

МОРФОЛОГИЯ, ПАТОЛОГИЯ

MORPHOLOGY, PATHOLOG

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.2.MORPH.1>

REVIEW ARTICLE

УДК 611.08

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА СОЗДАНИЯ АНАТОМИЧЕСКИХ МАКРОПРЕПАРАТОВ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ МЕТОДОМ ПЛАСТИНАЦИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В.П. Артищев¹, А.А. Супильников¹, К.Н. Крупин², Ян Фришонс³

¹Медицинский университет «Реавиз», ул. Чапаевская, д. 227, г. Самара, 443001, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова д. 1, г. Москва, 117997, Россия

³Ветеринарный университет Брно, Дворцево трж. 1946/1, 612 42 Брно, Чешская Республика

Резюме. Пластинация является современным и технологичным методом изготовления анатомического макропрепарата, позволяющим сохранить структурную целостность исследуемого материала. Цель исследования - изучение и анализ современной научной литературы, посвящённой технологии пластинации, и выявление общих этапов изучаемого процесса. Для работы был проведён отбор современной научной литературы, её анализ и систематизация полученных данных. В результате анализа были выявлены общие этапы технологического процесса, а также особенности методик, которые применяются различными авторами. Выявлено влияние технологии на качество изготавливаемого анатомического макропрепарата.

Ключевые слова: технология пластинации, анатомический макропрепарат, эпоксидная смола, силикон.

Конфликт интересов. Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Артищев В.П., Супильников А.А., Крупин К.Н., Фришонс Я. Описание технологического процесса создания анатомических макропрепаратов паренхиматозных органов методом пластинации (обзор литературы). *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье.* 2024;14(2):12-20. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.2.MORPH.1>

DESCRIPTION OF THE TECHNOLOGICAL PROCESS OF CREATION ANATOMICAL MACROPREPARTMENTS OF PARENCHYMATOUS ORGANS BY PLASTINATION METHOD (LITERATURE REVIEW)

Vyacheslav P. Artishchev¹, Aleksey A. Supil'nikov¹, Konstantin N. Krupin², Yan Frishons³

¹Medical University "Reaviz", 227, Chapaevskaya str., Samara, 443001, Russia

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

³Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

Abstract. Plastination is a modern and technological method for producing an anatomical macroscopic specimen, which allows preserving the structural integrity of the material under study. The purpose of the study is to study and analyze modern scientific literature on plastination technology and identify the general stages of the process being studied. For the work, a selection of modern scientific literature was carried out, its analysis and systematization of the data obtained. As a result of the analysis, the general stages of the technological process were identified, as well as the features of the methods used by various authors. The influence of technology on the quality of the produced anatomical macro-preparation was revealed.

Key words: plastination technology, anatomical macropreparation, epoxy resin, silicone.

Competing interests. The authors declare no competing interests.

Funding. This research received no external funding.

Compliance with ethical principles. The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary.

Cite as: Artishchev V.P., Supil'nikov A.A., Krupin K.N., Frishons Ya. Description of the technological process of creation anatomical macro-prepartments of parenchymatous organs by plastination method (literature review). *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ". Rehabilitation, Doctor and Health.* 2024;14(2):12-20. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2024.2.MORPH.1>

Актуальность

Пластификация представляет собой инновационный способ создания анатомических макропрепаратов. Придя на смену более старым технологиям, таким как влажный анатомический препарат, она позволяет не только улучшить визуальные свойства изучаемого объекта, но и избежать их обслуживания и соблюдения особых условий хранения и транспортировки. Несмотря на уже устоявшийся технологический процесс, различные авторы находят новые способы создать пластифицированный анатомический препарат и перспективы его применения. Таким образом, технология пластификации открывает намного больше перспектив применения, чем любая другая.

Введение

Создание анатомических макропрепаратов является неотъемлемой частью образовательной и научной деятельности в области медицины. Представляя собой одну из самых современных и совершенных методик, она позволяет значительно повысить качество изучаемого объекта в сравнении с анатомическими препаратами, изготовленными по иным технологиям. Помимо пластификации существует множество иных технологий создания анатомических макропрепаратов, таких как создание влажного препарата. Данная технология является одной из самых старых и широко распространённых. Несмотря на простоту методики, препараты, изготовленные в соответствии с ней, требуют постоянный уход и не обеспечивают хорошей наглядности. Более современная методика – это изготовление 3D-моделей, но это не обеспечит такой информативности, какую обеспечит настоящий макропрепарат. Несмотря на то, что технология пластификации – это весьма прочно устоявшийся в своём исполнении процесс, многие авторы привносят свои нововведения и открывают новые возможности технологии пластификации.

Цель: произвести анализ научной литературы и изучить различные методики создания пластификатов на примере паренхиматозных органов, провести анализ и выявить сходства и различия.

Материалы и методы

Был проведён отбор и анализ научных публикаций на тему технологии пластификации, основных её этапов и возможностей применения изучаемой технологии.

Результаты

Анализ отобранной научной литературы показал, что технология, которую использовали авторы изу-

ченной литературы, имеет в своей основе несколько главных этапов:

1. Фиксация. Перед пластификацией отпрепарированный фрагмент биологического материала подвергается процессу фиксации. В большинстве случаев используется 10 % раствор формалина. На данном этапе наблюдается вариативность – различные авторы видоизменяют процесс фиксации.

2. Дегидратация. После фиксации из объекта необходимо удалить воду и жировую ткань. Для этого используется чистый ацетон. Этап дегидратации может различаться у разных авторов временем экспозиции, частотой смены раствора, температурными условиями. После данного этапа объект готов к следующей ступени технологического процесса.

3. Импрегнация. Импрегнация является смыслообразующим этапом технологии пластификации. Биологический объект, находясь в специальной ёмкости с жидким силиконом, под отрицательным давлением пропитывается его парами. Виды силикона, время импрегнации и температурные условия, опять же, могут быть различны у разных авторов. Обычно время составляет от 24 часов до 7 суток в зависимости от множества факторов, таких как масса объекта, его структура и форма. После силикона объект обрабатывается аналогичным образом парами отвердителя.

В конечном итоге получившийся объект покрывается силиконом изнутри и снаружи. Такой анатомический препарат может храниться неограниченное количество времени, и такая технология позволяет использовать получившийся объект не только как анатомический препарат.

Описывая общие моменты пластификации, M.F. Sargon, I. Tatar ссылаются на работы Гюнтера фон Хагенса, разработавшего данную технологию в 1978 году в Гейдельбергском университете [1]. Расходными материалами при изготовлении пластификата являются фиксирующие вещества (чаще всего используется формалин, но различные авторы используют разные фиксирующие среды), ацетон, дихлорметан, силикон, отвердитель, катализатор для удлинения поперечных связей в молекулах силикона, а также сшивающий агент, образующий трёхмерную сетку из молекул силикона путём бокового соединения. Авторами отмечены 5 основных этапов пластификации: препарирование образца (фиксация при необходимости), дегидратация, удаление жира, импрегнация и отверждение.

Основной принцип дегидратации заключается в удалении из образца воды и межклеточной жидкости при помощи дегидратирующего агента, которым, преимущественно, является ацетон. Чаще всего дегидратация происходит в абсолютном ацетоне при температуре -25°C . Такие температурные условия вызваны необходимостью минимизировать

усадку исходного образца. Процесс дегидратации длится в среднем 3-5 недель, при этом обязательна как минимум троерктаная смена ацетона. В некоторых случаях для дегидратации может быть использован этанол, но, как утверждают авторы, он используется реже. После «холодной» стадии образцы помещают в ацетон при температуре 20 °С в среднем на одну неделю – так происходит процесс удаления остатков жира. Эта стадия считается завершённой, когда жир практически полностью теряет свой цвет [1].

Следующим этапом является импрегнация. Основной принцип процесса импрегнации заключается в замещении промежуточного вещества (ацетон) силиконом. Этот процесс обязательно должен происходить под воздействием вакуума. Вакуум позволяет силикону проникнуть вглубь ткани, и в данном случае вакуум имеет большое значение для предупреждения усадки образца. После импрегнации наступает следующий этап – отверждение. Этот этап технологически схож с предыдущим, но используется уже отвердитель, который поступает в закрытую ёмкость с образцом в газообразном виде. В некоторых случаях для ускорения этого процесса применяется мембранный насос. После этого процесса готовый пластинат хранится в закрытой ёмкости до полного отверждения.

Конечным результатом является пластинированный анатомический препарат. При соблюдении всех технических требований он представляет собой твёрдый фрагмент биологического материала, имеющий минимальные отличия от только что полученного *post mortem* объекта, или не имеющий таковых совсем.

Также в обозреваемой статье описана технология листовой пластинации с применением эпоксидной смолы. В данном процессе срез материала толщиной не более 5 мм помещается в отверждающую эпоксидную смолу. Перед этим образец проходит все стандартные этапы пластинации, описанные выше.

Препарирование объектов происходит после их замораживания, поскольку в таком случае можно производить срезы, не повреждая сам материал. Заморозка производится при -70(-75) °С 7-10 дней. Срезы производятся с использованием ленточной пилы. После этого получившиеся срезы помещают в ацетон, температура которого составляет -25 °С. Образец хранят в ацетоне до тех пор, пока его концентрация не понизится хотя бы до 98,5 % [1]. По мере достижения этой концентрации объект помещают в ацетон комнатной температуры для последующего удаления жира. Если объект содержит много жировой ткани, то для её удаления используется дихлорметан. Процесс импрегнации схож с описанным выше процессом, но в данном

случае авторами описывалась импрегнация эпоксидной смолой, при этом эпоксидная смола должна покрывать объект как минимум на 3-5 сантиметров выше. При температуре +5 °С импрегнация занимает 36-48 часов, при комнатной температуре этот процесс занимает 32 часа. После извлечения объекта и удаления излишков эпоксидной смолы для отверждения могут использоваться два метода – это простое отверждение и «сэндвич» методика.

В первом случае объект помещается в ёмкость со стеклянной крышкой. Крышка крепится на ёмкость при помощи силиконового герметика, а толщина крышки должна составлять 3-4 мм. Ёмкость заполняется газообразным отвердителем, после чего хранится либо при температуре +15 °С 24 часа, либо 4 суток при температуре 45 °С.

Второй способ устроен следующим образом: лист фольги накрывает стеклянную пластину, и на него выливается деаэрированная эпоксидная смола с отвердителем. Срез помещается на фольгу, сверху на нём размещается вторая пластина с фольгой, покрытая эпоксидной смолой, на которую воздействует небольшой пресс в целях удаления пузырей воздуха. Авторами этот метод отмечен как более быстрый и не менее эффективный. Если таким образом готовится несколько препаратов, то на каждые три комплекса «стекло-срез-стекло», установленных друг на друга, ставится сверху стеклянная пластина, на которую ставится утяжелитель. Такая секция выдерживается при температуре +45 °С в течение 4 суток. После этого образцы извлекаются и обрабатываются.

Также авторами описана методика листовой пластинации с применением полиэстера. Такой метод, по утверждению авторов, хорошо подходит для срезов головы и всего тела. Техника во многом схожа с вышеописанной и имеет схожие этапы, но в данной ситуации применяются нефиксированные образцы. Полиэстер отвердевает под воздействием ультрафиолетового излучения. Для избежания перегрева авторы описывают охлаждение образца при помощи вентилятора. На полное отверждение должен указать характерный звук трескающегося стекла. Остальные этапы схожи с классической техникой пластинации.

Известен способ пластинации почки лошади с применением эпоксидной смолы и изучение анатомических деталей процесса [2]. Почка была получена из трупа лошади, обработанного 10 % формалином методом перфузии в течение 1 недели. Капсула извлечённой почки рассекалась, и почка помещалась в 10 % раствор формалина на 7 дней для более качественной фиксации. После фиксации были сделаны срезы толщиной 2-3 мм. Получившиеся срезы были помещены в проточную воду на один день с целью удаления излишков формалина с объектов.

Получившиеся срезы помещали между квадратными сетками и укладывали их друг на друга так, чтобы формировались отдельные стопки.

Дегидратация производилась при температуре – 25 °С. При этой температуре образцы выдерживались последовательно в трёх ёмкостях с ацетоном: ежедневно концентрация ацетона контролировалась ацетонометром. Дегидратация в первой ёмкости продолжалась 5 суток, и к её концу концентрация ацетона понизилась до 92 %. Во второй ёмкости концентрация ацетона была 97 %, и время экспозиции составляло 72 часа. В третьей ёмкости концентрация возвращалась к значению 99,5 % [2]. В третьей ёмкости время экспозиции составило 48 часов. Из-за текстуры почек процесс обезжиривания не проводился.

Импregnация была произведена с использованием прозрачной формовочной полиэфирной смолы (Turkuaz Polyester, Türkiye) при температуре 20-22 °С. Связки из сеток со срезами помещались в смолу без отвердителя, и импregnация производилась в защищённом от ультрафиолетового излучения помещении в два этапа: на первом этапе объекты хранились в смоле 12 часов при отключенном вакуумном компрессоре, на втором этапе вакуумный компрессор включался. Продолжительность второго этапа также составляла 12 часов. Этот процесс занимал трое суток с циклической сменой первой и второй фаз. На протяжении всего этапа импregnации давление постепенно снижалось с 684 мм рт. ст. (912 мбар) до 15 мм рт. ст. (20 мбар). Об окончании импregnации в данном эксперименте говорило отсутствие пузырей воздуха при минимальном давлении в ёмкости.

После окончания импregnации объекты помещались в другую ёмкость для отвердевания. Каждый срез был помещён в стеклянную ёмкость. Каждая камера имела сверху и снизу стеклянные пластины толщиной 5 мм, которые были зафиксированы при помощи стяжек. Далее ёмкость заполняли смесью, имеющей следующий состав: полиэстер, 1 % кобальт и метилэтилкетонпероксид в соотношении 99,6 % / 0,1 % / 0,3 %. Для предотвращения образования пузырей в полиэстере была открыта верхняя крышка. Ёмкости подвергались воздействию ультрафиолетового излучения – лампы, расположенные в разных сторонах от объектов на расстоянии 30 см, включались на 30 минут, после чего на 30 минут отключались. Защита от перегрева обеспечивалась вентиляторами. Полное отвердевание было достигнуто за 12 часов. После завершения отвердевания стеклянные пластины были удалены, а объекты завернуты в полиэтиленовую плёнку в целях сохранности.

Получившиеся препараты имели тёмно-коричневый цвет, а полимер в данной ситуации обеспечил хорошую прочность препаратов, как

утверждают авторы. Готовые образцы были оценены авторами как оптимальное наглядное учебное пособие, позволяющее оценить анатомические особенности. Все структуры на срезах были хорошо сохранены и различимы. В том числе хорошо визуализировались корковое и мозговое вещество почки: на снимках корковое вещество имело нечёткие границы и более тёмный, в сравнении с мозговым веществом, оттенок. Также стоит отметить хорошую визуализацию лоханок.

Пластинация – методика, позволяющая создать анатомический препарат, который можно использовать не только для макроскопического изучения. Так, например, Sittel С. и соавт. для фиксации использовали 15 % раствор формалина, после чего материал, представленный срезами толщиной 4 мм, помещали в 10 % раствор метанола с целью предотвратить образование кристаллов льда [3]. В данном случае авторами производилось гистологическое исследование полученных препаратов, и кристаллы льда могли оказать негативное воздействие на ткани. Дегидратация объектов производилась в замороженном ацетоне в течение 48 часов. В течение этого времени замена ацетона производилась 4 раза, после этого объекты выдерживались в течение 2 часов в растворе метилена хлорида в условиях комнатной температуры.

После этого процесса производилась импregnация полученных объектов в силиконе. Для этого была изготовлена вакуумная камера из стекла, куда помещался сам объект. Под слабым воздействием вакуума объект находился в течение 24 часов, а следующие 72 часа отвердевание силикона происходило при комнатной температуре.

Пластинированные препараты нарезались при помощи алмазного диска марки Well, модель 4240. Толщина диска в 220 мкм позволила избежать значительных потерь при нарезке. Толщина срезов составила 80 мкм, при этом скорость вращения диска составляла 3 тысячи оборотов в минуту. Для гистологического исследования толщина объекта должна быть меньше, поэтому дополнительно она была уменьшена при помощи аппарата Polycut E фирмы Leica, который пошагово делает срез с шагом до 1 мкм, что позволило получить объекты толщиной, не превышающей 15 мкм. При этом объект необходимо перемещать как минимум один раз – это позволит не пропустить плоскость обработки.

Особенностью данного исследования является направленность его на гистологическое исследование пластинированного объекта, что открывает новые перспективы использования метода пластинации. Используя стандартные шаги, авторы смогли добиться получения гистологических препаратов. Для данной работы была применена модифицированная окраска по Ричардсону (раствор № 1 – мети-

леновый синий 0,25 % и бикарбонат натрия 0,5 %, растворённые в дистиллированной воде, смешанный в соотношении 1:1 с азуром 2 0,25 % и бикарбонатом натрия 0,5 %, растворёнными в дистиллированной воде. Раствор № 2 - фуксин 0,5 % в дистиллированной воде). Экспозиция раствора № 1 производилась в течение 4-5 минут при температуре 70 °С. В растворе № 2 объекты выдерживали при аналогичных температурных условиях 7 минут. Если результат оказывался неудовлетворительным, объекты обрабатывались спиртовым раствором соляной кислоты.

Авторами была использована ещё одна методика окраски - метод Ито и Винчестера. Краситель состоит из 4-х частей толлуидинового синего 1 % в 1 % буры и 1 % пиронина. После окраски таким методом объекты помещаются в этанол.

Гистологическое исследование пластинированных объектов показало, что даже на увеличении $\times 100$ были хорошо различимы все структуры. Между участками соединительной и хрящевой ткани не наблюдалось десквамации и прочих артефактов. Авторами отдельно отмечено высокое качество, и при втором способе окрашивания наблюдалось множество чистых от артефактов участков.

Благодаря такой методике авторам удалось получить препарат, который не только способен храниться без потери своих свойств, но и который можно исследовать гистологически.

Soga M.C. и соавт. технологический процесс был представлен в следующем виде [4].

Объекты размерами не более $100 \times 100 \times 100$ мм подвергались дегидратации при температуре 25 °С как минимум в трёх ёмкостях, концентрация ацетона в которых последовательно росла до 99 %. Следующим процессом являлось удаление жировой ткани. Для него применялись как ацетон, так и дихлорметан. Экспозиция производилась при комнатной температуре в течение 3-6 недель до полного удаления жировых отложений. Если происходила обработка объектов центральной нервной системы, то весь процесс проходил преимущественно при комнатной температуре во избежание повреждений.

Импрегнацию авторы проводили с использованием силикона E12, отвердителя E6 и катализатора E600 в пропорции 100:50:0,2 (Гюнтер ф. Хагенс, 1986). Для импрегнации объект помещался в вакуумную печь марки Heraeus, модель VT 6130 (страна-производитель Германия). В данной камере поддерживалась температура на уровне +30 °С первые 2-3 дня до достижения уровня давления в ёмкости, равном 5 мм рт. ст. В последний день температура повышалась до 60 °С, чтобы увеличить давление парообразного полимера, понизить вязкость раствора и обеспечить лучшее его проникновение в толщу ткани [4].

После импрегнации авторы помещали объект в форму и заливали его аналогичным составом (E12/E6/E600 [100:50:0.2]). Отвердевание происходило 3-4 дня в вакуумной печи при температуре 65 °С. Получившийся блок шлифовали и делали в нём несколько отверстий, играющих роль референсных точек при последующем 3D-моделировании. Срезы пластинированных блоков производились при помощи алмазной ленточной пилы. Толщина срезов составляла от 1,000 до 200 мкм. Полученные срезы могут быть использованы для макро-и микроскопического изучения. Далее производилось сэндвич-литьё полученных срезов составом E12 + E1 (100/28; Sora & Cook, 2007). Итоговая толщина объектов после шлифовки составляла не более 40 мкм.

Техника трассировки ткани (Tissue Tracing Technique-ТТТ) - технология, отдельно описанная авторами в обозреваемой статье. Начинается она с пластинирования объекта, удовлетворяющего интересам исследования, имеющего толщину 4-40 мм. По уже известной технологии создавался пластинированный блок. Для отвердевания объекты, пропитанные эпоксидной смолой, могут быть помещены на плоскую поверхность. В процессе шлифовки пластинированная ткань снимается до глубины, где располагаются интересные структуры. Часто при данном процессе происходит сгибание или деформация пластинатов. Чтобы этого избежать, объект нагревался до 45 °С и помещался под слабый пресс.

Таким образом, в выводах авторами отмечалось преимущество их модификации процесса пластинации, заключающееся в пилении алмазной ленточной пилой пластинированных блоков, что позволило избежать технологических сложностей, вызванных работой с замороженными объектами. Самым сложным этапом авторами отмечена импрегнация объекта силиконом E12 - очень важным моментом является проникновение вещества во всю толщу ткани [4].

Опираясь на работы Гюнтера Фон Хагенса, Latorre R. и соавт. описана техника пластинации «E12» [5]. Методика имеет много общих черт с классическим способом пластинации. Для неё подойдут фиксированные и нефиксированные биологические объекты. Фиксация производилась методом перфузии, в некоторых случаях фиксирующий раствор проводился по сосудистой системе. Для лучшей визуализации сосудов использовалась подкаршенная эпоксидная смола E20. Для диссекции образцы замораживались до -70 °С. Также во время резки элементы ленточной пилы охлаждались жидким азотом или сухим льдом до -40 °С. Получившиеся срезы толщиной 2-3 мм для последующей дегидратации укладывали друг на друга, проложив между ними пластиковую сетку.

Для дегидратации применялся ацетон в объёмном соотношении к объекту 10/1. Температура при этом составляла -25°C . Полностью дегидратация считалась завершённой спустя 5–7 дней. За это время смена ацетона проводилась 3 раза по мере снижения его концентрации до 98 % [5].

Импregnация проводилась с использованием эпоксидной смолы E12 и отвердителя E1 марки Biodur в объёмном соотношении 100/28. Импregnация производилась в течение 24 часов при пониженном давлении и считалась завершённой при условии отсутствия пузырей при достижении давления в 5 мм рт. ст.

Далее получившиеся образцы заливали новым слоем эпоксидной смолы. Для литья использовалась смесь из E12, E1 и E30 (для окружения объекта в ёмкости). Для позиционирования среза внутри ёмкости с эпоксидной смолой использовался металлический шарик с магнитом или металлическая проволока. Образующиеся пузыри воздуха удалялись при помощи вакуума. Сложность данного метода связана с необходимостью качественной герметизации вакуумной камеры. В связи с этим авторами был использован второй метод, заключающийся в следующем: на лист фольги выливается небольшое количество эпоксидной смеси, далее на лист укладывается срез; срез сверху заливается новым слоем эпоксидной смолы, после чего накрывается сверху новым листом фольги и придавливается лопаткой для разглаживания поверхностей [5].

В результате получившиеся препараты сохранили все свои визуальные свойства, на них были хорошо различимы все анатомические структуры, а в случае с объектами, на которых не производилась инъекция фиксирующего раствора, были хорошо различимы сосуды с кровью в их просвете. Благодаря минимальному коэффициенту преломления и минимальной ретракции при отверждении, эпоксидная смола E12 оптимальна для создания препаратов любых биологических объектов в любых плоскостях.

Ottone N.E. и соавт. описан способ экстракции ДНК из пластинированных объектов [6]. Исследование производилось на крысах Спрэга-Дуоли и собаках. Было использовано 4 фрагмента печёночной ткани собаки и 4 фрагмента ткани скелетных мышц крыс, которые были пластинированы с использованием силикона при комнатной температуре в 2016 году. Фиксация этих объектов производилась без использования формалина.

Для пластинации биологический объект (собака) был заморожен на одну неделю при температуре -20°C , после чего были произведены сагиттальные распилы. Крыса была отпрепарирована, были отделены кожные покровы. В результате были получены объекты, готовые к пластинации. Дегидратация

производилась при температуре -20°C на протяжении 4 недель в чистом ацетоне с еженедельной его заменой. Процесс контролировался при помощи ацетонометра, откалиброванного на -15°C [6]. При достижении концентрации ацетона более чем на 99,5 % дегидратация считалась завершённой. В дальнейшем образцы помещались в новую ёмкость с чистым ацетоном на одну неделю при комнатной температуре ($+20^{\circ}\text{C}$) в целях удаления жировых образований.

После этого объекты помещались в раствор силикона (dimethyl siloxane; Dow Corning(R) 200 Fluid, 50 cst; Merck, Darmstadt, Germany) и катализатора (dibutyltin dimethyl ester; Merck, Darmstadt, Germany) в соотношении 1000:1. Усиленная импregnация производилась в течение 24 часов в вакуумной камере. В последующие 5 суток давление постепенно понижалось с 760 мм рт. ст. до 10 мм рт. ст. Импregnация считалась завершённой, если при достижении самого низкого возможного давления воздушные пузыри визуально не определялись.

Фрагмент, взятый от крысы, был первым для проведения дальнейшего этапа пластинации. Для отверждения использовался тетраэтил ортосиликат (TEOS; Merck, Darmstadt, Germany), который в виде пара поступал в герметичную камеру, где находился объект. Для испарения использовался компрессор для домашнего аквариума. В дальнейшем образцы подвергали депластинации по протоколу, описанному Фрайерсоном. Суть методики заключалась в погружении объекта в 5 % метаноловый раствор метоксида натрия (CH_3NaO). Время экспозиции составило 24 часа для одной пары образцов и 48 часов для другой пары. В каждой паре один объект депластинировался с использованием минерального масла [6].

После депластинации из фрагментов производилось выделение ДНК. Данный этап осуществлялся с помощью системы ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega, USA), предназначенной для экстракции ДНК из объектов, заключённых в парафин. 500 мкл минерального масла было добавлено к 4 фрагментам тканей, по 2 каждого типа. В каждой паре образцов один проходил депластинацию 24 часа, а второй – 48 часов, и перед исследованием все объекты находились в термостате при температуре 80°C в течение 2 минут, после чего исследование проводилось по стандартному протоколу. Для экстракции ДНК к образцам было добавлено 200 мкл буфера для лизиса, и образцы центрифугировались на скорости 9 тысяч оборотов в минуту в течение 30 секунд. После этого к образцам была добавлена протеиназа К, образцы были перемешаны и снова подверглись инкубации. На данном этапе инкубация была двухэтапной: 1 час при 56°C , затем 4 часа при 80°C . Второй этап инкубации отмечен

авторами как самый важный этап для качественной экстракции ДНК. У образцов, инкубация которых производилась с добавлением минерального масла, наблюдалось расслоение: нижняя фракция была представлена водой с растворёнными в ней нуклеиновыми кислотами, верхняя - минеральным маслом. К нижней фракции было добавлено 10 мкл рибонуклеазы А, после чего объект был инкубирован при комнатной температуре в течение 5 минут. Далее к образцу были добавлены 220 мкл ВL буфера и 240 мкл этанола, и получившаяся смесь центрифугировалась при 9 тысячах оборотов в минуту в течение 30 секунд [6]. Водяная фракция располагалась в виде «столбика» посередине пробирки и промывалась трижды.

В итоге ДНК была экстрагирована благодаря использованию 50 мкл буфера. Получившиеся образцы изучили количественным методом с использованием флуорометра Qubit 4 (Invitrogen, USA) с набором для проведения ДНК-исследований того же производителя. Целостность ДНК была определена при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле.

Образцы, применяемые для исследования, были промаркированы в зависимости от типа материала, времени инкубации и среды, в которой происходила инкубация, в результате чего было получено восемь исследуемых объектов.

Для выявления возможности последующих применений выделенной ДНК было произведено ПЦР-исследование в реальном времени (Real-time PCR). С этой целью были отобраны образцы скелетных мышц крыс.

В результате авторами было выявлено, что образцы тканей, прошедшие депластинацию метоксидом в течение 24 и 48 часов, показали снижение их жёсткости, что говорит о полном удалении силикона из пластированных объектов. Депластинация была описана Файерсоном как процесс, длящийся минимум 48 часов. В данном эксперименте авторами было установлено, что успешная депластинация возможна и при 24 часах экспозиции. Однако образцы, депластинируемые метоксидом в течение 48 часов, показали большее содержание ДНК в получившемся материале. Так, количество выделенной ДНК варьировало в пределах от 3,51 до 30,6 мкг/мл [6].

При визуализации результатов электрофореза с агарозным гелем образец с наименьшим количеством ДНК показал самую тонкую полосу ДНК, а образец с наибольшим количеством ДНК показал самую широкую полосу.

Данное исследование наглядно демонстрирует иные векторы применения пластированных анатомических препаратов и описывает технологию получения ДНК из них, где, в том числе, важную роль имеет время депластикации и участие в технологическом процессе минерального масла.

Вместе с тем, возможно создание пластированных микропрепаратов [7]. Для этого производятся срезы толщиной не более 250 мкм с готовых пластированных блоков. Этап дегидратации включает в себя обработку биологических объектов чистым ацетоном при температуре -25°C в течение 12 суток с трёхкратной его заменой. На следующем этапе, с целью окончательного удаления воды и жира, используется метилхлорид, время экспозиции которого составляло от 4 до 7 суток. Сложность данного этапа заключается в токсичности метилхлорида, что обязывает предпринимать усиленные меры по обеспечению безопасности.

Импregnация производится в термостате при температуре от 30 до 65°C - именно такой температурный режим позволял добиться определённой вязкости эпоксидной смолы. Состав эпоксидной смеси: смола E12, отвердитель E6 и катализатор E600 в массовом соотношении 100:50:0,2. Перед началом импregnации каждый образец помещался в смолу на 24 часа при давлении 760 мм рт. ст. Далее температура повышалась до 30°C , а на пятый день импregnации - до 60°C [7].

После окончания стадии импregnации производились срезы полученных блоков. Для этого применялась низкоскоростная алмазная пила, что позволило добиться толщины среза не более чем 250 мкм.

В результате авторами технологии был сделан вывод, что при импregnации эпоксидной смолой большое значение имеет температура. Так, при температуре 5°C смола имеет более высокую вязкость, что может помешать импregnации, а при 30°C вязкость смолы позволит провести более качественную импregnацию. Для достижения полной полимеризации смолы при 60°C необходимо использование катализатора E600 [7].

При проведении всех манипуляций с образцами биологического материала неминуемо происходит потеря объёма и массы исходного образца [8], что может негативно сказаться на качестве получившегося препарата, если пренебрегать этими изменениями. В соответствии с соблюдением всех этических норм были получены 6 образцов различных органов собаки: головной мозг, сердце и почки. Образцы были промыты под проточной водой, измерены при помощи нониусного штангенциркуля и взвешены, после чего рассечены сагиттально и помещены в раствор формальдегида, приготовленного в соотношении формальдегида к воде 1:3. Фиксация в данном растворе проводилась в течение 3 месяцев.

Далее была проведена дегидратация образцов, которая осуществлялась в чистом ацетоне. Соотношение объёма биологического объекта к объёму ацетона было 1:10 [8]. Объекты помещались в ацетон без предварительного промывания и хранились

в нём при температуре -20°C . На этой стадии концентрация раствора определялась при помощи ацетонометра. По мере уменьшения концентрации ниже 99 % ацетон подлежал замене. Из головного мозга жировой компонент удалялся в условиях комнатной температуры при недельной экспозиции. Дегидратация сердца и почек занимала 4 недели, а дегидратация и удаление жира из головного мозга – 5 недель.

Импregnация производилась с использованием силикона марки Biodur S10 и S3. Оба компонента были перемешаны между собой в соотношении 100:1, а образовавшиеся при перемешивании пузыри воздуха были удалены посредством помещения ёмкости со смесью в вакуумную камеру на 6 часов, после чего объекты были размещены в ёмкости со смесью без вакуумного воздействия на 24 часа. После этого давление постепенно понижалось по мере появления пузырей. Процесс считался завершённым при условии отсутствия воздушных пузырей по достижении давления в 5 мм рт. ст. Этот процесс занял 5 недель. Отвердевание объектов производилось при помощи отвердителя Biodur S6. Объекты помещались в ёмкость той же марки, модель НН13А1.0 [8]. Данная ёмкость была оснащена вентилятором, тремя колбами Эрленмейера объёмом по 500 мл каждая и тремя стеклянными трубками. Процесс происходил посредством запуска множества четырёхчасовых циклов с ежедневной двукратной сменой положения объекта. После двух недель обработки отвердителем в ёмкости объекты помещались в пластиковые зиплок-пакеты, где находились ещё 3 недели до полного окончания полимеризации.

По завершении пластинации авторами были произведены повторные замеры в целях оценки усадки. Минимальный процент усадки составил 11,07 %, максимальный – 22,47 %. Отдельно авторами отмечен ствол головного мозга, который не подвергся усадке. Среднее значение усадки составило 15,52 %. Самые высокие процентные показатели усадки показали головной мозг и почка.

Для пластинации может применяться не только силикон. Известна методика пластинации биологических объектов при помощи пластика, полученного из отходов [9]. Использованные пластиковые отходы были получены из различных общественных мест. Человеческий биологический материал был получен от тел умерших пациентов после патологоанатомического вскрытия. Животный материал был

получен с мясных производств. С органов были удалены все посмертные сгустки крови, от печени был отсепарирован желчный пузырь, были также отсепарированы мозговые сосуды и конечности. Все полученные фрагменты были промыты под проточной водой перед дальнейшей пластинацией.

После препарирования образцы фиксировались в 5 % растворе формалина с соотношением объёма фиксирующей жидкости к объёму органа 20:1 в течение двух недель, за исключением головного мозга. Головной мозг фиксировался отдельно: на первом этапе фиксация производилась в 20 % растворе формалина 48 часов, после чего он перемещался в 5 % раствор на 2 месяца [9]. Дегидратация производилась в абсолютном ацетоне при нормальных условиях. Концентрация ацетона контролировалась ацетонометром. За две недели, которые занимала дегидратация в работе авторов, должно быть произведено не менее трёх смен ацетона.

Импregnация производилась также в нормальных условиях. В качестве полимера была использована смола, полученная из пластиковых отходов и термокола в равных количествах, растворённых в 15 % органическом растворителе. К получившейся смеси был добавлен вазелин в соотношении 500 г на 10 л. Биологические объекты, по мере пропитывания раствором, постепенно погружались в него, полное погружение в раствор свидетельствовало об окончании импregnации. В среднем у авторов этот процесс занял 2-4 недели. После завершения импregnации излишки полимера удалялись. Окончательное отвердевание проходило с использованием 5 % древесного раствора. Им образцы обрабатывались дважды в день с интервалом в 2-3 дня, после чего сушились при комнатной температуре.

В результате получившиеся пластинированные препараты имели естественный цвет, все анатомические структуры были визуальными определяемы с возможностью понять характер их структуры.

Заключение

На сегодняшний день пластинация является современным, безопасным и надёжным способом создания анатомического макро- и микропрепарата. Несмотря на непрерывно растущее число векторов применения данной технологии, до конца изучены далеко не все её возможности, что позволяет определять пластинацию как одно из перспективных научных направлений.

Литература [References]

- 1 Sargon M.F., Tatar I. Plastination: basic principles and methodology. *Anatomy*. 2014;8:13-18.
- 2 Bakıcı C., Yunus H.A., Batur B., Ekim O. Anatomical evaluation and preparation procedure of a cross-sectioned kidney plastination of a thoroughbred horse with local polyester resin. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2023;70(4):413-418.
- 3 Sittel C., Eckel E., Ricke S., Stennert E. Sheet plastination of larynx for whole-organ histology. *Acta Anatomica*. 1997;158:74-80.

- 4 Sora M.C., von Horst C., Latorre R. Ultra-thin sectioning and grinding of epoxy plastinated tissue. *Anatomia Histologia Embryologia*. 2019;48(6):564-571.
- 5 Latorre Rafael, de Jong K., Sora M.-C., López-Albors O., Baptista C. E12 technique: Conventional epoxy resin sheet plastination. *Anatomia Histologia Embryologia*. 2019;48(6):557-563.
- 6 Ottone N.E., Baptista Carlos A.C., del Sol M., Ortega M.M. Extraction of DNA from plastinated tissues. *Forensic Science International*. 2020;309.
- 7 Ottone N.E. Micro-Plastination. Technique for Obtaining Slices below 250 µm for the Visualization of Microanatomy in Morphological and Pathological Experimental Protocols International. *Journal of Morphology*. 2020;38(2):389-391.
- 8 Ana Belén Toaquiza; Carlos Gómez; Nicolás E. Ottone, María Revelo-Cueva Conservation of Organs (Heart, Brain and Kidney) of Canine by Cold-Temperature Silicone Plastination in an Animal Anatomy Laboratory in Ecuador / Ana Belén Toaquiza; Carlos Gómez; Nicolás E. Ottone, María Revelo-Cueva // *International Journal of Morphology*. – 2023. – № 41(4). – С. 1004-1008.
- 9 Vishveswara Ramkrishna, Leelavathy Nanjappa. The use of waste plastics for plastination of organic materials and in civil construction materials / Vishveswara Ramkrishna, Leelavathy Nanjappa // *Waste Management and the Environment*. – 2019. – № 231. – С. 193-200.

Авторская справка**Артищев Вячеслав Петрович**

Аспирант, Медицинский университет «Реавиз»; преподаватель анатомии человека, Московский медицинский колледж «Реавиз». ORCID 0000-0003-1299-9539; artishchev.vyacheslav@gmail.com
Вклад автора: разработка методики пластинации.

Супильников Алексей Александрович

Канд. мед. наук, доцент, первый проректор по научной деятельности, Медицинский университет «Реавиз». ORCID 0000-0002-1350-0704; a.a.supilnikov@reaviz.online
Вклад автора: анализ данных литературы.

Крупин Константин Николаевич

Канд. мед. наук, доцент кафедры судебной медицины им. П.А. Минакова, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова. ORCID: 0000-0001-6999-8524; krupin_kn@rsmu.ru
Вклад автора: анализ данных литературы.

Фришонс Ян

Кафедра анатомии, гистологии и эмбриологии факультета ветеринарной медицины, Ветеринарный университет Брно. ORCID 0000-0003-2998-260
Вклад автора: подготовка выводов и заключения.

Author's reference**Vyacheslav P. Artishchev**

Postgraduate student, Medical University "Reaviz"; lecturer in human anatomy, Moscow Medical College "Reaviz". ORCID 0000-0003-1299-9539; artishchev.vyacheslav@gmail.com
Author's contribution: development of plastination technique.

Aleksey A. Supilnikov

Cand. Sci. (Med.), Docent, First Vice-rector for Scientific Activity, Medical University "Reaviz". ORCID 0000-0002-1350-0704; a.a.supilnikov@reaviz.online
Author's contribution: literature data analysis.

Konstantin Nikolaevich Krupin

Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Forensic Medicine named after P.A. Minakov, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov. ORCID: 0000-0001-6999-8524; krupin_kn@rsmu.ru
Author's contribution: literature data analysis.

Jan Frishons

Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno. ORCID 0000-0003-2998-260
Author's contribution: preparation of findings and conclusions.