

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ

Εισαγωγή στις Βασικές Ιστολογικές Τεχνικές - Προετοιμασία των Ιστών

Για τη μελέτη των ιστών έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές επεξεργασίας τους ώστε να μοιάζουν με την έμβια κατάστασή τους και να μπορούν να μελετηθούν (Πίνακας 1.1). Μετά τη λήψη του βιοπτικού ή εγχειρητικού υλικού από τους κλινικούς ιατρούς το υλικό αποστέλλεται στο εργαστήριο μέσα σε μονιμοποιητικό υλικό. Η **μονιμοποίηση** είναι η επεξεργασία των ιστών με χημικές ουσίες, όπως π.χ. η ουδέτερα ρυθμισμένη φορμόλη, οι οποίες επιβραδύνουν τις αλλοιώσεις που υφίστανται οι ιστοί μετά την απομάκρυνσή τους από το σώμα αλλά και καταστρέφουν τους μικροοργανισμούς. Στη συνέχεια ακολουθείται σειρά πρωτοκόλλων επεξεργασίας. Επειδή κάθε τεμάχιο ιστού περιέχει αρκετό νερό, χρησιμοποιείται σειρά αλκοολούχων διαλυμάτων ώστε να αφαιρεθεί πλήρως το νερό (**αφυδάτωση**). Ακολούθως, ο ιστός υφίσταται την επίδραση ξυλόλης, μιας χημικής ουσίας που έχει την ιδιότητα να αναμειγνύεται με την τηγμένη παραφίνη. Η συγκεκριμένη διαδικασία χαρακτηρίζεται ως **διαύγαση** διότι η ξυλόλη καθιστά τους ιστούς διαφανείς. Η επόμενη διαδικασία που ακολουθείται είναι η **σκήνωση**. Για να μελετηθούν οι ιστοί και να διακριθούν μεταξύ τους τα αλληλοεπικαλυπτόμενα κύτταρα και η εξωκυττάρια ουσία, οι ιστοί πρέπει να εγκλεισθούν σε κατάλληλο μέσο και στη συνέχεια να κοπούν σε λεπτές φέτες-τομές. Το υλικό που χρησιμοποιείται για αυτόν τον σκοπό είναι η παραφίνη. Ο ιστός τοποθετείται μέσα σε τηγμένη παραφίνη που αφήνεται να πήξει, σχηματίζοντας έτσι έναν κύβο (ή μία κασέτα) παραφίνης, ο οποίος περιέχει τον ιστό. Στη συνέχεια διενεργείται η **παραγωγή των τομών**. Οι κύβοι παραφίνης κόβονται σε πολύ λεπτές τομές (7-12 μm) από ένα ειδικό όργανο που λέγεται μικροτόμος. Ο μικροτόμος διαθέτει λεπίδα και βραχίονα ο οποίος προωθεί τον κύβο του ιστού κατά καθορισμένα ίσα διαστήματα. Κάθε τομή ή σειρά τομών που προκύπτει τοποθετείται σε γυάλινα πλακίδια (αντικειμενοφόρες πλάκες). Σε

αυτό το στάδιο οι τομές πρέπει να χρωματιστούν (**χρώση των τομών**) ώστε να καταστούν κατάλληλες για εξέταση στο φωτομικροσκόπιο.

Πίνακας 1.1. Προετοιμασία των ιστών	
1. Συλλογή δείγματος: βιοψία, χειρουργική αφαίρεση	1. Δειγματοληψία ιστού για μικροσκοπική εξέταση
2. Μονιμοποίηση: τοποθέτηση του δείγματος του ιστού σε μονιμοποιητικό υλικό	2. Διακοπή της αλλοίωσης του ιστού, καταστροφή μικροοργανισμών
3. Επεξεργασία: σειρά πρωτοκόλλων - επεξεργασία χημικής ή θερμικής βάσης	3. Αφυδάτωση ιστού, εμποτισμός του ιστού με σκληρυντική ουσία
4. Σκλήρυνση: τοποθέτηση του υλικού σε υλικά σκλήρυνσης (παραφίνη) και έγκλεισή τους σε κασέτες	4. Εγκλεισμός του ιστού σε κασέτες - κύβοι παραφίνης
5. Παραγωγή τομών	5. Τομές ιστού πάχους 7-12 μm
6. Χρώση	6. Χρώση των τομών με διάφορες χημικές ουσίες με σκοπό την παρατήρηση κυτταρικών στοιχείων

Μέθοδοι Χρώσης (Πίνακας 1.2)

Η πλέον συχνά χρησιμοποιούμενη χρώση στην ιστολογία είναι η χρώση **αιματοξυλίνης-ηωσίνης**. Η αιματοξυλίνη είναι βασική, θετικά φορτισμένη χρωστική, η οποία βάφει επιλεκτικά τα όξινα στοιχεία των κυττάρων με κυανή χροιά. Επειδή τα πλέον όξινα στοιχεία είναι το DNA και το RNA, ο πυρήνας και περιοχές του κυτταροπλάσματος πλούσιες σε ριβοσώματα βάφονται βαθυκύανες (με σκούρο μπλε χρώμα). Η ηωσίνη είναι όξινη, αρνητικά φορτισμένη χρωστική, η οποία βάφει τα αλκαλικά στοιχεία του κυττάρου με ρόδινο χρώμα. Επειδή πολλά κυτταροπλασματικά στοιχεία έχουν αλκαλικό pH, αρκετές περιοχές του κυτταροπλάσματος βάφονται ροζ.

Η **ιστοχημεία** είναι η μέθοδος χρώσης των ιστών που χορηγεί πληροφορίες για την παρουσία ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μεγαλομοριακών ουσιών, καθώς συγκεκριμένες χρωστικές δεσμεύονται ή αντιδρούν με συγκεκριμένες κυτταρικές δομές. Για παράδειγμα, η **τριχρωματική ιστοχημική χρώση Masson** βάφει με γαλάζιο χρώμα το κολλαγόνο και τη βλέννη ενώ το κυτταρόπλασμα βάφεται ροζ-ερυθρό. Η **ιστοχημική χρώση PAS (χρώση υπεριοξειδίου οξέος Schiff)** βάφει φούξια το γλυκογόνο, περιοχές πλούσιες σε πολυσακχαρίτες (όπως π.χ. η βασική μεμβράνη) αλλά και τη βλέννη (όπως π.χ. αυτή που περιέχεται στα καλκοειδή κύτταρα).

Η **ανοσοϊστοχημεία** χρησιμοποιεί εξειδικευμένα αντισώματα ώστε να καταστήσει περισσότερο ακριβή την ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια εντόπιση μακρο-

Πίνακας 1.2. Μέθοδοι χρώσης

<p>1. Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη (H&E): η πιο κοινή μέθοδος χρώσης που χρησιμοποιεί δύο χρωστικές</p>	<p>Χρώση βασικών και όξινων δομών του ιστού</p>
<p>α. Αιματοξυλίνη: βασική, θετικά φορτισμένη χρωστική</p>	<p>Μωβ προς μπλε χρωστική: δεσμεύεται σε όξινες, αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές δομές όπως DNA, RNA στον πυρήνα και τα ριβοσώματα</p>
<p>β. Ηωσίνη: όξινη, αρνητικά φορτισμένη χρωστική</p>	<p>Ροζ προς κόκκινη χρωστική: δεσμεύεται σε βασικές, θετικά φορτισμένες κυτταρικές δομές, κυρίως πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος</p>
<p>2. Ιστοχημεία: χρωστικές δεσμεύονται ή αντιδρούν με συγκεκριμένες κυτταρικές δομές</p>	<p>Η χημική αντίδραση μεταξύ της χρωστικής ουσίας και του ιστού έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χρώματος</p>
<p>α. Τρίχρωμη χρώση Masson: βάφει το κολαγόνο και τη βλέννα μπλε, το κυτταρόπλασμα ροζ</p>	<p>Αναγνωρίζει το περιεχόμενο και την οργάνωση του συνδετικού ιστού</p>
<p>β. Χρώση υπερωδικού οξέος Schiff: πολυσακχαρίτες όπως το γλυκογόνο χρωματίζονται φούξια</p>	<p>Αναγνωρίζει περιοχές με υψηλή σύσταση σε πολυσακχαρίτες όπως η βασική μεμβράνη και τη βλέννη π.χ. στα καλυκοειδή κύτταρα</p>
<p>3. Ανοσοϊστοχημεία: χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα αντισώματα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων και δευτεροταγή αντισώματα έναντι των πρώτων σημασμένα με χημικό παράγοντα που χρωματίζει με καφέ χρώμα</p>	<p>Αναγνώριση κυττάρων ή ιστού που φέρουν συγκεκριμένο αντιγόνο</p>
<p>4. Ανοσοφθορισμός: παρόμοια τεχνική με την ανοσοϊστοχημεία, το δευτεροταγές αντισωμα είναι συνδεδεμένο με φθορίζοντα παράγοντα, είναι δυνατή η σήμανση περισσότερων από μίας πρωτεϊνών με φθορίζοντα παράγοντα διαφορετικού χρώματος</p>	<p>Αναγνώριση κυττάρων ή ιστού που φέρουν συγκεκριμένο αντιγόνο ή αντιγόνα</p>
<p>5. In situ Υβριδισμός: ανιχνεύει γενετικές/χρωμοσωμικές αλλοιώσεις και αλληλουχίες DNA ή RNA</p>	<p>Αναγνώριση κυττάρων ή ιστού με τις συγκεκριμένες ανωμαλίες και εκτίμηση της συσχέτισης των αλλοιώσεων με τη μορφολογία</p>

μοριακών ουσιών από ό,τι η ιστοχημεία. Αρχικά το πρωτογενές αντίσωμα αντιδρά με το αντιγόνο και στη συνέχεια προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα που είναι σημασμένο με χρωστική που χρωματίζει με καφέ χρώμα. Το σημασμένο αντίσωμα αντιδρά με το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος σχηματίζοντας δευτερογενές σύμπλεγμα, ορατό με το μικροσκόπιο λόγω της καφέ χρωστικής.

Ο **ανοσοφθορισμός** αποτελεί παρόμοια μέθοδο με την ανοσοϊστοχημεία. Στον ανοσοφθορισμό το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με φθορίζοντα παράγοντα και με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατή η αναγνώριση των κυττάρων που φέρουν το υπό μελέτη αντιγόνο. Επιπρόσθετα στον ανοσοφθορισμό είναι δυνατή η σήμανση περισσότερων από ένα αντιγόνων με φθορίζοντα παράγοντα διαφορετικών χρωμάτων.

Ο **in situ υβριδισμός** είναι νεότερη τεχνική με την οποία είναι δυνατή η ανίχνευση γενετικών/χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στους κυτταρικούς πληθυσμούς. Επίσης μπορεί να ανιχνευθεί ενσωματωμένο γενετικό υλικό ιών (π.χ. Epstein-Barr).

Ο **in situ υβριδισμός**, αποτελεί πολύτιμη μέθοδο μοριακής βιολογίας για τον παθολογοανατόμο, διότι επιτρέπει τη μορφολογική εντόπιση της γενετικής πληροφορίας.

Ενώ οι κλασικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας, όπως η Southern blot και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), πιστοποιούν απλώς την παρουσία μιας αλληλουχίας DNA ή RNA, ο *in situ* υβριδισμός προσδιορίζει επιπλέον σε ποια και πόσα κύτταρα υπάρχει η αλληλουχία αυτή και σε ποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα (κυτταρόπλασμα, πυρήνας) εντοπίζεται. Με τον τρόπο αυτό συσχετίζεται παρουσία της αλληλουχίας αυτής με συγκεκριμένες κυτταρικές και ιστικές αλλοιώσεις.

Η τεχνική του *in situ* υβριδισμού βασίζεται στη θεμελιώδη ιδιότητα των πυρηνικών οξέων να σχηματίζουν σύμφωνα με τον νόμο της συμπληρωματικότητας των βάσεων (αδενίνη-θυμίνη, γουανίνη-κυτοσίνη) σταθερά διμερή που ονομάζονται υβρίδια. Τα τελευταία μπορεί να αποτελούνται από δύο αλύσους DNA ή συνδυασμό αλύσων RNA-DNA και RNA-RNA. Ο *in situ* υβριδισμός μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλα τα είδη υλικού, όπως τα κυτταρικά επιχρίσματα και οι τομές παραφίνης και κρουστάτη.

Το Κύτταρο (Πίνακας 1.3)

Τα κύτταρα αποτελούν τις δομικές και λειτουργικές μονάδες όλων των ζωντανών οργανισμών. Όλα τα κύτταρα, ανεξάρτητα από τη λειτουργία που επιτελούν, αποτελούνται από τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα (που περιέχει τα κυτταρικά οργάνια, τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα και τα στοιχεία του κυτταροσκελετού) και την κυτταρική μεμβράνη.

Ο **πυρήνας** έχει ωοειδές ή σφαιρικό σχήμα, εντοπίζεται σχετικά κεντρικά και περιέχει το κυτταρικό DNA. Είναι βασεόφιλη δομή, δηλαδή χρωματίζεται με βασι-

Πίνακας 1.3. Το κύτταρο

Δομή	Λειτουργία	Εντόπιση
Πυρήνας		
Ωοειδής προς σφαιρική βασεόφιλη δομή	Αποθήκευση DNA ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης	Κεντρική προς περικεντρη
1. Πυρηνικός φάκελος: δύο φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες	Σχηματίζει έναν ισχυρά ρυθμιζόμενο φραγμό ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα	Περιβάλλει το πυρηνικό περιεχόμενο
α. Πυρηνικός πόρος: άνοιγμα επί του πυρηνικού φακέλου	Ρυθμίζει τη μεταφορά εκατέρωθεν του φακέλου	Σε όλο τον πυρηνικό φάκελο
2. Πυρηνίσκος: μικρή στρογγυλή βασεόφιλη δομή	Συνθεση ριβοσωμικού RNA (rRNA)	Στον πυρήνα μεταφραστικά ενεργών κυττάρων
3. Χρωματίνη: DNA σε περιελιγμένη μορφή	Οργάνωση DNA	Στον πυρήνα
α. Ευχρωματίνη: μη περιελιγμένη χρωματίνη, σχετικά ανοιχτόχρωμες περιοχές του πυρήνα	Περιοχές πιο προσβάσιμες σε μεταγραφικές πρωτεΐνες	Μεταγραφικά ενεργά κύτταρα έχουν περισσότερο ευχρωματίνη από ετεροχρωματίνη
β. Ετεροχρωματίνη: περισσότερο σφιχτά περιελιγμένη χρωματίνη, περιοχές χρωσμένες σκοτεινόχρωμα	Περιοχές λιγότερο προσβάσιμες σε μεταγραφικές πρωτεΐνες	Μεταγραφικά ανενεργά κύτταρα έχουν περισσότερο ετεροχρωματίνη από ευχρωματίνη
Συσκευή Golgi		
Οργανίδιο που αποτελείται από ομάδες - στοίβες μεμβρανικών σάκων	Μετα-μεταφραστική τροποποίηση, οργάνωση και πακετάρισμα πρωτεϊνών	Γύρω από τον πυρήνα στα περισσότερα κύτταρα, καλά οργανωμένο σε εκκριτικά, μεταφραστικά ενεργά κύτταρα
α. Περιοχή cis: πεπλατυσμένοι σάκοι	Υποδέχονται νεοσχηματιζόμενες πρωτεΐνες	Πιο κοντά στον πυρήνα
β. Περιοχή trans: κυρτή πλευρά	Αποστέλλει τροποποιημένες πρωτεΐνες σε κατάλληλες περιοχές του κυττάρου	Πιο μακριά από τον πυρήνα

2. Μιτοχόνδρια: σφαιρικές ως επιμηκυσμένες ωοειδείς δομές με διπλή μεμβράνη	Μεγάλη ποσότητα παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)	Πολυάριθμα σε κύτταρα που καταναλώνουν πολλή ενέργεια
α. Εξωτερική μεμβράνη: λείο εξωτερικό στρώμα	Οριοθετεί το οργανίδιο, περιέχει μεταφορείς ATP	Εξωτερικό στρώμα των μιτοχονδρίων
β. Εσωτερική μεμβράνη με πολυάριθμες πτυχωσεις	Περιέχει την υποδομή για τη διενέργεια του αερόβιου μεταβολισμού και την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ATP	Εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων
3. Αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο: σύστημα από σασκοειδείς και σκληροειδείς μεμβρανικές δομές με ριβοσώματα στην εξωτερική πλευρά	Πρωτεϊνική σύνθεση	Άφθονο σε εκκριτικά, μεταφραστικά ενεργά κύτταρα
4. Λείο ενδοπλασματικό δίκτυο: σύστημα χωρίς ριβοσώματα	Παραγωγή μεμβρανικών υλικών, μεταβολισμός λιπιδίων	Άφθονο σε κύτταρα που σχετίζονται με το μεταβολισμό λιπιδίων
Κυτταροσκελετός		
Σύστημα νηματοειδών ινών με ποικίλο προσανατολισμό	Παρέχουν δομική υποστήριξη, μηχανισμό κυτταρικής κίνησης, λειτουργούν ως σκαλωσιά και θέση πρόσδεσης οργανιδίων, συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια επικοινωνία	Σε όλο το κυτταρόπλασμα
1. Ινίδια ακτίνης - λεπτά νημάτια: λεπτά ινίδια 6-8 nm διαμέτρου, ποικίλου μήκους	Κίνηση σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο, σχηματίζουν τη δομική μονάδα των μικρολαχνών	Άφθονα στους μυς (συμμετοχή στον μηχανισμό σύσπασης), στον πυρήνα των μικρολαχνών
2. Ενδιάμεσα νημάτια: ινίδια διαμέτρου 8-10 nm. Υπάρχουν διαφόρων ειδών που εκφράζονται σε συγκεκριμένους ιστούς το καθένα	Υποστήριξη, παροχή δυνατότητας ικριώματος	Σε όλο το κυτταρόπλασμα των περισσότερων κυττάρων

<p>3. Μικροσωληνίσκοι: Κοίλες σωληνοειδείς πρωτεϊνικές ίνες διαμέτρου 20-25 nm αποτελούμενες από πρωτεΐνες τουμπουλίνης</p>	<p>Ενδοκυττάρια μεταφορά, παραγωγή κυτταρικής κίνησης</p>	<p>Σε όλο το κυτταρόπλασμα</p>
<p>α. Κεντριόλιο: κύλινδρος από εννιά τριπλέτες τουμπουλίνης</p>	<p>Ρύθμιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων</p>	<p>Κοντά στον πυρήνα</p>
<p>β. Κεντροσωμάτιο: δύο κεντριόλια τοποθετημένα υπό γωνία μεταξύ τους</p>		
<p>γ. Αξόνημα: κύλινδρος από εννιά ζεύγη μικροσωληνίσκων με δύο μονήρεις μικροσωληνίσκους στο κέντρο</p>	<p>Κίνηση κροσσών και μαστιγίων</p>	<p>Στο κέντρο των κροσσών και των μαστιγίων</p>

κές χρωστικές όπως η αιματοξυλίνη. Περιβάλλεται από δύο συγκεντρικές μεμβράνες, κάθε μία από τις οποίες συνιστά μία διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων. Το πυρηνικό περίβλημα σχηματίζει έναν ρυθμιζόμενο φραγμό ανάμεσα στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και λέγεται πυρηνικός φάκελος. Η μεμβράνη του πυρήνα είναι διάτρητη από πολυάριθμους πόρους, οι οποίοι εξασφαλίζουν την επικοινωνία μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Το πυρήνιο είναι μια σφαιρική βασεόφιλη περιοχή μέσα στον πυρήνα στην οποία παράγεται το ριβοσωμικό RNA και είναι πολύ εμφανές στα μεταφραστικά ενεργά κύτταρα.

Το πυρηνικό DNA περιελίσσεται γύρω από ειδικές πρωτεΐνες και σχηματίζει τη χρωματίνη. Η κατανομή της χρωματίνης δεν είναι ομοιόμορφη αντανακλώντας τον διαφορετικό βαθμό συμπύκνωσης που αντιστοιχεί στον βαθμό της μεταγραφικής δραστηριότητας. Η ευχρωματίνη φαίνεται ως αραιοχρωματικές, φωτεινές περιοχές στον πυρήνα, που αντιστοιχούν στο ενεργά μεταγραφόμενο DNA του κυττάρου. Η ετεροχρωματίνη διακρίνεται ως πυκνοχρωματικές περιοχές στις οποίες η χρωματίνη εμφανίζει υψηλό βαθμό συμπύκνωσης και αφορά μεταγραφικά ανενεργό DNA.

Η **συσσκευή Golgi** είναι οργανίδιο υπεύθυνο για τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση και συσκευασία των πρωτεϊνών που παράγονται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Εντοπίζεται κοντά στον πυρήνα και αποτελείται από σειρές, αποπλατυσμένων, ελαφρώς καμπύλων, αφοριζόμενων από μεμβράνη δεξαμενών. Διακρίνουμε δύο περιοχές στη συσκευή Golgi. Την περιοχή *cis* που βρίσκεται κοντά στον πυρήνα και υποδέχεται τις νεοσχηματισμένες πρωτεΐνες και την περιοχή *trans* που βρίσκεται πιο μακριά από τον πυρήνα και αποστέλλει τις τροποποιημένες πρωτεΐνες σε κατάλληλες περιοχές του κυττάρου.