

Marina Aunapuu (Tartu Ülikool), 2012



**E-kursuse**  
**"Histoloogiline tehnika"**  
**materjalid**

Aine maht 2 EAP

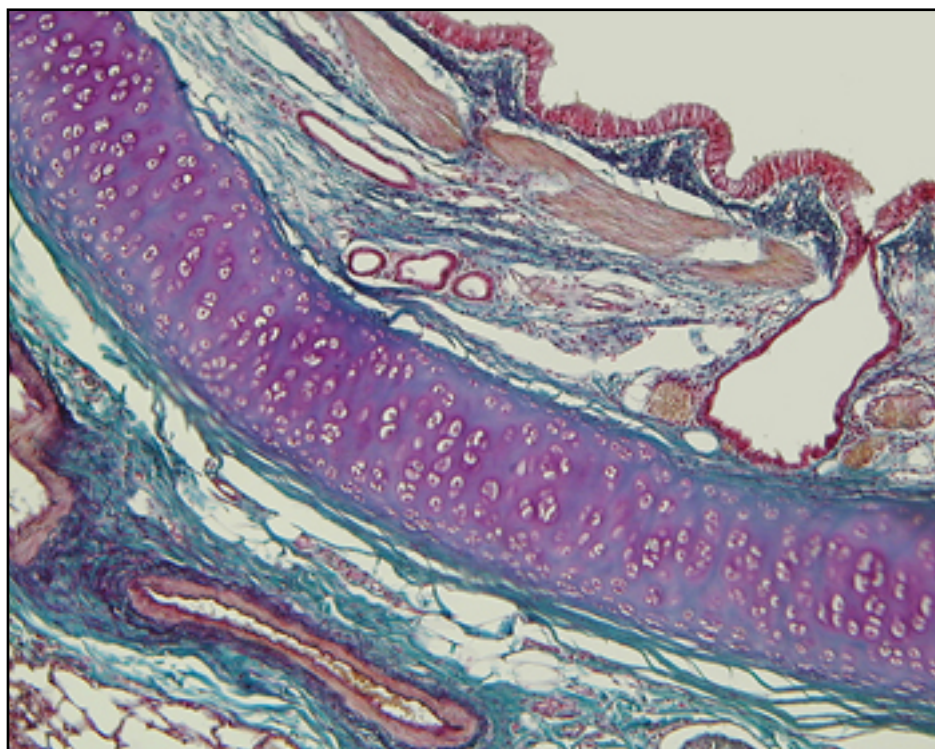
**Marina Aunapuu (Tartu Ülikool), 2012**

## HARRY ANDREAS KULL



Harry Andreas Kull (1886-1933). Õppis Tartu Ülikooli arstiteaduskonnas (1905-1912) ja lõpetas selle *cum laude*. Peale lõpetamist töötas prosektori kohusetäitjana, täiendas ennast Prantsusmaal (1922; 1924). Peale doktoritöö kaitsmist 1924.a. sai Kull embrüoloogia ja histoloogia eradotsendiks, 1926.a. professoriks. Harry Kull oli esimene eestlasest histoloog.

H. Kulli teaduslikud uuringud olid väga mitmekülgsed: ta tegeles mitokondrite, peensoole epiteeli, veresoonte, immuunorganite uurimisega. Suur huvi histoloogia ja laboratoorse töö vastu tõi ka reaalsed tulemused – Harry Kulli leiutatud on mitmed ka tänapäeval tunnustatud histoloogilised värvimismeetodid. Altmann-Kulli; Kopsch-Kulli meetod: mitokondrite värvimise meetodi modifikatsioon; Kull-Calleja meetod: värving karmin-pikroindigokarmiiniga.



# HISTOLOOGIAS ENAMKASUTATAVAD VÄRVINGUD

Värvimismeetod	Tulemus
<b>Hematoksüliin-eosiin</b>	rakutuum-tumesinine; tsütoplasma-erinevates punastes toonides; kollageen-kahvatu roosa; kõhred ja kaltsiumi ladestused-tumesinine; vere punalibled-erepunane
<b>Heidenhaini raudhematoksüliin</b>	tuumad-sinakasmustad; lihasvöötsus-sinakasmust; mitokondrid-tumesinised
<b>Van Gieson</b>	tuumad-mustad; tsütoplasma -kollakasroheline; kollageensed kiud-punased; punalibled-kollased
<b>Asaan (asokarmiin ja aniliinsinine)</b>	tuumad-punased; tsütoplasma -helerosa või sinakas; kollageensed kiud-sinised
<b>Resortsiin-fuksiin</b>	elastsed kiud - mustjasviolett
<b>Karmiin-pikroindigokarmiin</b>	tuum-punane; tsütoplasma -kollane; kollageen-sinine; kõhr-sinakashall; punalibled-kollased

# HISTOLOOGILISE PREPARAADI VALMISTAMISE ETAPID

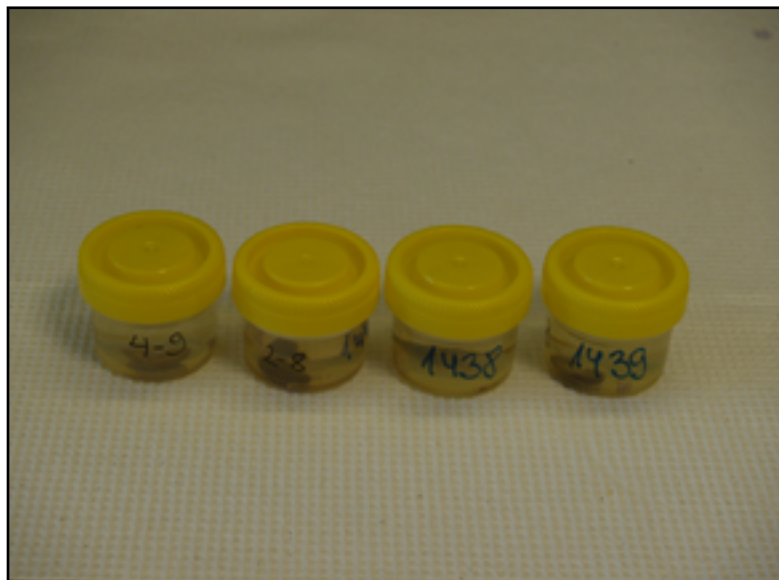
Histoloogia uurimisobjektiks on inimese või katselooma organismi koed ja organid. Selleks, et kude oleks võimalik mikroskopeerida, tuleb võetud proove töödelda. Vaatamegi järgnevalt, milliseid protsesse läbib proov, enne kui saame valmis mikroskopeerimiseks sobiva histoloogilise preparaadi.

[Histoloogilised meetodid on väga põhjalikult kirjeldatud raamatus Romeis „Mikroskopische technik“. 2010 aastal ilmus selle käsiraamatu täiendatud ja kaasajastatud versioon.]

1. Materjali võtmine
2. Fikseerimine
3. Veetustamine
4. Sisestamine
5. Lõikamine
6. Värvimine
7. Sulundamine

## 1. Materjali võtmine

Histoloogilisteks uuringuteks saab materjali võtta patsiendilt (biopsia, operatsioonil võetud kude, lahangul võetud kude) või katseloomalt teadusuuringuteks. Võetav proov ei tohiks olla liiga suur, fikseerimiseks sobiv koetüki suurus on 1 x 1 cm. Proovi tuleb lõigata skalpelli või žiletiga, kääridega lõikamisel võite vigastada uuritavat kude.



*Uuritav kude on asetatud nummerdatud, fiksaatoriga täidetud topsidesse.*

## Fikseerimine

Termin fikseerimine pärineb ladinakeelsest sõnast *fixus* – kindel, jääv. Fikseerimise

eesmärgiks on säilitada koed võimalikult elupuhuses seisundis. Materjali fikseerimiseks kasutatakse nii liht- kui liitfiksaatoreid. Allpool mõned näited:

### Lihtfiksaatorid

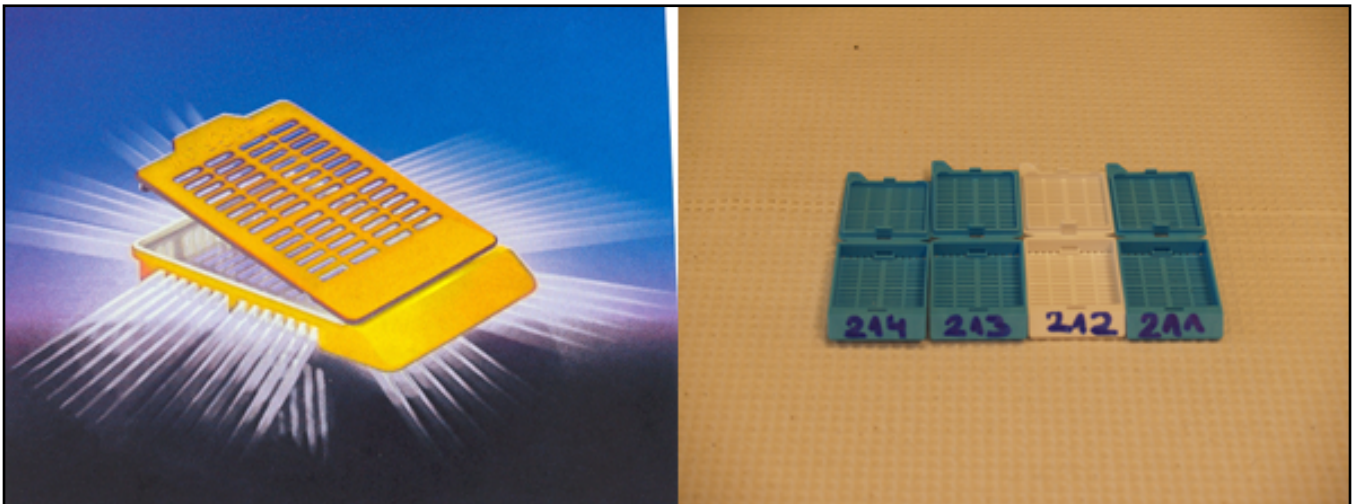
10% formaliin (10%-line lahus, mis valmistatakse 40%-lisest formaldehüüdist), 96° etanool; 1% äädikhape vesilahus (sobib tuumade uurimiseks).

### Liitfiksaatorid

Carnoy fiksaator (alkohol 6 osa, jää-äädikhape 1 osa, kloroform 3 osa) – säilib 1 päev!

4% paraformaldehüüd (450 ml 0.1 M PBS kuumutada kuni 45 °C, lisada 20g paraformaldehüüdi, segada). Valmis lahust tuleb jahutada ja filtreerida. Lisada dest vett 500 ml-ni.

## 2. Proovid asetatakse markeeritud kassetitesse



*Histoloogiline kassett*

Koe tükk asetatakse pintsettide abil kasseti, kassetid suletakse, markeeritakse (proovi number või patsiendi kood, kuupäev, aastaarv) ja asetatakse koeprotsessorissi sisestuskambrisse.

### Sisestus parafiini

Histoloogilistes laboratooriumides töödeldakse tänapäeval proove automaatsisestusliinidel. TÜ anatoomia instituudi laboratooriumis kasutatakse selleks koeprotsessorit Tissue-Tek® VIPTM 5 Jr. Kõik etapid on automatiseeritud ja sisestus toimub järgmise skeemi järgi:

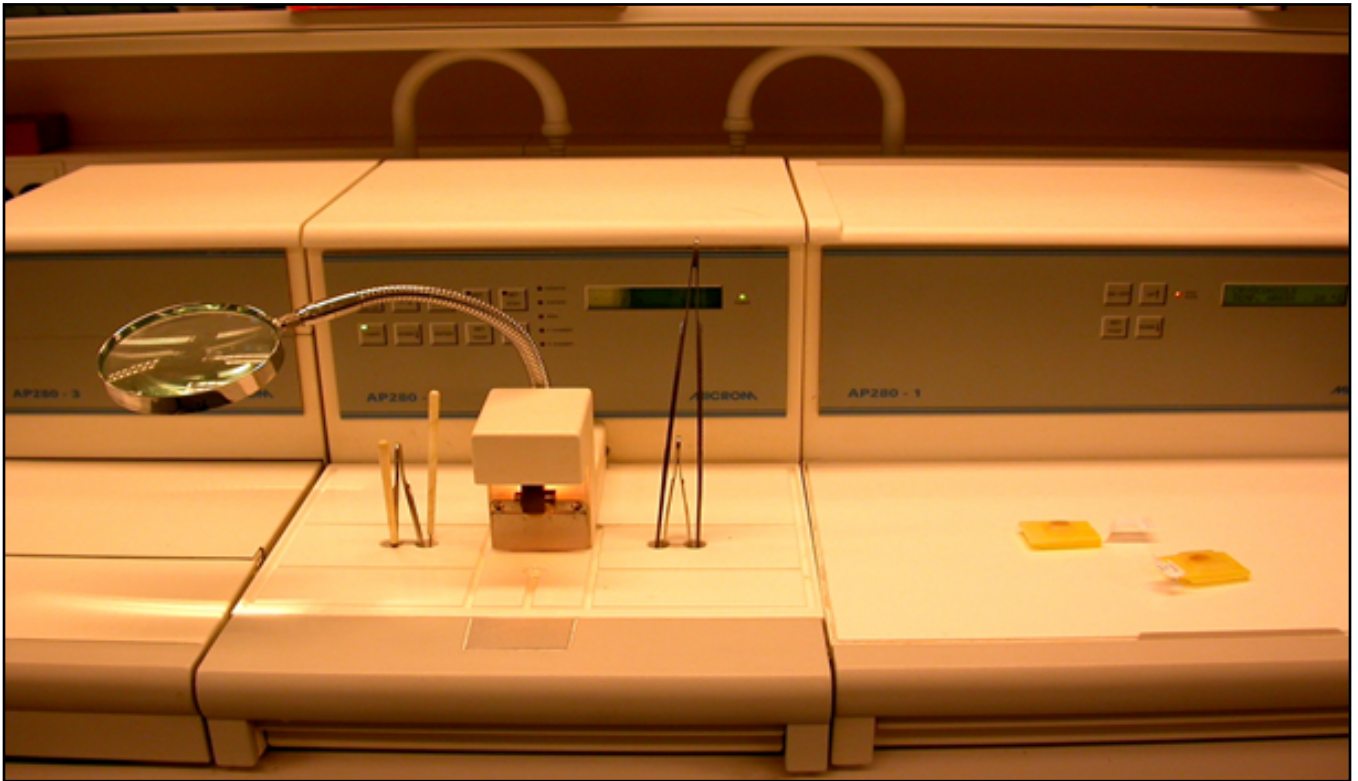
- 1. 10% formaliin - 60 min
- 2. 10% formaliin - 90 min

- 3. Kraanivesi - 30 min
- 4. 50° alkohol - 90 min
- 5. 70° alkohol - 60 min
- 6. 96° alkohol - 60 min
- 7. 96 ° alkohol - 60 min
- 8. 96 ° alkohol - 60 min
- 9. Ksülooli asendaja - 60 min
- 10. Ksülooli asendaja
- 11. Sulatatud parafiin I
- 12. Sulatatud parafiin II
- 13. Sulatatud parafiin III

Seejärel võetakse kassetid koeptsessorist välja ja lõplik sisestus blokkidesse toimub sisestusliinil MIKROM.



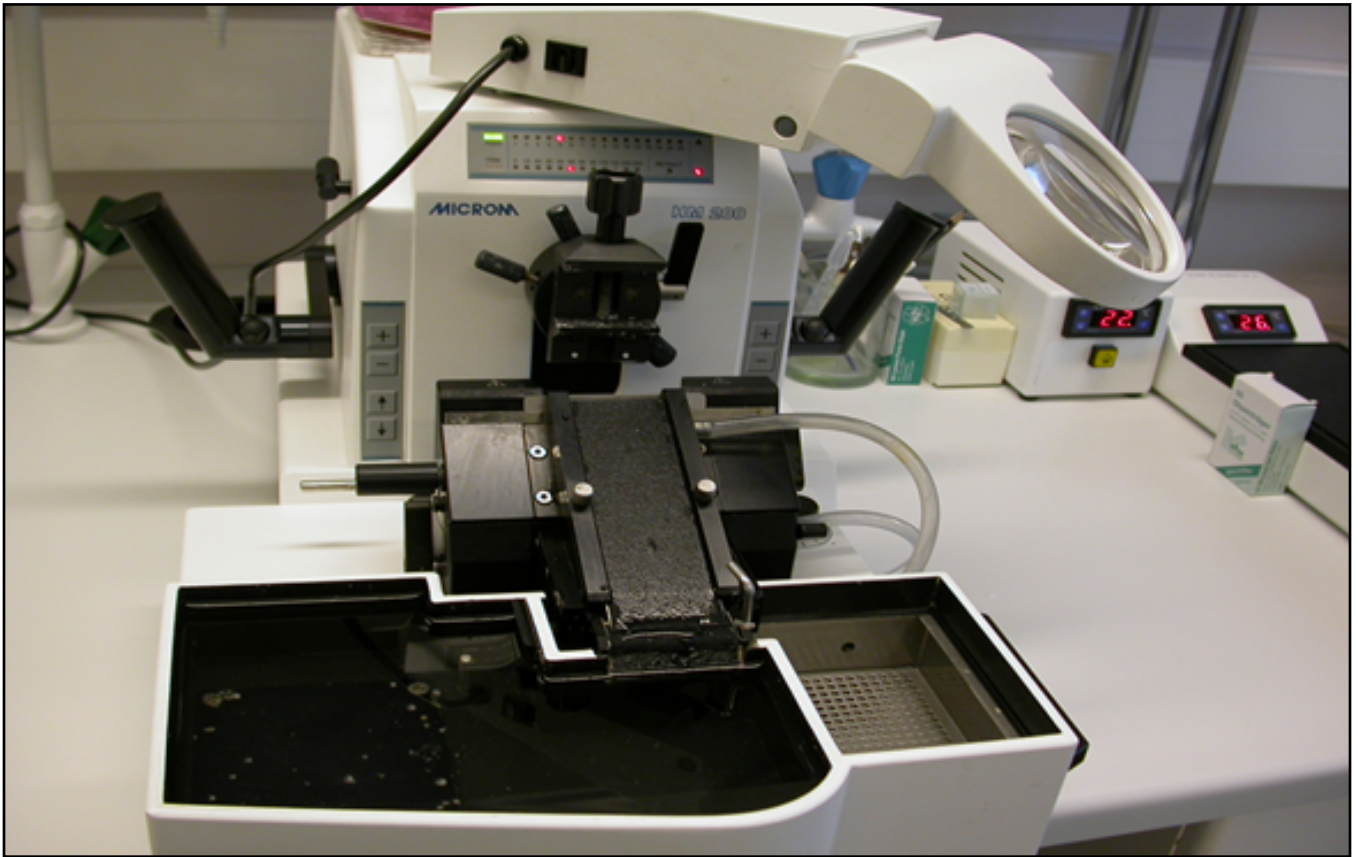
*Koeptsessor Tissue-Tek® VIPTM 5 Jr. 120 min*



*Sisestusliin MIKROM. Keskel sisestusmoodul (selles on sulatatud parafiin), paremal külmutusmoodul.*

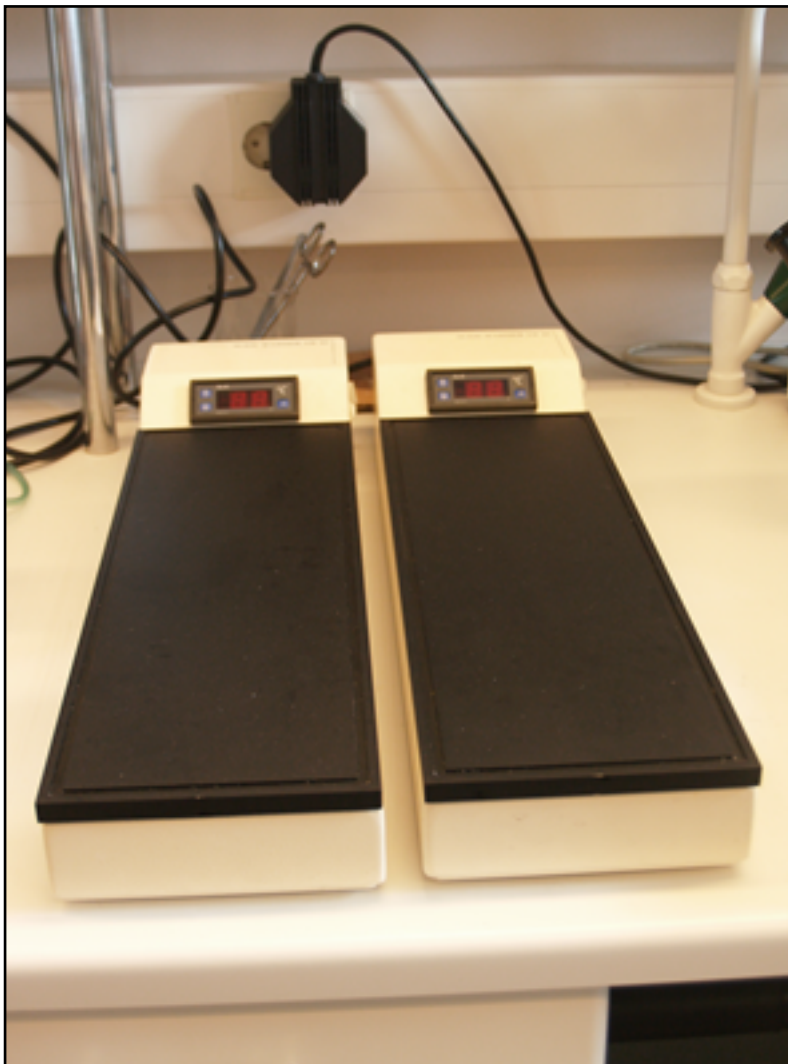
### 3. Lõikamine mikrotoomil

Parafiinblokkide lõikamiseks kasutatakse rotatsioonimikrotoome ja kelkmikrotoome. Rotatsioonimikrotoomidel on kasutusel ühekordsed noad, kelkmikrotoomidel aga teritamist võimaldav püsinuga. Samas on kelkmikrotoomi kasutamine töötajale ohtlikum, sest püsinuga on terav ja tema pind on täies ulatuses avatud. Histoloogiliste preparaate jaoks lõigatava lõigu paksus on 4-7  $\mu\text{m}$  piires. Parafiinblokk kinnitatakse hoidjasse ja tõmmatakse hoidja sujuvate liigutustega ette, vastu noahoidjasse kinnitatud nuga. Lõigud laskuvad veejoaga vesivanni, kus on soe (+37°C) destilleeritud vesi. Olenevalt valmistatavast preparaadist tuleb alusklaasile paigutada üks (õppepreparaat) või mitu (laboratoorne uuring) lõiku. Seejärel kuivatatakse preparaate histoloogilisel plaadil +37°C juures 12-24 tunni jooksul.



*Rotatsioonmikrotoom – Ergostar HM 200*





*Histoloogiline kuivatusplaat*

Kude võib sisestada ka teistesse materjalidesse, nt UNICRYL`i.

Sellise meetodi puhul sisestatakse uuritava koe tükk akrüülvaiku. Peale fikseerimist ja veetustamist alkoholis immutatakse kude UNICRYL`is 8 tunni jooksul ja polümeriseeritakse seejärel 55° C juures 1-2 päeva. Kogu protsess peab kulgema suletavas sisestusvormis.

#### 4. Histoloogilise preparaadi värvimine

Selleks, et hinnata histoloogilist preparaati, tuleb preparaati värvida. Histoloogias kasutatakse väga erinevaid värvimismeetodeid. Võib kasutada värvimist ühe värvainega (tioniin, karmin) või kahe ja enama värvaine kombinatsiooni. Alljärgnevast loetelust on näha, millised värvingud sobivad millistele kudedele.

- **Hematoksüliin – eosiin H&E** – kasutatakse ülevaatepreparaatide värvimiseks.
- **Epiteelkude:** H&E, hõbetamine, PAS-reaktsioon, asaan, Heidenhaini raudhematoksüliin, van Gieson
- **Veri:** H&E, Pappenheim
- **Sidekoe värvingud:** van Gieson, Masson-Trichrome, Masson-Goldner, hõbetamine, resortsiinifuksiin

- **Kõhrkoed:** H&E, resortsiinфуksiin
- **Luukude:** H&E, karmiin-pikroindigokarmiin, hapufuksiin, azaan, tioniin-pikriinhape
- **Lihaskude:** Weigerti hematoksüliin, Heidenhaini raudhematoksüliin
- **Närvikude:** H&E, tioniin, osmeerimine, hõbetamine, asaan, toluidiinsinine

## Hematoksüliin – eosiin värving

### *Deparafineerimine*

1. Ksülool I 3 min.
2. Ksülool II 3 min.
3. Absoluutne alkohol 3 min.
4. 96% alkohol 3 min.
5. 96% alkohol 3 min.
6. 70% alkohol 3 min.
7. Kraanivesi loputada

### *Värvimine*

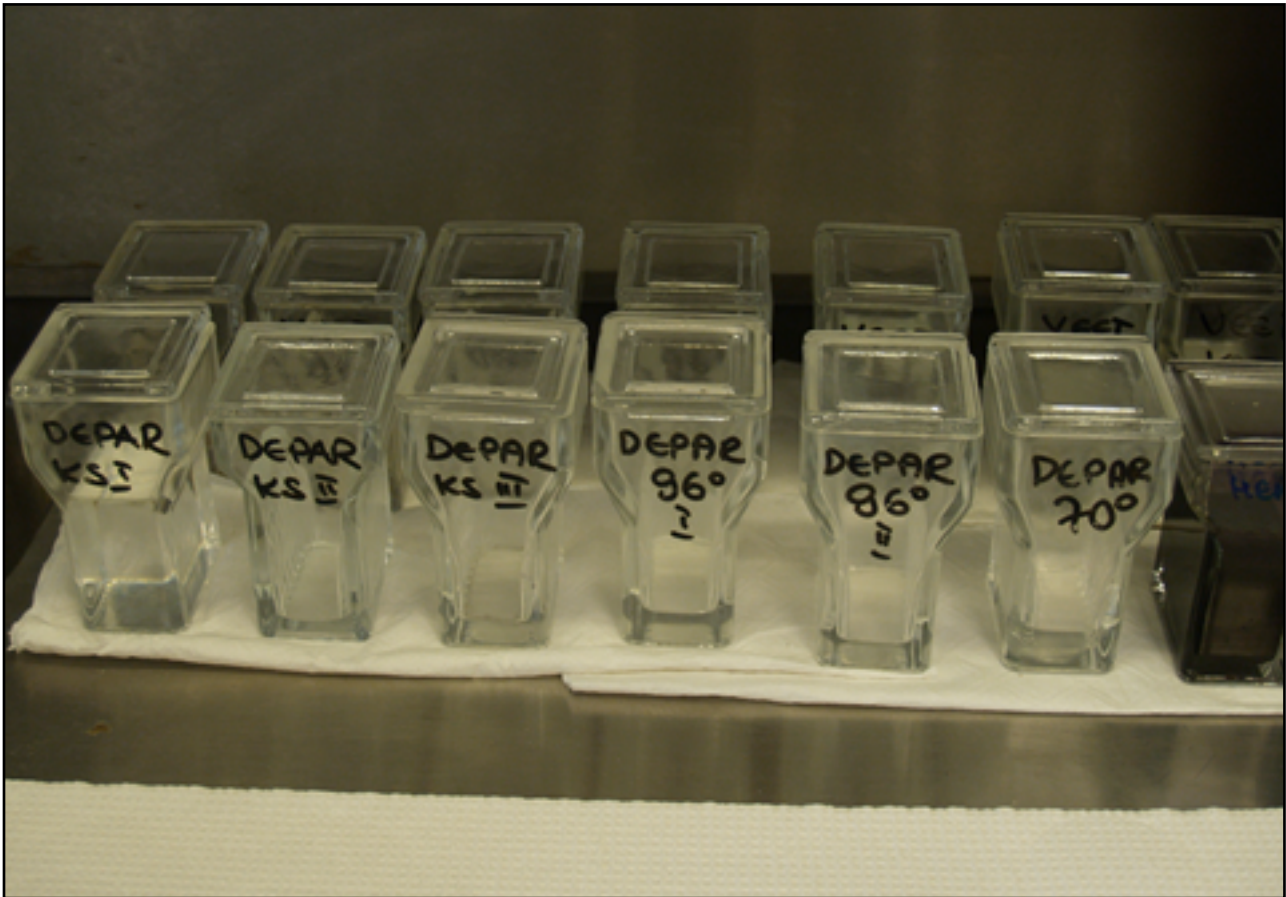
1. Hematoksüliin 5 min.
2. Kraanivesi loputada
3. Hapualkohol 3-10 sekundit
4. Kraanivesi 10 – 20 min.
5. Eosiin 1 min.
6. Kraanivesi loputada

### *Veetustamine*

1. 70% alkohol 2 min.
2. 96% alkohol 2 min.
3. 96% alkohol 2 min.
4. Ksülool I 2 min.
5. Ksülool II 2 min.
6. Ksülool III 2 min.

### *Sulundamine*

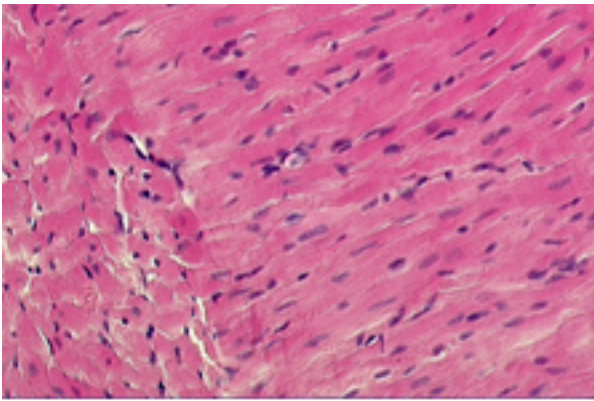
Lõigule panna tilk Eukitti, DPX-i ja katta katteklaasiga.



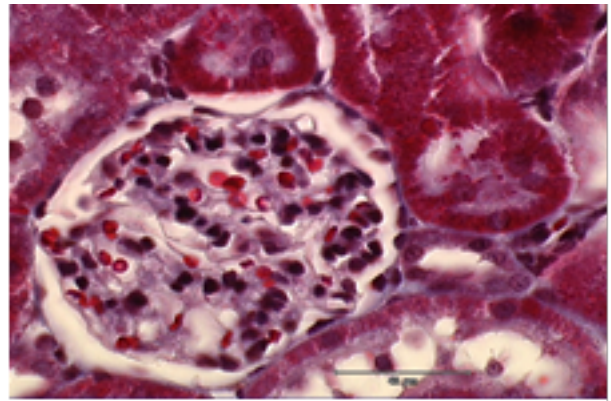
*Värvimiseks kasutatavad laboratoorsed nõud*



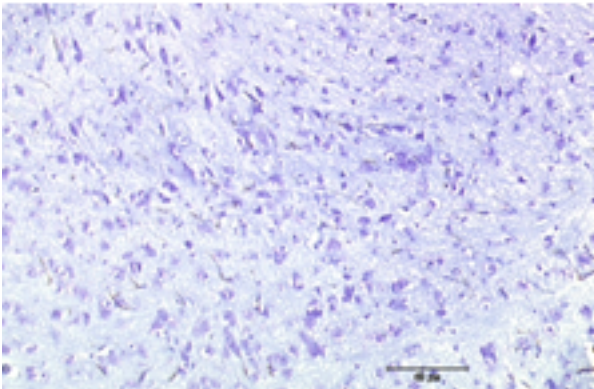
*Histoloogilised värvid*



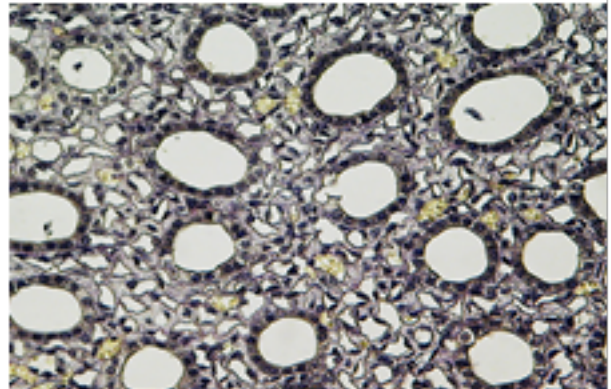
*H&E*



*Masson Trichrome*

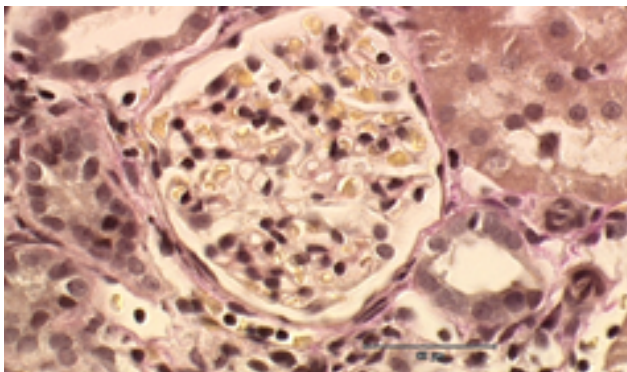


*Tioniin*

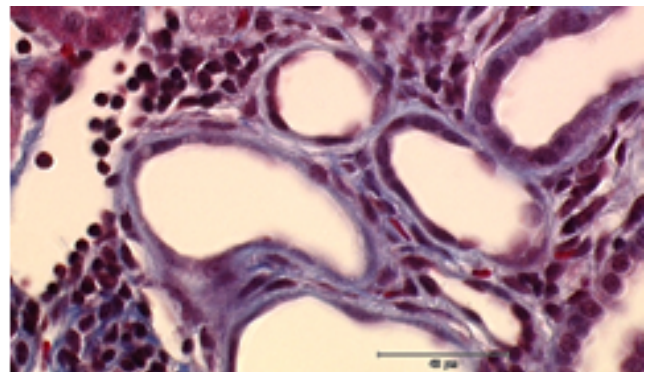


*Van Gieson*

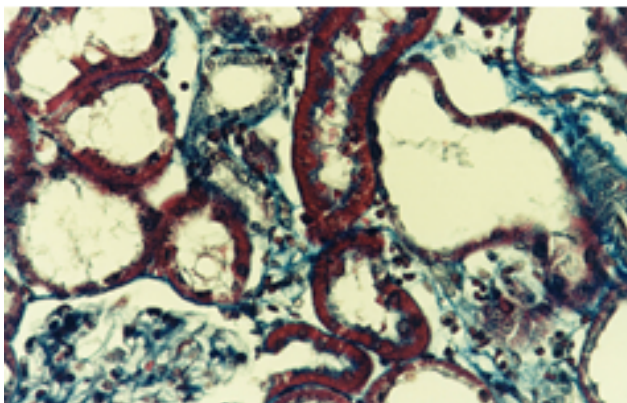
*Histoloogilised värvingud (M. Aunapuu preparaadid).*



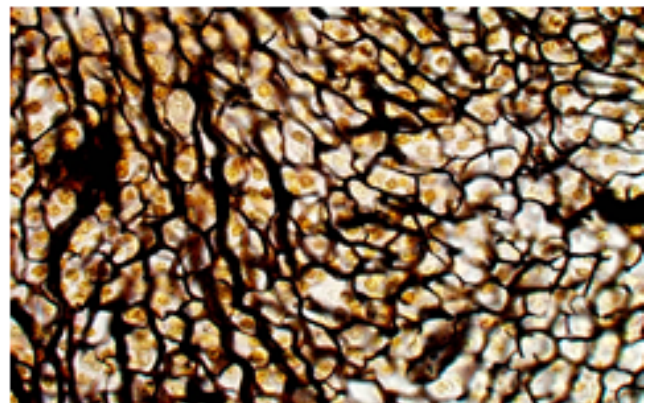
*Van Gieson*



*Masson Trichrome*



*Masson Goldner*



*Höbetamine*

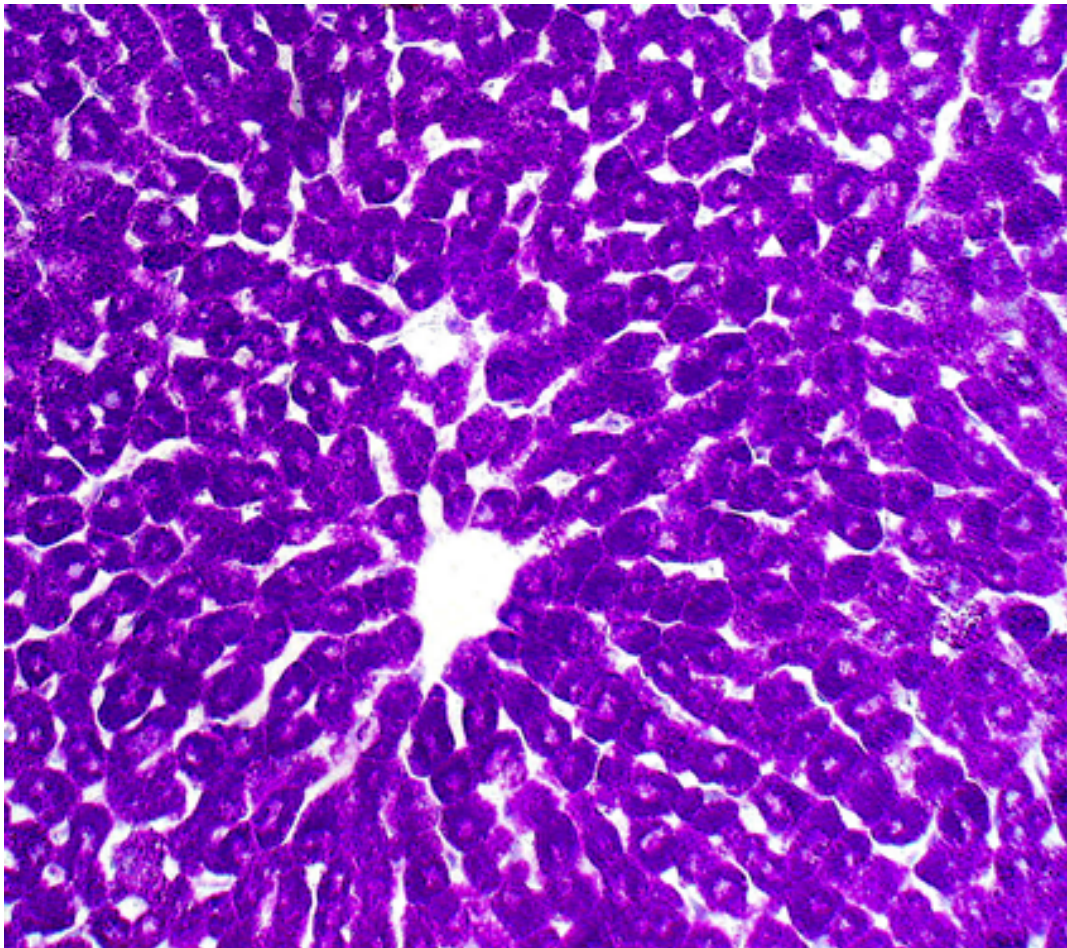
## *Sidekude (M. Aunapuu preparaadid).*

# HISTOKEEMIA

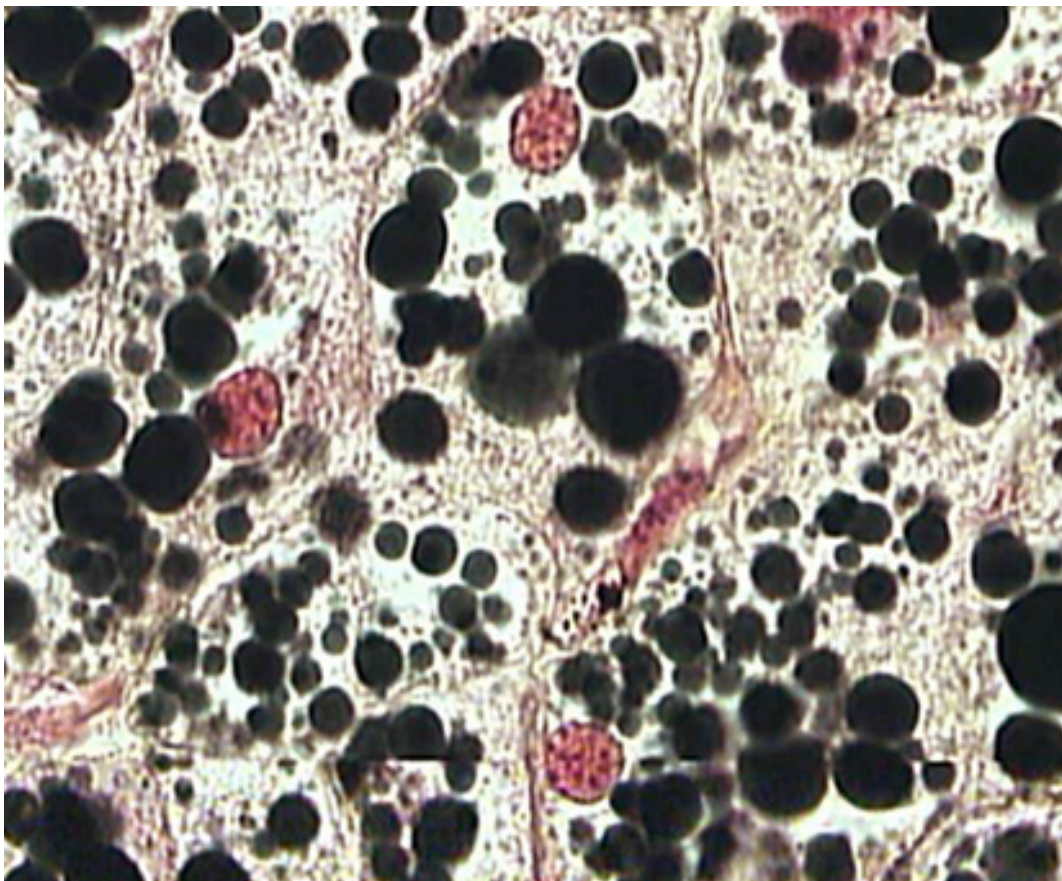
Histokeemiliste uuringute puhul kasutatakse keemilisi või värvusreaktsioone, et määrata ainete paigutust organi kudedes või rakkudes.

Histokeemiliste meetoditega saab määrata:

1. Süsivesikuid (glükoos, polüsahhariidid). Määramiseks kasutatakse erinevaid reaktsioone: kontrasteerimine fosforvolframhappega, vismutiga jne.
2. Valke. Määramiseks kasutatakse histoonide hõbetamist, elastiini kontrasteerimist jne.
3. Nukleiinhappeid. Kontrasteerimine raskemetallidega; Feulgeni reaktsioon jne.
4. Lipiide. Sudaan must jt meetodid.
5. Fermente. Määratakse happelist ja aluselist fosfataasi; peroksüdaasi, katalaasi, monoaminooksüdaasi jne.
6. Pigmente. Määratakse melaniini, neuromelaniini, hemosideriini.
7. Mitteorgaanilised ained (Fe, Ca, Na, K, Cl).



*Polüsahhariid glükogeen maksarakkudes. Histokeemiline PAS-reaktsioon.*



*Rasvasisaldised maksarakkudes. Fikseeritud osmiumtetroksiidiga. Tuumad värvitud safraniiniga.*

## IMMUNOHISTOKEEMIA

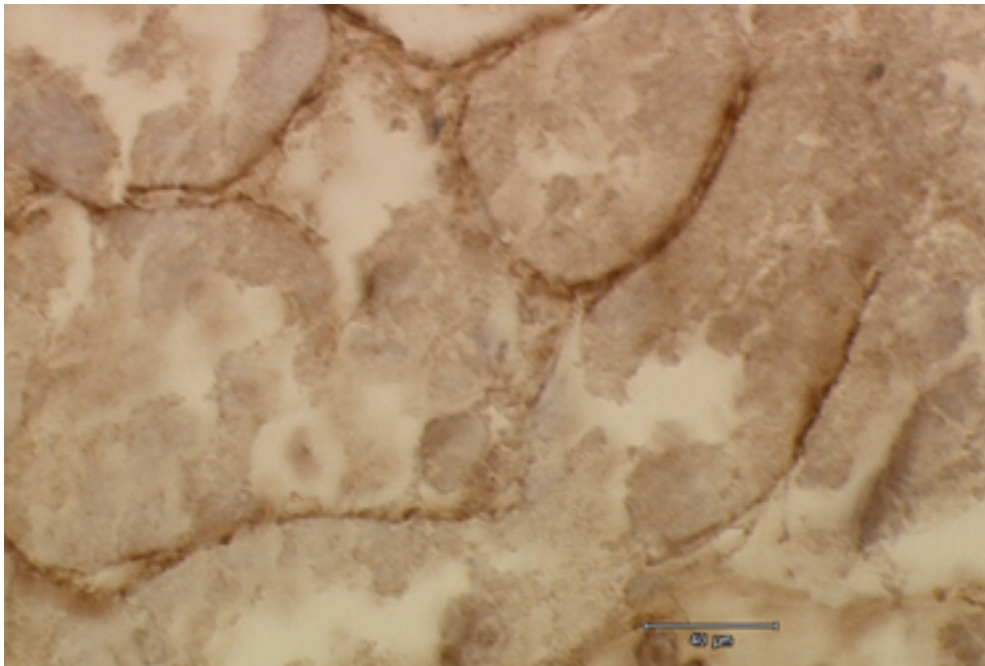
Immunohistokeemia meetodid avastati eelmisel sajandil (Albert Coons 1941; Kaplan 1950). Antigeen-antikeha reaktsiooni absoluutne spetsiifilisus annab võimaluse täpselt identifitseerida koekomponente.

Tingimused immunohistokeemilise analüüsi tegemiseks:

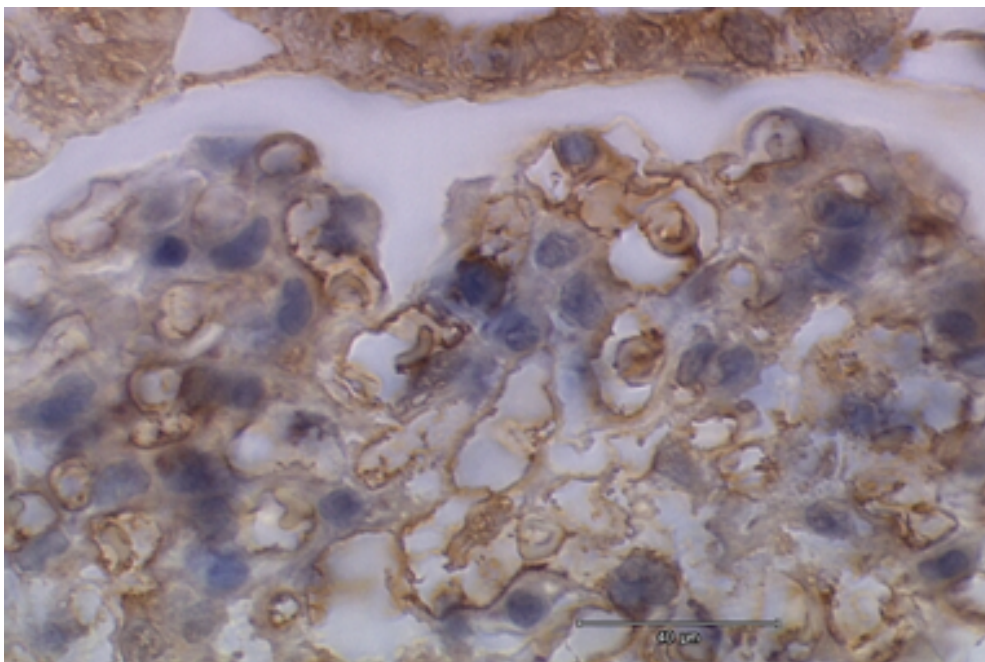
1. Antigeeni säilimine koes
2. Värvingu spetsiifilisus
3. Iseloomulik antikeha
4. Hea märgis

Antigeen-antikeha reaktsioonil põhineb immunohistokeemiline antigeenide väljaselgitamine koes antikehade sidumise abil. On olemas otsesed ja kaudsed meetodid. Otsesest meetodist märgistatakse antikeha enne koostoimet antigeeniga; antigeeni lokaliseerimise piirkonda koos spetsiifilise antikehaga viiakse sisse ka märgis. Kasutatakse nii valgusmikroskoopia kui ka fluorestsentsmikroskoopia jaoks sobivaid meetodikaid ja reaktiive.

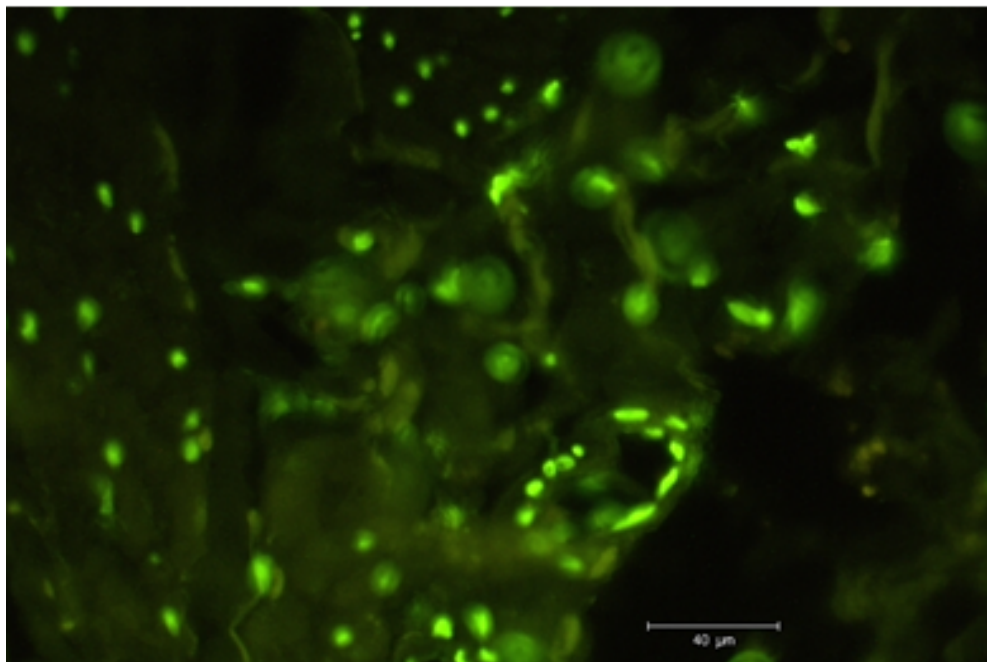




*Neer. Kollageen IV määramine distaalsete ja proksimaalsete tuubulite membraanis. Värving DAB + van Gieson.*



*Apoptoos. Värving DAB + hematoksüliin.*



*Apoptoos. Kasutatud on fluorestsentsmeetodit.*

## ELEKTRONMIKROSKOPIA

Rakkude ultrastruktuuri uuringuteks kasutatakse läbivalgustavat (*Transmission electron microscope, TEM*) ja skaneerivat (*Scanning electron microscope, SEM*) elektronmikroskoopiat. SEM loob kujutise uuritavast materjalist seda elektroniire abil skaneerides. Elektronmikroskoopias kasutatakse elektronide voogu ja klaasläätsete asemel magnetvälju. TEM-iga on võimalik saavutada väga tugevat suurendust (kuni 500 000x) ja uurida väga pisikesi objekte.

Esimese transmissioonelektronmikroskoobi konstrueerisid Saksamaal Max Knoll ja Ernst Ruska 1931. aastal. Siiski läks palju aega enne kui koostati õhukeste lõikude valmistamise meetoodika (1950-ks aastaks).

Elektronmikroskoopilisteks uuringuteks fikseeritava biopsia optimaalne suurus on 1 x 1mm. Fiksaatorina kasutatakse 2,5% glutaaraldehüüdi lahustatuna kakodülaat- või fosfaatpuhvrts. Fikseerimisele järgneb järelfikseerimine osmiumhappega, veetustamine ja sisestamine. Sisestamiseks kasutatakse erinevaid plastmasse: Epon 812, Araldit, LR White ja erinevaid sisestuskeeme.

## SISESTAMISE SKEEM

1. Proov fikseeritakse 2,5% glutaaraldehüüdi fosfaatpuhvri lahuses (1:10) - 1 – 2 tundi
2. Uuritavat kude pestakse 0,1M fosfaatpuhvriga (pH=7,4) – 15 min
3. Järgneb järelfikseerimine 2% OsO<sub>4</sub> fosfaatpuhvrts (pH=7,4) 1:1 – 1 tund
4. Uuritavat kude pestakse 0,1M fosfaatpuhvriga (pH=7,4) – 15 min
5. Veetustamine toimub tõusva kontsentratsiooniga etanooli reas:
  - 50°°60°°70°°80°°90°°96°°absoluutne etanool - igas lahuses -1 tund

**NB! 70° - sellel etapil võib sisestamise peatada järgmise päevani**

6. Järgneb veetustamine atsetoonis 15 min (kui sisestamiseks kasutatakse Epon 812)
7. Immutamine atsetooni-eponi seguga, igas lahjenduses hoitakse kude 1 tund:

Atsetoon		Epon
3	:	1
3	:	2

1	:	1	(võib sisestuse peatada)
2	:	3	
1	:	3	

### EPON 812 segu valmistamine

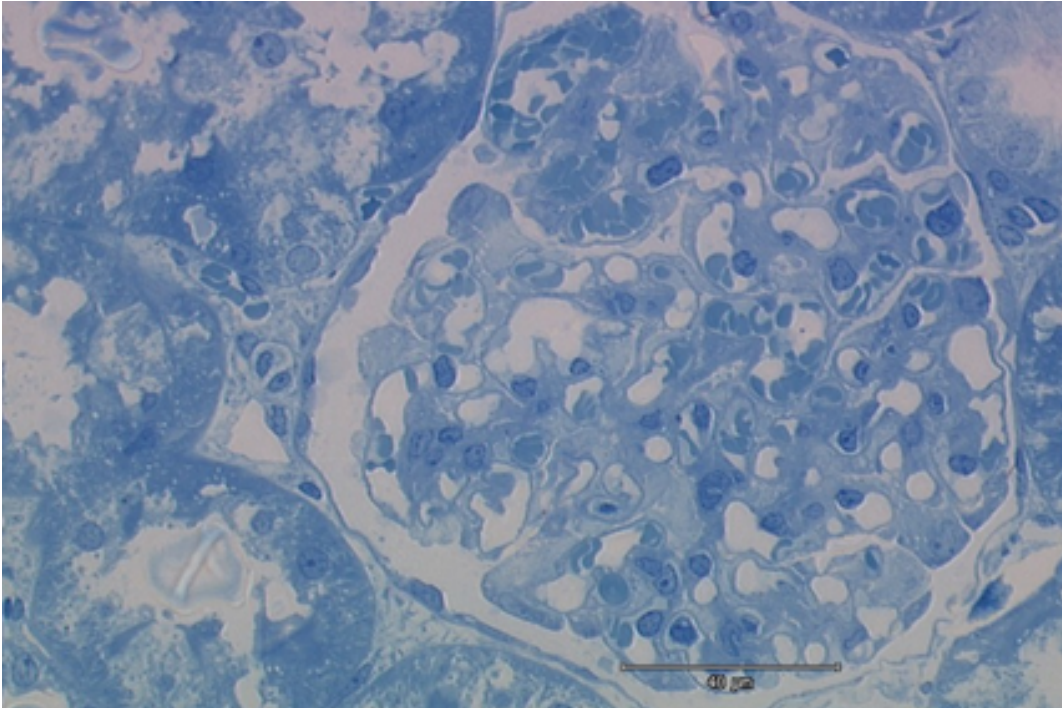
Komponent	Kogus
Epon 812	4,6 ml
DDSA	4,0 ml
MNA	1,4 ml
DMP-30	0,2 ml 10 ml segu kohta

Jälgida täpset retseptuuri! Kuna kõik komponendid on väga viskoossed, siis segu valmistamisel ei tohi kiirustada.

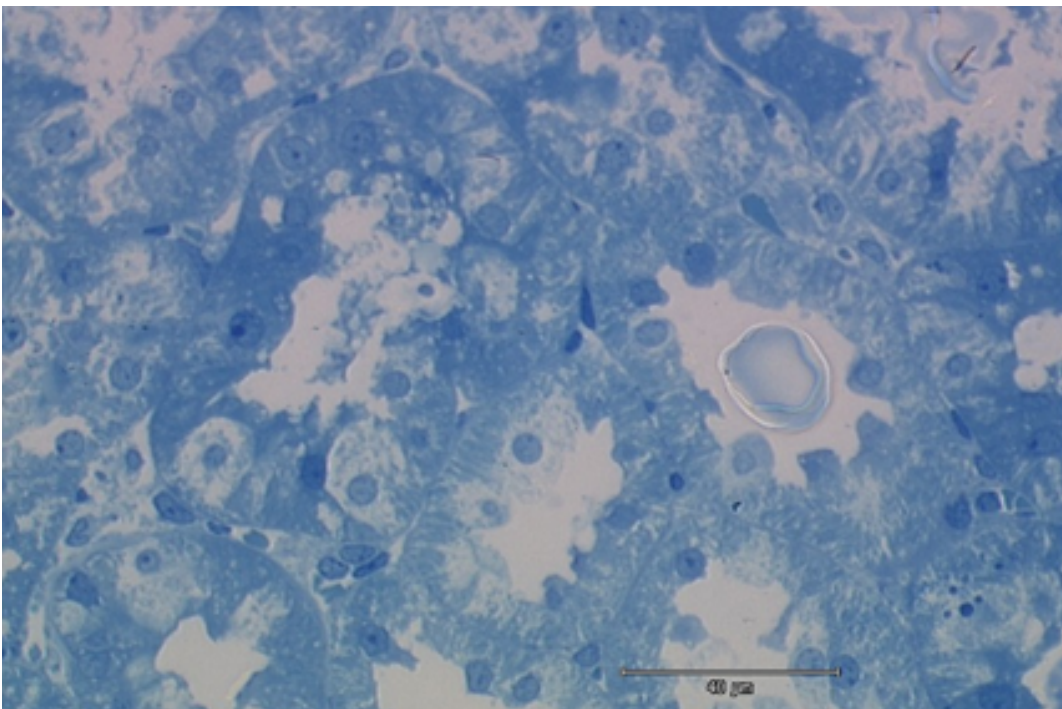
Sisestamiseks kasutatakse erinevaid plastmassvorme. Koe tükk asetatakse vormi põhja ja valatakse ettevaatlikult peale sisestussegu (Araldiit, Epon 812, LR White). Polümerisatsioon toimub termostaadis (24 tundi +37°C, 24 tundi 60°C). Sisestamiseks võib kasutada ka teisi skeeme (vt <http://www.udel.edu/biology/Wags/>).

### Poolpaksud preparaadid

Sisestatud materjalist valmistatakse kõigepealt poolpaksud valgusmikroskoopia preparaadid. Plastmassblokk teritatakse trapetsikujuliseks ja lõigatakse ultratoomil valmis lõigud. Seejärel kuivatatakse klaase histoloogilisel plaadil 10 - 15 min ja värvitakse toluidiinsinisega. Peale mikroskopeerimist valgusmikroskoobis valitakse välja uurijat huvitav piirkond ja blokk teritatakse väiksemaks.



*Poolpaks preparaat neerukehakesest. Värving: toluidiinsinine.*



*Poolpaks preparaat neeru distaalsetest ja proksimaalsetest tuubulitest. Värving: toluidiinsinine.*

### **Klaasnugade valmistamine**

Lõikude valmistamiseks on parimad teemantnoad, nende hind on aga väga kallis (ligikaudu 3 000 EUR). Võib kasutada ka isetehtud klaasnuga, mis valmistatakse spetsiaalsetest klaasiribadest. Klaasiriba kinnitatakse spetsiaalsesse hoidjasse ja murtakse parajateks nelinurkseteks tükikesteks. Viimased murtakse diagonaalselt pooleks, nii et tekib kaks

kolmnurkset tükikest. Edasi võib lõigata preparaate kuivalt klaasnoa kõige teravama osaga või kinnitada sinna spetsiaalne vesivannike.



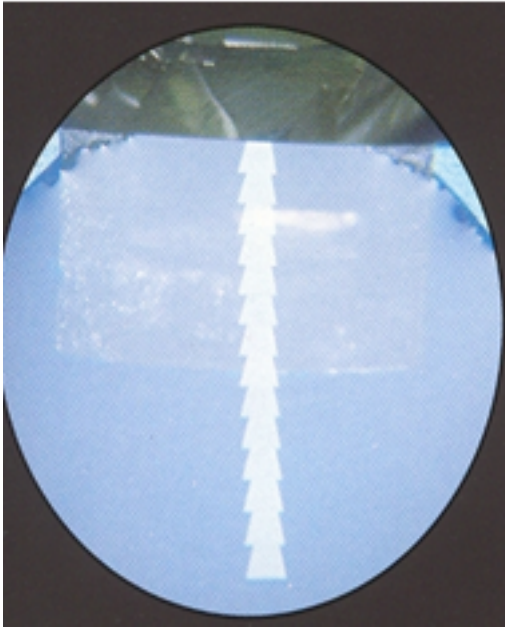
*Teemantnoad.*

## Ultraõhukesed lõigud

Trapetsikujuline blokk kinnitatakse hoidjasse ja automaatrežiimil lõigatakse ultraõhukesed lõigud (paksus 70-100 nm). Bloki alumine serv peab olema paralleelne klaas- või teemantnoa servaga. Ultramikrotoomis toimub lõiketera edasilükkamine tavaliselt soojuspaisumise abil. Lõigud jäävad ujuma klaas- või teemantnoa vesivanni (täidetud bidestilleeritud veega) ja kinnitatakse võrgule.

Elektronmikroskoopilistes uuringutes kasutatakse elektronmikroskoobis kullast, platinast, molübdeenist, niklist või vasest valmistatud ümmargusi aluseid, mida nimetatakse võrguks. Igal alusel on teatud arv avasid, mida nimetatakse „silmadeks“. Mida suurem on silmade arv (300, 400), seda kindlamini kinnitub lõik võrgule. Mina kasutan põhiliselt vasest võrke „silmade“ arvuga 200 (mesh 200), siis on uuritava koe piirkond paremini ja suuremas ulatuses näha.

Selliste võrkude puuduseks on see, et elektronkiire mõjul võib uuritav piirkond hakata hävima e sulama. Et sellist olukorda vältida, tuleb võrgud katta eelnevalt formvariga, siis on loodud läbipaistev toetuspind ultraõhukesele lõigule.



*Ultraõhukesed lõigud teemantnoa vesivannis ja võrk ultraõhukestele lõikudele.*



*Uut tüüpi ultramikrotoom RMC XL.*



*Vanemat tüüpi ultramikrotoom Reichert.*

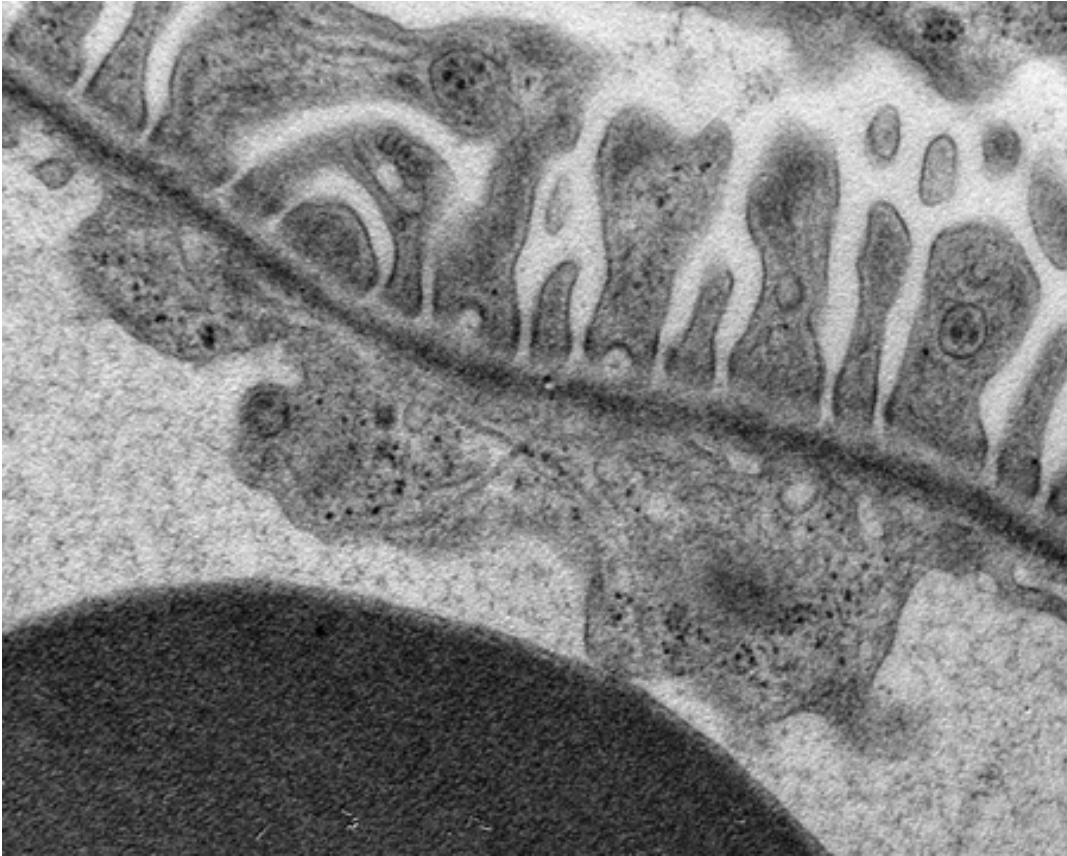
### **Ultraõhukeste preparaatide kontrasteerimine**

Lõikude kontrasteerimiseks valmistatakse 1-2 % uranüülatsetaadi vesilahus. Selle lahusega värvitakse lõike 10 – 15 minuti jooksul pimedas. Peale värvimist pestakse võrke ettevaatlikult destilleeritud vees ja kuivatatakse suletud Petri tassis. Järgmisel etapil kasutatakse kontrasteerimiseks pliiisoolasid. Peale värvimist tuleb lõike pestakse ettevaatlikult destilleeritud vees ja kuivatatakse.

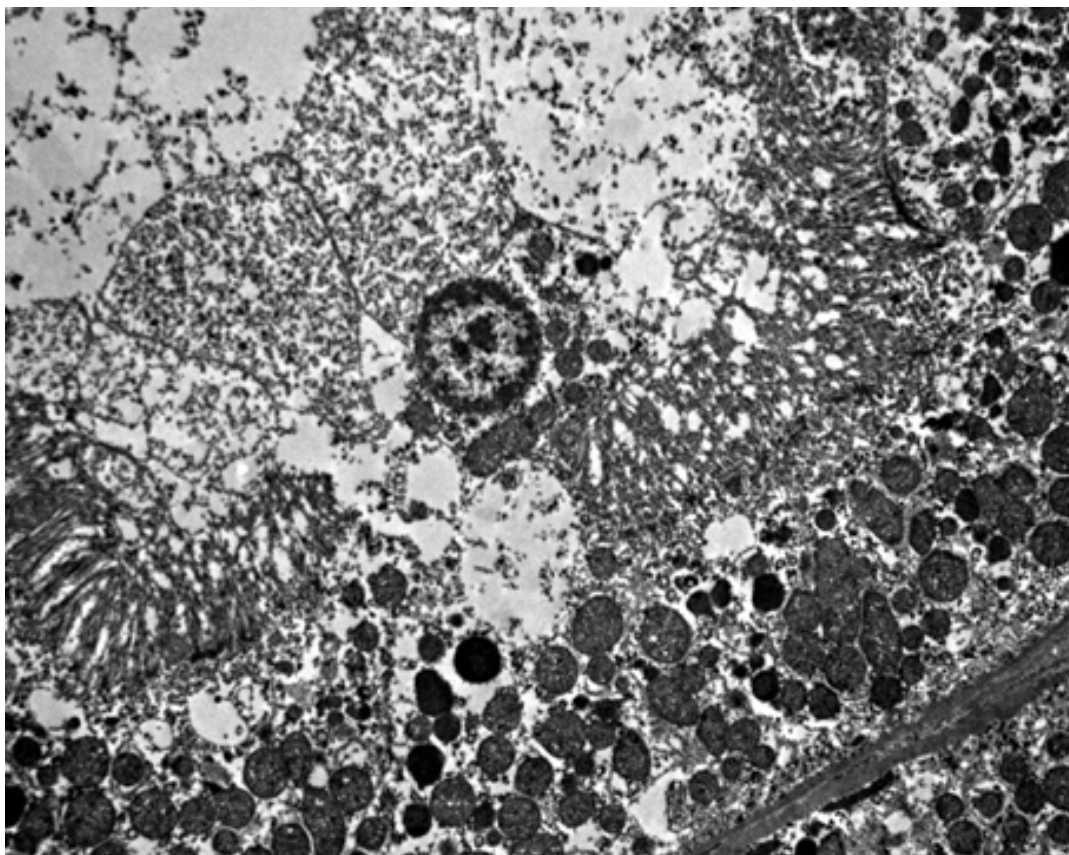
### **Ultraõhukeste preparaatide uurimine TEM-iga**

Valmistatud preparaadid säilivad kaua ja neid on võimalik uurida korduvalt. Preparaadid asetatakse TEM-i hoidjasse, mikroskopeeritakse erinevatel suurendustel ja pildistatakse. Uued TEM mikroskoobid on ühendatud arvutiga, mis võimaldab salvestada saadud kujutused ka digitaalselt ning neid arhiveerida.





*Neerude glomerulaarne basaalne membraan. TEM, suurendus 24 000x.*



*Fragment neeru proksimaalsest tuubulist. TEM, suurendus 3 700x.*

## Preparaatide valmistamine SEM uuringute jaoks

Skaneeriva elektronmikroskoopilise uuringu jaoks valmistatakse preparaate teise meetodika järgi. Kõigepealt tuleb materjal fikseerida ja selleks kasutatakse TEM meetodiga sarnast fikseerimist. Seejärel tuleb koe tükk veetustada tõusva kontsentratsiooniga etanoolide reas (50°?70°?80°?90°?96°?absoluutne etanool) ja seejärel atsetoonis. Koe tükid kuivatatakse kuivatusseadmes ja monteeritakse alumiiniumalustele. Seejärel asetatakse alused kuldamiseseadmesse ja kaetakse kolloidaalkullaga. Valmistatud preparaadid säilivad väga kaua ja neid uuritakse ja pildistatakse skaneerivas elektronmikroskoobis. Selle mikroskoobiga uurimisel saame uuritavast objektist pinnastruktuuride kujutise.



*Endomeetrium. SEM, suurendus 8070x.*

# MATERJALI FIKSEERIMINE

Bioloogilise materjali fikseerimine toimub fikseerivates lahustes e **fiksaatorites**. Selle protsessi eesmärgiks on ära hoida (või katkestada) autolüütilised protsessid, mis tekivad kudeses peale surma või peale koetüki/biopsia võtmist. Fikseerimisega püüame säilitada koed võimalikult elupuhuses seisundis. Tuleb aga arvestada, et fikseerimine põhjustab alati valkude kalgendumist. Vastavalt eesmärgile võima valida erinevate fiksaatorite hulgast sobilikuma.

On olemas **lihtfiksaatoreid**, mis on ühe aine lahused ja mitmest komponendist koosnevaid **liitfiksaatoreid**.

Fikseerivate vedelikena kasutatakse **formaliinilahust, etanooli, atsetooni**. Võib kasutada mitmesuguseid soolalahuseid (**sublimaat, kaaliumbikromaat** jt), mõnede hapete lahuseid (**kroom, osmium, äädikhape** jt). Liitfiksaatoritena kasutatakse segusid loetletud ainetest.

Kõige kiiremini saab fikseerida koetükke **formaliiniga** ja see fiksaator kõlbab enamike uuringute jaoks. Kui ei ole võimalik koheselt uuritavat suurt koetükki prepareerida, võib formaliini asetatav proov olla ka suur. Fikseerimiseks kasutatakse **10 % formaliinilahust**, mis on valmistatud kontsentreeritud formaliini lahjendamisel kraaniveega (mitte kasutada destilleeritud vett!). Kude on korralikult fikseerunud, kui uuritava koetüki värv on ühtlaselt hallikas ja proovi sügavuses puudub punakas toon (tingitud vere värvusest). Tuleb arvestada, et kompaktsete organite fikseerimisel tuleb teha mõned sisselõiked organit ümbritsevasse kapslisse. Viimane takistab fiksaatori läbiimbumist ja tulemuseks on halvasti fikseerunud või roiskunud organ.

Teine tuntum lihtfiksaator on **etanool**, mida kasutatakse veetustatud kujul (absoluutne alkohol 99.5 - 99.9 %). See lahus fikseerib kudesid väga kiiresti, kuid samaaegselt toimuvad ka koes deformatsioonid (kortsumine, lipiidide lahustumine jne). Siiski kasutatakse tihti etanooli vere äigepreparaatide valmistamisel.

## I. Lihtfiksaatorid

### 10 % formaliin

10 ml                      formaliini

90 ml                      kraanivett

Fikseerimise aeg mitte lühem kui 12 tundi!

### Absoluutne etanool 99.5-99.9 %

Fikseerimise aeg 0.5 – 12 tundi (sõltub proovi suurusest)

### **Kroomhape 0.3 – 0.5 % vesilahus**

Fikseerimise aeg 6 tundi. Lahus sobib väiksemate koetükkide fikseerimiseks.

### **Äädikhape 1 % vesilahus**

Lahus sobib väikeste proovide fikseerimiseks. Kasutatakse tuumade uurimiseks.

## **II. Liitfiksaatorid**

### **Carnoy fiksaator**

6 ml            96% etanool

3 ml            kloroform

1 ml            jää-äädikas

Fikseerimise aeg 6 – 12 tundi. Kasutada valmistamise päeval!

### **Mülleri lahus**

2.5 g            kaaliumbikromaat

1 g            naatriumsulfaat

100 ml        dest. vesi

Fikseerimise aeg 8 - 10 tundi.

### **Orti fiksaator**

9 ml            Mülleri lahus

1 ml            formaliin

Fikseerimise aeg 12 tundi kuni 2 päeva.

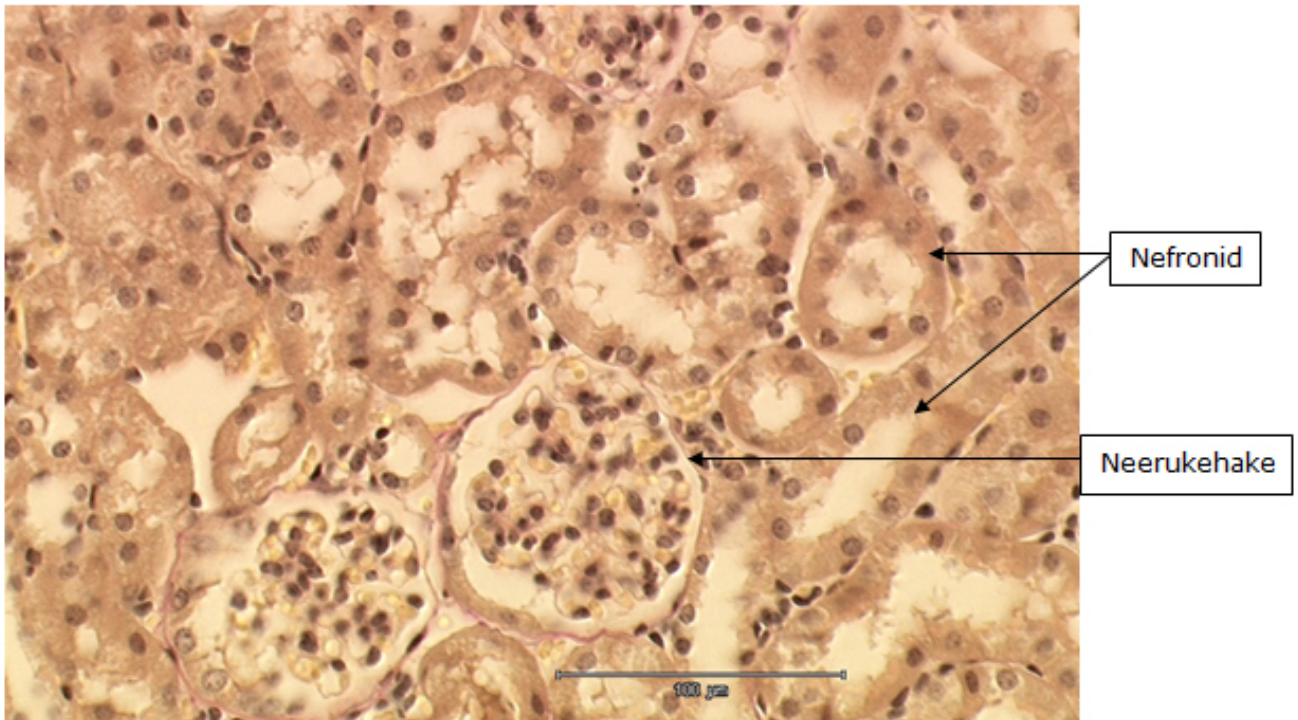
Enamik fiksaatoreid vajab fikseerimise lõpus kudedest eemaldamist. Seda tehakse voolavas kraanivees. Kude asetatakse klaasanumas 24 tunniks voolava kraanivee joa alla.

# HISTOLOOGILISTE VÄRVINGUTE PROTOKOLLID

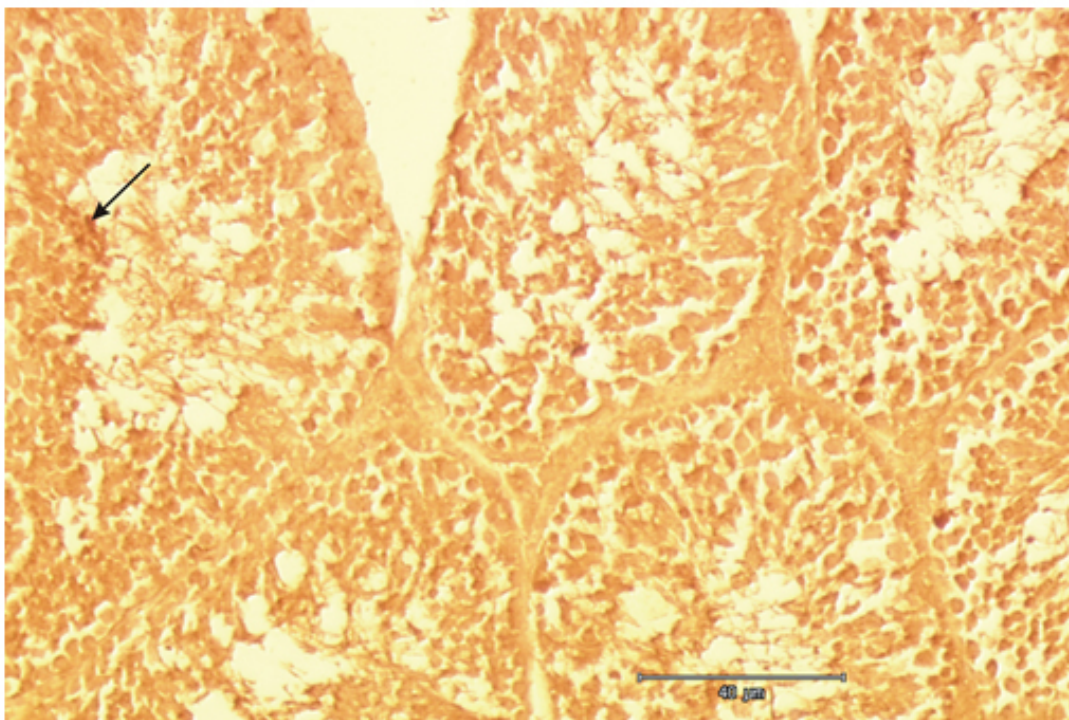
## van Giesoni värving

Sidekoe värvimiseks kasutatakse ühe võimaliku meetodina *van Giesoni* värvingut.

1. Deparafineerimine		2. Värvimine		3. Veetustamine	
1. Ksüloom	2 min	1. Weigert'i hematoksülin	5 min	1. 70% etanool	1 min
2. Ksüloom	2 min	2. Kraanivesi	loputada	2. 96% etanool	1 min
3. 96% etanool	2 min	3. Hapualkohol	10 sek	3. 96% etanool	1 min
4. 96% etanool	2 min	4. Kraanivesi	loputada	4. Ksüloom	2 min
5. 96% etanool	2 min	5. Kraanivesi	15 – 20 min	5. Ksüloom	2 min
6. 70% etanool	2 min	6. Pikrofoksiin	1 min	6. Ksüloom	2 min
7. Kraanivesi	loputada	7. Dest. vesi	loputada		



Preparaat neerust. Värving: *van Gieson*



Preparaat testisest. Värving: *van Gieson*

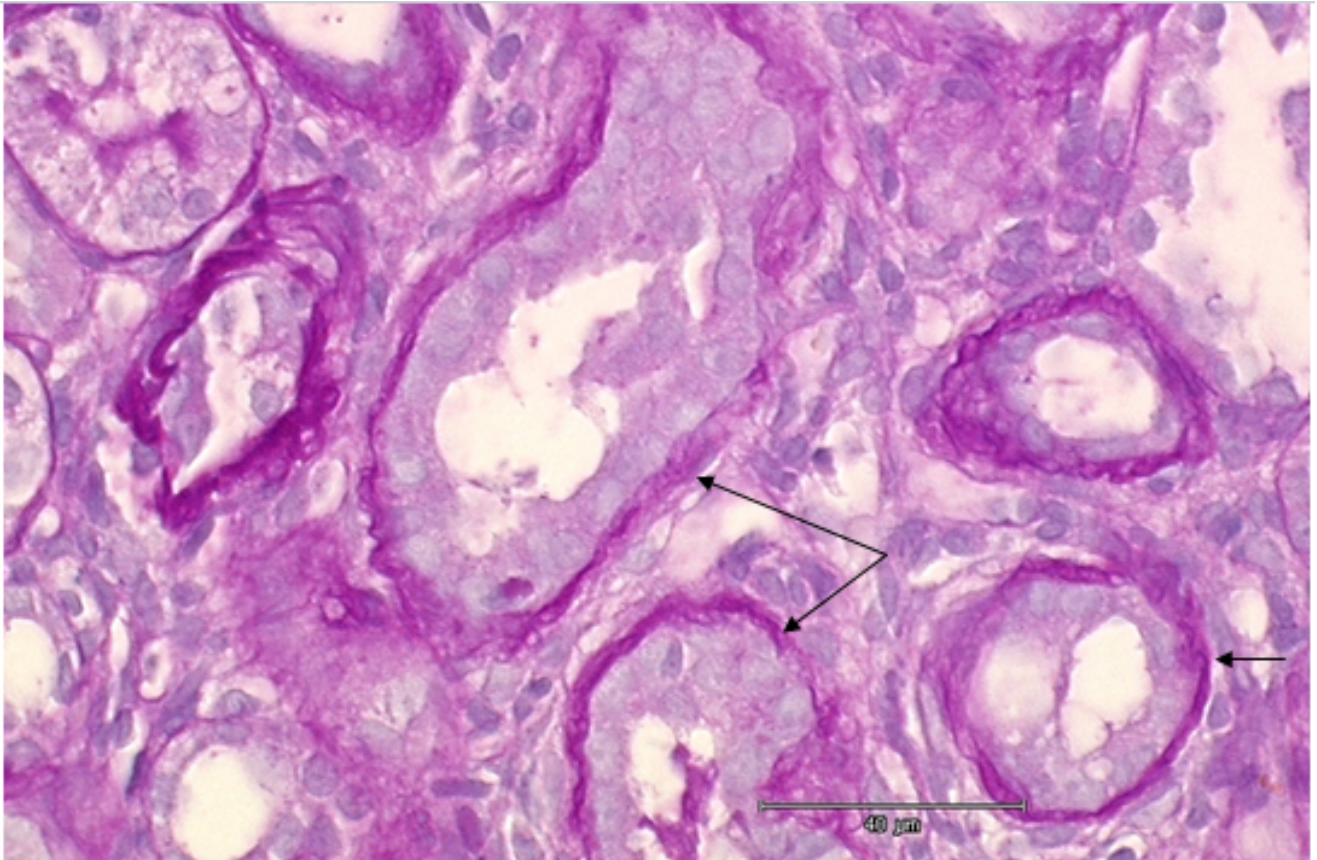
## PAS värving

PAS värvingut kasutatakse basaalmembraanide esiletoomiseks.

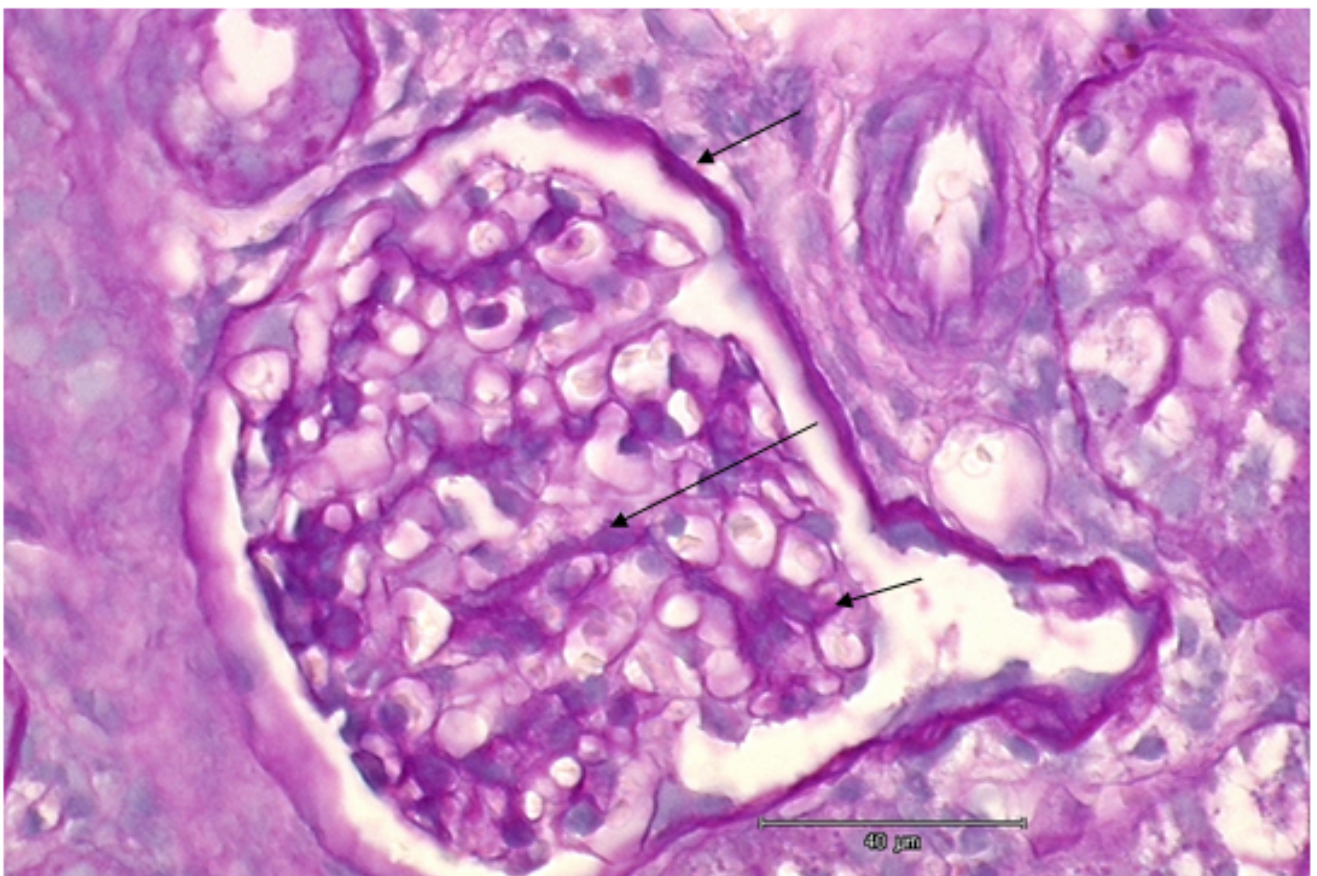
1. Deparafineerimine	2. Värvimine	3. Veetustamine
----------------------	--------------	-----------------

1. Ksüloom	5 min	1. 0.5% joodhape	5 min	1. 70% etanool	1 min
2. Ksüloom	5 min	2. Dest. vesi	loputada (kiiresti üks kord)	2. 96% etanool	1 min
3. 96% etanool	1 min	3. Schiffi reaktiiv	15 min (reaktiivi hoida eelnevalt toa °)	3. 96% etanool	1 min
4. 96% etanool	1 min	4. Jooksev vesi	10 min (vahetada 3 korda)	4. Ksüloom	5 min
5. 96% etanool	1 min	5. Harris`e hematoksüliin	1 – 2 min	5. Ksüloom	5 min
6. 70% etanool	1 min	6. Jooksev vesi	10 min (vahetada 3 korda)	6. Ksüloom	5 min
7. Dest. vesi	2 x 2 min	7. 1% äädikhape 70% etanoolis	5 sek		
		8. Jooksev vesi	10 min (vahetada 3 korda)		





Neer, krooniline neerupuudulikkus. Paksenenud basaalmembraanid nefronitel (nooled).  
Värving: PAS.



Neer, krooniline neerupuudulikkus. Paksenenud basaalmembraanid püsmakeses ja  
paksenenud Bowmani kapsel (nooled). Värving: PAS.

## Hõbetamine Bielschowski järgi

Hõbetamist kasutatakse sidekoe, närvikoe preparaatide värvimiseks.

Lõigata blokist paksud (8-15 µm) lõigud. Lõigud kinnitada alusklaasile valk-glütseriiniga (1:1).

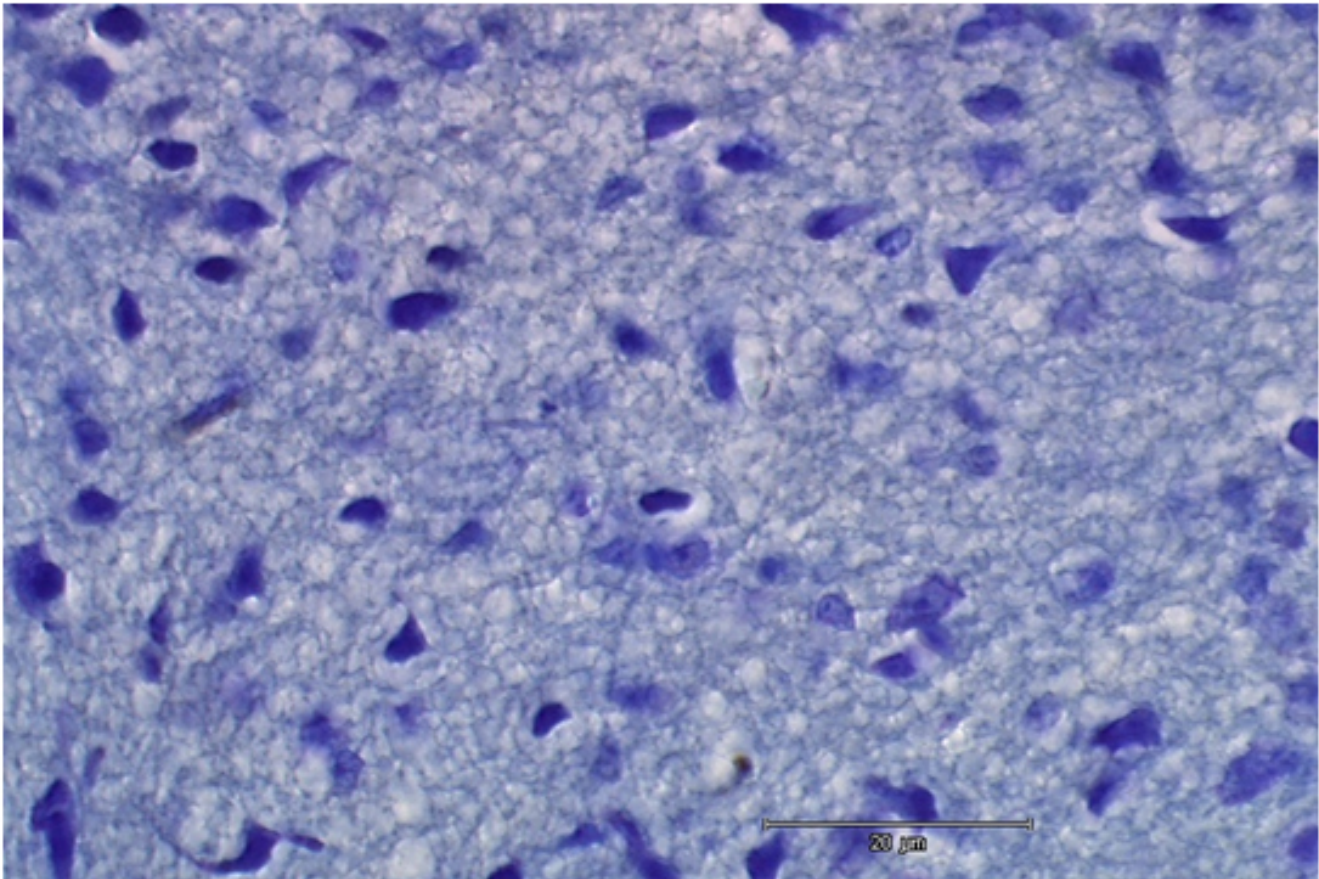
1. Deparafineerimine		2. Värvimine		3. Veetustamine	
1. Ksüloom	5 min	1. Hõbetada 2% hõbenitraadis	24h	1. 70% etanool	1 min
2. Ksüloom	5 min	2. Loputada bidest. vees	5 sek	2. 96% etanool	1 min
3. 96% etanool	1 min	3. Hoida amm ooniumhõbeda lahuses 5 – 10 min (lahus tilgutada alusklaasile)		3. 96% etanool	1 min
4. 96% etanool	1 min	4. Loputada bidest. vees	5 sek	4. Ksüloom	5 min
5. 96% etanool	1 min	5. Hoida neutraalses formaliinis	5 – 10 min	5. Ksüloom	5 min
6. 70% etanool	1 min	6. Loputada kraanivees	15 min	6. Ksüloom	5 min
7. Dest. vesi	2 x 2 min	7. Kuldkloriidi lahus	5 – 15 min		
		8. Fikseerida 5% hüposulfitis	30 sek – 1 min		
		9. Loputada kraanivees	30 min		

## Tioniin värving

Närvisüsteemi organite värvimiseks kasutatakse tihti tioniini värvingut.

1. Deparafineerimine		2. Värvimine		3. Veetustamine	
1. Ksüloom	2 min	1. 0.1% tioniin	1 - 2 min	1. 70% etanool	1 min
2. Ksüloom	2 min	2. Dest. vesi	loputada	2. 96% etanool	1 min
3. 96% etanool	2 min	3.	1 - 10 sek	3. 96% etanool	1 min

		Aniliin-alkohol			
4. 96% etanool	2 min			4. Ksülool	2 min
5. 96% etanool	2 min			5. Ksülool	2 min
6. 70% etanool	2 min			6. Ksülool	2 min
7. Dest. vesi	2 min				



Preparaat suurajust. Värving: tioniin.

Enne histoloogiliste preparaatide värvimist tuleks iga kord eelnevalt kontrollida protokolle ja värvida esialgu 1-2 preparati. Probleeme võib olla lahustega, värvidega. Mida kauem on seisnud histoloogilise värvi lahus, seda paremini ta reeglina ka värvib.

## IMMUNOHISTOKEEMIA PROTOKOLL Collagen IV

Lõigud: 4-5 ?m parafiinlõigud; 1. ksüloom 5+5+5 min; 96 alk 2+2 min; 70 alk 2 min;

1. Vesinikperoksiid 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metanoolis 15 min jooksul
2. Pesta PBS-s puhvril (pH=7,4) 5 min jooksul – 2x [1ltr PBS lisada 2,5 ml Triton100]
3. Lisada 1 tilk blokeerivat seerumit (normal serum, kollane silt) 5 ml puhvrile. Inkubeerida 20 min jooksul toa temperatuuril. **Ei loputa!**
4. Ettevaatlikult eemaldada lõikude kõrvalt filterpaberiga üleliigne blokeeriv seerum.
5. Inkubeerida **primaarse** antikehaga niiskes karbis (collagen I 1:100) +4C° juures.
6. Pesta PBS-s puhvril 5 min jooksul – 2x
7. Inkubeerida 30 min jooksul toa temperatuuril lahjendatud biotin. universaalse sekundaarse antikehaga. 2 tilka normaalse blok-seerumi lahust (kollane silt) lisada 5 ml puhvrile segamispudelil. Seejärel lisada 2 tilka biotin. universaalset antikeha lahust (sinine silt).
8. Pesta PBS-s puhvril 2 min jooksul – 3x
9. Inkubeerida 30 min jooksul toa temperatuuril VECTASTAIN ABC-AP Reagendiga. 1 tilk A reagenti lisada 5 ml puhvrile ABC Reagenti segamispudelil. Seejärel lisada 1 tilk Reagent B, segada. Lasta seista enne kasutamist ligikaudu 30 min.
10. Pesta PBS-s puhvril 5 min jooksul – 2x
11. DAB 5 min jooksul toa temperatuuril (5ml dest. vett + 2 tilka buffer stock solution ja segada; lisada 4 tilka DAB stock lahust ja segada; lisada 2 tilka Hydrogen Peroxide solution ja segada). Alus peab olema kaetud fooliumiga (prepsid pimedas!)
12. Loputada lühidalt dest. vees
13. Hematoxylin 1 – 2 min (enne filtreerida)
14. Loputada jooksvas kraanivees 5 min (meil 0-korrusel toodavas vees, vahetada vett)
15. Veetustamine: 70%, 96%, 96%, ksüloom I, ksüloom II, ksüloom III – 2 min igas lahuses.
16. Sulundada.