

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**HEMATOKSILINO - EOZINO DAŽYMO METODO MODIFIKAVIMAS ELASTINIŲ
SKAIDULŲ VIZUALIZAVIMUI**

Magistrantė ŽIVILĖ ŽUKAUSKAITĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas

doc. dr. Aida Laurinavičienė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

doc.dr. D. Karčiauskaitė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2019 m., Vilnius

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju:

- Valstybinio patologijos centro direktoriui Arvydui Laurinavičiui už galimybę atlikti baigiamąjį darbą šioje įstaigoje;
- Laboratorijos vedėjai bei darbo vadovei doc. dr. Aidai Laurinavičienei už perteiktas profesines žinias bei bendradarbiavimą.
- Gydytojams patologams dr. Justinui Besuspariui, Rokui Stulpinui ir Aušrai Garnelytei už pagalbą ir naujai įgytas žinias.
- Valstybinio patologijos centro kolektyvui už nuoširdų priėmimą ir bendradarbiavimą.

SANTRAUKA

Ši darbo tema yra pasirinkta dėl apsunkintos intraveninės navikų invazijos diagnostikos. Tai vienas iš naviko charakterizavimo bruožų. Norint įvertinti intraveninę naviko invaziją, kraujagyslių vizualizacija yra būtina. Įprastu rutininio hematoksilino – eozino (HE) metodu galima tik itin stambių kraujagyslių identifikacija. Elastinės skaidulos HE metodu nėra specifiskai atskiriamos, tam būtini papildomi dažymo metodai. Atsižvelgiant į tai, šio darbo tikslas: pasiūlyti modifikuotą HE dažymą, pritaikant jį elastinių skaidulų išryškinimui, intraveninės navikų invazijos diagnostikai. Iškelti uždaviniai: išanalizuoti elastinių skaidulų diagnostikos reikšmę; išbandyti įvairius HE ir elastinių skaidulų dažymo metodų derinius, atrenkant tinkamiausią navikų intraveninės invazijos vizualizavimui; pritaikyti pasiūlytą dažymo metodą diagnostiniam darbui ir palyginti su įprastiniu HE dažymo metodu. Pirmiausia atlikta literatūros analizė: išanalizuota intraveninės naviko invazijos diagnostinė reikšmė, surinkti duomenys apie HE ir elastinių skaidulų dažymo metodus. Remiantis surinkta informacija, atlikta 14 eksperimentų. Eksperimentų metu sukurta HE metodo modifikacija (HE_ORs), kuri leidžia maksimaliai išryškinti elastines skaidulas raudona spalva, branduoliai ir citoplazma nusidažo mėlynai, aplinkiniai audiniai - žalsvai, eritrocitai – ryškiai žalia spalva. Šis metodas negali pakeisti įprastojo HE metodo, tačiau papildo jį nauja informacija ir diagnostinėmis galimybėmis. HE_ORs modifikacija naudota tyrimui. Tyrimui pasirinkta 30 atvejų: 10 plaučių ir 20 storosios žarnos fragmentų su naviku. Tiriamieji audiniai paruošti įprasta FFPI technika. Visų tiriamųjų naviko pjūviai papildomai nudažyti HE_ORs modifikacija. Gydytojai patologai įvertino HE ir HE_ORs metodų galimybes išryškinti branduolius, elastines skaidulas ir intraveninę naviko invaziją. Tyrimo metu nustatytas HE metodo pranašumas branduolių vizualizavime: net 96,67 % atvejų branduoliai išryškinti gerai, HE_ORs metodu tik 36,67 %. Elastinių skaidulų vertinime stebimas atvirkštinis rezultatas: HE metodu net 66,67 % atvejų elastinės skaidulos neidentifikuojamos, HE_ORs metodu 76,67 % atvejų stebimas geras vizualizavimas. Intraveninės naviko invazijos vertinime gauti rezultatai įrodė HE metodo informatyvumo ribotumą. Pirmiausia įvertinus HE preparatus, teigiama intraveninė naviko invazija stebima tik 13,33 % atvejų, papildomai įvertinus HE_ORs preparatus - teigiamai įvertinta net 46,67 % atvejų. Gauti rezultatai įrodo HE_ORs metodo diagnostinę vertę intraveninės naviko invazijos diagnostikoje.

SUMMARY

The topic of this Thesis has been chosen due to complicated diagnostics of intravenous tumor invasion, which is one of the tumors characterization features. In order to evaluate intravenous tumor invasion, visualization of blood vessels is necessary. The usual hematoxylin – eosin (H&E) method can only identify large blood vessels. Elastic fibers are not specifically distinguished by the H&E method, which requires additional staining methods. Considering these problems, the aim of this research is to offer a modified H&E staining by adapting it to highlight elastic fibers for diagnostics of intravenous tumor invasion. Main tasks of the research: analyze the significance of elastic fiber diagnostics; try out different combinations of H&E and elastic fibers staining techniques, selecting the most appropriate to visualize intravenous invasion of tumor; apply proposed staining method for diagnostic work and compare results with H&E staining method. Literature analysis was first carried out: the diagnostic value of intravenous tumor invasion was analyzed, data about H&E and elastic fiber staining methods were collected. Based on the information gathered, 14 experiments were performed. The modification of H&E method (H&E_ORS) was developed during the experiments, which allows to highlight the elastic fibers in red color, nuclei and cytoplasm - blue, surrounding tissues – pale green, red blood cells - bright green color. This method cannot replace the usual H&E method but supplements it with new information and diagnostic capabilities. Results obtained: elastic fibers - dark red color, nuclei and cytoplasm - blue, surrounding tissue structures – pale green, red blood cells - bright green. This modification was used for the research. 30 cases were selected for the research: 10 lung and 20 rectum colon fragments with tumor. The test tissues were prepared using the usual FFPI technique. Tumor sections of all subjects were additionally stained with H&E_ORS modification. Pathologists have evaluated the possibilities of H&E and H&E_ORS methods to highlight the nuclei, elastic fibers and intravenous tumor invasion. The study found the superiority of the H&E method in nuclear visualization: in 96.67% of cases, the nuclei were well highlighted with only 36.67% by the H&E_ORS method. Reverse result observed in the evaluation of elastic fibers: 66.67% of cases in the H&E elastic fibers are not identified, good visualization is observed in 76.67% of cases by H&E_ORS method. The results of the intravenous invasion of the tumor have shown the limitations of the informative approach of the H&E method. After evaluating H&E preparations, positive intravenous tumor invasion was observed in only 13.33% of cases, with

additional evaluation of HE_ORS preparations in 46.67% of cases. The results show the diagnostic value of the HE_ORS method in diagnostics of intravenous tumor invasion.

TURINYS

Santrumpos	6
1. ĮVADAS	7
2. LITERATŪROS APŽVALGA	9
2.1. Hematoksilino – eozino dažymo metodas.....	9
2.2. Navikai ir jų invazija.....	10
2.3. Elastinės skaidulos	12
2.4. Elastinių skaidulų dažymo metodai.....	14
2.5. Orseino dažymo metodas	17
3. TYRIMO METODIKA	19
3.1. Tyrimo metodai	19
3.2. Tyrimo eiga	19
3.2.1. Eksperimentai	19
3.3.1.1. HE dažymo modifikacijos su rezorcino fuksino tirpalu	20
3.3.1.2. HE dažymo modifikacijos su Orseino tirpalu.....	24
3.2.2. Tyrimas	35
3.2.2.1. Tyrimo duomenys	35
3.2.2.2. Statistinė analizė.....	36
4. TYRIMO REZULTATAI.....	37
5. TYRIMO REZULTATŲ ANALIZĖ IR APIBENDRINIMAS	40
5.1. Eksperimentų rezultatų apibendrinimas.....	40
5.2. Tyrimo rezultatų apibendrinimas	42
6. IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS.....	44
LITERATŪROS SĄRAŠAS	45

Santrumpos

HE – hematoksilino – eozino dažymo metodas

HE_ORS – hematoksilino - eozino modifikacija

FFPI – formaline fiksuota, parafine impregnuota

LVI – limfovaskulinė invazija

1. ĮVADAS

Šiandieninėje histologijos laboratorijoje esančios tyrimų galimybės pranoksta kiekvieno šios srities pradininko vaizduotę. Mokslininkas Marcello Malpighi buvo pirmasis sugebėjęs atpažinti kraujagyslę. Šiandien pasitelkus dirbtinį intelektą tai gali atlikti kompiuteris. Dar prieš trisdešimt metų audinių dehidratavimas, skaidrinimas ir impregnavimas, buvo atliekami laboratorijos darbuotojo, audinių gabalėlius perkeliant iš vienos talpos į kitą. Šiuolaikinėje modernioje laboratorijoje naudojami automatizuoti audinių apdorojimo procesoriai, kurie greitai ir kokybiškai atlieka savo funkciją bei yra ekologiški. Daugybė inovatyvių technologijų palengvino tyrimų atlikimą, bet tuo pačiu ir daugelis senų metodų yra laikomi auksiniais standartais, kurie metai iš metų yra naudojami ir nepakeičiami. Histochemija yra viena iš sričių, kurioje daugelis laiko patikrintų metodų taikomi kaip rutininiai ar atrankiniai tyrimai. Patologijos ir histologijos laboratorijose pirmo pasirinkimo dažymo metodas – hematoksilino – eozino (HE), pirmą kartą panaudotas ląstelių komponentų išryškinimui 1800 metais. Sukurta daugybė šio dažymo variacijų, tačiau visų jų tikslas - išryškinti ir atskirti informatyviausią ląstelių elementą – branduolį. Nors branduolių vertinimas yra vienas svarbiausių tyrimo etapų, didėjant prieinamos informacijos kiekiui ir žinojimui, išskirti ir kiti diagnostikai būtini audinių elementai bei kriterijai. Navikų diagnostikoje labai svarbu įvertinti intraveninę naviko invaziją. Kraujagyslės identifikacijai būtina sienelėse esančių elastinių skaidulų vizualizacija. Vertinant HE metodu dažytą naviko preparatą, elastinės skaidulos neidentifikuojamos, nes jos kaip ir aplinkinės audinio struktūros nusidažo rožine spalva. Venos sienelėje išryškintas elastinių skaidulų sluoksnis leidžia identifikuoti net itin naviko deformuotas kraujagysles, kurios gali būti nepastebimos HE preparatuose. Elastinių skaidulų vizualizacijai sukurtas ne vienas metodas, tačiau visi turi trūkumų susijusių su dažymo kokybe, trukme ir kaštais. HE metodo ribotas informatyvumas ir elastinių skaidulų išryškinimo metodų trūkumai apsunkina diagnostinį procesą. Šio tiriamojo darbo metu buvo atlikta literatūros analizė, bandymai su įvairiomis metodų variacijomis ir pasiūlyta HE dažymo modifikacija. Šios modifikacijos tikslas - pagerinti diagnostiką, sutrumpinti tyrimo laiką bei sumažinti tyrimo sąnaudas ir kaštus. Modifikacijos diagnostinei reikšmei įvertinti atliktas tyrimas, palyginant dažymo modifikacijos ir HE galimybes išryškinti elastines skaidulas, branduolius bei identifikuoti intraveninę navikų invaziją.

Darbo tikslas: pasiūlyti modifikuotą HE dažymą, pritaikant jį elastinių skaidulų išryškinimui, intraveninės navikų invazijos diagnostikai.

Darbo uždaviniai:

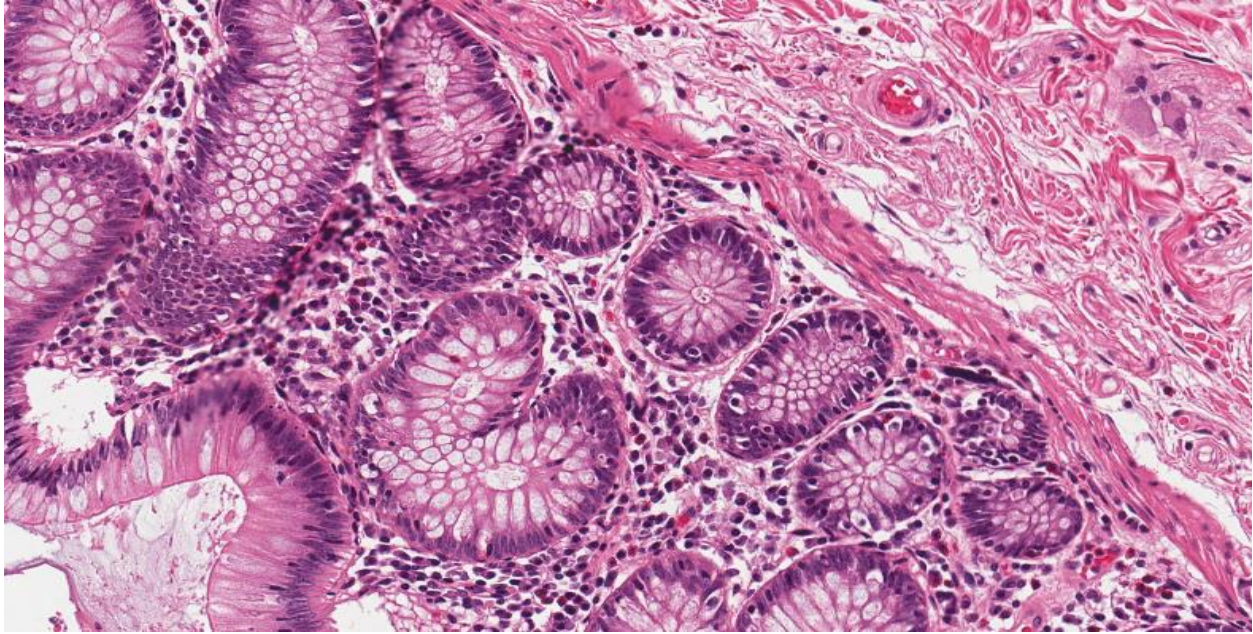
1. Išanalizuoti elastinių skaidulų diagnostikos reikšmę;
2. Išbandyti įvairius HE ir elastinių skaidulų dažymo metodų derinius, atrenkant tinkamiausią navikų intraveninės invazijos vizualizavimui;
3. Pritaikyti pasiūlytą dažymo metodą diagnostiniam darbui ir palyginti su įprastiniu HE dažymo metodu.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Hematoksilino – eozino dažymo metodas

Hematoksilinas atrastas dar XVII amžiuje. Pavadinimas suteiktas pagal medį (*Haematoxylum campechianum*), iš kurio išgaunamas junginys. Tai bespalvis flavanoidas, kuris oksiduojasi į hemateiną, silpną anijoninį dažą. Šiam dažo brandinimui naudojami įvairūs reagentai: natrio jodidas, vandenilio peroksidas, kalio permanganatas ar gyvsidabrio oksidas. Hematoksilinas gali oksiduotis ir esant ilgai sąveikai su ore esančiu deguonimi. Susidaręs hemateinas yra amfoterinis junginys, rūgštiniame pH įgauna raudoną spalvą, šarminiame pH – mėlyną. Dėl silpno dažo afiniškumo sąveikai su audiniu būtina metalo druska, dažniausiai naudojamos aliuminio ar geležies. Šie metalų katijonai sujungia hemateiną su branduolių baltymais, ypač histonų [1].

Nuo hematoksilino dažo atradimo sukurta įvairių metodo modifikacijų: Harris, Dalfield, Mayer, Ehrlich, Gill, Weigert ir kt. Metodai skiriasi ne tik naudojamais reagentais, bet ir gaunamu rezultatu. Kiekviena laboratorija pasirenka jiems optimaliausią metodą, kuris atitiktų diagnostikai būtinus kriterijus. Mayer hematoksilino modifikacija yra viena populiariausių. Šių dažų oksidatorius - natrio jodidas, o fiksatorius - aliuminio sulfatas. Citrinos rūgštis yra naudojama palaikyti tinkamą pH, o kartu su chloro hidratu apsaugo dažą nuo putojimo ir precipitacijos, kuri dažnai pasitaiko gaminant hematoksliną su aliuminio fiksatoriumi. Hematoksilino dažai stipriai sąveikauja su branduolių baltymais, tačiau norint išgauti mėlyną hematoksilino spalvą būtinas šarminis pH, tam naudojamas amonio vanduo. Mėlynai išryškinus branduolius, likęs audinys kontrastuojamas plazmos dažais. Dažniausiai šie dažai yra anijoniniai ar neigiamai įkrauti, todėl sąveikauja su itin katijoninėmis ar teigiamai įkrautomis audinių grupėmis [2]. Stipriausia sąveika vyksta su arginino, histidino ir lizino aminorūgštimis. Populiariausias ir plačiausiai naudojamas - eozinas. Tai rūgštinės spalvos natrio druska, o chromoforas yra anijoninėje molekulės dalyje. Optimaliausias pH šio dažo veikimui nuo 4,6 iki 5. Tinkamai naudojant eozino dažus stebimi trys skirtingi rožiniai atspalviai: eritrocitų, kolageno bei epitelio ir raumeninių ląstelių citoplazmos (1 pav.) [3].



1 pav. Hematoksilino – eozino metodu dažytas storosios žarnos sienelės pjūvis. Branduoliai – mėlyna spalva, likusios audinio struktūros – skirtingais rožiniais atspalviais.

HE dažymo metodas yra rutininis ir kasdien naudojamas visų tipų audiniams, iš kurių didžioji dalis navikiniai. Pasaulio sveikatos organizacijos surinkti duomenys rodo, kad mirštamumas nuo vėžio pasaulyje užima antrąją vietą. Todėl navikų diagnostika ir jos tobulinimas yra viena iš svarbiausių užduočių biomedicinos srityje [4].

2.2. Navikai ir jų invazija

Vėžys – šiuo terminu apibūdinama ligų grupė, kurias sukelia ląsteliniai pokyčiai, verčiantys ląsteles nekontroliuojamai augti, daugintis ir pasiskirstyti. Kai kurie šios ligos tipai sukelia sparčią ląstelių proliferaciją, kiti sulėtina ląstelių dalijimąsi ir augimą [5]. Daugelis organizmo ląstelių turi fiksuotą gyvavimo ir žūties ciklą. Ląstelių mirtis yra normalus procesas, vadinamas apoptoze. Sutrikus ląstelių apoptozės mechanizmui, šios pakeičia savo formą, struktūrą, architektūrą ir funkciją, tampa atipinėmis. Atipinės ląstelės gali formuoti įvairias struktūras – pirminius auglius, kurie dar vadinami piktybiniais navikais. Priklausomai nuo naviko tipo, liga gali progresuoti plisdama į kitus audinius ar organus, tai vadinama metastazavimu [6].

Piktybinių naviko ląstelių augimas ir metastazavimas į tolimesnius audinius ar organus yra naviko progresavimo apraiškos būdai, kurie tarpusavyje labai susiję. Masyvūs metastatiniai pažeidimai sukelia sunkius organų nepakankamumus ar pacientų mirtį. Pirminio naviko invaziją į aplinkinius audinius ir metastatinių židinių formavimąsi sudaro keletas etapų, kurie yra būtini sėkmingam naviko vystymuisi bei tolimesniam progresavimui ir augimui: intravazacija, buvimas ir išlikimas sisteminėje kraujotakoje, ekstravazacija su naviko ląstelių kolonizacija į organus ir kliniškai aptinkamų metastazių formavimas [7]. Naviko augimą lydi padidėjęs spaudimas tarpląstelinės medžiagos struktūroms, tuo tarpu audinių mikroaplinka stengiasi išlaikyti funkcinį – anatomicinį vientisumą didinant spaudimą naviko ląstelėms. Bazinė membrana ir įvairūs aplinkinės stromos komponentai, padidėjęs intersticinis spaudimas, ribotas deguonies tiekimas naviko ląstelėms ir aktyvių deguonies formų susidarymas, hipoksijos sąlygos ir nuolatinis imuninės sistemos ląstelių poveikis riboja piktybinių navikų augimą [8]. Navikai gali būti labai heterogeniški. Vienos ląstelės, dėl paminėtų veiksnių, gali regresuoti ir jas išstinka mirtis, kitos kovoja su augimą ribojančiais veiksniais, taip įgauna agresyvų fenotipą ir galimybę progresuoti bei metastazuoti. Piktybinių ląstelių atsiskyrimas nuo naviko masės, dėl sumažėjusio intraląstelinio adhezijos molekulių kiekio ar visiško jų praradimo, suteikia navikui galimybę invazyviai augti. Todėl ląstelės įgyja itin didelį judrumą, kuris leidžia prasiskverbti per tvirtus supančios stromos struktūrinius elementus [9].

Yra žinoma, kad naviko ląstelės, plintančios į aplinkinius audinius ir tolimesnius organus, kopijuoja sveikų, ne piktybinių ląstelių mechanizmus ir migracijos tipus fiziologiniuose procesuose. Piktybinės ląstelės, kurios panašios į sveikas ląsteles, sugeba aktyvuoti mechanizmus, kurie pakeičia ląstelės formą, sukuria sąlygas judėti, pertvarko aplinkinius audinius taip, kad susiformuotų migracijos keliai. Tačiau jos neturi fiziologinių sustojimo signalų šiems procesams. Tai yra pagrindinis skirtumas nuo sveikų ląstelių. Manoma, kad tai sukelia migracijos mechanizmų kūrimą ir skatina naviko progresavimą bei plitimą [10]. Piktybinės ląstelės naudoja genetines programas, kurios lemia invazyvų augimą ir metastazių galimybę. Pavyzdžiui, leukocitų judėjimas yra stebimas embriono vystymosi ir uždegimo laikotarpiu [11]. Panašus sklaidos mechanizmas būdingas piktybinėms ląstelėms, navikui progresuojant ir metastazuojant. Taip pat kaip keliauja viena ląstelė, gali keliauti ir tvirtai sujungtų naviko ląstelių grupės, tai vadinama kolektyvine ląstelių migracija. Šis migracijos tipas indukuoja audinių persitvarkymą, taip piktybinės ląstelės plačiai naudoja šį mechanizmą invazijos ir metastazavimo procesuose [9].

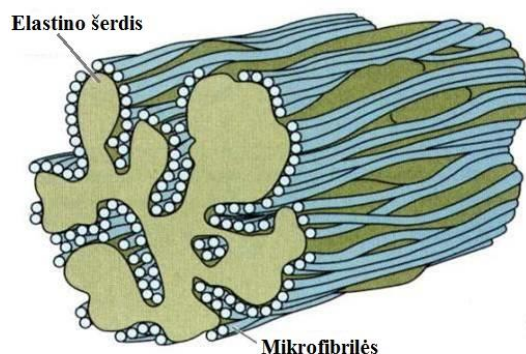
Krūties, endometriumo, prostatos, kolorektalinio vėžio, nesmulkiųjų ląstelių plaučių karcinomos, raudomiosarkomos, melanomos ir plokščiųjų ląstelių karcinomos atvejais yra stebima kolektyvinė ląstelių migracija. Dalis piktybinių ląstelių atsiskiria nuo naviko masės, prasiskverbia į aplinkinius audinius ir suformuoja trumpas juostas, klasterius ir plačias sritis. Taip pat suformuoja įvairias struktūras kraujagyslės spindyje, tai atspindi daugybės struktūrinių elementų dalyvavimą naviko invazijoje [12]. Judanti ląstelių grupė turi dvi pagrindines dalis: pirmaujančią ir sekančią. Pirmaujančios ląstelės dažniausiai panašios į mezinchimines ląsteles, turi silpnai išreikštą struktūrinę organizaciją, o sekančios ląstelės yra linkusios glaudžiau susijungti, formuoti tubulines struktūras su glaudžiu intraląsteliniais ryšiais. Pirmaujančios ląstelės suformuoja išaugas ir naudoja integrinus susijungimui su citoskeleto aktino filamentais, sukelia ekstraląstelinio užpildo proteolitinį skaidymą, taip sukuriama erdvė naviko invazijai [9].

Navikų klasifikacija yra sudėtinga ir kiekvienam atvejui individuali. Priklausomai nuo naviko lokalizacijos, struktūros, architektūros, plitimo ir kitų parametru, nustatomas vėžio tipas. Vienas pagrindinių naviko įvertinimų - TNM klasifikacija. TNM koduoja trijų žymenų vertinimą: T – įvertinamas naviko dydis ir aplinka, N - metastazės regioniniuose limfmazgiuose, M – tolimosios metastazės kituose audiniuose ar organuose. Taip pat įvertinamas histologinis laipsnis: GX – diferenciacijos laipsnio negalima įvertinti, G1 – gerai diferencijuotas, G2 – vidutiniškai diferencijuotas, G3 – blogai diferencijuotas, G4 – nediferencijuojamas. Taip pat labai svarbus ir limfovaskulinės invazijos (LVI) įvertinimas: 0 – limfovaskulinės invazijos nėra arba neidentifikuojama, 1 – stebima limfovaskulinė invazija, specifiskai neišskiriama, 2 – stebima tik limfinės sistemos ir smulkiųjų kraujagyslių invazija, 3 – stebima tik intraveninė invazija, 4 – stebima limfovaskulinė (limfinės sistemos, smulkiųjų kraujagyslių ir venų) invazija, 9 – limfovaskulinės invazijos negalima įvertinti [13,14]. Intraveninės navikų invazijos identifikavimui yra būtina venų vizualizacija. Visų kraujagyslių, taip pat ir venų, sienelėse yra elastinių skaidulų sluoksnis.

2.3. Elastinės skaidulos

Tai ekstraląstelinėje jungiamojo audinio dalyje esantis baltymų pluoštas, sudarytas iš baltymo elastino šerdies, kuris apsuktas mikrofibrilėmis (7 pav.). Elastinas yra gausiausias elastinių skaidulų baltymas, sudarantis net 90 % subrendusio pluošto. Šį baltymą koduoja genas esantis 7 chromosomos q11.2 srityje. Fibroblastai, lygiųjų raumenų ląstelės bei ausies kaušelio chondrocitai

sekretuoja tirpų šio baltymo pirmtaką tropoelastiną [15]. Tropoelastino molekulės susijungia desmozino skersiniais ryšiais. Tropoelastiną sudaro viena polipeptidinė grandinė, kurios konformacija yra netvarkinga spiralė. Elastine yra daug desmozino skersinių ryšių, todėl subrendęs elastinas yra netirpus ir ypač stabilus. Desmozino skersiniai ryšiai susidaro, kovalentiškai jungiantis vienos lizino molekulės liekanos aminogrupei su trimis alizino molekulių liekanomis, centre susidarant pirimidino žiedui. Dažniausiai tokiais skersiniais ryšiais sujungiamos keturios polipeptidinės grandinės, rečiau – dvi. Keturios polipeptidinės grandinės, sujungtos tarpusavyje, sudaro elastino monomerus, kurie toliau jungiasi desmozino skersiniais ryšiais [16].



7 pav. Elastinės skaidulos struktūra

Mikrofibrilės sudarytos iš trijų skirtingų fibrilino baltymų. Fibrilinai yra 350 kDa glikoproteinai, kuriuos koduoja trys skirtingi genai (fibrilina 1-3). Fibriliną 1 koduoja genas esantis 15 chromosomos q21.1 srityje. Šis fibrilinas yra gausiausias ir ekspresuojamas nuolatos, nes yra būtinas mikrofibrilių homeostazei. Kai tuo tarpu fibrilinas 2 (koduoja genas esantis 5 chromosomos q23-q31 srityje) ir fibrilinas 3 (koduoja genas esantis 19 chromosomos p3 srityje) ekspresuojami tik vystymosi metu. Visų trijų fibrilino ekspresija pasireiškia kraujagyslių, kremzlių, kaulų ir plaučių vystymosi procese. Tačiau stebima ir audiniui specifinė ekspresija: fibrilinas 1 – dermoje, fibrilinas 2 – periferiniuose nervuose, fibrilinas 3 – kremzlėse, perichondriume bei besivystančiuose bronchuose [17].

Subrendusių elastinių skaidulų architektūra yra sudėtinga ir audiniui specifinė, tai atsispindi jų funkcijose skirtinguose audiniuose. Elastinių skaidulų pluoštas, kurį atskiria lygiųjų raumenų

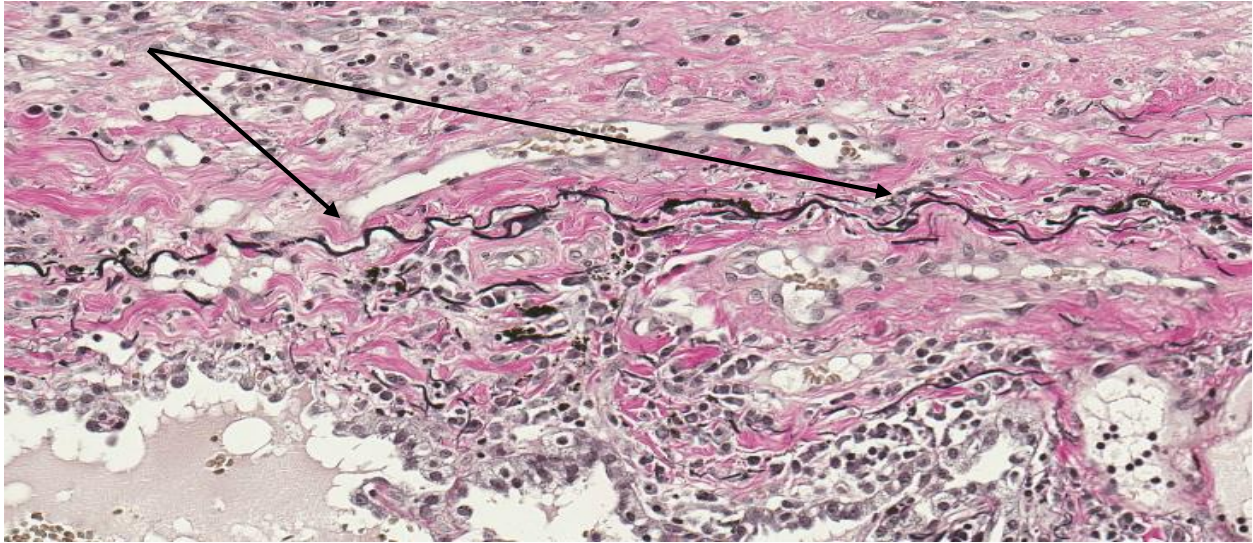
ląstelės, medialiniame aortų ir arterijų sluoksnyje suteikia šioms kraujagyslėms elastingumo ir atsparumo. Plaučiuose elastinės skaidulos sutinkamos ne tik kraujagyslių sienelėse, bet ir alveolėse, tai padeda plaučiams atlikti kvėpavimo funkciją. Taip pat šios skaidulos išsidėsto odoje, retikulinėje dermoje, horizontaliai suformuodamos storą sluoksnį, ausies kaušelio kremzlėje plonas pluoštas įsiterpia tarp kolageno skaidulų, lanksčiuose raiščiuose yra nemažas kiekis elastinių skaidulų, tačiau labai mažas kiekis sausgyslėse [16].

Žmogui senstant, sensta ir elastinės skaidulos, todėl pasireiškia fiziniai ir biocheminiai pokyčiai. Stebimi skaidulų plyšimai, fragmentacija ar praradimas. Šie pakitimai gali sukelti patologines būkles, tokias kaip aortų aneurizmos, plaučių emfizema, degeneraciniai odos pokyčiai [18]. Nenormali elastinių skaidulų fiziologija stebima ir esant paveldimoms jungiamojo audinio ligoms. Fibrilino 1 mutacijos lemia Marfano sindromą, kuris pasireiškia širdies ir kraujagyslių sistemos, akių ir skeleto defektais. Fibrilino 2 mutacijos sukelia įgimtą sutartinę arachnodaktiką, kurios simptomai pasireiškia akyse ir skeleto sistemoje. Elastino mutacijos sukelia Williams sindromą, supravaliulinę stenozę ir cutis laxa [16].

Hematoksilino – eozino dažymas specifiskai negeba išryškinti elastinių skaidulų, jų vizualizacijai naudojami kiti specifiniai dažymai: Van Gieson elastikai, Verhoeff elastikai, Russell Movat pentachrome ir kt.

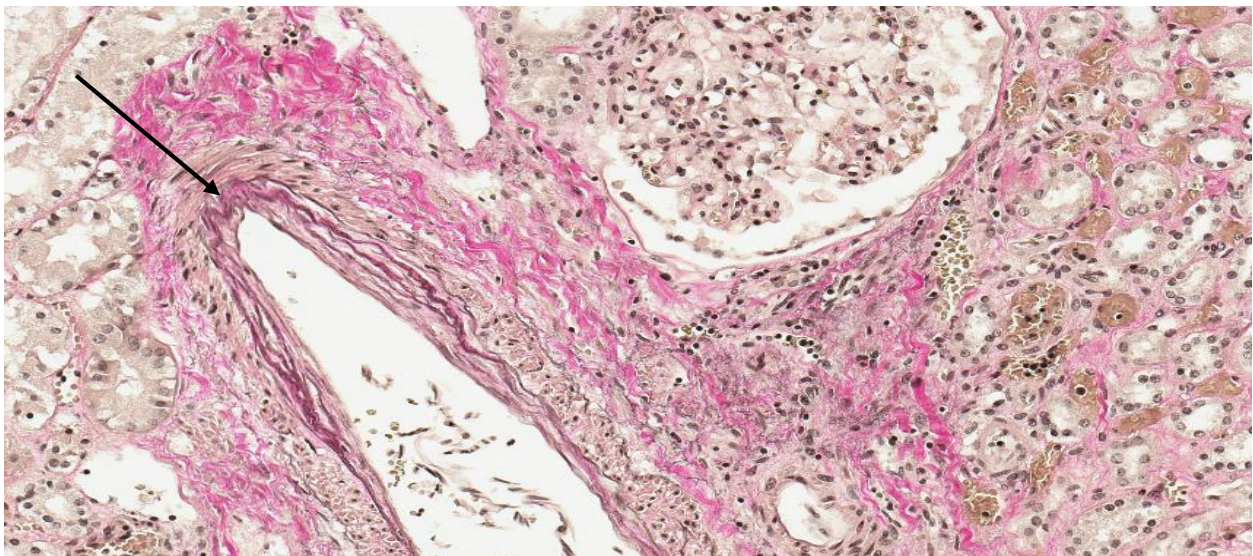
2.4. Elastinių skaidulų dažymo metodai

Verhoeff elastikai metodas paremtas labai dideliu elastinių skaidulų afiniškumu geležies hematokslinui. Tikslus elastinių skaidulų susijungimas su hematokslinu nėra nustatytas. Manoma, kad sąveika paremta vandenilinių ryšių susidarymu. Diferenciacijai naudojamas geležies chloridas, kuris pašalina geležies hematoksilino perteklių iš aplinkinių audinio struktūrų, tačiau branduoliai ir elastinės skaidulos išlieka juodos spalvos (2 pav.). Geležies hematoksilino tirpalas savo sudėtyje turi jodo, kurio perteklius pašalinamas naudojant natrio tiosulfatą. Kontrastui suteikti dažniausiai naudojamas pikrofuksino tirpalas, kuris suteikia kolagenui raudoną atspalvį, kitiems audinio elementams – geltoną. Šis metodas yra regresyvus, nes reikalauja perteklinio audinio dažymo ir diferenciacijos. Diferenciacija labai priklauso nuo audinio kilmės, paruošimo ir pjūvio storio, todėl tai yra vienas iš šio metodo trūkumų [19].



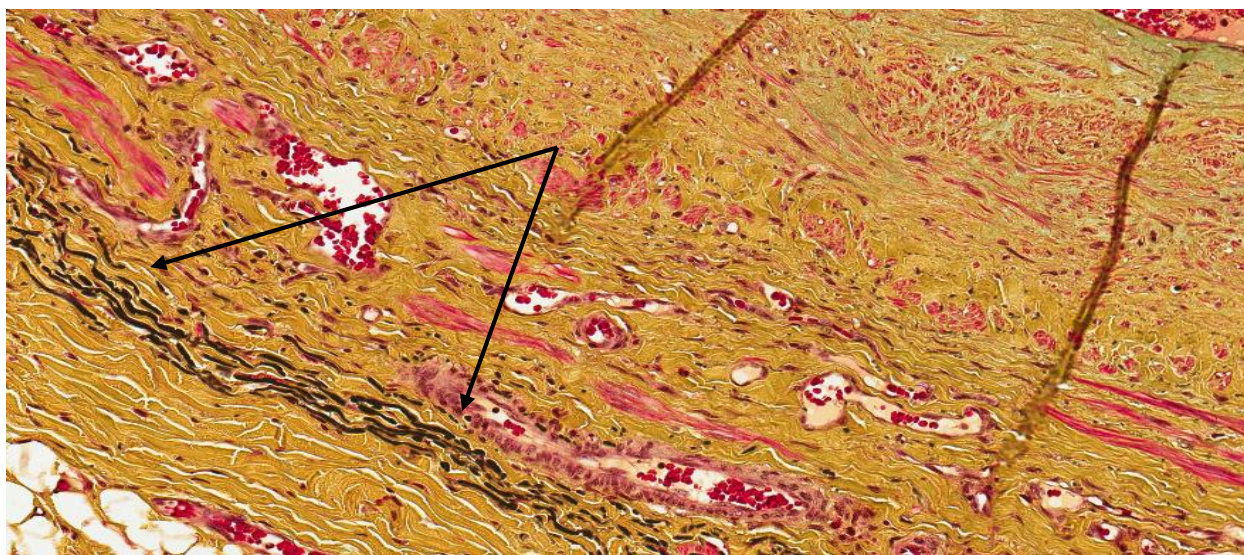
2 pav. Verhoeff elastikai dažymo metodu vizualizuotas pleuros elastinių skaidulų sluoksnis. Elastinės skaidulos ir branduoliai – juodos spalvos.

Van Gieson elastikai metodo principas labai panašus į Verhoeff. Pagrindinis šių metodų skirtumas – hematoksilinas. Pirmiausia audinys paveikiamas rezorcino fuksinio tirpalu, kuris sudaro kompleksus su elastinėms skaidulomis. Prie šių kompleksų jungiasi Weigert geležies hematoksilinas, kuris suteikia elastinėms skaiduloms pilkšvai juodą spalvą, o branduoliams juodą spalvą. Kontrastavimas taip pat atliekamas naudojant pikrofuksinio tirpalą [20].



3 pav. Van Gieson elastikai metodu dažytas inkstų audinio pjūvis. Elastinės skaidulos – pilkšvai juoda spalva, branduoliai – juoda spalva.

Vienas iš rečiausiai naudojamų metodų – Russell Movat Pentachrome. Šis dažymas reikalauja daug kaštų, laiko ir technologo patirties, tačiau gaunami rezultatai atitinkamai labai geri. Dažymo pavadinimas nurodo, kad išgaunamas net penkių spalvų spektras. Elastinių skaidulų išryškinimo principas paremtas Verhoeff metodu [3], elastinės skaidulos išryškinamos juoda spalva (4 pav.).

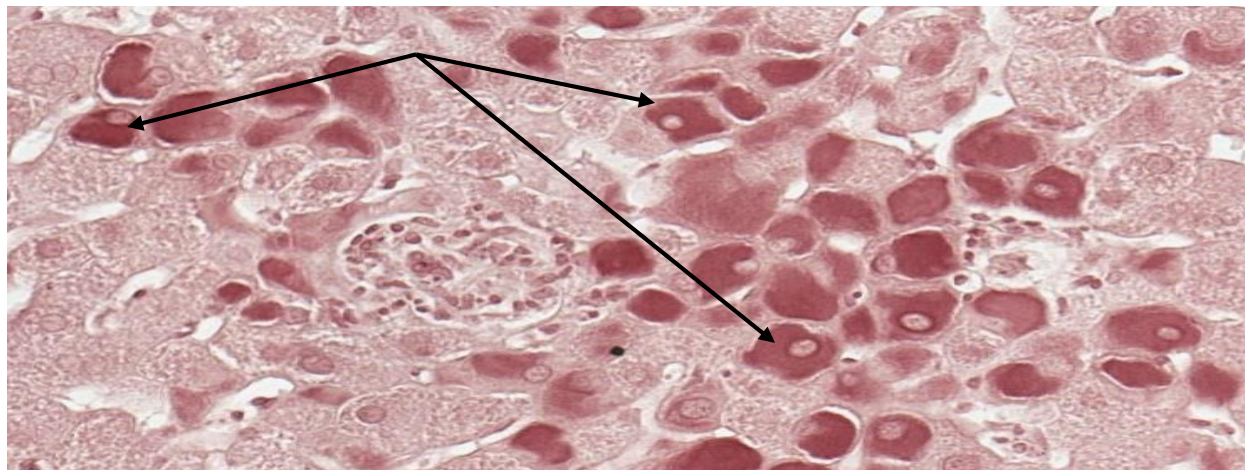


4 pav. Russell Movat Pentachrome metodu dažytas arterijos sienelės pjūvis, elastinės skaidulos – juoda spalva.

Šiuose trijuose metoduose elastinių skaidulų vizualizavimui naudojama jų sąveika su geležies hematoksilinu. Visi metodai turi du pagrindinius trūkumus: dėl geležies hematoksilino nestabilumo, tirpalai turi būti ruošiami *ex tempore*, tai apsunkina preparato gamybą dėl laiko sąnaudų ir kaštų; dažnai stebimas prastas dažo pasisavinimas bei jo pertekliaus pašalinimas iš aplinkinių audinių, todėl stebimas fonuojantis dažymas, sunku įvertinti branduolius ir kitas aplinkines audinio struktūras. Kai kuriose laboratorijose elastinių skaidulų išryškinimui naudojamas Orseino dažymo metodas, kurio principas nėra paremtas elastinių skaidulų ir geležies hematoksilino sąveika. [20].

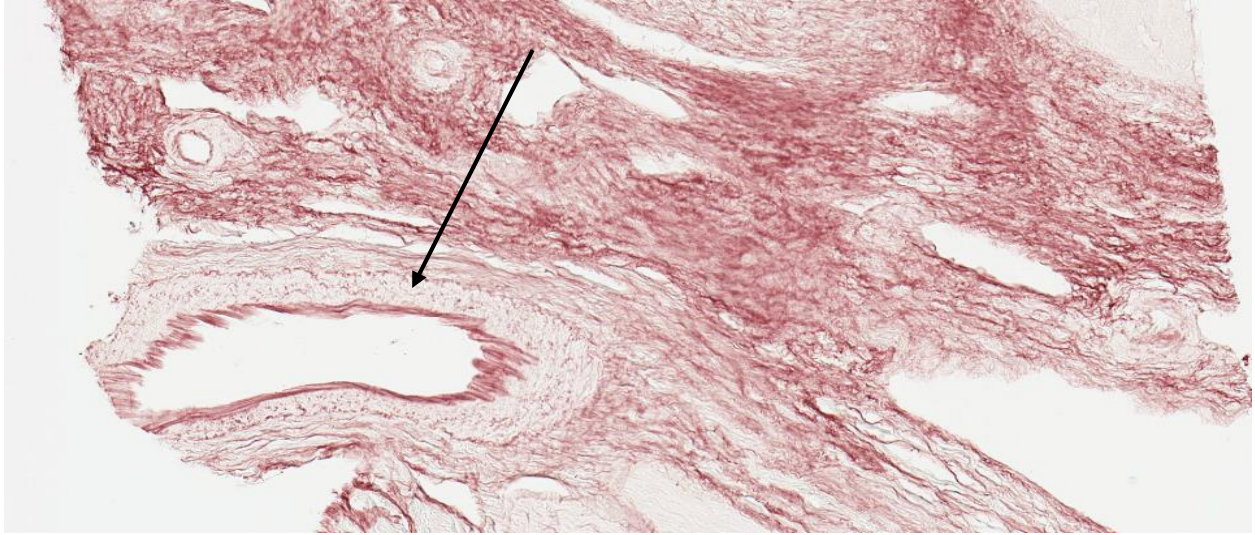
2.5. Orseino dažymo metodas

Orseinas histochemijoje pirmą kartą panaudotas 1950 metais, iš kerpių išskirtą orcinolį paveikus amoniaku. Tiksliai šio dažo struktūra ilgą laiką nebuvo atrasta. Nustačius cheminę formulę $C_{28}H_{24}N_2O_7$, pradėta sintetinio orseino gamyba. Tai hidroksiorseino, aminoorseino ir aminoorseiniminų mišinys [21]. Populiariausias dažymo metodas, kuriam naudojamas orseinas - Shikata modifikacija. Pirmiausia audinys yra oksiduojamas rūgščiu kalio permanganatu, perteklius pašalinamas oksalo rūgštimi. Oksiduotas audinys stipriau sąveikauja su orseino dažais. Šis dažymas vizualizuoja ne tik elastines skaidulas, bet ir su variu susijusius baltymus, sulfatuotus mucinus bei hepatito B viruso paviršiaus antigenus (HbsAg). Dažniausiai šis dažymo metodas naudojamas hepatito B diagnostikai. Hepatocituose stebimi citoplazmos intarpai, kurie nusidažo rausvai ruda spalva (5 pav.) [22].



5 pav. Orseino dažymo metodu išryškinti HBsAg kepenų bioplate

Elastinių skaidulų sąveika su orseinu vis dar nėra aiški. Manoma, kad susidaro elektrostatinis ryšys, kuris tikrai nėra joninio tipo. Elastinės skaidulos, kaip ir HbsAg, nusidažo rausvai ruda spalva, aplinkinės struktūros šviesiai rausva (6 pav.) [23]. Visos vizualizuotos audinio struktūros yra panašaus atspalvio, nes šis dažymas neturi kontrastavimo etapo, tai apsunkina pačių elastinių skaidulų identifikavimą, ypač esant mažiems elastinių skaidulų kiekams ir ploniems pluoštams.



6 pav. Orseino dažymo metodu rausvai ruda spalva išryškintos elastinės skaidulos kepenų bioptate

Atsižvelgiant į aptartų elastinių skaidulų vizualizavimo metodų trūkumus, šio darbo tyrimui pasirinkta modifikuoti HE dažymo metodą siekiant išryškinti elastines skaidulas ir pritaikyti metodą intraveninės navikų invazijos diagnostikai.

3. TYRIMO METODIKA

3.1. Tyrimo metodai

Literatūros apžvalga. Išnagrinėta literatūra apie HE dažymo metodą, elastinėms skaiduloms vizualizuoti naudojamus dažymo metodus ir intraveninės naviko invazijos diagnostikos reikšmę.

Ekperimentai. Šis metodas taikytas norint modifikuoti šiuo metu praktikoje naudojamam Hematoksilino - eozino dažymo metodui, suteikiant jam savybę išryškinti elastines skaidulas.

Ekperimento metu sukurto metodo HE_OR5 ir HE įvertinimų rezultatų statistinė analizė. Šis metodas pasirinktas norint įsitikinti naujo dažymo stabilumu ir diagnostine reikšme.

3.2. Tyrimo eiga

Tyrimas buvo atliktas Valstybiniame patologijos centre nuo 2018 m. sausio 2 d. iki 2019 m. gegužės 3 d. Patologijos technologijų laboratorijoje buvo suteiktos visos galimybės kokybiškam tyrimo atlikimui bei rezultatų vertinimui.

3.2.1. Ekperimentai

Ekperimentams atlikti tiriamąja medžiaga parinkti kontroliniai storosios žarnos ir plaučių navikų mikropjūviai. Audinių mikropjūviai paruošti įprasta FFPI (formaline fiksuota, parafine impregnuota) technika. Atlikta 14 skirtingų dažymo variacijų. Visi mikropjūviai prieš ekperimentus deparafinizuoti pagal Valstybiniame patologijos centre taikomą procedūrą (1 lentelė). Bandymų metu pagaminti preparatai vertinti kartu su gydytoju patologu.

1 lentelė. Valstybinio patologijos centro deparafinizacijos procedūra

Eil. Nr.	Reagentas	Laikas
1.	Mikropjūvių džiovinimas 60°C temperatūros termostate	20 min.
2.	Ksilenas	2 min.
3.	Ksilenas	2 min.
4.	Ksilenas	2 min.
5.	Izopropilo alkoholis	1 min. 20 s.
6.	Izopropilo alkoholis	1 min. 20 s.
7.	Izopropilo alkoholis	1 min. 20 s.
8.	96% etilo alkoholis	1 min. 20 s.
9.	Distiliuotas vanduo	Skalauti

Bandymais buvo siekiama HE dažymo metodą modifikuoti, suteikiant galimybę išryškinti elastines skaidulas ir išlaikyti HE dažymo metodo savybes.

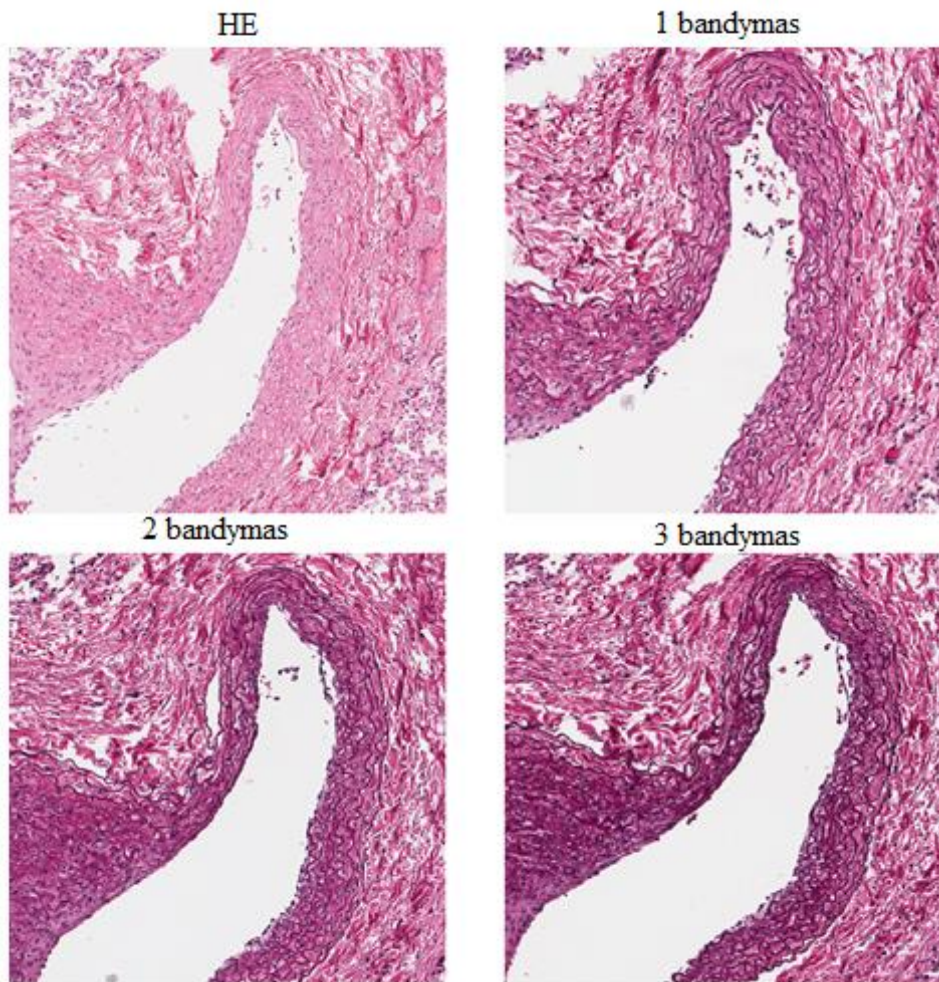
3.3.1.1. HE dažymo modifikacijos su rezorcino fuksino tirpalu

Rezorcino fuksino tirpalas buvo panaudotas 4 bandymuose. Pirmi trys bandymai atlikti su skirtingais šio tirpalo išlaikymais – 5, 2, ir 1 minutę (2 lentelė). Rezultatai lyginti su HE metodu dažytu kontroliniu pjūviu.

2 lentelė 1, 2, 3 bandymų procedūros, HE dažymo modifikacijos su rezorcino fuksino tirpalu

Eil. Nr.	Reagentas	1 bandymas	2 bandymas	3 bandymas
1.	Filtruotas rezorcino fuksino tirpalas	1 min.	2 min.	5 min.
2.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti		
3.	Rūgštus alkoholis	Diferencijuoti 1-2 s.		
4.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.		
5.	Mejerio hematoksilinas	5 min.		
6.	0,1% Amonio vanduo	1 min.		
7.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.		
8.	96% etilo alkoholis	Skalauti		
9.	Eozino tirpalas (alkoholinis)	1 min.		
10.	96 % etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas	Skalauti		

Visų bandymų rezultatuose stebimas elastinių skaidulų išryškėjimas nuo šviesiai iki tamsiai violetinės spalvos. Tačiau rezorcino fuksino tirpalas sumažina HE dažymo specifiškumą: stebimi hiperbazofiliniai branduoliai, citoplazma varijuoja nuo itin ryškios rožinės iki šviesiai violetinės, stebimas silpnas kontrastingumas tarp bazofilinių ir eozinofilinių struktūrų, eritrocitai itin ryškios raudonos spalvos. Esant intensyvesniam violetinės spalvos ekspresyvumui aplinkinėse audinio struktūrose, mažėja ir elastinių skaidulų išsiskyrimas (8 pav.).



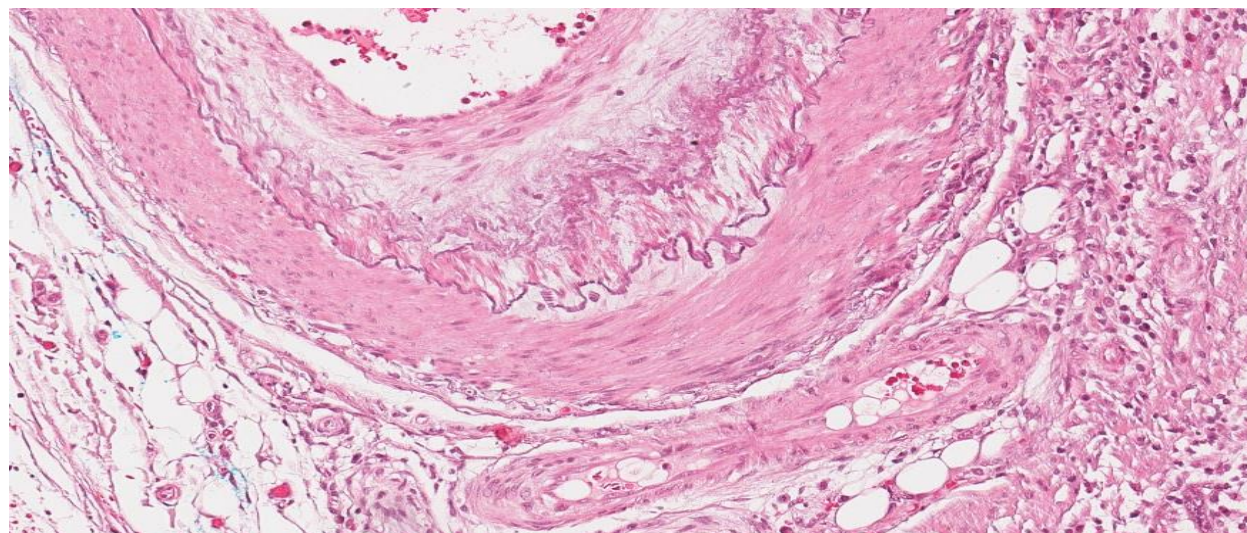
8 pav. HE dažymo modifikacijos su rezorcino fuksino tirpalu

Įsitikinti, kad rezorcino fuksinas nėra tinkamas HE modifikacijai, atliktas dar vienas bandymas. Atvirkštinis variantas, pirmiausia naudojant hematoksiliną, jį išryškinus amonio vandeniui ir paveikiant audinį rezorcino fuksinu (3 lentelė).

3 lentelė. 4 bandymo procedūra, atvirkštinė HE modifikacija su rezorcino fuksino tirpalu

Eil. Nr.	Reagentas	4 bandymas
1.	Mejerio hematoksilinas	5 min.
2.	0,1% Amonio vanduo	1 min.
3.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.
4.	Filtruotas rezorcino fuksino tirpalas	1 min.
5.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti
6.	Rūgštus alkoholis	Diferencijuoti 1-2 s.
7.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.
8.	96% etilo alkoholis	Skalauti
9.	Eozino tirpalas (alkoholinis)	1 min.
10.	96 % etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas	Skalauti

4 bandymo rezultatai labai neinformatyvūs, elastinės skaidulos išryškintos šviesiai violetine spalva tik stambiose kraujagyslėse, kuriose jų gausu, tačiau smulkesnėse kraujagyslėse neidentifikuojamos. Branduoliai silpnai bazofiliški (9 pav.). Šio bandymo rezultatai neturi pridėtinės vertės lyginant su HE metodu. Gavus diagnostikai netinkamus bandymų rezultatus, elastinių skaidulų išryškinimui išbandytas Orseino tirpalas.



9 pav. 4 bandymas, atvirkštinė HE dažymo modifikacija su rezorcino fuksino tirpalu

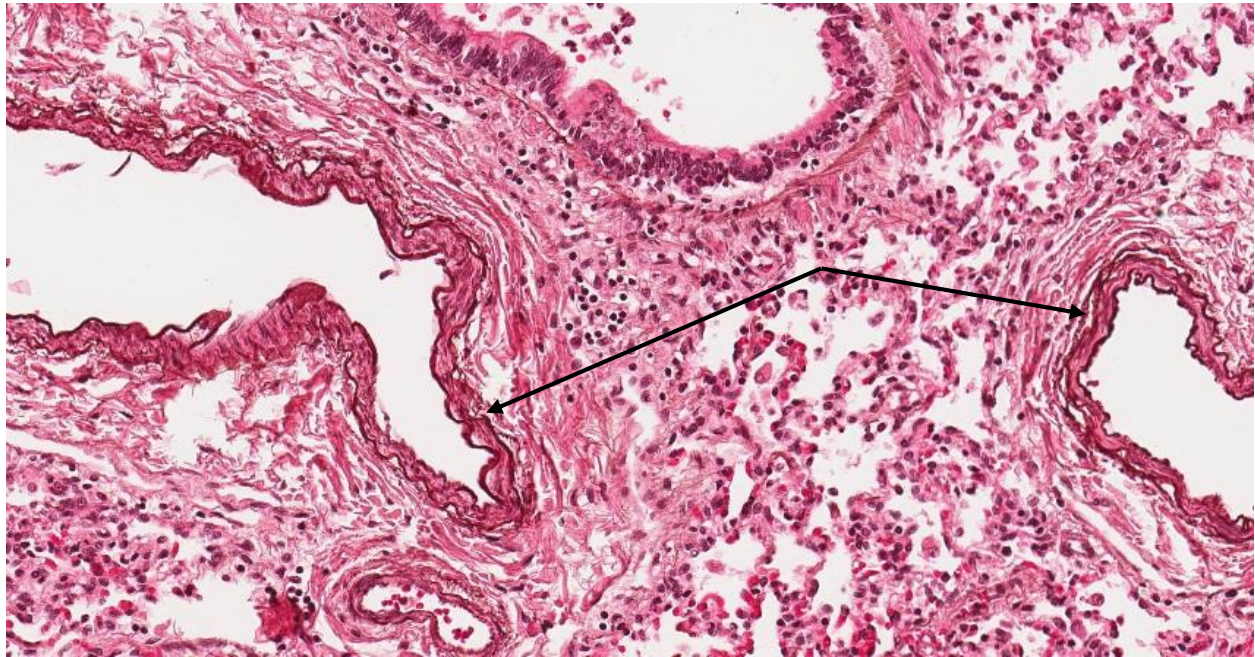
3.3.1.2. HE dažymo modifikacijos su Orseino tirpalu

Pradinis Orseino išlaikymas pasirinktas pagal laboratorijoje naudojamą Orseino dažymo metodą – 1 valanda, 60°C temperatūroje. Tolimesnė dažymo eiga įprasta HE dažymo procedūra (4 lentelė).

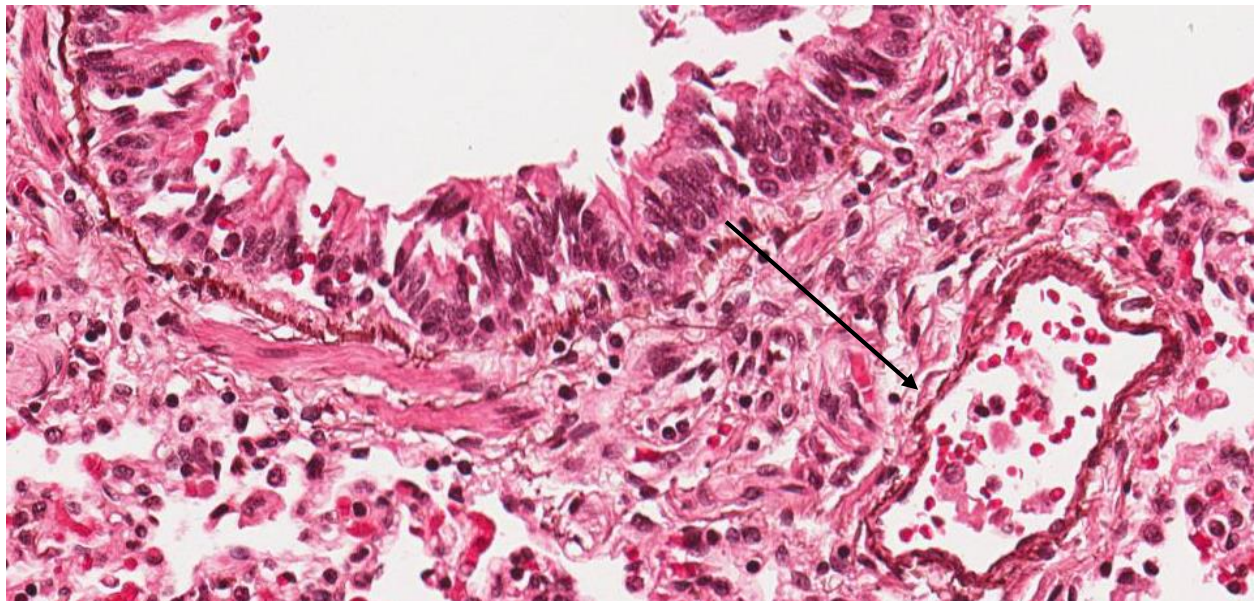
4 lentelė. 5 bandymo procedūra, HE dažymo modifikacijos su Orseinu procedūra

Eil. Nr.	Reagentas	5 bandymas
1.	Orseino tirpalas	1 val. 60°C temperatūroje
2.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti
3.	Mejerio hematoksilinas	5 min.
4.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti
5.	0,1 % Amonio vanduo	1 min.
6.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.
7.	96% etilo alkoholis	Skalauti
8.	Eozino tirpalas (alkoholinis)	1 min.
9.	Etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas	Skalauti

5 bandymo metu elastinės skaidulos išryškintos ryškiai raudona spalva tiek stambiose (9 pav.) tiek smulkiose kraujagyslėse (10 pav.), stebimi ir ploni skaidulų pluoštai aplinkiniame audinyje. HE metodo savybės pakinta: branduoliai nusidažo nuo rusvai violetinės iki pilkos spalvos, stebima hipereozinofilija tiek citoplazmoje, tiek ekstraląstelinėje audinio dalyje (10 pav.).



9 pav. 5 bandymas, HE dažymo modifikacija su Orseinu, elastinių skaidulų išryškėjimas stambiose kraujagyslėse



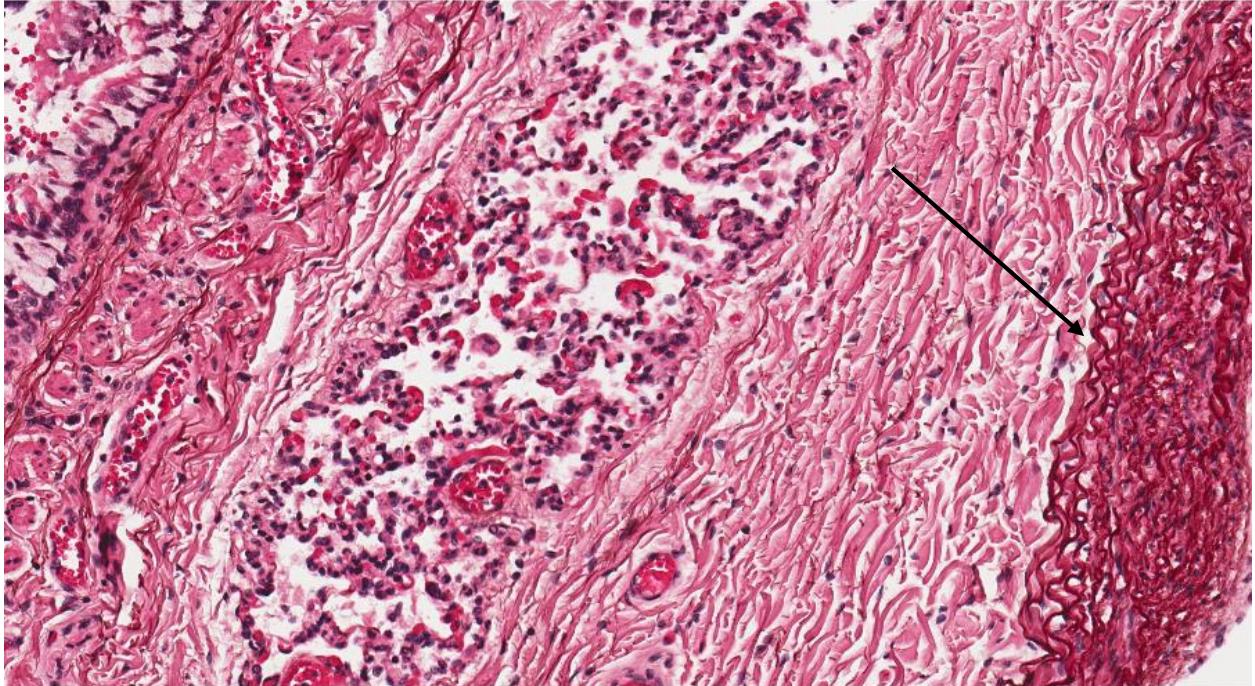
10 pav. 5 bandymas, HE dažymo modifikacija su Orseinu, elastinių skaidulų išryškėjimas smulkiose kraujagyslėse

Tolimesniems bandymams pasirinktas Orseino tirpalo išlaikymas kambario temperatūroje (6 bandymas). Taip pat išbandyta diferenciacija su rūgščiu alkoholiu, pašalinant Orseino perteklių (7 bandymas).

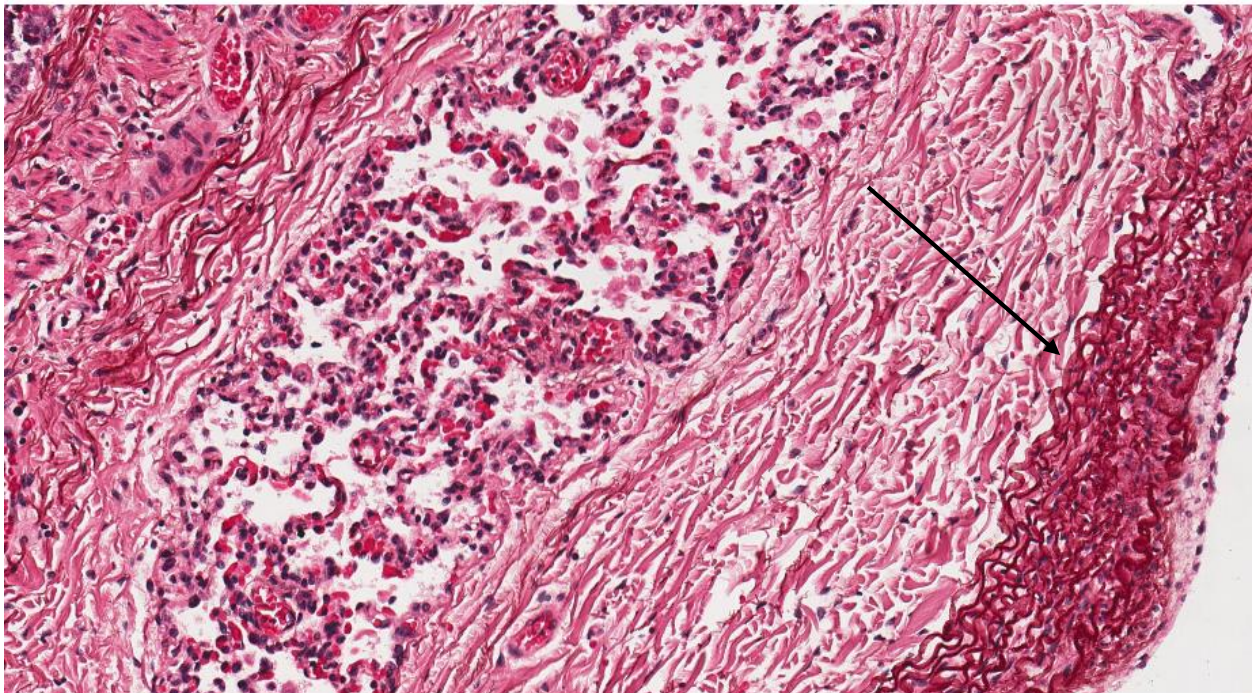
6 lentelė. 6 ir 7 bandymų procedūros, HE modifikacijos su Orseino išlaikymu kambario temperatūroje

Eil. Nr.	Reagentas	6 bandymas	7 bandymas
1.	Orseino tirpalas		1 val.
2.	Kambario temperatūros vanduo		Skalauti
3.	Rūgštus alkoholis	-	Diferencijuoti 1-2 s.
4.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	-	3 min.
5.	Mejerio hematoksilinas		5 min.
6.	0,1 % Amonio vanduo		1 min.
7.	Kambario temperatūros tekantis vanduo		3 min.
8.	96 % etilo alkoholis		Skalauti
9.	Eozino tirpalas (alkoholinis)		1 min.
10.	Etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas		Skalauti

5 ir 6 bandymo (11 pav.) rezultatai vizualiai nesiskiria, tačiau 7 bandyme (12 pav.) paveikus audinį rūgščiu alkoholiu, stebimas silpnėjęs hipereozinofiliškumas, elastinių skaidulų ir branduolių išryškėjimas nesiskiria. Siekiant sumažinti Orseino įtaką HE, atlikti bandymai su trumpesniu Orseino išlaikymu: 30 min., 15 min., 8 min. (7 lentelė).



11 pav. 6 bandymas, HE modifikacija su Orseino tirpalo išlaikymu kambario temperatūroje, nediferencijuota. Elastinės skaidulos ryškiai raudona spalva (juoda rodyklė)

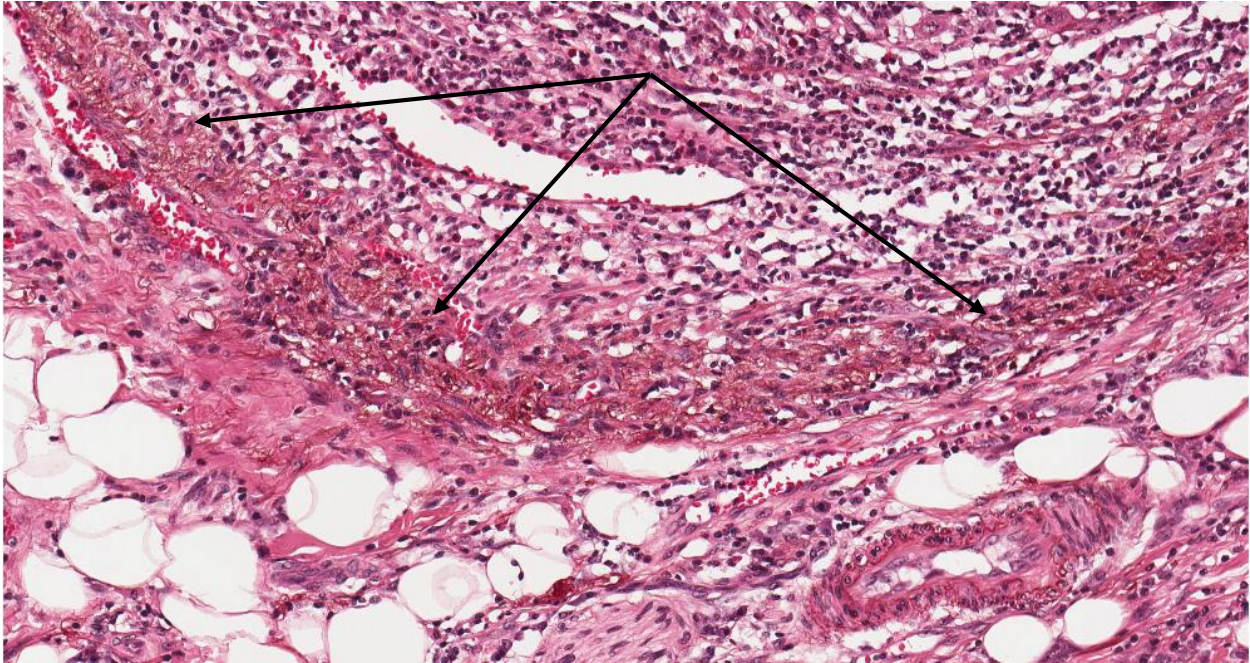


12 pav. 7 bandymas, HE modifikacija su Orseino tirpalo išlaikymu kambario temperatūroje, diferencijuota. Elastinės skaidulos ryškiai raudona spalva (juoda rodyklė)

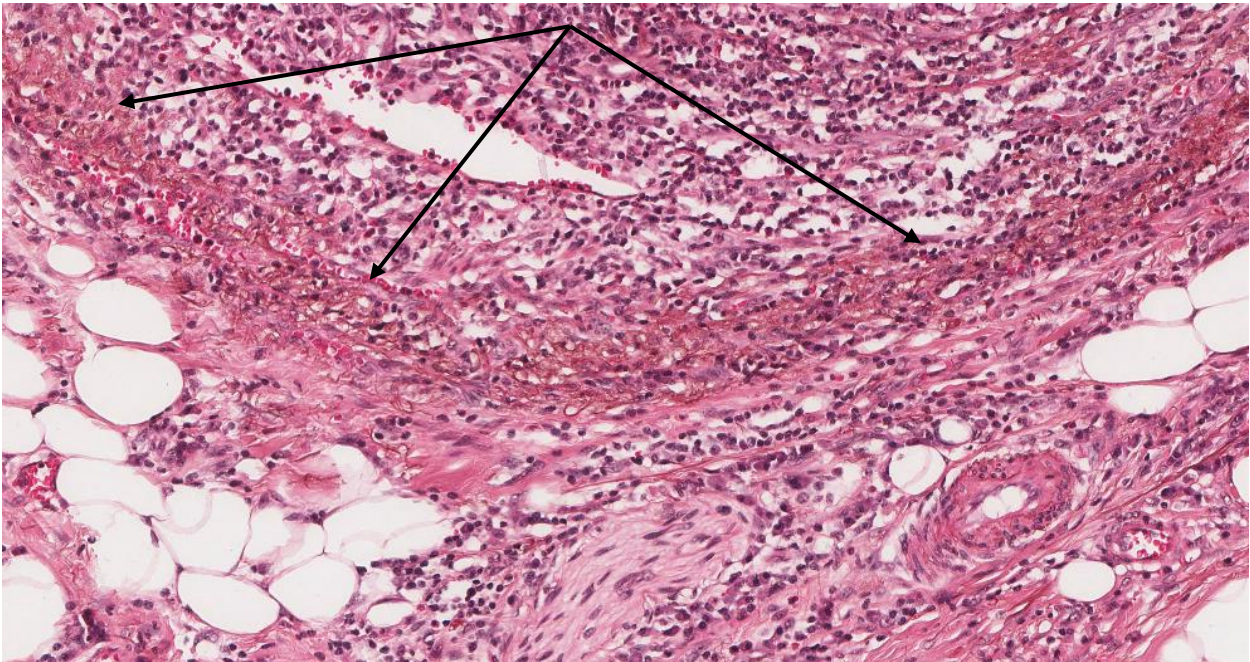
7 lentelė. 8, 9, 10 bandymų procedūros, HE modifikacijos su skirtingu Orseino ekspozicijos laiku

Eil. Nr.	Reagentas	8 bandymas	9 bandymas	10 bandymas
1.	Orseino tirpalas	30 min.	15 min.	8 min.
2.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti		
3.	Rūgštus alkoholis	Diferencijuoti 1-2 s.		
4.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.		
5.	Mejerio hematoksilinas	5 min.		
6.	0,1 % Amonio vanduo	1 min.		
7.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.		
8.	96 % etilo alkoholis	Skalauti		
9.	Eozino tirpalas (alkoholinis)	1 min.		
10.	Etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas	Skalauti		

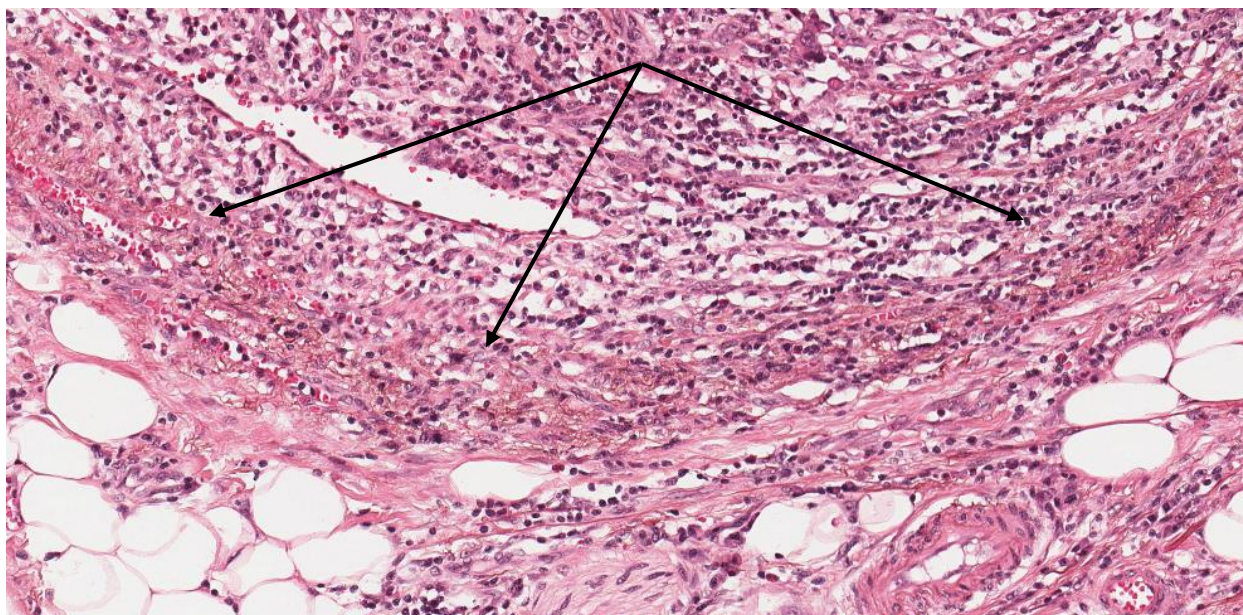
Įvertinus 8 (13 pav.), 9 (14 pav.) ir 10 (15 pav.) bandymų rezultatus, stebima ryški Orseino įtaka HE dažymui. Kuo ilgesnis Orseino išlaikymas, tuo ryškesnės elastinės skaidulos, tačiau HE informatyvumas mažėja. Elastinių skaidulų ryškumas 7 ir 8 bandymo rezultatuose yra labai panašus, todėl optimalus Orseino išlaikymas pasirinktas 30 minučių. Nors elastinės skaidulos gerai identifikuojamos, HE hipereozinofilija yra netinkama diagnostikai. Atliktas bandymas su trumpesniu Mejerio hematoksilino ir eozino išlaikymu (8 lentelė).



13 pav. 8 bandymas, HE modifikacija su Orseino tirpalo išlaikymu 30 minučių. Elastinės skaidulos raudona spalva (juodos rodyklės).



14 pav. 9 bandymas, HE modifikacija su Orseino tirpalo išlaikymu 15 minučių. Elastinės skaidulos rausva spalva (juodos rodyklės).



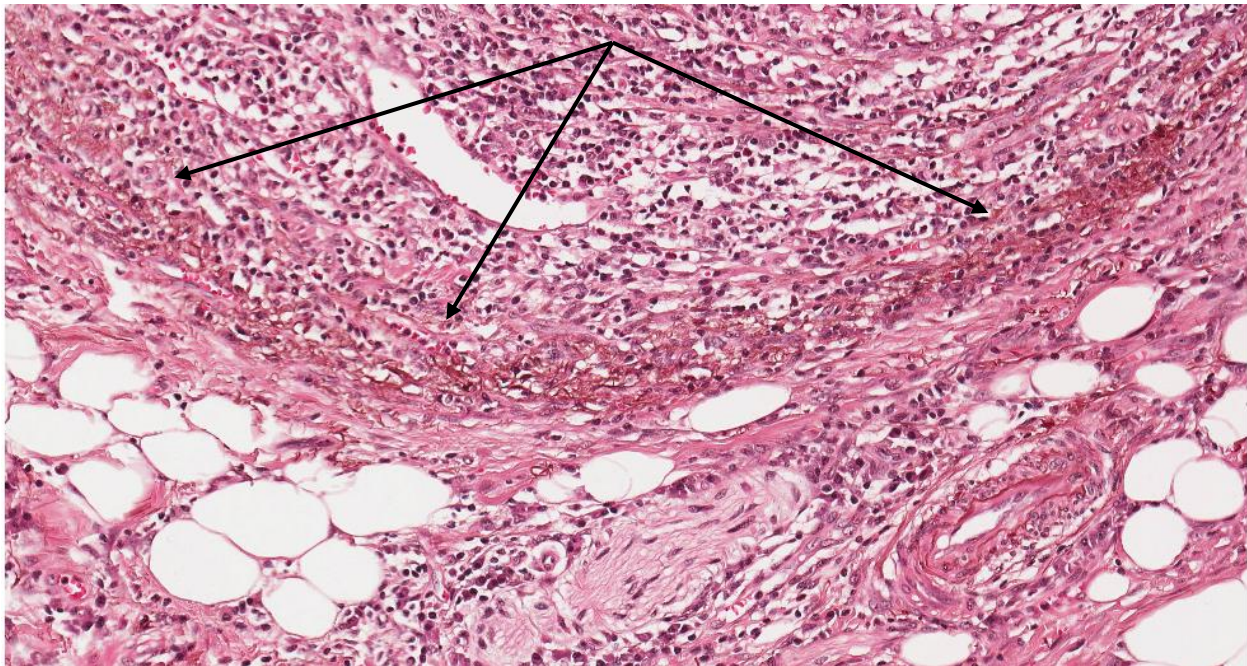
15 pav. 10 bandymas, HE modifikacija su Orseino tirpalo išlaikymu 8 minutes. Elastinės skaidulos švelniai rausvos spalvos (juodos rodyklės).

8 lentelė. 11 bandymo procedūra, HE modifikacija su trumpesniu HE ir eozino išlaikymu

Eil. Nr.	Reagentas	11 bandymas
1.	Orseino tirpalas	30 min.
2.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti
3.	Rūgštus alkoholis	Diferencijuoti 1-2 s.
4.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.
5.	Mejerio hematoksilinas	3 min.
6.	0,1 % Amonio vanduo	1 min.
7.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.
8.	96 % etilo alkoholis	Skalauti
9.	Eozino tirpalas (alkoholinis)	30 s.
10.	Etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas	Skalauti

11 bandymo metu gauti rezultatai taip pat nebuvo tinkami diagnostikai. Nors elastinės skaidulos išryškintos gerai, HE savybės yra nepakankamos tinkamai įvertinti preparatą, išlieka branduolių nusidažymas nuo rusvai violetinės iki pilkos spalvos, stebima hipereozinofilija tiek citoplazmoje, tiek ekstraląstelinėje audinio dalyje (16 pav.). Atlikti bandymai suteikė informacijos

apie bandymuose naudojamų reagentų sąveiką, tačiau nuspręsta tolimesnius bandymus atlikti nesiekiant išsaugoti HE dažymo savybių. Pagrindinė užduotis – sukurti HE modifikaciją siekiant maksimalios elastinių skaidulų vizualizacijos. Šiam tikslui pasiekti pasirinkta prieš dažymą oksiduoti audinį kalio permanganatu, perteklių pašalinant su oksalo rūgštimi (9 lentelė).

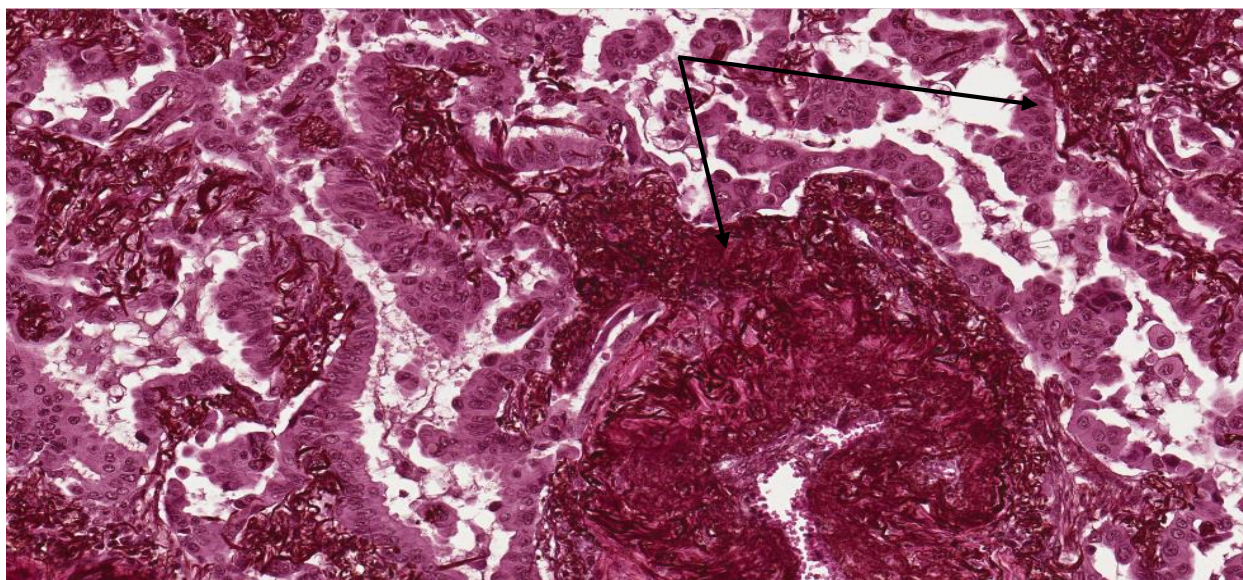


16 pav. 11 bandymas, HE modifikacija su trumpesniu HE ir eozino išlaikymu. Elastinės skaidulos rausva spalva (juodos rodyklės).

9 lentelė. 12 bandymas, HE modifikacija su oksidacija

Eil. Nr.	Reagentas	11 bandymas
1.	Rūgštus kalio permanganato tirpalas	15 min.
2.	Distiliuotas vanduo	Skalauti
3.	5 % oksalo rūgšties tirpalas	Skalauti, kol išbluks pjūvio spalva
4.	Distiliuotas vanduo	Skalauti 10 kartų
5.	Orseino tirpalas	30 min.
6.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti
7.	Rūgštus alkoholis	Diferencijuoti 1-2 s.
8.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.
9.	Mejerio hematoksilinas	3 min.
10.	0,1 % Amonio vanduo	1 min.
11.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.
12.	96 % etilo alkoholis	Skalauti
13.	Eozino tirpalas (alkoholinis)	30 s.
14.	Etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas	Skalauti

12 bandymo metu puikiai išryškintos elastingės skaidulos – ryškiai raudona, branduoliai rusvai violetine, citoplazma šviesiai violetine spalvomis (17 pav.). Siekiant didesnio kontrastingumo tarp elastinių skaidulų ir aplinkinių struktūrų, nuspręsta eoziną pakeisti darbinium Light green tirpalu ir išbandyti skirtingus jo išlaikymus (10 lentelė).

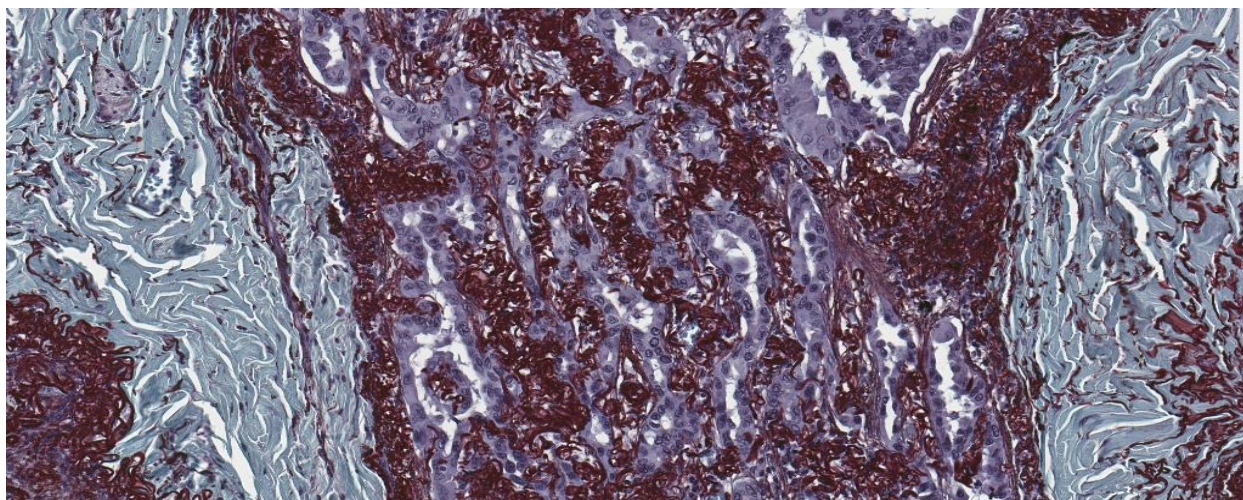


17 pav. 12 bandymas, HE modifikacija su oksidacija. Elastinės skaidulos ryškiai raudona splava (juodos rodyklės).

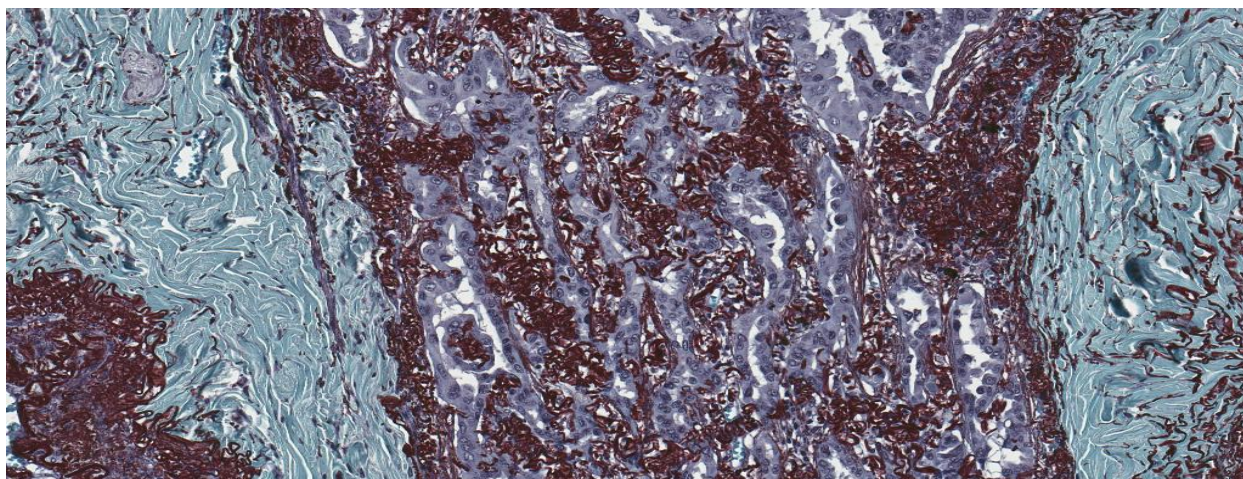
10 lentelė. 13 ir 14 bandymų procedūros, HE modifikacijos su darbinio Light green tirpalo išlaikymu 1 ir 3 minutes

Eil. Nr.	Reagentas	13 bandymas	14 bandymas
1.	Rūgštus kalio permanganato tirpalas	15 min.	
2.	Distiliuotas vanduo	Skalauti	
3.	5 % oksalo rūgšties tirpalas	Skalauti, kol išbluks pjūvio spalva	
4.	Distiliuotas vanduo	Skalauti 10 kartų	
5.	Orseino tirpalas	30 min.	
6.	Kambario temperatūros vanduo	Skalauti	
7.	Rūgštus alkoholis	Diferencijuoti 1-2 s.	
8.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.	
9.	Mejerio hematoksilinas	3 min.	
10.	0,1 % Amonio vanduo	1 min.	
11.	Kambario temperatūros tekantis vanduo	3 min.	
12.	Light green tirpalas	3 min.	1 min.
13.	Etilo alkoholis, izopropilo alkoholis, ksilenas	Skalauti	

13 (18 pav.) ir 14 (19 pav.) bandymų rezultatai labai panašūs. Elastinės skaidulos išryškintos tamsiai raudona spalva, branduoliai tamsiai violetiniai, citoplazma nuo šviesiai iki tamsiai violetinės, eritrocitai – ryškiai žalia spalva, kitos aplinkinės audinio struktūros žalsva spalva. Šių bandymų metu gautas labai ryškus elastinių skaidulų vizualizavimas, branduoliai gerai identifikuojami, kas retai stebima dažant metodais su geležies hematoksilinu. Pakeitus eoziną darbinio Light green tirpalu, stebimas ryškus elastinių skaidulų ir kitų audinio struktūrų kontrastingumas. 14 bandymo rezultatuose stebimas tolygesnis, šviesesnis ir skaidresnis struktūrų dažymas, todėl jis pasirinktas galutine HE dažymo modifikacija (HE_ORs).



18 pav. 13 bandymas, HE modifikacija su darbinio Light green tirpalo išlaikymu 3 minutes. Elastinės skaidulos – raudonai, ląstelės – mėlynai, aplinkinės struktūros – melsvai



19 pav. 14 bandymas, galutinė HE modifikacija su darbinio Light green tirpalo išlaikymu 1 minutę. Elastinės skaidulos – raudonai, ląstelės – mėlynai, aplinkinės struktūros – melsvai

3.2.2. Tyrimas

Šio tyrimo metu palygintos ir įvertintos HE ir HE_ORS dažymų metodų galimybės išryškinant branduolius, elastines skaidulas bei vizualizuojant intraveninę naviko invaziją.

3.2.2.1. Tyrimo duomenys

Tyrimui buvo pasirinkta 30 atsitiktinių atvejų, 20 storosios žarnos fragmentų su naviku ir 10 plaučių fragmentų su naviku. Tiriamieji audiniai buvo atrinkti tikimybinio pasirinkimo tiksliniu būdu, atsižvelgiant į galimybę įvertinti intraveninę naviko invaziją.

Atsižvelgiant į gydytojų patologų pastabas ir pasiūlymus, buvo pasirinkta HE_ORS metodu nudažyti visų atvejų pjūvius, kuriuose yra navikas. Tyrimo metu gydytojo patologo pirmi mikroskopuoti HE metodu dažyti visi atvejo pirminiai preparatai, įvertinus HE mikroskopuoti HE_ORS metodu dažyti naviko preparatai. Vertinimui paruoštos anketos, kiekvieno atvejo rezultatai sužymėti lentelėse (11 lentelė), tinkamą variantą pažymint varnele. Rezultatai pateikiami balais:

- Elastinės skaidulos ir branduoliai: 0 – neidentifikuojama, netinkama diagnostikai; 1 – silpnai išryškinta, nepakanka diagnostikai; 2 – patenkinamai išryškinta, tinkama diagnostikai; 3 – gerai išryškinta, tinkama diagnostikai.
- Intraveninė naviko invazija: 0 – nevertinama, neinformatyvus preparatas; 1 – intraveninė naviko invazija nėra stebima, tinkama diagnostikai; 2 – intraveninė naviko invazija įtariama, nepakanka diagnostikai; 3 – nustatyta intraveninė invazija.

11 lentelė. HE ir HE_ORIS dažymo metodų įvertinimo lentelė

Hematoksilinas – eozinas (HE)	0	1	2	3
Elastinės skaidulos				
Branduoliai				
Intraveninė naviko invazija				
Hematoksilinas – orseinas – light green (HE_ORIS)				
Elastinės skaidulos				
Branduoliai				
Intraveninė naviko invazija				
Pastabos				

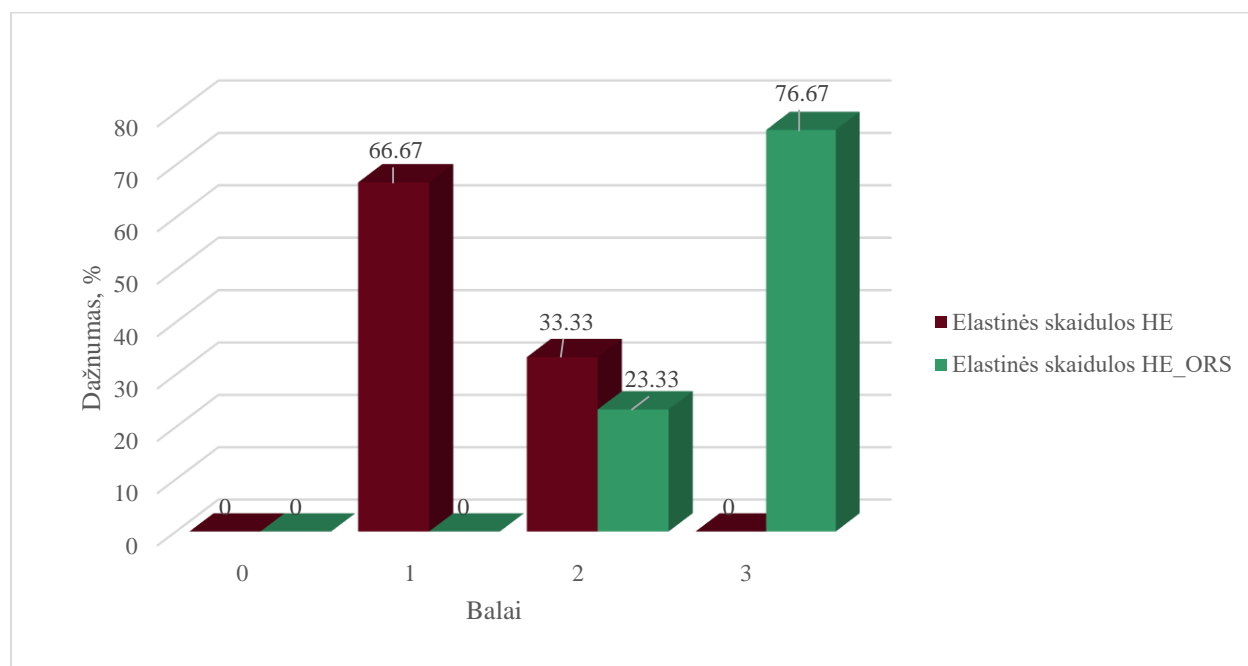
3.2.2.2. Statistinė analizė

Surinkus visus duomenis atlikta statistinė analizė su Microsoft Excel ir R commander programomis. Įvertinta branduolių ir elastinių skaidulų vizualizacijos skirtumai HE ir HE_ORIS metodais dažytuose preparatuose. Taip pat išanalizuoti ir palyginti intraveninės naviko invazijos vertinimai HE ir HE_ORIS metodais dažytuose preparatuose.

Taikytas Vilkoksono ženklų kriterijus, Šis kriterijus skirtas palyginti dvi neparametrines susijusias imtis. Apskaičiuojami imties tiriamųjų skirtumai tarp susijusių grupių, jie išranguojami ir gautos medianos palyginamos su nulinės hipotezės mediana. Nulinė hipotezė laikoma, kad susijusių imčių medianos yra lygios. Mažiausiu kriterijaus reikšmingumo lygmeniu pasirinktas $p=0,05$.

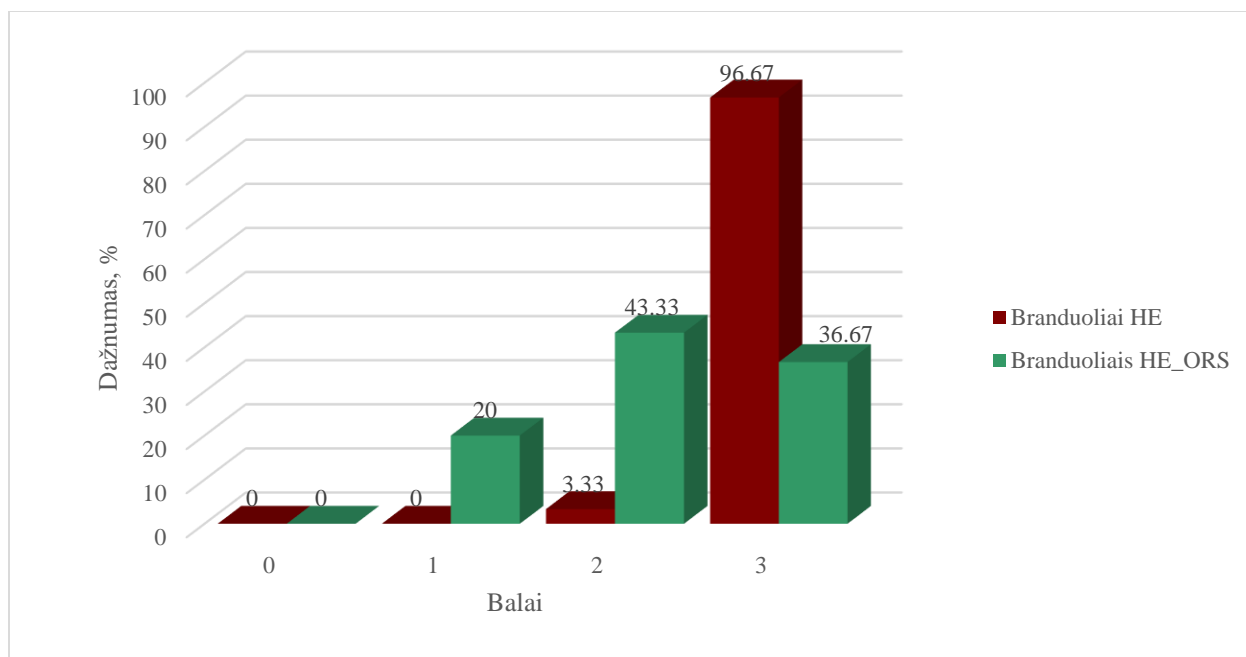
4. TYRIMO REZULTATAI

Išanalizavus elastinių skaidulų išryškavimo vertinimo rezultatus HE ir HE_ORIS metodais dažytuose preparatuose, stebimas didelis HE_ORIS metodo pranašumas. Elastinės skaidulos neidentifikuojamos net 66,67 % HE metodu dažytuose preparatuose ir tik 33,33 % patenkinamai. HE_ORIS metodu elastinės skaidulos gerai išryškintos net 76,67 % preparatų, patenkinimai 23,33 % (19 pav.). Pritaikius Vilkoksono kriterijų, stebime statistiškai reikšmingą HE_ORIS pranašumą išryškinant elastines skaidulas ($p < 0,001$).



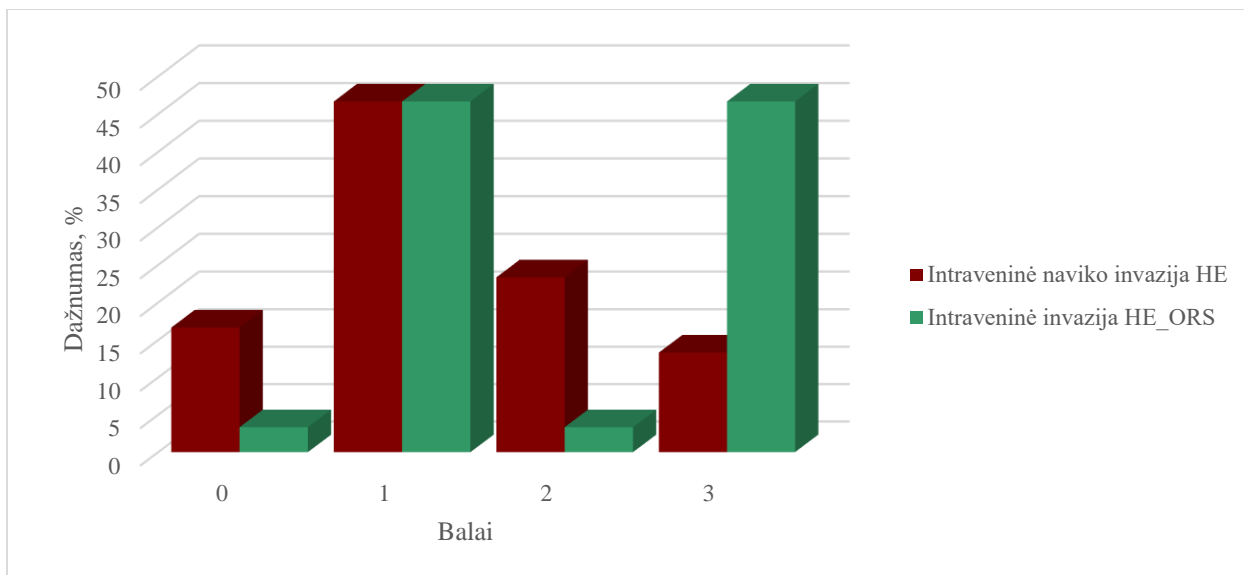
19 pav. Elastinių skaidulų išryškavimo vertinimai HE ir HE_ORIS dažymo metodais

Įvertinus branduolių vizualizaciją, stebimi priešingi rezultatai nei elastinių skaidulų. Tinkamam branduolių išryškimui pranašesnis HE dažymas. Gera branduolių vizualizacija stebima net 96,67 % atvejų HE dažytų preparatų ir tik vienas tiriamasis įvertintas patenkinamai, tai sudaro 3,33 %. HE_ORIS metodas branduolių vizualizacijai daugiausiai įvertintas 2 balais – patenkinamai, net 43,33 %, gerai įvertinta 36,67% ir 20% įvertinta 1 balu, kurie netinkami diagnostikai (20 pav.). Pritaikius Vilkoksono kriterijų gauti statistiškai reikšmingi rezultatai ($p < 0,001$) įrodo, kad branduolių vizualizacijai tinkamesnis yra HE metodas.



20 pav. Branduolių išryškinimo vertinimai HE ir HE_ORS dažymo metodais

Intraveninės naviko invazijos vertinimas skiriasi nuo elastinių skaidulų ir branduolių vertinimo. Įvertinus HE metodu dažytus preparatus, intraveninė naviko invazija nustatyta 13,33 % atvejų, įtariama 23,33% atvejų ir nenustatyta beveik pusei tiriamųjų 46,67 %. Įvertinus tų pačių atvejų HE_ORS metodu dažytus navikų pjūvius, intraveninė naviko invazija nustatyta net 14 atvejų (46,67 %) (21 pav.). Išanalizavus šių 14 atvejų HE vertinimus, nustatyta, kad net 6 atvejuose įvertinus HE metodu dažytus preparatus intraveninė naviko invazija buvo klaidingai neigiama, 3 atvejuose įtariama, vienas atvejis nevertinamas. Taigi, įvertinus pirminius HE preparatus, net 30 % atvejų įvertinti klaidingai, iš kurių 60 % atvejų su intravenine naviko invazija įvertinti kaip klaidingai neigiami. Pritaikius Vilkoksono kriterijų stebimas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp intraveninės naviko invazijos įvertinimo HE ir HE_ORS metodais ($p=0,004$).

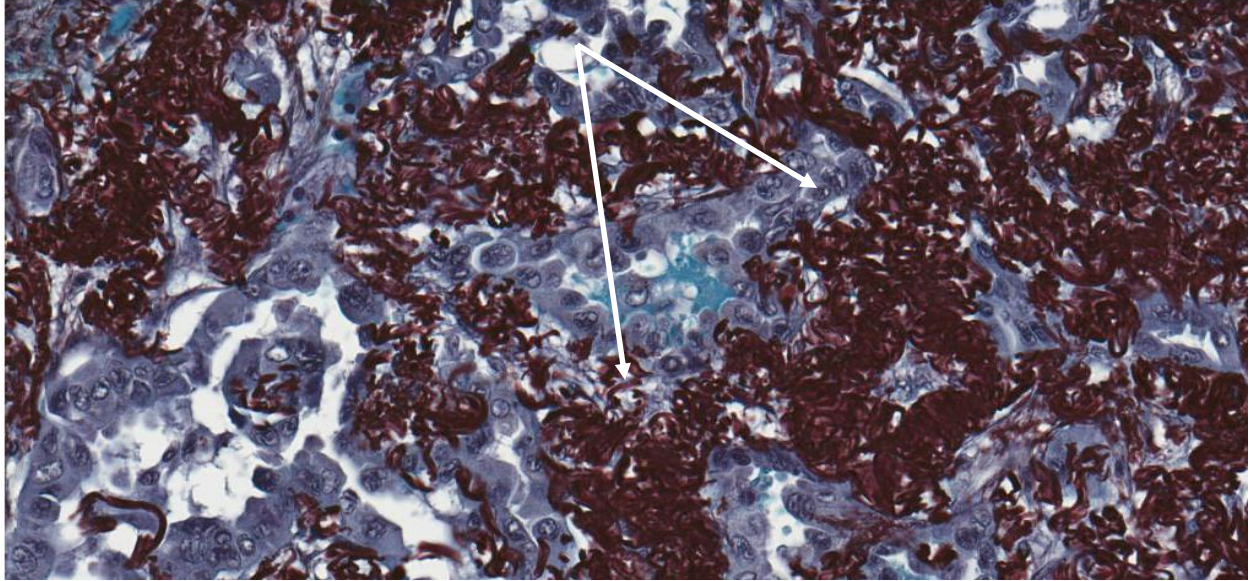


21 pav. Intraveninės naviko invazijos vertinimai HE ir HE_ORS dažymo metodais

5. TYRIMO REZULTATŲ ANALIZĖ IR APIBENDRINIMAS

5.1. Eksperimentų rezultatų apibendrinimas

Atlikta 14 eksperimentų, 4 bandymai paremti elastinių skaidulų išryškinimu rezorcino fuksino ir hematoksilino sąveika, kiti 10 orseino sąveika su elastinėmis skaidulomis. Panaudojus rezorcino fuksino tirpalą, gauti rezultatai nebuvo tinkami elastinių skaidulų išryškinimui, o HE metodo savybės stipriai pakito. Tolimesniems bandymams naudotas orseino tirpalas. Parinkus optimalų orseino išlaikymą, stebimas geras elastinių skaidulų išryškinimas, tačiau HE savybės netinkamos diagnostikai. Nuspręsta pakeisti paskutinių eksperimentų kryptį, pagrindinis siekis – kuo geresnis elastinių skaidulų vizualizavimas. Paskutinio eksperimento metu (HE_ORS) pasiektas tikslas: elastinės skaidulos išryškintos tamsiai raudona spalva, branduoliai - tamsiai violetine, citoplazma - nuo šviesiai iki tamsiai violetinės, eritorcitas – ryškiai žalia, kitos aplinkinės audinio struktūros – melsvai žalia spalva. Žalios ir raudonos spalvos kontrastingumas suteikia audiniui itin ryškų elastinių skaidulų vizualizavimą. Galima išskirti du pagrindinius šio metodo pranašumus prieš kitus elastinių skaidulų vizualizavimo metodus: visi dažymo reagentai gali būti naudojami ilgą laiko tarpą, nereikalauja *ex tempore* gamybos; naudojamas Mejerio hematoksilinas nudažo tik bazofilines audinio struktūras, perteklius lengvai pasišalina praplovimo metu ir nėra paveikiamos kitos audinio struktūros. Elastinės skaidulos puikiai išryškinamos ne tik stambiose kraujagyslėse, kur gausūs jų kiekiai, bet taip pat ir kitose audinio struktūrose, pavyzdžiui plaučių alveolių sienelėse (22 pav.) ar smulkiose kraujagyslėse (23 pav.), kur stebimi ploni skaidulų pluoštai.



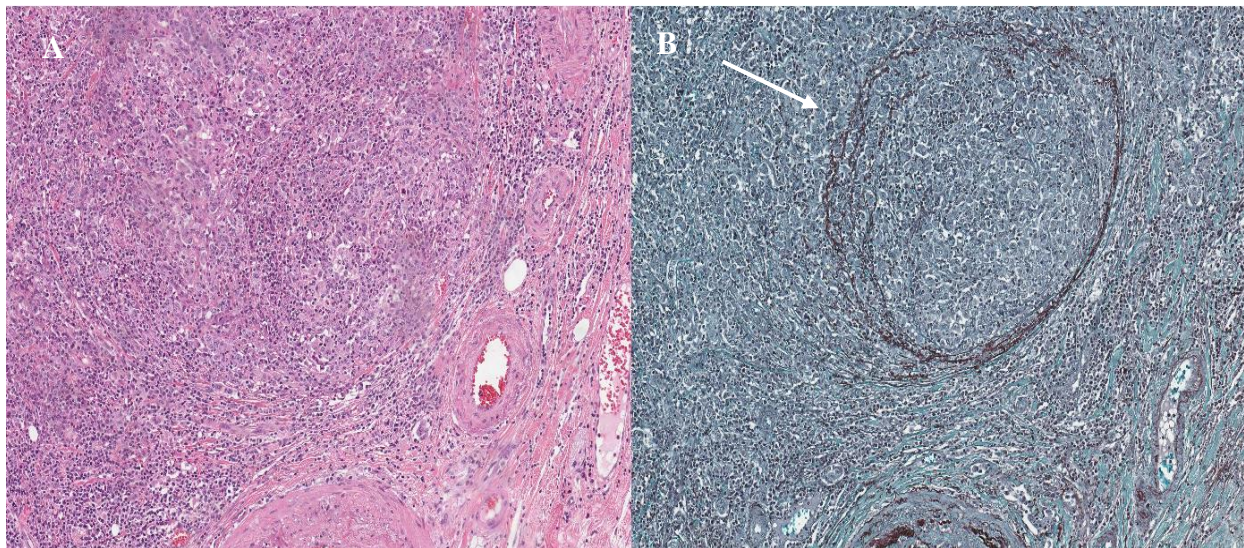
22 pav. Raudonos elastinės skaidulos (baltos rodyklės), plaučių naviko deformuotose alveolėse, HE_ORŠ dažymo metodas



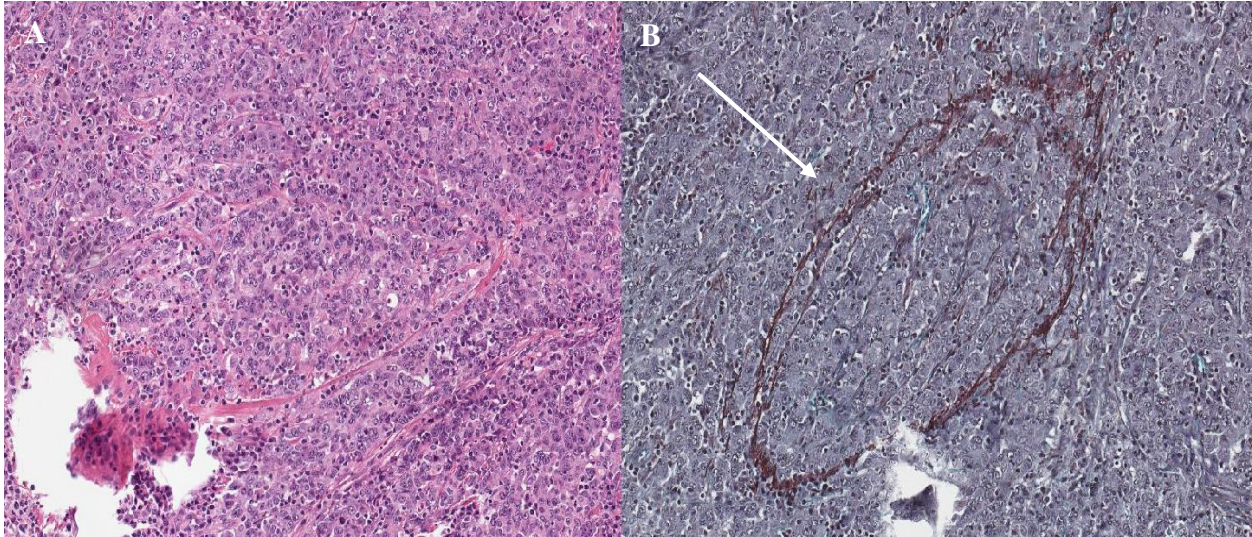
23 pav. Raudonos elastinės skaidulos, storosios žarnos smulkiosiose kraujagyslėse (baltos rodyklės), HE_ORŠ dažymo metodas

5.2. Tyrimo rezultatų apidendrinimas

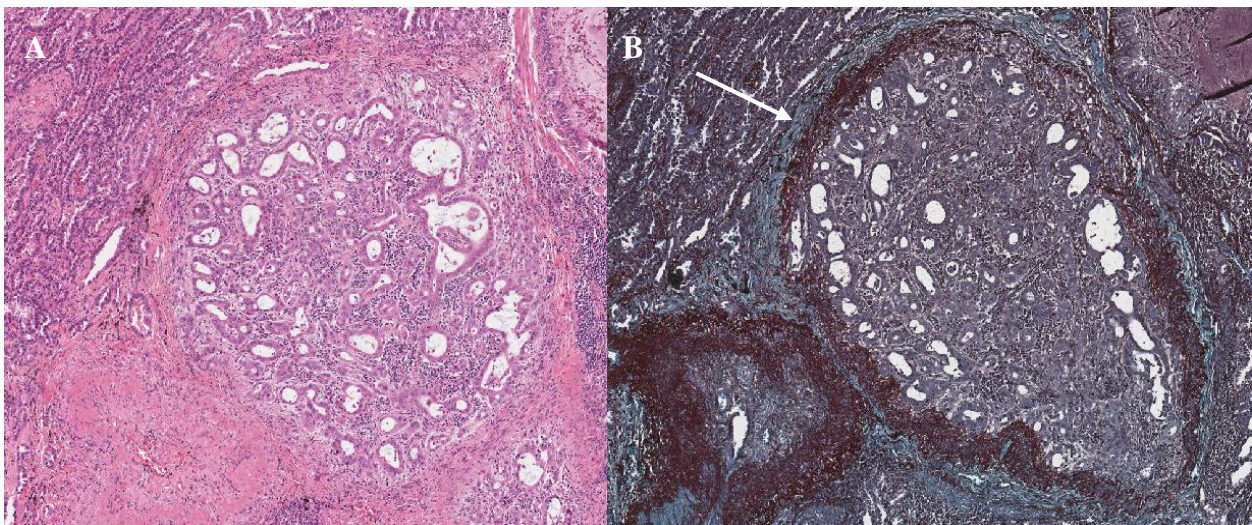
Tyrimas atliktas su 30 atvejų, kuriuose buvo galima intraveninė naviko invazija. Įvertinus dažymą ir palyginus jį su HE dažymu, kaip ir tikėtasi, gauti statistiškai reikšmingi rezultatai. HE metodas nėra skirtas elastinių skaidulų vizualizavimui, stebimi tik itin stambūs pluoštai stambiose kraujagyslėse. HE_ORs metodas puikiai jas išryškina, tai atsispindi ir gautuose rezultatuose: net 76,67 % HE_ORs dažytų preparatų elastinės skaidulos gerai išryškintos, o HE metodu beveik tiek pat, net 66,67 % yra neidentifikuojamos. Tačiau, HE metodas turi labai didelį pranašumą branduolių vizualizacijoje, beveik visų (96,67 %) atvejų branduolių išryškėjimas įvertintas gerai, o HE_ORs tris kartus mažiau (36,67 %). Intraveninės naviko invazijos vertinimas nustebino labiausiai. Įvertinus HE dažytus preparatus intraveninė naviko invazija nustatyta 4 atvejuose, papildomai įvertinus HE_ORs preparatus, skaičius išaugo iki 14 atvejų. Tai leidžia teigti, kad diagnostinį procesą papildžius naviko mikropjūvių dažymą HE_ORs metodu, galima tikėtis net iki 30 % daugiau teigiamų rezultatų. Išanalizavus atvejų, kuriuose po HE_ORs vertinimo nustatyta intraveninė naviko invazija preparatus, stebimas labai įvairus naviko invazyvumas. (24, 25, 26 pav.),



24 pav. Storosios žarnos naviko pjūvis. HE preparate intraveninė naviko invazija nestebima (A). HE_ORs metodu išryškintos elastinės skaidulos tamsiai raudona spalva, intraveninė naviko invazija identifikuojama (B) (I)



24 pav. Storosios žarnos naviko pjūvis. HE preparate intraveninė naviko invazija nestebima (A). HE_ORIS metodu išryškintos elastinės skaidulos tamsiai raudona spalva, intraveninė naviko invazija identifikuojama (B) (II)



26 pav. Plaučio naviko pjūvis. HE preparate intraveninė naviko invazija nestebima (A). HE_ORIS metodu išryškintos elastinės skaidulos tamsiai raudona spalva, intraveninė naviko invazija identifikuojama (B)

6. IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS

1. HE metodu elastinės skaidulos neidentifikuojamos. Pritaikius tinkamą specifinį metodą galima vizualizuoti kraujagyslių sienelėse esantį skaidulų sluoksnį. Tai leidžia nustatyti intraveninę invaziją. Invazijos tipo nustatymas ar jos nebuvimas padeda įvertinti naviko charakteristiką, ligos eigą, suteikia informacijos apie tolimesnių tyrimų galimybes.
2. Sukurta HE metodo modifikacija, kuri leidžia maksimaliai išryškinti elastines skaidulas raudona spalva, branduoliai ir citoplazma nusidažo mėlynai, aplinkiniai audiniai - žalsvai, eritrocitai – ryškiai žalia spalva. Šis metodas negali pakeisti įprastojo HE metodo, tačiau papildo jį nauja informacija ir diagnostinėmis galimybėmis. Itin kontrastingos elastinių skaidulų ir aplinkinių audinių spalvos leidžia identifikuoti net itin mažus skaidulų pluoštus. 76,67 % tirtų atvejų elastinės skaidulos gerai vizualizuotos.
3. Pritaikyta modifikacija leidžia puikiai identifikuoti intraveninę naviko invaziją. Deformuotos kraujagyslės stebimos naviko vietose, kuriose HE preparatuose matomas homogeniškas navikas, o invazijos įtarimo nėra. Modifikacija leidžia identifikuoti ir smulkiųjų kraujagyslių invaziją. Pritaikius šį metodą nustatyta net 30 % klaidingai neigiamų įvertinimų HE metodu. Siekiant išvengti klaidingai neigiamų tyrimų rezultatų, siūlomą HE metodo modifikaciją galima taikyti visiems navikinio audinio tyrimams.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. H and E Part One: History, Background and Solutions. [žiūrėta 2018 11 15]. <<http://www.agarscientific.net/h-and-e-part-one-history-background-and-solutions/>>
2. Feldman, A. T., Wolfe, D. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. *Methods Mol Biol.* 2014; 1180: 31-43; DOI:10.1007/978-1-4939-1050-2_3
3. Freida L. Carson., 1997, *Histotechnology*, p. 132-143.
4. Cancer, Key facts. [žiūrėta 2019 04 06]. <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>
5. Causality and Chance in the Development of Cancer. *N Engl J Med.* 2015; Jul 2;373(1): 84-8; DOI: 10.1056/NEJMs1502456.
6. Cancer causes cells to divide uncontrollably. This can result in tumors, damage to the immune system, and other impairment that can be fatal. [žiūrėta 2019 04 06]. <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/323648.php>>
7. Qian, C.-N., Mei, Y., & Zhang, J. Cancer metastasis: issues and challenges. *Chinese Journal of Cancer.* 2017; 36(1): 38. DOI:10.1186/s40880-017-0206-7
8. Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2015; 35: S25–S54. DOI:10.1016/j.semcancer.2015.02.006
9. Krakhmal, N. V., Zavyalova M. V., Denisov E. V., Vtorushin S. V., Perelmuter V. M. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae.* 2015; 7(2): 17–28.
10. Han T, Kang D, Ji D, et al. How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion?. *Cell Adh Migr.* 2013; 7(5): 395–403. DOI:10.4161/cam.26345
11. Devreotes P, Horwitz AR. Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 ;7(8): a005959. DOI:10.1101/cshperspect.a005959
12. Carey SP, Rahman A, Kraning-Rush CM, et al. Comparative mechanisms of cancer cell migration through 3D matrix and physiological microtracks. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015; 308(6): C436–C447. DOI:10.1152/ajpcell.00225.2014
13. Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., et al. *AJCC Cancer Staging Manual 2017.* American Joint Committee on Cancer.

14. Yuan H, Dong Q, Zheng B, Hu X, Xu JB, Tu S. Lymphovascular invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; 8(28): 46565–46579. DOI:10.18632/oncotarget.15425
15. Baldwin, A. K., Simpson, A., Steer, R., Cain, S. A., & Kielty, C. M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2013; 15. DOI:10.1017/erm.2013.9
16. Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Shuttleworth, C. A. Elastic fibres. *Journal of Cell Science*. 2002; 115: 2817-2828. ISSN 0021-9533.
17. Thomson, J., Singh, M., Eckersley, A., Cain, S. A., Sherratt, M. J., & Baldock, C. Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018; 89: 109-117. DOI:10.1016/j.semcdb.2018.07.016
18. Bancroft, J. D., Stevens, A., 1996, *Theory and Practice of Histological Techniques*, p. 118
19. Percival, K. R, Radi, Z. A. A modified Verhoeff's elastin histochemical stain to enable pulmonary arterial hypertension model characterization. *Eur J Histochem*. 2016; 60(1): 2588. DOI:10.4081/ejh.2016.2588
20. Laurinavičienė A., Smaliukienė R., 2007, *Histologinių technologijų vadovas*, p. 13-95.
21. Fullmer, H. M., Lillie, R. D. Some aspects of the mechanism of orcein staining. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1956, 4(1), pp. 64–68. DOI: 10.1177/4.1.64.
22. Orah, N., Rotimi, O., Abdulkareem. F. B. The use of special stains in liver biopsy interpretation: Implications for the management of liver disease in Nigeria. *Niger J Clin*. 2016; 19: 523-9. DOI: 10.4103/1119-3077.183309
23. Henwood, A. Current applications of orcein in histochemistry. A brief review with some new observations concerning influence of dye batch variation and aging of dye solutions on staining. *Biotechnic & Histochemistry*. 2003; 78(6): 303–308. DOI:10.1080/10520290410001671335