

Odabir fiksativa za procjenu enzimске aktivnosti u citokemijskim testovima leukemija

Dunder, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:079805>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikolina Dunder

**Odabir fiksativa za procjenu enzimske
aktivnosti u citokemijskim testovima
leukemija**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Nikolina Dunder

**Selection of fixatives to assess enzyme activity
in cytochemical leukemia assays**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za histologiju i citologiju u BioGnostu, pod voditeljstvom dr. sc. Maje Šantak, te suvoditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Maji Šantak na vodstvu, pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Nadi Oršolić na pomoći i susretljivosti.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na podršci, razumijevanju i povjerenju koje su mi pružali tijekom studiranja.

Hvala svim kolegama i prijateljima koji su me pratili na ovom putovanju.

Najviše hvala Jozi za sve.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Izbor fiksativa za procjenu enzimske aktivnosti u citokemijskim testovima leukemija

Nikolina Dunder

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Najčešće fiksirajuće sredstvo u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija je kombinacija acetona i formalina. Unatoč svojoj širokoj uporabi, formalin je kancerogen i mutagen, stoga se njegova uporaba nastoji izbaciti ili svesti na minimum. Trenutno ne postoji adekvatna zamjena formalina, stoga je glavni cilj ovog rada izraditi probne formulacije fiksativa za citokemijsku dijagnostiku leukemija koji neće sadržavati formalin i koji neće imati štetno djelovanje, a koji će dati jednako dobre rezultate kao fiksativ s formalinom. Napravljeno je 36 probnih formulacija, od kojih je 25 sadržavalo manje štetan dialdehid glioksal uz dodatak suplementa, a ostale nove formulacije nisu uopće sadržavale aldehidne fiksative. Od napravljenih 36 uzoraka njih 8 je fiksiralo stanice usporedivo s fiksativom koji sadrži formalin te su odabrani kao probni fiksativi u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija. Šest probnih fiksativa je pokazalo dobre rezultate pri bojenju kompletima za detekciju leukemija osim bojenja s kompletom Sudan Black B Eco. No jedna od preostale dvije nove formulacije koje nisu dale dobar rezultat s ostalim testovima za dijagnostiku leukemija je pokazala dobar rezultat s kompletom Sudan Black B Eco.

(75 stranica, 52 slike, 11 tablica, 39 bibliografskih referenci; izvornik na hrvatskom jeziku)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb.

Ključne riječi: fiksacija, formalin i enzimi

Voditelj: dr. sc. Maja Šantak

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Izv. Prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Prof. dr. sc. Goran Kovačević

Rad je prihvaćen: 02.09.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master Thesis

Selection of fixatives to assess enzyme activity in cytochemical leukemia assays

Nikolina Dunder

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The most common fixative in cytochemical tests for the diagnosis of leukemia is a combination of acetone and formalin. Despite its widespread use, formalin is carcinogenic and mutagenic, therefore its use seeks to be eliminated or minimized. There is currently no adequate replacement for formalin, therefore the main goal of this paper is to develop trial formulations of fixatives for cytochemical diagnosis of leukemia that will not contain formalin and that will not have a harmful effect, and which will give just as good results as a formalin fixative. 36 trial formulations were made, from which 25 contained the less harmful dialdehyde glyoxal with the addition of a supplement, and the other new formulations did not contain aldehyde fixatives at all. Of the 36 samples, 8 of them fixed cells comparable to a formalin-containing fixative and were selected as test fixatives in cytochemical tests for the diagnosis of leukemia. Six trial fixatives showed good results in staining with leukemia detection kits in addition to staining with the Sudan Black B Eco kit. But one of the remaining two new formulations that did not give a good result with other tests for the diagnosis of leukemia showed a good result with the Sudan Black B Eco kit.

(75 pages, 52 figures, 11 tables, 39 references; original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Key words: fixation, formalin, enzyme

Supervisor: Maja Šantak, PhD

Co-supervisor: Nada Oršolić, PhD, Full Prof.

Reviewers:

PhD, Full Prof. Nada Oršolić

Assoc. Prof. Jasna Lajtner

PhD, Full Prof. Goran Kovačević

Thesis accepted: 02.09.2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Fiksacija.....	1
1.2. Često korišteni fiksativi	6
1.2.1. Formaldehid	6
1.2.2. Glioksal	7
1.2.3. Glutaraldehid.....	8
1.2.4. Osmijev tetroksid	9
1.2.5. Alkoholni fiksativi	9
1.2.6. Aceton	10
2. Leukemija.....	10
3. Citokemijski testovi.....	12
3.1. Esteraze.....	12
3.2. Alkalna fosfataza	13
3.3. Kisela fosfataza.....	14
3.4. Mijeloperoksidaza	15
3.5. Sudan Black B	15
3.6. Reakcija perjodne kiseline i Schiffove baze u leukocitima.....	16
4. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
5. MATERIJALI I METODE	19
5.1. Materijali	19
5.2. METODE.....	23
5.2.1. Priprema krvnih preparata.....	23
5.2.2. Fiksacija krvnih preparata.....	23
5.2.3. Bojenje krvnih preparata Hematoksilinom ML	23
5.2.4. Određivanje vremena potrebnog za optimalnu fiksaciju	24
5.2.5. Bojenje krvnih preparata fiksiranih novim formulacijama fiksativa kompletima za dijagnostiku leukemija	24
6. REZULTATI.....	29
6.1. Rezultati mjerenja pH novim formulacijama fiksativa bez formalina za primjenu u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija.....	29

6.2. Bojenje krvnih preparata hematoksilinom ML nakon fiksacije s novim formulacijama fiksativa bez formalina	31
6.3. Optimalno vrijeme za fiksaciju s odabranim novim formulacijama fiksativa bez formalina	48
6.4. Testiranje novi formulacija fikstiva bez formalina u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija.....	57
7. RASPRAVA.....	67
8. ZAKLJUČAK	70
9. LITERATURA.....	71
10. Životopis.....	75

1. UVOD

1.1. Fiksacija

Fiksacija je kemijski proces kojim se nastoji morfologija stanice očuvati što bliže izvornom stanju. Fiksativ se koristi kako bi se spriječila autoliza i rast bakterija na tkivu, te kako bi se smanjio gubitak staničnih komponenti, uključujući proteine, lipide, citoplazmatske membrane, hrapavi ER, mitohondrije i lizosome (Dey 2018).

Tijekom fiksacije može doći do:

1. promjene u volumenu stanica, gdje fiksativ poput osmijevog tetroksida uzrokuje bubrenje stanica. Promjene u volumenu mogu nastati zbog inhibicije enzima koji je odgovoran za respiraciju, promjene u permeabilnosti membrane i zbog promjene u transportu Na^+ iona.
2. promjene u konzistenciji tkiva, stoga se određena količina otvrdnjavanja dogodi tijekom fiksacije.
3. promjene u optičkoj gustoći jezgre i jezgre mogu izgledati kondenzirano i hiperkromatski.
4. fiksacija može uzrokovati i smetnje u detekciji aktivnosti enzima (Dey 2018).

Na fiksaciju može utjecati više čimbenika:

1. pH i puferi

Većina fiksativa radi najbolje na neutralnom pH. U pravilu, dobra fiksacija će se dogoditi kada je pH od 6 do 8, i tada se ne vide nikakve morfološke promjene. Promjene u ultrastrukтури mogu postojati kada je pH prenizak ili previsok. Izbor optimalnog pH ovisi o tipu fiksativa i tkivu koje se fiksira. Puferi se koriste kako bi se pH održala na optimalnoj razini, stoga se biraju puferi koji ne reagiraju s fiksativom. Najčešće korišteni puferi su fosfati, bikarbonati i acetati (Hayat 1981).

2. Temperatura

Sobna temperatura je dovoljna za normalnu fiksaciju, i ne postoji razlika u morfologiji stanica od 0 °C do +45 °C, ali vrijeme fiksacije može biti smanjeno na višim temperaturama (+60 °C do +65 °C). Pri višim temperaturama vibracija i pokretanje molekula je povećano. To povećava stopu penetracije fiksativa u tkivo i ubrzava proces fiksacije. Naime, pri višim temperaturama se većina kemijskih reakcija brže odvija (Hayat 1981).

3. Trajanje fiksacije i veličina uzorka

Dubina koja je dosegnuta fiksativom je direktno proporcionalna s korijenom trajanja fiksacije.

$$D = k\sqrt{t}$$

D-dubina penetracije

t-vrijeme

k- koeficijent difuzije

Stoga vrijeme koje je potrebno da fiksativ penetrira do određene dubine tkiva ovisi o koeficijentu difuzije (k). Prisutnost krvi može ometati penetraciju fiksativa, stoga se tkivo ispere prije stavljanja u fiksativ. Tkivo treba biti odrezano na 3-5 mm. Većina fiksativa će penetrirati u tkivo na dubini od 1 mm u roku od 1 h. Prolongirana fiksacija može uzrokovati gubitak lipida i proteina te znatno smanjiti enzimске aktivnosti stanice (Hayat 1981).

4. Koncentracija fiksativa

Mala koncentracija fiksativa prolongira vrijeme fiksacije, dok visoka koncentracija uzrokuje brzu fiksaciju i može uzrokovati otvrdnjavanje tkiva i smanjenje tkiva (Thavarajah i sur., 2012).

5. Osmolalnost fiksativa i ionski sastav

Hipertonična otopina fiksativa uzrokuje smanjenje stanice, dok hipotonična otopina fiksativa uzrokuje bubrenje stanice. Najbolji rezultati se dobivaju s otopinama koje su blago hipertonične (400-450 mOsm). Ioni poput Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} mogu utjecati na strukturu i oblik stanice. Stoga ionski sastav tekućina treba biti što bliži fiziološkom sustavu (Dey 2018).

Fiksacija tkiva se može postići kemijskim ili fizičkim metodama.

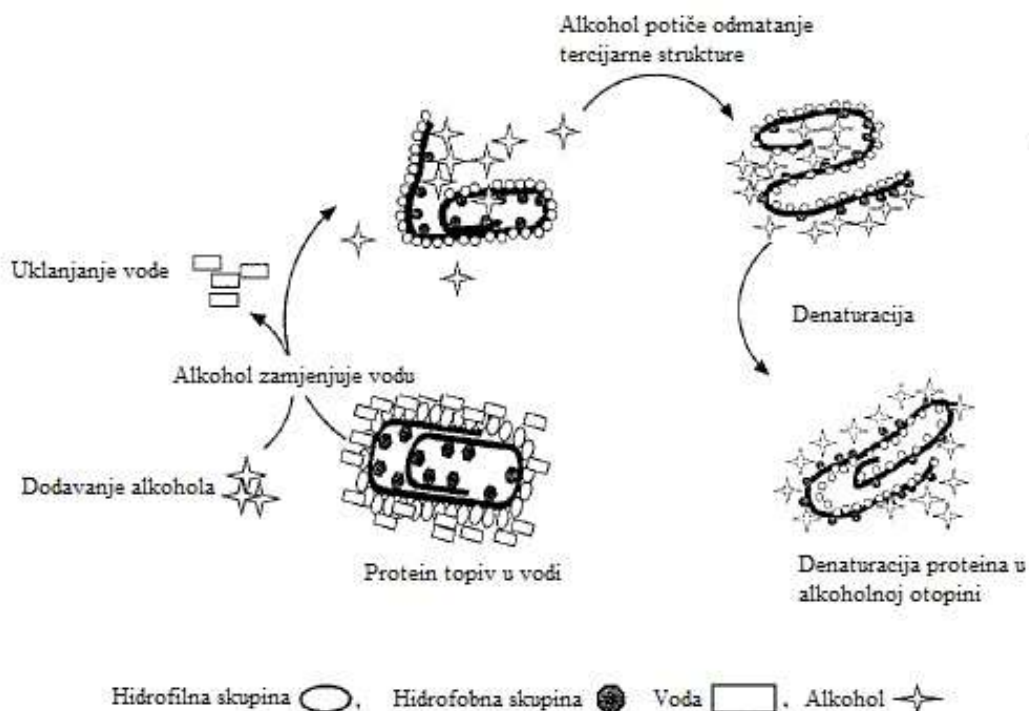
Kemijska fiksacija

Kemijska fiksacija uključuje korištenje organskih ili neorganskih otopina kako bi se održala morfologija stanice. Postoje dvije glavne kategorije kemijske fiksacije: koagulativni i nekoagulativni (Isam i sur., 2001).

Koagulativni fiksativi

Najčešći koagulativni fiksativi su dehidrati poput alkohola i acetona. Uklanjanje i zamjena slobodne vode iz tkiva ima jak učinak na proteine unutar tkiva. Molekule vode koje okružuju hidrofobne dijelove proteina potiču hidrofobne dijelove da međusobno budu u bližem kontaktu i time stabiliziraju vezu, stoga će uklanjanje vode destabilizirati hidrofobno vezivanje jer će se hidrofobni dijelovi raširiti jedni od drugih. Slično, vodikove veze molekula vode doprinose u hidrofilnom dijelu proteina, stoga će i tu uklanjanje vode destabilizirati vodikovu vezu u hidrofilnim područjima. Zajedno ove promjene djeluju na poremećaj tercijarne strukture proteina. Proteini koji su normalno topivi u vodenom okolišu primarno imaju hidrofilne grupe izložene s vanjske strane proteina. Kada se alkohol ili aceton dodaju umjesto vode, doći će do povlačenja hidrofobnih područja proteina prema novom organskom okolišu. Time će se struktura proteina djelomično promijeniti, gdje će hidrofobne grupe biti s vanjske strane proteina (Slika 1.). Ometanje tercijarne strukture proteina (denaturacija) promijenit će fizička svojstva proteina, uglavnom

uzrokujući netopivost i gubitak funkcije. Iako većina proteina postane manje topiva u organskom okolišu, do 13% proteina se izgubi s fiksacijom acetona (Isam i sur., 2001).



Slika 1. Prikaz denaturacije proteina nakon dodatka koagulacijskog fiksativa poput alkohola (Preuzeto i prevedeno iz Isam i sur., 2001).

Nekoagulativni fiksativ

Neke kemikalije se koriste kao fiksativi zbog njihove sposobnosti umrežavanja unutar i između proteina i nukleinskih kiselina. To uključuje aldehide poput formaldehida, glutaraldehida, kloral hidrata i glioksala (Isam i sur., 2001). Njihovo djelovanje bit će detaljnije objašnjeno u daljnjim poglavljima.

U fizičke metode spadaju:

Imerzijska fiksacija koja se najčešće koristi u laboratorijima. Tijekom ovog postupka cijeli uzorak je uronjen u tekući fiksativ (Dey 2018).

Premazivanje fiksativom koje se često koristi s citološkim uzorcima. Fiksativ u spreju se koristi za jednostavno nanošenje na stakalce. Fiksativ u spreju uglavnom sadrži alkohol i vosak, stoga se vosak mora ukloniti prije postupka bojenja (Dey 2018).

Fiksacija parom gdje se para kemikalije koristi kako bi se fiksirao razmaz ili tkivo. Najčešće korištene kemikalije za fiksaciju parom su formaldehid, osmijev tetroksid, glutaraldehid i etilni alkohol. Para pretvara topivi materijal u netopivi materijal i ti se materijali zadržavaju kad razmaz dođe u kontakt s tekućom otopinom (Dey 2018).

Perfuzijska fiksacija koja se uglavnom koristi u istraživačke svrhe. U ovoj se tehnici otopina za fiksiranje ulijeva u arterijski sustav životinje i fiksira se cijela životinja. Organi poput mozga ili leđne moždine također se mogu fiksirati perfuzijskom fiksacijom (Dey 2018).

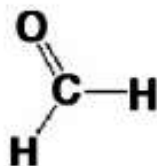
Mikrovalna fiksacija se koristi kako bi se ubrzala fiksacija, gdje će se vrijeme fiksacije smanjiti od 12 h na 20 minuta. Mikrovalna fiksacija tkiva u formalinu rezultira stvaranjem velike količine toksičnih para. Stoga se češće koriste fiksativi na bazi glioksala koji neće stvarati pare kada su zagrijani na 55 °C (Isam i sur., 2001).

Sušenje smrzavanjem se koristi za izučavanje visoko topivih materijala, posebno malih molekula. U ovoj se tehnici tkivo reže na tanke dijelove, a zatim brzo zamrzne na niskoj temperaturi (-30 °C). Poslije toga se led iz tkiva uklanja uz pomoć vakuumske komore na višoj temperaturi (Isam i sur., 2001).

1.2. Često korišteni fiksativi

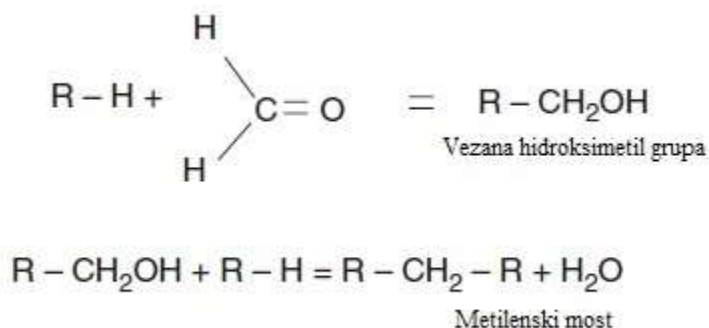
1.2.1. Formaldehid

Formaldehid (Slika 2.) je bezbojan, visoko zapaljiv i otrovan plin. Topiv je u vodi i drugim polarnim otapalima (Dey 2018). Formalin (40%-tna otopina formaldehida u vodi) je najčešće korišteno fiksirajuće sredstvo u histologiji (Zanini i sur., 2012). Razgrađuje se na temperaturi iznad 150°C na metanol i ugljikov monoksid. Nalazi se u maloj količini u svakoj ljudskoj stanici jer se uzima izvana ili se može direktno sintetizirati u organizmu preko metabolizma serina, glicina, kolina i metionina. Izlučuje se iz tijela preko urina ili stolice (Ince i sur., 2020). Formalinu je potrebno oko 24 h da u potpunosti fiksira tkivo od 1 cm³. Formaldehid reagira s proteinima i nukleinskim kiselinama bez da uništi polipeptidne ili polinukleotidne lance, modificira bazu i formira umrežavanje u nukleinskim kiselinama i sačuva konformaciju nukleoproteina (Isam i sur., 2001).



Slika 2. Kemijska struktura Formaldehida (Preuzeto iz Dapson 2007).

Formaldehid reagira s različitim bočnim lancima proteina i formira hidroksimetil bočnu grupu. Ti spojevi su izrazito reaktivni i dolazi do umrežavanja formiranjem metilenskih mostova (Slika 3.). Naknadno će doći do intramolekularnog i intermolekularnog umrežavanja molekula, što će u konačnici stvoriti netopiv produkt. Formalin se može ukloniti iz tkiva učestalim ispiranjem. Ali jednom kada se formiraju metilenski mostovi, reakcija je stabilna i tada ga je teže ukloniti iz tkiva (Dey 2018).



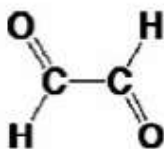
Slika 3. Prikaz reakcije fiksacije formalinom (Preuzeto i prevedeno iz Dey 2018).

Najveći problem u korištenju formalina kao fiksativa jest što je kancerogen (kategorija 1B) i mutagen (kategorija 2) (Regulation (EU) No 2015/491). Akutno unošenje formalina kod ljudi je rezultiralo gubitkom svijesti, vaskularnim kolapsom, upalom pluća, hemoragičnim nefritisom i abortusom. Ujedno formalin može oštetiti larinks i dušnik, a oštećenja gastrointestinalnog sustava se događaju primarno u želudcu i donjem dijelu jednjaka. Kontakt kože s formaldehidom primarno može uzrokovati iritaciju i alergijski dermatitis. Djeluje i kao iritans mukozne membrane uzrokujući konjunktivitis i lakrimaciju. Iritacija oka je učestala pojava. Prednosti formalina su što mu je stopa penetracije visoka, morfologija stanice je dobro očuvana, jeftin je, stabilan i otopinu je jednostavno napraviti. Negativna svojstva su mu da ima sporu fiksaciju, reakcija s tkivom je reverzibilna i može se ukloniti ispiranjem, ne može očuvati kisele mukopolisaharide, kancerogen je i mutagen (Vimercati i sur., 2010).

1.2.2. Glioksal

Glioksal (Slika 4.) je najjednostavniji dialdehid. Teoretski postoji kao plin, ali se industrijski direktno proizvodi u vodenom obliku. Glioksal ne stvara pare stoga nema rizika od inhalacije pa se zato često koristi kao zamjena umjesto formaldehida (Dey 2018). Vodena otopina glioksala slabo reagira s većinom krajnjih grupa. Vodenoj otopini se mora dodati pufer da bi imao pH 4 kako bi bio stabilan, i mora sadržavati malu količinu etanola koji katalizira reakciju glioksala s

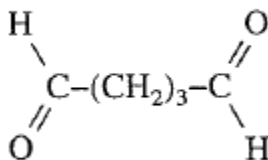
proteinima. Tkiva koja su fiksirana glioksalima imaju veći kontrast. Manja tkiva će se fiksirati u roku od 1 h glioksalom (Dapson 2007).



Slika 4. Kemijska struktura Glioksala (Preuzeto iz Dapson 2007).

1.2.3. Glutaraldehyd

Glutaraldehyd se koristi kao fiksativ za elektronsku mikroskopiju jer fiksira i očuva ultrastrukture. Za razliku od formaldehida glutaraldehyd ima dvije aldehydne skupine, svaku na jednom kraju molekule, koje su razdvojene s 3 metilenska mosta (CH₂) (Slika 5.) (Hopwood 1969). Aldehydna skupina glutaraldehyda reagira s amino skupinom proteina. Stopa penetracije glutaraldehyda je niska stoga se s njim treba fiksirati malo tkivo (do 1 mm). On ne reagira s lipidima niti ugljikohidratima, stoga se često koristi u kombinaciji s drugim fiksativima. U vodenim otopinama glutaraldehyd polimerizira tvoreći cikličke i oligomerne spojeve, a također se oksidira u glutarnu kiselinu. Da bi se postigla stabilnost, potrebno je skladištenje na 4 °C i pH oko 5 (Hopwood 1969).



Slika 5. Prikaz kemijske strukture glutaraldehyda (Preuzeto iz Isam i sur., 2001).

Njegove prednosti u odnosu na druge fiksative su što bolje fiksira ultrastrukture, manje smanjuje stanice, očuvanje proteina je bolje i nije iritans. Njegovi nedostaci su što može fiksirati samo male

komade tkiva (do 1 mm), dosta je nestabilan, ne fiksira lipide, polimerizira iznad 7.5 pH i skup je (Dey 2018).

1.2.4. Osmijev tetroksid

Osmijev tetroksid se koristi kao fiksativ u elektronskoj mikroskopiji. Može se koristiti sam ili u kombinaciji s drugim fiksativima. Topiv je u vodi kao i u nepolarnim otapalima i može reagirati s hidrofilnim i hidrofobnim mjestima. Reagira s bočnim lancima proteina uzrokujući umrežavanje. Velike količine proteina se izgube iz tkiva tijekom fiksacije osmium tetroksida (Isam i sur. 2001). Njegove prednosti su što je izuzetno dobar fiksativ za lipide, očuva citoplazmatske organele poput mitohondrija i Golgijevog aparata i ne čini tkivo tvrdim. Dok njegovi nedostaci su što ne fiksira proteine niti ugljikohidrate stoga se treba koristiti u kombinaciji s drugim fiksativima, slaba mu je stopa penetracije, može doći do bubrenja tkiva, isparava na sobnoj temperaturi stvarajući štetne pare koje su toksične za oči i respiratorni sustav (Dey 2018).

1.2.5. Alkoholni fiksativi

Pod najčešće alkoholne fikative ubrajaju se metanol (CH_3OH) i etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). Oba alkohola djeluju kao koagulanti koji denaturiraju proteine i istiskuju molekule vode u tkivu te na taj način remete hidrofobne i vodikove veze. Sve to dovodi to promjene tercijarne strukture proteina i njihove topivosti u vodi. Za fiksaciju se najčešće koriste koncentracije od 50% do 60% etanola i koncentracija veća od 80% metanola. Metanol se najčešće koristi kao fiksativ za krvne razmaze, a etanol se češće koristi u citologiji. Oba alkohola se često koriste i u kombinaciji s drugim fiksativima (Leong i sur., 1994; Eltoum i sur., 2001; Horobin, 2011).

1.2.6. Aceton

Aceton (CH_3COCH_3) ima slično djelovanje kao alkoholni fiksativi. Često se primjenjuje kod histoloških testova koji dokazuju aktivnosti staničnih enzima. Aceton je vrlo učinkovit kao otapalo za masti stoga može djelovati na tkivo da ga čini krutim (Leong i sur., 1994; Eltoum i sur., 2001).

2. Leukemija

Leukemije su neoplastične proliferacije nezrelih stanica hematopoetskog sustava, koje karakterizira abnormalna diferencijacija. Leukemijske stanice se ubrzano dijele i akumuliraju u koštanoj srži. Zamjenom normalnih stanica leukemijskim stanicama rezultira znakovima i simptomima bolesti. Posljedica nakupljanja tih stanica u koštanoj srži može utjecati na sve tri glavne stanične linije i time uzrokovati anemiju, hemoragiju i infekciju. Leukemije se mogu podijeliti na akutni oblik (brzo rastući) i kronični oblik (sporo rastući) (Walker i sur., 1990).

Akutne leukemije potječu od primitivnih krvotvornih matičnih stanica i mogu se podijeliti na akutnu mijeloičnu leukemiju (AML) i akutnu limfoblastičnu leukemiju (ALL). Kod ovakvih pacijenata se javlja anemija i trombocitopenija. Postoji 8 tipova AML (M0-M7) i 3 tipa ALL (L1-L3), koji su podijeljeni na temelju morfologije, citokemije i imunofenotipova. Ova podjela se koristi kako bi se mogla razlikovati limfoidna linija od mijeloidne linije radi adekvatnog liječenja. Od ALL-a, razlikovanje ALL3 je najbitnije jer ovaj tip leukemija ima drugačiju prognozu i liječenje. Blasti mijeloične leukemije su veći s okruglom ili nepravilnom, glatkom zrnastom jezgrom, dok su limfoblasti manji s pravilnijim jezgrama i oskudnom, agranularnom citoplazmom (Pejovic i Schwartz 2002).

Kronične leukemije

Ovaj oblik je najčešći kod odraslih ljudi. Pojam kronična dolazi od toga da ona napreduje sporije od drugih tipova leukemije. Postoje dva tipa; kronična mijeloična leukemija (CML) i kronična limfocitna leukemija (CLL) (Stefan i Hagop 2001).

Kronična mijeloična leukemija zahvaća pacijente srednje dobi (40-45 godina). Razmaz periferne krvi može potvrditi dijagnozu. Ovu leukemiju karakterizira zamjena normalnih elemenata koštane srži sa zrelim mijeloičnim stanicama koje više ne reagiraju na mehanizme koji upravljaju proliferacijom normalnih mijeloičnih stanica. Broj trombocita može biti povišen, dok je trombocitopenija rijetka. Najveće abnormalnosti se javljaju u leukocitima. Broj leukocita je povišen, nekad toliko da se i leukostaza može javiti. Stanice svih stadija granulopoeze su nađene u perifernoj krvi, čak i do te mjere da mogu nalikovati aspiratu koštane srži. Broj bazofila i eozinofila je povišen. Koštana srž je hipercelularna s prevladavanjem mijeloičnih elemenata. Klasična mijeloična leukemija se može podijeliti u tri kliničke faze: kronična, ubrzana i akutna faza. U kroničnoj fazi pacijenti imaju i do 20% manje nezrelih mijeloičnih stanica u perifernoj krvi. Koštana srž je hipercelularna s granulocitnom i megakariocitnom hiperplazijom. Ubrzana faza predstavlja prijelaz iz kronične u akutnu fazu. U ovoj fazi se javljaju progresivne sistemske tegobe, splenomegalija, anemija, bazofilija, kvantitativne abnormalnosti trombocita, povećana mijelopoeza i mijeloblasti u cirkulaciji. U akutnoj fazi većina pacijenata će imati postepen prijelaz iz kronične faze u akutnu u roku od 4 godine. Ovu fazu definira prisutnost cirkulirajućih mijeloblasta ili mijeloblasta u koštanoj srži za 30% ili više. Mijeloične stanice u ovoj fazi postaju manje diferencirane (Morrison 1994).

3. Citokemijski testovi

Uz tradicionalne hematološke metode poput morfologije i citokemije, danas se traže visoko specijalizirane tehnike za identifikaciju malignih i normalnih hematopoetskih stanica. Integracija različitih disciplina poput morfologije, citokemije, imunologije, enzimologije itd. je potrebna kako bi se mogao analizirati fenotip leukemijskih stanica. Enzimi leukocita se mogu izučavati preko biokemijskih ili citokemijskih testova. Imunološke metode se također koriste u detekciji enzima tako da se koriste antitijela protiv tih enzima koja se potom detektiraju imunofluorescencijom (Drexler i sur., 1985). Enzimi čija se identifikacija koristi u dijagnostici leukemija su: esterase (specifična i nespecifična), fosfataze (alkalna i kisela) i mijeloperoksidaze. Osim enzima dijagnostika leukemija se provodi i citokemijskim testovima koje koriste boju Sudan Black B ili detektiraju reakciju perjodne kiseline i Schiffove baze u stanicama. Za fiksaciju krvnih preparat u kojima se detektira aktivnost enzima ne mogu se kao fiksativi koristiti alkoholni fiksativi jer u tom slučaju može doći do inaktivacije enzima uslijed djelovanja alkohola (Crook i sur., 1980).

3.1. Esteraze

Esteraze su skupina enzima koji imaju sposobnost hidrolize različitih alifatskih i aromatskih estera u kiseloj ili neutralnoj pH. Na temelju supstrata podijeljene su na specifične i nespecifične esterase. Korištenjem različitih supstrata mogu se razlikovati tipovi stanica u pacijenata s neoplastičnim i ne-neoplastičnim bolestima. Kao supstrati se danas najviše koriste alfa naftil acetat, alfa naftil butirat i alfa naftol AS-D kloroacetat (Shibata i sur., 1985).

Kod detekcije nespecifične esterase monociti i makrofagi uglavnom prikazuju intenzivno obojenje citoplazme kad se koristi acetat ili butirat supstrat. Citokemijska reakcija u T limfocita se vidi kao nekoliko točkica u citoplazmi. B limfociti uglavnom pokazuju neznatnu obojenost. Megakariociti također pokazuju intenzivnu citoplazmatsku reakciju s acetatnim esterom, ali mnogo slabiju reakciju s butirat supstratom. Korištenjem različitih inhibitora za nespecifične esterase, kao što je npr. natrijev fluorid, one se mogu razlikovati jedna od druge u krvnim stanicama. Nespecifična esteraza u stanicama monocitne linije se može inhibirati preko natrijevog fluorida. S druge strane

nespecifične esterase u stanicama granulocitne linije su relativno otporne na inhibiciju preko natrijeva fluorida. Citokemijska reakcija leukocitnih alfa-naftil acetat esterase (ANAE) ili butirat esterase (ANBE) se koristi za identifikaciju monocitnih komponenti u akutnoj monocitnoj leukemiji, akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji i kroničnoj mijelomonocitnoj leukemiji. Normalni mijeloblasti i stanice granulocitnih linija uglavnom nemaju ANAE ili ANBE aktivnost, dok se slaba do umjerena reakcija javlja u leukemijskim mijeloblastima i promijelocitima akutne promijelocitne leukemije (Patel 1992). Identifikacija specifične esterase se koristi za dijagnostiku bolesti, gdje mijeloblasti sadrže aktivnost specifične esterase dok limfoblasti ne sadrže (Kass 1979). Specifična esteraza hidrolizira naftol AD-D kloroacetat, pri čemu će nastati slobodni naftol koji će u reakciji s diazo-solima stvoriti crveni precipitat na mjestu reakcije. Neutrofili, promijelociti i stanice mijeloblastične leukemije će prikazati crveno granulirano obojenje citoplazme, dok monociti rijetko pokazuju slabo crveno granulirano obojenje citoplazme (Shibata i sur., 1985).

3.2. Alkalna fosfataza

Alkalna fosfataza je glikoprotein koji katalizira hidrolizu fosfatnih monoestera. Alkalne fosfataze tvore veliku obitelj dimeričnih enzima, koji se nalaze na površini stanica (Sharma i sur., 2014). Kod sisavaca je to metaloenzim koji sadrži cink. Tri metalna iona, uključujući dva Zn^{2+} i jedan Mg^{2+} , na aktivnom mjestu su esencijalni za enzimsku aktivnost. Alkalna fosfataza se nalazi u zrelijim stanicama mijeloidne linije i neutrofilima. Korisna je za razlikovanje između kronične mijelocitne leukemije gdje je niska razina od leukemoidne reakcije gdje je normalna razina. Alkalna fosfataza katalizira hidrolizu fosfatnih estera u alkalnoj otopini. U toj reakciji će osloboditi 1-naftol iz 1-naftil fosfata, koji će u reakciji sa diazo-solima stvoriti smeđi precipitat na mjestu reakcije (Shibata i sur., 1985).

3.3. Kisela fosfataza

Grupa enzima koja ima sposobnost hidrolize fosfatnih estera u kiselom pH. Kisela fosfataza kod ljudi je normalno prisutna u niskim koncentracijama. Promjene u njihovoj sintezi se javljaju u određenim bolestima. Stoga se kisele fosfataze mogu koristiti kao serološki i histološki marker za bolesti (Bull i sur., 2002). Kisele fosfataze se mogu podijeliti u dvije glavne skupine. Prva grupa (metalohidrolaze) prikazuju ljubičastu boju zbog prijenosa naboja iz ostatka tirozina u Fe^{3+} , stoga se zove ljubičasta kisela fosfataza. Druga grupa je neosjetljiva na inhibiciju tartarata stoga se zovu kisele fosfataze otporne na tartarat (Anand i Srivastava 2012). Reakcija kisele fosfataze se koristi za dijagnostiku leukemije vlasastih stanica i radi razlikovanja između limfoproliferativnih poremećaja T stanica i ne T tipa (Shibata i sur. 1985). Aktivnost kisele fosfataze je povećana u kroničnoj granulocitnoj leukemiji i smanjena u kroničnoj limfatičkoj leukemiji i akutnim leukemijama. Razlika može biti zbog različitih tipova stanica koje sudjeluju u tim bolestima. Gotovo svi tipovi krvnih stanica imaju aktivnost alkalne fosfataze koja se može inhibirati dodavanjem dinatrijevog tartarata u otopinu za bojenje pri čemu se oboje jedino stanice vlasaste leukemije. Enzimska aktivnost je povećana u monocitima, histiocitima, megakariocitima i plazma stanicama, dok je dosta smanjena u nezrelim granulocitima, limfocitima, limfoblastima i eritroblastima. Postoji i razlika u supstratu između limfocita i neutrofila. Limfociti hidroliziraju naftol AS-BI fosfat, ali slabo reagiraju s alfa-naftil fosfatima. Dok neutrofili i monociti dobro hidroliziraju oba supstrata. To ukazuje na heterogenost enzima u limfocitima i neutrofilima. Supstrati koji se koriste za otkrivanje aktivnosti kisele fosfataze su fenil fosfat, para-nitrofenil fosfat, beta-glicerol-fosfat, alfa-naftil fosfat, beta-naftil fosfat, fenol ftalein fosfat, timol-ftalein fosfat i naftol AS-BI fosfat (Yam 1974).

3.4. Mijeloperoksidaza

Mijeloperoksidaza je hemoprotein koji ima ulogu enzima u leukocitima, imaju mikrobicidnu aktivnost na površini bakterija i nalazi se u azurofilnim granulama neutrofila i monocita. Postoji više metoda koje se koriste za prikazivanje aktivnosti enzima. Koriste se metode za razlikovanje akutnih mijeloidnih leukemija od akutnih limfocitnih leukemija. (Rośniak-Bąk i sur., 2017). Mijeloperoksidaza je uključena u različite bolesti poput reumatoidnog artritisa, arterioskleroze i raka pluća. Mijeloperoksidaza katalizira lipidnu peroksidazu preko tvorbe tirozil radikala i to dovodi do stvaranja drugih produkata koji uzrokuju lipoproteinsku oksidaciju. Oksidacija lipoproteina poput HDL-a dovodi do ateroskleroze. (Khan i sur., 2014). Često se koriste spojevi poput DAB i BDH. BDH metoda je jednostavna i brza, ali slaba lokalizacija produkta reakcije kao i nesposobnost prepoznavanja kvantitativnih razlika među stanicama je nedostatak. Produkt DAB reakcije je jednostavno lokaliziran. Metoda je jednostavna i pogodna za korištenje na elektronskom mikroskopu. Ove metode imaju svoje prednosti i svaka od njih može poslužiti kao adekvatna metoda. Stoga će izbor metode ovisiti o dostupnosti supstrata, kancerogenosti i osobnim zadovoljstvom s produktom reakcije (Shibata i sur., 1985).

3.5. Sudan Black B

Sudan Black B je bazična boja koja boji lipide i fosfolipide. Sudan Black B se sastoji od dvije glavne komponente SSB-I i SSB-II. SSB-I može bojati neutralne lipide i manje polarne spojeve, dok SSB-II može bojati nukleinske kiseline, kisele mukopolisaharide i u manjoj mjeri neutralne lipide (Pfüller i sur., 1977). Sudan Black B tehnika se koristi za identifikaciju lipofuscina jer ima visok afinitet za lipidni odjeljak lipofuscina. Pozitivna Sudan Black B lipofuscinska reakcija otkriva crveno-plave unutarstanične granule u stanicama i zamrznutim tkivima. Sudan Black B se nalazi u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji, ali se ne nalazi u svim blastima akutne limfoblastične leukemije (Evangelou i Gorgoulis 2017).

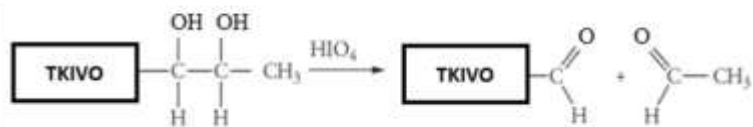
3.6. Reakcija perjordne kiseline i Schiffove baze u leukocitima

Ova metoda temelji se na reakciji perjordne kiseline koja specifično oksidira 1-2 glikolne grupe unutarstaničnih glikogena i neutralnih mukopolisaharida i stvara stabilne aldehide (Slika 6a). Te aldehidne grupe stupaju u reakciju sa Schiffovim reagensom (Slika 6b) pri čemu dolazi do specifičnog ružičastog obojenja. Schiffov reagens je otopina koja nastaje reakcijom boje pararosanilina i sumporaste kiseline. Produkt reakcije perjordne kiseline i Schiffovog reagensa je crvena boja koja može varirati od intenzivno ružičaste do blago-crvene. Citoplazmatska pozitivnost može biti granulirana ili difuzna.

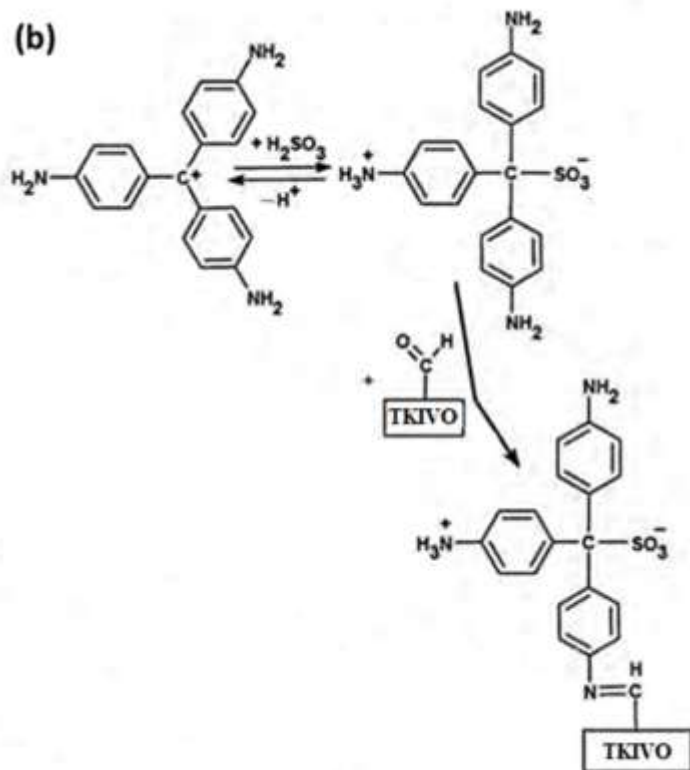
Specifično obojenje stanica pune krvi:

- prekursori granulocita pokazuju difuzno obojenje
- neutrofili se boje intenzivno granulirano
- eozinofilne granule su negativne, dok je citoplazma eozinofila difuzno obojena
- bazofili mogu biti negativni, ali često pokazuju nepravilne blokove pozitivnog obojenja koje nije povezano s bazofilnim granulama
- monociti i njihovi prekursori pokazuju difuznu pozitivnost s finim granulama obično na periferiji citoplazme
- normalni eritroidni prekursori i eritrociti su negativni
- megakariociti i trombociti su uglavnom intenzivno pozitivni s finim granulama
- granularna pozitivnost s negativnom citoplazmom se može naći u 10-40% limfocita (T i B limfociti)
- limfoblasti pokazuju pozitivnost u obliku granula ili blokova na neobojenoj citoplazmi (Culling 1974).

(a)



(b)



Slika 6. Reakcija perjordne kiseline i Schiffovog reagensa. (a) oksidacija tkivnih polisaharida perjordnom kiselinom, (b) reakcija pararosanilina i sumporaste kiseline pri čemu nastaje Schiffov reagens, i vezanje Schiffovog reagensa na aldehidne grupe. (Modificirano preuzeto od Kiernan, 2010)

4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada jest zamijeniti formalin u fiksativu u citkemijskim testovima za dijagnostiku leukemija manje škodljivom komponentom. S obzirom da formalin ima kancerogeno i mutageno svojstvo, nova komponenta mora biti manje štetna i biti jednako učinkovita kao formalin.

5. MATERIJALI I METODE

5.1. Materijali

Pripremila sam 36 probnih formulara fiksativa bez formaldehida oznake od GL13 do GL48. Materijali koje sam koristila kao i količina prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Priprema 50 mL probnih fiksativa.

Oznaka	Aceton	Glioksal	Limunska kiselina	Trinatrijev citrat dihidrat	NaCl	Ostalo	Voda
GL13	27,4 g	2,8 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Ništa	Do 50 mL
GL14	27,4 g	2,1 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Ništa	Do 50 mL
GL15	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Ništa	Do 50 mL
GL16	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	PEG400 5 g	Do 50 mL
GL17	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	PEG400 0,5 g	Do 50 mL
GL18	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	PEG400 5 g	Do 50 mL
GL19	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Glicerol 5 g	Do 50 mL
GL20	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Glicerol 0,5 g	Do 50 mL

Nastavak Tablice 1.

GL21	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Glicerol 5 g	Do 50 mL
GL22	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	DMSO 12,5 g	Do 50 mL
GL23	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	DMSO 5 g	Do 50 mL
GL24	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	DMSO 1 g	Do 50 mL
GL25	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	DMSO 5 g	Do 50 mL
GL26	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Acetilsalicilna kiselina 0,5 g	Do 50 mL
GL27	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Acetilsalicilna kiselina 0,5 g	Do 50 mL
GL28	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Manitol 5 g	Do 50 mL
GL29	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Manitol 0,5 g	Do 50 mL
GL30	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Manitol 5 g	Do 50 mL
GL31	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Sukroza 5 g	Do 50 mL
GL32	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Sukroza 0,5 g	Do 50 mL
GL33	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Sukroza 5 g	Do 50 mL
GL34	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Sorbitol 5 g	Do 50 mL

Nastavak Tablice 1.

GL35	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Sorbitol 0,5 g	Do 50 mL
GL36	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Sorbitol 5 g	Do 50 mL
GL37	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Triacetin 5 g	Do 50 mL
GL38	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Triacetin 0,5 g	Do 50 mL
GL39	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Triacetin 5 g	Do 50 mL
GL40	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Trietanolamin 5 g	Do 50 mL
GL41	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Trietanolamin 0,05 g	Do 50 mL
GL42	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Trietanolamin 5 g	Do 50 mL
GL43	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	4- heksilrezorcinol 5 g	Do 50 mL
GL44	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	4- heksilrezorcinol 0,05 g	Do 50 mL
GL45	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	4- heksilrezorcinol 5 g	Do 50 mL
GL46	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Imidazol 5 g	Do 50 mL
GL47	27,4 g	1,4 g	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Imidazol 0,05 g	Do 50 mL

Nastavak Tablice 1.

GL48	27,4 g	0	0,05 g	0,035 g	0,02 g	Imidazol 5 g	Do 50 M mL
------	--------	---	--------	---------	--------	--------------	---------------

Od ostalih kemikalija koristila sam:

- Hematoksilin ML (Mayerov hematoksilin, modificiran prema Lillieu, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost HEM (hematoksilin za primjenu u LeukoGnost kompletima, proizvođač BioGnost)
- BioMount Aqua (sredstvo za montiranje pokrovnih stakalaca na vodenoj bazi, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost Fiksativ (fiksativ za upotrebu u citokemijskoj dijagnostici leukemija, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost PAS (komplet za detekciju reakcije perjordne kiseline i Schiffove baze u leukocitima, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost MPO (komplet za detekciju aktivnosti mijeloperoksidaze u leukocitima, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost NSE (komplet za detekciju aktivnosti nespecifične esteraze u leukocitima, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost SPE (komplet za detekciju aktivnosti specifične esteraze u leukocitima, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost ALP (komplet za detekciju aktivnosti alkalne fosfataze u leukocitima, proizvođač BioGnost)
- LeukoGnost ACP (komplet za detekciju aktivnosti kisele fosfataze u leukocitima, proizvođač BioGnost)
- Sudan Black B Eco (komplet za bojenje neutrofilnih granula u hematološkim razmazima, proizvođač BioGnost)

- Imerzijsko ulje (proizvođač BioGnost)

- destilirana voda

5.2. METODE

5.2.1. Priprema krvnih preparata

Tijekom izrade ovog rada koristila sam krv zdravih volontera iz laboratorija. Napravila sam više krvnih preparata koristeći krv iz vrha prsta. Na bazu svakog predmetnog stakalca stavila sam kap krvi. Potom sam uzela drugo stakalce koje sam postavila ispred kapi krvi (pod kutom od 30° do 40°) i pomakla ga nazad tako da se krv razmaže po stakalcu u tankom sloju, nakon čega sam ostavila razmazu krvi da se osuše barem 30 minuta. Preparate sam koristila isti dan.

5.2.2. Fiksacija krvnih preparata

Pripremila sam probne fiksative oznaka od GL13 do GL48 kako je prikazano u Tablici 1. Nakon što sam pripremila probne fiksative izmjerila sam im pH pH-metrom.

Nakon izmjerene pH, uzela sam prethodno napravljene razmazu krvi i stavila ih na kadnicu za bojenje preparata. Na svako stakalce sam dodala nekoliko kapi fiksativa GL13-GL48 (izuzev GL28, GL30 i GL46 zbog stvaranja taloga), a kao kontrolu sam koristila komercijalni LeukoGnost fiksativ koji je mješavina acetona i formalina. Krvne preparate s fiksativima sam inkubirala 3 minute nakon čega sam ih isprala destiliranom vodom.

5.2.3. Bojenje krvnih preparata Hematoksilinom ML

Na fiksirane krvne preparate nanijela sam otprilike 1 mL Hematoksilina ML i ostavila da stoji 5 minuta, a zatim sam ih isprala tekućom vodovodnom vodom kroz 3 minute i ostavila ih da se osuše. Kada su se osušili na svaki preparat sam stavila kap sredstva BioMount Aqua i montirala pokrovno

stakalce. Kad se preparat s pokrovnim stakalcem osušio, stavila sam imerzijsko ulje i pod imerzijskim objektivom na mikroskopu sam tražila eritrocite, neutrofile, limfocite i monocite i zabilježila kako su probni fiksativi djelovali na morfologiju staničnih struktura, posebno jezgre i stanične membrane, intenzitet obojenja, te oblik obojenosti. Na temelju toga sam odabrala nove formulacije koje su najbolje fiksirale stanice.

5.2.4. Određivanje vremena potrebnog za optimalnu fiksaciju

Uzela sam nove krvne preparate na koje sam stavila par kapi odabranih novih formulacija fiksativa i ostavila 30 sekundi, 1 minuta, 2 minute, 3 minute i 5 minuta kako bih vidjela koliko je vremena potrebno da bi se postigla optimalna fiksacija. Potom sam isprala preparate i obojila ih Hematoksilinom ML kako je ranije opisano. Ponovila sam postupak montiranja pokrovnog stakalca i pod mikroskopom utvrdila optimalno vrijeme za fiksaciju sa svakom novom formulacijom fiksativa.

5.2.5. Bojenje krvnih preparata fiksiranih novim formulacijama fiksativa kompletima za dijagnostiku leukemija

Kao i u pasusu 5.2.2. uzela sam svježe krvne preparate na koje sam stavila nekoliko kapi odabranih novih formulacija fiksativa i inkubirala 3 minute. Preparate sam dobro isprala destiliranom vodom i osušila. Bojenje krvnih preparata kompletima za dijagnostiku leukemija nakon fiksacije odabranim novim formulacijama fiksativa bez formalina provedeno je prema uputama proizvođača:

a) LeukoGnost PAS komplet za detekciju reakcije perjordne kiseline i Schiff-ovog reagensa u leukocitima (Tablica 2).

Tablica 2. Postupak bojenja krvnih preparata LeukoGnost PAS kompletom.

POSTUPAK	TRAJANJE
Nanijeti Reagens 1 (otopina perjordne kiseline) (1-2 mL) na preparat	10 minuta
Isprati preparat u tekućoj vodovodnoj vodi	10 sekundi
Nanijeti sulfitnu otopinu (1-2 mL) na preparat	1 minuta
Nanijeti Reagens 4 (BioSchiff Forte) (1-2 mL) na preparat	15 minuta
Isprati preparat u tekućoj vodovodnoj vodi	10 sekundi
Nanijeti sulfitnu otopinu (1-2 mL) na preparat	3 minute
Isprati preparat u tekućoj vodovodnoj vodi	3 minute
Obojiti preparat LeukoGnost HEM reagensom	3 minute
Ispirati preparat pod tekućom vodovodnom vodom	3 minute
Osušiti preparat na zraku	

b) LeukoGnost NSE komplet za detekciju nespecifične esteraze u leukocitima (Tablica 3).

Tablica 3. Postupak bojenja krvnih preparata LeukoGnost NSE kompletom.

POSTUPAK	TRAJANJE
Nanijeti otopinu za bojenje (1-2 mL) na preparat	1 sat i 30 minuta
Snažno isprati preparat u destiliranoj vodi	10 sekundi
Obojiti preparat LeukoGnost HEM reagensom	15 minuta
Isprati preparat pod tekućom vodovodnom vodom	2 minute
Osušiti preparat na zraku	

c) Leukognost MPO komplet za detekciju aktivnosti mijeloperoksidaze u leukocitima (Tablica 4).

Tablica 4. Postupak bojenja krvnih preparata LeukoGnost MPO kompletom.

POSTUPAK	TRAJANJE
Nanijeti otopinu za bojenje (1-2 mL) na preparat	10 minuta
Snažno isprati u destiliranoj vodi	10 sekundi
Obojati preparat LeukoGnost HEM reagensom	2 minute
Ispirati preparat pod tekućom vodovodnom vodom	2 minute
Osušiti preparat na zraku	

d) LeukoGnost ACP komplet za detekciju aktivnosti kisele fosfataze u leukocitima (Tablica 5).

Tablica 5. Postupak bojenja krvnih preparata LeukoGnost ACP kompletom.

POSTUPAK	TRAJANJE
Nanijeti otopinu za bojenje (1-2 mL) na preparat	3 sata
Snažno isprati preparat u destiliranoj vodi	10 sekundi
Osušiti preparat	
Preparat obojiti LeukoGnost HEM reagensom	15 minuta
Ispirati preparat pod tekućom vodovodnom vodom	3 minute
Osušiti preparat na zraku	

e) LeukoGnost SPE komplet za detekciju aktivnosti specifične esteraze u leukocitima (Tablica 6).

Tablica 6. Postupak bojenja krvnih preparata LeukoGnost SPE kompletom.

POSTUPAK	TRAJANJE
Nanijeti otopinu za bojenje (1-2 mL) na preparat	30 minuta
Snažno isprati preparat u destiliranoj vodi	10 sekundi
Obojiti preparat LeukoGnost HEM reagensom	5 minuta
Isprati preparat pod tekućom vodovodnom vodom	5 minuta
Osušiti preparat na zraku	

f) LeukoGnost ALP komplet za detekciju alkalne fosfataze u leukocitima (Tablica 7).

Tablica 7. Postupak bojenja krvnih preparata LeukoGnost ALP kompletom.

POSTUPAK	TRAJANJE
Nanijeti otopinu za bojenje (1-2 mL) na preparat	10 minuta
Snažno isprati preparat u destiliranoj vodi	10 sekundi
Osušiti preparat	
Obojiti preparat LeukoGnost HEM reagensom	2 minute
Isprati preparat pod tekućom vodovodnom vodom	2 minute
Osušiti preparat na zraku	

g) Sudan Black B ECO (Tablica 8).

Tablica 8. Postupak bojenja krvnih preparata Sudan Black B Eco kompletom.

POSTUPAK	TRAJANJE
Tretirati preparat Sudan Black B reagensom, bez fenola	5 minuta
Isprati preparat kroz 2-3 izmjene 70%-tnog etanola	
Isprati preparat destiliranom vodom	30 sekundi
Obojiti preparat LeukoGnost HEM reagensom	3 minuta
Isprati preparat pod tekućom vodovodnom vodom	2 minute
Osušiti preparat na zraku	

Kad su se preparati osušili, ponovila sam postupak montiranja pokrovnog stakalca i pod mikroskopom utvrdila utjecaj novih formulacija fiksativa na bojenje kompletima za dijagnostiku leukemija.

6. REZULTATI

Kako bi zamijenili formalin u fiksativu za citokemijske testove za detekcije leukemija, pretražena je literatura vezana uz alternativna fiksirajuća sredstva. Na temelju prikupljenih informacija pripremljeno je 36 novih receptura pri čemu je jedan dio receptura sadržavao glioksal i neki od testiranih suplemenata, a kod drugog dijela receptura je potpuno izbačen glioksal iz sastava i korišteni su samo suplementi koji i sami mogu imati fiksirajuće djelovanje. Kao suplementi su korišteni polietilenglikol 400 (PEG400), glicerol, dimetilsulfoksid (DMSO), acetilsalicilna kiselina, manitol, sukroza, sorbitol, triacetin, trietanolamin, 4-heksilrezorcinol i imidazol. Svaki od suplemenata je korišten barem u dvije koncentracije kako bi se odmah istražilo utječe li koncentracija na djelovanje suplementa kao fiksativa. Sastav novih formulacija prikazan je u Tablici 1. Pri pripremi je zamijećeno da se manitol nije otopio u koncentraciji 10% ni s niti bez glioksala, kao ni 10% imidazol koji se nije otopio uz prisustvo glioksala, dok se dobro otopio bez glioksala. Rezultati ispitivanja novo pripremljenih formulacija fiksativa bez formalina opisani su u idućim poglavljima.

6.1. Rezultati mjerenja pH novim formulacijama fiksativa bez formalina za primjenu u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija

Obzirom da pH fiksacijskog sredstva može biti ključni parametar tijekom fiksacije izmjerila sam pH vrijednosti svim pripremljenim novim formulacijama fiksativa bez formalina za primjenu u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija (Tablica 9.) i te vrijednosti usporedila s pH vrijednosti komercijalnog fiksativa s formaldehidom LeukoGnost Fiksativ čija vrijednost je pH 5,4. U formulacijama kod kojih se suplementi nisu otopili (GL28, GL30 i GL46) pH nisam mjerila niti sam ih dalje testirala.

Tablica 9. pH vrijednosti novih formulacija fiksativa bez formalina.

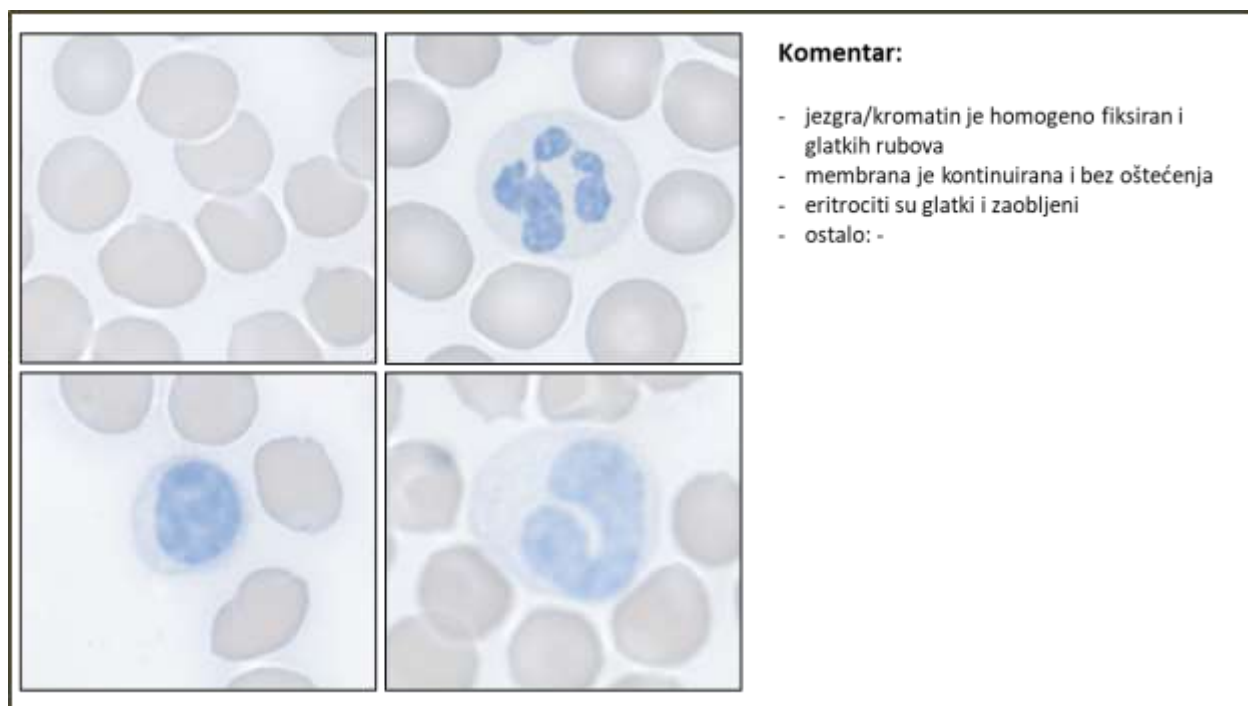
OZNAKA FORMULACIJE	pH
LeukoGnost Fiksativ	5,4
GL13	5,1
GL14	5,1
GL15	5,2
GL16	5,6
GL17	5,5
GL18	5,7
GL19	5,1
GL20	5,2
GL21	5,3
GL22	6,6
GL23	5,6
GL24	5,2
GL25	5,8
GL26	4,5
GL27	4,6
GL28	/
GL29	5,1
GL30	/
GL31	4,9
GL32	5,1
GL33	5,0
GL34	4,9
GL35	5,1
GL36	5,0
GL37	5,3
GL38	5,2
GL39	5,4
GL40	9,0

Nastavak Tablice 9.

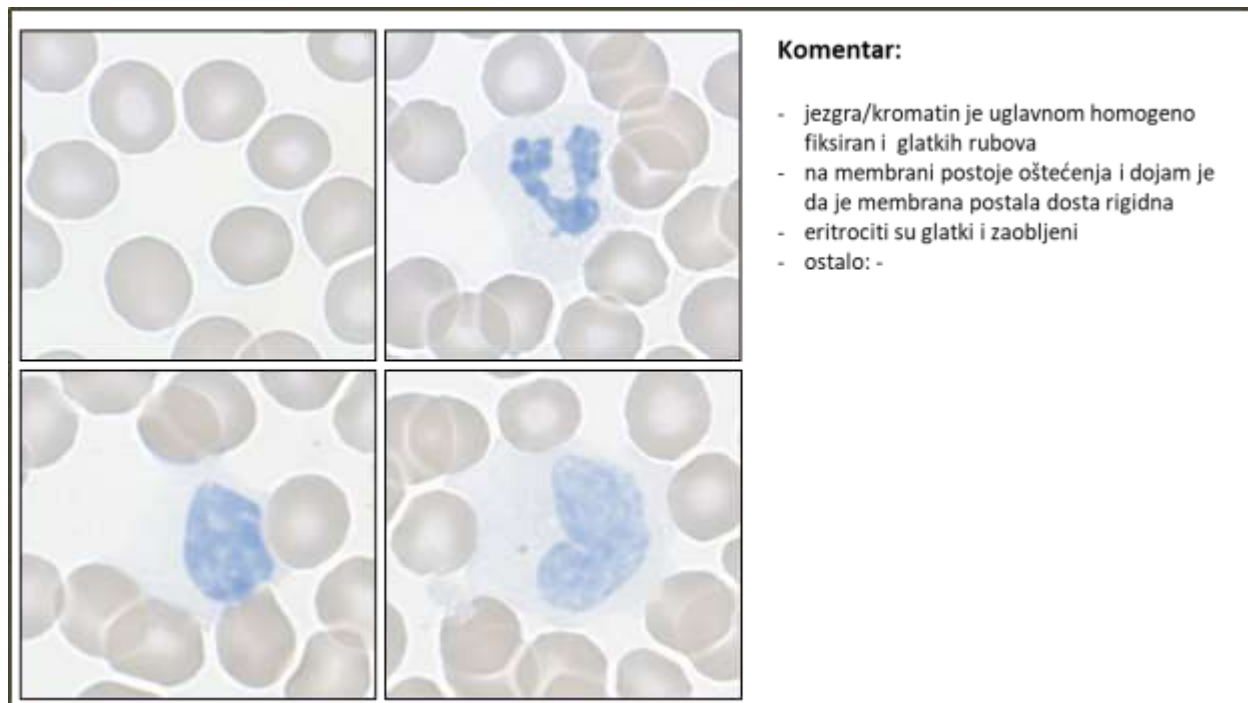
GL41	8,1
GL42	9,2
GL43	4,9
GL44	5,1
GL45	5,0
GL46	/
GL47	7,2
GL48	8,6

6.2. Bojenje krvnih preparata Hematoksilinom ML nakon fiksacije s novim formulacijama fiksativa bez formalina

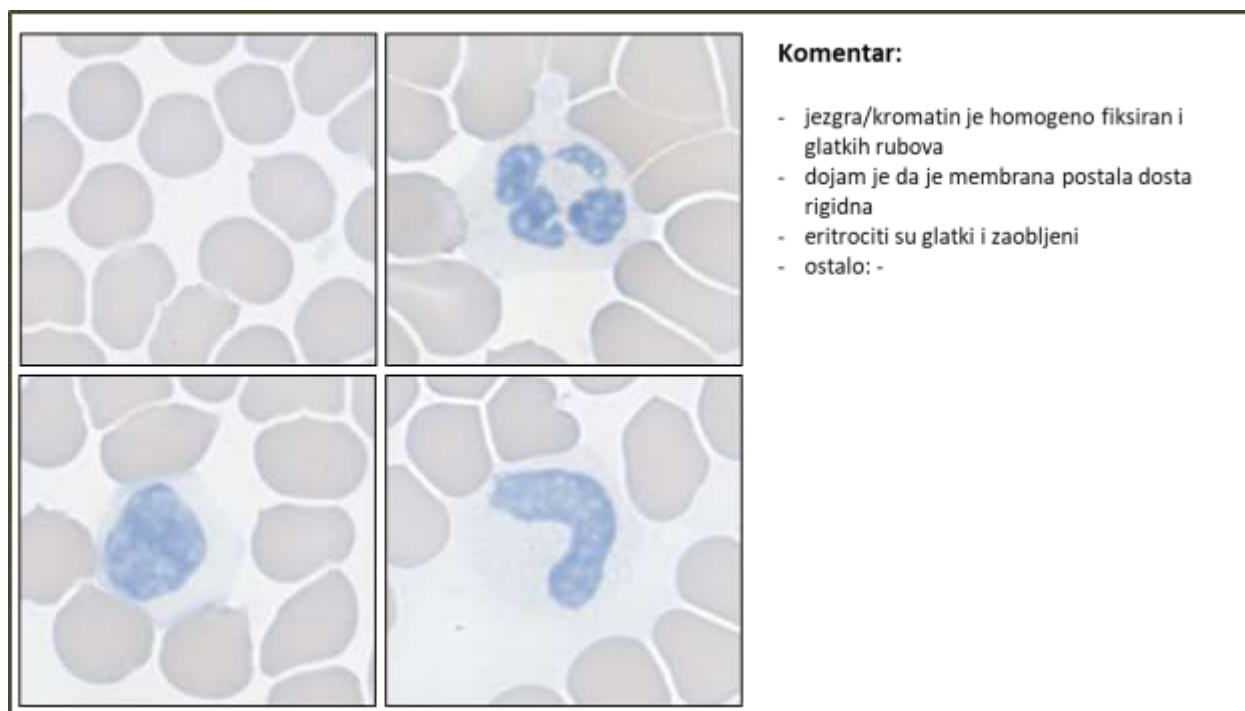
Preparati normalne krvi fiksirani su fiksativom LeukoGnost Fiksativ, te novim formulacijama od GL13 do GL48, izuzev GL28, GL30 i GL46 kako sam već ranije opisala. Preparati su fiksirani kroz 3 minute i podvrgnuti bojenju Hematoksilinom ML prema protokolu za progresivno bojenje. Formulacije s 4-heksilrezorcinolom su imale vrlo agresivan učinak na preparat tako da je većina stanica bila uništena. Ostali preparati nakon bojenja su prikazani slikama od Slike 7. do Slike 37. Uz svaku sliku dodan je komentar izgleda staničnih struktura koje su posebno praćene kao kriterij za ocjenu kvalitete potencijalno novog fiksativa bez formaldehida: izgled jezgre/kromatina, izgled stanične membrane, izgled eritrocita te neke druge posebnosti. Rezultati pokazuju da čak 13 od testiranih 36 novih formulacija daje dobru sliku preparata nakon bojenja Hematoksilinom ML (GL16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 29, 37, 38, 39, 41). Na izgled eritrocita velika većina novih formulacija djeluju blagotvorno uz izuzetak GL25 i GL 40. Nejednoliko obojenje kromatina izazivaju GL34 i GL42. Efekt staklaste citoplazme kod neutrofila izazivaju GL26, 27, 31, 33 i 47. Kod nešto većeg broja novih formulacija (GL13, 14, 15, 18, 25, 32, 35, 36, 42) dolazi do promjene u morfologiji stanične membrane koja nije lijepo zaobljena uslijed povećane rigidnosti. Varijante GL s gliksalom bez suplementa (GL13-15) imaju promjene u izgledu membrane.



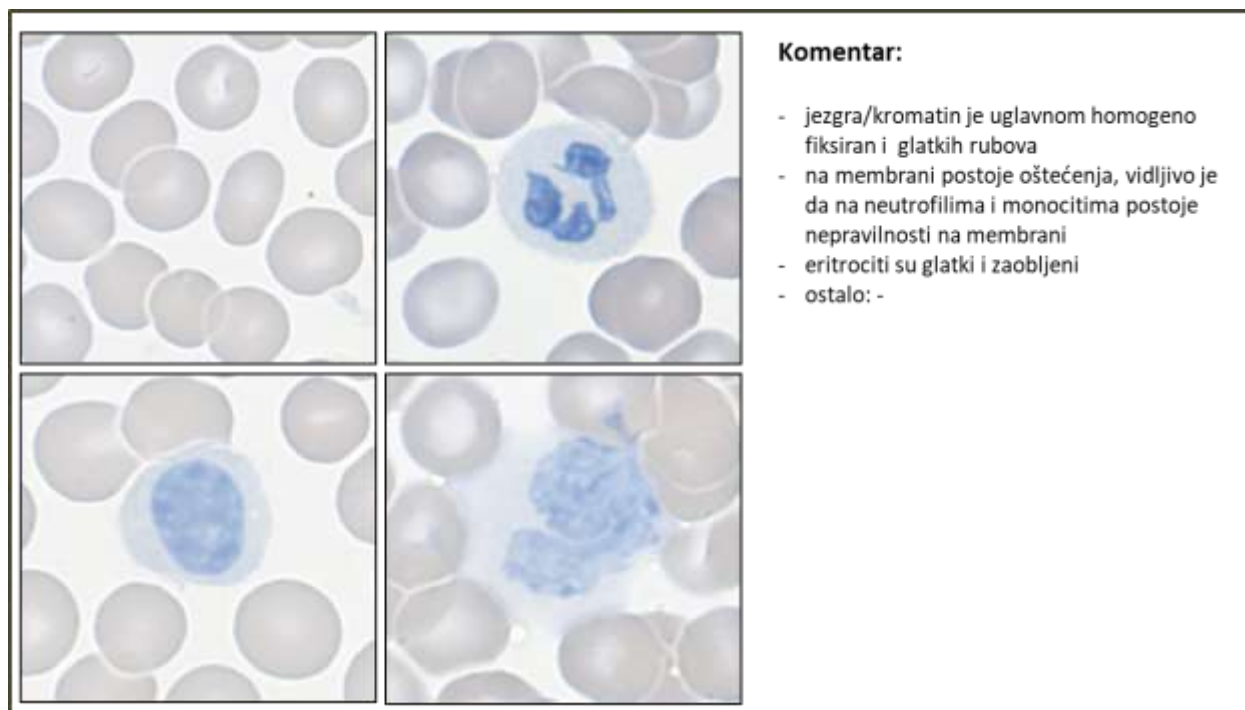
Slika 7. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani LeukoGnost Fiksativom. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



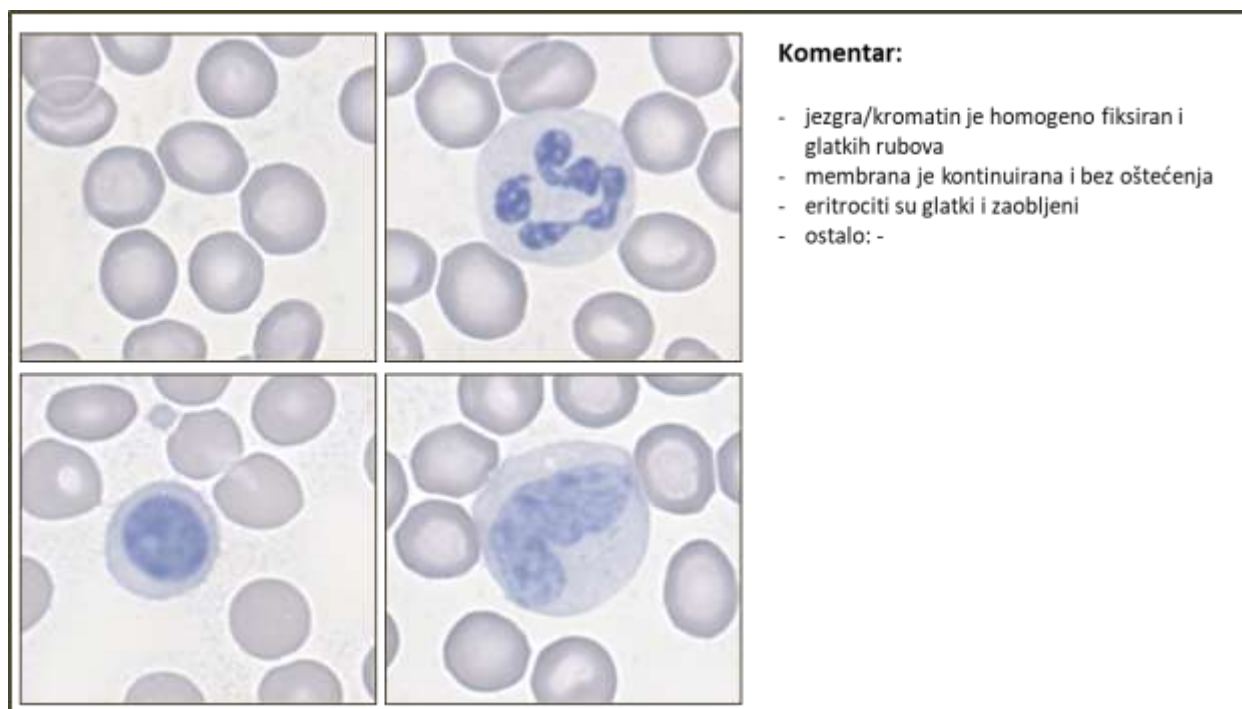
Slika 8. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL13. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



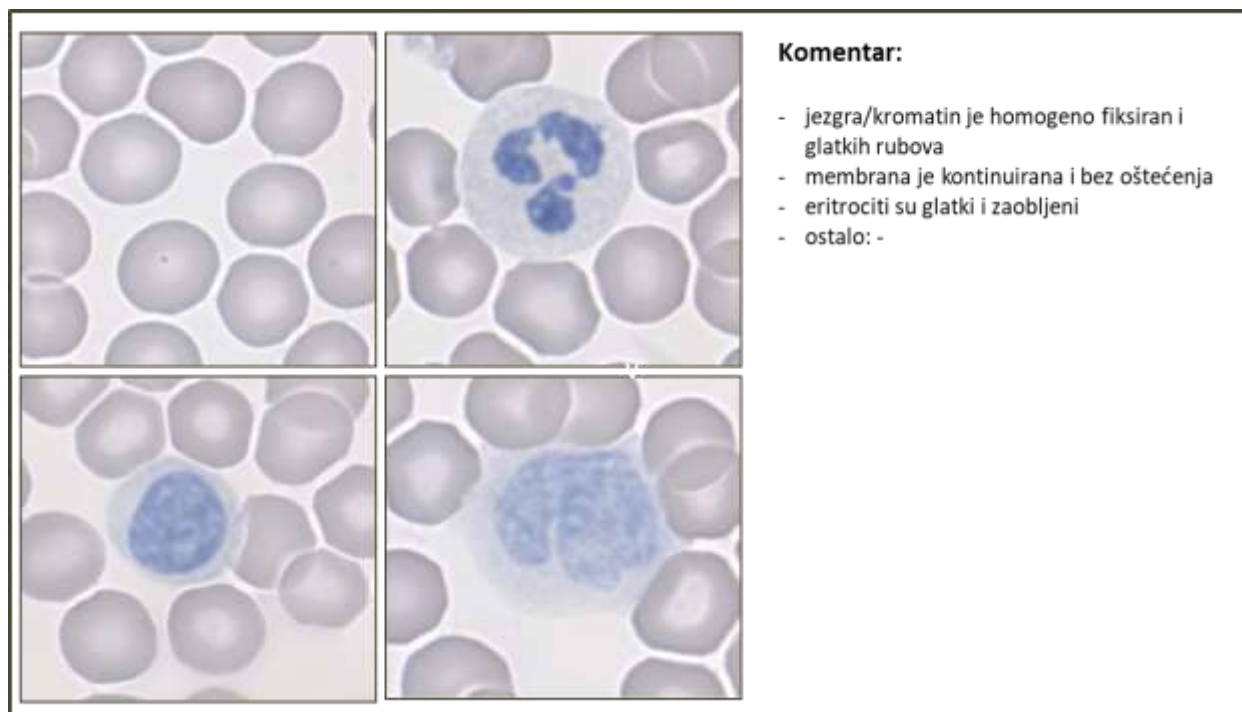
Slika 9. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL14. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



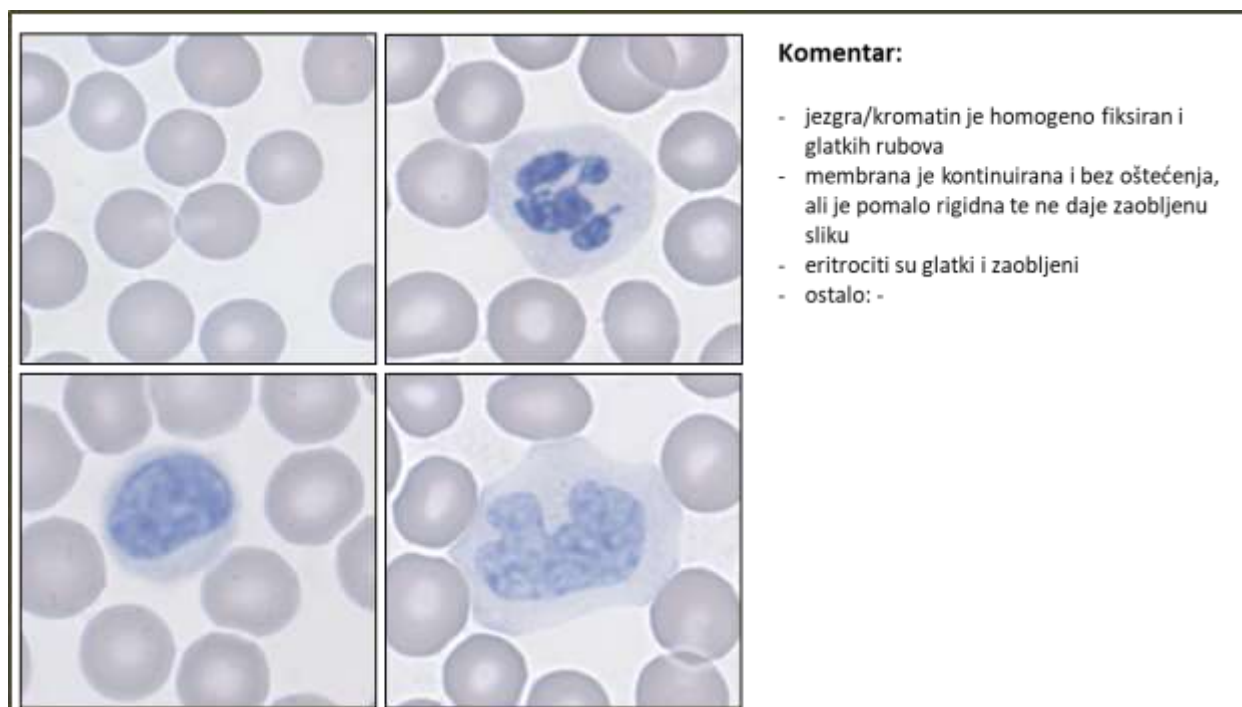
Slika 10. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL15. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



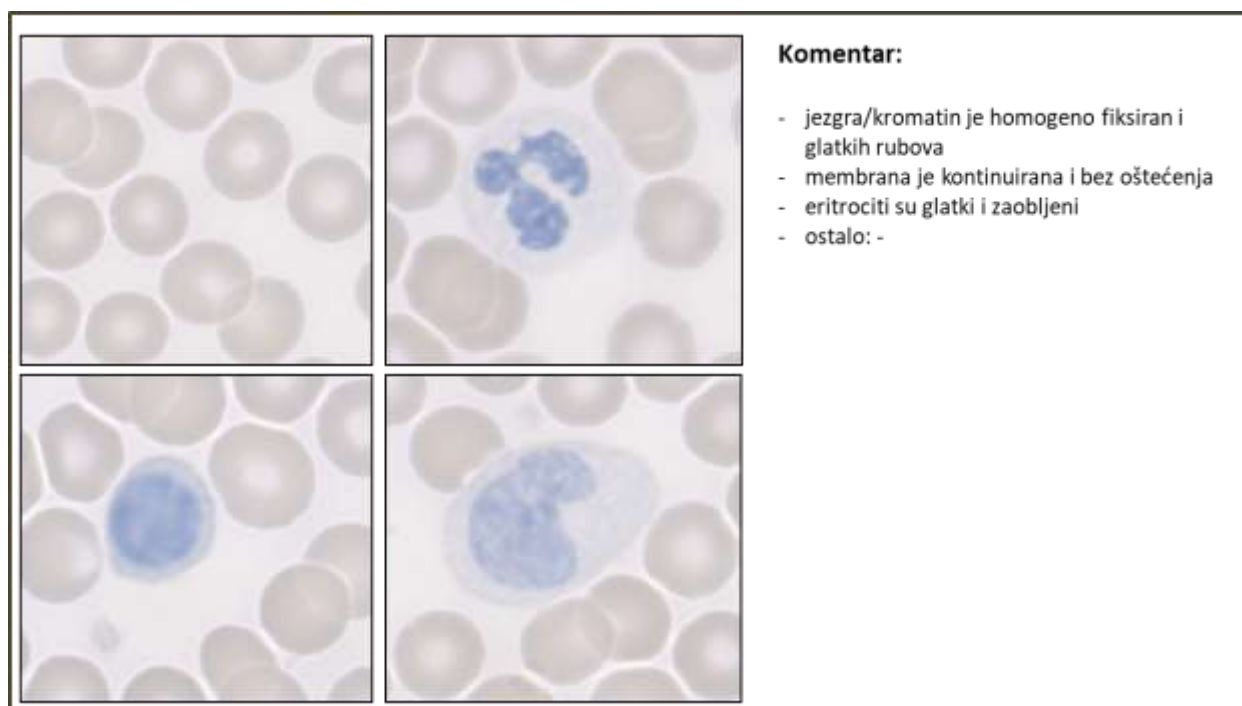
Slika 11. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL16. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



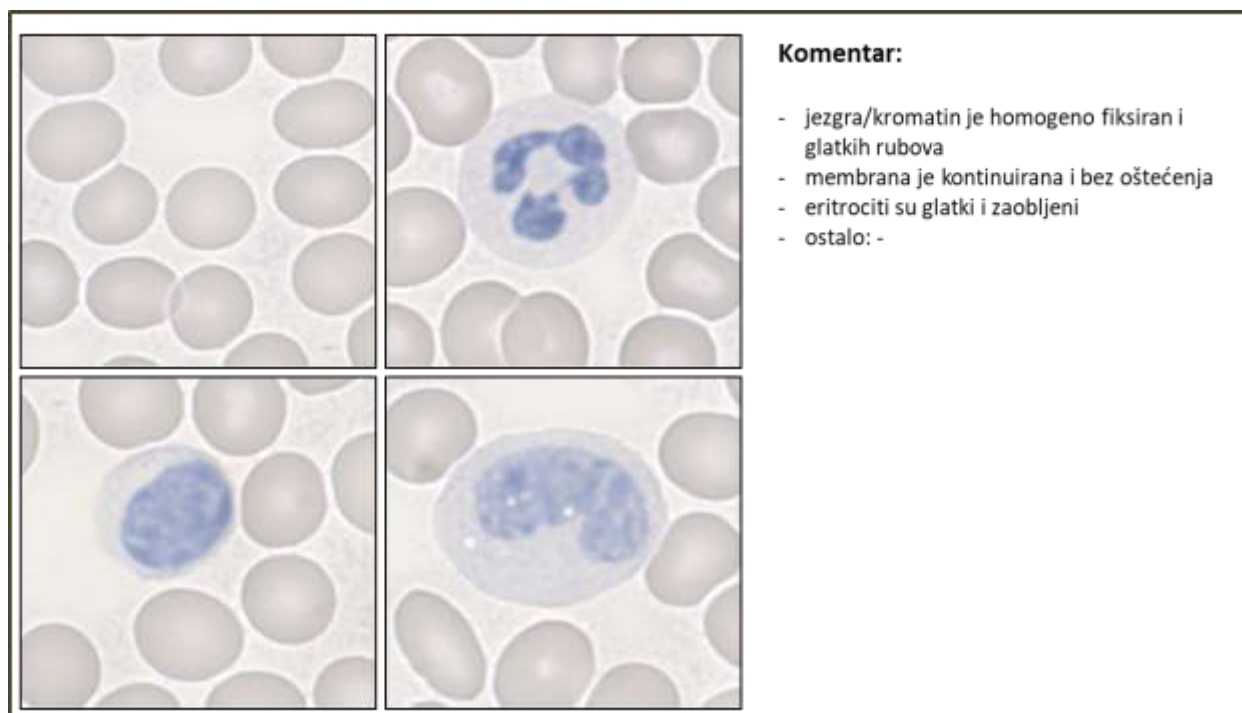
Slika 12. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL17. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



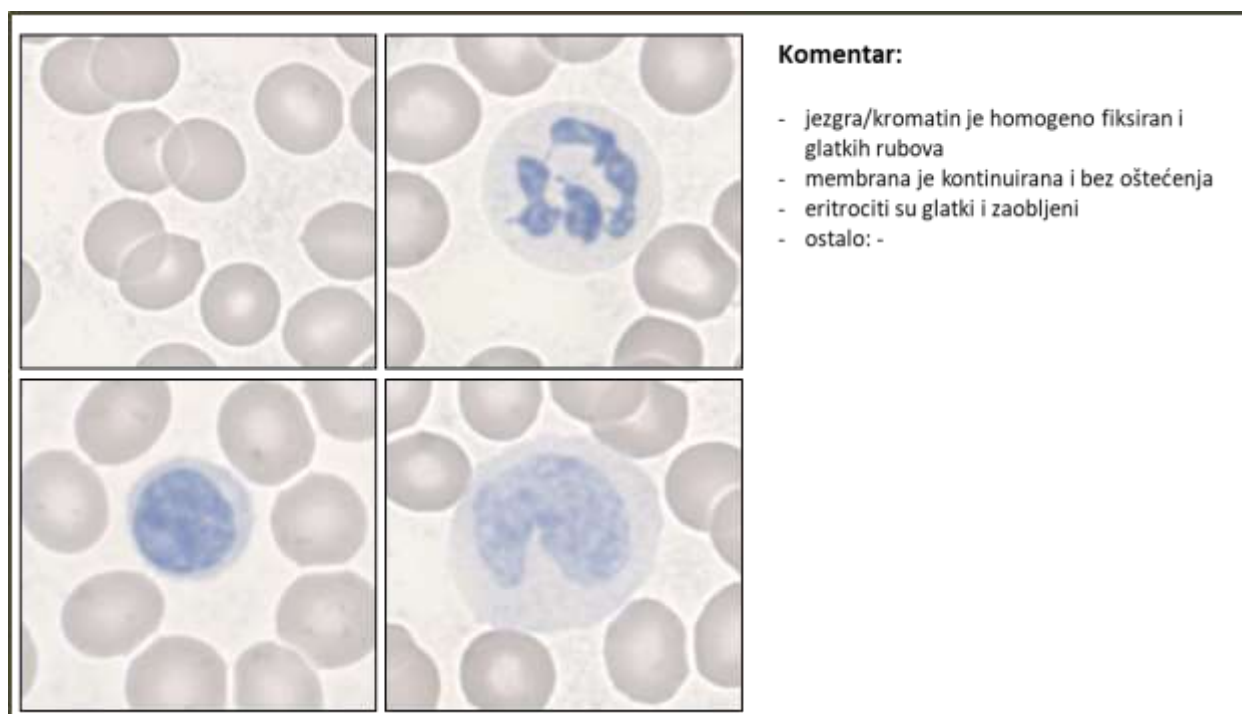
Slika 13. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL18. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



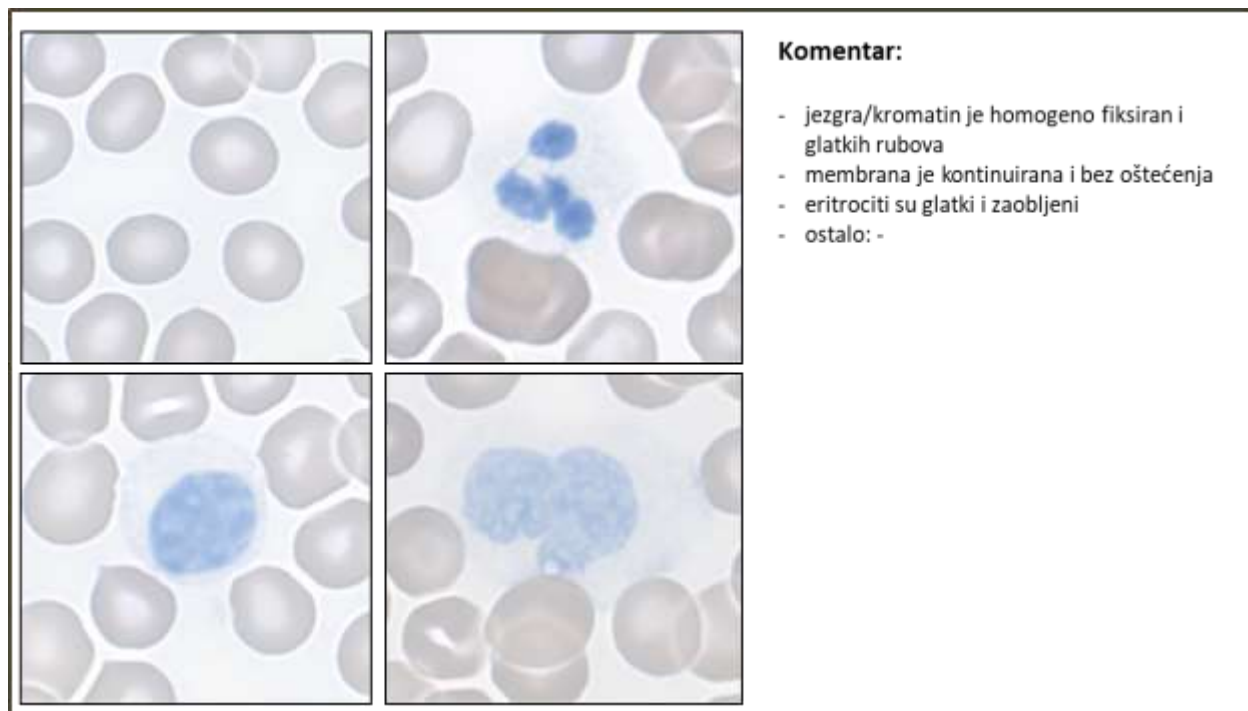
Slika 14. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL19. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



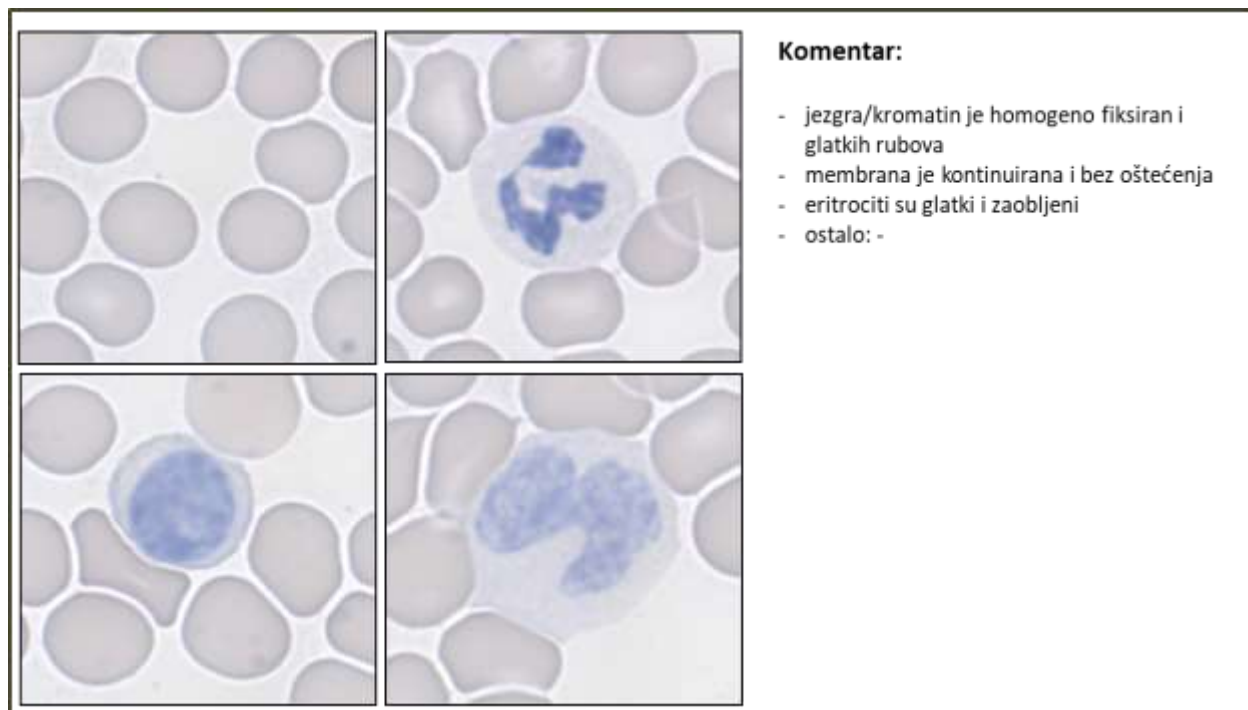
Slika 15. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL20. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



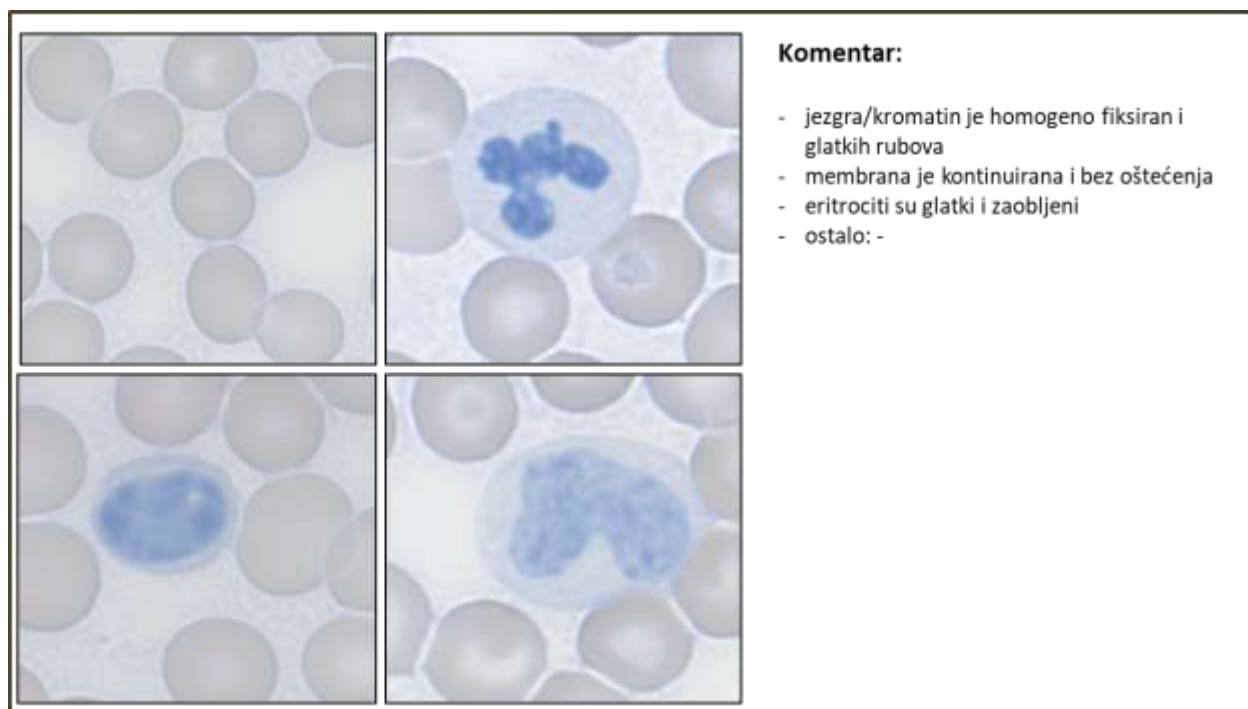
Slika 16. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL21. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



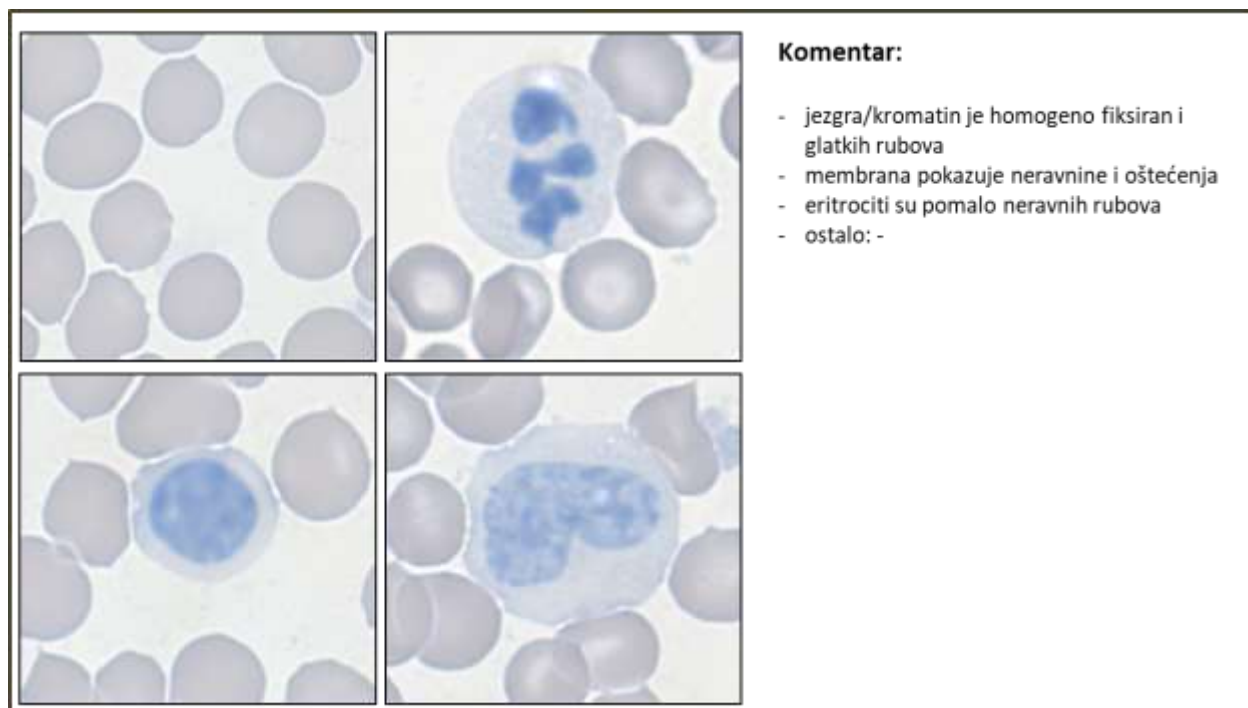
Slika 17. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL22. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



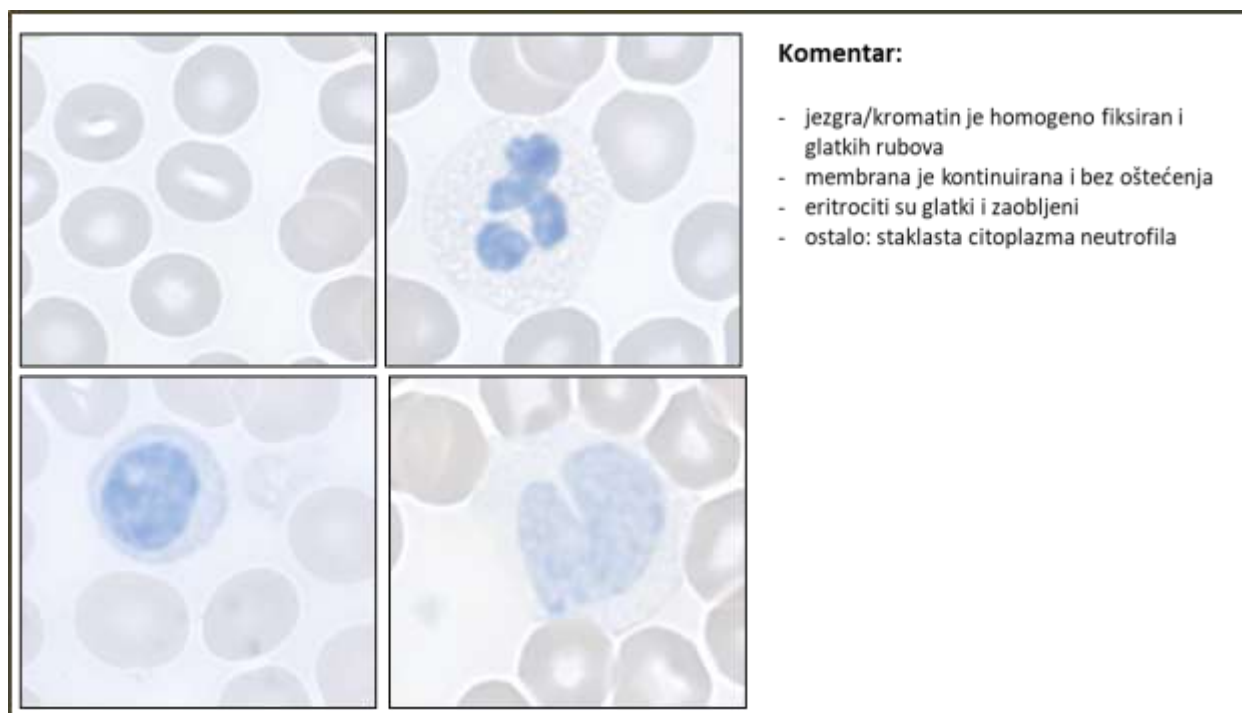
Slika 18. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL23. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



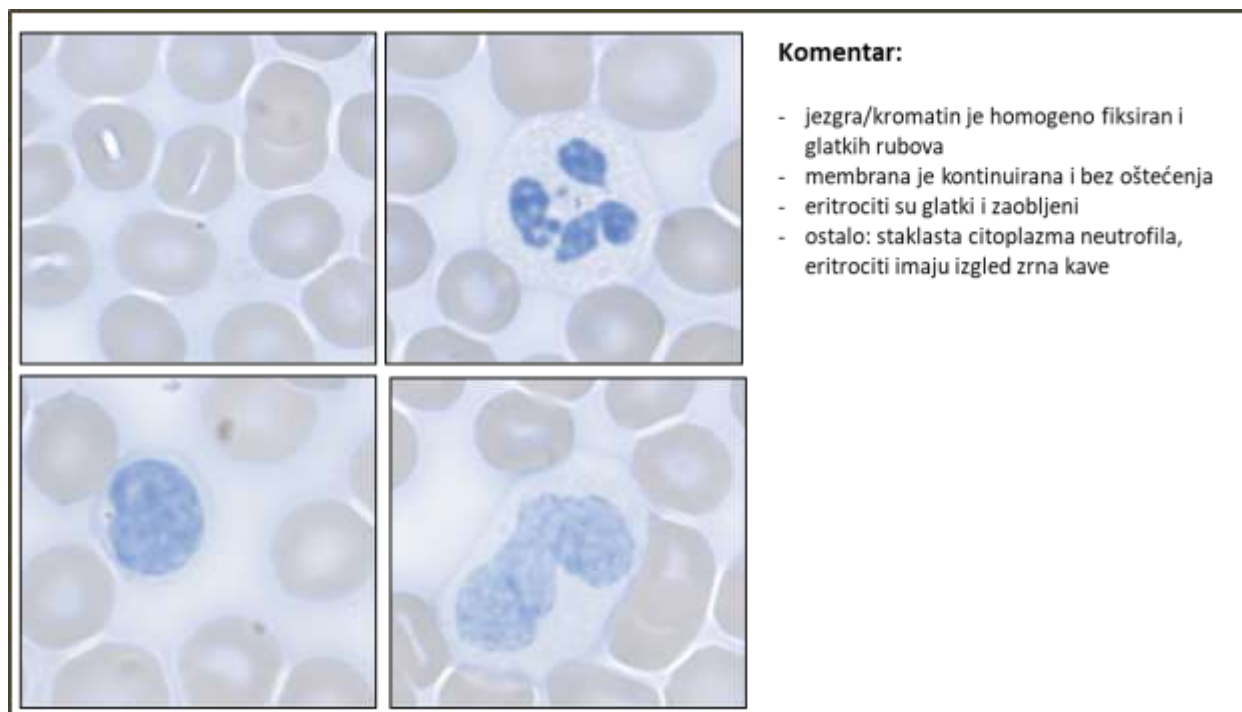
Slika 19. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL24. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



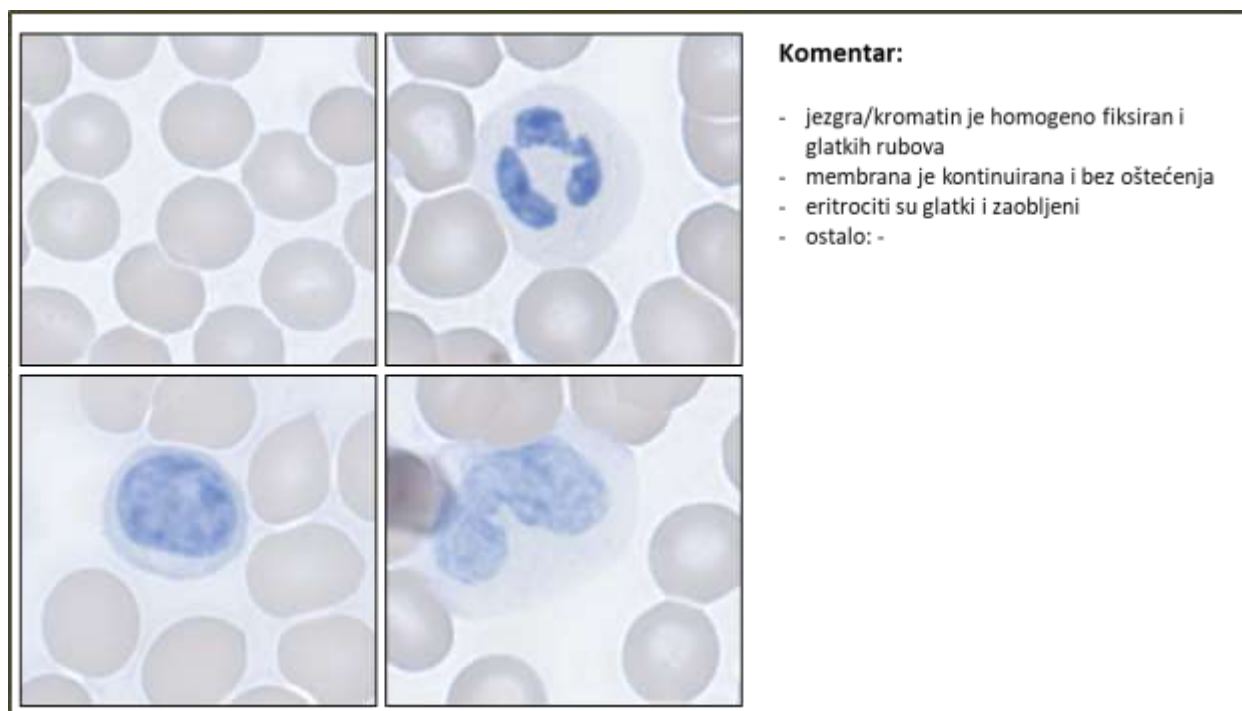
Slika 20. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL25. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



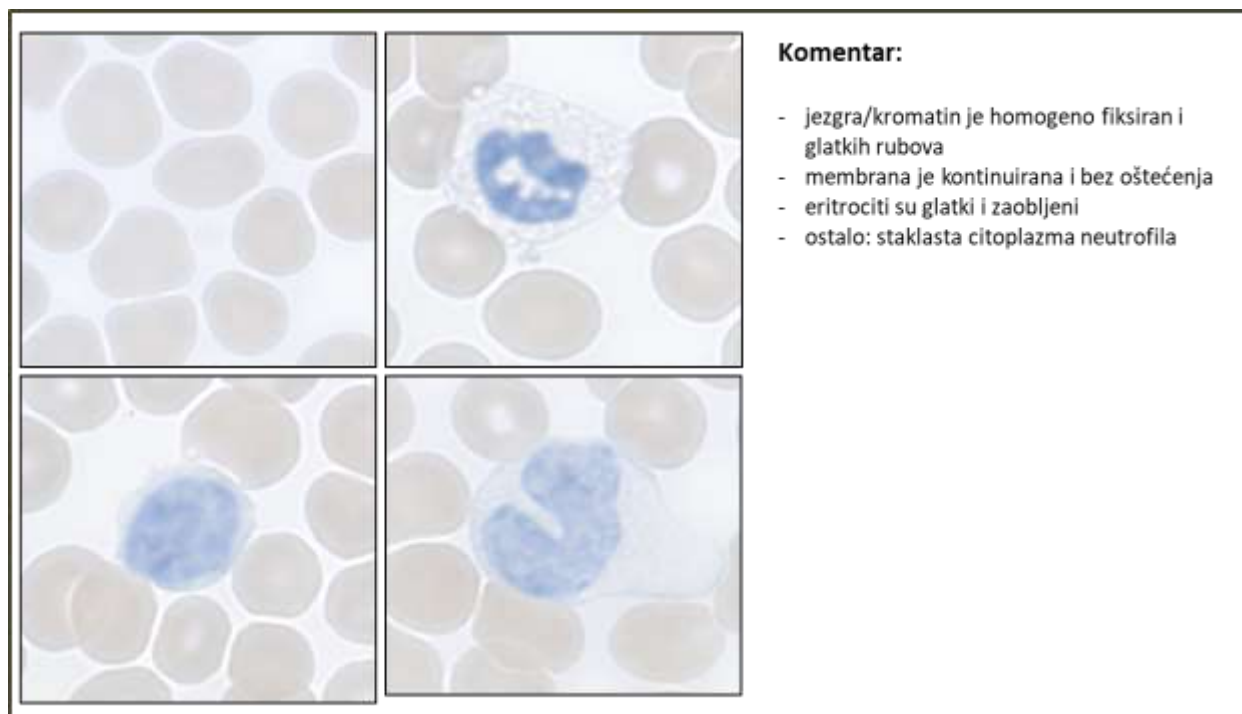
Slika 21. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL26. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



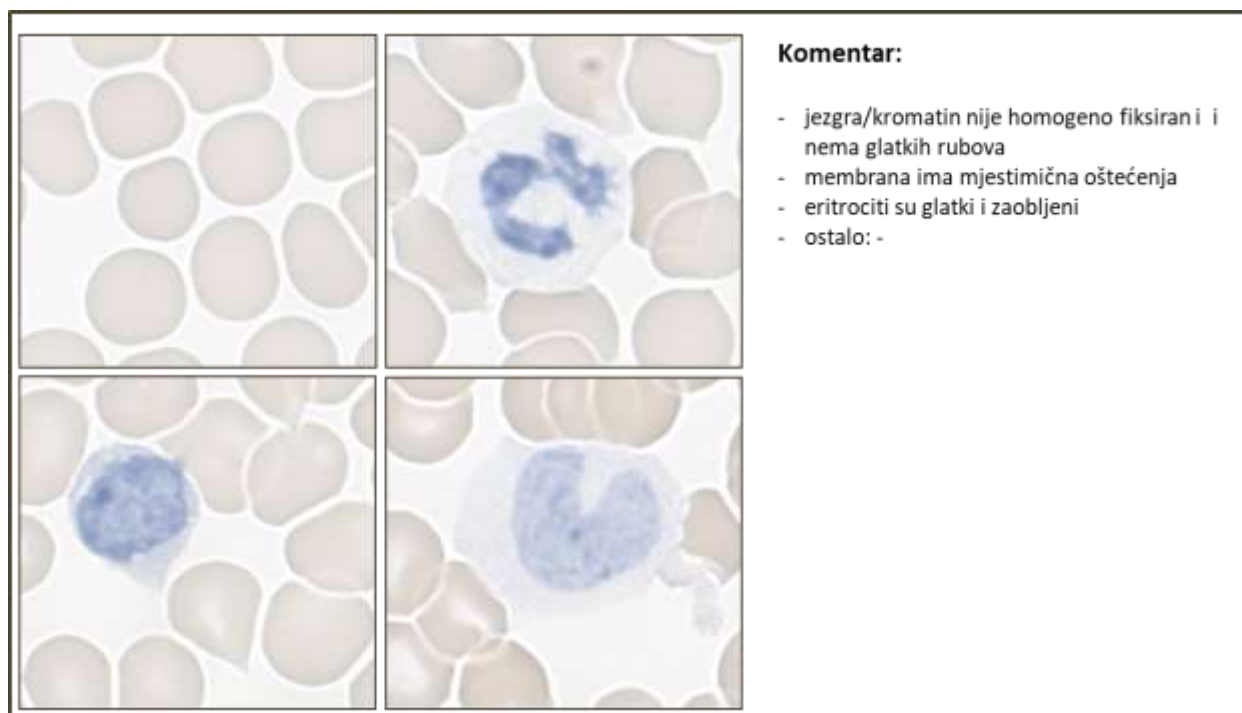
Slika 22. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL27. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



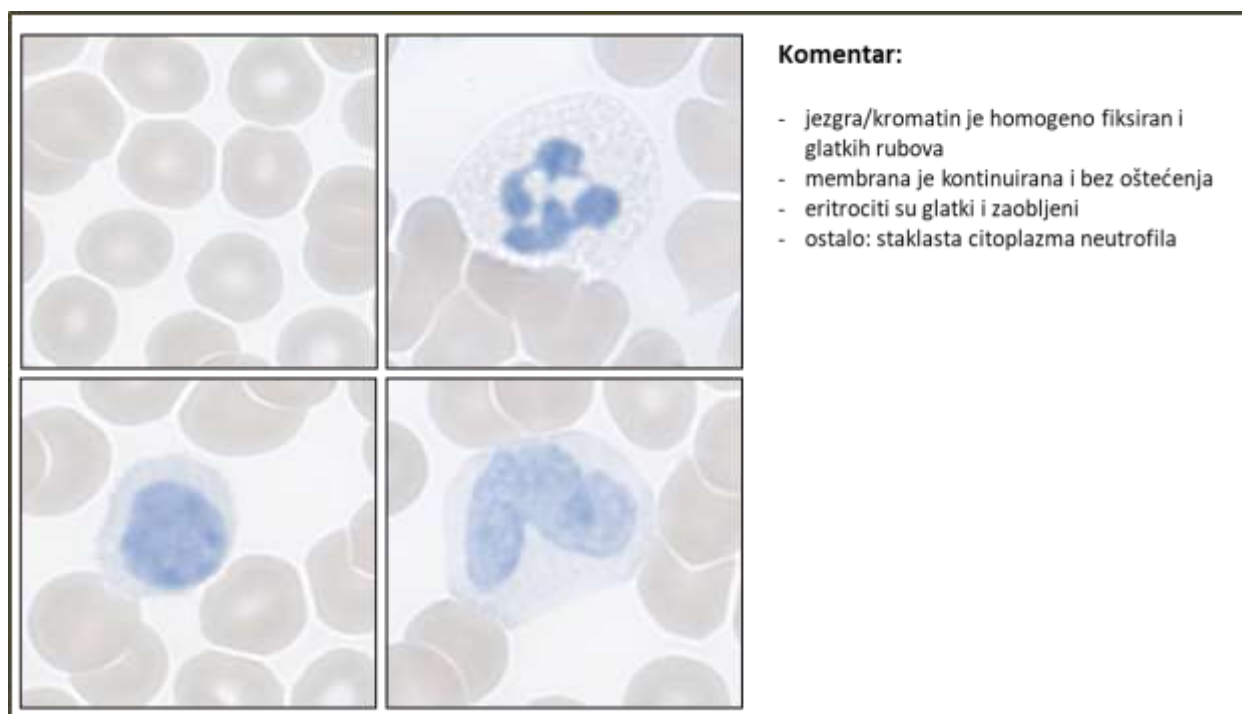
Slika 23. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL29. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



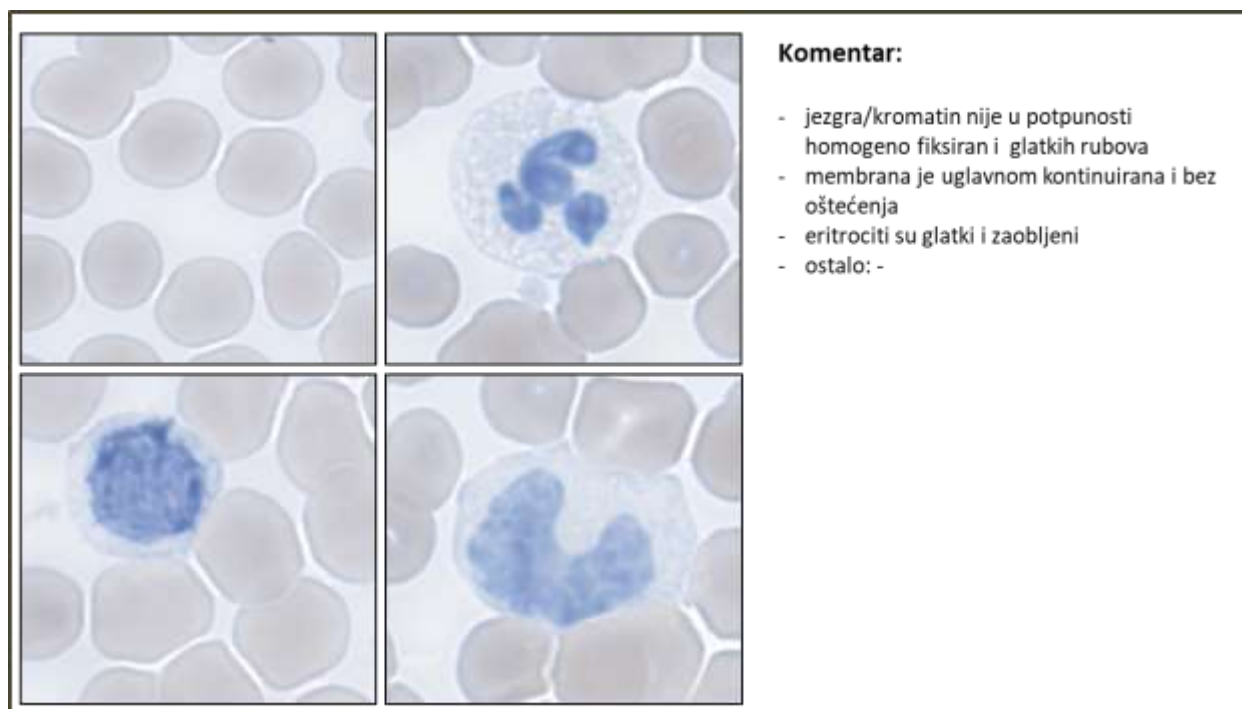
Slika 24. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL31. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



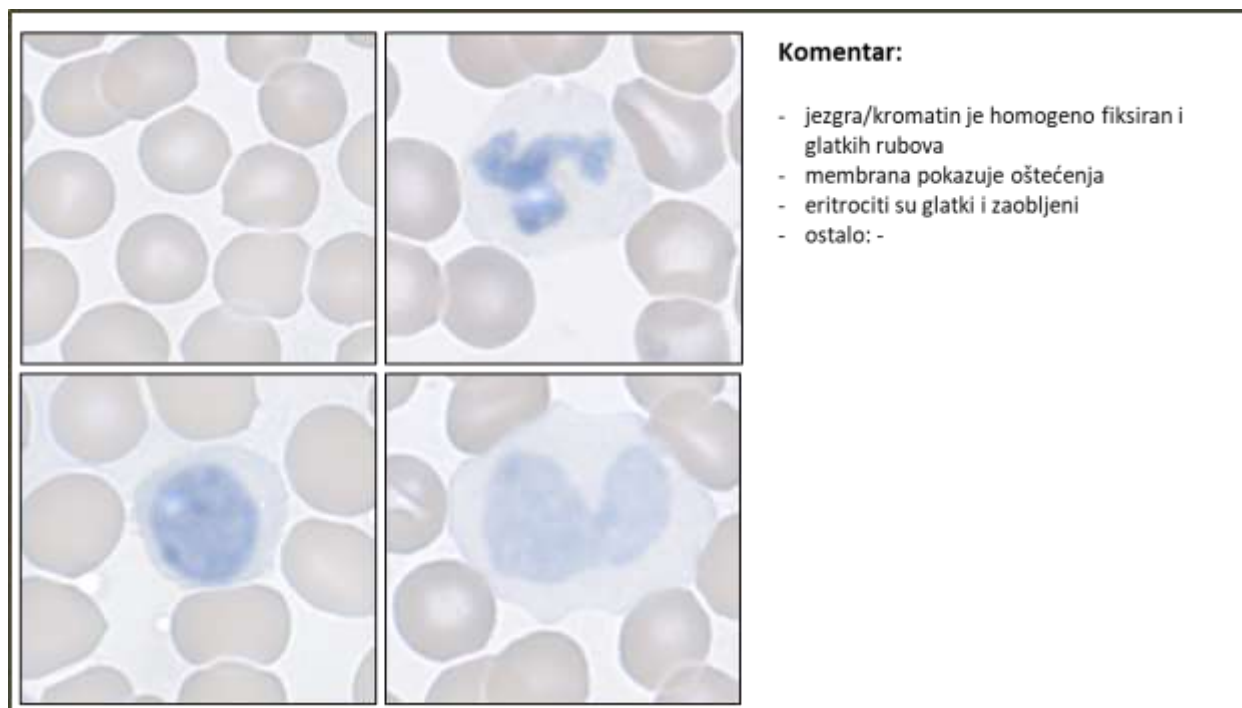
Slika 25. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL32. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



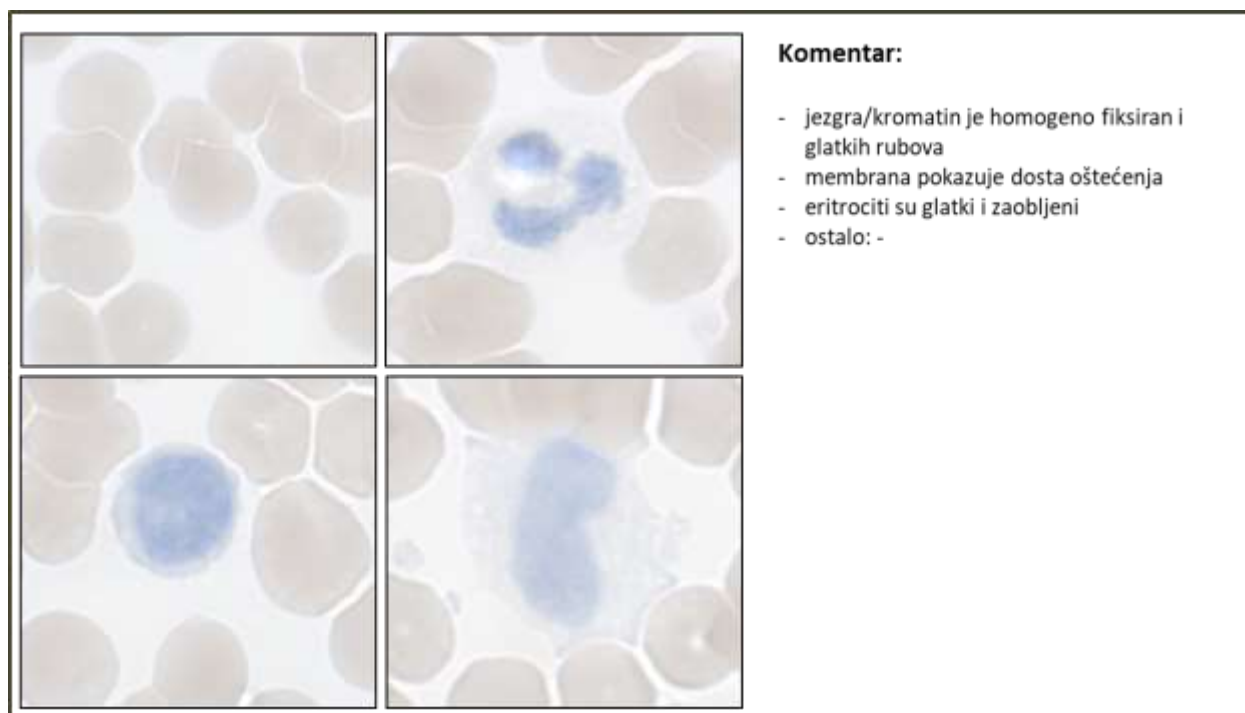
Slika 26. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL33. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



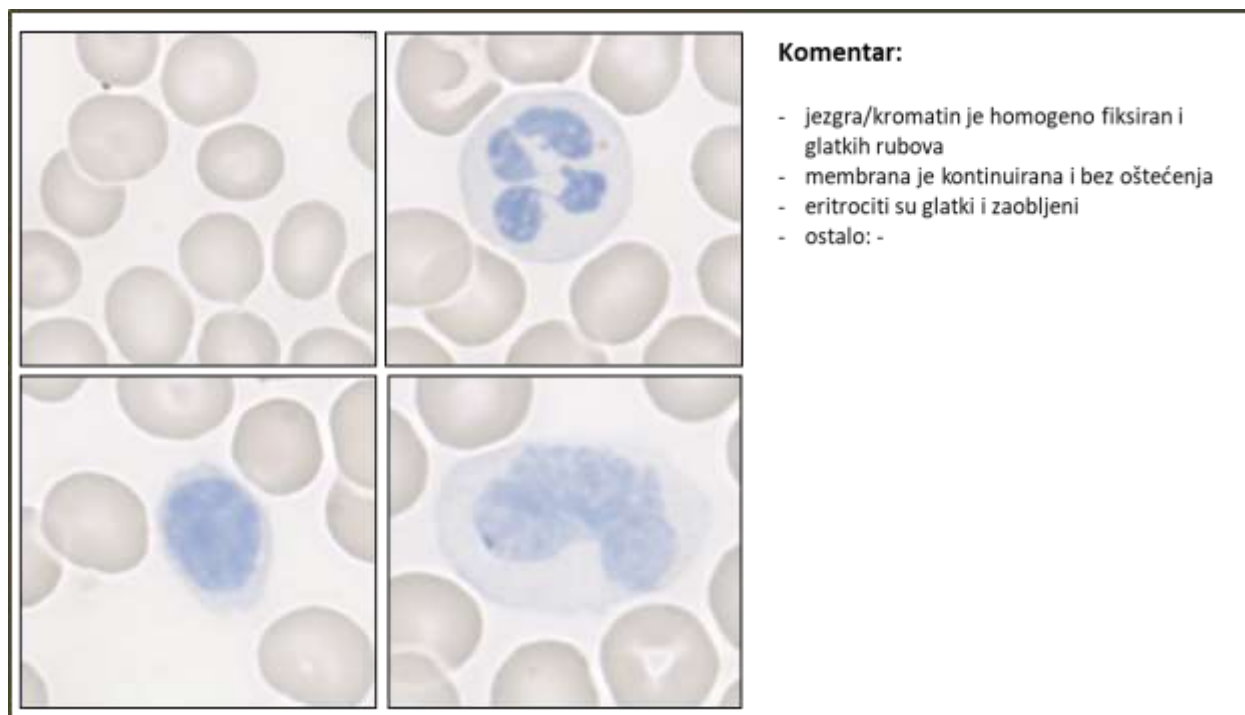
Slika 27. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL34. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



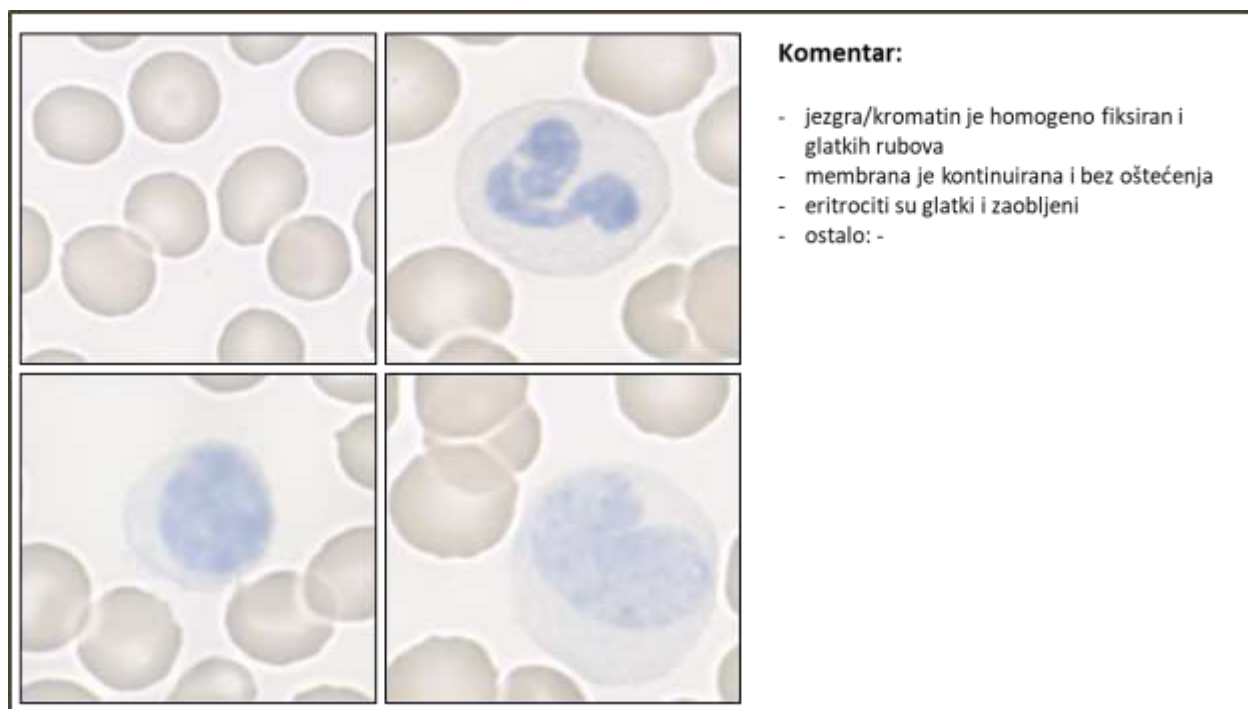
Slika 28. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL35. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



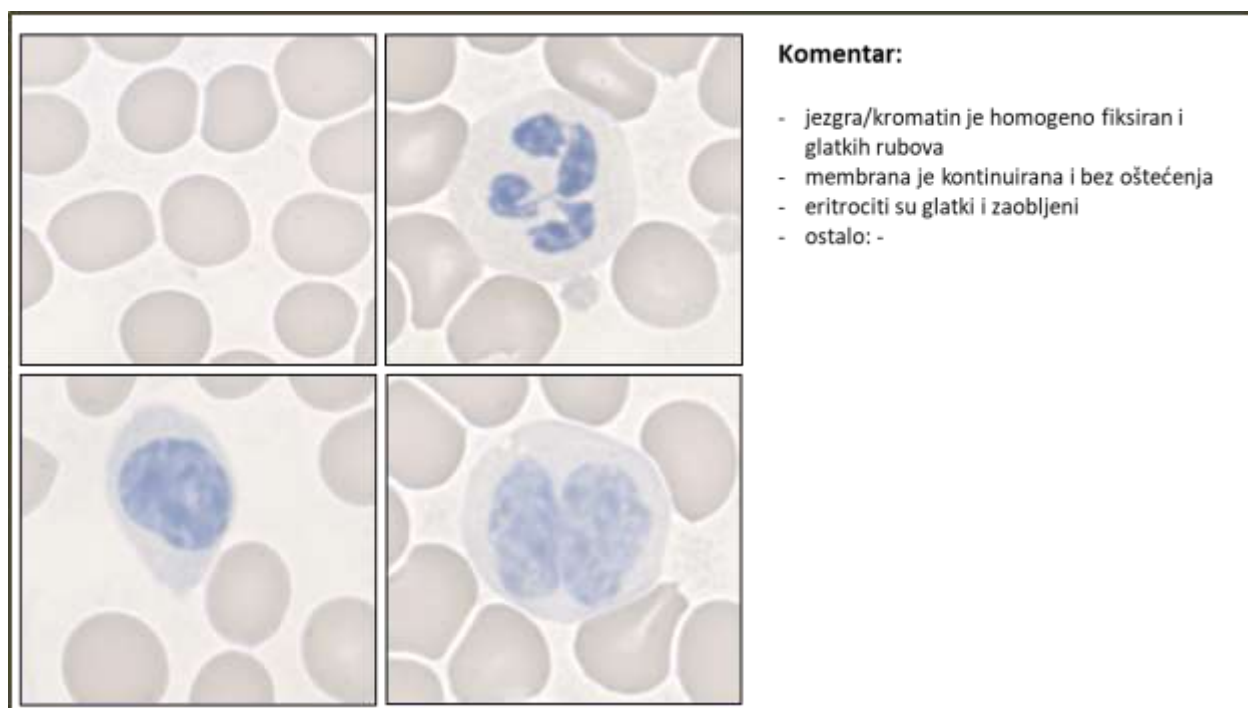
Slika 29. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL36. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



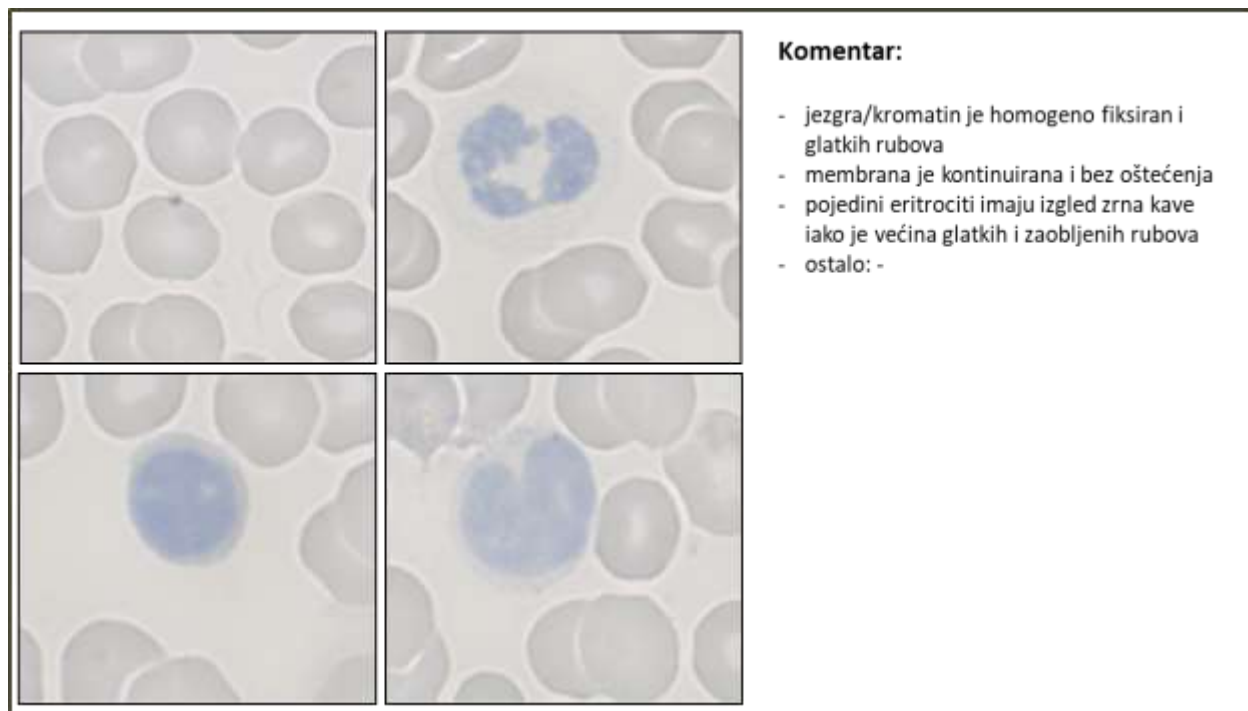
Slika 30. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL37. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



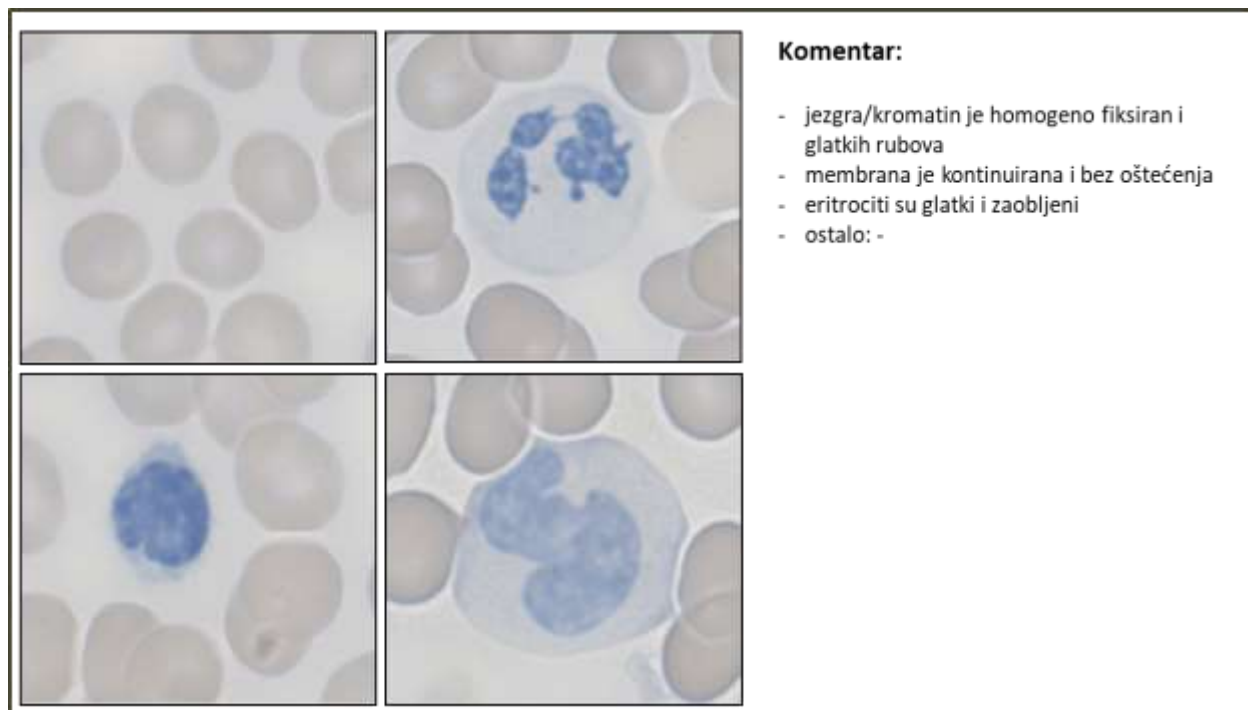
Slika 31. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL38. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



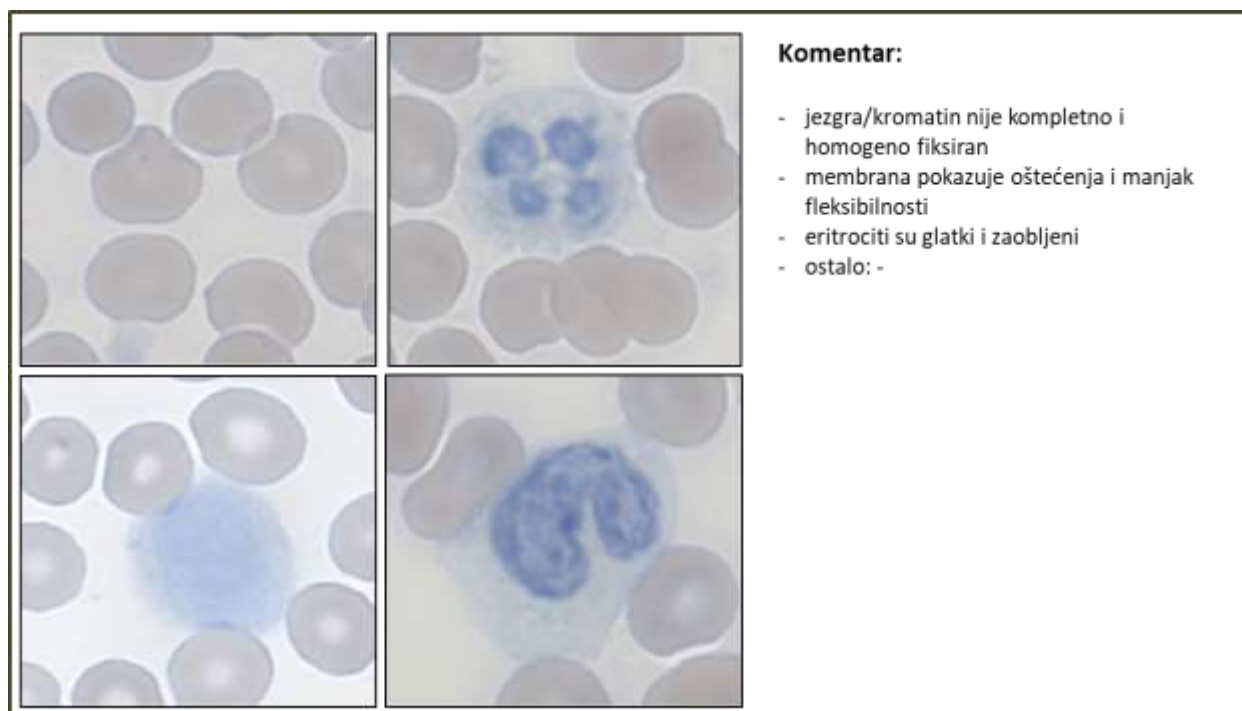
Slika 32. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL39. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



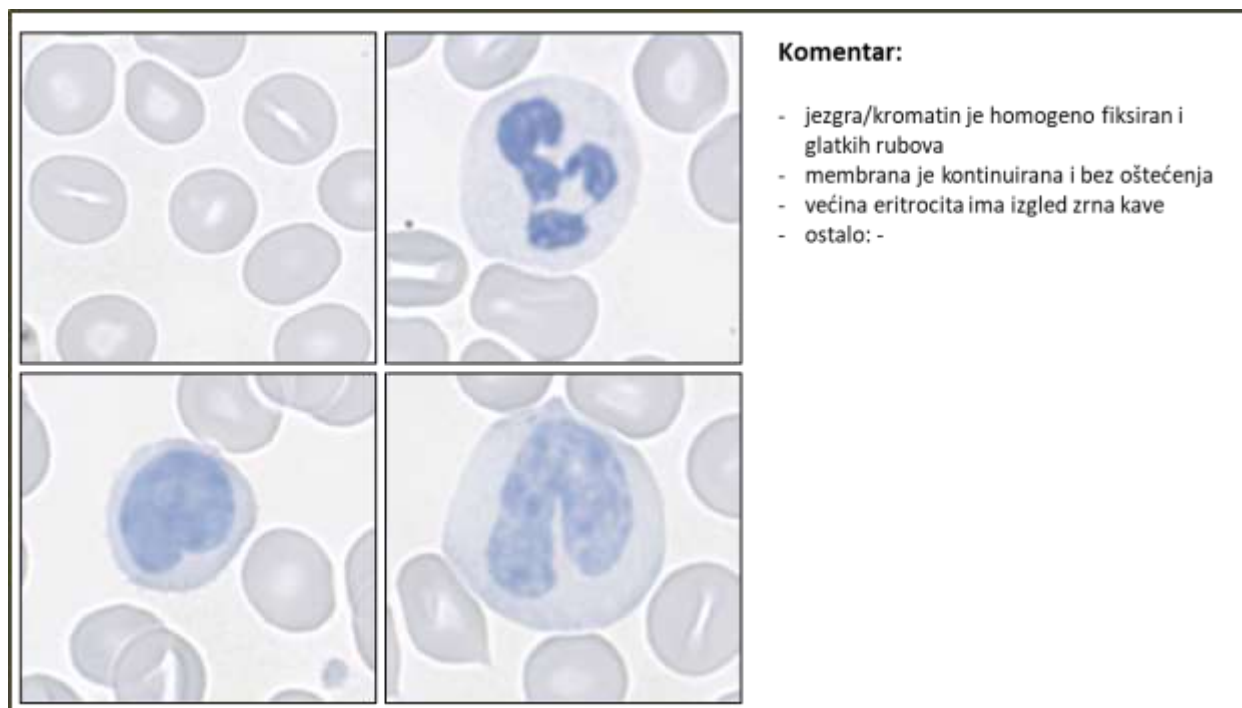
Slika 33. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL40. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



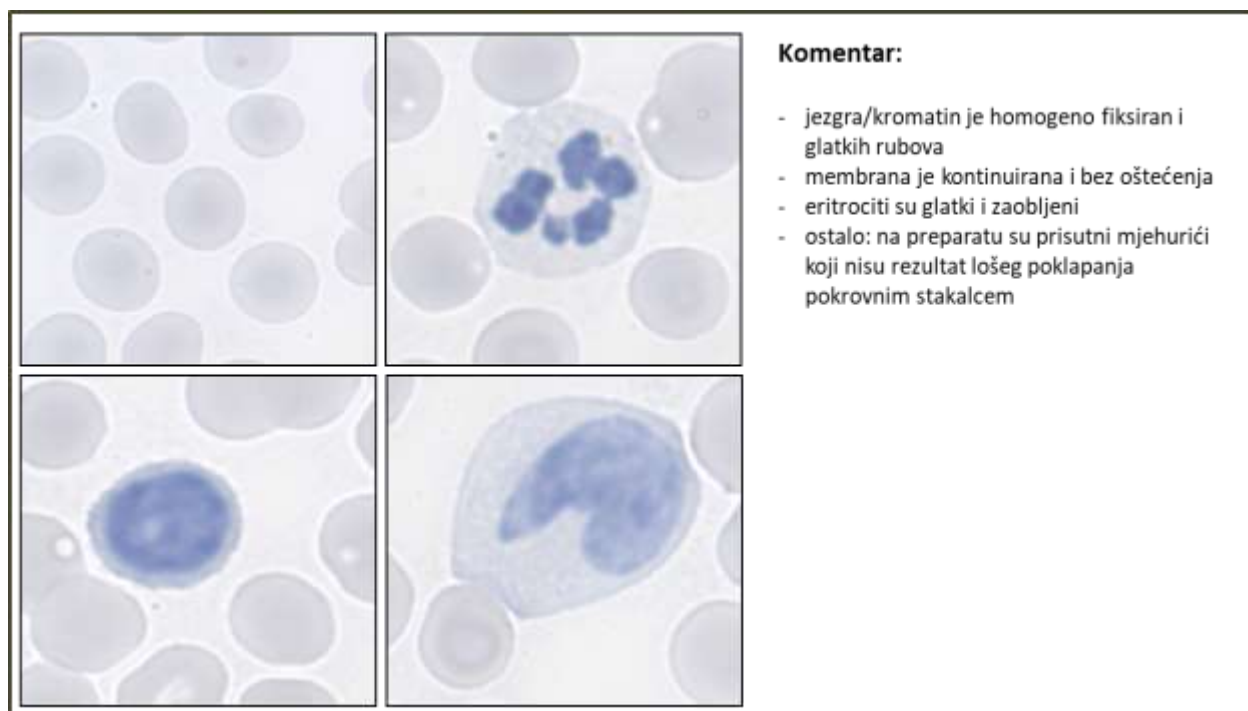
Slika 34. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL41. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



Slika 35. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL42. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



Slika 36. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL47. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.



Slika 37. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani formulacijom GL48. Komentari na izgled jezgre/kromatina, stanične membrane, eritrocita i dr. su dodani. Povećanje je 1000×.

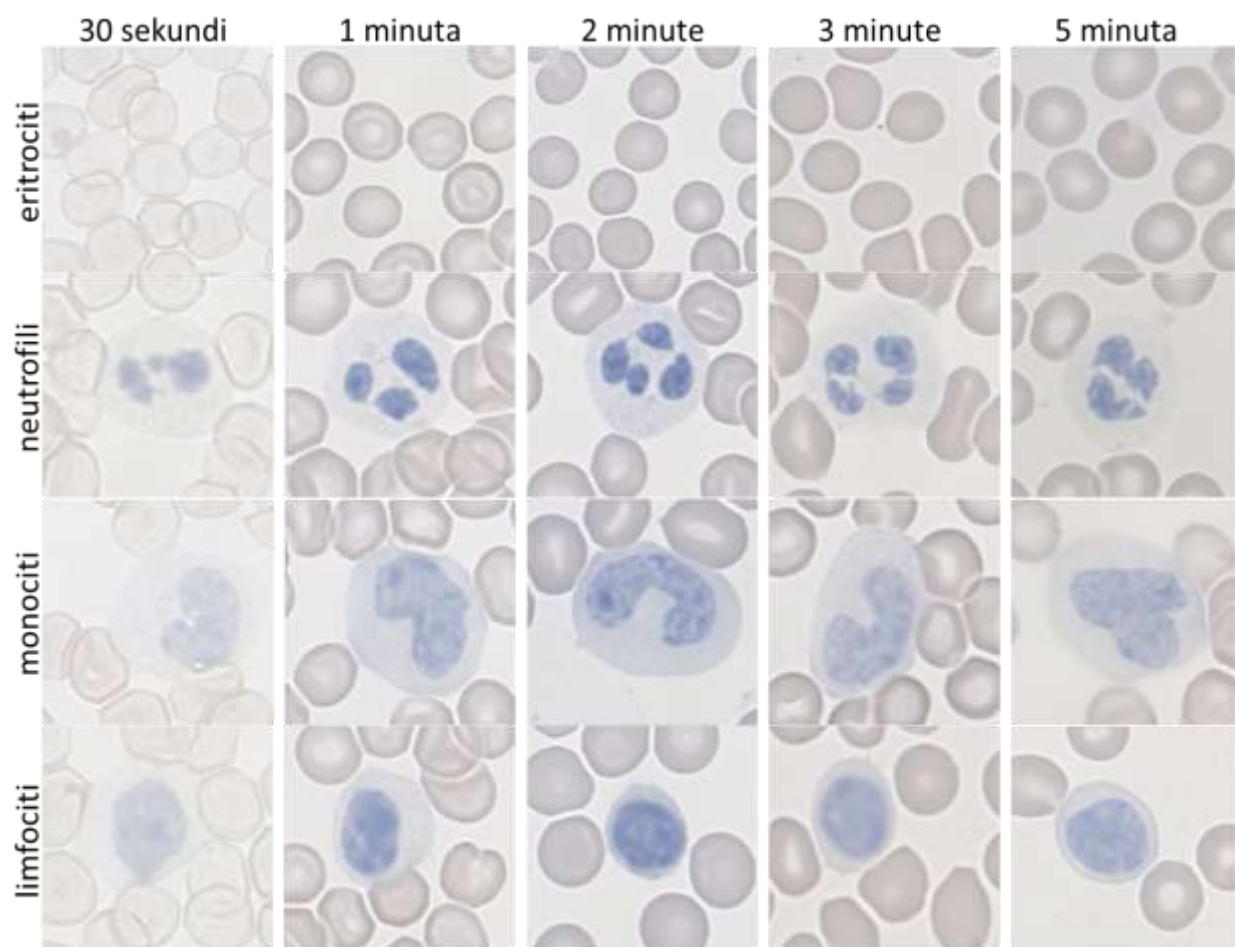
6.3. Optimalno vrijeme za fiksaciju s odabranim novim formulacijama fiksativa bez formalina

Kod testiranih 48 varijanti fiksativa bez formaldehida, a s dodatkom glioksala kao supstituenta za formaldehid uz dodatak suplementa ili bez glioksala (ili bilo kakvih drugih aldehidnih fiksativa) samo uz dodatak suplementa, 13 novih varijanti fiksativa je zadovoljilo kriterije za fiksaciju krvnih preparata. S obzirom da su suplementi dodavani u višoj i nižoj koncentraciji, za daljnja ispitivanja korištene su samo formulacije s nižom koncentracijom iz ekonomskih razloga. Sastav tih osam odabranih formulacija prikazan je u Tablici 10.

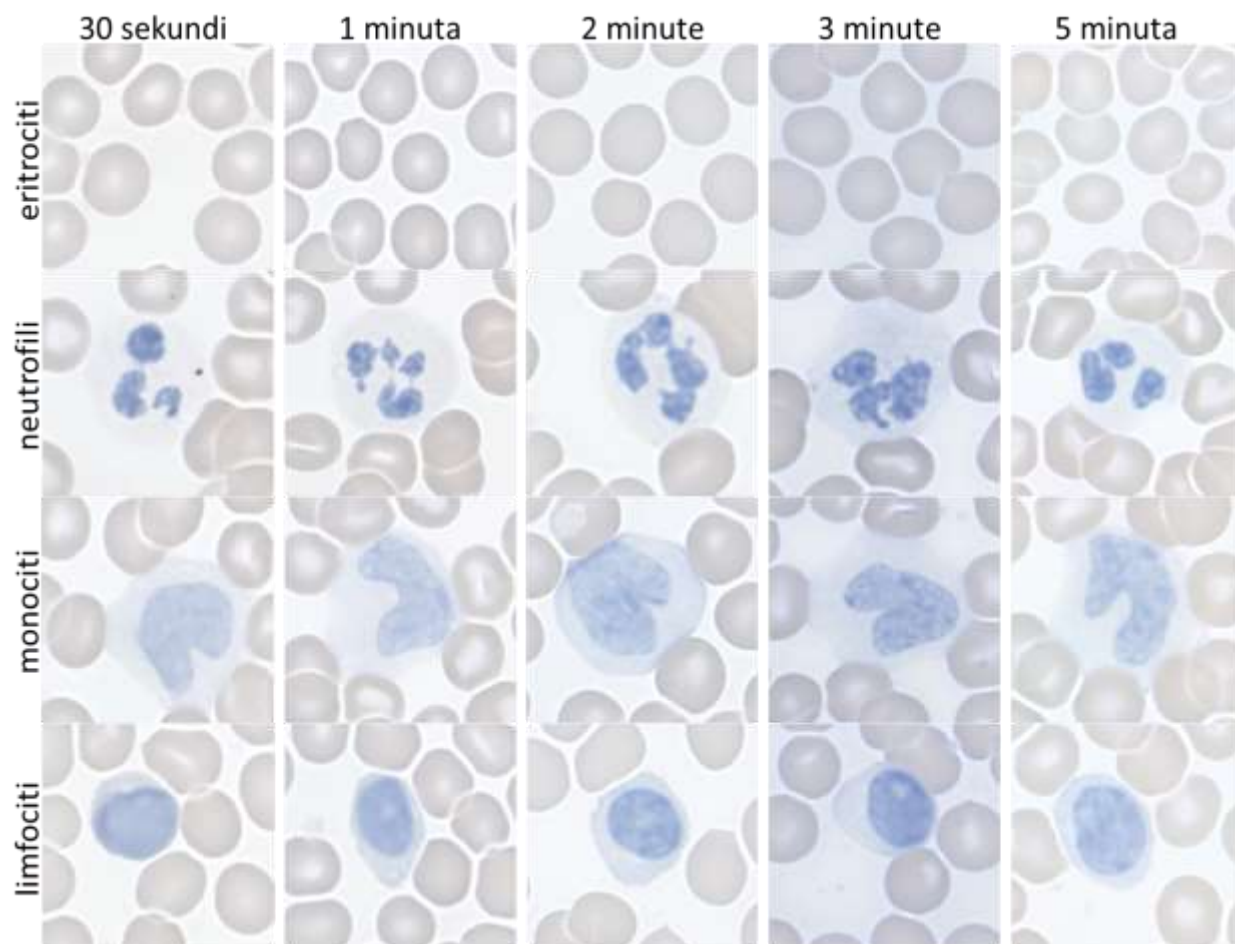
Tablica 10. Sastav i pH vrijednosti odabranih novih formulacija fiksativa bez formalina.

<i>naziv formulacije</i>	<i>aceton (g/L)</i>	<i>glioksal (g/L)</i>	<i>limunska kiselina (g/L)</i>	<i>trinatrijev citrat dihidrat (g/L)</i>	<i>NaCl (g/L)</i>	<i>suplement (%)</i>	<i>pH</i>
GL17	548	28	0,2	0,7	0,4	PEG400 1%	5,5
GL20	548	28	0,2	0,7	0,4	glycerol 1%	5,2
GL21	548	0	0,2	0,7	0,4	glycerol 10%	5,3
GL24	548	28	0,2	0,7	0,4	DMSO 2%	5,2
GL29	548	28	0,2	0,7	0,4	manitol 1%	5,1
GL38	548	28	0,2	0,7	0,4	triacetin 1%	5,2
GL39	548	0	0,2	0,7	0,4	triacetin 10%	5,4
GL41	548	28	0,2	0,7	0,4	trietanolamin 1%	8,1

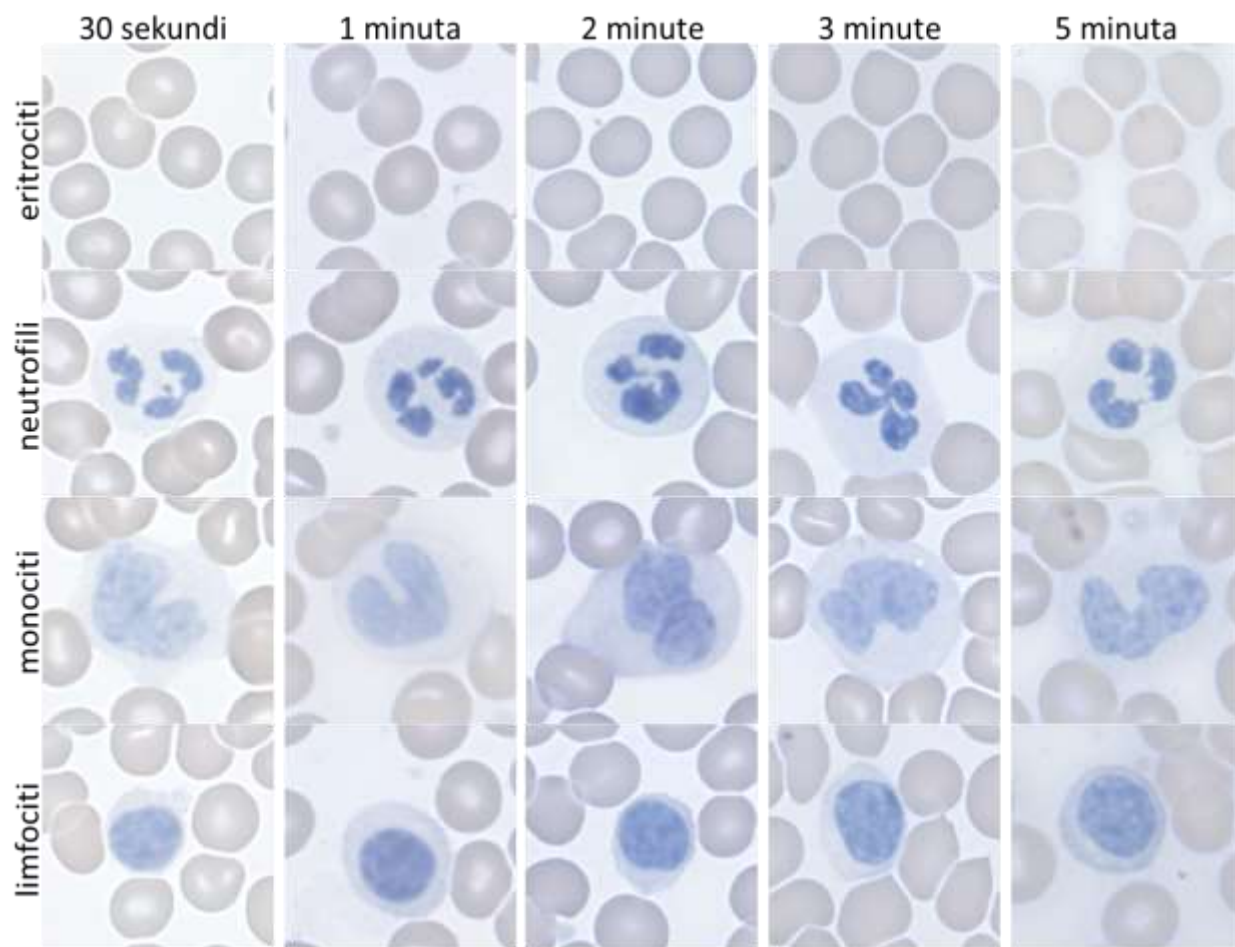
Kako bi se odredilo optimalno vrijeme fiksacije za svaku od odabranih osam novih formulacija fiksativa bez formalina, preparati su fiksirani kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta i podvrgnuti bojenju Hematoksilinom ML prema protokolu za progresivno bojenje. Obojenost i izgled staničnih struktura eritrocita, neutrofila, monocita i limfocita prikazani su na Slikama 38-45. Vidljivo je da GL 17 (Slika 38.) i GL41 (Slika 45.) ne fiksiraju dobro kroz 30 sekundi i 1 minutu, a kroz dulje vrijeme je fiksacijski učinak zadovoljavajući. Kod GL17 fiksacija od 30 sekundi dovodi do staklastog izgleda eritrocita i slabe i difuzne obojenosti jezgara, dok je kod fiksacije od 1 minute fiksacija nešto bolja, ali još uvijek postoje artefakti kod eritrocita. Kod GL41 fiksacija od 30 sekundi i 1 minute dovodi do nepravilne obojenosti jezgara koja se očituje jačim obojenjem uz jezgrinu membranu. Ostale odabrane nove formulacije fiksativa pokazuju dobra fiksacijska svojstva u svim ispitanim vremenima fiksacije.



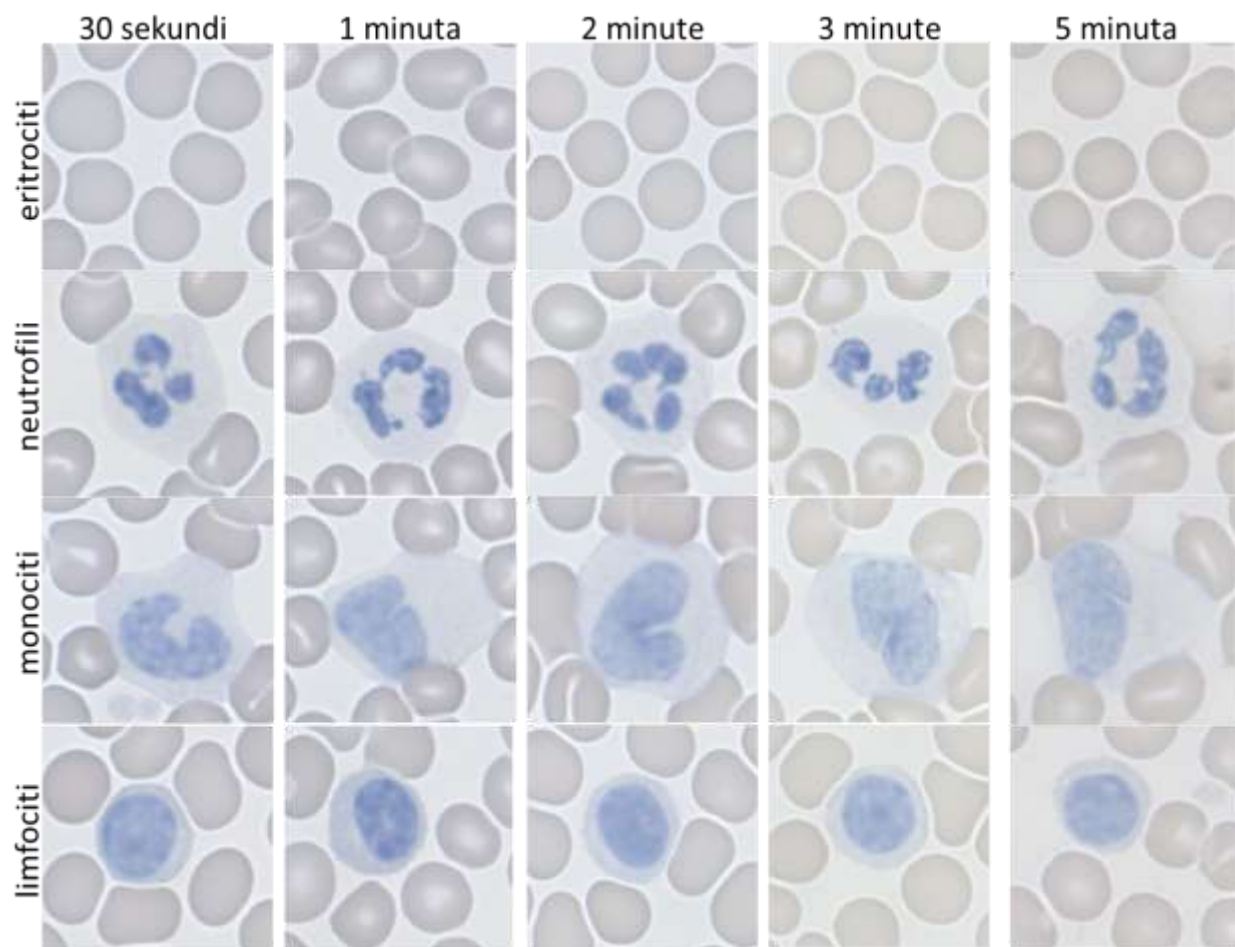
Slika 38. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL17 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000 $\times$.



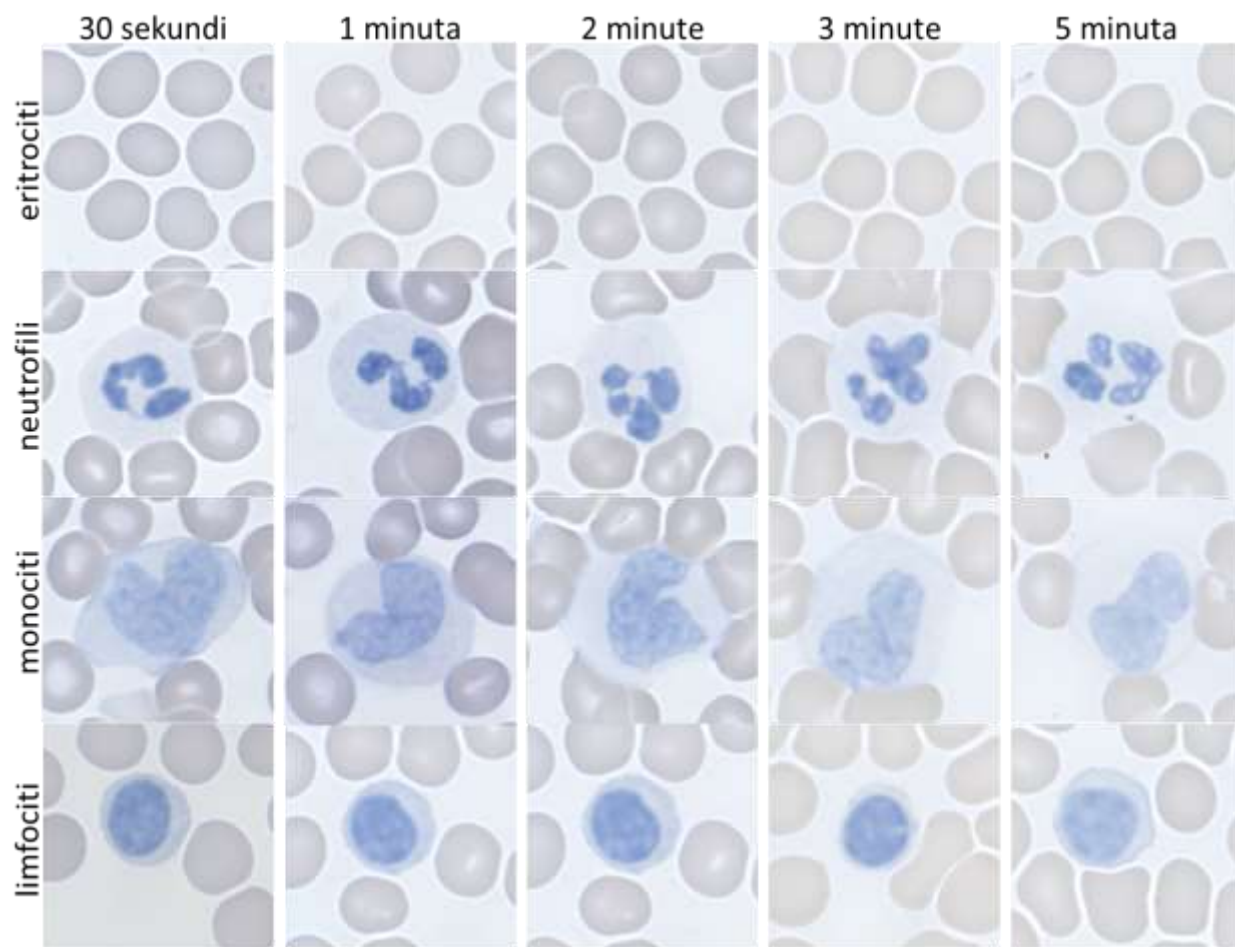
Slika 39. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL20 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000×.



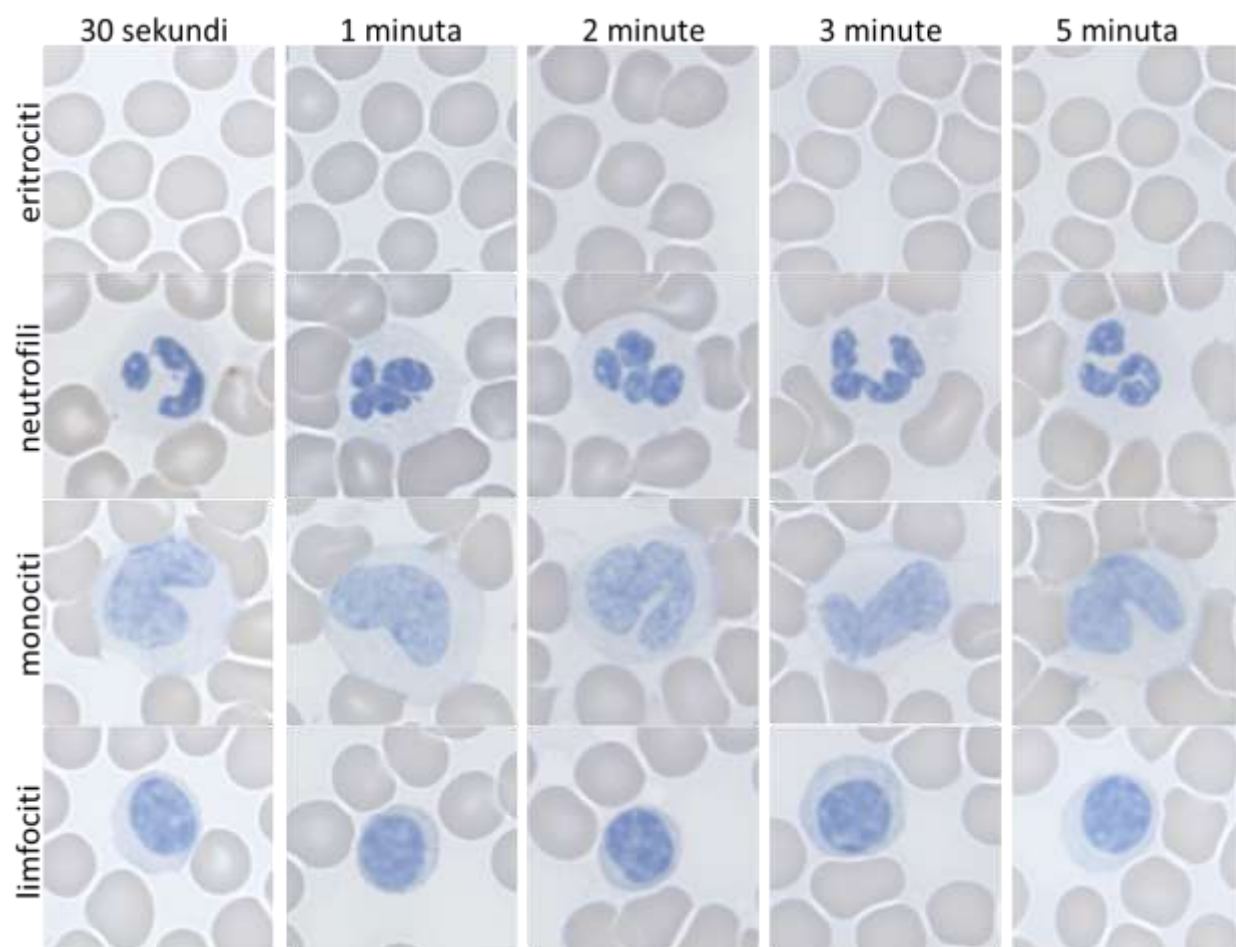
Slika 40. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL21 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000×.



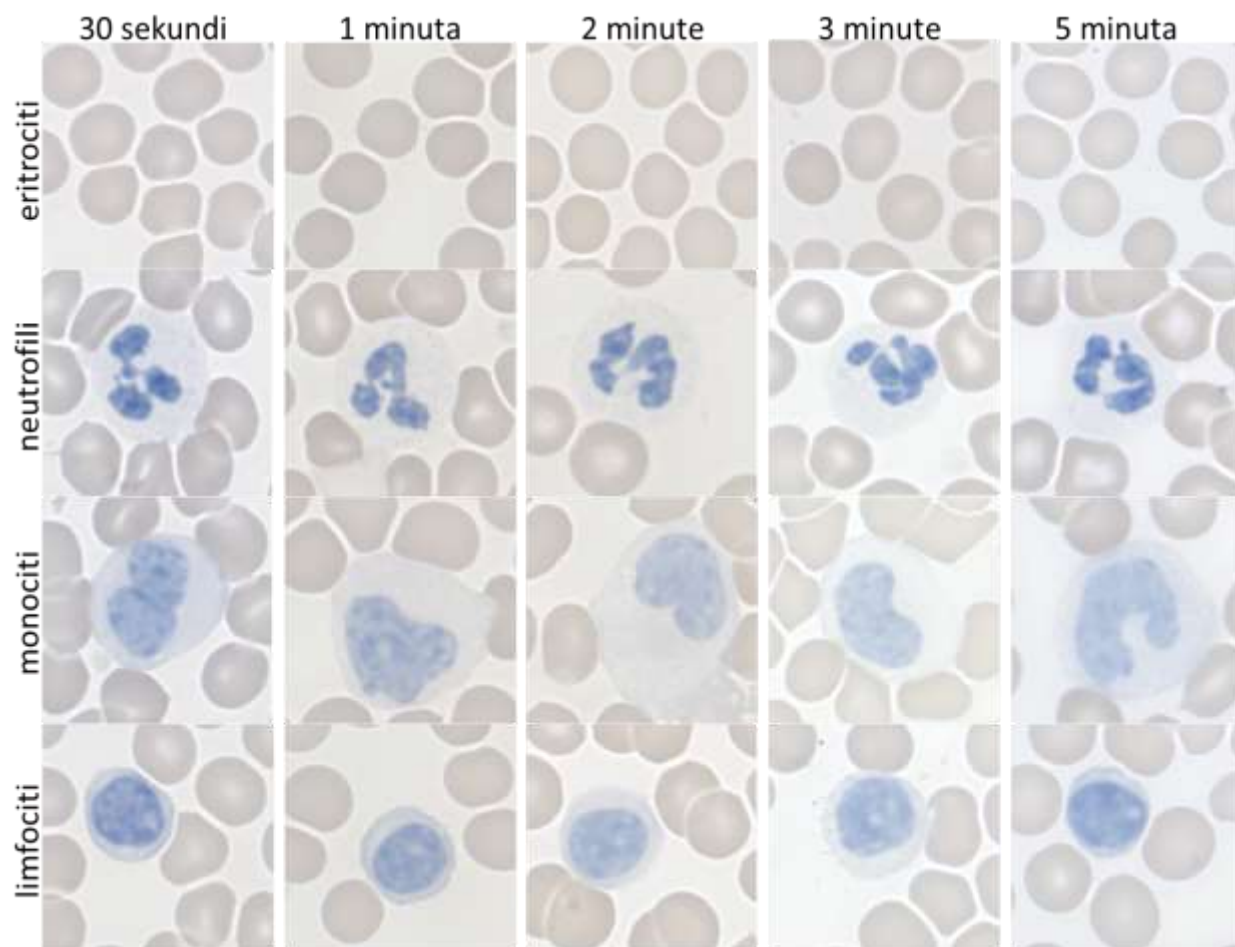
Slika 41. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL24 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000×.



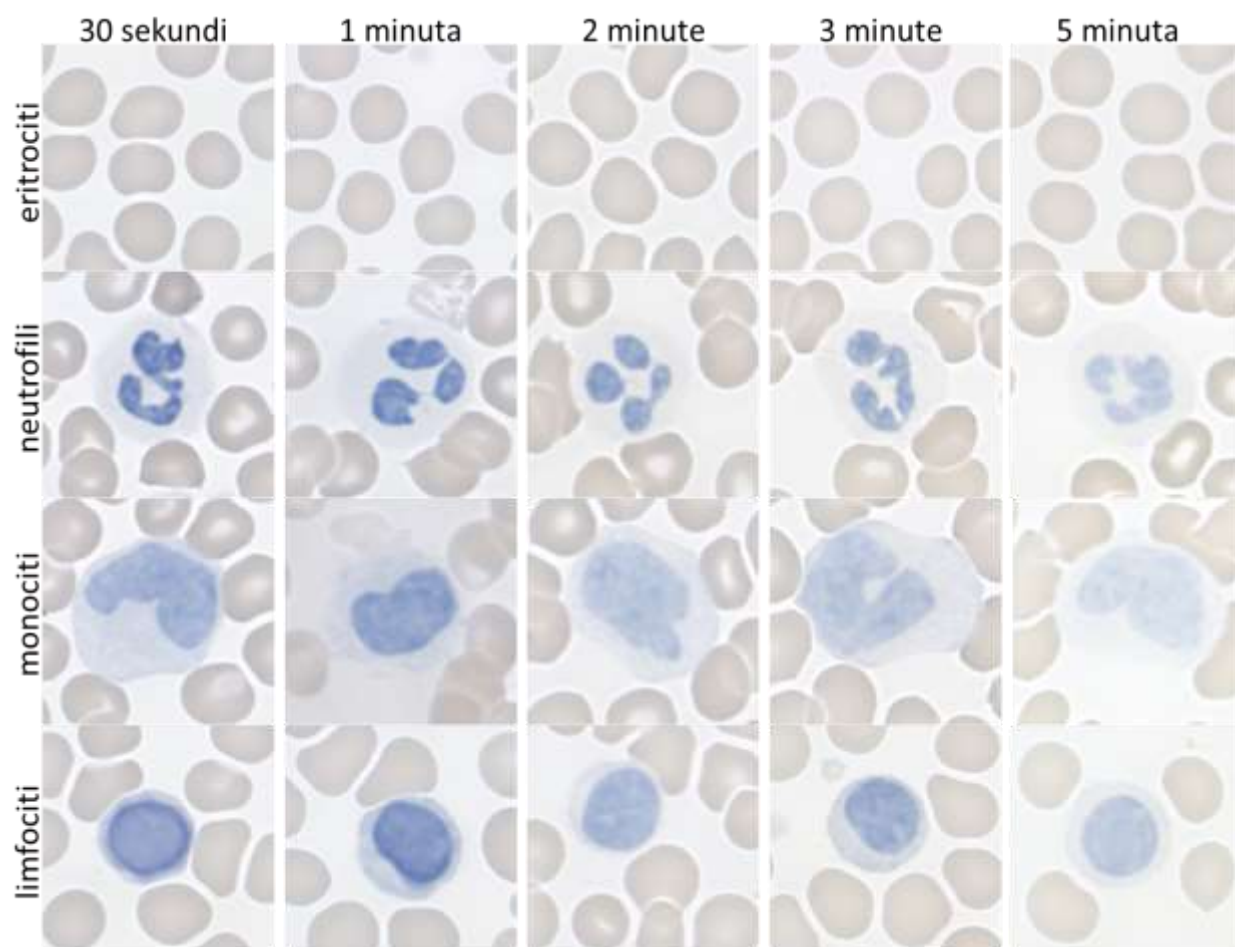
Slika 42. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL29 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000×.



Slika 43. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL38 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000×.



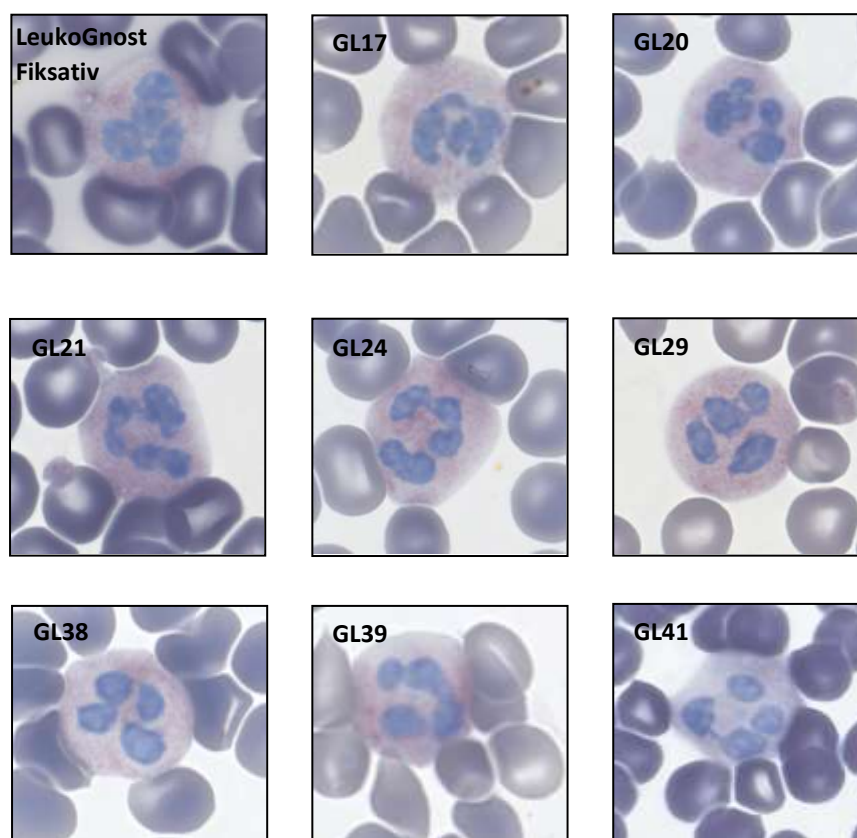
Slika 44. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL39 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000×.



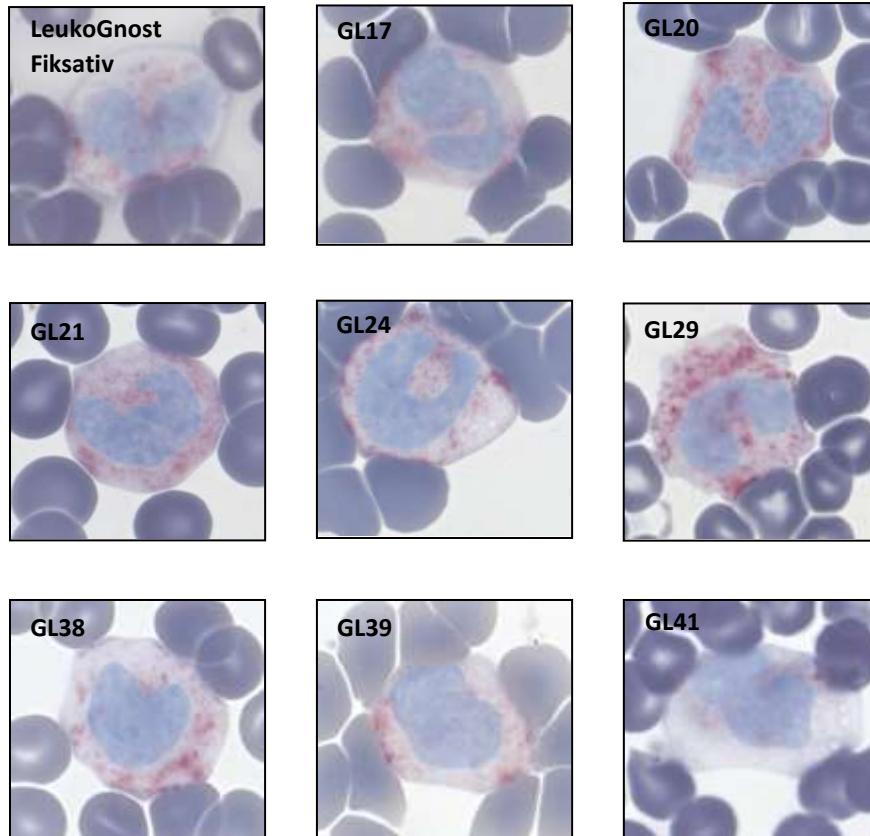
Slika 45. Preparati pune krvi obojeni Hematoksilinom ML. Preparati su fiksirani probnom formulacijom GL41 kroz 30 sekundi, 1 minutu, 2 minute, 3 minute i 5 minuta. Prikazani su eritrociti, neutrofili, monociti i limfociti. Povećanje je 1000×.

6.4. Testiranje novi formulacija fikstiva bez formalina u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija

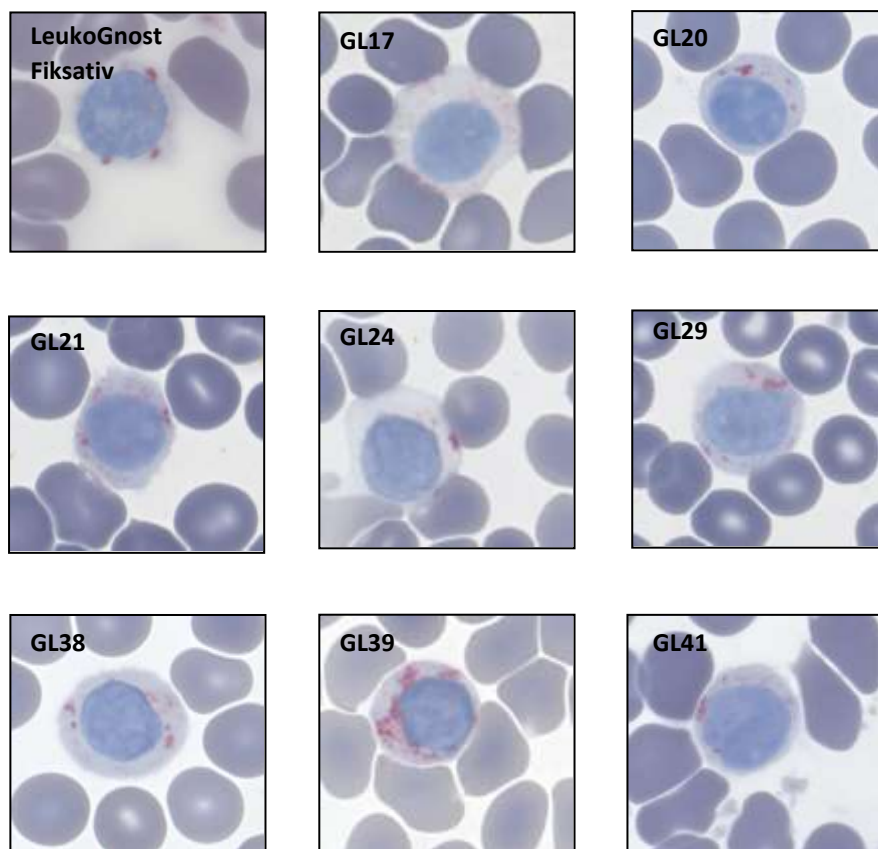
Da bih potvrdila kvalitetu i primjenjivost odabranih novih formulacija fiksativa bez formalina u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija, svaku od odabranih osam novih formulacija fiksativa bez formalina sam koristila za fiksaciju krvnih preparata koje sam nakon toga obojala kompletima za dijagnostiku leukemija: LeukoGnost ACP (Slika 46a, 46b, 46c), LeukoGnost PAS (Slika 47.), LeukoGnost SPE (Slika 48.), LeukoGnost NSE (Slika 49.), LeukoGnost MPO (Slika 50.), LeukoGnost ALP (Slika 51.) i Sudan Black B Eco (Slika 52.)



Slika 46a. Prikaz usporedbe neutrofila fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost ACP u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.

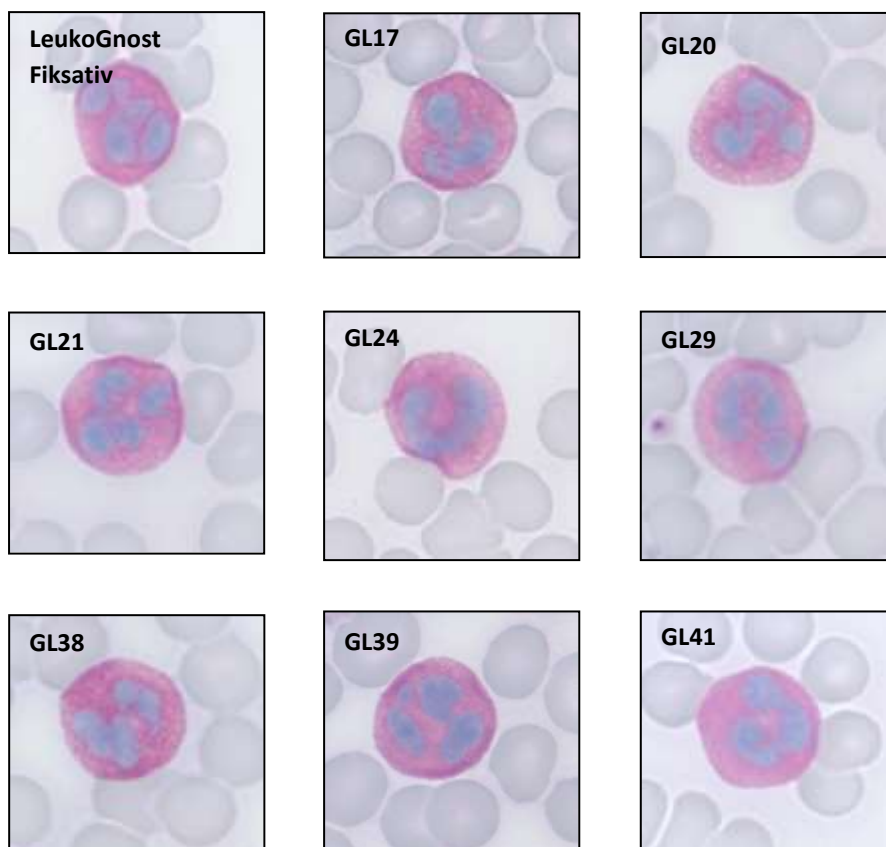


Slika 46b. Prikaz usporedbe monocita fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost ACP u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.



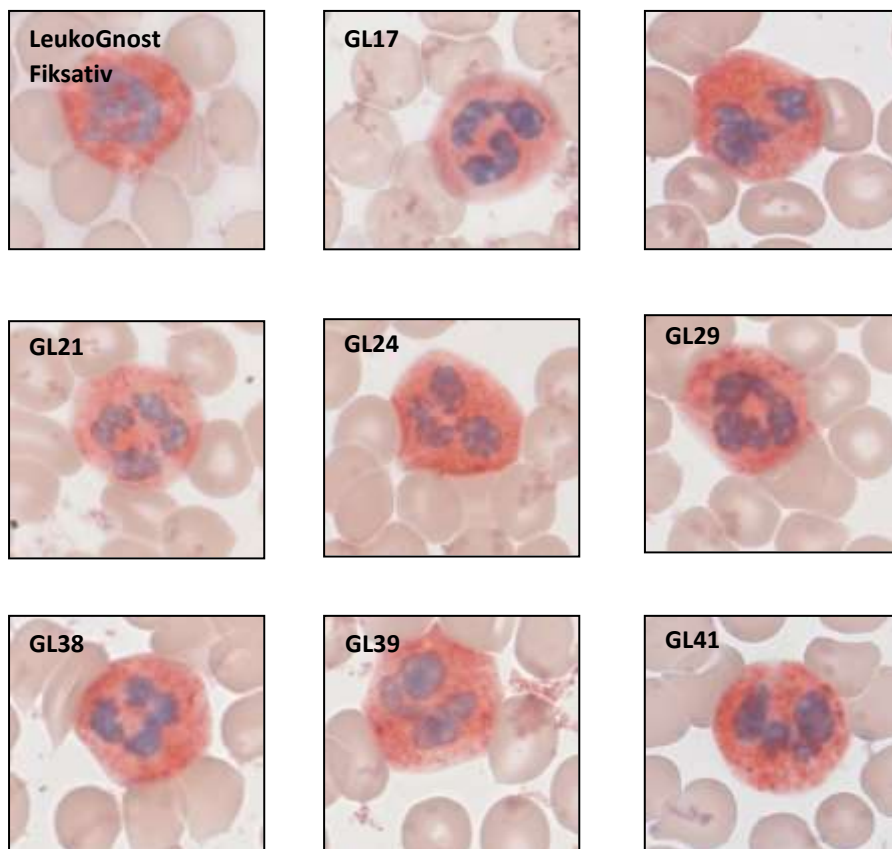
Slika 46c. Prikaz usporedbe limfocita fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost ACP u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.

Kod testiranja novih formulacija fiksativa u kompletu za detekciju aktivnosti kisele fosfataze LeukoGnost ACP (Slikama 46a, 46b i 46c) se mogu vidjeti specifično tamno crveno granulirano obojenje citoplazme monocita (Slika 46a.), neutrofila (Slika 46b.) i limfocita (Slika 46c.), što je rezultat reakcije naftol AS-BI fosfata s diazo-solima boje Fast Garnet GBC pri čemu se stvara crveni talog na mjestu reakcije. Svi preparati koji su fiksirani probnim fiksativima daju jednoliku obojenost usporedivu s LeukoGnost fiksativom osim preparata fiksiranih s GL41 koji pokazuju slabije obojenje u odnosu na preparate fiksirane LeukoGnost fiksativom i ostalim probnim fiksativima.



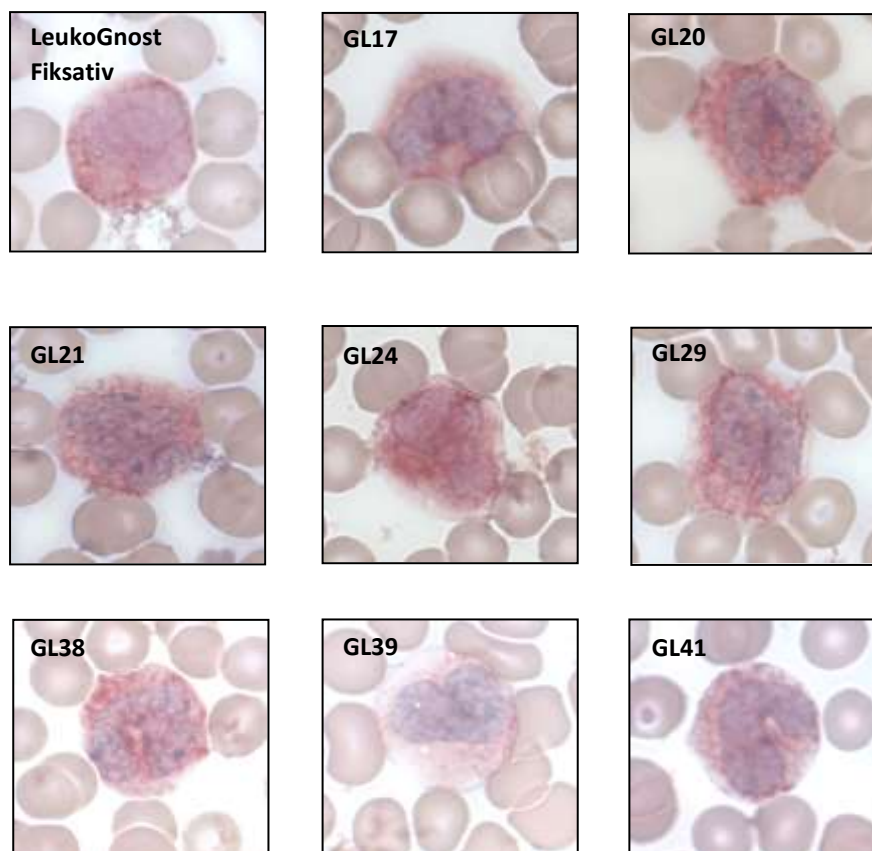
Slika 47. Prikaz usporedbe neutrofila fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost PAS u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×

Kod bojenja kompletom LeukoGnost PAS koji detektira reakciju perjodne kiselina i Schiffove baze (Slika 47.) citoplazma neutrofila je specifično obojena difuzno do fino zrnato magenta bojom kao rezultat stvaranja aldehida na koje djeluje Schiffov reagens i boji ih u intenzivnu magenta boju. Preparati koji su fiksirani s odabranim GL fiksativima daju jednoliku obojenost usporedivu s LeukoGnost Fiksativom.



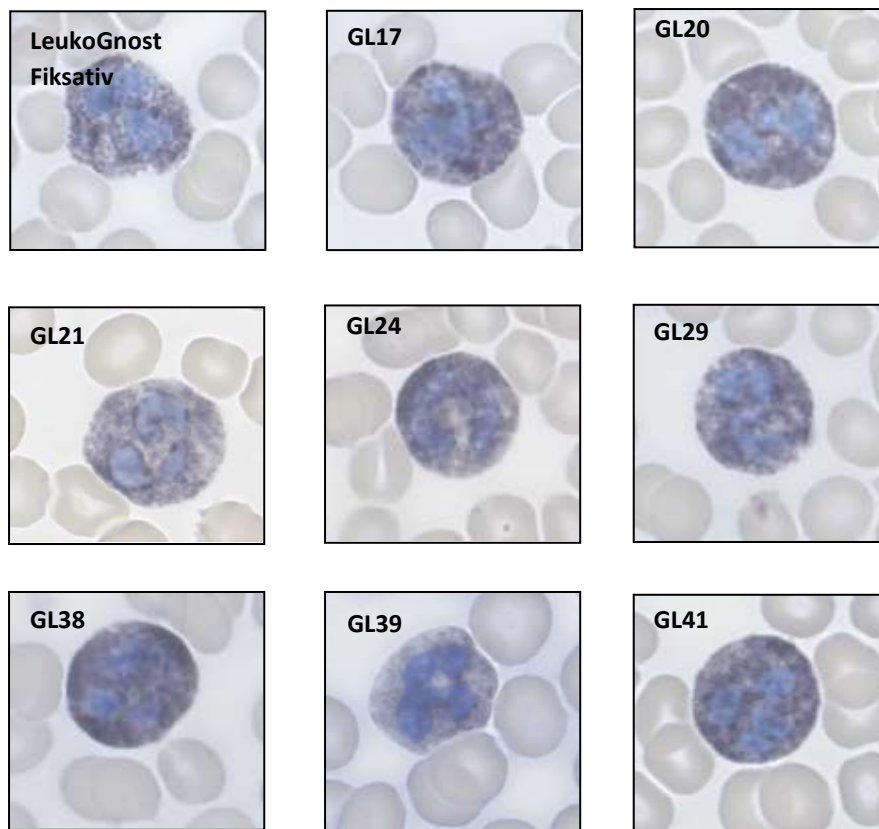
Slika 48. Prikaz usporedbe neutrofila fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost SPE u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.

Kod korištenja kompleta LeukoGnost SPE slobodni naftol iz naftol AS-D kloroacetata u reakciji s diazo-solima stvara netopivi crveni precipitat na mjestu reakcije. U normalnoj krvi specifično se boje samo neutrofili kako je prikazano na Slici 48. Svi preparati fiksirani s osam odabranih GL fiksativima daju jednoliku obojenost koja je usporediva s LeukoGnost Fiksativom.



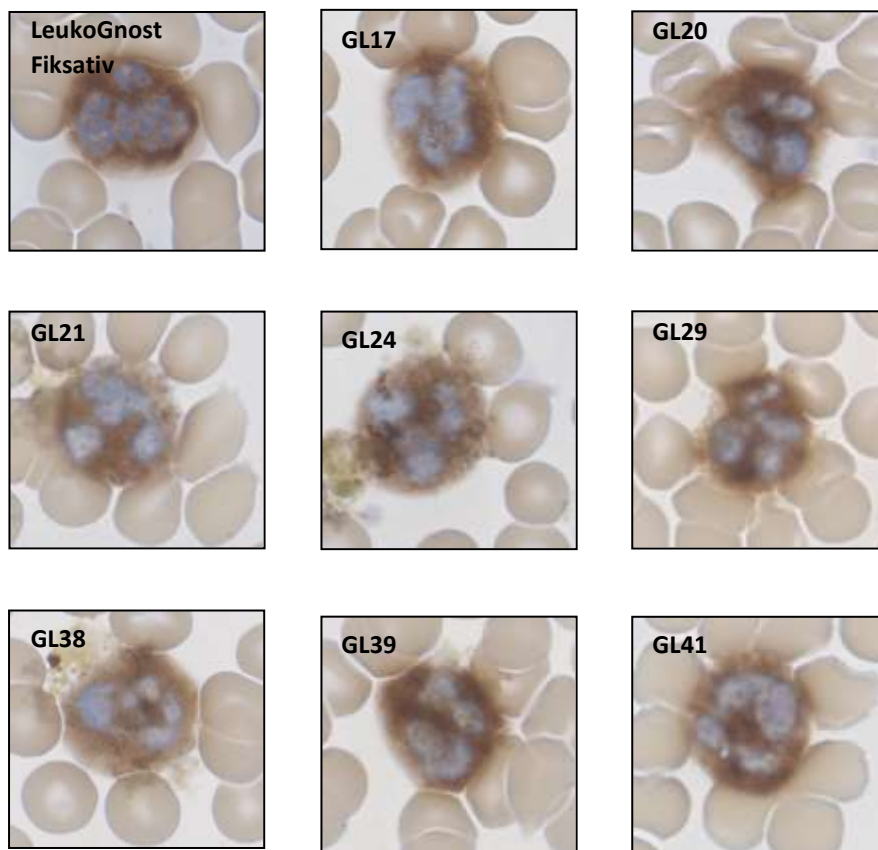
Slika 49. Prikaz usporedbe neutrofila fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost NSE u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.

U kompletu LeukoGnost NSE slobodni naftol iz 1-naftil acetata u reakciji s diazo-solima pararosanilina stvara netopiv crveno smeđi precipitat na mjestu reakcije. U normalnoj krvi specifično se boje samo monociti. Na Slici 49. najintenzivnije obojenje monocita daju preparati koji su fiksirani GL20 i GL21 fiksativima. Dostatno obojenje daju i preparati fiksirani GL17, GL24, GL29, GL38 i GL41 fiksativima. Dok preparati fiksirani GL39 fiksativom daju preslabo obojenje.



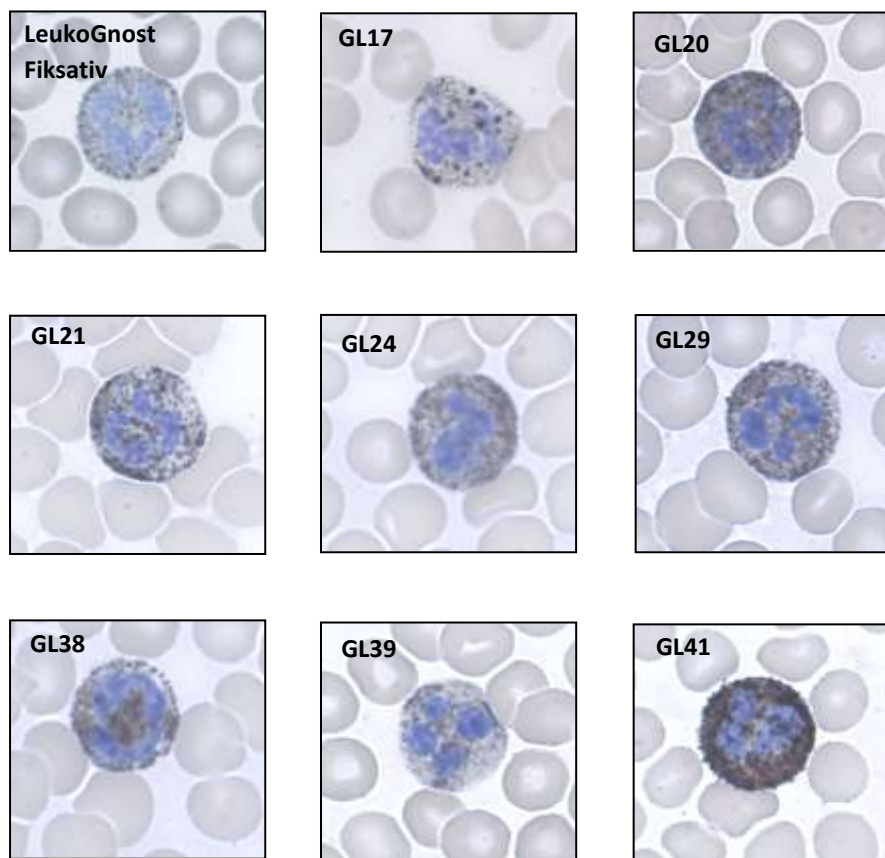
Slika 50. Prikaz usporedbe neutrofila fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost MPO u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.

Stanična mijeloperoksidaza katalizira redukciju vodikovog peroksida pri čemu nastaje voda i kisik koji oksidira 4-kloro-1-naftol što dovodi do stvaranja tamno-plavih do crnih precipitata na mjestu aktivne peroksidaze. Pri korištenju kompleta za detekciju aktivnosti mijeloperoksidaze u leukocitima LeukoGnost MPO uz odabrane nove formulacije fiksativa bez formalina (Slika 50.) može se vidjeti da su preparati fiksirani s GL21 i GL39 slabijeg intenziteta obojenja od ostalih koji su jednakog intenziteta kao i preparati fiksirani LeukoGnost Fiksativom, dok su GL38 i GL41 jačeg obojenja.



Slika 51. Prikaz usporedbe neutrofila fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom LeukoGnost ALP u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.

Kod detekcije aktivnosti alkalne fosfataze u leukocitima (LeukoGnost ALP) slobodni naftol iz 1-naftil fosfata u reakciji s diazo-solima Variamine Blue B boje stvara netopivi smeđi precipitat na mjestu reakcije. Na Slici 51. se može vidjeti da preparati koji su fiksirani sa svim odabranim novim GL fiksativima pokazuju jednako obojenje kao i LeukoGnost Fiksativ.



Slika 52. Prikaz usporedbe neutrofila fiksiranih probnim fiksativima i obojenih kompletom Sudan Black B Eco u odnosu na LeukoGnost fiksativ. Povećanje je 1000×.

Kod bojenja kompletom Sudan Black B (Slika 52.) se vidi da najintenzivnije obojenje daje preparat fiksiran GL41 fiksativom, čak intenzivnije nego preparati fiksirani LeukoGnost Fiksativom. Dostatno obojenje daju i preparati fiksirani sa GL20, GL21, GL29 i GL38 fiksativima dok preparati fiksirani sa GL17, GL24 i GL39 daju preslabo obojenje.

Budući da različite formulacije fikstiva bez formalina daju različite rezultate u odnosu na komercijalni fiksativ s formalinom LeukoGnost Fiksativ pri korištenju citokemijskih kompleta za dijagnostiku leukemija, zbirni rezultata su prikazani u Tablici 11.

Tabela 11. Zbirni prikaz rezultata nakon bojenja svim kompletima.

oznaka fiksativa	komplet LeukoGnost						Sudan Black B Eco
	PAS	SPE	NSE	MPO	ALP	ACP	
GL17	+	+	+	+	+	+	+/-
GL20	+	+	+	+	+	+	++
GL21	+	+	+	+/-	+	+	+
GL24	+	+	+	+	+	+	+
GL29	+	+	+	+	+	+	++
GL38	+	+	+	++	+	+	++
GL39	+	+	-	+/-	+	+	+
GL41	+	+	+	++	+	-	+++

(-) obojenje nije zadovoljavajuće

(+/-) obojenje je donekle zadovoljavajuće

(+) obojenje je usporedivo s obojenjem preparata fiksiranih LeukoGnost Fiksativom

(++) obojenje je nešto intenzivnije u usporedbi s obojenjem preparata fiksiranih LeukoGnost Fiksativom

(+++) obojenje je značajno intenzivnije u odnosu na obojenje preparata fiksiranih LeukoGnost Fiksativom

7. RASPRAVA

Iako se za fiksaciju krvnih preparata često koristi metanol (npr. kod bojenja tipa Romanowsky), u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija koji se baziraju na detekciji aktivnosti staničnih enzima (esteraze, fosfataze i mijeloperoksidaza), metanol nije primjenjiv jer zbog svojih alkoholnih svojstava inaktivira enzime čija aktivnost se dokazuje. Zbog toga su glavni sastojci komercijalnih fiksativa za krvne preparate u citokemijskoj dijagnostici leukemija formalin i aceton. S obzirom da je formalin kancerogen i mutagen, teži se njegovom potpunom izbacivanju iz uporabe. Stoga je pokrenuta opsežna pretraga literature vezana uz fiksirajuće sredstvo koje bi zamijenilo formalin ili kako bi se identificirao suplement koji bi svojim djelovanjem nadopunio djelovanje acetona bez dodavanja aldehidnih fikativa. Pretragom literature nije pronađen niti jedan navod o fiksativu za citokemijsku dijagnostiku leukemija koji bi sadržavao alterantivu formalinu iako neki autori (Shibata i sur., 1985; Kaplow i sur., 1986) koriste samo puferiranu otopinu acetona kao fiksativ. Za takvu formulaciju fiksativa u prethodnim istraživanjima u BioGnostu je pokazano da se ne postiže zadovoljavajući stupanj fiksacije. Općenito, umjesto formalina se najčešće koristi glioksal (Dey 2018) jer mu je strukturno najbliži iako se radi o dialdehidu pri čemu dvije aldehidne skupine na istoj molekuli mogu biti razlog različitog djelovanja glioksala i formalina. To je i ovdje pokazano kod formulacija GL13, GL14 i GL15 koje su sadržavale puferiranu otopinu acetona i glioksala. Ove formulacije su imale nepovoljan učinak na membranu stanica koja je pokazivala nepravilnosti i rigidnost umjesto glatku zaobljenost. S obzirom na ove rezultate napravljen je veći broj novih formulacija koje su uz puferirani aceton sadržavale samo suplemente ili i glioksal i suplemente. Suplementi su odabrani prema svojim dokazanim fiksirajućim svojstvima ili dodatka fiksativu (PEG400 (Boon i Kok, 2008), glicerol (Hammer i sur., 2012), DMSO (Fassel i sur., 1997), manitol (Andrews i Coffey, 1982), saharoza (Andrews and Coffey, 1982), sorbitol (Zhu i sur., 2021), triacetin (MacNive, 1995), trietanolamin (Ryss, 2017) i imidazol (Voigt i sur., 2002), ili su testirani zbog svojih svojstava zbog kojih bi se pretpostavljalo da bi mogli imati fiksirajuća svojstva (antioksidansi acetilsalicilna kiselina i 4-heksilrezorcinol). Suplementi su korišteni u najmanje dvije koncentracije kako bi se odmah utvrdio utjecaj koncentracije suplementa na fiksaciju. Pri pripremi fiksativa, neki od suplemenata su se istaložili ili se nisu otopili (manitol 5g s ili bez glioksala i imidazol 5 g s glioksalom), a neki su djelovali vrlo agresivno na preparat krvnog razmaza tako da je već nakon fiksacije bio uništen (4-heksil rezorcinol). Budući da pH fiksativa

može imati ključnu ulogu za dobru fiksaciju preparata, prvi korak je bio izmjeriti pH svim otopinama osim onih kod kojih je došlo do taloženja. Većina novih formulacija imala je pH vrijednosti u okviru komercijalnog fiksativa Leukognost Fiksativ (pH između 5 i 6). Iznimke su formulacije s dodatkom acetilsalicilne kiseline koje su imale niži pH (pH oko 4,5), 25%-tne otopine DMSO-a koja je imala nešto viši pH (pH 6,6), te trietanolamina (pH oko 9) i imidazola (1% pH 7,2, 10% pH 8,6) koje su imale značajno viši pH. Kao inicijalno bojenje provedeno je bojenje Hematoksilinom ML kako bi se dobila preliminarna informacija o samom djelovanju fiksativa na glavne stanične strukture, u prvom redu membrane i jezgre, te o intenzitetu i obliku obojenosti s hematoksilinom. Kod nešto većeg broja novih formulacija (GL13, GL14, GL15, GL18, GL25, GL32, GL35, GL36, GL42) dolazi do promjene u morfologiji stanične membrane koja nije lijepo zaobljena uslijed povećane rigidnosti. Preparati fiksirani varijantama s glioksalom bez suplementa (GL13-15) imali su promjene u izgledu membrane što ukazuje da je loše djelovanje glioksala na fiksaciju stanične membrane. No uz dodatak nekih od suplemenata inhibiraju taj loš učinak (PEG400, glicerol, manitol i triacetin). Efekt staklaste citoplazme kod neutrofila izaziva fiksacija s formulacijama GL26, GL27, GL31, GL33 i GL47. Ovaj prvi korak u testiranju novih formulacija eliminirao je 23 od 36 novih formulacija. Od trinaest novih formulacija koje su pokazale dobra svojstva, neke su bile istog sastava uz razliku u koncentraciji suplementa. Stoga su za daljnja testiranja uzete samo formulacije koje su imale nižu koncentraciju suplementa zbog ekonomske opravdanosti. Od odabranih osam formulacija dvije nisu sadržavale glioksal (GL21 s glicerolom i GL39 s triacetinom). Od ranije je poznato da glicerol može djelovati kao zamjena za formalin u nekim slučajevima (Hammer i sur., 2012), kao i da je triacetin djelotvoran kao formalinu sekundarni fiksativ (MacNiven, 1995). Ostalih šest od osam novih formulacija s dobrim fiksirajućim svojstvima sadržavale su uz glioksal PEG400 (GL17), glicerol (GL20), DMSO (GL24), manitol (GL29), triacetin (GL38) i trietanolamin (GL41). Ovi rezultati su u skladu s navodima iz literature. Boon i suradnici, 2008, su pokazali da PEG sprečava otvrdnjavanje tkiva i pospješuje koagulaciju proteina čime djeluje kao suplement u fiksirajućem sredstvu. Da DMSO ima osobine suplementa u fiksativu pokazali su Fassele i sur., 1997, pri čemu DMSO olakšava prodiranje drugih fiksirajućih tvari i time poboljšava fiksaciju. Manitol dokazano prevenira nekrozu u tkivu i time pospješuje fiksaciju (Andrews i Coffey, 1982), a trietanolamin se uspješno koristi za fiksaciju nematoda (Ryss, 2017). Iako je bojenje s Hematoksilinom ML pokazalo da ovih osam formulacija uspješno fiksira krvne preparate, daljnje testiranje bojenjem s citokemijskim

kompletima za dijagnostiku leukemija, pokazalo je da su neke od formulacije ipak bolje, a druge lošije u odnosu na komercijalni fiksativ LeukoGnost Fiksativ. Općenito, formulacija GL39 (aceton + triacetin) je u nekim od sedam citokemijskih kompleta dala slabije obojenje (LeukoGnost NSE i LeukoGnost MPO) što je isključuje iz finalnog odabira. Za šest kompleta (LeukoGnost PAS, LeukoGnost MPO, LeukoGnost NSE, LeukoGnost SPE, LeukoGnost ALP i LeukoGnost ACP) su dale dobro obojenje nove formulacija GL17, GL21, GL24, GL29 i GL38, dok je fiksacija s GL41 dala nešto slabije obojenje kod LeukoGnost ACP kompleta. Razlog tome može biti pH ovog fiksativa koji ima pH 8,1, a za učinkovitu detekciju aktivnosti kisele fosfazate kompletom LeukoGnost ACP su potrebni kiseli uvjeti. S druge strane, fiksacija formulacijom GL41 kod bojenja kompletom Sudan Black B Eco daje značajno jače obojenje čak i od komercijalnog fiksativa LeukoGnost Fiksativ, ali i od ostalih sedam novih formulacija, što čini formulaciju GL41 idealnim fiksativom za komplet Sudan Black B Eco.

Rezultati u ovom radu pokazuju da je moguće napraviti čak nekoliko novih formulacija fiksativa koji neće sadržavati formalin, pa čak ni bilo kakav drugi aldehidni fiksativ, za primjenu u citokemijskim kompletima za dijagnostiku leukemija.

8. ZAKLJUČAK

Iako formalin ima široku uporabu kao fiksativ, zbog svoje kancerogenosti i mutagenosti uporaba mu se nastoji izbaciti ili barem smanjiti. Stoga je ovo istraživanje imalo za cilj naći prihvatljivu zamjenu u fiksativu koji se primjenjuje u citokemijskim testovima za dijagnostiku leukemija. Od prvotnih 36 probnih formulacija bez formalina, u konačnici njih 6 (GL17, GL20, GL21, GL24, GL29, GL38) je pokazalo dobre rezultate na temelju morfologije fiksiranih stanica, te intenzitetu i obliku obojenja pri korištenju testova koji detektiraju aktivnost staničnih estera (nespecifične i specifične), fosfataza (kisele i alkalne), mijeloperoksidaze te reakciju perodne kiseline i Schiffove baze. Jedna od probnih formulacija (GL41) se pokazala kao vrlo dobra zamjena komercijalnog fiksativa kod korištenja Sudan Black B Eco kompleta jer je rezultat bio intenzivnije obojenje u odnosu na komercijalni fiksativ. Na temelju ovih rezultata 7 novih formulacija fiksativa se mogu koristiti kao adekvatna zamjena umjesto komercijalnog fiksativa koji sadrži formalin.

9. LITERAUTRA

Anand A., Srivastava P. K. (2012): A molecular description of acid phosphatase. *Appl Biochem Biotechnol.* 167: 2174-97.

Andrews P.M., Coffey A.K. (1982): Factors that improve the preservation of nephron morphology during cold-storage. *Lab Invest.* 46: 100–120.

Boon M.E., Kok L.P. (2008): Theory and practice of combining coagulant fixation and microwave histoprocessing. *Biotech Histochem.* 83: 261-277.

Bull H., Murray P. G., Thomas D., Fraser A. M., Nelson P. N.(2002): Acid phosphatases. *Mol Pathol.* 55: 65-72.

Culling C.F.A (1974): *Handbook of histopathological and histochemical techniques*, 2 ed. Butterworth, London, UK.

Dapson RW. (2007): Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. *Biotech Histochem.* 82: 161-6.

Dey P. (2018): *Fixation of Histology Samples: Principles, Methods and Types of Fixatives*. U: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore, str. 3-17.

Drexler H. G., Gaedicke G., Minowada J. (1985): Biochemical enzyme analysis in acute leukaemia. *J Clin Pathol.* 38: 117–127.

Eltoum I., Fredenburgh J., Myers R.B., Grizzle W.E. (2001): Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol.* 24: 173 -190.

Evangelou K., Gorgoulis V. G.(2017): Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. *Methods Mol Biol.*1534: 111-119.

- Fassel T.A., Sohnle P.G., Kushnaryov V.M. (1997): The use of dimethylsulfoxide for fixation of yeasts for electron microscopy. *Biotech Histochem.* 72: 268-272.
- Hammer N., Löffler S., Feja C., Sandrock M., Schmidt W., Bechmann I., Steinke H. (2012): Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: a potential alternative to formaldehyde and phenol embalming. *Anat Sci Educ.* 5: 225-233.
- Hayat M. A. (1981): *Fixation for Electron Microscopy.* Academic Press.
- Hopwood D. (1969): Fixatives and fixation: a review. *Histochem Journal.* 1: 323-60.
- Horobin R.W. (2011): How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem.* 86: 36-51.
- Ince M., Ince O. K., Ondrasek G. (2020): *Biochemical Toxicology - Heavy Metals and Nanomaterials.* U: Nuriye T. S. *Formaldehyde Advantages and Disadvantages: Usage Areas and Harmful Effects on Human Beings.* IntechOpen, str. 417-473.
- Isam E., Jerry F., Russell B. M., i William E. G. (2001): *Journal of Histotechnology.* U: *Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues,* str. 173-190.
- Kaplow L.S., Crouch J.Y., Meyers J.A., Kunz H., Garcia G.L. (1986): Assessment of Leukocyte Alkaline Phosphatase by Image Analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 468: 85-92.
- Kass L.(1979): *Cytochemistry of esterases.* CRC Crit Rev Clin Lab Sci. 10: 205-23.
- Khan A. A., Rahmani A. H., Aldebasi Y. H., Aly S. M. (2014): *Biochemical and Pathological Studies on Peroxidases –An Updated Review.* Glob J Health Sci. 6: 87–98.
- Leong AS-Y. (1994): Fixation and fixatives. In Woods AE and Ellis RC eds. *Laboratory histopathology.* New York: Churchill Livingstone, 4.1-1 - 4.1-26.
- MacNiven I. (1995): Triacetin Additive Improves Fixation and Cutting Quality of Paraffin. *J Histotech.* 18: 145-148.
- Morrison V. A. (1994): Chronic leukemias. *CA Cancer J Clin.* 44: 353-77.

Patel D. H. (1992): Characterisation of non-specific esterase isoenzyme forms in normal and leukaemic myeloid cells. University of Leeds.

Pejovic T, Schwartz P. E. (2002): Leukemias. *Clinical Obstetrics Gynecology*. 45: 866-78.

Pfüller U., Franz H., Preiss A.(1977): Sudan Black B: chemical structure and histochemistry of the blue main components. *Histochemistry*. 54: 237-50.

Regulation (EU) No 2015/491 amending regulation (EU) No 605/2014, amending regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the council of the 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures (Annex VI).

Rośniak-Bąk K, Jeleń A, Bąk M.(2017): Analysis of Separation of White Blood Cells in Peripheral Blood as an Indicator of MPO Deficiency. *Ann Clin Lab Sci*.47: 422-431.

Ryss A. Y. (2017): A Simple Express Technique to Process Nematodes for Collection Slide Mounts. *J Nematol*. 49: 27–32.

Sharma U., Pal D., Prasad R. (2014): Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem*. 3: 269-78.

Shibata A., Bennett J. M., Castoldi G. L., Catovsky D., Flandrin G., Jaffe E. S., Katayama I., Nanba K., Schmalzl F., Yam L. T. (1985): Recommended methods for cytological procedures in haematology. International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). *Clin Lab Haematol*. 7: 55-74.

Stefan F., Hagop K. (2001): *Leukemias: Principles and Practice of Therapy*. Wiley-Blackwell Pub.

Thavarajah R., Mudimbaimannar V. K., Elizabeth J., Rao U. K., Ranganathan K. (2012): Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 16: 400–405.

Vimercati L. Carrus A., Martino T., Galise I., Minunni V., Caputo F., Dell’Erba A., i Assennato G. (2010): Formaldehyde Exposure and Irritative Effects on Medical Examiners, Pathologic Anatomy Post-Graduate Students and Technicians. *Iran J Public Health*. 39: 26–34.

Voigt T., Dauber W., Bensemman-Ryvkin I., Härtel X. (2002): Increasing membrane contrast by means of imidazole-osmium post-fixation as exemplified by skeletal muscle fiber. *Microsc Res Tech.* 58: 121-124.

Walker H. K., Hall W. D., Hurst J. W. (1990): *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* Boston:Butterworths.

Yam L. T. (1974): Clinical significance of the human acid phosphatases: a review. *Am J Med.* 56: 604-16.

Zanini C., Gerbaudo E., Ercole A. V., Forni M. (2012): Evaluation of two commercial and three homemade fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible. *Environmental Health:* 11:59.

Zhu L., Rajendram M., Huang K. C. (2021): Effects of fixation on bacterial cellular dimensions and integrity. *iScience.* 24:102348.

10. Životopis

Rođena sam 1. 12. 1997. u Žepču, Bosna i Hercegovina. Nakon završene opće gimnazije KŠC Don Bosco u Žepču, upisujem preddiplomski sveučilišni studij Biologije 2016. godine na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti Sveučilišta u Mostaru. Nakon završetka preddiplomskog studija upisujem diplomski sveučilišni studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.