

на рентгенограммах и электрофореграммах, просветленных препаратах различных органов. Многократное повторение записи одной и той же артериограммы (или двух исследуемых объектов) показало высокую точность записанных кривых.

ЛИТЕРАТУРА

Катинас Г. С. и Степанцов В. И. Способ оценки некоторых данных, характеризующих емкость сосудистого русла. Известия АПН РСФСР, в. 84, с. 175—176.— Козлов В. И. К вопросу о развитии капиллярного стаза. В сб.: Механизмы внесосудистой и интрамуральной регуляции кровотока в патологии и эксперименте. М., 1970, в. 3, с. 58—66.— Мельман Е. П., Ветощук В. И. и Масленникова Л. Д. Опыт использования метода ангиофотометрии для количественного учета вместимости кровеносного русла. Арх. анат., 1967. Т. 53, в. 9, с. 102—105.— Смолитчев Е. П. и Володин В. М. Метод прижизненного изучения капиллярного кровообращения с фотоэлектрической регистрацией диаметра сосудов и определением скорости кровотока. Патол. физиол. и экспериментальная терапия, 1968. Т. 12, в. 3, с. 72—77.— Спирин Б. А. К методике морфофункционального изучения кровообращения в брыжейке тонкой кишки белой крысы. Арх. анат., 1968. Т. 53, в. 8, с. 140—143.— Тихомиров Ю. Л. Определение объема капиллярной сети шишковидной железы человека методом фотометрии. Арх. анат., 1970. Т. 59, в. 11, с. 98—102.— Richardson D. R. Measurement of microvascular diameter by a sensor scan technique. Microvasc. Res., 1973, v. 5, N 1, p. 100—104.— Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. София, 1963.

APPLICATION OF THE GAS LASER ЛГ-55 TO DETERMINE OPTIC DENSITY OF BIOLOGICAL OBJECTS

M. P. Zakruta and V. N. Zlupko

In order to registrate optic density of such subjects as vessels, tissues, roentgenogram and electrophoregram images, a universal device is suggested. It consists of a) a gas laser ЛГ-55 supplying a parallel bundle of light with small angular deflection and wave length of 0,6328 mc; b) mounting for attachment the reversible motor РД-9 with transmission to change the speed of the subject table, photo resistance ФСК-1, focusing lens, triple-edged prism and diaphragm, c) double coordinative recorder (endim 620.01). Repeatedly performed registration of the same arteriooentgenogram (or any other object investigated) has demonstrated a high accuracy of the registered curves.

Department of Normal Anatomy, Medical Institute, Laboratory of Gas Electronic, I. Ja. Franko University, Lvov

ТОМ LXXV АРХИВ АНАТОМИИ, ГИСТОЛОГИИ И ЭМБРИОЛОГИИ № 12
ЛЕНИНГРАД 1978

УДК 611-018-08 : 578.67

Ю. П. Костиленко и Е. В. Ковалев

МЕТОДЫ РАБОТЫ С ПОЛУТОНКИМИ ЭПОКСИДНЫМИ СРЕЗАМИ В ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Кафедра анатомии человека (зав.—проф. Ю. А. Максимук) Полтавского медицинского стоматологического института

Поступила в редакцию 29/VIII 1977 г.

Известно, что эпоксидные блоки, отличающиеся хорошей пластичной плотностью компаунда, позволяют легко получать срезы толщиной 1—2 мкм. В электронной микроскопии такие срезы служат для прицельного микротомирования. Указанная толщина срезов при условии достаточной контрастной окраски позволяет оптимально реализовать разрешающую способность световой оптики. Все же, несмотря на то, что эта особенность хорошо известна и отмечена Г. Гайер (1974),

Д. Пиз (1963) и др., полутонкие срезы не нашли еще достаточно широкого применения при гистологических исследованиях. Вероятно, это положение объясняется отсутствием в обычных гистологических лабораториях тех условий и возможностей, которыми располагают лаборатории электронной микроскопии. Однако даже в условиях обычной гистологической лаборатории можно наладить и с успехом освоить предлагаемый метод.

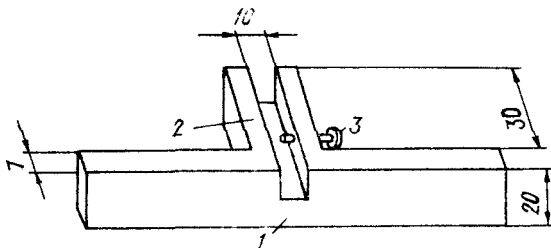
Фиксацию тканей целесообразно осуществлять по прописям, принятым в электронной микроскопии, используя для этого глутаровый альдегид или параформальдегид, с последующей обработкой четырехокисью осмия. Однако некоторые гистологические методы, предполагающие применение полихроматических реакций, требуют фиксации без применения четырехокси осмия, так как последний блокирует вещества, дающие реакцию с кислыми красителями. Подробно останавливаться на методах проводки, пропитывания, заключения и получения блоков нет необходимости в силу того, что они нашли отражение

Рис. 1. Приспособление для фиксации стеклянных ножей.

1 — металлическая планка; 2 — гнездо для установки ножа; 3 — прижимной винт.

Fig. 1. The device for fixing glass knives.

1 — metal plate; 2 — net for fixing the knife; 3 — fixing screw;



в специальных руководствах Г. Гайера (1974), Л. С. Гольдина (1963) и Д. Пиза (1963). Необходимо только отметить, что для гистологических исследований могут быть использованы кусочки тканей несколько больших размеров, чем для электронной микроскопии, однако величина их не должна превышать 6 мм^3 .

Получение срезов с эпоксидных блоков возможно только при помощи стеклянных ножей. В лаборатории электронной микроскопии процесс получения полутонких срезов осуществляется на ультратомах. Однако широкое применение предлагаемого метода с использованием ультратомов, оказывается не рациональным, так как при этом прибор длительное время вынужден работать в режиме повышенных нагрузок, что приводит к преждевременному износу основных узлов дорогостоящей аппаратуры. Для получения полутонких срезов с успехом можно приспособить обычный ротационный микротом типа МПС-2, оснастив его специальной приставкой, предложенной Ю. П. Костиленко, Е. В. Ковалевым и Н. А. Волобуевым (1976), позволяющей фиксировать стеклянные ножи. Рекомендуемое приспособление представляет собой металлическую планку, в центре которой и перпендикулярно к ней, составляя единое целое, находится прямоугольное гнездо, где укрепляется стеклянный нож при помощи бокового прижимного винта (рис. 1). Для работы приспособление фиксируется в держателе ножа микротомом и устанавливается вместе с ножом под необходимым углом. Эпоксидный блок зажимается в блокодержателе, для чего очень удобными оказались патроны, которыми комплектуются ультратомы отечественного производства типа УМПТ-1, так как их хвостовик удачно подходит к внутреннему диаметру цанговой головки микротомом МПС-2. Оценка качества получаемых срезов осуществляется посредством стереоскопического микроскопа (рис. 2). Для закрепления последовательного распределения срезов можно использовать принцип трафаретной раскладки их по 6—8 штук на каждом предметном стекле. С этой целью на пластмассовую пластинку наносится контур предметного

стекла с обозначением места для покровного стекла и местоположения каждого среза, отмеченного порядковым номером по часовой стрелке. На предметных стеклах, согласно данному трафарету, распределяются капли дистиллированной воды из стаканчика при помощи полиэтиленовой трубочки соответствующего диаметра. Наносятся капли путем прикосновения увлажненным концом трубочки к поверхности стекла, что значительно удобнее и проще, чем применение в данном случае шприца.

Окраску полученных срезов можно проводить сразу, предварительно подсушив их над пламенем спиртовки. Однако с целью лучшей фиксации среза к поверхности предметного стекла, полученную серию

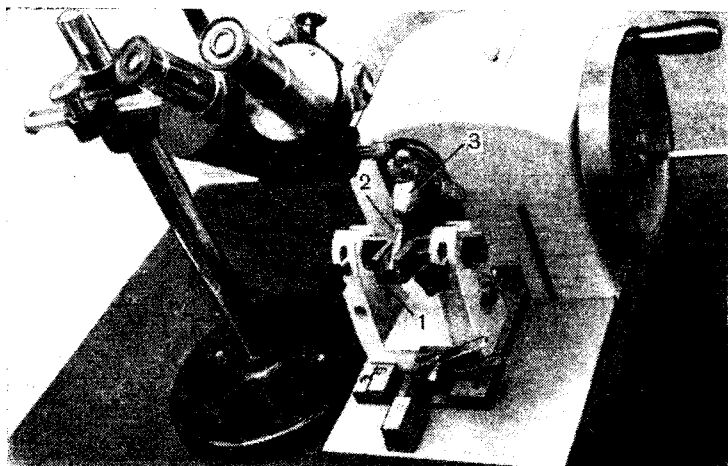


Рис. 2. Микротом МПС-2 с приспособлением для фиксации стеклянных ножей в рабочем виде.

1 — приспособление для фиксации стеклянных ножей; 2 — стеклянный нож; 3 — патрон с эпоксидным блоком.

Fig. 2. Microtome MPC-2 with the device for fixating glass knives, working position

1 — device for fixating glass knives; 2 — glass knife; 3 — chuck with epoxide block

желательно выдержать в термостате при температуре 50—60° в течение 10—12 ч. Наиболее распространенным красителем для полутонких срезов является толуидиновый синий. С тем же успехом можно применять любой другой основной краситель. Если ткань не подвергалась воздействию четырехокси осмия, можно использовать и более сложные полихроматические реакции.

Обычно окрашенные срезы заключали в полистирол под покровное стекло. Однако применение для этой цели эпоксидной смолы имеет явное преимущество, так как препараты при этом сохраняются значительно дольше. В данном случае с успехом можно использовать техническую эпоксидную смолу, разбавленную до нужной консистенции ацетоном.

В морфологии далеко еще не выявлены и не использованы в достаточной мере возможности применения эпоксидных смол, описанные К. И. Черняк (1959). Проведенные нами опыты показали, что эпоксидные смолы могут быть использованы для получения тотальных гистотопографических препаратов. В первую очередь это касается тех случаев, когда исследователь встречает трудности при изучении стереоморфологического изучения трехмерных объектов, в частности выявления пространственных взаимоотношений между отдельными элементами терминального сосудистого русла. Так, при исследовании

пульпы зубов, с целью получения общего представления о сосудистом русле и нервном аппарате, возникла необходимость привести их к плоскостному расположению, что было достигнуто методом равномерной, щадящей компрессии ткани в ходе полимеризации в эпоксидной смоле. Данный процесс включает следующие этапы: 1. Фиксация ткани. 2. После отмывки — импрегнация азотнокислым серебром. 3. Обезживание и пропитывание ткани эпоксидной смолой (проводится по общепринятым методам). 4. Заключительный этап состоит в том, что пропитанный кусочек ткани или тотальный препарат помещается в центре предметного стекла и на него наносится капля свежей эпок-

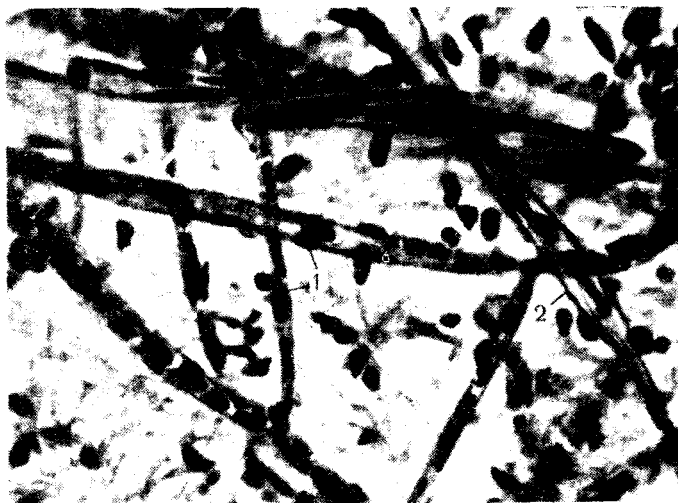


Рис. 3. Полутонкий срез пульпы зуба, уплощенной в процессе полимеризации в эпоксидной смоле. Импрегнация азотнокислым серебром по В. В. Куприянову с дополнительной окраской 1% раствором толуидинового синего.

1 — микрососуды; 2 — нервные волокна. Об. 20, гомаль 3.

Fig. 3. Semi-thin section of the tooth pulp flattened in the process of polymerization in epoxide resin. Silver nitrate impregnation after V. V. Kuprianov with counterstaining in 1% solution of toluidine blue.

1 — microvessels; 2 — nerve fibers. Ob. 20, gomal 3.

сидной смолы. Сверху накладывается второе предметное стекло. Затем два стекла с заключенной между ними тканью зажимаются в небольших тисочках. Компрессию ткани проводят постепенно через равные интервалы в течение 36-часовой полимеризации в термостате при температуре 45°. Исходя из предварительных расчетов толщины натурального объекта, которая не должна превышать 1,5 мм, можно заранее задать толщину получаемого плоскостного препарата, если между стеклами поместить рамку из полиэтиленовой пленки соответствующей толщины. Толщина пленки определяется с помощью микрометра.

После полимеризации одно из предметных стекол без особых усилий снимается, и объект оказывается готовым к исследованию. При условии хорошей импрегнации и оптимальной толщины препарата (не более 100—150 мкм) нервы и сосуды выявляются вполне удовлетворительно (рис. 3), без видимых повреждений, если не считать возникающих в разных местах разволоknений соединительной ткани. Препараты представляют собой пленку эпоксидной смолы с включенной в нее тканью, которую легко можно отделить от поверхности предметного стекла. В дальнейшем из определенных участков препарата можно

получить серию продольных полутонких гистотопографических срезов. Для этого неотделенный от стекла пленочный препарат прицельно рассекается острым лезвием на сегменты. Выбранный участок снимается со стекла и наклеивается на заточенный старый эпоксидный блок. Предварительная заточка эпоксидного блока, проводимая на микротоме, необходима для получения строго направленной, параллельной режущему краю поверхности, на которой ориентируется в капле эпоксидной смолы выбранный сегмент пленочного препарата. Блок вместе с блокодержателем помещается в термостат для полимеризации.

С уплотненного препарата толщиной 100 мкм легко можно получить около 40 полутонких срезов. При изучении под световым микроскопом срезов, окрашенных толуидиновым синим, оказалось, что клеточные элементы в ткани, подвергшейся компрессии, не повреждены. Все структуры имеют четкие контуры, а предварительная импрегнация азотнокислым серебром позволяет выявить мельчайшие нервные терминалы и их интимные взаимоотношения с другими структурами. Звенья микроциркуляторного русла выявляются на большом протяжении, что дает возможность проследить особенности их ветвления.

Рекомендуемая методика проста, однако требует тщательной подготовки и немалого кропотливого труда. Наиболее выгодна она при изучении тонкой организации трехмерных биологических объектов.

ЛИТЕРАТУРА

Га й е р Г. Электронная гистохимия. М., «Мир», 1974.— Г о л ь д и н Л. С. Основы гистологической техники электронной микроскопии. М., 1963.— П и з Д. Гистологическая техника в электронной микроскопии. М., 1963.— У н к л и Б. Электронная микроскопия для начинающих. М., «Мир», 1975.— Ч е р н я к К. И. Эпоксидные компаунды и их применение. Л., 1959.— К о с т и л е н к о Ю. П., К о в а л е в Е. В. и В о л о б у е в Н. А. Приспособление для фиксации стеклянных ножей в микротоме МПС-2 с целью получения сверхтонких срезов с эпоксидных блоков для гистологических исследований. В сб.: Рационализаторские предложения и изобретения в медицине. Киев, «Здоровье», 1976, с. 125—126.

THE METHOD TO WORK WITH SEMI-THIN EPOXIDE EMBEDDED SECTIONS IN HISTOLOGICAL PRACTICE

Yu. P. Kostilenko and E. V. Kovalev

Since ordinary histological laboratories have no special equipment, semi-thin epoxide embedded sections, to perfectly suitable to realize the resolving capacity of the light optic are not widely used in histological practice. However, even in an ordinary histological laboratory it is possible to master the method of their production. A special device is suggested to fix glass knives in the rotational microtome MPC-2. Simultaneously, a number of suggestions and recommendations are given as to certain specificities for obtaining serial semi-thin sections and the method for their staining. Besides, an original method is offered for producing film preparations by means of mild tissue compression in the process of polymerization in epoxide resin. This method allows not only to study some features in the composition of complex three-dimensional objects, but to obtain a series of semi-thin sections from the film preparation to reveal intimal interconnections between certain structural components.

Department of Human Anatomy, Stomatological Institute, Poltava