

Histologische techniek thuis

**door
Guus Löhlefink**

(c) 1984, 1999

INHOUDSOPGAVE

Inleiding

- 0 Algemene inleiding**
 - 0.1 Wat is histologische techniek ?**
 - 0.2 Voor wie is dit boek ?**
 - 0.3 Vereiste voorkennis**
 - 0.4 Wat is er bijzonder aan dit boek ?**
 - 0.5 De inhoud in vogelvlucht**
 - 0.6 Protocollen**
 - 0.7 Gevaren**
 - 0.8 Literatuur.**
 - 0.9 Toelichting bij de illustraties**

DEEL I (De procedure)

- 1 Benodigde stoffen, apparaten en materialen**
 - 1.1 De stoffen**
 - 1.2 Apparaten en materialen**
- 2 Het verkrijgen van organen en weefsels**
 - 2.1 Weefselbronnen**
 - 2.2 Prepareren**
- 3 Fixatie**
 - 3.1 Bijzondere fixatieven**
 - 3.2 "Theezakjes" methode**
 - 3.3 Spoelen**
 - 3.4 Ontkalken**
 - 3.5 Samenvatting en vooruitblik**
- 4 Doorvoer en inblokken**
 - 4.1 De reeks in praktijk**
 - 4.2 De eerste stap**
 - 4.3 De tweede stap**
 - 4.4 Stap drie, vier en vijf.**
 - 4.5 Watervrij!**
 - 4.6 Intermedium**
 - 4.7 De overgang naar paraffine**
 - 4.8 Paraffine**
 - 4.9 Inblokken**
 - 4.10 Samenvatting en nog enkele adviezen**

5 Het snijden

5.1 Het microtoom

5.2 Het microtoommes

5.3 Zelfbouw

5.3.1 Handmicrotoom zelf bouwen

5.3.2 Zelfbouw van een complexer microtoom

5.4 De techniek van het snijden

5.4.1 Het vastklemmen van het blokje

5.4.2 Het verkleinen van het blokje

5.4.3 Verdere voorbereidingen

5.4.4 Het aansnijden, snijden en afnemen

5.4.5 Opschuiven en terugtrekken

5.4.6 Goede coupes

5.4.7 Het mes schoonhouden

5.5 De meshoeken

5.6 Problemen bij het snijden

5.6.1 Opkrullen

5.6.2 Terugspringen naar het mes of niet

5.6.3 Verticale krassen blokje

5.6.4 Horizontale ribbels of krassen

5.6.5 Het mes schraapt alleen pulver

5.6.6 Vastslaan of springen van het mes

5.6.7 Weefsel laat los uit de paraffine

6 Opplakken

6.1 Het reinigen van de objectglaasjes

6.2 De eiwitglycerol

6.3 Het opplakken van coupes op het objectglaasje

6.4 Systematiek

6.5 Samenvatting en vooruitblik

7 Deparaffineren tot en met insluiten

7.1 deparaffineren

7.2 Kleuren

7.2.1 Giemsa

7.2.1.1 Te zware kleuring

7.2.1.2 Te lichte kleuring

7.2.2 May-Grünwald

7.2.3 Haematoxyline-Eosine

7.2.3.1 Haematoxyline

7.2.3.2 Eosine

7.3 Opnieuw ontwateren

7.4 Insluiten

7.4.1 Hanteerbaarheid van de hars

7.4.2 De goede zijde

7.4.3 Aanbrengen van het dekglasje

7.4.4 Drogen

7.4.5 Insluitmiddelen

7.5 Samenvattend van opgeplakte coupe naar

8 Bijzondere preparaten

8.1 Gelatine-inbedding, gelatine-insluiting

8.2 Uitstrijkjes

9 De resultaten (foto's)

DEEL II (ondersteunende technieken)

1 De aard van deel II

2 Fysiologische zoutoplossing

3 Filtreerpapier

4 Het ontkleuren van spiritus

5 Ontwateren van spiritus of zuivere ethanol

6 Het maken van verdunningen

6.1 Vaste hoeveelheid met bekende concentratie verdunnen

6.2 Vaste hoeveelheid maken van de verdunning

6.3 Concentratieverandering tgv. toevoeging berekenen.

7 Verwarmen au bain Marie en met zandbad.

8 Intermedia

9 Wegen

9.1 Het maken van de balans

9.2 Het afregelen van de balans

9.3 Het gebruik van de balans

10 Het microtoom

10.1 speling

10.2 gelijkmatige beweging

10.3 nauwkeurigheid

10.4 Het principe

10.5 Verschuiving

10.6 Integratie

10.7 Het mes

10.8 Klem voor weefselblokjes

10.9 Materialen

10.9.1 De as met veer

10.9.2 Buslager, arm en aandrukblokje

10.9.3 Het mesblok

10.9.4 De schroef

10.9.5 De hefboom

11 De microscoop

11.1 De onderdelen

11.2 Scherpstellen

11.3 Storingen bij het bestuderen van preparaten

11.3.1 Vreemde structuren

11.3.2 Mistig beeld

11.3.3 Scherpstellen onmogelijk

11.4 Donkerveldbelichting (incl. zelfbouw)

11.4.1 Het gebruik van donkerveldbelichting

11.4.2 Zelf donkerveld realiseren

11.5 Polarisaatie (incl. zelfbouw)

11.6 Oculairmicrometer (incl. zelfbouw)

11.7 Fotografie

11.8 Einde

0 Algemene inleiding

Dit boek is tamelijk technisch van aard. Het is zinvol om eerst uit te leggen wat de bedoeling van het boek is en voor welke doelgroep het is geschreven.

Het boek is op Internet gepubliceerd, om zoveel mogelijk lezers te bereiken. Een reguliere uitgave in boekvorm is niet haalbaar. Daarvoor is de doelgroep te klein.

De afbeeldingen zijn oorspronkelijk in kleur, maar met een zwart/wit scanner ingescand.

Greyscale-afbeeldingen kosten gelukkig niet veel ruimte.

Dit boek mag voor persoonlijk gebruik worden gehanteerd, ook in uitgeprinte vorm. Het citeren van delen eruit of het verspreiden van kleine selecties (bv. tbv. onderwijs) is toegestaan indien dit binnen het kader van de auteurswet blijft. Voor overnemen van grotere delen of het commercieel toepassen is toestemming van de auteur vereist.

(E-mail: loehlefink@scientassist.nl)

Snail-mail: K.G.L. Löhlefink p/a SCIENTASSIST, Postbus 9204, 9703 LE Groningen)

0.1 Wat is histologische techniek ?

Dit boek gaat over histologische techniek. Histologische techniek is niet hetzelfde als histologie. Histologie is weefselleer, een vak waarbij allerlei dierlijke of plantaardige structuren op celniveau worden bestudeerd. Doorgaans wordt hier een microscoop bij gebruikt.

Om met een zg. lichtmicroscoop (dwz. een gewone klassieke microscoop met lenzen) weefsels te kunnen bestuderen is het handig er 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 zg. preparaat gemaakt.

Het maken van een preparaat, dat later bestudeerd kan worden, is de histologische techniek. Het hulpje van de histologie eigenlijk.

0.2 Voor wie is dit boek ?

Het is mogelijk dat u graag met histologie aan de slag wilt, maar niet goed weet hoe een preparaat gemaakt kan worden.

Het kan ook zijn dat u de techniek op zich gewoon leuk vindt en het bestuderen aan iemand anders overlaat of de preparaten verkoopt.

Natuurlijk kunt u ook kunstzinnige motieven hebben: microscopische preparaten kunnen door een microscoop gezien heel fraaie beelden opleveren. Er zijn bijzonder mooie foto's mee te vervaardigen, die niet eens van wetenschappelijke waarde behoeven te zijn.

In al deze gevallen kunt u iets aan dit boek hebben. Het is namelijk bedoeld voor iemand die thuis op eenvoudige en goedkope wijze histologische preparaten wil vervaardigen.

Natuurlijk is het ook denkbaar dat u in het geheel niet geïnteresseerd bent in histologische techniek. In dat geval moet u een ander boek gaan lezen, tenzij u een heel andere interesse heeft en niet naar de inhoud van het boek wilt kijken, maar naar de vorm of de stijl. Veel plezier.

0.3 Vereiste voorkennis

Het is handig om over enige biologische of medische basiskennis te beschikken. Bepaalde keuzen zijn dan gemakkelijker te maken en alternatieven of afwijkingen kunnen beredeneerd worden. Enige kennis van de scheikunde is ook wel wenselijk. Dit geeft wat meer inzicht in de processen. Op welk niveau uw voorkennis moet liggen is moeilijk te zeggen.

Een exacte richting op MAVO/HAVO/VWO niveau is zeker een goede basis.

MBO of HBO in een exacte richting ook. Ervaring kan echter net zo zinvol zijn.

Histologische techniek zonder ervaring in het waarnemen door een microscoop is niet onmogelijk, maar het maakt het wel bijzonder moeilijk om achteraf (of tijdens het proces) de kwaliteit van het preparaat te beoordelen.

Om preparaten te kunnen bestuderen zijn geen speciale vaardigheden te noemen.

Waarnemen is moeilijk, maar gericht kijken en herkennen is te leren. Op de middelbare school worden soms microscoop-practica gegeven. De opleidingen in medische en biologische richting hebben ook trainingsperioden op het gebied van waarnemen.

Uiteraard is coaching door een vriend(in), familielid, student in de omgeving etc. een optie. Doorzettingsvermogen kan uiteindelijk ook zonder hulp de benodigde ervaring opleveren.

Hoe meer u van biologie en scheikunde afweet, hoe vrijer u bent in uw keuzes. Bent u niet thuis in deze gebieden, dan zal dit boek eerder een kookboek met recepten zijn.

Kort samengevat kunnen we stellen dat handelen met voorkennis hier niet verboden is, in tegenstelling tot wat de effectenbeurs geldt.

0.4 Wat is er bijzonder aan dit boek ?

Er zijn veel goede boeken op het gebied van de histologische techniek. Het nadeel van deze boeken is echter dat ze er eigenlijk allemaal van uit gaan dat de lezer een over een goed laboratorium beschikt en een budget van minstens enkele duizenden guldens (of zelfs tonnen !).

Voor particulieren geldt dat veel van de genoemde stoffen niet of nauwelijks verkrijgbaar zijn en mocht er wel een handelaar te vinden zijn, dan zijn de kosten vaak bijzonder hoog of worden er alleen grotere hoeveelheden geleverd.

Voor de thuiswerker met weinig geld zijn er echter wel degelijk alternatieven. In deze tekst worden de achtergronden van de histologische techniek globaal besproken. De nadruk ligt evenwel op allerlei praktische recepten, die het mogelijk maken thuis preparaten te vervaardigen. De kwaliteit van deze preparaten kan matig tot zeer goed zijn. In tegenstelling tot de officiële handleidingen is er een procedure beschreven die met tamelijk alledaagse middelen werkt en eenvoudig is.

Dit klinkt misschien wat merkwaardig. Hoe kan met een investering van een paar tientjes een goed resultaat bereikt worden, terwijl de grote laboratoria er tonnen doorheen jagen om tot resultaten te komen ?

Uiteraard zijn er verschillen:

- De hier beschreven methoden zijn gericht op kleine hoeveelheden weefsel, niet op massale verwerking van binnenkomende monsters zoals in een ziekenhuislaboratorium.
- De methode is arbeidsintensief. Dit spaart dure machines uit, maar het kost wel veel tijd. In een organisatie is tijd geld. Voor het besteden van eigen vrije tijd kan dat anders liggen.
- Er zijn geen garanties. Het gaat niet altijd goed. Een gerechtelijk laboratorium kan zich uiteraard geen enkele misser permitteren. Een zelfstandig onderzoeker mag thuis echter

best een steek laten vallen.

In ieder geval is het mogelijk om met geringe financiële middelen (enkele tientjes) een klein eigen laboratorium op te bouwen, waar heel wat bereik kan worden (zie foto I)

0.5 De inhoud in vogelvlucht

Misschien heeft u wel eens een plakje gesneden van een plantenstengel, om dit dan onder de microscoop te kunnen bekijken.

Planten zijn geschikt voor het maken van eenvoudige preparaten, aangezien ze een de cellen een stugge wand hebben. Die wanden maken veel planten-stengels redelijk stevig. Bij zachtere stengels kan piepschuim of vliermerg als steun worden gebruikt. De stengel wordt vastgeklemd en het materiaal wordt gewoon meegesneden.

Met enige oefening is het mogelijk redelijk dunne coupes (plakjes) te snijden. Vooral aan een van de randen is het materiaal soms heel dun.

Toch is een dergelijke coupe vaak 50 μm dik ($\mu\text{m} = 1/1000 \text{ mm}$).

Dierlijke weefsels laten zich niet zo eenvoudig snijden. Het materiaal is te week en vervormt gemakkelijk. Bovendien mogen coupes ten hoogste 10 μm zijn willen ze geschikt zijn voor bestudering.

Bij plantencellen kunnen we namelijk in dikkere coupes de celwanden heel mooi zien.

Dierlijk weefsel heeft geen celwanden, dus is het beeld ook niet te vergelijken. Coupes van dierlijk weefsel hebben niet veel contrast. Ze worden dan ook veelal gekleurd.

De enige weefsels die tot op zekere hoogte te vergelijken zijn met het plantaardige, zijn kraakbeen en (ontkalkt) bot en tanden en kiezen (ook ontkalkt). Hier zijn de vakjes in de tussenmassa, waar de cellen in liggen - of lagen - herkenbaar.

Omdat het wel zo prettig is ook iets anders dan kraakbeen te onderzoeken, wordt het slappe dierlijke weefsel zo behandeld dat het stevig wordt.

Hier is nogal wat voor nodig.

Allereerst moeten de chemische (verval)processen worden gestopt. Allerlei enzymatische processen kunnen namelijk de structuur totaal veranderen (denk maar aan een banaan die bruin en zacht wordt).

Er zijn twee opties: bevriezen of chemisch ingrijpen.

De bevroeringsmethode is thuis vrijwel niet uitvoerbaar. Het moet snel gebeuren en sterk afkoelen. Bespuiten met vloeibaar gas uit een navulflus voor aanstekers lijkt er wat op.

Het lastige is echter dat het materiaal daarna in bevroren toestand gesneden moet worden. Daarmee zou het halve boek overbodig worden, maar het is niet doenlijk.

Bevriezen is ook van belang als later nog bepaalde enzymen moeten worden aangetoond. Dit ligt echter evenmin binnen het bereik van thuiswerkers (neem ik aan).

De chemische ingreep heet fixeren. 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.

Daarom wordt het weefsel geleidelijk doordrenkt met een vette stof: paraffine. Het kan dan een eenheid vormen met een groter blok, dat ook van paraffine is. Dit is hanteerbaar en goed te snijden.

De plakjes moeten uiteindelijk echter op een glaasje komen en gekleurd worden met een kleurstof die doorgaans in water is opgelost. Dan is de paraffine weer lastig, dus geleidelijk aan wordt de stof weer verwijderd.

Uiteindelijk moet het weefsel in een soort kunsthars worden ingesloten om het houdbaar te maken. Daartoe moet eerst het water weer verwijderd worden.

Zo ontstaan reeksen die steeds de overgang van waterachtig naar watervrij en omgekeerd verzorgen. Het eindresultaat is een houdbaar preparaat waar hopelijk veel in valt te ontdekken.

0.6 Protocollen

Nog even een kort stukje over de zg. protocollen. Als er iets bijzonders in een preparaat te zien is kan dat te maken hebben met het weefsel zelf. Er kan echter ook iets bijzonders gebeurd zijn. Misschien is er een verkeerde handeling uitgevoerd, maar het is ook denkbaar dat er juist een methode is ontdekt die iets zichtbaar maakt.

Om naderhand na te kunnen gaan wat er gebeurd is in het proces, is het zinvol alle stappen kort te noteren. Een verzameling van degelijke notities wordt een protocol genoemd. Het is niet verplicht en het kan ook wachten tot een later stadium, maar het kan veel extra kennis opleveren.

Als alle stappen, samenstellingen, hulpmiddelen en tijden worden opgeschreven, is het na bv. een jaar veel gemakkelijker nog eens na te gaan wat er nu precies gebeurde. Eigenlijk is het net als met vakantiefoto's. Laat ze een half jaar liggen en van de helft is het niet meer duidelijk wanneer of waar ze genomen zijn.

0.7 Gevaren

Voor enthousiaste lezers die meteen aan de slag willen zijn paragrafen over gevaren nogal saai. Meestal worden er vreselijke dingen beloofd, maar in praktijk is er niets van te merken. Toch moeten er een paar woorden over worden gezegd. Hieronder worden de belangrijkste punten opgesomd:

- Allereerst lijkt het werken met weefsels en vloeistoffen heel onschuldig, maar het gaat vaak om vergiften. De dampen kunnen schadelijk zijn, dus ventileer goed.
- Denk aan brandgevaar en ontplofingsgevaar. Ventileer ook om deze reden en gebruik geen open vuur of gloeiende voorwerpen (sigaret!).
- De onschuldig uitziende stoffen kunnen voor kinderen (en ook voor huisdieren) heel boeiend zijn, dus zet ze achter slot en grendel.
- Voorzie flessen van een duidelijk (en juist) etiket, zodat verwisseling niet mogelijk is. Gebruik liever geen typische voedingsmiddelverpakkingen, zodat u geen xyleen-maggi in de soep doet, of de gasten een fles aceton-grolsch aanbiedt.
- Eet of drink niet tijdens de werkzaamheden en wrijf niet in uw ogen.
- Spoel geen resten van oplosmiddelen door gootsteen of toilet. Lever ze in bij een chemocar of leverancier (drogist, apotheek). Noteer op de afvalflessen bij voorkeur wat erin kan zitten.

Kleine resten zuren, formol, ammoniak etc. kunnen bij stromende kraan worden weggespoeld.

- Raak liever geen stoffen met blote handen aan. Draag evt. handschoenen en gebruik een pincet (te koop bij oa. de drogist).
- Bescherm uw kleding met bv. een kunststof schort.
- Draag een beschermbril en liever geen contactlenzen. Deze kunnen door de dampen schade oplopen.
- Behandel weefsel alsof het vergif is. Gebruik geen besmet weefsel.
- Laat scherpe voorwerpen (messen en naalden) niet rondslingeren.
- Houd een bakje zand in de buurt om eventuele vlammen te doven.

0.8 Literatuur.

De boeken die in deze lijst zijn opgenomen zijn tamelijk oud. Dit boek is oorspronkelijk ook tien jaar geleden geschreven. Het is onlangs herzien, maar de traditionele histologie is niet meer zo populair. Veel geschikte nieuwe publikaties zijn er dan ook niet. De oorspronkelijke literatuurlijst is daarom maar gehandhaafd. De boeken zijn via antiquariaten nog wel te verkrijgen en sommige zijn in een nieuwere druk nog bij de boekhandel te koop. Bibliotheken hebben vaak nog wel enkele boeken van deze lijst. Voor degenen die hun kennis van de microscopie willen ophalen en nog eens naar eenvoudige preparaten willen kijken, zijn de volgende boeken zeer geschikt:

Alders, J.C. Microscopie (Het zelf maken van eenvoudige
microscopische preparaten)
WenK Hobbygids 53 Kosmos Amsterdam/Antwerpen
ISBN 90 215 0360 3

Sterrenburg, F.A.S. Leidraad bij de microscopie
Kluwer technische Boeken B.V. Deventer 1975
ISBN 90 2010 742 9

Specifiek op de optica gericht is:

Flink, R.J. Microscopie en polarisatie
Heron bibliotheek Agon-Elsevier 1975
ISBN 90 10 10537 7

Voor algemene biologische achtergrondinformatie:

Vogel, G. Angermann, H Atlas bij de biologie (Sesam)
Bosch & Keuning N.V. Baarn 1971
ISBN 90 246 6910 3

Interessante medische achtergrondinformatie is te vinden in:

Elseviers Medisch Onderzoeksgids
Hoofdstuk "pathologisch-anatomisch onderzoek"
Elseviers uitgeverij. Amsterdam/Brussel 1982
ISBN 90 10 04232 4

Boeken op het gebied van de histologische techniek, uitgebreid maar gericht op het werkelijke laboratoriumonderzoek. Ze gaan dieper op de materie in en geven uitgebreide informatie over kleuringen:

Burck, H-C Histologische Technik
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1973
ISBN 3 13 314303 4

Carleton's Histological technique
Oxford University Press 1980
ISBN 019 261310 3

Ondersteuning bij het bestuderen van preparaten kan vooral uit de volgende boeken worden verkregen:

Bracegirdle, B Freeman, W.H
An atlas of Histology
Heinemann Educational Books London 1966-1980
ISBN 0 435 60311 6

Hooff, A v.d. Bijlsma, F
Histologie (een beknopt leerboek)
Academische Paperbacks
Oosthoek uitgeverij N.V. Utrecht 1972
ISBN 90 6046 590 3

Bloom, W. Fawcett, D.W.
A textbook of Histology
W.B. Saunders Company Philadelphia London Toronto
ISBN ?? (meerdere vertalingen)

Mayersbach, H von Reale, A
Grundriss der Histologie des Menschen
(met name deel I en II)
Gustav Fischer verlag Stuttgart 1976
ISBN 3 437 00126 4

Ondersteuning bij het uitprepareren van weefsels en organen:

Kamer, J.C.v.d. Kipp, P.J. Lambert, J.G.D.
Handleiding Zoölogisch practicum vertebraten
Oosthoek Scheltema & Holkema 1975
ISBN 90-31300756

0.9 Toelichting bij de illustraties

De foto's zijn gemaakt met behulp van een Olympus KC microscoop (1975) en een Zenith B Camera (ca. 1973) die mbv. een passieve adapter op elkaar werden aangesloten (oculair als lens).

Er zijn diverse filmmerken toegepast (kleurendia) en er is gewerkt zoals in het hoofdstuk "Fotograferen" van het technisch gedeelte is beschreven.

Bijna steeds is een blauwfilter toegepast in combinatie met daglichtfilm.

Dia's zijn afgedrukt en mbv. een Simplex flatbed kleurens scanner ingescand met vrijwel overal een resolutie van 300 dpi (bij de melk 600 dpi). Na het scannen is enige bewerking op helderheid, contrast, gamma en kleurevenwicht uitgevoerd. Hoewel de initiele opslag als bitmap plaatsvond is tbv. dit document met het JPEG formaat gewerkt (JPG-file).

De tekeningen zijn mbv. het computer-tekenprogramma DrGenius vervaardigd, gegrabd in WP-graphics (WPG) en automatisch van WordPerfect 5.1 meervertaald naar Word97.

DEEL I (De procedure)

1 Benodigde stoffen, apparaten en materialen

(Vanaf het onbewerkte weefsel tot en met het kant en klare preparaat)

Om bepaalde stoffen te bemachtigen is het vaak het eenvoudigst een ouderwetse drogist op te zoeken, die ook chemicaliën verkoopt. Apotheken zijn doorgaans veel duurder, ook al door de hogere zuiverheidsgraad van de stoffen. Een drogist zal "chemisch zuiver" verkopen, terwijl een apotheek "pro analysi" verstrekt, hetgeen niet nodig is. Sommige apotheken kunnen bovendien heel lastig zijn en over alles doorzeuren. Andere zijn weer heel soepel. Bepaalde apparaten zijn heel handig en soms onmisbaar. Ik ben uitgegaan van beproefde methoden met goedkope materialen- soms afval. Vervanging is misschien denkbaar. Houd dan rekening met alle functies van het apparaat of het materiaal.

1.1 De stoffen

Niet alle genoemde stoffen zijn meteen nodig. Bij het doornemen van een hoofdstuk of paragraaf blijkt wel wat nodig is.

Formol (formaline, formaldehyde-oplossing) 40% 50-100 ml evt. 4% 100-250 ml

Brokje marmer of ouderwets krijt (geen modern schoolkrijt, dat is van gips) ook geen poeder of gruis! Niet per se vereist.

Norit, poeder. Enkele grammen voor het ontkleuren van spiritus (zie deel II)

Brandspiritus. Deze vloeistof is blauw en bevat hinderlijke verontreinigingen. Volgens de beschrijving in deel II kan de vloeistof ontkleurd en gezuiverd worden.

Normaal wordt 96% ethanol (=ethylalcohol of alcohol) gebruikt. (De resterende 4% is water.) De accijns hierop is enorm hoog (tientallen guldens per liter). Ontkleurde spiritus voldoet uitstekend en is heel goedkoop. Het blijft wel giftig. Om spiritus ondrinkbaar te maken heeft men er namelijk een andere alcohol aan toegevoegd: methanol of methylalcohol.

Aangezien ontkleurde spiritus een mengsel is van twee alcoholen, zal ik niet over ethanol schrijven, maar over "ontkleurde spiritus" of "alcohol" als algemene term.

Neem 1-2 liter.

Bij de drogist is tamelijk goedkope ethanol te koop, zonder methanol. In verband met de accijns is ook deze stof ondrinkbaar gemaakt, maar nu met bv. lavendelolie. Dat is een vette stof, die het gebruik hier onmogelijk maakt. Bovendien is brandspiritus toch nog véél goedkoper.

Gedemineraliseerd water. Vroeger werd gedestilleerd water gebruikt (gecondenseerde stoom) maar gedemineraliseerd (met een soort kunsthars zijn de opgeloste zouten eruit getrokken) voldoet goed.

Het is verkrijgbaar bij drogist of supermarkt.

Aceton. Moet volledig water- en harsvrij zijn! De vloeistof moet kleurloos zijn en niet gelig. De watervrijheid is eenvoudig te testen: Meng 1 ml aceton met 1 ml xyleen (zie verderop). Treedt er troebeling of scheiding in lagen op, dan bevat de aceton water. Door aceton te gebruiken is absolute alcohol (100%) niet nodig. Absolute alcohol moet zelf gemaakt worden, hetgeen nogal omslachtig is. Goede aceton is daarentegen bij veel drogisten te koop en kost niet veel. 0.5 - 1 liter

Intermedium. Dit is geen stof, maar een functie die door meerdere stoffen vervuld kan worden. Het gaat om de laatste overgang van water naar paraffine en andersom. Ik gebruikte tijdens mijn eerste experimenten chloroform. Dat is een vrij riskante stof. Bovendien kan het niet als vervolg op aceton worden gebruikt (wordt later besproken). Later heb ik zg. **acetonvrije nagellakremover** van Yves Rocher gebruikt. Vermoedelijk is dit amylacetaat oid. Het heeft een vage kersenbonbongeur. Andere "acetonvrije" nagellakremovers bevatten mogelijk dezelfde stof. De stof is te mengen met aceton en lost paraffine op. **Xyleen** is ook een goede mogelijkheid. Het is vrij verkrijgbaar, maar het gaat wel om een schadelijke stof. Ventileer heel goed! 50-100 ml.

Paraffine Vast. Verwart u dit vooral niet met stearine, de stof waarvan kaarsen zijn gemaakt. Het smeltpunt van de paraffine moet tussen de 50° en 80° C liggen. Dit is het geval bij de gewone in de handel verkrijgbare paraffine. Paraffine-olie (een vloeistof) is dus niet geschikt!

Paraffine mag nooit zomaar op een open vlam verhit worden, aangezien het dan te heet wordt en kan ontleden. Gebruik een warmhoudplaatje van een oud koffiezetapparaat (ca. 85° C) of een zandbad (zie materialen).

Het verdient aanbeveling om nieuwe paraffine eerst te smelten en dan te zeven door een theezeeffje. Dit geldt ook voor restjes paraffine, die opnieuw gebruikt worden. Verwarm het theezeeffje wel eerst even voor in de gesmolten paraffine, anders komt er meteen een gestold laagje in.

Zorg dat er geen water in de paraffine komt!

Paraffine die herhaaldelijk is gesmolten en weer gestold schijnt beter te werken, vermoedelijk omdat de structuur ervan fijner is, waardoor het niet splintert bij het snijden.

Afwasmiddel Een zo goedkoop en slecht mogelijk merk. Dit laat namelijk de minste sporen achter op de objectglaasjes.

Glycerol (ook glycerine genoemd). Enkele ml zijn voldoende. Vermoedelijk is 50 of 100 ml het minimum. Minder is in ieder geval niet goedkoper.

Tijm of kamille (bevatten bederfwerende stoffen)

Een vers ei (voor het eiwit). Dit wordt gebruikt bij het opplakken van coupes.

Xyleen 100 à 200 ml.

Canadabalsem. Dit is tamelijk duur, maar u heeft er vrij weinig van nodig. In de loop der jaren heb ik zelf slechts enkele ml gebruikt. Het moet gekocht worden bij een speciaalzaak voor microscopie (evt. per post laten komen). Misschien is er een opticien die het verkoopt. Bij de kleine hobbymicroscopjes wordt het ook wel een meegeleverd in de doos.

Neem liefst de neutrale variant. Ik heb uitgeprobeerd of doorzichtige nagellak een alternatief is, maar voor preparaten die uit coupes bestaan voldeed het niet. Voor bv. het afdekken van uitstrijkjes werkte dit wel (zie andere technieken).

Kleurstofoplossingen Een paar ml. **Giemsa** "stockoplossing" is in het begin zeker genoeg. Deze geconcentreerde oplossing is bij een speciale drogist of apotheek te koop voor een paar gulden (evt. een vakhandel voor microscopie - probeer Internet!). NB: Het is echt Giemsa en geen Giesma.

De stockoplossing wordt 1:50 verdund en die verdunning is enige uren houdbaar. In praktijk wordt meestal een serie preparaten tegelijk gekleurd, zodat er af en toe weer eens 0.5 ml stock wordt gebruikt (geeft 25 ml verdunning).

Om wat verder te gaan met de kleuringen is **haematoxyline** aan te bevelen. Koop dit bij voorkeur kant en klaar, want u heeft slechts enkele milligrammen van het poeder nodig, terwijl levering doorgaans per gram plaatsvindt. Dit betekent dat u zich blauw betaalt voor een kleurstof die uw achterkleinkinderen nog meer dan genoeg van overhouden. Laat enige tientallen ml klaarmaken, of bestel een flesje. De kleurstofoplossing is houdbaar en kan steeds weer worden gebruikt.

Haematoxyline wordt steeds in combinatie met eosine genoemd. Van eosine wordt 1 gram opgelost in 100 ml gedemineraliseerd water, samen met 1 ml azijn (of een drupje zuiver azijnzuur).

Er zijn nog veel meer kleurstoffen en kleuringen: Azophloxine, saffranine, methyleenblauw, fuchsine, May-Grünwald en de zilverimpregnaties. Voor uitleg en recepten verwijs ik u graag naar gespecialiseerde literatuur, zoals Burck.

Om te oefenen is de Giemsa-kleuring meer dan voldoende. De HE-kleuring (Haematoxyline-Eosine) is echter heel gangbaar en ook de moeite waard, hoewel iets lastiger dan de Giemsa. Zie het gedeelte over kleuren.

Zuur Eventueel nodig voor het ontkalken van botten of kiezen. Neem bij voorkeur 5% zwavelzuur (accuzuur). Salpeterzuur 5% is ook geschikt, maar het is een zeer onaangename stof die doorgaans niet in verdunde vorm te koop is. De geconcentreerde vorm is - net als geconcentreerd zwavelzuur - bijzonder gevaarlijk.

1.2 Apparaten en materialen

Scheermesjes. Bv. de grote platte mesjes van Schick, Gillette of Nacet etc.

Maatkannetje of grote injectiespuit (ca. 100 ml). Koop vooral geen (te) dure maatcilinder bij de fotograaf oid. Eventueel is een gewone keukenmaatbeker van 1/4 tot 1 liter voldoende. Een paar kleinere injectiespuiten zijn ook handig voor kleinere hoeveelheden (niet van straat oprapen!).

Trechter Een gewone huishoudtrechter, met een diameter van 7-15 cm. aan de bovenzijde.

Potjes. Jampotjes zijn geschikt, maar smallere potjes zijn het zuinigst. Er worden namelijk vloeistoffen in gedaan, die een bepaalde hoogte moeten bereiken. Bij een smaller potje is minder vloeistof nodig. Olvarit-potjes zijn bv. geschikt. Voor de spiritus-stappen zijn plastic potjes te gebruiken, voor de andere is glas vereist. Zelf heb ik de kleine kokertjes van vissenvoer gebruikt. Ze zijn erg licht, dus vastlijmen op een plank is aan te raden. Aceton, xyleen en dergelijke oplosmiddelen tasten veelal kunststof aan. Als u de vloeistoffen ook in de potjes wilt bewaren moet er een deksel bij zijn. Dit hoeft niet heel goed af te sluiten, want er kan huishoudfolie tussen worden gedaan. Dit dunne taaie plasticfilm is tegen veel stoffen bestand.

Voor het doorvoeren van weefsels zijn ca. 10 potjes vereist. Eventueel kunt u bij ruimtegebrek volstaan met één potje, dat steeds met een andere vloeistof wordt gevuld. Voor het doorvoeren van de coupes op objectglasjes in een later stadium zijn ook tien potjes nodig. Neem echter liever teveel dan te weinig, want een gebrek aan potjes is bijzonder hinderlijk.

Verbandgaas Dit is alleen nodig als u met de "theezakjes"-methode meerdere blokjes weefsel tegelijk wilt fixeren. Vitrage is ook bruikbaar. Er zijn ook een paar stukjes garen nodig en een paar kartonnen labeltjes.

Huishoudfolie of ander stevig plasticfolie. Dit dient voor het afdichten van deksels. Pindakaaspotten hebben deksels die niet luchtdicht zijn. Bij jampotten is er vaak een rubber ring in het deksel aanwezig, maar die wordt aangetast door diverse stoffen. Als eerst huishoudfolie over de pot wordt gedaan en dan pas het deksel, zijn veel problemen verholpen.

Metalen pincet. Om glaasjes uit de vloeistoffen te nemen (zie "gevaren"). Een klein pincetje, zoals gebruikt wordt voor postzegels of splinters is geschikt.

Warmhoudplaatje, elektrisch. Een oud koffiezetapparaat of theelichtje kan heel handig zijn. Vraag of iemand nog een defect koffiezetapparaat heeft (bv. lek of gebarsten - het thermostaatdeel moet wel in orde zijn).

Kijk evt. op een rommelmarkt of bij het "grof vuil".

Om de temperatuur te testen: een druppel water mag op het hete plaatje wel dampen, maar niet sissen en sputteren. Een blikje water (bv. tomatenpureeblikje) mag niet gaan koken. Een iets lagere temperatuur voor bv. het drogen van coupes is te bereiken door er een extra metalen plaatje op te leggen, met een kleine ruimte ertussen.

Heeft u echt geen warmhoudplaatje, dan is een oud strijkijzer ook bruikbaar. De stand moet ongeveer synthetisch/zijde zijn. test weer met een druppel water. Een stukje paraffine moet meteen smelten !

Het smelten van een bakje paraffine kan met deze hulpmiddelen verscheidene uren duren. Houd hier rekening mee! Als de paraffine eenmaal gesmolten is, kan deze dagenlang op het plaatje blijven staan. Denk wel aan brandgevaar, kinderen, huisdieren etc.

Conservenblikje Hierin smelt u de paraffine, op het warmhoudplaatje. Het geschiktst is een vertind blikje, niet een exemplaar met een laklaag. Een laag blikje van ananasschijfjes (goed schoonmaken) is zeer geschikt. Laat het eerst enkele uren op het hete warmhoudplaatje drogen alvorens er paraffine in te doen.

Uitgietbakjes voor weefsel in paraffine. Een kunststof bakje voor ijsblokjes is zeer

geschikt.

Microtoom Een instrument om zeer dunne lagen (coupes) te snijden van weefsel. Uiteraard hebben slechts weinig mensen een dergelijk instrument. Zie onderdeel "snijden" en de aanwijzingen voor zelfbouw in het "technisch gedeelte".

Blokjes vurenhout, of ander poreus hout. Ongeveer 2x2 cm en 3 cm lang tot 3x3 cm en 5 cm lang. De (droge!) blokjes worden een nacht in de paraffine gelegd, zodat ze er geheel mee doordrenkt worden. Na afloop afkoelen en bewaren. Aan deze blokjes kunnen kleine blokjes paraffine met weefsel worden vastgesmolten. De houten blokjes kunnen stevig worden vastgeklemd itt. blokjes paraffine, die gemakkelijk breken. ca. 10 stuks gewenst.

Objectglaasjes. Een doos is meer dan voldoende (50 stuks). De glaasjes koopt u bij sommige opticiens of bij een laboratoriumhandel. Eventueel zijn reepjes vensterglas van ca. 2.5 x 7.5 cm bruikbaar. Vensterglas is echter dikker. Het is de moeite waard om glaasjes met gepolijste randen te kopen. Dit voorkomt snijwonden (ook later bij het oppakken van de preparaten). Maak de glaasjes meteen na aanschaf goed schoon met goedkoop afwasmiddel (stevig wrijven). Spoel ze af met gedemineraliseerd water en zet ze in een potje met ontkleurde spiritus. Ze moeten geheel onder vloeistof staan, maar mogen wel op elkaar gepakt zijn. Dek de pot af met een deksel tegen verdamping.

Dekglaasjes Deze zijn vrij duur en heel teer. U koopt ze bij dezelfde zaak als de objectglaasjes. vervanging is niet mogelijk. Ze zijn namelijk flinterdun. De dekglaasjes zitten in een speciaal doosje en daar blijven ze ook in tot het gebruik. Niet wassen of wrijven. Evt. met een zachte penseel stof wegvegen. Het is buitengewoon kwetsbaar materiaal.

Tissue Liefst een niet pluizende soort, zoals Kleenex. Keukenpapier of WC-papier voldoet ook wel. Het gaat er vooral om dat de natte objectglaasjes vlak voor gebruik drooggewreven worden met vetvrij papier, zonder dat er veel stof vrijkomt.

Satehstokjes of andere houtjes

Filtreerpapier (zie in het technisch gedeelte : "Filters")

Theezeeffe. Liefst een metalen exemplaar om paraffine te zeven. Het is ook handig om het zeer vloeibare deel van het eiwit van een kippen-ei op te vangen.

Reageerbuizen 2 à 3 stuks

Glaspen Zeer aan te raden. Hiermee kunnen alvast markeringen op objectglaasjes worden aangebracht vóór er een etiket op kan worden geplakt (tijdens de doorvoerreeksen). De kans op verwisseling is dan veel kleiner.

Etiketten Uiteindelijk worden de essentiële gegevens vermeld op een preparaat dmv. een etiket.

Stofjas, schort, voorschoot oid. Bestemd om kleding te beschermen tegen vlekken en beschadiging. Het is nu eenmaal niet te doen om iedere paar uur om te kleden. Zelf heb ik voorschoten van oude lappen (bv. broekspijpen) gemaakt.

Lichtbron Een die veel licht geeft. Minstens een sterke bureaulamp 100 W of een TL van 40 W. Bij voorkeur verplaatsbaar.



Foto I De laboratoriumkast van de auteur

2 Het verkrijgen van organen en weefsels

Natuurlijk is het mogelijk dat u weefsel heeft liggen dat u graag wilt verwerken (het moet dan wel gefixeerd zijn. Aan de andere kant is het mogelijk dat u preparaten wilt maken, maar niet weet waarvan.

In ieder geval wil ik benadrukken: Dood geen dieren tbv. uw experimenten. Zelfs het argument dat het om leven en dood gaat in een bepaald onderzoek zal hier niet van toepassing zijn.

Bovendien zijn er genoeg alternatieven.

Hieronder worden enkele opgesomd.

2.1 Weefselbronnen

- Verongelukte vogels. Ze breken soms hun nek bij een botsing met een raam. - In het verkeer verongelukken dieren (vaak egels).
- Sommige mensen zetten vallen voor muizen.
- Verse slachtmaterialen.
- Vers gevangen vissen (niet speciaal voor het onderzoek gevangen).
- Restweefsels van practica op scholen.
- Eigen operatiematerialen (meniscus, kies).
- Uw huisdier kan ook geopereerd zijn (knobbeltje verwijderd).
- Een stukje huid dat losraakt bij een verwonding.

Als u een dood dier gebruikt, overtuig u er dan eerst van dat het werkelijk dood is.

Wacht aan de andere kant niet te lang met het bewerken van de weefsels. Na de dood komen er allerlei vervalprocessen op gang.

Vlees in de supermarkt is bv. al gedeeltelijk vergaan. Alleen vlak na de slacht zijn organen in goede staat.

Het is niet zinvol om een dood dier compleet te conserveren.

Voor de histologische technieken die hier beschreven worden heeft u stukjes weefsel (spier, huid, hart, lever, nier, hersenen etc.) nodig van enkele mm tot ongeveer een cm maximaal. grotere stukken zijn niet goed (niet snel genoeg) te fixeren en zullen dus gedeeltelijk vervallen.

Als u een plakje uit een orgaan snijdt, maak dan een schets van de plaats en de richting. Wat uiteindelijk te zien zal zijn in een preparaat hangt daar sterk vanaf.

2.2 Prepareren

Hoewel dit boekje het ontleden van dieren niet behandelt, worden hieronder toch enkele adviezen gegeven. Ze zijn bedoeld als enig houvast bij het verkrijgen van materiaal uit dode gewervelde dieren.

Bedenk dat u altijd risico's loopt v.m. verwonden en besmetting. De auteur van dit boekje aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor eventuele schade die lezers direct of indirect lijden als gevolg van deze aanwijzingen!

- Maak allereerst een oplossing van 9 gram zout in 1 liter water. Als het afwegen van een dergelijke kleine hoeveelheid lastig is, neem dan 45 gram (brievenweger !) en los dit op in 1 liter water. Neem 200 ml. van deze oplossing en vul die weer aan tot een liter (met 800 ml dus). 90 gram in een emmer van 10 liter kan natuurlijk ook. Het oplossen duurt een tijdje. Blijf goed roeren.

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, spiritus en dergelijke voor het spoelen van vers onderzoeksmateriaal.

- Als u weinig of geen ervaring hebt in ontleedwerk, gebruik dan bij voorkeur een scherp schaartje en geen mes. Draag steeds (huishoud)handschoenen om evt. besmetting te vermijden. Probeer zonder ervaring geen complexe zaken uit, zoals het openbreken van een schedel.

- Werk op een laag stevig plastic - landbouwplastic of eventueel een dubbelgevouwen vuilniszak. Leg voor het snijden met een scheermes een oud glad houten plankje klaar.

- Pak het vel van borst- of buikholte op en geef er een knip in. De spierlaag wordt dan zichtbaar. Doe daar hetzelfde mee.

(Bij sommige dieren, zoals vissen, lukt dit niet. Probeer daar meteen -voorzichtig - door te steken naar de buikholte.)

Bij de borstholte zullen de ribben doorgeknipt moeten worden. Dit kan bij kleinere dieren met een schaar (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 nog een dwarse opening (omgekeerde T) 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.

- Snij met een scherp (nieuw!) scheermes de gewenste stukken uit de organen. Doe dit niet met een schaar, want dan wordt het weefsel kapotgeknepen.

- Breng de stukken orgaan meteen over in fixeeroplossing, om verder verval te voorkomen.

- Verwijder het afvalmateriaal en doe het meteen in "bio-" of vuilnisbak.

Gooi ook plastic, plankje, scheermes en handschoenen meteen in een container.

- Ontsmet het gebied waar u gewerkt heeft met dettol, bleekwater of een ander middel.

- Mocht u toch bv. hersenen willen bewerken, maak dan de kop los van de romp en haal de huid eraf. Breng dan eerst de kop in fixeervloeistof en laat deze zo lang als nodig inwerken (zie verderop). Later kunt u mbv. zuur het bot zacht laten worden, zodat de hersenen gemakkelijk vrij te prepareren zijn.

3 Fixatie

Zoals reeds eerder gezegd moet verval van weefsel - door bacteriën, maar vooral door de eigen enzymen - zo snel mogelijk gestopt worden. Doen we dit niet, dan blijft er uiteindelijk geen herkenbare structuur over, ongeacht de verdere technieken.

Behalve alle processen remmen door snelle bevriezing kunnen we ook chemisch "bevriezen". Daadwerkelijk bevriezen is hier geen optie, aangezien er ijskristallen zullen ontstaan in de cellen, die ook schade aanrichten.

Een chemische behandeling ligt echter wel binnen bereik. Een bij-effect van het fixeren is overigens ook dat het materiaal wat steviger wordt, net als bij het koken van een ei.

Een zeer geschikt en goedkoop middel is 4% formol. Formol werd vroeger wel formaline genoemd en is eigenlijk een oplossing van het gas ethanal (ook wel formaldehyde genoemd) in water. Het gas ontsnapt ook uit de oplossing en dat is te merken aan de stekende zoetige geur, die de slijmvliezen irriteert op dezelfde manier als vers gesneden uien dat doen. Het is niet onschadelijk, dus adem het gas niet in en ventileer goed.

Fixeren betekent overigens zoveel als vastleggen, vastmaken. Het begrip wordt op vele manieren gebruikt, onder andere bij fotografie en bij houtskooltekeningen. De daar gebruikte fixatieven zijn echter niet voor histologische fixatie te gebruiken.

Nu bestaat het gevaar dat weefsel krimpt of zwelt, doordat de formol water onttrekt aan het weefsel of het juist "uitdroogt". Bij zwellen moet de concentratie formol iets hoger worden en bij krimp moet er eventueel een klein beetje water bij. Krimpen is echter minder erg dan zwellen.

De problemen kunnen ontstaan doordat er gas is ontweken of polymeer is gevormd (zichtbaar als neerslag).

Het is ook mogelijk dat de opgegeven concentratie niet juist was, of dat er een vergissing is opgetreden bij het verdunnen. Raadpleeg evt. het technisch gedeelte over "het maken van verdunningen".

Krimpen, maar vooral zwellen van weefsel kan leiden tot inwendig scheuren, door de spanning

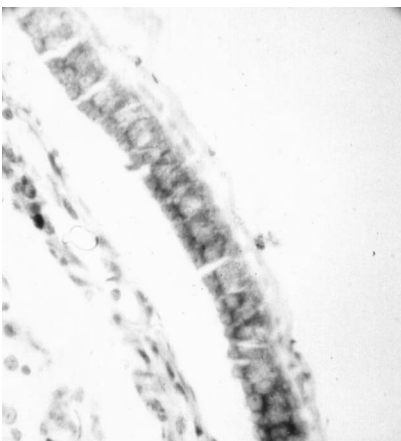


Foto II Het loslaten van een weefsellaag ten gevolge van ongelijkmatige krimp.

Door niet te dikke plakken weefsel te fixeren (maximaal enkele mm dik) kan de formol snel genoeg inwerken en worden problemen doorgaans voorkomen.

Het is van groot belang om niet te kort te fixeren. Een etmaal is aan te raden, maar langer mag. Formol is namelijk een geschikte bewaarvloeistof voor weefsels en organen. Het werd ook wel "sterk water" genoemd.

Indien u materialen maanden of jaren wilt bewaren is een brokje marmer nuttig. Dit vangt vrijkomend (mieren)zuur weg in de oplossing.

Wilt u stukken fixeren die veel dikker zijn dan 4 mm of zelfs een heel orgaan, sluit dan de pot goed af (huishoudfolie) en fixeer in de koelkast.

Dit remt de vervalprocessen, maar vertraagt de fixatie ook. Trek er dan een paar dagen of een week voor uit.

Vergeet niet om etiketten met tekst op te potten te plakken. Stukken orgaan zijn later niet altijd even eenvoudig te herkennen. De kleur verandert meestal in een onbestemd grijsbruin.

Bij grotere organen kan de fixatie ook verbeterd worden door zg. perfusie. Dit geldt overigens ook voor organen waar een luchtbel in kan blijven zitten, zoals darmen.

Er wordt vloeistof in het orgaan gebracht, bv. via een bloedvat, luchtpijp of rechtstreeks in de darmholte. Doe dit heel voorzichtig met een kleine injectiespuit zonder naald. Duw niet tegen weerstand in en maak de spuit ook niet vast als een fietspomp. Laat gewoon vrij druppelen zolang dit lukt. Hart en darm gaan vrij eenvoudig, maar bij longen moet heel voorzichtig te werk worden gegaan. Longen zijn er immers niet op berekend om veel vloeistof te bevatten. Laat ze tijdens het vullen drijven in formol en ga niet verder dan een lichte uitzetting. Zeker niet oppompen!

3.1 Bijzondere fixatieven

In sommige gevallen voldoet formol 4% niet helemaal. Er kunnen dan andere stoffen worden toegevoegd. De fixatievloeistoffen krijgen dan soms de naam van degene die de variant ontwikkelde. We bespreken hier "Schaffer" en "Orth" fixatief.

Schaffer bevat alcohol (ethanol). Voor de bereiding wordt een deel formol 40% met twee delen ontkleurde spiritus gemengd (zie technische deel "ontkleuren van spiritus"). Bijvoorbeeld 100 ml. formol 40% met 200 ml ontkleurde spiritus.

Het is een krachtiger fixatief. Bovendien wordt het weefsel meteen met alcohol doordrenkt, wat later eventueel tijd kan besparen.

Schaffer is geschikt voor oa. het spijsverteringsstelsel en longen.

Orth is een zeer sterk fixatief. Het kan bij zacht klierweefsel worden gebruikt, zoals lever, milt, pancreas en speekselklieren.

Om Orth te bereiden wordt aan 110 ml formol 4% nog 2.5 gram toegevoegd. Neem bij problemen met het afwegen 25 gram en los dit in 100 ml water op.

Neem van deze oplossing 10 ml en voeg dit toe aan 100 ml formol 4% Dit is niet helemaal hetzelfde, maar het is acceptabel.

De oplossing wordt na verloop van tijd groen. Maak bij voorkeur steeds een verse oplossing klaar.

Bedenk echter dat chroom een zwaar metaal is en chromaat moet dus niet door de gootsteen worden gespoeld. Verzamel de vloeistof als chemisch afval.
Maak geen Orth als het niet nodig is.
Fixeer niet te lang in Orth. Het weefsel kan keihard worden. 24-48 uur hoogstens.
Na Orth-fixatie is spoelen absoluut noodzakelijk. Zie verderop.

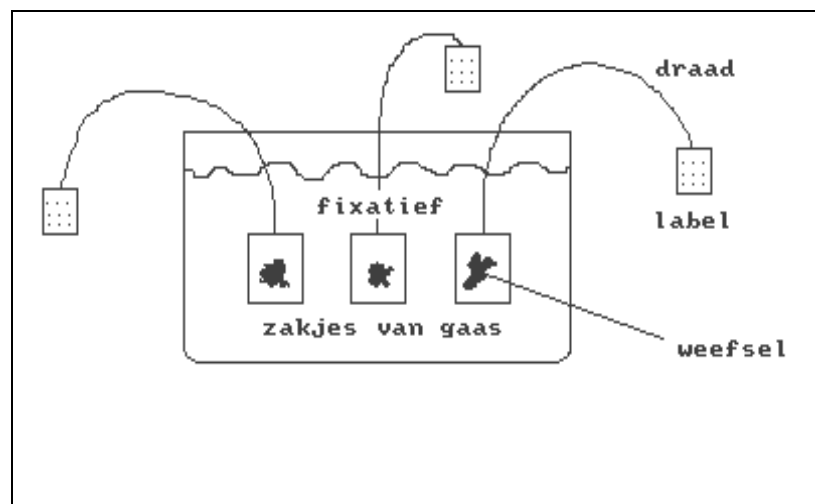
3.2 "Theezakjes" methode

Als meerdere stukken weefsels en organen in een fixatief liggen, is het verschil na een tijd niet eenvoudig meer te zien. Aparte potten met etiketten kunnen omslachtig zijn. Voor vele kleine stukjes is er daarom een andere oplossing.

Neem strookjes verbandgaas van ca 8 cm lang en 5 cm breed. Het gaat om gewoon verbandgaas, waar men doorheen kan kijken. Gewone vitrage met vierkante gaatjes van ca. 1 mm bij 1 mm is ook geschikt. Vouw de strookjes dubbel en leg het stukje weefsel ertussen. Rijg nu snel met een stuk garen rondom het gaasje dicht (maak aan het begin een knoopje) en laat een stuk van ca. 15 cm uitsteken.

Maak aan de uitstekende draad een kaartje of etiket vast en noteer daarom het type weefsel. Hang het "theezakje" nu in het fixatief en laat het kaartje buiten de pot bungelen. Herhaal deze werkwijze voor alle stukjes.

Dek dan de pot af met huishoudfolie en draai de dop erop.



Figuur 1 De "theezakjesmethode"

3.3 Spoelen

Er is al op gewezen dat verse weefsels en organen alleen met een zg. fysiologische zoutoplossing gespoeld mogen worden, omdat anders de cellen barsten. Merkwaardig genoeg geldt dit na fixatie niet meer. Gewoon kraanwater en tenslotte gedemineraliseerd water mogen gewoon gebruikt worden.

Spoelen na fixatie (of bewaren in formol) is van belang, omdat er dan geen resten formol achterblijven die een versturende werking kunnen hebben bij bv. de kleuring.

Aan de andere kant wordt gedurende de reeks vloeistoffen waar het weefsel doorheen gaat voldoende gespoeld. De vloeistoffen moeten dan echter wel af en toe ververs worden, anders hoopt zich alsnog verontreiniging op.

Bij Schaffer fixatief bevindt het weefsel zich al in 50% alcohol. Spoelen in water zou een stap terug zijn, dus meteen verdergaan is ook een mogelijkheid.

Na Orth-fixatief moet echter altijd eerst gespoeld worden. Liefst in een grote hoeveelheid water (minstens 100 x het volume van de stukjes weefsel) en er moet ook nog enkele malen ververs worden (bv. 3 x 8 uur in vers water).

Om geen andere verontreinigingen te introduceren kan de laatste spoeling altijd het beste in gedemineraliseerd water plaatsvinden.

3.4 Ontkalken

Bepaalde materialen, zoals bot en tanden, bevatten een soort kalk. Dit maakt het materiaal te hard om te bewerken, dus moet er "ontkalkt" worden.

Een paar dagen in 5% zwavelzuur of 5% salpeterzuur moet voldoende zijn. Dit gebeurt echter pas ná het fixeren en voor het spoelen.

Probeer niet na te gaan of de ontkalking compleet is door te buigen of te knijpen. Houd het materiaal tegen het licht (geen harde kern te zien?) en snij het eventueel met een scheermes doormidden. Een stroef gevoel of gekners wijst op onvoldoende ontkalking.

3.5 Samenvatting en vooruitblik

Door de fixatie en alles wat erbij komt kijken is het weefsel geschikt voor verdere bewerking. In de volgende stappen zal het water geleidelijk uit het weefsel worden verwijderd en worden vervangen door paraffine. Als dit goed wordt gedaan vormen paraffine en weefsel een geheel.

Dit lukt alleen goed als de stukken weefsel niet te groot zijn.

Heeft u toch grotere stukken gefixeerd, snij ze dan alsnog in kleinere stukken (enkele mm dik).

Vergeet bij fixeren, spoelen, maar ook bij de nu volgende stappen nooit het weefsel af en toe om te keren of door schudden door de vloeistof te bewegen.

Nog even het overzicht:

- Fixeer niet te kort.
- Fixeer kleine plakken (max ca. 4 mm).
- Vermijd zwellen van weefsel, maak de formol evt. iets geconcentreerder.
- Houd de weefsels uit elkaar, bv. met de "theezakjes" methode.
- Schud of keer af en toe.
- Bewaar weefsel evt. in formol 4% met een brokje marmer.
- Eventueel "ontkalken" na fixatie maar voor het spoelen.
- Spoel voor fixatie alleen met fysiologische zoutoplossing.
- Spoel ná fixatie met veel kraanwater en gedemineraliseerd water.
- Snij eventueel alsnog kleinere stukken.

4 Doorvoer en inblokken

Het gefixeerde weefsel is steviger geworden, maar dunne coupes snijden lukt nog niet, ook al omdat de stukjes klein zijn en geen houvast geven.

Inblokken in paraffine is een oplossing voor dit probleem, maar het weefsel is vochtig en paraffine mengt in het geheel niet met water. Zouden we het weefsel echter drogen in een oven, dan zou de structuur verloren gaan.

Daarom wordt er een geleidelijke overgang gemaakt, net als dat bij fossielen is gebeurd. Wij doen het echter wel sneller!

In dit hoofdstuk zal worden beschreven hoe de overgang gemaakt kan worden van het vochtige gefixeerde, eventueel ontkalkte weefsel, naar watervrij weefsel dat een eenheid vormt met de omringende paraffine.

De overgang geschiedt in stappen, waarbij water wordt vervangen door een stof die met water gemengd kan worden ("alcohol" = ethanol). Bij iedere stap is er minder water in de alcohol. Omdat watervrije alcohol echter praktisch niet te koop is en moeilijk gemaakt kan worden (gevaarlijk, lage opbrengst), stappen we over op aceton. Volledig watervrije aceton is gewoon te koop.

De aceton is niet te vermengen met paraffine. Alcohol ook niet trouwens. Er moet dus nog een extra stap worden ingelast. Deze tussenstof wordt "intermedium" genoemd. Na het intermedium kan de stap naar paraffine worden gemaakt.

4.1 De reeks in praktijk

Het principe zal nu wel duidelijk zijn, maar hoe wordt het in praktijk uitgevoerd ?

De stukjes weefsel mogen niet verward worden en er kunnen geen markeringen op worden aangebracht. De "theezakjes" methode is geschikt voor het fixeren, maar niet voor deze reeks. Er zou namelijk enorm veel vloeistof in het gaasje blijven hangen, waardoor de stoffen snel van concentratie veranderen door verontreiniging met de vorige stap.

Een reeks aparte potten voor ieder weefsel, waar steeds weer op allerlei momenten andere vloeistoffen in worden geschonken is ook niet al te handig en gezond. Echt werkbaar is het om een zg. doorvoerreeks klaarzetten.

In praktijk betekent dit dat er een vaste reeks potten of potjes wordt neergezet met de vloeistoffen die bij de opeenvolgende stappen horen. De stukjes weefsel stappen één voor één in en vormen een soort reeks. In een aantekenboekje is bij te houden welk weefsel in welke pot zit. Bovendien blijft de volgorde vaststaan. Eventueel kunnen er nog labeltjes bij de pot worden gestoken of op het deksel worden gelegd.

Het is sterk aan te bevelen kleine potten te nemen en deze vast te maken op of in een ondergrond. Zo kunnen ze niet door verschuiven van plaats verwisselen. Ze kunnen bv. met montagekit op een plank worden geplakt. Dit is echter lastig bij het leegschonken. Beter is het om in een plank, plaat zachtboard of "piepschuim" gaten te maken waar de potten goed in vastgeklemd worden. Er zijn zo' n acht tot elf potten nodig. Het beste is het om ze allemaal op één enkele rij te zetten. Bij niet al te grote potten moet dit te doen zijn.

Geef ondanks de vaste positie de potten alle een eigen etiket. Vergissingen moeten namelijk zo goed mogelijk worden uitgesloten. Bij het vullen kunnen er vergissingen optreden. Schrijf bij voorkeur niet op het glas met viltstift, want de oplosmiddelen maken er korte metten mee. Plaketiketten met ballpoint zijn evenmin duurzaam in deze omgeving. Schrijf met een potlood duidelijk op een stuk papier en plak het met sellotape of offset-tape (kortom doorzichtig plakband) helemaal rondom vast. De aanduiding kan dan niet van de pot afvallen.

Welke reeks wordt er nu precies doorlopen? Het is niet mogelijk om het weefsel plotseling watervrij te maken. Dan zou er krimp optreden met kans op vervorming en scheuren. Hieronder worden de stappen verder besproken.

4.2 De eerste stap

De eerste stap na het spoelwater is 50% alcohol. Hiervoor nemen we ontkleurde brandspiritus, die wordt verdund tot 50% alcohol. Spiritus bestaat niet uit zuivere ethanol, maar bevat een deel methanol. Dat is echter geen probleem.

Aangezien brandspiritus - gekleurd of ontkleurd - 15% water bevat, moet er wat extra water bij. Om een voorbeeld te geven: In 100 ml spiritus zit dus 15 ml water en 85 ml alcohol. De bedoeling is dat er ook 85 ml water is, dus voegen we aan 100 ml spiritus 70 ml gedemineraliseerd water toe. De verhouding alcohol/water is dan half/half oftewel 50%.

Nadere informatie en adviezen zijn te vinden in het gedeelte over "het maken van verdunningen".

Als het weefsel (in plakjes van enkele mm) enige uren in de 50% alcohol ligt, zal er water van het weefsel naar de vloeistof gaan en alcohol van de vloeistof naar het weefsel. Als er ongeveer 100 keer zoveel vloeistof is als weefsel, heeft het water uit het weefsel niet veel invloed op de concentratie van 50%. Deze zal misschien na een paar blokjes of plakjes 49% zijn, maar dat is niet erg.

Het is overigens de vraag of de 50% alcohol echt de eerste pot moet zijn. Met name na fixatie met formol is licht spoelen voldoende. De spoelstappen kunnen dan als eerste en tweede pot in de reeks worden opgenomen: een met kraanwater en een met gedemineraliseerd water. Of tweemaal gedemineraliseerd als u genoeg geld hebt.

De overgangen van pot naar pot kunnen het beste met een pincet worden uitgevoerd. Knijp niet in het weefsel, maar pak het voorzichtig vast, eventueel aan een vliesje of uitstekend bloedvat.

4.3 De tweede stap

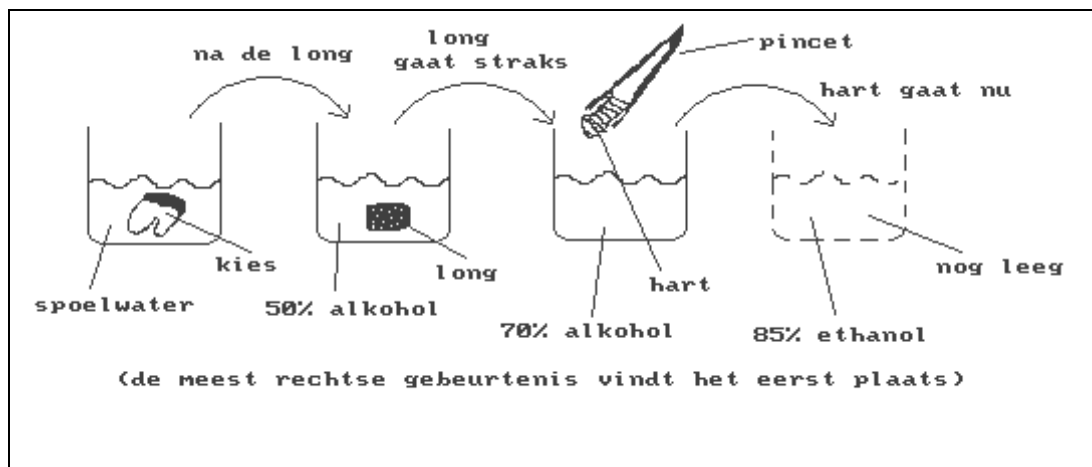
Na enkele uren is de vloeistof in het weefsel ook voor 50% alcohol. De volgende is 70% alcohol. Weer met behulp van een pincet.

Deze concentratie is overigens te maken door 70 ml alcohol en 30 ml water te nemen. In 82 ml ontkleurde spiritus zit ca. 70 ml alcohol en 12 ml water. Door er 18 ml water bij te doen wordt 70% alcohol verkregen.

In praktijk is het overigens handig om uit te gaan van het kwadraat van de weefseldikte in millimeters voor het aantal uren. Dus 1 mm wordt $1 \times 1 = 1$ uur.

2 mm wordt $2 \times 2 = 4$ uur, maar 5x5 mm wordt al 25 uur. Het is denkbaar dat u door ervaring gevoel krijgt voor deze tijden en wat meer risico's kunt nemen. Ga in het begin echter van deze vuistregel voor de "doordringingstijd" uit.

Aangezien 2-4 mm werkbaar is in praktijk, zal de wachttijd dus ongeveer van 4-16 uur variëren. Om aan te sluiten bij het menselijk dag/nacht ritme kan worden gekozen voor een standaard-duur van 12 uur voor stukken van 3-4 mm. Er kan dan iedere ochtend en iedere avond een stap verder worden gegaan in de reeks.



Figuur 2 Het begin van de oplopende doorvoerreeks

Het is van groot belang dat de stukjes weefsel niet door elkaar komen. Ze mogen elkaar dus niet inhalen. Aan de andere kant is het jammer als een traag stuk de hele reeks ophoudt. Begin daarom met de dunnere stukken en eindig met de grotere. Op het moment dat het eerste stukje weefsel naar 70% alcohol gaat, mag het volgende van fixatief of spoelwater naar de 50% alcohol. Heeft u inderdaad twee extra spoelwaterpotten, dan schuiven deze stukken weefsel nu ook op. Zijn de laatste stukken dikker, dan moeten ze misschien een "beurt overslaan" ivm. de al genoemde doordringingstijd.

4.4 Stap drie, vier en vijf.

Niet iedere stap vereist een aparte bespreking. Allereerst wordt na de 70% alcohol 85% alcohol genomen. Dit is de eigen concentratie van brandspiritus, dus verdunnen is niet nodig.

Na de alcohol zouden we overstappen op aceton. We nemen hiervoor dezelfde concentratie als de voorgaande alcoholstap. Een stap opzij in feite.

Door 85 ml aceton te mengen met 15 ml gedemineraliseerd water wordt 85% aceton gemaakt.

Na de 85% aceton komt 95% aceton. Uiteraard te maken door 95 ml aceton met 5 ml water te mengen. De vijfde stap is daarmee ook gezet. Bij het meetellen van spoelstappen zou overigens de zevende zijn.

Bedenk dat aceton zeer veel soorten kunststof aantast en zelfs oplost.

4.5 Watervrij!

Hoewel de paraffine nog niet in zicht is, breekt nu het moment aan om alle water te verwijderen. Dit gebeurt voor alle zekerheid door tweemaal 100% aceton te passeren. Nu is het namelijk wel van groot belang dat de omringende vloeistof zuiver blijft. Ook al wordt er geen aanhangende vloeistof van de 95% aceton meegenomen, een plakje weefsel van 10 x 10 x 5 mm brengt toch 5% van ca. een halve ml water mee. Dat is 25 microliter. Na 4 stukjes weefsel is dit 100 microliter, die in de 100 ml aceton komt.

Eentiende procent water en na 10 stukjes één kwart procent water. Dat is niet echt watervrij. Om geen storingen te krijgen wordt daarom nog een tweede stap ingelast van we 100% aceton. Hier wordt ook het laatste restje water tot een verwaarloosbare hoeveelheid teruggedrongen.

Na zo' 25 stukjes weefsel is verversen van de vloeistof overigens wel een goed idee. Als het weefsel blijft drijven bestaat het risico dat een kant niet goed ontwaterd wordt. Leg er in dat geval een gaasje op. Denk er echter om dat het gaasje in de eigen vloeistof moet blijven en niet met het weefsel meegaat naar de volgende stap!

4.6 Intermedium

De volgende stap is het intermedium. Het is een vloeistof die zowel met aceton als met paraffine te mengen is. Op deze wijze wordt de overstap mogelijk.

Bij de watervrije stappen doet zich steeds het probleem voor dat kunststof componenten aangetast worden. Huishoudfolie weerstaat in iedere geval enige tijd veel stoffen. Pas echter op met de plastic of rubber afsluitringen in de blikken deksels van jam- augurken- en andere potten. Deze worden door aceton vaak aangetast, maar zeker door intermedium.

Er zijn niet zoveel geschikte stoffen die gewoon te koop zijn. In feite kan ik twee voorbeelden geven:

Allereerst xyleen. Dit is een tamelijk riskante stof, die verwant is aan benzeen. Bij goede ventilatie en zorgvuldig gebruik is er mee te werken. Denk weer aan uw huisgenoten! Het is een goedkope stof die nog steeds verkocht wordt.

Een alternatief dat ik op een gegeven moment ontdekte is acetonvrije nagellakremover van Yves Rocher. Nagellakremover is in veel gevallen gebaseerd op aceton en dus niet bruikbaar. De aanduiding acetonvrij houdt in dat er een geheel andere stof is gebruikt. Naar de geur te beoordelen denk ik dat er amylacetaat of een soortgelijke stof is gebruikt.

Bij het kiezen van een andere stof dan xyleen (die zeker bruikbaar is) zult u eerst moeten testen of de stof daadwerkelijk als intermedium kan fungeren. Raadpleeg hiervoor het hoofdstuk "Intermedia" in het technisch gedeelte.

Stoffen die bedoeld zijn voor lichaamsverzorging bevatten overigens vaak geurtjes, vriendelijke oliën etc. Voor ons doel zijn dit eigenlijk verontreinigingen. Ze zijn te verwijderen met geactiveerde kool, op dezelfde wijze als bij het ontkleuren van spiritus. De typische geur van het oplosmiddel zelf (soms een kersenbonbongeur) zal uiteraard niet verdwijnen. Wel bv. de bloemengeur.

4.7 De overgang naar paraffine

Nadat de aceton vrijwel geheel uit het weefsel is verdwenen en plaats heeft gemaakt voor het intermedium, is bijna de paraffine in zicht.

Er komt echter nog één merkwaardige tussenstap, waarbij een mengsel van half om half paraffine/intermedium wordt toegepast.

In de praktijk kan een bepaalde hoeveelheid gesmolten paraffine gemengd worden met een gelijke hoeveelheid intermedium. Een andere mogelijkheid is een bepaald gewicht aan stukjes vaste paraffine te nemen, bv. 50 gram en dan toe te voegen aan 1.1 maal zoveel ml. intermedium. In dit voorbeeld dus $1.1 \times 50 = 55$ ml. Dit benadert de juiste verhouding redelijk.

De paraffine zal langzaam oplossen in het intermedium. Bij hogere temperaturen (ca. 35-40 °C) zal er een heldere oplossing ontstaan. 's zomers zullen dergelijke warme plekken wel te vinden zijn (schuur, zolder, achter een raam op het zuiden). In de winter kan de pot op de centrale verwarming worden geplaatst. Plaats de pot met het mengsel niet op of bij open vuur, dat is gevaarlijk. Lukt het helemaal niet, plaats dan de pot op een warmhoudplaatje van een koffiezetapparaat, maar in een zandbad. Het zandbad wordt in het technisch gedeelte beschreven.

Met een koortsthermometer kan worden gecontroleerd of de temperatuur niet te hoog wordt (ca. 40 °C moet voldoende zijn om een heldere oplossing te krijgen). De warme oplossing moet uiteraard goed afgesloten worden. Bijvoorbeeld weer met huishoudfolie en een schroefdeksel.

Bij het openen zal de pot sissen en komt er veel dampvormig oplosmiddel vrij. Open de pot dus bij een open raam of een wasemkap op de hoogste stand.

Lastig aan deze tussenstap is dat de weefsels er tweemaal zo lang in moeten blijven als in de andere stappen. Om vertraging in de reeks te voorkomen is het raadzaam twee potten met dit mengsel op te nemen. Niet omdat er twee stappen vereist zijn, maar omdat de reeks zo niet stagneert en er geen vergissingen op zullen treden.

4.8 Paraffine

Eindelijk is het dan zo ver. Het weefsel wordt in gesmolten paraffine gebracht. De paraffine moet nogal warm zijn om vloeibaar te blijven. Ruim 60 °C is gangbaar. Deze temperatuur is te bereiken op het warmhoudplaatje van een oud koffiezetapparaat of eventueel op een omgekeerd gemonteerd oud strijkijzer. De stukjes paraffine worden in een leeg, schoon en vooral droog blikje gebracht. Liefst een exemplaar met puur tin aan de binnenzijde, zoals bij ananas het geval is. Vooral de lage blikjes waar enkele schijven in zitten zijn geschikt. Laat het blikje na het schoonmaken en ontspoelen eerst een of twee uur op het hete warmhoudplaatje staan. Alle vocht zal dan verdampen. Pas daarna worden de stukjes paraffine erin gedaan. Nogmaals de waarschuwing: paraffine is iets anders dan stearine of waxine. Koop stukjes paraffine bij een drogist.

Het duurt een tijdje voordat de paraffine geheel gesmolten is. Wacht gewoon een uur af. Als het eenmaal gesmolten is mag het dagen of wekenlang in gesmolten toestand blijven.

De stukjes weefsel moeten helaas heel lang in de paraffine blijven. Zelfs viermaal zolang als de andere stappen (en tweemaal zolang als het paraffine/intermediummengsel). Dit zou ook weer een vertragend effect kunnen hebben. Vier blikjes paraffine is een oplossing. Het moeten dan wel kleine blikjes zijn, bv. van tomatenpuree.

Gemakkelijker is de volgende methode:

Maak een kruis van twee stroken karton, die beide half worden ingeknipt en met de knippen in elkaar geschoven. Maak de armen van het zo ontstane kruis zo kort dat het in het blikje kan staan. Het kruis moet wel een stuk boven het blik uitsteken.

Schrijf nu op het uitstekende deel met een zacht potlood of conté bij ieder vak een nummer: I, II, III en IV (of 1, 2, 3, 4 natuurlijk).

Het karton zal na enige tijd geheel doordrenkt raken met paraffine. Dat is geen probleem. Het karton verdeelt het blik in vier compartimenten en daar gaat het om. Het eerste stuk weefsel dat uit het paraffine/intermediummengsel komt, gaat naar paraffine I. Bij de volgende stap komt er een nieuw stuk binnen en het vorige gaat naar paraffine II. Op deze wijze blijft de "weefseltrein" zonder verstoring verder gaan, terwijl de paraffinestap 4 x de duur van de andere stappen heeft. Dat het viermaal dezelfde paraffine is maakt niet uit!

4.9 Inblokken

Eindelijk is het weefsel dan in de paraffine aangeland, maar het gaat om gesmolten paraffine. Om te kunnen snijden moeten er blokjes worden gemaakt van paraffine met het weefsel erin.

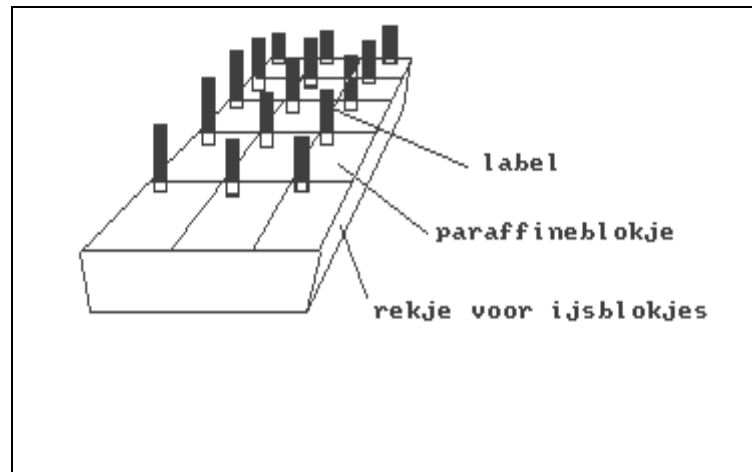
Dit gebeurt door een stukje weefsel met veel paraffine in een vorm te brengen. De vorm kan een fingerhoed zijn, maar ook een stukje metalen of kunststof pijp met een diameter van 1-3 cm, dat op een vlakke metalen ondergrond wordt gezet. Uiteraard hangt de diameter ook af van de grootte van het stuk weefsel. De metalen ondergrond is aan te raden, omdat de onderste laag paraffine dan snel stolt (metaal geleidt de warmte goed), waardoor er de buis meteen wordt gedicht aan de onderzijde.

Heel geschikt is echter een rekje voor ijsblokjes. Ieder stukje weefsel komt in een eigen vakje terecht. Het kunststof verdraagt de temperatuur van de gesmolten paraffine zonder meer. Het is niet heter dan een afwasmachine.

Wacht wel geruime tijd alvorens een poging te doen het blokje uit de vorm te halen.

Paraffine stolt ook al langzaam en het wordt bij verdere afkoeling nog harder. Zelfs in de koelkast kan het nog wel een uur duren voordat de blokken in een ijsblokjesrekje echt gestold zijn.

Maak voor het uitgieten papieren strookjes klaar, waarop met potlood de gegevens van het weefselblokje zijn geschreven. Leg deze strookjes oppervlakkig in de vorm. In ieder geval moet het papiertje niet naast of onder het weefsel komen. Als de paraffine vast is geworden, zit het papiertje ook vast in het blokje en is geen verwisseling mogelijk.

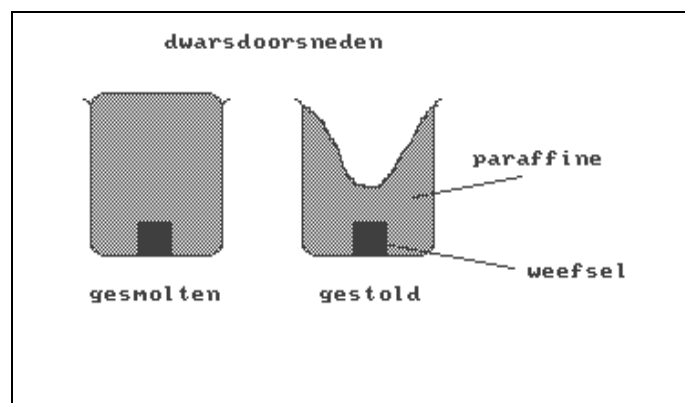


Figuur 3 Het vervaardigen van paraffineblokjes met weefsel

Nu heeft paraffine wel een heel vervelende eigenschap: Het zet sterk uit bij het smelten en krimpt dus ook weer bijzonder sterk bij het stollen.

Aangezien de buitenkanten van een vorm het koudst zijn, blijft daar het niveau gehandhaafd. Meer naar binnen ontstaat dan een steeds dieper wordend poeltje van nog vloeibare paraffine. Het kan zelfs voorkomen dat het in te blokken weefsel uiteindelijk bijna los is een trechter van paraffine ligt.

Het probleem is eenvoudig op te lossen door enige tijd na het uitgieten - als de randen in de vorm al vast zijn - wat extra vloeibare paraffine in de zich vormende holte te schenken. Deze nieuwe paraffine vormt een vast geheel met de oorspronkelijke lichteing.



Figuur 4 Krimp van paraffine bij stolling

Na volledige afkoeling kunnen de blokjes uit de vorm worden getikt of geduwd. Ze gedragen zich ongeveer als ijsblokjes, maar aangezien ze vettige zijn gaat het iets eenvoudiger. Bij fingerhoeden is het iets lastiger. Mbv. een speld of naald is het blokje echter wel te verwijderen.

4.10 Samenvatting en nog enkele adviezen

De stappen die na het fixeren en spoelen werden doorlopen op weg naar paraffine waren de volgende:

- 50% alcohol (ontkleurde brandspiritus, verdund met gedemin. water)
- 70% alcohol
- 85% alcohol
- 85% aceton
- 100% aceton I
- 100% aceton II
- Intermedium (bv. xyleen)
- Intermedium/Paraffine 1:1 I
- Intermedium/Paraffine 1:1 II
- Gesmolten paraffine (evt. in vier segmenten)
- Uitgieten in vorm en laten stollen.

De tijdsduur voor de eerste stappen is voor weefselstukjes van 3-4 mm dik ongeveer 12 uur per stap. Intermedium/Paraffine is verdubbeld ivm. de dubbele tijd. Paraffine (gesmolten) vraagt 4 maal zolang.

Dan nu nog enkele aanwijzingen:

- De aangegeven tijdsduur kan variëren met het type weefsel. Voor compacte organen als lever en nier moeten inderdaad deze tijden worden aangehouden. Voor longen en darmen ligt de zaak iets anders. Longen zijn poreus en darmen hol. Bij dergelijk weefsel kan de tijd wat krappier worden gekozen of de grootte van het stuk wat ruimer.

- Als weefsels van de ene vloeistof naar de andere gaan, kunnen ze een "vliezig" voorkomen krijgen. Er kan sprake zijn van weefsellaagjes die loslaten. Trek ze er niet af, maar houd de oorspronkelijke toestand zoveel mogelijk vast. Op foto's in leerboeken is soms ook te zien dat een weefsellaag is losgelaten. Deze ontbreekt dan echter niet.

- Bij het overbrengen van weefsel van de ene vloeistof naar de andere, wordt altijd wat van de vloeistof meegenomen naar de volgende pot. Deze verontreiniging moet binnen de perken blijven, maar het weefsel kan ook niet worden uitgeknepen of gewrongen. Door de pincet met het weefsel even boven de vloeistofspiegel tegen de wand van de pot te houden kan de aanhangende vloeistof echter gemakkelijk terugvloeien.

- Laat stukjes weefsel niet te lang in het intermedium staan. Het maakt het weefsel hard en bros. Te kort is uiteraard ook niet goed, maar dagenlang ipv. 12 uur is wat teveel van het goede.

- Om een goed overzicht te houden op de positie van de weefselstukjes, kan een afkruistabel worden gemaakt.

Horizontaal worden alle weefselstukjes genoteerd en in de kolommen komen de stappen van de doorvoerreeks te staan. Iedere keer als de stukjes een opschuiven, wordt er een kruisje gezet in de volgende kolom.

5 Het snijden

Tot nu toe is er een hele reeks bewerkingen beschreven, die slechts tot doel hadden het weefsel houdbaar te maken en er dunne plakjes van te kunnen snijden. Nu is het begrip "dunne plakjes" erg relatief. Plakjes voor de microscopie - coupes genaamd - moeten echt erg dun zijn. Zelfs de dunste kaas of boterhamworst is nog in vele coupes te splitsen.

Een coupe moet namelijk zo tussen de 5 en 15 micrometer dik zijn. Dat is zo ongeveer een honderdste millimeter. Superdunne plakjes zijn vaak tienmaal zo dik. Een vel papier is bijna tien keer zo dik. Alleen het bijzondere dundrukpapier, dat op sigarettenvloeit lijkt, komt in de buurt.

Niet bemoedigend. Toch is het mogelijk. U moet alleen werkelijk beseffen hoe dun de coupes wel niet moeten zijn. Pas dan zult u niet te gauw tevreden zijn en het geduld hebben om vol te houden tot er werkelijk goede coupes te voorschijn komen. Bovendien zijn dikkere coupes (20-30 micrometer) soms ook nog wel informatief.

Overigens is het heel lastig om met het blote oog te zien of een coupe echt dun is. Ik heb wel eens met een coupe gewerkt die me heel dun leek. Pas later merkte ik dat het dekglas er scheef op lag, zo dik was de coupe.

Uit de vrije hand snijden wil met plantaardig materiaal nog wel eens lukken en coupes van enkele tientallen micrometers opleveren. Met in paraffine ingeblokt dierlijk materiaal is het te proberen, maar het is niet eenvoudig. Doordat de stukjes zo klein zijn, moet het aantal pogingen beperkt blijven, terwijl een plantenstengel wel enkele honderden pogingen toelaat. Daarom zal in dit hoofdstuk ruim aandacht worden besteed aan snij-apparaten, microtomen genaamd.

5.1 Het microtoom

De beste resultaten worden zonder meer verkregen met een microtoom.

De vraag is hoe u aan zo' n instrument komt. De meest voor de hand liggende oplossing is zelfbouw. Misschien kent u wel iemand die vaardigheid heeft in fijne metaalbewerking. Het tweedehands kopen van een microtoom is ook een mogelijkheid, maar het zijn geen alledaagse instrumenten.

Natuurlijk kunt u proberen of u bij iemand - of bij een organisatie - gebruik mag maken van een dergelijk apparaat. Misschien kan Internet verrassende inzichten opleveren.

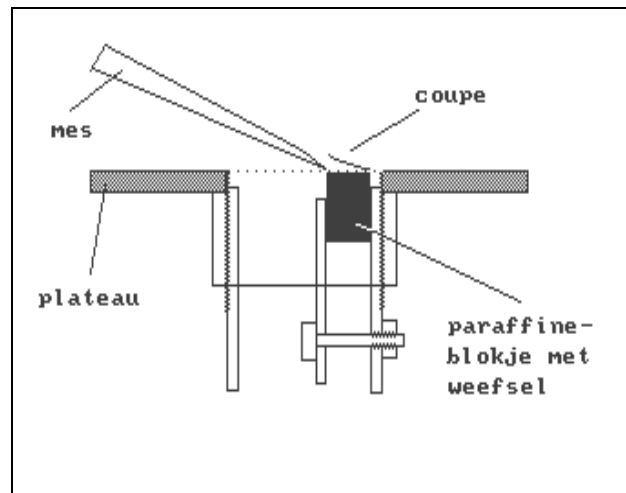
Er zijn overigens meerdere soorten microtomen.

Allereerst bestaan er zg. handmicrotomen, die voor een redelijk bedrag te koop zijn. Dit zijn een soort paddestoel-achtige voorwerpen. De bovenkant is een harde platte plaat waarover een scheermes wordt geschoven. Het blokje met het weefsel zit vast in een buis. Deze buis is eigenlijk een holle schroef, die in een andere buis zit, die weer aan de plaat vastzit.

Door de plaat te draaien gaat deze iets naar beneden en komt het blokje met het weefsel iets boven het oppervlak uit. Als er een vlijmscherp scheermes overheen glijdt wordt het bovenste laagje afgesneden. Bij de volgende verdraaiing komt het blokje weer een beetje boven het oppervlak van de plaat te liggen.

Natuurlijk heeft de schroefdraad van de buis een zeer kleine spoed (tiende millimeters). Een volle draai zou echter een coupe van minstens honderd micrometer opleveren. Door de buis slechts een klein stukje te verdraaien, komt het weefsel niet meer dan enkele micrometers naar boven.

Het blijft echter een kunst, want bij een te kleine verdraaiing ketst het scheermes alleen maar af. Om te snijden wordt een soort kappersscheermes gebruikt, dat ook zo wordt geslepen.



Figuur 5 Dwarsdoorsnede handmicrotoom

Een laboratorium-microtoom is een stuk ingewikkelder. En duurder uiteraard. Zelfs de eenvoudigste exemplaren kosten honderden guldens en daarmee is het probleem niet opgelost. Er worden namelijk heel bijzondere messen gebruikt, die ook extreem nauwkeurig geslepen moeten worden. Dit is zelfs niet te vergelijken met het aanzetten van een kappersscheermes en al helemaal niet met het gewoon slijpen van een mes. Een vlijmscherp vleesmes zal onder de microscoop aan de rand vrij rafelig blijken te zijn. Voor een microtoommes is dat onaanvaardbaar. Er zouden strepen in de coupes komen.

Microtoommessen zijn enorm duur in aanschaf en het onderhoud ervan is al helemaal niet op te brengen.

De microtomen voor het vervaardigen van traditionele coupes voor een lichtmicroscoop schuiven zelf bij iedere slag het blokje met het weefsel enkele micrometers op (instelbaar van ca. vijf tot enkele tientallen). Bovendien trekt het apparaat bij het weer teruggaan naar boven het mes het weefselblokje weg, zodat het niet langs het mes schraapt.

Er zijn ook microtomen die coupes maken voor elektronenmicroscopie. Deze apparaten werken niet meer met mechanisch opschuiven, maar met een staaf metaal die door verwarming steeds verder uitzet. Als mes wordt een stuk dik glas gebruikt, dat diagonaal wordt gebroken. De scherpe breuklijn aan één kant is scherp genoeg om als mes te fungeren. Aangezien glas vloeibaar is, voldoet het na enkele uren (of na intensief gebruik) niet meer. Het breukvlak is dan "slechts" zo scherp als een gewoon scheermes. Er zijn ook diamantmessen, die wel scherp blijven. Dit is hier echter allemaal niet van toepassing. (Bij elektronenmicroscopie wordt overigens geen paraffine gebruikt, maar - veel steviger - plexiglas!). Dit kleine uitstapje was alleen maar om te laten zien dat het allemaal nog veel erger kan.

De zogenaamde cryotomen, die bevroren weefsel snijden, laten we buiten beschouwing. Het hele apparaat en het mes moeten sterk gekoeld zijn. Zoals eerder gezegd is het chemisch fixeren en het in paraffine vatten dan ook niet nodig.

5.2 Het microtoommes

Terug naar het gewone microtoommes. Hoe onbereikbaar het ook allemaal lijkt, er zijn uitwegen. Gewone huis- tuin- en keukenscheermesjes, bestemd voor het scheren, voldoen namelijk goed. Ze gaan niet lang mee en zijn niet echt goedkoop, maar toch is het een prachtige oplossing. Een scheermesje kost bijna een gulden en zal na veel oefenen misschien 5 goede coupes opleveren alvorens te worden afgevoerd. Al met al wel aanvaardbaar. Bovendien hebben de traditionele mesjes twee kanten en ze zijn na gebruik nog wél geschikt voor scheren!

Helaas zijn ze erg slap en daardoor hebben ze de neiging om in het weefsel getrokken te worden. Ondersteuning is dus belangrijk.

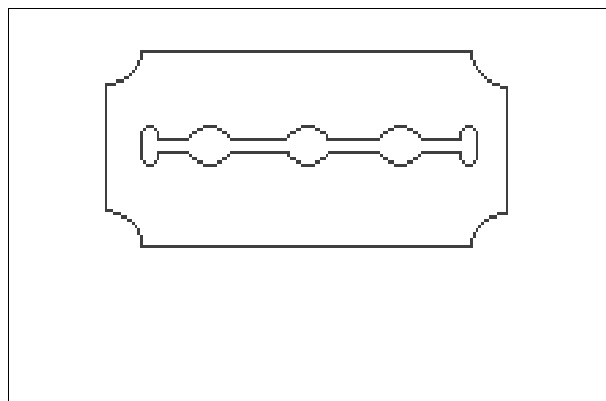
Om het mesje zo dicht mogelijk bij de snede te kunnen steunen, kan als steun het beste ook een mes worden gebruikt. Het moet dan een mes zijn dat aan één kant vlak is.

Sommige aardappelschilmesjes zijn zo geslepen.

Het scheermesje kan op een mes worden geplakt, maar ook met schroeven en een afdekplaatje worden vastgemaakt. Als u plakt, neem dan bv. nagellak, want dat is met aceton zo weer los te weken!

Een mesje dat zo is omgebouwd kan goed in combinatie met een handmicrotoom worden gebruikt.

Mocht u zo gelukkig zijn een oud microtoom op de kop te tikken, dan zal het mes onbruikbaar zijn. Het is echter wel geschikt als steun.



Figuur 6 Scheermesje

5.3 Zelfbouw

Het probleem met het mes mag dan opgelost zijn, de hulpmiddelen liggen niet voor het oprapen. Zoals gezegd is zelfbouw een mogelijkheid. Een handmicrotoom is met enige fantasie wel te ontwerpen. Het zal geen geweldig hulpmiddel zijn, maar met veel oefening valt er resultaat te bereiken.

Een eigen nabootsing van een laboratorium-microtoom is ook mogelijk. Daarbij slaat een arm met een blokje paraffine met weefsel langs een mes, en na iedere slag wordt de arm enkele micrometers opgeschoven.

5.3.1 Handmicrotoom zelf bouwen

Zelf heb ik gewerkt met een buisje met schroefdraad, waar een soort moeren oppasten. Het waren eigenlijk meer buisjes met inwendig draad. Ze hadden een zeskantige rand, zodat onderlinge verdraaiing met een steeksleutel te regelen was. Ik goot er paraffine in, met onderin een stukje weefsel. Later sloot ik de "bovenzijde af met een cent (muntstuk van 1/5 stuiver) in de rand van een soortgelijke moer geklemd. Door nu de beide "moeren" tegen elkaar in te verdraaien, werd de paraffine met het weefsel eruit gedrukt. Bij een kleine verdraaiing zou er een laagje worden afgesneden. De rand van de "moer" dient overigens zeer glad te zijn (langdurig polijsten) anders veroorzaakt deze direct bramen in het scheermes.

De theorie is leuk, maar in praktijk bleek het anders te werken.

Eerst de theorie:

Ten eerste is de spoed van een gewoon in de handel verkrijgbare moer of buis met draad nogal groot. Een halve millimeter is al geweldig (= 500 micrometer). Deze halve millimeter geldt wel voor een volledige omwenteling van 360 graden. Door over kleine hoeken te verdraaien bv. 18 graden (1/20 van een volledige slag) zouden redelijke coupes mogelijk moeten zijn, van 25 micrometer.

De praktijk:

De paraffine en het weefsel kwamen vrij onregelmatig naar buiten. Soms gebeurde er niets en dan weer schoof een heel stuk uit de buis (eentiende millimeter bv.)

Toch werden er goede coupes verkregen. Hoe kan dat?

Als de paraffine eenmaal op het niveau van de moer is afgesneden, kan er steeds overheen geschampt worden. Bij dat schampen buigt het scheermes een heel klein beetje door en haalt een plakje weefsel onder de oppervlakte van de moer vandaan. Dit plakje kan dus zo dun zijn als de verbuiging van het scheermes, mits deze minimaal is. Bij sterkere buiging wordt het mes de paraffine ahw. "ingesleurd". Overigens geeft zuivere paraffine, zonder weefsel, de beste coupes. Flinterdunne, heldere plakjes zijn zeker te snijden. Lege paraffineblokjes snijden is dan ook een goede oefening die geen moeizaam ingeblokt weefsel kost.

Weefsel dat aardig in de buurt komt van een leeg paraffineblokje is long. Een stuk long bevat vooral lucht en na inblokken is deze lucht vervangen door paraffine. Er is veel paraffine tussen de dunne cellagen. Long de volgende oefening kunnen zijn, die komt na het snijden van blokjes met uitsluitend paraffine.

5.3.2 Zelfbouw van een complexer microtoom

In het tweede deel wordt uitgebreid ingegaan op de diverse aspecten van zelfbouw. Hier volgt alleen een korte bespreking.

Op een stevige ondergrond wordt een soort slede vastgemaakt, waarin het mes geklemd kan worden. De slede is noodzakelijk, omdat het mes redelijk dichtbij de arm met het weefselblokje gezet moet kunnen worden.

Het is net als bij lijmklemmen: snel in positie schuiven en daarna aandraaien.

Beweeglijkheid van ca. een centimeter is dan ook wel prettig.

Erg secuur hoeft de verplaatsing niet te zijn. Als het mes ná het vastzetten maar volkomen in positie blijft.

Echt nodig is een verschuifbaar mes niet. Het mes mag een vaste positie hebben.

Door het blokje paraffine wat te verplaatsen in de klem van de arm, kan het weefsel ook dicht bij het mes worden gebracht.

Tegenover het mes zwaait een arm met een blokje weefsel in paraffine.

Bij een echt microtoom wordt vóór een zwaai de arm zo rond de tien (5-12) micrometer opgeschoven en na het passeren van het mes iets teruggetrokken om het mes niet te raken.

Een dergelijke ingewikkelde constructie is nauwelijks haalbaar.

Ik ben er echter in geslaagd om mbv. een hefboom de verplaatsing van een moer op een fijne schroef door te geven. De spoed was ca. 0.5 mm. Bij 18 graden draaiing gaf dit dus 25 micrometer.

De schroef verplaatste de lange arm van de hefboom. De korte, die 5x zo kort was, verschoof dus over een veel kleinere afstand. Theoretisch over 5 micrometer. In praktijk was 10 micrometer al mooi.

Na iedere slag langs het mes draaide ik de schroef even terug. Als het mes weer boven was draaide de schroef de dubbele afstand verder. De arm schoof daardoor zo'n 10 micrometer op. De constructie werkte echt.

Speling in de onderdelen kan uiteraard precisie elders teniet doen. Een licht zwabberende arm weegt niet op tegen een schroef met een spoed van 0.1 mm.

Nadere informatie in het technisch deel. Hier zal de techniek van het snijden verder nog worden besproken, maar niet de apparatuur.



Foto III Overzichtsfoto van het zelfgebouwde microtoom

5.4 De techniek van het snijden

We komen nu toe aan het snijden en alle handelingen die het snijden zo goed mogelijk moeten laten verlopen. Het snijden vergt zeer veel ervaring, dus oefen veel (met lege paraffineblokjes of slecht materiaal).

5.4.1 Het vastklemmen van het blokje

Om het even welk microtoom u toepast, het is moeilijk om paraffineblokjes vast te klemmen. Paraffine breekt gemakkelijk onder druk en glijdt weg. Toch is het van groot belang dat het oppervlak dat naar het mes is gericht, tijdens het snijden niet méér verschuift dan de bedoeling is. Een plotselinge kleine verschuiving door het breken van de paraffine of het wegglijden uit de klem kan een lelijke hak veroorzaken en tot het afbreken van een brok weefsel leiden. Het met veel moeite in paraffine gevatte stukje weefsel kan dan onbruikbaar zijn. Meestal is in zo' n geval het mes ook vernield, hetgeen weer heel wat werk met zich meebrengt.

Daarom is het veel handiger de paraffineblokjes met weefsel erin vast te smelten op een met paraffine doordrenkt houten blokje. Bij de lijst van benodigdheden is aan aangegeven dat vuren houten blokjes die in de gesmolten paraffine worden gezet binnen een nacht geheel doordrenkt zijn.

Door het blokje met het weefsel aan de achterzijde vlak af te snijden met een scheermes, kan het op het houten blokje worden bevestigd. Dit doet u overigens door een zeer warm mes plat op het houten blokje te leggen, dan het blokje paraffine met het weefsel daar weer op te doen en dan het mes weg te trekken. De gesmolten lagen van beide blokjes vervloeien en even later is de bevestiging zeer hecht.

5.4.2 Het verkleinen van het blokje

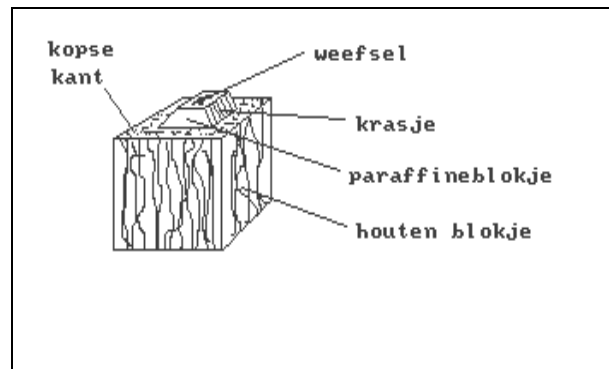
Nu zal het blokje paraffine tamelijk groot zijn, veel groter dan het stukje weefsel. Dat zou betekenen dat er onnodig grote coupes worden gesneden, die grotendeels uit paraffine bestaan. Grotere coupes zijn moeilijker te maken, dus kan het oppervlak dat langs het mes scheert beter verkleind worden.

Ook is het gemakkelijker om een rechthoekje langs het mes te laten gaan, terwijl uw blokje misschien nog rond is.

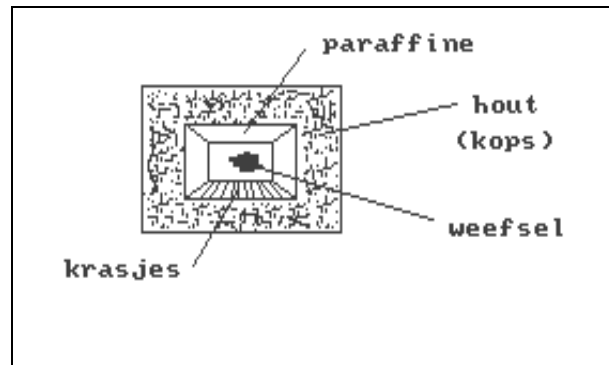
Het paraffineblokje kan het best met een scheermes worden verkleind (uit de vrije hand), door steeds een klein laagje weg te schaven aan de randen. Probeer de nieuwe vorm zo te maken dat het een rechthoekje is met zijden die parallel lopen aan die van het houten blokje.

Snij niet in een keer een enorm stuk aan de kanten weg. Ten eerste kan daardoor een breuk worden veroorzaakt en ten tweede kan het vastgesmolten blokje met weefsel door de uitgeoefende kracht losraken van het houten blokje.

Zorg ervoor dat uiteindelijk een soort afgeknotte piramide ontstaat. Aan de kant van het houten blokje moet de paraffine breder uitlopen dan aan de te snijden kant.



Figuur 7 Paraffineblokje met weefsel, vastgemolten op houten blokje



Figuur 8 Bovenaanzicht van de blokjes uit fig. 7

5.4.3 Verdere voorbereidingen

Aan de kant die het mes zal raken en de overkant, worden krasjes in de paraffine gegeven. Dit kan met een scheermesje of met een speld worden gedaan.

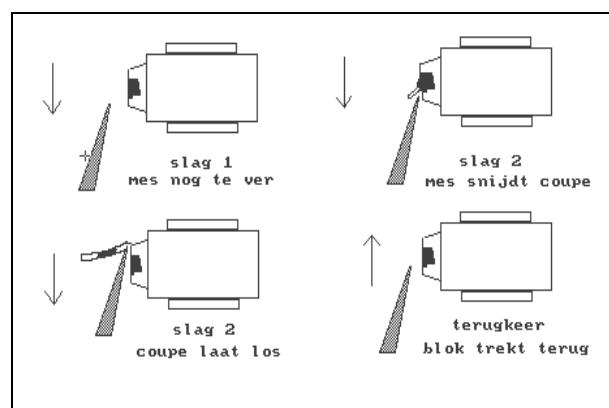
In laboratoriumomstandigheden, met een goed microtoom, kan zo bereikt worden dat de opeenvolgende coupes aan elkaar blijven hangen. Dat is handig, want een dergelijk "lintje" is gemakkelijk te pakken en op te plakken. Vermoedelijk heeft u veel minder kans op lintjes, maar er kunnen wel af en toe twee of drie coupes aan elkaar vast blijven zitten.

Daarnaast maakt het krassen (van de kant die op het mes komt) het aansnijden gemakkelijker.

5.4.4 Het aansnijden, snijden en afnemen

U klemmt uiteraard het blokje zó vast, dat de voorzijde van de paraffine het mes nog net niet raakt. Bij het geleidelijk opschuiven naar het mes, zal na een tijd de eerste coupe verschijnen. Deze kan heel goed uit paraffine bestaan, want het weefsel ligt niet steeds geheel aan de buitenzijde.

En dan is het eindelijk zover: De eerste weefselcoupe verschijnt. Deze kan heel goed waardeloos zijn, maar ga verder!

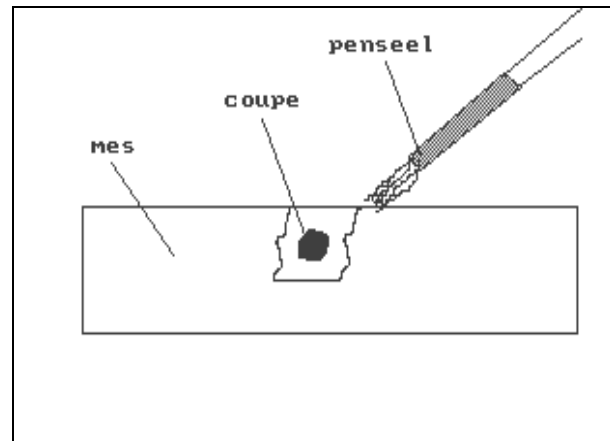


Figuur 9 Het snijden van een coupe

Na hele reeksen mislukkingen kan er een prachtig exemplaar opduiken. De

volgende zal er wel niet meteen achteraan komen, maar verschijnt hopelijk voor het weefsel op is.

Een coupe kunt u met een penseel of een prepareernaald (evt. gewone naald of speld) van het mes pakken. Zorg dat het mes niet wordt aangeraakt.



Figuur 10 Het afnemen van de coupe

5.4.5 Opschuiven en terugtrekken

Maakt u gebruik van een eigengebouwd microtoom, dan zult u de slag te pakken moeten krijgen van het heen en weer draaien van de schroef bij het op en neer bewegen van de arm.

Voor het langs het mes laten zwaaien van het blokje, draait u de schroef over zo' n hoek dat het blokje 5-10 μm opschuift.

Bij de terugkeer is dit plakje weg en zou het weefsel het mes net niet raken. Om problemen te voorkomen draait u de schroef 5 μm terug en draait weer 10-15 μm of meer vooruit. De vijf micrometer die u het blokje liet wijken moet namelijk weer overbrugd worden.

5.4.6 Goede coupes

Bij een blokje weefsel van 3 mm, zou u 300 coupes van 10 μm kunnen snijden. In praktijk zitten er dikkere bij, zodat u slechts 100-150 maal een poging kunt doen. Daarna is het weefsel in het blokje op.

En bij al die honderden pogingen is misschien maar één heel mooie coupe verschenen. Ook deze mooie coupe kan verloren gaan, dus plak deze zo gauw mogelijk op (zie volgende hoofdstuk). Zo niet, bewaar deze dan in een doos op zodanige wijze dat nergens druk op staat. De doos blijft vlak liggen (doe er een sticker op). Stoot of kantel niet.

Een goede coupe is overigens bijna doorschijnend en het is moeilijk om te zien waar het weefsel zit. Weefsel ziet er in dunne coupes doorgaans wat groenig uit. Ze kunnen streperig lijken en zijn doorgaans verkreukeld, juist doordat ze zo dun zijn.

5.4.7 Het mes schoonhouden

Na een aantal slagen zal het mes vies worden. Het snijden wordt dan moeilijk. Maak (voorzichtig) het mes schoon door er met een watje met xyleen langs te strijken (aan de zijkant, het watje niet snijden!). Mors er niet mee en laat het mes na het afpoetsen drogen. Als de xyleen niet verdampt is, kan de paraffine van het te snijden blokje een beetje oplossen. Het gevolg is een nog veel viezer mes. Na een paar mislukte slagen is het mes overigens snel vies. Er komt dan schraapsel van het blokje af, dat aan het mes blijft zitten.

5.5 De meshoeken

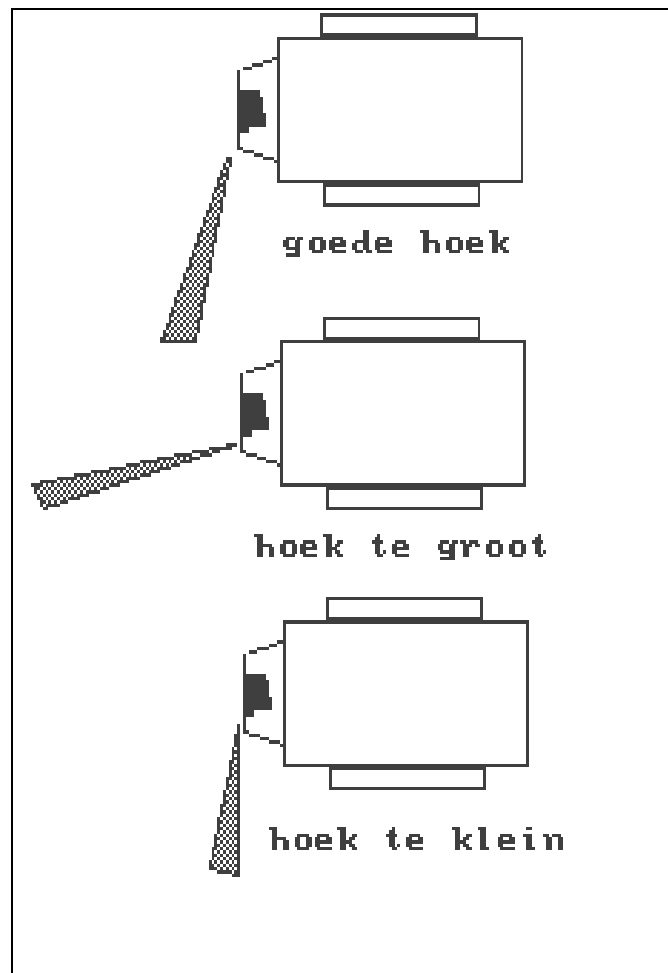
Een onderdeel van het snijden dat nog niet besproken is, betreft de meshoeken. Nu zal het vermoedelijk zo zijn dat u een bepaalde instelling heeft, met een bepaalde vaste hoek van het mes tov. de voorzijde van het paraffineblokje.

Toch is het goed nog even wat dieper in te gaan op de hoeken die mes en te snijden blokje maken, nog voor de mogelijke problemen besproken worden.

Het mes kan in eerste instantie op drie manieren een hoek maken met het oppervlak van het te snijden weefsel.

- De eerste is de hoek waaronder het mes langs het oppervlak van het paraffineblokje gaat. Bij een zeer grote hoek (bv. 90°) zal er alleen wat poeder afgeschaafd worden. Bij een kleine hoek (bv. 0°) slaat het mes vast en breekt misschien zelfs de paraffine. In het juiste gebied bestaat de kans op een goede coupe. Misschien is bij u de neiging aanwezig is om dan maar tussen 0 en 90 in te gaan zitten, op 45°

In praktijk paste ik zelf echter met succes een hoek van ca. $15-20^\circ$ toe.



Figuur 11 Meshoeken

- De tweede hoek geeft aan of het paraffineblokje over de gehele onderkant wel of niet tegelijk de snede van het mes raakt. Staat het mes aan de ene kant hoger dan aan de andere, dan maakt het een hoek met de onderkant van het blokje. Dit kan nuttig zijn, maar we gaan er hier niet op in.
- De derde is een tamelijk kunstmatig begrip. Dit is de hoek die aangeeft of de voorzijde van het blokje overal het mes raakt. Als dit niet het geval is, verandert de stand van de voorzijde van het blokje en is dit na enkele slagen alsnog het geval. Eigenlijk moet u alleen op deze hoek letten in gevallen waarin op een heel speciale manier door het weefsel moet worden gesneden. Bij een dwarsdoorsnede van een bloedvat, zal het scheef inzetten van het blokje ovale weefselcoupes opleveren.

5.6 Problemen bij het snijden

Er zijn vele complicaties die u kunnen plagen bij het snijden. Hieronder worden er enkele genoemd, met een mogelijke remedie.

Door logisch redeneren kunt u ver komen, maar het is wel zinvol om wat adviezen bij de hand te hebben.

Veel problemen kunt u voorkomen door kleine stukjes weefsel te kiezen, zo in de orde van 4x4 mm. Sommige hardere weefsels, zoals de lever, kunnen beter 2x2 mm worden gemaakt.

5.6.1 Opkrullen

Kleine coupes krullen vaak, zo niet altijd op. Met twee tamelijk dikke spelden of naalden is dit te verhelpen. Steek de spelden of naalden aan weerszijden in het gevormde kokertje en beweeg ze langzaam van elkaar weg. Adem ondertussen zacht op de coupe (voor de warmte). Als de coupe breekt was deze te dik. Een goede coupe zal weer ontrold kunnen worden.

5.6.2 Terugspringen naar het mes of niet loslaten van het blokje

Uiteraard probeert u eerst om met een penseel of evt. naald de coupe los te maken. Lukt dit niet, dan kan er sprake zijn van statische lading.

Om deze te vermijden zijn er enkele mogelijkheden:

- Het mes aarden aan bv. de waterleiding.
- Ademen op de coupe bij het afnemen (laat lading weglekken).
- De paraffineblokjes een nacht tevoren in water laten staan.

Deze laatste lijkt misschien vreemd. We hebben zoveel moeite gedaan alle water eruit te halen! Inmiddels is het weefsel echter één geheel met de paraffine en dan kan het wel. Paraffine neemt een heel klein beetje water op, maar dat voorkomt wel de statische lading.

5.6.3 Verticale krassen

Als het om duidelijke krassen gaat is het mes beschadigd of vuil. Als schoonmaken met een watje met xyleen (laat daarna even drogen!) niet helpt, zitten er bramen in het mes. Deze kunnen onzichtbaar zijn met het blote oog.

Misschien is het mogelijk het blokje met weefsel iets te verschuiven in de houder naar een andere plek. Wel opnieuw aansnijden.

Kan dit niet, dan moet u een nieuw mes plaatsen (of de onderkant boven zetten). Bramen kunnen overigens door het weefsel veroorzaakt worden.

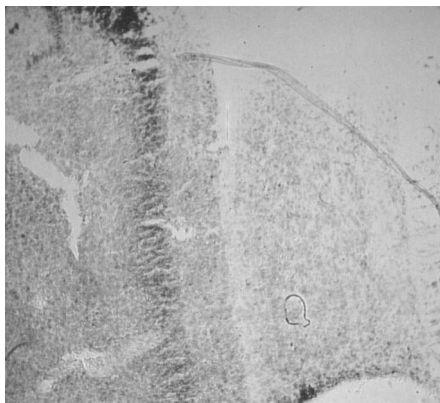


Foto IV Krassen in een coupe door een braam in het mes

5.6.4 Horizontale ribbels of krassen

De kans is groot dat de coupe te dik is. Het zijn dan geen krassen, maar breuklijntjes. Bij hard weefsel (overfixatie?) kan het blijven optreden, ongeacht de dikte. De kans op een goede coupe is dan zeer klein.

Een andere mogelijkheid is het trillen van het mes. Maak het dan beter vast. Het moet dan vermoedelijk dichter bij de rand ondersteund worden.

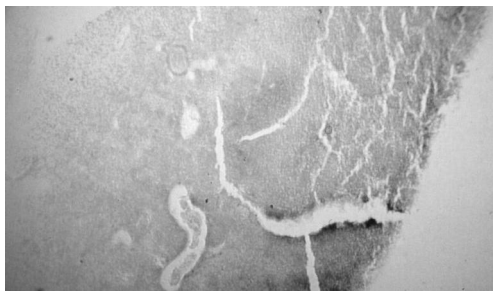


Foto V Breuken in het weefsel door te dik snijden

5.6.5 Het mes schraapt alleen pulver

Misschien is de hoek van het mes met de voorzijde van het paraffineblokje te groot. Het is ook denkbaar dat u te dun probeert te snijden. Dun snijden is nu eenmaal moeilijk. Is het mes nog scherp genoeg?

5.6.6 Vastslaan of springen van het mes

Bij vastslaan worden er doorgaans te dikke coupes gesneden, of het mes is niet voldoende ondersteund. Controleer de meshoek. Een te vlakke hoek werkt ook niet. Speling in de apparatuur kan ook van invloed zijn. Controleer of er geen ongewenste bewegingen optreden.

5.6.7 Weefsel laat los uit de paraffine

Dit zou nooit voor mogen komen. Het correct afwerken van alle stappen van de doorvoerreeksen geeft in feite voldoende garantie.

U kunt twee dingen doen:

- Het blokje wegwerpen (en een nieuw kiezen/vervaardigen)
- de doorvoerreeks deels achteruit doorlopen tot water en dan weer vooruit.

Dit moet echter niet gedaan worden met paraffine die in het water heeft gelegen.

6 Opplakken

De coupes die u nu heeft gemaakt, moeten op een objectglaasje worden gebracht. Later zullen ze op hetzelfde glaasje onder de microscoop worden bekeken. Coupes hechten echter niet zonder meer aan het glas. Bovendien zullen er nog enkele rigoureuze bewerkingen volgen tbv. het kleuren. Worden de coupes niet goed bevestigd, dan spoelen ze weg en raken verloren. Alle moeite is dan voor niets geweest.

Er bestaat gelukkig een goed plakmiddel, dat tevens goedkoop is. Dit middel is eiwit.

6.1 Het reinigen van de objectglaasjes

Allereerst moeten de glaasjes echter brandschoon zijn. Nieuwe glaasjes kunnen met goedkoop afwasmiddel worden geboend en na het spoelen in de ontkleurde spiritus worden geplaatst. Glaasjes waarop "pre-cleaned" of "vorgereinigd" staat, kunnen meteen in de spiritus om te worden bewaard. Ze kunnen wel stoffig zijn, maar er zit geen vet op. Pak ze wel aan de randen beet, anders komen er toch vingerafdrukken op.

Oude glaasjes kunnen met een scheermes worden afgekrabd, in een sopje inweken en dan

alsnog geboend en gespoeld worden, om dan ook in de ontkleurde brandspiritus te gaan. Vlak voor gebruik moeten een glaasje droog worden gemaakt. Op schone glaasjes blijft namelijk een laag vocht zitten. Valt de vloeistof er in druppels af, dan is een objectglaasje toch vet. De spiritus mag echter niet verdampen, want er zitten nog verontreinigingen in die niet achter mogen blijven. Droogvegen met Kleenex of WC-papier is het beste. Zorg dat er geen stof op komt. Gebeurt dit toch, wapper het dan weg of veeg licht met een zacht nieuw penseel.

6.2 De eiwitglycerol

Pas met een dergelijk schoon glaasje kan begonnen worden met het aanbrengen van het plakmiddel. Het eiwit wordt verdund met glycerol om een dunner laagje te kunnen maken. Er wordt dan gesproken van eiwitglycerol of - met de oude naam die nog steeds algemeen is - eiwitglycerine. Ten behoeve van de houdbaarheid wordt een conserveermiddel toegevoegd, nl. thymol. Dit kunnen we zelf vervangen door tijm te extraheren in de glycerol.

De glycerol (enkele ml hoogstens) wordt in een reageerbuis of evt. grote lepel verhit met wat tijm erbij (een of twee mespunten). Stop zodra de glycerol gaat koken. Filtreer door een gewoon koffiefilter en vang de heldere gelige of bruinige vloeistof op. Breek ook een ei en laat wat van het zeer vloeibare eiwit in een kopje of schaalje lopen. Absoluut geen spatje dooier en liever ook niet het taaiere eiwitdeel. Dit gaat heel gemakkelijk door het ei in een theezeefje te doen. Het zeer vloeibare eiwit druppelt er dan doorheen.

Meng nu één deel afgekoelde glycerol met drie delen eiwit en kluts dit goed door elkaar, bv. met een vorkje (bv. 6 ml eiwit met 2 ml glycerol). Er zal schuim verschijnen. Filtreer het mengsel opnieuw door een koffiefilter. Het gedeelte dat er snel doorloopt is geschikt. Nu heeft u eiwitglycerine, die een paar weken in de koelkast bewaard kan worden. Als er troebeling optreedt (even schudden) moet het worden vervangen door verse. De geur zal vrij snel onaangenaam worden (natte hondenlucht), maar dat is geen probleem.

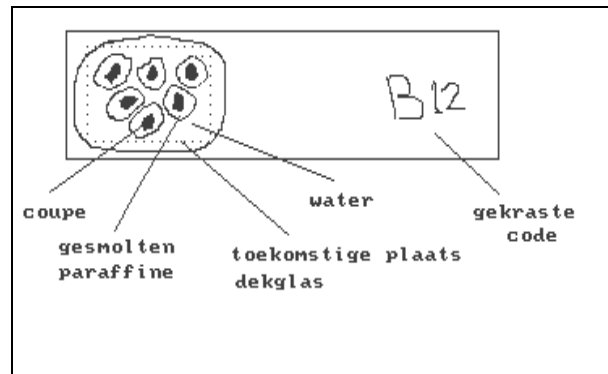
6.3 Het opplakken van coupes op het objectglaasje

Nu moeten de coupes er nog mee worden vastgeplakt op het objectglaasje.

Hiervoor noem ik twee methodes. De eerste, die ik zelf prettig vindt gaat als volgt:

- Er wordt met een tandenstoker, lucifer oid. een heel klein druppeltje eiwitglycerine op het glaasje gebracht. Gewoon indopen en aftikken. Er komt geen druppel maar een klein nat plekje. Dit plekje wordt met een schone vingertop uitgesmeerd over het glaasje, waarbij het lijkt alsof het weggeveegd wordt. Het laagje dat achterblijft is de juiste dikte.

Na enkele minuten is het laagje tamelijk droog. Er worden dan enkele druppels (gedemineraliseerd!) water op gebracht. Op dit water worden de coupes gelegd, die er wat kreukelig en verfrommeld uitzagen. Als het glaasje nu op het warmhoudplaatje wordt verwarmd, smelt de paraffine en trekken de zachte coupes mooi vlak op het oppervlak van de druppel.



Figuur 12 Strekken en plakken van coupes

Als de druppel verdampt is, liggen ze keurig op het glas, gehecht door het eiwit. Gaat het te snel, dan kan er tussentijds nog water worden bijgedruppeld.

Het oppakken van de coupes gebeurt overigens met een prepareernaald (naald in houder) of met een penseel. Een lange naald alleen voldoet ook goed. Raak de druppel vooral niet aan met naald of penseel, maar leg de coupes op de druppel neer. De bolle zijde van de coupe moet op het water komen, zodat er geen luchtbellens onder komen of stukken dubbelklappen.

De coupes die u heeft verkregen zullen vermoedelijk vrij klein en los zijn. Met professionele apparatuur kunnen coupes van meerdere vierkante centimeters worden gesneden, die bovendien als linten aan elkaar hangen.

In dit geval is het echter geduldwerk om ze een voor een neer te leggen.

Denk eraan dat hele kleine flintertjes van minder dan een millimeter toch interessante coupes kunnen zijn!

- Bij de tweede methode worden er meteen enkele druppels water op het glaasje gelegd, waarna er een klein beetje eiwitglycerine door wordt geroerd. Ook nu weer komen de coupes op de druppel te liggen, wordt het glaasje verwarmd en zijn de coupes uiteindelijk aan het glas gehecht. Verder is alles hetzelfde.

De druppel op het glaasje mag heel groot zijn, soms wel $\frac{2}{3}$ van het glaasje. Vooral als u veel coupes op wilt plakken of tamelijk grote heeft is dit noodzakelijk. Zorg er echter voor dat de druppel op het glaasje ligt en er niet aan de zijkanten afstroomt.

Denk wel aan het formaat van de dekglasjes die u heeft. Er kunnen misschien twee naast elkaar, maar dan mogen er geen goede coupes onder de naad komen. Buiten het gebied van het dekglasje zijn coupes later niet meer te bekijken en verdwijnen bovendien bij het latere wegkrabben van resten insluitmiddel.

Als alles goed verlopen is liggen de coupes uiteindelijk vlak op het glaasje, in een druppel paraffine. Na stolling is de paraffine een soort wazig aura om de coupe heen. Dit is in orde. In de volgende stappen zal de paraffine worden verwijderd.

Te dikke coupes kunnen ribbelig blijven of van opzij duidelijk als laag op het glaasje te zien zijn. Kras ze eventueel met een naald weg.

Laat het glaasje met de coupes nog een dag aan de lucht drogen als u daar de tijd voor heeft. Anders volstaat een uur op het warmhoudplaatje ook.

6.4 Systematiek

Uiteraard is het het beste om op één glaasje alleen coupes aan te brengen die van hetzelfde blokje zijn gesneden. Ze hebben dan alle dezelfde richting en zijn van hetzelfde weefsel.

Door tegelijk te snijden en te plakken kan ook hier weer verwarring worden voorkomen. Steeds na het snijden van een coupe wordt deze op de druppel gelegd. Het is wel zaak om de druppel regelmatig aan te vullen. Bij problemen bij het snijden zal al snel ongemerkt alle water verdampen en dan zit er weinig anders op dan een volgend glaasje te nemen.

Later zullen er etiketten worden aangebracht op de objectglaasjes. In dit stadium heeft dat nog geen zin, aangezien er nog veel vochtige bewerkingen moeten plaatsvinden. Met een zg. glaspen kan echter een code of afkorting of nummer in het glas worden gekrast. Eventueel kan het gekraste duidelijker zichtbaar worden gemaakt door er met een potlood overheen te gaan. Kraspen hebben veelal een kleine diamantpunt.

Een andere mogelijkheid is het vooraf etsen van de glaasjes. Een glaasje wordt dan geheel met een laagje paraffine bedekt. Terwijl deze nog zacht is wordt aan één kant een code ingekrast. Vervolgens wordt het glaasje in een oplossing van HF (waterstof-fluoride gezet voor ca. 1/2 uur). HF is een ongebruikelijke stof, maar Sorbo roestvlekoplosser is een oplossing van HF in water. (De stof is overigens gevaarlijk. Lees de aanwijzingen.) Na afloop moeten de glaasjes weer heel goed ontvet worden. (heet water, wrijven met xyleen, afwasmiddel en spiritus). Een kraspen is beslist de eenvoudigste optie.

6.5 Samenvatting en vooruitblik

Zorg voor eiwitglycerol (eiwitglycerine) en schone glaasjes onder ontkleurde spiritus. Zorg ook voor een kraspen of ets de glaasjes van tevoren.

- droog een glaasje met tissue
 - breng een zeer kleine druppel eiwitglycerol aan en smeer deze heel dun uit. Doe alsof alles eraf geveegd wordt.
 - Droog op een warmhoudplaatje (ca. 10 min.).
 - Breng één of meer druppels gedemineraliseerd water op en verspreid de vlek over het gehele gebied dat door een (of twee) dekglas wordt beslagen.
 - Coupes op de druppel brengen. Kijk of ze drijven en strekken.
 - Laat minstens een dag aan de lucht drogen of een uur op het warmhoudplaatje.
 - Krab eventuele slechte en vooral te dikke coupes weg.
- (Te dikke zullen later het dekglas te ver van het objectglas afhouden en zo scherpstelling verhinderen.)

Op deze wijze zijn objectglaasjes met aangehechte coupes verkregen. In de volgende stappen zal van paraffine weer teruggekeerd worden naar water, om te kunnen kleuren. Van water zal dan weer een ontwateringsreeks worden toegepast, die het mogelijk maakt een duurzaam preparaat te maken, dat is afgesloten met (kunst)hars.

7 Deparaffineren tot en met insluiten

Nu zal beschreven worden op welke wijze de tijdelijke terugkeer naar de waterige fase in zijn werk gaat. In feite zou het heel gemakkelijk zijn om de paraffine op te lossen en over te gaan naar het insluiten in kunsthars. Het preparaat zou dan echter kleurloos zijn en om de waterige kleurstofoplossingen te kunnen gebruiken moeten de coupes ook waterdoordrenkt zijn.

Onbekend is het allemaal niet meer, nu de ontwateringsreeks van het weefsel al eens doorlopen is. Gelukkig kan het nu allemaal veel sneller verlopen, omdat de plakjes weefsel wel heel dun zijn geworden.

7.1 deparaffineren

Het verwijderen van de paraffine wordt de afdalende reeks genoemd. Kies een ander soort potjes voor deze reeks. Hoge smalle buisjes - waar net een objectglaasje in kan staan - zijn handig. Er wordt dan weinig vloeistof verbruikt, terwijl de coupes toch goed onder de vloeistofspiegel komen te staan. Afsluitbaarheid is wel wenselijk! Denk aan evt. oplosbaarheid van het potje of de ring in het deksel.

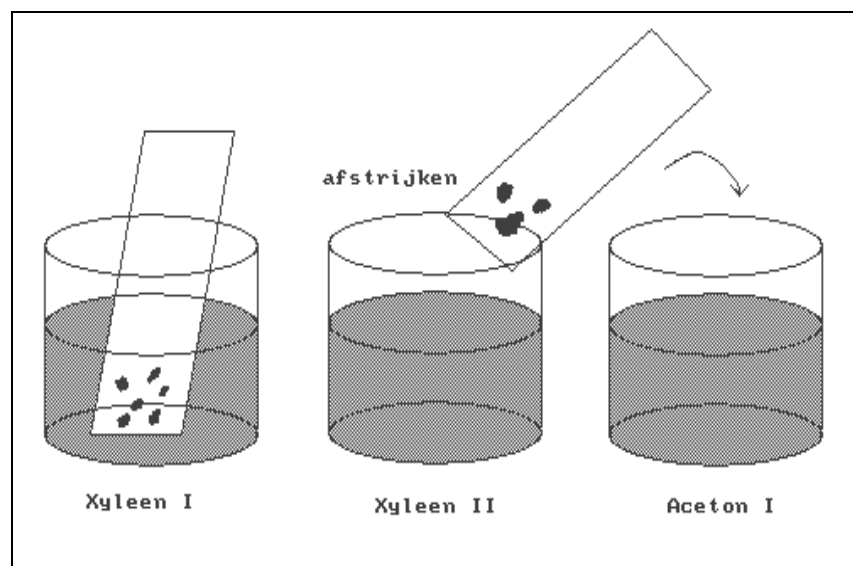
De stappen van de afdalende reeks zijn als volgt:

- Xyleen I

Hier wordt de paraffine opgelost uit het preparaat. Laat het preparaat (het glaasje met de coupes dus) zeker vier minuten in de xyleen staan. Het is mogelijk om het glaasje eerst nog voor te verwarmen, maar nodig is het niet. Paraffine lost heel goed op in xyleen. Zwenk het glaasje af en toe heen en weer. Het effect is hetzelfde als het roeren van thee met suiker.

- Xyleen II

Zoals bij het ontwateren de laatste restjes water in een tweede stap onttrokken werden, zo worden hier de laatste restjes paraffine verwijderd in een extra stap. Om niet teveel vloeistof mee te nemen naar het volgende vat met vloeistof kan het preparaat even met een zijkant langs de rand van het vat worden gestreken. Handel echter snel, zodat het preparaat niet droogvalt door verdamping!



Figuur 13 Deparaffineren

Na het overzetten van een preparaat van xyleen I naar II kan er een volgend preparaat in xyleen I worden gezet. Ook nu ontstaat er weer een treintje. De preparaten verblijven in ieder buisje weer ongeveer vier minuten. Aantekeningen van de posities zijn overbodig. De beweging gaat snel en op het glas is inmiddels een code gekrast.

Probeer niet om twee glaasjes in één buisje of potje te zetten. De kans is dan namelijk groot dat de coupes eraf geschaafd worden of op andere wijze schade oplopen.

Bovendien bestaat het gevaar dat de vloeistoffen hun werk niet goed kunnen doen. Op routinelaboratoria beschikt met over rekjes waar een hele set glaasjes in wordt vastgehouden. De rekjes worden in potten ondergedompeld.

- Na de xyleen volgen de stappen met 100% aceton I en 100% aceton II. Van de aceton kan meteen op ontkleurde spiritus worden overgestapt (85% ethanol/methanol). Via 70% alcohol en 50% alcohol (voor verdunningen zie technisch gedeelte of de reeds beschreven ontwateringsreeks) wordt water bereikt (uiteraard gedemineraliseerd!).

- Om alles nog bij te kunnen benen kunnen de preparaten het best worden verzameld in een bakje met water. Dit moet dan wel een speciaal bakje zijn dat de preparaten op een afstand van elkaar houdt. Dit kan natuurlijk zelf van bv. perspex worden gemaakt, maar dergelijke bakjes zijn ook te koop. Ze worden kleurstofbakjes genoemd (Zie foto VII). De prijs zal rond de f 10,- liggen.

Behalve de mogelijkheid om de preparaten te verzamelen geven de bakjes ook de gelegenheid om alle preparaten van een serie in één keer te kleuren.

Er hoeft dan maar éénmaal een Giemsa-oplossing te worden aangemaakt en het bewaken van de tijd is ook eenvoudiger. Het water wordt eenvoudig weggegoten en het bakje wordt gevuld met vers bereide Giemsa.

- Beschikt u niet over dergelijke bakjes, dan is er wel een alternatief:

Er bestaan plastic medicijnglaasjes, die per tientallen slechts een paar gulden kosten. Lijm tien of twintig van dergelijke glaasjes op een ondergrond, bv. een plankje. Vul ze met gedemineraliseerd water.

Na de afdalende reeks komt ieder preparaat in een eigen glaasje te staan.

Een voor een worden ze dan de juiste tijd in kleurstof gebracht, waarna ze terugkeren in het eigen glaasje. Het verschil tussen een gekleurd en een ongekleurd preparaat is trouwens over het algemeen wel te zien.

Zelf gebruikte ik de speciale kleurbakjes wel, maar tevens reeksen lege (schone) visvoerbakjes die op een plank gelijmd waren (foto IX).



Foto VI Reeks plastic potjes op een plank voor het deparaffineren

7.2 Kleuren

Voor het kleuren zullen we hier geen al te grote groep mogelijkheden bespreken. De kleuring die het eenvoudigst te realiseren is, is Giemsa.

Daarnaast is May-Grünwald een goede optie, eventueel in combinatie met Giemsa.

Tenslotte is Hematoxyline/Eosine (H-E) een bekende kleuringscombinatie.

7.2.1 Giemsa

In het begin is Giemsa aan te raden. Het is eenvoudig, de stamoplossing is goed verkrijgbaar en fouten zijn nog te herstellen.

Niet al te lang voor u gaat kleuren maakt u een verdunning van 1 ml. Giemsa op 50 ml water (gedemineraliseerd). Eén ml. kan met een kleine injectiespuit goed worden afgemeten. Dit verdunnen gebeurt vlak voor het kleuren, want de verdunning is niet houdbaar. Na enkele uren is de kleurstof uitgewerkt. Dit is een geleidelijk proces. Hoe ouder de oplossing, hoe minder kleurkracht deze heeft. Na een bv. uur zult u de tijden dan ook wat moeten verlengen. De stamoplossing wordt ook geleidelijk aan minder krachtig, maar dat verval vergt eerder maanden dan uren. De preparaten worden vanuit schoon gedemineraliseerd water in de Giemsa gebracht. Ze moeten ongeveer een kwartier in de kleurstof staan. De juiste tijd is te controleren door de preparaten af en toe even boven de vloeistof te bekijken.

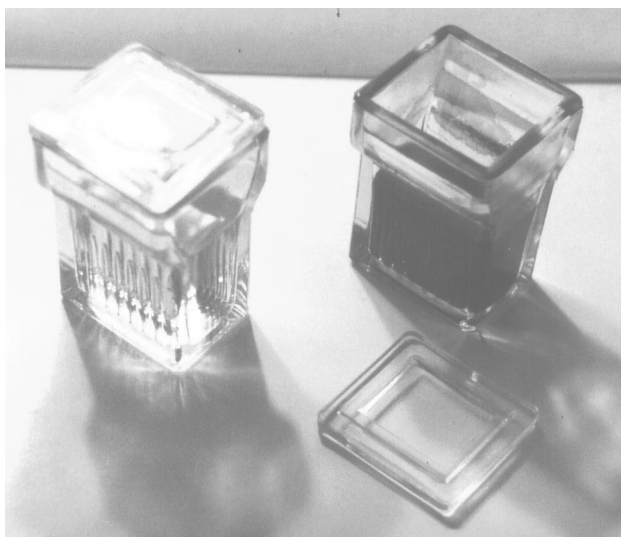


Foto VII Cuvetten voor objectglaasjes (kleuren, spoelen)

7.2.1.1 Te zware kleuring

De coupes worden steeds blauwer. Als ze echter al te blauw worden, werkt de kleuring niet verhelderend voor het bestuderen onder de microscoop. Als de coupes er als inktdruppels uitzien, is de kleuring beslist te sterk. Sommige mensen houden van sterke kleuren in een preparaat, maar het kan allerlei details onzichtbaar maken. In feite is het zo dat u het beste de kleursterkte kunt kiezen die er wat te licht uit ziet. Tegen het licht gehouden moeten de coupes nog mooi doorschijnend blauw zijn (Foto VIII).

Gelukkig is het mogelijk om met 50% alcohol (6 delen ontkleurde spiritus met 4 delen water) de kleurstof weer uit te spoelen. Hoe langer in de alcohol, hoe minder kleurstof achterblijft. Bij het ontkleuren moet echter meer in de orde van seconden worden gedacht. Het is ook te zien dat de kleurstof uitgespoeld wordt. Er komen blauwe sliertjes van de coupes af. Beweeg het glaasje wel langzaam heen en weer.

7.2.1.2 Te lichte kleuring

Het tegendeel van te zwaar kleuren kan ook optreden. Als de coupes helemaal geen kleur lijken te krijgen, kan de Giemsa-oplossing (en misschien dus de stam-oplossing) uitgewerkt zijn. Alleen nieuwe kopen helpt dan. Het is echter ook mogelijk dat om de een of andere reden het deparaffineren niet gelukt is of per ongeluk werd overgeslagen. Het water of de Giemsa-oplossing zullen dan als druppeltjes van het objectglaasje vallen of in ieder geval de coupe niet natmaken.

In dat geval moet de reeks even achterstevoren worden doorlopen, tot aan de xyleen. Ook nu vergt iedere stap weer een paar minuten. Vervolgens wordt de reeks weer richting water uitgevoerd.

Wel is het zo dat niet alle weefsels even goed met Giemsa te kleuren zijn. Na de kleuring (of na de alcohol-ontkleuringsstap) gaan de preparaten meteen in

aceton van 100%. Dit wordt echter in de volgende paragraaf beschreven. Hier gaan we eerst nog even in op enkele andere kleuringen, die thuis uitgevoerd kunnen worden.

7.2.2 May-Grünwald

Allereerst is er de May-Grünwald kleuring. Deze werkt ook met een stamoplossing, maar deze wordt 1:1 verdund, dus bv. 20 ml. stamoplossing met 20 ml. water. Dat is een veel kostbaarder werkwijze, omdat ook deze verdunning na een paar uur is uitgewerkt. Gelukkig is het ook mogelijk om met de onverdunde stamoplossing te kleuren. De kleurstof kan dan weer worden teruggegoten in de fles en is verscheidene keren te gebruiken. De kleuring duurt veel korter dan bij Giemsa, nl. een paar minuten. Net als bij Giemsa kan een te zwaar gekleurd preparaat met 50% alcohol lichter worden gemaakt (ook weer seconden). De May-Grünwald kleuring wordt wel met de Giemsa gecombineerd en heet dan May-Grünwald-Giemsa. De kleurstoffen worden echter niet gemengd. Eerst wordt er gedurende enkele minuten met May-Grünwald gekleurd en daarna ongeveer een kwartier met Giemsa (af en toe even kijken!). Tussen de twee kleuringen door moet niet met 50% alcohol worden gewerkt. Eventueel ophelderen van te zware kleuringen gebeurt pas na de Giemsa.

7.2.3 Haematoxyline-Eosine

Tenslotte is er de Haematoxyline-Eosine kleuring. Deze is veel moeilijker dan de Giemsa of May-Grünwald. Herstel van fouten is niet mogelijk en dat is nogal een risico bij de moeizaam verkregen coupes. Zijn er echter genoeg preparaten of heeft u een preparaat extra gemaakt door de coupes over meer objectglaasjes te verdelen, dan is het te proberen. Een ander nadeel van de Haematoxyline-Eosinekleuring (kortweg met H-E aangeduid) is overigens de prijs van de benodigde stoffen. Vooral haematoxyline is duur.

7.2.3.1 Haematoxyline

Nadat de preparaten een paar minuten in een bakje met gedemineraliseerd water hebben gestaan, moeten ze bij voorkeur nog even in vers gedemineraliseerd water opnieuw worden gespoeld. Dan kunnen ze naar de haematoxyline. Na 2-5 minuten zijn de coupes héél licht roze. Het glaasje wordt uit de vloeistof gehaald, even gespoeld in gedemineraliseerd water en dan in leidingwater gezet. Dit moet een paar keer ververst worden en de preparaten moeten er wel een kwartier in blijven staan. Ze worden dan van lichtroze al snel paarsig-blauw. Daarom noemt men het in water staan ook wel "blauwen". Wordt het water niet ververst, dan kan het blauwen minder goed verlopen. Blijkt de kleuring na het blauwen te zwaar, dan is dat jammer, maar er is niets aan te doen.

7.2.3.2 Eosine

Het tweede deel van de kleuring wordt met eosine gedaan. Eerst moet het preparaat echter even in gedemineraliseerd water worden gedompeld. Daarna kan het 30-90 seconden in de eosine worden gezet. Meteen erna gaat het weer even in gedemineraliseerd water. Voor al deze tussentijdse spoelingen moeten verschillende bakjes met gedemineraliseerd water worden gebruikt, of er moet iedere keer worden verversd (en gespoeld!). Na deze kleuring mogen de preparaten wel eerst in 70% alcohol (ontkleurde spiritus) worden gezet. Vervolgens komt de 85% alcohol. Pas na een stap met 96% aceton loopt alles weer gelijk op met de Giemsa-kleuring.

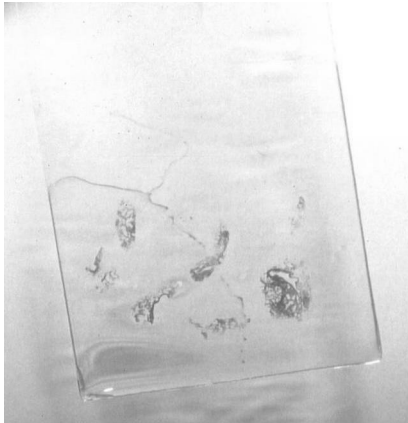


Foto VIII De gekleurde coupes op het objectglaasje

7.3 Opnieuw ontwateren

Het is bijna niet meer te geloven, maar het water moet weer helemaal uit de coupes worden gehaald. Water maakt namelijk bederf mogelijk, aangezien er micro-organismen in kunnen leven. Inpakken in (kunst)hars maakt preparaten zeer lang (decennia tot eeuwen) houdbaar. Eerst is dan een tweede opstijgende reeks noodzakelijk.

Afhankelijk van de kleuring is meteen de stap naar 100% aceton gemaakt (Giemsa of M-G), of is via 70% en 85% alcohol en 96% aceton dit niveau pas bereikt (H-E).

Schrik overigens niet als de Giemsa-preparaten na de 50% alcohol nog wat kleurstof afgeven aan de aceton. Het gaat hier om een restje gekleurde alcohol die de aceton ingaat.

Neem voor deze stappen overigens weer andere potjes of verse vloeistoffen. Voor de veiligheid wordt weer tweemaal 100% aceton gebruikt. We noemen de stappen weer aceton 100% I en II. Alle stappen vergen weer een paar minuten.

Na aceton 100% II komt weer de xyleen I en xyleen II. Vanuit xyleen kan de canadabalsem worden opgebracht, want deze hars lost goed op in xyleen en xyleen verdampt gelukkig langzaam.

7.4 Insluiten

Het insluiten in een (kunst) hars is zoals gezegd nodig om de preparaten voor zeer lange tijd te kunnen bewaren. U heeft veel moeite moeten doen en dan is het nogal verspilling van tijd om vervolgens de coupes op zodanige wijze af te dekken dat ze een paar dagen later weggegooid kunnen worden.

Het is voor een snelle controle mogelijk om meteen na de kleuring vanuit het water een druppel vloeibare gelatine op te brengen en een dekglasje op het preparaat te leggen. Na enkele uren tot dagen kan het preparaat worden weggeworpen en het is dan niet meer te redden.

Canadabalsem is een algemene naam voor het insluitmiddel. Merknamen als Euparal en Eukitt komen ook voor.

Canadabalsem is erg taai, waardoor het niet gemakkelijk is om snel een druppel op de coupes te leggen. Ook kan de laag te dik worden, waardoor de afstand van de het objectief van de microscoop tot de coupe te groot blijft. Bij hogere vergrotingen is scherpstellen dan onmogelijk. Juist om deze reden zijn dekglasjes zo dun, maar deze dunte kan volledig teniet worden gedaan door een te dikke laag insluitmiddel.

Waarschuwing: Eén enkele te dikke coupe op een objectglasje kan hetzelfde effect hebben. Het dekglasje wordt als het ware opgetild. Zelfs in de xyleen II stap kunt u nog besluiten een van de coupes weg te krassen met een mesje.

7.4.1 Hanteerbaarheid van de hars

Om de canadabalsem hanteerbaarder te maken wordt deze verwarmd. Vooral niet in heet water - vermijd water in dit stadium. In een glazen buisje (reageerbuis) op het warmhoudplaatje zetten is een goede mogelijkheid. De hars wordt dan minder taai. Bij het uitnemen van een druppel, bv. met een sateh-stokje, koelt de hars echter snel af en kan dan toch weer te taai zijn bij aankomst op het objectglasje. Het objectglasje voorverwarmen lijkt een oplossing, maar dan kan de xyleen helemaal verdampen en vallen de coupes droog. De schade is dan enorm (vooral gasbellen in het weefsel).

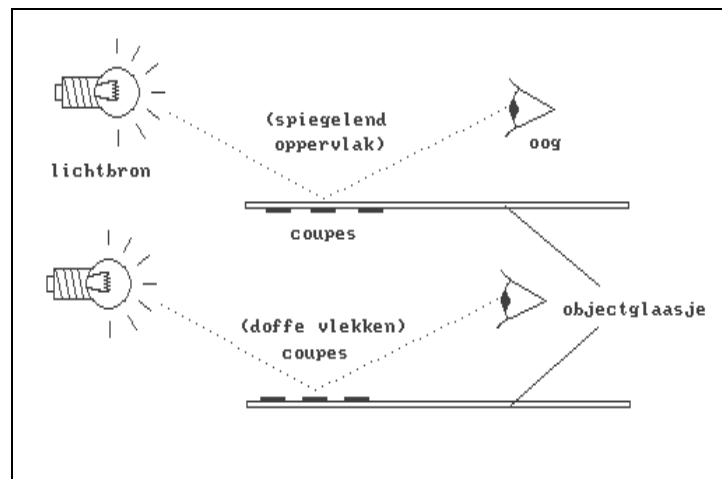
Het toevoegen van een druppel xyleen maakt de canadabalsem werkelijk vloeibaar, ook bij lichte afkoeling. Het moet beslist weinig xyleen zijn, want anders komt er in verhouding weer te weinig hars onder het dekglasje en kunnen er later bellen ontstaan.

De druppel(s) canadabalsem wordt (worden) op het objectglasje gebracht in de buurt van de coupes. Vervolgens wordt heel voorzichtig een dekglasje op de druppel gelegd, waardoor de vloeistof zich verspreidt en het dekglasje zich als het ware "vastzuigt". Soms is er te weinig insluitmiddel en blijft een deel van het dekglasje "in de lucht" hangen. Voeg dan voorzichtig aan de rand nog een druppel toe. Deze zal onder het glasje worden gezogen.

Indien er een groot oppervlak met coupes is bedekt, gebruik dan grote dekglasjes of leg er twee naast elkaar. Ze mogen elkaar niet overlappen. Een spleet tussen de twee mag wel. Zorg dat er geen coupes buiten het gebied van een dekglasje komen, ook niet onder de eventuele spleet. Ze zijn namelijk niet meer te bestuderen en dat is jammer.

7.4.2 De goede zijde

Nog even een tip om een rare fout te vermijden: Bij het insluiten is het niet ondenkbaar dat u de verkeerde kant van het preparaat afdekt. Het klinkt raar, maar het is me zelf wel overkomen dat ik een dekglasje op de onderkant plakte en de coupes op de ondergrond lagen. Soms is echt niet zomaar te zien aan welke kant ze nu zitten. Kijk daarom eerst met strijklicht aan welke kant de coupes zitten. Strijklicht houdt in dat bijna evenwijdig aan het oppervlak van het objectglasje naar een lichtbron wordt gekeken. De lege kant zal alleen maar glimmen, terwijl aan de kant met de coupes doffe vlekken te zien zijn. Tégen het licht houden van het glaasje (er dóórheen kijken dus), helpt niet! Probeer in géén geval te voelen.

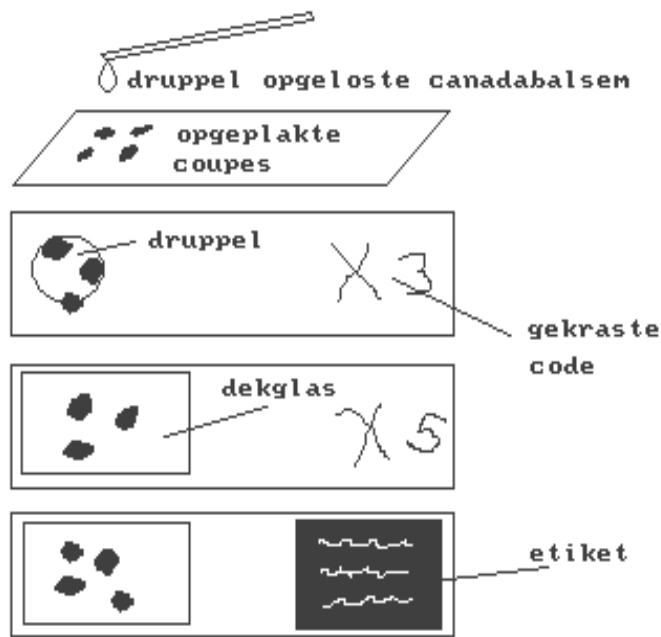


Figuur 14 Met reflectie nagaan waar het dekglas moet komen

7.4.3 Aanbrengen van het dekglasje

Nu nog even wat meer duidelijkheid over het aanbrengen van het dekglasje. In diverse boeken wordt beschreven hoe dit met twee naalden gedaan kan worden. De ene naald houdt het glaasje aan de voet tegen en de andere laat het langzaam op de vloeistof zakken. Zelf vind ik dit niet zo handig. Ik pak het dekglasje aan de zijkanten heel voorzichtig beet, zodat het niet breekt en er geen vlekken op komen. Dan breng ik het naar de druppel op het objectglasje. Zodra de druppel(s) wordt (worden) geraakt laat ik het glaasje los. het zuigt dan vanzelf vast op de ondergrond.

Als er teveel insluitmiddel is gebruikt moet de overvloedige hoeveelheid verwijderd worden. Dat is te doen. Als de canadabalsem verdund was met xyleen is deze vloeibaar. In andere gevallen wordt het objectglasje heet gemaakt op het warmhoudplaatje. Vervolgens wordt de achterkant van een gewoon potlood rustig op het dekglasje gezet. Niet duwen! Het gewicht van het potlood zal de canadabalsem onder het dekglasje uit persen. Haal niets weg, dan kan pas goed worden gedaan ná het drogen.



Figuur 15 Het insluiten

7.4.4 Drogen

Nu moeten de preparaten eerst lange tijd vlak drogen. Ze mogen wel een etmaal of nacht op een warm plaatje liggen. Niet rechtstreeks op het warmhoudplaatje, maar met een extra plaat ertussen, anders gaat de xyleen koken en belletjes vormen.

De preparaten kunnen voor de eerste droging wel vlak worden bekeken. Na droging is een schuine stand voor enkele minuten geen probleem. Voor ze op hun zijkant kunnen worden gezet in een preparatendoos (ongeveer zoals dia's) moet er nog wel een paar weken worden gewacht.

Gedurende deze droogtijd kunnen de preparaten alvast van etiketten worden voorzien. Vermeld op een etiket de relevante gegevens, zoals datum, weefseltype en organisme, kleuring en evt. andere zaken als fixatief.

Als het preparaat echt droog is, is de hars hard geworden. Met een scheermes kan dan het overtollige of per ongeluk uitgesmeerde gedeelte worden weggekrabd. Splintert de hars niet maar lijkt deze toch nog stroperig te zijn, stop dan en wacht langer. (Foto's IX en X)

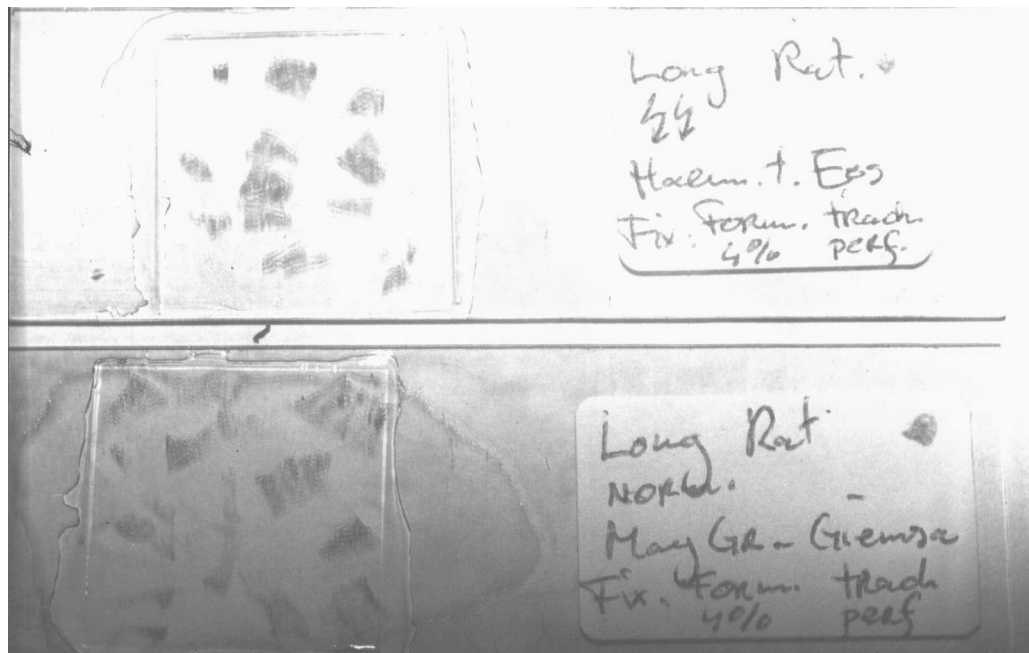


Foto IX Coupes afgedekt met insluitmiddel en dekglasje

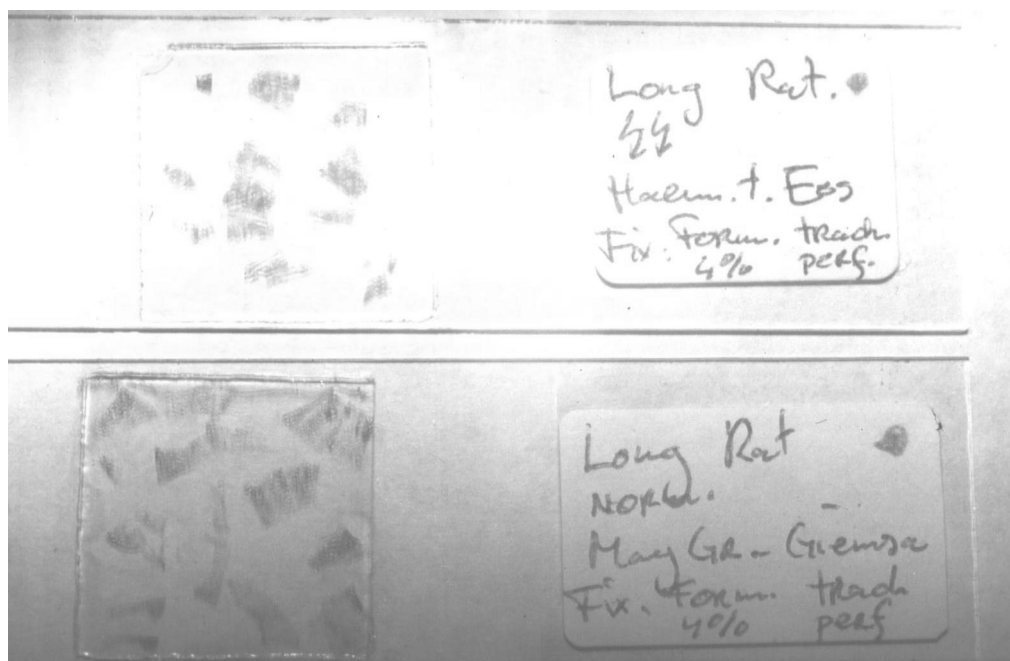


Foto X Overtollig insluitmiddel buiten het dekglasje (na harden) weggekrabd

7.4.5 Insluitmiddelen

Tenslotte nog een opmerking over de insluitmiddelen.

In sommige gevallen kan blanke nagellak een goede vervanging zijn voor canadabalsem. Helaas lijkt dit voor het insluiten van coupes niet het geval te zijn. Ik heb geprobeerd of ik blanke nagellak kon toepassen, maar daarbij deden zich enkele problemen voor.

Allereerst lost blanke nagellak goed op in aceton en niet in xyleen. Er moet dus meteen na de aceton II worden ingesloten - de xyleen wordt weggelaten. Aceton verdampt echter heel snel, veel sneller dan xyleen.

Een druppel nagellak komt daardoor dus bijna altijd te laat aan op de coupes.

Bovendien leek het beeld wazig te worden. Misschien toch een gevolg van indrogen. Wit neerslag en luchtbellens bederven de transparantie.

Om de nagellak sneller op te kunnen brengen, verdunde ik deze met aceton, net zoals canadabalsem met xyleen wordt verdund.

Helaas bleek dit mengsel de Giemsa-kleuring aan te tasten. De kleuren verdwenen geheel. Afzonderlijk hebben echter noch de nagellak, noch de aceton een schadelijke invloed op de Giemsa. Blijkbaar ontstaat er een nieuwe component, of wordt er een stof vrijgemaakt door de aceton.

Het is natuurlijk denkbaar dat andere kleuringen, zoals de Haematoxyline-Eosine wel tegen aceton/nagellak bestand zijn. Dat heb ik niet uitgeprobeerd. Neem bij experimenten de wat minder goede coupes. Lijkt iets te slagen, ga het dan uitproberen op de betere. Goede coupes liggen nu eenmaal niet voor het oprapen!

7.5 Samenvattend van opgeplakte coupe naar voltooid preparaat

- De preparaten, dwz. objectglaasjes met opgeplakte coupes, worden ontdaan van paraffine door onderdompelen in xyleen.
- In een tweede pot xyleen worden ook de restjes verwijderd.
- De xyleen wordt weggewassen met aceton 100%, ook in twee stappen.
- In toenemende mate wordt water in het preparaat gebracht: 85%, 70% en 50% alcohol. Dan gedemineraliseerd water. Alle stappen een paar minuten.
- De kleuring kan Giemsa (verdunding!) zijn (ca. 15 min.) of May Grünwald (enkele min.), maar ook Haematoxyline-Eosine (3 en 1 min.).
- Bij Giemsa of May-Grünwald eventueel eerst kleur afzwakken in 50% alcohol (ontkleurde spiritus).
- Bij Haematoxyline-Eosine na spoelen eerst "blauwen" in leidingwater.
- Dan weer een opstijgende reeks. Bij Giemsa en May-Grünwald meteen 100% aceton. Bij Haematoxyline-Eosine gewoon via 50%, 70%, 85% alcohol en 96% aceton en dan pas 100% aceton. Ook hier een tweede aceton 100%.
- Weer xyleen I en II
- Tenslotte insluiten in canadabalsem, met een dekglas. Een etmaal vlak liggend voordrogen
- Etiketteren.
- Wegkrabben van evt. harsranden.
- Pas weken later staand opbergen in een preparatendoos.

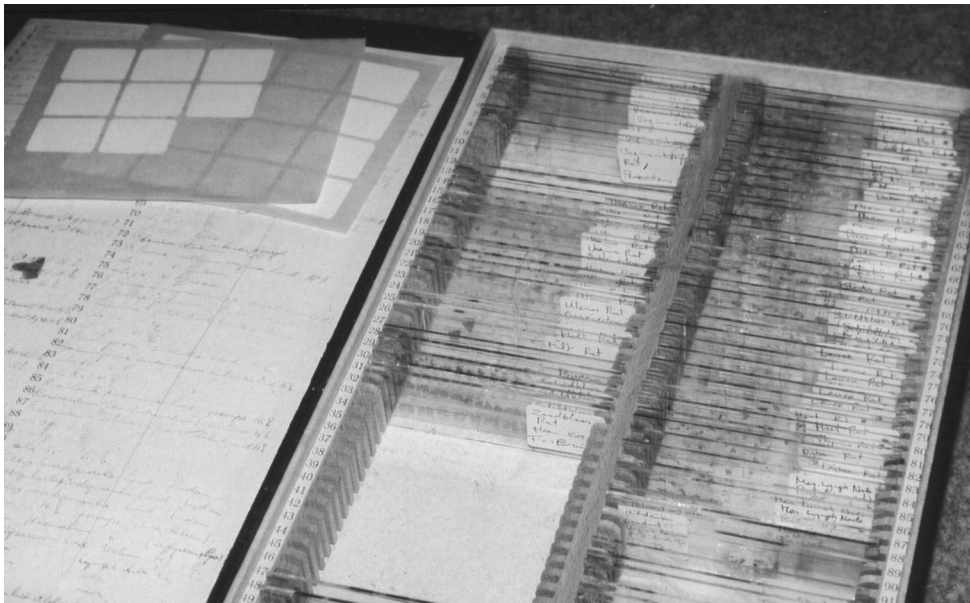


Foto XII De preparaten staan na grondig harden rechtop in de preparatendoos

8 Bijzondere preparaten

In feite is het eerste gedeelte van dit boek, waarin de technieken worden beschreven die leiden tot een houdbaar preparaat, nu compleet. Het tweede deel geeft adviezen over uiteenlopende technische zaken, gegroepeerd per onderwerp.

Toch zijn er nog een paar technieken die het vermelden waard zijn. Ze worden hieronder kort beschreven.

8.1 Gelatine-inbedding, gelatine-insluiting

Van deze techniek moet u beslist niet teveel verwachten. Enerzijds kan het een leuke oefening zijn, die een deel van de handelingen van de paraffinemethode omvat.

Anderzijds is het gewoon een snelle methode, die handig is als even snel naar weefsel gekeken moet worden.

Bij de gelatinemethode gaat u wel uit van gefixeerd weefsel. Het behoeft echter niet gespoeld te worden. Van gewone huishoudgelatine uit de supermarkt maakt u een zo geconcentreerd mogelijke oplossing. In een eetlepel water kan een heel blaadje worden opgelost!

Zeef de warme oplossing om eventuele klonten te verwijderen. Vervolgens wordt op dezelfde wijze als bij de paraffine-inbedding het weefsel in een bakje gelegd en overgoten met gelatine-oplossing. Laat het geheel afkoelen tot het vast is (evt. koelkast).

Leg als u tijd heeft het vaste blokje nog een paar uur in de formol. De gelatine wordt dan nog wat steviger. Als de gelatine echt stevig is kan er gesneden worden.

Het snijden kan het beste uit de vrije hand gebeuren, aangezien een blokje gelatine niet goed kan worden vastgeklemd.

Het is heel goed mogelijk dat het de eerste tientallen keren niet lukt. Is er echter een coupe waar een dun deel aan zit, snij dan het dunne deel af. (Met een scherp scheermesje loodrecht afsteken.) Het zal erop neer komen dat er toevallige flintertjes worden bemachtigd. Dun genoeg, maar niet groter dan een vierkante millimeter.

De coupe kan op een objectglaasje met eiwitglycerine worden vastgezet (zie het hoofdstuk over opplakken).

Daarna wordt meteen gekleurd, bij voorkeur in Giemsa. Houd er rekening mee dat de gelatine ook kleurt. Na het spoelen in water of eventueel 50% alcohol, wordt met een druppel gesmolten gelatine de coupe bedekt. Leg meteen het dekglaasje erop en laat de gelatine stollen. Eventueel in de koelkast, maar niet in het vriesvak. Het preparaat kan meteen bestudeerd worden, maar is slechts een paar dagen houdbaar.

8.2 Uitstrijkjes

Het maken van een uitstrijkje is een nog veel snellere methode, die echter niet voor vast weefsel geschikt is. Bloed, slijm (schraap over de binnenkant van uw wang!), pus (=etter) en bacteriesuspensie zijn geschikte bronnen.

Neem er een druppel van en leg die aan het uiteinde van een objectglaasje. Pak nu een tweede glaasje en duw dat in schuine stand over het eerste heen, naar het andere uiteinde. Niet slepen, maar duwen. Zo ongeveer als bij het sneeuwruimen met een sneeuwschuiver. Maak het "schuifglaasje" weer schoon en laat het glaasje met de uitgesmeerde druppel minstens tien minuten aan de lucht drogen.

Dompel het daarna even in (schone, dus verse) ontkleurde spiritus en laat het weer drogen.

Nu laat u enkele druppels onverdunde Giemsa op het glaasje vallen en wacht 1-2 minuten.

Droogt de Giemsa te snel doordat het warm is of de lucht te droog, doe dan het volgende:

Drenk een prop watten in een mengsel van ontkleurde spiritus en water (gelijke delen gemengd, bv van beide vingerhoed).

Leg de prop naast het uitstrijkje en plaats een stolp, plastic bak of diep bord over allebei.

Na de kleuring houdt u het preparaat met de **achterkant** - waar dus niets op zit - naar boven onder de lopende kraan. Zou u de bovenkant onder de straal houden, dan zou alles eraf kunnen spoelen. Nu gaat alleen de kleurstof eraf.

Spoel na met gedemineraliseerd water.

Zet het glaasje vervolgens op de zijkant op kladpapier of een koffiefilter en laat het geheel droog worden.

Als het echt droog is kunt u er meteen Canadabalsem op aan brengen en afdekken met een dekglasje.

In dit geval is blanke nagellak ook heel bruikbaar. Ook daarvan brengt u een of twee druppels op het objectglasje en dekt af met een dekglasje.

Overigens zullen veelal meerdere dekglasjes nodig zijn, omdat het oppervlak van een uitstrijkje zo groot is. Reserveer echter wel ruimte voor een etiket. Het preparaat kan namelijk heel goed bewaard worden, ook als er nagellak is gebruikt. Laat het insluitmiddel wel een paar weken drogen terwijl het preparaat plat ligt.

Het preparaat kan wel meteen bestudeerd worden.

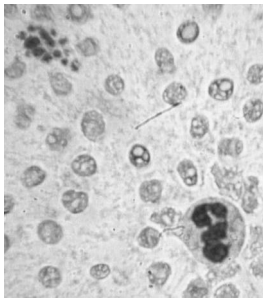


Foto XIII Een wit bloedlichaampje, rode bloedcellen en een bloedplaatje (1000x)

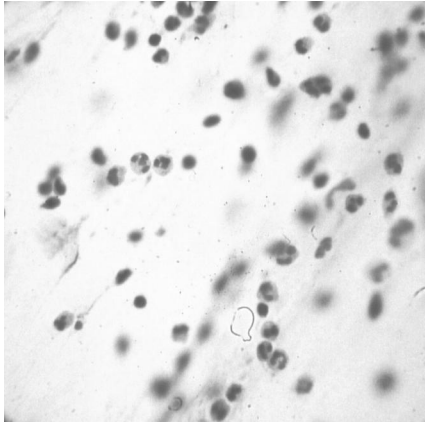


Foto XIV Een uitstrijkje met veel witte bloedlichaampjes (400x)

9 De resultaten (foto's)

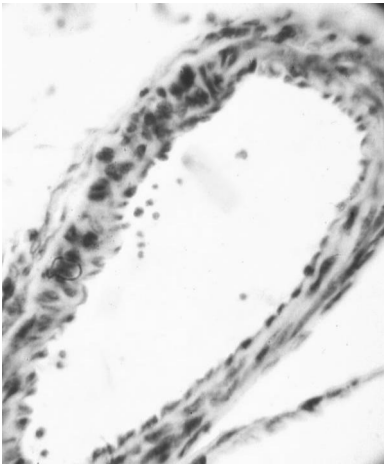


Foto XV Detail long van een rat. Kleuring: Giemsa. Vergr: 400x

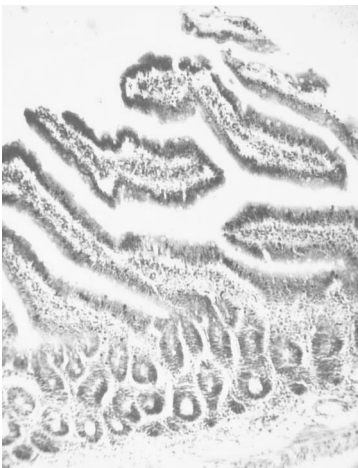


Foto XVI Darm van een rat. Kleuring: May-Grünwald Giemsa.
Vergr: 100x bel. 1/3 sec.



Foto XVII Darm van een (dodelijk bestraalde = 9 Gy) rat
Kleuring: Hematoxyline-Eosine. Vergr: 100x Belichting: 1/2 sec.

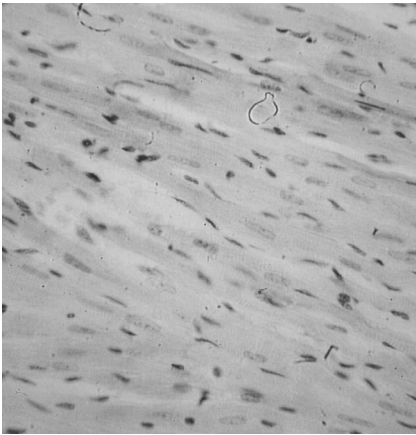


Foto XVIII Hartspierweefsel van een rat. Kleuring: May-Grünwald Giemsa.
Vergr: 400x belichting: 3 sec.

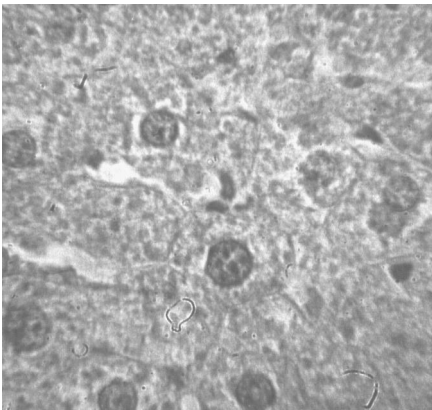


Foto XIX Levercellen van een (dodelijk bestraalde = 9 Gy) rat.
Kleuring: Hematoxyline-Eosine. Vergr: 1000x met olie-immersie Belicht: 4 sec

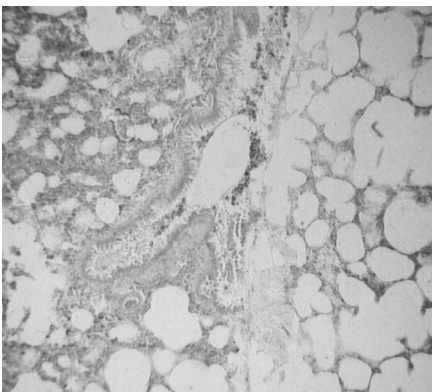


Foto XX Long van een (dodelijk bestraalde) rat.
Kleuring: Hematoxyline-Eosine. Vergr: 100x Belichtingstijd: 1/3 sec

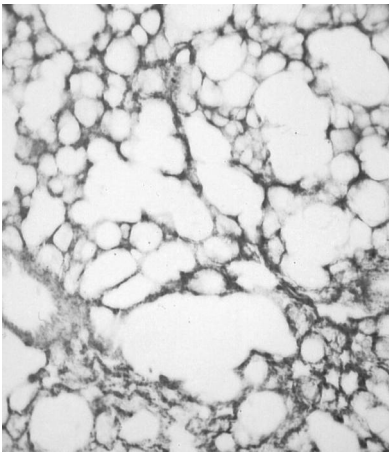


Foto XXI Long van een gezonde rat.
 Kleuring: Hematoxyline-Eosine. Vergr: 100x belicht: ½ sec.

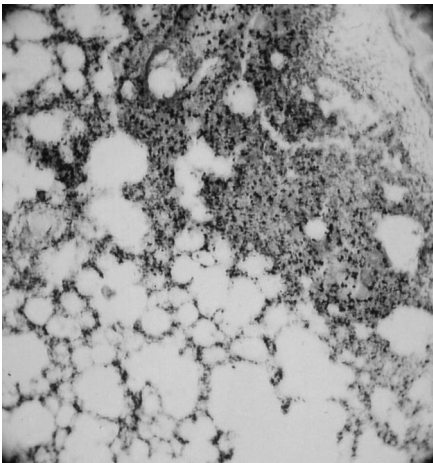


Foto XXII Long van een (dodelijk bestraalde = 9 Gy) rat
 Kleuring: May-Grünwald Giemsa. Vergr: 100x Belicht: 1 sec.
 (Toelichting: De rode gebieden zijn infecties met bloedingen. Door de zware bestraling met 9 Gray – in oude eenheden 900 Rad - is het immuunsysteem ondermijnd en breekt een latente mycoplasma-infectie (PPLO) geheel door.)

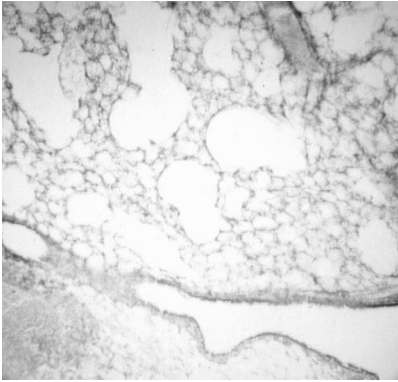


Foto XXIII Overzichtsfoto van de long van een gezonde rat.
 Kleuring: Giemsa. Vergr: 40x belichting onbekend ($< \frac{1}{2}$ sec)

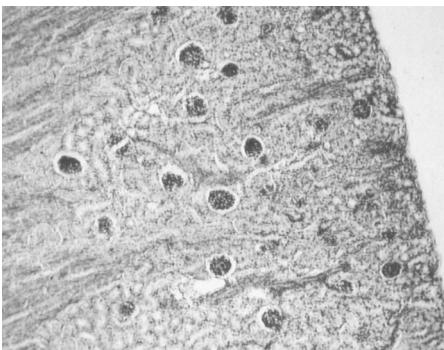


Foto XXIV Nier van een jonge rat. Kleuring: May-Grünwald Giemsa.
 Vergr: 100x belicht: $\frac{1}{2}$ sec.

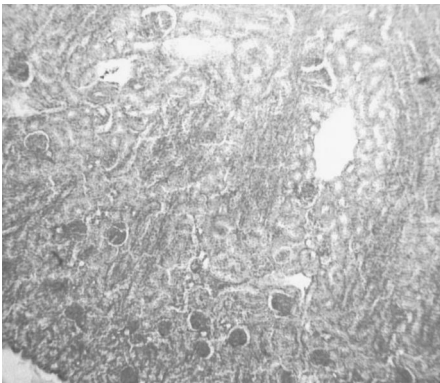


Foto XXV Nier van een jonge rat. Kleuring: Hematoxyline-Eosine.
 Vergr: 100x Belichtingstijd: $\frac{1}{3}$ sec.

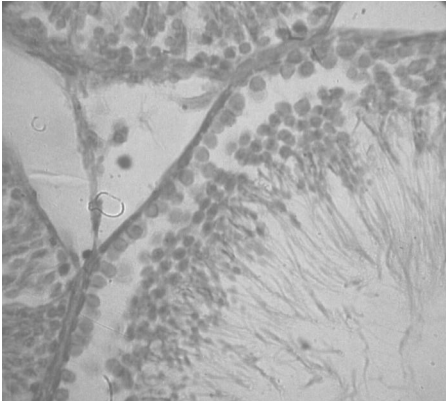


Foto XXVI Testis van een rat (lichte scheuring van het weefsel!)
Kleuring: Hematoxyline-Eosine. Vergr: 400x belicht: 1 sec.

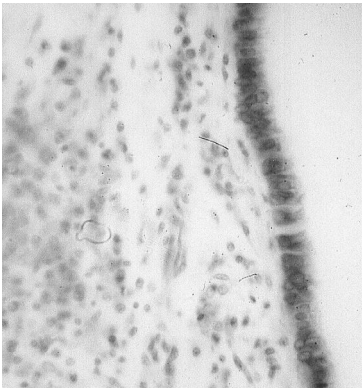


Foto XXVII Longepitheel van een rat. Kleuring: Giemsa.
Vergroting vermoedelijk 400x met olie-immersie
Belichtingstijd onbekend (< 1 sec.)

Vanaf hier vrijwel geen opnamen van weefselcoupes, maar illustraties van bijzondere technieken, zoals polarisatie en donkerveldbelichting. De technieken worden beschreven in deel II

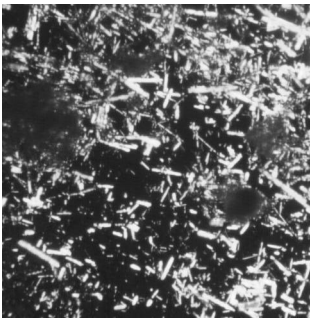


Foto XXVIII Kristallen, verkregen uit een extract van de pomelo-schil. Bitter, met licht verdovende werking. Normaal een wit poeder, maar tussen twee polaroid-filters gekleurd tgv. de optische activiteit van de stof. Vergroting 40x

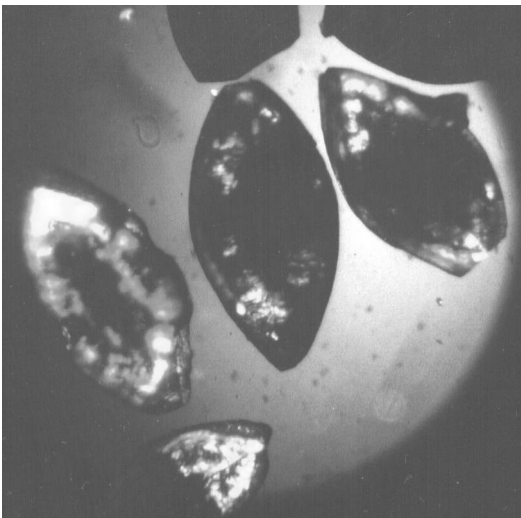


Foto XXIX Polarisatie-opname van kristallen wijnsteen (uit wijn). Vergroting 40x

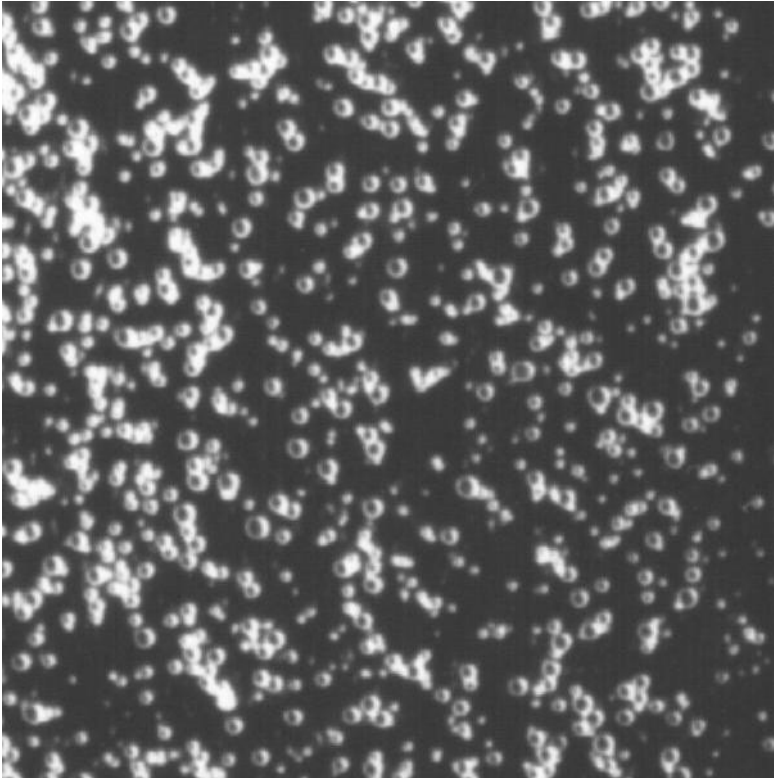


Foto XXX Moedermelk (menselijk) in donkerveldopname. De vetdruppeltjes zijn bijzonder duidelijk zichtbaar. Vergr: 100x



Foto XXXI Dezelfde melkopname als bij Foto XXX, maar nu zonder donkerveldinstelling

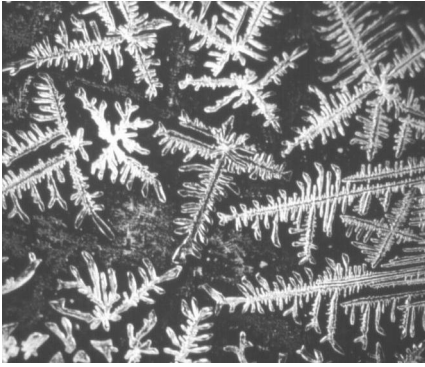


Foto XXXII Een donkerveldopname van salmiakkristallen. Vergr: 40x

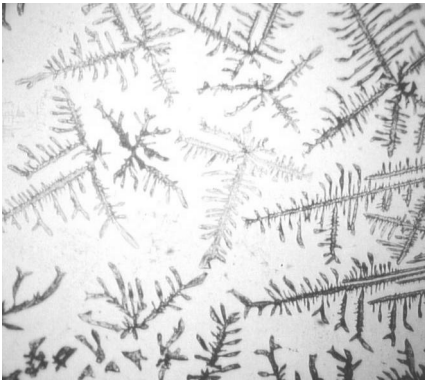


Foto XXXIII Als foto XXXII, maar zonder donkerveldbelichting

DEEL II (ondersteunende technieken)

1 De aard van deel II

Dit tweede gedeelte, aangeduid met "Technisch gedeelte" omvat allerlei hulptechnieken, die niet rechtstreeks betrekking hebben op het vervaardigen van preparaten.

Met name om niet steeds af te wijken van de hoofdlijnen in deel I zijn dergelijke zaken apart gezet. Degene die ze nodig heeft kan gericht zoeken. Strikt genomen zou dit deel vóór deel I moeten komen. Er is ook voortdurend naar verwezen in deel I. Toch moedigt zo' n enorme reeks steuntechnieken niet echt aan om met het echte werk te beginnen.

Deel II is geen eenheid, maar een losse verzameling van technieken, voorschriften, berekeningen, geheugensteuntjes en tips.

Om de omvang te beperken zijn de diverse onderdelen achter elkaar geplaatst, zonder pagina-overgang per onderwerp. De nummering is lineair.

2 Fysiologische zoutoplossing

Doorgaans wordt er een 0.9% oplossing van keukenzout (NaCl) in gedemineraliseerd (of gedestilleerd) water genomen. Het gemakkelijkst en nauwkeurigst is het om 9 gram keukenzout op te lossen in 1 liter water (= 1000 gram). Het water mag na afmeten worden verwarmd, maar laat niet te veel verdampen. De hoeveelheid zout is overigens zo gering dat ze ook in koud water goed oplost.

Als u een ander zout zou willen gebruiken dan NaCl, bedenk dan dat het om het aantal deeltjes gaat. Het aantal molen ionen bepaalt de osmotische sterkte van de oplossing. In praktijk gaat het om ca. 300 mM (milli-Molair).

Voor NaCl met een molmassa van 58.5 en dat zich in twee ionen splitst, komt dit neer op $0.15 \times 58.5 \text{ gram} = 8.8 \text{ gram}$ per liter. Afgerond is dat 0.9%

K₂SO₄ levert echter drie deeltjes en heeft een molmassa van 174. Dus wordt het $0.1 \times 174 = 17.4 \text{ gram}$ per liter.

Biologische materialen zorgen echter regelmatig voor verrassingen, dus experimenteer alleen als u de risico' s wilt nemen. Keukenzout is nu eenmaal gemakkelijk en goedkoop en het voldoet uitstekend.

3 Filtreerpapier

Om te filtreren kunt u het beste grote vellen laboratoriumpapier gebruiken. Deze zijn echter niet overal verkrijgbaar. Vermoedelijk zult u dus op zoek gaan naar alternatieven. Welke mogelijkheden er zijn hangt af van wat u wilt filtreren.

Grofheid 1 Affiltreren van vuiltjes, stukjes weefsel, grove deeltjes. Hiervoor kan gerust een filterzakje voor koffie worden genomen. Ook paraffine kan hiermee gereinigd worden. Daarvoor is een theezeeffe echter ook geschikt (mits voorverwarmd).

Grofheid 2 Voor fijnere neerslagen en stof is kladpapier meestal voldoende. Het laat vloeistoffen vrij snel door, maar houdt ook veel deeltjes tegen.

Grofheid 3 Voor zéér fijne deeltjes, zoals Norit en disperse kleurstoffen, is typmachinepapier heel bruikbaar. Neem ca. 65 grams wit papier. De zuivering is uitstekend, maar het papier laat de vloeistof zeer traag door.

Het passeren van een liter alcohol of water kan enkele uren duren.

Wees voorzichtig met logen en zuren. Daar is typmachinepapier veelal niet tegen bestand.

4 Het ontkleuren van spiritus

Brandspiritus is gewoon in de winkel te koop. Het is niet duur en zeer geschikt voor histologische techniek. Het is echter wel noodzakelijk om de blauwe kleurstof te verwijderen. Het vergif verdwijnt hiermee niet uit de spiritus. Dat brandspiritus goedkoop is komt doordat er geen accijns op wordt geheven, wat wel bij consumptie-alcohol gebeurt. Consumptie-alcohol is ethanol. Om er zeker van te zijn dat men geen spiritus gaat schenken op feestjes, is er een andere alcohol - methanol - toegevoegd. Deze is giftig. Na het ontkleuren is er nog steeds evenveel methanol aanwezig.

Het principe van de ontkleuring is dat de opgeloste kleurstof met behulp van geactiveerde kool wordt onttrokken aan de vloeistof.

Voeg daarom eerst aan een fles spiritus een eetlepel (of twee paplepels) norit toe. Gebruik poeder en liever geen tabletten. De poeder kan met behulp van een trechter of een opgerold stuk papier in de fles worden gebracht. Pas op, het stuift heel erg.

Sluit de fles en schud deze goed.

Als u het ontkleuringsproces wilt zien, kunt u de spiritus het beste eerst in een schone fles van bv. witte wijn overschenken. Spoel deze eerst goed om. Ook met een scheut spiritus die u weggooit.

De norit zakt na een aantal uren duidelijk naar beneden en laat een heldere laag vrijkomen. Op zich is dit niet belangrijk. De fles mag best geschud worden. Na ongeveer twee dagen moet de heldere spiritus worden afgefilterd. Dit gaat heel goed met echt filtreerpapier (bv. zwartband) maar 60-80 grams wit schrijfmachinepapier is een goed alternatief. Het doorlopen gaat dan wel traag.

Zet een andere (schone) fles klaar. Plaats een trechter en zet in de trechter het filter. Dit maakt u door een cirkelvormig stuk papier (met een bord en potlood tekenen en dan uitknippen!) in vieren te vouwen. De vier lagen splitst u in drie en een, waardoor er een soort puntzak ontstaat. Deze wordt in de trechter gelegd.

Schenk een scheut van de spiritus met norit in het filter. Laat dit doorlopen (10 minuten?).

Spoel de fles voor met deze heldere spiritus en giet deze eerste hoeveelheid weg. Schenk dan het filter redelijk vol en wacht af (het zal tientallen minuten duren).

Als het filter bijna leeg is kan het beter weer gevuld worden.

Als het goed is vult de onderste fles zich met een kleurloze vloeistof: ontkleurde spiritus (85% alcohol). Mocht de vloeistof nog blauw zijn, dan heeft u misschien niet lang genoeg gewacht (2 dagen) of er is te weinig norit gebruikt (een éetlepel per liter).

De hier beschreven methode is ook geschikt om alcohol weer van kleurstof te ontdoen. De concentratie verandert er echter niet door.

5 Ontwateren van spiritus of zuivere ethanol

Deze bezigheid kan ik u van harte afraden. Het is riskant werk, door de giftigheid van kopersulfaat. De opbrengst is laag en bovendien is aceton - zoals beschreven - een uitstekend alternatief.

Het ontwateren gebeurt mbv. kopersulfaat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Aan de formule is te zien dat de kristallen water in zich dragen. Door dit water heeft kopersulfaat een mooie blauwe kleur. Bij verhitting verlaat het water het kopersulfaat en blijft er een wit poeder achter. Dit poeder trekt zeer sterk water aan.

Het verhitten moet op een speciale manier gebeuren. Ongeveer 50 gram wordt in een metalen bakje op het warmhoudplaatje gezet of op een kleine gasvlam.

Roer voortdurend en pas op dat er geen zwarte plekken ontstaan. Zwarte plekken geven aan dat de stof ontleedt. Er is (zwart) koperoxide gevormd.

Gebruik bij dit werk steeds een nat mondlapje (een droog houdt de poeder niet tegen) en blijf uit de buurt van anderen (mensen, huisdieren etc.)

Breng het witte poeder in een pot, laat het afkoelen en giet er 100 ml ontkleurde spiritus op. Het poeder zal meteen vaag blauw worden. Na langere tijd (fles goed afsluiten!) kleurt het kopersulfaat sterk blauw.

De 100 ml spiritus bevat ongeveer 15 ml water. Dit is ca. 0.8 mol water.

Aangezien iedere mol kopersulfaat 5 mol water op moet kunnen nemen (zie formule) zou 1/5 mol ruim voldoende moeten zijn voor 100 ml spiritus. Dit komt neer op 50 gram kopersulfaat, want de molmassa van CuSO_4 met kristalwater is 250. (Watervrij is het 160, dus de 50 gram zou na het drogen nog maar zo'n 32 gram mogen wegen.)

In principe zou de spiritus nu watervrij moeten zijn. Het kopersulfaat zal echter niet in staat zijn alle water aan de spiritus te onttrekken.

Daarom wordt de procedure nog eens herhaald. Eigenlijk moet er gedestilleerd worden, maar affiltreren werkt ook. Gebruik kladpapier om te filtreren (in vieren vouwen en splitsen naar 1 en 3 lagen - zie ook ontkleuren).

De achterblijvende kopersulfaat wordt eerst aan de lucht gedroogd (spiritus eruit) en dan weer ontwaterd. Na toevoegen aan de reeds behandelde spiritus moet de kleur ook na een dag hoogstens lichtblauw zijn.

Kopersulfaat is bijzonder giftig. Er treedt echter (gelukkig) al gauw de neiging tot braken op. Bij inademen van het poeder zullen zware hoofdpijnen en misselijkheid het gevolg zijn. Braken helpt in dat geval echter niet om de stof te verwijderen.

Na afloop (handen wassen!) is het eten van een ei of iets met mayonaise aan te raden.

Eventuele restjes kopersulfaat zullen door het sulfide worden omgezet in onoplosbaar kopersulfide.

6 Het maken van verdunningen

Bij het maken van verdunningen gaat u steeds uit van een stamoplossing met een bekende concentratie. Alleen dan is het mogelijk om te berekenen wat u moet doen om een andere concentratie te krijgen. Verder is het alleen mogelijk om van een hogere naar een lagere concentratie te gaan - het woord verdunnen geeft het al aan.

Nu zijn er echter nog drie situaties denkbaar:

1) Er is een hoeveelheid oplossing met een bepaalde concentratie (bv. 5% NaCl) en er moet een andere concentratie worden bereid (bv. 0.9%). Eindvolume nog niet bekend.

2) De benodigde hoeveelheid van de verdunning is bekend: hoeveel van de geconcentreerde oplossing is nodig?

3) Er is een bepaalde hoeveelheid oplosmiddel (water) toegevoegd aan een oplossing met bekende concentratie. Hoeveel lager is de concentratie nu?

Dit laatste geval doet zich bv. voor als nagegaan wordt of aceton 100% niet teveel water gaat bevatten.

PAS OP BIJ BEREKENINGEN AAN SPIRITUS. SPIRITUS IS VERDUNDE ALCOHOL VAN 85%

6.1 Vaste hoeveelheid met bekende concentratie verdunnen

Bereken allereerst het getal A, dat groter is dan 1:

$$A = \frac{\text{hoge conc. in \%}}{\text{lage conc. in \%}} \quad (\% \text{ is gram per deciliter of ml per 100 ml})$$

U weet hoeveel vloeistof u gaat verdunnen (of meet dit eerst). Vermenigvuldig dit volume met getal A en u weet het eindvolume. De hoeveelheid geconcentreerde oplossing moet dus met oplosmiddel (doorgaans water) worden aangevuld tot het nieuwe volume.

Voorbeeld: Er is 23.5 ml spiritus (85% alcohol). De gewenste conc. is 55%
getal A wordt $85/55 = 1.55$

Er komt dus $1.55 * 23.5 \text{ ml} = \text{ca. } 36.5 \text{ ml}$ verdunde spiritus. Dit wordt bereikt door 13 ml water toe te voegen.

6.2 Vaste hoeveelheid maken van de verdunning

Ook hier wordt eerst het getal A berekend, groter dan 1:

$$A = \frac{\text{hoge conc. in \%}}{\text{lage conc. in \%}} \quad (\% \text{ is gram per deciliter of ml per 100 ml})$$

De gewenste hoeveelheid verdunning heet V. Dit betekent dat V/A ml van de geconcentreerde oplossing verdund moeten worden tot het gewenste volume.

Voorbeeld: U heeft 7% keukenzoutoplossing. U wilt 50 ml fysiologische zoutoplossing maken. A is dan $7 / 0.9 = 7.78$

Dat betekent dat $50 / 7.78 \text{ ml}$ van de 7% oplossing moet worden aangevuld tot 50 ml.

6.3 Concentratieverandering tgv. toevoeging berekenen.

Begin- en eindvolume moeten nu bekend zijn (of hoeveel erbij kwam). Ook de beginconcentratie moet bekend zijn.

De nieuwe concentratie is nu te berekenen:

$$\text{conc (\%)} \text{ nieuw} = \frac{\text{oude conc. (\%)} * \text{oud volume (in ml)}}{\text{nieuw volume}}$$

Voorbeeld: 20 ml aceton van 96% is al voor de doorvoer van 50 glaasjes gebruikt. Per glaasje hangt er echter toch steeds een druppel water aan (ca. 20 microliter).

De concentratie is dan nu:

$$\frac{96\% * 20 \text{ ml}}{21 \text{ ml}} = \text{ca. } 91.5 \%$$

De aceton is wel erg sterk verdund, gebruik nieuwe.
In praktijk komt het glaasje niet uit het water, maar uit bv. 50% of 80% alcohol.
Hierdoor wordt er minder water toegevoegd.

WAARSCHUWING: Van een oplossing wordt aangegeven hoeveel % deze is. Dat houdt veelal in dat in 100 ml van de oplossing een bepaalde hoeveelheid zoveel grammen van een stof bevat. Dus een bepaald aantal grammen moet worden aangevuld tot 100 ml. Niet 100 ml erbij!

Vooraf bij hogere concentraties is dit van belang: Een 40% suikeroplossing wordt niet bereid uit 40 gram suiker en 100 ml water. De 40 gram dient te worden aangevuld tot 100 ml.

Zorg bij verwarmen ook dat er niet veel verdampt. Meet en weeg bij kamertemperatuur.

7 Verwarmen au bain Marie en met zandbad.

Een directe vlam kan te krachtig zijn voor het verwarmen. Sommige stoffen (paraffine, suiker, kopersulfaat) kunnen dan ontleden. Als er dan geen elektrisch plaatje beschikbaar is (met thermostaat), kan er een tussenlaag worden ingezet, die de hitte tempert.

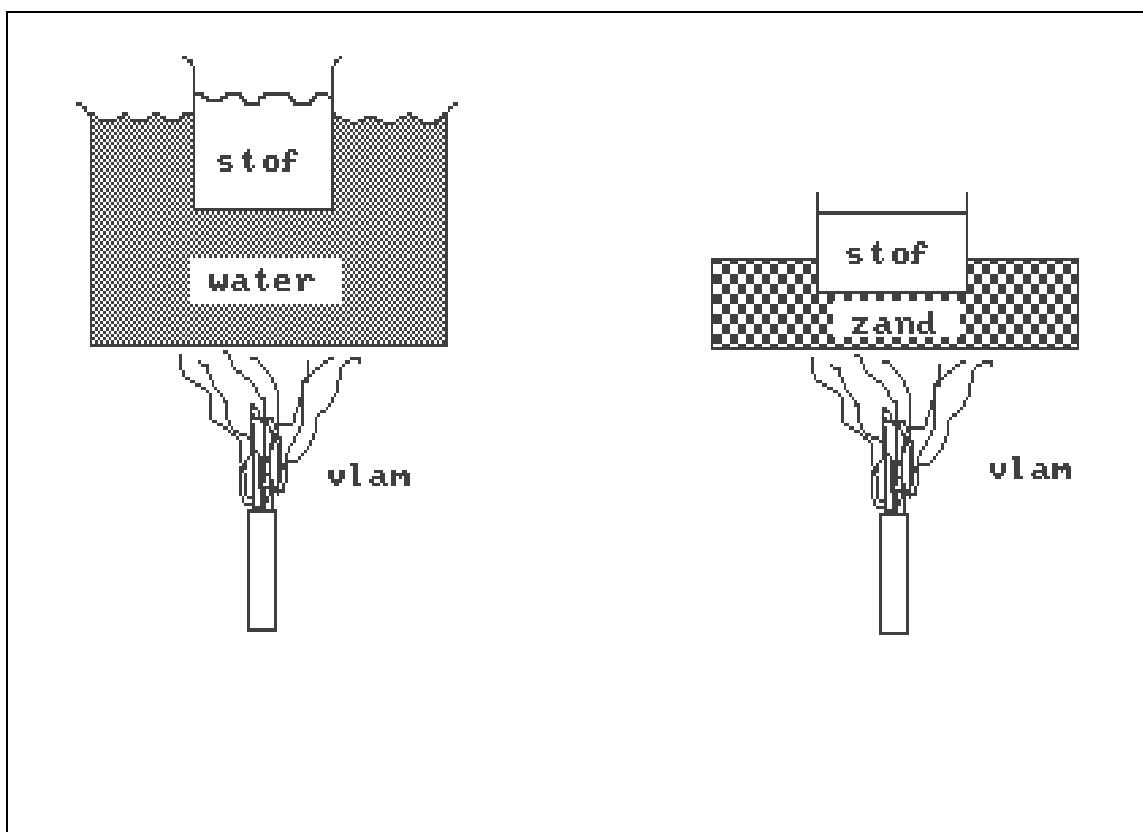
Deze tussenlaag kan uit bv. water bestaan of uit zand.

Au bain Marie houdt in dat er in een bad van kokend water wordt verwarmd. Het is een bekende keukentechniek. Een bak wordt in een andere, met water gevulde bak geplaatst. De buitenste bak komt op een vlam te staan. Indien het de bodem van de binnenste bak die van de buitenste niet raakt, wordt de temperatuur in de binnenste bak beperkt door het kookpunt van het omringende water.

In veel gevallen mag er echter geen water in de buurt van de gebruikte stof komen (paraffine!). Bij stoffen die niet met water in aanraking mogen komen is een zandbad handig. Ook hier is sprake van een binnen- en een buitenbak. Er moet onder de bodem van de binnenste bak een flinke laag zand liggen.

Een zandbad kan uiteindelijk wel veel heter worden dan een waterbad. Water wordt ca. 100° terwijl zand geen kookpunt bereikt. Door de laag zand in dikte te variëren wordt echter geregeld hoeveel van de warmte verloren gaat. Een dikke laag zand kan uiteindelijk lauwwarm zijn.

Nog een ander alternatief is een oliebad. Hiermee kunnen hogere stabiele temperaturen worden bereikt dan met een waterbad. Gewone voedingsolie is echter nauwelijks geschikt. Er wordt veelal speciale siliconenolie voor gebruikt. Wilt u het toch proberen, neem dan maaskiemolie. Deze walmt niet bij verhitten.



Figuur 16 Verwarmen met een waterbad en met een zandbad

8 Intermedia

Om erachter te komen of een stof geschikt is als intermedium, kunt u het volgende doen:

- Vul een reageerbuis of ander glazen kokertje voor een deel met de laatste vloeistof uit de doorvoerreeks. Vermoedelijk zal dit aceton (100%) zijn, maar misschien gebruikt u toch watervrije ethanol of hebt u zelf nog iets ontdekt.

Giet er nu ongeveer evenveel bij van de vloeistof die u als intermedium zou willen gebruiken. Schud nu goed.

Wacht enkele tellen. Er mag nu geen blijvende troebeling zijn en er mogen zich zeker geen twee lagen vormen! Ook zwevende bolletjes zijn niet acceptabel. Alleen volledige menging is goed.

- Als de eerste test gunstig uitvalt, komt de tweede. Neem een schone reageerbuis. Doe er een paar stukjes paraffine in. Giet er zoveel van het beoogde intermedium op, dat de brokjes onder de vloeistof staan. Houdt nu de reageerbuis met de buitenzijde onder de hete kraan. Zorg dat er geen spatjes water in komen. In plaats van de hete kraan kunt u de buis ook in een bak met heet water zetten (60-80°).

Als de mengbaarheid met paraffine goed is, zal er een heldere vloeistof ontstaan. Door een druppel op een glasplaat (objectglaasje?) te laten vallen kan dit vermoeden bevestigd worden. Eén druppel van de oplossing mag niet uiteenvallen in componenten. Er moet een redelijk ronde vlek gevormd worden.

Alleen als beide testen een goed resultaat opleveren kan de stof als intermedium fungeren.

Indien u deze testen met xyleen uitvoert, zal blijken dat de paraffine zelfs zonder verhitten oplost. Dit is niet beslist nodig, maar het is wel van belang dat het weefsel in een homogene vloeistof ligt. Bij de stap naar paraffine moet eerst een 1:1 mengsel van paraffine en intermedium worden gebruikt, dat geheel vloeibaar is.

Om u alvast wegwijs te maken is hieronder een tabel opgenomen met de mengbaarheid van enkele stoffen:

TABEL

betekenis van de symbolen:

+ redelijk goed tot volledig mengbaar

- matig tot niet mengbaar

. niet bekend bij de schrijver

* vermoedelijk niet verkrijgbaar

	tetra- chloor- koolstof	tolueen (thinner)	xyleen	ether	trileen (tri)	chloroform	aceton	ethanol	water	
aceton	-	-	+	+	-	-		+	+	+
chloroform *	-	+	+	+	-	+		-	+	-
ethanol	-	+	+	+	+	+		+	+	+
ether *	+	+	+	+	+	+		+	+	-
glycerol -	-	-	-	-	-		-	+	+	
paraffine +	+	+	-	+	+		-	-	-	
spiritus (85% (m)ethanol)	-	-	-	-	-	-		+	+	+
tetrachloor- koolstof	+	+	+	+	.	-		-	-	-
tolueen *+	+	+	+	.	+		-	+	-	
trileen	.	.	.	+	+	-		-	.	-
water	-	-	-	-	-	-		+	+	+
xyleen	+	+	+	+	+	+		+	+	-

9 Wegen

Er zijn verschillende manieren om stoffen af te wegen. Een van de eenvoudigste methoden is het gebruik van een zakbrievenweger met een koffiefilterzakje eraan om de stof in te doen. Tel wel het gewicht van het zakje op bij het gewenste gewicht als u de brievenweger afleest.

Overigens is het raadzaam om de brievenweger enigszins te ijken met bekende gewichten. De afwijking kan namelijk wel 5-10% van het werkelijke gewicht zijn.

Een veel nauwkeuriger methode om te wegen is mbv. een balans. Dit is een kleine uitvoering van de ouderwetse "hangweegschaal". Een dergelijke balans die tot honderden milligrammen af kan wegen is met eenvoudige middelen zelf te vervaardigen.

9.1 Het maken van de balans

Het is in feite een staaf met in het midden een gat of een oog, waaraan deze is opgehangen. Aan beide uiteinden hangen schalen. Aan de ene kant worden gewichten gelegd en aan de andere de af te wegen stof. Als de staaf helemaal horizontaal hangt zijn gewichten en te wegen stof in evenwicht. Nu is horizontaal niet eenvoudig te zien, maar verticaal wel. Door loodrecht op de staaf een soort naald te monteren en deze met een loodlijn te vergelijken (draad met gewicht, hangt steeds verticaal) is de evenwichtstoestand goed af te lezen.

Bij zelfbouw kan er een dunne houten of metalen strook worden genomen. (twee of drie ijshoutjes zijn bruikbaar). Heel erg nauwkeurig hoeft er niet gewerkt te worden, want later wordt de balans toch "afgesteld". Aan beide uiteinden wordt een gat geboord en in het midden - iets meer aan de boven dan aan de onderzijde - ook.

Door het gat in het midden kan een uitgebogen paperclip worden gehaakt, die weer aan een schroefoogje wordt gehangen. Dat schroefoogje kan bv. onderaan een kastplank zitten.

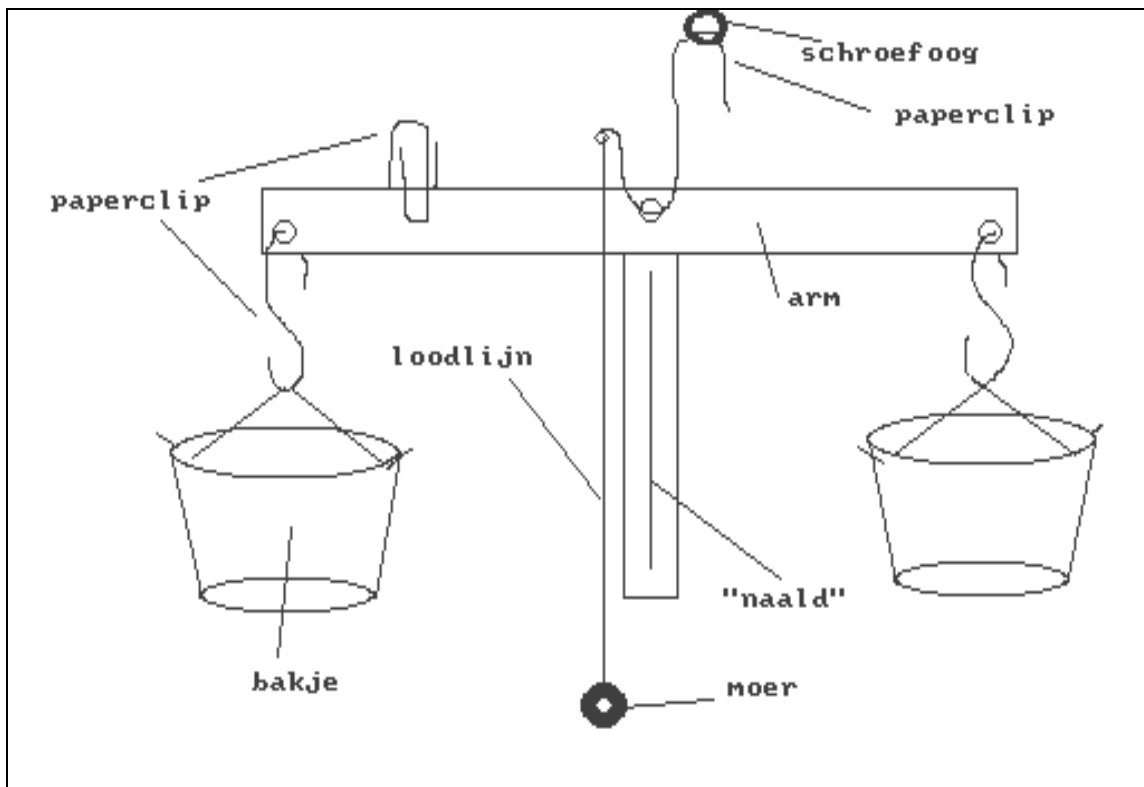
Loodrecht op de strook, onder het middengat, wordt een naald of pen vast gemaakt (satehstokje of een echte lange naald of een strook doorzichtig plastic met een gekraste lijn). Als het uiteinde van de paperclip nu tot een lusje wordt gebogen, kan er een draad aan worden gehangen, die met een moertje verzwaard is. Evenwicht houdt dan in dat de naald of de kras zo bekeken kunnen worden dat ze samenvallen.

Aan de beide uiteinden worden ook uitgebogen paperclips gehangen. Aan deze paperclips komen plastic automaatbekertjes te hangen. Dit kan weer door een boog dun ijzerdraad door een gat aan weerszijden van een bekertje te steken. Deze gaten kunnen het best met een hete spijker worden gesmolten.

9.2 Het afregelen van de balans

Het geheel ziet er primitief uit, maar is heel bruikbaar. Als beide zijden leeg zijn, moet de balans uiteraard in evenwicht zijn. Is dit niet het geval dan kan er aan de lichtere kant een paperclip op de ene arm worden geklemd, of eventueel twee. Een stuk stopverf of wat lijm met een moer kan ook. Het is in ieder geval de bedoeling dat bij een lege balans de naald en de loodlijn over elkaar heen vallen, dwz. geen hoek maken. Aangezien er tijdens het werk verschuivingen op kunnen treden, is het aan te raden op de ene arm in ieder geval één paperclip te klemmen. Deze kan af en toe verplaatst worden op de balans weer "op nul te zetten".

Blijkt de balans zonder enige correctie al perfect te zijn, zet dan op beide armen een paperclip.



Figuur 17 De eigengebouwde “waterbalans”

9.3 Het gebruik van de balans

Nu is zo'n balans heel leuk, maar waar komen de gewichten vandaan? Daarvoor bestaan enkele mogelijkheden. Allereerst is het mogelijk om gewichten te kopen, maar dat is duur en dat was niet de bedoeling. Zelf maken is een mogelijkheid. Er kunnen strookjes roestvrij staal worden gezaagd en door afvijlen op een bepaald gewicht worden gebracht. Kras het juiste gewicht eerst in het metaal, dan heeft het krassen geen invloed meer op het gewicht. Het ijken moet wel op een nauwkeurige weeginstallatie gebeuren (bv. elektronische balans) en zeker niet op een brievenweger. Met de combinatie 0.1, 0.2, 0.2, 0.5, 1, 2, 2 en 5 gram is in principe ieder gewicht tussen 0.1 en 10 gram, in stappen van 0.1 gram samen te stellen (8.9 gram is bv. $5+2+1+0.5+0.2+0.2+0.1$ gram). Nog veel gemakkelijker en bijzonder nauwkeurig is het werken met water. Een milliliter water weegt bij kamertemperatuur redelijk nauwkeurig 1 gram. Door met een pipet te werken die bv. 5 ml in stappen van 0.1 ml

De juiste hoeveelheid water wordt afgemeten in de pipet (iets meer opzuigen en dan met de punt tegen een oppervlak weg laten vloeien). Daarna wordt de pipet rustig geleegd in een van de bekertjes - met de punt tegen de zijkant. Ondersteun het, zodat de balans niet volkomen scheef komt te hangen. Dit kan het nulpunt doen verschuiven, waardoor er een meetfout optreedt. Breng nu de benodigde stof in de andere beker en ga door met toevoegen tot er ongeveer evenwicht is. Laat dan de beker met water los en ga door tot volledig evenwicht.

Als de stof aan de andere kant in een papiertje wordt afgewogen, om de beker niet te verontreinigen, kan dit eerst gecompenseerd worden. Leg het papiertje in de ene beker en druppel zo lang water in de andere, tot er evenwicht is. Voeg daarna zoals reeds beschreven werd het gewenste gewicht in water toe etc.

Ook al lijkt deze werkwijze merkwaardig, de nauwkeurigheid is veel groter dan die van een brievenweger. Controleer na weging wel even of de balans nog in evenwicht is.

10 Het microtroom

Het snijden van coupes is het meest complexe punt voor een thuis-onderzoeker. In het eerste deel is al uitgelegd wat een microtroom precies doet en welke types er zijn. In dit technische gedeelte zal worden beschreven hoe een dergelijk apparaat zelf in vereenvoudigde vorm kan worden vervaardigd. Natuurlijk is het mogelijk hier een complete bouwbeschrijving te geven van een bepaald type microtroom. Dat zou betekenen dat de meeste lezers er niets aan hebben en de rest veel geld uit moet geven. Bovendien kunnen zelfs goedkope materialen plotseling zeldzaam worden en daarmee meestal duur.

Daarom worden hier alleen principes beschreven van een zelfbouw-microtroom.

Met afbeeldingen wordt de constructie verduidelijkt. Daar waar het van toepassing is wordt aangegeven welk type materiaal geschikt is. Overigens heb ik zelf daadwerkelijk een dergelijk microtroom gebouwd en er bruikbare coupes mee gesneden (zie foto's!) dus het is geen theoretische exercitie. Ik laat het aan uw eigen inzicht en creativiteit over om iets te bouwen dat redelijk werkt. In ieder geval zal de hieronder beschreven constructie gemonteerd zijn op een plaat van hout of metaal. Op deze wijze krijgen de onderdelen een vaste positie.

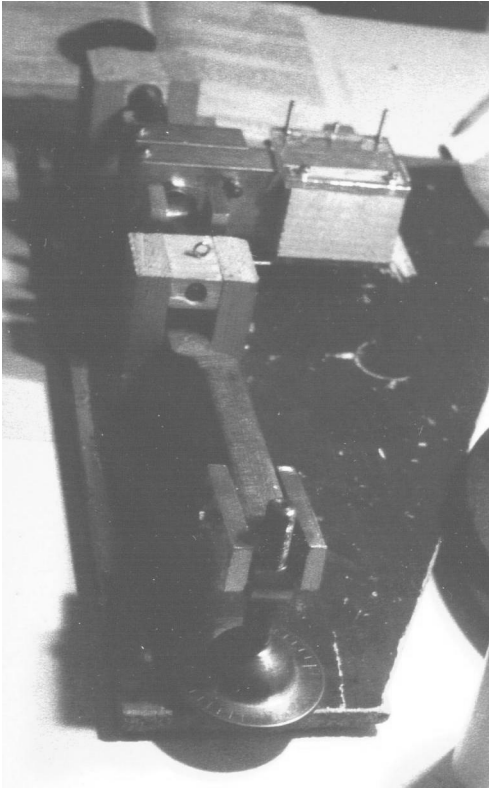


Foto XXXIV De schoef en de hefboom van het microtoom

10.1 speling

Het grootste probleem bij zelfbouw is wel de nauwkeurige verplaatsing in relatie tot de speling. Verplaatsingen van micrometers zijn op papier eenvoudig te realiseren. De speling verstoort alles evenwel, omdat die in de orde van tiende millimeters (honderden micrometers!) kan liggen. Een coupe moet ca. 10 micrometer worden, maar bij een speling in die grootte-orde kan alles onbeweeglijk worden en veel te gevoelig voor temperatuur-invloeden.

Het probleem is op te lossen door de onderdelen tegen elkaar aan te laten duwen, zodat er tijdens het snijden van één stukje weefsel geen afwijkingen optreden. In praktijk heb ik dit kunnen realiseren door een sterke veer in het ontwerp op te nemen. Dit maakte echter wel weer noodzakelijk dan de materialen veel sterker moesten zijn. "Sterke veer" is een relatief begrip. Het ging zeker niet om een ballpointveertje, maar ook niet om een veer uit een springstok of luchtdrukpistool. Een veer die met de blote hand in te drukken is (zonder verwondingen) is geschikt.

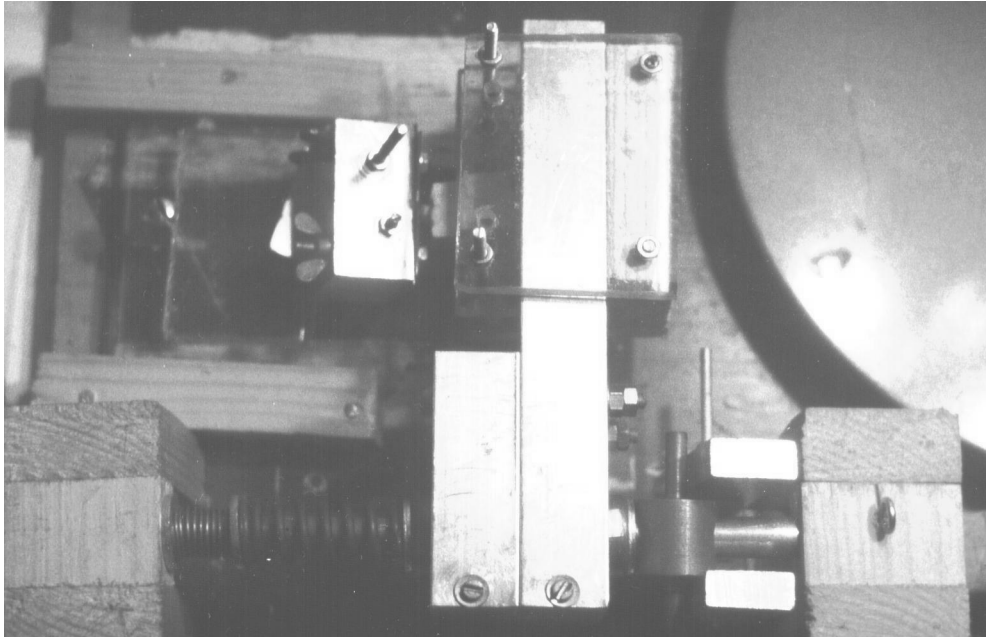


Foto XXXV Detailopname van de arm met paraffineblokje, aandrukveren en mes

10.2 gelijkmatige beweging

Er is echter nog een ander hinderlijk probleem. Ondanks het feit dat een constructie in kleine stapjes zou moeten bewegen, komt het voor dat de beweging wordt "opgespaard". In plaats van vijf kleine stapjes gebeurt er vier keer niets en de vijfde keer wordt een grote stap genomen. Veelal is er sprake van drempels, die pas genomen kunnen worden als er voldoende druk is opgebouwd. Door bewegende onderdelen zeer glad te maken - zowel door polijsten als door smeermiddelen - kan dit voorkomen worden. Een glad oppervlak zorgt ervoor dat een bewegend onderdeel niet blijft haken. Smeermiddelen verlagen de wrijving, waardoor een beweging gemakkelijker op gang komt.

10.3 nauwkeurigheid

De nauwkeurigheid is al eerder aan de orde geweest. Er kan op twee manieren naar gekeken worden: absoluut en relatief.

Bij een absolute nauwkeurigheid is een bepaalde stand van de instelschroef een bepaalde positie van het weefsel ten opzichte van het mes. Dat geldt vandaag en morgen en volgende week. Dit vraagt veel van het ontwerp, maar nog veel meer van degene die bouwt. Er zijn ook dure hulpmiddelen voor nodig.

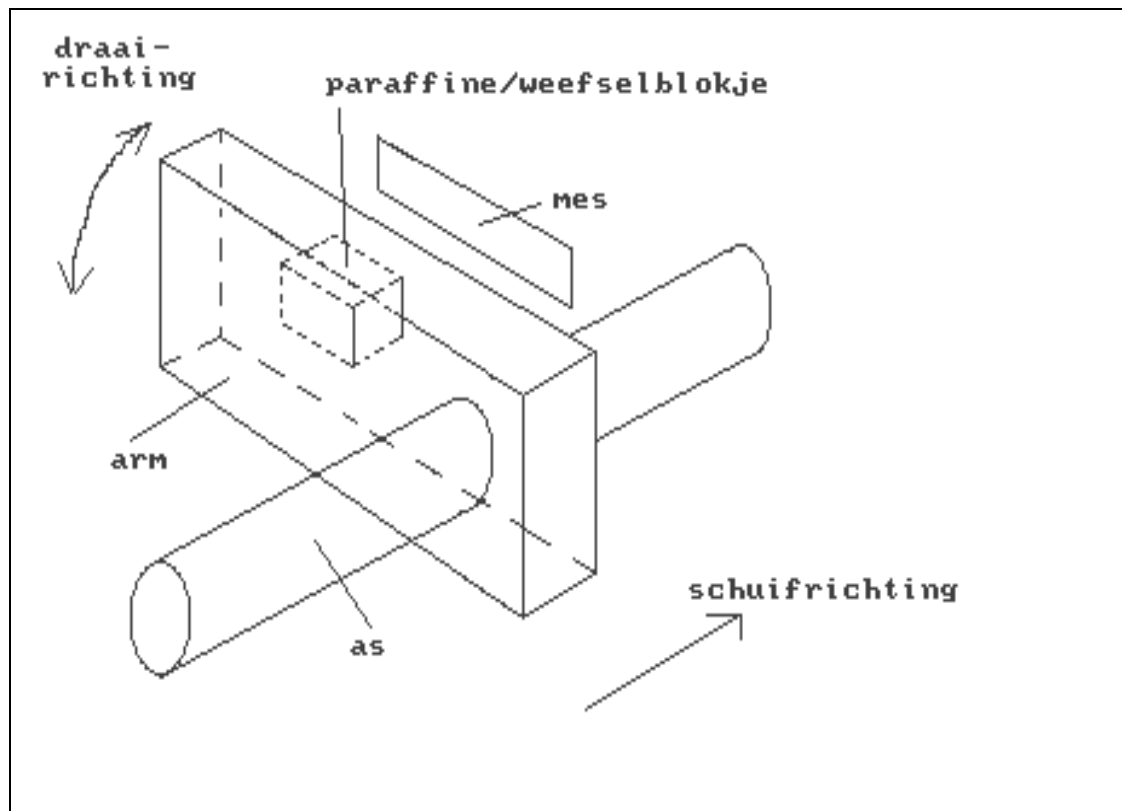
Relatieve nauwkeurigheid is iets anders. Op een bepaald moment wordt er een instelling gekozen en over een kleine afstand, gedurende een korte periode zijn de onderlinge posities bereikbaar door bepaalde instellingen van de stelschroef. Bij een volgend blokje weefsel kan dit anders zijn, morgen kan het anders zijn en een millimeter verder is het misschien ook al anders. Zolang een dergelijke relatieve nauwkeurigheid haalbaar is, kunt u tevreden zijn en er gebruik van maken.

Een dergelijke werkwijze is overigens heel gangbaar. Er zijn veel apparaten die voortdurend (soms per minuut, soms dagelijks) afgeregeld moeten worden voor een nulwaarde. Het is ook een goed gebruik om bij metingen aan bepaalde stoffen, ter controle metingen zonder de stof te doen. Dit om er zeker van te zijn dat de gemeten waarde iets betekent. Het gaat hier bij dit microtoom bovendien niet om onderzoek, maar om (hulp)techniek en dan zijn er al helemaal geen problemen. Niemand hoeft het later precies na te kunnen doen.

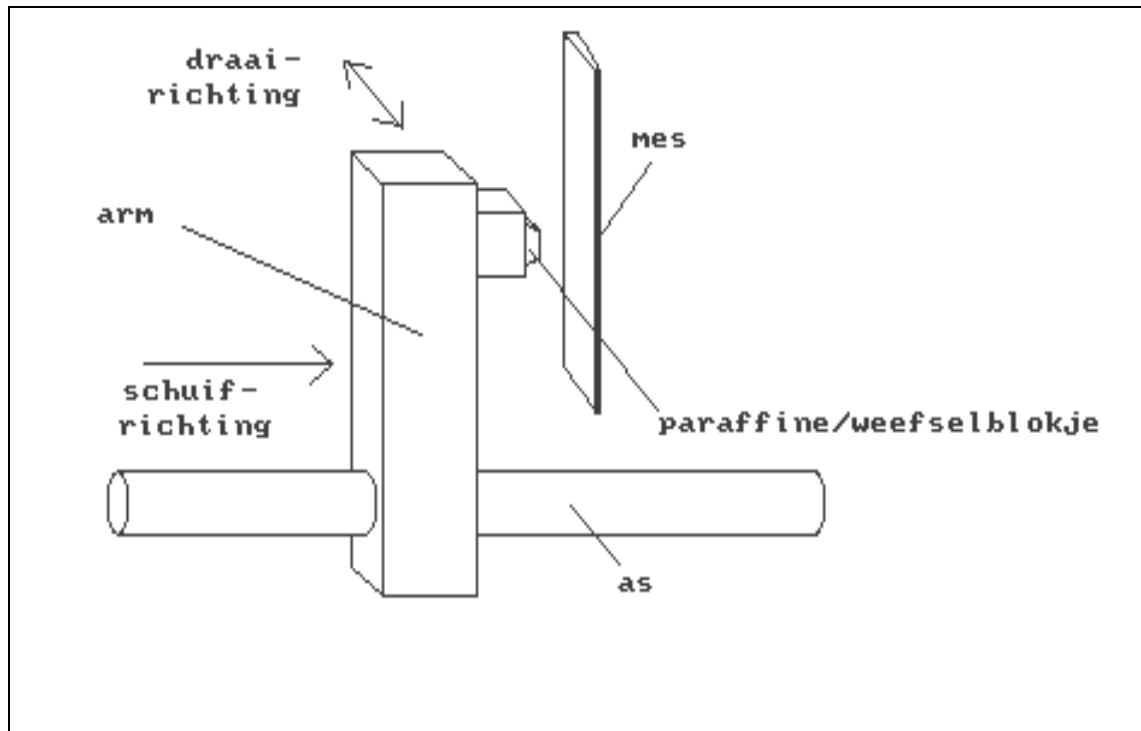
10.4 Het principe

Bij een origineel microtoom wordt het paraffineblokje met weefsel van boven naar onder bewogen, vlak bij een mes. Zodra de voorzijde van het blokje iets over de rand van het mes uitsteekt, zal bij de eerstvolgende beweging het overstekende stuk afgesneden worden en als een plakje (coupe) aan het mes blijven zitten of eraf vallen. Bij een kaasmes wordt de juiste dikte verkregen doordat er een soort steunplaat of het kaasoppervlak ligt, die ervoor zorgt dat het mes niets steeds verder de kaas in wordt getrokken. Hier is er geen steuntje. Alleen de onderlinge positie van mes en blok bepalen de dikte van een coupe.

De op en neer gaande beweging is lastig. Het vereist een heel secuur soort slede. Het is gemakkelijker om uit te gaan van een arm, die om een as draait. Het blokje weefsel in paraffine wordt aan het uiteinde bevestigd en passeert bij een zwaai het mes. Door de arm op te schuiven kunnen er coupes worden gesneden. Een nadeel van deze benadering is dat de speling versterkt wordt. Als de arm slechts één micrometer speling om de as heeft (en de arm moet wel kunnen schuiven en draaien!) dan kan het uiteinde van de arm wel tien keer zoveel speling krijgen. Dit hangt vooral af van de verhouding tussen de basis (het stuk dat om de as zit) en de lengte van de arm.

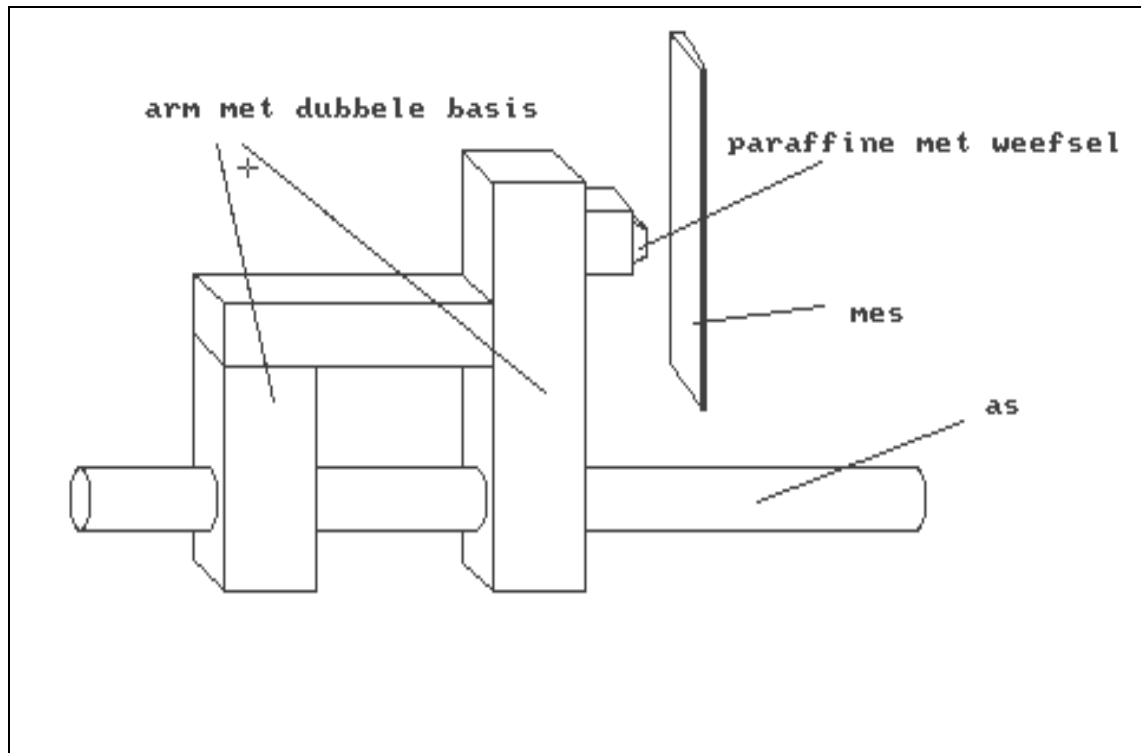


Figuur 18 De beweging van het weefsel langs het mes



Figuur 19 Bovenanzicht van de arm

Het probleem kan sterk verkleind worden door de basis groter te maken en de arm zo kort mogelijk. Op de eerste afbeeldingen wordt een enkele arm getoond die om een as draait. Wordt er echter een tweede steun-arm vastgemaakt op enige afstand van de echte arm, dan verbreedt deze de basis. Uiteraard moet de steun-arm meedraaien om de as. (Zie figuur 20).



Figuur 20 Reductie van speling: bredere basis

10.5 Verschuiving

Uiteindelijk is het de bedoeling de arm over een heel kleine afstand op te schuiven, naar het mes toe. Nu kan dit het beste gedaan worden mbv. een schroef. We kiezen echter niet voor een horizontale schroef, die rechtstreeks de arm verschuift. Dat zou een weinig realistische constructie opleveren. De minimale verdraaiing moet toch minstens 18 graden zijn (één-twintigste omwenteling). Bij een spoed van één mm. zou dit neerkomen op 50 micrometer. Dat is bijzonder veel.

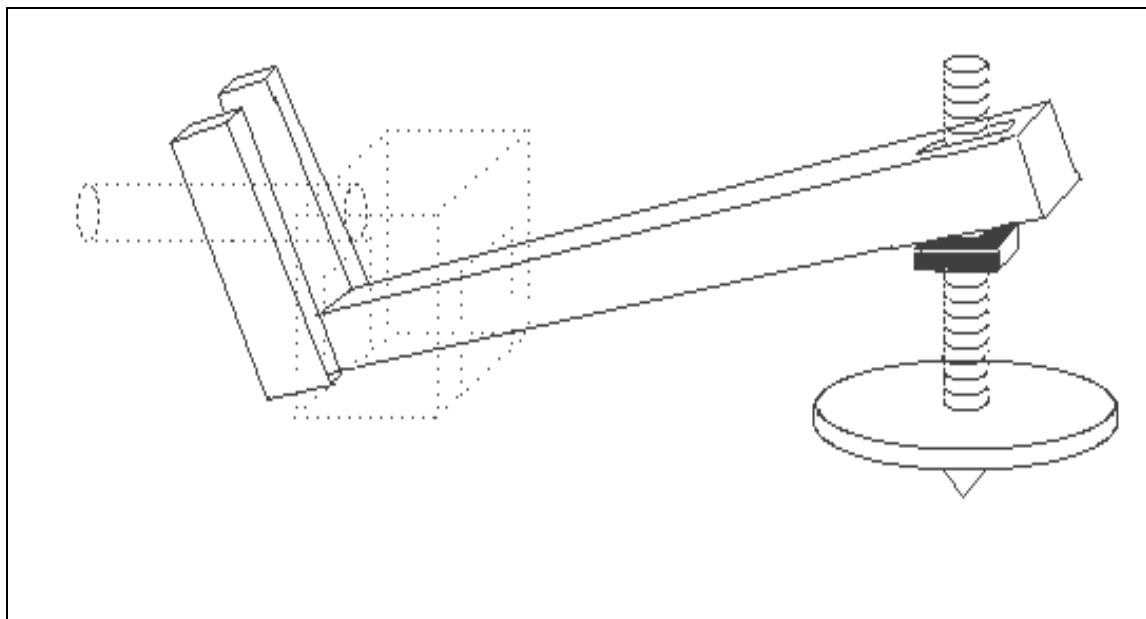
Daarom is een verticale schroef met een hefboom een geschikter benadering. Als de hefboom aan de schroefkant vijf- tot tienmaal zo lang is als aan de kant die de snij-arm verschuift, levert dit met dezelfde spoed en draaihoek 10 micrometer of minder op. Als er een redelijk grote schijf aan de schroef wordt bevestigd en een zo klein mogelijke spoed wordt genomen, is zelfs een kleinere verschuiving denkbaar.

De hefboom kan niet zonder meer tegen de arm duwen. Daarom moet er een tussenblokje worden toegepast, waarop de hefboom aan kan grijpen en dat zelf weer tegen de arm duwt. De hefboom kan het beste een vork krijgen, die om de as van de arm grijpt. Het blokje wordt dan door beide vorkpunten weggeduwd.

10.6 Integratie

Het beeld begint nu completer te worden:

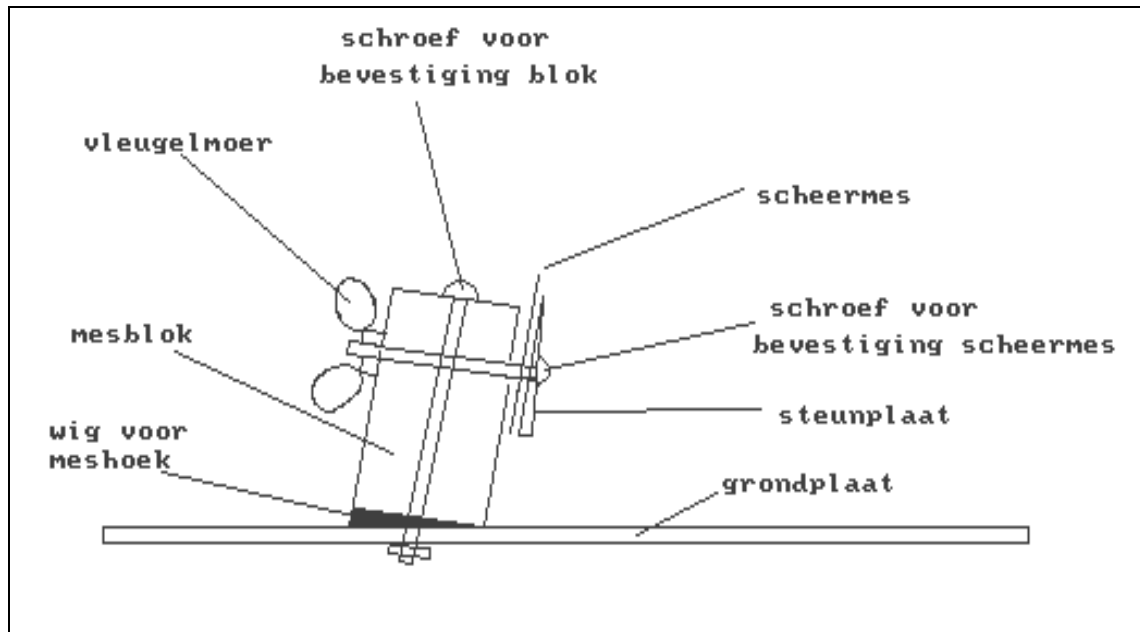
Er is een arm met een weefselblokje, die om een as draait, waarbij het blokje langs een mes scheert. De arm wordt weggeduwd van het mes door een tamelijk sterke veer. Een tussenblokje duwt de arm juist naar het mes toe en dit tussenblokje wordt verplaatst door de vorkpunten van een hefboom, die weer door een schroef wordt opgetild. De hefboom is dus aan beide zijden een vork. Aan de ene zijde drukt de vork een schuifblokje weg dat tegen de arm drukt. Aan de andere zijde wordt de hefboom opgetild door een soort moer met uitsteeksels waarop ook een vork rust. Bij het verdraaien van de schroef schuift de moer een stukje op. De schroef moet in een kuil of ring staan, zodat deze in dezelfde positie blijft. De onderzijde van de schroef moet het liefst een punt hebben, zodat het geheel secuur kan verdraaien zonder verstorende verschuivingen.



Figuur 21 De hefboom

10.7 Het mes

Het mes is al in het eerste deel besproken. Scheermesjes zijn scherp, maar slap. Voor voldoende ondersteuning moet het worden afgedekt door een stevige plaat, zó dat er maar een klein randje overblijft. Het weefsel mag uiteraard niet de steunplaat raken, dus moet deze schuin geslepen zijn in een soort wigvorm. Plaats en scheermes kunnen weer aan een steunblok worden bevestigd met twee schroeven met vleugelmoeren. Dit steunblok kan het best vast gemonteerd worden, onder een optimale hoek. Het blok kan met een lange schroef die dwars door het blok heenloopt aan de ondergrond worden verankerd. Door bepaalde wiggen tussen blok en ondergrond te plaatsen kan de hoek evt. gevarieerd worden in het experimentele stadium. Uiteraard moeten de verticale schroeven die het blok vasthouden niet in botsing komen met de schroeven die de steunplaat op het mes klemmen.



Figuur 22 Dwarsdoorsnede van het mesblok

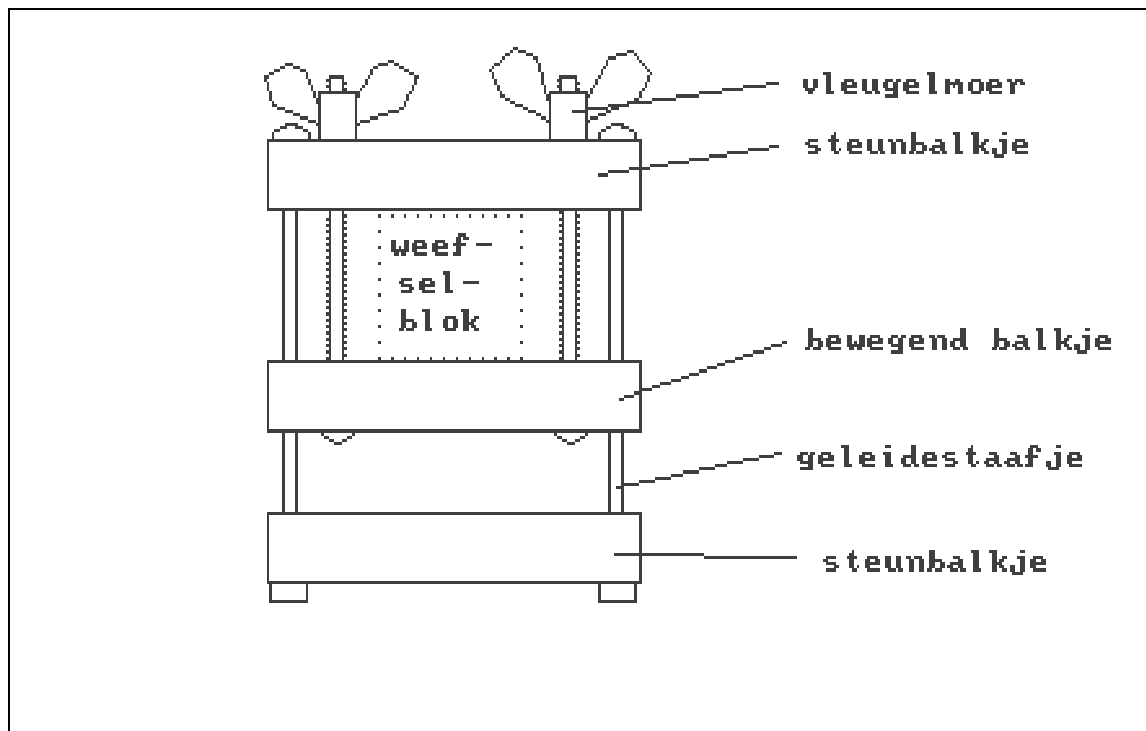
10.8 Klem voor weefselblokjes

Eén onderdeel van het zelf te bouwen microtoom is nog niet besproken. Het gaat dan om de klem aan de bewegende arm, waarin een blokje wordt vastgezet. Niet het meest ingewikkelde onderdeel, maar wel essentieel. In deel 1 is al gesteld dat het monteren op een houten blokje aan te raden is, ivm. de krachten die op het blokje komen te staan. Het probleem van de klem is op meerdere manieren op te lossen. Belangrijk is echter dat een vastgeklemd blokje niet meer mag bewegen of verschuiven. En dat is niet voldoende, want de klemconstructie zelf mag ook niet beweeglijk zijn. U kunt in een bankschroef iets muurvast klem zetten, maar als de bankschroef zelf niet goed aan het werkblad vast zit haalt dat niets uit.

Een oplossing die dit zeker garandeert houdt het volgende in:

Er worden drie balkjes gemaakt van enkele cm lang en met een breedte en dikte van ca 1 cm. Twee worden bevestigd op een plankje (de arm). Er worden twee lange pennen door de balkjes gezet. Het derde balkje kan vrij over de pennen heen en weer bewegen. Het heeft iets grotere gaten en het zit niet vast.

Iets binnen de pennen komen twee schroeven, die echter alleen door één van de vaste balkjes en door het bewegende balkje gaan. Door deze schroeven met vleugelmoeren aan te draaien schuift het losse balkje naar het ene vaste. Zo is een klem gevormd.



Figuur 23 De klem voor het weefselblok

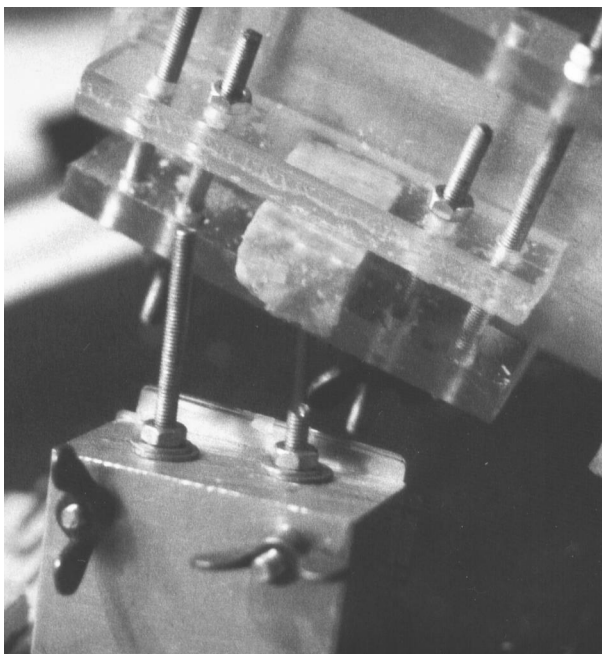


Foto XXXVI Detail van het mes en het blokje met weefsel

10.9 Materialen

Nu alle onderdelen beschreven zijn, moet nog worden aangegeven welke materialen geschikt zijn. In praktijk vallen de eisen mee. Uiteraard moeten sommige delen van metaal zijn, maar dat kunnen materialen gebruikt worden die standaard te koop zijn. Op veel plaatsen is stevig hout echter geschikt. Hardhout, zoals eiken of beuken is dan aan te bevelen. Afvalstukjes van tropisch hardhout, zoals meranti, zijn ook eenvoudig te bemachtigen. Voor de basis van het gehele apparaat kan het beste weinig vervormend materiaal worden genomen. Dus eerder een dikke plaat geplastificeerd spaanplaat of MDF dan een dunne metaalplaat. Een dikke metaalplaat is natuurlijk niet verboden, maar zal erg zwaar zijn.

10.9.1 De as met veer

We beginnen met de as waarlangs de arm schuift en waar deze bovendien om roteert. Het zal duidelijk zijn dat deze as stevig en glad moet zijn. Hout komt hier niet in aanmerking, vanwege de slijtage en vaak de ruwheid (ook na schaven en polijsten). Neem een zuiver ronde staaf van staal of roestvrij staal. Overweeg eventueel een zeer grote spijker (ca. 20 cm.). Hoe dikker de staaf hoe beter het is. Uiteraard met zekere grenzen, in verband met de hanteerbaarheid. Eén tot drie cm. is wel werkbaar. Een dikke buis kan ook worden toegepast, mits deze niet in het minst gebogen is. Polijsten kan met speciaal polijstpoeder worden gedaan, maar met olie en krijtpoeder lukt het ook. De staaf wordt tussen een soort poortjes geplaatst en vastgezet in de bovenzijde. Deze poortjes mogen gerust van hout zijn, evenals de arm. De constructie moet stevig zijn, omdat de spiraalveer de stellage onder druk zet.

Zorg overigens dat de spiraalveer aan beide zijden wordt afgesloten met geoliede geperforeerde schijven, zodat de draaiing van de arm niet wordt gehinderd. Aan de kant van het houten poortje dient de ijzeren schijf als steun. Aan de kant van de arm zorgt de metalen schijf voor het soepel laten passeren van het buslager (zie hieronder) langs de veer. Neem liefst meerdere schijven en schuif die tegen elkaar op de as, tussen veer en arm.

10.9.2 Buslager, arm en aandrukblokje

Er zal een buslager (een buisje dat er nauw omheen past) moeten worden gevonden. Dit buslager kan beter iets zachter zijn dan de staaf. Brons, messing of (vliegtuig)aluminium is geschikt. Het zachtste materiaal van twee die over elkaar wrijven slijt het snelst. En het onderdeel dat het eenvoudigst te vervangen is (of het goedkoopst is), mag meer slijten dan het andere. Het buslager moet wel goed in de arm worden vastgezet met bv. harde lijm (niet rubberachtig!). Er is al aangegeven dat de arm van hout gemaakt kan worden. In dat geval is een buslager echt onmisbaar. Als de bus iets buiten de arm uitsteekt kan deze ook de druk op zich nemen van het blokje dat de verplaatsing van de arm door de hefboom regelt. Dat blokje kan overigens ook het best van metaal worden gemaakt. Aangezien het redelijk stabiel tussen de vork van de hefboom moet vallen en om de as moet passen, kan het middendeel het beste vrij dik zijn. De twee staafjes die weggeduwd worden door de hefboomvork zijn dunner (waar wel stevig) en rond. Bij een dubbele basis voor de arm zijn uiteraard twee buslagers nodig, die bovendien heel secuur in één lijn moeten staan. In het algemeen is het raadzaam om bij het verwerken van hout een combinatie van lijm en schroeven te gebruiken. Dit geeft

stevige constructies. Het is ook mogelijk om de arm van een holle aluminium balk te maken. Dergelijke buizen met een rechthoekige doorsnee (ca. 4 x 2 cm) zijn gewoon bij een ijzerwinkel te koop. Het monteren van de buslagers blijft noodzakelijk. De dunne aluminium wanden (ca. 1.5 mm) zullen namelijk snel slijten. Ook in dit geval kan een lager worden vastgelijmd, bv. met twee-componentenlijm. Mocht u de arm van metaal maken, bv. een massief aluminium of messing staaf, dan kunt u het eventueel zonder lagerbussen stellen. De gaten waar de as doorheen zal gaan moeten dan wel uiterst nauwkeurig en in lijn geboord worden. De klem voor het weefselblokje kan van hout, metaal of kunststof gemaakt worden.

10.9.3 Het mesblok

Het blok waaraan het scheermes wordt vastgemaakt kan eveneens van hout worden gemaakt, bv. een blokje eikenhout. Werk wel met ringetjes onder de moeren en schroefkoppen, om de kracht op het hout te beter te verdelen. De steunplaat moet uiteraard van metaal zijn, bv. een stuk dat uit een oud vleesmes wordt gezaagd. Aardappelmesjes zijn alleen te gebruiken als ze niet aan twee zijden afgeschuind zijn. Zorg dat de gaten voor de schroeven zó geboord worden dat ze door de openingen in het scheermes vallen zonder te wringen en het dekplaatje vlak onder de rand van het mes laten eindigen.

10.9.4 De schroef

De onderdelen die nog niet genoemd zijn, zijn de schroef en de hefboom. De schroef - uiteraard van hard metaal - moet ook vrij dik zijn, maar een heel kleine spoed hebben. Waarschijnlijk zult u er een moeten bestellen, want het is geen gangbaar produkt. Een spoed van minder dan 1 mm is prachtig, maar als u er niet aan kunt komen, neem dan genoeg met die ene millimeter en maak de hefboom wat langer. Bij ééntiende slag (100 micrometer) en een overdracht van 1 op 10 door de hefboom, komt de beweging toch neer op de gewenste 10 micrometer. Ga dus eerst naar de schroef zoeken (neem de beste!) en pas daar de rest van het ontwerp op aan. Vergeet overigens niet meteen de moer erbij te kopen. Hoe groter de moer, hoe meer bewerkingen er nog mogelijk zijn. Het uiteinde van de hefboom moet er namelijk stevig op rusten en dat kan enige aanpassingen vereisen. In ieder geval zullen er twee staafjes aan vast gemaakt moeten worden, om de vork te laten steunen.

Aan de voet van de schroef, iets boven de plaats waar de punt in een kuiltje staat, komt een schijf. Deze schijf dient ervoor om nauwkeurig te kunnen verdraaien. Dit onderdeel geeft alleen houvast. Mits het goed wordt bevestigd kan het van hout, kunststof of metaal zijn. Kras er eventueel een verdeling in, bv. in hoeken van 10° .

10.9.5 De hefboom

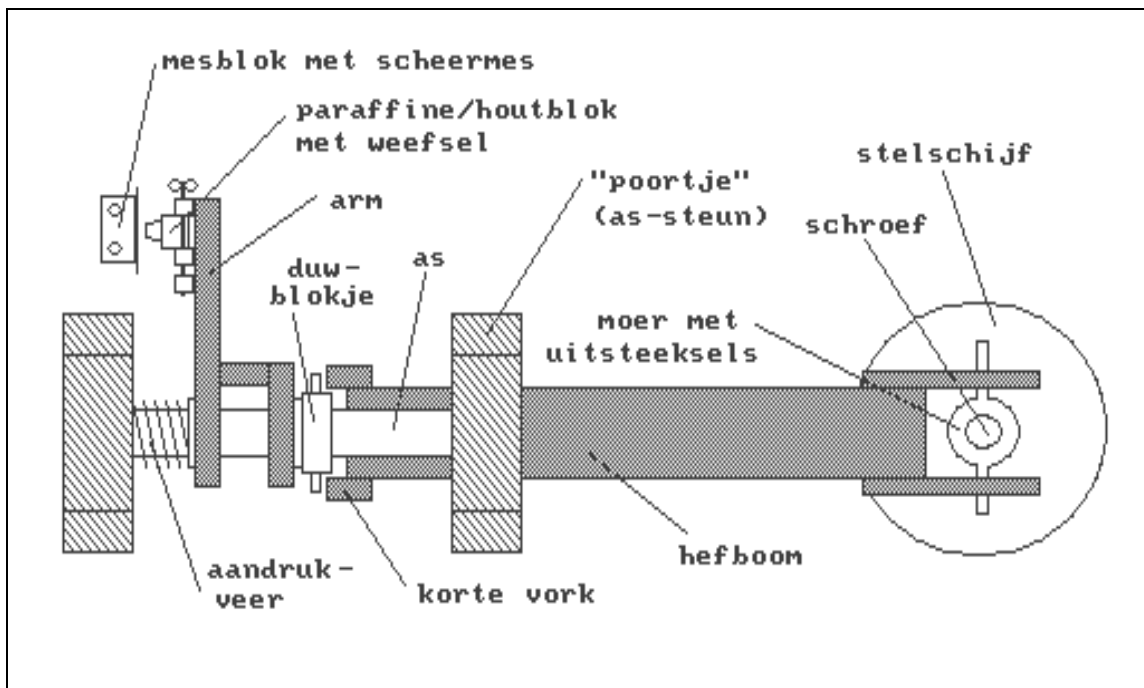
De hefboom is het laatste onderdeel van dit microtoom. Eigenlijk kan deze ook beter pas op het eind worden gemaakt. Het is namelijk het onderdeel dat aan moet sluiten bij de eigenschappen van de arm en de schroef. De hefboom kan allerlei knelpunten die zijn ontstaan nog wegwerken. Om deze reden adviseer ik dan ook de kern van de hefboom (niet de beide vorken) van hout te maken. Ook hier is weer stevig, taai hout vereist, want er komen grote krachten op de hefboom te staan. Met name de korte kan wordt door de drukveer belast. Om de hefboom helemaal op maat te maken voor het reeds voltooide deel van de constructie kan er

nog heel wat zaag-, schaaf-, rasp- en schuurwerk nodig zijn. Het voordeel van hout is duidelijk. Hout is met eenvoudiger middelen te bewerken en het is bovendien gemakkelijker.

Aangezien de beide vorken veel bijdragen aan de beweging en derhalve aan de nauwkeurigheid, kunnen deze onderdelen het best van metaal worden gekozen. De schuiven over andere metalen onderdelen (de moer en het duwblokje voor de arm).

Dit geeft heel wat slijtage, dus slijtvast metaal - bv. staal - is wenselijk. Bij een slimme constructie van de hefboom kan het draaipunt worden gevormd door een pen die door het voorste poortje loopt. Zo is meteen een stabiele constructie tov. de as gegarandeerd.

Met een laatste tekening van het microtoom wordt het totaal hopelijk duidelijk. Voor iets meer inzicht kunnen de foto's nog worden geraadpleegd.



Figuur 24 Boven aanzicht van het microtoom

11 De microscoop

Veel boeken over histologie kunnen een hoofdstuk over de microscoop niet achterwege laten. Eerlijk gezegd waren er in een eerdere versie van dit boek ook enkele pagina's aan de microscoop gewijd. Bij het herzien heb ik het meeste eruit gelaten, behalve enkele zaken die van belang zijn voor het opsporen van fouten. Daarnaast is het van belang voor de zelfbouw van een micrometer en een donkerveldbelichting de microscoop enigszins te begrijpen. Belangrijk is in ieder geval dat niet de vergroting, maar het zg. oplossend vermogen van de microscoop telt. Vaak wordt er bij kleine microscoopjes vermeld dat 750x haalbaar is. Dat klopt, maar er staat niet bij dat alle details dan wegvallen. Het is zoiets als een zeer groot venster in een kamer laten aanbrengen tbv. het uitzicht, maar er dan matglas in plaatsen. Een groot raam, dat is waar!

Het is beter een goede eenvoudige tweedehands microscoop aan te schaffen, zonder veel snuffjes. Hieronder zullen enkele onderdelen en hun functie worden besproken.

11.1 De onderdelen

- Lamp: Deze kan een onderdeel van de microscoop zijn. Op zich handig. Is er geen vaste lamp, dan is een spiegel noodzakelijk. Beide onderdelen zorgen voor licht dat door het preparaat wordt gestuurd. De lamp is vaak voorzien van matglas voor een gelijkmatige belichting (verdoezelen van de gloeidraad).
- Lampdiafragma: Bekend van fototoestellen. Het kan de lichtbundel van de lamp breder en smaller maken. Dit voorkomt reflecties en "overstralen". Kan gemist worden.
- Condensor: Een lenzenstelsel dat het licht op zo gunstig mogelijke wijze op het preparaat laat vallen. Duur en niet direct noodzakelijk.
- Apertuurdiafragma: Een tweede diafragma, dat in feite de scherptediepte regelt. Wordt veel misbruikt om de lichtsterkte te variëren. Voor het maken van een eigen donkerveldbelichting wel noodzakelijk.
- (Kruis)tafel: Een microscoop heeft een tafel. Dat is het plateau waar het preparaat (vooral het objectglaasje) op komt te liggen. Bij een kruistafel zijn er stelschroeven aanwezig waarmee de horizontale en verticale beweging geregeld kunnen worden. Heel handig, maar duur en niet direct noodzakelijk. Een gewone tafel is noodzakelijk.
- Objectief: Het meest essentiële onderdeel van een microscoop. Het vergroot het beeld en daar gaat het om. Hoe sterker de vergroting (bij goede beeldkwaliteit) hoe duurder het objectief. In principe volstaat een set van 10 x en 40 x.
- Revolver: Meerdere objectieven die naar keuze ingeschakeld kunnen worden zijn op een soort draaischijf gemonteerd die "revolver" wordt genoemd.
- Tubus: De buis boven het objectief naar het "oculair".
- Oculair: Dit is noodzakelijk om het beeld van het objectief te kunnen bekijken. Het is wat minder kostbaar. 7x, 10x of 15x zijn gangbare sterkten. Neem als beginner geen wide-field oculair. Bij fotografie is het beeld bovendien kleiner. Let bij de keuze op kwaliteit en prijs. De combinatie van objectief en oculair bepalen de vergroting. 7x oculair en 10x objectief geven 70x, terwijl 15x oculair en 40x objectief samen 600x opleveren. 10x is wel een mooie tussenmaat.

11.2 Scherpstellen

Om een preparaat goed te kunnen zien moet het objectief op de juiste afstand van het preparaat staan. Hierin lijkt een microscoop wat op een fototoestel. Alleen staat bij een fototoestel de afstand tot het onderwerp vast, zodat de afstand van de lens tot de film wordt aangepast. Hier is het zo dat juist het onderwerp (het preparaat) dichterbij en verderweg wordt gebracht. Dit gebeurt door de tafel mbv. een stelschroef op te tillen of te laten zakken en bij andere microscopen door de tubus (kijkbuis met objectief en oculair) op en neer te bewegen met zo' stelschroef.

Hierin schuilt een zeker gevaar. Als u de verkeerde kant opdraait, duwt het objectief door het glas van het preparaat heen. Einde preparaat. Sommige microscopen kunnen "op slot". Dwz. dat het objectief minstens een bepaalde afstand moet houden (bv. 0.5 mm). Dit is zeker de moeite waard.

Heeft u geen slot, draai dan het objectief tot bijna op het preparaat (aan de zijkant kijken naar objectief en preparaat!). Daarna kijkt u door het oculair en draait het objectief en het preparaat van elkaar weg tot er een scherp beeld ontstaat.

De duurdere microscopen hebben doorgaans twee stelschroeven: een grove en een fijne. Wordt het beeld min of meer scherp, dan kan het met de andere schroef helemaal goed worden ingesteld.

11.3 Storingen bij het bestuderen van preparaten

Als u preparaten heeft vervaardigd wilt u weten of ze goed zijn. Soms lijkt het erop dat ze niet deugen. Er kunnen echter ook storingen zijn die door de microscoop veroorzaakt worden. Daarvan zullen we hier enkele bespreken. Uiteraard wordt aangegeven hoe eea. te verhelpen is.

11.3.1 Vreemde structuren

- Het eerste wat u moet doen is het preparaat heen en weer bewegen. Gaan de structuren met het preparaat mee, dan kan het vuil zijn of er is iets misgegaan bij het insluiten of zelfs eerder. Maak met wat ontkleurde spiritus en een tissue of WC-papiertje de boven en onderzijde van het preparaat schoon. Kijk dan opnieuw of er verbetering is.

- Licht het niet aan het preparaat (dwz. verschuiven heeft geen invloed), dan komt de volgende mogelijkheid in beeld: het oculair. Het oculair kan vuil worden door gebruik, of doordat het een tijd apart heeft gestaan. Door het rond te draaien is meteen te zien of de storingen meedraaien. Is dat het geval, dan neemt u het oculair uit de tubus - dat behoort namelijk te kunnen. Reinig de bovenste en de onderste lens met speciaal lenstissue, dat niet pluist. Gewoon tissue kan ook, maar dan moet u met een penseel of blaasborsteltje even navenen. Blijven de vreemde structuren zichtbaar en draaien ze nog steeds mee, dan zit het vuil binnen in het oculair en zal het voor reiniging opengemaakt moeten worden. Veelal is het mogelijk het plaatje aan de oogzijde los te schroeven.

- Als preparaat en oculair niet de oorzaak zijn, kan het objectief de oorzaak zijn. Door voorzichtig het objectief een beetje te verdraaien, alsof u een ander objectief wilt kiezen, kunt u het beeld bewegen. Het ronde preparaatbeeld lijkt weg te draaien, maar de vraag is of de vreemde structuren met het preparaat mee bewegen of niet. Zo niet, dan kan het objectief verontreinigd zijn. Het gaat dan vrijwel zeker om de buitenzijde. Wrijf met lenspapier of een sigarettenvloetje (ongegomd rijstpapier) met xyleen langs de buitenste lens. Na olieimmersie moet de lens altijd goed worden gereinigd. Het kan altijd voorkomen dat het objectief per ongeluk in

aanraking is geweest met iets.

- Soms zijn er korrelige structuren in een preparaat te zien, die zelfs zichtbaar blijven als het preparaat wordt weggehaald. Het komt zelfs voor dat er bij lagere vergroting Philips, Osram oid. staat. In dat geval geeft de condensor een scherp beeld van het matglas of van de lamp. Zonder condensor treden dergelijke vreemde effecten normaal niet op. Door de condensor iets anders in te stellen verdwijnen de structuren doorgaans.

Blijken de structuren niet mee te bewegen met het preparaat en worden ze ook niet door de condensor veroorzaakt (bijvoorbeeld doordat u er geen heeft), dan

11.3.2 Mistig beeld

Vooraf na enige tijd kijken naar een preparaat kan het beeld mistig lijken. In de meeste gevallen zal er sprake zijn van het beslaan van objectief of oculair. Dit zal zelfs heel duidelijk het geval zijn als de microscoop in een koudere ruimte heeft gestaan. Het duurt heel lang voor de lenzen opgewarmd zijn, dus bewaar het apparaat liefst in een verwarmde omgeving. Het beslaan treedt bij een koude microscoop iedere keer weer op.

Insmeren met allerlei middeltjes kan een nadelig effect hebben. Informeer eventueel bij uw opticien. Wat voor een bril goed is hoeft niet goed te zijn voor een microscoop.

Behalve beslaan kan er ook sprake zijn van traanvocht of huidsmeer dat op de lens is gekomen.

11.3.3 Scherpstellen onmogelijk

Het kan voorkomen dat het scherpstellen van een preparaat niet mogelijk is. Hoe dicht het objectief naar het preparaat gaat hoe scherper het beeld, maar helemaal scherp wordt het niet. In dat geval is het blijkbaar zo dat voor een scherp beeld het objectief nog dicht bij het preparaat zou moeten komen, terwijl dit niet kan.

- Controleer in zo'n geval eerst of het objectglas niet ondersteboven ligt. Voel met uw nagel of het dekglas wel aan de kant van het objectief zit. Ga niet op het etiket af, want dat kan per ongeluk aan de verkeerde kant zitten.

- Licht het preparaat goed, dan is het denkbaar dat het preparaat te dik is. Het kan daarbij gaan om een klein stukje van het preparaat, dat het dekglas te hoog optilt. De rest van de coupes is dan niet meer voldoende dicht te benaderen voor een goed beeld. Om deze storing te voorkomen is er eerder al gesteld dat bij het insluiten de te dikke preparaten zonder aarzeling weggekrast moeten worden. Of zich zoiets heeft voorgedaan is nog enigszins te achterhalen door de zijkant van het preparaat te bekijken (met het blote oog). Licht het dekglasje schuin of hoog boven het objectglas, dan is dit misschien het geval. Het kan echter ook zo zijn dat er teveel insluitmiddel is gebruikt, waardoor het dekglas nodeloos hoog ligt. Om die reden moet na het afdekken met het gewicht van een potlood de overtollige canadabalsem worden "weggeperst". Als er sprake is van een te dikke coupe moet deze te herkennen zijn aan de donkerder kleur. Bij gelijke kleurtijd worden de dikke coupes nu eenmaal donkerder.

Is het preparaat echt te dik, dan kan het alleen nog op een lagere vergroting worden bekeken. Doet zicht dit probleem voortdurend voor, dan moet uw microscoop misschien worden nagekeken.

Een wat krom reddingsmiddel kan het verkleinen van het apertuurdiafragma zijn. Door het verhogen van de scherptediepte komt het weefsel misschien nog net binnen het scherptebereik. Er kunnen echter wel complicaties optreden, zoals het meervoudig verschijnen van lijnen (interferentie).

11.4 Donkerveldbelichting (incl. zelfbouw)

Normaal is het beeld van een lichtmicroscoop gebaseerd op lichtabsorptie. Daar waar het licht slecht wordt doorgelaten is een donker deel en daar waar het gemakkelijk passeert is het licht. Een sticker op het raam is in tegenlicht te zien doordat het raam het licht doorlaat en de sticker niet. Spatjes modder en vliegjes zijn ook nog te zien, maar stofjes niet. Dit komt doordat ze zo klein zijn dat ze "overstraald" worden. Het kleine gebiedje zonder licht is voor het oog niet te herkennen omdat er omheen overal wel licht is. Keren we het beeld om, met lichtende puntjes op een donkere achtergrond, dan zijn zeer kleine puntjes ineens wel goed te zien. Denk maar aan de sterrenhemel.

11.4.1 Het gebruik van donkerveldbelichting

Door tegemoet te komen aan deze eigenschap van het licht en het oog, kunnen heel kleine structuren ook zichtbaar worden gemaakt. In plaats van een volle belichting met absorptie door het preparaat, wordt het licht zo aangeboden dat het langs het objectief valt, waardoor het beeld zwart blijft. Alleen licht dat tegen iets opbotst en wordt verstrooid, komt in beeld. Zo ontstaan lichtende deeltjes op een zwarte achtergrond. Een dergelijke belichting wordt "donkerveld" genoemd en waarom is wel duidelijk.

Voor volledig verwerkte weefselcoupes zal een dergelijke belichting zelden worden ingezet. Het geeft een raar negatief beeld, dat wat kunstmatig aandoet.

Voor "verse" preparaten van stofjes, kristallen, spermatozoïden, emulsies etc. geeft het evenwel een enorme verbetering van het beeld.

11.4.2 Zelf donkerveld realiseren

Een dergelijke belichting is zelf te realiseren met weinig hulpmiddelen.

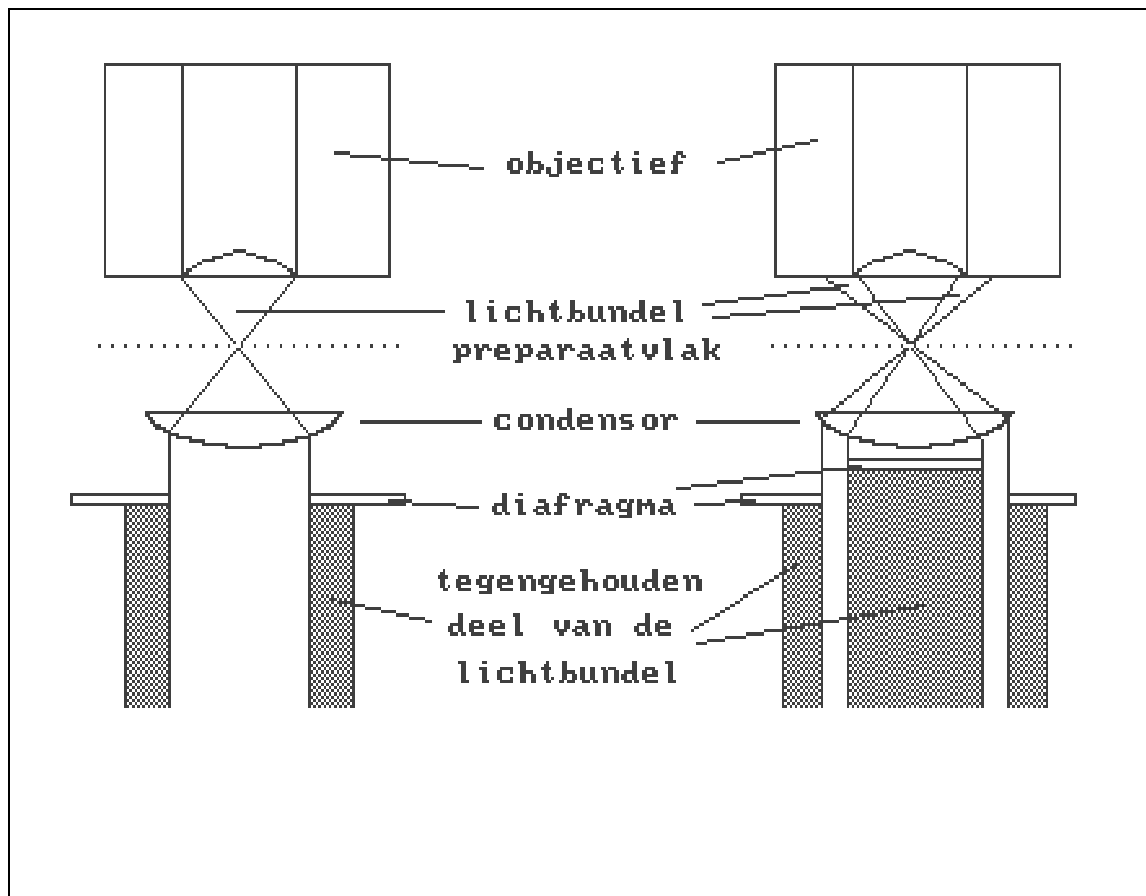
Voorwaarde is echter dat u over een condensor met apertuurdiafragma beschikt en liefst ook over een filterhouder. Normaal wordt het lampdiafragma zo ingesteld dat de lichtbundel niet groter is dan het objectief. Nu wordt het echter vol opengedraaid en wordt juist het gedeelte dat binnen het objectief zou vallen weggehaald.

Het opendraaien van het apertuurdiafragma (op de condensor, niet voor de lamp!) is noodzakelijk, evenals het openen van het lampdiafragma. Het weghalen van de binnenste lichtbundel gebeurt met een speciaal hulpmiddel, een zg. centraaldiafragma of centraalblende. Dit is een ondoorzichtig vlakje dat in de lichtbundel wordt gelegd. Alleen voor de niet al te sterke objectieven is een dergelijke benadering haalbaar. Van ca. 1 tot 10 x lukt het goed. Daarboven wordt het steeds moeilijker.

Zoek of maak allereerst een glaasje dat precies in de filterhouder past. Een tweede blauwfilter mag natuurlijk ook. Kunststof kan, maar als u een onderliggende lamp heeft kan het bij de filterhouder bijzonder heet worden. De kunststof moet dus niet gemakkelijk smelten.

De tweede stap is het opmeten van de grootte van het uit te filteren deel. Dit wordt gedaan door eerst scherp te stellen op een preparaat en dit weer te verwijderen. Daarna wordt met de condensor scherp gesteld op lampdiafragma of matglas. Heeft u een lampdiafragma, dan wordt dit zo ingesteld dat de randen nog juist in beeld zijn. De opening is dan de afmeting van het centraaldiafragma. Heeft u geen lampdiafragma, dan heeft u op het matglas scherp gesteld. Ga nu met een zeer scherp potlood bij het matglas het beeldvlak in. Zodra u de punt van het potlood in beeld krijgt zet u een streepje. Hetzelfde doet u aan de andere kant. De afstand van de streepjes is nu bij benadering de diameter van het donkere vlakje dat het centraaldiafragma moet vormen. Heeft u zelfs geen matglas, stel dan scherp op de lamp en bepoeder deze of beroet het glas licht met een kaars. Ga op dezelfde wijze te werk als bij het matglas. Het streepje zal een krasje in de poeder zijn. Bij objectieven met lage sterkte kan het vlakje ongeveer een dubbeltje zijn. Bij grotere sterkte kan het de doorsnede van een kleurpotlood hebben.

Maak van metaal of zwart karton zo'n schijfje en leg het op het plaatje in de filterhouder. Maak het eventueel met een héél klein stipje lijm tijdelijk vast. Draai het apertuurdiafragma geheel open en leg dan een schoon objectglaasje onder de microscoop waarop u heel weinig peper of talkpoeder heeft gestrooid. Draai de condensor op en neer en kijk of er een soort sterrenhemel verschijnt. Deze moet gelijkmatig zijn, zonder lichte randen. Blijft alles zwart, dan is het schijfje iets te groot of het apertuurdiafragma is niet wijd genoeg geopend. Blijft het beeld min of meer verlicht, dan is het schijfje te klein of het ligt volkomen naast de centrale bundel. Bij een gedeeltelijk donkerveld ligt het net iets uit het centrum. Corrigeer de plaats van het schijfje (draai de filterhouder helemaal in de bundel!). Als alles goed is kan het schijfje worden vastgelijmd.



Figuur 25 Gewone verlichting en donkerveld

11.5 Polarisatie (incl. zelfbouw)

Voor bepaalde weefsels kan polarisatie interessant zijn. Spierweefsel is bijvoorbeeld optisch actief. Voor het bestuderen van kristallen kan gepolariseerd licht ook zinvol zijn. Het principe van het gebruik van gepolariseerd licht is vrij eenvoudig samen te vatten. Lichtgolven worden gefilterd op bewegingsrichting door een polariserend filter. Als er nu een tweede filter wordt geplaatst dat filtert in een richting die loodrecht op de vorige staat, blijft er niets over. Het beeld wordt vrijwel zwart. Polaroid zonnebrillen werken met dit verschijnsel. Licht dat weerkaatst op het wegdek of motorkappen is vooral horizontaal gepolariseerd. De brillen filteren juist "verticale" lichtgolven uit. De schittering wordt zo onderschept.

Als er nu tussen het eerste en het tweede filter een zg. optisch actieve stof zit, zal de trillingsrichting van de lichtgolven veranderen. Daardoor staat deze niet meer loodrecht op het tweede filter. Tegen de verwachting in wordt er toch licht doorgelaten. Uiteraard alleen daar waar de actieve stof zit, zodat deze goed te zien is.

Om zelf zo iets in de microscoop te kunnen doen moet u een glas van polaroid zonnebril bemachtigen. Een ander merk polariserende glazen is ook goed. Soms zijn dergelijke brillen al voor een tientje te koop. Een aardig alternatief is een oud LCD-scherm, bv. van een oude rekenmachine (zie foto XXXVII). Ook deze bevatten een polariserende laag. Uit een enkel glas valt een filter te knippen of te figuurzagen, dat in de filterhouder past. Het restant is groot genoeg om een tweede filtertje te maken dat in het oculair gelegd kan worden. Het dekseltje van het oculair kan doorgaans opengeschroefd worden. Dit moet de diafragma-opening in het oculair bedekken en mag dus rechthoekig zijn (hoeken wel afronden). IJken is niet noodzakelijk. Als het grote filter in de houder ligt en de kleine in het oculair (of eventueel erop) is de opstelling gereed. Door het oculair te draaien draait het bovenste filter mee. Bij een bepaalde stand zal het beeld op z' n donkerst zijn. Als u nu een schoon objectglaasje met wat suikerkristallen bekijkt, zal opvallen dat deze kristallen veel helderder zijn dan de omgeving. Bij spierweefsel is een dergelijk effect ook te zien. Zie ok de foto's aan het einde van Deel I

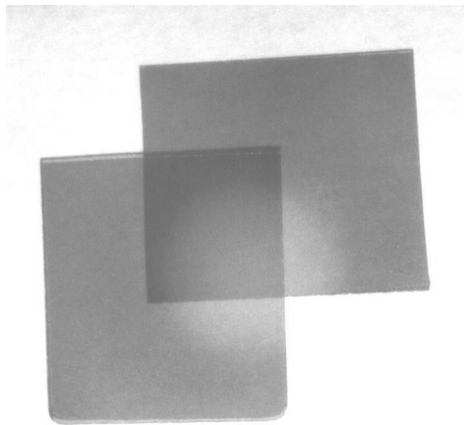


Foto XXXVII Twee plaatjes polaroid onder een hoek van 90 graden

11.6 Oculairmicrometer (incl. zelfbouw)

Een oculairmicrometer is een handig hulpmiddel bij de microscopie. Bij allerlei vergrotingen is het heel moeilijk om te schatten hoe groot bepaalde structuren nu gezien worden. Met een oculairmicrometer kunnen ze onderling vergeleken worden en in absolute eenheden worden beschreven. In feite is een oculairmicrometer een soort liniaal die door het beeld heen zichtbaar is. Als u er een koopt krijgt u een soort rond glasplaatje met kleine streepjes, waarvoor u al gauw honderd gulden kwijt bent. Het is evenwel eenvoudig om zelf een dergelijk hulpmiddel te vervaardigen. Het enige dat u hoeft te doen is een nauwkeurige schaalverdeling op een vel papier tekenen.

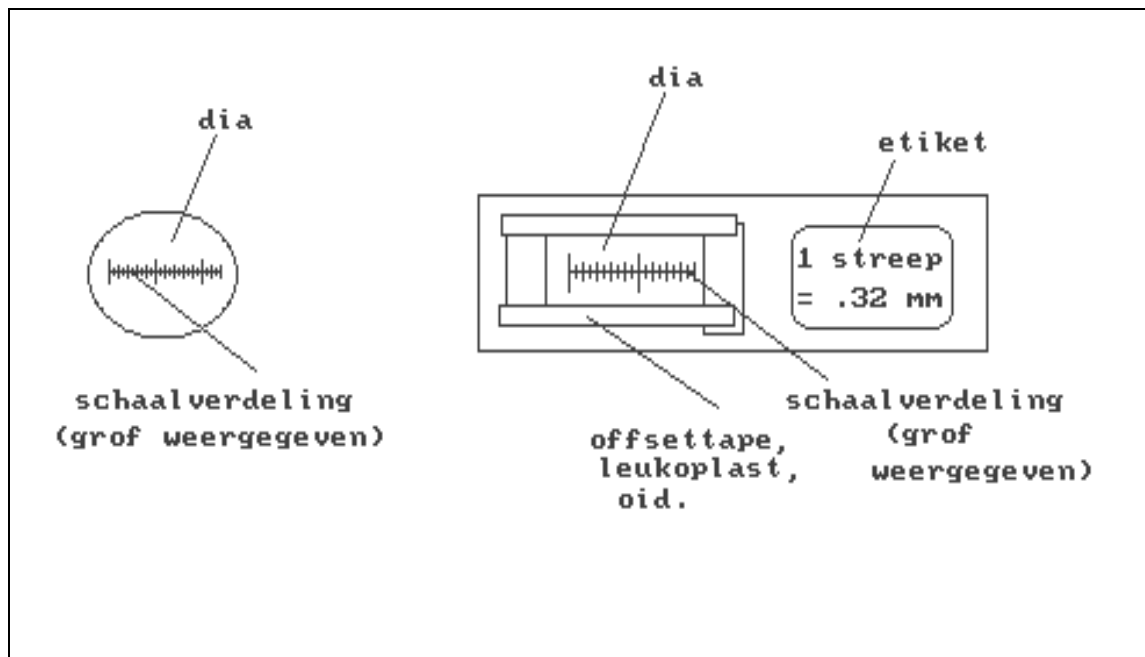
Neem een groot wit vel papier (A3 of A2) en teken een lijn van ca. 30 cm. Op de halve centimeters komen dan kleine dwarsstreepjes. De hele centimeters worden met wat grotere streepjes aangeduid en op de vijftallen komen grote strepen. Maak vervolgens minstens twee dia's van dit vel. Zorg ervoor dat het vel het gehele beeld vult en belicht liever te lang dan te kort. Mocht u alleen foto's maken en geen diarolletje willen spenderen aan deze micrometer, teken dan een schaalverdeling met witte inkt op zwart papier en belicht aan de korte kant. U kunt het negatief dan verder gebruiken. Misschien is het handig om cijfers bij de schaal te plaatsen, om later niet in een oerwoud van streepjes te verdwalen. Maak deze cijfers dan niet te klein. Zelf heb ik dit niet geprobeerd.

Heeft u de dia's in handen, kijk dan of een ervan het helderst is (dwz. het doorzichtgst). Knip deze ongeveer zo groot als een stuiver uit om de dia binnen in het oculair te laten passen. Net als bij de polarimeter moet u het oculair openschroeven, door het bovenste plaatje te draaien. Als u het oculair weer dicht heeft gedraaid moet er bij het kijken naar een preparaat een soort liniaal scherp in beeld zijn. Dit is de eigenlijke oculairmicrometer die u voortaan kunt gebruiken. Om te weten welke afstand de streepjes hebben moet de micrometer eerst nog geijkt worden. Dit wordt gedaan met een hulpmicrometer.

De tweede dia legt u daarom op een vel wit papier. Met een gewone liniaal meet u over een zo groot mogelijk deel van de schaalverdeling de werkelijke afstand in millimeters. Door tellen en terugrekenen weet u dan de werkelijke afstand van een stel maatstreepjes. Om dit heel secuur te kunnen doen, legt u het midden van de nulstreep van de liniaal op het eerste streepje van de dia.

Daarna zoekt u in de buurt van het einde van de lange streep op de dia een ander streepje dat samenvalt met het midden van een millimeterstreep op de liniaal. Als dit bijvoorbeeld voor 57 streepjes geldt (op het oorspronkelijke witte vel dus $57 \times 0.5 \text{ cm} = 28.5 \text{ cm}$), dan meet u die. Komt hier dan bv. 16 mm uit (u krijgt door deze methode een geheel aantal millimeters), dan weet u de afstand van één streepjespaar. Dit is namelijk $16/57 \text{ mm}$ ($= 0.28 \text{ mm}$) per minimeenheid.

Knip nu de dia zo uit dat deze op een objectglas past met rondom enige ruimte. Plak dan met offettape of leukoplast (geen sellotape) de dia vast op het glaasje. Noteer op het etiket de berekende afstand tussen twee streepjes. De hulpmicrometer is nu klaar. Hiermee kunt u bij verschillende vergrotingen de oculairmicrometer ijken.



Figuur 26 Oculairmicrometer en hulpmicrometer

Deze ijking lijkt weer wat op het opmeten van de hulpmicrometer. U draait de oculairmicrometer horizontaal. Zorg ervoor dat de hulpmicrometer goed in beeld is. Zet de laagste vergroting op. Meet nu hoeveel streepjes van de oculairmicrometer er tegenover een bepaald aantal van de hulpmicrometer staan. Kies uiteraard weer voor een begin en eindpunt waarvan de streepjes precies samenvallen (verschuif eventueel de hulpmicrometer iets). Hoewel de oculairmicrometer en de hulpmicrometer in principe een dia van dezelfde schaalverdeling zijn, zien ze er niet gelijk uit. Ze staan op twee verschillende plaatsen in het lenzenstelsel en de hulpmicrometer wordt in verhouding groter gezien dan de oculairmicrometer.

Het is dus te verwachten dat in 5 streepjes van het beeld van de hulpmicrometer wel 27 van de oculairmicrometer staan. De oorspronkelijke afstand van 0.28 mm per streepjeset op de hulpmicrometer (zie hierboven) komt dan overeen met 27 posities op de oculairmicrometer. Derhalve is een streepjes-afstand in de oculairmicrometer dan ongeveer 0.52 mm en dat is 52 micrometer (duizendste millimeter of miljoenste meter). Bedenk echter goed dat dit gold voor dit ene objectief van bv. 4 x. Noteer deze waarde voor de oculairmicrometer dan ook met de vergroting van het objectief erbij. Stop de micrometer ook niet zomaar in een ander oculair, want dan kunnen ook andere waarden gaan gelden. Noteer dus eventueel ook welk oculair van toepassing is als u er meerdere heeft.

Herhaal nu de ijking met het volgende objectief. Als dit bv. 10 x is, zult u zien dat een streepjespaar nu een nog kleinere afstand vertegenwoordigt, bv. 20 micrometer. Bij een 40x objectief zal het zelfs in de orde van enkele micrometers liggen. Zelf kon ik met deze eigengemaakte micrometer uitstekend celkernen, bloedlichaampjes en bv. glomeruli opmeten.

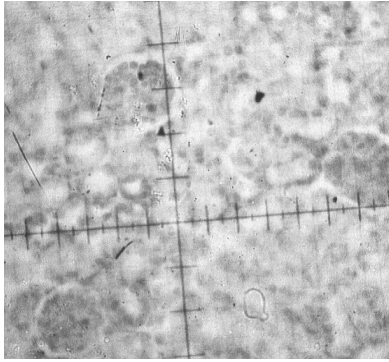


Foto XXXVIII De oculairmicrometer met nierweefsel

11.7 Fotografie

Het fotograferen mbv. een microscoop is eigenlijk heel eenvoudig. Een spiegelreflexcamera is bijzonder geschikt, omdat dan van tevoren goed te zien is wat er vastgelegd zal worden. Een oud toestel volstaat. Alleen de B-stand hoeft goed te werken en een belichtingsmeter is ook niet noodzakelijk. Zelfs de lens mag ontbreken, aangezien het oculair deze functie overneemt. Een draadontspanner is echter geen overbodige luxe. Kies een lang exemplaar van enkele decimeters. Om de microscoop en de camera op elkaar aan te sluiten heeft u een adapter nodig. Het kan een soort koker zijn waar het oculair in wordt gelegd, waarna het geheel weer aan de camera wordt vastgedraaid of geklikt. Adapters zijn echter niet algemeen verkrijgbaar, dus kunt u ook zelf iets dergelijks vervaardigen van een oude tussenring. Wilt u het niet te moeilijk maken, lijm dan een zwart fluwelen of kunstleren manchete aan de ring en zorg dat het andere uiteinde vastgesnoerd kan worden om de tubus, met een veter of klem. Gebruik een statief om de camera een vaste stand te geven. Zorg dat de oogzijde van het oculair zich ter hoogte van de nulring bevindt (ongeveer de voorzijde van de camera, de plaat waar lenzen op worden gezet). Op het matglas is te zien waar het beeld scherp is. Zorg er wel voor dat u de spiegel niet beschadigt en ook niet blokkeert (deze klapt immers op bij het openen van de sluiters).

Laat u niets wijsmaken door handelaren vwb. de microscoopfotografie. Een trillingsvrije en lichtdichte opstelling, daar gaat het om.

Pas overigens wel op dat - vooral bij een adapter - de camera niet verdraait tijdens de opname. Zelf plak ik de draadontspanner vast op tafel met leukoplast, zodat ik daarmee geen verplaatsingen veroorzaak.

De film die gebruikt wordt is niet bijzonder van belang. "Gewone" kwaliteit zal misschien beter voldoen dan de betere of professionele. De typische "huis-, tuin- en keukenrolletjes" hebben namelijk een veel grotere tolerantie voor belichting. Een afwijking van één stop heeft vrijwel geen invloed. Zelf heb ik met oa. Dixons, Hema en Revue-diafilm gewerkt.

Zet bij het gebruik van dim-installaties de lampsterkte op vol. Gebruik een blauwfilter in combinatie met daglichtfilm. Kunstlichtfilm zonder blauwfilter kan wel, maar wordt vrij geel.

Pas liever geen wide-field oculair toe. Dit geeft vreemd genoeg kleinere beelden (en dus veel zwarte omlijsting).

Om de juiste tijden te achterhalen kunt u het best proefreeksen maken met een diarolletje (geen afdrukkosten, inramen overbodig!). Het diafragma staat vast, door de opening van het oculair. Lampsterkte, helderheid van de lenzen en dikte van het preparaat zijn allemaal van invloed. De volgende belichtingstijden kan ik u echter wel als richtlijn geven:

objectief 4x	ca. 1/4 sec.
objectief 10x	ca. 1/2 sec.
objectief 40x	ca. 1-3 sec.
objectief 100x	ca. 5-30 sec. (olie-immersie)

Noteer bij iedere foto - ook als het niet om een proefreeks gaat - objectief, oculair en belichtingstijd.

Nog een lastig probleem: De oculairmicrometer geeft geen scherp beeld in het beeld van het preparaat bij het fotograferen. Door de micrometer vast te maken aan de onderzijde van het oculair (met kleine stukjes leukoplast) slaagde ik erin wèl een scherpe afbeelding van de combinatie te verkrijgen.



Foto XXXIX Afwijkende plaatsing van de oculairmicrometer tbv. fotografie

11.8 Einde

Met deze reeks recepten, adviezen en schema's is er een ~~en~~ gekomen aan deel II en daarmee aan dit boek. Ik hoop dat u er plezier aan beleeft. Het boek is immers op internet geplaatst om ondersteuning te bieden en nieuwe wegen te tonen. Dank voor uw aandacht.