

МЕДИЦИНА

Оптимизация исследования структурных элементов биологических тканей на гистотопографических шлифах

Белоконь Сергей Александрович, кандидат медицинских наук, доцент;

Витко Юлия Николаевна, ассистент;

Ткаченко Павел Иванович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой;

Старченко Иван Иванович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой;

Гринь Владимир Григорьевич, кандидат медицинских наук, ассистент

Украинская медицинская стоматологическая академия (г. Полтава)

Не секрет, что полноценное и адекватное решение многих проблем клинической медицины в значительной степени определяется степенью осведомлённости о микроскопическом строении соответствующего органа, а помогают в решении подобных задач специальные морфологические методы исследования, суть которых заключается в изготовлении каким-либо способом тонких срезов биологических тканей с дальнейшим их окрашиванием и изучением при помощи светового микроскопа [2, 4, 6, 7].

В экспресс-диагностике биопсийного и операционного материала, при изучении ферментов и в отдельных иммуногистохимических исследованиях достаточно распространённым является способ замораживания тканей с последующим изготовлением срезов толщиной 10–30 мкм. Но, к сожалению, полученные таким образом гистологические препараты зачастую непригодны для изучения при больших увеличениях светового микроскопа из-за неминуемой деформации тканевых структур при замораживании-оттаивании и значительной толщины гистологических срезов [2, 6].

Сегодня достаточно распространёнными остаются заливка тканей в парафин, целлоидин и желатин, позволяющие получать более «показательные» гистологические препараты с использованием большого разнообразия способов окраски, проводить иммуногистохимические исследования. Однако недостатком таких методик является посредственное качество сохранения тканевых структур и относительно небольшая площадь гистологических срезов [4, 7].

В то же время наилучшая сохранность тканевых структур достигается при заливке тканей в эпоксидные смолы с последующим изготовлением полутонких срезов [3], которые целесообразно использовать для изучения тканевых элементов при максимально воз-

можных разрешениях световой микроскопии и для пространственной реконструкции гистологических объектов. Но полутонкие срезы имеют крайне малую площадь, редко превышающую 5х4 мм.

В представленном контексте отдельного внимания заслуживает способ заключения биологических тканей в эпоксидную смолу для макро-микроскопических исследований с изготовлением гистотопографических шлифов. Как отмечают исследователи, такой способ подготовки препаратов для тонкого микроскопического изучения биологических объектов с большой обзорной поверхностью позволяет проводить комплексное, многоуровневое исследование, изучая в единстве разнородные по плотности тканевые комплексы, состоящие из мягких и твёрдых структур (хрящевые, костные), без предварительной их декальцинации [5]. По этой методике уже проведены оригинальные исследования строения различных органов и тканей в норме и при патологии [1, 8].

Недостатками такого способа являются, в ряде случаев, трудности получения достаточно тонкого шлифа с абсолютно плоской поверхностью, что осложняет изучение гистологических структур при максимальных разрешениях световой микроскопии, ограничение использования широкого спектра гистологических окрасок, применение которых возможно на полутонких срезах.

Целью нашей работы стало усовершенствование способа изучения гистологических структур на гистотопографических шлифах, полученных по вышеупомянутой методике заключения биологических тканей в эпоксидную смолу для макро-микроскопических исследований.

Согласно нашим рекомендациям, после предварительного исследования на макро-микроскопическом уровне и при небольших увеличениях светового микроскопа гистотопографических шлифов, при помощи бинокулярной лупы на них выбирается один или несколько участков раз-

мером около 3x4 мм для дальнейшего, более детального изучения при больших увеличениях светового микроскопа. Под контролем бинокулярной лупы, лезвием безопасной бритвы эти фрагменты вырезаются со шлифа с последующим их наклеиванием ЕПОНОм-812 на заранее изготовленные эпоксидные блоки, подобные используемым в электронной микроскопии [11].

После застывания эпоксидной смолы с наклеенных фрагментов при помощи ультрамикротомы, с использованием стеклянных ножей, получают полутонкие срезы толщиной 2–3 мкм, достаточно легко окрашивающиеся различными способами, разработанными для полутонких срезов [6].

Описанная методика была использована нами при изучении строения отдельных участков языка и тройничного узла человека во внутриутробном периоде развития.

В частности, после установления на продольных гистотопографических шлифах языков топографии зобно-глоточного протока (ЗГП), представленного системой разнонаправленных трубчатых разветвлений в области корня языка [10] (Рис. 1), на полутонких срезах соответствующего фрагмента гистотопографического шлифа проводилось изучение строения слизистой оболочки (СО) ЗГП.

Оказалось, что клеточный состав её эпителия отличается в разветвлениях различных размеров. Так, в больших из них СО покрыта многорядным полиморфнофункциональным эпителием, несколько напоминающим таковой дыхательных путей. Среди его клеточных элементов постоянно встречались довольно крупные, вытянутые эпителиоциты с ресничками на апикальной поверхности; эпителиоциты, подобные по форме и размеру предыдущим, но лишённые ресничек; базальные клетки.

В более мелких разветвлениях ЗГП клеточный состав эпителия СО был подобен таковому в мелких междольковых выводных протоках слюнных желез. Отчётливо прослеживалось двухслойное расположение клеток: внутренний слой представлен эпителиоцитами призматической формы, а наружный составляют клеточные элементы, подобные миоэпителиоцитам (Рис. 2).

На гистотопографических шлифах височной кости изучено строение тройничной полости, её взаимоотношение с окружающими анатомическими структурами (Рис. 3) [9], а полутонкие срезы, прицельно изготовленные с тканей тройничного узла, позволили достаточно детально изучить строение его капсулы, локализацию кровеносных микрососудов, охарактеризовать клеточные элементы.

Установлено, что на 16–23 неделях фетогенеза, капсула тройничного узла человека образована сращением периневрия ствола тройничного нерва с листками твёрдой оболочки головного мозга.

В составе капсулы определяется два слоя (внутренний и наружный), отличающиеся плотностью компоновки клеточных и фибриллярных структур. Нейроциты тройничного узла в изучаемый период имеют существенные отличия по размерам и тинкториальным свойствам, что позволяет, на основании перечисленных признаков, разделить последние на несколько групп (Рис. 4).

Таким образом, положительный эффект представленного способа изготовления полутонких срезов заключается в возможности предварительного изучения гистологических структур на макро-микроскопическом уровне с последующим исследованием выбранных структур при максимальных увеличениях светового микроскопа с применением широкого спектра гистологических красителей.

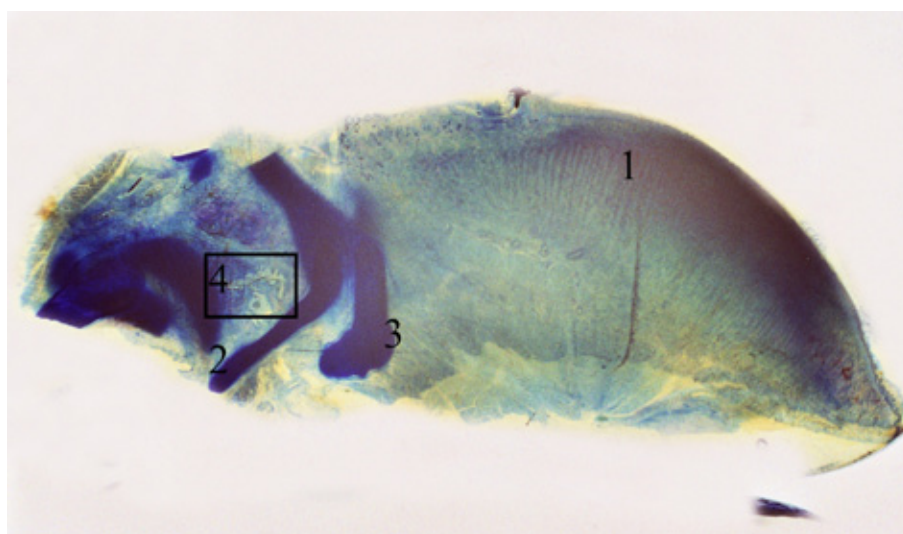


Рис. 1. Продольный шлиф языка на 18–20 неделях внутриутробного развития (сагитальная плоскость). Окраска метиленовым синим. Макросъёмка: объектив $f=50$ мм, Рарcolar, растяжение меха 75 мм. 1 — тело языка; 2 — зачаток подъязычной кости; 3 — зачаток щитовидного хряща; 4 — фрагменты зобно-глоточного протока, в последующем изучавшиеся на полутонких срезах

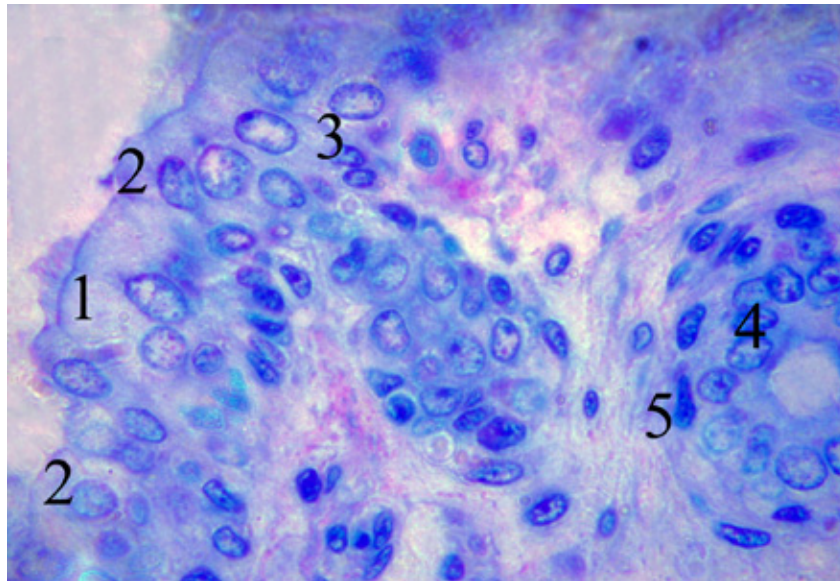


Рис. 2. Строение зубно-глочного протока на 18–20 неделях внутриутробного развития. Полутопкий срез. Окраска полихромным методом. Об. 100х, ок. 10х. 1 — реснитчатые клетки; 2 — безреснитчатые клетки; 3 — базальные клетки; 4 — эпителиоциты внутреннего слоя мелкого ответвления зубно-глочного протока; 5 — миоэпителиальные клетки

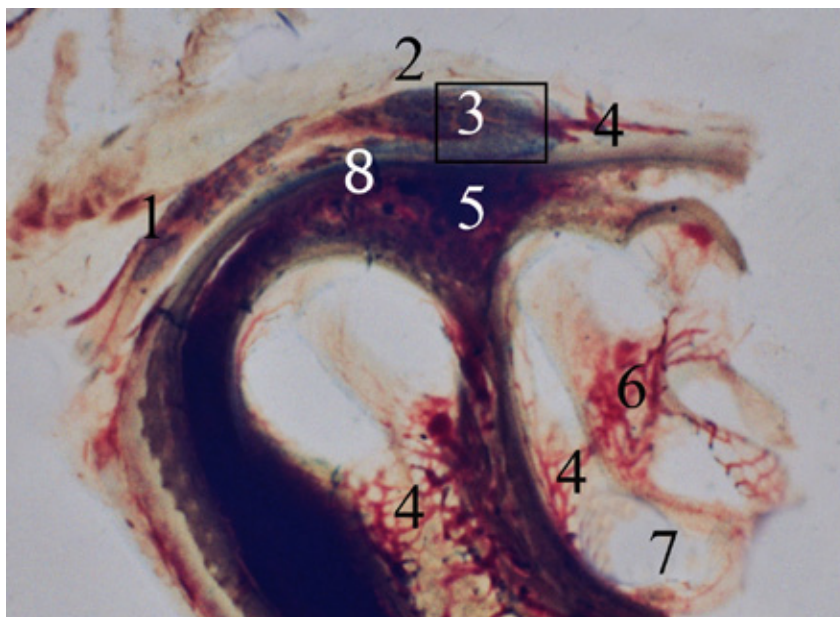


Рис. 3. Шлиф пирамидки височной кости на 20–23 неделях внутриутробного развития (парасаггитальная плоскость). Окраска метиленовым синим. Макросъёмка: объектив $f=50$ мм, Рарcolar, растяжение меха 110 мм. 1 — ствол тройничного нерва; 2 — верхняя пластинка твёрдой оболочки головного мозга; 3 — тройничный узел, в последующем изучавшийся на полутопких срезах; 4 — кровеносные сосуды венозного типа; 5 — костное вещество пирамидки височной кости; 6 — стержень улитки; 7 — спиральный канал улитки

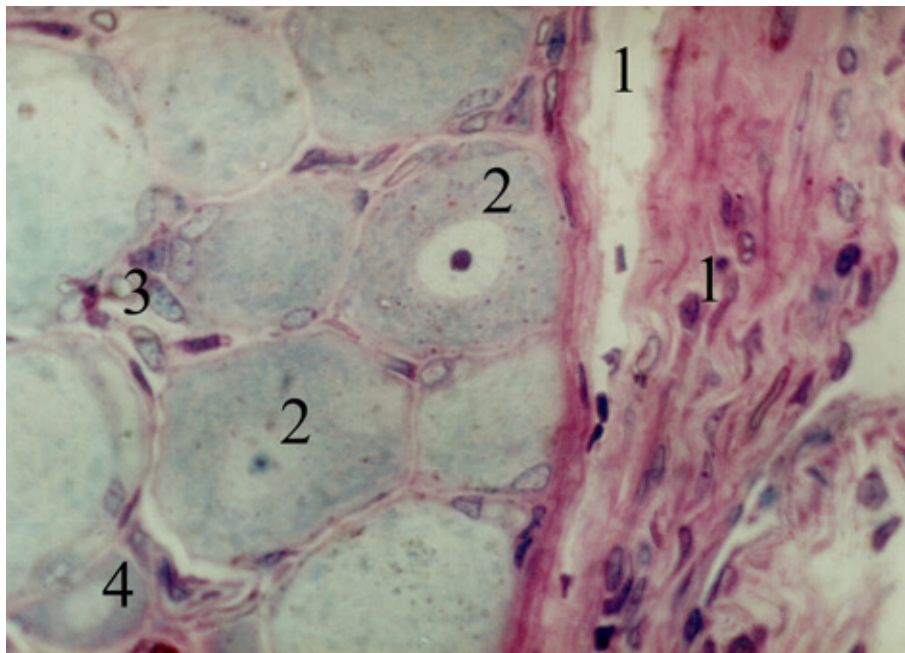


Рис. 4. Строење тройничного узла человека на 20–23 неделях внутриутробного развития. Полутонкий срез. Окраска полихромным методом. Об. 100х, ок. 10х. 1 — капсула узла; 2 — крупные нейроны; 3 — мантийные клетки; 4 — мелкий нейрон

Литература:

1. Гринь, В. Г. Будова ілеоцекального відділу кишечника людини з інтактним апендиксом та після апендектомії: автореф. дис. на здобуття вченого ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.01 «нормальна анатомія»/В. Г. Гринь — Харків, 2013. — 18 с.
2. Коржевский, Д. Е. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии/Д. Е. Коржевский, О. В. Кирик, М. Н. Карпенко — Санкт-Петербург, 2012. — 112 с.
3. Костиленко, Ю. П. Методы работы с полутонкими эпоксидными срезами в гистологической практике/Ю. П. Костиленко, Е. В. Ковалёв — Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. — 1978. — Т. 75, В. 12. — с. 68–72
4. Меркулов, А. Б. Курс патогистологической техники/А. Б. Меркулов — Л.: Медицина, 1969. — 237 с.
5. Метод изготовления гистологических препаратов, равноценных полутонким срезам с большой обзорной поверхности, для многоцелевых морфологических исследований/Ю. П. Костиленко, И. В. Бойко, И. И. Старченко [и др.]// Морфология. — 2007. — №5. — с. 94–96
6. Райхлин, Н. Т. Ультраструктура опухолей человека/Н. Т. Райхлин, Г. Давид, К. Лапиш — Москва, 1981. — 552 стр.
7. Ромейс, Б. Микроскопическая техника/Б. Ромейс; [пер. с нем. В. Я. Александрова, З. И. Крюкова]. — М.: ИЛ., 1953. — 716 с.
8. Старченко, І. І. Морфологічна характеристика динаміки топологічних перетворень зародкових структур зубних зачатків у внутрішньоутробному розвитку людини: автореф. дис. на здобуття вченого ступеня док. мед. наук: спец. 14.03.01 «нормальна анатомія»/І. І. Старченко — Харків, 2010. — 32 с.
9. Старченко, І. І. Особенности топографии тройничного узла человека во внутриутробном периоде развития/І. І. Старченко, Ю. Н. Витко — Вісник проблем біології і медицини. — 2013. — Вип. 1. Т. І — с. 208–210
10. Ткаченко, П. І. Про походження та морфологічні відмінності щито-язичної і зобно-глоткової проток як анатомічних утворень, що можуть стати джерелом розвитку кіст ший/П. І. Ткаченко, І. І. Старченко, С. О. Білоконь — Вісник проблем біології і медицини. — 2014. — Вип. 2. Т. 2 — с. 179–182
11. Уикли, Б. Электронная микроскопия для начинающих/Б. Уикли; [пер. с англ. И. Викторовой]. — М.: Мир, 1974. — 324 с.