

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ОБНИНСКИЙ ИНСТИТУТ АТОМНОЙ ЭНЕРГЕТИКИ – филиал
федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования
«Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»
(ИАТЭ НИЯУ МИФИ)

ОТДЕЛЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ

ОТЧЕТ
о прохождении производственной практики

Место прохождения практики _____

Сроки прохождения практики с _____ по _____

Выполнил:

Студент группы МФ-Б2 _____

Руководитель практики от
ИАТЭ НИЯУ МИФИ

Руководитель практики от предприятия

Оценка _____ « _____ » _____ 202____ г.

Обнинск, 202____ г.

Оглавление

	(пример)	
1. Задание на производственную практику		3
2. Ход производственной практики		5
3. Введение		6
4. Изучение структуры, свойств и особенностей микротомы с вибрирующим лезвием Leica VT1200		8
5. Литературный обзор		10
5.1. Методики предварительной подготовки и нарезки тканей на микротоме с вибрирующим лезвием Leica VT1200 или Leica VT1200 S		10
5.1.1 Подготовка к нарезке и культивирование		10
5.1.2. Процедура нарезки.		12
5.2. Количественный анализ жизнеспособности клеток в тканях		14
6. Проведение лабораторных исследований.		17
6.1. Получение тонких срезов ткани печени и опухолевой ткани слизистой оболочки альвеолярного отростка верхней челюсти при помощи микротомы с вибрирующим лезвием Leica VT1200		17
6.2 Проведение качественного анализа жизнеспособности клеток в срезах тканей		18
7. Заключение		20
8. Список использованной литературы		21
9. Иллюстрации		23

1. Задание на производственную практику

Целями производственной практики являются:

- изучение основ педагогической и учебно-методической работы в высших учебных заведениях;
- овладение навыками проведения отдельных видов учебных занятий по дисциплинам образовательной программы;
- приобретение опыта педагогической работы в условиях высшего учебного заведения.

Для эффективного достижения целей производственной практики в качестве основных задач определены:

- закрепление теоретических знаний в области организации и методического обеспечения учебного процесса в высшем учебном заведении;
- формирование компетенций научно-педагогического работника, развитие навыков самостоятельной научно-педагогической деятельности;
- формирование профессионально-педагогических умений преподавателя вуза;
- ознакомление с формами организации и методами воспитательно-образовательного процесса в вузе;
- ознакомление с разносторонней деятельностью преподавателя вуза как ученого, педагога, воспитателя;
- овладение навыками самостоятельного ведения учебно-воспитательной, научно-исследовательской, методической работы;
- изучение современных образовательных технологий высших учебных заведений;
- непосредственное участие практикантов в учебном процессе.

Выполнив поставленные задачи, студент освоил следующие компетенции:

Коды компетенций	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции
УКЦ-3	Способен ставить себе образовательные цели под возникающие жизненные задачи, подбирать способы решения и средства развития (в том числе с использованием цифровых средств) других необходимых компетенций	З-УКЦ-3 – Знать: основные приемы эффективного управления собственным временем, основные методики самоконтроля, саморазвития и самообразования на протяжении всей жизни с использованием цифровых средств. У-УКЦ-3 – Уметь: эффективно планировать и контролировать собственное время, использовать методы саморегуляции, саморазвития и самообучения в течение всей жизни с использованием цифровых средств. В-УКЦ-3 – Владеть: методами управления собственным временем, технологиями приобретения, использования и обновления социокультурных и профессиональных знаний, умений, и навыков; методиками саморазвития и самообразования в течение всей

		жизни с использованием цифровых средств.
ПК-8	Способен проектировать, организовывать и анализировать педагогическую деятельность, обеспечивая последовательность изложения материала и междисциплинарные связи физики с другими дисциплинами	З-ПК-8 – Знать: теоретические основы создания и использования новых педагогических технологий и методических систем обучения, нормативно-правовые документы, регламентирующие образовательный процесс. У-ПК-8 – Уметь: разрабатывать научно-методическое обеспечение реализации курируемых учебных предметов, курсов, дисциплин. В-ПК-8 – Владеть: систематизированными теоретическими и практическими знаниями для определения и решения задач в области образования.

ВОСПИТАТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРАКТИКИ

Направления/цели воспитания	Задачи воспитания (код)	Воспитательный потенциал дисциплины
Гражданское и патриотическое воспитание	Формирование неприятия деструктивных идеологий (В6)	1. Использование воспитательного потенциала дисциплин «История (история России, всеобщая история)», «Право», «Социальные взаимодействия и общественные отношения», «Психология» и др. для формирования понимания многообразия культур и цивилизаций, их взаимодействия, многовариантности, формирования уважения к уникальности народов, культур, личности посредством тематического акцентирования в содержании дисциплин и учебных заданий. 2. Использование воспитательного потенциала дисциплин «История (история России, всеобщая история)», «Философия», «Социально-политические отношения» для формирования понимания влияния различных аспектов культуры и религии на общественную жизнь и формирование личности; роли нравственности, морали, толерантности в развитии общества посредством тематического акцентирования в содержании дисциплин и учебных заданий. 3. Использование воспитательного потенциала дисциплин «История (история России, всеобщая история)», «Право»,

		««Социально-политические отношения»», «Философия» и др. для формирования неприятия экстремизма и девиантного поведения посредством тематического акцентирования в содержании дисциплин и специализированных учебных заданий.
--	--	--

2. *Ход производственной практики*

Определение темы, целей, задач, плана, форм отчетности. Получение первичной информации о правилах составления и оформления учебно-методических и организационно-методических материалов, организации учебного процесса в вузе, задачах преподавателей и учебно-методических подразделений и др.

Освоение аудиторной педагогической работы. Закрепление, расширение, углубление и систематизация знаний, полученных в процессе изучения специальных дисциплин и информации, полученной в ходе первого этапа педагогической практики. В частности, ознакомление с организацией и проведением различных форм учебных занятий, посещение и анализ лекций, лабораторных и практических занятий и т.д.

Составление рабочих планов и конспектов практических занятий и текстов лекций, их обсуждение с научным руководителем. Подготовка и проведение аудиторных занятий (чтение или сопровождение лекций, проведение лабораторных или практических занятий и др. в присутствии научного руководителя с последующим разбором) и др.

Окончательное оформление отчета и дневника по практике. Подготовка презентации

Согласование отчета по практике с руководителем.

Защита отчета и обсуждение выступления обучающегося с анализом проделанной работы. Сдача дневника.

3. *Введение*

(Пример) Биологическое действие ионизирующих излучений обусловлено энергией, отдаваемой излучениями разных видов (альфа, бета-частицами, нейтронами, гамма-квантами) тканям и органам. Несмотря на не одинаковую физическую природу различных видов ионизирующих излучений, существует определенная общность их биологического действия, обусловленная их ионизирующим действием на биосубстраты.

При воздействии ИИ на биосубстрат происходит поглощение последним энергии излучения. Это приводит к ионизации атомов и молекул (то есть, потере атомом электрона, оставшаяся часть атома приобретает положительный заряд) или к возбуждению атомов, молекул (переход электрона на более высокий энергетический уровень в пределах атома).

Образовавшиеся в результате ионизации атомов ионы и свободные электроны взаимодействуют между собой и с окружающими неповрежденными атомами и молекулами, образуя при этом свободные радикалы.

Неорганические радикалы образуются при радиоллизе воды - гидроксильный радикал (ОН), радикал водорода (Н), гидратированный электрон, перекись водорода (H₂O₂), гидропероксид (НО₂), супероксид-анион-радикал (O₂), атомарный и синглетный кислород. Продукты радиоллиза воды обладают сильным окислительным действием в отношении органических веществ биотканей.

Под воздействием ионизирующих излучений и продуктов радиоллиза воды происходит радиоллиз молекул основных биологически важных органических веществ клетки (ДНК, нуклеотидов, аминокислот, белков, углеводов, фосфолипидов и др.) с образованием органических радикалов, обладающих повреждающим действием на ткани. В присутствии кислорода органические радикалы вступают с ним во взаимодействие. Высокое сродство кислорода к органическим радикалам лежит в основе так называемого «кислородного эффекта», суть которого состоит в усилении радиационного повреждения белков, ДНК и других биомолекул в присутствии кислорода.

Продукты радиоллиза воды, активные формы кислорода и органические радикалы, в свою очередь, способны изменять структуру биологически важных макромолекул с нарушением их функции. Наибольшее значение для дальнейшей судьбы облученной клетки имеют процессы, происходящие в белках, ДНК и фосфолипидах.

В связи с этим актуальным остаётся разработка трёхмерных физиологически совместимых тканевых моделей для оценки эффектов ионизирующего излучения различного качества.

В настоящее время одним из перспективных и активно развивающихся направлений в области радиобиологии является использование культивируемых на питательной среде тканей в качестве образца для оценки влияния ионизирующего излучения. В связи с этим для получения таких образцов необходимо предварительно получить срезы живых тканей толщиной не более 200 мкм для дальнейшего их успешного культивирования в питательной среде, а также провести флуоресцентное окрашивание полученных и облученных тканей.

4. Изучение структуры, свойств и особенностей микротомов с вибрирующим лезвием Leica VT1200

Полуавтоматический микротом с вибрирующим лезвием Leica VT1200 разработан для работы со свежими образцами в нейропатологии (переживающие срезы мозга), нейрофизиологии (patch-clamping) и электрофизиологии [12].

Прибор Leica VT1200 предназначен для получения срезов в таких сферах как медицина, биология, а также для промышленного применения, в частности, для получения срезов образцов фиксированных и нефиксированных живых тканей в буферном растворе.

Для получения высококачественных срезов, особенно при работе с нефиксированными тканями, в Leica можно использовать дополнительный измерительный прибор VibroCheck — он предназначен для определения амплитуды высоты лезвия после каждой его смены и ее последующей минимизации с помощью установочного винта на держателе лезвия.

Говоря о технических параметрах, следует сказать, что толщина срезов на микротоме с вибрирующим лезвием Leica VT1200 настраивается вручную и составляет от 0 до 1000 мкм с шагом 1 мкм, который также можно менять. Максимальный размер образца составляет 33x50 мм. Ориентация образца – 360°. Ретракция – в диапазоне от 0 до 100 мкм. Поворот площадки образца – в диапазоне от 0 до 10°. Горизонтальное перемещение ножа настраиваемое и составляет 45 мм. Вертикальное перемещение ножа моторизованный и составляет 20 мм. Частота вибрации ножа – в диапазоне от 0 до 85 Гц. Амплитуда вибрации ножа – в диапазоне от 0 до 3 мм с шагом 0.5 мм. Скорость резки находится в диапазоне от 0,01 до 1,5 мм/сек с шагом от 0,01 до 0.10 мм/с в зависимости от диапазона значений, а скорость возврата составляет 2,5 мм/сек \pm 0,25 мм/сек.

В комплект основного и часто используемого состава деталей микротомов с вибрирующим лезвием Leica VT1200 входит основной прибор VT1200. Панель управления, набор ключей, набор кабелей, цианоакрилатный клей, ледяная ванна, лоток для буферного раствора и VT лезвия (10x10 Gillette)

Применение прибора:

1. Подготовить прибор для использования, а именно снять защитный чехол, подключить вибратор к источнику питания и подключить панель управления, настроить положение увеличительного стекла, подключить к источнику питания люминесцентный источник света, включить свет, продезинфицировать все поверхности вибратора, чтобы исключить в дальнейшем контаминацию образца и вставить лезвие.

2. Вставить лоток для буферного раствора в ледяную ванну и закрыть его крышкой. Наполнить ледяную ванну раздробленным льдом.

3. Снять крышку и наполнить лоток для буферного раствора предварительно охлажденным физиологическим буферным раствором.

4. Вставить ледяную ванну и лоток для буферного раствора в соединение типа «ласточкин хвост» и прижать их книзу. Убедиться в закреплении ледяной ванны и лотка с буферным раствором засчёт отведения регуляторной ручки в крайнее дальнее положение

5. Для приклеивания образца к столику для образца необходимо использовать цианоакрилатный клей, а для помещения столика для образца в лоток для буферного раствора нужно использовать манипулятор.

6. Для того чтобы быстро поднять образец на уровень лезвия для изготовления срезов, необходимо нажать кнопку UP (Вверх). Возможна также тонкая пошаговая настройка положения лезвия по отношению к образцу (размер шага настраивается – 1, 10 или 100 мкм)

7. Для того чтобы запустить продвижение лезвия к образцу, необходимо нажать кнопку продвижения лезвия вперед.

8. Перед изготовлением срезов с помощью ручки настройки подачи нужно выбрать требуемую толщину среза (размер шага – 1, 10 или 100 мкм). Это поднимет держатель образца на требуемую величину.

9. Начать процесс приготовления срезов можно нажав кнопку RUN/STOP (Пуск/Стоп). После того как резка завершена процесс можно остановить повторным нажатием этой же кнопки. Для того, чтобы поместить лезвие перед образцом, нужно нажать кнопку возврата лезвия. Установить заново толщину среза для следующей резки и снова запустить процесс приготовления срезов.

10. После завершения процесса приготовления срезов, необходимо удалить лезвие, перевести держатель образца в самое нижнее положение, нажав кнопку DOWN (Вниз). Освободить, опустошить и вычистить ледяную ванну и лоток для буферного раствора.

Данный тип микротомы с вибрирующим лезвием оптимально подходит для получения различных по толщине срезов разных живых тканей, которые в последующем можно культивировать на питательной среде для получения образцов для дальнейшего облучения или трансплантации в организм реципиента, а также данные образцы могут быть использованы как модель для исследования различных доз излучения и влияния их на состояние клеток той или иной ткани [2].

5. Литературный обзор

5.1. Методики предварительной подготовки и нарезки тканей на микротоме с вибрирующим лезвием Leica VT1200 или Leica VT1200 S

Изготовление срезов тканей с помощью микротомы с вибрирующим лезвием приводит к воспроизводимости важных параметров срезов, а также улучшению жизнеспособности срезов ткани. Получение таких высококачественных прецизионных срезов, демонстрирующих превосходную жизнеспособность, является результатом более мягкой обработки образцов, которая сопровождается минимизацией сдвига и сдавливания тканей. Кроме того, возможность выбирать параметры нарезки на микрометрическом уровне позволяет улучшить воспроизводимости всех важных характеристик срезов.

Секционирование с помощью вибрационного микротомы (вибратомы) является ценной процедурой для получения срезов, которые могут быть использованы для иммуногистохимии и гибридизации *in situ*. Она особенно полезна для выявления гистологических и 3D деталей в тканях и эмбрионах, которые были подвергнуты различным гистологическим процедурам, таким как окрашивание β -галактозидазой и щелочной фосфатазой, а также флуоресцентное и DAB (диаминобензидин) иммуноокрашивание. При секционировании с помощью вибротомы не используются агрессивные органические растворители и поэтому он подходит для обработки образцов, окрашенных флуоресцентными антителами или красителями. Кроме того, живые ткани могут быть секционированы для последующего культивирования, манипуляций и визуализации в реальном времени [4].

5.1.1 Подготовка к нарезке и культивирование

Перед началом изготовления срезов необходимо провести некоторые предварительные процедуры.

Для визуализации живых клеток тканей, срезованных с помощью вибротомы, необходимо иную процедуру, чем для фиксированных срезов. Поскольку ткань должна оставаться живой в течение всей процедуры, она должна обрабатываться в живом виде без фиксации и храниться при температуре от комнатной до 38°C. Кроме того, ткани встраивают в низкотемпературную агарозу в сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) вместо физиологического раствора с фосфатным буфером (PBS) и быстро переносят в среду для культивирования тканей после среза. Как и при любых манипуляциях с тканями для целей культивирования, необходимо следить за тем, чтобы все растворы, материалы и инструменты были стерильными перед использованием [4].

В связи с этим можно использовать различные виды подготовки к нарезке и культивированию. Одним из таких способов является использование встраивания тканей в низкоплавкую агарозу в сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS). В данном случае необходимо последовательно выполнить следующие действия:

1. Приготовьте HBSS, добавив 2 мг/мл глюкозы и пенициллин-стрептомицин. Этот раствор можно стерильно профильтровать в 50-мл пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой, используя фильтр 0,45 мкм и шприц Luer-Lok 50-го калибра. Этот раствор будет использоваться для препарирования всех живых тканей.

2. Приготовьте раствор для встраивания.

i. Приготовьте 7% раствор низкоплавкой агарозы в стерильном HBSS путем нагревания в течение 1 часа при 65°C.

ii. Дайте раствору остыть в течение 30 мин в ванне при 37°C, прежде чем добавлять его к живым тканям.

3. Приготовьте среду для культивирования тканей.

i. Инактивируйте фетальную бычью сыворотку (FBS) в течение 30 минут при 56°C. Создайте аликвоты и храните при -20°C.

ii. Для приготовления каждого 20-мл препарата среды добавьте 2 мл термоинактивированного FBS к 18 мл DMEM/F12 GlutaMAX (10% сыворотки) и 200 мкм пенициллина-стрептомицина.

iii. Перенесите 1,5 мл готовой среды в каждую 35-миллиметровую посуду со стеклянным дном и поместите ее в инкубационную камеру, установленную при температуре 37°C с 5% CO₂.

iv. Дайте раствору уравновеситься в инкубационной камере в течение 30 мин - 1 ч.

4. Выделите все живые ткани в HBSS с антибиотиками и глюкозой при комнатной температуре. Удалите растворенную низкоплавкую агарозу из ванны 37°C и поместите ткани в одноразовый муляж.

5. Подготовьте и секционируйте образец толщиной 75-100 мкм в камере вибратора, заполненной PBS (с добавлением антибиотиков) при комнатной температуре.

i. Быстро перенесите нужный свежесрезанный живой срез в предварительно прогретую и уравновешенную полную среду для культивирования тканей в 35-миллиметровую культуральную посуду со стеклянным дном. Дайте ткани осесть на дно чаши и быстро верните ее в инкубационную камеру для повторной калибровки в течение 30 мин - 1 ч.

ii. После того, как ткань восстановит равновесие, прикрепите крышку чашки к дну с помощью парафильма.

6. Визуализируйте ткань с помощью инвертированного микроскопа; ткань можно наблюдать не более 12-24 ч. Если требуется несколько дней инкубации, необходимо ежедневно менять предварительно подогретую среду [4].

Процесс культивирования тканей, например тканей печени, в течении длительного времени (двух - четырех недель) можно производить следующим образом. Срезы, от трех до шести штук поместить на полупористые мембраны (Millipore, Herts, UK), и выдерживать в инкубаторе при 37 ° C в 5% CO². Культуральная среда должна состоять из среды Дульбекко, модифицированной среды Орли с глутамином, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, 5% пенициллина - стрептомицина - гентамицина, 1% амфотерицина, 5 мг/мл инсулин , 0,4 мг/мл дексаметазона, 10 ммоль/л HEPES, 20 ммоль/л пирувата натрия и 50 мг/мл аскорбиновой кислоты. Среду необходимо менять каждые 3 дня [10]. Другим примером длительного культивирования тканей, является культивирование тканей хряща. Срезы нормального хряща человека можно поместить в 6 луночный планшет (если количество срезов больше, то можно использовать планшеты больших размеров), по одному срезу в каждую лунку. Серию образцов необходимо инкубировать в питательной среде DMEM с добавлением в неё 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) и 2% пенициллин-стрептомицина [9]. Альтернативным методом является культивирование в обедненных средах без FBS и глутамин. Так ломтики ткани печени инкубировали в средах DMEM без FBS и RPMI без FBS в течение различных временных интервалов при 37 °C с 5% содержанием CO₂ [8]. Или же использовать питательную среду среды DMEM с добавлением 5 мкг/мл трансферрина, 10 мкл гидрокортизона, 10 мкл ретиноевой кислоты, 5 мкг/мл инсулина, 80 нг/мл эпидермальный фактор роста, 5 мкл L-глутамин, 50 мкг/мл сульфата гентамицина и 10 мкл/ мл смеси микроэлементов [6].

5.1.2. Процедура нарезки.

Если говорить конкретно о процедуре нарезки, то для различных тканей она будет разная. Например, с помощью микротом с вибрирующим лезвием Leica VT1200 S соответствующие ткани печени разрезали на кубики размерами 1,5 x 1,0 x 0,5 см³ и закрепляли суперклеем на пластинах с образцами. Срезы выполняли после вибропроверки (0; 0) с использованием бритвенных лезвий из нержавеющей стали (Personna Medical, Стейнтон, Вирджиния, США) в буферных условиях со льдом-холодным буфером KrebsHenseleitbuffer (КНВ), содержащим 25 мкл глюкозы (Merck, Дармштадт, Германия), 25 мкл NaHCO (Roth, Карлсруэ, Германия) и 10 мкл органического буфера HEPES (Roth) при следующих регулируемых настройках: угол ножа 15°; скорость резки 0,4-1 мм/с; амплитуда колебаний 3; размер шага 200 мкм; непрерывный ход. Для получения сечений

одинакового размера были сделаны вырезы диаметром 8 мм с использованием штампа из нержавеющей стали диаметром 8 мм [11]. Альтернативным методом нарезки тканей печени для получения срезов является способ вырезания из печени (из любой части) кубика объемом 0,5 см³ и дальнейшая их нарезка на слайсы толщиной 100, 200 или 400 мкм в ледяной холодной ванне PBS с помощью вибротома [10].

Для нарезки мозга необходимо использовать другие параметры. Для резки образца в сагитальном плане, мозг делили на полушария (одно оставляли для хранения при +4°C в PBS с добавлением 0,01% азида натрия), второе приклеивали цианакрилатным гелем на блок 2% агарозного геля. Всю конструкцию клеили на столик вибротома. Для получения фронтальных срезов полушарие заливали в агарозный гель и уже в таком виде приклеивали к столику вибротома. Резка проходила в PBS, толщина срезов 50 мкм (при скорости 1,5 мм/с и амплитуде 1 мм) [1].

Для приготовления срезов эмбрионов мышей в качестве раствора для буферного лотка использовали HBSS без содержания ионов Ca²⁺, Mg²⁺, с добавлением 10 мкл буфера HEPES с соблюдением pH 7,3 и добавлением 500 Ед/мл пенициллин-стрептомицина. Далее изготавливали срезы размером 350-450 мкм при скорости 2 мм/с и амплитуде 1,5 мм и переносили их с помощью укороченных стеклянных пипеток Пастера в планшеты для культур тканей, хранящиеся на льду [3].

Для приготовления срезов костей и хрящей можно использовать схожую с нарезкой печени методику. Экспланты помещали в предварительно охлажденные формы из нержавеющей стали (Tissue-Tek - Sakura, Япония) в расплавленную 2,5% агарозу и охлаждали на льду для ускорения застывания. Вибратом VT1200 Leica, откалиброванный в соответствии с инструкциями производителя, использовался для приготовления корональных срезов бедренной кости размером 300-400 мкм. Вживленные эксплантаты закрепляли на пластине для образцов с помощью цианакрилатного клея для тканевых культур (Roth, Австрия) и срезали лезвием из нержавеющей стали (Gillette Procter & Gamble, Великобритания) в буферных условиях с использованием ледяного холодного фосфатно-солевого буферного раствора Дульбекко (DPBS), с амплитудой 1,5 мм и скоростью секционирования 0,6 мм/с. Полученные срезы затем осторожно промывали в течение 30 сек в α -минимальной основной среде (α -MEM) с добавлением антибиотиков пенициллина и стрептомицина и переносили в 6-луночные планшеты, содержащие 30-миллиметровую вставку для культуры клеток Millcell с размером пор 0,4 мкм [7].

5.2. Количественный анализ жизнеспособности клеток в тканях

Большинство биологических объектов обладают низким контрастом внутренних структур, которые в основном прозрачны, поэтому возможности их наблюдения методом классической микроскопии светлого поля ограничены. Эта проблема может быть преодолена несколькими путями: применением метода исследования в темном поле, использованием метода фазового контраста, для двулучепреломляющих материалов применяют поляризационный контраст. Основным же методом контрастирования в биологии является окрашивание препаратов веществами, способными связываться с препаратом и поглощать свет или флуоресцировать.

В связи с этим актуальной задачей данной работы является анализ жизнеспособности клеток в тканевых срезах спустя несколько недель культивирования. Морфологическую оценку и визуализацию жизнеспособности клеток в тканевых срезах можно проводить несколькими методами, такими как фазово-контрастная микроскопия; метод Live/Dead; иммуногистохимическое исследование; трансмиссионная электронная микроскопия; сканирующая электронная микроскопия; двухфотонная микроскопия и другие. Однако для данного исследования метод Live/Dead является слишком грубым, так как происходит окраска при помощи реактивов ацетоксиметилового эфира кальцеина. и этидия гомодимер-1 (в качестве альтернативы можно использовать димер бромистого этидия, так как сам бромистый этидий проникает через мембраны и живых клеток, окрашивая все нуклеиновые кислоты, но в дальнейшем его можно использовать при оценке качества децеллюляризации различных тканей, в том числе фланников). В связи с этим необходима более точная количественная оценка, и в качестве альтернативы можно использовать флуоресцентные красители, интенсивность окраски которыми различается в зависимости потенциала мембраны митохондрий.

Существует несколько коммерчески доступных анализов, нацеленных на различные аспекты митохондрий. Наборы JC-10 MMR являются превосходной альтернативой плохо растворимому в воде красителю JC-1 и могут быть найдены у Abcam, Merck и Sigma-Aldrich [5]. Набор для анализа потенциала митохондриальной мембраны JC-10 разработан для использования в проточной цитометрией, но также может быть использован на конфокальном микроскопе, и обеспечивает наиболее надежный метод анализа для мониторинга изменений потенциала митохондриальной мембраны [13]. В целом, краситель JC-10 накапливается в матриксе митохондрий здоровых клеток и дает красный эмиссионный сигнал при 570-590 нм. Когда клетки становятся апоптотическими или некротическими, JC-10 легко диффундирует в цитоплазму и превращается в мономерный JC-10, который дает зеленый эмиссионный сигнал при 520-540 нм.

Красители MitoTracker могут применяться для измерения общей массы митохондрий или для изучения изменений массы митохондрий после необходимых процедур. MitoTracker Green FM от Cell Signaling и от ThermoFisher Scientific являются примерами коммерчески доступных анализов MitoTracker. Краситель MitoTracker Green окрашивает митохондрии живых клеток, но не зависит от митохондриального мембранного потенциала. MitoTracker Green не совместим с фиксацией, а сигнал может быть получен при длинах волн возбуждения и эмиссии 490 и 516 нм, соответственно [5]. Существуют и другие продукты из этой линии. Например, краситель MitoTracker Red CMXRos это красный флуоресцентный краситель, который окрашивает митохондрии в живых клетках, и его накопление зависит от мембранного потенциала. Он хорошо удерживается после альдегидной фиксации и сигнал может быть получен в диапазон длин волн возбуждения от 579 до 599 нм [15]. Другим примером является не менее эффективный краситель MitoTracker® Orange CMTMRos - это оранжевый флуоресцентный краситель, который окрашивает митохондрии в живых клетках, и его накопление зависит от мембранного потенциала. Этот краситель также хорошо удерживается после альдегидной фиксации и сигнал может быть получен в диапазон длин волн возбуждения от 554 до 576 нм.[14].

Другой стратегией окрашивания митохондрий является определение проницаемости митохондрий. Этот анализ предоставляется компаниями Abcam и ThermoFisher Scientific. В состав анализа входят краситель, кальцеин АМ, и гаситель, CoCl_2 , и оба они легко диффундируют в клетки. Кальцеин АМ расщепляется цитозольными эстеразами. После расщепления он гасится CoCl_2 в цитоплазме, но сохраняется в митохондриях живых здоровых клеток. Когда клетки имеют митохондриальные повреждения или апоптоз, содержимое митохондрий вытекает, и митохондриальный сигнал также теряется [5].

Альтернативным методом количественного анализа жизнедеятельности клеток в тканях является определение уровня активных форм кислорода в раковых клетках. Активные формы кислорода производятся преимущественно в митохондриях, когда электроны выходят из цепи переноса электронов. Эти электроны соединяются с молекулярным кислородом, образуя различные активные формы кислорода, или АФК. В раковых клетках происходит перепроизводство активных форм кислорода. Эти высокореактивные молекулы АФК могут вызывать окислительное повреждение мембран, белков и ДНК внутри клетки. Определение общих клеточных активных форм кислорода (ROS) происходит с использованием диацетата 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина (DCFH-DA). DCFH-DA проникает через клеточную мембрану, и попав внутрь клетки, DCFH-DA превращается в DCFH в присутствии фермента клеточной эстеразы. Кроме того, окисление DCFH реактивными формами кислорода дает зеленые флуоресцентные молекулы, что

можно увидеть на конфокальном микроскопе в диапазоне длин волн возбуждения 530 нм. Интенсивность зеленой флуоресценции указывает на уровень активных форм кислорода в клетке. Этот метод помогает визуализировать локализацию АФК в прикрепленных клетках с помощью конфокального микроскопа и дополнительно определять интенсивность АФК.

6. Проведение лабораторных исследований.

6.1. Получение тонких срезов ткани печени и опухолевой ткани слизистой оболочки альвеолярного отростка верхней челюсти при помощи микротом с вибрирующим лезвием Leica VT1200

Перед проведением лабораторного исследования необходимо подготовить прибор для использования, а именно: подключить вибратор к источнику питания и подключить панель управления, закрепить ледяную ванну и поместить в неё лоток для буферного раствора, продезинфицировать все поверхности вибратора, чтобы исключить в дальнейшем контаминацию образца и вставить лезвие.

1. Свежую ткань печени телёнка разрезали стерильным скальпелем на кубики размером 1,5 см³ и закрепляли цианакрилатным клеем для тканевых культур на столик для образца и выжидали 1-2 минуты, пока образец закрепится на подложке.
2. После этого столик с образцом помещали при помощи торцового ключа в лоток для буферного раствора и перед нарезкой ткани в лоток для буферного раствора заливали раствор PBS с добавлением 1% пенициллин-стрептомицина.
3. Вибратор Leica VT1200 откалибровывали в соответствии с инструкциями производителя и настраивали нужные параметры: амплитуда составляла 3 мм, а скорость резки была настроена на 1,5 мм/сек.
4. Лезвие отводили в самое крайнее положение, чтобы получить более аккуратный срез, так как ткань печени очень рыхлая и при неправильном положении лезвия, получались бы разорванные и некачественные срезы.
5. Далее регулировали положение образца в соответствии с уровнем лезвия засчёт нажатия кнопок UP (Вверх) и DOWN (Вниз) для изготовления срезов.
6. После этого перед началом изготовления срезов с помощью ручки настройки подачи выбирали необходимую толщину среза - она находилась в диапазоне от 100 до 200 мкм и начали процесс приготовления срезов, нажав кнопку RUN/STOP (Пуск/Стоп).
7. Первоначальный срез, как и ожидалось, был неровным и имел толщину большую, чем 200 мкм, но этот процесс необходим был для выравнивания поверхности образца ткани печени. Далее при помощи нажатия кнопки возврата лезвия и установления толщины в 100 мкм, процесс нарезки был снова запущен.
8. Образец толщиной 100 мкм оказался слишком тонким и рыхлым, что не позволяет провести в дальнейшем его культивирование, в связи с этим была задана новая толщина в 150 мкм. Однако и этот образец, хоть он и был более аккуратным ровным, содержал в себе большое количество разрывов, что также бы в дальнейшем

препятствовало нормальному культивированию и поддержанию жизнеспособности среза. Самой оптимальной для рыхлой ткани печени, содержащей большое количество мелких сосудов, оказалась толщина в 200 мкм.

9. Получившийся хороший тканевый срез при помощи укороченных стеклянных пипеток Пастера вынимали из лотка для буферного раствора и аккуратно промывали стерильным раствором PBS с антибиотиками и помещали переносили в 24-луночные планшеты в ламинарный шкаф.
10. После этого продолжили нарезать новые слайсы ткани печени и переносить их в планшеты. После окончания изготовления образцов тканей печени, из лотка для буферного раствора утилизировали раствор и остатки ткани печени убирали со столика для образца.
11. После этого также при помощи стерильного скальпеля в ламинарном шкафу опухолевую ткань слизистой оболочки альвеолярного отростка верхней челюсти разрезали на кубики размерам 1,5 см³ и закрепляли цианакрилатным клеем для тканевых культур на столик для образца и выжидали 1-2 минуты, пока образец закрепиться на подложке.
12. Повторно проводили пункты 2-5, описанные выше, и установили толщину среза в 200 мкм.
13. Как и при работе с печенью, первый образец получился неровным и непригодным для использования, но это было также необходимо для получения ровной поверхности для дальнейшего нарезания образца. После этого заново установили толщину в 200 мкм и начали нарезку тканей. Получившиеся образца оказались ровными, аккуратными и пригодными для дальнейшего использования и их при помощи укороченных стеклянных пипеток Пастера вынимали из лотка для буферного раствора и аккуратно промывали стерильным раствором PBS с антибиотиками и помещали переносили в 24-луночные планшеты в ламинарный шкаф. После этого повторили пункт 10 и отключили вибратор от источника питания. Полученные срезы на вибраторе будут использованы для дальнейшего культивирования в нормальной или обедненной питательной среде (без добавления PBS и глутамина в качестве факторов роста), децеллюляризации и трансплантации в животное.

6.2 Проведение качественного анализа жизнеспособности клеток в срезах тканей

Качественный анализ проводили при помощи набора LIVE/DEAD — это быстрый и простой двухкомпонентный анализ жизнеспособности, основанный на окрашивании на целостность мембраны и активность эстеразы. Целостность плазматической мембраны

определяется окрашиванием на гомодимер этидия-1, который проникает в клетки с поврежденными плазматическими мембранами, чтобы связывать ДНК и излучать красную флуоресценцию. Живые клетки идентифицируются кальцеином АМ, флуорогенным красителем, проникающим в клетки, который превращается в зеленую флуоресценцию после взаимодействия с внутриклеточной эстеразой.

Качественный анализ жизнеспособности клеток в срезах тканей проводился при помощи красителей гомодимера этидия-1 и кальцеина АМ.

1. Флаконы с красителем размораживали в водяной бане при температуре до 37°C.
2. Далее к добавляли 0,5 мкл кальцеина АМ и 2 мкл гомодимера этидия-1 к 1 мл PBS для создания окрашивающего раствора и перемешивали.
3. Срез ткани толщиной 200 мкм промывали 3 раза чистым, стерильным раствором PBS для удаления компонентов среды.
4. После этого срез помещали в 1 мл раствора PBS с добавлением гомодимера этидия-1 и кальцеина АМ и инкубировали в течение 30-40 минут при температуре 37°C для получения качественной окраски живых и мертвых клеток.
5. Далее удаляли раствор PBS, в котором происходила окраска и промывали срезы тканей 3 раза буферным раствором PBS, чтобы отмыть несвязанные компоненты красителя.
6. После этого проводили осмотр на конфокальном микроскопе.

В результате окрашивания в диапазоне длин волн возбуждения от 494 до 517 нм мы наблюдали окрашивание живых клеток, а в диапазоне длин волн возбуждения от 517 до 617 нм мы наблюдали окрашивание мертвых клеток.

7. Заключение

Данный литературный обзор и отработка лабораторных методов являются основой для дальнейшего исследования возможности культивирования, манипуляций и визуализации тканей в реальном времени в качестве образца для оценки влияния ионизирующего излучения и разработки трёхмерных физиологически совместимых тканевых моделей для оценки эффектов ионизирующего облучения, а также децеллюляризации и трансплантации в животное.

В связи с этим, запланированы исследования возможности оценки жизнеспособности перевиваемых тканевых культур при воздействии различных видов ионизирующего излучения или химиопрепаратов.

Таким образом, целями дальнейшего исследования являются:

1. Разработка методов оценки жизнеспособности тканевых культур;
2. Разработка метода длительного культивирования тканевых культур.

8. Список использованной литературы

1. Иванова О. В. Картирование экспрессии немедленных ранних генов c-fos и zif/268 в развивающемся мозге мышей линии Thy1-EGFP при обследовании новой обстановки / О. В. Иванова // Биомедицина – 2014. - №1. – С. 109-116.
2. Микротом с вибрирующим лезвием. Модели Leica VT1200 и VT1200S. Руководство пользователя, 2007. – 60 листов.
3. Brachmann I., Tucker K. L. Organotypic slice culture of GFP-expressing mouse embryos for real-time imaging of peripheral nerve outgrowth / Brachmann I., Tucker K. L. // Journal of visualized experiments – 2011. – №. 49.
4. Iulianella, A. Cutting thick sections using a vibratome / Iulianella, A. // Cold Spring Harbor protocols. - 2017. - Vol. 6. - P. 480-485.
5. Kamiloglu S. Guidelines for cell viability assays / Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. // Food Frontiers. - 2020. - Vol. 1 - № 3. - P. 332-349.
6. Meyer R. Radiation treatment of organotypic cultures from submandibular and parotid salivary glands models key in vivo characteristics / Meyer R., Wong WY., Guzman R, Burd R., Limesand K. // Journal of visualized experiments. - 2019. - Vol. 147.
7. Srinivasaiah S. A 300 µm organotypic bone slice culture model for temporal investigation of endochondral osteogenesis / Srinivasaiah S., Musumeci G. et al. // Tissue engineering. Part C, Methods. -2019. - Vol. 25. - № 4. - P. 197-212.
8. Swaminathan A. Developing a partially perfused liver model using caprine liver explant conditioned to the chicken extra-embryonic perfusion system / Swaminathan A., Ranganathan S., Baskar K, et al. // Tissue Cell. - 2020. - Vol. 62. – P. 101-108.
9. Tinti L. A novel ex vivo organotypic culture model of alkaptonuria-ochronosis / Tinti L., Spreafico A., Chellini F. et al // Clin Exp Rheumatol. - 2011. - Vol.29. - № 4. - P. 693-696.
10. Verrill, C. Organotypic liver culture in a fluid-air interface using slices of neonatal rat and adult human tissue—a model of fibrosis in vitro / Verrill, C., Davies, J. et al. // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. - 2002. - Vol. 48. - № 4. - P. 103–110.
11. Zimmermann M. Precision-cut slices of normal and tumorous liver tissues generated with the Leica VT1200 S vibrating blade microtome / Zimmermann M. et al. // LeicaBiosystems. – 2012. – Vol. 95.
12. Полуавтоматический микротом с вибрирующим лезвием Leica VT1200 [Электронный ресурс]: <https://bioline.ru/catalog/gistologiya/vibratomy/poluavtomaticheskij-mikrotom-s-vibriruyushchim-lezviem-leica-vt1200> (Дата обращения: 11.10.2021).

13. JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Flow Cytometry) (ab112133) [Электронный ресурс]: <https://www.abcam.com/jc-10-mitochondrial-membrane-potential-assay-kit-flow-cytometry-ab112133.html> (Дата обращения: 18.10.2021).

14. MitoTracker™ Orange CMTMRos - Special Packaging [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M7510> (Дата обращения: 18.10.2021).

15. MitoTracker™ Red CMXRos - Special Packaging [Электронный ресурс]: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M7512> (Дата обращения: 18.10.2021).

9. Иллюстрации



Рисунок 1. Полуавтоматический микротом с вибрирующим лезвием Leica VT1200 в лаборатории отделения регенеративных технологий и биофабрикации МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии»

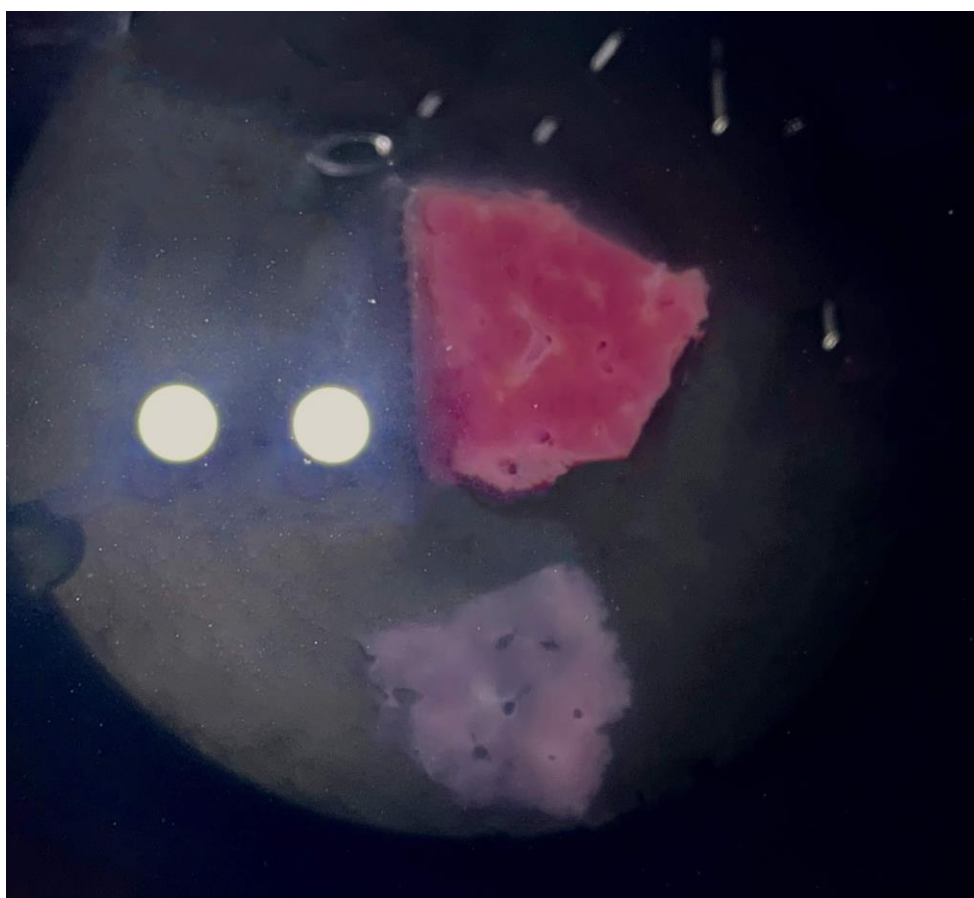


Рисунок 2. Тканевый срез печени толщиной 200 мкм



Рисунок 3. Образец опухолевой ткани, фиксированные на подложке

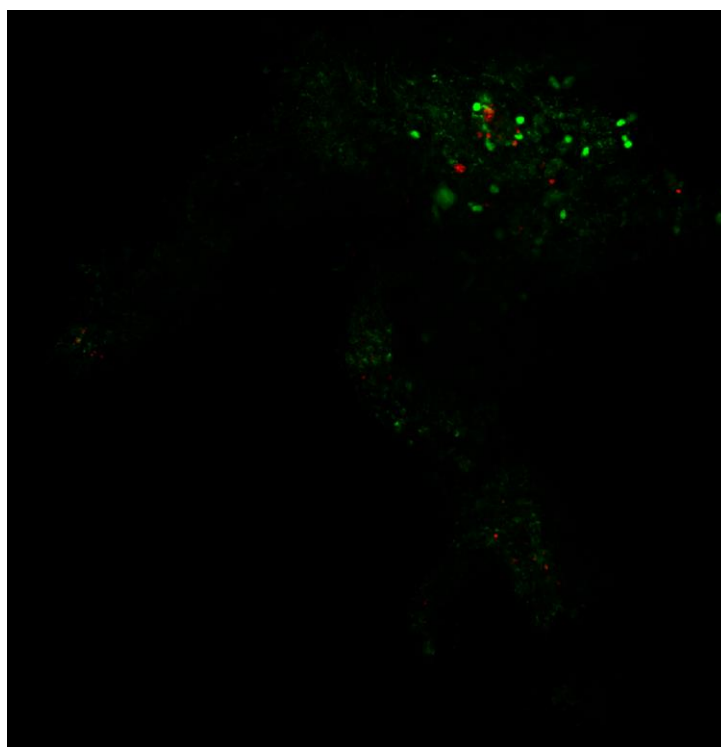


Рисунок 4. Окраска среза альвеолярного отростка толщиной 200 мкм при помощи набора LIVE/DEAD

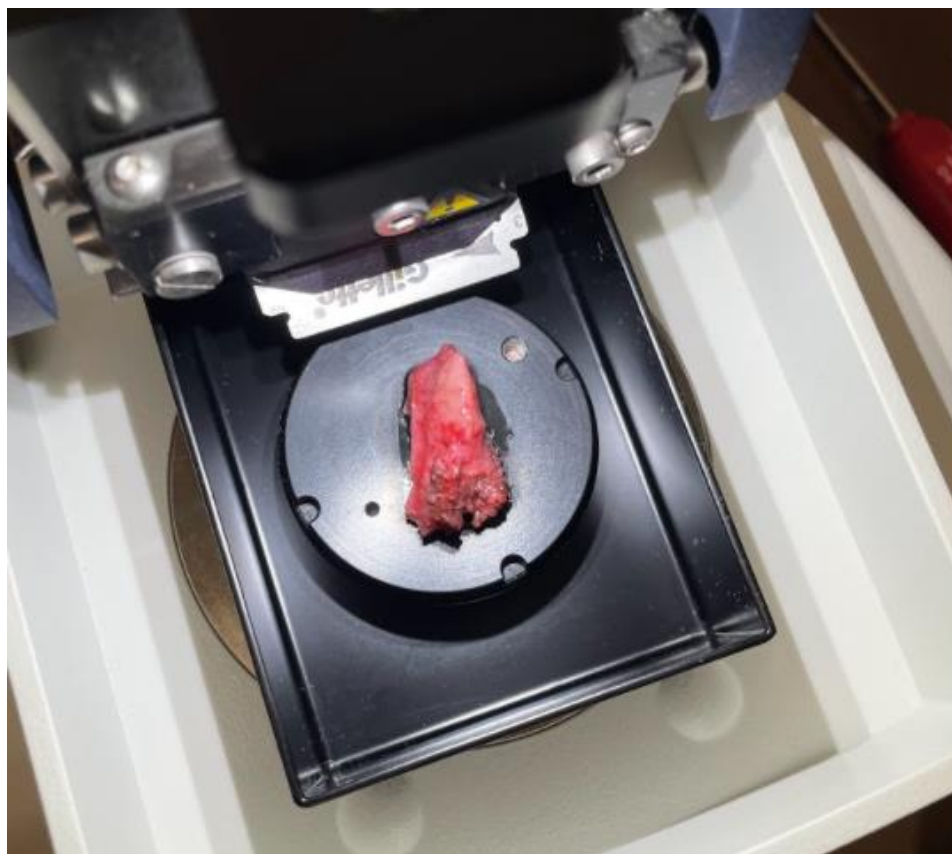


Рисунок 5. Образец опухолевой ткани слизистой оболочки альвеолярного отростка
верхней челюсти