

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ - ΧΡΩΣΕΙΣ

Ι. Γ. Παναγιωτίδης

Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Διευθυντής Β' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής

Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν»

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ - ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Δυσχερής ο ορισμός.

Στόχοι:

- παύση αυτολύσεως (ένζυμα οργανισμού) και βακτηριακής σήψεως
- διατήρηση μακρο- και μορίων (παρεμπόδιση εκχυλίσεως)
- διατήρηση τριτοταγούς δομής πρωτεϊνών
- διατήρηση σχήματος και όγκου ιστοτεμαχίων
- διευκόλυνση μεταγενεστέρων χρώσεων

Στην πράξη:

- ανέφικτη η ταυτόχρονη ιδανική επίτευξη όλων των ανωτέρω
- «χρυσός συμβιβασμός»

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ - ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κατηγορίες μονιμοποιητικών:

- αλδεΰδες (φορμαλδεΰδη, γλουταραλδεΰδη, ...)
- οξειδωτικοί παράγοντες (διχρωμικό κάλιο, υπερμαγγανικό κάλιο, τετροξειδίο οσμίου, ...)
- ουσίες που προκαλούν αποδιάταξη της δομής των πρωτεϊνών [protein-denaturing] (μεθανόλη, αιθανόλη, οξεϊκό οξύ, ...)
- φυσικοί παράγοντες (θερμότητα, υπέρηχοι)
- αγνώστου μηχανισμού (διχλωριούχος υδράργυρος [sublimé], πικρικό οξύ, ...)

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ - ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Επίδραση μονιμοποιητικών:

- **πρωτεΐνες:** σταυροειδής αντίδραση (cross-linking), πολυμερισμός,...
- **πυρηνικά οξέα (DNA, RNA):** εκχύλιση, αποπολυμερισμός,...
- **λιπίδια:** εκχύλιση, διάσπαση, ...

Γενικώς: μείγματα (διαλύματα) μονιμοποιητικών, αναλόγως με την σκοπούμενη επεξεργασία ιστών/κυττάρων

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ - ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η μονιμοποίηση εξαρτάται από:

- τον όγκο του ιστοτεμαχίου
- την θερμοκρασία
- την ωσμωτικότητα του διαλύματος
- το pH του διαλύματος (προσθήκη ρυθμιστικής ουσίας [buffer] → τιτλοποιημένο διάλυμα)

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΩΝ - ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΦΟΡΜΟΛΗΣ

- φορμόλη: 40% v/w φορμαλδεΐδης
- συνήθως αραίωση 1:10 → το τελικό διάλυμα περιέχει 4% φορμαλδεΐδης
- αλατούχο διάλυμα: 1:10 σε νερό βρύσης, προσθήκη NaCl
- τιτλοποιημένο ουδέτερο διάλυμα: 1:10 σε απεσταγμένο νερό, προσθήκη ρυθμιστικής ουσίας (EDTA)
- αλκοολικό διάλυμα: 1:10 σε οινόπνευμα 95°
- διάλυμα Bouin: 1:4 σε κεκορεσμένο διάλυμα πικρικού οξέος

ΧΡΩΣΗ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΡΩΣΕΩΣ

Τέσσερεις παράμετροι:

- εκλεκτικότητα
- τρόπος
- ένταση
- χρόνος

ΧΡΩΣΗ

ΣΥΝΑΦΕΙΑ (AFFINITY)

- **αλληλεπίδραση μεταξύ διαλυτών (solvent):** υδρόφοβοι δεσμοί (ιστοενζυμικές χρώσεις, χρώσεις λιπιδίων [Sudan black, scharlachrot, Oil Red O,...])
- **αλληλεπίδραση μεταξύ χρωστικών:** μεταχρωμασία (μονομερές /πολυμερές)
- **αλληλεπίδραση μεταξύ χρωστικής και ιστού:**
 - * δυνάμεις van de Waal (ορσεΐνη)
 - * δυνάμεις Coulomb (όξινες ή βασικές χρωστικές)
 - * ομοιοπολικοί δεσμοί (PAS, Feulgen)
 - * δεσμοί υδρογόνου (καρμίνιο Best)

ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ

- από τον κορμό του δένδρου *Haematoxylum campechianum* (Campeche, Mexico)
- Δυτ. Ινδίες (Μπαχάμες < πακκάμιν [Κυπρ.])
- **ωρίμανση /οξείδωση:** → αιματεΐνη
 - * φυσική (Ehrlich, Delafield): βραδεία (3-4 μήνες), μακροχρόνιος χρήση
 - * τεχνητή (ιωδιούχο νάτριο [Mayer], οξείδιο υδραργύρου [Harris]): ταχεία ή άμεση, βραχυχρόνιος χρήση → υπεροξείδωση
- χρωματίζει τον πυρήνα

ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ

- ανάγκη προστύμματος (mordant): ενσωματωμένο στο διάλυμα χρώσεως ή με προέκθεση του ιστού
- στυπτηρίες («στύψη»: άλατα Al): Ehrlich, Delafield, Mayer, **Harris**
- άλατα Fe (οξειδωτικό + πρόστυμμα): Weigert, Hedenhain, Verhoeff, Loyez
- άλατα Wo: ΡΤΑΗ

ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ

- **οπισθοχωρητική (regressive):**
 - α) υπερέκθεση στο διάλυμα αιματοξυλίνης
 - β) έκπλυση σε διάλυμα νερού βρύσης ($\pm 1\%$ ανθρακικό λίθιο)
 - γ) ταχεία εμφάνιση σε όξινη αλκοόλη: *διαφοροποίηση* (“*blueing*”)
- **προχωρητική (progressive):**
ποικίλος χρόνος εκθέσεως στο διάλυμα αιματοξυλίνης

ΗΩΣΙΝΗ

- αντίχρωση αιματοξυλίνης
- συνηθέστερα Eosin Y (διαλυτή σε νερό ή οινόπνευμα): 0,5 -1 % υδατικό διάλυμα με προσθήκη 0,5 ‰ οξεικού οξέος
- άλλες: φλοξίνη-σαφρανίνη (HPS [Γαλλία], ...)

ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

- γλυκογόνο: πολυσακχαρίτης (D-γλυκόζη)
- βλέννες (βλεννοπολυσακχαρίτες, γλυκοζαμινογλυκάνες): πολυσακχαρίτες + αμίνες + πρωτεΐνες
 - α) *όξιμες βλέννες*:
 - α1) θειούχες (sulphomucins):
 - * συνδετικός ιστός (χονδροϊτίνη, ηπαράνη, ηπαρίνη, κερατάνη,...)
 - * επιθήλιο (λ.χ. καλυκοειδή παχέος)
 - α2) σιελοβλέννες (N-ακετυλονευραμινικό οξύ) (sialomucins):
 - * ευαίσθητες σε σιαλιδάση (enzyme-labile)
 - * ανθεκτικές σε σιαλιδάση / O-ακετυλ-... (enzyme-resistant)
 - β) *υαλουρονικό οξύ*
 - γ) *ουδέτερες βλέννες*

PAS

- Periodic acid - Schiff (Mc Manus, 1946)
- vic-glycol groups → aldehyde
- καταδεικνύει:
 - * γλυκογόνο (προηγούμενη επίδραση αμυλάσης σιέλου/διαστάσης: PAS[-])
 - * ουδέτερες, SL σιελοβλέννες
 - * SR σιελοβλέννες: προκατεργασία (λ.χ. Periodate - borohydride - KOH - PAS)

ALCIAN DYES

- κατιονικές χρωστικές (I.C.I., 1948 - ...) για βαμβακερά υφάσματα (monastral)
- Alcian blue 8GX, Alcian yellow → Alcian green 2GX, Alcian green 3BX
- όξινες βλέννες:
 - α) διακύμανση pH: $AB_{pH} < 1$ για θειούχες συνδετικού, $AB_{pH} < 2,5$ για θειούχες επιθηλιακές, $AB_{pH} < 3,2$ για υαλουρονικό και σιελοβλέννες
 - β) συνδυασμός χρωστικών: AB/AY → κυανές οι θειούχες, κίτρινες οι σιελοβλέννες, πράσινα τα μείγματα
 - γ) με διακύμανση της συγκεντρώσεως ηλεκτρολύτου ($MgCl_2$) (Critical Electrolyte Concentration)

ΒΛΕΝΝΟΚΑΡΜΙΝΗ

- κονιοποιημένη *Cochinella* spp
- Mayer-Southgate (1927)
- αλκοολικό διάλυμα με προσθήκη ΑΙΟΗ
- βάφει όλες τις βλέννες (φυσική διάλυση; θετικό φορτίο; μεγαλομοριακή ένωση;)
- ουσιαστικά υποκαθίσταται από ΑΒ/PAS
- ελάχιστες εφαρμογές (λ.χ. έλυτρο *Cryptococcus* spp)

ΜΕΤΑΧΡΩΜΑΣΙΑ

- ιστικό στοιχείο με χρώμα διαφορετικό από αυτό της χρωστικής ουσίας
- όξινες βλέννες (λ.χ. κοκκία βασεοφίλων αίματος και σιτευτικών κυττάρων [mast cells]: πορφυρά με Giemsa ή κυανούν της τολουϊδίνης)
- καλυμμένη (masked): προκατεργασία με όξινη υδρόλυση εν θερμώ (λ.χ. κυανούν τολουϊδίνης κατά Solcia [1968]) → κοκκία νευροενδοκρινών κυττάρων

ΕΝΑΠΟΘΕΣΕΙΣ / ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

- εξωγενείς: ανθράκωση λεμφαδένων, αργυρίαση, δερματοστιξία, ...
- ενδογενείς:
 - α) σιδηρούχες → αιμοσιδηρίνη (κυανούν του Βερολίνου [Perls])
 - β) μελανίνη (δέρμα, οφθαλμός, ΚΝΣ) →
 - β₁) αποχρωματισμός (bleaching): H_2O_2 , $KMnO_4$, ...
 - β₂) αργενταφφινική (Fontana-Masson) / αργυρόφιλη (Grimelius)
 - γ) χρωστικές κατατριβής: λιποφαιΐνη (lipofuscin), κηροειδές, ψευδομελανίνη εξ υπακτικών (melanosis coli) → Ziehl-Neelsen
 - δ) ελαιομελανίνη / αιμοζωΐνη (Pl. malariae, Leishmania, ...)
 - ε) χολοχρωστικές (αιματοειδίνη / χολερυθρίνη) → Fouchet-van Gieson
 - ς) ασβέστιο → von Kossa, ερυθρό της αλιζαρίνης, ...
 - ζ) ουρικά άλατα → de Galantha, ...

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

- **βακτηρίδια** → τροποποίηση Gram για ιστούς
- **μύκητες** → PAS, εμποτισμού δι' αργύρου (Grocott)
- **παράσιτα** → τροποποίηση Giemsa για ιστούς
- **μυκοβακτηρίδια** (φυματίωση, λέπρα, άτυπα,...), **Nocardiae** → Ziehl-Neelsen (φουξινοφιλία κηρολιπιδίων ανθεκτική σε όξινη αλκοόλη [*acide-alcoolorésistants*, οξεάντοχα])
- **ιοί** → Lendrum's phloxine-tartrazine, ...

ΧΡΩΣΕΙΣ ΕΜΠΙΟΤΙΣΜΟΥ ΔΙ' ΑΡΓΥΡΟΥ

- **αργενταφφινική (argentaffin):** ανάγει τα άλατα αργύρου προς μεταλλικό Ag αφ' εαυτής
- **αργυροφιλική (argyrophilic):** ανάγει τα άλατα αργύρου προς μεταλλικό Ag με προσθήκη αναγωγικού παράγοντος
- Gomori, Grocott, Grimelius, Gordon-Sweet (reticulin), Fontana-Masson, ...
 - α) δικτυωτές ίνες (χόριο, ικρίωμα λεμφαδένων, ...)
 - β) πολυσακχαρίτες (βασική μεμβράνη νεφρικών σπειραμάτων, μύκητες,...)
 - γ) μελανίνη
 - δ) κοκκία νευροενδοκρινών κυττάρων
 - ε) αργυρόφιλοι πλόκοι (κουβάρια [tangles]) σε Alzheimer

ΧΡΩΣΕΙΣ ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

- **κολλαγόνοι ίνες:** τριχρωμικές χρώσεις (Masson, Lendrum MSB, ...), van Gieson
- **δικτυωτές ίνες:** αργυρόφιλες
- **ελαστικές ίνες (ελαστίνης, οξυταλάνης, ελαυνίνης):** Verhoeff - van Gieson, ορσεΐνη, ρεσορκίνης-φουξίνης κατά Weigert, ...
- **ινική:** Lendum MSB, PAS, ...