

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 611.316-018.7-08 : 578.67

Ю. П. Костиленко

МЕТОДЫ МНОГОСЛОЙНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ НА ОСНОВЕ СЕРИЙНЫХ ПОЛУТОНКИХ СРЕЗОВ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. Ю. А. Максимук) Полтавского медицинского стоматологического института и лаборатория электронной микроскопии (зав. — проф. Я. Л. Караганов) 2-го Московского медицинского института им. Н. И. Пирогова

Несмотря на наличие высокоэффективных технических средств, таких, например, как сканирующая электронная микроскопия, и теперь единственно возможным способом решения некоторых задач, касающихся изучения трехмерной пространственной организации паренхиматозных органов, остаются традиционные методы реконструкции на основе серийных гистологических срезов [Туркевич Н. Г., 1967]. Между тем, в процессе реконструкции происходит искажение не только формы объекта, но и топологических взаимоотношений между его составными компонентами. Степень искажения зависит от толщины и качества гистологических срезов: чем срезы тоньше, она меньше. Практически вопрос заключается не в стремлении к использованию предельно тонких срезов, а в определении в каждом конкретном случае оптимальной толщины их, позволяющей свести искажение к тому пределу, который существенным образом не отразится отрицательно на решении поставленных задач.

Опытным путем удалось установить, что для реконструкции многокомпонентного микроскопического объекта необходимо использовать серийные срезы, толщина которых должна быть примерно в 20—30 раз меньше линейного размера индивидуального структурного компонента, входящего в состав данного объекта: например, если диаметр индивидуального ацинуса слюнной железы на поперечном сечении равен 60 мкм, то для трехмерного воссоздания группы ацинусов, составляющих структурную единицу железы, необходимо получить серийные срезы толщиной 2—3 мкм. Это положение должно служить основным критерием для объективной оценки получаемых при реконструкции результатов. Применение срезов, толщина которых превышает данный оптимальный предел, приводит не только к грубому искажению внешних форм объекта, но и не позволяет выявлять границы между тесно примыкающими друг к другу структурными компонентами: чем толще срез, тем большие в нем заключаются объемы тканевых компонентов, которые имеют изменчивые профили сечения по глубине, не выявляющиеся полностью в микроскопе в результате малого фокусного расстояния и прямолинейного хода лучей света. Поэтому наиболее сильное искажение формы реконструируемого объекта возникает в тех местах, где поверхность его резко отклоняется от прямоугольного направления по отношению к плоскости среза (рис. 1). Следует также учитывать, что на результаты реконструкции существенно влияют потери срезов в процессе микротомирования. Они не должны превышать 3% при условии равномерного распределения в серийной выборке.

Таким образом, при реконструкции микроскопических объектов необходимо предъявлять повышенные требования к методам получения гистологических срезов. Этому в настоящее время наиболее отвечают условия и технические средства, применяемые при получении полутонких срезов тканей, заключенных в эпоксидные смолы. Во-

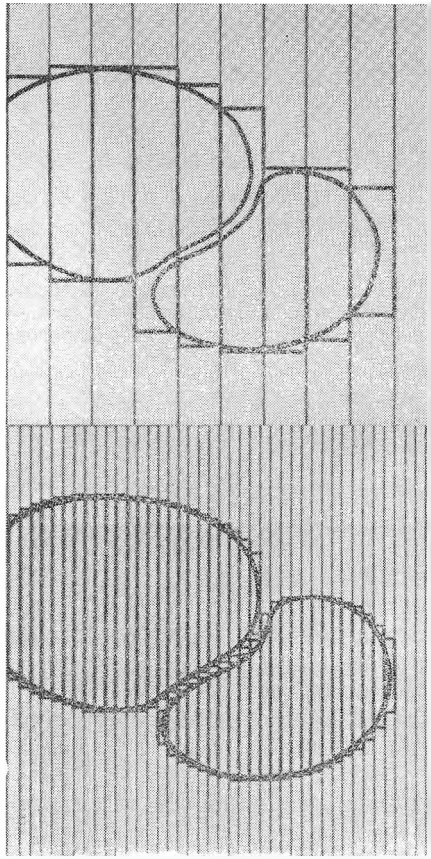


Рис. 1. Принципиальная схема, иллюстрирующая степень искажения формы объекта в зависимости от толщины срезов.

Объяснение в тексте.

Fig. 1. Scheme of principle illustrating the degree to what the object's form is distorted depending on thickness of sections.

See explanations in the text.

первых, подготовка объектов для электронной микроскопии позволяет в значительной мере повысить результативность исследований в целом. Во-вторых, в процессе микромирования представляется возможность сравнительно легко осуществлять пространственную переориентировку ткани в блоках, что позволяет выбрать наиболее удачный ракурс сечения объекта. Обеспечивается большая надежность и высокая производительность при получении серийных срезов, в результате чего сводятся к минимуму потери ткани. В-третьих, на полутонких срезах при соответствующих окрасках более тонко выявляются тканевые структуры, что способствует полной реализации разрешающей способности световой оптики. Напомним, что в условиях обычной гистологической лаборатории, при наличии минимальных технических средств, серийные полутонкие срезы можно получить без особого труда с площади ткани, равной 4×4 мм [Костиленко Ю. П. и Ковалев Е. В., 1978].

Предлагаемые в данном сообщении способы многослойной реконструкции на основе серийных полутонких срезов разработаны применительно к стереологическому анализу эпителиальных комплексов слюнных желез, но с тем же успехом они могут быть использованы для изучения других паренхиматозных органов.

Первый способ реконструктивного отображения трехмерного строения микроскопических объектов можно назвать методом мно-

гослойной фотореконструкции [Костиленко Ю. П., 1980а], который должен рассматриваться как разновидность многослойной графической реконструкции [Туркевич Н. Г., 1967]. Подготовительный этап его заключается в микрофотографировании определенной индивидуальной структурной единицы железы в каждом полутонком срезе серийной выборки, что осуществляется с помощью фотонасадки МФН-1, которая позволяет вращать тубус вместе с фотоаппаратом для правильного размещения объекта относительно фотокадра. Следующий этап состоит в получении позитивных отпечатков на стеклянных фотопластинках с помощью фотоувеличителя при строго заданном увеличении.

Удобно использовать фотопластинки для ядерных исследований (тип МР, формат 9×12), позволяющие работать при красном свете.

После проявления, фиксации, промывки и высушивания профили тканевых компонентов изучаемого объекта следует со стороны эмульсионного слоя фотопластинок кисточкой покрыть 1 % раствором нитроцеллюлозы на амилацетате. Затем фотопластинки погружают в раствор ослабителя (красной кровяной соли — 0,5 г, гипосульфита натрия — 20 г, воды — 200 мл), после чего на них сохраняются только те участки, которые были покрыты коллодиевой пленкой, а остальной фон становится прозрачным. Это избавляет объект от маскирующего фона окружающих структур. В дальнейшем в результате послойного сопоставления фотопластинок в толще блока возникают отчетливые телесные очертания изучаемого объекта. Для получения необходимой информации о пространственной организации субдольковой единицы железы требуется не более 30—40 серийных срезов, чем и определяется общий расход фотопластинок.

Этот метод наиболее прост и вполне эффективен, однако он имеет несколько ограниченное применение. Его можно рекомендовать, если изучаемый объект характеризуется не очень плотной компоновкой входящих в его состав структурных единиц, таковы, например, слюнные железы на ранних этапах развития. При изучении плотно скомпонованных объектов метод оказывается недостаточно эффективным из-за возникающей при послойном совмещении микрофотографий чрезмерной плотности силуэтов в тех местах, где оказывается большая скученность концевых отделов железы.

Чтобы иметь возможность более глубоко и подробно разобраться в характере пространственных взаимоотношений был разработан метод **полихромной многослойной графической реконструкции** [Костиленко Ю. П., 1980], смысл которого заключается в селективном выделении отдельных концевых отделов с помощью соответствующего цвета. На засвеченные стеклянные фотопластинки со стороны эмульсионного слоя (светлый фон его служит хорошим экраном) с помощью фотоувеличителя простым карандашом переносят контуры эпителиальных комплексов железы с серийных негативных фотоснимков. Контуры дифференцированно очерчивают с помощью фломастеров в различные цвета таким образом, что одним цветом выделяют индивидуальный концевой отдел на всех фотопластинках, содержащих его профиль. После этого фотопластинки погружают в обычный фиксаж, в котором они, сохраняя отчетливые контуры объекта, становятся прозрачными (следы фломастера на эмульсионном слое устойчивы в фиксаже и не смываются при дальнейшей промывке в воде). Последующее сопоставление в строгой последовательности всех стекол в единый блок дает наглядное и отчетливое отображение объекта с одновременным выявлением его составных компонентов и взаимоотношений между ними.

Для придания стеклянным блокам аккуратного внешнего вида их можно поместить в обрамляющие прямоугольные футляры с двусторонними оконными вырезами.

Описанные выше модифицированные методы графической реконструкции дают возможность относительно быстро и вполне эффективно провести анализ внутренней пространственной организации слюнных желез, но на их основе трудно получить наглядные иллюстрации с помощью фотографирования. Поэтому наиболее оптимален метод пластической реконструкции — очень трудоемкий, но самый эффективный (рис. 2).

Материалом для изготовления пластических моделей на основе серийных гистологических срезов служат восковые пластинки, которые изготавливают обычно вручную, что сопряжено с большими затратами времени. Целесообразнее использовать пластинки базисного зуботех-

нического воска толщиной 2 мм, обладающего необходимой прочностью и пластичностью [Костиленко Ю. П., 1980в]. Они достаточно прозрачны и можно на просвет переносить на их поверхность профильные контуры объекта. Если размеры модели выполняют в меньшем линейном увеличении по сравнению с исходной толщиной восковых пластинок, последние приходится истончать. Удобнее всего это делать гладким металлическим валиком на подогреваемом снизу стекле. Для множественного воспроизведения стандартной толщины восковых пластинок прокатку хорошо проводить на участке стекла, ограниченном картонной рамкой, толщина которой соответствует задаваемой толщине

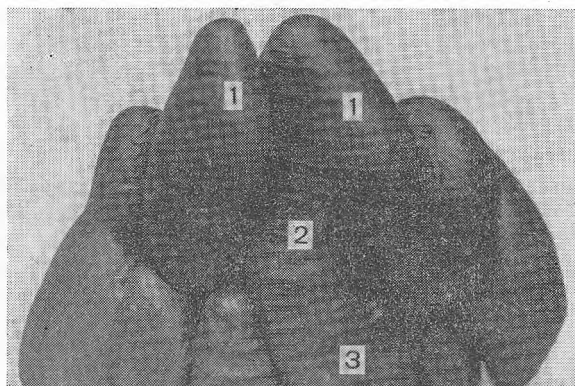


Рис. 2. Сублобулярная единица (аденомер) небной слюнной железы крысы.

1 — ацинусы; 2 — вставочные трубки; 3 — центральная железистая трубка. Продольный размер индивидуального ацинуса 80—90 мкм. Пластическая реконструкция на основе серийных срезов толщиной 3 мкм. Окраска толуидиновым снним. Об. 25, ок. 6,3.

Fig. 2. Sublobular unite (adenomere) of the rat palatal salivary gland.

1 — acinii; 2 — intercalated tubes; 3 — central glandular tube. Longitudinal size of each acinus is 80—90 mcm. Plastic reconstruction basing on serial sections 3 mcm thick. Toluidine blue staining. Ob. 25. oc. 6.3.

восковых пластинок. Чтобы воск не прилипал к стеклу и валику, поверхности их перед прокаткой следует смазывать маслом (лучше всего — силиконовым). После прокатки пластинки переносят поочередно для остывания на ровную поверхность под груз, перекладывая их листами промасленной бумаги.

Методы многослойной реконструкции на основе серийных полутонких срезов приобретают особую ценность в сочетании с методами сканирующей электронной микроскопии, так как последние позволяют дополнять результаты исследования подробными данными о характере рельефа поверхностей изучаемого объекта.

ЛИТЕРАТУРА

Костиленко Ю. П. Способ фотореконструкции микроскопических объектов. Удостоверение на рацпредложение № 788, выданное Полтавским медицинским институтом, 1980а; Способ полихромной графической реконструкции микроскопических объектов. Удостоверение на рацпредложение № 785, выданное Полтавским медицинским институтом, 1980б; Метод пластической реконструкции микроскопических объектов. Удостоверение на рацпредложение № 787, выданное Полтавским медицинским институтом, 1980 в. — Костиленко Ю. П. и Ковалев Е. В. Методы работы с полутонкими эпоксидными срезами в гистологической практике. Арх. анат., 1978, т. 75, вып. 12, с. 68—72. — Туркевич Н. Г. Реконструкция микроскопических объектов по гистологическим срезам. М., «Медицина», 1967.