

Histologische Techniek (Deel 2)

Het eerste deel behandelde het proces van weefselafname tot aan inbedding in paraplast. Dit tweede deel behandelt het microtoomsnijden, kleuren en insluiten in kunsthars.

Ook deze keer wordt er volgens een vast patroon gewerkt. De blokken worden met een microtoom gesneden; in deze bijdrage is gekozen voor een rotatiemicrotoom. Bij dit microtoom beweegt het weefsel verticaal langs een vast staand mes. Plantaardig materiaal wordt misschien beter gesneden op een sledemicrotoom. Hier beweegt het mes zich in lengterichting langs het vast opgestelde weefsel.

De coupes worden gesneden, gestrekt, ontdaan van paraffine en gekleurd. In deze bijdrage wordt een trichroomkleuring volgens Mallory uit 1900 uitgevoerd. De coupes worden na het kleuren wederom gedehydrateert en in een kunsthars ingesloten. Nadat de preparaten gearchiveerd zijn kunnen ze in een preparaatdoos worden opgeborgen en jaren worden bewaard zonder dat de hun kleurkwaliteiten verliezen.

1. Weefsel snijden met een microtoom
2. Coupes bevestigen op een objectglas
3. Paraffine verwijderen en terug in water brengen (hydreren)
4. Kleuren
5. Preparaat houdbaar maken

1. Microtoomsnijden

Een microtoom is een stuk gereedschap dat niet elke dag aangeschaft wordt. Voor aanschaf moet goed worden nagedacht wat de histoloog met het microtoom bereiken wil. Een microtoom is een precisieinstrument en daarom vrij duur in aanschaf. Een eenvoudig handaangedreven, maar zeer goed bruikbaar, microtoom is b.v. een A&O 820 (figuur 1). Hiermee zijn paraffinecoupes van hoge kwaliteit te snijden. Belangrijk is natuurlijk dat het microtoom mechanisch perfect werkt, geen roest of speling heeft en de beschikking heeft over goede messen. Het mes is eigenlijk het belangrijkste deel van het microtoom. Er bestaan vaste stalen messen die nageslepen kunnen worden en losse stalen messen voor éénmalig gebruik. In deze bijdrage wordt gesneden met Leica 818 hoogprofiel wegwerpmesjes (figuur 2). Daarvoor beschikt het microtoom over een speciale meshouder geschikt voor deze mesjes. Belangrijk is dus dat deze meshouder bij het microtoom geleverd wordt daar anders een passende meshouder moet worden gefabriceerd.



figuur 2

figuur 1 microtoom met een meshouder voor vaste messen

Een verdere overweging is de aanschaf van een beter type microtoom (figuur 3) met meer mogelijkheden waar b.v. later ook kunststof coupes mee gemaakt kunnen worden. Een goede voorlichting is hier wenselijk. Op b.v. een Duits microscopie-forum:
<http://www.mikroskopie-forum.de/index.php>
 worden vele discussies gevoerd over soorten microtomen en zijn er vaak zeer bruikbare snijtips te lezen.

Wanneer het blok opgespannen is en gesneden kan worden komt de vraag op: „hoe dik of dun moet ik snijden?“ Die vraag is niet altijd makkelijk te beantwoorden. In de Histologie en Pathologie is een snededikte van 4 tot 5 μm eigenlijk al dik. In een dikke coupe is b.v. een dendriet van een purkinjecel goed te volgen, maar het microscopische beeld wordt onduidelijker omdat verschillende cellagen zich overlappen. Een dunne snede van 1 tot 2 μm geeft meestal een zeer detailrijk beeld maar vergt voor paraffine veel ervaring.

Om deze dikte goed te kunnen snijden moet het weefsel in kunststof worden gegoten. Dit kunststof kan niet met de vrij eenvoudige A&O 820 worden gesneden. Daarvoor is microtoom met motoraandrijving en blok-retractie noodzakelijk zoals het geval is bij bijvoorbeeld een Leica 2265 of LKB Historange 2218.



figuur 3

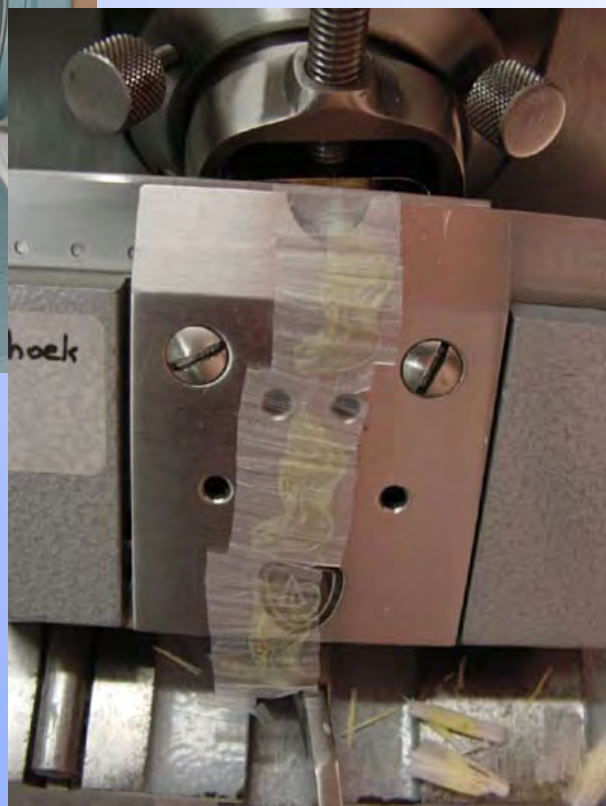


figuur 4

Mijn tips om een goede coupe te verkrijgen zijn:

- Paraffine van goede kwaliteit gebruiken (Paraplast b.v. laat zich heel goed snijden)
- De te snijden blokken een hele nacht in de koelkast bewaren. Eerst kort voor het snijden opspannen in het microtoom.
- Het aansnijden van het blok kan het best gebeuren met een reeds gebruikt deel van het microtoommes, de eigenlijke snede wordt gemaakt met een nieuw deel van het mes of een nieuw mes.
- Het handwiel regelmatig bewegen.
- Bij een te lage luchtvochtigheid kleven de coupes meestal aan elkaar omdat er statische electriciteit ontstaat. Het is te proberen om dit op te lossen door een kan met heet dampend water in de buurt te plaatsen. Beter is het om de volgende dag te snijden.

In figuur 4 en 5 is het A&O in gebruik. Als alles juist uitgevoerd wordt ontstaan er coupes in lintjes.



figuur 5

Om een goede snede te maken moet er veel geoefend worden. Ik heb een video gemaakt van het microtoomsnijden en deze is te vinden op volgende link (figuur 6).

<http://www.youtube.com/watch?v=qGyE4p9XanA>

Cutting with a microtome

RONALDSCHULTE

7 video's

Abonneren



figuur 6

2. Coupes bevestigen op een objectglas

Om de gesneden coupe of coupelintjes op een voorwerpglas te bevestigen moeten ze eerst gestrekt worden. De zeer dunne paraffinecoupe is zo dun en fragiel dat het niet zonder schade met de hand kan worden vastgepakt. Daarom wordt er gebruik gemaakt van een pincet of penceel. Het is ook mogelijk de coupe rechtstreeks op een objectglas te strekken maar ik geef de voorkeur aan een waterbad (figuur 7).

De watertemperatuur moet tussen de 40° en 45° C liggen. Als het water te warm wordt beginnen ze te smelten en drijft het weefsel uitelkaar waardoor ze waardeloos worden. De af fabriek gereinigde objectglaasjes dienen nogmaals gereinigd te worden met een mengsel van ethanol 96% en aceton. Sommige histologen geven er voorkeur aan om de objectglaasjes te voorzien van een dunne film eiwitglycerine om een betere hechting aan het glas te verkrijgen; ik geef voorkeur aan alleen zuiver schone objectglaasjes. De kans dat in een later stadium een coupe van het glas afzwemt onder invloed van chemicaliën of kleurstoffen is klein.



figuur 7



figuur 8

Het opbrengen van de gesneden coupes op het warme water is ook weer een zaak van veel oefenen. Hier ontstaat vaak een vouw in de coupe die er ook in latere behandeling niet meer uit zal gaan. Voor b.v. routine-pathologie zal dit niet zo erg zijn maar voor de amateur die streeft naar perfectie is het zaak om gewoon een nieuwe coupe snijden en te strekken. De coupe strekt onmiddellijk en mag gerust enige tijd op het water blijven liggen voordat het met een objectglaasje wordt opgenomen (figuur 8). Enkele minuten strekken is in elk geval voldoende. Nu moet de coupe op een zuiver rein (en ethanol/aceton droog) objectglas worden opgegist. Met professionele warmwaterbaden kan het objectglaasje vertikaal in het water worden gebracht en hecht de coupe vrij eenvoudig. De hier getoonde techniek is wat omslachtiger maar werkt perfect. Na het opvissen het objectglas even schuin houden waardoor het overtollige water wegvloeit. Nu kunnen de objectglaasjes gedroogd worden aan buitenlucht. Het drogen mag op een droogplaat of iets dergelijks gebeuren om het droogproces te versnellen. Belangrijk is dat de temperatuur niet boven het smeltpunt van de paraffine uitkomt. Drogen in een kartonnen preparaatmap gaat ook heel prima. Droog echter niet te kort, alle water moet echt zijn verdampt. Hierna zijn de coupes zover dat ze gekleurd kunnen worden.

Stretching tissue in warm water.

RONALDSCHULTE

7 video's

Abonneren



figuur 9

Op 'YouTube' heb ik een video geplaatst die het strekken op water en het opvissen van coupes toont (figuur 9).

http://www.youtube.com/watch?v=cbQnZr0wx0I&feature=mfu_in_order&list=UL

3. Paraffine verwijderen en terug in water brengen (hydreren)

Om de verschillende weefsels onder een microscoop te kunnen bestuderen moeten ze eerst gekleurd worden. Hiervoor is het noodzakelijk dat alle paraffine uit de coupes wordt verwijderd en dat de coupe terug gebracht wordt in een waterige omgeving. De hiervoor benodigde chemicaliën zijn precies gelijk aan het ontwateringsproces, zoals aan het begin van de histologie, met het verschil dat de volgorde omgekeerd is.

De alcoholreeks zoals hier getoond bestaat uit:

- 2 Xylolstappen
- Isopropanol 100%
- Ethanol 96%
- Ethanol 85%
- Ethanol 70%
- Ethanol 50%
- Aqua dest. (AD).



figuur 10

Natuurlijk kunnen meerdere preparaten gelijktijdig in de reeks behandeld worden. In dit voorbeeld worden twee preparaten simultaan van paraffine ontdaan en in water gebracht. Elke stap bedraagt vier minuten. Een simpel kookwekkertje is een prima hulpmiddel. Het is raadzaam om de objectglasjes af en toe wat in de vloeistof te bewegen. In deze afbeelding bevindt zich coupe 1 in Xylol II en coupe 2 in Xylol I.



figuur 11

Het is zinvol om na elke stap de overtollige vloeistof met een tissue te verwijderen maar de coupes mogen hierbij niet opdrogen. Hier wordt coupe 1 bevrijd van overtollig Xylol voordat deze in de Isopropanol gezet wordt.



Figuur 12

Coupe 1 wordt in Isopropanol 100% gedoopt, terwijl coupe 2 zich in de laatste Xylolstap bevindt.



figuur 13

Coupe 1 is al in Ethanol 70% aangekomen terwijl coupe 2 wisselt van Ethanol 96% naar Ethanol 85%.



figuur 14

Na verloop van tijd komen de coupes aan in water waar ze enige tijd in kunnen blijven. Één tot twee uur is OK maar een dag is te lang. Het bindweefsel in een coupe begint dan op te zwellen.



figuur 15

4. Kleuren

Het kleuren van de coupes is het moeilijkste deel van de histologie. Het microtoomsnijden was al niet makkelijk, nu begint het meesterwerk. Ik vergelijk het wellevens met het braden van een steak. Dat kan in principe iedereen maar alleen een meesterkok krijgt hem smakelijk en sappig. Zo gaat met kleuren ook. In het boek 'Mikroskopische Technik' van Romeis zijn vele recepten te vinden. Dit boek is voor iedere histoloog een aanrader. Figuur 16 toont de oudere uitgave die naar mijn mening het beste is. De nieuwste uitgave, figuur 17, gaat voor de amateur veelal te ver. Hier zijn meestal instrumenten en kleurstoffen benodigd die voor erg duur zijn en kleurmethoden die te moeilijk zijn. Te denken valt aan immunohistochemische kleuringen.

Het gaat te ver om hier alle details van kleuringen te benoemen, daarvoor is de kleurtechniek te gecompliceerd.

Benoemenswaardig is echter:

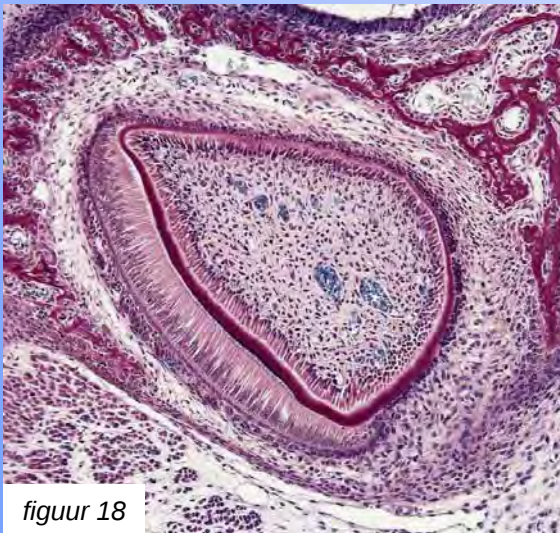
- Progressief kleuren is een techniek waarbij de coupes zolang in de kleurstof verblijven totdat ze genoeg gekleurd zijn.
- Regressief kleuren is een techniek waarbij eerst overkleurd wordt en daarna door middel van differentiëren (uitwassen met een geschikte vloeistof) het juiste kleurniveau bereikt wordt.
- Men kan een coupe kleuren met één kleurstof maar ook dubbel-, drie-, en meervoudige kleuringen zijn mogelijk.
- De kleuring is o.a. afhankelijk van:
 - kleurtijd
 - concentratie van de kleuroplossing
 - temperatuur, coupedikte, fixatie.



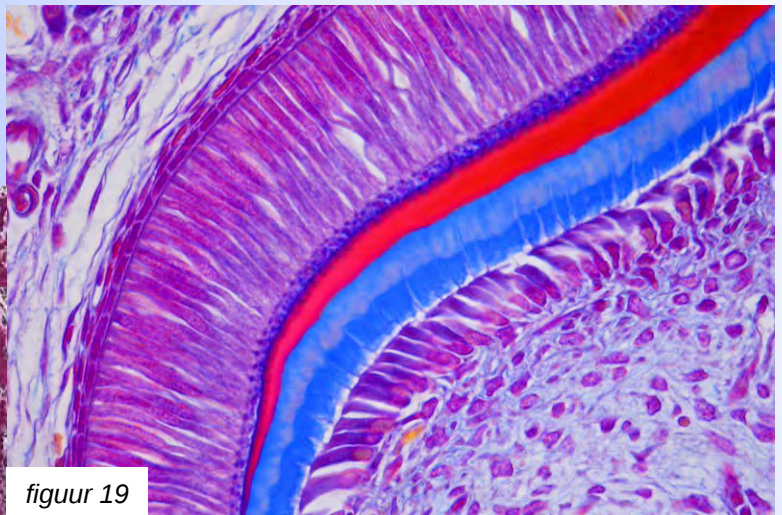
figuur 16



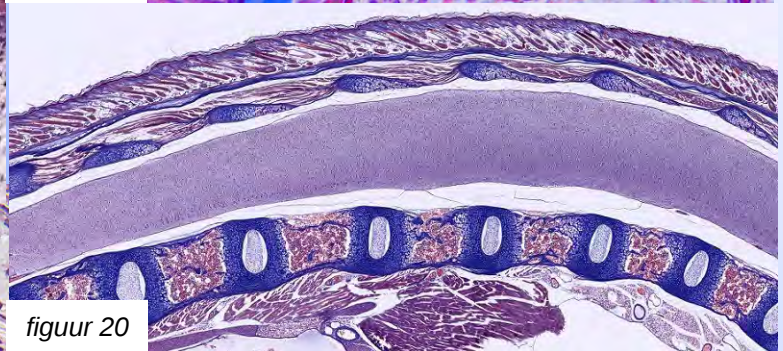
figuur 17



figuur 18



figuur 19



figuur 20



figuur 21

Vier opnames van verschillende kleuringen. Fig 18, Tand in aanleg gekleurd met PTAH. (PTAH=Fosforwolframhaematoxyline) Fig 19, Zelfde tand in een Trichroom-kleuring volgens Mallory. Fig 20, Wervelkolom in een AZAN kleuring volgens Heidenhain. Fig 21, Orgaan van Jacobson van een muis in de klassieke HE kleuring. De HE (Haematoxyline/Eosine) kleuring is routinekleuring in histologische- en pathologische Laboratoria.

Kleurstoffen dienen te worden aangeschaft. Kant en klare kleuroplossingen kunnen b.v. bij Chroma in Münster (Duitsland) worden aangeschaft. Het nadeel daarvan is dat de oplossingen met het vergaan van tijd hun kleurkracht verliezen. Een betere methode is om kleurstoffen in vaste vorm aan te schaffen zoals getoond in figuur 22. Het Anilineblauw/Orange G is een kant en klaar mengsel, het zure fuchsine echter is een kleuropoeder. Hoe het tot een kleuroplossing moet worden verwerkt staat in 'Romeis' beschreven.



figuur 22

De kleuring, die ik wil laten zien, is een Trichroom-overzichtskleuring volgens Mallory.

Frank Burr Mallory was een Amerikaanse Patholoog en Professor voor pathologie aan de Harvard University.

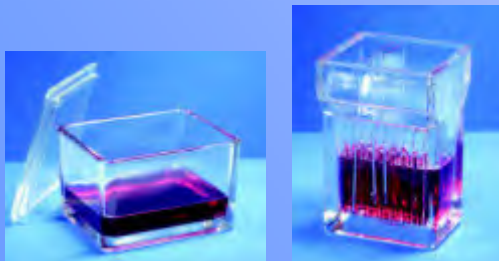
Zijn kleurprotocol stamt reeds uit het jaar 1900. Hij beschrijft een weefsel fixatie met Zenkerse vloeistof. Mijn ervaring met Zenker is prima maar ook na fixatie met Bouin en zelfs na een eenvoudige formaldehyde fixering zijn de kleurresultaten nog prima al vallen ze minder krachtig uit.

Het protocol:

- Coupes in water brengen
- Fuchsine zuur 0,25% in AD, 5Min
- Spoelen met AD
- Fixeren en differentiëren met fosforwolframzuur 5% in AD, 5Min
- Spoelen met AD
- Anilineblauw/Orange G/Oxaalzuur mengsel, 7Min
- Spoelen met AD
- Differentiëren in twee porties Ethanol 96% totdat geen kleurstofwolkjes worden afgegeven
- Ontwateren
- Xylol en insluiten in kunsthars.

In de meeste histologische boeken wordt beschreven dat kleuringen worden gedaan in speciaal daarvoor bestemde kleurkuvetten. Mijn kleurtechniek ziet er echter iets anders uit.

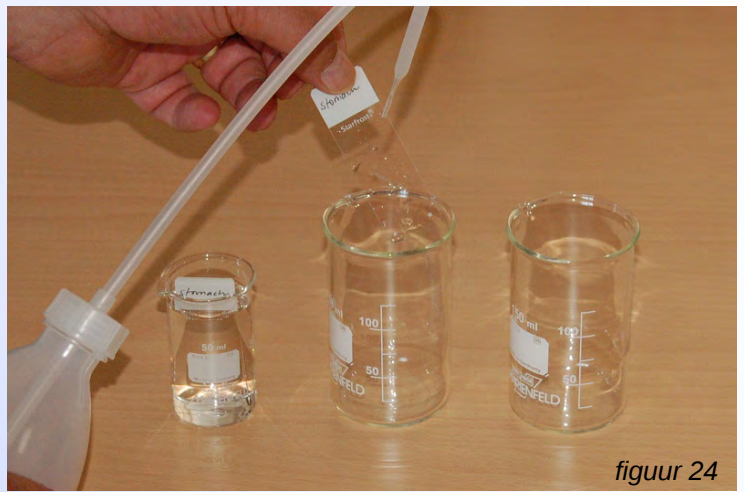
In deze kuvetten is het kleurstofverbruik vrij hoog. Meestal kleur ik slechts enkele coupes tegelijk en daarvoor zijn de normale bekersglazen ook zeer geschikt. Deze kleuringen worden uitgevoerd direct op het objectglas en dat werkt perfect.



figuur 23

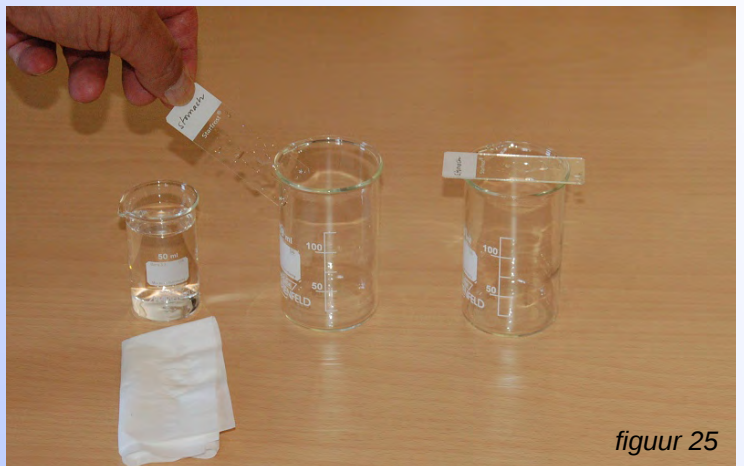
In deze kleuring worden twee coupes in één arbeidsproces gekleurd.

Figuur 24: De coupes worden nogmaals met AD gespoeld en horizontaal op een bekerglas gelegd.



figuur 24

Figuur 25: De kleurprocessen zijn voor beide coupes identiek.



figuur 25

Figuur 26: De Fuchsine wordt opgebracht. Het weefsel moet met voldoende kleurstof worden bedekt.



figuur 26

Figuur 27: De kleurstof 5 Minuten laten inwerken en de fles met AD gereed houden.



figuur 27

Figuur 28: De kleurstof met AD afspoelen.



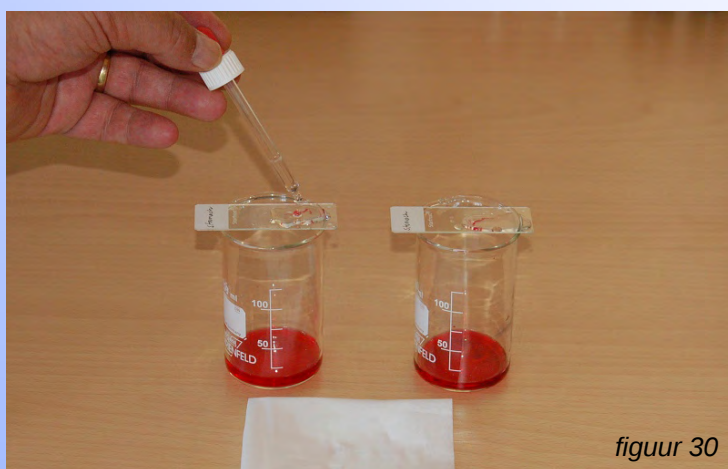
figuur 28

Figuur 29: De kleurstof met AD afspoelen.



figuur 29

Figuur 30: Het fosforwolfraamzuur aanbrengen.



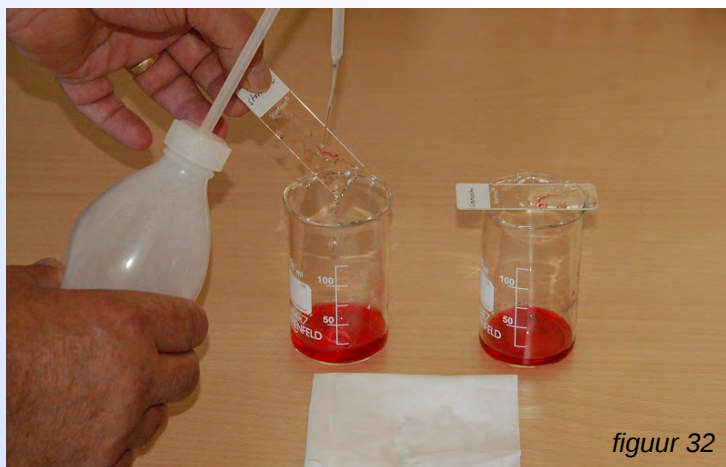
figuur 30

Figuur 31: 5 Minuten laten inwerken en de fles met AD gereed houden.



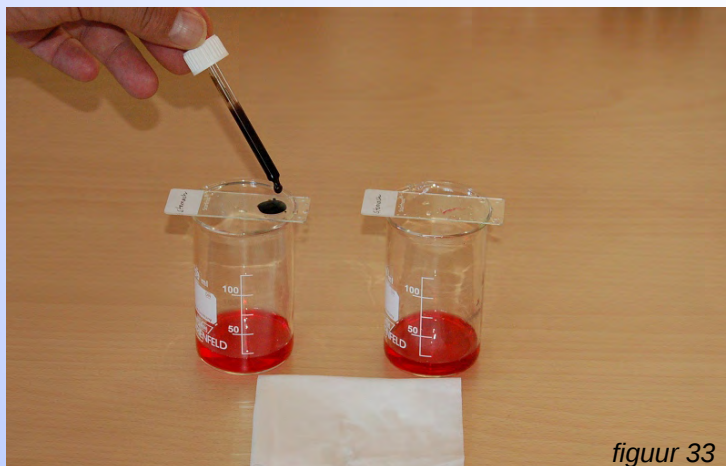
figuur 31

Figuur 32: Het fosforwolfraamzuur grondig met AD afspoelen.



figuur 32

Figuur 33: De Aniline/OrangeG oplossing aanbrengen en 7 minuten laten inwerken.



figuur 33

Figuur 34: De Aniline/OrangeG oplossing aanbrengen en 7 minuten laten inwerken.



figuur 34

Figuur 35: De kleurstof grondig met AD afspoelen.



figuur 35

Figuur 36: De coupes kort differentiëren in Ethanol 96%. Hier moet snel gewerkt worden omdat anders de blauwe kleurstof teveel wordt uitgewassen. Meestal is 1 minuut voldoende.



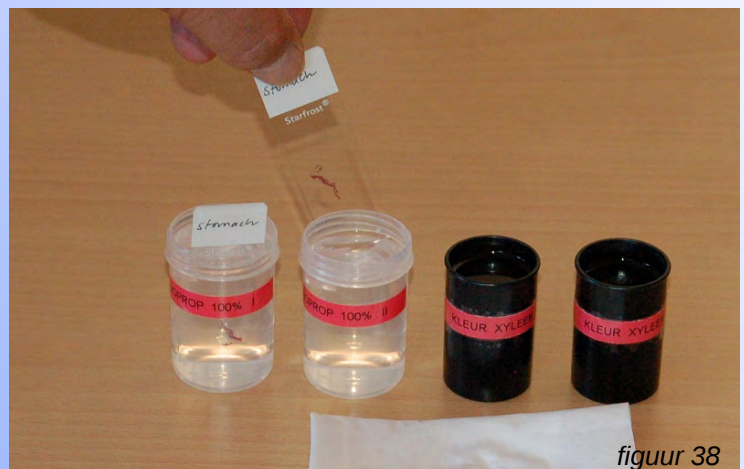
figuur 36

Figuur 37: Vele kleuringen worden gedehydrateerd vanaf Ethanol 70%, maar omdat hier al gedifferentieerd is met Ethanol 96% kann de volgende stap meteen Isopropanol 100% zijn. In deze stap wordt bijna geen kleurstof meer afgegeven en daarom mogen de stappen weer 4 minuten duren. Twee stappen Isopropanol 100% om er zeker van te zijn dat alle water uit de coupes verdreven is.



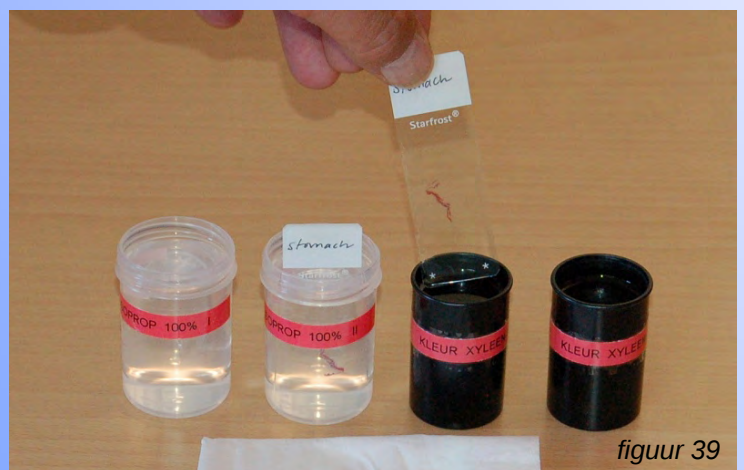
figuur 37

Figuur 38: Na de tweede stap Isopropanol wordt het objectglas met een tissue zoveel mogelijk droog gewreven. Doel hiervan is om zo weinig mogelijk isopropanol te verslepen naar de volgende Xylol stappen. Deze Xylol stappen wederom 4 minuten. Hier wordt geen kleurstof meer afgegeven.



figuur 38

Figuur 39: Ook hier weer twee Xylol stappen. Alle Isopropanol moet geheel door Xylol verdreven worden omdat de meeste kunstharsen geen Isopropanol verdragen en al helemaal geen water. Een uitzondering hierop is de hars 'Euparal'. Deze hars mengt niet met water maar wel met Isopropanol.

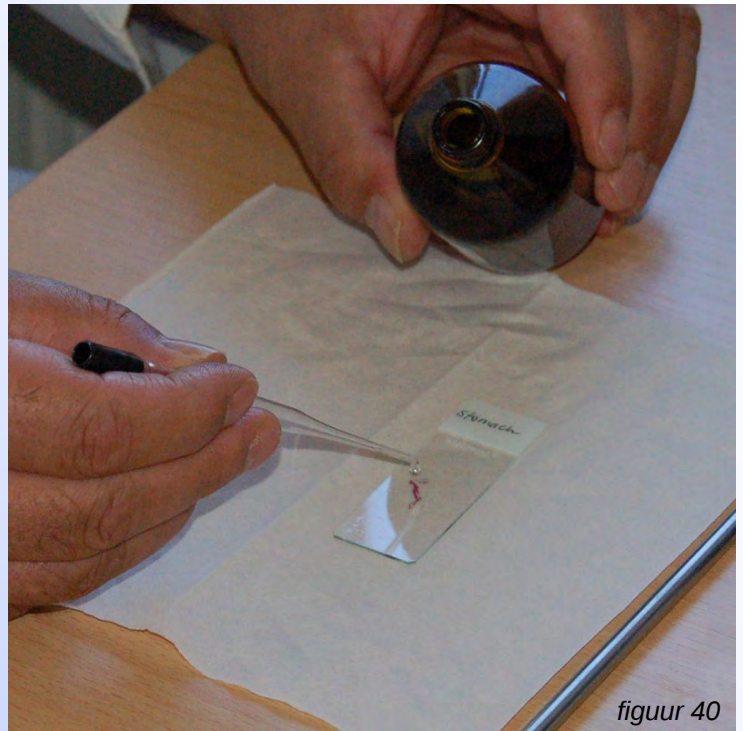


figuur 39

5. Preparaat houdbaar maken

Vroeger werd het natuurlijke hars „Canadabalsem“ gebruikt maar tegenwoordig kunnen we kiezen uit een reeks goede synthetische kunstharsen die onder verschillende merknamen gevoerd worden. Het hier getoonde preparaat wordt ingegoten met DePeX. DePeX kan alleen vanuit Xylol worden ingesloten.

Figuur 40: Onmiddellijk na de Xylol-stappen moet het preparaat met kunsthars worden ingesloten. Een glazen pasteurpipet met gesmolten punt of een ander soort glasstaaf kann goed gebruikt worden om de hars aan te brengen.



figuur 40



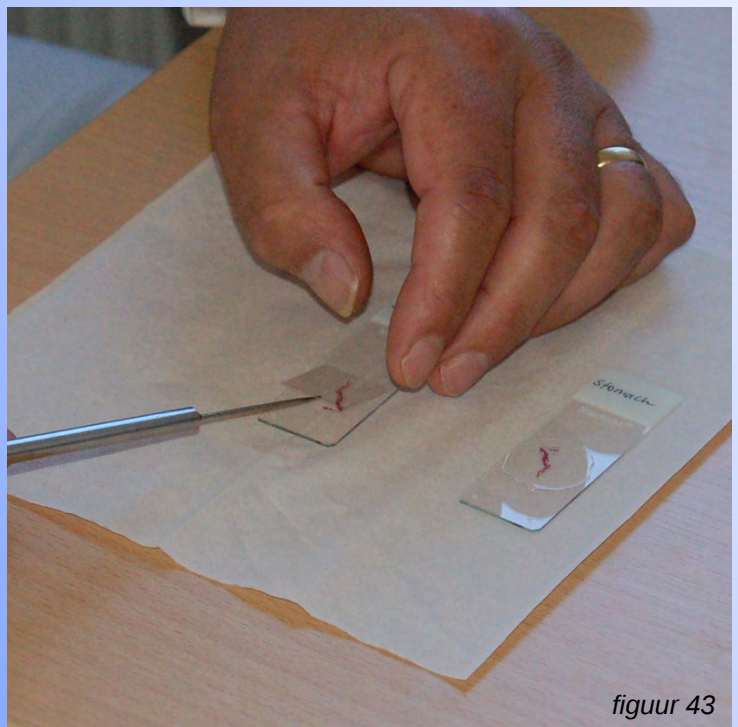
figuur 41



figuur 42

Dekglazen zijn in vele soorten en maten te verkrijgen (figuur 41 en 42). Belangrijk is echter een dekglas met een dekglasdikte van 0.17mm aan te schaffen omdat de meeste objectieven hiervoor gecorrigeerd zijn (b.v. een bloeduitstrijk die zonder dekglas bekeken kan worden zal met de gebruikelijke, 0.17mm gecorrigeerde objectieven, geen scherp beeld opleveren omdat het dekglas een onderdeel van de objectieffcorrectie is en dus nodig is).

Figuur 43: Het aanbrengen van een dekglas moet worden aangeleerd. Het dekglas mag alleen aan de rand worden aangeraakt. Het is raadzaam om het glas schuin aan te brengen zodat storende luchtbelletjes geen kans krijgen om mee ingesloten te worden.



figuur 43

Nadat het dekglas is aangebracht moet het preparaat drogen. Een hars zoals DePeX is na enkele dagen voldoende aangedroogd zodat de overtollige hars kan worden weggesneden. Euparal heeft een droogtijd van ongeveer twee weken, Malinol drie tot vier weken. Voor een volledige uitharding moet gerekend worden met enkele maanden. Enige preparaatmappen van karton is een nuttige aanschaf (figuur 44).



figuur 44

Later kan het preparaat worden gereinigd, voorzien van een etiket en worden gearchiveerd (figuur 45).



figuur 45

Het resultaat

