



De wereld onder de microscoop

[Home](#)
[Histologie](#)
[Materialen](#)
[Preparaten](#)
[Fotogaleri](#)
[Downloads](#)
[Links](#)
[Sitemap](#)
[Contact](#)

Weefsel uitnemen en fixeren

Inleiding

In tegenstelling tot plantenweefsel is het snijden van dierlijk weefsel veel lastiger. Dierlijke weefsels laten zich niet zo eenvoudig snijden. Het materiaal is te week en vervormt gemakkelijk. Bovendien mogen coupes (plakjes) ten hoogste 10 μm (1 μm = 1/1000 mm), maar liever nog minder, dik zijn willen ze geschikt zijn voor bestudering. Zoals plantenweefsel celwanden bezit heeft dierlijk weefsel geen celwand, het is daarom niet contrastrijk. Kleuring van het preparaat zal daarom altijd nodig zijn. Om de vervalprocessen te stoppen zal dierlijk weefsel altijd moeten worden gefixeerd. De structuur van het weefsel blijft ongeveer gelijk, maar chemisch verandert er veel. Het weefsel wordt wat harder, maar snijden is nog steeds niet goed mogelijk. Het weefsel is stroef. Het gaat bovendien vaak om kleine stukjes materiaal, die bijna niet vast te houden zijn. Een goede oplossing voor het snijden is het gebruik van paraffine.

Deze stof laat zich heel goed bewerken maar heeft een groot nadeel n.l. het is niet oplosbaar in water en bijna alle dierlijke weefsels bestaan voor een groot gedeelte uit water. Om die reden wordt in verschillende stappen (50% ethanol, 70% ethanol, 85% ethanol, 96% ethanol en 100% isopropanol) het water verdreven door alcohol (dehydratie). Nadat alle water door alcohol is verdreven wordt de alcohol op z'n beurt weer verdreven door een intermedium. Voorbeelden van intermedia zijn: xylol, butanol, benzol, toluol et cetera. Deze stoffen zijn wel oplosbaar in paraffine. Nadat tenslotte het intermedium is verdreven door paraffine kan het weefsel worden ingegoten tot een blokje paraffine. Het ingegoten weefsel kan nu op een microtoom worden gesneden tot dunne coupes. De flinterdunne coupes worden vanuit een warmwaterbad op een voorwerpglasje gebracht of soms geplakt met een eiwit/glycerol mengsel.

Om het preparaat te kunnen kleuren zal alle paraffine eerst uit de coupes moeten worden verwijderd omdat de meeste kleurstoffen op een waterige basis zijn. Dit 'hydrateren' gebeurt in omgekeerde volgorde zoals boven beschreven dus, eerst wordt met behulp van xylol de paraffine verwijderd en daarna wordt via een dalende alcoholreeks een waterige omgeving bereikt. Nu kunnen diverse kleurmethodes worden toegepast. Na het kleuren kan het preparaat in principe bekeken worden maar zal het na een paar uur of dagen niet meer 'goed' zijn. Water maakt namelijk bederf mogelijk, aangezien er micro-organismen in kunnen leven. Inbedden in (kunst)hars maakt preparaten zeer lang (decennia tot eeuwen) houdbaar. De kunsthars die hiervoor wordt gebruikt laat zich echter niet in water oplossen zodat het preparaat opnieuw ontwaterd moet worden. Hiervoor wordt opnieuw een stijgende alcoholreeks toegepast (50% ethanol, 70% ethanol, 85% ethanol, 96% ethanol en 100% isopropanol) die meestal eindigt in een xylol omgeving. Nu kan de kunsthars worden opgebracht waarna een dekglasje het preparaat definitief afsluit. Het preparaat kan al wel worden bestudeerd maar het duurt nog enkele weken voordat de hars volledig is uitgehard. Laatste fase bestaat uit het afwerken van het preparaat, etiketteren en documenteren. De volgende tekst gaat dieper in op de histologie.

Histologie

Wat is histologie? Histologie betekent letterlijk, weefselleer. Om met een lichtmicroscop dierlijke weefsels, zoals long, hart of nieren op celniveau te kunnen bestuderen is het noodzakelijk om het weefsel eerst te fixeren (stoppen van chemische processen), er zeer dunne plakjes van te snijden, ze op een stevige ondergrond te bevestigen, ze op speciale manieren te kleuren en bovendien "houdbaar" te maken. Er is dan een zogenaamd preparaat gemaakt. Het maken van een preparaat, dat later bestudeerd kan worden, wordt histologische techniek genoemd. Dit hele proces wordt altijd in een vast patroon afgewerkt.

1. Weefsel uitnemen
2. Fixeren
3. Dehydrateren
4. Inbedden in paraffine
5. Coupes snijden op microtoom

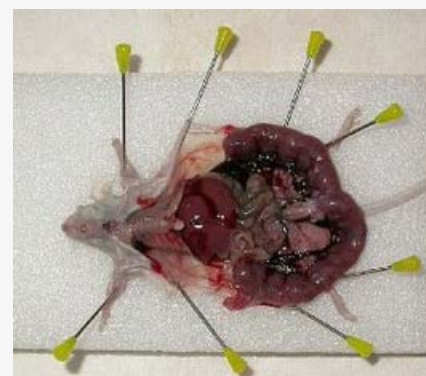
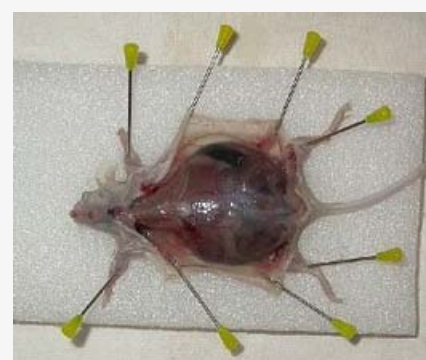
6. Coupes bevestigen op voorwerpglas
7. Hydrateren
8. Kleuren
9. Preparaat houdbaar maken

1. Weefsel uitnemen

Weefsel moet vooral 'vers' zijn. Na ongeveer 1 uur begint de autolyse (verval) op gang te komen en is het voor histologische doeleinden minder of niet meer bruikbaar. Om aan bruikbaar weefsel te komen kan men gebruik maken van b.v. vers gevangen vissen, bezoek aan een slachthuis of b.v. zelf kweken van muizen. Muizen zullen op deze website veelvuldig worden gebruikt. Reden hiervoor is dat muizen makkelijk te verkrijgen zijn, het weefsel veelal overeenkomt met menselijk weefsel en doordat muizen in de wetenschap veel worden gebruikt is er op internet zeer veel informatie over te vinden in zowel Histologie alsmede de Pathologie. Wanneer het doel is om pasgeboren muizen te prepareren is het raadzaam om de zwangere muis te scheiden van de andere muizen. Vlak na de geboorte zal het mannetje de jonge muizen doodbijten.

Het is niet zinvol om een dood dier compleet te fixeren. Voor de histologische technieken die hier beschreven worden zijn stukjes weefsel (spier, huid, hart, lever, nier, hersenen etc.) nodig van enkele mm tot ongeveer twee cm maximaal. Grotere stukken zijn niet goed (niet snel genoeg) te fixeren en zullen dus gedeeltelijk vervallen. Een uitzondering hierop is het fixeren van een compleet embryo van een klein dier zoals dat van een rat of muis en zelfs een pasgeboren muis is met een speciale techniek compleet te fixeren. Verderop in dit histologische deel zal hier op ingegaan worden en in de preparaatpagina's zijn diverse voorbeelden beschikbaar die de fixatie van een pasgeboren muis laten zien. Als er een plakje uit een orgaan wordt gesneden, maak dan een schets van de plaats en de richting van het plakje. Wat uiteindelijk te zien zal zijn in een preparaat hangt daar sterk vanaf. Maak een werktafel en leg alle materialen en gereedschappen klaar.

Het doden van kleine dieren, zoals hier een muis, gaat eenvoudig met het toedienen van een met ether doordrenkt bolletje watten in een afgesloten bakje. Een kort filmpje van dit deel kan op aanvraag toegezonden worden. De gedode muis wordt even ondergedompeld in 50% ethanol. Dit om steriel te werken en om te voorkomen dat er tijdens de incisie haren mee naar binnen worden genomen. De muis wordt met naalden netjes op een stuk stevig schuim opgespannen. Draag de gehele periode plastic handschoenen om mogelijke bacteriebesmettingen te voorkomen. Maak allereerst een oplossing van 9 gram keuzenzout (Natriumchloride) in 1 liter water. Deze oplossing wordt "fysiologische zoutoplossing" genoemd. Deze stemt redelijk overeen met de "zoutheid" van weefselvocht. Organen en weefsel kunnen ermee gespoeld worden. Gebruik nooit kraanwater voor het spoelen van vers onderzoeksmateriaal. Door de grote verschillen in osmotische waarde zullen de cellen openbarsten. Gebruik een scalpel, pincet en een verbandschaar. Pak het vel van borst- of buikholte op en maak een incisie. De spierlaag wordt dan zichtbaar. Doe daar hetzelfde mee (bij sommige dieren, zoals vissen, lukt dit niet. Probeer dan meteen door te steken naar de buikholte). Bij de borstholte zullen de ribben doorgeknipt moeten worden. Dit kan bij kleinere dieren met een verbandschaar (bv. muizen). Bij grotere dieren is een blik- of snoeischaar wenselijk. Bij de borstholte kan door links en rechts te knippen een soort dekseltje worden losgemaakt. Bij de buikholte kan de spierlaag open worden geduwd of kunnen er flappen worden geknipt door een dwarse opening te maken. In de borstholte zijn de longen en het hart te vinden. In de buikholte liggen doorgaans lever, maag, nieren, darmen.

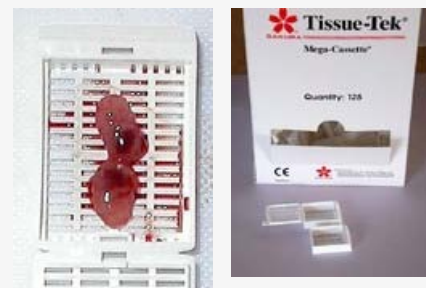


Pak met een pincet een orgaan vast aan een bloedvat of andere uitloper (de long bv. bij een luchtpijp) en knip het vrij. Spoel desgewenst steeds met fysiologische zoutoplossing om het zicht niet kwijt te raken door bloed. Van het verse bloed kan natuurlijk meteen een bloeduitrijk gemaakt worden. Snijdt met een nieuw scalpelmes de gewenste stukken uit de organen. Doe dit niet met een schaar, want dan wordt het weefsel kapot geknepen. Breng de stukken orgaan onmiddellijk over in een fixeeroplossing, om verder verval te voorkomen. Van belang is dat er verschillende kleine potjes met fixeer gereed staan. Doe geen twee orgaansoorten in één potje want na fixatie is het verschil nauwelijks meer zichtbaar omdat bijna alle weefsels een grijsbruine tint aannemen. Etiketteer alles met weefselsoort en datumtijdgroep. Vergeet niet de werktafel en gereedschappen grondig schoon te maken en met een ontsmettingsmiddel (bv. ethanol, spiritus) te ontsmetten.

Een goede website voor orgaanlocaties van muizen is op deze link te vinden.

<http://reni.item.fraunhofer.de/reni/trimming/>

Nadat een orgaan is genomen moet het zo snel mogelijk in fixeervloeistof worden gebracht. Om alle weefsels overzichtelijk te fixeren kan gebruik worden gemaakt van fixeercassettes. Op deze cassettes kan met een watervaste stift een beschrijving worden aangebracht. Deze stap is noodzakelijk, omdat na het fixeren de meeste weefsels slecht herkenbaar worden (alles wordt bruin en lijkt op elkaar).



2. Fixeren

Waarom fixeren? Met fixeren (vastleggen) stoppen we de ingewikkelde stofwisselingsprocessen en voorkomen verder verval van het weefsel. Het doel van fixeren is het op een zo identiek mogelijke manier vastleggen van de structuur die het weefsel had toen het nog in leven was. Weefsels invriezen is hier geen optie omdat levend weefsel uit ongeveer 80% water bestaat en daardoor alle cellen zouden barsten (water zet immers uit bij bevriezing) en door vorming van ijskristallen snijden de scherpe kristallen dwars door de structuur van de cel heen. Met bijzondere technieken kunnen wel vriescoupes gemaakt worden maar dit zal hier niet behandeld worden. Een chemische ingreep is dus noodzakelijk. Om de fixeervloeistof de kans te geven om goed en zo snel mogelijk in te werken is het van belang dat de weefselstukken niet te groot zijn.



Blokjes van 4 tot 8 mm zijn goed te fixeren of een plakje van een paar millimeter dik en dat mag rustig 2 of 3 centimeter lang zijn. Ook is het beter om het weefsel in de fixeervloeistof te hangen in plaats van op de bodem te laten liggen. Dit is te realiseren door gebruik te maken van cassettes of een plukje watten onder in het potje te leggen waar het weefsel op komt te liggen. Het doel is in elk geval om de fixeervloeistof kans te geven om van alle kanten zo snel mogelijk het weefsel binnen te laten dringen. Een manier om deze snelheid te verhogen is om weefsel (met name de grotere stukken) warm voor te fixeren tussen de 35-40°C en daarna verder koud te fixeren¹. Een groot nadeel van fixeren is dat het weefsel krimpt of juist zwelt. Ervaring leert dat hoe meer water een weefsel bevat, hoe groter de volumeverandering zal zijn. De krimp kan zo groot worden dat de epitheellaag van het onderliggend bindweefsel scheurt. Ook latere behandelingen zoals dehydrateren leidt meestal tot weefselkrimp. In totaal kan de krimp wel tot 20 tot 25% van de oorspronkelijke grootte oplopen. Er bestaan vele soorten fixatievloeistoffen die allen hun eigen voor- en nadeel hebben.



De keuze van het soort fixatief is afhankelijk van: welke structuur heeft het weefsel, wat willen we in een preparaat zien en welke kleurmethode gaan we toepassen. Zo slaan alcoholen en aceton eiwitten goed neer door dehydratie en denaturatie, maar nucleïnezuren blijven na behandeling in water oplosbaar, lipiden worden zelfs opgelost en het weefsel krimpt sterk. Azijnzuur doet het weefsel zwellen en slaat nucleïnezuren goed neer. Trichloorazijnzuur precipiteert (een vaste stof uit een vloeistof laten bezinken door toevoeging van een reagens) eiwitten en nucleïnezuren goed. Picrinezuur ook, maar heeft tevens de neiging om nucleïnezuren te hydrolyseren (splitsen). Kwik en chroom

kunnen crosslinks in eiwitten maken. De werking van formaldehyde kan worden beschreven als het leggen van waterstofbruggen binnen en tussen eiwitmoleculen. Om ervoor te zorgen dat het fixatief zo weinig mogelijke nadelige invloeden op het weefsel heeft zijn er naast de enkelvoudige stoffen verschillende combinaties van fixatieven ontwikkeld. Hieronder enkele voorbeelden van veel gebruikte fixatieven.

Bronvermelding:

1. Theorie: Prof. Dr. Peter Böck (1989, 17., neubearbeitete auflage), *Romeis Mikroskopische Technik*, München. Verleger Urban & Schwarzenberg. Hoofdstuk 4, 'Fixierung histologischer Präparate'.

- **Ethylalcohol of Ethanol**¹ is een fixatief dat snel inwerkt maar abrupt het water uit het weefsel verdrijft. Het is geschikt voor kleine stukjes weefsel (3-4 mm dikte is in 2-4 uur gefixeerd). De krimp is groot en de buitenzijde van het weefsel wordt snel hard en is ongunstig voor het latere coupe snijden. De samenstelling van eiwitten wordt door ethanolfixatie niet aangetast. In eiwitten ingesloten stoffen zoals slijm en glycogeen blijven intact. Lipiden (vet) en hemoglobine (rode kleurstof van erythrocyt) worden wel uitgespoeld. Ethanol wordt soms toegepast bij een bloeditstrijk maar hoofdzakelijk in de plantkunde.

- **Formaldehyde**¹ is een stekend ruikend gas dat zich goed in water laat oplossen. De oplossing in water wordt formaline genoemd en bevat 37-40% formaldehyde (syn. formol) (vroeger heette het nog wel eens 'sterk water'). De oplossing penetreert het weefsel goed en is ook geschikt om wat grotere stukken te fixeren. In tegenstelling tot alle andere fixatieven kan een stukje weefsel in formaline enkele maanden verblijven zonder dat de structuur duidelijk verandert. Willen we weefsel langer bewaren dan is het raadzaam om aan het formaline een klein brokje marmer toe te voegen. De reden hiervoor is dat onder invloed van zonlicht en stoffen die uit het weefsel trekken er spontaan mierenzuur gaat ontstaan. Als fixatief wordt meestal een concentratie van 4% formaldehyde (formol) in water gebruikt. Kijk op oplossingen voor een handige tabel.

- **Zenker**¹ is een combinatiefixatief die bestaat uit: Sublimaat (kwikzilver 2 chloride), kaliumbichromaat, natriumsulfaat, ijsazijn en gedestilleerd water. Kijk op oplossingen maken voor de juiste mengverhoudingen. Enkelvoudig sublimaat laat het cytoplasma sterk krimpen maar in verbinding met formaline, ijsazijn, trichloorazijnzuur of chroomzouten telt het tot een van de meest gebruikte fixatieven. Een nadeel van dit fixatief is dat er altijd een neerslag van kwikzilver ontstaat die uit het preparaat moet worden weggehaald. Na fixatie in Zenker is het preparaat voor veel kleurstoffen uitstekend toegankelijk en bij sommige kleuringen, b.v. Mallory of AZAN, zelfs noodzakelijk.

- **Bouin**¹ is een combinatiefixatief dat bestaat uit: Picrinezuur, formol en ijsazijn. Dit fixatief wordt veelvuldig gebruikt en is uitstekend geschikt voor overzichtskleuringen, cytologische studies en embryo's. Vetten worden niet bewaard. De krimp bedraagt slechts 2,5%. De fixeertijd bedraagt tussen de 2 en 24 uur afhankelijk van de grootte van het weefsel. Groot voordeel van dit fixatief is dat het weefsel er maanden in kan blijven zonder dat het weefsel er schade van ondervindt. De meeste preparaten op deze site zijn dan ook met Bouin gefixeerd. Het kan kant en klaar aangeschaft worden maar is ook goed zelf aan te maken. Bij oplossingen is de mengverhouding op te zoeken.

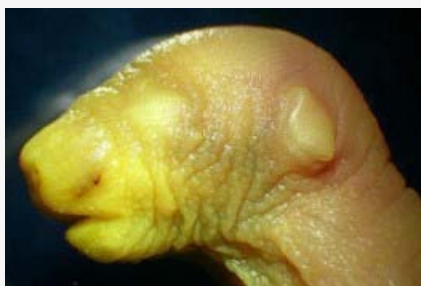
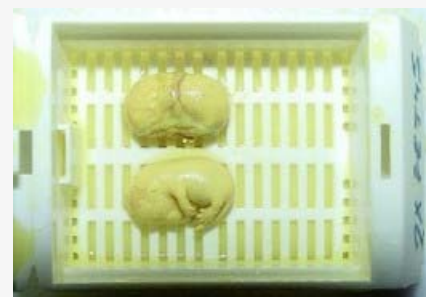
- **Stieve**¹ is een combinatiefixatief dat bestaat uit: Sublimaat (kwikzilver 2 chloride), formol en ijsazijn. Het dringt zeer snel in het weefsel en is daarom ook geschikt voor het fixeren van grotere stukken weefsel. Na fixatie wordt het weefsel rechtstreeks in 96% ethanol gelegd zonder de gebruikelijke lagere ethanolreeks. In plaats van ijsazijn kan men ook gebruik maken van trichloorijsazijn.

- **Susa volgens Heidenhain**¹ is een combinatiefixatief die gemaakt kan



worden uit twee houdbare voorraadoplossingen. Het bestaat uit: Sublumaat (kwikzilver 2 chloride), formol, ijsazijn, zout, trichloorijsazijn en water. Het mengsel dringt uitstekend in het weefsel. Fixatietijd tussen de 1 en 24 uur. Na fixatie wordt het Weefsel uitnemen en fixeren weefsel in 90% ethanol gelegd die meerdere malen moet worden verversd. Een nadeel van dit fixatief is dat er altijd een neerslag van kwikzilver ontstaat die uit het preparaat moet worden weggehaald.

De fixeerduur is sterk afhankelijk van: het gebruikte fixatief, het soort weefsel en de temperatuur van het fixatief. De meeste preparaten die op deze website worden beschreven zijn met formaldehyde, Zenker of Bouin gefixeerd. De duur varieert tussen een paar dagen tot ongeveer een week. De gebruikte fixeertijden zijn in alle preparaten genoemd en gedeeltelijk empirisch vastgesteld. Zo zal een stukje sponzig longweefsel een kortere fixeertijd nodig hebben dan het veel vastere leverweefsel. Wil men b.v. een pasgeboren muis in zijn geheel fixeren dan is het raadzaam om het dier aan de zijkanten in te snijden. Een paar kleine incisies door de huid is voldoende. De extremiteiten kunnen ook worden verwijderd zodat ook daar de fixeervloeistof naar binnen kan dringen.



[Top](#) [Next](#)