	АШ-8	8 <sup>x</sup>	20	
5	АШ-8 <sup>c</sup>	8 <sup>x</sup>	20	
6	АШ-12,5	12,5 <sup>x</sup>	18	
7	АШ-17	17 <sup>x</sup>	13,6	

Место соединения окуляра с микроскопом — цилиндр диаметром 30 мм.

### Окуляры специальные

№ п.п.	Шифр	Увеличение	Поле зрения	Примечание
1	АТ-14	10 <sup>x</sup>	16	С иглой-указателем
2	АТ-38	15 <sup>x</sup>	12	Со шкалой
3	АТ-40	15 <sup>x</sup>	12	С перекрестием

## Гомали

№ гомалией	Шифр	Фокусное расстояние	Поле зрения	Примечание
Гомаль II	ОН-6	-70,55	15	Применяется с объективами тубуса 160 и 190 мм $\Gamma = 5^x : 20^x$ и с объективами тубуса $\infty \Gamma = 11^x : 30^x$
Гомаль IV	ОН-7	-20,28	8	Применяется с объективами тубуса 160 и 190 мм $\Gamma = 60^x$ и выше и с объективами тубуса $\infty, \Gamma = 90^x$ с дополнительными линзами $f = 250$ мм
Гомаль VI	ОН-8	-37,61	13	Применяется с объективами тубуса 160 и 190 мм, $\Gamma = 5^x \div 20^x$ и с объективами тубуса $\infty, \Gamma = 11^x \div 30^x$

Гомали — проекционные системы, применяются при фотографировании в видимой области спектра. Местом соединения гомали с микроскопом является цилиндр, имеющий диаметр 30 мм. Гомали несколько исправляют кривизну поля и хроматизм увеличения у апохроматических и ахроматических объективов. Не применяются с планахроматами.



## ОПТИКА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ МИКРОСКОПОВ

Г. И. СОКОЛОВА

(Ленинград)

Оптическое устройство современного микроскопа состоит из объектива, окуляра и осветительной части.

Развитие отечественных объективов микроскопа протекало в следующих направлениях:

- а) получение объективов с плоским изображением,
- б) создание зеркально-линзовых и линзовых систем для видимой и ультрафиолетовой областей спектра,
- в) получение объективов с увеличенными рабочими расстояниями.

Необходимость систем с плоским изображением вызвана потребностями микрофотографии. Зеркально-линзовые и линзовые объективы необходимы для ультрафиолетовых микроскопов. Системы объективов с увеличенными рабочими расстояниями применяются при исследовании толстослойных препаратов, сильно нагретых тел, а также объектов, находящихся в их естественной среде.

Цель настоящей статьи — ознакомить читателей с оптическими характеристиками объективов и окуляров, выпускаемых отечественной промышленностью, с новыми типами объективов, их достоинствами, недостатками и принципиальными особенностями, а также затронуть вопросы правильного использования микрооптики.

### I, КЛАССИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТИВОВ

Разнообразные современные объективы микроскопа можно разделить на группы на основе их оптических характеристик — апертуры, увеличения и степени исправления аберраций. Апертурой называют произведения показателя преломления среды, находящейся между покровным стеклом и первой линзой объектива, на синус половины угла лучей, входящих в систему. У сухих объективов такой средой является воздух с показателем преломления равным единице. Поэтому величина апертуры определяется здесь только значением синуса и не может быть больше 0,95. На рис. 1 представлена зависимость от

апертурного угла от величины первой линзы и от расстояния между ней и предметом у объективов  $8 \times 0,20$ ;  $20 \times 0,40$ ;  $40 \times 0,65$ ;  $40 \times 0,95$  и  $90 \times 1,25$ .

В иммерсионных объективах показатель преломления среды значительно больше единицы (для воды он равен 1,33; для масла — 1,515; для монобромнафталина — 1,6). Соответственно апертура объектива может быть равной 1,25; 1,30; 1,40 и 1,60.

Апертура является одной из основных величин, характеризующих достоинства объектива, так как она и длина волны

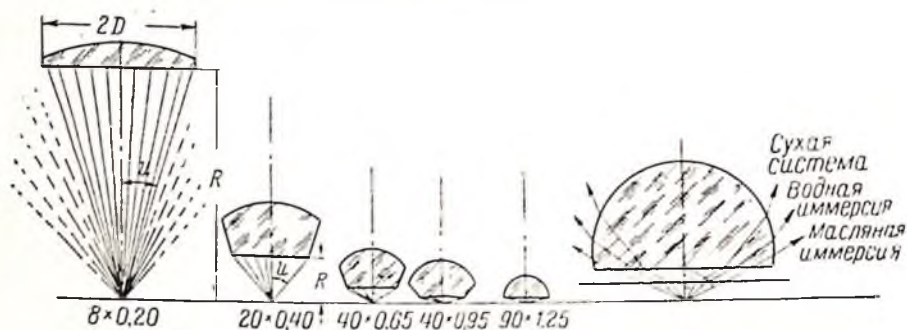


Рис. 1. Зависимость апертуры объектива от величины первой линзы и предметного расстояния.

$U$  — апертурный угол;  $R$  — предметное расстояние;  
 $2D$  — световое отверстие 1-й поверхности  
 $A = n \cdot \sin U$ .

света определяют разрешающую способность микроскопа, которая характеризуется формулой:

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{A},$$

где:  $d$  — наименьшее расстояние между деталями объекта,  
 $\lambda$  — длина волны света,  
 $A$  — апертура объектива,  
 0,61 — числовой коэффициент.

Из формулы следует, что чем меньше длина волны применяемого света и чем больше апертура, тем меньшие детали можно увидеть в микроскопе. Так как длина ультрафиолетовых волн значительно меньше видимых, то их применение повышает разрешающую способность микроскопа, которая будет соответствовать указанной выше формуле, если апертура конденсора не меньше апертуры объектива. Наиболее распространены конденсоры с апертурами 1,20 и 1,40, причем эта величина достигается при условии, если между первой линзой конденсора и предметным стеклом помещена иммерсионная жидкость.

По значениям апертуры и увеличения различают слабые,

средние и сильные объективы. К слабым относят системы с апертурой от 0,02 до 0,25 и увеличением от  $1\times$  до  $10\times$ . Они характеризуются значительным рабочим расстоянием и большим полем зрения.

Средние объективы имеют апертуру от 0,30 до 0,65 и увеличение от  $10\times$  до  $40\times$  включительно. Рабочее расстояние их лежит в пределах от 0,5 до 8 мм, а поле зрения микроскопа при употреблении средних объективов равно от 0,2 до 2 мм. К группе сильных относят объективы с апертурой от 0,70 до 1,60 и увеличением от  $40\times$  до  $120\times$  включительно. Рабочее расстояние этих объективов очень мало и исчисляется десятками, а иногда и сотыми долями миллиметра.

По характеру исправления аберраций (дефектов изображения оптических систем) объективы делятся на ахроматы, апохроматы и объективы с плоским изображением; по типу конструкции — на линзовые и зеркально-линзовые системы.

Рассмотрим объективы отечественного производства с точки зрения указанного разделения.

#### А. Ахроматические объективы для длины тубуса 160 мм и препаратов с покровным стеклом толщиной 0,17 мм

Эти объективы широко применяются для работы в проходящем свете и дают достаточно резкое изображение в центральной части поля, а при перефокусировке — и на краях. Однако контуры деталей слегка окрашены в синий, желто-зеленый, красноватый и другие цвета, в зависимости от типа объектива. Окраска изображения вызвана дисперсией (разложением) света в оптическом стекле и тем сильнее, чем больше увеличение системы. Погрешности изображения по окраске принято называть хроматизмом.

Устранить эту погрешность для всех длин волн нет возможности, поэтому в ахроматах, линзы которых изготовлены только из оптического стекла, их устраняют для каких-либо двух длин волн, чаще всего для линий *C* и *F*. В табл. 1

Таблица 1

#### Ахроматы для длины тубуса 160 мм

Увеличение и апертура

сухие объективы		объективы водной иммерсии	объективы масляной иммерсии
$1 \times 0,03$	$10 \times 0,30$	$6 \times 0,11$	$12 \times 0,25$
$1,5 \times 0,05$	$20 \times 0,40$	$40 \times 0,75$	$90 \times 1,25$
$3,7 \times 0,11$	$40 \times 0,65$		$90 \times 1,25$ с ирисовой диафрагмой
$5,5 \times 0,16$	$60 \times 0,85$		
$8 \times 0,20$			

представлены эти объективы, выпускаемые отечественной промышленностью.

Раздел ахроматов в будущем может быть дополнен объективами  $90 \times 1,20$  — водной иммерсии и  $50 \times 0,90$  — масляной иммерсии. Объектив  $50 \times 0,90$  интересен тем, что имеет большое поле и большее, чем у объектива  $90 \times 1,25$  рабочее расстояние.

### Б. Апохроматические объективы для длины тубуса 160 мм и препаратов с покровным стеклом толщиной 0,17 мм

У апохроматических объективов погрешности хроматизма (окраска) почти в 10 раз меньше, чем у ахроматических. Лучшее исправление их достигается за счет усложнения схемы оптики (некоторые апохроматы имеют 10 линз вместо 6 у ахроматов) и, кроме того, путем применения особых сортов оптического стекла, а также флюорита и квасцов. Эти объективы дают очень отчетливое, почти бесцветное изображение и применяются для ответственных исследований и микрофотографирования.

Необходимо отметить, что у всех апохроматов, а также у сильных ахроматов имеется погрешность изображения, называемая хроматизмом увеличения. В этом случае для лучей различных длин волн изображения точек предмета, удаленных от оптической оси, имеют разные увеличения. Хроматическую aberrацию увеличения (окраску) при расчете объективов устранить полностью не представляется возможным, однако она легко исправляется применением компенсационных окуляров.

В табл. 2 представлены апохроматы, выпускаемые промышленностью.

Таблица 2

Апохроматы для длины тубуса 160 мм

Увеличение и апертура		
сухие объективы	объективы водной иммерсии	объективы масляной иммерсии
$6 \times 0,15$	$70 \times 1,25$	$60 \times 1,0$ с присоединенной диафрагмой
$10 \times 0,30$		$90 \times 1,30$
$20 \times 0,65$		$60 \times 1,40$
$40 \times 0,95$		$90 \times 1,40$

Необходимо отметить, что апохроматы  $60 \times 1,40$  и особенно  $90 \times 1,40$  имеют очень малое рабочее расстояние — 0,08 мм и, кроме того, фронтальная линза в силу ее конструк-

ции не может быть прочно укреплена в оправе. Вследствие этого объективы с апертурой 1,40 (особенно  $90 \times 1,40$ ) требуют бережного обращения, в противном случае они быстро выбывают из строя.

Раздел апохроматов в будущем можно расширить за счет объективов  $35 \times 0,85$  и  $60 \times 1,30$  масляной иммерсии. Объектив  $35 \times 0,85$  имеет рабочее расстояние 0,4 мм и полезен для работы как в светлом, так и темном поле.

### В. Ахроматические и апохроматические объективы для длины тубуса $\infty$ и 190 мм и препаратов без покровного стекла

Эти объективы входят в комплект металлографических, поляризационных и двойных микроскопов, а также и некоторых биологических. На оправе объективов маркируются апертура и величина фокусного расстояния. Увеличение объектива получается в результате деления фокусного расстояния дополнительной линзы (250 или 160 мм) на фокусное расстояние объектива. Эти объективы даны в табл. 3.

Таблица 3

Ахроматы и апохроматы для длины тубуса  $\infty$  и 190 мм

Ахроматы длины тубуса $\infty$		Ахроматы длины тубуса 190	Апохроматы длины тубуса $\infty$		Рекомендуемые
$f'$	A	увеличение и апертура	$f'$	A	
33,1	0,12	$9 \times 0,20$	15,7	0,30 для светлого и темного поля	$108 \times 1,60$ монобромнафталиновой иммерсии
25,0	0,13	$12 \times 0,30$	8,4	0,65	
23,2	0,17	$21 \times 0,40$	4,3	0,95 для светлого поля	
13,9	0,30	$40 \times 0,65$			
8,2	0,37	$95 \times 1,25$ масляной иммерсии			
6,2	0,60		2,8	1,30 для светлого поля, масляной иммерсии	
6,0	0,65 масляной иммерсии				
4,9	0,55		2,8	1,0 для темного поля, масляной иммерсии	
4,3	0,60				
4,0	0,50				
2,8	0,75				
	1,25 масляной иммерсии				

Раздел В в будущем можно дополнить высокоапертурным объективом  $108 \times 1,60$  монобромнафталиновой иммерсии.

В этом же разделе следует упомянуть об эпнобъективах, предназначенных для наблюдения непрозрачных объектов в светлом и темном полях. Всестороннее освещение объектов в темном поле осуществляется кольцеобразным параболическим зеркалом или системой кольцевых линз, внутри которых заключен объектив (рис. 2).

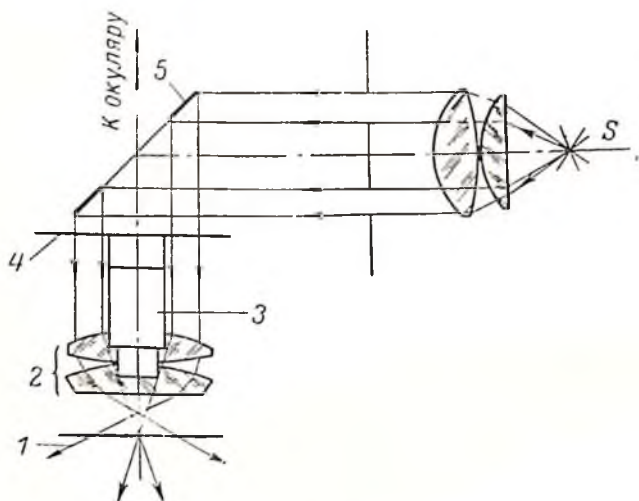


Рис. 2. Схема освещения предмета в эпнобъективах.  
1 — предмет; 2 — конденсор; 3 — объектив; 4 — опорная пластинка объектива; 5 — кольцевое зеркало.

Эти объективы входят в комплект биологического микроскопа МБИ-6 (новая модель) и металлографического МИМ-7, а из серийных приборов — в микротвердомер. В микроскопе МБИ-6 набор из 4 объективов  $9 \times 0,20$ ;  $21 \times 0,40$ ;  $40 \times 0,65$  и  $95 \times 1,0$  рассчитан на длину тубуса 190 мм, в микроскопе МИМ-7 — набор с апертурами от 0,17 до 1,0 — на длину тубуса  $\infty$ .

#### Г. Объективы с плоским изображением для проходящего и отраженного света

Известно, что объективы микроскопа при фокусировке на центр поля дают нерезкое изображение на краях. При визуальных наблюдениях этот недостаток не является столь существенным, так как всегда можно сфокусировать изображение в любой части поля, пользуясь микрометренным винтом. При фотографировании кривизна является большим недостатком и вынуждает уменьшать поле зрения микроскопа.

В последние годы отечественная промышленность стала осваивать новые типы объективов с плоским изображением. Они представляют собой линзовые ахроматы и апохроматы, но более сложной конструкции. В табл. 4 указаны увеличения и апертуры таких объективов.

Таблица 4

Объективы с плоским изображением

№ п/п	Увеличение или фокусное расстояние	Апертура	Степень исправления aberrации	Среда между объектом и объективом	Примечание
1	3,5 <sup>x</sup>	0,10	Планахромат	Сухая система	Для проходящего света
2	9 <sup>x</sup>	0,20	"	" "	То же
3	20 <sup>x</sup>	0,40	"	" "	" "
4	40 <sup>x</sup>	0,65	"	" "	" "
5	75 <sup>x</sup>	0,90	"	Масляная иммерсия	" "
6	$f'=10$ мм	0,50	Планапохромат	Сухая система	Для отраженного света
7	$f'=2,43$ мм	0,90	"	" "	То же

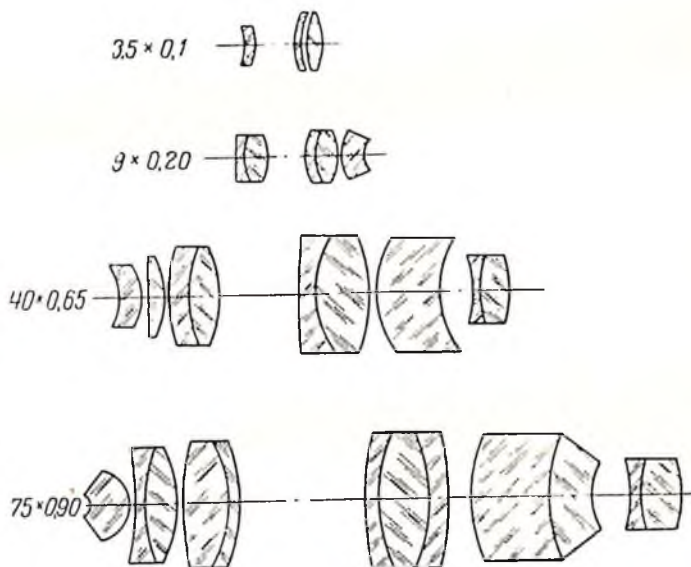


Рис. 3. Планахроматические объективы.

На рис. 3 представлены схемы оптики планахроматических объективов, на рис. 4 — схемы обычных ахроматов. Из сравнения этих рисунков видно, что конструкция планахроматов,

предназначенных для проходящего света, значительно сложнее. Число линз у средних и сильных систем планохроматов равно 9 и 12, а у ахроматов — 5 и 6. Конструкция планохроматов, предназначенных для работы в отраженном свете (длина тубуса  $\infty$ ), гораздо проще, число линз у средней системы равно 5, у сильной — 9 (рис. 5 и 6).

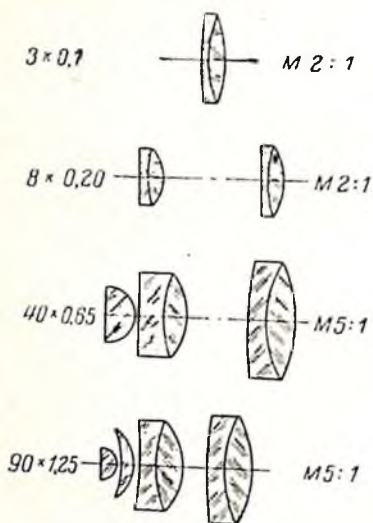


Рис. 4. Ахроматические объективы.

Как известно, обычные апохроматические объективы отличаются от ахроматических главным образом лучшим исправлением вторичного спектра. У апохроматов он приблизительно в 10 раз меньше, чем у ахроматов. Наоборот, хроматическая aberrация увеличения у всех апохроматов значительно больше, чем у слабых и средних ахроматов. Исправление этой aberrации требует усложнения системы объектива и не всегда приводит к желаемым результатам. Гораздо

проще хроматизм увеличения компенсируется с помощью специальных окуляров. Поэтому с давних времен апохроматы и сильные ахроматы применяются с компенсационными окулярами.

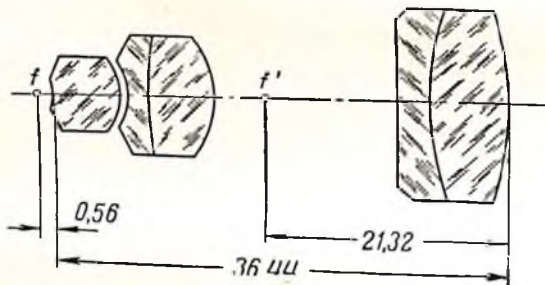


Рис. 5. Планохроматический объектив микроскопа  $F = 10$ ;  $A = 0,50$  для отраженного света.

Некоторые объективы, например ахромат  $108 \times 1,60$  (монобромнафталиновая иммерсия), имеют хроматическую aberrацию увеличения даже больше, чем апохроматы, и употребляются со специальным компенсационным окуляром.



Хроматизм увеличения у слабых планахроматов  $3,5 \times 0,10$  и  $9 \times 0,20$  небольшой (табл. 5), поэтому для них не требуется специальных окуляров и они дают хорошее изображение с обычными окулярами для ахроматов. Планахроматы  $f' = 10$  мм и  $f' = 2,4$  мм имеют хроматическую aberrацию увеличения такого же порядка, как апохроматы, и при работе с ними необходимо применять обычные компенсационные окуляры.

Исправление кривизны изображения у планахроматов  $40 \times 0,65$  и  $75 \times 0,90$  потребовало сильного усложнения их конструкции (9 и 12 линз). Хроматизм увеличения у них получился значительно больше, чем у апохроматов, и для его компенсации необходимо употребление специальных окуляров. Для объектива  $75 \times 0,90$  рассчитан и изготовлен окуляр пятикратного увеличения, а для объектива  $40 \times 0,65$  — семикратного.

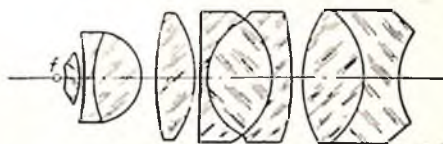


Рис. 6. Планапохроматический объектив  $F = 2,43$ ;  $A = 0,9$  для отраженного света.

Таблица 5

Кривизна изображения и хроматизм увеличения объективов

Наименование объектива	Кривизна изображения			Наибольший хроматизм увеличения в %
	$2y' = 9$ мм	$2y' = 18$ мм	$2y' = 25,4$ мм	
Ахромат $3 \times 0,10$	- 0,21	- 0,82		0
" $8 \times 0,20$	- 0,57	- 2,27		0
" $40 \times 0,65$	- 2,93	- 11,71		0,8
" $90 \times 1,25$	- 6,71	- 26,84		1,9
" $108 \times 1,60$	- 6,24			6,1
Апохромат $5 \times 0,15$	- 0,40	- 1,61		0,7
" $10 \times 0,30$	- 0,84	- 3,35		1,2
" $20 \times 0,65$	- 1,52	- 6,07		1,2
" $40 \times 0,95$	- 2,72	- 10,87		1,2
" $60 \times 1,30$ без квасцов	- 4,73	- 18,92		2,3
" $90 \times 1,30$	- 6,8	- 27,2		2,0
Планахромат $3,5 \times 0,10$	- 0,09	- 0,37		0,17
" $9 \times 0,20$	+ 0,28	+ 1,13		0,43
" $40 \times 0,65$	- 0,84	- 3,38		2,53
" $75 \times 0,90$	- 0,94	- 3,37		5,35
Планахромат, $f' = 10$ $A = 0,50$	- 0,14	- 0,57	- 1,13	2,3
Планапохромат, $f' = 2,4$ мм $A = 0,9$	- 1,0	- 3,0	- 5,4	1,93

В табл. 5 приведены данные о кривизне изображения для поля 9 и 18 мм для объективов с длиной тубуса 160 мм и поля 9, 18 и 25 мм для объективов с плоским изображением и длиной тубуса  $\infty$ .

В настоящее время отечественная промышленность выпускает два слабых апланхроматических объектива  $3,5 \times 0,10$  и  $9 \times 0,20$ . Последний входит в комплект поляризационных микро-

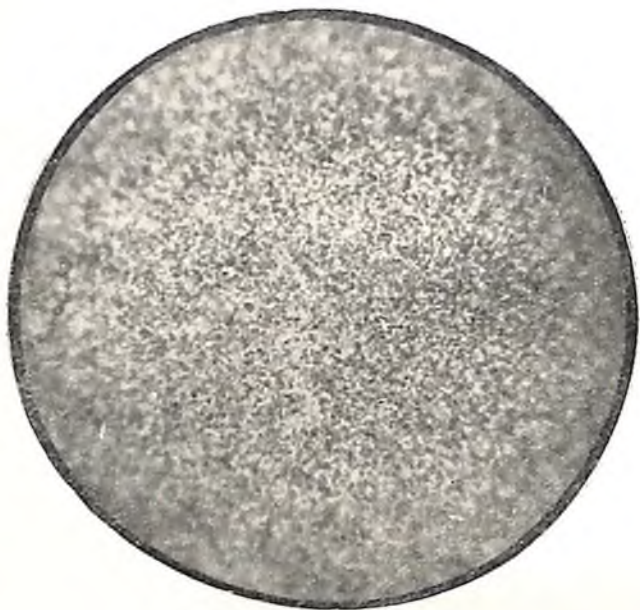


Рис. 7. Снимок сделан апланхроматом  $75 \times 0,90$  и специальным окуляром  $5\times$ .

скопов. В виде опытных образцов выпущены два средних апланхромата  $20 \times 0,40$  и  $40 \times 0,65$ . Они входят в комплект микропроекционной установки МПР-1.

Применение объективов с плоским изображением позволяет существенно увеличить поле зрения при фотографировании.

На рис. 7 и 8 представлены микрофотографии, снятые апланхроматом  $75 \times 0,90$  и ахроматом  $90 \times 1,25$ , наглядно характеризующие преимущества объективов с плоским изображением. Фотографирование производилось на диапозитивных пластинках с применением синих светофильтров.

#### Д. Объективы для фазовоконтрастного микроскопа

От обычных ахроматов и апохроматов они отличаются тем, что вблизи фокальной плоскости объектива, обычно между склеенными линзами, помещается тонкая пластинка в виде кольца, полученная распылением специального слоя толщиной в несколько десятых микрона.



Рис. 8. Снимок сделан ахроматом  $90 \times 1,25$   
и окуляром  $7^x$  К.

Присутствие фазовой пластинки внутри объектива не мешает вести наблюдение обычных препаратов, однако резкость изображения, как правило, несколько понижается.

На оправе объективов для фазового контраста маркируется буква „Ф“. Промышленность выпускает следующие образцы объективов: сухие системы ( $10 \times 0,30$ ;  $20 \times 0,40$ ;  $40 \times 0,65$ ); водной иммерсии ( $40 \times 0,75$ ;  $70 \times 1,25$ ) и масляной иммерсии ( $90 \times 1,25$ ).

#### Е. Зеркально-линзовые объективы

Многие органические и неорганические вещества имеют характерные и резкие полосы поглощения в ультрафиолетовом свете. Поэтому наблюдение в ультрафиолетовых лучах

открывает возможность, наряду с обнаружением тонкой структуры, выявлять также и химическую природу изучаемых объектов. Так как оптическое стекло непрозрачно для ультрафиолетовых лучей, то обычная оптика микроскопа при этих исследованиях непригодна. В ультрафиолетовом микроскопе ранее применялись системы только из кварца, что давало возможность получить лишь монохроматические объективы. Каждый такой объектив работает при одной вполне определенной длине волны света.

В последнее время в ультрафиолетовом микроскопе применяются зеркально-линзовые объективы. Первые конструкции их были предложены Максутовым и Гершгориным. Несколько позднее были предложены также системы Рабиновичем и Волосовым. В 1941 г. по инициативе Е. М. Брумберга был изготовлен первый зеркально-линзовый объектив  $100 \times 0,50$  для длины тубуса 560 мм. В послевоенные годы разработано еще 7 типов зеркально-линзовых объективов, пять из них рассчитаны для видимой и ультрафиолетовой областей спектра, два — только для видимой области.

В табл. 6 и 7 приведены основные оптические характеристики зеркально-линзовых систем.

Из табл. 6 видно, что кривизна изображения зеркально-линзовых объективов  $90 \times 1,20$  значительно меньше, чем у обычных апохроматов. Хроматическая аберрация увеличения у объективов  $30 \times 0,40$  и  $40 \times 0,50$  незначительна, у более сильных зеркально-линзовых объективов  $65 \times 0,80$  и  $90 \times 1,20$  она несколько больше, чем у апохроматов.

Таблица 6

Зеркально-линзовые объективы

№ п/п	Увеличение или фокусное расстояние	Апертура	Длина тубуса	Сухая или иммерсионная система	Область спектра
1	$100\times$	0,50	560	Сухая система	Видимая и ультрафиолетовая
2	$30\times$	0,40	160	" "	" "
3	$40\times$	0,50	160	" "	То же
3а	$f' = 4$ мм	0,50	$\infty$	" "	" "
4	$65\times$	0,80	160	Глицериновая иммерсия	" "
4а	$f' = 2,5$ мм	0,80	$\infty$	То же	" "
5	$90\times$	1,0	160	" "	" "
6	$90\times$	1,20	160	" "	" "
7	$90\times$	1,20	160	Масляная иммерсия	Видимая
8	$90\times$	1,20	160	" "	" "

Кривизна изображения и хроматическая aberrация увеличения  
зеркально-линзовых объективов

Наименование объектива	Кривизна изображения		Хроматизм увеличения в %		Рабочее расстояние в мм	Виньетирова- ние по диаметру выходного зрачка в $\mu$
	$2y' = 9$ мм	$2y' = 18$ мм	в видимой области	в ультрафиоле- товой области		
30 × 0,40	— 1,83	— 7,32	0,16	0,16	3	45
40 × 0,50	— 2,23	— 9,0	0,05	0,05	от 2 до 5	46
65 × 0,80	— 5,20	— 20,81	4,2	2,8	0,5	48
90 × 1,20 (глицери- новая иммерсия)	— 2,43	— 9,7	3	2,2	0,2	30
90 × 1,20 (масляная иммерсия)	— 1,43	— 5,71	1,2	—	0,2	30

Величина вторичного спектра у всех зеркально-линзовых объективов небольшая (в таблице не приводится), и в этом отношении их можно отнести к группе апохроматов.

В оптическую систему зеркально-линзовых объективов наряду с линзами вводятся зеркала: выпуклые, вогнутые и плоские. Сочетание преломляющих и отражающих поверхностей позволяет исправить сферическую и хроматическую aberrации для широкой области спектра, а также кривизну изображения.

Зеркально-линзовые системы можно разделить на три основные группы. На рис. 9 дана схема оптики объектива 1-й группы, в котором основное значение имеют две концентрические отражающие поверхности, а роль преломляющих поверхностей сводится главным образом к коррекции aberrаций. На рис. 10 представлена схема оптики объектива 2-й группы. Здесь имеются вогнутое и плоское зеркала, фронтальная и коррекционная линзы, причем роль преломляющих и отражающих поверхностей в образовании изображения примерно одинакова.

Ход лучей в зеркально-линзовых системах своеобразен. В объективе 2-й группы (рис. 10) лучи света проходят фронтальную линзу *I*, центральную неалюминированную часть плоскопараллельной пластинки *II* и падают на вогнутое зеркало *III* с вырезом в середине. После отражения от зеркала *III* лучи идут в обратном направлении, встречают алюминированную часть плоскопараллельной пластинки *II* и, отражаясь от нее, направляются в коррекционные линзы *IV*, *V*, *VI*, а затем к плоскости изображения. Таким образом, внутри объектива лучи света образуют характерную петлю.

На рис. 11 представлена зеркально-линзовая система, предложенная Волосовым. Она состоит из фронтальной линзы, двух concentрических зеркал, плоскопараллельной пластинки, на которой укреплено выпуклое зеркало, и защитной пластинки.

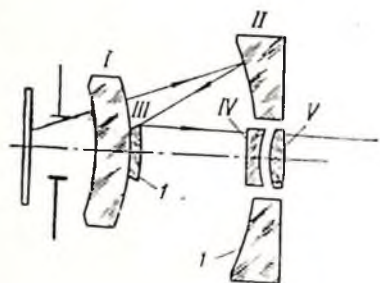


Рис. 9. Схема оптики зеркально-линзового объектива  $40 \times 0,50$ .  
 I — алюминированные поверхности, I, IV, V — линзы, II и III — зеркала.

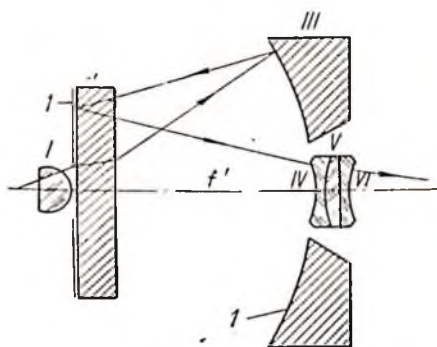


Рис. 10. Схема оптики зеркально-линзового объектива  $90 \times 1,20$ .

I — алюминированные поверхности, I, IV, V — линзы, II — плоскопараллельная пластинка — зеркало, III — зеркало.

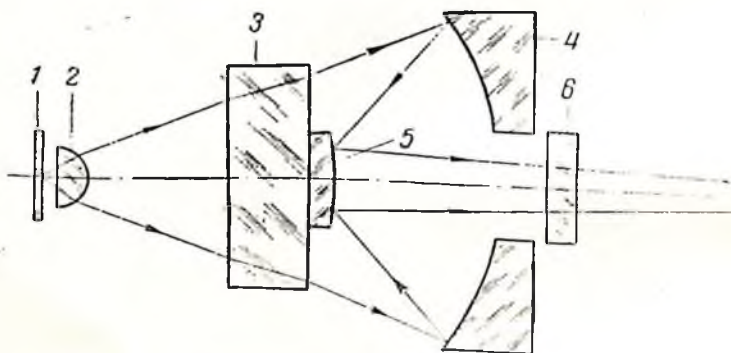


Рис. 11. Схема оптики зеркально-линзового объектива  $65 \times 0,80$ .  
 1 — покрывное стекло; 2 — фронтальная линза; 3 — кварцевая пластинка; 4 — зеркало, 5 — зеркало; 6 — защитное стекло.

На рис. 12 дана схема зеркально-линзового объектива 3-й группы, предложенного Максудовым. Объектив состоит из единственной оптической детали с поверхностями различной кривизны, из которых одна асферическая. Окончательная доводка и юстировка объектива производится посредством ретуши асферической поверхности.

По сравнению с линзовыми системами зеркально-линзовые имеют как достоинства, так и недостатки. Преимуществами их являются: возможность использования в видимой, ультрафио-

223

летовой и инфракрасной областях спектра, почти полное отсутствие вторичного спектра и большее, чем у линзовых объективов, рабочее расстояние. Однако зеркально-линзовые системы имеют принципиальный недостаток, свойственный их конструкции, а именно: центральные пучки лучей не участвуют в образовании изображения, так как задерживаются или выпуклым зеркалом (рис. 9), или специальным непрозрачным экраном, нанесенным на поверхности линзы IV (рис. 10). Вследствие этого объективы дают пониженную резкость изображения. Кроме того, имеется некоторое вуалирование изображения из-за рефлексов внутри объектива.

В существующих зеркально-линзовых системах величина виньетирования центральных лучей лежит в пределах от 30 до 48%.

Дальнейшее улучшение этих систем должно идти по пути снижения процента виньетирования. Экспериментально установлено, что экранирование центра зрачка до 20% не отражается заметно на качестве изображения.

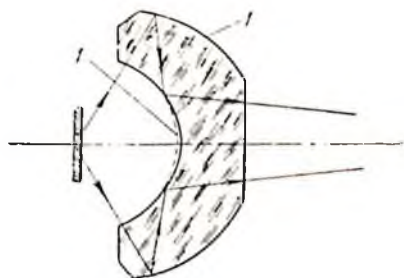


Рис. 12. Схема оптики зеркально-линзового объектива  $60 \times 0,85$ .

1 — алюминированные поверхности.

## II. НОВЫЕ СИСТЕМЫ ОБЪЕКТИВОВ

### А. Объективы с увеличенным рабочим расстоянием

Некоторые микроскопические объекты, расположенные в толще среды, живые организмы, находящиеся в их естественной среде, а также сильно нагретые тела недоступны наблюдению с помощью обычных объективов вследствие их малого рабочего расстояния. Для изучения подобных объектов разработаны два типа объективов с большим рабочим расстоянием. Схема оптики одного из них представлена на рис. 13. Увеличение объектива равно 14, апертура 0,50 и рабочее расстояние 20 мм. Малое увеличение объектива позволяет получать большое поле зрения.

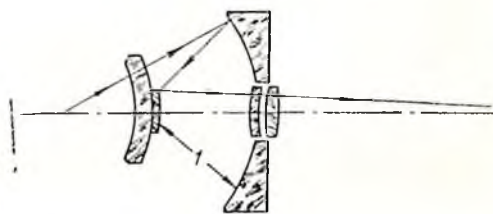


Рис. 13. Схема оптики зеркально-линзового объектива  $14 \times 0,50$ , рабочее расстояние 20 мм.

1 — алюминированные поверхности.

Конструкция объектива выполнена по схеме зеркально-

линзового объектива  $40 \times 0,50$  (рис. 9). Требование большого рабочего расстояния неизбежно вызывает увеличение габари-

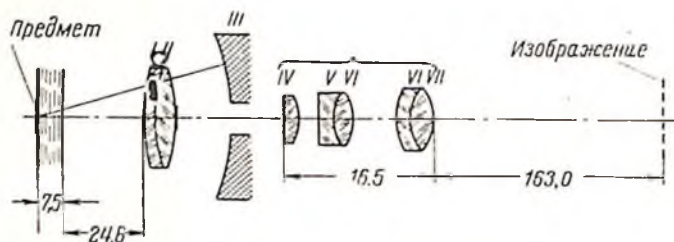


Рис. 14. Схема оптики зеркально-линзового объектива  $20 \times 0,40$ , рабочее расстояние 30 мм.

тов системы. Все недостатки зеркально-линзовых систем присущи и этому объективу, так как виньетирование центральных лучей составляет  $46\%$  диаметра выходного зрачка.

Объектив с рабочим расстоянием 30 мм состоит из обычного объектива  $20 \times 0,40$  и зеркально-линзовой насадки с рабочим расстоянием 30 мм и увеличением  $1^x$  (рис. 14 и 15). В этой системе экранирование центральных лучей значительно меньше, чем в зеркально-линзовых объективах, и равно  $13\%$  вместо  $30-50\%$ . Поэтому объектив  $20 \times 0,40$  дает достаточно резкое изображение. Важной особенностью объектива является наличие в нем полупрозрачной поверхности. Вследствие этого понижается до  $25\%$  освещенность изображения и, кроме того, появляются рефлексы, которые снижают контраст. При наблюдении объектов в проходящем свете освещенность изображения в  $25\%$  является еще вполне достаточной, при наблюдении в отраженном свете она

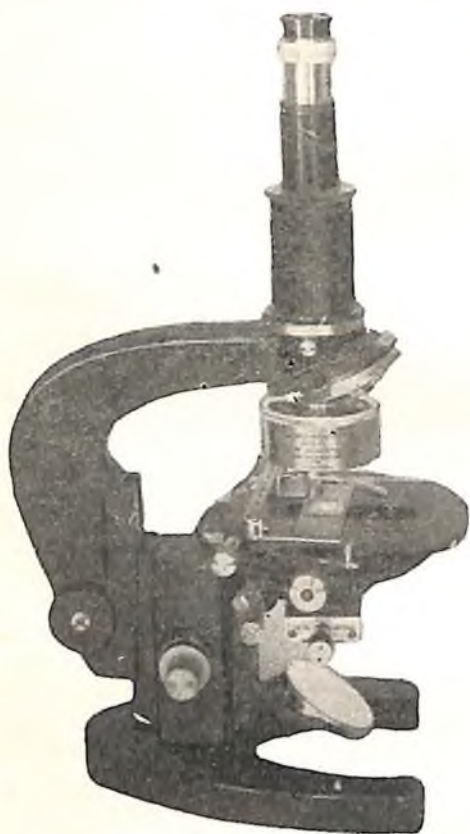


Рис. 15. Общий вид объектива  $20 \times 0,40$ , рабочее расстояние 30 мм на микроскопе МБИ-3.



мала. Поэтому работа над данными объективами и главным образом в направлении расчета новых систем должна продолжаться.

Объективы  $30 \times 0,60$ ;  $20 \times 0,80$  и  $40 \times 1,25$  имеют специальное назначение. Они предназначены для наблюдения толсто-слойных объектов в проходящем свете видимой области

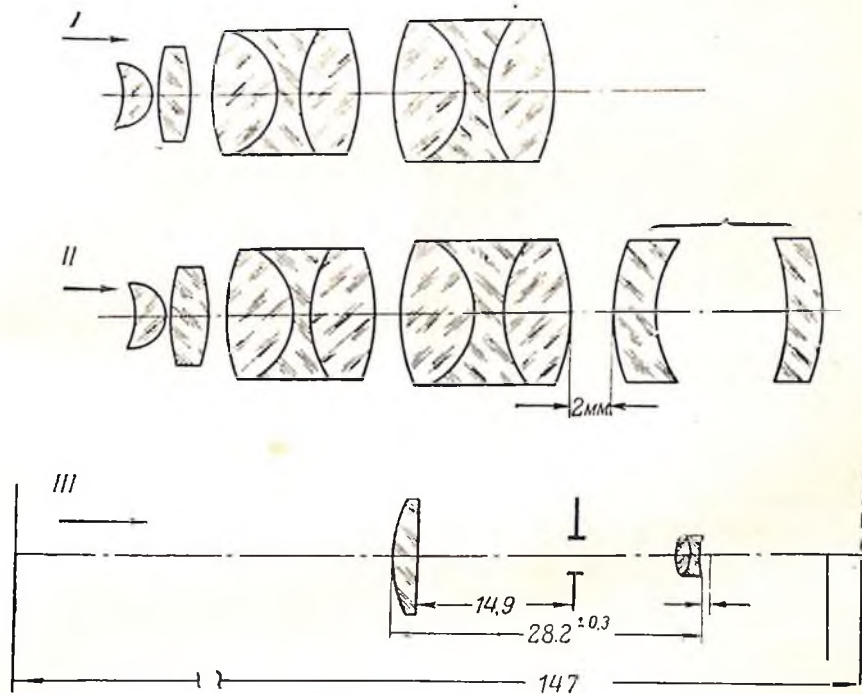


Рис. 16. Схема оптики линзового ахромата  $58 \times 0,80$  водной иммерсии для ультрафиолетового микроскопа.

I — кварц-флуоритовый объектив; II — объектив и коррекционная система; III — проекционный окуляр.

спектра. Первый рассчитан для наблюдения объектов, расположенных в толще среды от 0 до 4 мм. Он неудобен из-за толстого слоя иммерсии и имеет неодинаковую освещенность изображения при различной глубине объекта. Объективы  $20 \times 0,80$  и  $40 \times 1,25$  являются линзовыми апохроматами масляной иммерсии. Они дают вполне удовлетворительное качество изображения объектов, расположенных в слое желатины толщиной до 0,9 мм. При этом в высокоапертурном объективе  $40 \times 1,25$  одинаковая резкость изображения предметов, залегающих на различной глубине, достигается с помощью коррекционного кольца, при повороте которого изменяется расстояние между линзами и тем самым исправляется изображение.

## Б. Линзовые объективы для ультрафиолетового микроскопа

Выше отмечалось, что зеркально-линзовые объективы дают пониженную резкость изображения по сравнению с линзовыми из-за экранирования центральных лучей.

Чтобы улучшить качество изображения, даваемого ультрафиолетовым микроскопом, предлагается серия линзовых ахроматических объективов слабого, среднего и сильного увеличений. Один из них — объектив  $58 \times 0,80$  водной иммерсии —

оригинальной конструкции, рассчитан М. К. Турбиной. Объектив вместе с коррекционной системой и специальным проекционным окуляром позволяет вести наблюдение и фотографирование объектов в промежутке длин волн от 434 до 365 м $\mu$ . Объектив без коррекционной системы, но с тем же окуляром без изменения фокусировки позволяет фотографировать объекты в ультрафиолетовой области в промежутке длин волн от 280 до 248 м $\mu$ .

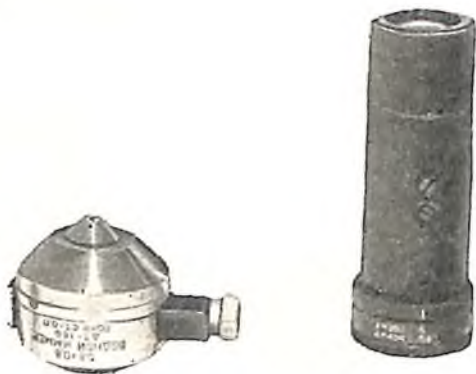


Рис. 17. Общий вид объектива  $58 \times 0,80$  и проекционного окуляра к нему.

На рис. 16 представлена оптическая схема системы, состоящая из: 1) кварц-флуоритового объектива  $58 \times 0,80$ ; 2) коррекционной системы и 3) проекционного окуляра с фокусным расстоянием равным 25 мм.

На рис. 17 представлен общий вид объектива и окуляра. В корпусе объектива сделана прорезь, через которую коррекционная система, смонтированная в оправе — ползуне, может включаться в систему объектива и выключаться наподобие анализатора в поляризационном микроскопе.

Проекционный окуляр имеет переменное увеличение: от  $5^{\times}$  до  $10,3^{\times}$  для  $\lambda = 260$  м $\mu$  и от  $5,6^{\times}$  до  $11,5^{\times}$  для  $\lambda = 434$  м $\mu$ .

Это осуществляется изменением расстояния между линзами окуляра поворотом кольца (в верхней части окуляра) с индексом. Цифры, указывающие увеличение, нанесены на неподвижной части оправы окуляра.

Изменение масштаба изображения на светочувствительной пластинке достигается изменениями как увеличения окуляра, так и расстояния от пластинки до окуляра.

В табл. 8 представлена зависимость между этими величинами.

В результате визуальных и фотографических испытаний

установлено, что линзовые ахроматические объективы  $50 \times 0,80$  дают более отчетливое изображение, чем зеркально-линзовые  $65 \times 0,80$ , как в видимой, так и в ультрафиолетовой областях спектра.

Таблица 8  
Зависимость между расстоянием пластинки  
от окуляра и увеличением окуляра

Расстояние светочувствительной пластинки от последней поверхности окуляра в мм	Увеличение окуляра	
	$\lambda = 260 \text{ н.д.}$	$\lambda = 434 \text{ н.д.}$
125	5,0 ×	5,6 ×
150	6,0 ×	6,8 ×
175	7,1 ×	7,9 ×
200	8,2 ×	9,1 ×
225	9,2 ×	10,3 ×
250	10,3 ×	11,5 ×

### III. ОКУЛЯРЫ

При работе с микроскопом выбор окуляра и его увеличения определяется в основном типом и апертурой объектива. Как известно, окуляры Гюйгенса и ортоскопические окуляры применяются с ахроматическими объективами слабых и средних увеличений; компенсационные окуляры употребляются с объективами-апохроматами и сильными ахроматами.

Имеются объективы, которые дают хорошее изображение лишь при применении специально рассчитанных для них окуляров. Таковы, например, объективы  $108 \times 1,60$  монобромнафталиновой иммерсии и планахроматы  $40 \times 0,65$  и  $75 \times 0,90$ .

Выпускаются окуляры, увеличение которых лежит в пределах от  $3^x$  до  $50^x$ . Кроме того, в виде опытных образцов изготовлены окуляры 100-кратного увеличения.

Новые типы окуляров с увеличением  $5^x$  и  $7^x$  рассчитаны специально для объективов  $40 \times 0,65$  и  $75 \times 0,90$  с плоским изображением, улучшенные компенсационные окуляры  $5^x$  и  $15^x$  для сильных апохроматов  $70 \times 1,25$  — водной иммерсии;  $90 \times 1,30$  и  $90 \times 1,40$  — масляной иммерсии и некоторых других. Перечисленные объективы имеют несколько больший хроматизм увеличения, поэтому обычные компенсационные окуляры не могут его полностью исправить.

Улучшенные окуляры дают хорошее изображение лишь в сочетании с сильными апохроматами.

### IV. КОМПЛЕКТОВАНИЕ МИКРОСКОПОВ ОБЪЕКТИВАМИ И ОКУЛЯРАМИ

Микроскоп МБИ-1, изготавливаемый крупносерийно, снабжается тремя ахроматическими объективами  $8 \times 0,20$ ;  $40 \times 0,65$ ;  $90 \times 1,25$ , и тремя окулярами  $7^x$ ,  $10^x$ ,  $15^x$ . Микроскоп МБИ-2

комплектуется четырьмя апохроматами —  $10 \times 0,30$ ;  $20 \times 0,65$ ;  $60 \times 1,0$ ;  $90 \times 1,30$  и пятью компенсационными окулярами:  $K5^x$ ,  $K7^x$ ,  $K10^x$ ,  $K15^x$ ,  $K20^x$ .

Значительно богаче комплектуются новые типы микроскопов: ультрафиолетовый (МУФ-1) — 12 объективов, микрокиноустановка (МКУ) — 16, микроскоп биологический исследовательский (МБИ-6) — 18 объективов.

При этом новые микроскопы комплектуются не только большим количеством ахроматов и апохроматов для проходящего и отраженного света, но и всеми новыми объективами, как то: фазовоконтрастными, зеркально-линзовыми, объективами водной иммерсии и др. Более рационально оставить в микроскопах минимальный набор объективов ахроматов и апохроматов, а остальные приобретать отдельно.

## У. КАЧЕСТВО ИЗОБРАЖЕНИЯ ОБЪЕКТИВОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО УЛУЧШЕНИЯ

1. Изображение прозрачных (слабо окрашенных) объектов в микроскопе получается не всегда достаточно контрастным. Для повышения контраста изображения в процессе изготовления объективов стремятся устранить вредные отражения (рефлексы) от поверхностей линз, оправ, корпуса объектива и тубуса микроскопа.

Рефлексы от оптических деталей устраняют (ослабляют) обычно путем просветления оптики. Для этого на поверхность линзы наносится тонкая пленка. Линзы объектива в этом случае имеют слегка синеватый или фиолетовый оттенок. Ввиду того, что вредное действие рефлексов сильнее проявляется при работе объективов в отраженном свете, в настоящее время просветление оптики распространяется в первую очередь на объективы без покровного стекла.

2. Некоторые сорта оптического стекла, применяемые преимущественно в апохроматах, являются нестойкими. По прошествии определенного времени оптические детали, изготовленные из такого стекла, покрываются налетом (в виде капелек воды), а изображение, даваемое объективом, становится вялым и завуалированным. В настоящее время линзы подвергаются специальной обработке, в процессе которой на них наносится тонкая, незаметная на глаз пленка.

3. Качество изображения микроскопов серийного выпуска зависит не только от расчета системы и точности изготовления, но в большей мере от правильного применения объективов и окуляров, настройки освещения, а также от качества покровных и предметных стекол и иммерсионного масла.

При расчете объективов, предназначенных для работы с покровным стеклом, принимают во внимание влияние последнего. Несмотря на незначительную толщину, покровное

стекло изменяет качество изображения вследствие того, что расположено в сильно сходящемся пучке лучей. Расчет объективов производят на толщину покровного стекла 0,17 мм. Отступление от нее на  $\pm 0,02$  мм заметно снижает качество изображения сильных, в особенности сухих объективов.

Рабочее расстояние у сильных объективов мало. Если покровное стекло толстое, то при фокусировке изображения исследователь может прижать фронтальную линзу к стеклу и тем повредить ее. В результате часто иммерсия попадает внутрь объектива и отмечается даже выпадение линзы.

Встречаются случаи, когда при работе на биологическом микроскопе иммерсионные объективы используются без покровных стекол. Этим исследователи заведомо ухудшают качество изображения. Если исследование объектов ведется без применения покровных стекол, то для получения хорошего изображения необходимо применять иммерсионное масло с показателем преломления больше обычного ( $n_D = 1,52$  вместо 1,515). Такое масло изготавливается по специальному заказу.

4. Среди объективов микроскопа имеется большая группа иммерсионных, при работе с которыми между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом, а также между конденсором и предметным стеклом помещают жидкость с показателем преломления больше, чем у воздуха. Различают масляную или однородную, водную, глицериновую, монобромнафталиновую и другие иммерсии.

Чаще всего объективы рассчитывают на применение масляной однородной иммерсии, т. е. жидкости, показатель преломления которой приблизительно равен показателю преломления фронтальной линзы объектива и покровного стекла.

Глицерин и монобромнафталин как иммерсионные жидкости применяются реже, чем иммерсионное масло, они требуются в малых количествах и их получение не представляет затруднений. О водной иммерсии говорить не приходится, так как она имеется везде.

Хуже обстоит дело с масляной иммерсией. При расчете объективов оптические постоянные иммерсионного масла приняты равными:

$$\begin{aligned} \text{показатель преломления } n_D &= 1,515 \text{ при } T = 21^\circ, \\ \text{частная дисперсия } n_F - n_C &= 0,0106. \end{aligned}$$

Именно такая жидкость должна применяться при работе с объективами масляной иммерсии. Даже незначительные отклонения оптических постоянных масла от номинала ухудшают качество изображения, даваемое объективами с апертурой 1,30 и 1,40. Отклонение показателя преломления на 2—3 единицы третьего десятичного знака вызывает размытость и вуалирование изображения. Отклонение частной дисперсии на 4—5 единиц четвертого десятичного знака вызывает у апохроматов

несвойственную им окраску, и таким образом они теряют свои преимущества перед ахроматами. Для объективов ахроматов предел отклонения мог бы быть расширен, так как они сами имеют хроматическую aberrацию, но так как нераціонально иметь одно масло для ахроматов, другое для апохроматов, допуски на масло установлены с ориентацией на апохроматы.

5. Рассмотрим теперь вопросы, связанные с оценкой качества изображения объективов в период эксплуатации. Микроскоп в целом, а в особенности объективы требуют, как известно, бережного обращения.

Помимо явных причин порчи изображения, как то: царапин, выбоин и грязи на наружных линзах, попадания иммерсии внутрь объектива, в период эксплуатации могут быть замечены недостатки, портящие изображение, но не отражающиеся на внешнем виде объектива. Такова, например, децентрировка объектива, вызываемая обычно сотрясением его или развинчиванием прижимных колец, налеты на оптике, расклейки линз и пр. Все это важно своевременно выявить и отдать объектив на исправление.

Имеется простой метод оценки качества изображения объективов, называемый дифракционным. Для реализации его надо иметь препарат, представляющий собой покрывное стекло толщиной 0,17 мм, посеребренное или алюминированное с одной стороны и приклеенное бальзамом к предметному. На препарате имеются обычно отдельные мелкие отверстия — точки, группы точек и тонкие линии, свободные от серебра и пропускающие свет. Объектив изображает мелкие отверстия в виде дифракционных кружков рассеяния, по виду и форме которых можно делать заключения о децентрировке и прочих погрешностях системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

Соколова Т. И. Объективы микроскопа, их сборка и испытание. Л., 1950. — Norris, Seeds and Wilkins. Reflecting Microscopes with spherical Mirrors. Journ. Opt. Soc. Amer., 2, 1951. — Payne B. O. Observations on Microscopes Condensers, Objectives and Eyepieces. Part II, Microscope Objectives. Journ. Royal micr. Soc., 70, 1950. — V a r e r R. Progress in Practical Microscopy. Journ. Royal micr. Soc., dec. 1951.

## ФАЗОВОКОНТРАСТНАЯ И ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Г. А. ИОФФЕ

(Ленинград)

Глаз человека может воспринимать изображение структуры объекта под микроскопом только в том случае, если элементы структуры отличаются по освещенности либо по цвету. При проходящем свете эти различия в изображении могут быть вызваны изменениями общего или избирательного поглощения света в объекте.

Естественные биологические объекты являются практически прозрачными в пределах видимого спектра. Элементы их структуры по отношению к проходящему свету не имеют различного поглощения и, как правило, бесцветны, поэтому изображение естественных биологических объектов в микроскопе не контрастно и не может дать представления об их строении.

Именно характер биологических объектов обусловил применение метода дифференциального окрашивания препаратов, в результате которого малоконтрастные прозрачные объекты превращаются в поглощающие (контрастные). Однако техника дифференциального окрашивания имеет существенные недостатки: во-первых, не все объекты и не все детали в них поддаются действию красителей, во-вторых, эта техника мало пригодна для изучения живых объектов. Поэтому вопрос о повышении контраста изображения прозрачных объектов весьма актуален.

Такие способы повышения контраста при микроскопировании, как уменьшение диаметра диафрагмы конденсора, косое освещение, наблюдение в темном поле (при косом и центральном падении света), нельзя признать полноценными, и каждый из них имеет свои недостатки. Так, при сильном диафрагмировании конденсора, помимо ослабления освещения, происходит снижение разрешающей способности микроскопа. Способ косого освещения хотя и дает возможность подчеркнуть рельеф объекта, но не обеспечивает точного соответствия изображения объекту. Темнопольное наблюдение, при котором выявляются лишь контуры объекта, также может исказить

восприятие его и вызвать ошибки, связанные с некоторым преувеличением контраста.

Более совершенный контраст изображения прозрачных объектов дает способ фазового контраста, обоснованный в 1934 г. голландским ученым Цернике и получивший значи-

тельное распространение за последние 10 лет. Этот новый метод повышения контраста позволяет видеть те элементы структуры, которые отличаются от среды по показателю преломления или по толщине. Распределение освещенности в поле зрения соответствует изменениям показателя преломления или толщины объекта.

Чтобы представить хотя бы в самом общем виде принцип действия фазовоконтрастного микроскопа, необходимо вспомнить основные положения теории образования изображения в микроскопе (по Аббе). В микроскопе возникает сначала первичное изображение (в задней фокальной плоскости объектива), которое является результатом дифракции на объекте света, идущего от источника. Изображение самого объекта, называемое вторичным, появляется как результат соединения и взаимодействия световых волн, идущих от первичного изображения. Чем больше апертурный угол объектива микроскопа, тем больше дифракционных пучков от объекта попадает в первичное изображение и тем точнее вторичное изображение воспроизводит объект.

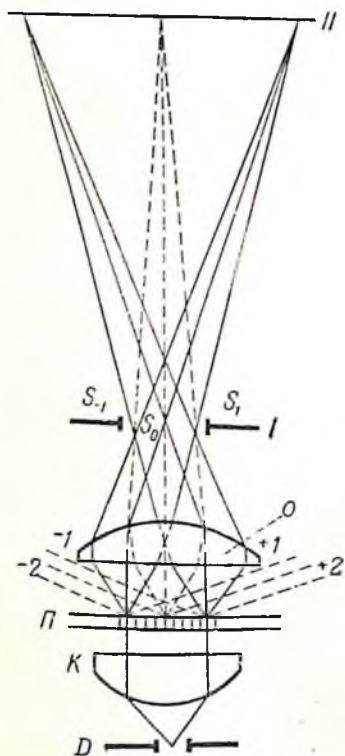


Рис. 1. Схема, поясняющая теорию Аббе.

$D$  — диафрагма конденсора;  $K$  — конденсор;  $II$  — объект (дифракционная решетка);  $O$  — объектив;  $I$  — плоскость первичного изображения;  $II$  — плоскость вторичного изображения;  $S_0$  и  $S_{-1}$   $S_{+1}$  — дифракционные изображения источника света.

На рис. 1 показан ход лучей в микроскопе и дано пояснение теории образования изображения для объекта, имеющего вид дифракционной решетки.

Источником служит отверстие диафрагмы конденсора. Цифрами 0, +1, -1, +2, -2 обозначены дифракционные пучки нулевого, первого и т. д. порядков, возникающие в результате дифракции света от периодической структуры (решетки).

Основным законом теории является то положение, что при



условии попадания в объектив всех дифрагированных на объективе лучей в плоскости  $H$  возникает изображение, подобное объекту как по структуре, так и по фазе.

Именно вопрос о фазе световых колебаний в объекте и в изображении и послужил исходным моментом для метода фазового контраста. В самом деле, проходя через прозрачный бесцветный объект, свет претерпевает изменения только по фазе. Превратить эти изменения фаз в объекте в изменения освещенности в изображении — задача фазового микроскопа. Она осуществляется путем искусственного приема, который первичное изображение прозрачного объекта приводит к виду первичного изображения поглощающего объекта. Различия в картине первичного изображения для прозрачного объекта от поглощающего заключаются прежде всего в отличии фазы центрального дифракционного максимума от фазы боковых дифракционных максимумов. Кроме того, яркость центрального максимума значительно превышает яркость боковых по сравнению с картиной первичного изображения поглощающего объекта.

Следовательно, чтобы уравнивать картины первичных изображений, надо ввести изменение фазы центрального максимума и ослабить его яркость. Для этого от всего дифрагированного света выделяют центральный дифракционный максимум путем введения в конденсоре кольцевой диафрагмы (рис. 2). В плоскость первичного изображения, находящегося, как правило, внутри объектива, помещают так называемое фазовое кольцо (рис. 2), которое одновременно изменяет фазу нулевого дифракционного пучка лучей и уменьшает его интенсивность. Весь свет, прошедший объект без отклонений, обязательно пройдет через фазовое кольцо. Остальной дифрагированный свет пройдет также и помимо фазового кольца, не испытав никаких изменений. Соединяясь в плоскости вторичного изображения, световые волны, прошедшие и не

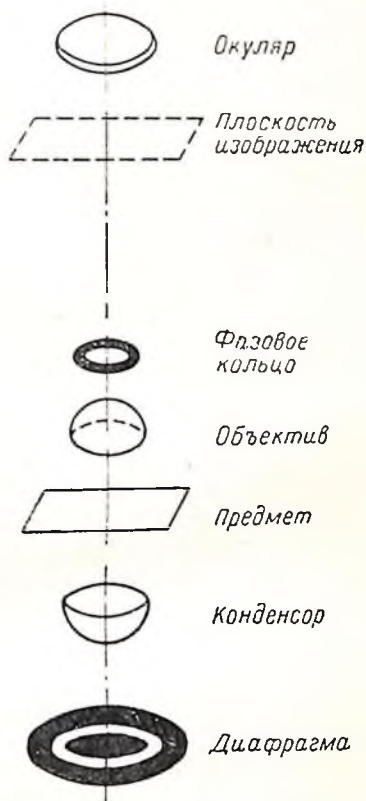


Рис. 2. Принципиальная схема фазово-контрастного микроскопа.

прошедшие фазовое кольцо, интерферируют, в результате чего получается контрастное изображение структуры прозрачного объекта.

Контраст может быть либо позитивным, при котором более плотные включения в объективе являются темнее, чем фон, или негативным, когда более плотные включения объектива выглядят в изображении светлее. Позитивный или негативный контраст в изображении возникает в том случае, если свет, проходящий через фазовое кольцо, будет опережать по фазе дифрагированный свет или отставать от него.

Величина изменения фазы, которую необходимо задавать фазовому кольцу, зависит от величин фазовых изменений в самом объекте.

В настоящее время разработаны и выполнены фазовоконтрастные микроскопы, позволяющие иметь переменные значения фазового изменения, а также интенсивности света, проходящего через фазовое кольцо (в пределах: фаза от нуля до целой длины волны, интенсивность от 100% до нуля).

В подобных микроскопах можно достигать значительного контраста в изображении путем изменений только интенсивности центрального максимума (переменное поглощение фазового кольца). Получаемый при этом эффект принято называть амплитудным контрастом. Для малых изменений фаз в объекте эта величина изменения фазы, даваемая фазовым кольцом, принята постоянной и равной  $\frac{1}{4}$  длины световой волны. Постоянное значение придано также и поглощению в фазовом кольце ( $\sim 70\%$ ).

Позитивный фазовый контраст с такими характеристиками осуществляется в так называемом „фазовоконтрастном устройстве“ КФ-1, которое выпускается отечественной промышленностью в виде принадлежностей к стандартным микроскопам МБИ-1, МБИ-3, МБИ-4, М-9 и М-10.

Комплект принадлежностей КФ-1 для фазового контраста (рис. 3) состоит из: 1) четырех специальных фазовых объективов-ахроматов ( $10\times$ ,  $20\times$ ,  $40\times$  и  $90\times$  — масляная иммерсия), внутри которых заключены фазовые колечки; 2) конденсора (с набором кольцевых диафрагм) и 3) вспомогательного микроскопа (МИР-4), вставляемого вместо окуляра.

Имеются также специальные фазовые объективы водной иммерсии, которые следует особенно рекомендовать для изучения живых объектов.

Чтобы применить устройство КФ-1 с микроскопом, необходимо удалить собственный конденсор микроскопа, вставить вместо него конденсор от КФ-1 и ввинтить в револьвер фазовые объективы.

Порядок работы с фазовоконтрастным устройством следующий.

1. После фокусировки микроскопа на резкое изображение объекта необходимо правильно настроить осветитель. Для этого на диске конденсора должна быть поставлена буква „О“, и перемещением конденсора вдоль оси, а также покачиванием зеркала надо получить изображение максимально закрытой присовой диафрагмы осветительной лампы в центре поля зрения микроскопа. После этого, заменив окуляр на специальный вспомогательный микроскоп МИР-4, следует получить путем перемещения последней линзы МИР-4 резкое изображение фазового кольца в объективе. Продольным перемещением лампочки в осветителе надо получить резкое изображение нитей лампы, расположенных по всему зрачку. При этом ни в коем случае нельзя прикасаться ни к микрометрическому винту, ни к кремальере конденсора.

2. После наладки освещения необходимо центрировать фазовую диафрагму, для чего надо установить диск конденсора на цифру, соответствующую увеличению объектива. Тогда одновременно с фазовым кольцом в МИР-4 будет наблюдаться резкое изображение светлой кольцевой диафрагмы конденсора, как правило, смещенной относительно темного фазового кольца.

Действуя одновременно обоими винтами конденсора (рис. 3), необходимо точно совместить светлое кольцо диафрагмы с фазовым.

На этом заканчивается предварительная настройка фазово-контрастного микроскопа и можно приступать к наблюдению объекта, заменив МИР-4 окуляром и открыв диафрагму осветителя (лампы) до краев поля.

При переходе к наблюдению с другим объективом необходимо после быстрого контроля освещения снова произвести центровку соответственной кольцевой диафрагмы конденсора относительно фазового кольца. Следует помнить, что для разных объективов фокусировка вспомогательного микроскопа МИР-4 будет различной, кроме того, присовая диафрагма конденсора всегда должна быть полностью открыта.

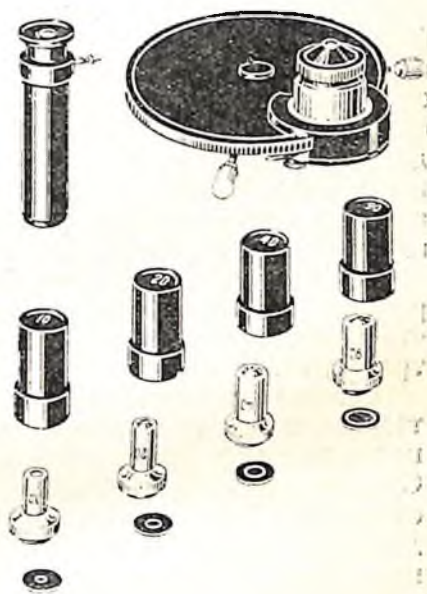


Рис. 3. Комплект фазово-контрастных принадлежностей КФ-1.

При наблюдении на фазовоконтрастном микроскопе бывает весьма полезен слабозеленый либо желто-зеленый светофильтр, вкладываемый под конденсором.

Фазовоконтрастное устройство позволяет также вести наблюдение в обыкновенном светлом поле. Для этого достаточно установить на диске конденсора цифру 0, а в особо ответственных (в смысле разрешения мелких деталей) случаях следует заменить фазовый объектив на обычный ахромат или апохромат.

Предпочтительная толщина препарата для наблюдения с фазовым контрастом зависит от соотношений оптической плотности в самом прозрачном объекте и лежит в пределах от 3 (для более плотных объектов) до 10  $\mu$ . Однако такое общее указание относительно толщины препарата недостаточно для исследователя. Работая с фазовым контрастом, он должен выработать индивидуальный подход к изготовлению препаратов, а также проявлять большую осторожность при оценке наблюдаемой картины.

Так, для тонких срезов, имеющих мелкую структуру при равномерной толщине, можно уверенно делать заключения, что более темные элементы структуры (при позитивном контрасте) являются плотнее, чем светлые детали или среда.

Однако для объектов с меняющейся в пределах поля зрения толщиной или если объект представляет совокупность зерен или шариков различных размеров такого вывода делать нельзя. Степень потемнения отдельных элементов будет зависеть как от плотностей (показателей преломления), так и от толщины. Для того чтобы давать хотя бы приближенную количественную оценку, необходимо иметь уверенность в постоянном значении толщины либо показателя преломления в данном объекте.

Надо также помнить, что эффект фазового контраста в большой степени зависит от размеров структуры объекта. Максимальная величина фазового контраста получается при весьма мелкой структуре. В том случае, когда объект наряду с мелкой структурой имеет крупные детали, хотя и с той же самой оптической плотностью, центральные участки их остаются при фазовом контрасте светлыми, контрастируют только края.

Однако для большинства типичных гистологических препаратов (например срезов почки, яичника, печени, мышц и т. д.) способ фазового контраста позволяет выявлять основные элементы структуры, открывая возможности также и прижизненных наблюдений. На рис. 4 представлена фотография изображения, получаемого с фазовоконтрастным устройством КФ-1 (неокрашенный фиксированный срез).

Для объектов, структура которых содержит включения, очень сильно отличающиеся по своему показателю преломления от всех других деталей объекта, применение фазово-

контрастного устройства не дает хороших результатов: более плотные включения видны крайне плохо. Для подобных объектов целесообразно пользоваться не КФ-1, а МИ-18.

Успех применения фазового контраста определяется тем, насколько различия по показателю преломления в объекте отражают его морфологические особенности.

В настоящий момент нужно ставить вопрос о том, чтобы фазово-контрастное устройство применялось в любой исследовательской лаборатории.

Интерференционная биологическая микроскопия имеет то же назначение, что и метод фазового контраста. Она также позволяет наблюдать контрастные изображения прозрачных неконтрастных объектов, причем получаемый контраст также зависит от показателя преломления и толщины деталей объекта, т. е. определяется фазовыми изменениями света, прошедшего через объект. Но механизм образования контрастного изображения в интерференционном микроскопе является специфическим. При интерференционных схемах первичное изображение в микроскопе остается неприкосновенным, а на вторичное (неконтрастное) изображение прозрачного объекта накладывается дополнительная световая волна, так



Рис. 4. Микрофотография (с объективом  $40 \times 0,65$ ) фиксированного неокрашенного среза желтого тела яичника кролика ( $8 \mu$ ) в системе фазового контраста.

называемая волна сравнения, от взаимодействия с которой изображение объекта не только делается контрастным, но может стать цветным. Иными словами, в каждой точке вторичного изображения световая волна, прошедшая через соответствующую точку объекта и получившая некоторое изменение фазы, встречается с другой световой волной от того же источника, которую можно назвать эталонной, так как она идет мимо объекта и имеет первоначальную фазу, одинаковую для всех точек поля. При встрече этих двух волн — претерпевшей изменение в объекте и эталонной — происходит интерференция их, т. е. сложение согласно законам физической оптики. В результате такого сложения происходит усиление или ослабление освещенности отдельных точек объекта, возникает так называемое интерференционное изображение его.

В случае освещения объекта белым светом, состоящим из широкого диапазона длин волн, при некоторых сочетаниях толщины и показателей преломления в объекте может возникнуть цветной контраст изображения.

К настоящему времени известно большое количество различных схем интерференционных микроскопов для прозрачных объектов, выполненных в Советском Союзе и за границей (Розенберг, 1953). Отличительные особенности их заключаются лишь в способе получения дополнительной интерферирующей световой волны от того же источника, которым освещается объект.

Для Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова выпущена серия интерференционных микроскопов,

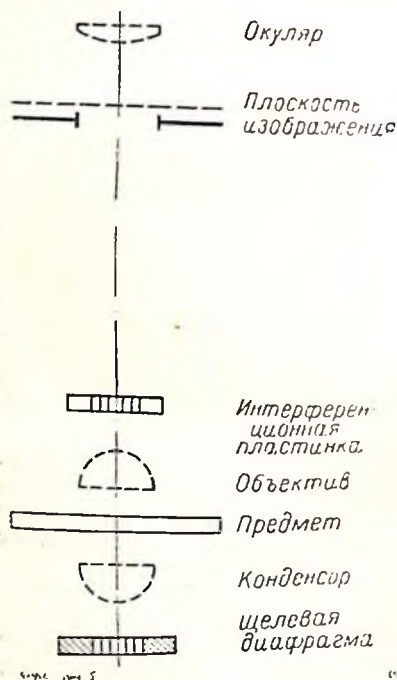


Рис. 5. Принципиальная схема интерференционного микроскопа МИ-18.

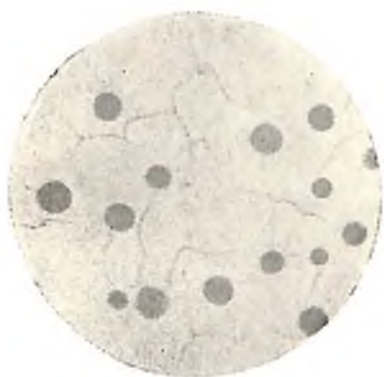
объединенных со схемой переменного фазового микроскопа в виде интерференционного приспособления МИ-18 к биологическим микроскопам.

Принципиальная оптическая схема интерференционного микроскопа МИ-18 представлена на рис. 5, причем детали, относящиеся к интерференционной схеме, изображены сплошными линиями, а детали самого микроскопа, к которому присоединяется приспособление, — пунктирными.

Действие интерференционной схемы МИ-18 в общем виде может быть представлено следующим образом. Световая волна, прошедшая через объект (освещение объекта происходит от щелевой диафрагмы) (рис. 5), претерпевает искажение своей формы от действия оптических неоднородностей в объекте. На пути этой световой волны в фокальной плоскости объектива микроскопа помещается специальная

интерференционная пластинка, которая представляет систему тонких бороздок в прозрачном слое и по размерам точно соответствует системе щелей в диафрагме.

В результате дифракции света в интерференционной пластинке возникает вторая дополнительная световая волна, свободная от искажений. В плоскости изображения объекта обе указанные волны интерферируют, вследствие чего отдельные участки объекта получают в изображении отличную от фона освещенность или цвет. Результат интерференции обусловлен двумя характеристиками объекта в данной точке: показателем преломления  $n$  и толщиной  $l$ . Цвет зависит от значения  $nl$  — произведения этих величин.



*a*



*б*

Рис. 7.

*a* — микрофотография (с объективом  $40 \times 0,65$ ) фиксированного неокрашенного среза (10 м) яичника курицы в схеме обыкновенного микроскопа; *б* — то же, в схеме интерференционного микроскопа МИ-18.

*По конструкции интерференционное приспособление представляет набор принадлежностей к биологическому микроскопу и может быть использовано с биологическими микроскопами МБИ-1, МБИ-3 и МБИ-4. Оно состоит из насадки, которая надевается на микроскоп между револьвером и наклонной окулярной трубкой, специального конденсора (сходного с конденсором от устройства КФ-1) и вспомогательного микроскопа МИР-4.*

На рис. 6 представлена фотография приспособления МИ-18, установленного на биологическом микроскопе МБИ-1. Как уже говорилось, пользуясь приспособлением МИ-18, можно быстрее переходить от обычного светлопольного наблюдения к наблюдению в схеме микроскопа с переменным фазовым контрастом, предложенной М. В. Лейкиным, либо в схеме интерференционного микроскопа (по Н. И. Полякову).

В комплект интерференционного приспособления МИ-18 микрообъективы не входят, так как оно позволяет использовать стандартные отечественные объективы ахроматы  $10\times$ ,  $20\times$ ,  $40\times$  и  $90\times$  масляной иммерсии.

Пользование интерференционным приспособлением требует от исследователя некоторого навыка. Так, например, при работе с переменным фазовым контрастом, помимо настройки, аналогичной имеющейся в микроскопе КФ-1, требуется еще регулировка компенсатора, расположенного в верхней части насадки. Эта регулировка дает возможность подобрать наилучшее значение фазы и амплитуды для фазового кольца.

Наладка интерференционной схемы микроскопа в приспособлении заключается в точном совмещении изображения светлых щелей диафрагмы (рис. 5) со штрихами интерференционной пластинки при наблюдении через вспомогательный микроскоп МИР-4, вставляемый вместо окуляра.

На рис. 7 б показано цветное изображение прозрачного бесцветного объекта, рядом — вид этих же объектов при наблюдении в обычный микроскоп 7 а.



Рис. 6. Фотография интерференционного приспособления МИ-18.



Интерференционная микроскопия дает возможность получения контрастных изображений для более широкого круга прозрачных объектов (с большими размерами, плавными переходами показателей преломления), однако это достигается за счет некоторого усложнения техники микроскопирования по сравнению с обычным фазовым контрастом (КФ-1). Поэтому правильнее расценивать данные методы как дополняющие друг друга. Однако практически интерференционные микроскопы для прозрачных объектов применяются значительно реже, чем фазовоконтрастные.

Невозможно заранее сделать точные методические рекомендации по части изготовления препаратов, расшифровки получающихся контрастных или цветных изображений, так как для этого требуется накопление большого опыта работы в разнообразных областях (гистология, микробиология, ботаника и т. д.). Методика интерференционного и фазовоконтрастного способов исследования прозрачных объектов подлeжит еще длительной разработке.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Александров В. Я. и Крюкова З. И. Цитофизиологический анализ естественной гибели клеточных элементов в организме. Известия АН СССР, серия биологическая, 2, 1950. — Розенберг Г. В. Интерференционная микроскопия. Успехи физических наук, 50, 2, 1953. — Шпольский Э. В. Новые методы в микроскопии. Успехи физических наук, 32, 1947. — Venet A. H., Osterberg H., Junnik H., Richards O. W. Phase Microscopy. Principles and Applications. New York, 1952. — Larnike F. Beugungstheorie des Schneidverfahrens und seiner verbesserten Form der Phasenkontrastmethode. Physica, 1, 1934.
-

## ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В ЦИТО-И ГИСТОФИЗИОЛОГИИ

М. Г. МЕЙСЕЛЬ  
(Москва)

В решении современных задач теоретической и прикладной биологии немалое значение приобретает вопрос о разработке и использовании более совершенных, тонких и скоростных методов, которые позволили бы исследовать явления глубже, в динамике, в развитии. К таким методам относится люминесцентная, или флуоресцентная, микроскопия.

Развитие теории и техники люминесцентного исследования, чему в высшей степени способствовали работы акад. С. И. Вавилова, дает возможность широко использовать люминесцентную микроскопию в области биологии и медицины (Мейсель, 1940, 1947, 1949; Константинова-Шлезингер, 1948; Хайтингер, 1938).

Фотолюминесценцией, или флуоресценцией, мы называем свечение объекта, возбуждаемое световой энергией, поглощенной им. В силу ряда физических закономерностей происходит размен более крупных поглощенных световых квантов на меньшие кванты люминесценции. Вследствие этого отдаваемое световое излучение (люминесценция) энергетически беднее возбуждающего света, т. е. оно обычно является более длинноволновым или сдвинутым в сторону красной части спектра. Исходя из этого, люминесценцию выгодно возбуждать либо ультрафиолетовыми лучами 300--400  $\mu$ , либо сине-фиолетовым светом; при этом мы можем рассчитывать получить люминесценцию в широком диапазоне всего или почти всего видимого спектра, т. е. цветную светящуюся картину.

Для люминесцентного микроскопирования необходимы: 1) источник возбуждающего люминесцентного света, 2) светофильтры, 3) обычный биологический микроскоп, 4) флуоресцирующие „красители“ для обработки самостоятельно нефлуоресцирующих структур и других компонентов препарата.

Для возбуждения люминесценции ультрафиолетовым светом необходим специальный люминесцентный микроскоп или

мощный ультрафиолетовый осветитель с ртутнокварцевой горелкой типа СВД-120 с черным вудовским светофильтром.

Наш многолетний опыт показал, что для подавляющего числа исследовательских и практических аналитических задач не требуется сложных ультрафиолетовых установок. Для проведения даже весьма тонких исследований вполне достаточным является сильно концентрированный синий цвет, испускаемый в спектре белого света лампочкой накаливания, обладающей большой поверхностной яркостью. Для выделения сине-фиолетового участка спектра необходим стеклянный или жидкий синий светофильтр между источником света и зеркалом микроскопа, а для отсекания излишнего синего света — желтый стеклянный светофильтр, применяемый в фотографии (типа ЖС-17 или 18), который помещают на окуляр. В качестве синего светофильтра можно рекомендовать стеклянные светофильтры СС-8 или ФС-7 в комбинации с поглощающим красные лучи фильтром (СЗС-7).

Синий светофильтр может быть изготовлен самим исследователем следующим образом. В 116 мл дистиллированной воды растворяют 8,33 г химически чистого медного купороса и к этому раствору прибавляют 100 мл концентрированного аммиака. В результате получается насыщенный сине-фиолетовый прозрачный раствор, которым и заполняют оптическую кювету или любой стеклянный сосуд с плоскопараллельными стенками (сосуд для анатомических препаратов или даже флакон из-под цветочного одеколona). Если светофильтр окажется слишком насыщенным (в этом случае он поглощает чрезмерно много света), его разбавляют в несколько раз дистиллированной водой. Синий жидкий светофильтр должен быть подогнан под желтый окулярный светофильтр так, чтобы они друг друга дополняли, т. е. чтобы желтый фильтр полностью гасил яркий свет, проходящий через синий. Синий жидкий светофильтр может быть приготовлен и по рецепту, приведенному в статье Замкова.

В качестве источника света используют лабораторный осветитель точечного типа для микроскопа с хорошим стеклянным коллектором. Для не очень больших увеличений (до 400) достаточны выпускаемые промышленностью осветители ОИ-7 и ОИ-9. Для больших увеличений и получения ярких свечений мелких структур необходим более сильный источник света, каковым может служить лампа накаливания 100 *вт* с конической спиральной нитью или ртутно-кварцевая горелка СВД-120, дающая достаточное количество синих и фиолетовых лучей.

Вся установка, следовательно, состоит из источника яркого света (с большой поверхностной яркостью) синего и дополнительно к нему желтого светофильтров и обычного биологического микроскопа. Эта установка, которую легко собрать

почти в любой лаборатории, работает так: белый, смешанный, свет, излучаемый источником, фильтруется через сине-фиолетовый светофильтр. Прошедший через него сине-фиолетовый свет отражается зеркалом в конденсор и последним собирается на препарате. В препарате возбуждается люминесценция, которая рассматривается через оптику обычного микроскопа. Избыточный, не поглощенный сине-фиолетовый свет, мешающий выявлению люминесценции, отсекается желтым светофильтром на окуляре, и, следовательно, в глаз наблюдателя попадают только люминесцентные лучи.

Ряд веществ, обычно встречающихся в живых организмах, обладает способностью к люминесценции без какой-либо специальной обработки. К их числу относятся витамины А и В<sub>2</sub>, порфирины, многие пигменты, некоторые липиды, стерны, антибиотики. Некоторые продукты нормального и патологического обмена зачастую характеризуются отчетливой собственной люминесценцией.

Однако несравненно большее значение, чем выявление собственной, или первичной, люминесценции приобретают приемы получения наведенной, или вторичной, люминесценции. Практически любой микроскопический препарат, любую структуру из нелюминесцирующих можно превратить в ярко люминесцирующие путем своеобразной люминесцентной или флуоресцентной „окраски“, т. е. обработки препарата подходящими флуоресцирующими веществами, так называемыми флуорохромами.

Среди флуорохромов имеются вещества, входящие в нормальный обмен организмов, т. е. не чуждые организму, а также естественные и синтетические красители, антибиотики и химиотерапевтические препараты. Из синтетических флуоресцирующих красителей наилучшими являются акридин оранжевый, корифосфин, флуоресценн, родамин, фосфин, флоксин. В качестве флуорохромов с успехом могут быть использованы некоторые химиотерапевтические препараты, такие, как риванол, акрихин, трипафлавин (эуфлавин) и др. Флуорохромы обычно применяются сильно разведенными в водных растворах (Мейсель, Кондратьева и Помощникова, 1951).

Метод люминесцентной микроскопии позволяет проводить исследования с живыми объектами, наблюдать в динамике проникновение, распределение и судьбу люминесцирующих веществ, как возникающих в организме в процессе нормального или патологического обмена, так и искусственно вводимых в организм, в ткани и клетки извне.

Изучаемые структуры или исследуемые вещества ярко светятся различными цветами, что на темном фоне нелюминесцирующих частей препарата создает необычайный контраст (см. рисунок).

Чувствительность этого метода очень высока. Достаточно

ничтожно малых количеств люминесцирующих веществ, чтобы ярко и отчетливо их обнаружить или выявить структуры, ими обработанные. Единичные бактерии и вирусные тельца в поле зрения могут быть легко открыты. Высокая чувствительность метода позволяет применять для прижизненной обработки очень сильно разведенные растворы флуорохромов, чем резко снижается их токсичность. Прижизненно флуорохромированные ткани продолжают расти, микроорганизмы — размножаются. Флуорохромы без вреда могут вводиться в кровоток животного.

При помощи люминесцентного микроскопа можно исследовать не только тонкие прозрачные объекты, но и ткани и органы животных *in situ*, пользуясь падающим сверху на объект возбуждающим светом. Для этого используют опак-иллюминаторы и ультраопак-иллюминаторы различных типов. В последнее время Брумберг и Гершгорин предложили специальный люминесцентный опак-иллюминатор, в котором в качестве наклонной пластинки, отражающей свет в объектив микроскопа, использованы тонкие стекла с особым интерференционным покрытием, разработанным Крыловой. Эти опак-иллюминаторы отражают через объектив микроскопа на объект 90% ультрафиолетового, фиолетового и синего света и пропускают без задержки лучи других частей спектра. Они работают несколько эффективнее обычных опак-иллюминаторов и особенно ультраопак-опак-ов. При помощи их можно получить исключительно яркие люминесцентные картины. Нет сомнения, что они окажутся чрезвычайно полезными для люминесцентного микроскопирования не только толстых непрозрачных, но и прозрачных объектов, яркость свечения которых при освещении через объектив возрастает пропорционально квадрату апертуры объектива, т. е. становится максимальной с высокоапертурными иммерсионными объективами, обладающими обычно и большим собственным увеличением.

Итак, для люминесцентной микроскопии характерно: 1) цветное изображение, имеющее несомненное преимущество перед монотонным серым, труднее различимым и дифференцируемым изображением; 2) высокая степень контрастности самосвещающегося объекта на темном нелюминесцирующем фоне; 3) широкая возможность исследования живых объектов как прозрачных, так и крупных, непрозрачных; 4) возможность исследования процессов, протекающих в живых организмах, особенно отдельных звеньев обмена веществ, что в широких масштабах недоступно для иных методов микроскопии; 5) возможность обнаружения и топографической локализации мельчайших микробов и ультрамикробов и ничтожно малых концентраций определенных веществ, а также развития весьма тонкого и чувствительного цито- и гистохимического анализа; 6) простота и широкая перспективность использования для скоро-



Люминесценция в синем свете микроскопических препаратов, обработанных слабым водным раствором акридина оранжевого.

1 — выделенный из тканей рибонуклеопротеид; 2 — выделенный из тканей дезоксирибонуклеопротеид; 3 — группа нормальных эпителиальных клеток из слизистой оболочки гортани человека (оранжевые — бактерии); 4 — группа раковых клеток (мазок из гортани).

стных методов диагностики, в частности для цитодиагностики.

Рассмотрим кратко некоторые области применения люминесцентной микроскопии.

В микробиологии люминесцентная микроскопия успешно служит для быстрого обнаружения и бактериоскопического распознавания бактерий и некоторых вирусов. Она применяется в бактериоскопической диагностике туберкулеза, проказы, дифтерии, гонорреи и некоторых вирусных инфекций, в частности определенных форм гриппа. Наши исследования показали, что люминесцентная микроскопия позволяет выявить в тканях и клетках животных мельчайшие формы микробов и, возможно, риккетсии, располагающиеся внутри клеток. Флуорохромирование и люминесцентно-микроскопическое выявление бактерий и вирусов имеет много преимуществ перед обычными бактериоскопическими методами (быстрота, простота получения препаратов, высокая контрастность). Не менее доступны для исследования при помощи люминесцентной микроскопии процессы взаимодействия микробов и простейших с антибиотиками, химиотерапевтическими препаратами и антителами.

Важный и трудный вопрос о различении под микроскопом живых и мертвых клеток точнее всего может решаться при помощи люминесцентного микроскопа.

Предложение зарубежных исследователей (Шуммельфер, 1950) применять для этой цели флуорохром акридин-оранжевый, который придает живым клеткам зеленое, а мертвым — красное свечение, при проверке у нас не дало безупречных результатов. Мы использовали для этой цели кислые флуорохромы, которые по-разному связываются с живым протопластом и дают различное по интенсивности и цвету свечение живых и мертвых клеток.

В цито- и гистофизиологии, как нормальной, так и патологической, люминесцентная микроскопия, особенно пропагандируемая нами прижизненная или суправитальная, также весьма полезна. Многие флуоресцирующие вещества, различно связываясь, адсорбируясь или растворяясь в веществах разных клеточных, неклеточных и тканевых структур, придают им разнообразное по цвету и яркости свечение. Так, например, акридин-оранжевый, относительно слабо связываясь с белками протоплазмы, придает им темнозеленое свечение. Больше его накапливается в ядре, и он, соединяясь с ядерными нуклеопротейдами, люминесцирует чрезвычайно ярко светозеленым; наконец, вызывая отщепление в протоплазме рибонуклеиновой кислоты и сочленяясь с ней, дает гранулы, светящиеся огненно-красным светом. Небольшие изменения в физико-химическом состоянии живого вещества (клеточного и неклеточного) могут быть уловимы по изменениям интенсивности и цвета люминесценции. Нами с Ларионовым и Кондратьевой (1950) было

показано, что многие флуорохромы свободно проникают в живые и неповрежденные клетки, перемещаются из цитоплазмы в ядра, где нередко накапливаются в значительно большей концентрации, что дает возможность прижизненно исследовать ядра и ядерное вещество. Люминесцентный анализ подтвердил, что ядра не отделены труднопроницаемой оболочкой от протоплазмы клеток и находятся с ней в постоянном обмене.

Некоторые флуорохромы акридинового ряда, так же как акридин оранжевый, ауорофосфин, корифосфин, будучи применены в одних и тех же концентрациях, придают, как было показано нами с Корчагиным (1952), яркозеленое свечение дезоксирибонуклеиновой кислоте и ее соединениям и ярко-красное — рибонуклеиновой кислоте и ее производным, рыхло связанным с белком.

Таким образом, прижизненная обработка флуорохромами дает в ряде случаев быстрый и точный ответ о локализации и распределении в клетке и неклеточных структурах определенных химических соединений. Вследствие чрезвычайной чувствительности люминесцентного анализа вообще люминесцентно-микроскопический анализ, без сомнения, может стать тончайшим цито- и гистохимическим методом. Особенно существенно то, что этот анализ может проводиться на живых объектах. Накопление в живом веществе, в клетках и тканях различных продуктов обмена, возрастные нарушения в обмене веществ, патологические изменения обмена тонко и отчетливо выявляются путем прижизненного флуорохромирования, а в ряде случаев путем обработки фиксированных срезов. При этом быстро и отчетливо обнаруживаются различные дегенерации, некрозы, амилоидоз и т. п. (Хайтингер и Гейзер, 1944).

Совместно с Гуткиной (1953) мы применили прижизненную люминесцентную микроскопию для цитодиагностики состояния органов и тканей. Мазки, отпечатки, соскобы, пунктаты, срезы с биопсического материала обрабатывались в течение 2—3 минут весьма слабыми растворами флуорохромов. Препараты тотчас же были готовы для исследования.

На основании изучения большого числа таких препаратов, полученных при анализе острых и хронических воспалительных процессов, доброкачественных и злокачественных опухолей, мы пришли к убеждению, что этот метод по простоте, скорости, красочности и контрастности получаемых картин превосходит существующие методы цитодиагностики по так называемым нативным, а также по фиксированным и окрашенным цитологическим препаратам. Он может оказаться очень полезным при экспериментальных исследованиях на животных и для быстрой цитодиагностики патологических состояний, особенно злокачественных опухолей.

Во многих случаях флуорохромирование дает возможность



выявить детали строения органов и тканей на фиксированных срезах тоньше, ярче и контрастнее, чем обычные гистологические окраски (Бобров, 1950).

Следует остановиться еще на одной весьма перспективной области применения люминесцентной микроскопии в цито- и гистофизиологии — на экспериментальном анализе функционального значения определенных структур не клеточного и клеточного живого вещества. П. В. Макаров прав, призывая с осторожностью относиться к широко применяемому, особенно за рубежом, выявлению функционального значения клеточных компонентов путем биохимического и физиологического изучения изолированных дробным центрифугированием из тканевых гомогенатов клеточных структур. Этот метод постоянно должен контролироваться опытами на живых неповрежденных клетках, тканях и органах. Такой контроль весьма тонко может быть осуществлен при помощи люминесцентной микроскопии. Многие из клеточных структур (ядра, хондриосомы, микросомы, вакуолярный аппарат, оболочки) избирательно адсорбируют те или иные флуорохромы. Адсорбция и концентрация их на структурах приводит, естественно, к временному полному или частичному блокированию функциональной активности этих структур, что сказывается в конечном счете на изменении определенных функций.

Сопоставление под люминесцентным микроскопом точной локализации и накопления флуорохромов на интересующих нас структурах с общей физиологической характеристикой объекта дает возможность глубже и точнее познавать физиологию клеточной и тканевой структурной организации (Мейсель, Помощникова и Шавловский, 1950).

В области гистофизиологии тканей и органов люминесцентная микроскопия позволяет досконально исследовать образование и судьбу ряда веществ нормального и патологического обмена, проникновение, распределение и превращения вводимых извне люминесцирующих соединений, как естественных, так и чужеродных, в том числе лекарственных; позволяет следить за процессами секреции и экскреции, за поведением макрофагов, за проницаемостью сосудов и т. д. (Ханзон, 1952; Франк и Лахнит, 1952).

Особенно интересные и широкие возможности открылись в связи с получением прочных соединений белков с флуоресцирующими веществами, например флуоресцеином. Недавно А. А. Красновским в лаборатории акад. Теренина был выделен ярко люминесцирующий белок фикоэритрин. Использование таких белков открывает весьма важные и интересные перспективы в непосредственном визуальном исследовании поведения и судьбы в организме различных белков, возникновения и развития реакций иммунитета, образования антител и т. п.

В краткой статье можно было коснуться лишь немногих

областей и возможностей применения методов люминесцентной микроскопии. Но уже из сказанного ясно, насколько существенны и перспективны эти методы для различных морфофизиологических исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бергольц В. М. Люминесцентная микроскопия. М., 1953.— Бобров Н. Флуоресцентная микроскопия лабораторно-клинического материала при новых методах его окраски. Архив патол., 7, 45—47, 1950.— Замков В. А. Простое приспособление для люминесцентной микроскопии. Микробиология, 17, 400, 1948.— Константинова-Шлезингер М. А. Люминесцентный анализ. М., 1948.— Мейсель М. Успехи в развитии микроскопии. Микробиология 9, 909, 1940.— Мейсель М. Люминесцентная микроскопия и ее применение в микробиологии. Микробиология, 16, 527, 1947.— Мейсель М. Некоторые итоги и перспективы применения люминесцентной микроскопии в биологии. Изд. АН СССР, серия физич., 13, 230, 1949.— Мейсель М. и Гуткина А. Применение люминесцентной микроскопии для быстрого обнаружения патологических изменений в тканях и органах. Доклады АН СССР, 91 (3), 647, 1953.— Мейсель М., Кондратьева Т. и Помощникова Н. Функциональное состояние и реактивность структур клеточного протопласта. Журнал общей биологии, 12, 312, 1951.— Мейсель М. и Корчагин В. Люминесцентно-микроскопическое выявление нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Бюлл. эксп. биол. и мед., 3, 49, 1952.— Мейсель М., Ларионов Л. и Кондратьева Т. Прижизненное флуорохромирование тканей, культивируемых вне организма. Доклады АН СССР, 76, 723, 1951. Мейсель М., Помощникова Н. и Шавловский Ю. Угнетение дыхательной активности клетки при избирательном блокировании хондриосом. Доклады АН СССР, 70, 1065, 1950.— Frank O. und Lachnit V. Die Nierentubuli im Intravitalmikroskop. Arch. exper. Path. und Pharmacol., 214 (5), 507—512, 1952.— Haitinger M. Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Leipzig, 1938.— Haitinger M. und Geiser P. Über ein neues Fluorochromierungsverfahren. Virchows Arch., 312, 116—137, 1944.— Hanson V. Liver cell Secretion under normal and pathologic conditions studied by fluorescence microscopy on living rats. Acta physiologica scandinav., Vol. 28, Suppl. 101, 1952.— Schümmelfeder N. Die Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmes mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehung zur Stoffwechsellaktivität der Zelle. Virchows Arch., 318, 119—154, 1950.
-

## МИКРОСКОПИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧАХ

Е. М. БРУМБЕРГ  
(Ленинград)

Серьезный интерес, который представляет ультрафиолетовая микроскопия для многих областей науки и техники, связанных с изучением микроскопически малых структур, определяется следующими обстоятельствами:

- 1) с уменьшением длины волны света, применяемого для наблюдений, возрастает разрешающая способность микроскопа;
- 2) в ультрафиолетовой области сосредоточены сильные полосы поглощения многих веществ, совершенно прозрачных в видимом свете.

Это в свою очередь позволяет решать следующие три важные задачи:

- 1) продвинуть предел разрешения микроскопа в сторону более мелких структур,
- 2) наблюдать структуры биологических препаратов, не подвергая их химической обработке и не окрашивая красителями, следовательно, также и в живом состоянии, и
- 3) изучать химический состав очень мелких частиц, видимых только при помощи микроскопа.

Переход к наблюдениям в ультрафиолетовых лучах с длиной волны 200  $\mu$  позволяет поднять предельное увеличение оптического микроскопа с 1500 $\times$  (в фиолетовых лучах, т. е. в лучах с наименьшей длиной волны в пределах видимой области спектра) до 3000 $\times$ .<sup>1</sup> Продвижение в более коротковолновую ультрафиолетовую область встречает серьезные технические трудности. Значение этой возможности повышения предельного увеличения микроскопа понятно и не требует пояснений. Интереснее поэтому более подробно остановиться на рассмотрении двух последних указанных выше задач, которые усиленно разрабатываются в последнее время.

---

<sup>1</sup> Электронный микроскоп дает еще большие увеличения — до 100 000 $\times$ . Однако это не исключает важности повышения разрешающей способности оптического микроскопа, так как с помощью электронного микроскопа могут исследоваться далеко не все объекты. Заметим, что повышение разрешающей способности объектива микроскопа можно реализовать также в форме повышения качества изображения, если работать с малыми окулярными увеличениями.

Для того чтобы четко увидеть очертания тонких структур на срезах растительных и животных тканей, биологу приходится подвергать свои препараты такой химической обработке, после которой естественно возникают трудно разрешимые сомнения в том, передает ли наблюдаемая в микроскоп картина истинный вид изучаемого объекта или же многое из того, что видно, является результатом процессов, развивающихся в клетках при их умирании и последующей химической обработке. Кроме того, предварительная подготовка изучаемого материала и окраска полученных из него препаратов во многих случаях очень сложны и требуют от исследователя большого искусства и большой затраты времени. Так, например, при некоторых вариантах „серебряной“ методики выявления нервных окончаний материал выдерживается в реактиве неделями, а иногда и месяцами. Трудно представить, чтобы после такого грубого вмешательства можно было уловить тончайшие различия в строении нервных окончаний, выполняющих разные функции.

Еще хуже обстоит дело с определением химического состава элементов животных и растительных тканей. Число применяемых гистологами цветных гистохимических реакций крайне недостаточно, и многие из них либо мало чувствительны, либо очень капризны. На подавляющее большинство веществ, представляющих существенный интерес для биолога, гистохимических реакций не существует. Это положение вносит разобщенность в работу таких тесно связанных между собой разделов биологии, как гистология, физиология и биохимия.

Гистолога давно уже перестало удовлетворять формальное описание только внешнего вида структур препаратов. От него требуется описание не только формы, но и процессов, происходящих в клетках и даже в мельчайших органоидах отдельной клетки. Но описание подобных процессов сводится в подавляющем большинстве случаев к изучению распределения и обмена веществ, т. е. к исследованиям химического характера. Биохимик и физиолог также стремятся довести свои исследования до изучения процессов, происходящих в клетках. Однако в настоящее время гистолог не владеет в достаточной степени навыками работы в области химии, так же как и биохимик—в области гистологии. Такое положение определяется, очевидно, в значительной степени отсутствием достаточно тонкого метода, который позволил бы химику приняться за изучение клетки, а гистологу перейти, наконец, к серьезному изучению состава и функций клеток.

В Советском Союзе работы по ультрафиолетовой микроскопии были начаты в Государственном оптическом институте в лаборатории акад. С. И. Вавилова в 1939 г.

К этому времени за границей уже имелись ультрафиолетовые микроскопы системы А. Келера, выпускавшиеся фирмой

К. Цейсс. Приборы эти предназначались главным образом для повышения предельной разрешающей силы микроскопа, хотя в дальнейшем применялись частично также и для микроабсорбционного анализа, как это известно хотя бы по работам шведского биолога и химика Т. Касперсона (1936, 1950). Приборы были очень сложны и мало доступны для рядового исследователя-биолога.

Начиная работу в этой области, мы исходили из того, что метод ультрафиолетовой микроскопии может сблизить работу химика и гистолога. Представлялось также, что ультрафиолетовый микроскоп в отличие от микроскопа электронного может быть сделан столь же простым и доступным в обращении, как и обычный микроскоп, работающий в видимом свете. Для этого, разумеется, нужно было проделать большую работу: решительно изменить и упростить конструкцию самого прибора и разработать ряд новых приемов исследования микропрепаратов в лучах ультрафиолетовой области спектра.

### Метод цветовой трансформации

Первым был предложен особый способ наблюдения в невидимых лучах, получивший в дальнейшем название „метода цветовой трансформации“ (Е. М. Брумберг, 1939, 1942). Этот метод основан на использовании спектров поглощения веществ в невидимых областях спектра и замечательной способности глаза к цветному зрению.

На рис. 1 представлены спектральные кривые поглощения некоторых белковых веществ, содержащихся в клетках животных и растительных тканей. На том же рисунке для сравнения приведена кривая поглощения кармина. Из кривых видно, например, что хроматин имеет в ультрафиолетовой области спектра такое же сильное и избирательное поглощение, какое в видимой области имеет типичный краситель кармин. Именно наличие у многих веществ в ультрафиолетовой области такого избирательного поглощения позволяет на микрофотографии, полученной в ультрафиолетовых лучах соответственно выбранной длине волны, выделить в изображении препарата новые детали, совершенно терявшиеся в видимом свете из-за близости их показателя преломления к показателю окружающей среды и отсутствия в видимой области заметного поглощения.

Такое же сильное поглощение наблюдается у многих веществ в инфракрасной области спектра в лучах с длинами волн от 3—5  $\mu$  и выше. Возможности инфракрасной микроскопии ограничены двумя обстоятельствами: 1) до настоящего времени нет еще удовлетворительных способов получения фотографий в лучах с длиной волны большей 1—1,5  $\mu$  и

2) при увеличении длины волны быстро падает разрешающая сила прибора.

В инфракрасных лучах возможно лишь изучение спектров поглощения биологических препаратов не слишком мелких структур.

Таким образом, участок спектра, воспринимаемый глазом, представляющий собой интервал между двумя видами поглощения разной природы,<sup>1</sup> оказывается наиболее прозрачным и наименее подходящим для наблюдений с помощью обычного микроскопа.

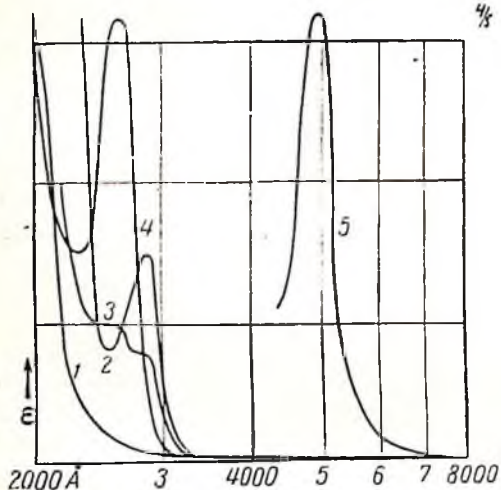


Рис. 1. Спектральные кривые поглощения некоторых веществ, содержащихся в живой клетке.

1 — различные углеводы и ациклические аминокислоты; 2 — белковые вещества с ациклическими аминокислотами; 3 — гистон из зубной железы; 4 — дрожжевая и тимонуклеиновая кислоты; 5 — краситель кармин.

Метод цветовой трансформации позволяет как бы осуществить, правда, в несколько искусственной и условной форме, такое цветное видение в невидимых глазом лучах.

Этот метод имеет два основных варианта. Первый — фотографический — сводится к получению с бесцветных в обычных условиях препаратов цветных микрофотографий, окраска ко-

<sup>1</sup> Поглощение веществом ультрафиолетовых лучей сопровождается переходом в его молекулах части внешних электронов на высшие энергетические уровни. Поглощенная веществом энергия инфракрасных лучей идет на повышение энергии колебательного и вращательного движения молекул и атомов в молекулах. Видимая окраска красителей представляет собой относительно редкий случай, когда поглощение электронной природы начинается уже в видимой области спектра.

торых определяется спектрами поглощения соответствующих элементов препарата в ультрафиолетовой области.

Для того чтобы понять, как это делается, напомним сначала схему обычной трехцветной фотографии в том ее виде, в каком она применялась до появления современных многослойных фотографических материалов для цветной фотографии. Если требовалось получить этим способом цветной снимок, например портрет или пейзаж, обычно поступали следующим образом: с намеченного предмета делалось последовательно три снимка через три светофильтра — красный, зеленый, синий. Получить многоцветное изображение с приготовленных таким образом трех серых снимков можно, например, проектируя их на одно место экрана тремя проекторами; перед ними установлены именно те светофильтры, через которые были сделаны соответствующие снимки. При точном совмещении контуров трех изображений на экране достигается правильная передача действительных цветов снявшихся предметов.

Мы поступаем таким же образом, отличие состоит лишь в том, что снимки делаются в лучах трех длин волн не видимой, а ультрафиолетовой области спектра, но рассматривание их производится в видимых лучах с применением красного, зеленого и синего светофильтров. Окраска деталей полученных таким способом цветных изображений определяется различием в почернении исходных серых снимков и, следовательно, при прочих равных условиях ходом ультрафиолетовых спектральных кривых поглощения соответствующих мест препарата. Применяя метод цветовой трансформации, мы как бы смещаем изображение по шкале длин волн из невидимой области спектра в видимую, сохраняя характер распределения энергии в спектре.

Для цветной микрофотографии в ультрафиолетовых лучах пользуются обычным биологическим микроскопом, в котором стеклянные объективы и окуляры, так же как и все линзы осветителя, заменены соответствующей оптикой, прозрачной для ультрафиолетовых лучей. Источником света служит кварцевая ртутная лампа, излучение которой богато ультрафиолетовыми лучами разных длин волн, однако лучи с длиной волны меньше 230—235  $\mu$  поглощаются кварцевой колбой лампы и не выходят наружу. Между источником света и микроскопом помещаются сменные светофильтры или монохроматор, с помощью которых при фотографировании выделяются лучи различных узких участков спектра. Над микроскопом укрепляется микрофотографическая камера, снабженная подвижной кассетой, позволяющей получать последовательно три снимка на разных местах одной фотографической пластинки. Примеры таких тройных микрофотографий показаны на рис. 2.

Воспроизведение цветных изображений осуществляется с помощью отдельного прибора хромоскопа, проектирующего одновременно три микрофотографии, полученные в ультрафиолетовых лучах на один экран. Этот прибор схематически изображен на рис. 3. Тройной снимок, подобный снимкам, приведенным на рис. 2, кладется на столик осветителя хромоскопа и освещается снизу отдельными лампочками. Объектив отбрасывает изображения снимков на экран так, чтобы эти снимки точно наложились друг на друга. Под снимками помещены светофильтры — красный, зеленый и синий. Таким образом, цветные изображения получаются



365  $\lambda_{\mu}$

313  $\lambda_{\mu}$

265  $\lambda_{\mu}$

Рис. 2. Три микрофотографии одного и того же места среза поджелудочной железы человека.

Фиксация формалином; срез не окрашен.

только при просмотривании тройных серых снимков на хромоскопе, подобно тому, как объемный эффект получается лишь при рассматривании двойных плоских снимков в стереоскопе. Лишь некоторые из цветных изображений, изучаемых с помощью хромоскопа, приходится по ходу работы в целях документации полученных результатов превращать в цветные микрофотографии, производя фотографирование с экрана обычным фотоаппаратом на фотографических материалах для цветной фотографии. Примеры таких фотографий можно найти в опубликованных уже работах, выполненных с применением метода цветовой трансформации (Е. М. Брумберг, 1939; Е. М. Брумберг, Г. А. Зайцев и Т. Г. Порохова, 1950).

Казалось бы, что для наведения порядка в разнообразном материале, получаемом этим способом, следовало принять определенную систему цветовой трансформации, связав три участка длин волн ультрафиолетовой области со светофильтрами трех основных цветов. Однако это сильно ограничило бы возможности метода. Допустим, например, что спектры поглощения двух интересующих нас веществ достаточно различаются в ультрафиолетовой области, а поглощение третьего вещества в этой области сходно с одним из предыдущих, но отличается от него в инфракрасной области спектра, доступ-



ной для фотографии ( $\lambda < 1,5 \mu$ ). Тогда для выявления цветомым способом всех этих графии следовало бы два серых снимка для хромоскопа сделать в ультрафиолетовых лучах, а третий — в инфракрасных, как мы и поступаем в подобных случаях. Иной раз, напротив, снимки приходится делать в монохроматическом свете трех или двух длин волн, очень близко расположенных друг к другу в спектре, выбирая наиболее характерные точки в спектрах поглощения исследуемых веществ.

Описанная выше схема цветной фотографии в условных цветах, так же как и схема обычной цветной фотографии, отражает то обстоятельство, что цветное зрение человека осуществляется посредством всего лишь трех независимых приемников света с различными спектральными характеристиками чувствительности, возбуждение которых вызывает в нашем сознании впечатление одного из основных цветов — красного, зеленого или синего. Различная степень нагруженности этих светоприемников вызывает ощущение всех остальных

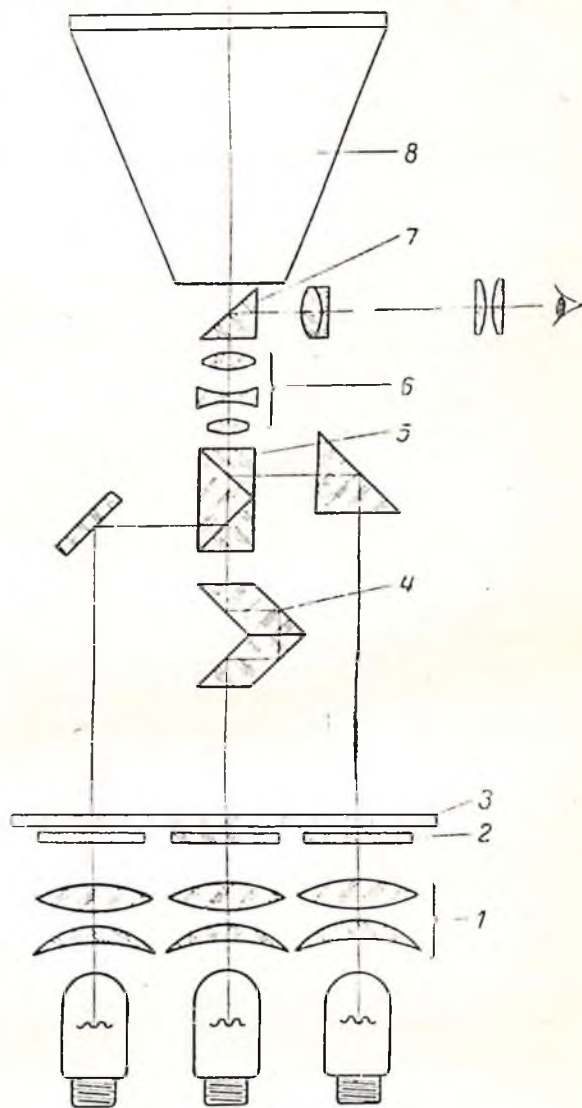


Рис. 3. Схема хромоскопа.

1 — конденсор; 2 — светофильтр; 3 — тройной снимок; 4 — призма, выравнивающая длину луча; 5 — делительная призма с полупрозрачными слоями; 6 — объектив; 7 — призма полного внутреннего отражения; 8 — фотокамера.

сложных цветов и оттенков, и, в частности, при равной нагрузке ощущение белого тона. Поэтому мы для воспроизведения цветных изображений также применяем три основных цвета; замена их сложными или добавление четвертого изображения какого-нибудь другого цвета именно вследствие трехкомпонентности цветного зрения не может принести пользы. Мы только как бы порываем связь между спектральным положением соответствующего приемника света и создаваемым им впечатлением. Вследствие этого возможно не только переносить наше цветное зрение в невидимые области спектра, но также по желанию расходовать все цветовые возможности глаза в пределах очень небольшого участка спектра или, напротив, в очень широкой спектральной области, расположив чувствительные приемники по обе стороны за пределами видимой области спектра, как это имело место в одном из рассмотренных выше примеров. Для того чтобы внести известную определенность в результаты и дать возможность сравнения таких опытов, выполненных в разных лабораториях, необходимо под снимками указывать условия съемки.

Одной из наиболее важных деталей микроскопа являются его объективы. Ультрафиолетовый микроскоп Келера был снабжен набором неахроматических объективов с линзами, изготовленными из одного материала — плавленного кварца. Такие объективы-„монохроматы“ требовали применения при фотографировании в ультрафиолетовых лучах строго монохроматического света, чем и определялась в значительной степени сложность аппаратуры Келера. Источником света в его приборе служила высоковольтная электрическая искра между металлическими электродами, так как только такой источник дает в спектре излучения достаточно тонкие спектральные линии, которые можно хорошо изолировать от соседних, далеко отстоящих линий, кварцевым монохроматором. При переходе от одной длины волны к другой каждый раз приходилось препарат фокусировать заново. Масштаб изображения на микрофотографиях, полученных в лучах разных длин волн, был неодинаковым.

Цветная микрофотография по методу цветовой трансформации и в особенности визуальные наблюдения по этому методу требуют равенства масштабов изображений, даваемых микроскопом в лучах разных длин волн, так как в противном случае невозможно осуществить точное совмещение контуров таких изображений. Этому требованию удовлетворяет только ахроматическая оптика микроскопа. Поэтому с самого начала работ по цветной ультрафиолетовой микроскопии перед оптиками-вычислителями была поставлена задача создания ахроматической оптики для ультрафиолетового микроскопа. С. А. Гершгориним было предложено применить для этой цели не линзовые, а зеркальные объективы, и был рассчитан

первый такой объектив с числовой апертурой 0,5. Этот объектив был нами изготовлен, изучен и применен к ультрафиолетовой микроскопии.

В дальнейшем С. А. Гершгориным, Д. С. Волосовым и другими советскими оптиками при участии автора этой статьи были разработаны более сложные зеркально-линзовые ахроматические объективы ультрафиолетового микроскопа. Некоторые из них описаны в настоящем сборнике в статье Т. И. Соколовой.

Ахроматическая оптика ультрафиолетового микроскопа, кроме того, что она позволяет получать цветные изображения в невидимых лучах, имеет и ряд других существенных преимуществ перед неахроматической оптикой. Освобождая от необходимости применения строго монохроматического света, она позволяет перейти от чрезвычайно неудобного и опасного источника света — высоковольтной искры — к несравненно более удобному в обращении источнику — ртутной лампе — и заменить громоздкий двупризменный кварцевый монохроматор набором простых светофильтров; то и другое существенно упрощает прибор и делает его более компактным.<sup>1</sup> Ахроматическая оптика позволяет пользоваться для наблюдений излучением сравнительно широких участков спектра, суммируя энергию нескольких спектральных линий источника света, что дает возможность существенно сократить экспозиции при фотографировании и упрощает осуществление визуальных наблюдений в ультрафиолетовых лучах с помощью флуоресцирующих экранов, для которых ранее не хватало света. Ахроматическая оптика микроскопа значительно упрощает процесс фотографирования в невидимых лучах, так как она позволяет производить наводку препарата на фокус в видимом свете, а затем переходить к фотографированию в ультрафиолетовых лучах выбранной длины волны простой сменой светофильтров перед прибором. Наконец, при помощи этой оптики можно изучать спектры поглощения микрообъектов.

Хотя о применении в микроскопии зеркальных объективов для видимой области и говорили ранее (Д. Д. Максутов), такие объективы не были осуществлены, так как имелись линзовые объективы, лишенные некоторых недостатков, свойственных зеркальным системам.

Лишь после того, как такие объективы были применены для ультрафиолетовой и инфракрасной микроскопии, где не было другого удовлетворительного решения этой задачи, на-

---

<sup>1</sup> Для ряда задач и при наличии ахроматической оптики микроскопа следует применять монохроматор, тем более, что пока еще не разработан достаточно широкий набор хороших светофильтров для ультрафиолетовой области спектра.

чалось быстрое развитие зеркальной и зеркально-линзовой оптики.

В дальнейшем мы все же пользовались также и линзовой оптикой, так как она хотя и представляет меньшие возможности для ахроматизации, но в монохроматическом свете дает лучшее качество изображения.

Было предложено рассчитать из известных оптических материалов, прозрачных для ультрафиолетовых лучей, линзовые ахроматические объективы, ахроматизировав их хотя бы на ограниченном участке спектра, наиболее интересном для биологии, т. е. на участке 250—300 м $\mu$ . Над объективом был помещен включающийся линзовый компенсатор, исправляющий aberrации объектива как в остальной более длинноволновой части спектра, так и видимой области. Такой объектив позволяет получать микрофотографии для хромоскопа и производить визуальные наблюдения с помощью флуоресцирующих экранов в монохроматическом свете в пределах очень широкой области спектра, а также производить визуальные наблюдения с применением цветовой трансформации, о чем подробнее будет сказано дальше, и производить спектроскопические наблюдения в более ограниченной области. В статье Т. И. Соколовой имеется описание одного из таких объективов.

Цветовая трансформация не является единственным методом исследования препаратов в ультрафиолетовых лучах. Во многих случаях для того, чтобы составить себе представление о строении препарата или о распределении в нем какого-нибудь одного вещества, оказывается вполне достаточным изучение или сравнение простых серых снимков, полученных в ультрафиолетовых лучах разных длин волн. Цветная микрофотография в условных цветах лишь обогащает возможности такого исследования. Однако исторически именно работа над этим методом привела к серьезному упрощению ультрафиолетового микроскопа и, в частности, к появлению зеркальных и зеркально-линзовых объективов, которые по мере их совершенствования постепенно начинают применять и в других областях.

### **Визуальные наблюдения в ультрафиолетовых лучах**

Не подлежит сомнению, что осуществление визуальных наблюдений в ультрафиолетовых лучах посредством трансформирования их тем или иным способом в видимые лучи представляет чрезвычайно серьезное значение для всей ультрафиолетовой микроскопии. Действительно, только возможность таких наблюдений позволяет детально изучать препараты, состоящие из структур, совершенно невидимых при обычных способах исследования. Ограничение наблюдений одним фотографическим методом, представляющим собой в этом случае

нечто вроде стрельбы по невидимым целям, чрезвычайно увеличивает трудоемкость такого рода исследований. Особенно большие трудности возникают при работе с сильными объективами микроскопа, когда при фотографировании не так-то легко уловить в фокусе нужные структуры препарата, не превышающие в продольном направлении глубину фокуса сильного объектива. Именно отсутствие визуальной микроскопии послужило, очевидно, главной причиной определенного неуспеха работ Келера по повышению предела разрешающей силы микроскопа посредством применения коротковолновых лучей.

Визуальные наблюдения не только чрезвычайно упрощают и ускоряют процесс исследования, позволяя за короткий срок изучить несколько препаратов или мест на одном препарате, но и открывают новые возможности по сравнению с фотографическим методом.

Если прибор обладает достаточной разрешающей способностью, визуальные наблюдения позволяют подробно рассмотреть тонкие детали объекта, что весьма затруднительно при фотографическом способе (Е. М. Брумберг, Н. В. Королев, Л. И. Костина и Л. Ф. Ларионов, 1953).

При визуальном способе возможно непрерывное наблюдение за процессами, протекающими во времени, и за подвижными объектами (Е. М. Брумберг, Л. Ф. Ларионов, Т. Л. Кондратьева и Н. В. Королев, 1953).

Существует мнение, что при помощи фотографии иногда можно выявить новые детали препарата, не наблюдаемые непосредственно глазом. Это соответствующее действительности положение определяется лишь различием в спектральной чувствительности глаза и фотопластинки. Максимум чувствительности глаза находится в желто-зеленой части видимой области спектра, а фотопластинки — в синей. Поэтому фотографическая пластинка значительно лучше, чем глаз, „видит“ желтые структуры препарата, поглощающие синие и фиолетовые лучи.

Дело обстоит совершенно иначе, когда имеется возможность, например, с помощью флуоресцирующего экрана любые лучи превращать в зеленые, перенося по желанию максимум чувствительности и различительной способности глаза в любую часть спектра, как это имеет место в визуальной ультрафиолетовой микроскопии. В этом случае никакая фотография, кроме, разве, фотографии по методу цветовой трансформации, не может дать более, чем визуальные наблюдения.

Осуществление приборов для визуальной ультрафиолетовой микроскопии является одной из насущных задач в этой области.

Превратить ультрафиолетовое изображение в видимое можно двумя способами: проектируя такое изображение непосредственно на флуоресцирующий экран или на фотокатод электронно-оптического преобразователя.

Мы остановились на первом из них потому, что в настоящее

время еще нет хороших электронно-оптических преобразователей для ультрафиолетовой области спектра, а также потому, что первым, чисто оптическим способом легче получить интересные нас цветные изображения.

На флуоресцирующем экране, помещенном в окуляре микроскопа в плоскости действительного изображения препарата, даваемого объективом ультрафиолетового микроскопа, при современных источниках ультрафиолетовых лучей невозможно получить видимого изображения достаточной яркости. Это, очевидно, и послужило главной причиной отсутствия визуальной ультрафиолетовой микроскопии за рубежом. Нами была применена особая система прибора, позволившая существенно повысить яркость изображения препарата на флуоресцирующем экране.

Оптическая схема микроскопа для визуальных наблюдений в ультрафиолетовых лучах приведена на рис. 4. Изображение препарата в ультрафиолетовых и видимых лучах, пропускаемых светофильтром, проектируется объективом микроскопа и добавочным ахроматическим объективом, приближающим это изображение к объективу микроскопа на флуоресцирующий экран, где оно рассматривается в видимом свете флуоресценции экрана с помощью второго микроскопа со стеклянной оптикой. Помещение флуоресцирующего экрана на близком расстоянии от объектива микроскопа приводит к уменьшению масштаба изображения препарата на экране и соответствующему существенному выигрышу в яркости изображения, которая возрастает обратно пропорционально квадрату изменения масштаба. При последующем увеличении изображения с помощью второго микроскопа-окуляра до нормальных размеров, соответствующих разрешающей способности объектива ультрафиолетового микроскопа,

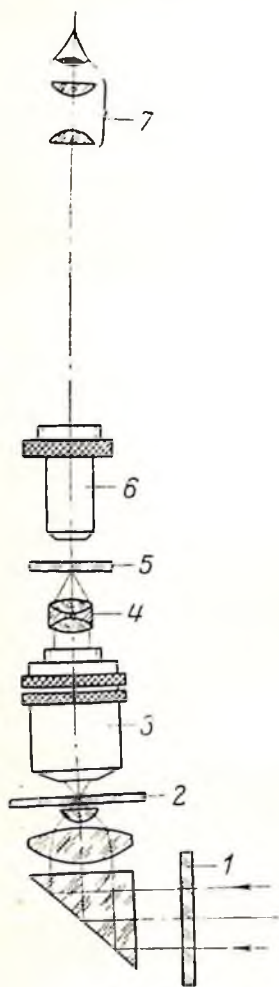


Рис. 4. Оптическая схема микроскопа для визуальных наблюдений в ультрафиолетовых лучах.

1 — светофильтр; 2 — препарат; 3 — объектив ультрафиолетового микроскопа; 4 — объектив, проектирующий изображение препарата на флуоресцирующий экран; 5 — флуоресцирующий экран; 6 и 7 — объектив и окуляр микроскопа.

можно при соблюдении известных условий сохранить этот выигрыш в яркости. При такой схеме прибора, уменьшая сна-

чала масштаб изображения препарата на экране, благодаря чему существенно увеличивается его яркость, а затем, увеличивая это изображение без потери полученного ранее выигрыша, можно значительно повысить яркость картины, рассматриваемой наблюдателем в поле зрения визуального ультрафиолетового микроскопа по сравнению с тем, что он видел бы при обычной простой схеме микроскопа на экране, помещенном в плоскости полевой диафрагмы в окуляре. Опыт показывает, что без описанного выше оптического маневра при современных источниках ультрафиолетовых лучей невозможно осуществить с помощью флуоресцирующих экранов визуальные наблюдения в лучах ультрафиолетовой области спектра из-за недостаточной яркости изображения.

При визуальной ультрафиолетовой микроскопии, так же как и при микрофотографии, выделяя с помощью монохроматора или светофильтров излучения, соответствующие узким спектральным участкам, можно найти условия, наиболее выгодные для наблюдения определенных структур. Таким образом, не прикасаясь к препарату, лишь изменяя длину волны лучей, его освещающих, можно по желанию как бы недокрасить или перекрасить препарат, подбирая нужную степень окраски и контраст для наблюдения определенных структур или для количественного установления содержания в них данных веществ (Е. М. Брумберг и Н. В. Королев, 1955).<sup>1</sup> Оптимальные условия, различные для разных задач, определяются при этом как характером спектров поглощения самих изучаемых структур, так и фоном, на котором они расположены.

Естественно, возникает желание и при визуальных наблюдениях в ультрафиолетовых лучах также получать цветные изображения по методу цветовой трансформации.

Было предложено несколько способов получения с помощью флуоресцирующих экранов многоцветных изображений, характеризующих ход спектральных кривых поглощения препарата в ультрафиолетовой области спектра (Е. М. Брумберг, 1939, 1941, 1946). Некоторые способы заключаются в комбинировании цветных изображений препарата, образующихся в прямых видимых лучах источника света, с флуоресцентными изображениями, возникающими на флуоресцирующем экране под действием падающих на экран ультрафиолетовых лучей. Ахроматическая оптика ультрафиолетового микроскопа дает в плоскости флуоресцирующего экрана действительное изображение препарата одновременно в лучах разных длин волн видимой и ультрафиолетовой области спектра, причем лучи видимой

<sup>1</sup> Е. М. Брумбергом и Н. В. Королевым был разработан простой метод количественной оценки поглощения препарата путем фотометрирования яркости свечения определенных точек флуоресцирующего экрана визуального микроскопа (1953). Этот прием может быть использован также для визуальной микроспектрофотометрии.

области, свободно проходя сквозь прозрачный для них экран, дают изображение препарата обычным способом, а ультрафиолетовые лучи, поглощаясь экраном, создают на нем изображение препарата, видимое в свете флуоресценции. Эти два изображения, имеющие равный масштаб и находящиеся в одной плоскости, точно накладываются друг на друга, сливаясь для наблюдателя в одно общее изображение, окраска деталей которого определяется окраской и яркостью соответствующих деталей складываемых первичных цветных изображений.

Для микрохимического анализа могут представлять интерес два способа комбинирования флуоресцентных и обычных изображений.

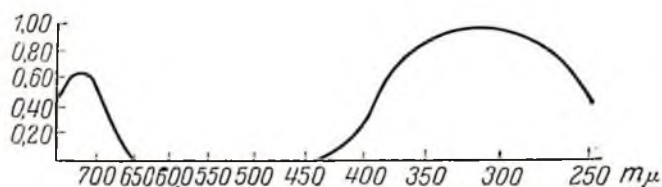


Рис. 5. Спектральная кривая пропускания светофильтра из стекла УФС-1.

Первый способ. Флуоресцирующий экран двуслойный. Первый слой (по ходу лучей) дает флуоресценцию зеленого цвета, возбуждаемую ультрафиолетовыми лучами с длиной волны от 320  $m\mu$  и короче. Второй слой с синей флуоресценцией возбуждается лучами с длиной волны от 400 до 320  $m\mu$  (лучи с меньшей длиной волны не действуют на этот слой, так как они полностью поглощаются стоящим перед ним первым слоем). Светофильтр, установленный перед источником света, пропускает, кроме ультрафиолетовых лучей с длиной волны от 410 до 250  $m\mu$ , еще и красные лучи видимой области; спектральная кривая пропускания этого светофильтра приведена на рис. 5.

Таким образом, в данном случае цветное изображение препарата, рассматриваемое наблюдателем, строится из сочетания трех цветных изображений, окрашенных в основные цвета (синего и зеленого, характеризующих поглощение препарата в лучах разных участков ультрафиолетовой области спектра, и красного, характеризующего поглощение препарата в красных лучах — в видимой области спектра). Сложение этих трех изображений в местах, свободных от препарата, дает равномерно освещенное белое поле. Участки препарата, одинаково ослабляющие лучи разных длин волн, например тени от наклонных граней кристаллов, будут серыми разной степени плотности. И лишь участки, избирательно поглощающие ультрафиолетовые лучи, будут цветными.

Так, например, в изображении точки препарата, преимуще-



ственно поглощающей ультрафиолетовые лучи с длиной волны 313 м $\mu$ , при указанном выше экране ослабнут зеленые лучи флуоресценции первого слоя экрана, в результате чего соответствующее место изображения окрасится в дополнительный пурпурный (красный + синий) цвет. Структуры препарата, поглощающие все ультрафиолетовые лучи с длиной волны до 400 м $\mu$ , но прозрачные в видимой области, будут чисто красными.<sup>1</sup>

Вещества, ослабляющие красные лучи, но прозрачные в ультрафиолетовых лучах (например соли двухвалентного железа), будут голубыми и т. д.

Известно, что, изменяя различным образом степень ослабления лучей трех основных цветов, можно получить в их смеси все остальные известные цвета и цветные оттенки. Заметим здесь же, что в нашем случае не следует особенно стремиться к многоцветности изображения, так как практически в микрохимическом анализе не приходится одновременно в одном опыте отличать друг от друга большое количество разных веществ. Обычно речь идет о выделении на общем фоне одного, максимум четырех веществ. В этих условиях лучше анализ основывать на наблюдении небольшого числа наиболее четких цветов, выбирая условия съемки или используя химическую избирательность реактивов, применяемых для микрохимических реакций, чем на тонких не всегда надежных цветовых различиях.

Второй способ. Экран однослойный с зеленой флуоресценцией, возбуждаемой любыми ультрафиолетовыми лучами, начиная от границы видимой области спектра. Перед источником света устанавливается светофильтр из стекла УФС-1, пропускающего, кроме лучей ультрафиолетовой области спектра, ослабленные видимые синие и красные лучи. Добавлением к этому фильтру других светофильтров, не изменяющих его пропускания в видимой области спектра, но обладающих различным пропусканием в ультрафиолете, можно по желанию изменять спектральный состав ультрафиолетовых лучей, действующих на экран. В этом случае цветное изображение препарата, получаемое также по трехцветному способу, образуется сочетанием лучей трех основных цветов, интенсивность двух из которых — красного и синего — определяется поглощением препарата в этих лучах, а третьего — зеленого — поглощением препаратом ультрафиолетовых лучей, выделяемых указанным выше комбинированным светофильтром.

Этот способ позволяет, используя один и тот же экран,

<sup>1</sup> Без добавления к изображению прямых красных лучей источника света такие структуры препарата были бы не красными, а черными и не отличались от действительно черных, непрозрачных также и для лучей видимой области. Этим определяется необходимость добавления к изображению препарата в качестве одной из его компонент цветного изображения, полученного в прямых лучах какого-нибудь участка видимой области спектра.

заменой одного из светофильтров между источником света и микроскопом перемещать по спектру область возбуждения экрана. Однослойный флуоресцирующий экран, безусловно, обладает большей разрешающей способностью, чем двуслойный. Вместе с тем этот способ, также дающий цветное изображение препарата, позволяет по цвету выделить на нем вещества, поглощающие одновременно с ультрафиолетовыми лучами коротковолновые лучи видимой области — синие и фиолетовые. Такие вещества, имеющие в обычных условиях наблюдения бледножелтую окраску, очень плохо заметную на белом фоне, в описанном здесь ультрафиолетовом микроскопе с однослойным экраном окрашиваются в значительно более контрастный красный цвет. В таком виде они очень четко выделяются в белом поле зрения ультрафиолетового микроскопа и отличаются от веществ, поглощающих только ультрафиолетовые лучи, окрашивающихся в тех же условиях в яркий пурпурный цвет. Это позволяет, в частности, существенно повысить чувствительность многих обычных микрохимических реакций, дающих в обычных условиях осадки бледножелтого цвета.

### **Комбинирование ультрафиолетовой и флуоресцентной микроскопии**

Поскольку в ультрафиолетовом микроскопе препарат интенсивно облучается ультрафиолетовыми лучами, такой прибор легко может быть использован также и в качестве флуоресцентного микроскопа. Во всех моделях советских ультрафиолетовых микроскопов предусмотрена возможность комбинированного применения этих двух видов микроскопии. Переход от абсорбционной микроскопии к флуоресцентной осуществляется простым выключением из хода лучей блока флуоресцентного преобразователя (рис. 4), причем в поле зрения микроскопа все время остается одно и то же место препарата. Для того чтобы перейти к обычным наблюдениям в видимом свете, заменяем ультрафиолетовые светофильтры перед прибором на серый нейтральный (серый фильтр нужен для уменьшения чрезмерной яркости поля зрения микроскопа). Комбинирование различных способов изучения объекта, основанных на использовании разных его оптических свойств, существенно обогащает возможности и результаты исследования.

Ввиду того, что в настоящем сборнике флуоресцентная микроскопия подробно описана М. Н. Мейселем, мы ограничимся лишь рассмотрением тех дополнительных возможностей, которые дает комбинирование ультрафиолетовой и флуоресцентной микроскопии при исследовании биологических объектов.

Ультрафиолетовый микроскоп в отличие от обычного флуоресцентного позволяет возбуждать флуоресценцию препарата как длинноволновыми, так и коротковолновыми ультрафиоле-

товыми лучами. Эта возможность не представляется особенно ценной для биологических объектов, видимая флуоресценция которых, как правило, возбуждается также и длинноволновыми ультрафиолетовыми лучами, и в некоторых случаях даже видимым светом. Пожалуй, единственное преимущество такого возбуждения состоит в том, что сильно поглощаемые препаратами коротковолновые ультрафиолетовые лучи возбуждают флуоресценцию даже толстых объектов в очень тонком поверхностном слое; это существенно улучшает условия наблюдения флуоресценции таких объектов.

Особый интерес представляет возможность изучения с помощью ультрафиолетового микроскопа невидимой ультрафиолетовой флуоресценции гистологических препаратов. Такая флуоресценция очень мало изучена, но по некоторым предварительным данным можно ожидать, что она присуща многим интересным для биолога органическим соединениям. К сожалению, яркость ультрафиолетовой флуоресценции не настолько велика, чтобы ее можно было наблюдать визуально с помощью флуоресцентного преобразователя ультрафиолетового микроскопа, и может изучаться только фотографическим способом.

При флуоресцентной микроскопии важным признаком вещества является цвет его флуоресценции. Фотографирование по методу цветовой трансформации позволяет получать цветные микрофотографии также и в свете ультрафиолетовой флуоресценции препарата. Для этого при возбуждении флуоресценции коротковолновыми ультрафиолетовыми лучами делается последовательно несколько снимков препарата в свете его флуоресценции в более длинноволновых лучах. Например, при возбуждении флуоресценции лучами с длиной волны 250—280 м $\mu$  фотографирование производится в лучах с длиной волны 300 и 350 м $\mu$ . Третий снимок можно сделать в видимом свете или ограничиться двумя снимками. При сличении таких микрофотографий на хромоскопе получается цветная картина, на которой невидимая ультрафиолетовая флуоресценция с разным распределением энергии в спектре передается разной окраской.

Цветовая трансформация может быть использована также при получении снимка в свете одного и того же узкого участка видимой или длинноволновой ультрафиолетовой области спектра изменением лишь длины волны возбуждающего света. Оно вызовет различное изменение интенсивности флуоресценции разных флуоресцирующих веществ, отличающихся спектрами поглощения. Цветная картина, получаемая на хромоскопе, будет определяться в этом случае спектрами поглощения флуоресцирующих веществ. Данный способ позволяет выявить среди различных флуоресцирующих веществ как вещества, имеющие недостаточно сильный для обнаружения в ультрафиолетовых лучах спектр поглощения, так и вещества, спектр

поглощения которых маскируется другими смешанными с ними веществами.

Во флуоресцентной микроскопии может быть применен также и метод цветового сравнения, например для сличения снимков, полученных в свете флуоресценции до и после тушения флуоресценции определяемого вещества соответствующим специфическим тушителем.

### Микроспектральный анализ

Создание ахроматической оптики ультрафиолетового микроскопа позволило осуществить непосредственное фотографирование и наблюдение ультрафиолетовых спектров поглощения микроструктур биологических препаратов и микрокристаллов различных органических и неорганических соединений. Вскоре после того как был осуществлен первый зеркальный объектив микроскопа, мы с С. А. Гершгориным занялись конструированием специальной спектрографической насадки к ультрафиолетовому микроскопу, позволяющей производить фотографирование спектров поглощения малых участков препарата. Это было первым соединением зеркальной оптики микроскопа со спектральным прибором; тем самым было положено начало микроспектроскопии в лучах невидимых областей спектра.<sup>1</sup> Значительно позже стали появляться работы по микроспектральному анализу за рубежом.

Изучение спектров поглощения микрообъектов, разумеется, возможно также и в видимой области спектра. Для этой цели давно уже существует аппаратура, несколько отличная от применяемой нами для ультрафиолетовой области. Однако, как уже отмечалось выше, в пределах видимой области слишком мало веществ имеет поглощение, заметное в тонких слоях препарата; это лишь небольшое число известных пигментов, спектроскопическое изучение которых представляет ограниченный интерес для некоторых частных задач. Совершенно иной смысл и значение имеет микроспектроскопия в ультрафиолетовых и инфракрасных лучах, где она может быть применена к изучению широкого класса важных веществ.

Внешний вид установки для микроспектрального абсорбционного анализа показан на рис. 6. Небольшой спектрограф с кварцевой оптикой укрепляется над микроскопом на той же штанге, что и фотографическая камера. Поворотом штанги на 120° вокруг ее вертикальной оси можно переходить от фотографирования изображения препарата на трехпольную

<sup>1</sup> Прибор был построен сразу после войны. Первое описание его дано нами в одной из работ, посвященных изучению спектров поглощения светящихся порошков — кристаллофосфоров в 1948 г. (Е. М. Брумберг и Ф. М. Перкерман, 1948). Фотография этого прибора имеется в статье М. Н. Мейселя, опубликованной в 1947 г.

камеру к фотографированию спектров (положение, изображенное на рис. 6). При фотографировании спектров поглощения применяются источники света, дающие излучение со сплошным спектром в видимой и ультрафиолетовой областях, — водородная или криптоновая лампа. Зеркальный объектив микроскопа проектирует увеличенное изображение препарата

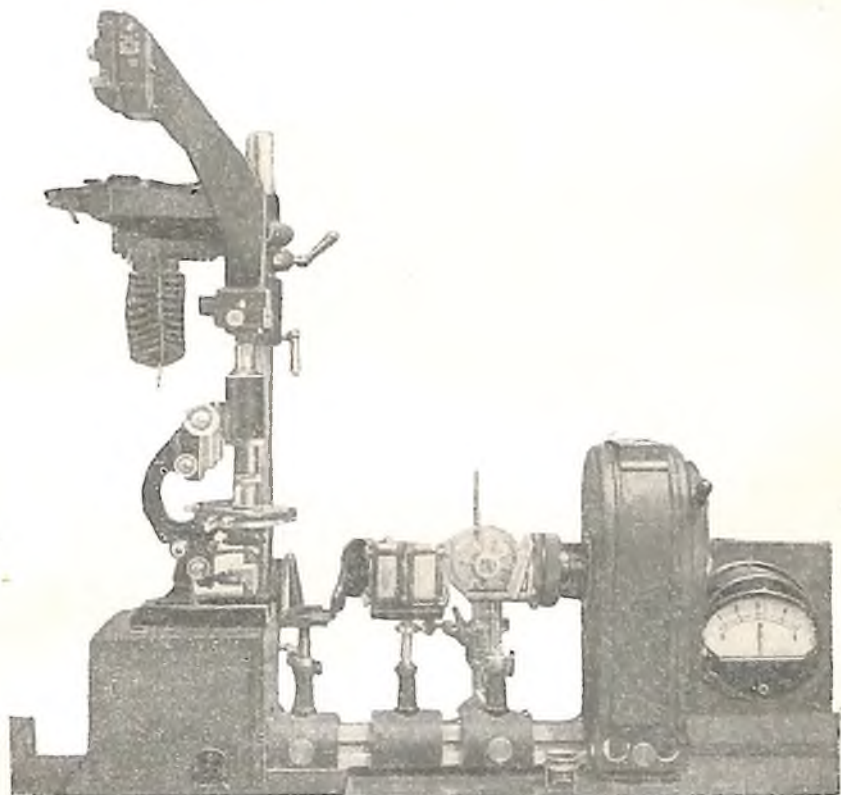


Рис. 6. Внешний вид установки для микроспектрального анализа.

в плоскость щели укрепленного над микроскопом спектрографа.<sup>1</sup> Спектрографическая насадка имеет специальный боковой окуляр (рис. 7), наблюдая в который исследователь может, не смещая насадки, сфокусировать препарат в плоскости щели и подвести к щели интересующее его место препарата. В приборе предусмотрена возможность по желанию плавно изменять длину и ширину щели. Придавая ей нужный размер, можно

<sup>1</sup> Спектрографические опыты в области микроскопии потому и невозможны с неахроматической оптикой микроскопа, что она не позволяет получить изображение исследуемой точки объекта в плоскости щели спектрографа одновременно во всех длинах волн в пределах фотографируемого участка спектра.

пропустить в спектрограф свет только от выбранного очень маленького участка препарата, при сильных объективах микроскопа порядка 2—3  $\mu$ , и получить таким образом на фотопластинке узенькую полоску спектра света, прошедшего только сквозь данный участок.

Мы действовали, однако, иным образом. Особое устройство сконструированной нами спектральной насадки позволяет получить на фотографической пластинке в одном масштабе изображение поля зрения микроскопа с изображением на нем щели спектрографа и рядом с ним спектр поглощения препарата, представляющий собой спектральное отображение щели по всей ее длине; под этой спектрограммой фотографируется узкая полоска ртутного спектра, служащая шкалой длин волн.

Образец такой микроспектрограммы, или спектродиаграммы, приведен на рис. 8.

Если при обычной спектроскопии нас интересует только концентрация исследуемого вещества в растворе и толщина слоя этого раствора по ходу луча, но не форма сосуда, в который налит раствор, то в микроспектроскопии дело обстоит совершенно иначе: исследователю очень важно знать, какой именно структуре аппарата, даже какому ее участку принадлежит сфотографированный спектр поглощения, так как без этих сведений все исследование часто не имеет смысла. Конечно, можно, как это было указано выше, ограничить в изображении препарата щелью малый участок, но потом обычно очень нелегко описать, к каким именно структурам препарата относятся полученные

таким образом спектры. Спектродиаграмма, содержащая, кроме спектров, изображение самого препарата с изображением на нем проекции щели спектрографа, дает полное описание опыта, причем не для одной, а для многих точек препарата, лежащих на пути прохождения проекции щели по нему. Такие снимки дают также возможность легко сравнивать спектры поглощения одинаковых или различных по своей природе и назначению структур препарата.

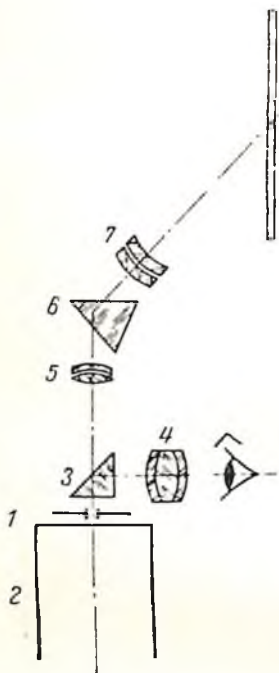


Рис. 7. Схема спектрографической насадки для ультрафиолетового микроскопа. Призма 3 при фотографировании спектра выводится из хода лучей.

1 — щель спектрографа; 2 — микроскоп; 3 — призма полного внутреннего отражения; 4 — окуляр; 5, 6, 7 — оптическая система насадки.

Линия, проведенная из какой-либо точки, лежащей на изображении щели параллельно горизонтальной границе спектральной диаграммы, позволяет проследить спектр поглощения для соответствующей точки препарата.<sup>1</sup> Наоборот, если в спектральной диаграмме обнаружатся интересные полосы или границы поглощения, всегда можно найти, к какому участку препарата или к какой его структуре они относятся. Изображение препарата служит как бы путеводителем по довольно сложной, но содержательной картине спектральной развертки щели.

Если закрыть изображение препарата, можно видеть, что без него разобраться в такой спектральной „бородe“ очень трудно, а при очень мелких структурах вообще невозможно.

Одновременно применительно к этой аппаратуре была разработана методика получения количественных спектральных кривых поглощения микроструктур препаратов (Е. М. Брумберг и Ф. М. Пекерман, 1948).

Прибор предназначался для микроспектрального абсорбционного анализа самых различных объектов и в первую очередь биологических препаратов. Однако испытание его было произведено сначала на изучении спектров поглощения отдельных микрокристалликов различных порошкообразных веществ, спектры поглощения которых невозможно получить другим способом. Одновременно один из первых построенных нами приборов, так же как и разработанная нами методика получения количественных спектральных кривых поглощения, были переданы для применения в области гистохимии Е. А. Моисееву и А. А. Ферхмин, которые и получили впервые спектральные кривые поглощения веществ, содержащихся в тканях животных, методом непосредственного фотографирования спектров поглощения через ультрафиолетовый микроскоп (Е. А. Моисеев и А. А. Ферхмин, 1948, 1949).

В ряде случаев очень существенно уметь производить быстрые спектроскопические наблюдения, не прибегая к по-



Рис. 8. Спектродиаграмма среза кожи с включениями кровяного пигмента.

<sup>1</sup> При промере почернений в такой спектрограмме на микрофотометре фотопластинка устанавливается на столике микрофотометра так, чтобы в дальнейшем при установке визирной точки прибора на какую-нибудь точку изображения препарата на линии щели при движении столика автоматически измерялось почернение по спектру поглощения, соответствующему именно этому месту препарата.

мощи фотографии. Нами была осуществлена установка, позволяющая с помощью флуоресцирующего экрана визуально наблюдать спектры поглощения микрообъектов.

Микроспектроскопия, разумеется, не исключает, а лишь дополняет цветные методы микрохимического исследования биологических и других препаратов. Указанные выше приборы позволяют осуществить переход от одного способа наблюдений к другому с сохранением в поле зрения микроскопа одного и того же участка препарата. При наличии в спектре поглощения изучаемого вещества характерной полосатой структуры или четких границ областей поглощения спектроскопический способ позволяет точнее отождествить вещество. Однако этот способ не дает достаточно полной и наглядной картины распределения вещества в препарате и неприменим к очень мелким структурам. Поэтому, определив с помощью абсорбционной спектроскопии, с чем мы имеем дело, очень удобно цветным способом детально проследить за распределением уже известного нам вещества по всему полю зрения микроскопа, а также в большом числе препаратов того же объекта. Спектроскопическое изучение препарата очень полезно при выборе условий съемки для получения максимального цветового контраста при фотографировании по методу цветовой трансформации.

В иных случаях как спектроскопический, так и цветовой методы могут применяться самостоятельно.

### **Микрохимические реакции в ультрафиолетовой микроскопии**

Теперь мы должны вернуться к рассмотрению снимка, приведенного на рис. 2. Такое распределение поглощения очень характерно для тонких гистологических срезов тканей животных — все поглощение сосредоточено в коротковолновой ультрафиолетовой области, а в лучах с длиной волны 365 и 313  $\mu$  препарат так же прозрачен, как и в видимом свете. Именно так выглядит большинство микрофотографий биологических объектов.

Такое положение определяется тем, что в подавляющем большинстве случаев разнообразные структуры биологических объектов обязаны своим появлением на микрофотографиях, полученных в коротковолновых ультрафиолетовых лучах, поглощению двух родственных веществ — дрожжевой и тимонуклеиновой кислот, спектральные кривые поглощения которых были приведены на рис. 1. Эти два вещества, первое из которых, как известно, содержится в ядрах, а второе — преимущественно в цитоплазме клеток, обладают очень высокими коэффициентами поглощения как раз на участке длин волн 275—250  $\mu$ . На этом по существу и была основана до сих



пор почти вся ультрафиолетовая микроскопия в области биологии. Здесь, вероятно, сыграли свою роль два обстоятельства: 1) сами нуклеиновые кислоты, очевидно, имеют очень большое значение в жизни клетки, еще не вполне выясненное наукой, и 2) эти вещества, присутствующие в очень многих мельчайших структурных элементах клетки, как бы вырисовывают всю структуру препарата, позволяя производить морфологические исследования неокрашенных препаратов и, в частности, что особенно важно, исследования живых объектов. Отвлекаясь от второй, чисто морфологической задачи, можно было бы сказать, что ультрафиолетовая микроскопия служит в биологии (в других областях она практически вовсе не применялась) для изучения нуклеиновых кислот.

Такое положение не отвечает поставленной выше задаче: через микроскоп необходимо видеть не только формы, но и химический состав микроструктур препарата. Действительно, если говорить о гистохимическом анализе, то как быть со многими другими важными для биолога и биохимика веществами — белками, углеводами, жирами, ферментами, гормонами и др., либо вовсе не поглощающими ультрафиолетовые лучи в интересующей нас области спектра, либо поглощающими не избирательно с малыми коэффициентами поглощения. Так, например, коэффициент поглощения белка в 40—60 раз ниже коэффициента поглощения нуклеиновых кислот. Расчет показывает, что при обычной толщине препарата в несколько микрон нормальный белок не виден в лучах, соответствующих первому максимуму в его спектре поглощения около 280  $\mu$ .<sup>1</sup> Нам пришлось прибегнуть к помощи химии и некоторых новых приемов наблюдения, на которых мы остановимся ниже.

В ультрафиолетовой микроскопии, так же как и в обычной, возможно проведение на препаратах качественных „цветных“ микрохимических реакций, условный цвет которых наблюдается в ультрафиолетовых лучах методом цветовой трансформации (Е. М. Брумберг, 1946, Е. М. Брумберг, М. П. Бухман и В. Е. Козлов, 1952). Цветной эффект получается в этом случае за счет появления в препарате при действии реактива новых веществ с характерными спектрами поглощения в ультрафиолетовой области спектра. Возможности такой ультрафиолетовой микрохимии значительно шире, чем обычной, ввиду

---

<sup>1</sup> Поглощение белка в области 280—270  $\mu$  определяется поглощением содержащихся в нем ароматических аминокислот (рис. 1, кривая 2). Нормальным мы называем белок, имеющий нормальное соотношение аминокислот и не содержащий, кроме аминокислот, каких-либо сильно поглощающих хромозных групп, как это имеет, например, место для некоторых белковых соединений вроде тироксина или гемоглобина. Белок мог бы наблюдаться в лучах с меньшей длиной волны в районе 200  $\mu$ , но там он будет часто маскироваться другими веществами, имеющими сильное поглощение на этом же участке спектра.

того, что в ультрафиолетовой области спектра, как правило, значительно легче получить в реакции „цветные“ соединения. Действительно, из реакций, которые можно было бы провести с данным веществом в условиях гистологического препарата, т. е. без сильного нагревания и без применения разрушающих препарат реактивов, цветными в видимой области (в тонких слоях) окажутся очень немногие, в то время как большая часть этих реакций приведет к серьезному изменению поглощения препарата в ультрафиолетовой области спектра. Проведенные нами опыты вполне подтвердили эти общие рассуждения.

Одной из первых была испытана видоизмененная так называемая ксантопротеиновая реакция. В обычных условиях эта групповая реакция, применяемая для обнаружения основных ароматических аминокислот, — тирозина, триптофана, фенилаланина — сводится, как известно, к получению оранжевого окрашивания белков, содержащих хотя бы одну из указанных аминокислот, при действии концентрированной азотной кислоты. Эта в основном макроскопическая реакция применяется в микроскопии лишь для грубых определений, так как концентрированная азотная кислота сжигает и разрушает большинство мелких структур биологических препаратов. Мы действовали на препарат очень слабой азотной кислотой (концентрированная азотная кислота разбавлялась в 100 раз), которая при таких малых концентрациях не искажает структур препарата, но и не вызывает в нем заметной окраски. Однако слабое воздействие на препарат, содержащий белок, вызывает серьезное изменение его спектра поглощения в ультрафиолетовой области.

Более слабое воздействие на препарат тем же реактивом приводит в большинстве случаев к большей специфичности микрохимической реакции.

Реакция нитрирования аминокислот была развита и усовершенствована В. Я. Бродским и И. Лимаренко, причем удалось ее распространить на две аминокислоты — тирозин и триптофан (В. Я. Бродский и И. Лимаренко, 1953).

Появление или определенное изменение „ультрафиолетовой окраски“ вещества в данной химической реакции позволяет значительно точнее определить вещество, нежели один его первоначальный ультрафиолетовый цвет, так как в первом случае мы используем для идентификации вещества не только его ультрафиолетовую окраску до и после реакции (что уже значительно сужает число возможных совпадений), но и химическую специфичность применяемого реактива, выбор которого находится в нашем распоряжении.

Первым шагом на пути отыскания цветных гистохимических реакций для ультрафиолетовой микроскопии должно быть перенесение на препараты некоторых качественных цветных

реакций, применяемых в биохимии. Многие из таких реакций хотя и могут быть проведены на препаратах, но не дают заметного окрашивания в столь тонких слоях. Следующим шагом будут поиски совершенно новых реакций, бесцветных в обычных условиях наблюдения.

Аналогичный прием был применен К. П. Столяровым (1952) и автором этой статьи к неорганическому микрохимическому анализу, называемому микрохимиками микрокристаллоскопией. Некоторые приемы этой быстро развивающейся в настоящее время области микрохимического анализа могут быть использованы биологами для определения неорганических веществ в биологических препаратах.

Описанными здесь химическими опытами отнюдь не ограничивается возможность активного вмешательства исследователя в область оптических свойств препарата. Напротив, ультрафиолетовая микроскопия с ее цветовыми и другими приемами наблюдения открывает широкое поле для применения различных новых оптических приемов исследования микроструктур.

Мы укажем здесь еще на один такой прием, названный нами „методом цветового сравнения“.

Этот чисто фотографический прием, основанный на использовании аппаратуры, предназначенной для ультрафиолетовой микроскопии по методу цветовой трансформации, сводится к сравнению на хромоскопе двух или трех серых снимков одного и того же места препарата, полученных в лучах одной и той же длины волны, до и после обработки препарата реактивами или лучами, способными вызвать в нем химические превращения (Е. М. Брумберг, 1942, Е. М. Брумберг, М. П. Бухман и В. Е. Козлов, 1950). Перед каждым следующим снимком препарат снимается с предметного столика микроскопа, подвергается соответствующей химической обработке, после чего ставится обратно точно в то же положение. Ввиду того, что хромоскоп отмечает цветом только различия в почернении снимков, при совместном рассмотрении полученных таким образом микрофотографий на хромоскопе будет наблюдаться следующая цветная картина: все места препарата, поглощенные которых для лучей, использованных при съемке, не изменилось в результате произведенного химического воздействия на препарат, останутся бесцветными — светлыми или темными разной степени плотности; лишь те места, поглощение которых увеличилось или уменьшилось, будут цветными, причем окраска их определится при заданном расположении светофильтров на хромоскопе степенью и направлением происшедшего в препарате изменения.

При определении локализации в препарате нескольких разных веществ можно произвести сравнение на хромоскопе трех серых снимков, подвергая препарат перед третьим снимком

новому воздействию или делая два снимка в лучах разных длин волн и действуя на препарат лишь перед третьим снимком с целью отличить вещество, которое не удалось отчетливо выявить применением спектральной цветовой трансформации.

Фотографирование должно производиться в лучах с длиной волны, соответствующей тем участкам в спектрах поглощения определяемых веществ, которые претерпевают наибольшие изменения в результате примененного воздействия на препарат; у большинства веществ такие участки находятся в ультрафиолетовой области спектра, вследствие чего этот прием применим главным образом в ультрафиолетовой микроскопии. Растворитель может удалять из препарата, кроме определяемых, также вещества, не поглощающие лучи, в которых производится фотографирование, но он не должен растворять вещества, поглощающие эти лучи.

Описанный способ цветной фотографии отмечает цветом лишь различия в почернении сравниваемых снимков и, следовательно, лишь изменения, происшедшие в препарате. Таким образом, при этом способе окраска деталей изображения определяется не спектральными кривыми поглощения соответствующих мест препарата в видимой или ультрафиолетовой области спектра, как это было в ранее описанных случаях, а реакцией их на химическое или иное воздействие. При удачном выборе реактивов цветная фотография и в этом случае позволяет делать заключения о химической природе отдельных структурных составляющих препарата и судить о распределении в препарате разных веществ. В частности, как мы видели выше, этим способом можно „окрасить“ вещество, просто удаляя его из препарата специфическим растворителем. Исползованные здесь цветные микрохимические реакции построены на временном принципе: окраска вещества возникает в результате его исчезновения или появления, т. е. по динамической схеме, которую можно было бы охарактеризовать словами „было и не стало“ или в отдельных случаях „не было и появилось“.

Изменение коэффициентов поглощения веществ для последующего окрашивания их на цветных микрофотографиях по методу цветового сравнения или цветовой трансформации можно получить и при помощи реакций, приводящих к появлению в препарате новых веществ с характерными спектрами поглощения. Однако возможность получения цветной характеристики вещества не путем превращения его в новое соединение с характерным спектром поглощения (задача во многих случаях даже в ультрафиолетовой области не очень простая), а удалением его из препарата, представляется наиболее интересной, так как она открывает некоторую совершенно новую возможность исследования химического состава клеток и тканей.

Применению метода цветового сравнения могут препятствовать деформации, происходящие в препарате при его химической обработке между первой и последующими съемками. Сильные деформации, особенно при работе с большими увеличениями микроскопа, могут сделать такое сравнение вообще невозможным, а слабые вызовут появление цветных каемок вокруг деталей препарата, изменивших свои размеры. Малые деформации не очень сильно мешают проведению химических исследований, так как по виду цветной картины, наблюдаемой в хромоскопе, обычно можно легко судить о том, имеется ли деформация препарата в чистом виде или, кроме нее, отмечается изменение поглощения некоторых деталей препарата по всему их объему. Во всяком случае при использовании метода цветового сравнения для гистохимических целей необходимо позаботиться о том, чтобы препарат был хорошо приклеен к предметному стеклу и чтобы проводимые на нем реакции не вызвали значительных деформаций его деталей.

К сожалению, этот метод не имеет визуальных вариантов и требует обязательного применения фотографии.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ультрафиолетовая микроскопия с ее цветовыми и спектроскопическими приемами наблюдения открывает перед биологией новые серьезные возможности для изучения строения и химического состава микроструктур неокрашенных препаратов, в частности также и за пределами разрешающей способности обычного микроскопа. Этот путь, основанный на использовании собственного поглощения ультрафиолетовых лучей веществами, содержащимися в препаратах, самый простой и удобный, не говоря уже о том, что он позволяет изучать объект в состоянии, наиболее близком к естественному.

Если использование собственного поглощения ультрафиолетовых лучей препаратом и позволяет в большинстве случаев удовлетворительно решать некоторые частные гистохимические задачи, а также задачи чисто морфологического характера, то его оказывается совершенно недостаточно для создания сколько-нибудь полной и подробной системы гистохимического анализа, способной удовлетворить современным требованиям биохимического исследования. Для решения этой весьма актуальной задачи требуется применение химических реакций, позволяющих открывать в препарате вещества, которые не удается определять непосредственно по их естественному поглощению в видимой или ультрафиолетовой области спектра.

Теперь необходимо работать над отысканием новых микрохимических и гистологических реакций для ультрафиолетовой микроскопии, подбирая оптические приемы и химические условия для наилучшего определения тех или иных веществ.

В новой системе не предполагается полностью изгнать старые цветные реакции. Напротив, следует, очевидно, развивать общую систему микрохимического и гистохимического анализов, сохраняя наиболее удачные видимые реакции и вводя ультрафиолетовые или флуоресцентные лишь для замены тех, которые уступают последним в каком-нибудь отношении. Комбинирование разных способов наблюдения может осуществляться с помощью универсального прибора — ультрафиолетового и флуоресцентного микроскопов.

Несмотря на то, что речь в этой статье шла о всех трех задачах ультрафиолетовой микроскопии, особое предпочтение отдавалось выявлению химических соотношений в различных биологических объектах, изучаемых с помощью микроскопа. Все методические и аппаратные усовершенствования преследовали главным образом эту задачу.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бергольц В. М. Люминесцентная микроскопия. Медгиз, 1953. — Брумберг Е. М. Новый метод микроскопии в ультрафиолетовом свете. Доклады АН СССР, 25, 473, 1939. — Брумберг Е. М. Новый вариант метода цветного видения в ультрафиолетовых лучах. Доклады АН СССР, 31, 658, 1941. — Брумберг Е. М. Новый метод микроскопии в ультрафиолетовых лучах. Известия АН СССР, серия физич., 6, 32, 1942. — Брумберг Е. М. Микроскоп для визуальной цветной микроскопии в ультрафиолетовых лучах. Доклады АН СССР, 52, 503, 1946. — Брумберг Е. М. О микроскопии в ультрафиолетовых лучах. Вестн. АН СССР, 6, 117, 1946. — Брумберг Е. М. Фотохимический метод ультрафиолетовой микроскопии. Доклады АН СССР, 51, 591, 1946. — Брумберг Е. М. и Пекерман Ф. М. Новый метод исследования спектров поглощения кристаллофосфатов. Доклады АН СССР, 61, 43, 1948; Известия АН СССР, серия физич., 13, 218, 1949. — Брумберг Е. М., Зайцев Г. А. и Порохова Т. Г. Травление металлов и минералов для ультрафиолетовой микроскопии. Доклады АН СССР, 73, 1165, 1950. — Брумберг Е. М., Бухман М. П. и Козлов В. Е. Микрохимические реакции для ультрафиолетовой микроскопии. Доклады АН СССР, 86, 625, 1952. — Брумберг Е. М., Кондратьева Т. М., Королев Н. В. и Ларионов Л. Ф. Визуальная ультрафиолетовая микроскопия — новый метод изучения живой клетки. Доклады АН СССР, 88, 1055, 1953. — Брумберг Е. М., Королев Н. В., Костина Л. И. и Ларионов Л. Ф. О применении визуальной ультрафиолетовой микроскопии в патологической гистологии. Бюлл. эксп. биол. и мед., 5, 61, 1953. — Мейсель М. Н. Флуоресцентная микроскопия и ее применение в микробиологии. Микробиол., 14, 527, 1947. — Моисеев Е. А. и Ферхман А. А. О применении непосредственной спектрографии в ультрафиолетовых лучах при микроскопических исследованиях. Тр. физиол. ин-та им. Павлова, 3, 42, 1949. — Столяров К. П. Применение ультрафиолетовой микроскопии в качественном микрохимическом анализе. Журн. аналитич. химии, 7, 195, 1952. — Blaut E., Bird G. und Grey D. Infra — Red Microspectroscopy, JOSA, 40, 304, 1950. — Caspersson T. Skand. Arch. Physiol. (Suppl. 8), 1936.

## ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ В НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ГИСТОЛОГИИ

Л. Ф. ЛАРИОНОВ  
(Москва)

Ультрафиолетовая микроскопия, являясь одним из новейших гистохимических методов исследования, открывает новые возможности для наблюдений по сравнению с обычной микроскопией в видимых лучах.

С помощью ультрафиолетового микроскопа можно изучать химический состав тканей и клеток и его изменения, не подвергая их при этом действию каких-либо реактивов. Эта возможность обусловлена тем, что некоторые химические вещества, прозрачные для видимых лучей, интенсивно поглощают ультрафиолетовые лучи определенной длины волны. Исследуя наличие и степень поглощения лучей объектом, мы обнаруживаем в нем эти вещества, их распределение и количество.

Современная ультрафиолетовая микроскопия дает особенно широкую возможность изучения нуклеопротеидов. Это объясняется тем, что нуклеиновые кислоты обладают избирательным и очень интенсивным поглощением в ультрафиолетовой области спектра с максимумом около 260 и минимумом около 230  $\mu$ . Белки, не находящиеся в соединении с нуклеиновыми кислотами, благодаря содержанию в них циклических аминокислот также поглощают ультрафиолетовые лучи с максимумом около 280  $\mu$ , но это поглощение является значительно более слабым. Для одной и той же концентрации в растворе коэффициент вывращения у нуклеиновых кислот оказывается в 30—60 раз больше, чем, например, у альбумина. Поэтому те структуры, которые содержат нуклеиновые кислоты, даже находясь в белковой среде, хорошо выступают на фотографиях, сделанных при освещении объектов лучами с длиной волны около 200  $\mu$ . Интенсивное поглощение лучей нуклеиновыми кислотами обуславливает чрезвычайную чувствительность метода. Согласно вычислениям Касперсона, с помощью ультрафиолетового микроскопа можно обнаружить структуру в белковой среде, если в ней содержится лишь  $10^{-9}$  мг нуклеиновой кислоты.

Метод микроскопического исследования в ультрафиолетовых лучах был применен Келером в 1902 г. и усовершенствован Касперсоном (1936). Недостатком кварцевых объективов являлось то, что они не были ахроматичными и требовали перефокусировки при переходе от лучей одной длины волны к другой.

Впервые в СССР в лаборатории С. И. Вавилова Е. М. Брумбергом и С. А. Гершгоринным (1942) был сконструирован микроскоп с ахроматическим отражательным объективом. Этот микроскоп дает возможность переходить на ультрафиолетовые снимки непосредственно после фокусировки в видимом свете, которая может производиться в темном поле или же с помощью флуоресцирующего экрана. В последнее время Е. М. Брумбергом и Н. В. Королевым сконструирован ультрафиолетовый микроскоп для визуального наблюдения, в котором изображение препарата проицируется объективом в ультрафиолетовых лучах определенной длины волны на небольшой флуоресцирующий экран, помещенный внутри микроскопа. Отечественный ультрафиолетовый микроскоп является прибором, очень полезным при изучении ряда вопросов цитологии, нормальной и патологической гистологии. Визуальный микроскоп, как будет видно из дальнейшего, может с успехом применяться в патологоанатомических отделениях лечебных учреждений.

Наша работа с ультрафиолетовым микроскопом, в которой принимала участие Т. М. Кондратьева, была начата в 1946 г. и протекала в содружестве с физиками Е. М. Брумбергом и М. П. Бухман. В ней участвовали также Н. В. Королев и Л. И. Костина. Наши исследования относятся к следующим вопросам: 1) структуре живых клеток и ее изменениям при повреждении и фиксации, 2) изменениям нуклеопротеидов при некоторых патологических процессах и воздействиях и 3) патологоанатомической диагностике с помощью визуального ультрафиолетового микроскопа.

Для изучения нуклеопротеидных структур живых клеток мы пользовались растущими культурами из сердца куриного зародыша и некоторых опухолей (карциномы молочной железы мыши, крысиные саркомы). Фотографирование производилось в ультрафиолетовых лучах на отрезке спектра от 254 до 280  $\mu$  (рис. 1). В первое время мы применяли объектив с собственным увеличением  $40\times$  и апертурой 0,5, а в дальнейшем с увеличением  $65\times$  и апертурой 0,8. Несколько снимков было сделано с помощью объектива с апертурой 1,0 (увеличение  $90\times$ ).

На фотоснимках в ядрах живых клеток отчетливо выявлялись ядрышки благодаря большой концентрации содержащейся в них рибонуклеиновой кислоты. Вместе с тем поглощение ультрафиолетовых лучей всем ядром в недифференцированных клетках оказалось относительно слабым и почти равномерным.



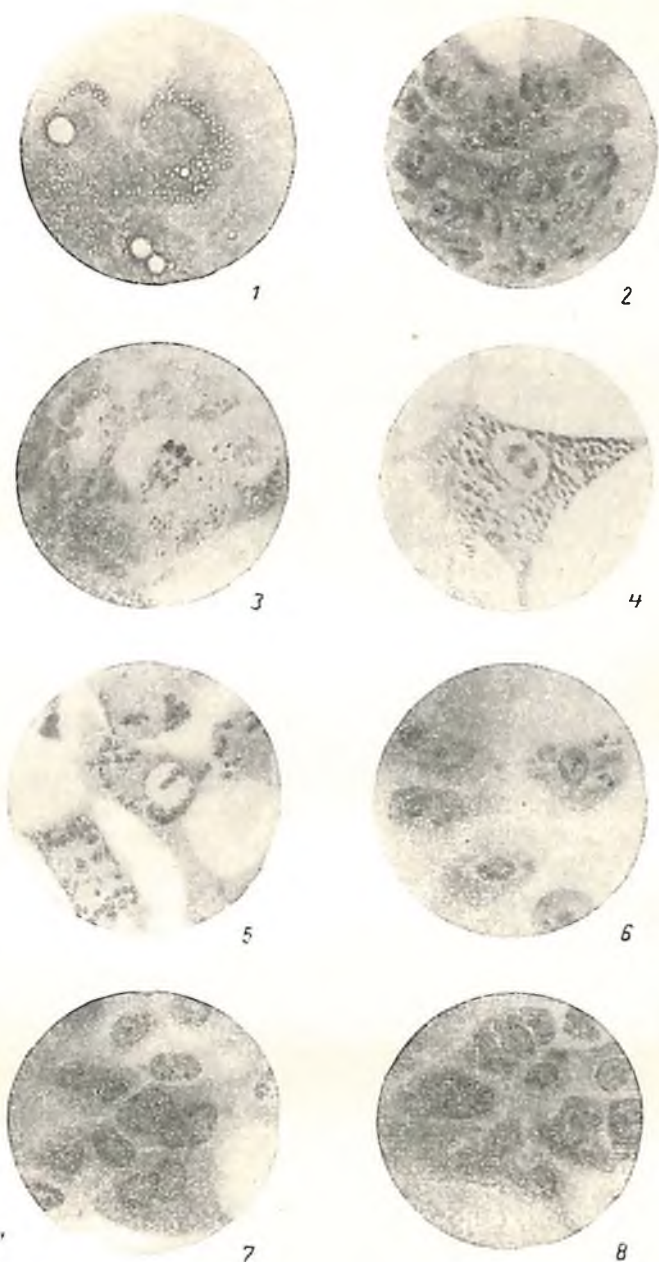


Рис. 1. Микрофотографии живых тканей, снятых в ультрафиолетовых лучах.

1 — живые неповрежденные клетки карциномы молочной железы мышцы в тканевой культуре. Оболочки у ядер отсутствуют, относительно равномерное поглощение лучей ядром, ядрышки поглощают отчетливо; 2 и 3 — такие же культуры. Резкое поглощение лучей хромосомами; 4 и 5 — живые неповрежденные клетки в культурах из сердца куриного зародыша. Отсутствие ядерной оболочки. Поглощение лучей ядрышками; 6 — культура клеток из сердца куриного зародыша, подвергнутая действию ультрафиолетовых лучей. Поглощение лучей ядрами усилилось, выявилась оболочка; 7 — культура клеток карциномы молочной железы мышцы после фиксации формалином. Ядра имеют вид, как на окрашенных гистологических препаратах; 8 — подобная культура, фиксированная спиртом.

Многочисленные фотографии показали, что ни ядерной оболочки, ни отчетливых „хроматиновых“ структур, хорошо знакомых по фиксированным и окрашенным препаратам, в живых неповрежденных клетках не выявляется. О местоположении ядра можно судить по некоторой разнице в поглощении лучей между ним и цитоплазмой и по липоидным зернышкам, располагающимся вокруг ядра. В некоторых ядрах отмечается лишь 3–5 мелких, слабо поглощающих зерен с неясными контурами. В отличие от этого в делящихся клетках хромозомы сильно поглощают лучи и представляются в позитивах почти черными.

Таким образом, микроскопия в ультрафиолетовых лучах показала, что распределение дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах неповрежденных недифференцированных клеток в интеркинезе является почти равномерным, причем и на поверхности ядер нет повышения концентрации нуклеиновой кислоты.

Поглощение же цитоплазмой ультрафиолетовых лучей в клетках разной природы неодинаково, соответственно различному содержанию в них рибонуклеиновой кислоты. В цитоплазме неповрежденных опухолевых клеток всегда обнаруживается большая концентрация нуклеиновой кислоты.

Вся описанная картина резко меняется при повреждении клеток, например при более сильном освещении теми же ультрафиолетовыми лучами или при действии тепла и т. п. При этом быстро появляются оболочка и внутренняя структура ядер, размеры их уменьшаются. Общее поглощение ядрами ультрафиолетовых лучей возрастает. Напротив, поглощение цитоплазмы ослабевает вследствие, как это было нами установлено, выхода нуклеиновой кислоты из цитоплазмы в окружающую среду.

В дальнейшем с помощью визуального ультрафиолетового микроскопа мы проследили всю динамику только что описанных изменений, установив при этом, что в процессе повреждения на поверхности клетки часто образуются своеобразные цитоплазматические вздутия, первоначально содержащие нуклеиновую кислоту, а затем теряющие ее.

При действии на живые клетки различных гистологических фиксаторов (за исключением слабых растворов осмиевой кислоты) нами также наблюдалось появление оболочки и внутренней структуры, но без исчезновения нуклеиновой кислоты из цитоплазмы (рис. 2).

Таким образом, с помощью ультрафиолетового микроскопа было установлено истинное почти равномерное распределение нуклеопротеидов в ядрах живых неповрежденных недифференцированных клеток и притом без применения каких-либо химических реактивов. Прижизненное установление этих фактов возможно только с помощью данного метода, так как даже применение для изучения прозрачных в видимом свете живых

объектов фазовоконтрастной или интерференционной микроскопии не дает права судить о химическом составе наблюдающихся структур. Как показали работы М. Н. Мейселя, частично проведенные совместно с нами, при люминесцентной микро-

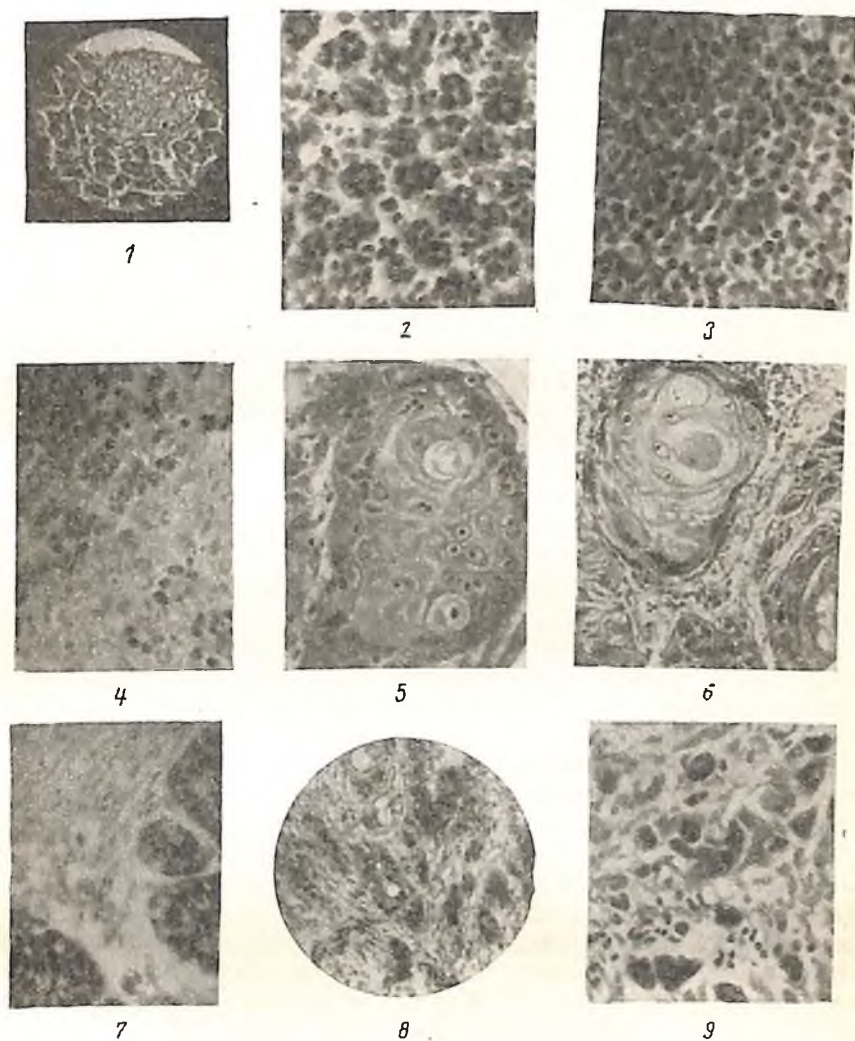


Рис. 2. Микрофотограммы фиксированных тканей, снятых в ультрафиолетовых лучах.

1 — срез поджелудочной железы мыши. Картина распределения нуклеопротеидов; 2 — печень мыши. Цитоплазматические нуклеопротеиды в виде крупных зерен; 3 — фолликул селезенки мыши; 4 — фолликул селезенки мыши, облученной рентгеновыми лучами. Распад ядерных нуклеопротеидов на капли; 5 — срез плоскоклеточного рака губы человека. Распределение нуклеопротеидов в раковой „жемчужине“; 6 — плоскоклеточный рак губы на 5-й день после начала лучевого лечения (иглами с радием). Изменение нуклеопротеидов в периферических клетках „жемчужин“ (усиление поглощения ультрафиолетовых лучей); 7 — переживаемый рак молочной железы мыши. Огромное количество нуклеопротеидов в раковых клетках, бедность стромы нуклеопротеидами; 8 — рак молочной железы женщины (скирр); 9 — отдельные клетки рака молочной железы в лимфатическом узле (метастаз).

скопии с применением флуорохромов жизнедеятельность клеток сохраняется, однако при этом же происходит структурирование ядер.

Гистологические фиксаторы сильно изменяют состояние ядерных нуклеопротеидов, вызывая в них структурирование различного характера и степени. Сохранить бесструктурность и диффузное распределение ядерного нуклеопротеида, как это показал П. В. Макаров, удается только с помощью слабых растворов осмиевой кислоты. Для гистологов, которые привыкли иметь дело с фиксированными и окрашенными препаратами, ультрафиолетовые фотографии живых клеток кажутся непонятными, как будто на них „ничего не видно“. Это зависит от того, что вследствие отсутствия ядерных оболочек и хроматиновых структур на фотографиях действительно не видно ядер и об их местоположении приходится заключать по разности поглощения лучей ядром и цитоплазмой (если она имеется) или по расположению липоидных зернышек в цитоплазме. Однако наблюдаемые в ультрафиолетовой микроскоп картины как раз и соответствуют истинному прижизненному состоянию и распределению нуклеопротеидов. Следовательно, ультрафиолетовая микроскопия по сравнению с микроскопией в видимых лучах дает новые возможности для исследования прижизненного строения и химического состава биологических объектов.

Для изучения нуклеопротеидов в тканях при некоторых патологических процессах мы применяли фотографирование неокрашенных гистологических срезов. Такие фотографии сразу дают полное представление о содержании и распределении как ядерных, так и цитоплазматических нуклеопротеидов. Получаемые снимки довольно похожи на гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и другими основными красками. Это объясняется тем, что так называемая базофилия цитоплазмы и ядра обусловлена главным образом содержащимися в них нуклеиновыми кислотами. Однако ультрафиолетовые фотографии передают отношения более точно и главное — количественно. Ультрафиолетовая микроскопия с успехом может быть использована в нормальной гистологии, если требуется получить представление о содержании и распределении нуклеопротеидов в нормальных органах и тканях.

Мы изучали содержание нуклеопротеидов в различных злокачественных опухолях животных и человека. Если с помощью определения количества нуклеиновых кислот в опухолях биохимическими методами можно получить лишь суммарные данные, то ультрафиолетовая микроскопия дает реальное представление о содержании и распределении этих важных соединений в опухолях. Нами было установлено, что клетки многих опухолей, в частности перевиваемого рака молочных желез

у мышей или крысиных сарком, содержат громадные количества рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме и в ядрышках. Эта характерная особенность опухолевых клеток может быть использована при цитодиагностике опухолей.

Однако содержание нуклеиновых кислот в разных частях опухолей весьма различно. Как правило, в периферических частях клеточных комплексов, на границе со стромой, нуклеиновой кислоты в цитоплазме гораздо больше, чем в центральных частях. Это наблюдалось нами, например, при раке молочной железы и при плоскоклеточном раке кожи человека. Особенно много рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме клеток, инфильтрирующих окружающие нормальные ткани. Такие клетки на ультрафиолетовых фотографиях выглядят совсем черными.

Известно, что рост и распространение злокачественных опухолей осуществляется главным образом самыми периферическими клетками опухолевого узла и отдельных комплексов опухолевых клеток. Эти данные заставляют полагать, что между содержанием рибонуклеиновой кислоты в цитоплазме и в ядрышках опухолевых клеток и свойствами злокачественности имеется внутренняя связь.

Далее мы использовали метод ультрафиолетовой микроскопии для изучения механизма действия на опухоли некоторых терапевтических агентов, в частности проникающего излучения. Так, были исследованы срезы из маленьких кусочков рака губы человека, полученные с помощью биопсии в процессе лечения иглами с радием. Нами было установлено, что самые ранние явления, которые можно заметить в опухолях во время лечения, состоят в изменении нуклеопротеидов наиболее жизнеспособных опухолевых клеток, расположенных по периферии клеточных комплексов. Эти изменения касаются как ядерных, так и цитоплазматических нуклеопротеидов. В частности, ядерные нуклеопротеиды начинают сильнее поглощать ультрафиолетовые лучи, а в цитоплазме опухолевых клеток на известном этапе отмечается накопление нуклеиновых кислот. Очевидно, обмен нуклеопротеидов в опухолях под влиянием лечения резко нарушается. В дальнейшем опухолевые клетки гибнут и подвергаются лизису.

На основании этих данных мы сделали предположение, что изменения нуклеопротеидного обмена лежат в основе так называемого деструктивного эффекта проникающего излучения. В дальнейшем это предположение было подтверждено при изучении действия лучистой энергии на те нормальные ткани, например кроветворные, в которых также происходят деструктивные явления, а также многочисленными биохимическими исследованиями (в частности с применением изотопов).

Таким образом, применение ультрафиолетовой микроскопии дало возможность сделать важное заключение, что нуклео-

протеиды являются одним из субстратов, на которые действует проникающее излучение.

С введением визуальной ультрафиолетовой микроскопии появилась возможность использования метода при патологогистологической диагностике болезней.

Прежде всего нами было установлено, что для визуальной ультрафиолетовой микроскопии нет надобности не только окрашивать срезы, но и фиксировать материал. Срезы, приготовленные на замораживающем микротоме из свежесрезанных кусочков, могут непосредственно наблюдаться в капле разведенного глицерина. При этом получают картины, не уступающие наблюдаемым при исследовании фиксированных и окрашенных срезов в обычный микроскоп. Тем самым резко сокращается время, затрачиваемое на изготовление препарата, не говоря о большой экономии реактивов, так как совершенно не требуется фиксаторов, красок, спирта, ксилола, бальзама и т. д.

Сокращение времени для изготовления препаратов даст возможность с успехом использовать визуальный ультрафиолетовый микроскоп, во-первых, для срочной микроскопической диагностики при хирургических операциях (на все исследование уходит 3—5 минут), во-вторых, во время патологоанатомических вскрытий. Прозектор может просмотреть микроскопический препарат в течение 3 минут еще в процессе вскрытия.

Таким образом, ультрафиолетовая микроскопия может быть использована в разнообразных направлениях для решения самых различных вопросов и, несомненно, найдет широкое применение в цитологии, нормальной и патологической гистологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Брумберг Е. М. Новый метод микроскопии в ультрафиолетовых лучах. Известия АН СССР, серия физич., 6, 1—2, 32, 1942. — Брумберг Е. М., Ларионов Л. Ф., Кондратьева Т. М. и Королев Н. В. Визуальная ультрафиолетовая микроскопия — новый метод изучения живой клетки. Доклады АН СССР, 88, 1055, 1953. — Ларионов Л. Ф. и Брумберг Е. М. Живые и мертвые клетки в ультрафиолетовом микроскопе. Доклады АН СССР, 54, 3, 267, 1946. — Ларионов Л. Ф., Бухман М. П. и Кондратьева Т. М. Ультрафиолетовая абсорбционная микроскопия живых клеток. Журн. общей биологии, 12, 6, 394, 1951. — Ларионов Л. Ф. и Кантии А. В. Гистохимические изменения рака губы в процессе лечения радоном. Вестн. рентгенол. и радиол., 1953. — Макаров П. В. Физико-химические свойства клетки и способы их изучения. ЛГУ, 1948. — Caspersson T. Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. Skandinav. Arch. Physiol., 73, 8, 1936.

# АППАРАТУРА И МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*В. Н. ВЕРЦНЕР*

(Ленинград)

## ВВЕДЕНИЕ

Со времени появления первых электронных микроскопов прошло около 20 лет. Несмотря на это, электронная микроскопия успела пройти путь от первых несовершенных микроскопов до приборов, в которых достигается разрешающая способность, предсказанная теорией, — в 400 раз больше, чем у лучших световых микроскопов.

В настоящее время наша промышленность выпускает модернизированные электронные микроскопы ЭМ-3 (модель 1952 г.); осуществлен выпуск серии приборов ЭМ-3М. Разрешающая способность, получаемая при работе с этими приборами, достигает 30 Å. Они дают возможность вести исследования в светлом и темном полях, проводить стереоскопическую съемку и выполнять полноценные электронографические исследования в проходящих и отраженных лучах. Помимо того, разработаны и выпущены электронномикроскопические вакуумные посты ЭВП-1, необходимые для подготовки препаратов.

Работы по совершенствованию и разработке новых типов электронных микроскопов проводятся в направлении использования для микроскопии электронов высокой скорости, разработки и осуществления отражательных насадок для исследования в отраженных лучах, эмиссионных насадок для исследования эмиссии и ряда микроскопов: большого универсального прибора, микроскопа с электростатической оптикой, прибора с небольшим увеличением и т. д.

Одновременно с развитием аппаратуры энергично разрабатывались новые специфические методы подготовки препаратов. Они составляют весьма существенную часть всякого электронномикроскопического исследования. Только при правильной методике подготовки препаратов изучение биологических объектов является плодотворным. Новые ультра-микротомы позволяют получать сверхтонкие срезы толщиной в 200—

100 Å. Появилась возможность делать срезы отдельных бактериальных клеток и проводить исследования гистологических препаратов при предельных разрешениях.

## I. ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

В 1924 г. было установлено, что пучку электронов, движущихся в вакууме с постоянной скоростью, после ускорения их электрическим полем напряжением  $V$  вольт, соответствует волновой процесс с длиной волн  $\lambda$ , определяемой приближенно выражением:

$$\lambda = \frac{12,21}{\sqrt{V}} \text{ \AA}$$

В случае электронов больших скоростей при точных расчетах приходится учитывать поправку на зависимость массы электрона от скорости

$$\lambda = \frac{12,21}{\sqrt{V}} \frac{1}{\sqrt{1 + 9,78 \cdot 10^{-7} V}}$$

Для ускоряющего напряжения в 50 000 в, обычного для многих современных электронных микроскопов,  $\lambda$  составляет всего 0,056 Å, т. е. примерно в 100 000 короче длин волн видимого света.

Если бы оказалось возможным использовать электронные волны для целей микроскопии, то предельное разрешаемое расстояние  $d$ , выражаемое в оптике формулой

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \alpha},$$

соответственно оказалось бы в 100 000 раз меньше получаемого в видимом свете. Однако такой величины в действительности не удастся достигнуть, так как из-за несовершенства электронных линз приходится пользоваться очень малыми апертурами, обычно на 2–3 порядка меньшими, чем у светового микроскопа. Сейчас в электронных микроскопах достигается разрешающая способность в 100–400 раз больше, чем в светооптических приборах.

Для получения изображений в электронных лучах необходимы оптические системы — электронные линзы, которые преломляют и фокусируют электронные лучи.

Сравнительно давно, со времени открытия катодных лучей, было установлено, что скорость электронов и их направление определяются электрическими и магнитными полями, в которых они движутся. Показатель преломления для электронных



лучей, как показывает теоретическая физика, определяется выражением:

$$n = v - \frac{l}{mc} A \cos(\hat{v}A),$$

где  $v$  — скорость электрона,  $A$  — вектор-потенциал магнитного поля, которым характеризуется его значение в пространстве, и  $\cos(\hat{v}A)$  — косинус угла между направлением скорости движущегося электрона и вектором-потенциалом магнитного поля. При движении электронов в электрическом поле (в отсутствие магнитного поля) вектор-потенциал равен 0 и тогда  $n = v$ . Скорость электронов в этом случае можно определить из закона сохранения энергии:

$$\frac{1}{2} m v^2(x y z) = e V(x y z),$$

где  $e$  и  $m$  соответственно заряд и масса электрона, а  $V(x y z)$  — потенциал точки поля  $(x y z)$ , где скорость электрона имеет соответственно величину  $v(x y z)$ . Показатель преломления выражается равенством:

$$n(x y z) \cong v(x y z) \cong \sqrt{2 \frac{e}{m} V(x y z)}$$

Таким образом, в случае электростатического поля показатель преломления равен скорости частицы или корню квадратному из потенциала электрического поля (с точностью до постоянного множителя). Так как потенциал изменяется от точки к точке поля, то электрическое поле, по терминологии световой оптики, является для электронов изотропной, неоднородной средой, у которой показатель преломления изменяется непрерывно. В световой оптике, как правило, мы встречаемся с оптическими средами, на границе которых происходит скачкообразное изменение показателя преломления. Среды с непрерывным изменением показателя преломления являются редким исключением. Примером такой среды будет атмосфера, окружающая землю, так как оптическая плотность ее непрерывно изменяется с высотой.

Показатель преломления при наличии электрического и магнитного полей будет зависеть также и от направления движения электронов. Величина показателя преломления определяется также углом между направлением скорости электрона и вектором-потенциалом магнитного поля. Таким образом, электроннооптическая среда при движении электронов в электрическом и магнитном полях является для электронов неоднородной, анизотропной. По аналогии со световой оптикой такая среда соответствовала бы кристаллической неоднородной среде. Подобных сред в световой оптике не встречается.

В электронной микроскопии для получения изображений высокого качества используются неоднородные электрические и магнитные поля, обладающие осевой симметрией. Такие поля получили название электронных линз. Под ними обычно подразумевают не только сами поля, но и систему электродов или катушку и магнитные цепи, с помощью которых эти поля реализуются.

На рис. 1 показана упрощенная схема симметричной электростатической линзы, применяемой в электронной микроскопии. Под линзой изображена эквивалентная оптическая схема.

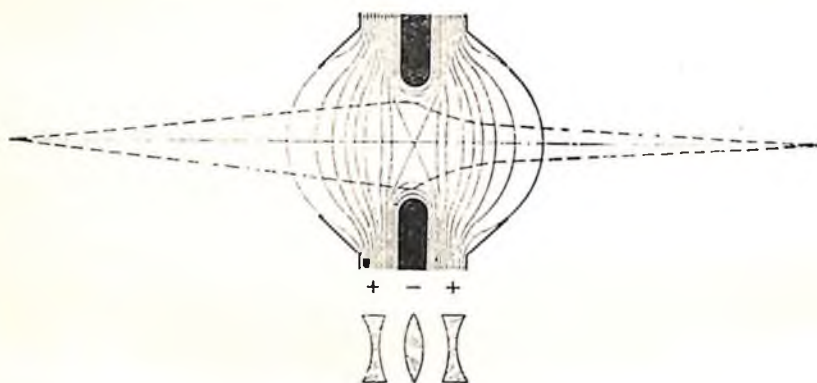


Рис. 1. Симметричная электростатическая линза.

Сплошными линиями на рисунке показаны поверхности равного потенциала. Их можно сопоставить со сферическими поверхностями стеклянных линз, при пересечении которых лучи преломляются.

В качестве простейшей магнитной линзы может быть использован многослойный соленоид (рис. 2). Магнитное поле, возникающее при прохождении электрического тока через обмотку такого соленоида, фокусирует электронные лучи. Оптическая сила линзы определяется величиной тока через обмотку соленоида. Для концентрации магнитного поля, т. е. повышения оптической силы линзы, катушку можно заключить в железный панцырь, имеющий внутри кольцевой разрыв магнитопровода. Наконец, чтобы создать линзы большей оптической силы, фокусные расстояния которых измеряются несколькими миллиметрами или долями миллиметра, в месте разрыва магнитопровода устанавливают специальные наконечники из мягкого железа или сплавов с большой магнитной проницаемостью.

Электронные линзы, как магнитные, так и электрические, еще весьма несовершенны. Для повышения качества изображения и уменьшения ошибок — аббераций, вызываемых плохим

качеством электронных линз, обычно прибегают к линзам, в которых используются очень узкие пучки электронов. Рабочие апертуры таких линз почти в тысячу раз меньше апертур световых микроскопов. Дальнейшему исправлению линз за счет уменьшения апертур препятствует явление дифракции.

Конфигурация магнитного и электрического полей определяет оптические свойства линзы. Если катушка была намотана плохо или железный панцирь либо полюсные наконечники сделаны с отклонением от симметрии, то в этом случае магнитное поле не будет симметричным, а линза даст заметные искажения. То же самое может быть сказано и в отношении электрических линз. Изготовление электродов и их центрировка требуют высокой степени точности, ибо этим определяется качество линзы.

В последние годы для устранения нарушений симметрии магнитных и электрических полей в электронной микроскопии стали широко использоваться стигматоры. Электрические линзы дополняют электродами, подбором потенциала на которых удается компенсировать асимметрию основного электростатического поля. В случае магнитных полей подобный же эффект достигается также введением небольших ферромагнитных масс в магнитное поле линзы. Стигматоры позволяют тонко исправлять поля и добиваться высокой степени их симметрии.

Использование их весьма целесообразно, так как даже при высокой точности изготовления полюсных наконечников магнитных линз и электродов электростатических систем нельзя полностью избежать астигматизма. Применение стигматоров позволило на ряде моделей электронных микроскопов получить разрешение, предсказанное теорией, т. е. 4—5 Å.

## II. ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРОХОДЯЩИХ ЭЛЕКТРОННЫХ ЛУЧАХ

Оптическая схема электронного микроскопа для исследования в проходящих электронных лучах сходна со схемой оптического светового микроскопа (рис. 3).<sup>1</sup> В электронном

<sup>1</sup> Для иллюстрации нами выбрана оптическая схема электронного микроскопа ЭМ-3, широко используемого в СССР. Краткое описание этого прибора будет приведено ниже.

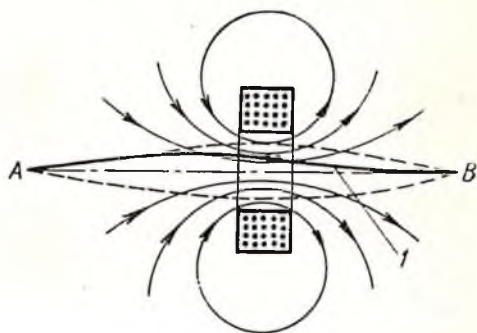


Рис. 2. Слабая магнитная линза.  
I — путь электрона.

микроскопе все оптические элементы светового микроскопа заменяются соответствующими электрическими: источник света — источником электронов; стеклянные линзы — электронными (магнитными или электростатическими).

Источником электронов служит вольфрамовая проволока, нагреваемая электрическим током. Электроны, покинувшие нить, ускоряются электрическим полем от 30 000 до 100 000 в, приложенным между нитью и анодом. В центре анода имеется

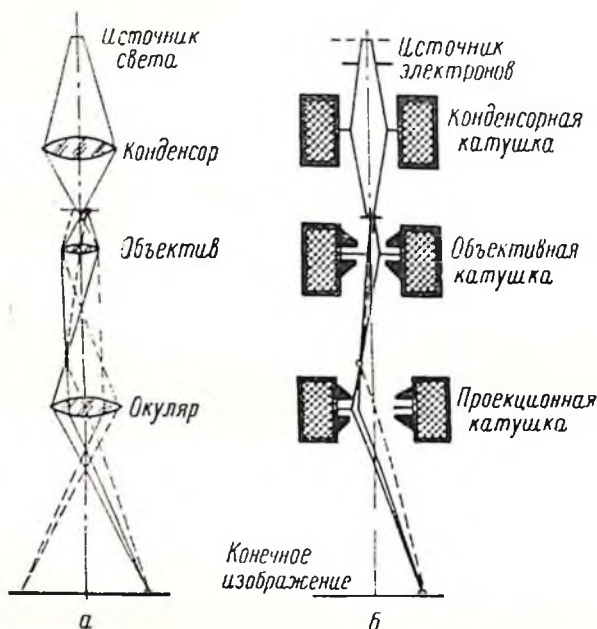


Рис. 3. Оптические схемы светового (а) и электронного (б) микроскопов, работающих в проходящих лучах.

отверстие, через которое пролетают электроны, используемые в дальнейшем для образования изображения. Эта часть микроскопа получила название электронной пушки. Вылетевшие из пушки электроны летят далее по инерции и попадают в поле конденсорной линзы, простой панцирной катушки, которая изменяет направление их движения таким образом, что они собираются на исследуемом объекте.

Различные участки объекта в зависимости от их толщины и плотности по-разному рассеивают падающие на них электроны. На промежуточном экране, расположенном после объективной линзы (панцирной катушки с полюсными наконечниками) перед проекционной линзой микроскопа, будут фокусироваться лишь те электроны, которые при прохождении

объекта отклоняются на сравнительно малые углы. На экране соответствующие участки будут светлыми. В том случае, когда электроны при прохождении участков объекта отклоняются на большие углы, они задержатся апертурной диафрагмой, применяемой в объективе (отверстие апертурной диафрагмы имеет диаметр 0,05 мм) и соответствующие элементы изображения будут на экране темными.

В центре экрана для промежуточного изображения имеется небольшое отверстие, через которое во вторую увеличивающую линзу попадают электроны, идущие от участка объекта, изображение которого попадает на это отверстие. В магнитном поле проекционной линзы электроны снова фокусируются, и на экране для конечного изображения, находящемся в нижней части микроскопа, получается повторно увеличенное изображение объекта.

Для наблюдения изображений, даваемых электронами, можно пользоваться либо экранами, покрытыми катодолюминофорами (светящимися под действием падающих на них электронов), либо непосредственно фотослоями, в которых электроны вызывают почернения, подобные почернениям под влиянием света.

### III. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМЫХ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННЫХ МИКРОСКОПОВ

В современных электронных микроскопах, предназначенных для работы в проходящих лучах, можно проводить весьма разнообразные по своему характеру исследования: в светлом и темном полях, стереоскопические и электроннографические.

#### Исследования в темном поле

Схемы исследования в темном поле показаны на рис. 4. По первой схеме (а) в конденсорной линзе на пути прямых лучей ставится кольцевая диафрагма, центральная непрозрачная часть которой задерживает прямые лучи, заполняющие при ее отсутствии апертуру объектива. Через кольцевую прорезь проходят лишь те лучи, которые попадают на края апертурной диафрагмы. Поле изображения в отсутствие объекта кажется темным, так как прямые лучи не попадают в объектив. Наличие объекта приводит к тому, что электроны, прошедшие через кольцевую прорезь диафрагмы, претерпевают рассеяние на деталях объекта и частично попадают в отверстие апертурной диафрагмы объектива — на темном фоне появляется изображение деталей объекта.

Тот же эффект получается и при работе по схеме б. Наклон осветительной системы микроскопа обеспечивает здесь такое направление прямых лучей, при котором они не попадают в отверстие апертурной диафрагмы объектива. Помещение

объекта на пути лучей приводит, так же как и при применении первой схемы, к появлению темнопольного изображения.

Для получения снимков в темном поле подвижная диафрагма конденсорной линзы микроскопа ЭМ-3 смещается в сторону приблизительно на 1 мм так, чтобы прямые лучи перестали попадать в отверстие апертурной диафрагмы объективной линзы.

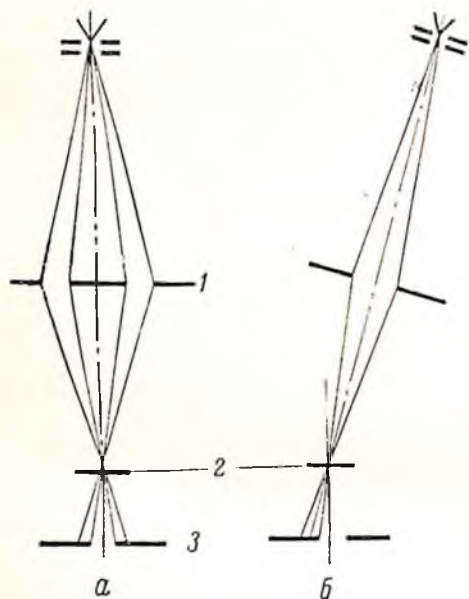


Рис. 4. Получение темнопольных изображений с помощью темнопольной диафрагмы в конденсорной линзе (а) и наклона осветительной системы (б).

1 — диафрагма темного поля; 2 — объект; 3 — апертурная диафрагма.

Темнопольные исследования оказываются весьма полезными при изучении малококонтрастных объектов. В ряде случаев они позволяют установить, являются ли исследуемые объекты кристаллическими или аморфными. Это обусловлено тем, что при исследовании кристаллических объектов происходит избирательное рассеяние электронов от атомных плоскостей.

### Стереоскопические исследования

Стереоскопическое наблюдение объектов в электронном микроскопе становится возможным благодаря большой глубине резкости электронномикроскопических объективов. С одинаковой четкостью передаются детали объектов, находящиеся на расстоянии до 1—2  $\mu$  от истинной предметной плоскости объектива. Это обстоятельство весьма облегчает получение стерео-

снимков в электронных микроскопах. Стереоскопическая пара получается съемкой в электронном микроскопе одного и того же места объекта в двух положениях, когда он повернут на небольшие углы к оси объектива (обычно  $\pm 4^\circ$ ). Для стереоскопического наблюдения снимки рассматриваются с помощью обычного стереоскопа. Измерение их, производимое на специальных стереокомпараторах, позволяет определить расстояние (по глубине) между отдельными элементами объекта.

### Электроннографические исследования

Электроннографические исследования могут производиться на любом из современных электронных микроскопов. В основе таких наблюдений лежит способность электронных волн интерферировать при рассеянии их от атомов кристаллической решетки. В случае регулярного расположения атомов в решетке появление интерференционных максимумов возможно лишь при выполнении соотношения Вульфа — Брэгга

$$n\lambda = 2d \sin \theta,$$

где  $\lambda$  — длина волны электронных волн,  $d$  — расстояние между соседними отражающими атомными плоскостями и  $\theta$  — угол скольжения.

Обычно электроннографические исследования проводятся по двум схемам: в проходящих и отраженных электронных лучах (рис. 5). В первом случае на пути пучка электронов находится тончайшая пленка исследуемого вещества, во втором — электронный пучок скользит по исследуемой поверхности.

По положению интерференционных максимумов, или, как их часто называют, рефлексов, могут быть вычислены соответствующие им расстояния между атомными плоскостями:

$$d = \frac{\lambda L}{R}.$$

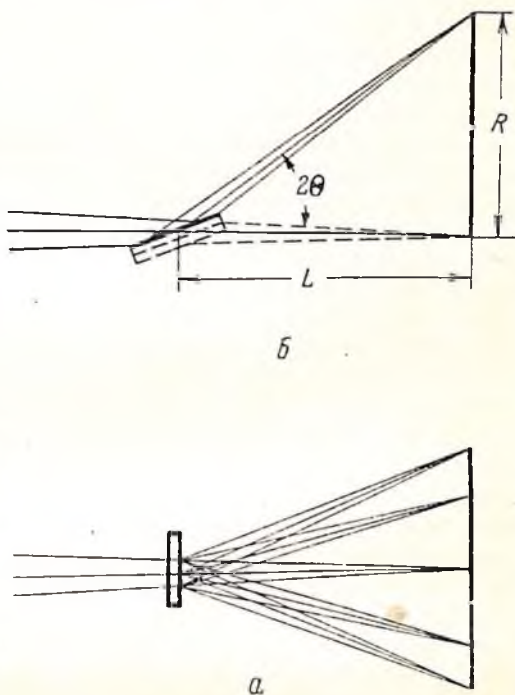


Рис. 5. Схемы электроннографических исследований в проходящих (а) и отраженных лучах (б).

Произведение  $\lambda L$  является постоянной прибора, так как при заданном значении ускоряющего напряжения и постоянном  $L$  (фиксированном положении электроннографической насадки), оно имеет неизменное значение.

Электроннограммы во многом сходны со снимками, получаемыми при рентгеновском структурном анализе. Однако между дифракцией рентгеновых и электронных лучей имеется существенная разница. Первые, обладая высокой проникающей способностью, рассеиваются от всех атомов кристаллов, составляющих образец, вторые из-за их малой проникающей способности рассеиваются только в тончайших поверхностных пленках толщиной в десятки ангстрем. Это делает метод дифракции электронов особенно ценным для исследования поверхностной структуры.

Существенным оказывается также и то обстоятельство, что дифракция электронов несравненно более интенсивна, чем дифракция рентгеновых лучей; это обеспечивает возможность визуального наблюдения дифракционной картины и позволяет получать электроннограммы при очень коротких выдержках (секунда, несколько секунд).

Электроннографические исследования могут дать важные дополнительные сведения о структуре большого числа электронномикроскопических объектов. В ряде случаев они позволяют дополнить данные о внешней форме кристалликов или иных образований с периодической упорядоченностью строения, сведениями об их кристаллической структуре или характере упорядочения. Электроннографическое исследование оказывается полезным как при изучении прозрачных для электронов объектов, так и при исследовании массивных, непрозрачных образцов. В первом случае дифракция электронов может быть получена непосредственно от препаратов, исследуемых электронномикроскопически, во втором — получают дифракцию в отраженных лучах непосредственно от тех массивных объектов, слепки с которых рассматриваются в электронном микроскопе.

Использование электронных микроскопов для электроннографических исследований особенно ценно еще потому, что совершенная оптика и высокостабилизированное электрическое питание могут обеспечить получение электроннограмм очень высокого качества.

#### IV. ЭЛЕКТРОННЫЕ МИКРОСКОПЫ ЭМ-3 (МОДЕЛЬ 1952 г.) И ЭМ-3М

Работы по созданию советских электронных микроскопов проводились под руководством А. А. Лебедева; был разработан советский тип электронных микроскопов под названием ЭМ-3, серийное производство которых ведется нашей промышленностью.



В настоящем разделе кратко описывается устройство электронного микроскопа ЭМ-3 (модели 1952 г.) и сообщаются сведения о наиболее существенных изменениях конструкции, осуществленных в приборах ЭМ-3М.

Электронный микроскоп имеет вид колонны высотой 1 м, диаметром 130 мм, установленной на специальном столе, прикрепленном к шкафу.

В колонне микроскопа располагаются следующие основные узлы прибора:

а) осветительная система микроскопа, состоящая из источника электронов (электронной пушки) и магнитной конденсаторной линзы, собирающей электроны на исследуемых образцах;

б) камера образцов с предметным столиком, конструкция которого позволяет перемещать образец по двум взаимно перпендикулярным направлениям, а также наклонять его на  $\pm 4^\circ$ , что необходимо для стереосъемки;

в) объективная магнитная линза, дающая первое увеличенное в 130 раз изображение исследуемых образцов;

г) проекционная магнитная линза, позволяющая производить вторичное увеличение изображения в диапазоне от 2 до 192 раз; таким образом, общее увеличение микроскопа можно изменять от 250 до 25 000 раз;

д) фотокамера микроскопа с флуоресцирующим экраном для получения конечного изображения (фотокассетная часть расположена под экраном). Для наблюдения конечного изображения фотокамера снабжена тремя большими смотровыми люками.

При фотосъемках экспонирование производится при помощи экрана, который одновременно выполняет и функции затвора фотокамеры.

В передней части колонны расположены малые смотровые люки для наблюдения за ходом электронных лучей в микроскопе, а также для наблюдения изображения на промежуточном экране проекционной линзы.

Установка образцов на предметном столике, зарядка и удаление фотокассет из микроскопа производятся через специальные люки, которыми снабжены соответственно объективная линза и фотокамера микроскопа. Через эти же люки могут быть вынуты столик и полюсные наконечники объективной линзы и экран фотокамеры, что необходимо для чистки и смены апертурной диафрагмы линзы и обновления светосостава экрана. Полюсные наконечники проекционной линзы могут быть вынуты через смотровой люк над этой линзой. Это во многом упрощает эксплуатацию микроскопа, так как позволяет производить общую сборку всего микроскопа практически один раз при его установке и запуске.

Вакуумная система микроскопа состоит из колонны, насоса предварительного вакуума, диффузионного вакуумного насоса,

термопарного вакуумметра, вакуумпровода и специального распределительного механизма, осуществляющего во время работы необходимые вакуумные переключения. Распределительный механизм соединен вакуумпроводами с колонной микроскопа и обоими вакуумными насосами. Подача воздуха внутрь микроскопа производится распределителем через осушитель.

Размещенная в шкафу схема электрического питания микроскопа смонтирована в виде отдельных блоков. Она имеет два основных направления — низковольтное и высоковольтное. Основная часть питающего устройства включается в сеть 220 в через ферро-резонансный стабилизатор напряжения. Низковольтная часть схемы обеспечивает питание накала нити пушки током высокой частоты и обмоток линз выпрямленным, стабилизированным напряжением, а также питание мотора вакуумного насоса, печи диффузионного насоса, термопарного вакуумметра и всех сигнальных ламп. Высоковольтная часть схемы обеспечивает электронный микроскоп выпрямленным ускоряющим напряжением до 50 000 в ступенями 30 000, 40 000 и 50 000 в.

В модернизированных приборах ЭМ-3 (1952) улучшена электрическая схема питания и существенно упрощен монтаж ее элементов. Подвергся переделке также и внешний вид прибора.

В результате модернизации существенно упростились эксплуатационные характеристики прибора и повысилась разрешающая способность. Во время испытаний на изготовленных приборах получают разрешающую способность 60 Å и выше вместо требовавшихся до модернизации 100 Å. Такое разрешение, конечно, не является пределом для этих приборов. Обычно при их нормальной эксплуатации на лучших снимках удается получать разрешение примерно в два раза лучше (полезное увеличение 100 000). Весьма существенным является введение в комплект приборов электроннографических насадок для исследований в проходящих и отраженных лучах. Наличие этих насадок позволяет совместить электронный микроскоп с электроннографом высокого качества.

Дальнейшее совершенствование промышленных электронных микроскопов было проведено во время разработки и изготовления партии приборов для Московского государственного университета (электронные микроскопы ЭМ-3М) (рис. 6). В этих приборах были предусмотрены следующие существенные изменения.

1. Введено юстировочное устройство, обеспечивающее возможность полной центрировки осветительной системы микроскопа относительно объектива.

2. Использована новая электронная пушка с отрицательным смещением, чем снижена еще в несколько раз общая нагрузка объектов и повышена освещенность конечного изображения.

3. В комплект прибора введена электроннографическая насадка для исследования в отраженных лучах.

4. Осуществлен переход на 12-зарядную фотокамеру с пластинками  $4,5 \times 6$  см, в полтора раза большей площади, чем в ранее использовавшейся 4-зарядной.

5. Повышена стабилизация первичного напряжения.

6. Введено автоматическое разрядное устройство для снятия заряда с высоковольтных конденсаторов при выключении высокого напряжения и т. д.

Проведенная модернизация обеспечила значительное улучшение качества выпускаемых приборов.

#### **V. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИ- ЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

##### **Общие сведения о методах приготовления препаратов**

Успех исследований с электронным микроскопом во многом определяется выбором правильной методики приготовления объектов. При ускоряющих напряжениях в 50 000 в, наиболее часто используемых в электронных микроскопах, толщина объектов при изучении их в проходящих электронных лучах не должна превосходить 0,1  $\mu$ , хотя отдельные элементы объекта и могут иметь значительные размеры (до нескольких микронов). Это специфическое для электронномикроскопического исследования требование оказывает существенное влияние на всю технику изготовления препаратов.

Существующие методы исследования разделяются на прямые и косвенные. При прямых методах в электронных микроскопах

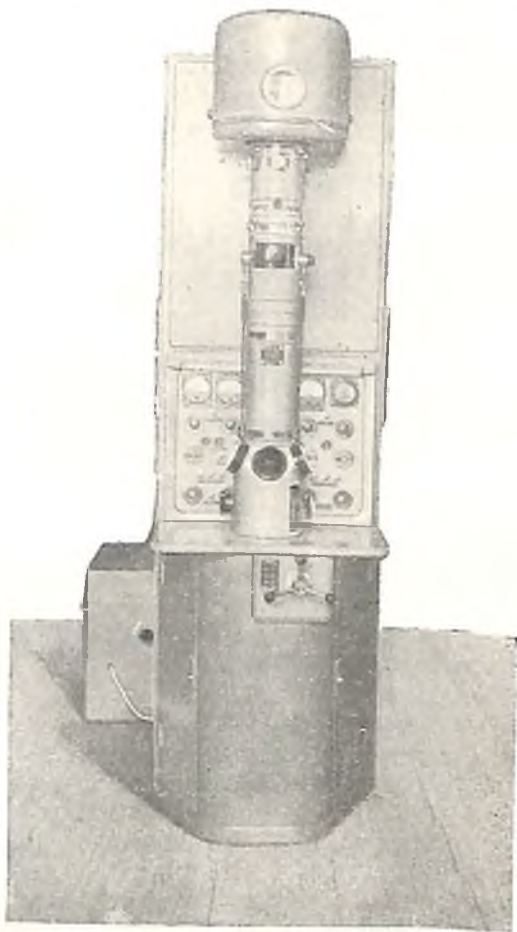


Рис. 6. Электронный микроскоп ЭМ-3М.

исследуются непосредственно сами объекты; при косвенных — тончайшие слепки с поверхности изучаемых массивных объектов: костей, срезов тканей, металлографических шлифов и т. д.

При прямом исследовании объекты чаще всего наносятся на тончайшие пленки — носители объекта. Наиболее часто применяются органические пленки толщиной в  $10^{-5}$  —  $10^{-6}$  мм. В последнее время с успехом применяются также и неорганические пленки из кварца, берилля, окиси алюминия и т. д. Пленки — носители объекта не дают какой-либо заметной собственной структуры при электронномикроскопическом исследовании и весьма незначительно рассеивают и поглощают проходящие через них электронные лучи.

Они укрепляются на небольших дисках из частой сетки (100 отверстий на  $1 \text{ мм}^2$ ) или на диафрагмах с малыми отверстиями. Исследуемое вещество может быть нанесено на них осаждением из раствора или взвеси, напылением взвешенных в атмосфере частиц, улавливанием частиц дымов, образующихся при сгорании каких-либо веществ, и т. д. В некоторых случаях оказывается удобным вводить частицы исследуемого вещества в раствор, служащий для получения органических пленок. При изучении порошков частицы наносятся иногда на края проволочек сеток и диафрагм или на тончайшие волокна, укрепленные на них. Если исследуемое вещество может быть получено в виде тончайшей пленки, то последняя укрепляется на сетках или дисках и исследуется обычным путем (так могут быть исследованы некоторые пластмассы, каучук, резина и т. д.). Гистологические срезы обычно также непосредственно накладываются на сетки.

При косвенных исследованиях слепки с поверхности изучаемых объектов изготавливают разными способами. В настоящее время их можно подразделить на две группы: приготовление однократных, или негативных, слепков и получение двукратных, или позитивных, слепков. В первом случае с поверхности исследуемого массивного образца снимается тончайший слепок — негатив, который затем непосредственно рассматривается в электронном микроскопе (рис. 7). В качестве материала для слепков часто применяются различные производные нитроклетчатки, в частности целлулоид, коллодиум, а также поливинилформал (формвар). Для получения слепков на специально подготовленную поверхность образцов выливают несколько капель сильно разбавленного раствора органического вещества. Отделение слепков производится обычно в воде, где набухшая органическая пленка легче отслаивается от поверхности. Негативные слепки готовят также из кварца, который наносится вакуумным испарением. Наконец, в ряде случаев при исследовании металлов могут быть использованы слепки

из пленки окиси, если последние аморфны и бесструктурны (алюминий, никель, нержавеющая сталь и т. д.).

Чтобы получить позитивные, или двукратные, слепки с поверхности исследуемого образца, делается сначала массивный отпечаток-негатив, хорошо воспроизводящий его рельеф, а затем с отпечатка-негатива снимается тончайший слепок-позитив (рис. 8). Наиболее распространены следующие методы изготовления двукратных слепков: полистироло-кварцевый, метилметакрилатово-кварцевый, алюминиево-полистироловый, поливиниловый спирт-кварц и т. д.

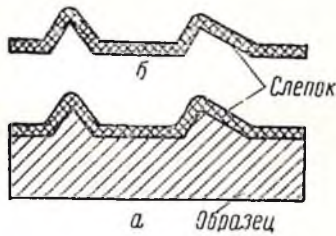


Рис. 7. Получение однократного слепка-негатива.  
а — массивный объект; б — отделенный слепок-негатив.

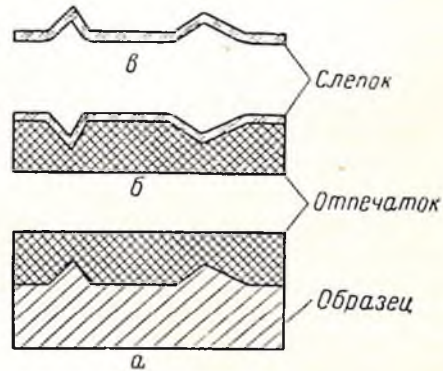


Рис. 8. Получение двукратного слепка-позитива.  
а — объект с массивным отпечатком-негативом; б — отпечаток с образованным на нем слепком; в — отделенный слепок-позитив.

По полистироло-кварцевому методу массивный отпечаток негатив получают, применяя термопластическую деформацию полистирола. На поверхность полистиролового отпечатка с воспроизведенным рельефом исследуемого образца вакуумным испарением наносят тончайший слой кварца. Кварцевый слепок отделяется от негатива растворением последнего в этилбромиде.

При работе по методу метилметакрилатово-кварцевых слепков на поверхность образца наносят метилметакрилат. После механического отделения негатива с него делают кварцевый слепок, отделяемый растворением отпечатка в хлороформе.

По методу алюминиево-полистироловых слепков первичный отпечаток получается выдавливанием на тонкой алюминиевой фольге. В дальнейшем с негатива — оттиска объекта изготавливается тончайший полистироловый слепок.

При пользовании поливиниловым спиртом на поверхность сначала наносят водный раствор этого вещества. После высыхания его механическим путем отрывают отпечаток, на который в дальнейшем в вакууме наносят кварц. Отделение кварцевого слепка происходит в воде.

## Повышение контрастности электронномикроскопических изображений

Часто при проведении электронномикроскопических исследований приходится сталкиваться с малой контрастностью изображения. Контрасты в изображении, даваемом электронным микроскопом, возникают за счет различного рассеяния электронов отдельными элементами, составляющими объект. На экране или фотопластинке фокусируются электронными линзами лишь те электроны, которые при прохождении объекта отклоняются на углы, не превосходящие апертурный угол объектива электронного микроскопа (меньше  $5 \cdot 10^{-3}$  радиана). При исследовании однородных объектов различной рассеивающая способность может быть лишь в том случае, если толщина отдельных частей препарата различна; при неоднородных объектах этот же эффект может быть обусловлен их составом.

Получение хорошей контрастности в изображении объектов органической природы осложняется еще тем обстоятельством, что основным методом изготовления препаратов является нанесение исследуемого вещества на органическую пленку, которая сама рассеивает электроны. Практически оказывается невозможным наблюдать малые органические объекты, если их размеры меньше  $100 \text{ \AA}$ . Эти же затруднения возникают при использовании простых негативных органических слепков.

Для увеличения контрастности электронномикроскопического изображения на исследуемые объекты или слепки наносится в вакууме тонкий слой металла. Испарение производится под очень малым углом со спирали, удаленной на сравнительно большое расстояние от образцов, при этом чем мельче объекты, находящиеся на поверхности препарата, тем меньше должен быть угол, под которым происходит нанесение металла. На поверхностях объектов, обращенных к спирали, откладывается слой металла, а с противоположной стороны (куда металл не попадает) образуются тени. Количество конденсированного металла определяется крутизной рельефа. По длине образующихся теней можно судить о величине выступов на поверхности. При исследовании таких образцов в электронном микроскопе получают изображения с очень высокой контрастностью, что позволяет значительно повысить разрешение. Для теневого покрытия обычно применяют хром, золото, уран и т. д.

### Электронномикроскопический вакуумный пост (ЭВП-1)

Для подготовки электронномикроскопических препаратов необходимо специальное вакуумное оборудование, так как ряд операций производится в условиях вакуума: испарение кварца, алюминия, бериллия и т. д. при изготовлении неорганических

подкладок и слепков, операции по оттениванию образцов и слепков и т. д. Вакуумные посты ЭВП-1 (рис. 9) при несложной схеме и простоте обслуживания позволяют проводить весь необходимый цикл вакуумных операций по подготовке электронномикроскопических препаратов. Вакуумный пост уста-

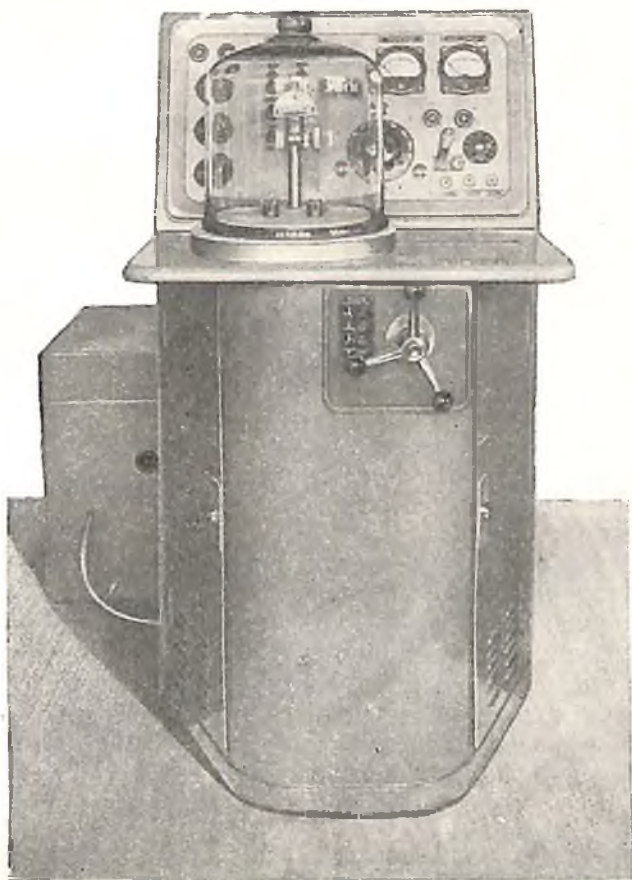


Рис. 9. Электронномикроскопический вакуумный пост ЭВП-1.

новлен на специальном столе, прикрепленном к шкафу, расположенному позади поста. Верхняя часть шкафа, находящаяся над уровнем поста, занята пультом управления установки. Вакуумная система ЭВП-1 полностью воспроизводит систему электронного микроскопа ЭМ-3. Размещенное в шкафу электропитающее устройство обеспечивает накал двух испарителей, измерение вакуума и питание электродвигателя-насоса предварительного вакуума и печи диффузионного насоса.

## Методы приготовления гистологических препаратов

Ряд серьезных затруднений испытали гистологи, а также другие исследователи, стремившиеся изготовить тончайшие срезы, пригодные для электронномикроскопических исследований. До недавнего времени не существовало микротомов, с помощью которых можно было бы получать срезы толщиной менее 1  $\mu$ . Вместе с тем для электронномикроскопических исследований необходимы срезы, толщина которых не превосходит 0,1  $\mu$ .

В начале изготавливали препараты тканей путем их механического расщепления. В ряде случаев это достигалось с помощью ультразвука. Мельчайшие обрывки ткани наносились на объектодержатели и исследовались. Основным недостатком этого метода приготовления препаратов является разрушение и деформация исследуемых тканей.

Можно готовить образцы, пользуясь методом клиновидных срезов. Сначала на обычном микротоме делается обычный срез, а затем образец поворачивается в держателе на небольшой угол и производится второй срез. На конце полученных образцов имеются утонченные по отношению к основной части участки ткани. Этот метод в разных вариантах оказался также мало пригодным. Практически было невозможно получать срезы в 0,1  $\mu$  и особенно был затруднен их монтаж на объектодержателях.

Разрабатывая методы электронномикроскопической гистологии, пытались также производить срезы при высокой скорости резания. Для этого на диске типа ультрацентрифуги укреплялся нож, который делал совместно с диском несколько десятков тысяч оборотов в минуту. Ткань непрерывно подавалась и при каждой встрече с ножом получался срез. Диск с ножом и образец усиленно охлаждались. Основными затруднениями были деформация образцов, сложность их собирания и монтаж. Этот способ, как и предыдущие, имеет ограниченное распространение.

Наконец, в последнее время были разработаны специальные микротомы, в которых нож укреплялся неподвижно, а образец, находящийся на медленно вращающемся диске, подавался непрерывно вместе с ним в сторону ножа. Для подачи использовалось термическое расширение металлического стержня, толкающего диск с блоком. Этим путем удается получать срезы толщиной в 200—100, и даже в 70  $\text{Å}$ . Ножи изготавливаются из стекла, кварца и специальной стали.

Другим путем, которым пытаются облегчить исследование гистологических объектов, является использование в электронной микроскопии более жестких проникающих электронных лучей, имеющих скорость от 100 000 до 500 000 *v*. Хотя это и разрешает проводить исследование более толстых объектов



(толщиной 2—3  $\mu$ ), но сопровождается обычно значительным снижением разрешающей способности из-за уменьшения контраста. Это вполне естественно, так как оказывается невозможным наблюдение образований в несколько десятков ангстрем в препаратах общей толщиной 20 000—30 000 Å. Если же препараты представляют собой совокупность мелких структур, то наложение изображений друг на друга не позволит наблюдать их отдельно. В ряде случаев высокие напряжения могут быть полезными, например для исследования внутренней структуры больших бактериальных клеток при пониженном разрешении.

Эти обстоятельства заставляют, несмотря на ряд преимуществ использования электронов повышенных скоростей (уменьшение ошибок изображения, снижение поглощения электронов объектами, приводящего к их разрушению), пользоваться при исследованиях преимущественно ускоряющими напряжениями в 50 000—60 000 в, при которых обеспечивается высокая контрастность изображения и большая разрешающая способность.<sup>1</sup> В этом случае при гистологических исследованиях срезы должны быть порядка 0,1—0,01  $\mu$ . Все сказанное подтверждает настоятельную потребность в специальных микротомов для получения тончайших гистологических срезов.

Исследование срезов толщиной 100—200 Å дает качественно новые результаты. Ранее, пользуясь методикой, во многом заимствованной из световой микроскопии, бактерии исследовались как целое. При изучении гистологических срезов большой толщины (0,1  $\mu$  и толще) изображение возникало в результате прохождения электронами тех участков тканей, откуда испарялась вода. Разрешение при проведении таких исследований мало отличалось от разрешающей способности светооптических микроскопов. Сейчас с помощью новых микротомов удается получать срезы бактерий в разных сечениях, позволяющие увидеть детали строения их оболочки, распределение протоплазмы, ядерного вещества и т. д. Новые интересные результаты получаются и при гистологических исследованиях, которые при срезах толщиной 100—200 Å проводятся с предельным разрешением, свойственным электронным микроскопам. Дальнейшее усовершенствование методов подготовки препаратов позволит еще более полно использовать электронную микроскопию для морфологических исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

Вайнриб Е. А., Милютин В. И. Электронная оптика. Госэнергоиздат, 1951. — Верниер В. Н. Советский электронный микроскоп. Заводская лаборатория, 13, 1364, 1947. — Верниер В. Н. Электроннографическая

<sup>1</sup> Настоящее заключение является общим не только для гистологических объектов, но и вообще для исследования любых образцов большой толщины.

насадка для получения дифракции в электронном микроскопе. Заводская лаборатория, 18, 1481, 1952. — Верциер В. Н., Гольдин Л. С. Электронномикроскопическое исследование гистологических объектов. Журн. общей биологии, IX, 423, 1948. — Верциер В. Н., Зандин Н. Г. Электроннографическая насадка для получения дифракции на отражение в электронном микроскопе ЭМ-3. Заводская лаборатория, 20, 741, 1954. — Коссеlegt В. Введение в электронную оптику. М., 1950. — Лебедев А. А. Советская модель электронного микроскопа. Общее собрание Академии наук СССР, стр. 31—44, 1946. — Пинскер З. Г. Дифракция электронов. М., 1949. — Описание и краткая инструкция по монтажу и эксплуатации электронного микроскопа. 1952. — Рустерхольц А. Электронная оптика. М., 1952. — Стоянова И. Г., Фример А. И. Темнопольный метод в электронной микроскопии. Заводская лаборатория, 18, 1472, 1952. — Материалы первого совещания по электронной микроскопии. Изв. АН СССР, серия физич., 15, 283—474, 1951. — Сушкин Н. Г. Электронный микроскоп. Гостехиздат, 1949. — Электронная микроскопия. Под редакцией акад. А. А. Лебедева. М., 1954. — Ardenne M. Elektronen — Übermikroskopie. 259—269, Berlin, 1940. — O'Brien H. C., McKinley G. M. New microtome and sectioning method for electron microscopy. Science 98, 455, 1943. — Pease D. C., Baker R. F. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 67, 470, 1948. — Gettner M. E., Hillier Q. Improved Ultra-Thin Sectioning of Tissue for Electron Microscopy. Journal of applied Physics, 21, 889, 1950. — Sjöstrand F. Experientia, 9, 114, 1953.

---

## О ПРИМЕНЕНИИ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ГИСТОЛОГИИ И ЦИТОЛОГИИ

Г. М. ФРАНК  
(Москва)

За 20 с лишним лет существования метода электронной микроскопии отношение к нему менялось. Первоначальное увлечение сменилось известным разочарованием и даже скептицизмом в отношении полезности этого метода для гистологии и цитологии, и лишь в настоящее время после длительной и кропотливой работы намечаются новые рациональные пути его применения. Разочарование было связано с тем, что оказались наивными иллюзии в субмикроскопической организации тканей увидеть большее богатство и разнообразие картин, чем это привычно гистологу. Это и не могло быть иначе, так как коллоидные макромолекулы, независимо от их химической конституции и свойств, гораздо ближе друг к другу по „внешнему виду“, чем их сложные и разнообразные сочетания, с которыми привык иметь дело гистолог.

В самом деле, в электронной микроскопии исследователь наблюдает картины, которые по размерам структурных элементов приближаются к компетенции физико-химика.

Необходимость трактовки электронномикроскопических картин не только с позиций морфологии, но и с позиций физико-химии обязывает нас не изолировать электронномикроскопический метод, а опираться на другие способы изучения субмикроскопических структур, до настоящего времени не имевшие никаких связей с морфологией, в частности на рентгеноструктурный анализ.

Новые успехи рентгеноструктурного анализа в изучении дифракции под малыми углами чрезвычайно расширили диапазон исследований этим методом. Возникла возможность изучать структуры не только внутримолекулярного порядка, но и такие, в которых величины отдельных элементов или периодов повторяемости свойств доходят до размеров  $1000 \text{ \AA}$ , т. е.  $0,1 \text{ \mu}$ , и подойти вплотную к структурам, разрешаемым световым микроскопом.

Благодаря использованию высокой разрешающей способности электронной оптики изучение органов и тканей

в морфологии идет также в направлении исследования их коллоидных структур, а рентгеноструктурный анализ, которому ранее были доступны лишь внутримолекулярные структурные сочетания, стал шире использоваться в морфологии. Вследствие этого устанавливается непрерывная лестница структурного анализа от гистологических картин до внутримолекулярной организации.

С физико-химической трактовкой электронномикроскопических картин непосредственно связана и сама форма подготовки объектов для их изучения в электронном микроскопе — мы снова встречаемся с проблемой артефактов, пожалуй, в еще более острой форме, чем при фиксации и окрашивании в обычной световой микроскопии. Об изучении живых структур здесь вообще не может идти речи, за исключением едва намекающегося в настоящее время пути, о чем будет сказано дальше.

Однако это не препятствует принципиальной возможности применения электронного микроскопа для изучения клеточных и тканевых структур. Важно лишь ясно отдавать себе отчет в том, что электронномикроскопическая картина в какой-то мере условно отображает живые структуры, и суметь организовать проверку и контроль подлинности рассматриваемых картин.

Так, большинство биохимических исследований связано с далеко идущим разрушением живого субстрата и теоретическим воссозданием действительных структур и явлений по анализу обломков. И в электронной микроскопии, приближаясь методом прямого рассмотрения картин к размерностям субмикроскопического мира — к коллоидным структурам, — мы не должны обманывать себя непосредственно видимыми картинками; необходимо учитывать, что электронная микроскопия в какой-то мере — косвенный способ исследования.

Если посмотреть перечень объектов, которые на различных этапах истории применения электронного микроскопа для биологических целей включались в рамки исследований, то отчетливо видно, насколько это было связано с особенностью получения электронномикроскопического изображения. Первоначально были доступны лишь мелкодисперсные частицы: микробные тела, вирусные частицы и т. п. Значительный успех применения электронного микроскопа в микробиологии и вирусологии надолго приковал внимание к этим объектам. Ряд первоклассных работ в данной области выполнен советскими исследователями.

Далее возникла техника искусственного диспергирования тканей с наблюдением в первую очередь волокнистых структур (волокон мышц, коллагеновых волокон и т. п.) и, наконец, в самое последнее время в практику входит приготовление ультратонких срезов толщиной 0,1  $\mu$  и меньше, что сделало доступным электронномикроскопическое изучение любых органов и тканей.

Электронномикроскопические картины, наблюдаемые визу-ально на флюоресцирующем экране или фотографируемые, представляют собой гигантски увеличенное теневое изображение рассматриваемого объекта. Для грубо подготовленного препарата это дает возможность в соответствующем масштабе наблюдать лишь его контуры. Определенный подбор объектов или техника их подготовки обогащает рассматриваемые картины черно-белого изображения всей гаммой полутонов. Важно при



Рис. 1. Электронномикроскопическое изображение эритроцита человека. Увеличение около 3000 $\times$ .

анализе этих картин отдавать себе ясный отчет в том, что электронномикроскопическое изображение со всей гаммой полутонов есть проекция объемного объекта на плоскость. Эта объемность объекта подчеркивается широко используемым сейчас „тенивым“ методом электронной микроскопии, методом покрытия препарата парами металлов под определенным углом к плоскости.

На рис. 1 дано электронномикроскопическое изображение эритроцита человека при увеличении около 3000 раз. Это изображение является тенью, где, помимо контуров и некоторого просвечивания в середине, ничего рассмотреть нельзя. Вряд ли имеет смысл электронномикроскопическое изучение такого объекта, изолированно взятого. Однако, если его

сравнить со снимком (рис. 2), на котором изображен аналогичный эритроцит крови больного бронхопневмонией с резко увеличенной РОЭ, мы увидим поразительное различие в контурах. Оказывается, подобные эритроциты обнаруживают склонность к агглютинации. Не исключено, что это связано с отсутствием тех четких контуров, которые мы видели на предыдущей фотографии, и наличием какой-то протоплазма-

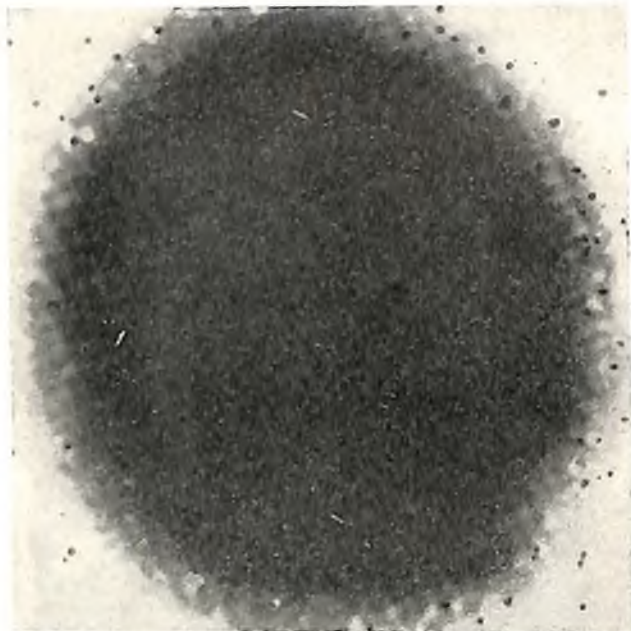


Рис. 2. Эритроцит человека, больного бронхопневмонией, с резко увеличенной РОЭ (по Блоху и Повелю, 1952).

тической бахромой, обладающей вязкими свойствами и увеличивающей вероятность сцепления эритроцитов. При увеличениях обычного светового микроскопа подобная картина контуров края красного кровяного шарика практически неразличима.

Еще более существенным является изучение эритроцитной стромы, структура которой лежит почти вне возможности обычной световой микроскопии. Можно спорить о том, действительно ли существует характерная сетка стромы, или она образуется в процессе фиксации и высушивания. Однако важно, как меняется структура стромы, условно принимаемая за нормальную, при различных воздействиях на строму после гемолиза и при действии различных гемолитических агентов на эритроцит.

Нами совместно с А. С. Мочалиной и М. И. Дашевским показано глубокое изменение структуры белкового вещества стромы при воздействии ультрафиолетовыми лучами.

Снимок эритроцита после осмотического гемолиза представляет собой прозрачное изображение стромы с тем же контуром, без каких-либо деталей структуры. На снимке облученного ультрафиолетом эритроцита можно видеть строму его с характерным рисунком мелких кратеров по всему полю контура эритроцита (рис. 3). Внимательное изучение снимков позволило сделать заключение, что под влиянием



Рис. 3. Эритроцит, облученный ультрафиолетом. Видна строма.

ультрафиолетового света происходят изменения белка стромы и распад липидостромативного комплекса.

Еще более интересно изучение белых кровяных шариков. В работе Маршанта (1952) сопоставлены структуры, видимые в фазовоконтрастном микроскопе, с картинками, наблюдаемыми в электронном микроскопе. Оба эти метода дают возможность раздвинуть пределы разрешающей способности обычного микроскопа за счет электронной микроскопии, а с другой стороны, оценить степень витальности электронномикроскопического наблюдения, рассматривая белые клетки крови в нефиксированном состоянии.

На рис. 4 показаны снимки лейкоцитов-нейтрофилов, фиксированных осмием. Отмечается чрезвычайная переменчивость отростков различных клеток, иногда ветвящихся и образующих густую сеть.

Следует обратить внимание на способность контакта и, может быть, взаимодиффузии, которая видна благодаря высокой разрешающей способности электронного микроскопа. Речь идет не о случайном перекрещивании или наложении отдельных

филоподий, а о прямом сращивании клеток, о каком-то типе взаимодиффузии. На этом же рисунке имеется аналогичный снимок моноцита, захватившего бактерию, обозначенную буквой *в*.

В фазовоконтрастном микроскопе протоплазма моноцита практически прозрачна. На электронномикроскопическом снимке отчетливо видны гранулы в значительном количестве диаметром до  $0,1 \mu$ .

По данным снимкам могут быть проанализированы размеры и характер гранул, проведено их измерение и даже статистиче-

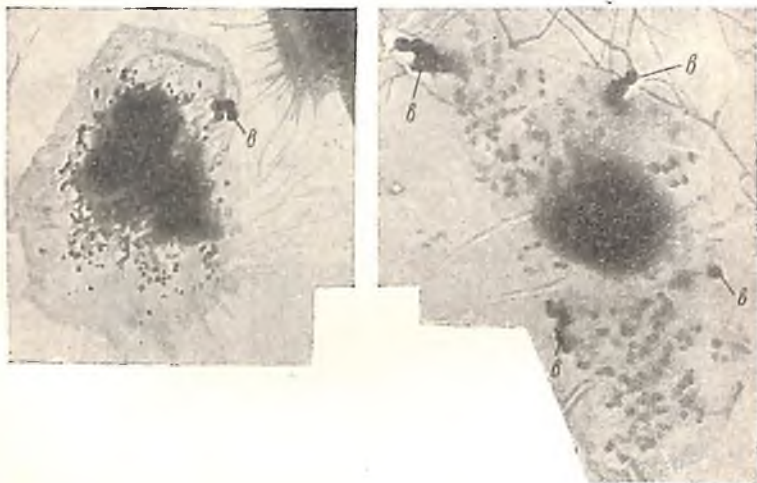


Рис. 4. Нейтрофильные лейкоциты, фиксированные осмием, и моноцит, фагоцитирующий бактерию (*в*) (по Мэршанту, 1952).

ский анализ их числа и размеров. К такого рода электронномикроскопическому рассмотрению следует подходить не только с целью описания видимых картин, но и с точки зрения точного числового анализа структурных элементов, что даст возможность дифференцировать различные функциональные состояния клетки.

Сеть псевдоподий полинуклеаров при увеличении около 7000 представлена на рис. 5. Эти филоподии настолько тонки, что в рассмотрении данной картины преимущества электронной микроскопии по сравнению со световой полностью использованы; без электронной оптики эта сеть едва ли была бы выявлена. В то же время подлинность ее существования не вызывает сомнений, так как тенденция к образованию таких отростков и их начальные более утолщенные части уже различимы в фазовоконтрастном микроскопе.

Следующий этап в развитии электронномикроскопической морфологии связан с подготовкой объектов специальным раз-



мельчением. Это оказалось легче всего достигнуть при изучении некоторых волокон. Расщепление и разволокнение создает условия для достаточной прозрачности и в то же время не превращает полностью этот объект в бесформенный гомогенат, оставляя возможность рассмотреть характерные субмикроскопические структуры фибриллярных образований. Оказалось, что коллагеновые волокна дают правильную суб-



Рис. 5. Псевдоподии полинуклеара. Увеличение  $7000\times$  (по Берихарту и др., 1950)

микроскопическую периодику. Исключительно отчетливы и технически хорошо выполнены электронные микрограммы, полученные в работе наших отечественных исследователей А. Д. Зайдес и С. Л. Пупко (1948, 1951); они показывают чередование темных и светлых полос с периодом  $680\text{ \AA}$  (рис. 6). При больших увеличениях обнаруживаются также субпериоды в  $170\text{ \AA}$  (рис. 7). Обработка коллагена дубовым экстрактом и уранилацетатом не изменяет величины периода, лишь подчеркивает контрастность чередования поперечных или винтообразных полос. Любопытно, что при обработке фосфорновольфрамовой кислотой выявляется другая величина периода  $510$  и субпериода  $140\text{ \AA}$ .

Таким образом, в открытии этой правильной периодики, недоступной рассмотрению в световом микроскопе, мы видим



Рис. 6. Электронные микрограммы коллагеновых волокон. Чередование темных и светлых полос с периодом 680 Å (из работы А. Д. Зайлес и С. Л. Пулко, 1948, 1951).

не детализацию, не увеличение подробностей, а открытие принципиально новых структур, находившихся до сих пор за пределами возможности гистологии. Что означает эта периодика? При помощи электронного микроскопа можно установить различия в плотности вещества или в количестве его на единицу поверхности проекции препарата. Таким образом, речь идет о периодическом сгущении белковых цепей или периодическом обрастании их более мощно развитыми боковыми цепями.

Из сказанного ясно, что, рассматривая эти структуры субмикроскопического диапазона, мы не удовлетворяемся столь привычным для морфолога описанием картины, а невольно стремимся к физико-химическому истолкованию их.

Возникает вопрос, не образуется ли эта субмикроскопическая поперечная полосатость при высыхании волокон как какой-то своеобразный периоди-

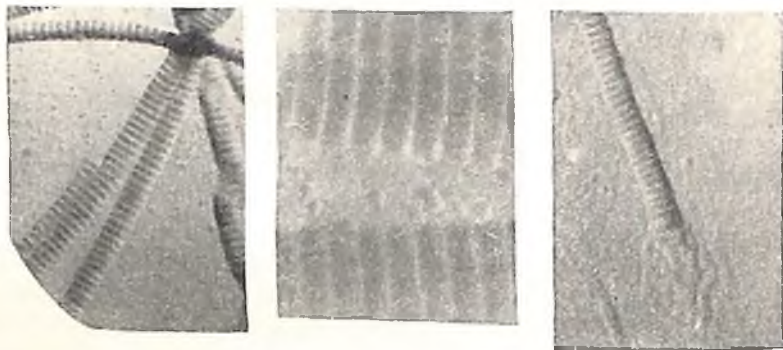


Рис. 7. То же при больших увеличениях. Субпериоды 170 Å.

ческий процесс, связанный с денатурацией. Однако полученная с помощью метода рентгеноструктурного анализа невысушенного нативного коллагена отчетливая картина дифракции

рентгеновых лучей под малыми углами говорит об упорядоченности структуры, строгой периодичности свойств вдоль волокна с периодом около  $7000 \text{ \AA}$ , что находится в полном соответствии с непосредственно видимой морфологической картиной в электронном микроскопе.

Удивительное соответствие и логическое совпадение результатов, полученных с помощью этих двух методов, может быть показано и в анализе некоторых патологических состояний. Так, в работе Астбюри описано изменение корнума кожи, сопутствующее ревматоидным артритам.

Любопытно, что с помощью рентгеноструктурного анализа эти гистологически и электроннооптически видимые нарушения организации можно проследить и на более мелких структурах вплоть до внутримолекулярных. Таким образом, рентгеноструктурный анализ свежего, неразмельченного, нефиксированного и невысушенного объекта дает своего рода витальное подтверждение электронномикроскопических картин. Более того, дифракция рентгеновых лучей позволяет получить не только качественное описание картин, но и строго количественную их характеристику по интенсивности и соотношению коллагеновых и фибриноидных диаграмм.

Не менее существенно изучение с помощью электронного микроскопа мышечных волокон, которые также подготавливаются различными способами разволокнения и где нам также доступно сопоставление с рентгеноструктурным анализом.

На рис. 8 представлена поверхность мышечного волокна — видны коллагеновые фибриллы сарколеммы и волокна поперечной полосатости мышцы (Портер, 1951). На рис. 9 сарколемма сорвана; мышечное волокно несколько растянуто; отчетливо видно сжатие материала, образующее поперечную полосатость. Анизотропные диски дают более плотные и как бы выпирающие структуры.

Помимо хорошо различимой сложной структуры (гистологически знакомой поперечной полосатости), на электронномикроскопических картинах мышечного волокна видна еще более мелкая субпериодичность в поперечном направлении, выступающая в виде легкого муара. Мышечная фибрилла выглядит, как полоска грубого холста, как бы сотканного из ниток. Этих субпериодов в одном саркомере помещается около 100. Подобная же исчерченность имеет место в продольном направлении — это группы миозиновых нитей, идущие по фибрилле и непрерывно прошивающие отдельные элементы структуры через весь рисунок поперечной полосатости.

Интересны картины структуры мышцы при окраске фосфорно-вольфрамовой кислотой. Видно, насколько различны сорбционные свойства анизотропной и изотропной частей, хорошо окрашены субпериоды.

При сокращении или, вернее, фиксации в укороченном состоянии анизотропный диск растет за счет изотропного, а при максимальном укорочении имеется сгущение материала возле мембран. Электронномикроскопические картины окончательно разрушили теорию Сент-Джорджи о том, что попереч-



Рис. 8. Поверхность поперечнополосатого мышечного волокна. Видны коллагеновые фибриллы сарколеммы и волокна поперечнополосатой мышцы (по Портеру, 1951).

ная полосатость мышечного волокна — это не истинная структура, а лишь оптическая иллюзия.

Очень важно открытие субмикроскопических периодов — поперечных полос второго порядка. В настоящее время можно утверждать, что мицеллярная исчерченность — реально в живой мышце существующая структура. Более того, следует думать, что не во внутримолекулярных соотношениях, а в изменении пространственной конфигурации мицеллярных комплексов заложена основа динамического укорочения мышечных воло-

кон. В электронном микроскопе уже почти виден этот скрытый механизм, однако пока в статическом состоянии.

Рентгеноструктурный анализ наталкивает также на некоторые соображения о физико-химической сущности различий А- и I-дисков при непосредственном переходе миофибрил из одного диска в другой. Речь идет не только о более параллельном и упорядоченном расположении цепей в анизотропной части волокна. Это достигается большей степенью развития межцепочных связей, что сразу меняет по сравнению с изотропной частью электрические, а также оптические свойства за счет создания кристаллоидного типа решетки и, наконец, проявляется в видимом при помощи электронного микроскопа сгущении материала.

Весьма интересны данные, свидетельствующие о том, что субмикроскопическая организация изотропной части делает ее более уязвимой для ферментативной атаки. На рис. 10 мышечные фибриллы, подвергнутые перевариванию трипсином, разваливаются на аккуратные столбики А-дисков при практическом исчезновении в первую очередь изотропной части.

Появление методической возможности готовить ультратонкие срезы сразу расширило круг применения электронной микроскопии, позволило изучать морфологию любых органов и тканей с громадными полезными увеличениями. Сущность техники заключается не только в конструкции микротомы, позволяющего делать срезы толщиной 0,1  $\mu$  и даже менее, но и в том, как подготовлен объект для этих целей.

Впрочем, необходимо подчеркнуть, что электроннооптическая гистология, изучающая тонкие срезы, переживает еще



Рис. 9. Миофибриллы поперечнополосатой мускулатуры (по Портеру, 1951).

своего рода левенгуковский период первоначального, довольно бессистемного описания различных картин. Весьма любопытно, что в некоторых случаях при исследовании нервных волокон этим методом обнаружилась несомненная связь с данными, полученными нами по ультраструктуре нервного волокна с помощью других косвенных методов.

На рис. 11 представлен продольный срез волокна седалищного нерва кролика из работы Сьестранда (1935). Видны миелиновый слой и структура аксоплазмы. Последняя пред-



Рис. 10. Мышечные фибриллы, подвергнутые перевариванию трипсином (по Ашлею, Портеру и др., 1951).

ставляется в виде трехмерной сетки переплетающихся и анастомозирующих волокон.

Своеобразной является также структура миелинового слоя со своего рода лакунами, которые возникают в результате растворения липидной фракции миэлина. Авторы крайне не критически подошли к оценке наблюдаемых структур. В частности, ими оставлено без внимания то обстоятельство, что разнообразие структур аксоплазмы относится к неучитываемым результатам действия фиксатора.

В последние годы, занимаясь в нашей лаборатории ультраструктурой аксоплазмы нервных волокон мякотных и безмякотных нервов методом регистрации светорассеяния, мы обнаружили быстро протекающие изменения их оптических свойств. При нанесении раздражения распространяющееся возбуждение по нервному волокну может быть зарегистрировано

по нарушению структурного равновесия. Это явление можно записать с помощью фотоэлемента и осциллографа и выражается оно в изменении светорассеяния нерва. Разное функциональное состояние, разный уровень возбудимости непосредственно связан с различными динамически устанавливающимися структурными особенностями. Обнаруживаемая при помощи электронного микроскопа сеть в аксоплазме и различия ее строения являются результатом фиксации структур, находящихся в разном функциональном состоянии. Не подлежит сомнению, что фиксатор, являющийся мощным раздражителем, в зависимости от условий фиксации способен изменять структуры.

Очень важен вопрос о структуре миелинового слоя. Пятнистые лакунарные образования, которые видны на фотографии, мало понятны. Данные рентгеноструктурного анализа говорят об удивительной упорядоченности липопротеинового комплекса и о расположении липидных молекул перпендикулярно оси волокна в виде частокола. Между липидными молекулами располагаются белковые цепи.

Если при изучении коллагена и мышц рентгеноструктурный анализ подтвердил подлинность субмикроскопических структур, то в отношении строения миелиновой оболочки исследование с помощью рентгеноструктурного анализа неповрежденного нерва дало возможность предсказать наличие структур, выявленных позже уже прямым рассмотрением в электронном микроскопе.

Однако рентгеноструктурный анализ не единственный способ контроля витальности субмикроскопической организации. Такой контроль намечается сейчас в успешно развиваемом С. Л. Пупко методе съемки структуры поверхности толстых непрозрачных живых объектов. Съемка поверхности достигается изготовлением слепков, получаемых в результате распыления кварца в виде тончайших пленок. Они повторяют поверхностную структуру необезвоженного нативного ничем не обработанного объекта. Пленки кварца непосредственно рассматриваются в электронном микроскопе. На рис. 12 представлена картина поверхности необезвоженного нативного сухожилия,



Рис. 11. Продольный срез волокна седалищного нерва кролика в изображении электронного микроскопа (по Сьестранду, 1953).

полученного методом слепков (реплики) С. Л. Пупко в Институте экспериментальной биологии АМН СССР. Этот метод находится в начальной стадии развития, однако ему принадлежит будущее в изучении живых структур как косвенным, так и прямым путем.

Применяя электронную микроскопию, важно не ограничиваться одним данным методом. Сочетая электронномикроско-

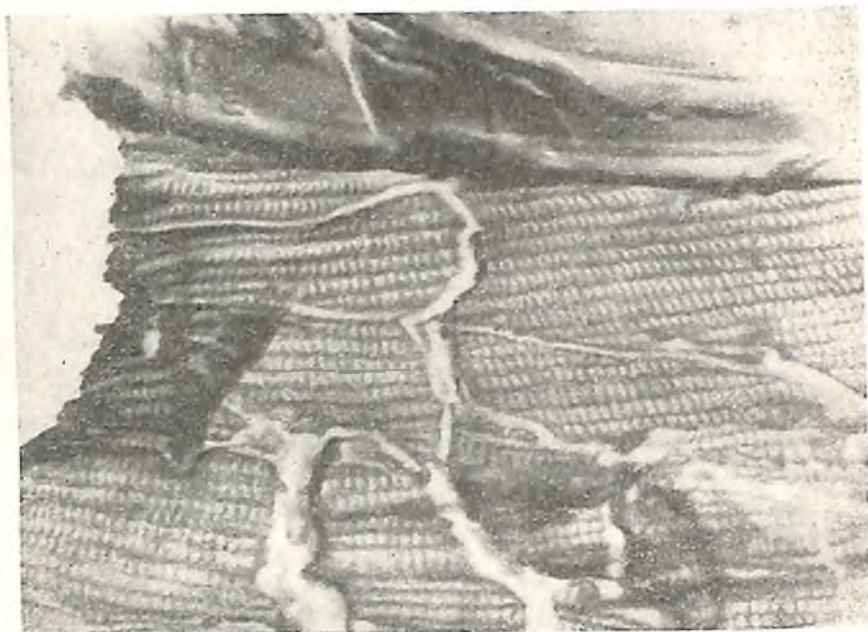


Рис. 12. Картина поверхности необезвоженного сухожилия, полученного методом слепков С. Л. Пупко.

пические исследования с другими методами, всесторонне контролируя витальность наблюдаемых структур, устанавливая адекватность их тому или иному функциональному состоянию, мы получим возможность успешно развивать не только гистофизиологию, но и субмикроскопическую функциональную морфологию, приближаясь к подлинному пониманию материальной основы изучаемых жизненных явлений.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Гольдин Л. С. Электронная микроскопия периферического нерва. Доклады АН СССР, 62, 4, 529, 1948. — Зайдес А. Л. и Пупко С. Л. Электронномикроскопическое исследование коллагена. Доклады АН СССР, 65, 2, 227, 1949. — Зайдес А. Л. и Пупко С. Л. Электронномикроскопическое исследование коллагена методом реплик. Доклады АН СССР, 73, 2, 379, 1950. — Зайдес А. Л. и Пупко С. Л. Электронномикроскопическое исследование влияния электролитов на структуру коллагена. Доклады АН



СССР, 80, 4, 647, 1951. — Опарин А. И., Крисс А. Е. Метод электронной микроскопии в биологии. (Основные итоги работы лаборатории электронной микроскопии отделения биологических наук АН СССР). Вестн. АН СССР, 6, 1951. — Porter A. and al. Adenosinetriphosphate contraction of skeletal myofibrils. J. of Exp. med., 9, 94, 9, 1951. — Bloch and Powell. Science, 115, 2976, 46, 1952. — Draper M. H. and Hodges A. J. Studies on muscle with the Electron microscope. Australian J. of Exp., Biol., 27, 5, 465, 1949. — Kelgren J. H., Ball J., Astbury W. T., Reid R. and Beighton E. Biophysical studies of rheumatoid connective tissue. Nature, 168, 4273, 493, 1951. — Marchant J. Quart. J., micr., Sci., 93, 4, 395, 1952. — Sjostrand F. S. The Lamellated Structure of the nerve myelin sheath as Revealed by High Resolution Electronmicroscopy. Experientia, IX, 41, 1953. — Rozca J., Morgan G., Szent-Györggi A. and Wyckoff R. Science, 112, 2998, 42, 1950.

---

## МЕТОД РАДИОАУТОГРАФИИ В МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

А. М. КУЗИН и Я. В. МАМУЛЬ

(Москва)

Метод радиоавтографии позволяет выяснить локализацию радиоактивных веществ в различных макро- и микроструктурах организма.

Еще в 1904 г. Е. С. Лондон впервые использовал его для наблюдения над распределением естественных радиоактивных веществ в животных тканях. Однако свое настоящее развитие этот метод получил сравнительно недавно, после того как успехи современной ядерной физики позволили применять его для изучения распределения в тканях искусственных радиоактивных элементов.

Если подвергнуть такое вещество, как серу, нейтронному облучению, то она превращается в фосфор, обладающий всеми химическими свойствами обычного элемента фосфора, и который даже в различных соединениях будет вести себя в биологической структуре совершенно так же, как обычный фосфор. Однако в отличие от обыкновенного фосфора он будет обладать свойством радиоактивности и излучать  $\beta$ -лучи, а в силу этого действовать на фотографическую пластинку, как все радиоактивные вещества, оставляя на ней соответствующие следы. Это будет радиоактивный изотоп фосфора.

В настоящее время почти все элементы, которые принимают участие в процессах обмена веществ, происходящих в живом организме, можно получать в виде их радиоактивных изотопов. Вводя их в различные сложные органические вещества, можно придать радиоактивные свойства многим соединениям, входящим в состав тех или иных тканей организма, что значительно расширяет применение метода радиоавтографии и позволяет использовать его для исследования не только локализации тех или иных сложных органических веществ в различных микро- и макроструктурах, но определять скорость обновления их, что раньше казалось совершенно неразрешимой задачей. Используя соединения, „меченые“ радиоактивными изотопами, и применяя радиоавтографический метод, мы создаем пред-

посылки для развития динамической морфологии, изучающей макро- и микроструктуры в их становлении, вскрывая скорость их обновления, т. е. скорость распада и восстановления.

Достоинства метода радиоавтографии заключаются прежде всего в том, что при помощи его можно проследить распределение веществ в тонких структурах организма, составить представление о скорости обновления различных фирменных элементов органов, тканей, клеток и неклеточного вещества, что подчас не может быть исследовано другими методами.

Второе достоинство заключается в чрезвычайно большой чувствительности метода. Благодаря тому, что фотоэмульсия обладает способностью суммировать воздействие радиоактивных лучей, можно обнаружить предельно малые количества веществ, находящихся в исследуемой ткани, которые нельзя установить самыми точными химическим и гистохимическим методами. Обычно для этой цели приходится только удлинять экспозицию изучаемого объекта, увеличивая ее до нескольких дней, недель, а иногда и месяцев, за счет чего можно обнаружить такие количества веществ, которые не поддаются обнаружению обычными методами химического анализа.

В современной модификации радиоавтография позволяет определять различную локализацию радиоактивных веществ не только в макро-, но и в микроструктуре в пределах, исчисляемых несколькими микронами.

Одно из достоинств этого метода состоит в том, что в полученной радиоавтограмме мы имеем документ, который надолго фиксирует результаты эксперимента.

Для изучения распределения тех или иных радиоактивных веществ в микроструктуре требуется особо мелкозернистая фотоэмульсия, обладающая большой чувствительностью. Большое значение имеет момент предварительной обработки исследуемой ткани: срез не должен оказывать непосредственного химического воздействия на фотоэмульсию. Это особенно существенно при обнаружении очень малых количеств радиоактивных веществ, когда время экспозиции исчисляется неделями и месяцами. Даже ничтожные количества химически активных веществ (например формалин и др.) могут оказать воздействие на фотоэмульсию, образуя ложную радиоавтограмму. Важным условием является также тщательное просушивание препаратов.

Исходя из сказанного, при приготовлении среза ткани для радиоавтографии следует исключить моменты фиксации ткани в формалине, тщательно высушивать исследуемые срезы и саму экспозицию образца на фотопленке проводить в сухом помещении при низкой температуре.

Макрорадиоавтографии обычно получают путем непосредственного контакта изучаемого образца с фотоэмульсией рентгеновской пленки или фотопластики. При работе с радио-

изотопами, обладающими достаточно жестким излучением ( $J^{131}$ ,  $P^{32}$ ,  $Fe^{59}$  и др.) целесообразно применение усиливающих экранов и желательное помещение между образцом и фотоэмульсией тонкого листа целлофана, снимающего опасность искажения автографа за счет химических воздействий. При работе с изотопами, излучающими  $\beta$ -частицы небольшой энергии ( $C^{14}$ ,  $S^{35}$ ,  $H^3$  и др.), следует осуществить непосредственный контакт между объектом и фотоэмульсией, так как целлофан может поглотить значительную часть радиации.

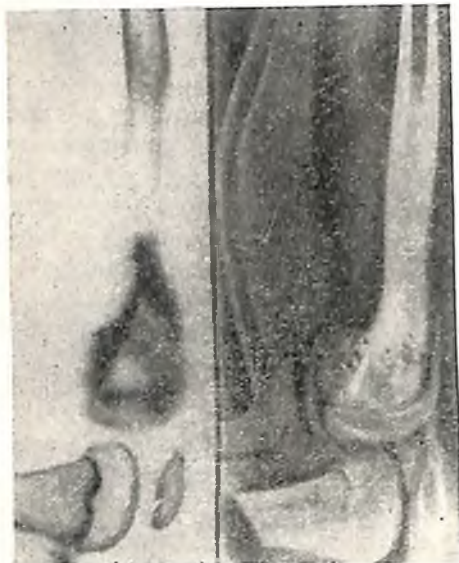


Рис. 1. Распределение стронция в костной ткани.

Возможности метода микро-радиоавтографии представлены на рис. 1.

Большие возможности представляет микромодификация радиоавтографического метода.

При получении микро-радиоавтограмм, т. е. при исследовании распределения радиоизотопов в микроструктуре тканей, исключительно большое значение имеет метод обработки препарата. Обычная гистологическая обработка возможна только при исследовании включений тех или иных меченых радиоактивных веществ в белковых соединениях. Если же стоит вопрос о распределении в клетке

или гистологических срезах соединений, которые могут вымываться при обычной гистологической обработке, следует применять метод быстрой лиофильной сушки.

В нашей лаборатории для этой цели успешно применяется следующий метод: кусочки ткани толщиной 1—1,5 мм помещают на тонкую алюминиевую пластинку, которую затем опускают в предварительно охлажденный до  $-160^\circ$  изопентан. Благодаря хорошей смачиваемости ткань быстро замораживается без образования кристалликов льда, нарушающих структуру ткани. Отделив замороженную ткань от алюминиевой пластинки, ее переносят при охлаждении сухим льдом в вакуумную установку для обезвоживания (рис. 2). Благодаря компактной монтажке прибора и приспособлению, позволяющему изменять температуру ткани, обезвоживание при температуре  $-60$ — $-40^\circ$  при вакууме  $10^{-4}$ — $10^{-5}$  мм Hg достигается

в течение 5—6 часов. Пропитывание обезвоженной ткани парафином производится в той же установке. Для этого по истечении указанного времени выключают диффузионный насос и при работающем форвакуумном насосе медленно поднимают температуру в тканедержателе до расплавления парафина.

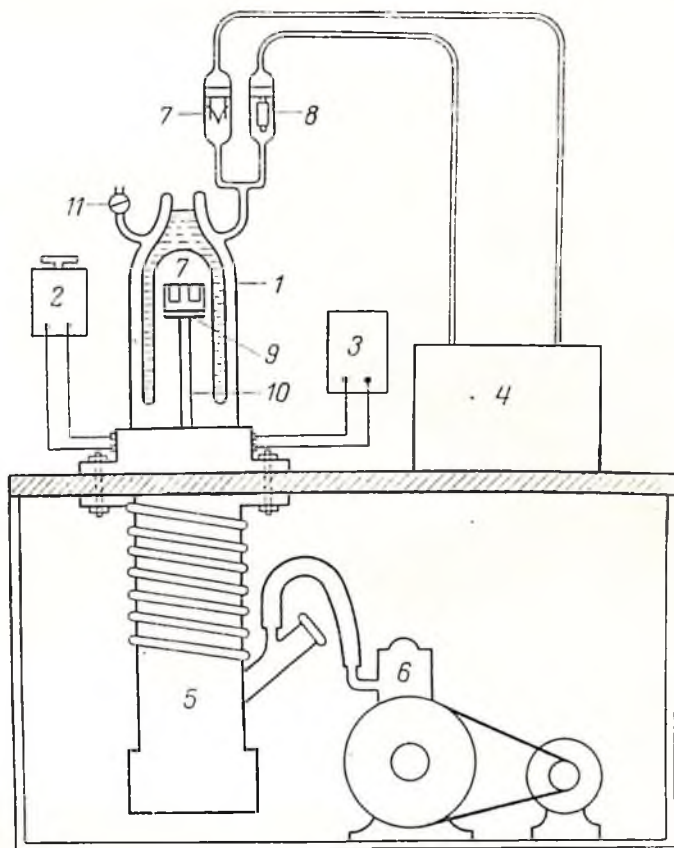


Рис. 2. Вакуумная установка для обезвоживания тканей.

1 — ловушка; 2 — латр-2 для питания нагревателя; 3 — гальванометр для терморпары, измеряющей температуру ткани; 4 — вакуумметр; 5 — диффузионный насос; 6 — форвакуумный насос; 7 — камера для парафина и помещения ткани; 8 — лампа ЛМ-2; 9 — нагреватель; 10 — стеклянный держатель; 11 — край для впуска атмосферного воздуха.

Через 10—15 минут выключают форвакуумный насос и извлекают из установки обезвоженные пропитанные парафином кусочки ткани. После заделки в парафиновые блоки ткань поступает на микротом для получения срезов. Распрямление их производится на поверхности подогретой ртути, с которой срезы переносят на предметные стекла. В конечном счете получают хорошие результаты как в смысле сохранения

в препаратах радиоактивных веществ, которые при обычной гистологической обработке неизбежно были бы вымыты, так и в отношении сохранения микроструктуры ткани. Серия таких срезов, нанесенных на предметное стекло (желательно получить срезы толщиной 2—4  $\mu$ ), погружается в темноте в расплавленную эмульсию. Для этой цели используется мелкозернистая расплавленная эмульсия толстослойных фотопластинок типа К.

Так как в тонких срезах ткани обычно находится ничтожное количество радиоактивных веществ, то время экспозиции приходится удлинять, иногда до сроков свыше месяца.

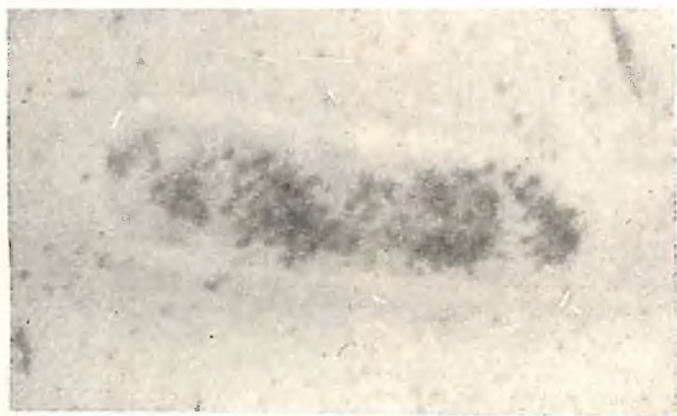


Рис. 3. Микрорадиоавтограф дрожжевой клетки, культивированной на среде, содержащей  $\text{P}^{32}$ .

Благодаря тому, что эмульсия нанесена непосредственно на изучаемый препарат, облегчается сопоставление его с получаемыми радиоавтограммами, что трудно достигнуть при исследовании микрообъектов методом контактной радиоавтографии или съемной эмульсии, описанным в литературе.

Обычно срезы сильно окрашивать не рекомендуется, так как различные тона окраски затрудняют чтение радиоавтографа. Для сопоставления радиоавтографа со структурой следует рекомендовать фазовоконтрастную микроскопию. Приведенные на рис. 3 и 4 микрорадиоавтограммы, полученные этим методом, демонстрируют его возможности.

Микрофотометрическое исследование интенсивности почернений в различных структурах дает возможность получать не только качественную характеристику распределения радиоизотопа в тех или иных структурах, но также может дать представление о количестве изотопа. Точность количественных определений может быть значительно повышена при одновре-

менном экспонировании эталонов известной активности или радиоактивности, как это было предложено Я. В. Мамуль.

Доступность и простота метода макро- и микроавтографии, его большие возможности в области исследования локализации веществ и скорости обновления различных структур-

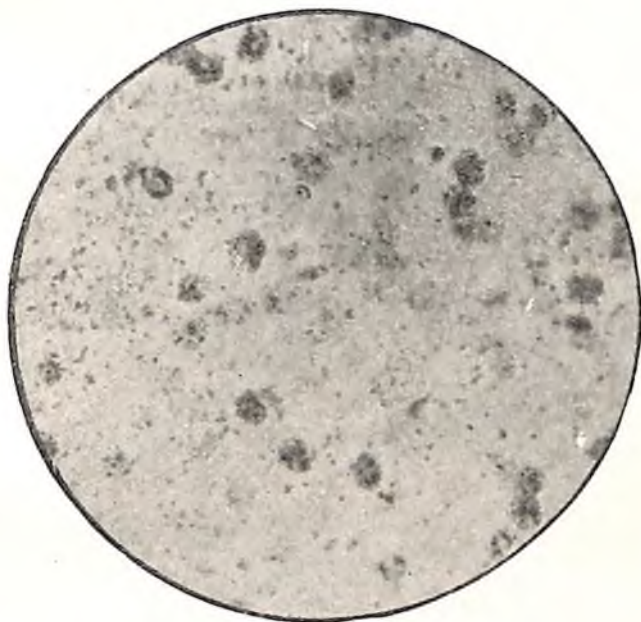


Рис. 4. Микроавтограф среза селезенки крысы. На фотографии видно, что радиоактивный фосфор локализуется главным образом в ядрах клеток.

ных элементов ткани и клетки, несомненно, приведут к тому, что он вскоре найдет широкое применение как в гистохимии, так и в динамической морфологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Баранов В. И., Жданова А. Б., Дейзенрот-Мысовская М. Ю. Применение метода микроавтографии для выяснения характера распределения радиоактивных элементов в природных условиях. Известия АН СССР, Отд. хим. наук, 1, 1944. — Дробков А. А. Радиографический метод определения естественных и искусственных радиоактивных элементов в растениях. Доклады АН СССР, 68, 1, 1949. — Лондон Е. С. О физиологическом значении эманации радия. Русск. врач, 24, 1904. — Мамуль Я. В. Получение микроавтографов методом погружения. Журн. общей биологии, XIII, 4, 1952. — Belanger L. F. a. Leblond C. P. A method for locating radioactive elements in tissues with a photographis emulsion. Endocrinology, 39, 8, 1946. — Bogoroch R. Detection of radio-

elements in histological slides by coating with stripping emulsion the „stripecoating“ technics. Stain Technol. I. F. Microtechn., 26, 1, 1951. — Boyd G. A. a. Williams A. I. Strippig film technics for histological autoradiographs. Soc. Exp. Biol. a. Med., 69, 2, 1948. — Doniach M. D. a. Pele S. R. Autoradiographic technique. Brit. J. of Radiol., 23, 267, 1950. — Gross I., Bogoroch R., Nadler N. I. a. Leblond P. The theory and methods of the radiographic localization of radioelements in tissues. Röntgenology a. Radium Therapy American Journ., 65, 3, 1951. — Hamilton I. G., Soley M. H. a. Einhorn K. B. Univ. of Calif.-Publ. Pharmacology, 1, 339, 1940. — Harvey Mendelow and James B. Hamilton. A new technique for rapid freezing and dehydration of tissues for histology and histochemistry. Anat. Record., 107, 4, 443, 1950. — Lacasagne M. A. et Lattes J. S. Méthode auto-histo-radiographique pour la détection dans les organes du polonium injecté. C. R. Acad. Sci., 178, 488, 1924. — Stowell R. E. A Modified freezing — drying apparatus for tissues. Stain Technology, 26, 2, 1951. — Wang K. J. and Grossman, M. I. A simplified vacuum dehydration technique for the preparation of sections by freezing — drying. J. Lab. Clin. Med., 34, 292, 1949.

---



## СОВРЕМЕННЫЕ ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

*А. А. ТУСТАНОВСКИЙ и Г. В. ОРЛОВСКАЯ*  
(Москва)

Гистохимия развивается как результат своеобразного сочетания методов, применяемых в морфологии и химии. Задачей настоящей статьи является обзор существующих гистохимических методов и анализ некоторых принципиальных основ применения их в морфологии.

Принцип гистохимических окрасок заключается в том, что окрашивающий агент реагирует с определенными химическими группировками субстратов, входящих в состав тканевых и клеточных структур. Подбор красящих агентов, отличающихся химической специфичностью, возможен лишь при условии знания химических и физико-химических свойств тканевых субстратов.

Описание способов использования реагентов, вступающих в красочную химическую реакцию с определенными компонентами ткани и тем самым облегчающих установление природы последних, можно найти в книге А. Л. Шабадша, в сводках Глика, Ромейса, а также в ряде оригинальных новейших публикаций (Даниэли, 1949, 1952; Зилигман, Ашбель, 1949; Беннет, 1948; Бернет, 1953; Ритгер и Ольсон, 1950; Харди, 1952; Фишер, 1953; Хейдек, 1953; Хашим и Акра, 1953; Хашим, 1953; Херман, Николас, Боришьяс, 1950; Жанлоз, Форчиелли, 1951; Леблонд, 1950; Меншик, 1953; Пирсон, 1952; Патерс, 1953; Верне, Вей, Шарпаль, Чеккальди, 1952, и др.).

Гистохимический анализ позволяет выявлять в срезах аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, различные виды углеводов и липидов. Разработка красочных реакций с естественными метаболитами и синтетическими субстратами дает возможность установить непосредственно в срезе наличие ферментных систем (Боурн, 1953; Ван-Флит, 1943; Франсис, 1953; Зилигман, Мангеймер, Нахлас, 1949).

Гистохимия должна быть рассмотрена как система приемов, в которой химикоаналитические методы, заимствованные из препаративной биохимии, органически слиты с методами гистологических наблюдений и приспособлены к специфике гистологической техники.

Заключения, сделанные в результате окраски срезов, должны

вытекать из точного представления о соотношении реактив — субстрат. Игнорирование соотношения реактив — субстрат часто приводит к ошибочным заключениям и гипотезам. Приведем соответствующие примеры.

При исследовании процессов новообразования волокон коллагена в заживающих ранах Э. З. Юсфина пользовалась методом аргирофильной окраски. Произвольно допустив неаргирофильность фибрина, она сочла возможным описать одну из стадий коллагенообразования как процесс превращения неаргирофильного фибрина в аргирофильный преколлаген (Э. З. Юсфина, 1946). Поставленный нами (А. А. Тустановский и Г. В. Орловская, 1953) гистохимический контроль показал, однако, что фибрин резко аргирофилен. Отсюда следует, что схема фибриллогенеза, предложенная Э. З. Юсфиной, не отображает природного процесса. Источником ошибки явилось отсутствие внимания к химической природе фибрина, преколлагена и коллагена и к сущности взаимодействия этих тел с примененными реактивами.

Термин „основное вещество“ или „основное аргирофильное вещество“ в работах ряда авторов, создавших понятие об аргирофильности основного вещества, отражает формальный интерес к его составу и химическим свойствам его компонентов. Замечательно, что в этом понятии объединены как действительно аргирофильные компоненты — белки волокнистых мембран, так и вещества, не обладающие аргирофильностью — компоненты аморфного основного вещества соединительной ткани — кислые и нейтральные полисахариды, мукопротеины и муцины (А. И. Смирнова-Замкова, 1946; Б. И. Могильницкий, 1949).

Авторы описывают расплавление и уплотнение „основного аргирофильного вещества“. По существу же речь может идти только о расплавлении и уплотнении аргирофильных белковых волокон и никак нельзя говорить об изменении аргирофильности собственно основного вещества, не обладающего вовсе аргирофилией: ни цельные, ни деполимеризованные полисахариды не являются аргирофильными в силу особенностей своего химического строения.

Добавление к определению основного вещества и представление о его лабильности на основании изменения аргирофильности в условиях нарушения дыхания ткани под влиянием бактериальных токсинов, адреналина и его антагонистов, хлористого кальция (А. И. Смирнова-Замкова, 1946; Б. И. Могильницкий, 1949) и т. д. нельзя считать обоснованными. Причина ошибочных определений и гипотез, несомненно, кроется в игнорировании данных гистохимии и биохимии.

До настоящего времени считали, что красная окраска по Ван-Гизону специфична для коллагена. С точки зрения гисто-логического понятия о коллагеновом волокне это верно. Однако

наши последние гистохимические наблюдения вносят в это представление существенные коррективы. Полное извлечение из коллагенового волокна кожи крыс проколлагена (К. И. Страчичский, А. А. Тустановский, К. Ф. Фирфарова, 1951, 1952; А. А. Тустановский, 1947, 1949; А. А. Тустановский и В. О. Шпикитер, 1952)—белка, тесно связанного со стромой волокна, лишает последнее способности окрашиваться пикрофуксином в красный цвет. Способность специфического окрашивания этим реактивом принадлежит, как установлено нами, только проколлагену в любом его состоянии (геля — в волокне или кристалла — в чистом препарате белка). Пикрофуксин превращается, таким образом, в химический реактив на проколлаген, который может быть использован в гистохимии.

На основании приведенных примеров можно сделать следующий вывод: пока не будет изучено химическое или физико-химическое взаимодействие красящего реактива и тканевого субстрата, до тех пор многие мнения и гипотезы не выйдут за пределы малообоснованных суждений.

При современном гистохимическом анализе применяются не только методы окраски цельной ткани, но и методы выключения, извлечения или разрушения тех или иных компонентов среза с последующим красочным проявлением остающихся субстратов. Исследование извлеченных продуктов дополняет анализ среза и дает более полное представление о составе ткани.

Современные приемы гистохимического исследования находятся в состоянии постоянного развития. В связи с этим они могут быть классифицированы лишь очень приблизительно.

1. Окраска компонентов ткани, основанная на специфичности реакции между красящим реактивом и субстратом.
2. Блокировка компонентов ткани специфическим агентом.
3. Контрольное окрашивание чистых субстратов.
4. Дифференциальное извлечение ингредиентов ткани, дополняемое анализом извлеченного субстрата методами микроанализа и хроматографии.
5. Специфическое разрушение отдельных компонентов ткани.
6. Радиоавтография.
7. Окрашивание с применением физических агентов.
8. Дифференциальное центрифугирование.
9. Сорбиционная окраска.
10. Определение активных ферментных систем.

В кратком обзоре нет возможности привести описание сущности гистохимических экспериментов первой группы. Целесообразно остановиться, в качестве одного примера, на выяснении сущности весьма распространенной аргирофильной окраски волокнистых образований соединительной ткани.

Аргирофильная окраска объективно приобрела смысл и

значение гистохимического метода лишь после того, как были получены данные о прямой зависимости аргирофилии от наличия в составе тканевых белковых структур свободных сульфгидрильных групп (А. А. Тустановский и Г. В. Орловская, 1953).

Наши опыты с аргирофильной окраской чистых белков показали, что аргирофилия является свойством только тех из них, которые содержат цистин или цистеин.

Неаргирофильные белки	Содержание цистина (%)	Аргирофильные белки	Содержание цистина (%)
Коллаген дермы . . . . .	0	Альбумин дермы . . . . .	2,0
Проколлаген дермы . . . . .	0	Фибрин . . . . .	2,0
Глобулин дермы . . . . .	0	Миозин . . . . .	1,5
Коллаген сухожильный . . . . .	0	Кератин волоса . . . . .	13,0—15,0
Фиброин шелка . . . . .	0	Хрусталик глаза . . . . .	4,0
		Эластондин . . . . .	Следы
		Ретикулин селезенки . . . . .	1,0—2,0

Эта же закономерность выявляется в тканях в ряде специальных экспериментов (А. А. Тустановский и Г. В. Орловская, 1953), часть из которых будет приведена дальше.

Химическая основа аргирофильной реакции белков может быть сведена к образованию серебряных меркаптидов в результате взаимодействия солей серебра с цистеином и к последующему восстановлению меркаптидов формолом. В итоге возникает металлическое атомное серебро, которое и отлагается в месте реакции.

Обращаем внимание на найденные нами способы усиления аргирофилии белков путем гистохимического воздействия на сульфгидрильные (цистеин) и дисульфидные (цистин) их группы. Ослабление аргирофилии белков должно одновременно послужить примером метода блокирования, основным принципом которого является связывание химически активного компонента ткани с образованием бесцветных продуктов.

Известно, что не все сульфгидрильные группировки нативных белков являются реагентоспособными. Часть из них становится доступной реактивам лишь после денатурации белка. Так, например, наличие свободных сульфгидрилов в нативном яичном альбумине установить не удастся. Однако большое количество этих групп становится реагентоспособным в результате денатурации белка любым способом. Мы стремились к шадящей денатурации, не искажающей строения тканей, для чего использовали некоторые детергенты, гуанидин-хлорид и мочевины, которые возбуждают активность сульфгидрилов и действительно усиливают аргирофилию белковых образований ткани. В срезах легкого (в наших опытах) ретикулиновые

волокна стромы окрасились интенсивнее, чем обычно. Кроме того, выявились тончайшие волоконца, впаянные в базальную мембрану.

Увеличение числа активных сульфгидрилов усиливает, таким образом, аргирофилию. Следовало ожидать, что уменьшение числа сульфгидрилов повлечет за собой ослабление аргирофилии. Нами найдено, что специфическая блокировка сульфгидрилов тканевых белков практически ослабляет аргирофилию до нуля. В качестве блокирующего агента мы использовали моноодацетат, необратимо связывающий свободные реагентоспособные сульфгидрилы. Срезы легкого, обработанные моноодацетатом, действительно утрачивают аргирофилию.

Приведенные эксперименты дают пример химических операций на компонентах тканевых срезов и одновременно подтверждают правильность гипотезы, выдвинутой нами для объяснения аргирофильных свойств белков.

Необходимо, кроме того, иметь в виду следующее обстоятельство: аргирофильная окраска в зависимости от особенностей применяемых технических приемов, выработанных эмпирически, дифференциально выявляет различные по своему химизму образования. Это могут быть белковые образования, богатые сульфгидрильными группами, например ретикулиновые волокна, возможно, также и аксиальная часть нервного волокна, образования, богатые ненасыщенными липидами или альдегидолипидами (миэлиновая обкладка нервных волокон). Не исключена возможность аргирофильной реакции метаболитов, возникающих в местах синапсов.

Проблемы состава, строения и функции основного вещества ткани, волокнообразования в онто- и филогенезе, в норме и патологии, проблемы проницаемости капилляров и межклеточного вещества и др. требуют гистохимического анализа не только белков ткани, но и компонентов полисахаридной и липоидной природы.

Мы остановимся на некоторых сторонах гистохимии тканевых структур и образований полисахаридной природы.

Существующие к настоящему времени приемы прямого выявления в ткани субстратов полисахаридной природы ограничиваются реакциями метакромазии и специфического окисления периодатом. Периодат окисляет не любые полисахариды или моносахариды, а только те из них, которые имеют в своей структуре два рядом расположенных и притом свободных гидроксила (Адамс и др., 1950). Эти гидроксилы окисляются до альдегидных групп. Выявить новообразованные альдегиды возможно либо путем конденсации их с фуксин-сульфитом, по Шабадашу, с фенол-гидразином, по Беннету (Гомори, 1942), либо путем последующей обработки тканей, по Бильшовскому-Футу, как это предложено нами (А. А. Тустановский и Г. В. Орловская, 1953).

Известно, что коллаген и проколлаген содержат в своем составе углеводы. Однако, как известно, эти белки не аргирофильны при окраске по Бильшовскому-Футу. Обработка периодатом приводит к образованию альдегидных групп в углеводных цепях и создает тем самым условия аргирофильности коллагеновых волокон, проколлагена и резко усиливает аргирофильность ретикулиновых волокон.

Если учесть, что периодат окисляет цистин и последний, следовательно, становится недействительным в качестве фактора аргирофильности белков, то при такой постановке опыта аргирофильность, очевидно, зависит только от появления свободных альдегидогрупп тех углеводов, которые способны к окислению периодатом. Для проверки был проведен опыт блокировки новообразованных альдегидогрупп с помощью бисульфита. В этом случае аргирофильность исчезла почти совсем (А. А. Тустановский и Г. В. Орловская, 1953).

Приведенные факты позволили заключить, что разница в аргирофильности нативных коллагеновых и ретикулиновых волокон не зависит от различного содержания в них углеводов, но обусловлена неодинаковым содержанием цистина в их белках.

Очень важно иметь в виду, что не все полисахариды реагируют с периодатом и, следовательно, не все из них после обработки периодатом дают фуксин-сернистую или аргирофильную реакцию. Положительно реагируют полисахариды типа гликогена и хондроитин—серная кислота, отрицательно — полисахариды типа гиалуроновой кислоты.

На примере гиалуроновой кислоты мы можем демонстрировать один из перечисленных выше методов гистохимии, именно — контроль с применением чистого препарата. Так, Девис показал на чистых препаратах гиалуроновой кислоты, что в противоположность существующему до сих пор убеждению она не реагирует с периодатом и положительная реакция с сернистым фуксином зависит только от примесей иных полисахаридов, реагирующих с периодатом (Девис, 1952).

О реакции метахромазии известно лишь, что толуидиновая голубая является специфическим реактивом на группу полисахаридов, содержащих в своем составе сильно диссоциирующий кислый компонент (Вислоцкий, Бантинг, Демпси, 1947). Типичным представителем является хондроитин — серная кислота. Однако метахроматичными могут быть соединения, которые содержат фосфорную кислоту (Херман, Николас, Боришьяс, 1950). Последнее обстоятельство не дает возможности точно определить субстрат реакции только на основании метахромазии и требует поэтому дополнительного анализа другими средствами.

В качестве примера подобного анализа приведем исследование природы полисахаридов основного вещества вартонова студня. Окраска периодат-сернистым фуксином дает отрица-

тельный результат. Параллельная окраска толудиновой синью открывает наличие метакромазирующего вещества. Заключение анализа следующее: полисахарид основного вещества, вероятно, является гиалуроновой кислотой, ибо, во-первых, последняя периодат-отрицательна, и во-вторых, метакроматична в высокой концентрации. Окончательное же подтверждение высказанного положения можно получить, если в третьей параллельной пробе обнаружится, что метакроматическая субстанция разрушается гиалуронидазой. Необходимо пользоваться только чистыми препаратами гиалуронидазы, так как не исключено, что обычные препараты этого фермента содержат хондромуциназу, почему с помощью такого препарата нельзя определить тип полисахаридов (Лилли, Эммарт, Ласки, 1951; Мэтьюз, Роузман, Дорфман, 1951).

Периодатная проба не должна применяться без учета особенностей состава конкретных видов клеток и тканей, ввиду того, что она одинаково положительна как в отношении хондромукоидов, так и гликогена, плазмалы, ненасыщенных жирных кислот, ряда церебросидов, сфингомиелинов, кефалинов, керазинов и т. д. (Кейн, 1949; Вольман, 1950). Последние из перечисленных компонентов особенно богато представлены в нервной ткани.

Затруднения в дифференцировке субстратов, однако, могут быть в значительной мере преодолены применением метода дифференциального извлечения или разрушения конкурирующих ингредиентов. Так, плазмаль удаляется спиртом, липиды — органическими растворителями и метанол-хлороформом, гликоген разрушается амилазой (Леблонд, 1950; Хейдек, 1953; Гирш и Кетчполь, 1949).

Метод дифференциального извлечения для полисахаридов разработан все же недостаточно. Существенным дополнением его является метод микроанализа и, в частности, хроматографического анализа продуктов извлечения, который дает возможность определять природу белков, липоидов, полисахаридов и метаболитов (количество последних в анализируемом экстракте измеряется тысячными долями миллиграмма). Хроматографическая техника значительно увеличивает возможности гистохимии и должна применяться в любой гистохимической лаборатории.

Дальнейший прогресс в гистохимии связан с введением в практику высокоспецифичных ферментов. К настоящему моменту наиболее разработана техника применения рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, разрушающей гиалуроновую кислоту, диастазы, вызывающей распад гликогена, каппа-токсина, разрушающего проколлаген, а также в меньшей степени пектиназы, разлагающей полисахариды, эластазы, разрушающей эластин, и хондромуциназы, вызывающей распад хондромукоидов.

Пользование чистыми препаратами перечисленных ферментов открывает перспективы точного анализа срезов тканей на присутствие ряда субстратов: гликогена, гиалуроновой кислоты, проколлагена, нуклеиновых кислот ядер и плазмы клеток и т. д. (Тустановский, Страчицкий, Фирфарова, 1951; Кауфман, Гей, Мак-Дональд, 1952; Фаунс и Ленделс, 1952; Кулонен, 1950; Лилли, Греко, Ласки, 1949; Мак-Манус, 1950).

Особенно перспективным для дальнейшего развития биохимического и гистохимического методов анализа является использование радиоизотопов (см. сборник. Терапевтическое применение радиоактивных изотопов, 1952). Метод радиоизотопов привлекает не только возможностью регистрации метаболизирующих структур клеток и ткани на фотопленке, но и тем, что наличие радиометки в срезе отражает состояние обмена в цельном организме, функциональное состояние органа или ткани: радиоизотоп вводится в жизнедеятельный организм (Эсбоу-Хенсен, 1953; Верн, Вей, Чеккелди, Шарпаль, 1952).

Значительную пользу в гистохимическом анализе может принести применение физических приемов окраски тканевых структур. О перспективах в этом разделе гистохимии можно судить при ознакомлении с методом Д. И. Иванова — импрегнация нервных окончаний коллоидным серебром с помощью ультразвука.

Применение дифференциального центрифугирования в качестве способа разделения внутриклеточных структур приобрело особое значение в цитохимических исследованиях. Оно дает возможность ознакомления с составом и биохимическими функциями отдельных органоидов и структур клетки, а также, возможно, с патологическим новообразованием тканей.

В заключение остановимся на перспективах абсорбционного метода в гистохимии. Принцип его сводится к сорбции реагентов на структурах тканевого среза и к последующему проявлению сорбированного агента. В настоящее время этот метод еще не может служить для определения химической природы того или иного ингредиента ткани. Задача его ограничена пока улучшением тинкториальных качеств окраски, ее контрастности. Нами, в частности, предложена обработка ткани рядом восстановителей. Сорбированные реагенты мы выявляли аргирофильной пробой; выяснилось, что аскорбиновая кислота, например, прочно удерживается волокнистыми образованиями ткани и оболочками клеточных элементов. Опыт применения хорошо сорбируемых неорганических солей, например хлористого кальция, также оказался удачным. В результате обработки срезов ткани легкого этими реактивами отчетливо выявились все волокнистые структуры альвеолярной стенки и границы альвеолярного эпителия.



## ЛИТЕРАТУРА

Адамс и др. Органические реакции, 2, 362, 1950. — Кауфман Б., Гей Е., Мак-Дональд М. Определение локализации клеточных белков методом ферментативного анализа. В сб. Аминокислоты и белки, 376, М., 1952. — Орловская Г. В., Тустановский А. А. О химических основах метода аргирофильной окраски. Арх. патол., 6, 1954. — Смирнова-Замкова А. И. О значении основного аргирофильного вещества в норме и патологии. Арх. патол., 8 (5—6), 3, 1946. — Страчицкий К. И., Тустановский А. А., Фирфарова К. Ф. Определение коллагенозной активности методом проколлагеновых пленок. Вопросы медицинской химии, 4, 237, 1952. — Терапевтическое применение радиоактивных изотопов (сборник статей). М., 1952. — Тустановский А. А. О белках кожи. Биохимия, 12, 285, 1947. — Тустановский А. А. О препаратах нативного проколлагена. Вопросы медицинской химии, 1, 160, 1949. — Тустановский А. А., Орловская Г. В. О специфичности аргирофильности белковых образований соединительной ткани. Арх. патол., 3, 32, 1953. — Тустановский А. А., Страчицкий К. И., Фирфарова К. Ф. О коллагенозном действии К-токсина *Cl. Welchii* (тип А). Вопросы медицинской химии, 3, 176, 1951. — Тустановский А. А., Страчицкий К. И., Фирфарова К. Ф. Трипсиноустойчивость нативного и денатурированного проколлагена и коллагена. Вопросы медицинской химии, 4, 48, 1952. — Тустановский А. А., Шпикитер В. О. О начальных структурных изменениях проколлагена в процессах денатурации. Вопросы медицинской химии, 4, 70, 1952. — Юсфина Э. З. Роль фибрина в образовании волокон соединительной ткани при заживлении ран. Врач. дело, 7—8, 399, 1946. — Asboe-Hansen G. Autoradiography of mast cells in experimental skin tumors injected with radioactive sulfur ( $S^{35}$ ). *Canc. res.*, 13, 587, 1953. — Barnett R. Histochemical distribution of protein-bound sulfhydryl groups. *J. natl. canc. inst.*, 13, 905, 1953. — Bennett H. Cytochemical evidence for sulfhydryl in nerve axoplasm, retinal rods and capillary endothelium. *Anat. rec.*, 100, 640, 1948. — Bourne J. Histochemistry of xanthine oxidase. *Nature*, 172, 193, 1953. — Cain A. On the significance of plasmal reaction. *Quart. j. microsc. sci.*, 90, 9, 75, 1949. — Danielli I. Исследования по цитохимии белков. В сб. Аминокислоты и белки, 363, М., 1952. — Danielli J. Critical study of techniques for the cytochemical demonstration of aldehydes. *Quart. j. microsc. sci.*, 90, 9, 67, 1949. — Davies D. Specificity of staining methods for mucopolysaccharides of the hyaluronic acid type. *Stain techn.*, 27, 65, 1952. — Erikson R. Perchloric acid in the cytochemistry of pentose nucleic acid. *Science*, 110, 472, 1949. — Fawns H., Landells J. Application of collagenase and Hyaluronidase to the study of cartilage in histological sections. *J. physiol.*, 11, 1, 5, 1952. — Fisher E. Destruction of cytoplasmic basophilia with mineral acids. *Stain techn.*, 28, 1, 9, 1953. — Van Fleet D. Unsaturated fat oxidase: histochemical identification. *J. am. chem. soc.*, 65, 740, 1943. — Francis S. Histochemical demonstration of amine oxidase in liver. *Nature*, 171, 701, 1953. — Gersh J., Catchpole H. — Organisation of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *Am. j. anat.*, 85, 457, 1949. — Gomori G. Histochemical reactions for lipid aldehydes and ketons. *Proc. soc. exp. biol. med.*, 51, 133, 1942. — Hadek R. Mucin secretion in the ewes oviduct. *Nature*, 171, 750, 1953. — Hardy M. Histochemistry of hair follicles in the mouse. *Am. j. anat.*, 90, 285, 1952. — Hashim S., Asra A. Lead-tetracetate Schiff procedur. *Stain techn.*, 28, 1, 27, 1953. — Feulgen hydrolysis with phosphoric acid. *Stain techn.*, 28, 1, 27, 1953. — Herrmann H., Nicholas J., Borcious J. Toluidine blue binding by developing muscle tissue assay and data on the mechanisms involved. *J. biol. chem.*, 184, 321, 1950. — Jeanloz R., Forchielli E. Periodate oxidation of glucosamine and derivatives. *J. biol. chem.*, 188, 361, 1951. — Kulonen E. Histochemical method for determination of hyaluronic acid. *Acta path. microsc. scand.*, 27, 461, 1950. — Leblond C. Distribution of the periodic acid reactive carbohydrates in the adult rat. *Am. j. anat.*, 86, 1, 1950. — Lillie R., Em-

mart E., Laskey A. Chondromucine from bovine testis and the chondromucine of umbilical cord. *Arch. path.*, 52, 363, 1951. — Lillie R., Greco J., Laskey A. Histochemical studies with malt diastase. *Anat. rec.*, 103, 635, 1949. — Mc Manus J. Carbohydrate specificity of the periodic acid Schiff-reagent. *Am. j. path.*, 26, 690, 1950. — Mathews M., Roseman S., Dorfman A. Determination of the chondroitinase activity of bovine testicular preparations. *J. biol. chem.*, 188, 327, 1951. — Menschik Z. Nil blue histochemical method for phospholipids. *Stain techn.*, 28, 1, 1953. — Persson B. Distribution of dextran in the tissues of rabbits. *Nature*, 170, 716, 1952. — Peters A. Silver impregnation of nerve fibres. *Nature*, 171, 613, 1953. — Ritter H., Oleson Ph. Combined histochemical staining of acid polysaccharides and 1,2-glycol in sections of rat tissues. *Am. j. path.*, 26, 639, 1950. — Seligman, Ashbel R. A new reagent for the histochemical demonstration of active carbonyl groups. *Canc. res.*, 9, 624, 1949. — Seligman A., Manheimer L., Nachlas M. New method for the histochemical demonstration of intracellular enzymes. *Canc. res.*, 9, 601, 1949. — Verne J., Weill R., Charpal O., Ceccalbi P. Détection histochimique des polysaccharides dans la genèse de dent. *Compt. rend. séances sol. biol.*, 146, 1555, 1952, a. — Verne J., Weill R., Charpal O., Ceccalbi P. Sur le métabolisme du soufre radio-marqué dans les dents de jeunes rats. *Compt. rend. séances soc. biol.*, 146, 1558, 1952, b. — Wislocki G., Bunting H., Dempsey E. Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides. *Am. j. anat.*, 81, 1, 1947. — Wolman M. Staining of lipids by the periodic acid Schiff reaction. *Proc. soc. exp. biol. med.*, 75, 583, 1950.

---

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЦИТОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И НЕКОТОРЫЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

*П. В. МАКАРОВ*

(Ленинград)

Как известно, обмен веществ, непрерывный процесс самообновления, лежит в основе всего живого, идет ли речь о доклеточных и клеточных формах либо о сложном, высокодифференцированном организме. Тип обмена веществ определяет наследственность живого тела, его интенсивность обуславливает жизнеспособность. Под влиянием условий жизни происходит изменение обмена веществ, что может повлечь за собой изменение наследственного основания. Обмен веществ лежит в основе интимных механизмов нервной деятельности, заслуженно привлекающих к себе сейчас столь большое внимание.

О самообновлении, процессах ассимиляции-диссимиляции можно судить по химическим превращениям, которые претерпевает вещество, по тому, как видоизменяются те или иные соединения, как эти вещества включаются в состав живого тела, т. е. ассимилируются им. Один из наиболее доступных путей для решения этой задачи и открывают методы гистохимии.

В свое время о химическом составе организмов, тканей, живого вещества и их изменениях судили на основании валового анализа, т. е. используя обычные приемы аналитической химии. Однако эта методика нарушает павловский принцип структурности, отрывает обменные процессы от того субстрата, на котором они разыгрываются и без которого, понятно, они не могут осуществляться.

За последние десятилетия в практику цитологических и гистологических исследований введен обширный арсенал разнообразных методов химического анализа, направленных на удовлетворение запросов микроскопистов-морфологов и физиологов.

В настоящее время имеет место увлечение методикой дробного центрифугирования, основанного на изготовлении гомогенатов из изучаемых объектов. При помощи особой аппаратуры органы и ткани подвергаются измельчению до

полного разрушения клетки. Получающаяся кашница, или, как ее называют, гомогенат, подвергается центрифугированию в мощной ультрацентрифуге. В центрифугате структурные элементы протоплазмы располагаются слоями в соответствии с их удельным весом. Благодаря этому становится возможным выделять ядерное вещество, хондросомы, микросомы и т. д., а затем методами аналитической химии изучать их состав, наличие ферментных систем.

Было установлено, что особенно богаты ферментами хондриосомы, которые содержат ферментативные системы трикарбонного цикла, в то время как микросомы бедны ферментами, но богаты рибонуклеиновой кислотой.

Несомненно, что методика дробного центрифугирования дала некоторые ценные результаты. Вместе с тем нельзя забывать, что при ее использовании возможно перераспределение как химических соединений, так и ферментов вследствие нарушения целостности тканей и клеток, а также адсорбция их на вновь образовавшихся в результате обработки структурах. Это заставляет отнестись к данным дробного центрифугирования, не подкрепленным другими методами, с известной осторожностью.

Более перспективны и точны методы, которые условно можно назвать методами топографической цито- и гистохимии, т. е. приемы, дающие возможность судить о локализации тех или иных соединений и ферментных систем в тканях и клетках, а также выявлять изменения, происходящие в разных условиях жизни или при различных физиологических состояниях.

Наиболее надежны и, несомненно, наиболее потенциальные методы ультрафиолетовой и флуоресцентной микроскопии, которые открывают перспективу изучения обменных процессов в клеточных и неклеточных формах живого вещества в живом организме.

Об эффективности этих методов можно судить по работам М. Н. Мейселя, Л. Ф. Ларионова, Е. М. Брумберга и их сотрудников. Но данные вопросы составляют предмет специальных сообщений в настоящем сборнике, поэтому я в своей статье не буду на них останавливаться.

Однако и помимо методов оптико-химического исследования, в распоряжении морфологов имеются разнообразные приемы, позволяющие значительно расширить и углубить наши знания в области химизма биологических объектов и направления, этапности обменных процессов, происходящих в них.

Для обнаружения и суждения о локализации неорганических соединений и зольного остатка (Ca, Mg, Si, SO<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub> и др.) используется микросжигание срезов в муфельной печи при 600—800° с последующим изучением таких срезов в темном поле, а также применением обычных приемов микрохимии.

При проведении такого рода исследований материал фиксируется спиртом. Парафиновые срезы наклеиваются на тугоплавкие предметные стекла. Температура в муфельной печи должна повышаться постепенно.

Наряду с этим используют характерные цветные реакции, в частности образования турнбуллиевой сини для обнаружения железа. В этом случае лучше пользоваться срезами, изготовленными на замораживающем микротоме. Срезы помещают сначала в многосернистый аммоний, после чего переносят в смесь растворов красной кровяной соли и соляной кислоты. Надо избегать употребления металлических инструментов. Во многих случаях наилучшие результаты дает фиксация формалином.

Мы можем определять наличие и распределение в тканевых структурах витаминов А (ультрафиолетовый анализ) и С (восстановление металлического серебра). Разнообразные приемы предложены для обнаружения жиров и липоидов. Значительно усовершенствована А. Л. Шабдашем методика выявления гликогена. Им предложена фиксация, устраняющая посмертный гликогенолиз, что дает возможность сохранять гликоген. Изготовленные срезы обрабатывают периодатом и погружают их в фуксинсернистую кислоту (реактив Шиффа).

Для суждения о топографии органических соединений широко используется действие специфических растворителей и разнообразных гидролитических ферментов. По исчезновению той или иной структуры (например капля жира после обработки эфиром или хлороформом), а также по характеру реакции или окраски (например пиронином после воздействия рибонуклеазой) заключают о локализации соответствующих веществ.

Большое внимание сейчас привлекают нуклеиновые кислоты, их локализация и динамика изменений. Для выявления дезоксирибонуклеиновой кислоты используется реакция Фельгена (обработка срезов реактивом Шиффа после кислотного гидролиза). При изготовлении реактива Шиффа особое внимание надо обращать на качество основного фуксина. Лучше пользоваться крупными кристаллами, чем порошком. Обесцвечивание фуксина можно производить как добавлением бисульфита натрия или калия, так и пропусканием сернистого газа, получаемого любым путем, через раствор до его обесцвечивания. В этом случае добавление соляной кислоты излишне. При изготовлении промывных вод вместо бисульфата натрия можно пользоваться обычным сульфитом, применяемым в фотографии.

Рибонуклеиновые кислоты могут быть обнаружены на основании характерной для них базофилии (окраска метиловым зеленым с пиронином, эозиназуром и т. д.).

Наилучшие результаты при окраске метиловым зеленым — пиронином получаются после фиксации материала смесью

Карнуа. После действия фиксаторов, содержащих формалин, трудно добиться чистозеленой окраски дезоксирибонуклеотидов.

Надо отметить, что результаты, полученные этими методами, особенно в отношении рибонуклеотидов, должны контролироваться ультрафиолетовым спектральным анализом и действием соответствующих ферментов: рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы. Много сделали в области изучения нуклеиновых кислот, а также их обмена Б. В. Кедровский и А. Н. Белозерский.

В последние годы начато изучение важнейшего компонента живого вещества, носителя жизни — белка. Наряду со старыми приемами выявления белков и входящих в их состав аминокислот (биуретовой и милоновой реакции, ксантопротеиновой пробой), предложены новые методы для обнаружения таких аминокислот, как аргинин и гистидин.

В связи с изучением белкового состава живого вещества, а также его изменений при различных условиях и в ходе развития существенный интерес приобретает определение изоэлектрической точки, которая характеризует белки различного типа и может служить тонким индикатором их изменения при тех или иных условиях. Наибольшее распространение в настоящее время приобрел метод определения изоэлектрической точки по кривым окраски кислыми и основными красителями при меняющихся значениях концентрации водородных ионов (рН). Материал надо фиксировать спиртом, обработку производить в кварцевых стаканчиках или посуде, изготовленной из невыщелачивающегося стекла.

Вполне понятно то внимание, которое привлекают к себе исследования локализации ферментов. Кроме известных методов обнаружения оксидаз и редуказ (образование индофенолового синего, нитропруссидная реакция и др.), в настоящее время предложены приемы выявления фосфатаз и холинэстеразы (В. В. Португалов).

Об эффективности методов цитохимического исследования можно судить по работам Г. И. Роскина, Л. Б. Левинсона и др., которые выяснили динамику нуклеиновых кислот, аргинина, минеральных солей в ходе митоза и амитоза и изучили явление нейросекреции.

Для иллюстрации приложения цитохимических приемов можно рассмотреть результаты изучения хода процесса оплодотворения у лошадиной аскариды (П. В. Макаров).

Известно, что аскарида послужила объектом для исследования морфологии оплодотворения. На основании работ Т. Бовери и др. была сформулирована морганистская трактовка этого процесса как сочетания в зиготе отцовских и материнских хромосом. Такое понимание сущности оплодотворения было подвергнуто обоснованной критике Т. Д. Лысенко.

Исходя из опытов по вегетативной гибридизации, Т. Д. Лысенко высказал свою теорию, согласно которой в основе

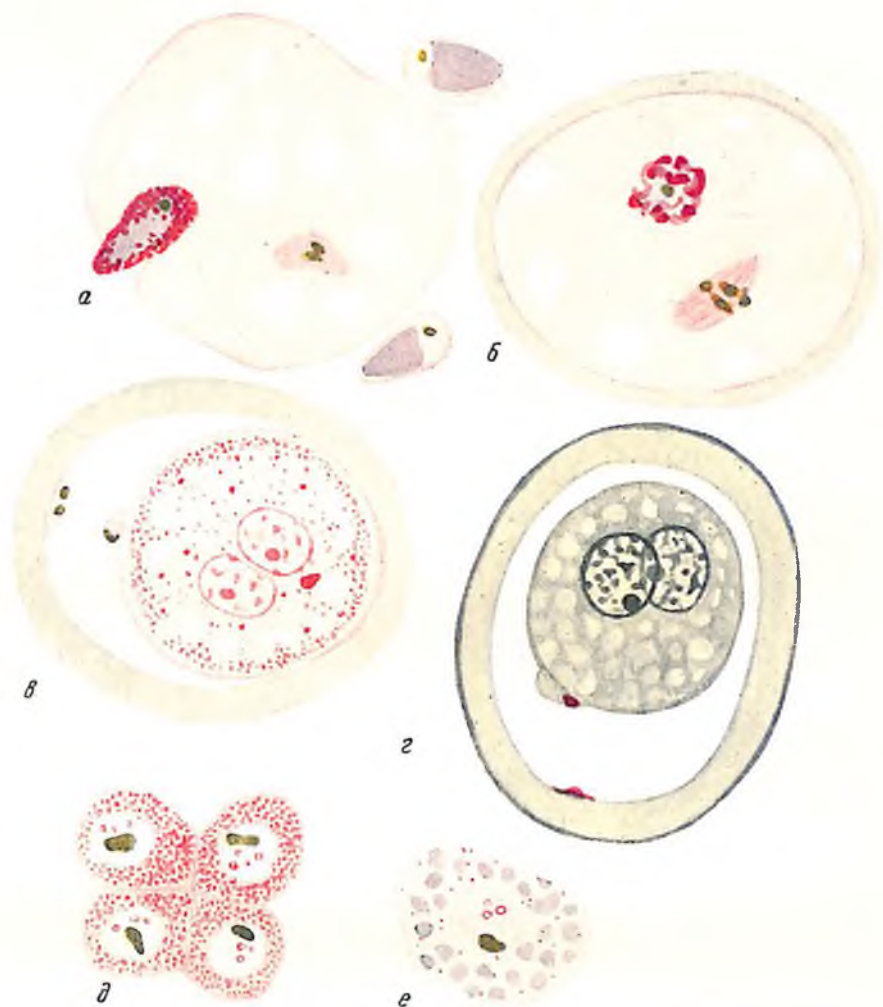


Рис. 1. Последовательные изменения яйца и живчика лошадиной аскариды в ходе оплодотворения.

*a* — начало ассимиляции живчика яйцом; ассимилируемый живчик переполнен рибонуклеотидами; рядом с яйцом два неассимилируемых живчика; *b* — живчик занял центральное положение в яйце; хроматиновая глыба окружена рибонуклеотидами; *c* — зигота; образование ахроматиновых пронуклеусов. Фиксация по Карнуа, метиловый зеленый — окрашивание. Рибонуклеотиды — красные, хроматин — зеленый; *d* и *e* — изменения содержания рибонуклеотидов в сперматоцитах порядка лошадиной аскариды; молодые сперматоциты, богатые рибонуклеотидами (*d*), исчезновение рибонуклеотидов по мере роста сперматоцита и образование белковых включений (*e*). Фиксация по Карнуа, метиловый зеленый — пиридин.

процесса оплодотворения лежит взаимная ассимиляция двух гамет, своеобразный обмен веществ. Каких-либо морфологических подтверждений этой теории не имелось, наоборот, все цитологические данные, казалось бы, свидетельствовали в пользу хромосомного понимания сущности оплодотворения.

Использование цитохимических приемов исследования позволило пролить свет на эту проблему. Оказалось, что в ходе оплодотворения и живчик, и яйцо претерпевают глубокие изменения, свидетельствующие об их взаимной ассимиляции (рис. 1).

Живчик аскариды, как известно, имеет конусовидную форму. В переднем расширенном конце располагается хроматиновая глыбка, дающая реакцию на дезоксирибонуклеиновую кислоту, и эозинофильная зернистость. Основной объем тела живчика занимает блестящее тело. Рибонуклеиновых кислот в заметных количествах здесь нет.

В ассимилируемых яйцом живчиках происходят резкие изменения. В них образуются большие массы рибонуклеотидов, вследствие чего они приобретают базофилию и интенсивно окрашиваются пиронином (рис. 1, *a*). Надо подчеркнуть, что в неассимилируемых живчиках, даже соприкасающихся с поверхностью яйца, подобных изменений не наблюдается. Затем материал спермия перемещается в центр яйца (рис. 1, *b*) и становится ареной оживленных обменных процессов, в частности образования белковых включений, будущей пищи развивающегося зародыша. В ходе этих процессов рибонуклеотиды живчика постепенно расходуются, и к моменту образования пронуклеусов от них остается обычно лишь небольшая глыбка (рис. 1, *в*). Следовательно, под влиянием яйца в результате ассимиляции происходят глубокие изменения спермия. В конце концов он как таковой перестает существовать.

Не менее резкие изменения под воздействием живчика претерпевает яйцо (рис. 2). До проникновения спермия в нем обнаруживаются многочисленные слизистые включения округлой формы, содержащие вакуоли, а также липидные чешуйки и глыбки (рис. 2, *a*).

Рибонуклеотидов в яйце нет, если не считать небольшого количества их в веретене первого деления созревания (рис. 1, *a*).

После осеменения яйца слизистые и липидные включения отходят к периферии и здесь расходуются на образование оболочки (рис. 2, *b*). К этому времени в центре яйца вокруг спермия и при его участии синтезируются новые липидные включения, которые к моменту образования пронуклеусов набухают, диспергируются и распространяются в диффузном состоянии по всему объему яйца (рис. 2, *в*). Зигота начинает давать отчетливую реакцию на рибонуклеиновую кислоту. В ходе оплодотворения, которое представляет собой длительный



процесс, а не одномоментный акт, действительно образуется третья, новая клетка — зигота (ср. рис. 1, *a* и *b*).

Вполне определенные изменения дезоксирибонуклеиновой кислоты наблюдаются при образовании пронуклеусов, формирование которых связано с расходом дезоксирибонуклеотидов (рис. 1, *z*). Сформированные пронуклеусы, как правило, не содержат дезоксирибонуклеиновой кислоты, они ахромати-

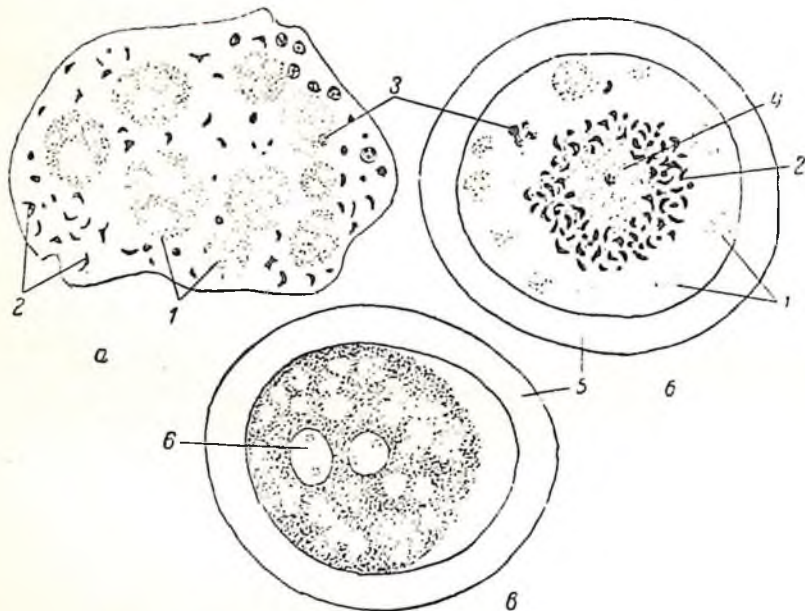


Рис. 2. Изменения яйца лошадиной аскариды в ходе оплодотворения.

*a* — яйцо до оплодотворения; *б* — центральное расположение живчика; *в* — зигота.  
1 — „слизистые“ включения; 2 — липиды; 3 — хроматиновый материал яйца; 4 — хроматиновый материал живчика; 5 — оболочка; 6 — пронуклеус. Фиксация 0,5% OsO<sub>4</sub>, окраска эозин-азуром.

новые. После обработки железным гематоксилином структуры пронуклеусов окрашиваются очень интенсивно. Без использования фельгеновской реакции можно прийти к ложному выводу о том, что пронуклеусы богаты хроматином.

В ходе последующего дробления наблюдаются весьма характерные циклические изменения содержания дезоксирибонуклеотидов. Во время профазы количество последних сильно увеличивается, вероятно, за счет синтеза их живым веществом, в телофазе вновь происходит снижение количества дезоксирибонуклеиновой кислоты, которая расходуется при образовании ядерных белков.

Такие изменения наблюдаются не только у аскариды, но и при дроблении яиц циклопа (И. И. Кикнадзе), морского ежа

(Л. И. Павлова), кролика (Е. Б. Зыбина), а также на клевере (Т. Ф. Полякова), горохе (О. А. Василева). Следовательно, нуклеиновые кислоты могут созидаться, синтезироваться живым веществом, они не обладают свойством непрерывного существования.

Очень характерен цикл изменений рибонуклеиновой кислоты в ходе сперматогенеза аскариды (рис. 1, *д* и *е*). Молодые сперматоциты богаты этим соединением — их цитоплазма интенсивно окрашивается пиронином. В период роста, который у сперматоцитов аскариды выражен вполне отчетливо, наблюдается постепенное расходование рибонуклеотидов, которые полностью исчезают во время образования включений, видимому, белковой природы.

Это наблюдение противоречит широко распространенному мнению о том, что при образовании белков содержание рибонуклеиновой кислоты повышено. Вместе с тем расходование данного соединения в период роста и усиленного синтеза белка согласуется с тем, что нуклеиновые кислоты, в частности их фосфорные связи, служат энергетическим источником, своего рода топливом при белковом синтезе. Это утверждение нашло обоснование в опытах с мечеными атомами фосфора ( $P^{32}$ ).

В связи с рассматриваемым вопросом уместно сделать ряд замечаний по поводу широко распространенной схемы белкового синтеза, выдвинутой Т. Касперсоном.

Как известно, Т. Касперсон отводит большое место в белковом синтезе ядрышку. При росте живой массы, при белковой секреции и т. п. прежде всего увеличиваются размеры ядрышек. Затем вокруг них появляется ядрышковый хроматин, который перемещается к периферии ядра, локализуясь на ядерной оболочке. В цитоплазме вблизи ядерной поверхности скопляются рибонуклеотиды, при участии которых и происходит созидание белка.

Нельзя не отметить, что эта схема выведена не на основании прослеживания процесса в его последовательности, динамике, а является результатом произвольного сцепления отдельных изолированных явлений, не объединенных между собой причинно-следственной связью. Она может получить совершенно иное толкование. В самом деле, увеличение объема ядрышка отнюдь не значит, что синтез белка начинается с этой клеточной структуры. Весьма вероятно, что большие размеры ядрышек в растущих клетках обусловлены общим увеличением живой массы. Ядрышковый хроматин, так же как и хроматин, локализованный на периферии ядра, представляет собой результат осаждающего действия фиксаторов. В клетках при жизни нуклеопротеиды распределены по пространству ядра равномерно. Под влиянием раздражителей, в том числе и коагулирующих фиксаторов, происходит осаждение нуклеопротеидов, выпадающие их в виде ядерных структур, в том числе на

поверхности ядрышка и на разделе между ядром и цитоплазмой (П. В. Макаров). Следовательно, Т. Касперсон в свою схему белкового синтеза вовлек искусственные образования, артефакты, что и лишает ее фактической основы. Я здесь не касаюсь ложных теоретических позиций Т. Касперсона, который полностью разделяет генную концепцию.

Как уже говорилось, нуклеиновые кислоты могут образовываться вновь в процессе жизнедеятельности, в свою очередь за их счет может идти синтез белка. Не надо приписывать этим соединениям исключительной, монополярной роли в структурообразовательных процессах живых систем. То же значение могут иметь и другие линейноорганизованные, высокомолекулярные соединения, например, по данным В. И. Воробьева, гиалуроновая кислота.

Рассмотренный пример анализа морфологии оплодотворения показывает эффективность приложения методов цитохимии для освещения проблем мичуринской биологии.

Перед гистохимией открываются широкие перспективы внедрения ее методов в различные области морфологии. Необходимо вместе с тем совершенствовать уже существующие методики и находить новые. Основное внимание должно быть уделено изысканию способов обнаружения промежуточных этапов метаболизма. В настоящее время нам в лучшем случае доступны конечные продукты обмена, а это отнюдь не может удовлетворить запросы науки на современном этапе ее развития. Это относится в первую очередь к синтезу белков. Разработка новых методов цитохимического анализа, успех в этой области может быть обеспечен лишь в результате тесного содружества морфологов с химиками, биохимиками и физиологами.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Белозерский А. Н. Бактериальные нуклеопротеиды и полинуклеотиды. Вести. МГУ, 2, 1949. — Белозерский А. Н. Полинуклеиновые кислоты и их связь с эволюцией ядерного аппарата растительной клетки. Усп. совр. биол., 18, 1944. — Вайль С. С. Руководство по патологогистологической технике. Медгиз, 1947. — Глик Д. Методика гисто- и цитохимии. М., 1950. — Кедровский Б. В. Нуклеиновые кислоты клеточной протоплазмы. Усп. совр. биол., 15, 1942. — Кедровский Б. В. О новой структуре в составе протоплазмы. Усп. совр. биол., 26, 1948. — Кедровский Б. В. Рибонуклеиновая кислота и ее роль в развитии и функции клетки. Усп. совр. биол., 31, 1951. — Макаров П. В. Физико-химические свойства клетки и методы их изучения. Изд. ЛГУ, 1948. — Макаров П. В. Основы цитологии. Сов. наука, 1953. — Макаров П. В. Цитологический и цитохимический анализ гаметогенеза и оплодотворение в свете мичуринского учения. Сб. Вопросы биологии оплодотворения, ЛГУ, 1954. — Мейсель М. Н. Функциональная морфология дрожжевых организмов. Изд. АН СССР, 1950. — Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953. — Роскин Г. И. Витамин С в жизни клеток в норме и патологии. Усп. совр. биол., 18, 1944. — Роскин Г. И. Изoeлектрические пункты клеток и капилляров. Доклады АН СССР, 42, 1944. — Роскин Г. И. Микроскопическая техника. Сов.

наука, 1951. — Сб. Некоторые проблемы современной эмбриофизиологии, М., 1951. — Хесин Р. В. Выделение цитоплазматических гранул, их строение и роль во внутриклеточном обмене. Усп. совр. биол. 31, 1951. — Baker J. Cytological technique. London, 1945. Brachet J. The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. Quart Y. micr. sc., 94, 1953. — Caspersson T. Cell growth and cell function. New-jork, 1950. — Durand M. Evolution de la chromatine dans la spermatogenèse de gryllus bimaculatus. Études critique des quelques réactions histochimiques de acides nucléiques. Bull. biol. france et belg., 86, 1952. — Enzyklopedie der mikroskopischen Technik. Bd. 1—3, Berlin, 1925 28. — Mauritzen C. M. Roy A. B. a. Stedman E. The ribosenucleic acid content of isolated cell nuclei. Proc. roy. soc., ser. B, 140, 1952. — Mirsky A. E. a. Ris H. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionery significance. J. gen. physiol., 34, 1951. — Robertis de E., Nowinski W. W. a. Saez F. A. General cytology. Philadelphia a. London, 1949. — Цанев Р. Изследованя върху биологичната роля на нуклеиновите киселини. Изв. на биол. инст. Бълг. акад. на науките. 2, 1951.

## К МЕТОДИКЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИСТОХИМИИ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

В. В. ПОРТУГАЛОВ  
(Москва)

Одна из важных задач морфологии сейчас состоит в конкретизации того, какие химические процессы происходят в клетках и неклеточных структурах живого вещества и каким образом они связаны с клеточными структурами, в определении локализации и степени участия ферментов и различных активных веществ в осуществлении специфических функциональных отправлений тканей и органов в целостном организме. Такие возможности дают гистохимические методы исследования.

По правильному определению А. Л. Шабадаша, гистохимия представляет комплексный метод исследования, включающий в себя принципы качественного анализа и гистологическую технику.

Надо как можно скорее преодолеть разрыв между представлениями биохимиков и морфологов о структуре и функции. Этому способствуют достижения современной биохимии. В. А. Энгельгардтом введено понятие о структурном белке как о ферментноактивной системе, которая одновременно со своей каталитической способностью осуществляет физиологическую функцию, связанную с расходом энергии. Обменные реакции рассматриваются как фактор накопления энергии в удобной для использования форме, а функция — как переход накопленной энергии в работу клеточной структуры, т. е. взаимодействие макроэргического агента с физиологическим механизмом. Такая постановка вопроса должна приниматься во внимание и при изучении морфологическими методами химических процессов.

Существенное значение в изучении механизмов функциональной деятельности тканевых структур приобретает вопрос о распределении в них ферментноактивных веществ и субстратов их действия. Характер распределения этих веществ в микроструктурах тканей может служить прямым указанием на значение тех или иных обменных процессов и связь между

ними и функциональными отправлениями тканевых элементов, а также позволит установить связи, возникающие в процессе обмена веществ между отдельными структурами. Установление с этих позиций физиологического значения отдельных структур будет способствовать развитию функциональной морфологии, что является чрезвычайно важным для развития павловского направления в гистофизиологии.

Химический состав тканевых и клеточных структур всегда интересовал морфологов. Стремление связать функциональные особенности структуры с ее химизмом является характерным для нашей отечественной гистологии.

Развитие современной гистохимии происходит в двух направлениях. С одной стороны, усиленно разрабатываются вопросы энзимогистохимии, ведутся исследования по выявлению локализации и активности ферментных систем при различных функциональных состояниях структуры, с другой стороны, изучаются субстраты действия ферментов. Здесь мы касаемся некоторых задач исследования в области гистохимии ферментных систем.

В морфологии в настоящее время наиболее актуальным представляется изучение обмена фосфорсодержащих соединений, играющих важнейшую роль в энергетике биохимических процессов. Именно в соединениях фосфорной кислоты определенной структуры, как это доказано работами В. А. Энгельгардта и его сотрудников, заключена энергия, непосредственно обуславливающая физиологическую деятельность клетки. Использование этой энергии осуществляется в химических реакциях, проходящих под влиянием ферментов, которые могут являться неотъемлемыми частями морфологических структур. Функция клетки сохраняется до тех пор, пока в ней имеется неизрасходованный запас макроэргических, богатых энергией фосфорных соединений. С этой точки зрения особый интерес представляет изучение ферментов фосфорного обмена, как, например, фосфоамидаз, различных фосфатаз и особенно такой из них, как аденозинтрифосфатаза. Хотя с методической стороны гистохимия фосфорного обмена и является по сравнению с другими наиболее разработанной, однако имеющиеся в распоряжении морфологии возможности почти не используются.

О способах выявления локализации и активности этих ферментов на гистологических препаратах можно найти указания в руководствах Д. Глика, Г. И. Роскина, а также в исследованиях А. Г. Андреса и его сотрудников.

Надо помнить, что наиболее четкие результаты при использовании перечисленных выше энзимогистохимических реакций могут быть получены при работе на срезах из свежей, нефиксированной ткани или, что несколько хуже, на срезах, изготовленных после фиксации на замораживающем микротоме.

Использование заливки в парафин приводит к значительной, а часто и к полной инактивации ферментов.

При изучении вопросов механизмов функциональной активности нервной ткани большое значение приобретает гистохимический анализ медиаторных систем и, в частности, ацетилхолина, адреналина, гистамина.

Для развития функциональной морфологии важной задачей является установление микротопографии различных химических веществ в структурах и, в частности, ферментов. Но составление гистохимической карты распределения активных веществ не является самоцелью, а служит для выяснения вопроса, в какой мере те или иные химические системы живых структур связаны с функциональными отправлениями клетки как в нормальных, так и патологических условиях. Такого рода направление исследования может быть реализовано только изучением материала не в статическом, а в динамическом аспекте.

Применение гистохимических тестов в изучении онтогенеза поможет выяснить биохимическую динамику ткани в связи со становлением функции с созреванием структур. Имеющиеся в настоящее время сведения показывают, что по мере созревания структуры происходит не только ее морфологическая, но и химическая дифференцировка. Эти сведения должны быть систематизированы и углублены.

Для того чтобы показать возможности гистохимического метода исследования, привожу пример из нашей совместно с В. А. Яковлевым работы о распределении холинэстеразы в тканях животных. При разработке метода выявления холинэстеразы были учтены условия, обязательные для определения на гистологическом препарате любого фермента.

Мы стремились: 1) избежать таких приемов обработки ткани, которые могли бы оказать влияние на локализацию изучаемого фермента; 2) использовать в качестве субстрата действия фермента вещества, специфичные для данного тканевого фермента; 3) чтобы хоть один из продуктов реакции взаимодействия фермента с субстратом действия мог быть уловлен в месте выделения и в дальнейшем переведен в видимую под микроскопом форму; 4) избежать диффузии продуктов реакции ферментативного расщепления — субстрата действия фермента; 5) чтобы реактив, переводящий продукты ферментативной реакции в форму нерастворимых осадков, не реагировал ни с одним из компонентов исходного раствора субстрата; 6) создать возможность проведения контроля на специфичность реакции или путем добавления к раствору субстратов ингибиторов ферментов, или исключением субстрата действия фермента из раствора.

Для изучения локализации и активности истинной или специфической холинэстеразы в наших опытах служил сернистый

аналог ацетилхолина — ацетилтихолин (подробнее см. об этом В. В. Португалов и В. А. Яковлев, 1953). Образующийся в местах локализации холинэстеразы продукт ферментативного расщепления ацетилтихолина — тихолин — осаждался в виде плохо растворимого маркаптида меди, а последний при обработке раствором сульфида натрия превращался в плохо растворимый темнокоричневый осадок сульфида меди. Для исследования неспецифической, или ложной, холинэстеразы использовался бутирилтихолин.

Основное условие при изготовлении препаратов ткани для выявления ферментов — отсутствие операций, ведущих к потере ферментной активности. В связи с чрезвычайно легкой повреждаемостью ферментов гистохимическая техника изучения локализации холинэстеразы не допускает обычно применяемых в гистологии приемов фиксации ткани.

Исходя из этого, техника приготовления микроскопических препаратов для выявления на срезах холинэстеразы состояла в следующем. У животного, убитого путем обезглавливания или обескровливания, вырезывали кусочки подлежащей изучению ткани и из них тотчас же на замораживающем микротоме готовили срезы толщиной в 40—60  $\mu$ , которые с ножа переносили непосредственно в раствор субстрата. При параллельном изучении специфической и неспецифической холинэстеразы соседние срезы помещали один — в раствор ацетилтихолина (субстрат I), другой — в раствор бутирилтихолина (субстрат II).

### Приготовление растворов субстратов

Раствор А. 3,75 г гликокола, 18 мл I N раствора едкого кали, 82 мл дистиллированной воды.

Раствор Б. 2,5 г сернокислой меди кристаллической, 100 мл дистиллированной воды.

Раствор В. 14,5 мг ацетилтихолиндида, 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл раствора Б.

Образующийся при этом осадок иодистой меди следует отделить на центрифуге.

Для получения субстрата I смешивают 0,4 мл раствора А, 0,2 мл раствора Б и 8,6 мл насыщенного водного раствора медного производного тиохолина.

Смесь выдерживают 15—20 минут при температуре 37°, прибавляют 0,8 мл раствора Б и фильтруют.

Субстрат II готовится по прописи: 12 мг бутирилтихолинбромида, 0,4 мл раствора А, 0,2 мл раствора Б, 9,4 мл дистиллированной воды, насыщенной медным производным тиохолина.

В случае необходимости раствор фильтруют.



## Получение медного производного тиохолина

Растворяют 0,3 г ацетилтиохолиндида и 0,1 г медной соли гликокола (можно получить длительным кипячением водного раствора эквивалентных количеств гликокола и уксуснокислой меди) в 25 мл воды и по каплям прибавляют 1 N раствор едкого кали до устойчивой величины  $\text{pH} = 12$ .

Реакция заканчивается обесцвечиванием раствора и выпадением белого осадка медного производного тиохолина. На другой день осадок отсасывают на воронке со стеклянным фильтром, многократно промывают водой и высушивают на воздухе.

Срезы ткани мы инкубировали в растворах субстратов (состав см. выше) при температуре  $37^\circ$  в течение 20 минут и более (иногда до 2—3 часов) в зависимости от активности фермента.

После двукратного ополаскивания в дистиллированной воде, насыщенной медным производным тиохолина, срезы погружали на 30—60 секунд в разбавленный раствор (0,1%) сернистого натрия, после чего ополаскивали водой, насыщенной сульфидом меди.

Полученные таким образом препараты наклеивали на предметные стекла яичным белком, обезжировали спиртами восходящей крепости и заключали в канадский бальзам.

Приготовленные по описанному методу препараты дают возможность наблюдать локализацию холинэстеразы лишь в поверхностно расположенных слоях, что связано с плохой проницаемостью ткани для четвертичных аммонийных соединений, каковыми являются эфиры холина. Оказывается, однако, возможным наблюдать распределение холинэстеразы и внутри клеток, если искусственно увеличить проницаемость клеточных оболочек для холиновых эфиров.

Мы добились увеличения проницаемости клеточных оболочек путем выдерживания кусочков тканей в ацетоне от 10 минут до 3 часов. Инактивация фермента предотвращалась благодаря обработке при температуре  $-15^\circ$ . В ряде опытов такая обработка ткани позволила выявить важные подробности внутриклеточного распределения фермента.

Используя этот метод, мы доказали, что функциональные особенности структуры в значительной степени определяются пространственным распределением в ней химически активных веществ. Было найдено, что в мышечных волокнах тонических и слаботонических (нетонических) мышц имеются различия в локализации холинэстеразы. В то время как в нетонических или слаботонических мышцах холинэстераза обнаруживается только в зоне нервно-мышечного сочленения или участка мышечного волокна, прилегающего к нему (рис. 1а), в тонических она оказывается широко распространенной по всей длине мышечного волокна (рис. 1б).

Работами Гинецинского и его сотрудников физиологическими методами доказано аналогичное распределение в мышечном волокне ацетилхолина. Таким образом, имеются все



*a*



*б*

Рис. 1. Распределение истинной холинэстеразы в нетонических (слаботонических) и тонических мышцах.

*a* — икроножная мышца кролика. Наибольшая активность фермента обнаруживается в моторных бляшках и структурах мышечных волокон, расположенных вблизи них; *б* — мышца, втягивающая голову у черепахи. Фермент выявлен не только в области нервно-мышечных синапсов, но и в мышечных волокнах

основания по распределению холинэстеразы в мышечном волокне судить и о распределении в нем ацетилхолина. Другими словами, приведенный материал может служить указанием на существование корреляции между распределением холинэсте-

разы в мышечном волокне и степени тоничности мышцы. Мы не склонны относить все особенности функциональных отправления разных типов мышц только за счет различного содержания в них ацетихолина и холинэстеразы. В работах Х. С. Коштыянца и его сотрудников показано изменение качества мышечного сокращения в связи с наличием или отсутствием в мышечном волокне креатинфосфорной кислоты.

Связь между формой функционирования и химизмом ткани, очевидно, можно показать и на других примерах, однако это не входит в нашу задачу.

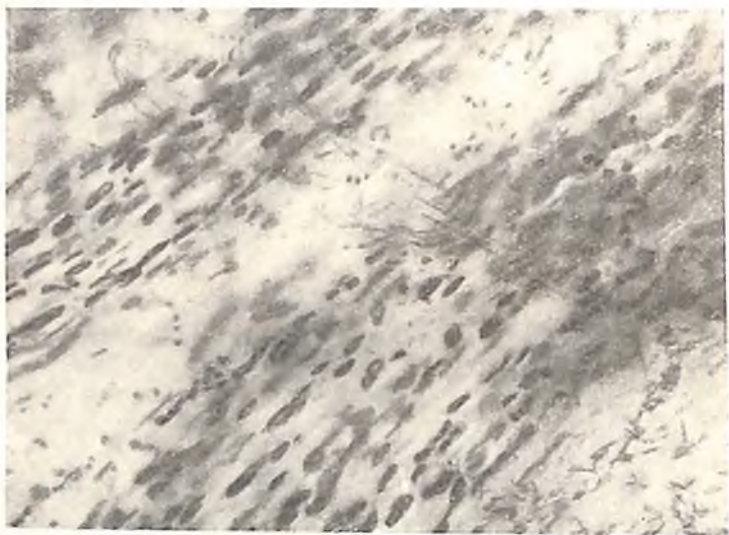


Рис. 2. Распределение истинной холинэстеразы в денервированной мышце.

Через 26 дней после денервации фермент выявлен далеко за пределами моторных бляшек (икроножная мышца кролика).

Интересно, что тоничность сократимого субстрата нельзя рассматривать как имманентное, раз и навсегда установленное свойство, она определяется формой и характером нервных связей мышечного волокна. Наблюдения над денервированными мышцами показывают, насколько глубоко влияние нервного компонента на организацию иннервируемого субстрата. Локализация биохимических процессов в денервированной мышце, если судить об этом по распределению холинэстеразы, отличается от того, что наблюдается в мышце, обладающей нормальными нервными связями. В денервированной мышце холинэстераза обнаруживается не только в области органического синапса, но и по всей длине мышечного волокна (рис. 2). Появление в мышце, лишенной нервных связей, новых физиоло-

гических качеств (в данном случае тоничности) можно поставить в причинную связь с иной топографией ферментноактивных веществ в ее структурах. Иными словами, наличие или отсутствие нервного окончания на мышечном волокне определяет в последнем характер распределения химически активных веществ, что в свою очередь накладывает отпечаток и на характер функции. Выключение нервной связи сразу же приводит к перестройке функции.

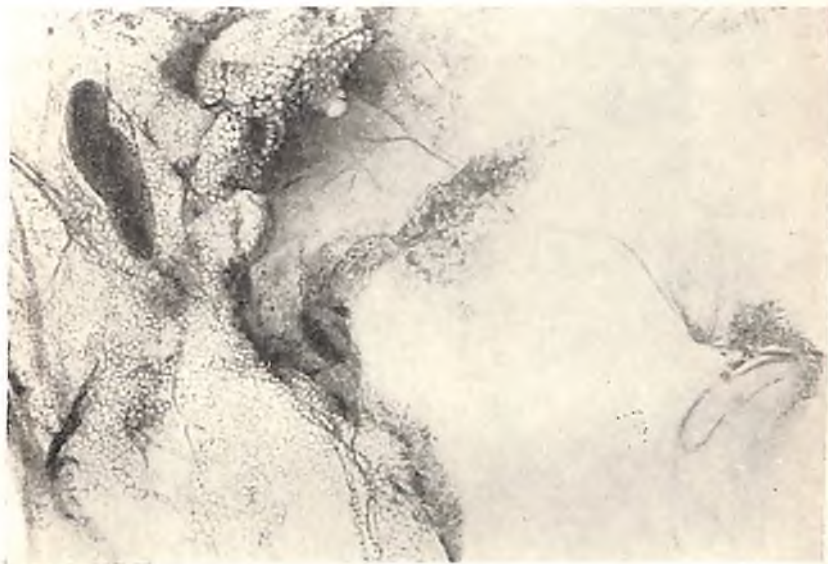


Рис. 3. Ткань брыжейки кошки, обработанная 0,1 N раствором цианида натрия в течение 15 минут.  
Активность щелочной фосфомоноэстеразы в зоне нанесения яда не обнаруживается.

Мышечное волокно икроножной мышцы новорожденного крысенка содержит холинэстеразу на всем своем протяжении. К концу 3-й недели постнатальной жизни в связи с включением центральных нервных механизмов локализация холинэстеразы оказывается идентичной распределению фермента в мышцах взрослых животных. Следовательно, можно думать, что включение иннервационных механизмов в онтогенезе также неизменно ведет к перестройке хемиоцитоархитектоники мышечного волокна.

Таким образом, можно сказать, что с развитием гистохимических методов исследования трофики ткани изучение процессов обмена веществ становится предметом морфологического анализа.

Уже теперь надо думать о том, чтобы гистохимию поставить

на службу клинике, для анализа мазка крови и биопсии необходимо искать такие тесты, которые позволили бы делать обоснованные диагностические и прогностические выводы о характере обмена веществ у больного.

Необычайно широким полем действия морфолога могут явиться изыскания в области эксперимента, связанного с воз-

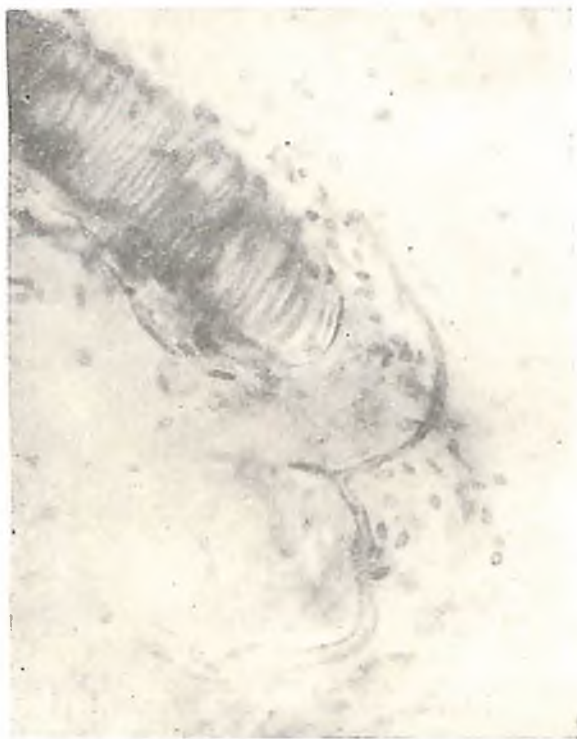


Рис. 4. Распределение истинной холинэстеразы в тканевых структурах десны собаки.

Холинэстераза выявляется в нервных волокнах, рецепторных аппаратах, а также в мышечных элементах кровеносных сосудов.

действием агентов различной природы на те или иные химические системы элементарных структур организма как *in vivo*, так и *in vitro*. Работы в этом направлении, т. е. в областях экспериментальной фармакологии, физиологии, токсикологии и т. п., представляются чрезвычайно важными, так как включают комплекс вопросов, связанных с расшифровкой механизмов действия ядов, лекарственных веществ, физических агентов на живые системы.

В этом направлении нами были проведены ориентировочные опыты, в которых в условиях целого организма без на-

рушения нервных и гуморальных связей испытывалось действие различных веществ на ферментные системы тканей. Оказалось возможным гистохимическим методом улавливать такие изменения состояния тканевых элементов, которые не открываются обычными цитологическими методами. Полученные данные позволили судить о точке приложения того или иного химического агента при его действии на живое вещество. В наших опытах было показано, что различные химиче-

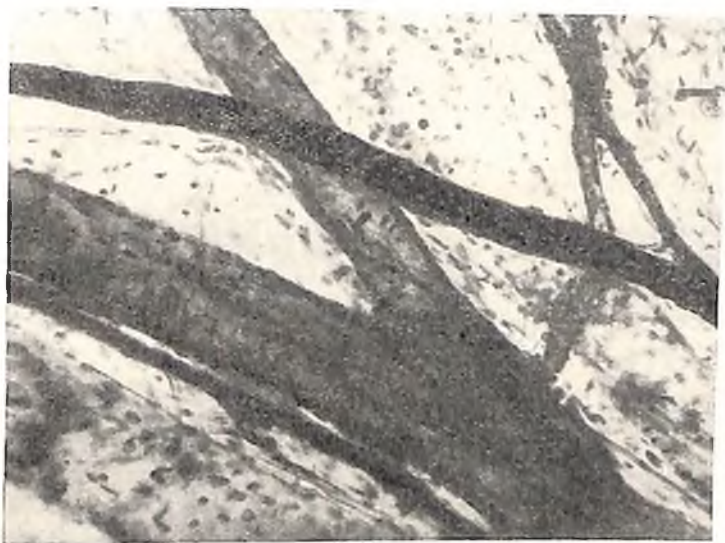


Рис. 5. Ткань брыжейки кошки после 15-минутной обработки 0,1 N раствором аскорбиновой кислоты. Активность кислой фосфоэстеразы в структурах кровеносных сосудов и нервного стволика резко увеличена.

ские вещества вызывают соответствующие ответные реакции живого вещества.

Так, при работе с пластинчатыми тельцами протоплазма шванновского симпласта рецептора на воздействие фтористого натрия отвечает угнетением локализованной в ней кислой фосфатазы при „безразличном отношении“ к этому веществу со стороны щелочной фосфатазы симпласта. В результате действия цианидов и кислая, и щелочная фосфоэстеразы шванновского симпласта оказываются инактивированными (рис. 3).

При приложении анестезирующих веществ фосфоэстеразы пластинчатого тельца остаются к ним безразличными, но при этом возникает полное торможение активности холинэстеразы (рис. 4).

Аскорбиновая кислота, несколько угнетая щелочную фос-

фомоноэстеразу, резко активирует кислую (рис. 5). Ингибиторы холинэстеразы — эзерин и прозерин, — полностью угнетая активность холинэстеразы, в то же время не оказывают никакого влияния на активность фосфатаз.

Результаты наших экспериментов находятся в полном соответствии с данными биохимии. Некоторые вещества, оказывая влияние на состояние одной ферментной системы, работающей в структуре, могут оставаться безразличными для другой или, напротив, производят на нее действие, противоположное имевшемуся в первом случае.

Этими примерами мы хотели продемонстрировать, что, экспериментируя, морфолог имеет возможность не только вмешиваться в процесс обмена веществ, но и определять механизмы вызываемых им нарушений.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Андрес А. Г. и Перевощикова К. А. Морфология фосфорного обмена в норме и патологии. Сообщение 1. Арх. патол., 9, 2, 1937. — Глик Д. Метод гисто- и цитохимии. 1950. — Португалов В. В. и Яковлев В. А. Локализация холинэстеразы в тканях животных. Вопросы медицинской химии, 5, 1953. — Роскин Г. И. Микроскопическая техника. Изд. 2-е, 1951.
-

## О НЕКОТОРЫХ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДАХ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Г. И. РОСКИН  
(Москва)

Можно утверждать, что в настоящее время ни один из разделов гистологии не нуждается в применении гистохимических методов в такой мере, как нейрогистология. Гистохимические методы, давно и со все возрастающим успехом применяемые при исследовании самых различных тканей, не были в должной мере использованы при изучении нервной системы, хотя они составляют основу гистофизиологии, в частности гистофизиологии нервной системы.

Мне совместно с М. В. Шорниковой и А. А. Жирновой удалось показать, что каждому из типов нервных клеток кролика и белой крысы может быть дана определенная гистохимическая характеристика. Более того, полученные гистохимические данные могут служить известным основанием для дальнейших работ по изучению обмена веществ нервных клеток.

Гистохимические различия особенно четко выступают при сравнительном изучении функционально различных нервных клеток. Примером могут служить чувствительные нервные клетки спинальных ганглиев и моторные клетки спинного мозга. Наши наблюдения показали, что названные клетки различаются по концентрации и распределению тимонуклеиновой кислоты, а также по концентрации и топографическому расположению рибонуклеиновой кислоты. Дальнейшие наблюдения установили, что физико-химические свойства цитоплазмы чувствительных клеток спинальных ганглиев и моторных клеток спинного мозга неодинаковы, о чем свидетельствуют четкие различия изоэлектрических точек цитоплазмы, ядер и тигроида этих двух видов нервных клеток.

О том же говорят наблюдения М. Е. Струве и И. М. Лимаренко, проведенные в нашей лаборатории. Согласно их данным, чувствительные клетки спинальных ганглиев и моторные клетки спинного мозга существенно различаются по гистохимическим реакциям на аргинин и гистидин. Это показывает, что аминокислотный состав протоплазмы двух типов нервных



клеток неодинаков. Чувствительные клетки спинальных ганглиев и моторные клетки спинного мозга достаточно четко различаются по интенсивности и топографическому распределению щелочной фосфатазы. Применение реакции на жиры и особенно на плазмоль также позволяет установить различия между названными чувствительными и моторными клетками. Не следует, однако, думать, что в разных типах нервных клеток все гистохимические реакции будут протекать неодинаково. Так, например, гистохимическая реакция на глутатион не выявила каких-либо существенных различий в чувствительных клетках спинальных ганглиев и в моторных клетках спинного мозга.

Конечно, нет никаких оснований ограничивать гистохимический анализ нервной ткани относительно узким кругом использованных нами методов — современная гистохимия ими очень богата.

Существенную помощь в анализе нервной ткани могут оказать новые гистохимические реакции, разработанные в нашей лаборатории, — определение нуклеотидов (Роскин и Бродский, 1953), фермента сукцинодегидразы (Семенов, 1935, Роскин и Струве, 1949) и, наконец, аминокислот триптофана и тирозина (Бродский и Лимаренко, 1953). Техника выполнения этих методов достаточно подробно описана в недавно опубликованных работах. На некоторых из них следует остановиться.

Прежде всего я хочу обратить внимание на метод определения изоэлектрических точек, который может быть очень полезен при решении самых различных гистофизиологических проблем, как это и следует из имеющихся в нашей литературе сводок (Роскин, 1946; Макаров, 1948). Можно утверждать, что этот метод (конечно, при известном навыке) позволяет определять такие различия между клетками или устанавливать такие изменения клеточных и неклеточных элементов, которые не поддаются учету какими-либо другими способами.

Дальше я остановлюсь на методе гистохимического определения глутатиона. Вполне законен значительный интерес гистофизиологов к изучению глутатиона, однако нельзя не признать, что имевшиеся в литературе методы определения этого биологически важного компонента протоплазмы не позволяли получить ни достаточно четкие, ни в достаточной мере устойчивые препараты. В своих исследованиях мы использовали новый метод, предложенный Шевремоном и Фредериком, который при соответствующих контролях дает весьма удовлетворительные результаты.

В нашей работе определение глутатиона производится следующим образом.

1. Используются или свежие кусочки ткани, из которых изготавливаются срезы на замораживающем микротоме, или фиксируют объект формалином не более 24 часов, после чего как

можно быстрее производят заливку в парафин (3—4 часа) или изготавливают срезы на замораживающем микротоме, причем срезы должны быть наиболее тонкими.

2. Срезы тщательно промывают в дистиллированной воде для удаления формалина.

3. Наклеенные на стекло срезы проводят последовательно через 3 биологических стаканчика, в которые наливают свежеприготовленную смесь (не касаться никакими металлическими инструментами) следующего состава:

0,1% Kalium ferricyanid (pro analysi) — 1 часть, 1% Ferrisulfat — 3 части.

Эту смесь можно хранить 2—3 часа на леднике в склянке из темного стекла. Общая длительность пребывания препаратов в биологических стаканчиках: 10—20 минут для замороженных срезов, 20—25 минут для срезов, проведенных через парафиновую заливку.

4. Тщательно промывают водой.

5. Срезы по желанию докрашивают, например азокармином и др.

6. Срезы заключают (без обезвоживания) в сироп левулезы или после обезвоживания по обычному способу в канадский бальзам.

При этом методе зоны нахождения свободных групп SH, т. е. восстановленного глутациона, окрашиваются в сине-голубой цвет. Для выявления тотального глутациона свежую ткань предварительно обрабатывают 10% KCN в течение 5—10 минут. При этом восстановленный глутацион остается почти без изменения, в то время как окисленный глутацион восстанавливается. После этого можно применять как нитропруссидную реакцию (Роскин, 1951), так и реакцию Шевремона и Фредерика. Сульфгидрильные радикалы, связанные с протеинами, можно демаскировать предварительной обработкой кусочка свежей ткани в трихлоруксусной кислоте (Роскин, 1951). Чтобы убедиться в том, что синее окрашивание после реакции зависит от присутствия глутациона, часть кусочков свежей ткани следует предварительно блокировать сулемой, моноодуксусной кислотой, иодноватокислым калием  $KJO_3$  (или хлорпикрином), а затем проделать реакцию на глутацион. В этих условиях реакция должна быть отрицательной, т. е. сине-голубого окрашивания не наступает.

В заключение остановимся на гистохимической реакции на плазмоль, которая дает очень четкие результаты. Мы, следуя указаниям Паниеля (1951), пользовались следующим методом.

1. Маленькие кусочки свежей ткани фиксируют 3 часа в следующей смеси: насыщенный раствор сулемы — 1 часть, реактив Шиффа — 1 часть. Одновременно для контроля такие же кусочки ткани кладут на то же время в смесь, где раствор сулемы заменен соответствующим объемом воды.

2. Зафиксированные кусочки промывают в растворе  $\text{SO}_2$  (10 минут в 3 биологических стаканчиках, так, как это делается при реакции Фельгена на тимонуклеиновую кислоту).

3. Объекты помещают на 2 часа в 20% формалин. Соединение формальдегид-реактив Шиффа образуется очень быстро и при этом контрольные кусочки принимают более интенсивный фиолетовый цвет, чем кусочки ткани, обработанные смесью, указанной в пункте 1.

4. Объекты промывают 3 суток в проточной воде. Комплекс формальдегид-реактив Шиффа легко растворим, и поэтому окраска контрольных кусочков ткани очень резко ослабевает, в то время как кусочки, обработанные смесью, указанной в пункте 1, остаются без изменения. Это зависит от того, что комплекс ацетилфосфатид-реактив Шиффа растворим в спирте, но не в воде. Таким образом, промывка в воде удаляет только формальдегид.

5. Обработанные опытные и контрольные кусочки ткани заключают в желатину (длительность пропитывания 12 часов, подробно см. Роскин, 1951) и для уплотнения помещают на 20–24 часа в эксикатор с  $\text{CaCl}_2$  (при  $37^\circ$ ); уплотненный желатиновый блок позволяет изготовить из него срезы толщиной до  $5\mu$ , которые заключают в глицерин. Можно также изготовлять срезы на замораживающем микротоме.

При этой реакции ацетальфосфатиды, к которым относится плазмоль, окрашиваются в темнофиолетовый цвет. Если окрашивание красное, следует с осторожностью оценивать результаты реакции. Паниель считает, что этот метод, так же как метод Фельгена, выявляет только свободные, а не связанные с протеином ацетальфосфатиды; метод же демаскирования связанных ацетальфосфатидов пока еще не разработан.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Макаров П. В. Физико-химические свойства клетки и методы ее изучения. 1948. — Роскин Г. И. Изoeлектрические пункты клеток и их изменения в норме, развитии и патологии. Усп. совр. биол., XXII, 1946. — Роскин Г. И. Микроскопическая техника. 1951. — Роскин Г. И. Распределение рибонуклеиновой кислоты в плазме и ядрах различных клеток. Доклады АН СССР, XLIX, 4, 1945. — Роскин Г. И. и Бродский В. Я. Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты протозойной клетки. Доклады АН СССР XCIX, 1953. — Роскин Г. И. и Струве М. Е. Гистохимические наблюдения над аргинином нормальных тканей. Доклады АН СССР, LVIII, 8, 1947. — Семенов В. Е. Mikrochemische Bestimmung der Aktivität der Succinodhydrase in den Organen der Rana temporaria. Zeitschr. f. Zellforschung, 1935. — Singer M. Internat. Review of Cytology, vol. 1, 1952. — P a n y e l J. Les problèmes de l'histochimie et biologie cellulaire. 1951.

## НОВЫЙ ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРОЗИНА И ТРИПТОФАНА (РЕАКЦИИ ДЛЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ)

*В. Я. БРОДСКИЙ и И. М. ЛИМАРЕНКО*  
(Москва)

Многие органические вещества обладают способностью поглощать ультрафиолетовые лучи. Однако до последнего времени при помощи ультрафиолетовой микроскопии определяли главным образом нуклеиновые кислоты, оставляя без внимания другие вещества биологического происхождения. Дело в том, что нуклеиновые кислоты обладают очень сильным избирательным поглощением ультрафиолетовых лучей с длиной волны 250—290 м $\mu$ . Поглощение этих кислот в десятки раз сильнее ароматических аминокислот — тирозина, триптофана и фенилаланина, поглощающих лучи той же области спектра.

Таким образом, ароматические аминокислоты в клетках можно наблюдать и фотографировать, лишь предварительно удалив со среза с помощью ферментов нуклеиновые кислоты. Но этот метод позволяет определить тирозин, триптофан и фенилаланин только суммарно, так как максимумы поглощения перекрывают друг друга.

Однако ультрафиолетовая микроскопия может идти по другому пути. В статьях Е. М. Брумберга указывается, что если химически изменить молекулу поглощающего вещества, изменится и спектр его поглощения. При этом могут сместиться максимумы поглощения, появиться новые максимумы, увеличиться поглощение и т. д. В одной из последних работ коллектива авторов, возглавляемого Е. М. Брумбергом, показано, что при нитрировании тирозина слабой азотной кислотой в кри-вой его поглощения появляется второй максимум около 360 м $\mu$ . Остальные аминокислоты при этом не изменяют спектров своего поглощения. Таким образом, после обработки среза слабой  $\text{HNO}_3$  тирозин можно наблюдать в зоне 360—370 м $\mu$ , где нуклеиновые кислоты не поглощают ультрафиолетовых лучей.

По предложению Е. М. Брумберга мы решили попробовать другой способ нитрирования ароматических соединений, а именно реакцию с азотистой кислотой.

Для того чтобы определить, как изменяются спектры поглощения при реакции с  $\text{HNO}_2$ , мы вначале обработали ею чистые растворы аминокислот как ароматических, так и линейных. Оказалось, что при обработке слабой (0,2—1%)  $\text{HNO}_2$  с нагреванием до 40—50° меняются спектры поглощения только ароматических кислот, причем существенные изменения, которые можно использовать в спектрографическом анализе, испытывают тирозин и триптофан.

Кривые спектров поглощения этих аминокислот тирозина, триптофана и фенилаланина имеют по одному максимуму — 250, 270, 290  $\mu$ , а при спектре поглощения около 300  $\mu$  все три кривые приближаются к нулю, т. е. лучи длиннее 300  $\mu$  свободно пропускаются ароматическими аминокислотами. При действии  $\text{HNO}_2$  у триптофана появляется второй значительный максимум около 300—310  $\mu$ . У тирозина также обнаруживается второй максимум кривой поглощения на 390  $\mu$ , а первый смещается на 265  $\mu$ . Кроме того, поглощение ультрафиолетовых лучей этими аминокислотами увеличивается примерно вдвое. У фенилаланина появляется очень небольшой и не всегда четко обнаруживаемый максимум около 350  $\mu$ , величина поглощения фенилаланина почти не меняется.

Таким образом, уже эти наблюдения показывают возможность отдельного определения тирозина и триптофана в растворах аминокислот по характерным кривым их поглощения. Однако для целей ультрафиолетовой микроскопии, где о поглощении судят не по спектрограммам, а по фотоснимкам, снятым в разных длинах волн, такие опыты были бы недостаточны. В ткани концентрация тирозина нередко в несколько раз выше концентрации триптофана, иногда бывает и наоборот. Следовательно, тирозин на спаде кривой поглощения при высокой концентрации может вызвать картину поглощения на 310  $\mu$  и в отсутствие триптофана. Те же рассуждения могут иметь место и в отношении триптофана. Чтобы избежать ошибки, необходимо было подобрать такие условия реакции, когда при 310  $\mu$  поглощение тирозина будет близко к нулю, а в ультрафиолетовых лучах большей длины волн будет незначительным поглощение триптофана.

Мы поставили серию опытов, выясняющих влияние времени реакции, температуры, концентрации  $\text{HNO}_2$  на изменение спектра поглощения ароматических аминокислот. Эти опыты показали следующее: для тирозина поглощение увеличивается пропорционально времени реакции, температуре и концентрации  $\text{HNO}_2$ . При времени реакции 2 часа, 1%  $\text{HNO}_2$  и температуре 50° достигается максимальное поглощение лучей с длиной волны 390  $\mu$ . При использовании 0,2%  $\text{HNO}_2$  и температуре 40° поглощение невелико. Для триптофана факторы времени и температуры имеют меньшее значение, так как уже при 30-минутной обработке 1%  $\text{HNO}_2$  отмечается сильное поглощение в зоне 300  $\mu$ .

С увеличением времени реакции поглощение на 300  $\mu$  почти не изменяется, а с повышением температуры становится даже меньше. При этом следует отметить, что с увеличением времени реакции, концентрации  $\text{HNO}_2$  и повышением температуры меняется вид кривой поглощения триптофана. Это позволяет предполагать, что реакция триптофана с  $\text{HNO}_2$  идет несколькими этапами и каждому промежуточному продукту свойствен свой спектр поглощения. Однако при любых условиях реакции около 380—400  $\mu$  кривая поглощения триптофана приближается к нулю.

Поглощение фенилаланина при любых условиях меньше поглощения тирозина и триптофана в 30—50 раз, так что в любой концентрации фенилаланин не мешает определению тирозина и триптофана. Как известно, аминокислоты встречаются в ткани не в свободном состоянии, а в составе белков, поэтому перед тем как перейти к реакции аминокислот с  $\text{HNO}_2$  на срезах ткани мы исследовали изменение поглощения белков при этой реакции. При обработке  $\text{HNO}_2$  желатины (белка без триптофана и тирозина, но содержащей фенилаланин) кривая поглощения в основном не изменяется. Гистон — белок, не содержащий триптофана, но имеющий в своем составе тирозин, — после реакции с  $\text{HNO}_2$  начинает поглощать лучи с длиной волны 390—400  $\mu$  (максимум поглощения тирозина). В кривой поглощения казеина, обработанного  $\text{HNO}_2$ , четко намечаются два максимума — 290  $\mu$  (триптофана) и 400  $\mu$  (тирозина). Как известно, казеин содержит обе эти аминокислоты.

Опыты с растворами аминокислот и белками позволяют предполагать, что и на срезах ткани реакции с  $\text{HNO}_2$  могут дать картину распределения тирозина и триптофана в ткани. Первый снимок делается с фильтром, выделяющим 313  $\mu$  (максимум поглощения триптофана). При фотосъемке препарата, обработанного разведенной  $\text{HNO}_2$  при 40° в течение не более часа, когда поглощение триптофана превышает поглощение тирозина в 6—10 раз, обнаруживается триптофан. При более высокой температуре и большем времени полнее реагирует тирозин. Снимок с фильтрами, выделяющими 390—410  $\mu$ , где поглощение тирозина превышает поглощение триптофана более чем в 20 раз, дает представление о гистотопографии тирозина.

Нами изучалось распределение тирозина и триптофана в нервных клетках различных отделов нервной системы кролика. После обработки 1%  $\text{HNO}_2$  (для выявления триптофана 15—30 минут при 40°, для выявления тирозина дополнительно 30 минут — 2 часа при 50°) препарат начинает поглощать лучи длиной 300—315 и 390—410  $\mu$ .

Первое, что удалось заметить в нервной ткани, это почти полное совпадение мест расположения тирозина и триптофана в структурах. Исключением является глия серого вещества

спинного мозга, где поглощение ультрафиолетовых лучей тирозином очень интенсивное, а триптофаном слабое.

Поглощение света различными структурами клеток неодинаково, что позволяет судить и о разном количестве ароматических аминокислот в этих структурах. В цитоплазме нервных клеток особенно сильную реакцию на тирозин и триптофан дает тигроид. Место отхождения аксона почти не содержит тирозина и триптофана, в то время как оболочки отростков нейронов интенсивно поглощают лучи 313 и 405 м $\mu$ .

Особый интерес представляет распределение ароматических аминокислот в ядре. Как известно, триптофан совершенно не содержится в щелочных белках типа гистонов, которые ранее считались единственным белковым компонентом ядра. Биохимическими методами кислые и нейтральные белки, богатые триптофаном, выделены из ядра многими исследователями, однако гистохимики до сих пор не наблюдали триптофансодержащий белок в ядерном хроматине. Реакция с  $\text{HNO}_2$  на срезах спинального ганглия, спинного мозга, коры, мозжечка и верхнего шейного узла показывает, что белковые глыбки в ядре нейронов поглощают лучи с длиной волны 313 м $\mu$  интенсивнее, чем другие структуры клетки, и, следовательно, содержат триптофан в высоких концентрациях. Особенно богат триптофаном хроматин, примыкающий к ядрышку. При изучении последовательных снимков при разной установке фокуса объектива, а также снимков одной клетки на серийных срезах удалось установить, что к поверхности ядрышка тесно примыкает зона из глыбок хроматина, содержащего нещелочной белок. На срезе эта зона дает типичную картину кольца вокруг слабо поглощающего ядрышка. Четкую реакцию на триптофан дает хроматин клеток-зерен мозжечка, сателлитов и клеток соединительной ткани из спинального ганглия.

Обработка срезов шелкоотделительной железы китайского дубового шелкопряда, богатой тирозином, ферментом тирозиназой позволяет установить, в какой форме — свободной или связанной с белком — выявляется на срезах тирозин. При малом времени реакции, однако достаточном для обнаружения тирозина без предварительной обработки тирозиназой, поглощение отсутствует. Увеличив время реакции, можно добиться четкого поглощения. Это свидетельствует о том, что в первую очередь азотистая кислота реагирует со свободным тирозином, удаляемым ферментом, затем происходит реакция с аминокислотой, связанной с белком.

---

## МЕТОД ПРИЖИЗНЕННОГО МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТКАНЕВЫХ СТРУКТУР В ОРГАНИЗМЕ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ОПЫТА С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРЕРЫВИСТОЙ МИКРОКИНОСЪЕМКИ

Г. Б. ПЛИСС  
(Тихвин)

Для прижизненного микроскопического исследования тканевых структур в целостном организме до некоторой степени пригоден кларковский метод „окошечек“ на ухе кролика (1924). Суть метода заключается в следующем: в ухе кролика делается сквозное отверстие. С наружной стороны уха по краю раны от хряща отсепаровывается кожа с подкожной клетчаткой и в образовавшееся ложе вставляются края целлулоидовой камеры, которая состоит из основной, покровной пластинок, стоек и столика, причем высота стоек больше высоты столика. В образовавшийся промежуток между столиком и покровной пластинкой вырастают ткани, окружающие камеру (рис. 1).

Метод Кларка имеет целый ряд серьезных недостатков — сложность устройства и приготовления целлулоидовой камеры, трудность наблюдений (кролик фиксируется на спине), ограниченность выбора животных, трудность сочетания метода с микрокиносъемкой.

Этот метод был изменен Вильямсом (1934) и применен для изучения кожи. При операции им выкраивалась широкая дубликатура из кожи животного, образовывалось своеобразное искусственное ухо. Отсутствие опоры (в ухе — хрящ) заставило автора искусственно ее создать, подшивая всю дубликатуру к целлулоидовым лубкам. Модификация Вильямса также обладает рядом недостатков и, в частности, не дает возможности производить сколько-нибудь длительную микрокиносъемку.

В 1917 г. наш соотечественник В. П. Филатов предложил оригинальный метод образования круглого стебля для пересадки тканей. Метод этот нашел большое применение в пластической хирургии. Воспользовавшись им, нам удалось разработать сравнительно простой метод прижизненного



микроскопического исследования тканевых структур в организме в условиях хронического опыта.

Разработка нашего метода велась на кроликах. Однако он может быть применен и на других животных. У кролика сбоку от лопатки до таза выкраивался кожный стебель длиной 15—20 см. Дистальная ножка стебля после тренировки отсекалась, образовавшиеся раны на стебле и на теле зашивались. Затем в стебле делалось сквозное отверстие через все ткани и после остановки кровотечения в отверстие вставлялся пластмассовый (Акр. 7) ограничитель со стеклянной камерой (рис. 2).

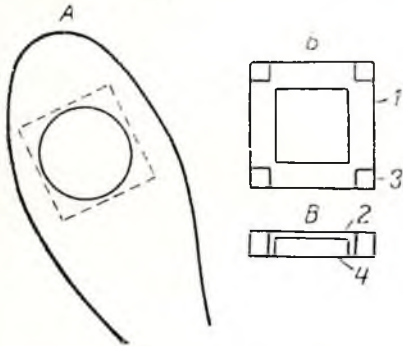


Рис. 1. Схема метода „окошечек“ (по Кларку).

А — ухо кролика с вживленной в него целлулоидной камерой; Б — вид камеры сверху; В — вид камеры сбоку. 1 — основная пластинка; 2 — покровная пластинка; 3 — стойки; 4 — столбик.

Ограничитель фиксирует камеру, в которую вырастает ткань, и препятствует надвиганию окружающих тканей на поле зрения. Камера состоит из предметного и покровного стекол. Соответственно размеру щели ограничителя из обычного предметного стекла вырезается пластинка, две боковые стороны которой наклонно спиливаются наждачным бруском. Затем на предметное стекло наносятся две небольшие капли акрилового клея и сверху накладывается покровное стекло. Между стек-

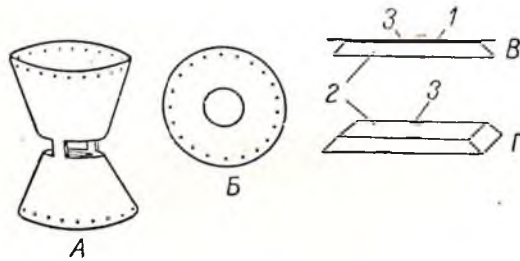


Рис. 2. Ограничитель со стеклянной камерой.

А — общий вид ограничителя; Б — вид сверху; В и Г — стеклянная камера (В — профиль, Г — общий вид предметного столика). 1 — покровное стекло; 2 — предметное стекло; 3 — капля клея.

лами образуется щель, высота которой лимитируется толщиной капли клея и равняется 15—20  $\mu$ . Камера вдвигается в щель ограничителя так, чтобы плотно прилегать к нему верхней и нижней поверхностями, и вместе с ним стерилизуется логическим раствором, но в связи с тем, что при операции имеется большее или меньшее кровотечение и камера так или

иначе заполняется кровью, вводить в камеру физиологический раствор не обязательно.

Ограничитель сшивается с кожей и плотно держится в тканях в течение нескольких месяцев. Успех операции во многом зависит от стерильности ее проведения. В случае неудачи

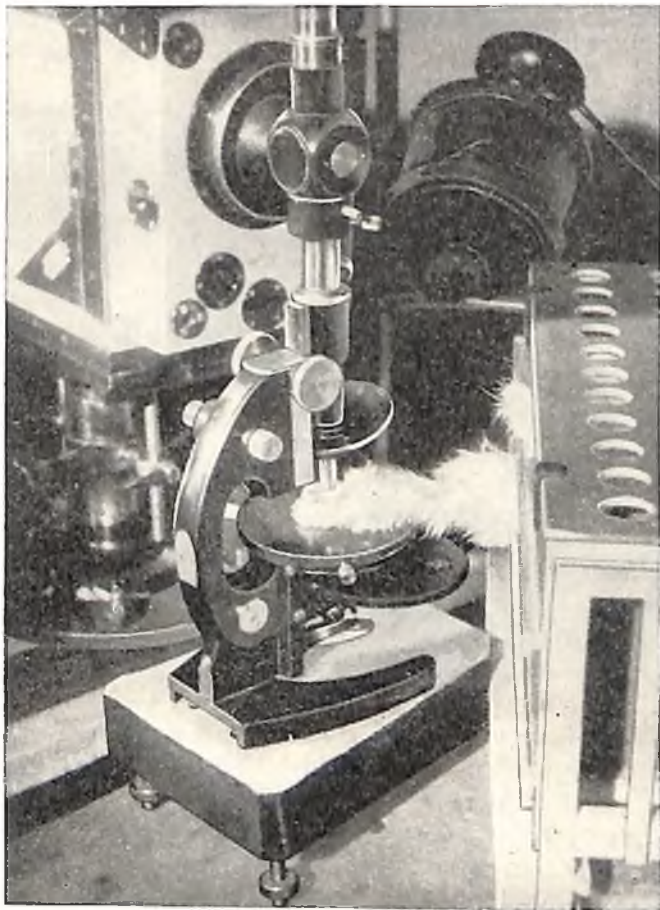


Рис. 3. Общий вид установки для прижизненного изучения тканевых структур. Виден стебель с камерой, фиксированной для наблюдения в микроскопе.

опыта ограничитель с камерой может быть извлечен и через неделю вновь вшит в тот же лоскут. После операции конец стебля забинтовывается и прикрепляется к телу при помощи металлических клемм.

Частым затруднением при длительных микрокиносъемках является подвижность животного. Она устраняется обычно применением наркотических средств, что, естественно, отра-

жается на течении нормальных физиологических процессов. По нашему методу производится иммобилизация стебля. Это достигается тем, что к нижней части ограничителя приклеивается кольцо предметного столика микроскопа, которое вместе с ограничителем после этого вставляется обратно в свое ложе.

При работе кролик помещается в узкую, несколько ограничивающую его движения клетку с отверстием сбоку, через которое пропускается стебель (рис. 3). Таким образом, благо-

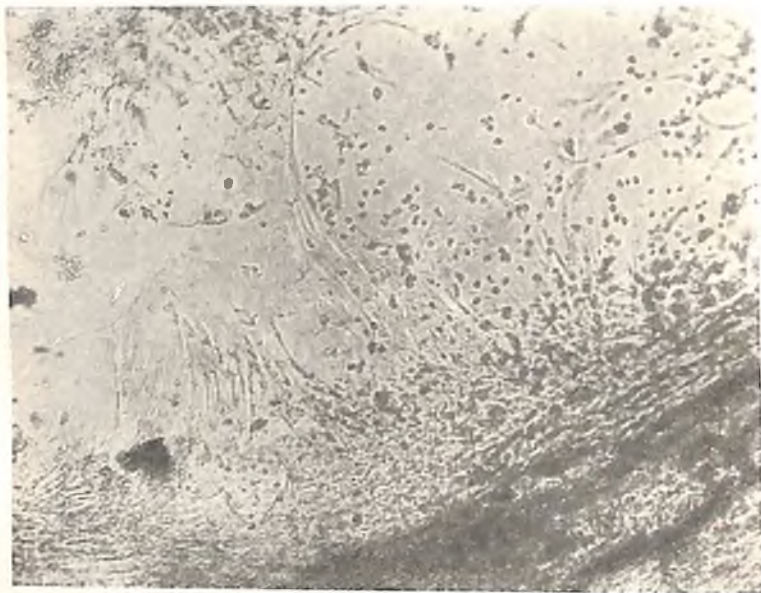


Рис. 4. Вид соединительной ткани, врастающей в камеру. Срок опыта 10 дней.

даря длинному стеблю и его гибкости удастся прочно зафиксировать конец стебля с камерой, не ограничивая полностью подвижность кролика. Во время киносъемки в наших опытах кролик находился в клетке до  $2\frac{1}{2}$  суток без каких-либо нарушений его нормальных физиологических отправления — кролик во время съемки мог спокойно есть, пить, спать.

Непосредственно после операции камера заполняется жидкостью, содержащей элементы крови, которые вскоре погибают. Выпавшие нити фибрина постепенно становятся контрастнее, в петлях их находится большое количество лейкоцитов и макрофагов.

На 10—11-й день в камеру начинает вращать тонкий пласт соединительной ткани, который местами дает картину травовидного роста (рис. 4). Интенсивность нарастания пласта непостоянна и равняется приблизительно 1,5 мм в неделю.

В разрастании пласта ткани различают: а) пролиферацию элементов края роста и б) поступательное продвижение всего пласта ткани в камеру.

Одновременно и параллельно с ростом соединительной ткани в камере появляются отдельные петли капилляров, в которых видна циркулирующая кровь. Разрастание капиллярной сети происходит, как правило, из предсуществующей сосудистой петли за счет эндотелия ее стенки. Диаметр отдельных



Рис. 5. Развитие сосудов в регенерате.

капилляров постепенно увеличивается, и на 15—20-й день опыта можно отчетливо видеть артерии и вены (рис. 5).

Динамика структурных изменений в камере может быть заснята на кинолентку под большим и малым увеличением.

Усовершенствование прижизненного микроскопического исследования тканевых структур в организме дает новые возможности для изучения вопросов цито- и гистофизиологии.

Метод может быть использован как для изучения изменений тканевых структур при экспериментальных воздействиях на организм в целом, так и зависимости их от регулирующей функции нервной системы.

#### ЛИТЕРАТУРА

Куккин Н. Н. Восстановление чувствительности в мигрирующем стебле. Сб. работ хир. клиники I ММИ, 1938.— Михельсон Н. М., Шефтель М. П. Филатовский стебель и его применение в восстановительной хирургии. М., 1951.— Преображенский П. Изменения кровяного давления в сосудах на филатовском стебле. Врач. дело, 16, 1929.— Филатов В. П.

Пластика на круглом стебле. Вестн. офтальмол., 4—5, 1917. — Филатов В. П. Пластика на мигрирующем круглом стебле. Врач. дело, 9—10, 1923. — Clark E. R., Kirby-Smith H. T., Rex O. R. and Williams R. G. Recent modifications in the method of studying living cells and tissues in transparent chambers inserted in the rabbits ear. Anatomical Record, 47, 187—211, 1930. — Clark E. R., Hirschler W. J., Kirby-Smith H. T., Rex O. R. and Smith G. H. General observations on the ingrowth of new blood vessels into standardized chambers in the rabbit's ear and the subsequent changes in the newly grown vessels over a period of one month. Anatomical Record, 50, 129—167, 1931. — Sandison J. C. The transparent chamber of the rabbits ear, giving a complete description of improved technic of construction and introduction, and general account of growth and of behavior of living cells and tissues as with the microscope. American journal of Anatomy, 41, 447—472, 1928. — Sandison J. C. Observations on the growth of blood vessels as seen in the transparent chamber introduced into the rabbits ear. American journal of Anatomy, 41, 475—496, 1928. — Williams R. G. An adoption of the transparent chamber technique to the skin of the body. Anatomical Record, 60, 493—499, 1934. — Williams R. G. The transparent chamber adapted for cells culture and permitting access to the contained living tissues. Anatomical Record, 60, 487—491, 1934.

---

## ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА СУПРАВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ НЕРВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПО А. С. ДОГЕЛЮ

*И. В. ГОРСКАЯ*  
(Киев)

Всестороннему изучению строения центральной и периферической нервной системы может оказать большую помощь разработанный казанской школой нейрогистологов метод суправитальной окраски нервных элементов метиленовой синью.

В данной статье описано применение метода, предложенного А. С. Догелем, с теми изменениями, которые внесены нами в процессе работы. Они сводятся к ослаблению концентраций и уменьшению времени действия красящего и фиксационных растворов и приспособлению всех условий обработки материала для изготовления тотальных препаратов. Последние представляют особую ценность при изучении распространения и связей нервных элементов.

Не останавливаясь на теоретическом обосновании метода, подробно разработанного А. В. Леонтовичем, А. Л. Шабашем и др., мы хотим последовательным и подробным изложением всех технических условий облегчить начинающим экспериментаторам освоение этого сложного, но очень эффективного метода.

### **Выбор животного и приготовление его к окрашиванию**

Лучше всего суправитальное окрашивание удается на молодых животных (щенки, котята, кролики), которые легче переносят рекомендованную А. С. Догелем трансфузию краски в кровяное русло. На них с помощью небольшого количества красящего раствора в относительно короткое время удается хорошо и полно выявить нервные элементы органа.

Метод окраски метиленовой синью, как и всякий суправитальный метод исследования, ставит своей задачей максимальное приближение к естественным условиям существования организма. Это заставляет избегать травмы животного в процессе подготовки и на первых этапах трансфузии.

Экспериментатор должен помнить, что, искажая естественные условия, он лишается возможности квалифицировать как

нормальные образования те морфологические структуры, которые он выявляет.

Усыплять животных лучше с помощью уретана или гексонала, так как эфирный или хлороформный наркоз, который приходится поддерживать во время трансфузии, затрудняет ее проведение, затягивает подготовку к ней, утомляет животное и вызывает его перевозбуждение.

У спящего животного надо тщательно выстричь операционное поле и смочить водой окружающую шерсть, чтобы предотвратить засорение препарата.

### Техника трансфузии

Трансфузия красящего раствора осуществляется путем введения канюли в сосуд, подводющий кровь к исследуемому органу (канюля № 1). Чтобы основная масса красящего раствора попала в орган, необходимо лигировать все крупные боковые ветви сосуда, по которым может оттекать жидкость. Для оттока вымываемой крови и трансфузируемого раствора в сосуд, отводящий кровь от органа, вставляется канюля, по которой промывная жидкость выводится из тела животного (канюля № 2).

Важно следить за тем, чтобы во всех случаях поперечник канюли соответствовал просвету сосуда, в который она вводится, с тем, чтобы ток трансфузата соответствовал объему тока крови в сосуде.

При введении канюль № 1 и 2 лучше по возможности не нарушать целостность грудной клетки, это позволит на некоторое время сохранить дыхание и сердцебиение животного, благодаря чему пульсирующее сердце будет толчками посылать красящий раствор в сосуды, а аспирационные движения легких и всех участвующих в дыхательном акте органов обеспечат глубокое проникновение красящего раствора в капиллярную сеть, и, следовательно, более полное окрашивание нервных элементов. Поэтому при исследовании органов грудной полости лучше как можно дольше ее не вскрывать, вводя канюлю № 1 в нижнюю полую (субдиафрагмально) или яремную вену. Одновременно следует лигировать правые и левые аксиллярные сосуды, а также сонную артерию с тем, чтобы трансфузируемый раствор направлялся в основном в исследуемый орган. Для оттока трансфузата лучше всего ввести канюлю № 2 в верхнюю треть брюшной аорты.

При исследовании органов брюшной полости лучше вводить канюлю № 1 через небольшой разрез боковой брюшной стенки и верхнюю треть брюшной аорты у выхода ее из диафрагмы. Для оттока жидкости удобно вскрыть бедренные артерии.

Для того чтобы лучше окрасить желудок, сальник, верх-

ние отделы кишечника и поджелудочную железу, канюлю № 1 надо вводить в а. coeliaca. При этом также следует лигировать сосуды, направляющиеся к голове и верхним конечностям.

### Состав красящего раствора

Успех трансфузии в значительной мере зависит от состава красящего раствора. В начале трансфузии, для того чтобы освободить сосуды от форменных элементов крови, можно вводить чистый раствор Рингер-Локка, а после того как органы побледнеют, т. е. освободятся от крови, добавить в него краску. Можно также и сразу начать с трансфузии красящего раствора и им отмывать кровь. Это ускорит ход окраски и сократит время трансфузии.

Красящий состав готовится на растворе Рингер-Локка при избытке глюкозы (учитывая наблюдения А. Л. Шабаша).

Следует иметь готовый 1% раствор метиленовой сини, который перед трансфузией надо подогреть и профильтровать. Исходный раствор разводится 1 на 1000 и окрашивание ведется 0,01% раствором метиленовой сини. Такая концентрация не токсична и обеспечивает интенсивное и элективное окрашивание нервных элементов.

А. В. Леонтович, Л. Д. Олеандров и др. для увеличения интенсивности окрашивания периферических нервных элементов рекомендуют добавлять в красящий раствор различные алкалоиды и иные реагенты. Среди них нами с успехом испытаны ареколин, тиопиронин и осмиевая кислота. Ареколин заметно усиливает интенсивность окраски, ускоряет ход ее и позволяет особенно четко выявить перицеллюлярные структуры. Тиопиронин окрашивает ядра шванновских клеток и концевые ветвления в лиловые тона. Осмиевая кислота несколько тонирует ядра нервных клеток, этим помогая их выявлению. Эти нюансы окраски позволяют более четко дифференцировать нервные структуры в препаратах.

Мы считаем, что добавлять в красящий раствор уксусную кислоту, как рекомендует В. П. Воробьев и его ученики, при исследовании микроскопических структур не следует, так как она вызывает грубые изменения в строении периферических нервных элементов.

Одно из условий, обеспечивающих успех трансфузии, — это правильный выбор и постоянство температуры красящего раствора, которая должна поддерживаться на уровне температуры тела животного. Падение температуры задержит ход окрашивания и даже приостановит его, тогда как повышение ее приведет к патологическим изменениям в тканях: вызовет набухание, отек, появление грубых варикозностей в нервных структурах.

Подобные изменения при изучении препаратов могут быть



приписаны результатам специальных экспериментальных воздействий (денервация, раздражение органа и пр.) и введут в заблуждение исследователя.

Также важно поддерживать нормальный уровень давления тока жидкости, для чего необходимо включать в трансфузионную систему манометр. Раз установленный уровень давления можно просто регулировать изменением высоты столба жидкости.

Время трансфузии не должно превышать 40—50 минут. Указать точные сроки нельзя, так как условия окрашивания каждого органа различны и экспериментатор сам должен установить срок окраски в каждом отдельном случае.

### Сбор материала

Периферические нервные структуры окрашиваются метиленовой синью в различные сроки трансфузии, поэтому материал надо собирать не одновременно, а последовательно, на протяжении всех этапов трансфузии.

Первыми, по мнению большинства авторов, окрашиваются периферические безмякотные волокна, их сплетения и нервные клетки, далее нервные сплетения сосудов и тонкие мякотные волокна; последними окрашиваются толстые мякотные волокна и нервные окончания.

Имея в виду, что окраска метиленовой синью нестойкая, следует собирать материал в несколько приемов, с тем чтобы уловить момент выявления интересующих нас структур. Для того чтобы усилить и несколько продлить стадию окрашивания нервных элементов, необходимо обеспечить свободный доступ кислорода к тканям. Так, например, окраска органов грудной полости наступает после вскрытия грудной клетки, когда метиленовая синь под действием кислорода переходит в свою цветную форму. Этого нельзя забывать и при обследовании материала, извлекаемого крупными кусочками. Важно, чтобы все поверхности кусочка получили свободный доступ кислорода, для чего достаточно недолгое пребывание увлажняемого кусочка на воздухе. Срезы, полученные на замораживающем микротоме, также надо выдерживать 3—5 минут на воздухе, постоянно увлажняя их красящим раствором. Дальнейшая обработка срезов не отличается от той, которая предлагается нами для тотальных препаратов.

После того как достигнута желаемая окраска нервных элементов, для выявления строения окружающих тканей и для подкрашивания ядер можно дополнительно окрасить препараты слабыми растворами основного фуксина (Догель), борного кармина (Леонтович) или сафранина (Алексеева). Для этого кусочки, в которых метиленовой синью выявлены нервные элементы, погружаются в раствор дополнительной краски.

Ход окрашивания непременно контролируется под микроскопом, с тем чтобы не переокрасить окружающие ткани, поскольку их интенсивная окраска может замаскировать нервные элементы.

### Фиксация окраски

В настоящее время большинство авторов пользуется двумя способами фиксации метиленовой сини.

1. Способ А. С. Догеля — фиксация в течение суток в концентрированном на холоде растворе молибденовокислого аммония или в концентрированном растворе пикриновокислого аммония.

2. Способ А. В. Леонтовича — фиксация путем последовательного проведения материала через три смеси: пикриновокислый аммоний 0,6%, концентрированный 1 час, молибденовокислый аммоний 5%, концентрированный 30 минут, соль Леонтовича-Лютеоннобовольфромат 2%, концентрированный 30 минут.

После публикации Н. В. Бодровой (1948) стал известен предложенный А. В. Леонтовичем второй способ фиксации. В нем Н. В. Бодрова заменила первые два фиксатора смесью Калачева, а заключительным фиксатором оставила соль Леонтовича.

Наш опыт показал, что применение концентрированных растворов пикриновокислого и молибденовокислого аммония приводит иногда к исчезновению окраски тончайших нервных элементов, а длительное пребывание кусочков в этой соли часто вызывает мацерацию тканей.

Использование же очень эффективных способов фиксации по А. В. Леонтовичу, к сожалению, крайне затруднено применением редко встречающихся солей.

Нам удастся хорошо и на длительные сроки фиксировать окраску нервных элементов метиленовой синью с помощью последовательного проведения через слабые растворы пикриновокислого и затем молибденовокислого аммония.

### Техника фиксации

После того как иссеченные кусочки или пленки просмотрены в малых увеличениях микроскопа и в них обнаружены удовлетворительно окрашенные нервные структуры, следует на 2—3 минуты оставить увлажненный красящим раствором материал на воздухе, а затем фильтровальной бумагой отсосать избыток краски и перенести кусочек в бюкс с 0,15% раствором пикриновокислого аммония, к которому предварительно был добавлен аммиак из расчета 10 капель на 100 мл раствора (по рекомендации А. В. Леонтовича). Длительность фиксации в этом растворе 3—4 минуты. По истечении этого срока кусочек извлекают, отсасывают остатки раствора фильтровальной бумагой и переносят его в 2,5% раствор молибденовокислого аммония также на 3—4 минуты.

Объект в обоих растворах во время фиксации надо покачивать, с тем чтобы он равномерно со всех сторон обмывался фиксатором. Лучше фиксировать в бюксе по одному кусочку, так как одновременная проводка нескольких срезов заметно ухудшает качество фиксации.

По извлечении из второго раствора процесс фиксации краски заканчивается, кусочки быстро обмывают в дистиллированной воде и приступают к обезвоживанию их для приготовления длительно хранящихся препаратов.

При этом следует помнить о малой стойкости метиленовой сини. Иногда после хорошей фиксации окраски последующая процедура обезвоживания вызывает обесцвечивание препарата. Это обстоятельство заставило нас несколько изменить общепринятый способ обезвоживания препаратов.

Для лишенных жира объектов хорошо обезвоженный и просветленный препарат мы получаем следующим образом. Извлеченный из молибденовокислого аммония кусочек или пленку быстро ополаскивают в дистиллированной воде и распластывают на предметном стекле. Далее его тщательно высушивают сложенной в несколько слоев фильтровальной бумагой, которую накладывают на расплавленный препарат и с силой к нему придавливают. Бумагу снимают и еще раз тщательно расправляют препарат на стекле. Удовлетворительно растянутые препараты оставляют под колпаком в темноте на сутки или больше для медленного подсыхания. Просушенный таким образом на стекле препарат просветляют ксилолом или толуолом, который накапывают на препарат и затем быстро отсасывают (1—2 раза). Потом препарат заключают в канадский бальзам. Пленки малого размера закрывают покровными стеклами. Если же препарат большой (от 5 до 15 см<sup>2</sup>), его можно залить двумя-тремя слоями канадского бальзама и в процессе изучения покрыть покровными стеклами интересующие места. Такие препараты следует тщательно хранить от пыли и царапин. Заключенные в бальзам без покровных стекол препараты доступны для изучения с иммерсионными системами при условии осторожного смазывания иммерсионным маслом объектива и последующего осторожного снятия масла с препарата ватой, слабо смоченной толуолом. Если после микроскопирования на препарате остается след, то для его устранения достаточно легкого подогревания стекла в термостате.

Обезвоживание затрудняется, если ткань содержит большое количество жира, мешающего наблюдению и утолщающего препарат. В этих случаях после промывания в дистиллированной воде распластанный и подсушенный фильтровальной бумагой препарат можно последовательно обработать тремя порциями 96° спирта, а затем тремя порциями смеси спирта с эфиром 1:1 и, наконец, тремя порциями эфира. Растворы наносят пипеткой на препарат и тотчас тщательно снимают

их, высушивая несколькими слоями фильтровальной бумаги. После этого препарат закрывают и оставляют высыхать на сутки. Если он имеет большую толщину, то предварительно зажимают между двумя предметными стеклами. По высыхании его заливают несколько раз сменяемым ксилолом и заключают в канадский бальзам. Таким образом, весь процесс обезвоживания проводится на стекле, что сберегает препарат от сморщивания.

Способ медленного высушивания препарата на стекле благодаря исключению спиртов или укороченному времени их воздействия не приносит практически заметного вреда объекту и позволяет сохранить окраску тонких нервных структур. Одновременно получается возможность расчленить процесс фиксации и обезвоживания на два этапа, что значительно упрощает работу.

В тех случаях, когда тотальный препарат интересен для наблюдения с двух поверхностей, его можно заключить между двумя покровными стеклами (как рекомендует А. В. Леонтович).

Техника суправитального окрашивания метиленовой синью и фиксации тотальных объектов изложена с нарочитой детализацией каждого процесса, чтобы облегчить работу впервые приступающему к исследованию этим методом. Следует, однако, помнить, что постоянны только общие принципы применения суправитального метода, детали приходится приспособлять к особенностям каждого органа и ткани.

#### ЛИТЕРАТУРА

Бодрова Н. В. Метод метиленовой сини и дегенерация нервных элементов. Збірник, присвячений пам'яті Олександра Васильевича Леонтовича, Киев, 1948. — Воробьев В. П. *Methodik der Untersuchungen von Nerven-elementen des makro und makro-mikroskopischen Gebietes*. Berlin, 1925. — Догель А. С. Техника окрашивания нервной системы метиленовой синью. СПб., 1902. — Збірник, присвячений пам'яті Олександра Васильевича Леонтовича, Киев, 1948. — Олександров Л. Д. К методике окраски нервной системы метиленовой синью. Збірник, присвячений пам'яті Олександра Васильевича Леонтовича, Киев, 1948. — Шабдаш А. Л. Теория и практика прижизненной окраски нервной системы метиленовой синью. Горький, 1932.

## МЕТОД ИМПРЕГНАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ СВИНЦОВЫМИ СОЛЯМИ

*И. Ф. ИВАНОВ*  
(Москва)

Идея применения импрегнации нервной ткани свинцовыми солями возникла в процессе освоения метода выявления локализации кислой фосфатазы. Импрегнация свинцом, будучи близкой методу Гомори, в то же время резко отличается от него. Работая по методу Гомори, исследователь стремится сохранить активность ферментов, тогда как наилучшие результаты при свинцовой импрегнации получились, наоборот, после инактивирования фермента. Метод разработан аспирантом Г. Н. Чилингаряном.

Сущность метода сводится к следующему.

Материал фиксируют 1—4, чаще 3—4 дня в ацетоне (по всей вероятности, можно использовать и другие фиксирующие средства, так, например, четкая импрегнация нервных волокон коры головного мозга получается после фиксирования в нейтральном формалине).

Затем кусочки отмывают в дистиллированной воде и из них готовят замороженные срезы. Можно применять тотальную импрегнацию, т. е. импрегнировать не срезы, а, например, целиком весь наружный продольный слой мышечной оболочки кишечника. Затем срезы помещают на 5—6 дней (возможны вариации в сроках, обусловленные, как мы думаем, различиями в содержании ортофосфатов в нервных элементах) при температуре 37° в жидкость следующего состава:

ацетатный буфер с рН 4,7—5,0—10 мл,

3% раствор чистого азотнокислого свинца — 10 мл,

дистиллированная вода — 80 мл.

Буферную смесь готовят добавлением к 50 мл 6% уксусной кислоты 100 мл 13,6% раствора уксуснокислого натрия.

Затем срезы промывают в течение 15—20 минут в несколько раз сменяемой дистиллированной воде и погружают на 1 минуту в 0,1—0,5% раствор сернистого натрия, где они быстро темнеют.

Таков первый вариант метода, очень хорошо выявляющий клетки II типа Догеля и все нервные волокна (рис. 1 и 2).

Гораздо более полные картины импрегнации различных нервных клеток получаются при добавлении к свинцовой смеси органических фосфорных соединений. Импрегнация при этом значительно ускоряется.

В этом случае срезы перед погружением их в свинцовую смесь подвергаются нагреванию (до  $60^{\circ}$  в течение 5 минут) или обрабатываются 5—10% раствором красной кровяной соли (15—20 минут). Затем срезы погружают в жидкость следую-

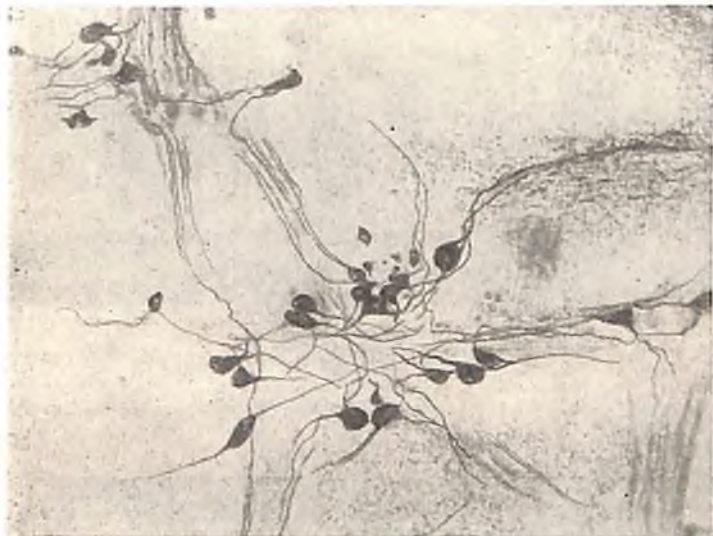


Рис. 1. Межмышечное нервное сплетение тонкой кишки кошки.

Первая модификация метода. Микрофотограмма с препарата А. М. Чингаряна.

щего состава: ацетатный буфер — 10 мл, 3% раствор азотно-кислого свинца — 10 мл, 2% раствор глицерофосфата натрия — 10 мл (возможно применение и других органических соединений фосфора), дистиллированная вода — 70 мл.

Через 6—8 часов срезы промывают водой, погружают в 0,1—0,5% раствор сернистого натрия или аммония и заключают в канадский бальзам.

Преимущества метода свинцовой импрегнации:

1) мы освобождаемся от необходимости использования дефицитного азотнокислого серебра;

2) метод действует совершенно безотказно, по крайней мере на тех объектах, с которыми мы работали;

3) импрегнация идет совершенно равномерно во всем срезе, чего обычно не бывает при работе с серебром, поэтому можно импрегнировать куски любой величины, например мышечную

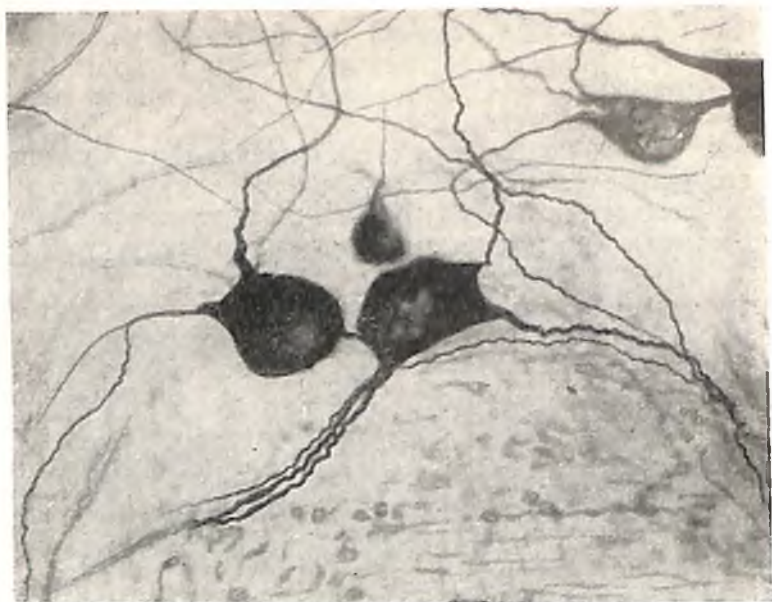


Рис. 2. Ганглиозные клетки межмышечного нервного сплетения кишечника кошки.

Первая модификация метода. Микрофотограмма с препарата А. М. Чилингаряна.



Рис. 3. Общий вид межмышечного нервного сплетения тонкого отдела кишечника кошки.

Вторая модификация метода. Микрофотограмма с препарата А. М. Чилингаряна.

оболочку целой кишечной петли, большие куски брыжейки и т. д.;

4) импрегнация не требует контроля под микроскопом, следовательно, можно обрабатывать этим способом любое количество срезов одновременно;

5) во второй модификации метода одновременно выявляются клетки различных типов, например в ганглиях межмышечного нервного сплетения кишки кошки видны одновременно клетки Догеля I и II типов, тогда как при серебряной импрегнации кишки у кошек выявляются только клетки II типа (рис. 3);

6) свинцовую импрегнацию можно использовать в качестве гистохимического метода выявления локализации тканевых ортофосфатов.

Метод свинцовой импрегнации еще нуждается в дальнейшей разработке.



## НОВЫЕ МЕТОДЫ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СУХИХ АНАТОМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С СОХРАНЕНИЕМ ЕСТЕСТВЕННОГО ВИДА

М. Г. ПРИВЕС

(Ленинград)

В нашей стране анатомы издавна занимались разработкой методов бальзамирования трупов и сохранения отдельных органов и частей тела.

В этом отношении наша отечественная наука имеет крупнейшие достижения и приоритет в разработке целого ряда вопросов. Достаточно указать на методы Выводцева (1881), Мельникова-Разведенкова (1899), Шора (1904), Белоусова, Воробьева, Синельникова и др.

Однако проблема консервации анатомических препаратов в сухом виде с сохранением естественного вида органов и тканей полностью еще не разрешена. Применяемые в настоящее время для выдачи на руки студентам влажные препараты быстро высыхают и приходят в негодность. Это обстоятельство и заставило нас заняться на кафедре нормальной анатомии I Ленинградского медицинского института им. акад. И. П. Павлова разработкой методов изготовления сухих анатомических препаратов с сохранением их естественного вида (прижизненная окраска, форма, величина, строение, эластичность).

Существующие методы консервации сухих препаратов не вполне удовлетворительны. Одни из них (Д. Выводцев, 1881; Г. В. Шор, 1904) требуют хранения в специальных герметических камерах или витринах, что лишает учащихся возможности брать препараты в руки. Другие, хотя и позволяют сохранять эти препараты в сухом виде (Шавловский и др.), но не предохраняют их от значительного уменьшения в объеме и искажения действительных анатомических отношений. Потеря же эластичности делает препараты хрупкими.

Открытое хранение сухих препаратов с сохранением естественного вида обогатит музей анатомических кафедр.

В настоящем сообщении мы и делимся некоторым опытом, полученным на нашей кафедре коллективом сотрудников, разрабатывающих методы консервации анатомических объектов в сухом виде.

Бурный рост химии дает нам средства для разработки новых методов приготовления анатомических препаратов, основанных на использовании различных пластических масс и синтетического каучука. Сочетая старые способы консервации с помощью обычных консервирующих жидкостей с применением искусственного каучука или органического стекла, можно получить препараты значительно более высокого качества.

Опишем вкратце некоторые из разработанных нами методов.

## **I. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУХИХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКОГО КАУЧУКА И ПЛАСТИЧЕСКИХ МАСС**

(М. Г. ПРИВЕС, И. С. ГИЛЬБО, В. М. КРЫЛОВА и И. М. ЕЗРИЛЕВ)

### **А. Инъекции сосудистой системы органа синтетическим каучуком — латексом, окрашенным в цвет венозной крови**

Латекс — это дисперсия синтетического каучука. Впервые для анатомических целей он был использован В. М. Степановой, но не для консервации препаратов, а для изготовления коррозионных препаратов сосудистой системы, которые представляют каучуковые слепки сосудов, окрашенные не в цвет крови, а в другие цвета (яркокрасный, синий). Для целей консервации препаратов синтетический каучук ранее никем не применялся.

Заполнение всего сосудистого русла (артерий и вен) латексом придает препарату эластичность, упругость и прочность. Кроме того, вследствие коагуляции латекса синтетический каучук задерживает в препарате влагу и сохраняет его объем, форму и величину.

Для сохранения первоначальной окраски органа надо пользоваться латексом, окрашенным в цвет венозной крови красителями, растворимыми в специфических веществах (в состоянии мономера), но не растворимыми в воде, так что стенки сосудов не окрашиваются и не происходит диффузной окраски препарата в один цвет. Таким окрашенным латексом инъцируются артерии обычным способом до полного заполнения артериального и венозного русла.

### **Б. Обработка препарата по модифицированному способу Мельникова-Разведенкова**

С целью консервации тканей и сохранения прижизненной окраски органа и части тела производится обработка препарата по Мельникову-Разведенкову с небольшими изменениями.

1. После инъекции синтетического каучука и перевязки сосудов препарат погружается в 5% раствор формалина на сутки.

2. Препарат переносится в водный раствор солей (селитра и искуснокислый калий) в пропорциях, предусмотренных прописью Мельникова-Разведенкова, на 3—4 дня.

В растворе формалина препарат фиксируется с изменением первоначальной окраски. В растворе солей (электролитов) происходит коагуляция латекса, который превращается в резину и придает препарату упругость, эластичность и прочность.

3. Из солевого раствора препарат переносится в спирт (можно бесцветный сырец), где происходит в течение 10—12 часов восстановление прижизненной окраски органа.

### В. Образование на препарате защитной (от высыхания) пленки

Для предотвращения высыхания препарата при обычных комнатных условиях температуры и влажности на препарат наносится специальная защитная пленка, что достигается следующим образом:

1) поверхность органа или часть тела тщательно просушивается гигроскопическим материалом (марля, лигнин и т. п.);

2) орган или часть тела покрывается 5% раствором низкомолекулярного (20 000—30 000) полиизобутилена, растворенного в бензине или бензоле; покрытие препарата полиизобутиленом производится либо путем погружения его в сосуд, наполненный указанным раствором, либо поливкой органа, подвешенного на нитке к штативу.

Полиизобутилен, обладая большой адгезией к влажной поверхности препарата, прочно пристает к нему, сохраняя свою прозрачность, а будучи абсолютно гидрофобным, способствует сохранению влаги в органе или части тела. Покрытие надс производится несколько раз, причем каждый раз после высыхания предыдущего слоя, о чем можно судить по исчезновению запаха бензина или бензола. Для последнего покрытия следует употреблять полиизобутилен более высокого молекулярного веса (35 000—50 000). В результате образуется пленка полиизобутилена толщиной в 20—50  $\mu$ .

Для устранения сильного блеска поверхностный слой полибутилметакрилата покрывают тонким слоем специального нитроцеллюлозного матового лака (толщина 5—10  $\mu$ ).

В результате на поверхности препарата получается тонкая пленка, обладающая прозрачностью, бесцветностью, эластичностью, отсутствием блеска, прочностью, герметичностью (с точки зрения влажности препарата). Все эти свойства обуславливают длительное сохранение препаратом своего объема и влажности. Этому способствует синтетический каучук, который также обуславливает сохранение объема, влажности, эластичности, прижизненной окраски, т. е. естественного вида препарата. Поверхность препарата при этом остается сухой,

что позволяет хранить его без банок с жидкостью или герметических камер, а также брать препарат в руки для изучения анатомических деталей. В случае порчи препарата он легко реставрируется. Необходимые для приготовления препаратов реактивы легко доступны и недороги. Простота техники позволяет готовить препараты в массовом масштабе.

## II. ЗАКЛЮЧЕНИЕ АНАТОМИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ В ОРГАНИЧЕСКОЕ СТЕКЛО — ПЛЕКСИГЛАС

(М. Г. ПРИВЕС, И. С. ГИЛЬБО, В. М. КРЫЛОВА и И. М. ЕЗРИЛЕВ)

Впервые начала заключать органы в прозрачную пластическую массу (метилметакрилат) Сафронова, которая сделала устное сообщение в Московском обществе судебных медиков в 1947 г. К сожалению, способ Сафроновой не был опубликован в печати.

В иностранной литературе встречаются работы с описанием техники заключения анатомических препаратов в метилметакрилат. Эта техника сводится к постепенному проведению анатомических или биологических объектов через спирты, затем через метилметакрилат для вытеснения воды. После этого препарат заливают в специальных формах форполимером метилметакрилата и производят окончательную полимеризацию.

Однако повторить описанную в литературе технику оказалось трудно вследствие неполноты ее изложения. Часто получалось помутнение пластической массы на месте соприкосновения ее с поверхностью объекта. Для устранения этого недостатка мы разработали новую технику заключения анатомических объектов в плексиглас.

Эта техника состоит в следующем:

- 1) обычная консервация и подготовка препарата;
- 2) нанесение на препарат прозрачной пленки из полиизобутилена, как это описано выше; такая пленка препятствует выделению из препарата влаги, вызывающей помутнение органического стекла, и легко вступает в соприкосновение с метилметакрилатом, не вызывая помутнения его при полимеризации.
- 3) заливка препарата, покрытого полиизобутиленовой пленкой, в пластическую массу — органическое стекло (плексиглас).

Наиболее часто применяется пластическая масса акрилового ряда — метиловый эфир метакриловой кислоты (метилметакрилат). В жидком виде он называется мономером, в загустевшем — форполимером и в затвердевшем — полимером. При нагревании мономера или форполимера происходит процесс полимеризации, который внешне проявляется в превращении жидкого метилметакрилата в твердый.

Препарат, покрытый полиизобутиленовой пленкой, заливается форполимером в особых формах, процесс полимеризации в которых доводится до конца нагреванием в термостате. В результате получают прекрасные препараты, заключенные в прозрачную пластическую массу желаемой формы.

Такие препараты, изготовленные из небьющегося стекла, весьма прочны, чисты, красивы и удобны для пользования.

Применение их освобождает анатомические музеи от употребления стеклянной посуды (банки, витрины) и постоянной смены консервирующей жидкости.

### III. ИЗГОТОВЛЕНИЕ СУХИХ ПРЕПАРАТОВ ПУТЕМ ВЫСУШИВАНИЯ ИХ НАГРЕТЫМ ВОЗДУХОМ

(М. Г. ПРИВЕС, В. М. КРЫЛОВА, С. А. СЕЛИВАНОВСКИЙ)

В 1943 г. Н. С. Харченко опубликовал способ консервации анатомических объектов Брюнетти путем высушивания их горячим воздухом, продуваемым под давлением через кровеносную систему. Этот метод, несомненно, имеет большие достоинства, так как с его помощью получают сухие препараты, сохраняющие естественные форму, величину и строение.

Однако он имеет и недостатки, заключающиеся в следующем: при простом продувании горячим воздухом теряется прижизненная окраска препарата и органы приобретают однообразный цвет. Харченко для устранения этого недостатка вводил в кровеносную систему красители, растворенные в воде, но достигнуть таким путем подлинной прижизненной окраски ему все же не удалось. К тому же введение водного раствора краски делает препарат влажным, и он подвергается аутолизу.

Нами был разработан иной метод, сущность которого заключается в следующем.

После высушивания анатомических препаратов по модифицированному нами способу Харченко производится пропитывание их растворами высокомолекулярных органических соединений (натуральный или синтетический каучук, синтетические пластмассы), окрашенных органическими красителями.

Благодаря применению этих веществ препараты, высушенные по модифицированному методу Харченко, в отличие от полученных им, приобретают стойкость по отношению к влаге и к воздействию гнилостных факторов, эластичность и плотность, близкую к естественной, и прочность, допускающую возможность держать их в руках и использовать для практических занятий студентов.

Приводим описание нашего способа.

1. После обычной подготовки препарата (препарирование, отделение ненужных частей и т. п.) производится промывка кровеносной системы дистиллированной водой.

2. Препарат высушивается по модифицированному нами

методу Харченко. В артерию данного органа вставляется стеклянная канюля, соединенная резиновым шлангом с баллоном сжатого воздуха, пропускаемого через кровеносное русло под давлением 0,5—1 атмосферы. До поступления в артерию воздух из баллона проходит через медный змеевик, где нагревается до температуры 50—60°. Сам препарат помещается в термостат, где находится в течение нескольких часов при температуре 39—50°. Этим достигается нагревание проходящего через сосуд нагретого воздуха с высушиваемого органа.

3. Высушенный описанным способом препарат для придания ему естественной окраски пропитывают не водяными красками, как это делает Харченко, а раствором высокомолекулярных органических соединений (натурального или синтетического каучука и др.) в бензине. Этот раствор окрашивается органическими красителями, применяемыми в текстильной промышленности (прямой алой, оранжевый для капрона, коричневый для капрона и др.).

Получаемый таким образом окрашенный каучуковый клей инъецируется в артерию данного органа. Для вулканизации в него добавляются вулканизирующие агенты (сера, окись цинка, ультраускорители и пр.), благодаря которым каучуковый клей превращается в резину. Через 30—40 минут, когда наступает полное пропитывание высушенного органа окрашенным каучуковым клеем, избыток последнего удаляют из кровеносной системы путем отсасывания шприцем и продувания воздухом. После этого препарат оставляют на 10—12 часов для испарения бензина.

Применение бензинового раствора каучука вместо водного красителя выгодно в том отношении, что препарат хорошо высыхает, а использование каучука делает его эластичным и прочным.

4. Для предотвращения слипания стенок кровеносных сосудов до наступления полной вулканизации производят припудривание сосудистой системы мелкой пудрой путем повторного продувания воздуха вместе с пудрой.

Снаружи органы также смазывают раствором каучука в бензине и припудривают.

В результате получают сухие препараты, имеющие естественные форму, величину, окраску, мягкие и эластичные на ощупь, без какого-либо неприятного запаха, достаточно прочные.

Подводя итог всему изложенному, можно сказать, что советская анатомия располагает разнообразными методами изготовления сухих препаратов, сохраняющих естественные вид и строение. Эти методы удобны для индивидуального пользования и освобождают анатомические музеи от применения стеклянных банок, витрин, громоздких шкафов и постоянной смены дорогостоящих консервирующих жидкостей.

## ЛИТЕРАТУРА

Выводцев Д. Бальзамирование и способы сохранения анатомических препаратов и трупов животных. СПб., 1881. — Лауэр В. В. О способах примененных при бальзамировании тела В. И. Ленина. Кубан. науч. мед. вестн., IV, XXIV, 1924. — Мельников-Разведенков Н. Д. О новом способе приготовления анатомических препаратов. Мед. обозр., 278—281, 1899. — Степанова В. Н. Об изготовлении коррозионных препаратов из отечественного синтетического каучука. Сб. Пробл. сосуд. и нерв. связей, 1, 50, 563—579, 1953. — Харченко Н. С. Новый способ приготовления органо-терапевтических препаратов. Тр. Киргизск. гос. мед. ин-та, 1, 1943. — Шор Г. В. К вопросу о приготовлении анатомических препаратов. Мед. обозр., 62, 18, 398—402, 1904. — Corbone and others. The plastic ethyl methacrylate in routine laboratory technic. Stain. Tech., 17, 75—78, 1942. — Passett D. Z. Ethyl methacrylate as a preserving medium for gross anatomical serial sections. Anat. Rec., 99, 145—150, 1947. — Patterson, Robert C. The use of unsaturated polyester resins for embedding biological material. Anat. Rec., 98, 87—92, 1947. — Puckett W. O. The methacrylate plastics as mounting media for biological. Anat. Rec., 80, 453—463, 1941. — Puckett W. O. Ethyl methacrylate as a mounting medium for embryologia specimens. Science., 91, 625—626, 1940. — Romaniar T. The use of unsaturated polyester resins for embedding biological material. Ward's Natural Science Bull., 20, 39—42, 1947.

---

## МАКРОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ И СТЕРЕОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОНСТРУКЦИИ ОРГАНОВ

Д. А. ЖДАНОВ  
(Ленинград)

Отечественная морфология всегда пользовалась новыми и оригинальными методами исследования. Нельзя не отметить глубокое понимание значения их для развития науки о строении нервной системы, которое издавна проявляли представители отечественной морфологии. В 1870 г. русский гистолог Рудановский писал: „Историческое понятие о строении нервной ткани указывает, что оно тесно связывается со способом ее исследования. Ни в одном отделе гистологии последний (способ исследования) не оказывает такого поработщающего влияния на выводы автора, как в отделе о нервной системе“.

А. П. Вальтер, В. А. Бец, В. М. Бехтерев, А. С. Догель, С. А. Суханов, Б. И. Лаврентьев явились новаторами методов исследования морфологии центральной и периферической нервной системы.

Отечественной анатомии принадлежит инициатива широкого применения макромикроскопических методов исследования. Решающее значение здесь имели новаторские исследования В. П. Воробьева периферических экстраорганных и интрамуральных вегетативных сплетений и узлов.

Одним из первых применив бинокулярную лупу, точнее препаративный стереоскопический микроскоп типа Грену, в нейроморфологических исследованиях, В. П. Воробьев начал создание стереоморфологической методики изучения конструкции органов, устанавливающей взаимоотношения между целым органом и его частями, а также между отдельными элементами органа.

Макромикроскопическое исследование, как оно сложилось в лаборатории В. П. Воробьева, особенно после 1922 г., это — не случайный набор эмпирически найденных технических приемов, а основанная на знании современной физики и химии система применения новейшей оптики, избирательных окрасок различных тканей, рациональных фиксаторов, способов просветления, приемов просветления и высокого мастерства



тонкой препаровки. В. П. Воробьев развил предложенный Догелем метод скрашивания нервов метиленовой синью. Его сотрудники Кондратьев, Шабадаш, Вольтинский, Синельников и др. усовершенствовали этот метод и, что особенно важно, поставили применение его на прочную базу биохимического анализа избирательной окраски нервной ткани.

Начав с периферического отдела нервной системы, В. П. Воробьев распространил методы макромикроскопического исследования на скопления клеток и на проводящие пути центральной системы. Известно, что он научился препарировать окрашенные пучки волокон в целом препарате спинного мозга, изучать форму и микротопографию клеток на продольных разрезах больших отрезков спинного мозга.

Всем известно огромное значение многолетних работ В. П. Воробьева, посвященных иннервации сердца.

В. П. Воробьев, и особенно его ученики — Синельников, Отелин и др., распространили макромикроскопическую методику исследования на лимфоидные узелки кишечника, железы кожи и слизистых оболочек пищеварительного тракта, дыхательных путей, мочеполовых органов, конъюнктивы глаза, слизистой оболочки полостей органа слуха и т. д.

Развитие макромикроскопических методов исследования должно быть направлено на пересмотр и уточнение представления о пространственных трехмерных конструкциях органов, структурно отражающих их функции.

Существующие представления о конструкциях органов (костей, легких, щитовидной железы, печени и др.) еще весьма неточны. Между тем И. П. Павлов требовал изучать значение каждой части тела, чтобы правильно понять жизнедеятельность всего организма человека. Органы, составляющие тело живого человека, взаимодействуют, как указывал И. П. Павлов, „в сфере организма, приспособляясь к деятельности своих бесчисленных сожителей и к общим условиям внутренней среды организма“.

Однако не следует забывать, что каждый орган является специфической частью целого организма. Поэтому орган сам — целостное образование, характеризующееся особым положением в теле, только ему принадлежащей формой, своеобразным строением, нервными и сосудистыми связями и индивидуальной, присущей только ему, функцией.

Поэтому для анатома в строении органа первостепенный интерес должна представлять конструкция его, т. е. способ объединения структурных элементов органа, таких, как остеоны в костях, хондроны в хрящах, пучки мышечных волокон в мышцах, дольки печени и других желез, ацинусы или первичные дольки в легком, нефроны в почках и т. д. В объединении отдельных структурных элементов в целостную конструкцию большое значение имеет внутриорганный архитектура крове-

носных и лимфатических сосудов органа и его иннервация, а также конструкция стромы органа как целого. В самом деле, для физиологии органов и для патологических процессов, происходящих в нем, важна, например, архитектура чувствительной иннервации органа как целого, эффекторная — двигательная или секреторная иннервация. Большое значение имеет конструкция соединительной ткани стромы органа для течения патологических процессов в нем.

Конструкция органа является отражением его функций и сама определяет многие стороны этих функций в условиях нормы и патологии. Доказательства этого можно найти в классических исследованиях П. Ф. Лесгафта по функциональной характеристике конструкции скелетных мышц. Патологическая анатомия учит, что локализация и способ развития патологических процессов в органах, наряду с другими факторами, определяется конструкцией органа, т. е. способом объединения структурных элементов, его составляющих. Понять ацинозный туберкулез легких, дегенеративные процессы в печени, локализацию и распространение поражений нефронов при нефритах, направления переломов костей невозможно без учета конструкции этих органов. Особенности патологии правой и левой половин печени стоят в связи с различной архитектурой кровеносных сосудов и неодинаковыми условиями кровообращения в них (И. В. Давыдовский). Все глубже раскрывается роль артерио-венозных анастомозов в норме и патологии. Локализация и распространение туберкулезных и раковых поражений легкого вытекают из архитектуры и функции кровеносной и лимфатической систем этого органа.

Поэтому стереоморфологическое установление правильных, исходящих из принципа единства части и целого взглядов на конструкции органов является одним из важнейших условий синтетического понимания взаимоотношений строения и функции органов в целостном организме в различных условиях его существования.

В настоящее время макромикроскопические методы стереоморфологического исследования широко применяются советскими учеными. А. Л. Шабадаш разработал способы изучения конструкции целых костей. Александров сделал ценные наблюдения по архитектонике соединительнотканых футляров органов, фасций и сосудисто-нервных влагалищ. Активно изучаются мышечные и соединительнотканые конструкции стенок внутренних органов и стенок кровеносных и лимфатических сосудов. Продолжаются работы Р. Д. Синельникова с сотрудниками, Отелина и др. по макромикроскопической анатомии желез кожи и слизистых оболочек. Весьма интенсивно, в том числе макромикроскопическими рентгеновскими способами, исследуется внутриорганный кровоснабжение органов М. Г. Привесом и его помощниками. Клоссовский объединил

макромикроскопический метод исследования кровеносных сосудов мозга с прямым экспериментальным изучением физиологии этой чрезвычайно важной области кровообращения. Плодотворно продолжается макромикроскопическое изучение иннервации различных органов в работах ряда анатомических кафедр. В последнее время Отелин применяет макромикроскопические методы исследования для экспериментального изучения различных рецепторов.

Пример В. П. Воробьева должен поддерживать стремление к новаторской инициативе в развитии методов и техники исследования. Следует помнить слова И. П. Павлова: „Часто говорится, и недаром, что наука движется толчками, в зависимости от успехов, делаемых методикой. С каждым шагом методики вперед мы как бы поднимаемся ступенью выше, с которой открывается нам более широкий горизонт, с невидимыми раньше предметами“.

Советские анатомы непрерывно совершенствуют макромикроскопические методы исследования. Большого совершенства достигла препаровка в поле зрения бинокулярной лупы. Хорошим инструментом для этого является новый советский стереоскопический микроскоп МБС-2. Тонкие ветвления нервов препарируются в воде или под падающей каплей по Воробьеву. Для орошения падающей каплей используется вода или 0,5% раствор уксусной кислоты. Препаровка нервов отличается специальной подготовкой трупного материала: погружением в воду на 2—3 дня с последующим погружением на 2—24 часа в 0,25—0,5% раствор уксусной кислоты и промывкой водопроводной водой; продолжительным вымачиванием (до 4—6 недель) в 1—3% растворе уксусной кислоты; созданием искусственного отека для лучшего разрыхления тканей путем инъекции в артериальное русло (после промывки сосудов от крови) избыточного количества воды; введением слабого раствора уксусной кислоты. Во время препаровки препараты полезно сохранять в растворе 1 части уксусной кислоты и 2—5 частей формалина на 100 частей воды.

Для фотографирования и монтировки музейных препаратов под отпрепарованные нервы следует подкладывать полоски пропитанного желатиной шелка после 2—4-часового кипячения его в 5% растворе уксусной кислоты.

Расщепление нервных стволов на пучки нервных волокон в целях исследования внутривольного строения нервов производится обычно на матовом стекле в проходящем свете от электрических ламп, заключенных в ящик, верхней стенкой которого является это матовое стекло.

Н. И. Одноралов предложил для более точной дифференцировки нервных пучков при разволокнении нерва окрашивать нервные волокна азотнокислым серебром. После промывки нерва в течение 24 часов в проточной воде его переносят на сутки в 20% раствор поваренной соли и снова промывают в

течение суток в проточной воде и полчаса-час в дистиллированной воде. Затем берут источник постоянного тока из 20—30 соединенных последовательно сухих элементов, центральный конец нерва присоединяют к аноду, другой конец нерва, присоединенный к катоду, как и сам катод, погружают в 20% раствор азотнокислого серебра.

Когда нервные пучки почернеют, препарат ополаскивают 3—5 минут в дистиллированной воде, а затем переносят на 1—2 суток в глицерин.

Применяют и более сложные способы подготовки к препаровке нервов, например способ Пермана: погружение препарата на 24 часа в 1% раствор уксусной кислоты, промывка и погружение на 20—40 минут в 6% раствор карболовой кислоты, промывка и погружение на 24 часа в насыщенный раствор пикриновой кислоты, после чего производится препаровка нервов.

На кафедре анатомии 2 МГМИ им. Сталина под руководством проф. П. П. Дьяконова с успехом изучалось расщеплением препаровальными иглами под бинокулярной лупой под падающей каплей воды строение мышечного слоя кровеносных сосудов после мацерации фиксированных в 5—10% растворе формалина препаратов в 30% водном растворе соляной кислоты и спирта.

Для макромикроскопической препаровки гладкой мускулатуры трахей и бронхов Миллер (1940) фиксировал трахею в алкоголе по Ранвье 36—48 часов, отделял слизистую оболочку и адвентицию и погружал препарат в 50% раствор глицерина, окрашенный в темнокрасный цвет пикрокармином. Из этого раствора препарат переносился в чистый глицерин, в котором и производилась окончательная тонкая препаровка мышечных пучков и их изучение.

В последние годы С. Б. Дзугаевой развит метод препаровки проводящих путей мозга расщипыванием. Перед препаровкой пучков белого вещества мозга по методу расщипывания она обрабатывала мозг следующим образом.

Свежий мозг фиксировался в 2—3% формалине в течение 3 дней; в 5% формалине — 5 дней; в 10% формалине — 15 дней; в 15% формалине — 15 дней.

После этого снимались оболочки, мозг промывался 3—5 минут проточной водой и на 3—5 дней погружался в раствор, который придает мозгу эластичность, растяжимость и легкую расщипываемость.

Раствор готовился следующим образом: на 1 л 60% спирта прибавляли 20,0 мл дымящейся соляной кислоты, 20,0 г поваренной соли и 1,0 г пепсина.

Пепсин расщепляет белки межклеточной ткани, скрепляющей отдельные пучки нервных волокон, вследствие чего они легче отделяются друг от друга.

Стереоморфологическое исследование широко использует методы избирательной окраски различных тканей суправитально на целых животных, на органах и частях тела и на тотальных макромикроскопических препаратах.

Особенно широко развились в СССР методы избирательной окраски нервной ткани метиленовой синью. Они описаны в известной книге В. П. Воробьева (1925), книгах А. Л. Шабадаша (1936, 1939), статьях Воынского (1948) и др.

Ф. А. Воынский для окраски суправитальной инъекцией применяет метиленовую синь в прописи: рингер-локковского раствора 4000,0; метиленовой сини -- 1,0; перекиси магния — 5,0.

Препараты, взятые от мертвых животных, окрашиваются с применением физиологического раствора.

На анатомических препаратах хорошие результаты дают способы А. П. Журавлева: 1) окраска в меняющемся каждые 2 часа насыщенном водном растворе метиленовой сини после предварительной 10—15-часовой обработки в 1% железистом купоросе и 2) окраска метиленовой синью с нейтральной красной с добавлением сернокислой магнезии.

Р. Д. Синельников (1948) подчеркивает, что наилучшее выявление нервных клеток вегетативных узлов удается обработкой метиленовой синью в концентрации от 0,1 до 0,02% в присутствии 0,12—1% уксусной кислоты.

Для успеха работы с метиленовой синью важны рациональные способы фиксации окраски нервных элементов (Шабадаш, 1930; Синельников, 1948; Воынский, 1948).

Очень ценным и многообещающим является метод прижизненной микроскопии процесса окрашивания нервных элементов кишечника и других органов, разработанный А. А. Вишневым и Б. И. Лаврентьевым.

Мы в исследовании иннервации грудного протока и крупных лимфатических сосудов (1947) впервые применили импрегнацию серебром на тотальных препаратах сосудистой стенки.

В последнее время некоторые авторы (А. П. Маслов, 1950) комбинируют тотальную окраску нервной системы метиленовой синью с последующей фиксацией в жидкости „АФА“ Б. Н. Лаврентьева, перефиксацией в нейтральном 20% формалине и дальнейшей обработкой срезов, изготовленных на замораживающем микротоме, серебром по Гросс-Бильшовскому.

Макромикроскопические препараты элективно окрашенных желез слизистых оболочек и кожи готовятся по Синельникову погружением препарата на 20—30 часов в 0,25% водный раствор метиленовой сини, в которую добавляется ледяная уксусная кислота из расчета 0,25—0,5%. Препараты фиксируются в течение 24—30 часов в насыщенном растворе пикриновокислого аммония, просветляются и хранятся потом в смеси равных частей фиксатора и химически чистого глицерина.

А. А. Отелин окрашивал железы кожи в 0,25% растворе метиленовой сини в течение 10—15 минут.

Тотальные препараты серозных оболочек с инъцированными сосудами или импрегнированными разветвлениями нервов полезно дополнительно окрашивать для выявления других тканевых структур железным триоксигематинном, слабым раствором фуксина или анилиновой сини, или по Ван-Гизону.

Техника тотального микроскопического изучения строения серозных оболочек детально разработана на кафедре гистологии 1 МОЛМИ.

Шамаева (1952) готовит тотальные препараты брюшины следующим образом.

Препарат фиксируют в 10% нейтральном формалине и промывают 12 часов в водопроводной и дистиллированной воде. Затем его обрабатывают 70° спиртом в течение 20—30 минут и 1—12 часов красят орсеином, после чего дифференцируют в нескольких порциях 96° спирта, пока спирт не перестанет окрашиваться. Препарат затем промывают в дистиллированной воде в течение 1—12 часов и окрашивают 3—10 минут в железном триоксигематине, споласкивают в дистиллированной воде и оставляют в проточной воде на ночь. После этого его окрашивают в течение 3—4 минут в анилиновой сини, промывают несколько раз в сменяющейся дистиллированной воде и обрабатывают 2—3 порциями 96° спирта, а потом оставляют на ночь в абсолютном спирте. После 2-часового пребывания в карболксиллоле и обработки 1—2 минуты ксилолом препарат заключают в канадский бальзам (см. Барон, 1949).

Наряду с применением стереоскопических микроскопов и бинокулярных луп различных конструкций, большое значение для стереоморфологических исследований приобрели разработанные на кафедре гистологии 1 МОЛМИ методы микротрахископии или микроскопирования рельефа (подробно см. Роскин, 1951; Барон, 1949).

В последние годы значительно усовершенствованы методы исследования внутриоргана кровоснабжения. Однако еще недостаточно обсуждены задачи этого исследования, недостаточно подчеркнута, что в свете современных требований нельзя ограничиваться только инъекцией артерий. Должны одновременно изучаться артерии, капилляры и вены органа как элементы его конструкции, т. е. в единстве с функциональными тканевыми структурами органа.

Среди новых технических приемов инъекции следует указать физиологически обоснованный способ одновременной инъекции нескольких источников кровоснабжения органа или области тела различными красками при одинаковом нормальном давлении с помощью аппарата В. Н. Терновского и В. Н. Мурата (1949).

Новым является также прием инъекции вен конечностей

уколом пункционной иглы в губчатое костное вещество коротких костей, эпифизов и метафизов длинных костей, плоских костей (А. Г. Федорова, 1952).

Для инъекции артерий и вен предложено много различных жидких горячих и холодных жидких застывающих масс (см. Р. И. Венгловский, 1906; В. П. Воробьев, 1932; Ромейс, 1953).

Остановлюсь лишь на некоторых новых предложениях отечественных анатомов.

Многие авторы инъцируют кровеносные сосуды органов водной взвесью туши. Огнев использовал для этого дилатированную тушь.

Давно применяются для тонкой инъекции кровеносных сосудов, включая кровеносные капилляры, разведенная в желатине тушь или берлинская лазурь. М. Э. Комахидзе (1949) предложил для инъекции кровеносных капилляров массу, состоящую из 10% желатины, смешанной с жидкой тушью, которая разведена равным количеством 10% раствора лимоннокислого натрия.

Техника изготовления синей желатиновой массы для инъекции сосудов детально разработана на кафедре гистологии 1 МОЛМИ (цит. по Шамаевой, 1952).

25,0 г берлинской сини в течение 15—20 минут растирают в ступке с небольшим количеством глицерина. Полученную кашицу разводят 600 мл дистиллированной воды и фильтруют через крупнопористую фильтровальную бумагу.

50,0 г пищевой желатины помещают на сутки в дистиллированную воду, отжимают руками и растворяют на водяной бане при температуре 45—50°. На 500 мл желатины прибавляют 40 мл глицерина и 3,0 г хлоралгидрата.

Взвесь берлинской сини смешивают с желатиной. Для предупреждения коагуляции при этом сначала 10 мл горячей взвеси берлинской сини прибавляют к 10 мл теплой (40°) желатины. Получившуюся смесь прибавляют к остальной желатине. К уже окрашенной желатине добавляют остальную теплую (50°) взвесь берлинской сини.

Массу фильтруют через фланель в воронке с подогреванием. Для „созревания“ массы ее выливают тонким слоем на несколько суток в большой плоский сосуд, а потом вновь расплавляют в банке с притертой пробкой при температуре не выше 50°.

Качество массы определяют контролем величины частиц под микроскопом и погружением кусочка массы в воду: вода не должна окрашиваться.

Киноварную массу для тонкой наливки артерии готовят растиранием 10—15 г порошка киновари в нескольких каплях глицерина и постепенным перемешиванием в 1000 мл 5—10% геля желатины (Шандлер, 1951).

Для тонкой инъекции сосудов применяются также разно-

цветные целлоидиновые массы, а для тончайшей инъекции кровеносной системы — масса Герота в модификации А. Т. Акиловой (1944). Эту массу получают разведением 20—30 мл масляной краски „прусской синей“ в 50 мл хлороформа. О. А. Дербенев (1953) для тех же целей использовал взвесь масляной краски „газовая сажа“ в смеси равных частей хлороформа и эфира. В модификации Ф. В. Судзиловского (1953) „газовая сажа“ разводится только эфиром.

Новым достижением советской анатомической техники является предложенный В. А. Белянским (1948) метод тотальной одномоментной окраски кровеносных сосудов, основанный на окраске интимы. Сначала кровеносные сосуды промывают 4—5% раствором сернистого натрия. Через известный промежуток времени в артериальное русло вводят 4—5% раствор уксусного свинца. Интиму окрашивают осадком сернистого свинца (PbS).

С. В. Ишаков (1953) исследовал кровоснабжение компактного костного вещества, помещая мацерированные и обезжиренные кости в колбу, наполненную 2% раствором хлорного золота. При нагревании в условиях пониженного давления под отсасывающим насосом раствор проникает в гаверсовы каналы, а при понижении температуры золото осаждается на их стенках в виде темнофиолетового налета. Кости далее декальцинируются и просветляются в глицерине.

Аналогичным способом Рат (1947) окрашивал гаверсовы каналы 40% раствором индийской туши.

Рентгенография крупных артерий производится после инъекции их массами, содержащими, например, серноокислый барий, смешанный с желатиной, мукой и мелом.

Многочисленные исследователи для инъекции артерий с последующей рентгенографией их применяют свинцовый сурик, растертый в вазелиновом масле и разведенный скипидаром и бензином, или тонкотертые масляные краски — свинцовые белила и свинцовую оранжевую краску, разведенные скипидаром и бензином. Некоторые авторы применяют для этого желтую свинцовую гуашь. На кафедре топографической анатомии 1 МОЛМИ для инъекции артерий применяется контрастная масса, состоящая из 1 весовой части тонкотертой эскизной краски — свинцовых белил или свинцовой оранжевой,  $\frac{1}{2}$  весовой части вазелинового масла и 1 весовой части скипидара. Н. В. Крылова (1952) в качестве контрастной массы предложила водный раствор темпера-декоративной свинцовой желтой казенномасляной краски. Краска смешивается с водой в пропорции 1:2 по объему. А. И. Новицкий применяет для инъекции артерий мозга массу, содержащую масляную краску — жженая кость — 30 г и масляные свинцовые белила — 70 г, разведенные в 126 мл скипидара.

Заслугой советских анатомов является разработка методов



прямой и внутритканевой инъекции лимфатических сосудов на трупах и физиологической инъекции лимфатической системы у животных.

Техника инъекции лимфатических сосудов подробно изложена мной в книге „Функциональная анатомия лимфатической системы“ (1940). Здесь я остановлюсь главным образом на инъекционных массах, применяемых для окраски внутриорганных лимфатических сосудов.

Из водных взвесей чаще всего мы применяем черную тушь, иногда с добавлением глицерина, например в прописи Пожарского (1929): 12 мл жидкой туши разводится 12 мл физиологического раствора и 1—2 мл глицерина.

Из коллоидных красок мы применяем 15—30% разведение колларгола, а для физиологических инъекций — 2% водный раствор трипановой сини.

Л. Д. Губский (1948) предложил „лимфотраст“ в двух модификациях: 1) колларгола — 5,0; сергозина — 2,0; 20% раствора глюкозы — 15,0; 2) колларгола — 8,0; сергозина — 5,0; очищенного спирта — 10,0; дистиллированной воды — 5,0.

Мы широко применяем различные желатиновые массы, в частности по заново разработанным нами рецептам белую и желтую свинцовые желатиновые массы Тейхмана.

Основными в инъекции лимфатических сосудов остаются синяя масса Герота и желтая масса Стефаниса. Для полихромной инъекции, наряду с ними, мы употребляем красную и черную массы Герота, зеленую массу Стефаниса, красную суриковую массу, красную краплаковую массу, белую массу из тертых свинцовых белил и массы, приготовленные по типу Герота и Стефаниса из других масляных красок.

В последнее время для инъекции лимфатических сосудов мы применяем целлондиновые массы, пластмассы и окрашенный севанит.

Как тотальные элективноокрашенные препараты, так и препараты макромикроскопической инъекции сосудов должны быть просветлены.

Для просветления этих препаратов мы пользуемся главным образом простым способом проводки. После фиксации в 5—10% формалине препараты в течение 4—10 часов отбеливаются в 3% перекиси водорода, после чего длительно промываются в воде и проводятся через 75°, 96° спирты, абсолютный спирт и бензол. Препараты выдерживаются в этих средах по 2—4 дня и затем просветляются в ксилоле или в метиловом эфире салициловой кислоты. После этого препараты заделываются в полистирол. Техника заделки просветленных макромикропрепаратов в полистирол детально разработана на нашей кафедре В. Н. Надеждиным.

Для работы удобнее всего пользоваться двумя растворами полистирола в ксилоле: в концентрации 30 и 15%. Вначале

готовится первый раствор, а затем разведением его — второй. Для приготовления первого раствора сухой измельченный полистирол помещают в стеклянный сосуд с притертой пробкой и заливают ксилолом. Через сутки массу в сосуде перемешивают стеклянной палочкой; на третьи сутки еще раз перемешивают до полного растворения полистирола. Подогревание ее в термостате или на водяной бане до  $35^{\circ}$  ускоряет процесс растворения полистирола. После того как из массы отойдут все пузырьки воздуха, ее следует профильтровать через марлю.

Оба раствора хранятся в стеклянных сосудах с притертыми пробками. Для работы оба раствора необходимо предварительно разлить в тубусы, которые обычно применяются в химической промышленности или парфюмерии для расфасовки тонкотертых масляных красок или различных кремов и паст. Это очень важно, так как метод „накапывания“ на препарат непосредственно из сосуда или при помощи стеклянных палочек непригоден. При накапывании ток массы трудно дозировать, неизбежно „загрязнение“ раствором полистирола периферических частей предметного стекла, внесение пузырьков воздуха и пыли в массу, окружающую препарат.

Все эти недостатки совершенно устраняются работой с раствором полистирола, заключенным в тубус, — масса становится „послушной“ и по желанию вытекает из тубуса непрерывной струей или каплями.

Стекла для заделки препарата должны быть совершенно прозрачны, что достигается обработкой их растворами кислот, щелочей и ксилолом. Площади предметного и покровного стекол должны находиться в строгой зависимости от величины заделываемого препарата. Стекла режут с таким расчетом, чтобы от любого края препарата до края предметного стекла было расстояние не менее 2 см, а до края покровного стекла — 1 см.

Предназначенный к заделке просветленный препарат непосредственно перед этим на несколько минут погружают в ксилол, чтобы удалить излишек метилового эфира салициловой кислоты, так как его присутствие задерживает уплотнение полистирола. Пребывание препарата в ксилоле необходимо использовать для удаления из него посторонних частиц, пузырьков воздуха и его окончательной монтировки.

На предметное стекло наносят второй, т. е. более жидкий раствор полистирола, общей площадью соответствующий  $\frac{2}{3}$  площади, занимаемой препаратом. После этого, начиная с одного края, постепенно погружают препарат в раствор, придавая ему центральное положение на стекле. Далее на его поверхность наносят слой того же раствора с расчетом, чтобы он покрыл всю поверхность препарата, обращенную к работающему. Затем накладывают покровное стекло на препарат

так, чтобы от любого края его до соответствующего края покровного стекла было расстояние не менее 1 см.

Последнее важно для предупреждения проникновения воздуха в пространство между препаратом и стеклами.

После заделки препарат помещают в открытую ванночку или коробку с плоским дном. Ванночку покрывают сверху одним или двумя слоями марли, для того чтобы, препятствуя проникновению пылевых частиц, которые легко впитывает в себя свежий раствор полистирола, дать возможность свободному обмену воздуха для испарения ксилола. Через сутки заделанные микропрепараты уже годны для исследования.

При заделке макропрепаратов толщиной до 0,5 см нужно дополнительно пространство между краем препарата и двумя стеклами заполнить первым, т. е. более густым (30%), раствором полистирола.

В зависимости от величины и толщины препарата последнюю манипуляцию приходится повторить от 1 до 3 раз, через сутки. По истечении нескольких суток препараты годны к употреблению. Лишний полистирол за краем покровного стекла удаляют ножом. Лучше срез проводить отступя 2—3 мм от края покровного стекла.

Не следует применять давление на препарат „грузиками“.

Препараты толщиной свыше 0,5 см надо заделывать в готовую стеклянную камеру или изготовленную из обрезков стекла при помощи жидкого стекла или полистирола. Размер покровного стекла должен быть меньше дна камеры, чтобы была возможность доливать первый раствор полистирола в камеру.

Быстрый способ просветления применил также Малыгин. Он проводил кусочки инъицированных препаратов стенки полых органов последовательно через растворы № 1, 2, 3, 4, оставляя их в каждом растворе по 3 часа при температуре 37°. Состав раствора № 1: спирта 96° — 200,0 мл; ацетона — 40,0 мл; хлороформа — 40,0 мл; эфира — 120,0 мл; ледяной уксусной кислоты — 20,0 мл; № 2: абсолютного спирта — 240,0 мл; ацетона — 80,0 мл; хлороформа — 40,0 мл; эфира — 40,0 мл; № 3 и 4: абсолютный спирт.

Затем препарат переносили на 3 часа при комнатной температуре 16—18° в 500,0 мл смеси равных количеств абсолютного спирта и эфира. В заключение препарат окончательно просветлялся в метиловом эфире салициловой кислоты, где и сохранялся.

Техника изготовления коррозионных препаратов давно достигла в нашей стране большой высоты (А. А. Красуская, 1934). В последнее время больших успехов в применении целлулоидных коррозионных масс добилась А. Т. Акилова (1944).

Для коррозии с успехом применяются пластмассы. Геселевич (1946) первым применил для коррозии полиметилметакрилат, т. е. органическое стекло или плексиглас. Его примеру

последовали Иоффе (1949), Гильбо (1950). Подробно этот вопрос освещен в статье М. Г. Привеса (1952).

Заслугой В. Н. Степановой (1953) является использование для изготовления мягких коррозий кровеносных сосудов отечественного синтетического каучука или севанита — нейрита. Он замечателен тем, что коагулирует и уплотняется при действии вытравливающей ткани кислоты (75% раствора соляной кислоты) или щелочи (35% раствора едкого кали).

На нашей кафедре, начиная с 1949 г., для инъекции внутриорганный лимфатической системы с успехом применялся севанит. Микрокоррозии наполненных севанитом лимфатических капилляров и мелких отводящих лимфатических сосудов весьма красивы. Полезно изготовление двойных микрокоррозий: мягких севанитовых коррозий лимфатических капилляров и сосудов на твердых целлулоидиновых коррозиях кровеносной системы органа, например почки.

Севанит может быть окрашен различными красками. На кафедре анатомии I ЛМИ в качестве мягкой коррозионной массы применяется темпера в смеси с равным объемом севанита. Использование макромикроскопических методов исследования на основе понимания конструкции органа как целостной системы, структурно отражающей функции органа, позволило представить ряд новых данных по внутриорганный анатомии лимфатической системы человека и животных (Жданов и сотрудники, 1951; Жданов, 1952; Жданов и сотрудники, 1953, 1954).

Раньше авторы изучали лимфатические сосуды вне связи с другими элементами кожи. Мы изучили сети лимфатических капилляров и сплетения лимфатических сосудов кожи, рассматривая архитектуру лимфатической системы в единстве со всей конструкцией кожи, обусловленной ее сложными функциями.

Для этого мы (Жданов и др., 1952) одновременно с инъекцией лимфатических сосудов инъцировали кровеносные сосуды кожи, а также макромикроскопически выявляли железы кожи. Наряду с изучением лимфатических и кровеносных сосудов на тотальных просветленных препаратах, мы исследовали гистотопографию и взаимоотношения сосудов в различных слоях кожи на толстых просветленных срезах, проведенных перпендикулярно или параллельно поверхности тела или на толстых и тонких микроскопических срезах инъцированных кусочков кожи, окрашенных различными гистологическими методами.

Строение кожи как органа в различных местах характеризуется специфическими особенностями. Естественно, что функционально-анатомические особенности кожного покрова отдельных областей тела отражаются в архитектуре и степени развития лимфатических капилляров и сосудов. Здесь имеют значение толщина кожи, форма и величина сосочков кориума,

количество волос, потовых и сальных желез. В местах, подвергающихся усиленному давлению, например на подошве, лимфатические сети особенно хорошо развиты, имеют как бы резервы емкости и резервные пути оттока.

Направления главных каналов поверхностной и глубокой сетей лимфатических капилляров определяются преимущественной ориентацией соединительнотканых пучков корнума, соответствующей линиям натяжения кожи. Корнум не является беспорядочным сплетением пучков соединительнотканых волокон, а имеет закономерное строение, отражающее функции основного слоя кожи. Совпадение преимущественной ориентации соединительнотканых пучков корнума с преимущественным направлением каналов сети лимфатических капилляров складывается по ходу гистогенеза и формообразования кожи под влиянием общих условий функции кожи.

Интересные данные представлены В. Н. Надеждиным по внутриорганной архитектуре лимфатических сосудов двигательного аппарата. Они говорят, например, что лимфатические капилляры отсутствуют между отдельными мышечными волокнами и находятся только между мышечными пучками. Соответствующие данные получены Кефели на мышцах глазного яблока.

Подробно изучены особенности лимфатических сетей брюшины, плевры и перикарда.

Изучены лимфатические капилляры и сосуды на фоне общей картины строения пищевода, желудка, тонкой и толстой кишок. Составлены схемы конструкции стенки этих отделов пищеварительной трубки.

Изучена внутриорганная лимфатическая система легкого, сердца, почки, матки, печени и ряда других внутренних органов в единстве с архитектурой кровеносных сосудов и конструкцией этих органов в целом.

На фоне тканевой структуры органа на значительном количестве препаратов инъекции кровеносной и лимфатической систем на основе многочисленных обработанных вариационно-статистическим методом измерений калибра сосудов, относительной насыщенности ими различных мест органов, размеров петель сплетений и сетей, глубины залегания лимфатических сосудов объединяются в одно целое структурные и функциональные элементы органа.

На схемах архитектуры кровеносной и лимфатической системы все элементы конструкции органа представляются в одном согласованном масштабе. В дальнейшем изучаются возрастные изменения конструкции органа.

Это требует кропотливой работы, но она нужна, так как правильные представления о конструкциях органов должны помочь лучше понять функции их как целостных систем, которые в условиях патологии могут мобилизовывать в организме свои внутренние ресурсы.

Макромикроскопические исследования могут и должны вестись как у человека в различные стадии индивидуального развития, так и сравнительноанатомически, т. е. в историческом плане и при экспериментально измененных условиях жизнедеятельности организма в целом или функций отдельных органов. Тогда эти исследования помогут решению важнейших стоящих перед морфологической наукой задач — исследования развития тканей и органов, объединенных нервной регуляцией в целостном организме в различных условиях его существования; изучения формообразующих факторов внешней среды и функции в филогенетическом и онтогенетическом развитии организмов на основе раскрытия ведущей роли нервной системы в механизмах действия этих факторов.

#### ЛИТЕРАТУРА

Акилова А. Т. Методика изготовления коррозионных препаратов сосудов. Тр. ВММА., III, 2, 73—80, 1944. — Барон М. А. Реактивные структуры внутренних оболочек, 1949. — Белянский В. А. Метод тотальной и одномоментной краски кровеносных сосудов. Труды Всесоюзн. об-ва физиологов, биохимиков и фармакологов, I, 77—78, 1952. — Венгловский Р. И. Приготовление анатомических препаратов, Хирургия, XIX, 124—145, 1906. — Воробьев В. П. Methodik der Untersuchungen von Nerven-Elementen des makro- und makromikroskopischen Gebietes. Berlin, 1925. — Волынский Ф. А. Об окраске вегетативной нервной системы. Врач. дело, 4, 351—354, 1948. — Геселевич А. М. Способ получения вытравленных макромикроскопических препаратов — слепков из пластической массы. Л., 1946. — Зелькин И. Ю. К методике регистрации размеров различных образований, снятых на микрофотограмме или срисованных с микроскопа. Журн. общ. биол., X, 6, 480—484, 1949. — Золотухин А. С. Рентгеноангиология. Л., 1934. — Иоффе И. Опыт применения органического стекла для изготовления коррозионных препаратов. Врач. дело, 8, 1949. — Красуская А. А. Техника коррозионных и просветленных препаратов. Изв. Научн. ин-та им. П. Ф. Лесгафта, XVII—XVIII, 5—44, 1934. — Крылова Н. В. и Харкевич Д. А. Новая контрастная масса для изготовления рентгеноанатомических препаратов. Научн. конф., посв. анат. периф. нервной и сосуд. систем, Л., 1952. — Отелін О. А. Методика макромикроскопического вивчення залоз шкіри за В. И. Воробьевым. Наук. Зап. Львівського Держ. унів., VIII. Серія біол., 4, 63—73, 1948. — Привес М. Г. К методике анатомического исследования сосудов. Арх. анат., гистол. и эмбриол., XXIX, 2, 60—63, 1952. — Привес М. Г. Метод томографии в изучении артериальной системы. Вестн. рентгенол. и радиол., 2, 64—68, 1952. — Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953. — Роскин Г. И. Микроскопическая техника. М., 1946. — Синельников Р. Д. Метод определения топографии внутриствольных узлов и отдельных клеточных скоплений в нервных стволах. Сб. Материалы к макромикроскопии вегетативной нервной системы и желез. 205—211, 1948. — Синельников Р. Д. Метод окраски желез слизистых оболочек и кожи. Там же, 401—405, 1948. — Терновский В. Н. и Мурат В. Н. О методике изучения сосудистых бассейнов кровоснабжения органов. Вопросы морфологии, 24—28, 1949. — Шабаш А. А. К теории и практике фиксации окрасок нервной системы метиленовой синью. Врач. дело, 4, 1929. — Шабаш А. А. Theoretische und experimentelle Studien zur Methylenblaufärbung des Nervensystems. Горький, 1936.

## НОВЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ДВИЖЕНИЙ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА

*М. Ф. ИВАНИЦКИЙ*

(Москва)

Методы изучения движений тела человека имеют большое значение для решения многих общих и частных теоретических и практических вопросов анатомии и физиологии.

В настоящее время они особенно важны в связи с необходимостью усилить изучение проблем, относящихся к теории и практике физического воспитания и спорта.

В нашей стране физкультура и спорт имеют государственное значение. Они широко используются для оздоровления населения, повышения трудоспособности, увеличения продолжительности жизни.

Необходимо изучение движений тела при физических упражнениях и спорте. Но при проведении этих исследований часто ощущается значительный недостаток в приборах и методах точной регистрации движений тела.

Методы изучения движений, выполняемых человеком, представляют интерес в анатомии при изучении движений в суставах, исследовании функции мышц, рассмотрении дыхательных движений диафрагмы и грудной клетки и пр. В физиологии методы изучения движений важны для исследования безусловных и условных рефлексов, первой и второй сигнальных систем, явлений утомления, тренированности и пр. В ортопедии они необходимы для определения величины нарушения функций двигательного аппарата и степени их восстановления, суждения о функциональной ценности протезов и пр. В невропатологии и психиатрии они нужны для определения степени повреждения тех или иных образований нервной системы и влияния лечебных мероприятий.

Огромное значение методы изучения движений тела человека имеют в деле повышения производительности труда. Г. А. Пруденский в книге „За научное обобщение и распространение стахановского метода труда“ (Госполитиздат, 1951) в главе о сущности метода инженера Ф. Ф. Ковалева пишет: „Лишь глубокое изучение трудового процесса группы стахановцев по отдельным элементам операции, ее рабочим приемам, с учетом особенностей организации рабочих мест, позволило

выяснить особенности методов работы каждого стахановца, установить в дальнейшем наиболее прогрессивный обобщенный метод выполнения операций ткача“.

Вопросы методики изучения движений возникают также у специалистов военного дела, по художественной гимнастике, у музыкантов, артистов.

Учение о движениях представляет пограничную область между анатомией и физиологией. Поскольку в современной анатомии изучается не только строение, но и функция двигательного аппарата, вопрос этот интересует в первую очередь анатомов. Пограничная область между анатомией и физиологией, изучающая движения тела, формируется в современной науке в самостоятельную область — кинезиологию, т. е. учение о движениях.

Частные и общие задачи, которые ставят перед собой исследователи, крайне разнообразны. Вот некоторые из них:

изучение 1) структуры движения; 2) силы движения; 3) скорости движения; 4) ускорений; 5) динамических усилий; 6) точности движений; 7) изменений внешней формы тела при данном движении и связанных с этим изменением перемещений внутренних органов; 8) значения отдельных мышц и мышечных групп при выполнении данного движения; 9) изменений в соотношениях между суставными поверхностями сочленяющихся костей при выполнении данного движения; 10) функции связочного аппарата и внутрисуставных образований при выполнении данного движения; 11) возрастных особенностей движения тела; 12) процесса совершенствования движений в результате спортивной или трудовой тренировки; 13) патологических процессов, имеющих свое проявление в выполнении движений; 14) процессов восстановительного характера после тех или иных повреждений или заболеваний; 15) движений применительно к решению большого круга вопросов, касающихся безусловной и условнорефлекторной деятельности организма.

Естественно, что наряду с вопросом о методах изучения движений человеческого тела большое значение имеет вопрос о методах обработки получаемых материалов.

Наряду с такими испытанными методами исследования, имеющими давнее происхождение, как пневматическая запись движений, методю отпечатков, измерений, гониометрический метод, применение фотографии и кино в их различных модификациях, в настоящее время используются методы рентгенологического, кинорентгенологического исследований, регистрации токов действия, т. е. электрографическая методика, и пр.

В книге Т. С. Поповой и З. М. Могилянской „Техника изучения движений. Практическое руководство по циклограмметрии“, изданной в 1934 г., подробно описываются методики циклографической съемки и обработки получаемых материалов.

Следует указать на необходимость организации серийного



производства тех приборов, которые оправдали себя на практике. Кроме того, я хотел бы поделиться тем опытом, который имеется на кафедре анатомии ГЦОЛИФК им. И. В. Сталина в отношении методики изучения движений в отдельных суставах. Я также скажу о некоторых интересных и нужных приборах, которые изобретены конструктором, заслуженным мастером спорта В. М. Абалаковым и изготовлены в руководимой им лаборатории Государственного центрального научно-

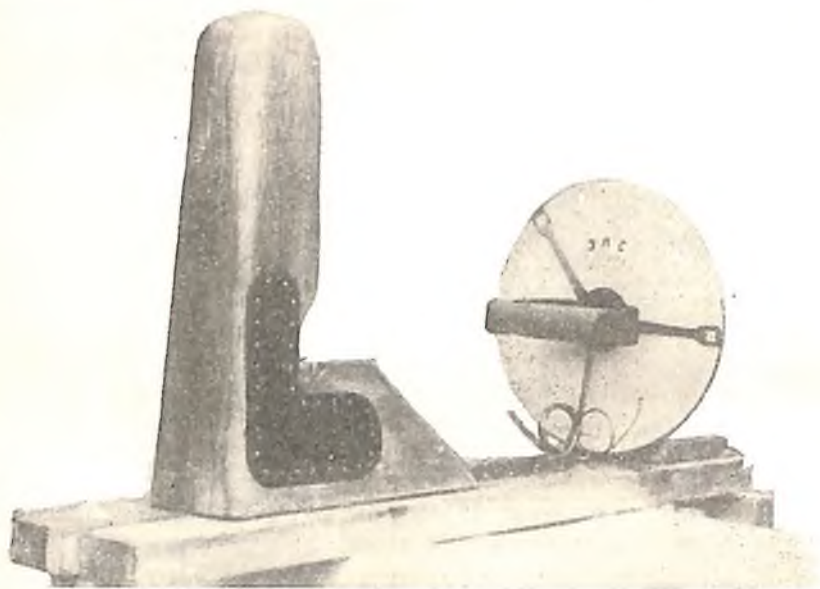


Рис. 1. Прибор для определения величины пронаторно-супинаторных движений предплечья и кисти (по Р. И. Смирнову).

исследовательского института по физкультуре. В статье будет упомянуто о приборах, изобретенных А. А. Стукаловым и некоторыми другими специалистами в области физкультуры и спорта. Считаю, что целый ряд этих приборов должен стать достоянием всех, кто занимается изучением движений.

При изучении движений в отдельных суставах мы широко пользуемся, помимо рентгенологического метода, фотографии и кино, некоторыми простыми приборами, которые в каждом случае обычно приходится конструировать заново применительно к цели данного исследования.

Все наши приборы для определения величины подвижности в том или ином суставе основаны на одном принципе, который заключается в том, что проксимальное звено тела, участвующее в образовании данного сустава (скажем, бедро — для коленного сустава, плечо — для локтевого и пр.), фиксировано на неподвижной части прибора, в то время как дистальные звенья

(например голень и стопа, предплечье и кисть) соединены с его подвижной частью. Величина подвижности в изучаемом суставе или в каком-либо другом виде соединения костей определяется по циферблату.

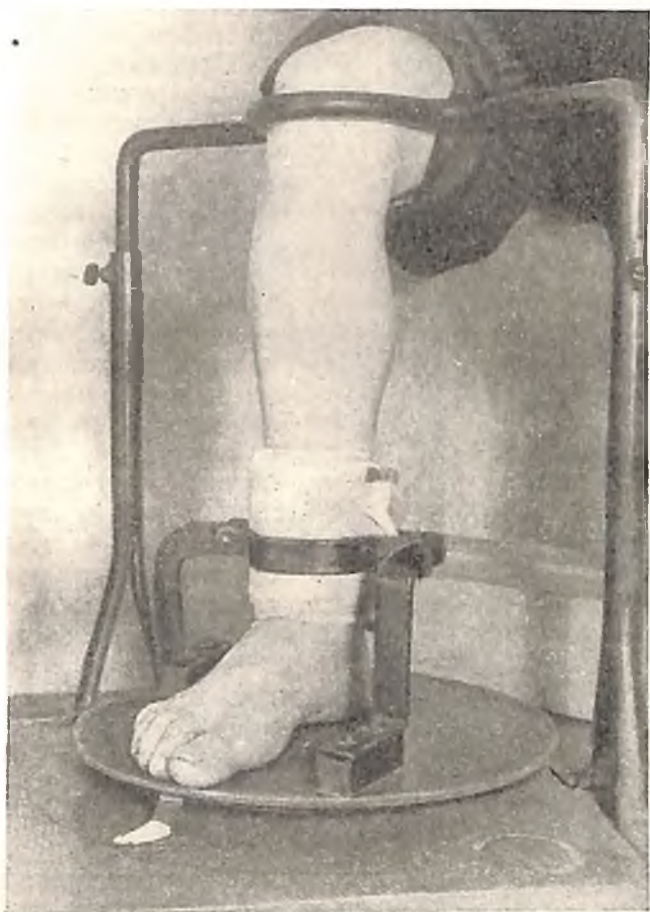


Рис. 2. Прибор для определения величины пронаторно-супинаторной подвижности голени в коленном суставе (по Т. Л. Петухову).

На кафедре анатомии ГЦОЛИФК им. И. В. Сталина применялись следующие приборы.

Прибор для определения величины пронаторно-супинаторных движений предплечья и кисти (Р. И. Смирнова) (рис. 1). Согнутая в локтевом суставе рука фиксируется на специальной подставке. Кисть захватывает ручку вращающейся части прибора. Величина подвижности отсчитывается по циферблату.

Прибор для определения величины пронаторно-супинаторной подвижности голени в коленном суставе (Т. Л. Петухов) (рис. 2). Бедро согнутой в коленном суставе ноги фиксировано. Голень вместе со стопой фиксирована на вращающейся части прибора. Величина подвижности отсчитывается также по циферблату.

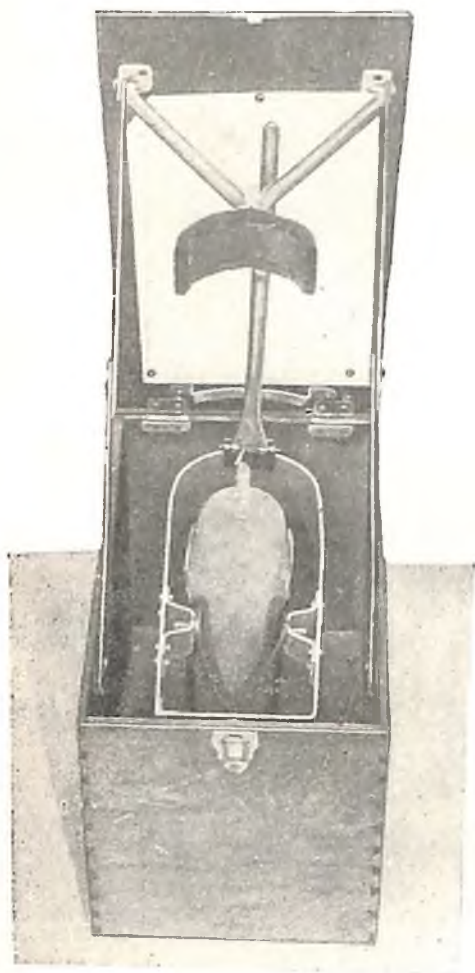


Рис. 3. Прибор для определения подвижности в голеностопном суставе (по А. Г. Пашкову).

Прибор для определения подвижности в голеностопном суставе (А. Г. Пашков) (рис. 3). Исследуемый сидит, его стопа фиксирована на педали, которая подвижна вокруг двух взаимноперпендикулярных осей вращения. При движениях стопы специальный писчик на прикрепленном листе бумаги вычерчивает линию, характеризующую величину подвижности. Этот прибор позволяет также определять величину пронаторно-супинаторной подвижности стопы и ее приведения и отведения по мере сгибания ее в голеностопном суставе.

Прибор для определения пронаторно-супинаторной подвижности в тазобедренном суставе (М. Ф. Ивановичий) (рис. 4) позволяет определять величину подвижности вокруг вертикальной оси вращения тазобедренного сустава. Им можно пользоваться для определения общей подвижности одновременно в правом и левом тазобедренных суставах. В таком случае одна нога испытуемого опирается

стопой на неподвижную педаль, а другая — на подвижную. При определении величины пронаторно-супинаторной подвижности в тазобедренном суставе одной стороны тела испытуемый не стоит обеими стопами на педалях, а сидит на высокой табуретке и только одной ногой опирается на подвижную педаль.

Помимо этих приборов, мы пользуемся также описанными в литературе гониметром, или угломером в модификации В. А. Гамбурцева и угломером Барышникова (рис 5). Оба при-

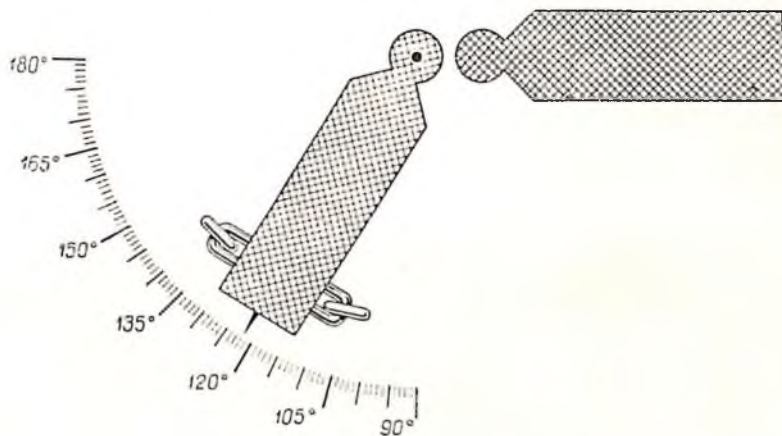


Рис. 4. Прибор для определения пронаторно-супинаторной подвижности в тазобедренном суставе (по М. Ф. Иваничкому).

бора основаны на одном и том же принципе, заключающемся в использовании действия силы тяжести указательной стрелки, располагающейся на вертикально поставленном циферблате всегда в вертикальном положении.

Для динамометрии отдельных мышечных групп предложено и употребляется большое количество различных динамометров. Одним из наиболее простых и удобных является прибор системы Г. Г. Тополяна для определения силы мышц сгибателей голени (рис. 6).

Среди приборов, используемых для аналогичной цели, изготавливаемых экспериментальной лабораторией спорта ГЦОЛИФК им. И. В. Сталина (зав. лабораторией К. Н. Спиридонов),



Рис. 5. Угломер Барышникова.

следует указать на динамограф для записи силы ног (конструкция В. М. Абалакова). Этот прибор позволяет регистрировать максимальную силу мышц — разгибателей ноги в коленном суставе

(четырёхглавая мышца бедра). В результате давления на опорную площадку на листе бумаги с помощью этого прибора вычерчивается график максимальных усилий, выраженных в килограммах. Прибор позволяет определять величину мышечной силы ног не только при их „преодолевающей“, но также при „уступающей“ работе (рис. 7).

Одним из наиболее трудных при изучении движений является определение траектории общего центра тяжести тела. Существующий метод получения и обработки циклограмм очень громоздок и требует большого количества времени, а также недостаточно точен. Дело в том, что надеваемое при приме-

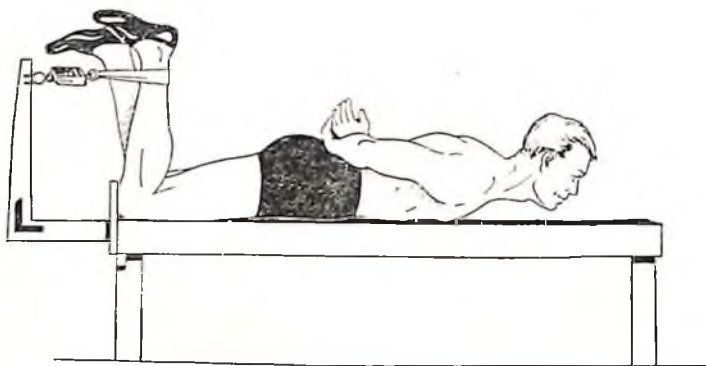


Рис. 6. Динамометр системы Г. Г. Топольяна для определения силы мышц сгибателей голени.

нении этого метода снаряжение сильно стесняет движения испытуемого. Так, например, высота прыжка с шестом у спортсмена, надевшего такое снаряжение, уменьшается почти вдвое по сравнению с нормой для данного спортсмена. Предложена замена этого снаряжения более простым, состоящим из отдельных небольших сферических зеркал, прикрепляемых к определенным опознавательным точкам тела.

В отношении определения траектории общего центра тяжести тела при выполнении тех или иных движений в настоящее время есть существенные усовершенствования. Лишь определив ее, можно получить такие показатели, характеризующие движение, как его скорость и ускорение, и вычислить динамические усилия, по которым можно судить о величине силы мышечных сокращений, обуславливающих возможность выполнения данного движения.

С целью упрощения определения траектории общего центра тяжести советскими учеными, работающими в области изучения спортивных движений, предложено несколько новых методов (в первую очередь методы В. М. Абалакова и А. А. Стукалова).

Прибор для определения общего центра тяжести человека и моментов инерции по модели (система В. М. Абалакова) состоит из шарнирной металлической модели человека в  $\frac{1}{5}$  натуральной величины. Относительные веса отдельных частей модели сделаны в соответствии со средними данными, касающимися веса отдельных звеньев тела человека (рис. 8).

Негативные кадры кинолент, изображающие человека в том или ином положении, процируются на лист бумаги и обводятся карандашом. При этом увеличение делается с таким расчетом, чтобы на листе бумаги совмещались контуры модели

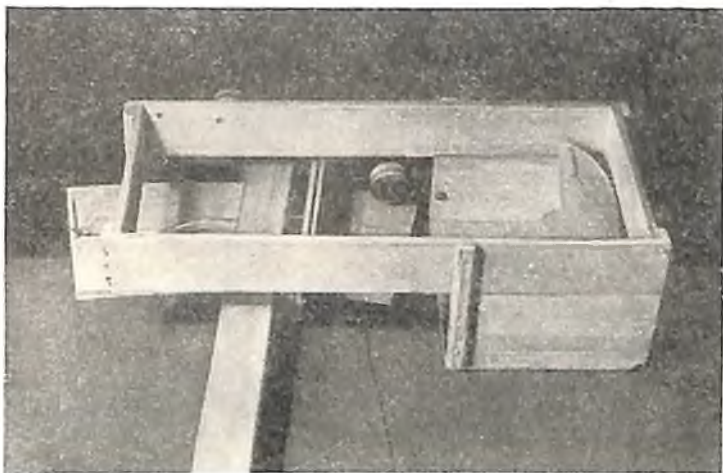


Рис. 7. Динамограф для записи силы ног (по В. М. Абалакову).

с контурами проекции тела в данном положении. Второй частью прибора является качающаяся уравновешенная платформа. Помещая шарнирную модель вместе с листом бумаги на эту платформу, можно, передвигая лист бумаги вместе с моделью, найти уравновешенное положение платформы вместе с последней. Далее путем специального приспособления, имеющегося на нижней поверхности платформы, производится накол на бумаге в той точке, где располагается общий центр тяжести всей системы. Производя подобную манипуляцию на серии последовательных кадров киноленты движения, можно определить траекторию общего центра тяжести человека.

Данный прибор может быть также использован для определения момента инерции тела человека в том или ином его положении, для чего применяется метод качания этой модели. В основу способа положено соотношение, согласно которому момент инерции равняется коэффициенту 364, 76, умноженному

на частное от деления веса тела человека, умноженного на величину расстояния от центра тяжести до оси вращения, на квадрат простых качаний в минуту. Иначе говоря:

$$I = 364,78 \times \frac{G \cdot r}{n^2} .$$

Не останавливаясь подробно на описании этого метода, следует сказать, что для получения графика изменения моментов инерции при исследовании вращательных движений тела чело-

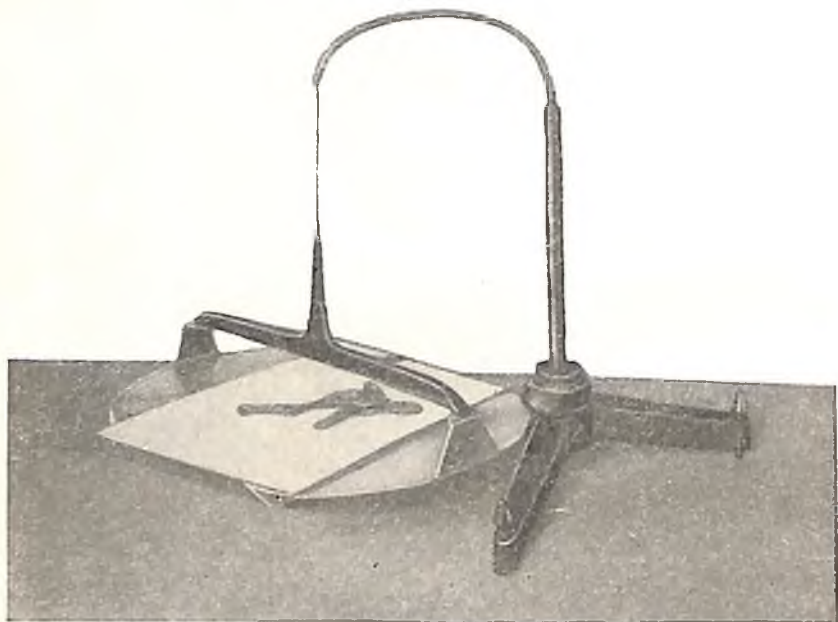


Рис. 8. Прибор для определения общего центра тяжести человека и моментов инерции по модели (система В. М. Абалакова).

века предварительно строится график изменения моментов инерции моделей и полученные данные используются для вычисления моментов инерции тела человека.

Определение положения общего центра тяжести тела можно производить при помощи метода А. А. Стукалова (рис. 9).

Прибор А. А. Стукалова состоит из корпуса в виде линейки с пазами, 9 пластинок и ползунка для установления прибора в положение равновесия. Корпус прибора по своему относительному весу соответствует весу туловища человека. Пластинки, вставленные в пазы прибора и передвигающиеся по ним, по своему относительному весу соответствуют отдельным

частям тела, абсолютные величины которых при весе тела в 65 кг приняты следующие:

Туловище . . . . .	27,755 кг
Голова . . . . .	4,589 "
Плечо . . . . .	2,184(×2) кг
Предплечье и кисть . . . . .	2,082(×2) "
Бедро . . . . .	7,527(×2) "
Голень со стопой . . . . .	4,589(×2) "

Всего . . . 65 кг

Корпус прибора устанавливается в положение равновесия на нижнем бедре ползунка. Чтобы определить местонахождение

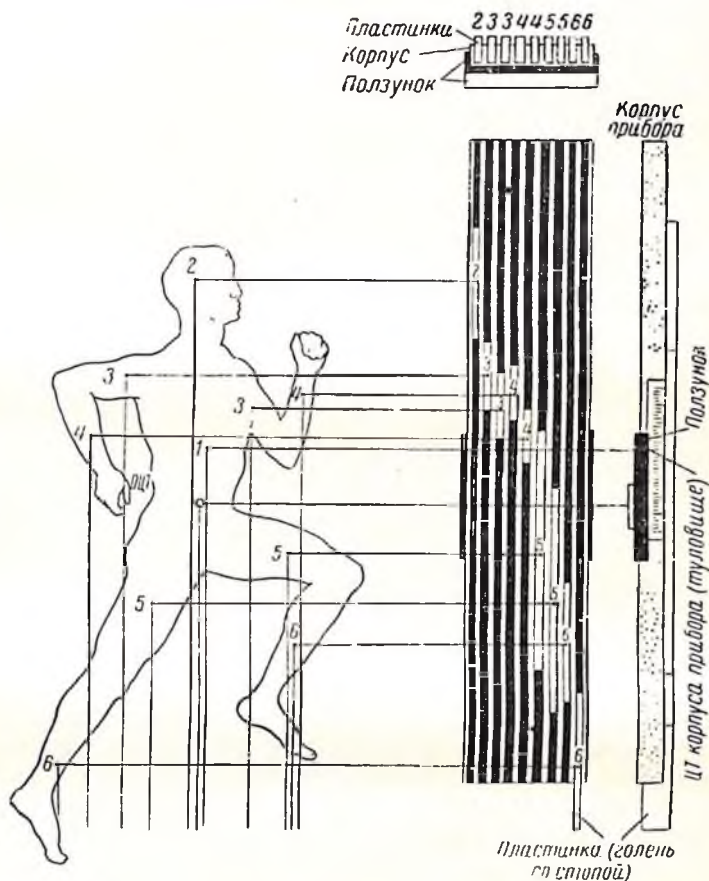


Рис. 9. Схема прибора А. А. Стукалова для определения положения общего центра тяжести.

Цифры обозначают части тела человека и соответствующие им пластинки прибора; точки, около которых находятся цифры, указывают на положение центров тяжести данных звеньев. 1 — туловище; 2 — голова; 3 — плечо; 4 — предплечье и кисть; 5 — бедро; 6 — голень и стопа.

общего центра тяжести тела человека в положении, снятом на данном кадре, следует изготовить фотоувеличение или



произвести обводку контура тела с помощью фотоувеличительного аппарата. А. А. Стукалов для упрощения пользования его прибором изготовил шарнирную модель человека без учета относительного веса частей его тела, но с указанием положения центра тяжести отдельных звеньев модели. С помощью этой модели можно воспроизводить положение тела, изображенное на кадре.



Рис. 10. Динамограф для непосредственной записи изменений усилий в течение толчка (по В. М. Абалакову).

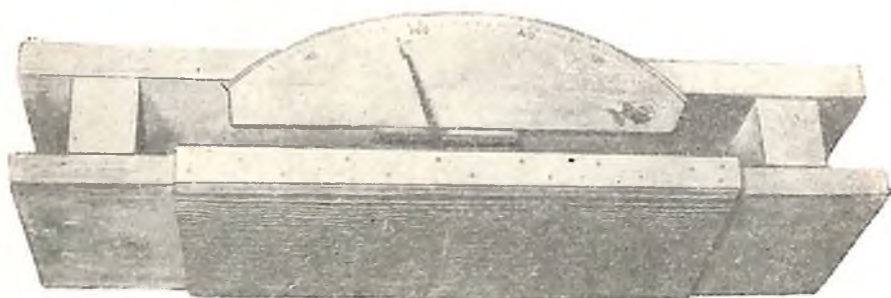


Рис. 11. Динамометр для измерения максимальной силы удара (толчка) (конструкция В. М. Абалакова).

Получив увеличенное с кадров изображение изучаемого положения тела, соответствующее размерам прибора, и обозначив на нем центры тяжести отдельных частей тела или применяя упомянутую шарнирную модель, корпус прибора устанавливают таким образом, чтобы его центр тяжести находился на одном уровне с центром тяжести туловища человека в положении, изображенном на кадре. Некоторые пластинки в пазах устанавливают на таких уровнях, чтобы их центры тяжести соответствовали уровням центров тяжести отдельных звеньев изображенной на кадре фигуры.

После этого весь прибор устанавливается в положении равновесия на ползунке, причем местонахождение ребра пол-

зунка соответствует положению поперечной плоскости общего центра тяжести тела, изображенного на кадре. Прodelав всю манипуляцию в другом направлении, мы получим место пересечения двух плоскостей общего центра тяжести тела, т. е. определим местонахождение центра тяжести тела в данном положении.

В. М. Абалаковым сконструирован целый ряд новых приборов для изучения движений. Остановлюсь на некоторых из них.

Динамограф (рис. 10) предназначен для непосредственной записи изменений усилий, которые происходят в течение толчка ногой при прыжках в высоту или длину с места и с разбега, а также толчка при тройном прыжке, ходьбе и беге и других движениях.

Конструкция прибора сводится к следующему. Эластическая пластинка, на которую опирается нога при толчке, поддерживается двумя стойками. Прогиб этой пластинки при нажиме на нее отмечается при помощи рычага и писчика на поверхности вращающегося барабана, приводимого в движение небольшим мотором. Скорость вращения барабана — 1 оборот в секунду. Если пластинка не имеет нагрузки или последняя постоянна, то при вращении барабана вычерчивается круговая горизонтальная линия. Так как во время толчка отклонение стрелки пропорционально приложенному усилию, то получаемая кривая дает возможность определить величину всех произведенных усилий и показать характер их изменений. С помощью этого прибора можно решать целый ряд вопросов, до настоящего времени являющихся спорными, в частности вопрос об

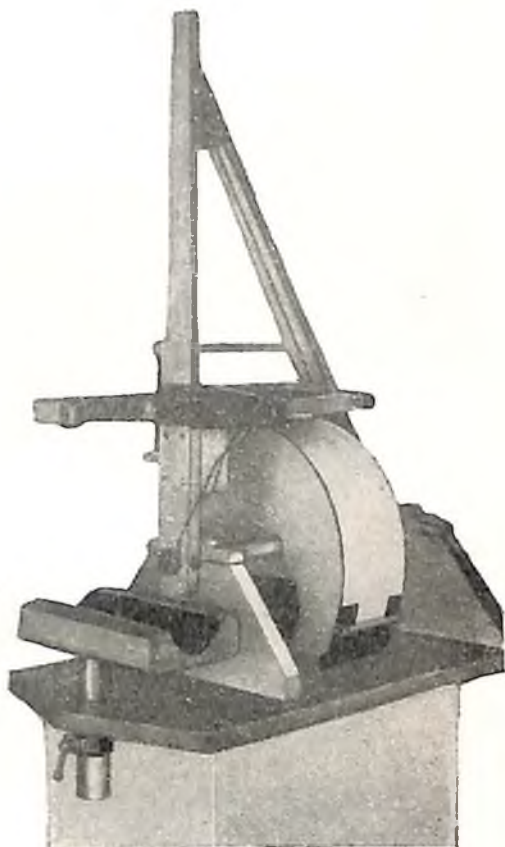


Рис. 12. Динамограф для исследования работы мышечных групп рук и ног (конструкция В. М. Абалакова).

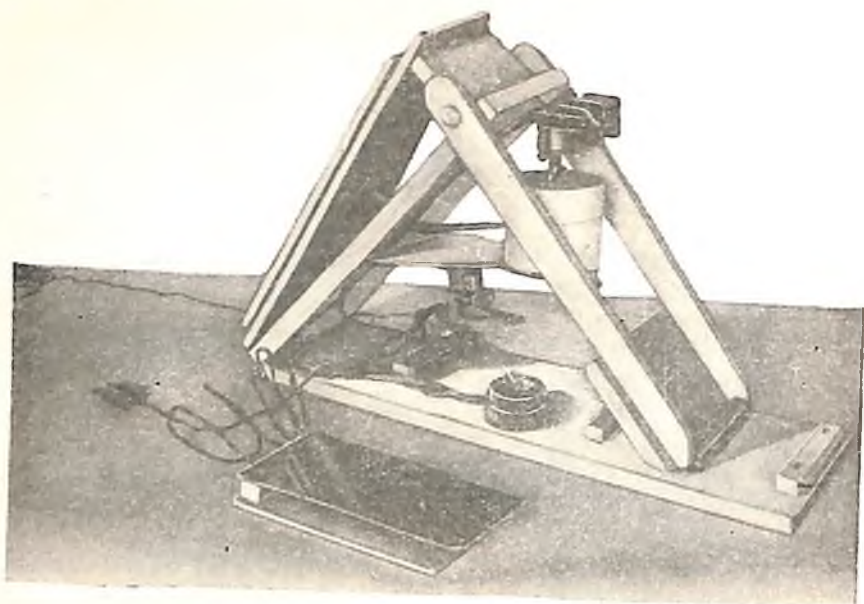


Рис. 13. Прибор для изучения старта при беге (по В. М. Абалакову).

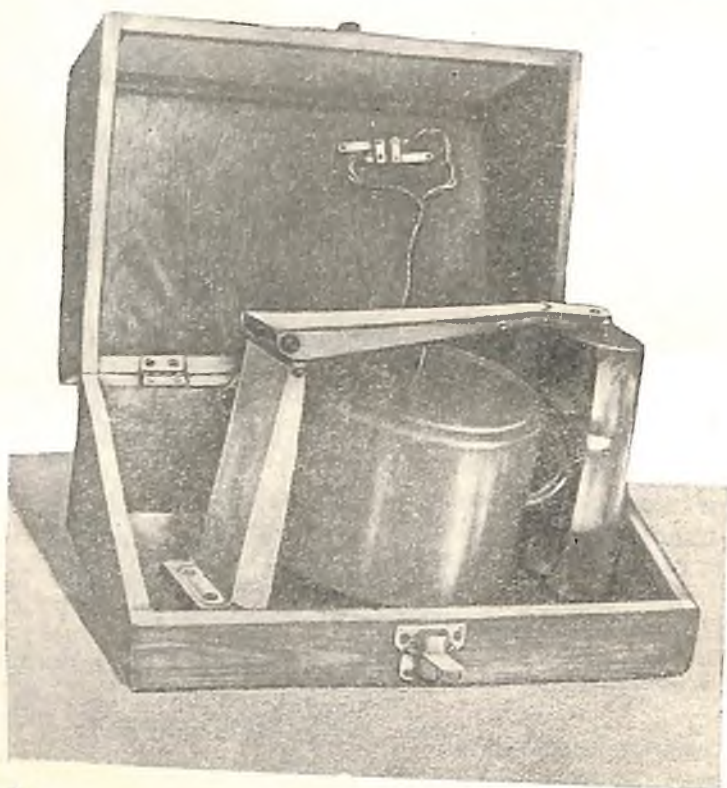


Рис. 14. Регистратор скорости бега и частоты шагов (по В. М. Абалакову).

оптимальной постановке стоп при выполнении тех или иных толчковых движений.

Динамометр для определения максимальной силы удара или толчка применяется главным образом при занятии боксом. Кроме того, он позволяет регистрировать силу удара мячом при игре в футбол, баскетбол, теннис, хоккей и пр. Им можно также определять силу толчка при прыжках. Прибор является простым по своей конструкции, прочным и удобным (рис. 11).

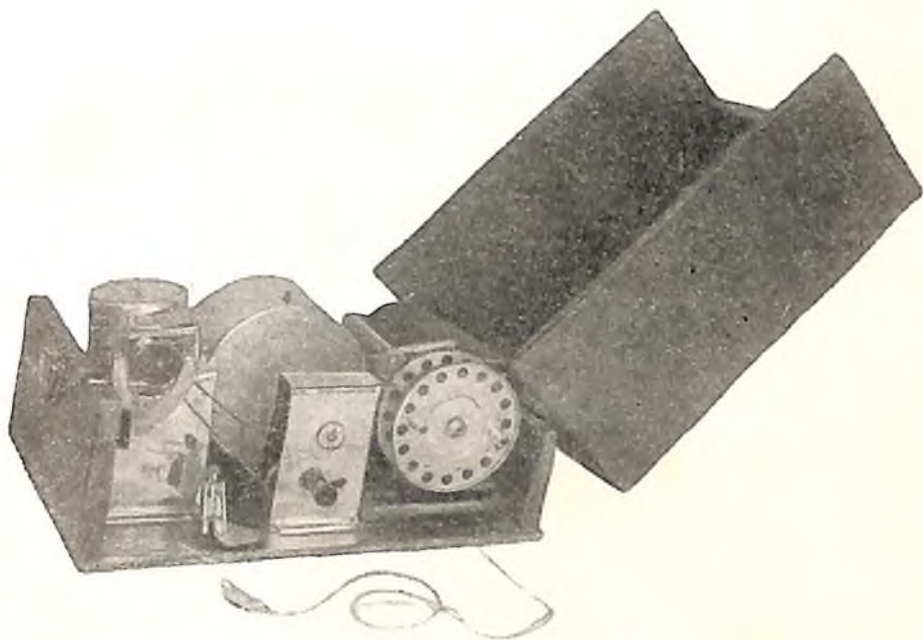


Рис. 15. Спидограф В. М. Абалакова.

Динамограф для исследования работы мышечных групп рук и ног позволяет изучать усилия, развиваемые мышечными группами, причем не только в одном каком-либо определенном положении звеньев тела относительно друг друга, но также в процессе изменения этих усилий при движении. С помощью данного прибора определяют максимальные моменты мышечных усилий относительно осей суставов рук и ног в пределах всего диапазона угловой подвижности в данном суставе. После выполнения движения на ленте барабана остается кривая тех максимальных усилий, которые могут развить мышцы руки или ноги в зависимости от угла между сочленяющимися звеньями (рис. 12).

Прибор для изучения старта при беге позволяет регистрировать время реакции спортсмена на стартовый сигнал, величину

и характер изменения усилий ног при взятии старта, а кроме того, время прохождения первых послестартовых метров. Стартовые колодки (рис. 13) ставятся своими основаниями на плоскость беговой дорожки в необходимом для бегуна взаимном расположении относительно линии движения.

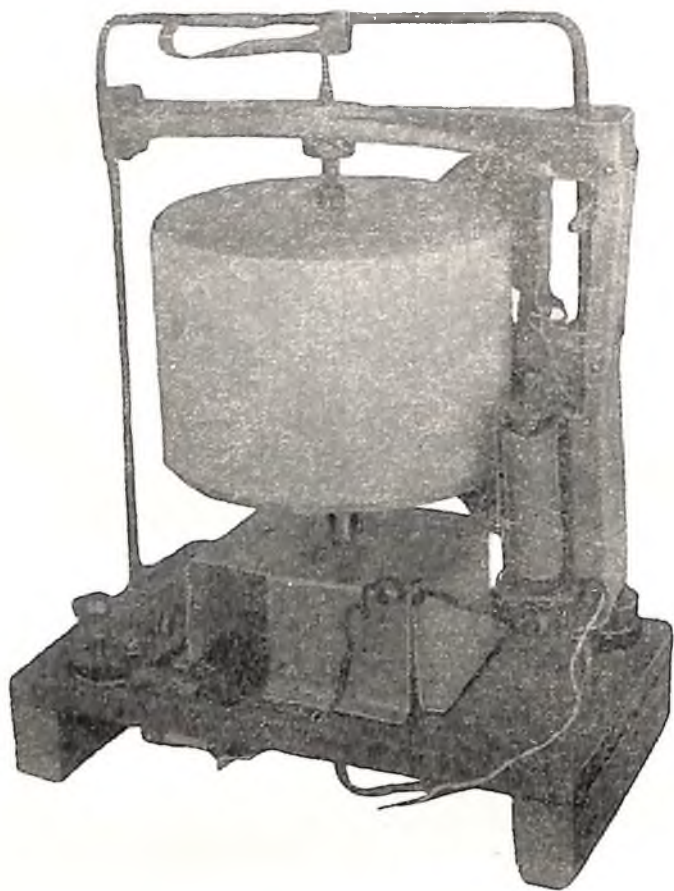


Рис. 16. Ритмописец В. М. Абалакова.

Регистратор скорости бега и частоты шагов позволяет изучать частоту и ритм движений испытуемого и одновременно развиваемую им скорость движения. Данный прибор может быть использован при изучении движений во время занятий легкой атлетикой, плавания, лыжного, велосипедного, конькобежного спорта и пр. (рис. 14).

При помощи спидографа изучают изменения скорости во время бега на короткие дистанции, плавания, конькобежного спорта, велосипедного спорта и пр., которую развивает испытуемый на любом участке данной дистанции (рис. 15).

Ритмоиссец, позволяющий судить об изменениях скорости реакции испытуемого в ответ на те или иные сигналы, представлен на рис. 16.

Выше упомянуты только некоторые из многочисленных приборов для изучения отдельных вопросов, касающихся движений тела человека, которые изобретены и в виде первообразов изготовлены заслуженным мастером спорта В. М. Абаляковым. К настоящему времени им сконструировано более 100 приборов.

Целый ряд других наших изобретателей-спортсменов работает над конструкцией новых приборов, предназначенных для решения отдельных вопросов, возникающих при изучении спортивных движений тела человека (А. А. Стукалов, Н. Н. Гончаров, К. Н. Спиридонов, Г. П. Богданов и др.).

Заслуживает внимания разработанный Г. П. Богдановым метод „зенитной съемки“, позволяющий сверху точно регистрировать движения при спусках с гор на лыжах и изучать производимые лыжником повороты. Несколько приборов сконструировал А. А. Стукалов для ускорения и уточнения обработки материалов, получаемых методом киноциклографической съемки. Им изобретены прибор для определения угла вылета, например при прыжке и начальной скорости полета, и „счетная линейка“ — прибор для определения высоты взлета по общему центру тяжести тела и начальной скорости полета.

Следует использовать новые принципы конструкции приборов, совершенствовать и упрощать уже имеющиеся, а главное — приближать обстановку исследования к естественным условиям движения. Крайне важно, чтобы исследуемый при выполнении им упражнений по возможности был независим от аппаратуры, применяемой исследователем, находился в обычных условиях деятельности и иногда даже не знал о том, что он является объектом изучения.

#### ЛИТЕРАТУРА

Абалаков В. М. О новых методах исследования в спорте. Тезисы докладов итоговой сессии Центрального научно-исследовательского ин-та физической культуры за 1952 г. М., 1953. — Абалаков В. М. Разработка регистрирующей аппаратуры для исследований в спорте. Тезисы докладов итоговой сессии Центр. научн.-иссл. ин-та физ. культуры 1953. М., 1954. — Бернштейн Н. А. Исследования по биомеханике локомоций. М.—Л., 1935. — Гурфинкель В. С. Методика и первые результаты электромиографического анализа стояния и ходьбы. Третья научная сессия Центрального научно-исследовательского ин-та протезирования и протезостроения. М., 1953. — Довгялло Н. Д. Исследования по биомеханике гимнастических упражнений на снарядах. Сталино-Донбасс, 1936. — Канторович Я. А. и Пашин П. А. Расчетные таблицы для определения положения центра тяжести человека. Л., 1953. — Конради Г. П., Слоним А. Д., Фардель В. С. Общие основы физиологии труда. Л., 1931. — Котикова Е. А. Биомеханика физических упражнений. М.—Л., 1939. — Попова Т. С. и Могиланская З. В. Методика изучения движений. Л.—М., 1934.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗРАСТНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ТОПОГРАФИИ, ФОРМЫ И СТРОЕНИЯ ОРГАНОВ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА

Ф. И. ВАЛЬКЕР

(Ленинград)

Во всех областях науки чрезвычайно важно, чтобы названия определенных разделов ее соответствовали их содержанию. Если так подойти к понятиям „возрастная анатомия“, „возрастная изменчивость“, то исследователь, изучающий те изменения топографии, формы и строения органов, которые возникают у человека в процессе его развития на протяжении многих десятков лет, невольно делает главный акцент на возрасте и в значительной степени отбрасывает множество других условий, иногда влияющих на сложный процесс развития даже сильнее, чем время, в течение которого эти изменения развивались. Поэтому правильнее отказаться от общепринятых названий „возрастная анатомия“ и „возрастная изменчивость“, так как не только возраст (т. е. время, в течение которого развиваются изменения топографии, формы и строения органов тела человека), но и бесчисленное множество других условий влияют на процесс развития организма человека.

По этим соображениям мы должны говорить не о „возрастной анатомии“ и „возрастной изменчивости“, а о развитии тканей, органов и систем тела человека.

Развитие человека, начинающееся с момента оплодотворения и кончающееся его смертью, следует разделить на два периода: внутриутробный и внеутробный.

Методы исследования изменений топографии, формы и строения органов, наблюдаемых у плода и у человека на протяжении всей его жизни, должны быть разнообразными, но в основном это общепринятые в морфологии способы: антропометрические и иные измерения, препаровка, распилы, коррозия, рентгенография, микроскопия, микромакроскопия, эксперименты на трупе и на животных, наблюдения над людьми.

Для получения надежных результатов необходимо иметь достаточно большое количество наблюдений (не менее 150).

Надо обратить особое внимание на те периоды, когда сильнее всего изменяются условия развития: плод и новорожденный; ребенок начинает ходить; ребенок переходит на другую пищу; период полового созревания; период старения организма.

Периоды наиболее интенсивного развития и начала увядания органов человека соответствуют разному возрасту. Так, например, наиболее интенсивное развитие зубной железы начинается у плода последних месяцев и продолжается от периода новорожденности до 2 лет, увядание ее начинается с 12—15 лет, а сердце достигает своего наибольшего развития к 20—30 годам и медленно увядает, начиная с 50—60 лет.

Сопоставляя препараты разных возрастных групп, мы ясно можем видеть, как изменяются органы в процессе развития человеческого организма. Для большей отчетливости выявления изменений органов и закономерностей развития (особенно в начале исследования, когда число наблюдений еще не велико) полезно делать сопоставление ранней стадии развития (плодов или новорожденных) с более поздней (40—50-летними людьми).

Так, например, данные работы А. П. Кондратьева ясно показывают отличие строения диплоэтических вен новорожденного от такового у человека 20 лет. Установив это отличие и расположив свой материал по различным возрастным группам, исследователь легко может проследить ход развития диплоэтических вен у человека после рождения.

Изменения, возникающие в процессе развития органов у человека после рождения, при таком сравнении хорошо выявляются. Индивидуальные особенности в пределах одной возрастной группы довольно легко определяются; они не нарушают общей закономерности, указывая, однако, на задержку, ускорение или изменение процесса развития органа.

В работе А. А. Хонду показано обычное расположение поперечной ободочной кишки у новорожденного и провисание ее книзу. В этом случае провисание надо рассматривать как индивидуальную особенность ребенка.

Индивидуальные особенности отражают весь прошлый фило- и онтогенез данного индивидуума, развивавшегося в данных условиях и под влиянием определенных факторов. Особенности выявляются лучше всего при изучении препаратов одной и той же возрастной группы. Для детального изучения этого вопроса нужно по крайней мере 100 препаратов.

При изучении индивидуальной изменчивости полезно прибегать к методу вариационной статистики.

Обычно у новорожденных почки дольчатые, но встречаются почки и с гладкой поверхностью, как у 2—3-летних детей. Иными словами, форма органа, несмотря на одинаковый возраст исследуемых, может быть разная, так как она зависит



не только от длительности процесса развития (т. е. возраста), но и от многих других условий.

Влияние отдельных факторов на развитие тканей, органов и систем изучают путем экспериментальных исследований. В некоторых случаях (главным образом, если имеются в виду механические факторы) возникающие у исследователя вопросы могут быть разрешены путем эксперимента на трупе. М. Н. Гончарова таким образом изучала смещение органов средостения на трупах детей раннего возраста при скоплении жидкости в полости плевры, А. А. Хонду изучал особенности топографии органов брюшной полости на трупах детей при наличии у них жидкости в брюшной полости.

Такой способ исследования дает возможность уловить особенности топографии, которые наблюдаются в процессе развития человека при патологических условиях. Полученные с помощью эксперимента на трупе результаты, конечно, нельзя непосредственно переносить на живой организм, но при сопоставлении их с клиническими наблюдениями и данными патологоанатомических вскрытий можно иногда решать вопросы клинического порядка.

Изучение истории болезни умершего нередко дает возможность установить влияние различного рода условий на процесс развития организма.

Эксперимент на животном является обязательным для каждого морфолога. Широкое использование эксперимента для изучения процесса развития тканей, органов и систем дает возможность изучить влияние на него условий внешней и внутренней среды, в особенности (что важно для клиницистов) патологических условий. Так, например, И. И. Геронимусу удалось убедительно показать важную роль внутрипозвоночных сплетений вен при выключении наиболее крупных стволов, отводящих кровь от головы.

Полная картина развития органов, тканей и систем человеческого тела может быть получена, однако, лишь после того, как анатомическое и экспериментальное исследования будут сопоставлены с клиническими наблюдениями, так как, естественно, данные, установленные путем эксперимента на животных, не могут быть целиком перенесены на человека. Поэтому наблюдение над живым человеком является необходимым дополнением к анатомическому и экспериментальному исследованиям. С. И. Баркай, который сначала на трупах изучал изменения, происходящие в головке, шейке бедра и вертлужной впадине, и обнаружил в некоторых случаях задержку развития этих участков костей, не мог, конечно, определить, какие функциональные последствия это влечет за собой в дальнейшем. Экспериментальное исследование на кроликах, у которых ему удалось искусственно вызвать задержку развития головки, шейки бедра и вертлужной впадины, показало,

что при этих условиях у животного развивается картина, характерная для врожденного вывиха бедра. Сопоставление рентгенограмм, заснятых с тазобедренного сустава подопытных кроликов и больных, страдающих врожденным вывихом бедра, дало возможность сделать вывод, что задержка развития головки, шейки бедра и вертлужной впадины влечет за собой развитие упомянутого заболевания.

Исследователю, изучающему развитие тканей, органов и систем человеческого тела, нужно различать два процесса, тесно связанные друг с другом, — рост и развитие, т. е. количественные и качественные изменения, происходящие в организме.

При изучении роста тканей, органов и систем необходимо сравнивать их линейные, объемные и иные измерения с измерениями всего тела или отдельных его частей. При этом всегда выявляются большие изменения пропорций, происходящие в процессе развития у человека после рождения. Примером может служить изменение не только пропорций отдельных частей тела (головы, туловища, конечностей), но и отдельных систем, органов и тканей. Так, например, русло артериальной системы после 50 лет сужается, а венозной расширяется. Заметно изменяется соотношение диаметров основного ствола артерий и ветвей первого, второго, третьего и т. д. порядков, равно как и крупного венозного ствола и его притоков первого, второго, третьего и т. д. порядков. С возрастом изменяются относительные размеры печени, селезенки, желудка, легких, сердца и т. д.

Для изучения изменений пропорций отдельных частей тела, возникающих в процессе развития человека, исследователю приходится прибегать к антропометрическим измерениям головы, шеи, груди, живота, конечностей. Необходимо определить длину тела исследуемого, размеры головы, туловища, конечностей. Полученные данные, изображенные графически в виде схематических рисунков, диаграмм, кривых, таблиц, дают очень наглядное представление об изменениях пропорций тела человека после рождения. При анализе данных антропометрии надо, так же как и при других способах изучения развития человека после рождения, учитывать не только возраст, но и иные условия. Это особенно важно в первые годы жизни, когда под влиянием некоторых факторов (особенно болезни) происходит задержка развития организма. В таких случаях двухмесячный ребенок может по своему росту, весу и другим данным походить на новорожденного, а иногда и недоноска.

При изучении развития тканей, органов и систем плодов и недоносков следует еще учитывать анамнез матери, где должны быть отражены, по возможности, все условия, которые могли влиять на развитие плода.

Гистологическое исследование позволяет не только более детально изучить строение развивающихся тканей, органов и систем, но и объяснить возникающие в них изменения, а также иногда проверить правильность данных, полученных при макроскопическом исследовании. Так, например, при макроскопическом исследовании коррозийных препаратов органов старых людей мы обычно наблюдаем слабое, т. е. обратное, развитие мелкой сосудистой сети, но часто у исследователя возникает сомнение, не является ли это следствием плохой инъекции сосудов? В таких случаях гистологическое исследование (контрольное) разрешает вопрос.

Морфологические изменения, конечно, всегда связаны с нарушением функции органов, тканей и систем. Изучить физиологические особенности развивающегося организма можно только экспериментальным путем. В этом отношении каждому морфологу надо быть одновременно и физиологом. Впрочем, это относится в одинаковой мере и к физиологам, которые, изучая изменения физиологических процессов у людей или животных разного возраста, должны, конечно, помнить и об изменениях морфологического порядка.

Имея перед собой ряд препаратов органов, мы должны тщательно анализировать те из них, которые выделяются своими индивидуальными особенностями, и искать условия, нарушившие обычную (т. е. наиболее часто встречающуюся) закономерность развития.

Таким образом, в основу методики исследования развития топографии, формы и строения органов нельзя положить один какой-либо критерий (например, только возраст) или способ изучения, нужно использовать все, что дают нам современная наука и техника.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Валькер Ф. И. Топографоанатомические особенности детского возраста. Л., 1938. — Валькер Ф. И. Развитие органов у человека после рождения. М., 1951. — Клебанова А. и Кавешникова А. Возрастные изменения васкуляризации почки. Арх. анат., гистол. и эмбриол., XXIV, 2, 209—224, 1940. — Гундобин Н. П. Особенности детского возраста. СПб., 1906. — Тур А. Ф. Пропедевтика детских болезней. Л., 1949. — Штефко В. Г. Анатомофизиологические особенности детского возраста. 1935. — Штефко В. Г. Возрастная остеология. 1947. — Пузик В. И. и Харьков А. А. Возрастная морфология сердечно-сосудистой системы человека. М.—Л., 1948.
-

## НОВЫЕ ДАННЫЕ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ В АНАТОМИИ

М. Г. ПРИВЕС  
(Ленинград)

Рентгеновы лучи уже в годы их открытия были использованы для изучения строения организма человека. В анатомии первым применил их В. Н. Тонков (1896). Вслед за ним значение этого нового метода оценили такие выдающиеся анатомы, как П. Ф. Лесгафт, И. И. Белоусов, П. И. Дьяконов, Я. Б. Зельдович (1896 — 1897) и др. Они произвели рентгенологические исследования строения различных систем организма человека.

Однако только после Великой Октябрьской социалистической революции создались условия для расцвета рентгенологии. Примечательно, что первый научно-исследовательский институт, созданный молодой советской властью в 1918 г., был Рентгенологический (в Ленинграде). В нем проф. А. С. Золотухин организовал специальную лабораторию нормальной и сравнительной анатомии, перед которой была поставлена задача изучать строение организма человека и животных с помощью рентгеновых лучей.

В настоящее время многие кафедры анатомии в СССР имеют рентгеновские кабинеты. В нашем сообщении будут приведены данные об использовании рентгеновых лучей, полученные в последние годы на кафедре нормальной анатомии I Ленинградского медицинского института им. акад. И. П. Павлова, где впервые (в 1932 г.) начала преподаваться рентгеноанатомия.

Основным и самым ценным свойством рентгеновых лучей является возможность изучения при их помощи строения тела человека. П. Ф. Лесгафт писал: „Основным объектом изучения анатомии должен быть живой человек, а труп имеет лишь вспомогательное значение“.

В самом деле, при изучении трупа преобладает аналитический метод исследования. Наоборот, при изучении живого организма анатом имеет возможность судить о состоянии здоровья данного человека, об условиях его труда и быта и, следовательно, получать истинное представление о связи формы и функции органов, систем и организма в целом, о единстве

организма с условиями его существования. При таком изучении неоценимую услугу оказывают рентгеновы лучи, особенно в отношении тех систем организма, которые недоступны для исследования на живом другим методом.

К числу таких систем в первую очередь относится костная. Известно, что с помощью лучей Рентгена у людей можно исследовать форму и строение костей, рост, окостенение.

В свете данных советского творческого дарвинизма необходимо изучать не просто строение и развитие органов и систем, а движущие силы развития организма и влияние на него факторов внешней среды. Поэтому представляется важным исследовать строение скелета в единстве с условиями существования организма.

Основным условием жизни человека, как известно, является труд. Поэтому одной из задач советской анатомии должно быть изучение изменений в строении организма человека, обусловленных различными формами труда.

Пользуясь передвижным рентгеновским аппаратом, мы с рядом сотрудников произвели рентгенологическое исследование скелета кисти и стопы рабочих различных профессий, артистов оперы и балета и спортсменов.

Так, ассистент нашей кафедры К. И. Машкара, исследовав кости шоферов и грузчиков, а также лиц умственного труда, показала, что в скелете кисти грузчиков отмечается увеличение I луча по сравнению с работниками умственного труда. Кроме того, у мужчин-грузчиков больше увеличивается длина фаланг, а у женщин-грузчиков — длина пястных костей. У шоферов увеличивается ширина и длина трубчатых костей кисти, а также утолщается их компактное вещество. При сравнении кисти грузчиков и шоферов отмечается, что у последних удлиняются кости II—V пальцев, а у грузчиков — I пальца.

Я. И. Кушнаревский исследовал позвоночник штангистов, борцов, пловцов и гимнастов. Оказалось, что форма тела поясничных позвонков различна у людей, занимающихся определенным видом спорта. В то время как, по данным Бунака, Рыжова и Меркулева, не учитывавших образ жизни людей, тела поясничных позвонков имеют большие размеры спереди, нежели сзади, и, следовательно, имеют форму клина, суживающегося сзади, по данным Кушнаревского, форма тел позвонков у названных спортсменов представляет характер клина, суживающегося спереди. При этом у штангистов и борцов передние размеры тела поясничных позвонков значительно меньше, нежели у пловцов и гимнастов.

Н. В. Крылова, исследовавшая кости стопы балерин и учеников хореографического училища, обнаружила резкое утолщение компактного вещества диафиза II и III пястных костей, сужение костномозгового пространства и увеличение ширины тела этих костей. М. Э. Кальвент произвела рентгенологичес-

кое исследование трубчатых костей стопы текстильщиц, шоферов грузовых машин и автобусов, футболистов, артистов балета и лиц, работающих сидя (контрольная группа). Она обнаружила определенную разницу в строении костей у представителей названных профессий. Так, у шоферов грузовых машин по сравнению с контрольной группой обращает на себя внимание неодинаковое распределение пластинок костного вещества справа и слева: справа более выражена крупночешуйчатая структура, слева — среднечешуйчатая. У шоферов автобусов крупно- и среднечешуйчатая структура выражена одинаково в костях обеих стоп. У футболистов наблюдаются увеличение ширины диафиза и утолщение кортикального слоя плюсневых костей, особенно вторых. У артистов балета увеличение ширины диафиза и уплощение кортикального слоя достигают таких размеров, что костномозговое пространство у них почти исчезает. Эти наблюдения показывают огромный диапазон индивидуальной изменчивости формы и строения костей.

Благодаря рентгенологическому методу исследования накапливается материал для создания новой остеологии, основанной на изучении не только мацерированных костей, но и непосредственно костей живых людей.

Соединения костей, особенно суставов, также могут изучаться с помощью рентгеноскопии и рентгенографии непосредственно на людях с учетом их образа жизни, выполняемой работы и т. п. Особенно ценные данные о строении и функции суставов живого человека дает сочетание рентгеноскопии (просвечивания) суставов с киносъемкой. Киносъемка с рентгеновского экрана, на котором ясно видны движения в различных суставах живого человека, дает возможность не только изучать характер движений в суставах, но и учитывать зависимость их от тех или иных видов труда и спорта (М. Г. Привес и М. Ф. Иваницкий).

То же можно сказать и про рентгенологические исследования некоторых мышц, недоступных для изучения другими методами. К числу таких мышц принадлежит диафрагма. Д. Л. Клейнман произвела рентгенологические исследования состояния диафрагмы у артистов хора, певцов-солистов, музыкантов, играющих на духовых инструментах, а также у лиц, занимающихся канцелярским трудом (контрольная группа). Оказалось, что толщина видимого рентгенологически левого купола диафрагмы значительно больше у певцов и музыкантов-духовиков, диафрагма у них располагается выше, нежели у лиц контрольной группы. Дыхательные экскурсии диафрагмы больше всего у музыкантов-духовиков и солистов оперы. Наблюдаемые различия в дыхательных смещениях диафрагмы у мужчин и женщин — работников канцелярского труда и артистов балета сглаживались у певцов и музыкантов, т. е. у людей, тренирующих диафрагмальное дыхание. У лиц канцелярского

труда и артистов балета отмечалось уменьшение дыхательных экскурсий с возрастом, что описано в литературе. Однако у артистов оперы имело место обратное явление: увеличение дыхательных экскурсий с возрастом соответственно увеличению стажа работы. Следовательно, изменения дыхательных экскурсий зависят не только от возраста, но и от функциональной нагрузки диафрагмы, обусловленной профессией человека.

На этом примере мы видим, что абстрактные представления о так называемой „возрастной анатомии“ должны смениться представлениями о конкретных условиях существования, которые оказывают решающее влияние на человека, на строение и функции органов и систем его организма.

Значение рентгеноскопии и рентгенографии для исследования органов пищеварения, дыхания и мочеотделения достаточно хорошо известно.

В свете учения о влиянии коры головного мозга на внутренние органы представляется интересным исследовать, как меняются форма и положение внутренностей при различных эмоциональных состояниях. И. Н. Преображенская и П. И. Буль выясняли нормальные изменения в некоторых органах, возникающие при воздействии на кору головного мозга путем внушения — гипноза. Так, были показаны закономерные изменения формы и положения желудка при различных эмоциональных состояниях.

Сначала производилась рентгенография желудка в обычном состоянии, затем — при ощущении чувства голода или сытости, ощущении вкусной или неприятной пищи и т. п. После этого полученные рентгенологические картины желудка одного и того же человека сравнивались между собой. Оказалось, что при ощущении вкусной пищи желудок хорошо заполнялся пищей и активно перистальтировал, а при ощущении противоположного чувства появлялась антиперистальтика, могущая завершиться актом рвоты. Желудок при этом приобретает иную форму и поднимается выше обычного положения. Заметная разница в характере перистальтики, формы и положения желудка отмечалась и при внушении чувства голода и сытости. Следовательно, с помощью рентгеновых лучей можно наблюдать влияние коры головного мозга на форму и положение желудка.

Пользуясь методом бронхографии (рентгенография наполненного контрастным веществом бронхиального дерева), Злыдников получил рентгеновскую картину бронхиального дерева. При этом можно было видеть изменения длины и ширины бронхов при дыхании: в момент вдоха бронхи удлинялись и становились шире, а при выдохе они укорачивались и суживались. Наблюдались также перистальтика бронхов, временное появление при выдохе физиологических бронхиальных сфинктеров, существование которых ранее вызывало сомнение. Вну-

шение тех или иных эмоциональных состояний оказывало резкое влияние на состояние бронхов, которые спастически сокращались, суживались и укорачивались на глазах исследователя.

Вопрос о рентгенологическом исследовании нервной системы нуждается еще в разработке. В клинике уже давно применяются известные методы рентгеновского изображения полушарий головного мозга (энцефалография), его желудочков (вентрикулография), сосудов (артериальная энцефалография), спинного мозга (миелография) и конского хвоста (неврорадиография). Эти рентгенограммы могут быть использованы анатомами для сравнения результатов анатомических исследований, полученных на трупах, с клиническими данными диагностического исследования людей, например для изучения variability формы, величины и положения мозговых желудочков, их топографии и отношений к черепу, характера разветвлений артерий мозга и пр.

Переходим к рассмотрению некоторых вопросов рентгенологических исследований сосудистой системы.

Современная клиника, используя вводимое в артериальное или венозное русло безвредное контрастное вещество, применяет рентгенологическое исследование сосудов тех или иных областей с диагностической целью. Этот клинический материал в виде рентгенограмм может быть использован анатомами для изучения анатомии сосудистой системы живого человека.

Само собой разумеется, что анатомы не могут заниматься рентгенологическими исследованиями нервной и сосудистой систем живых людей, так как для этого требуется клиническая обстановка и они могут производиться лишь по определенным показаниям диагностического или лечебного характера.

Для исследования артерий малого круга кровообращения рентгенологи располагают методом рентгеновского изображения и без наполнения сосудов контрастным веществом — способ послойной рентгенографии, называемой томографией. С помощью томографа получается рентгеновское изображение только одной данной плоскости органа или области тела. Контуры остальных частей „размазываются“, становятся невидимыми и не дают проекционного наложения. Вследствие этого ясно изображается только один слой, который выигрывает в четкости изображения. Этим и объясняется, что при помощи томографии грудной клетки отчетливо заметны без введения контрастного вещества разветвления легочной артерии.

Советский инженер Овощников сконструировал особый аппарат — томофлуорограф, представляющий сочетание томографа с установкой для массовой фотосъемки с рентгеновского экрана на фотографическую пленку (томофлуорография). Благодаря этому представляется возможным быстро производить любые количества томограмм с одного объекта и как бы



рассекать тело человека на отдельные плоскостные срезы. Такой метод до известной степени аналогичен способу получения срезов замороженного трупа (Н. И. Пирогов), но в то время как объектом изучения „ледяная анатомия“ Пирогова имела трупы, томофлуорография позволяет оптически „разрезать“ живого человека. Томография имеет известное значение и для исследования трупного материала, например сосудов головы, когда исследователь не хочет нарушать препарированием естественные анатомические отношения (М. Г. Привес).

Основанное на принципах павловской физиологии современное экспериментальное направление морфологии ставит перед анатомами задачу изучать строение организма в связи с функцией в эксперименте над животными. В этом неоценимую услугу могут оказать рентгеновы лучи.

Метод Рентгена дает возможность наблюдать состояние сосудистого русла органа или области тела у одного и того же животного до и после вмешательства на нервной системе.

Например, нами изучается влияние коры головного мозга на развитие коллатерального кровообращения. У собак удаляется кора одного из больших полушарий в области премоторной зоны и перерезаются обе бедренные артерии. Делается повторное прижизненное исследование артериального русла тазовых конечностей с помощью наполнения артерий контрастным веществом с последующей рентгенографией. Ангиография производится до вмешательства на коре головного мозга и через различные сроки после нее, благодаря чему удается наблюдать динамику морфологической перестройки артериального русла на одной и той же конечности животного. Повторное исследование в те же сроки производится у собак без нарушения коры головного мозга, после чего данные обеих серий опытов сравниваются.

Особый интерес приобретает использование рентгенологического метода для исследования в эксперименте на животных лимфатической системы (лимфорентгенография). Разработка этого метода является достижением отечественной анатомии, так как впервые он был применен для анатомических целей в нашей стране (А. С. Золотухин, 1928). В дальнейшем он был разработан Д. А. Ждановым и М. Г. Привесом.

Мы изучали влияние коры головного мозга на коллатеральное лимфообращение, для чего у собак производилось повреждение коры больших полушарий в области премоторной зоны одновременно с удалением подколенных лимфатических узлов на обеих тазовых конечностях. Для суждения о динамике развития процесса коллатерального лимфообращения в условиях нарушения коры головного мозга производилась рентгенография лимфатической системы, инъецированной безвредным для собак контрастным веществом (торотраст), как до операции на мозге, так и через различные сроки после нее. Рентгено-

графия лимфатической системы у животных даже при одномоментном исследовании выявляет ряд морфологических признаков лимфатического русла, которые искажаются после смерти вследствие потери мышечного тонуса и прекращения циркуляции крови и лимфы.

В этом отношении примечательно исследование А. В. Дроздовой, получившей на рентгенограмме лимфатической системы кишечника живой собаки многообразные картины лимфатического русла, свидетельствующие о различном функциональном состоянии его (сужение и расширение, четкообразное изображение клапанов, извилистость, выявление резервных путей, анастомозов, коллатералей, необычное направление сосудов и т. д.).

Рентгенография сосудистой системы широко используется и для исследования трупного материала. Для устранения проекционных наслоений на рентгенограмме при изучении тонких структур в настоящее время применяется рентгенография отдельных срезов органов. Кроме того, оказывает пользу и метод микрорентгенографии, который заключается или в рассмотрении рентгенограмм сосудов в лупу или под микроскопом при малом увеличении, или в получении фотографическим путем увеличенного изображения отдельных участков рентгенограммы.

До недавнего времени можно было наблюдать конкуренцию трех методов исследования сосудистой системы: коррозии, просветления и рентгенографии. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки. Поэтому мы пошли по пути сочетания всех трех методов при исследовании одного объекта.

С этой целью нами применялись инъекционные массы, которые позволяют одновременно исследовать сосуды одного и того же органа с помощью трех названных методов.

Так, в работе И. С. Гильбо и М. Г. Привеса разработана техника изготовления рентгенокоррозионных препаратов, которая заключается в инъекции артериального русла органа массой, представляющей собой сочетание свинцовых красок с пластмассой — плексигласом (метилметакрилат). Подробно эта техника описана в статье названных авторов, опубликованной в журнале „Бюллетень экспериментальной биологии и медицины“ за 1952 г. Н. В. Крылова для той же цели изготовила инъекционную массу, представляющую сочетание свинцовых красок с синтетическим каучуком. Подробное описание техники изложено в ее работе, напечатанной в том же журнале. Обобщающая статья опубликована мной в журнале „Архив анатомии, гистологии и эмбриологии“, № 2 за 1952 г.

Для сочетания всех трех методов исследования сосудов Н. В. Крылова и Д. А. Харкевич применили инъекционную массу, состоящую из синтетического каучука (севанита) и

темпера-декоративной свинцовой желтой казенново-масляной краски. Темпера разводится в искусственном каучуке, и получается масса желтого цвета, которая легко проникает в мельчайшие сосуды до капилляров. После инъекции производится сначала рентгенография препарата, затем препарат просветляется и, наконец, коррозируется.

Задачей настоящего сообщения было показать значение рентгеновых лучей при изучении организма человека в свете новых направлений в морфологии, основанных на творческом применении принципов мичуринской биологии и павловской физиологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Гильбо И. С. и Привес М. Г. О применении пластических масс для изготовления коррозионных анатомических препаратов. Бюлл. эксп. биол. и мед., 5, 83—84, 1952. — Золотухин А. С. Рентгеноангиология. Л., 1934. — Крылова Н. В. Новый метод приготовления рентгенокоррозионных препаратов. Бюлл. эксп. биол. и мед., 5, 80—82, 1950. — Крылова Н. В. и Харкевич Д. А. Новая контрастная масса для изготовления рентгено-анатомических препаратов. Научн. конф. I ЛМИ им. акад. И. П. Павлова, посвящ. анат. перифер. нервн. и сосуд. систем., 35—37, Л., 1952. — Майкова-Строганова В. С. и Финкельштейн М. А. Кости и суставы в рентгеновском изображении. Л., 1952. — Привес М. Г. К методике анатомического исследования сосудов. Арх. анат., гистол. и эмбриол., 2, 60—63, 1952. — Привес М. Г. Метод микрорентгенографии в анатомии. Анат. внутрнорг. сосудов. Сб. тр. каф. норм. анат. I ЛМИ, 1948. — Привес М. Г. Метод послойного рентгенологического исследования (томография) в анатомии. Природа, 5, 1945. — Привес М. Г. Метод Рентгена в анатомии человека. Природа, 6, 1937. — Привес М. Г. Рентгенография лимфатической системы. Л., 1948. — Привес М. Г. Рентгенологический метод в анатомии. В сб. Очерки развития медицинской рентгенологии, 36—58, М., 1943. — Привес М. Г. Рентгенологический метод исследования периферической нервной системы. Юбил. сборник, посвящ. проф. В. Н. Тонкову, 1937. — Привес М. Г. и Гречишкин. Мягкие рентгеновы лучи в анатомии и эмбриологии. Тр. сессии Гос. рентгенол. ин-та, 1935. — Привес М. Г. и Золотухин А. С. Рентгенологический метод исследования лимфатической системы. Вестн. рентгенол., 5, 1933. — Рохлин Д. Г. Рентгеноosteология и рентгеноантропология. Л. — М., 1936.

## МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ТОПОГРАФОАТОМИЧЕСКИХ СООТНОШЕНИЙ МЕЖДУ МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ОБРАЗОВАНИЯМИ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ

*Р. Д. СИНЕЛЬНИКОВ*  
(Харьков)

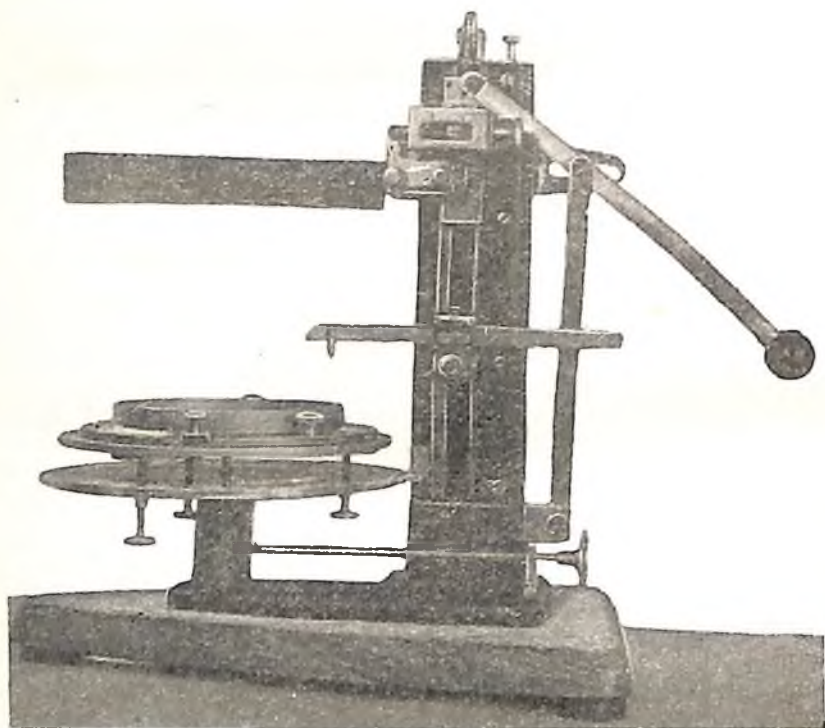
В 1943 г. нами был предложен способ быстрой дифференцировки серого и белого веществ головного и спинного мозга. Этот метод позволяет выявить серое вещество на обесцвеченных от пребывания в растворе формалина срезах головного и спинного мозга (Синельников, 1943).

Для получения срезов мозга мы сконструировали прибор, названный „органотомометром“.

Органотомометр (см. рисунок) состоит из основания, имеющего вертикальный цилиндрический выступ с отверстием, в которое вставлена ось-фланец с укрепленным в верхней своей части диском. Над диском находится второй диск, меньшего диаметра, который притягивается центральным стержнем с шарообразной головкой к нижнему диску благодаря действию пружины, упирающейся одним концом в него и другим в гайку, навинченную на нижнюю часть центрального стержня. Нижний диск имеет три винта с коническими концами, которые упрутся в пазы укрепленных ко второму диску пластинок.

Винты служат для установки второго диска в различных наклонных положениях. Нижний диск имеет на своей торцевой поверхности деления (в один градус). Неподвижный указатель для этих делений укреплен к стойке прибора. Фиксация установленного положения осуществляется рукояткой с длинным стержнем, ввинченным в цилиндрический выступ основания. На втором диске укрепляют различных размеров чашки с бортом (в зависимости от величины органа, который для крепления в чашке заливают целлоидином или желатиной). Чашки крепятся за борт особыми двумя прижимами, которые вследствие различных размеров чашек могут радикально перемещаться в пазах второго диска. Для возможности ориентировочной установки чашек по центру вращения второй диск имеет концентрические линии.

Основание органотометра имеет второй вертикальный прямоугольный выступ, к которому укреплена высокая стойка, служащая салазками аппарата. В салазках движется ползунок по форме ласточкиного хвоста. Он имеет противовес, укрепленный на стальном тросике, переброшенном через ролик на другую сторону вертикальной стойки. Движение ползунка вниз регулируется и ограничивается винтом, в который упи-



Органотометр (вид спереди).

рается противовес, имеющий в этом месте резиновый амортизатор. К ползунку укреплен корпус микропередачи с входящей в нее бритводержалкой. Бритва в держалке крепится двумя винтами, а наклон ее (угол резания) устанавливается другими двумя винтами. Паз бритводержалки расположен по отношению к вращающемуся столику таким образом, что конец лезвия малой бритвы совпадает с геометрической осью вращения столика; большая бритва по всей своей длине совпадает с указанной осью. Достигается эта установка благодаря имеющемуся упору на бритводержалке, к которому при закреплении вплотную подводится бритва.

Срезы укрепленных к вращающемуся столику органов производятся при вертикальном движении бритвы вниз. Осуще-

ствляется это рычагом с шаровой рукояткой, перемещающим ползунок с укрепленным к нему узлом микропередачи, несущим бритводержалку и бритву. Рычаг имеет качающуюся опору. Вес груза отрегулирован таким образом, что ползунок со всеми несущими деталями остается в любом установленном положении.

Для получения серии тонких срезов бритва имеет микрометрическое поступательное перемещение, оставаясь параллельной самой себе. Осуществляется это движение следующей конструкцией: держалка бритвы, входящая в корпус микропередачи, упирается в пластинчатые пружины, с противоположной стороны ее находится клин, имеющий угол скоса такой же, как и в примыкающей к нему поверхности держалки бритвы. Клин этот имеет прямоугольный выступ, являющийся разрезной гайкой микрометрического винта, который вращается в корпусе микропередачи. К микровинту укреплен лимб с делениями; при вращении винта перемещается клин. Следовательно, корпус бритводержалки вместе с укрепленной к ней бритвой производит поступательное движение в направлении, перпендикулярном лезвию бритвы. Деления на лимбе произведены из расчета шага винта и угла скоса клина таким образом, что одно деление соответствует  $1\mu$  перемещения бритвы (всего делений на лимбе 5). Количество полных оборотов микровинта отсчитывается по делениям, нанесенным над окном держалки микропередачи, а сравнительная черта находится на торце разрезной гайки клина. Делений над окном 20—каждое соответствует  $5\mu$  (т. е. полному обороту лимба микровинта). Максимальное перемещение бритвы соответствует  $100\mu$ . Перед началом срезов бритва должна быть приведена в нулевое положение по делениям над окном.

Органотомометр снабжен приспособлением, позволяющим измерять длину установленных на вращающемся столике органов в различных сечениях с точностью до 1 мм, и одновременно центроуказателем, дающим возможность установить заранее отмеченную точку органа, с тем чтобы она совпала с геометрической осью вращения столика.

Это приспособление состоит из корпуса упора, являющегося вторым нижним ползунком, также имеющим форму ласточкиного хвоста. В выступающей передней части корпус имеет паз, куда входит линейка. К передней плоскости корпуса прикреплена крышка с окном, имеющим указательную черту. В верхней части паза корпуса находятся пружинка, постоянно прижимающая линейку к нижней направляющей плоскости паза, и винт, закрепляющий положение линейки. При пользовании описываемым измерительным приспособлением ползунок вместе с бритвой приводится посредством рукоятки в крайнее верхнее положение. Корпус приспособления вместе с горизонтальной линейкой может быть установлен

в пазу вертикальной стойки на необходимой высоте и положение зафиксировано винтом. Нулевое положение линейки соответствует совпадению ее скошенного конца с геометрической осью вращения столика, а положение линейки при совмещении черточки Ц со сравнительной черточкой в окне соответствует совпадению геометрической оси с острием центрораздателя.

Для установки намеченной заранее точки на органе по оси вращения столика поднимают линейку вверх, с тем чтобы центрораздатель (прикрепленный к линейке) находился сверху и вблизи намеченной точки, при этом линейка должна быть установлена на черточку Ц; затем к острию подводят намеченную точку, после чего специальными зажимами закрепляют чашку с фиксированным в ней органом на верхнем диске.

Измерение длины органа по требуемому сечению производят следующим образом: линейку приводят в крайнее правое положение (по черточке 90) и затем подводят к крайней боковой выступающей поверхности органа острие линейки, для чего необходимо производить также движение линейки в вертикальном направлении (вместе с корпусом, освободив фиксирующий винт), и замечают показание линейки. Затем, повернув столик на  $180^\circ$ , производят аналогичное измерение. Сумма двух показаний линейки дает длину органа в заданном сечении. В отдельных случаях требуются показания определения размеров в различных сечениях только от заранее намеченной точки органа (как, например, при исследовании мозга людей различных возрастов).

Кроме указанных назначений, скошенное острие линейки служит для установки плоскости органа, ориентированной тремя нанесенными на боковой поверхности мозга точками. Путем вращения столика подводят намеченные на органе точки к острию линейки. Путем наклона столика (достигается, как было описано выше, вращением винтов) устанавливается в горизонтальное положение плоскость, проходящая через три намеченные точки.

При этом данная установка органа производится до установки по центрораздателю, так как при наклоне органа верхняя намеченная точка также отклоняется.

Таким образом, принцип устройства органотометра основан на том, что исследуемые органы, в нашем случае головной мозг, взятые от разных объектов (человек или животные) и различных или одной и той же возрастных групп, устанавливаются на столике прибора и подвергаются исследованию всегда в одном и том же положении, приближенном к их положению в целом организме.

Для исследования головного мозга при помощи органотометра следует произвести специальную подготовку.

Подлежащий изучению головной мозг фиксируют в поло-

сти черепа 10% водным раствором нейтрального формалина, который вводят через дугу аорты или брюшную аорту в количестве, индивидуальном для каждого объекта. Перед инъекцией вскрывают верхнюю полую вену либо стенку правого предсердия. После инъекции горизонтальным разрезом на уровне угла нижней челюсти отделяют голову от туловища. Далее на нее наносят правую и левую надглазничные горизонтальные линии, на каждой из которых отмечают по три точки, приблизительно на одном расстоянии одна от другой. В указанных точках бормашиной или обычным дрелем продырявливают отверстия через толщу черепной стенки и в каждое из них вводят по одной ежовой игле так, чтобы острый конец ее погрузился в вещество мозга. Затем в различных участках крыши черепа делают 3—4 небольших трепанационных отверстия и весь препарат помещают для дальнейшей фиксации в 10% водный раствор нейтрального формалина на 1—2 недели, в зависимости от величины объекта.

По окончании фиксации вскрывают череп и извлекают мозг, как обычно, и устанавливают его на столике органотометра так, чтобы линия, соединяющая иглы и являющаяся проекцией на поверхность мозга надглазничных горизонтальных линий, при вращении столика совпадала бы по всей своей длине с острием измерительной линейки. Это достигается поднятием и опусканием столика путем вращения указанных трех винтов. Такая установка мозга соответствует его положению в полости черепа и позволяет проводить точные сравнительные исследования на различных препаратах. На данном этапе исследования производят измерения мозга и устанавливают степень симметрии и асимметрии его полушарий или тех или других идентичных участков обоих полушарий.

В дальнейшем мозг проводят через возрастающей крепости спирты и целлоидин (можно мозг желатинизировать), после чего его устанавливают (на блоке целлоидина, парафина или воска) в специальной металлической чашке на столик органотометра таким же образом, как и для проведения измерений, и обливают целлоидином (желатинизированный — желатиной), далее раствором формалина.

Подготовленный таким образом препарат мозга можно рассекать на серии либо параллельными срезами путем перемещения чашки вместе с верхним диском, движущимся по миллиметровой шкале, нанесенной на нижнем диске, и путем вращения микрометрического винта бритводержалки, либо радиальными срезами путем вращения нижнего диска по градуированной шкале. Полученные серии срезов можно изучать макромикроскопически, а также производить микроскопические исследования каждого из них, но в том и другом случае надо заведомо знать их топографоанатомические взаимоотношения с целым мозгом. При изучении полученных срезов методом



макромикроскопического исследования топографоанатомических взаимоотношений серого и белого веществ может быть использован указанный выше способ дифференцировки их.

Таким образом, органотомометр состоит из измерительной и режущей частей, взаимно связанных между собой. Измерительная часть состоит из круглого, подвижного в трех плоскостях столика с вращающейся вокруг него градуированной шкалой и измерительной линейкой, передвигающейся к плоскости столика в вертикальной (перпендикулярной) и горизонтальной (параллельной) плоскостях. Линейкой определяют точное положение мозга на столике в трех плоскостях, т. е. устанавливают его в том положении, в каком он находился в полости черепа. Для этого используют три взаимноперпендикулярные плоскости: сагиттальную (передне-заднюю), фронтальную (билатеральную) и горизонтальную (плоскость, проходящую через указанные три точки).

Режущая часть представляет зажатый в муфту с микрометрической подачей нож, скользящий по вертикальной, перпендикулярной поверхности столика плоскости. Опусканием ножа мозг рассекают либо под различными углами путем поворачивания столика по градуированной шкале, либо параллельными срезами путем вращения микрометрической подачи ножа, или путем передвижения самого столика.

Указанные моменты — нанесение на мозг проекционных топографоанатомических точек, установка мозга на столике органотомометра всегда в постоянных (геометрических) плоскостях, рассечение мозга всегда в одинаковых плоскостях и на одинаковые по толщине срезы — позволяют при совершенно равных условиях с известной точностью определить возрастные и индивидуальные особенности строения и взаимоотношения частей головного мозга.

Органотомометр позволяет изучать указанные взаимоотношения не только на извлеченном, но и на не извлеченном из плоскости черепа мозгу (после декальцинации).

Органотомометр может быть использован для изучения и других органов.

#### ЛИТЕРАТУРА

Синельников Р. Д. Способ приготовления препаратов по топографии серого и белого вещества центральной нервной системы. Труды Украинского психо-неврологического института, XIII, 202—204, 1943.

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

	<i>Стр.</i>
Предисловие . . . . .	3
<i>Н. Т. Шелаев.</i> Новая советская оптическая аппаратура для морфологических исследований . . . . .	5
<i>Т. И. Соколова.</i> Оптика отечественных микроскопов . . . . .	41
<i>Г. А. Иоффе.</i> Фазовоконтрастная и интерференционная микроскопия . . . . .	63
<i>М. Н. Мейсель.</i> Люминесцентная микроскопия и ее применение в цитологии и гистофизиологии . . . . .	73
<i>Е. М. Брумберг.</i> Микроскопия в ультрафиолетовых лучах . . . . .	81
<i>Л. Ф. Ларионов.</i> Применение ультрафиолетовой микроскопии в нормальной и патологической гистологии . . . . .	109
<i>В. Н. Верцнер.</i> Аппаратура и методы электронной микроскопии и их применение для морфологических исследований . . . . .	117
<i>Г. М. Франк.</i> О применении электронной микроскопии в гистологии и цитологии . . . . .	137
<i>А. М. Кузин и Я. В. Мамуль.</i> Метод радиоавтографии в морфологических исследованиях . . . . .	152
<i>А. А. Тустановский и Г. В. Орловская.</i> Современные гистохимические методы . . . . .	159
<i>П. В. Макаров.</i> Современные методы цитохимического анализа и некоторые их применения . . . . .	169
<i>В. В. Португалов.</i> К методике исследования гистохимии ферментных систем . . . . .	178
<i>Г. И. Роскин.</i> О некоторых гистохимических методах исследования нервных клеток . . . . .	189
<i>В. Я. Броский и И. М. Лимаренко.</i> Новый гистохимический метод определения тирозина и триптофана (реакции для ультрафиолетовой микроскопии) . . . . .	193
<i>Г. Б. Плисс.</i> Метод прижизненного микроскопического исследования тканевых структур в организме в условиях хронического опыта с применением прерывистой микрокиносъемки . . . . .	197
<i>И. В. Горская.</i> Технические условия применения метода суправитального окрашивания нервных элементов по А. С. Догелю . . . . .	203
<i>И. Ф. Иванов.</i> Метод импрегнации нервной ткани свинцовыми солями . . . . .	210
<i>М. Г. Привес.</i> Новые методы изготовления сухих анатомических препаратов с сохранением естественного вида . . . . .	214
<i>Д. А. Жданов.</i> Макромикроскопические и стереоморфологические методы исследования конструкции органов . . . . .	221
<i>М. Ф. Иваицкий.</i> Новые методы изучения движений тела человека . . . . .	236
<u>Ф. И. Валькер.</u> Методы исследования возрастной изменчивости топографии, формы и строения органов тела человека . . . . .	252
<i>М. Г. Привес.</i> Новые данные к использованию рентгенологического метода исследования в анатомии . . . . .	257
<i>Р. Д. Синельников.</i> Метод изучения топографоанатомических соотношений между морфологическими образованиями в головном мозгу . . . . .	265



Редактор *Е. Ш. ГЕРЛОВИИ*

Техн. редактор *Г. А. Хараш*

Корректор *В. Н. Вишнякова*

---

Сдано в набор 20/1 1955 г. Подписано к печати 31/V 1955 г. Тираж 5 000. Формат  
бумаги  $60 \times 92 \frac{1}{16}$  д. л. Пет. лист. 17 +  $\frac{3}{8}$  вклейки. Бум. лист. 8,5. Учетно-изд. лист. 19,01.  
М-40023. Заказ № 256. Цена 10 р 10 к. + 2 р. переплет.

---

Типография имени Володарского, Ленинград, Фонтанка, 37.

100-1000