

# Podstawy techniki histologicznej

Przygotowanie preparatu histologicznego jest wieloetapowym, złożonym procesem, którego celem jest uzyskanie trwałego, zabarwionego skrawka tkanki bądź narządu o grubości umożliwiającej analizę jego struktury przy użyciu mikroskopu świetlnego. Standardowa grubość skrawka histologicznego wynosi 5-7  $\mu\text{m}$ , niekiedy, zwłaszcza wówczas, gdy wskazane jest dobre zobrazowanie organelli komórkowych sporządzane są tzw. preparaty półcienkie o grubości nawet poniżej 1  $\mu\text{m}$ . Pełna procedura wykonania preparatu od chwili pobrania wycinka żywej struktury aż do momentu zamknięcia go szkiełkiem nakrywkowym trwa od kilku dni (w przypadku standardowych barwień przeglądowych), aż do kilku miesięcy (m.in. barwienie tkanki kostnej, impregnacja tkanki nerwowej etc.). Wykonane *lege artis* i przechowywane w odpowiednich warunkach (miejsce ciemne, chłodne i suche) preparaty histologiczne mogą zachować barwny obraz komórek nawet po 100 latach! Metodyka tworzenia preparatów zarówno histologicznych jak i histopatologicznych opiera się zawsze na sekwencji scharakteryzowanych poniżej działań laboratoryjnych.

## 1. POBIERANIE TKANKI I JEJ UTRWALANIE

Pierwszym etapem w procedurze tworzenia preparatu jest pobieranie materiału tkankowego. Ma to zwykle miejsce podczas sekcji prowadzonych w ramach realizowanych w Zakładzie Histologii prac doświadczalnych. Wszystkie działania eksperymentalne dokonywane są zgodnie ze standardami badań na zwierzętach, w warunkach anestezji, zawsze po uzyskaniu zgody odpowiedniej komisji bioetycznej. Izolowane są zazwyczaj całe narządy małych zwierząt, czasem konieczne jest pokrojenie pobranego wycinka na mniejsze fragmenty, celem lepszego i szybszego ich utrwalenia. Pewna liczba preparatów powstaje na bazie fragmentów narządów ludzkich pozyskiwanych śródoperacyjnie lub sekcyjnie. Natychmiast po pobraniu, wycinek narządu trafia do płynu utrwalającego, aby zapobiec wystąpieniu komórkowych zmian nekrotycznych i degeneracyjnych. Za uniwersalny utrwalacz uznawany jest powszechnie 10% wodny roztwór formaldehydu zobojętnionego węglanem wapnia. Istnieje jednak cały szereg innych, wieloskładnikowych utrwalaczy (zawierających m.in. chloroform, kwas octowy, sole rtęci i chromu, czterotlenek osmu) szczególnie preferowanych dla określonych tkanek i narządów i odpowiednich dla specjalnych technik barwienia preparatów. Najczęściej stosowane są płyny: Carnoya, Zenkera, „Suza”. Czas utrwalania zależy od rodzaju zastosowanego płynu, rodzaju tkanki oraz wielkości wycinka, zwykle jest nie krótszy niż 12 godzin. Przedłużone utrwalanie nie jest wskazane, może bowiem spowodować kruchość preparatu, konsekwencją zbyt krótkiego czasu jest natomiast nieprawidłowy obraz wielu struktur komórkowych.

## 2. ODWADNIANIE I ZATAPIANIE PREPARATU

Niemal wszystkie narządy ludzkie i zwierzęce są w przeciwieństwie do tkanek roślinnych obiektami niezwykle miękkimi, nie istnieje zatem możliwość ich bezpośredniego pokrojenia na bardzo cienkie skrawki. Aby tego dokonać należy zatopić tkankę w twardszym, lecz łatwo skrawalnym i biochemicznie obojętnym materiale, z których najpowszechniej stosowana jest parafina. W technice histologicznej wykorzystuje się również celoidynę, specjalne żywice organiczne oraz pewne związki polimerowe. Warunkiem prawidłowego zatopienia tkanki w parafinie jest jej przepojenie tym węglowodorem, które staje się możliwe jedynie po całkowitym usunięciu wody. Alternatywnym rozwiązaniem umożliwiającym szybkie krojenie tkanki jest jej zamrożenie przy użyciu kriostatu, wykorzystywane rutynowo do wykonywania preparatów histochemicznych. Ponieważ woda stanowi integralny składnik komórek, zatem gwałtowne odwodnienie tkanki może spowodować ich obkurczenie i uszkodzenie organelli a w konsekwencji zniszczenie preparatu. W tej sytuacji proces odwadniania prowadzony jest stopniowo poprzez umieszczanie tkanki w rozworach etanolu o wzrastającym stężeniu w tzw. szeregu odwadniającym, począwszy od alkoholu 50% poprzez 70%, 80%, 90%, 96% i bezwodny (absolutny 99,8%) do mieszaniny etanol-ksylen i czystego ksylenu. Kolejny etap zwany przepajaniem, odbywa się w temperaturze 52 °C i polega na umieszczeniu tkanki w mieszaninie parafiny z ksylenem a następnie w ciekłej parafinie, w której przebywa kilkanaście godzin. Przepojony skrawek jest następnie zatapiany we wnętrzu bloczka parafinowego, który sporządza się, wlewając porcję parafiny do metalowej formy i wprowadzając doń fragment tkanki ustawiony w odpowiedniej orientacji przestrzennej. Proces ten może odbywać w sposób częściowo zautomatyzowany z wykorzystaniem urządzenia do zatapiania/chłodzenia, utrzymującego stałą temperaturę ciekłej parafiny (fot.1.).

## 3. WYTWARZANIE SKRAWKÓW I ICH NAKLEJANIE

Zatopiony w bloczku parafinowym obiekt biologiczny jest wraz z nim samym krojony na skrawki ustalonej grubości przy użyciu urządzenia histologicznego zwanego mikrotomem rotacyjnym. Mikrotomy te, zarówno klasyczne - ręczne jak i nowoczesne – w pełni automatyczne (fot.2.), to specjalistyczne aparaty tnące, których zasadniczym elementem jest niezwykle ostry nóż, precyzyjnie ścinający bloczek parafinowy, cyklicznie przesuwany przez układ mechaniczny o odcinek rzędu kilku mikrometrów. W wyniku pracy mikrotomu powstają cienkie listki parafiny zawierające wewnątrz, widoczny makroskopowo skrawek tkanki. Tkanka zamrożona cięta jest w kriostacie, będącym zasadniczo mikrotomem rotacyjnym, w którym część skrawająca umieszczona jest wewnątrz komory zamrażającej (fot.2). Skrawki parafinowe są w kolejnym etapie naklejane na uprzednio przygotowane (silanizowane, rzadziej nabiątkowane) szkiełka podstawowe. W pierwszej fazie naklejania, skrawki umieszcza się na powierzchni ciepłej wody wypełniającej wanienkę (fot.2. po lewej). Pod wpływem podwyższonej temperatury skrawki, początkowo pomarszczone rozprostowują się, nabierając gładkości. W tym momencie delikatnie naciąga się je na szkiełko podstawowe. Trwałe przyklejenie skrawków uzyskuje się ogrzewając szkiełko w cieplarni w temp 50°C w ciągu minimum kilku godzin.

## 4. NAWADNIANIE I BARWIENIE SKRAWKÓW

Przyklejony do szkiełka podstawowego wycinek tkanki jest przepojony parafiną, zatem w pełni hydrofobowy. W tym stanie nie jest możliwe jego zabarwienie, bowiem większość barwników funkcjonuje w postaci roztworów wodnych. Konieczne jest zatem całkowite usunięcie ze skrawków parafiny a następnie ich nawodnienie. Odparafinowanie odbywa się poprzez umieszczenie szkiełek w 2 zmianach ksyleny, natomiast nawodnienie w szeregu alkoholowym, złożonym podobnie jak szereg odwadniający z roztworów etanolu, jednak ustawionych w odwrotnej kolejności, począwszy od alkoholu absolutnego aż do 70%. Z etanolu skrawki trafiają do wody, skąd mogą być bezpośrednio przeniesione do roztworów barwników. Współczesna technika histologiczna dysponuje wielką liczbą różnorodnych metod barwienia tkanek i narządów, pozwalających na ukazanie tak ogólnej budowy komórkowej badanego obiektu jak i określonych elementów biostruktury. Właściwości selektywnego barwienia komórek wykazuje kilkaset naturalnych i syntetycznych substancji. Najważniejszą, rutynowo stosowaną od ponad 150 lat, standardową techniką obrazowania histologicznego jest barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E). Jest to tzw. topograficzne barwienie przeglądowe, pozwalające ocenić całość struktury tkanki, poprzez kontrastowe zabarwienie cytoplazmy i jader komórkowych. Hematoksylina jest barwnikiem pochodzenia roślinnego, pozyskiwanym z niebieskiej kory drzewa kampszowego *Hematoxylum campechianum*, substancją zasadową, barwiącą jądra komórkowe na kolor fioletowy do niebieskiego. Eozyna to związek syntetyczny, kwaśna pochodna fluoresceiny, podbarwiająca cytoplazmę na różowo do czerwonego. Do barwienia przeglądowego stosowane są również metody: Mallorego, Massona, AZAN i inne. Istnieją też specyficzne techniki barwienia poszczególnych rodzajów tkanek i komórek, obok klasycznego barwienia stosowane są m.in. techniki impregnacji solami srebra, złota i chromu pozwalające na wizualizację włókien nerwowych, łącznotkankowych, komórek gębowych i innych elementów niewidocznych w barwieniach przeglądowych. Szczegółowe informacje na temat tych metod dostępne są w wielu podręcznikach techniki histologicznej.

## 5. ODWADNIANIE I ZAMYKANIE PREPARATÓW

Chcąc uczynić preparat trwałym, należy ponownie pozbawić go wody. Cel ten zostaje osiągnięty drogą przeprowadzenia szkiełek z zabarwionym skrawkiem tkanki przez opisany poprzednio alkoholowy szereg odwadniający. W końcowym etapie preparaty trafiają do ksyleny a następnie są zamykane. Proces ten polega na naniesieniu na powierzchnię skrawka kropli medium zamykającego (obecnie stosowane są żywice syntetyczne Entellan i DPX, rzadziej naturalny balsam kanadyjski) i delikatnym umieszczeniu szkiełka nakrywkowego. Zamykanie należy przeprowadzić ostrożnie i wolno, w taki sposób, aby pod powierzchnią szkiełka nakrywkowego nie pozostały pęcherzyki powietrza, które znacznie utrudniają obserwację. Po godzinie, następuje polimeryzacja żywicy, preparat staje się trwały i gotowy do analizy mikroskopowej.