

Л. С. ГОЛЬДИН и Я. Ю. КОМИССАРЧИК

**МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ  
ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

(Представлено академиком Л. А. Орбели 16 XI 1953)

За последние 15 лет большое число исследований было предпринято для того, чтобы внедрить электронную микроскопию в область гистологии и гистопатологии. Наибольшие трудности представляло получение достаточно тонких срезов или слоев ткани толщиной примерно в 0,1  $\mu$ , которые можно было бы просмотреть в электронном микроскопе. Для этой цели был предложен ряд методов. Достаточно упомянуть метод клиновидных срезов (1, 2, 3), метод скоростной резки (4, 6), метод эксплантатов (5). Были предложены также ножи из материалов более твердых и мелкозернистых, чем сталь, таких, как стекло, кварц и другие

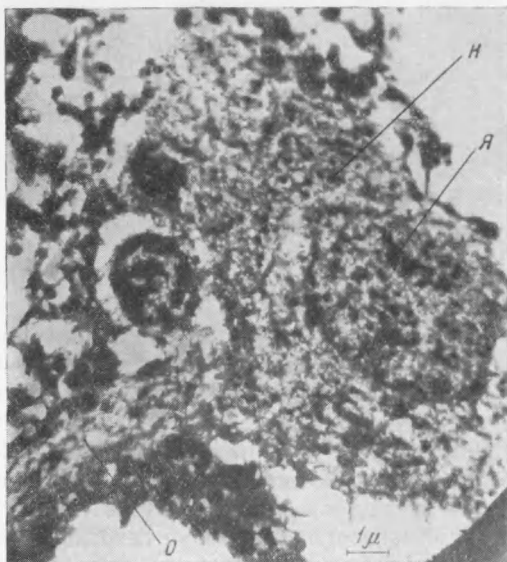


Рис. 1

твердые минералы (7). Наконец, стали применять комбинированные двойные (целлоидин-парафиновые), тройные и более сложные заливки для повышения твердости (прочности) материала ((3) и др.), что давало возможность получать более тонкие срезы, причем до заливки в парафин материал пропитывался 10—12% раствором целлоидина и другими веществами. Все эти методы, насколько можно судить по доступной литера-

туре, не дали пока результатов, которые можно было признать вполне удовлетворительными.

Комбинированную целлоидин-парафиновую заливку в настоящее время следует признать наилучшей для получения срезов, предназначенных для электронной микроскопии. Эту заливку мы применяли начиная с 1947 г., однако мы считали, что количество целлоидина в тканях не должно быть велико, так как большие количества целлоидина делают ткани слишком твердыми и хрупкими, что затрудняет резку. Кроме того, этим затрудняется интерпретация и затушевываются тончайшие структурные элементы ткани. Поэтому мы в основном пользуемся 2% раствором целлоидина. Более густые растворы (4 и 8%) мы применяем для вспомогательных целей.

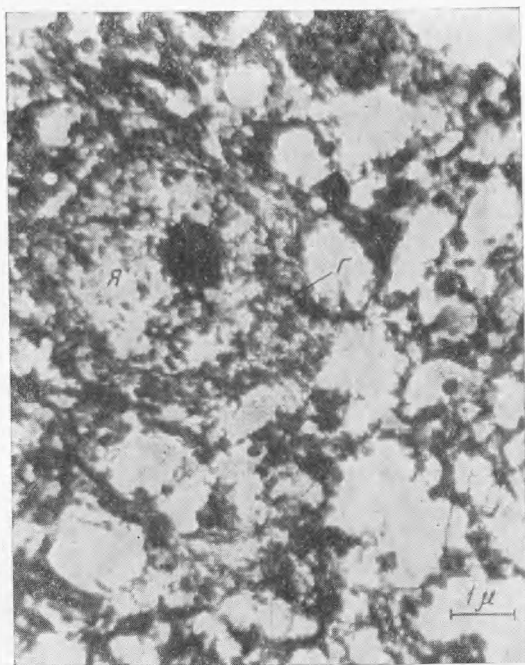


Рис. 2

Разрабатывая вопросы методики приготовления препаратов для целей электронной микроскопии, мы пришли к выводу, что главной причиной неудач при изготовлении достаточно тонких просматриваемых срезов является их сминание при резке, обусловленное размягчением и расплавлением парафина в слое, имеющем некоторую небольшую толщину, что происходит вследствие огромного давления режущего края ножа на препарат. Это не имеет существенного значения при резке препаратов обычной толщины, применяемых в светооптической гистологии, так как на более толстых срезах слой сминания относительно невелик в сравнении с остальным остающимся неповрежденным слоем. Между тем при изготовлении тончайших срезов для электронной микроскопии вся толща среза оказывается вовлеченной в процесс расплавления.

Для того чтобы устранить разрушающее действие лезвия ножа на срез, мы решили применить при резке охлаждение ножа, которое было предложено Шульцц-Браунсом<sup>(9)</sup> для других целей. Мы полагали, что охлажденное лезвие врезаясь в препарат, будет препятствовать расплавлению парафина и тем самым можно будет избежать сминания срезов. Это наше предположение оправдалось.

Охлаждение ножа мы решили производить при помощи охлаждающей насадки, предложенной Цетреусом (10). Модель такой насадки для наших целей разработана Я. Ю. Комиссарчиком. Углекислый снег мы набирали из обычного баллона для углекислоты в полотняный мешочек, из которого пересыпали его в насадку, после чего последнюю надевали на микротомный нож. Через несколько минут нож охлаждается и можно начать резку. Микротом устанавливается на минимальную микроподачу в 1  $\mu$ , затем быстро производится несколько срезов подряд, исходя из того, что при такой установке микроподачи на пределе она, вследствие влияния мертвого хода, будет колебаться от долей микрона до 1—2  $\mu$ . Из сделанных таким образом срезов мы отбираем наиболее тонкие, которые и используем для изучения. Срезы снимали с ножа при помощи тоненькой заостренной деревянной палочки и переносили их в каплю воды, нанесенную на предметное стекло, где они легко расправляются. В каждую

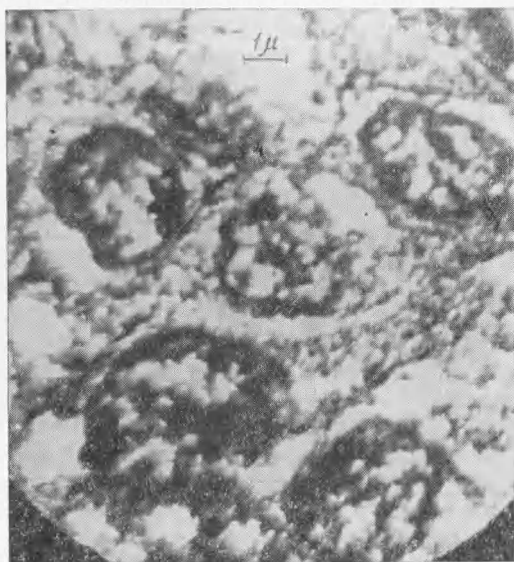


Рис. 3

каплю воды следует помещать несколько срезов. Затем под контролем лупы при помощи той же палочки мы помещаем нужный нам срез над сеточкой для объекта, погруженной под поверхность воды. Придерживая срез палочкой в нужном положении, отсасываем воду фильтровальной бумагой, и срез прилипает к сеточке. После просушки препарата парафин удаляют ксилолом и препарат готов для изучения.

Можно пользоваться любыми фиксирующими средствами как в жидком, так и в газообразном состоянии. Приведенные ниже снимки сделаны с препаратов, фиксированных 1 сутки в 10% формалине и затем проведенных через спирт восходящей крепости обычным способом. Затем кусочки переносились в спирт — эфир *aa*, 2% раствор целлоидина, ксилол, ксилол — парафин, парафин 1, парафин 2; плавкость 52—54°. Все эти операции проводятся по обычным правилам, выработанным гистологической техникой. При проведении материала через целлоидин мы рекомендуем применять три варианта для каждого случая: одни кусочки проводить только через 2% целлоидин и затем заливать в парафин; другие до заливки в парафин провести через 2 и 4% целлоидин и, наконец, третьи кусочки до заливки в парафин провести через 2, 4 и 8% целлоидин. В каждом из растворов целлоидина маленькие кусочки достаточно держать по 2—3 суток. Лучше всего режутся и наилучшие картины дают препараты, прове-

денные через 2% целлоидин, но эти препараты отличаются меньшей устойчивостью против электронных лучей в сравнении с препаратами, содержащими больше целлоидина; поэтому и желательно иметь три варианта. Впрочем, третьим вариантом, в котором использован 8% раствор целлоидина, придется пользоваться редко. Результаты, получаемые при помощи описанного метода резки, иллюстрируют снимки, приведенные на рис. 1—3.

На рис. 1 приведена электронная фотография нервной клетки, на рис. 2 — глиозная клетка (астроцит) из коры мозга собаки. Рис. 3 представляет поле зрения из среза через раковую опухоль желудка человека. Использован микроскоп ЭМЗ. Скорость электронов 40 и 50 кв. Увеличение снимков рис. 1 и 3 — 6000×, снимка рис. 2 — 9000×. На снимках выявлены все основные элементы клеток, известные из светооптической гистологии: ядро *я*, ядрышко, зерна хроматина. В протоплазме нервной клетки *н* видна сложная тончайшая фибриллярная сеть и зерна, которые следует рассматривать как нисслевскую зернистость. Такое же строение имеет отходящий от клетки отросток *о*. В глиозной клетке хорошо выделяется ядро *я* сложного строения с ядрышком и сравнительно узкая кайма протоплазмы *г*. На рис. 3 хорошо видны ядра раковых клеток, среди которых наряду с малоизмененными встречаются ядра в различной степени дезинтеграции. Протоплазма, окружающая эти ядра, обнаруживает сложное строение.

Не касаясь пока более детальной интерпретации приведенных снимков, отметим, что детали строения ткани на них выступают с такими подробностями, которое невозможно было бы обнаружить при помощи светового микроскопа.

Ленинградский психоневрологический институт  
им. В. М. Бехтерева

Поступило  
10 XI 1953

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Н. Верцнер, Л. С. Гольдин, Журн. общ. биол., **6** (1948). <sup>2</sup> M. Z. Ardenne, Zs. wiss. Mikr., **56**, 8 (1939); Elektronen Übermikroskopie, 1940. <sup>3</sup> R. F. Backer, D. C. Pease, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **67**, No. 7, 470 (1948); Anat. Rec., **110**, 505, 531 (1951). <sup>4</sup> H. C. O'Brien, G. M. McKinley, Science, **98**, 455 (1943). <sup>5</sup> A. Claude, K. Porter, E. Pickles, Cancer Research, **7**, No. 7 (1947). <sup>6</sup> E. F. Fullam, A. E. Gessler, Rev. Sci. Inst., **17**, 23 (1946). <sup>7</sup> H. Latta, J. F. Hartmann, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **74**, No. 2, 436 (1950). <sup>8</sup> G. A. Richards, T. F. Anderson, R. T. Hance, *ibid.*, **51**, 148 (1942). <sup>9</sup> O. Schultz-Brauns, Zs. wiss. Mikr., **48**, 2, 161 (1931). <sup>10</sup> O. Zethraeus, *ibid.*, **54**, 408 (1937).