

Histologische Techniek (deel 1)

Het doel van dit document is om aan te tonen dat het met betrekkelijk eenvoudige middelen mogelijk is dierlijk weefsel te prepareren. Alle gegevens, zoals tijdsduren, zijn deels uit Histologische boekwerken en deels empirisch vastgesteld. Dit deel behandelt het weefsel nemen tot en met het inbedden in paraffine.

Histologie

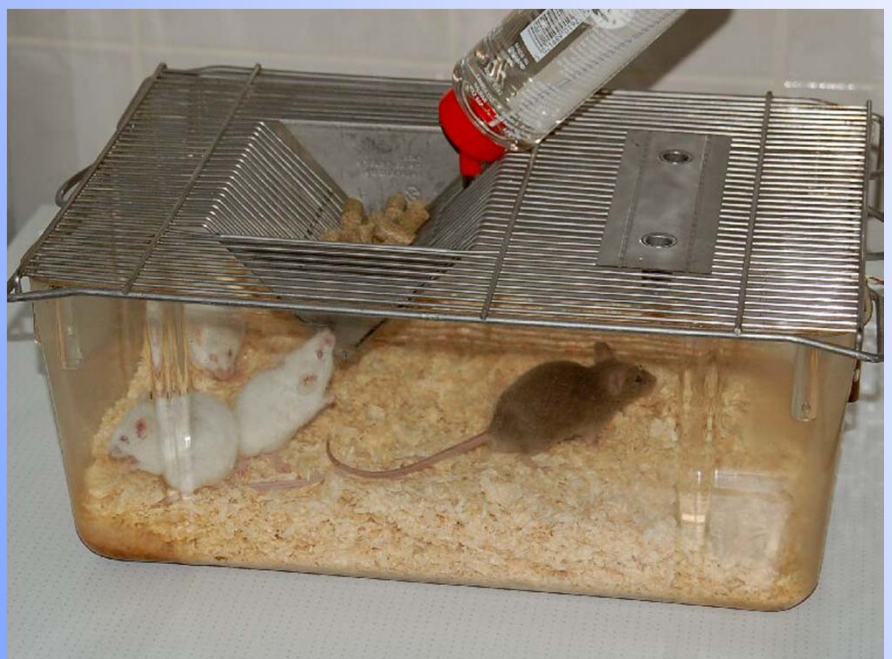
Wat is histologie? Histologie betekent letterlijk, weefselleer. Om met een lichtmicroscop dierlijke weefsels, zoals long, hart of nieren op celniveau te kunnen bestuderen is het noodzakelijk om het weefsel eerst te fixeren (stoppen van chemische processen), er zeer dunne plakjes van te snijden, ze op een stevige ondergrond te bevestigen, ze op speciale manieren te kleuren en bovendien "houdbaar" te maken. Er is dan een z.g. 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 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.

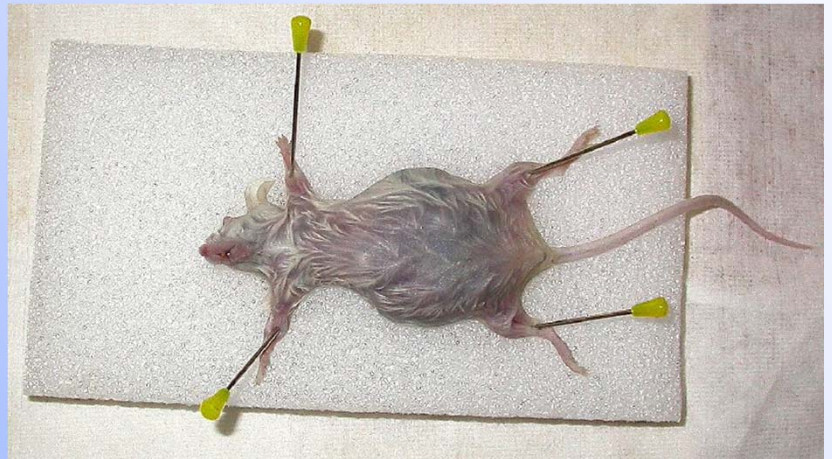


Om bijvoorbeeld een muis goed te kunnen prepareren moeten de diverse gereedschappen overzichtelijk worden klaargezet.

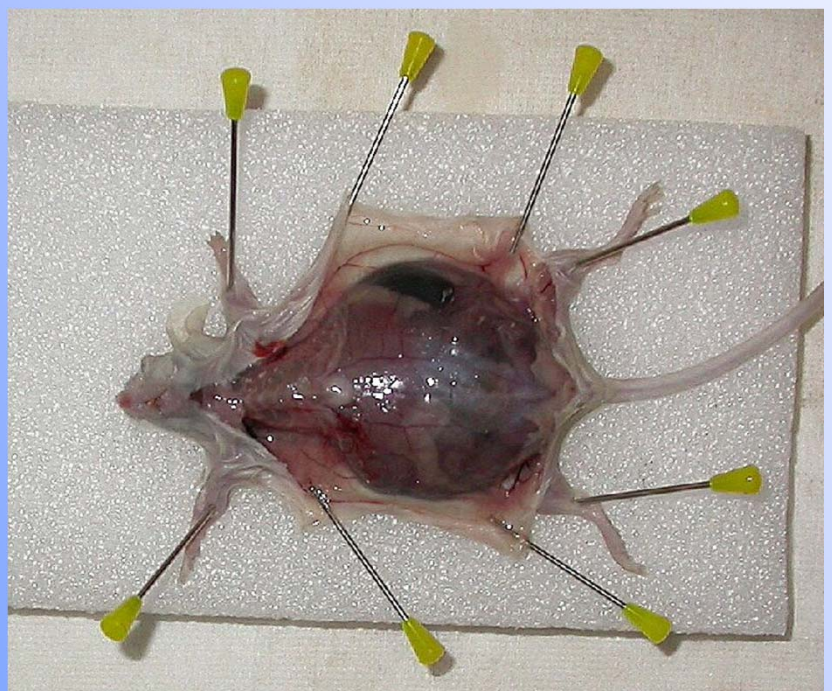


Het doden van de muis gaat eenvoudig met het toedienen van een met ether doordrenkt bolletje watten in een afgesloten bakje.

De gedode muis wordt even ondergedompeld in 50% ethanol. Dit om sterieler te werken en om te voorkomen dat er tijdens de incisie haren mee naar binnen worden genomen. De muis wordt met naalden netjes opgespannen.



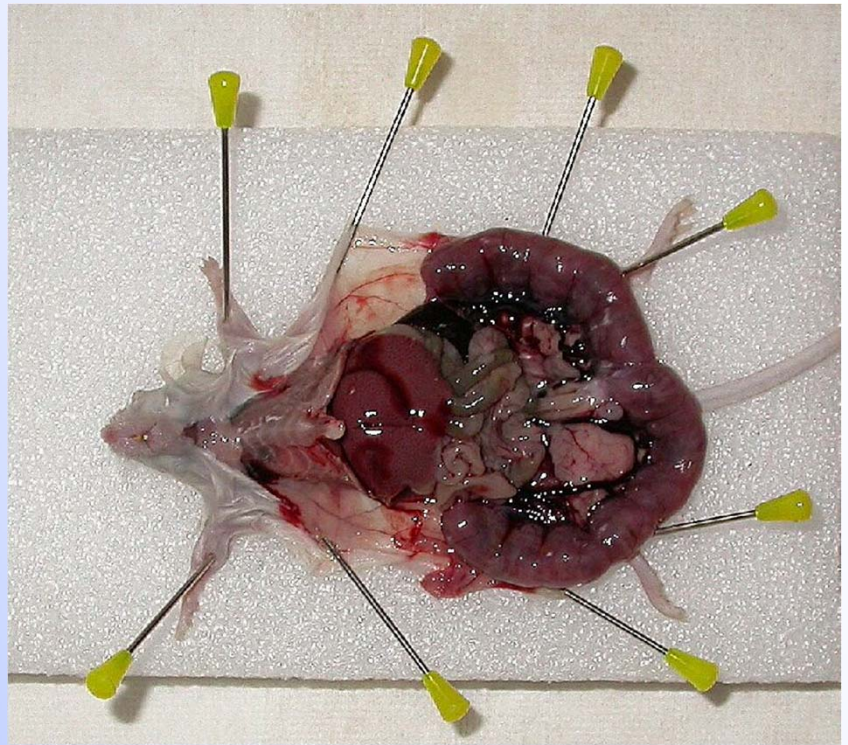
De huid voorzichtig openknippen en met naalden vastzetten. Het nu vrijliggende weefsel zal snel uitdrogen en dat moet te allen tijde worden voorkomen. Het weefsel geregeld vochtig maken met een 0,9% zoutoplossing (9 gram zout oplossen in 1 liter water). Deze oplossing heeft een gelijke osmotische waarde als het weefsel, zodat het weefsel niet zal krimpen of opzwellen.



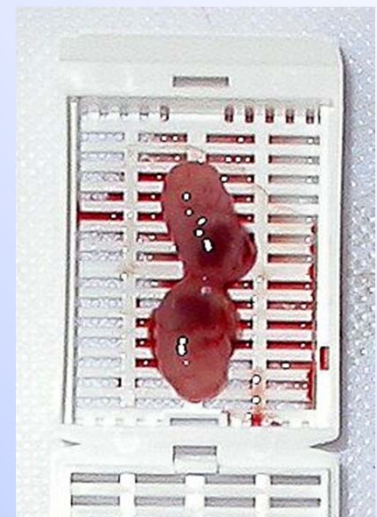
Nu kunnen de organen of weefsels worden verwijderd.

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

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



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

Er bestaan diverse fixatieven, die allen hun specifieke eigenschappen hebben. Een veel gebruikt fixatief is de 4% formaldehyde oplossing. Voordeel van formaldehyde is dat het weefsel maanden kan worden bewaard zonder dat de structuur duidelijk verandert. Voor de HE (haematoxyline/eosine) routine kleuring is dit een uitstekend fixatief.



Een ander zeer bruikbaar fixatief is de 'Bouinse' vloeistof. Dit kan kant en klaar worden aangeschaft, maar is ook eenvoudig zelf te maken. Benodigd is: Picrinezuur 1,2%, formaline 37% en ijsazijn 99%. Mengverhouding: 15ccm picrinezuur, 5ccm formaline en 1ccm ijsazijn. Bouin fixeert snel en het weefsel kan hierin lang worden bewaard. Weefsels zijn later heel goed te kleuren.



Een ander veel gebruikt fixatief is 'Zenker'. Ook dit is een combinatiefixatief van: Sublimaat (kwikzilver 2 chloride), kaliumbichromaat, natriumsulfaat, ijsazijn en gedestilleerd water. Zenker dringt snel in het weefsel, maar het weefsel mag hier niet te lang in liggen, omdat het anders te hard wordt om te kunnen snijden. Een ander nadeel van zenker is het neerslaan van kwikzilver. Deze neerslag moet na het fixeren worden verwijderd met lugol (mengsel van jodium en kaliumjodide) en natriumthiosulfaat.



De stukken weefsel mogen niet te groot zijn. Hoe groter de stukken zijn hoe groter de kans bestaat dat de autolyse (celvernietiging) van het weefsel begint. Soms kan het handig zijn om grotere stukken, zoals een hele foetus (ongeboren vrucht), warm voor te fixeren. Het doel is dan om snel wat stevigheid te creëren, waardoor je na een paar uren het weefsel kunt halveren zonder dat er veel beschadigingen optreden. Op de afbeelding staat links een Bouin- en rechts een Zenker fixatief op 30 graden te fixeren.



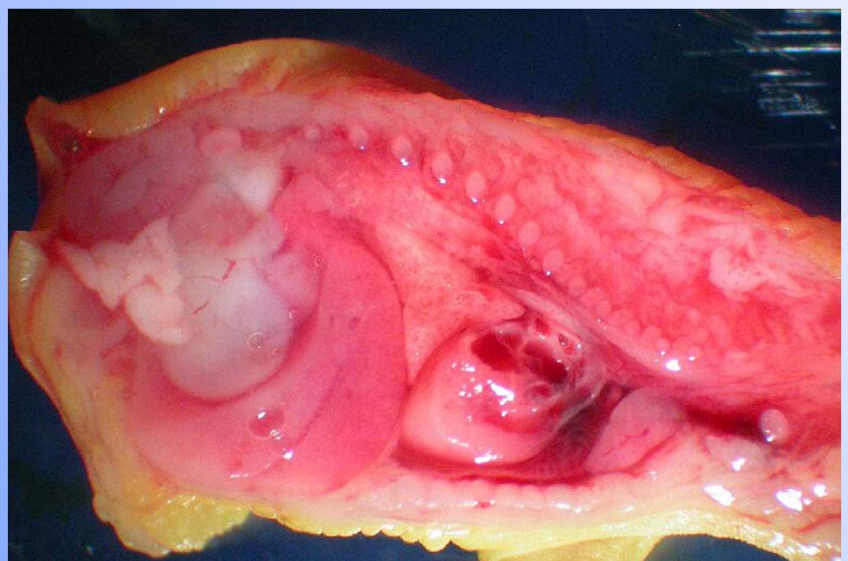
Onder een stereomicroscop kan met behulp van een oud mikrotomes een lengte- of dwarsnede worden gemaakt.



Op deze afbeelding is een pas geboren muis te zien, die drie uur warm gefixeerd is met Bouin.



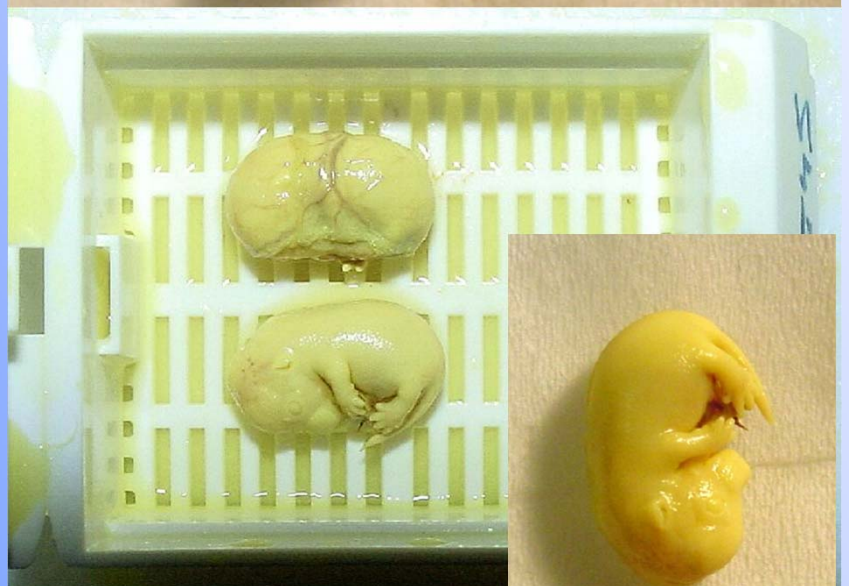
In de lengtedoorsnede zijn de wervels, lever, hart en thymus reeds goed waarneembaar. Het voordeel van deze methode is dat de verdere fixatie goed kan verlopen. Nadeel is dat bij het mikrotomsnijden er eerst een paar millimeter weefsel moet worden weggesneden voordat een goede snede kan worden gemaakt.



Het weefsel dient nu koud verder gefixeerd te worden. In de koelkast gaat de autolyse van het weefsel langzamer, maar fixeert het weefsel ook langzamer. Fixatie bij 15°C blijkt goed te voldoen.

Kleine stukken (5x5x5mm) een paar dagen. Grotere stukken minimaal een week, met formaldehyde of bouin liever twee weken. Elke dag de potjes schudden bevordert een goede fixatie.

Na fixatie ziet het weefsel er uit als in de afbeeldingen.



Na fixatie moet het weefsel worden gespoeld. Bij formaldehyde en zenker moet dit in water gebeuren. Bij bouin rechtstreeks in 70% ethanol brengen. Gele wolken fixatief komen vrij. Het is raadzaam geregeld het water of ethanol te verversen. Het spoelen dient minimaal 24 uur te gebeuren.



3. Dehydrateren (ontdoen van water)

Wanneer het fixatief goed is uitgespoeld kan worden begonnen met dehydrateren. Het doel is geleidelijk het water te verdrijven door ethanol en te vervangen door paraffine of paraplast.



De nu volgende stappen zijn:

- 50% ethanol
- 70% ethanol
- 85% ethanol
- 95% ethanol
- 100% isopropanol
- xyleen
- xyleen/paraplast
- paraplast

Het is handig om voorraadpotten met ethanol aan te maken. De 100% ethanol kan heel goed vervangen worden door 100% isopropanol daar 100% ethanol vrij kostbaar is. Gebruik van aceton wordt afgeraden vanwege de sterke krimp van het weefsel.



Kleine stukjes weefsel (5x5x5mm) verblijven in elk bad 12 uur terwijl grotere stukken 24 uur in elk bad moeten verblijven. Het is praktisch om de wisseling om b.v. 07.00uur en 19.00uur te laten plaatsvinden.



Onderstaande tabel kan helpen bij het maken van een verdunning.

In dit voorbeeld is:

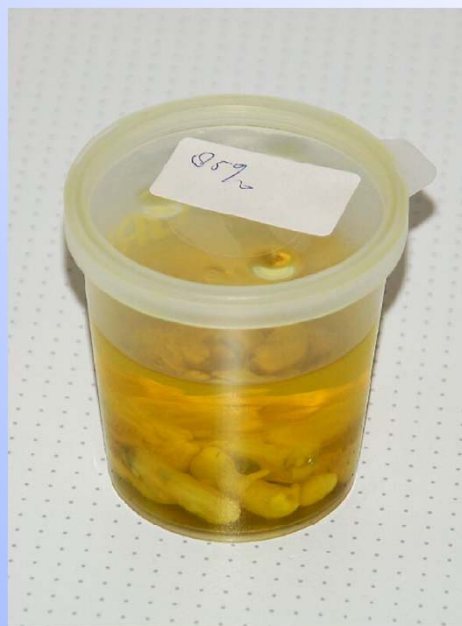
Aanwezig: 95% ethanol
Benodigd: 70% ethanol
Neem: 70ml van 95% ethanol
Voeg toe: 25ml AD
Verkregen: 95ml 70% ethanol

Sterkte aanwijzingen geconcentreerde oplossing.		100	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50	40	30
Te verkrijgen sterkte in % en te gebruiken volume van geconcentreerde oplossing.	95	5												
	90	10	5											
	85	15	10	5										
	80	20	15	10	5									
	75	25	20	15	10	5								
	70	30	25	20	15	10	5							
	65	35	30	25	20	15	10	5						
	60	40	35	30	25	20	15	10	5					
	55	45	40	35	30	25	20	15	10	5				
	50	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5			
	40	60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10		
	30	70	65	60	55	50	45	40	35	30	25	20	10	
	20	80	75	70	65	60	55	50	45	40	35	30	20	10
Volume toe te voegen oplosmiddel														

Alle stappen worden zorgvuldig doorlopen. Men kan de weefsels in de cassettes laten, maar ook los in de vloeistof is een mogelijkheid. Wees voorzichtig bij het wisselen van weefsels. Pak met een pincet een uitstekend deel zoals een bloedvat. Laat het weefsel heel even op een niet pluizende tissue uitlekken, zodat zo weinig mogelijk vloeistof wordt meegenomen naar het volgende bad. Het is hier ook weer aan te raden de potjes af en toe te bewegen, zodat er geregeld nieuwe vloeistof om het weefsel vloeit.



Na de 100% isopropanol volgt de xyleenstap. In deze stap wordt het weefsel glazig. Belangrijk is om het hier niet langer in te laten dan strikt noodzakelijk, daar xyleen het weefsel hard maakt. Met name bijvoorbeeld lever of milt kan zo hard worden dat het op het mikrotroom niet meer te snijden is.

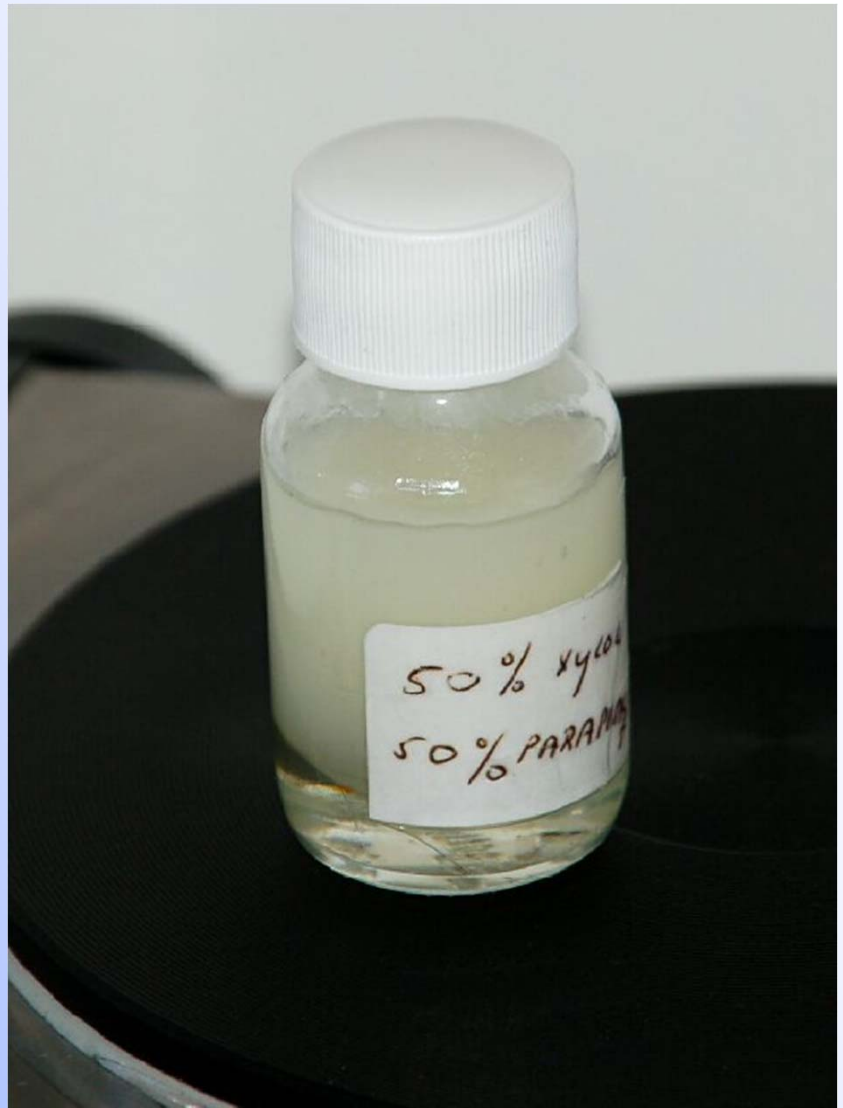


Na de xyleen volgt een warm mengsel van xyleen en paraplast of paraffine (1:1). Paraplast dringt sneller in het weefsel dan paraffine maar mag absoluut niet heter worden dan 62°C.



Hiernaast is het mengsel aan het opwarmen. Laat het mengsel rustig op temperatuur komen. Het moet net vloeibaar zijn.

In deze stap blijft het weefsel 2x zo lang als de vorige stappen; dus: kleine stukjes (5x5x5mm) 24 uur en grotere stukken 2x24=48 uur.



Al het water is nu bijna uit het weefsel verdwenen. Het laatste restje xyleem zal nu worden verwijderd in 2 paraplast-stappen. Vul 2 roestvaststalen bekers met paraplastkorrels en laat het rustig smelten (duurt een uur). Het weefsel in de eerste beker brengen en hierin verblijft het: kleine stukjes (5x5x5mm) 24 uur en grotere stukken 2x24=48 uur.



Hiernaast is het mengsel aan het opwarmen. Laat het mengsel rustig op temperatuur komen. Het moet net vloeibaar zijn.

Nadat de eerste stap is voltooid voorzichtig ruiken boven de vloeibare paraplast. Er zal een lichte geur van xyleen worden geroken. De volgende schone paraplaststap is nu aan de beurt. Wederom geldt: kleine stukjes (5x5x5mm) 24 uur en grotere stukken 2x24=48 uur. De xyleengeur mag niet meer te ruiken zijn. Bij twijfel een nieuwe beker met paraplast smelten en de weefsels langer in de schone paraplast laten (langer schaadt zeker niet). Blijft er nog een klein beetje xyleen achter dan is het weefsel niet te snijden.



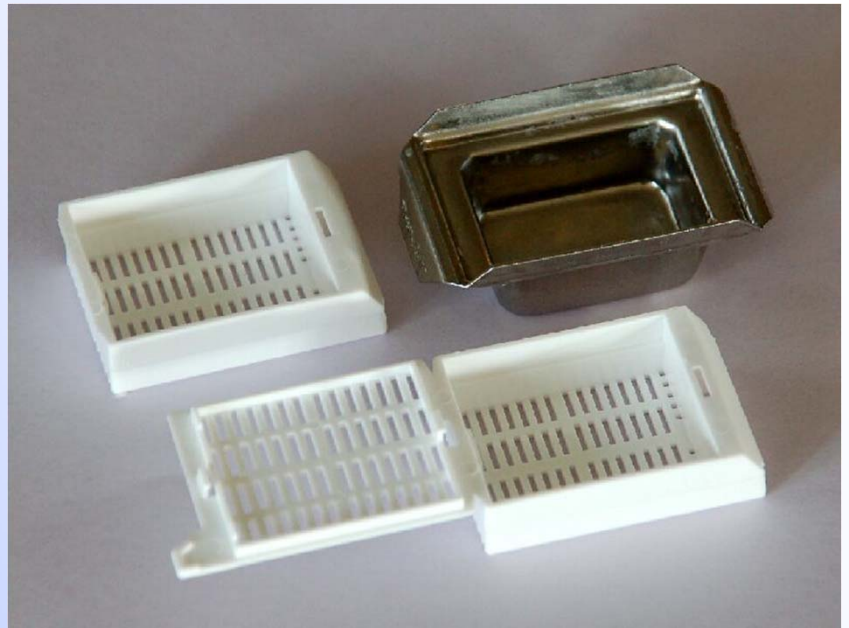
Na de laatste vloeibare stap paraplast kan er gegoten worden. Wanneer er een hoeveelheid, zoals hier getoond, moet worden gegoten, moet er minimaal een halve dag worden gereserveerd (er is geen tijd meer voor bijkomstigheden).

Nieuwe paraplast laten smelten (paraplast niet boven de 62°C laten komen).

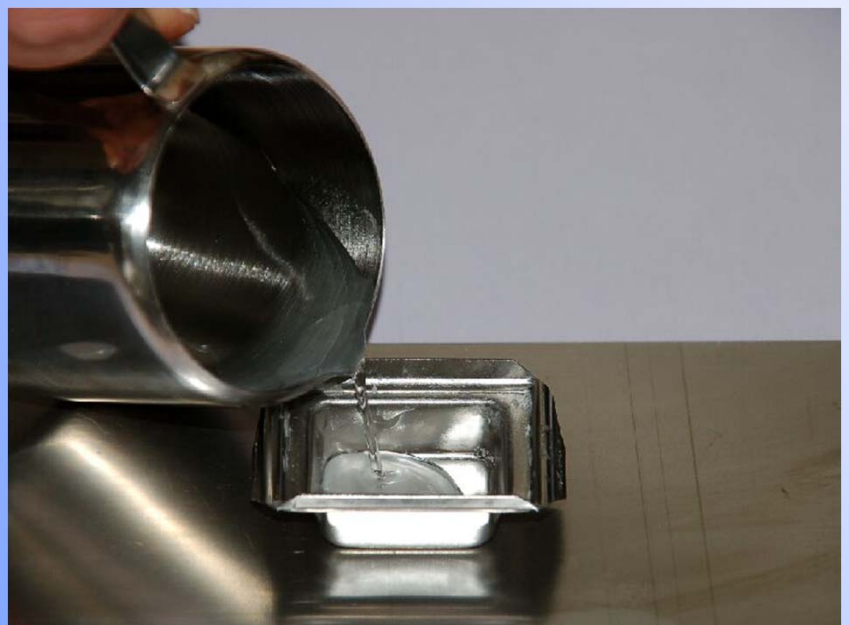


4. Inbedden in paraffine

Bij gebruik van makrocassettes past de cassette precies bovenop de gietmal. De mal is van roestvast staal, zodat deze steeds opnieuw kan worden gebruikt.



Nu komt het aan op snel werken. De gietmal wordt geplaatst op een plaat staal. Dit om de paraplast snel te laten afkoelen.
Giet een laagje paraplast in de mal.



Het weefsel moet klaarliggen in
b.v. een warm horlogeglas



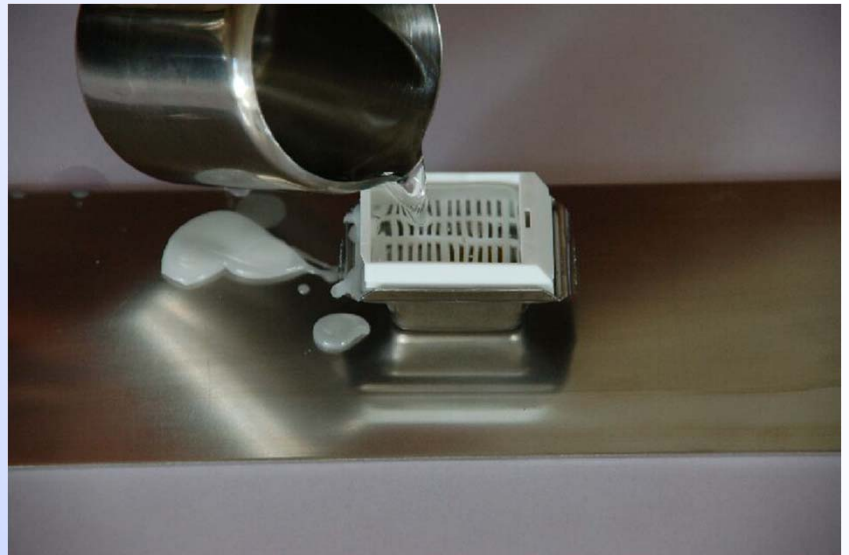
Positioneer snel het weefsel in
de al stollende paraplast. Er is
hier slechts een paar seconden
tijd om uit te richten. Een warm
pincet kan hier voordelig zijn.



De mal wordt gevuld met
vloeibare paraplast tot aan de
eerste rand.



De cassette op de mal plaatsen
en volgieten met paraplast.



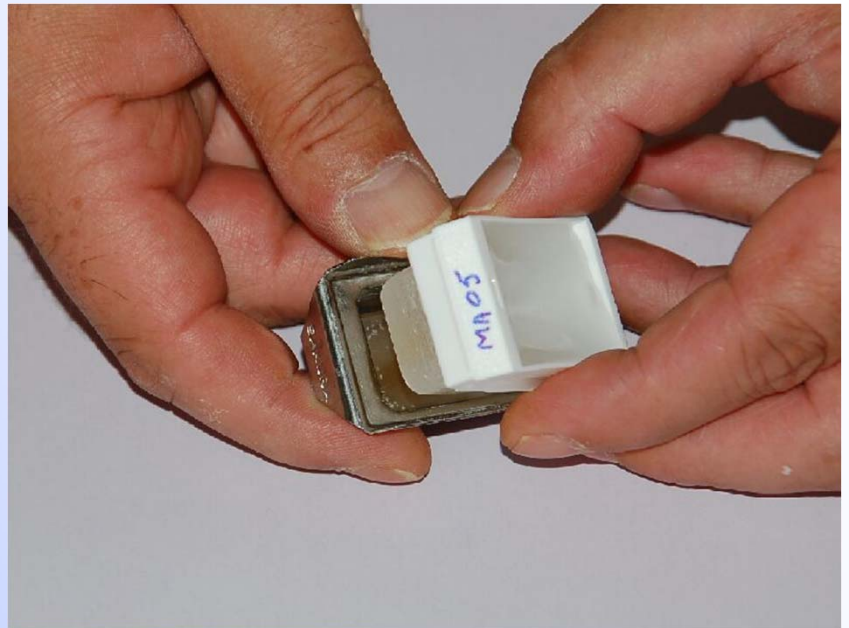
Al snel zal de paraplast
beginnen te stollen. Breng bij
voorkeur de warme mal in een
koude omgeving (koelkast).
Hoe sneller de paraplast afkoelt
hoe kleiner de paraffinekristallen
zijn, wat weer beter snijdt.
Paraplast krimpt vrij sterk en
daarom ontstaat een krimpdal
in de cassette. Dit is prima.



Na ongeveer een kwartier is
alles uitgehard.



Omdat de paraplast gekrompen is zal hij heel makkelijk uit de gietmal vallen.



Nu kan het blok worden afgewerkt. Gietuitlopers wegsnijden en eventueel het blok verkleinen. Niet noodzakelijk, maar wel praktisch. De paraplast kan weer worden hergebruikt en alle paraplast die in een snede zit moet later weer worden opgelost in xyleen. Er moet wel voldoende paraplast om het weefsel blijven om het stevig genoeg te houden.



De blokken nummeren en archiveren. Ze kunnen jaren worden bewaard.

