

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2007
УДК 578.6

Ю.П. Костиленко, И.В. Бойко, И.И. Старченко и А.К. Прилуцкий

МЕТОД ИЗГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, РАВНОЦЕННЫХ ПОЛУТОНКИМ СРЕЗАМ БОЛЬШОЙ ОБЗОРНОЙ ПОВЕРХНОСТИ, ДЛЯ МНОГОЦЕЛЕВЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. О.А. Шерстюк) Украинской медицинской стоматологической академии, г. Полтава, e-mail: melkor2002@ukr.net

В настоящее время эффективных способов получения полутонких срезов большой обзорной поверхности не существует. Предлагается альтернативное решение этой задачи без самой процедуры получения гистологических срезов как таковых. Он включает модифицированную комбинацию методов фиксации тканей и заключение их в эпоксидную смолу с известными техническими приемами изготовления шлифов. Данный метод подготовки препаратов для микроскопического изучения биологических объектов с большой обзорной поверхностью обладает дополнительными ценными возможностями, так как позволяет изучать разнородные комплексы, состоящие из мягких и твердых (хрящевых и костных) тканей без предварительной их декальцинации.

Ключевые слова: шлифы, заливка, эпоксидная смола, световая микроскопия, электронная микроскопия.

Полутонкие срезы тканей, заключенных в эпоксидную смолу, согласно требованиям, предъявляемым в трансмиссионной электронной микроскопии, находят все большее применение в гистологической практике, так как они в значительной мере позволяют повысить результативность исследований.

Однако полутонкие срезы обладают одним существенным недостатком, состоящим в том, что техника их изготовления с помощью стеклянных ножей крайне ограничивает обзорную площадь изучаемого объекта. Обычно их максимальная поверхность не превышает площади, равной 4×4 мм.

Несмотря на имеющиеся попытки решения этой задачи [4], в настоящее время каких-либо эффективных способов преодоления технических трудностей в получении полутонких срезов большой обзорной поверхности не существует.

Решить эту задачу нам удалось иным путем, позволяющим обойтись без самой процедуры получения гистологических срезов как таковых. Он заключается в модифицированной комбинации методов фиксации тканей и заключения их в эпоксидную смолу (в соответствии с требованиями трансмиссионной электронной микроскопии) с известными техническими приемами изготовления шлифов [1 — 3]. В данном случае мы полагались на удовлетворительный просветляющий эффект эпоксидной смолы при пропитывании ею тканевых структур, в связи с чем пришлось исключить дополнительную фиксацию в четырехокиси осмия.

Для этого полученный материал (мы использовали тканевые комплексы размером примерно 20×10×8 мм) промывали в изотоническом растворе, а затем погружали в 4% раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере на 2–7 сут.

Отмывку, дегидратацию, с переходом в ацетон, и дальнейшую пропитку тканей эпоксидной смолой эпон-812 осуществляли в соответствии с методами подготовки образцов для трансмиссионной электронной микроскопии, но с двойным удлинением времени на каждом этапе.

Пропитанный препарат помещали в смесь эпоксидной смолы (28,9 мл). Для получения более плотного блока к ней добавляли 0,8 мл отвердителя ДМП-30. Полимеризацию проводили в кювете, соответствующей размеру препарата.

После полимеризации полученный блок обрабатывали на наждачном диске до щадящего обнажения ткани или, в некоторых случаях, разрезали сепаровочным стоматологическим диском на две половины. Затем торцевые поверхности с обнаженными тканями подвергали щадящей шлифовке и полировке до получения ровной гладкой поверхности, после чего обнаженные тканевые структуры становятся доступными для окраски. Наиболее простым и эффективным красителем может служить свежеприготовленный и отфильтрованный 0,1% раствор толуидинового синего на фосфатном буфере. После этого препарат готов для изучения под световым микроскопом в проходящем и отраженном свете. При изучении препарата в проходящем свете исследуемую поверхность следует заключить в полистирол под покрывное стекло (рис. 1, 2).

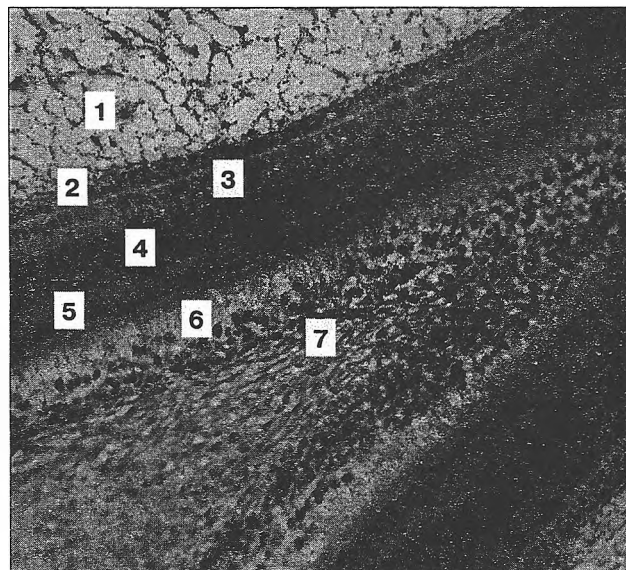
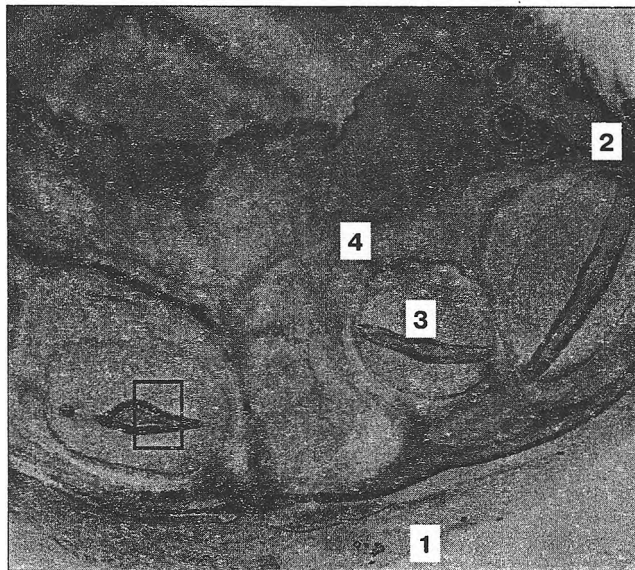


Рис. 1. Тотальный препарат верхнечелюстных альвеолярных отростков плода человека 22 нед развития.

1 — вестибулярная сторона; 2 — срединный шов; 3 — зубные зачатки в поперечном сечении; 4 — небная сторона. Горизонтальный шлиф. Окраска толуидиновым синим. Ув. 8.

Рис. 2. Зачаток зуба на стадии формирования его твердых тканей (соответствует участку, отмеченному квадратом на рис. 1).

1 — пульпа эмалевого органа; 2 — промежуточный слой эпителия; 3 — слой энамелобластов; 4 — первичный слой незрелой эмали; 5 — первичный слой незрелого дентина; 6 — первичный предентин; 7 — первичная пульпа зуба. Окраска толуидиновым синим. Об. 25, ок. 10.

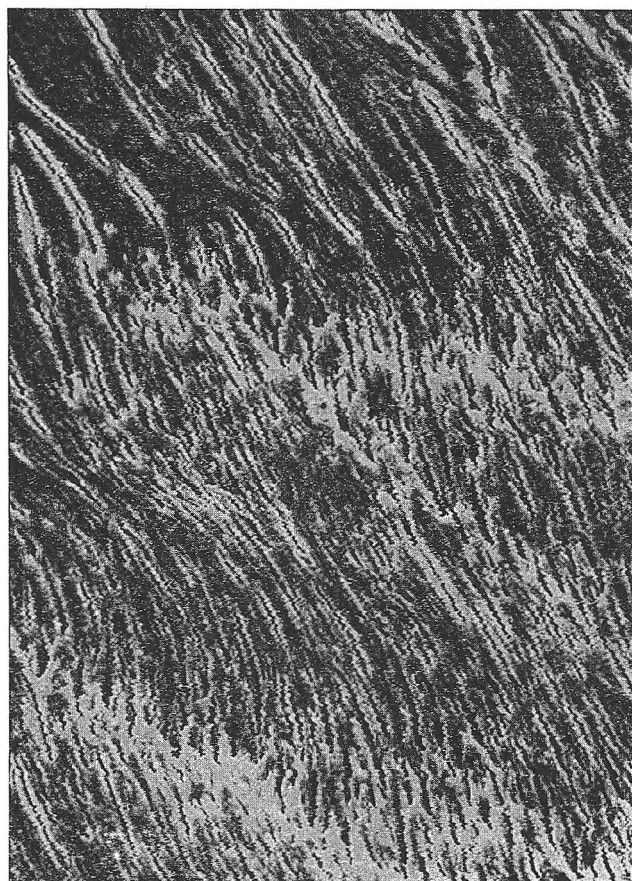


Рис. 3. Структура зрелой зубной эмали человека.

Видны эмалевые призмы в пределах полос Гунтера-Шрегера. Сканирующая электронная микрофотография. Ув. 200.

Данный метод подготовки препаратов для микроскопического изучения биологических объ-

ектов с большой обзорной поверхностью обладает дополнительными очень ценными возможностями, так как позволяет изучать в единстве разнородные по плотности тканевые комплексы, состоящие из мягких и твердых структур (хрящевые и костные) без предварительной их декальцинации.

Благодаря этому разработанный нами и опробованный на практике метод явился очень эффективным при комплексном изучении твердых тканей зуба не только на световом уровне, но также с помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, что становится возможным после проведения следующих дополнительных процедур.

После указанных выше манипуляций, связанных с получением двух половин зуба, заключенного целиком в эпоксидный блок, а также шлифовки их торцевых поверхностей и изучения под световым микроскопом, данные препараты подвергали частичной, контролируемой по времени декальцинации в хелатобразующем агенте, которым служила динатриевая соль этилендиаминтетра-ацетата (Трилон-Б). Здесь следует отметить одну особенность, заключающуюся в том, что при пропитывании эпоксидной смолой пропитываются все ткани, за исключением эмали, в силу ее чрезмерно прочной кристаллической структуры. Иными словами, эмаль оказывается заключенной в объеме, который ограничен, с одной стороны, пропитанным дентином, а с другой

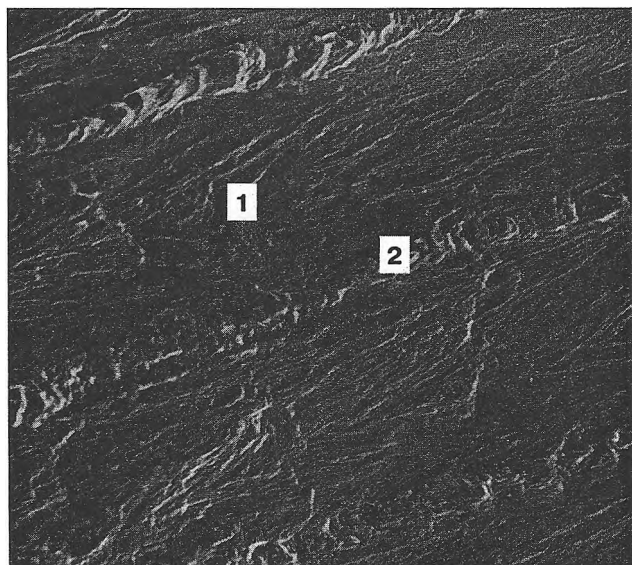


Рис. 4. Ультраструктура эмаливых призм (1) и межпризменных прослоек (2).

Электронная микрофотография. Ув. 5000.

стороны — внешним слоем эпоксидной смолы. Благодаря этому она становится доступной для направленного и контролируемого травления в декальцинирующем растворе.

Под его воздействием происходит послойное вытравливание эмали из указанного объема с образованием постепенно углубляющейся полости, глубину которой легко контролировать временем пребывания препарата в декальцинирующем растворе. При этом дном ее становится обнажившийся слой протравленной эмали, рельеф которого будет отражать ее внутреннюю структуру, доступную для изучения в световом (в отраженном свете) и в сканирующем электронном микроскопе после нанесения на изучаемую поверхность электропроводящего слоя (рис. 3).

Вслед за этим данные препараты служили для снятия с изучаемых поверхностей отпечатков с помощью нитроклетчатки, с которых затем готовили угольные реплики путем напыления в ваку-

уме спектрально чистого углерода. Полученные реплики наносили на предметные сетки и изучали в трансмиссионном электронном микроскопе (рис. 4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Костиленко Ю.П. и Бойко И.В. Метод изготовления препаратов прижизненно сохраненных зубов для многоцелевых исследований. *Клін. анат. опер. хірургія*, 2004, № 2–3, с. 63–65.
2. Костиленко Ю.П. и Бойко И.В. Структура зубной эмали и ее связь с дентином. *Стоматология*, 2005, № 5, с. 10–13.
3. Старченко И.И. и Прилуцкий А.К. Применение метода пластикации в стереоморфологических исследованиях. *Вісник проблем біології і медицини*, 2006, вип. 2, с. 420–422.
4. Rotwell G. «Ralph» glass knives – their effect on paraffin and resin sections. *N.Z. J. Med. Lab. Technol.*, 1981, v. 35, № 2, p. 59–61.

Поступила в редакцию 24.01.07

METHOD OF PRODUCING HISTOLOGICAL PREPARATIONS, EQUIVALENT TO LARGE-AREA SEMITHIN SECTIONS, FOR MULTIPURPOSE MORPHOLOGICAL STUDIES

Yu.P. Kostilenko, I.V. Boyko, I.I. Starchenko and A.K. Prilutskiy

The effective methods for producing large-area semithin sections are presently still unavailable. The method is suggested to alternatively solve this problem without the very procedure of histological sectioning. It includes a modified combination of the methods of tissue fixation and embedding in epoxy resin with the known technique of preparing the ground sections. This method of slide preparation for the microscopical study of large area biological objects gives an additional valuable opportunity, since it allows to study heterogeneous complexes consisting of soft and hard (cartilaginous and bone) tissues without their prior decalcination.

Key words: ground sections, embedding, epoxy resin, light microscopy, electron microscopy.

Department of Human Anatomy, Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, Ukraine.