

Metoda: Massonův trichrom – Modrý

Karolína Bílková, ZL2

Školitelé: Petr Ferczadi, DiS., Šiklův ústav patologie FN Lochotín

Princip:

Kolageny tvoří skupinu proteinů selektovanou v průběhu evoluce pro schopnost formovat různá extracelulární vlákna, lamely a sítě jako extrémně silné a odolné vůči normální zátěži, ohybu a tahu. Kolagen je nejhojnější bílkovinou v lidském těle a představuje asi 30 % jeho suché váhy. Je především produktem fibroblastů, přestože kolageny jsou secerovány i několika dalšími typy buněk. Kolageny se liší svým molekulárním složením, morfologickými charakteristikami, výskytem i funkcí. U obratlovců existuje skupina 28 kolagenů, které jsou číslovány podle pořadí své indentifikace.

Uplatnění metody:

Barvení Massonovými trichromy se využívá při průkazu kolagenního vaziva. Podle toho, jak se vazivo barví, rozeznáváme tři druhy trichromů. Žlutý trichrom – kolagenní vazivo se barví žlutě (šafránem), modrý trichrom – kolagenní vazivo se barví modře (anilinovou modří) a zelený trichrom – kolagenní vazivo se barví zeleně (světlou zelení). Metoda se využívá hlavně ke zjištění množství fibrotických vláken a následně určení fibrózy například u jater a ledvin. Fibróza je stav zmnožení vaziva, typu pojivové tkáně, jakožto důsledku hojivého procesu po zánětu, zranění či reparativní reakce na různé typy podnětů, včetně příčin nejasné etiologie.

Úskalí metody:

Výsledek barvení může být ovlivněn prací laboranta nebo používanými roztoky chemikálií a barviv. Roztoky barviv jsou velmi stálé a dobře barví po dlouhou dobu. Po každém barvení je nutná kontrola v mikroskopu (posouzení správnosti barvení laborantem). Může se stát, že laborant po inkubaci s kyselinou fosfomolybdenovou opláchne preparát destilovanou vodou – tím se zamezí vazba kolagenu s anilinovou modří a kolagen se tak neobarví. V tomto kroku barvení nesmí dojít k chybě a preparát se nesmí opláchnout.

Přístrojové vybavení:

K tomuto typu barvení není potřeba přístrojové vybavení. Dá se vše udělat ručně, případně se sklíčko s materiálem vloží do barvicího automatu.

Odběr a transport:

Pro Massonův modrý trichrom se používá biopsie či punkční cytologie. Materiál se ihned po odběru šetrně uloží do fixační tekutiny nejčastěji do 4 % pufrovaného formolu. Fixační tekutina musí 10 – 20x násobně převyšovat vlastní objem vzorku. V případě preoperační biopsie se vzorek přepravuje v nativním (nefixovaném) stavu. Po příjmu do laboratoře patolog přikrojí materiál, který se umístí do bločků. V případě preoperační biopsie se vzorek zamrazí a nakrájí na mikrotomu.

Zhotovení vzorku:

Po přikrájení patologem a umístění do bločku se vzorek musí odvodnit. Odvodňování se může provádět ručně nebo pomocní autotechnikonu. Bločky se ponořují do řady vzestupných alkoholů (70%,

80%, 96%, 96%). Zbytek ethanolu a vody se odstraní jednou lázní acetonu a následně se prosytí v xylenu. Dále se tkáň prosytí parafinem a zalijí do bločků. Bločky se následně krájí na mikrotomu a natahují na sklíčko.

Barvení:

Před samotným barvením se sklíčko s nataženým preparátem musí odparafinovat. Odparafinování probíhá sestupnou řadou nejdříve několik lázní xylenu a následně lázně s ethanolem (96%, 96%, 80%, 70%). Dále probíhá samotné barvení v několika krocích:

1. Weigertův hematoxylin,
2. oplach v 70% alkoholu,
3. praní pod tekoucí vodou,
4. oplach v deionizované vodě,
5. nalití roztoku AB (2 díly roztoku B, 1 díl roztoku A),
6. oplach v deionizované vodě,
7. diferencovat 1 % roztoku kyseliny fosfomolybdenové,
8. ponoření do roztoku anilinové modři,
9. oplach v deionizované vodě,
10. odvodnit, projasnit, montovat.

Roztok A:

- kyselý fuchsin 1 g,
- deionizovaná voda 100 ml,
- ledová kyselina octová 1 ml.

Roztok B:

- ponceau 2R 2 g,
- deionizovaná voda 200 ml,
- kyselina fosfowolframová 2 g,
- ledová kyselina octová 4 ml.

Vzorek se již dále pouze prohlíží po mikroskopem.