

Zpracování vzorků pro histologické vyšetření

Fixace vzorku

Po odebrání vzorku tkáně dojde k přerušení regulačních vztahů buněk, zásobování kyslíkem a dezorganizaci buněčného metabolismu. Činností vlastních enzymů buňky dochází k **autolýze** (posmrtnému samonatravení) buněk. Vzorek může být znehodnocen i mikroorganismy (hniloba – v laboratoři by k ní nemělo nikdy dojít). Těmto změnám zabráníme **rychlou fixací** vzorku (okamžitě po odběru).

Fixace = denaturace bílkovin (tedy i enzymů) buněk a tkání, prováděna za účelem, aby nedošlo k autolýze.

Fyzikální metody fixace

Činnost enzymů je vázána na vodné prostředí, proto ustane, když ovlivníme transportní funkci vody.

Působení velmi nízkých teplot

Metoda freezing-drying – vysoušení vzorku za mrazu, kdy dochází k sublimaci vody ve vakuu (metoda velmi drahá). Využívá se při průkazu aktivity enzymů.

Metoda rychlého zmrazení – pomocí suchého ledu (pevný CO_2) nebo kapalných plynů např. dusíku. Musí probíhat rychle, aby nevznikly krystaly ledu, které by poničily buňky.

Působení vysokých teplot

Využití kahanu – nátěr bakterií na podložním skle se protáhne plamenem kahanu, metoda používaná v mikrobiologii.

Mikrovlnné záření – řízený ohřev v mikrovlnné troubě v rozmezí $45\text{--}55\text{ }^\circ\text{C}$ ^[1]. Dochází k jemné denaturaci bílkovin, používá se v běžných histopatologických metodách, ale i při rychlém zpracování peroperační biopsie.



Ukládání vzorku do fixačního roztoku

Chemické metody fixace

Rychlá a šetrná denaturace bílkovin pomocí chemických fixačních prostředků. Takové prostředky jsou například roztoky směsí několika látek tzv. **fixační roztoky** (fixační tekutiny). Fixace obvykle probíhá za pokojové teploty, či při mírném zahřátí (pro usnadnění průniku roztoku do vzorku). Vzorek necháváme ve fixační tekutině na přesně určenou dobu. Při fixaci vzorků užívaných v elektronové mikroskopii (malé rozměry vzorků), jsou fixační časy kratší.

U některých fixačních tekutin není problém, pokud se doba fixace prodlouží (formol), ale u jiných tekutin musí být doba fixace přesně dodržována (sublimát), aby nedošlo ke vzniku fixačních artefaktů.

Požadavky na fixační tekutinu:

- Rychlá, ale šetrná fixace (nepoškozuje vzorek, zachovává strukturu buněk a tkání).
- Rychlý průnik do tkáně, musí působit v celém vzorku.
- Musí umožnit další zpracování vzorku.

Optimální vzorek má velikost do 1 cm^3 . Fixační tekutiny musíme dát 25–50 krát více, než je objem vzorku. Vzorek v nádobě s fixační tekutinou podložíme filtračním papírem/gázou (aby nedošlo k přilepení vzorku na dno nádoby a tím zamezení fixace vzorku zespod).

Formol (formalín)

Nejčastěji používaná fixační tekutina. Z chemického hlediska, 100% formol = **40% roztok** formaldehydu (HCHO). Před použitím formolu, se ředí na 10–25% roztok. Ředíme pramenitou vodou (ideálně z vodovodu), která udržuje roztok formolu v neutrálním stavu. Občas se k ředění využívá také fyziologický roztok, jehož smíchám s formolem získáme tzv. **slaný formol** nebo pufr zvaný **nárazníkový formol**. Fixace trvá 24 hodin. Nemůže vzorek prefixovat.

Skládá se v lahvích z tmavého skla, které je pokryté vrstvou mletého vápence (CaCO_3 , MgCO_3). Na světle totiž formol oxiduje a mění se na kyselinu mravenčí. Tmavé sklo brání oxidaci a mletý vápenec váže vzniklou kyselinu mravenčí.

Bakerova tekutina

Směs 10% formolu, chloridu vápenatého (CaCl_2) a vody. Vhodná fixační tekutina pro fixaci lipidů a enzymů vázaných na membrány. Fixace trvá 24 hodin.

Bouinova tekutina

Tekutina žluté barvy. Chemicky to je nasycený roztok kyseliny pikrové (3 díly) smíchaný s formolem (1 díl). Před použitím se na každých 100 ml roztoku přidává 5 ml ledové kyseliny octové. Po fixaci se vzorek dává do 80% ethanolu. Nemůže vzorek prefixovat. Není vhodné ji použít při fixaci krevnatých orgánů či při průkazu lipidů.

Bromformol

Tekutina obsahující 15% formol a bromid amonný (NH₄Br). Využívá se u impregnačních metod, při průkazu gliových buněk v nervové tkáni.

SUSA

Fixační tekutina obsahující **SU**blimát, **SA**lt (NaCl), formol, kyselinu octovou, kyselinu trichloroctovou a destilovanou vodu. Po fixaci se přenáší do 90% ethanolu, v kterém se provádí jódování (odstranění sublimátových sraženin). Využití pro cytologii, fixaci kostí, zubů a chrupavek.

Zenkerova tekutina

Vzniká jako směs sublimátu (chlorid rtuťnatý), dichromanu draselného, síranu sodného, ledové kyseliny octové a destilované vody. **NEOBSAHUJE formol.**^[2] Fixace probíhá 24 hodin. Dále se vzorek 24 hodin vypírá v tekoucí vodě. Takto vypraný vzorek se přenáší do 70% ethanolu a jóduje se.

Etanol

Používá se zejména v neurohistologii při *Nisslově metodě*. Tkáň se značně dehydratuje a extrahují se tuky. Dojde ke zvýraznění komplexů granulárního ER v podobě tzv. *Nisslovy substance*. Ta se pak barví například thioninem.

Fyzikálně-chemické metody fixace

Kombinace fyzikálních a chemických metod (např. silně vychlazená fixační tekutina).

Odkazy

Související články

- Odběr materiálu pro histologické vyšetření
- Biopsie

Reference

1. JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika*. 1. vydání. Praha : Galén, 2006. 80 s. ISBN 80-7262-263-3.
2. JIRSOVÁ, Zuzana. *Histologická technika* [přednáška k předmětu Obecná histologie a obecná embryologie, obor Všeobecné lékařství, 1. lékařská fakulta Univerzita Karlova]. Praha. 3.10.2013. praktické cvičení, 1. ročník.

Použitá literatura

- JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika*. 1. vydání. Praha : Galén, 2006. 80 s. ISBN 80-7262-263-3.
- Brichová, Hana: *Zpracování materiálu pro histologické vyšetření*. [Praktikum pro 1. ročník 1. LF UK (obecná histologie, všeobecné lékařství)]. Praha, 2008.
- JIRSOVÁ, Zuzana. *Histologická technika* [přednáška k předmětu Obecná histologie a obecná embryologie, obor Všeobecné lékařství, 1. lékařská fakulta Univerzita Karlova]. Praha. 3.10.2013. praktické cvičení, 1. ročník.