

УСТРОЙСТВО ДЛЯ ВАКУУМНОЙ ОБРАБОТКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

© А. Ю. Буданцев

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, 142290;
электронный адрес: budantsev@mail.ru*

В гистологической практике используются методы вакуумной инфильтрации образцов ткани для удаления воздуха из ткани при фиксации (ткань растений), для ускорения проникновения фиксаторов в ткань и инфильтрации фиксированного материала парафином в вакууме. Такие процедуры не только экономят время при проведении гистологического процессинга, но и уменьшают время контакта ткани с фиксирующими реагентами, органическими растворителями и расплавленным парафином. Описанное оригинальное устройство для проведения всех типов вакуумной инфильтрации гистологического материала позволяет проводить инфильтрацию фиксаторами и другими реагентами одновременно до 20 тканевых образцов в контролируемых условиях: при регуляции температуры в диапазоне 23—65 °С и разряжении в термостатируемой камере до 50—100 мм рт. ст.

Ключевые слова: фиксация гистологического материала, инфильтрация гистологического материала, заливка ткани в парафин в вакууме.

В гистологическом процессинге применяется обработка тканей в вакууме в двух случаях: 1) при фиксации для удаления воздуха и ускорения проникновения фиксатора в ткань (особенно часто используется при фиксации растительной ткани); 2) при заливке в парафин фиксированных и особенно лиофилизированных образцов ткани (Saas, 1958; Прозина, 1960; Дженсен, 1962; Пирс, 1962; O'Brien, McCully, 1981; Паушева, 1988; Барыкина и др., 2004, др.).

В статьях и руководствах по практической гистологии и гистохимии отмечается, что скорость проникновения фиксаторов и температура, при которой происходит фиксация, имеют решающее значение для сохранения морфологической структуры ткани в ходе гистологического процессинга (Baker, 1958; Saas, 1958; Dempster, 1960; Braune et al., 1967; Cox et al., 2006, и др.). Ряд гистохимических реакций с использованием лиофилизации тканевых образцов включает в себя обязательную вакуумную пропитку образцов ткани парафином (Пирс, 1962; Буданцев, 1976). Совершенно очевидно, что ускорение фиксации и заключения образцов ткани в заливочные материалы путем вакуумной инфильтрации не только экономит время при проведении гистологического процессинга, но и уменьшает время контакта ткани с фиксирующими реагентами, органическими растворителями и расплавленным парафином.

Для вакуумной инфильтрации ткани при фиксации и пропитке заливочными материалами обычно используется откачка воздуха из сосудов с тканевыми образцами шприцами, водоструйными и механическими насосами (O'Brien, McCully, 1981; Барыкина и др., 2004). Такие способы не позволяют контролировать и регулировать условия инфильтрации (разряжение, температура).

Нами разработано уникальное устройство для быстрой и удобной инфильтрации тканевых образцов фиксаторами и расплавленным парафином при разных уровнях вакуумирования и регулируемой температуре внутри рабочей кюветы с образцами.

Описание конструкции установки

На рис. 1, *а* показана конструкция основного узла устройства — термостатированной кюветы для проведения вакуумной инфильтрации гистологического материала фиксаторами или парафином. Устройство состоит из кюветы (1), закрытой сверху стеклянной пластиной (2). Для герметизации кюветы между стеклянной пластиной и стенками кюветы имеется резиновая прокладка (3). Стеклянная крышка закрепляется двумя винтами (на рис. 1 не показаны). В боковой стенке кюветы имеется штуцер (4) для подключения к откачному насосу. В основании кюветы расположены два нагревателя (5), датчик температуры (6) и канал (7) для проточной воды (через выводы 1—3 нагреватели и датчик температуры подключаются в измерительную схему устройства). Канал (7) имеет два штуцера (8) для подключения к водопроводной системе (рис. 1, *б*).

Внутри кюветы можно поместить (рис. 1, *в*): чашки с гистологическим материалом и фиксатором (9), чашки с материалом и расплавленным парафином (10), кассету (11) с перфорированным дном (12). Кювета помещена в оболочку (13) из пенопласта (боковые стенки кюветы и дно). В боковой стенке кюветы помещен контрольный термометр (14). На рис. 2 показана схема подключения элементов кюветы к внешним системам. Установка тем-

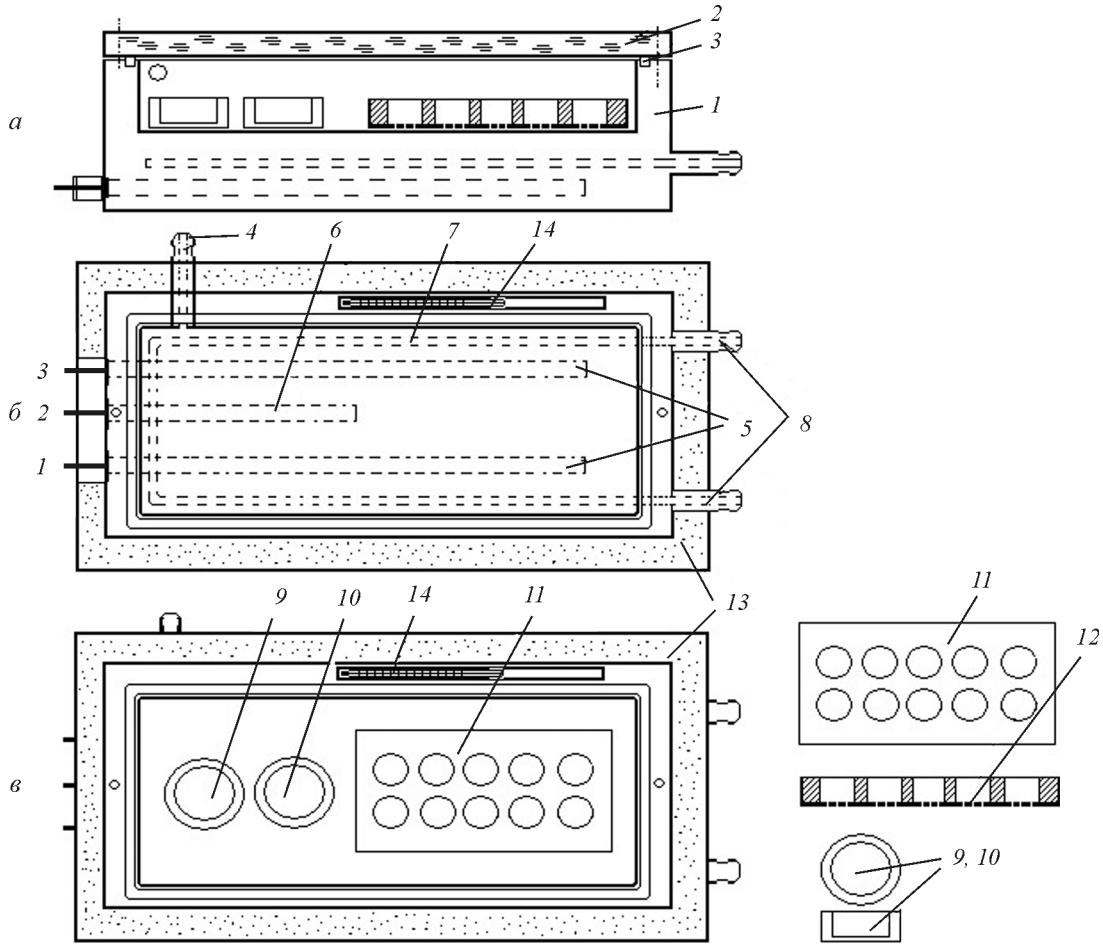


Рис. 1. Схема конструкции термостатированной кюветы.

Объяснения см. в тексте.

пературы внутри кюветы устанавливается регулятором температуры (1), контактная группа которого (2) включает (выключает) нагреватели к электросети (3) при достижении заданной температуры. Откачной штуцер подключается к насосу (4) и манометру (5). Штуцеры канала для проточной воды подключены шлангами к водопроводной сети (6).

На рис. 3, а представлены внешний вид устройства вакуумной обработки образцов ткани и дополнительные приспособления для работы (кассеты, чашки, поршень). На передней панели (рис. 3, а) выведены манометр и регулятор температуры, тумблеры и индикаторные лампочки (общее включение устройства в электросеть, работа термостата). На верхней панели (рис. 3, б) показана кюве-

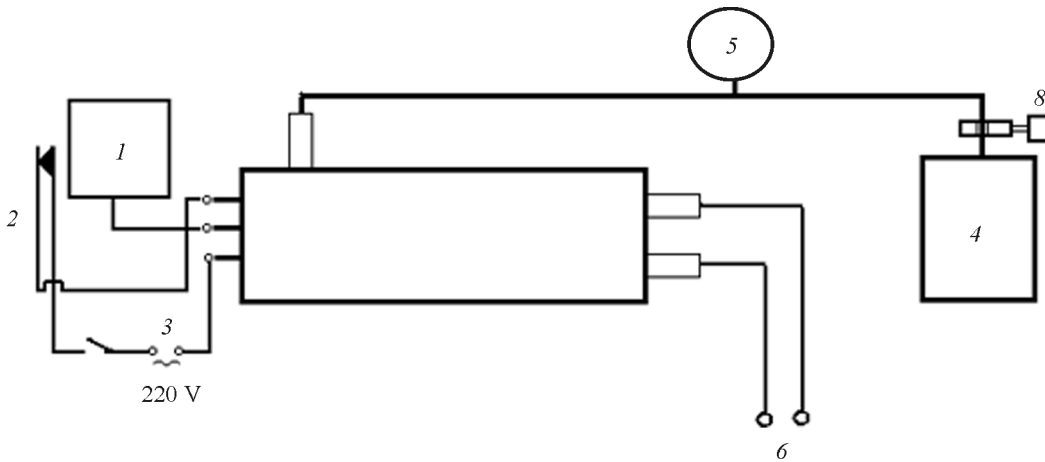


Рис. 2. Схема подключения элементов кюветы к внешним системам.

Объяснения см. в тексте.

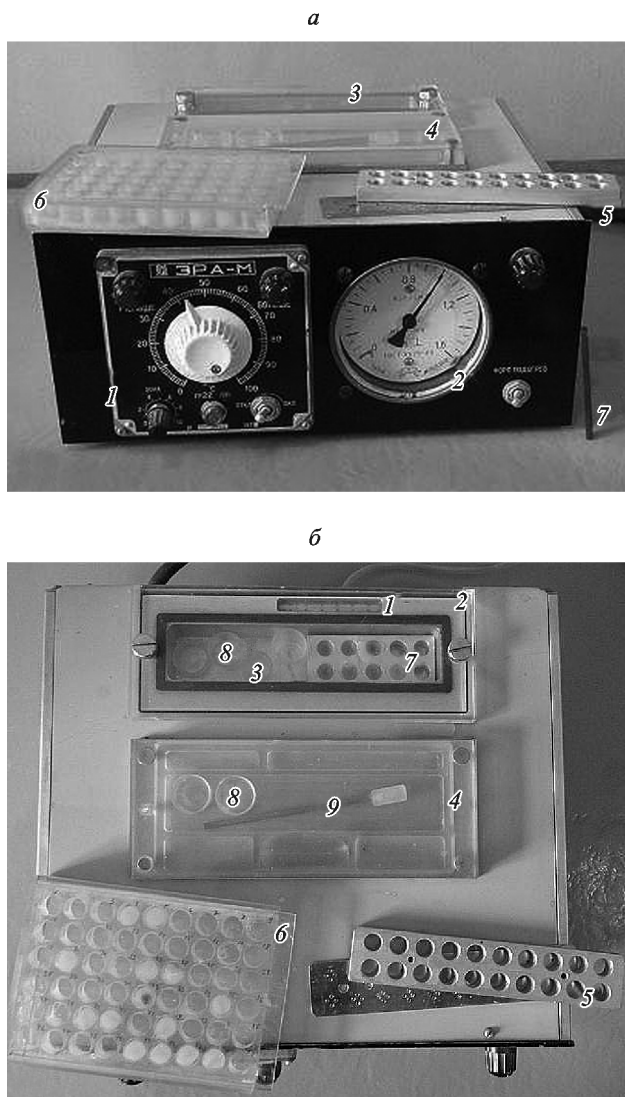


Рис. 3. Общий вид установки (а) и ее вид сверху (б).

а: 1 — терморегулятор, 2 — манометр, 3 — кювета, 4 — лоток для инструментов, 5 — кассета на 20 образцов ткани (диаметр ячеек 10 мм), 6 — контейнер для залитых блоков ткани, 7 — кассета для пропитки в парафин 10 образцов ткани. б: 1 — контрольный термометр, 2 — стеклянная крышка кюветы, 3 — кювета, 4 — лоток для инструментов, 5 — кассета на 20 образцов ткани, 6 — контейнер для залитых образцов, 7 — кассета для пропитки в парафин 10 образцов ткани, 8 — чашечки для инфильтрации тканей фиксатором и другими растворами, 9 — поршень для выталкивания заливной ткани из ячеек кассет (5 и 7).

та, контрольный термометр и другие аксессуары для работы на установке. На задней стенке корпуса выведены штуцеры для подключения к насосу и водопроводной сети. Работа на описанном устройстве включает в себя следующие операции.

1. Включение устройства в сеть (загорается индикаторная лампочка).

2. Установка необходимой температуры на шкале терморегулятора.

3. Открытие стеклянной крышки кюветы.

4. Загрузка материала внутрь кюветы — чашек с образцами ткани и фиксатором (или другим раствором гистологической проводки), чашек с образцами ткани в расплавленном парафине (после разогрева кюветы до соответствующей температуры включается красный инди-

катор). Кювета заполняется расплавленным парафином (уровень парафина должен быть ниже входного отверстия отсоса кюветы); в кювету опускается нагретая кассета и во внутренние ячейки кассеты помещаются образцы тканей. Закрывается кювета стеклянной крышкой, ее положение закрепляется винтами; включается насос, скорость откачки регулируется зажимом (рис. 2, 8), установленным на шланге насоса. Выход пузырьков воздуха из образцов ткани хорошо виден через стеклянную крышку.

5. После завершения инфильтрации (прекращение выделения пузырьков) освобождаются крепежные винты стеклянной крышки, отключается насос. В случае инфильтрации ткани фиксатором или растворами проводки стеклянная крышка убирается и чашки с образцами извлекаются из кюветы.

6. В случае парафиновой инфильтрации после отключения насоса выключаются нагревательные элементы и включается проток воды из водопроводной сети. Парафин быстро застывает. Проток воды закрывается.

7. Для извлечения чашек с парафином или кассеты с тканевыми образцами повторно включаются нагреватели. После плавления парафина снаружи чашек или кассеты (пинцетом слегка двигают чашки или кассету) нагреватели выключаются и чашки или кассета извлекаются из кюветы.

8. Извлечение парафиновых блоков из кассеты: отвинчиваются винты, соединяющие перфорированное дно кассеты и тело кассеты, и слегка разогретым поршнем выдавливается блок из ячейки кассеты. Поршень имеет внешний диаметр, равный внутреннему диаметру ячеек кассеты.

Обсуждение

Главными элементами описанного устройства являются терморегулятор и манометр, что позволяет управлять температурой инфильтрации тканевого материала и контролировать уровень разрежения воздуха в кювете устройства. Конструкция термостатируемой кюветы позволяет одновременно обрабатывать до 20 образцов ткани. Устройство удобно в работе и обеспечивает проведение инфильтрации быстро и надежно.

При инфильтрации образцов листовой пластинки табака и первичного корня лука фиксаторами Карнуа, Кларка и Навашина время фиксации сокращается до 1—2 ч вместо 10—12 без такой инфильтрации (в случае фиксатора Навашина время фиксации корешков лука и листовой пластинки табака при инфильтрации сокращалось до 5—6 ч вместо 24 без инфильтрации). Фиксация апекса корней лука в нейтральном 10%-ном формалине при 37 °С продолжалась при вакуумной инфильтрации 2—3 ч вместо 8—12 в обычных условиях (Fox et al., 1985). Время пропитки лиофилизированных образцов мозга крыс, кроликов и сусликов равно 15—30 мин, в то время как в обычных условиях такая же пропитка занимает 1—3 ч. Во всех приведенных случаях отмечалась хорошая сохранность структуры клеток и тканей при микроскопическом анализе препаратов: отсутствие сморщенных клеток и их ядер, отсутствие разрушенных клеток, хорошая сохранность пластид и воздухоносных пространств в мезофилле листовой пластинки табака и др.

Лиофилизированный материал при гистохимическом изучении, например биогенных моноаминов методом

Фалька—Хилларпа, необходимо пропитывать парафином только в вакууме. Анализ таких препаратов с помощью флуоресцентного микроскопа позволил нам провести исследование распределения биогенных моноаминов в терминалях аксонов и перикарионах нейронов мозга разных животных. Критическим моментом вакуумной обработки при фиксации является уровень откачки кюветы устройства. Например, некоторые растительные ткани, такие как корни (горох, лук) выдерживают откачку до 100—200 мм рт. ст. Листья (табак) имеют большие воздухоносные полости, и надо очень аккуратно использовать откачку, чтобы не повредить мезенхиму листа. Кроме того, необходимо внимательно следить за скоростью откачки: резкие перепады давления могут привести к разрушению ткани. Описанное устройство обеспечивает подбор необходимых условий уровня и скорости откачки при инфильтрации.

Термин «вакуумная» инфильтрация, используемый в литературе, некорректен. Правильнее называть такую процедуру обработкой ткани при «небольшом разряжении», так как ниже 100—150 мм рт. ст. проводить обработку ткани не рекомендуется в связи с высоким риском ее разрушения. Наша практика инфильтрации с использованием описанного устройства подтверждает такую рекомендацию (Муравьева, 1984; Буданцев, 2009, 2011, 2012; Ермошин и др., 2011; Буданцев, Кутышенко, 2012, и др.). При правильном подборе условий обработки ткани при небольшом разряжении можно получить удовлетворительные результаты сохранности морфологии ткани и значительно сократить время обработки ткани в гистологическом процессинге.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-8-00295).

Список литературы

- Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятков А. Г., Джалилова Х. Х., Ильина Г. М., Чубатова Н. В. 2004. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ. 311 с. (Barykina R. P., Veselova T. D., Devyatov A. G., Dzhaliyeva Kh.Kh., Ilina G. M., Chubatova N. V. 2004. Botanical microtechnique. Theory and Methods. Moscow: Moscow State Univ. Press. 311 p.)
- Буданцев А. Ю. 1976. Моноаминэргические системы мозга. М.: Наука. 192 с. (Budantsev A. Yu. 1976. Monoaminergic systems of brain. Moscow: Nauka. 192 p.)
- Буданцев А. Ю. 2009. Микроморфометрический анализ клеток корневого чехлика *Allium cepa*. Изв. РАН. Сер. биол. 3 : 1—8. (Budantsev A. Yu. 2009. Micromorphometric analysis of root cap cells in *Allium cepa*. Bull. Russ. Acad. Sci. Ser. Biol. 3 : 1—8.)
- Буданцев А. Ю. 2011. Изменение морфологии растительных клеток при действии спирт-формалинового фиксатора.

Фундаментальные исследования. 9 (1) : 130—134. (Budantsev A. Yu. 2011. The morphology of *Elodea* leaf cells during of alcohol-formalin fixation. Fundamental Res. 9 (1) : 130—134.)

Буданцев А. Ю. 2012. Биоиндикация (тканевые биотесты). Saarbrücken: Palmarium Acad. Publ. 136 с. (Budantsev A. Yu. 2012. Bioindication. Tissues biotests. Saarbrücken: Palmarium Acad. Publ. 136 p.)

Буданцев А. Ю., Кутышенко В. П. 2012. Действие метотрексата на первичный рост корней *Allium cepa*. Фундаментальные исследования. 11 : 833—836. (Budantsev A. Y., Kutysheiko V. P. 2012. The action of methotrexate on the growth of *Allium cepa* roots. Fundamental Res. 11 : 833—836.)

Дженсен У. 1965. Ботаническая гистохимия. М.: Мир. 420 с. (Jensen U. 1965. Botanical histochemistry. Moscow: Mir. 420 p.)

Ермошин А. А., Синенко О. С., Алексеева В. В., Киселева И. С., Рукавицова Е. Б., Буданцев А. Ю., Бурьянов Я. И. 2011. Исследование влияния гетерологического гена *hmg1* на мезоструктуру листа и устойчивость трансгенных растений к *Pseudomonas syringae*. Вест. Томск. Гос. университета. Биология. 14 : 46—55. (Ermoshin A. A., Sinenko O. S., Alekseeva V. V., Kiselevyova I. S., Rukavtsova E. B., Budantsev A. Yu., Buryanov Y. I. 2011. Study of influence of heterologous *hmg1* gene on leaf mesostructured and resistance of the transgenic tobacco plants to *Pseudomonas syringae*. Ann. Tomsk State Univ., Biol. 14 : 46—55.)

Муравьева Л. И. 1984. Гистохимическое изучение распределения и содержания биогенных моноаминов в головном мозгу суслика *Citellus parry* Rich. 1827. Криобиол. криомед. 14 : 64—66. (Muraveva L. B. 1984. Histochemical study distribution and quantity of biogenic amines in brain of ground squirrel *Citellus parry* Rich. 1827. Cryobiol. Cryomed. 14 : 64—66.)

Паушева З. П. 1988. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат. 230 с. (Pausheva Z. P. 1988. Practical handbook of plant cytology. Moscow: Agropromizdat. 230 p.)

Пирс Э. 1962. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 962 с. (Pearse A. G. E. 1962. Histochemistry. Theoretical and Applied. Moscow: Publ. of Inostr. Literature. 962 p.)

Прозина М. Н. 1960. Ботаническая микротехника. М.: Высшая школа. 210 с. (Prozina M. N. 1960. Botanical Microtechnique. Moscow: Vyshaya Shkola. 210 p.)

Baker J. 1958. Principles of biological microtechnique. A study of fixation and dyeing. London; New York: John Wiley and Sons Inc. 357 p.

Braune W., Leman A., Taubert H. 1967. Pflanzenanatomisches praktikum. Jena: Veb Gustav Fischer Verlag. 331 p.

Cox M. L., Schray C. L., Luster C. N., Stewart Z. S., Korytko P. J., Khan K. N. M., Paulauskis J. D., Dunstan R. W. 2006. Assessment of fixatives, fixation and tissue processing on morphology and PNA integrity. Exp. Mol. Pathol. 80 : 183—191.

Dempster W. T. 1960. Rates of penetration of fixing fluids. Amer. J. Anat. 107 : 59—72.

Fox C. H., Johnson F. B., Whitting J., Roller P. P. 1985. Formaldehyde fixation. J. Histochem. Cytochem. 33 : 845—853.

O'Brien T. P., McCully M. E. 1981. The study of plant structure principles and selected methods. Melbourne: Termarcaphi Pty. Ltd. 458 p.

Sass J. E. 1958. Botanical microtechnique. Ames: State Univ. Press, Iowa. 227 p.

Поступила 1 VII 2015

A DEVICE FOR THE VACUUM TREATMENT OF HISTOLOGICAL MATERIAL

A. Yu. Budantsev

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Puschino, 142290; e-mail: budantsev@mail.ru

A device to carry out all types of vacuum infiltration in a wide temperature range. The device is easy to use and allows you to simultaneously conduct the infiltration of a large number of tissue samples. The main element of the device is a temperature-controlled cuvette, the temperature of which is set in the range of

23—65 °C. The design of the cell allows pumping air from the cell to the 50—100 mm Hg. In practice, histological methods are used to remove the vacuum infiltration of air from the tissue fixation (plant tissue), to accelerate the penetration of fasteners into the tissue. To carry out such a procedure, syringes, water pump and other hand-held devices are used. Only vacuum infiltration allows a fill lyophilized tissue in paraffin. Efficiency of the described device is checked during the experiments at various fixing plant tissue and nervous tissue filling lyophilized in paraffin.

Key words: fixation of histological materials, infiltration of histological materials, vacuum embedding tissue in paraffin.
