

KROJENIE NA MIKROTOMIE I SPORZĄDZANIE PREPARATÓW

W trakcie ćwiczeń z krojenia i sporządzania preparatów mikroskopowych z mózgów szczurzych należy wykonać szereg czynności, na które składają się:

1. Dalsze utrwalanie tkanki,
2. Odwadnianie tkanki (dehydratacja),
3. Prześwietlanie (przepojenie ksylenem),
4. Przepojenie tkanki paraplasmem,
5. Krojenie mózgu na mikrotomie,
6. Sporządzanie preparatów.

1. DALSZY UTRWALANIE TKANKI UZYSKANEJ PO PERFUZJI

Pozyskaną w wyniku przeprowadzonej perfuzji tkankę (w tym przypadku mózg szczura), należy poddać dalszej obróbce (postfixacji). Preparat umieszcza się na 24 godziny w roztworze 4% paraformaldehydu w temp. 4°C. Poprzez zabieg ten dokonujemy dokładnego utrwalenia całości tkanki dzięki stabilizacji struktury białek. Jednakże tkanka nie może przebywać w roztworze utrwalacza zbyt długo, gdyż może on doprowadzić do nieprawidłowych zmian jej struktury i zbyt dużej kruchości tkanki. Działanie utrwalacza przerywa się więc poprzez przeniesienie tkanki do substancji będącej rozpuszczalnikiem utrwalacza. Takimi substancjami mogą być: woda, alkohol czy bufor.

2. ODWADNIANIE TKANKI (DEHYDRATAcja)

W celu skrojenia na cienkie skrawki pozyskanych i utrwalonych mózgów szczura, należy je najpierw zatopić w medium, które nada im odpowiednią twardość i wytrzymałość. Jednym z najbardziej popularnych jest parafina, czy też używany coraz częściej paraplasm. Paraplasm jest substancją o konsystencji przypominającej parafinę. Przechodzi w stan ciekły w temperaturze ok. 57°C i jest substancją o charakterze silnie hydrofobowym. Zatem aby możliwe było przepojenie tkanki paraplasmem, należy wcześniej usunąć z niej wodę. Nie można jednak zrobić tego jednoetapowo, ponieważ nagły wypływ wody z tkanki powoduje obkurczenie się komórek i organelli komórkowych, a w rezultacie zniszczenie struktury tkanki (zjawisko plazmolizy). Dlatego tkankę przeprowadza się przez roztwory alkoholu etylowego o rosnących stężeniach, kolejno: 70%, 95% i dwukrotnie 100%. W każdym z tych roztworów mózg powinien przebywać 24 godziny. Odwadnianie ma na celu usunięcie z preparatu utrwalacza, wody oraz utwardzenie tkanki. Tak przygotowany preparat może zostać poddany kolejnemu etapowi obróbki – prześwietlaniu.

3. PRZEŚWIETLANIE

Prześwietlanie to zastąpienie substancji odwadniającej substancją prześwietlającą, w tym przypadku 100% alkoholu etylowego ksylenem. Substancja prześwietlająca to taka, która jest rozpuszczalnikiem zarówno dla substancji odwadniającej jak i medium, którym przepojony zostanie preparat. Dla alkoholu etylowego i paraplasteru taką substancją jest ksylen, który cechuje się szybkim tempem przenikania przez tkankę. Zabieg ten pozwala na przepojenie badanej tkanki paraplasterem i umożliwia krojenie jej na skrawki. W celu prześwietlania preparatów przenosi się mózgi ze 100% roztworu alkoholu etylowego do ksylenu i pozostawia na wytrząsarce przez okres 2 godzin.

4. PRZEPAJANIE TKANKI PARAPLASTEM

Aby przepoić tkankę paraplasterem, należy podgrzać paraplaster do temperatury 57 – 58°C tak, aby zmienił stan skupienia na ciekły. W tym celu należy umieścić płatki paraplasteru w komorze cieplarki nastawionej na odpowiednią temperaturę. Następnie roztopiony paraplaster umieszcza się w kartonowych pudełeczkach, które służą za formę i pozostawia w cieplarce. Z powierzchni preparatów, które poddano wcześniej prześwietlaniu należy usunąć



Zdjęcie 1. Mózgi szczurów zatopione w paraplaście

za pomocą papierowego ręcznika nadmiar ksylenu i umieścić je na 2 godziny w pudełeczku z paraplasterem w cieplarce. Jest to czas, w którym paraplaster swobodnie przepoi całą tkankę (mózg). Po tym czasie przenosi się pudełka z cieplarki do temperatury pokojowej, ustawia preparat w odpowiedniej orientacji przestrzennej i pozostawia do zastygnięcia. Taki bloczek paraplasteru zawierający tkankę jest niemalże gotowy do skrojenia na mikrotomie.

5. KROJENIE NA MIKROTOMIE

Mikrotom to urządzenie służące do krojenia preparatów biologicznych na skrawki o bardzo małej grubości, z których można sporządzać odpowiednie preparaty do obserwacji mikroskopowych. Składa się ze statywu oraz części ruchomych, do których należą: uchwyt holdera, uchwyt noża oraz koło zamachowe (opis mikrotomu na zdjęciu poniżej). Zakres grubości skrawków wynosi od 0,5 do 60 μm .



Zdjęcie 2. Bloczek paraplasteru po wyjęciu z pudełeczka. Widoczna część grzbietowa mózgu szczura

Zazwyczaj sporządza się skrawki o grubości od 5 do 10 μm . Przed rozpoczęciem krojenia należy wyjąć bloczek z zatopioną tkanką z pudełeczka, odciąć nadmiar paraplastu wokół preparatu i przykleić przy pomocy roztopionego paraplastu przycięty bloczek do holdera. Bardzo ważne jest, aby po przyklejeniu bloczka mózg znajdował się częścią grzbietową do góry, a krojenie następowało od mózdzku ku przodowi. Istotną kwestią pozostaje ustawienie



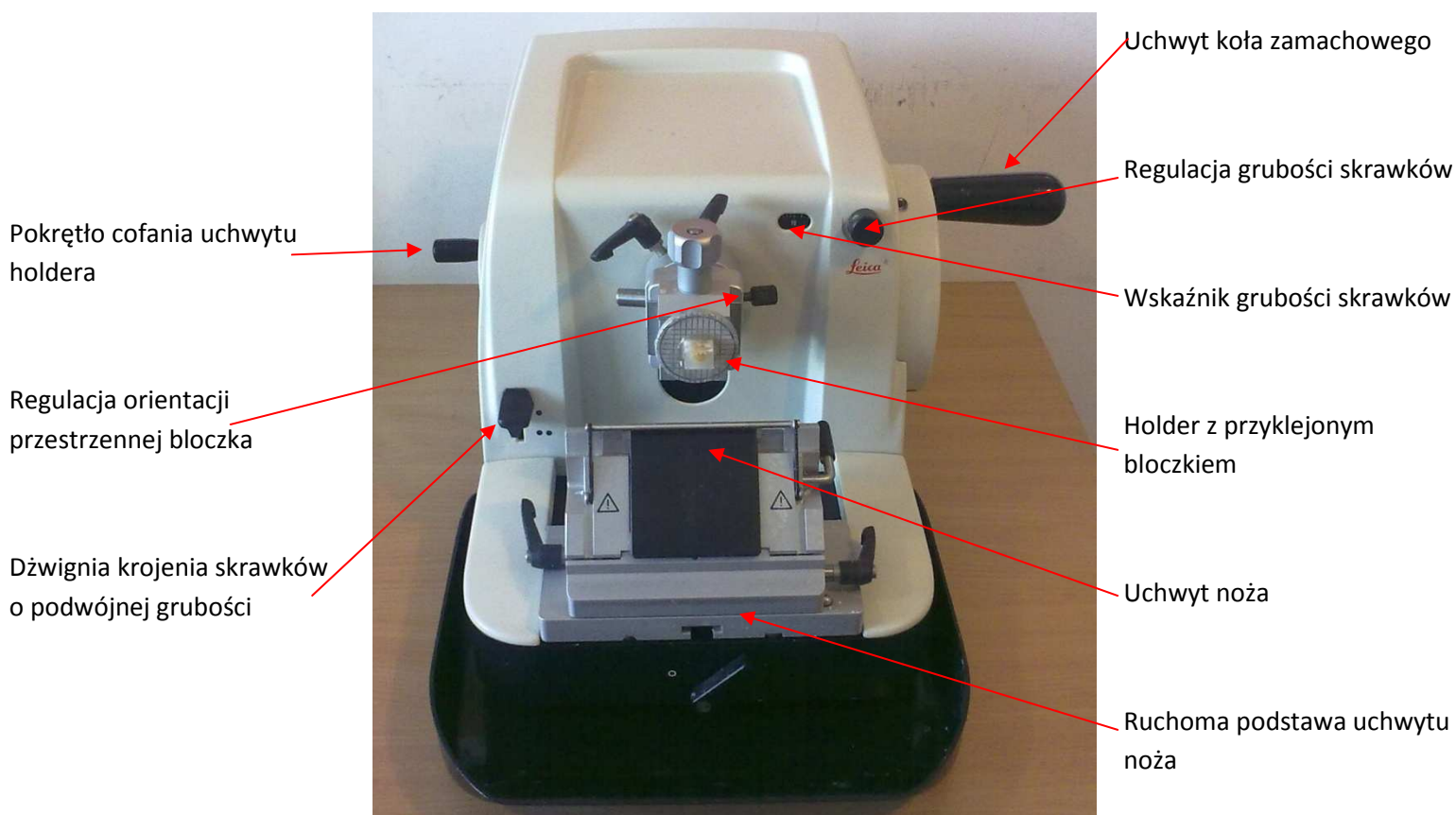
Zdjęcie 3. Przycięty bloczek przyklejony do holdera

odpowiedniej orientacji przestrzennej preparatu (mózgu), aby w trakcie krojenia zachowana została symetria bilateralna pomiędzy lewą i prawą półkulą mózgu. Ważne jest także, żeby ostrze znajdowało się pod kątem prostym do górnej powierzchni bloczka. Opisywane postępowanie ma zastosowanie, jeśli

kroimy mózg w przekroju poprzecznym. W wyniku krojenia otrzymujemy kolejne skrawki, które skleją się samoczynnie w tasiemkę. Taką tasiemkę przenosimy na odpowiednie tacki i kroimy na elementy zawierające po jednym lub dwa skrawki mózgu.



Zdjęcie 4. Tasiemki powstałe w wyniku krojenia

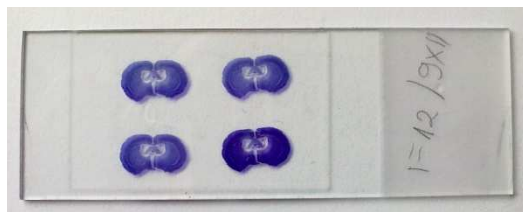


Zdjęcie 5. Budowa mikrotomu

6.SPORZĄDZANIE PREPARATÓW

Szkiełka na których umieszcza się preparaty do obserwacji mikroskopowych należy wcześniej odpowiednio przygotować, poprzez pokrycie ich powierzchni roztworem żelatyny. W celu sporządzenia takiego roztworu rozpuszcza się 4 g żelatyny w 400ml wody destylowanej poprzez podgrzanie roztworu do temperatury wrzenia. Wówczas dodaje się 0,2 g ałunu potasowego, całość przesącza przez bibułę filtracyjną i pozostawia do ostygnięcia. W takim roztworze zanurza się szkiełka podstawowe i pozostawia do całkowitego wyschnięcia.

Nakładanie preparatów na szkiełka podstawowe odbywa się również przy użyciu roztworu żelatyny, którego odpowiednia temperatura (ok. 57°C) utrzymywana jest przy użyciu płyty grzewczej. Wcześniej przygotowane skrawki, przenosi się na powierzchnię roztworu żelatyny, dzięki czemu pod wpływem wysokiej (ale nie za wysokiej!) temperatury rozprostowują się one. Gładkie skrawki umieszcza się na szkiełkach podstawowych i pozostawia do wyschnięcia. Na jednym szkiełku znajduje się zazwyczaj 2 lub 4 skrawki mózgu. Tak przygotowane preparaty nadają się do dalszej obróbki (np. barwień histologicznych).



Zdjęcie 6. Prawidłowe ułożenie skrawków na szkiełku.



Zdjęcie 7. Suszące się preparaty