

# BOJENJE ELASTIČNIH TKIVA BEZ DIFERENCIJACIJE: NOVA, BRZA METODA

Mirjana Abramović<sup>1</sup>, Radmila Pavlović<sup>1</sup> i Gorana Rančić<sup>2</sup>

Naš metodološki postupak ustanovio je uspešnu tehniku direktnog bojenja elastičnih vlakana i lamela u elastičnim tkivima. Eksperimenti su izvedeni na humanom obdukcijском materijalu. Isečci bogati elastičnim vlaknima su fiksirani u 10% neutralnom formalinu i sečeni na debljinu od 5  $\mu\text{m}$ . Deparafinisanje preseka vršeno je ksilolom (2x15 min). Dodatna denaturacija je postignuta kombinovanim rastvorom koji se sastoji od 1.2 g pikrinske kiseline u 30% rastvoru glacijalne sirćetne kiseline. Primenom hloramina B kao blokirajućeg sredstva u obliku 1% DMSO rastvora afinitet boja za okolno tkivo je smanjen. Tkiva pripremljena na ovaj način tretirana su 0.5% rastvorom kisele sulfonske boje Evans Blue (C.I.23860) u odnosu 2:1. Lamelle su tamno-ljubičaste sa svetiloljubičastom periferijom. Dobijeni rezultati govore u prilog visokoj primenljivosti ove metode u svetlosnoj mikroskopiji. Prema našem mišljenju metoda može biti preporučena kao jedna od tehnika za identifikaciju elastičnih tkiva. *Acta Medica Medioanae* 45(3):40-42.

**ključne reči:** elastična tkiva, histohemijska identifikacija

Katedra za hemiju Medicinskog fakulteta u Nišu<sup>1</sup>  
Institut za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Nišu<sup>2</sup>

Kontakt: Mirjana Abramović  
Katedra za hemiju Medicinskog fakulteta  
Bulevar dr Zorana Djindjića 81  
18000 Niš  
Tel.: 018/22 66 44 lok 113

## Uvod

Elastična vlakna čine posebnu vrstu vezivnih, fibrilanih proteina sa specifičnom strukturom koja je određena prisustvom dominantne amorfne komponente (elastina) i fibrilina 1 i 2, glikoproteina koji predstavljaju glavnu komponentu mikrofibrila vezivnog tkiva (1,2,3). Pored fibrilina prisutni su i mikrofibrilarni udruženi glikoproteini 1 i 2 (MAGP1, MAGP2), koji u elastičnim tkivima postaju inkorporisani u elastična vlakna i ponašaju se kao njihove determinante (4). Specifična građa elastičnih struktura, kao i ukupne promene koje se dešavaju sa starenjem ili zbog oboljenja, nisu dozvolile do danas pouzdanu identifikaciju ovih struktura (5,6). Tehnike koje se u tu svrhu koriste zasnivaju se na primeni ogromnog broja organskih i neorganskih supstanci različitog hemijskog sastava (7,8,9). Kod većine primenjenih tehnika najveću opasnost predstavlja potreba diferencijacije viška boje sa tkiva, što uvek ostavlja sumnju u krajnji učinak bilo koje metode (10). U tom slučaju, odlučujući faktor je iskustvo istraživača i njegova subjektivna procena dobijenih rezultata uz dugotrajno i strpljivo, mada problematično odbojavanje.

## Cilj rada

Hemijski sastav elastina, odnosno, veliki procenat nepolarnih aminokiselina, ne dozvoljava ostvarenje čvrstih kovalentnih veza između primenjenih boja i supstrata, a s tim u vezi i uspostavljanje jedinstvenog metodološkog pristupa za bojenje elastike. Zbog toga, i danas postoji potreba da se u svetlosnoj mikroskopiji uspostavi takva tehnika koja bi uvek, na isti način, bez obzira na vrstu i mnogobrojnost elastičnih vlakana i lamela, sa sigurnošću i ponovljeno tačno prikazala njihovu strukturu, brojnost i umreženost.

## Materijal i metode rada

Eksperimenti su vršeni na humanom obdukcijском materijalu. Uzorci iz srednjih partija silaznog dela grudne aorte su fiksirani u 10% puferisanom neutralnom formalinu 24 časa, dehidratirani i dovođeni do parafinskih kalupa. Korišćeni su isečci debljine 5  $\mu\text{m}$ . Prema našoj metodi deparafinisanje uzoraka i vraćanje uzorka u stanje slično prirodnom vršeno je tretiranjem ksilolom (2x15 min). Dodatna denaturacija proteina i povećanje bazofilije urađeno je istovremeno pomoću kombinovanog rastvora koji sadrži 1,2 g pikrinske kiseline u 30% rastvoru glacijalne acetatne kiseline. Ovako preparisana tkiva tretirana su rastvorom boje Evans Blue pripremljenim na odgovarajući način.

## Postupak I

Uzorci su fiksirani 10% puferisanim, neutralnim formaldehidom i sečeni na 5  $\mu\text{m}$ , posle

rutinske dehidratacije i dovođenja do parafinskih kalupa.

Rastvori:

Rastvor pikrinske kiseline

pikrinska kiselina 1,2 g  
glacijalna sirćetna kiselina 30 mL  
destilovana voda 70 mL

Rastvor hloramina B

hloramin B 1 g  
glacijalna sirćetna kiselina 100 mL

Rastvor boje Evans Blue

A: Evans Blue (C.I. 23860) 0.5 g DMSO 100 mL  
B: Acetatni pufer (pH=4)

Rastvori A i B u odnosu su pomešani 2:1 pre upotrebe

Metoda:

1. Deparafinisati uzorke ksilenom (2x15min)
2. Preneti u rastvor pikrinske kiseline 5 min
3. Inspirati tekućom vodom
4. Oksidovati preparate rastvorom hloramina B 1 min
5. Preneti neosušene preparate u rastvor boje Evans Blue 5 min
6. Isprati tekućom vodom, dehidratisati u etanolu, prosvetliti ksilenom i kalupiti u Permantu.

### Rezultati

Frakcionom primenom pogodnih rastvarača i primenom boje Evans Blue elastika se boji plavo-ljubičasto sa svetloljubičastim omotačem (Slika 1).



Slika 1. Elastika obojena bojom Evans Blue (C.I. 23860): plavo-ljubičasta elastika sa svetloljubičastim omotačem, (1x120)

Dobijeni rezultati govore u prilog dobre aplikabilnosti naše metode za bojenje tkiva i la-

mela. Ljubičasta boja elastike ima dobar kontrast sa svetlo-ljubičastom okolinom.

Prateći eksperimentalne rezultate dobijene sistematskim istraživanjem boja i njihove aplikabilnosti u različitim pH uslovima primenom različitih rastvarača smatrali smo da možemo predložiti metodu koja brzo, direktnim postupkom pouzdano odslikava elastična vlakna i lamele u elastičnom tkivu.

Najbolje rezultate postigli smo upotrebom boje Evans Blue, velike molekulske mase koja po našem mišljenju može da ostvari hidrofobno vezivanje za hidrofobni supstrat - elastin (10).

Vodne rastvore potpuno smo supstituisali dimetil-sulfoksidom (DMSO) (11).

Preliminarna priprema tkiva podrazumevala je dobijanje elastičnih struktura u što prirodnijem obliku: uzorci su fiksirani 10% puferisanim, neutralnim formalinom i parafinisani radi lakšeg sečenja tkivnih preseka. Preseci su tretirani ksilenom više puta, radi što boljeg odstranjivanja parafina. Preparate nismo sprovodili kroz silazni red etanola, niti hidratisali, već su odmah dodatno denaturisani pikrinskom kiselinom u smeši sa glacijalnom kiselinom zbog opasnosti eluiranja elastina u rastvore kojima su tkiva tretirana tokom bojenja.

Pošto pikrinska kiselina skuplja tkivne komponente, a sirćetna kiselina ima suprotan efekat na proteinske molekule (bubrenje) napravili smo pogodnu kombinaciju pikrinske i glacijalne kiseline i na taj način izbegli propratni efekat koji daje pikrinska kiselina u vodenom ili alkoholnom rastvoru.

Hloramin B koji je korišćen za oksidaciju tkiva tako je je rastvaran u DMSO-u i korišćen kao 1% rastvor. Primenom hloramina B postignuta je oksidacija tkivnih komponentata okolnog tkiva i specifična blokada primarnih i sekundarnih amino grupa (12). Boja je time usmerena prema elastičnom tkivu i realno je bilo očekivati da će time biti favorizovano vezivanje boje za hidrofobni elastin.

Bez obzira što je u našim prethodnim istraživanjima utvrđeno da boja Evans Blue pokazuje dobar afinitet prema elastici i u kiseloj i u baznoj sredini, boju smo aplikovali iz rastvora kome je dodavan acetatni pufer da bi bojenje bilo još efikasnije (9).

Uslovi pri kojima se primenjuje odgovarajuća boja, podešeni prema predloženoj metodi, najverovatnije omogućavaju bojenje amorfnih komponente-elastina, odnosno bojenje srži vlakna Polama periferija elastičnih vlakana kao i polarna okolina neznatno su obojeni ili su bez boje.

## Literatura

1. Ross R. Elastic fibers: A Review. *J Histochem Cytochem* 1973; 21:199-208.
2. Gibson MA, Kumaratilake JS, Cleary EG. The protein components of the 12nm microfibrils of elastic and non-elastic tissues. *J Biol Chem* 1989; 264:4590-8.
3. Henderson M, Polewsky R, Fanning CJ, Gibson M. Microfibril-associated glycoprotein I-(MAGP - 1) is specifically located on the bead of the beaded-filaments structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by rotary shadowing technique. *J Histochem Cytochem* 1996; 44:1389-97.
4. Ayad S, Boot-Handford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA. *The Extracellular Matrix FactsBook*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press;1998.
5. Rustin MHA, Papadaki L, Rode J, Dowd PM. Elastic fibers in patients with systemic sclerosis. *Arch Pathol Anat* 1989; 416 :115-20.
6. Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG. Elasin structure biosynthesis and relation to disease states. *New Engl J Med* 1989; 304:566-79.
7. 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* 1980; 119:357-72.
8. Garwey W. Modified elastic tissue - Masson trichrome stain. *Stain Techn* 1984; 59:213-6.
9. Petrovic S, Abramovic M: New method for dyeing of elastic tissues: modification of Verhoff's method, *Facta Universitatis* 1998; 5:50-53.
10. Gosline JM. Hydrophobic interaction and a model for the elasticity of elastin *Biopolymers* 1978; 17:677-95.
11. Wilton HB. The effects of DMSO on permeation of nonelectrolytes through the Barnacle cell membrane. *J Cell Chem* 1989; 262:2244-9.
12. Pearse EAG. *Histochemistry: Theoretical and applied*. Boston: LB Company; 1968.

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

*Mirjana Abramovic, Radmila Pavlovic and Gorana Rancic*

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 5µm. Deparaffinization of slides is done by xylol treatment (2x15 min). Additional denaturation is achieved by combined solution, which contains 1.2 g of picric acid in 30% solution of glacial acetic acid. By chloramine B application as blocking agent in form of 1% DMSO solution the dye's affinity for environmental 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 are in favor of high applicability of this method in light microscopy. In our opinion, this method can be recommended as one of the methods for identification of elastic tissues. *Acta Medica Medianae* 2006;45(3):40-42.

**Key words:** *elastic tissue, histochemical identification*