

Uživatel:Jaslik/Pískoviště

Přístroje pro přípravu základních typů preparátů pro světelnou mikroskopii

Ke zhotovení histologických preparátů pro světelnou mikroskopii, je potřeba několik základních postupů. Abychom získali vzorek, je nutné provést biopsii nebo nekropsii. Odběr materiálu pro histologické vyšetření. Poté se vzorek fixuje, zalévá, krájí, napíná, barví a nakonec montuje. Vznikne histologický preparát, který můžeme sledovat pomocí světelného mikroskopu. Je důležité brát na vědomí, že pro světelnou mikroskopii je odlišná úprava vzorku než pro elektronovou mikroskopii. Oproti dřívějším postupům, je velká výhoda automatizace některých úkonů. Jednotlivé přístroje usnadňují práci laboranta, a zároveň urychlují celý proces přípravy vzorku.

Fixace

Fixace vzorku se provádí z důvodu zamezení autolýzy. Tkáňové enzymy způsobují samovolný rozklad tkání. Musí se provést denaturace bílkovin buněk a tkání, co nejrychleji a nejšetrněji. K tomu se využívá chemických a fyzikálních fixačních prostředků. Chemické fixační prostředky jsou roztoky jedné nebo několika organických i anorganických sloučenin (př. formol, roztoky s kys. pikrovou, atd.)^[1]

Nejčastěji se používá 10% formol, což je směs 4% formaldehydu a methanolu rozpuštěných ve vodě. Fixace potom probíhá 24 hod/1 cm² a následně může být vzorek zpracováván nebo přemístěn do 4% paraformaldehydu, kde může být uskladněn až po dobu 2 měsíců bez ovlivnění antigenicity proteinů, cukrů i lipidů. Doba uskladnění závisí na detekovaném antigenu. Většina antigenů je stabilní po dobu až 7 týdnů^[2].

Dalšími alternativami jsou potom glutaraldehyd a hydroxyadipaldehyd, nebo alkoholy. Fyzikální fixace využívá teplo, var, vysušení za nízké teploty nebo stabilizace pomocí mikrovln.

Při použití fixace nízkou teplotou je potřeba zchladit vzorky na -20 až -70 °C a následně jsou zpracovávány na kryostatu za přítomnosti vody nebo kryoprotektivních médií.

Stabilizace pomocí mikrovln

Na základě různých výzkumů se zjistilo, že až 40% bílkovin se může ztratit po fixaci formaldehydem. U stabilizace pomocí mikrovln dochází ke smrštění tkáně nebo rozpadu červených krvinek. Dva vědci Kok a Boon přišli s tzv. hybridní metodou, kdy se nejdříve před chemickou fixací provede mikrovlnná stabilizace. Mikrovlny v tkáni vytvoří kanálky, které umožňují lepší prostup chemické fixační nebo jiné tekutiny. Toho se využívá nejen pro fixaci, ale také pro zalévání do parafínu nebo barvení vzorku.

Dr. Anthony S.-Y. Leong publikoval práci, která se zaměřuje na metodu stabilizace pomocí mikrovln. Bločky s tkáněmi se umístí do kádinky s fyziologickým roztokem a nechá se na ně působit mikrovlnné záření po dobu 5 minut při 68 °C. Poté se bloky dehydrují a zalévají do parafínu. Díky této metodě se zlepšila kvalita uchování antigenů v tkáňových řezech.^[3]

Metoda stabilizace pomocí mikrovln se provádí pomocí odvětrávané mikrovlnné trouby pro světelnou i elektronovou mikroskopii.

Mikrovlnné záření má vliv na částice v tkáni, které rozkmitá (zejména molekuly vody) stejně jako při šíření tepla. Mikrovlny pronikají dovnitř tkáně, a tím dochází k relativně velmi rychlému zahřátí celku. Je nutné tedy korigovat teplotu.

Zalévání a odvodňování

Odvodňování

Odvodňování se provádí z důvodu, abychom předešli smrštění tkáně, ke kterému by došlo, kdybychom tkáň vložili rovnou do koncentrovaného ethanolu. Celý proces zalévání a odvodňování trvá okolo 1-2 dnů u parafínu, záleží na velikosti bločku a zalití do celoidinu až 3 dny, podle koncentrace celoidinu. Máme dva typy odvodňovacích automatů: **Karuselový typ** a **lineární typ**. **Karuselový typ**- zfixovaný vzorek se umístí do košíčku do dírkované nádoby. Připevní se na karusel a postupně se ponoří do lázní s vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 80%, 96%, 100% ethanol), intermedia a do lázní s parafínem. Jakmile je dodržen potřebný čas, je proces odvodňování ukončen. Tento přístroj je řízen elektronicky a může se také vyskytovat se zabudovaným vakuovým systémem. **Lineární typ**- na rozdíl od karuselového typu, jsou nádobky řazeny za sebe. Do jednotlivých nádobek se umístí vzorek a pomocí čerpadla jsou naplňovány a odsávány příslušnými roztoky, podle postupu pro odvodňování vzorku. Výhodou je, že se zkracuje doba ponechání vzorku v jednotlivých lázních, aniž by se znehodnotil. Toto zařízení je opět řízeno elektronicky a můžeme dosáhnout teplotního maxima až 99 °C.

Zalévání

K zalití vzorku se nejčastěji používá nerozpustné médium ve vodě - parafín nebo jeho polymerová náhrada, Paraplast.

Díky působení mikrovlnného záření se v tkáni vytvoří mikroskopické štěrby, které parafín vyplní a umožní tak krájet vzorek v tenkých řezech. Je to metoda rychlá a snadná. Ovšem parafín nemůžeme použít u tkání tužší konzistence jako je chrupavka nebo kost. K tomu se používá, např. celoidin. Parafín je nevhodný i pro průkaz lipidů (použití organických rozpustidel)^[1].

U zalévacího automatu se parafín udržuje v tekutém stavu, proto zařízení obsahuje ohřívací box a zalévací komůrky, kde je udržována stálá teplota. Součástí je také chladicí deska, která zajišťuje rychlé ztuhnutí vzorku.

Mikrotomy

Jsou to přístroje, které slouží ke krájení histologického materiálu a zhotovení jejich preparátů. První mikrotomy se začaly objevovat ve druhé polovině 19. století pojmenovány J.E. Purkyněm. Byla to velmi dobře nabroušená břitva. V jedné ruce se držel bloček, pro bezpečnost zanořený např. do korkové zátky, a v druhé ruce břitva. Řez byl nedokonalý. Nejdříve se začaly zdokonalovat nože, které byly na jedné straně zcela rovné (Prof. Toldt), poté došlo k upevnění nože se sklonem k bločku.^[4]

Je několik typů mikrotomů: **sáňkový, rotační, diskový, ultramikrotom, laserový mikrotom, atd.** (poslední dva mají využití zejména pro elektronovou mikroskopii).

Používají se **ocelové nože**, které lze opakovaně brousit, **ocelové pásy s žiletkovým ostřím** na jedno použití nebo pro glykol-methakrylátové bločky **skleněné nože**. **Diamantové nože** se používají pro krájení tvrdých materiálů, např. kosti a zuby. Jednotlivé nože mají také své typické seřiznutí a podle toho je rozdělujeme na: **nůž s horní plochou vydutou a dolní rovnou, nůž s oběma plochami vydutými, klínovitého tvaru- obě plochy rovné a s jednou plochou rovnou**^[1]. Histologické řezy se krájí o tloušťce od 4 do 20 µm. Jejich tloušťka lze nastavit pomocí mikrometrického šroubu nebo elektronicky u moderních mikrotomů.

Sáňkový mikrotom

Slouží ke krájení řezů zalitých do parafínu, celoidinu, želatiny nebo glykol-methakrylátové pryskyřice. Nosič s bločkem se připevní do tzv. neapolské svorky, která umožňuje měnit sklon nože ke směru řezu a také sklon nože k rovině řezu (úhel dán úhlovou stupnicí na svorce). Úhel, který svírá nůž s rovinou řezu, by měl být menší jak 10°^[1]. U tohoto typu mikrotomu je nůž upevněn na sáních, které se pohybují po kluzké ploše lithinového podstavce. Nůž je veden v rovině proti bloku a po každém řezu je posunován šroubem do výšky o nastavený počet mikrometrů proti bločku.

Rotační mikrotom

Slouží výhradně ke krájení parafinových bloků, zejména pro zhotovování sériových řezů. Nůž je nepohyblivý, upevněn v držáku a proti němu se pohybuje svorka s bločkem uchycená na posuvné tyči ve svislé rovině. Při každé otáčce setrvačnickového kola se blok vysune pomocí mikrometrického šroubu o předem nastavený počet µm^[5]. Ke svorce mikrotomového nože je většinou také připojen transportér, který slouží k zachycení řezů v sérii. Ty se spojují v dlouhý pás přesně po sobě jdoucích řezů a nesmí dojít k vynechání nějakého řezu. Jakmile k tomu dojde, musí se místo označit.

Diskový mikrotom

Vzorek je upevněn na disku mikrotomu a je krájen žiletkou, který se k němu přibližuje. Oproti sáňkovému a rotačnímu mikrotomu, má výhodu v tom, že je kvalitnější, výkonnější a má lepší ergonomii (lepší uzpůsobení přístroje člověku)^[6]. Zpracování kontroluje mikroprocesor.

Kryostat

Umožňuje krájení řezů nativních i fixovaných při teplotě okolo -20 °C až -45 °C, záleží na typu tkáně. Používá se pro průkaz lipidů, enzymů a jiných histochemických vyšetření nebo pro přípravu řezů pro účely rychlé diagnostiky. Je to mrazicí box, ve kterém je umístěn sáňkový nebo rotační mikrotom. Obsahuje kovovou svorku, k níž je přimrazen neprosycený bloček se vzorkem. Používá se také chladicí stolek, který je chlazen termočlánkem nebo CO₂^[1]. Umisťuje se místo mikrometrického šroubu. Nůž i bloček jsou samostatně chlazeny. Tloušťka řezů je obvykle 7 µm. Bloček se přimrazí na svorku nebo na chladicí stolek kapkou vody a poté se vypouští oxid uhličitý až bloček zcela promrzne. Pomocí mikrotomu se nakrájí na potřebnou tloušťku řezů. Novodobější kryostaty jsou opatřeny UV desinfekcí, Ag antibakteriální ochrannou povrchovou vrstvou, automatickým odmrazovacím plynem, volbou manuálního nebo motorického krájení.

Barvicí automat

Jestliže chceme dobře zhodnotit preparát ve světelném mikroskopu, je třeba ho obarvit. U neobarveného preparátu nerozeznáme jednotlivé složky tkáně, díky malé odlišnosti lomivosti světla. Různé druhy barviv používáme podle toho, co potřebujeme obarvit. Základní rozdělení je na barviva zásaditá (barví jádra) a kyselá (barví cytoplazmu). Dále přirozená (př. hematoxylin, šafrán) a umělá (př. anilín). Barvení ve světelné mikroskopii

Tyto automaty se skládají z různých lázní pro odparafinování, barvení, odvodnění a projasňování preparátů. Koše se skly jsou přenášeny z jedné lázně do druhé podle předem nastaveného času barvení a odkapávání. Čas barvení se nastavuje do 12 minut a je stejný pro každou lázeň. Obarvení preparátu závisí na typu reagentů a na počtu použitých identických lázní. Většina automatů v dnešní době jsou vybaveny tak, že dokážou zpracovat několik vzorků najednou, podle různých barvicích protokolů. Umožňují zpracování až 600 skel za hodinu a jsou vybaveny odsáváním a filtrací nebezpečných výparů.

Montovací automat

K některým barvicím přístrojům jsou připojeny rovnou i montovací automaty, kdy jsou pomocí robotického systému přikládány krycí sklíčka na obarvené preparáty. Montovací médium musí být látka dokonale průhledná s vysokým indexem lomu. Jsou dva druhy těchto látek: **Nemísitelné s vodou**- rozpouštějí se v xylenu (př. kanadský balzám, cedrový olej nebo syntetické pryskyřice) a je nutné preparáty odvodnit a prosytit. **Mísitelné s vodou**- (př. glycerin, glycerinová želatina, sirup z arabské gumy).

Odkazy

Související články

- https://cs.wikipedia.org/wiki/Histologick%C3%A9_prepar%C3%A1ty
- https://www.wikiskripta.eu/w/Zhotoven%C3%AD_histologick%C3%A9ho_prepar%C3%A1tu

Zdroj

- *Nekompletní citace webu*. . *Mikrotomy* [online]. [cit. 2013-05-18]. <http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_2/HP_txt7-4-1.htm>.
- *Nekompletní citace webu*. . *Microtome* [online]. [cit. 2013-05-18]. <<https://en.wikipedia.org/wiki/Microtome>>.
- *Nekompletní citace webu*. . *Cryostat* [online]. [cit. 2013-05-18]. <<https://en.wikipedia.org/wiki/Cryostat>>.
- *Nekompletní citace webu*. . *EBSciences* [online]. [cit. 2013-05-18]. <http://www.ebsciences.com/papers/mw_tech.htm>.
- *Nekompletní citace webu*. . *ZDRAVOTNICTVÍ - STUDIUM NEJEN PRO STUDENTY* [online]. [cit. 2013-05-18]. <<http://zdravotnictvi.studentske.cz/2010/09/19-krajeni-parafinovych-rezu-na.html>>.
- *Nekompletní citace webu*. . *IHCWORLD* [online]. [cit. 2013-05-18]. <<http://www.ihcworld.com/products/KEDEE-Processor.htm>>.
- *Nekompletní citace webu*. . *Leica Biosystems* [online]. [cit. 2013-05-18]. <<http://www.leicabiosystems.com>>.
- *Nekompletní citace webu*. . *Centrum onkologické prevence v gynekologii* [online]. [cit. 2013-05-18]. <<http://copcb.cz/laborator/vybaveni/linearni-barvici-automat/>>.

Reference

1. VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika. Díl 2, Histologická technika*. 1. vydání. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 80-701-3202-7.
2. Joshua D. Webster, Margaret A. Miller, Dee DuSold a José Ramos-Vara, Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals, J Histochem Cytochem. Aug 2009; 57(8): 753-761, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2713075/>
3. *Nekompletní citace webu*. . *Nekompletní citace webu*. . *EBSciences* [online]. [cit. 2013-05-18]. <http://www.ebsciences.com/papers/mw_tech.htm>.
4. KOPECKÁ, S, L MARTINKOVÁ a H ŠIMKOVÁ. *Vývoj histologických technik s nahlédnutím do historie* [online]. [cit. 2013-05-18]. <www.cshl.cz/soubor/kestudiu/2-Predn-v-2.doc>.
5. JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika : pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vydání. Praha : Galén, c2006. ISBN 978-80-7262-263-4.
6. *Nekompletní citace webu*. . *Mikrotomy* [online]. [cit. 2013-05-18]. <http://www.med.muni.cz/histol/MedAtlas_2/HP_txt7-4-1.htm>.

Použitá literatura

- VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika. Díl 2, Histologická technika*. 1. vydání. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. 0 s. ISBN 80-701-3202-7.
- JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika : pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vydání. Praha : Galén, c2006. ISBN 978-80-7262-263-4.
- MAŇÁKOVÁ, Eva; SEICHERTOVÁ, Alexandra. *Metody v histologii: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001, 80 s. Základy (Galén). ISBN 978-80-246-0230-1