



Камчатский филиал ФГБУН
Тихоокеанского института географии ДВО РАН
Центр охраны дикой природы (ЦОДП)
Русское ботаническое общество (РБО)
Камчатская краевая научная библиотека
имени С.П. Крашенинникова

СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ КАМЧАТКИ И ПРИЛЕГАЮЩИХ МОРЕЙ

**Материалы
XIII международной научной конференции
14–15 ноября 2012 г.**

**Conservation of biodiversity of Kamchatka
and coastal waters**

Materials of XIII international scientific conference
Petropavlovsk-Kamchatsky, November 14–15 2012

Издательство «Камчатпресс»
Петропавловск-Камчатский
2012

ББК 28.688
С54

Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей : материалы XIII международной научной конференции, посвященной 75-летию со дня рождения известного отечественного специалиста в области лесоведения, ботаники и экологии, д.б.н. С.А. Дыренкова. — Петропавловск-Камчатский : Камчатпресс, 2012. — 320 с.

ISBN 978-5-9610-0198-3

Сборник включает материалы состоявшейся 14–15 ноября 2012 г. в Петропавловске-Камчатском XIII международной научной конференции по проблемам сохранения биоразнообразия Камчатки и прилегающих к ней морских акваторий. Рассматривается история изучения и современное биоразнообразие отдельных групп флоры и фауны полуострова и прикамчатских вод. Обсуждаются теоретические и методологические аспекты сохранения биоразнообразия в условиях возрастающего антропогенного воздействия.

ББК 28.688

Conservation of biodiversity of Kamchatka and coastal waters : materials of XIII international scientific conference, dedicated to the 75th anniversary of S.A. Dyrenkov's birthday. — Petropavlovsk-Kamchatsky : Kamchatpress, 2012. — 320 p.

The proceedings include the materials of XIII scientific Conference on the problems of biodiversity conservation in Kamchatka and adjacent seas held on 14–15 November, 2012 in Petropavlovsk-Kamchatsky. The history of study and the present — day biodiversity of specific groups of Kamchatka flora and fauna are analyzed. Theoretical and methodological aspects of biodiversity conservation under increasing anthropogenic impact are discussed.

Редакционная коллегия:

В.Ф. Бугаев, д.б.н., А.М. Токранов, д.б.н. (отв. редактор), О.А. Черныгина

Перевод на английский д.б.н. О.Н. Селивановой

Издано по решению Ученого Совета КФ ТИГ ДВО РАН

ISBN 978-5-9610-0198-3

© Камчатский филиал ФГБУН
Тихоокеанского института
географии ДВО РАН, 2012

МЕТОД «ИЗОПРОПАНОЛ — МИНЕРАЛЬНОЕ МАСЛО» В ГИСТОЛОГИИ

К.Э. Санамян, Н.П. Санамян

*Камчатский филиал ФГБУН Тихоокеанского института географии
(КФ ТИГ) ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский*

ISOPROPANOL — MINERAL OIL METHOD IN HISTOLOGY

K.E. Sanamyan, N.P. Sanamyan

*Kamchatka Branch of Pacific Geographical Institute (KB PGI) FEB RAS,
Petropavlovsk-Kamchatsky*

Детальные микроскопические исследования тканей животных в большинстве случаев невозможны без изготовления гистологических препаратов. Во многих лабораториях до настоящего времени используют классические методики изготовления таких препаратов. Они чаще всего предполагают применение достаточно токсичных летучих растворителей, таких как ксилол. Традиционный, описанный во многих учебниках по гистологии, процесс изготовления препаратов с заключением исследуемого образца в парафин состоит из нескольких этапов. Образец последовательно помещают в водные растворы этилового спирта возрастающей концентрации. Последним в ряду спиртов должен быть абсолютный (100 %) спирт, который полностью замещает воду в образце. Далее спирт в образце замещают растворителем, смешивающимся с парафином, обычно это ксилол или толуол. Полностью пропитанный ксилолом образец помещают в расплавленный парафин. После затвердевания полученный парафиновый блок режут на микротоме, срезы наклеивают на предметные стекла. Далее стекла со срезами проводят по растворителям в обратном порядке: сначала ксилолом вымывают из срезов парафин, затем отмывают ксилол спиртом, доводят препарат до воды и окрашивают. После окраски замещают воду спиртом, спирт ксилолом и заключают в раствор смолы (бальзама) или полистирола в ксилоле. Эта достаточно длительная процедура хорошо отработана и, как было сказано выше, используется в большинстве лабораторий. Между тем в последнее время появились новые, более удобные методики, где токсичный ксилол не используется вовсе. Эти методики разрабатываются в основном врачами гистопатологами, и в зоологии они пока еще мало применяются.

Следует сказать, что ксилол был широко введен в гистологическую технику всего несколько десятилетий назад. Ранее руководства рекомендовали использование ряда других растворителей парафина. Некоторые из

них, например диоксан, одинаково хорошо смешивались как с водой, так и с парафином, что позволяло значительно упростить и ускорить проводку тканей. Ксилол стал менее удобной, но и менее токсичной альтернативой таким высокотоксичным растворителям, как диоксан, анилин или бензол. Тем не менее, ксилол — также достаточно токсичное вещество, легко попадающее в организм через кожу и при вдыхании паров, с достаточно длительным периодом полувыведения из организма человека (несколько дней). Предлагались различные альтернативы ксилолу, но многие из них либо уступали ему по своим свойствам, либо обладали иными качествами, затрудняющими их применение (например лимонен — вещество с чрезвычайно сильным лимонным запахом, который многие не переносят).

Одним из веществ, которое можно использовать в качестве промежуточной среды для заливки в парафин, является изопропиловый спирт (изопропанол). Изопропанол упоминается в некоторых руководствах, однако долгое время он не находил широкого применения. Между тем изопропанол обладает рядом качеств, делающих его применение в гистологической технике весьма перспективным. Прежде всего, изопропанол, как и этиловый спирт, неограниченно смешивается с водой. В то же время он в некоторой степени смешивается с расплавленным парафином. Поэтому образец ткани животного, пропитанный изопропанолом, можно напрямую помещать в расплавленный парафин, минуя пропитывание ксилолом. Проблема заключается в том, что расплавленный парафин довольно медленно замещает изопропанол, и если исследуемый образец имеет размеры более нескольких миллиметров, то процесс пропитывания затягивается надолго (до нескольких дней).

Настоящим прорывом стал недавно разработанный американским гистотехнологом Рене Буэсой и российским врачом Максимом Пешковым метод проводки через изопропанол и минеральное масло (Buesa, Peshkov, 2009; Буэса, Пешков, 2011). Этот протокол заливки в парафин состоял из следующих этапов. Образец проводится по нескольким склянкам со 100 % изопропанолом при комнатной температуре, при этом происходит его дегидратация. Далее при 50 °С через смеси изопропанола и минерального масла образец переводят в чистое минеральное масло и, наконец, пропитанный маслом образец помещают в расплавленный парафин, который достаточно быстро его пропитывает. При этом переход от полярных сред (вода и спирт) к неполярным (масло и парафин) получается гораздо более мягким, чем, к примеру, переход от этилового спирта к ксилолу (как это имеет место в традиционной методике), что способствует лучшему сохранению особо нежных тканей. Для исключения ксилота из протокола депарафинизации срезов, наклеенных на стекла, Буэса и Пешков (2011) предлагают совершенно необычный метод: стекла сушат

в боковом положении в термостате при 60 градусах минимум 20 минут, а затем просто отмывают парафин, помещая срезы в 2 смены 2 % раствора жидкого средства для мытья посуды (например «Фейри») при 90 °С по 1 минуте, с последующим промыванием в чистой воде.

Метод проводки через изопропанол и минеральное масло в настоящее время широко обсуждается на медицинских форумах в Интернете и уже применяется в ряде крупных медицинских учреждений в разных странах, однако он практически неизвестен зоологам. Нам удалось адаптировать его для морских беспозвоночных (в нашем случае актиний). Как оказалось, он позволяет получить великолепные результаты даже на материале много лет пролежавшем в формалине.

Ниже приведен разработанный нами протокол для материала, фиксированного в формалине, размер кусочка немного меньше 1 см в высоту, длину и ширину.

I. Заключение в парафин.

1. Отмывка в проточной воде; для образцов, долго хранившихся в формалине, желательно не менее 12 часов (на ночь).

2. Изопропанол 100 % — 5 смен по 1 часу каждая. Нежные и легко сжимающиеся образцы можно до помещения в 100 % изопропанол провести по разбавленным смесям (например, 60 %, 80 %, 90 % изопропанол). Для маленьких кусочков время нахождения в каждой смене спирта можно сократить (вплоть до 15 минут).

3. Изопропанол : минеральное масло (5 : 1) — 1 час при 50 °С. В этом и следующем растворе образец не только пропитывается маслом, но еще и продолжается дегидратация, если она не была до конца завершена ранее. В качестве минерального масла применено автомобильное масло И-20А (веретенное масло). Оно лишено добавок и характеризуется низкой вязкостью (масла с более высокой вязкостью не годятся). Смесь масла с изопропанолом должна быть абсолютно прозрачной (не мутной) при 50 °С, при комнатной температуре смесь расслаивается.

4. Изопропанол : минеральное масло (2 : 1) — 1 час при 50 °С.

5. Минеральное масло — минимум 1 час при 50 °С. В масле образец может долго храниться при комнатной температуре, например может быть оставлен на ночь, если оставшуюся часть проводки предполагается выполнить на следующий день.

6. Парафин — 3 смены по 3 часа каждая при 56 °С.

II. Резка, наклеивание срезов на стекла, сушка.

После резки парафиновые срезы наклеивают на предметные стекла. В прошлом для лучшего приклеивания обычно стекла смазывали

особым образом приготовленным яичным белком, однако гораздо проще использовать хромоквасцовый клей: растворяют 2,5 г желатина в 500 мл дистиллированной воды, затем добавляют 0,25 г хромокалиевых квасцов. Помещают в раствор очищенные предметные стекла, вынимают и сушат при 60 °С не менее часа. Обработанные стекла можно долго хранить.

III. Депарафинизация срезов.

К сожалению, метод отмывки парафина (депарафинизация) в горячем растворе моющего средства, хорошо работающий для тканей человека, показал нестабильные результаты на срезах тканей беспозвоночных (соединительная ткань часто отклеивается в горячем растворе). Поэтому мы разработали следующий протокол.

1. Уайт-спирит — 4 смены по 5 минут каждая. Уайт-спирит растворяет парафин. Количество смен уайт-спирита можно уменьшить, но в этом случае увеличится его расход (растворы надо будет чаще менять).

2. Ацетон — 4 смены по 5 минут каждая. Ацетон вымывает из срезов нерастворимый в воде уайт-спирит. Время отмывки в ацетоне, вероятно, можно значительно сократить.

3. Ацетон : вода (1 : 1) — 20–30 секунд.

4. Вода.

IV. Окраска и заключение препаратов.

Методика окраски зависит от целей исследования и здесь не рассматривается. По наиболее распространенной методике окрашенные срезы дегидратируют в этаноле, затем просветляют в ксилоле и заключают под покровное стекло в каплю раствора смолы (бальзама) в ксилоле. Нам удалось упростить процедуру и исключить ксилол из нее. После окраски мы помещаем срезы сразу в 100 % изопропанол: две смены по примерно 30 секунд, а в качестве заключающей среды используем раствор пихтового бальзама в изопропаноле. Такие срезы немного дольше сохнут, по сравнению с «ксилольными», но по остальным показателям (в частности прозрачности) практически не уступают им.

В заключение отметим основные преимущества приведенной выше методики.

1. Полное исключение токсичного ксилола на всех этапах работы.

2. Изопропиловый спирт, в отличие от этилового, поставляется 100 %; нет необходимости дополнительно обезвоживать его, как это обычно делают с этанолом.

3. Отпадает необходимость использования таких токсичных водоотнимающих веществ, как фенол (в составе карбол-ксилола).

4. 100 % изопропанол не пересушивает материал, поэтому даже передержанные в изопропаноле образцы хорошо режутся (в отличие от образцов, передержанных в абсолютном этаноле).

5. Изопропиловый спирт, в отличие от этилового, не входит в перечень веществ строгой отчетности — это имеет значение, если реактивы закупает организация (а не сотрудники в частном порядке).

ЛИТЕРАТУРА

Буэса Р.Х., Пешков М.В. 2011. Полное удаление ксилола в практике гистологической лаборатории // Архив патологии. Т. 73(1). С. 54–60.

Buesa R.J., Peshkov M.V. 2009. Histology without xylene // Annals of Diagnostic Pathology. № 13. P. 246–256.