

ЗАСТОСУВАННЯ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ В ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Проскуріна І.В., аспірант, **Нагорна Л.В.**, д.вет.н., доцент,
Сумський національний аграрний університет, м. Суми
e-mail: lvn_10@ukr.net

Актуальність проблеми. Електронна мікроскопія є одним з методів дослідження різних за призначенням та структурою об'єктів. Вона дозволяє візуалізувати атомну будову речовини, що має велике наукове та прикладне значення. Растрова електронна мікроскопія почала використовуватися в медицині з кінця 60-х років минулого століття. Отримані дані внесли суттєвий внесок в розвиток нових уявлень про будову клітин, органів та тканин [1, 2].

Растровий електронний мікроскоп (РЕМ, англ. *Scanning Electron Microscope, SEM*) – прилад, заснований на принципі взаємодії електронного пучка з речовиною, призначений для отримання зображення поверхні об'єкту з високим просторовим дозволом (декілька нанометрів).

Принцип роботи РЕМ полягає в скануванні поверхні зразка сфокусованим електронним пучком і аналізі відбитих від поверхні часток та рентгенівського випромінювання, що виникає в результаті взаємодії електронів з речовиною. Аналіз часток дозволяє отримувати інформацію про рельєф поверхні, про фазову відмінність і кристалічну структуру приповерхневих шарів. Аналіз рентгенівського випромінювання, що виникає в процесі взаємодії пучка електронів із зразком дає можливість якісно і кількісно охарактеризувати хімічний склад приповерхневих шарів [3, 4].

Матеріали і методи досліджень.

Для дослідження було використано пробки крові великої рогатої худоби. Зразки крові відбирали з яремної вени великої рогатої худоби в умовах ТОВ агрофірма «Хоружівка» Недригайлівського району. Дослідження проб крові проводили в лабораторії електронної мікроскопії Сумського національного аграрного університету за використання растрового електронного мікроскопу (РЕМ)

Фіксацію зразків крові проводили розчинами з різною концентрацією фіксатора – глютарового альдегіду в фосфатному буфері Соренсена, зокрема 2,5 % і 1,25 %.

Для підготовки препарату готували наступні реагенти:

- розчин А (24,0 г NaH_2PO_4 безводного на 1000 мл дистильованої води);
- розчин В (71,7 г Na_2HPO_4 12ти -водного на 1000 мл дистильованої води);

- буферний розчин Соренсена з рН 7,2 (28 мл розчину А + 72 мл розчину В);
- фіксатор (50 мл буфера Соренсена +10 мл 25% глютарового альдегіду + 40 мл дистильованої води).

Стабілізовану гепарином кров поміщали в центрифугу на 5 хв. при 2000 об. Відділену плазму видаляли піпеткою. До 1 мл фракції формених елементів першого зразка додавали розчин для фіксації (1:10), суспензували, витримували 1 годину, періодично суспензуючи. Надосадову рідину видаляли піпеткою і аналогічно повторювали процес фіксації. Другий зразок фіксували відповідно, попередньо знизивши концентрацію фіксатора буферним розчином до 1,25 %.

Відмивку від фіксатора проводили фосфатним буферним розчином. Витримували 5–15 хв., після чого центрифугували та видаляли надосадову рідину піпеткою.

Зневоднення робили проведенням зразка в серії спиртів зростаючої концентрації від 30 % до 100 %. Час експозиції в спиртах з концентрацією 30, 50 і 70 % становив 5 хв. В спирті з концентрацією 96 і 100 % витримували зразки по 15 хв..Останнє зневоднення зразка у 100 % спирті повторювали двічі. Після кожної експозиції центрифугували зразки та видаляли надосадову рідину.

Нанесення на пластину та напилення вуглецем здійснювали в наступній послідовності: спершу на металеву пластину розміром 4x2 см наклеювали електропровідну вуглецеву стрічку, на яку наносили зразки, а потім – напилювали вуглецем для надання електропровідності.

Результати досліджень. Зразок крові, фіксований 2,5 % розчином глютарового альдегіду містив клітини у формі двоввігнутого диска (з потовщенням по колу і ввігнуті в середині) діаметром 7,2–7,5 мкм, позбавлені ядра. Середня товщина їх коливалася в межах 2,1 до 2,4 мкм. Об'єм еритроцитів складав 86 – 90 мкм³, загальна поверхня 140 – 145 мкм².

В зразку з концентрацією фіксатора 1,25 % клітини крові були недостатньо фіксовані. Еритроцити крові у гіпертонічному розчині втрачали воду й зменшувалися в об'ємі.

Окремі еритроцити змінювали еліпсоїдну форму, проте зміна форми не викликала зміни розмірів досліджуваних клітин. У деяких клітин відбувалася краплеподібна деформація. Еритроцити мали форму краплі, витягнутої і загостреної з одного полюса і нормальної округлої з іншого. Також відмічали зморщування клітини.

Окремі клітини зменшувалися в розмірах, що супроводжувалося утворенням глибоких складок в їх оболонці. У деяких клітин відбувалася веретеноподібна деформація. Еритроцити набували загостреної форми з

протилежних полюсів, при цьому ширина їх зменшувалася, в результаті чого клітини за формою нагадували веретено. Траплялись клітини з фестончатим краєм. Оболонка мала ряд округлих випинань та западин при нормальних розмірах еритроцита.

Висновки. 1. При застосуванні методів растрової електронної мікроскопії з'ясували, що більш коректним для електронної мікроскопії крові є фіксатор з концентрацією глютаральдегіду в буфері Соренсена – 2,5 %, оскільки за вказаної концентрації зберігається двовігнутість еритроцитів.

2. За фіксації зразків крові з меншою концентрацією глютаральдегіду (1,25 %), еритроцити втрачали природну форму, що спричиняло до появи похибок при проведення досліджень.

Література

1. Перехрестов В. І. Практичні методи електронної мікроскопії : навч. посібник. Суми: Сумський державний університет, 2014. – 241 с.
2. Синдо Д., Оикава Т. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия. М.: Техносфера, 2006. – 255с.
3. Антонюк В. С., Тимчик Г.С., Бондаренко Ю. Ю. Методи та засоби мікроскопії: Київ: НТУУ «КПІ», 2013. – 336 с.
4. Брандон Д., Каплан У. Микроструктура материалов. Методы исследования и контроля. М.: Техносфера, 2004. – 384 с.