



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

# Особине и начин деловања фиксатива

пета 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**

# Улоге фиксатива



- Фиксатив **спречава аутолизу** ћелија, даје **тврдоћу** ткиву која омогућава сечење и бојење, **смањује оштећење** ткива током даљих поступака, **стабилизује** међусобни однос **ћелијских структура** како би што више подсећале на *in vivo* услове, **штити хистолога** од могуће инфекције микроорганизмима из ткива.

# Улоге фиксатива



- **Фиксативи делују** на ћелијске структуре на два начина:
- **денатурацијом беланчевина** (нпр. пикринска киселина)
- **без денатурације беланчевина** (нпр. формалин, ацетон и етанол)

# Фиксација



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

- Избор фиксатива зависи од **врсте ткива** и **одабраног бојења**.
- Нека ткива и неке хистолошке технике захтевају **одређене фиксативе** (у употреби су многи **једноставни фиксативи** или **мешавине фиксатива**).

# Фиксативи

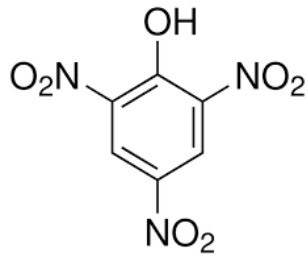
- Од једноставних фиксатива најчешће је у употреби раствор **неутралног формалина** - 10ml комерцијалног формалина (36%-тни раствор формалдехида) помеша се са 90ml неутралног фосфатног пуфера (PBS).
- Фиксација најчешће траје 24 сата на собној температури.
- Користи се и 4%-тни или 10%-тни водени раствор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





# 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



# Фиксативи који се најчешће користе

- Формалин
- Алкохол-формалин
- Буенов фиксатив
- Фиксатив ФАА
- Фиксатив Карноа (Carnoy)
- Навашина
- Фармеров фиксатив...

Histo-Line  
Laboratories



# 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)

# Алдехиди



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

- То су најпопуларнији и највише коришћени фиксативи, а међу њима формалдехид. Алдехидни фиксативи због брзог продора у ткиво изазивају његову мању деформацију и бољу заштиту структуре, а имају и мању тенденцију ка екстраковању цитоплазматичних компоненти. Штите структуре као што су микротубули, стабилизују нуклеопротеине, добро штите гликоген.).

# Формалдехид

- Припрема се по следећој рецептури:
- 35% или 40% комерцијални формалин 2-4-6ml
- Вода 98-96-94 ml



# Формалдехид



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

- У лабораторији се користи разређен (1 део куповног формалина и 9 делова воде, што је 10% формалин, тј. 4% формалдехид).
- За фиксацију ткива најбољи је неутрални пуферисани формалин (pH 7,0), али његова киселост стајањем расте, па се препоручује контрола pH вредности пре употребе



# Формалдехид



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

- Неутрални пуферисани формалин је добар општи фиксатив, јер ткиво у њему може стајати дуже време. У почетку изазива смањење волумена ткива, а касније долази до повећања волумена.
- Ткиву даје релативно малу чврстину, па му се често додају и други реагенси или се комбинује са другим фиксативима.

# Формалдехид

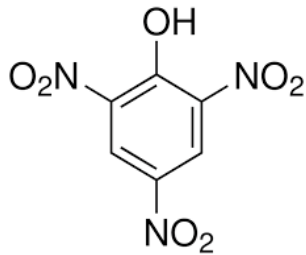


<https://www.paramedicalinfo.com/2021/12/fixation-of-histology-samples.html>

- Узорци ткива се фиксирају у неутралном пуферисаном формалину 24 - 48 сати, а ткиво може и дуже да стоји у њему.
- После фиксирања формалином узорци ткива обавезно морају да се испирају текућом водом (преко ноћи или више промена у току дана), пре него се пребаце у алкохол.



# Буенов фиксатив

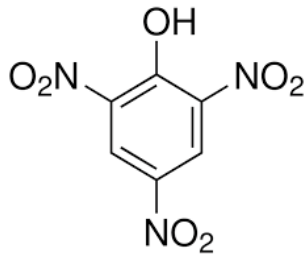


Пикринска  
киселина

- Припрема се по следећој рецептури:
- 40% куповни формалин 25ml
- Пикринска киселина (засићен раствор у 70% етил алкохолу) 75ml
- Глацијална сирћетна киселина 5ml
- Фиксирање траје 24 сата.
- Испирање у 70% алкохолу све док из материјала излази жута боја.
- Дехидратација кроз серију алкохола растуће концентрације.
- У 80% алкохолу материјал се може конзервирати, или се даље спроводи по принципима парафинске методе.



# Буенов фиксатив



Пикринска  
киселина

- Трокомпонентни фиксатив
- Погодан за трихромна бојења
- Ткиво се лако прати током процесуирања, јер поприма изузетно жуту боју пикринске киселине. Фиксатив делује брзо, чува гликоген, не ствара кисели формалински пигмент и нема поремећаја ткива и стврдњавања. Фиксирање у њему траје 24-48 сати.
- Недостаци: оштећује еритроците, смањује дејство рибонуклеазе на РНК, смањује количину ДНК, а слаба му је и продорност у ткиво. Из Буена се ткиво директно пребацује у 70% алкохол (неки препоручују да се ипак ткиво фиксирано у Буену прво добро испере текућом водом да се што више жуте боје избаци).



# Алкохол и ацетон

- Спадају у фиксативе који врше коагулацију протеина и добри су за хисто-хемијску детекцију ензимске активности.
- Недостаци су им велико стврдњавање ткива, слаба продорност у ткиво и то што растварају липиде



# Алкохол и ацетон

- Механизам деловања алкохола као фиксатива још увек није разјашњен, познато је да зависи од температуре (испод  $15^{\circ}\text{C}$  не делује на протеине). Добро чува SH групе, не раствара гликоген, чува Нислова тела у неуронима, соли гвожђа, мокраћну киселину и муцин.
- Ацетон се употребљава само код брзе припреме за калупљење у парафину



# Алкохол -формалин

- Припрема се по следећој рецептури:
- 50% етил алкохол 100ml
- 35 или 40% куповни формалин 5ml



# Фиксатив ФАА (формалин-ацетоацид-етил алкохол)

- Припрема се на следећи начин:
- 70 % етил алкохол 90ml
- 40 % (комерцијални) формалин 5ml
- Глацијална сирћетна киселина 5ml
- У овом фиксативу материјал остаје 24 сата.
- Испира се у 70% алкохолу 1 сат.
- Дехидратација и конзервирање као и после употребе Буеновог фиксатива.
- Погодан фиксатив за цитолошка истраживања.



# Фиксатив Карноа (Carnoy)

- Припрема се по следећој рецептури:
- Апсолутни алкохол 6ml
- Хлороформ 3ml
- Глацијална сирћетна киселина 1ml
- Овај фиксатив брзо продире.
- Фиксација 6 до 12 сати (и краће).
- Испирање у апсолутном алкохолу све док се осећа мирис сирћетне киселине.
- Уколико се у даљем поступку не примењује парафинска метода, материјал се може чувати (конзервира се) у 80% етил алкахолу.
- Фиксатив Карноа налази широку примену у цитолошким и ембриолошким истраживањима.



<https://www.fishersci.ca/shop/products/carnoy-s-solution-ricca-chemical/r18510004c>



# Фиксатив Карноа (Carnoy)

- Погодан је за фиксацију нуклеусних структура, посебно нуклеинских киселина, Нислових тела и SH група на протеинима.
- При томе се губе липидне структуре и мијелин, а еритроцити хемолизирају, али гликоген остаје добро очуван, као и већина цитоплазматских структура.
- Предност му је брза фиксација, недостатак то што стврдњава ткиво, које због тога пуца у току сечења.



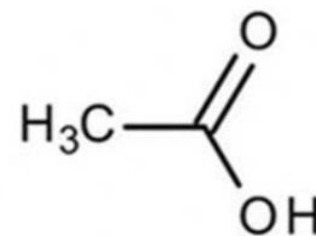
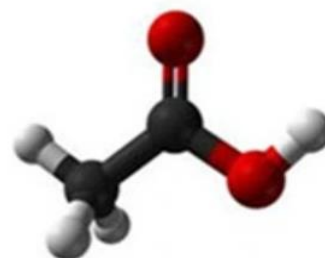
<https://www.fishersci.ca/shop/products/carnoy-s-solution-ricca-chemical/r18510004c>

Након фиксације ткиво може да се чува у 80% алкохолу и кедровом уљу.



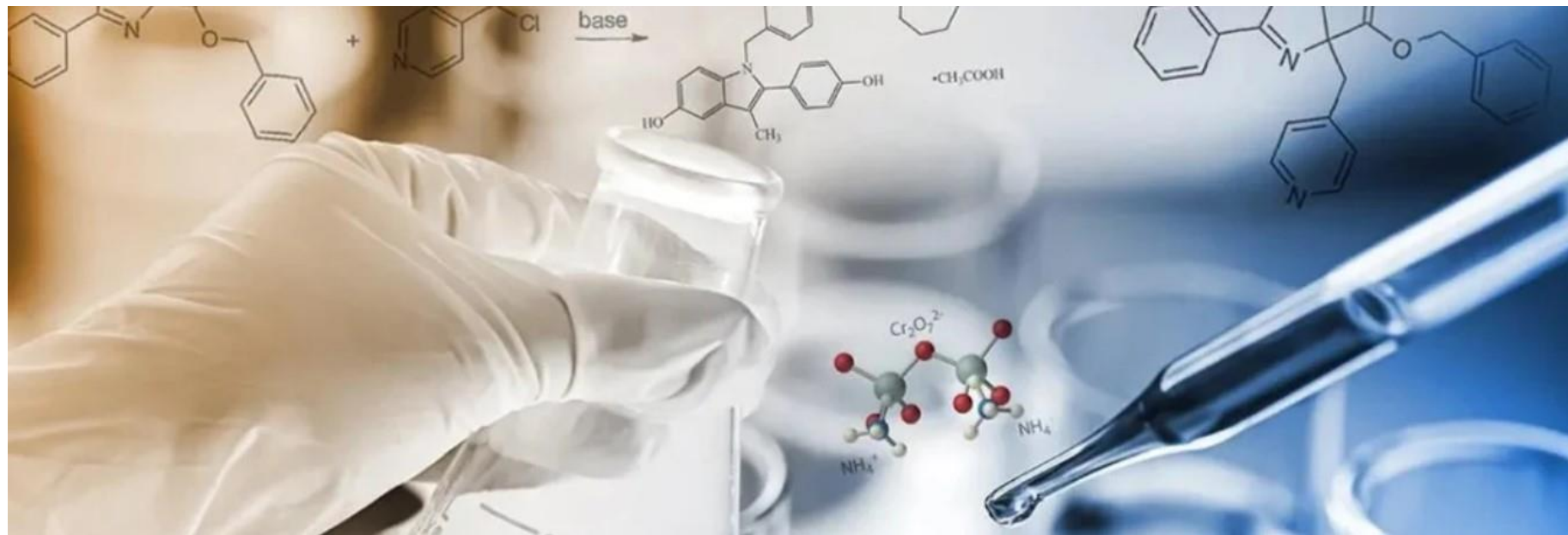
# Фармеров фиксатив

- Припрема се по следећој рецептури:
- Апсолутни алкохол 6 ml
- Глацијална сирћетна киселина 1 ml
- Фармеров фиксатив се употребљава на исти начин и у исте сврхе као и фиксатив Карноа



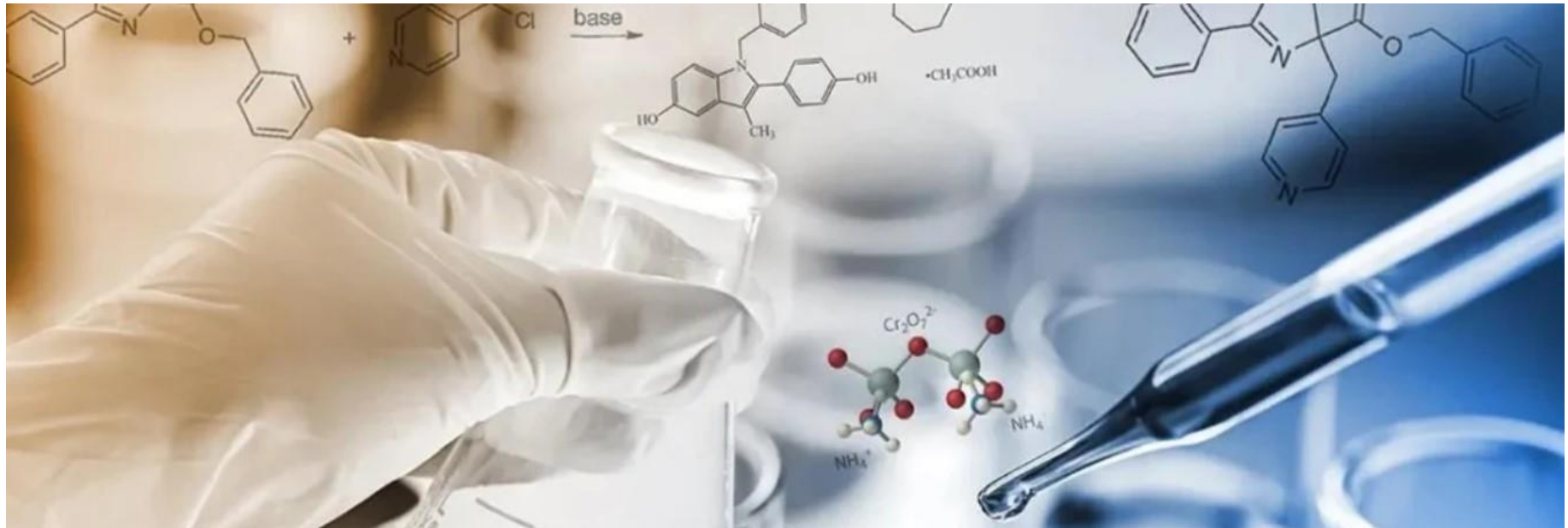
# Перманганат

- То је јак оксидирајући агенс, који добро чува мембранске структуре, а посебно је добар за заштиту мијелина.
- Преципитира грубо грануларни, електрон густу материјал на мембранама, што га препоручује за електронску микроскопију.
- Елементи који садрже ДНК и РНК не чувају се задовољавајуће, па га је боље користити као селективни него општи фиксатив.



# Перманганат

- Користи се у неким комбинованим фиксативима и у светлосној микроскопији.
- Изузетно одржава фосфолипидну компоненту мембране.
- Стопа продора у ткиво је слаба (као код  $\text{OsO}_4$ ) у поређењу са оном код алдехида.



# Фиксативи са хроматима

- Ступају у комплексну интеракцију са многим ткивним компонентама, посебно протеинима, где реагују са карбоксилним и аминок-групама.
- При употреби важна је вредност рН:
- рН 3,4-3,8 – добро за цитоплазму и митохондрије, нуклеолус се делимично дезорганизује, хромозоми се слабо виде,
- рН испод 3,4 – коагулација цитоплазматских структура и нуклеусног матрикса, нуклеолус и хромозоми се добро фиксирају, уз деструкцију митохондрија.



# Фиксативи са хроматима

- Хромати стврдњавају ткиво.
- Најчешћи фиксативи су хромни триоксид, калијум дихромат и хромна киселина.
- Након фиксације потребно је добро испирање ткива водом (не ставља се одмах у алкохол), како би се избегло формирање нерастворљивог хромат субоксида услед реакције алкохола са солима хромата.
- Традиционално, фиксативи који садрже дихромате се користе у хистохемијским методама за „хромафине“ грануле ендокриних ткива, које садрже аминне.

Histo-Line  
Laboratories



# Фиксатив Навашина

- **Јачи раствор:**
- 1 % хромна киселина 10ml
- 40 % (комерцијални) формалин 4ml
- Глацијална сирћетна киселина 1ml
- **Слабији раствор:**
- 1 % хромна киселина 15ml
- Дестилована вода 17ml
- 40 % (комерцијални) формалин 2ml
- Глацијална сирћетна киселина 1ml

Histo-Line  
Laboratories





# Фиксатив Навашина

- 1 % раствор хромне киселине може да се направи у већој количини, а комплетан фиксатив непосредно пре употребе.
- Фиксација 24 сата.
- Дуго испирање текућом водом (и до 24 сата).
- Дехидратација кроз серију алкохола растуће концентрације.
- У 80% алкохолу материјал може да се конзервира или се поступак наставља даље парафинском методом.
- Овај фиксатив погодан је за финају хистолошка и ембриолошка истраживања.



# 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).

# Испирање материјала

- Најједноставнији (али не најбољи) традиционални начин за исперивање је често мењање воде или алкохола у стакленим теглама у којима је материјал фиксиран.
- Много је боље наћи могућност сталног протока воде преко фиксног материјала – што такође представља традиционални начин испирања.

# Испирање материјала

- Један од добрих, али компликованијих начина испирања је употреба апарата који представља батерију цевчица које се уводе у посуде у којима се налази материјал који се испира.
- Цевчице се уводе у посуде кроз газу, којом су ове затворене и доводе до дна.
- Пуштањем воде преко прикључка на славини у више посуда истовремено, вода равномерно и стално протиче онолико времена колико је предвиђено да испирање траје (од 1 до 24 сата).

# Испирање материјала

- Материјал може да се испира и на други начин.
- Фиксирани објекти се заједно са етикетама пребаце у врећице од газе.
- Подразумева се да се материјали из различитих посуда не мешају већ да сваки има своју врећицу.
- Сваку врећицу при врху добро везати концем, тако да из њих ништа не може испасти.
- Овако припремљене врећице стављају се у један шири суд у који се, кроз левак, пушта вода са чесме.
- Материјал у врећицама испира се онолико времена колико је потребно.

# 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.
- **Вуковић И.** Имунохистохемијска и ултраструктурна анализа ремоделованог зида аорте. Докторска дисертација. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац, 2006.
- **Вуковић И.** Цитохистолошке и имунохистохемијске карактеристике атеросклеротичних и неатеросклеротичних пролиферација у интими. Магистарска теза. Медицински факултет Универзитета у Београду, Београд, 2003.