

В.А. Пчелкина

ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова», г. Москва, Российская Федерация

РАЗРАБОТКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ МЯСНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ

V. Pchelkina

The Gorbatov All-Russian Meat Research Institute, Moscow, Russian Federation

DEVELOPMENT OF HISTOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS OF RESEARCH OF MEAT RAW MATERIALS AND MEAT PRODUCTS

e-mail: pchelkina@vniimp.ru

В статье представлены результаты исследований по разработке методов гистологического и иммуногистохимического анализа мясного сырья и готовых продуктов. Целью работы является развитие методологии и усовершенствование классических микроструктурных методов выявления компонентов состава для установления фальсификации мясных продуктов. При разработанном безбиотиновом иммуногистохимическом окрашивании выявление соевого белка основано на его визуализации за счет хромогена (диаминобензидин), который придает ему коричневый цвет. Окраске подвергается только идентифицируемый компонент, а другие ингредиенты остаются не окрашенными. Данный метод предоставляет возможность применения компьютерной системы анализа изображения для количественной оценки содержания выявляемого соевого белкового компонента в автоматическом режиме.

The article describes the results of development of histologic and immunohistochemical methods of research of meat raw materials and finished products. The aim of work is the development of methodology and the improvement of classical microstructural methods of identification of composition's components to establish the adulteration of meat products. During the developed immunohistochemical color staining, the identification of soy protein was based on its visualization by means of a chromogen (diaminobenzidine) which gives it a brown color. Only the identified component is exposed to color staining, while other ingredients remain of the same color. This method gives the possibility of using a computer image analysis system for quantitative assessment of the composition of the determined soy proteins in the automatic mode.

Ключевые слова: гистологический анализ; иммуногистохимия; анализ изображения; соевые белки; метод окраски.

Keywords: histology assay; immunohistochemistry; image analysis; soy proteins; staining methods.

Введение. В связи с поступлением на потребительский рынок России большого объема и разнообразного ассортимента отечественных и импортных мясных продуктов требуется тщательный и всесторонний контроль степени их соответствия требованиям Технического регламента. Официальная оценка качества мясной продукции направлена на определение ее безопасности, практически не затрагивая установление состава использованного сырья и выяснения соответствия продукции нормативным документам.

Метод гистологического исследования, не требуя сложного оборудования, позволяет достаточно быстро получать убедительный ответ о качественном составе большинства мясных продуктов. Микроструктурные исследования позволяют судить как о структуре продукта в целом, так и об изменениях, происходящих в отдельных участках и компонентах исследуемых объектов. При этом на основе тех или иных морфологических особенностей различных тканевых и клеточных структур можно установить не только сам факт их присутствия в продукте, но и определить их количество [1].

Методы гистологического анализа, наряду с физико-химическими и молекулярно-биологическими, в настоящее время достаточно широко распространены во всем мире. Сегодня известно большое количество как классических, так и основанных на возможностях современного оборудования технических приемов подготовки образцов и получения препарата для проведения микроструктурного анализа.

На современном этапе развития гистологического оборудования и программного обеспечения для проведения исследований все шире используются компьютерные системы анализа изображения, представляющие собой модульные системы обработки изображений и проведения морфометрических исследований [2]. Данные системы позволяют существенно сократить время исследования, одновременно предоставляя возможность значительно расширить набор определяемых показателей. В настоящее время, в мясоперерабатывающей промышленности системы анализа изображений используются для измерения различных параметров мышечного волокна, для определения количества тканей и костей, особенно в мясе механической обвалки, для обнаружения растительных компонентов [3].

Во ВНИИМП активно проводятся исследования, направленные на развитие методологии и усовершенствование классических гистологических методов оценки качества для установления фальсификации мясного сырья, а также создание на этой основе методик, имеющих научно-практическое и нормативно-правовое значение для защиты интересов потребителей мясной продукции и рационального использования сырья на мясоперерабатывающих предприятиях [4].

Объектами исследования являлись модельные мясные системы, а также полуфабрикаты и готовые мясные продукты, представленные на потребительском рынке России. Гистологические исследования проводили в соответствии с традиционными методами анализа в соответствии с разработанными ранее ГОСТ 19496 – 2013 «Мясо и мясные продукты. Метод гистологического исследования», ГОСТ 31796 – 2012 «Мясо и мясные продукты. Ускоренный метод определения структурных компонентов состава», ГОСТ 31474 – 2012 «Мясо и мясные продукты. Гистологический метод определения растительных белковых добавок», а также используя авторские модификации метода. Иммуногистохимический (ИГХ) анализ осуществляли по оптимизированному протоколу проведения окрашивания с использованием безбиотиновой мультимерной системы детекции (REVEAL Biotin-Free Polyvalent DAB, BioVitrum). Гистологические срезы изготавливали на криостатном микротоме MICROM HM-525. Изучение гистологических препаратов осуществляли на световом микроскопе «AxioImaiger A1» (Carl Zeiss, Германия) с применением компьютерной системы анализа изображений «AxioVision 4.7.1.0». Морфометрические исследования проводили в соответствии с традиционными методами количественного анализа и трехкратной повторностью эксперимента.

В ходе работы было установлено, что использование традиционных гистологических красителей (гематоксилина и эозина) для выявления растительных белков, в первую очередь соевых, не всегда дает достоверную информацию об их содержании в составе продукта. Ни один из специальных методов гистологического окрашивания не обладает высокой специфичностью, поскольку они в значительной степени основаны на обнаружении полисахаридных структур растительных клеток. Использование различных растительных белков в относительно небольших количествах в составе одного продукта может также осложнить оценку. К тому же, окрашиваемость соевых белковых препаратов как мышечных структур затрудняет применение современных компьютерных анализаторов изображения [5].

Современное модульное программное обеспечение позволяет проводить «выбор» анализируемых структур в автоматическом режиме с учетом многофакторного анализа. В этом случае требуется максимальная контрастность изучаемых объектов и их дифференцированное окрашивание, так как все программы автоматически распознают структуры только по их цветовым характеристикам. Очень важный шаг для успешного

автоматического анализа изображений является правильный выбор специального метода окрашивания для изучаемого компонента. Так, для изучения жировых компонентов лучше применять окрашивание Суданом III, IV или Oil Red O, а для выявления крахмала использовать раствор Люголя. Следовательно, использование таких компьютерных программ для идентификации растительных белковых компонентов в составе мясных продуктов при окрашивании традиционными гистологическими методами невозможно [6].

В связи с вышеизложенным возникла необходимость в разработке новых методов гистологического анализа. Одним из таких методов был выбран иммуногистохимический (ИГХ). В России данный метод применяется только в ветеринарии и медицине при патологоанатомических исследованиях и не используется для определения состава мясных продуктов и идентификации компонентов.

ИГХ методы являются выокоспецифичными, и объединяют преимущества традиционных гистологических методов с чувствительностью иммунологических. Эти методы основаны на обработке гистологических срезов маркированными специфическими антителами к выявляемому веществу, которое в данной ситуации служит антигеном. При этом окраске подвергается только выявляемый компонент, а фоновое контрастирование среза можно проводить различными методами. Это дает возможность широкого применения системы анализа изображения для более детального изучения гистологического препарата и проведения морфометрического анализа. За рубежом ИГХ методы стали очень популярны для обнаружения небольших количеств аллергенов в составе пищевых продуктов [7].

Нами была разработана методика выявления растительных белков (соевого, пшеничного) безбиотиновым ИГХ методом. Подобраны рациональные условия пробоподготовки, получения и анализа препаратов, протокол проведения окрашивания. При разработанном ИГХ методе достигается хорошее контрастирование среза, что дает возможность применения компьютерной системы анализа изображения для оценки содержания выявляемого растительного белкового компонента в автоматическом режиме.

В качестве контрольных образцов выступали срезы, окрашенные традиционными красителями: гематоксилином и эозином. Соевый изолированный белок на препарате, окрашенном гематоксилином и эозином, выявляется в виде отдельных более или менее округлых частиц, окрашенных эозином в красный цвет, характерной особенностью которых является довольно сложная структурированность, сочетающая множественные наложенные друг на друга кольца с небольшими каплевидными пустотами внутри (рис.1). Соевые концентраты идентифицируются как группы клеток с выраженной эозинофилией, отделенные друг от друга неокрашенными прослойками целлюлозы. Клетки могут быть ориентированы на гистологических срезах как в продольном, так и в поперечном направлениях относительно длинной оси клеток. Соевые текстураты характеризуются слоистой белковой структурой, составляющей его основную часть и зернистым компонентом, заполняющим пространство между слоями фибрилл. Фибриллярные слоистые белковые структуры и зернистый компонент окрашиваются в красно-розовый цвет с фиолетовым оттенком различной интенсивности. Также на препарате присутствуют комплексы растительных клеток оболочки соевого боба, содержащих значительное количество целлюлозы и не воспринимающие красители.

При иммуногистохимическом окрашивании выявление соевого белка основано на его визуализации за счет хромогена (в нашем исследовании в роли хромогена выступал диаминобензидин), который придает ему коричневый цвет (рис. 2, 3, 4). При этом окраске подвергается только идентифицируемый компонент, т.е. соевый белок, а другие ингредиенты остаются не окрашенными.

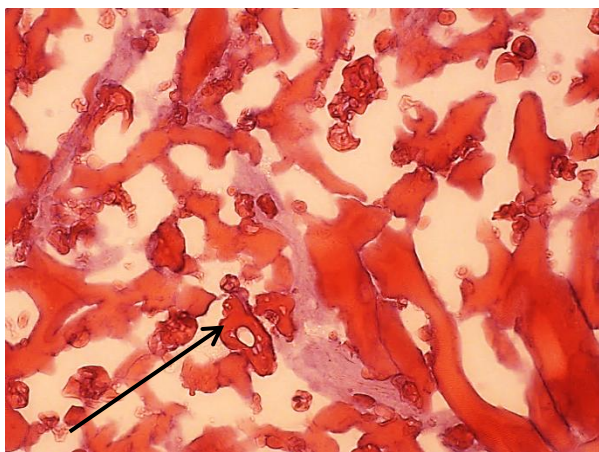


Рис. 1. Соевый изолят, окраска гематоксилином и эозином (об. x20)

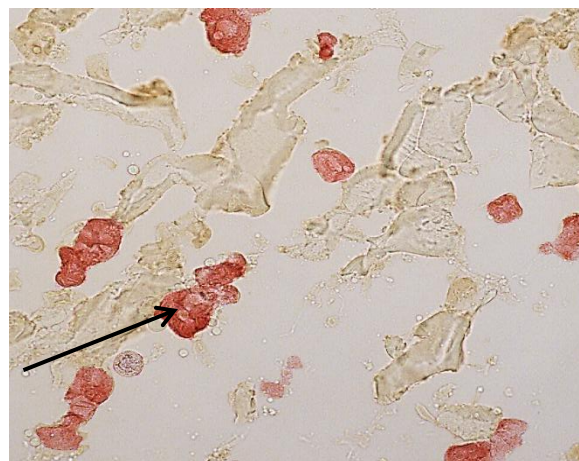


Рис. 2. Соевый изолят, ИГХ окрашивание (об. x20)

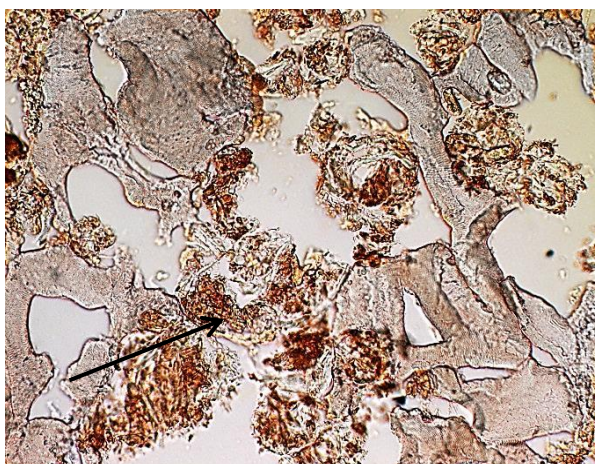


Рис. 3. Соевый концентрат, ИГХ окрашивание (об. x20)

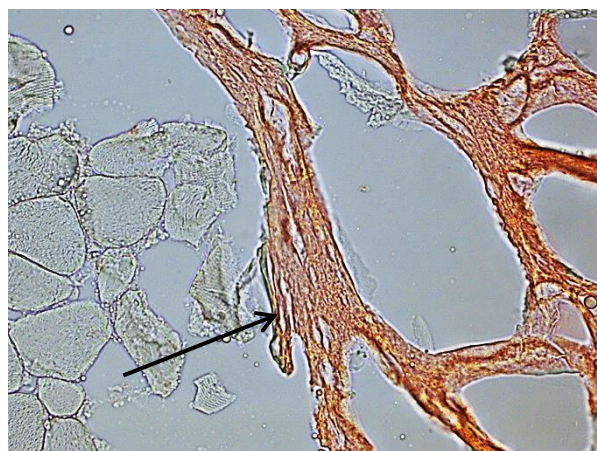


Рис. 4. Соевый текстурат, ИГХ окрашивание (об. x20)

Заключение. Таким образом, при разработанном ИГХ методе достигается хорошее контрастирование среза, что дает возможность применения компьютерной системы анализа изображения для количественной оценки содержания выявляемого соевого белкового компонента в автоматическом режиме.

Однако, ни одна из самых современных компьютерных систем анализа изображений не способна заменить квалифицированного исследователя. Это связано, прежде всего, с тем, что пока современная наука не может создать аппаратуру, характеристики которой приближались бы к возможностям человеческого глаза, и которая могла бы заменить человеческий мозг. Системы анализа и обработки изображений, активно развивающиеся в последнее время, позволяют при участии высококвалифицированного специалиста на порядки увеличить производительность труда и оперативно получать результаты высокого качества.

Совмещение высокоспецифичных методов окрашивания с применением новейшего программного обеспечения позволит существенно расширить возможности использования системы анализа изображений для исследования мясного сырья и готовых продуктов и определения их качества и состава.

Список использованных источников

1. Хвыля, С.И., Контроль качества мяса: гистологические методы / С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина // Контроль качества продукции. – 2013. – №10 – С. 30–34.

Hvylja, S.I., Kontrol' kachestva mjaso: gistologicheskie metody / S.I. Hvylja, V.A. Pchelkina // Kontrol' kachestva produkcii. – 2013. – №10 – S. 30–34.

2. Newman, P.B. The use of video image analysis for quantitative measurement of visible fat and lean in meat: Part 4 – application of image analysis measurement techniques to minced meats / P.B. Newman // Meat Science. – 1987. – №19. – P. 139–150.

3. Pospiech, M. Microscopic methods in food analysis / M. Pospiech at all // Maso international, Brno. – 2011. – Vol. 1. – P. 27–34.

4. Хвыля, С.И. Применение гистологического анализа при исследовании мясного сырья и готовых продуктов / С.И. Хвыля, В.А. Пчелкина, С.С. Бурлакова // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – №3 (26). – С. 132–138.

Hvylja, S.I. Primenenie gistologicheskogo analiza pri issledovanii mjasnogo syr'ja i gotovyh produktov / S.I. Hvylja, V.A. Pchelkina, S.S. Burlakova // Tehnika i tehnologija pishhevyh proizvodstv. – 2012. – №3 (26). – S. 132–138.

5. Пчелкина, В.А. Практические аспекты применения ГОСТ 31474-2012 «Мясо и мясные продукты. Гистологический метод определения растительных белковых добавок» / В.А. Пчелкина, С.И. Хвыля // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – №3. – С. 50–54.

Pchelkina, V.A. Prakticheskie aspekty primeneniya GOST 31474-2012 «Mjaso i mjasnye produkty. Gistologicheskij metod opredelenija rastitel'nyh belkovyh dobavok» / V.A. Pchelkina, S.I. Hvylja // Tehnika i tehnologija pishhevyh proizvodstv. – 2015. – №3. – S. 50–54.

6. Boutten, B. Quantification of soy proteins by association of immunohistochemistry and video image analysis / B. Boutten, C. Humbert, M. Chelbi, P. Durand, D. Peyraud // Food and Agricultural Immunology. – 1999. – Vol.11. – P. 51–59.

7. Pospiech, M. Immunohistochemical detection of soya protein – optimisation and verification of the method / M. Pospiech, B. Tremlová, E. Renčová, Z. Randulová // Czech Journal of Food Sciences. – 2009. – №27. – P. 11–19.