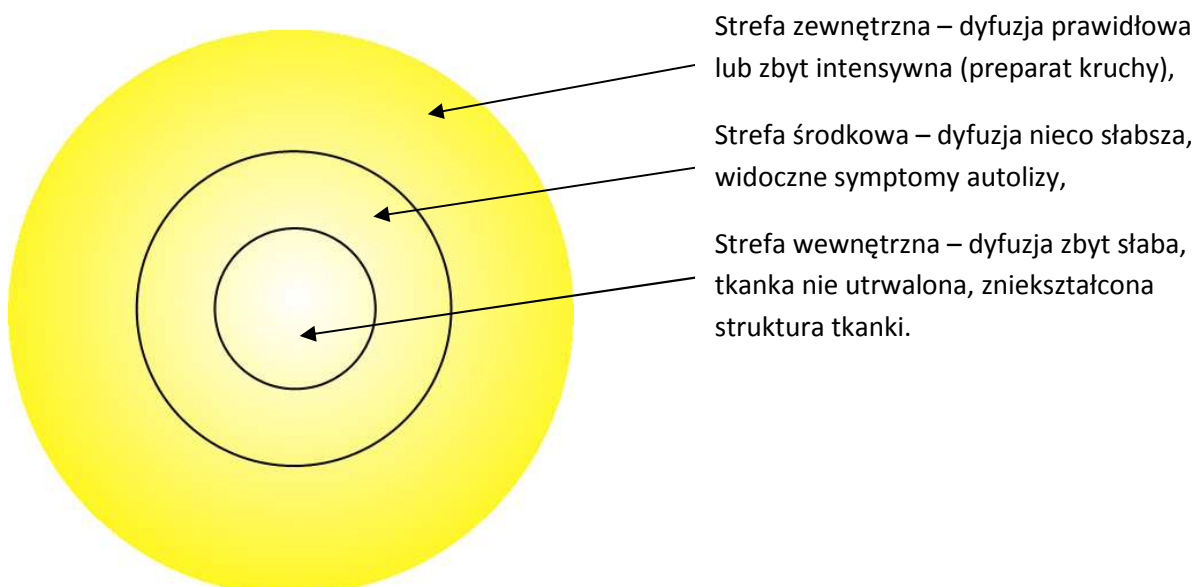


UTRWALANIE PERFUZYJNE

Wstęp

Utrwalanie to proces polegający na traktowaniu komórek, fragmentów tkanek lub całych narządów czynnikami chemicznymi bądź fizycznymi, posiadającymi właściwości utrwalające. Celem działania dobrego utrwalacza jest usztywnienie struktury preparatu tak, by nadawał się do dalszej obróbki (np. krojenia na skrawki). Równie istotne jest, aby utrwalacz w miarę szybko blokował wszelkie procesy biochemiczne, jakie zachodzą w tkance, którą się pozyskuje. Zbyt długie działanie enzymów wewnątrzkomórkowych prowadzić może do zmian w strukturze tkanki, przez co możemy otrzymać zafałszowany obraz pewnych struktur. Do najbardziej znanych utrwalaczy chemicznych należą aldehydy (formaldehyd, aldehyd glutarowy, paraformaldehyd), alkohole (etanol i metanol), związki metali ciężkich (czterotlenek osmu, dwuchromian potasu) oraz przedstawiciel ketonów – aceton. Działanie aldehydów opiera się w głównej mierze na wytwarzaniu wiązań krzyżowych pomiędzy różnymi grupami chemicznymi (końcowe grupy chemiczne białek) oraz tworzeniu tzw. mostków metylenowych. W rezultacie struktura preparatu jest bardziej usieciowana i związana, a centra aktywne enzymów zablokowane. Natomiast mechanizm działania alkoholi polega na denaturacji białek.

Pewnym problemem w utrwalaniu tkanek lub ich fragmentów może być rozmiar utrwalanego preparatu. Jeśli jest on niewielki (kilka mm³), można go umieścić w roztworze utrwalacza, który przeniknie do jego wnętrza szybko i równomiernie. Jeśli natomiast jest to duży fragment tkanki bądź nawet cały narząd (np. mózg szczura), utrwalacz będzie przenikał zbyt wolno i w rezultacie wytworzą się 3 strefy o różnym stopniu utrwalenia. Najbardziej wewnętrzna część będzie utrwalona zbyt słabo, utrwalacz zbyt późno zablokuje centra aktywne enzymów w tym rejonie, przez co nastąpi zmiana naturalnej struktury tego obszaru. Jedynym rozwiązaniem pozostaje wówczas przedłużenie czasu działania utrwalacza na skrawek, co z kolei może być bardziej niekorzystne dla jego strefy zewnętrznej. Dzieje się tak, ponieważ zbyt długie działanie utrwalacza prowadzi do zbytnej kruchości tej strefy. Również w strefie pośredniej widoczna będzie zbyt późna dyfuzja utrwalacza i w rezultacie skutki naturalnych procesów autolizy.



Rysunek 1. Stopień dyfuzji utrwalacza do wnętrza tkanki.

Rozwiązaniem opisywanych powyżej problemów jest tzw. utrwalanie perfuzyjne. Termin perfuzja oznacza przepływ płynu ustrojowego przez tkankę lub narząd (np. krwi przez naczynia krwionośne jakiegoś narządu). W utrwalaniu perfuzyjnym zastępuje się krew roztworem utrwalacza, który za pośrednictwem systemu naczyń krwionośnych dociera do każdego rejonu ciała. Dzięki temu utrwalony jest każdy fragment ciała zwierzęcia, nawet największe narządy takie jak płuca, serce, mózg czy wątroba. Oczywiście utrwalanie perfuzyjne ma jeden bardzo poważny mankament – organizm, który poddany zostaje utrwalaniu perfuzyjnemu nie przeżywa.

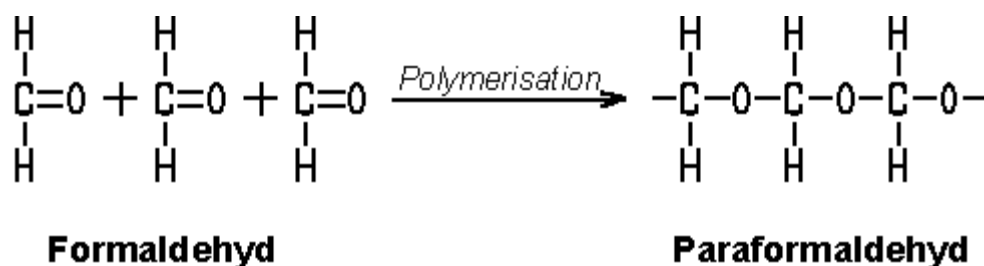
Przygotowanie do utrwalania perfuzyjnego.

W trakcie ćwiczeń utrwalaniu perfuzyjnemu zostaje poddany szczur szczepu Wistar. Przeprowadzenie tego procesu poprzedza uzyskanie zgody miejscowej komisji bioetycznej. Utrwalanie przeprowadza się wyłącznie na zwierzętach poddanych anestezji (nie odbierających żadnych bodźców zewnętrznych). W celu przeprowadzenia utrwalania (perfuzyji) należy przygotować następujące roztwory:

1. Roztwór 0,9% NaCl (sól fizjologiczna),
2. 4% roztwór paraformaldehydu (utrwalacz).

W celu sporządzenia 1000 ml 4% roztworu paraformaldehydu należy:

- odmierzyć 750 ml H₂O destylowanej i ogrzać do temp. 80⁰C,
 - odważyć 40 g paraformaldehydu i dodać do podgrzanej wody destylowanej.
- Paraformaldehyd (paraform) w warunkach normalnych jest ciałem stałym, barwy białej o konsystencji pyłu. Jest substancją słabo rozpuszczalną w wodzie, dlatego rozpuszcza się go „na gorąco”. Jest toksyczny, w znacznych dawkach może być rakotwórczy. Przenika przez drogi oddechowe, skórę i oczy. Dlatego odważanie wykonujemy pod dyktando, używając rękawic ochronnych, okularów i maseczki.



Rysunek 2. Polimeryzacja formaldehydu w paraformaldehyd i jego wzór.

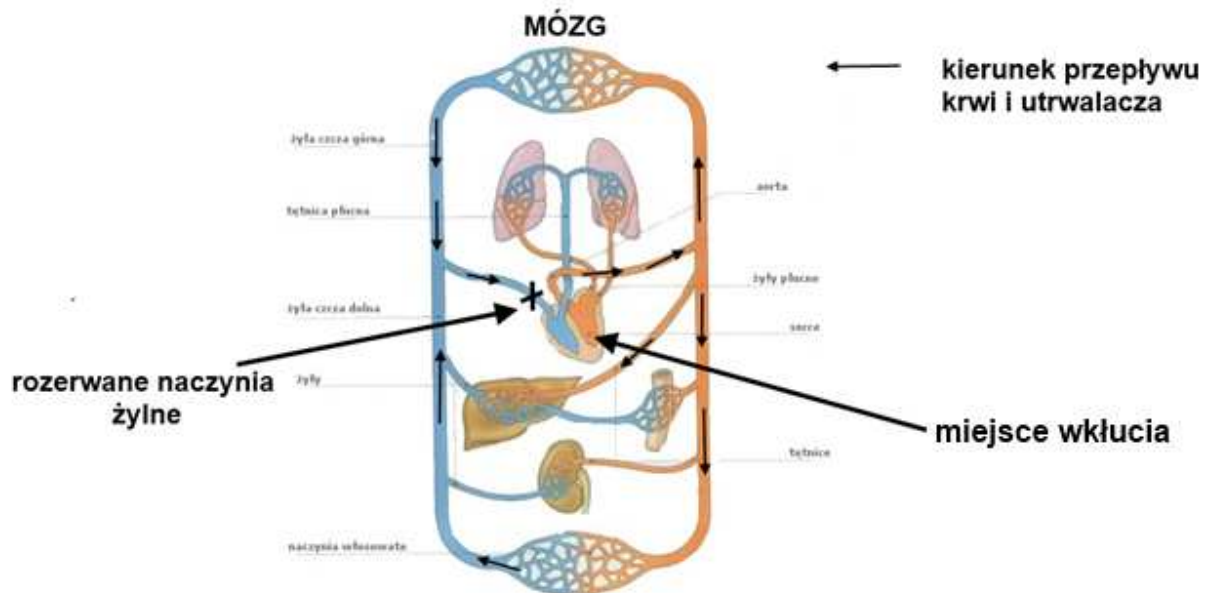
- po całkowitym rozpuszczeniu paraformu w wodzie roztwór oziębamy do temperatury pokojowej i dodajemy 250 ml buforu fosforanowego (wymieszane w odpowiedniej proporcji NaH₂PO₄ i Na₂HPO₄). Na koniec mierzymy pH utrwalacza i korygujemy je do wartości 7,4 dodając ostrożnie nieco kwasu lub zasady.

Przeprowadzanie perfuzji

Przed przystąpieniem do perfuzji usypiamy zwierze i upewniamy się, że nie reaguje ono na żadne bodźce (np. próba reakcji powieki). Do wtłaczania soli fizjologicznej i utrwalacza do układu krążenia zwierzęcia wykorzystuje się pompę perystaltyczną, której wydajność tłoczenia powinna być zbliżona do wydajności z jaką serce tłoczy krew. Gdy zwierze jest już głęboko uśpione (ale koniecznie żywe!) rozcinając jego klatkę piersiową odsłaniamy serce i wbijamy igłę perfuzyjną do lewej komory serca. Jednocześnie przerywamy ciągłość naczyń żylnych wpadających do prawego przedsionka serca. W pierwszej kolejności wtłaczamy sól fizjologiczną w celu wypłukania krwi z układu krwionośnego.



Rysunek 3. Pompa perystaltyczna



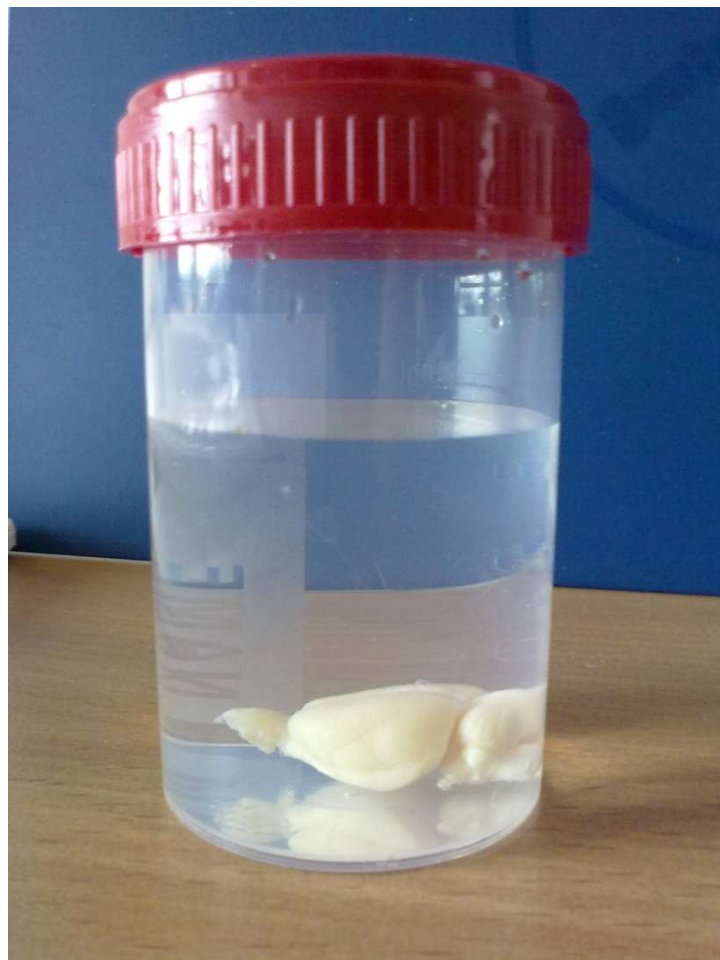
Rysunek 4. Schemat przepływu utrwalacza podczas perfuzji.

Następnie rozpoczynamy podawanie utrwalacza, podczas którego mięśnie zwierzęcia reagują na jego obecność skurczem (dzięki temu obserwujemy, czy utrwalacz dostaje się do układu krwionośnego zwierzęcia). W pierwszej fazie wtłaczamy utrwalacz szybciej, następnie zmniejszamy o połowę przepływ w pompie perystaltycznej. Jeśli masa zwierzęcia, które poddajemy perfuzji wynosi ok. 250 g przetaczamy przez jego krwioobieg ok 400 ml utrwalacza. Po zakończeniu perfuzji usuwamy z wężyków pompy perystaltycznej utrwalacz, przepłukując je roztworem soli fizjologicznej.

Zwierzę, które poddano utrwalaniu perfuzyjnemu powinno być „sztywne”. W celu pozyskania szczurzego mózgu rozcina się skórę na czaszce, usuwa kości czaszki, opony mózgowę, przecina rdzeń kręgowy, nerwy czaszkowe i opuszkę węchową. Wyjęty mózg umieszcza się w roztworze utrwalacza w temp. 4°C na 24 h.



Rysunek 5. Wypreparowany mózg szczura po perfuzji.



Rysunek 6. Mózg szczura w utrwalaczu.

Oprac. Łukasz Uram. Pytania i uwagi proszę kierować na adres mailowy: lukasz.uram@gmail.com