



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΩΝ
ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΣΥΝ-ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ : ΜΠΟΓΡΗ ΟΛΓΑ

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ : 19678202

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ ΚΑΘΗΓΗΤΗ:
ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ, MD, PhD, PharmD, MSc – ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE
SCIENCES DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

**SUBJECT: COMBINATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL AND
HISTOCHEMICAL TECHNIQUES ON PARAFFIN EMBEDDED TISSUES FOR
THE CO-LOCALIZATION OF CELLULAR AND MICROENVIRONMENTAL
PROTEINS.**

STUDENT NAME: BOGRI OLGA

CN: 19678202

NAME OF SUPERVISOR:

PAPANASTASIOU ANASTASIOS, MD, PhD, PharmD, MSc – ASSISTANT
PROFESSOR IN THE DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES OF
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ATHENS, 2024



**ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΕ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΥΝ-
ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.**

Μέλη εξεταστικής επιτροπής:

Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/Α	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ	Δ.Ε.Π., Επίκουρος Καθηγητής στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	
2	ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΧΑΝΙΩΤΗΣ	Δ.Ε.Π., Καθηγητής και Πρόεδρος του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών	
3	ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΣ	Δ.Ε.Π., Επίκουρος Καθηγητής στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μπόγρη Όλγα του Σταματίου, με αριθμό μητρώου 19678202 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	IV
ABSTRACT	VI
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην Παθολογική Ανατομική	1
1.1. Ορισμός Παθολογικής Ανατομικής.....	1
1.2 Ιστορική αναδρομή εξέλιξης της Παθολογικής Ανατομικής.....	1
Κεφάλαιο 2: Διαδικασίες και τεχνικές επεξεργασίας του ιστού στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο	4
2.1 Πρωτοκόλληση ιστολογικών παρασκευασμάτων.....	4
2.2 Μονιμοποίηση ιστολογικών παρασκευασμάτων- Μονιμοποιητικά διαλύματα.....	4
2.3. Ανεπαρκής και παρατεταμένη μονιμοποίηση.....	6
2.4 Εναλλακτικά Μονιμοποιητικά διαλύματα.....	8
2.4.1 Διάλυμα Bouin	8
2.4.2 Γλουταραλδεΐδη.....	9
2.4.3. Γλυοξάλη.....	9
2.4.4. Διάλυμα Zenker	10
2.4.5. Διάλυμα B5.....	10
2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της μονιμοποίησης.....	11
Κεφάλαιο 3: Μακροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων	13
3.1. Επεξεργασία των ιστολογικών παρασκευασμάτων στην ιστοκινέτα	13
3.2. Σκλήρωση.....	14
3.3. Μικροτόμηση	16
Κεφάλαιο 4: Ιστοχημικές χρώσεις Παθολογοανατομικού εργαστηρίου	20
4.1. Ιστοχημικές χρώσεις.....	20
4.1.1 Ιστορική εξέλιξη Ιστοχημικών χρώσεων.....	21
4.1.2 Τρόπος δράσης των Ιστοχημικών χρώσεων.....	23
4.2.Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.....	26
4.2.1. Τύποι Αιματοξυλίνης	28
4.3. Ειδικές Ιστοχημικές χρώσεις	30
4.3.1. Giemsa.....	30
4.3.2. PAS.....	31
4.3.3. Alcian Blue	32
4.3.4. Ziehl Neelsen.....	33

4.3.5. Masson Trichrome	35
4.3.6 Ιστοχημική χρώση Ανιλίνης.....	36
Κεφάλαιο 5: Ανοσοϊστοχημεία.....	39
5.1. Ιστορική εξέλιξη ανοσοϊστοχημείας.....	39
5.2. Αντιγόνο-Αντίσωμα.....	40
5.3.Αντιγονική ανάκτηση (Antigen retrieval).....	41
5.4. Μονοκλωνικά-Πολυκλωνικά αντισώματα	42
5.5. Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας	43
5.6. Συστήματα ανίχνευσης στην Ανοσοϊστοχημεία.....	44
5.6.1.Ανίχνευση ενός σταδίου (Άμεση)	45
5.6.2.Ανίχνευση δύο σταδίων (Εμμεση).....	45
5.6.3. Ανίχνευση τριών σταδίων (Εμμεση).....	47
5.7. Διπλή Ανοσοχρώση (πρωτόκολλο και σημαντικά σημεία ελέγχου)	47
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	50
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	50
1. Επιλογή ιστού.....	50
2. Εμπορικά διαθέσιμα αναλώσιμα.....	50
3. Αναλυτικό πρωτόκολλο διπλής ανοσοϊστοχημικής και ιστοχημικής χρώσης ανιλίνης.....	51
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73
Παράρτημα Εικόνων.....	81

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ανατομίας-Παθολογικής Ανατομίας και Φυσιολογίας-Διατροφής του πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Μετά την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Αναστάσιο Παπαναστασίου τόσο για την άριστη συνεργασία μας όσο και για το σύνολο των γνώσεων που μου μετέδωσε όλον αυτόν τον καιρό. Παράλληλα τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την έμπνευση που μου μετέδωσε ώστε να ασχοληθώ με τον κλάδο της παθολογικής ανατομικής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πρόεδρο του τμήματος κύριο Δημήτριο Χανιώτη και τον κύριο Νικόλαο Θαλασσινό, που δέχτηκαν να είναι στην τριμελή επιτροπή μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κωνσταντίνο Ντόστογλου για τον χρόνο που μου διέθεσε ώστε να μου λύσει οποιαδήποτε απορία μου , για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη διάρκεια συγγραφής αυτής της εργασίας. Η βοήθεια του ήταν καθοριστική.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια και του φίλους μου για την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν καθόλη τη διάρκεια που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Ο όρος παθολογική ανατομική αναφέρεται στην ειδικότητα της ιατρικής που μελετά την παθοφυσιολογία της νόσου. Ειδικότερα μελετώνται τα κύτταρα και οι ιστοί, καθώς η νόσος ξεκινά στο κυτταρικό επίπεδο, ωστόσο οι κυτταρικές διαταραχές προέρχονται από μεταβολές σε άλλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες, οι οποίες επηρεάζουν την επιβίωση και τη βιολογική συμπεριφορά των κυττάρων. Στην καθ'ημέρα πράξη, στο εργαστήριο παθολογικής ανατομικής η κύρια χρώση που χρησιμοποιείται είναι αυτή της αιματοξυλίνης/ηωσίνης ενώ εφαρμόζονται και άλλες χρώσεις για τη διερεύνηση άλλων συστατικών του κυττάρου, όπως η χρώση της ανιλίνης που χρησιμοποιείται για την ανάδειξη του κολλαγόνου των ιστών το οποίο συμμετέχει στην εξέλιξη πολλών νόσων. Παράλληλα η ανοσοϊστοχημεία αναγνωρίζεται ως μια τεχνική που στηρίζεται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου και αντισώματος με σκοπό τον εντοπισμό και την ανάδειξη ειδικών αντιγόνων εντός των κυττάρων και των ιστών. Επιπλέον η εφαρμογή αυτής της τεχνικής συμβάλλει στην ταξινόμηση των νεοπλασμάτων και στην ταυτοποίηση της προέλευσης ενός μεταστατικού όγκου. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου συνδυασμού των δύο βασικών τεχνικών του παθολογοανατομικού εργαστηρίου: Της Διπλής Ανοσοϊστοχημικής χρώσης που στοχεύει στον εντοπισμό δύο αντιγονικών επιτόπων και της Ιστοχημικής χρώσης της Ανιλίνης για την ανάδειξη του κολλαγόνου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκε ιστός από μασχαλιαίο λεμφαδένα, εγκλεισμένος σε παραφίνη, ο οποίος παρουσίαζε μεταστατική εστία από καρκίνωμα μαστού. Η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε μέσω της χρήσης ειδικών αντισωμάτων έναντι της πυρηνικής πρωτεΐνης Ki-67 και της διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης CD8 και συνδυάστηκε με την ιστοχημική χρώση της ανιλίνης. Έπειτα πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων που αποσκοπούσαν στην αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών για το συνδυασμό των δύο αυτών τεχνικών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Πραγματοποιήθηκαν πέντε τροποποιήσεις στο βασικό πρωτόκολλο, οι οποίες οδήγησαν στην τελική μορφή του. Μια από αυτές τις τροποποιήσεις λειτούργησε ως μέθοδος επιβεβαίωσης της παρουσίας κολλαγόνου. Οι

διάφορες παραλλαγές πραγματοποιήθηκαν αποσκοπώντας η τελική πειραματική διαδικασία να αναδεικνύει με τον βέλτιστο τρόπο ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες K α 67, CD8 και το κολλαγόνο, τόσο μέσα στα κύτταρα όσο και στο μικροπεριβάλλον του ιστού.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Μετά από μια σειρά πειραμάτων που ως στόχο είχαν την επανεξέταση και τη βελτίωση των συνθηκών για τον συνδυασμό των δύο μεθόδων (ανοσοϊστοχημείας και ιστοχημείας) χαρακτηρίστηκε το τελικό πρωτόκολλο που παρέχει σαφή αποτελέσματα όσον αφορά τη μέθοδο της διπλής ανοσοϊστοχημείας K α 67-CD8 σε συνδυασμό με τη χρώση ανιλίνης. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί στο μέλλον ευρύτερα και σε διάφορες παθολογικές οντότητες που παρουσιάζουν ίνωση.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Surgical Pathology refers to the specialty of medicine that studies the pathophysiology of human disease. More specifically, cells and tissue are studied as the disease starts at the cellular level. However, cellular disorders come from changes in molecules such as proteins, which affect the survival and biological behavior of cells. In the pathology laboratory the main staining used is hematoxylin/eosin, while other histochemical stainings are also used to investigate other cell components, such as the aniline staining which is used to highlight the tissue collagen that participates in the development of many diseases. At the same time immunohistochemistry is recognized as a technique based on the antigen-antibody interaction in order to identify specific proteins within cells and tissues. Furthermore, the application of this technique contributes to the classification of neoplasms and to the identification of the origin of a metastatic tumor.

The aim of this thesis is to study the combination of the two basic techniques of the pathology laboratory on the same tissue sample: Double immunohistochemical staining and Aniline histochemical staining. The first one allows the detection of two different antigenic epitopes, while the second is used to detect collagen at the same time.

MATERIALS AND METHODS: For the fulfilment of this study, FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) tissue from an axillary lymph node was used, which presented a metastatic focus from a breast carcinoma. The technique of immunohistochemistry was performed through the use of specific antibodies against the nuclear protein Ki-67 and the transmembrane glycoprotein CD8 and was combined with the histochemical staining for aniline. Then, a series of refinement experiments were carried out aimed at defining the optimal conditions for the combination of these two techniques.

RESULTS: Five modifications were carried out to the basic protocol, leading to its final form. One of these modifications worked as a method of confirming the presence of collagen. The various variations were performed in order that the final experimental

procedure would optimally highlight the Ki67, CD8 and collagen simultaneously, both inside the cells and in the tissue microenvironment.

CONCLUSIONS: After a series of experiments that aimed at reviewing and improving the conditions for the combination of the two methods (immunohistochemistry and histochemistry) the final protocol was characterized that provides clear results regarding the double immunohistochemistry method Ki67-CD8 in combination with the histochemistry staining of aniline. This technique can be applied in the future more widely and in various pathological conditions that show fibrosis.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην Παθολογική Ανατομική

1.1. Ορισμός Παθολογικής Ανατομικής

Στη σύγχρονη εποχή ο όρος *Παθολογική Ανατομική* αναφέρεται στο κλάδο της ιατρικής που ασχολείται με τη κατανόηση των μηχανισμών της νόσου και τις σχετικές με τη νόσο μεταβολές των κυττάρων, των ιστών και των οργάνων οι οποίες δίνουν γένεση στα σημεία και στα συμπτώματα που εμφανίζει ο ασθενής.

Δύο είναι οι κυριότερες έννοιες που πρέπει να αποσαφηνιστούν στην παθολογική ανατομική. Αρχικά είναι η έννοια της **αιτιολογίας**, όπου αναφέρεται στα αίτια και τους υποκείμενους παράγοντες που ευθύνονται για την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου και η **έννοια της παθογένειας** η οποία αναφέρεται στους μηχανισμούς ανάπτυξης και εξέλιξης της νόσου, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις κυτταρικές και μοριακές μεταβολές και δίνουν γένεση στις ειδικές λειτουργικές και δομικές διαταραχές, χαρακτηριστικές κάποιας συγκεκριμένης νόσου (Kumar V, Abbas A.K, Aster J.C, Perkins J.A, 2018)

1.2 Ιστορική αναδρομή εξέλιξης της Παθολογικής Ανατομικής

Ο όρος της Παθολογικής Ανατομικής έκανε την εμφάνιση του μεταξύ του 16^{ου} και 17^{ου} αιώνα, όπου εγκαθιδρύθηκαν οι βάσεις για την επιστημονική και τεχνολογική εξέλιξη όπως τη γνωρίζουμε σήμερα. Αξίζει ιστορικά να αναφερθεί πως ο **Giovanni Battista Morgagni** (1682-1771) ήταν ο πατέρας της παθολογικής ανατομικής και ο πρωτοπόρος της σύγχρονης ιατρικής (Ghosh, S.K, 2017). Η προσπάθεια και το έργο του θεωρήθηκαν κομβικής σημασίας για την αναθεώρηση παλαιότερων απόψεων που επικρατούσαν κατά την εποχή του Ιπποκράτη και του Γαλιανού, όπου οι σπουδές ανατομίας και η κλινική ιατρική θεωρούνταν δύο διαφορετικές έννοιες. Ειδικότερα, ο Ιπποκράτης (460-370 πχ) εισήγαγε τη θεωρία των τεσσάρων χυμών (μαύρη χολή, κίτρινη χολή, αίμα, φλέγμα). Όταν οι χυμοί αυτοί βρίσκονταν σε ισορροπία τότε το σώμα ήταν υγιές. Στην περίπτωση που ένας από τους χυμούς δε βρισκόταν σε ισορροπία, τότε ο οργανισμός νοσούσε. Η θεωρία του επηρέασε την ιατρική μέχρι και την περίοδο της αναγέννησης.

Στη συνέχεια ο Γαληνός (129-201μχ), μέσω της ανατομίας των ζώων περιέγραψε δομές όπως το νευρικό και το ουροποιητικό σύστημα και εισήγαγε την έννοια της αιμορραγίας (van den Tweel JG, Taylor CR, 2010).

Ο Morgagni έχει θεωρηθεί ως ο ιδρυτής της Παθολογικής Ανατομικής και έδωσε ιδιαίτερη έμφαση στη συσχέτιση μεταξύ των εμπειρικών συμπτωμάτων μιας νόσου και των παθολογικών ευρημάτων που παρατηρούνταν κατά τη νεκροψία-νεκροτομή. Περιέγραψε χαρακτηριστικά τα κλινικά συμπτώματα ως «το δάκρυ των οργάνων που υποφέρουν». Έτσι παρέκκλινε από την παραδοσιακή προσέγγιση των προκατόχων του, οι οποίοι αγνοούσαν τον μηχανισμό των ασθενειών και η διαχείριση τους βασιζόταν μόνο στην παρατήρηση των συμπτωμάτων .

Ο Morgagni ήταν ο πρώτος που εισήγαγε την ιδέα της κλινικής ανατομικής για τον καθορισμό των μηχανισμών της νόσου και υποστήριξε ότι η ανατομία είναι το όργανο με το οποίο αναγνωρίζεται η θέση και η αιτιολογία οποιασδήποτε ασθένειας. Η παραπάνω συσχέτιση των παθολογικών αλλαγών σε συνδυασμό με τα συμπτώματα της νόσου εξακολουθεί να αποτελεί κοινή πρακτική μέχρι και σήμερα. Την χρονιά όπου ο Morgagni απεβίωσε , γεννήθηκε ένας σπουδαίος επιστήμονας ο Marie Francois Xavier Bichat (1771-1802) , ο οποίος έθεσε τα θεμέλια για την εμφάνιση του όρου «Ιστολογία». Πιο συγκεκριμένα ο Bichat χρησιμοποίησε τις διασυνδέσεις του ως χειρουργός στρατού στη Γαλλική επανάσταση ώστε να εξετάσει τα νωπά σώματα εκείνων που είχαν καταδικαστεί στη λαιμητόμο. Με απλές μεθόδους και χωρίς τη χρήση μικροσκοπίου ήταν ικανός να αναγνωρίσει 21 τύπους ιστών , βελτιώνοντας το υπόβαθρο για τη κατανόηση των ασθενειών που σχετίζονται με τους ιστούς.

Ένας άλλος επιστήμονας που συνέλαβε καθοριστικά στην εξέλιξη της Παθολογικής Ανατομικής ήταν ο Rudolf Virchow (1821-1902).Ο Virchow θεωρείται η σημαντικότερη προσωπικότητα στην ιστορία της παθολογίας και ήταν μαθητής του Johannes Müller (1801–1858) στο Βερολίνο. Ο Müller αποτέλεσε την κύρια πηγή από την οποία προέκυψαν οι επιστήμες της Ιστολογίας και της Κυτταρικής Παθολογίας. Παράλληλα ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε το μικροσκόπιο για την ανάλυση των ιστών.

Με την εμφάνιση του μικροσκοπίου και σε συνδυασμό με την επαναστατική δουλειά των Morgagni, Bichat και Virchow, η ειδικότητα της παθολογίας εισήλθε σε μια νέα εποχή από τις απαρχές του 19^{ου} αιώνα. Ειδικότερα η εμφάνιση του μικροσκοπίου

έφερε επανάσταση στην έννοια της νόσου μετατοπίζοντας το επίκεντρο όχι στα όργανα μόνο αλλά και στα κύτταρα που περιέχει (van den Tweel JG, Taylor CR, 2010). Στα αρχικά στάδια της Παθολογικής Ανατομικής, οι νεοποι ιστοί κόβονταν με το χέρι και εξετάζονταν χωρίς να βαφτούν με κάποια Ιστοχημική χρώση όπως συμβαίνει σήμερα. Σταδιακά κατά τις τελευταίες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα αυτή η προσέγγιση εξελίχθηκε στη χρήση μονιμοποιημένων ιστών, στις τεχνικές εμπέδωσης των ιστών, στη μικροτόμηση και στη χρήση πληθώρας Ιστοχημικών χρώσεων (Sadeghipour A, Babaheidarian P, 2019).

Κεφάλαιο 2: Διαδικασίες και τεχνικές επεξεργασίας του ιστού στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο

2.1 Πρωτοκόλληση ιστολογικών παρασκευασμάτων

Πρωταρχικό και σημαντικότερο βήμα για την επεξεργασία ενός ιστολογικού παρασκευάσματος αποτελεί η ταυτοποίηση του δείγματος με το παραπεμπτικό δελτίο που συνοδεύει το παρασκεύασμα. Ο Βιοϊατρικός Επιστήμονας που παραλαμβάνει το δείγμα οφείλει να ελέγξει πλήρως τα στοιχεία που αναγράφονται στο παραπεμπτικό δελτίο όπως το όνομα, την ηλικία του ασθενούς, το όνομα του κλινικού γιατρού, το είδος της επέμβασης που πραγματοποιήθηκε, τα τυχόν ευρήματα που βρέθηκαν στο χειρουργείο καθώς και το είδος του ιστού που αποστέλλεται, και τα συγκρίνει με τα στοιχεία που αναγράφονται στο ειδικό δοχείο όπου περιέχεται το προς εξέταση παρασκεύασμα. Επίσης, οφείλει να ελέγξει την ποσότητα του μονιμοποιητικού διαλύματος μέσα στο οποίο εμπεριέχεται το προς εξέταση δείγμα και να προσθέσει εάν απαιτείται, προκειμένου να γίνει σωστή μονιμοποίηση του ιστού. Στη συνέχεια και αφού γίνει ο παραπάνω έλεγχος εκτυπώνεται και ο αριθμός πρωτοκόλλου που είναι μοναδικός για κάθε ασθενή.

2.2 Μονιμοποίηση ιστολογικών παρασκευασμάτων- Μονιμοποιητικά διαλύματα

Οποιοσδήποτε ιστός εξέρχεται από το ανθρώπινο σώμα κατά την διάρκεια μια χειρουργικής επέμβασης, πρέπει να μεταφέρεται σε ειδικό δοχείο που περιέχει επαρκές μονιμοποιητικό υγρό και να μεταφερθεί όσο το δυνατόν συντομότερα στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο. Πιο συγκεκριμένα το μέγεθος των ιστολογικών παρασκευασμάτων ποικίλλει από μερικά χιλιοστά όπως είναι οι βιοψίες που λαμβάνονται μέσω ενδοσκοπικών τεχνικών (γαστροσκόπηση, κολonosκόπηση) είτε μέσω της χρήσης ειδικής βελόνης (βιοψία μαστού), έως ολόκληρα όργανα όπως μαστός, τμήμα παχέος εντέρου, ωθήκη, μήτρα, πνεύμονας.

Αρχικά, μετά την παραλαβή των ιστολογικών παρασκευασμάτων, παραμένουν στο μονιμοποιητικό υγρό για χρονικό διάστημα ανάλογο του μεγέθους τους, το οποίο όμως δεν πρέπει να είναι λιγότερο από 24 ώρες ούτε να υπερβαίνει τις 48 ώρες. Η διαφοροποίηση στον χρόνο παραμονής των ιστών στο μονιμοποιητικό μέσο οφείλεται

στο γεγονός ότι η φορμόλη χρειάζεται περισσότερη ώρα να διηθήσει ένα ολόκληρο όργανο όπως για παράδειγμα τον μαστό σε σχέση με μια βιοψία δέρματος.

Το πρώτο και κυριότερο βήμα στην επεξεργασία ενός ιστού είναι η **μονιμοποίηση** ώστε να αποφευχθεί η αυτόλυση, δηλαδή η διάσπαση των κυττάρων καθώς και η σήψη του παρασκευάσματος. Υπάρχουν πολλά μονιμοποιητικά υλικά στο εμπόριο, ωστόσο το ευρέως χρησιμοποιούμενο στα εργαστήρια της Παθολογικής Ανατομικής είναι η **φορμαλδεΰδη** με χημικό τύπο HCHO. Η φορμαλδεΰδη είναι ένα μόριο χαμηλού μοριακού βάρους (MB=30 KDa) όπου στη φυσική μορφή της την συναντάμε ως αέριο και είναι πολύ διαλυτή στο νερό. Έτσι οι κατασκευαστές διαλυτοποιούν την αέρια μορφή της φορμαλδεΰδης μέχρι να επέλθει ο κορεσμός και να μην μπορεί να διαλυθεί άλλο αέριο (37%) και κατά συνέπεια πωλείται ως υδατικό διάλυμα 37%. Το διάλυμα εργασίας που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια αποτελείται από ένα μέρος φορμαλδεΰδης 37% και εννέα μέρη νερού, σχηματίζοντας τελικά το **διάλυμα φορμόλης 10%** όπου η περιεκτικότητα της φορμαλδεΰδης είναι 4% (Feldman AT, Wolfe D. 2014).

Ως μονιμοποιητικό η φορμαλδεΰδη διατηρεί κυρίως πεπτίδια και τη γενικότερη μορφή των κυτταρικών οργανιδίων. Έχει επίσης την ικανότητα να αντιδρά με τα νουκλεϊκά οξέα ασκώντας ελάχιστη επίδραση στους υδατάνθρακες. Επιπρόσθετα η φορμαλδεΰδη διατηρεί αρκετά καλά τα λιπίδια εάν το μονιμοποιητικό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί περιέχει ασβέστιο (Ramos-Vara JA. 2005).

Η μονιμοποίηση με φορμόλη αποτελεί μια διαδικασία τριών βημάτων: **α) της διείσδυσης β) της δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών γ) και τέλος του σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών**. Πρέπει να τονιστεί ότι η δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ πεπτιδίων-στόχων και μη σχετικών πρωτεϊνών μπορεί να μειώσει ή να αναστείλει την άνοσο-δραστικότητα τους. Παρόλο που οι παραπάνω τρεις διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα έχουν διαφορετικούς ρυθμούς, με τη διείσδυση να προπορεύεται έναντι της δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών που συμβαίνει αμέσως μετά τη διείσδυση και της δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών που ολοκληρώνεται τελευταία. Επίσης η μονιμοποίηση στους 37⁰C είναι ταχύτερη σχετικά με τη μονιμοποίηση στους 25⁰C. Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι η φορμαλδεΰδη

διαπερνά σχετικά γρήγορα τους ιστούς αλλά η διείσδυση του ιστού δεν είναι ανάλογη της μονιμοποίησης του (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

Το διάλυμα φορμαλδεΰδης έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα ακόλουθα αμινοξέα: λυσίνη, τυροσίνη, ασπαργίνη, τρυπτοφάνη, ασπαργίνη, ιστιδίνη, αργινίνη, κυστεΐνη και γλουταμίνη. Έτσι όταν είναι γνωστή η σύνθεση των αμινοξέων ενός επιτόπου μπορεί να προβλεφθεί και η ευαισθησία του στη μονιμοποίηση με φορμόλη. Ωστόσο η διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ αντιγόνων και μη σχετικών πρωτεϊνών μπορεί να επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα στην άνοσο-δραστικότητα των αντιγόνων μετά τη μονιμοποίηση.

Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη είναι ο σχηματισμός ενδιάμεσων προϊόντων, μεταξύ της φορμόλης και των μη φορτισμένων αντιδρώντων αμινομάδων (-NH ή NH₂) σχηματίζοντας τελικά διασταυρούμενους δεσμούς. Μόλις σχηματιστεί το ενδιάμεσο προϊόν (ενεργό μείγμα υδροξυλίων-μεθυλίων), τότε θα πραγματοποιηθεί η επιπρόσθετη διασταυρούμενη σύνδεση. Επιπλέον με την παρουσία ενός δεύτερου αντιδρώντος υδρογόνου η υδροξύ-μεθυλομάδα θα σχηματίσει μια γέφυρα μεθυλενίου. Η χημική αντίδραση που προαναφέρθηκε περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα (Ramos-Vara JA. 2005):

A) Σχηματισμός προϊόντων προσθήκης :



Ενεργό υδρογόνο στον ιστό φορμαλδεΰδη Ενεργό ενδιάμεσο προϊόν υδροξύμεθύλιο

B) Σχηματισμός γέφυρας μεθυλενίου :



Ενεργό ενδιάμεσο προϊόν Δεύτερο ενεργό υδρογόνο Γέφυρα μεθυλενίου

υδροξυλίων -μεθυλίων στην πρωτεΐνη διασταυρούμενος δεσμός

2.3. Ανεπαρκής και παρατεταμένη μονιμοποίηση

Η μη επαρκής μονιμοποίηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων οδηγεί σε μη αναμενόμενα αποτελέσματα και θεωρείται πιο συχνό και αναμενόμενο πρόβλημα

συγκριτικά με την παρατεταμένη μονιμοποίηση. Σύμφωνα με τη βασική μεθοδολογία που ακολουθείται κατά την επεξεργασία των ιστολογικών παρασκευασμάτων, αυτά μετά τη μονιμοποίηση τους με φορμόλη επεξεργάζονται στην ιστοκινέτα όπου διέρχονται από μια σειρά δοχείων που εμπεριέχουν διαλύματα αλκοολών με αυξανόμενη συγκέντρωση, πριν την εμπότιση τους με παραφίνη. Εάν τα μεγάλου μεγέθους ιστολογικά παρασκευάσματα μονιμοποιηθούν για 24 έως 48 ώρες, και οι βιοψίες για μερικές μόνο ώρες τότε ελλοχεύει ο κίνδυνος ανάπτυξης διασταυρούμενων δεσμών μόνο στην περιφέρεια του δείγματος με το κέντρο να παραμένει μη μονιμοποιημένο είτε να μονιμοποιείται από τα διαλύματα αλκοολών που χρησιμοποιούνται για την αφυδάτωση κατά τη μετέπειτα επεξεργασία του ιστού. Η μη επαρκής μονιμοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε αμφισβητούμενα αποτελέσματα που μπορούν να διαφοροποιήσουν την ανίχνευση ή και την αξιολόγηση διάφορων δεικτών στην ανοσοϊστοχημεία (Ramos-Vara JA. 2005).

Δεν υπάρχει συγκεκριμένος χρόνος μονιμοποίησης για καθένα από τα αντιγόνα. Η δομή του αντιγόνου όπως και η σχέση του με τις άλλες πρωτεΐνες επηρεάζει την επίδραση της μονιμοποίησης στην ανοσο-δραστικότητα. Η πρόσφατη σύσταση του Ινστιτούτου Κλινικών και Εργαστηριακών προτύπων για το χρόνο μονιμοποίησης σε φορμόλη είναι 16 έως 32 ώρες, με πλήρη μονιμοποίηση να επιτυγχάνεται κατά μέσο όρο από 24 έως 48 ώρες (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

Ποικίλα προβλήματα αναδύονται λόγω της παρατεταμένης μονιμοποίησης κατά το στάδιο της ανοσοϊστοχημείας, λόγω της δημιουργίας πολλών διασταυρούμενων δεσμών. Το γεγονός αυτό παρατηρείται ιδιαίτερα πριν την εφαρμογή μεθόδων αντιγονικής ανάκτησης που βασίζονται στη θερμοκρασία. Ωστόσο σημαντική μείωση της ανοσο-δραστικότητας ανιχνεύεται σε λίγους δείκτες μετά από μονιμοποίηση που διήρκεσε μια εβδομάδα. Έτσι εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αρνητική επίδραση της παρατεταμένης μονιμοποίησης εξαρτάται από το είδος του αντιγόνου και του αντισώματος και τα αρνητικά αποτελέσματα που προκύπτουν μπορούν να ξεπεραστούν μετά από την κατάλληλη διαδικασία αντιγονικής ανάκτησης. Παράλληλα η επίδραση της παρατεταμένης μονιμοποίησης με φορμαλδεΰδη εξαρτάται και από τον κυτταρικό εντοπισμό του αντιγόνου. Για παράδειγμα στην περίπτωση της Bcl-2, μιας ογκοπρωτεΐνης που ανήκει στην ομάδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απόπτωση, παρατηρείται μια μη αναστρέψιμη απώλεια της

ανοσοδραστηριότητας στην περιοχή του πυρήνα ακόμη και μετά από την εφαρμογή μεθόδων αντιγονικής ανάκτησης βασισμένων στη θερμοκρασία.

Με βάση τα προαναφερθέντα όταν τα δείγματα εκτίθενται στη φορμόλη για μεγαλύτερη διάρκεια πέραν της προβλεπόμενης λόγω αναπόφευκτων καταστάσεων, τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα θα πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά, διότι πολλά αντιγόνα είναι πιθανό να έχουν χαθεί είτε να έχουν καλυφθεί χωρίς να επιδέχονται βελτίωση.

Από τα παραπάνω καθίσταται αποδεκτό ότι η φορμόλη αποτελεί ένα σημαντικό μονιμοποιητικό διάλυμα καθώς διατηρεί τη μορφολογία των ιστών. Έτσι αυτό το μονιμοποιητικό χρησιμοποιείται ευρέως για την εφαρμογή ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων. Παρόλα αυτά η φορμόλη ασκεί και αρνητική επίδραση στους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, η αλλαγή της δομής πολλών αντιγόνων λόγω των διασταυρούμενων συνδέσεων καθιστά απαραίτητη την εφαρμογή μεθόδων αντιγονικής ανάκτησης προκειμένου να επανέλθει η απώλεια της αντιγονικότητας. Άλλος ένας περιορισμός της χρήσης της φορμαλδεΐδης είναι η αργή και η ημιτελής μονιμοποίηση, η εσφαλμένη εντόπιση και η αλλαγή της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών στόχων, όπως και η απώλεια των επιτόπων που οδηγεί στη μειωμένη αποτελεσματικότητα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν τους επιστήμονες στην ανεύρεση νέων μονιμοποιητικών εναλλακτικών της φορμαλδεΐδης.

2.4 Εναλλακτικά Μονιμοποιητικά διαλύματα

2.4.1 Διάλυμα Bouin

Το διάλυμα Bouin περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Tilland και McCulloch το 1897. Η σύνθεση του αποτελείται από διάλυμα φορμαλδεΐδης 37%, **πικρικό οξύ** και **κιτρικό οξύ**. Προκαλεί μετουσιωτική και διασταυρούμενη επίδραση στις πρωτεΐνες. Χάρη του πικρικού οξέος παράγεται μια κίτρινη χρωστική, η περίσσεια της οποίας πρέπει να απομακρύνεται με αιθανόλη 70% πριν τη διαδικασία της χρώσης. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το διάλυμα Bouin μπορεί να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (Hassannia, Hadi, 2023). Η διάρκεια μονιμοποίησης κυμαίνεται από 4 έως 18 ώρες.

(<https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/#bouins-solution>). Τα μονιμοποιητικά που περιέχουν πικρικό οξύ παρουσιάζουν πολύ καλή ικανότητα διείσδυσης του ιστού, διατήρηση του γλυκογόνου όπως και διατήρηση των ειδικών λεπτομερειών του πυρήνα. Έτσι αυτού του είδους τα μονιμοποιητικά συχνά συστήνονται για περιοχές όπου η μελέτη των λεπτομερειών του πυρήνα θα μπορούσε να θεωρηθεί ωφέλιμη, όπως στις κακοήθειες του λεμφικού συστήματος και στις βιοψίες όρχεων. Ωστόσο οι ιστοί οι οποίοι μονιμοποιούνται με το παραπάνω μονιμοποιητικό βράφονται κίτρινοι λόγω της παρουσίας του πικρικού οξέος με αποτέλεσμα αυτοί οι ιστοί να διατηρούν χαμηλή συγγένεια για τις βασικές ιστοχημικές χρώσεις. Τέλος, αυτού του είδους τα μονιμοποιητικά προκαλούν σημαντική συρρίκνωση στους ιστούς (Rai, Radhika, et al. 2016).

2.4.2 Γλουταραλδεΐδη

Η γλουταραλδεΐδη ή γλουταρική διαλδεΐδη ($\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) θεωρείται ως αλδεΐδη με δύο λειτουργίες καθώς το μόριο της έχει ομάδες αλδεΐδης σε κάθε άκρο του, έχοντας δυνητικά την ικανότητα να αντιδρά με τις ίδιες χημικές ομάδες με τη φορμαλδεΐδη. Τα μονιμοποιητικά που περιέχουν ως κύριο συστατικό τους την γλουταραλδεΐδη προκαλούν ισχυρότερη διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών συγκριτικά με τη φορμαλδεΐδη. Ωστόσο η εκτεταμένη διασταυρούμενη σύνδεση επηρεάζει αρνητικά την ανοσοϊστοχημική χρώση, αλλά παρέχει εξαιρετική διατήρηση της δομής των ιστών, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο μονιμοποιητικό για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Rolls, G. 2010).

2.4.3. Γλυοξάλη

Η γλυοξάλη παρουσιάστηκε το 1943 και είναι ένα μικρό μόριο διαλδεΐδης αποτελούμενο από δύο άτομα άνθρακα. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά αυτού του μονιμοποιητικού είναι ο γρήγορος ρυθμός της αντίδρασης και η διασταυρούμενη σύνδεση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Όπως και η φορμαλδεΐδη είναι εμπορικά διαθέσιμη ως διάλυμα που περιέχει ένυδρες μορφές όπως διμερή, τριμερή και δομές δακτυλίου. Όσον αφορά τη μονιμοποίηση, διαρκεί από 1 έως 9 ώρες ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος και παρέχει καλή κυτταρική και μοριακή δομή. Επίσης η

γλυοξάλη αποτελεί ένα αξιόπιστο μονιμοποιητικό για τη διατήρηση των αντιγόνων καθώς λόγω των ελεγχόμενων διασταυρούμενων συνδέσεων η διαδικασία της αντιγονικής ανάκτησης καθίσταται περιττή.

2.4.4. Διάλυμα Zenker

Το διάλυμα Zenker's προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Albert von Zenker και είναι ένα μονιμοποιητικό διάλυμα που δρα ταχέως στους ιστούς και περιέχει χλωριούχο υδράργυρο, διχρωμικό κάλιο, θειικό νάτριο, νερό και οξικό οξύ. Είναι ένα αρκετά καλό μονιμοποιητικό ρουτίνας που διεισδύει τον ιστό αρκετά γρήγορα και ομοιόμορφα. Τα μονιμοποιητικά υγρά που περιέχουν ως κύριο συστατικό τους το χλωριούχο υδράργυρο όπως το Zenker, παρέχουν εξαιρετική μονιμοποίηση του πυρήνα, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται η **χρωματίνη** με λεπτομέρεια. Εκτός αυτού, το συγκεκριμένο μονιμοποιητικό, μονιμοποιεί πολύ καλά τις ίνες του συνδετικού ιστού, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο μονιμοποιητικό για την εφαρμογή της τριχρωμης χρώσης Masson's η οποία βάφει, μεταξύ άλλων, και τον συνδετικό ιστό. Ο χρόνος μονιμοποίησης του ποικίλλει από 4 έως 24 ώρες. (<https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/#bouins-solution>). Παρόλα αυτά, το μονιμοποιητικό Zenker παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα που αποτρέπουν την ευρεία χρήση του. Ειδικότερα δεν είναι ιδιαίτερα σταθερό μονιμοποιητικό διάλυμα, μετατρέπει τους ιστούς σε σκληρούς και εύθραυστους ιστούς και οδηγεί στον αποχρωματισμό τους. Το σημαντικότερο όμως μειονέκτημα αυτού του μονιμοποιητικού είναι ο χλωριούχος σίδηρος που περιέχει ο οποίος έχει τοξική δράση (Rai, Radhika, et al. 2016).

2.4.5. Διάλυμα B5

Το μονιμοποιητικό διάλυμα B5 συνίσταται για τη μονιμοποίηση των στοιχείων του αιμοποιητικού και λεμφικού συστήματος, παρά την περιεκτικότητά του σε χλωριούχο υδράργυρο. Πιο συγκεκριμένα βελτιώνει την πυρηνική λεπτομέρεια, παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα συνδυαζόμενο με πολλές ειδικές ιστοχημικές χρώσεις και συνίσταται για την μέθοδο της Ανοσοϊστοχημείας. Ο χρόνος που απαιτείται για τη μονιμοποίηση του ιστού με διάλυμα B5 κυμαίνεται από 4 έως 8 ώρες.

<https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/#bouins-solution>).

2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της μονιμοποίησης

Εκτός του είδους και της μη σωστής προβλεπόμενης χρήσης του μονιμοποιητικού διαλύματος, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της μονιμοποίησης, όπως το pH του μονιμοποιητικού διαλύματος, το μέγεθος του ιστού, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση και το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται.

A) pH

Το βέλτιστο αποτέλεσμα που λαμβάνεται κατά τη μονιμοποίηση συμβαίνει σε pH που κυμαίνεται από 6 έως 9. Όταν οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο ισοηλεκτρικό τους pH τότε παρουσιάζουν τη μικρότερη διαλυτότητα, ωσμωτική πίεση και διόγκωση Hassannia, Hadi. (2023).

B) Μέγεθος ιστών

Το μικρό μέγεθος των ιστών οδηγεί σε ομοιόμορφη μονιμοποίηση. Εάν το μέγεθος του δείγματος είναι πολύ μεγάλο τότε δεν είναι εύκολο το μονιμοποιητικό να διηθήσει τον ιστό και να φτάσει στα βαθύτερα τμήματα του οδηγώντας στην αυτόλυση του. Μεταξύ των κοινών χρησιμοποιούμενων μονιμοποιητικών, η φορμαλδεΰδη διηθεί γρηγορότερα τους ιστούς. Τα μονιμοποιητικά διασταυρούμενων συνδέσεων (φορμαλδεΰδη, γλουταραλδεΰδη) είναι προτιμότερα για τα μεγάλα μεγέθους δείγματα (Suvarna, K.S. 2019).

Γ) Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία του μονιμοποιητικού διαλύματος κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης φαίνεται πως επηρεάζει τη δομή των ιστών. Η διάχυση των μορίων αυξάνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας λόγω της πιο γρήγορης κίνησης τους και της δόνησης, δηλαδή ο ρυθμός διείδυσης ενός ιστού είναι ταχύτερος σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ειδικότερα όσον αφορά τη μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη. Ως εκ τούτου, έχουν χρησιμοποιηθεί φούρνοι μικροκυμάτων προκειμένου να επιταχυνθεί η μονιμοποίηση

των ιστών, αυξάνοντας τόσο τη θερμοκρασία όσο και τις κινήσεις των μορίων. Έτσι οι περισσότερες χημικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται πιο γρήγορα σε υψηλότερες θερμοκρασίες όπως η μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη η οποία δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η μονιμοποίηση στους 4°C προτιμάται για τη μονιμοποίηση με γλουταραλδεΰδη (Horwood, 1985).

Δ) Συγκέντρωση

Η συγκέντρωση του μονιμοποιητικού διαλύματος εξαρτάται από τον τύπο του μονιμοποιητικού μέσου που θα χρησιμοποιηθεί. Πιο αναλυτικά οι συγκεντρώσεις φορμαλδεΰδης πάνω από 10% τείνουν να προκαλούν αυξημένη σκληρότητα και συρρίκνωση των ιστών (Fox et al, 1985). Επιπλέον σε υψηλές συγκεντρώσεις η φορμαλδεΰδη υπάρχει στην πολυμερή της μορφή, η οποία μπορεί να εναποτεθεί ως λευκό ίζημα, σε αντίθεση με τη μονομερή της μορφή $\text{HO}(\text{H}_2\text{CO})\text{H}$, η οποία παρουσιάζει υψηλή διαλυτότητα σε ποσοστό 4% (Baker, 1958). Τέλος, οι συγκεντρώσεις αιθανόλης κάτω από 70% δεν απομακρύνουν αποτελεσματικά το ελεύθερο νερό από τους ιστούς.

Ε) Ρυθμιστικό διάλυμα

Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελεί ένα διάλυμα που προστίθεται προκειμένου να διατηρηθεί το βέλτιστο pH. Ο τύπος και η συγκέντρωση του ρυθμιστικού εξαρτώνται από τον τύπο του μονιμοποιητικού και την επιθυμητή εφαρμογή. Τα φωσφορικά, διαττανθρακικά, το Tris ρυθμιστικό διάλυμα (τρισαμινομεθάνιο) και το οξικό άλας είναι τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα. Στο ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης (NBF-neutral buffered formalin) το pH είναι ρυθμισμένο μεταξύ των τιμών 7,2-7,4 όπου σε αυτή την τιμή οι αμινομάδες αποβάλλονται και αντιδρούν με τη φορμαλδεΰδη. Τέλος τα δείγματα που μονιμοποιούνται σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης δίνουν καλύτερη ποιότητα DNA χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στη μορφολογία των ιστών (Suvarna, K.S. 2019).

Κεφάλαιο 3: Μακροσκοπική εξέταση παρασκευασμάτων

Ο Παθολογοανατόμος, μετά την είσοδο του δείγματος στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο, εξετάζει μακροσκοπικά το ιστολογικό παρασκεύασμα και καταγράφει τις διαστάσεις, το μέγεθος ακόμη και το χρώμα του, και αφού έχει μονιμοποιηθεί το παρασκεύασμα, παίρνει αντιπροσωπευτικές τομές από τα σημεία που παρουσιάζουν αλλοίωση προκειμένου να διερευνηθεί η παθολογία του ιστού. Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα λαμβάνεται μια θέση για κάθε εκατοστό. Επιπρόσθετα ο ιατρός μπορεί να βάψει τους ιστούς με σινική μελάνη προκειμένου να διαπιστωθεί κατά τη μικροσκόπηση εάν ένα νεόπλασμα έχει ξεπεράσει τα χειρουργικά όρια, και κατά συνέπεια έχει γίνει μετάσταση στους γειτονικούς ιστούς. Εφόσον λάβει τις θέσεις, τις τοποθετεί σε ειδικές κασέτες, οι οποίες έχουν κεκλιμένο επίπεδο στην επάνω επιφάνεια ώστε να αναγράφεται ο αριθμός πρωτοκόλλου του κάθε περιστατικού. Οι κασέτες είναι πλαστικές μιας χρήσης και έχουν οπές προκειμένου να διευκολύνεται η ανταλλαγή των υγρών που λαμβάνει χώρα στην ιστοκινέτα.

3.1. Επεξεργασία των ιστολογικών παρασκευασμάτων στην ιστοκινέτα

Τα στάδια από τα οποία πρέπει να περάσουν οι ιστοί υποχρεωτικά κατά την είσοδο τους στην ιστοκινέτα είναι τρία . Αρχικά **το στάδιο της αφυδάτωσης**, έπειτα **το στάδιο της διαύγασης** των ιστών και τέλος το **στάδιο της παραφινοποίησης**.

Πιο συγκεκριμένα, προτού οι κασέτες εισέλθουν στο **στάδιο της αφυδάτωσης** μονιμοποιούνται ξανά καθώς το πρώτο δοχείο που υπάρχει στην ιστοκινέτα περιέχει φορμόλη με συγκέντρωση 10%. Στη συνέχεια, περνούν στο δοχείο το οποίο περιέχει νερό ώστε να φύγει η περίσσεια της φορμόλης και να μην αναμειχθεί με τις αλκοόλες. Οι κασέτες στη συνέχεια εισέρχονται στο στάδιο της αφυδάτωσης, μια διαδικασία κατά την οποία απομακρύνεται το νερό από τους ιστούς. Είναι σημαντικό ο ιστός να αφυδατώνεται αργά προκειμένου να αποφευχθεί η συρρίκνωση του. Για αυτό το λόγο η αφυδάτωση πραγματοποιείται με σταδιακό τρόπο όπου οι κασέτες που περιέχουν τα ιστοτεμάχια περνούν μέσα από μια σειρά δοχείων που περιέχουν διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης με αυξανόμενη συγκέντρωση (50%,70%,80%,95%,100%). Κατ' αυτόν τον τρόπο το νερό που υπήρχε στα ιστοτεμάχια αντικαθίσταται πλήρως από την αλκοόλη.

Στη συνέχεια οι ιστοί περνούν στο **στάδιο της διαύγασης**. Σκοπός αυτού του βήματος είναι να αφαιρεθεί η αλκοόλη που χρησιμοποιήθηκε για την αφυδάτωση και να γίνει ο ιστός δεκτικός στο μέσο διήθησης δηλαδή στην παραφίνη. Υπάρχουν αρκετά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό, όπως η ξυλόλη, η τολουόλη, η βενζόλη και το χλωροφόρμιο. Ωστόσο η **ξυλόλη** αποτελεί το ευρέως χρησιμοποιούμενο διάλυμα καθώς αντικαθιστά γρήγορα την αλκοόλη και έχει την ικανότητα να αναμειγνύεται με την παραφίνη.

Αμέσως μετά το στάδιο της διαύγασης, ο ιστός πρέπει να διηθηθεί με ένα υλικό που θα είναι ικανό να απομακρύνει την ξυλόλη από τους ιστούς και να λειτουργήσει και ως υποστηρικτικό μέσο κατά τη διάρκεια της μικροτόμησης. Πολλά προϊόντα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο για την εξυπηρέτηση αυτού του σκοπού με την παραφίνη να αποτελεί το δημοφιλέστερο υλικό σε ένα Παθολογοανατομικό εργαστήριο. Η παραφίνη διατίθεται στο εμπόριο με ποικίλα σημεία τήξης που κυμαίνονται από 40°C έως 70°C, συνεπώς κατά την επιλογή της παραφίνης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο τύπος του ιστού που πρόκειται να κοπεί. Πιο συγκεκριμένα όταν πρόκειται να κοπεί ένας σκληρός ιστός όπως για παράδειγμα ο τράχηλος της μήτρας τότε χρησιμοποιείται παραφίνη με σημείο τήξης μεγαλύτερο ή ίσο των 60°C, στην περίπτωση ενός πιο μαλακού ιστού όπως ο μαστός χρησιμοποιείται παραφίνη με σημείο τήξης ίσο ή χαμηλότερο των 45°C. Στη ρουτίνα των Παθολογοανατομικών εργαστηρίων δεν είναι πρακτικό να διαχωρίζονται οι ιστοί με βάση τη σκληρότητα και να διηθούνται από παραφίνες με διαφορετικό σημείο τήξης, έτσι η παραφίνη με σημείο τήξης 56°C με 57°C συστήνεται για γενικούς σκοπούς (Sadeghipour A, Babaheidarian P. 2019)

3.2. Σκλήνωση

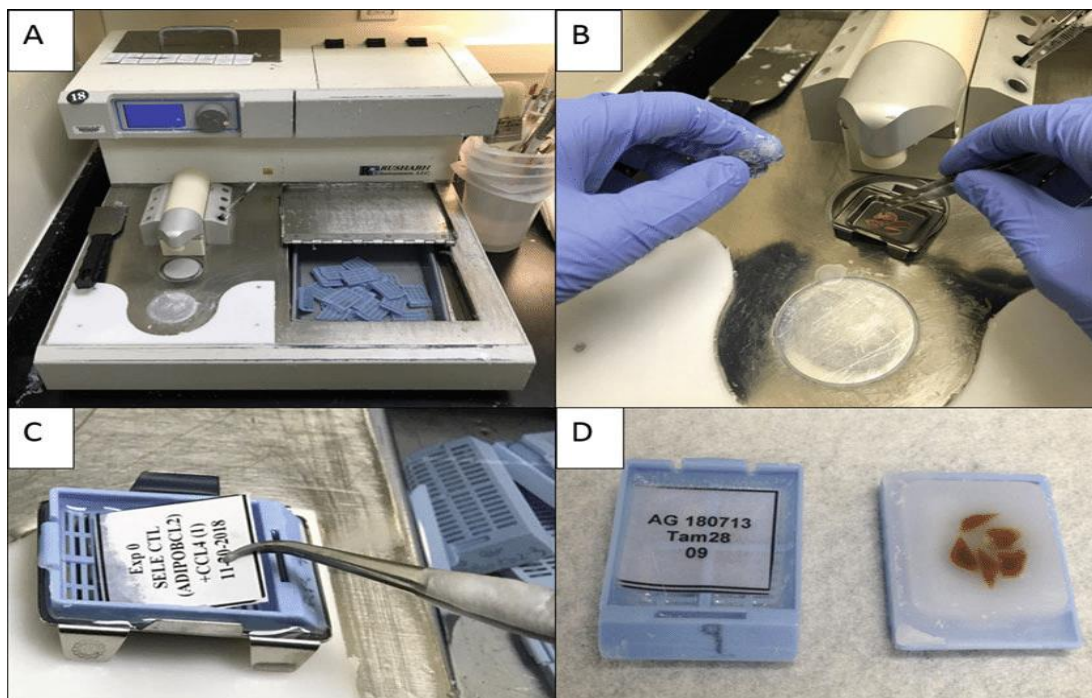
Ιστορικά αξίζει να αναφερθεί πως η διαδικασία της σκλήνωσης παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1869 από τον Edwin Klebs (1834-1913). Η εμπέδωση των ιστών με παραφίνη είναι μια διαδικασία η οποία πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των ιστών στην ιστοκινέτα, κατά την οποία οι σωστά προσανατολισμένοι ιστοί εγκλείονται πλήρως στην παραφίνη ώστε να δημιουργηθεί το **μπλοκ παραφίνης** και έπειτα να ακολουθήσει η μικροτόμηση.

Δείγματα όπως είναι για παράδειγμα ένας όγκος, δε χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή στον προσανατολισμό, αντίθετα ο προσανατολισμός δειγμάτων που περιέχουν πολλά

στρώματα όπως είναι το δέρμα που αποτελείται από την επιδερμίδα, το χόριο και τον υποδόριο ιστό, χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή στο να εμποδιστούν με το σωστό προσανατολισμό ώστε να είναι ορατά όλα τα στρώματα κατά το στάδιο της μικροσκόπισης από τον Παθολογοανατόμο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ο λανθασμένος προσανατολισμός των ιστών στα μεταλλικά καλούπια μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια ή στην καταστροφή σημαντικών τμημάτων των ιστών κατά τη μικροτόμηση.

Σημαντικό βήμα πριν την έναρξη της διαδικασίας της σκηνώσης είναι ο έλεγχος των συνθηκών. Πιο συγκεκριμένα η παραφίνη πρέπει να βρίσκεται ζεστή μέσα στο δοχείο του σκηνωτικού μηχανήματος, η θερμαινόμενη πλάκα στην οποία γίνεται ο χειρισμός των ιστοτεμαχίων και ο προσανατολισμός τους πρέπει να είναι ζεστή, ωστόσο πρέπει να ελέγχεται τακτικά η θερμοκρασία της διότι η υπερβολική θερμότητα μπορεί να βλάψει το δείγμα. Αντίστοιχα η ψυχόμενη πλάκα στην οποία τοποθετούνται τα μπλοκ μέχρι να παγώσει η παραφίνη πρέπει να παραμένει κρύα. Παράλληλα οι λαβίδες με τις οποίες χειριζόμαστε τα παρασκευάσματα πρέπει να είναι ζεστές έτσι ώστε να μπορούμε με ασφάλεια να χειριζόμαστε τους ιστούς και να αποφευχθεί ο κίνδυνος να προσκολληθεί κάποιο ιστοτεμάχιο βιοψίας στην λαβίδα. Τέλος ο χώρος που τοποθετούνται τα μεταλλικά καλούπια πρέπει να είναι εξίσου ζεστός ώστε όταν θα τοποθετηθεί η παραφίνη να μην στερεοποιηθεί αμέσως, όπως και ο χώρος που φυλάσσονται οι κασέτες.

Πρώτο βήμα κατά τη διαδικασία της σκηνώσης αποτελεί η επιλογή του κατάλληλου μεταλλικού καλουπιού ανάλογα με το μέγεθος ιστού. Έπειτα, τοποθετείται μικρή ποσότητα παραφίνης και τοποθετείται ο ιστός στο κέντρο του καλουπιού με τη βοήθεια της θερμής λαβίδας και προσανατολίζεται σωστά. Αμέσως μετά, τοποθετούμε το καλούπι στην κρύα επιφάνεια του σκηνωτικού μηχανήματος και πιέζουμε ελαφρά τον ιστό με τις ειδικές σφραγίδες, ώστε να σκηνωθεί όλη η επιφάνεια του ιστού στο ίδιο επίπεδο. Στη συνέχεια τοποθετείται το πάνω μέρος της κασέτας όπου αναγράφεται ο αριθμός πρωτοκόλλου του περιστατικού και συμπληρώνεται το καλούπι με επαρκή ποσότητα παραφίνης. Αφήνεται να κρυώσει στην ψυχόμενη πλάκα μέχρι να στερεοποιηθεί η παραφίνη η οποία συνήθως αποκτά λευκό χρώμα και να βγαίνει το μπλοκ με ευκολία από το μεταλλικό καλούπι (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Βήματα σκίρωσης ενός ιστολογικού παρασκευάσματος

3.3. Μικροτόμηση

Η μικροτόμηση είναι απαραίτητη για την εξέταση του ιστού στο φωτονικό μικροσκόπιο. Υπάρχουν πολλοί τύποι μικροτόμων, ωστόσο ο περιστροφικός μικροτόμος αποτελεί το συνηθέστερο τύπο που χρησιμοποιείται σήμερα για τη μικροτόμηση.

Προτού ξεκινήσει η διαδικασία της μικροτόμησης πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένα σημεία. Πιο αναλυτικά, ο μικροτόμος θα πρέπει να είναι καθαρός, να μην έχει δηλαδή υπολείμματα παραφίνης από την επεξεργασία προηγούμενου κύβου. Σημαντική κρίνεται επίσης και η απομάκρυνση της περίσσειας παραφίνης που υπάρχει πάνω στην κασέτα του μπλοκ από το στάδιο της σκίρωσης, είτε με απόξεση με κάποιο αιχμηρό αντικείμενο είτε με λιώσιμο σε υψηλή θερμοκρασία. Επίσης πριν ξεκινήσει το τριμμάρισμα θα πρέπει οι κύβοι παραφίνης να βρίσκονται στην ψυχόμενη πλάκα. Στη συνέχεια τοποθετείται προσεκτικά η λεπίδα του μαχαιριού στη θέση υποδοχής του μαχαιριού, διασφαλίζοντας ότι έχει τοποθετηθεί σωστά. Παράλληλα ο βραχίονας του μικροτόμου πρέπει να είναι κλειδωμένος προτού εισαχθεί το μπλοκ παραφίνης στη βάση του. Σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να υπάρξει τραυματισμός από το μαχαίρι.

Για να «κλειδώσει» το μπλοκ παραφίνης στη κεφαλή του μικροτόμου πρέπει να τραβηχτεί ο κατακόρυφος μοχλός προς τα εμπρός και αφού τοποθετηθεί σωστά το μπλοκ θα ακουστεί ένας χαρακτηριστικός ήχος. Έπειτα προσανατολίζεται κατάλληλα το μπλοκ ώστε το μαχαίρι να κόβει όλη την επιφάνεια του ομοιόμορφα. Για να ξεκινήσει η διαδικασία λήψης τομών απελευθερώνεται ο βραχίονας και μεταφέρεται το μπλοκ κοντά στη λεπίδα του μαχαιριού. Όταν το μπλοκ βρεθεί στην κατάλληλη θέση τότε ενεργοποιείται η λειτουργία του τριμμαρίσματος όπου λαμβάνονται τομές με πάχος 10-30 μm και αποσκοπεί στην απομάκρυνση της περίσσειας της παραφίνης μέχρι να φανεί καθαρά όλη η επιφάνεια του ιστού. Μόλις τριμμαριστούν όλα τα μπλοκ παραφίνης αφήνονται να παγώσουν στην ψυχόμενη πλάκα και κατόπιν αντικαθίσταται το μαχαίρι με ένα καινούριο ώστε να ξεκινήσει η λήψη τομών με πάχος 3 μm . Αφού δημιουργηθεί η κορδέλα παραφίνης σηκώνεται προσεκτικά με ένα πινέλο και μεταφέρεται στο υδατόλουτρο ώστε να “ανοίξουν” οι τομές, η θερμοκρασία του οποίου είναι περίπου 10 βαθμούς χαμηλότερος από το σημείο τήξης της παραφίνης **(Εικόνα 2)**. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετούνται σε ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες όπου αναγράφεται ο αριθμός πρωτοκόλλου του κύβου παραφίνης από τον οποίο προέρχεται η τομή. Τέλος οι τομές τοποθετούνται για περίπου 10 λεπτά στον κλίβανο ώστε να στεγνώσουν (Sy J, Ang LC. 2019).



Εικόνα 2: Μικροτόμηση μπλοκ παραφίνης

[BioRender.com](https://www.biorender.com)

Σημεία κατά τη μικροτόμηση που απαιτούν προσοχή

1. Το υδατόλουτρο πρέπει να παραμένει καθαρό ώστε να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση των ιστών, η παρουσία δηλαδή θραυσμάτων από προηγούμενους ιστούς στην αντικειμενοφόρο πλάκα, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει σύγχυση κατά τη μικροσκόπηση. Συνεπώς η επιφάνεια του υδατόλουτρου πρέπει να καθαρίζεται με διηθητικό χαρτί αμέσως μετά από κάθε μπλοκ.
2. Υπάρχει κίνδυνος στην περίπτωση που δεν στεγνώσουν επαρκώς οι ιστοί στις αντικειμενοφόρες πλάκες, να δημιουργηθούν φυσαλίδες που δυσχεραίνουν την προσκόλληση του ιστού πάνω στα πλακίδια. Ένα φαινόμενο που παρατηρείται στη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.
3. Συχνό φαινόμενο αποτελούν οι αναδιπλώσεις των ιστών πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες, οι οποίες μπορεί να προκύψουν για πολλούς λόγους. Η πιο συνηθισμένη αιτία είναι τα λάθη που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της επίπλευσης του ιστού στο υδατόλουτρο λόγω μεταφοράς του με ακατάλληλες και απότομες κινήσεις.

Δευτερευόντως μπορεί να ευθύνεται η θερμοκρασία του υδατόλουτρου εάν είναι πολύ υψηλή καθώς και το μπλοκ όταν δεν είναι κρύο.

4. Τέλος, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο μαχαίρι, διότι εάν είναι βρώμικο τότε οι τομές παραφίνης προσκολλώνται πάνω του και είναι δύσκολο να ανασηκωθούν στη συνέχεια. Συνεπώς αυτές οι τομές καταστρέφονται (Sy J, Ang LC. 2019).

Κεφάλαιο 4: Ιστοχημικές χρώσεις Παθολογοανατομικού εργαστηρίου

Η χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης θεωρείται ως η βασική χρώση του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής καθώς παρέχει μια πολύ λεπτομερή εικόνα του ιστού. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της σαφής χρώσης των κυτταρικών δομών συμπεριλαμβανομένων του πυρήνα, του κυτταροπλάσματος, των οργανιδίων και της εξωκυττάριας ουσίας. Μια καλή πυρηνική χρώση είναι κρίσιμη για την αξιολόγηση ενός φυσιολογικού ιστού έναντι ενός ιστού που παρουσιάζει ανωμαλία. Η αύξηση του μεγέθους του πυρήνα, η υπερχρωμασία, το ακανόνιστο πυρηνικό περίγραμμα και οι ενεργές μιτωτικές μορφές είναι χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου. Αντίθετα στα φυσιολογικά κύτταρα το μέγεθος και το περίγραμμα του πυρήνα είναι κανονικό, η λεπτή χρωματίνη είναι ομοιόμορφα κατανεμημένη στον πυρήνα και υπάρχουν λιγότερες μιτώσεις (Lai, M. & Lü, B. 2012). Οι πληροφορίες αυτές συχνά επαρκούν ώστε να επιτρέψουν τη διάγνωση της νόσου. Ακόμη και αν χρησιμοποιούνται προηγμένες μέθοδοι χρώσης, η χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης εξακολουθεί να αποτελεί κρίσιμο κομμάτι της διάγνωσης καθώς μέσω αυτής εμφανίζεται η θεμελιώδης μορφολογία του ιστού (Anderson, J. 2010).

4.1. Ιστοχημικές χρώσεις

Η ιστορία της ιστολογίας δείχνει ότι υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη της ιστολογικής χρώσης, μέσω χημικών και ανοσολογικών τεχνικών καθώς και μέσω δοκιμασιών μοριακής βιολογίας, που συλλογικά αναφέρονται ως **Ιστοχημεία** (Alturkistani, H. A.; Tashkandi, F. M.; Mohammedsaleh, Z. 2015). Η ιστολογική χρώση είναι μια σειρά διαδικασιών που πραγματοποιείται ώστε να βοηθηθεί η μελέτη των ιστών στο μικροσκόπιο. Η διαδικασία της χρώσης κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να αναδειχθούν σημαντικά χαρακτηριστικά του ιστού καθώς και για να τονιστεί η αντίθεση μεταξύ των ιστών. Τέλος, η αιματοξυλίνη είναι η βασικότερη χρώση που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια ιστολογίας. Ύστερα από την εφαρμογή της οι πυρήνες αποκτούν ένα γαλαζωπό χρώμα, ενώ το κυτταρόπλασμα βάφεται ροζ χάρη στην χρήση της ηωσίνης. Παρόλα αυτά υπάρχουν και άλλες τεχνικές ιστοχημικών χρώσεων που χρησιμοποιούνται για συγκεκριμένα κύτταρα και δομικά στοιχεία.

4.1.1 Ιστορική εξέλιξη Ιστοχημικών χρώσεων

Η περίοδος μεταξύ του 1880 και του 1930 σηματοδότησε τη γέννηση και την πρώιμη ανάπτυξη της **Ιστοχημείας**. Ο Γερμανικής καταγωγής Franz Bohmer κατόρθωσε το 1865 να βάψει τμήματα ιστών με **αιματοξυλίνη**. Μερικά χρόνια αργότερα το 1871, ο Bayer μαζί με τους συνεργάτες του συνέθεσαν την **ηωσίνη**, η οποία το 1875 αναδείχθηκε χρήσιμη ως χρώση για τους ιστούς από τους Dreschfeld και Fischer (King, D. F.; King, L. A. C. 1986). Μερικούς μήνες μετά, οι δύο παραπάνω χρωστικές συνδυάστηκαν προς σχηματισμό μιας ενιαίας μεθόδου, της **Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης**, γεγονός που αποδόθηκε στον Wissowzky το 1875, στον Reynaud το 1876 και στον Busch το 1876-78 (Cook, H. C. 1997)

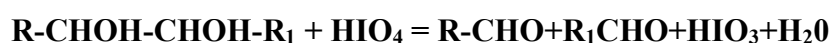
Στις αρχές του 1880 έκανε την εμφάνιση της μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα και είναι γνωστή ως τεχνική **Ziehl-Neelsen**. Η πορεία για την εφεύρεση και εξέλιξη της παραπάνω χρώσης οφείλεται στον Robert Koch. Ο Koch επεξήγησε και ανέλυσε όλα τα αποτελέσματα που απέδωσαν τα πειράματα του τόσο στον εργαστηριακό πάγκο όσο και στα ζώα που χρησιμοποίησε ως πειραματόζωα για την ταυτοποίηση και απομόνωση του βακίλου της φυματίωσης και έδειξε τη μεταδοτική φύση του και τους τρόπους που προκαλεί φυματίωση στους ανθρώπους, η οποία ασθένεια εκείνη την εποχή ήταν θανατηφόρα. Η τεχνική που ακολούθησε ο Koch προκειμένου να εντοπίσει τα βακτήρια ήταν αρχικά η μονιμοποίηση του βακτηριακού επιχρίσματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα και η χρώση της με αλκαλικό διάλυμα μπλε του μεθυλενίου, χρησιμοποιώντας ως αντίχρωση την καφέ χρώση Vesuvin (Lakhtakia R. 2014). Την ίδια χρονιά ο Paul Ehrlich βελτίωσε τη μέθοδο του Koch μέσω αποχρωματισμού με ανόργανο οξύ, χρησιμοποιώντας μια κόκκινη χρωστική και τέλος άλλαξε το σταθεροποιητή σε έλαιο ανιλίνης. Έπειτα ο Ziehl άλλαξε το σταθεροποιητή σε καρβοξυλικό οξύ. Παράλληλα ο Rindfleisch τροποποίησε την τεχνική θερμαίνοντας την αντικειμενοφόρο πλάκα και όχι τοποθετώντας τη σε ζεστό νερό σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Koch. Τέλος το 1883 ο Neelsen συνδύασε το καρβοξυλικό οξύ που πρότεινε ο Ziehl με την κόκκινη χρωστική του Ehrlich (Bishop PJ, Neumann G. 1970).

Ο Berthold Carl Gustav Giemsa (1867-1948), εργάστηκε ως επί το πλείστον ως χημικός και εφάρμοσε τις ικανότητες του στην ιατρική και μικροβιολογική έρευνα. Η

μέθοδος της χρώσης η οποία φέρει το όνομα του (**Giemsa**) σχεδιάστηκε το 1902 κυρίως για τον εντοπισμό των παρασίτων που προκαλούν την ελονοσία. Στη συνέχεια τροποποιήθηκε προκειμένου να έχει την ικανότητα να βάφει το ωχρό τρεπόννημα (*treponema pallidum*) (Barcia JJ. 2007).

Ένα άλλο σημαντικό ορόσημο στην ιστορία της μεθοδολογίας της ιστολογικής χρώσης ήταν η εμφάνιση των λεγόμενων τεχνικών τριχρωμίας στις αρχές της δεκαετίας του 1920. Αυτές οι τεχνικές μαζί με τη μέθοδο του φωσφοβολφραμικού οξέος-αιματοξυλίνης του 1897 σχεδιάστηκαν αποσκοπώντας στην παρουσίαση της αντίθεσης των χρωμάτων σε ένα ευρύ φάσμα συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των ιστών και ειδικότερα μεταξύ του συνδετικού και μυϊκού ιστού. Ο Frank Mallory του οποίου το όνομα είναι πιο συχνά συνδεδεμένο με αυτές τις τεχνικές ήταν καθηγητής παθολογίας στο νοσοκομείο της Βοστώνης. Πέθανε το 1941 σε ηλικία 76 ετών, έχοντας 3 χρόνια πριν δημοσιεύσει ένα κείμενο για τις ιστολογικές τεχνικές. Αργότερα το 1929 μια ακόμη κλασική μέθοδος τριχρωμίας παρουσιάστηκε από τον Pierre Masson (Cook, H. C. 1997).

Από τη δεκαετία του 1940 και έπειτα εμφανίστηκαν σχετικά λίγες αλλά εξίσου σημαντικές τεχνικές Ιστοχημικών χρώσεων, όπως είναι η τεχνική του περιοδικού οξέος- Schiff (**PAS-Periodic acid Schiff**). Ο όρος εισήχθη για πρώτη φορά από τον Malaprade το 1928, ο οποίος έδειξε ότι το περιοδικό οξύ οξειδώνει τις γλυκόλες με τις γειτονικές ομάδες υδροξυλίου OH σε δύο μόρια αλδεϋδης -CHO σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο :



Η ιστολογική οξείδωση από το HIO₄ ακολουθούμενη από το αντιδραστήριο Schiff προτάθηκε για πρώτη φορά από τον McManus το 1946 και τον Hotchkiss το 1948 και στο εξής αναφέρεται ως τεχνική McManus. Μέσα σε λίγα χρόνια έγινε μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους χρώσης. Η δημοτικότητα αυτής της τεχνικής οφείλεται στο γεγονός ότι παρέχει πληροφορίες αρχικά σχετικά με τη χημική φύση των δομών που βάφονται και έπειτα αποκαλύπτει μορφολογικές λεπτομέρειες που είναι αδύνατον να απεικονιστούν με οποιαδήποτε άλλη μέθοδο. Οι πιο σημαντικές

ουσίες θετικές κατά McManus είναι: το γλυκογόνο, το άμυλο, η κυτταρίνη, τα γλυκολιπίδια και οι βλεννοπολυσακχαρίτες στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η βλεννίνη, οι βλεννοπρωτεΐνες και οι γλυκοπρωτεΐνες (G. Gomori. 1952).

Η Ιστοχημική χρώση **Alcian Blue (Κυανό της Αλσατίας)** χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1950 από τον ερευνητή Harold Steedman, ο οποίος παρατήρησε ότι τόσο οι βλεννίνες του επιθηλίου όσο και του συνδετικού ιστού που περιέχουν όξινους υδατάνθρακες παρουσιάζουν αξιόλογη χρώση. Η Alcian Blue χρώση φάνηκε να είναι δυνητικά πιο χρήσιμη συγκριτικά με τις έως τότε χρησιμοποιούμενες μεταχρωματικές χρώσεις, όπως για παράδειγμα η τουλοϊδίνη, καθώς ήταν πιο εύκολη στη χρήση και παρουσίαζε ανθεκτικότητα στη χημική αποικοδόμηση, ενώ φαινόταν να αλληλεπιδρά εξίσου καλά με καρβοξυλιωμένα και θειωμένα πολυανιόντα (Quintarelli G, Scott JE, Dellovo MC. 1964)

4.1.2 Τρόπος δράσης των Ιστοχημικών χρώσεων

Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ των ιστών και των χρωστικών ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: τις φυσικές και τις χημικές αλληλεπιδράσεις.

➤ **Φυσική αλληλεπίδραση**

Στις φυσικές βαφές, η χρωστική μπορεί να διαλυθεί στη χρωματισμένη ουσία, να απορροφηθεί στην επιφάνεια της δομής του ιστού ή να κατακρημνιστεί εντός του ιστού. Οι παραπάνω διαδικασίες ευνοούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Οι περισσότερες χρώσεις που αφορούν το λίπος δουλεύουν σύμφωνα με αυτή την αρχή της διαλυτότητας (Michael Titford 2009).

➤ **Χημική αλληλεπίδραση**

Αντίθετα με τη φυσική αλληλεπίδραση η χημική αλληλεπίδραση είναι πιο συχνή στην ιστολογία και συνεπάγεται το σχηματισμό δεσμού μεταξύ του ιστού και της χρωστικής. Οι τέσσερις τύποι δεσμών που αναπτύσσονται περιγράφονται παρακάτω:

- **Ετεροπολικός δεσμός ή ιοντικός δεσμός:** Αποτελεί τον πιο σημαντικό τύπο δεσμού στην ιστοχημική χρώση και περιλαμβάνει ηλεκτροστατικές έλξεις μεταξύ των αντίθετων φορτίων που φέρουν ο ιστός και η χρωστική. Έτσι ένα άτομο που έχει περίσσεια ηλεκτρονίων αλληλεπιδρά με ένα άτομο που έχει έλλειψη ηλεκτρονίων, με

αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η ολική ουδετερότητα (Dapson RW. 2005). Λόγω του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες περιέχουν τόσο όξινα όσο και βασικά αμινοξέα, αυτός ο τύπος δεσμού εξαρτάται από το στάδιο του ιονισμού των συστατικών του ιστού, τα οποία είναι ευαίσθητα στο pH. Στα όξινα διαλύματα η υψηλή συγκέντρωση υδρογόνου συσχετιζόμενη με χαμηλό pH, ευνοεί τον ιονισμό των αμινομάδων καθιστώντας τις θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες ικανές να συνδέονται με αρνητικά φορτισμένες χρωστικές. Από την άλλη πλευρά η απουσία ιόντων υδρογόνου που σχετίζονται με αλκαλικά διαλύματα επιτρέπει το σχηματισμό καρβοξυλικών ανιόντων ικανά να δεσμεύονται σε θετικά φορτισμένες χρωστικές.

- Ένας άλλος τύπος δεσμού είναι ο **ομοιοπολικός δεσμός**, ωστόσο είναι σημαντικός μόνο σε λίγες τεχνικές χρώσεων. Πιο συγκεκριμένα αυτός ο τύπος δεσμού είναι το προϊόν της αντίδρασης μεταξύ του ιστού και της χρωστικής και συχνά σχηματίζεται ένας νέος δεσμός C-C. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί είναι πολύ ισχυροί και δεν μπορούν να διασπαστούν με διαδικασίες που πραγματοποιούνται στην ιστοχημική χρώση. Παράδειγμα αποτελεί το αντιδραστήριο Schiff's που προσκολλάται ομοιοπολικά στις αλδεΐδες κατά την ταυτοποίηση υδατανθράκων μέσω της χρώσης PAS.
- Οι **δεσμοί υδρογόνου** παράγονται μεταξύ του υδρογόνου και ενός μικρού άκρως ηλεκτροαρνητικού ατόμου όπως το οξυγόνο ή το άζωτο, τα οποία είναι απαραίτητα ώστε και οι δύο εμπλεκόμενες ομάδες να είναι αρκετά κοντά (Dapson RW. 2005). Αυτός ο τύπος δεσμού είναι λιγότερο σημαντικός στην ιστοχημική χρώση συγκριτικά με τον ετεροπολικό δεσμό.
- Τέλος, οι δυνάμεις **Van der waals**. Αυτού του τύπου οι δεσμοί δεν είναι κλασσικοί δεσμοί και περιλαμβάνουν όλους τους εναπομείναντες μηχανισμούς σύνδεσης που περιλαμβάνουν δίπολα. Αποτελούν δυνάμεις μικρής εμβέλειας μεταξύ δύο οποιοδήποτε ατόμων, χωρίς εξειδίκευση αν και μια μικρή απόσταση μεταξύ των εμπλεκόμενων ατόμων είναι απαραίτητη μαζί με ένα ταίριασμα στο σχήμα στο συστατικό του ιστού και τη χρωστική. Αυτές οι δυνάμεις πιθανότατα δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία δέσμευσης αν και θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη διαδικασία εκλεκτικότητας μεταξύ ιστού και χρωστικής (Veuthey T, Herrera G, Dodero VI. 2014).

4.1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την ένταση της χρώσης

- **Μοριακό βάρος της χρωστικής**

Το μέγεθος της χρωστικής που δίνεται από το μοριακό βάρος αποτελεί σημαντικό παράγοντα που εμπλέκεται στη δέσμευση της βαφής από τον ιστό και μπορεί να επηρεάσει άμεσα το ρυθμό διάχυσης της (Dapson RW. 2005). Πιο αναλυτικά βαφές μεγαλύτερου μοριακού βάρους διαχέονται στον ιστό πολύ πιο αργά συγκριτικά με τις βαφές μικρότερου μοριακού βάρους, αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται ευρέως σε ορισμένες διαδικασίες χρώσης. Τέλος μια αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να αυξήσει το ρυθμό χρώσης αυξάνοντας τη διάχυση του μορίου της βαφής (Goldstein, D. J. 1963).

➤ **Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία του διαλύματος της χρώσης μπορεί να επηρεάσει τη χρώση με πολλούς τρόπους. Ίσως η πιο έντονη επίδραση εντοπίζεται στον ρυθμό με τον οποίο διαχέεται η χρωστική μέσα στην πρωτεΐνη και ως εκ τούτου στο ρυθμό της χρώσης. Ο ρυθμός της χρώσης αυξάνεται προοδευτικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Έτσι η χρώση φτάνει σε ισορροπία πολύ πιο γρήγορα σε υψηλότερες θερμοκρασίες παρά σε χαμηλότερες. Η αξιοσημείωτη επίδραση της θερμοκρασίας απεικονίζεται πολύ καλά στο παράδειγμα του Vickerstaff (1950) ο οποίος χρησιμοποίησε ίνες μαλλιού. Πιο αναλυτικά παρατήρησε στο πείραμα του ότι απαιτούνται πέντε μήνες στους 20°C για την ολοκληρωμένη βαφή του μαλλιού, ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί σε 1 ώρα στους 100°C. Αυτή η επίδραση της θερμοκρασίας στη διαχυτικότητα της βαφής έχει αντιμετωπιστεί ποσοτικά με τον προσδιορισμό της ενέργειας ενεργοποίησης της βαφής από τον Vickerstaff (Singer, M. 1952).

➤ **Είδος μονιμοποιητικού**

Η μονιμοποίηση όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι απαραίτητη ώστε να αποφευχθεί η μη ζωτική αυτόλυση των ιστών που προκαλεί μορφολογικές αλλαγές και για την πρόληψη απωλειών ορισμένων συστατικών των ιστών κατά την εφαρμογή διαλυμάτων επεξεργασίας και χρώσης. Πιο αναλυτικά, μια δεδομένη ουσία μπορεί να συγκρατηθεί στο δείγμα σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το είδος του μονιμοποιητικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί και τίποτα δεν μπορεί να χρωματιστεί εάν δεν έχει πρώτα μονιμοποιηθεί. Για παράδειγμα πολλά λιπίδια διατηρούνται σε καλό βαθμό ύστερα από τη μονιμοποίηση με διχρωμικά ή όσμιο, ενώ μετά τη μονιμοποίηση με φορμόλη διατηρούνται ελάχιστα. Παράλληλα τα λιπίδια απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης με αλκοόλη ή ακετόνη. Ως εκ

τούτου η χρώση τους ύστερα από τη μονιμοποίηση με τις παραπάνω ουσίες θεωρείται μη αποτελεσματική (Suvarna, K.S. 2019).

➤ **Ρυθμός της αντίδρασης**

Η επιλεκτική χρώση από αντιδραστήρια στηρίζεται στους διαφορετικούς ρυθμούς αντίδρασης. Για παράδειγμα, το περιοδικό οξύ μπορεί να οξειδώσει διάφορα υποστρώματα που υπάρχουν στους ιστούς. Ωστόσο κατά τη διαδικασία της χρώσης PAS εφαρμόζονται σύντομοι χρόνοι οξείδωσης περιορίζοντας τη χρώση στις ομάδες πολυσακχαριτών 1,2-διόλης που αντιδρούν γρήγορα. Η ενζυμική ιστοχημεία παρέχει περισσότερα παραδείγματα. Κατά την επώαση σε χαμηλό pH η υδρόλυση ενός φωσφορικού άλατος είναι ταχεία σε ιστούς που περιέχουν όξινες φωσφατάσες αλλά αργή σε δομές που περιέχουν αλκαλικές φωσφατάσες (Suvarna, K.S. 2019).

4.2.Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι εμπεδωμένοι με παραφίνη ιστοί στην ρουτίνα ενός παθολογοανατομικού εργαστηρίου βάφονται με την βασική ιστοχημική χρώση της Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης. Η αιματοξυλίνη είναι η μοναδική φυσική βαφή με ευρεία χρήση, η οποία αποτελεί φυσικό εκχύλισμα του δέντρου logwood.

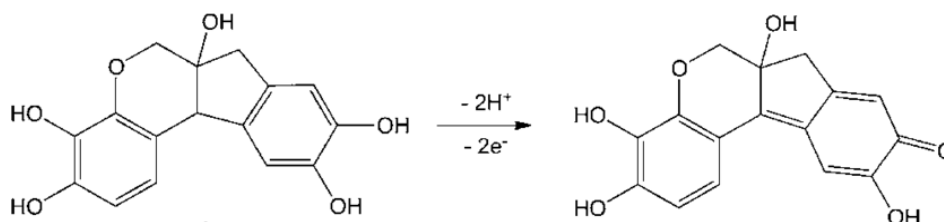
Το δέντρο logwood (*Haematoxylin campechianum*) ανακαλύφθηκε το 1502 από Ισπανούς εξερευνητές στην πόλη Yucutan Peninsula του σημερινού Μεξικού. Το παραπάνω δέντρο παράγει βαθιά κόκκινες λεπτές υφές ξύλου και αποτελεί εγγενές προϊόν της κεντρικής Αμερικής και των Δυτικών Ινδιών. Η αιματοξυλίνη χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως βαφή υφασμάτων και συγκεκριμένα αξιοποιήθηκε για τη βαφή στρατιωτικών στολών στον Αμερικανικό εμφύλιο πόλεμο, και στη συνέχεια στον Α και Β΄ Παγκόσμιο πόλεμο. Η χρήση της ως βαφή γνώρισε άνθιση κατά τη διάρκεια του Β΄ παγκοσμίου πολέμου, καθώς οι συμμαχικές δυνάμεις αναζήτησαν πηγές βαφής διαφορετικές από τις έως τότε γερμανικής κατασκευής βαφές ανιλίνης (Ali, F. R.; Orchard, G. E 2017). Για πολλά χρόνια αποτελούσε πηγή εσόδων για την πόλη Καμπέτσε του Μεξικού επειδή αυτό το δέντρο χρησιμοποιούνταν εκτενώς στη βιομηχανία για τον χρωματισμό των κρασιών πριν την ανάπτυξη των συνθετικών υλών.

Προκειμένου να αποκτηθεί η αιματοξυλίνη απαιτείται μια διαδικασία. Αρχικά τα κομμένα τμήματα του δέντρου βράζονται σε νερό. Στην αρχή ένα πορτοκαλοκόκκινο

διάλυμα σχηματίζεται το οποίο όταν έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετατρέπεται σε μαύρο διάλυμα. Στην συνέχεια η αιματοξυλίνη καθιζάνει με την βοήθεια ουρίας ή αιθέρα και στη συνέχεια συλλέγεται μια καφέ ανοιχτή σκόνη (Titford, M. 2005). Σε αυτή τη μορφή η αιματοξυλίνη δεν έχει σχεδόν καμία ικανότητα χρώσης. Προκειμένου να αυξηθεί η συγγένεια, είναι απαραίτητο τα διαλύματα αιματοξυλίνης να περιέχουν αιματίνη, δηλαδή το προϊόν οξείδωσης της αιματοξυλίνης σε συνδυασμό με ένα μεταλλικό σταθεροποιητή-στερεωτή (mordant).

Η οξείδωση της αιματοξυλίνης έχει ως αποτέλεσμα την αιματίνη η οποία έχει κόκκινο-καφέ χρώμα και χρησιμοποιείται ως το τελικό προϊόν χρώσης. Υπάρχουν δύο βασικές διαδικασίες μέσω των οποίων η αιματοξυλίνη μετατρέπεται σε αιματίνη. Αρχικά αναφέρεται η φυσική οξείδωση ή αλλιώς «ωρίμανση» (ripening) η οποία πραγματοποιείται μέσω της έκθεσης στο φως και στον αέρα και έπειτα υπάρχει η χημική οξείδωση μέσω της χρήσης είτε ιωδικού νατρίου (Αιματοξυλίνη Gill's) είτε οξειδίου του υδραργύρου (Αιματοξυλίνη Harris) μαζί με υπερμαγγανικό κάλιο (Baker, J. R. 1962). Η χημική μέθοδος είναι γρηγορότερη και οδηγεί σε ακαριαία οξείδωση (GE Orchard. 2018).

Η χημική αντίδραση παρουσιάζεται παρακάτω:



Αιματοξυλίνη

Αιματίνη

(Canevari, C et al. 2016). Το διάλυμα αιματοξυλίνης βάφει τη χρωματίνη που βρίσκεται στον πυρήνα. Υπάρχουν ποικίλες συνθέσεις της χρωστικής της αιματοξυλίνης διαθέσιμες. Οι περισσότερες από αυτές οφείλουν το όνομα τους στον δημιουργό τους και ποικίλλουν ως προς τη σύνθεση και συγκέντρωση των συστατικών τους. Πιο αναλυτικά, η κάθε αιματοξυλίνη ανάλογα με τη σύνθεση της παράγει διαφορετικά μοτίβα χρώσης και διαφορετικό χρώμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν η Αιματοξυλίνη Harri's και η Αιματοξυλίνη Gill's. Είναι σημαντικό να

αναφερθεί ότι η επιλογή του σταθεροποιητή θα καθορίσει και το χρώμα που θα λάβει ο πυρήνας. Έτσι, οι σταθεροποιητές που έχουν ως βάση το σίδηρο παράγουν μπλε-μαύρους πυρήνες, ενώ οι σταθεροποιητές που έχουν ως βάση το αλουμίνιο παράγουν μπλε-μωβ πυρήνες (Feldman AT, Wolfe D. 2014).

Η Αιματοξυλίνη είναι μια σκούρα μπλε ή βιολετί χρωστική. Έχει βασικό χαρακτήρα και είναι θετικά φορτισμένη, έτσι συνδέεται με το DNA/RNA που είναι αντίστροφα όξινα και αρνητικά φορτισμένα μόρια. Συνεπώς ο πυρήνας χρωματίζεται μπλε.

Η Ηωσίνη ανήκει στην κατηγορία των κόκκινων χρωστικών. Είναι ένα τεχνητό παράγωγο της φλουορεσκεΐνης που αποτελείται από δύο συγγενικές ενώσεις, την ηωσίνη Y και B. Η Ηωσίνη Y χρησιμοποιείται συχνότερα στα εργαστήρια Παθολογικής Ανατομικής. Η Ηωσίνη χρησιμοποιείται για τη χρώση του κυτταροπλάσματος, των ερυθρών αιμοσφαιρίων, του κολλαγόνου και των μυϊκών ινών που προορίζονται για ιστολογική εξέταση (Lai, M. & Lü, B. 2012).

4.2.1. Τύποι Αιματοξυλίνης

- **Αιματοξυλίνη με βάση τον σίδηρο**

Τα διαλύματα αιματοξυλίνης με βάση τον σίδηρο, χρησιμοποιούν άλατα σιδήρου, συνήθως χλωριούχο σίδηρο και θεικό αμμώνιο σιδήρου τόσο ως σταθεροποιητή όσο και ως μονιμοποιητικό. Παράλληλα, έχουν την ικανότητα να αναδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα ιστολογικών δομών συγκριτικά με τα διαλύματα αιματοξυλίνης που έχουν ως βάση το αλουμίνιο Suvarna, K.S. (2019).

- **Αιματοξυλίνη με βάση το αλουμίνιο**

Τα διαλύματα αιματοξυλίνης που έχουν ως βάση το αλουμίνιο χρησιμοποιούνται ευρέως στα εργαστήρια Ιστοπαθολογίας για την χρώση της αιματοξυλίνης/ηωσίνης, καθώς επιτυγχάνουν πολύ καλή πυρηνική χρώση. Ως σταθεροποιητής στα παραπάνω διαλύματα χρησιμοποιείται το αλουμίνιο και πιο συγκεκριμένα το θεικό κάλιο αλουμινίου ή το θεικό αμμώνιο αλουμινίου. Οι πυρήνες βάφονται με κόκκινο χρώμα, το οποίο μετατρέπεται στο γνωστό μπλε-μαύρο όταν οι αντικειμενοφόρες πλάκες πλένονται σε ασθενές αλκαλικό διάλυμα. Το τρεχούμενο νερό βρύσης είναι αρκετά αλκαλικό ώστε να επιτευχθεί η παραπάνω αλλαγή χρώματος. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως **blueing** (Lai, M. & Lü, B.. 2012). Οι αιματοξυλίνες που έχουν ως βάση το

σίδηρο μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε οπισθοδρομικά (regressively) είτε προοδευτικά (progressively). Στη **regressive** χρώση οι τομές υπέρ-χρωματίζονται, στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε όξινη αλκοόλη και ακολουθεί το **blueing**. Από την άλλη μεριά στη **progressive** χρώση οι τομές βάφονται για προκαθορισμένο χρόνο, οι πυρήνες βάφονται επαρκώς ενώ το υπόβαθρο του ιστού δε χρωματίζεται επαρκώς. Ο χρόνος που απαιτείται για τη χρώση με αιματοξυλίνη με καλή διαφοροποίηση ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο και την ηλικία της αιματοξυλίνης, τον τύπο του ιστού και την προσωπική προτίμηση του παθολογοανατόμου. Τέλος, οι αιματοξυλίνες Ehrlich's, Mayer's, Harris's, Gill's είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αιματοξυλίνες με βάση το αλουμίνιο για τη χρώση ρουτίνας.

- **Αιματοξυλίνη με βάση το βολφραΐμιο**

Είναι γεγονός ότι υπάρχει μόνο μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αιματοξυλίνη με βάση το βολφραΐμιο, αν και υπάρχουν αρκετές παραλλαγές της αρχικής τεχνικής την οποία παρουσίασε ο Mallory το 1897 (Mallory, F. B. 1900).

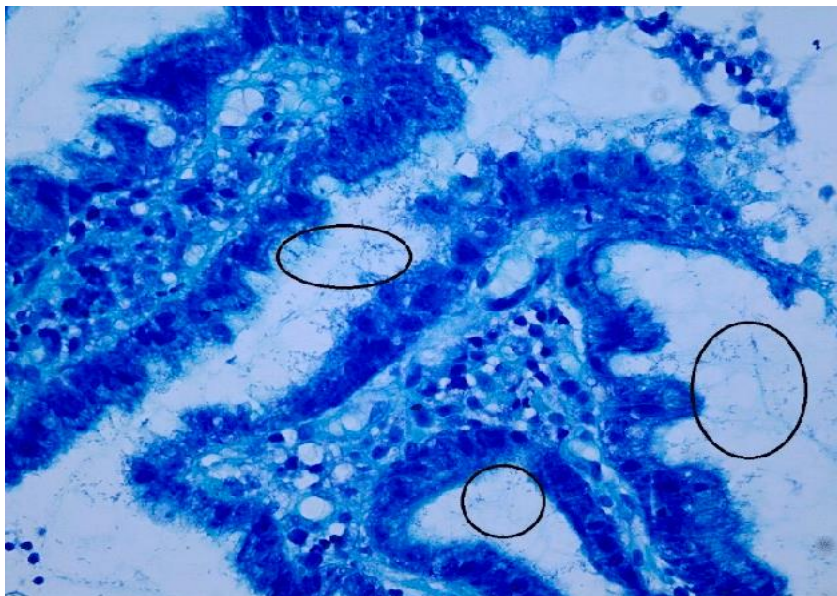
Πιο συγκεκριμένα ο Mallory συνδύασε την αιματοξυλίνη με 1% διάλυμα φωσφοβολφραϊμικού οξέος, το οποίο δρα και ως σταθεροποιητής. Είναι δυνατό να παρασκευαστεί ένα διάλυμα χρώσης χρησιμοποιώντας αιματίνη έναντι της αιματοξυλίνης. Σε αυτήν την περίπτωση η διαδικασία της οξειδωσης είναι περιττή και το διάλυμα της χρώσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως, ωστόσο αυτή η ενέργεια έχει μικρή διάρκεια ζωής. Η οξειδωση της αιματοξυλίνης μπορεί είτε να επιτευχθεί με χημικό τρόπο χρησιμοποιώντας διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου, γεγονός που καθιστά τη χρώση έτοιμη για χρήση μετά το πέρας των 24 ωρών, είτε με φυσικό τρόπο. Η φυσική ωρίμανση του διαλύματος της αιματοξυλίνης με βάση το βολφραΐμιο στο φως και τον αέρα είναι πιο ικανοποιητική αλλά χρονοβόρα. Πλεονέκτημα των παραπάνω διαλυμάτων αιματοξυλίνης αποτελεί το γεγονός ότι μπορούν να χρησιμοποιούνται για πολλά χρόνια, παρόλο που χρειάζονται μερικοί μήνες μέχρι να ωριμάσουν. Αξίζει να αναφερθεί ότι η χρήση τους μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε υλικά που προέρχονται από το κεντρικό νευρικό σύστημα, όσο και σε γενικότερες δομές ιστών και σε ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε διάφορα μονιμοποιητικά υγρά. Τέλος, ο χρόνος της χρώσης ποικίλλει ανάλογα με το υγρό που χρησιμοποιήθηκε για τη μονιμοποίηση και τη δομή του ιστού που πρόκειται να μελετηθεί.

4.3. Ειδικές Ιστοχημικές χρώσεις

4.3.1. Giemsa

Η ιστοχημική χρώση Giemsa επιτρέπει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού, επιτρέποντας επίσης την ανίχνευση παρασίτων και μυκήτων. Η παραπάνω χρώση ανιχνεύθηκε από τον Gustav Giemsa το 1902 (Jager, M. M. et al. 2011). Είναι γεγονός ότι αποτελεί πρότυπο για την ανίχνευση των παρασίτων της ελονοσίας σε επιχρίσματα αίματος (Sathpathi, S. et al. 2014). Παράλληλα η παραπάνω χρώση είναι δημοφιλής στην κλινική μικροβιολογία καθώς διαθέτει την ικανότητα να αποκαλύπτει τις μορφολογικές αποκλίσεις που έχουν τα διάφορα είδη πλασμωδίου στα μολυσμένα ερυθροκύτταρα (Jager, M. M. et al. 2011). Διαθέτει επίσης την ικανότητα να χρωματίζει μικροοργανισμούς όπως η Πνευμονοκύστης, το Τρυπανόσωμα, το Ιστόπλασμα και τη Λεισμάνια (Koduri, P. R. 1998).

Η χρώση Giemsa λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μικροοργανισμών, έχει ευρεία εφαρμογή συμπεριλαμβανομένης της διάγνωσης διαφορετικών μολυσματικών παραγόντων, της έρευνας όσον αφορά τους τομείς της μικροβιολογίας, παρασιτολογίας και ιολογίας. Στα μολυσμένα από το πλασμώδιο επιχρίσματα αίματος, τα ερυθροκύτταρα χρωματίζονται κόκκινα, ενώ σε τμήματα ιστού ο πυρήνας βάφεται μπλε, το κυτταρόπλασμα ανοιχτό μπλέ και τα ερυθροκύτταρα κιτρινωπό ροζ (Rene J. Buesa 2001). Τέλος, γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω το γεγονός ότι η χρώση Giemsa χρησιμοποιείται κυρίως στην αιματοπαθολογία, ωστόσο χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση ή όχι του **ελικαβακτηριδίου του πυλωρού** σε γαστρικές βιοψίες όπως και για την ανίχνευση των μαστοκυττάρων (Barcia JJ. 2007).

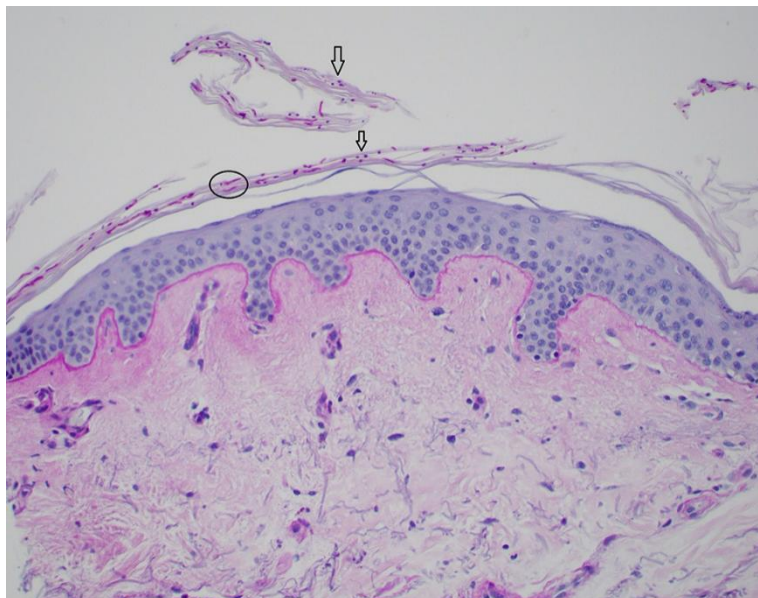


Εικόνα 3: Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα θετικά αποτελέσματα της λοίμωξης από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, με τη χρήση της χρώσης Giemsa. Οι μαύροι κύκλοι υποδεικνύουν το χρωματισμένο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού με μπλε χρώμα, το οποίο βρίσκεται προσκολλημένο στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.

https://www.researchgate.net/figure/The-positive-results-of-Helicobacter-pylori-infection-by-Giemsa-stain-Black-circles_fig1_342221251

4.3.2. PAS

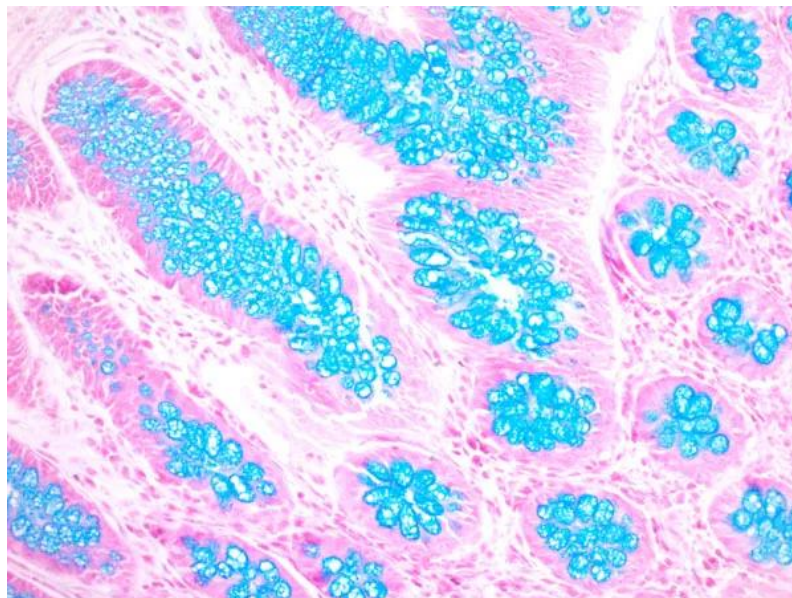
Η ιστοχημική χρώση PAS χρησιμοποιείται για την ανάδειξη βλεννοπολυσακχαριτών και μυκήτων σε τομές ιστού και σε συνδυασμό με την πέψη της α-αμυλάσης ή διαστάσης χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της νόσου αποθήκευσης του γλυκογόνου (Sheehan, D. C.; Hrapchak, B. B. 1987). Οι θετικές στη μέθοδο PAS ουσίες όπως τα γλυκολιπίδια, το γλυκογόνο, οι ίνες κολλαγόνου και τα φωσφολιπίδια εμφανίζονται ροζ, κόκκινα ή μωβ ενώ οι πυρήνες εμφανίζονται μπλε (Hauber, H. P.; Zabel, P. 2009)



Εικόνα 4: Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται μια βιοψία δέρματος με μυκητιακές υφές και ζυμομύκητες που φαίνονται εντός της κεράτινης στιβάδας (βέλη), με τη χρήση της χρώσης του περιοδικού οξέος-Schiff (PAS) (Stowman, A. M. 2019).

4.3.3. Alcian Blue

Alcian Blue είναι το όνομα που δίνεται σε μια οικογένεια πολυσθενών βασικών βαφών. Αυτές οι χρωστικές διαθέτουν την ικανότητα να αντιδρούν με ενώσεις που περιέχουν ανιονικές ομάδες όπως όξινες βλεννογονικές ουσίες και όξινες βλεννίνες. Υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι που χρησιμοποιούν την Alcian Blue σε διαφορετικές τιμές pH. Μια γενική μέθοδος χρησιμοποιεί διάλυμα Alcian Blue με pH ίσο με 2,5. Η χρωστική Alcian Blue με μικρότερο pH, μπορεί να βάψει πολλές όξινες βλεννίνες και βλεννογονικές ουσίες. Τα διαλύματα με ακόμη χαμηλότερη τιμή pH μπορούν να βάψουν μόνο όξινες θειϊκές βλεννογονικές ουσίες με pH 1 ή ακόμη και ισχυρά όξινες θειϊκές βλεννογονικές ουσίες με pH μόλις 0,4. Η ιστοχημική χρώση Alcian blue μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη μέθοδο περιοδικού οξέος - Schiff (PAS). Ο παραπάνω συνδυασμός μπορεί να αναδείξει ταυτόχρονα όξινες βλεννίνες και βλεννογονικές ουσίες καθώς και ουδέτερες βλεννίνες (Lai, M. & Lü, B. 2012).

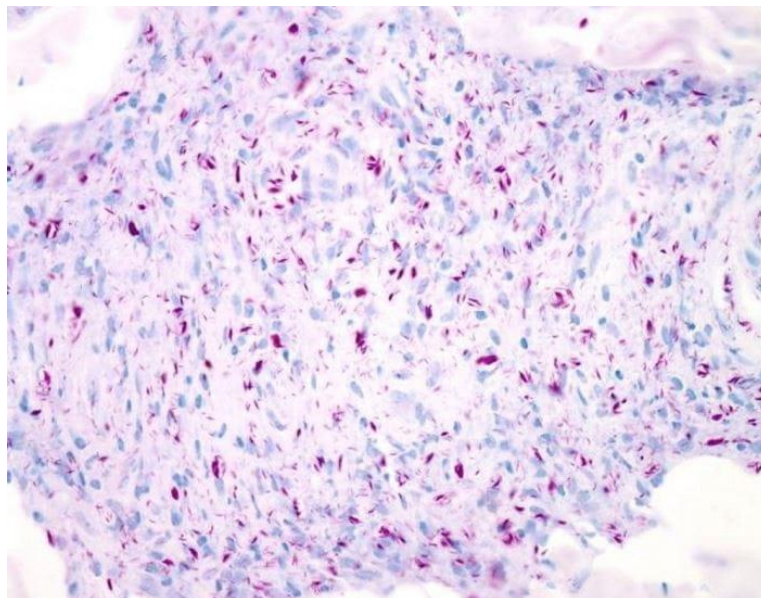


Εικόνα 5: Βιοψία τμήματος γαστρεντερικού σωλήνα με τη χρήση της χρώσης Alcian Blue.

<https://www.abcam.com/products/assay-kits/alcian-blue-stain-kit-ph-25-mucin-stain-ab150662.html#lb>

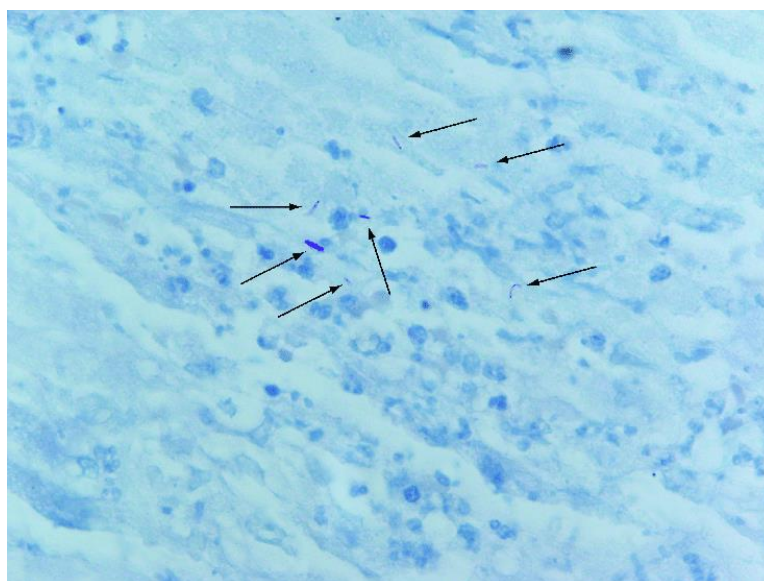
4.3.4. Ziehl Neelsen

Η χρώση Ziehl-Neelsen και οι τροποποιήσεις της ιστορικά υπήρξαν ουσιαστικά εργαλεία για την αναγνώριση των μυκοβακτηριδίων (*Mycobacterium* spp), καθώς και για την αναγνώριση μερικών άτυπων μυκοβακτηριδίων όπως το σύμπλεγμα *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC), το οποίο βάφεται και με τη χρώση PAS. Η τροποποιημένη χρώση για τα βακτήρια που παρουσιάζουν αντοχή στα οξέα ανιχνεύει ευαίσθητα στα ισχυρά οξέα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα. Η αντοχή στα οξέα είναι μια φυσική ιδιότητα που προσφέρει στα βακτήρια την ικανότητα να αντιστέκονται στον αποχρωματισμό από οξέα κατά τη διάρκεια της χρώσης και στην προκειμένη περίπτωση κατά τη διάρκεια της χρώσης με τη χρώση Ziehl-Neelsen. Για αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο όλων των μυκοβακτηριδίων. Ακόμη μπορεί να χρειαστεί για την ανίχνευση ορισμένων άτυπων μυκοβακτηριδίων όπως το μυκοβακτηρίδιο της λέπρας (*Mycobacterium leprae*), το Ροδόκοκκο (*Rhodococcus*) και τη *Legionella micdadei*. Τέλος, τα άγκριστρα από τον εχινόκοκκο και τα σπόρια από το κρυπτοσπορίδιο βάφονται εξίσου καλά (Kradin RL, Deshpande V, Iafrate AJ. 2017).



Εικόνα 6: Η παραπάνω εικόνα απεικονίζει βιοψία δέρματος με λεπρωματώδη λέπρα. Τα μυκοβακτηρίδια της λέπρας βάφονται κόκκινα με τη χρήση της τροποποιημένης χρώσης Ziehl-Neelsen.

<https://www.msmanuals.com/en-pt/professional/multimedia/image/ziehl-neelsen-stain-mycobacterium-leprae->

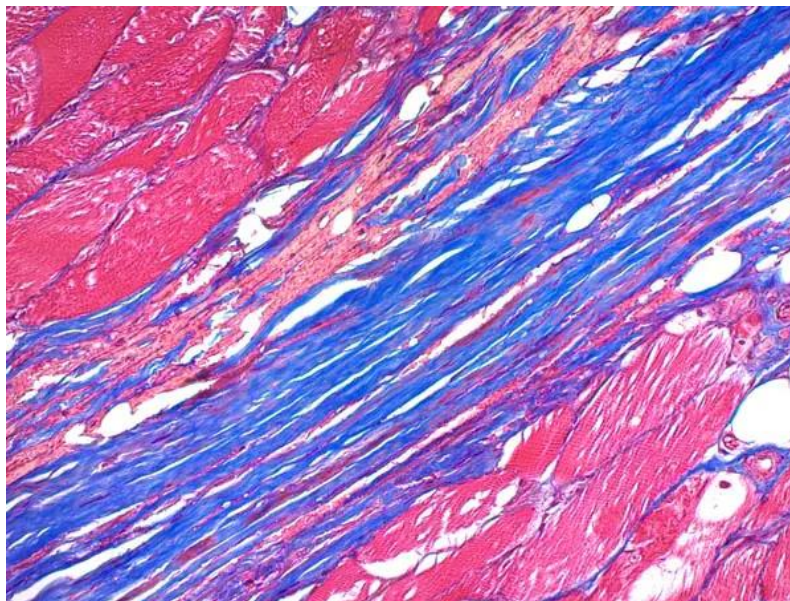


Εικόνα 7: Παραπάνω απεικονίζονται τα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης τα οποία βρίσκονται στο νεκρωτικό κέντρο ενός κοκκιώματος. Τα μυκοβακτηρίδια χρωματίζονται μπλε με τη χρήση της χρώσης Ziehl-Neelsen.

https://www.researchgate.net/figure/Red-acid-fast-bacteria-Mycobacterium-tuberculosis-within-the-necrotic-center-of-a_fig3_49847442

4.3.5. Masson Trichrome

Η τρίχρωμη χρώση αποτελείται από τρεις χρωστικές που βάφουν τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και το κολλαγόνο διαφορετικά. Πιο συγκεκριμένα η τρίχρωμη χρώση Masson χαρακτηρίζεται ως σειριακή χρώση καθώς αποτελείται από αιματοξυλίνη που έχει ως βάση τον σίδηρο, από το διάλυμα Biebrich scarlet-Acid Fuchsin που δίνει ένα κόκκινο χρώμα και τέλος από την ανιλίνη που βάφει μπλε είτε ανοιχτό πράσινο. Έτσι οι πυρήνες χρωματίζονται μαύροι ή σκούρο μωβ, στο κυτταρόπλασμα και τους μυς προσδίδεται ένα κόκκινο χρώμα και το κολλαγόνο βάφεται μπλέ ή ανοιχτό πράσινο αντίστοιχα (Masson, P. and Masson, P. 1929). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην τρίχρωμη χρώση Masson ως μονιμοποιητικό χρησιμοποιείται το διάλυμα Bouin. Έπειτα, πρώτο στάδιο αποτελεί η πυρηνική χρώση που συνήθως εκτελείται με τη χρήση της αιματοξυλίνης. Ωστόσο επειδή το χαμηλό pH των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στα επόμενα βήματα μπορεί να απομακρύνει την αιματοξυλίνη που έχει ως βάση το αλουμίνιο, αντικαθίσταται από σιδηρούχα αιματοξυλίνη και πιο συγκεκριμένα από την αιματοξυλίνη Weigert's, η οποία αντιστέκεται στην απομάκρυνση από τα οξέα. Στη συνέχεια εφαρμόζεται η πρώτη όξινη βαφή, το διάλυμα: Biebrich Scarlet/Acid fuchsin ενδιάμεσου μοριακού βάρους, το οποίο βάφει με κόκκινο χρώμα όλα τα μέρη του ιστού όπως τους μυς, το κολλαγόνο ακόμη και τα ερυθροκύτταρα. Το επόμενο βήμα αφορά τη διαφοροποίηση που επιτυγχάνεται με τη χρήση του φωσφομολυβδικού οξέος (phosphomolybdic acid) το οποίο έχει υψηλό μοριακό βάρος, είναι άχρωμο και έχει αρνητικό φορτίο. Ο ρόλος αυτού του οξέος είναι η απομάκρυνση του κόκκινου χρώματος από το κολλαγόνο. Όταν πια το κολλαγόνο δεν είναι κόκκινο εφαρμόζεται η δεύτερη όξινη βαφή, το **μπλε της ανιλίνης**. Ο ρόλος της παραπάνω χρωστικής είναι η πλήρης βαφή του κολλαγόνου χωρίς την απομάκρυνση του κόκκινου από τα άλλα συστατικά του ιστού (Veuthey T, Herrera G, Dodero VI. 2014).



Εικόνα 8: Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται ένας μυς εγκλεισμένος σε παραφίνη, βαμμένος με την τρίχρωμη χρώση Masson. Ο μυς απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα ενώ το κολλαγόνο βάφεται μπλε λόγω της ανιλίνης.

<https://www.abcam.com/products/assay-kits/trichrome-stain-kit-connective-tissue-stain-ab150686.html#lb>

4.3.6 Ιστοχημική χρώση Ανιλίνης

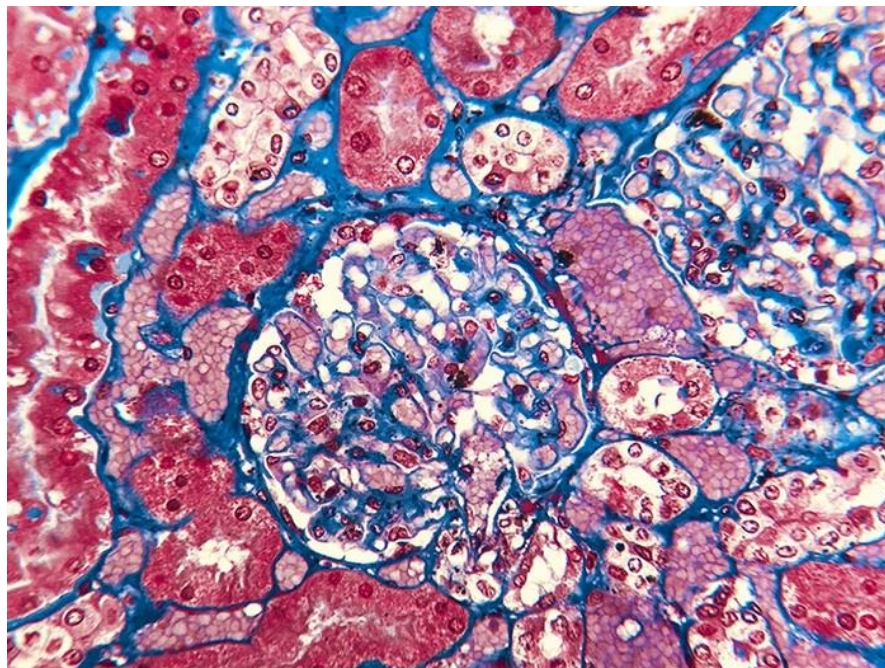
Δομικά ο συνδετικός ιστός αποτελείται από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και έναν αριθμό κυττάρων. Εντός των κυττάρων οι ινοβλάστες είναι ο πιο κοινός τύπος, ωστόσο τα μακροφάγα, τα μαστοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα και τα λευκοκύτταρα είναι επίσης παρόντα και ο κάθε τύπος κυττάρων είναι υπεύθυνος για κάθε μια διαφορετική λειτουργία. Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Extracellular matrix-ECM), το κυριότερο συστατικό του συνδετικού ιστού αποτελείται από υπόστρωμα και ίνες. Το υπόστρωμα είναι ένα άμορφο σύμπλεγμα αποτελούμενο από ανιονικά μακρομόρια, πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, ενώ οι ίνες του συνδετικού ιστού αποτελούνται από δομικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι ίνες κολλαγόνου, δικτυωτές ίνες και ελαστικές ίνες.

Το **κολλαγόνο** αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη στο σώμα, γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης περισσότερων από 20 τύπων του, ενώ οι δικτυωτές ίνες είναι

γνωστό ότι αποτελούνται από κολλαγόνο τύπου III και υπάρχουν ως δίκτυα λεπτών και γλυκοζυλιωμένων ινών. Παράλληλα οι ελαστικές ίνες σχηματίζονται χάρη στην πρωτεΐνη ελαστίνη και όπως υποδηλώνει το όνομα αποτελούν ένα υψηλά ελαστικό δίκτυο. Παρόλο που πολλές λειτουργίες μπορούν να αποδοθούν στο συνδετικό ιστό, η παροχή υποστήριξης στους ιστούς και στα όργανα του σώματος είναι η πιο σημαντική. Επιπλέον ο συνδετικός ιστός παρέχει μεταβολική υποστήριξη στα κύτταρα ενεργώντας ως μέσο για τη διάχυση θρεπτικών ουσιών και την αποβολή των άχρηστων προϊόντων του μεταβολισμού.

Λόγω του γεγονότος ότι η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελεί το κυριότερο συστατικό του συνδετικού ιστού και οι διάφοροι τύποι ινών μπορούν να τροποποιηθούν κάτω από ορισμένες συνθήκες υπάρχουν πολλές μέθοδοι χρώσης, ωστόσο η **τρίχρωμη χρώση** αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την απεικόνιση των ινών κολλαγόνου στα εργαστήρια Παθολογικής Ανατομικής (Veuthey T, Herrera G, Dodero VI. 2014).

Το **μπλε της ανιλίνης** είναι ένα διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται στο πρωτόκολλο της τρίχρωμης χρώσης Masson, μια διαδικασία ιστολογικής χρώσης που αποσκοπεί στην οπτικοποίηση των ινών κολλαγόνου, του μυϊκού ιστού και των πυρήνων των κυττάρων στις ιστικές τομές, όπως προαναφέρθηκε παραπάνω. Το διάλυμα μπλε της ανιλίνης είναι υπεύθυνο για τη χρώση των ινών κολλαγόνου δίνοντας τους ένα μπλε χρώμα. Η βαφή αυτή συνδέεται με τις ίνες κολλαγόνου μέσω όξινων κυτταρικών συστατικών όπως οι βλεννοπολυσακχαρίτες (https://www.morphisto.de/en/shop/detail/d/Anilinblau_%28MASSON_C%29//898/)



Εικόνα 9 : βιοψία νεφρού, με την χρώση της ανιλίνης βάφει επιλεκτικά με μπλε χρώμα τα νεφρικά σπειράματα.

<https://www.newcomersupply.com/product/trichrome-control-slides-kidney/?tab=information>

Κεφάλαιο 5: Ανοσοϊστοχημεία

Η Ανοσοϊστοχημεία χαρακτηρίζεται ως μια ισχυρή τεχνική που εκμεταλλεύεται την ειδική σύνδεση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, αποσκοπώντας στην ανίχνευση και τον εντοπισμό ειδικών αντιγόνων σε κύτταρα και ιστούς, τα οποία συχνά ανιχνεύονται και εξετάζονται με τη βοήθεια του φωτονικού μικροσκοπίου.

Επιπλέον, η εφαρμογή αυτής της τεχνικής συμβάλλει στην ταξινόμηση των νεοπλασμάτων, στον προσδιορισμό της θέσης προέλευσης ενός μεταστατικού όγκου και στην ανίχνευση καρκινικών εστιών οι οποίες είναι δυσδιάκριτες στη συνήθη ιστοχημική χρώση αιματοξυλίνη/ηωσίνη. Τέλος η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας εκτελείται πιο συχνά σε ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη, οι οποίοι φέρουν και το πλεονέκτημα της εύκολης αποθήκευσης, παρότι η τεχνική εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε παγωμένους ιστούς (Magaki S. et al. 2019).

5.1. Ιστορική εξέλιξη ανοσοϊστοχημείας

Η κλασική μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας επιτρέπει την οπτικοποίηση ειδικών αντιγόνων σε ιστούς ή κύτταρα σύμφωνα με την τεχνική αναγνώρισης αντιγόνου-αντισώματος, με τη χρήση είτε οπτικού μικροσκοπίου είτε μικροσκοπίου φθορισμού (O'Hurley G. et al. 2014).

Η ιστορία της ανοσοϊστοχημείας ξεκινά στις αρχές του 1940, όταν ο Albert Coons και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν αντιγόνα σε κατεψυγμένες τομές ιστού με την ανάπτυξη της τεχνικής του ανοσοφθορισμού. Πιο αναλυτικά, ο Coons απέδειξε ότι ο εντοπισμός αντιγόνων ήταν εφικτό σε τομές ιστών, χρησιμοποιώντας αντισώματα ενάντια του *Streptococcus pneumoniae*, τα οποία είχαν προηγουμένως χρωματιστεί με φλουορεσκεΐνη και ήταν ορατά με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού (A. H. Coons, H. J. Creech and R. N. Jones. 1941).

Στη συνέχεια, η εισαγωγή ενζύμων ως σημασμένων αντισωμάτων, μια τεχνική που αναπτύχθηκε από τον Nakane (Nakane PK. 1968) προανήγγειλε μια νέα και σημαντική εποχή για την Ανοσοϊστοχημεία διότι τα αποτελέσματα της τεχνικής ήταν ορατά μέσω του οπτικού μικροσκοπίου. Αυτή η καινοτομία βοήθησε στην εξάπλωση της ανοσοϊστοχημείας και σε εργαστήρια τα οποία δεν ήταν εξοπλισμένα με

μικροσκόπια φθορισμού καθώς αυτή η τεχνική μπορούσε να εφαρμοσθεί σε τομές ιστών που είχαν επεξεργασθεί με τη συνήθη διαδικασία, όπως ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (O'Hurley G. et al. 2014). Οι ακόλουθες ανακαλύψεις συμπεριλαμβανομένων της μεθόδου υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (peroxidase-antiperoxidase - PAP) από τον Sternberger (Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J., Meyer, H.G. 1970) και της μεθόδου της αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase -APAAP) από τον Masson (Mason DY, Sammons R. 1978) επέκτειναν σημαντικά τη χρήση της τεχνικής.

Σημαντικό βήμα στην εξέλιξη της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας αποτέλεσε η ανακάλυψη μεθόδων αντιγονικής ανάκτησης από τον Huang και τους συνεργάτες του το 1976 (Huang SN, Minassian H, More JD. 1976), η οποία συμβάλλει στην έκθεση των αντιγονικών επιτόπων που υπάρχουν στον υπό μελέτη ιστό ευνοώντας κατά αυτόν τον τρόπο την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος που θα λάβει μέρος στα επόμενα στάδια της μεθόδου. Δεν θα μπορούσε να παραληφθεί η ανακάλυψη συστημάτων ανίχνευσης δευτερογενούς αντισώματος όπως για παράδειγμα το σύμπλοκο αβιδίνης -βιοτίνης - υπεροξειδάσης -ABC από τον Hsu και τους συνεργάτες του το 1981 (Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. 1981 a, b, c)

Ορόσημο επίσης αποτέλεσε η ανακάλυψη των μονοκλωνικών αντισωμάτων από τον Kohler και τους συνεργάτες του (Köhler, G. and Milstein, C. (1976), η οποία αύξησε σημαντικά τη διαγνωστική ικανότητα της τεχνικής (Lin, F., Shi, J. 2022).

Τέλος στις αρχές της δεκαετίας του '90 η ανάπτυξη τεχνικών θερμοεπαγόμενης αντιγονικής ανάκτησης από τον Shi και τους συνεργάτες του (Shi, S.R., Key, M.E. and Kalra, K.L. 1991), αύξησε σημαντικά τον αριθμό των αντιγόνων που μπορούσαν να ανιχνευθούν στους ιστούς (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

5.2. Αντιγόνο-Αντίσωμα

Η ανοσοϊστοχημεία περιλαμβάνει την αναγνώριση του αντισώματος και τη δέσμευσή του στον επίτοπο του αντιγόνου στόχου. Η ειδικότητα της αντίδρασης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες του πρωτογενούς αντισώματος και την ικανότητα του αντιγονικού επιτόπου να το δεσμευτεί (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

5.3.Αντιγονική ανάκτηση (Antigen retrieval)

Έχει παρατηρηθεί ότι η διαδικασία της μονιμοποίησης τροποποιεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, γεγονός που καθιστά τα αντιγόνα μη ανιχνεύσιμα από τα ειδικά αντισώματα, καθώς η ανοσολογική αντίδραση εξαρτάται από τη διαμόρφωση του αντιγόνου.

Σκοπός των διαδικασιών της αντιγονικής ανάκτησης είναι η αναστροφή των αλλαγών που συνέβησαν λόγω της μονιμοποίησης. Η αντιγονική ανάκτηση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τους ιστούς οι οποίοι έχουν μονιμοποιηθεί σε μονιμοποιητικά διαλύματα διασταυρούμενης σύνδεσης. Περίπου το 85% των αντιγόνων που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη απαιτούν κάποιον τύπο αντιγονικής ανάκτησης, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η άνοσο-αντίδραση. Παράλληλα, η ανάγκη για αντιγονική ανάκτηση και η επιλογή της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί είναι δύο παράμετροι που εξαρτώνται τόσο από το αντιγόνο-στόχο όσο και από τον τύπο του αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί. Οι δύο πιο κοινές μέθοδοι περιλαμβάνουν την **ενζυμική ανάκτηση** (πρωτεϊνάση K, πεψίνη) και τη **θερμοεπαγόμενη ανάκτηση** (κιτρικά pH 6, Tris-EDTA pH 9, EDTA pH 8). Η τελευταία αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο, καθώς έχει φέρει την επανάσταση στην ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των αντιγόνων που έχουν μονιμοποιηθεί σε μονιμοποιητικά διασταυρούμενης σύνδεσης όπως είναι η φορμόλη.

Η μέθοδος της θερμο-επαγόμενης αντιγονικής ανάκτησης εισήχθει από τον Shi και τους συνεργάτες του (Shi, S.R., Key, M.E. and Kalra, K.L. 1991). και βασίζεται στην ιδέα του Fraenkel-Conrat (FRAENKEL-CONRAT H, BRANDON BA, OLCOTT HS . 1947) και των συνεργατών του , ο οποίος επισήμανε ότι οι χημικές αντιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και αντιγόνων μπορούν να αναστραφούν εν μέρη είτε με τη χρήση υψηλής θερμοκρασίας είτε μέσω ισχυρής αλκαλικής υδρόλυσης. Η θέρμανση μπορεί να «αποκαλύψει» αντιγονικούς επιτόπους μέσω της υδρόλυσης των διασταυρούμενων δεσμών του μεθυλενίου (Donald Van Hecke 2002).

Ο εξοπλισμός που απαιτείται για την επίτευξη της θερμο-επαγόμενης αντιγονικής ανάκτησης περιλαμβάνει: ατμομάγειρες, χύτρες ταχύτητας, υδατόλουτρα ή φούρνο μικροκυμάτων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η θερμοκρασία και ο χρόνος που

απαιτείται για την επίτευξη των καλύτερων αποτελεσμάτων είναι αντιστρόφως ανάλογα. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία τόσο μικρότερος είναι ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Η θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (100°C) και σε μικρότερο χρόνο (10 λεπτά) φέρει καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τη θέρμανση που πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία αλλά για περισσότερο χρόνο (M A Hayat 2013). Τέλος, ικανοποιητικά αποτελέσματα μπορούν να ληφθούν σχεδόν για όλα τα αντιγόνα μέσω της θέρμανσης στους 90°-95°C για 20 λεπτά (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

5.4. Μονοκλωνικά-Πολυκλωνικά αντισώματα

Τα **μονοκλωνικά αντισώματα** παράγονται κυρίως από τα ποντίκια. Οι George Kohler και Cesar Milstein ήταν εκείνοι που ανακάλυψαν το 1976 πως να παράγουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων, τα οποία προέρχονται από τον κλώνο ενός μόνο Β κυττάρου (Köhler G, Milstein C. 1976). Σύμφωνα με αυτή την τεχνική ένα ζώο και συνηθέστερα το ποντίκι ανοσοποιείται με καθαρό αντιγόνο. Εφόσον επιτευχθεί η άνοσο-απόκριση, το ζώο θανατώνεται μετά την πάροδο συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος και λαμβάνονται στη συνέχεια κύτταρα σπληνός, από τα οποία διαχωρίζονται τα Β λεμφοκύτταρα και ακολουθεί η σύντηξή τους με κύτταρα πολλαπλούν μυελώματος, διότι τα απομονωμένα Β λεμφοκύτταρα έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η παραγωγή κυττάρων που καλούνται υβριδώματα. Το υβρίδωμα διαθέτει τις ιδιότητες αθανασίας του πατρικού μυελωματικού κυττάρου και της έκκρισης του μοναδικού αντισώματος που έχει παραχθεί από το πατρικό Β κύτταρο (Punt, J., Stranford, S., Jones, P.P. and Owen, J.A. 2019). Το πλεονέκτημα που χαρακτηρίζει τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι η υψηλή ειδικότητα που παρουσιάζουν έναντι των πολυκλωνικών αντισωμάτων. Τα υβριδώματα μπορούν να διατηρηθούν σε καλλιέργειες κυττάρων είτε ενίονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα των ποντικών παράγοντας ασκητικό υγρό το οποίο έχει 10-100 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση αντισωμάτων συγκριτικά με την καλλιέργεια.

Τα **πολυκλωνικά αντισώματα** αποτελούν μια συλλογή αντισωμάτων τα οποία στοχεύουν έναντι πολλαπλών επιτόπων ενός συγκεκριμένου αντιγόνου (O'Hurley G.

et al. 2014). Παράγονται σε πολλά είδη ζώων και ιδιαίτερα στο κουνέλι ακολουθεί η αίγα, το πρόβατο, το άλογο, ο χοίρος και το κοτόπουλο (Ramos-Vara JA. 2005). Γενικότερα όταν ένα ζώο ενίεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, το ανοσοποιητικό του σύστημα προκαλεί μια πρωτογενή ανοσολογική απόκριση και παράγει πολλαπλούς κλώνους Β λεμφοκυττάρων έναντι αυτού του αντιγόνου. Ύστερα από την ανοσοποίηση με το ίδιο αντιγόνο, αυτά τα Β λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν αντισώματα που βρίσκονται στον ορό (O'Hurley G. et al. 2014). Τα πολυκλωνικά αντισώματα πλεονεκτούν έναντι των μονοκλωνικών καθώς παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια και ευρύτερη δραστηριότητα αλλά μειονεκτούν ως προς την εξειδίκευση. Παράλληλα είναι πιο πιθανό να αναγνωρίσουν πολλαπλές ισομορφές της πρωτεΐνης στόχου. Ωστόσο ένα παρασκεύασμα πολυκλωνικών αντισωμάτων που δεν έχει καθοριστεί ως προς την συγγένεια, μπορεί να είναι ετερογενές λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας αντισωμάτων υψηλής συγγένειας και ασθενώς ανοσογονικών επιτόπων. Η ετερογενής ανοσολογική ανάμειξη των πολυκλωνικών αντισωμάτων προσδίδει το πλεονέκτημα της ενίσχυσης της αντίδρασης του αντιγόνου μέσω της αναγνώρισης πολλαπλών επιτόπων. Ωστόσο, μπορεί να αποτελέσει και μειονέκτημα διότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των διαφορετικών αντισωμάτων στην πρωτεΐνη-στόχο, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης με παρόμοιους επιτόπους άλλων πρωτεϊνών και επομένως η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

5.5. Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας

- Πρωταρχικό βήμα για την έναρξη της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας αποτελεί η αποπαραφίνωση των τομών, οι οποίες εφόσον έχουν τοποθετηθεί στον κλίβανο στους 60°C για 1 ώρα, στη συνέχεια εμβαπτίζονται στη ξυλόλη για 15 λεπτά.
- Ακολουθεί το στάδιο της ενυδάτωσης, κατά το οποίο οι τομές εμβαπτίζονται σε διαλύματα αλκοολών κατά κατιούσα σειρά (αλκοόλη 100%, 96%, 80%, 70%).
- Ύστερα πραγματοποιείται το βήμα της αντιγονικής ανάκτησης. Η αρχή της αντιγονικής ανάκτησης βασίζεται στην εφαρμογή θερμότητας για ποικίλα χρονικά

διαστήματα σε τομές ιστών που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και έχουν εγκλειστεί στην παραφίνη. Μετά το στάδιο της αποπαραφίνωσης και της ενυδάτωσης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες βυθίζονται μέσα σε ένα υδατικό διάλυμα που καλείται “διάλυμα ανάκτησης”, το pH του οποίου κυμαίνεται σε ένα εύρος μεταξύ των τιμών 2 έως 10. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ύστερα από την εμβάπτιση τους στο προθερμασμένο υγρό εκτίθενται στη θερμότητα. Αυτό το βήμα είναι το κρισιμότερο στην αντιγονική ανάκτηση διότι ο βαθμός στον οποίο θα επέλθει η ανοσοδραστικότητα σχετίζεται άμεσα με τη διάρκεια της επώασης και την θερμοκρασία.

- Μετά το στάδιο της αντιγονικής ανάκτησης εφαρμόζεται στα πλακίδια το υπεροξειδίου (H_2O_2) προκειμένου να αποκλειστεί η ενδογενής δράση της υπεροξειδάσης.
- Έπειτα εφαρμόζεται το πρωτογενές αντίσωμα και ακολουθεί το blocking step όπου εμποδίζεται η δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων. Έπειτα εφαρμόζεται το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Τέλος, προστίθεται το χρωμογόνο υπόστρωμα DAB, το οποίο δίνει ένα καφέ προϊόν αντίδρασης όταν συνδυάζεται με το ένζυμο HRP.
- Ακολουθεί το στάδιο της αντίχρωσης η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση της αιματοξυλίνης.
- Έπειτα οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται σε διαλύματα αλκοολών κατά ανιούσα σειρά (70%, 80%, 96%, 100%) προκειμένου οι ιστοί να αφυδατωθούν.
- Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται στην ξυλόλη.
- Τέλος, τα πλακίδια καλύπτονται με καλυπτρίδες και παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

5.6. Συστήματα ανίχνευσης στην Ανοσοϊστοχημεία

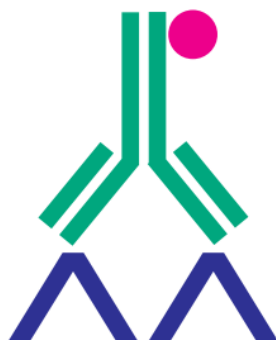
Η επιλογή του συστήματος ανίχνευσης είναι πολύ σημαντική στην τεχνική της ανοσοϊστοχημείας λαμβάνοντας υπόψη ότι η ευαισθησία της ανοσολογικής αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από το σύστημα ανίχνευσης που θα χρησιμοποιηθεί (Ramos-Vara JA. 2005). Το σύστημα ανίχνευσης είναι σημαντικό να μεγιστοποιεί την ευαισθησία της τεχνικής και να βελτιστοποιεί την οπτικοποίηση της ανοσολογικής αντίδρασης σε λιγότερα βήματα και σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Η εμπειρία του βιοϊατρικού επιστήμονα, ο τύπος του αντιγόνου που πρόκειται να ανιχνευθεί (εάν για παράδειγμα η έκφραση του συγκεκριμένου αντιγόνου είναι χαμηλή απαιτούνται

πιο ευαίσθητα συστήματα ανίχνευσης), ο τύπος του αντισώματος καθώς διαφορετικά αντισώματα απαιτούν διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης και τέλος το κόστος. Όλα τα παραπάνω αποτελούν παραμέτρους που πρέπει να ληφθούν υπόψιν για τη σωστή επιλογή του συστήματος ανίχνευσης (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

Τα συστήματα ανίχνευσης ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες : Την **άμεση** και **έμμεση** μέθοδο.

5.6.1.Ανίχνευση ενός σταδίου (Άμεση)

Η άμεση μέθοδος ανίχνευσης είναι μια διαδικασία που αποτελείται μόλις από ένα βήμα. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, το πρωτογενές αντίσωμα επισημαίνεται με ένζυμα, κολλοειδές χρυσό ή φθοριοχρώματα, επιτρέποντας έτσι την άμεση ανίχνευση του αντιγόνου στο τμήμα του ιστού δίχως την απαίτηση δευτερογενούς αντισώματος. Αυτή η μέθοδος ανίχνευσης παρόλο που είναι πιο απλή και λιγότερο χρονοβόρα, φέρει το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας συγκριτικά με την έμμεση μέθοδο ανίχνευσης (O'Hurley G. et al. 2014).



Εικόνα 10: Άμεση μέθοδος: Το επισημασμένο με ένζυμο πρωτογενές αντίσωμα αντιδρά με το αντιγόνο του ιστού. Boenisch, T (2001).

5.6.2.Ανίχνευση δύο σταδίων (Έμμεση)

Η χαμηλή ευαισθησία που παρουσιάζει η άμεση μέθοδος ανίχνευσης δημιούργησε την ανάγκη για την ανάπτυξη πιο ευαίσθητων τεχνικών για την ανίχνευση του αντιγόνου. Έτσι ο Coons και οι συνεργάτες του, κατευθύνθηκαν προς τη δημιουργία μιας μεθόδου αποτελούμενης από δύο βήματα. Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο το πρωτογενές αντίσωμα που δεν είναι επισημασμένο με κάποιο ένζυμο ή φθοριόχρωμα

ενώνεται με το αντιγόνο και στη συνέχεια ένα επισημασμένο δευτερογενές αντίσωμα στρέφεται έναντι του πρωτογενούς ακολουθούμενο από το διάλυμα χρωμογόνου-υποστρώματος. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η παραγωγή του δευτερογενούς αντισώματος πρέπει να στρέφεται έναντι των ανοσοσφαιρινών του είδους που έχει παραχθεί το πρωτογενές. Εάν για παράδειγμα το πρωτογενές αντίσωμα έχει παραχθεί σε ποντίκι τότε το δευτερογενές θα πρέπει να στρέφεται έναντι των ανοσοσφαιρινών του ποντικιού, συνεπώς θα παραχθεί σε ένα άλλο είδος όπως είναι το κουνέλι, ώστε να αναγνωρίσει το πρωτογενές ως ξένο (αντιγόνο) και να αρχίσει η παραγωγή αντισωμάτων εναντίον του (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014). Παρόλο που η έμμεση μέθοδος είναι πιο χρονοβόρα και πιο περίπλοκη λόγω των πολλαπλών βημάτων, είναι πιο ευαίσθητη ως προς την ανίχνευση των αντιγόνων (O'Hurley G. 2014). Η υψηλή ευαισθησία της μεθόδου οφείλεται αρχικά στο γεγονός ότι το πρωτογενές αντίσωμα δεν είναι επισημασμένο διατηρώντας έτσι την ενεργότητα του και οδηγώντας κατ'επέκταση σε πιο ισχυρό σήμα. Έπειτα ο λόγος των μορίων αναφοράς όπως η υπεροξειδάση είναι υψηλότερος αυξάνοντας έτσι την ένταση της αντίδρασης. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στην ανίχνευση μικρότερων ποσοτήτων αντιγόνου καθιστώντας τη μέθοδο πιο ευαίσθητη (Ramos-Vara JA. 2005)



Εικόνα 11: Έμμεση μέθοδος δύο βημάτων : Το επισημασμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα αντιδρά με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο συνδέεται με το αντιγόνο. Boenisch, T (2001).

5.6.3. Ανίχνευση τριών σταδίων (Έμμεση)

Στην έμμεση μέθοδο τριών σταδίων ένα δεύτερο επισημασμένο αντίσωμα προστίθεται στην προαναφερθείσα έμμεση τεχνική δύο σταδίων. Τα δύο επισημασμένα με ένζυμο δευτερογενή αντισώματα προστίθενται διαδοχικά. Εάν για παράδειγμα το δευτερογενές αντίσωμα παράχθηκε σε κατσίκια, τότε το τριτογενές πρέπει να είναι ειδικό ως προς την ανοσοσφαιρίνη της κατσίκας. Τόσο το πρωτογενές όσο και το δευτερογενές αντίσωμα πρέπει να είναι συζευγμένα με το ίδιο ένζυμο. Το πλεονέκτημα που προσφέρει η παραπάνω μέθοδος είναι η ενίσχυση του σήματος γεγονός που συμβάλλει στην ανίχνευση αντιγόνων που φέρουν περιορισμένο αριθμό επιτόπων καθώς και στην περαιτέρω αύξηση της έντασης της χρώσης (*Dako_Handbook*).



Εικόνα 12: Έμμεση μέθοδος τριών σταδίων : Το επισημασμένο με ένζυμο τριτογενές αντίσωμα με το επισημασμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα. *Boenisch, T (2001)*.

5.7. Διπλή Ανοσοχρώση (πρωτόκολλο και σημαντικά σημεία ελέγχου)

Η Ανοσοϊστοχημεία τις τελευταίες δεκαετίες χάρη στη χρήση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων για την τυποποίηση ιστών και κυττάρων, έχει αναδειχθεί σε ισχυρό εργαλείο τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. Σε πολλές περιπτώσεις η ανίχνευση δύο ή περισσότερων αντιγόνων στο ίδιο τμήμα ιστού

κρίνεται αναγκαία. Η ανάγκη της μελέτης του συν-εντοπισμού (δηλαδή την παρουσία δύο αντιγόνων σε ένα κύτταρο) είναι ένας από τους κυριότερους λόγους που οδήγησε στη δημιουργία της μεθόδου της διπλής ανοσοχρώσης. Όταν και τα δύο αντιγόνα βρίσκονται στον ίδιο κυτταρικό τύπο όπως είναι ο πυρήνας, τότε ο συν εντοπισμός υποδηλώνεται με ανάμεικτο χρώμα. Στην περίπτωση που τα δύο αντιγόνα εντοπίζονται σε διαφορετικό κυτταρικό τύπο όπως πυρήνας-κυτταρόπλασμα, τότε ο συν εντοπισμός υποδηλώνεται με διαφορετικό χρώμα όπως για παράδειγμα : καφέ-κόκκινο (Chris M. van der Loos 2010).

Η μέθοδος της διπλής ανοσοχρώσης ταξινομείται σε δύο κατηγορίες: την **ταυτόχρονη** και τη **διαδοχική** μέθοδο.

Η μέθοδος της **ταυτόχρονης (simultaneous)** διπλής ανοσοχρώσης πραγματοποιείται με τη χρήση δύο πρωτογενών αντισωμάτων τα οποία παράγονται σε δύο διαφορετικά ζωικά είδη. Τα δύο αυτά πρωτογενή αντισώματα εφαρμόζονται ταυτόχρονα, ακολουθούμενα από ένα μείγμα διαφορετικών δευτερογενών αντισωμάτων-συζευγμένα με ένζυμα.

Στην περίπτωση όμως που τα δύο πρωτογενή αντισώματα προέρχονται από το ίδιο είδος, τότε η εφαρμογή της **διαδοχικής (sequential)** μεθόδου κρίνεται απαραίτητη. Ο κίνδυνος που ελλοχεύει από την χρήση αυτής της μεθόδου είναι ότι το δεύτερο στρώμα αντισωμάτων που προορίζεται για το δεύτερο αντιγόνο μπορεί να δεσμεύσει το πρώτο αντιγόνο μέσω του πρωτογενούς αντισώματος, λόγω της προέλευσής τους από το ίδιο ζωικό είδος. Το πρόβλημα αυτό ωστόσο μπορεί να ξεπεραστεί με την προσθήκη ενός ενδιάμεσου βήματος μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ανοσοϊστοχημικής αντίδρασης, αποσκοπώντας στην έκλυση του πρωτογενούς αντισώματος της πρώτης αντίδρασης που επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης υπερμαγγανικού καλίου είτε διαλύματος γλυκίνης-υδροχλωρικού οξέος. Επιπλέον μπορεί να εφαρμοσθεί ένα βήμα θερμοεπαγόμενης αντιγονικής ανάκτησης. Εναλλακτικά, έναντι του βήματος της έκλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπηκνωμένο διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (DAB) για την πρώτη ανοσοϊστοχημική αντίδραση, το οποίο θα εμπόδιζε θεωρητικά οποιοδήποτε υπολειμματικό πρωτογενές αντίσωμα της πρώτης ανοσοαντίδρασης (Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί ο συνδυασμός δυο βασικών τεχνικών του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου, της **Διπλής Ανοσοϊστοχημικής χρώσης** έναντι συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων με την **Ιστοχημική χρώση της Ανιλίνης** για την ανάδειξη του κολλαγόνου των ιστών, συγχρόνως στην ίδια τομή του ιστού. Η αναζήτηση των βέλτιστων συνθηκών για τον συνδυασμό αυτών των δύο τεχνικών θεωρείται απαραίτητη καθώς θα αποτελέσει σημαντικό «εργαλείο» στην διερεύνηση υποκείμενων μηχανισμών που σχετίζονται με την αυξημένη παρουσία του κολλαγόνου σε συνδυασμό με την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή ιστού

Ο ιστός που επιλέχθηκε για τη διενέργεια των πειραμάτων της διπλής ανοσοϊστοχημείας-Ανιλίνης ήταν ένας λεμφαδένας που παρουσιάζει μετάσταση από Καρκίνωμα του Μαστού, μονιμοποιημένος σε φορμόλη και εγκλεισμένος σε παραφίνη. Τα ακόλουθα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση σειριακών τομών μεγέθους 4μm.

2. Εμπορικά διαθέσιμα αναλώσιμα

Για τη μέθοδο της διπλής ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

1. Το kit από την εταιρεία Immunologic: BrightVision Ultimate plus, two component detection system Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG HRP plus DAB (Ready-to-Use).
2. 1^ο πρωτογενές αντίσωμα αντι-Ki-67 [MIB-1] (mouse monoclonal antibody) της εταιρείας BIOCARE MEDICAL. Το anti-Ki-67 είναι ένα πυρηνικό αντιγόνο το οποίο σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
3. 2^ο πρωτογενές αντίσωμα αντι-CD8 (C8/144 B) (mouse monoclonal antibody) της εταιρείας Cell Marque. Το CD8 (Cluster of Differentiation 8) αντιγόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων. Το anti-

CD8 είναι ένας δείκτης των T-κυττάρων που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση κυτταροτοξικών/κατασταλτικών λεμφοκυττάρων. Το αντίσωμα CD8 χρησιμοποιήθηκε ύστερα από αραίωση 1/80.

4. Το χρωμογόνο HRP Red Magenta από την εταιρεία Dako χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των CD8 θετικών T-λεμφοκυττάρων. Για 100μL χρωμογόνου αναμείχθηκαν 85μL HRP Magenta και 15μL Substrate buffer.
5. Για τη μέθοδο της ανιλίνης χρησιμοποιήθηκε το kit από την εταιρεία ScyTek : Trichrome Stain Kit (Modified Masson's) . Το kit αυτό χρησιμοποιείται για τη χρώση και την απεικόνιση των ινών κολλαγόνου του συνδετικού ιστού , σε τομές ιστών. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη της χρώσης της ανιλίνης είναι τα παρακάτω :
 - a. Φωσφομολυβδικό οξύ (Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid Solution)
 - b. Διάλυμα ανιλίνης (Aniline Blue Solution)
 - c. Οξικό οξύ (Acetic Acid Solution 1%)

3. Αναλυτικό πρωτόκολλο διπλής ανοσοϊστοχημικής και ιστοχημικής χρώσης ανιλίνης

1. Τοποθέτηση των τομών στον κλίβανο στους 60° C για 1 ώρα
2. Εμβάπτιση στην ξυλόλη για 5 λεπτά
3. Εμβάπτιση στην ξυλόλη για 5 λεπτά
4. Εμβάπτιση σε αλκοόλη 100% για 1 λεπτό
5. Εμβάπτιση σε αλκοόλη 98% για 1 λεπτό
6. Εμβάπτιση σε αλκοόλη 80% για 1 λεπτό
7. Εμβάπτιση σε αλκοόλη 70% για 1 λεπτό
8. Έκπλυση με dH₂O 1-2 φορές
9. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
10. Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων με τη χρήση κιτρικών οξέων pH 6. Αρχικά προθερμαίνεται μόνο του το διάλυμα για 5 λεπτά (65⁰C) και στη συνέχεια

τοποθετούνται τα πλακίδια στο ήδη προθερμασμένο υγρό για άλλα 15 λεπτά (90⁰-95⁰C)

11. Αφήνεται το διάλυμα με τα πλακίδια να κρυώσει για 15-20 λεπτά
12. Έκπλυση με dH₂O
13. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
14. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
15. Προσθήκη 3% H₂O₂ για 15 λεπτά στο σκοτάδι (περίπου 100μl σε κάθε τομή).
Η χρήση του H₂O₂ αποσκοπεί στην απενεργοποίηση της δράσης της υπεροξειδάσης.
16. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
17. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
18. Εφαρμογή πρωτογενούς αντισώματος anti-Ki67 για 1 ώρα στους 37⁰ C ή ολονύκτια επώαση στους 4⁰C
19. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
20. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
21. Εφαρμογή Post-Blocking διαλύματος για 15 λεπτά
22. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
23. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
24. Εφαρμογή διαλύματος HRP polymer για 30 λεπτά
25. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
26. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
27. Προσθήκη του χρωμογόνου DAB για 5 λεπτά
28. Έκπλυση με dH₂O
29. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
30. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
31. 2^η αποκάλυψη με κιτρικό οξύ. Αρχικά προθερμαίνεται μόνο του το υγρό για 2 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετούνται τα πλακίδια στο ήδη προθερμασμένο υγρό για άλλα 7 λεπτά
32. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
33. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
34. Προσθήκη 3% H₂O₂ για 15 λεπτά στο σκοτάδι (περίπου 100μl σε κάθε τομή)
35. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά

36. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
37. Εφαρμογή δεύτερου πρωτογενούς αντισώματος anti-CD8 για 1 ώρα στους 37⁰
C ή overnight επώαση στους 4⁰C
38. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
39. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
40. Εφαρμογή Post-Blocking διαλύματος για 15 λεπτά
41. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
42. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
43. Εφαρμογή διαλύματος HRP polymer για 30 λεπτά
44. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
45. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
46. Εφαρμογή χρωμογόνου Red Magenta για 7 λεπτά
47. Έκπλυση σε τρεχούμενο νερό για 5 λεπτά
48. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
49. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
50. Τοποθέτηση των τομών σε TBS για 5 λεπτά
51. Αιματοξυλίνη Gill's 30 δευτερόλεπτα
52. Έκπλυση σε τρεχούμενο νερό για 2 λεπτά

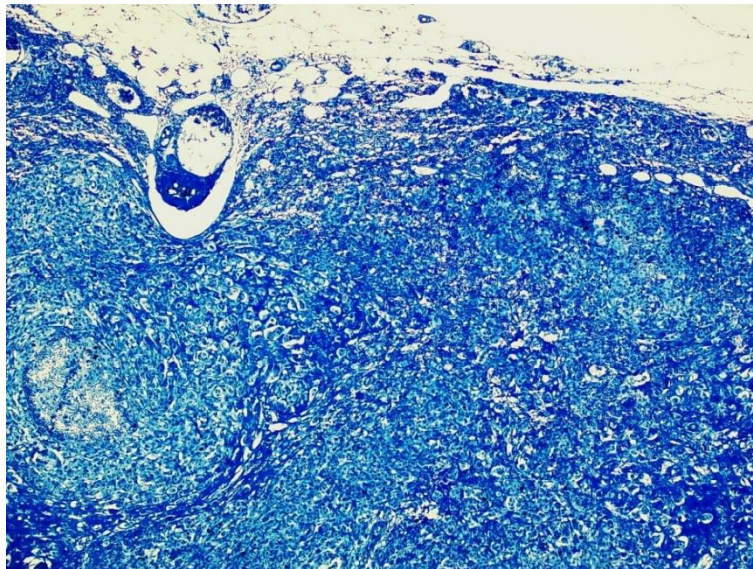
Για την ανιλίνη

53. Έκπλυση με dH₂O 1-2 φορές
54. Διαφοροποίηση με phosphomolybdic acid 5 σταγόνες , για 10 λεπτά
55. Χωρίς έκπλυση, εφαρμόζεται το διάλυμα της ανιλίνης : 5 σταγόνες για 14
λεπτά
56. Έκπλυση σε dH₂O
57. Εφαρμογή οξικού οξέος 1% : 5 σταγόνες για 4 λεπτά
58. Έκπλυση σε dH₂O
59. Αφυδάτωση με 2 αλλαγές σε αλκοόλη 95% και 2 αλλαγές σε αλκοόλη 100%
60. Καθαρισμός στην ξυλόλη
61. Κάλυψη των τομών

➤ **Τροποποιήσεις πρωτοκόλλου και παραλλαγές.**

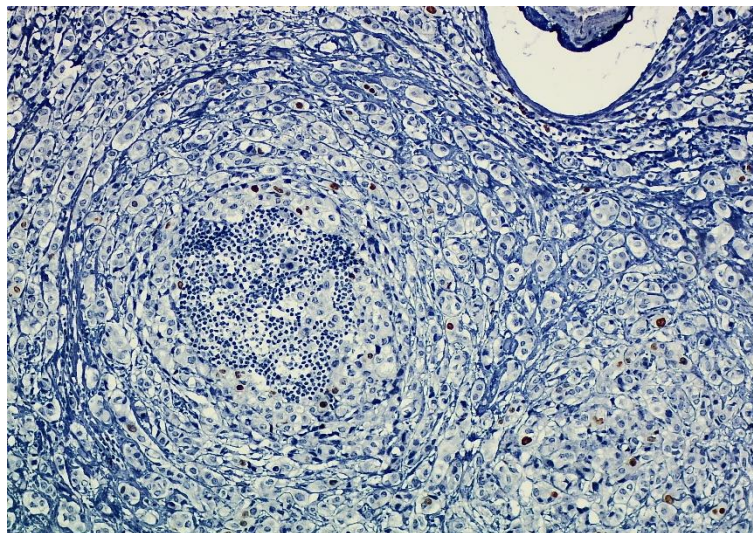
Η διπλή ανοσοϊστοχημεία για τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Ki-67 [MIB-1] (mouse monoclonal antibody) της εταιρείας BIOCARE MEDICAL και το CD8 (C8/144 B) (mouse monoclonal antibody) της εταιρείας Cell Marque. Έπειτα από το στάδιο της αποπαραφίνωσης ακολούθησε η αντιγονική αποκάλυψη η οποία πραγματοποιήθηκε στους 96⁰C για 15 λεπτά στο φούρνο μικροκυμάτων, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών με pH 6. Ακολούθησε η επώαση των πλακιδίων σε H₂O₂, ώστε να αποκλειστεί η ενδογενής δράση της υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πρώτο πρωτογενές αντίσωμα Ki67 για 1 ώρα στους 37⁰C. Ύστερα προστέθηκε το διάλυμα post-blocking για τον αποκλεισμό των μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα ανίχνευσης με βάση το πολυμερές και η αντίδραση αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας τη διαμινοβενζιδίνη (DAB) ως χρωμογόνο το οποίο δίνει ένα καφέ χρώμα στα θετικά κύτταρα. Ακολούθησε και δεύτερη αντιγονική αποκάλυψη καθώς τα δύο πρωτογενή αντισώματα προέρχονται από το ίδιο ζωικό είδος. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το δεύτερο πρωτογενές αντίσωμα CD8. Ακολούθησαν τα ίδια βήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ως χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε το Red Magenta Chromogen, το οποίο βάφει τα θετικά κύτταρα κόκκινα. Τέλος τα πλακίδια επώαστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 3 λεπτά.

Πείραμα 1 (εικόνα 13): Όσον αφορά την ιστοχημική χρώση της ανιλίνης, στο παρόν πείραμα θελήσαμε να δούμε την επίδραση του φωσφομολυβδικού οξέος. Συνεπώς έγινε παράλειψη αυτού του βήματος. Η ανιλίνη εφαρμόστηκε για 3 λεπτά και το οξικό οξύ για 4 λεπτά.

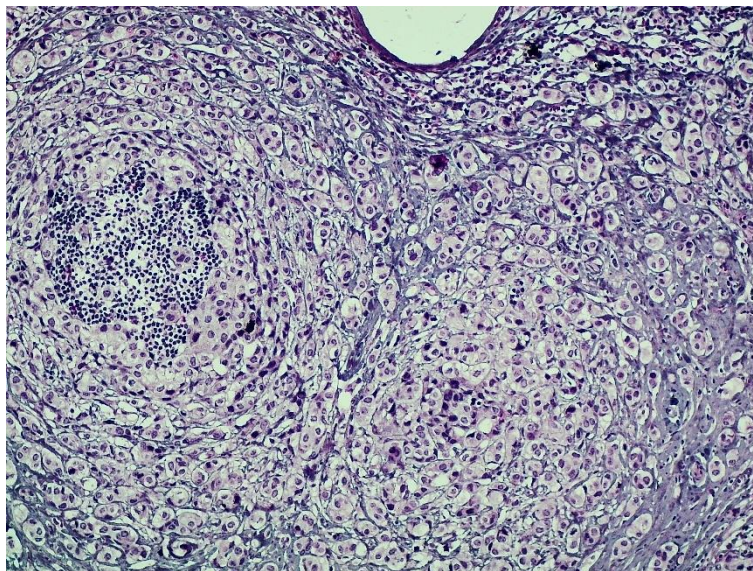


Εικόνα 13: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1^ο)

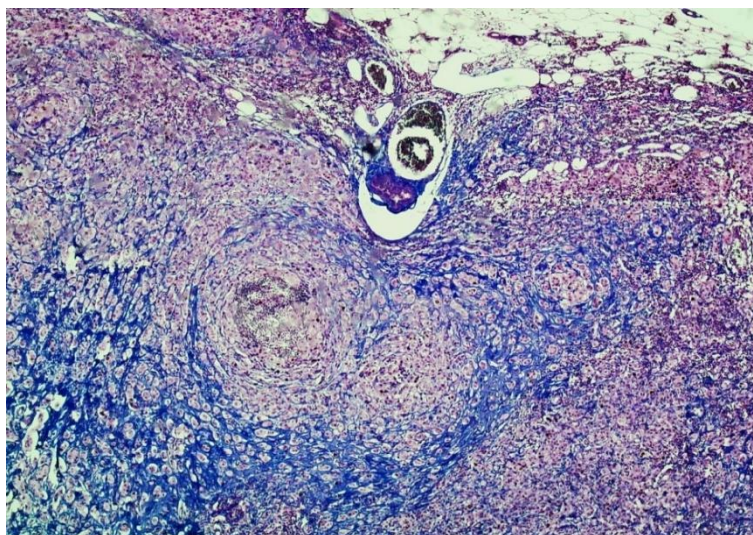
Πείραμα 2 (εικόνα 14,15,16,17) : Στο παρόν πείραμα ακολουθήθηκαν τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν και στο πείραμα 1, με τη χρήση ωστόσο του φωσφομολυβδικού οξέος. Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν ο έλεγχος του επιδραστικού ρόλου που έχει η αιματοξυλίνη Harri's στην τελική εικόνα του πειράματος. Η αιματοξυλίνη εφαρμόστηκε για 3 λεπτά στις τομές.



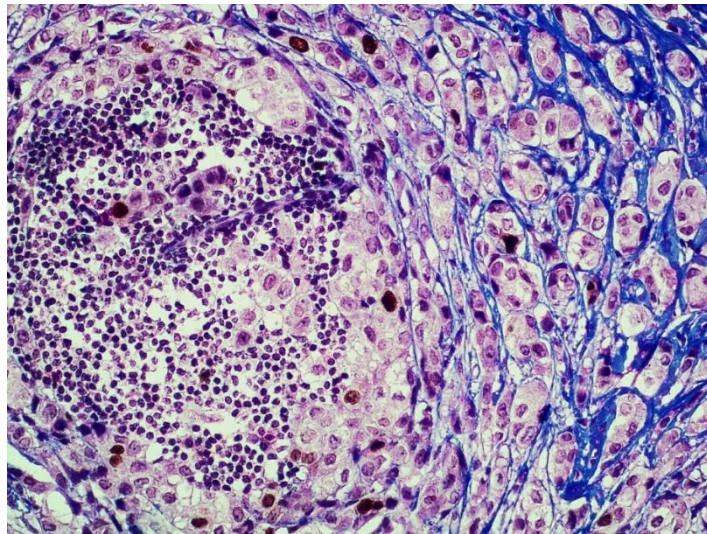
Εικόνα 14: Ki67 -Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1^ο)



Εικόνα 15: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1ο)

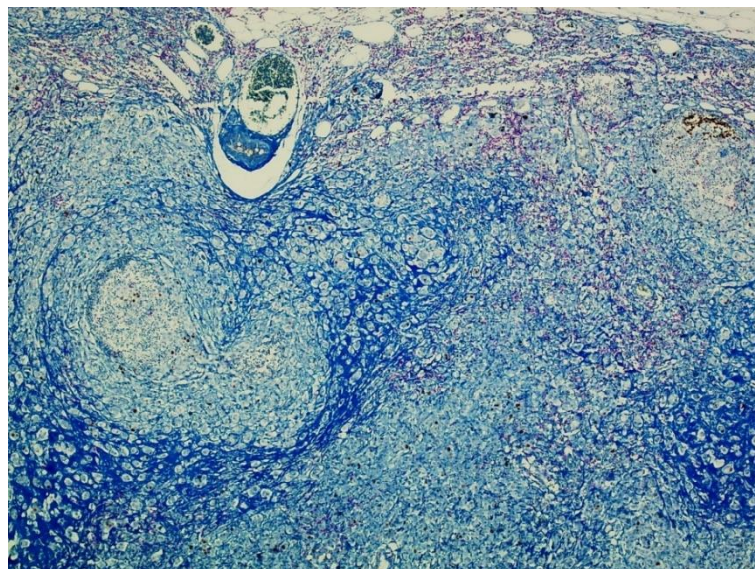


Εικόνα 16: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο)

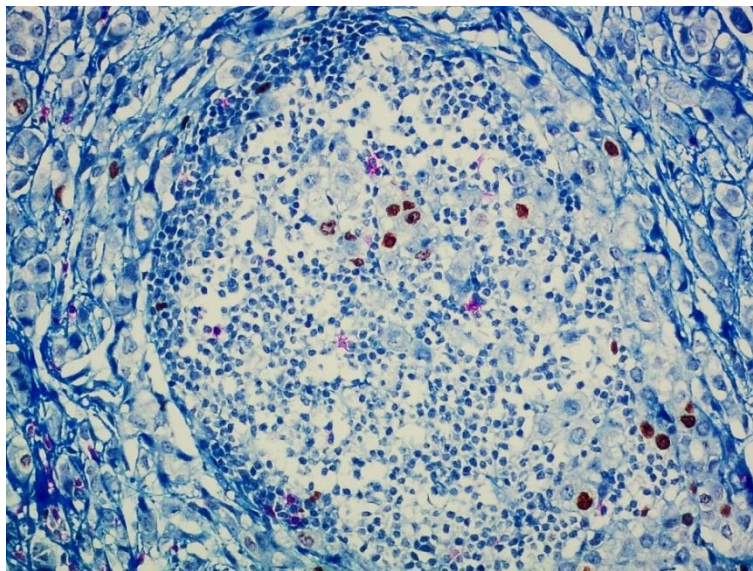


Εικόνα 17: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο)

Πείραμα 3 (εικόνα 18,19): Σε αυτό το πείραμα το πρωτόκολλο της διπλής ανοσοϊστοχημείας παρέμεινε το ίδιο με τη μόνη διαφορά στον τύπο και τον χρόνο επώασης της αιματοξυλίνης. Έτσι χρησιμοποιήσαμε την αιματοξυλίνη Mayer για 5 λεπτά.

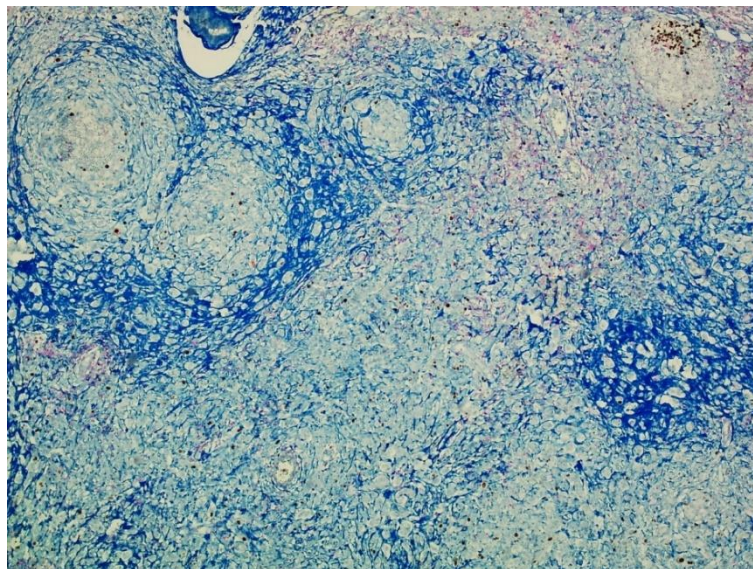


Εικόνα 18: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο)

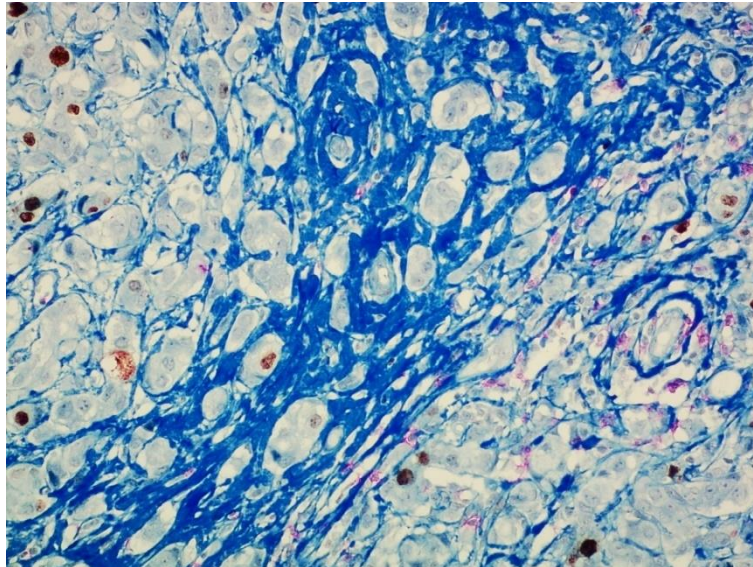


Εικόνα 19: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο)

Πείραμα 4 (εικόνα 20,21): Σε αυτό το πείραμα έχοντας εντοπίσει το πρόβλημα της αντίχρωσης, χρησιμοποιήσαμε τη modified Mayer αιματοξυλίνη της εταιρείας Roche για 10 λεπτά.



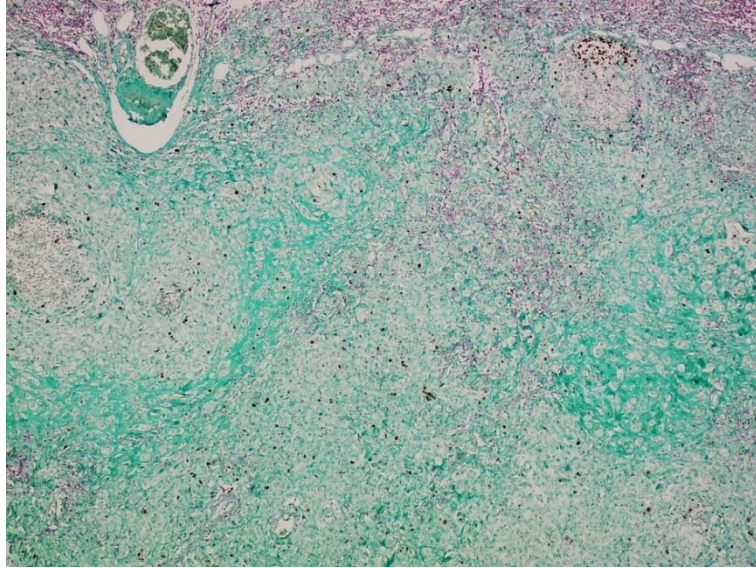
Εικόνα 20: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο)



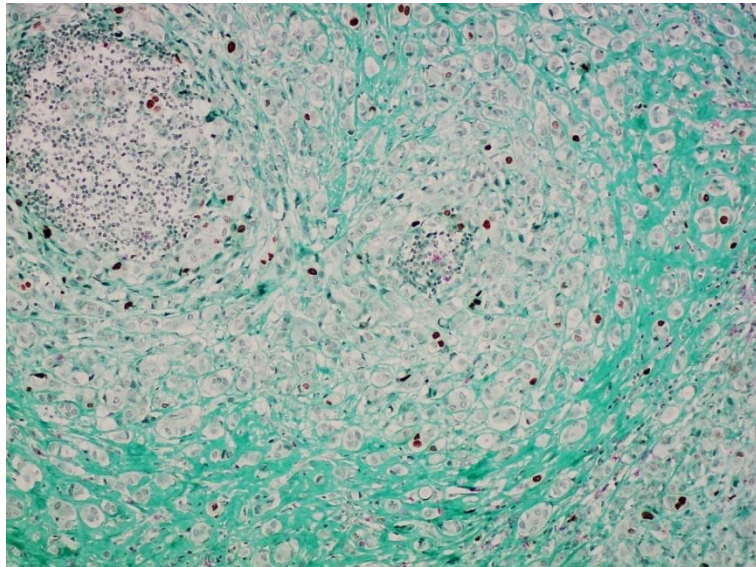
Εικόνα 21: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο)

Πείραμα 5: Συνδυασμένη χρώση ανοσοϊστοχημείας έναντι ki-67, CD8 και Goldner στον ίδιο ιστό με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων μας .

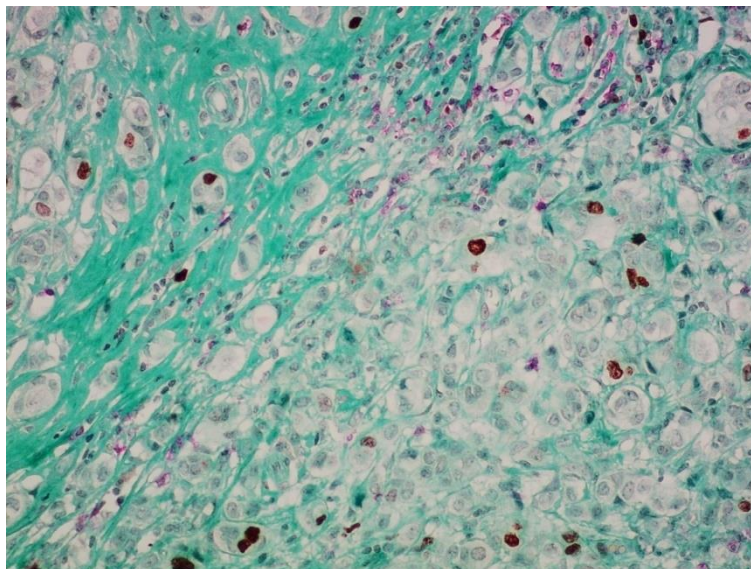
Σε αυτό το πείραμα (εικόνα 22,23,24) θελήσαμε να δούμε την τεχνική της Masson, τροποποιημένη κατά Goldner. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή το κολλαγόνο βάφεται ανοιχτό πράσινο (Bio Optica). Το παραπάνω πρωτόκολλο παρέμεινε το ίδιο. Αυτή η μέθοδος αποτελεί άλλον έναν τρόπο επιβεβαίωσης ύπαρξης του κολλαγόνου.



Εικόνα 22: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο)



Εικόνα 23: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1ο)



Εικόνα 24: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο)

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων:

Στο πείραμα 1 , παρατηρήσαμε ότι η παράλειψη του φωσφομολυβδικού οξέος οδηγεί σε μια έντονη μπλε χρώση όλων των συστατικών του ιστού (εικόνα 13). Σύμφωνα με τον Rashmil Saxena το φωσφομολυβδικό οξύ εμποδίζει όλα τα συστατικά εκτός από το κολλαγόνο, το οποίο το αφήνει να βαφθεί με ανιλίνη (Dual Immunohistochemistry—Aniline Blue Stain: The Trichrome Stain Revisited)

Στο πείραμα 2 το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν ότι επηρέαζε αρκετά την εικόνα της ανοσοϊστοχημείας και ιδιαίτερα το πλακίδιο με το CD8 (εικόνα 15) αντίσωμα. Παρατηρήσαμε ιδιαίτερα ότι το χρώμα της αιματοξυλίνης Harri's γίνεται έντονα κόκκινο μετά την τοποθέτηση του φωσφομολυβδικού οξέος (phosphomolybdic acid). Συνεπώς τα πλακίδια μας παρουσίασαν έντονο background και έτσι έπρεπε να επαναπροσδιορίσουμε τον τύπο της αιματοξυλίνης και τον χρόνο επώασής της στον ιστό (εικόνα 14,15,16,17).

Στο πείραμα νούμερο 3 διαπιστώσαμε ότι παρότι η τεχνική μας είχε αποδώσει σωστά, δεν υπήρχε σαφής διαχωρισμός μεταξύ του κυτταροπλάσματος και της ανιλίνης (εικόνα 18,19). Δεν υπήρχε σαφής διαχωρισμός του κολλαγόνου με τον περιβάλλον

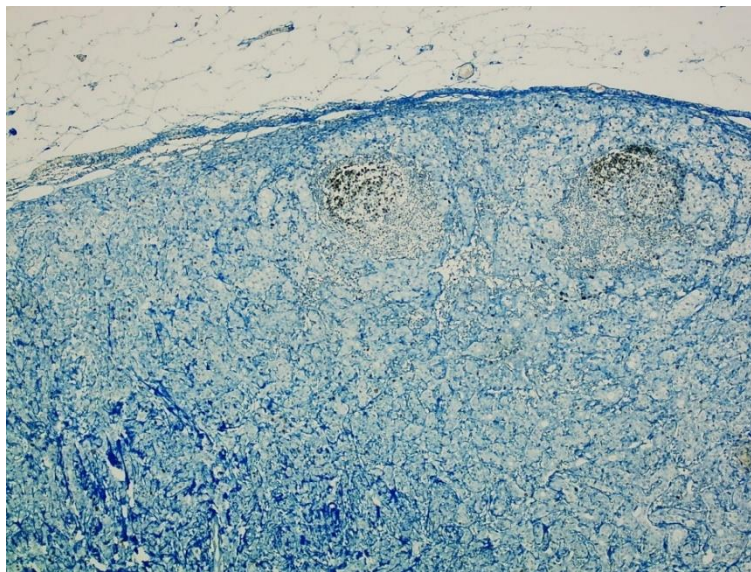
ιστό (έντονη κυτταροπλασματική χρώση της αιματοξυλίνης και έντονη αιματοξυλίνη στον περιβάλλον ιστό).

Στο πείραμα 4 έχοντας εντοπίσει το πρόβλημα της αντίχρωσης , χρησιμοποιήσαμε τη modified Mayer αιματοξυλίνη της εταιρείας Roche για 10 λεπτά (εικόνα 20,21). Στην περίπτωση αυτή τα αποτελέσματα παρουσίασαν βελτίωση αλλά επιθυμούσαμε μια πιο βελτιωμένη έκδοση της τεχνικής μας.

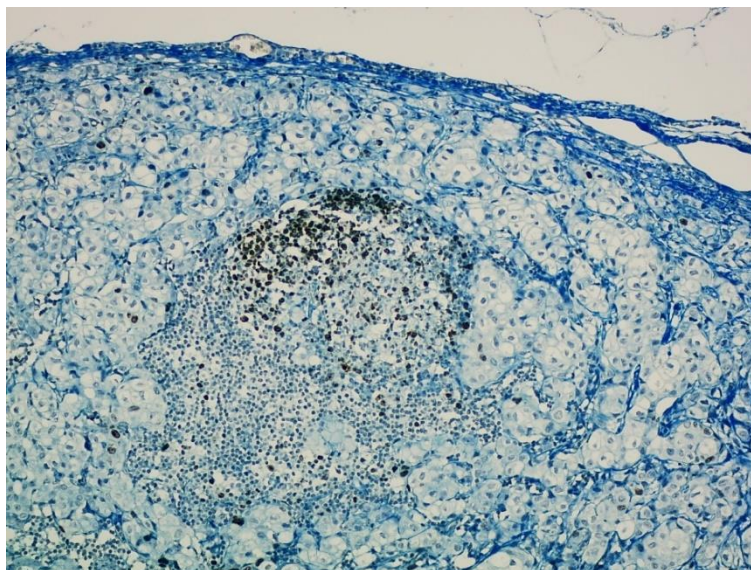
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έχοντας λάβει υπόψιν μας όλα τα παραπάνω καταλήγουμε στις εξής τροποποιήσεις : Αιματοξυλίνη Gill's για 30 δευτερόλεπτα, ανιλίνη για 14 λεπτά με σκοπό την καλύτερη αντίθεση της ανιλίνης με την αιματοξυλίνη και κατ' επέκταση με τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

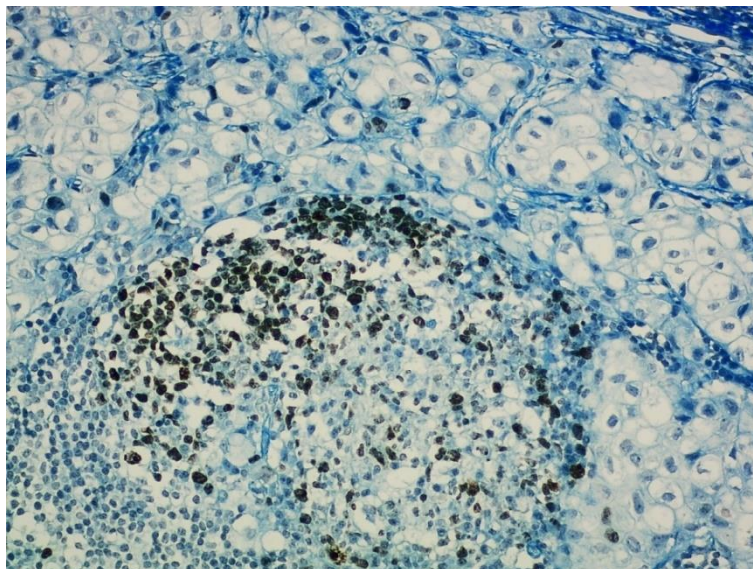
1. Απλή ανοσοϊστοχημική χρώση του δείκτη πολλαπλασιασμού ki-67 σε συνδυασμό με ιστοχημική χρώση ανιλίνης.



Εικόνα 25: Ki67-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 2ο)

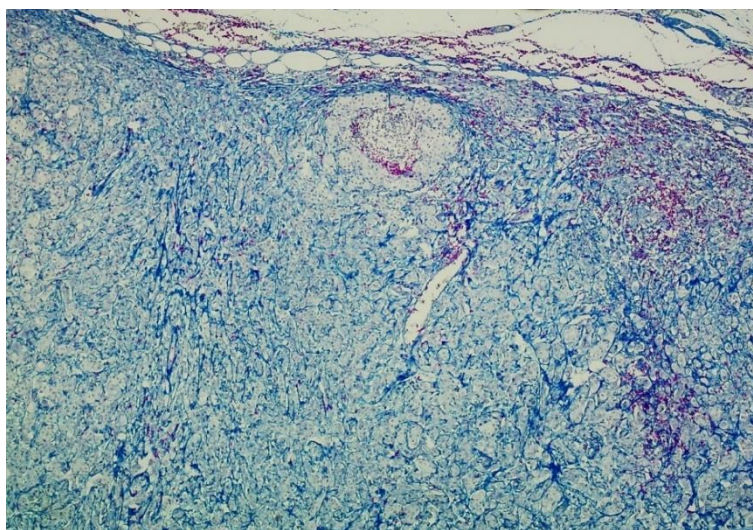


Εικόνα 26: Ki67-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 2ο)

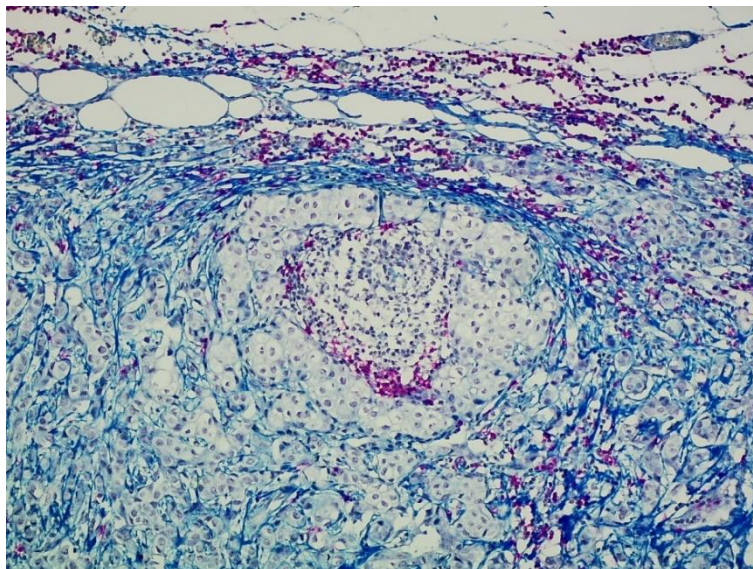


Εικόνα 27: Ki67-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 2ο)

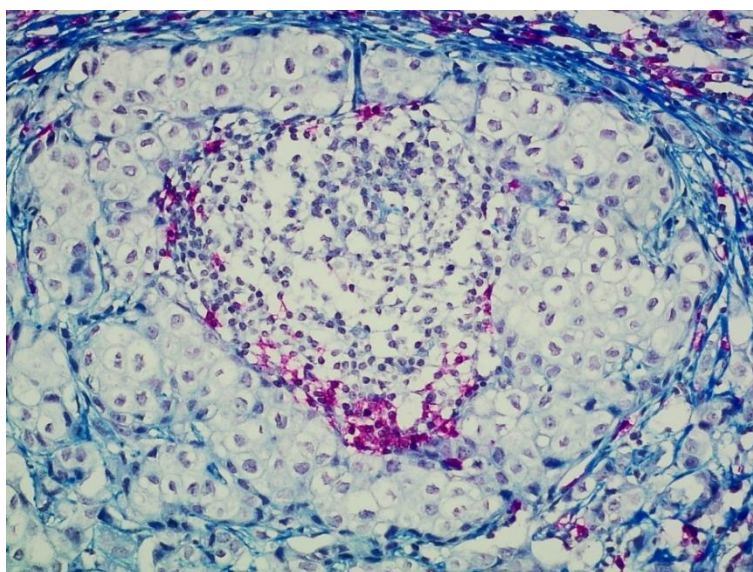
2. Απλή ανοσοϊστοχημική χρώση του δείκτη των T λεμφοκυττάρων CD8 σε συνδυασμό με ιστοχημική χρώση ανιλίνης



Εικόνα 28: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 2ο)

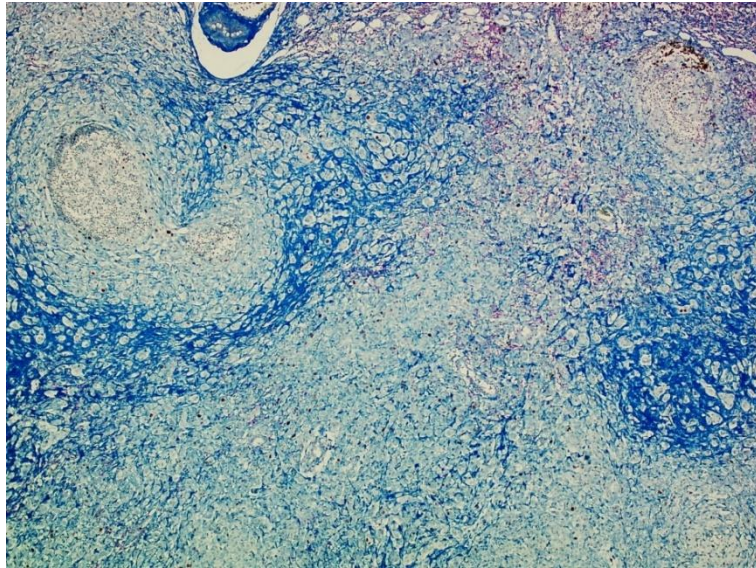


Εικόνα 29: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 2ο)

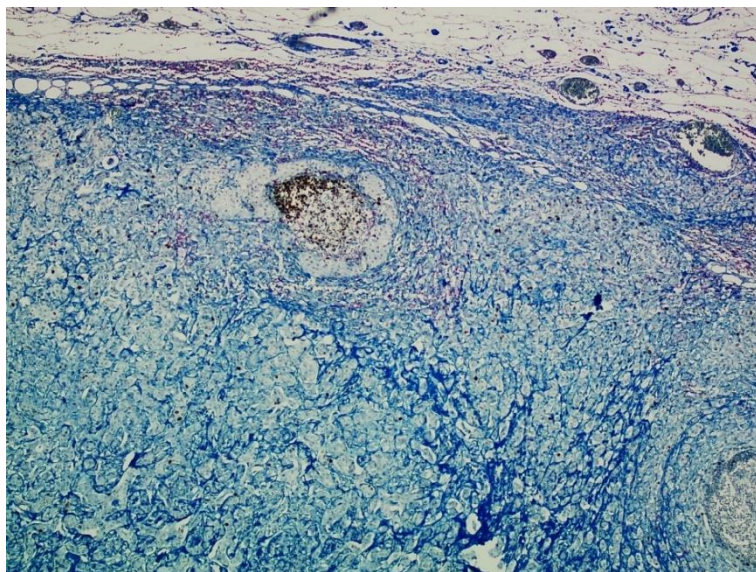


Εικόνα 30: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 2ο)

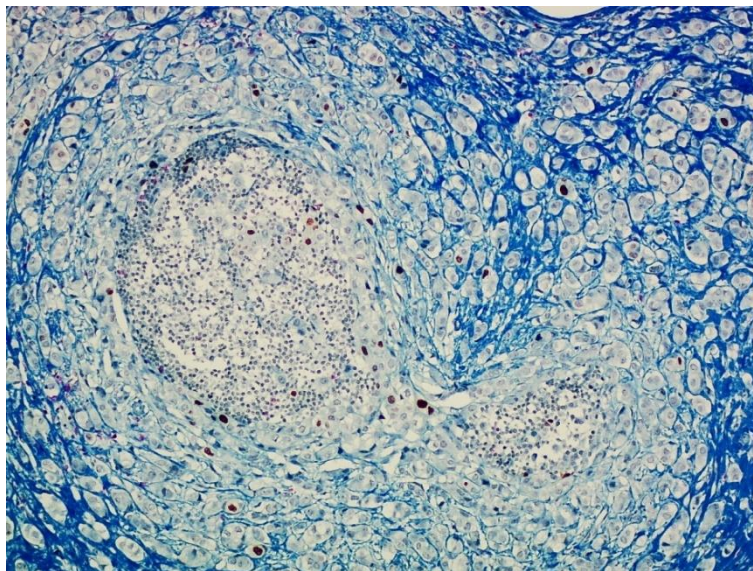
3. Συνδυασμένη χρώση ανοσοϊστοχημείας έναντι ki-67, CD8 και ανιλίνης σε ιστό από λεμφαδένα που παρουσιάζει μετάσταση από καρκίνωμα μαστού.



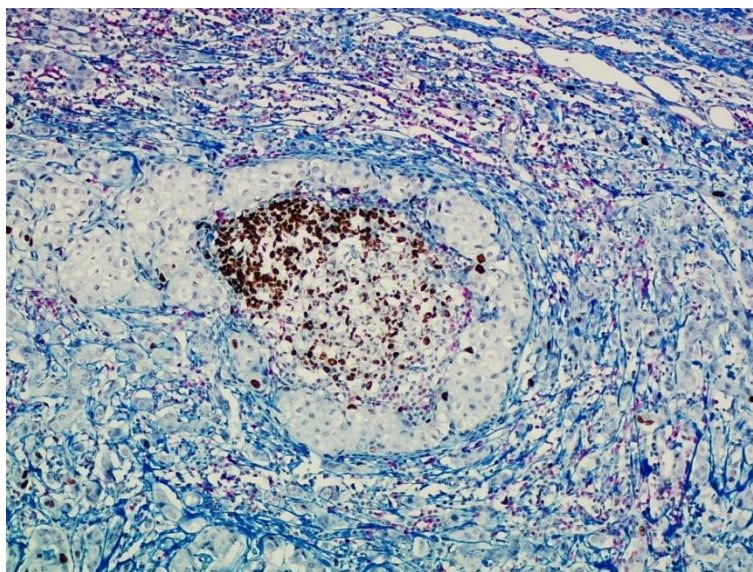
Εικόνα 31: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο)



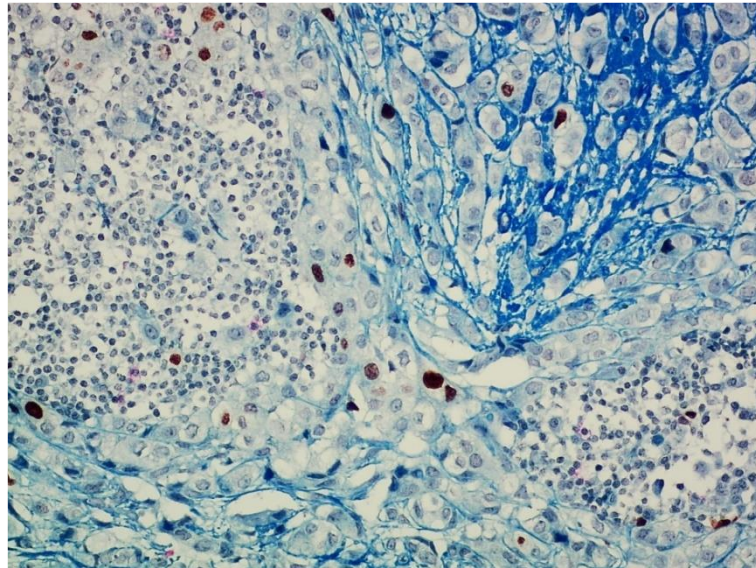
Εικόνα 32: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 2ο)



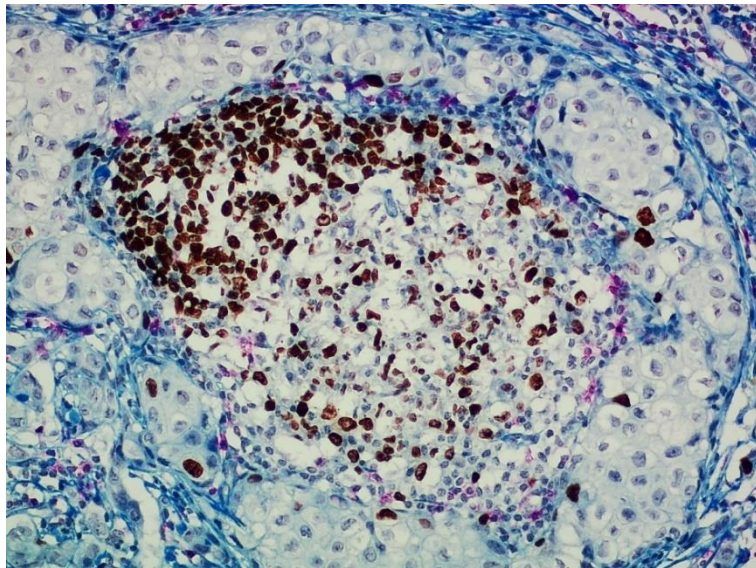
Εικόνα 33: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1ο)



Εικόνα 34: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 2ο)



Εικόνα 35: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο)



Εικόνα 36: Ki67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 2ο)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πρωτεΐνη Ki-67 σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και είναι παρούσα κατά τη διάρκεια όλων των ενεργών φάσεων του κυτταρικού κύκλου (G1,S,G2 και M), ενώ απουσιάζει στη φάση G0 όπου τα κύτταρα βρίσκονται στην φάση ηρεμίας. Η έκφραση του Ki-67 είναι στενά συνδεδεμένη με τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και χρησιμοποιείται ευρέως στη ρουτίνα των εξετάσεων που πραγματοποιούνται για τη διερεύνηση της παθολογίας ως δείκτης πολλαπλασιασμού. Κλινικά έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη Ki-67 σχετίζεται με τη μετάσταση και το κλινικό στάδιο των όγκων και έχει φανεί ότι η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης είναι σημαντικά υψηλότερη στους κακοήθεις ιστούς που έχουν κακώς διαφοροποιημένα κύτταρα, συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η ανοσοϊστοχημική χρώση Ki-67 αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο αξιολόγησης της πρόγνωσης σε έναν μεγάλο αριθμό όγκων (Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. 2015).

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου τα CD8 T-λεμφοκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσία του όγκου. Τα CD8 T-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και διακινούνται στο μικροπεριβάλλον του όγκου παρουσιάζοντας κυτταροτοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων.

Το μικροπεριβάλλον του όγκου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου και η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία αποτελεί σημαντικό συστατικό του. Οι μηχανικές ιδιότητες των όγκων συνδέονται με την εναπόθεση του κολλαγόνου μέσω των οδών σηματοδότησης και πρωτεϊνοσύνθεσης, οι οποίες είναι καίριας σημασίας για τη ρύθμιση της συμπεριφοράς των όγκων (Zhang et al., 2023). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία αυξημένης ποσότητας κολλαγόνου, επηρεάζει την πρόγνωση και την εξέλιξη πολλών όγκων όπως του γαστρικού καρκίνου (Zhou ZH. Et al. 2017), του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, του καρκίνου του πνεύμονα (Zhang H. et al. 2018) και του καρκίνου του παγκρέατος (Huang H, Brekken RA. 2020). Παράλληλα το κολλαγόνο, συμβάλλει στη διήθηση των καρκινικών κυττάρων , στην επέκτασή τους και τέλος στη μετάσταση κατά την εξέλιξη του καρκίνου. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την ικανότητα του κολλαγόνου να εναποτίθεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου στοχεύοντας στον σχηματισμό ενός τοιχώματος κατά μήκος του οποίου θα

μπορούν να καρκινικά κύτταρα να διεισδύουν και εμποδίζουν τα φάρμακα να δράσουν έναντι τους (Zhang et al. 2023).

Ο συνδυασμός της διπλής ανοσοϊστοχημείας με την ιστοχημική χρώση της Ανιλίνης που εφαρμόσαμε μας επιτρέπει να μελετάμε ταυτόχρονα τη συσχέτιση του κολλαγόνου με τα κυτταροτοξικά CD8+ T λεμφοκύτταρα καθώς και την λειτουργική κατάσταση των CD8+ T λεμφοκυττάρων που συν-εκφράζουν τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67. Είναι γεγονός ότι το κολλαγόνο αποτελεί το κύριο συστατικό της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) η οποία υπόκειται σε δραματική αναδιαμόρφωση κατά την εξέλιξη του όγκου, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία μιας ειδικής για τον όγκο εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η διήθηση του όγκου από λεμφοκύτταρα (**Tumor-infiltrating lymphocytes- TILs**) και ιδιαίτερα από τα CD8+T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα αποτελεί στοιχείο θετικής πρόγνωσης για πολλούς τύπους καρκίνου (Fridman WH et al. 2017). Η ευεργετική δράση των T-λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο αντικατοπτρίζει την ικανότητα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος να δρουν έναντι των καρκινικών (Dunn, G., Bruce, A., Ikeda, H. *et al.* 2002). Παράλληλα, η συσχέτιση του κολλαγόνου με τα T-λεμφοκύτταρα έχει μελετηθεί από τους Dorota E. Kuczek και τους συνεργάτες της (Kuczek DE et al. 2019) οι οποίοι μελέτησαν το πως ανταποκρίνονται τα T-λεμφοκύτταρα σε 3D καλλιέργειες με διαφορετική πυκνότητα κολλαγόνου. Παρατήρησαν ότι ο αριθμός των T-λεμφοκυττάρων μειώθηκε σε όγκους του μαστού οι οποίοι είχαν υψηλή πυκνότητα κολλαγόνου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η πυκνότητα του κολλαγόνου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των T κυττάρων στον Καρκίνο του Μαστού.

Η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας σε συνδυασμό με την ανιλίνη έχει υλοποιηθεί και από τον Rashmil Saxena (Rashmil Saxena. 2010). Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν ο συνδυασμός της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τον εντοπισμό του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 με μια ιστοχημική χρώση για την οπτικοποίηση του κολλαγόνου σε ιστό από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Οι ερευνητές αυτής της μελέτης αποσκοπούσαν μόνο στη χρώση του κολλαγόνου και όχι του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος καθώς αυτά θα βάφονταν μέσω κάποιας ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Επειδή όμως δεν υπήρχαν στη βιβλιογραφία πληροφορίες σχετικά με τη

χρησιμότητα της μονιμοποίησης της σημασίας του φωσφομολυβδικού οξέος και του οξικού οξέος , πραγματοποίησαν μια σειρά πειραμάτων. Έτσι κατέληξαν στο τελικό πρωτόκολλο στο οποίο βασιστήκαμε και εμείς στα πειράματά μας όσον αφορά τη χρώση της ανιλίνης , το οποίο περιγράφεται στα ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ύστερα από τη διενέργεια μιας σειράς πειραμάτων που μας επέτρεψαν την διεύρυνση των βέλτιστων συνθηκών για τον συνδυασμό των δύο μεθόδων, καταλήξαμε στο πρωτόκολλο το οποίο μας παρέχει σαφή αποτελέσματα όσον αφορά τη μέθοδο της διπλής ανοσοϊστοχημείας Ki67-CD8 σε συνδυασμό με την Ανιλίνη. Στόχος μας ήταν η βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιώντας σαν θετικό μάρτυρα (positive control) μεταστατικό λεμφαδένα πλούσιο σε κολλαγόνο, πλούσιο σε CD8+ T λεμφοκύτταρα, και ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων που εκφράζουν τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

Η τεχνική μας μπορεί στο μέλλον να εφαρμοστεί ευρύτερα και σε διάφορους τύπους καρκίνου οι οποίοι εμφανίζουν υψηλή ίνωση, άρα αυξημένη εντόπιση κολλαγόνου, και να έχει ιδιαίτερη προγνωστική αξία στον καρκίνο του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. and Perkins, J.A. (2018). *Robbins Basic Pathology*. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania Elsevier.

Ghosh, S.K. (2017). Giovanni Battista Morgagni (1682-1771): father of pathologic anatomy and pioneer of modern medicine. *Anatomical science international*, [online] 92(3), pp.305–312. doi:<https://doi.org/10.1007/s12565-016-0373-7>.

van den Tweel JG, Taylor CR. A brief history of pathology: Preface to a forthcoming series that highlights milestones in the evolution of pathology as a discipline. *Virchows Arch*. 2010 Jul;457(1):3-10. doi: 10.1007/s00428-010-0934-4. Epub 2010 May 25. PMID: 20499087; PMCID: PMC2895866.

Sadeghipour A, Babaheidarian P. Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:253-268. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_22. PMID: 30539450.

Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*. 2014;1180:31-43. doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3. PMID: 25015141.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005 Jul;42(4):405-26. doi: 10.1354/vp.42-4-405. PMID: 16006601.

www.leicabiosystems.com. (n.d.). *Popular Types of Fixative Solutions - Fixation and Fixatives*. [online] Available at: <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-4-popular-fixative-solutions/#bouins-solution>.

Hassannia, Hadi. (2023). "Characterization of Fixatives and their Application in Histopathology". *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 47. 10.26717/BJSTR.2023.47.007563.

Rai, Radhika, et al. "Tissue Fixatives: A Review." *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, vol. 4, no. 4, 22 Apr. 2016, pp. 183-187.

Rolls, G. (2010). *Fixation and Fixatives (2) – Factors influencing chemical fixation, formaldehyde and glutaraldehyde*. [online] Leica Biosystems. Available at:

<https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-2-factors-influencing-chemical-fixation-formaldehyde-and-glutaraldehyde/>.

Suvarna, K.S. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Eighth Edition)*. Elsevier Masson.

Hopwood, D. (1985). Cell and tissue fixation, 1972– 1982. *Histochemical Journal*, 17, 389–442.

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33, 845–853.

Baker, J. R. (1958). *Principles of biological microtechnique: a study of fixation and dyeing*. London: Methuen & Co Ltd.

Sy J, Ang LC. Microtomy: Cutting Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:269-278. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_23. PMID: 30539451.

Lai, M. & Lü, B. (2012). Tissue Preparation for Microscopy and Histology. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. 3. 53-93. 10.1016/B978-0-12-381373-2.00070-3.

Anderson, J. (2010). *An Introduction to Routine and Special Staining*. [online] Leica Biosystems. Available at: <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-routine-and-special-staining/>.

Alturkistani, H. A.; Tashkandi, F. M.; Mohammedsaleh, Z. M. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science* **2015**, 8 (3), 72. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>.

King, D. F.; King, L. A. C. A Brief Historical Note on Staining by Hematoxylin and Eosin. *The American Journal of Dermatopathology* **1986**, 8 (2), 168. <https://doi.org/10.1097/00000372-198604000-00013>.

Cook, H. C. Origins of ... Tinctorial Methods in Histology. *Journal of Clinical Pathology* **1997**, 50 (9), 716–720. <https://doi.org/10.1136/jcp.50.9.716>.

Lakhtakia R. The Legacy of Robert Koch: Surmise, search, substantiate. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2014 Feb;14(1):e37-41. doi: 10.12816/0003334. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24516751; PMCID: PMC3916274.

Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle*. 1970 Jun;51(2):196-206. doi: 10.1016/0041-3879(70)90073-5. PMID: 4099679.

Barcia JJ. The Giemsa stain: its history and applications. *Int J Surg Pathol*. 2007 Jul;15(3):292-6. doi: 10.1177/1066896907302239. PMID: 17652540.

G. Gomori, The Periodic-Acid Schiff Stain, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 22, Issue 3_ts, March 1952, Pages 277 281, https://doi.org/10.1093/ajcp/22.3_ts.277

Quintarelli G, Scott JE, Dellovo MC. The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. II. Dye binding of tissue polyanions. *Histochemie*. 1964 Jul 17;4(2):86-98. doi: 10.1007/BF00306150. PMID: 5890155.

Michael Titford (2009) Progress in the Development of Microscopical Techniques for Diagnostic Pathology, *Journal of Histotechnology*, 32:1, 9-19, DOI: 10.1179/ his.2009.32.1.9

Dapson RW. Dye-tissue interactions: mechanisms, quantification and bonding parameters for dyes used in biological staining. *Biotech Histochem*. 2005 Mar-Apr;80(2):49-72. doi: 10.1080/10520290500219982. PMID: 16195171.

Veuthey T, Herrera G, Dodero VI. Dyes and stains: from molecular structure to histological application. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jan 1;19(1):91-112. doi: 10.2741/4197. PMID: 24389174.

Goldstein, D. J. An Approach to the Thermodynamics of Histological Dyeing, Illustrated by Experiments with Azure A. *Journal of Cell Science* **1963**, S3-104 (68), 413-439. <https://doi.org/10.1242/jcs.s3-104.68.413>.

Singer, M. Factors Which Control the Staining of Tissue Sections with Acid and Basic Dyes. *Academic Press* **1952**, 1, 211-255. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60012-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60012-1).

Ali, F. R.; Orchard, G. E.; Mallipeddi, R. Hematoxylin in History—the Heritage of Histology. *JAMA Dermatology* **2017**, 153 (3), 328. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2016.0506>.

Titford, M. The Long History of Hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry* **2005**, 80 (2), 73-78. <https://doi.org/10.1080/10520290500138372>.

Baker, J. R. Experiments on the Action of Mordants 2. Aluminium-Haematein. *Journal of Cell Science* **1962**, *S3-103* (64), 493–517. <https://doi.org/10.1242/jcs.s3-103.64.493>.

GE Orchard (2018): Haematoxylin – the story of the blues, *British Journal of Biomedical Science*, DOI: 10.1080/09674845.2018.1439430

Canevari, C.; Delorenzi, M.; Invernizzi, C.; Licchelli, M.; Malagodi, M.; Rovetta, T.; Weththimuni, M. Chemical Characterization of Wood Samples Colored with Iron Inks: Insights into the Ancient Techniques of Wood Coloring. *Wood Science and Technology* **2016**, *50* (5), 1057–1070. <https://doi.org/10.1007/s00226-016-0832-2>.

Mallory, F. B. (1900). A contribution to staining methods. *Journal of Experimental Medicine*, *5*, 15.

Jager, M. M.; Murk, J. L.; Piqué, R. D.; Hekker, T. A. M.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. Five-Minute Giemsa Stain for Rapid Detection of Malaria Parasites in Blood Smears. *Tropical Doctor* **2011**, *41* (1), 33–35. <https://doi.org/10.1258/td.2010.100218>.

Sathpathi, S.; Mohanty, A. K.; Satpathi, P.; Mishra, S. K.; Behera, P. K.; Patel, G.; Dondorp, A. M. Comparing Leishman and Giemsa Staining for the Assessment of Peripheral Blood Smear Preparations in a Malaria-Endemic Region in India. *Malaria Journal* **2014**, *13* (1), 512. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-512>.

Koduri, P. R. Novel Cytomorphology of the Giant Proerythroblasts of Parvovirus B19 Infection. *American Journal of Hematology* **1998**, *58* (2), 95–99. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8652\(199806\)58:2%3C95::aid-ajh1%3E3.0.co;2y](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8652(199806)58:2%3C95::aid-ajh1%3E3.0.co;2y).

Rene J. Buesa (2001) Giemsa Staining of Tissue Sections: A New Twist on an Old Technique, *Journal of Histotechnology*, *24*:4, 251-253

Sheehan, D. C.; Hrapchak, B. B. *Theory and Practice of Histotechnology*; Battelle Press: Columbus, 1987.

Hauber, H. P.; Zabel, P. PAS Staining of Bronchoalveolar Lavage Cells for Differential Diagnosis of Interstitial Lung Disease. *Diagnostic Pathology* **2009**, *4* (1), 13. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-4-13>.

Stowman, A. M. Educational Case: Vitiligo. *Academic Pathology* **2019**, *6*, 237428951988871. <https://doi.org/10.1177/2374289519888719>.

Alcian Blue Stain Kit (pH 2.5, Mucin Stain) (ab150662) | Abcam. www.abcam.com. <https://www.abcam.com/products/assay-kits/alcian-blue-stain-kit-ph-25-mucin-stain-ab150662.html#lb> (accessed 2024-02-08).

Histochem Cytochem. 1968 Sep;16(9):557-60. doi: 10.1177/16.9.557. PMID: 5717715.

STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., CUCULIS, J.J. and MEYER, H.G. (1970). THE UNLABELED ANTIBODY ENZYME METHOD OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY PREPARATION AND PROPERTIES OF SOLUBLE ANTIGEN-ANTIBODY COMPLEX (HORSE RADISH PEROXIDASE-ANTI HORSE RADISH PEROXIDASE) AND ITS USE IN IDENTIFICATION OF SPIROCHETES. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 18(5), pp.315–333. doi:<https://doi.org/10.1177/18.5.315>.

Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol*. 1978 May;31(5):454-60. doi: 10.1136/jcp.31.5.454. PMID: 77279; PMCID: PMC1145303.

Huang SN, Minassian H, More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest*. 1976 Oct;35(4):383-90. PMID: 62099.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*. 1981 May;75(5):734-8. doi: 10.1093/ajcp/75.5.734. PMID: 6165237. (a)

Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am J Clin Pathol*. 1981 Jun;75(6):816-21. doi: 10.1093/ajcp/75.6.816. PMID: 6167159. (b)

Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(4), pp.577–580. doi:<https://doi.org/10.1177/29.4.6166661>.

Köhler, G. and Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European Journal of Immunology*, 6(7), pp.511–519. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.1830060713>.

Lin, F., Shi, J. (2022). Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry. In: Lin, F., Prichard, J.W., Liu, H., Wilkerson, M.L. (eds) *Handbook of Practical*

Immunohistochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83328-2_2

Shi, S.R., Key, M.E. and Kalra, K.L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(6), pp.741–748.
doi:<https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>.

FRAENKEL-CONRAT H, BRANDON BA, OLCOTT HS. The reaction of formaldehyde with proteins; participation of indole groups; gramicidin. *J Biol Chem*. 1947 Apr;168(1):99-118. PMID: 20291066.

Donald Van Hecke (2002) Routine Immunohistochemical Staining Today: Choices to Make, Challenges to Take, *Journal of Histotechnology*, 25:1, 45-54, DOI:10.1179/ his.2002.25.1.45

Autor: M A Hayat (2013). *Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods : for light and electron microscopy*. Editorial: New York: Springer Science+Business Media.

Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol*. 1976 Jul;6(7):511-9. doi: 10.1002/eji.1830060713. PMID: 825377.

Punt, J., Stranford, S., Jones, P.P. and Owen, J.A. (2019). *Kuby Immunology*. 8th ed. New York: Macmillan Education.

Chris M. van der Loos (2010) Chromogens in Multiple Immunohistochemical Staining Used for Visual Assessment and Spectral Imaging: The Colorful Future, *Journal of Histotechnology*, 33:1, 31-40, DOI: 10.1179/his.2010.33.1.31

Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*. 2015 Mar;11(3):1566-72. doi: 10.3892/mmr.2014.2914. Epub 2014 Nov 10. PMID: 25384676.

Zhang, Q., An, Z.-Y., Jiang, W., Jin, W.-L. and He, X.-Y. (2023). Collagen code in tumor microenvironment: Functions, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 166, pp.115390–115390.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115390>.

Zhou ZH, Ji CD, Xiao HL, Zhao HB, Cui YH, Bian XW. Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis. *J Cancer*. 2017 Jun 1;8(8):1466-1476. doi: 10.7150/jca.18466. PMID: 28638462; PMCID: PMC5479253.

Zhang H, Fredericks T, Xiong G, Qi Y, Rychahou PG, Li JD, Pihlajaniemi T, Xu W, Xu R. Membrane associated collagen XIII promotes cancer metastasis and enhances anoikis resistance. *Breast Cancer Res*. 2018 Oct 1;20(1):116. doi: 10.1186/s13058-018-1030-y. PMID: 30285809; PMCID: PMC6167877.

Huang H, Brekken RA. Beyond Stiffness: Collagen Signaling in Pancreatic Cancer and Pancreas Regeneration. *Am J Pathol*. 2020 Aug;190(8):1622-1624. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.05.005. Epub 2020 May 22. PMID: 32450151; PMCID: PMC7397458.

Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Dec;14(12):717-734. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.101. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28741618.

Dunn, G., Bruce, A., Ikeda, H. *et al*. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
<https://doi.org/10.1038/ni1102-991>

Kuczek DE, Larsen AMH, Thorseth ML, Carretta M, Kalvisa A, Siersbæk MS, Simões AMC, Roslind A, Engelholm LH, Noessner E, Donia M, Svane IM, Straten PT, Grøntved L, Madsen DH. Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells. *J Immunother Cancer*. 2019 Mar 12;7(1):68. doi: 10.1186/s40425-019-0556-6. PMID: 30867051; PMCID: PMC6417085.

Rashmil Saxena (2010) Dual Immunohistochemistry—Aniline Blue Stain: The Trichrome Stain Revisited, *Journal of Histotechnology*, 33:1, 25-29

Boenisch, T (2001). *Handbook, Immunochemical Staining Methods*. 3rd ed. [online] DAKO Corporation, pp.26–28. Available at:
https://books.google.gr/books?id=iS_IPwAACAAJ.

Παράρτημα Εικόνων

Εικόνα 1: Βήματα σκλήνωσης ενός ιστολογικού παρασκευάσματος	16
Εικόνα 2: Μικροτόμηση μπλοκ παραφίνης.....	18
Εικόνα 3: Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα θετικά αποτελέσματα της λοίμωξης από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, με τη χρήση της χρώσης Giemsa. Οι μαύροι κύκλοι υποδεικνύουν το χρωματισμένο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού με μπλε χρώμα, το οποίο βρίσκεται προσκολλημένο στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.	31
Εικόνα 4: Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται μια βιοψία δέρματος με μυκητιακές υφές και ζυμομύκητες που φαίνονται εντός της κεράτινης στιβάδας (βέλη), με τη χρήση της χρώσης του περιοδικού οξέος-Schiff (PAS) (Stowman, A. M. 2019).	32
Εικόνα 5: Βιοψία τμήματος γαστρεντερικού σωλήνα με τη χρήση της χρώσης Alcian Blue.	33
Εικόνα 6: Η παραπάνω εικόνα απεικονίζει βιοψία δέρματος με λεπρωματώδη λέπρα. Τα μυκοβακτηρίδια της λέπρας βάφονται κόκκινα με τη χρήση της τροποποιημένης χρώσης Ziehl-Neelsen.	34
Εικόνα 7: Παραπάνω απεικονίζονται τα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης τα οποία βρίσκονται στο νεκρωτικό κέντρο ενός κοκκιώματος. Τα μυκοβακτηρίδια χρωματίζονται μπλε με τη χρήση της χρώσης Ziehl-Neelsen.	34
Εικόνα 8: Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζεται ένας μυς εγκλεισμένος σε παραφίνη, βαμμένος με την τρίχρωμη χρώση Masson. Ο μυς απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα ενώ το κολλαγόνο βάφεται μπλε λόγω της ανιλίνης.	36
Εικόνα 9 : βιοψία νεφρού, με την χρώση της ανιλίνης βάφει επιλεκτικά με μπλε χρώμα τα νεφρικά σπειράματα.....	38
Εικόνα 10: Άμεση μέθοδος: Το επισημασμένο με ένζυμο πρωτογενές αντίσωμα αντιδρά με το αντιγόνο του ιστού. Boenisch, T (2001).	45
Εικόνα 11: Έμμεση μέθοδος δύο βημάτων : Το επισημασμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα αντιδρά με το πρωτογενές αντίσωμα το οποίο συνδέεται με το αντιγόνο. Boenisch, T (2001).	46
Εικόνα 12: Έμμεση μέθοδος τριών σταδίων : Το επισημασμένο με ένζυμο τριτογενές αντίσωμα με το επισημασμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα. Boenisch, T (2001).	47
Εικόνα 13: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1 ^ο).....	55
Εικόνα 14: Κί67 -Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1 ^ο)	55
Εικόνα 15: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1ο).....	56
Εικόνα 16: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο).....	56
Εικόνα 17: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο).....	57
Εικόνα 18: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο).....	57
Εικόνα 19: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο).....	58
Εικόνα 20: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο).....	58
Εικόνα 21: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο).....	59
Εικόνα 22: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο).....	60
Εικόνα 23: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1ο).....	60
Εικόνα 24: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο).....	61
Εικόνα 25: Κί67-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 2ο)	63
Εικόνα 26: Κί67-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 2ο)	63
Εικόνα 27: Κί67-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 2ο)	64
Εικόνα 28: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 2ο).....	64

Εικόνα 29: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 2ο).....	65
Εικόνα 30: CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 2ο).....	65
Εικόνα 31: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 1ο).....	66
Εικόνα 32: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 4x (πεδίο 2ο).....	66
Εικόνα 33: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 1ο).....	67
Εικόνα 34: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 10x (πεδίο 2ο).....	67
Εικόνα 35: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 1ο).....	68
Εικόνα 36: Κί67-CD8-Ανιλίνη. Μεγέθυνση 20x (πεδίο 2ο).....	68