



- Home
- Histologie
- Materialen
- Preparaten
- Fotogalerij
- Downloads
- Links
- Sitemap
- Contact

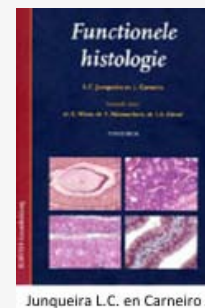
Botvorming in diverse histologische kleuringen

Download deze pagina als .pdf , klik [hier](#)

Bronvermelding:

1 Theorie: Junqueira L.C. en Carneiro J. (2004, tiende druk), *Functionele histologie*, Maarssen. Uitgeverij Elsevier. Hoofdstuk 8, pag. 161-170, 'Botweefsel', ISBN: 978-9035228627.

2 Wikipedia, de vrije encyclopedie, <http://nl.wikipedia.org/wiki/Hoofdpagina>



Doel,

Botvorming of [ossificatie](#)² zichtbaar maken door middel van verschillende histologische kleuringen.

Inleiding¹

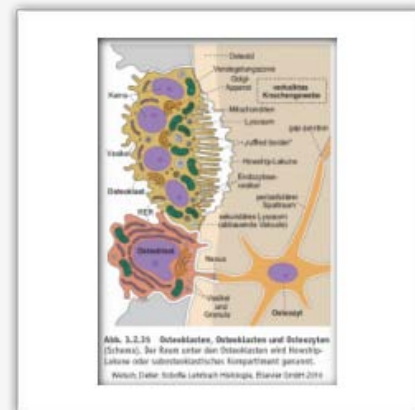
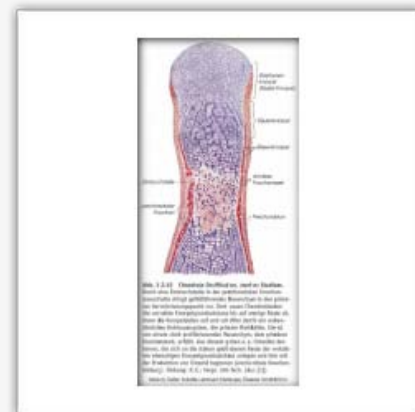
Bot kan op twee manieren ontstaan:

1. Endesmaal, hierbij wordt botweefsel direct vanuit het bindweefsel gevormd; de botafetting gebeurt hierbij in de vorm van een band (desmos).
2. Enchondraal, hierbij wordt botweefsel indirect gevormd doordat [kraakbeen](#)² (chondros) vervangen wordt door bot.

In beide gevallen wordt eerst primair (gevlochten of plexiform) bot gevormd, dat spoedig vervangen wordt door secundair (lamellair) bot, dat macroscopisch een compact of spongieus uiterlijk kan hebben. Gedurende de botgroei komen er voortdurend gebieden van primair bot, botafbraak en secundair bot naast elkaar voor. Dit samengaan van afbraak en aanmaak (remodellering) gaat ook in het volwassen lichaam steeds door, zij het in een veel lager tempo.

Bot is samengesteld uit cellen en intercellulair materiaal dat verkalkt is, de bot- of beenmatrix. Drie typen cellen zijn te onderscheiden:

1. Osteoblasten (botvormende cellen), die de organische componenten van de botmatrix produceren. Osteoblasten ontstaan uit osteoprogenitorcellen, die voorkomen in [endost](#)² en [periost](#)². Osteoblasten [synthetiseren](#)² de organische bestanddelen van de botmatrix en produceren dus collageen type I, [proteoglycanen](#)² en [glycoproteïnen](#)². Osteoblasten liggen in aaneengesloten rijen, de osteoblastenzoom, tegen het oppervlak van het bot aan;
2. Osteocyten (volwassen botcellen) die door rijping van osteoblasten ontstaan, liggen in holten (lacunae) van de botmatrix. Vanuit deze holten lopen in verschillende richtingen canaliculi door het bot, waarin zich de uitlopers van osteocyten bevinden. Zij maken contact met elkaar door middel van [gap junctions](#)², waardoor ionen en kleine moleculen uitgewisseld kunnen worden;
3. Osteoclasten (botafbrekende cellen); dit zijn grote multinucleaire (tot vijftig kernen) cellen die bot kunnen afbreken. Osteoclasten zijn vrij beweeglijke



cellen en liggen als langgerekte cellen tegen de botrand, soms in een uitholling die ontstaan doordat zij matrix wegvreten: de lacune van Howship.



Materialen en methoden

Om de aankleuring van botvormend weefsel en de verschillen in kleuringen goed te kunnen waarnemen is ervoor gekozen om coupes te snijden van gelijksoortig weefsel welke op gelijke wijze gefixeerd is. Voor dit doel zijn vijf dagen oude muizen gefixeerd in Bouinse vloeistof. Om de fixatievloeistof makkelijker in het weefsel te laten binnendringen zijn de extremiteiten verwijderd en kleine incisies in de huid gemaakt. Weefsel heeft ongeveer twee maanden in Bouin gelegen waarna de dehydratie is begonnen in ethanol 70%. Het gebruikelijke uitspoelen van het fixatief in water heeft niet plaatsgevonden om te voorkomen dat weefsel teveel gaat zwellen. Verdere ethanolstappen waren 85%, 95% en 100% met een duur van 48 uur per stap. Via xyleen is daarna de overstap naar paraplast gemaakt. Om zeker te zijn dat alle xyleen vervangen werd door paraplast zijn drie vloeibare paraplastbaden gebruikt.



Weefsel is daarna gesneden op een A&O 820 rotatiemicrotoom met Leica 818 hoogprofiel microtoommessen. Na droging werd de paraffine via 2 xyleenbaden verwijderd en de coupes gehydrateerd in een ethanolreeks van 100%, 95%, 85%, 70% en 50%. Kleuringen welke zijn uitgevoerd zijn:

- Haematoxyline/Eosine;
- PTAH (Fosforwolframhaematoxyline);
- Van Gieson;
- Volgens Mallory uit 1900;
- AZAN volgens Heidenhain;
- Volgens Masson-Goldner.

Kleurprotocollen worden hierna genoemd. Na droging van de hars werden opnamen van de coupes gemaakt met een Moticam 2300 digitale microscoopcamera gemonteerd op een Leitz Orthoplan microscoop.

Kleurprotocollen van de toegepaste kleuringen

Haematoxyline/eosine	
Paraffinecoupes via xylol en dalende alcoholreeks in water brengen	stappen van 4 min
Kernkleuring met Haematoxyline (b.v. volgens Ehrlich, Gill enz)	4-5 min

Afspoelen AD (kort afspoelen is voldoende)	
Blauwen in leidingwater	10 min
Spoelen AD	
Eosine 1% (kort voor kleuren verdunnen 1:4 + enkele druppels ijsazijn 2%)	8 min
Spoelen AD	
Ethanol 70% (totdat coupe op juiste kleur is)	≈ 30-60 sec
Ethanol 96%	2 min
Isopropanol 100% 2x	4 min
Xylol 1	4 min
Xylol 2	4 min
Insluiten in b.v. Depex	

PTAH (Fosforwolframhaematoxyline)	
Paraffinecoupes via xylol en dalende alcoholreeks in water brengen	stappen van 4 min
Oxideren in kaliumpermanganaat 0,25%	10 min
Spoelen AD	
Oxaalzuur 5% (mangaandioxide verwijderen)	10 min
Spoelen AD	
Fosforwolframhaematoxyline	16 uur
Ethanol 96% (dus niet eerst met AD spoelen)	≈ 1 min
Ethanol 96 %	1 min
Isopropanol 100% 2x	4 min
Xylol 1	4 min
Xylol 2	4 min
Insluiten in b.v. Depex	

Fosforwolframhaematoxyline:

- 1g haematoxyline oplossen onder verwarmen in 50ml AD;
- 20g fosforwolframzuur oplossen in 50ml AD;
- Beide oplossingen mengen en enkele weken laten rijpen (eventueel kunstmatig rijpen door toevoeging van 0,177g kaliumpermanganaat).

Van Gieson (gemodificeerd)	
Paraffinecoupes via xylol en dalende alcoholreeks in water brengen	stappen van 4 min
Kernkleuring met IJzerhaematoxyline (b.v. Weigert)	4 min
Spoelen AD	
Blauwen in leidingwater	10 min

Spoelen AD	
Kleuroplossing volgens van Gieson aanbrengen	7 min
Spoelen AD	
Ethanol 96% (meerdere malen spoelen met schone ethanol, zie *)	≈ 1 min
Isopropanol 100% 2x	4 min
Xylol 1	4 min
Xylol 2	4 min
Insluiten in b.v. Depex	

Gemodificeerde 'van Gieson' kleuroplossing:

- 60ml verzadigde waterige picrinezuur-oplossing (1,5g picrinezuur overgieten met 500ml heet water en goed schudden. Oplossing is ongeveer 1,2%);
- 5ml waterige thiazine-rood oplossing van 1% toevoegen en mengen.

De originele 'van Gieson' oplossing is vervaardigd met zure fuchsine maar deze is onstabiel met basen en zuren waardoor de kleuring snel uitbleekt. Thiazine rood is beter bestendig tegen basen en zuren.

*Het spoelen in meerdere stappen met ethanol 96% heeft dan ook als doel om alle picrinezuur te verwijderen.

In principe kan ook met andere haematoxyline worden gekleurd echter is ijzerhaematoxyline beter bestand tegen het zure milieu van de 'van Gieson' kleuroplossing.

Volgens Mallory uit 1900	
Paraffinecoupes via xylol en dalende alcoholreeks in water brengen	stappen van 4 min
Kernkleuring met Fuchsine (zuur) 0,1%	6 min
Spoelen AD	
Fixeren in Fosformolybdeenzuur 2%	7 min
Spoelen AD	
Kleuroplossing volgens Mallory	7 min
Spoelen AD	
Differentiëren in Ethanol 96%	≈ 10-30 sec
Isopropanol 100% 2x	4 min
Xylol 1	4 min
Xylol 2	4 min
Insluiten in b.v. Depex	

Kleurstof volgens Mallory:

- 0.5g Anilineblauw;
- 2g Orange G;
- 2g Oxaalzuur;
- In 100ml Aqua dest. koken en na afkoelen filtreren.

Deze variant uit 1900 gebruikt oxaalzuur. In 1936 werd de kleurstof bereid met fosforwolframaamzuur. Dat recept behoeft niet gekookt te worden maar slechts verwarmd.

AZAN volgens Heidenhain	
Paraffinecoupes via xylol en dalende alcoholreeks in water brengen	stappen van 4 min
Kernkleuring met azokarmijn*	90 min
Spoelen met aniline ethanol*	3 min
IJsazijn ethanol*	1 min
Fixeren in fosformolybdeenzuur 5%*	90 min
Spoelen AD	
Anilineblauw-Orange G-IJsazijn*	120 min
Spoelen AD	
Differentiëren in ethanol 96%	≈ 60 sec
Isopropanol 100% 2x	4 min
Xylol 1	4 min
Xylol 2	4 min
Insluiten in b.v. Depex	

Azokarmijn:

- 0,1g azokarmijn-G kort koken in 100ml AD;
 - Laten koelen en filtreren;
 - 1ml ijsazijn (100%) toevoegen;
- Bij gebruik van azokarmijn-B moet 0,25 tot 1g gebruikt worden. Ook hier 1ml ijsazijn toevoegen.

Aniline ethanol:

- 100ml ethanol (96%);
- 0,1ml aniline toevoegen.

IJsazijn ethanol:

- 100ml ethanol (96%);
- 1ml ijsazijn (100%) toevoegen.

Fosformolybdeenzuur:

- 5g Fosformolybdeenzuur oplossen in 100ml AD.

Anilineblauw-Orange G-IJsazijn:

- 0,5g aniline blauw + 2g orange G oplossen in 100ml AD;
- 8ml ijsazijn (100%) toevoegen;
- Kort koken en na afkoelen filtreren.

Volgens Masson-Goldner

Paraffinecoupes via xylol en dalende alcoholreeks in water brengen	stappen van 4 min
Kernkleuring met ijzerhaematoxyline (Weigert)	3 min (niet overkleuren)
Spoelen AD	

Blauwen in leidingwater	10 min
Spoelen AD	
Azophloxine-ijsazijn*	5 min
Spoelen in ijsazijn 1%	
Fosformolybdeenzuur-orange G*	3 min
Spoelen in ijsazijn 1%	
Lichtgroen SF-ijsazijn*	8 min
Spoelen in ijsazijn 1%	5 min
Differentiëren in Ethanol 96% (Lichtgroen spoelt snel af)	≈ 5 sec
Isopropanol 100% 2x (stopt onmiddellijk het differentiëren)	4 min
Xylol 1	4 min
Xylol 2	4 min
Insluiten in b.v. Depex	

Azophloxine-ijsazijn:

- 0,5g azophloxine oplossen in 100ml AD;
- 0,2ml ijsazijn toevoegen.

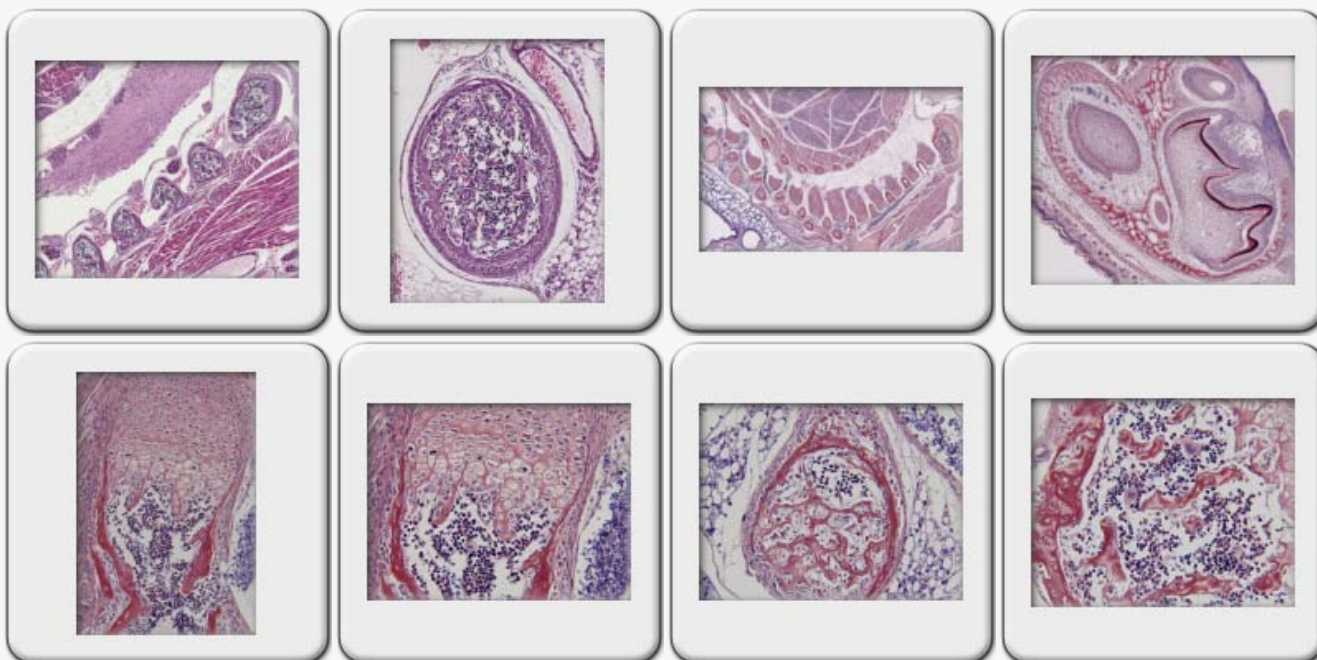
Fosformolybdeenzuur-orange G:

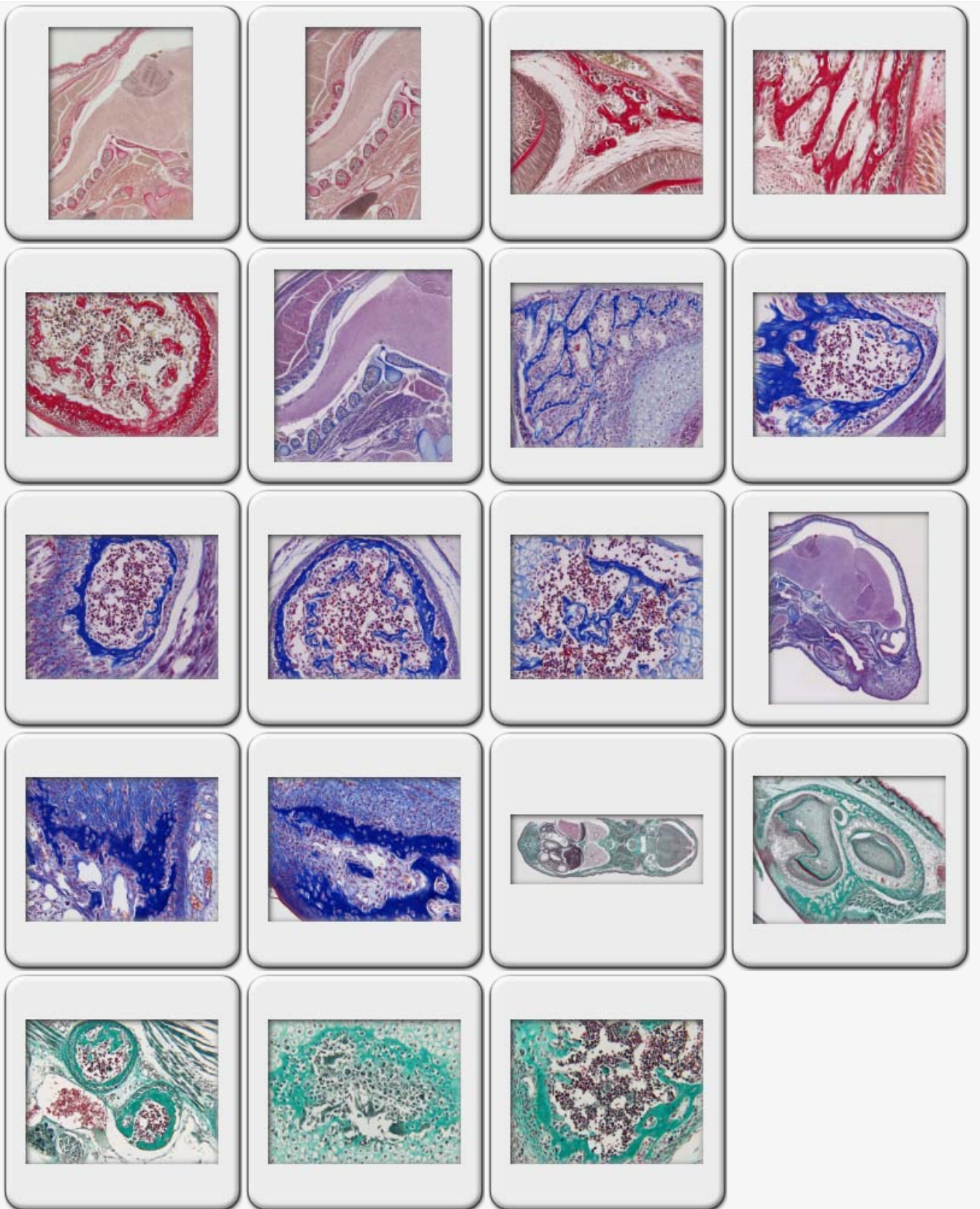
- 3g fosformolybdeenzuur + 2g orange G oplossen in 100ml AD.
- In plaats van fosformolybdeenzuur kan ook fosforwolframzuur gebruikt worden.

Lichtgroen SF-ijsazijn:

- 0,2g lichtgroen SF oplossen in 100ml AD;
- 0,2ml ijsazijn (100%) toevoegen.

Resultaten





[Top](#)