

ИССЛЕДОВАНИЕ
СПЕРМАТОЗОИДОВ ЖУРАВЛЕЙ
С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОГО
КОНФОКАЛЬНОГО
МИКРОСКОПА

Н.В. Шишова ИБК РАН

Г.Ю. Максудов Московский
Зоопарк

Способы получения микроскопического изображения:

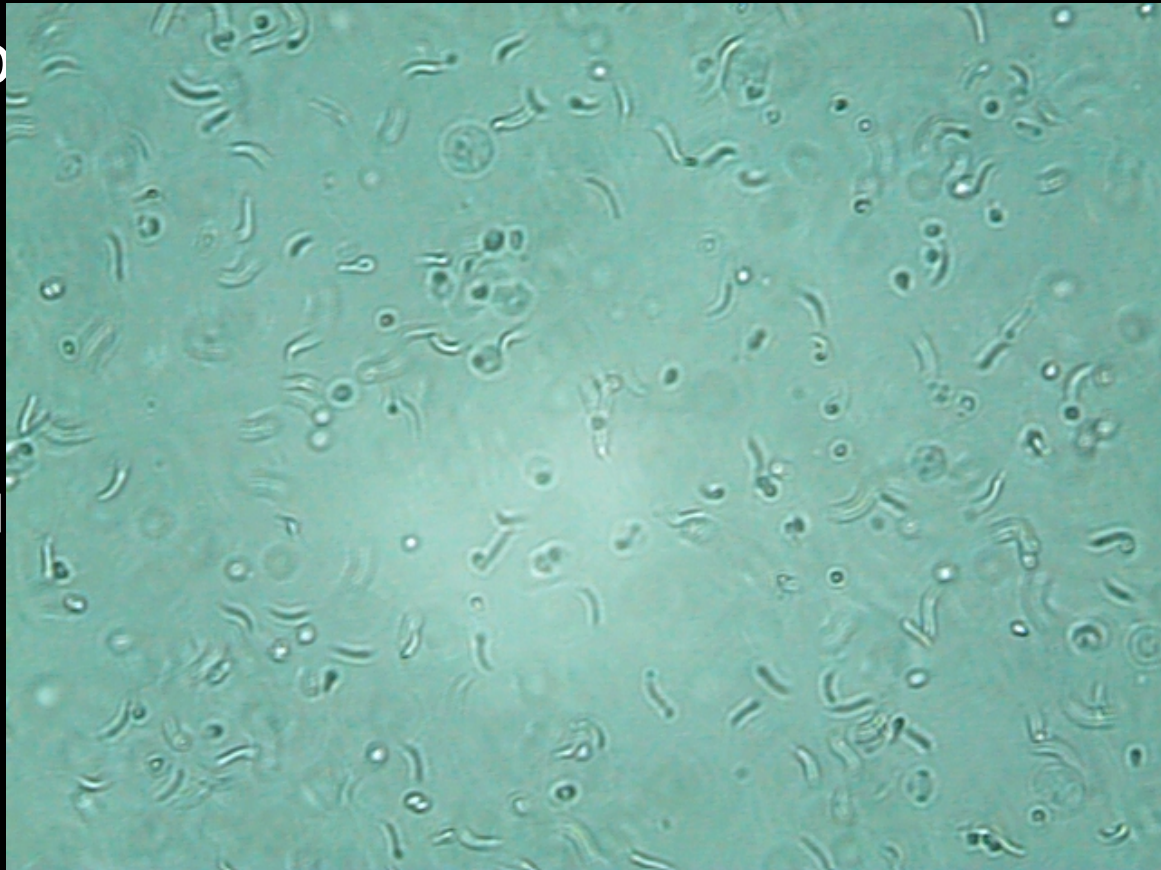
Светлопольная микроскопия

Тёмнопольная микро

Фазово-контрастная
микроскопия

Дифференциально-
интерференционный
контраст (DIC)

Флуоресцентная
микроскопия



Способы получения микроскопического изображения:

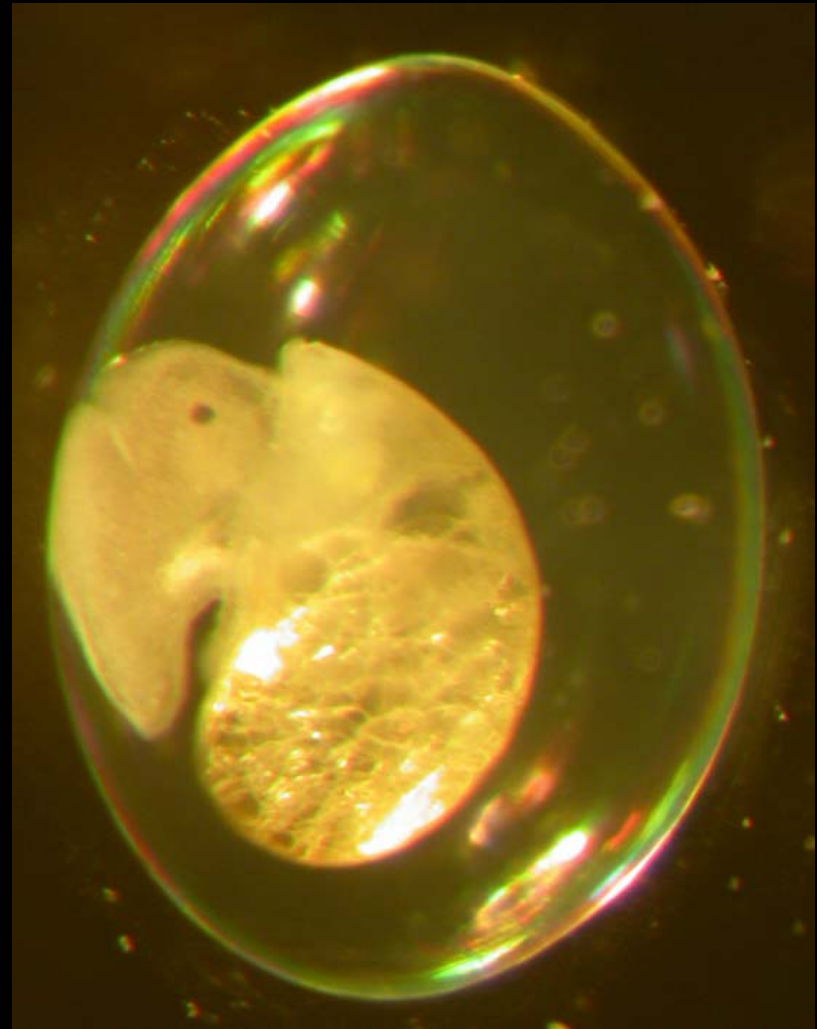
Светлопольная микроскопия

Тёмнопольная микроскопия

Фазово-контрастная
микроскопия

Дифференциально-
интерференционный
контраст (DIC)

Флуоресцентная
микроскопия



Способы получения микроскопического изображения:

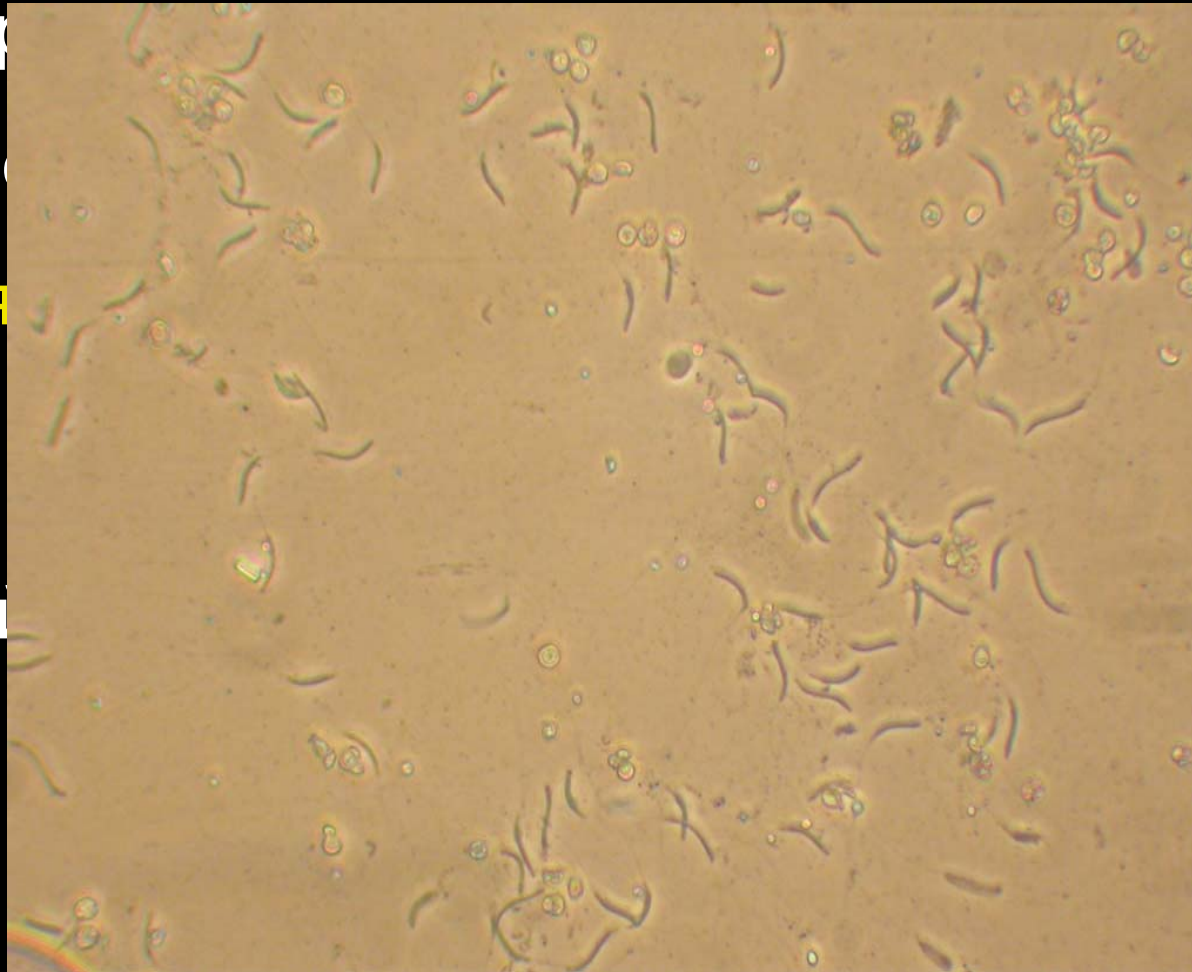
Светлопольная микр

Тёмнопольная микр

Фазово-контрастная
микроскопия

Дифференциально-
интерференционный
контраст (DIC)

Флуоресцентная
микроскопия



Способы получения микроскопического изображения:

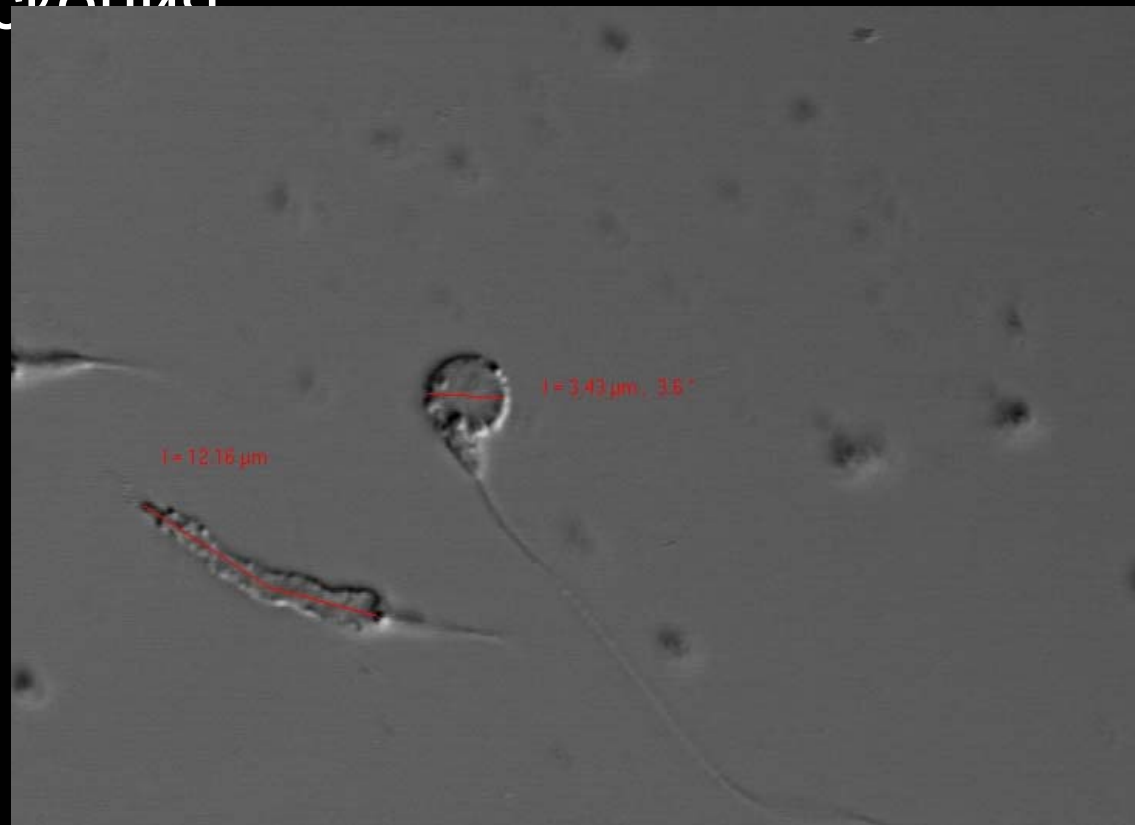
Светлопольная микроскопия

Тёмнопольная микроскопия

Фазово-контрастная
микроскопия

Дифференциально-
интерференционный
контраст (DIC)

Флуоресцентная
микроскопия



Способы получения микроскопического изображения:

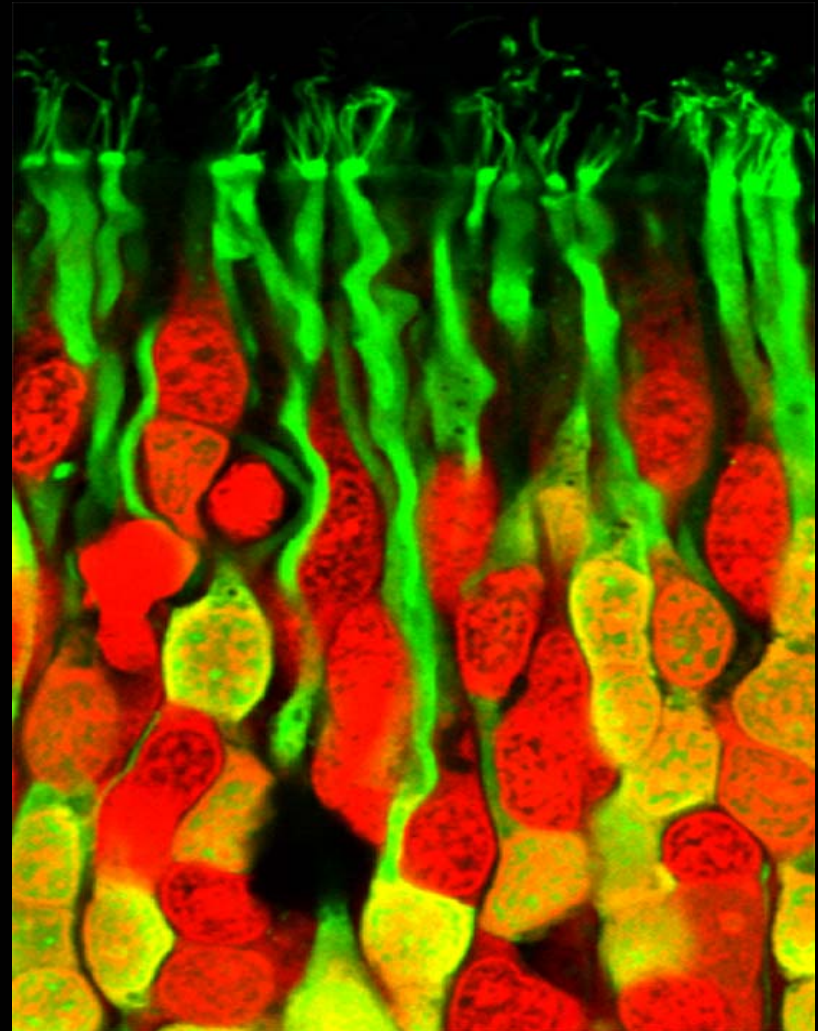
Светлопольная микроскопия

Тёмнопольная микроскопия

Фазово-контрастная
микроскопия

Дифференциально-
интерференционный
контраст (DIC)

**Флуоресцентная
микроскопия**



Микроскоп проходящего света видит только структуры, которые:

- **поглощают или отражают свет;**
- **поворачивают плоскость поляризации света (поляризационные микроскопы);**
- **смещают свет по фазе (фазовый и интерференционный контраст).**

Недостатки микроскопии, основанной на поглощении света:

- **оптическое разрешение менее $\frac{1}{2}$ длины световой волны;**
- **высокие требования к системе освещения;**
- **дифракция, аберрации;**
- **из двух наложенных друг на друга структур мы можем видеть только одну;**
- **сложные методы окрашивания объектов**

Эпифлуоресцентные микроскопы:

- разрешение не ограничено;
- объект остается прозрачным;
- система освещения не участвует в построении изображения;
- отсутствуют хроматические aberrации;
- окрашивание упрощено.

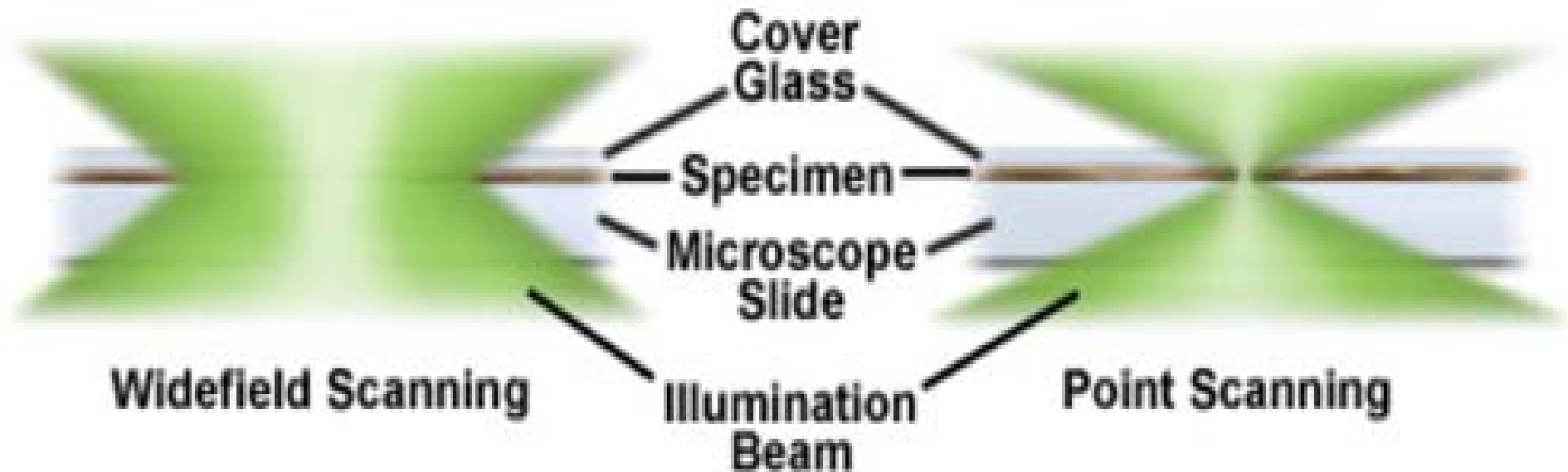
Способ конфокального сканирования трёхмерных микрообъектов был предложен ещё в 1950-х годах , но первые коммерческие 3D - микроскопы появились только к концу 80-х. В настоящее время наибольшее распространение получила лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Объёмное изображение в ней получается при регистрации флуоресценции в фокусе лазерного луча. Излучаемые фотоны фокусируются объективом на небольшом (~ 50 мкм) отверстии, которое позволяет исключить флуоресцирующие элементы, находящиеся вне плоскости фокуса

Получаемые виртуальные трёхмерные изображения высокого разрешения позволяют заглянуть в микромир и по информативности несопоставимы с обычными двухмерными картинками, но даже при минимальной комплектации ЛКФМ стоят сотни тысяч долларов

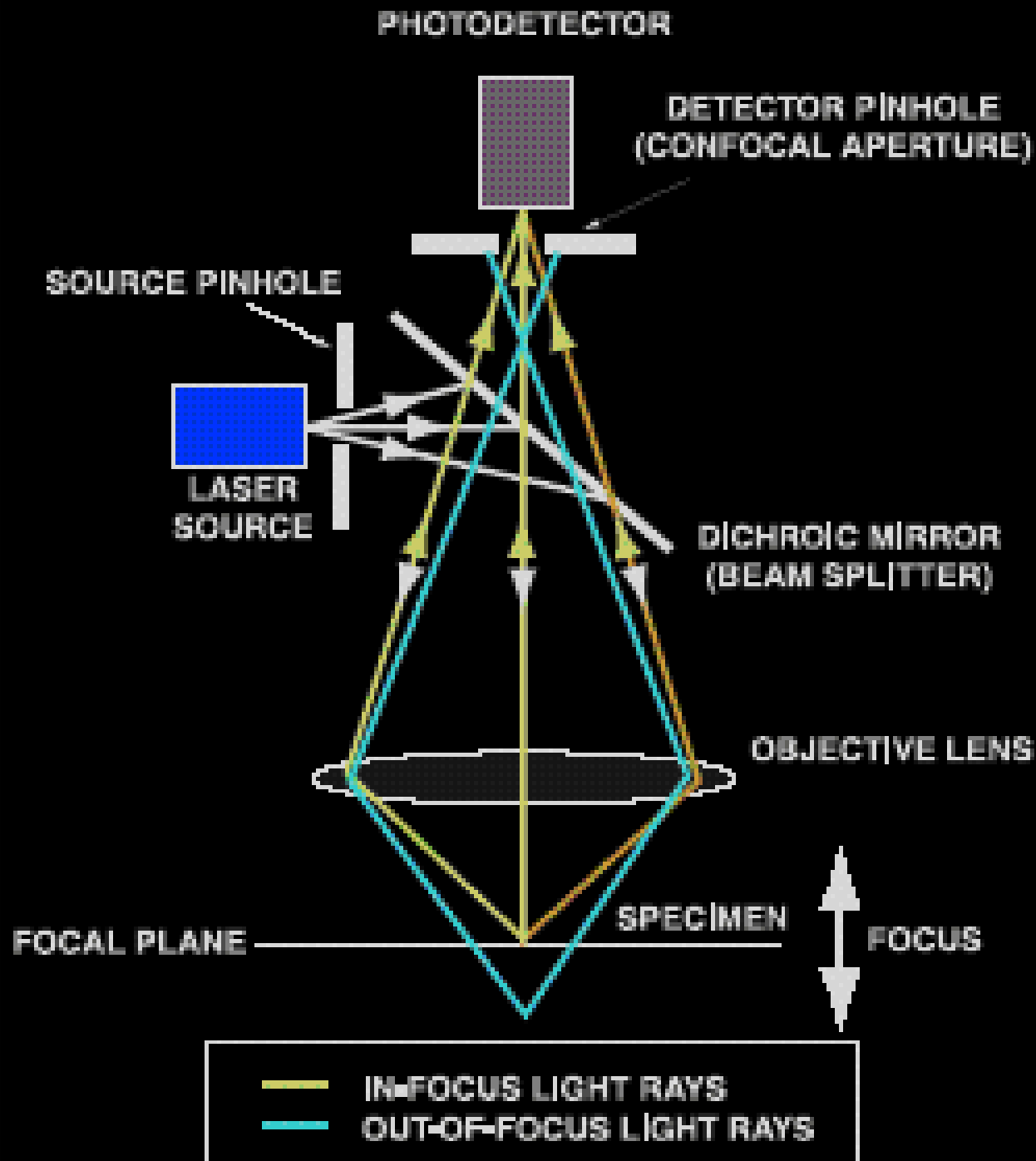


Сравнительные размеры области фокусировки обычного (слева) и конфокального (справа) микроскопов

Widefield Versus Point Scanning of Specimens



Принцип конфокаль ности



1

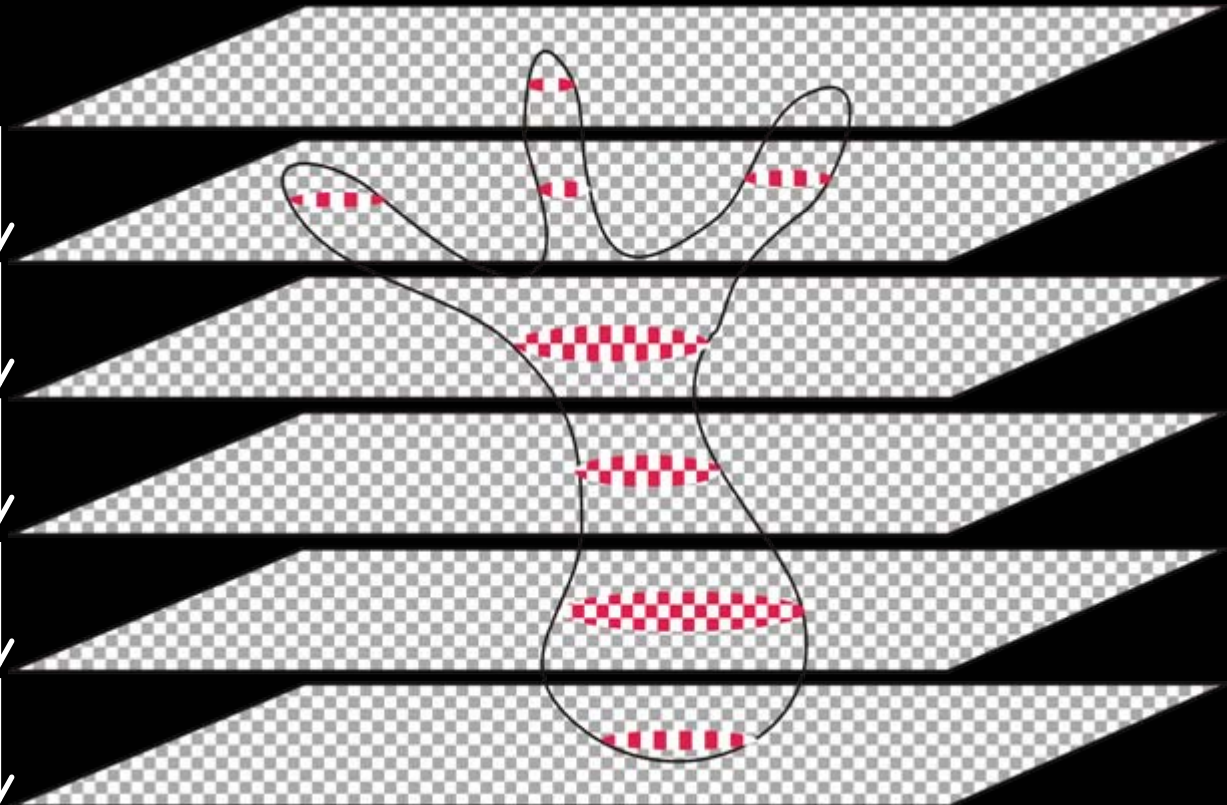
2

3

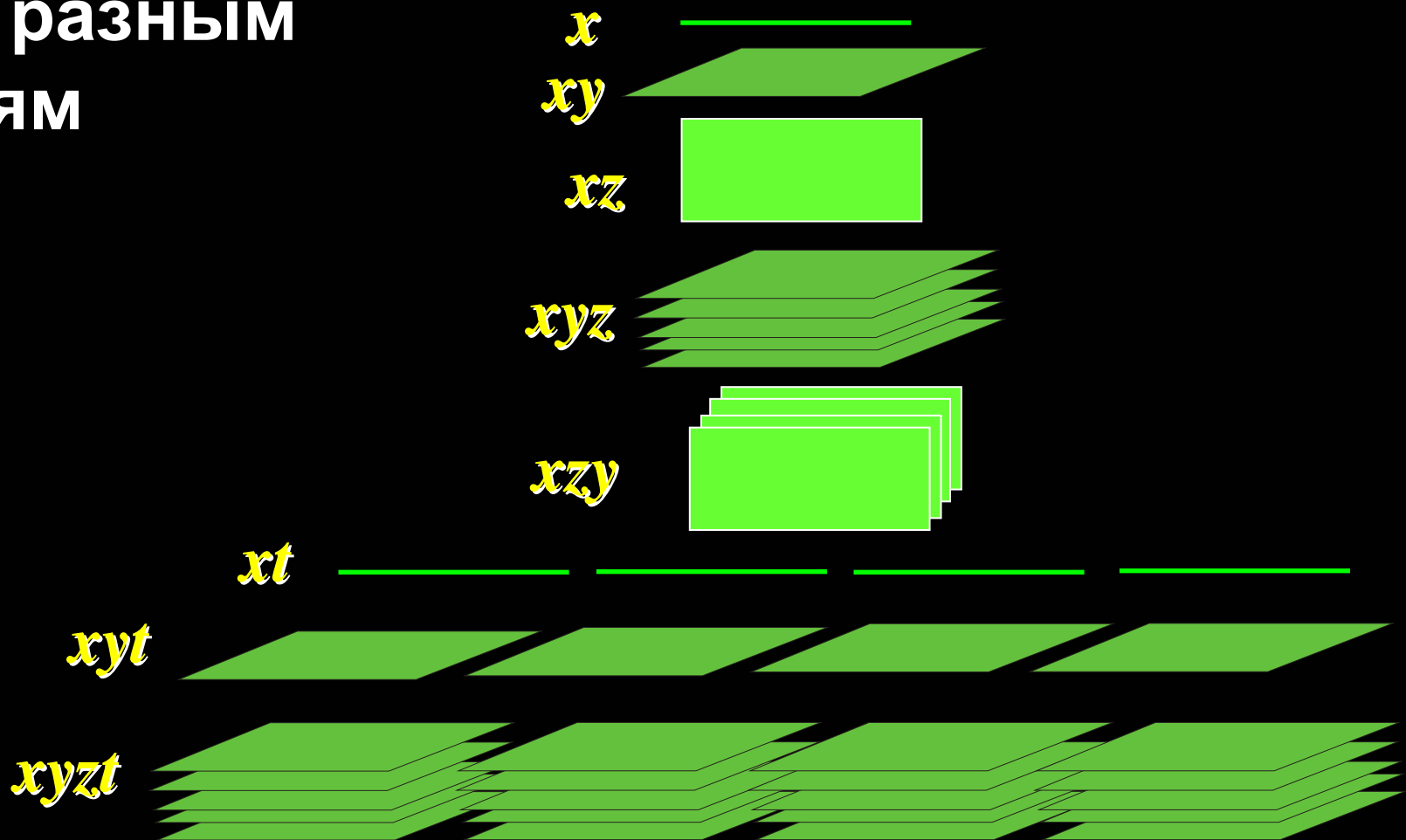
4

5

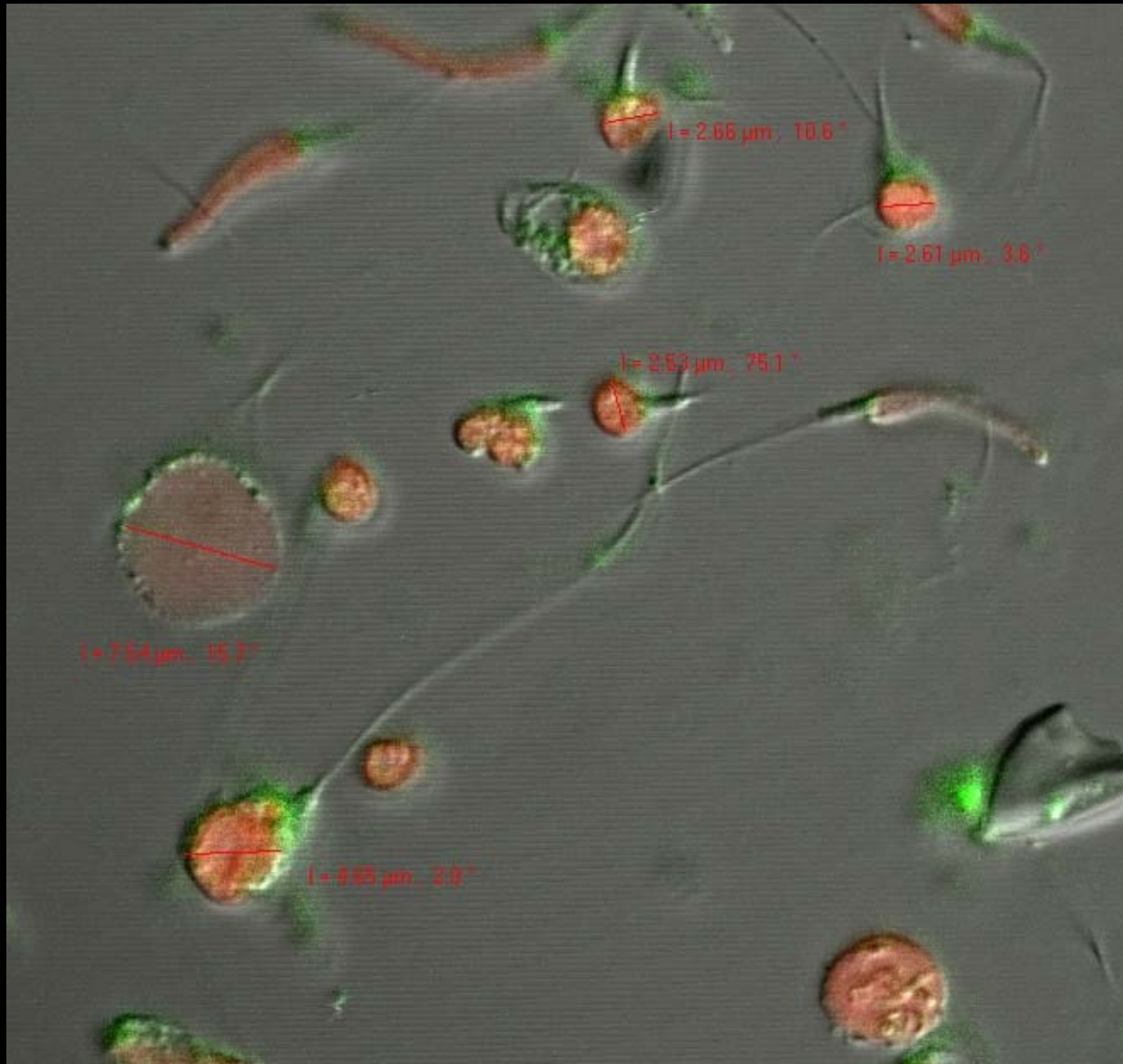
6



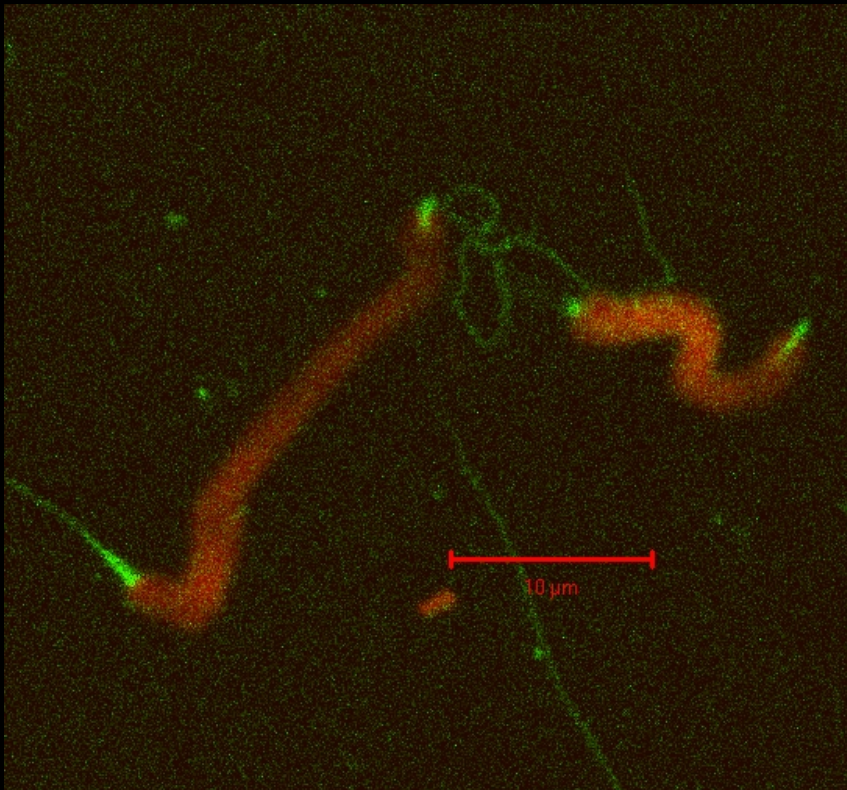
Сканирование по разным осям



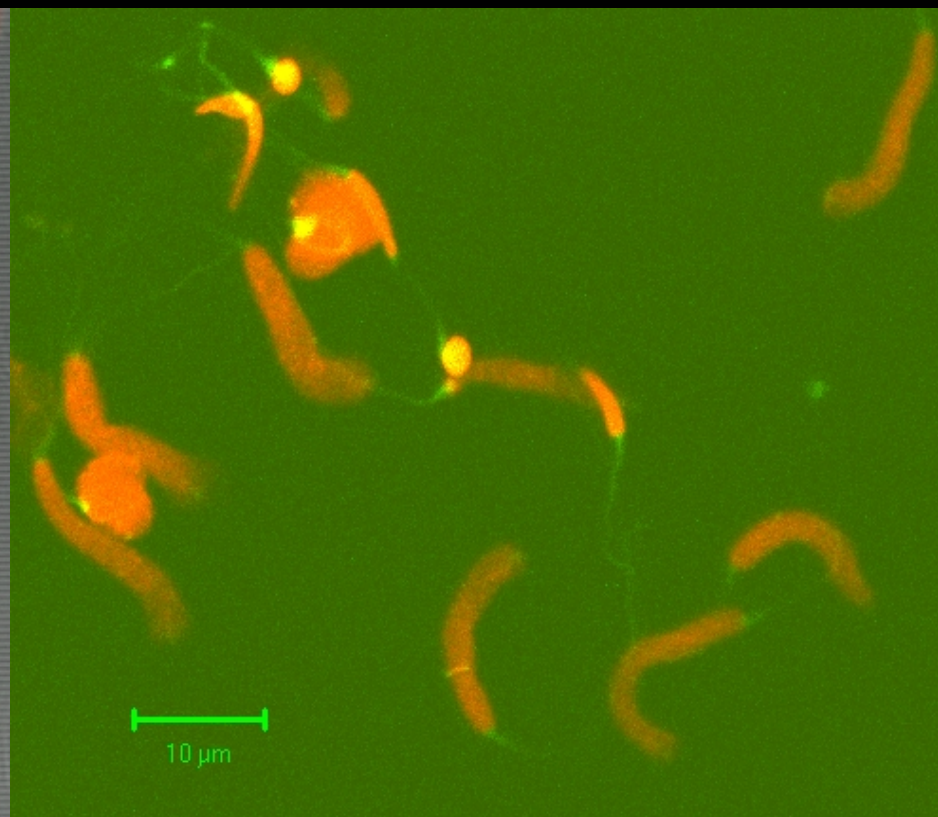
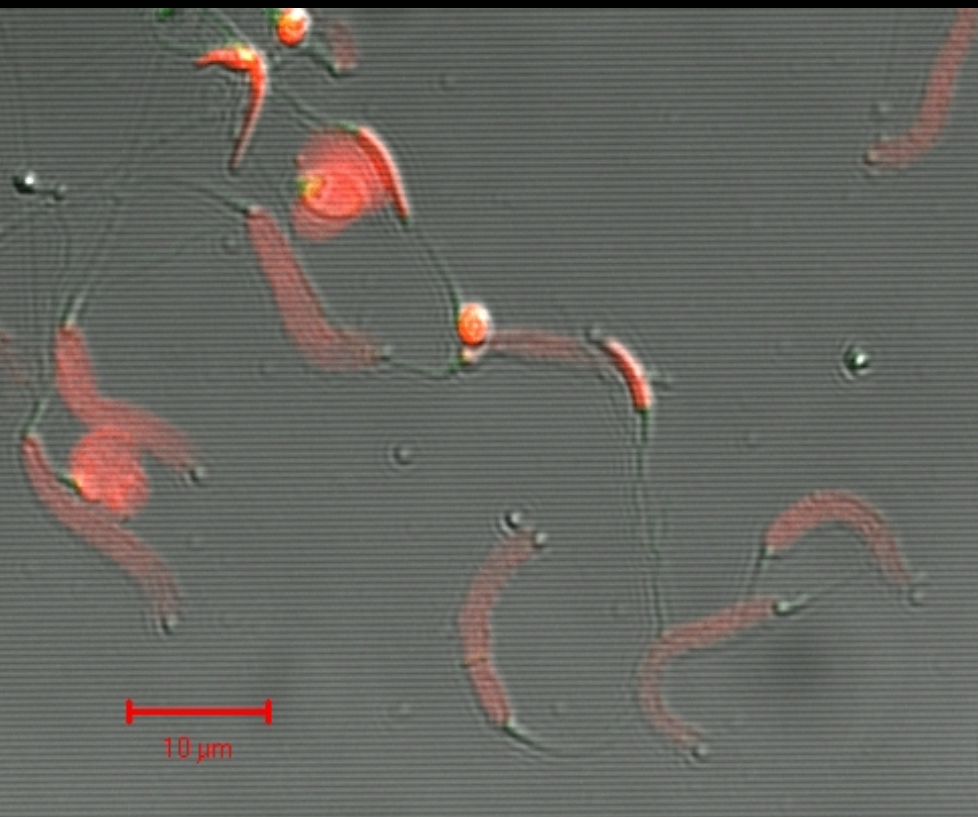
Мазок спермы стерха
G. leucoderanus. Окраска АНС (белок) и
бромистый этидий (нуклеиновые к-ты)



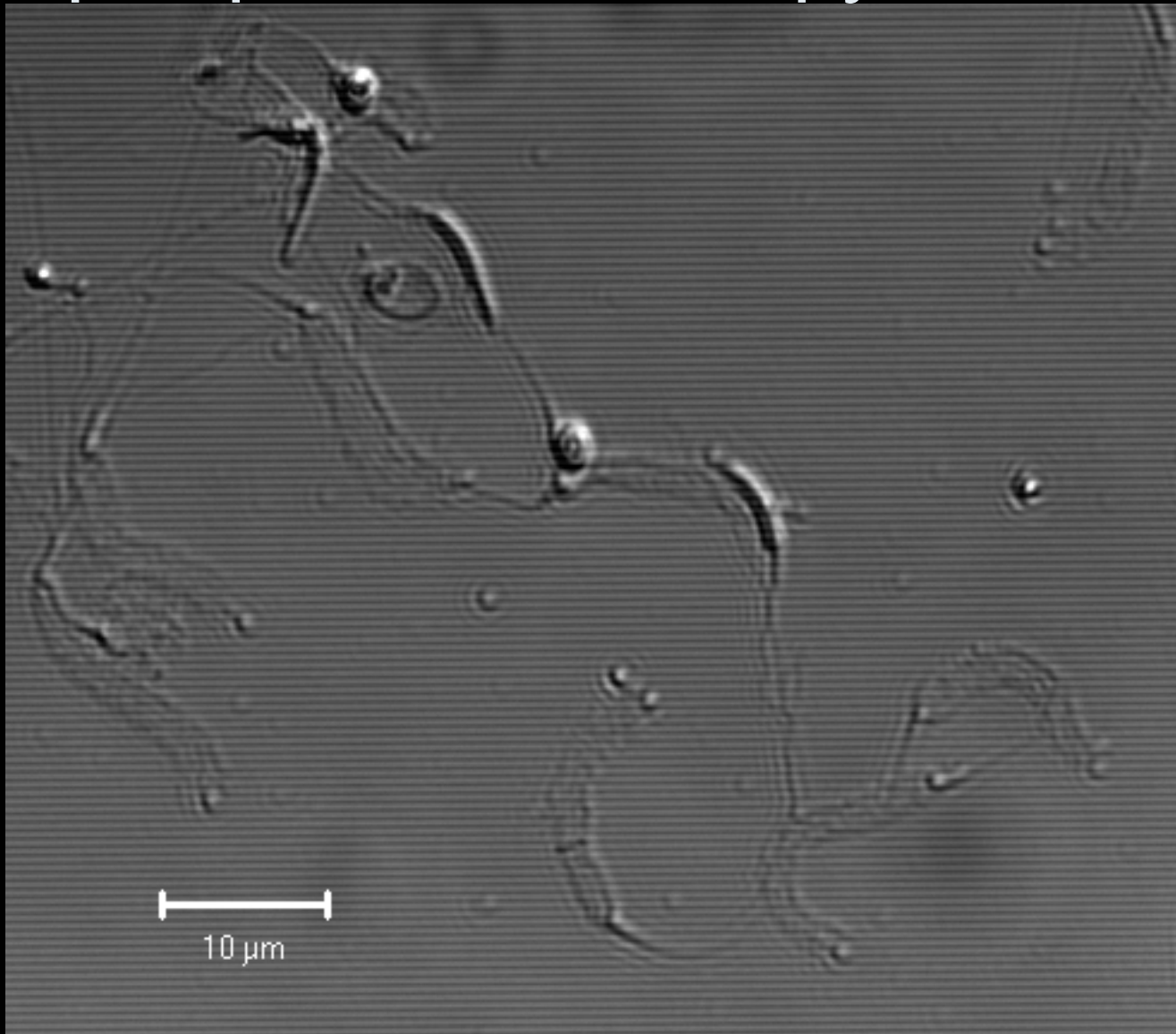
Сперматозоиды стерха (слева) и быка (справа).
Окраска одинаковая: фаллоидин-фитц (зеленый)
– цитоскелет и бромистый этидий (красный) – ядра



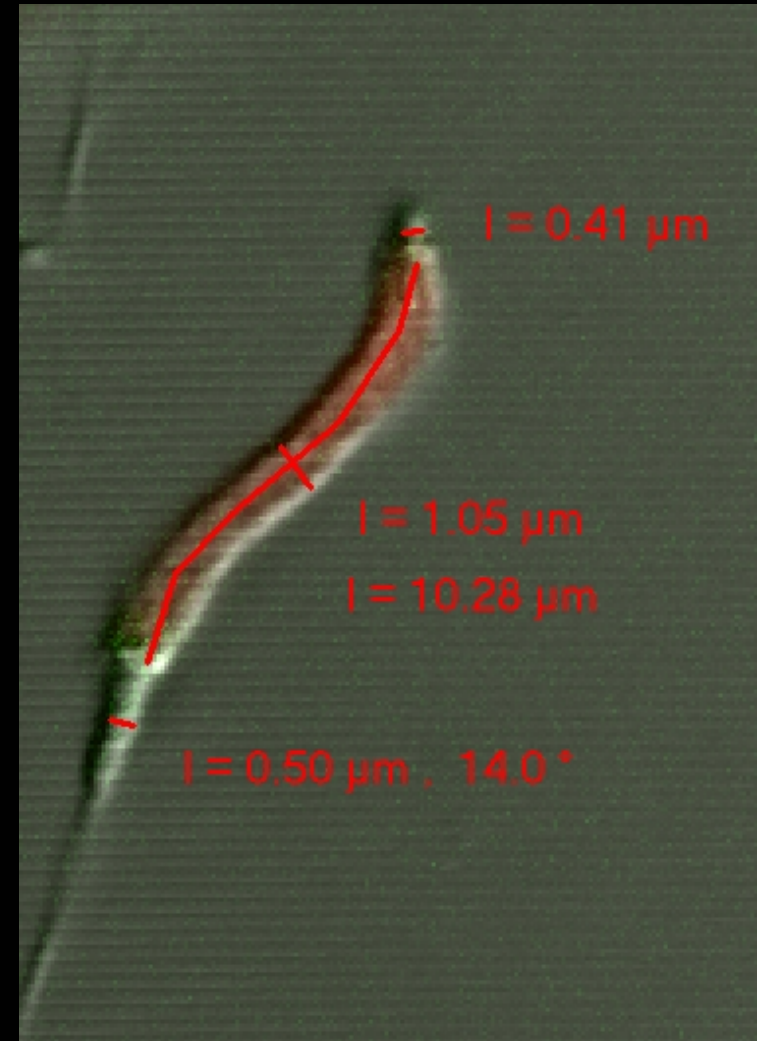
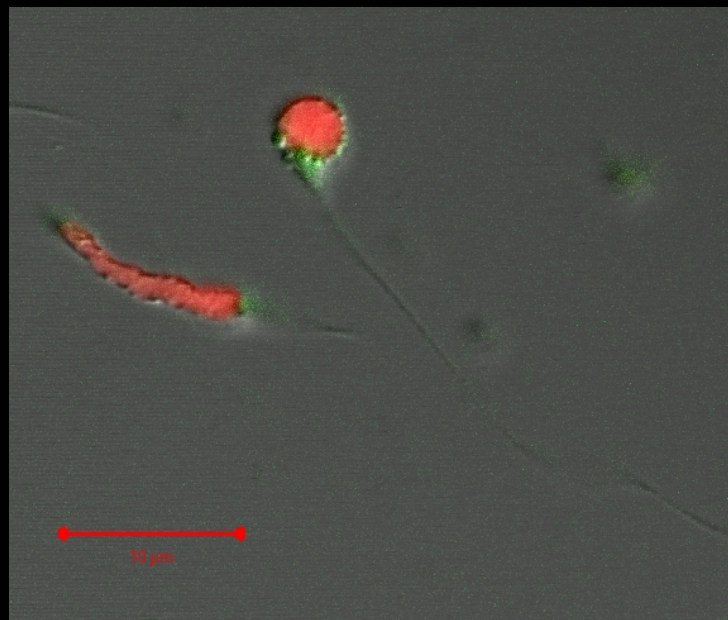
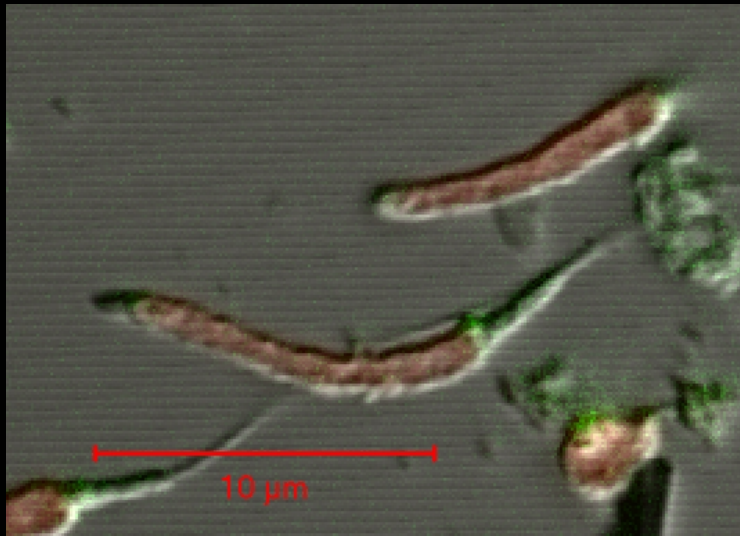
Целые и поврежденные сперматозоиды стерха.
Сравнение методов обработки полученного
изображения. Окраска та же, фаллоидин-фитц
(ФФ) и бромистый этидий (БЭ)



Обычные микроскопы такие артефакты не обнаруживают.



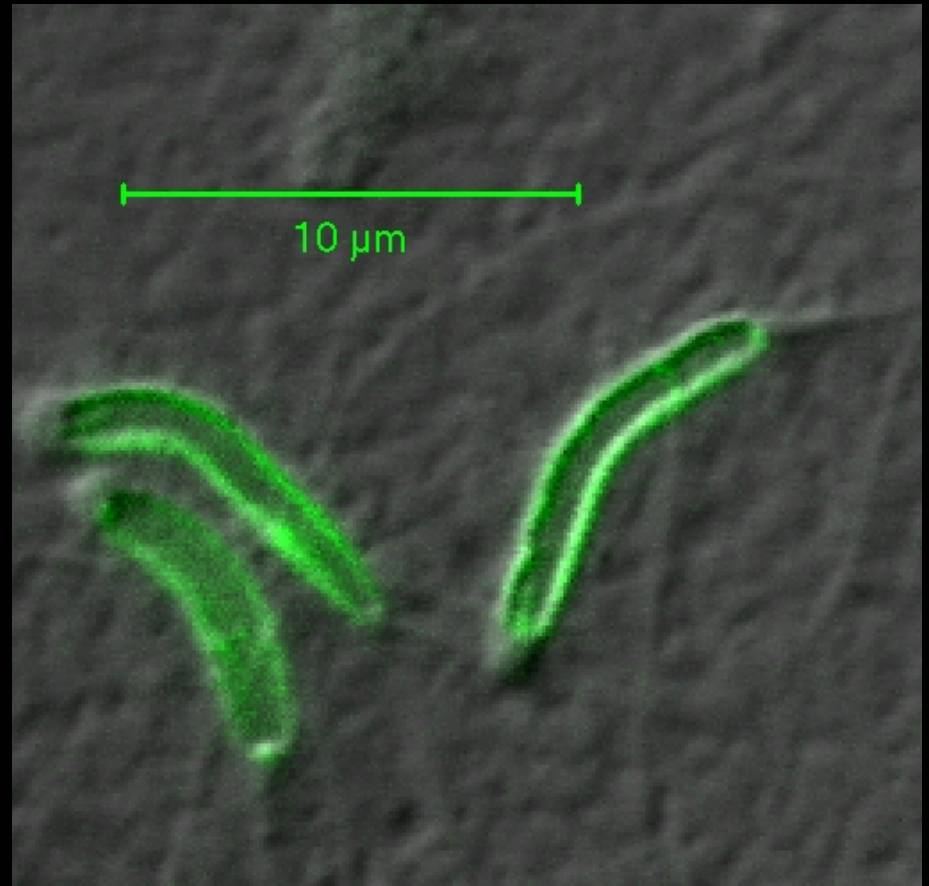
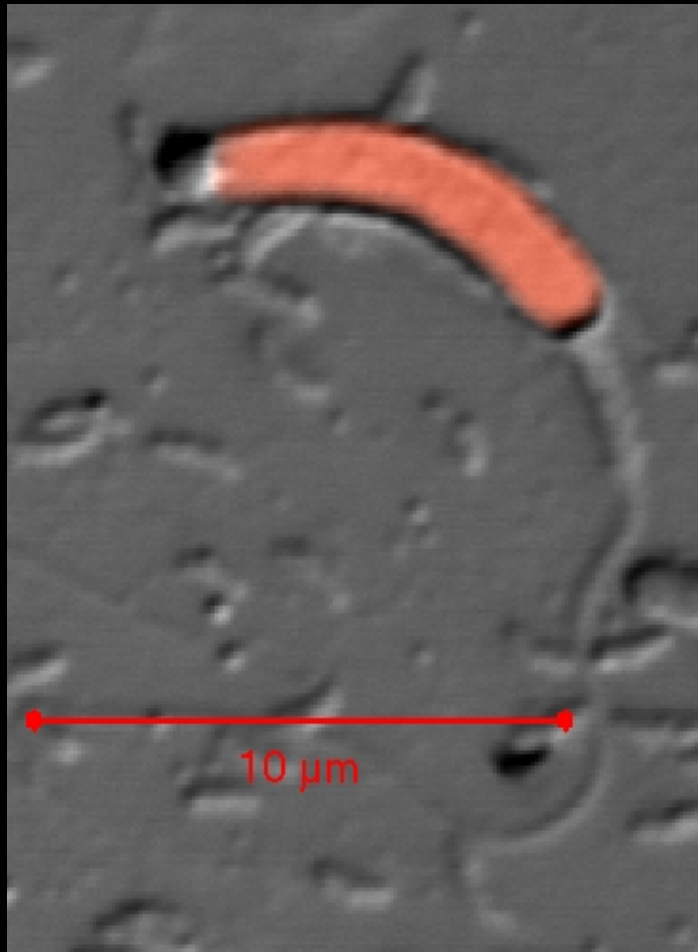
Сперматозоиды стерха *G. leucogeranus*. Окраска ФФ и БЭ



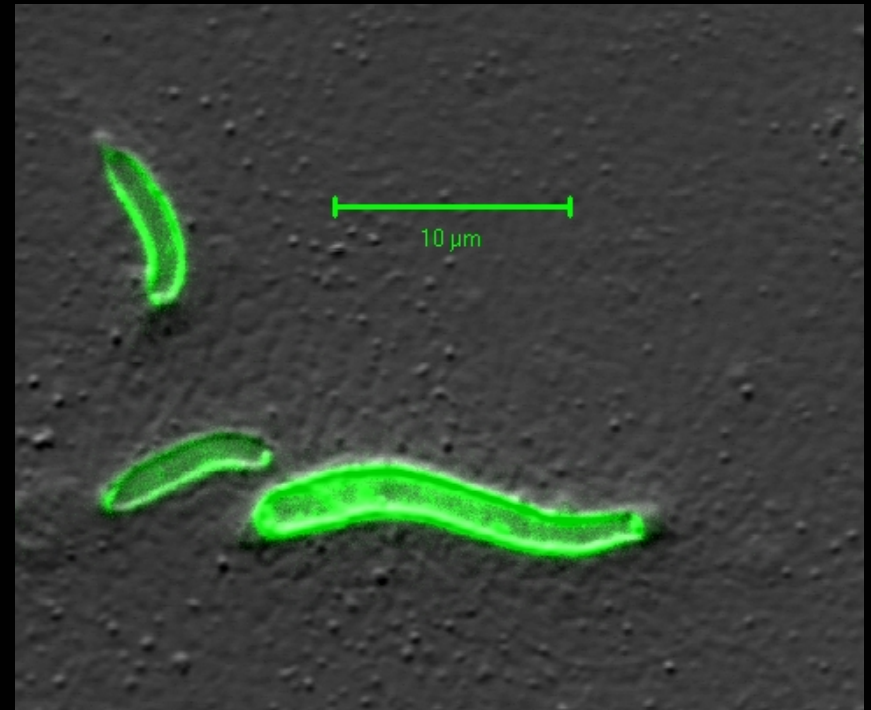
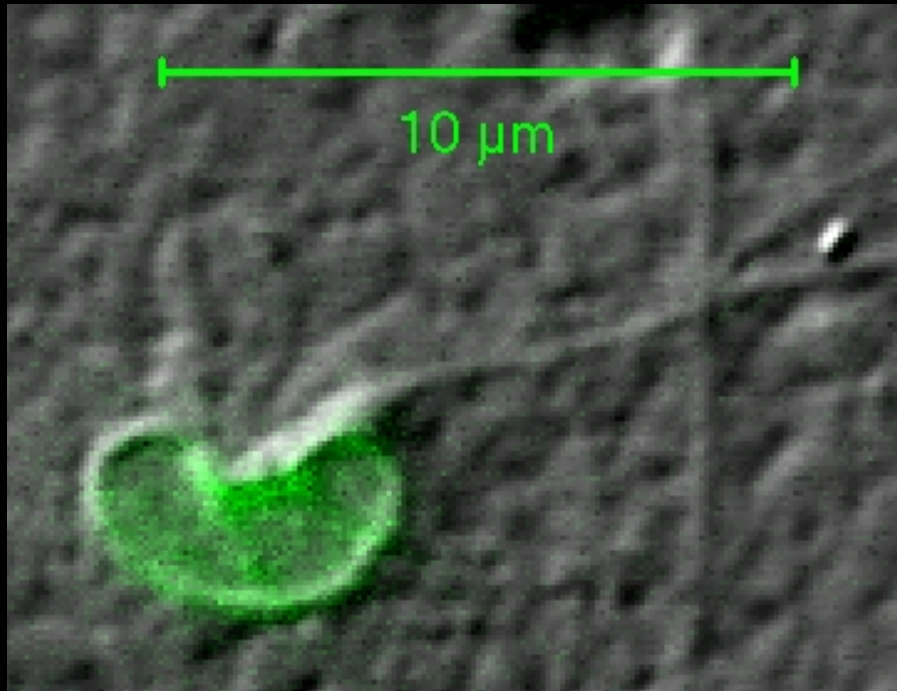
Сперматозоиды стерха
G. leucoderanus. Окраска –слева БЭ,
справа БЭ и АНС



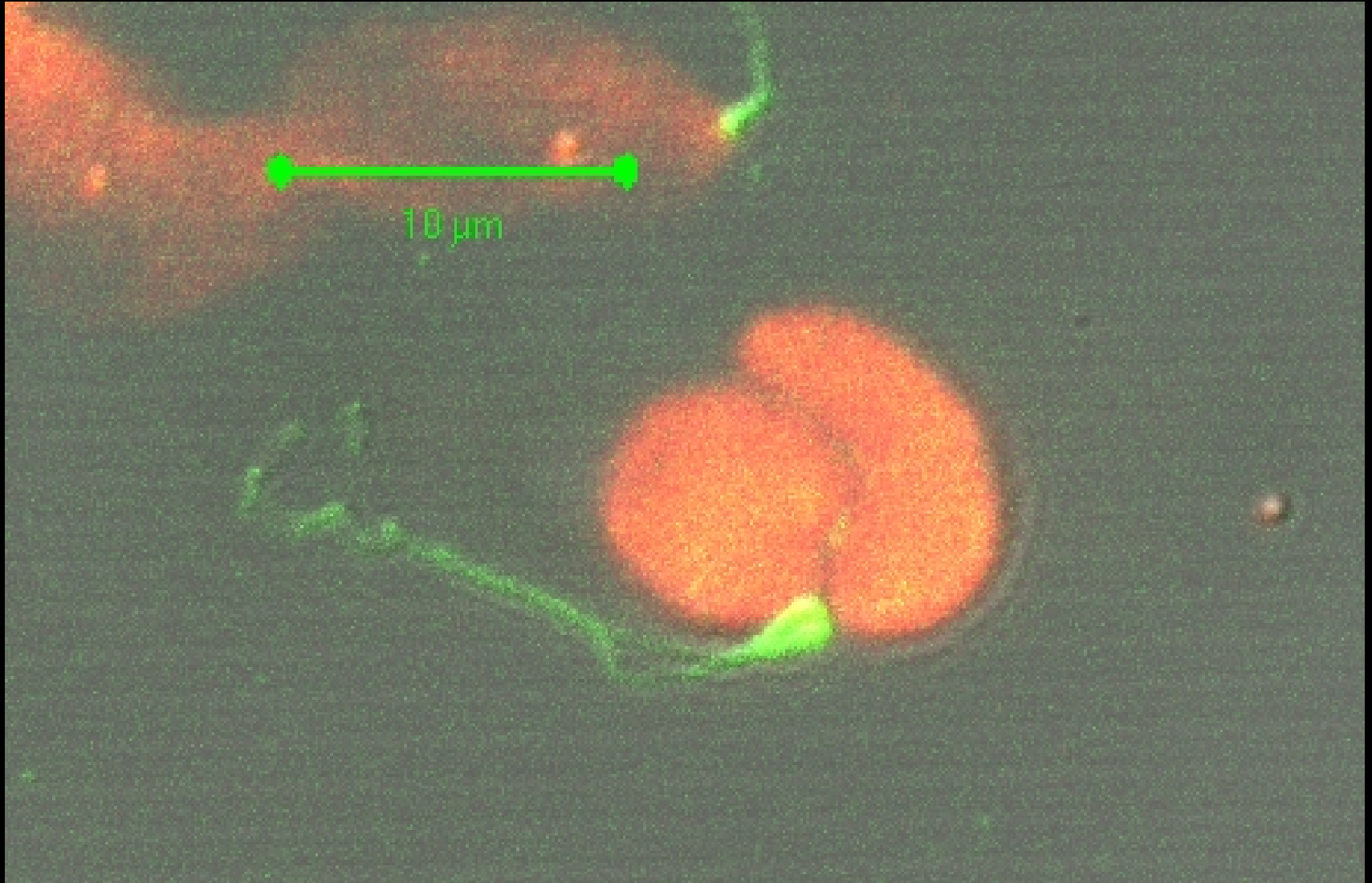
Сперматозоиды даурского журавля *G. virio*. Окраска –слева БЭ, справа флуоресцеин



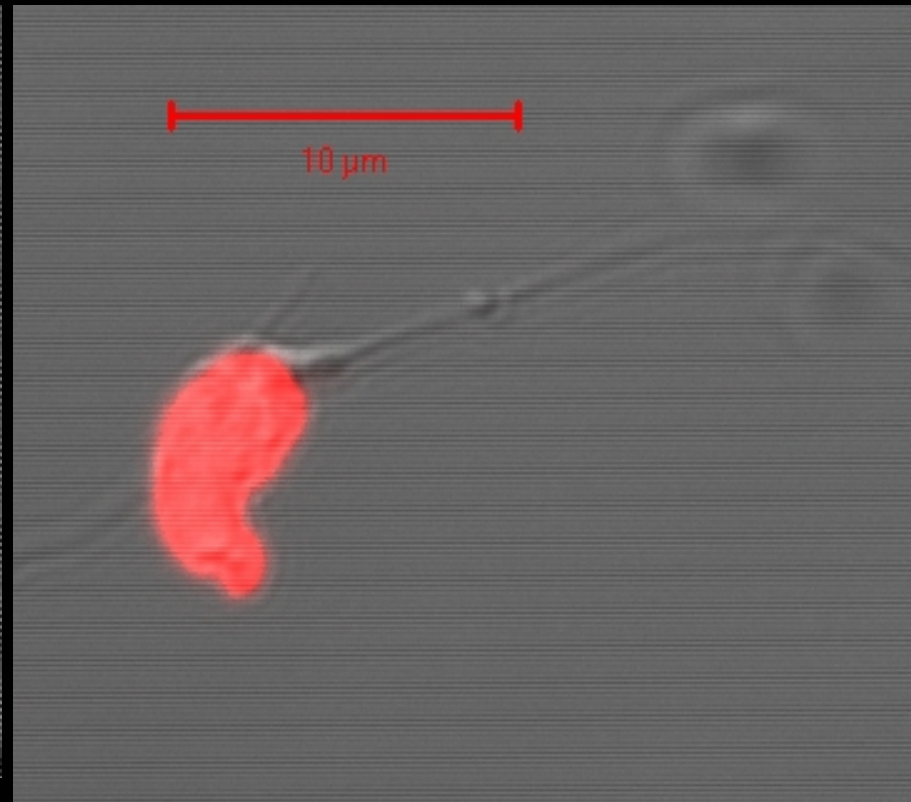
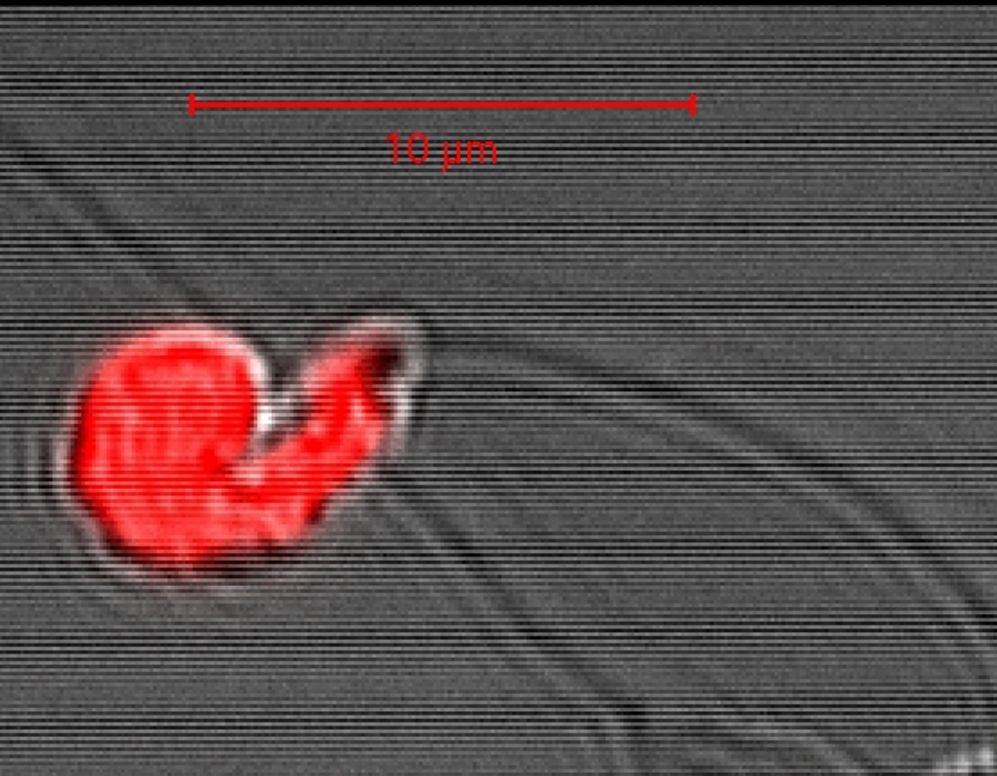
Сперматозоиды даурского журавля *G. virio*. Окраска - флуоресцеин



Два «сросшихся» сперматозоида, вероятно, нарушения при сперматогенезе



Промежуточная форма между длинными
и круглыми сперматозоидами -
«запятая». Окраска - бромистый этидий.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



Сперма стерха «Сергей»
(снято на спермоанализаторе SFA-500, ЦРИЖ)