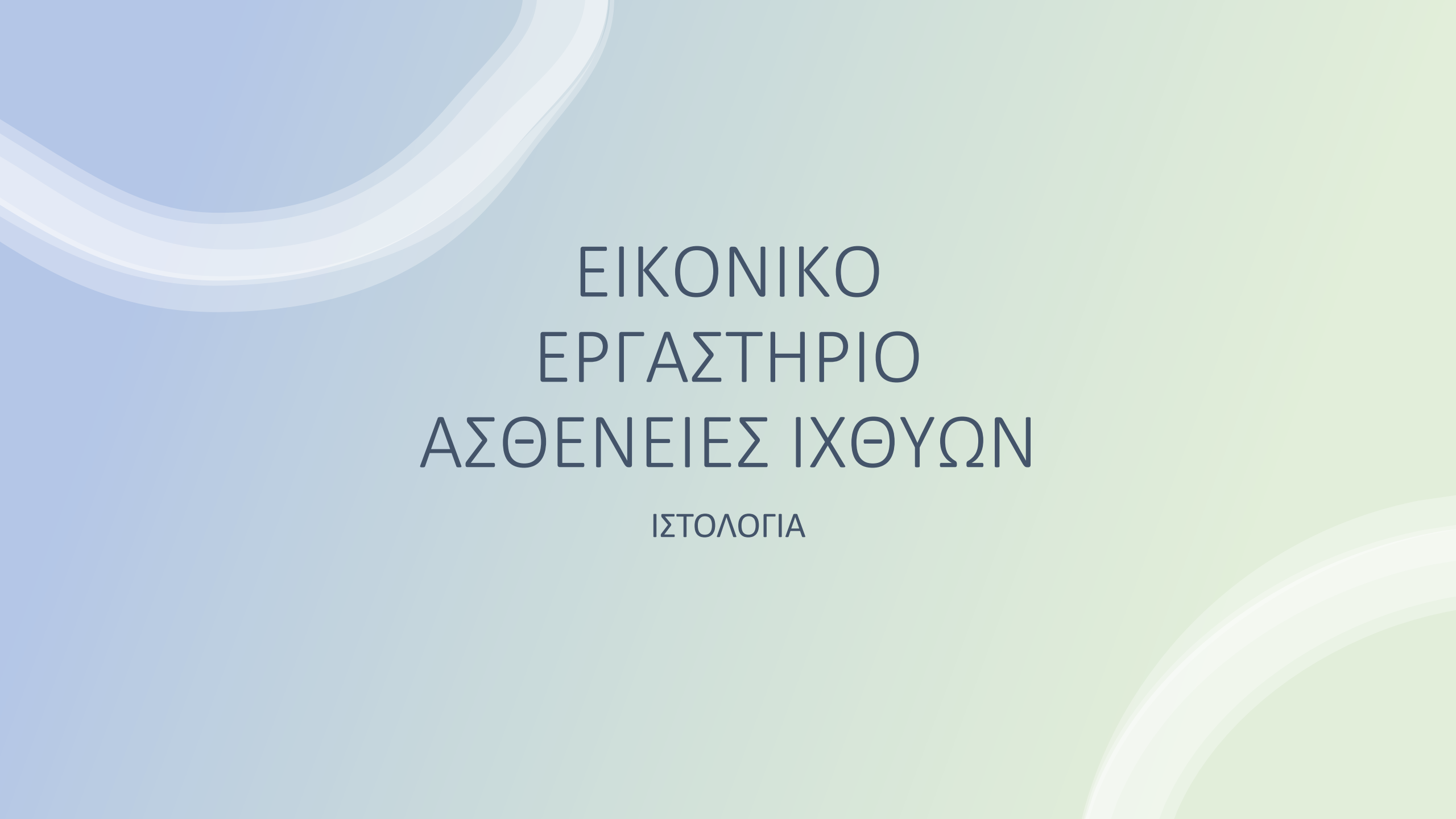




ΕΙΚΟΝΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΙΧΘΥΩΝ

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Η μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων και των ιστών απαιτεί την προετοιμασία πολύ λεπτών, υψηλής ποιότητας τμημάτων (τομές) τοποθετημένων σε γυάλινες διαφάνειες και κατάλληλα χρωματισμένων για να αποδείξουν φυσιολογικές και μη φυσιολογικές δομές.

Οι περισσότεροι νωποί ιστοί είναι πολύ λεπτοί και παραμορφώνονται ή καταστρέφονται εύκολα, και έτσι είναι αδύνατο να προετοιμαστούν λεπτές τομές εκτός αν είναι χημικά διατηρημένοι ή «σταθεροί» και υποστηρίζονται με κάποιο τρόπο ενώ κόβονται. Σε γενικές γραμμές υπάρχουν δύο στρατηγικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παροχή αυτής της στήριξης.

Μπορούμε να παγώσουμε τον ιστό και να τον κρατήσουμε παγωμένο όσο κόβουμε τις τομές. Αυτές οι τομές ονομάζονται "παγωμένες τομές".

Εναλλακτικά μπορούμε να διεισδύσουμε στο δείγμα ιστού έναν υγρό παράγοντα που μπορεί στη συνέχεια να στερεοποιηθεί και ο οποίος θα έχει τις κατάλληλες φυσικές ιδιότητες που θα επιτρέψουν να κοπούν λεπτές τομές. Το κερί παραφίνης είναι ένας τέτοιος παράγοντας. Αυτό παράγει τις λεγόμενες "τομές παραφίνης".

Στο εργαστήριο θα μιλήσουμε για τη μέθοδο επεξεργασίας ιστού με την οποία δημιουργούμε ενσωματωμένα σε παραφίνη δείγματα έτοιμα για τεμαχισμό.

Εισαγωγή

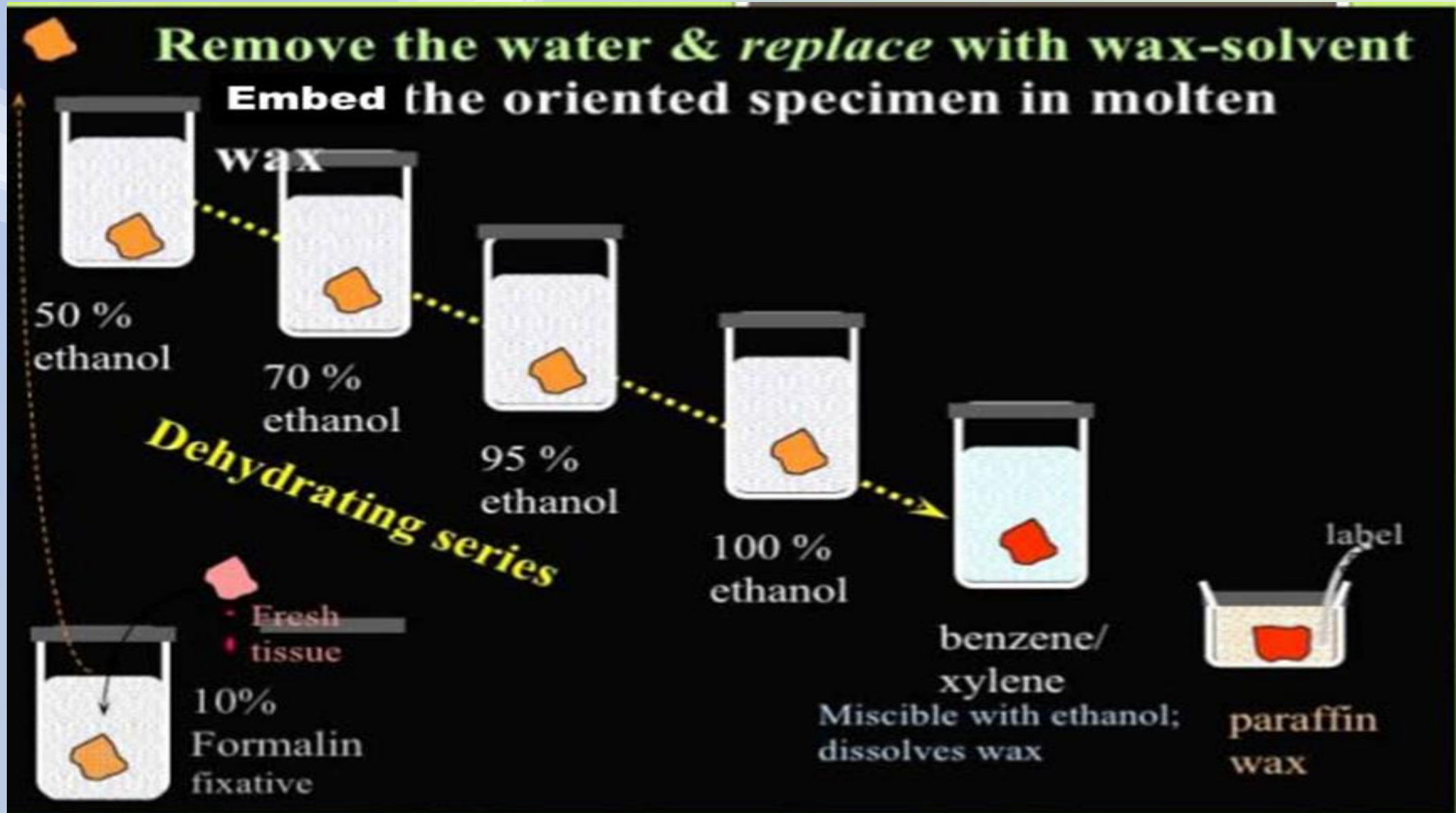
Η "επεξεργασία ιστών" περιγράφει τα βήματα που απαιτούνται από την μονιμοποίηση ζωικού ή ανθρώπινου ιστού μέχρι την κατάσταση όπου έχει διεισδύσει πλήρως το κατάλληλο ιστολογικό κερί και μπορεί πλέον να γίνει η κοπή τμημάτων στον μικροτόμο.

Η επεξεργασία των ιστών μπορεί να πραγματοποιηθεί χειροκίνητα (επεξεργασία με το χέρι), αλλά όταν πρέπει να επεξεργαστούν πολλά δείγματα είναι πιο βολικό και πολύ πιο αποτελεσματικό να χρησιμοποιηθεί μια αυτοματοποιημένη μηχανή επεξεργασίας ιστών (ένας "επεξεργαστής ιστού").

Ο κύριος τύπος επεξεργαστή είναι εκείνος όπου τα δείγματα μεταφέρονται από δοχείο σε δοχείο προς επεξεργασία.



Σύνοψη των βημάτων επεξεργασίας ιστών για τη δημιουργία τομών παραφίνης



1. Λήψη νωπού δείγματος

Τα νωπά δείγματα ιστών θα προέρχονται από διάφορες πηγές. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μπορούν πολύ εύκολα να υποστούν βλάβη κατά τη διάρκεια της απομάκρυνσης από τον ασθενή ή το πειραματόζωο.

Είναι σημαντικό να αντιμετωπίζονται προσεκτικά και να μονιμοποιηθούν κατάλληλα το συντομότερο δυνατό μετά την εκτομή. Ιδανικά η μονιμοποίηση θα πρέπει να πραγματοποιείται στο χώρο της εκτομής ή εάν αυτό δεν είναι δυνατό, αμέσως μετά τη μεταφορά στο εργαστήριο.

Η άμεση μονιμοποίηση πρέπει να γίνεται για τους κάτωθι λόγους οι οποίοι προκαλούν την εκφύλισή τους, καθιστώντας τους είτε ακατάλληλους για ιστολογία ή μετά την εκφύλισή τους, αδύνατο να δώσουν συμπεράσματα σχετικά με την φυσιολογική ή παθολογική τους κατάσταση:

A) Ο ιστός στερείται αιμάτωσης, δηλαδή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου, που οδηγούν σε νέκρωση.

B) Το δείγμα μπορεί να είναι ήδη νεκρωτικός ιστός.

Γ) Τα νεκρά κύτταρα εκφυλίζονται με γρηγορότερο ρυθμό.

Δ) Η νέκρωση στερεί τα κύτταρα από προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι λειτουργικών ενζύμων του ιστού που συνεχίζουν να δρουν.

E) Η νέκρωση ενός κυττάρου οδηγεί σε αυτόλυση.

2. Μονιμοποίηση

Το δείγμα τοποθετείται σε υγρό παράγοντα μονιμοποίησης, όπως ένα διάλυμα φορμαλδεΐδης. Αυτό θα διεισδύσει αργά στον ιστό προκαλώντας χημικές και φυσικές αλλαγές που θα σκληρύνουν και διατηρήσουν τον ιστό και θα τον προστατεύσουν από τα επόμενα βήματα επεξεργασίας.

Υπάρχει περιορισμένος αριθμός αντιδραστηρίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μονιμοποίηση, καθώς θα πρέπει να διαθέτουν ιδιαίτερες ιδιότητες που τα καθιστούν κατάλληλα για το σκοπό αυτό.

Για παράδειγμα, τα συστατικά ιστού θα πρέπει να διατηρούν κάποια χημική αντιδραστικότητα, έτσι ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν στη συνέχεια ειδικές τεχνικές χρώσης. Η φορμαλίνη, συνήθως ως διάλυμα σε ρυθμιστικό υδατικό διαλύτη με φωσφορικό άλας, είναι το πιο δημοφιλές μονιμοποιητικό για τη διατήρηση των ιστών που θα υποβληθούν σε επεξεργασία για την προετοιμασία τομών παραφίνης.

Ιδανικά, τα δείγματα θα πρέπει να παραμένουν στο μονιμοποιητικό για αρκετό χρονικό διάστημα ώστε το μονιμοποιητικό να διεισδύσει σε κάθε μέρος του ιστού και στη συνέχεια για ένα επιπλέον χρονικό διάστημα ώστε να μπορέσουν οι χημικές αντιδράσεις της μονιμοποίησης να επιτύχουν ισορροπία (χρόνος μονιμοποίησης).

Γενικά αυτό σημαίνει ότι το δείγμα θα πρέπει να μονιμοποιηθεί για 6 έως 24 ώρες. Τα περισσότερα εργαστήρια θα χρησιμοποιήσουν ένα βήμα μονιμοποίησης ως πρώτο σταθμό στον επεξεργαστή τους.

2. Μονιμοποίηση

Μετά τη μονιμοποίηση, τα δείγματα μπορεί να απαιτούν περαιτέρω εκτομή για την επιλογή κατάλληλων περιοχών για εξέταση.

Τα δείγματα που πρόκειται να υποβληθούν σε επεξεργασία θα τοποθετηθούν σε κατάλληλες κασέτες με επισήμανση (μικρά διάτρητα καλαθάκια) για τον διαχωρισμό τους από άλλα δείγματα.

Η διάρκεια του προγράμματος επεξεργασίας που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των δειγμάτων εξαρτάται από τον τύπο και τις διαστάσεις των μεγαλύτερων και μικρότερων δειγμάτων, από τον χρησιμοποιούμενο επεξεργαστή, από τους διαλύτες που επιλέγονται, από την θερμοκρασία των διαλυτών και άλλων παραγόντων.

3. Αφυδάτωση

Επειδή το λιωμένο κερί παραφίνης είναι υδρόφοβο (αδιάλυτο με νερό), το μεγαλύτερο μέρος του νερού σε ένα δείγμα πρέπει να αφαιρεθεί για να μπορέσει να διεισδύσει το κερί.

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται συνήθως με εμβάπτιση των δειγμάτων σε μια σειρά από διαλύματα αιθανόλης (αλκοόλη) με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσής της μέχρι να επιτευχθεί καθαρή, χωρίς νερό αλκοόλη.

Η αιθανόλη διαλύεται στο νερό σε όλες τις αναλογίες, έτσι ώστε το νερό στο δείγμα αντικαθίσταται σταδιακά από την αλκοόλη. Χρησιμοποιείται αυτή η σειρά αυξανόμενων συγκεντρώσεων για να αποφευχθεί η υπερβολική παραμόρφωση του ιστού εάν εμβαπτιζόταν απευθείας σε 100% αιθανόλη.

Μια τυπική ακολουθία αφυδάτωσης για δείγματα πάχους όχι μεγαλύτερου των 4 mm θα ήταν:

70% ethanol	15 min
90% ethanol	15 min
100% ethanol	15 min
100% ethanol	15 min
100% ethanol	30 min
100% ethanol	45 min

Σε αυτό το σημείο όλο, εκτός από ένα ελάχιστο υπόλειμμα του στενά δεσμευμένου (μοριακού) νερού, θα πρέπει πλέον να έχει αφαιρεθεί από το δείγμα.

4. Καθαρισμός

Δυστυχώς, αν και ο ιστός είναι τώρα ουσιαστικά χωρίς νερό, ακόμα δεν μπορεί να διεισδύσει το κερί, επειδή το κερί και η αιθανόλη είναι σε μεγάλο βαθμό μη διαλυτά μεταξύ τους. Επομένως, πρέπει να χρησιμοποιήσουμε έναν ενδιάμεσο διαλύτη που είναι πλήρως διαλυτός τόσο με την αιθανόλη όσο και με το κερί παραφίνης.

Αυτός ο διαλύτης θα εκτοπίσει την αιθανόλη από τον ιστό και μετά αυτός με τη σειρά του θα εκτοπιστεί από το λιωμένο κερί παραφίνης.

Αυτό το στάδιο της διαδικασίας ονομάζεται "καθαρισμός" και το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται ονομάζεται "παράγοντας εκκαθάρισης". Ο όρος "καθαρισμός" επιλέχθηκε επειδή πολλοί (αλλά όχι όλοι) οι παράγοντες εκκαθάρισης προσδίδουν οπτική σαφήνεια ή διαφάνεια στον ιστό λόγω του σχετικά υψηλού δείκτη διάθλασης.

Ένας άλλος σημαντικός ρόλος του παράγοντα εκκαθάρισης είναι η αφαίρεση σημαντικής ποσότητας λίπους από τον ιστό το οποίο ειδάλλως αποτελεί ένα εμπόδιο στη διείσδυση του κεριού παραφίνης.

Ένας δημοφιλής παράγοντας εκκαθάρισης είναι το ξυλένιο και απαιτούνται πολλαπλές αλλαγές για να εκτοπίσει εντελώς την αιθανόλη.

Μια τυπική σειρά καθαρισμού για δείγματα πάχους όχι μεγαλύτερου των 4 mm θα ήταν:

xylene 20 min

xylene 20 min

xylene 45 min

5. Διείσδυση κεριού

Ο ιστός μπορεί τώρα να εμποτιστεί με ένα κατάλληλο ιστολογικό κερί. Αν και έχουν αξιολογηθεί και χρησιμοποιηθεί πολλά διαφορετικά αντιδραστήρια για το σκοπό αυτό για πολλά χρόνια, τα ιστολογικά κεριά με βάση το κερί παραφίνης είναι τα πιο δημοφιλή.

Ένα τυπικό κερί είναι υγρό στους 60°C και μπορεί να διεισδύσει στον ιστό σε αυτή τη θερμοκρασία και στη συνέχεια αφήνεται να κρυώσει στους 20°C, όπου στερεοποιείται με μια τέτοια συνοχή που επιτρέπει στα τμήματα να κόβονται με συνέπεια.

Αυτά τα κεριά είναι μίγματα καθαρισμένου κεριού παραφίνης και διάφορων προσθέτων που μπορεί να περιέχουν ρητίνες όπως το στυρένιο ή το πολυαιθυλένιο.

Αυτά τα σκευάσματα κεριών έχουν πολύ ιδιαίτερες φυσικές ιδιότητες που επιτρέπουν στους ιστούς που εμποτίστηκαν με το κερί να κόβονται σε πάχος έως τουλάχιστον 2 μm , να σχηματίζουν κορδέλες καθώς οι τομές κόβονται στο μικροτόμο και να διατηρούν επαρκή ελαστικότητα ώστε να γίνουν οι τομές πλήρως επίπεδες κατά τη διάρκεια της επίπλευσης σε ένα ζεστό υδατόλουτρο.

Μια τυπική ακολουθία διείσδυσης για δείγματα πάχους όχι μεγαλύτερης των 4 mm θα ήταν:

wax 30 min

wax 30 min

wax 45 min



Sections from two different blocks must not be floated out simultaneously. Even though the specimens may be of a different type, there is a possibility of cross-contamination and confusion leading to incorrect identification. This procedure should therefore be avoided at all times.



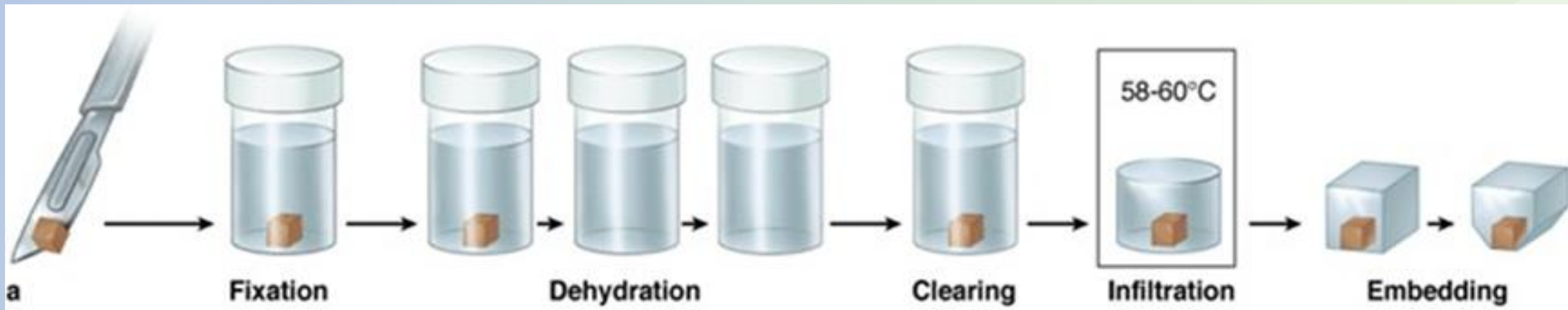
6. Ενσωμάτωση

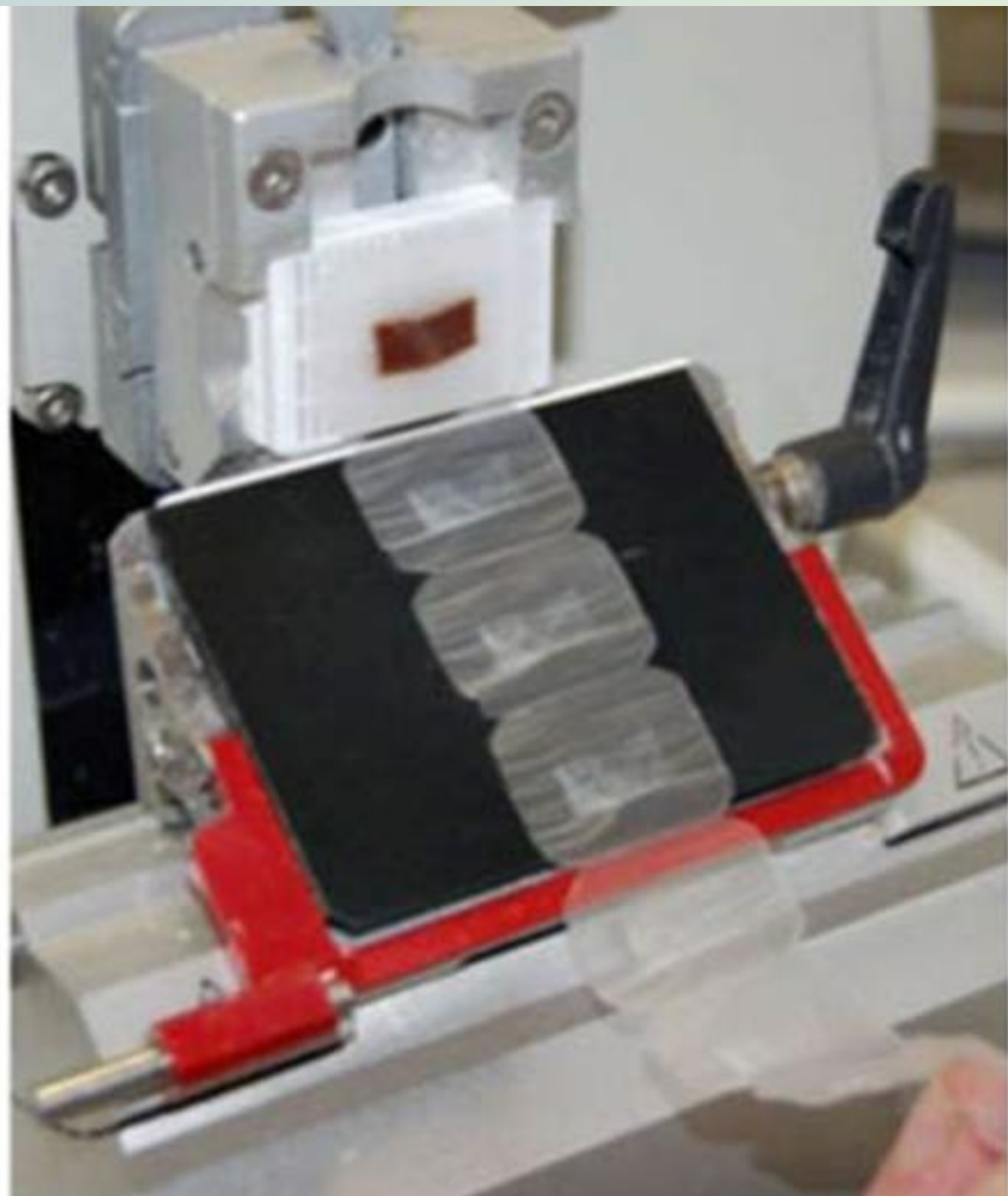
Τώρα που το δείγμα εμποτίστηκε καλά με κερί, πρέπει να μετασχηματιστεί σε ένα παραλληλεπίπεδο σχήμα το οποίο να μπορεί να στερεωθεί σε ένα μικροτόμο για κοπή τομών.

Το βήμα αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση ενός "κέντρου ενσωμάτωσης" όπου ένα καλούπι είναι γεμάτο με λιωμένο κερί και το δείγμα τοποθετείται μέσα σε αυτό. Το δείγμα προσανατολίζεται πολύ προσεκτικά μέσα στο καλούπι, επειδή η τοποθέτησή του θα καθορίσει το "επίπεδο της τομής", ένα σημαντικό ζήτημα τόσο στη διαγνωστική όσο και στην ερευνητική ιστολογία.

Μια κασέτα τοποθετείται πάνω από το καλούπι, συμπληρώνεται με περισσότερο κερί και το όλο κατασκεύασμα τοποθετείται σε ένα κρύο πιάτο για να στερεοποιηθεί. Όταν ολοκληρωθεί, η κατασκευή με την συνημμένη κασέτα μπορεί να αφαιρεθεί από το καλούπι και είναι έτοιμη για μικροτόμιση.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, εάν η επεξεργασία των ιστού πραγματοποιηθεί σωστά, τα μπλοκ κεριών που περιέχουν τα δείγματα ιστών είναι πολύ σταθερά και αντιπροσωπεύουν μια σημαντική πηγή αρχειακού υλικού.







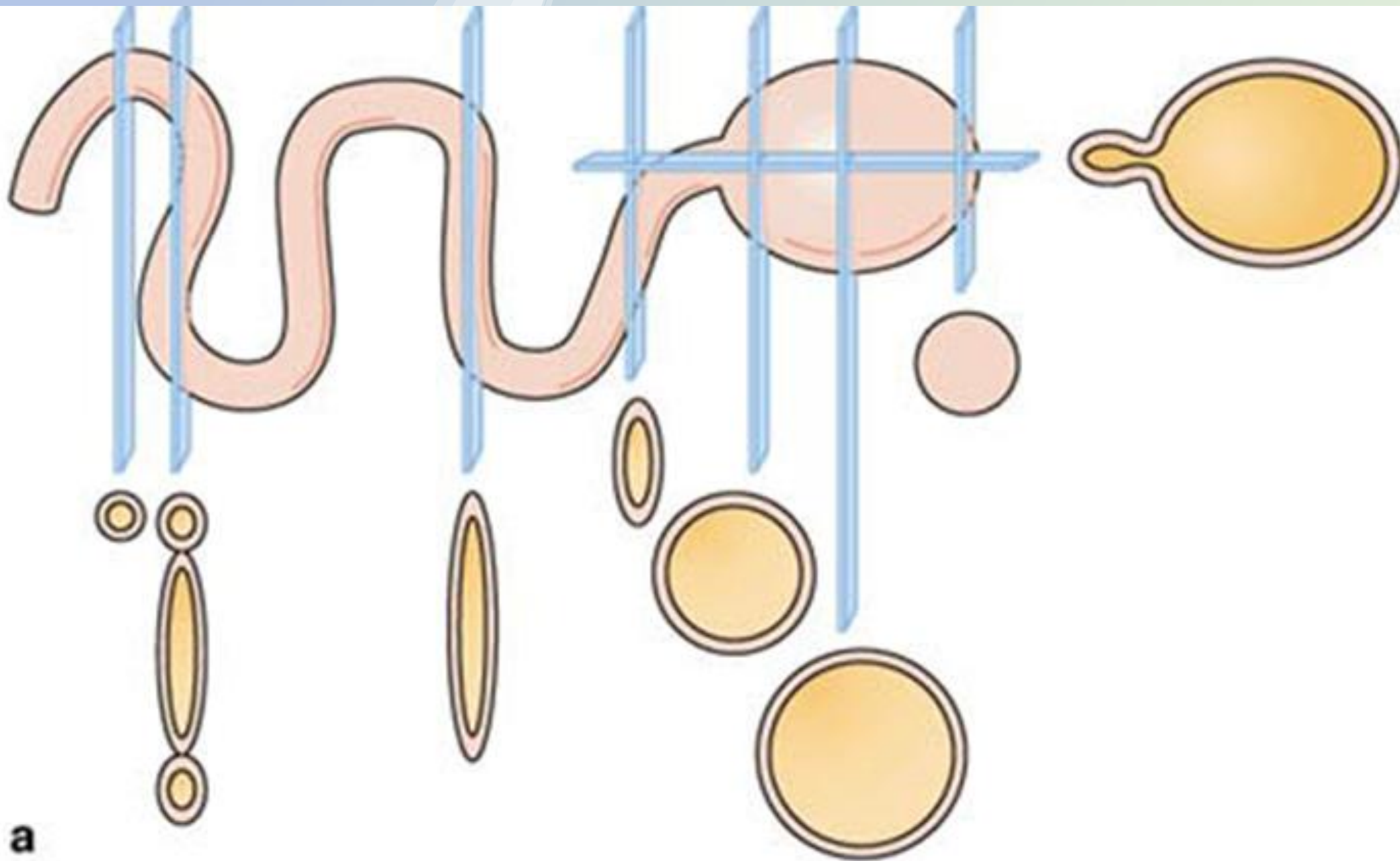
Drive wheel

Block holder

Paraffin block

Tissue

Steel knife



Η επίδραση της επεξεργασίας των ιστών στα δείγματα

Τα συνδυασμένα αποτελέσματα της μονιμοποίησης και της επεξεργασίας είναι να σκληρύνει ο ιστός και είναι αναπόφευκτο ότι θα συμβεί επίσης και συρρίκνωση. Έχει εκτιμηθεί ότι οι ιστοί έχουν συρρικνωθεί έως και 20% ή περισσότερο τη στιγμή που εμποτίζονται με κερί.

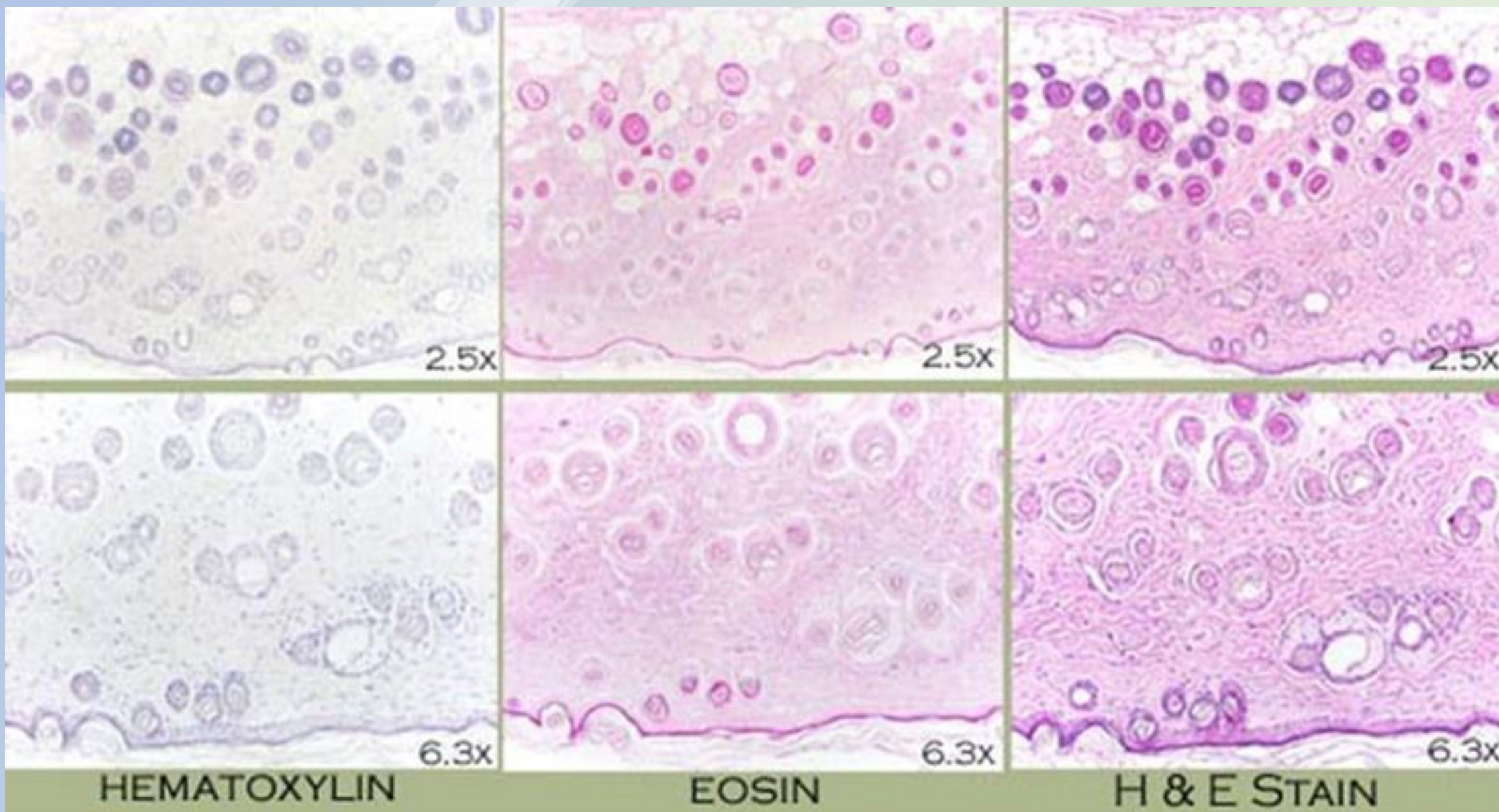
Παρά αυτές τις επιδράσεις, οι τομές που παρασκευάζονται από βέλτιστα επεξεργασμένους ιστούς θα παρουσιάζουν με συνέπεια εξαιρετική μορφολογική λεπτομέρεια, η οποία επιτρέπει συγκρίσεις μεταξύ δειγμάτων και ιστοπαθολογικών διαγνώσεων με ακρίβεια.

Θεωρητικά και στην πράξη τα μπλοκ παραφίνης που είναι ευκολότερο να κοπούν περιέχουν σχετικά ομοιογενή ιστό ομοιόμορφης μαλακής σύστασης (όπως οι νεφροί, το ήπαρ ή η σπλήνα), οι οποίοι, όταν εμποτίζονται με κερί, έχουν σύσταση παρόμοια με εκείνη του στερεοποιημένου κεριού μόνο (που δεν περιέχει τον ιστό).

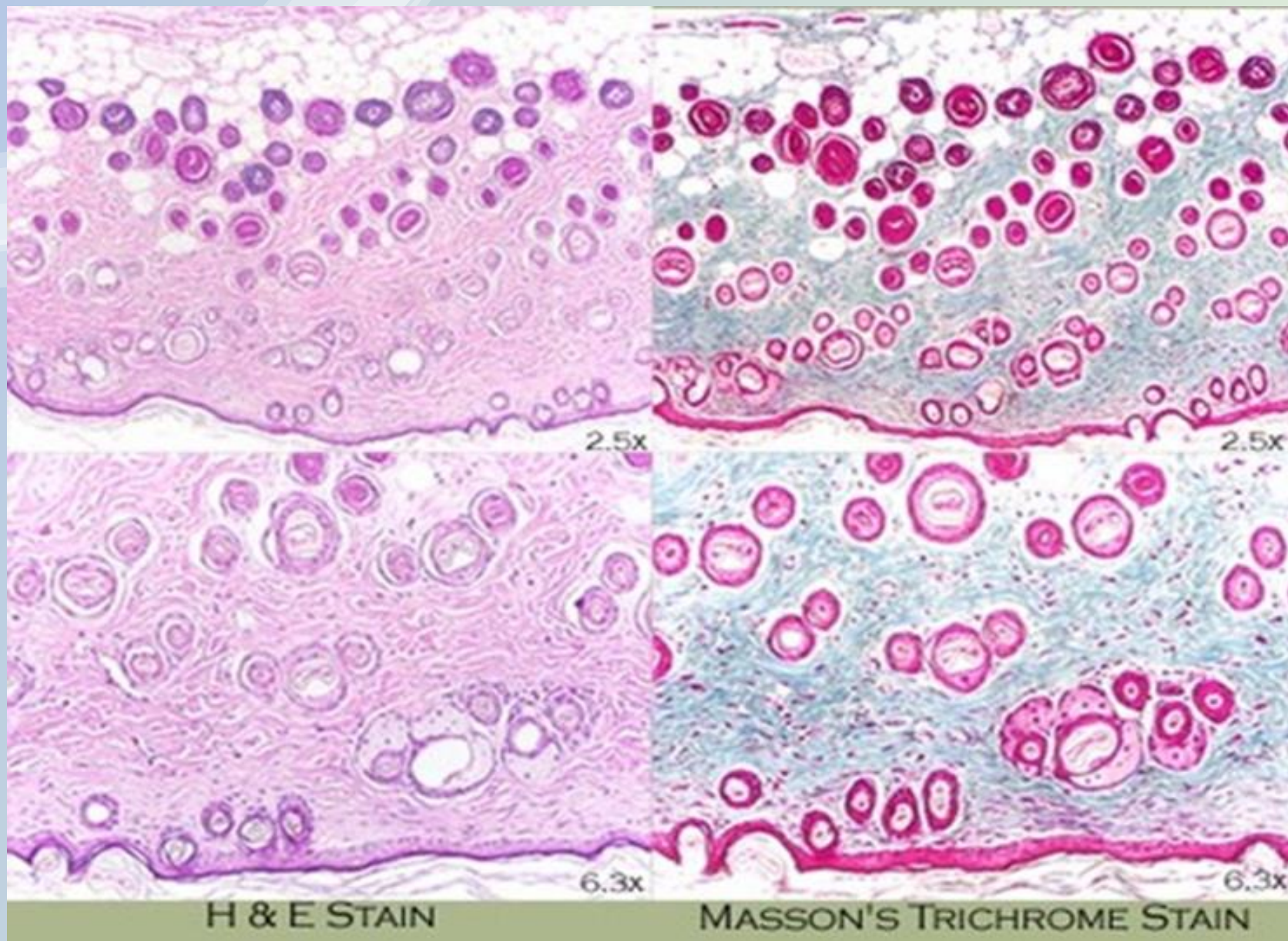
Ιστοί πυκνής ή ινώδους φύσης, ή ένα δείγμα όπου τόσο οι σκληροί όσο και οι μαλακοί ιστοί είναι παρόντες σε διακριτά στρώματα μπορούν να θέσουν πρόκληση, επειδή μέρη τους δεν υποστηρίζονται τόσο καλά από το στερεοποιημένο κερί.

Η διαφορική συρρίκνωση των διαφόρων στοιχείων σε αυτά τα μπλοκ κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης και της επεξεργασίας συμβάλλει στα προβλήματα που μπορεί να παρουσιάζονται κατά τον τεμαχισμό τους.

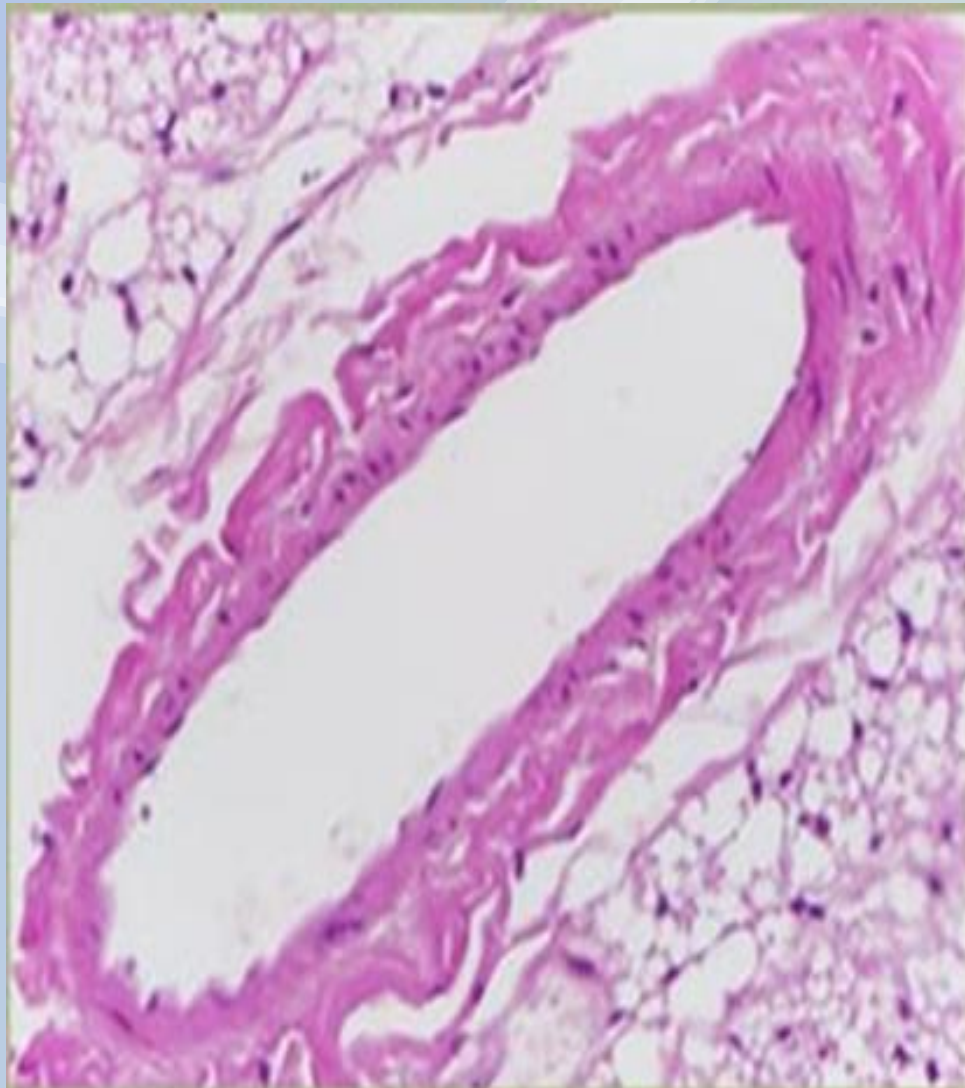
Χρώση των ιστών



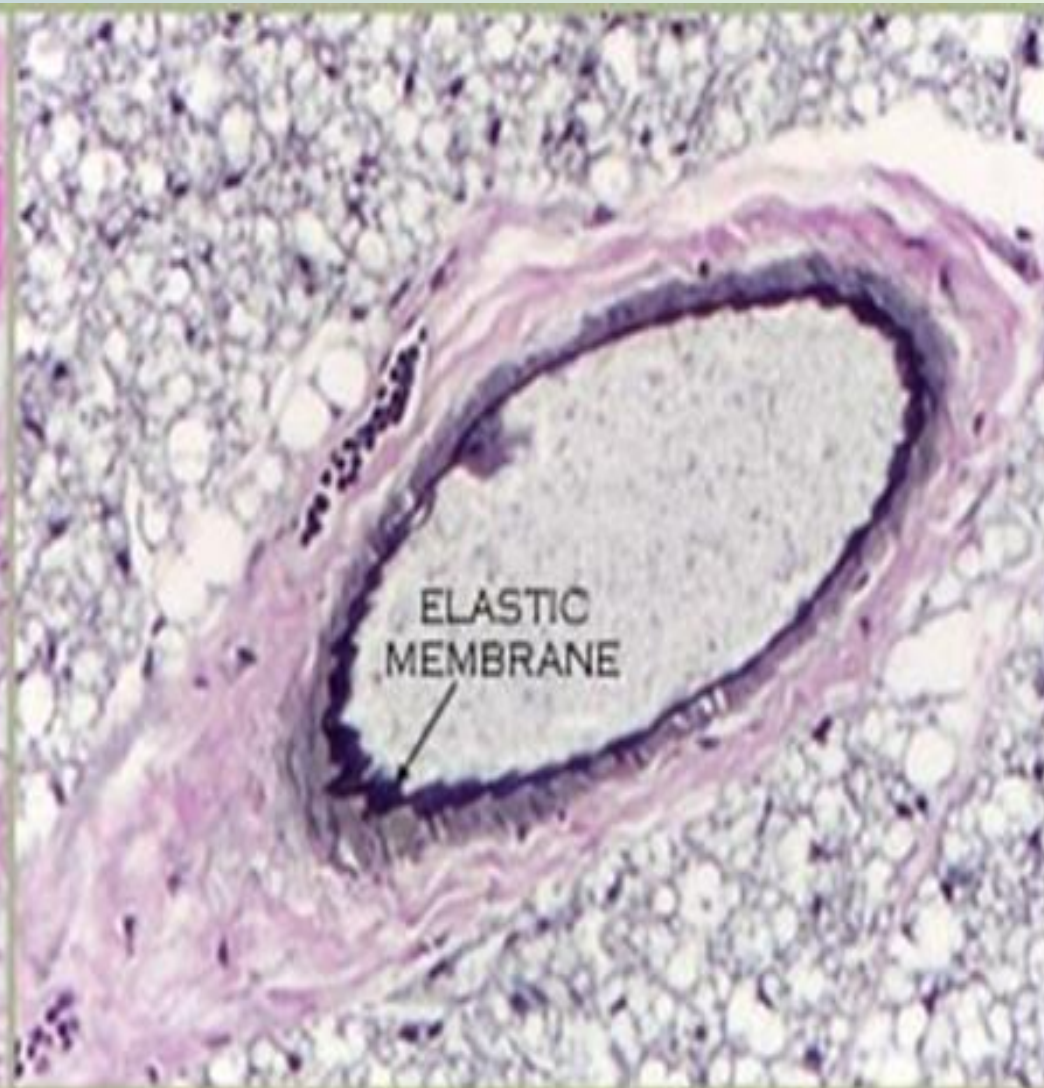
Χρώση των ιστών



Χρώση των ιστών

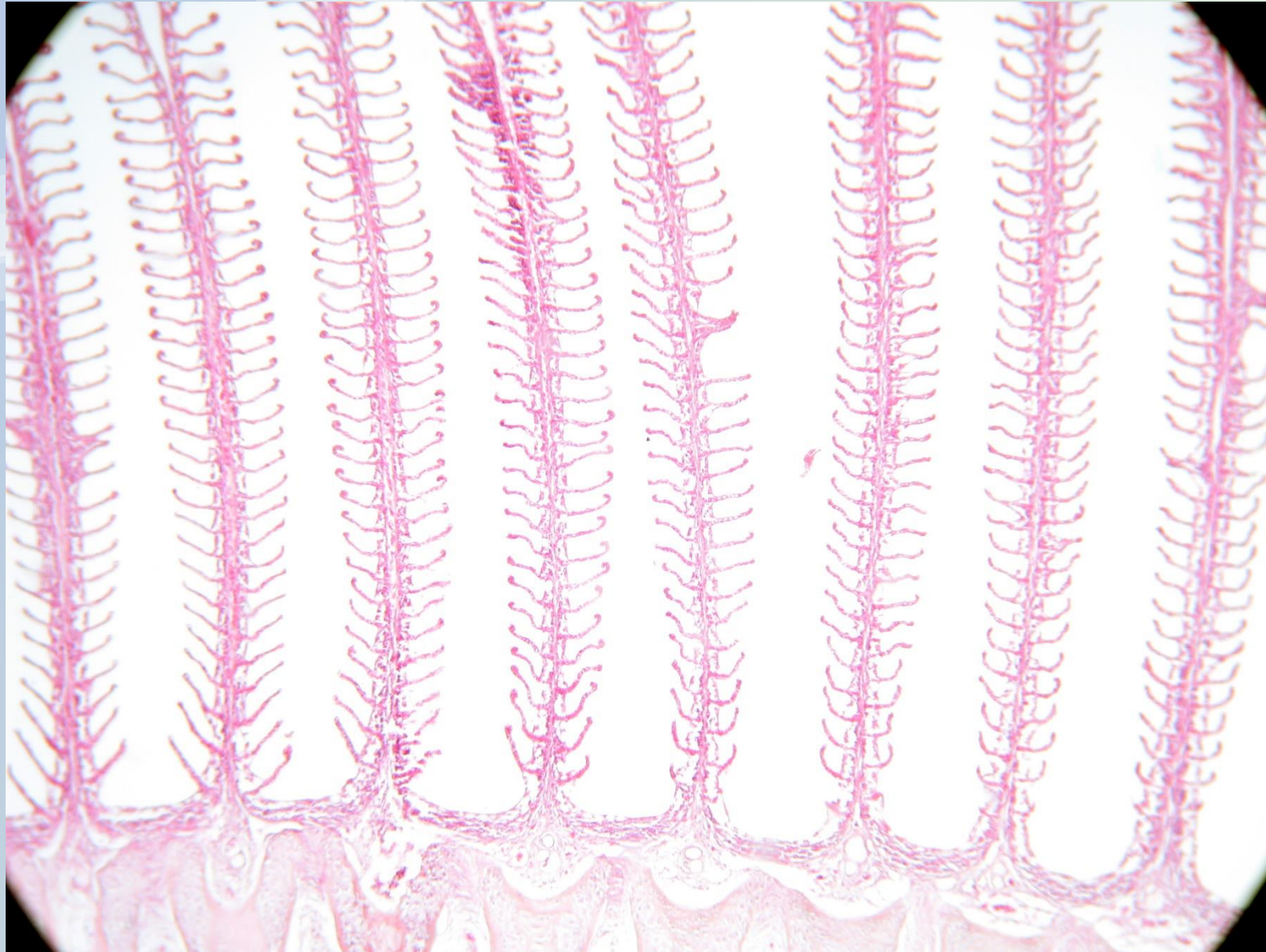


H & E STAIN



VERHOFF STAIN

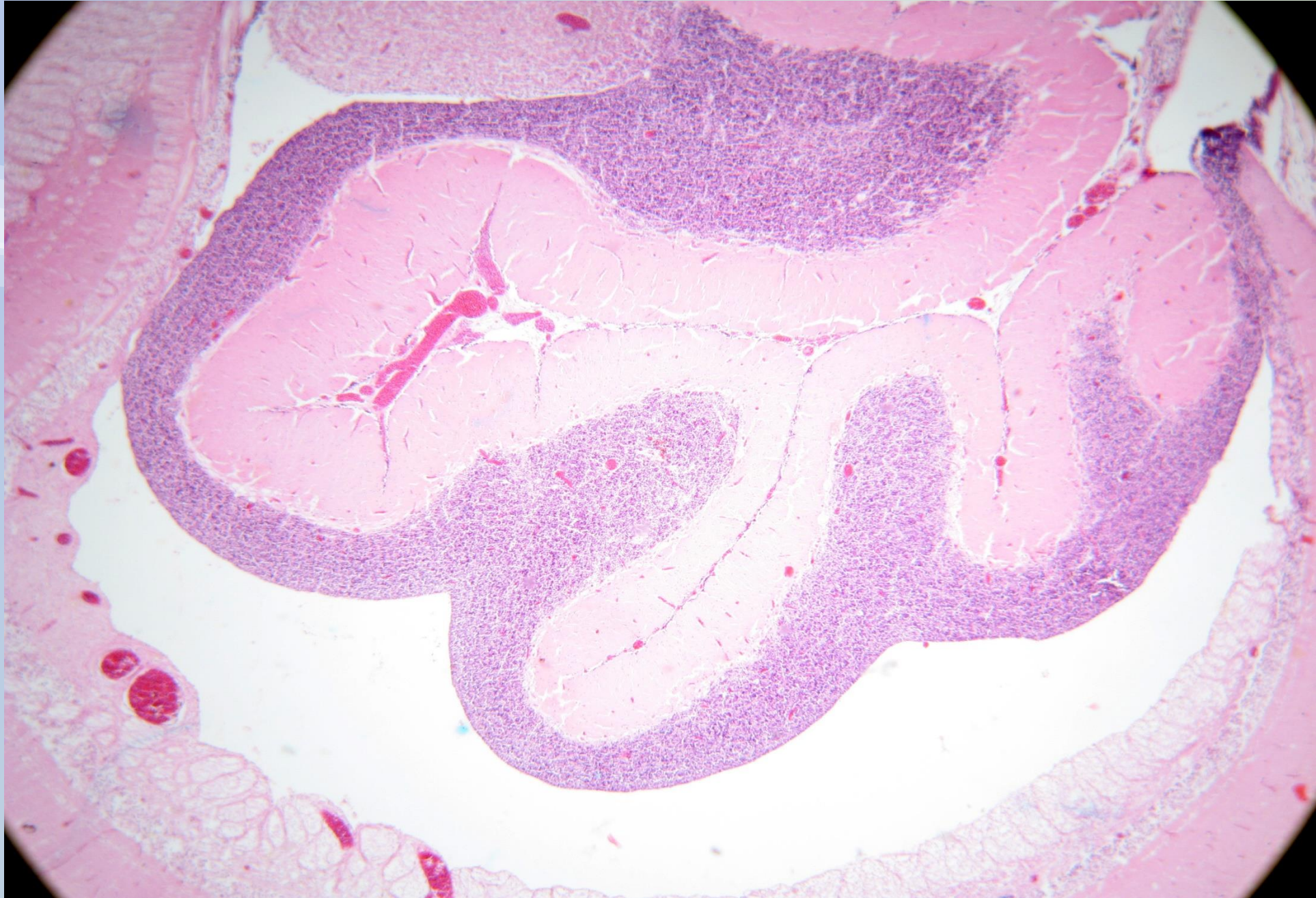
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



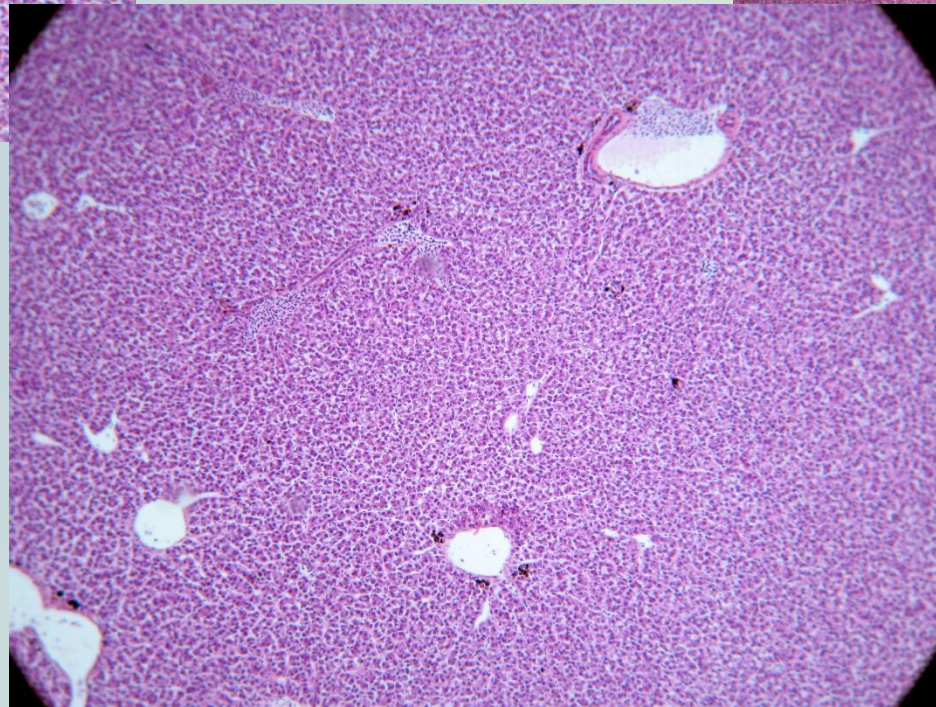
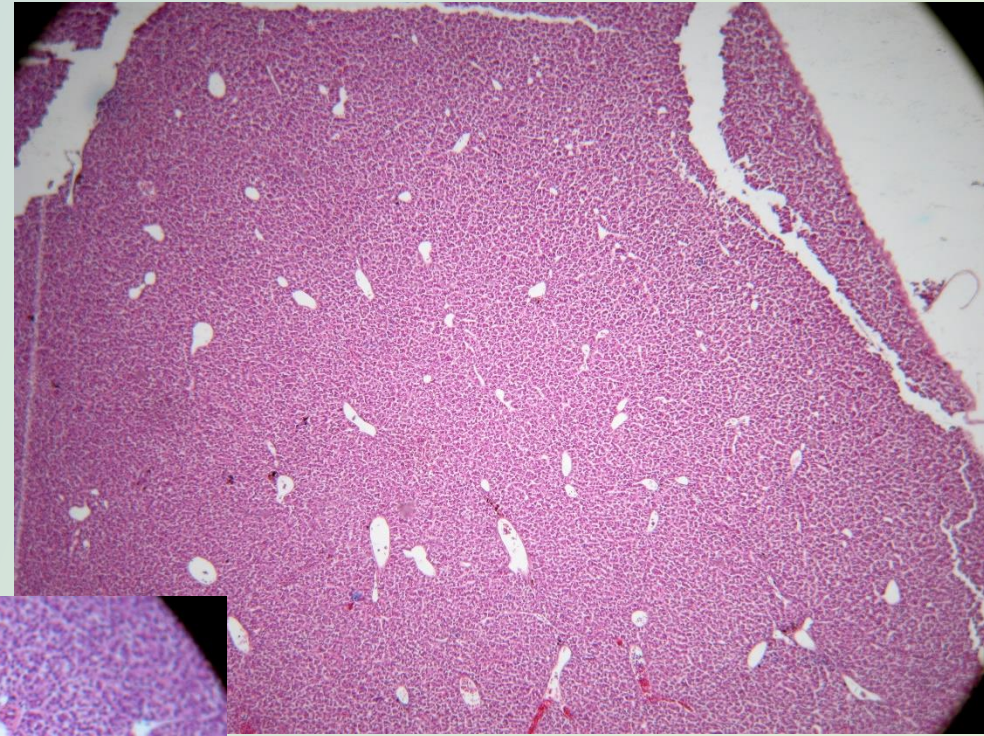
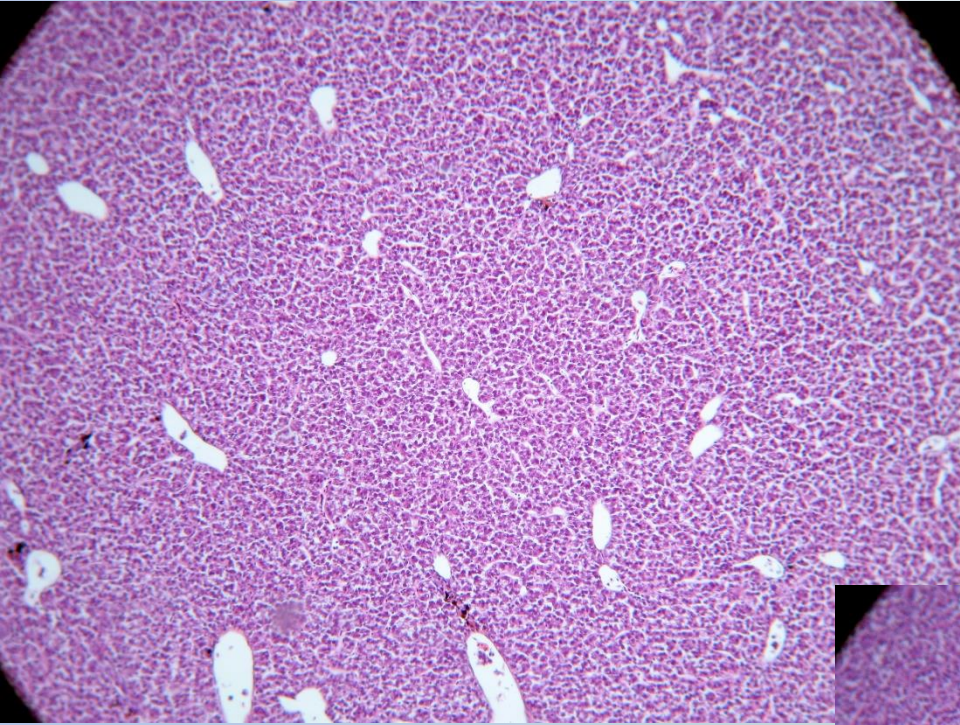
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



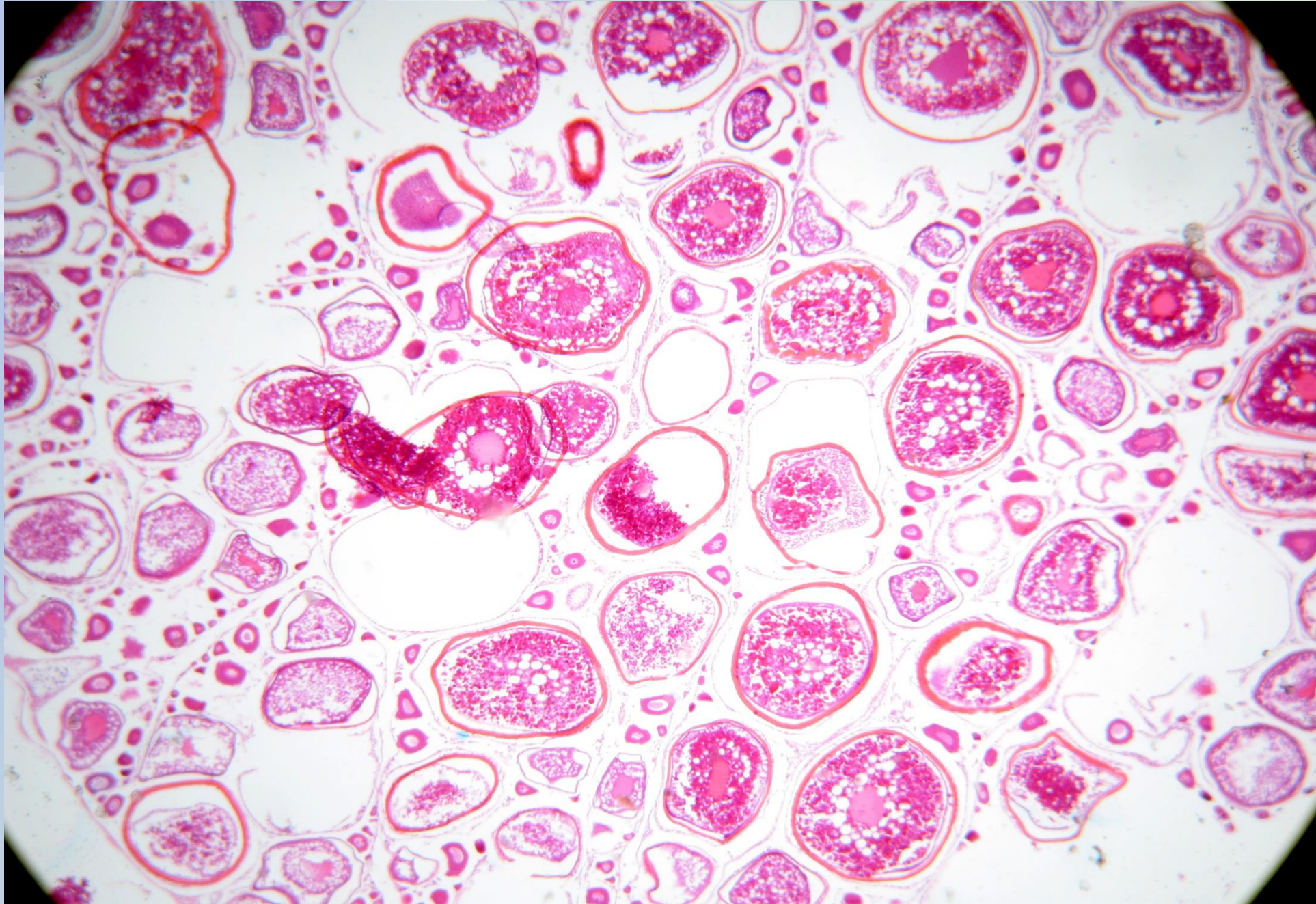
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



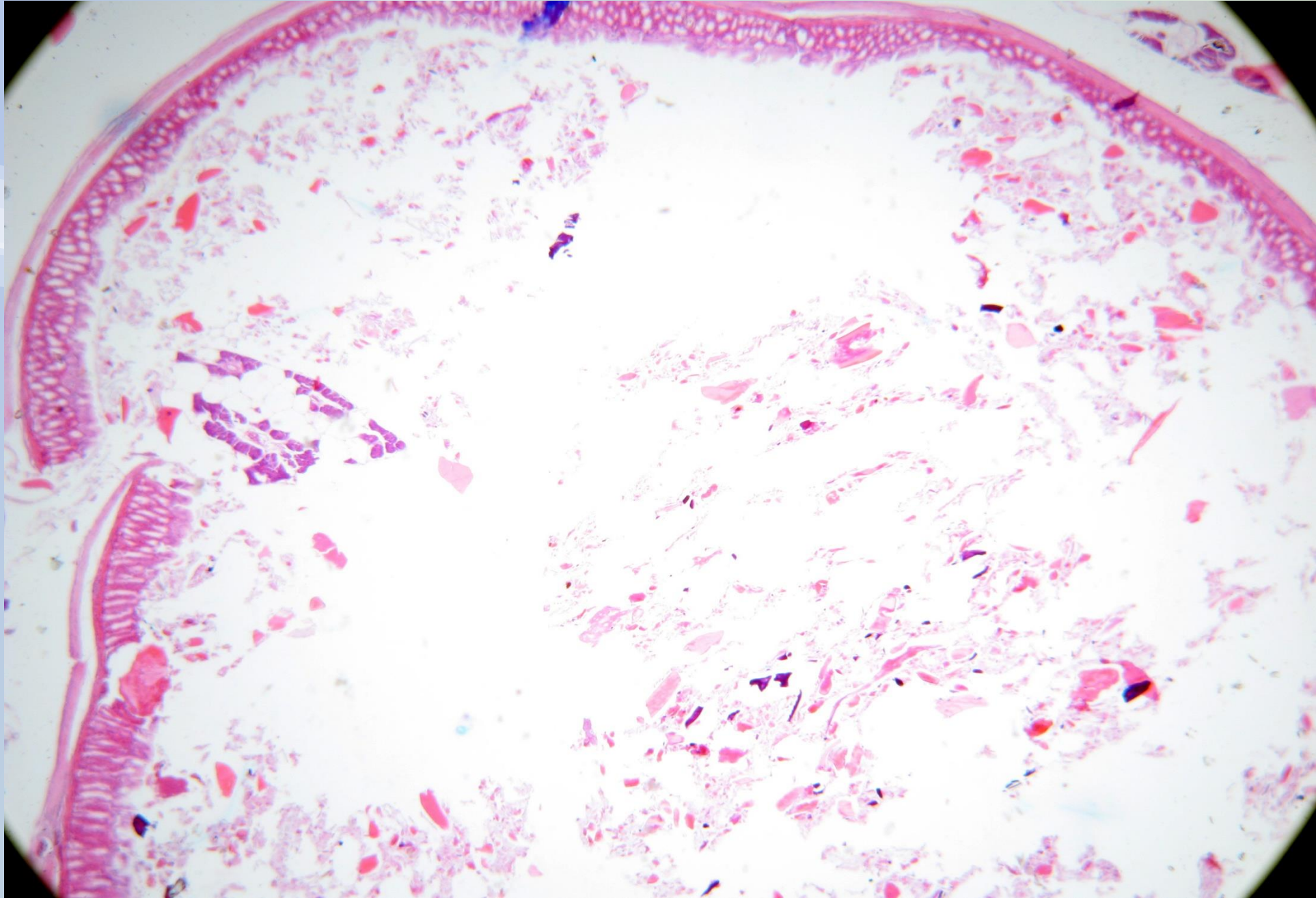
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



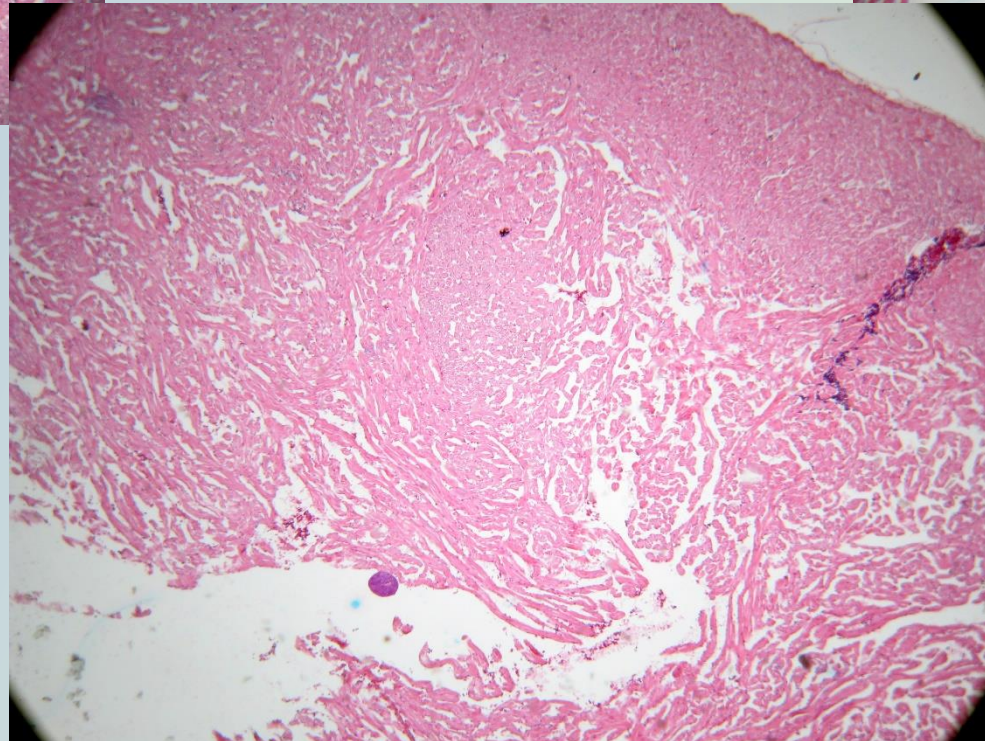
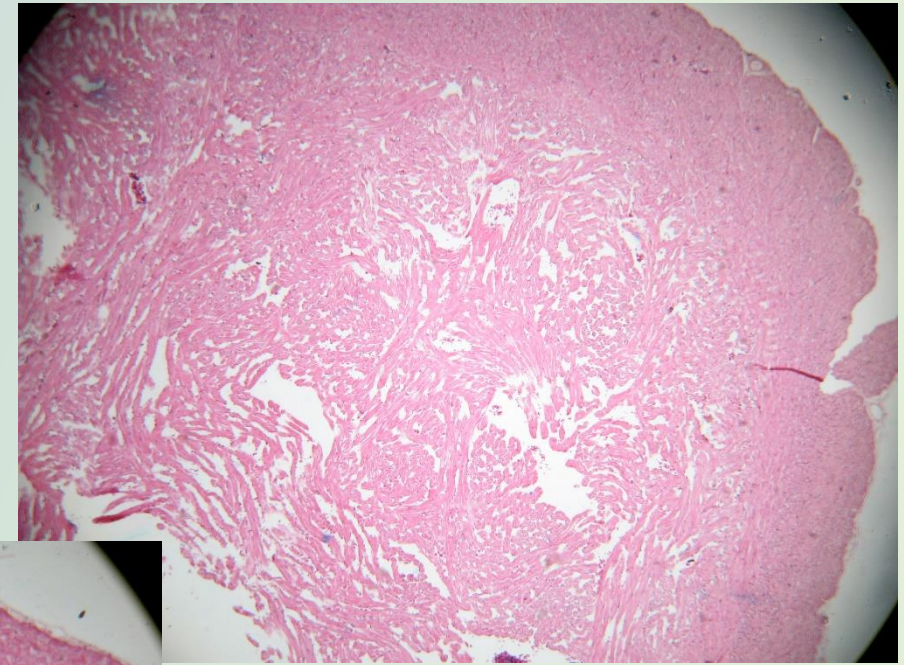
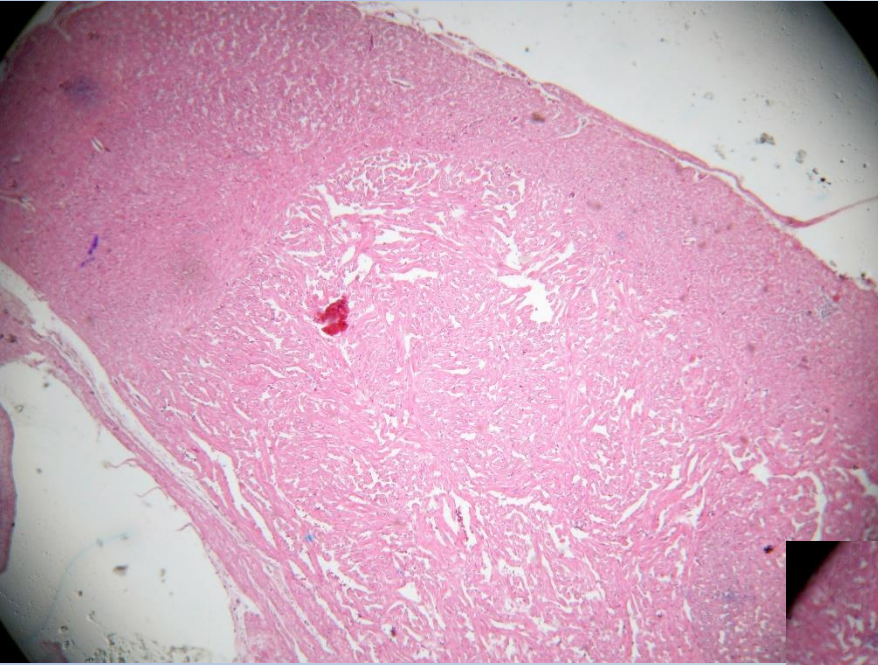
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



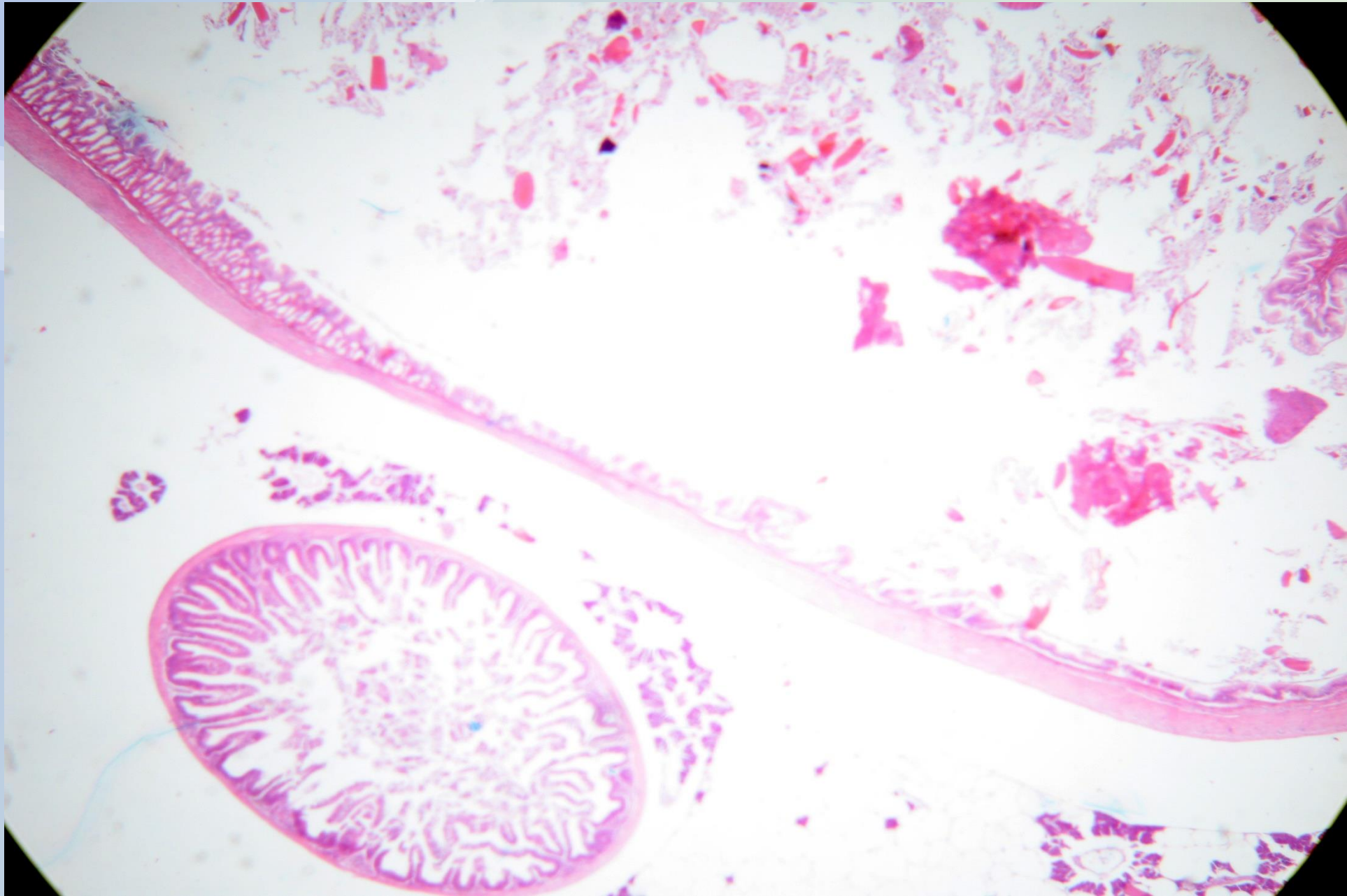
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



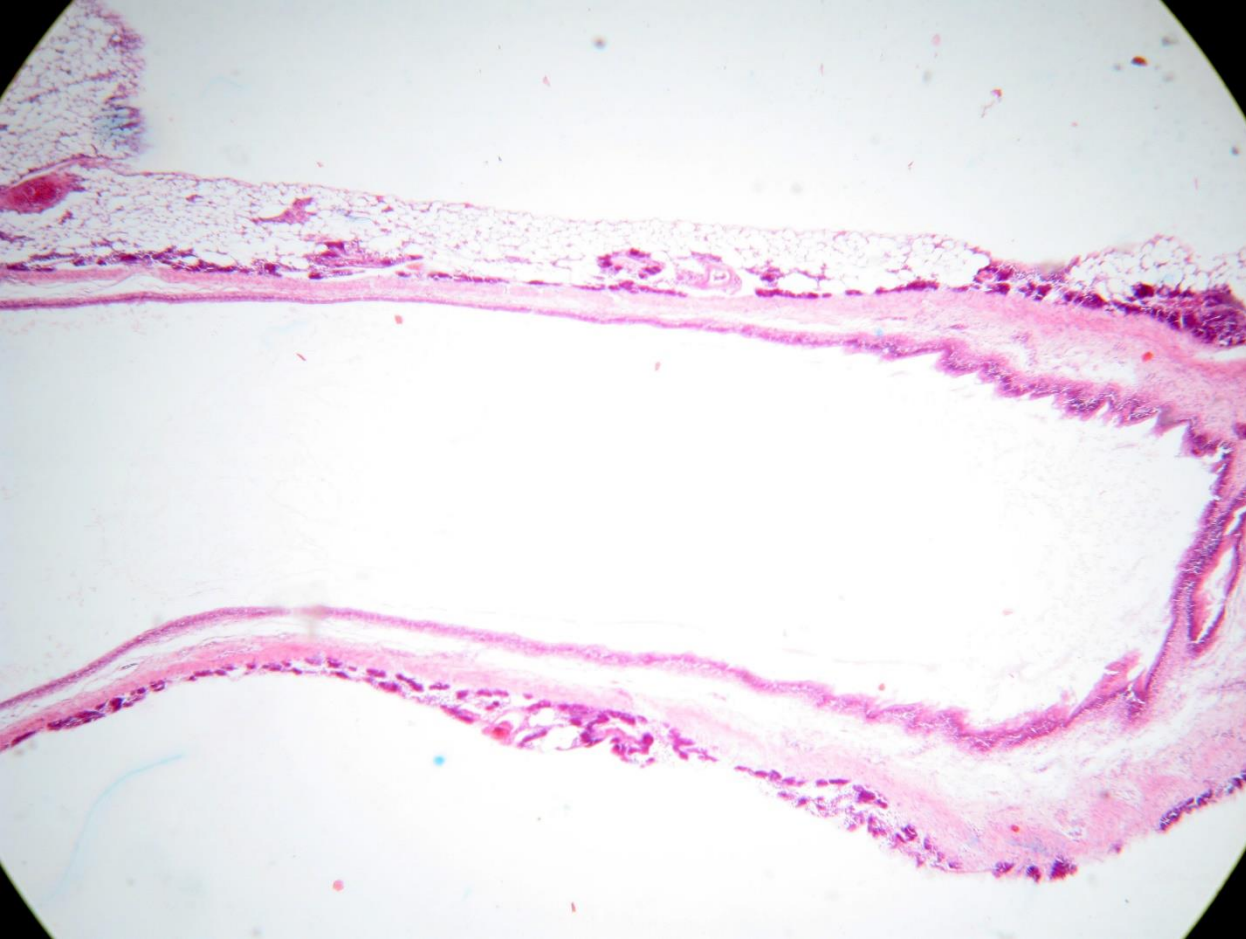
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



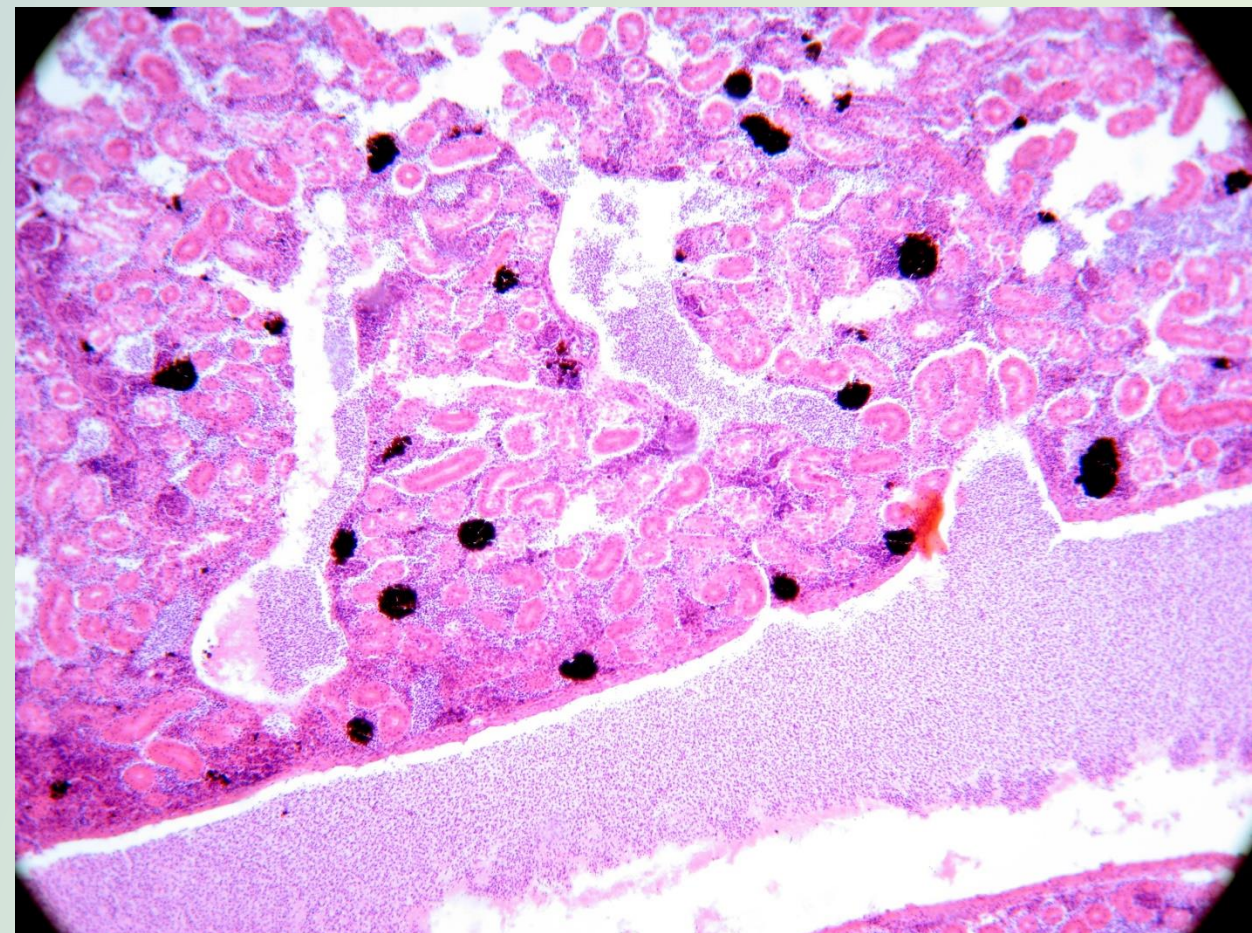
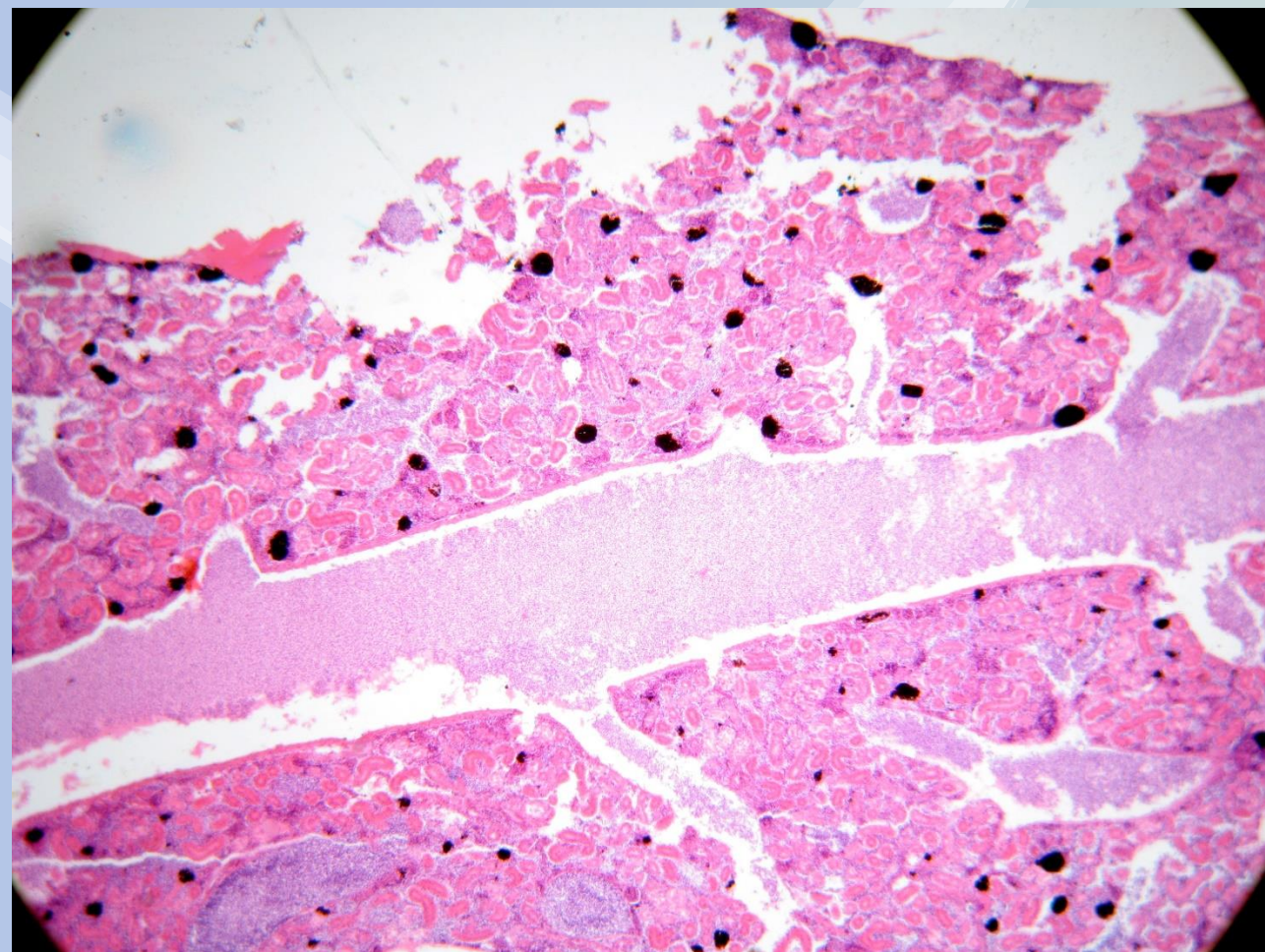
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



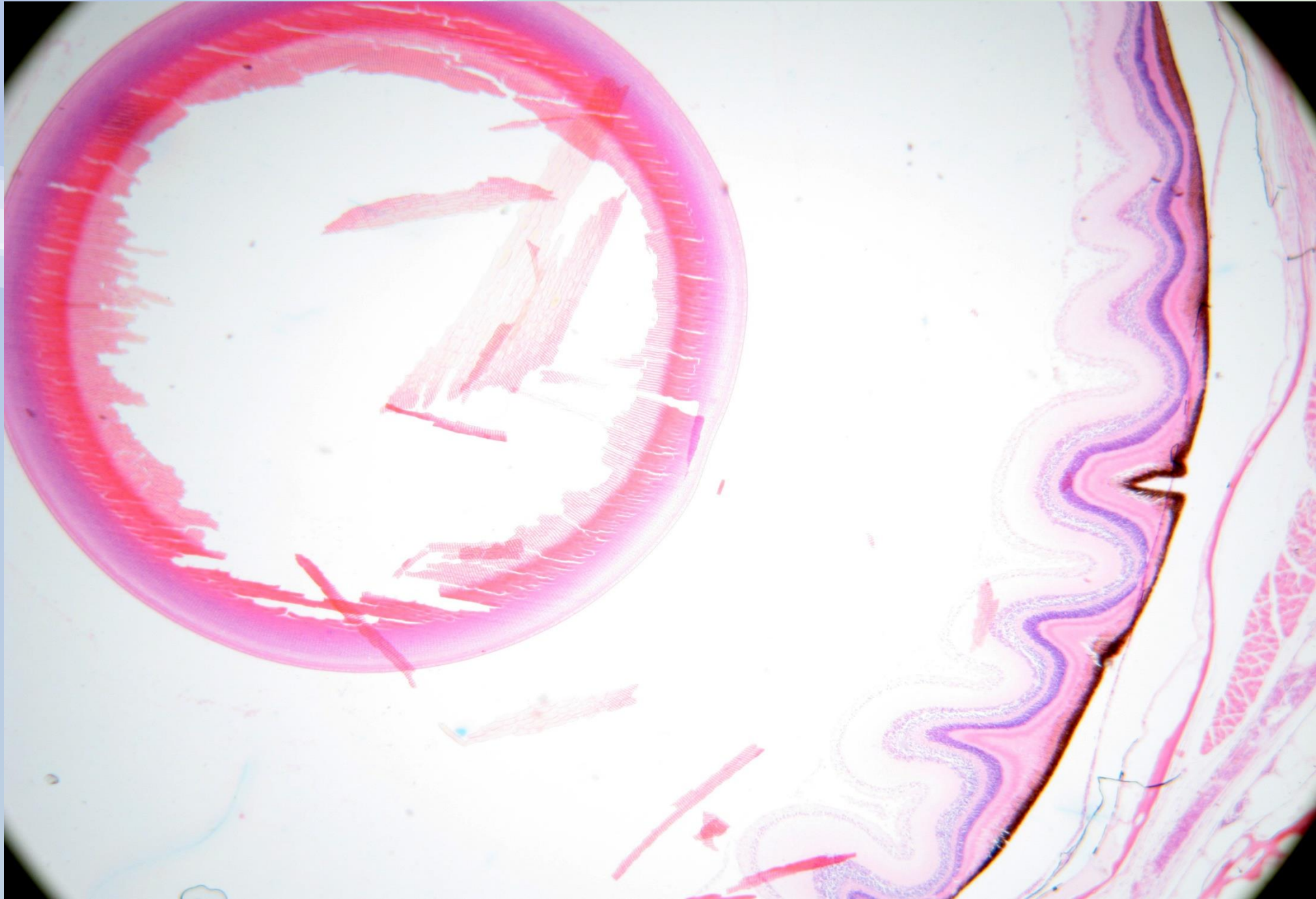
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



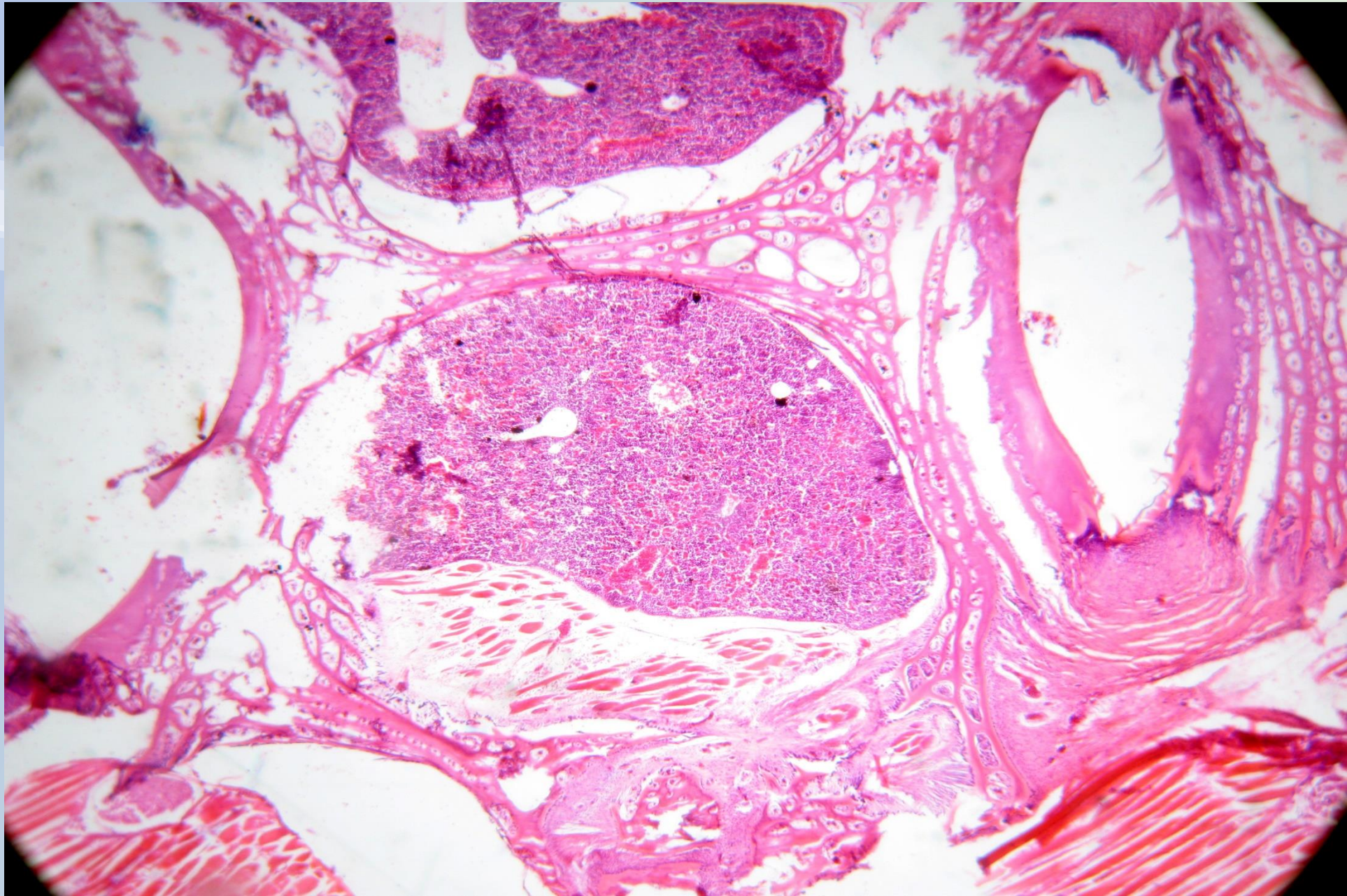
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



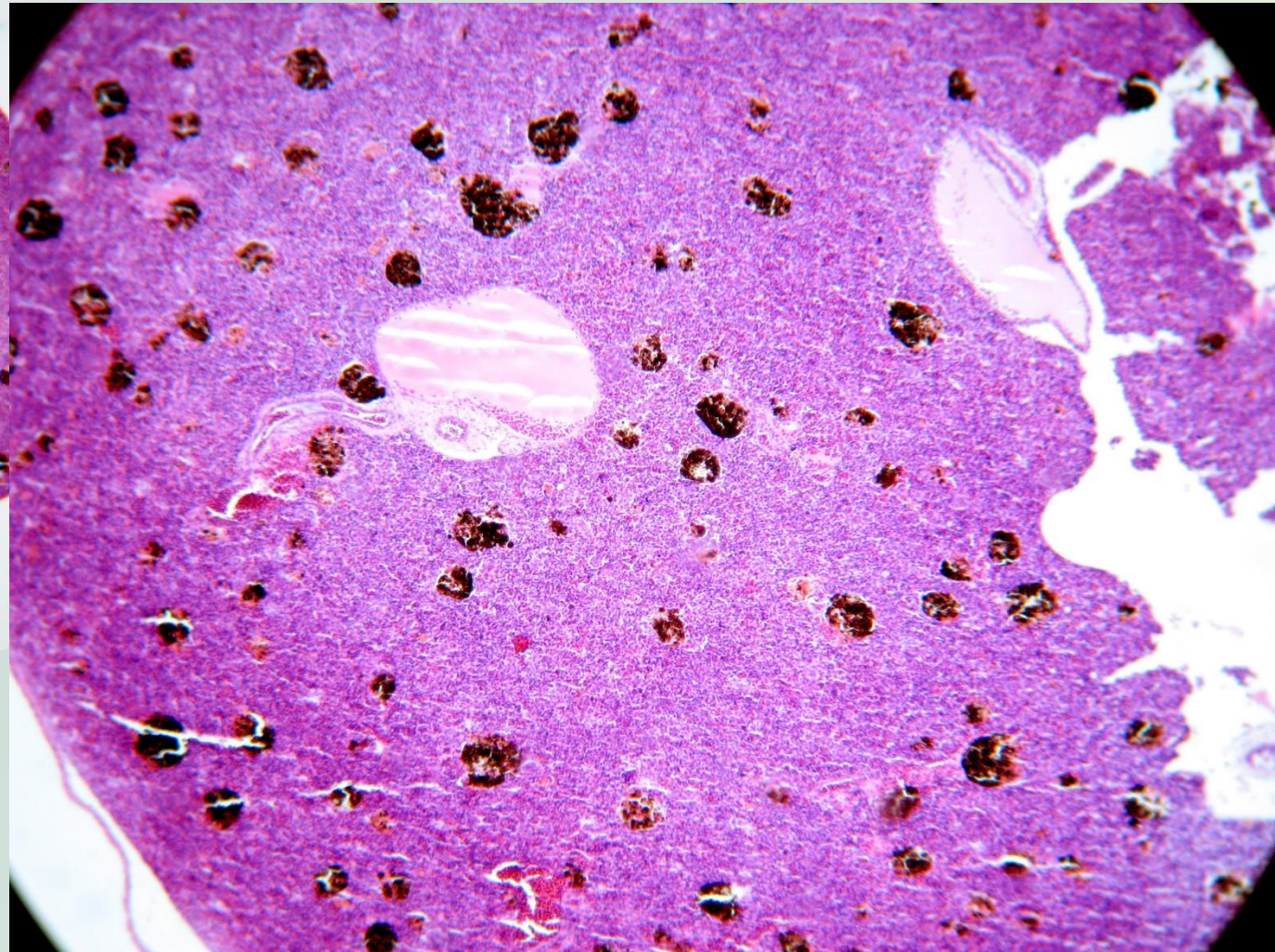
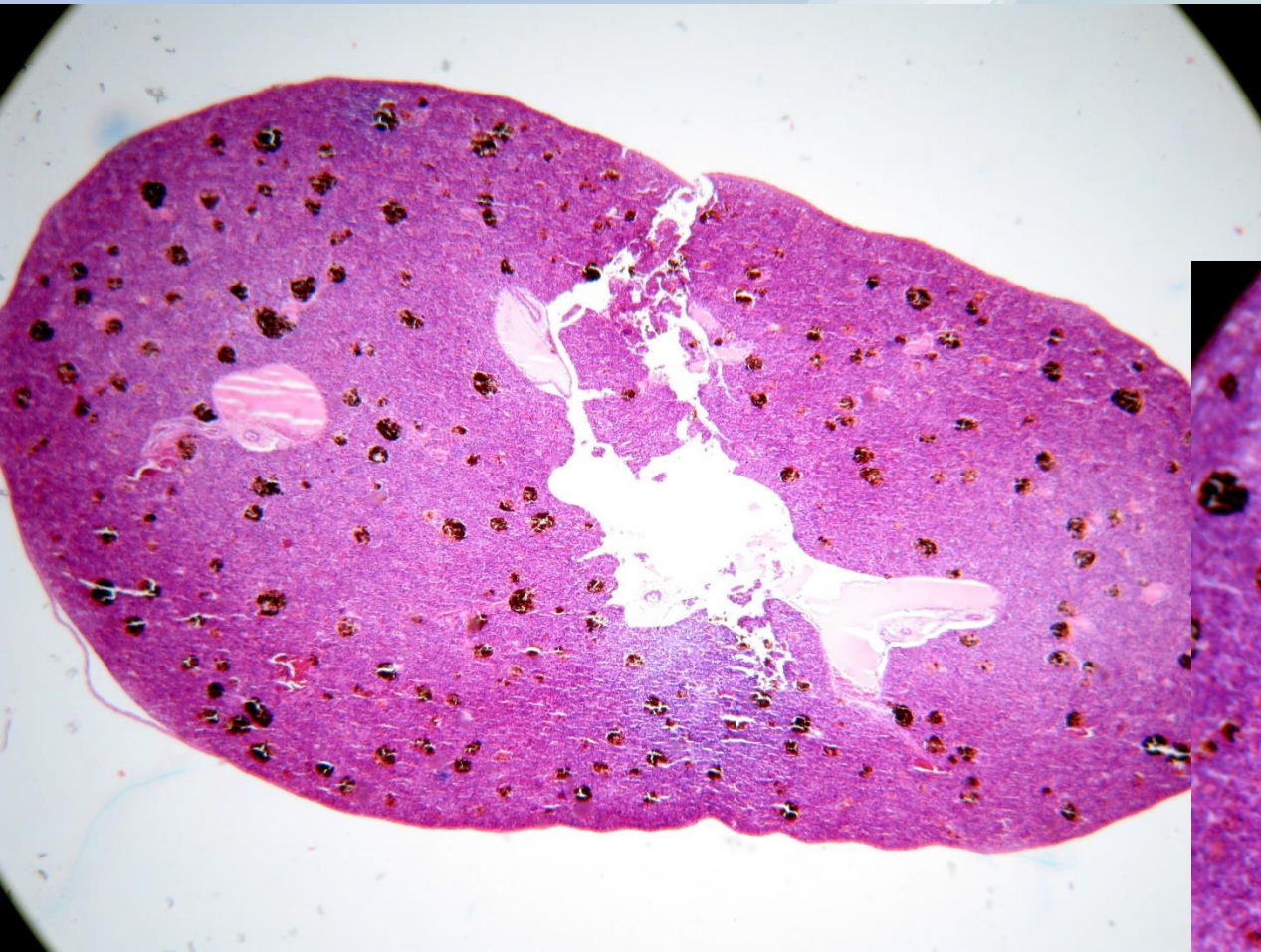
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



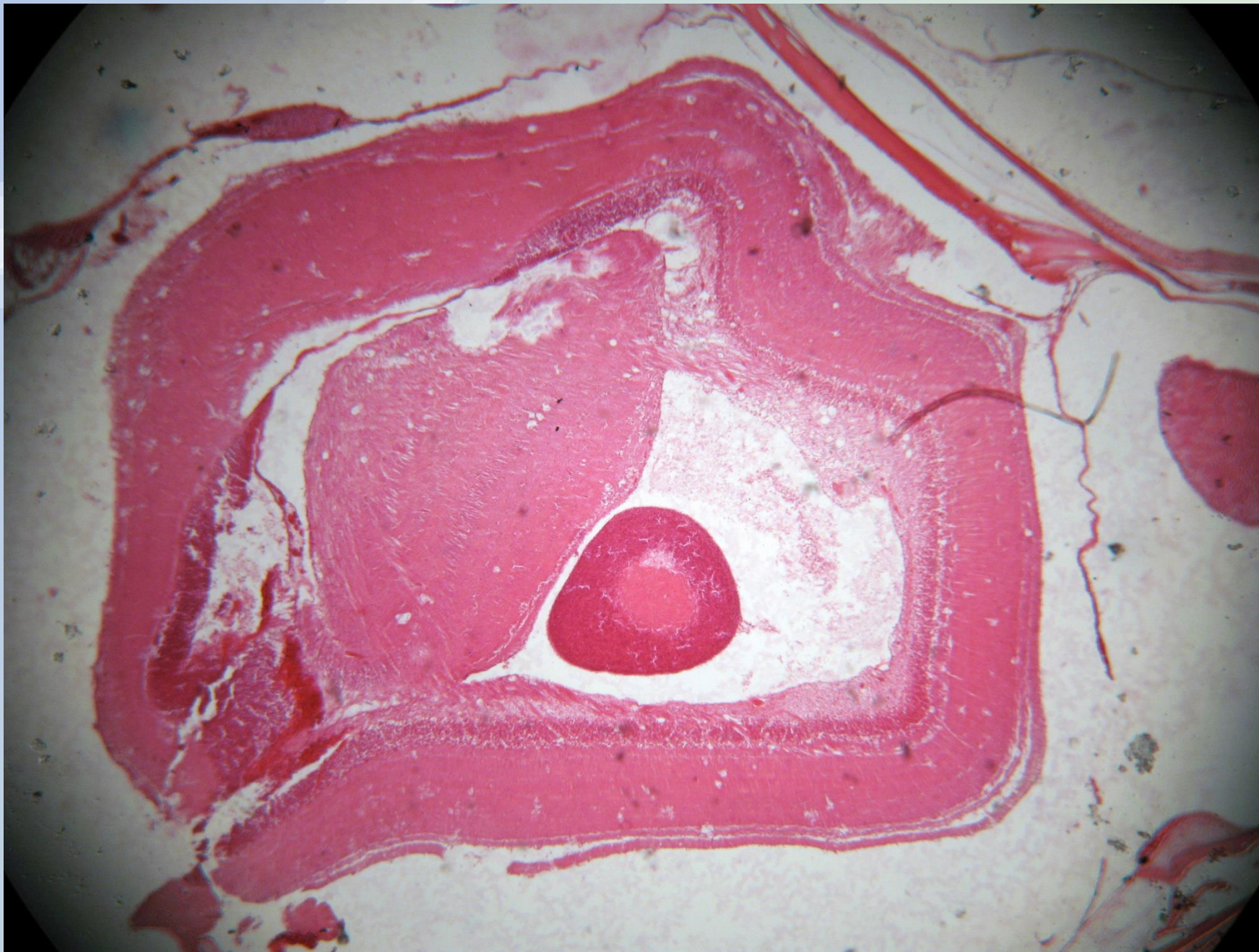
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



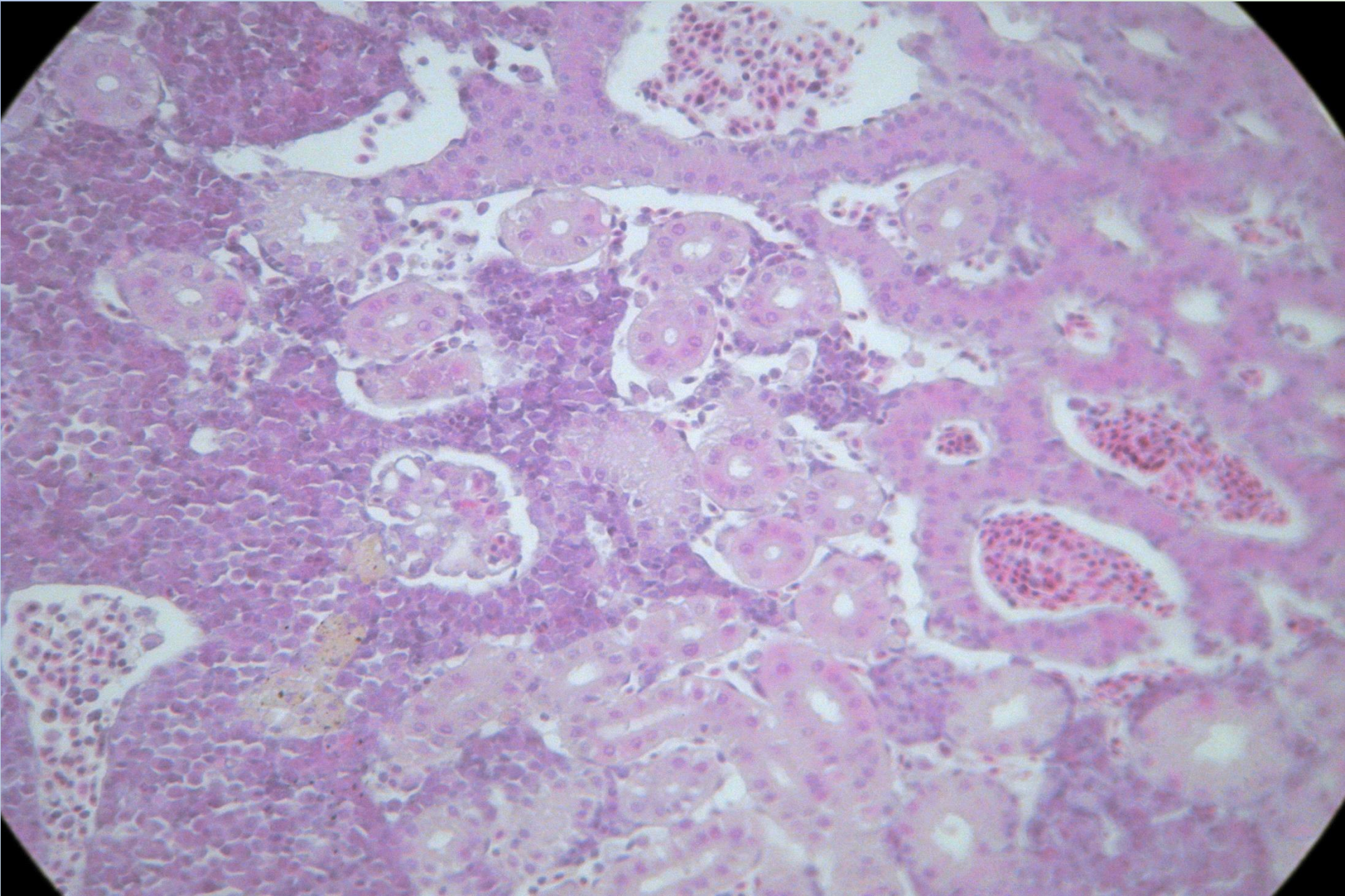
Φυσιολογικοί ιστοί ψαριών



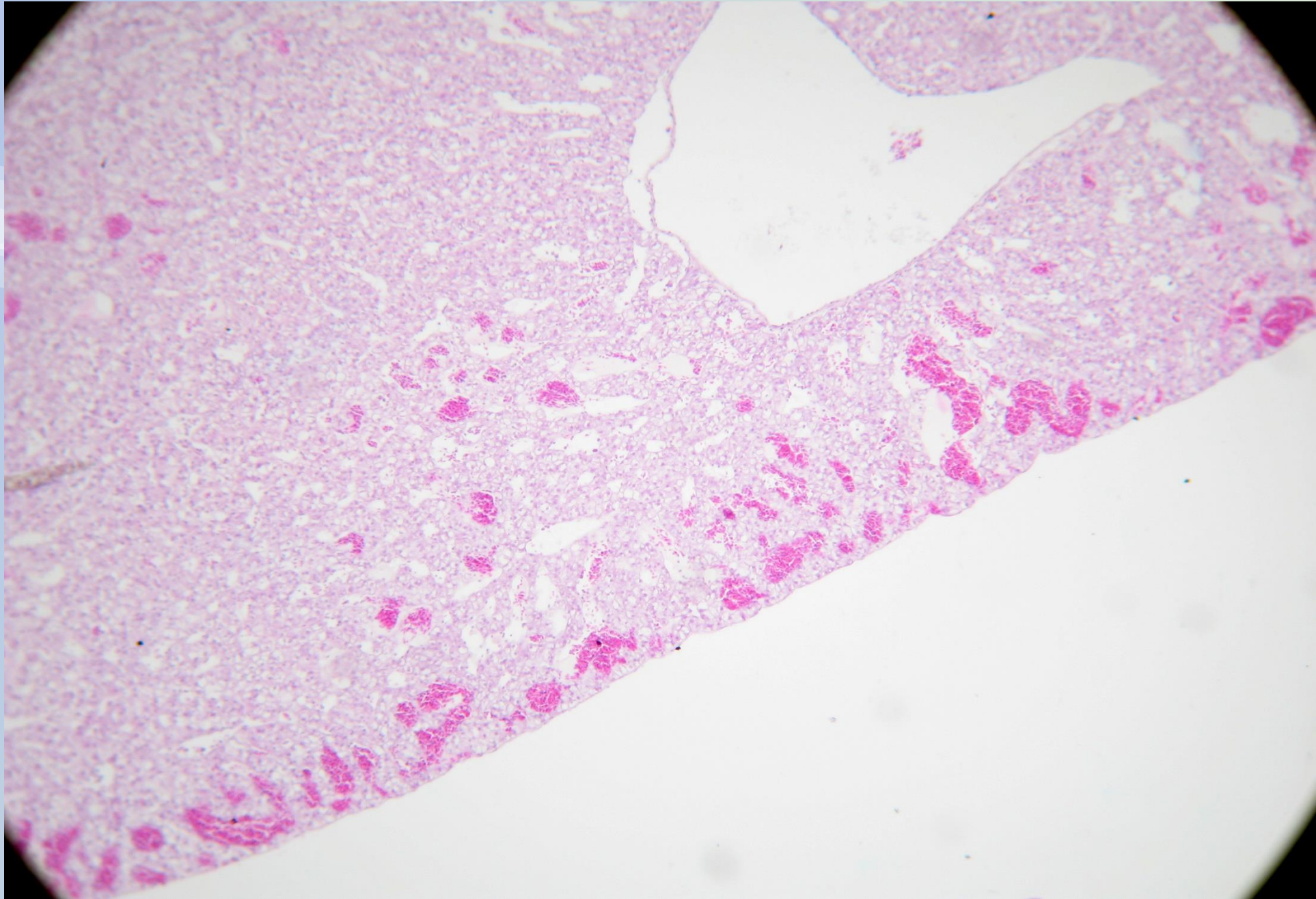
Παθολογικοί ιστοί ψαριών - VER



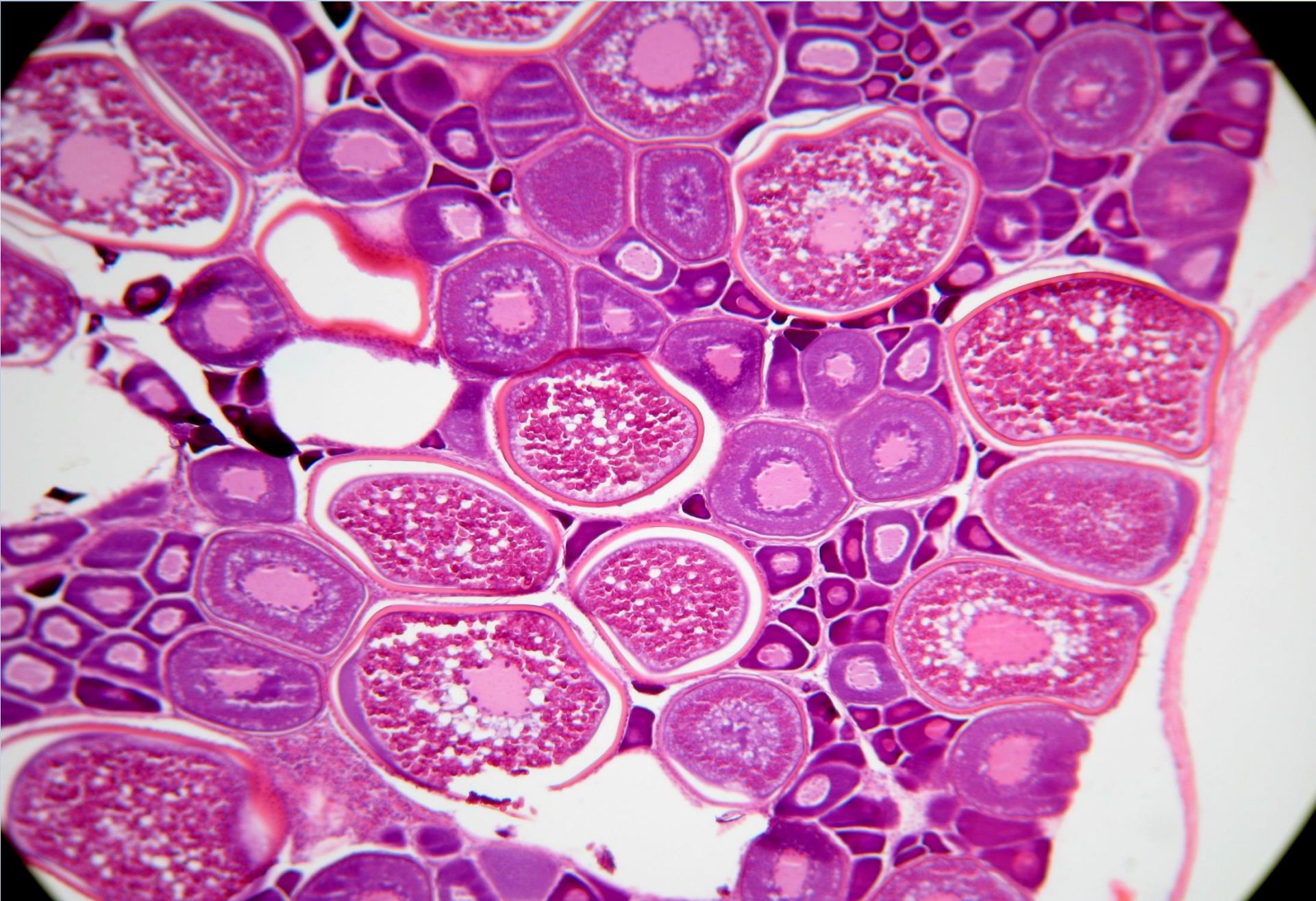
Παθολογικοί ιστοί ψαριών - VHS



Παθολογικοί ιστοί ψαριών - IPN



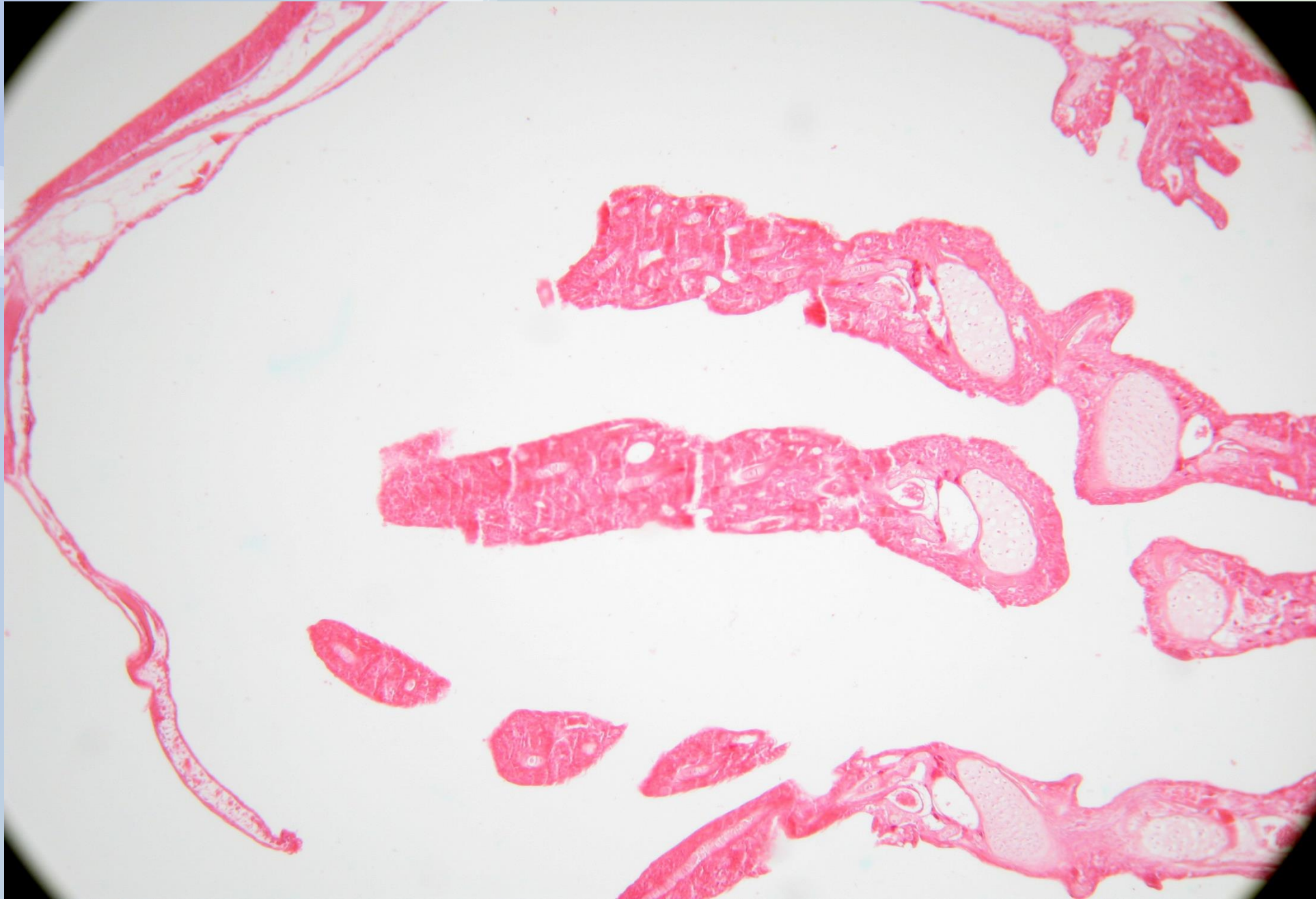
Παθολογικοί ιστοί ψαριών - Flexi



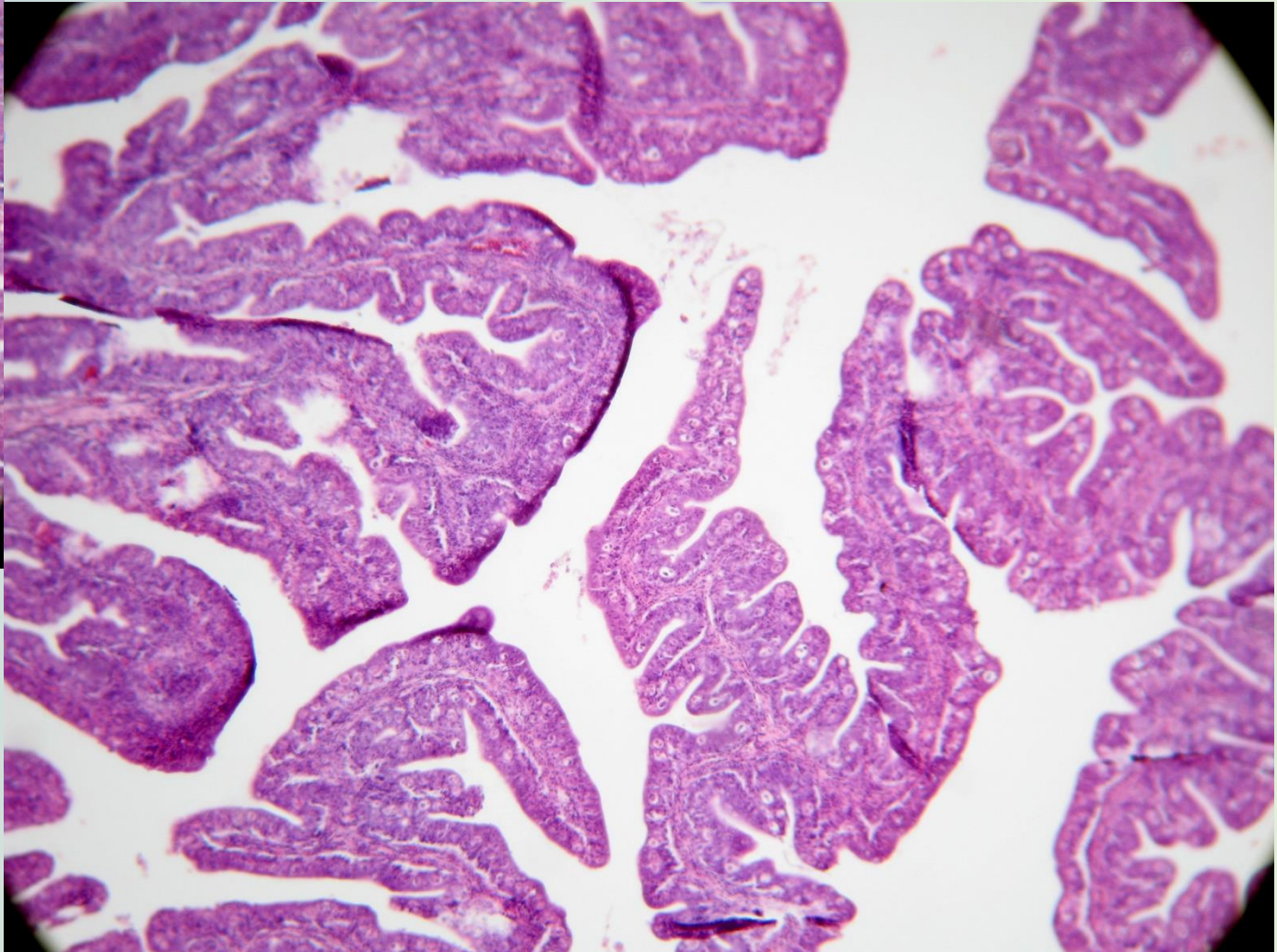
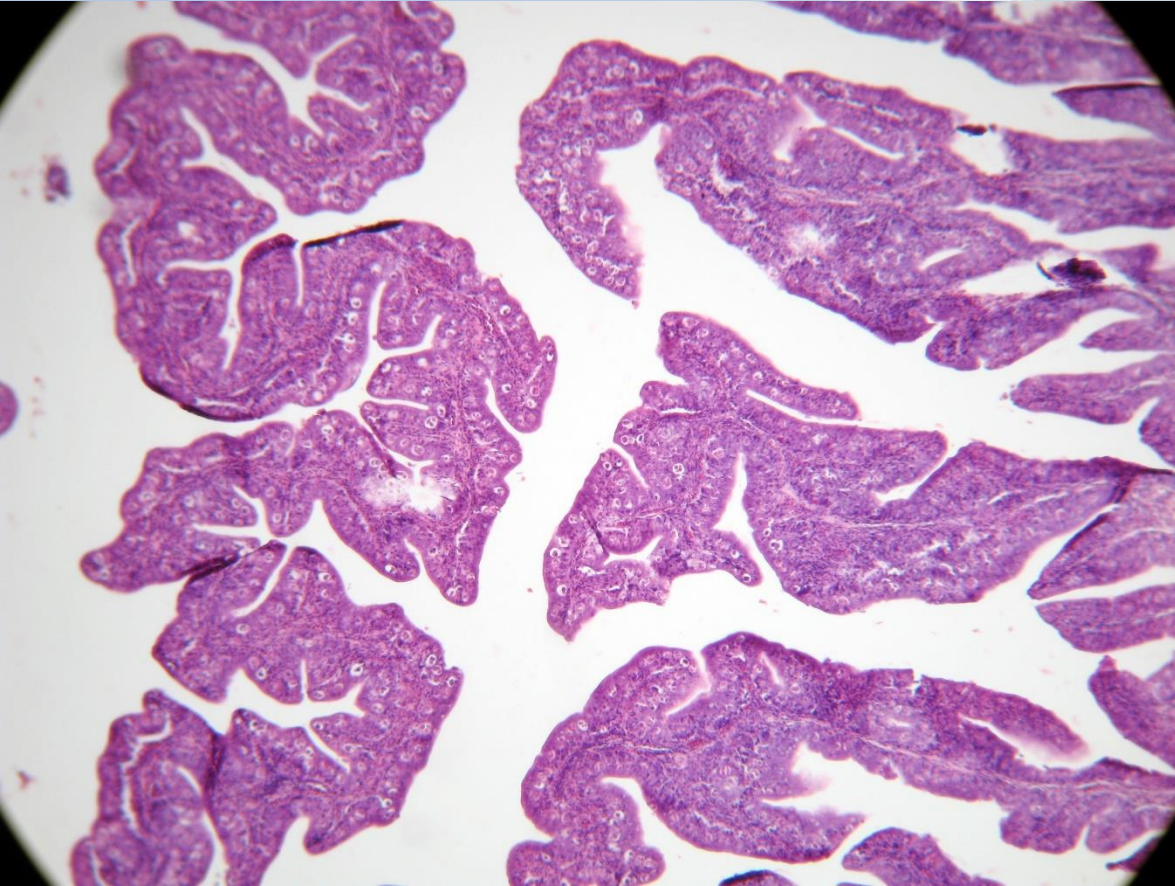
Παθολογικοί ιστοί ψαριών - epitheliocystis



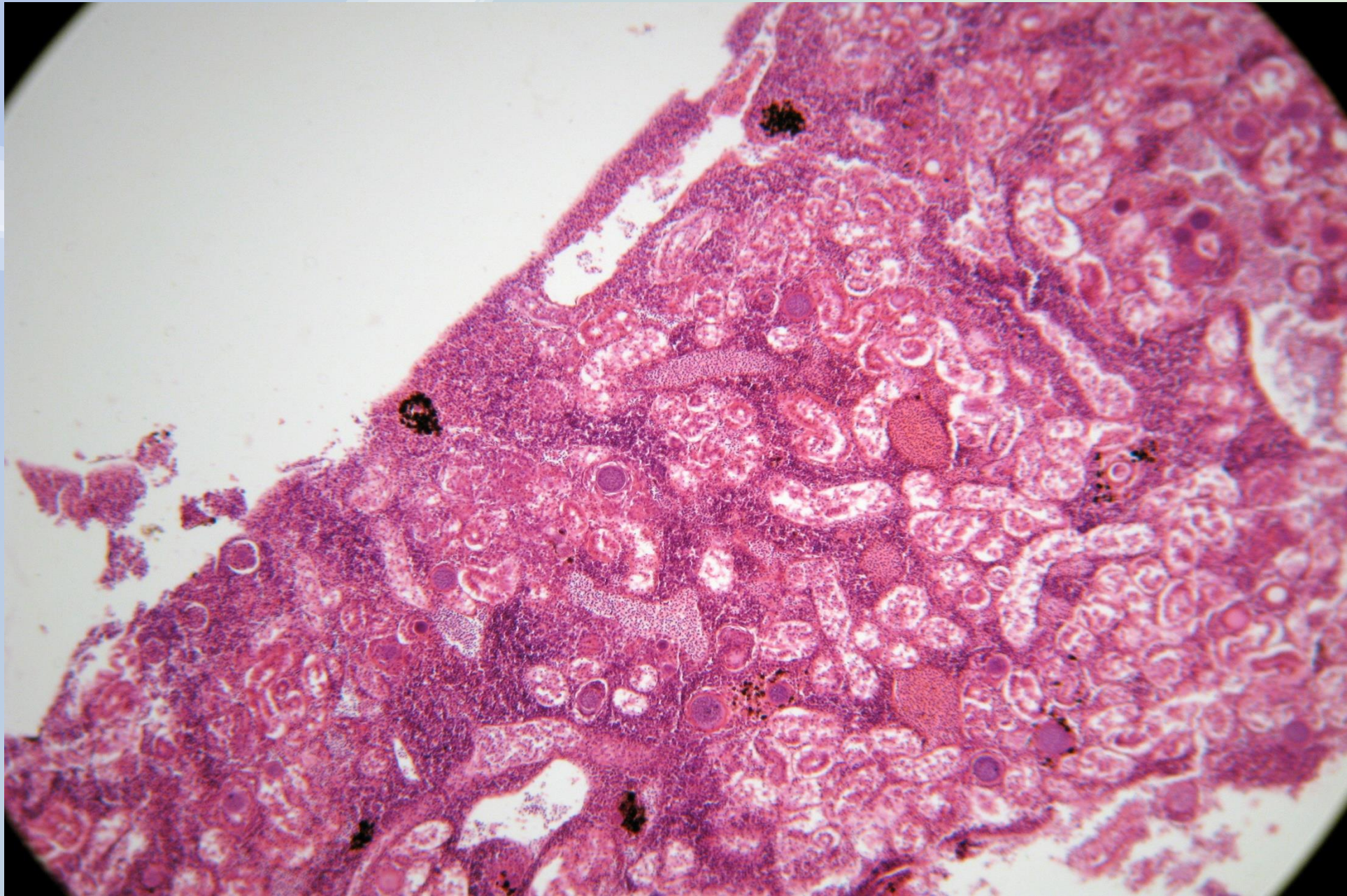
Παθολογικοί ιστοί ψαριών - αποεβα



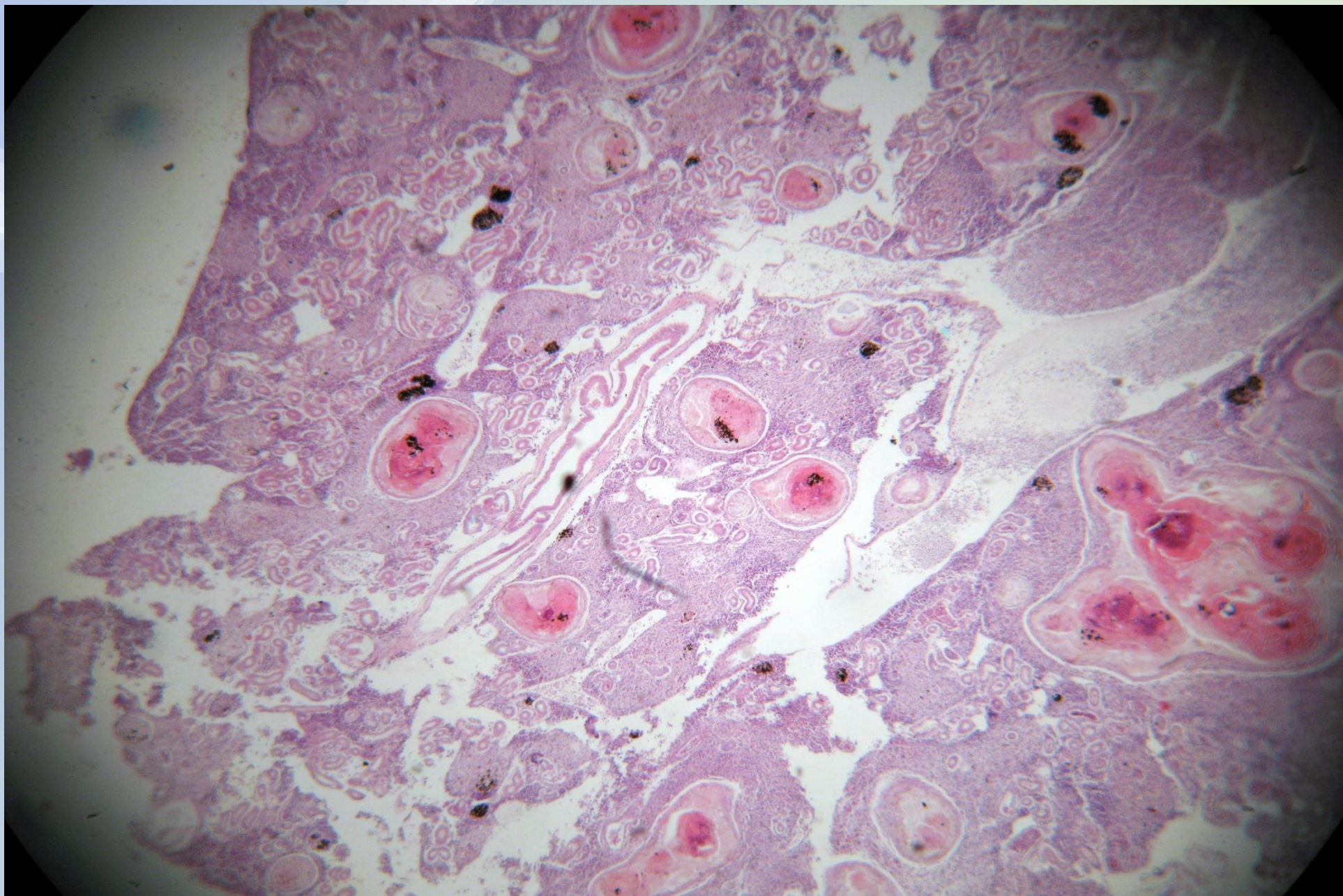
Παθολογικοί ιστοί ψαριών – E. Ieei



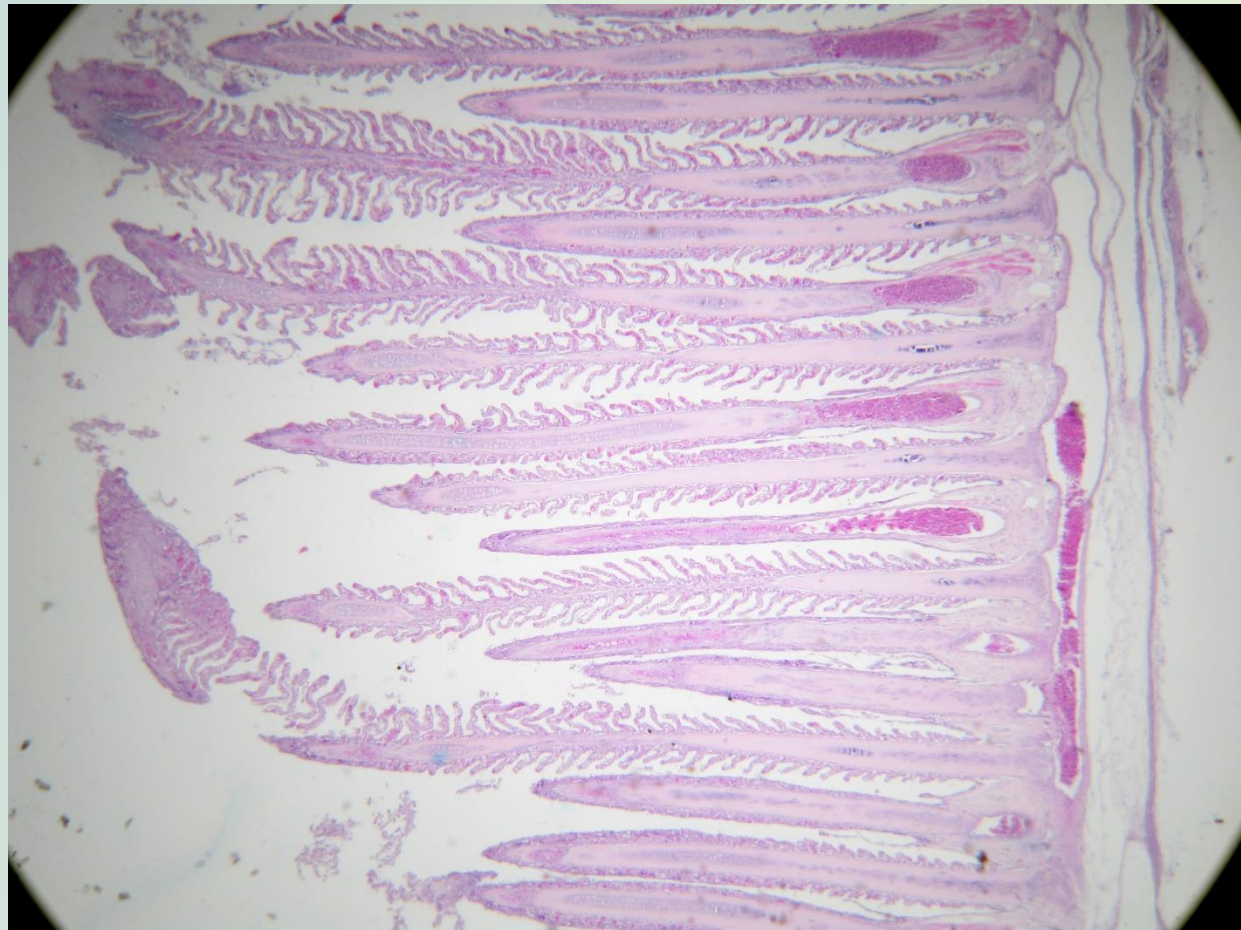
Παθολογικοί ιστοί ψαριών – Ichthyorhonus



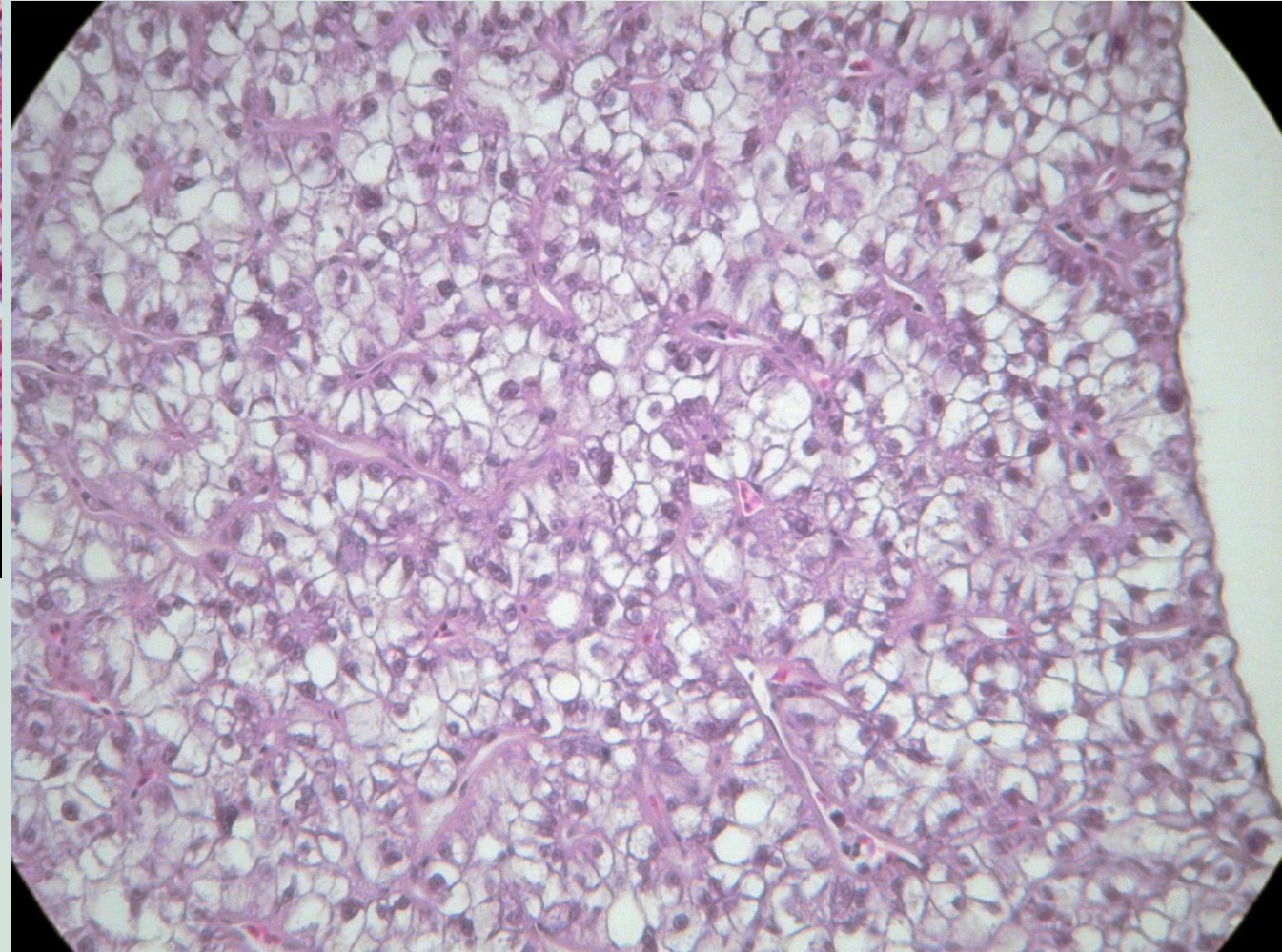
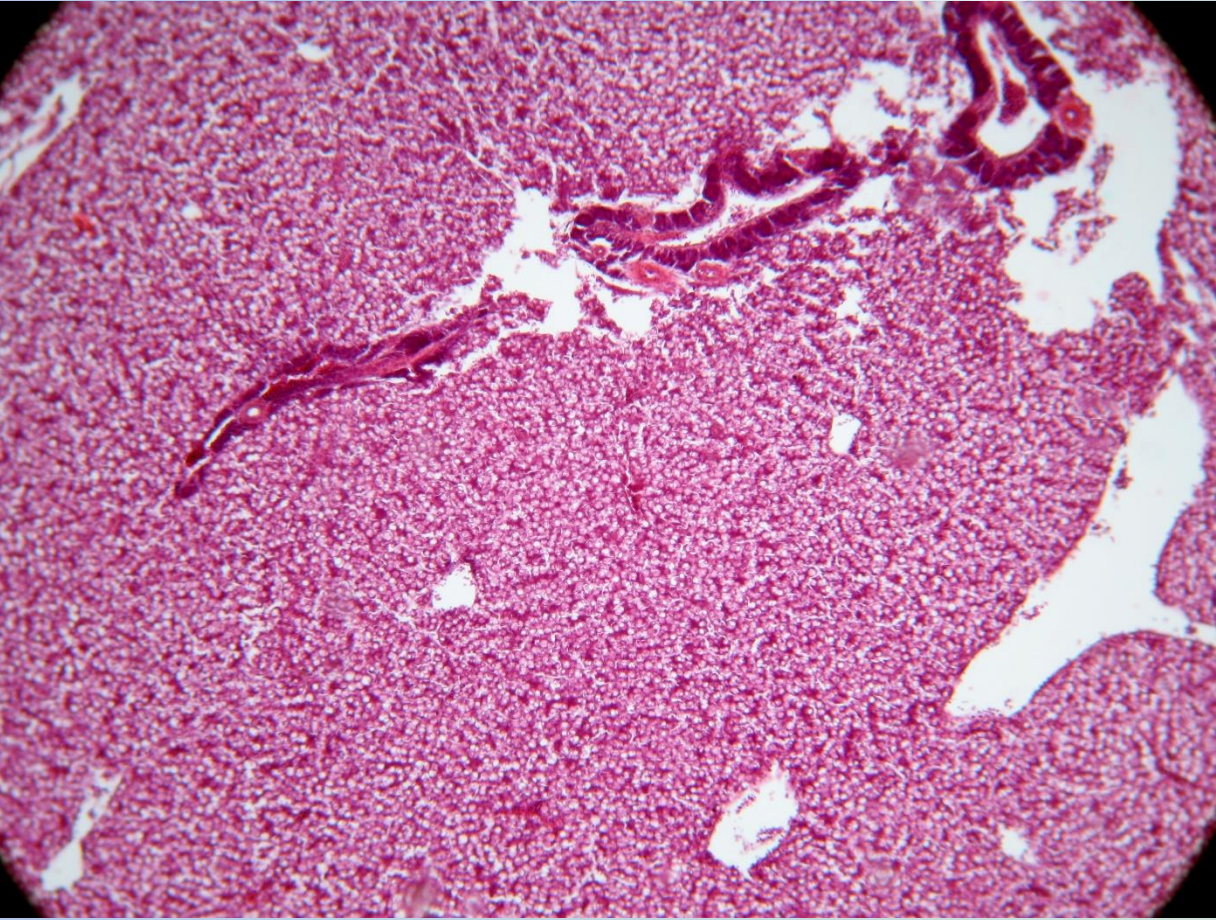
Παθολογικοί ιστοί ψαριών – Granuloma



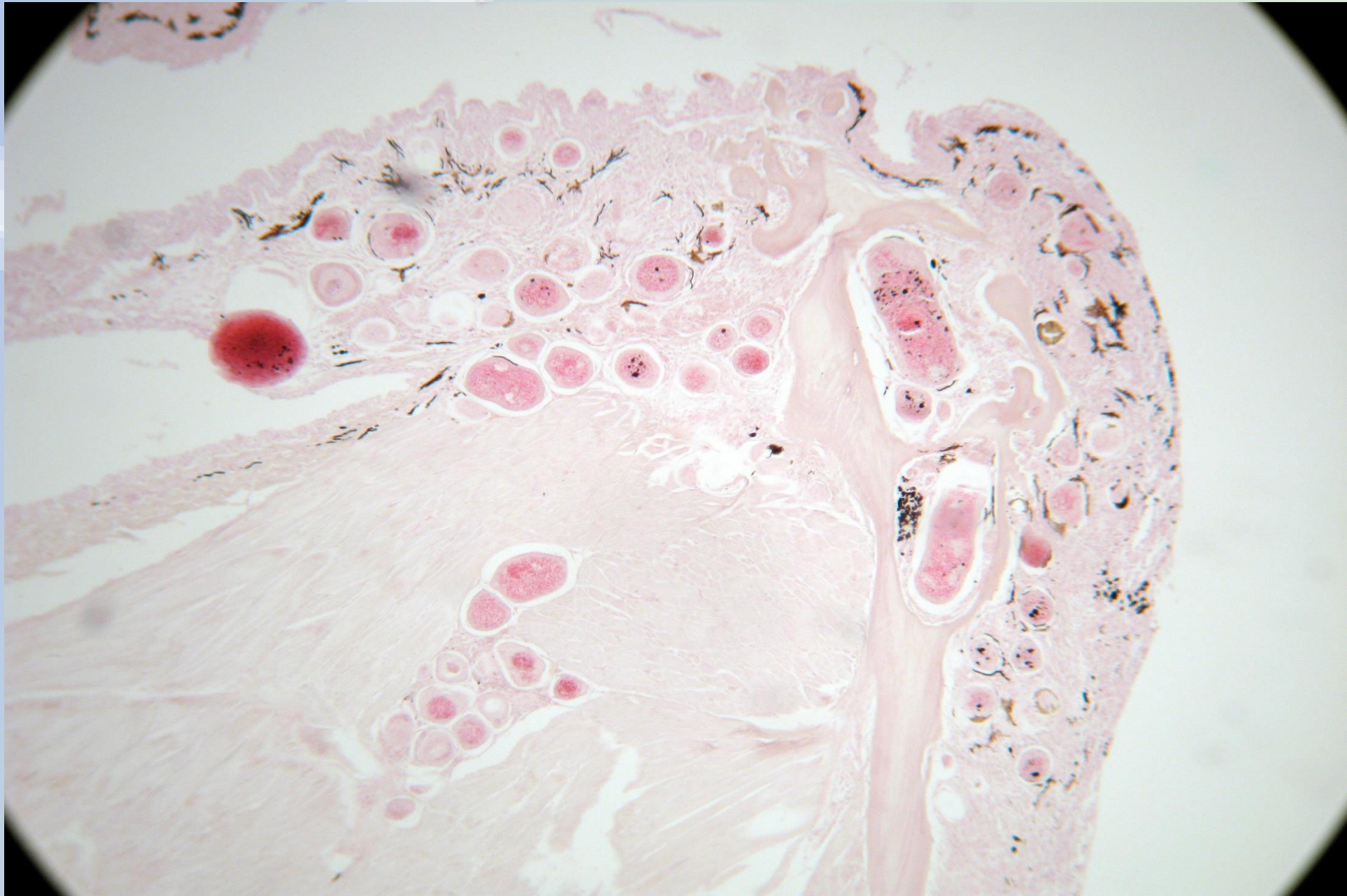
Παθολογικοί ιστοί ψαριών – Hyperplasia nutritional (i.e. pantothenic acid)



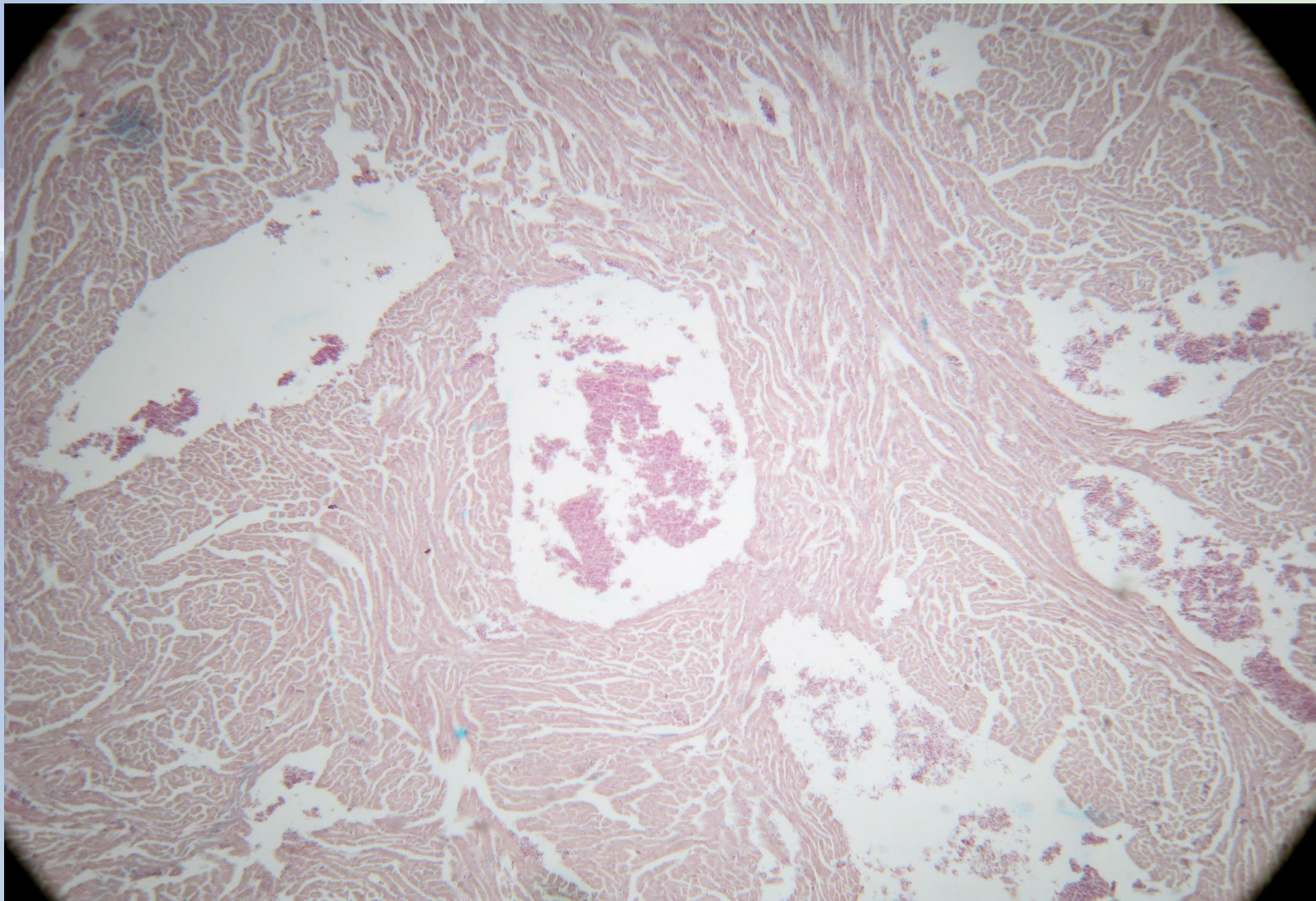
Παθολογικοί ιστοί ψαριών – Fatty degeneration



Παθολογικοί ιστοί ψαριών – Jaw nodules



Παθολογικοί ιστοί ψαριών – Urolithiasis



Παθολογικοί ιστοί ψαριών – systematic granulosis

