

3 lesson

# Sectioning

# The **FIVE MAIN STAGES** in the preparation of histology slides are:

1. Fixing

2. Processing

3. Embedding

**4. Sectioning**

5. Staining

# 4. Sectioning

- Sectioning an embedded tissue sample is the step necessary to produce sufficiently thin slices of sample that the detail of the microstructure of the cells/tissue can be clearly observed using microscopy techniques (either light microscopy or electron microscopy).
- Possible orientations at which tissue samples may be sectioned include:

**Vertical sectioning** perpendicular (i.e. at right-angles) to the surface of the tissue. This is the most common method.

**Horizontal sectioning** is often done for the study of hair follicles and structures that include hairs, hair follicles, arrector pili muscles, and sebaceous glands in general. Such structures are sometimes called "pilosebaceous units".

**Tangential to horizontal sectioning** is done in chemosurgery, which is a form of microscopically controlled surgery used to treat certain types of skin cancer.

- The method used to actually cut sections from the hardened block of tissue depends on the type of microscopy that will be used to observe it and hence the thickness of sample required. In the case of samples to be studied using light microscopy, a steel knife mounted in a microtome may be used to cut 10 $\mu$ m tissue sections which are then mounted on a glass microscope slide. In the case of samples to be studied using transmission electron microscopy, a diamond knife mounted in an ultramicrotome may be used to cut 50 nm tissue sections which are then mounted on a 3-millimeter-diameter copper grid.

# A microtome

- (from the Greek mikros, meaning "small", and temnein, meaning "to cut") is a tool used to cut extremely thin slices of material, known as sections.

# Microtome types



**Sledge microtome**



**Rotary microtome**

# Sledge microtome

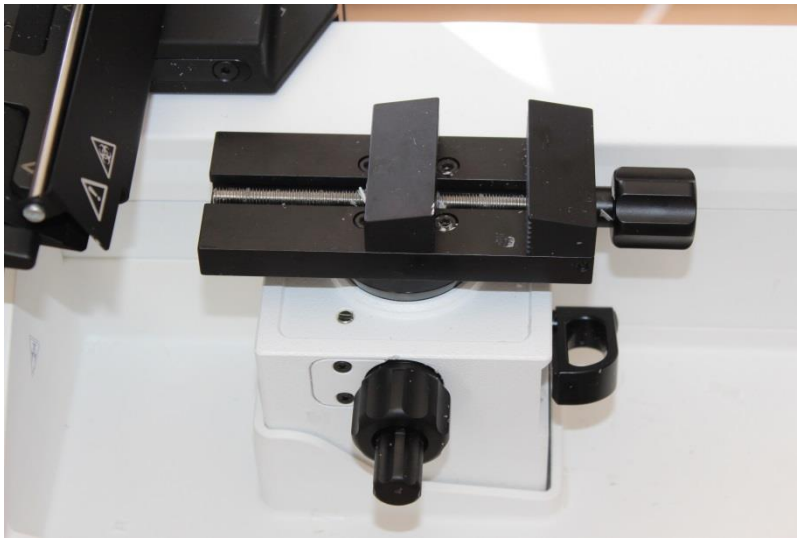


# Rotary microtome



# Столик объектодержателя

**Стандартный**



**Кассетный**



# A sledge microtome

A sledge microtome is a device where the sample is placed into a fixed holder (shuttle), which then moves backwards and forwards across a knife. Modern sled microtomes have the sled placed upon a linear bearing, a design that allows the microtome to readily cut many coarse sections. By adjusting the angles between the sample and the microtome knife, the pressure applied to the sample during the cut can be reduced. Typical applications for this design of microtome are of the preparation of large samples, such as those embedded in paraffin for biological preparations. Typical cut thickness achievable on a sledge microtome is between 1 and 60  $\mu\text{m}$ .





# Rotary microtome

- This instrument is a common microtome design. This device operates with a staged rotary action such that the actual cutting is part of the rotary motion. In a rotary microtome, the knife is typically fixed in a horizontal position.
- Principle of sample movement for making a cut on a rotary microtome
- In the figure to the left, the principle of the cut is explained. Through the motion of the sample holder, the sample is cut by the knife position 1 to position 2, at which point the fresh section remains on the knife. At the highest point of the rotary motion, the sample holder is advanced by the same thickness as the section that is to be made, allowing the next section to be made.
- The flywheel in many microtomes can be operated by hand. This has the advantage that a clean cut can be made, as the relatively large mass of the flywheel prevents the sample from being stopped during the sample cut. The flywheel in newer models is often integrated inside the microtome casing. The typical cut thickness for a rotary microtome is between 1 and 60  $\mu\text{m}$ . For hard materials, such as a sample embedded in a synthetic resin, this design of microtome can allow good "semi-thin" sections with a thickness of as low as 0.5  $\mu\text{m}$ .

# Расправление срезов 1

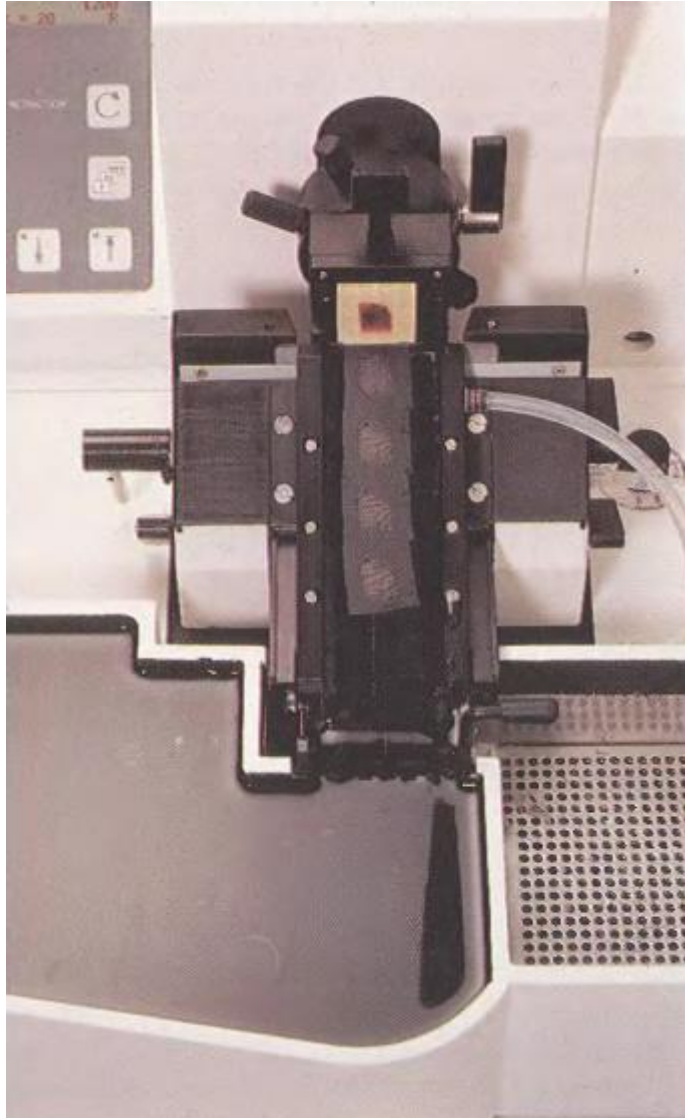


Ванночки для расправления срезов

# Cryomicrotome

- For the cutting of frozen samples, many rotary microtomes can be adapted to cut in a liquid-nitrogen chamber, in a so-called cryomicrotome setup. The reduced temperature allows the hardness of the sample to be increased, such as by undergoing a glass transition, which allows the preparation of semi-thin samples.[12] However the sample temperature and the knife temperature must be controlled in order to optimise the resultant sample thickness

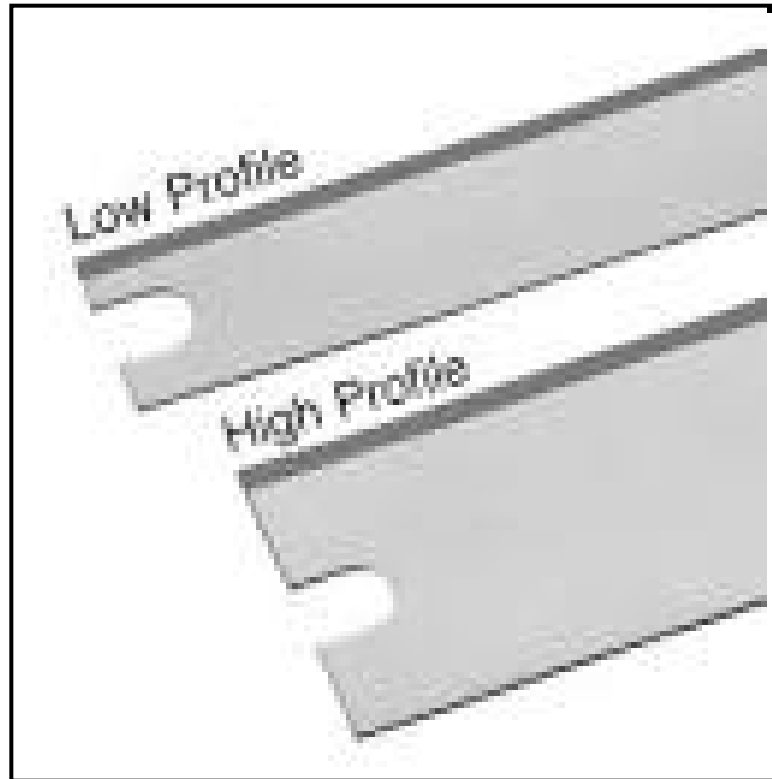
## Расправление срезов 2



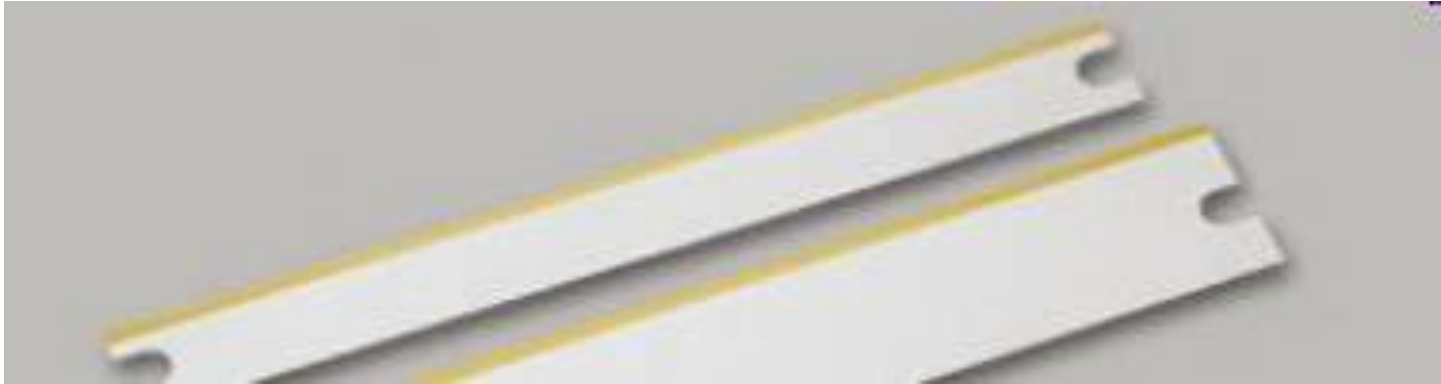
# Microtome knives (blades)

- The selection of microtome knife blade profile depends upon the material and preparation of the samples, as well as the final sample requirements (e.g. cut thickness and quality).

# Types of disposable blades



# Disposable blades Sturkey



Blades have different coatings - deposition of silver, gold, diamond and uncoated blades.

# Knife design and cut types

- [Planar concave microtome knives](#) are extremely sharp, but are also very delicate and are therefore only used with very soft samples.
- [The wedge profile knives](#) are somewhat more stable and find use in moderately hard materials, such as in epoxy or cryogenic sample cutting.
- [The chisel profile](#) with its blunt edge, raises the stability of the knife, whilst requiring significantly more force to achieve the cut.

## Knife profiles



Planar concave



Wedge

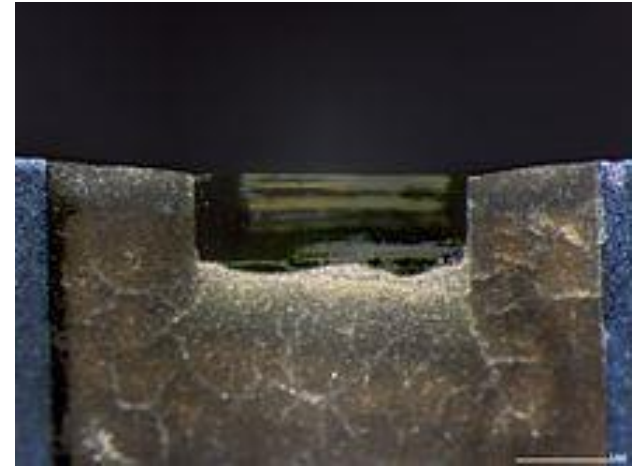


Chisel-shaped



# Knife design and cut types

- For ultramicrotomes, glass and diamond knives are required.
- **Glass knives** may be used for initial sample preparations even where **diamond knives** may be used for final sectioning.



A diamond knife blade used for cutting ultrathin sections (typically 70 to 350 nm) for transmission electron microscopy.

## Advantages of reusable microtome knife

- Durable, reusable, can be sharpen for many times.
- Very Strong.

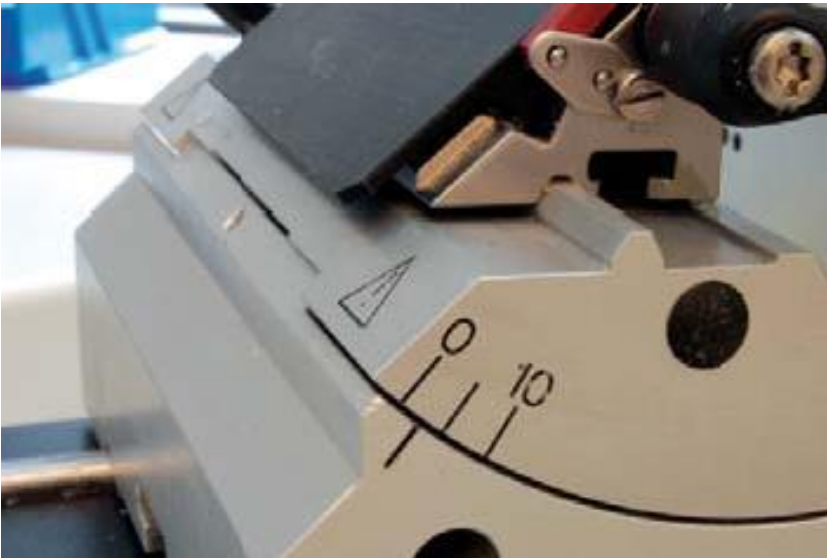
## Disadvantages of reusable microtome knife

- Sharpening required equipment, supplies and time.
- We need an experienced technology, who can properly sharpened the knife.
- Deep notch is very difficult to correct.

# The advantages of disposable blades

- Have low and high hardness.
- Manufactured industrially.
- They don't need sharpening.
- The amorphous layer on the surface is created of teflon coated metal or composite material.
- Blade can cut from 20 to 120 units (blocks).

# The optimum angle of the blade in a rotary microtome



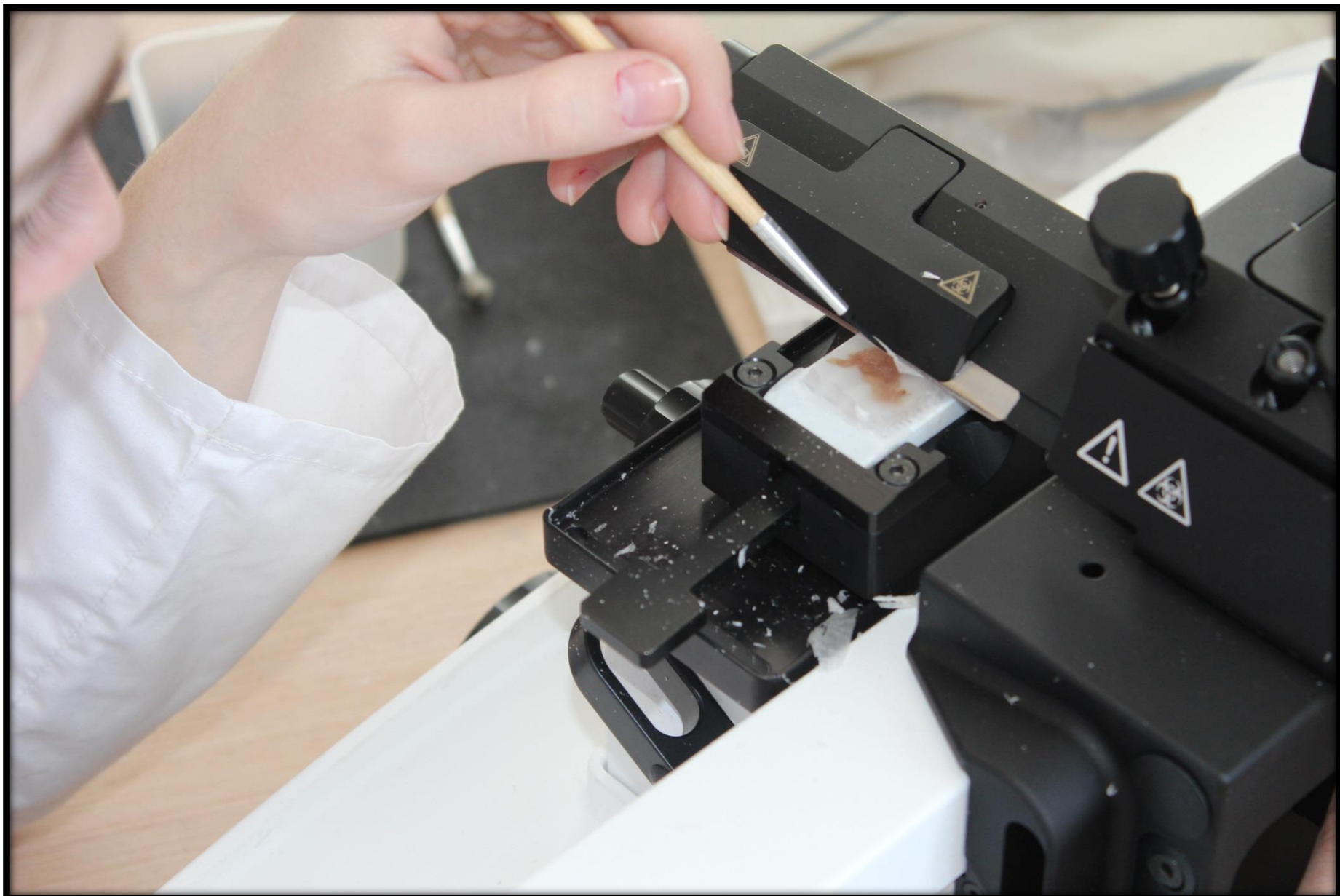
Optimal angle is about 0-5°.

# Sectioning

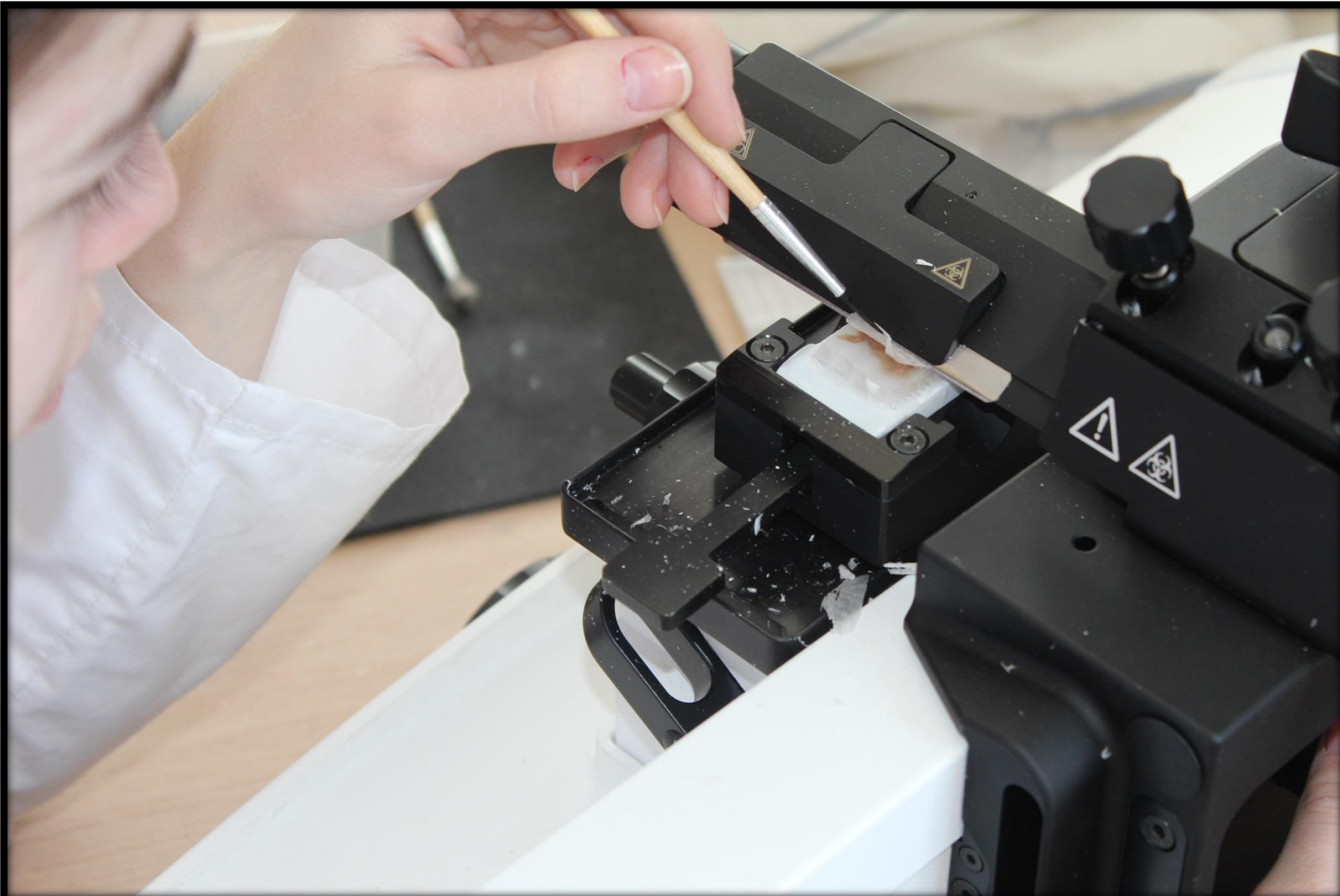
- Prior to cutting by microtome, biological materials are usually placed in a more rigid fixative, in a process known as embedding.

# Sectioning stages

- Cool paraffin block (keep in the freezer until the morning)
- Customize microtome, to heat the water in the bath.
- If necessary, cut off the excess wax from the sides and front of the block with a scalpel.
- Begin with rough cutting and cut off the excess material to the required depth (usually enough to 10-15 movements at 30 microns).
- Cut 5-6 thin slices to the polishing surface of the block. Throw out these sections.
- Cut slices of the required thickness. For routine diagnostic purposes and immunohistochemistry sufficient thickness is about 3-4 microns.
- Spread slices on a water surface and to catch them on the glass. Extract glass with a slice almost vertically.
- Dry up the end with the filter paper
- Sign glass and dried it at 60 ° C vertically for 20-30 minutes.
- Put the block into the archive











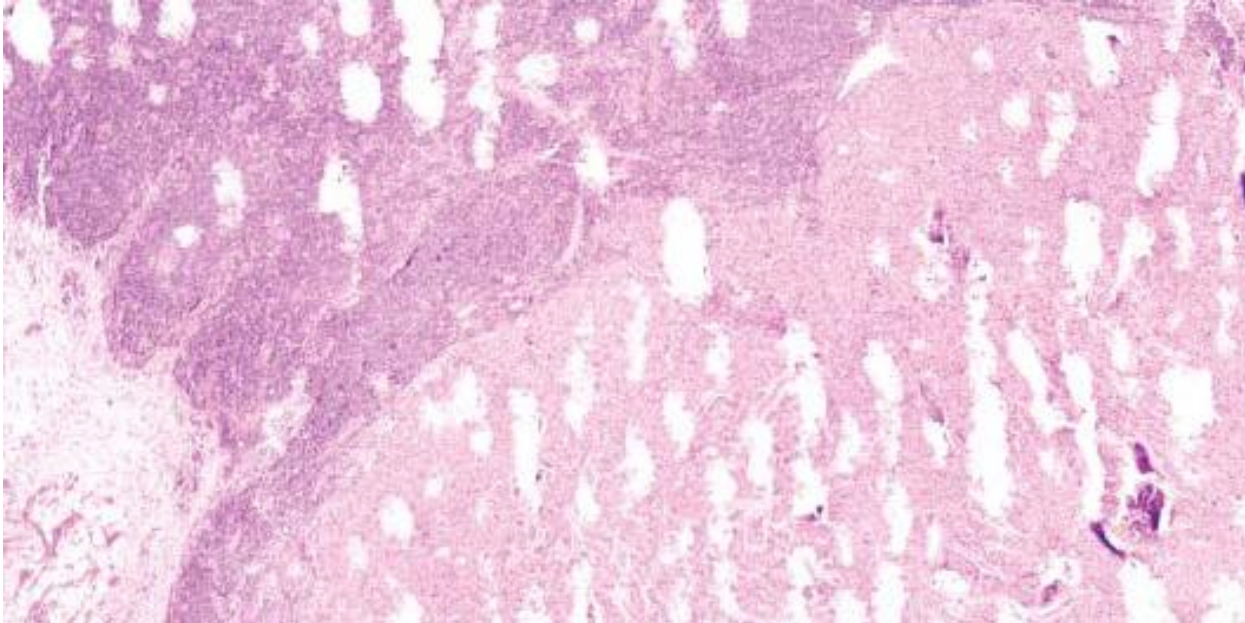








# Artifacts 1

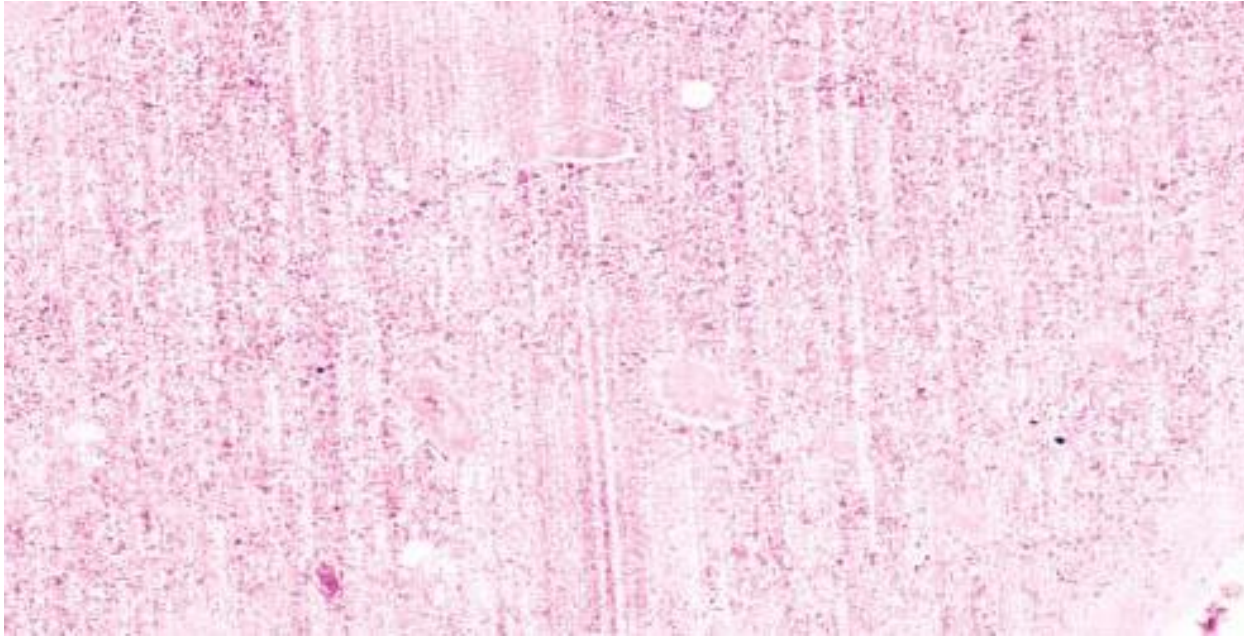


The surface of the block was not polished before receiving this thin section.

Holes is the traces of rough cutting thick slices. The first 5-6 thin slices can not be used for further work.

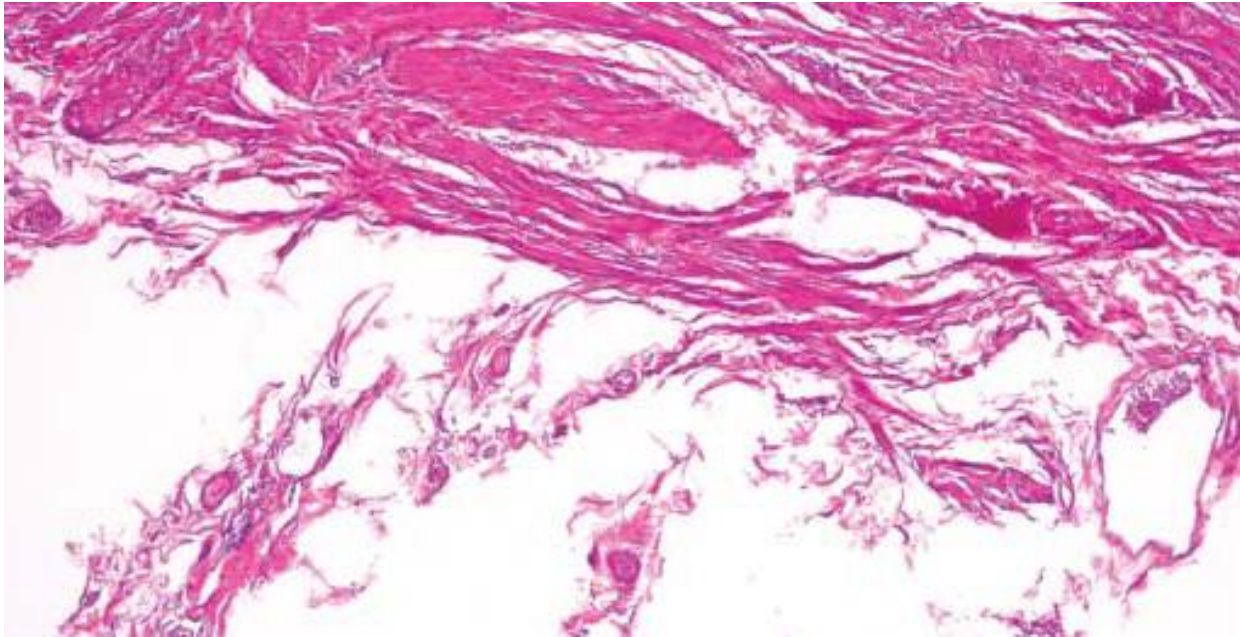


## Artifact 2



Dirt on the cutting edge of a knife or a notch.  
Perhaps the remains of buffer salts in poor flushing material  
before posting.

## Артефакты микротомии 3



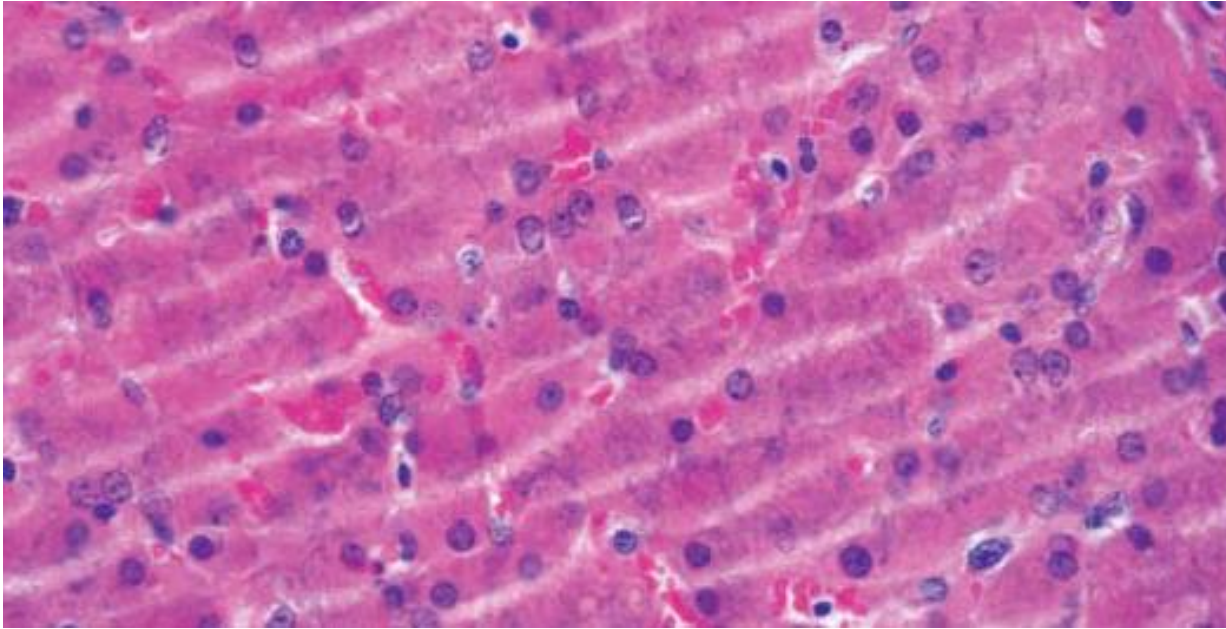
Material compressed with knife.

Inadequate embedding or messy reagents

Incomplete straighten sections in a water bath.

Too hot water in the swimming bath.

## Artifact 4



Excessive dehydration or enlightenment (in xylol) of the material.

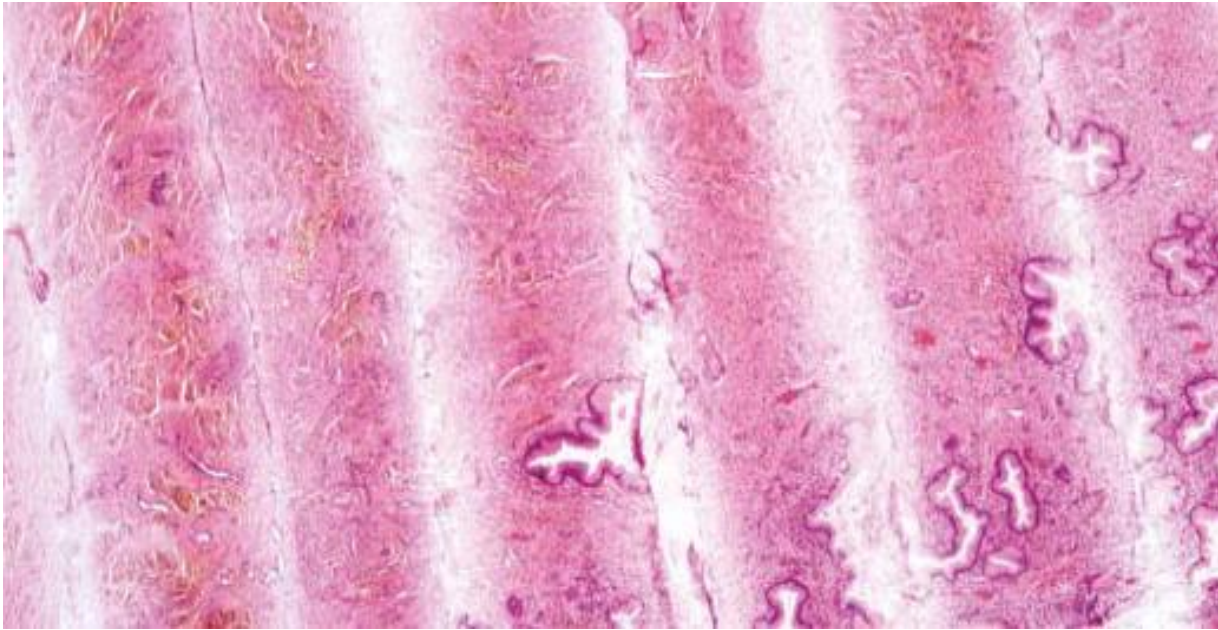
Too cold block

Poorly tightened jaws and knife holder.

Wrong angle.



## Artifact 5



Poorly tightened jaws and knife holder.  
Too tight pattern - defects in embedding  
The cut is made too quickly.  
Insufficient angle of the knife.  
Problems with the microtome.

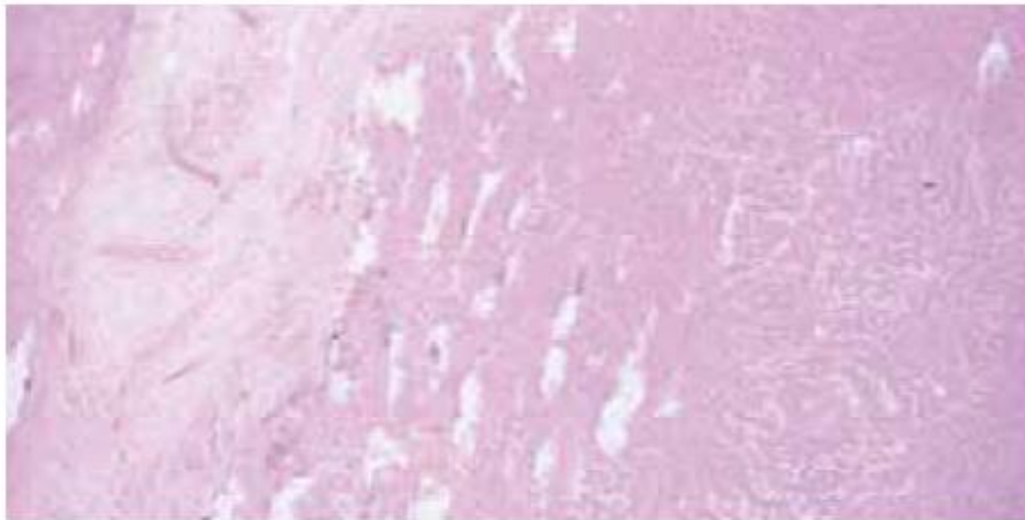
# Подрезка блоков



Подрезка (тримминг) блоков производится бережно, чтобы не утратить важные фрагменты ткани. Для полировки поверхности блока толщину последних нескольких срезов тримминга всегда следует делать равной конечной толщине среза.



Для ускорения процесса блоки подрезаются не аккуратно. Поверхность не полируется перед изготовлением финальных срезов. Это приводит к формированию большого количества рваных дефектов ткани, похожих на дырки "проеденные молью".



При быстром и неаккуратном подрезании блока с его поверхности выбиваются отдельные фрагменты, что ведет к образованию многочисленных дефектов в срезе (H&E).

## Использование лезвий высокого качества

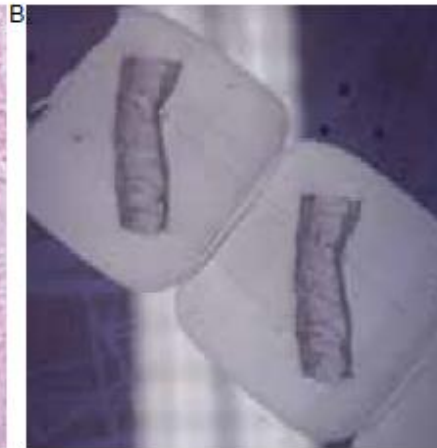
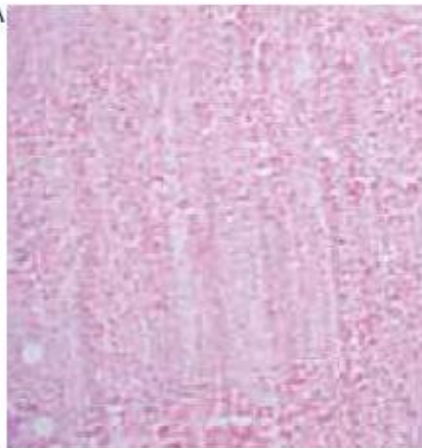


Для микротомии всегда следует использовать острые лезвия высокого качества.



Не следует использовать лезвия после появления на нем полос.

А



А На образце среза селезенки (Н&Е) видны множественные параллельные линии (борозды), образовавшиеся вследствие использования тупого ножа.

В Срезы после расправления на водяной бане. Видны грубые полосы от ножа, проходящие через весь срез. Похожие эффекты лучше видны во время флотации.

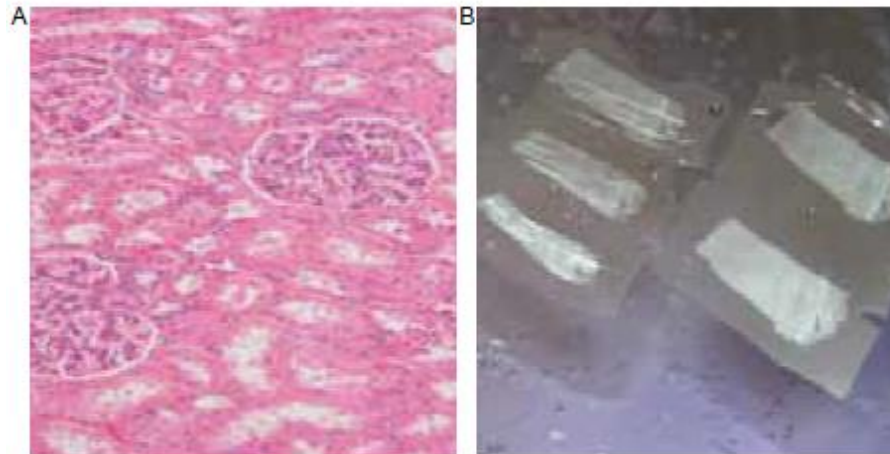
# Охлаждение блоков



Для микротомии всегда следует использовать охлажденные блоки.



Если для микротомии используются неохлажденные блоки. Это приводит к сильной деформации образца при резке.



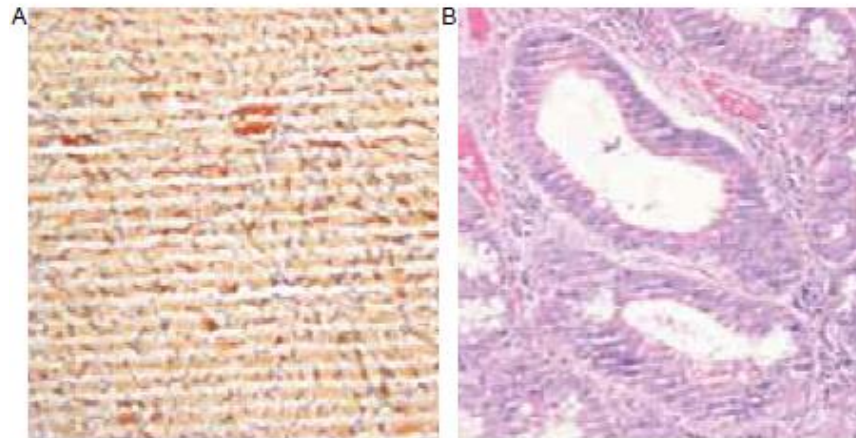
А На образце среза почки (H&E) видны трещины в почечных клубочках вследствие сильной деформации блока при микротомии.

В Срезы с одного и того же блока, прошедшие процедуру расправления во флотационной емкости. Слева – срезы, сделанные с неохлажденного блока, справа – срезы сделанные с охлажденного блока.



# Скорость реза

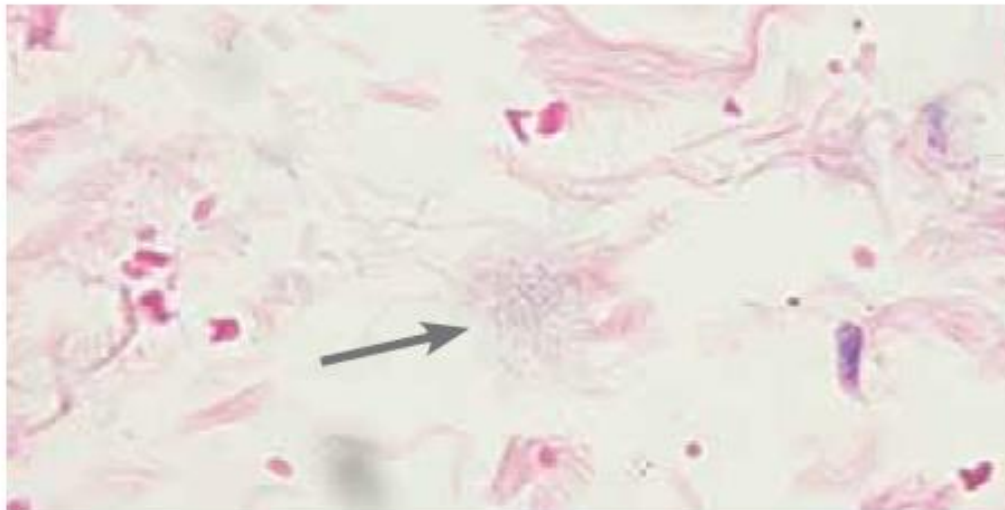
- ✓ При нарезки последних срезов блока следует устанавливать малую скорость реза и обращаться с прибором осторожно.
- ✗ Часто микротомия производится при быстрой скорости реза в надежде, что избыточное сморщивание срезов будет устранено при их расправлении на водяной бане.



- A На образце среза печени (Reticulin stain) видны следы вибрации ножа вследствие слишком быстрой резки хрупкой плотной ткани охлажденного блока. Уменьшение скорости реза может устранить этот дефект. Следы вибрации могут обнаруживаться в микропрепарате также если блок или нож недостаточно плотно закреплены в микротоме
- B Образец среза железистой ткани (H&E) показывает следы вибрации вследствие слишком быстрой резки переохлажденного блока.

# Использование чистой воды

- ✓ Воду в емкости для флотации (водяная баня) следует заменять регулярно.
- ✗ Если вода в емкости заменяется редко, а только добавляется. На срез могут попасть загрязняющие реагенты, (например, споры грибов или фрагменты срезов с других блоков).



Образец среза брюшной полости (H&E). Колонии слабоокрашенных микроорганизмов, представленные также и за пределами среза. Вероятным источником данных микроорганизмов может быть флотационная емкость.

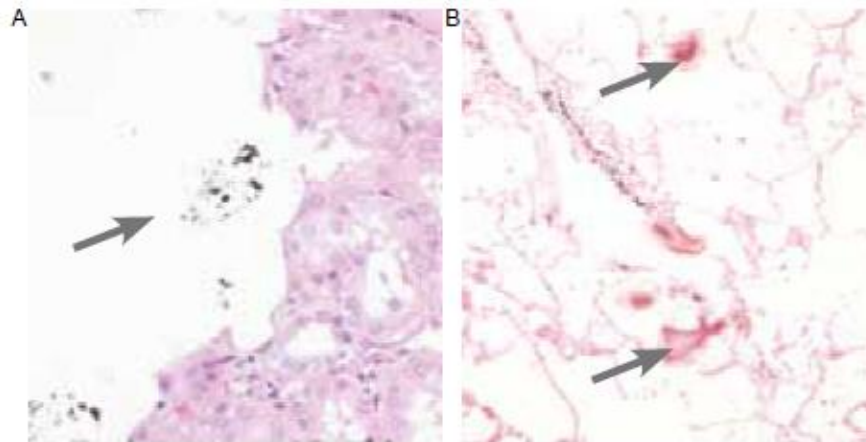
## Использование чистых предметных стекол



Перед использованием всегда следует проверять чистоту предметных стекол. Прикосновение к стеклам руками необходимо свести к минимуму, чтобы предотвратить загрязнение их чешуйками плоского эпителия кожи рук.



Если чистота предметных стекол не контролируется, на них попадают частички грязи и микроорганизмы. Испарения, посторонние организмы и другие загрязнения могут испортить высококачественный срезю

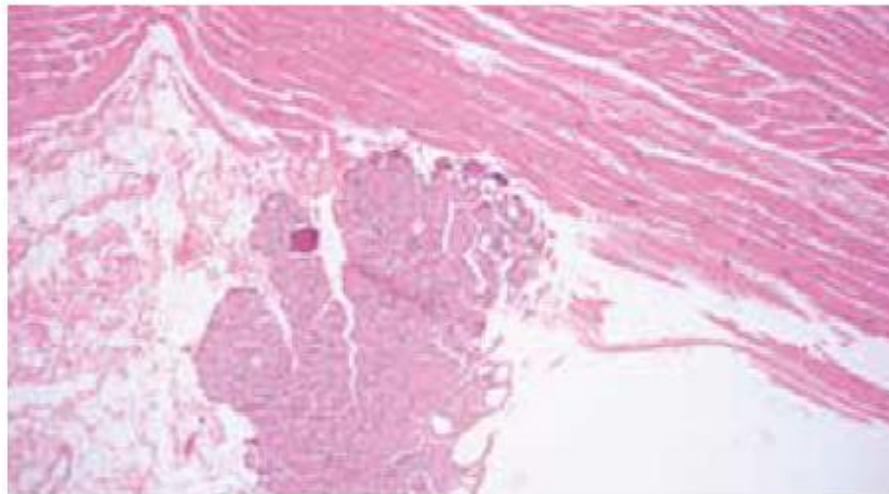


- A Образец среза почки загрязнен черным веществом, которое находилась на стекле до помещения на него образца. Это загрязнение можно увидеть на другой части стекла.
- B Образец срез легкого показывает бесструктурные оксифильные комочки - возможно частички адгезива. Вероятно, адгезив (возможно, основанный на желатине) находился во флотационной жидкости. Протеиновые клетки адгезива сконденсировались при высушивании микропрепарата. Предварительное высушивание среза может предотвратить данную проблему.



## Предотвращение попадания на срез фрагментов других срезов

- ✓ Поверхность воды во флотационной емкости следует очищать после каждого блока во избежание попадания частиц среза одного образца на срезы другого.
- ✗ Если поверхность воды во флотационной емкости не очищается после каждого блока. Это может привести к попаданию частичек одного препарата на другой и быть причиной диагностических ошибок.



Образец среза миокарда, загрязненный фрагментом ткани щитовидной железы из другого блока. Это пример попадания одного образца на другой во флотационной емкости.



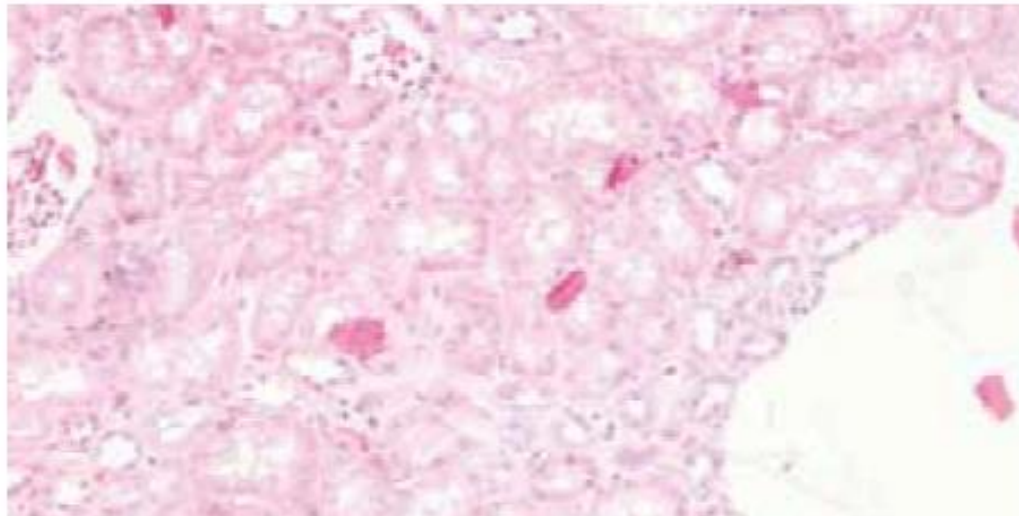
# Предотвращение попадания на срез чешуек плоского эпителия с рук



Следите за тем, чтобы частицы волос или кожи с рук не попадали на срезы, плавающими на поверхности воды во флотационной емкости, это может привести к загрязнению срезов чешуйками плоского эпителия.



Микропрепараты, изготовленные неопытными сотрудниками, часто содержат в большом количестве чужеродные загрязнения в виде чешуек плоского эпителия. Постарайтесь избежать этого.



Образец среза почки содержит большое количество посторонних кератиновых чешуек, наложенных на срез и рядом с ним. Они становятся твердыми и в дальнейшем окрашиваются эозином.

# Предотвращение движения нескольких блоков

- ✓ Срезы более чем с одного блока не должны находиться вместе во флотационной емкости.
- ✗ Не следует оставлять во флотационной емкости срезы двух или нескольких блоков. Это может привести к неверной идентификации образцов. Особенно высокий риск возникает при одновременной обработке тканей одного типа.



Здесь представлены срезы с двух разных блоков, одновременно находившихся во флотационной емкости. Подобный метод может привести к ошибкам и неправильной идентификации образцов.

# Предотвращение формирования складок на срезах



При помещении во флотационную емкость качественные срезы должны быстро расправляться.



Если срезы не расправляются во флотационной емкости. Причиной этому может служить слишком холодная вода в емкости, образец сморщится.



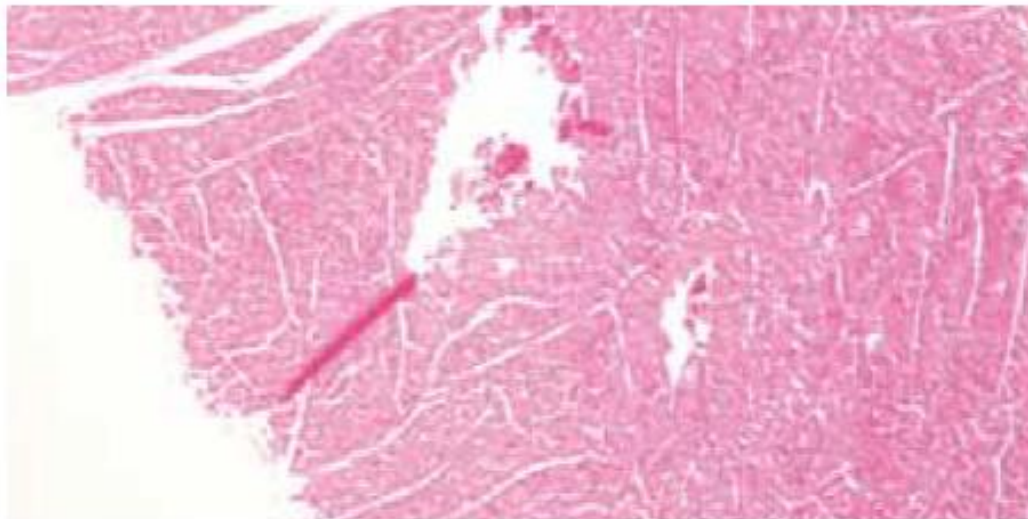
Во время флотации не происходит расправления складок на срезе, образовавшихся при микротомии. Решить проблему помогут улучшение техники микротомии и более теплая вода во флотационной емкости.



# Предотвращение повреждения срезов

✓ Расправление складок на срезах с помощью щеточки или щипцов следует выполнять чрезвычайно аккуратно, чтобы не повредить срез.

✗ Если расправление складок на срезах с помощью щеточки или щипцов выполняется энергичными движениями. В результате этого возникают макро- и микроскопические повреждения срезов.



Образец среза миокарда, окрашенный Н&Е - следы механического повреждения, вызванного попыткой расправить складку на срезе при флотации.

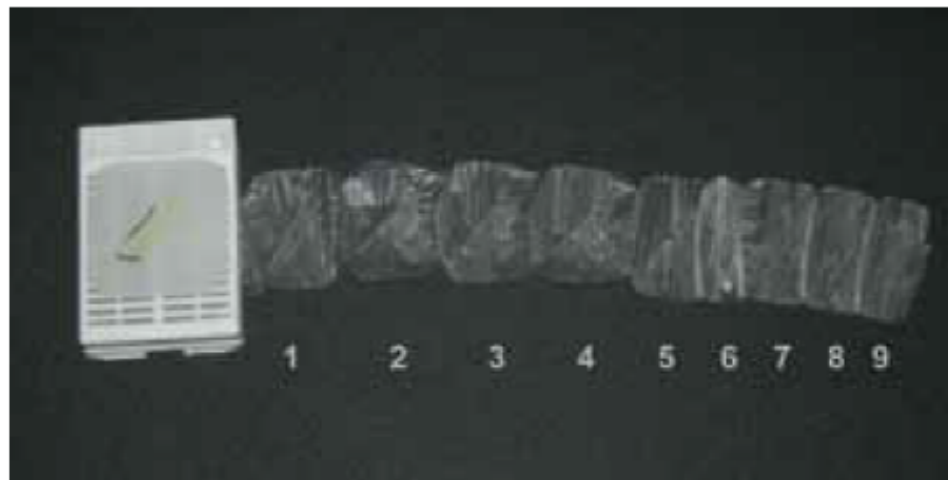
# Выбор срезов



Никогда не следует переносить на стекло первый и второй срезы из серии.



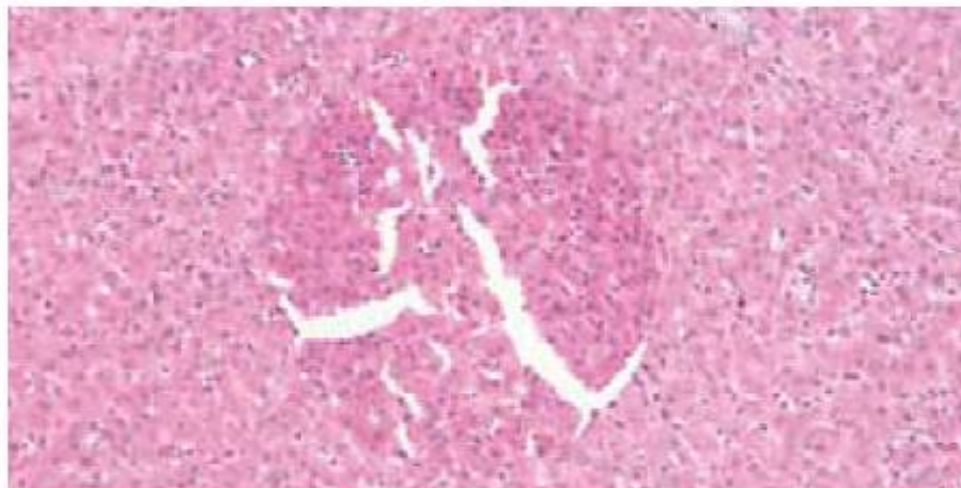
Первый и второй срез одной серии выбираются для исследования, они всегда выглядят лучше, чем остальные срезы. Первый и второй срезы выглядят лучше поскольку они всегда толще из-за теплового расширения холодного блока при первом прохождении ножа.



Срезы в серии пронумерованы в той последовательности, в которой они были изготовлены. Первые два среза кажутся наиболее широкими (они менее сжаты), по мере нагревания блока они становятся уже (более сжатыми). Несмотря на то, что микротом был установлен на 3 мкм, первые два среза будут иметь толщину 4-5 мкм вследствие теплового расширения.

# Предотвращение формирования пузырей под срезами

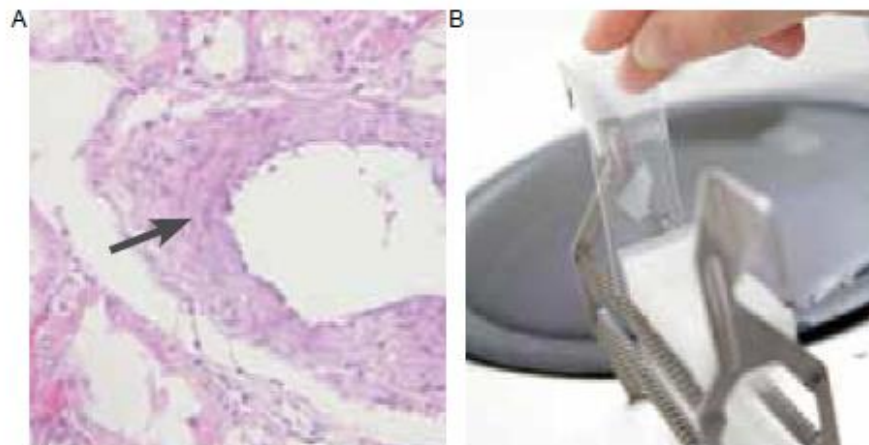
- ✓ Предотвращайте образование пузырьков воздуха во флотационной емкости. Любые видимые пузырьки воздуха плавающие на поверхности флотационной жидкости следует удалять до того, как срезы помещаются в воду.
- ✗ Если Вы игнорируете пузырьки воздуха во флотационной емкости. Любые пузырьки, попадающие под срез исчезают при его высыхании. Несмотря на это, область среза над пузырьком часто разрушается и может быть утрачена во время окрашивания.



Образец среза печени, окрашенный Н&Е – фокус повреждения среза округлой формы с трещинами в центре. Причиной их образования явился пузырек воздуха, попавший под срез во время флотации и сделавший невозможной расправление и адгезию среза в этом месте.

# Удаление воды перед сушкой

- ✓ Перед переносом стекол на плитку или в сушильный аппарат их необходимо немного просушить.
- ✗ Срезы, помещенные в горизонтальное положение, недостаточно просыхают.. Необходимо предотвратить движение среза на стекле.

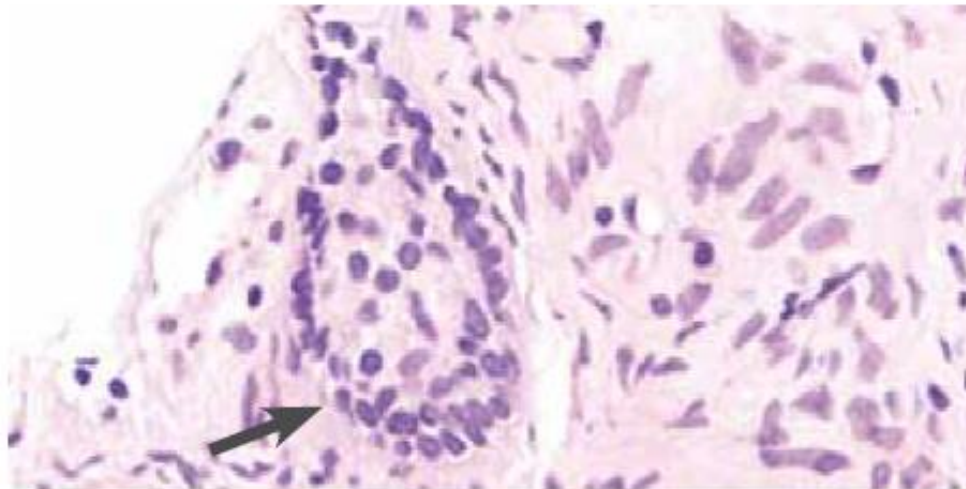


- A Данный микропрепарат был высушен без предварительного удаления воды. В результате в центре образовалась деформация среза в виде выпуклой зоны вне фокуса.
- B Микропрепарат только что извлечен из флотационной емкости и будет короткое время просушен вертикально перед помещением в сушильный аппарат . Это предотвратит проблему, показанную на рисунке А.



# Поддержание оптимальной температуры сушки

- ✓ Температуру в сушильном аппарате следует постоянно контролировать.
- ✗ Если температура в сушильном аппарате превышает установленные значения. Это может вызывать появление «тепловых пятен» и участков неравномерного окрашивания препарата

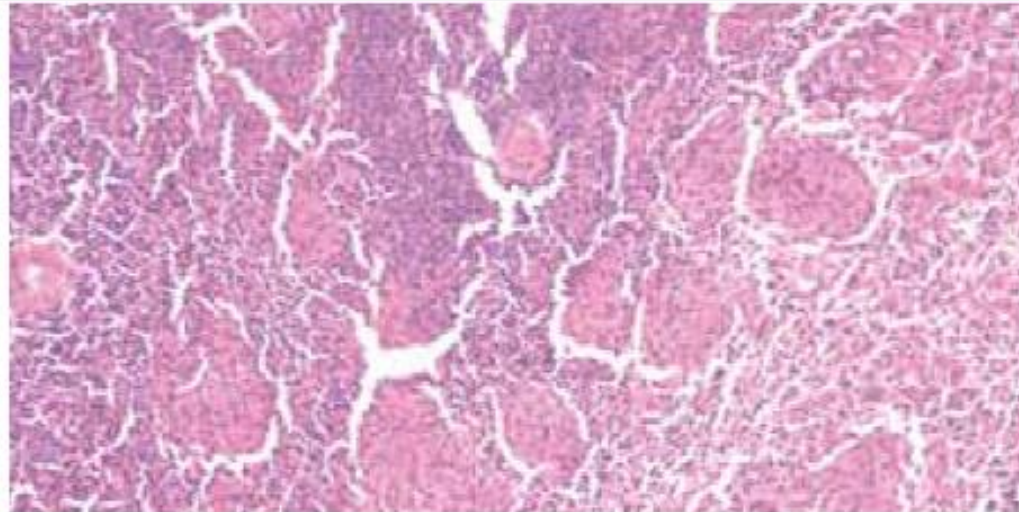


Образец среза предстательной железы – фокус термического повреждения ядер при высокой температуре сушки. Также причиной может служить неправильная проводка образца. Расплавление ядер встречается чаще всего по периферии образца, обычно в эпителиальной ткани, и выражается в неравномерной их окраске. Подобный процесс может также выражаться появлением розовых или яркоголубых пятен.



# Продолжительность сушки

- ✓ Необходимо тщательно следить за минимальной и максимальной продолжительностью сушки.
- ✗ Продолжительность сушки может значительно изменяться. Длительная сушка при высоких температурах может быть губительна для срезов.



Образец среза лимфатического узла (H&E), большое количество трещин вследствие длительной сушки при высокой температуре. Похожий эффект может давать также и слишком длинная программа проводки.

# Cracks in block

## Causes

- Rapid cooling of high (up to 2 cm) blocks.
- Excessive compression of the block in the microtome clamp.
- Inadequate wax composition.

## Solutions

- Do not admit rapid cooling of the high blocks.
- Clamp the block in the clip firmly, but not excessively. Use paraffin with plasticizers.

# Cutting Problems

## 1. Cut on an angle

- It is important to make sectioning cuts that are perpendicular to the longitudinal axis of the root. This seems basic, however it is much more difficult to perform and to sustain throughout the sectioning of an entire segment. When one cut is made an angle, all subsequent sections will be at an angle, until a cut is made to renew the perpendicular surface.

Angled cuts can be identified in the following ways:

- the section or cells within it are oval in shape
- one can focus through several cell layers in one area of the section
- part of the section appears to be “smeared”

# Cutting Problems

## 2. Cut too thin

- This problem can be identified if a section has a part missing, and/or it is not completely round.

## 3. Cut too thick

- This problem can be identified if boundaries within the section appear exceptionally thick, or if you are able to focus through several cell layers across the whole section.

# Cutting Problems

## 4. Dull Razorblade

- Cutting resistance from the blade may cause the researcher to exert extra pressure on the segment or to use a sawing motion with the blade, both without realizing it. This results in sections that appear “smeared” or misshapen, usually in an oval shape.

# Cutting Problems

## 5. Sections cut in half

- The problem here is that there are too many sections in the drop of water, and convection is bringing them back towards the razor where they are being cut in half.



# General difficulties in microtomy

- Experience microtomy purchased not only as practical work, but also during the accumulation of a certain level of knowledge of physics, geometry and chemistry.
- Monotonous work that requires precise coordination, fine motor skills, stress of many muscle groups.
- Without optimal lighting and excellent quality histological preparations of the preparation can not be
- Equally important proper working conditions, quality equipment and supplies.
- Impeccably fixed and embedded samples prepared with high-quality reagents make this operation a pleasure.