

ІІТМО

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДАМ В БИОТЕХНОЛОГИИ



Санкт-Петербург
2026

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО
ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДАМ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

**РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО**

по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология»
в качестве учебно-методического пособия по дисциплине
«Пищевая химия», используемого при реализации основных профессиональных
образовательных программ высшего образования бакалавриата.

ИТМО

Санкт-Петербург

2026

УДК 664.8.037

Лабораторный практикум по гистологическим методам в биотехнологии / Яковченко Н. В., Кравцова Е. В., Гольцман Л. М, [и др.] — Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2026. — 75 с.

Рецензент(ы):

Ашихмина Мария Сергеевна, кандидат технических наук, старший преподаватель (квалификационная категория "старший преподаватель"), научный сотрудник научно-образовательного центра инфохимии, Университет ИТМО.

ИТМО

Лабораторный практикум предназначен для студентов, обучающихся по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология», в качестве учебного пособия по дисциплине «Пищевая химия» и ориентирован на формирование практических компетенций в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов методами гистологического и микроскопического анализа. Практикум используется в образовательном процессе Университета ИТМО при изучении дисциплин, связанных с контролем качества пищевого сырья и продукции животного происхождения. В лабораторном практикуме представлены теоретические основы гистологической обработки тканей, включая методы фиксации, обезвоживания, очистки, инфльтрации, заливки и изготовления срезов, а также современные подходы к их окрашиванию и микроскопическому исследованию. Подробно рассмотрены особенности микроструктуры мышечной, соединительной и жировой тканей, критерии оценки свежести и степени созревания мяса, признаки микробиологической контаминации и фальсификации продукции. Приведены методики подготовки препаратов, правила работы с лабораторным оборудованием и требования техники безопасности.

Практикум содержит описания лабораторных работ, рекомендации по оформлению отчётов, интерпретации результатов и выполнению полуколичественной оценки состава исследуемых образцов. Представленные материалы направлены на развитие навыков самостоятельной исследовательской работы, анализа экспериментальных данных и принятия обоснованных решений в области контроля качества пищевых производств.

Практикум предназначен для использования в учебном процессе Университета ИТМО, а также может быть полезен преподавателям, аспирантам и специалистам лабораторий пищевой промышленности и биотехнологического профиля.

© Университет ИТМО, 2026

© Яковченко Н.В., Кравцова Е.В., Гольцман Л.М., Ширяев В. А.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ	6
1.1 Фиксация.....	8
1.2 Классификация фиксирующих агентов и механизмы фиксации	11
1.3 Методы фиксации	19
1.4 Обработка тканей и заливка.....	24
1.5 Изготовление срезов	29
1.6 Основные типы современных микротомов	29
2. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ	56
РАЗДЕЛ I ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОТОМНЫХ СРЕЗОВ	59
Лабораторная работа №1.....	59
РАЗДЕЛ II. ОКРАШИВАНИЕ И МИКРОСКОПИРОВАНИЕ СРЕЗОВ	64
Лабораторная работа №2.....	64

ВВЕДЕНИЕ

Гистологические методы исследования применяются для изучения микроскопического строения тканей и органов и являются обязательной частью морфологических исследований. Их использование позволяет получать объективные данные о структуре тканей, состоянии клеточных элементов и характере межклеточных взаимодействий. В учебной и лабораторной практике данные методы используются для формирования навыков работы с биологическим материалом и освоения основных приемов микроскопического анализа.

В зависимости от состояния исследуемого объекта и целей исследования применяются различные гистологические подходы. Витальные методы основаны на изучении живых клеток и тканей без предварительной обработки и используются преимущественно для наблюдения общих структурных особенностей. Интравитальные методы позволяют исследовать ткани непосредственно в организме, что дает возможность оценивать их функциональное состояние в естественных условиях. Суправитальные методы применяются при работе с тканями и клетками, извлеченными из организма, но сохраняемыми в жизнеспособном состоянии вне его.

Наиболее распространёнными являются поствитальные гистологические методы, при которых ткани подвергаются фиксации и дальнейшей обработке. Несмотря на прекращение жизнедеятельности клеток, основные морфологические характеристики тканей сохраняются, что делает возможным их детальное изучение. Однако при выполнении гистологических процедур неизбежно возникают изменения структуры ткани, связанные с техническими этапами подготовки материала. Эти изменения, называемые артефактами, необходимо учитывать при анализе микропрепаратов.

Существенным этапом поствитальной гистологической обработки является получение тонких срезов ткани, пригодных для микроскопического исследования. Качество микропрепаратов во многом определяется равномерностью и толщиной срезов, а также сохранностью структурных элементов. Для выполнения данной задачи используются специализированные режущие приборы — микротомы и криотомы, конструкция которых обеспечивает точную и контролируемую резку тканей.

Микротомы применяются преимущественно для работы с материалом, залитым в парафин, и используются в рутинной гистологической практике. Криотомы предназначены для получения срезов замороженных тканей и позволяют сократить время подготовки образцов. Для исследований, требующих получения ультратонких срезов, применяются ультрамикротомы, обеспечивающие толщину срезов, необходимую для электронно-микроскопического анализа.

Таким образом, правильный выбор метода подготовки тканей и соответствующего оборудования является необходимым условием получения

качественных гистологических препаратов и достоверных результатов микроскопического исследования.

Настоящее учебное пособие предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки 19.03.01 «Биотехнология», и разработано для изучения дисциплины «Пищевая химия». Пособие ориентировано на формирование у обучающихся теоретических знаний и практических навыков в области применения гистологических и микроскопических методов исследования, используемых при анализе качества и безопасности пищевого сырья и готовой продукции.

В пособии последовательно представлены теоретические основы гистологической обработки тканей, современные методы фиксации, обезвоживания, заливки, изготовления срезов, их окрашивания и последующего микроскопического исследования, а также приведены методические рекомендации по выполнению лабораторных работ, интерпретации результатов и соблюдению требований техники безопасности. Особое внимание уделено вопросам оценки микроструктурных характеристик пищевых продуктов, выявлению признаков свежести, степени технологической обработки, микробиологической контаминации и возможной фальсификации продукции, что имеет важное значение в рамках дисциплины «Пищевая химия».

В результате освоения дисциплины обучающиеся должны знать:

- 1) теоретические основы гистологических методов исследования;
- 2) основные этапы подготовки биологических образцов к микроскопическому анализу;
- 3) принципы фиксации, обезвоживания, заливки и окрашивания тканей;
- 4) особенности микроструктуры тканей пищевого сырья и продукции;
- 5) методы оценки качества и безопасности пищевых продуктов в рамках дисциплины «Пищевая химия»;

уметь:

- 1) проводить подготовку образцов к гистологическому исследованию;
- 2) изготавливать микропрепараты и выполнять их окрашивание;
- 3) работать с микроскопическим оборудованием;
- 4) анализировать микроструктурные особенности исследуемых образцов;
- 5) интерпретировать результаты лабораторных исследований при оценке качества пищевой продукции;

владеть:

- 1) навыками лабораторной работы с биологическими образцами;
- 2) методами микроскопического анализа тканей;
- 3) навыками обработки и интерпретации экспериментальных данных;
- 4) приемами оценки качества и безопасности пищевых продуктов на основе морфологических признаков.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

Гистологическая обработка включает в себя множество методов и методик, направленных на изучение молекулярных и морфологических особенностей тканей в зависимости от того, что мы хотим изучить. Однако существуют общие протоколы, используемые во многих гистологических лабораториях для обработки тканей, представленные на рисунке 1. Методы и методики можно адаптировать и комбинировать для достижения результатов, которые лучше соответствуют нашим целям.



Рисунок 1 – Гистологическая обработка начинается со сбора образцов тканей для изучения

В гистологии растений кусочки тканей извлекаются непосредственно из тела растения. В гистологии животных есть два варианта: получить образец органа или ткани с помощью биопсии у живого животного или при вскрытии мертвого животного, а затем начать гистологическую обработку, или начать гистологическую обработку целого органа или тела [4].

При работе со свежей тканью необходимо обращаться с ней осторожно, чтобы избежать механического повреждения. Не допускайте высыхания образца и при необходимости смочите его физиологическим раствором.

Все образцы сначала фиксируются растворами, известными как фиксаторы. Они сохраняют особенности тканевых молекул и структур, пока образец проходит через последовательные гистологические методы. Фиксация подобна фотографированию образца в живом организме, его организация и особенности не изменяются во время обработки, и они сохраняются, когда образец подвергается микроскопированию. Другой способ фиксации тканей — быстрое замораживание. Этот тип фиксации используется, когда химические фиксаторы или другие этапы обработки влияют на интересующие нас тканевые свойства. Например, некоторые молекулы могут модифицироваться фиксаторами или химическими растворами на более поздних этапах. После того, как ткань зафиксирована, ее дополнительно обрабатывают для наблюдения под микроскопом.

Для обработки тканей также применяют следующие дополнительные методы: обезвоживание, очистка, замораживание после фиксации, заливка.

Так как любой залитый парафином образец, разрезанный на микротоме, должен быть достаточно мягким, чтобы его можно было разрезать лезвием микротомы, в некоторых случаях может понадобиться декальцинация. Некоторые ткани состоят из материала, содержащего кальций, представленного кристаллами гидроксиапатита, который слишком тверд для того, чтобы его можно было разрезать одноразовым лезвием микротомы. Декальцинация - техника удаления минералов из кости или другой кальцинированной ткани. При проведении декальцинации следует помнить: размер кости определяет декальцинирующий агент, который необходимо использовать (сильная или слабая кислота); чрезмерная продолжительность декальцинации приведет к потере морфологии; недостаточное время декальцинации затруднит, если не сделает невозможным, получение среза ткани. Образцы для анализов иммуногистохимического анализа (ИНС), гибридизации *in situ* (ISH, FISH) и ПЦР (PCR) могут потребовать специального декальцинирующего агента (14% раствор соли этилендиаминтетрауксусной кислоты); некоторые ткани, не подвергавшиеся декальцинации, могут нуждаться в ней, если в них, вопреки ожиданиям, присутствуют соли кальция (например, в случае камней в почках или кальцинированных кровеносных сосудов). Большую часть кислотного декальцинатора следует смыть перед обработкой, чтобы избежать загрязнения реагентов для обработки.

Заливка — это инфильтрация образца жидкими веществами, которые затем затвердевают под воздействием температуры (парафин) или полимеризации (смола). Чем тоньше мы хотим получить срез, тем тверже должна быть заливочная среда. Затвердевание, а следовательно, и получение тонких срезов, также могут быть достигнуты путем замораживания образца. Более толстые срезы (например, 40 мкм) могут быть получены без заливки с помощью специальных устройств для

секционирования, таких как вибратор и замораживающий микротом. Обычно заливочные вещества не являются гидрофильными. Таким образом, сначала вода должна быть заменена липофильным растворителем, который, в свою очередь, заменяется заливочным материалом. В просвечивающей электронной микроскопии образцы обычно заливаются эпоксидной смолой и разрезаются с помощью ультрамикротомов на ультратонкие срезы, которые окрашиваются с использованием тяжелых металлов, таких как свинец, уран или вольфрам.

После заливки или замораживания образцы разрезаются на секции. Существует ряд устройств для резки, которые позволяют получать секции различной толщины: ультратонкие секции (десятки нанометров), полутонкие секции (от 0,5 до 2 микрометров), тонкие секции (от 3 до 10 микрометров) и толстые (толще 10 микрометров). Секции подвергаются дальнейшей обработке, которая обычно включает окрашивание гидрофильными красителями. Однако существует несколько типов методов микроскопии, таких как фазово-контрастная микроскопия, которые позволяют визуализировать тканевые особенности без обработки секции. Если используются гидрофильные красители, заливочную среду необходимо заменить водой, в противном случае красители не проникают в ткань. Полутонкие секции (для световой микроскопии) и ультратонкие секции (для электронной микроскопии), полученные из образцов, залитых смолой, можно окрашивать красителями или контрастировать тяжелыми металлами не удаляя смолу. На срезах, полученных из замороженных образцов, красители наносятся после размораживания ткани.

Обработанные ткани изучаются с помощью микроскопов. Доступны различные типы микроскопов, но наиболее распространены световые и электронные микроскопы. Световые микроскопы работают на видимом свете и стеклянных линзах. Доступны несколько установок световой микроскопии: чистое поле, фазовый контраст, поляризация и дифференциальный интерференционный контраст. Электронные микроскопы дают гораздо большее увеличение, что позволяет изучать так называемую ультраструктуру клеток и тканей.

1.1 Фиксация

Все ткани, полученные от живых или мертвых организмов, подвергаются процессу деградации. Деградация может быть внутренней, известной как автолиз, которая обусловлена активностью литических тканевых ферментов и приводит к перевариванию тканей внутриклеточными ферментами, высвобождаемыми при разрыве мембран органелл. В то же время внешний процесс деградации, называемый гниением, запускается микроорганизмами, в основном бактериями. Более того, методология гистологической обработки для изучения отдельных особенностей ткани может деградировать или разрушать тканевые структуры [4,14,15].

Основная цель фиксации тканей — сохранить клетки и компоненты тканей в «состоянии, близком к естественному», и сделать это таким образом, чтобы можно было приготовить тонкие окрашенные срезы [4].

Таким образом, фиксация сохраняет морфологические и молекулярные особенности ткани максимально похожими на те, которые были в живом организме. Другими словами, фиксация уменьшает как молекулярные, так и структурные изменения в тканях, которые могут произойти во время лабораторной обработки. Это как сделать снимок живой ткани, сохранить его неизменным во время гистологической обработки и наблюдать эту картину с помощью микроскопа. Правильная интерпретация особенностей ткани зависит от правильной фиксации. Например, пациенту может быть поставлен неправильный диагноз вследствие плохой фиксации, приведшей к изменениям тканевых и клеточных структур в биоптате, биологическом материале, полученном путем биопсии [1,4,6].

Фиксация убивает клетки и должна подавлять автолиз клеток, защищать ткани от микроорганизмов, понижать растворимость молекул, которые могут быть потеряны, а также предотвращать ретракцию или набухание тканей, которые могут изменить морфологию ткани [4]. Кроме того, фиксация должна подготовить ткань к реализации определенных гистологических методов, если это необходимо, и сохранить неизменными свойства ткани во время лабораторной обработки, такой как заливка и окрашивание. Существуют физические фиксаторы, такие как тепло и замораживание, и химические фиксаторы. Химические фиксаторы взаимодействуют с тканевыми молекулами. Каждый тип имеет свои преимущества и недостатки. Химические фиксаторы наиболее часто используются в гистологических лабораториях для исследований с помощью световой и электронной микроскопии.

Не существует универсального фиксатора, как и единственного метода фиксации. Специальные методы, такие как иммуногистохимия, могут потребовать более короткого времени фиксации, чем классическая гистохимия, поскольку слишком длительная фиксация может разрушить антигенные свойства ткани и привести к ложноотрицательным результатам. Кроме того, несколько фиксаторов могут быть последовательно использованы в одном и том же процессе фиксации. Выбор фиксатора и метода фиксации зависит от особенностей ткани, которые необходимо сохранить [4,5,7]. Например, если необходимо сохранить ферментативную активность, фиксация не должна разрушать каталитический центр фермента, но другие особенности ткани, такие как морфология клеток, могут быть изменены. Большинство фиксаторов не сохраняют липиды, но эти молекулы остаются в ткани, если избегать растворов растворителей. Однако изучение ультраструктуры ткани включает органические растворители во время заливки в смолы, поэтому необходим фиксатор, который сохраняет липиды в ткани, если необходимо наблюдать, например, клеточные мембраны. Большинство фиксаторов не сохраняют углеводы, но эти молекулы остаются в ткани, поскольку

они обычно прикреплены к белкам [4]. Иногда некоторые фиксаторы могут изменять молекулярные компоненты ткани таким образом, чтобы они легче окрашивались красителями.

В любом случае есть некоторые особенности, которые следует учитывать перед выбором фиксатора.

Скорость проникновения фиксатора в ткань является одним из ключевых факторов фиксации. Для получения качественного результата процесс должен происходить достаточно быстро, однако скорость ограничивается тем, насколько быстро фиксирующее вещество может диффундировать через тканевые структуры. Именно этот показатель определяет допустимый размер образца: если диффузия происходит медленно, необходимо использовать меньшие фрагменты ткани. Кроме того, интенсивность диффузии напрямую влияет на длительность фиксации — чем быстрее фиксатор распространяется в ткани, тем меньше времени требуется для завершения процесса. Скорость самой фиксации не всегда совпадает со скоростью проникновения фиксатора. Она определяется химическими свойствами используемого вещества, поскольку фиксация тканей представляет собой химическую реакцию между компонентами фиксатора и клеточными структурами. Поэтому тип фиксатора также влияет на общее время обработки образца.

В процессе фиксации ткани обычно становятся более плотными и твердыми. Степень такого затвердевания зависит как от вида применяемого фиксатора, так и от продолжительности его воздействия на ткань.

Большое значение имеют осмотические условия и кислотность среды. Во время фиксации необходимо избегать изменений объема клеток и тканей, которые могут возникать из-за различий в осмолярности или уровне pH между тканью и фиксирующим раствором. Для предотвращения подобных эффектов осмолярность раствора стараются приблизить к физиологической. Например, при работе с животными тканями часто добавляют 0,9 % раствор хлорида натрия. Кроме того, рекомендуется использовать буферные растворы с уровнем pH, близким к pH самой ткани.

Температурный режим также оказывает влияние на процесс фиксации. Повышение температуры по сравнению с температурой тела животного или комнатной температурой для растительных тканей может ускорять фиксацию. Однако слишком высокая температура способна вызвать структурные изменения тканей.

Некоторые клеточные структуры плохо окрашиваются из-за слабого сродства к красителям. Для усиления способности тканей связывать красители применяют предварительные обработки. Ряд фиксаторов выполняет двойную функцию: они не только сохраняют ткань, но и изменяют её химические свойства таким образом, что повышается восприимчивость к определённым красителям [4].

Артефакт — это любое изменение, внесенное в ткань во время гистологического процесса. Фиксация является этапом гистологического процесса

с большим влиянием на конечное качество тканей. В отличие от окрашивания или плохой заливки парафином, фиксация необратима. В зависимости от фиксатора и метода фиксации возможны изменения тканей, такие как набухание, ретракция, кристаллизация или затвердевание веществ, а также перемещение и извлечение молекул. Эти изменения могут быть вызваны фиксатором или его неправильным использованием.

Важно понимать, что то, что в данном случае будем наблюдать, является артефактом фиксации, поэтому его нельзя описывать как тканевую особенность. Фиксаторы могут вызывать ретракцию ткани, которую можно проверить, проверив размеры образца ткани до и после фиксации. Однако ретракции или набухание могут не влиять на все ткани образца одинаково. Например, фиксация в 10% забуференном формалине изначально вызывает небольшое набухание образцов тканей. Однако в дальнейшем во время обработки образец может дать усадку на 20 - 30% от своего объема.

Вопросы для контроля освоения теоретических основ лабораторного практикума:

1. Какова основная цель фиксации биологических тканей в гистологическом исследовании?
2. Какие процессы деградации тканей предотвращает фиксация?
3. Чем отличаются физические и химические способы фиксации?
4. Какие факторы влияют на качество фиксации тканей?
5. Почему нарушение условий фиксации может привести к появлению артефактов?
6. Как влияние рН и осмолярности фиксирующего раствора отражается на состоянии ткани?
7. Почему фиксация считается необратимым этапом гистологической обработки?

1.2 Классификация фиксирующих агентов и механизмы фиксации

Традиционно фиксирующие агенты назывались «коагулянтами» или «некоагулянтами» в зависимости от их воздействия на растворимые белки в растворе. Считалось, что коагулянтные фиксаторы приводят к образованию проницаемой сети белковых нитей, тогда как некоагулянтные фиксаторы, которые являются аддитивными по своей природе, образуют обширные поперечные связи, что приводит к образованию менее проницаемого геля. Эти термины все еще встречаются в современной литературе, но недавно был принят более систематический подход к классификации.

Клетки и внеклеточные компоненты содержат пептиды и белки, липиды и фосфолипиды (мембраны), углеводы и углеводные комплексы, различные типы РНК и ДНК и так далее. То, как эти элементы будут реагировать во время фиксации, будет зависеть от типа фиксации, используемого фиксирующего агента и условий фиксации. Некоторые элементы ткани вступают в химическую реакцию

с фиксатором, стабилизируются путем образования поперечных связей и, таким образом, сохраняются, другие могут не подвергаться воздействию фиксатора, но быть захваченными внутри клетки или ткани другими фиксированными элементами.

Существует два основных механизма, которые важны для фиксации белков и белковых комплексов - денатурация и образование поперечных связей.

Денатурация. Чаще всего этот эффект вызывается дегидратантами, такими как спирты, ацетон, Буэн и Карнуа. Эти реагенты удаляют и заменяют свободную воду в клетках и тканях и вызывают изменение третичной структуры белков, рисунок 2, дестабилизируя гидрофобные связи. Гидрофобные области, часто встречающиеся внутри молекул белка, становятся свободными, чтобы занять большую площадь. В гидрофильных областях белка молекулы воды слабо связаны водородными связями, и удаление воды также дестабилизирует эти связи. Изменения, происходящие в конформации молекул белка, вызывают изменение растворимости белка, делая водорастворимые белки нерастворимыми, изменение, в большей степени необратимо, если белок вернуть в водную среду.

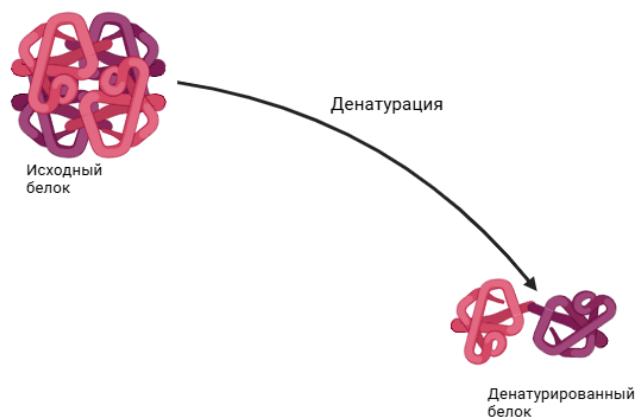


Рисунок 2 – Денатурация белка

Образование поперечных связей (шивка): некоагулянтные фиксирующие агенты химически реагируют с белками и другими компонентами клеток и тканей, связываясь с ними и образуя межмолекулярные и внутримолекулярные поперечные связи, рисунок 3. Поскольку эти вещества являются реактивными соединениями, они связываются с различными химическими группами в тканях, часто влияя на их заряд в месте прикрепления. Это может повлиять на последующие характеристики окрашивания конкретного белка, а также изменить его молекулярную конформацию и, следовательно, его растворимость. Например, ткань, фиксированная формальдегидом, плохо окрашивается эозином, поскольку формальдегид активно реагирует с аминоклассами, образуя метиленовые мостики, и, таким образом, эти группы больше не доступны для связывания отрицательно заряженных молекул красителя, таких как молекулы эозина.

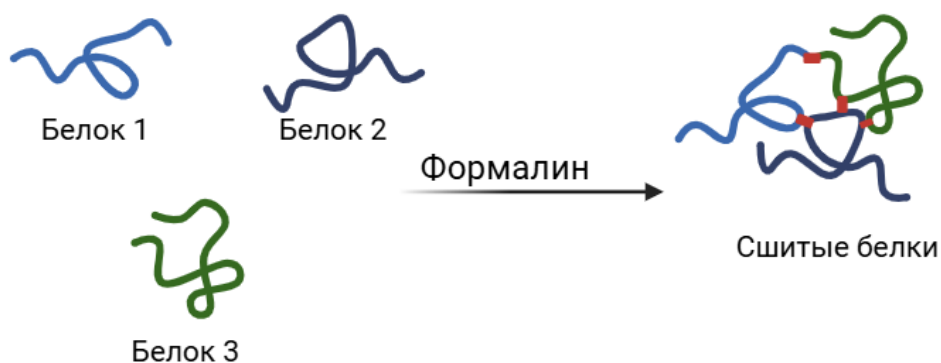


Рисунок 3 – Образование поперечных связей (сшивка)

Степень образования поперечных связей значительно различается. Например, глутаровый альдегид более эффективен в образовании поперечных связей, чем формальдегид. Это объясняет, почему он так эффективно сохраняет ультраструктуру клеток и является фиксатором для электронной микроскопии. Это также объясняет, почему ткани, фиксированные глутаровым альдегидом, плохо окрашиваются обычными методами окрашивания красителями.

Методы извлечения антигенов в иммуногистохимии показали, что некоторые реакции фиксации обратимы, особенно реакции формальдегида, но существуют значительные различия в качестве сохранения антигенов с различными агентами. Сохранение антигенности стало очень важным фактором при выборе фиксатора.

Фиксаторы также классифицируются как аддитивные и неаддитивные. Аддитивные фиксаторы объединяются с молекулами ткани, так что фиксатор или некоторые его компоненты становятся частью ткани, и он присутствует на следующих этапах гистологической обработки [4]. В основном это сшивающие фиксаторы и некоторые коагулянтные фиксаторы. Неаддитивные фиксаторы после выполнения фиксации удаляются из ткани на последующих этапах обработки ткани. Спирт и уксусная кислота являются примерами неаддитивных фиксаторов. Важно помнить, что большинство фиксирующих растворов токсичны при вдыхании или контакте с кожей, а некоторые из них канцерогенны. Важно соблюдать правила безопасности при работе с этими веществами.

Фиксирующие растворы могут содержать один фиксирующий агент, растворенный в растворителе, таком как вода или спирт, или, что более распространено, буферный раствор для стабилизации pH. Некоторые популярные фиксирующие растворы содержат несколько различных фиксирующих агентов в комбинации, таким образом компенсируя негативное воздействие одного агента добавлением другого. Например, уксусная кислота присутствует в некоторых составах для предотвращения усадки, вызванной другими агентами, такими как этанол.

1. Однокомпонентные фиксаторы

Этанол

Этанол, метанол и ацетон применяются как фиксирующие вещества благодаря их способности вызывать обезвоживание тканей и коагуляцию белков, главным образом белков цитозоля. В процессе такой фиксации липиды частично удаляются из тканей, тогда как углеводные соединения в основном сохраняются. Метанол часто считают более эффективным фиксатором по сравнению с этанолом, поскольку он вызывает меньшее уплотнение тканей и обеспечивает более аккуратное сохранение структуры. Эти спирты особенно подходят для небольших образцов и хорошо сохраняют различные белковые компоненты, включая ферменты, гликоген и некоторые пигменты. Поскольку они одновременно выполняют функции дегидратации и фиксации, образцы могут храниться в них достаточно длительное время до последующей заливки. Однако применение таких фиксаторов нередко сопровождается уплотнением и сокращением тканей, а также отсутствием протравливающего эффекта.

Уксусная кислота

Уксусная кислота не фиксирует ткани напрямую, а действует за счёт изменения коллоидных свойств белковых молекул. Обычно её используют в растворах концентрацией около 1–5 %. Она хорошо сохраняет нуклеиновые кислоты и связанные с ними нуклеопротеины. Среди недостатков следует отметить разрушение митохондрий и слабую фиксацию цитоплазматических компонентов и клеточных мембран. Чаще всего уксусная кислота используется как компонент комбинированных фиксирующих растворов, например жидкости Буэна, раствора Карнуа или смеси FAA. В составе таких растворов она также помогает уменьшить появление артефактов, которые могут возникать при использовании этанола или пикриновой кислоты.

Хлорид цинка и сульфат цинка

Хлорид цинка раньше применяли как самостоятельный фиксатор, однако со временем его стали использовать главным образом как компонент комбинированных растворов. В современных методиках соли цинка часто сочетают с параформальдегидом. Такое сочетание способствует эффективной фиксации тканей и одновременно позволяет сохранить антигенные свойства структур, что особенно важно для иммуногистохимических исследований. Ранее аналогичную роль выполняли соединения ртути, однако они были постепенно заменены солями цинка. В отличие от многих других фиксирующих растворов, смеси с цинком обычно не готовят на фосфатном буфере. После завершения фиксации необходимо тщательно удалить остатки цинка из образца, для чего материал промывают в дистиллированной воде.

Пикриновая кислота

Фиксация с использованием пикриновой кислоты основана на коагуляции белков за счёт образования солей пикрата. Чаще всего применяют 2–15 %

насыщенного раствора, который включают в состав комбинированных фиксирующих смесей. При правильно подобранной продолжительности фиксации пикриновая кислота хорошо сохраняет клеточные структуры, а также такие компоненты, как гликоген и липиды. Она обладает выраженным протравливающим действием, благодаря чему повышается интенсивность последующего окрашивания тканей. Перед заливкой материала в парафин образцы необходимо тщательно промывать, поскольку остатки пикриновой кислоты могут препятствовать проникновению парафина. Одним из наиболее известных фиксаторов, содержащих это вещество, является жидкость Буэна.

Формальдегид

Формальдегид относится к наиболее широко применяемым фиксирующим веществам, так как обеспечивает хорошее сохранение морфологической структуры тканей и позволяет длительно хранить материал при минимальных изменениях объёма. Он совместим с большинством методов гистологической обработки, включая различные способы окрашивания, иммуногистохимические исследования и гибридизацию мРНК *in situ*. Механизм действия формальдегида связан с его взаимодействием с функциональными группами белков, что приводит к образованию гидроксиметильных производных и последующему формированию метиленовых мостиков между молекулами. В реакцию могут вступать различные группы, например аминные, сульфгидрильные, гуанидиновые и алифатические гидроксильные. Такие химические изменения делают многие ферменты неактивными и препятствуют разрушению тканей под действием гидролитических ферментов. Формальдегид также способен хорошо сохранять липиды, особенно если в фиксирующий раствор добавляют кальций, который уменьшает растворимость фосфолипидов и при этом не взаимодействует с углеводами.

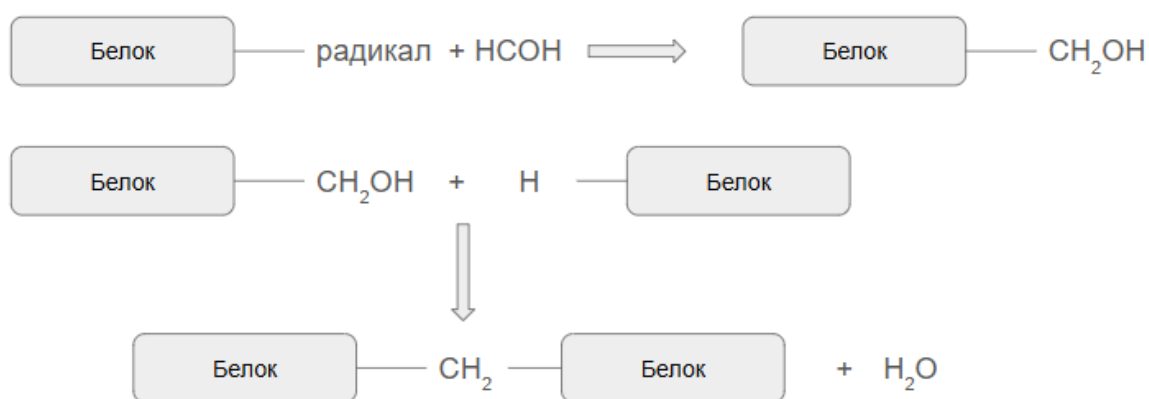


Рисунок 4 – Сшивание белков формальдегидом

Время фиксации параформальдегидом составляет от 24 до 48 часов при 20°C, хотя может длиться 1 или 2 недели. Если ткань предназначена для иммуногистохимии, рекомендуется фиксация от 12 до 24 часов при 4 °C. Длительная фиксация делает ткань твердой и может вызвать нестабильность нуклеиновых кислот [4]. Фиксатор может быть частично удален из ткани путем длительных промывок. Формальдегид обычно используется в буферных растворах - формалин нейтральный забуференный 10%. Примеры фиксаторов с формальдегидом: жидкость Буэна, фиксирующий раствор FAA, PLP, Фиксатор Жандра и другие.

Глутаровый альдегид

Глутаровый альдегид является широко используемым фиксатором. Когда он находится в растворе, то образует димеры и тримеры. Альдегидные группы, расположенные внутри полимеризованной молекулы, реагируют с аминок группами аминокислот, связывая белки, создавая молекулярные мостики. Однако внешние альдегидные группы остаются несвязанными и должны быть заблокированы или удалены для предотвращения ложноположительных результатов, например, при добавлении белков, таких как иммуноглобулины, во время иммуногистохимии или для предотвращения реакций с альдегидными группами во время гистохимии PAS (ШИК-реакции). Поэтому хорошей практикой является удаление свободных от глутарового альдегида групп, обычно предварительной обработкой в 1% борогидриде натрия. Скорость проникновения глутарового альдегида низкая, поэтому рекомендуется фиксация перфузией [1,2,4]. Обычно используется 0,5-3% раствор. Он может сохранять ультраструктуру тканей намного лучше, чем другие фиксаторы, и именно поэтому он является предпочтительным фиксатором для исследований с помощью электронной микроскопии. Однако его не рекомендуется использовать для заливки парафином, поскольку получение срезов затруднено. Низкая скорость диффузии может вызвать ретракцию тканей.

Тетраоксид осмия

Тетраоксид осмия был одним из первых фиксаторов в гистологии, использовавшихся с 1865 года. В водном растворе он не проникает глубоко в тканевые блоки, и образцы размером более 0,5–1 мм не рекомендуются для фиксации с его использованием. Тетраоксид осмия можно использовать в растворе и в качестве газообразного фиксатора, поскольку он является летучей молекулой. Он не создает артефактов, но делает образцы хрупкими. Химически он образует мостики между ненасыщенными жирными кислотами мембранных липидов (Рисунок 5). Таким образом, клеточные мембраны становятся нерастворимыми, темными и электронно-плотными, которые при электронной микроскопии интенсивно поглощают электроны. В световой микроскопии он полезен, например для изучения ненасыщенных липидных отложений. Тетраоксид осмия нечасто сочетается с красителями, поскольку он является сильной окисляющей молекулой и препятствует связыванию анионных красителей с тканью [3,4,14,15]. В настоящее время тетраоксид осмия в основном используется после фиксации

происходит дегидратация и, следовательно, сжатие ткани. Это один из первых использованных фиксаторов, хорошо подходящий для заливки в парафин.

Считается, что он лучше жидкости Карнуа для общей морфологии, с хорошей ядерной сохранностью.

Его часто используют для фиксации криостатных срезов и перед окрашиванием с использованием гематоксилина и эозина (Н&Е), которое является лучшим способом просмотра частей клеточной и тканевой структуры. Для этого обычно достаточно одной минуты. Срезы либо помещают в фиксатор перед сушкой, либо сушат на воздухе, а затем помещают в фиксатор.

Жидкость или фиксатор Карнуа

Фиксатор Карнуа содержит этанол, хлороформ и уксусную кислоту и является хорошим фиксатором для гликогена, простых углеводов и фибриллярных белков. Он также хорошо фиксирует нуклеиновые кислоты, хотя ядерная морфология несколько искажается. Пятиминутное применение раствора Карнуа проникает в кость на глубину 1,5 мм, не повреждая нейроваскулярные структуры. Однако при передерживании ткани становятся хрупкими из-за слишком сильной дегидратации, он может вызывать ретракцию тканей.

Растворы формальдегида

Растворы, содержащие формальдегид, вероятно, являются наиболее широко используемыми фиксаторами для обычных гистологических методов, а также для иммуноокрашивания и гибридизации мРНК *in situ*. Обычно используется концентрация параформальдегида 4% в сочетании с другими фиксаторами в буферных изоосмотических растворах. Для исследований с помощью электронной микроскопии наиболее популярным фиксатором является формальдегид в сочетании с глутаровым альдегидом. Формальдегид инициирует быструю фиксацию благодаря более высокой скорости диффузии, тогда как глутаральдегид выполняет более медленную, но более сильную фиксацию. Фиксация формальдегидом защищает от потенциальных тканевых ретракций, вызванных глутаральдегидом. Примеры фиксаторов, содержащих формальдегид: буферный формальдегид, фиксатор Буэна, фиксирующий раствор FAA (формальдегид, уксусная кислота, спирт), PLP (параформальдегид, лизин, перйодная кислота).

Глутаральдегид-тетраоксид осмия

Фиксаторы можно использовать не одновременно, а последовательно. Образцы для электронной микроскопии сначала фиксируют раствором, содержащим глутаровый альдегид (1–3 %) и параформальдегид (2–4 %), а затем тетраоксидом осмия (1 %). Такое сочетание подходит практически для всех тканевых структур, особенно мембран. Это важно, поскольку процедура электронной микроскопии обычно включает дегидратацию в органических растворителях и полимеризацию смол при 60 °С, в ходе которой необходимо сохранить клеточные структуры [4].

Вопросы для контроля освоения теоретических основ лабораторного практикума:

1. По каким признакам классифицируют фиксирующие агенты?
2. В чем заключается механизм денатурации белков при фиксации?
3. Что понимают под образованием поперечных связей в процессе фиксации?
4. Чем отличаются аддитивные и неаддитивные фиксаторы?
5. Какие преимущества и недостатки имеет формальдегид как фиксатор?
6. В каких случаях применяют глутаровый альдегид?
7. Для каких целей используют комбинированные фиксирующие растворы?

1.3 Методы фиксации

Существует несколько методов фиксации тканей, которые выбираются в зависимости от типа фиксатора, структуры, которую необходимо зафиксировать, и того, что мы хотим наблюдать. Процесс фиксации базируется на законах физики (диффузия) и химии (ковалентное и перекрестное связывание белков). Фиксация - это химическая реакция, а проникновение формалина в ткань – физический процесс.

Методы фиксации можно разделить на два типа: физические и химические.

1. Физические методы.

Физические методы включают нагревание, тепловую обработку и криоконсервацию (сублимационную сушку).

Замораживание считается эффективным способом сохранения молекулярных свойств биологических образцов. Для того чтобы структура тканей не повреждалась, процесс должен происходить максимально быстро, поскольку медленное охлаждение приводит к образованию крупных ледяных кристаллов, способных разрушать клеточные структуры. По этой причине обычно используют небольшие образцы — примерно до 2 мм толщиной, что позволяет равномерно охладить ткань по всей глубине. Очень быстрое охлаждение достигается несколькими способами: погружением материала в изопентан с температурой около $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$, замораживанием в жидком азоте ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), размещением образца на металлической пластине, охлаждаемой жидким азотом, а также применением смеси сухого льда и ацетона (около $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$). В некоторых случаях используется даже жидкий гелий, температура которого достигает приблизительно $-268\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед замораживанием образцы нередко обрабатывают криопротекторами, которые уменьшают повреждение клеток при образовании льда. В качестве таких веществ часто применяют, например, раствор сахарозы (около 25 %) в фосфатном буфере. Наиболее распространёнными криопротекторами являются диметилсульфоксид, глицерин, сахароза и растворы на их основе.

Лиофилизация (сублимационная сушка) и криозамещение представляют собой методы удаления воды из предварительно замороженных образцов. В этих процессах лёд переходит непосредственно из твёрдого состояния в газообразное, минуя жидкую фазу. Благодаря этому предотвращаются химические реакции,

которые обычно происходят в жидкой воде, что позволяет лучше сохранить тканевые структуры на длительное время. Криозамещение основано на постепенной замене льда фиксирующим раствором. Этот метод применяют для тех тканей, которые после замораживания не подверглись значительному разрушению.

Фиксация нагреванием. Использование высокой температуры в качестве способа фиксации в гистологии применяется относительно редко, поскольку нагрев может приводить к повреждению тканей. Под воздействием тепла белки коагулируют, а липидные компоненты могут растворяться. Тем не менее данный способ хорошо подходит для фиксации микроорганизмов, поскольку позволяет сохранить их форму и облегчает последующую идентификацию. В современной практике тепловую обработку часто сочетают с химической фиксацией. Например, образец помещают в фиксирующий раствор и подвергают нагреванию в микроволновой печи примерно до 55 °С. Такая температура обычно не вызывает артефактов, но значительно ускоряет процесс фиксации, сокращая его продолжительность с нескольких часов или суток до нескольких минут. Микроволновая фиксация, рассматриваемая как разновидность тепловой обработки, сегодня широко используется в лабораторной практике. При этом применение нагревательных водяных бань считается нежелательным, поскольку они могут создавать неравномерное распределение температуры между наружными и внутренними частями образца.

2. Химические методы.

При использовании химических методов используют водные растворы, содержащие фиксирующие вещества, которые образуют мостики между тканевыми молекулами, что приводит к иммобилизации тканевых соединений и предотвращает деградацию образца ткани. В большей или меньшей степени химические фиксаторы воздействуют на ткани как химически, так и физически. Химическая фиксация обычно достигается путем погружения образца в фиксатор (иммерсионная фиксация) или, в случае мелких животных или некоторых целых органов, таких как легкие, путем перфузии сосудистой системы фиксатором (перфузионная фиксация). Для некоторых специализированных гистохимических процедур фиксаторы иногда применялись в виде пара. Например, параформальдегид и тетраоксид осмия можно использовать для фиксации паром лиофилизированных тканей. В любом случае фиксатор должен как можно скорее попасть во все области образца.

3. Погружение.

В методе погружения образцы тканей погружаются в фиксирующий раствор (рисунок 6).

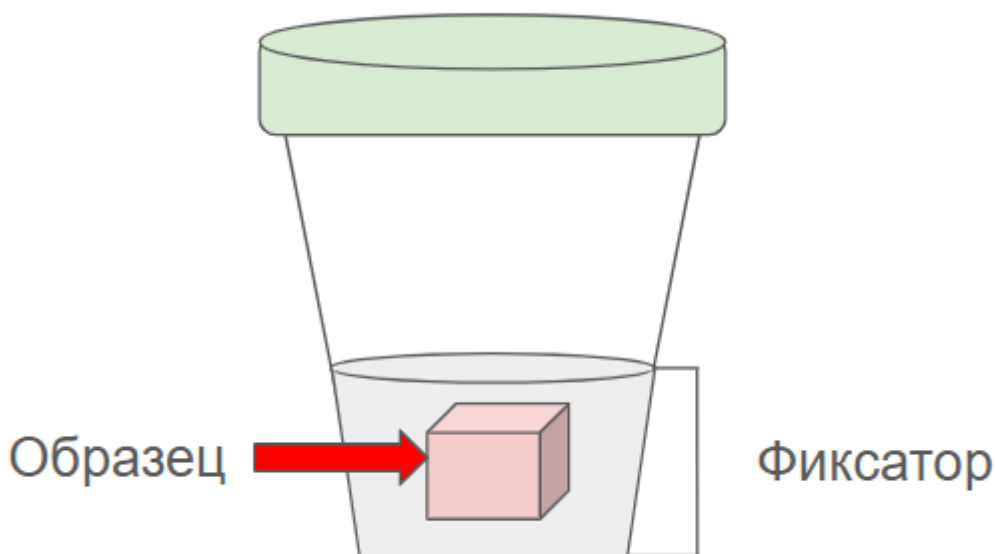


Рисунок 6 – Фиксация погружением

При фиксации методом погружения следует помнить о некоторых правилах:

1) Образец ткани не должен быть толще 4 мм, чтобы фиксатор проник в самую глубокую часть образца до того, как клетки начнут разрушаться. Размер образца следует выбирать в соответствии со скоростью проникновения фиксатора. Для медленно диффузионных фиксаторов рекомендуются образцы не более 2 мм. Необходимо также учитывать особенности ткани. Например, фиксатор быстрее проникает в рыхлые ткани или образцы с большими пространствами для диффузии.

2) Рекомендуется, чтобы объем фиксатора был в 15–20 раз больше объема образца. Заливать вырезанные образцы только свежим фиксатором и только однократно.

3) Осмолярность образца и фиксирующего раствора должны быть максимально схожими.

4) pH фиксирующего раствора должен быть близок к физиологическому pH образца.

5) Время фиксации зависит от свойств фиксатора - диффузии и скорости фиксации (интенсивности и скорости создания мостиков между белками или того, насколько быстро белки коагулируют). Время фиксации должно быть достаточным для надлежащей фиксации, но не слишком длительным, так как это может привести к появлению артефактов. Рекомендуется осторожное перемешивание образца во время фиксации, что сокращает время фиксации. Для небольших образцов биопсии может быть достаточно 2-6 часов. Плотные или жировые ткани обычно требуют больше времени для полной фиксации. Фиксация в течение 24 часов является наиболее распространенной для большинства фиксаторов. Однако для некоторых из них, таких как формальдегид, время

фиксации может занимать 48 ч. Например, проникновение формалина в образец толщиной 3 мм происходит за 3 часа, а фиксация требует не менее 24 часов при комнатной температуре или 18 часов при 37 °С. Увеличение температуры более 37°С не ускоряет фиксацию, а при температуре выше 50 °С белки подвергаются термической коагуляции. Чаще материал фиксируют при комнатной температуре, но для некоторых видов исследования необходимо проводить фиксацию при 4°С.

6) Не все типы тканей одинаково хорошо фиксируются, поэтому им требуется особые условия подготовки. Например, кости содержат очень мало воды, но много минерализованного внеклеточного вещества, поэтому требуют фиксации не менее 48-72 часов. Также формалин с трудом проникает через неповрежденную кожу, поэтому любые опухоли кожи, даже малых размеров, должны быть обязательно разрезаны или надрезаны.

7) Для фиксации рекомендуется использовать гистологические кассеты и заливочные формы. Заполнение их тканью не более, чем на 75 %. (рисунок 7). Кассеты позволяют удерживать и защищать образец во время обработки.

В этом методе фиксации фиксирующий раствор вводится через сосудистую систему и достигает всех клеток ткани через капиллярную сеть (рисунок 8). Можно зафиксировать целое животное, если фиксирующий раствор поступает через левый желудочек сердца. Затем фиксирующий раствор продвигается перистальтическим насосом через сосудистые ветви артерий, выходящих из этого желудочка. Если необходимо, чтобы фиксатор находился в легких, фиксирующий раствор вводится через правый желудочек.



Рисунок 7 – Гистологические кассеты и заливочные формы

С помощью перфузии можно зафиксировать один орган, если фиксирующий раствор поступает через главную артерию, которая кровоснабжает весь орган (рисунок 9).

При перфузии фиксирующий раствор достигает каждой клетки органа через сосудистую систему. Перистальтический насос вводит фиксатор через главную артерию, которая снабжает орган. Все кровеносные сосуды, которые не проводят кровь к органу, закрываются, но венозная сеть остается открытой [4].

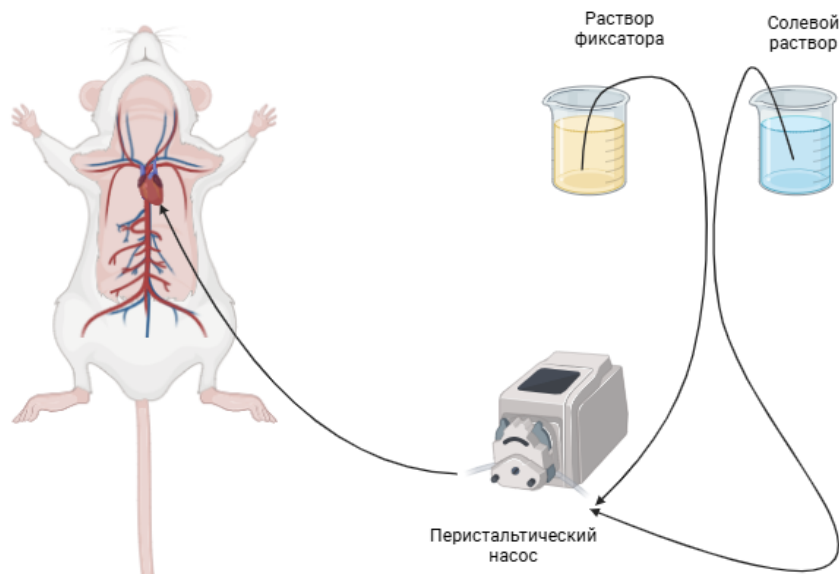


Рисунок 8 – Фиксация перфузией всего животного

Фиксирующий раствор вводится через сосудистую систему. Давление обеспечивается перистальтическим насосом. Фиксирующий раствор поступает через левый желудочек (IV) и достигает аорты. Эта артерия и ее ветви распределяют фиксатор по всему телу (за исключением легочного контура). Фиксатор поступает в капиллярную сеть и заполняет ее, где происходит большая часть процесса фиксации. После этого фиксирующий раствор собирается венозной системой, которая сходится в правом предсердии (rA). Эта сердечная камера открывается небольшим разрезом, чтобы открыть сосудистый контур и позволить фиксирующему раствору покинуть тело.

Фиксация перфузией более эффективна, чем фиксация погружением, поскольку фиксирующий раствор очень быстро контактирует со всеми клетками перфузируемой структуры. Таким образом, скорость проникновения фиксатора не является ограничивающей характеристикой.

Перед введением фиксатора в сосудистую систему кровь следует удалить с помощью оксигенированного физиологического раствора. В противном случае фиксатор может зафиксировать кровь, коагулировать ее и вызвать тромб, что не позволит фиксирующему раствору попасть в некоторые части образца. Как и при фиксации погружением, pH и осмолярность фиксирующего раствора, а также время фиксации должны быть установлены корректно [18,19,4].

Другим параметром, который следует иметь в виду, является давление фиксирующего раствора при попадании в образец, которое должно быть аналогично давлению крови у живого животного. Давление фиксации можно регулировать с помощью перистальтических насосов (рисунки 8, 9) и гравитации (подъем или уменьшение высоты контейнера с фиксирующим раствором). Это важно, поскольку низкое давление может помешать фиксирующему раствору достичь каждого капиллярного протока образца, а высокое давление может разрушить кровеносные сосуды и тканевую структуру [4].

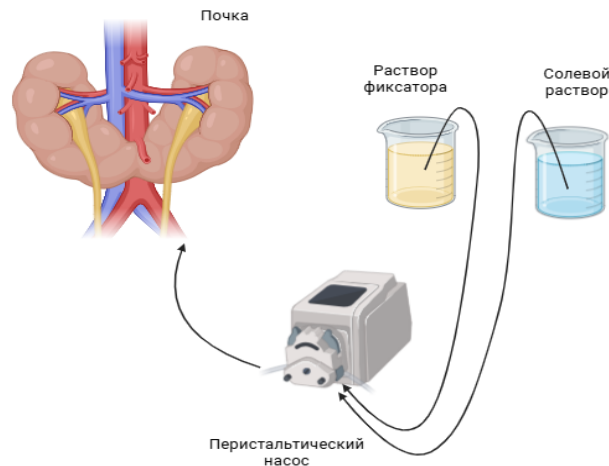


Рисунок 9 – Фиксация перфузией органа

Вопросы для контроля освоения теоретических основ лабораторного практикума:

1. Какие методы фиксации относятся к физическим?
2. В чем заключается принцип химической фиксации?
3. Каковы основные особенности метода фиксации погружением?
4. Какие требования предъявляются к размеру образца при фиксации погружением?
5. В чем заключаются преимущества метода перфузионной фиксации?
6. Почему важно соблюдать объемное соотношение ткани и фиксатора?
7. Как температура влияет на скорость и качество фиксации?

1.4 Обработка тканей и заливка

Обработка тканей включает в себя следующие этапы:

1)Обезвоживание.

После обработки образцов их заливают парафином, создавая таким образом парафиновые блоки. После того, как блоки разрезаны, их можно архивировать на десятилетия для использования в будущем.

Фиксатор обеспечивает достаточное затвердевание, если нам нужны толстые срезы (от 30 до 200 мкм). Ткани уже затвердели при фиксации, но не настолько, поэтому срезы толщиной менее 20-30 мкм получить сложно. Чем тоньше необходимо получить срезы, тем тверже должен быть образец. С помощью

вибратора можно получать толстые срезы непосредственно из фиксированных тканей.

Замораживание предварительно зафиксированных тканей обеспечивает надлежащее затвердевание для получения срезов толщиной от примерно 50 мкм до десятков нанометров (нм).

Используются несколько аппаратов для получения срезов: замораживающий микротом для толстых срезов (более 20 мкм), криостат для тонких срезов (от 5 мкм до примерно 20 мкм или 1-5 мкм) и ультрамикротом с криокамерой для сверхтонких срезов (десятки нм до 10 нм).

Замораживание образует кристаллы воды, которые могут разрушать ткани. Эти повреждения можно уменьшить, следующими способами:

а) Погружение образцов в криозащитные растворы, которые позволяют уменьшить размер кристаллов во время замораживания. Сахароза (30%) является наиболее распространенным криопротектором, но также используются диметилсульфоксид, глицерин, этиленгликоль. Они выбираются в зависимости от типа и размера образца, а также процедуры, которая будет выполняться позже.

б) Регулирование скорости замораживания. Чем быстрее замораживается образец, тем мельче кристаллы воды, поэтому это минимизирует повреждения тканей. Например, часто используется замораживание в жидком азоте. На практике оба метода обработки последовательно используются в одном и том же протоколе. Например, криопротекция и быстрое замораживание являются обычными процедурами для исследований с помощью электронной микроскопии.

Операция дегидратации — это удаление воды из ткани, рисунок 10, зафиксированной с использованием фиксаторов, которые не обладают или обладают этим свойством в недостаточной степени.

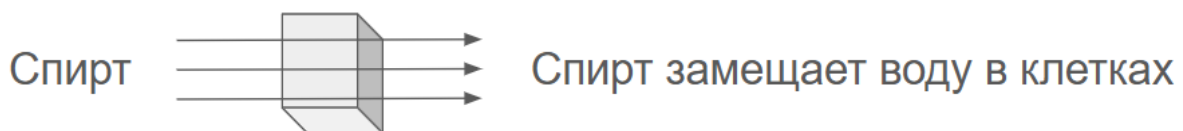


Рисунок 10 – Дегидратация или обезвоживание тканей

Большинство дегидратирующих реагентов — это спирты (т. е. этанол, метанол, изопропанол, бутанол). На этом этапе спирт быстро проникает в ткань, и вода заменяется спиртом. Поскольку спирты действуют быстро и могут слишком сильно сжимать ткань и делать ее слишком твердой, необходимо соблюдать осторожность при расчете времени, необходимого на этапе дегидратации. Этанол является наиболее широко используемым дегидратантом. Так как использование этанола строго контролируется (требуется лицензия и ведение учета), чтобы сделать его непригодным для потребления человеком и, следовательно, менее проблемным, производители добавляют метанол и/или изопропанол. Такой продукт известен как денатурированный спирт. Процесс дегидратации часто

выполняется путем погружения образцов в ряд спиртов и начинается с погружения образца в 70% спирт с постепенным увеличением концентрации, обычно 80%, 95% и 100% спирта (*этанол, 89.0-92.0%, изопропанол, 4.0-6.0%, метанол, 3.5-5.5%*). Если дегидратация будет неполная, очищающий агент (растворитель) не будет действовать должным образом, и результатом будут мягкие, кашеобразные блоки. Неполная дегидратация является причиной большинства проблем обработки.

Механическое перемешивание увеличивает скорость, с которой спирт заменяет воду. Гистороцессоры позволяют мягко нагревать образцы во время дегидратации. Поскольку нагревание жидкостей делает их менее вязкими, это повышает эффективность дегидратации за счет повышения способности проникать в ткани. Длительная, медленная дегидратация дает наилучшие качественные результаты. Обработка, проводимая в течение ночи, является наиболее распространенной. Дегидратация, проводимая при комнатной температуре, начиная с умеренных концентраций спирта, вызывает небольшую усадку ткани.

Дегидратанты: Этиловый спирт, Метиловый спирт, Изопропиловый спирт, Бутиловый спирт, Ацетон, Спиртосодержащий реагент

2)Очистка.



Рисунок 11 – Операция очистки

Поскольку большинство спиртов (за исключением изопропилового спирта) и парафина НЕ смешиваются, добавляется еще один этап, известный как очистка, рисунок 11. Необходимо использовать очищающие агенты или растворители, которые полностью смешиваются как со спиртом, так и с парафином (например, ксилол). Этот растворитель вытесняет спирт из ткани, который, в свою очередь, вытесняется расплавленными парафинами на следующем этапе. Еще одна важная роль очищающего агента заключается в удалении значительного количества липидов из ткани, которые в противном случае представляют собой барьер для инфильтрации парафина.

Процесс просветления изначально был назван так, потому что реагенты, используемые на этом этапе, имеют высокий показатель преломления и делают ткань прозрачной. Очищающие агенты — это растворители, которые полностью смешиваются как со спиртом, так и с парафином. Они вытесняют спирт в ткани, который, в свою очередь, вытесняется расплавленными парафинами на

следующем этапе. Длительное воздействие многих очищающих агентов приведет к образованию твердой, хрупкой ткани, в то время как недостаточная очистка сделает ткань чрезвычайно трудно поддающейся разрезанию для получения срезов.

При очистке требуется меньше смен растворителя, чем при дегидратации спиртом. Минимум – 2 смены, рекомендуется 3-4 смены для полного удаления спирта. Как и при дегидратации, легкое перемешивание может улучшить очистку и сократить время, необходимое для ее выполнения. Ароматические углеводороды (ксилол, толуол, бензол) имеют большую толерантность к воде, чем алифатические углеводороды (заменитель ксилола, лимонен), поэтому требуют меньше смен и меньше времени для замены спирта.

Ксилол - ароматическое соединение, которое является самым популярным из очищающих агентов, хотя многие лаборатории стремятся использовать менее токсичные заменители. Он быстро вытесняет спирт из тканей и, в свою очередь, будучи отличным растворителем парафина, может быть относительно легко вытеснен из тканей расплавленным парафином. Ксилол - недорогой в покупке, но дорогой в утилизации. Он легко воспламеняется и длительное воздействие может привести к затвердению и хрупкости ткани.

Заменители ксилола - растворители на основе алканов и лимонена также стали широко доступны для использования в качестве очищающих агентов. Они имеют меньшую токсичность, чем ксилол, и состоят из смесей алифатических углеводородов. Это более мягкие растворители, и большинство из них нетоксичны, также не вызывают твердости или хрупкости тканей по сравнению с ксилолом.

Очистители (Растворители): Ксилол, Толуол, Бензол, Хлороформ, Лимонен, Алифатические углеводороды

3) Инфильтрация и заливка.



Рисунок 12 – Операция заливки

Во время заливки, рисунок 12, вещества в жидкой фазе проходят через образец, пропитывая его, и после периода охлаждения или полимеризации заливочное вещество, а следовательно, и образец, затвердевают, не изменяя морфологические или молекулярные характеристики тканей. Таким образом, в зависимости от заливочного вещества, можно получить очень тонкие срезы (от десятков мкм до

нескольких нм), не разрушая и не портя ткань. Кроме того, заливка является хорошим методом для сохранения образцов в течение длительного времени. Существует ряд заливочных веществ для получения определенной толщины среза и для выполнения определенных методов. Для исследований с помощью световой микроскопии наиболее распространенным заливочным веществом является парафин. Для электронной микроскопии наиболее используемой заливочной средой являются эпоксидные и акриловые смолы. Существуют и другие заливочные вещества, такие как целлоидин, нитроцеллюлоза, полиэтиленгликоль и полиэфирный воск. Большинство сред для заливки не являются гидрофильными, т. е. они не смешиваются с водой. Это означает, что вода в образце должна быть заменена на гидрофобные соединения, а затем среда для заливки должна заменить соединение. Если в образце остается некоторое количество воды, процесс заливки не достигает должным образом всех областей образца, поэтому метод дает некачественные срезы и ткани.

Парафин, нагретый примерно до 60°C, становится жидким и может проникать в ткани. Расплавленный парафин пропитывает ткани и при охлаждении до комнатной температуры затвердевает до консистенции, которая позволяет делать срезы на микротоме. Парафин удерживает клетки и межклеточные структуры в их правильном соотношении, в процессе получения тонких срезов. Для полного вытеснения очищающего агента требуется несколько смен гистологического парафина. При использовании современных закрытых гистологических процессоров рекомендуется использовать не менее трех смен парафина, чтобы убедиться, что все следы очищающего агента удалены из обрабатываемых тканей. Парафиновая инфильтрация значительно облегчается вакуумом; однако вакуум и тепло следует применять осторожно при обработке очень маленьких образцов.

Парафины представляют собой смеси очищенного воска и различных добавок, которые могут включать пластиковые смолы (полимеры), антиоксиданты, красители и другие добавки. Конкретный химический состав определяет характеристики парафина, такие как температура плавления или твердость.

Тип используемого парафина часто является личным выбором лаборантов или лаборатории в целом. Существует парафин для обработки - оптимальный для инфильтрации (содержащий диметилсульфоксид или димексид, низкие уровни полимера), и парафин для заливки - оптимальный для поддержки и обеспечения структуры (содержащий высокие уровни полимера).

Вопросы для контроля освоения теоретических основ лабораторного практикума:

1. Какие основные этапы включает обработка тканей перед изготовлением срезов?
2. Какова цель этапа обезвоживания тканей?
3. Для чего проводится очистка ткани после дегидратации?
4. Почему перед заливкой необходимо полностью удалить воду из образца?

5. Какие вещества используют в качестве заливочных сред?
6. В чем заключается значение парафина в гистологической практике?
7. Какие ошибки могут возникнуть при неполной дегидратации или очистке ткани?

1.5 Изготовление срезов

Толщина среза может варьироваться от сотен микрометров (мкм) до нескольких нанометров (нм). Некоторые ткани, такие как растительные ткани, можно изучать в толстых срезах (сотни мкм). Клетки крови или клеточные культуры наблюдаются без срезов, поскольку их можно растянуть на предметном стекле и сформировать один слой толщиной в клетку [4].

Как упоминалось на предыдущих страницах, чем меньше толщина среза, тем тверже должна быть ткань перед срезом. Твердость ткани зависит от свойств ткани (например, стенки растительных клеток делают растительные ткани твердыми) и фиксации. Однако более важным шагом для получения твердых тканей является заливочная среда. Другой способ затвердевания образцов — замораживание. Микротомы — лабораторные аппараты для получения гистологических срезов. Существует широкий спектр микротомов, предназначенных для различных целей: получение срезов различной толщины, резка мягких или твердых заливочных сред, для незалитых тканей, а также для получения срезов из замороженных образцов.

Вопросы для контроля освоения теоретических основ лабораторного практикума:

1. От каких факторов зависит толщина гистологического среза?
2. Почему для получения тонких срезов требуется высокая твердость образца?
3. Какие способы подготовки ткани применяют перед изготовлением срезов?
4. Чем отличаются толстые, тонкие и ультратонкие срезы?
5. Какие требования предъявляются к качеству срезов для микроскопического исследования?
6. Какие дефекты могут возникать при изготовлении срезов?
7. Как толщина среза влияет на качество микроскопического анализа?

1.6 Основные типы современных микротомов

Компания Cummings, основанная в 1770 году, начала производство ручных инструментов для секционирования тканей, предназначенных исключительно для ботанических исследований растений [8]. В 1839 году Шевалье впервые ввёл термин «микротом» в научную практику, что стало важным событием в области гистологии. Первая серийная модель микротома, названная «микротомом Тома», была разработана патологоанатомом Рудольфом Томой из Гейдельберга в сотрудничестве с инженером Рудольфом Юнгом, и именно она положила начало новой эре в спецификации необходимых для гистологии инструментов [10,11,12].

Современные микротомы являются прецизионными инструментами, предназначенными для вырезания равномерно тонких срезов различных материалов, что позволяет проводить детальное микроскопическое исследование образцов. С опытом работы пользователи могут получать очень тонкие срезы. Для световой микроскопии, увеличивающей изображение до 1 800 раз, толщина срезов может варьироваться от 1 до 10 микрон (тонкие срезы). Для электронной микроскопии, где увеличение достигает около 10 000 000 раз, толщина срезов обычно составляет приблизительно 10 нанометров (ультратонкие срезы) [10,11,12].

Структурно микротомы состоят из трёх основных компонентов:

- Основание (корпус микротомы);
- Насадка для ножа и сам нож;
- Держатель материала или ткани.

Каждый из этих компонентов обеспечивает точность и качество нарезки, что критично для получения пригодных к анализу образцов.

В большинстве микротомов процесс получения среза осуществляется за счёт продвижения держателя материала к ножу, при этом нож остаётся неподвижным. Режущее действие может происходить как в вертикальной, так и в горизонтальной плоскости и связано с механизмом продвижения, что обеспечивает перемещение держателя материала после каждого разреза. Расстояние, на которое перемещается держатель, предварительно устанавливается с помощью шкалы, расположенной на корпусе микротомы, и может составлять от 0,5 до 50 микрон для микротомов, предназначенных для тонких срезов, и от менее 60 до более 500 нанометров для аппаратов, производящих ультратонкие срезы.

Микротомы можно классифицировать следующим образом:

- Качающийся микротом
- Ротационный микротом
- Саный (Салазочный) микротом
- Замораживающий микротом
- Вибрационный микротом
- Ультрамикротом
- Лазерный микротом

При этом микротомы можно разделить на ручные микротомы, полуавтоматические и автоматические.

Микротомы для разрезания образцов, залитых парафином, являются, вероятно, наиболее используемым оборудованием в гистологических лабораториях. Они имеют лезвие, держатель образца и механическое устройство, способное перемещать образец по лезвию с выбранными шагами в несколько микрон, а затем получать срезы.

Существует основные типы парафиновых микротомов: качающийся, ротационный микротом и саный микротом.

Качающийся микротом

Качающийся микротом является одним из старейших по конструкции и относительно дешёвым.

Качающийся микротом — это прибор для получения тонких срезов материала (животного или растительного происхождения), залитого исключительно в парафиновый блок. Он был разработан в мастерских Кембриджского университета в конце XIX века. Несмотря на то, что это старая модель, он до сих пор очень эффективен для создания серий качественных парафиновых срезов толщиной 5–20 микрон без перерывов.

Как и у других типов микротомов (санного и ротационного), его название происходит от принципа движения держателя образца: рычаг с образцом в этом микротоме совершает повторяющиеся качательные движения, приближаясь к неподвижному ножу. Этот метод резки даёт срезы со слегка цилиндрической поверхностью, однако эффект кривизны незначителен. Срезы становятся заметно неплоскими только при резке очень крупных объектов (высотой более 10 миллиметров).

Простая конструкция качающегося микротомы делает его производство относительно недорогим.

Качество срезов материала, залитого в парафин, полученных с помощью качающегося микротомы, конкурентоспособно с качеством срезов, производимых современными ротационными и санными микротомы. Он особенно хорошо подходит для резки небольших и относительно мягких объектов. Качающийся микротом не способен резать твёрдые материалы, такие как дерево или кость. Максимальный размер образца, который можно без проблем разрезать с его помощью, довольно мал по сравнению с современными моделями, но это скорее специализация, а не недостаток.

Для работы с качающимся микротомом используют двусторонние вогнутые лезвия типа А. Эти ножи довольно легко затачиваются, но также довольно быстро тупятся. Главными недостатками качающегося микротомы является отсутствие регулировочных винтов для угла установки ножа, что вызывает трудности с получением очень тонких секций, а также склонность к перемещению во время процесса нарезки, что может быть связано с его лёгким весом. Решением для регулировки угла ножа, одобренным специалистами Brunel, является изготовление и использование клиньев. Важно, чтобы клинья были изготовлены из прочного материала, так как они должны выдерживать давление во время процесса резки без малейшего смещения или деформации. Использование дерева или пластика недопустимо, подходят только металлические клинья.

Если на ноже микротомы нет серьёзных зазубрин от падения или резки очень твёрдого материала, то рекомендуется использовать абразивы с зернистостью 1000 и выше. При этом не прилагайте усилий к точильному камню — это убережет тонкую кромку от случайных повреждений. Затем переходите к последовательной полировке лентами зернистостью 2000, 3000 и 6000.

Такой микротом требует минимального обслуживания. Помимо заточки ножа, необходимо заботиться о защите открытого механизма от влажности воздуха и пыли.

Силиконовая смазка и смазки на биоразлагаемой масляной основе не должны использоваться с микротомом, так как они не отталкивают влагу и/или со временем окисляются, меняя свои свойства. Только смазка на нефтяной основе подходит для длительного использования. Технический вазелин является также плохой заменой специализированной смазке. На первый взгляд он может казаться слишком густым, но разжижается при нагреве от трения в механизме и начинает подтекать и плохо удерживается на металлической поверхности. Моторные масла на металлической поверхности не удерживаются вовсе. Оптимально использовать комбинацию универсального спрея для защиты поверхностей от пыли и ржавчины и белой литиевой смазки для деталей, подверженных трению.

Ротационный микротом

Ротационный микротом получил своё название благодаря использованию вращательного действия маховика, который отвечает за режущее движение. Эти устройства являются универсальными микротомом, предназначенными для получения полутонких и тонких срезов, используемых в световой микроскопии.

Принцип работы ротационного микротомом основан на вращении маховика, который обеспечивает движение блока материала к фиксированному ножу. Нож обычно фиксируется в горизонтальном положении. Блок ткани перемещается вверх и вниз в вертикальной плоскости относительно ножа, что позволяет выполнять ровные срезы. Одним из существенных преимуществ ротационного микротомом является его большая масса, что обеспечивает лучшую устойчивость и следовательно отсутствие вибрации по сравнению с качающимся микротомом. Угол резки и угол ножа можно регулировать. Микротомом можно использовать для получения срезов, залитых целлоидином, с помощью специального держателя для установки ножа.

На ротационном микротомом можно работать с большими блоками тканей, а также регулировать угол наклона ножа, что увеличивает гибкость в процессе нарезки. Благодаря использованию более тяжёлого и крупного ножа, на этом типе микротомом снижается вероятность вибрации во время разреза. Толщина срезов может колебаться от 0,5 до 60 микрон на большинстве моделей. В частности, срезы парафиновых блоков обычно изготавливаются в диапазоне от 3 до 5 микрон или 20 микрон, в то время как срезы из смол могут быть получены в диапазоне от 0,5 до 1 микрон. Некоторые модели ротационных микротомом поставляются с электронным двигателем для автоматического секционирования

Саный микротом

Саный микротом был изначально разработан для нарезки очень больших блоков тканей, таких как целый мозг. Часто такие микротомом используются для работы с биологическими материалами и образцами, залитыми в парафин, целлоидин. Этот тип микротомом стал широко использоваться со времён Второй

мировой войны. Блок-держатель установлен на стальной каретке, которая перемещается вперёд и назад по направляющим, осуществляя контакт с неподвижным горизонтальным ножом.

Одним из ключевых преимуществ санного микротомы является его универсальность, простота обслуживания, а также его тяжёлое и устойчивое исполнение, что минимизирует влияние вибраций на процесс нарезки. Он оснащён большим ножом длиной 24 см, который, как правило, имеет клиновидную форму. Эта форма ножа снижает вероятность возникновения вибраций и требует меньшей частоты заточки. Кроме того, зажимы, удерживающие нож, регулируются, что позволяет легко настраивать наклон и угол резания в зависимости от характеристик обрабатываемого блока. Типичная толщина среза, достигаемая на санном микротоме, составляет от 10 до 60 микрон. Срезы обычно составляют от 1 мкм до 60 мкм.

Однако следует отметить, что скорость работы этого микротомы значительно ниже в сравнении с качающимся или ротационным микротомом, что является его основным недостатком.

Замораживающий микротом

Замораживающий микротом является эффективным инструментом для получения замороженных срезов и используется достаточно широко. Он подсоединяется к баллону с углекислотой с помощью специально усиленной гибкой металлической трубки. В отличие от других микротомов, в этом аппарате нож перемещается, в то время как блок ткани остается неподвижным. После каждого среза блок ткани перемещается на заданное расстояние в микронах. Однако получение последовательных высококачественных тонких срезов с помощью этого устройства является задачей не из лёгких.

Замораживающий микротом предназначен для замораживания образца, чтобы он был достаточно твердым для точного нарезания микротомом без его разрушения. Замораживающие микротомы могут использоваться для тонкой нарезки ряда продуктов и образцов, включая кожу, текстиль, продукты питания, а также образцы тканей человека и животных. Срезы изучаются с помощью световой микроскопии.

Замораживающий микротом *с криостатом* позволяет замораживать ткани без использования диоксида углерода. В данном случае микротом помещён в шкаф глубокой заморозки. Температура в шкафу может регулироваться в диапазоне от -10°C до -40°C .

В данном приборе часто используется так называемый элемент Пельтье, когда два различных металла размещаются друг рядом с другом, и при прохождении постоянного электрического тока через них на одной поверхности выделяется тепло, а на другой — идет его потеря.

Чтобы свести к минимуму ненужный нагрев, все необходимые механические движения микротомы можно выполнять вручную с помощью колеса, установленного снаружи камеры. Более новые микротомы имеют электрическую

кнопку перемещения ткани. Точность разрезания составляет микрометры. Ткань разрезается на срезы толщиной до 1 микрометра. Обычные гистологические препараты имеют толщину около 7 микрометров.

Криофиксация образцов с низкотемпературным секционированием в криостате имеет существенное преимущество в скорости. Образцы поддерживаются (с использованием геля или коммерческого препарата, такого как Tissue-Tek на основе гликоля и смол) на металлических блоках, а затем быстро замораживаются, как правило, в жидком азоте ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) для сохранения или криофиксации их структуры. Замороженный блок разрезается при температуре приблизительно от -20 до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ с использованием обычного настольного микротомы, размещенного в холодильной установке (криостате). Этот метод имеет особое применение для замороженных продуктов, таких как мороженое, но также часто используется для продуктов с высоким содержанием воды или с которыми трудно обращаться каким-либо другим способом. Однако некоторые пищевые продукты непригодны для разрезания в замороженном виде, например, если они остаются мягкими или становятся хрупкими. Кроме того, первоначальные капитальные затраты могут быть высокими, и, хотя срезы можно законсервировать и закрепить на постоянной основе, замороженный блок можно сохранить только в условиях жидкого азота. Срезы собирают на предметных стеклах, иногда с помощью тонкого покрытия/слоя клея, например, яичного альбумина, и дают им нагреться до комнатной температуры. На этом этапе их часто дополнительно химически фиксируют перед окрашиванием. Предметное стекло и образец высушиваются на воздухе и окрашиваются. Весь процесс от установки до считывания предметного стекла занимает от 10 до 20 минут. Качество среза микротомы-криостата хуже по сравнению с фиксированными срезами тканей.

Ткани для криостатного среза не нужно фиксировать в формалине, как в случае обычной гистологии. Вместо этого ткани немедленно криофиксируются после взятия образца. Для криофиксации ткань может помещаться в вязкую гелеобразную среду для заливки криосекционных образцов тканей, и погружается в изопентан, охлажденный сухим льдом или жидким азотом.

С помощью этого микротомы можно получить срезы толщиной в среднем от 30 мкм до 200 мкм из замороженных образцов. Использование некоторых моделей позволяет получить срезы толщиной 0,5-100 мкм. Срезы изучаются с помощью световой микроскопии. Лаборанты обычно используют криостатные микротомы для нарезки замороженных блоков тканей на секции толщиной от 8 до 15 микрон (мкм). Микротом может быть настроен на толщину срезов в диапазоне 2-16 мкм [18].

Существует более сложный микротом, называемый ультракриотомом, который позволяет получать ультратонкие срезы из замороженной ткани. Его используют, когда интересующие молекулярные свойства могут быть нарушены в процессе заливки. Таким образом, можно изучать ультраструктурные особенности тканей без заливки с высокой молекулярной сохранностью.

Сэру Джеймсу Дьюару приписывают изобретение первого действующего криостата в 1897 году. Вначале криостаты использовались для хранения сжиженных газов. Дьюар использовал двухстенные металлизированные стеклянные контейнеры для хранения сжиженного азота. Сегодня криостаты, в которых хранятся криогенные жидкости, называются дьюарами.

Введение метода флуоресцентного окрашивания антителами в 1941 году увеличило потребность в тонких срезах (3-5 мкм) свежемороженой ткани, свободной от кристаллов льда.

Чтобы достичь этого, ткань необходимо замораживать при очень низких температурах. Первый криостат был сконструирован Линдерстрем-Лангом и Могенсенем в 1938 году, а в 1951 году его модернизировали Кунс и его коллеги.

Криостат может служить альтернативой замораживающему микротому для быстрого секционирования. После замораживания ткани переносятся на микротом, что позволяет значительно ускорить процесс окрашивания, так как срезы легко приклеиваются к теплым предметным стеклам.

Цель состоит в том, чтобы заморозить ткань как можно быстрее и предотвратить образование кристаллов льда.

При работе с тканями, которые плавятся, сморщиваются, трескаются, рвутся или иным образом дегенерируют, криосекционирование является наилучшим вариантом.

Замораживание ткани занимает около 3 минут в зависимости от размера ткани.

Для поддержания постоянной температуры криостата используются морозильная камера с элементом Пельтье, а также ванны с жидким гелием или жидким азотом. Криостат также может охлаждаться с помощью криогенных жидкостей аргона и кислорода.

Доступны небольшие портативные криостаты, которые могут работать от генераторов или автомобильных инверторов

Криостаты могут быть ручные и автоматические, а также однокомпрессорные и двухкомпрессорные.

1. Однокомпрессорный криостат.

Однокомпрессорный криостат использует один компрессор для охлаждения камеры и полки замораживания. С одним компрессором вы не можете контролировать температуру полки замораживания отдельно, поскольку она является частью системы охлаждения камеры.

2. Двухкомпрессорный криостат.

Двухкомпрессорный криостат использует два компрессора. Один компрессор контролирует температуру камеры, позволяя поддерживать желаемую температуру при разрезании ткани. Второй компрессор охлаждает полку замораживания отдельно. Системы с двумя компрессорами могут охлаждаться быстрее, чем криостаты с одним компрессором, и достигать более низких температур в камере. Кроме того, система с двумя компрессорами помогает

предотвратить прерывание охлаждения, если один из компрессоров выходит из строя.

Вибрационный микротом (микротом с вибрирующим лезвием)

Существует несколько причин избегать заливки тканей для получения срезов. Во время заливки парафином или смолой образцы подвергаются дегидратации и нагреванию, что может вызвать повреждение некоторых молекул или молекулярных областей. Кроме того, некоторые тканевые или клеточные особенности необходимо изучать в толстых срезах толщиной около 100 мкм или больше. Вибратом может делать эти две вещи: толстые срезы и помочь избежать заливки. Другой способ получить толстые срезы без заливки — использовать замораживающий микротом, но необходимы криозащита и замораживание образца.

Вибрационный микротом был разработан с целью заменить ручной микротом. Он предназначен преимущественно для получения высококачественных срезов из живых, нефиксированных и незамороженных мягких тканей, образцов как животного, так и растительного происхождения, а также для резки серийных срезов фиксированных образцов [15]. Вибрационные микротомы позволяют точно разрезать ткань в физиологических условиях без необходимости в заливке и предобработке ткани промежуточными растворителями. Однако при помощи этого вида микротомии невозможно получить серии тонких срезов живых тканей.

Например, вы можете посмотреть на окрашивание флуоресцентных белков, таких как, зелёный флуоресцентный белок (GFP) в глубоких тканях, которые вы не смогли бы легко визуализировать с помощью конфокального микроскопа. Это особенно важно, так как корни люцерны *Medicago truncatula* намного толще корней резуховидки *Arabidopsis thaliana*, а узелки еще толще.

Это дает возможность исследовать внутреннюю структуру любого органа. Вибратом не делает особенно тонкие срезы, но он позволяет делать срезы живой ткани. Они сильно отличаются от того, что вы видите в фиксированной ткани.

Этот инструмент находит своё основное применение в гистохимии ферментов и ультраструктурных исследованиях. Он способен поддерживать морфологию клеток, сохраняет ее жизнеспособность и активность фермента.

В отличие от микротома, который использует неподвижное лезвие для разрезания ткани, в вибраторе используется вибрирующее (осциллирующее) лезвие. Образцы разрезаются при комнатной температуре. Кроме того, микротомы обычно используются для получения более тонких срезов, тогда как вибраторы лучше подходят для более толстых образцов тканей.

Осциллирующий нож приводит к меньшему сжатию среза и, следовательно, к меньшему количеству артефактов по сравнению с микротомным и криостатным срезом, при котором ножи статичны. Для того чтобы избежать распада ткани, микротом такого типа обладает низкой скоростью при резке.

Частоту и амплитуду движения лезвия бритвы можно изменять в соответствии со специфическими свойствами вашего образца (твердые или мягкие ткани) путем регулирования изменения подаваемого напряжения к ножу.

Амплитуда вибрации регулируется изменением подаваемого напряжения. Для предотвращения разрыва мягких материалов во время резки они погружаются в жидкость, которая также помогает рассеивать тепло, выделяющееся на вибрирующей кромке ножа.

В зависимости от производителя, максимальный диаметр образца 30 мм, высота 20 мм или 33x50 мм.

Принцип работы. Нож вибратора (лезвие безопасной бритвы) совершает вертикальное движение и продольное – вибрирующее. После каждого среза держатель ножа передвигается вдоль оси резания на определенное расстояние, которое определяет толщину срезов [19]. Исследователь может задавать толщину срезов и получать серии срезов заданной толщины. Благодаря рассчитанному вертикальному отклонению ножа, а также специальному держателю ножа после резки тканей на поверхности срезов остаются живые неповрежденные клетки.

Толщина среза обычно составляет около 30-1000 мкм для живой ткани и 10-1000 мкм для фиксированной ткани. Свежие образцы, разделяемые вибрационными микротомомы, обычно имеют толщину более 30 мкм. Фиксированные образцы имеют толщину более 10 мкм.

Из фиксированных образцов животных и растений с помощью вибратора можно получить срезы толщиной от 40-50 мкм до сотен мкм. Механизм секционирования состоит из платформы с держателем образца, который можно поднимать или опускать для регулировки толщины среза, и лезвия с очень острым краем. Лезвие движется и режет в горизонтальной плоскости параллельно поверхности образца. Название «вибратор» происходит от боковой вибрации лезвия при его движении, так что процесс резки похож на пилу (рисунок 13). Таким образом, относительно мягкий материал можно разрезать, не натягивая и не разрывая его. Для работы на вибраторе образец ткани может быть залит в легкоплавкую агарозу и далее приклеивается к неподвижному держателю (подставке) при помощи специального клея (например, цианокрилатного клея, который полимеризуется при соприкосновении с водой) (рисунок 14). Отдельные срезы собираются тонкой кисточкой или пипеткой, и могут просматриваться без дальнейшей обработки или после окрашивания с помощью широкопольного или конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Еще одной особенностью вибратора является то, что все разрезание часто выполняется в водном растворе, обычно буферном или физиологическом растворе. Если разрезание тканей проводилось не в растворе, но потом их можно перенести в раствор азида натрия или PBS (Фосфатно-солевой буфер) для консервации и фиксации биологических объектов. В любом случае, чтобы получить качественные срезы, образец должен быть однородным.

Ультрамикротом

Ультрамикротом используется для подготовки ультратонких срезов толщиной от 5 до 200 нанометров, предназначенных для световой и электронной микроскопии. Обычно очень маленькие образцы тканей или промышленных изделий помещаются в твёрдую смолу перед резкой. Для создания таких тонких срезов ультрамикротом использует очень острое лезвие, изготовленное из стекла, алмаза или сапфира.

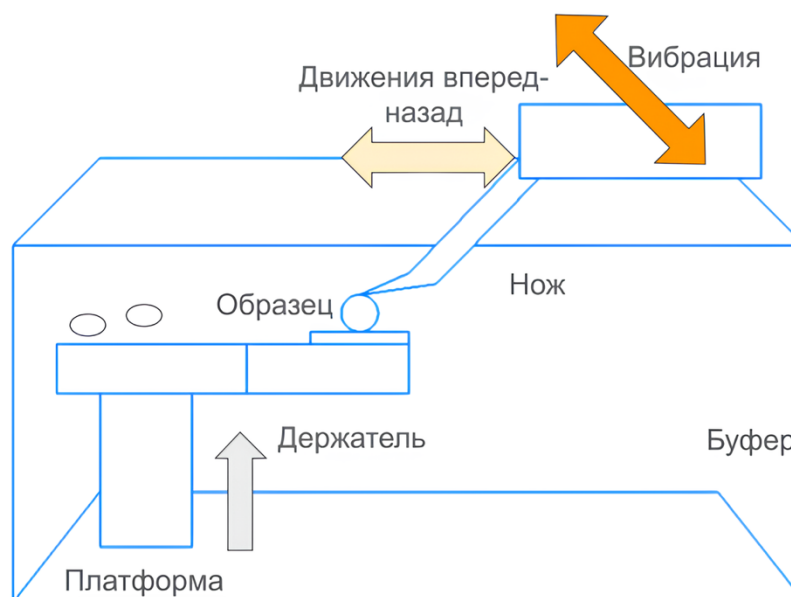


Рисунок 13 – Боковой вид режущей камеры вибратома

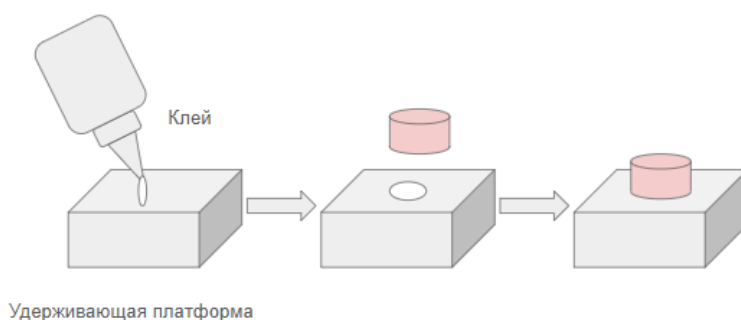


Рисунок 14 – Приклеивание образца к блоку для помещения в держатель образца

Процесс подготовки препаратов для исследования включает в себя фиксацию, проводку, ультрамикротомию, контрастирование.

Поскольку срезы чрезвычайно тонки, любые вибрации или колебания температуры могут изменить толщину между последовательными срезами. Поэтому ультрамикротом следует размещать в помещении, максимально защищенном от вибраций, с регулируемой и постоянной температурой. Обычно его устанавливают на специальный стол с механизмом поглощения вибраций. Управление процессом нарезки (старт/стоп, установка толщины, скорости резки, рабочего окна, подсветки и других параметров) осуществляется с помощью внешней панели управления.

Позиционирование залитого блока материала относительно режущей кромки контролируется оператором с помощью встроенного микроскопа.

Ультратонкие срезы остаются на поверхности воды в специальной ванночке ножа. Их собирают на медные или никелевые сеточки. Эти сеточки представляют собой круглые тонкие диски с ячейками различной плотности, предназначенные для срезов разного размера. Площадь «окон» — свободных от перегородок участков — составляет от сотен до нескольких сотен квадратных микрометров. Такие сеточки обеспечивают наилучшее качество изображения, поскольку электронам нужно пройти только через срез, прежде чем попасть на экран визуализации. Однако участки среза, лежащие на перегородках сетки, наблюдать невозможно.

Существуют также другие типы «сеточек» с одним большим окном, куда помещается весь срез. В этом случае окно должно быть покрыто тонкой опорной пленкой из специальной смолы (формивара). Эта пленка очень тонкая, пропускает электроны и служит поддержкой для среза.

Толщину ультратонкого среза можно приблизительно оценить по интерференционному цвету, который он отражает с поверхности. Эти цвета варьируются: серый (менее 60 нм), серебристый (60–90 нм), бледно-золотистый (90–120 нм), темно-золотистый (120–150 нм) и пурпурный (150–190 нм).

Ультрамикротомия может использоваться для различных типов образцов, включая биологические объекты и промышленные материалы, такие как полимеры (резина и пластмассы), а также пластичные, твердые или хрупкие материалы (металлы или керамика).

Лазерный микротом

Это инструмент для бесконтактной резки. Предварительная подготовка образца путем заливки, замораживания или химической фиксации не требуется. В качестве альтернативы микротом можно также использовать для очень твердых материалов, таких как кости или зубы, а также некоторых видов керамики. Устройство работает с использованием режущего действия инфракрасного лазера. Поскольку лазер испускает излучение в ближнем инфракрасном диапазоне, в этом режиме длины волны лазер может взаимодействовать с биологическими материалами. В основе действия фемтосекундного лазера лежит эффект фоторазрушения [4]. Ограничивая длительность лазерного импульса фемтосекундным диапазоном, энергия, расходуемая в целевой области, точно

контролируется, тем самым ограничивая зону взаимодействия разреза менее чем микрометром. Вне этой зоны сверхкороткое время приложения луча вносит минимальное или нулевое тепловое повреждение в оставшуюся часть образца [4].

Лазерный микротом использует современную фемтосекундную лазерную технологию для точного бесконтактного секционирования образцов. Он гарантирует высокую точность нарезки, позволяя безопасно разрезать биологические ткани и другие материалы без термического повреждения. Толщина срезов может варьироваться от 5 до 100 мкм, в зависимости от обрабатываемого материала. Преимущества лазерного микротомы включают бесконтактную обработку, отсутствие термических повреждений и сокращение времени на подготовку образцов.

Лазерный микротом используется для точного бесконтактного микротомирования и разрезает ткань или другой материал с помощью фотонов вместо стальных лезвий. Метод является бесконтактным и позволяет резать ткань в ее естественном состоянии. Специальные методы подготовки, такие как предварительная фиксация, заливка или замораживание, не требуются. Полученный образец ткани помещается на обычное предметное стекло микроскопа [18].

В основе лазерного микротомы лежит фемтосекундный лазер, излучающий свет в ближнем инфракрасном диапазоне. Лазерный свет в ближнем инфракрасном диапазоне от 740 до 1400 нм. Длина волны около 1000 нм хорошо подходит для обработки биологического материала, поскольку большинство биологических тканей имеют очень низкий коэффициент поглощения на этой длине волны [18].

Для выполнения разреза лазерный луч плотно фокусируется на образце с помощью светосильного объектива. Из-за экстремальных интенсивностей до 1ТВт/см² внутри фокуса многофотонное поглощение вызывает ионизацию ткани. Этот процесс называется оптическим пробоем и приводит к образованию плазмы. Быстрое расширение плазмы вызывает разрушение ткани и обеспечивает ее разрезание.

Если длительность импульса достаточно коротка (100–400 фс), а диаметр фокального пятна ограничен дифракцией (1 мкм), то для возникновения оптического пробоя требуется очень низкая энергия импульса, порядка 10 нДж. Это ограничивает диапазон взаимодействия диаметрами менее одного микрометра. Разделение материалов происходит только в фокальной области. За пределами этой области не обнаружено никаких термических или механических повреждений.

Основным компонентом лазерного микротомы является высокомогущный фемтосекундный генератор, излучающий сверхкороткие лазерные импульсы с длиной волны 1030 нм, длительностью импульса около 300 фс и частотой повторения импульсов 10 МГц. Максимальная средняя мощность этой лазерной системы составляет 2,5 Вт. Объектив с высокой числовой апертурой доставляет к образцу импульсную энергию до 100 нДж [18].

Для процесса резки лазерный луч и образцы перемещаются одновременно. Лазерный луч отклоняется быстрым сканером, в то время как образец на стандартной стеклянной пластине перемещается позиционирующим столиком с 3D-пьезоприводом. Пользователь может задать такие параметры, как перекрытие импульсов, толщина среза и размер области резки. Обычно может быть обработана область размером до 14 x 14 мм. Скорость резки зависит от свойств образца, тогда как типичной является 1 мм²/с. В настоящее время были получены срезы толщиной от 5 до 100 мкм [18].

Более тонкие срезы также возможны, но обработка таких срезов ткани после удаления основной массы образца более сложна. Для световых микроскопических исследований толщина от 5 до 10 мкм в большинстве случаев достаточна. Однако более толстые срезы представляют интерес, например, для нейробиологических экспериментов или подготовки образцов для ультрамикротомии.

Для достижения хороших результатов поверхность ткани должна быть плоской с хорошим оптическим контактом со стеклянным предметным стеклом. При необходимости можно использовать каплю жидкости, чтобы способствовать согласованию показателей преломления. Солевые растворы также подходят, как и большинство сред, используемых для культивирования клеток. Программное обеспечение позволяет использовать три режима резки: резка всего поля (максимальный размер и максимальное время), определенного прямоугольного поля (например, 5x6 мм) или настраиваемого поля путем установки маркеров положения. В зависимости от точности оси z толщина срезов может контролироваться с точностью до трех микрон [18].

Во время процесса резки на экране управления отображается живое видео образца, т. е. плоскости резки. Это позволяет пользователю наблюдать, успешно ли выполнена процедура резки. Быстро растущее поле микропузырьков типично для возникновения фотодеструкции и, следовательно, является признаком правильной резки. После процесса резки срез ткани отделяется от основной массы пинцетом и помещается на предметное стекло. Теперь его можно окрасить и покрыть, если необходимо [18].

В большинстве случаев обработке могут подвергаться практически все мягкие ткани, за исключением тканей, содержащих меланин. Это связано с тем, что излучение с длиной волны около 1040 нм почти не поглощается тканевыми хромофорами. Также возможна работа с твердыми тканями, например костями или структурами зубного происхождения, однако для них требуется индивидуальный подбор параметров резки.

Использование лазерного микротомата не ограничивается только подготовкой тонких гистологических срезов для световой микроскопии. Поскольку во время разрезания на образец не действуют механические сдвиговые нагрузки, появляется возможность исследовать очень мягкие или легко повреждаемые ткани, морфология которых может нарушаться при использовании традиционных методов.

Следует отметить, что лазерный микротом не предназначен для повседневной лабораторной работы, так как процесс разделения тканей занимает сравнительно много времени. Тем не менее, у этого метода есть важные преимущества по сравнению со стандартной микротомией, особенно когда необходимо сохранить ткани в максимально естественном состоянии. Например, в исследованиях, связанных с иммуноокрашиванием, иногда требуется сохранять жизнеспособность ткани. Кроме того, лазерная микротомия открывает возможности для задач, которые сложно выполнить традиционными способами, включая резку твердых тканей, растительных образцов, древесины и других материалов. Благодаря этому технология может применяться в самых разных направлениях научных исследований — от ботаники до регенеративной медицины.

Ножи для микротомов

Микротомный нож играет ключевую роль в производстве качественных срезов. Первоначальная попытка создать адекватную режущую поверхность была осуществлена с помощью остро заточенных лезвий бритв, но они быстро тупились. В 1950 году Латта и Хартманн обнаружили, что тонкие края можно получить, используя свеженарезанное стекло. Микротомия требует наличия острого, без недостатков, режущего края. Появление одноразовых лезвий значительно упростило процесс получения тонких и качественных срезов, однако они часто не подходят для секционирования более твердых тканей, таких как кости. Это создаёт необходимость поддерживать острые ножи в удовлетворительном состоянии.

Ножи для микротомов можно классифицировать по материалу, из которого они изготовлены, а также по форме их острия.

Помимо формы и профиля, важно также учитывать материал лезвия

Классификация ножей по материалу [20]:

- Стальные ножи
- Некоррозионные ножи для криостата
- Ножи из карбида вольфрама
- Стекланные ножи
- Алмазные ножи
- Сапфировые ножи
- Керамические режущие лезвия

Классификация ножей по форме кромки (профиль) [20]:

- Профиль А: Сильно планово-вогнутый/биконический
- Профиль В: Планово-вогнутый
- Профиль С: Клиновидная форма
- Профиль D: Плоскость

Стальные ножи и некоррозийные ножи

Сменные стальные лезвия для микротомов изготавливаются из высококачественной нержавеющей стали. При установке в подходящий держатель ножа они обеспечивают получение высококачественных срезов. Стальные лезвия можно использовать для резки растительных, животных и человеческих тканей.

Стальные ножи для микротомов производятся из высококачественной углеродистой или инструментальной стали, которая подвергается термической обработке для упрочнения режущей кромки. Сталь должна быть устойчива к ржавчине, не содержать примесей и обладать антикоррозийными свойствами. Наилучшие результаты демонстрируют ножи, прошедшие полную закалку, в то время как ножи, закаленные только поверхностно, быстро теряют свою остроту после повторной заточки.

Некоррозионные ножи

Стальные ножи для микротомов производятся из высококачественной углеродистой или инструментальной стали, которая подвергается термической обработке для упрочнения режущей кромки. Сталь должна быть устойчива к ржавчине, не содержать примесей и обладать антикоррозийными свойствами. Наилучшие результаты демонстрируют ножи, прошедшие полную закалку. В основном используются в криостатах.

Лезвия из карбида вольфрама

Ножи изготавливают из композитного материала, состоящего из атомов вольфрама и углерода, которые соединены в кристаллическую структуру. Ножи из карбида вольфрама чрезвычайно твердые и износостойкие, но также хрупкие и требуют осторожного обращения. Ножи, изготовленные из качественного карбида вольфрама, в 100 раз превосходят по твердости закаленную инструментальную сталь. Их можно использовать для нарезки твердых материалов, таких как ткани, залитые в смолу. Важно отметить, что такие ножи могут обеспечить до 30 000 серийных срезов из некальцифицированной кости, помещенной в метакрилат. Карбид вольфрама обладает хорошей теплопроводностью, что способствует отводу тепла и предотвращает перегрев лезвия во время резки.

Стеклянные ножи

Стеклянные ножи можно использовать для нарезки материалов для световой микроскопии и создания очень тонких срезов для электронной микроскопии. Эти ножи требуют специальных держателей для использования с ротационным микротомом. Несмотря на свою твердость, стеклянные ножи - хрупкие и требуют осторожности при обращении; они могут разрушаться при неправильном хранении из-за изменения «текучести» стекла и окислительных процессов. Поэтому желательно подготавливать ножи непосредственно перед использованием.

Алмазные ножи

Алмазные ножи для микротомов предназначены для получения очень тонких срезов для световой и электронной микроскопии. Алмазные ножи изготавливаются из беспримесных бриллиантов и очень дороги, но благодаря своей высокой твердости они играют важную роль в резке очень тонких образцов. Используются для резки очень твердых тканей, таких как кость или зубы.

Сапфировые ножи

Сапфировые ножи изготавливаются из цельного куска искусственно выращенного монокристалла глинозема, полученного под контролем компьютера в специальных термических условиях. Эти ножи тверже карбида вольфрама и стекла, обеспечивая высокую стойкость режущей кромки для работы с различными материалами. Однако размер блока для сапфировых ножей ограничен 11 мм, что требует использования специального держателя. Сапфировые ножи можно использовать со всеми типами материалов.

Керамические режущие лезвия

Керамические лезвия — это режущие инструменты, изготовленные из современных керамических материалов, таких как диоксид циркония (циркония) или оксид алюминия (глинозем). Они известны своей высокой твердостью и износостойкостью, а также способностью долго сохранять острую режущую кромку.

Одним из главных преимуществ керамических лезвий является их способность резать твердые и абразивные материалы с минимальным износом самого лезвия. Они также устойчивы к коррозии и могут выдерживать высокие температуры, что делает их пригодными для использования в суровых условиях. Кроме того, керамические лезвия часто имеют малый вес и более низкий коэффициент теплового расширения по сравнению со стальными лезвиями, что может повысить точность резки.

Однако они, как правило, дороже стальных лезвий и могут быть более склонны к поломке в условиях грубой эксплуатации.

Фиксированные лезвия и сменные (одноразовые) лезвия

Одноразовые лезвия представляют собой очищенные и утолщенные бритвенные лезвия. Сменные (одноразовые) лезвия часто используются для общей микротомии и во многих случаях заменили собой традиционные ножи для микротомов. С качественными сменными лезвиями получают чрезвычайно острую кромку и безупречный срез.

Режущая кромка сменных лезвий может иметь хромовое или платиновое покрытие для увеличения срока службы и прочности. Например, тефлоновое покрытие обеспечивает минимальное трение и идеально подходит для использования в криостате.

Более мелкие и тонкие одноразовые лезвия быстрее достигают температуры камеры криостата, что минимизирует задержки при замене лезвий или регулировке температуры. Важно обеспечивать жесткое закрепление одноразовых лезвий в специальном держателе, чтобы предотвратить вибрацию во время процесса резания.

Сменные лезвия часто поставляются в прочном диспенсере и доступны с высоким или низким профилем для резки различных материалов, и их не нужно затачивать или обслуживать.

Но если необходимо нарезать чрезвычайно твердые материалы, такие как блоки смолы, лучше выбрать фиксированный нож из стекла или алмаза. При этом

необходимо учитывать, что фиксированные ножи требуют частой заточки и правки.

Ножи можно классифицировать по профилю режущей кромки:

Лезвия микротомы с высоким профилем длиннее и имеют большую высоту, чем лезвия с низким профилем, но могут иметь ту же длину, что и низкопрофильные лезвия. Они предназначены для резки толстых и плотных образцов тканей и идеально подходят для работы с твердыми, плотными или волокнистыми тканями, такими как кости, хрящи и кожа, а также для разрезания образцов замороженных тканей. Толщина срезов варьируется обычно от 4 до 15 мкм.

Низкопрофильные лезвия микротомы короче и имеют меньшую высоту. Они предназначены для резки более тонких и хрупких образцов тканей и идеально подходят для работы с мягкими или деликатными тканями, такими как мозг, печень и почки, а также для разрезания образцов тканей, залитых парафином. Их конструкция оптимизирована для получения тонких и ровных серийных срезов толщиной от 2 до 10 мкм.

По конфигурации лезвия различают четыре группы микротомных ножей, рисунок 15.

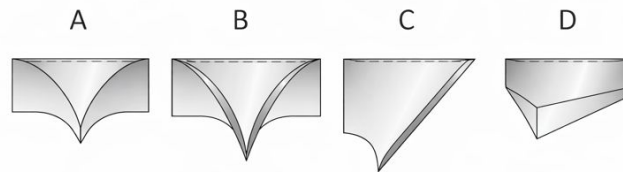


Рисунок 15 – профиль А (плоско-вогнутый), профиль В (двояковогнутый), профиль С (клиновидный) и профиль D (режущая кромка инструмента)

Профиль А: Плоско-вогнутый (стандартный).

Этот нож схож с профилем А, но имеет более толстую спинку. Он используется для резки материалов, которые слишком тверды для ножей профиля А, но также подходит для более мягких веществ, таких как парафин. Нож должен быть установлен под углом по отношению к разрезаемому материалу. Плавно-вогнутые ножи могут иметь разные степени вогнутости.

Профиль В: Сильно плоско-вогнутый/биконический (двояковогнутый).

Они характеризуются наличием одного или двух вогнутых (шлифованных с углублением) боковых поверхностей, что придает лезвию характерный профиль. Эти ножи очень острые и подходят для резки мягких, залитых материалов. Этот тип профиля чрезвычайно острый и подходит для резки мягких, залитых

материалов. Следует избегать резки твердых материалов таким ножом, так как это может вызвать вибрацию лезвия.

Основное преимущество - возможность заточки до исключительной остроты.

Основной недостаток - требуют регулярного обслуживания (заточка, правка), навыков для работы и менее устойчивы к вибрации при резке твердых материалов.

Особенности - самый острый из стальных ножей благодаря тонкой режущей кромке, формируемой при заточке.

Применение - идеально подходит для получения тончайших парафиновых срезов (2–7 мкм) мягких, гомогенных тканей (например, мозг, печень, почки).

Недостатки: Низкая жесткость: из-за глубокой вогнутости и тонкого обуха склонен к вибрации («дребезжанию»). Не для твердых материалов, категорически не подходит для резки плотных, фиброзных тканей, биопсийных капсул, замороженных или залитых в смолу образцов — легко выкрашивается и повреждается.

Сильно плоско-вогнутые и двояковогнутые ножи — это исторические артефакты высокого мастерства микротомии. Их использование сегодня крайне ограничено, в основном в некоторых специализированных или консервативных лабораториях, где ценится традиционный подход. В абсолютном большинстве современных гистологических лабораторий их полностью заменили стандартизированные сменные лезвия, которые обеспечивают лучшую воспроизводимость, скорость и удобство работы.

Профиль С: Клиновидная форма.

Клиновидные лезвия — это один из основных профилей как для сменных одноразовых лезвий, так и для фиксированных ножей. Лезвие представляет собой симметричный или асимметричный клин с прямыми гранями. Профиль: обе боковые поверхности лезвия прямые и сходятся под углом, образуя режущую кромку. В сечении напоминает равнобедренный или прямоугольный треугольник. Клиновидный нож обладает большей жесткостью, чем ножи профилей А и В и поэтому может использоваться для резки более твердых материалов. Из-за большой толщины клина на кончике этот тип ножа не может быть заточен так же остро, как ножи профилей А или В. Их можно использовать для резки материалов, залитых в парафин, замороженных срезов и образцов, залитых в некоторые виды смолы.

Это самый распространенный и универсальный профиль. Отсутствие вогнутости делает лезвие менее гибким и более предсказуемым при резке, что обеспечивает ровные последовательные срезы. Такие лезвия используются для выполнения косых срезов тканей.

Профиль D: Прямой / Инструментальный профиль (Plane Shaped / Tool Edge Shaped)

Ножи с инструментальным профилем более устойчивы, чем другие профили лезвий, но также являются наименее острыми. Такие ножи обычно используются

для резки твердых материалов, блоков синтетической смолы и крупных парафиновых блоков [18].

Режущая кромка всех стальных ножей производится путем шлифовки фаски на каждой стороне ножа для профилей - А, В и С, или на угловой поверхности ножа профиля D. Скошенные поверхности имеют более острый угол, чем основные поверхности ножа.

Микротомы также можно разделить на ручные, полуавтоматические и автоматические.

Работа на **ручном ротационном** микротоме позволяет детально наблюдать за каждым образцом. Полный контроль со стороны оператора даёт возможность оценивать точность среза каждый раз, когда поверхность ткани соприкасается с лезвием, что позволяет в реальном времени устранять такие дефекты, как сморщивание среза. При этом работа на ручных микротоме требует постоянного внимания, что в течение длительного времени может приводить к повышенной нагрузке на оператора.

Автоматизация процесса нарезки тканевых срезов позволяет проводить быструю настройку и юстировку, что позволяет гистопатологам обрабатывать больше образцов за меньшее время. Однако при работе с ручным микротомом поддержание одного и того же стандарта срезов постоянно в высокой степени зависит от навыков пользователя. Полуавтоматические и полностью автоматические микротомы могут поддерживать ручной режим работы.

Возможные причины появления артефактов микротомии:

1. Грубая предварительная обрезка парафинового блока для приближения к нужному уровню ткани. Перед забором серии диагностических срезов поверхность блока необходимо отполировать (выполнить "чистовую" обрезку). Первые 5-6 срезов после грубой обрезки содержат дефекты микротомирования и не должны использоваться. Особое внимание следует уделить самому первому тонкому срезу в новой серии. Из-за теплового расширения парафина от микротомного ножа его фактическая толщина превышает установленное на микротоме значение. Этот срез также рекомендуется отбраковывать. Для работы пригодны только срезы, взятые после последовательного удаления указанного начального слоя, что обеспечивает их оптимальную толщину, целостность и отсутствие технических артефактов.

2. Контаминация лезвия микротоме: на режущей кромке ножа могут находиться частицы инородного материала или имеются механические повреждения (зазубрины)

3. Недостаточная промывка образца: Остаточные кристаллы солей из фиксатора или буферного раствора, не удаленные на этапе промывки ткани перед проводкой, внедряются в блок и повреждают срез.

4. Механическая компрессия образца ножом на вырезке

5. Нарушение временного или температурного режима обработки ткани

6. Использование загрязненных или некондиционных реактивов (спиртов, ксилолов, парафина)
7. Неполное расправление срезов на поверхности водяной бани
8. Повышенная температура воды в водяной бане или чрезмерно длительная экспозиция среза в воде, вызывающая мацерацию ткани и отслоение клеток от стекла.
9. Избыточная обработка материала органическими растворителями (ксилол, спирты) на этапе проводки, приведшая к повышенной хрупкости ткани.
10. Работа с недостаточно прогретым парафиновым блоком, что может вызвать его излишнюю твердость и растрескивание.
11. Недостаточная фиксация узлов крепления в микротоме, а именно слабо затянутые зажимы ножа и держателя блока, а также неверно выставленный угол резания.
12. Превышение скорости подачи блока на лезвие, что не позволяет парафину и ткани срезаться равномерно и без деформаций
13. Чрезмерное сдавливание блока в зажиме микротоме
14. Неадекватный состав парафина.
15. Неидеальная форма блока, а именно противоположные грани залитого блока не являются строго параллельными.
16. Лезвие ножа заточено несимметрично, что приводит к неравномерной нагрузке на образец во время микротомирования.
17. Одна сторона блока теплее другой, например, из-за неравномерного нагрева или охлаждения.
18. Парафин на одной стороне блока может быть мягче, чем на другой, что связано с различиями в плотности или температуре плавления парафина, особенно, если материал был перезалит в парафин другой твердости.

Основные правила при микротомии.

Избегайте механических повреждений и обращайтесь с образцами бережно

Удаляйте ткань деликатно, чтобы избежать повреждения образца вследствие раздавливания или разрыва. обращайтесь с образцами деликатно, чтобы хрупкие структуры оставались неповрежденными. Грубое обращение (сдавливание пинцетом) вызывает механические артефакты, которые могут имитировать истинную структуру.

Тщательно отбирайте срезы

Перед забором серии диагностических срезов поверхность блока необходимо отполировать (выполнить "чистовую" обрезку). Первые 5-6 срезов после грубой обрезки содержат дефекты микротомирования и не должны использоваться. Особое внимание следует уделить самому первому тонкому срезу в новой серии.

Обеспечьте срочную фиксацию и предотвращайте высыхание образца

Фиксацию необходимо проводить немедленно. Если образец должен оставаться нефиксированным кратковременно (например, при транспортировке),

его следует хранить при температуре +4°C. Охлаждение замедляет аутолиз (самопереваривание) и рост бактерий, но не заменяет фиксацию. Промедление с фиксацией ведет к необратимой деградации тканей. Образец не должен высыхать до момента его фиксации. Если немедленная фиксация невозможна, для предотвращения десикации ткань следует обернуть стерильной марлей, смоченной в физиологическом растворе (0,9% NaCl). Размеры образца должны позволять быстрое проникновение фиксатива. Фиксатив проникает в ткань со скоростью ~1 мм/час. Образцы обрабатываются оперативно, особенно крупные, которые в противном случае могут оказаться неадекватно фиксированными. Перефиксация (более 24-48 часов в формалине для большинства тканей) так же вредна, как и недофиксация, что приводит к ухудшению качества срезов. Проявляйте осторожность, чтобы не травмировать delicate образцы, особенно те, которые еще не полностью зафиксированы. Неполностью фиксированная ткань особенно уязвима. Обращайтесь аккуратно, не сдавливайте, всегда используйте острые лезвия. Разрывы и сдавления острым или тупым инструментом создают неинтерпретируемые артефакты. Если образцы были не полностью фиксированы, в программу включается дополнительный этап фиксации в формалине.

Наилучшие результаты дает качественная фиксация с использованием контролируемых и постоянных условий (тип фиксатива, pH, температура, время). Это особенно критично для сохранения нуклеиновых кислот.

Избегайте термического повреждения

По возможности следует полностью избегать локального перегрева образца. Пинцет подогревается лишь до температуры, при которой парафин только начинает плавиться. Температура нагревательного столика и резервуаров с парафином на заливочном центре регулярно контролируется и калибруется.

Избегайте химического повреждения

Не допускайте контакта свежего (нефиксированного) материала с инородными химическими веществами, такими как дезинфицирующие растворы, антисептики для кожи или контрастные препараты.

Используйте достаточный объем фиксатива и подходящий контейнер

Используйте адекватный объем фиксатива в контейнере подходящего размера. Минимальное соотношение фиксатива к ткани — 20:1. Это предотвращает деформацию свежего образца и обеспечивает качественную фиксацию. Недостаток фиксатива приводит к плохому проникновению, неравномерной фиксации и артефактам в центре образца.

Контролируйте pH фиксатива

Фиксатив должен быть высокого качества и иметь оптимальный pH (для нейтрального забуференного формалина — около 7,0). Кислый фиксатив вызывает образование формалинового пигмента (темные гранулы в ткани) и ухудшает сохранность клеточных структур и нуклеиновых кислот.

Готовьте тонкие срезы

Всегда старайтесь готовить однородные, тонкие срезы из крупных образцов. Максимальная рекомендованная толщина — 3–4 мм, особенно для плотных тканей. Толстые куски фиксируются неравномерно, что приводит к плохому качеству заливки, микротомирования и окрашивания.

Избегайте перекрестной контаминации

Каждый образец обрабатывается на чистой поверхности (новое покрывное стекло, чистый стол, промытые инструменты), чтобы исключить возможность контаминации между образцами.

Не перегружайте кассеты

Кассеты никогда не перегружаются тканью. Между кусочками должно оставаться пространство, чтобы обеспечить свободную циркуляцию реагентов и парафина и предотвратить слипание и деформацию образцов.

Поддерживайте качество реагентов

Реагенты (спирты, ксилолы/заменители, парафин и т.д.) заменяются строго в соответствии с установленными нормами — по количеству проведенных образцов или отработанных часов. Учитывайте срок годности и стабильность используемых реагентов. Одни растворы (например, некоторые красители) медленно деградируют, другие (например, некоторые ферменты или восстановленные антитела) очень нестабильны и должны приготавливаться непосредственно перед использованием. Некоторые (например, старые партии гематоксилина) требуют времени для «созревания» (окисления) перед применением. Обеспечьте правильные условия хранения реагентов. Некоторые требуют холодильника из-за склонности к росту грибков и плесени. Другие светочувствительны и должны храниться в темноте.

Используйте высококачественный парафин

Для инфильтрации и, что особенно важно, для заливки блоков используется высококачественный парафин с определенной температурой плавления. Это гарантирует получение плотных, однородных блоков, которые легко режутся на микротоме.

Избегайте опасных реагентов, где это возможно

По возможности отдавайте предпочтение протоколам без использования ксилола (например, с применением менее токсичных заменителей, доступных в современных процессорах). Это создает более безопасную рабочую среду для персонала без ущерба для качества.

Тщательно ориентируйте образцы при заливке

Образцы аккуратно ориентируются в парафине требуемой стороной к будущему лезвию микротоме для обеспечения ровных поверхностей кусочков.

Выбирайте подходящую форму (молд) и не переполняйте формы

Для каждого образца всегда выбирается форма (молд) подходящего размера, чтобы избежать лишнего расхода парафина и обеспечить достаточную поддержку ткани. Формы заполняются парафином до оптимального уровня, не допуская переливов.

Бережное обращение с образцами

При переносе образцов из кассеты в форму необходимо чрезвычайно бережно с ними обращаться, чтобы не повредить хрупкие структуры.

Используйте высококачественные лезвия

Для нарезки срезов всегда используются только высококачественные, острые одноразовые лезвия или отточенные ножи.

Оптимизируйте угол наклона ножа

Угол наклона лезвия микротомы всегда оптимизируется и точно настраивается в соответствии с моделью микротомы, типом ножа и твердостью парафинового блока.

Избегайте повреждения от заморозки / Правильно охлаждайте блоки

Блоки охлаждаются для упрочнения парафина на холодной влажной поверхности. Идеальной считается поверхность тающего льда (+4 °С...0 °С). Не допускается использование сухого льда или сверхнизких температур, которые могут вызвать растрескивание блока и ткани. Резка срезов всегда выполняется, когда блок стабильно и равномерно охлажден. Это обеспечивает необходимую твердость парафина, предотвращает его «мазание» и смятие мягких тканей (например, жира), способствуя формированию ровных и несклеенных срезов.

Выполняйте резку медленно

Финальные, диагностические срезы из каждого блока выполняются плавно, с равномерным и медленным вращением маховика микротомы. Быстрое или рывкообразное движение — основная причина смятия, сдавливания среза.

Используйте чистую воду и избегайте контаминации

Вода в ванночке для расплавления срезов (флотации) регулярно заменяется на свежую дистиллированную или деионизированную воду для предотвращения накопления примесей, бактерий и частиц парафина. Поверхность воды в ванночке всегда очищается (например, чистым стеклом или салфеткой) между расплавлением срезов из разных образцов, чтобы избежать переноса клеток или тканевых фрагментов с одного среза на другой. Не прикасайтесь к волосам или лицу во время работы с ванночкой, чтобы чешуйки кожи не попали на поверхность воды и не прилипли к срезу.

Убедитесь в чистоте предметных стекол

Чистота предметных стекол всегда проверяется перед использованием. Стекло должно быть обезжиренным и не иметь царапин. Необходимо избегать контаминации стекол клетками кожи до контакта со срезом.

Не расплавливайте срезы из нескольких блоков одновременно

Срезы из более чем одного блока никогда не расплавляются на водяной бане одновременно. Это строгое правило предотвращает катастрофическую ошибку в виде перекрестной контаминации.

Контролируйте температуру воды и продолжительность нахождения в ней срезов

Температура воды в ванночке тщательно контролируется. Оптимальная температура — на 4–5 °С ниже температуры плавления используемого парафина. При такой температуре срезы должны легко расправляться, но парафин не должен плавиться. Срезы остаются на водяной бане ровно столько времени, сколько необходимо для их полного расправления, после чего немедленно переносятся на стекло. Длительное пребывание в горячей воде вызывает мацерацию ткани и отслоение клеток от стекла.

Избегайте складок на срезах и не повреждайте срезы при расправлении

Срезы должны равномерно и полностью расправляться на поверхности водяной бани, без складок и заломов, которые после высыхания станут артефактами. При механическом удалении складок кисточкой или пинцетом проявляется особая осторожность, чтобы не порвать и не деформировать нежный срез.

Предотвращайте образование пузырей под срезом

Следите, чтобы под срезом не оставалось воздушных пузырей. Все видимые пузыри на поверхности воды удаляются до укладки среза. Пузырь создаст артефакт в виде неокрашенного участка.

Предотвращайте отслоение срезов

Для проблемных тканей (жир, кость, мозг) используются **специальные стекла с адгезивным покрытием** или добавление **адгезивов в водяную баню** (например, альбумина, желатина, коммерческих составов вроде AAS).

Дайте стечь воде перед сушкой

После переноса на стекло излишкам воды под срезом дают стечь наклоняя стекло, прежде чем поместить его в сушильный шкаф или на горячую плитку. Это уменьшает риск образования пузырей при нагреве.

Контролируйте температуру и продолжительность сушки

Температура в сушильном шкафу или на горячей плитке тщательно отслеживается и поддерживается в оптимальном диапазоне (обычно 55–65°С). Перегрев приводит к «запеканию» ткани, ее потемнению и ухудшению последующего окрашивания.

Контролируется как минимальное, так и максимальное время сушки стекол. Недостаточная сушка приведет к отслоению срезов при окрашивании. Избыточная сушка делает ткань хрупкой и ухудшает восприятие красителей.

Стандартизируйте условия окрашивания

Для всех этапов оптимизируются и строго соблюдаются условия: интенсивность перемешивания растворов, длительность и эффективность промывок, время стекания. Каждый этап протокола окрашивания (депарафинизация, гидратация, окраска гематоксилином и эозином, дифференцировка, обезвоживание) выполняется с точным соблюдением временных интервалов. Это предотвращает появление пятен и неравномерности окраски.

Обеспечьте полное депарафинирование

Процесс удаления парафина со стекол (депарафинизация) тщательно оптимизируется. Неполное удаление парафина блокирует доступ красителей к ткани, приводя к бледным, неконтрастным и непригодным для диагностики препаратам.

Полностью гидратируйте срезы

Перед окраской гематоксилином срезы должны быть тщательно гидратированы путем прохождения через нисходящую градацию спиртами (например, 100% → 96% → 80% → вода). Пропуск или сокращение этого этапа ухудшит смачиваемость ткани и приведет к неравномерному окрашиванию.

Обеспечьте полное «посинение» ядер

После окраски гематоксилином и промывки всегда проводится тщательное «посинение» ядер в подщелоченной воде (раствор Скотта, аммиачная вода или буферный раствор). Этот этап превращает гематеин (красный) в окончательный синий цвет и критически зависит от pH. Необходимость и длительность этапа определяются щелочностью местной водопроводной воды.

Избегайте неравномерного окрашивания эозином

После «посинения» следует очень тщательная промывка в проточной водопроводной воде для полного удаления остаточной щелочи. Оставшаяся щелочь нейтрализует кислый эозин, что приводит к слабому, бледному и неравномерному окрашиванию цитоплазмы. pH эозинового раствора контролируется и поддерживается близким к 5.0, что является оптимумом для контрастного окрашивания цитоплазмы. Для оперативного снижения pH (если раствор стал слишком щелочным) можно использовать добавление нескольких капель уксусной кислоты.

Полностью обезвоживайте образцы

Перед помещением в ксилол (или его заменитель) для очистки срезы должны быть тщательно и полностью обезвожены путем прохождения через восходящую градацию спиртов (например, 80% → 96% → 100% → 100%). Наличие даже следов воды в ткани на этом этапе приведет к: мутности препарата: вода, смешиваясь с ксилолом и средой, создает опалесцирующую эмульсию, которая резко ухудшает прозрачность и четкость изображения под микроскопом; непрочному закреплению покровного стекла: влага препятствует полимеризации многих сред; появлению артефактов при длительном хранении.

Избегайте высыхания среза и образования кристаллов

Покровное стекло наносится немедленно после извлечения стекла из последней ванны с ксилолом, до того, как срез начнет подсыхать. Даже кратковременное высыхание приводит к появлению воздушных артефактов, необратимой потере прозрачности ткани и может затруднить диагностику.

Применяется только высококачественная и проверенная среда, отвечающая требованиям: оптическая прозрачность и совместимость с иммерсионным маслом; стойкость к выцветанию (не желтеет со временем); стабильность при хранении. В

противном случае это приведет к образованию кристаллов внутри препарата. Эти кристаллы могут появиться спустя месяцы или даже годы.

Понимайте суть метода

Четко понимайте, какую именно структуру или вещество вы пытаетесь выявить с помощью выполняемого окрашивания

Строго следуйте методу и фиксируйте любые отклонения

Точно следуйте утвержденному протоколу без самовольных изменений. Документируйте любое отклонение от стандартного метода, которое было применено в конкретном случае.

Правильно настраивайте микроскоп

Контролируйте настройки микроскопа, так как неправильные настройки конденсора и диафрагмы могут создавать ложное впечатление о фоновом окрашивании.

Избегайте проблем с адгезией срезов

Избегайте использования **адгезивов на белковой основе** (клей, крахмал, желатин) в ванночке для расправления срезов, особенно при работе со стеклами с адгезивным покрытием, так как это может приводить к неспецифическому окрашиванию.

Избегайте градиентов концентрации

Избегайте образования градиентов концентрации реагентов на поверхности среза за счет их аккуратного и равномерного нанесения.

Тщательно выбирайте антитело и изучайте технические паспорта

Тщательно выбирайте первичное антитело, учитывая его чувствительность и специфичность. Помните, что антитела от разных поставщиков часто имеют одно и то же происхождение и просто переупаковываются. Всегда проверяйте технический паспорт, чтобы определить пригодность вашего метода для конкретного антитела. Паспорта должны обновляться при покупке новой партии антител.

Учитывайте возможную перекрестную реактивность антител

Имейте в виду потенциальные проблемы перекрестной реактивности антител с похожими эпитопами в других, нецелевых белках.

Блокируйте эндогенную пероксидазу

При использовании систем детекции на основе пероксидазы (HRP) всегда применяйте этап блокирования эндогенной пероксидазы в ткани (например, перекисью водорода). Это предотвращает ложноположительное окрашивание, особенно в тканях, богатых миелоидными клетками или эритроцитами.

Предотвращайте фоновое окрашивание

Всегда используйте соответствующий блокирующий раствор (например, нормальную сыворотку животного-хозяина вторичного антитела или коммерческие белковые блоки) для минимизации неспецифического связывания антител с тканью и снижения фонового сигнала.

Используйте подходящую систему детекции

Выбирайте оптимальную систему детекции (например, полимерную, авидин-биотиную), которая обеспечит точное, специфичное окрашивание с адекватной чувствительностью для конкретной цели и антитела, избегая как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов.

Стандартизируйте этапы промывки

Используйте стандартизированные этапы промывки на протяжении всего протокола (строгое соблюдение длительности, объема и способа перемешивания буфера). Это ключевое условие для воспроизводимости и стабильности результатов от эксперимента к эксперименту.

Оптимизируйте контрастирующее окрашивание

Интенсивность ядерного контрастирующего окрашивания (чаще всего гематоксилином) тщательно регулируется и стандартизируется, чтобы оно не маскировало специфическое положительное окрашивание хромогеном. Контрастное окрашивание должно обеспечивать максимальный визуальный контраст между хромогеном и элементами фона ткани. Выбор контрастного красителя (например, гематоксилин, метиловый зеленый) должен соответствовать используемому хромогену (DAB — коричневый, Fast Red — красный и т.д.).

Используйте соответствующие контроли

Всегда используйте соответствующие положительные и отрицательные контроли, которые необходимо тщательно исследовать для валидации результатов. Также крайне важны внутренние тканевые контроли (клетки в том же срезе, заведомо экспрессирующие или не экспрессирующие целевой антиген). Они служат отличным инструментом внутреннего контроля качества (QA) иммуногистохимической реакции.

Тщательно оценивайте результаты

Четко знайте, что именно и где искать при оценке окрашенных тестовых срезов и контрольных препаратов. Оценка должна включать анализ локализации окрашивания (ядерная, цитоплазматическая, мембранная), его интенсивности и распределения, а также сравнение с контролями.

Вопросы для контроля освоения теоретических основ лабораторного практикума:

1. Какие основные типы микротомов применяются в современной гистологии?
2. В чем особенности конструкции качающегося микротом?
3. Для каких целей используется ротационный микротом?
4. Чем отличается замораживающий микротом от парафинового?
5. В каких случаях применяют ультрамикротом?
6. Какие преимущества имеют автоматические микротомы?
7. Как выбор типа микротомов зависит от метода исследования?

2. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Микротомы — это инструмент, используемый для приготовления очень тонких срезов тканей для микроскопического исследования. Они могут управляться вручную, полуавтоматически или автоматически. Для получения используют очень острые лезвия, и их использование сопряжено с рядом потенциальных опасностей. Перед началом любой работы с микротомами в лаборатории необходимо провести оценку местных рисков и создать стандартные операционные процедуры и правила для работы:

- 1) Прочтите и соблюдайте все предоставленные инструкции по безопасному использованию и техническому обслуживанию оборудования.
- 2) Носите необходимые средства индивидуальной защиты.
- 3) Эксплуатируйте и обслуживайте все микротомы в соответствии с изложенной процедурой безопасности и лабораторным протоколом.
- 4) Сообщайте о любых причинах беспокойства или проблемах при работе с оборудованием ответственному оператору лаборатории или руководителю.
- 5) Немедленно сообщайте своему руководителю о любых несчастных случаях (травмах, разливах) или инцидентах, угрожающих жизни.
- 6) Лабораторные халаты должны быть с длинными рукавами и до колен.
- 7) Необходимы длинные брюки или юбка (все ноги должны быть закрыты)
- 8) Обувь должна быть с закрытым носком и пяткой, на низком каблуке (или без каблука) и с нескользящей подошвой. Восковая стружка может сделать пол вокруг микротомов очень скользким, поэтому используйте одноразовые нескользящие бахилы, предназначенные для микротомов.
- 9) При работе необходимо использовать перчатки: нитриловые/латексные лабораторные перчатки для работы с образцами, универсальные перчатки, устойчивые к порезам перчатки для работы с лезвиями, и изолированные рабочие перчатки для работы с замерзающими материалами.
- 10) Если существует возможность попадания брызг в глаза или разлетающихся обломков, при работе с жидким азотом, могут потребоваться защитные очки или лицевой щиток.
- 11) При работе с инфицированными материалами или токсинами, которые могут не быть инактивированы фиксацией, следует надевать средства защиты органов дыхания.
- 12) Осторожно снимайте СИЗ, чтобы свести к минимуму возможное загрязнение их кожи, волос или одежды при выходе из лаборатории.
- 13) Одежда и средства индивидуальной защиты, которые могут быть заражены, должны быть обеззаражены перед стиркой.

При работе с лезвиями соблюдайте следующие меры безопасности.

- 1) Перед использованием необходимо осмотреть микротомы и сообщить о любых повреждениях. Поврежденные устройства использовать НЕЛЬЗЯ.

2) При установке или снятии лезвий необходимо соблюдать осторожность. Всегда носите лезвия в футляре. Никогда не оставляйте лезвия на столе или без присмотра.

3) Во время установки сначала поместите образец, а затем вставьте лезвие, и никогда наоборот.

4) Держите руки подальше от движущихся частей, используйте щипцы или иглу и кисть для подъема лент срезов тканей или отдельных срезов.

5) Перед размещением образца убедитесь, что защитный кожух ножа находится в нужном положении, а маховик микротомы заблокирован.

6) Не чистите лезвие ножа, когда оно установлено в микротоме, за исключением использования щетки с длинной ручкой.

7) При использовании многоразовых лезвий надевайте стойкие к порезам перчатки при снятии лезвия для заточки или чистки.

8) При чистке лезвия ножа используйте салфетку, вытирая его от края

Снижение эргономической нагрузки:

- Обеспечьте достаточное рабочее пространство вокруг микротомы.
- Храните расходные материалы в пределах легкой досягаемости
- Расположите стул на нужной высоте по отношению к рабочему столу.
- Стопы должны стоять на полу.
- Необходимо использовать стулья с поясничной поддержкой
- Делайте регулярные перерывы, чтобы размяться и подвигаться (рекомендуется каждые 20 минут).

О любом несчастном случае, повлекшем за собой травмы, необходимо сообщить ответственному работнику лаборатории.

Размещение лезвия

• Обратите особое внимание на то, что лезвие микротомы очень острое и требует осторожного обращения.

• Всегда устанавливайте поворотную рукоятку микротомы в заблокированное положение при замене парафинового блока или лезвия.

• Поместите новое лезвие в держатель лезвия и зафиксируйте его до того, как замок поворотного колеса освободится.

• После того, как лезвие установлено и закреплено, блокировку поворотного колеса можно снять, а нож и держатель передвинуть к блоку образцов. Удалите лезвие из корпуса, если образец нуждается в регулировке.

Удаление лезвия

• Одноразовые лезвия всегда следует извлекать с помощью щипцов или подобного инструмента и помещать непосредственно в контейнер для утилизации острых предметов.

• Не снимайте держатель лезвия с микротомы при наличии лезвия и не транспортируйте корпус с лезвием.

- Если лезвия многоразового использования, при снятии лезвия для заточки или чистки необходимо надевать стойкие к порезам перчатки.

Очистка микротома

- Перед очисткой поворотный механизм необходимо заблокировать, а лезвие вынуть из держателя. Убедитесь, что замок правильно зафиксирован.

- Всегда надевайте перчатки при очистке микротома.

- Используйте дезинфицирующее средство, эффективное против возможных инфекционных агентов. Если вы используете 10% отбеливатель, обязательно промойте его водой, чтобы избежать коррозии оборудования.

РАЗДЕЛ 1 ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОТОМНЫХ СРЕЗОВ

Лабораторная работа №1

ОЦЕНКА СВЕЖЕСТИ МЯСА И ЕГО МИКРОСТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель работы: оценить микроструктурные характеристики мяса различных видов и его свежесть с помощью гистологического исследования.

1. Материалы и оборудование

-Предварительно фиксированные в формалине, обработанные в сменных растворах изопропанола и уплотненные в парафине согласно схеме лабораторной работы (табл. 1) кусочки мяса определенной видовой принадлежности размером 15x15x5 мм – 2 шт;

-Микротом санный Орион Медик с набором микротомных ножей и адаптером одноразовых лезвий, рисунок 16;

-Заливочные кольца для заливки в парафин;

-Заливочные формы из нержавеющей стали для заливки в парафин;

-Кисти для чистки микротома;

-Термостат на 60°C.

-Морозильная камера.

-Нож по ГОСТ 21240-89 «Ножи медицинские. Общие технические условия».

-Термометры жидкостные стеклянные по ГОСТ 28498-90 «Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний».

-Пинцеты медицинские по ГОСТ 21241-89 «Пинцеты медицинские. Общие технические условия».

-Стекла предметные для микропрепаратов со шлифованным краем и матовой полосой по ГОСТ 9284-75 «Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия».

-Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672-75 «Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия».

-Стаканы термостойкие для водяной бани.

-Баня водяная.

-Бумага фильтровальная.

-Стеклянные палочки.

-Прямоугольная пластиковая емкость (либо одноразовая посуда прямоугольной формы) для расправления микротомных срезов – 5-10шт;

-Комплект для окрашивания предметных стекол: стеклянная емкость 210 мл (108 x 105 x 55 мм) и корзина на 20 стекол;

-Штатив-бокс на 25 предметных стекол

2. Реактивы

1. Реактив для фиксации образцов - 10% забуференный формалин;
2. Реактив для проводки образцов - Изопропанол плюс;
3. Парафин для заливки и проводки образцов с температурой плавления 56-58°C;
4. Растворитель парафина спрей для чистки микротомов;
5. Масло для смазывания подвижных частей микротомов;
6. Желатиновый адгезив для стекол, набор 3x18 мл с кистью;
7. Вода дистиллированная

3. Теоретические положения

За последние годы на российском рынке существенно расширился ассортимент мясной продукции, а объемы ее реализации заметно увеличились. Мясо остается товаром устойчивого спроса, при этом потребителю все сложнее ориентироваться в большом разнообразии представленных видов и выбирать действительно качественный продукт. Если раньше мясо было менее доступным и чаще употреблялось в переработанном виде, преимущественно в составе варёных колбас, то в настоящее время покупателю предлагается широкий выбор натурального мясного сырья.

Расширение ассортимента и рост конкуренции создают предпосылки для недобросовестных действий со стороны отдельных поставщиков. В целях увеличения объемов реализации или снижения себестоимости продукции могут применяться различные способы фальсификации, включая искусственное увеличение массы мяса за счет добавления воды, крови, воздуха и других посторонних компонентов. Существенной проблемой остается отсутствие возможности проведения комплексной и оперативной экспертизы всего мяса, поступающего на рынки Российской Федерации.

В процессе проведения экспертизы решаются, как правило, две основные задачи: установление видовой принадлежности мяса и выявление фактов его фальсификации. Под фальсификацией понимаются умышленные действия, направленные на введение покупателя или потребителя в заблуждение путём подделки или подмены товара с целью получения материальной выгоды.

Мясо представляет собой пищевой продукт, основу которого составляет мышечная ткань теплокровных травоядных животных и птицы, прошедший установленную технологическую обработку и ветеринарное клеймение. Мясо хищных животных и хищных птиц в пищу, как правило, не используется. Идентификация мяса осуществляется по ряду признаков, включая вид животного, пол, возраст, степень упитанности и термическое состояние.

В ходе идентификационных исследований нередко выявляются случаи ассортиментной фальсификации. Наиболее распространённой формой подмены является замещение более ценных видов мясного сырья менее ценными. Так, говядина может заменяться кониной, оленина — бараниной, свинина — мясом собак, мясо зайца — мясом кошки и другими аналогичными вариантами. В

отдельных случаях подобная подмена легко обнаруживается, однако нередко выявление фальсификации представляет значительную сложность.

Если исследуемое мясо представлено в виде туш или крупных кусков, содержащих элементы скелета, определение его происхождения возможно на основе сравнительно-анатомических особенностей костей. Такой подход позволяет достаточно быстро и достоверно установить видовую принадлежность. Вместе с тем на практике подмена мяса чаще осуществляется более скрытно — в измельченном виде или в составе мясных продуктов, где вероятность обнаружения значительно ниже. Например, добавление 5–15 % конины в фарш говяжьих колбас может остаться незамеченным. Практика показывает, что особенно часто подобные приемы используются при производстве дешевых сортов колбас, в том числе копченых.

Следует отметить, что замена мяса одного вида другим, как правило, не представляет серьезной опасности для здоровья человека, поскольку ядовитых видов мяса среди сельскохозяйственных животных не существует. Однако такая подмена является обманом потребителя, поскольку информация о составе продукта не доводится до его сведения. Кроме того, у значительной части населения употребление мяса некоторых животных вызывает отрицательное отношение по этическим и культурным причинам.

В связи с этим разработке методов выявления фальсификации мяса давно уделяется внимание специалистов в области химии, медицины и ветеринарии. В настоящее время предложено множество способов распознавания мяса различных животных. Однако практика показывает, что часть из них характеризуется нестабильными результатами, другие требуют применения дорогостоящего оборудования, а некоторые, несмотря на относительную простоту, имеют ограниченную область применения.

К числу основных признаков, используемых для определения видовой принадлежности мяса, относятся анатомические особенности костей и внутренних органов, физико-химические характеристики мышечной и жировой тканей, содержание гликогена, а также серологические методы, в частности реакция преципитации. Наиболее достоверные результаты достигаются при использовании сравнительно-анатомического анализа, основанного на различиях в строении скелета и органов у разных видов животных. Однако данный метод применим не во всех случаях, поскольку эксперту не всегда предоставляются органы и крупные фрагменты мяса, содержащие неповрежденные кости. Кроме того, такие показатели, как цвет и структура мышечной ткани, существенно зависят от пола, возраста и степени упитанности животного.

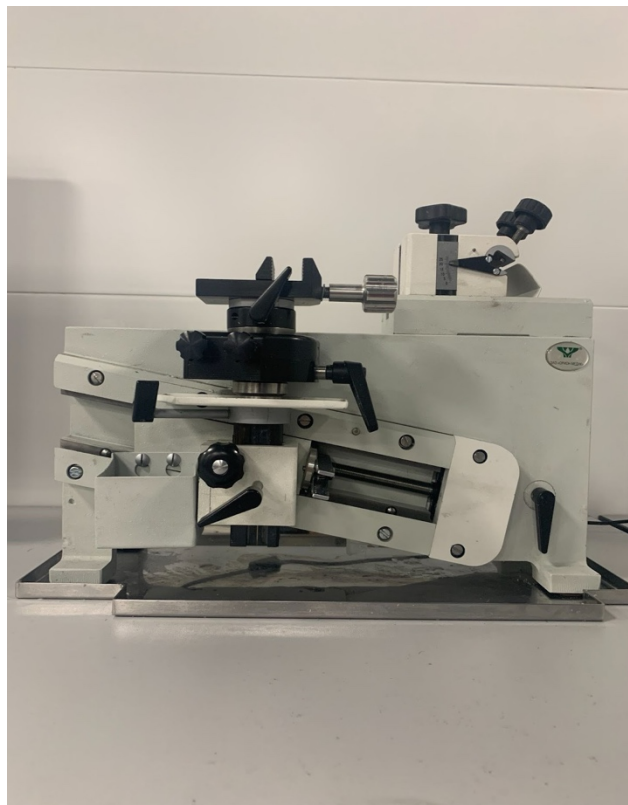


Рисунок 16 – Микротом санный Орион Медик с набором микротомных ножей и адаптером одноразовых лезвий

Таблица 1 – Схема лабораторной работы

Этап	Описание	Срок исполнения
Фиксация образцов мяса размером 15x15x5 мм	формалин 10 % 24 ч промывание в проточной воде 0,5 ч	Выполняется за несколько дней до начала работы. Образец помещается в стеклянную баночку с закрывающейся крышкой. В баночку заливается соответствующая этапу среда.
Проводка образцов в сменных растворах спирта	изопропанол I 1 ч комн. Изопропанол II 1 ч комн. Изопропанол III 1ч комн. Изопропанол IV 1ч комн. Изопропанол от 1,5ч комн. последний час 37°C	
Проводка образцов в парафин	Парафин I 56-58 °C 1ч термостат Парафин II 56-58 °C 1ч Парафин III 56-58 °C 1ч	
Заливка образцов в парафин	Пинцетом поместить образец на дно формочки из нержавеющей стали, залить формочку на 2/3 расплавленным при 60°C парафином, прижать сверху заливочным кольцом	На занятии I

Быстрое охлаждение парафинового блока	В морозильной камере	На занятии I
Приготовление срезов на санном микротоме	Установить блок в объектодержатель микротомы, угол наклона лезвия микротомы 10°; толщина срезов 15-16 мкм	На занятии I
Перенос срезов в пластиковую емкость для расправления	Полученные срезы снимают кисточкой, смоченной в воде, и помещают в емкость с дистиллированной водой	На занятии I
Перенос срезов на предметное стекло	Предварительно на предметное стекло наносится желатиновый адгезив. После расправления срезы аккуратно переносятся на предметное стекло и прижимаются к стеклу фильтровальной бумагой	На занятии I
Высушивание предметных стекол	В вертикальном положении для стекания воды на специальных штативах	На занятии I
Депарафинизация срезов	Высушенное предметное стекло поместить в чашку Петри и с помощью стеклянной палочки наносить на срез соответствующую этапу среду. Ксилол I – 7 мин Ксилол II – 7 мин	На занятии II
Регидратация срезов	Фильтровальная бумага Этанол 95° I - 5 мин. Этанол 95° II - 5 мин. Дистиллированная вода – 3 мин. Фильтровальная бумага	На занятии II
Окрашивание срезов	Раствор гематоксилина – 1-3 мин. Проточная вода – 5-10 мин. Раствор эозина – 10 с – 5 мин Дистиллированная вода – 1 мин.	На занятии II
Дегидратация и просветление	Этанол 95° Фильтровальная бумага Ксилол больше 10 мин	На занятии II
Заключение срезов в синтетическую среду	Капнуть монтирующую среду для стекол на орто-ксилольной основе и накрыть срез покровным стеклом	На занятии II

РАЗДЕЛ II. ОКРАШИВАНИЕ И МИКРОСКОПИРОВАНИЕ СРЕЗОВ

Лабораторная работа №2

ОЦЕНКА СВЕЖЕСТИ МЯСА И ЕГО МИКРОСТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

1. Материалы и оборудование

- Микротом санный Орион Медик с набором микротомных ножей и адаптером одноразовых лезвий, рисунок 16;
- Микроскоп биологический световой в комплекте с осветителем или отдельно – 3 шт;
- Окуляр-микрометр, 10 мм/100 делений, диаметром 20,4 мм.
- Объект-микрометр типа ОМО с ценой деления 0,01 мм.
- Пинцеты медицинские по ГОСТ 21241-89 «Пинцеты медицинские. Общие технические условия».
- Стекла предметные для микропрепаратов со шлифованным краем и матовой полосой по ГОСТ 9284-75 «Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия».
- Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672-75 «Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия».
- Бумага фильтровальная.
- Стеклянные палочки
- Чашки Петри.
- Комплект для окрашивания предметных стекол: стеклянная емкость 210 мл (108 x 105 x 55 мм) и корзина на 20 стекол;
- Штатив-бокс на 25 предметных стекол

2. Реактивы

1. Орто-ксилол ХЧ;
2. Этанол 95%;
3. Краситель гематоксилин Эрлиха;
4. Краситель эозин водно-спиртовой;
5. Вода дистиллированная;
6. Монтирующая среда для стекол на орто-ксилольной основе.
7. Иммерсионное масло для световой микроскопии.

3.Ход работы

Отобранные образцы перед исследованием подвергают обработке в следующей последовательности: фиксация, промывка проточной водой, уплотнение образцов, изготовление срезов, окраска срезов, заключение срезов под покровное стекло.

Фиксация образцов. Отобранные образцы с этикетками помещают в раствор формалина с массовой долей формальдегида 10 %, взятый в

десятикратном объеме к объему фиксируемых образцов, и плотно укупоривают. Время фиксации при температуре $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$ составляет 24 ч. Понижение температуры фиксации на $10 ^\circ\text{C}$ увеличивает продолжительность фиксации в два раза. Образец, фиксированный в достаточной степени, должен быть равномерно уплотненным и иметь одинаковый вид как на внешней поверхности, так и на свежем разрезе. Фиксированные образцы хранят при температуре $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в плотно закрытой посуде в растворе формалина с массовой долей формальдегида 10 % в течение трех лет.

Промывка образцов. Зафиксированные образцы помещают в колбу или стакан по ГОСТ 25336 и через вставленную стеклянную воронку промывают холодной проточной водой в течение 15 мин (рисунок 17).

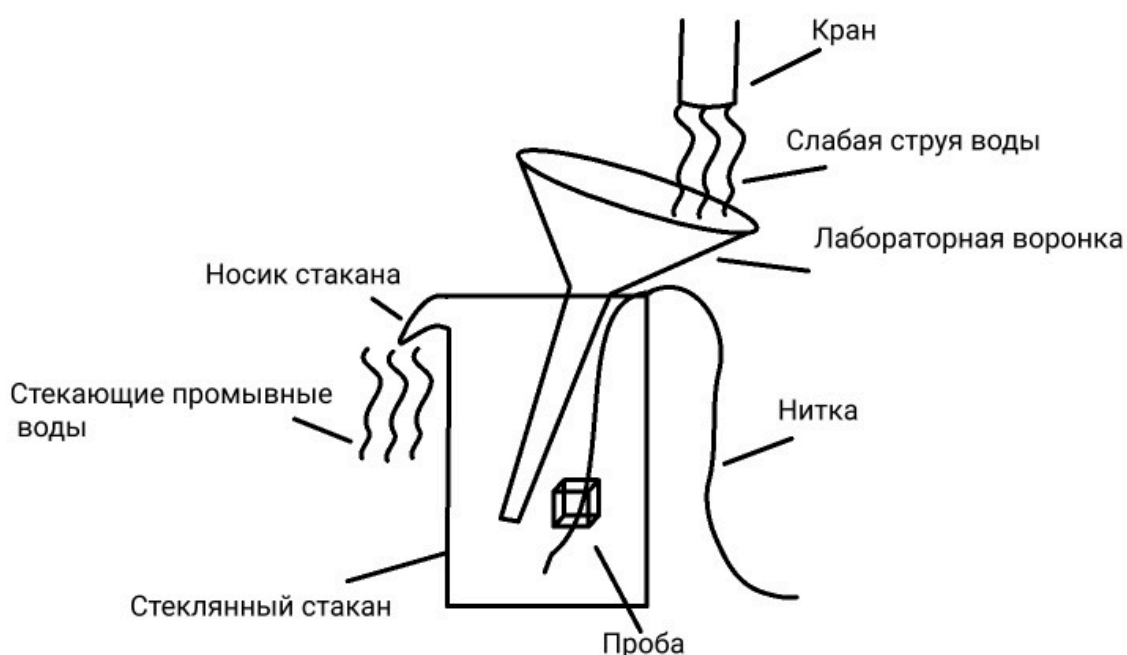


Рисунок 17 – Особенности промывки пробы

Проводка образцов в сменных растворах спирта. Проводку образца выполняют в сменных растворах изопропанола 4 раза по 1 ч при комнатной температуре и один раз в течение 1,5 ч при 37°C . Проводку образца в парафин выполняют 3 раза по 1 ч при температуре парафина $56-58^\circ\text{C}$. Затем образец помещают на дно формочки из нержавеющей стали, заливают на $2/3$ расплавленным при 60°C парафином (рисунок 18), прижимают заливочным кольцом и охлаждают в морозильной камере.



Рисунок 18 – Тримминг парафинового блока

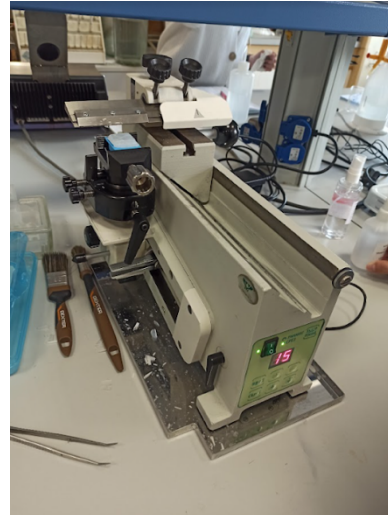


Рисунок 19 – Резка пробы на микротоме

Изготовление срезов. Парафиновый блок с образцом устанавливают в объектодержатель микротоме, устанавливают угол наклона лезвия 10° . Проводят тримминг парафинового блока с толщиной среза 30 мкм, затем выполняют срезы толщиной 15-16 мкм (рисунок 19).

Полученный срез снимают кисточкой, смоченной в дистиллированной воде, и помещают в емкость с дистиллированной водой. На предметное стекло наносят желатиновый адгезив. Срез после расплавления переносят на предметное стекло и прижимают фильтровальной бумагой. Предметное стекло со срезом сушат на штативе в вертикальном положении.

Срез извлекают из воды на середину стекла, удерживая его там препаровальной иглой. Срез должен быть неповрежденным (рисунок 20).



Рисунок 20 – Извлечение среза на предметное стекло с помощью кисточки

Окрашивание срезов гематоксилин-эозином (общая окраска).

Предметное стекло со срезом помещают в чашку Петри и выполняют депарафинизацию среза. Стеклопалочкой наносят на срез ксилол 2 раза по 7 минут, затем прижимают фильтровальной бумагой. Для регидратации среза на него наносят 95% этанол 2 раза по 5 минут, промывают дистиллированной водой 3 минуты и прижимают фильтровальной бумагой. Срез окрашивают раствором гематоксилина в течение 3 минут, промывают проточной водой 5-10 минут. Затем окрашивают раствором эозина не более 5 минут, промывают дистиллированной водой 1 минуту. Для дегидратации и просветления на срез наносят 95% этанол, прижимают фильтровальной бумагой, затем наносят ксилол и выдерживают около 10 минут. После этого на срез наносят монтирующую среду на орто-ксилольной основе (гистогель) и накрывают покровным стеклом.

Результаты окраски: в животных тканях ядра клеток - темно-синие, цитоплазма принимает красные тона различной интенсивности и оттенка. В растительных тканях выделяются клеточные оболочки, цитоплазма светлая.

На данном изображении видна выраженная структура мяса с равномерной окраской (рисунок 21)

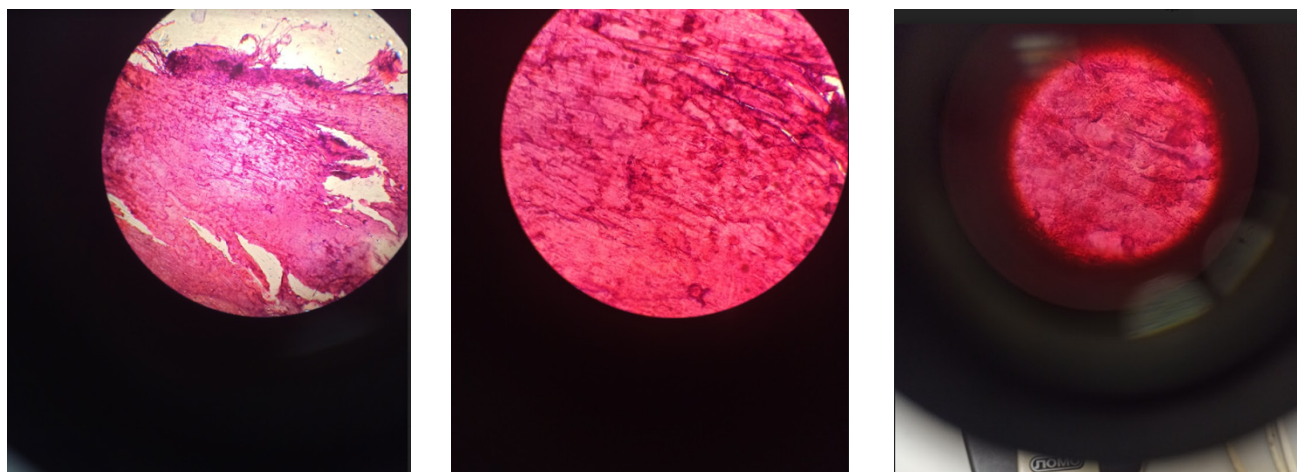


Рисунок 21 – Слева направо: при 40-кратном увеличении; при 60-кратном увеличении; при 100-кратном увеличении

4. Проведение исследования и обработка результатов

Приготовленные гистологические препараты рассматривают под любым световым микроскопом проходящего света.

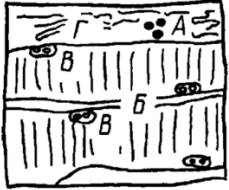
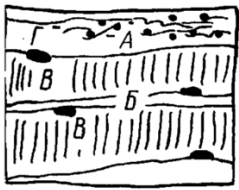
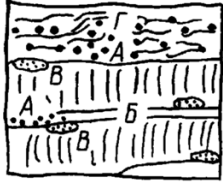
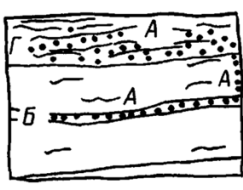
Сначала используют обзорный план-объектив - 10-кратный или меньше, а затем объективы с увеличением - до 40-кратного. Окуляры применяют с 10- или 16-кратным увеличением.

Для получения достоверных результатов необходимо исследовать не менее двух срезов с каждого из трех кусочков, отобранных от каждого образца.

Степень свежести мяса определяют по показателям, указанным в таблице 2.

Таблица 2 – Определение степени свежести мяса

Наименование показателя	Микроструктурная характеристика мяса			
	Свежего	Свежего, не подлежащего длительному хранению	Сомнительной свежести	Несвежего
Состояние структуры ядер мышечных волокон	Структура четко выражена, окраска хорошая, равномерная	Структура неразличима. Изменение ядер может распространиться на глубину до 3 мм от поверхности мяса, окраска хорошая равномерная	Ядра в состоянии распада растворения, их окраска неравномерная, слабая, тневидная	Почти полное исчезновение ядер, окраска отсутствует или едва различима
Состояние поперечной и продольной исчерченности мышечных волокон	Исчерченность мышечных волокон ясно и четко выражена, окраска хорошая, равномерная	Исчерченность мышечных волокон ясно и четко выражена, окраска хорошая, равномерная	Исчерченность мышечных волокон слабо различима. Изменение мышечных волокон распространяется на глубину до 15 мм от поверхности мяса. Окраска ослаблена и неравномерная. Ослизненные участки поверхности мяса принимают темнофиолетовую окраску (базофильную)	Полное исчезновение исчерченности мышечных волокон. Изменение мышечных волокон распространяется на глубину до 30 мм и больше от поверхности мяса. Окраска отсутствует или едва различима. Поверхность мяса принимает темнофиолетовую окраску (базофильную)

<p>Локализация микрофлоры и границы ее распространения</p>	<p>На поверхности разруба и в рыхлой соединительной ткани поверхностных фасций могут встречаться отдельные очажки кокковой микрофлоры</p>	<p>На поверхности разруба и в рыхлой соединительной ткани поверхностных фасций в перимизии и эндомизии наличие кокковой и палочковидной микрофлоры в виде множественных очажков и диффузных наложений, распространившихся на глубину до 3 мм от поверхности мяса</p>	<p>На поверхности разруба и в рыхлой соединительной ткани поверхностных фасций в перимизии и эндомизии наличие кокковой и палочковидной микрофлоры в виде множественных очажков и диффузных наложений, проникающих на глубину до 5 мм от поверхности мяса</p>	<p>На всей поверхности разруба и в рыхлой соединительной ткани поверхностных фасций в перимизии и эндомизии диффузные наложения преимущественно палочковидной микрофлоры, проникающих на глубину до 10 мм от поверхности мяса</p>
<p>Микрокартина структурных изменений мяса</p>				
<p>А — микрофлора; Б — мышечные волокна; В — ядра; Г — прослойка рыхлой соединительной ткани</p>				


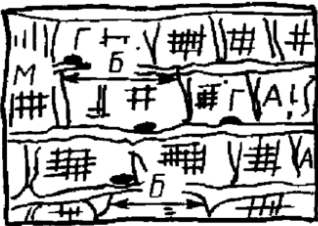
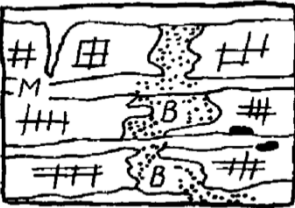
Степень (этапы) созревания мяса определяют по:

- интенсивности автолитического распада мышечных волокон на фрагменты;
- разволокнутию фрагментов на миофибриллы и их распаду на саркомеры в виде зернистой массы, заключенной в эндомизий;
- сохранению восприятия окраски составными элементами волокна.

Степень (этапы) созревания мяса определяли согласно таблице (ГОСТ 19496-2013):

Микроструктурные характеристики мяса в зависимости от степени созревания приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Микроструктурные характеристики мяса

Этапы созревания мяса	Микроструктурная характеристика	Микрокартина структурных изменений мяса
1	В срезах мяса обнаруживаются поперечно-щелевидные нарушения целостности или фрагментация отдельных мышечных волокон при сохранении во фрагментах структуры ядер, поперечной и продольной исчерченности	
2	В срезах мяса обнаруживаются множественные поперечно-щелевидные нарушения целостности или фрагментация многих мышечных волокон при сохранении во фрагментах структуры ядер, поперечной и продольной исчерченности	
3	В срезах мяса обнаруживается распад отдельных фрагментов на миофибриллы, а миофибрилл - на саркомеры в виде зернистой массы, местами заключенной в эндомизий	
<p>А — поперечно-щелевидные нарушения мышечных волокон; Б — фрагментация мышечных волокон; В — мелкозернистая белковая масса; Г — ядра; М — мышечные волокна</p>		

При проведении идентификации состава анализируемого продукта следует придерживаться следующей последовательности.

В первую очередь оценивают количество и состояние скелетной мускулатуры, жировой ткани и элементов соединительной ткани. При этом необходимо учитывать как особенности микроструктуры этих тканевых элементов, так и степень их измельчения и равномерность распределения по всей массе образца.

На следующем этапе устанавливают наличие в анализируемой пробе других мышечных тканей - сердечной и гладкой. Скелетная мускулатура млекопитающих и птицы дифференцируется на основании локализации клеточных ядер (в мышечных волокнах млекопитающих ядра имеют периферическое расположение, в мышечных волокнах птицы ядра имеют не только периферическое, но и центральное расположение).

В дальнейшем устанавливают присутствие покровных эпителиальных структур, а также плотной соединительной ткани и субпродуктов.

На отдельных срезах сразу же после окрашивания проводится обнаружение присутствия крахмала. Выявление и идентификацию растительных компонентов проводят на тех же срезах, что и для анализа животных компонентов.

Одновременно с качественной оценкой состава образца может возникнуть необходимость установить количество того или иного компонента. Для этого следует использовать либо окуляр-микрометр, либо прилагаемые к световым микроскопам специальные окулярные вставки с нанесенной на них решеткой.

В соответствии с принципами полуколичественной оценки применяют следующие оценочные классы встречаемости:

- преимущественно - когда данный компонент является преобладающим во всем объеме исследуемой пробы;

- в достаточном количестве - когда данный компонент составляет в образце больше половины его объема;

- в среднем количестве - когда данный компонент занимает в анализируемом образце около половины объема;

- в умеренном количестве - когда данный компонент составляет в образце меньше половины его объема;

- в незначительном количестве - когда данный компонент равномерно распределен хотя бы в незначительном количестве в каждом срезе образца;

- в отдельных случаях - если данный компонент выявляется в единичных полях зрения или срезах образца.

На основании данных, полученных в результате гистологического анализа, выявляют входящие в состав компоненты и проводят выяснение соответствия реального состава образца указанному в действующей документации или на этикетке.

После проведения исследования препараты с окраской срезов гематоксилином Эрлиха и эозином хранят при комнатной температуре в течение трех лет.

4. Оформление работы

Отчет о работе должен содержать:

1. Тему и цель работы
2. Краткое описание методики исследования
3. Результаты исследования, оформленные в виде таблиц
4. Зарисовку микроскопического препарата с обозначением основных структур
5. Анализ полученных результатов
6. Выводы по работе

Таблица 4 – Результаты микроскопического исследования гистологического препарата

Увеличение	Наблюдаемые	Характеристика	Особенности	Примечание
×40				
×60				
×100				

Таблица 5 – Микроструктурные признаки свежести мяса

Показатель	Наблюдаемое	Соответствие категории	Примечание
Состояние ядер мышечных			
Поперечная и продольная			
Окрашиваемость ткани			
Наличие микрофлоры			

Таблица 6 – Определение степени (этапа) созревания мяса

Микроструктурный признак	Наблюдение	Этап созревания (1–3)	Примечание
Целостность мышечных волокон			
Фрагментация мышечных волокон			
Распад на миофибриллы			
Сохранность ядер			
Окрашиваемость структур			

Таблица 7 – Состав исследуемого образца (полуколичественная оценка)

Компонент ткани	Степень встречаемости*	Особенности	Примечание
Скелетная мышечная			
Соединительная			
Жировая ткань			
Другие тканевые			
Посторонние			

* Степень встречаемости: преимущественно / в достаточном количестве / в среднем количестве / умеренно / незначительно / в отдельных случаях

Таблица 8 – Итоговая оценка исследуемого образца

Критерий оценки	Результат исследования	Заключение	Примечание
Свежесть мяса			
Степень созревания			
Структурная сохранность			

Соответствие нормативным требованиям			
Общая оценка образца			

Таблица 9 – Основные этапы приготовления гистологического препарата

Этап работы	Использованные реагенты / оборудование	Условия проведения (время, температура)	Примечание
Фиксация			
Промывка			
Обезвоживание			
Заливка в парафин			
Изготовление срезов			
Окрашивание			
Заключение под покровное стекло			

Зарисовка микропрепарата

Зарисовка выполняется простым карандашом и должна содержать:

- название объекта исследования— увеличение микроскопа
- обозначения основных структур (мышечные волокна, ядра, соединительная ткань и др.)
- подписи к рисунку

Контрольные вопросы к лабораторной работе

1. Какова роль фиксации образцов и почему для этого используют формалин?
2. Зачем проводится депарафинизация и регидратация срезов перед окрашиванием?
3. Какие структурные элементы ткани окрашиваются гематоксилином и эозином?
4. По каким микроструктурным признакам определяют свежесть мяса?
5. В чём заключаются отличия микроструктуры свежего и несвежего мяса?
6. Как по микроскопической картине определить этап созревания мяса?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abd El-Aziz Y. M., Sobh M. S., Saad H. M. et al. Mastering the art of sectioning: a comprehensive guide to slide-microtome technology and histological applications // *Frontiers in Veterinary Science*. — 2025. — Vol. 12. — DOI: 10.3389/fvets.2025.1635706.
2. Bancroft J. D., Layton C., Suvarna S. K. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. — 8th ed. — Elsevier, 2019. — 760 p.
3. Cheng Q., Sun D.-W. Factors affecting the water holding capacity of red meat products // *Food Science and Nutrition*. — 2017. — Vol. 57. — P. 185–195. — DOI: 10.1080/10408398.2015.1028134.
4. Uttarakhand Open University. MSCZO-605 (L): Histological Techniques [Электронный ресурс]. — Режим доступа: [https://uou.ac.in/sites/default/files/slm/MSCZO-605\(L\).pdf](https://uou.ac.in/sites/default/files/slm/MSCZO-605(L).pdf)
5. Handbook of basic general histology. URL: https://www.researchgate.net/publication/369437874_Handbook_of_Basic_General_Histology.
6. Hughes J. M., Oiseth S. K., Purslow P. P., Warner R. D. A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness // *Meat Science*. — 2020. — Vol. 160. — 107958. — DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.107958.
7. Kiernan J. A. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. — 5th ed. — Scion Publishing, 2015. — 571 p.
8. Listrat A., Lebret B., Louveau I. et al. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality // *Scientific World Journal*. — 2016. — Article ID 3182746. — DOI: 10.1155/2016/3182746.
9. *Microtomy and paraffin section preparation*. — Wetzlar: Leica Biosystems, 2024. — URL: https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media_document-file/2024-03/201295_Rev_A_Microtomy_and_Paraffin_Section_Preparation.pdf
10. Open textbooks collection. — Sioux Falls: Augustana University. — URL: https://digitalcommons.augustana.edu/open_textbooks/1/
11. *Paraffin methods*. — Basel: University of Basel, Department of Biomedicine. — URL: https://biomedizin.unibas.ch/fileadmin/user_upload/biomedizin/core_facilities/histology/Guides/Paraffin_methods.pdf
12. Purslow P. P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality // *Meat Science*. — 2018. — Vol. 70. — P. 435–447. — DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.02.011.
13. Tornberg E. Effects of heat on meat proteins — Implications on structure and quality of meat products // *Meat Science*. — 2018. — Vol. 70. — P. 493–508. — DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.02.008.
14. Афанасьев Ю. И., Юрина Н. А., Котовский Е. Ф. *Гистология, цитология и эмбриология: учебник*. — 7-е изд., перераб. и доп. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2021. — 800 с.

15. Быков В. Л. Частная гистология человека: учебник. — 2-е изд. — СПб.: СпецЛит, 2020. — 352 с.
16. ГОСТ 19496–2013. Мясо. Метод гистологического анализа. — М.: Стандартиформ, 2014.
17. ГОСТ 9959–2015. Мясо и мясные продукты. Общие условия проведения органолептической оценки. — М.: Стандартиформ, 2016.
18. Filipe J., Silva M., Monteiro N., Maia-Matos M., Borges-Ferro A. Finefix® fixation in histopathological samples with macroscopic, histochemistry and immunohistochemistry assessment: a systematic literature review [Электронный ресурс]. — 2024. — Режим доступа: <http://hdl.handle.net/10400.21/17253>
19. Лисицын А. Б., Кудряшов Л. С., Алексахина В. А. Технология мяса и мясных продуктов: учебник. — М.: КолосС, 2018. — 367 с.
20. Пальцев М. А., Иванов А. А. Патологическая анатомия: учебник. — 2-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. — 880 с.

Яковченко Наталья Владимировна
Кравцова Евгения Владимировна
Гольцман Людмила Михайловна
Ширяев Валерий Алексеевич

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО
ГИСТОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДАМ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел

Университета ИТМО

197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А