

ФГБОУ ВО «КАЗАНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ  
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ ИМЕНИ Н.Э. БАУМАНА»

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

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

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА  
В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ**

*Учебное пособие*

Казань  
ООО «Олитех»  
2024

УДК 591.5:57.086.15(075.8)

ББК 28.680с5в676я73

П76

Печатается по решению ученого совета факультета биотехнологии и стандартизации ФГОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» от 21 февраля 2024 г., протокол № 2.

Рецензенты: д.б.н., проф. каф. технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» О.А. Якимов; д.б.н., зав. каф. биоэкологии, гигиены и общественного здоровья, проф. ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» И.И. Рахимов

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

П76 Применение микротомы-криостата в исследованиях по экологии животных. Учебное пособие / В.И. Белявский, Р.И. Замалетдинов, О.С. Анисина, Р.И. Михайлова // Под редакцией проф., д.с.-х.н. Михайловой Р.И. и к.б.н. Замалетдинова Р.И. – Казань: ООО «Олитех», 2024. – 104с.

**ISBN 978-5-6044131-7-3**

Пособие представляет собой адаптированный на базе кафедры биологии, генетики и разведения животных ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» сборник рекомендаций по использованию микротомы-криостата. Наряду с общими рекомендациями в пособии подробно описаны конкретные примеры проведения исследований. Издание адресовано всем интересующимся вопросами микроскопических исследований в экологии животных и начинающим исследователям.

УДК 591.5:57.086.15(075.8)

ББК 28.680с5в676я73

**ISBN 978-5-6044131-7-3**

© **Белявский В.И.**, Замалетдинов Р.И.,  
Анисина О.С., Михайлова Р.И., 2024  
© ООО «Олитех», оформление, 2024

## ВВЕДЕНИЕ

Развитие современной науки диктует применение интегрального сочетания различных методологических подходов и методов решения конкретных задач. Процесс адаптации животных к изменчивым условиям обитания отражается на морфологической изменчивости. Не случайно традиционно в экологии животных большое внимание принято уделять различным аспектам морфологии (С.С. Шварц и др., 1968 и др.). Большую роль в решении разнообразных вопросов экологии животных позволяет решить применение микроскопической техники.

Основные методики микроскопических исследований достаточно подробно изложены в специализированных изданиях. Однако большинство из них были выпущены ограниченным тиражом и превратились в раритеты, малодоступные большинству исследователей. Одновременно возникает проблема полноты изложения методических нюансов в литературе – в большинстве пособий весь процесс проведения конкретного исследования со всеми особенностями и тонкостями обычно не представлен, а ограничен общими замечаниями.

Выпуск специализированных пособий, оптимизированных на местах специалистами различного профиля, облегчает выполнение задачи особенно начинающим исследователям (студентам и аспирантам). Настоящее издание представляет собой одну из попыток такого рода обобщений по многолетнему опыту использования микротомы-криостата МК-25 для исследований различных тканей беспозвоночных и позвоночных животных на кафедре биологии, генетики и разведения животных (в прошлом кафедра зоологии, затем кафедра биологии и экологии) ФГБОУ ВО «Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (бывший КВИ).

Приготовление срезов на замораживающем микротоме широко применяется в зоологических исследованиях, когда требуется изучить объект в течение короткого промежутка времени. Экономия времени достигается тем, что срезы изготавливаются из фиксированного органа без длительной заливки

их в парафин или целлоидин, а иногда из свежего, нефиксированного материала.

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

Первый микротом-криостат был создан в Дании. Его впервые применили Линдстрем Ланг и Могенсон в 1938 году в своих исследованиях в области количественной гистохимии. Для химического анализа и гистологического изучения они использовали парные, последовательно полученные замороженные срезы.

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

В середине прошлого столетия Кунс, Ледюк и Каплан ввели ряд технических усовершенствований. Эти инновации позволили существенным образом не только усовершенствовать технические характеристики микротомов-криостатов, но и сделать работу на них более комфортной.

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

На кафедре биологии, генетики и разведения животных ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ исследования проводились на микротоме-криостате МК-25

(рис. 1). Данный аппарат представляет собой закрытую холодильную камеру, где поддерживается заданная пониженная температура (от  $-5$  до  $-25^{\circ}\text{C}$ ).

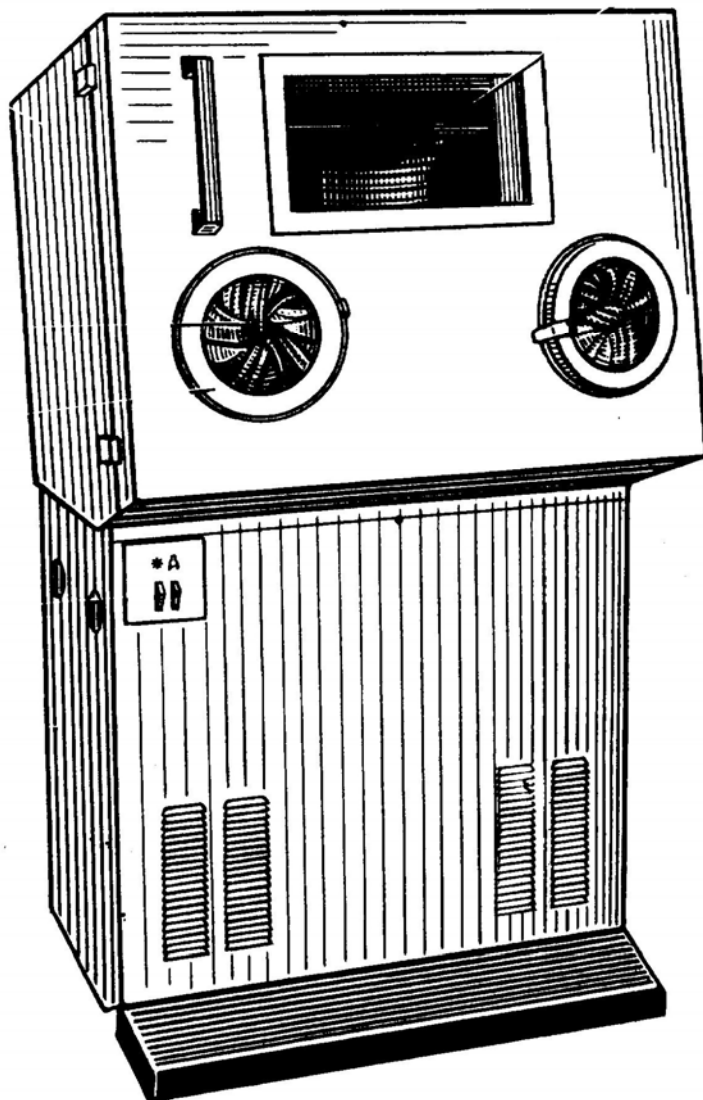


Рисунок 1. Общий вид микротом-криостата МК-25

Постоянство температуры обеспечивается путем работы компрессора, который автоматически запускается при повышении температуры воздуха в камере. Термореле находится справа, рядом с ртутным термометром. В этой камере находится микротом, который позволяет получать срезы толщиной до 25 микрон. Слева находится подставка с блоками, на которые примораживаются кусочки ткани.

Для предупреждения конденсации влаги в камере криостата слева помещается коробка с силикогелевыми шариками. Доступ в камеру при работе криостата осуществляется через специальные отверстия в корпусе аппарата, расположенные на передней панели. Для изоляции холодного воздуха внутри камеры от внешней среды отверстия закрыты резиновыми рукавами.

Первые исследования с применением микротом-криостата на кафедре биологии, генетики и разведения животных были начаты под руководством профессора Н.А. Голиковой в 80-х годах прошлого столетия (Н.А. Голикова, В.И. Белявский, 1984) при комплексном изучении жирового тела медоносной пчелы.

В 1986 году началась работа по изучению нервной системы медоносной пчелы (О.С. Анисина, 1994; 1996). Для исследования нервной ткани был использован метод импрегнации серебром, применение которого предпочтительно на замороженных срезах. Эти исследования были предприняты в связи с распространившимся в то время заболеванием пчел – варроатозом.

С 2002 года ведутся работы по исследованию возрастной структуры популяций амфибий и рептилий с использованием скелетохронологического метода, который основан на исследовании слоистой структуры костей животных по срезам, полученным на замораживающем микротоме (Р.И. Замалетдинов, 2003; Р.И. Замалетдинов и др., 2005; 2013; Р.И. Замалетдинов, Д.А. Файзуллин, 2008; И.З. Хайрутдинов, 2010; А.А. Kidov et al., 2018 и др.).

За эти годы был накоплен значительный опыт применения микротом-криостата в зоологических исследованиях различной направленности. В данном пособии наряду с общим описанием той или иной методики были по возможности учтены все методические нюансы, вскрытые авторами в ходе проведения собственных исследований. Это позволит начинающему исследователю в ходе работы избежать лишних затрат времени и средств и получить максимально удовлетворительный результат при проведении исследований по экологии животных.

Предлагаемое пособие является несколько дополненной версией того, что было выпущено в 2007 году (В.И. Белявский и др., 2007). За прошедшие

годы интерес к работам с использованием микротомо-криостата не утратил своей актуальности. К сожалению, за эти годы ушел из жизни Владимир Иванович Белявский (2023). Его вклад в данную работу сложно переоценить.

Пособие построено так, что в первой части даются общие рекомендации по проведению исследований, где наряду с описанием методик, реактивов и инструментов обращается внимание на технику безопасности и профилактику заболеваний, которые могут возникнуть у исследователей в ходе работы на микротоме-криостате.

Вторая часть посвящена описанию методик на примере собственных наработок авторов. Основными направлениями исследований, описанных в пособии, являются морфология, гистология, гистохимия жирового тела и головного мозга перепончатокрылых насекомых (на примере медоносной пчелы), а также скелетохронологический метод исследования возраста и скорости роста наземных позвоночных (земноводных и пресмыкающихся). В пособии обобщен многолетний опыт авторов по данным аспектам.

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

Настоящее пособие может быть использовано при ведении курсов, посвященных отдельным аспектам экологии животных – «Экология», «Биология с основами экологии», «Пчеловодство», «Биология и патология пчел», «Болезни пчел», «Зоология», «Основы эволюционного учения», «Биоиндикация». Пособие также может быть использовано при проведении научно-исследовательских работ студентов, аспирантов и других исследователей.

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

Представляемое на суд читателей издание является не только плодом трудов составителей пособия. Полученные результаты – это еще и итог многочисленных консультаций, научных дискуссий и обычных разговоров

со многими коллегами, которым авторы выражают свою искреннюю благодарность. Особую признательность авторы выражают своим учителям – Н.А. Голиковой, Э.М. Смириной. Без участия этих людей не был бы получен опыт работы, изложенный в данном пособии. Авторы также благодарны С.М. Окуловой за ценные замечания при обсуждении рукописи пособия.



## **ЧАСТЬ 1. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Прежде чем приступить к работе, необходимо соответствующим образом подготовить рабочее место исследователя. Для гистологических исследований желательно иметь лабораторный стол. При его отсутствии может быть использован любой стол (желательно с ящиками) с рабочей поверхностью не менее 60×120 см. Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из влагостойкого материала. Лучше всего для этих целей подходит настольное толстое стекло. Можно приспособить линолеум, пластик или клеенку.

Участок стола, предназначенный для изготовления препаратов, необходимо покрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9×12 см) листы белой и черной бумаги. Этим создается соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными и неокрашенными объектами. Под оставшейся свободной поверхностью стекла размещают прописи наиболее часто используемых растворов и методик. Нельзя использовать органическое стекло, так как оно подвержено воздействию химических растворов и на нем легко появляются царапины.

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

Достаточная освещенность рабочего места является одним из важнейших требований, так как изготовление гистологических препаратов требует значительного напряжения зрения. Необходимо максимально использовать дневной свет. Лучше ставить рабочий стол около окна. Если же такой возможности нет, то следует обеспечить хорошее искусственное освещение.

Однако даже при достаточном дневном свете рабочее место должно быть оснащено специальным осветителем к микроскопу или настольной лампой (с наклоняющейся верхней частью) для обеспечения постоянной освещенности препаратов при микроскопировании, так как изменение освещенности неблагоприятно сказывается на восприятии цвета препарата, и затрудняет оценку качества его окраски. Наш опыт показывает, что наименее утомительным для глаз является белый свет галогеновых ламп.

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

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

Общие правила фиксации для всех типов тканей принципиально не отличаются друг от друга. Для фиксации используют только чистую посуду; лучше, если посуда будет широкогорлой. Перед погружением кусочков в фиксатор недопустимо обмывать их водой. Объем фиксирующей жидкости, куда погружают материал, должен быть в 20-40 раз больше объема фиксируемых кусочков. На дно сосуда помещают тонкий слой стеклянной ваты. Этим достигается равномерное омывание всего исследуемого материала.

Для лучшего пропитывания кусочков фиксатором размеры их должны быть не более 10-15 мм в длину, 5-10 мм в ширину и 3-4 мм в толщину. Фиксирующую жидкость необходимо незамедлительно сменить, если после погружения материала она поменяла цвет, помутнела или потемнела. Повторное ее использование нежелательно; ее следует готовить непосредственно перед употреблением.

Выбор фиксатора определяется целью исследования, видом материала, химическими свойствами изучаемого вещества и временем, которым распо-

лагает исследователь. Правильно выбранный фиксатор может способствовать лучшему поглощению тканью красителя.

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

Простые фиксаторы – различные обезвоживающие вещества (этиловый, метиловый спирт, ацетон), соли тяжелых металлов (сулема, хлорид платины и др.), кислоты (уксусная, трихлоруксусная, сульфосалициловая, пикриновая, осмиевая) и формальдегид.

Наиболее употребляемыми и доступными следует считать этиловый спирт и особенно формальдегид – дешевое и универсальное фиксирующее средство, в частности, его водный раствор – формалин. Другие фиксаторы по ряду причин относительно редко находят применение в гистологической технике.

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

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

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

Даже доброкачественный формалин имеет слабокислую реакцию, так как всегда содержит примеси муравьиной кислоты, ацетона и метилового спирта. При общих методах обработки материала это не оказывает особого влияния на ход окрашивания, однако при некоторых методах, например при серебрении, формалин необходимо нейтрализовать.

Для нейтрализации формалин наливают в темную банку, на дно которой насыпают порошкообразный мел (углекислый кальций –  $\text{CaCO}_3$ ) или магнезию (углекислый основной магний –  $3\text{MgCO}_3\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) из расчета 100 г порошка на 1000 мл неразведенного формалина. Многократное повторное взбалтывание через несколько часов или через сутки обеспечивает достаточную нейтрализацию.

Периодически степень нейтрализации формалина следует проверять индикаторной бумагой. В настоящее время вместо индикаторной бумаги можно использовать современные электронные рН-метры.

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

Работая с растворами формалина, надо соблюдать осторожность, так как пары формалина вызывают раздражение слизистых оболочек глаз, носа,

гортани и трахеи. Смачивание кожи формалином оказывает дубящий эффект, а при повторных частых контактах вызывает сухую экзему.

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

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

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

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

Сама приморозка кусочка объекта не представляет особой сложности. Необходимо учитывать только то, что для дальнейшего анализа примораживать ткань следует строго определенным образом. Например, в скелетохронологических исследованиях кость необходимо примораживать только перпендикулярно плоскости блока.

При изготовлении срезов головного мозга насекомых учитывается положение неудаленных остатков хитиновой кутикулы. Объект необходимо примораживать так, чтобы он был обращен свободной от кутикулы поверхностью к ножу.

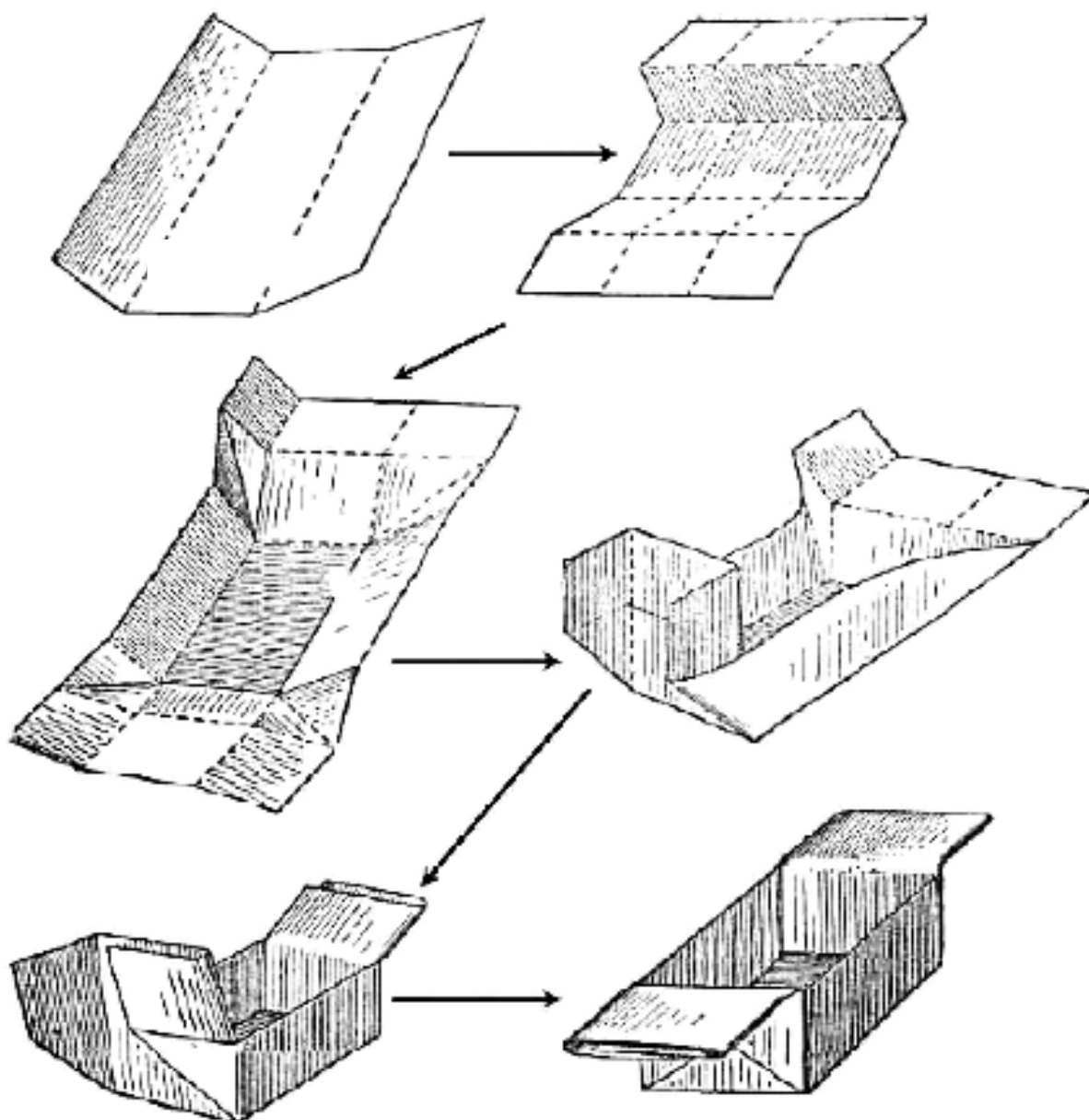


Рисунок 2. Схема изготовления бумажного кораблика  
(по В.Г. Елисееву, 1967)

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

низма подачи. Это позволяет избежать откалывания кусочков исследуемой ткани.

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

Замороженные срезы в процессе дальнейшей обработки легко повреждаются. Поэтому особо нежные объекты наклеивают на специально подготовленные предметные стекла (см. пункт «Заливка в желатин» раздела 2.2) и всю дальнейшую обработку проводят уже на стеклах.

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

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

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

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

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

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

Нейтральные красители представляют собой соединения солей кислот и оснований.

Различают прогрессивные и регрессивные способы окрашивания. При прогрессивном окрашивании срез сразу же приобретает нужную степень (тон) окраски. При регрессивной окраске красители окрашивают срез более интенсивно, чем это необходимо, переокрашивают его. Такие переокрашенные срезы затем дополнительно обрабатывают особым веществом, которое ослабляет окраску до желаемого тона.

В одних случаях красители сразу окрашивают срез без предварительной обработки последнего (в большинстве случаев это имеет место при прогрессивном окрашивании), в других (чаще это регрессивное окрашивание) срез перед окраской необходимо обработать другим неокрашивающим веществом – протравой, после чего хорошо воспринимается и сам краситель.

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



В первом случае срез окрашивают одним красителем; очень часто применяется, например, окраска железным гематоксилином, который четко выявляет ядра и различные базофильные структуры в протоплазме. При сложной окраске срез окрашивают двумя или более красителями, выявляющими различные структуры. Так, при необходимости выявить мышечные клетки и волокна соединительной ткани препарат окрашивают тремя красящими веществами: гематоксилином выявляют ядра, пикриновой кислотой – протоплазму мышечных клеток и фуксином – коллагеновые волокна соединительной ткани. В большинстве случаев применяют сложные методы окрашивания.

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

Переносить срезы из одного бюкса в другой следует с большой осторожностью. Это делают с помощью препаровальных игл и тонких металлических шпателей. В ряде случаев, например при импрегнации серебром, применение металлических инструментов недопустимо. В этом случае используются стеклянные инструменты. Срез подхватывают загнутым концом стеклянной палочки и быстро переносят в следующий бюкс. При перенесении среза в некоторые растворы (абсолютный спирт, карбол-ксилол) на нем остается складка, несколько затрудняющая его дальнейшую обработку, поэтому лучше пользоваться шпателем. Изогнутый конец шпателя правой рукой осторожно подводят под срез и, слегка придерживая последний концом иглы на шпателе, извлекают из бюкса. Чтобы не повредить срез следует прикасаться иглой лишь к его краю, а для целлоидиновых срезов – к той части среза, где нет объекта.

Дальнейшую подготовку препаратов (освобождение от примесей, окраску, просветление и заключение), как наклеенных на стекло, так и не на-

клеенных, производят одинаково. Разница заключается лишь в том, что первые обрабатывают в биологических стаканчиках, вторые – в бюксах или в часовых стеклах (рис. 3).

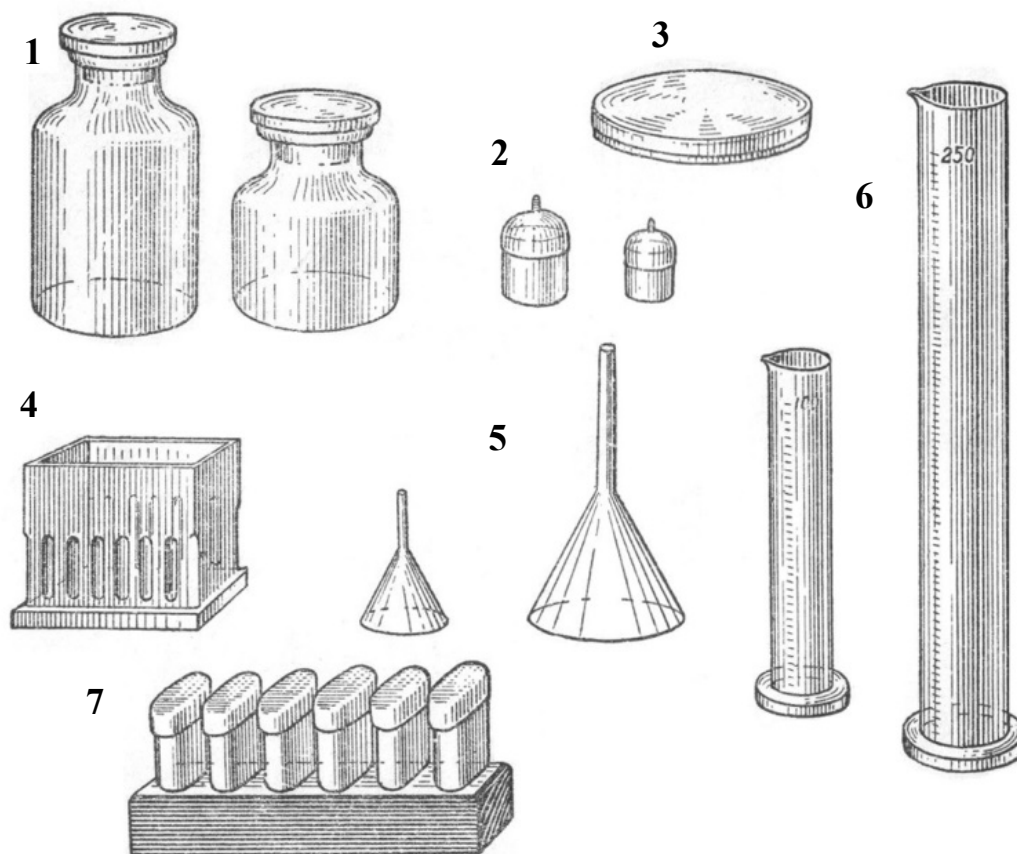


Рисунок 3. Посуда, необходимая для оборудования рабочего места (по В.Г. Елисееву, 1967 с нашими дополнениями): 1 – широкогорлые банки с притертой крышкой; 2 – бюксы различных размеров; 3 – чашка Петри; 4 – кювета; 5 – воронки; 6 – мерные цилиндры; 7 – биологические стаканчики в штативе

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

их в каждом отдельном случае зависит от задач, поставленных перед исследователем, и условий предварительной обработки среза.

Чаще всего применяется окраска гематоксилин-эозином (гематоксилин окрашивает ядерные структуры, а эозин – протоплазму клеток). В зависимости от задачи исследования этот метод окрашивания сочетают с другими. Если, например, перед исследователем стоит задача выяснить наличие и распределение в органе жира, применяется судан III, красный шарлах и др. одновременно ядра клеток окрашивают гематоксилином. При выявлении различных межклеточных структур, например коллагеновых и эластиновых волокон их окрашивают анилиновым синим и орсеином. Перед заключением срезы обычно просветляют. Для этого пользуются различными просветляющими жидкостями, которые делают окрашенные срезы прозрачными и окончательно их обезвоживают.

Обычно для просветления употребляют карбол-ксилол, карбол-толуол или карбол-скипидар, различные масла – гвоздичное, каепутовое, бергамотовое; при некоторых специальных методиках (например, при выявлении жира) просветление производят в глицерине. Наиболее часто применяемый для просветления карбол-ксилол готовят, растворяя 1 часть кристаллической карболовой кислоты в 3 частях ксилола (толуола или скипидара). Этот раствор имеет слабый красновато-желтый оттенок. Перед просветлением препарат нужно тщательно обезводить, так как ксилол не смешивается с водой и необезвоженный срез мутнеет. Срез обрабатывают в течение 3-5 минут в 70% этиловом спирте, затем 3-5 минут в 96% (при работе с различными маслами необходимо еще и обезвоживать в абсолютном спирте).

В карбол-ксилоле просветление среза продолжается около 3 минут. Окрашенный срез становится при этом прозрачным как стекло. В том случае, если срез при перенесении в карбол-ксилол помутнел (появились матовые непрозрачные участки), необходимо вернуться к обработке спиртом. Недостаточно обезвоженные срезы вновь переносят на несколько минут в карбол-ксилол. Следует иметь в виду существенный недостаток карбол-

ксилола и карбол-толуола: быстро и хорошо просветляя срезы, эти жидкости вызывают некоторое их сморщивание, поэтому для просветления иногда применяют перечисленные выше масла (для целлоидиновых срезов не применяют гвоздичное масло, так как оно растворяет целлоидин).

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

**Подготовка стекол.** Предметные и покровные стекла необходимо подготовить заранее.

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

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

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

**Заключение срезов.** Заключение срезов преследует цель сохранения препарата в доступном для микроскопирования виде. Для этого срезы помещают между двумя стеклами в каплю канадского (или пихтового сибирского) бальзама, который представляет собой раствор смолы в ксилоле или толуоле. При некоторых специальных методах, например при выявлении жира, вместо бальзама применяют глицерин-желатин. В некоторых исследованиях используются временные препараты, заключенные в глицерин (фиксация срезов костей при использовании скелетохронологического метода).

Глицерин не фиксирует покровное стекло. Для его укрепления края можно покрыть валиком из расплавленного воска, парафина или менделеевской замазки. Ее готовят по следующей прописи: в металлической посуде расплавляют 125 г желтого воска и, помешивая, понемногу добавляют 500 г канифоли, затем также постепенно добавляют прокаленную мумию (минеральная краска коричневатого-красного цвета; состоит в основном из безводной окиси железа –  $Fe_2O_3$ ), - в количестве 200 г, 3-5 г льняного масла; варят до исчезновения пены. Сохраняют в виде плотной массы; перед употреблением подогревают. Выбранный фиксированный материал берут шпателем и фиксируют все четыре угла покровного стекла. Затем фильтровальной бумагой удаляют излишек глицерина и протирают углы препарата 50-70% спиртом. После этого все четыре стороны покровного стекла можно покрыть тушью, воском или менделеевской замазкой. Подготовленные таким образом препараты хранят только в горизонтальном положении.

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

Предметное стекло с наклеенным на него срезом извлекают из ксилола, быстро просушивают с обратной стороны и по краям чистой сухой салфеткой и, положив на стол, наносят на срез каплю канадского бальзама. Все

эти манипуляции выполняют как можно быстрее, не давая срезу просохнуть. Не наклеенные целлоидиновые и замороженные срезы извлекают из ксилола следующим образом: одной рукой опускают предметное стекло в бюкс под углом к его стенке, а другой при помощи препаровальной иглы или стеклянной палочки (загнутой или с закругленным концом) расправляют срез и осторожно подтягивают его на середину предметного стекла.

Сразу после нанесения капли канадского бальзама на срез, его нужно закрыть покровным стеклом. При этом следует сначала приложить к предметному стеклу одно ребро покровного стекла, а затем медленно опустить последнее, наблюдая за тем, чтобы срез был в центре (рис. 4).

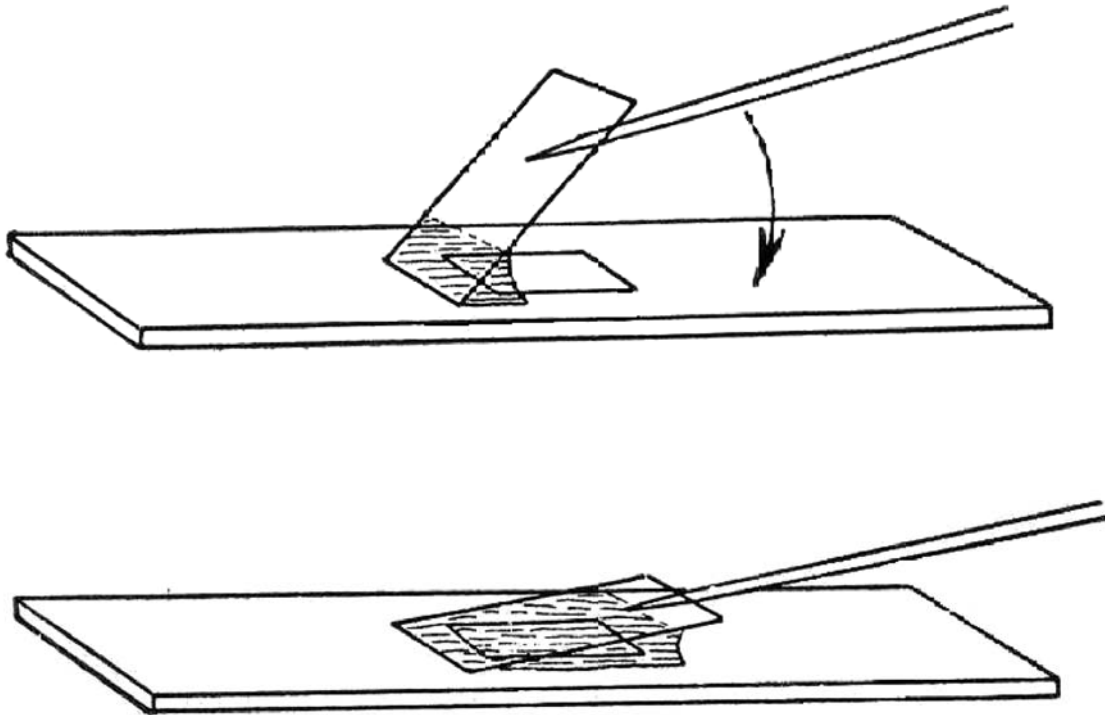


Рисунок 4. Схема заключения препарата под покровное стекло  
(по Д. Кисели, 1962)

Канадского бальзама должно быть достаточно для того, чтобы между покровным и предметным стеклом не было видимых пузырьков воздуха, и вместе с тем не столь много, чтобы бальзам растекался по предметному стеклу вокруг покровного. Если канадского бальзама было взято недоста-

точно и между стеклами осталось большое воздушное пространство, а препарат необходимо сохранить продолжительное время, можно нанести на предметное стекло каплю бальзама у того края покровного стекла, где имеется воздух; бальзам сейчас же затечет под стекло.

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

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

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



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

В начале необходимо определить кратность увеличения оптики микроскопа, с которым вы работаете. Далее для измерения объекта необходимо установить объектив с определенной кратностью. На столик микроскопа следует положить «объект-микрометр», а обычный окуляр заменить на «окуляр-микрометр». После этого производится подсчет – сколько делений «окуляр-микрометра» уместится на 10 делениях «объект-микрометра». Цена деления «объект-микрометра» стандартна и равна 0,01 мм (вся шкала делений составляет 1 мм).

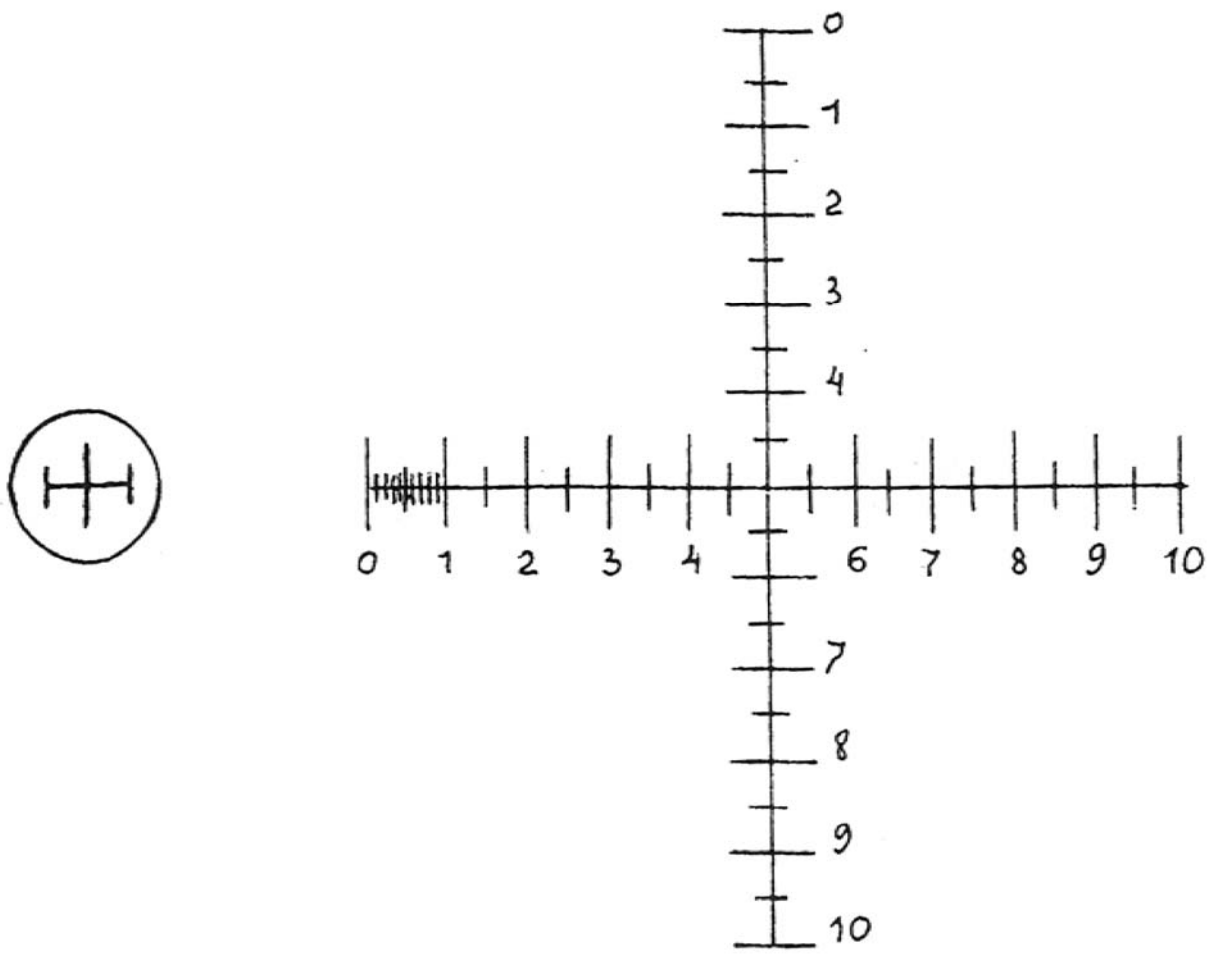


Рисунок 6. Схема расположения делений окуляр-микрометра (по Ф.М. Соколиной, П.А. Писареву, 2001)

Например, 7 делений объект-микрометра покрываются 52 делениями окуляр-микрометра. 1 деление объект-микрометра равно 10 мк. Получается,



что 1 деление окуляр-микрометра =  $70/52 = 1,3$  мк. Эта величина должна быть вычислена для каждого увеличения отдельно. Соответствующим образом проводится пересчет размеров объекта.

Измерение клеток и участков ткани рекомендуется проводить на объектах, залитых в парафин с температурой плавления  $47^{\circ}\text{C}$  (Б. Ромейс, 1953). Если с помощью криостата срезы получают с залитой в желатин ткани, то при фиксации естественные размеры клеток значительно изменяются, особенно при подсушивании блока перед приготовлением срезов. Результаты таких измерений могут быть использованы только при расчете индексов или для оценки ядерно-плазменного отношения.

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

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

При изготовлении срезов руки исследователя находятся в среде с пониженной температурой. Переохлаждение рук может привести к нежелательным последствиям. Чтобы их избежать, необходимо применять профилактические меры:

- во-первых, работать в теплой одежде и обуви;
- во-вторых, руки должны быть защищены от холода перчатками из натуральной ткани с обрезанными для удобства работы кончиками пальцев. Для этой цели можно использовать обычные хлопчатобумажные рабочие перчатки;
- в-третьих, рекомендуется работать на криостате не более 10-15 минут, после чего делать перерывы продолжительностью не менее пяти минут. Более продолжительные периоды работы могут негативным образом отразиться на работоспособности оператора в дальнейшем. В перерывах между сеансами работы рекомендуется провести легкую разминку для разогрева рук; пить горячий чай, желательно с лимоном;
- в-четвертых, для профилактики ревматизма, на ночь, в период обработки материала на криостате, мы рекомендуем делать йодное колечко на запястье каждой руки. Утром, если такое колечко исчезает и не оставляет следов, обработку запястья йодом следует повторить.

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

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

## ЧАСТЬ 2. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ

Одним из основных объектов исследования на кафедре биологии, генетики и разведения животных ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ является медоносная пчела (*Apis mellifera* L., 1758). Изучение медоносной пчелы представляет большой интерес в научном и практическом отношении в связи с ее ролью в жизни человека.

Медоносные пчелы совершают 80-90% всей работы по опылению сельскохозяйственных растений, повышают урожайность культур на 25-40%. Продукты пчеловодства благотворно влияют на организм человека, и задачи отрасли состоят в том, чтобы обеспечить население целебным медом, медицину – маточным молочком, прополисом, пчелиным ядом и цветочной пылью, а промышленность – воском, который применяется более чем в 40 отраслях народного хозяйства.

В понимании биологии пчелиной семьи с точки зрения повышения продуктивности сельскохозяйственного производства определенную роль играют и исследования морфологии отдельных тканей пчел. Для этих исследований на кафедре биологии, генетики и разведения животных применяется микротом-криостат.

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

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

Одним из показателей физиологического состояния пчелиной семьи является степень развития жирового тела у отдельных пчел. По степени развития жирового тела и массы брюшка можно судить о запасах резервных веществ в теле медоносной пчелы (R. Lotmar, 1935; А. Маурицио, 1958; М.В. Жеребкин, Я.Л. Шагун, 1971; В. Кепеня, 1971), составить прогноз продолжительности жизни пчел (А. Маурицио, 1958) и результатов зимовки пчелиных семей (В.И. Белявский, 1985).

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

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

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

**Методика визуальной оценки жирового тела пчелы.** А. Маурицио (1958) выявила у медоносных пчел и описала пять степеней развития жирового тела (рис. 7-15 по В.И. Белявскому, 1985).

1 степень. Жировое тело не развито: оно настолько прозрачно, что через него ясно просвечивает хитин спинного панциря (рис. 7).

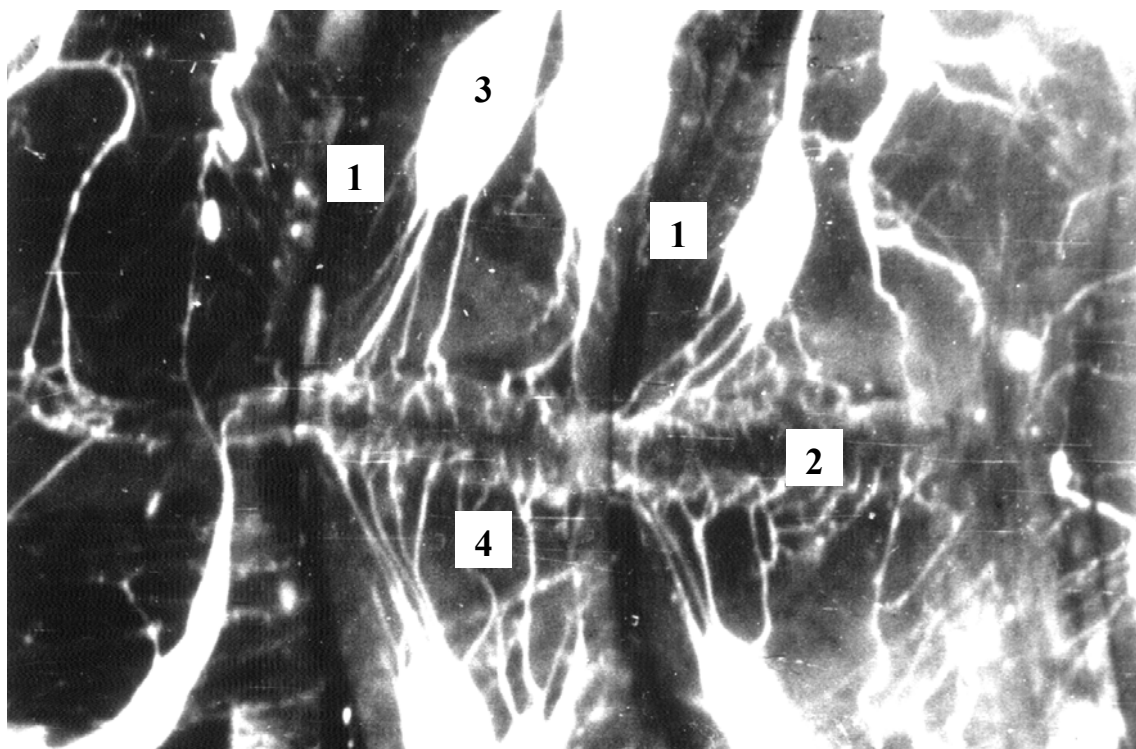


Рисунок 7. Жировое тело осенне-зимней пчелы в первой степени его развития. Перикардиальная зона. Условные обозначения: 1 – прозрачное жировое тело (просвечивает хитин); 2 – камера сердца; 3 – малые воздушные мешки; 4 – трахеи

2 степень. Жировая ткань однослойная, плоская. Клетки голубовато-белые, полупрозрачные без отчетливо видимых включений.

3 степень. Жировая ткань однослойная, с несколькими складками. Клетки белые, округлые, без хорошо заметных включений (рис. 8, 12).

4 степень. Жировая ткань многослойная, складчатая. Клетки круглые, с хорошо выраженными включениями.

5 степень. Жировая ткань многослойная, с многочисленными складками. Клетки большие, круглые, желтого цвета, заполненные включениями (рис. 9, 13).

Позднее (Н.А. Голикова, В.И. Белявский, 1984) была обнаружена еще одна стадия развития жирового тела – «расходное» жировое тело (рис. 10, 14), характерное для пчел из зимнего клуба, находящегося во втором периоде годового жизненного цикла пчелиной семьи по С.В. Жданову (1961), называемом «зимним размножением».

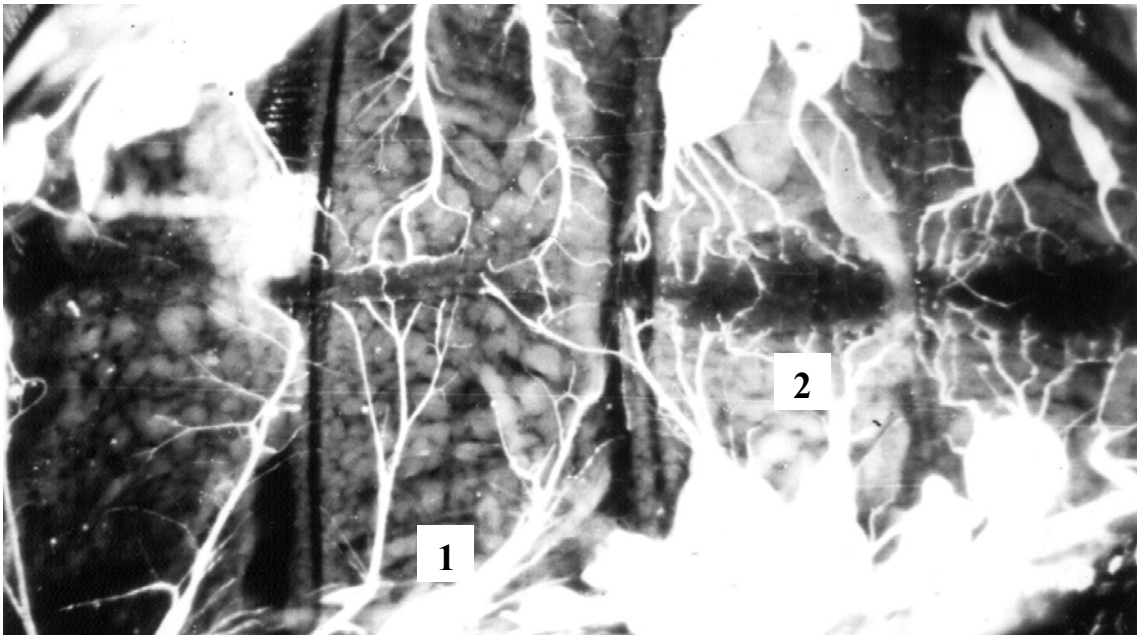


Рисунок 8. Жировое тело осенне-зимней пчелы в третьей степени его развития. Перикардиальная зона. Условные обозначения: 1 – однослойное складчатое жировое тело; 2 – камера сердца

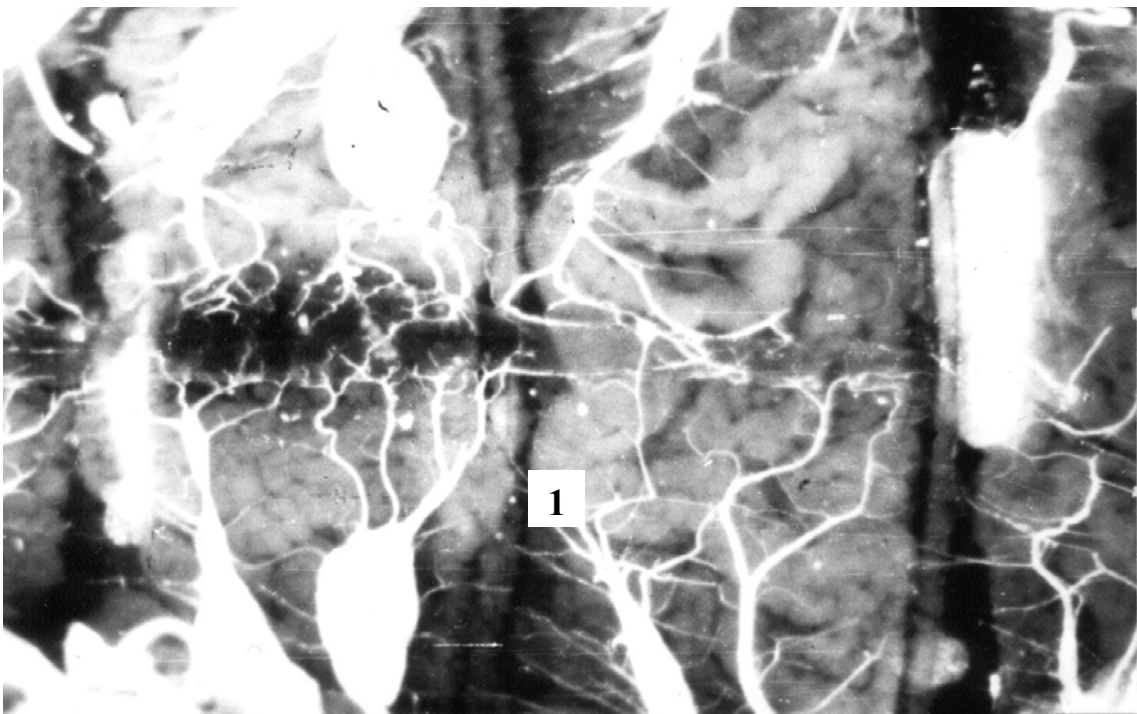


Рисунок 9. Жировое тело осенне-зимней пчелы в пятой степени его развития. Перикардиальная зона. 1 – многослойное складчатое жировое тело

«Расходное» жировое тело может быть складчатым и многослойным, но клетки, его составляющие, заметно мельче. Они прозрачные в центре и

белые (или голубовато-белые) по периметру. Внешне жировое тело напоминает завитки овчины («шубу»).

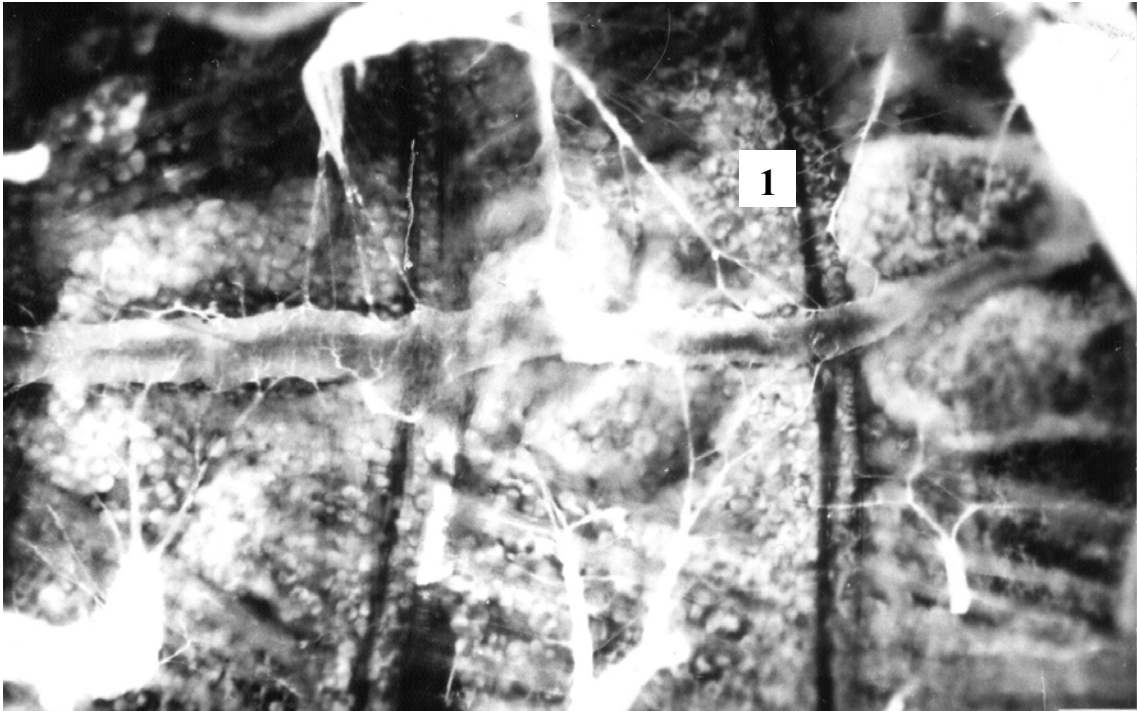


Рисунок 10. Жировое тело осенне-зимней пчелы в состоянии «расхода» («расходное» жировое тело). Перикардиальная зона. 1 – жировые клетки,

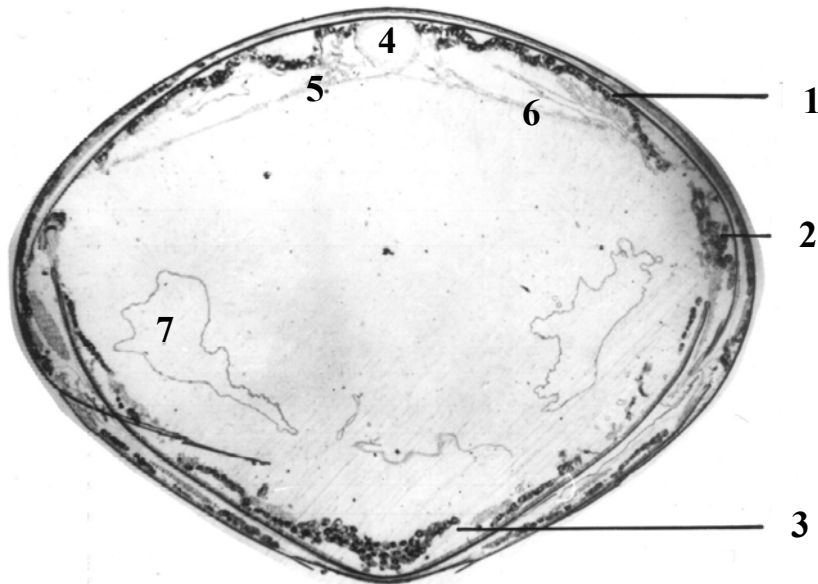


Рисунок 11. Поперечный срез брюшного отдела тушки брюшка пчелы. Окраска суданом черным В. Условные обозначения: 1 – перикардиальное жировое тело; 2 – латеральное жировое тело; 3 – стернитное жировое тело; 4 – сердце; 5 – перикардиальные клетки; 6 – спинная диафрагма; 7 – воздушные мешки

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

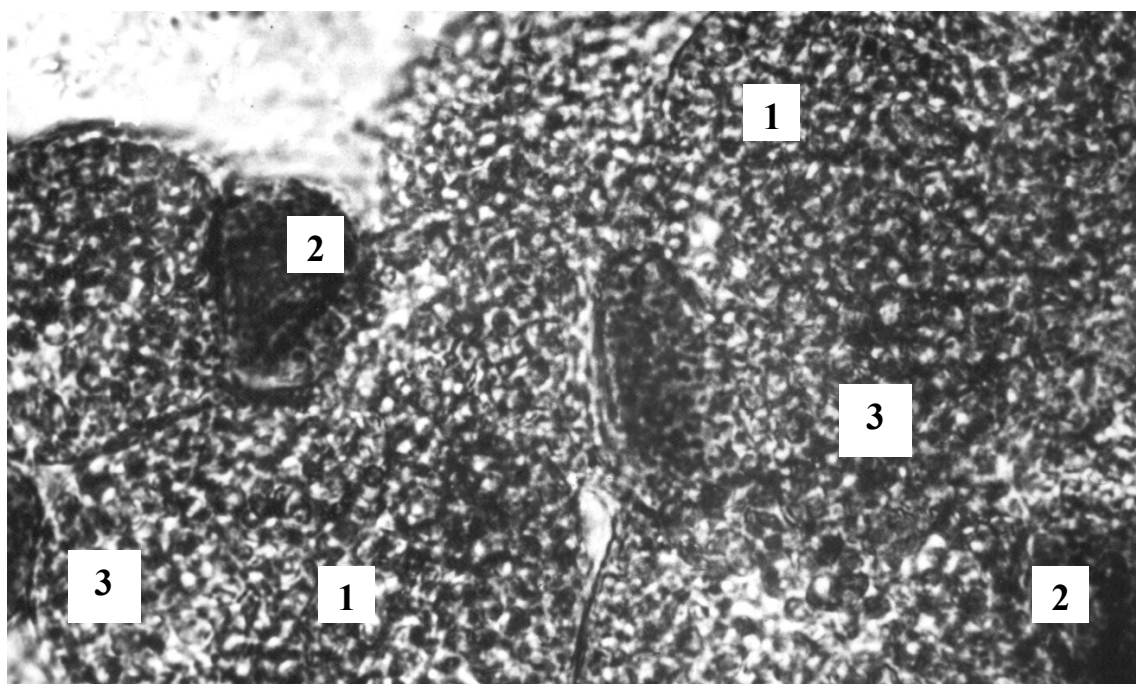


Рисунок 12. Жировое тело осенне-зимней пчелы в третьей степени его развития. Перикардиальная зона. Окраска суданом черным В. Условные обозначения: 1 – жировые клетки; 2 – эритроциты; 3 – «каталисомы» в виде «колец» и «шапочек»

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

У пчелы сначала необходимо отстричь голову, затем удалить кишечник. Для этого большим и указательным пальцем левой руки удобно удерживать грудь пчелы. Затем анатомическим пинцетом, находящимся в правой руке, зажать последний сегмент брюшка и медленно вытаскивать кишечник, внимательно следя за тем, чтобы все отделы (по порядку их



появления снаружи: ректальная, тонкая, средняя кишки, зоб и пищевод) оказались за пределами брюшка. Лучше, если при этом пчела удерживается вертикально, а кишечник вытягивается вниз, тогда под действием своей тяжести он извлекается практически без обрывов.

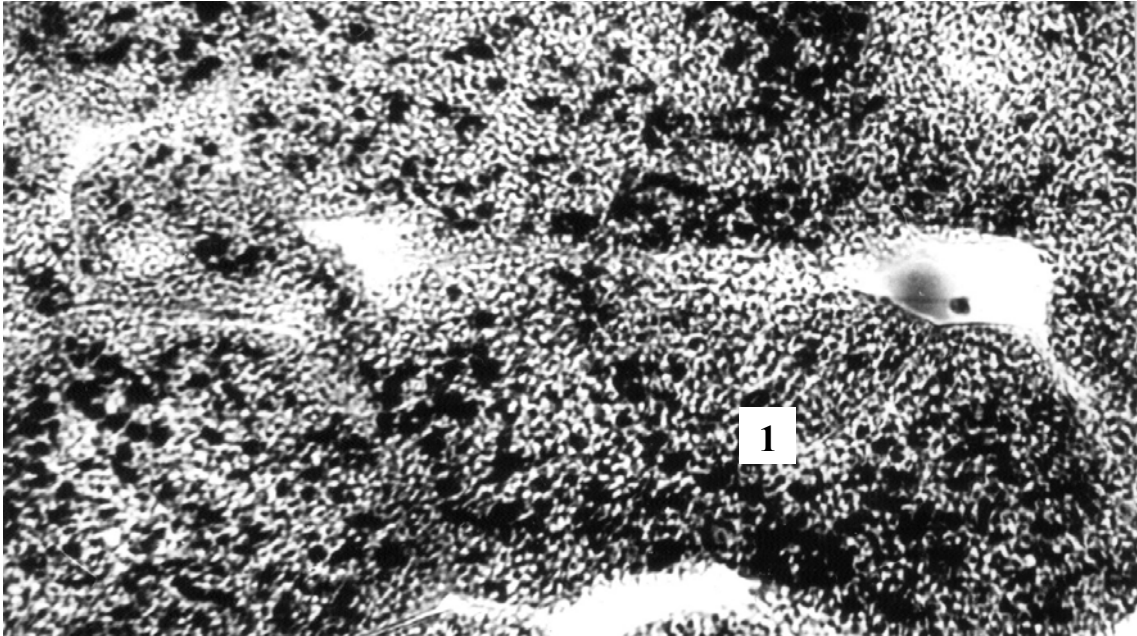


Рисунок 13. Жировое тело осенне-зимней пчелы в пятой степени его развития. Перикардиальная зона. Окраска суданом черным В. 1 – жировые капли

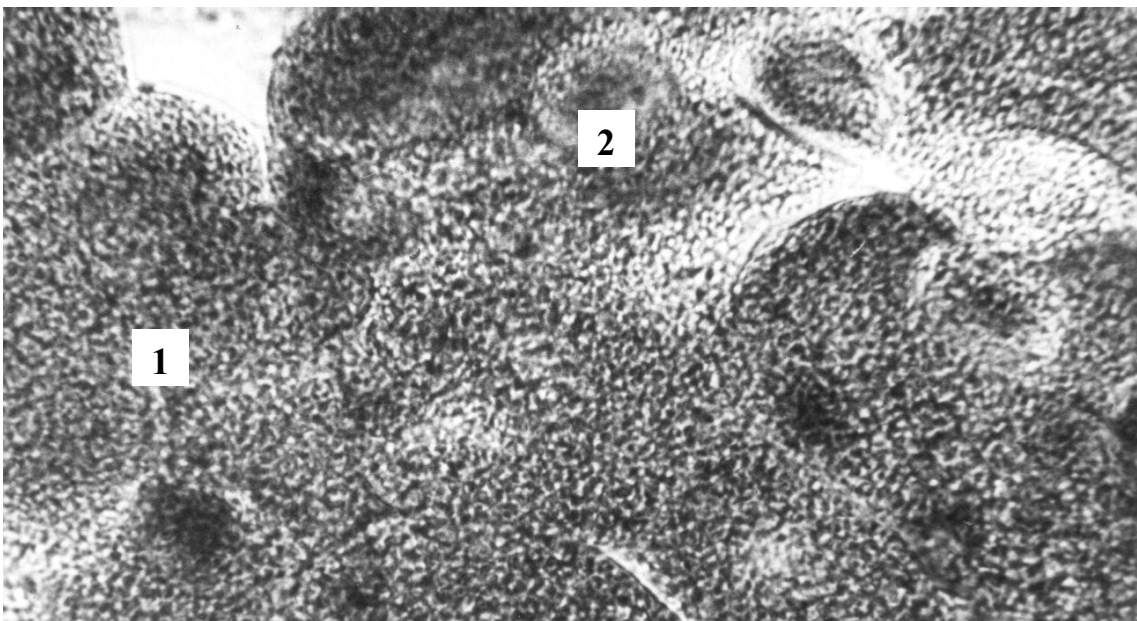


Рисунок 14. Жировое тело осенне-зимней пчелы в состоянии «расхода» («расходное» жировое тело). Перикардиальная зона. Окраска суданом черным В. Условные обозначения: 1 – жировые клетки; 2 – эноциты

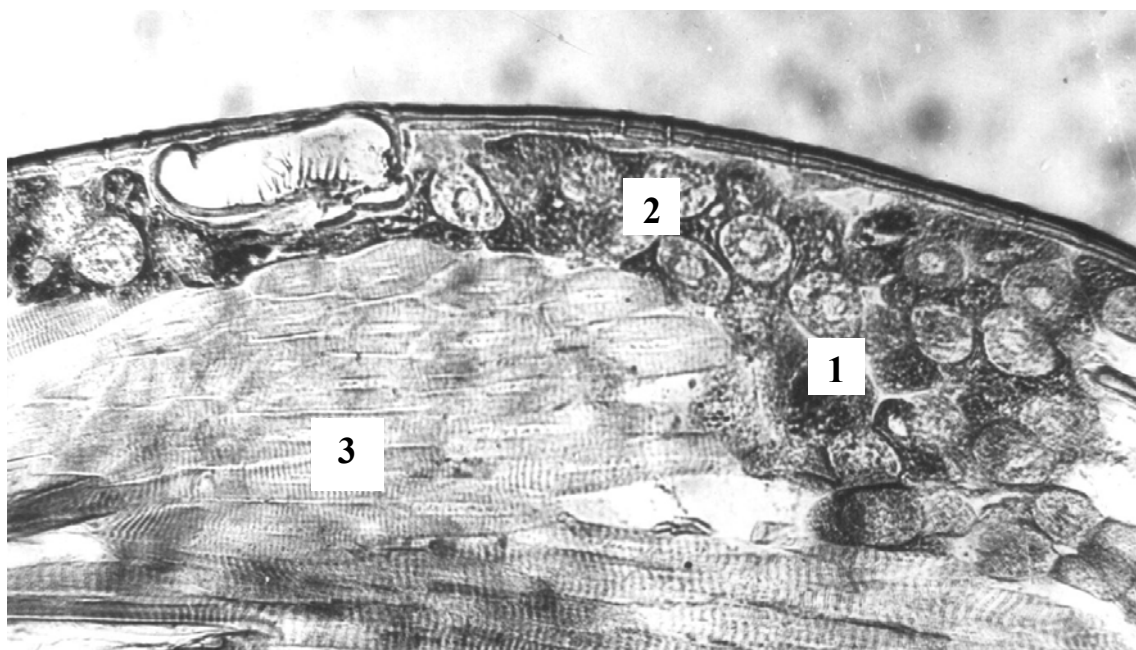


Рисунок 15. Латеральное жировое тело пчелы. Окраска суданом черным В.  
Условные обозначения: 1 – жировые клетки; 2 – эритроциты; 3 – мышцы

Все то, что осталось от пчелы (грудной отдел и брюшко без последнего сегмента и кишечника) следует уложить дорзальной стороной вниз на восковой столик и булавками зафиксировать грудь пчелы в воске. Затем глазными ножницами необходимо аккуратно сделать два продольных разреза брюшка в области границ тергита и стернита, а пластинку из стернитов отстричь. С помощью стеклянных игл следует удалить воздушные мешки и крупные трахеи, которые закрывают располагающееся под ними по центру сердце и посегментно расположенное по его бокам перикардальное жировое тело брюшного отдела пчелы.

Мы для такой работы использовали микроскоп МБС-9 с осветителем ОИ-19. Дальнейшую работу проводили в отраженном свете. Обычно, если все выше перечисленное сделано быстро, то при 24-кратном увеличении (окуляр  $6^{\times}$ , объектив  $4^{\times}$ ) в поле зрения видно пульсирующее сердце, границы брюшка и жировое тело пчелы.

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

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

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

х - нет сведений

**Фиксация.** В нашем случае при изготовлении препаратов для общего обзора и для изучения материала на жир лучше всего использовать 10% раствор нейтрального формалина (Г.И. Роскин, 1946; Г.А. Кононский, 1976), поскольку он не изменяет расстояний между молекулами в состоянии золя, сохраняет их адсорбирующую способность по отношению к воде и

красителям. Особенно важно, что этот фиксатор на водной основе достаточно хорошо сохраняет жиры в объекте.

Применение для фиксации излишне кислого формалина, без предшествующей нейтрализации, может отразиться на способности тканей воспринимать окраску, поэтому формалин следует нейтрализовать (см. пункт «Фиксация материала» Части 1).

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

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

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

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

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

Для обеспечения равномерной и быстрой пропитки тушки пчелы фиксатором достаточно обработать их нейтральным формалином в условиях небольшого вакуума в течение 15 минут. Для этого помещают флакончики с тушками пчел в фиксаторе в герметично закрывающуюся стеклянную бан-

ку, в крышку которой встроен вентиль для соединения с помощью шланга с вакуум-насосом Комовского. Д. Кисели (1962) рекомендует использовать вакуумный насос с величиной конечного вакуума 0,1 мм ртутного столба. Признаком заполнения трахейной системы фиксатором – появление пузырьков воздуха при создании слабого вакуума и опускание тушки брюшка пчелы на дно сосуда с раствором формалина при нормализации давления в сосуде. Дальнейшее хранение фиксированных тушек обычно осуществляют в той же этикетированной посуде в 10% растворе нейтрального формалина.

**Промывка.** Промывка в проточной водопроводной воде в течение примерно трех часов освобождает тушки от формалина (см. пункт «Промывка» раздела 2.2.). Увеличение времени промывки может привести к мацерации тканей объекта.

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

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

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

Из раствора фенола брюшко следует перенести сначала в 12,5% желатин и поставить в термостат при температуре + 37°C в приспособление для создания слабого вакуума. Если брюшко пчел через 1 час после постановки в желатин не тонуло, то с помощью насоса Комовского мы создавали слабый

вакуум – до появления пузырьков воздуха на поверхности желатина и оставляли исследуемые объекты в термостате на сутки.

По истечении суток материал следует переносить из 12,5% раствора желатина в 25% раствор на неделю (цельное брюшко) или на двое суток (стернитная зона брюшка). После этого каждую тушку рекомендуется переложить в свой бумажный кораблик (рис. 2), на котором карандашом были написаны: № пчелиной семьи, дата и степень развития жирового тела.

Для изучения жирового тела требуются поперечные срезы, поэтому необходимо изготовить высокий бумажный кораблик. В него наливают сравнительно небольшой слой желатина и в течение непродолжительного времени – 5-10 минут дают ему слегка застыть в помещении. После этого на уплотнившийся слой желатина помещают тушку пчелы спинкой вниз, доливают кораблик доверху 25% раствором желатина.

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

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

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

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

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

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

Если качество получаемых срезов низкое, следует выяснить причины, сделать об этом запись в дневнике и искать пути исправления ситуации. В нашем случае наиболее эффективными путями были создание слабого вакуума при фиксации и пропитке объекта, применение высушивания желатинового блока вместо его дубления в формалине, изменение толщины среза, изменение наклона ножа.

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

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

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

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

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

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

Липиды при окраске приобретают выраженный черно-серый цвет. Хорошо окрашиваются миелин, проводящие пути центральной и перифери-



ческой нервной системы. Достаточно отчетливо выявляются синапсы на моторных нейронах спинного мозга.

Время окрашивания различных тканей определяется эмпирически. Наш опыт окрашивания жирового тела пчелы показал, что передерживание объекта в судане черном В не опасно.

Срезы органов, богатых фосфатидами окрашиваются в течение 1-3 минут. При окрашивании на жир срезы жирового тела пчелы мы оставляли на сутки и более в растворе красителя и получали слегка перекрашенные срезы, которые затем дифференцировали в 70% спирте и получали контрастные четкие картины расположения жира в клетке и общей топографии (рис. 11).

Поскольку судан черный В окрашивает фосфолипиды, то на срезе после окраски хорошо просматриваются «черные» форменные элементы жирового тела – липоциты и эноциты, и поперечнополосатая мускулатура стенки сердца и межсегментная мускулатура (рис. 15), клетки восковой железы и их ядра; в серый цвет окрашивались гиподерма и перикардальные клетки. Ядра липоцитов (жировых клеток), в отличие от ядер эноцитов, суданом черным В не прокрашиваются (рис. 12-14), что позволяет судить о различиях в функциональной активности этих клеток.

Четкую окраску оболочек эноцита и его ядра можно использовать при характеристике ядерно-плазменного отношения, что позволит связать возрастные функциональные особенности пчел и их физиологическое «старение» (В.И. Белявский, 1985).

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

При изучении полученных препаратов в дневнике отмечают № стекла, название краски и рисуется схема расположения срезов. Самый простой способ – нарисовать схему: квадрат покровного стекла, а в нем место обнаружения цели.

Другой способ – поставить точку тушью на предметном стекле рядом с местом углового скоса объектива большого увеличения (объект в это время должен быть виден в центре поля зрения).

Лучшим способом, на наш взгляд, является изучение под микроскопом препаратов, закрепленных в специальном устройстве СТ-12, препаратоводителе, позволяющем передвигать препарат по предметному столику микроскопа в двух взаимоперпендикулярных направлениях и считывать координаты. Две шкалы перемещений позволяют быстро устанавливать искомый объект в центре поля зрения, если координаты его были ранее (при первом изучении срезов) записаны в дневнике.

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

Готовят глицерин-желатин следующим образом. Необходимо взять 5 г мелко нарезанного чистого пищевого желатина и залить 30 мл дистиллированной воды. Получившуюся смесь следует оставить на 2-3 часа набухать. Затем в получившуюся смесь добавляют 30-35 г глицерина и 0,5 г кристаллической карболовой кислоты, которые растворяют и, постоянно помешивая, нагревают на водяной бане.

Поскольку при сильном и продолжительном нагревании желатин теряет способность затвердевать после охлаждения, то приготовленную смесь не следует доводить до кипения. После нагревания ее профильтровывают в горячем виде через влажную стеклянную вату. Для заключения срезов в смесь, последняя должна быть нагрета до 30-35°C.

Каплю расплавленного глицерин-желатина стеклянной палочкой наносят на окрашенный срез и быстро покрывают стеклом. Важно, чтобы кап-

ля не была крупной. В противном случае при избытке среды препарат представляется весьма затруднительным рассматривать под иммерсией.

## 2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

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

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

Традиционно для исследования нервной системы применяются методы импрегнации солями металлов, основанный на различной способности структур клеток и тканей удерживать или восстанавливать соли тяжелых металлов (например, серебра, свинца, осмия, золота), растворами которых были пропитаны объекты микроскопирования, в связи с чем определенные участки их оказываются окрашенными в черный, бурый или другой цвет.

Наиболее важным этапом импрегнации является восстановление металлической соли, которое чаще обуславливается редуцирующим (восстанавливающим) действием некоторых веществ, содержащихся в определенных компонентах тканей (аскорбиновая кислота, адреналин, креатин, глутатион, некоторые пигменты и пр.). Иногда объект обрабатывают редуцирующими реактивами (формалин, пирогалловая кислота и т.п.). В ряде случаев в качестве редуцирующих агентов при импрегнации используют солнечный свет или ультрафиолетовое облучение от искусственных источников, подкисление, нагревание и т.д.

В процессе импрегнации большое значение имеют размеры межмикроцеллярных пространств тканевых элементов, электростатические свойства микроскопических структур, размер образующихся частиц восстановленного металла и т.п. Поэтому успех импрегнации в значительной степени определяется способом фиксации, рН применяемых растворов, чистотой используемых реактивов и другими факторами. Меняя условия импрегнации, можно достичь избирательного выявления тех или иных тканевых элементов в зависимости от задач исследования.

Например, импрегнация осмием (чаще четырехокисью осмия) служит преимущественно для выявления жиров и липоидных веществ (окрашиваются в оливково-черные или коричневые тона). Импрегнация осмием существенно понижает растворимость жиров в абсолютном спирте, хлороформе, эфирных маслах и др., вследствие чего этот метод обладает преимуществом. Особенно это важно при изучении миелиновых нервных волокон. Импрегнация осмием применяют также для выявления пластинчатого комплекса (комплекса Гольджи) в клетках, а также для фиксации клеток с целью дальнейшей электронной микроскопии.

В исследованиях преимущественно используется импрегнация серебром. Успех серебрения во многом зависит от соответствующей микроскопической и субмикроскопической плотности тканевых элементов и невысокого содержания в них защитных коллоидов.

Импрегнацию солями серебра используют для выявления нервных клеток, нейроглиальных элементов, периферических нервных волокон и их окончаний, ретикулярной стромы органов, межклеточного вещества эпителия и гладкой мускулатуры, бледных трупом и др.

Восстановление (редукция) металлического серебра приводит к осаждению его на определенных структурах, которые приобретают коричневый или черный цвет. Среди тканевых компонентов различают аргентаффинные, в которых редукция серебра осуществляется в темноте за счет их собственных восстановительных свойств, и аргирофильные, в которых серебро осаждается только под действием света или химических восстановителей.

Сущность методов серебрения остается все еще не вполне ясной. Большинство этих методов основано на эмпирических разработках. По-видимому, в феномене аргентаффиности определенная роль принадлежит присутствию в клетках производных катехоламинов, а развитие аргирофилии связано, в частности, с наличием в тканевых компонентах сульфгидрильных групп (SH-групп) и ненасыщенных жирных кислот.

Из солей серебра для методов серебрения обычно используют 0,5-20% растворы нитрата серебра, нередко в виде аммиачного серебра. Применяют также ацетат, карбонат, пикрат, лактат серебра, протаргол и др. Во всех случаях для методов серебрения требуются химически чистые реактивы и посуда; работать следует стеклянными иглами, избегая соприкосновения препаратов с металлом.

В зависимости от цели, серебрение проводят либо на свежих, нефиксированных препаратах, либо после фиксации, чаще 10-20% раствором формалина. Без фиксации методами серебрения выявляют межклеточные границы эпителия и мезотелия.

Серебро может служить также агентом, фиксирующим ткань. Фиксирующие свойства растворов серебра используют при импрегнации выстилки альвеол по методу Эберта, когда через бронх или трахею наполняют долю или все легкое 0,5% раствором нитрата серебра с последующим УФ-облучением замороженных срезов легкого, а также для выявления нейрофибрилл в свежих кусочках ткани мозга.

На фиксированных препаратах методы серебрения позволяют селективно выявлять многие элементы нервной ткани (отростки нервных клеток (рис. 16), нервные клетки (рис. 17), нейрофибриллы, нейроглию, осевые цилиндры и узлы миелиновых нервных волокон, безмиелиновые волокна, нервные окончания), аргирофильные волокна соединительной ткани, аргентаффиные клетки желудка и кишечника (аргентаффиноциты), хромаффиные клетки надпочечников и параганглиев, некоторые пигменты, а также известь и др. Методы серебрения применяют также в бактериологии, вирусологии, цитологии – импрегнация комплекса Гольджи, выявление ядрышковых организаторов.

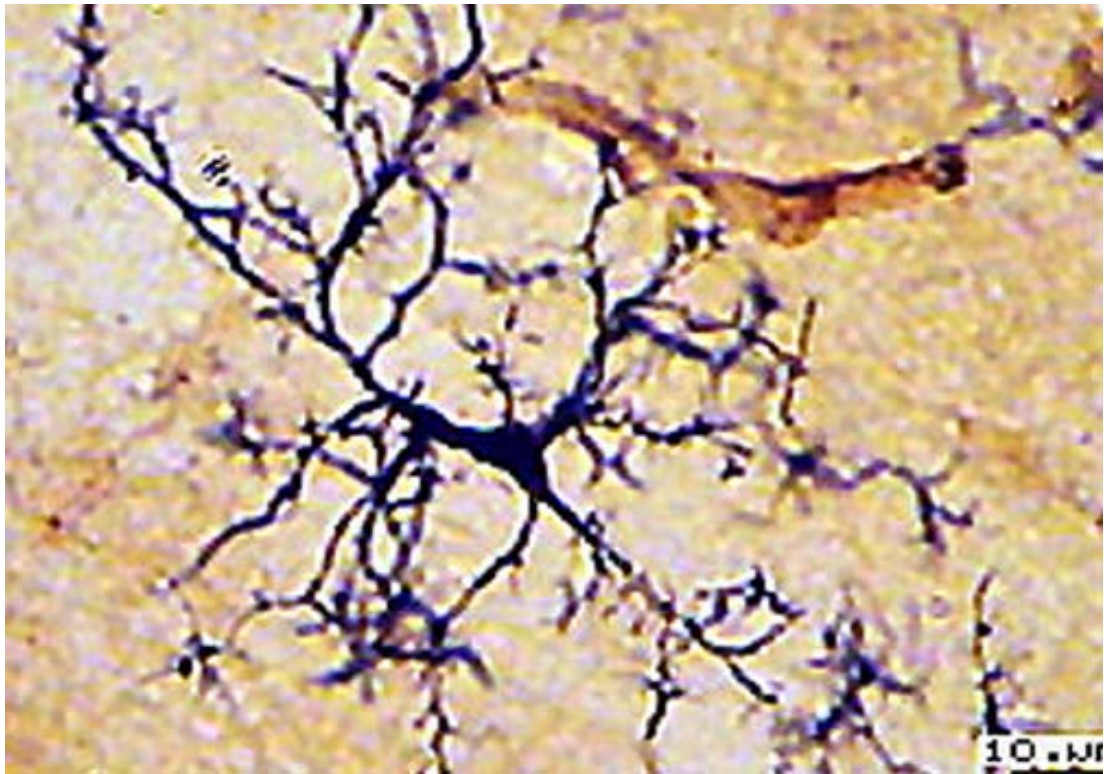


Рисунок 16. Радиарные слои гиппокампа. Ветвистые отростки микроглиоцитов. Импрегнация серебром. Ув. об.х40. (по В.И. Кузьмину, 2016)

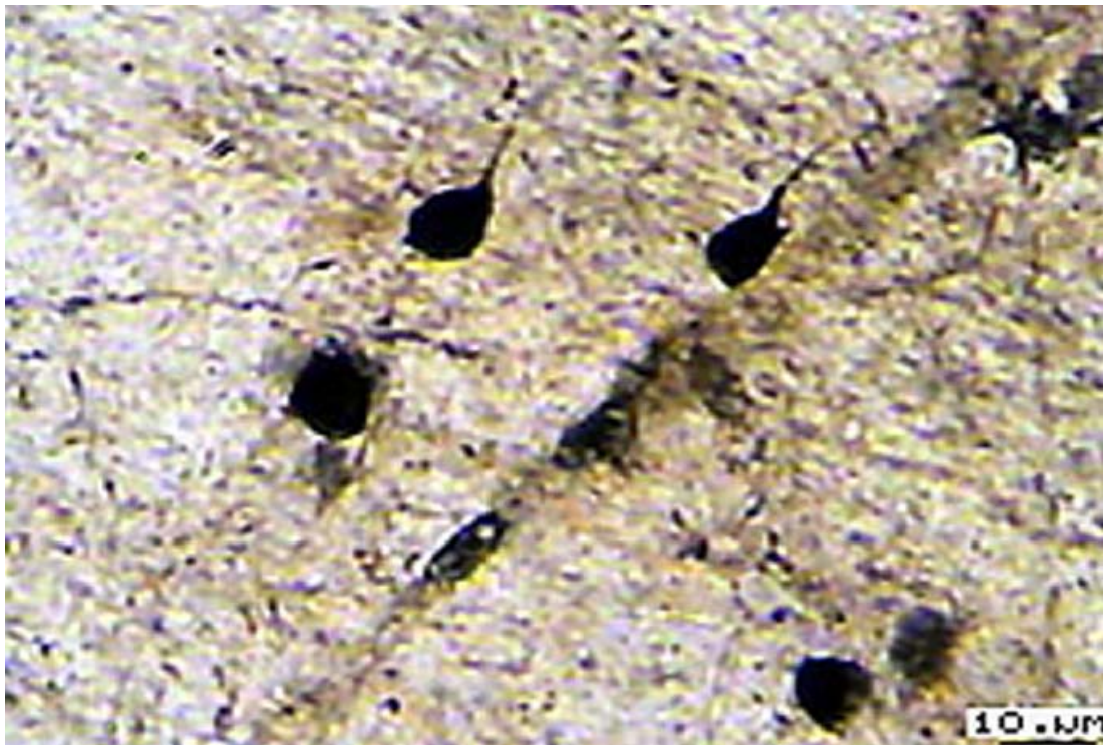


Рисунок 17. Лакунарные слои гиппокампа. Безотросточные клетки с концевыми жгутиками. Импрегнация серебром. Ув.об.х40. (по В.И. Кузьмину, 2016)

Разработан ряд вариантов методов серебрения для выявления определенных элементов нервной ткани в различных отделах нервной системы. Эти варианты различаются по составу фиксирующих смесей и способам редукции серебра.

Так, элементы нервной ткани изучают либо путем обработки серебром целых кусочков ткани (тотальная импрегнация) с последующим изготовлением срезов, например, при тотальной импрегнации с пиридином по Бильшовскому, варианте этого способа – методе Буке, а также при использовании методов Гольджи, Рамон-и-Кахаля, либо путем импрегнации замороженных срезов. Периферические нервы и их окончания хорошо выявляются по методу Кампоса, представляющего собой модификацию метода Билыновского – Грос – Лаврентьева.

При всех методах серебрения быстрое прекращение серебрения достигается путем погружения препаратов в аммиачную воду (разведенный в три раза 25% раствор аммиака). Избыточное осаждение серебра можно устранить дифференцировкой в 0,25% растворе перманганата калия, 2% растворе персульфата аммония и др. После применения методов серебрения срезы можно тонировать растворами солей золота.

Для золочения используют 0,5-1% раствор хлорного золота ( $\text{AuCl}_3$ ) или золотохлористоводородной кислоты  $\text{H}(\text{AuCl}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . При тонировании срезов, импрегнированных серебром, может отмечаться некоторое ослабление импрегнации тонких нервных волокон и синаптических структур. Срезы помещают в разведенный раствор хлорного золота. Обычно несколько капель 1% раствора на 10 мл дистиллированной, воды, при некоторых модификациях применяют более концентрированные растворы – до 1% нередко с добавлением небольшого количества уксусной кислоты. Срезы из коричневатого-желтого становятся серо-стальными или красновато-фиолетовыми; импрегнированные серебром элементы при этом приобретают черный или темно-фиолетовый цвет.



Предпочтительнее использовать замороженные срезы, изготовленные из нефиксированной ткани или залитые в желатин.

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

### **Фиксация материала.**

Фиксация представляет собой физико-химический процесс, обеспечивающий сохранение прижизненной структуры клеток и тканей путем инактивации лизосомальных ферментов – причины аутолиза, ингибирования бактериального и грибкового роста – причины гетеролизиса, коагуляции белков и образования новых связей между биомолекулами.

Не существует идеального способа фиксации, подходящего для всех типов микроскопических исследований. Все методы фиксации приводят в той или иной степени к образованию артефактов. Следует подчеркнуть, что основная причина неудачного окрашивания (особенно иммуногистологического) заключается в неадекватной фиксации. Большое значение имеет выбор фиксатора с учетом целей исследования (табл. 2).

Наиболее качественная фиксация независимо от фиксатора требует соблюдения следующих условий:

1. Ткань после вырезки должна быть помещена в раствор фиксатора как можно быстрее. Не рекомендуется откладывать фиксацию, например, в формалине более чем на 1 ч.
2. Объем фиксатора должен превышать объем образца в 20-30 раз и составлять не менее 20-30 мл, это позволит избежать разбавления раствора фиксатора тканевой жидкостью и кровью.

Выбор фиксатора для последующего выявления на гистологическом срезе различных веществ (по М.О. Мавликееву и др., 2020)

Выявляемое на срезе вещество	Оптимальный фиксатор	Неподходящий фиксатор
Белки	Нейтральный забуференный формалин	Тетраоксид осмия
Ферменты	Без фиксации	Химические фиксаторы
Жиры	Без фиксации или глутаральдегид/тетраоксид осмия	Спирты, нейтральный забуференный формалин
Нуклеиновые кислоты	Спирты, НОРЕ	Альдегиды
Мукополисахариды	Без фиксации	Химические фиксаторы
Биогенные амины	Жидкость Боуэна, нейтральный забуференный формалин	
Гликоген	Спирты	Тетраоксид осмия

3. Ткань после вырезки должна быть помещена в раствор фиксатора как можно быстрее. Не рекомендуется откладывать фиксацию, например, в формалине более чем на 1 ч.
4. Объем фиксатора должен превышать объем образца в 20-30 раз и составлять не менее 20-30 мл, это позволит избежать разбавления раствора фиксатора тканевой жидкостью и кровью.
5. Если цвет фиксатора изменился после помещения в него образца, раствор фиксатора следует заменить на свежий.
6. Фиксатор должен иметь рН, близкий к тканям (7,35-7,45), это уменьшит изменения объема ткани и денатурацию белков, а также

образование темно-коричневого формалинового пигмента (результата взаимодействия с гемоглобином) в случае использования незабуференного формалина, который диспропорционирует в воде на муравьиную кислоту и метанол. Нейтрализацию производят чаще всего с помощью буфера (например, фосфатного).

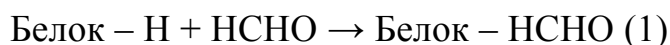
7. Температура фиксации может варьировать и обычно производится в пределах 20-37°C. Более высокая температура может применяться для экспресс-фиксации, однако следует учитывать, что увеличение температуры фиксатора ускоряет процесс, но приводит к большим изменениям в тканях. Фрагменты кишечника и поджелудочной железы рекомендуют фиксировать первые два часа в холодильнике при +4°C для инактивации ферментов и предупреждения аутолиза.
8. Время фиксации следует соблюдать для каждого из фиксаторов, например, для формалина оптимальное время фиксации 24 ч при комнатной температуре и 18 ч при +37°C, длительное пребывание образцов в растворе формалина возможно, но снижает качество иммуногистологического окрашивания.
9. Следует избегать попадания прямых солнечных лучей на емкость с фиксируемым образцом.
10. Нельзя допускать повторное использование фиксатора.
11. При долгом стоянии неразбавленного формалина происходит полимеризация формальдегида с выпадением белого осадка, который необходимо растворить нагреванием перед использованием.
12. Кусочки материала не должны соприкасаться, находясь в одной посуде.
13. Фиксатор должен равномерно покрывать исследуемый материал со всех сторон; для этого на дно банки кладут слой стеклянной ваты или марлю.

Одним из наиболее популярных фиксаторов является формалин.

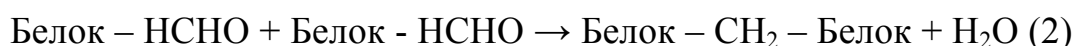
Этапы фиксации в формалине:

1) пропитывание ткани формалином (достаточно быстро, скорость – 1 мм/ч);

2) ковалентное связывание (реакция 1);



3) образование метиленовых мостиков (реакция 2).



В процессе этой реакции образуются метиленовые мостики – «сшивки» между аминокислотными остатками (в основном лизин, цистеин, аспарагин и тирозин) индивидуальных белков и между соседними белками, тем самым происходит дублирование пептидных связей и предотвращение распада полипептидов на отдельные фрагменты.

Несмотря на то, что пропитывание ткани формалином происходит достаточно быстро, завершается фиксация только после формирования перекрестных связей между молекулами белка. С образованием метиленовых мостиков связан и недостаток фиксации в формалине, поскольку при их образовании происходит постепенное «маскирование» антигенных детерминант. Это существенным образом ослабляет их реакцию с используемыми в иммуногистологическом окрашивании диагностическими антителами. Есть данные, что минимальное время фиксации при комнатной температуре, которое позволяет обеспечить достаточную сохранность морфологии образца при минимальном маскировании антигена, составляет 6 ч.

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

При фиксации пчел в кальций-формоле по Бэкеру фиксатор плохо проникает внутрь из-за несмачиваемости хитина водными растворами. Трахейная система пчелы, как правило, не заполняется фиксирующей жидко-

стью, и пчела плавает на ее поверхности. По этой причине еще в процессе сбора материала в полевых условиях покрывали плавающих пчел слоем марли, а затем при фиксации в лабораторных условиях применяли вакуум. Фиксированный материал помещали в холодильник. При пониженной температуре происходит замедление или полное прекращение аутолиза, благодаря чему лучше сохраняются тонкие структуры. Фиксированный материал можно хранить в холодильнике до момента его использования.

Головной мозг пчелы заключен в прочную хитиновую капсулу, которая значительно затрудняет резку объекта на микротоме. Кусочки хитина деформируют и разрывают нервную ткань. Наибольшую трудность представляет работа с выходящими пчелами по сравнению с куколками.

После фиксации материала мы удаляли глазными ножницами насколько это возможно фронтальную и дорзальную части хитиновой капсулы. При заливке отмечали поверхность, освобожденную от хитина, и для нарезки блок устанавливали таким образом, чтобы нож микротомы входил в него со свободной стороны.

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

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

**Заливка в желатин.** Для растворения желатина необходимо приготовить карболовую воду: в 100 мл дистиллированной воды при постоянном взбалтывании растворить 1 г карболовой кислоты. Можно использовать для растворения желатина 1% тимоловую воду (1 г тимола растворяют в 100 мл дистиллированной воды при температуре +50°C с последующим фильтрованием). Однако для растворения желатина лучше использовать 1% карболовую воду, она лучше подавляет рост микробов.

Измельченный или порошкообразный желатин смешивается в соотношении 1:3 (1 часть желатина на 3 части жидкости) с 1% карболовой или тимоловой водой, далее при помешивании в течение 20 минут идет набухание, затем растворяют на водяной бане при температуре +37°C и фильтруют через воронку в термостате. Часть полученного 25% раствора желатина смешивается с равным количеством карболовой воды для получения 12,5% раствора желатина. Растворы желатина лучше готовить по мере необходимости, хранить застывшим в холодильнике в плотно закрытой посуде. Многократное нагревание раствора желатина не рекомендуется, перед хранением лучше расфасовать его на объемы необходимые для однократного использования.

Промытые кусочки материала помещаются для пропитывания в 12,5%, затем в 25% раствор желатина при температуре +37°C. Для улучшения заполнения трахейной системы пчелы раствором желатина и ускорения пропитки мы применяли вакуум, откачивая несколько раз воздух до погружения тушек пчел на дно сосуда.

Для этого можно изготовить в лабораторных условиях простейший вакуум-термостат (Д. Кисели, 1962). Необходимо взять стеклянную банку с металлической винтовой крышкой, лучше низкую, с широким горлом, чтобы в нее было легко ставить и извлекать несколько мелких емкостей с раствором желатина или другой средой. В крышке делается отверстие, которое закрывают резиновой пробкой, с вставленной в нее стеклянной трубкой. На

стеклянную трубку надевают резиновый шланг от вакуумной установки, его вводят в термостат через вентиляционное отверстие или отверстие, предназначенное для термометра.

Во втором случае термометр помещают внутрь термостата. Термостат должен иметь стеклянную дверку, так как необходим визуальный контроль за температурой и состоянием пропитываемого материала. При создании вакуума среда начинает вспениваться, тушки пчел всплывают на поверхность. В этот момент необходимо прекратить откачку воздуха, иначе тушки вместе с пеной выпадут из своих емкостей.

Если дно банки не полностью заполнено, то при открывании ее, после завершения вакуумной обработки, находящиеся в ней емкости могут упасть, а содержимое разлиться. Необходимо заполнить дно пустой посудой, ватой или другим уплотнителем.

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

Материал должен быть равномерно окружен заливочной средой, поэтому сначала на дно кораблика наливают небольшое количество 25% желатина (примерно на половину объема). На застывший желатин выкладывают объект, заливают оставшимся желатином, препаровальной иглой придают необходимое положение кусочкам материала и охлаждают.

Охлаждение можно проводить в большой чашке с холодной водой. Сначала охлаждают дно кораблика, затем постепенно погружают в воду. Когда желатин застынет, кораблик погружают в воду целиком и удерживают в ней 5-10 минут. Преждевременное погружение ведет к смешиванию желатина с водой.

Охлаждать желатин можно в холодильнике. Из затвердевшего желатина мы вырезали блоки, которые подсушивали на воздухе.

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

Если желатиновый блок в день изготовления не использован, то его 1-2 недели и даже более можно хранить в плотно закрытой посуде.

Для более длительного хранения необходимо поместить его в формалин в разведении 1:9 (4% раствор формальдегида). Перед резкой на замораживающем микротоме блоки нужно отмыть от формалина в проточной воде в течение 10-15 минут. Следует помнить, что хранение блока в формалине уплотняет желатин и делает его ломким и формалиновая обработка не дает возможности полностью удалить желатин из срезов во время окрашивания.

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

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

**Обработка предметных стекол яичным белком.** Для хорошего приклеивания срезов подготовленное предметное стекло покрывается тонким слоем белка с глицерином. Для приготовления белка с глицерином свежий яичный белок (без примеси желтка) взбивается шпателем и выливается в воронку с фильтром, смоченным дистиллированной водой. Фильтрация продолжается около 24 часов. К профильтрованному белку обычно доливается



равный объем глицерина, размешивается и добавляется один кристаллик тимола для предупреждения загнивания.

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

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

**Импregnация аммиачным серебром.** Это один из классических методов исследования нервной ткани. Он предполагает следующее:

- 1) срезы помещаются на 24 часа в 2% раствор азотнокислого серебра;
- 2) быстро промываются дистиллированной водой (2-3 секунды);
- 3) помещаются в свежеприготовленный раствор аммиачного серебра на 10-20 минут. Срезы должны принять в этом растворе желтоватый оттенок;
- 4) быстро проводятся через 2-3 чашки с дистиллированной водой;

- 5) восстанавливаются в формалине, не содержащем кислоты (1:4 части обычной воды) в течение 10 минут. Срезы быстро окрашиваются в шиферно-серый цвет;
- 6) промываются в обычной воде 15 минут;
- 7) золотятся в разбавленном растворе хлорного золота (3-5 капель 1% раствора желтого хлорного золота на 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды), пока коричневый тон препарата не переходит в серый или серо-фиолетовый;
- 8) фиксируются 1-2 минуты в 5% растворе гипосульфита;
- 9) тщательно промываются в воде (1-2 часа).

**Приготовление раствора аммиачного серебра.** Правильное приготовление раствора аммиачного серебра имеет большое значение для получения хорошего результата. В мензурку со стеклянной пробкой, которая используется только для приготовления раствора серебра, надо отмерить 10 см<sup>3</sup> 10% раствора азотнокислого серебра и прибавить 5 капель 40% едкого натрия; образуется коричнево-черный осадок окиси серебра. При постоянном взбалтывании, к раствору серебра необходимо прибавлять по каплям аммиак до тех пор, пока от осадка не останется несколько крупинок.

Вначале можно прибавлять по 3-5 капель, когда облачка осадка начнут разрыхляться, необходимо прибавлять каплю за каплей, после каждой капли нужно взбалтывать раствор и выждать 10-20 секунд, прежде чем прибавить следующую. Необходимо избегать избытка аммиака. Полученный объем надо довести дистиллированной водой до 20 см<sup>3</sup>. Раствор содержит аммиачную окись серебра и аммиачный нитрат серебра; его следует готовить непосредственно перед употреблением, так как он быстро становится непригодным, и держать плотно закрытым.

Многочисленные современные методы импрегнации серебром весьма несовершенны. Как и многие другие методы в гистологической технике он применяется эмпирически, и сущность процесса импрегнации еще мало

изучена. Что касается импрегнации серебром ретикулиновых волокон, то здесь главное значение принадлежит цистинсодержащим белкам.

Г.В. Орловская и А.А. Тустановский (1954) дали анализ реакций, составляющих процесс импрегнации по Бильшовскому в модификации Фута. Они показали, что реакция сульфгидрильных групп белков является центральной в развитии явления аргирофилии.

Способность ретикулиновых волокон пропитываться серебром может быть также связана и с жирами, и с полисахаридами. По данным А.А. Тустановского и Г.В. Орловской (1953), окисление углеводного компонента ретикулина и коллагена периодатом вызывает резкое усиление аргирофилии белково-углеводных комплексов.

Известно также, что материал, залитый в желатин, импрегнируется лучше, чем заключенный в парафин. Г.В. Орловская с соавторами (1959) на основе материалов, полученных с помощью электронного микроскопа, установила, что ретикулиновые волокна состоят из фибрилл, заключенных в бесструктурное вещество (матрикс), и гистохимические свойства их обусловлены бесструктурным веществом, а не фибриллярным компонентом.

Как показывает практика, даже тщательное соблюдение всех условий серебрения (чистота посуды и реактивов, качество воды и пр.) не гарантирует хороших результатов. Несовершенство методов серебрения и, в первую очередь, элементов нервной ткани, объясняется тем, что здесь имеют значение многие факторы: качество формалиновой фиксации, промывка в водопроводной воде, сложные физико-химические процессы, происходящие при пропитывании тканей растворами серебра, многообразие свойств самой нервной ткани и пр. Эти факторы трудно учитывать и регулировать.

По этой причине для адекватной трактовки морфологических картин импрегнированной нервной ткани требуется постоянная практика и сравнительный анализ. Характер отложения серебра в клетках может быть самым различным и отражать различные функциональные состояния структур нервной ткани (рис. 18).

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

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

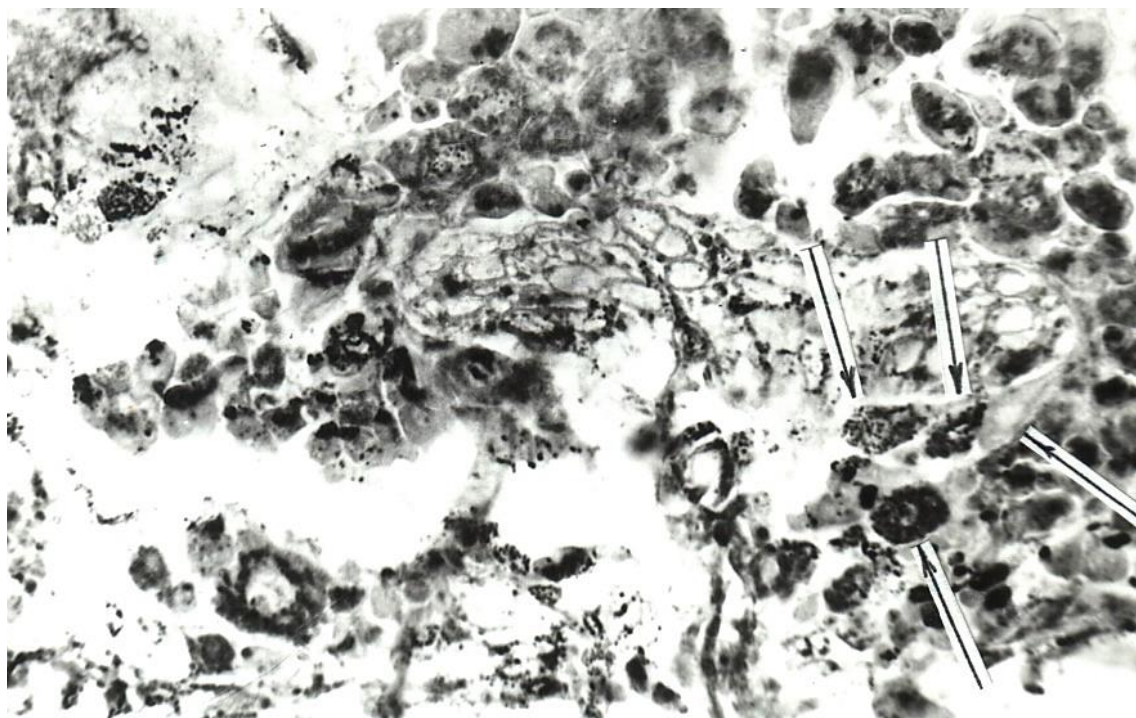


Рисунок 18. Нейроны центрального тела с различной степенью аргирофилии.  
Окраска по Бильшовскому (по О.С. Анисиной, 1996)

Частые дефекты серебрения определяют необходимость использования средств для исправления переимпрегнированных препаратов. Наиболее доступными являются следующие:

- 1) 0,25% раствор марганцовокислого калия;
- 2) 2% персульфат аммония;
- 3) смесь 5% раствора гипосульфита и 20% красной кровяной соли (из расчета 1-2 капли красной кровяной соли на 5-10 мл гипосульфита).

Все эти реактивы готовят на дистиллированной воде. Обработка обычно проводится очень быстро, в течение 5-10-20 секунд, однако в некоторых

случаях может занимать и больше времени. Срезы становятся более светлыми, поскольку обработка сопровождается извлечением части восстановленного серебра и ослаблением фона (Г.А. Меркулов, 1969).

**Просветление срезов.** В результате просветления срезы становятся однородными в отношении преломления света. Полное обезвоживание препарата – обязательное условие для просветления и заключения его в смолы.

После окрашивания водными красителями обезвоживание препаратов проводят спиртами постепенно возрастающей крепости (спиртовый ряд, например, 60-, 80-, 96% по 1-2 минуте в каждом). Ниже представлена таблица разбавления спиртов (табл. 3).

Таблица 3

Таблица разведения спирта до необходимой концентрации

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

По оригинальной версии серебрения Бильшовского (Б. Ромейс, 1953) рекомендуется дальнейшую обработку проводить в карбол-ксилоле. Д. Кисели (1962) пишет, что обезвоживание в абсолютном спирте не очень эффективно, так как влага, содержащаяся в воздухе, может снизить степень обезвоживания. В этом случае срезы после ксилола и толуола мутные, непрозрачные.

Для полноценного обезвоживания он рекомендует пользоваться после 96% спирта карбол-ксилолом, который готовят следующим образом. Кристаллическую карболовую кислоту расплавляют в термостате при температуре +56°C, затем смешивают с ксилолом или бензолом в соотношении 1:4. Этот раствор имеет слабый красновато-желтый оттенок. Б. Ромейс (1953) рекомендует брать раствор меньшей концентрации (10 г фенола на 100 см<sup>3</sup> ксилола), но чаще его менять. Это оказывает менее вредное воздействие на кожу рук исследователя, а также щадит препараты.

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

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

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

Если обезвоживание проделано недостаточно тщательно, то при переносе предметного стекла в ксилол появляется беловатое помутнение. В таком случае препарат кладется в новую порцию абсолютного спирта. Необходимо следить, чтобы перед переносом в ксилол на верхних краях предметного стекла, не погружающихся в жидкость, не было следов воды. Предметные стекла следует переносить в различные жидкости по одному.

Иногда для ускорения процесса стекла, приложенные спинка к спинке, переносят парами. Обычно это не рекомендуется, так как жидкость, находящаяся между стеклами, полностью не вытесняется. Жидкость из преды-

дущей емкости не должна переходить в следующую; перед каждым погружением обратную сторону предметного стекла и свободные края быстро протирают сухой марлевой салфеткой.

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

**Заключение срезов.** Для заключения срезов после серебрения мы пользовались канадским бальзамом. Канадский или пихтовый бальзам готовят заранее; сухой бальзам растворяют в ксилоле или толуоле до консистенции свежего меда (растворение идет медленно; его можно значительно ускорить, пользуясь термостатом).

Для хранения бальзама пользуются специальными широкогорлыми склянками, закрывающимися притертыми колпачками. Поверхность шлифа слегка смазывают глицерином. Внутри склянки помещают тонкую стеклянную палочку, с помощью которой бальзам извлекается по капле. При отсутствии специальной посуды можно пользоваться пенициллиновым флаконом. В резиновой крышке флакона прокалывается отверстие, через которое до самого дна вставляется стеклянная глазная палочка. При загустении в бальзам доливают растворяющую жидкость и доводят ее до нужной консистенции.

Предметное стекло с наклеенным на него срезом извлекают из ксилола, быстро подсушивают с обратной стороны и по краям сухой салфеткой и наносят каплю канадского бальзама. Это необходимо выполнять быстро, не давая срезу подсохнуть.

При заключении в бальзам следует избегать попадания пузырьков воздуха под покрывное стекло. Для этого на край среза кладут каплю бальзама, очищенное покрывное стекло ставят на предметное под углом 45°, бальзам растекается по краю покрывного стекла. Покрывное стекло медленно опускается так, чтобы срез был в центре его.

Бальзама должно быть достаточно, чтобы между стеклами не было пузырьков воздуха, и не так много, чтобы он вытекал за границы покрывного

стекла. В том случае, если бальзам не заполнил все пространство под покровным стеклом, то можно нанести его на предметное стекло у края покровного и он затечет под стекло.



### **2.3. СКЕЛЕТОХРОНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД В ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЗЕМНОВОДНЫХ И ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ**

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

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

В последние годы появились новые, в том числе и экзотические методы, благодаря которым появилась возможность достаточно точно определить возраст у некоторых специфических групп позвоночных. В частности имеет место использование метода оценки содержания Sr-90, содержания белка в хрусталике и др. у млекопитающих (Г.А. Клевезаль, 2007). Однако, применимость таких подходов в демографических исследованиях популяций амфибий и рептилий в настоящее время не рассматривается.

Первый метод основан на положении о том, что амфибии и рептилии являются животными, которые растут на протяжении всей жизни, то есть их можно классифицировать как животных с «бесконечным» ростом (М.В. Мина, Г.А. Клевезаль, 1976). На основании этого положения в традиционных подходах исследования демографической структуры популяций и роста амфибий и рептилий достаточно долго господствовал метод определения возраста особей по размерам тела (А.Г. Банников, 1950; П.В. Терентьев, 1950).

Данный подход дает возможность в относительно короткие сроки собрать информацию о размерно-возрастной структуре исследуемой популяции. При этом подходе, как правило, можно выделить максимум только три более или менее выраженных размерно-возрастных класса (группы) животных: juvenes, subadultus, adultus.

Надежным методом для исследования демографии популяций амфибий и рептилий является массовое индивидуальное мечение особей с повторным отловом. Метод достаточно прост и не требует какого-либо специального оборудования. Мечение животных можно осуществлять непосредственно в полевых условиях. Наиболее распространенные методы мечения: ампутация дистальных фаланг пальцев по определенной схеме, нанесение цветных меток у ящериц или надрезы брюшных щитков у змей. Для бесхвостых амфибий и ящериц может быть использована схема мечения, предложенная Мартовым (В. Martof, 1953) (см. рис. 19 а).

Суть метода заключается в последовательной ампутации дистальных фаланг пальцев животных в определенной последовательности, где каждый палец является соответствующим схеме мечения номером. При помощи такого метода стационарными исследованиями удалось выявить продолжительность жизни ряда видов (В.И. Гаранин, 1969). Однако работа по определению максимальной продолжительности жизни этим методом является очень трудоемкой и требует длительных стационарных исследований. Подобный подход неприменим при исследовании экологии хвостатых амфибий в связи с высокой регенерационной способностью их конечностей.

Наибольшее распространение в настоящее время получил метод определения абсолютного возраста по слоям, образующимся в регистрирующих структурах. У амфибий и рептилий регистрирующей структурой является костная ткань. Данный метод основан на сезонных изменениях темпов роста животных. Так, в течение периода активного роста в костях животных формируются широкие слои костной ткани, а в период остановки, например, в период зимней спячки, формируются узкие линии, называемые в русско-

зычной литературе линиями склеивания (линиями покоя), а в англоязычной – restinglines. Этот метод позволяет определить с высокой точностью не только абсолютный возраст особи, но и скорость линейного роста (Э.М. Смирин, 1983; В. Rozenblut, М. Ogielska, 2005). В настоящее время определение возраста скелетохронологическим методом проведено на нескольких сотнях видов земноводных и пресмыкающихся.

Существуют три основных способа выявления годовых слоев в кости:

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

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

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

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

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

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

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

Удобнее работать с крупными костями – бедренными, голенью и др. Возможно прижизненное определение возраста, поскольку в фалангах пальцев бесхвостых амфибий и ящериц также формируется слоистая структура (Э.М. Смирин, 1989). Последняя фаланга, несущая коготь, для этих целей непригодна. Для получения корректных результатов необходимо использовать фаланги одного и того же пальца у всех исследуемых особей. Можно совместить эту процедуру с мечением амфибий путем ампутации фаланг пальцев.

Следует отметить, что в последние годы все более широкое применение находят методы идентификации особей амфибий и рептилий на основе обработки цифровых изображений с использованием глубоких сверточных нейронных сетей. Подобного рода исследования ориентированы на минимизацию повреждений животных. Перспективность таких работ не вызывает сомнения. Более того, для некоторых видов именно такой подход может оказаться единственно возможным при популяционных исследованиях (например, для хвостатых амфибий).

Однако, как показывают результаты современных исследований в этой сфере считать метод идентификации особей абсолютно эффективным пока некорректно (Н.А. Грушецкий, С.В. Огурцов, 2021; М. Раджабизаде, М. Резги, 2021). В этой связи использование методов индивидуального мечения путем ампутации фаланг пальцев до настоящего времени не утратил своей актуальности в силу своей эффективности.

Мы в наших исследованиях используем предпоследнюю дистальную фалангу четвертого пальца, по несколько измененной схеме индивидуального мечения. При оценке возраста животных по фалангам пальцев мы рекомендуем применять модернизированную нами схему классического мечения с целью использования для дальнейшей работы фаланги одного пальца у всех особей (рис. 19 б).

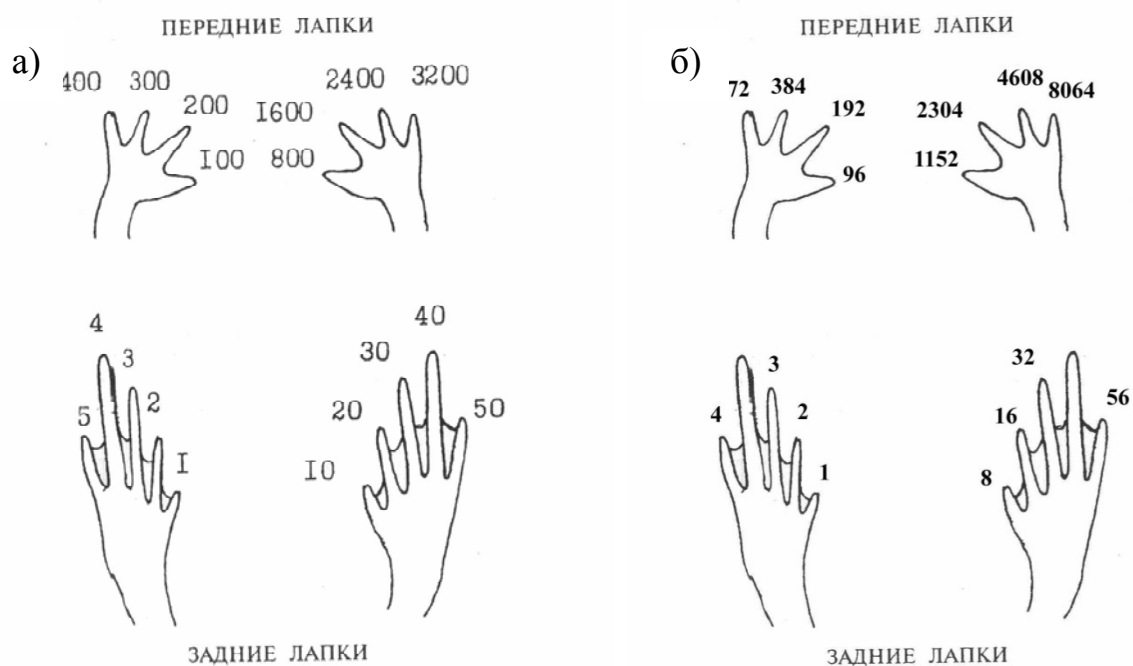


Рисунок 19. Схема мечения бесхвостых амфибий а) по В. Martof (1953); б) с нашими добавлениями (по Р.И. Замалетдинову, И.З. Хайрутдинову, 2006); пояснения см. в тексте

Номера 1-7 проставляются на левой задней лапке: с 1 по 4 – путем отрезания одного пальца, имеющего соответствующий номер; с 5 по 7 – ампутации фаланги одного пальца.

тацией пары пальцев (например,  $4 + 2 = 6$ ). Аналогичным образом можно сочетать ампутацию разных пальцев. На правой задней лапке проставляются номера от 8 до 56. Соответственно максимальное число, отмечаемое на правой задней лапке будет  $56 + 32 = 88$ . Наибольшая цифра, которая может быть получена при таком способе мечения будет  $12\ 672 + 1\ 056 + 88 + 7 = 13\ 823$ .

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

Для корректной оценки возрастной структуры популяции желательно иметь материал по всем размерным группам животных, собранных на протяжении всего периода активности. Желательно взять единовременно большую выборку, в которой присутствуют все возрастные классы. При использовании сухих костей, нам представляется удобным способом хранения является аналог чешуйной книжки, которую используют для аналогичных целей ихтиологи (И.Ф. Правдин, 1966).

На отдельной странице записываются все основные характеристики особи: дата и место поимки, вид, пол, размерные характеристики. В нижней части страницы делается небольшой конверт, куда укладываются кости. Подобный способ хранения позволяет избежать путаницы при дальнейшей камеральной обработке и анализе материала.

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

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

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

**Декальцинация костей.** Для декальцинации рекомендуют использовать растворы азотной или соляной кислоты малой концентрации (4-5%). Мы обычно используем раствор азотной кислоты концентрацией 2-3%. При работе с мелкими костями (с фалангами пальцев) приемлема такая концентрация.

Перед декальцинацией подготовленную кость (очищенную от мягких тканей и, если кость хранилась в фиксирующей жидкости, промытую в про-

точной воде) необходимо упаковать в конверт, сделанный из мельничного газа. К конверту пришивается обычная нитка, к которой прикрепляется этикетка с информацией о кости (номер особи, дата поимки, размеры тела, пол). Объем раствора кислоты должен примерно в 10 раз превышать объем объекта декальцинации.

Сроки декальцинации зависят от размера кости и варьируют от 2-3 часов (фаланги пальцев мелких особей) до 1-2 суток (трубчатые кости крупных экземпляров). В любом случае представляется целесообразным выявлять время декальцинации опытным путем.

При декальцинации более суток раствор необходимо менять ежедневно. Декальцинацию можно считать законченной, если кость эластична на изгиб и легко, без хруста режется лезвием бритвы. Если после проведения декальцинации кость будет крошиться, то ясной картины слоистой структуры мы не получим. В таком случае необходимо снова провести декальцинацию.

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

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

**Изготовление срезов.** Необходимым условием получения качественных срезов является правильная установка кости на блок. Срезы должны проходить перпендикулярно длинной оси кости.



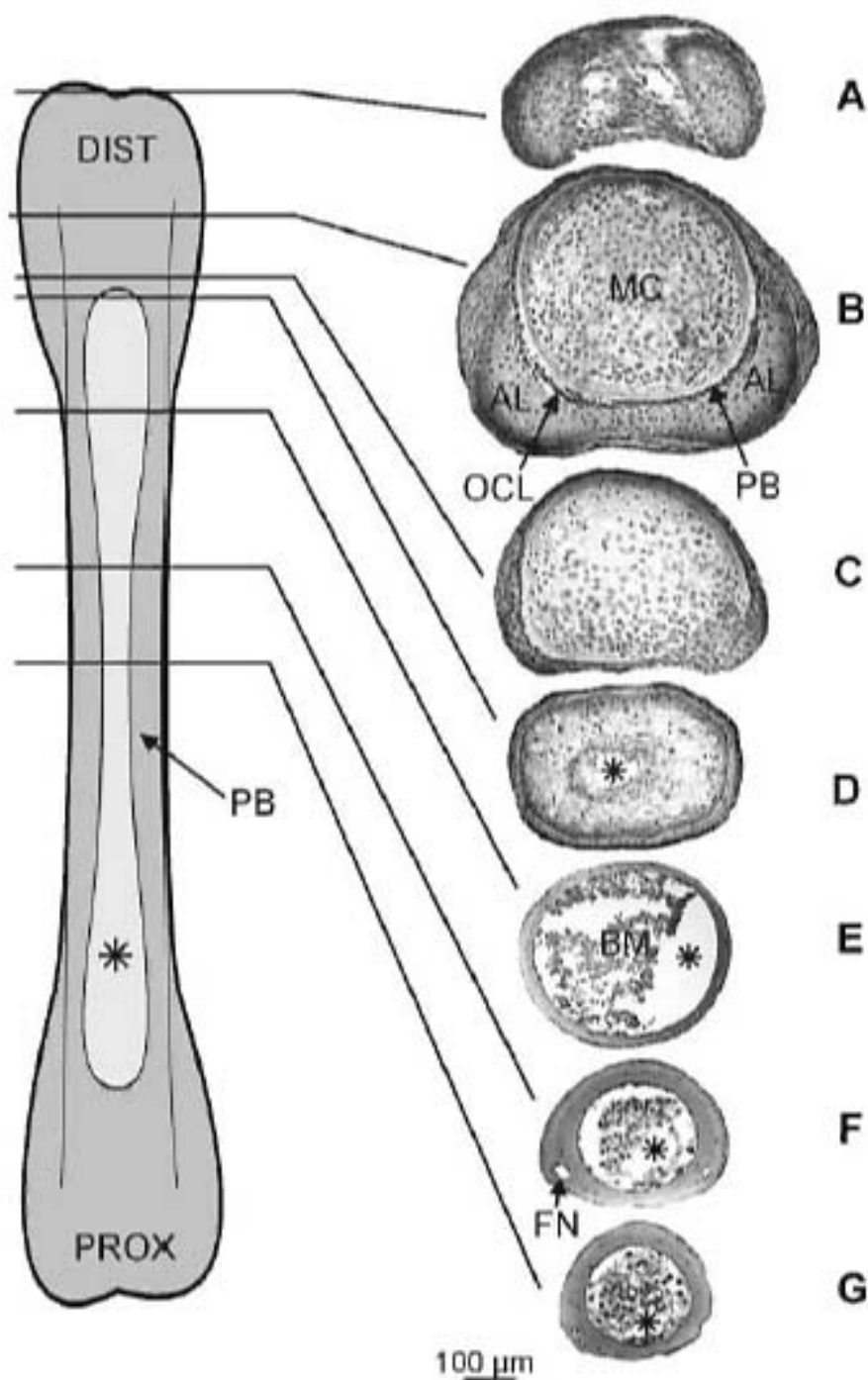


Рисунок 20. Серия последовательных поперечных срезов V плюсневой кости *Pelophylax lessonae* после первой спячки, начиная с верхушки дистального эпифиза (A) до середины диафиза (G) (по В. Rozenblut, М. Ogielska, 2005); \* – о изменение диаметра костномозговой полости, толщины надкостницы кости и формы латерального суставного хряща дистального эпифиза (ДИСТ). Сечения берутся на уровнях, обозначенных линиями. BM – костный мозг; FN – канал питания; MC – метафизарный хрящ; OCL, костно-хрящевая связка; PROX, проксимальный эпифиз

При использовании трубчатых костей этот участок расположен в месте, где проходит отверстие для кровеносного сосуда. Это отверстие обычно находится в самом центре диафиза трубчатых костей, где наиболее широк слой периостальной кости (периост) и самая узкая эндостальная полость (эндост) (рис. 20; 21).

После примораживания необходимо нарастить ледяную рубашку вокруг кости, постепенно добавляя маленькими каплями дистиллированную воду. Толщина срезов обычно равняется 20-25 мк. Наиболее предпочтительным вариантом в наших работах является толщина 23 мк. Получить срезы такой толщины можно, в том числе и во время работы компрессора криостата. Таким образом, можно значительно сэкономить время на осуществление изготовления срезов.

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

**Окраска.** Для окраски срезов мы используем кислый гематоксилин Эрлиха. Он готовится следующим образом: 2 г порошка гематоксилина необходимо растворить в 100 см<sup>3</sup> 96% спирта, добавить 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 100 см<sup>3</sup> чистого глицерина, 3 г алюмокалиевых квасцов и 10 см<sup>3</sup> ледяной уксусной кислоты. Раствор следует оставить на 14 дней в сосуде, прикрытом бумажным колпачком; периодически раствор необходимо взбалтывать, а затем закрыть пробкой. Раствор считается готовым, если он имеет темно-красный тон (обычно через 1-2 мес.). Чем дольше хранится

раствор, тем он лучше окрашивает срезы. Раствор, бывший в употреблении, можно использовать повторно, но перед этим его необходимо профильтровать.

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

Продолжительность окрашивания зависит от качества краски, что определяется опытным путем, и размеров исследуемых срезов. Если используется новая, только что приготовленная краска, то время окрашивания увеличивается. Если краска хранится несколько лет, то время окраски уменьшается. Продолжительность окраски срезов фаланг пальцев бесхвостых амфибий в наших исследованиях составляла 4-7 минут. Для определения времени окраски лучше предварительно попробовать покрасить 1-2 среза, которые не будут использоваться для анализа (как правило, их выбирают из тех, что сделаны с концов кости), а после промывки рассмотреть под микроскопом. Удовлетворительным временем окраски мы считаем такое, после которого срез приобретает темно-синий, но не сине-черный цвет.

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

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

Самой ответственной операцией является отбор наиболее подходящих срезов; его лучше всего проводить под бинокляром. Отбираются срезы, сделанные из участков, где наиболее широк слой периостальной кости. Для трубчатых костей этот участок очень хорошо виден даже под небольшим увеличением бинокляра.

Такие срезы характеризуются наличием заметной «вмятины» на одной из сторон (рис. 21). Это след отверстия кровеносного сосуда.

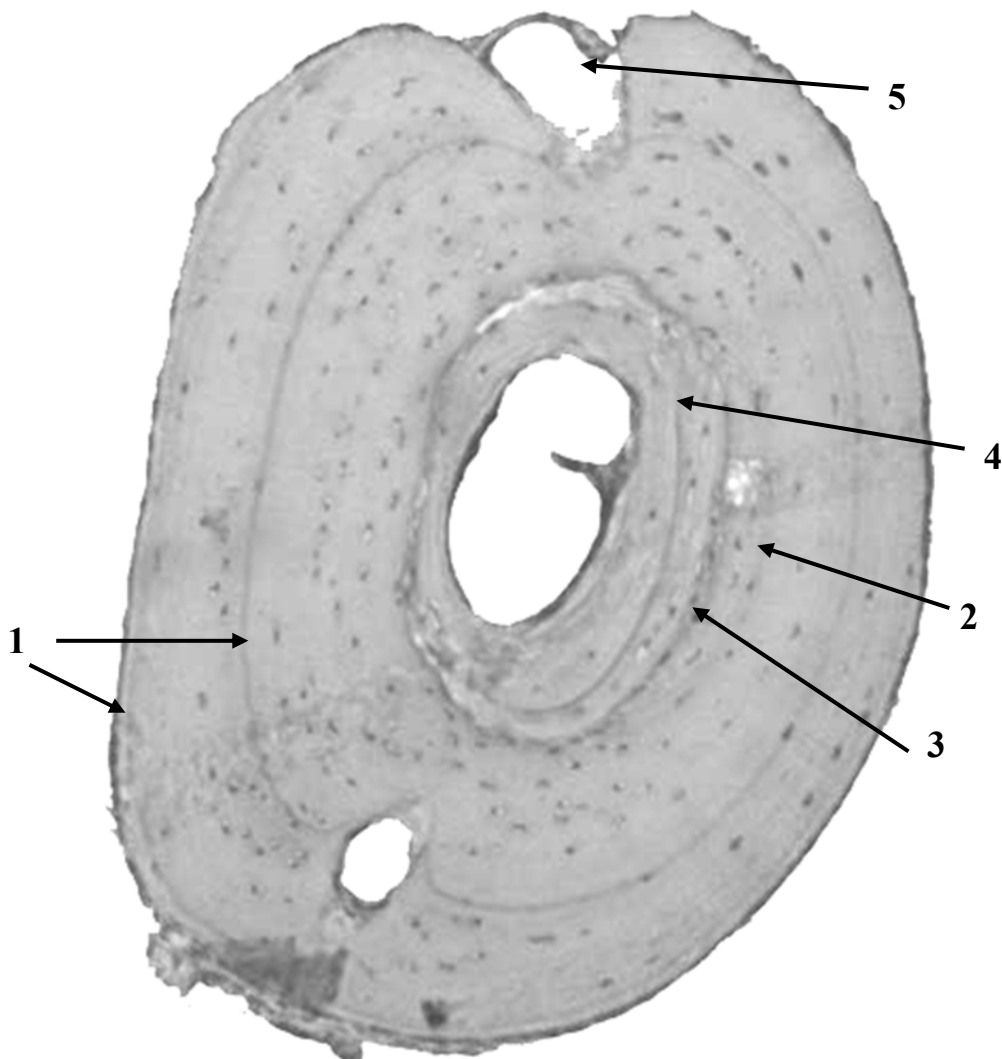


Рисунок 21. Внешний вид поперечного среза кости фаланги пальца прудовой лягушки. Условные обозначения: 1 – линии склеивания; 2 – частично резорбирующаяся линия склеивания; 3 – граница эндостальной полости; 4 – линия, отложенная внутри эндостальной полости; 5 – канал кровеносного сосуда

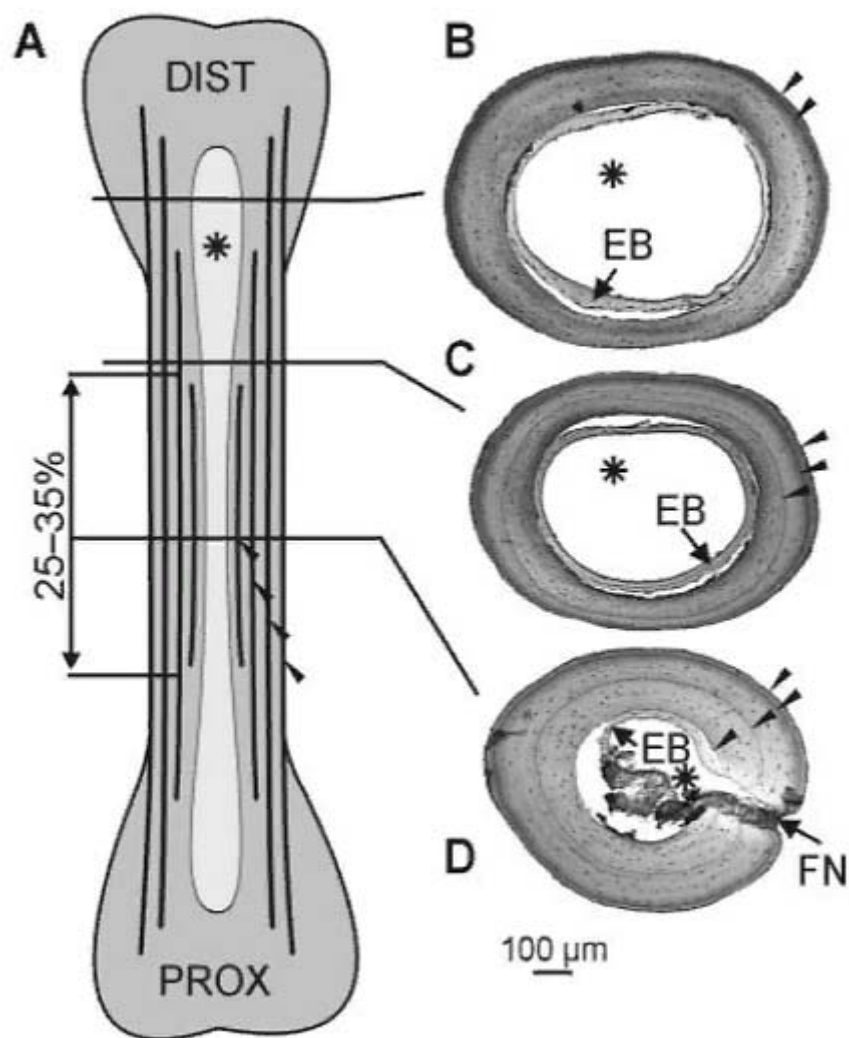


Рисунок 22. Длины последовательных линий склеивания (LAG) в фаланге у *Pelophylax esculentus* после четвертой зимовки (по В. Rozenblut, М. Ogielska, 2005); А: Схематическое изображение продольного разреза длинной кости с линиями склеивания, указанными стрелками. Самая первая линия склеивания – это самый внутренний слой, ближайший к костномозговой полости (\*); длина первой линии склеивания составляет 25-35% от общей длины кости. Последовательные поперечные срезы Фаланги 1, цифры III (BD) показывают количество линий склеивания на различных уровнях, обозначенных линиями. Четыре линии склеивания видны на срезе только в средней части диафиза (D). EB – эндостальная кость; FN – канал питания

Именно в этом участке наиболее отчетливо можно обнаружить все линии склеивания. На рис. 22 приведена схема распределения линий склеивания по длине трубчатой кости на примере фаланги пальца.

Необходимо ориентироваться на этот участок, но отбирать надо срезы с максимальной площадью периостальной кости. Иногда отверстие канала в середине диафиза отсутствует, тогда просто выбирают срезы наименьшие по диаметру, но с наибольшей шириной периостальной костной ткани.

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

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

Из чашки Петри осторожно препаровальной иглой в первый раствор переносятся все отобранные срезы костей. Затем таким же образом в той же последовательности переносятся срезы во второй, а затем в третий растворы. В каждом из растворов они должны находиться не менее 5 минут. После этого срезы помещают на предметное стекло в каплю чистого глицерина и для лучшей сохранности покрывают покровным стеклом.

Полученные таким способом препараты являются временными. Для длительного хранения и перевозки их нужно накрывать сверху покровными стеклами большого диаметра, «посаженными» на канадский бальзам. Препараты следует хранить в горизонтальном положении.

Для этого можно использовать как фабричные коробочки или доски для хранения, так и самодельные. Для перевозки можно использовать как фабричные пластиковые боксы, так и самодельные, сделанные из гофрированного картона.

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

Если в ходе работы обнаруживаются некоторые артефакты, свидетельствующие о нарушении методики необходимо исправить ошибки и добиться получения качественных препаратов. В таблице 4 представлены некоторые артефакты, их причины и способы устранения.

Таблица 4

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

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

**Определение возраста.** На препаратах, окрашенных гематоксилином Эрлиха, широкие слои костной ткани, сформированные в периоды активного роста – более светлые, тогда как линии склеивания соответствующие зимним задержкам роста, видны в виде темных узких линий (рис. 21).

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

Для правильного определения возраста для каждого вида должно быть установлено число слоев, которое успевает резорбироваться к моменту наступления половой зрелости. Для определения количества линий склеивания подвергающихся резорбции, существуют два пути. Первый – индивидуальное мечение лягушек, начиная с момента окончания их метаморфоза, и слежение за ними до взрослого состояния (для выполнения этой крайне трудоемкой работы необходимо не менее трех – четырех лет).

Второй путь – сопоставление размеров кости в поперечном сечении у сеголеток или особей, перезимовавших один раз, с величиной костномозговой полости и с диаметром кости, ограниченной первой видимой целиком линией склеивания, при необходимости, то и последующими линиями у половозрелых и взрослых животных (Э.М. Смирин, А.Н. Макаров, 1987).

Мы рекомендуем брать единовременную выборку, состоящую из всех возрастных групп: сеголетки, половозрелые и взрослые особи. У самых мелких экземпляров, которые зимовали один раз, необходимо измерять диаметр или площадь сечения кости.



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

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

\* все измерения представлены в делениях окуляр-микрометра;

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

Под понятием «диаметр» в данном случае подразумевается средняя величина измерений большой и малой полуосей. Понятие «площадь» в данном случае обозначает произведение величин большой и малой полуосей. У полувзрослых животных необходимо измерять еще и величину костномозговой полости; у половозрелых особей необходимо проводить измерение костномозговой полости и величины кости, ограниченной первой видимой целиком линией склеивания. Полученные данные усредняются, и сопоставляются диаметры кости у сеголеток, у годовиков и однолеток с диаметром эндоста взрослых особей (табл. 5). Ошибка такого способа не превышает  $\pm 1$  год.

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

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

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

Наряду с годовыми линиями склеивания, на срезах могут быть заметны дополнительные линии, которые образуются под влиянием летнего похолодания, засухи, недостатка пищи, болезни и так далее. На срезе они выглядят

менее четкими, местами прерывистыми и обычно хорошо отличаются от годовых линий. Вероятно, влияния таких факторов как летнее похолодание, засуха, бескормица, сильные оттепели зимой, болезни и т. д. отражаются на физиологическом состоянии животных и, возможно, вызывают задержку роста. Эта задержка фиксируется в кости в виде дополнительных линий (Бу.Ж. Castanet, Е. Smirina, 1990).

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

**Субъективность оценки возраста животных.** Важным моментом при проведении работы по определению возраста является оценка субъективности каждого конкретного исследователя. Субъективность подсчета слоев считается основным недостатком метода по сравнению с методами, основанными на измерениях каких-либо структур (В.С. Смирнов, 1984).

Субъективность подсчета слоев предопределяет ошибку оценки возраста, и минимизировать субъективность подсчета особенно трудно в тех случаях, когда нет материала от особей известного возраста и нельзя оценить прямым путем, какие слои считать годовыми и какова ошибка определения возраста.

Таким образом, при подсчете годовых слоев для определения возраста можно выделить две основные задачи. Во-первых, это определить степень субъективности подсчета слоев и тем самым косвенно оценить возможность ошибок при определении возраста, что можно сделать на любом материале, а во-вторых, определить реальную величину ошибки при определении возраста, имея в распоряжении материал от особей известного возраста (Г.А. Клевезаль, 1988).

Проверку представляется предпочтительно проводить с более опытным оператором. Но обычно это весьма затруднительно. Для оценки субъектив-

ности и воспроизводимости результатов определения возраста Г.А. Клевезаль с соавторами (1981) предложила оригинальный метод, который многие ученые, в том числе и мы, используют в своих исследованиях. Необходимо классифицировать рассматриваемую выборку по четкости слоев. Четкость слоев, их пригодность для подсчета оцениваются по пяти балльной системе:

5 – слои четкие, их подсчет затруднений не вызывает;

4 – слои легко разграничить, однако полной уверенности в оценке их числа нет;

3 – слои удается выделить только предположительно, возможны несколько оценок их числа;

2 – слои для подсчета можно выделить с большим трудом;

1 – аргументированную оценку числа слоев дать не представляется возможным.

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

$$r = \sqrt{p_1 q_1} + \sqrt{p_2 q_2} + \dots + \sqrt{p_m q_m}$$

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

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

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

где  $N$  – число особей, соответственно, в первой и второй выборках,  $p_0$  – сумма долей особей категорий пригодности, представленных в первой выборке и не представленных во второй,  $q_0$  – сумма долей особей категорий пригодности, представленных во второй выборке и не представленных в первой.

На основании полученных результатов можно судить о «качестве» определения возраста тем или иным оператором по сравнению с «опытным» специалистом.

Часто сравнивать «правильность» определения возраста не представляется возможным. В таком случае речь идет уже о стандартизации ошибки, получаемой оператором. Используя описанный выше прием можно стандартизировать ошибку любого оператора. Для этой цели оценку возраста каждого препарата из выборки следует проводить несколько раз с периодичностью повтора 1 раз в 2-3 месяца. Если статистической разницы в оценках обнаружено не будет, то можно утверждать, что ошибка оценки стандартна и результаты исследования достоверны.

Важным моментом в применении скелетохронологического метода является возможность проведения анализа скорости линейного роста тела в каждой конкретной особи в выборке. Речь идет о ретроспективной оценке длины тела (А. Camargo et al., 2008).

Такого рода анализ позволяет выявить изменчивость роста особей в популяциях в определенном градиенте. Речь может идти как об изменчивости скорости роста в градиенте антропогенной трансформации среды обитания (в городских условиях) (Р.И. Замалетдинов, Д.А. Файзуллин, 2008), а также о географической изменчивости (С.М. Ляпков, 2013; 2021 и др.).

Представляется наиболее целесообразно для проведения ретроспективной оценки длины тела использовать уравнение Даля-Лео (J. Marunouchi et al., 2000):

$$SVL_t = \frac{SVL * D}{D_{\text{внеш}}},$$

где  $SVL_i$  – рассчитанная длина тела в данном возрасте  $i$ ,  $D_i$  – диаметр соответствующей линии склеивания,  $D_{\text{внеш}}$  – внешний диаметр среза, измеренный у пойманной особи,  $SVL$  – длина тела пойманной особи. По рассчитанным длинам тела перед данной ( $SVL_{i+1}$ ) и предыдущей ( $SVL_i$ ) зимовками были вычислены ежегодные приросты:  $SVL_{i+1} - SVL_i$ , а по ним – скорость прироста за данный сезон:

$$V(i \rightarrow i + 1) = \frac{SVL_{i+1} - SVL_i}{T},$$

где  $T$  (мес.) – длительность сезона активности в местообитании данной популяции.

## КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

**Аргирофилия** – способность тканевых структур импрегнироваться серебром при применении соответствующего восстановителя.

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

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

**Включения цитоплазматические** – непостоянные структуры цитоплазмы, не имеющие строго определенного строения. Включения представляют собой продукт жизнедеятельности клетки и образуются в определенные периоды ее жизни.

**Выходящая пчела** – пчела, которая закончила свое развитие в запечатанной ячейке сота, прогрызает восковую крышечку и выходит из ячейки. Выход рабочей пчелы происходит через 21 день после откладки яйца маткой.

**Гистологическая техника** – техника обработки гистологического материала и приготовления гистологического препарата, пригодного для изучения с помощью микроскопа.

**Гистологический препарат** – обработанные с помощью гистологической техники срезы ткани, органа, их отпечатки, мазок либо пленка. В качестве гистологического препарата может служить также культура клеток или тканей, позволяющая изучить тонкое строение клеток, тканей и органов животного организма.

**Гистологический срез** – тонкие сечения органов и тканей, полученные в результате резки гистологического объекта.

**Гистология** – наука о микроскопическом и ультрамикроскопическом строении, развитии и функциях клеток, тканей и органов и их взаимодействии в историческом и индивидуальном развитии многоклеточных животных организмов.

**Гистохимия** – раздел гистологической техники, позволяющий идентифицировать и определять локализацию и количество в клетках и тканях животного организма различных химических веществ (минеральных, органических), интенсивность химических реакций (гистохимия ферментов).

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

**Жировые клетки (липоциты)** – клетки, которые синтезируют и накапливают в цитоплазме липиды, участвующие в трофике, энергообразовании и метаболизме воды. Образуя значительные скопления, липоциты формируют жировую ткань.

**Жировое тело** – мезодермальное образование, рыхлая клеточная ткань, выстилающая внутренние органы и внутренние стенки тела пчелы; желтовато-белая, состоит из мелких долей, окруженных соединительной тканью и связанных тканевыми тяжами. Различают периферийную, или париетальную, часть жирового тела, расположенную под кутикулой, и внутреннюю, или висцеральную, окружающую кишечник. Служит для накопления и синтеза резервных и транспортных веществ, выделения и ряда других функций. Жировое тело имеется у всех насекомых.

**Заключение гистологического препарата** – завершающий этап гистологической техники, заключающийся в помещении гистологических срезов, смонтированных на предметном стекле, под тонкое покровное стекло в среды особого химического состава.

**Заливка гистологического материала (уплотнение гистологического материала)** – пропитывание гистологического материала специальными средами, которые в последующем застывают с образованием однородной плотной массы.



**Замораживание** – метод физической фиксации гистологического материала.

**Замораживающий микротом** – прибор для получения свежемороженых гистологических срезов.

**Изготовление гистологических срезов** – получение тонких прозрачных срезов из уплотненного гистологического материала и нанесение их на специальным способом обработанное предметное стекло (наклейка).

**Импregnация, пропитывание** – обработка срезов в процессе приготовления препарата растворами азотнокислого серебра, хлорного золота и др.

**Криостат** – прибор, используемый для изготовления замороженных срезов из гистологических объектов.

**Липоциты** – клетки жирового тела пчелы. См. жировые клетки.

**Межклеточное вещество** – вещество, расположенное между клетками, являющееся в основном продуктом их жизнедеятельности.

**Микрометр** – единица длины, равная 1/1000 миллиметра, микрометр (10~\* м); является основной единицей длины, выражающей размеры микроскопических объектов.

**Микроскоп светооптический** – микроскоп, для работы с которым используется свет. Светооптический микроскоп является основным прибором, используемым в гистологических, цитологических и эмбриологических исследованиях.

**Микротом** – специальный прибор, позволяющий изготавливать гистологические срезы определенной толщины, следующие друг за другом (серийные срезы).

**Морфометрия** – совокупность методов, позволяющих давать количественную оценку гистологическим структурам при изучении их как в световом, так и электронном микроскопе.

**Объект-микрометр** – это металлическая пластинка размером с предметное стекло. В центре пластинки находится круглое отверстие в которое вставлено стекло со шкалой деления. Длина шкалы 1 мм. Она разделена на 10

групп по 10 делений, то есть всего 100 делений.  $1\text{мм}:100\text{ (делений)} = 0,01\text{ мм}$  – это цена одного деления (рис. 5).

**Оксифилия** – способность гистологических структур окрашиваться кислыми красителями (см. Ацидофилия).

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

**Окуляр-микрометр** – это окуляр, на линзу которого нанесены две шкалы деления (рис. 6). Они расположены взаимно перпендикулярно. Обе шкалы имеют по 100 делений.

**Периост** – надкостница, двуслойная соединительнотканная оболочка. Наружный плотный фиброзный слой ее укрепляет кость, увеличивает ее упругие свойства и несет в себе сосуды и нервы, связанные с глубже лежащими сосудами и нервами всей кости. Внутренний слой содержит большое количество клеток – остеобластов, за счет которых идет рост.

**Резорбция** костной ткани – разрушение (рассасывание, деградация) костной ткани под действием остеокластов.

**Склериты** – плотные участки кутикулы у членистоногих. Часть кутикулярного кольца (скелетной основы) сегмента груди или брюшка насекомого. Соединены они между собой эластичными мембранами, обеспечивающими взаимную подвижность склеритов. Выполняют защитную функцию, предохраняя от механических повреждений, и служат скелетными элементами, к которым крепятся мышцы. В базовой схеме каждый свободный сегмент тела членистоногого покрывают 4 склерита: тергит, стернит и два плеурита.

**Стернит** – склерит в виде брюшного полукольца кутикулы сегмента груди или брюшка насекомого. Брюшная склеротизованная часть сегментарного кольца членистоногих. Они несколько меньше, чем склериты спинной части сегмента – тергиты.

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

**Увеличение микроскопа** – произведение увеличения объектива микроскопа на увеличение его окуляра. Увеличение светового микроскопа может достигать 1500-2500 крат. Увеличение трансмиссионного электронного микроскопа равно около 500000х.

**Уплотнение гистологического материала** – см. Заливка гистологического материала.

**Фиксация гистологического материала** – один из этапов гистологической техники. Обработка гистологического материала, ставящая целью сохранение его прижизненного состояния.

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

**Эноциты** – крупные клетки, располагающиеся среди клеток жирового тела пчелы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аль-Завахра, Х.А. Змеи Татарстана / Х.А. Аль-Завахра. Дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1992. – 130 с.
2. Анисина, О.С. Микроморфология и гистохимия головного мозга медоносной пчелы в онтогенезе и при варроатозе / О.С. Анисина. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1996. – 19 с.
3. Анисина, О.С. Морфогенез головного мозга медоносной пчелы / О.С. Анисина // Межвуз. сборник научн. трудов КГВИ «Физиологические аспекты ветеринарии и зоотехнии». – Казань, 1994. – С. 60-63.
4. Банников, А.Г. Возрастной состав популяции и его динамика у *Bombina bombina* L. / А.Г. Банников // Докл. АН СССР (Нов. серия). 1950. т. 9. вып. 5. – С. 53-55.
5. Белявский, В.И. Морфогистохимический анализ возрастных и сезонных изменений жирового тела медоносной пчелы / В.И. Белявский. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1985. – 22 с.
6. Белявский, В.И. Применение микротомы-криостата в зоологических исследованиях (учебно-методическое пособие) / В.И. Белявский, Р.И. Замалетдинов, О.С. Анисина, Р.И. Михайлова. – Казань, Фолиантъ, 2007. – 72 с.
7. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1971. – 271 с.
8. Гайдученко, Ю.С. Модификация импрегнации гистологических объектов азотнокислым серебром по методу Кахаля-Фаворского-Ренсона / Ю.С. Гайдученко // Международный журнал экспериментального образования. – 2011. – № 5. – С. 37.
9. Гаранин, В.И. Продолжительность жизни амфибий в природе / В.И. Гаранин // Природа. – 1969. № 4. – С. 35-38.
10. Гиляров, М.С. Основные сведения о насекомых / М.С. Гиляров // Жизнь животных. – М.: Просвещение, 1969. – Т. 3. – С. 157-196.

11. Голикова, Н.А. Морфология и гистохимия жирового тела осенне-зимних пчел / Н.А. Голикова, В.И. Белявский // Научные труды КВИ. – Казань, 1984. – С. 105-112.
12. Грушецкий, Н.А. Идентификация особей серой жабы (*Bufo bufo*) по изображению с использованием глубоких сверточных нейронных сетей // Вопросы герпетологии / Н.А. Грушецкий, С.В. Огурцов // Программа и тезисы докладов VIII съезда Герпетологического общества им. А.М. Никольского при РАН «Современные герпетологические исследования Евразии». – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2021. – С. 82-84.
13. Жданов, С.В. Периоды в годовом цикле пчелиной семьи / С.В. Жданов // XVIII Международный конгресс по пчеловодству. – М.: Колос, 1961. – С. 36-43.
14. Жеребкин, М.В. О некоторых физиологических изменениях в организме медоносных пчел при подготовке их к зиме / М.В. Жеребкин, Я.Л. Шагун // Уч. записки Ин-та пчеловодства. Вестник. 1971. № 20. – С. 1-57.
15. Животовский, Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам / Л.А. Животовский // Фенетика популяций. – М.: Наука, 1982. – С. 38-44.
16. Замалетдинов, Р.И. Экология земноводных в условиях большого города: (на примере г. Казани) / Р.И. Замалетдинов. Дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2003. – 167 с.
17. Замалетдинов, Р.И. Особенности размерно-возрастной структуры популяции и скорости полового созревания у прудовой лягушки *Rana lessonae* / Р.И. Замалетдинов, В.И. Белявский, Р.И. Михайлова // Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных. – Саранск, 2005. – С. 73-78.
18. Замалетдинов, Р.И. Материалы к мониторингу возрастной структуры популяций амфибий на урбанизированных территориях Волжского бассейна / Р.И. Замалетдинов, А.И. Файзулин, Р.И. Михайлова, А.Е. Кузовенко // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. 2013. Т. 213. – С. 85-90.

19. Замалетдинов, Р.И. Материалы по скорости роста тела в городских популяциях прудовых лягушек / Р.И. Замалетдинов, Д.А. Файзуллин // Вопросы герпетологии. Материалы Третьего съезда герпетологического общества им. А.М. Никольского. – Санкт-Петербург, 2008. – С. 136-141.
20. Замалетдинов, Р.И. Модификации метода прижизненного мечения амфибий и рептилий в популяционных исследованиях / Р.И. Замалетдинов, И.З. Хайрутдинов // Актуальные вопросы герпетологии и токсикологии. – Тольятти, 2006. Вып. 9. – С. 66-72.
21. Капитанова, Д.В. Модифицированный метод импрегнации серебром для визуализации нервной ткани рыб / Д.В. Капитанова, Н.А. Веретенников, Ф.Н. Шкиль // Вопросы ихтиологии. – 2022. – Т. 62, № 3. – С. 365-365.
22. Кепеня, В. Влияние осенней подкормки на качество пчел / В. Кепеня // XXIII Международный конгресс по пчеловодству. – М., 1971. – С. 370.
23. Кисели, Д. Практическая микротехника и гистохимия / Д. Кисели. – Изд. акад. наук: Венгрия: Будапешт, 1962. – 399 с.
24. Клевезаль, Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих Г.А. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 283 с.
25. Клевезаль, Г.А. Регистрирующие структуры млекопитающих в зоологических исследованиях / Г.А. Клевезаль. – М.: Наука, 1988. – 288 с.
26. Клевезаль, Г.А. Способ оценки пригодности регистрирующих структур для подсчета слоев при определении возраста животных / Г.А. Клевезаль, Х. Груе, М.В. Мина // Зоол. журн. 1981. Т. LX.. Вып. 12. – С. 1869-1877.
27. Кожевников, Г.А. Материалы к естественной истории пчелы / Г.А. Кожевников // Изв. об-ва любителей естествознания. Тр. зоол. отд. XIV. – 1900. – 144 с.
28. Кононский, Г.А. Гистохимия / Г.А. Кононский. – Киев: Выща школа, 1976. – 278 с.
29. Кузьмин, В.И. Импрегнация микроглиоцитов солью серебра на гистологических срезах гиппокампа кроликов / В.И. Кузьмин // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2016. –Т.12, №4. – С. 692-695.

30. Лада, Г.А. Методы исследования земноводных: научно-методическое пособие / Г.А. Лада, А.С. Соколов. – Тамбов, 1999. – 75 с.
31. Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
32. Луппа, Х. Основы гистохимии / Х. Луппа. – М.: Мир, 1980. – 343 с.
33. Ляпков, С.М. Географическая изменчивость и половые различия по длине тела и возрастному составу у остромордой лягушки: формирование и закономерности проявления / С.М. Ляпков // Параці Українського герпетологічного товариства. 2013. №4. – С. 64-86.
34. Ляпков, С.М. Популяционная экология остромордой и травяной лягушек. Географическая изменчивость возрастного состава, постметаморфозного роста, размеров и репродуктивных характеристик / С.М. Ляпков. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2021. – 219 с.
35. Мавликеев, М.О. Краткий курс гистологической техники. Учебно-методическое пособие / М.О. Мавликеев, С.С. Архипова, О.Н. Чернова, А.А. Титова, Г.О. Певнев, А.К. Шафигуллина, А.П. Киясов. – Казань: Казан. ун-т, 2020 – 107 с.
36. Маурицио, А. Кормление пыльцой и жизненные процессы у медоносной пчелы / А. Маурицио // Новое в пчеловодстве. – М., 1958. – С. 372-444.
37. Меркулов, Г.А. Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 422 с.
38. Мина, М.В. Рост животных / М.В. Мина, Г.А. Клевезаль. – М.: Наука, 1976. – 291 с.
39. Орловская, Г.В. О химических основах метода аргирофильной окраски / Г.В. Орловская, А.А. Тустановский // Арх. пат. 1954. Т. XXI. Вып. I, – С. 13-22.
40. Орловская, Г.В. Компоненты аморфного вещества ретикулиновых волокон и их роль в гистохимических реакциях / Г.В. Орловская, А.А. Тустановский, А.Л. Зайдес // Арх. пат. 1959. Т. XXI. Вып. 7. – С. 23-32.
41. Основы гистологии и гистологической техники / Под общ. ред. Елисеева В.Г. – М.: Медицина, 1967. – 267 с.

42. Панов, А.А. Нейрогенез в центральной нервной системе насекомых и его своеобразие в грибовидных телах головного мозга / А.А. Панов // Зоологический журнал. – 2022. – Т. 101, № 3. – С. 294-313.
43. Павловский, Е.Н. Методы ручного анатомирования насекомых / Е.Н. Павловский. – М.-Л. ЗИН АН СССР, 1957. – 45 с.
44. Правдин, И.Ф. Руководство по изучению рыб / И.Ф. Правдин. – М.: Пищевая промышленность, 1966. – 376 с.
45. Раджабизаде, М. Сравнительное исследование алгоритмов машинного обучения используемых для фотоидентификации змей / М. Раджабизаде, М. Резги // Вопросы герпетологии. Программа и тезисы докладов VIII съезда Герпетологического общества им. А.М. Никольского при РАН «Современные герпетологические исследования Евразии». – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2021. – С. 219.
46. Ромейс, Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М.: Иностранная литература, 1953. – 718 с.
47. Роскин, Г.И. Микроскопическая техника / Г.И. Роскин. – М.: Сов. наука, 1946. – 289 с.
48. Румянцев, А.В. Опыт исследования эволюции хрящевой и костной ткани / А.В. Румянцев. – М., Изд-во АН СССР, 1958. – 376 с.
49. Смирин, Э.М. Об установлении соответствия числа слоев в трубчатых костях у амфибий возрасту особей / Э.М. Смирин, А.Н. Макаров // Зоол. журн. 1987. Т. LXVI. Вып. 4. – С. 599-604.
50. Смирин, Э.М. Методика определения возраста амфибий и рептилий по слоям в кости / Э.М. Смирин // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. – Киев, 1989. – С. 144-153.
51. Смирин, Э.М. Прижизненное определение возраста и ретроспективная оценка размеров тела серой жабы (*Bufo bufo*) / Э.М. Смирин // Зоол. ж. 1983. Т. LXII. №. 3. – С. 437-444.
52. Смирнов, В.С. О точности определения возраста при подсчете слоев цемента у волков / В.С. Смирнов // Регистрирующие структуры и определение возраста млекопитающих: Тез. докл. Всесоюз. конф. – М., 1984. – С. 63-64.



53. Смирнов, В.С. Сравнение двух методов определения возраста, используемых для анализа возрастной структуры волка / В.С. Смирнов // Исследования актуальных проблем териологии. – Свердловск, 1983. – С. 79-82.
54. Соколина, Ф.М. Учение о клетках и тканях (часть 1 – цитология) / Ф.М. Соколина, П.А. Писарев. – Казань, 2001. – 57 с.
55. Таранов, Г.Ф. Анатомия и физиология медоносных пчел / Г.Ф. Таранов. – М.: Колос, 1968. – 344 с.
56. Таранов, Г.Ф. Биология пчелиной семьи / Г.Ф. Таранов. – М.: Госиздат. с.-х. лит., 1961. – 336 с.
57. Терентьев, П.В. Лягушка / П.В. Терентьев. – М.: Советская наука, 1950. – 344 с.
58. Тустановский, А.А. О специфичности аргирофилии белковых образований соединительной ткани / А.А. Тустановский, Г.В. Орловская // Арх. пат. 1953. Т. XV. Вып. 3. – С. 32-44.
59. Хайрутдинов, И.З. Экология рептилий урбанизированных территорий (на примере г. Казани) / И.З. Хайрутдинов. Дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2010. – 149 с.
60. Циколенко, С.П. Морфофункциональные изменения в организме медоносных пчел в период зимовки и в условиях защищенного грунта после коррегирующих подкормок / С.П. Циколенко. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2004. – 22 с.
61. Шварц, С.С. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных / С.С. Шварц, В.С. Смирнов, Л.Н. Добринский // Труды Института экологии растений и животных УрФ АН СССР. – Вып. 58. – Свердловск, 1968. – 387 с.
62. Шовен, Р. Физиология насекомых / Р. Шовен. – М.: ИЛ, 1953. – 494 с.
63. Boehm, B. Beziehungen zwischen Fettkörper, Oenocyten und Wachstumsentwicklung bei *Apis mellifica* L. / B. Boehm // Naturwissenschaften, 1961. 48. № 21. – S. 675-676.

64. Camargo, A. Reproductive effort and the egg number vs. size trade-off in *Physalaemus* frogs (Anura: Leiuperidae) / A. Camargo, M. Sarroca, R. Maneyro // *Acta oecologica*. 2008. 34. – P. 163-171.
65. Castanet, J. Introductions to the skeletocronological method in amphibians and reptiles / By J. Castanet, E. Smirina // *Annales des Sciences Naturelles Zoologie*. 1990. 13 Serie. vol. 11. pp. – P. 191-196.
66. Esteban, M. Use of bone histology in estimating the age of frogs (*Rana perez*) from a warm temperate climate area / M. Esteban, M. Garcia-Paris, J. Castanet // *Can. J. Zool.* 74. – 1996. – P. 1914-1921.
67. Hausser, H. Markierung an Amphibien / H. Hausser // *Vierteljahr. Naturf. Ges. Zurich*. 1958. Bd. 103. – S. 304-320.
68. Kidov, A.A. Notes on study of age and growth of the hyrcanian frog, *Rana pseudodalmatina* Eiselt et Schmidtler, 1971 in the Talysh mountains / A.A. Kidov, R.I. Zamaletdinov, K.A. Matushkina, R.I. Mikhailova // *Russian Journal of Herpetology*. 2018. Vol. 25. № 3. P. 183-188.
69. Kulkarni, J.T. Age related changes in ovarian follicular kinetics in the Indian skipper frog *Rana cyanophlyctis* (Sehn.) / J.T. Kulkarni, K. Pancharatna // *J. Biosci.* Vol. 21. № 5. 1996. – P. 699-710.
70. Lotmar, R. Untersuchungen über den Eisenstoffwechsel der Insekten, besonders der Honigbiene / R. Lotmar // *Rev. Suisse. Zool.* 1938. 45. – S. 237-271.
71. Martof, B. Territoriality in the green frog *Rana clamitans* / B. Martof // *Ecology*. 1953. V. 34. № 1. – P. 165-174.
72. Marunouchi, J. Validity of back-calculation methods of body size from phalangeal bones: an assessment using data for *Rana japonica* / J. Marunouchi, T. Kusano, H. Ueda // *Curr. Herpetol.* 2000. Vol. 19. – P. 81-89.
73. Rozenblut, B. Development and Growth of Long Bones in European Water Frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), With Remarks on Age Determination / B. Rozenblut, M. Ogielska // *Journal of morphology*. 2005. 265. – P. 304-317.

74. Smirina, E.M. Age determination and Longevity in Amphibians / E.M. Smirina // Gerontology. 1994. 40. – P. 133-146.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ЧАСТЬ 1. ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	9
ЧАСТЬ 2. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ .....	27
2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РАЗВИТИЯ ЖИРОВОГО ТЕЛА ПЧЕЛЫ И ХАРАКТЕРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В НЕМ ОБЩИХ ЛИПИДОВ.....	28
2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ....	44
2.3. СКЕЛЕТОХРОНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД В ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЗЕМНОВОДНЫХ И ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ.....	65
КРАТКИЙ СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ .....	87
ЛИТЕРАТУРА .....	92
ОГЛАВЛЕНИЕ .....	100

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

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

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОТОМА-КРИОСТАТА  
В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПО ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ

*Учебное пособие*

Редакторы Р.И. Михайлова, Р.И. Замалетдинов  
Компьютерная верстка и дизайн Р.И. Замалетдинов  
Корректурa авторов

Подписано в печать 21.02.2024 г. Бумага офсетн ая.  
Гарнитура «Таймс». Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ.л. 6,5.  
Уч.-изд. л. 6,75. Тираж 100 экз. Заказ № 001.  
Издательство ООО «Олитех».  
420126, РТ, г. Казань, ул. Адоратского, д.21, кв.98.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии ООО «Олитех».  
420126, РТ, г. Казань, ул. Адоратского, д.21, кв.98.

ISBN 978-5-6044131-7-3

