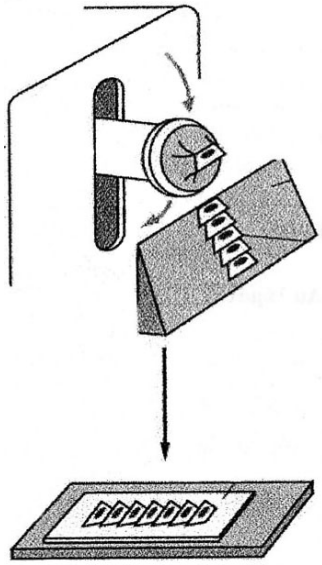


Παρασκευή τομών παραφίνης για ιστοχημική χρώση

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΜΩΝ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ ΓΙΑ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΟ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΕΝΩΣΕΩΝ

Σκοπός της άσκησης : η κατανόηση εργαστηριακών εννοιών όπως αφυδάτωση, ενυδάτωση, παραφινοποίηση και αποπαραφινοποίηση ιστών, καθώς και η εφαρμογή τους στην μονιμοποίηση και έγκλειση ιστών σε παραφίνη και προετοιμασία τομών για ιστοχημικές χρώσεις.

ΓΕΝΙΚΑ

Η **ιστοχημεία** και η **κυτταροχημεία** χαρακτηρίζονται από αρχές και μεθόδους που μας δίνουν τη δυνατότητα με τη βοήθεια του μικροσκοπίου ν'ανιχνεύουμε με χημικό τρόπο και να εντοπίζουμε μέσα στους ιστούς και τα κύτταρα την ύπαρξη ειδικών χημικών ομάδων ή ουσιών (DNA, λιπιδίων, υδατανθράκων κλπ.). Οι πληροφορίες που παίρνουμε από τους ζωντανούς ιστούς είναι περιορισμένος. Τα όρια των κυττάρων όταν είναι ζωντανοί οι ιστοί, δεν ξεχωρίζουν. Οι κυτταρικές σχέσεις μελετώνται καλύτερα σε λεπτές τομές ενώ οι ζωντανοί ιστοί είναι μαλακοί και δεν κόβονται καλά. Πολλά από τα κυτταρικά συστατικά δεν φαίνονται με εξέταση στο μικροσκόπιο, όταν είναι ζωντανά. Αντίθετα διαπιστώνονται σε νεκρά κύτταρα μετά από κατάλληλη επεξεργασία. Η ιστοχημεία δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ζωντανά κύτταρα. Τέλος είναι πιο καλά για τον ερευνητή να έχει μόνιμα παρασκευάσματα για να μελετάει όποτε θέλει.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΜΟΝΙΜΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Η διαδικασία που ακολουθείται για την παρασκευή **μόνιμων παρασκευασμάτων** κυττάρων και ιστών είναι συνοπτικά η παρακάτω: α) **μονιμοποίηση** (fixation), β) **έγκλειση** (embedding), γ) κόψιμο σε **λεπτές τομές** (sectioning), δ) **βάψιμο** (staining) και ε) **καθήλωση** και έγκλειση της της τομής πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα (mounting).

Μονιμοποίηση

Είναι μια χημική διαδικασία που έχει ως κύριο σκοπό την προστασία των ιστών από αυτόλυση και βακτηριακή μόλυνση καθώς και τη σταθεροποίησή τους ώστε να διατηρείται η κυτταρική δομή στα επόμενα στάδια. Για τους λόγους αυτούς πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη θανάτωση του οργανισμού ώστε να αποφευχθούν οι διάφορες αλλοιώσεις.

Ο ιστός που θα μονιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει μικρό μέγεθος (όχι >5 mm) και μάλιστα ο λόγος επιφάνεια/πάχος >>1 και να τοποθετηθεί σε τουλάχιστον 10πλάσιο όγκο μονιμοποιητικού. Τα μονιμοποιητικά είναι διάφοροι οργανικοί διαλύτες και δραστικές οργανικές ή ανόργανες ουσίες. Μερικά από τα πιο κοινά **μονιμοποιητικά** είναι η αιθανόλη, η φορμαλδεΰδη, το οξικό οξύ, το πικρικό οξύ κ.ά. Η φορμαλδεΰδη είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο μονιμοποιητικό στην Ιστοπαθολογία (το 40% v/v διάλυμά της που διατίθεται από το εμπόριο, ονομάζεται φορμαλίνη). Είναι καλό μονιμοποιητικό για τη διατήρηση της γενικής δομής του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα λόγω του πρωτεϊνικού τους περιεχομένου. Οι αλδεΰδες γενικά σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών και με αυτό τον τρόπο διασυνδέουν τις γειτονικές πρωτεΐνες και τις σταθεροποιούν. Η επιλογή του μονιμοποιητικού πάντως εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης και από τη φύση του υλικού. Οι ομοιόμορφοι ιστοί μονιμοποιούνται ταχύτερα από τους σύνθετους. Κανένα όμως μονιμοποιητικό δεν είναι ιδεώδες για όλα τα συστατικά των κυττάρων. Γι αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται μίγματα π.χ. με διάλυμα αιθανόλης-οξικού μονιμοποιείται το κυτταρόπλασμα και η χρωματίνη αντίστοιχα.

Γενικά οι κύριοι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνει κανείς υπόψη του για την **επιλογή** του **μονιμοποιητικού** είναι α) η ταχύτητα διείσδυσής του στους ιστούς, β) η αποφυγή παραμόρφωσής τους λόγω πρόκλησης οσμωτικών κινήσεων (π.χ. συρρίκνωση ή διόγκωση), γ) η δυνατότητα μετατροπής διαλυτών κυτταρικών συστατικών σε αδιάλυτα, ε) η δυνατότητα να επιτρέπουν στα διάφορα κυτταρικά τμήματα να γίνονται επιλεκτικά και ευκρινώς ορατά όταν βαφούν. Η μονιμοποίηση καθιστά τα κύτταρα διαπερατά στις χρωστικές. Συχνά δε, βελτιώνει τη χρώση αυξάνοντας τη συγγένεια κυτταρικών συστατικών προς τα μόρια της χρωστικής. Μερικά μονιμοποιητικά είναι ασταθή. Γι αυτό πρέπει να είναι φρέσκα και να μην ξαναχρησιμοποιούνται. Μετά τη μονιμοποίηση χρειάζεται πολύ καλό ξέπλυμα ώστε να απομακρυνθεί τελείως το μονιμοποιητικό το οποίο μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στις επόμενες διαδικασίες.

Έγκλειση

Οι ιστοί είναι μαλακοί και εύθραυστοι ακόμα και μετά από την στερέωση. Γι αυτό χρειάζεται να εμποτιστούν με κάποιο υλικό που θα τους σκληρύνει ώστε να μπορούν στη συνέχεια να κοπούν σε λεπτές τομές. Τα συνηθισμένα μέσα έγκλεισης για φωτονικό μικροσκόπιο είναι η **παραφίνη** και η **ζελατίνη**. Στην υγρή μορφή τους διεισδύουν στους ιστούς και τους περιβάλλουν. Στη συνέχεια με ψύξη στερεοποιούνται.

Επειδή τα δείγματα των ιστών έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό, αν η έγκλειση γίνει σε παραφίνη, θα πρέπει να γίνει: α) αφυδάτωση του ιστού, β) τοποθέτησή του σε οργανικό διαλύτη (ξυλόλη), γ) τοποθέτησή του σε λειωμένη παραφίνη.

Η **αφυδάτωση** γίνεται ώστε να εισχωρήσει στον ιστό η αδιάλυτη στο νερό παραφίνη. Αυτό επιτυγχάνεται ξεκινώντας από σκέτο νερό και καταλήγοντας σε σκέτο διαλύτη (συνήθως αιθανόλη) με ενδιαμέσως μια σειρά υδατικών διαλυμάτων του διαλύτη, αύξουσας συγκέντρωσης. Η αφυδάτωση πρέπει να γίνεται βάσει χρονοδιαγράμματος, ώστε να αποφεύγεται η παραμόρφωση και η σκλήρυνση του παρασκευάσματος λόγω παρατεταμένης παραμονής στο αφυδατωτικό μέσον, αλλά και η επίσπευση γιατί η μη πλήρης αφυδάτωση καταστρέφει τα δείγματα περισσότερο από κάθε τι άλλο. Η έγκλειση σε ζελατίνη δεν απαιτεί προηγουμένως αφυδάτωση του ιστού γιατί διαλύεται στο νερό και μπορεί εύκολα να διεισδύσει στους ιστούς.

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την αφυδάτωση συνήθως δεν είναι διαλυτές στην παραφίνη. Γι αυτό πρέπει οι ιστοί να εμποτιστούν προηγουμένως με υγρές ουσίες που μπορούν να αναμειχθούν με αυτή. Τέτοιες ουσίες καθιστούν τους ιστούς διαφανείς και αποκαλούνται μέσα διαύγασης. Αποτελούν δε και ένα δείκτη του αν έχει γίνει καλά η αφυδάτωση. Αν δεν είναι πλήρης, μπορεί να δημιουργηθεί ένα γαλακτώδες ίζημα στο υγρό διαύγασης οπότε θα πρέπει να επαναληφθεί η διαδικασία της αφυδάτωσης ξεκινώντας συνήθως από την απόλυτη αιθανόλη. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μέσα διαύγασης είναι υδρογονάνθρακες όπως η ξυλόλη, το τολουόλιο κ.ά. Πολλά από αυτά τα υγρά μέσα είναι πτητικά και σκληραίνουν τους ιστούς γρήγορα, είναι δε επιβλαβή για την υγεία. Υπάρχουν και έλαια όπως κεδρέλαιο και γαρυφαλέλαιο τα οποία είναι ασφαλέστερα αλλά δρουν αργά.

Η **έγκλειση** σε παραφίνη επιτυγχάνεται με διαδοχική εμβάπτιση σε μια σειρά μιγμάτων μέσου διαύγασης - μέσου έγκλεισης (με αύξουσα συγκέντρωση του μέσου διαύγασης) σε θερμοκρασία μεγαλύτερη της θερμοκρασίας τήξης της παραφίνης. (Στο εμπόριο υπάρχουν παραφίνες με διαφορετικό σημείο τήξης 58-60^{0}C για σκληρούς ιστούς που θα κοπούν σε λεπτές τομές και σε 52^{0}C-56^{0}C για μαλακούς και πιο παχιές τομές). Μετά την τέλεια διαπότιση του ιστού με υγρή παραφίνη φτιάχνεται το μπλοκ παραφίνης σε καλούπια (εικ. 2).

Κατά τη διάρκεια της στερεοποίησης πρέπει το δείγμα να προσανατολίζεται προσεκτικά ώστε να είναι γνωστό σε τι επίπεδο γίνονται οι τομές.

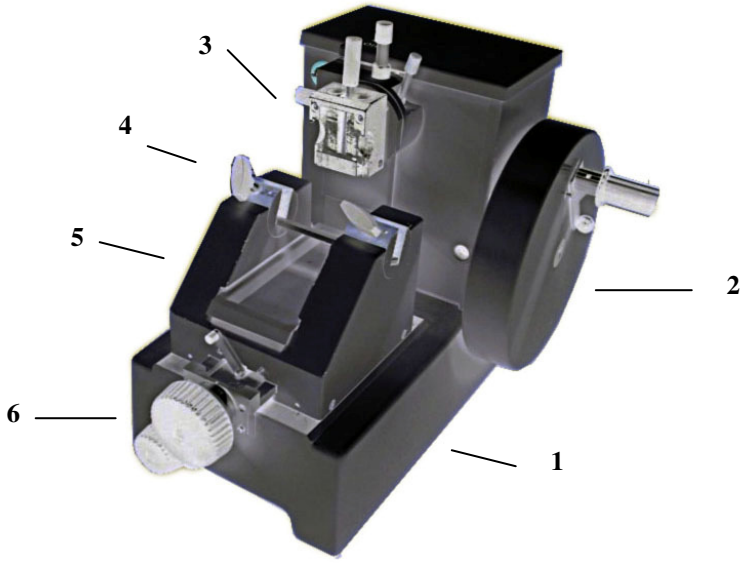
Κόψιμο τομών

Τα δείγματα των ιστών είναι πολύ παχιά για να μπορούν τα κύτταρά τους να εξεταστούν κατευθείαν στο μικροσκόπιο και να αποκαλύψουν λεπτομέρειες της δομής τους. Γι αυτό πρέπει να κοπούν σε λεπτές τομές (συνήθως πάχους 1-10 μm) με ένα μικροτόμο. Ο **μικροτόμος** (εικ.1) είναι ένα όργανο που έχει ως κύρια μέρη το μαχαίρι που κόβει τις τομές, τη θέση που τοποθετείται το μπλοκ με το δείγμα και το μηχανισμό που φέρνει το μπλοκ προς το μαχαίρι.

Μια άλλη μέθοδος για κόψιμο του δείγματος σε λεπτές τομές είναι σε **κρυοστάτη**, έναν ειδικό μικροτόμο που διατηρείται σε ψυχρό θάλαμο. Επειδή οι προαναφερθείσες διαδικασίες της στερέωσης και έγκλεισης μπορεί να αλλοιώσουν τη δομή των κυττάρων ή τα συστατικά τους μόρια (απενεργοποίηση ενζύμων, απομάκρυνση λιπιδίων) με μη αρεστό τρόπο, μπορούν να αντικατασταθούν με γρήγορη ψύξη (με ξηρό πάγο ή μίγματα αιθανόλης, ισοπεντάνιο κ.ά.) και ο παγωμένος ιστός να κοπεί κατευθείαν στον κρυοστάτη. Με αυτό τον τρόπο οι δομές των μορίων π.χ. πρωτεϊνών διατηρούνται συχνά όμως καταστρέφεται η δομή του κυττάρου από παγοκρυστάλλους.

Τόσο η παραφίνη όσο και η ζελατίνη ως μέσα έγκλεισης έχουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους. Η **παραφίνη** χρησιμοποιείται περισσότερο γιατί με αυτή κόβονται λεπτότερες και ομοιόμορφες τομές που διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Έχει όμως και τα μειονεκτήματά της καθώς οι διαδικασίες που ακολουθούνται για την έγκλειση του ιστού σε αυτή μπορεί να συρρικνώσουν τον ιστό, να αδρανοποιήσουν ορισμένα ένζυμα και να διώξουν τα λιπίδια. Η **ζελατίνη** δεν είναι πολύ σκληρή· για να γίνουν τομές ο ιστός προηγουμένως στερεώνεται σε φορμαλδεΰδη και αφήνεται στο ψυγείο να παγώσει. Οι τομές όμως είναι παχύτερες από ότι σε παραφίνη. Επίσης επειδή η ζελατίνη δε μπορεί να απομακρυνθεί από τον ιστό η έγκλειση σε αυτή παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι μερικές χρωστικές μαζί με τον ιστό βάφουν κι αυτή.

Καλές τομές θα επιτύχουμε μόνο όταν χρησιμοποιήσουμε με το μικροτόμο αρκετές φορές. Στην εικόνα 1 απεικονίζεται ένας μικροτόμος σαν αυτόν που θα χρησιμοποιήσουμε στο εργαστήριο.



Εικόνα 1. *Ένας τυπικός μικροτόμος.*

1. Βάση	*4. Υποδοχέας στήριξης μαχαιρού*
2. Κοχλίας προώθησης	*5. Κινούμενο μέρος*
3. Υποδοχέας παραφίνης	*6. Μοχλός προώθησης*

Τα κύρια μέρη σ' ένα μικροτόμο είναι το μαχαίρι που κόβει τις τομές, η θέση που τοποθετείται το μπλοκ και ο μηχανισμός που φέρνει το μπλοκ προς το μαχαίρι.

Χρώση

Σκοπός της χρώσης είναι:

α) η αύξηση της **αντίθεσης** ώστε να εντοπιστούν κύτταρα και ιστοί και να παρατηρηθεί η μορφολογία τους. Τα περισσότερα κύτταρα είναι διάφανα. Δεν περιέχουν φυσικές χρωστικές όπως χλωροφύλλη, αιμοσφαιρίνη ώστε να είναι δυνατή η διάκριση ανάμεσα σε αυτά και το περιβάλλον τους. Γι αυτό ένας τρόπος αύξησης της αντίθεσης είναι η χρήση χρωστικών.

β) η **ανίχνευση** συγκεκριμένων χημικών ομάδων και ενώσεων σε κυττάρα και ιστούς.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της χρωστικής καθορίζουν αν αυτή θα προσροφηθεί επιλεκτικά σε συγκεκριμένες δομές ή αν θα διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Πολλές όμως χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου δρουν βάσει φορτίου και διακρίνονται σε όξινες και βασικές. Επειδή οι περισσότερες χρωστικές δρουν σε υδατικά διαλύματα, αν οι τομές έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη πρέπει πριν τη χρώση να ενυδατωθούν αφού προηγουμένως απομακρυνθεί η παραφίνη με ξυλόλη.

Η ενυδάτωση των τομών γίνεται με το πέρασμά τους από υδατικά διαλύματα αιθανόλης μειούμενης συγκέντρωσης και τελικά από νερό.

Η πιο κατάλληλη χρώση για τομές ζωικών ιστών που χρησιμοποιείται ευρέως και για ιστοπαθολογικά παρασκευάσματα είναι η διπλή χρώση αιματοξυλίνης-εωζίνης. Η αιματοξυλίνη ως βασική χρωστική βάφει τον πυρήνα μπλε ενώ η εωζίνη ως όξινη χρωστική βάφει το κυτταρόπλασμα ροζ. Η αιματοξυλίνη βάφει επίσης και άλλες όξινες δομές, όπως περιοχές του κυτταροπλάσματος πλούσιες σε RNA. Οι όξινες χρωστικές πάλι όπως η εωζίνη τείνουν να βάφουν όλα τα συστατικά των ιστών ιδίως σε χαμηλό pH και γι αυτό χρησιμοποιούνται για να βάφουν το φόντο με διαφορετικό χρώμα (counterstains) από εκείνο που βάφει η χρωστική που έχει επιλεγεί για τις δομές που μας ενδιαφέρουν.

Επικάλυψη τομών

Το τελευταίο βήμα της ετοιμασίας ενός μόνιμου παρασκευάσματος είναι η **επικάλυψη** των τομών με κατάλληλο διάφανο υλικό το οποίο στη συνέχεια θα σκληρύνει. Η επικάλυψη είναι απαραίτητη για να προστατευθεί το παρασκεύασμα και να διατηρηθεί χωρίς να χάσει την ποιότητά του με το χρόνο. Τα σύγχρονα υλικά επικάλυψης είναι συνθετικές ρητίνες ή πλαστικά (DPX, Gelvatol, Eukitt, Mowiol κ.ά.) διαλυμένα σε οργανικό διαλύτη. Είναι κολλώδεις ουσίες ώστε η καλυπτρίδα να παραμείνει μόνιμα στη θέση της πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Υπερέχουν έναντι των φυσικών ρητινών (βάλσαμο Καναδά) γιατί παραμένουν διαφανή με το χρόνο, σκληραίνουν γρήγορα, είναι χημικά αδρανή και διατίθενται σε ένα μεγάλο εύρος δεικτών διάθλασης (ένα καλό μέσον επικάλυψης πρέπει να έχει παρόμοιο δείκτη διάθλασης με τον ιστό που επικαλύπτει). Για τα περισσότερα υλικά επικάλυψης απαιτείται η απομάκρυνση όλου του νερού από την τομή. Γι αυτό μετά τη χρώση μεταφέρουμε τις τομές σε αύξουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης μέχρι 100% αιθανόλης. Για συστατικά όμως ιστών που είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες χρησιμοποιούνται υδατικά μέσα επικάλυψης που βασίζονται σε ζελατίνη ή γλυκερόλη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

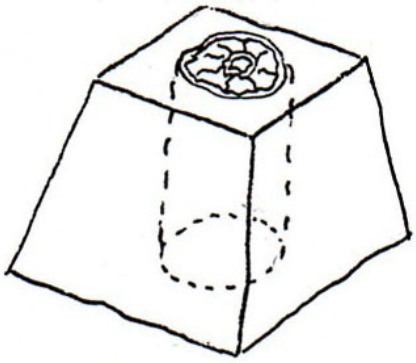
ΥΛΙΚΑ

Θερμαντική πλάκα
Μικροσκόπιο
Μικροτόμος
Πινέλο
Ξυριστικές λεπίδες
Αντικειμενοφόροι επικαλυμένοι με πολυ-λυσίνη
Σιφώνια 1ml
Μόνιμα παρασκευάσματα ιστών

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

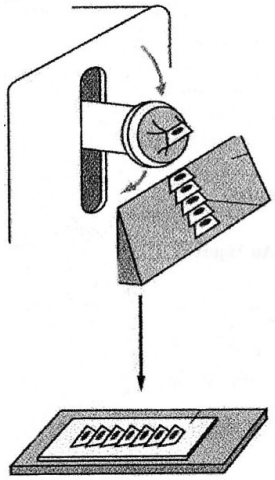
Οι ιστοί ποντικού που θα κόψετε στο μικροτόμο έχουν εγκλειστεί σε μπλοκ παραφίνης. Με τη βοήθεια μιας ξυριστικής λεπίδας κόψετε το μπλοκ παραφίνης έτσι ώστε να πάρει τη μορφή που δείχνεται στην εικόνα 2. Η κάτω πλευρά είναι μεγαλύτερη από την πάνω και παράλληλη προς αυτή. Επίσης προσέξτε ώστε το πάχος της παραφίνης γύρω από τον ιστό να μην είναι πάνω από 2 cm.

1. Τοποθετείστε και στερεώστε το μπλοκ στον ειδικό υποδοχέα του μικροτόμου. Για να γίνει αυτό περάστε με ένα λεπτό στρώμα λειωμένης παραφίνης την πάνω επιφάνεια του υποδοχέα, ενώ ταυτόχρονα ζεσταίνετε μία σπάτουλα και πάνω της τοποθετείστε το μπλοκ οπότε λειώνει η επιφάνεια του μπλοκ που έρχεται σε επαφή με τη σπάτουλα. Σπάτουλα και μπλοκ τοποθετούνται πάνω στον υποδοχέα. Σιγά-σιγά τραβήξτε τη σπάτουλα οπότε έρχεται σε επαφή το μπλοκ με τη λειωμένη παραφίνη της πάνω επιφάνειας του υποδοχέα. Στη θέση αυτή κρατείστε το μπλοκ μέχρι να στερεοποιηθεί η παραφίνη. Ενισχύστε το σημείο επαφής προσθέτοντας λίγη ζεστή παραφίνη.



Εικόνα 2. *Μπλοκ παραφίνης με κομμάτι ιστού.*

2. Με τη βοήθεια ξυριστικής λεπίδας κόψτε τομές στην πάνω επιφάνεια του μπλοκ παράλληλες προς την ακμή του μαχαιριού, μέχρι να φανεί ο ιστός.
3. Τοποθετείστε τον υποδοχέα στο μικροτόμο και κοιτάξτε αν το μαχαίρι είναι τοποθετημένο καλά στην υποδοχή του. Ρυθμίστε τη θέση του υποδοχέα έτσι ώστε το μπλοκ της παραφίνης μόλις να έρχεται σε επαφή με το μαχαίρι.



Εικόνα 3. *Τοποθέτηση του μπλοκ πάνω στον υποδοχέα. Τα βέλη δείχνουν την κίνηση της κεφαλής.*

5. Ρυθμίστε το μικροτόμο στο πάχος της τομής που θέλετε και αρχίστε το κόψιμο. Συνήθως πετάμε τις πρώτες τομές γιατί τα άκρα του ιστού δεν είναι κατάλληλα για καλές τομές. Συνεχίστε το κόψιμο σχηματίζοντας αλυσίδες από τομές.

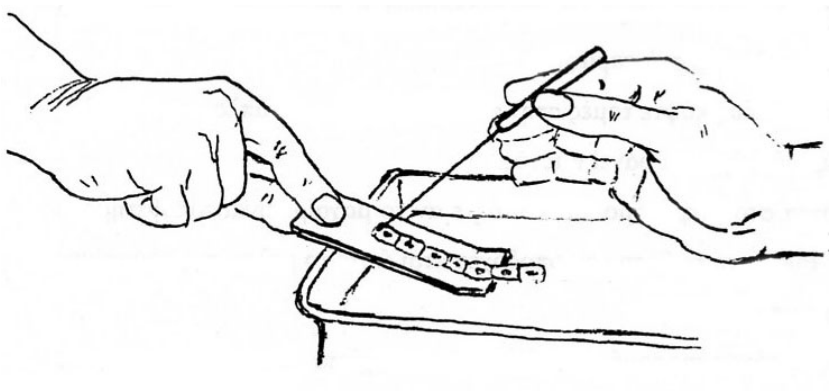
Μόλις αρχίσει να σχηματίζεται η αλυσίδα από τις τομές, τις απομακρύνετε από το μαχαίρι με ένα λεπτό πινέλο και συνεχίζετε το κόψιμο.

6. Όταν κόψτε αρκετές τομές, τις μεταφέρετε πάνω σε ένα καθαρό κομμάτι χαρτί και τις χωρίζετε σε τμήματα ανάλογα με τον αριθμό των τομών που θέλετε να τοποθετήσετε σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.

7. Αλείφετε την επιφάνεια των αντικειμενοφόρων με το διάλυμα επίστρωσης. Για κάθε αντικειμενοφόρο χρησιμοποιείστε 10 σταγόνες από το στοκ διάλυμα σε 0,5ml H_2O.

8. Τοποθετείστε τις τομές πάνω στην ειδικά επεξεργασμένη επιφάνεια της αντικειμενοφόρου (εικ. 4).

9. Η επιπεδοποίηση των τομών γίνεται με τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου με τις τομές, πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα. Η θερμοκρασία της πλάκας πρέπει να είναι μικρότερη από τη θερμοκρασία που λειώνει η παραφίνη. Μετά από λίγο οι τομές επιπεδοποιούνται. Με προσοχή απομακρύνετε την περίσσεια του διαλύματος που έχετε επιστρώσει την πλάκα. Στην θέση αυτή αφήστε τις αντικειμενοφόρους για 2-3 ώρες.



Εικόνα 4. *Τοποθέτηση των τομών στην αντικειμενοφόρο.*