

27.

TECHNIKA PERFUZJI I JEJ ZASTOSOWANIA

Pracownia Chronobiologii UJ

Wstęp

Perfuzja to przepuszczanie przez naczynia krwionośne określonych narządów lub części ciała, płynów perfuzyjnych w celu : 1) wypłukania z nich krwi, 2) utrwalenia, 3) wykonania krioprotekcji. Postępowanie to w dalszej kolejności umożliwia przygotowanie tkanki do barwień histo- oraz immunohistochemicznych.

Cel pierwszy osiąga się, stosując zimny (4°C) zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) lub sól fizjologiczną (0.85–0.90% NaCl) w ilości 100 ml/100 g masy ciała.

Postępowanie to ma na celu usunięcie krwi, będącej źródłem substancji biologicznie czynnych, mogących dawać w barwieniach histo- i immunohistochemicznych reakcje fałszywie pozytywne oraz duże tło (np. acetylocholinesteraza, oznaczana w tkance nerwowej, występuje również w erytrocytach i trombocytach).

Cel drugi osiąga się, stosując klasyczne w histologii utrwalacze, takie jak 4% roztwór paraformaldehydu zbuforowany 0.1 M buforem fosforanowym o pH 7.4 (do mikroskopii świetlnej) lub 1.0% roztwór paraformaldehydu z 1.5% roztworem glutaraldehydu, zbuforowany 0.1 M buforem fosforanowym o pH 7.4 (do mikroskopii elektronowej). W każdym przypadku używa się zimnych (4°C) utrwalaczy w ilości 100 ml/100 g masy ciała.

Ten sposób utrwalania wykorzystujący gęstą sieć naczyń krwionośnych sprawia, że utrwalacz w bardzo krótkim czasie osiąga każdy narząd i tkankę, zapewniając ich równomierne oraz błyskawiczne utrwalenie. Metoda ta, skracając wybitnie czas samego utrwalania (10–15 min), zapewnia najlepsze zachowanie struktury komórek, tkanek i narządów.

Cel trzeci osiąga się, stosując 20% roztwór sacharozy zbuforowany 0.1 M buforem fosforanowym o pH 7.4, o temperaturze pokojowej, w ilości 100 ml/100 g masy ciała.

Postępowanie to, określane mianem krioprotekcji, ma za zadanie wyeliminowanie niekorzystnego zjawiska uszkodzenia struktury komórek przez kryształki lodu (przemiana wody w lód zachodzi na drodze jej krystalizacji). Osiąga się to perfuzyjnym przepajaniem tkanek i narządów substancją, której wodny roztwór w temperaturze krzepnięcia nie tworzy kryształków, lecz ulega żelifikacji. Takie właściwości posiada właśnie powyższy roztwór sacharozy. Postępowanie to jest nieodzowne podczas wykonywania skrawków mroźniowych.

Materiały

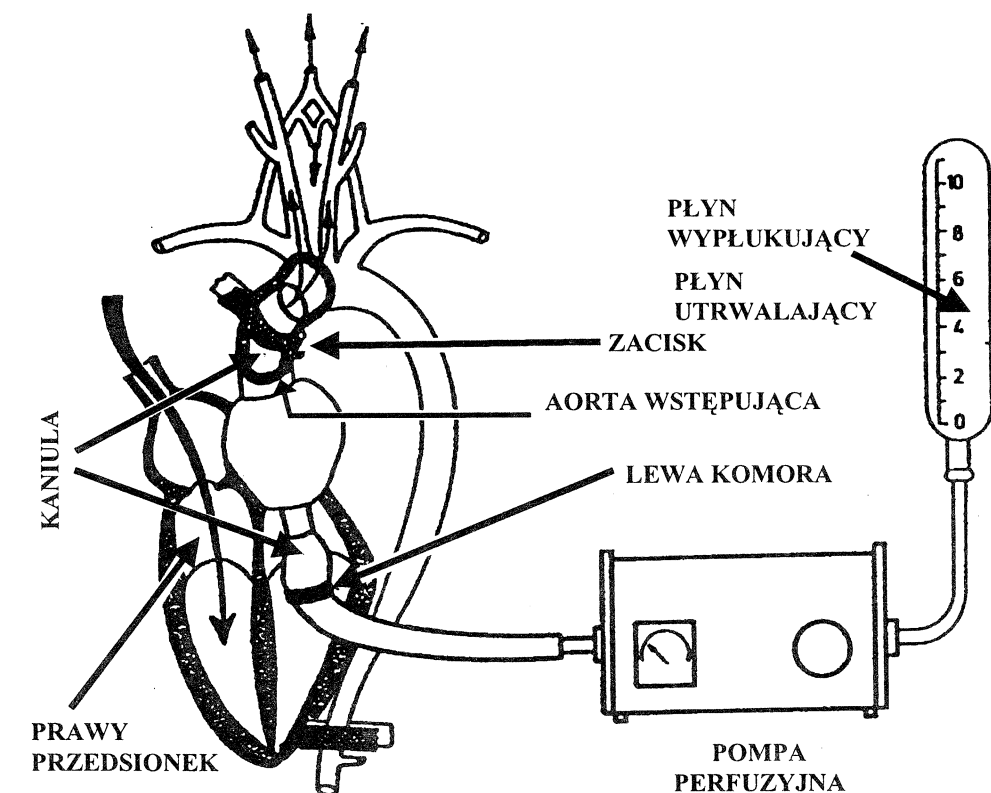
- A. Odczynniki: vetbutal, PBS lub sól fizjologiczna, 4% zbuforowany roztwór paraformaldehydu lub 1% zbuforowany roztwór paraformaldehydu z 1.5% zbuforowanym roztworem glutaraldehydu, 0.1 M bufor fosforanowy o pH 7.4 oraz 20% zbuforowany roztwór sacharozy.
- B. Sprzęt do perfuzji: pompa perfuzyjna lub zestaw perfuzyjny do perfuzji wykonywanej metodą kroplówkową, składający się z naczyń na płyny perfuzyjne, połączonych z drenami w kształcie litery Y, statywu o wysokości około 1 m, zacisków, kaniuli, oraz zestaw preparacyjny, lignina i strzykawka o objętości 1 ml.

27.1. Wykonanie ćwiczenia

Perfuzję wykonujemy na zwierzęciu w głębokim znieczuleniu ogólnym, podając dootrzewnowo 100 ml vetbutalu/100 g masy ciała.

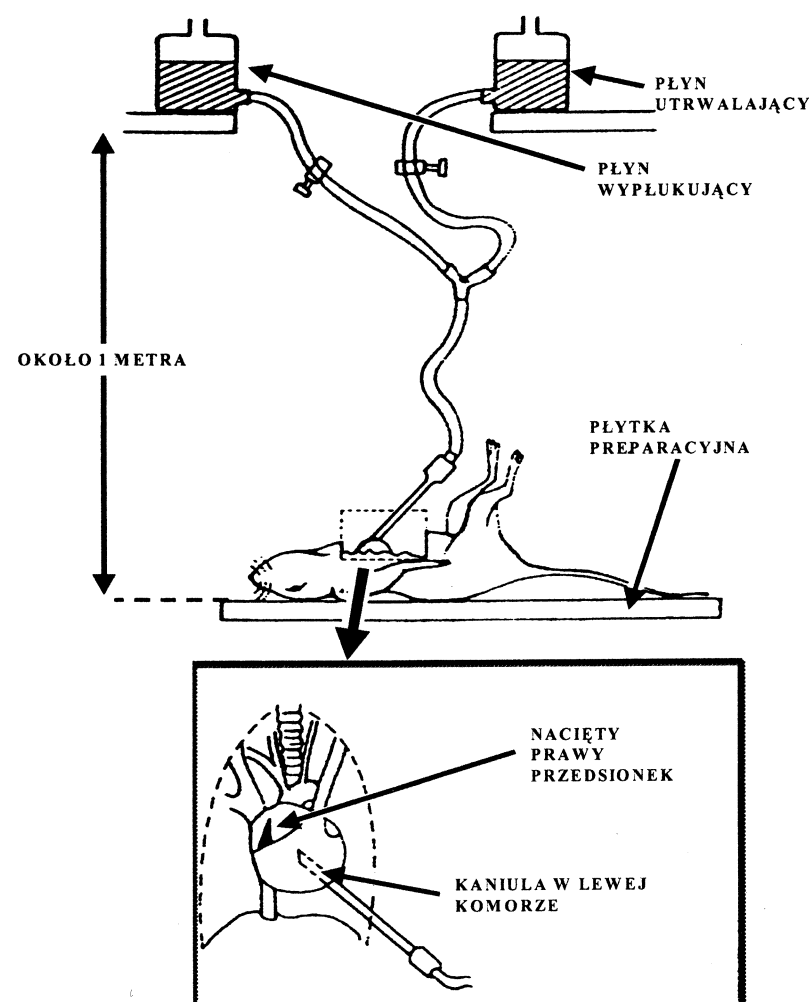
W dalszej kolejności zwierzę mocujemy na deseczce preparacyjnej, odsłaniamy serce i nacinamy lewą komorę, przez którą do aorty wstępującej wprowadzamy kaniulę, mocując ją w tym położeniu za pomocą zacisku. Kolejny krok – to nacięcie prawego przedsionka w celu umożliwienia wypływu krwi i podawanych płynów perfuzyjnych, a następnie włączenie pompy perfuzyjnej (rys. 1).

Płyny podajemy z prędkością około 30 ml/min.



Rys. 1. Schemat ilustrujący zestaw do wykonywania perfuzji za pomocą pompy perfuzyjnej

W przypadku perfuzji wykonywanej metodą kroplówkową na statywach, na wysokości około 1 metra nad powierzchnią serca zwierzęcia umieszczamy naczynia zawierające odpowiednie płyny perfuzyjne zgodnie z rysunkiem 2.



Rys. 2. Schemat ilustrujący zestaw do wykonywania perfuzji metodą kroplówkową (zmieniona: za J.A. Kiernan, *Histological and histochemical methods: Theory and practice*, 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo 1990)

Dalsze postępowanie podobnie – jak wyżej.

Wyflukiwanie krwi należy kontynuować do momentu, kiedy z prawego przedsionka wypływa już tylko płyn perfuzyjny, wolny od krwi. Cała procedura wyflukiwania i utrwalania trwa około 20 do 30 minut, a krioprotekcja około 10 do 15 minut. Wstępnej oceny przebiegu samej perfuzji dokonujemy najpierw makroskopowo w trakcie samego zabiegu (brak krwi w prawym przedsionku, sztywność ciała zwierzęcia), a ostatecznej – mikroskopowo (brak krwinek w naczyniach i zmian kształtu komórek w badanej tkance lub narządzie).

L i t e r a t u r a

Kiernan J.A.: *Histological and histochemical methods: Theory and Practice*, 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford – New York – Seoul – Tokyo 1990, s. 30–31.

Litwin J.A.: *Podstawy technik mikroskopowych*, Collegium Medicum UJ, Kraków 1995.

28.

HISTOCHEMICZNA METODA LOKALIZACJI ACETYLOCHOLINESTERAZY (ACHE)

Pracownia Chronobiologii UJ

Wstęp

Acetylocholinesteraza (AChE, hydrolaza acetylocholíny, EC. 3.1.1.7) jest to enzym, który hydrolizuje acetylocholínę (ACh) do choliny i kwasu octowego, we wszystkich miejscach przekąźnictwa cholinergicznego, ograniczając tym samym czas działania tego neuroprzekąźnika w szczelinie synaptycznej. Enzym ten charakteryzuje bardzo duża wydajność, gdyż 1 mol AChE hydrolizuje około 10 milionów cząsteczek ACh w ciągu 1 minuty. Występuje on w błonie komórkowej elementów pre- i postsynaptycznych synapsy cholinergiczej (aksony, dendryty), w błonie jądrowej oraz w retikulum endoplazmatycznym elementów postsynaptycznych lub cholinoceptywnych (mięsień szkieletowy w płytce nerwowo-mięśniowej, komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy, itp.).

Acetylocholinesteraza obecna jest również w neuronach serotoninergicznych jąder szwu, noradrenergicznych miejsca sinawego, dopaminergicznych istoty czarnej, jak również we włóknach peptydergicznych, w tym zawierających substancję P. W tych ostatnich degradowuje substancję P do dwupeptydów, czemu zapobiegają odpowiednie inhibitory AChE. Z tych względów obecność AChE w badanych neuronach upoważnia wyłącznie do stwierdzenia, że są one AChE-zowo pozytywne i potencjalnie cholinergiczne. O cholinergicznym charakterze danego neuronu jednoznacznie przesądza tylko obecność acetylotransferazy cholinowej (CAT, EC. 2.3.1.6) enzymu syntetyzującego ACh z acetyloCoA i choliny.

Acetylocholinesteraza obecna jest ponadto w erytrocytach i trombocytach, co wymusza dla celów histochemicznych i biochemicznych wykonanie perfuzji naczyń badanej tkanki w celu wyflukania z niej krwi. Pomimo pewnych ograniczeń wynikających z obecności AChE nie tylko w strukturach cholinergicznych, histochemiczna metoda jej lokalizacji w tkankach i narządach znalazła zastosowanie w diagnostyce chorób mięśni (*myasthenia gravis*), choroby Alzheimera, choroby Hirschsprunga, jak również w histologicznej weryfikacji skuteczności i poprawności dokonywanych lezji w obrębie struktur cholinergicznych.

W badaniach histochemicznych nad lokalizacją AChE, jak i biochemicznych, należy pamiętać o stymulującym wpływie narkozy eterowej na aktywność układu współczulnego, zwłaszcza w obrębie rdzenia nadnerczy. Wpływ ten jest związany ze zwiększonym uwalnianiem ACh i zwiększoną aktywnością AChE. Fakt ten należy zatem uwzględnić przy wyborze narkozy.

W tkankach (osocze, neuroglej, niektóre neurony, śródbłonek naczyń włosowatych mózgu) obok AChE występuje butyrylocholinesteraza (BuChE, EC. 3.1.1.8), określana mianem pseudocholinesterazy. Enzym ten, hydrolizując butyrylocholiny (BuCh), prawdopodobnie zapobiega jej przenikaniu do mózgu i toksycznemu działaniu. Obok butyrylocholiny, BuChE hydrolizuje również ACh, wykazując pod tym względem, odmiennie od AChE, zwiększoną aktywność w obecności nadmiaru substratu. Z tego powodu, poszukując miejsc AChE-zowo pozytywnych, należy w badanej tkance zablokować BuChE za pomocą czteroizopropylodifosforamidu (ISO-OMPA) w stężeniu 10^{-4} M. Związkiem stosowanym w oznaczeniach histochemicznych i biochemicznych do blokowania AChE jest dwubromek 1,5-dwu (4-allilodwumetyloamoniofenylo) pentan-3-onu (BW284C51) w stężeniu 10^{-5} M. Stosuje się również inhibitor obu cholinesteraz (AChE i BuChE) ezerynę (fizostygminę), w stężeniu 10^{-4} M. Powyższe inhibitory wykorzystuje się w celu odróżnienia w badanej tkance miejsc związanych z obecnością AChE od miejsc związanych z BuChE.

28.1. Metoda

Obecnie powszechnie stosowaną metodą histochemicznej lokalizacji acetylocholinesterazy jest metoda tiocholinowa i żelazicyjankowa według Tago i wsp. (1986), stanowiąca modyfikację metody Karnovsky'ego i Roots'a z 1964 roku. Powstający bezpośrednio w miejscu obecności AChE brązowy i drobnoziarnisty produkt cechuje się bardzo małą dyfuzyjnością, co sprawia, że nawet przy długotrwałej inkubacji skrawków nie tworzy się tło (lub tworzy się w znikomym stopniu). Modyfikacja Tago i wsp. (1986) polega na wzmocnieniu pierwotnej reakcji Karnovsky'ego i Roots'a (1964), przez wykorzystanie faktu, iż jej końcowy produkt, żelazocyjanek miedziowy ($\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$), tzw. brąz Hatchetta, posiada właściwości peroksydazowe i w obecności nadtlenu wodoru (H_2O_2) utlenia czterochlorowodorek dwuaminobenzyny (DAB), chromogen powszechnie stosowany w histo- i immunohistochemii, do brunatnego związku odkładającego się bezpośrednio w miejscu reakcji pierwotnej. Ponadto w obecności siarczanu amonowoniklawego ($\text{Ni}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), DAB utlenia się na kolor czarny, a w obecności chlorku kobaltowego (CoCl_2) na kolor niebieski. Modyfikacje te umożliwiają zatem zmianę barwy i jej nasilenia w miejscu obecności AChE. Ma to ogromne znaczenie przy badaniu tkanek o małej aktywności tego enzymu, a jednocześnie umożliwia wykonanie na jednym skrawku dwóch różnych oznaczeń. W przypadku tkanki o dużej aktywności AChE (synapsa nerwowo-mięśniowa, neurony cholinergiczne) lokalizowanie AChE można zakończyć na reakcji pierwotnej, tj. na powstaniu żelazocyjanku miedziowego, a powyższe etapy pominąć.

Zarówno produkt reakcji pierwotnej, tj. $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$, jak i reakcji wtórnej, tj. utleniony DAB, są związkami nierozpuszczalnymi w alkoholu i ksylenu, co pozwala na dowolny sposób zamykania preparatów. Reakcje przeprowadzamy na skrawkach kriostatowych o grubości od 10 do 20 μm , utrwalonych i perfundowanych, lub na świeżej tkance.

28.2. Odczynniki

- A. 1) Jodek acetylotiocholiny (JATCh-substrat AChE); 2) cytrynian sodowy dwuwodny ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$); 3) siarczan miedziowy bezwodny (CuSO_4); 4) żelazicyjanek potasu

- ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$); 5) bufor octanowy 0.1 M o pH 5.0 dla tkanek o dużej aktywności lub 6.0 dla tkanek o małej aktywności AChE, 6) ISO-OMPA (bloker BuChE); 7) BW284C51 (bloker AChE); 8) ezeryna (fizostygmina) (bloker AChE i BuChE), a w przypadku wzmocnienia reakcji: 9) perhydrol (30% H_2O_2); 10) DAB; 11) siarczan amonowoniklawy ($\text{Ni}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); 12) bufor TRIS 0.05 M o pH 7.6.
- B. Płyn wyjściowy: 65 ml buforu octanowego 0.1 M o pH 5.0 lub 6.0 + 147 mg cytrynianu sodowego $\times 2\text{H}_2\text{O}$ + 48 mg siarczanu miedziowego bezw., + 17 mg żelazicyjanku potasu + 35 ml wody destylowanej. Roztwór ten jest bładozielony i trwały przez tydzień w temperaturze pokojowej.
- C1. Płyn inkubacyjny o pH 5.0 dla tkanek o dużej aktywności AChE-zowej: 9 ml płynu wyjściowego + 10 mg JATCh + 1 ml 10^{-4} M ISO-OMPA. Płyn ten jest trwały przez wiele godzin.
- C2. Płyn inkubacyjny o pH 6.0 dla tkanek o małej aktywności AChE-zowej: 10 ml płynu wyjściowego B + 80 ml buforu octanowego + 10 ml 10^{-4} M ISO-OMPA + 5 mg JATCh. W przypadku wzmocnienia reakcji przygotować:
- D. 0.05 % roztwór DAB: 10 mg DAB + 20 ml buforu TRIS 0.05 M o pH 7.6 + 150 mg siarczanu amonowoniklawego + 2 ml 0.03% H_2O_2 przygotowanego z perhydrolu (30% H_2O_2). Roztwór ten przygotowujemy na 15 minut przed użyciem.

28.3. Wykonanie ćwiczenia

1) 30-minutowa preinkubacja w temperaturze 37°C z 10^{-4} M ISO-OMPA lub z 10^{-5} M BW284C51 lub EZERYNĄ 10^{-4} M.

2) Przeniesienie skrawków do odpowiedniego medium inkubacyjnego C1 lub C2 na 2 lub 3 godziny w temperaturze 37°C lub na 12 do 24 godzin w temperaturze 4°C . Są to tylko bardzo przybliżone czasy inkubacji, zależne głównie od rodzaju tkanki, sposobu jej utrwalania, czasu, jaki upłynął od momentu pobrania materiału, i dlatego nie można ich ustalić w sposób arbitralny. Dla uzyskania optymalnych wyników poleca się prowadzić co 30 minut kontrolę przebiegu reakcji pod mikroskopem.

Czas inkubacji jest wystarczający, jeśli w miejscach aktywności AChE powstaną brązowe ziarnistości i nie tworzy się tło.

Na tym etapie można zakończyć inkubację i zamknąć preparaty. Jeśli natomiast chcemy z różnych względów wzmocnić ją, to postępujemy w następujący sposób:

3) Płukanie preparatów $3 \times$ po 3 minuty w buforze TRIS 0.05 M o pH 7.6 w temperaturze pokojowej.

4) Nakrapianie na skrawki, po wcześniejszym obrysowaniu ich diamentem, 50–100 μl roztworu D w temperaturze pokojowej.

5) Prowadzenie kontroli pod mikroskopem; brązowy produkt reakcji zmienia się w czarny.

6) Płukanie preparatów $3 \times$ po 3 minuty w buforze TRIS i wodzie kranowej.

7) W razie konieczności – podbarwić skrawki hematoksyliną i/lub eozyną.

8) Zamknąć preparaty w glicerożelu lub w balsamie kanadyjskim po wcześniejszym odwodnieniu (alkohol) i prześwietleniu (ksylen).

28.4. Wyniki

W miejscach aktywności AChE znajduje się brązowy drobnoziarnisty produkt (ETAP 2), a czarny na ETAPIE 4.

Uwagi

1. Etap 4 można pominąć, jeśli badamy tkankę o dużej aktywności AChE i stosujemy płyn inkubacyjny C1 o pH 5.0.
2. Etap 4 jest niezbędny, jeśli badamy tkankę o małej aktywności AChE i stosujemy płyn inkubacyjny C2 o pH 6.0. W tym przypadku, w celu zablokowania endogennej peroksydazy (erytrocyty, granulocyty, trombocyty, pozostałe komórki organizmu zawierające peroksydazę NAD, NADP i glutationu), skrawki, przed przystąpieniem do etapu 1, inkubujemy $3 \times$ po 10 minut w 0.1–0.3% H_2O_2 .
3. W celu określenia specyficzności miejsc reakcji AChE-zowej konieczne jest wykonanie kontroli polegających na inkubacji skrawków badanej tkanki w płynach inkubacyjnych zawierających obok substratu (JATCh) również odpowiedni bloker (BW284C51, EZERYNA). Wykonuje się również tzw. próbę ślepa, inkubując skrawki w płynie pozbawionym substratu (JATCh).

L i t e r a t u r a

- Kiernan J.A.: *Histological and histochemical methods: Theory and practice*, 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford 1990, s. 246–252.
- Krygier-Stojałowska A. i Godlewski H.: *Topochemiczne metody badań komórek i tkanek*, PWN, 1982, t. 2, s. 746–758.
- Tago H., Kimura H. and Maeda T.: *Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and staining in rat brain by sensitive histochemical procedure*, "The Journal of Histochemistry and Cytochemistry", 34 (1986), s. 1431–1438.

29.

BADANIA CYTOCHEMICZNE W DIAGNOSTYCE BIAŁACZEK WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI MIELOPEROKSYDAZY W KOMÓRKACH SZPIKU MYSZY

Pracownia Hematologii i Toksykologii Zwierząt Zakładu Fizjologii Zwierząt UJ

Wstęp

Białaczki (leukemie) stanowią bardzo zróżnicowaną grupę chorób rozrostowych dotyczących komórek szpiku kostnego. Istota ich polega na niekontrolowanym namnażaniu się komórek prekursorowych (blastycznych) wywodzących się z różnych linii krwinkowych. Jednocześnie w ich przebiegu dochodzi do stłumienia normalnej hematopoezy i niewydolności funkcjonalnej szpiku. W związku z tym w przebiegu białaczek dochodzi do granulocytopenii, niedokrwistości i małopłytkowości. Chorzy najczęściej mają objawy podobne do grypy i skarżą się na ogólne osłabienie, gorączkę i zaburzenia krzepnięcia krwi (siniaki, krwawienia z dziąseł). W przypadku białaczek ostrych czas przeżycia bez podjęcia leczenia jest zazwyczaj krótszy niż 6 miesięcy. Komórki białaczkowe bardzo często (choć nie zawsze) pojawiają się w dużych ilościach w krwi obwodowej, zasiedlają śledzionę, wątrobę i węzły chłonne. Mogą również tworzyć nacieki w innych narządach. Związane jest to z upośledzeniem funkcjonowania tzw. bariery szpikowej.

Klasyfikacja białaczek zależy zarówno od typu komórki, z której wywodzi się klon białaczkowy, jak i stopnia jej dojrzałości. W związku z tym wyróżniamy białaczki szpikowe pochodzące z mieloblastów i białaczki limfatyczne wywodzące się z linii limfocytarnej. Białaczki ostre wywodzą się z komórek słabiej zróżnicowanych, podczas gdy w białaczkach przewlekłych dominują komórki o większym stopniu dojrzałości. Już z tego pobieżnego opisu wynika, że identyfikacja rodzaju komórek blastycznych ma kluczowe znaczenie dla diagnozy, a następnie rodzaju stosowanej terapii. Niestety w wielu wypadkach morfologia komórek występujących w krwi czy szpiku pacjenta lub też zwierzęcia nie daje wyraźnych podstaw do postawienia diagnozy, ponieważ szczególnie niedojrzałe blasty są bardzo do siebie podobne. W diagnostyce białaczek oprócz kryteriów morfologicznych stosuje się zatem różnorodne barwienia cytochemiczne, analizę immunofenotypu (markerów powierzchniowych – CD) z użyciem przeciwciał monoklonalnych i badania cytogenetyczne. Opierając się na tych kryteriach, ustalono powszechnie akceptowaną klasyfikację ostrych białaczek określaną mianem FAB (*French-American-British classification*) (tabela 1).