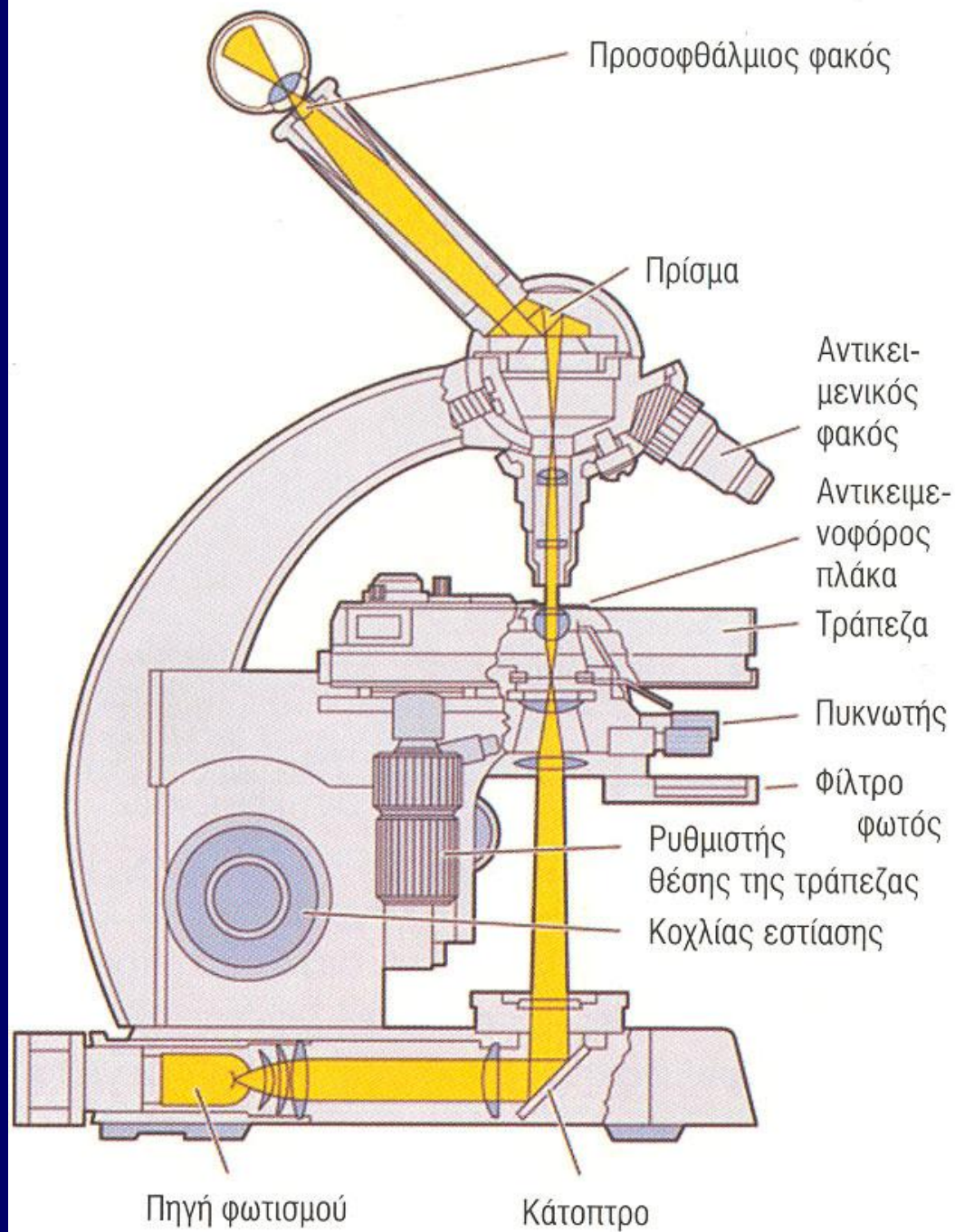




Ιστολογικές Τεχνικές





ΣΤΑΔΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΙΣΤΟΥ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΟ ΦΩΤΟΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

1. Μονιμοποίηση
2. Έγκλειση
3. Τομή
4. Χρώση

Μονιμοποίηση

Απαραίτητη για την αποφυγή αλλοιώσεων που τροποποιούν τη μορφολογία είτε λόγω **αυτόλυσης** είτε λόγω **επιμόλυνσης**.

Διάρκεια : Εξαρτάται από το μέγεθος του ιστοτεμαχίου (4 – 24 ώρες)

Μονιμοποιητές

1. Αλδεΐδες

Σ' αυτές περιλαμβάνονται η **φορμαλδεΐδη** και η **γλουταραλδεΐδη** η οποία έχει ιδιαίτερη εφαρμογή στα υλικά για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

2. Ενώσεις υδραργύρου

Περιέχουν χλωριούχο υδράργυρο και οι πιο γνωστές είναι το **B-5** και το υγρό **Zenker**. Αποδίδουν εξαιρετικά τη μορφολογία του πυρήνα και χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μελέτη λεμφικού και αιμοποιητικού ιστού.

Μονιμοποιητές

3. Αλκοόλες

Πρόκειται για την **μεθανόλη** και την **αιθανόλη**. Είναι κατάλληλες για πολύ μικρά ιστοτεμαχίδια και για επιχρίσματα γιατί δρουν άμεσα και επιφανειακά.

4. Οξειδωτικοί παράγοντες

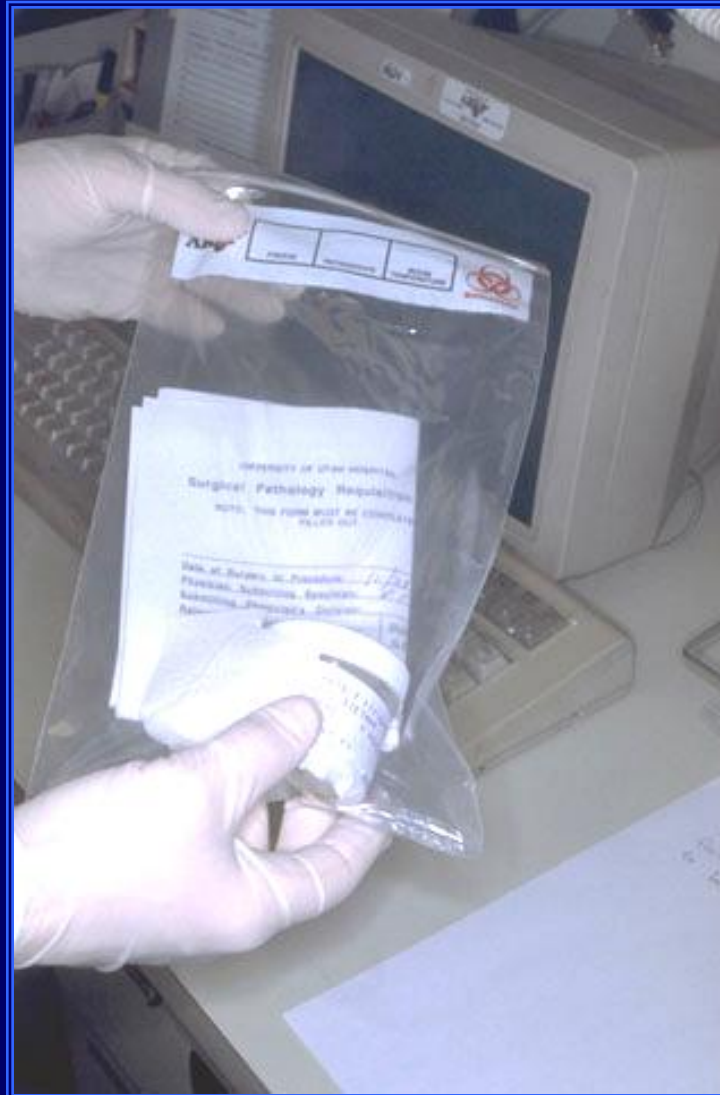
Περιλαμβάνουν ενώσεις του **υπερμαγγανικού οξέος**, του **διχρωμικού οξέος** και το **τετροξειδίο του οσμίου**. Αναδεικνύουν τις μεμβράνες αλλά και είναι ακατάλληλα για ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.

Μονιμοποιητές

5. Ενώσεις του πικρικού οξέος

Σ' αυτή την κατηγορία ανήκει το **υγρό Bouin** το οποίο δίνει εξαιρετική απεικόνιση των στοιχείων του πυρήνα.

Μονιμοποίηση



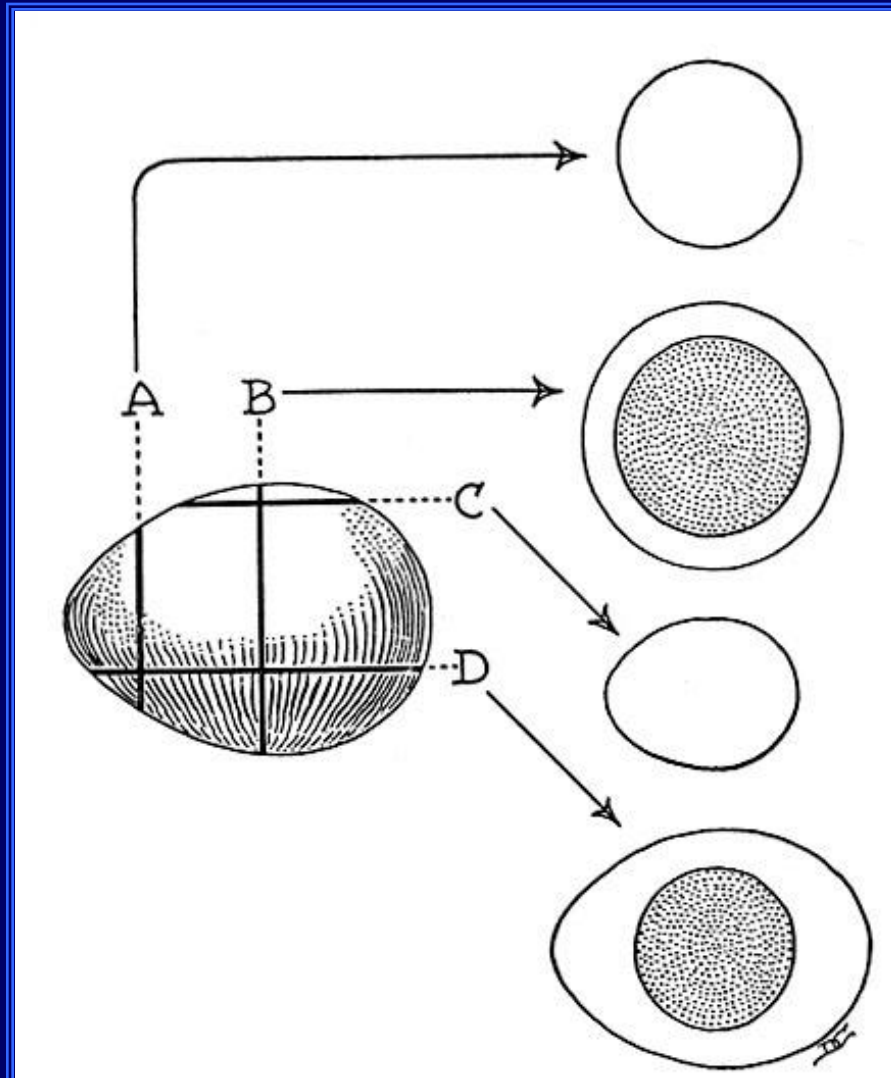
Επιλογή θέσεων



Επιλογή θέσεων



Επιλογή θέσεων



Αφυδάτωση

Πριν από την έγκλειση του ιστού στην παραφίνη πρέπει αυτός να αφυδατωθεί διότι η παραφίνη είναι υδρόφοβη. Έτσι, προηγείται η διαδικασία της **αφυδάτωσης** με την οποία απομακρύνεται το ενδογενές νερό του ιστού, αλλά και εκείνο του μονιμοποιητικού υλικού.

Η διαδικασία αυτή διαρκεί 6-24 ώρες και περιλαμβάνει την εμβάπτιση του ιστού διαδοχικά σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλκοόλης (70°, 80°, 96° και 100°).

Διαύγηση

Μετά τα οίνοπνεύματα και πριν την παραφίνη παρεμβάλλεται η διαδικασία της «**διαύγησης**». Στο στάδιο αυτό ο ιστός εμβαπτίζεται σε μια ουσία διαλυτή τόσο στην αλκοόλη όσο και στην παραφίνη, όπως η ξυλόλη και σπανιότερα η τολουόλη ή το βενζόλιο, που προσδίδει μια ημιδιαφανή όψη στον αδιαφανή μέχρι τότε ιστό και γι' αυτό και καλείται «διαύγηση».

Η διάρκεια του σταδίου αυτού είναι 1-2 ώρες.

Αφυδάτωση – Διαύγηση - Έγκλειση



ΙΣΤΟΚΙΝΕΤΑ

Έγκλειση

Για τη λήψη λεπτών τομών από ένα ιστό θα πρέπει αυτός να εγκλεισθεί σ' ένα στερεό μέσο.

Ως τέτοιο μέσο χρησιμοποιείται η **παραφίνη** η οποία στη συνήθη θερμοκρασία δωματίου είναι σε στερεή μορφή ενώ σε μεγαλύτερη τήκεται.

Η παραφίνη των ιστολογικών παρασκευασμάτων έχει συνήθως σημείο τήξεως 56°- 60°.

Ένα άλλο υλικό έγκλεισης είναι και η **κελλοϊδίνη** όμως χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά.

Η παραφίνη διεισδύει στον ιστό δρώντας σαν ένα φυσικό στερεωτικό μέσο (διάρκεια 6 ώρες περίπου).

Τυπική διαδοχή των μεθόδων στην ετοιμασία των ιστών προς παρατήρηση με το φωτοmikροσκόπιο

Στάδιο	Σκοπιμότητα	Διάρκεια
1. Μονιμοποίηση σε απλά ή σύνθετα μονιμοποιητικά	Διατήρηση της μορφολογίας του ιστού και της μοριακής σύνθεσής του	Περίπου 12 ώρες, ανάλογα με το μονιμοποιητικό και το μέγεθος του ιστού
2. Αφυδάτωση σε διαφορετικούς βαθμούς πυκνότητας αιθυλικής αλκοόλης	Αντικατάσταση του νερού των ιστών με οργανικούς διαλύτες	6-24 ώρες
3. Διαύγηση σε ξυλόλη	Διαπότιση του ιστού μ' ένα διαλύτη παραφίνης	1-2 ώρες
4. Έγκλειση σε υγρή παραφίνη (58-60° C)	Διείσδυση παραφίνης ενδοκυττάρια και στα μεσοκυττάρια διαστήματα	1-6 ώρες

Έγκλειση σε παραφίνη



Τομή

Ο ιστός ο εγκλεισμένος σε κύβο παραφίνης τοποθετείται σε ένα ειδικό όργανο που καλείται **μικροτόμος** και κόβεται σε λεπτές τομές συνήθως πάχους 5-8 μm .



Οι τομές
παραφίνης αφού
εκπτυχθούν σε
υδατόλουτρο,
επικολλώνται
μετά σε γυάλινη
πλάκα
μικροσκοπίου για
να
επακολουθήσει η
χρώση.



Υδατόλουτρο

Αχρωμάτιστες τομές παραφίνης



Κλίβανος

Χρώση

- Οι περισσότερες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τα ιστολογικά παρασκευάσματα είναι δραστικές ως **υδατικά διαλύματα**. Γι' αυτό θα πρέπει να απομακρυνθεί η παραφίνη από την τομή και να ενυδατωθεί πάλι ο ιστός. Έτσι ακολουθεί η αντίστροφη της ιστοκινέτας πορεία.
- Μετά την ενυδάτωσή του, ο ιστός χρωματίζεται με χρωστικές που αναδεικνύουν τα διάφορα του στοιχεία με διακριτές αποχρώσεις, αποδίδοντας έτσι τις μεταξύ τους **χημικές αντιδράσεις ή συγγένειες**.
- Η χρωματισμένη τομή επικαλύπτεται με **καλυπτρίδα** και προωθείται για μικροσκόπηση.

Χρώση



ΚΡΥΟΤΟΜΗ

1. Ταχεία εξέταση

2. Διατήρηση συστατικών διαλυτών
στην αλκοόλη
(λιπίδια, ένζυμα, αντιγονικοί επίτοποι)

Κρυοτομή

- Ταχεία ψύξη του ιστού είτε σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-70°C) είτε σε υγρό άζωτο. Με τη διαδικασία αυτή ο ιστός γίνεται μια συμπαγής σκληρή μάζα (κύβος πάγου), λόγω της ψύξης του ενδογενούς νερού.
- Με ειδικούς μικροτόμους (**κρυοστάτες**) λαμβάνονται από τον «κύβο» λεπτές τομές (πάχους 5-10 μm) οι οποίες χρωματίζονται χωρίς να εκτεθούν σε αλκοόλη ή άλλους οργανικούς διαλύτες.

ΣΥΝΗΘΗΣ ΧΡΩΣΗ

A & H

Αιματοξυλίνη



Βασική χρωστική



Βασίφιλα στοιχεία
(όξινα συστατικά
π.χ. Νουκλεοπρωτεΐνες
γλυκοζαμινογλυκάνες)

Ηωσίνη

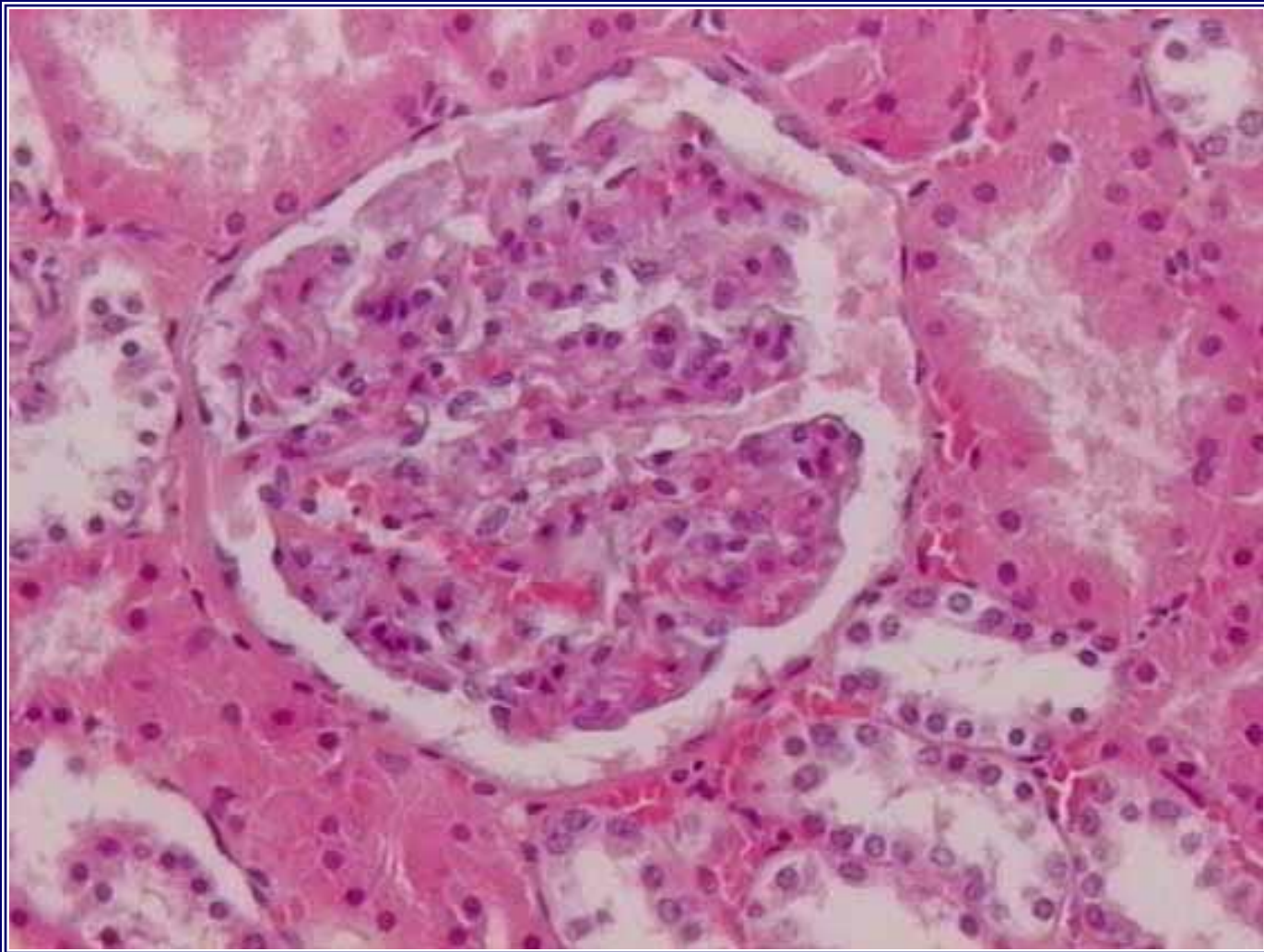


Όξινη χρωστική

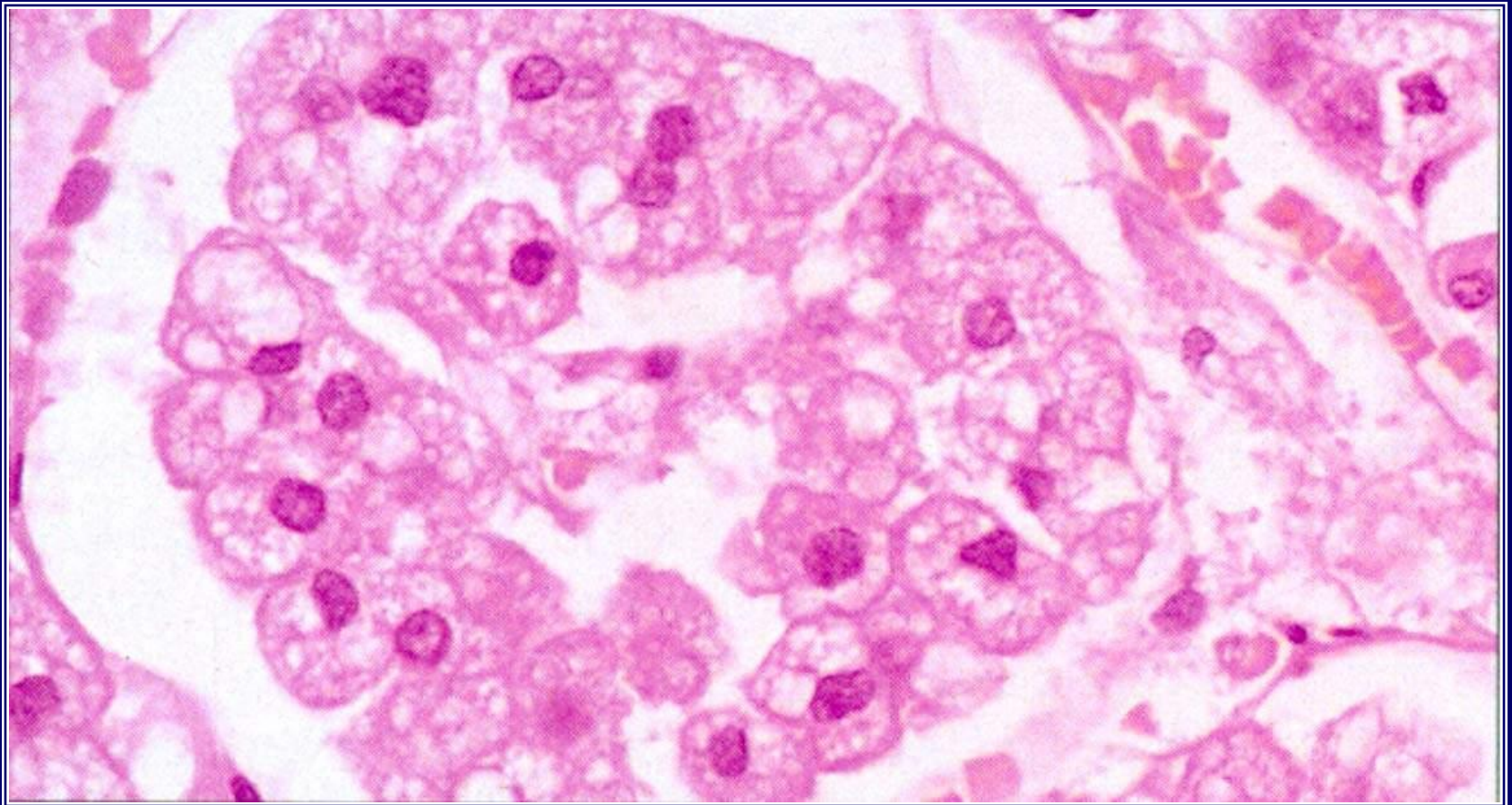


Οξύφιλα στοιχεία
(βασικά συστατικά
π.χ. κυτταροπλασματικών
πρωτεϊνών)

Χρώση Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης (A & H)



Χρώση Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης (A & H)



ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανίχνευση διαφόρων συστατικών του κυττάρου με βάση το χρωματικό αποτέλεσμα που προκύπτει από τη **χημική τους αντίδραση** με συγκεκριμένα στοιχεία.

ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΧΡΩΣΕΙΣ

- Μέθοδος PAS

Πολυσακχαρίτες ==> γλυκογόνο

Γλυκοπρωτεΐνες ==> ουδέτερες βλέννες
βασικές μεμβράνες

- Μέθοδος Van Gieson

Ελαστικές και κολλαγόνες ίνες

- Μέθοδος τριχρωμική

- Μέθοδος αργύρου

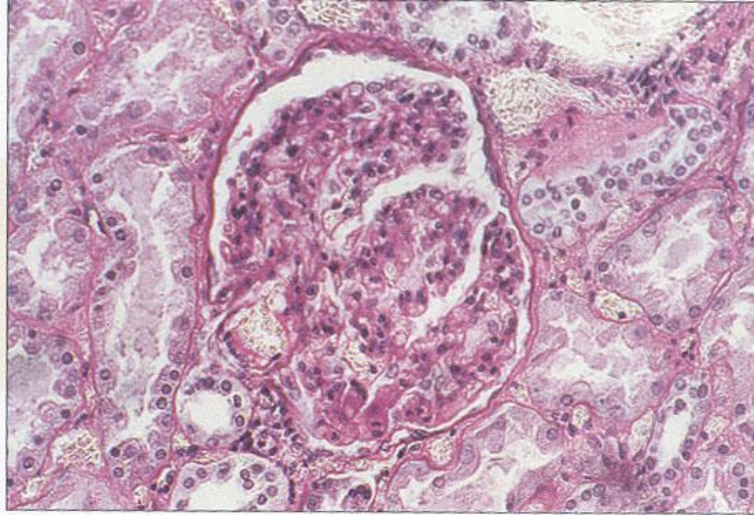
Οξειδωση νιτρικού άλατος αργύρου από
συστατικά του κυττάρου

Ίζημα μεταλλικού αργύρου

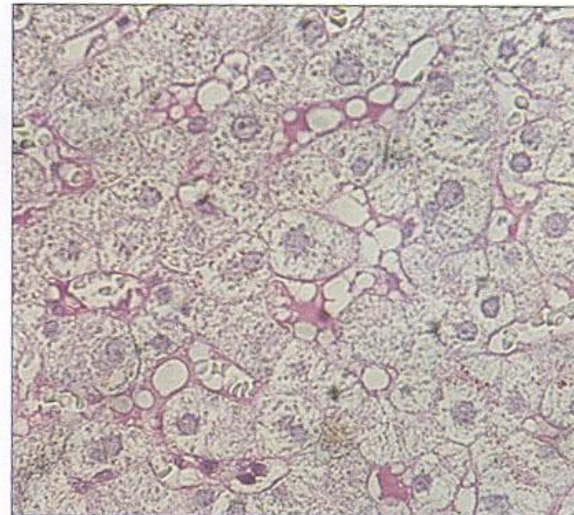
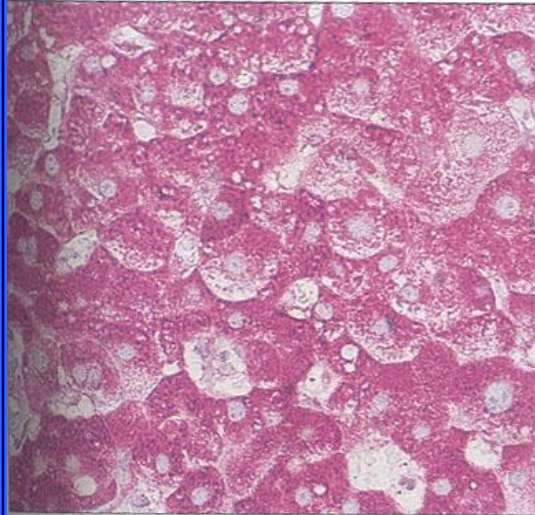
- Μέθοδος κυανού της Αλσατίας

Όξινες βλέννες

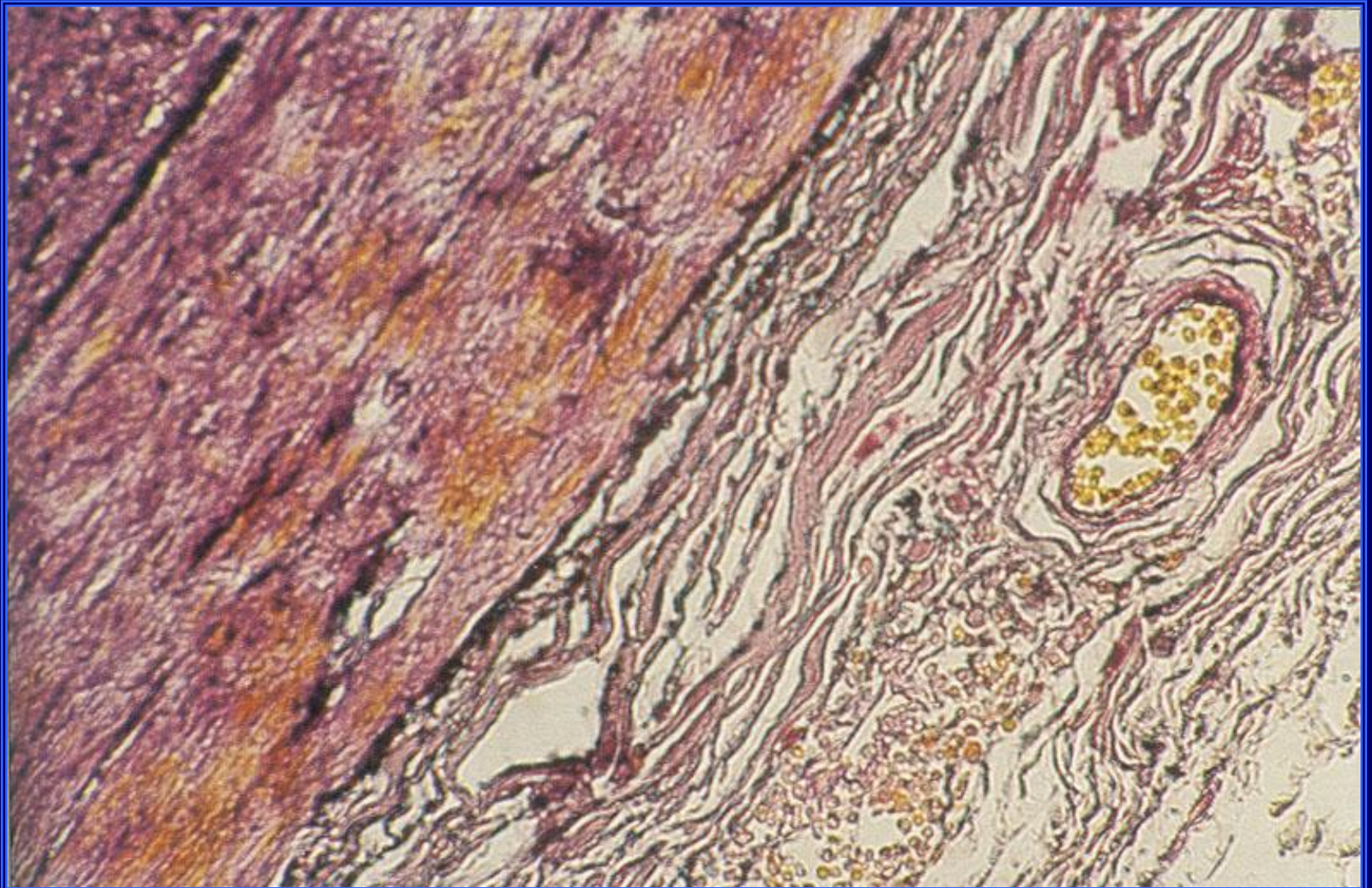
Μέθοδος PAS



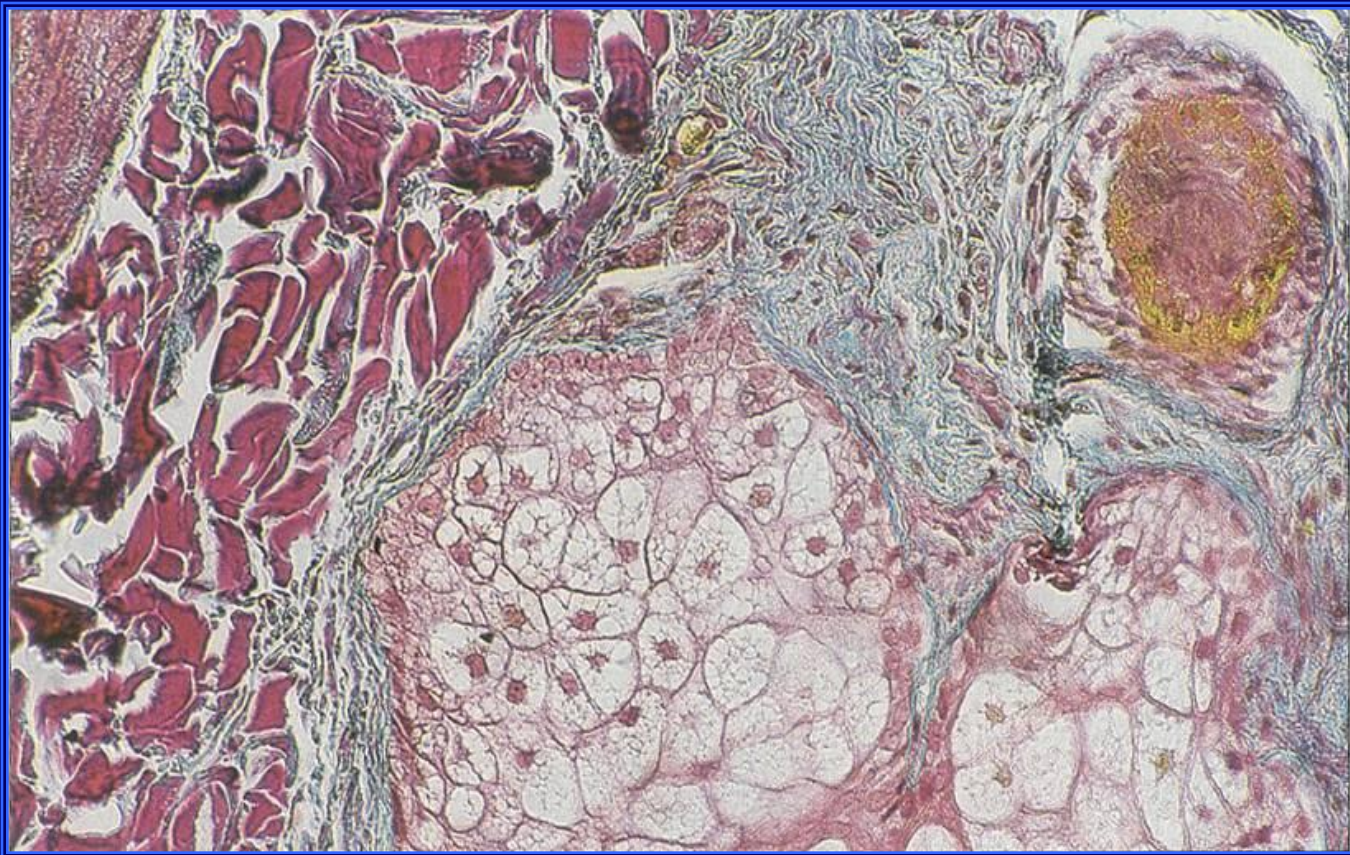
Kidnev



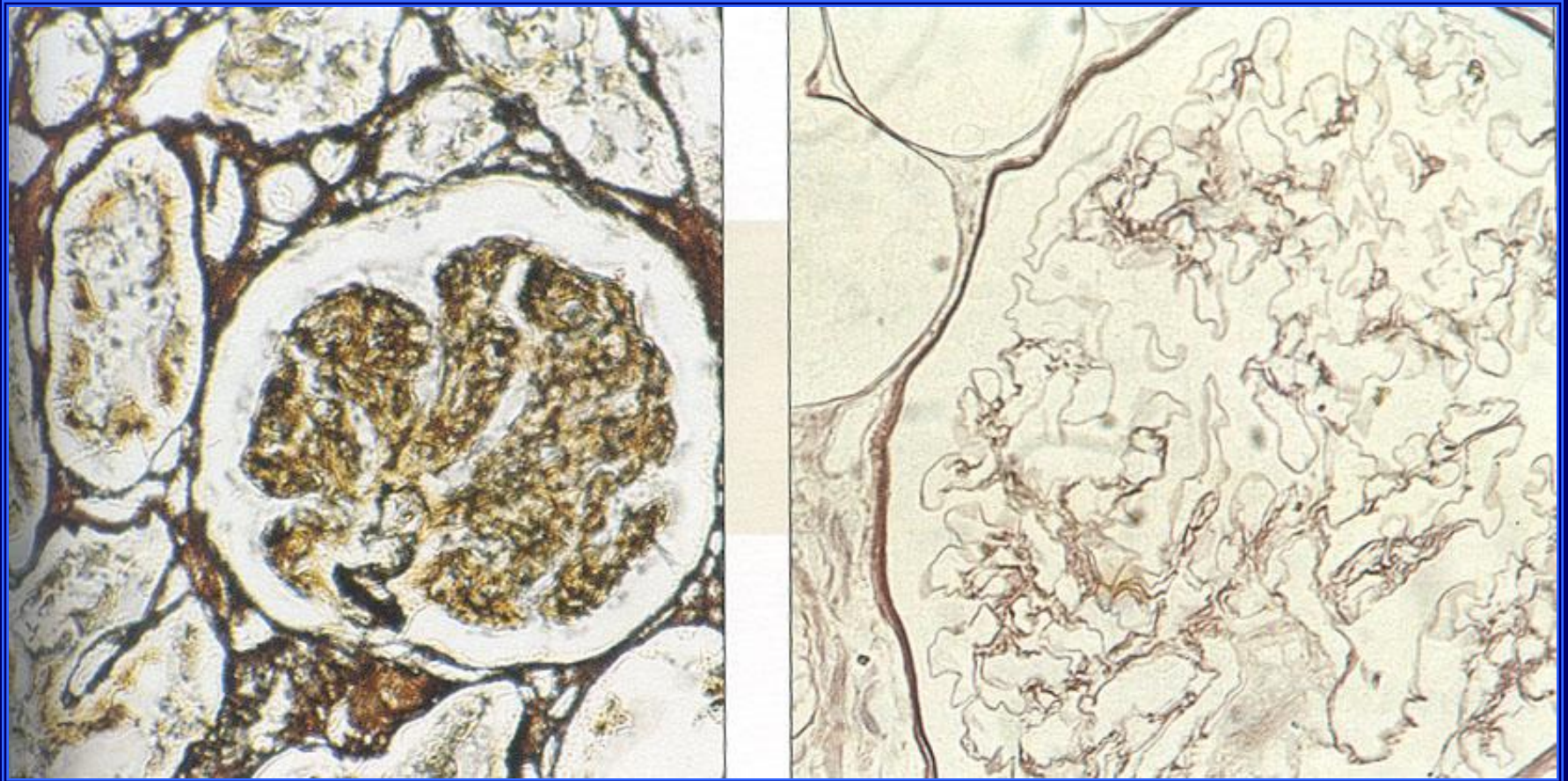
Μέθοδος Van Gieson



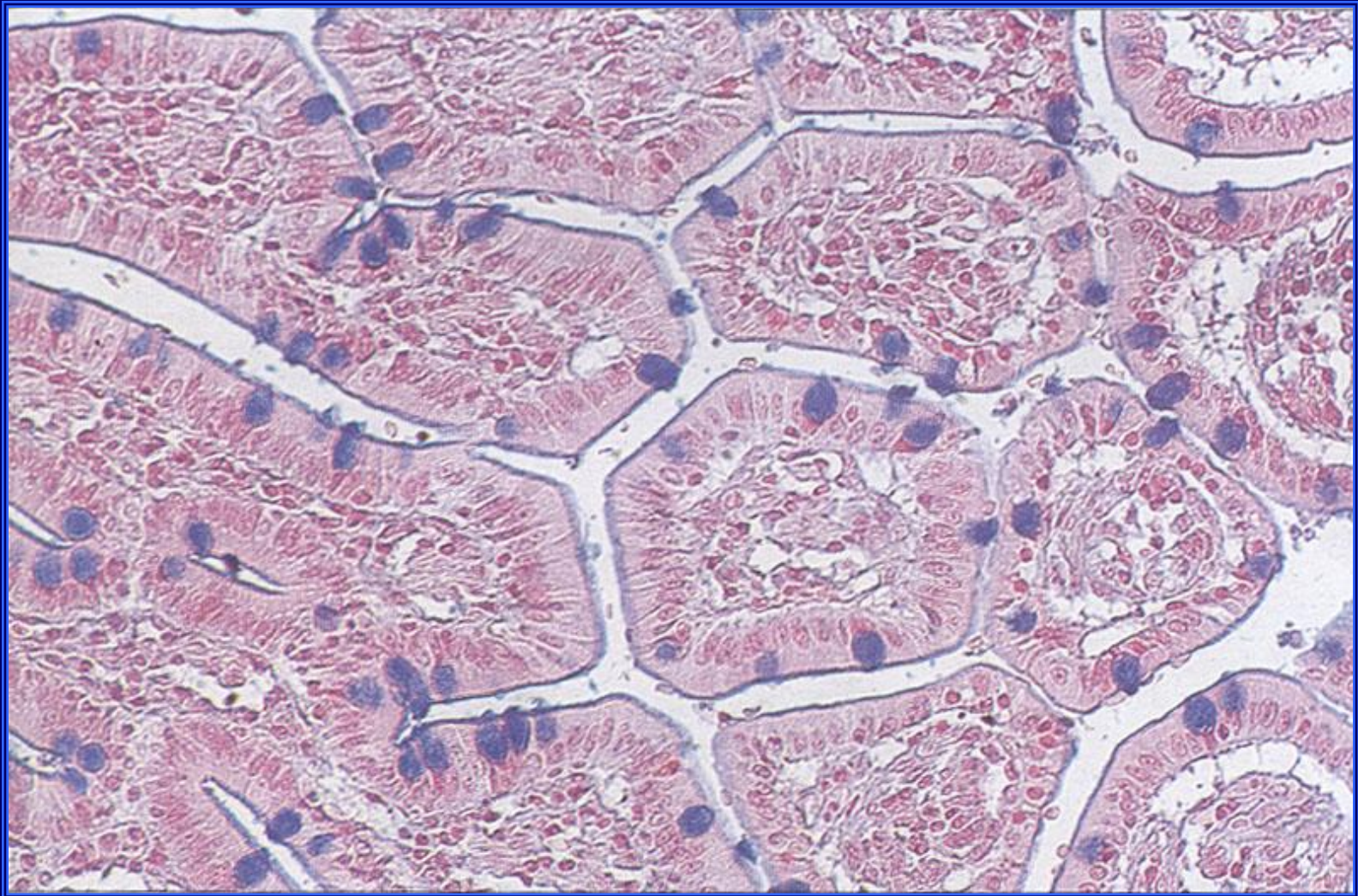
Μέθοδος τριχρωμική



Μέθοδος αργύρου



Μέθοδος κυανού της Αλσατίας

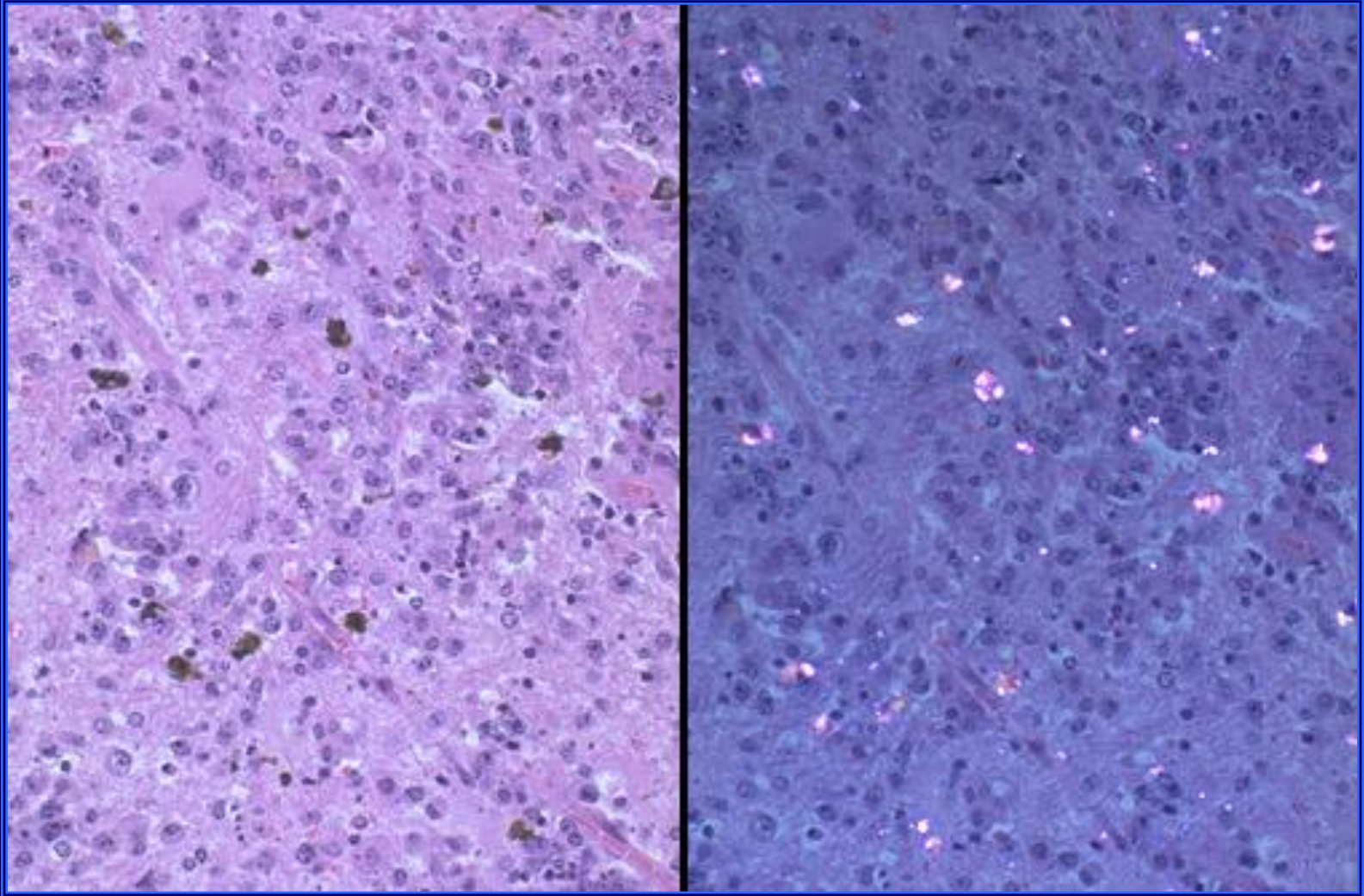


ARTIFACTS

Πάντοτε αποτέλεσμα χειρισμών ή διαδικασιών κατά τη διάρκεια της παρασκευής των ιστών

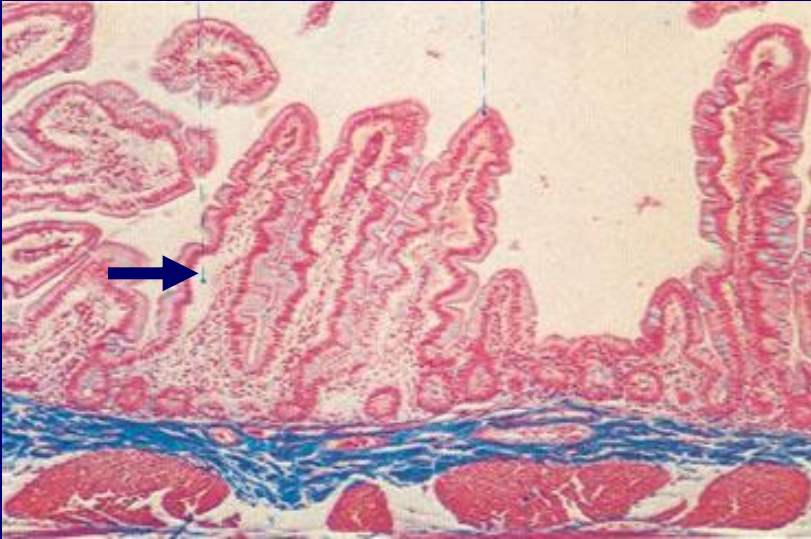
1. **Συστολή**, συρίκνωση
2. **Κατακρήμνιση** (μη πλήρης απομάκρυνση μονιμοποιητικού υλικού)
3. **Πτύχωση**, ρυτίδωση
4. **Εγκοπές** μαχαιριού μικροτόμου
5. Βίαιος χειρισμός φρέσκου ιστού, **σύνθλιψη**

ARTIFACTS

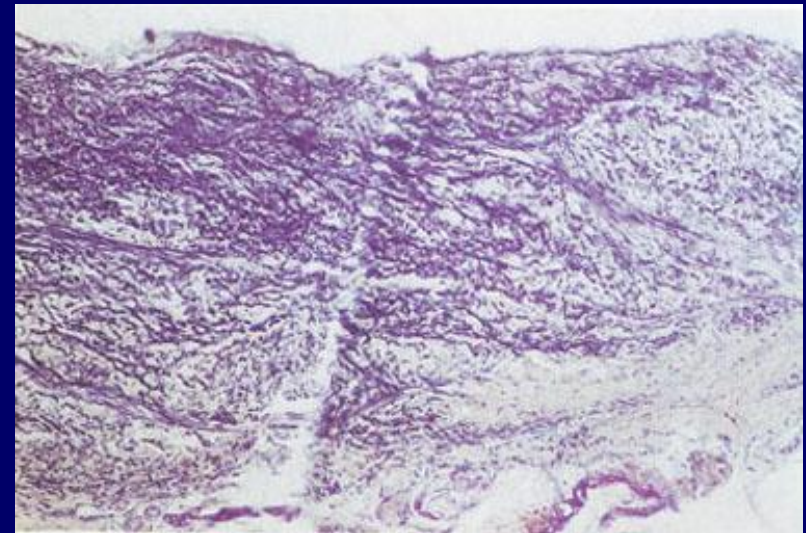


Κατακρήμνιση

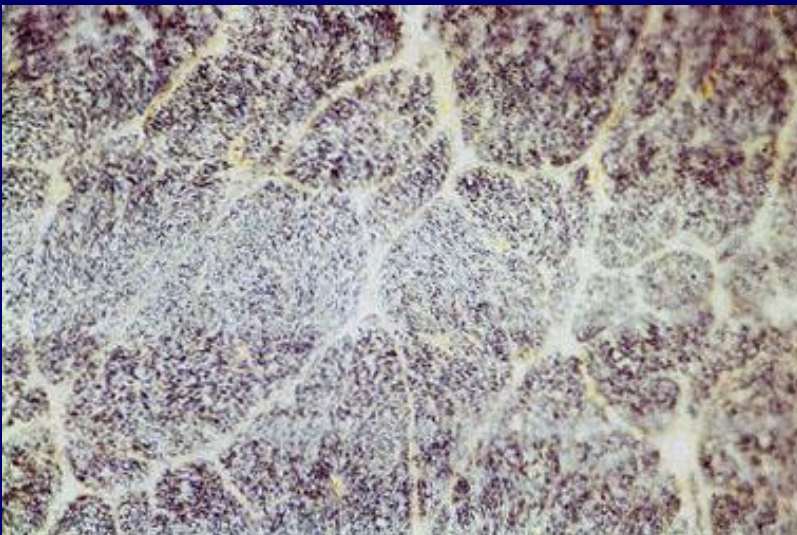
ARTIFACTS



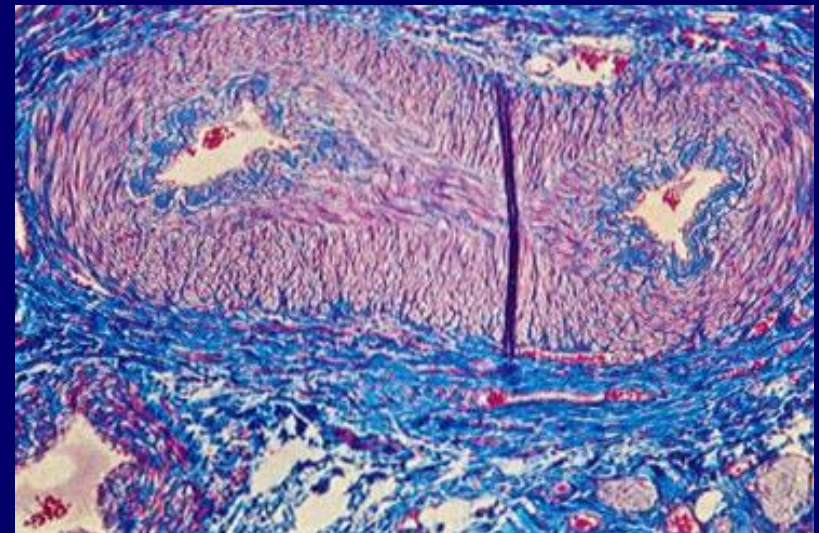
Συρίκνωση



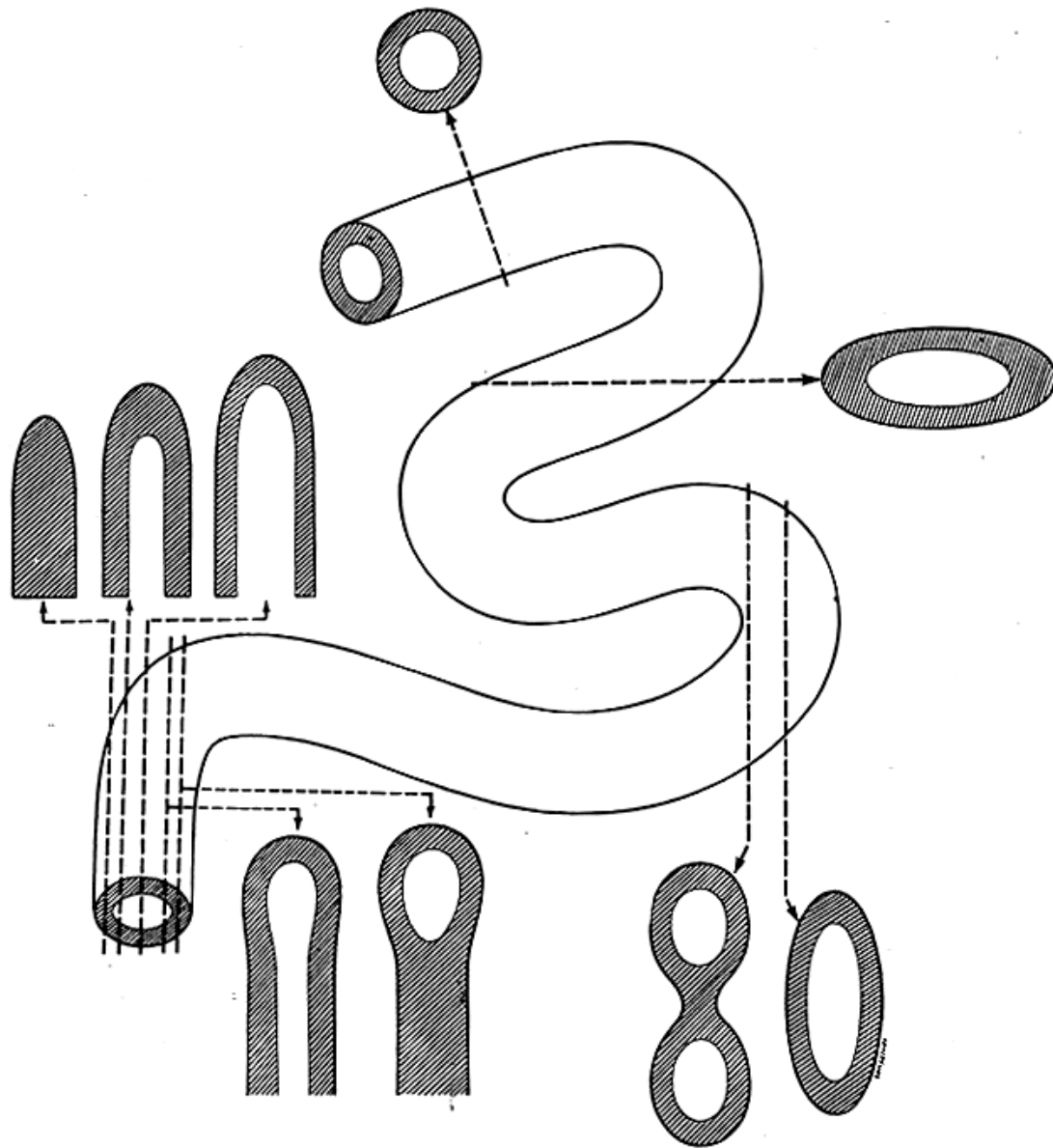
Εγκοπή από μαχαίρι



Διαφορετικό πάχος τομής



Πτύχωση



Μερικές από τις όψεις που μπορεί να δείχνει ένα κοίλο όργανο όταν τμηθεί. Τα βέλη δείχνουν τί φαίνεται κάτω από το μικροσκόπιο σε κάθε ιδιαίτερο επίπεδο τομής.

Αφαλάτωση ή Απασβέστωση

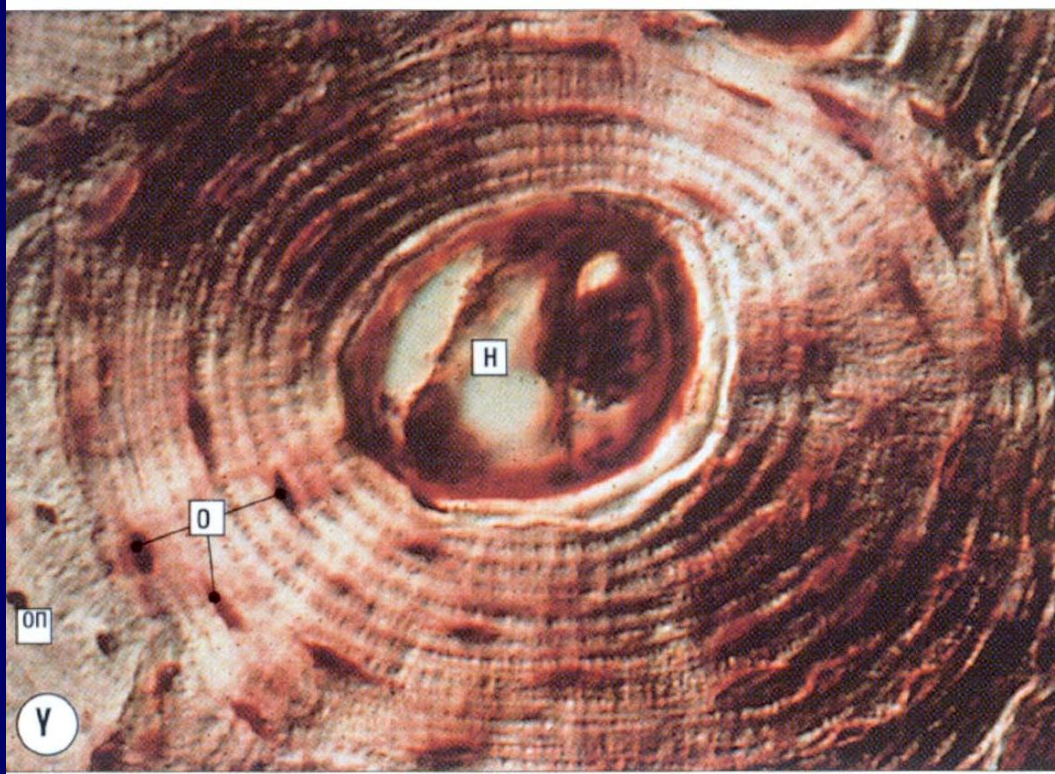
Μερικοί ιστοί που περιέχουν **άλατα ασβεστίου** (π.χ. οστίτης ιστός, αποτιτανωμένες εστίες) δεν είναι δυνατόν να κοπούν στο συνήθη μικροτόμο πριν αφαλατωθούν και μαλακώσουν.

Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την εμφάπτιση του ιστού μετά την μονιμοποίησή του σε αφαλατωτικό υγρό.

Αφαλατωτικά υγρά

Διαλύματα οξέων (νιτρικού, υδροχλωρικού)
τα οποία απομακρύνουν τα ανόργανα
άλατα από τον ιστό.

Όστό





291

82