

Tissue Processing

Mojtaba Masoudi

Sampling

1: Autopsy

tissue sampling from dead body

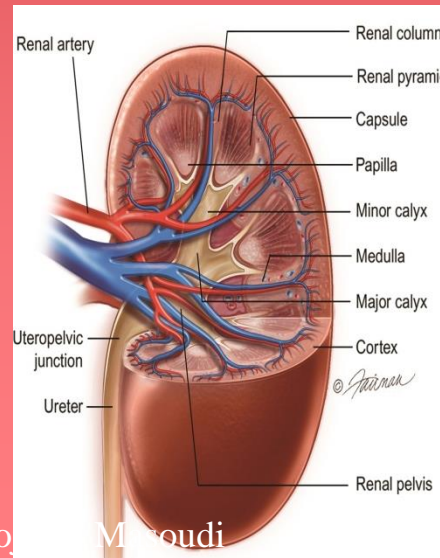
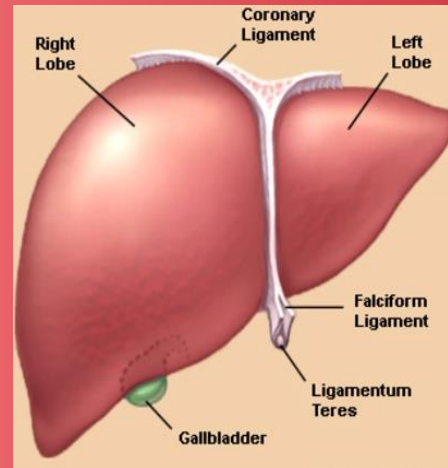
2: Biopsy

tissue sampling from live organism

Sampling

1. Dissection
2. Trimming
3. Orientation

- use of sharp blade or knife
- it must fast and immediately after it remove from organism





Fixation

Mojtaba Masoudi

why did we do fixation?

Prevent of postmortem changes

Definition:

- فیکساتیوها باید محتویات محلول سلول را به مواد نامحلول تغییر دهند.

protein molecule to unfold ← Denaturation ✓

- حضور فیکساتیو ← ترکیب مولکول پروتئین
بافیکساتیو نامحلول شدن پروتئین

- نبود فیکساتیو ← واکنشی تر شدن پروتئین
حلالیت پروتئین

- فیکساتیوها با تثبیت پروتئین بافت را در برابر تغییرات مقاوم می کنند.

Function of fixative:

- (1) حفظ پیوندهای بین سلول ها و مواد خارج سلولی
- (2) افزایش در visibility بافت و تفاوت ایجاد کردن در شاخص های انکساری
- (3) تثبیت و یا حفظ لیپیدها و کربوهیدرات ها
- (4) نامحلول کردن اجزا اصلی سلول ها یعنی پروتئین ها
- (5) سخت تر کردن بافت
- (6) کشتن بافت قبل از پوسیدگی

Actions of fixative:

- غیرفعال کردن آنزیم ها
 - پذیرا کردن بافت ها برای رنگ آمیزی
 - اصلاح کردن اجزای اصلی بافت
-
- روش های فیزیکی و شیمیایی تثبیت پروتئین ها:
 - گرما (فیزیکی)
 - خشک کردن (فیزیکی)
 - استفاده از یک ویا تعداد بیشتری معرف شیمیایی

Qualities of Good Fixative

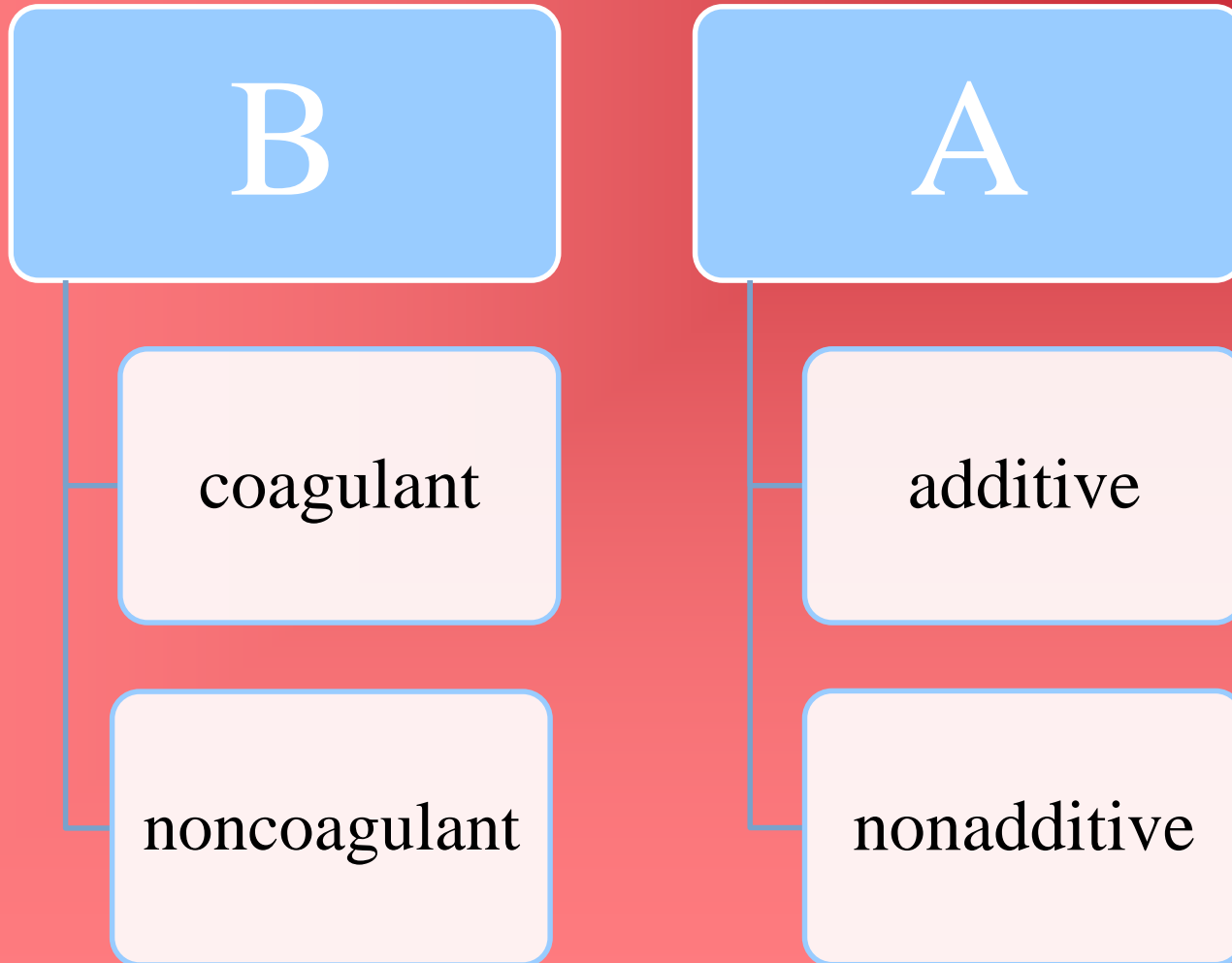
A good fixative should be capable of fulfilling the following requirements:-

- (1) It must kill the cell quickly without shrinking, swelling, or other distortion.
- (2) It must penetrate the tissue and cells rapidly and evenly.
- (3) It must render insoluble substance of the cell and give good optical differentiation.
- (4) It must harden the tissue and render it insensitive to subsequent treatment.

Qualities of Good Fixative

- (5) It must permit at a later date the application of numerous staining procedures.
- (6) It must inhibit bacterial decay and autolysis.
- (7) It should allow tissue to be stored for long period of time.
- (8) It should permit the restoration of natural color for photography and mounting as museum specimens.
- (9) It should be simple to prepare and economical in use.

Classification of fixative:



Additive fixative:

برقراری پیوندهای شیمیایی با بافت ❖

mercuric chloride ■

Chromium trioxide ■

Picric acid ■

formaldehyde ■

Nonadditive fixative:

- ❖ برقرار نکردن پیوندهای شیمیایی با بافت
- ❖ ته نشین کردن یا لخته کردن پروتئین ها
- ❖ جدا کردن پیوندهای بین مولکول های آب و پروتئین ها

Acetone ■

Alcohol ■

Groups on the protein:

(-COOH)

- Heavy metals
- Mercury, chromium

(-NH₂)

- Formaldehyde
- pH 7

Cagulation:

❖ ایجاد یک شبکه در بافت

Zinic salts ■

Mercuric chloride ■

Ethyl alcohol ■

Methyl alcohol ■

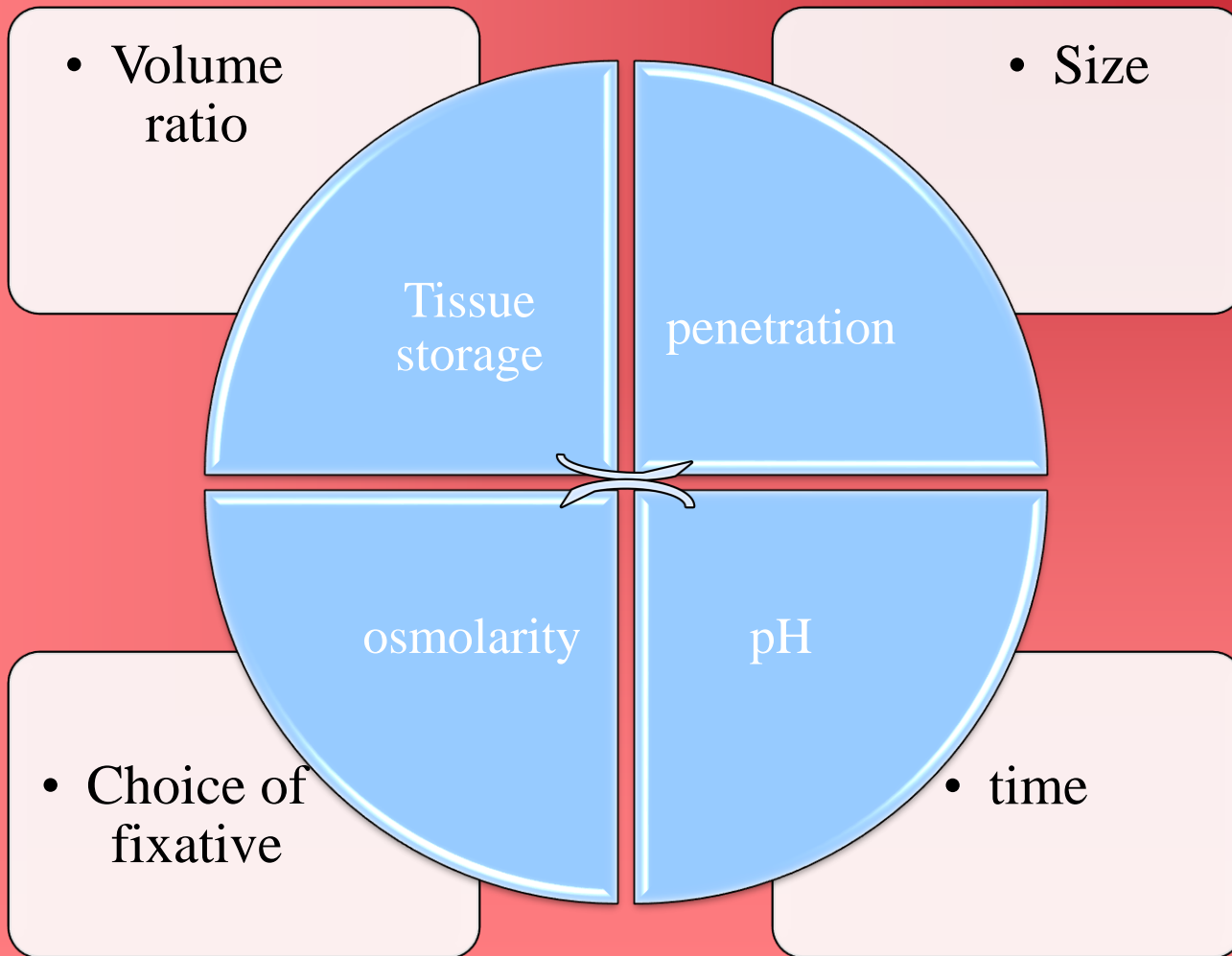
acetone ■

Noncoagulation:

ایجاد ژل ❖

- Formaldehyde ■
- Glutaraldehyde ■
- Osmium tetroxide ■

Factors affecting fixation



Size:

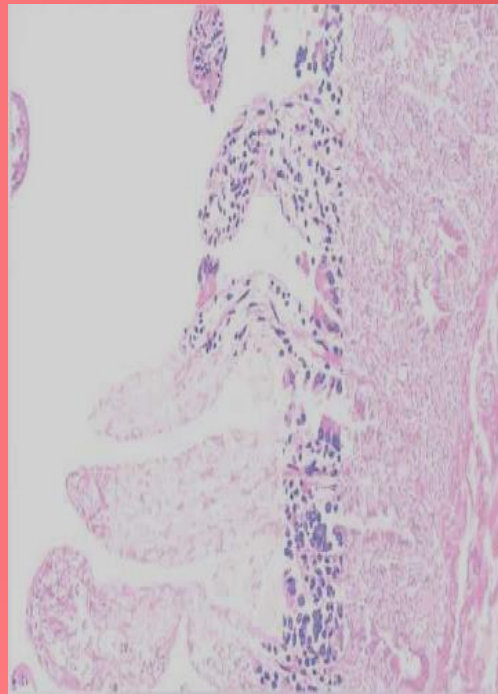
- نفوذ فیکساتیوها به بافت یک فرآیند آهسته است و بلوک ها باید کوچک و نازک باشند
- نمونه بزرگ باید قبل از قرار دادن در داخل فیکساتیو بازو محتویاتش شسته شود و به ورقه های نازک تبدیل شود
- توصیه شده که ضخامت نمونه ها نباید بیش از 3mm باشد
- برای برنامه های پردازشی برش ها باید نازکتر باشد

Volume ratio:

- توصیه می شود که نسبت حجم فیکساتیو به حجم بافت 15 تا 20 بار بزرگتر باشد

Time:

1. زمان بین قطع شدن منبع خون و قرار دادن بافت در فیکساتیو



Choice of fixative:

- روش تثبیت بلافاصله پس از اینکه نمونه ارائه شد باید انتخاب شود
- فیکساتیوها را باید باتوجه به اینکه ممکن است در آینده تحت تاثیر مطالعات هیستوشیمی قرار گیرند انتخاب شوند
- برای میکروسکوپ الکترونی Glutaraldehyde استفاده می شود

Penetration:



- ضریب نفوذ فیکساتیوها
به بافت مختلف است
- ممکن است تحت
تاثیر گرما قرار بگیرد
- در حاشیه بافت شروع
شده و به سمت مرکز پیش
می رود

pH:

❖ غلظت یون هیدروژن بین فیکساتیوها متفاوت است اما در کل باید در محدوده pH فیزیولوژیک نگه داشته شود

❖ pH برای حفظ فراساختار نمونه بزرگ باید بین 7.2 تا 7.4 باشد

❖ در میکروسکوپ الکترونی pH از اهمیت بالایی برخوردار است

Osmolarity:

- تعداد اجزا در محلول
- افزایش بافر به محلول فیکساتیو ممکن است فشار osmotic که توسط محلول اعمال می شود را افزایش دهد
- محلول های هیپرتونیک موجب چروکیدگی سلول در حالی که محلول های ایزوتونیک و هیپوتونیک منجر به باد کردن سلول و تخریب فرایند fixation می شود
- برای میکروسکوپ الکترونی بهترین نتایج از استفاده اندک از محلول های هیپرتونیک بدست می آید

Type of fixative

It divided based upon

their component → **simple**

→ **compound**

the speed of its penetration

Routine simple fixatives

Alcohol

Formaldehyde

Osmium tetroxide

Heat

نتر اکسید اسمیوم

- بسیار گران است.
- لپید ها و غشاء ها را بخوبی حفظ و از طریق ایجاد دی اکسید اسمیوم هیدراته به رنگ سیاه پدیدار می کند.
- آرام و اندک نفوذ می کند پس برای قطعات کوچک بافت مناسب است.

الکل

- اساسا جهت فیکس کردن اسمیر های خون و مغز استخوان بکار میرود. فیکساتیوی قوی ولی با سرعت نفوذ کم است.

اسید استیک گلاسیال

- در 17 درجه سانتیگراد جامد می شود.
- پروتئین ها فیکس نمی شوند اما پروتئین های هسته رسوب می دهند به این دلیل فیکساتور کروموزوم ها است.
- میتوکندری و دستگاه گلژی از بین می رود.

Compound fixatives

Advantage and disadvantage

Compound fixative

1- Zenker's solution

2- Bouin's fluid

3- Carnoy's fluid

Zenker's solution

- کلرید جیوه (۵ گرم)
- سولفات سدیم (۱ گرم) – اختیاری
- بی کرومات پتاسیم (۵/۲ گرم)
- اب مقطر ۱۰۰ میلی لیتر
- ۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال بلافاصله قبل از مصرف اضافه شود.
- زمان فیکس شدن بافت $۰/۵ \times ۱/۵ \times ۳$ سانتی متر ۱۲ تا ۲۴ ساعت است.

محاسن محلول زنکر

- فیکس شدن نسبتاً سریع است.
- برای کبد، طحال، رشته های همبندی و هسته ها عالی است.
- محلول ذخیره ماندگاری بالایی دارد.

معایب محلول زنکر

- ضخامت بافت نباید بیش از ۰/۵ سانتی متر باشد.
- فیکس کردن بیش از ۲۴ ساعت سبب شکنندگی بافت می گردد.
- برای برطرف کردن بیکرومات پتاسیم نیاز به شستشو با آب جاری به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت دارد.
- ایجاد لکه کلرید جیوه می کند. بعد از افزودن اسد استیک پایدار نمی باشد.

Bouin fluid

- محلول ابی اسید پیکریک اشباع ۷۵ میلی لیتر
- فرمالدئید ۴۰٪، ۲۵ میلی لیتر
- اسید استیک گلاسیال ۵ میلی لیتر
- زمان فیکس شدن بافت $1 \times 1 \times 3$ سانتی متری
۶ تا ۲۴ ساعت است.

محاسن محلول بوئن

- برای جنین توصیه می شود.
- گلیکوژن را حفظ می کند.
- نتایج رنگ آمیزی شفاف است.
- تخریب بافتی کم است.
- برای اجزاء ریز بافت مناسب است، بطوری که رنگ زرد ایجاد شده در بافت یافتن آن را ساده تر می کند.
- بافت را می توان به طور مستقیم به الکل ۷۰٪ انتقال داد.

معایب محلول بوئن

- نفوذ آن ضعیف است و برای قطعات کوچک مناسب است.
- کلیه ها نباید در این محلول فیکس شوند چون بشدت آسیب می بینند.
- بعضی ارگانل ها مثل میتوکندری بشدت آسیب می بینند.

Carnoy's fluid

- الکل اتیلیک مطلق ۶۰ میلی لیتر
- کلروفرم ۳۰ میلی لیتر
- اسید استیک گلاسیال ۱۰ میلی لیتر
- زمان فیکس شدن بافت $1 \times 1 \times 3$ سانتی متری
۰/۵ تا ۳ ساعت است.

محاسن محلول کارنوی

- برای غدد لنفاوی، بیوپسی ها و کروموزوم توصیه می شود.
- گلیکوژن را حفظ می کند.
- به طور همزمان فیکساسیون و دهیدراسیون را انجام می دهد.
- بسیار سریع بوده و شاید سریعترین فیکساتورها می باشد.

معایب محلول کارنوی

- باعث چروکیدگی فراوان می شود.
- سبب همولیز گلبول های قرمز را باعث می شود.
- فقط برای قطعات ریز بافتی مناسب است.

Fixation Procedure

- 1. Dissection**
- 2. Trimming and orientation**
- 3. Immersion fixation**
 - a. tissue cassette**
 - b. tissue basket**
 - c. cloth**



The types of fixation

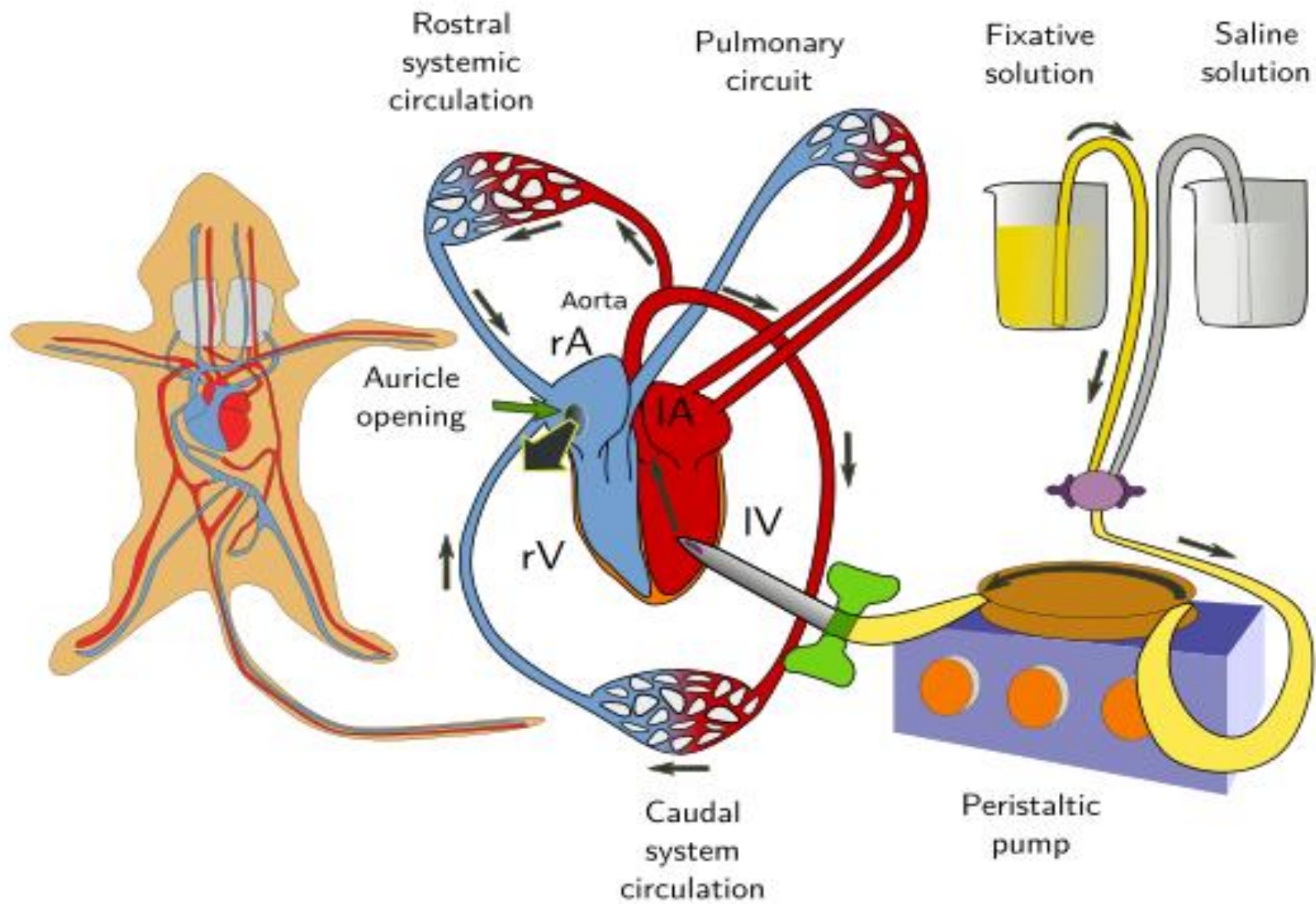
1. immersion

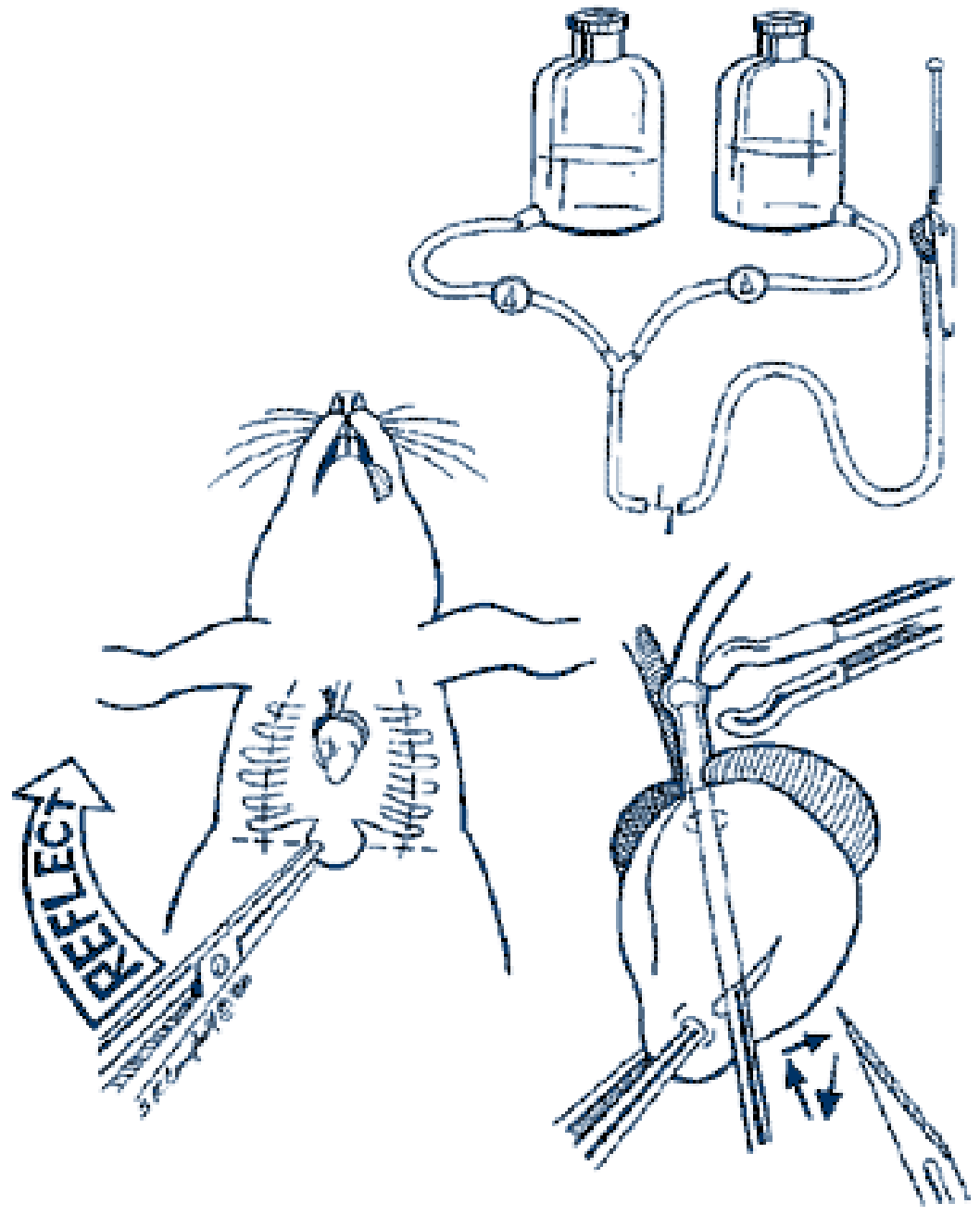
2. perfusion

a. intracardiac perfusion

Application of fixative

- 1. sample size considerations**
- 2. volume of fixation**
- 3. exposure time**





Perfusion Setup Diagram



2006/10/19 19:47

Tissue processing

Dehydration

A. Definition: removal of water

B. Rationale: for paraffin embedding/sectioning

C. Steps

1. wash out fixative

2. graded series of alcohol

a. 70%, 95%, 100%, 100%

3. replace water by diffusion

4. not too long, not too short

Clearing

A. Paraffin solvent

B. Xylene, “clearing agent”

C. Makes tissue appear “clear”

Dehydration and clearing jars



Mojtaba Masoudi

Infiltration

A. Replace xylene with paraffin

B. Immerse in melted paraffin

~55° C MP

C. Remove all bubbles, xylene

D. Procedure

Two baths of melted paraffin



Mojtaba Masoudi

automated tissue processing



Mojtaba Masoudi



Embedding

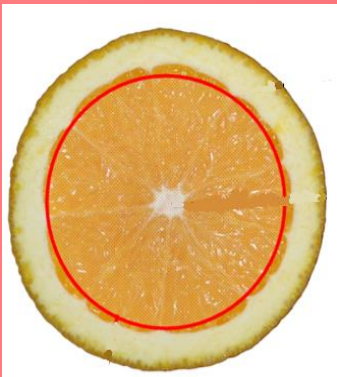
A. Orient tissue

1. cross section

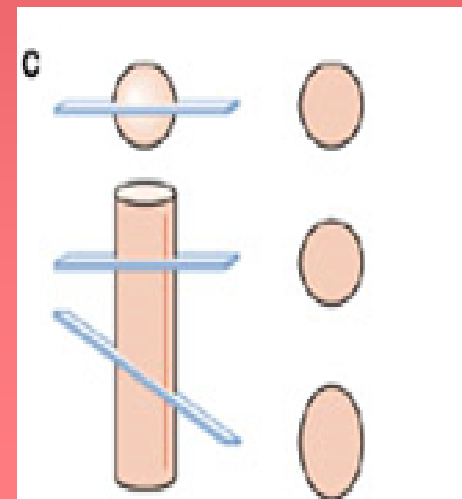
2. longitudinal section

B. Dissection orientation

C. Avoid bubbles



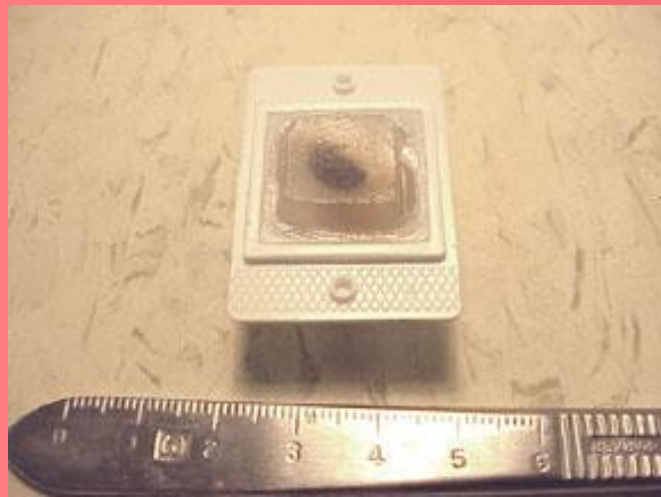
Mojaba Masoudi



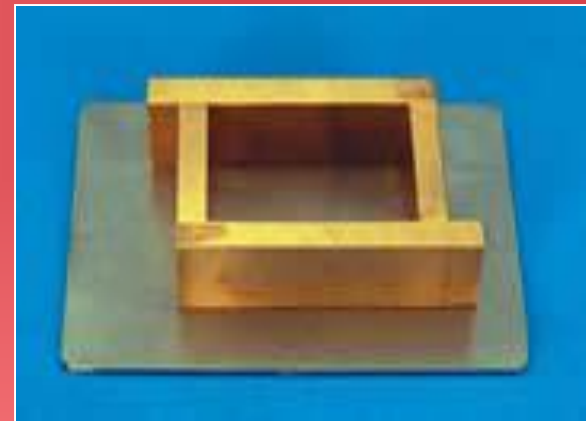
Embedding

D.Procedure

1. Place tissue cassette in melted paraffin
2. Fill mold with paraffin
3. Place tissue in mold
4. Allow to cool



The types of mould



Wax dispenser



Mojtaba Masoudi



Mojtaba Masoudi

(Trimming the Block)

Untrimmed tissue block



Trimmed block with excess paraffin removed and block face in a trapezoid shape



Mojtaba Masoudi





۱۵- تنظیم برشگیری با ضخامت ۵ تا ۷ میکرون به صورت پشت سر هم



۱۴- قرار دادن قالب از محل تکیه گاه در میکروتوم



۱۹- جمع کردن برشها از روی سطح آب توسط لام چسب خورده



۱۸- استفاده از چسب آلبومین مایر روی سطح لام تمیز



۱۷- باز شدن چروکهای برشها



۱۶- انتقال برشها روی آب گرم

Sectioning

A. Rotary microtome

1. 5-10 μm

2. resolution vs. staining

B. Cryostat

C. Freezing microtome

D. Vibratome



Rotary lever

Block holder

Paraffin mould

Sample

Knife holder



Mojtaba Masoudi

Knife microtome





Mojtaba Masoudi

Sectioning

E. Procedure

1. Place tissue block in microtome with wide edge of trapezoid lowest, and parallel to knife
2. Advance blade toward block
3. Begin sectioning



NOTE: Many of the figures in the text are of plastic embedded sections cut at 1 μm thickness, and thus showing better resolution than 5-10 μm paraffin sections seen in lab.

Knife sharpener



Mojtaba Masoudi

Knife sharpener



Tissue float or tissue bath



Mojtaba Masoudi



Mojtaba Masoudi

Mounting sections

A. 40° C water bath

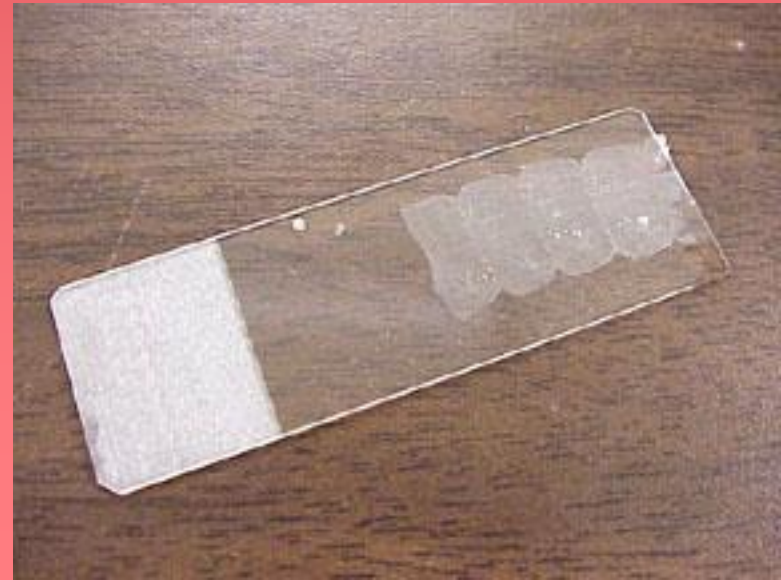
1. Flattens paraffin section

2. Permits mounting on slide

B. Gelatin & albumin

C. Glass slides

D. Oven / air dry



Freezing Microtome



Mojtaba Masoudi

Dual Purpose Microtome for Frozen & Paraffin



Motorized drive.
Range of the thickness of slice:
0.25 - 60 μm .
Maximum section of slice:
50 x 50 mm
Cryo-plate temperature:
ambient temperature to -55°C
Maximum area of cryo-plate:
45 x 40 mm.
Cooling time:
4-7 minutes.
Dimension and weight:
Height: 520 x 430 x 330 mm,
24 kg.

Staining

Routine

- Hematoxyline for nucleous
violet to dark blue
- Eosine for cytoplasm
pink to red

Specific

Masson's trichrome, van giseen,

Staining jar and rack



Mojtaba Masoudi

staining

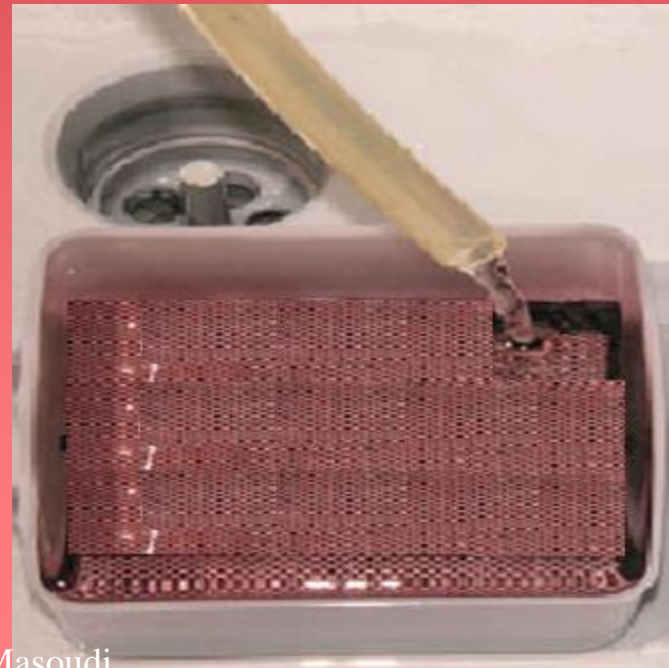
1. Slide rack

2. Solutions

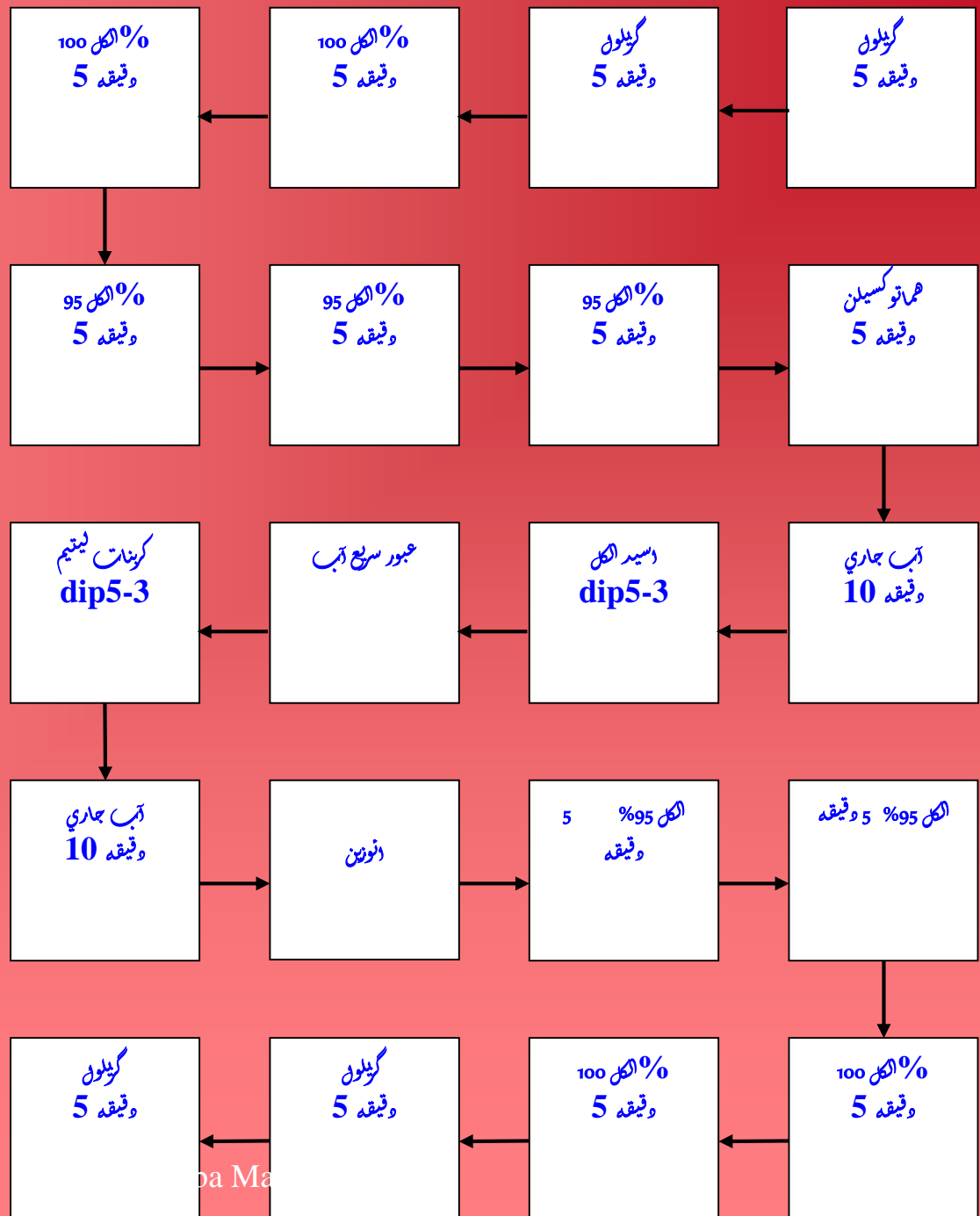
a. rehydration

b. stain

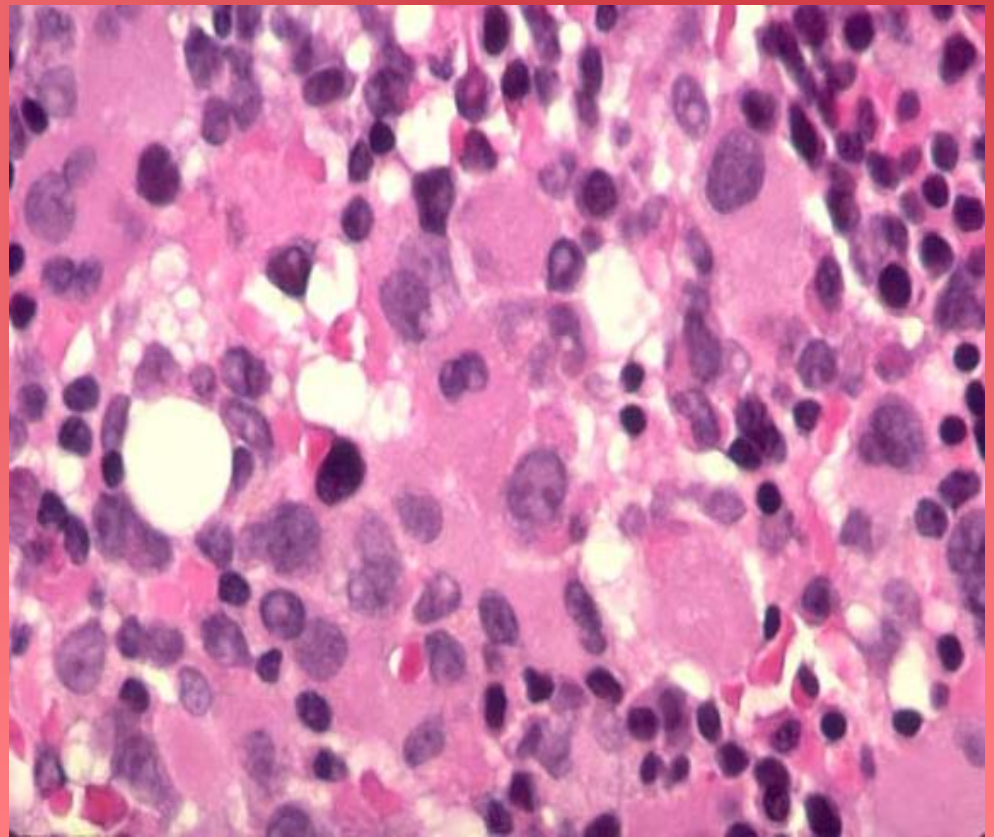
c. dehydration



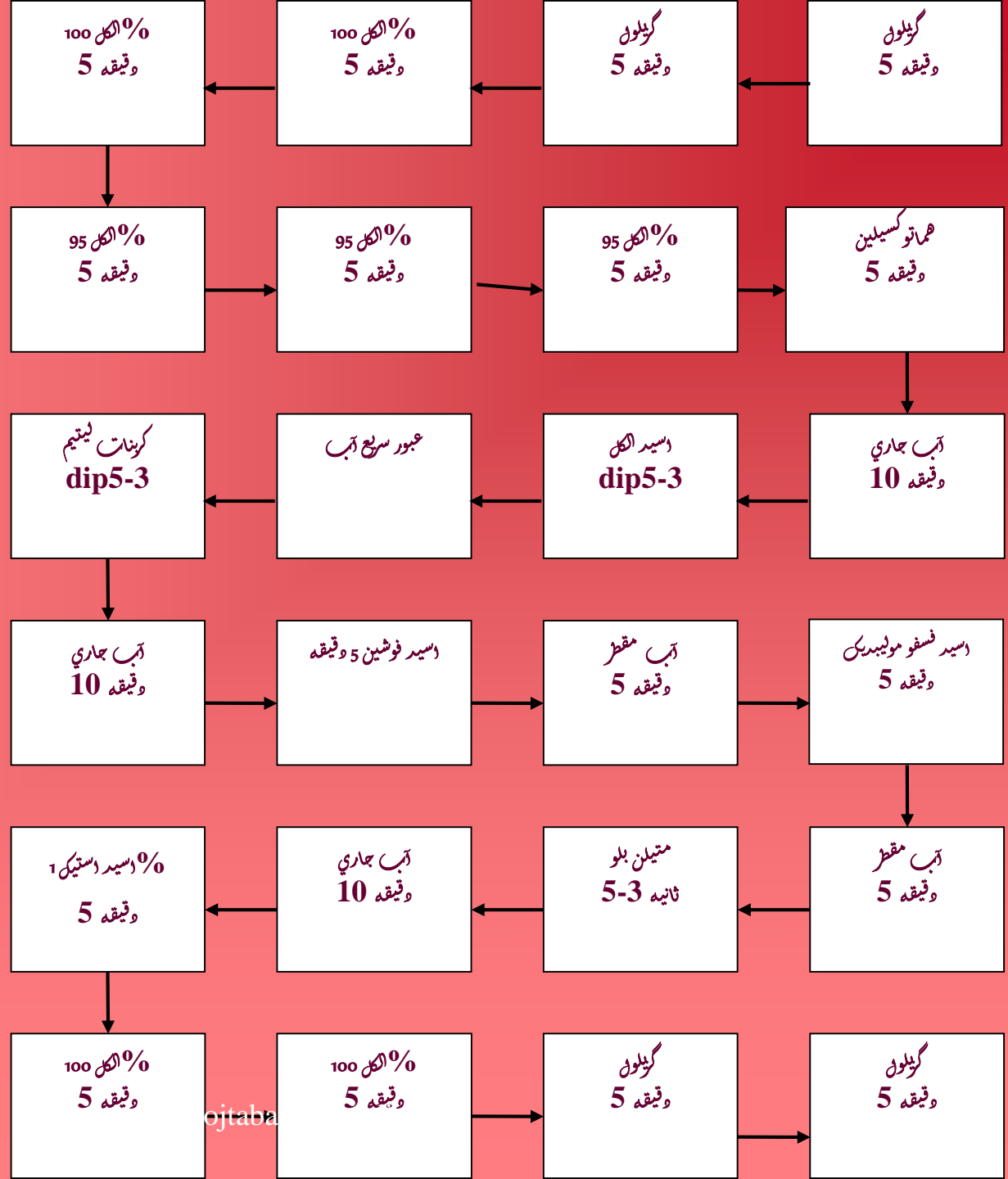
Hematoxyline eosin staining

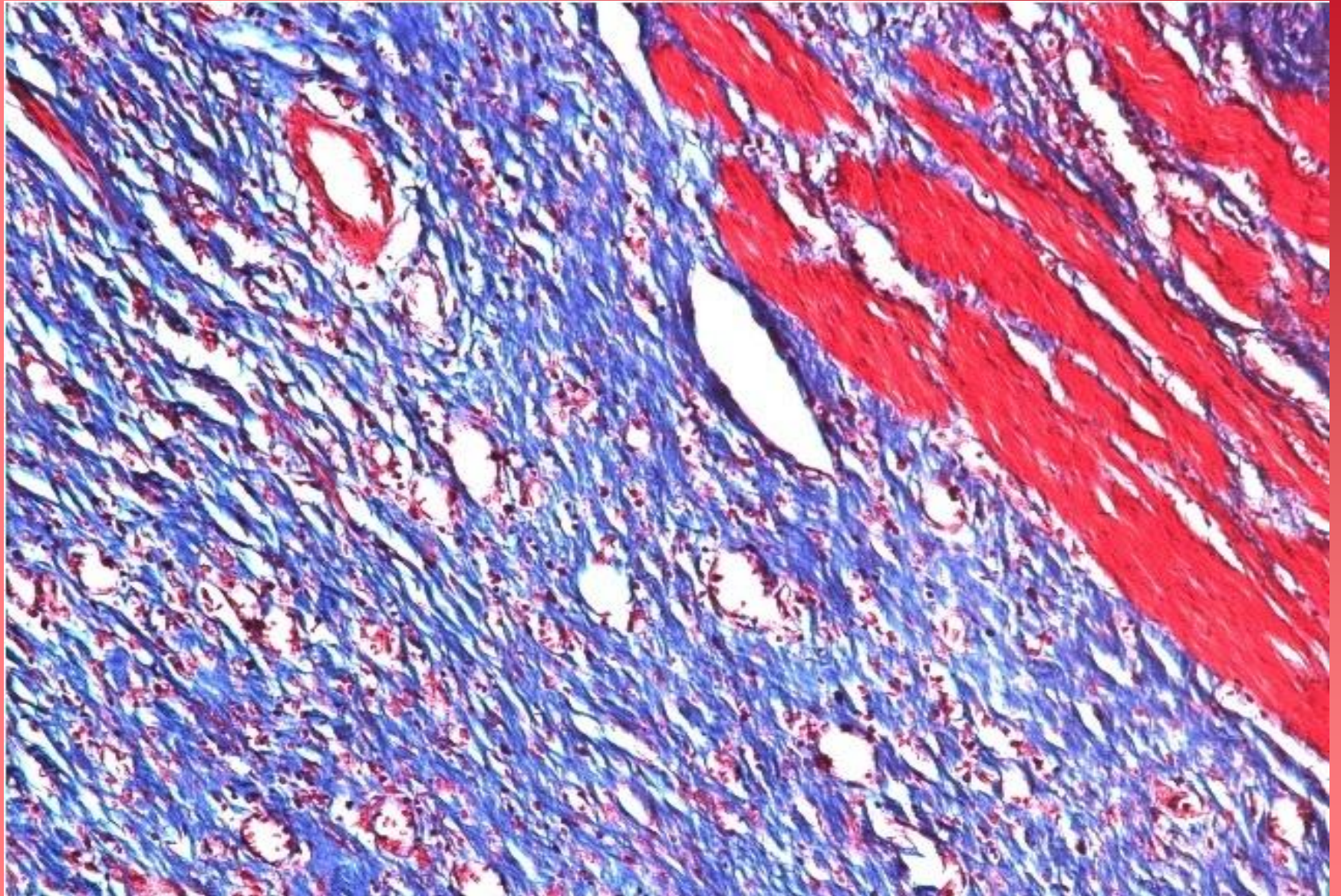


Staining results



Masson's Trichrome staining





Mojtaba Masoudi

ALCIAN BLUE METHOD (pH 2.5)

FIXATION: 10% buffered neutral formalin.

TECHNIQUE: Paraffin sections cut at 5 μ m.

SOLUTIONS:

3% Acetic Acid Solution

Acetic acid, glacial -----	-	3.0 ml
Distilled water -----		97.0 ml

1.0% Alcian Blue Solution

Alcian blue 8GX, C.I. 74240 -----	1.0 ml
3% acetic acid -----	100.0 ml

Filter and add a few crystals of thymol.

Nuclear Fast Red Solution

Dissolve 0.1 gm nuclear fast red in 100 ml of 5% solution of aluminum sulfate with aid of heat. Cool, filter and add a few grains of thymol as a preservative.

Staining Procedure:

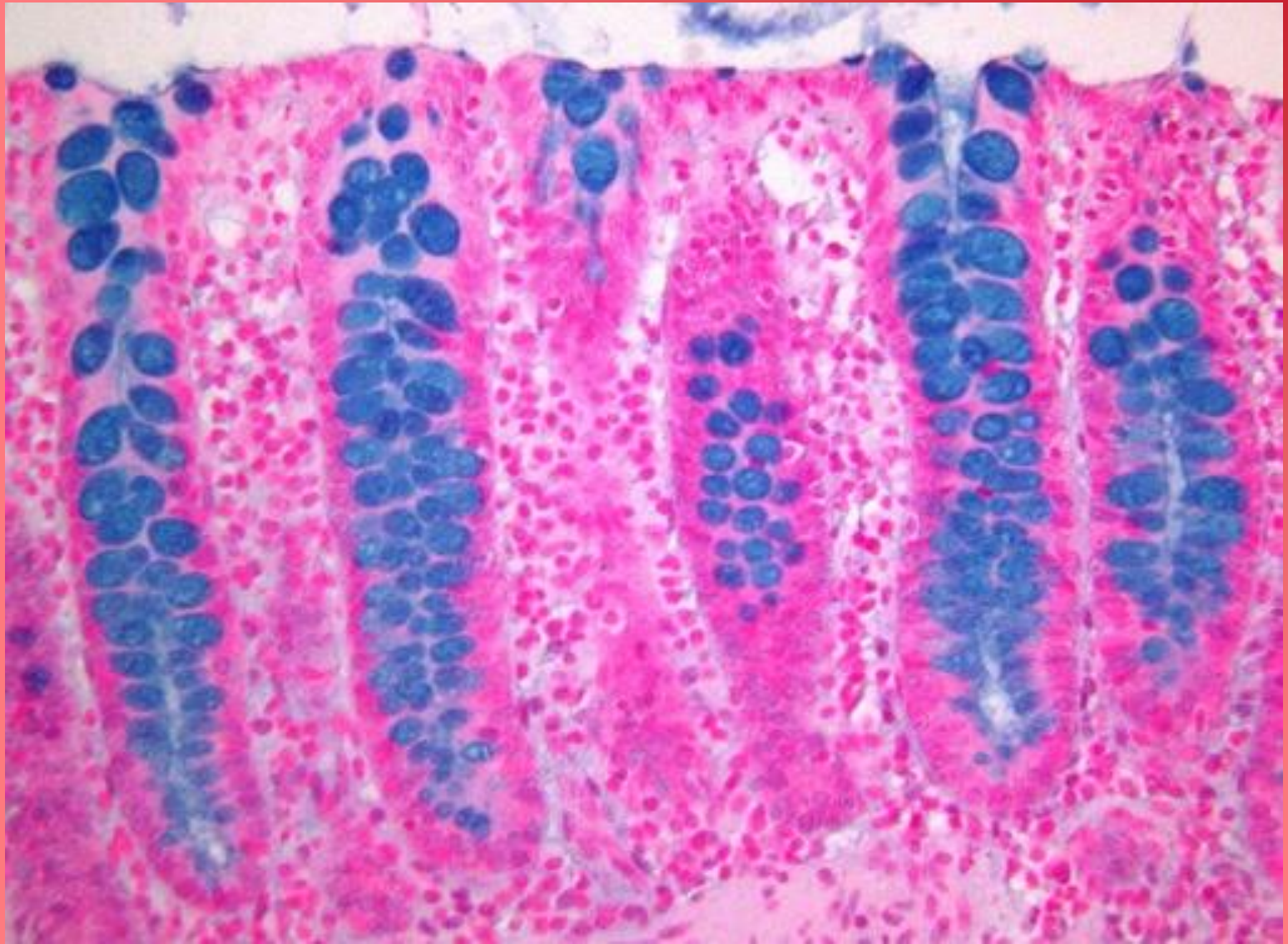
- 1. Deparaffinize and hydrate to distilled water.**
- 2. Place in 3% acetic acid for 3 minutes.**
- 3. Place in 40 ml of 1.0% alcian blue solution in a glass Coplin jar and microwave at power level 1 (60W) for 3 minutes. Dip the slides up and down several times and allow them to remain in the hot solution (65° C) for 5 minutes.**
- 4. Wash in running tap water for 1 minute and rinse in distilled water.**
- 5. Nuclear fast red solution for 3 minutes.**
- 6. Rinse in three changes of distilled water.**
- 7. Dehydrate in graded alcohols.**
- 8. Clear in three or four changes of xylene.**
- 9. Mount with synthetic resin.**

Staining Results:

- Acidic sulfated mucosubstances ----- blue
- Cryptococcus ----- blue
- Nuclei----- red

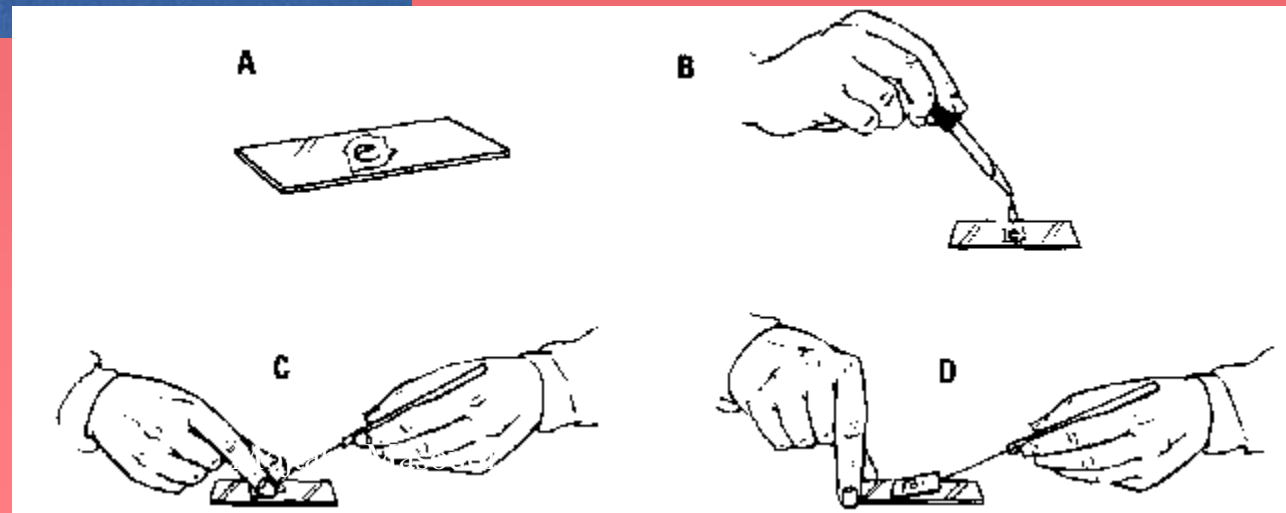
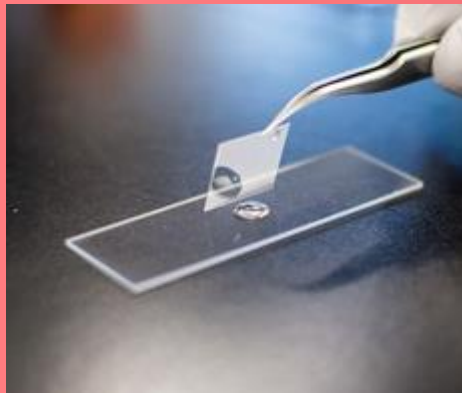
- References:

McManus, J.F. and Mowry, R.W.: Staining Methods Histologic and Histochemical, New York, Paul B. Hoeber, 1960, pp. 137-138.



Mojtaba Masoudi

Coverslipping and mounting



Slide box



Smear staining



Artifacts

- A. Poor fixation (poor structural details)
- B. Inadequate dehydration
- C. Contaminated xylene (milky)
- D. Poor infiltration (bubbles, poor support)
- E. Embedding: orientation, bubbles

4. Examples of artifacts

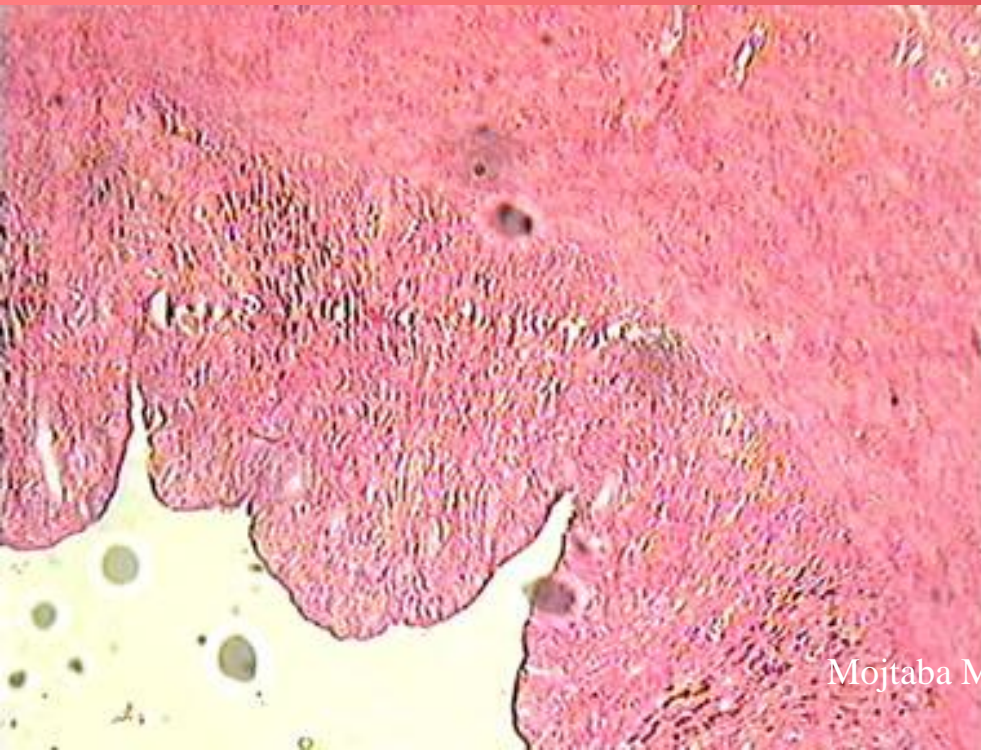
1. swelling of tissue components
2. shrinkage of tissue components
3. wrinkles in section
4. tears in section
5. air bubbles
6. Dust
7. stain precipitate

- Artifact types 1 and 2 are unavoidable to some extent, but when excessive are the result of poor fixation, dehydration and/or embedding techniques.
- Artifact types 3, 4, 5 and 6 are usually the result of poor sectioning technique or poor technique during mounting of sections.
- Artifact type 7 can result from use of old stain solutions, use of improperly filtered or unfiltered stain solutions, mistakes made during preparation of the stain, or poor staining technique.

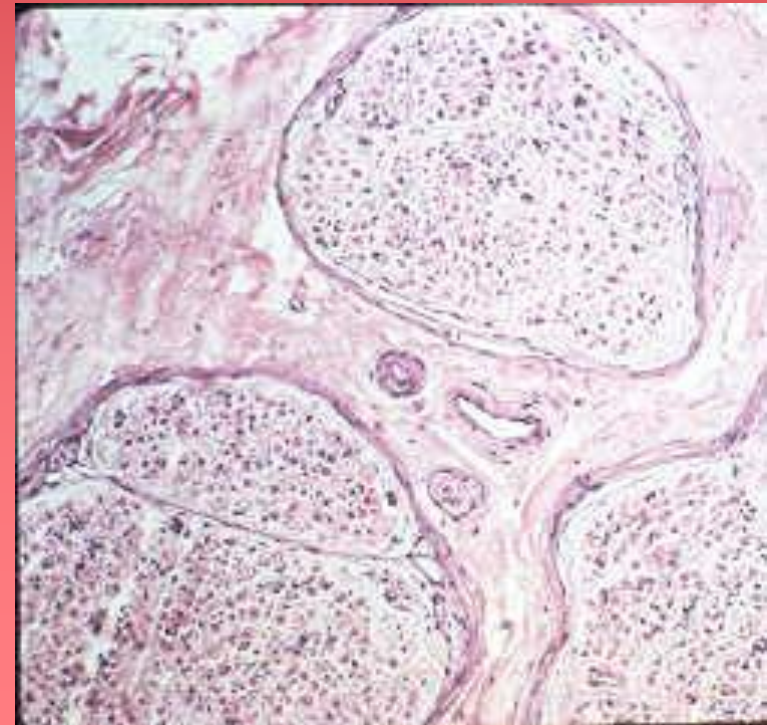
Pitfalls

F. Poor sectioning

1. knife marks (scratches perpendicular to knife edge)
2. compression (waves parallel to knife edge)



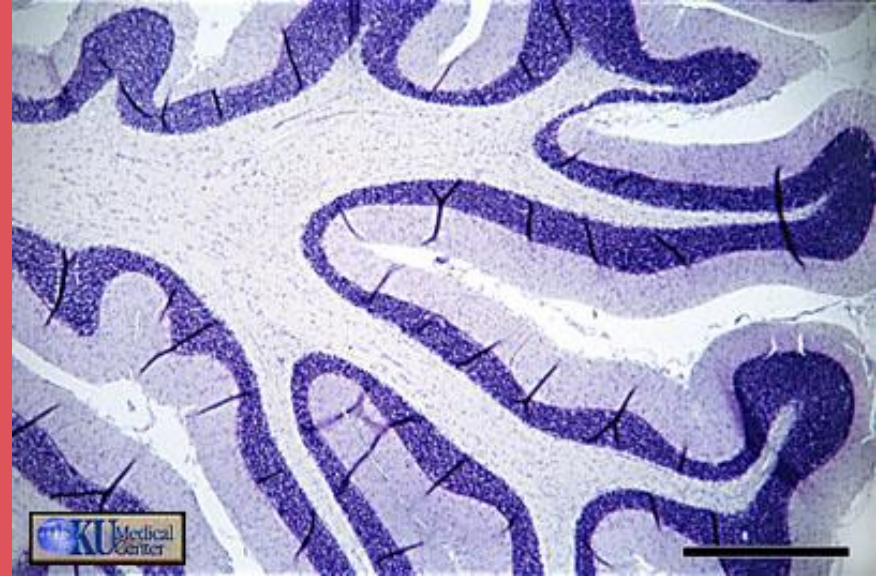
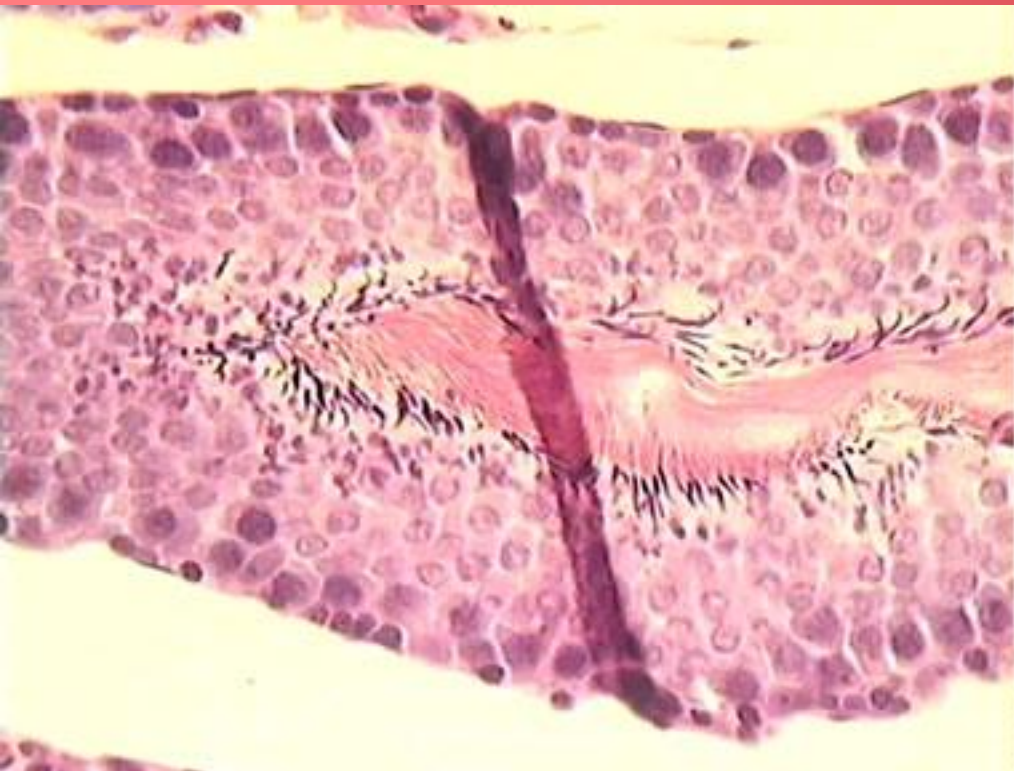
Mojtaba Masoudi



Pitfalls

G. Mounting sections

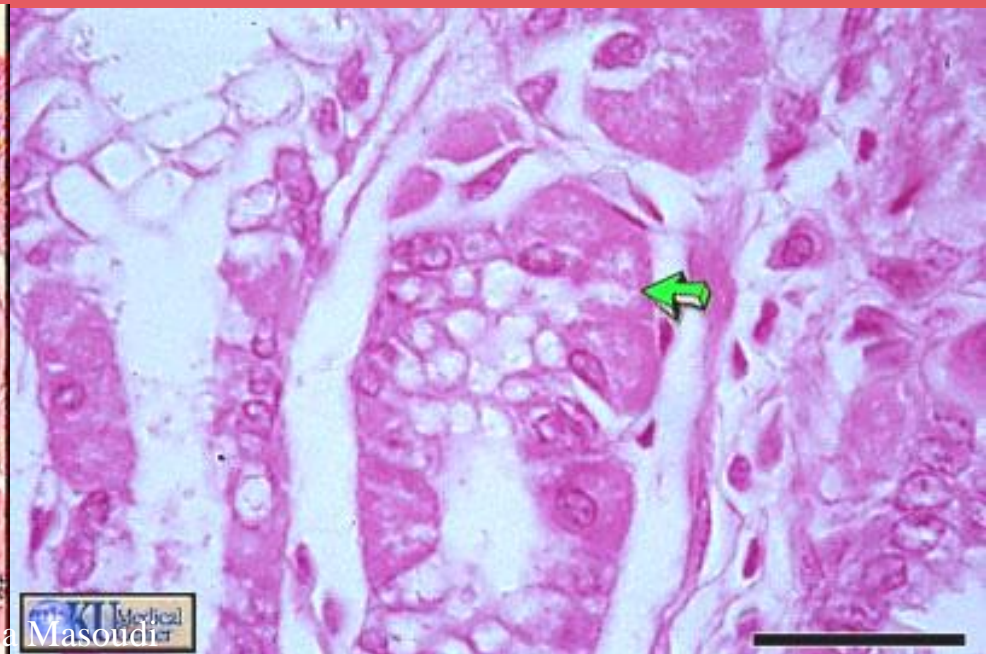
1. folds & tears
2. excess albumin (stain)



Pitfalls

H. Staining

1. inadequate rehydration (uneven staining)
2. too dark or too light (timing off)



Pitfalls

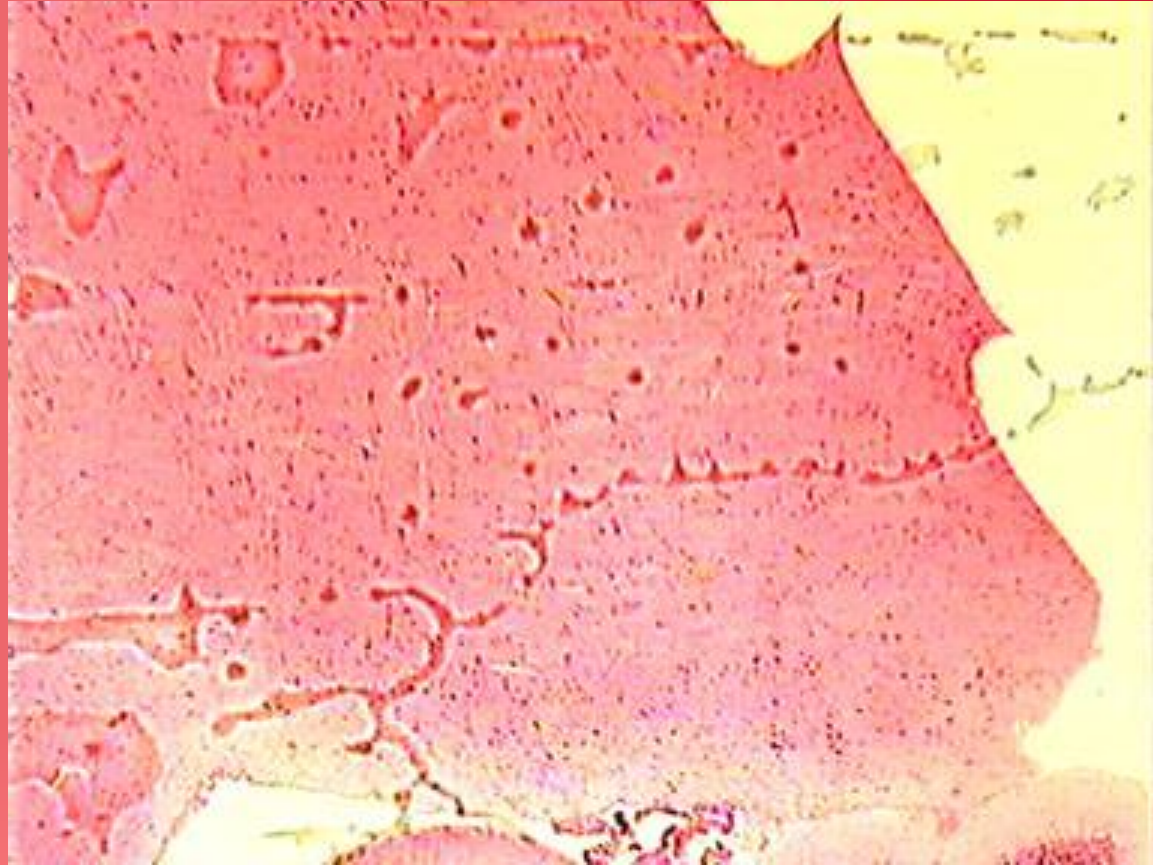
I. Coverslipping

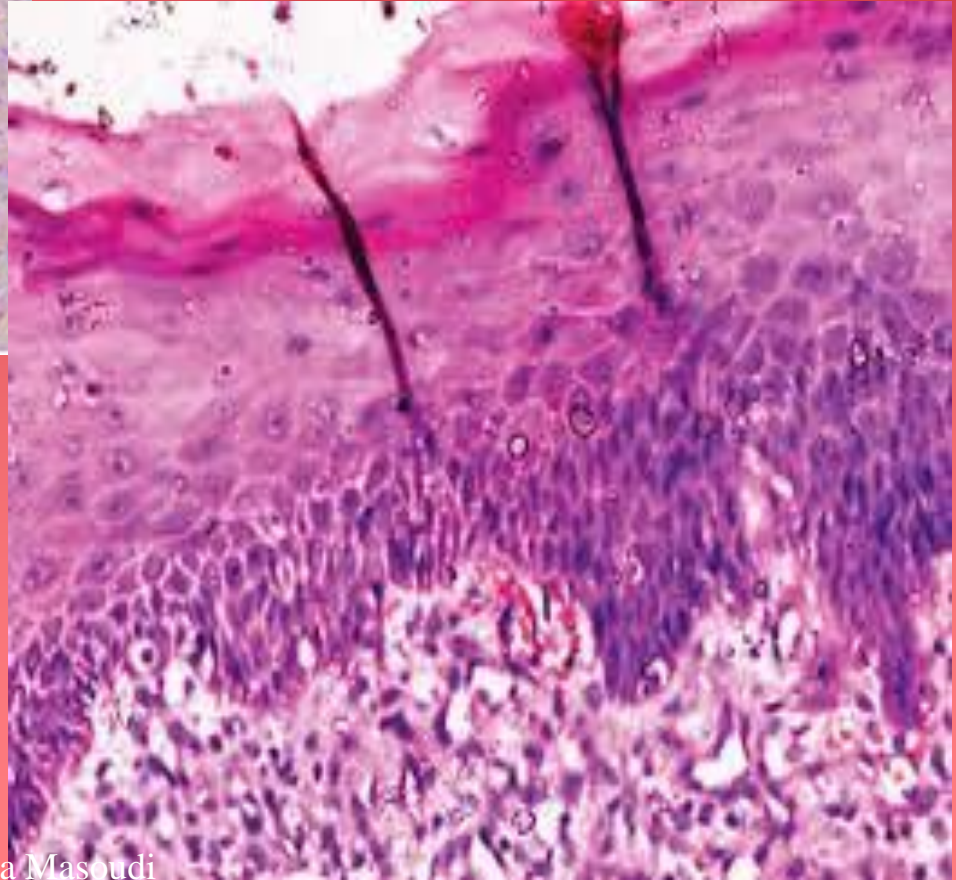
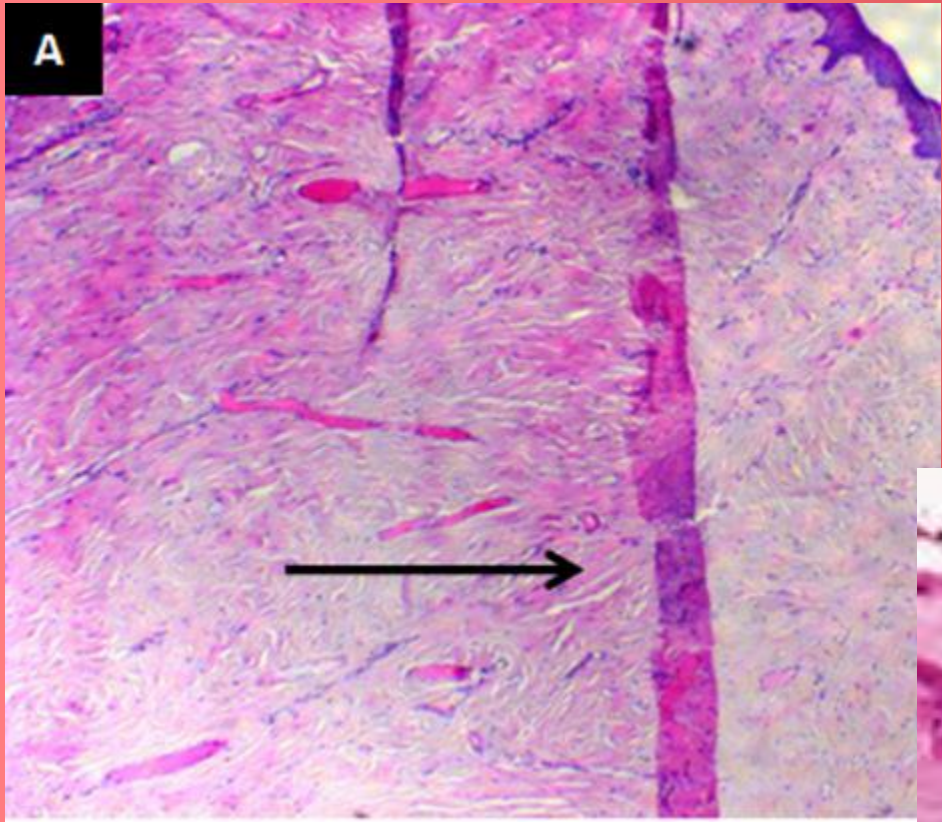
1. Bubbles

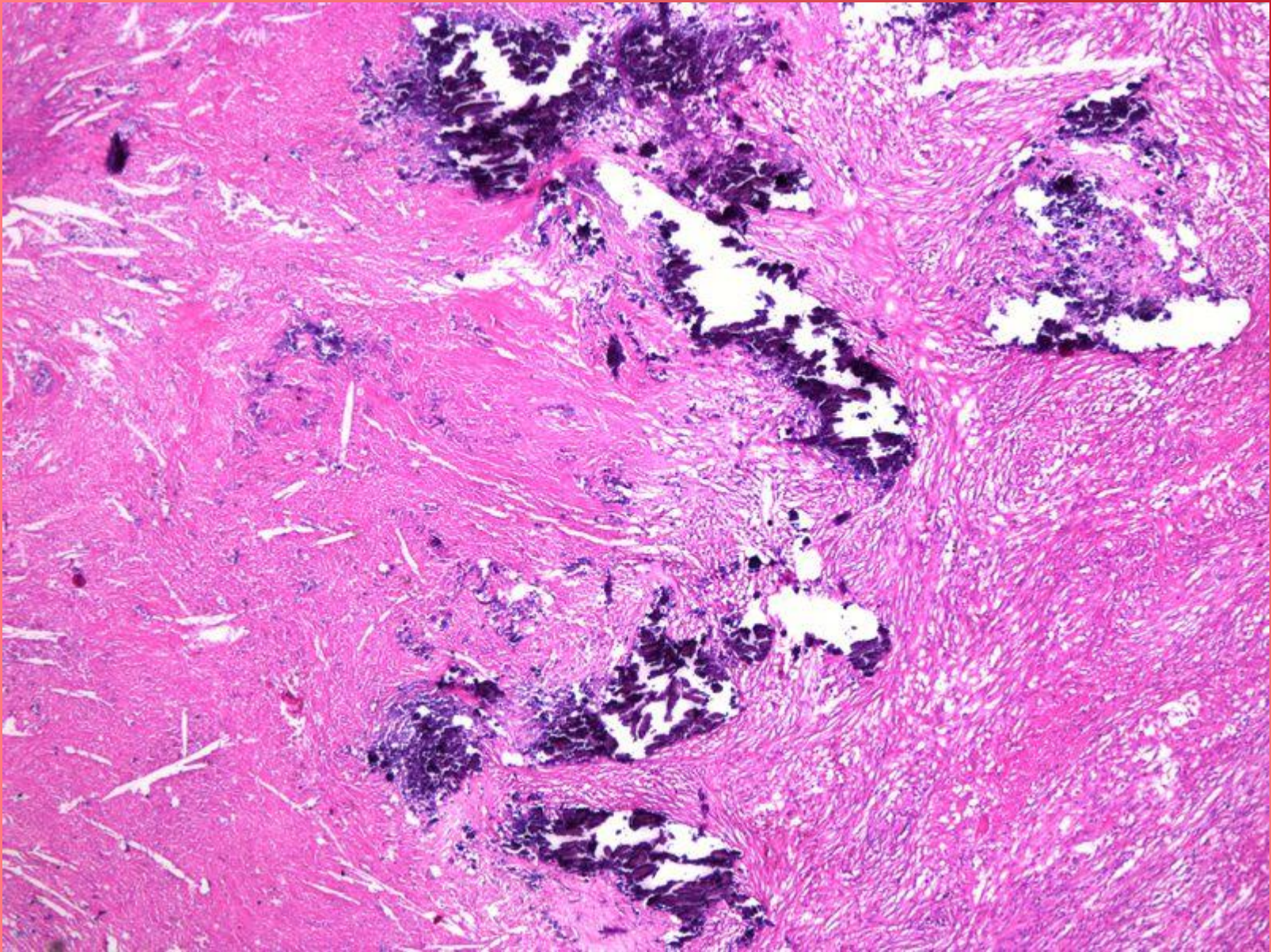


Pitfalls

1. Coverslipping
2. excess Permout
3. two coverslips







Mojtaba Masoudi