

УДК 578.67

МОДИФИКАЦИЯ РОТАЦИОННОГО МИКРОТОМА ДЛЯ РЕЗКИ НАТИВНОЙ ТКАНИ

Буданцев А.Ю.

*ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино,
e-mail: budantsev@mail.ru*

Стандартный ротационный микротом используется для получения тонких срезов из фиксированной ткани, залитой в твердые материалы (например, парафин). В статье описана модификация ротационного микротом, в результате которой появляется возможность получать срезы из нативной ткани для проведения прижизненных исследований клеток и тканей *in vitro*. Модификация заключается в использовании специального держателя режущего инструмента, держателя образца нативной ткани и пятизаходного микровинта с левосторонней резьбой. Описанное устройство позволяет надежно получать срезы нативной ткани толщиной 200–400 мкм. Микротом был удачно использован в электрофизиологических исследованиях нервной ткани.

Ключевые слова: ротационный микротом, резак нативной ткани, слайсы

MODIFICATION OF THE ROTARY MICROTOME FOR NATIVE TISSUE

Budantsev A.Y.

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Puschino,
e-mail: budantsev@mail.ru*

Standard rotary microtome used for obtaining thin slices from fixed tissue filled into hard materials (e.g., paraffin). The article describes the modification of a rotary microtome, which resulted in an opportunity to receive sections of native tissue for studies of cells and tissues *in vitro*. Modification is the use of a special cutting tool holder, the sample holder for native tissue and pentathread microscrews with left thread. The described device can reliably receive sections of native tissue thickness of 200–400 microns. Microtome has been successfully used in electrophysiological studies of the nervous tissue.

Keywords: rotary microtome cutter native tissue slices

В настоящее время среди методов точной биологии широко используются так называемые переживающие срезы нативной ткани («slaces», толщина слайсов – 200–400 мкм). Особенно много работ на слайсах проводится в различных исследованиях центральной нервной системы [1,9 и др.]. Однако метод переживающих срезов можно использовать в различных областях экспериментальной клеточной биологии: сочетание с электронной микроскопией, длительным культивированием эксплантатов ткани, в интравитальной микроскопии *in vitro* и др.

Невзирая на то, что ряд фирм выпускает коммерческие приборы для получения слайсов (резаки, вибраторы), продолжают поиски новых технических решений приборов для микротомирования нативной ткани.

В данной статье рассматривается конструкция оригинального резака нативной ткани, на основе модификации стандартного ротационного микротом.

Описание конструкции микротом-резака

1. Базовая конструкция модифицированного ротационного микротом

В основе устройств использована стандартная схема ротационного микротом

для получения гистологических срезов из фиксированной ткани (рис. 1).

Микротомный узел закреплен на общем основании (1). на вертикальной станине (2) каретка (3), совершает вертикальное поступательно-возвратное движение при помощи кривошипно-шатунного механизма (на схеме не показан). на каретке закреплена пластинка (4) с направляющими типа «ласточкин хвост». Вдоль пластинки (4) движется призма (5). В стандартном ротационном микротоме на переднем конце призмы закреплен блок ткани, который движется на определенное расстояние вперед и при движении каретки (3) вниз ткань режется ножом микротом, закрепленном на основании микротом (1). на другом конце призмы имеется гайка (7), в которой движется специальный правозаходный микровинт (8). на заднем конце оси микровинта имеется шаровая опора (9) и храповое колесо (10). При движении храпового колеса по часовой стрелке, при каждом цикле вертикального движения каретки (3) микровинт продвигает вперед призму (5) на расстояние определяемое шагом микровинта и величиной поворота храпового колеса. Обычно толщина срезов, получаемых на ротационном микротоме, находится в диапазоне (0,5)1 – (15)20 мкм.

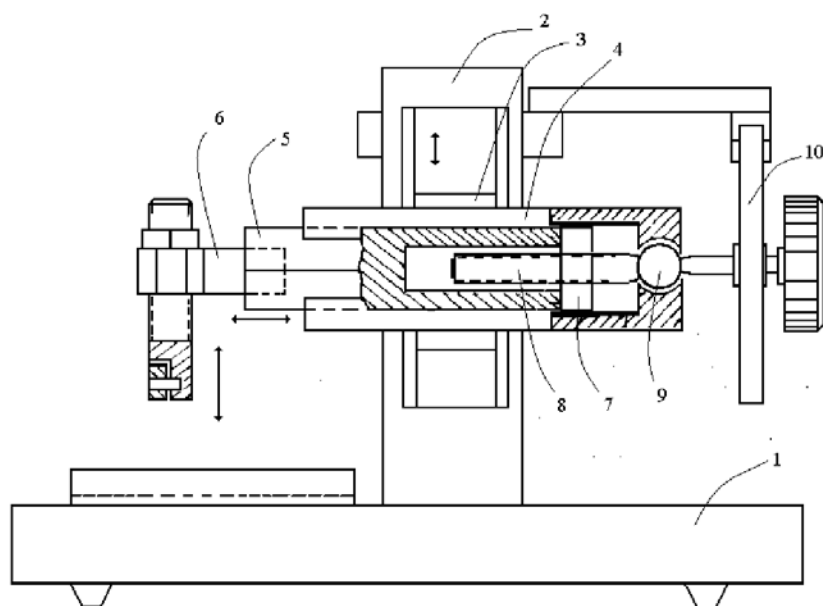


Рис. 1. Схема базовой конструкции резака. Объяснения в тексте

2. Модификация ротационного микротомы для резки нативной ткани

а) Вместо ручного привода движения каретки (3) разработан специальный электропривод (на рис. 1 не показан), обеспечивающий работу кривошипно-шатунного механизма, приводящего в движение каретку (3). Дистанционное управление электроприводом (ножная педаль) освобождает руки экспериментатора для манипуляции со срезами нативной ткани.

б) Устанавливается микровинт (8) с левосторонней пятизаходной резьбой с шагом 5 мм. Храповое колесо с 200-ю зубцами позволяет осуществлять передвижение призмы назад от оператора на расстояние 25 мкм/на зуб колеса.

в) На основании микротомы укрепляется кювета, в которой в специальный держатель в виде ванночки из желатины (агара) (рис. 2а) помещается нативная ткань.

Дно кюветы (1) имеет паз (2) глубиной 1 мм и шириной 15 мм. по бокам паза закреплены две пластинки (3) из нержавеющей стали толщиной 0.2 мм. Внутри паза помещается желатиновый держатель ткани в виде ванночки (4). Держатель ткани помещается у передней стенки кюветы, а затем плавным движением вдвигается в паз. Желатиновая ванночка-держатель ткани прочно удерживается в пазах кюветы пластинками (3). В центральный канал желатиновой ванночки помещается образец ткани (5). Кювета (1) закрепляется на основании микротомы-резака (6).

г) В переднюю часть призмы (5) вставляется держатель режущего инструмента (6 на рис. 1; рис. 2а, в). Держатель представляет рамку, в которой натянута половинка лезвия

безопасной бритвы (режущий инструмент). Вид сверху (рис. 2в) показывает, что рамка держателя имеет хвостовик (14) для вставки в призму и винт (13), при помощи которой фиксируется угол положения рамки относительно образца нативной ткани. На рис. 2а показано крайнее нижнее положение режущего инструмента. Видно, что режущая кромка лезвия бритвы (7) не касается поверхности кюветы. В начале работы призма с держателем режущего инструмента перемещается в крайнее переднее положение ручкой храпового колеса. При резке режущий инструмент уходит назад от оператора, а срез ткани остается на передней стенке лезвия бритвы.

Для приготовления желатиновых ванночек используется специальное приспособление (рис. 2б), состоящее из двух деталей: основания (8) и крышки (9). Крышка имеет выступы (10), размеры которых определяют ширину агаровых ванночек. Основание устройства имеет перегородки (11), определяющие размер канала в желатиновой ванночке (12). В пространство между основанием и крышкой заливается нагретый 6-8% раствор желатины. После охлаждения желатины устройство разбирается, ванночки вынимаются и хранятся до использования в холодильнике в закрытой влажной камере (чашка Петри). В зависимости от размера образца ткани, определяется размер перегородок в основании описанного устройства. Например, для приготовления переживающих срезов хвостатого ядра мозга крысы (pus. caudatus), мы использовали желатиновые ванночки с размером канала 4 x 4 мм.

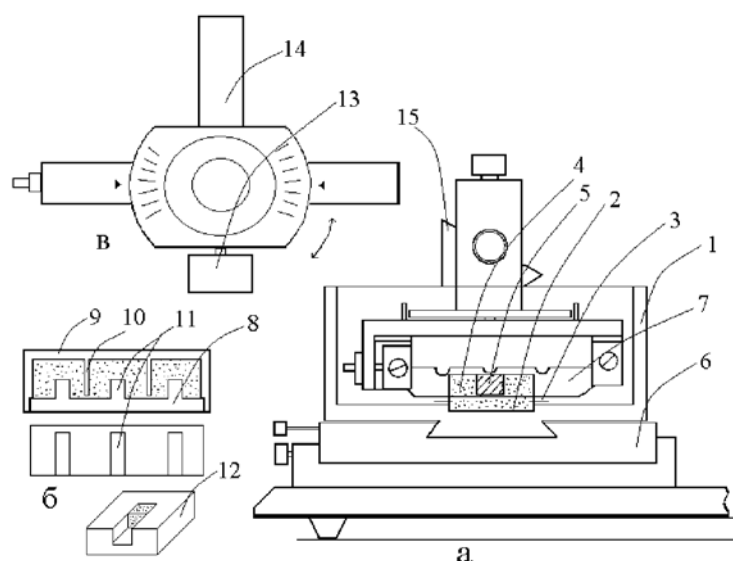


Рис. 2. Схема кюветы, блока режущего инструмента и устройства для приготовления агаровых ванночек. Объяснение в тексте

Обсуждение. Для приготовления срезов нативной ткани в разное время было предложено ряд устройств для ручного и механизированного приготовления слайсов [2, 3, 6-8 и др.].

В описанной конструкции резака на основе модификации стандартного ротационного микротомата удачно решено надежное закрепление образца нативной ткани относительно режущего инструмента. Применение агаровых ванночек, предложенное в данной работе, имеет явные преимущества перед описанными в литературе способами (закрепление образцов ткани на фильтровальной бумаге при помощи агара, желатинных или полимерных (акриловых) клеев).

Описанный резак позволяет надежно готовить из нативной ткани слайсы толщиной 200-400 мкм. Известно, что именно этот диапазон толщин позволяет проводить изучение электрической активности нейронов в слайсах (in vitro).

Использование электропривода с дистанционным управлением позволяет быстро готовить небольшие серии слайсов из различных тканей.

Особенно удачно описанный резак был использован при получении слайсов из разных отделов головного мозга лабораторных животных для проведения электрофизиологических исследований (см., например, [4, 5, 10 и др.]).

Работа поддержана грантом РФФИ, проект 14-00-295.

Список литературы

1. Dingledine R. (Ed.) Brain slices. New York. – 1982. 320 P.
2. Elliot K.A. The use of brain slices // In Handbook of neurochemistry. Vol.11. Structural neurochemistry. Plenum Press. N.-Y., L. 1969. P.103-114.
3. Jefferys J.G.R. The vibroslice, a new vibrating blade tissue slicer // J. Physiol. (L.). – 1981. Vol.324. 2P.
4. Levin S.G., Shamsutdinova A.A., Godukhin O.V. Comparison of the effect of ATP-sensitive blockers channels brief episodes of hypoxia inducible changes in the activity of CA1 pyramidal neurons in the hippocampal slices // Bull. Experimental biology and medicine (Russia). – 2012. Vol. 154. – P. 435-439.
5. Levin S.G., Godukhin O.V. Anti-inflammatory cytokines, TGF-β1 and IL-10, exert anti-hypoxic action and abolish posthypoxic hyperexcitability in hippocampal slice neurons: comparative aspects // Experimental Neurology. – 2011. Vol. 232. – P. 329-332.
6. McIlwain H. Techniques in tissue metabolism. 5. Chopping and slicing tissue samples // Biochem. J. – 1961. Vol.78. – P. 213-218.
7. McIlwain H., Buddle H.L. Techniques in tissue metabolism. 1.A mechanical chopper // Biochem. J. – 1953. Vol.53. – P. 412-420.
8. O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. – Termarcarphi Pty. Ltd. – Melburn, Australia.1981. – P.4.2-4.7.
9. Schurr F., Reid K.H., Tseng M.T., Endmondsards H.L. The stability of the hippocampal slices preparation: an electrophysiological and ultrastructural analysis // Brain Res. 1984. Vol.297. P. 357-362.
10. Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Zinchenko V.P., Levin S.G., Shamsutdinova A.A., Godukhin O.V. Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons // Neuroscience Letters. 2011. Vol. 496. P.11-14.