



Факултет медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу
Интегрисане академске студије медицине
Основи хистолошких и патолошких техника

Реагенси за светлосну микроскопију

четврта недеља наставе

Припрема ткива за светлосну микроскопију

- Избор и узимање материјала
 - Биопсија или некропсија / Испитивање *in vivo* или фиксирани препарати
- **Обрада материјала**
 - Фиксација
 - Дехидратација
 - Просветљавање
 - Калупљење у парафинске блокове
- **Израда препарата**
 - Сечење
 - Депарафинизација
 - Хидратација
 - Бојење препарата (Рутинско и специфична бојења)
 - Покривање препарата
- Анализа препарата

Дехидратација, просветљавање и парафинско калупљење



ФИКСАЦИЈА

Фиксација



<https://www.paramedicalinfo.com/2021/12/fixation-of-histology-samples.html>

- **Фиксација** је први и пресудан корак у припреми материјала за микроскопију.
- **Сврха фиксације** је стабилизација протеинске основе у ћелији, очување ћелијске морфологије и локализације хемијских једињења у њој.

Фиксација



<https://www.paramedicalinfo.com/2021/12/fixation-of-histology-samples.html>

- **Фиксација хемијски стабилизује ткиво**, повећава његову тврдоћу, што касније омогућава лакши рад са њим, зауставља ензимску аутолизу и продор бактерија, а побољшава и ефикасност техника бојења, али при томе долази до мењања физичких и хемијских својстава ћелија, односно ткива.

Фиксација



<https://www.paramedicalinfo.com/2021/12/fixation-of-histology-samples.html>

- **Неправилна фиксација** доводи до пропадања испитиваног материјала (ткива) и неповратног губитка или инактивације многих ћелијских компоненти и супстанци које се анализирају.

Фиксација



<https://www.paramedicalinfo.com/2021/12/fixation-of-histology-samples.html>

- **Неправилна фиксација може настати као последица:**
неправилног избора фиксатива, лоше пенетрације фиксатива кроз ткиво, недовољне количине фиксатива којим се ткиво прекрива и неодговарајуће дужине фиксације.

Аутолиза

- **Аутолиза** започиње одмах чим се ткиво извади из организма.
- Тада се активирају **унутарћелијски ензими** који доводе до хидролизе пептидних веза.
- **Аутолиза** је независна од дејства бактерија и зауставља се стављањем ткива на хладно или загревањем на 57 °C (када је скоро потпуно заустављена), а убрзана је на температури око 37 °C.



Аутолиза

- Најјаче је изражена у ткивима која су богата лизозомалним ензимима (јетра, мозак, бубрег), а најмања у ткивима у којима се налази обиље еластичних и колагених влакна.
- **Постморталне промене** у ћелији почињу одмах.
- Осам минута након смрти мења се електрични потенцијал ћелијске мембране и **вода улази у ћелију**.



Аутолиза

- На нивоу светлосне микроскопије у ћелијама ткива које подлеже аутолизи запажа се извесна „испражњеност“, **бубрење цитоплазме**, која понекад добија изглед хромофобне грануларне, хомогене масе.
- **Једра** показују некротичне промене: лизирање – **кариолиза**, кондензација - **пикнозис**, фрагментација – **кариорекса**.
- При томе, ове промене **нису праћене инфламаторним одговором**.



Својства фиксатива



- **Фиксативи треба да имају следећа својства:** да инактивирају протеолитичке ензими, да спречавају раст микроорганизама, да не оштећују или растварају ткиво, да не доводе до бубрења или смањења запремине ткива и да очувају нормални облик ткива и локализацију његових састојака.

Избор фиксатива

- **Избор фиксатива** је од пресудног значаја, с обзиром на то да је његова главна **намена одржавање почетне форме узорка**, спречавањем посмртних појава у њему (**очување** сваког детаља **ћелијске ултраструктуре** до молекуларног нивоа, као што је била пре ћелијске смрти).

Histo-Line
Laboratories



Избор фиксатива

- Поред тога важна је и његова функција у **припреми узорка** да може да издржи наредне кораке у препаративној процедури, да **очврсне протеине** везане за ћелијске мембране, **очува просторне односе** између различитих органа као што су били, да направи **нерастворљивим** све друге ћелијске састојке, као што су нуклеинске киселине, нуклеопротеини, угљени хидрати и липиди.

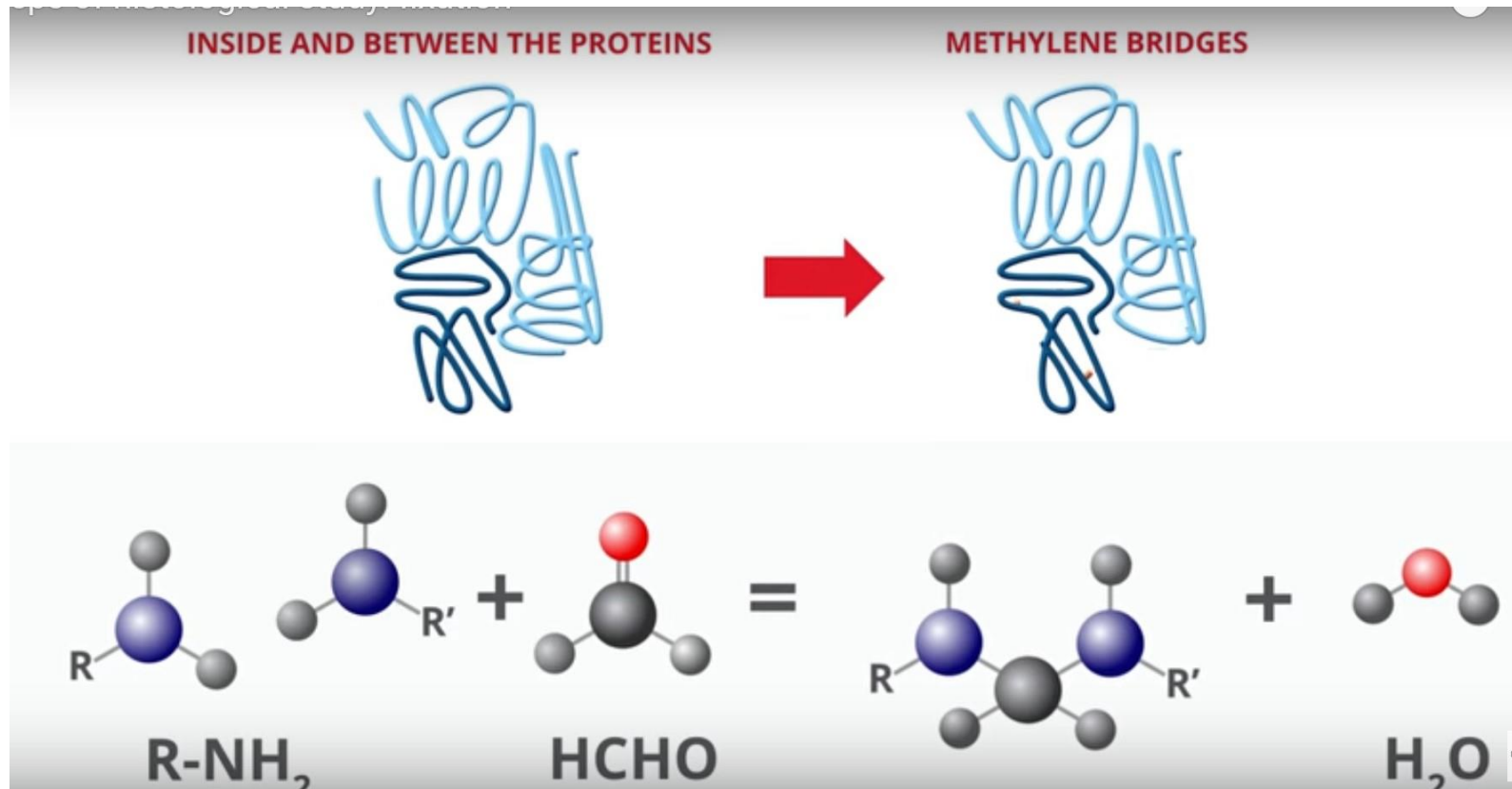


Фиксативи

- Од **једноставних фиксатива** најчешће је у употреби раствор **неутралног формалина** - 10ml комерцијалног формалина (36%-тни раствор формалдехида) помеша се са 90ml неутралног фосфатног пуфера (PBS).
- Фиксација најчешће траје 24 сата на собној температури.
- Користи се и 4%-тни или 10%-тни водени раствор формалина.



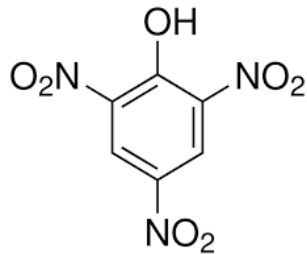
Избор фиксатива



- **Формалин** реагује са **амино-групама** **протеина**, због чега је добар фиксатив за заштиту опште структуре цитоплазме и нуклеуса, јер добро штити њихову протеинску компоненту.

Фиксативи

- **Сложени фиксативи** представљају мешавину различитих хемијских супстанци.
- Најчешће се употребљава Боуенов фиксатив (пикринска киселина + формалин + сирћетна киселина + вода).
- Фиксација траје 24 сата на собној температури.

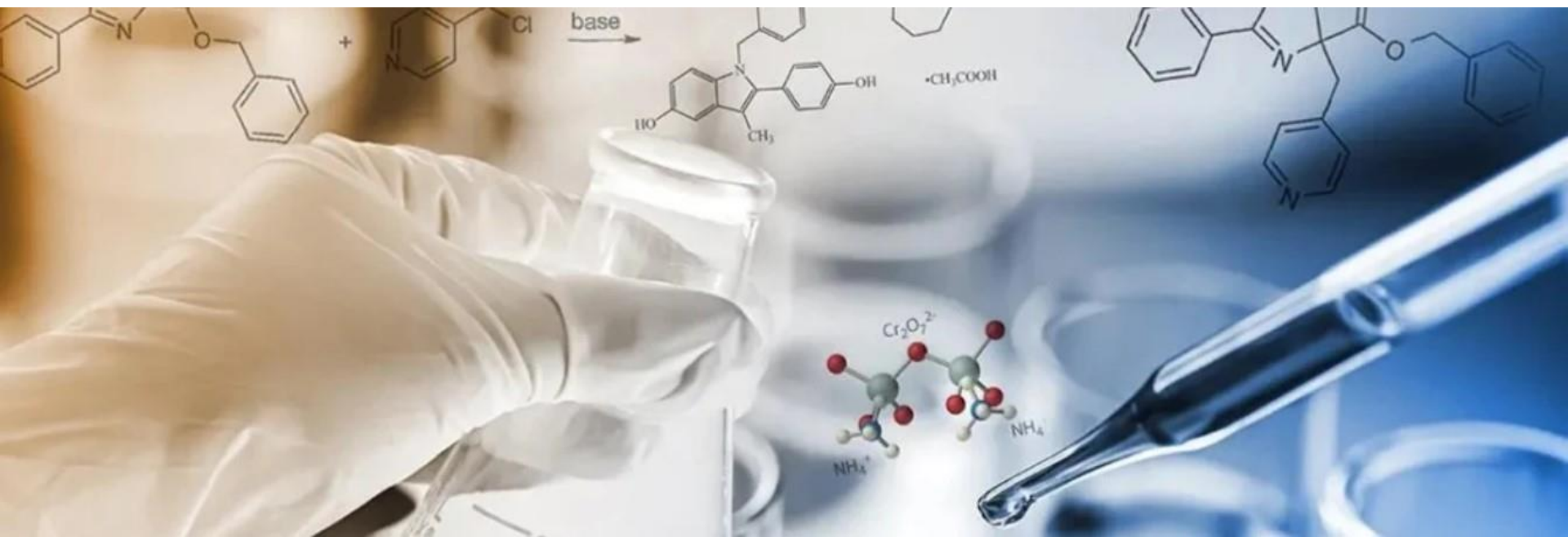


Пикринска
киселина



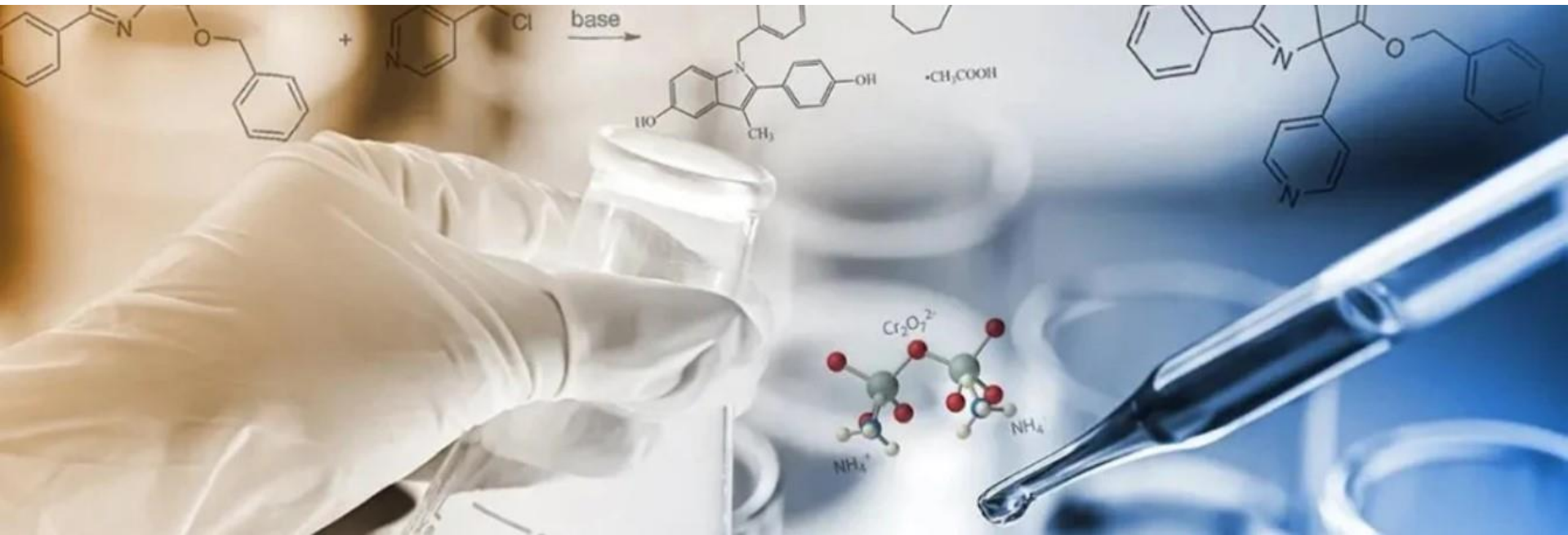
Деловање фиксатива зависи од:

- Вредности рН фиксатива
- Температуре на којој се одвија фиксација
- Механизма деловања фиксатива
- Компактности и врсте ткива
- Дебљине (величине) ткивног узорка



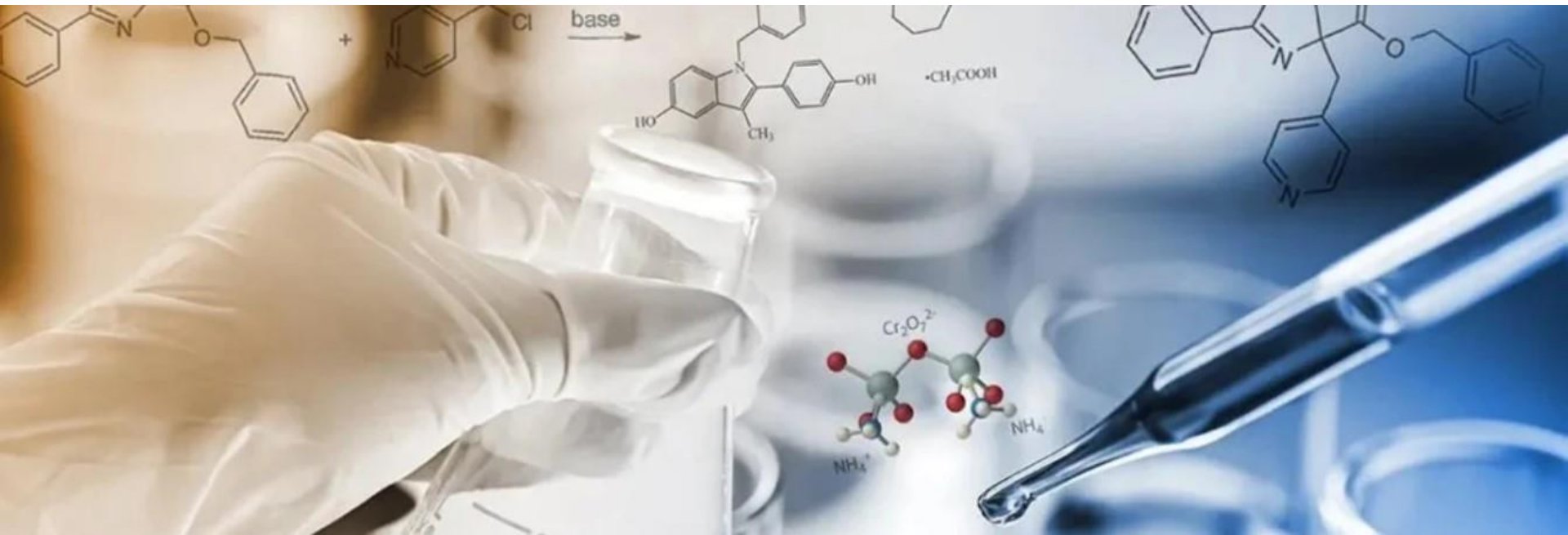
Дужина фиксације

- **Дужина фиксације** и **температура** на којој се она врши зависе од природе и величине узорка и од састава фиксатива.
- **Дужина фиксације** не сме бити прекратка како би стабилизујуће дејство фиксатива било потпуно, али ни предугачка, јер може довести до скупљања и стврдњавања ткива.
- **Оптимално трајање** фиксације зависи од брзине продирања фиксатива и величине узорка.



Температура фиксације

- **Температура** на којој се врши фиксација зависи од жељених резултата и природе фиксатива.
- **Брзина продирања фиксатива** је већа на собној температури, али су ниске температуре погодније, јер се смањују аутолитички процеси и скупљање узорка, мада су неповољне за неке органеле (микротубули се разграђују на ниским температурама).



Општа правила за фиксацију

- Узорак ткива треба да буде мали (дебљине до 0,5 cm),
- Фиксацију треба започети одмах после биопсије
- Фиксатива треба да буде 10 пута више него ткива
- Ткиво треба да буде потпуно покривено фиксативом
- Повишена температура убрзава фиксацију, али и аутолитичке процесе, па се препоручује дужа фиксација на ниској температури; температура код фиксације не треба да буде изнад 60 °C
- Ткиво не треба фиксирати дуже него што је потребно
- Концентрација фиксатива треба да буде одговарајућа (висока концентрација раствора фиксатива доводи до стварања коре на површини ткива, па нема продора фиксатива у унутрашњост узорка)
- Строго пазити да фиксатив буде оптималног pH и осмоларности (да буде изотоничан са ћелијским садржајем)

КЛАСИФИКАЦИЈА ФИКСАТИВА

Класификација фиксатива

- **Фиксативи** се према дејству на ткивне протеине сврставају у **коагулантне** и **некоагулантне** (према Baker-у)
- Према другој класификацији, на основу **хемијске природе** деле се на:
- **Алдехидне** (формалдехид, глутаралдехид, акролеин)
- **Оксидујуће агенсе** (осмијум тетраоксид, калијум перманганат, калијум дихромат),
- **Фиксативе који денатуришу протеине** (сирћетна киселина, метил алкохол, етил алкохол)
- **Фиксативе са непознатим механизмом** (живин хлорид, пикринска киселина)

Фиксирање узорака ткива

- **Фиксирање узорака ткива** може бити:
- **Имерзијом**
- ***In vivo***
- Имерзија је потапање узорака у фиксатив (један слој ћелија, ћелијске суспензије, изоловани делови ткива/органа)
- *In vivo* фиксација је преливање изложеног ткива фиксативом, као и перфузија која представља уливање или убризгавање неке течности у неки орган или структуру или кроз њега.
- Код фиксације перфузијом крв се замењује фиксативом који прожима дати орган.

Испрање материјала после фиксације

- У фиксативу материјал остаје краће или дуже време.
- Време фиксирања је увек назначено у методологији и различито је за поједине фиксативе.
- Да би даљи микротехнички поступци могли правилно да се одвијају неопходно је да се након фиксирања материјал добро испере.
- У чему ће се испирање обавити зависи од састава фиксатива.
- Ако у састав фиксатива улази алкохол онда се испирање врши алкохолом оне концентрације која је употребљена и при прављењу фиксатива.

Испирање материјала

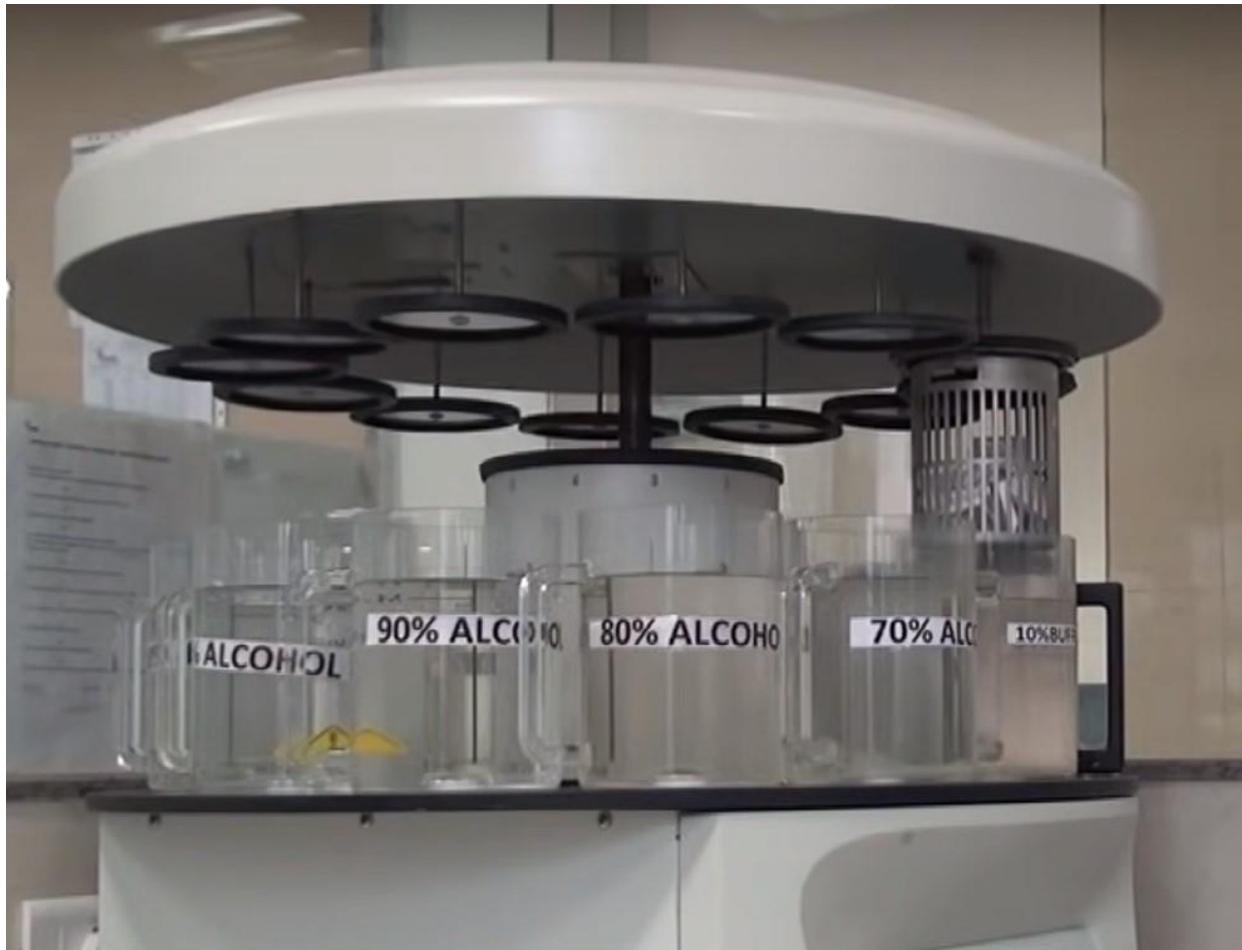
- Ако је фиксирање вршено у фиксативу Карноа (садржи апсолутни етанол), испирање се врши апсолутним алкохолом.
- Материјал фиксиран у Буеновом фиксативу биће испиран 70% алкохолом.
- Ако је за фиксирање коришћен водени раствор неке материје, испирање се обавља текућом водом (најмање 1 до 3h, а често и дуже).

ДЕХИДРАТАЦИЈА и ПРОСВЕТЉАВАЊЕ

Дехидратација, просветљавање и парафинско калупљење



Средства за дехидратацију



- Након испирања ткива у текућој води следи **дехидратација**.
- Како око 70% живих ћелија чини вода потребно је уклонити је како би се ткиво укалупило у парафину.

Алкохоли



- Вода се из фиксираног узорка уклања **поступним урањањем у растуће концентрације алкохола** (дехидратација).

Алкохоли



- Најчешће се употребљава **етанол** (или **пропанол**) у концентрацији од 70%, а затим следи 80%-тни, 96%-тни и на крају 100%-тни алкохол (тзв. апсолутни алкохол).

Алкохоли



- Метил алкохол се ређе користи, јер има неповољније дејство од етил алкохола и није погодан за калупљење у целоидину.

Алкохоли



- Изопропил алкохол изазива мања оштећења ткива, продужен је поступак, добар је за осетљива ткива и из њега ткиво може одмах да иде у парафин. Не користи се при калупљењу у целоидин.

Средства за дехидратацију

- АЦЕТОН - он је ефикасан, брзо делује, али има тај недостатак да везује атмосферску воду. Постоји могућност вишекратне употребе истог раствора, а користи се 4 x 40 min.
- ДИОКСАН - меша се са водом и парафином, па није потребно средство за просветљавање. Веома је отрован, са кумулативним дејством. Задржава воду у ткиву што омета калупљење. Веома је скуп, али може да се рециклира.
- ЦЕЛОСОЛВЕ - делује брзо, кроз неколико промена концентрованог раствора. Нема скупљања или очвршћавања ткива, па оно може да стоји неколико месеци у њему. Недостатак му је то што раствара унутарћелијске компоненте, чак и када су оне добро фиксиране.

Просветљавање

- Поступна дехидратација смањује оштећење ткива.
- Етанол се не меша с парафином па се након дехидратације ткиво ставља у **ксилол** током 24 сата – **просветљавање**.
- Добро средство за просветљавање би требало да **замени алкохол брзо** и да **не изазива прекомерно очвршћавање** ткива.
- Већина агенаса за просветљавање је високо токсична и запаљива и требало би са њима руковати пажљиво.
- Агенси који се користе за ову намену су: ксилол, бензол, толуол, хлороформ и кедрово уље.

Средства за просветљавање

- КСИЛОЛ - он се најчешће користи. Безбојан је, брзо делује, високо запаљив и токсичан. Оштећује ткиво и очвршћава га, а није погодан за мека ткива. Ако је дехидратација некомплетна постаје млечан, па је решење да се ткиво поново врати у апсолутни алкохол и настави дехидратација.
- БЕНЗОЛ - продире у ткиво брзо, изазива минимално скупљање ткива, али га не очвршћава. Употребљава се за већину ткива, осим за мозак. Запаљив је и користи се технички чист.
- ТОЛУОЛ - има слична својства као ксилол, мање очвршћава ткива и спорије продире у њега. Запаљив је.

Средства за просветљавање

- ХЛОРОФОРМ - продире у ткиво спорије од ксилола и изазива мање промена у ткиву (мање скупљање и очвршћавање). Не просветљава ткиво. Није запаљив, токсичан је и осетљив на кисеоник и светлост. Не треба га излагати високим температурама.
- КЕДРОВО УЉЕ - ово уље лагано делује, добро продире у ткиво и минимално га мења, па у њему ткиво може стајати јако дуго. Инфилтрација парафина у ткиво је спора, па морају постојати три промене парафина. Вода у ткиву, евентуално прео- стала после непотпуне дехидратације, не омета његово деловање. Погодно је за осетљива ткива (мозак, ембрионално ткиво) и кожу, утерус и мишћно ткиво. Веома је скупо, али може да се рециклира за поновно коришћење.

КАЛУПЉЕЊЕ

Својства која треба да има медијум за калупљење

- Чврстина ткива која је неопходна за сечење ткива постиже се прожимањем ткива одређеном супстанцом (медијумом) или смрзавањем.
- **Медијуми** за светлосну микроскопију су мање тврди од оних за електронску микроскопију.
- Медијум треба да буде у **течном стању** како би могао да се инфилтрира у ткиво
- **Температура** на којој се ткиво прожима медијумом не сме да буде висока
- Хлађењем медијум **мора да се стврдњава** (солидификација)

Својства која треба да има медијум за калупљење

- Медијум мора да буде **хемијски инертан** и да не раствара ткивне компоненте или изазива њихову дифузију
- Потребно је да медијум може **лако да се одстрани из ткива**, а раствор који се употребљава за то не сме бити реактиван и изазивати дифундовање или растварање ткивних компоненти
- Медијум својим продирањем у ткиво или одстрањивањем из ткива **не сме пореметити морфологију** и међусобне односе ткивних и ћелијских компоненти

Подела медијума за калупљење

- Постоји подела на медијуме **растворљиве у води** (карбовокс, желатин, агар) и **нерастворљиве у води** (парафин, целоидин, воскови, метакрилат).
- Процедура калупљења је једноставнија са медијумима растворљивим у води.
- Фиксирано ткиво се испира и ставља у низ раствора медијума све веће и веће концентрације.
- Тешкоће се јављају када се такво ткиво исече, јер пресеци не смеју да се растежу на води, па даљи поступак мора да се модификује.

Поступак калупљења у парафин

- **Након просветљења**, ткиво се преноси у мешавину хлороформа и парафина (1:1) пола сата (или ксилола и парафина).
- Затим у **растуће концентрације парафина** (3x1h) што се спроводи на температури од 50-60 °C у термостату, диспензеру парафина или **автоматизованом ткивном процесору** када је парафин у течном стању
- Хлороформ или ксиол у ткиву се постирпо замењују парафином.



Поступак калупљења у парафин

- **Парафин** у ткиву **попуњава место** које је након дехидратације имао **апсолутни алкохол**.
- Наглим хлађењем, парафин се стегне у унутрашњости фиксираног ткива.
- Захваљујући томе, може да се сече на врло танке резове.
- Парафин је мешавина засићених угљоводоника.
- Раствара се у бензолу, хлороформу и ксиолу.



Предности употребе парафина

- Време инфилтрације и каснијег калупљења релативно је кратко за мале узорке ткива
- Инфилтрирано и укалупљено ткиво може да буде складиштено у сувим условима неодређено време без оштећења
- Приликом сечења ротационим микротомом, ако је калуп добро истримован, танки пресеци се међусобно повезују формирајући траку (доња ивица једног пресека се "лепи" за горњу ивицу претходног)

Недостаци употребе парафина

- Нарушавање хистолошке организације ткива услед скупљања које може да се деси – парафински артефакт
- Сечење парафина на вишим температурама ваздуха у радној просторији је тешко јер се парафин топи, а пресеци лепе за микротом
- Када је у соби ниска влажност, статички електрицитет изазива да се пресеци лепе за микротом
- Време инфилтрације парафина у велике блокове ткива је предуго

Извори

- **Глишић Р, Станковић В.** Теорија и пракса хистолошких техника. Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац, 2017.
- **Танасковић И.** Методологија хистолошких бојења, курс континуиране медицинске едукације (Здравствени савет Србије одлука бр. 153-02-371/2010-02). Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу.