

Κεφάλαιο 2

Μέθοδοι και τεχνικές ιστολογίας

Μαριάνθη Χατζιωάννου
Χρυσούλα Αποστολογάμβρου
Δημήτρης Βαφείδης



2. Μέθοδοι και τεχνικές ιστολογίας

Σύνοψη

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά οι μέθοδοι και οι τεχνικές για την παραγωγή ιστολογικών τομών. Παρουσιάζεται επίσης συνοπτικά ο βασικός εξοπλισμός ενός εργαστηρίου Ιστολογίας και δίνονται οδηγίες για την παρατήρηση των παρασκευασμάτων σε οπτικό μικροσκόπιο. Σε όλες τις ενότητες υπάρχουν εποπτικοί πίνακες και φωτογραφίες.

Προαπαιτούμενη γνώση

Γενική Ζωολογία, Χημεία.

2.1 Παρασκευή ζωικών υλικών για μικροσκοπική εξέταση

Κάθε βιολογικό υλικό πρέπει να υποστεί κάποια κατάλληλη προετοιμασία, ώστε να μελετηθεί στο μικροσκόπιο. Οι δύο κλασικές τεχνικές για την ετοιμασία και τη μελέτη των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων είναι:

- η άμεση παρατήρηση ζωντανού υλικού (νωπό παρασκεύασμα) και
- η παρατήρηση του υλικού, ύστερα από στερέωση και χρώση (μόνιμα ή ημι-μόνιμα παρασκευάσματα).

Σε κάθε περίπτωση η επεξεργασία αρχικά περιλαμβάνει:

- τη συλλογή υλικού,
- την καταγραφή και ταξινόμηση του υλικού και
- τη μακροσκοπική εξέταση.

Στα προσωρινά παρασκευάσματα η παρατήρηση του δείγματος γίνεται είτε στη φυσική του κατάσταση (όπως απαντά στον οργανισμό) είτε μετά από την απομόνωση ορισμένων στοιχείων που ενδιαφέρουν την άσκηση ή την έρευνα.

Τα μόνιμα παρασκευάσματα ετοιμάζονται με ειδικές τεχνικές κατεργασίας και έγκλεισης, που εξασφαλίζουν ποιότητα και μεγάλη διάρκεια διατήρησης, ενώ τα ημι-μόνιμα παρασκευάζονται με πιο σύντομες τεχνικές όπως είναι η προσθήκη γλυκερίνης στη σταγόνα νερού τής παρατήρησης και διατηρούνται για μικρό χρονικό διάστημα.

2.2 Στερέωση και χρώση ζωικού υλικού (Μόνιμα παρασκευάσματα)

Ο όρος στερέωση δηλώνει την άμεση νέκρωση του βιολογικού υλικού (κύτταρα, ιστοί, ολόκληροι οργανισμοί) με χημικά, κυρίως, μέσα, ώστε να διατηρηθεί αναλλοίωτη η υφή τους. Οι νεκρωμένοι ιστοί έχουν αυξημένη ικανότητα να αποταμιεύουν χρωστικές ουσίες, αναδεικνύοντας έτσι τα συστατικά τους. Η τεχνική της χρώσης στερεωμένου υλικού χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα στη μελέτη του φυτικού και ζωικού κυττάρου. Ανάλογα με το υλικό και τον σκοπό για τον οποίο αυτό εξετάζεται, χρησιμοποιούνται ποικίλα υλικά και τεχνικές για τη στερέωση και τη χρώση.

Ο ιστός που λαμβάνεται αμέσως μετά την καταγραφή και την ταξινόμηση του υλικού προς εξέταση τοποθετείται σε μια μονιμοποιητική ουσία (fixative). Ανάλογα με τον τύπο τού ιστού και τα υπό μελέτη χαρακτηριστικά, επιλέγονται οι κατάλληλες μονιμοποιητικές ουσίες (οργανικοί διαλύτες και δραστικές ανόργανες ουσίες). Η πιο γνωστή είναι η φορμαλδεΐδη (συνήθως σε συγκέντρωση 10%), που δρα σχηματίζοντας δεσμούς με τις πρωτεΐνες των ιστών. Η μεθανόλη και η αιθανόλη δε

χρησιμοποιούνται συχνά ως μονιμοποιητικά, γιατί αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες, σκληραίνουν και καθιστούν εύθραυστους τους ιστούς. Αντίθετα, χρησιμοποιούνται σε κυτταρολογικά επιχρίσματα, γιατί δρουν ταχύτατα και δίνουν πολύ καλές λεπτομέρειες του πυρήνα. Το διάλυμα Bouin, που αποτελείται από πικρικό οξύ, χρησιμοποιείται ευρέως για τη μονιμοποίηση ιστών και οργάνων, όπως οι γονάδες και ο γαστρεντερικός σωλήνας (το πικρικό οξύ είναι εκρηκτικό σε ξηρή μορφή). Η επιλογή της μονιμοποιητικής ουσίας εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης και από τη φύση του υλικού.

Για τη δημιουργία καλών τομών με τη χρήση μικροτόμου, το επόμενο στάδιο είναι η έγκλειση (εμποτισμός) του ιστού σε παραφίνη αλλά και σε άλλες ουσίες, όπως ζελατίνη, κυτταρίνη και ρητίνες (χρησιμοποιούνται συνήθως για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο). Τον υγρό μονιμοποιημένο ιστό δεν μπορούμε να τον επεξεργαστούμε κατευθείαν με παραφίνη, αν δεν αφαιρεθεί πρώτα το νερό (αφυδάτωση). Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχικά βαπτίσματα σε βαθμιαίες σειρές από υδατικά διαλύματα αιθανόλης με αύξουσα συγκέντρωση (συνήθως από 70% μέχρι 100%). Μετά η αιθανόλη αντικαθίσταται από ουσίες που διαλύουν το λίπος (διαύγαση). Στη έγκλειση με παραφίνη χρησιμοποιείται συνήθως ως διαλυτικό η ξυλόλη. Όταν ο ιστός εμποτισθεί με το διαλυτικό, τοποθετείται στη συνέχεια σε λιωμένη παραφίνη. Η θερμότητα έχει ως αποτέλεσμα να εξατμίζεται το διαλυτικό και οι χώροι που αδειάζουν να γεμίζουν με παραφίνη. Οι εμποτισμένοι στην παραφίνη ιστοί μπορούν να κοπούν σε τομές με μικροτόμο και στη συνέχεια να παρατηρηθούν σε οπτικό μικροσκόπιο. Μια άλλη μέθοδος για την παραγωγή τομών σε νωπό υλικό είναι με τη χρήση του κρουστάτη (ένας ειδικός μικροτόμος που διατηρείται σε ψυχρό θάλαμο) χωρίς να προηγούνται τα στάδια της μονιμοποίησης.

Οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι και για τη μικροσκοπική τους παρατήρηση έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για τη χρώση των παρασκευασμάτων (staining), που επιτρέπουν τόσο την παρατήρηση των επιμέρους συστατικών του ιστού αλλά και τη διάκριση ανάμεσά τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιγμάτων χρωστικών που επιτρέπουν την αύξηση της αντίθεσης, ώστε να εντοπιστούν κύτταρα και ιστοί και να παρατηρηθεί η μορφολογία τους. Οι περισσότερες χρωστικές συμπεριφέρονται σαν βασικές ή όξινες ενώσεις και έχουν την τάση να σχηματίζουν άλατα με τις ιονίζουσες ρίζες των ιστών. Η χρώση επιτρέπει την ανίχνευση συγκεκριμένων χημικών ομάδων και ενώσεων σε κύτταρα και ιστούς.

Η αιματοξυλίνη χρησιμοποιήθηκε ως γενική χρωστική σε μόνιμα ανατομικά παρασκευάσματα. Είναι μια φυσική χρωστική που περιέχεται στο ξύλο του φυτού *Haematoxylon campechianum*. Το χρωματικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το υλικό και το pH του διαλυτικού μέσου. Συγκεκριμένα, σε όξινο περιβάλλον εμφανίζεται χρώμα ερυθρό και σε αλκαλικό μπλε. Η ηωσίνη είναι η κυτταροπλασματική χρωστική που χρησιμοποιείται περισσότερο συχνά. Η ηωσίνη είναι μια όξινη χρωστική, η οποία αντιδρά με τις κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε βασικά αμινοξέα, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης, που χαρακτηρίζεται από έντονη ροζ κυτταροπλασματική χρώση. Ήδη από το 1885 ο List εισηγήθηκε τη χρήση της ως αντιχρώσης για το πράσινο του μεθυλίου. Επίσης, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τις βασικές μπλε χρωστικές. Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την αιματοξυλίνη, επικρατεί η ονομασία «χρωστικές H & E».

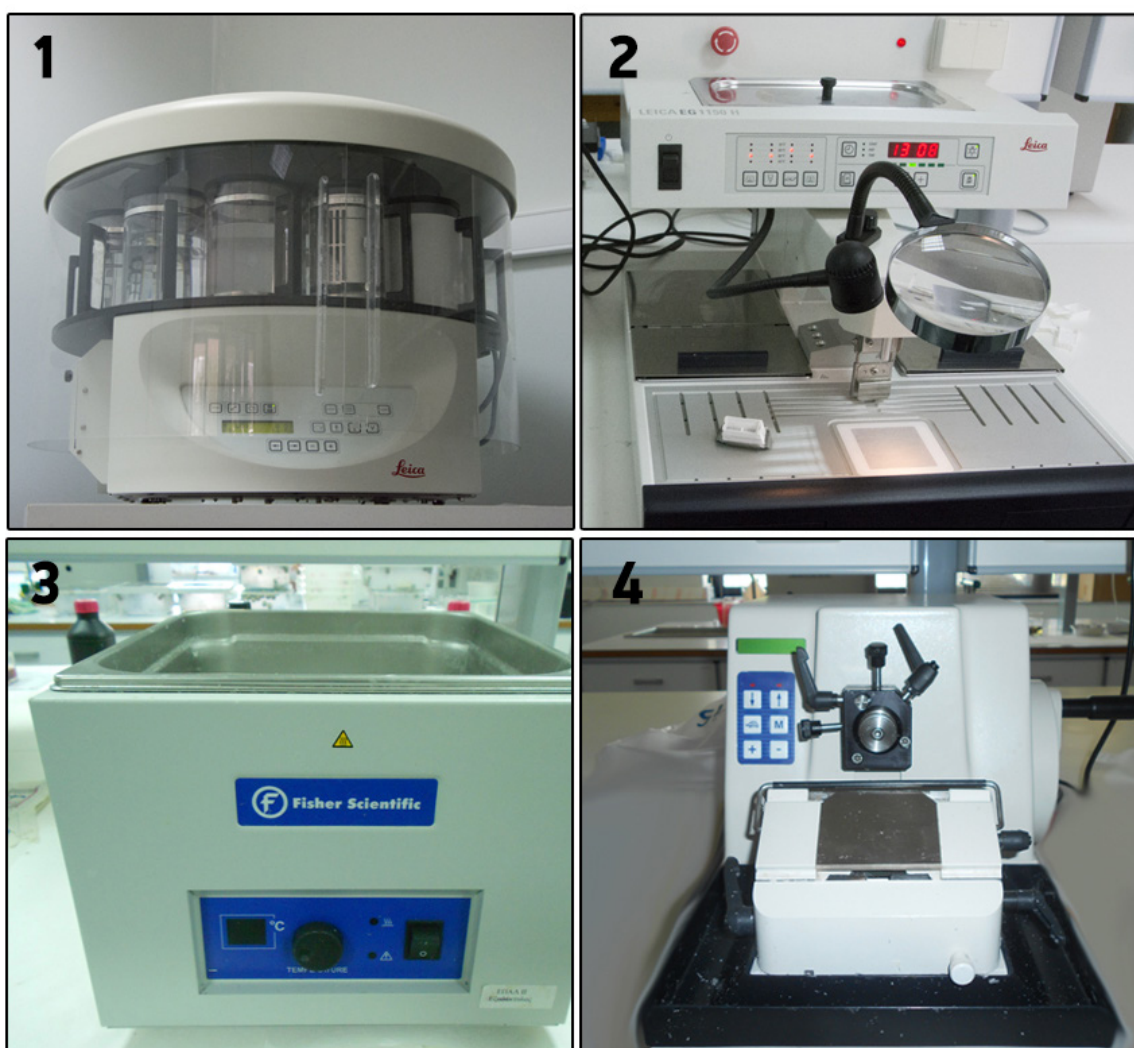
Άλλες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση κυττάρων του αίματος είναι η Giemsa, η Wright, η Leishman. Η Giemsa χρησιμοποιείται συχνά για την απεικόνιση χρωμοσωμάτων και μικροοργανισμών. Οι χρωστικές αυτές είναι μίγματα χρωστικών με βάση το κυανό του μεθυλενίου (βασική χρωστική), την ηωσίνη και χρωστικές της ανιλίνης (αζούρια). Η May Grunwald – Giemsa χρησιμοποιείται, κυρίως, για τα επιχρίσματα αίματος και μυελού των οστών. Περιλαμβάνει ένα μείγμα χρωστικών, όπως μπλε του μεθυλενίου, που βάφει μπλε τα όξινα συστατικά του κυττάρου,

κυανό (azure), που βάφει κόκκινα και μωβ τα βασικά κυτταρικά συστατικά και ηωσίνη, που βάφει πορτοκαλί-κόκκινα τα αλκαλικά συστατικά του κυττάρου. Αυτή η χρώση χαρακτηρίζεται ως πανοπτική, επειδή βάφει όλα τα κυτταρικά συστατικά.

Στις επόμενες ενότητες παρουσιάζονται οι τεχνικές για την παρασκευή και μελέτη ιστολογικών τομών.

2.3 Εξοπλισμός του εργαστηρίου Ιστολογίας

Τα όργανα και τα σκεύη που αποτελούν τον εξοπλισμό τού εργαστηρίου Ιστολογίας (Εικόνα 2.1) του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι η ιστοκινέτα, η συσκευή σκλήνωσης, η παλινδρομική μικροτόμος, το υδατόλουτρο και η θερμαντική πλάκα.



Εικόνα 2.1 Εξοπλισμός του εργαστηρίου Ιστολογίας του Τμήματος: 1: ιστοκινέτα 2: συσκευή σκλήνωσης 3: παλινδρομική μικροτόμος 4: υδατόλουτρο.

2.4 Συνοπτική παρουσίαση της κλασικής ιστολογικής τεχνικής

Η κλασική ιστολογική τεχνική για την παραγωγή μόνιμων ιστολογικών παρασκευασμάτων ζωικών ιστών περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- 1) Λήψη βιολογικού υλικού,
- 2) Μονιμοποίηση,
- 3) Αφυδάτωση, καθαρισμός και εμποτισμός με παραφίνη,
- 4) Έγκλειση σε παραφίνη,
- 5) Κοπή των τομών,
- 6) Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση των τομών,
- 7) Χρώση των τομών,
- 8) Αφυδάτωση και καθαρισμός των τομών,
- 9) Στερεοποίηση των τομών.

2.5 Αναλυτικό Πρωτόκολλο: Buin-Παραφίνη / Η & Ε

2.5.1 Λήψη υλικού (απομόνωση ιστών)

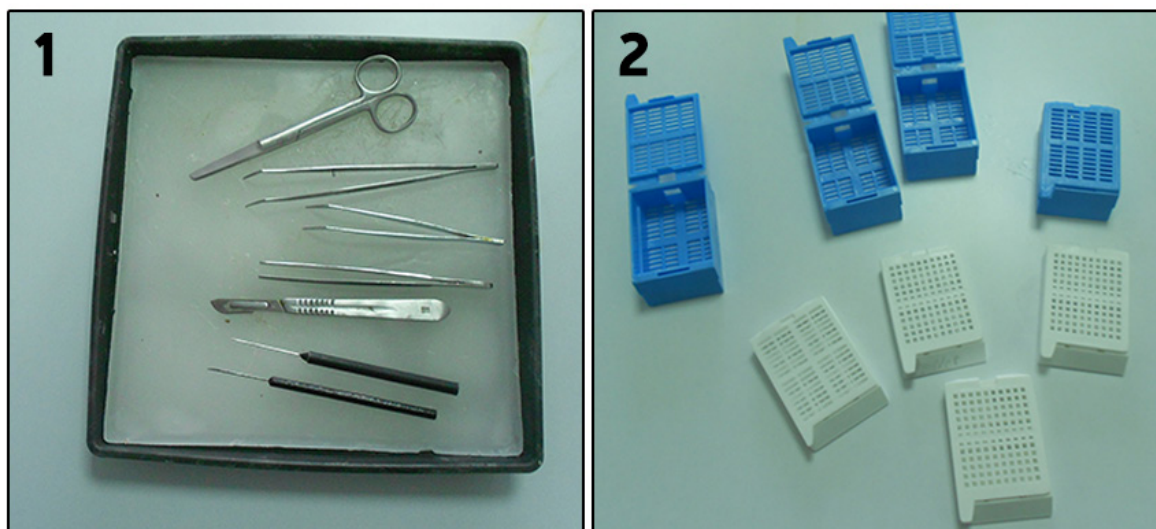
Η λήψη των δειγμάτων των ζωικών οργανισμών που προορίζονται για ιστολογική μελέτη πραγματοποιείται με την απαιτούμενη προσοχή και την κατάλληλη προετοιμασία. Χρησιμοποιούνται όργανα ανατομίας (Εικόνα 2.2) και καταγράφονται όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την κωδικοποίηση του δείγματος.

Κατά την απομόνωση των ιστών, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μονιμοποίησης αλλά και σε όλα τα επόμενα στάδια, πρέπει να διατηρείται και να μεταφέρεται σωστά η αρίθμηση και οι αντίστοιχοι κωδικοί των ζώων από τα οποία προήλθαν.

2.5.2 Μονιμοποίηση

Τα δείγματα μετά τη λήψη και την καταγραφή τους στο εργαστήριο τοποθετούνται σε δοχεία ή δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκι. Τα δοχεία και οι σωλήνες αυτοί περιέχουν το διάλυμα μονιμοποίησης.

Αν τα δείγματα των ιστών είναι μικρά, τοποθετούνται από την αρχή σε κασετίνες (συνήθως διαστάσεων 4,5 cm x 2,8 cm) μιας χρήσεως (Εικόνα 2.2) και όλες μαζί οι κασετίνες σε ένα δοχείο με καπάκι, το οποίο περιέχει το διάλυμα μονιμοποίησης. Το διάλυμα μονιμοποίησης πρέπει να έχει πενταπλάσιο όγκο από αυτόν των ιστών.



Εικόνα 2.2 Εργαλεία και όργανα που χρησιμοποιούνται σε ιστολογικές τεχνικές 1: όργανα ανατομίας 2: κασετίνες μονιμοποίησης

Ενδεικτικά, τα στάδια της διαδικασίας μονιμοποίησης που διαρκεί 48 ώρες είναι τα ακόλουθα:

- Τοποθέτηση των ιστών στο διάλυμα μονιμοποίησης και τοποθέτησή τους σε ψυγείο (θερμοκρασία 4 °C) όπου παραμένουν για 12 ώρες,
- Αντικατάσταση του διαλύματος μονιμοποίησης με νέο διάλυμα όπου παραμένουν για 12 ώρες (θερμοκρασία 4 °C),
- Μεταφορά των ιστών σε αιθανόλη 70 % (έκπλυση) όπου παραμένουν 24 ώρες.

2.5.3 Αφυδάτωση σε Ιστοκινέτα

Οι κασετίνες με τους ιστούς μετά τη μονιμοποίηση τοποθετούνται σε ειδικό εξάρτημα της ιστοκινέτας, το οποίο με τη σειρά του τοποθετείται στην Ιστοκινέτα (Εικόνα 2.1), όπου πραγματοποιούνται διαδοχικά τα παρακάτω στάδια:

- Αφυδάτωση: Για την απομάκρυνση του νερού που υπάρχει στον ιστό γίνονται διαδοχικές εμβαπτίσεις με αλκοόλες αυξανόμενου βαθμού, ώστε να αποφευχθεί η συρρίκνωση του ιστού.
- Καθαρισμός: Η απομάκρυνση της αλκοόλης γίνεται με διαδοχικές πλύσεις με ξυλόλη.
- Εμποτισμός με παραφίνη: Τόσο η αφυδάτωση όσο και ο καθαρισμός πραγματοποιούνται σε συνθήκες δωματίου.

Μετά την προετοιμασία των υλικών και των διαλυμάτων εργασίας ρυθμίζεται το πρόγραμμα στην Ιστοκινέτα. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζεται ένα ενδεικτικό πρόγραμμα λειτουργίας της Ιστοκινέτας διάρκειας 6 ωρών και 45 λεπτών.

Προσοχή:

- Τα διαλύματα εργασίας και η παραφίνη, μετά το πέρας της λειτουργίας του προγράμματος της Ιστοκινέτας διατηρούνται για επόμενες χρήσεις. Εάν δεν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν άμεσα, αποθηκεύονται σε κατάλληλα δοχεία, στην ετικέτα των οποίων πρέπει να αναγράφεται το είδος του διαλύματος εργασίας, η ημερομηνία παρασκευής και η επανάληψη της χρήσης του.
- Πριν από κάθε επόμενη χρήση, τα διαλύματα εργασίας πρέπει να φιλτράρονται.

α/α	ΔΙΑΛΥΜΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΣΤΑΔΙΟ
1	Αλκοόλη 70%	15 min	ΑΦΥΔΑΤΩΣΗ
2	Αλκοόλη 70%	15 min	
3	Αλκοόλη 95%	30 min	
4	Αλκοόλη 95%	30 min	
5	Αλκοόλη 100%	30 min	
6	Αλκοόλη 100%	30 min	
7	Αλκοόλη 100%	30 min	
8	Ξυλόλη	15 min	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ (ΔΙΑΥΓΑΣΗ)
9	Ξυλόλη	15 min	
10	Ξυλόλη	15 min	
11	Παραφίνη I	1 h	ΕΜΠΟΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ (ΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ)
12	Παραφίνη II	2 h	

Πίνακας 2.1 Πρόγραμμα λειτουργίας της ιστοκινέτας για το Πρωτόκολλο Buiν-Παραφίνη / H & E.

2.5.4 Έγκλειση Ιστών σε Παραφίνη

Οι κασετίνες με τους αφυδατωμένους ιστούς τοποθετούνται σε ειδικό δοχείο με υγρή παραφίνη προς αποφυγή πήξης της υπάρχουσας παραφίνης που έχει παραμείνει από την προηγούμενη διαδικασία τού εμποτισμού. Η διαδικασία της έγκλεισης γίνεται σε μηχανήμα σκλήνωσης (Εικόνα 2.1).

Ο ιστός τοποθετείται σε ειδικό καλούπι, το οποίο γεμίζει με υγρή παραφίνη και μεταφέρεται στην ψυχρή πλάκα όπου στερεοποιείται η παραφίνη. Έπειτα αφαιρείται το καλούπι και απομακρύνεται η στερεοποιημένη παραφίνη από τις άκρες του κύβου (block).

Η διαδικασία της έγκλεισης μπορεί να γίνει και χειροκίνητα.

Η έγκλειση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 60 °C, ενώ τα μπλοκάκια παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου (ή στο ψυγείο) μέχρι να παγώσει η παραφίνη. Οι στερεοποιημένοι ιστοί είναι έτοιμοι για να εισαχθούν στη διαδικασία κοπής ιστολογικών τομών.

Προσοχή:

- Σε περίπτωση που, λόγω πήξης, δημιουργούνται κενά, αυτά συμπληρώνονται με υγρή παραφίνη.
- Σε κάθε μπλοκ αναγράφονται (με μολύβι) τα στοιχεία του δείγματος.
- Οι λαβίδες πρέπει να ζεσταίνονται πριν τη χρήση τους, για να μη παγώσει η παραφίνη.

2.5.5 Τεχνική κοπής ιστολογικών τομών

Ο κύβος παραφίνης με τον εγκλεισμένο πλέον ιστό, τοποθετείται και στερεώνεται στον ειδικό υποδοχέα της μικροτόμου (Εικόνα 2.1).

Η λεπίδα της μικροτόμου που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς και ο εργαστηριακός πάγκος, καθαρίζονται προσεκτικά με ξυλόλη.

Η θέση του υποδοχέα ρυθμίζεται έτσι ώστε το μπλοκ της παραφίνης μόλις να έρχεται σε επαφή με τη λεπίδα. Στη συνέχεια, η μικροτόμος ρυθμίζεται στο επιθυμητό πάχος της τομής (συνήθως 6-8 μm) και κατοπίν, ξεκινά το κόψιμο. Συνήθως οι πρώτες τομές απορρίπτονται, διότι τα άκρα του ιστού δεν είναι κατάλληλα για καλές τομές. Μόλις αρχίσει να σχηματίζεται η αλυσίδα από τομές, αυτές απομακρύνονται από το μαχαίρι με ένα λεπτό πινέλο.

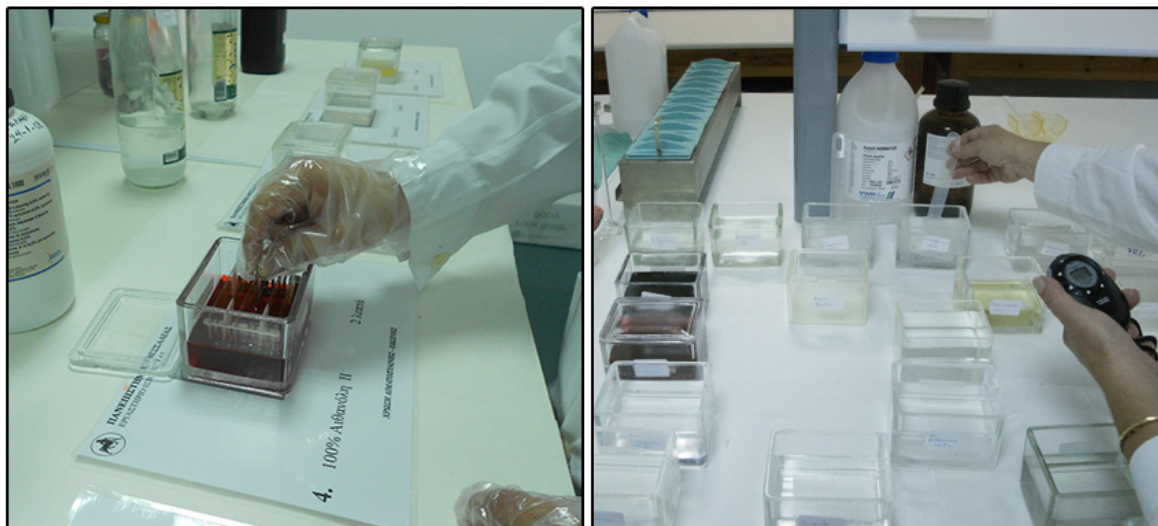
Οι τομές παραφίνης αφού εκπτυχθούν σε υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία 40°C, επικολλώνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα για να επακολουθήσει χρώση. Η επιπεδοποίηση των τομών γίνεται με την τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας με τις τομές, πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα ώστε να εξατμιστεί όλο το νερό. Τέλος, οι τομές μπορούν να τοποθετηθούν σε κλίβανο στους 50°C για 15 λεπτά.

Προσοχή:

- Να γίνεται έλεγχος αν η λεπίδα είναι καλά τοποθετημένη στην υποδοχή της μικροτόμου.
- Αφού τελειώσουν οι τομές, η μικροτόμος πρέπει πάντα να κλειδώνεται για την αποφυγή ατυχημάτων.
- Η λεπίδα δε θα πρέπει να μένει πάνω στη μικροτόμο.
- Βουτάμε τις αντικειμενοφόρους πλάκες μέσα σε ζελατίνη και «ψαρεύουμε» τις τομές, όταν έχουν απλώσει καλά.

2.5.6 Αποπαραφίνωση και χρώση

Η μεταφορά των αντικειμενοφόρων γίνεται με ειδικό δοχείο με ειδικούς υποδοχείς (10 θέσεων) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3 Διαδικασία αποπαραφίνωσης και χρώσης ιστολογικών τομών.

Προσοχή:

- Θα πρέπει να τηρούνται οι χρόνοι του πρωτοκόλλου (Πίνακας 2.2).
- Τα διαλύματα χρώσης που χρησιμοποιούνται κατ' επανάληψη χάνουν τις δυνατότητες χρώσης τους. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να επιμηκυνθεί ο χρόνος χρώσης.
- Πριν από την επόμενη χρήση, τα διαλύματα εργασίας και, ιδιαίτερα, οι χρωστικές πρέπει να διηθούνται.

2.5.7 Επικάλυψη των τομών

Η επικάλυψη των ιστολογικών τομών, που αποτελεί και το τελευταίο στάδιο της ιστολογικής τεχνικής, πραγματοποιείται με κατάλληλο διάφανο υλικό, όπως Βάλσαμο του Καναδά ή άλλη συνθετική ουσία, όπως για παράδειγμα το DPX. Οι ουσίες αυτές έχουν δείκτη διάθλασης παρόμοιο με αυτόν των τομών.

Αμέσως μετά τη χρώση, σε κάθε παρασκεύασμα γίνεται η προσκόλληση της καλυπτρίδας. Κατά τη διαδικασία, απλώνεται βάλσαμο Καναδά με γυάλινη ράβδο πάνω στις τομές των ιστών. Συνήθως χρησιμοποιούνται καλυπτρίδες διαστάσεων 24x50 mm, για να καλύπτουν όλη την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας.

Η επικάλυψη είναι απαραίτητη για να προστατευθεί το παρασκεύασμα και να διατηρηθεί, χωρίς να χάσει την ποιότητά του με την πάροδο του χρόνου.

Προσοχή:

- Στις αντικειμενοφόρους πλάκες η πλευρά της παραφίνης να είναι στραμμένη προς το μέρος του χρήστη, ώστε να μην τοποθετηθεί στην ανάποδη πλευρά το βάλσαμο του Καναδά.
- Κατά την τοποθέτηση της καλυπτρίδας, να υπάρχει μέριμνα να μην παγιδευτούν φυσαλίδες στο παρασκεύασμα.

2.6 Προετοιμασία χημικών αντιδραστηρίων

2.6.1 Διάλυμα μονιμοποίησης Buiin

Η διαδικασία για την ετοιμασία 100 ml διαλύματος μονιμοποίησης Buiin (διάλυμα εργασίας) είναι η ακόλουθη:

- 5 ml Οξικό οξύ
- 15 ml Διάλυμα Φορμαλδεΐδης 37 %
- 80 ml Μητρικό διάλυμα

Προσοχή:

- Το διάλυμα μονιμοποίησης να παρασκευάζεται μόνον όταν είναι απαραίτητο και διατηρείται στους 4 °C.

Το Μητρικό διάλυμα (Solution mere) είναι κεκορεσμένο διάλυμα Πικρικού οξέως (σε πούδρα) με Αιθανόλη 95 % και το χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος μονιμοποίησης (Saturated alcoholic picric acid). Η διαδικασία προετοιμασίας 200 ml μητρικού διαλύματος είναι η ακόλουθη:

- Σε ογκομετρική φιάλη τοποθετούνται 200 ml αλκοόλης 95 % και προστίθεται πικρικό οξύ.
- Για την ανάδευση του διαλύματος, η ογκομετρική φιάλη τοποθετείται πάνω σε μία μαγνητική πλάκα.
- Για τον έλεγχο κορεσμού του διαλύματος, αφήνεται σε ηρεμία για ένα τέταρτο και ελέγχεται αν έχει κατακαθήσει ίζημα. Αν όχι, προστίθεται μικρή ποσότητα πικρικού οξέος και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία.

α/α	Διαλυμα	Διάρκεια σταδίου	Στάδιο
1	Ξυλόλη	2 min	Αποπαραφίνωση
2	Ξυλόλη	2 min	
3	Αιθανόλη 100 %	2 min	Απομάκρυνση Ξυλόλης
4	Αιθανόλη 100 %	2 min	
5	Αιθανόλη 95 %	1 min	Ενυδάτωση
6	Αιθανόλη 95 %	1 min	
7	Νερό βρύσης	15 min	
8	Διάλυμα Αιματοξυλίνης	5 έως 15 min	Χρώση
9	Διαφοροποίηση	3 έως 5 min	
10	Ξέπλυμα σε νερό βρύσης		
11	Αμμωνιούχο νερό	3 έως 5 καταδύσεις	
12	Ξέπλυμα σε νερό βρύσης		
13	Διάλυμα Ηωσίνης	15 sec έως 2 min	
14	Αιθανόλη 95 %	2 min	Αφυδάτωση
15	Αιθανόλη 95 %	2 min	
16	Αιθανόλη 100 %	2 min	
17	Αιθανόλη 100 %	2 min	
18	Ξυλόλη	2 min	Διαύγαση
19	Ξυλόλη	2 min	

Πίνακας 2.2 Πρωτόκολλο αφυδάτωσης και χρώσης Αιματοξυλίνης & Ηωσίνης.

2.6.2 Παρασκευή Bouin Holland

Η διαδικασία για την ετοιμασία 100 ml διαλύματος μονιμοποίησης Bouin Holland (διάλυμα εργασίας) είναι η ακόλουθη:

- Ουδέτερος οξικός χαλκός: 2,5g στα 100ml απεσταγμένο H₂O
- Πικρικό οξύ (ενυδατωμένο 50%): 8g στα 100ml απεσταγμένο H₂O
- Φορμαλδεΰδη 40%: 10ml στα 100ml απεσταγμένο H₂O
- Οξικό οξύ: 1ml στα 100ml απεσταγμένο H₂O

2.6.3 Παρασκευή Αμμωνιούχου Νερού

Η διαδικασία για την ετοιμασία 100 ml διαλύματος Αμμωνιούχου νερού (διάλυμα εργασίας) είναι η ακόλουθη:

- Νερό βρύσης : 100 ml
- Υδροξείδιο του Αμμωνίου 28 %: 2 -3 ml

2.6.4 Παρασκευή διαλύματος Διαφοροποίησης

Η διαδικασία για την ετοιμασία 1000 ml διαλύματος Διαφοροποίησης (όξινη αλκοόλη) είναι η ακόλουθη:

- Αιθανόλη 70 %: 1000 ml
- Πυκνό Υδροχλωρικό οξύ (13 N) : 10 ml

Προσοχή:

- Αν χρησιμοποιήσουμε Αιθανόλη 95 % για να κάνουμε διάλυμα 70 %, θα πρέπει να πάρουμε 736,8 ml Αιθανόλη 95 % και 263,2 ml απεσταγμένο νερό.

2.7 Πρακτικές οδηγίες

Τα αντιδραστήρια ιστολογίας φυλάσσονται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου (18–26 °C) ή σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στην ετικέτα τους. Οι ετικέτες όλων των αντιδραστηρίων φέρουν ημερομηνία λήξης.

Απαραίτητο είναι να τηρούνται οι κανόνες ασφαλείας και να λαμβάνονται οι συνηθισμένες προφυλάξεις που εφαρμόζονται κατά τον χειρισμό αντιδραστηρίων στο εργαστήριο (Πίνακας 2.3). Τα δοχεία των αντιδραστηρίων πρέπει να διατηρούνται καλά σφραγισμένα. Τα αντιδραστήρια επιβάλλεται να φυλάσσονται μακριά από πηγές ανάφλεξης, καθώς πολλά από αυτά είναι εύφλεκτα, ενώ πολλά από τα αντιδραστήρια είναι τοξικά, επιβλαβή ή ερεθιστικά για το δέρμα και τα μάτια (Πίνακας 2.4). Τα απόβλητα, τέλος, πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους κανονισμούς.

Στο τέλος κάθε εργαστηριακής άσκησης ή της εφαρμογής ενός πρωτοκόλλου ιστολογίας δεν απορρίπτεται κανένα από τα υλικά και από τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν. Μαζεύονται όλα στις ειδικές φιάλες και σημειώνεται λεπτομερώς το είδος της ουσίας ή του διαλύματος εργασίας, η ημερομηνία παρασκευής του και το πόσες φορές έχει χρησιμοποιηθεί.

2.8 Οδηγίες για τη μελέτη των ιστολογικών τομών στο οπτικό μικροσκόπιο

Για τη μελέτη κάθε ιστολογικού παρασκευάσματος, είναι απαραίτητο να γνωρίζει ο φοιτητής τις παρακάτω πληροφορίες:

- το όνομα του οργάνου ή του ιστού απ' όπου πάρθηκε το παρασκεύασμα,

ΟΔΗΓΙΕΣ	
1	Να φοράτε πάντα κατάλληλο προστατευτικό ρουχισμό, γάντια και προστασία για τα μάτια και το πρόσωπο.
2	Να εργάζεστε σε χώρους αεριζόμενους και στον απαγωγό, όταν αυτό είναι απαραίτητο.
3	Μην καπνίζετε στους χώρους των εργαστηρίων.
4	Μην καταναλώνετε τρόφιμα στους χώρους των εργαστηρίων.
5	Μην εισπνέετε τις αναθυμιάσεις.
6	Να αποφεύγετε την επαφή των χημικών αντιδραστηρίων με το δέρμα και τα μάτια.
7	Σε περίπτωση επαφής των χημικών αντιδραστηρίων με τα μάτια, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και ζητήστε ιατρική συμβουλή.
8	Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν δεν αισθάνεστε καλά, ζητήστε αμέσως βοήθεια από το προσωπικό του εργαστηρίου και στη συνέχεια ιατρική συμβουλή. Δείξτε την ετικέτα του αντιδραστηρίου, όταν είναι δυνατό.
9	Προσοχή στα αιχμηρά αντικείμενα.
10	Να ακολουθείτε τις οδηγίες για την ενδεδειγμένη συμπεριφορά στους εργαστηριακούς χώρους και να διατηρείτε τον εξοπλισμό και τους πάγκους καθαρούς.

Πίνακας 2.3 Οδηγίες και προφυλάξεις κατά τη διάρκεια της εργασίας στο εργαστήριο Ιστολογίας.

α/α	ΥΛΙΚΑ	ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑ
1.	Αλκοόλη	Πολύ εύφλεκτη Ερεθιστική για τα μάτια, το αναπνευστικό σύστημα και το δέρμα.
2.	Ξυλόλη	Εύφλεκτη, τοξική, ερεθιστική και επιβλαβής για το αναπνευστικό σύστημα και το δέρμα. Κίνδυνος μειωμένης γονιμότητας Κίνδυνος σοβαρής βλάβης στα μάτια
3.	Αιματοξυλίνη	Πολύ εύφλεκτη Ερεθιστική για τα μάτια, το αναπνευστικό σύστημα και το δέρμα. Επιβλαβής σε περίπτωση κατάποσης
4.	Ηωσίνη	Πολύ εύφλεκτη Επιβλαβής, με πιθανό κίνδυνο μη αντιστρέψιμων επιπτώσεων από εισπνοή, επαφή με το δέρμα και κατάποση.
5.	Διάλυμα Διαφοροποίησης	Τοξικό, εύφλεκτο

Πίνακας 2.4 Κατάλογος χημικών αντιδραστηρίων και διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο Ιστολογίας.

- το ζώο από το οποίο παρασκευάστηκε,
- την κατεύθυνση της κοπής και το πάχος της τομής,
- τη μέθοδο στερέωσης και τη χρωστική ή τον συνδυασμό χρωστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν

Οι πληροφορίες αυτές αναγράφονται συνήθως στην ετικέτα του μόνιμου παρασκευάσματος είτε πρόκειται για παρασκευάσματα μελέτης, είτε πολύ περισσότερο για ερευνητικά παρασκευάσματα. Ένα παράδειγμα σωστής ετικέτας ενός ιστολογικού παρασκευάσματος (Εικόνα 2.4) που περιέχει όλα τα παραπάνω στοιχεία είναι το εξής:

(α) Ήπαρ

(β) *Amphiuma* sp (Αμφίβιο)

(γ) Εγκάρσια τομή – 1,5 μm

(δ) Αιματοξυλίνη και Ηωσίνη (H & E)

Στη διάρκεια της μικροσκοπικής παρατήρησης στην αίθουσα μικροσκοπίας (Εικόνα 2.5) πρέπει να προσδιοριστούν οι βασικοί ιστοί που απεικονίζονται σε κάθε τομή και στη συνέχεια να αξιολογηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Η μέθοδος της στερέωσης που χρησιμοποιείται στην παρασκευή των κυττάρων και των ιστών θα καθορίσει τον τύπο και την ποιότητα της διατήρησης των ιστών καθώς και την επακόλουθη επιλογή της χρώσης. Η αναγραφή του πάχους της τομής στα μόνιμα ιστολογικά παρασκευάσματα μας πληροφορεί για το ποια κατά προσέγγιση μεγέθυνση είναι η κατάλληλη για τη μικροσκοπική εξέταση. Όσο λεπτότερη είναι η τομή του ιστού, τόσο μεγαλύτερη είναι η μεγέθυνση. Οι κυτταρολόγοι προτιμούν τομές 1 έως 3 μm, ενώ οι ιστολόγοι μπορούν να χρησιμοποιούν τομές μέχρι 50 μm ή και περισσότερο.



Εικόνα 2.4 Φωτογραφία ιστολογικού παρασκευάσματος που απεικονίζει τομή ήπατος του Ουρόδηλου Αμφιβίου του γένους *Amphiuma*. Στην ετικέτα του εμπορικού παρασκευάσματος αναγράφονται οι απαραίτητες πληροφορίες για την χρώση και το μέγεθος της τομής.



Εικόνα 2.5 Οπτικό μικροσκόπιο με κάμερα υψηλής ανάλυσης από την αίθουσα μικροσκοπίας του εργαστηρίου Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Π.Θ.

Μετά από την προσεκτική ανάγνωση της ετικέτας, το ιστολογικό παρασκευάσμα μπορεί να εξεταστεί με γυμνό μάτι και να σημειωθούν ορισμένα χαρακτηριστικά του, χρήσιμα για την περαιτέρω μελέτη. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν το μέγεθος, το χρώμα, το σχήμα. Εάν η τομή αποτελείται από διάφορα μέρη, μπορεί να σημειωθεί η σχέση τους και οι διαφορές στη χρώση, εάν υπάρχουν. Ακόμη, καλό είναι να γίνεται εξέταση της τομής, για να διαπιστωθεί αν ο ιστός κόπηκε από ένα μεγαλύτερο κομμάτι. Αυτό θα βοηθήσει την επόμενη μελέτη σε μεγαλύτερη μεγέθυνση.

Αφού τοποθετηθεί το ιστολογικό παρασκευάσμα στην τράπεζα του μικροσκοπίου, ξεκινά η μελέτη με μια συστηματική σάρωση της τομής, χρησιμοποιώντας τη χαμηλότερη μεγέθυνση (π.χ. 8× ή 10× προσοφθάλμιος και 4× αντικειμενικός φακός), με στόχο να προσδιοριστούν περαιτέρω και να εντοπιστούν τα συστατικά του ιστού. Η μελέτη συνεχίζεται με χαμηλή μεγέθυνση (10× αντικειμενικός), με ιδιαίτερη προσοχή στις μικρότερες και πιο λεπτές κατασκευαστικές λεπτομέρειες. Στη συνέχεια η συχνή αλλαγή των φακών από τη χαμηλή στην υψηλότερη μεγέθυνση (40× αντικειμενικός) θα διευκολύνει τη μελέτη.

Ο καταδυτικός φακός (100× αντικειμενικός) θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τη μελέτη των κυτταρολογικών και μικροσκοπικών συστατικών των ιστών και συνήθως αυτό γίνεται στο τελικό στάδιο της μελέτης. Το έλαιο πρέπει να χρησιμοποιείται με οικονομία. Εάν λερώσουν οι υπόλοιποι φακοί του μικροσκοπίου, πρέπει να καθαριστούν προσεκτικά μόνο με ένα υψηλής ποιότητας, καθαρό χαρτί φακού. Η χρήση διαλυτών, όπως η ξυλόλη, μπορεί να καταστρέψει έναν πολύ καλό φακό μικροσκοπίου. Σε μεγάλες μεγεθύνσεις μπορεί να δει κανείς συμπληρωματικές λεπτομέρειες, κάνοντας συνεχείς λεπτές ρυθμίσεις τής εστίασης, προκειμένου να απεικονίσει τις δομές πιο επιφανειακά ή πιο βαθιά. Αυτή η μέθοδος της συνεχούς λεπτής ρύθμισης της εστίασης επιτρέπει την ανίχνευση των δομών και των σχέσεών τους σε ολόκληρο το πάχος τού τμήματος του ιστού, παρέχοντας ένα «τριδιάστατο» αποτέλεσμα.

Στη διάρκεια της παρατήρησης, ο φοιτητής μπορεί να κρατά σημειώσεις στο τετράδιό του και να κάνει απλά σχέδια με βάση τα σημαντικά χαρακτηριστικά τού τμήματος του ιστού. Η τεχνική αυτή είναι πολύτιμη, καθώς διασφαλίζει την προσοχή στη λεπτομέρεια στο πλαίσιο της διαδικασίας «μετάφρασης» της οπτικής εικόνας σε ένα σχέδιο, όπου θα απεικονίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά τού τμήματος του ιστού.

Όταν ολοκληρωθεί η μελέτη, η αντικειμενοφόρος πρέπει να καθαρίζεται από τα δακτυλικά απότυπώματα, προσεκτικά με χαρτί. Τα παρασκευάσματα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή, λαμβάνοντάς τα με τη σειρά από την ειδική θήκη τους και επιστρέφοντάς τα καθαρά στην ίδια θέση. Η παρασκευή των μόνιμων ιστολογικών τομών για την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο είναι δαπανηρή και σε ορισμένες περιπτώσεις το βιολογικό υλικό μπορεί να είναι σπάνιο και αναντικατάστατο.

Βιβλιογραφία

Ελληνόγλωσση

Κουσουλάκος Σ. 2007. Εισαγωγή στην αναπτυξιακή βιολογία και ιστολογία Εκδοσεις Παρισιάνου Α.Ε., 482 σελ. ISBN 978-960-394-312-9

Μιχαήλ Γ.Σ. 2010. Ιστολογία Έκδοσεις ΑΦΟΙ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗ. 426 σελ. ISBN139789603430285

Παυλίδης Μ. 2002 Εργαστηριακές ασκήσεις Ζωολογίας Ι, Ιστολογία. Πανεπιστήμιο Κρήτης Ηράκλειο. 44 σελ.

Ξενόγλωσση

Kiernan J.A. 1999. Histological & Histochemical Methods Theory & Practice Third edition. Arnold. pp 477.

Mumford S. Heidel J., Smith C. Morrison J. MacConnell B. Blazer V. 2007. Fish Histology and Histopathology Manual USFWS-NCTC pp 357.

Vergne C. 1998. Comment faire les préparations microscopiques. Diffusion microscopique. AZUR – IMPRIMERIE. Depots legal 4e Trimestre, No 129. pp 94

Ηλεκτρονικές πηγές

Bergman R A., Afifi A.K., Heidger P.M. 1999. Atlas of Microscopic Anatomy - A Functional Approach: Companion to Histology and Neuroanatomy. Second Edition (<http://www.anatomyatlases.org>) (πρόσβαση 30/10/2013).

Yonkos L.T., Fisher D.J., Reimschuessel R. Kane A.S. 2000. Atlas of fathead minnow normal histology. An online publication of the University of Maryland Aquatic Pathobiology Center (<http://aquaticpath.umd.edu/fhm>) (πρόσβαση 28/4/2013).