Доклады Академии наук СССР
1955. Том 103, № 2

ГИСТОЛОГИЯ

Н. В. САМОСУДОВА

ОБ ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ СТРУКТУРЫ МЫШЦ ПРИ ПОМОЩИ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ

(Представлено академиком А. И. Опариным 25 II 1955)

До недавнего времени электронный микроскоп в биологии удавалось применять для исследования лишь мелкодисперсных объектов, таких, как белковые макромолекулы, вирусные частицы, микробные клетки и т. д. Для изучения клеточных и тканевых элементов приходилось специально диспергировать объект, тем самым существенно нарушая не только общую архитектонику клеток и тканей, но и повреждая структуры отдельных исследуемых элементов. Обычные гистологические срезы толщиной даже до 1 μ совершенно непрозрачны для электронного пучка. По этой причине, наряду с чрезвычайно успешным использованием электронного микроскопа в вирусологии, микробиологии и отчасти в биохимии, применение его в гистологии было крайне ограниченно и, как казалось, мало перспективно.

Положение радикально изменилось за последние годы, когда была получена возможность изготавливать ультратонкие срезы любых органов и тканей толщиной в сотые доли микрона.

Разработка этого метода явилась трудной задачей. Одни исследователи пытались получить тонкие срезы методом клина при использовании обычной гистологической техники ([1], [2]), другие изменяли среду для заключения объекта, используя сложную комбинированную заливку в коллодий и парафин ([3]), а также в целлоидин и парафин ([4]). Такая сложная комбинированная заливка позволила Пизу и Бекеру ([3]) при некотором усовершенствовании гистологического микротома получить срезы толщиной 0,1 μ. Ньюман, Бориско и Свердлов ([5]), впервые осуществив заливку в твердые пластические массы и применив микротом с измененным механизмом подачи, добились толщины срезов в сотые доли микрона.

Таким образом, усовершенствование техники резания шло, с одной стороны, за счет уплотнения материала для заливки объекта, а с другой, за счет замены стальных ножей стеклянными, более твердыми, чем стальные, и улучшения обычного гистологического микротома. Это улучшение было достигнуто значительным уменьшением хода механизма подачи до десятых и сотых долей микрона ([3], [6]), а также увеличением скорости резания в отдельных системах микротомов ([7], [8]).

В настоящей работе была использована следующая методика. Для фиксации материала применялся 1% буферный раствор OsO_4 при pH 7,2—7,5 ([9]). Фиксировался кусочек размером от 1 до 2 мм^3 (в течение 4—24 час.). Кроме того, была сделана попытка применить комбинированную фиксацию материала (предварительное фиксирование в жидкости Карнуа 15 мин. с последующим пропитыванием в осмии в течение 24 час.). Улучшение качества фиксации очень важно при электронномикроскопическом исследовании биологических объектов. Работы Палада, Портера и Колмана показали, что осмий является лучшим фиксатором для целей электронной микроскопии, поскольку он не вызывает сморщивания и явной коагуляции тканей, сохраняя структуры в виде, близком к прижиз-

ненному состоянию. Применение осмия удобно еще и потому, что он действует не только как фиксатор, но и как электронная «краска». Осмий избирательно увеличивает плотность некоторых структур, адсорбируясь на них, и тем самым усиливает контрастность препарата. Кроме того, благодаря своему «утяжеляющему» действию, он предохраняет ткань от деформации при заливке.

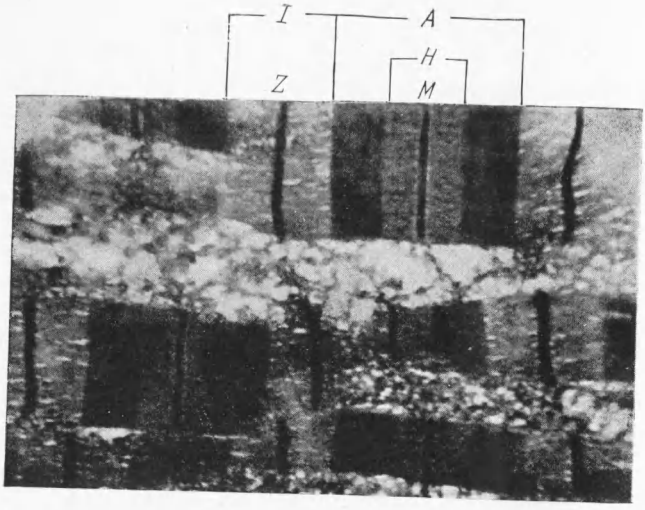
Основным материалом для заливки объекта в нашей работе послужил *н*-бутилметакрилат, который в настоящее время довольно широко употребляется для целей электронной микроскопии; *н*-бутилметакрилат в присутствии определенных катализаторов полимеризуется, переходя из формы мономера, т. е. жидкого состояния, в твердую полимерную форму, оставаясь оптически прозрачным. Следует указать, что *н*-бутилметакрилат обычно стабилизован гидрохиноном, который можно удалить из мономера, промывая его 10% раствором едкой щелочи или карбоната натрия.

В отличие от некоторых методик, описанных в литературе, в нашей работе *н*-бутилметакрилат не применялся в чистом виде, так как оказалось, что он слишком мягок для резки, на что указывают и другие авторы. Из литературных данных известно, что для увеличения твердости к *н*-бутилметакрилату добавляется метилметакрилат. Попытки применить его в смеси с *н*-бутилметакрилатом в нашей работе не дали положительных результатов, так как такое добавление вызывало набухание и плохое обезвоживание ткани. В силу указанных причин мы пользовались другим веществом — стиролом, который в полимеризованном виде является более твердым, чем *н*-бутилметакрилат, и поэтому его добавление увеличивает твердость смеси. Вместе с тем стирол не оказывает на ткань действия, подобного метилметакрилату, т. е. не вызывает набухания ткани, и хорошо ее обезвоживает.

Перед заключением кусочка ткани в смесь стирола и *н*-бутилметакрилата ткань обезвоживается, как обычно, в спиртах. Дальнейшее обезвоживание производится в смеси равных частей абсолютного спирта и мономера (2 или 3 части *н*-бутилметакрилата и 1 часть стирола) в течение 1 часа, затем в двух сменах чистого мономера (смесь той же пропорции) по 1 часу в каждой, после чего кусочек ткани перекладывается в мономер, к которому добавляется катализатор (2 вес.%). В качестве катализатора мы пользовались перекисью бензоила вместо рекомендуемого в литературе ([5]) катализатора — 2,4-дихлорперекиси бензоила. Заливка и полимеризация материала производились в желатиновых капсулах №№ 1 и 2. Процесс полимеризации идет в течение 48 час. при 48—50°. После того как полимеризация заканчивается, желатиновые капсулы растворяются в воде.

При резке кусочка ткани, заключенного в полимеризованную твердую массу, применялись стеклянные ножи, изготовленные по способу, указанному Латта и Гартманом ([11]). На пластинку стекла шириной 2 см и толщиной 6 мм алмазом наносятся штрихи под углом 90 и 45°. Таким образом вся пластинка подразделяется на прямоугольники, которые отламываются по линии штриха, лучше всего при помощи ручных тисков. Каждый такой прямоугольник и служит ножом, имея два режущих края, образованных гранями, сходящимися под углом в 45°. Стеклянный нож вставляется в особый держатель микротома и неподвижно закрепляется. Угол, под которым устанавливается режущий край ножа по отношению к блоку, равен примерно 5°.

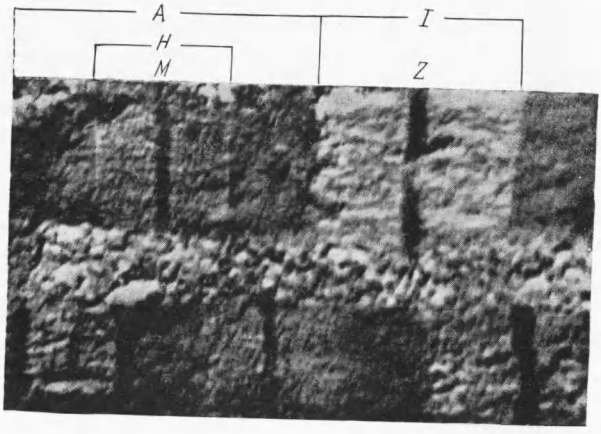
Срезы толщиной от 0,1 до 0,05 μ были получены на микротоме с механизмом подачи от 1 до 0,01 μ. При помощи кисточки срезы переносятся с ножа на каплю воды на предметном стекле. Расправление срезов от складок, образующихся при резке, производится при подогревании до 35—40°. Затем расправленные срезы извлекаются из воды и переносятся на сетку, покрытую тонкой коллодиевой пленкой. Под лупой срез поме-



а



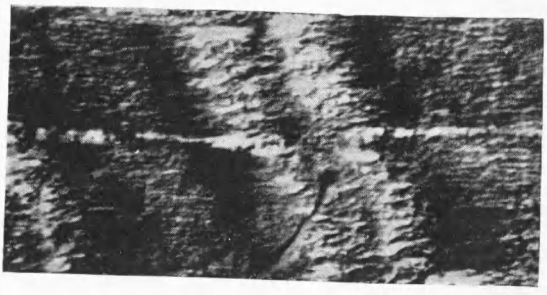
г



б



д



в

Рис. 1

щается в центр сетки и, высыхая, плотно прилипает к пленке. Для удаления пластической массы сеточка погружается на 15—20 мин. в ксилол, после чего извлекается из него на фильтровальную бумагу и высушивается. Срез после растворения ксилолом пластического материала остается на пленке. Препарат готов для просмотра в электронном микроскопе.

Незначительная толщина срезов и высокая разрешающая способность электронного микроскопа по сравнению со световым микроскопом дают возможность увидеть такие структурные детали тканей, которые не видны в обычном микроскопе.

Микрофотографии рис. 1, *а* (× 25800) и *б* (× 28000) представляют собой продольный срез портняжной мышцы лягушки. Ткань зафиксирована в 1% растворе осмия при pH 7,2 в течение 24 час. На фотографиях видны отдельные миофибриллы. Резко очерчена граница между дисками *A* и *I*, в которых очень отчетливо выделяются мембраны *Z* и *M*. Мембрана *Z* кажется более утолщенной. В диске *A* хорошо заметна полоса *H*, менее плотная, чем остальные участки диска *A*, расположенная по обеим сторонам мембраны *M*. Особенно хорошо она видна на напыленном препарате (рис. 1, *б*).

Микрофотография рис. 1, *в*. Та же мышца. Снимок сделан с препарата, напыленного хромом. Напыление выявило продольный компонент миофибрилл или так называемые протофибриллы, которые довольно слабо видны на первых двух снимках. Здесь же протофибриллы выступают очень отчетливо, и особенно в диске *A*. Увеличение 17200.

Микрофотография рис. 1, *г*. Срез с портняжной мышцы лягушка, зафиксированной в 1% осмия при pH 7,3 в течение 24 час. На фотографии видны митохондрии с характерной слоистой структурой. Увеличение 17200.

Микрофотография рис. 1, *д*. Снимок поперечно-полосатой мышцы лягушки (m. sartorius), зафиксированной при несколько других условиях, чем мышца на первом снимке. Мышца предварительно в течение 15 мин. фиксировалась в быстро проникающем фиксаторе Карнуа, а затем дополнительно пропитывалась осмием 24 часа.

При такой комбинированной фиксации ряд структурных элементов выявляется более отчетливо. Кроме тонких структур, уже описанных на первом снимке, здесь можно увидеть некоторые дополнительные детали. Например, хорошо заметны протофибриллы как в диске *I*, так и в диске *A*, хотя они лучше выражены в диске *I*. Кроме того, в самом диске *I* достаточно хорошо заметен участок, располагающийся около мембраны *Z*, более плотный, чем участки, граничащие с полосой *A*. Увеличение 17200.

Приведенные данные показывают, что использованная нами процедура подготовки объекта и заливки в испытанную смесь мономеров позволяет получать ультратонкие срезы, пригодные для гистологических исследований при помощи электронного микроскопа.

Институт биофизики
Академии наук СССР и
Лаборатория электронной микроскопии
Отделения биологических наук
Академии наук СССР

Поступило
18 II 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] M. Ardenne, Zs. wiss. Mikr., 56, 8 (1939). [2] G. Richards, T. F. Anderson, J. Morphol., 71, 135 (1942). [3] D. C. Pease, R. F. Baker, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 67, 470 (1948). [4] Л. С. Гольдин, Я. Ю. Комиссарчик, ДАН, 95, 171 (1954). [5] S. B. Newman, E. Borysko, M. Swerdlow, J. Res. Nat. Bur. Stand., 43, 183 (1949). [6] F. S. Sjöstrand, Experientia, 9, 114 (1953). [7] E. F. Fullam, A. E. Gessler, Rev. Sci. Instr., 17, 23 (1946). [8] H. C. O'Brien, G. M. McKinley, Science, 98, 455 (1943). [9] G. E. Palade, J. Exp. Med., 95, 285 (1952). [10] K. R. Porter, F. Kallmann, Exp. Cell. Res., 4, 127 (1953). [11] H. Latta, I. F. Hartmann, Proc. Soc. Exp. Biol., 74, 436 (1950).