

Μια εύκολη και αξιόπιστη μέθοδος για την παρασκευή ημίλεπτων ιστικών τομών σε ρητίνη και την περαιτέρω επεξεργασία τους με ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Αλεξίου Μ., Πάτρα Ε., Μπατιστάτου Α.

An easy and reliable method for the preparation of semi-thin tissue sections in resin and the subsequent histochemical and immunohistochemical staining.

Alexiou M., Patra E., Batistatou A.

Department of Pathology, University Hospital of Ioannina, Greece

The preparation of semi-thin tissue sections from resin-embedded material is a particularly useful technique in Pathology laboratories for diagnostic purposes and research protocols. In our laboratory we have utilized this method in order to study the regeneration of the peroneal nerve after transection and suture. In addition, we have strengthened our results with the application of immunohistochemical technique after removal of the resin. In this study, we present the modifications we have applied in the classical method of preparation of semi-thin tissue sections in resin, as well as a simple histochemical stain and an immunohistochemical technique. The important-innovative steps are the removal of resin with a saturated buffer of NaOH in ethanol, the staining of the tissue sections with a very diluted Toluidine Blue stain (0.3%) and the subsequent immunostaining of section with an anti-S100 antibody.

Key words: resin, semi-thin sections, histochemistry, immunohistochemistry.

Η τεχνική παρασκευής ημίλεπτων ιστικών τομών σε ρητίνη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σ' ένα Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, τόσο για διαγνωστικούς σκοπούς όσο και για ερευνητικά πρωτόκολλα. Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήσαμε αυτήν την τεχνική για τη μελέτη αναγέννησης του περονιαίου νεύρου μετά από διατομή και συρραφή. Επιπλέον, ενισχύσαμε τα αποτελέσματά μας με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που έγιναν στις τομές μετά από την αφαίρεση της ρητίνης. Στην εργασία αυτή παρουσιάζουμε τις τροποποιήσεις που εφαρμόσαμε στην κλασική μέθοδο

παρασκευής ημίλεπτων τομών σε ρητίνη, μια απλή ιστοχημική χρώση και μια ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Συνοπτικά, ο ιστός τεμαχίζεται και κατόπιν κατάλληλης επεξεργασίας σκηνώνεται σε ρητίνη. Κόβονται τομές πάχους 1 μ. Για ανοσοϊστοχημική χρώση οι τομές απορητινοποιούνται σε κεκορεσμένο διάλυμα NaOH σε αλκοόλη. Σε δοκιμές που προηγήθηκαν αποδείχτηκε ότι η αφαίρεση της ρητίνης με αυτόν τον τρόπο, πριν εφαρμοστεί η ανοσοϊστοχημική μέθοδος, είναι κριτικής σημασίας για την αναγνώριση των ζητούμενων αντιγόνων. Οι τομές ελέγχονται για την ποιότητα και την καταλληλότητά τους με μια γρήγορη χρώση με εξαιρετικά αραιό διάλυμα *Toluidine Blue* (0,30%). Σε δοκιμές με διάφορες πυκνότητες του διαλύματος διαπιστώθηκε ότι η ιδανικότερη χρώση επιτυγχάνεται με αραιότερο διάλυμα. Ακολουθεί η κλασική ανοσοϊστοχημική μέθοδος με την τεχνική αβιδίνης-βιοτίνης και DAB ως χρωμογόνο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για την πρωτεΐνη S-100. Συμπερασματικά, παρουσιάζεται μια εύκολη μέθοδος παρασκευής ημίλεπτων τομών, ένα διάλυμα απορητινοποίησης το οποίο επιτρέπει την άριστη διατήρηση τόσο της μορφολογίας όσο και της αντιγονικότητας του ιστού και μια τροποποιημένη ειδική χρώση που επιτρέπει τον έλεγχο της ποιότητας του ιστού και περαιτέρω μορφομετρικές και ανοσοϊστοχημικές μελέτες.

Λέξεις κλειδιά: ρητίνη, ημίλεπτη τομή, ανοσοϊστοχημεία, ιστοχημεία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνική παρασκευής ημίλεπτων ιστικών τομών σε ρητίνη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σ' ένα Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, τόσο για διαγνωστικούς σκοπούς όσο και για ερευνητικά πρωτόκολλα. Υλικά σκηνωμένα σε ρητίνη μπορούν να κοπούν σε πολύ λεπτές τομές οι οποίες στη συνέχεια εκτιμούνται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επιπλέον, η υψηλή ποιότητα των ημίλεπτων τομών επιτρέπει την αναγνώριση δομικών λεπτομερειών του εξεταζόμενου παρασκευάσματος και στο οπτικό μικροσκόπιο. Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος πρωτοεφαρμόστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980, και από τότε έχουν γίνει πολλές πρόοδοι. Σήμερα, υπάρχουν πολλά αντισώματα υψηλής ποιότητας και η ανοσοϊστοχημική μέθοδος έχει απλοποιηθεί αρκετά, ώστε να είναι απλή, με ταυτόχρονα αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ελάχιστες προσπάθειες εφαρμογής της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου σε ημίλεπτες τομές σε ρητίνη (1-3). Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήσαμε την τεχνική παρασκευής ημίλεπτων ιστικών τομών σε ρητίνη για τη μελέτη αναγέννησης του περονιαίου νεύρου μετά από διατομή και συρραφή. Ακολούθησε μορφομετρική μελέτη και επιπλέον, ενισχύσαμε τα αποτελέσματά μας με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που έγιναν στις

τομές μετά από την αφαίρεση της ρητίνης. Στην εργασία αυτή παρουσιάζουμε τις τροποποιήσεις που εφαρμόσαμε στην κλασική μέθοδο παρασκευής ημίλεπτων τομών σε ρητίνη και στη μεθοδολογία ειδικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων με άριστα αποτελέσματα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό

Τμήματα περονιαίων νεύρων από επίμυες Wistar μετά από τελικο-τελική συρραφή, μονιμοποιημένα σε διάλυμα γλουταραλδεϋδης (2,5% σε 0,1M Cacodylate buffer) και διατηρημένα στους 4°C.

Μέθοδος

Συνοπτικά, ο ιστός τεμαχίζεται (5 mm) και μονιμοποιείται σε διάλυμα γλουταραλδεϋδης (2,5% σε 0,1M Cacodylate buffer) για τουλάχιστον 4 ώρες. Στη συνέχεια κόβεται σε μικρότερα τεμάχια και τοποθετείται σε διάλυμα 1% Osmium Tetroxide. Ακολουθεί η διαδικασία παρασκευής με 0,5% Uranyl acetate και διαδοχικών αφυδατώσεων, ώσπου καταλήγει να σκηνωθεί σε ρητίνη (Πίνακας 1, Εικόνα 1Α). Κόβονται τομές πάχους 1 μ σε ειδικό μικρότομο με γυάλινα μαχαίρακία ίδιας κατασκευής (Εικόνα 1B). Για ανοσοϊστοχημική χρώση οι τομές απορητινοποιούνται σε κεκορεσμέ-

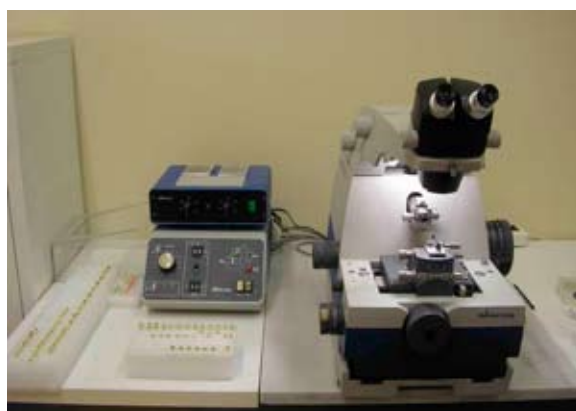
Πίνακας 1. Μέθοδος επεξεργασίας του ιστού για σκλήνωση σε ρητίνη

Βήμα	Χρόνος	Επεξεργασία*
1	4 ώρες τουλάχιστον	Κόβουμε τον ιστό σε μικρά τεμάχια (5 mm) και τον μονιμοποιούμε σε 2,5% γλουταραλδεΐδη σε 0.1M Sodium Cacodylate Buffer (SCB, σε 0.2M HCL)
2	5 λεπτά	Ξεπλένουμε σε SCB
3	5 λεπτά	Ξεπλένουμε σε SCB
4	1 ώρα	Τοποθετούμε τα τεμάχια σε 1% Osmium Tetroxide (σε SCB) για το 2 ^ο στάδιο μονιμοποίησης
5	10 λεπτά	Ξεπλένουμε με SCB
6	10 λεπτά	Ξεπλένουμε με SCB
7	1 λεπτό	Ξεπλένουμε σε διάλυμα Sodium Acetate
8	2 ώρες	Τοποθετούμε σε διάλυμα 0,5% Uranyl Acetate (σε αποσταγμένο νερό) στο ψυγείο με συνεχή ανάδευση
9	30 δευτερόλεπτα	Ξεπλένουμε με αποσταγμένο νερό
10	15 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 50% αλκοόλης
11	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 70% αλκοόλης
12	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 70% αλκοόλης
13	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 95% αλκοόλης
14	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 95% αλκοόλης
15	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 100% αλκοόλης
16	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 100% αλκοόλης
17	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα 100% αλκοόλης
18	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα propyleneoxide ή ακετόνης
19	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα propyleneoxide ή ακετόνης
20	20 λεπτά	Τοποθετούμε σε διάλυμα propyleneoxide ή ακετόνης
21	2 ώρες	Τοποθετούμε σε διάλυμα 33% ρητίνης σε ακετόνη
22	17 ώρες	Τοποθετούμε σε διάλυμα 67% ρητίνης σε ακετόνη

* Προσοχή, όλη η επεξεργασία γίνεται με γάντια και μάσκα σε απαγωγό.



Εικόνα 1Α. Κύλινδροι ρητίνης με σκηνωμένα τεμάχια νεύρου.



Εικόνα 1Β. Μικροτόμος με γυάλινο μαχαίρακι.

νο διάλυμα NaOH σε αλκοόλη. Σε δοκιμές που προηγήθηκαν, με ποικιλία διαλυμάτων

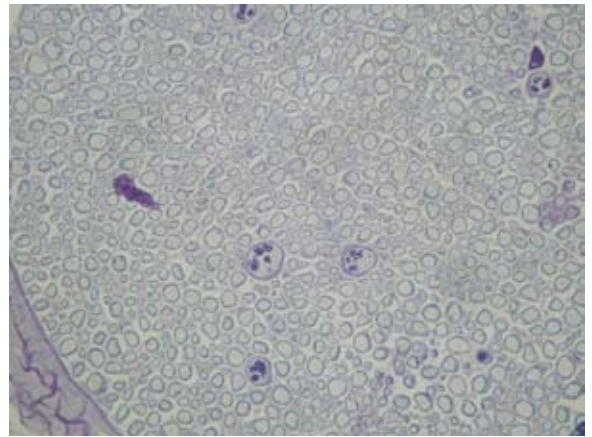
σε διάφορες συγκεντρώσεις αποδείχτηκε ότι η αφαίρεση της ρητίνης με αυτόν τον τρόπο,

πριν εφαρμοστεί η ανοσοϊστοχημική μέθοδος, είναι κριτικής σημασίας για την αναγνώριση των ζητούμενων αντιγόνων. Ταυτόχρονα, δεν επηρεάζει την αντιγονικότητα των ιστών. Οι τομές ελέγχονται για την ποιότητα και την καταλληλότητά τους με μια γρήγορη χρώση με εξαιρετικά αραιό διάλυμα Toluidine Blue (0,3%). Σε δοκιμές με διάφορες πυκνότητες του διαλύματος διαπιστώθηκε ότι η ιδανικότερη χρώση επιτυγχάνεται με αραιότερο διάλυμα. Ακολουθεί η κλασική ανοσοϊστοχημική μέθοδος με την τεχνική αβιδίνης-βιοτίνης και DAB ως χρωμογόνο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για το δείκτη S100.

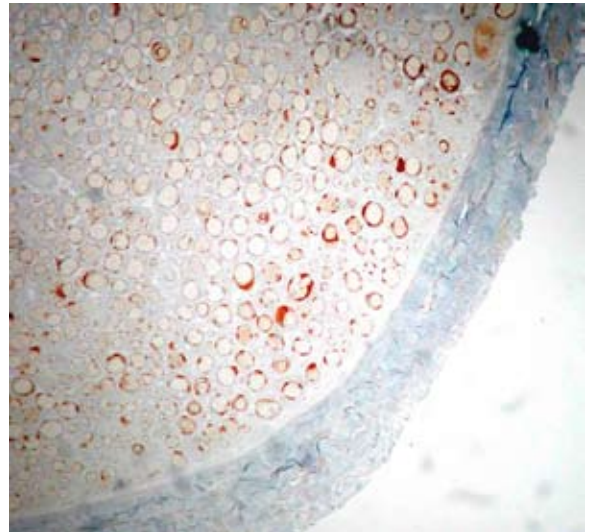
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρουσιάζουμε μια εύκολη μέθοδο παρασκευής ημίλεπτων τομών μετά από σκλήνωση σε ρητίνη, η οποία συνήθως χρησιμοποιείται για παρασκευάσματα που μελετούνται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Εδώ οι ημίλεπτες τομές εκτιμούνται σε οπτικό μικροσκόπιο, μετά από ειδική χρώση και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις. Για να επιτευχθεί αυτό, είναι απαραίτητη η απορητινοποίηση του ιστού, που γίνεται με ένα ειδικό διάλυμα το οποίο, όπως αποδεικνύουμε, επιτρέπει την άριστη διατήρηση τόσο της μορφολογίας όσο και της αντιγονικότητας του ιστού με άριστα αποτελέσματα. Μια ακόμα νέα μεθοδολογία που προτείνουμε είναι η ειδική χρώση των τομών με αραιό διάλυμα Toluidine Blue. Αυτή η τροποποιημένη από εμάς ειδική χρώση επιτρέπει τον έλεγχο της ποιότητας και της καταλληλότητας του ιστού για περαιτέρω επεξεργασία. Επιπλέον, επιτρέπει μορφομετρικές μελέτες και εξαγωγή συμπερασμάτων. Στο συγκεκριμένο μοντέλο, μετρήσαμε τον αριθμό, τη διάμετρο, την πυκνότητα των αξόνων, το πάχος της μυελίνης κ.λπ. (Εικόνα 2Α).

Επιπρόσθετα, ενισχύσαμε τα αποτελέσματά μας και μελετήσαμε την παθοφυσιολογία της αναγέννησης των νεύρων, καθώς επιτύχαμε στις ίδιες τομές να ανιχνεύσουμε ανοσοϊστοχημικά σχετικά αντιγόνα. Στην Εικόνα 2Β, παρατίθεται αντιπροσωπευτική ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη S-100. Το αντίσωμα είναι μονοκλωνικό και σχεδιάστηκε για την ειδική εντόπιση της S-100 πρωτεΐνης σε ιστολογικές τομές μονιμοποιημένες σε φορμόλη και σκληνωμένες σε παραφίνη. Στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και σε ημίλεπτες τομές μονιμοποι-



Εικόνα 2Α. Τομή περιφεριακού νεύρου πάχους 1μ. Χρώση Toluidine Blue (X200)



Εικόνα 2Β. Τομή περιφεριακού νεύρου πάχους 1μ. Ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη S-100 (X200).

ημένες σε γλουταραλδεΐδη και σκληνωμένες σε ρητίνη.

Συμπερασματικά, παρουσιάζεται μια εύκολη μέθοδος παρασκευής ημίλεπτων τομών και ένα διάλυμα απορητινοποίησης το οποίο επιτρέπει την καλή διατήρηση τόσο της μορφολογίας (όπως εκτιμάται με τροποποιημένη ειδική χρώση) όσο και της αντιγονικότητας του ιστού με άριστα αποτελέσματα.

Η παρούσα εργασία τιμήθηκε με το βραβείο της «ΒΙΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ Α.Ε.» για την αρτιότερη

επιστημονική εργασία Τεχνολόγων στα πλαίσια του 10^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιωάννινα, Μάιος 2006.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dolapchieva S, Eggers R, Kuhnel W. N- and R-cadherins expression in the rat sciatic nerve demonstrated by postembedding immunogold method on semi-thin sections. *Ann Anat* 183:405-411, 2001.
2. Haraguchi CM, Yokota S. Immunofluorescence technique for 100-nm-thick semithin sections of Epon-embedded tissues. *Histochem Cell Biol* 117:81-85, 2002.
3. Vidal S, Lombardero M, Sanchez P, Roman A, Moya L. An easy method for the removal of Epon resin from semi-thin sections. Application of the avidin-biotin technique. *Histochem J* 27:204-209, 1995.

Corresponding Author:

Alexiou Michael

Department of Pathology,

University Hospital of Ioannina

Ioannina

Υπεύθυνος Αλληλογραφίας:

Αλεξίου Μιχ.

Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής,

Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων,

Ιωάννινα