

Metoda: Zhotovení tkání zmrazovací technikou

Klára Beránková, 3. ročník

Školitelé: Gabriela Suchá, Petr Ferczadi, Dis.

Princip: Jedná se o rychlou metodu na vyšetření vzorků, pro které je fixování formaldehydem nevhodné a znehodnotily by se tím významné látky (např. průkaz tuků, průkaz enzymatické aktivity...). Používá se nativní materiál, který se musí zamrazit, co nejdříve po odběru. Dle druhu materiálu k rychlému zamražení používáme suchý led (-78,8°C), kapalným dusíkem (-196°C), 2-methylbutan s kapalným dusíkem (-196°C) nebo mražení v kryostatů (-25°C).

Suchý led používáme ke zmražení kůží na imunofluorescenci. Vzorek nejdříve osušíme buničinou a necháme namrazit na kryostatovém stolečku položeném v rozdrčeném suchém ledu. Dále si připravíme kryostatový stoleček a do jeho středu nanese lepidlo Cryomount. Jakmile začne bělat, umístíme tkáňový vzorek do lepidla a necháme zatuhnout. Následně stoleček přesuneme do kryostatu, kde ho necháme stabilizovat na teplotu uvnitř aspoň 20 minut. Poté se uchytí do pohyblivé části rotačního mikrotomu umístěného ve zmrazovacím zařízení a makroposunem se seřízne ve svislé rovině proti pevně umístěné žiletce. Krájíme řezy silné 4 mikrometry, umístíme na skla se speciálním adhezivním povrchem a vzorky jsou připravené na další zpracování pro imunofluorescenci.

Kapalným dusíkem zamrazíme biopsie ledvin určené na imunofluorescenci. Připravíme si izolační nádobu naplněnou tekutým dusíkem. Poté nanese do středu kryostatového stolečku lepidlo Cryomount a umístíme do něj tkáňový vzorek. Stoleček následně ponoříme přibližně na 1 minutu do kapalného dusíku. Po zmražení stoleček se vzorkem přesuneme do kryostatu a stabilizujeme cca 20 minut. Řezy krájíme o tloušťce 3 mikrometry a přenášíme na podložní skla. Výsledné vzorky jsou připravené pro další zpracování na imunofluorescenci.

Připravené 2 vzorky tkáně ze svalové biopsie mrazíme 2-methylbutanem společně s kapalným dusíkem. Do polystyrenové nádoby nebo Dewarova válce v laminárním boxu připravíme kapalným dusíkem. Zároveň nalijeme do plechovky 2-methylbutan a ponoříme jej do kapalného dusíku, dokud se na okrajích plechovky neobjeví lehká jinovatka. Připravený sval na kovové lžičce umístíme do plechovky s 2-methylbutanem a necháme promrazit. Následně se vzorek přenáší do kryostatu. Výsledný preparát krájíme o tloušťce 8 - 10 mikrometrů pro histochemické reakce a 4 - 6 mikrometrů na imunohistochemii. Výsledek přenášíme na podložní sklo a dále pokračujeme se specifickým barvením.

V kryostatu rychle mrazíme peroperační biopsie. Tkáň se umístí na kryostatový stoleček, ve kterém je pár kapek vody nebo lepidlo Cryomount. Dále vzorek necháme před následnou manipulací na 1 - 2 minuty zamrazit v kryostatu. Poté stoleček umístíme do pohyblivé části kryostatu a makroposunem jej seřízne do rovné plochy. Po seříznutí krájíme vzorky o tloušťce 1,5 - 2 mikrometry, umístíme na podložní sklo, fixujeme, rychle obarvíme, odvodníme a montujeme do pertexu.

Uplatnění metody: Pomocí kryostatu se nejčastěji zpracovávají peroperační biopsie. Dále biopsie ledvin, kůže na imunofluorescenci, tkáň na průkaz enzymů a tuků.

Úskalí metody: Zmrazovací technikou nelze vyšetřit všechny typy tkání. Žiletkou neukrojíme např. kosti, které mají sklony se o ostří potřhat nebo tukovou tkáň. V případě peroperační biopsie se tkáň zmrazením částečně poškozuje, což může mít za následek obtížnější zhodnocení diagnózy patologem. Peroperační biopsie musí být domluveny předem a zhotovení provádí pouze zkušený pracovník.

Přístrojové vybavení: Ke zhotovení preparátu využíváme jako přístroj zmrazovací mikrotom. Výsledek následně prohlédneme ve světelném mikroskopu.

Odběr a transport: Každá již zmíněná tkáň se odebírá jiným způsobem. Všechny jsou po odběru dodávány pro zmrazovací techniku ve specifických roztocích, nikoliv zpracovávány klasickou formol-parafinovou cestou. Kožní excize přichází do laboratoře fixovány v Michellově roztoku B. Svalové a ledvinové biopsie jsou transportovány v Petriho misce s gázou namočenou ve fyziologickém roztoku.