

## БОЈЕЊЕ ЕЛАСТИЧНИХ ТКИВА БЕЗ ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈЕ: НОВА БРЗА МЕТОДА

**Абрамовић М., Павловић Р.**  
Медицински факултет, Ниш

## DEYING OF ELASTIC TISSUES WITHOUT DIFFERENTIATION: NEW, QUICKLY METHOD

**Абрамовић М., Павловић Р.**  
Faculty of Medicine, Niš

### SUMMARY

Our methodological procedure established successful technique of the direct dyeing of elastic fibers and lamellas in elastic tissues. Experiments were carried out on a human autopsy material. Blocks rich in elastic fibers were fixed by 10% buffered neutral formaline and cut in the thickness of 5m. Deparaffining of slides is done by xylol treatment (2x15min). Additional denaturation is achieved by combined solution, which contains 1.2g of picric acid in 30% solution of glacial acetic acid. By chloramine B application as blocking agent in form of 1% DMSO solution the dyes affinity for enviromental tissue is decreased. Tissues prepared in this way are treated with 0.5% solution of acidic sulfonic color Evans Blue (C.I.23860) in ratio 2:1. Lamellas are dark violet with light violet periphery. Obtained results speak in favor of high applicability of this method in light microscopy. In our opinion, this method can be recommended as one of methods for identification of elastic tissues.

**Key words:** Elastic tissue, Hystochemical identification.

### САЖЕТАК

Наш методолошки поступак установио је успешну технику директног бојења еластичних влакана и ламела у еластичним ткивима. Експерименти су изведени на хуманом обдукцијском материјалу. Исечци богати еластичним влакнима су фиксирани у 10% неутралном формалину и сечени на дебљину од 5м. Депарафинисање пресека вршено је ксилолом (2x15мин). Додатна денатурација је постигнута комбинованим раствором који се састоји од 1.2г пикринске киселине у 30% раствору глацијалне сирћетне киселине. Применом хлорамина Б као блокирајућег средства у облику 1% DMSO раствора афинитет боја за околно ткиво је смањен. Ткива припремљена на овај начин третирана су 0.5% раствором киселе сулфонске боје Evans Blue (C.I. 23860) у односу 2:1. Ламеле су тамно-љубичасте са светло-љубичастом периферијом. Добијени резултати говоре у прилог високој применљивости ове методе у светлосној микроскопији. Према нашем мишљењу метода може бити препоручена као једна од техника за идентификацију еластичних ткива.

**Кључне речи:** Еластична ткива, Хистохемијска идентификација.

### УВОД

Еластична влакна чине посебну врсту везивних, фибрилних протеина са специфичном структуром која је одеђена присуством доминантне аморфне компоненте (еластина) и фибрилина састављеног од неколико гликопротеина (1,2,3). Специфична грађа еластике, као и укупне промене које се дешавају са старењем или због обољења, нису дозволиле до данас поуздану идентификацију ових структура (4,5). Технике које се у ту сврху користе заснивају се на примени огромног броја органских и неорганских супстанци различитог хемијског састава (6,7,8). Код већине примењених техника највећу опасност представља потреба диференцијације вишка боје са ткива, што увек оставља сумњу у крајњи учинак било које методе (9). У том случају одлучујући фактор је искуство истраживача и његова субјективна процена добијених резултата уз дуготрајно и стрпљиво, мада проблематично одбојавање.

### ЦИЉ РАДА

Хемијски састав еластина односно, велики проценат неполарних аминокиселина, не дозвољава остварење чврстих ковалентних веза између примењених боја и супстрата, а с тим у вези и успостављање јединственог методолошког приступа за бојење еластике. Због тога, и данас постоји потреба да се у светлосној микроскопији успостави таква техника која би увек, на исти начин, без обзира на врсту и многобројност еластичних влакана и ламела са сигурношћу и поновљено тачно приказала њихову структуру, бројност и умреженост.

### МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Експерименти су вршени на хуманом обдукцијском материјалу. Узорци из средњих партија силазног дела грудне аорте су фиксирани у 10% пуферисаном не-

утралном формалину  $24^h$ , дехидратисани и довођени до парафинских калуца. Коришћени су исечци дебљине 5м.

Према нашој методи депарафинисање узорака и враћање узорка у стање слично природном вршено је третирањем ксилолом (2x15мин.). Додатна денатурација протеина и повећање базофилије урађено је истовремено помоћу комбинованог раствора који садржи 1,2g пикринске киселине у 30% раствору глацијалне ацетатне киселине. Овако препарисана ткива третирана су раствором боје Evans Blue припремљеним на одговарајући начин.

#### **Посиљак I**

Узорци су фиксирани 10% пуферисаним, неутралним формалдехидом и сечени на 5 $\mu$ , после рутинске дехидратације и довађења до парафинских калуца.

Раствори:

*Расиљор пикринске киселине*

- пикринска киселина 1,2g
- глацијална сирћетна киселина 30mL
- дестилована вода 70mL

*Расиљор хлорамина Б*

- хлорамин Б-1g
- глацијална сирћетна киселина 100mL

*Расиљор боје Evans Blue*

- А: Evans Blue (C.I. 23860) 0.5g
- DMSO 100mL
- Б: Ацетатни пуфер (pH=4)

Раствори А и Б у односу су помешани 2:1 пре употребе

#### **МЕТОДА**

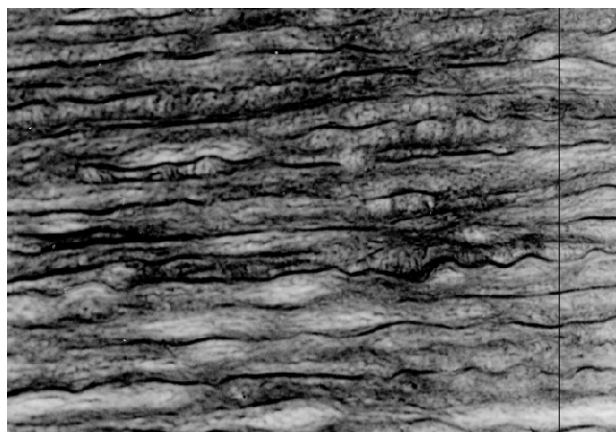
- Депарафинисати узорке ксиленом (2x15мин),
- Пренети у раствор пикринске киселине 5мин,
- Испирати текућом водом,
- Оксидовати препарате раствором хлорамина Б-1мин,
- Пренети неосушене препарате у раствор боје Evans Blue 5мин,
- Испирати текућом водом, дехидратисати у етанолу, просветлити ксиленом и калупити у Remaunt-u.

#### **РЕЗУЛТАТИ**

Фракционом применом погодних растварача и применом боје Evans Blue еластика се боји плаво-љубичасто са светлољубичастим омотачем (Слика 1.). Добијени резултати говоре у прилог добре апликабилности наше методе за бојење ткива и ламела. Љубичаста боја еластике има добар контраст са светло-љубичастом околином.

#### **ДИСКУСИЈА**

Пратећи експерименталне резултате добијене систематским истраживањем боја и њихове апликабилности у различитим рН условима применом различитих растварача сматрали смо да можемо предложити методу која брзо, директним поступком поуздано одсликава еластична влакна и ламеле у еластичном ткиву.



**Слика 1.** - Двокомпонентно бојење ламела тамно-љубичасто са светлољубичастом периферијом (x120)

Најбоље резултате постигли смо употребом боје Еванс Блуе, велике молекулске масе која по нашем мишљењу може да оствари хидрофобно везивање за хидрофобни супстрат - еластин (9).

Водене растворе потпуно смо супституисали диметил-сулфоксидом (ДМСО) (10).

Прелиминарна припрема ткива подразумевала је добијање еластичних структура у што природнијем облику: узорци су фиксирани 10% пуферисаним, неутралним формалином и парафинисани ради лакшег сечења слајдова. Пресеци су третирани ксиленом више пута, ради што бољег одстрањивања парафина. Препарате нисмо спроводили кроз силазни ред етанола, нити хидратисали, већу су одмах додатно денатурисани пикринском киселином у смеси са глацијалном киселином због опасности елуирања еластина у растворе којима су ткива третирана током бојења.

Пошто пикринска киселина скупља ткивне компоненте, а сирћетна киселина има супротан ефекат на протеинске молекуле (бубрење) направили смо погодну комбинацију пикринске и глацијалне киселине и на тај начин избегли пропратни ефекат који даје пикринска киселина у воденом или алкохолном раствору.

Хлорамин Б који је коришћен за оксидацију ткива такође је растваран у ДМСО-у и коришћен као 1% раствор. Применом хлорамина Б постигнута је оксидација ткивних компонента околног ткива и специфична блокада примарних и секундарних амино група (11). Боја је тиме усмерена према еластичном ткиву и реално је било очекивати да ће тиме бити фаворизовано везивање боје за хидрофобни еластин.

Без обзира што је у нашим предходним истраживањима утврђено да боја Еванс Блуе показује добар афинитет према еластици и у киселој и у базној средини боју смо апликовали из раствора коме је додаван ацетатни пуфер да би бојење било још ефикасније (8).

Услови при којима се примењује одговарајућа боја, подешени према предложеној методи, највероватније омогућавају бојење аморфне компоненте, односно бојење сржи влакна. Поларна периферија еластичних влакана као и поларна околина незнатно су обојени или су без боје.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Ross R: Elastic fibers: A Review, *J Histochem Cytochem* 21: 199-208, 1973.
2. Gibson MA, Kumaratilake JS, Cleary EG: The protein components of the 12nm microfibrils of elastic and non-elastic tissues, *J Biol Chem* 264: 4590-8, 1989.
3. Henderson M, Polewsky R, Fanning CJ, Gibson M: Microfibril-associated - glycoprotein I-(MAGP - 1) in specifically located on the bead of the beaded - filaments structure for fibrillin-containing microfibrills as visualized by rotary shadowing technique, *J Histochem Cytochem* 44: 1389-97, 1996.
4. Rustin MHA, Papadaki L, Rode J, Dowd PM: Elastic fibers in patients with systemic sclerosis, *Arch Pathol Anat* 416 115-20, 1989.
5. Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG: Elasin structure biosynthesis and relation to disease states, *New Engl J Med* 304: 566-79, 1989.
6. Horbin RW, Fleming L: Structure-staining relationship in histochemistry and biologic stains. II Mechanistic and practical aspects of the staining of elastic fibers. *J Microsc* 119: 357-72, 1980.
7. Garwey W: Modified elastic tissue - Masson trichrome stain, *Stain Techn* 59: 213-6, 1984.
8. Petrovic S, Abramovic M: New method for dyeing of elastic tissues: modification of Verhoffs method, *Facta Universitatis*, 5, 50-53, 1998.
9. Gosline JM: Hydrophobic interaction and a model for the elasticity of elastin *Biopolymers* 17: 677-95, 1978.
10. Wilton HB: The effects DMSO on permeation of none - electrolytes through the Barnacle cell membrane, *J Cell Chem* 262:2244-9, 1989.
11. Pearse EAG: *Histochemistry: Theoretical and applied*, LB Co Boston, 1968.