

Контроль за величиною негативного тиску в системі (40—60 мм рт. ст.) здійснюється за допомогою ртутного манометра (IV).

Таблиця для визначення дебіту вільної НСІ складена за формулою: кількість вільної НСІ (у мг) $= A \cdot B \cdot 0,0365$, де A — кількість шлункового соку (в мл); B — показник вільної кислотності у титраційних одиницях; 0,0365 — коефіцієнт для переведення даних, виражених у титраційних одиницях, на кількість вільної НСІ у мг. Підсумовуючи вміст вільної НСІ у чотирьох п'ятнадцятихвилинних порціях шлункового соку, одержують дебіт-годину вільної НСІ.

У здорових людей за даними коливань величини вільної кислотності в межах 20—40 титр. од. і кількості шлункового соку, виділеного за 1 год (50—100 мл), дебіт-година вільної НСІ дорівнює в середньому $82,0 \pm 2,7$ мг (межі норми — 40—120 мг, $p=0,01$).

Література

1. Лебедев Ф. М.— В сб.: Труды совещ. по пробл. физиол. и патол. пищеварения, Тарту, 1957, 134.
2. Курцин И. Т., Зворикина В. Н., Курпатов И. К. и др.— Тер. архив, 1960, 3, 60.
3. Коростовцев С. Б.— Лабор. дело, 1963, 1, 30.
4. Туголуков В. Н.— Соврем. методы функц. диагностики сост. слиз. оболочки желудка и их клинич. знач. Л., 1965.
5. Lambling A., Gosset J., Bernier J.— Arch. Mal. App. Dis., 1953, 42, 885.
6. Gray S., Ramsey C. et al.— Gastroenterol., 1953, 25, 2.

Надійшла до редакції
21.X 1974 р.

УДК 636.4:591.8.08

МЕТОД ОДЕРЖАННЯ ТОНКИХ ЗРІЗІВ ЯЙЦЕКЛІТИН ССАВЦІВ ДЛЯ НАСТУПНОЇ ЦИТОСПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ

Н. А. Мартиненко

Полтавський інститут свинарства

Кількісний аналіз вмісту різних компонентів у яйцеклітині ссавців вимагає застосування високоточного методу цитоспектрофотометрії. В зв'язку з цим виникає необхідність виготовлення тонких (5 мкм) паралельних зрізів яйцеклітин, причому абсолютно неприпустимо попереднє її закладення в середовище, яке б зберігалось після виготовлення зрізів, а також попереднє пофарбування.

Ми пропонуємо модифікацію способу одержання тонких зрізів яйцеклітини, придатних для їх дослідження методом цитоспектрофотометрії як в ультрафіолетовій, так і у видимій частині спектра. Запропонований спосіб цілком забезпечує збереження структури яйця, як це можна бачити з рис. 1.

Фіксація. Під візуальним контролем з допомогою мікроскопа МБС-2 яйцеклітина переноситься мікропіпеткою в невеличку краплину фізіологічного розчину на предметному склі (щоб запобігти можливому розтіканню краплини, його не слід обезжирювати) фіксація здійснюється в парах формальдегіду, який наливають у лунку плексигласової камери з подвійною стінкою (рис. 2). Рівчачок між стінками камери заповнюють водою, пари якої запобігають висиханню краплини з яйцеклітиною. Краї зовнішньої стінки змащують вазеліном або ексикаторним мастилом і на них опускається скло з яйцеклітиною краплиною униз. Фіксація відбувається протягом години.

Промивання. Після закінчення фіксації скло знімають з камери і обертають краплиною догори. Всі операції надалі, аж до перенесення об'єкту в парафін, здійснюються під контролем МБС-2. Яйцеклітина засмоктується в піпетку з мінімальною кількістю рідини і переноситься у водопровідну воду, налиту в годинникове скло діаметром 7 см. Через 2 хв вона проводиться через дві порції свіжої води, в кожній з яких знаходиться протягом 30 хв.

Обезводнювання. Поступове обезводнювання при максимальному збереженні структури забезпечує багатоступінчаста проводка через спирти, концентрація яких поступово підвищується на 10° аж до 96° (починаючи з міцності 10°). Для цього використовуються також прозорі камери з плексигласу (рис. 3), що дозволяє стежити за об'єктом. З однієї камери в іншу яйцеклітина переноситься з мінімальною кількістю

розчину. В кожній камері вона знаходиться лише той час, який необхідний для того, щоб висадити її з піпетки і забрати в нову. Практично перебування яйцеклітин в розчині спирту кожної концентрації становить 10—15 сек.

Просвітлювання і прикріплення до основи. Щоб запобігти втра-



Рис. 1. Гістологічний зріз двобластоїрної зиготи, одержаний за нашим методом.

послі після попереднього відсмоктування папером майже всього розчину з капіляра. Переконавшись, що яйцеклітина знаходиться в потрібній ділянці пластинки, однією мікропіпеткою відсмоктують надлишок рідини, а другою додають маленьку краплину хлороформу. В результаті яйцеклітина міцно фіксується на поверхні целоїдину. Надалі пластинка наколюється номерованою шпилькою і опускається в хлороформ. Ця шпилька залишається в целоїдині аж до заливки блока, забезпечуючи процедуру перенесення об'єкта з одного сердовища в інше. В хлороформі яйцеклітина знаходиться до просвітлювання целоїдину, який спочатку мутнішає, що триває не більше 15 хв.

в капіляри мікропіпетки. Разом із 96° спиртом яйцеклітина засмоктується в піпетку. Під візуальним контролем (1) надлишок спирту відбирається фільтрувальним папером і обережно підсмоктується суміш спирту з гвоздичною олією (2:1). Більш високі концентрації гвоздичної олії небажані через надмірно високий темп просвітлювання. Тим часом готується основа для наступних маніпуляцій з яйцеклітиною. Це невеличка (2×3×3 мм) пластинка целоїдину ущільненого в парах хлороформу, яка зберігається в терпініолі*. На обсушену фільтрувальним папером поверхню пластинки обережно наноситься маленька краплинка чистої гвоздичної олії і в неї висаджується яйцеклітина

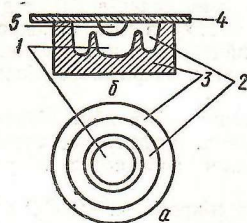


Рис. 2. Камера для фіксації яйцеклітини

а — вигляд зверху; б — в розрізі; 1 — лунка для фіксуючої речовини, 2 — рівначок для води, 3 — тіло камери, 4 — предметне скло, 5 — краплина з яйцеклітиною.

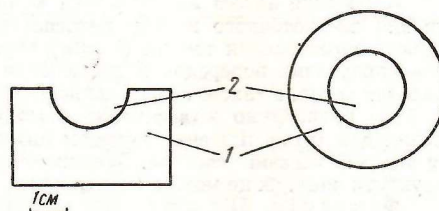


Рис. 3. Камера для проведення і заливки мікрооб'єктів

1 — тіло камери, 2 — лунка для розчинів.

Заливка в парафін. З хлороформу яйцеклітина переноситься на 5 хв в суміш хлороформу з парафіном (1:1), підігріту до 56° С в невеличкому термостаті, сконструйованому нами разом з академіком О. В. Квасницьким (рис. 4). Такий термостат конче необхідний в зв'язку з специфікою мікрооб'єкта. Він являє собою шестигранний

* Метод використання целоїдинових пластинок, просочених терпініолом, розроблено в Інституті морфології тварин АН СРСР проф. Г. А. Шмідтом і канд. мед. наук Ю. Б. Баєвським, яким ми висловлюємо щирю подяку за методичну консультацію і практичну можливість роботи з терпініолом.

(можна і круглий) циліндр з плексигласу, в середину якого герметично вмонтовано матовий ковпак з електричною лампочкою всередині. Навколо ковпака в дні зовнішнього циліндра вмонтовано константову спіраль; в кришці є отвори для склянок з парафіном. Циліндр заповнено підфарбованою в зелений колір (щоб пом'якшити світло від лампи) водою. За допомогою спіралі, що підключається до електричної мережі через ЛАТР-2, а також лампи (100 вт) температура швидко доводиться до потрібних 56° і надалі підтримується лише шляхом регулювання напруження на спіралі. Освітлення вимикається при маніпуляціях з об'єктом.

Із суміші хлороформу з парафіном яйцеклітина переноситься послідовно в три порції чистого парафіну, по 15 хв у кожній, після чого її разом з целоїдиною основою поміщають в плексигласову камеру, змащену гліцериним, нагріту до 60°C і заповнену парафіном. Камера встановлюється під мікроскопом МБС-2, з целоїдину виймається шпилька і він орієнтується яйцеклітиною вниз. Таким чином зрізи яйцеклітини будуть одержуватись на початку різки блока. Товстостінні прозорі камери забезпечують можливість виконати дуже важливий етап роботи по орієнтації яйцеклітини під візуальним контролем і не поспішаючи. Застигання парафіну в камері повинно відбуватися природним шляхом, без додаткового охолодження.

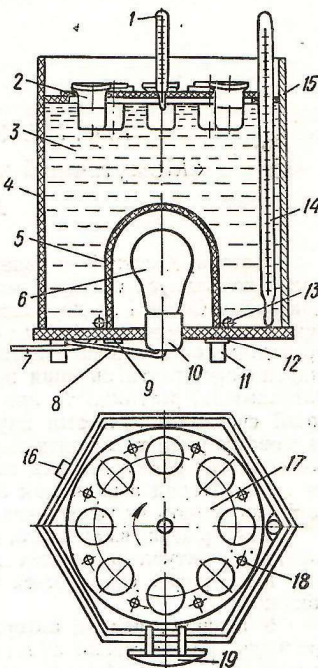


Рис. 4. Термостат для гістологічної проводки мікрооб'єктів з візуальним контролем.

1 і 14 — термометри, 2 — склянки з парафіном, 3 — вода, 4 — корпус термостата, 5 — ковпак для лампи, 6 — лампа, 7 — шнур нагрівальної спіралі, 8 — шнур лампи, 9 і 12 — фіксатори лампи, 10 — патрон, 11 — ніжка термостата, 13 — нагрівальна спіраль, 15 — опорне кільце, 16 — розетка, 17 — обертний круг для склянок, 18 — виступи для обертання круга, 19 — лупа.

Виготовлення зрізів. Блок, що має напівкулясту форму, обрівнюється бритвою у вигляді піраміди; при цьому слід орієнтуватися на целоїдинову пластинку, яка добре просвічує крізь парафін. В процесі різки блока слід стежити за температурою, охолоджуючи його верхівку кубиком червоної міді, яку тримають на мікрохолодильному приладі ТП-2М або ж просто на льоду. Зрізи роблять поодинокі, оскільки серійні зрізи можуть бути неоднакової товщини внаслідок поступового розігріву парафіну частими рухами ножа при мікроскопічних розмірах самого об'єкта. Досить точним контролем товщини зрізів під час різки є однакова площа двох сусідніх зрізів. Перевірку справжньої товщини наклеєних на скло зрізів краще проводити на інтерференційному мікроскопі.

Щоб зрізи добре розправились, їх переносять з ножа в 70° спирт при температурі 38°C (на столику автоматичного підігріву зрізів конструкції Одеського заводу ЕМА). Бюкси $2,5 \times 3 \text{ см}$ із зрізами (по 5—8 штук у кожному) передивляються під МБС-2 (окулярі 2х і 4х). Звичайно яйцеклітина виявляється на зрізах другої-третьої пари бюксів. Як правило, целоїдин при цьому в площину зрізу не потрапляє, оскільки яйцеклітина йде під ніж мікротома першою. З одного бюкса зрізи наклеюються на кварцеві скельця (якщо будуть досліджуватись нуклеїнові кислоти в ультрафіолетових променях), з іншого — на звичайні (для гістохімічних реакцій або морфологічного дослідження). Таким чином кожна зигота може бути досліджена одночасно по двох показниках.

З метою невідкладного контролю за якістю зрізів можна користуватись запропонованим нами простим пристроєм для швидкого висушування зрізів в процесі їх розплавлення. Він складається з чашки Петрі, між двома половинками якої вміщено і зафіксовано невеличку константову спіраль. На неї подається напруга через РНШ чи інший трансформатор, на шкалу якого слід нанести додаткові поділки від 0 до 20 хв. Після попереднього 15—20 хв висушування зрізів на столику автоматичного підігріву, скло вміщується на наш пристрій. Наближаючи чи віддаляючи його від ділянки з спіраллю, можна регулювати інтенсивність його прогрівання під контролем МБС-2. При цьому слід дотримуватись певної обережності, оскільки при швидкому прогріванні можлива деформація структур і відклеювання зрізу. Парафін повинен плавитись протягом кількох хвилин і потім так само поступово застигати.