

Udžbenici Hrvatskog katoličkog sveučilišta • Manualia Universitatis studiorum catholicae Croatiae
Udžbenici Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku • Manualia Universitatis Iosephi Georgii Strossmayer Oessekiensis
Udžbenici Sveučilišta u Rijeci • Manualia Universitatis studiorum Fluminensis
Udžbenici Sveučilišta u Splitu • Manualia Universitatis studiorum Spalatensis
Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu • Manualia Universitatis studiorum Zagrabienis

© NAKLADADA SLAP



HRVATSKO
KATOLIČKO
SVEUČILIŠTE
ZAGREB
UNIVERSITAS
STUDIORUM
CATHOLICA
CROATICA
ZAGABIA



Izdavač

NAKLADA SLAP, Dr. Franje Tuđmana 33, 10 450 Jastrebarsko
www.nakladaslap.com

Direktor

Biserka Matešić

Glavni urednici

Biserka Matešić
dr. sc. Krunoslav Matešić

Biblioteka Biomedicina i zdravstvo

Urednik
prof. dr. sc. Dalibor Karlović

Lektor

Petra Trumbetić Prša

Recenzenti

prof. dr. sc. Branko Dmitrović, Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
prof. dr. sc. Danka Grčević, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
prof. dr. sc. Ivica Grković, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu
prof. dr. sc. Stipan Jonjić, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

Objavlivanje ovog sveučilišnog udžbenika odobrio je Senat Hrvatskog katoličkog sveučilišta
odlukom Urbroj 498-03-02-23-008, Klasa 613-01/21-03/01 od 28. veljače 2023. godine.

Objavlivanje ovog sveučilišnog udžbenika odobrio je Senat Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
odlukom Urbroj 2158-60-01-23-2, Klasa 611-01/23-01/4 od 28. veljače 2023. godine.

Objavlivanje ovog sveučilišnog udžbenika odobrio je Senat Sveučilišta u Rijeci
odlukom Urbroj 2170-137-03-23-3 Klasa 602-03/23-03/03 od 22. veljače 2023. godine.

Objavlivanje ovog sveučilišnog udžbenika odobrio je Senat Sveučilišta u Zagrebu
odlukom Urbroj 251-25-07-01/2-23-5, Klasa 032-01/22-02/47 od 14. veljače 2023. godine.

Anthony L. Mescher

Junqueira

Osnove histologije

UDŽBENIK I ATLAS

PRIJEVOD ŠESNAESTOG IZDANJA

Urednici

Marija Ćurlin, Dinko Mitrečić

Suurednici

Tatjana Belovari, Bojan Polić, Mirna Saraga-Babić



NAKLADA SLAP

Naziv izvornika

Mescher, Anthony L. (2021) Junqueira's Basic Histology Text & Atlas, 16th Edition, McGraw Hill. 330 West 42nd Street, Manhattan, New York, NY 10036, USA

Copyright © 2021 by McGraw Hill. All rights reserved.

© 2023. Naklada Slap. Sva prava pridržana. Nijedan dio ove knjige ne smije se reproducirati ni prenositi ni u kakvom obliku niti ikakvim sredstvima, elektroničkim ili mehaničkim, fotokopiranjem, snimanjem ili umnožavanjem u bilo kojem informatičkom sustavu za pohranjivanje i korištenje bez prethodne suglasnosti vlasnika prava.

Važna napomena

Kao i sve znanosti i medicina se stalno razvija. Istraživanje i klinička iskustva proširuju naša znanja, osobito što se tiče zbrinjavanja i medikamentoznog liječenja. Ako se u ovom djelu spominje doziranje i primjena, čitatelj se može pouzdati u to da su autori i nakladnik posvetili veliku pažnju tome da ove upute odgovaraju znanstvenim stavovima u trenutku dovršavanja ovog djela. Nakladnik ne može jamčiti za navode o uputama za doziranje i oblike primjene. Svaki korisnik je dužan, brižnom provjerom tvorničkih uputa o primjenjivanom preparatu i, prema potrebi, u konzultaciji sa specijalistom, utvrditi odstupaju li tamo dane preporuke za doziranje ili navedene kontraindikacije od uputa u ovoj knjizi. Ovakva provjera je osobito važna kod pripravaka koji se ne upotrebljavaju često ili onih koji su novi na tržištu. Svako doziranje i primjena je na vlastitu odgovornost za korisnika. Autori i nakladnik mole korisnike da im dojavu moguće netočnosti.

CIP zapis dostupan u računalnom katalogu
Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu
pod brojem 001167604.

ISBN 978-953-191-033-0

Likovno i grafičko oblikovanje: Naklada Slap, ožujak 2023.
Tisak: Grafički zavod Hrvatske

Anthony L. Mescher
Junqueira Osnove histologije, udžbenik i atlas
Prijevod šesnaestog izdanja

Urednici

izv. prof. dr. sc. **Marija Ćurlin**, Medicinski fakultet, Hrvatsko katoličko sveučilište
prof. dr. sc. **Dinko Mitrečić**, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Suurednici

prof. dr. sc. **Tatjana Belovari**, Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
prof. dr. sc. **Bojan Polić**, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci
prof. dr. sc. **Mirna Saraga-Babić**, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

Prevoditelji

doc. dr. sc. **Marina Babić Čač**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

prof. dr. sc. **Tatjana Belovari**
Medicinski fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

doc. dr. sc. **Nikola Bijelić**
Medicinski fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

prof. dr. sc. **Ivana Bočina**
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu

izv. prof. dr. sc. **Marija Ćurlin**
Medicinski fakultet, Hrvatsko katoličko sveučilište

prof. dr. sc. **Srećko Gajović**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

doc. dr. sc. **Anton Glasnović**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

doc. dr. sc. **Romana Gračan**
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

dr. sc. **Ivana Ilić**
Medicinski fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

doc. dr. sc. **Biljana Jelić Puškarić**
Medicinski fakultet, Hrvatsko katoličko sveučilište

prof. dr. sc. **Davor Ježek**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

izv. prof. dr. sc. **Sandra Kostić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

prof. dr. sc. **Astrid Krmpotić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

doc. dr. sc. **Maja Lenartić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

izv. prof. dr. sc. **Snježana Mardešić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

prof. dr. sc. **Dinko Mitrečić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

doc. dr. sc. **Sandra Moslavac**
Medicinski fakultet, Hrvatsko katoličko sveučilište

prof. dr. sc. **Ester Pernjak Pugel**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

prof. dr. sc. **Bojan Polić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

prof. dr. sc. **Livia Puljak**
Medicinski fakultet, Hrvatsko katoličko sveučilište

izv. prof. dr. sc. **Marina Radmilović**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

prof. dr. sc. **Damir Sapunar**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

prof. dr. sc. **Mirna Saraga-Babić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

doc. dr. sc. **Marko Šestan**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

izv. prof. dr. sc. **Violeta Šoljić**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Mostaru

doc. dr. sc. **Maja Tolušić Levak**
Medicinski fakultet, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

prof. dr. sc. **Jelena Tomac**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

doc. dr. sc. **Ankica Vasilj**
Medicinski fakultet, Hrvatsko katoličko sveučilište

prof. dr. sc. **Katarina Vukojević**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

izv. prof. dr. sc. **Felix M. Wensveen**
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

Sadržaj

PREGOVOR IX | PREGOVOR HRVATSKOM IZDANJU XI

1 Histologija i histološke metode 1

Sandra Kostić

- Priprema tkiva za proučavanje 1
- Svjetlosna mikroskopija 4
- Elektronska mikroskopija 8
- Autoradiografija 9
- Stanična i tkivna kultura 10
- Enzimska histokemija 10
- Prikazivanje specifičnih molekula 10
- Interpretacija struktura u preparatima tkiva 14
- Sažetak ključnih pojmova 15
- Procijenite svoje znanje 16

2 Citoplazma 17

Ester Pernjak Pugel, Maja Lenartić

- Diferencijacija stanice 17
- Stanična membrana 17
- Citoplazmatske organele 27
- Citoskelet 42
- Citoplazmatske uklopine 48
- Sažetak ključnih pojmova 51
- Procijenite svoje znanje 52

3 Jezgra 53

Jelena Tomac

- Dijelovi jezgre 53
- Stanični ciklus 58
- Mitoza 61
- Matične stanice i obnavljanje tkiva 65
- Mejoza 65
- Apoptoza 67
- Sažetak ključnih pojmova 69
- Procijenite svoje znanje 70

4 Epitelno tkivo 71

Livia Puljak

- Oblici i značajke epitelnih stanica 72
- Specijalizirane tvorbe na apikalnoj površini stanice 77
- Vrste epitela 80
- Prijenos tvari kroz epitel 88

- Obnavljanje epitelnih stanica 88
- Sažetak ključnih pojmova 90
- Procijenite svoje znanje 93

5 Vezivno tkivo 96

Dinko Mitrečić, Marina Radmilović

- Stanice vezivnog tkiva 96
- Vlakna 103
- Osnovna tvar 111
- Vrste vezivnog tkiva 114
- Sažetak ključnih pojmova 119
- Procijenite svoje znanje 120

6 Masno tkivo 122

Ankica Vasilj

- Bijelo masno tkivo 122
- Smeđe masno tkivo 126
- Sažetak ključnih pojmova 127
- Procijenite svoje znanje 128

7 Hrskavica 129

Tatjana Belovari

- Hijalina hrskavica 129
- Elastična hrskavica 133
- Vezivna hrskavica 134
- Nastanak, rast i obnavljanje hrskavice 134
- Sažetak ključnih pojmova 136
- Procijenite svoje znanje 136

8 Koštano tkivo 138

Ivana Bočina

- Stanice koštanog tkiva 138
- Koštani matriks 143
- Periost i endost 143
- Vrste koštanog tkiva 143
- Razvoj kosti (osteogeneza) 148
- Pregradnja i cijeljenje kosti 152
- Metabolička uloga kosti 153
- Spojevi među kostima 155
- Sažetak ključnih pojmova 158
- Procijenite svoje znanje 159

9 Živčane stanice i živčani sustav 161

Damir Sapunar

Razvoj živčanog tkiva 161
Neuroni (živčane stanice) 163
Glija stanice 168
Središnji živčani sustav 175
Periferni živčani sustav 182
Plastičnost i regeneracija živčanog tkiva 187
Sažetak ključnih pojmova 190
Procijenite svoje znanje 191

10 Mišićno tkivo 193

Romana Gračan

Skeletno mišićno tkivo 193
Srčano mišićno tkivo 206
Glatko mišićno tkivo 208
Regeneracija mišićnog tkiva 213
Sažetak ključnih pojmova 213
Procijenite svoje znanje 214

11 Žilni sustav 215

Katarina Vukojević, Violeta Šoljić

Srce 215
Građa stijenke krvnih žila 219
Krvne stanice 220
Limfne žile 232
Sažetak ključnih pojmova 235
Procijenite svoje znanje 235

12 Krv 237

Sandra Moslavac

Sastav plazme 237
Krvne žile 239
Sažetak ključnih pojmova 252
Procijenite svoje znanje 253

13 Stvaranje krvnih stanica 254

Biljana Jelić Puškarić

Matične stanice, čimbenici rasta i diferencijacija 254
Koštana srž 255
Sazrijevanje eritrocita 258
Sazrijevanje granulocita 260
Sazrijevanje agranulocita 263
Sazrijevanje krvnih pločica (trombocita) 263
Sažetak ključnih pojmova 265
Procijenite svoje znanje 265

14 Imunosni sustav i limfni organi 267

Bojan Polić

Urođena i stečena imunost 267
Citokini 269
Antigeni i protutijela 269
Predočavanje antigena 271
Stanice stečene imunosti 273
Timus 276
Limfno tkivo pridruženo sluznicama 281
Limfni čvorovi 282
Slezena 286
Sažetak ključnih pojmova 293
Procijenite svoje znanje 294

15 Probavni sustav 295

Astrid Krmpotić, Marina Babić Čač

Osnovna građa probavne cijevi 295
Usna šupljina 298
Jednjak 305
Želudac 307
Tanko crijevo 314
Debelo crijevo 318
Sažetak ključnih pojmova 326
Procijenite svoje znanje 327

16 Organi pridruženi probavnoj cijevi 329

Nikola Bijelić

Žlijezde slinovnice 329
Gušterača 332
Jetra 335
Žučni kanali i žučni mjehur 345
Sažetak ključnih pojmova 346
Procijenite svoje znanje 348

17 Dišni sustav 349

Snježana Mardešić

Nosna šupljina 349
Ždrijelo 351
Grkljan 352
Dušnik 354
Bronhalno stablo i pluća 354
Plućne krvne žile i živci 367
Pleura 368
Respiracijski pokreti 368
Sažetak ključnih pojmova 369
Procijenite svoje znanje 370

18 Koža 371

Maja Tolušić Levak, Ivana Ilić

Epidermis 372
Dermis 380
Potkožno tkivo 381
Osjetni receptori 382
Dlake 383
Nokti 384
Kožne žlijezde 385
Regeneracija kože 388
Sažetak ključnih pojmova 391
Procijenite svoje znanje 392

19 Mokraćni sustav 393

Mirna Saraga-Babić, Katarina Vukojević

Bubrezi 393
Krvne žile bubrega 394
Bubrežna funkcija: filtracija, sekrecija i reapsorpcija 395
Mokraćovodi, mokraćni mjehur i mokraćna cijev 406
Sažetak ključnih pojmova 410
Procijenite svoje znanje 411

20 Endokrini sustav 413

Felix M. Wensveen, Marko Šestan

Hipofiza 413
Nadbubrežna žlijezda 423
Langerhansovi otočići 427
Difuzni neuroendokrini sustav 429
Štitnjača 430
Paratireoidne žlijezde (epitelna tjelešca) 432
Epifiza 435
Sažetak ključnih pojmova 437
Procijenite svoje znanje 437

21 Muški spolni sustav 439

Davor Ježek

Sjemenici 439
Kanali unutar sjemenika 449
Odvodni spolni kanali 450
Pridružene žlijezde 451
Penis 456
Sažetak ključnih pojmova 457
Procijenite svoje znanje 459

22 Ženski spolni sustav 460

Marija Čurlin

Jajnici 460
Jajovodi 470
Glavni događaji tijekom oplodnje 471
Maternica 471
Implantacija zametka, decidua i posteljica 478
Vrat maternice 482
Rodnica 483
Vanjski spolni organi 483
Mliječne žlijezde 483
Sažetak ključnih pojmova 488
Procijenite svoje znanje 489

23 Oko i uho: posebni osjetni organi 490

Srećko Gajović, Anton Glasnović

Oko: fotoreceptorski sustav 490
Uho: organ za ravnotežu i sluh 509
Sažetak ključnih pojmova 522
Procijenite svoje znanje 522

DODATAK 525

DOPUŠTENJA ZA SLIKE 527

INDEKS 529



1

Histologija i histološke metode

PRIPREMA TKIVA ZA PROUČAVANJE	1	AUTORADIOGRAFIJA	9
Fiksacija	1	STANIČNA I TKIVNA KULTURA	10
Uklapanje i rezanje	2	ENZIMSKA HISTOKEMIJA	10
Bojenje	3	PRIKAZIVANJE SPECIFIČNIH MOLEKULA	10
SVJETLOSNA MIKROSKOPIJA	4	Imunohistokemija	11
Mikroskopija sa svjetlim poljem	4	Tehnike hibridizacije	12
Fluorescencijska mikroskopija	5	INTERPRETACIJA STRUKTURA U PREPARATIMA TKIVA	14
Faznokontrastna mikroskopija	5	SAŽETAK KLJUČNIH POJMOVA	15
Konfokalna mikroskopija	5	PROCIJENITE SVOJE ZNANJE	16
Polarizacijska mikroskopija	7		
ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	8		
Transmisijska elektronska mikroskopija	8		
Skenirajuća elektronska mikroskopija	9		

Histologija je znanost o tkivima i načinu kako njihov raspored oblikuje organe u tijelu. Ovaj predmet uključuje sve aspekte biologije tkiva, a usredotočuje se na razumijevanje građe i organizacije stanica u svrhu postizanja učinkovite optimizacije specifičnih uloga svakog organa.

Tkiva se sastoje od dvije međusobno povezane komponente: stanica i međustanične tvari (matriksa, engl. *extracellular matrix*, ECM). Međustanična tvar sadrži nekoliko različitih vrsta makromolekula koje većinom tvore složene strukture, kao što su, primjerice, kolagena vlakna. Međustanična tvar pruža potporu stanicama i sadrži tekućinu koja prenosi hranjive tvari do stanica i uklanja njihove otpadne tvari i izlučevine. Stanice proizvode međustaničnu tvar, a istovremeno su izložene molekulama u međustaničnoj tvari. Mnogi se sastojci međustanične tvari vežu na specifične receptore na površini stanica koji se protežu kroz staničnu membranu i vežu na strukturne komponente unutar stanica, tvoreći međusobnu vezu u kojoj stanice i međustanična tvar zajednički funkcioniraju na koordiniran način.

Tijekom razvoja, stanice i međustanična tvar specijaliziraju se po funkcijama i stvaraju osnovne vrste tkiva s karakterističnim strukturnim značajkama. Kombiniranjem tkiva oblikuju se organi, što omogućuje funkcioniranje organizma kao cjeline.

Zbog malih dimenzija stanica i sastojaka međustanične tvari u histologiji se primjenjuju mikroskopi i molekularne metode proučavanja. Napredak u biokemiji, molekularnoj biologiji, fiziologiji, imunologiji i patologiji značajno je pri-

donio poznavanju biologije tkiva. Poznavanje alata i metoda bilo koje grane znanosti važno je za ispravno razumijevanje histologije. U ovom poglavlju opisane su standardne metode koje se koriste za proučavanje stanica i tkiva, s naglaskom na mikroskopiju.

➤ PRIPREMA TKIVA ZA PROUČAVANJE

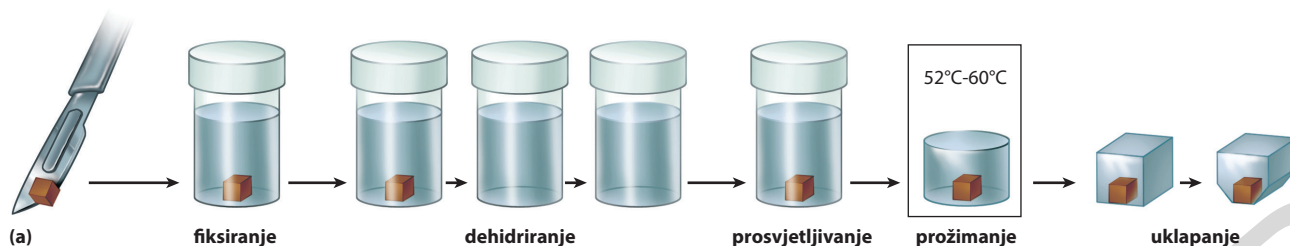
Najčešći postupak koji se koristi u histološkim istraživanjima je priprema rezova tkiva ili “preparata” koji se mogu vizualno pregledati propuštanjem svjetlosti kroz preparat. Budući da su tkiva i organi većinom predebili da bi svjetlost mogla prolaziti kroz njih, režu se na tanke prozirne rezove i stavljaju na stakalce za mikroskopski pregled njihove strukture.

Idealan mikroskopski pripravak je očuvan tako da tkivo na stakalcu ima iste strukturne značajke koje je imalo u tijelu. Međutim, to često nije izvedivo jer proces pripremanja može ukloniti stanične lipide i djelomično izobličiti stanične strukture. Osnovni koraci koji se koriste u pripremi tkiva za svjetlosnu mikroskopiju prikazani su na Slici 1–1.

Fiksacija

Za očuvanje strukture tkiva i sprječavanje razgradnje enzima koji se oslobađaju iz stanica ili mikroorganizama, komadići organa nakon uklanjanja iz tijela stavljaju se što je prije moguće u otopine spojeva za stabilizaciju ili umrežavanje koji se nazivaju **fiksativi**. Fiksativ mora potpuno prožeti tkivo kako

SLIKA 1-1 Rezanje fiksiranog i uklopljenog tkiva



U histologiji se većina tkiva priprema kako je prikazano, na sljedeći način (a):

- **Fiksiranje:** Mali komadići tkiva stavljaju se u otopinu kemikalija koje križno povezuju proteine i inaktiviraju enzime za razgradnju, čime se očuva struktura stanice i tkiva.
- **Dehidriranje:** Tkivo se prenosi kroz niz sve koncentriranijih otopina alkohola, završavajući sa 100%-tnim etanolom, kojim se uklanja sva voda.
- **Prosvjetljivanje:** Alkohol se uklanja primjenom organskih otapala koja se miješaju i s alkoholom i s parafinom.
- **Prožimanje:** Tkivo se stavlja u otopljeni parafin dok ne postane potpuno prožeto parafinom.
- **Uklapanje:** Tkivo prožeto parafinom stavlja se u mali kalup s otopljenim parafinom i ostavlja da se stvrdne.
- **Oblikovanje (podrezivanje):** Parafinski blok se podrezuje kako bi se tkivo prilagodilo za rezanje na mikrotomu.

Slični koraci se koriste u pripremi tkiva za TEM, osim što su uzorci tkiva manji, pa su i fiksativi i otopine za dehidraciju drugačiji. Kako bi se moglo rezati na vrlo tanke rezove, tkivo se uklapa u epoksidne smole koje su mnogo tvrđe od parafina.

(b) **Mikrotom** se koristi za rezanje tkiva uklopljenih u parafin namijenjenih za pregledavanje svjetlosnim mikroskopom. Oblikovani uzorak tkiva stavlja se na nosač parafinskog bloka. Okretanjem pogonskog kotača, tkivo na nosaču se povlači preko ruba čeličnog noža i nastaje histološki rez. Nosač s tkivom se pri svakom punom okretu pogonskog kotača približi čeličnom nožu za unaprijed zadanu udaljenost, uglavnom od 1 do 10 μm , pa tako debljina rezova odgovara veličini pomaka bloka. Parafinski rezovi se stavljaju na predmetna stakalca na grijanoj podlozi kako bi se rezovi priljepili uz stakalce. Slijedi deparafiniranje i bojenje pa proučavanje svjetlosnim mikroskopom. Za TEM se uzorci uklopljeni u smolu režu na debljinu manju od 1 μm (obično 70 nm) pomoću ultramikrotoma sa staklenim ili dijamantnim nožem.

bi se sačuvala sve stanice. Stoga se, da se olakša prožimanje, tkivo obično izreže na manje dijelove prije fiksacije. Kako bi se poboljšalo očuvanje stanica u velikim organima, fiksativi se propuštaju kroz krvne žile postupkom perfuzije, koja omogućuje brzu fiksaciju cijelog tkiva.

Kao fiksativ za svjetlosnu mikroskopiju često se koristi formalin, puferirana izotonična otopina 37%-tnog formaldehida. Formaldehid, kao i glutaraldehid, fiksativ koji se koristi za elektronsku mikroskopiju, reagira s aminoskupinama ($-\text{NH}_2$) proteina i tako sprječava njihovu razgradnju proteazama. Glutaraldehid također križno povezuje susjedne proteine, učvršćujući strukture stanice i međustanične tvari.

Elektronska mikroskopija omogućuje mnogo jače povećanje i razlučivanje vrlo malih staničnih struktura. Kako bi se sačuvali i "ultrastrukturni" detalji stanica, fiksacija se mora obaviti vrlo pažljivo. U takvim se istraživanjima tkivo nakon djelovanja glutaraldehidom uroni u puferiranu otopinu osmijeva tetroksida, koji sačuva (i oboji) stanične lipide i proteine.

Uklapanje i rezanje

Da bi se mogla rezati na tanke rezove, fiksirana tkiva se prožimaju i uklapaju u materijal koji im daje čvrstu konzistenciju. Mediji za uklapanje uključuju parafin, koji se rutinski koristi

za svjetlosnu mikroskopiju, i plastične smole, koje su prigodne i za svjetlosnu i za elektronsku mikroskopiju.

Prije prožimanja, fiksirano tkivo mora proći **dehidraciju**. To se postiže postupnim prijenosom tkiva kroz sve veće koncentracije etanola, da bi se na kraju uronilo u 100%-tni etanol, koji iz tkiva posve ukloni vodu. Nakon toga se etanol zamijeni organskim otapalom koje se miješa i s alkoholom i s medijem za uklapanje, a taj se korak naziva **prosvjetljivanje** jer prožimanje ovim reagensima daje tkivu proziran izgled.

Potpuno prosvjetljeno tkivo se zatim stavlja u termostat, u otopljeni parafin na temperaturi 52°C-60°C, što uzrokuje isparavanje organskog otapala i potiče **prožimanje** tkiva s parafinom. Na sobnoj temperaturi tkivo se stvrdne u malom kalupu i na taj se način uklopi u parafinski blok. Tkiva koja se **uklapaju** u plastičnu smolu također se dehidriraju u etanolu, a zatim prožimaju otopljenom plastikom koja se stvrdne dodavanjem polimerizatora za križno povezivanje. Uklapanjem u plastičnu smolu izbjegavaju se visoke temperature potrebne za parafin, što pomaže u izbjegavanju izobličenja tkiva.

Tvrđi blok koji sadrži tkivo u mediju za uklapanje oblikuje se podrezivanjem i stavlja na uređaj za rezanje tkiva koji se naziva **mikrotom** (Slika 1-1). Parafinski rezovi su obično debljine od 3 do 10 μm za svjetlosnu mikroskopiju, a elektronska mikroskopija zahtijeva rezove tanje od 1 μm. Jedan mikrometar (1 μm) jednak je 1/1000 milimetra (mm) ili 10⁻⁶ m. Ostale mjerne jedinice koje se obično koriste u mikroskopiji su nanometar (1 nm = 0,001 μm = 10⁻⁶ mm = 10⁻⁹ m) i angstrom (1 Å = 0,1 nm ili 10⁻⁴ μm). Preparati se stavljaju na predmetno stakalce i oboje za svjetlosnu mikroskopiju, ili se stavljaju na metalne mrežice na kojima se dodatno kontrastiraju i proučavaju.

» MEDICINSKA PRIMJENA

Biopsije su uzorci tkiva koji se uzimaju tijekom operacije ili rutinskih medicinskih zahvata. U operacijskoj se sali uzorci biopsije stavljaju u bočice s formalinom i šalju na obradu i mikroskopsku analizu u patološki laboratorij. Ako su rezultati takvih analiza potrebni prije završetka medicinskog zahvata, na primjer, da bi se još tijekom kirurške operacije utvrdilo je li izraslina maligna, pristupa se mnogo bržoj obradi uzorka. Uzorak biopsije brzo se zamrzava u tekućem dušiku, čime se čuvaju stanične strukture, a tkivo istovremeno postaje tvrdo i spremno za rezanje. Mikrotom s komorom u kojoj se blok s tkivom reže na temperaturi ispod nule naziva se **kriostat**. Smrznuti rezovi stavljaju se na stakalce, brzo se oboje i patolog ih odmah pregledava.

Zamrzavanje tkiva također je učinkovito u histokemijskim istraživanjima vrlo osjetljivih enzima ili malih molekula, jer zamrzavanje, za razliku od fiksacije, ne inaktivira većinu enzima. Konačno, budući da otapala za prosvjetljivanje često otapaju i stanične lipide u fiksiranim tkivima, smrznuti preparati su također korisni za histološko proučavanje struktura koje sadrže lipide.

Bojenje

Većina stanica i međustanične tvari potpuno je bezbojna, pa je preparate potrebno obojiti za mikroskopsko proučavanje. Osmišljene su metode bojenja pomoću kojih su različiti sastojci tkiva ne samo uočljivi već se mogu i međusobno razlikovati. Boje oboje tkivo više ili manje selektivno, a često se ponašaju poput kiselih ili bazičnih spojeva te stvaraju elektrostatske (ionske) veze s ionskim skupinama makromolekula u tkivima. Stanični sastojci, kao što su nukleinske kiseline s neto negativnim nabojem (anionskim), imaju afinitet prema bazičnim bojama i nazivaju se **bazofilnim**. Kationski elementi stanice, kao što su proteini s mnogo ioniziranih aminoskupina, više se boje kiselim bojama i nazivaju se **acidofilnim**.

Bazične boje su, primjerice, toluidinsko, alcijansko i metilensko modriilo. Hematoksilin se ponaša poput bazične boje, bojeći bazofilne sastojke tkiva. Glavni sastojci tkiva koji ioniziraju i reagiraju s bazičnim bojama čine to zbog kiselina u svojem sastavu (DNA, RNA i glikozaminoglikani). Kisele boje (npr. eozin, orange G i kiselni fuksin) boje acidofilne sastojke tkiva kao što su mitohondriji, sekrecijska zrnca i kolagen.

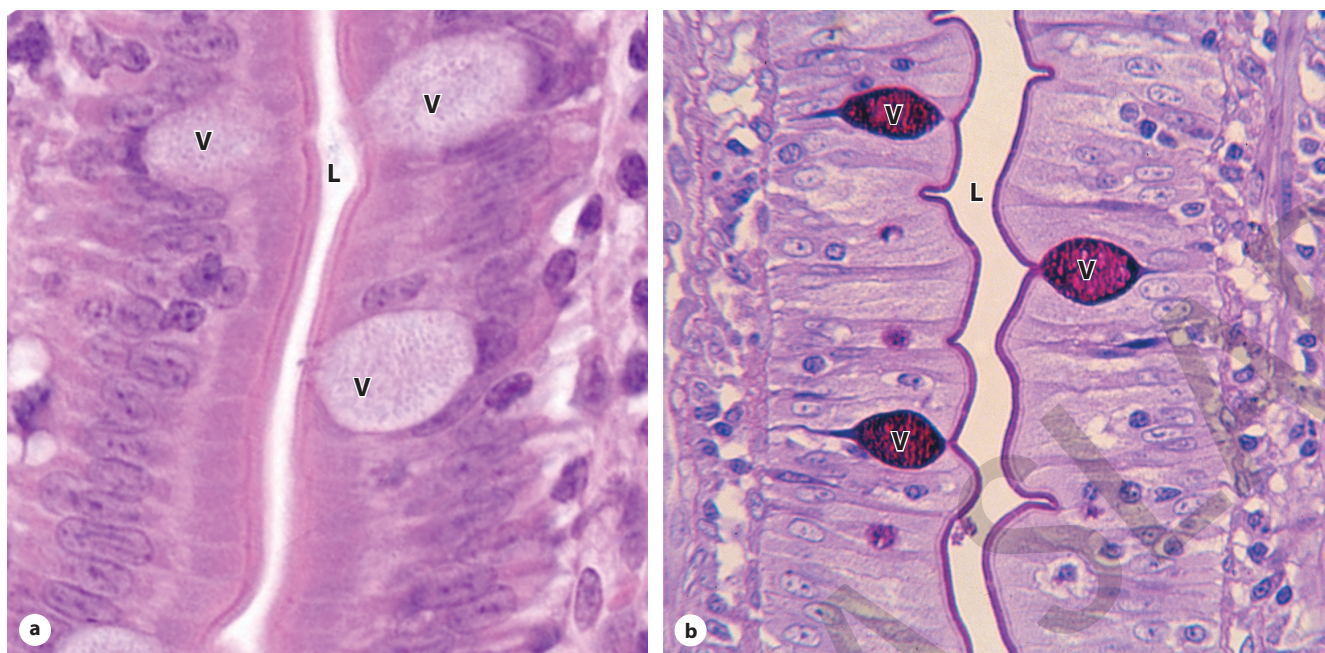
Od svih metoda bojenja najčešće se koristi jednostavna kombinacija **hematoksilina i eozina (HE)**. Hematoksilin boji DNA u staničnoj jezgri, dijelove citoplazme s mnogo RNA i matriks hrskavice u tamnoplavu ili ljubičastu boju. Nasuprot tome, eozin boji druge citoplazmatske strukture i kolagen u ružičasto (Slika 1-2a). Stoga se eozin smatra **kontrastnom bojom**, što je obično boja koja se nanosi zasebno, s ciljem razlikovanja dodatnih svojstava tkiva. Složeniji postupci, kao što su trikromatska bojenja (npr. bojenje po Massonu), omogućuju bolje razlikovanje različitih sastojaka međustanične tvari.

Reakcija perjordne kiseline i Shiffova reagensa (PAS) koristi heksozne prstenove polisaharida i druge strukture tkiva bogate ugljikohidratima te boji takve makromolekule u izrazito ljubičastu (magenta) boju. Slika 1-2b prikazuje primjer stanica s područjima bogatim ugljikohidratima koja su obojena reakcijom PAS. DNA staničnih jezgri može se posebno obojiti korištenjem modifikacije postupka PAS koji se naziva Feulgenova reakcija.

Bazofilni ili PAS-pozitivni sastojci mogu se dodatno razlučivati razgradnjom enzimima, na način da se na rezove tkiva nanese otopina enzima koji specifično razgrađuje određene molekule u tkivu. Na primjer, stavljanjem ribonukleaze na rezove tkiva prije postupka bojenja, uvelike će se smanjiti bazofilnost citoplazme, a bazofilnost jezgre će ostati gotovo jednaka, što pokazuje da sadržaj RNA značajno utječe na bojenje citoplazme.

Strukture stanica bogate lipidima prikazuju se izbjegavanjem koraka obrade tkiva koji uklanjaju lipide, kao što su djelovanje topline i organskih otapala, te bojenjem **bojama topljivim u lipidima** kao što je **sudansko crnilo**. Ova metoda može biti korisna u dijagnozi metaboličkih bolesti pri kojima nastaju unutarstanične nakupine kolesterola, fosfolipida ili glikolipida. Manje uobičajene metode bojenja su tehnike **impregnacije metalom**, primjenom otopine srebrnih soli za prikazivanje određenih vlakana međustanične tvari i specifičnih staničnih elemenata živčanog tkiva. U Dodatku su navedeni važni postupci bojenja koji su korišteni za dobivanje većine svjetlosnih mikroskopskih fotografija u ovoj knjizi.

SLIKA 1-2 Bojenje hematoksilinom i eozinom (HE) i reakcijom perjodne kiseline i Shiffova reagensa (PAS)



Mikrofotografije epitela koji oblaže tanko crijevo (**a**) obojene hematoksilinom i eozinom (HE) i (**b**) reakcijom PAS za prikazivanje glikoproteina. Bojenjem HE bazofilne stanične jezgre oboje se ljubičasto, a citoplazme ružičasto. Dijelovi stanice s obiljem oligosaharida na glikoproteinima, kao što su površine stanica okrenute prema lumenu (L) ili razbacane vrčaste stanice (V) koje izlučuju sluz, slabije su obojene. Međutim, pri bojenju PAS-om, boja

je najintenzivnija uz lumen (L), gdje su brojni mikrovili uloženi u sloj glikoproteina na površini stanica. Jednako su intenzivno obojene vrčaste stanice zbog mucina u sekretijskim zrcima. Površinski glikoproteini i mucin su PAS-pozitivni zbog visokog sadržaja oligosaharida i polisaharida. Tkivo obojeno PAS metodom obojeno je i kontrastnom bojom hematoksilinom kako bi se prikazale stanične jezgre. (a. 400 \times , b. 300 \times)

Priprema stakalca s preparatom, od fiksacije tkiva do promatranja svjetlosnim mikroskopom, može trajati od 12 sati do 2½ dana, ovisno o veličini tkiva, sredstvu za uklapanje i načinu bojenja. Posljednji korak prije mikroskopiranja je poklapanje preparata zaštitnim pokrovnim stakalcem koristeći prozirni adhezivni medij.

➤ SVJETLOSNA MIKROSKOPIJA

Standardna mikroskopija sa svijetlim poljem i njezine specijalizirane varijante poput fluorescencijske mikroskopije, faznokontrastne mikroskopije, konfokalne i polarizacijske mikroskopije, temelje se na interakciji svjetlosti sa sastojcima tkiva i koriste se za prikazivanje i proučavanje značajki tkiva.

Mikroskopija sa svijetlim poljem

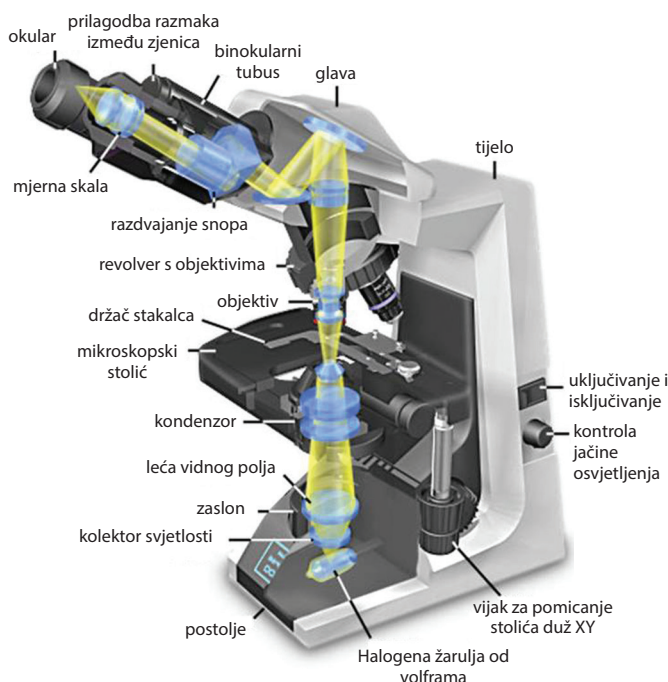
Mikroskopom sa svijetlim poljem ispituje se obojeno tkivo svjetlom koje prolazi kroz preparat. Kao što je prikazano na Slici 1-3, mikroskop se sastoji od optičkog sustava i mehanizama za pomicanje uzorka i fokusiranje svjetlosnog snopa. Optički dijelovi su **kondenzor** koji fokusira svjetlost na preparat, leća **objektiva** koja povećava i projicira sliku predmeta prema promatraču i **okular** koji dodatno povećava sliku i projicira je

na mrežnicu oka promatrača ili na poluvodički senzor (engl. *charge-coupled device*, CCD), koji je vrlo osjetljiv na niske razine osvjetljenja, a ima kameru i monitor. Ukupno povećanje dobiva se umnoškom povećanja objektiva i okulara.

Kritični čimbenik za dobivanje jasne, detaljne slike na svjetlosnom mikroskopu njegova je **moć razlučivanja**, definirana kao najmanja udaljenost između dvije strukture na kojoj se one mogu vidjeti kao zasebni objekti. Maksimalna moć razlučivanja svjetlosnog mikroskopa je približno 0,2 μm , što omogućuje gledanje jasnih slika uvećanih 1000-1500 puta. Predmeti manji ili tanji od 0,2 μm (kao što je jedan ribosom ili mikrofilament u citoplazmi) ne mogu se razlikovati svjetlosnim mikroskopom. Isto tako, dvije strukture kao što su mitohondriji vidjet će se kao samo jedan objekt ako su razdvojene na udaljenost manju od 0,2 μm . Moć razlučivanja mikroskopa određuje kvalitetu slike, njezinu jasnoću i bogatstvo detalja, a ovisi uglavnom o kvaliteti leće objektiva. Povećanje ima vrijednost samo kada ga prati visoka moć razlučivanja. Leće objektiva za jača povećanja su napravljene tako da imaju i veću moć razlučivanja. Leća okulara samo povećava sliku koja dolazi s objektiva i ne povećava moć razlučivanja.

Virtualna mikroskopija obično se koristi za proučavanje mikroskopskih preparata u svijetlom polju, a odnosi se na snimanje obojenih rezova tkiva i stvaranje digitalnih slika visoke

SLIKA 1–3 Dijelovi i put svjetlosti mikroskopa sa svijetlim poljem



Svjetlosni mikroskop sa svijetlim poljem, njegovi mehanički dijelovi i put svjetlosti od žarulje ispod stolića do oka promatrača. Optički sustav sastoji se od tri seta leća:

- **Kondenzor** skuplja i fokusira stožac svjetla koji osvjetljava tkivo na stakalcu smještenom na stoliću.
- **Leće** objektivna povećavaju i projiciraju sliku predmeta prema okularu. Izmjenjivi objektiv s različitim povećanjima koji se rutinski koriste u histologiji uključuju povećanje 4× za promatranje velike površine (polja) tkiva pri slabom povećanju, 10× za srednje povećanje manjeg polja i 40× za jako povećanje i detaljno proučavanje područja.
- Dva **okulara** povećavaju ovu sliku za još 10× i projiciraju je na promatračevo oko, dajući ukupno povećanje od 40×, 100× ili 400×.

moći razlučivanja, čime je omogućeno naknadno proučavanje tkiva pomoću računala ili drugog digitalnog uređaja. Primjenom posebnog mikroskopa za snimanje histoloških preparata moguće je snimati dio po dio preparata na različitim povećanjima i spremiti te snimke u obliku tisuća slikovnih datoteka. Te se datoteke stavljaju na server, a prethodno se softverski udružuju u odgovarajući format koji omogućuje pristup tim snimkama putem mrežnih preglednika ili na drugim uređajima. Zbog prihvatljive cijene i jednostavnosti primjene, virtualna mikroskopija sve više zamjenjuje svjetlosne mikroskope i potrebu za zbirnkama histoloških preparata u nastavi iz histologije.

Fluorescencijska mikroskopija

Kada se neke tvari u stanici osvijetle svjetlošću odgovarajuće valne duljine, one emitiraju svjetlost veće valne duljine. Ta se

pojava naziva **fluorescencija**. U **fluorescencijskoj mikroskopiji** dijelovi tkiva obično se osvijetle ultraljubičastim (UV) svjetlom, a emitiraju valove u vidljivom dijelu spektra. Tvari koje fluoresciraju vide se kao svijetle strukture na tamnoj pozadini. U fluorescencijskoj mikroskopiji mikroskop ima izvor UV ili drugog svjetla te filtere koji propuštaju svjetlost onih valnih duljina koje emitiraju tvari koje želimo promatrati.

Fluorescencijski spojevi s afinitetom za specifične stanične makromolekule mogu se koristiti kao fluorescencijske boje. Primjer je narančasti akridin (engl. *acridine orange*), koji veže DNA i RNA. Kada se promatraju fluorescencijskim mikroskopom, te nukleinske kiseline emitiraju svjetlost drugačijih valnih duljina, što omogućuje njihovo odvojeno prikazivanje u stanicama (Slika 1–4a). Drugi spojevi, kao što su DAPI i Hoechst boja, specifično vežu DNA i koriste se za bojenje staničnih jezgri, emitirajući pod UV svjetlom karakterističnu plavu fluorescenciju. Druga važna primjena fluorescencijske mikroskopije postiže se vezanjem komponenti kao što je fluorescein na molekule koje će se specifično vezati za određene stanične komponente i tako omogućiti prepoznavanje tih struktura pod mikroskopom (Slika 1–4b). Protutijela obilježena fluorescencijskim spojevima iznimno su važna u imunohistokemijskom bojenju. (Pogledajte odjeljak Prikazivanje specifičnih molekula.)

Faznokontrastna mikroskopija

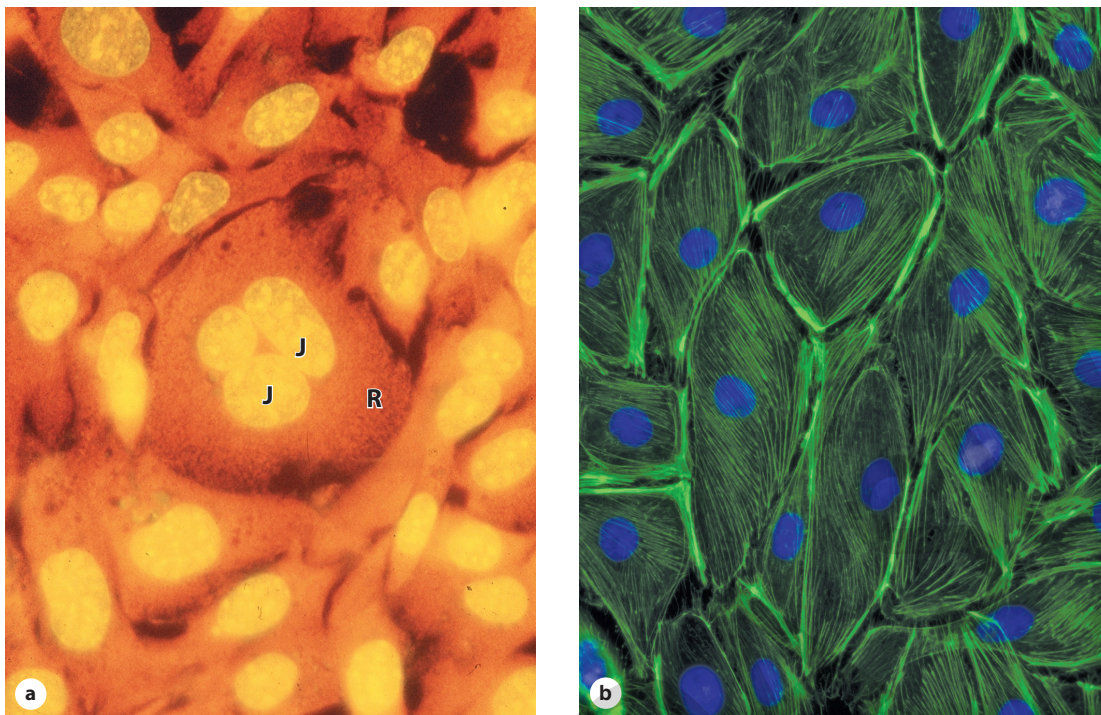
Ovim modificiranim svjetlosnim mikroskopima mogu se proučavati neobojene stanice i dijelovi tkiva koji su inače prozirni i bezbojni. U neobojenim tkivima teško je vidjeti stanične detalje jer svi dijelovi tkivnog uzorka imaju otprilike sličnu optičku gustoću. Međutim, **faznokontrastna mikroskopija** upotrebljava sustav leća koji omogućuje promatranje slika prozirnih predmeta i, što je važno, može se koristiti za proučavanje živih staničnih kultura (Slika 1–5).

Mikroskopija faznog kontrasta temelji se na principu da svjetlost mijenja brzinu kada prolazi kroz stanične i međustanične strukture s različitim indeksima loma. Sustav faznog kontrasta te promjene u brzini svjetlosti pretvara u tamnije ili svjetlije dijelove slike koje su odraz različite građe pojedinih dijelova preparata. Budući da faznokontrastni mikroskopi omogućuju promatranje stanica bez fiksiranja ili bojenja, oni su važna oprema u svim laboratorijima za proučavanje staničnih kultura. **Diferencijalna interferencijska kontrastna mikroskopija** s Nomarskijevom optikom je modifikacija faznokontrastne mikroskopije kojom se dobiva slika živih stanica s jasnijim trodimenzionalnim (3D) prikazom (Slika 1–5c).

Konfokalna mikroskopija

Kod običnog mikroskopa sa svijetlim poljem, snop svjetlosti je relativno širok i prolazi kroz cijeli uzorak. Višak svjetla smanjuje kontrast unutar slike te tako smanjuje i moć razlučivanja leće objektivna. Konfokalna mikroskopija (Slika 1–6) zaobilazi ove probleme i postiže visoku moć razlučivanja i oštar fokus primjenom (1) točkastog izvora svjetlosti visokog intenziteta, obično iz lasera i (2) ploče s malim otvorom ispred detekto-

SLIKA 1-4 Izgled stanica pod fluorescencijskim mikroskopom



Komponente stanica često su obojene spojevima vidljivim pomoću fluorescencijske mikroskopije.

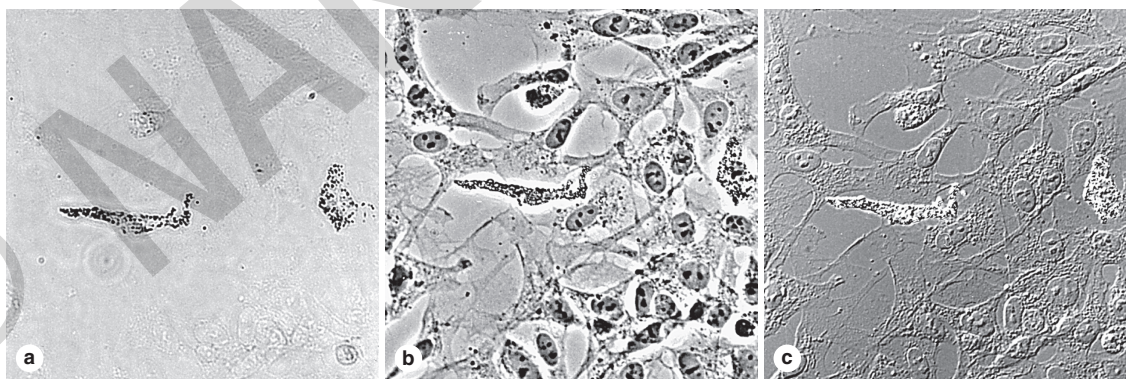
(a) Narančasta akridin boja veže nukleinske kiseline i uzrokuje da DNA u jezgri stanica (J) emitira žuto svjetlo, a da citoplazma s mnogo RNA (R) izgleda narančasto u prikazanim stanicama bubrežnog kanalića.

(b) Kultivirane stanice obojene bojom DAPI (4',6-diamino-2-fenilindolom), koja veže DNA, i fluorescentnim faloidinom,

koji veže aktinske filamente, pokazuju jezgre s plavom fluorescencijom i aktinske filamente obojene zeleno. Važni podaci, kao što je veća gustoća mikrofilamenata na periferiji stanice, odmah su vidljivi. (obje slike 500×)

(Slika 1-4b, upotrebljava se uz dopuštenje dr. Claire E. Walczak i Ranie Rizk, Indiana University School of Medicine, Bloomington.)

SLIKA 1-5 Izgled nebojenih stanica u tri vrste svjetlosne mikroskopije



Žive stanice neuralnog grebena u kulturi stanica izgledaju drugačije kada se promatraju različitim tehnikama svjetlosne mikroskopije. Ovdje je isto polje nebojenih stanica, od kojih su dvije pigmentirane stanice u diferencijaciji, prikazano primjenom triju različitih metoda (sve 200×):

(a) Mikroskopija sa svijetlim poljem: Bez fiksiranja i bojenja, mogu se vidjeti samo dvije pigmentirane stanice.

(b) Faznokontrastna mikroskopija: Granice među stanicama, jezgre i citoplazmatske strukture s različitim indeksima loma

različito utječu na fazni pomak svjetlosti i stvara se slika tih struktura u svim stanicama.

(c) Diferencijalna interferencijska kontrastna mikroskopija: Stanični detalji su istaknuti na drugačiji način pomoću Nomarski optike. Mikroskopija faznog kontrasta, s diferencijalnom interferencijom ili bez nje, naširoko se koristi za promatranje živih stanica uzgojenih u kulturi tkiva.

(Upotrebljava se uz dopuštenje dr. Sherry Rogers, Department of Cell Biology and Physiology, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico, SAD.)