



Факултет медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу  
Интегрисане академске студије медицине  
Основи хистолошких и патолошких техника

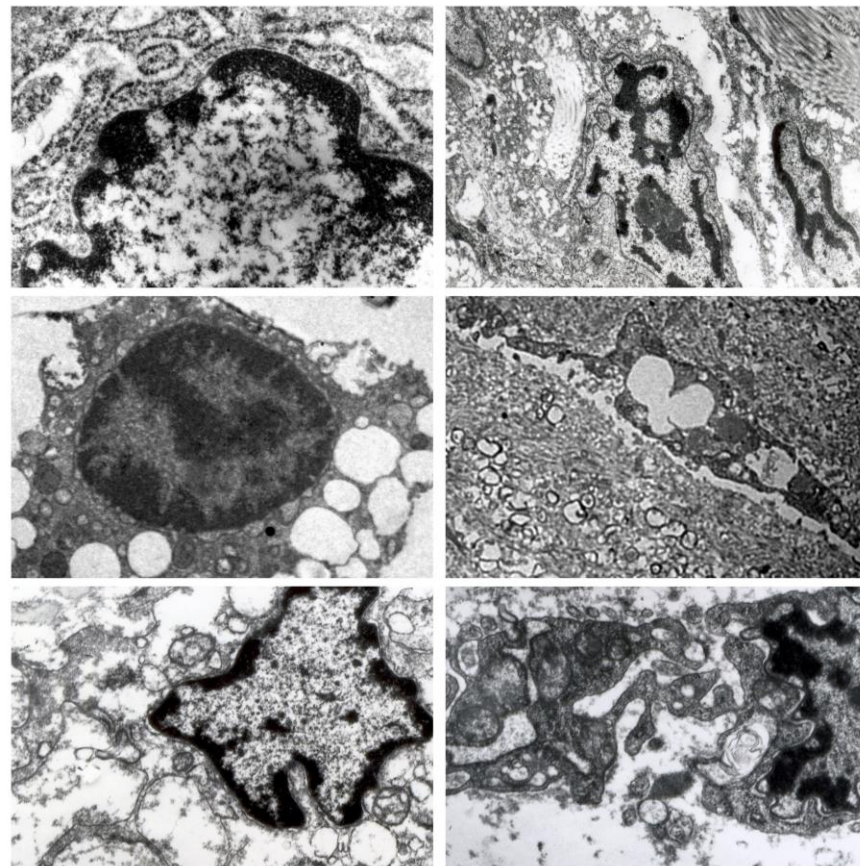
# Припрема ткива за посматрање под електронским микроскопом

трећа недеља наставе

# **Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)**

# Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)

- Припрема ткива за посматрање **трансмисионим електронским микроскопом** разликује се у односу на светлосну микроскопију,
- Те разлике огледају се у величини ткивних узорака који су знатно мањи ( $1\text{mm}^3$ ), посебним фиксативима, методологији и трајању калупљења, другачијим сечењем, монтирањем и бојењем ткивних пресека...
- Ове разлике условљене су **различитим принципима визуелизације узорака**, одн. условљава их употреба трансмисионог електронског микроскопа.



Трансмисионе електронске  
фотографије  
Аутор: проф. др И. Танасковић

# Узимање узорака за TEM

- Узимање **узорака** за **ТЕМ** (биопсијом или некропсијом), треба обавити брзо избегавајући механичка оштећења ткива.
- Узима се узорак приближне величине **1x1mm** што је важно због успешне фиксације и дехидратације ткива.



# Обрада ткива до калупа

- Стандардни протокол фиксације ткива за електронску микроскопију подразумева **префиксацију** у **глутаралдехиду** да би се стабилизовали **протеини**, а након тога **постфиксацију** у **осмијум тетраоксиду**, да би се очували **липиди**.
- Обрада ткива за TEM траје три дана и састоји се у следећим процедурама.
- **Префиксација** се врши у раствору 2,5% глутаралдехида у 0,1 M какодилатном пуферу (pH 7,4), преко ноћи на температури 4°C.

# Обрада ткива до калупа

- **Постфиксација** се врши у 1% раствору  $\text{OsO}_4$  у 0,1 М какодилатном пуферу, 1h на 4°C, након чега се узорци остављају преко ноћи у засићеном раствору 4,8% уранил ацетата на 4°C.
- **Након фиксације** следи **дехидратација** у растућем реду алкохола и **калупљење** у епону (Ероху resin смола).
- Сечење узорака врши се на **ултрамикротому**.
- **Полутанки пресеци** који се користе за оријентацију на светлосном микроскопу, најчешће се боје толуидин плавим.
- **Ултратанки пресеци** боје се 2%-тним раствором уранил ацетата и олово-цитрата.

# Фиксација ткива за трансмисиону електронску микроскопију

- **Фиксација ткива** за трансмисиону електронску микроскопију најчешће се врши у раствору направљеном од 3% **глутар-алдехада** у 0,1 M какодилатном пуферу преко ноћи или до 7 дана, на 4° C.
- **Фиксатив** се прави од 2,5ml 0,4M какодилата, 1,25ml 25% глутаралдехида и до 10ml додаје се вода.



<https://www.bio-world.com/elisa-buffer/sodium-cacodylate-buffer-02m-ph-74-p-40120084>



# Фиксација ткива за трансмисиону електронску микроскопију

- **Какодилатни пуфер** прави се мешањем 4,28gr натријум-какодилата у 100ml дејонизоване и дестиловане воде, чиме се добија 0,2M раствор натријум-какодилата.
- Затим се у овај раствор додаје 5,5ml 0,2 N HCl (pH = 7,4).
- У исту сврху може се користити и комерцијално доступни раствор.



<https://www.bio-world.com/elisa-buffer/sodium-cacodylate-buffer-02m-ph-74-p-40120084>



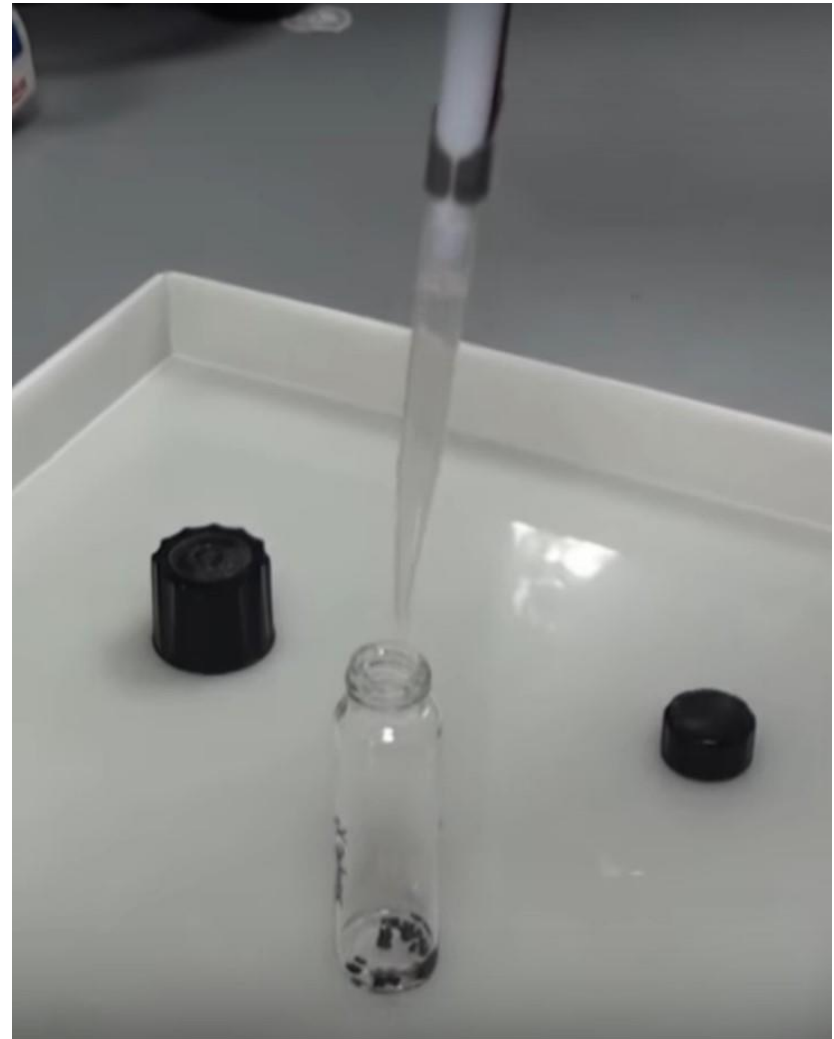
# Калупљење ткива за ТЕМ – први дан

- **Фиксирано ткиво** се испира у 0,1М какодилатном пуферу (pH = 7,4) три пута по 10 минута на собној температури.
- Затим се узорак ткива потапа у раствор добијен растварањем 1% **OsO<sub>4</sub>** у 0,1М какодилату у трајању од 1h на 4° C.



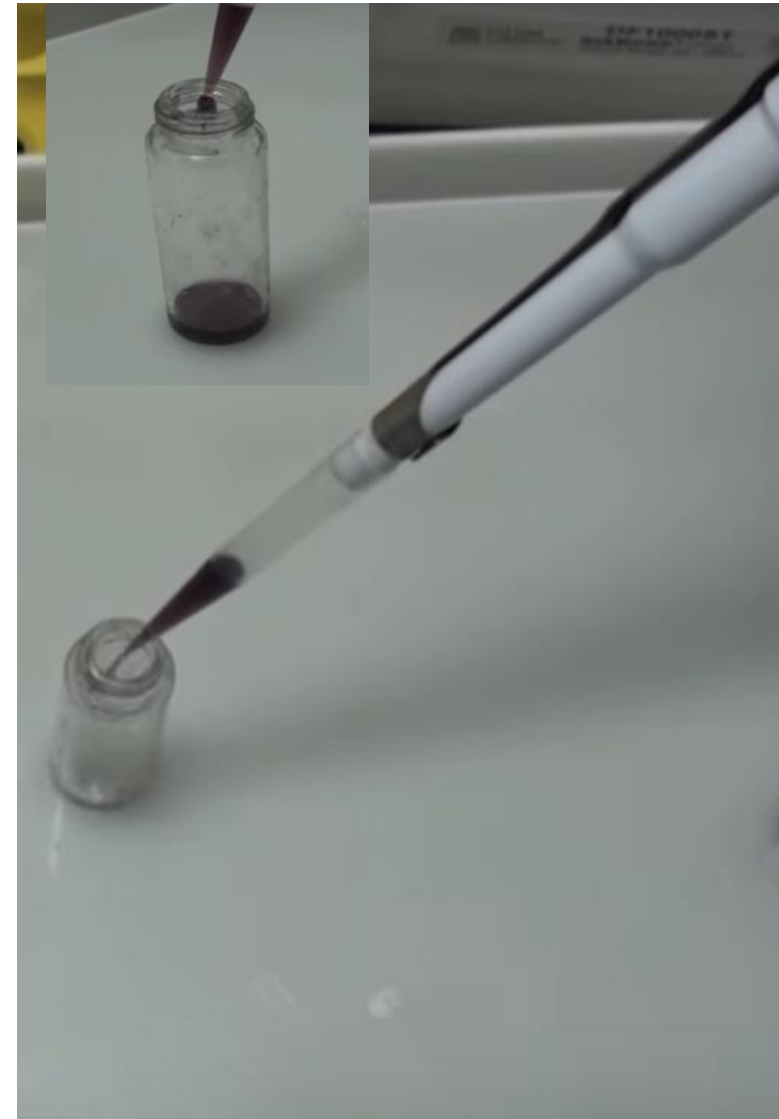
# Калупљење ткива за ТЕМ – први дан

- **Фиксирано ткиво** се испира у 0,1М какодилатном пуферу (pH = 7,4) три пута по 10 минута на собној температури.
- Затим се узорак ткива потапа у раствор добијен растварањем 1% **OsO<sub>4</sub>** у 0,1М какодилату у трајању од 1h на 4° C.



# Калупљење ткива за ТЕМ – први дан

- Након тога, припрема се 1:1 раствор 2% воденог раствора  **$\text{OsO}_4$**  и 0,2M какодилата.
- Добијени раствор се пипетом сипа у бочице са узорком, а затим испира у 0,1M **какодилатном пуферу** (pH = 7,4) три пута по 10 минута на собној температури.
- Ткиво се затим ставља у 4,8% уранил ацетат да одстоји преко ноћи на 4° C.



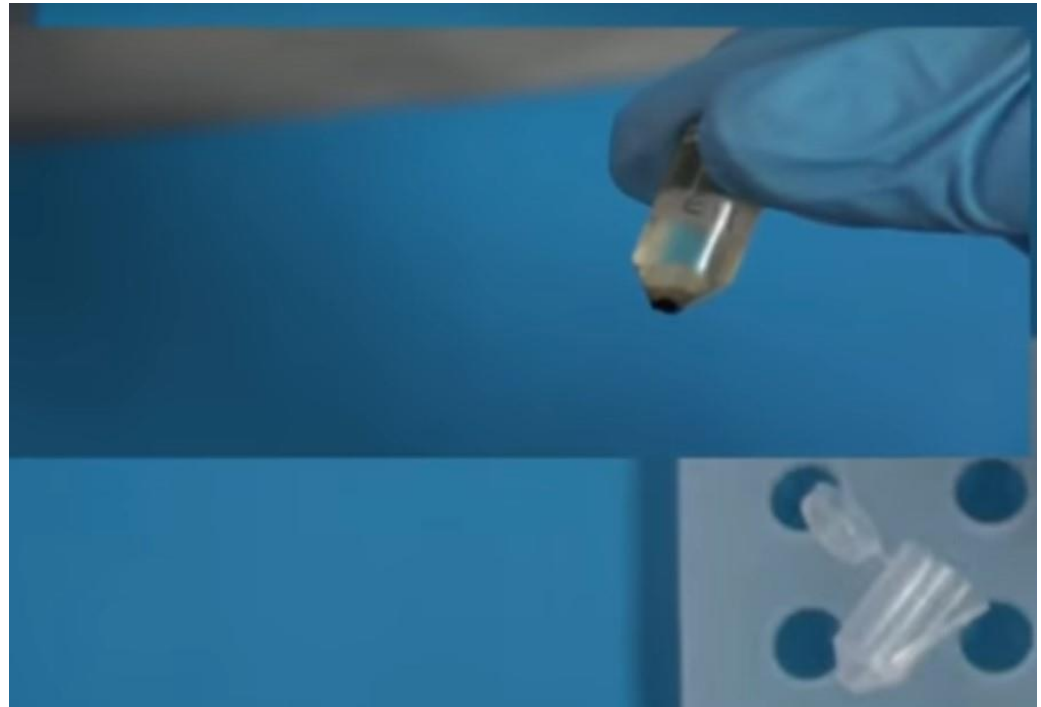
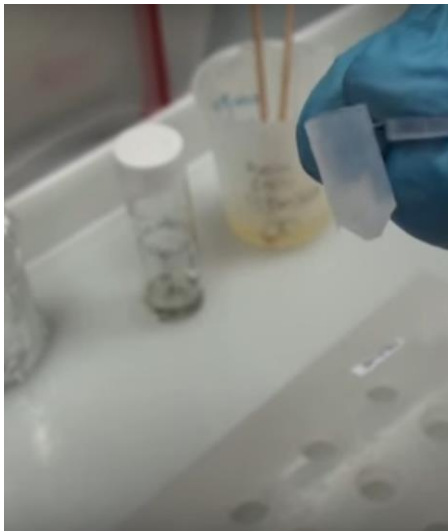
# Калупљење ткива за ТЕМ – други дан

- Процедура почиње испирањем ткива, прво 5 минута у води, на собној температури, а затим 5 минута у 50% етанолу на 4° С, чиме се постиже боље очување цитолошких детаља.
- Следи **дехидратација** у 70%, а затим 95% етанолу (оба по 30 минута на 4° С) и најзад у 100% етанолу три пута по 10 минута на собној температури.
- Следи **просветљавање** у 100% **пропилен оксиду** три пута по 10 минута на собној температури.
- Узорци се затим стављају у мешавину **комплетног епона** и **пропилен оксида** у размери 1:1. преко ноћи.



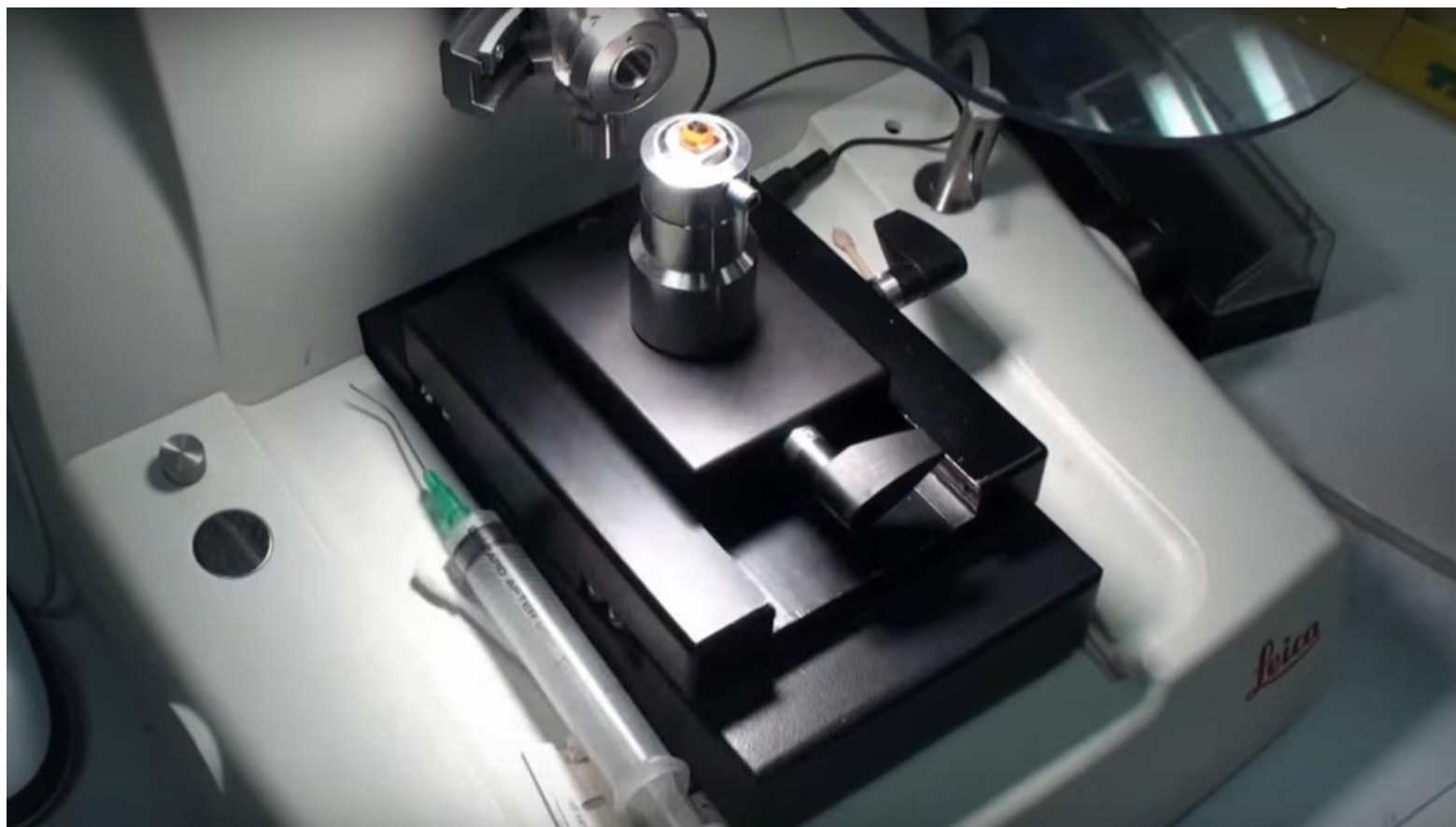
# Калупљење ткива за TEM – трећи дан

- Ткиво се потапа у смесу **Епон : Пропилен оксид** у размери **3 : 1**.
- Следи калупљење у **Епону** (Ероху resin смоли) који се састоји из:
  - Епона 812 (4,8ml)
  - DDSA (1,7ml)
  - MNA (3,5ml)
  - DMP-30 (0,2ml)



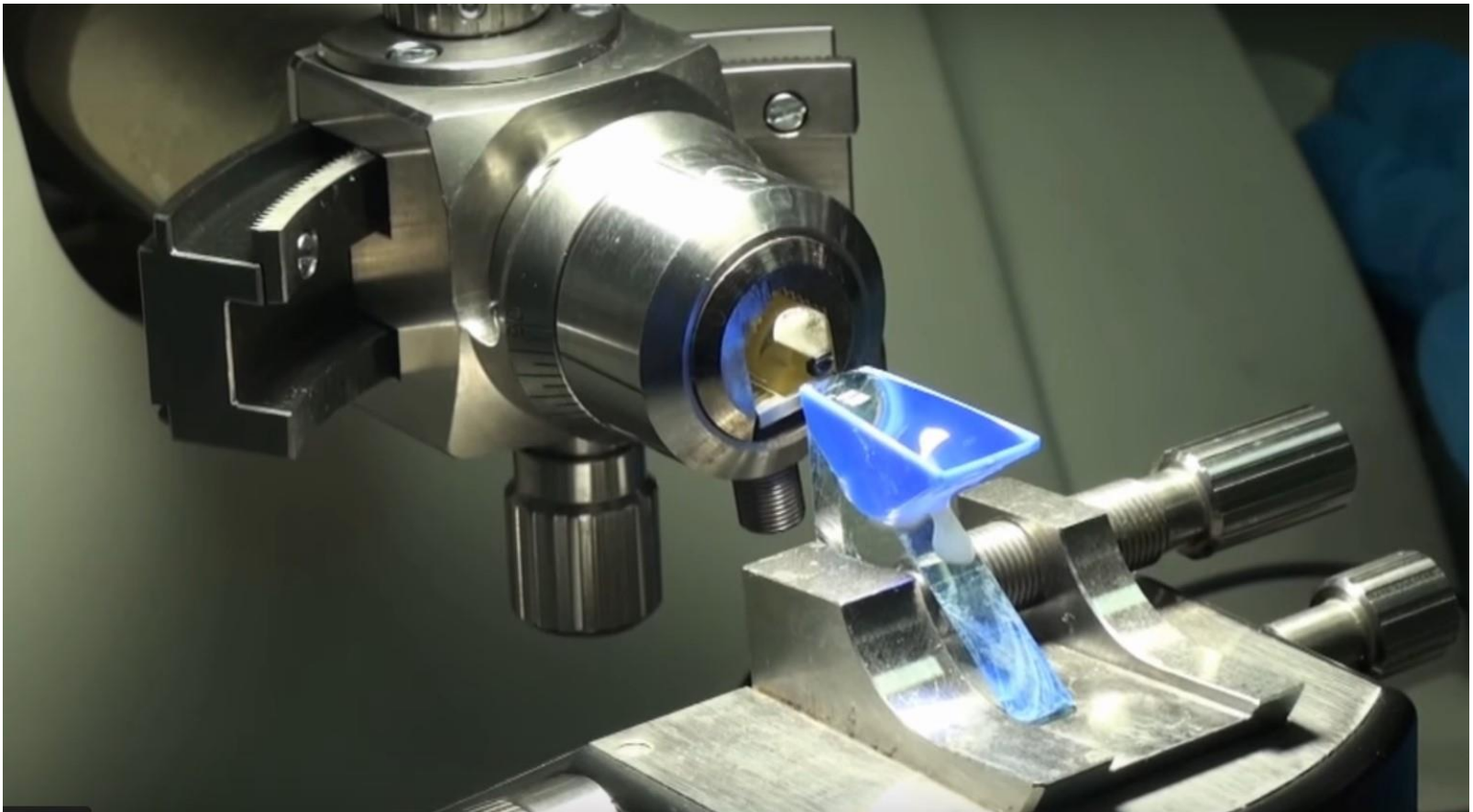
# Сечење калупа за ТЕМ

- Калупи се секу **дијамантским ножем** на **ултрамикротому**.
- Обично се прво праве тзв. „**полутанки**“ пресеци ( $0,5 - 1 \mu\text{m}$ ) који се боје **толуидин плавим** у сврху оријентације на светлосном микроскопу.

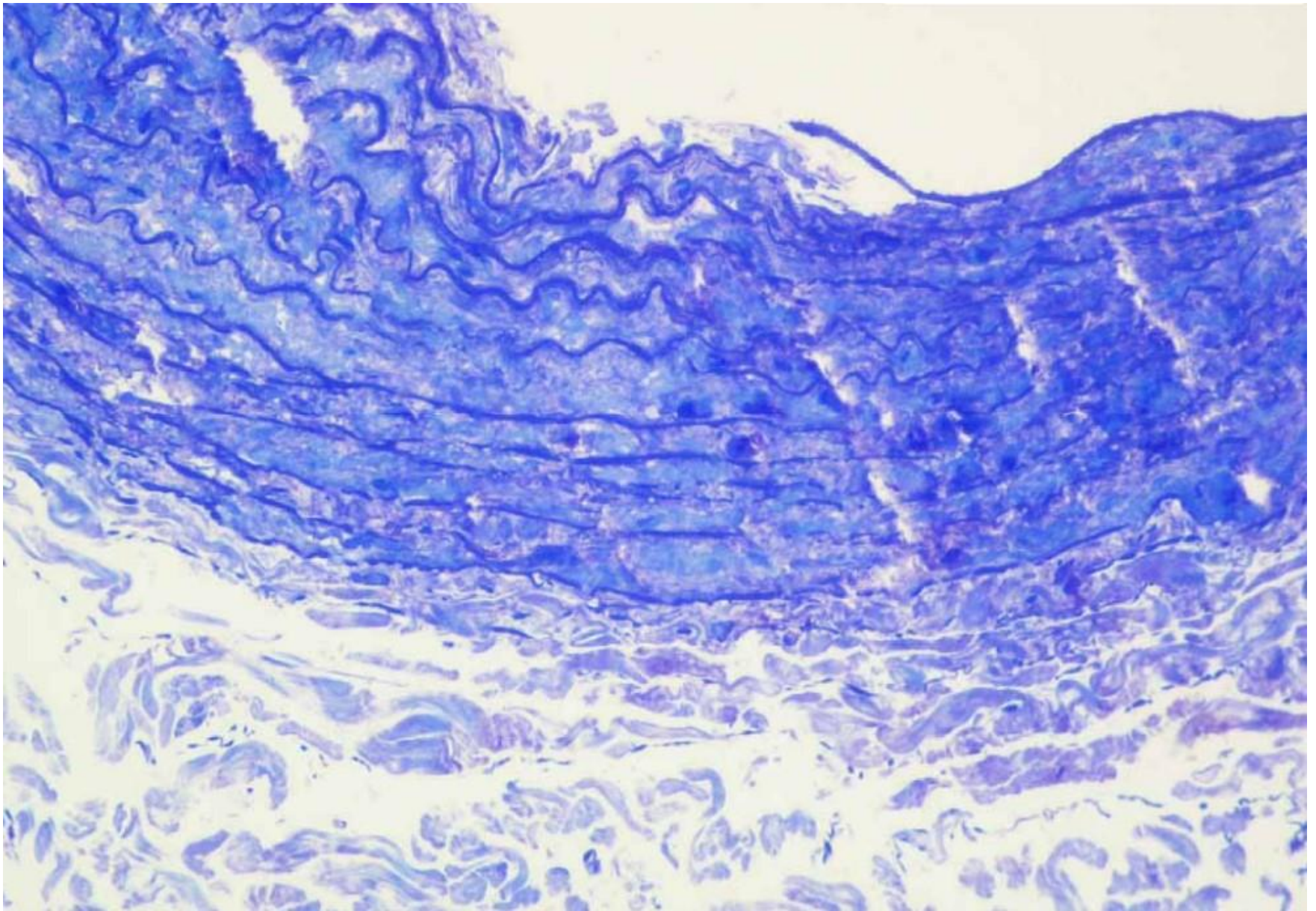


# Сечење калупа за ТЕМ

- Калупи се секу **дијамантским ножем** на **ултрамикротому**.
- Обично се прво праве тзв. „**полутанки**“ пресеци ( $0,5 - 1 \mu\text{m}$ ) који се боје **толуидин плавим** у сврху оријентације на светлосном микроскопу.







- **Полутанки пресек** (за оријентацију на светлосном микроскопу), на основу кога се секу ултратанки исечци за TEM (toluidin blue, x 128; Танасковић И).

# Сечење калупа за ТЕМ

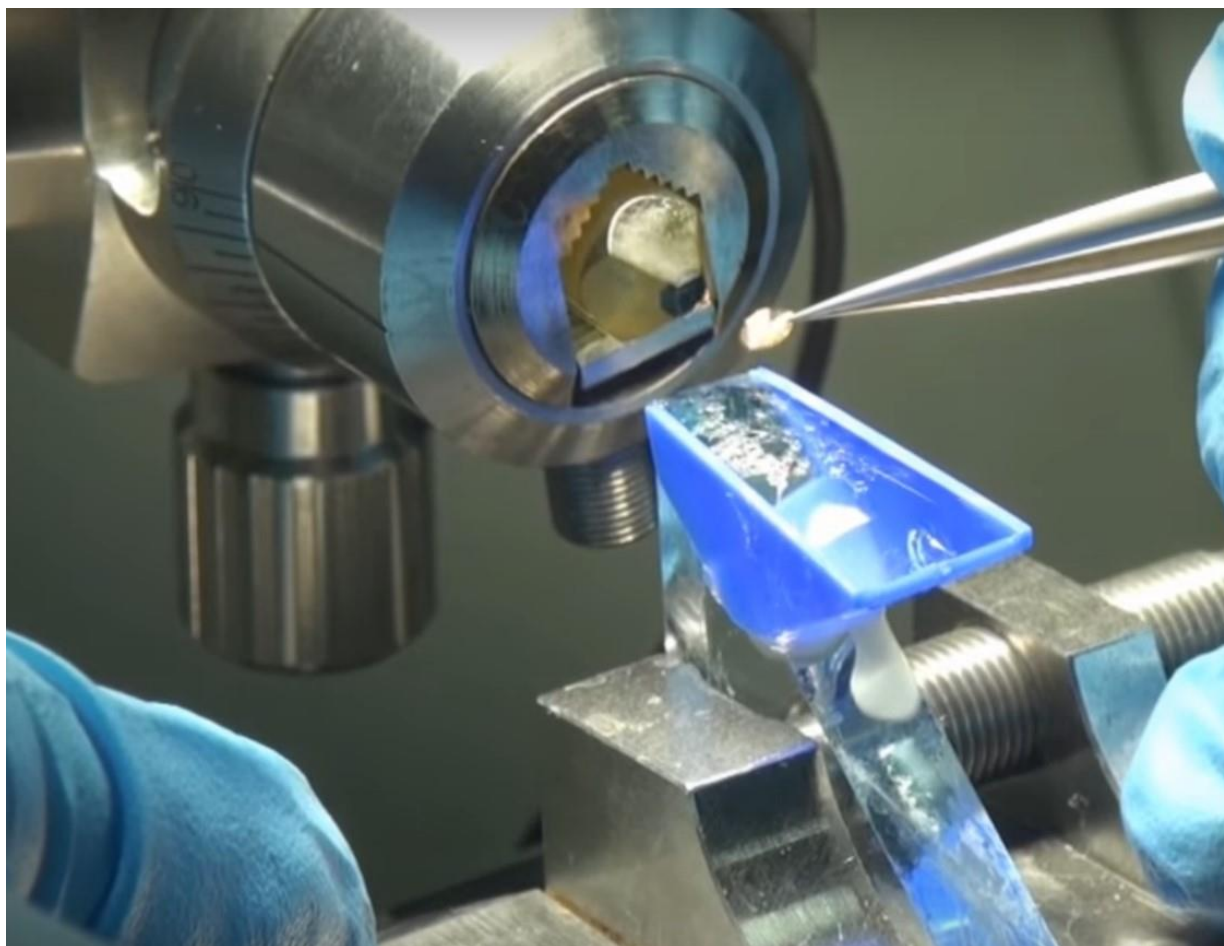
- Након оријентације на светлосном микроскопу, са тачно одређеног дела калупа, секу се ултратанки оресеци, „хватају“ на **мрежице**, а затим боје - контрастирају солима тешких метала: 2% **уранил ацетатом** и **олово-цитратом**.





# Сечење калупа за ТЕМ

- **Ултратанки пресеци** дебљине су до 100nm (најчешће 50-80nm).
- **Мрежице** су дијаметра 3.05mm, дебљине и величине „окаца“ од свега неколико до 100μm (могу бити од бакра, молибдена, злата или платине)



# Сечење калупа за ТЕМ

- **Уранил ацетат** и **олово цитрат** добро расејавају електроне.
- Препарат није потребно ослобађати Епона да би се узорак **контрастрирао**.
- Вишак „боје“ се испира и након сушења **посматра на ТЕМ**.



# Посматрање узорака

- **Припремљене мрежице** се постављају на носач и стављају у трансмисиони електронски микроскоп.
- У ТЕМ-у је извор визуелизације **усмерени сноп електрона** (уместо фотона, као што је то случај код светлосног микроскопа).



# Посматрање узорака

- ТЕМ има **кондензорска** и **објектна сочива**.
- **Кондензорска сочива** (електромагнетне завојнице) подсредством магнетног поља фокусирају снап електрона емитованог са електронског топа (тунгстенски филамент) у високом вакууму.





# Посматрање узорака

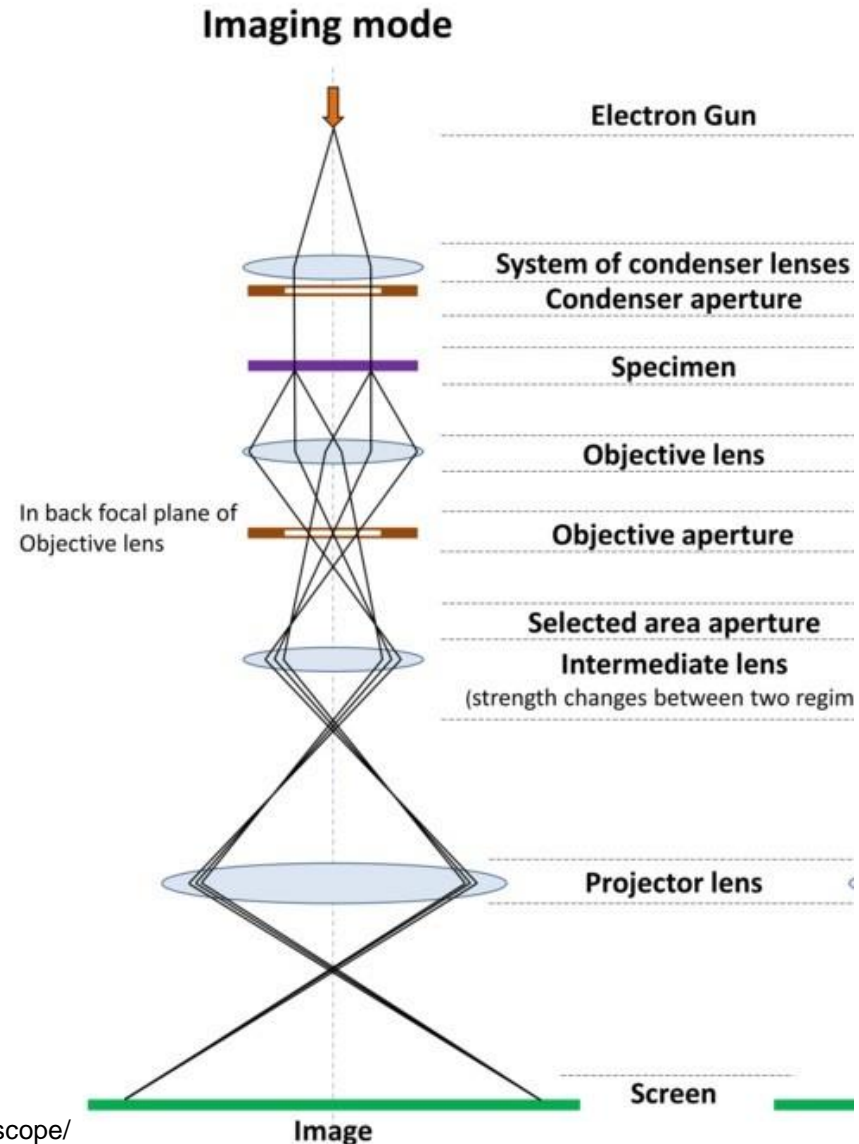
- **Објектна сочива** представљају систем за стварање слике који је еквивалент окулару (постоји уместо окулара)
- То су **пројекторска сочива** која формирају слику на равној металној плочи обложеној флуоресцентним материјалом или на екрану.





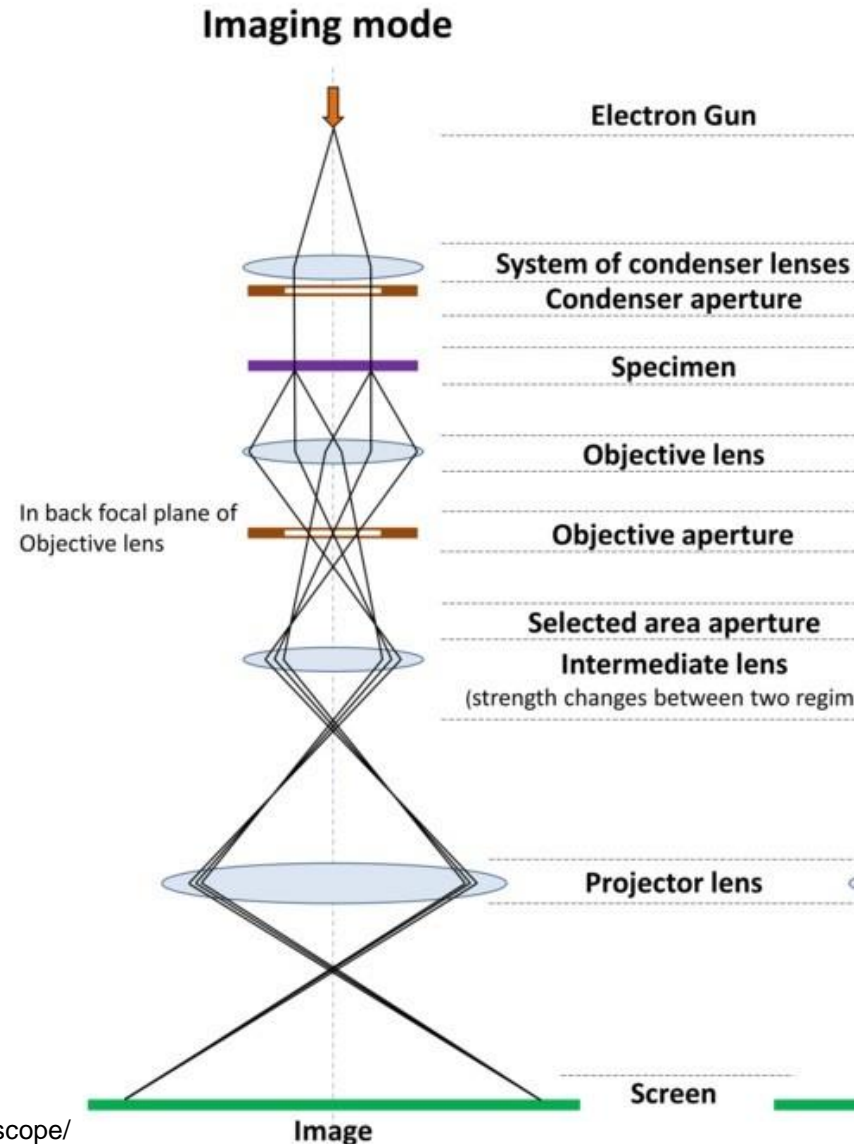
# Посматрање узорака

- **Кондензорска сочива** (електромагнетне завојнице) подсредством магнетног поља фокусирају сноп електрона емитованог са **елктронског топа** (тунгстенски филамент) у високом вакууму.
- **Објектна сочива** представљају систем за стварање слике који је еквивалент окулару (постоји уместо окулара)
- То су **пројекторска сочива** која формирају **слику** на равној металној плочи обложеној флуоресцентним материјалом или екрану.

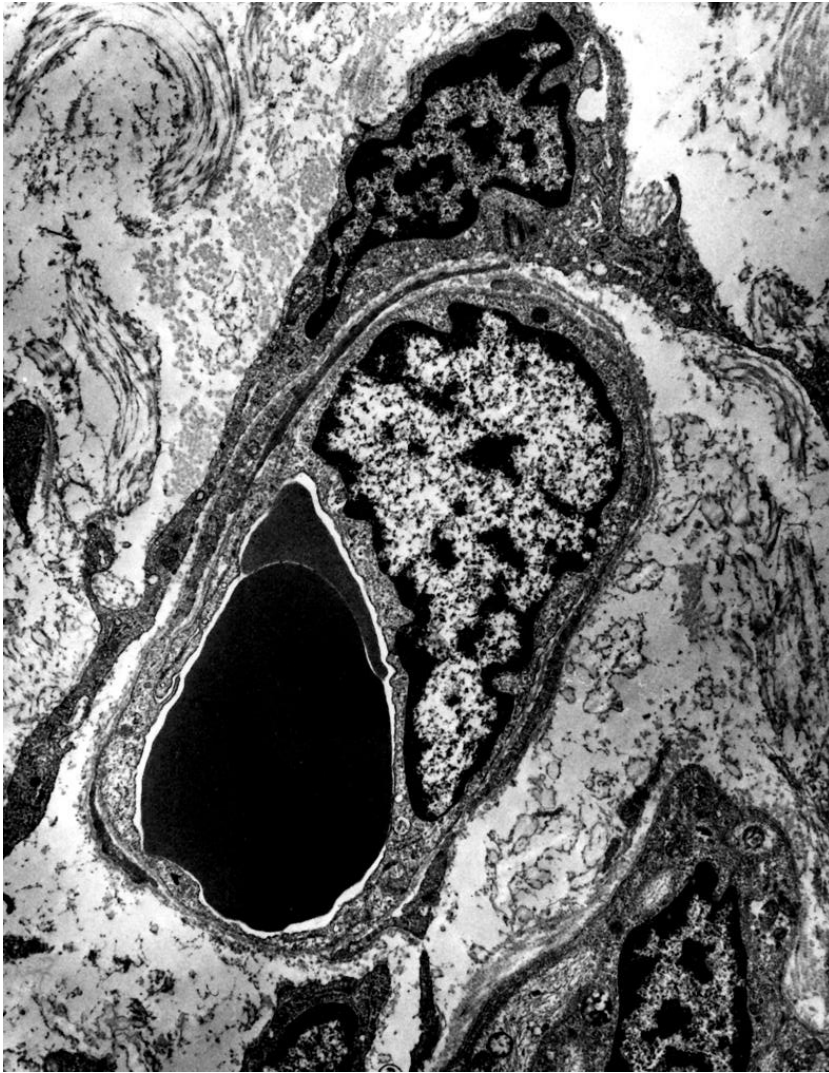


# Посматрање узорака

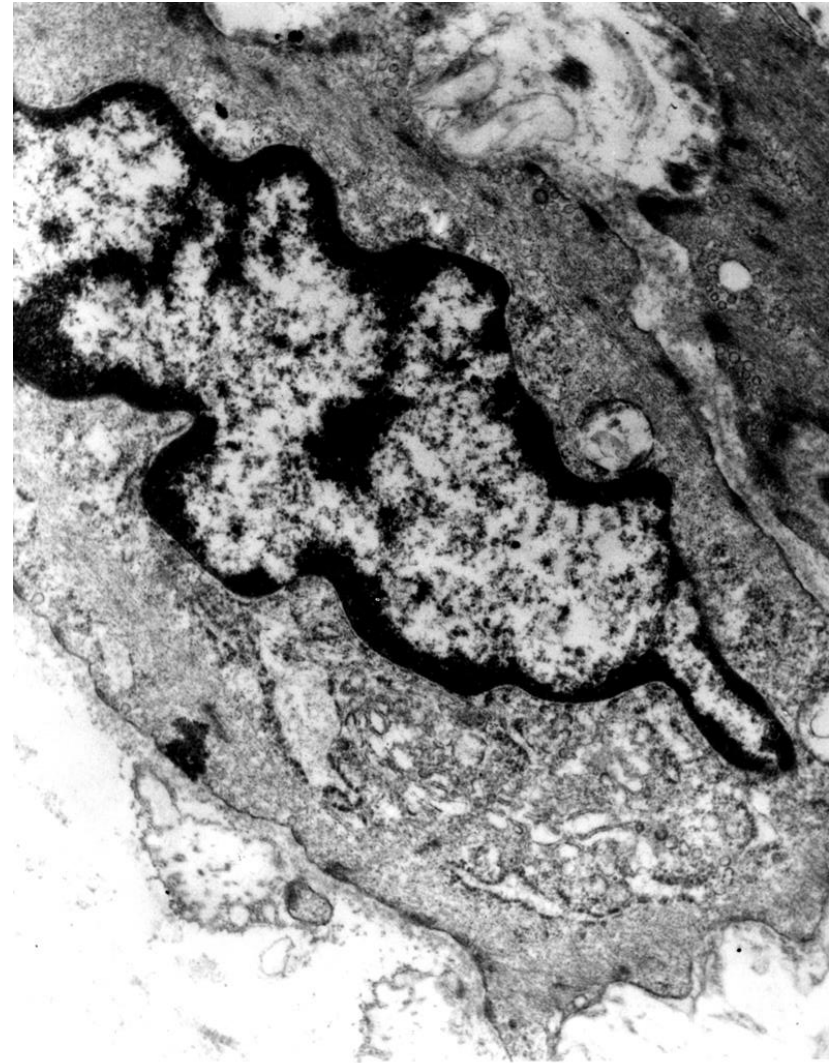
- **Усмерени сноп електрона** пролази кроз узорак и због структуре узорака мења густину.
- Када погоде плочу (превлаку на њој), тамо где је **много електрона** – сјај је јачи и то **место је светло** и обрнуто.
- На тај начин слика створена на екрану представља верни одраз објекта који се посматра јер одражава **разлике у густини различитих делова узорака**.



# Посматрање узорака



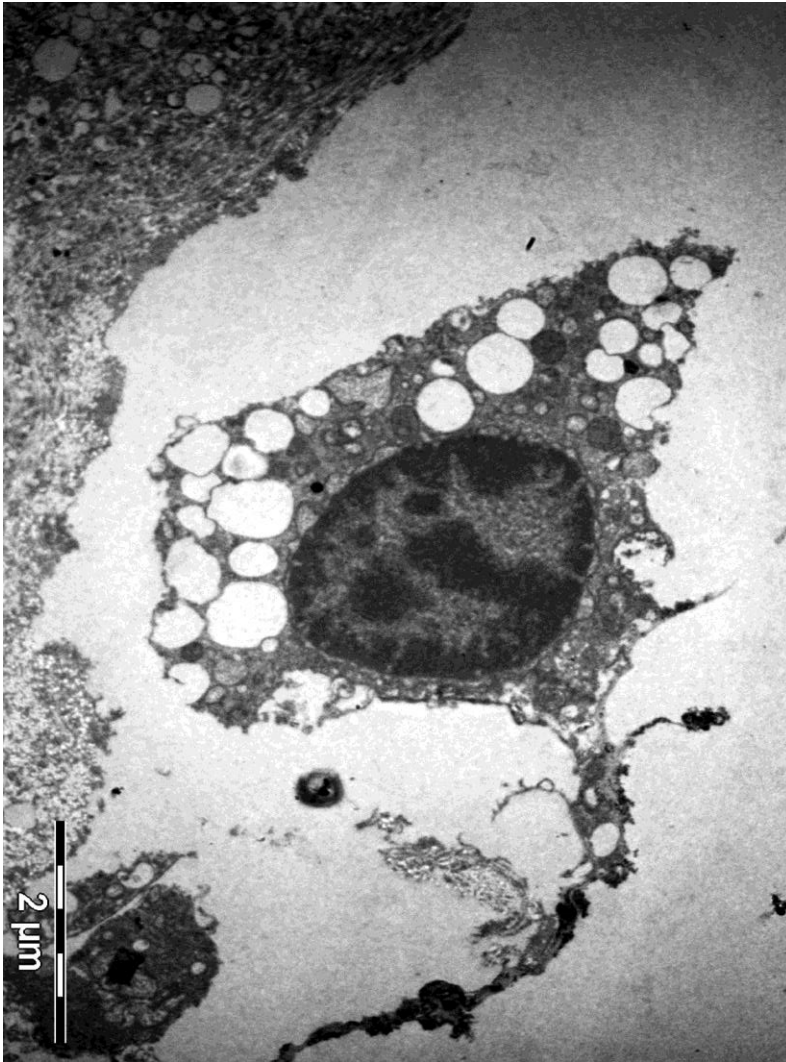
Капилар у адвентицији аорте (ТЕМ, x 8250)  
проф. др Ирена Танасковић



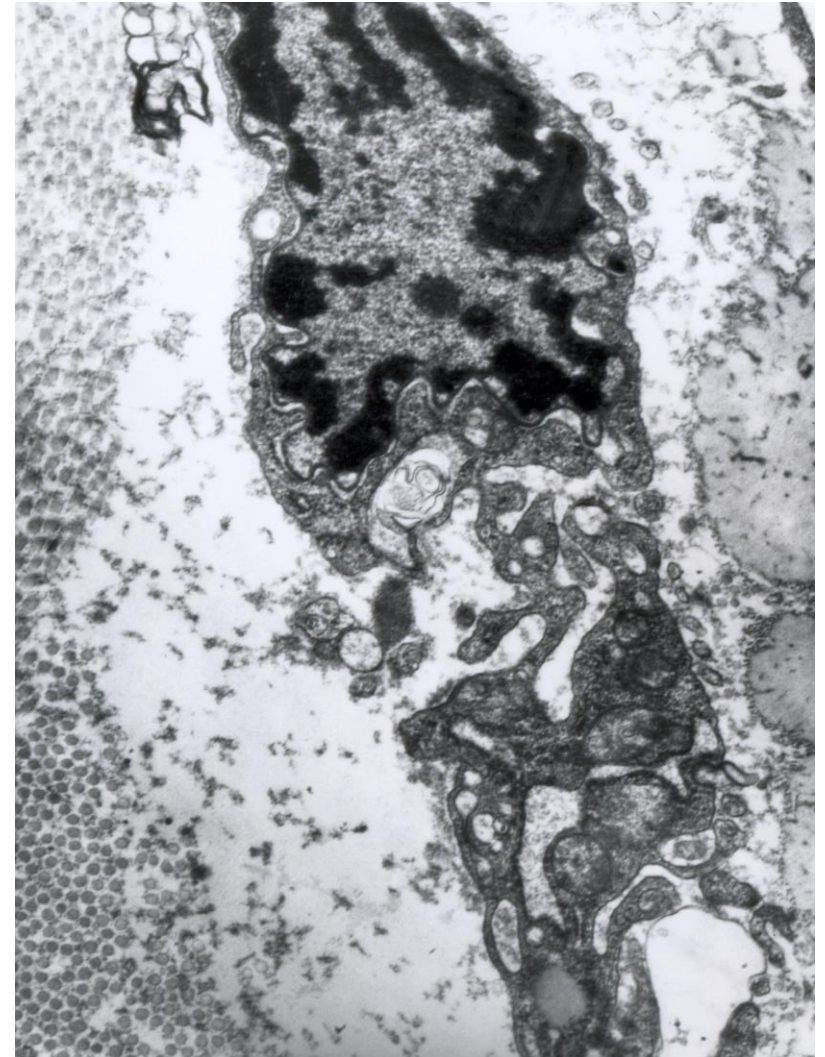
Глатка мишићна ћелија синтетског фенотипа  
(ТЕМ, x 17500) проф. др Ирена Танасковић



# Посматрање узорака



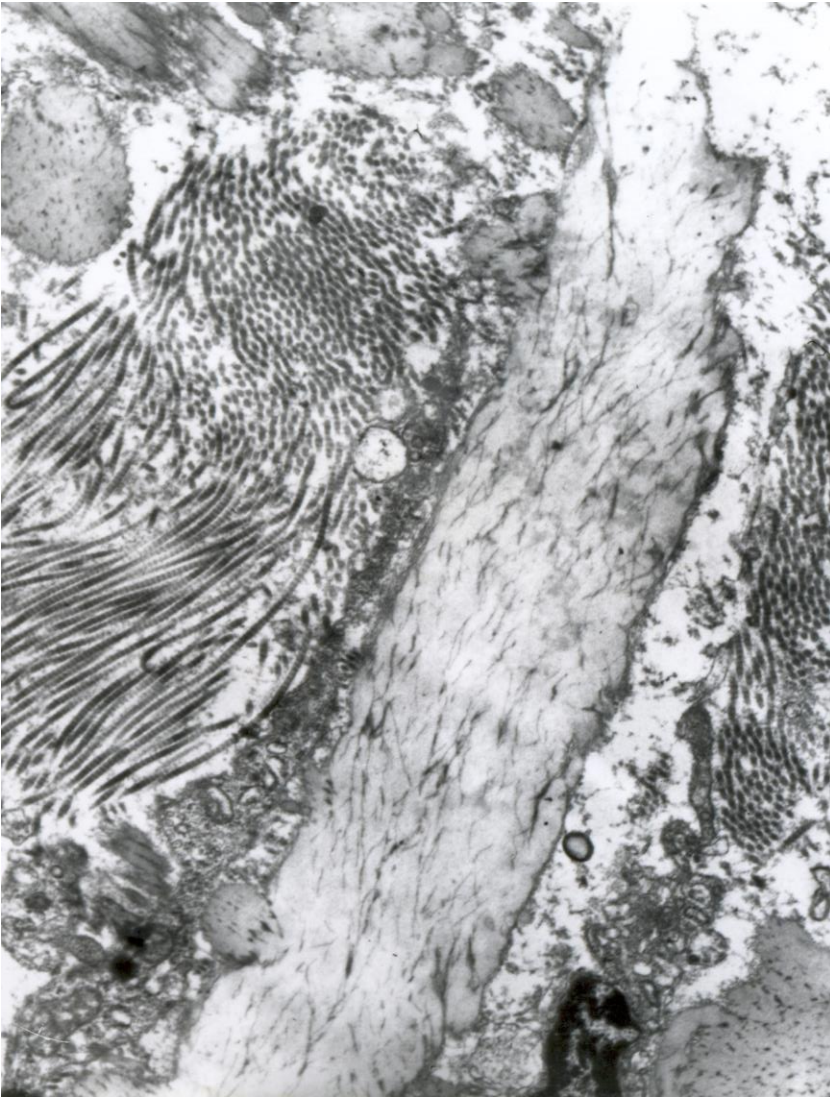
Пенаста ћелија (ТЕМ,  $\times 16875$ )  
проф. др Ирена Танасковић



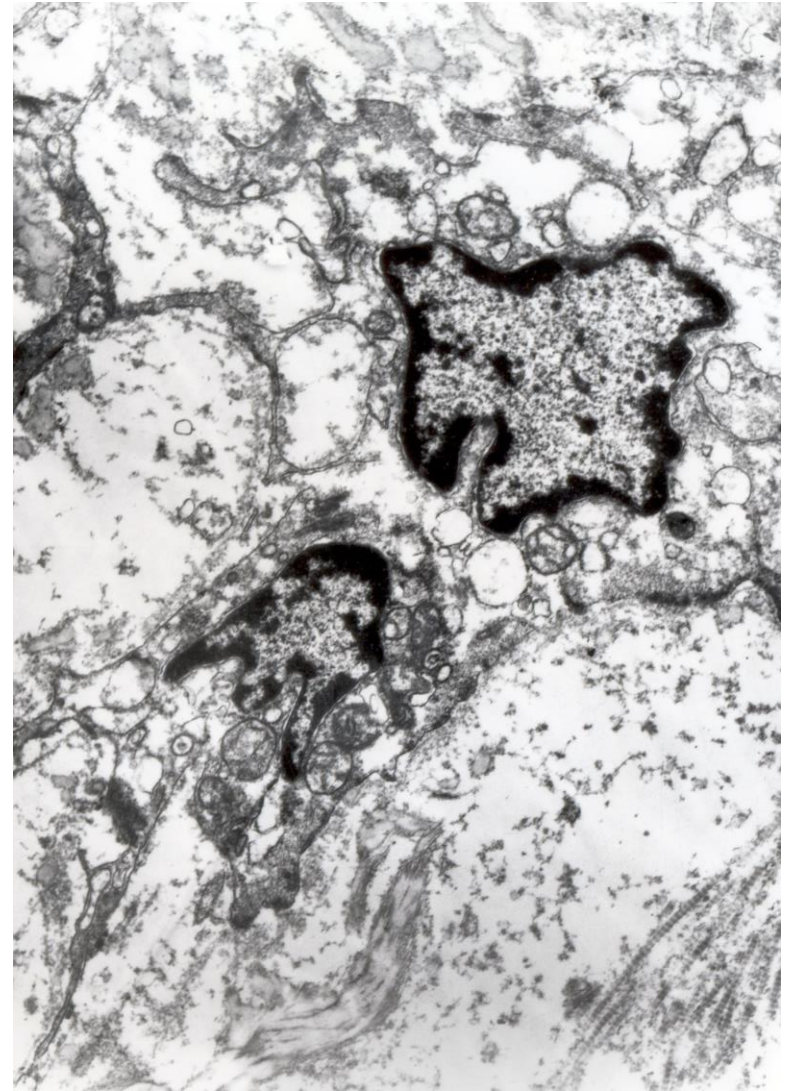
Апоптоза (ТЕМ,  $\times 17500$ )  
проф. др Ирена Танасковић



# Посматрање узорака



Колагена и еластична влакна везивног ткива  
(TEM, x 17500); проф. др Ирена Танасковић



Некроза (TEM, x 8250)  
проф. др Ирена Танасковић

# **Скенирајућа електронска микроскопија (СЕМ)**

# Припрема узорака за СЕМ

- Узорци се припремају **потапањем у ултразвучну каду** у којој је дестилована вода, у трајању од 20 минута.
- Након тога, узорци се суше на температури од 37°C током 24 h.
- Следи **дехидратација** у растућим концентрацијама етанола у трајању од по 20 минута, која се завршава потапањем у 100% етанол у трајању од 1 h.
- Узорци се постављају на **алуминијумске носаче** помоћу специјалне лепљиве траке.



Ултразвучна када. Рударско-геолошки факултет Универзитета у Београду (фотографија из докторске дисертације др Дајане Ного – Живановић, менторство: проф. др Ирена Танасковић)



# Припрема узорка за СЕМ

- Припрема узорка врши се у условима **ниског вакуума**.
- Узорци се у посебном апарату **«напарују» златом** дебљине 20 nm у трајању од 100 s и јачини од 33 mA.
- Танак **филм од тешког метала**
- (платина, злато), напарава се под косим углом тако да се на неким местима више, а на неким мање задржава („**сенчење**“).
- **Реплика узорка** ставља се на површину снажног растварача како би растворио узорак.
- Реплика се затим **испира** и ставља на **бакарну мрежицу** ради испитивања.



Апарат Leica EM SCD005 Sputter Coater . Рударско-геолошки факултет Универзитета у Београду (фотографија из докторске дисертације др Дајане Ного – Живановић, менторство: проф. др Ирена Танасковић)



Скенирајући електронски микроскоп (JEOL-JSM-661 OLV, Токуо, Јапан)  
Рударско-геолошки факултет Универзитета у Београду  
(фотографија из докторске дисертације др Дајане Ного – Живановић, менторство:  
проф. др Ирена Танасковић)

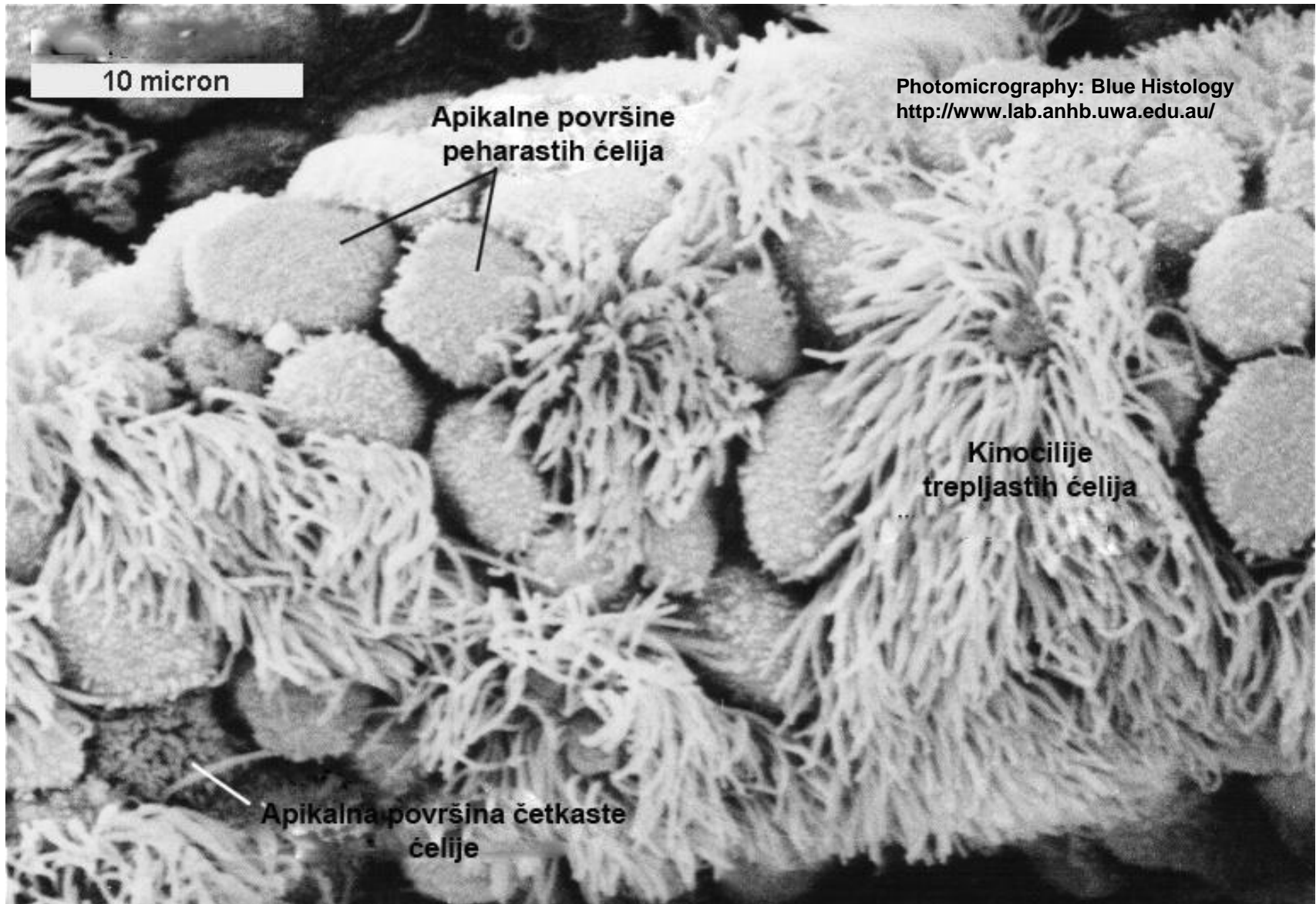
# Скенирајући електронски микроскоп

- Ови микроскопи омогућавају испитивање **површинских структура**, јер стварају **тродимензионалну слику објекта**.
- На врху уређаја је **извор електрона**, танки тунгстенски филамент.
- **Електронски сноп** није статичан, већ се креће преко узорка (скенира га).
- Када електрони погоде узорак, са датог места се ослобађају **секундарни електрони**, који се расејавају са тог места у правцу који зависи од **угла упадног зрака** и топографије **површине узорка**.



Скенирајући електронски микроскоп Рударско-геолошки факултет Универзитета у Београду (фотографија из докторске дисертације др Дајане Ного – Живановић, менторство: проф. др Ирена Танасковић)

# Скенирајући електронски микроскоп



# Извори

- **Танасковић И.** Методологија хистолошких бојења, курс континуиране медицинске едукације (Здравствени савет Србије одлука бр. 153-02-371/2010-02). Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу.
- **Глишић Р, Станковић В.** Теорија и пракса хистолошких техника. Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац, 2017.
- **Ного-Живановић Д.** Електронско-микроскопска анализа утицаја ириганаса на размазни слој и минерални састав дентина канала корена зуба, докторска дисертација. Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац, 2019.
- **Вуковић И.** Имунохистохемијска и ултраструктурна анализа ремоделованог зида аорте. Докторска дисертација. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац, 2006.
- **Вуковић И.** Цитохистолошке и имунохистохемијске карактеристике атеросклеротичних и неатеросклеротичних пролиферација у интими. Магистарска теза. Медицински факултет Универзитета у Београду, Београд, 2003.