

Vergelijkende studie tussen conventionele en microgolfgestimuleerde fixatie met formol en formolvervangende producten uitgevoerd met LOGOS

Stagerapport van

Bianca Stals

Kandidate voor de graad van Professionele Bachelor
in de richting Biomedische laboratoriumtechnologie

Promotoren:
dr. L. Op De Beeck
dr. Liesbeth Maes

Academiejaar 2013-2014
Referentie : E14_S_BLT_31

Vergelijkende studie tussen conventionele en microgolfgestimuleerde fixatie met formol en formolvervangende producten uitgevoerd met LOGOS

Stagerapport van

Bianca Stals

Kandidate voor de graad van Professionele Bachelor
in de richting Biomedische laboratoriumtechnologie

Promotoren:
dr. L. Op De Beeck
dr. Liesbeth Maes

Academiejaar 2013-2014
Referentie : E14_S_BLT_31

Trefwoorden

Fixatie
Dehydratatie
Formol
Xyleen
Microgolven

Voorwoord

Naar aanleiding van mijn studie medische laboratoriumtechnologie heb ik tijdens de laatste maanden van mijn schoolcarrière stage gelopen in het Mariaziekenhuis te Overpelt. Hier kreeg ik de opdracht om een eindwerk te maken en dit zou niet gelukt zijn zonder volgende personen, naar wie ik dit dankwoord richt.

Ten eerste zou ik Dr. Op De Beeck willen bedanken voor zijn hulp. Als ik vragen had, nood had aan stalen of als de coupes bekeken moesten worden heeft hij mij altijd erg goed geholpen. Ook met het schrijven van mijn eindwerk heeft hij mij steeds in de juiste richting gestuurd waarvoor ik hem erg dankbaar ben.

Ten tweede zou ik Dr. Maes bedanken. Als mijn schoolpromotor kon ik altijd bij haar terecht voor vragen of verbeteringen aan mijn eindwerk.

Dan zou ik ook graag de firma Klinipath willen bedanken met in het bijzonder Els Jordens voor het aanleveren van het demotoestel en de nodige informatie voor mijn eindwerk.

Verder zou ik ook alle medewerkers van het labo anatomopathologie willen bedanken. Andrea, Anneleen, Helga, Hilda, Ilse, Lydia, Viviane en Yolande stonden altijd klaar als ik vragen had of hulp nodig had. Maar ik wil hen niet alleen voor hun hulp bedanken maar ook voor hun leuke samenwerking en de manier waarop ik opgenomen werd in het team.

Als laatste zou ik ook graag mijn mama en mijn vriendin Melina willen bedanken voor de steun tijdens deze stageperiode. Zij waren degenen die altijd in mij geloofden en mij motiveerden om het schrijven van dit eindwerk tot een goed einde te brengen.

Aan jullie allen een dikke welgemeende dank je wel. Zonder jullie was het mij nooit gelukt.

Inhoudstafel

1.	Literatuurstudie	12
1.1.	Gebruikte procedures tijdens het behandelen van het staal.....	12
1.2.	Fixatie	13
1.2.1.	Algemeen	13
1.2.2.	Functie.....	13
1.2.3.	Belangrijke factoren voor een optimale fixatie	13
1.2.3.1.	Vers weefsel.....	14
1.2.3.2.	Goede penetratie van het fixatief	14
1.2.3.3.	Juiste keuze van een correct fixatief	14
1.2.4.	Soorten fixatie	15
1.2.5.	Methoden van fixatie	15
1.2.5.1.	Denaturatie.....	15
1.2.5.2.	Additie en cross-linking	15
1.2.6.	Factoren die chemische fixatie beïnvloeden.....	16
1.2.6.1.	Temperatuur.....	16
1.2.6.2.	Tijd.....	16
1.2.6.3.	Penetratiegraad.....	16
1.2.6.4.	Afmetingen van het staal.....	17
1.2.6.5.	Volumeverhouding	17
1.2.6.6.	pH en buffers.....	17
1.2.6.7.	Osmolaliteit.....	17
1.2.6.8.	Formol	17
1.3.	Dehydratatie en ontvetting	18
1.3.1.	Functie.....	18
1.3.2.	Xyleen	19
1.4.	Gebruikte kleuringen tijdens het behandelen van het staal	20
1.4.1.	Routinekleuring: Haematoxyline-eosine kleuring.....	20
1.4.1.1.	Doel	20
1.4.1.2.	Principe	20
1.4.2.	Histochemische kleuringen	20
1.4.2.1.	Alfa-periodic acid shiff (α -PAS)	20
1.4.2.1.1.	Doel	20
1.4.2.1.2.	Principe.....	21
1.4.2.2.	Periodic acid shiff (PAS)	21
1.4.2.2.1.	Doel	21
1.4.2.2.2.	Principe.....	21
1.4.2.3.	Gomori's trichroom.....	21
1.4.2.3.1.	Doel	21
1.4.2.3.2.	Principe.....	22
1.4.2.4.	Reticuline.....	22
1.4.2.4.1.	Doel	22
1.4.2.4.2.	Principe.....	22
1.4.3.	Immunohistochemische kleuringen.....	22
1.4.3.1.	Alfa inhibine R1	22
1.4.3.1.1.	Doel	22
1.4.3.1.2.	Principe.....	23
1.4.3.2.	Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR)	23
1.4.3.2.1.	Doel	23
1.4.3.2.2.	Principe.....	23
1.4.3.3.	Alfa smooth muscle (ASMA)	23
1.4.3.3.1.	Doel	23
1.4.3.3.2.	Principe.....	23
1.4.3.4.	Beta humaan choriongonadotrofine (β hCG).....	24
1.4.3.4.1.	Doel	24
1.4.3.4.2.	Principe.....	24
1.4.3.5.	Cluster of differentiation 3 (CD3)	24
1.4.3.5.1.	Doel	24

1.4.3.5.2.	Principe	24
1.4.3.6.	Cluster of differentiation 20 (CD20)	24
1.4.3.6.1.	Doel	24
1.4.3.6.2.	Principe	24
1.4.3.7.	Cluster of differentiation 23 (CD23)	25
1.4.3.7.1.	Doel	25
1.4.3.7.2.	Principe	25
1.4.3.8.	CDX2.....	25
1.4.3.8.1.	Doel	25
1.4.3.8.2.	Principe	25
1.4.3.9.	Chromogranine	25
1.4.3.9.1.	Doel	25
1.4.3.9.2.	Principe	26
1.4.3.10.	Cytokeratine cam 5.2 (CK cam 5.2)	26
1.4.3.10.1.	Doel	26
1.4.3.10.2.	Principe	26
1.4.3.11.	Cytokeratine 5/6 (CK 5/6).....	26
1.4.3.11.1.	Doel	26
1.4.3.11.2.	Principe	26
1.4.3.12.	Cytokeratine 7 (CK 7).....	27
1.4.3.12.1.	Doel	27
1.4.3.12.2.	Principe	27
1.4.3.13.	Cytokeratine 14 (CK 14).....	27
1.4.3.13.1.	Doel	27
1.4.3.13.2.	Principe	27
1.4.3.14.	Cytokeratine 20 (CK 20).....	27
1.4.3.14.1.	Doel	27
1.4.3.14.2.	Principe	27
1.4.3.15.	Desmine	28
1.4.3.15.1.	Doel	28
1.4.3.15.2.	Principe	28
1.4.3.16.	EMA.....	28
1.4.3.16.1.	Doel	28
1.4.3.16.2.	Principe	28
1.4.3.17.	Oestrogenreceptor (ER).....	28
1.4.3.17.1.	Doel	28
1.4.3.17.2.	Principe	28
1.4.3.18.	KI-67.....	29
1.4.3.18.1.	Doel	29
1.4.3.18.2.	Principe	29
1.4.3.19.	MSH2	29
1.4.3.19.1.	Doel	29
1.4.3.19.2.	Principe	29
1.4.3.20.	p57kip2.....	29
1.4.3.20.1.	Doel	29
1.4.3.20.2.	Principe	29
1.4.3.21.	PLAP	30
1.4.3.21.1.	Doel	30
1.4.3.21.2.	Principe	30
1.4.3.22.	Progesteronreceptor (PR)	30
1.4.3.22.1.	Doel	30
1.4.3.22.2.	Principe	30
1.4.3.23.	S100	30
1.4.3.23.1.	Doel	30
1.4.3.23.2.	Principe	30
1.4.3.24.	Synaptophysine.....	31
1.4.3.24.1.	Doel	31
1.4.3.24.2.	Principe	31
1.4.3.25.	Thyroid transcription factor 1 (TTF1)	31
1.4.3.25.1.	Doel	31
1.4.3.25.2.	Principe	31

1.5.	Microgolven	31
1.5.1.	Microgolven	31
1.5.2.	Methoden van gebruik van microgolven	32
2.	Materiaal en methoden	33
2.1.	Conventionele methoden	33
2.1.1.	Toestel.....	33
2.1.1.1.	Reactiekamer en mandjes	33
2.1.1.2.	Scherf	34
2.1.1.3.	Toetsen	34
2.1.1.4.	Reagensgedeelte	34
2.1.2.	Reagentia	35
2.1.2.1.	Formol	35
2.1.2.1.1.	Methanol	35
2.1.2.1.2.	Xyleen.....	35
2.1.2.2.	Paraffine	35
2.1.2.3.	Safranine	35
2.1.3.	Werkwijze	36
2.2.	Alternatieve methode	37
2.2.1.	Toestel.....	37
2.2.1.1.	Reactiekamer en mandjes	37
2.2.1.2.	Paraffinekamer.....	38
2.2.1.3.	Reagensgedeelte	38
2.2.1.4.	Scherf	38
2.2.2.	Reagentia	39
2.2.2.1.	Formol	39
2.2.2.2.	Finefix.....	39
2.2.2.3.	Ethanol	39
2.2.2.4.	Ethanol 60%.....	39
2.2.2.5.	Isopropanol	39
2.2.2.6.	Paraffine	40
2.2.2.7.	Ultraclear	40
2.2.2.8.	Erythrosine	40
2.2.2.9.	Vergelijking verschillende reagentia Excelsior en LOGOS.....	40
2.2.3.	Werkwijze	41
2.2.3.1.	Programma formol Eth-Iso overnacht 5mm	41
2.2.3.2.	Programma formol up to 5mm	42
2.2.3.3.	Programma finefix Eth-Iso overnacht 5mm.....	43
2.2.3.4.	Programma finefix up to 5mm	43
3.	Resultaten	44
3.1.	Run 1.....	44
3.1.1.	Histochemische kleuringen	44
3.1.1.1.	Rectum	44
3.1.1.2.	Galblaas	44
3.1.1.3.	Ovarium.....	45
3.1.2.	Immunohistochemische kleuringen.....	45
3.1.2.1.	Rectum	45
3.1.2.2.	Nier	46
3.1.2.3.	Colon	46
3.1.2.4.	Curettage.....	46
3.1.2.5.	Darm.....	47
3.1.2.6.	Huid	47
3.1.3.	Resultaten run 1	47
3.2.	Run 2 en 3.....	48
3.2.1.	Histochemische kleuringen	48
3.2.1.1.	Darm.....	48
3.2.1.2.	Haarnestcyste	48
3.2.1.3.	Tonsil.....	48
3.2.2.	Immunohistochemische kleuringen.....	49
3.2.2.1.	Placenta	49
3.2.2.2.	Darm.....	49
3.2.2.3.	Darm.....	50

3.2.2.4.	Darm.....	50
3.2.2.5.	Prostaat	51
3.2.2.6.	Darm.....	51
3.2.2.7.	Schildklier	51
3.2.2.8.	Tonsil.....	52
3.2.2.9.	Curettage.....	52
3.2.3.	Resultaten run 2 en 3.....	52
3.3.	Run 4.....	53
3.3.1.	Histochemische kleuringen	53
3.3.1.1.	Maagfundus	53
3.3.1.2.	Pancreas	53
3.3.1.3.	Darm.....	53
3.3.1.4.	Huid	54
3.3.2.	Immunohistochemische kleuringen.....	54
3.3.2.1.	Maagfundus	54
3.3.2.2.	Pancreas	55
3.3.3.	Resultaten run 4.....	55
3.4.	Run 5.....	56
3.4.1.	Histochemische kleuringen	56
3.4.1.1.	Darm.....	56
3.4.1.2.	Darm.....	56
3.4.2.	Immunohistochemische kleuringen.....	57
3.4.2.1.	Uterus/adnex	57
3.4.2.2.	Uterus.....	57
3.4.2.3.	Darm.....	57
3.4.2.4.	Twijfelachtige resultaten darm	58
3.4.3.	Resultaten run 5.....	58
3.5.	Vergelijking 4 methoden.....	59
3.5.1.	Darm HE-kleuring.....	59
3.5.2.	Darm PAS-kleuring	60
4.	Besluit.....	61

Abstract

Vergelijkende studie tussen conventionele en microgolfgestimuleerde fixatie met formol en formolvervangende producten uitgevoerd met LOGOS

door : Bianca STALS
promotoren : Dr. L. Op De Beeck
Dr. L. Maes

Tijdens de stage in het labo anatomopathologie van het Mariaziekenhuis te Overpelt werd een vergelijkend onderzoek uitgevoerd in verband met de fixatie, dehydratatie en ontvetting van weefsel. Het vaak gebruikte fixatief formol en de ontvetter xyleen, gebruikt tijdens de dehydratatiestap, zijn beide schadelijke stoffen die men uit het laboratorium wil bannen. Verschillende alternatieven op de huidige methode werden getest. Bij de huidige methode wordt gebruik gemaakt van de conventionele verwarming en van zowel formol als xyleen voor de behandeling van het weefsel. Het testen van de alternatieven werd met het LOGOS toestel gedaan (Klinipath). Dit toestel heeft als extra voordeel dat er microgolven gebruikt kunnen worden voor de verwarming waardoor een cyclus sneller doorlopen wordt. Bovendien kan met dit toestel dual runs gelopen worden zodat 2 runs gedeeltelijk overlappen en weefsel dus sneller behandeld kan worden. De uitgevoerde vergelijkende studie bestaat uit verschillende delen. Als eerste werd de kwaliteit van de huidige fixatie, dehydratatie en ontvetting met het toestel Excelsior vergeleken met de formolfixatie in de LOGOS. In beide processen gebeurde dit overnacht. Hierbij werd xyleen vervangen door isopropanol voor de ontvetting van weefsel. Ten tweede werd in de LOGOS een overdag fixatie, dehydratatie en ontvetting met de microgolftechniek getest waarbij nog steeds formol gebruikt werd. Ten derde werd in de LOGOS een vervangproduct van formol getest, namelijk finefix tijdens een overnacht run. Finefix zorgt voor de fixatie van het weefsel. Als laatste werd de microgolftechniek met finefix in de LOGOS getest. Bij elk van deze 4 fasen werd de huidige methode vergeleken met de testmethode. Hierbij werden ook steeds verschillende kleuringen en immunochemische kleuringen uitgevoerd en de resultaten hiervan vergeleken met elkaar. De resultaten zijn erg veelbelovend maar voor een sluitende conclusie moeten meer stalen getest worden. Zowel de HE-kleuringen als de histochemische en immunohistochemische kleuringen leveren goede resultaten op. De overschakeling naar Finefix brengt validatiemaatregelen met zich mee voor erop volgende farmacodiagnostische testen en moleculaire diagnostiek. Echter in het belang van de gezondheid van het personeel moet dit zeker overwogen worden.

Ref : E14_S_BLT_31

Inleiding

Tijdens de stage in het Mariaziekenhuis in Overpelt werd een vergelijkend onderzoek uitgevoerd in verband met de fixatie, dehydratatie en ontvetting van weefsel. Hierbij werd onderzocht welke alternatieven er bestaan voor formol en xyleen. Het is van groot belang om deze stoffen uit het laboratorium te bannen aangezien beide stoffen ernstige gezondheidsrisico's inhouden voor de medewerkers. In de toekomst wil men er naar streven om zo weinig mogelijk in contact te komen met schadelijke stoffen. Dit onderzoek verkent enkele mogelijke alternatieven die getest werden met het LOGOS toestel (Klinipath). Dit toestel kan gebruik maken van microgolven voor de verwarming en van dual runs. Het voordeel van het gebruik van microgolven en dual runs is dat weefsel de fixatie-, dehydratatie- en ontvettingscyclus veel sneller kan doorlopen en veel sneller behandeld kan worden.

Als eerste wordt een korte uitleg gegeven over de verwerking van stalen in het labo anatomopathologie om een duidelijke situering van het onderzoek in het labo te geven en om de procedure die doorlopen werd met de stalen te schetsen.

Verder in dit eindwerk gaat de theoretische achtergrond van fixatie, dehydratatie en ontvetting en microgolven gekaderd worden waarbij onder andere dieper ingegaan wordt op de reden van fixatie, de verschillende methoden van fixatie, belangrijke factoren voor een goede fixatie, formol, de reden van dehydratatie en ontvetting, xyleen, de karakteristieken van microgolven en methoden van gebruik van microgolven. In dit onderdeel worden ook de kleuringen besproken die tijdens dit onderzoek uitgevoerd werden.

Na deze theoretische achtergrond wordt het gebruikte materiaal en de gebruikte methoden besproken. Hierin wordt zowel op de huidige methode als op de alternatieve methode met het LOGOS toestel (Klinipath) ingegaan. Bij elke methode wordt het toestel met de accessoires, de reagentia die het toestel gebruikt en de werkwijze besproken. Bij de werkwijze van de LOGOS worden de 4 geteste methoden besproken. Als eerste werd er een overnacht run gelopen met conventionele verwarming en formol. Hierbij werd het gebruik van xyleen vermeden. Als tweede werd een overdag run getest met microgolfverwarming en formol. Ook hier werd xyleen vermeden en konden de stalen sneller verwerkt worden. De derde methode is vergelijkbaar met de eerste, maar hier werd formol vervangen door finefix. De laatste methode is vergelijkbaar met de tweede, maar ook hier werd formol vervangen door finefix.

Hierna worden de resultaten van het onderzoek weergegeven per gebruikte methode en worden de haematoxyline-eosine en periodic acid Schiff kleuringen over de 4 methoden vergeleken.

Het laatste deel van dit eindwerk is het besluit van het onderzoek aan de hand van de bekomen resultaten.

1. Literatuurstudie

1.1. Gebruikte procedures tijdens het behandelen van het staal

De stappen die de weefsels ondergaan van aankomst tot protocol worden in deze paragraaf besproken.

Verse weefselstalen of weefselstalen ondergedompeld in formol komen aan in het laboratorium anatomopathologie. In deze studie werden beide soorten weefselstalen gebruikt indien de weefsels gefixeerd werden met formol. Het formolvervangend product finefix werd enkel gebruikt bij verse weefselstalen. Bij ontvangst van de weefselstalen worden de stalen eerst ingegeven in de computer aan de hand van het aanvraagblad. De patiënt wordt opgezocht en de biopsie krijgt een uniek biopsienummer dat gelinkt is aan de patiënt en het staal.

Hierna gaat het staal verkleind worden door de medisch laboratoriumtechnoloog of door de patholoog. Het staal wordt hierbij in cassettes gestoken die geïdentificeerd zijn met hetzelfde biopsienummer. Na het weefsel in de cassettes te plaatsen worden de cassettes in mandjes gezet die in het fixatief staan, hetzij formol, hetzij finefix.

Na het verkleinen van de weefsels wordt de fixatie- en dehydratiestap uitgevoerd met behulp van de LOGOS (Klinipath) (paragraaf "2.2.3 Werkwijze"). Tijdens de routine gebeuren deze stappen echter in de Excelsior (Thermo Scientific) zoals beschreven in paragraaf "2.1.3 Werkwijze".

Na dehydratie van het weefsel wordt het weefsel ingebed in paraffine. Dit gebeurt door in een houder paraffine te plaatsen, het weefsel vervolgens hierin te plaatsen en dit te laten uitharden met de cassette erop. Het inbedden in paraffine gebeurt zodat het weefsel gemakkelijker te snijden is.

In een volgende stap worden zeer dunne coupes van het weefsel gesneden met behulp van een microtoom. Dit gebeurt door de blokjes paraffine op een koelplaat te leggen en deze dan aan te snijden op een dikte van 20 μm tot het weefsel bereikt wordt. Daarna worden zeer dunne coupes gesneden van 4-5 μm . De dikte van de coupes is afhankelijk van het weefseltype. De coupes worden zo dun gesneden zodat ze bruikbaar zijn voor lichtmicroscopie. Het licht moet dus nog door de coupe kunnen dringen. Deze coupes worden vervolgens op een draagglaasje gebracht dat gelabeld is met hetzelfde biopsienummer als de cassette. Op dit draagglaasje bevindt zich een lijm voor weefselcoupes waardoor de coupe zich goed uitstrekt en beter blijft kleven aan het glaasje. Deze vloeistof wordt dan afgegoten en de coupe wordt gedroogd op een warmteplaat.

Na het drogen worden de coupes gekleurd. Een kleuring bestaat altijd uit 3 fasen namelijk deparaffineren, kleuren en dehydrateren. Het deparaffineren wordt uitgevoerd omdat de gebruikte kleurstoffen op waterbasis zijn en indien er nog paraffine aanwezig is er geen goede kleuring zal optreden. Het deparaffineren gebeurt door het staal een aflopende alcoholgradiënt te laten doorlopen. De eigenlijke kleuringsprincipes (routinekleuring, histochemische kleuring en immunohistochemische kleuringen) worden in hoofdstuk 1.4 'Gebruikte kleuringen tijdens het behandelen van het staal' besproken. De laatste stap van dehydratie wordt uitgevoerd om van een waterig milieu over te gaan naar xyleen zodat de glaasjes gemonteerd kunnen worden. Dit gebeurt door het weefsel verschillende baden met oplopende alcoholgradiënt te laten doorlopen.

Als de kleuring uitgevoerd is, worden de glaasjes gemonteerd in het daarvoor bestemde toestel. Hierbij wordt een tape over het draagglaasje gebracht onder afgifte van xyleen. Deze tape doet dienst als dekglasje.

Als de glaasjes afgedekt en gedroogd zijn, kunnen ze bekeken en beoordeeld worden door de patholoog.

1.2. Fixatie

1.2.1. Algemeen

Fixatie is een chemisch proces dat uitgevoerd wordt om weefsel te bewaren in een staat die zo dicht mogelijk aansluit bij deze in het menselijk lichaam.

Cellen en extracellulaire componenten bestaan onder andere uit koolhydraten, proteïnen, lipiden, fosfolipiden, verschillende types RNA en DNA, Hoe deze elementen reageren tijdens de fixatie is afhankelijk van verschillende factoren, zoals het type van fixatie, de gebruikte reagentia en de omstandigheden van fixatie. Sommige weefselementen reageren chemisch met het fixatief waardoor zij gestabiliseerd worden door cross-linking. Andere elementen reageren echter niet met het fixatief maar deze zullen gevangen geraken in de cellen of het weefsel door andere elementen die wel cross-links gevormd hebben. (Rolls, 2012a)

1.2.2. Functie

Het voornaamste doel van de fixatie van weefsel is om cellen en weefselcomponenten in een levensechte toestand te bewaren. Dit moet zodanig gebeuren dat er nog paraffineblokjes van het weefsel gemaakt kunnen worden om later coupes van te maken en deze te kleuren. Natuurlijk ondergaat het weefsel tijdens de fixatie en in de stappen daarna wel degelijk veranderingen in de samenstelling en in het uitzicht van de cellen en de weefselcomponenten. Het resultaat dat bekomen wordt verschilt echter nog veel van de staat zoals het weefsel zich in het lichaam bevindt. Hoewel er toch chemische en fysische karakteristieken in het weefsel optreden, kunnen er patronen, morfologische en chemische veranderingen opgemerkt worden en kan men dit allemaal vergelijken. Door deze observaties kan er een histopathologische diagnose gesteld worden.

Fixatie wordt gebruikt om degeneratie te voorkomen of tegen te houden vanaf het moment dat het weefsel afgekoppeld is van de bloedvoorziening. Autolyse, een proces dat vermeden moet worden, zorgt voor het verteren van het weefsel door intracellulaire enzymen (die vrijkomen wanneer organelmembranen scheuren) en voor het ontbinden of rotten van het weefsel door bacteriën die al aanwezig zijn in het staal. In de mate van het mogelijke moet verlies en diffusie van oplosbare bestanddelen voorkomen worden door middel van precipitatie of coagulatie van deze componenten. Dit gebeurt door ze te cross-linken aan onoplosbare bestanddelen. Het weefsel moet erg goed beschermd worden tegen de schadelijke effecten van de verdere behandeling van het weefsel zoals infiltratie van warme paraffine, maar het is zeer belangrijk dat het weefsel nog gevoelig blijft voor kleurstoffen en andere reagentia zoals antistoffen en probes.

Indien weefsel niet onder optimale condities of te laat wordt gefixeerd, kan er onherroepelijke schade optreden. Dit zal altijd gevolgen hebben voor de beoordeling van het weefsel, zelfs al zijn alle verdere stappen in het behandelen van het weefsel perfect uitgevoerd. Daarom is het belangrijk dat iedereen weet dat fixatie een zeer belangrijke stap is in het afnemen en behandelen van weefsel. (Rolls, 2012a)

1.2.3. Belangrijke factoren voor een optimale fixatie

Bij het fixeren van weefsel is het belangrijk dat dit zo snel mogelijk gebeurt voordat veranderingen in het weefsel optreden. Verder is het ook belangrijk dat weefsel in het juiste fixatief gefixeerd wordt. Een veel gebruikt fixatief, ook in het Mariaziekenhuis, is gebufferde formol (zie paragraaf "1.2.6.8 Formol").

Het is belangrijk om er bewust van te zijn dat fixatieven meteen een groot aantal veranderingen in het weefsel veroorzaken. Voorbeelden van deze veranderingen zijn het krimpen, zwellen en verharderen van verschillende componenten. Niettegenstaande deze initiële effecten ondergaat het weefsel verdere veranderingen gedurende het hele proces. Bij de fixatie in 10% gebufferde formol ontstaat er in het begin een lichte zwelling van het weefsel maar tijdens het verdere proces krimpt het staal 20-30%. Het gebruikte fixatief heeft ook een invloed op de mate waarin de individuele elementen zullen kleuren met verschillende histochemische en

immunohistochemische reagentia. Het totale effect van een bepaald fixatief op het weefsel moet geëvalueerd worden nadat het weefsel behandeld, gesneden en gekleurd is. Om een zo goed mogelijk resultaat te bekomen moeten onderstaande punten nagestreefd worden. (Rolls, 2012c)

1.2.3.1. Vers weefsel

Het is belangrijk om met vers weefsel te werken. Het weefsel moet zo snel mogelijk gefixeerd worden omdat de degeneratie begint vanaf het moment dat het weefsel van de bloedtoevoer afgesloten wordt. Indien de fixatie niet meteen kan gebeuren, moet het weefsel in de koelkast geplaatst worden. Het weefsel mag echter niet ingevroren worden omdat dit schade kan veroorzaken door het ontstaan van ijskristallen. Verder moet er ook rekening mee gehouden worden dat vers weefsel besmettelijk kan zijn. Bij het behandelen van het weefsel is het belangrijk dat ervoor gezorgd wordt dat het weefsel niet uitdroogt omdat dit schade kan veroorzaken en pathologische afwijkingen kan verbergen. Ook mag men het weefsel niet te ruw behandelen want dit zal morfologische schade veroorzaken. Het is natuurlijk belangrijk om het weefsel volledig en nauwkeurig te identificeren. (Rolls, 2012c)

1.2.3.2. Goede penetratie van het fixatief

Bij de penetratie van het weefsel moet het fixatief het weefsel langs alle kanten kunnen binnendringen. In het recipiënt zou best al fixatief aanwezig zijn voordat het weefsel erin geplaatst wordt om adhesie van het staal op het recipiënt te voorkomen. Indien het staal van nature openingen bevat, moeten deze geopend worden. Op deze manier heeft het fixatief de mogelijkheid om het weefsel beter binnen te dringen van alle kanten. Indien perfusie van het vasculair systeem mogelijk is, moet men dit zeker overwegen aangezien het zeer goede resultaten voortbrengt. Ook is de dikte van het staal belangrijk (max. 4 mm). Tijdens het fixeren kan het nuttig zijn om rustige bewegingen van het staal te veroorzaken omdat dit de penetratie zal verbeteren. Het volume van het fixatief t.o.v. het volume van het staal is ook zeer belangrijk. Men zou moeten streven naar ten minste een 20:1 ratio. Dit is van belang omdat sommige werkzame bestanddelen uitgeput kunnen worden door de fixatiereactie. Deze fixatiereactie moet voldoende tijd krijgen omdat het fixatief tot in het midden van het weefsel moet migreren en daar deze reacties nog moeten plaatsvinden. De optimale temperatuur voor de eerste fixatie is kamertemperatuur. (Rolls, 2012c)

1.2.3.3. Juiste keuze van een correct fixatief

De fixatieven die instaan voor de fixatie van het weefsel moeten zorgvuldig bereid worden met reagentia van goede kwaliteit. Soms kan het zelfs nodig zijn om enkele reagentia vers te bereiden. Indien men fixatieven van slechte kwaliteit gebruikt, kan dit leiden tot een slechte fixatie. Het is mogelijk dat samengestelde fixatieven (zie paragraaf "1.2.4 Soorten fixatie") pas bereid kunnen worden net voordat ze gebruikt worden omdat ze onstabiele oplossingen vormen. Stalen die in een fixatief aankomen, moeten steeds gecontroleerd worden of er een juist fixatief gebruikt is en indien nodig moet dit fixatief vervangen worden. Het is zeer belangrijk te onthouden dat fixatieven maar eenmalig gebruikt mogen worden aangezien stalen cellen en weefselfragmenten achterlaten in de fixatievloeistof wat voor contaminatie zou kunnen zorgen. Hiernaast kunnen ook componenten in de fixatievloeistof opgebruikt worden door de fixatiereactie. Na de fixatie moet er een geschikte behandeling uitgevoerd worden. Dit is afhankelijk van het gebruikte fixatief. Als laatste is het belangrijk voorzichtig om te gaan met fixatieven omdat deze toxisch en irriterend zijn. (Rolls, 2012c)

1.2.4. Soorten fixatie

Het fixeren van weefsel kan met verschillende methodes uitgevoerd worden. Deze methodes kunnen zowel van chemische als fysische aard zijn. De fysische methoden omvatten de microgolffixatie en cryopreservatie. Onder cryopreservatie verstaat men het invriezen van weefsel in vloeibare stikstof onder erg lage temperatuur. Warmtefixatie wordt maar zelden gebruikt voor weefselstalen. Microgolffixatie daarentegen, een techniek die tot de warmtefixatie gerekend kan worden, wordt wel erg veel gebruikt in routinelaboratoria. Cryopreservatie, wat voornamelijk onder de vorm van vriesdrogen gebruikt wordt heeft enkele toepassingen in de histochemische branche maar wordt meestal niet gebruikt om een diagnose te stellen op weefselstalen.

Chemische fixatie wordt normaal bekomen door het weefsel onder te dompelen in het fixatief of door de toediening van het fixatief in het vasculair systeem. Deze laatste methode wordt vooral gebruikt indien men met grote organen te maken heeft zoals longen. Voor sommige gespecialiseerde histochemische procedures worden de fixatieven onder de vorm van damp toegediend aan het weefsel.

Fixatie oplossingen kunnen bestaan uit enkelvoudige fixatieven opgelost in een oplosmiddel zoals water of alcohol. Meer gebruikt is een gebufferde oplossing om de pH te stabiliseren. Sommige populaire fixatie oplossingen bevatten een combinatie van verschillende fixerende reagentia en worden samengestelde fixatieven genoemd. Dit wordt gebruikt omdat dat de minpunten van het ene reagens gecompenseerd worden door de toevoeging van een ander reagens. Een voorbeeld hiervan is dat de inkrimping van weefsel door ethanol gecompenseerd wordt door de toevoeging van azijnzuur. (Rolls, 2012a)

1.2.5. Methoden van fixatie

Vroeger werden fixatie oplossingen ingedeeld in klonterend en niet-klonterende oplossingen, gebaseerd op hun effect op oplosbare proteïnen in oplossing. Klonterende fixatieven werden verondersteld een permeabel netwerk van eiwitketens te vormen, terwijl niet-klonterende fixatieven, die een natuurlijk toevoegsel zijn, uitgebreide cross-links vormen waarbij een minder permeabele gel gevormd wordt. Deze voorwaarden worden nog steeds aangetroffen in de moderne histologische literatuur, maar er is recent een meer systematisch systeem in gebruik genomen. Er zijn twee voornaamste mechanismen die belangrijk zijn in de classificatie van de fixatie van proteïnen en proteïnecomplexen: enerzijds denaturatie en anderzijds additie en cross-link vorming. (Rolls, 2012a). Deze begrippen worden hier onder meer uitgelegd.

1.2.5.1. Denaturatie

Denaturatie wordt meestal veroorzaakt door gebruik te maken van dehydraterende reagentia zoals alcoholen of aceton. Deze reagentia verwijderen en vervangen het vrije water in cellen en weefsel en veroorzaken een verandering in de tertiaire eiwitstructuur door het breken van waterstofbindingen. In de hydrofobe regio's, die veel voorkomen aan de binnenkant van de eiwitmoleculen, wordt de afstoting van water opgeheven en krijgen ze de vrijheid om een grotere ruimte in te nemen. In de hydrofiele regio's van eiwitten zijn de watermoleculen gebonden door waterstofbindingen en de verwijdering van water breekt ook deze bindingen. De verandering in de structuur van het eiwit zorgt ervoor dat de oplosbaarheid van het eiwit verandert. Het zorgt ervoor dat een oplosbaar eiwit onoplosbaar wordt. Dit is een verandering die irreversibel is als het eiwit terug in waterige oplossing gebracht wordt. (Rolls, 2012a)

1.2.5.2. Additie en cross-linking

De niet-klonterende reagentia reageren op chemische wijze met proteïnen en andere cel- en weefselcomponenten. Ze gaan binden met deze componenten door additie en door de vorming van intermoleculaire en intramoleculaire cross-links. Omdat deze reagentia reactieve componenten zijn, binden ze aan een hele waaier van chemische groepen in weefsel. Meestal beïnvloeden ze de lading op de plaats waar de binding gevormd wordt. Dit kan een effect hebben op de kleureigenschappen van een bepaald proteïne en eveneens kan het de

moleculaire constructie wijzigen en dus ook de oplosbaarheid. Weefsel dat bijvoorbeeld gefixeerd is met formaldehyde kleurt slecht met eosine omdat formaldehyde extreem reageert met de aminogroepen van het weefsel om methyleenbruggen te vormen. Deze groepen zijn dus niet meer beschikbaar om met negatief geladen kleurmoleculen zoals eosine te binden.

De omvang waarmee additieve fixatievallen cross-links vormen varieert erg. Glutaaraldehyde is namelijk meer effectief om cross-links te vormen dan formaldehyde. Dit verklaart waarom glutaaraldehyde zo effectief is om de ultrastructuur van de cellen te behouden en het fixatief naar keuze is voor elektronenmicroscopie. Het verklaart ook waarom glutaaraldehyde-gefixeerd weefsel slecht kleurt met conventionele kleurstof-kleuringsmethodes. Antigen-retrieval methodes in de immunohistochemie hebben aangetoond dat sommige van de reacties van fixatie omkeerbaar zijn, vooral deze van formaldehyde. Maar er is een aanzienlijke variatie in de kwaliteit van de mate waarin het antigen behouden wordt met verschillende reagentia. Deze mate van antigeniciteit is een zeer belangrijke factor wanneer men een fixatief gaat kiezen. (Rolls, 2012a)

1.2.6. Factoren die chemische fixatie beïnvloeden

Er zijn een hele reeks factoren die de mate en de efficiëntie van fixatie van weefsel beïnvloeden. Hieronder worden de belangrijkste factoren besproken.

1.2.6.1. Temperatuur

Als men de temperatuur waarbij de fixatie plaatsvindt gaat opdrijven, zal ook de mate waarin het fixatief gaat diffunderen in het weefsel en de snelheid van de chemische reactie tussen het fixatief en het weefsel verhoogd worden. Het verhogen van de temperatuur zorgt er ook voor dat het weefsel sneller degenereert in de zones die nog niet gefixeerd zijn. Voor lichtmicroscopie wordt de eerste fixatie meestal uitgevoerd op kamertemperatuur en dit kan eventueel opgevolgd worden door verdere fixatie op 45°C tijdens de behandeling van het weefsel. Dit is een compromis dat wereldwijd aanvaard wordt om goede kwaliteit van het morfologisch behoud te bekomen. Bij microgolffixatie kunnen hogere temperaturen tot 65°C gebruikt worden gedurende korte periodes. (Rolls, 2012b)

1.2.6.2. Tijd

De optimale tijd voor fixatie kan verschillen tussen verschillende fixatievallen. Om een fixatie te laten optreden moet het fixatief het weefsel door diffusie penetreren tot in het midden van het staal. Dan moet er nog voldoende tijd verstrijken zodat de reacties voor fixatie kunnen optreden. Zowel de diffusietijd als de reactietijd kan verschillen per reagens en de optimumtijd zal verschillen van fixatief tot fixatief. In drukke diagnostische laboratoria is er een aanzienlijke druk om de doorlooptijd te verkorten. Dit kan tot gevolg hebben dat weefsel dat nog niet volledig gefixeerd is al verder behandeld wordt. Dit zorgt voor een slechte kwaliteit van de coupes waarin weefselveranderingen voorkomen. Het kan ook leiden tot een slechte kwaliteit bij het kleuren omdat het slecht gefixeerde weefsel niet goed voorbereid is. Indien onvolledig gefixeerd weefsel uit formol gehaald wordt en geplaatst wordt in ethanol gedurende het proces, zorgt ethanol voor een verdere fixatie. In het midden van het staal zal er dus een morfologisch uitzicht te zien zijn van ethanol-gefixeerd weefsel. (Rolls, 2012b)

1.2.6.3. Penetratiegraad

De graad van penetratie van een fixatief is afhankelijk van de diffusie-eigenschappen van dit reagens. Dit is afhankelijk van reagens tot reagens. De penetratiegraad kan uitgedrukt worden als $d = K/t$ (d : de diepte van penetratie, K : de diffusiecoëfficiënt (specifiek voor elke fixatief), t : de tijd). Dit wil zeggen dat de diffusiecoëfficiënt (K) de afstand in mm is dat het fixatief in het weefsel is gediffundeerd over een tijdspanne van 1 uur. (Rolls, 2012b)

1.2.6.4. Afmetingen van het staal

De voorgaande punten benadrukken de belangrijkheid van de staalafmetingen wanneer men weefsel gaat fixeren. Het staal zou niet meer dan 4 mm dik mogen zijn. 3 mm dikke schijven zouden zeer goede fixatieresultaten moeten geven. Het is nuttig om eraan te denken dat de diepte van een standaardcassette 5 mm is. (Rolls, 2012b)

1.2.6.5. Volumeverhouding

Het is belangrijk om een overmaat aan volume van fixatief te hebben in verhouding tot het totale volume van het weefsel. Dit omdat bij het gebruik van additieve fixatieven de effectieve concentratie van het reagens verminderd wordt wanneer de fixatie gebeurt. In een klein totaal volume kan dit een effect hebben op de fixatiekwaliteit. Een verhouding van 20:1 van het fixatief tot het weefsel is de laagst geaccepteerde verhouding, maar men streeft best naar een 50:1 verhouding. (Rolls, 2012b)

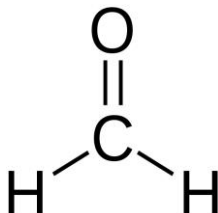
1.2.6.6. pH en buffers

In lichtmicroscopie lijkt de pH van een fixatief geen effect te hebben op de kwaliteit van de bewaring omdat de meeste al een lage pH hebben, zoals de fixatieven die azijnzuur of picrinezuur bevatten. Toch kan de pH belangrijk zijn omwille van andere redenen. Bij formaldehyde oplossingen wordt een zure oplossing bekomen omwille van afbraak van formaldehyde tot mierenzuur. In deze zure oplossing treden vervolgens reacties met hemoglobine op zodat er artefacten gevormd kunnen worden (zuur-formaldehyde hematine). De populairste formaldehyde oplossing die vandaag de dag gebruikt wordt is daarom gebufferd met een pH van 6,8-7,2. Voor elektronenmicroscopie is de pH belangrijker en zou deze moeten overeenstemmen met de fysiologische pH. (Rolls, 2012b)

1.2.6.7. Osmolaliteit

De osmotische effecten die uitgeoefend worden door het fixatief zijn opnieuw belangrijker op het ultrastructureel niveau dan op het niveau van de lichtmicroscopie. Dit is zo omdat het de fosfolipidemembranen zijn die gemakkelijk beschadigd geraken door uiterst hypotonische of hypertonische oplossingen. Maar de osmolaliteit heeft wel enige relevantie in routine histopathologie. Over het algemeen is het de osmolaliteit van de buffer die het meest belangrijk is, en in sommige bufferformules is deze aangepast om te lijken op deze van het weefselvocht (vb. formol in isotonische zoutoplossing). Voordat de fixatie optreedt kunnen cellen een bepaalde schade ondergaan door niet-isotonische vloeistoffen zoals water. Als het staal niet onmiddellijk gefixeerd kan worden, kunnen ze vochtig gehouden worden door ze in een gaasje gedrenkt in isotonische oplossing te brengen voor een korte tijd. Het is geen goed idee om weefsel voor langere tijd in zoutoplossingen onder te dompelen. (Rolls, 2012b)

1.2.6.8. Formol



Figuur 1: Structuurformule van formol

Formaldehyde (CH_2O) (Figuur 1) is een gasvormig aldehyde dat opgelost is in water met vorming van een 37-40% oplossing. Deze oplossing wordt meestal formol genoemd. Voor de fixatie wordt vaak een oplossing met 1 deel formol en 9 delen water of buffer gebruikt. Dit resulteert in een 10% formoloplossing die bestaat uit ongeveer 4% formaldehyde, hetgeen een optimale concentratie voor de fixatie is. In geconcentreerde oplossing bestaat formaldehyde uit

zijn monohydraat methyleenglycol en laag moleculair gewicht polymerische hydraten. In zijn opgeloste vorm overheerst de monohydraatvorm. Paraformaldehyde, een hoog gepolymeriseerde vorm van formaldehyde, kan afgezet worden als een witte neerslag in een geconcentreerde formaldehyde oplossing. Om dit te voorkomen worden vaak kleine hoeveelheden methanol (tot 15%) toegevoegd aan gepatenteerde oplossingen. Paraformaldehyde kan gekocht worden als droog poeder en gebruikt worden om zeer pure oplossingen van formaldehyde te maken zoals de oplossingen voor elektronenmicroscopie (Rolls, 2012b).

Ongebufferde formol oxideert traag tot mierenzuur en dit kan ervoor zorgen dat de pH daalt. Onder deze omstandigheden reageert mierenzuur vervolgens met hemoglobine om zuur formaldehyde hematine te vormen. Dit is een bruin-zwart granulair artefact pigment dat afgezet wordt in bloedrijke weefsels. Dit pigment is een hinder omdat het verward kan worden met micro-organismen of andere pathologische pigmenten. Hoewel het pigment verwijderd kan worden vooraleer het staal gekleurd wordt met verzadigd waterig picrinezuur, is het aangeraden om zijn vorming in de eerste plaats te voorkomen. Daarom zijn 10% formol oplossingen meestal gebufferd tot een pH van 6,8-7,2.

Formaldehyde reageert met de zijketens van eiwitten om reactieve hydroxymethylgroepen te vormen. Het kan kerneiwitten en nucleïnezuren penetreren door het nucleïnezuur-eiwit omhulsel te stabiliseren en de nucleotiden te wijzigen door reactie met de vrije aminogroepen. Formaldehyde kan met sommige groepen in onverzadigde lipiden reageren, vooral indien calciumionen aanwezig zijn, maar neigt ernaar om niet reactief te zijn met carbohydraten. Formaldehyde kan reageren met groepen op lysine, arginine, cysteine, tyrosine, threonine, serine en glutamine. Hierbij worden reactieve complexen gevormd die met elkaar gecombineerd kunnen worden door methyleenbruggen te vormen (cross-links). Het is wereldwijd aanvaard dat het wassen van het weefsel na fixatie met formol sommige van deze reacties kan omkeren maar belangrijke cross-links blijven bestaan. Formaldehyde heeft zijn nut als algemeen fixatief te danken aan het feit dat het peptiden van cellulaire proteïnen kan behouden.

Er zijn goed gekende gevaren geassocieerd bij het werken met formol als fixator door huid of oogcontact of door het ademhalingsstelsel. Het is irriterend, corrosief en kan allergische reacties veroorzaken. Vanaf 1981 was formaldehyde bepaald als "redelijk verwacht om carcinogeen te zijn bij mensen" en in 2011 is het geüpgraded tot "gekend carcinogeen voor mensen" (Rolls, 2012b). Studies (Rolls, 2012b) hebben uitgewezen dat formaldehyde nasopharyngale kanker en myeloïde leukemie kan veroorzaken. Daarom worden er in de meeste landen strikte regels in acht genomen om de limieten van blootstelling aan formol door werknemers in te perken.

Ondanks de risico's bij het gebruik van formaldehyde hebben morfologen hun kennis van gezond en ziek weefsel opgebouwd aan de hand van stalen die in formol gefixeerd zijn. Nu men zich bewust is van de giftige gevaren van dit reagens, hebben vele laboratoria gezocht en zijn ze nog steeds aan het zoeken naar een veiliger alternatief. Van alternatieven voor formol worden meestal gevonden dat ze morfologisch dezelfde of betere beelden produceren. Hiernaast kunnen ze een hele reeks van kleuringmethoden (inclusies moleculaire methoden) verdragen en zijn ze net zo goedkoop. Toch blijven de meeste laboratoria formol gebruiken omdat ze geen vervanger vinden die hun helemaal tevreden stelt. Maar de voornaamste reden dat de meeste laboratoria blijven vasthouden aan formol is het vele werk dat bij een overschakeling naar een ander fixatief zou komen kijken. Bij een overschakeling zouden zeker de farmacodiagnostische testen (zoals bv ER, PR, HER2NEU) vele validatietesten en bewijsvoeringen nodig hebben om dezelfde kwaliteit te garanderen als met formolfixatie. (Rolls, 2012b).

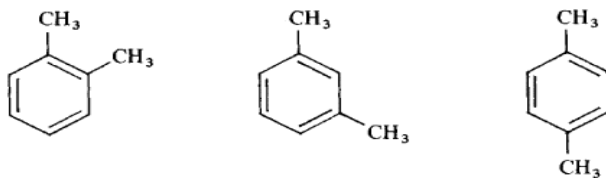
1.3. Dehydratatie en ontvetting

1.3.1. Functie

Onder dehydratatie wordt het verwijderen van water uit weefsel dat gefixeerd werd met een waterig fixatief verstaan. Omdat de meeste fixatieven op waterbasis zijn is deze stap essentieel in het voorbereiden van het weefsel om het in te bedden in niet-waterige media zoals paraffine. Voor de dehydratatie worden meestal alcoholen gebruikt in laboratoria, aangezien ze mengbaar zijn met waterige fixatieven zoals 10% formol. Tijdens deze stap gaat alcohol het weefsel snel

binnendringen en wordt het water vervangen door alcohol. Alcoholen werken snel en kunnen weefsel doen verhard en krimpen. Hier moet rekening mee gehouden worden wanneer de dehydratatietijd bepaald wordt. De dehydratatie van weefsel wordt meestal uitgevoerd op kamertemperatuur. Ethylalcohol en isopropylalcohol worden meestal gebruikt, maar ook methanol en butanol worden gebruikt bij sommige speciale technieken. Aangezien de meeste alcoholen (behalve isopropylalcohol) en paraffine niet mengbaar zijn, moet er een tussenstap uitgevoerd worden. Deze tussenstap staat bekend als opheldering of ontvetting. Xyleen is een veel gebruikt reagens voor deze stap. (Medialab)

1.3.2. Xyleen



Figuur 2: Structuurformules van respectievelijk ortho-, metha- en paraxyleen

Xyleen is een aromatisch koolwaterstof dat wereldwijd gebruikt wordt in de industrie en medische technologie als oplosmiddel. Het is een kleurloze, zoet ruikende vloeistof of gas dat natuurlijk voorkomt in petroleum, steenkool en houtteer. Zijn chemische formule is $C_6H_4(CH_3)_2$ en wordt ook wel dimethylbenzeen genoemd omdat het bestaat uit 6 carbonringen waaraan 2 methylgroepen gebonden zijn. Xyleen komt voor in 3 optische isomeren, respectievelijk ortho-, meta- en paraxyleen (Figuur 2). Xyleen wordt gebruikt in histologische laboratoria voor weefselverwerking, kleuring en afdekking. Zijn hoge oplosbaarheidfactor zorgt ervoor dat een maximale verplaatsing van alcohol gebeurt. Het maakt het weefsel transparant en verbetert de paraffine infiltratie. In kleuringprocedures dragen de zeer goede deparaffinerende en ophelderende eigenschappen van xyleen bij tot schitterend gekleurde coupes.

Xyleen dat in laboratoria gebruikt wordt, is opgebouwd uit 40-65% metha-xyleen, 20% paraxyleen, 20% ortho-xyleen en 6-20% ethyl benzeen. Verder bevat het ook sporen van toluen, trimethylbenzeen, fenol, thiofeen, pyridine en waterstofsulfide. Histopathologische medewerkers die routinematig in contact komen met xyleen gecontamineerde oplosproducten in de werkplaats zijn de mensen die het vaakst blootgesteld worden aan hoge waarden van xyleen. Hiervoor zijn er maximale dosissen opgesteld die streng nagestreefd moeten worden.

Blootstelling aan xyleen kan voorkomen door inhalatie, inslikken, oog- of huidcontact. Het wordt eerst gemetaboliseerd in de lever door oxidatie van een methylgroep en conjugatie met glycine tot methylhippuurzuur. Deze stof wordt afgescheiden in de urine. Kleinere hoeveelheden van methylhippuurzuur worden ongewijzigd geëlimineerd via de uitgeademde lucht. Er is een lage kans op accumulatie. Xyleen veroorzaakt gezondheidseffecten na zowel acute als chronische blootstelling. Het type en de ernst van de gezondheidseffecten hangen af van verschillende factoren, zoals de hoeveelheid chemicaliën waaraan men is blootgesteld en de tijdsduur van blootstelling. Elke persoon reageert ook anders op verschillende hoeveelheden van blootstelling.

De blootstelling aan xyleen kan effect hebben op verschillende delen van het menselijk lichaam. Het grootste effect van de inhalatie van xyleendampen is de onderdrukking van het centraal zenuwstelsel, met symptomen zoals hoofdpijn, duizeligheid, misselijkheid en overgeven. De effecten kunnen omkeerbaar zijn en komen vaker voor als de tijdsduur van blootstelling verhoogt. Irritatie van de neus en keel kan snel optreden indien de maximale waarden overschreven worden. Een druppel in het oog kan het oppervlak van het oog beschadigen, maar dit geneest normaal gezien binnen een aantal dagen. Irritatie van de longen veroorzaakt pijn op de borst en kortademigheid. Zeer hoge blootstelling kan leiden tot pulmonale zwelling, wat een levensbedreigende complicatie kan zijn waarbij de longen zich vullen met vocht. Er is wel een bewijs dat herhaaldelijke blootstelling aan lage concentraties een effect hebben op de longen (Kandyala, Raghavendra en Rajasekharan, 2010). Bij een zeer hoge blootstelling aan xyleen kunnen de lever en nieren beschadigd raken. Maar dit is zeer onwaarschijnlijk zonder dat er eerst symptomen van het zenuwstelsel optreden. Ook deze schade is reversibel. Blootstelling aan lage concentraties zou geen effect hebben op de lever en nieren. Symptomen van misselijkheid, overgeven en maagpijn zijn waargenomen bij mensen die blootgesteld werden aan xyleen. Deze symptomen waren steeds reversibel. Personen die blootgesteld werden aan xyleen rapporteerden verminderde kracht en verminderde spierkracht in de

extremiten (Kandyala, Raghavendra en Rajasekharan, 2010). Dit is eerder te wijten aan het neurologisch effect dan aan het direct effect op de spieren. Xyleen kan zoals andere organische solventen de natuurlijke beschermende oliën van de huid oplossen. Vaak of lang contact met de huid kan irritatie, huidontsteking, droogheid, schilfering en barsten van de huid veroorzaken. Gekwetste huid kan meer chemicaliën absorberen. Xyleen dringt gemakkelijk de meeste kleren binnen en kan vastgehouden worden in gewone kleding of schoeisel. Xyleen dat in kleren zit kan brandwonden of blaarvorming veroorzaken. Er is nog onvoldoende bewijs naar de kankerverwekkendheid van xyleen en of xyleen het voortplantingssysteem aantast. Xyleen dat geïnhaleerd wordt door vrouwen kan tot bij een groeiende foetus komen en haar moedermelk besmetten. Het is aangeraden dat zwangere vrouwen en vrouwen die hun kind voeden blootstelling aan xyleen vermijden, net zoals ze contact met alcohol, tabak en andere drugs vermijden. (Kandyala, Raghavendra en Rajasekharan, 2010)

1.4. Gebruikte kleuringen tijdens het behandelen van het staal

1.4.1. Routinekleuring: Haematoxyline-eosine kleuring

1.4.1.1. Doel

De haematoxyline-eosine (H.E.) kleuring wordt in het labo anatomopathologie gebruikt als standaardkleuring.

1.4.1.2. Principe

Bij deze kleuring worden de kleurstoffen haematoxyline en eosine gebruikt voor het kleuren van celstructuren. Haematoxyline is een basische kleurstof die aan zure of negatief geladen componenten gaat binden zoals de kernen (Tabel 1). Eosine is een zure kleurstof die aan basische of positief geladen componenten gaat binden zoals eiwitten. (Jaspers, en Leenen).

Tabel 1: Resultaten van de haematoxyline-eosinekleuring

Weefselcomponent	Kleur
Kernen	Paars/blauw
Collageen	Lichtroze
Spieren	Donkerroze
Zuur cytoplasma	Rood
Basisch cytoplasma	Paars
Erytrocyten	Kersrood

1.4.2. Histochemische kleuringen

Deze kleuringen maken gebruik van de histochemische eigenschappen van cellen.

1.4.2.1. Alfa-periodic acid shift (α -PAS)

1.4.2.1.1. Doel

De α -PAS kleuring wordt gebruikt voor de detectie van glycogeen na behandeling met alfa amylase.

1.4.2.1.2. Principe

Alfa amylase, ook wel diastase genoemd, is een enzyme dat gewoonlijk voorkomt in speeksel. Het weefsel wordt voorbehandeld met alfa amylase om de α -1,4-glycosidische bindingen van zetmeel of glycogeen aan elkaar te hangen zodat er wateroplosbare suikers (maltose) of dextrinen ontstaan. Deze wateroplosbare suikers worden dan weggewassen uit het weefsel. Daarna worden de reagentia perijoodzuur en Schiff reagens gebruikt. Het weefsel wordt blootgesteld aan perijoodzuur waardoor de naburige glycolgroepen of amino- en alkylaminoderivaten geoxideerd worden tot dialdehyden. Deze dialdehyden worden in aanraking gebracht met het Schiff reagens waardoor er een onoplosbare magentaverbinding gevormd wordt. (Ellis). Tabel 2 geeft de resultaten van deze kleuring weer.

Tabel 2: Resultaten van de α -PAS kleuring

Weefselcomponent	Kleur
Glycogeen	Rood/Paars
Mucines	Rood/Paars
Schimmels	Rood/Paars
Kernen	Blauw
Achtergrond	Blauw

1.4.2.2. Periodic acid Schiff (PAS)

1.4.2.2.1. Doel

De PAS kleuring wordt gebruikt voor de detectie van glycogeen in weefsel.

1.4.2.2.2. Principe

Bij de PAS kleuring worden de reagentia perijoodzuur en Schiff reagens gebruikt. Het weefsel wordt blootgesteld aan perijoodzuur waardoor de naburige glycolgroepen of amino- en alkylaminoderivaten geoxideerd worden tot dialdehyden. Deze dialdehyden worden in aanraking gebracht met het Schiff reagens waardoor er een onoplosbare magentaverbinding gevormd wordt. (IHC World). Tabel 3 geeft een overzicht van de resultaten van de PAS kleuring weer.

Tabel 3: Resultaten van de PAS kleuring

Weefselcomponent	Kleur
Glycogeen	Rood/Paars
Mucines	Rood/Paars
Schimmels	Rood/Paars
Kernen	Blauw
Achtergrond	Blauw

1.4.2.3. Gomori's trichroom

1.4.2.3.1. Doel

Deze kleuring wordt gebruikt voor de detectie van een vermeerdering van het collageen bindweefsel of om een onderscheid te maken tussen collageen en gladde spiervezels.

1.4.2.3.2. Principe

Bij de Gomori's trichroom kleuring wordt een plasma- en een bindweefselkleurstof samengebracht in een oplossing van fosforwolfraamzuur waaraan ook nog azijnzuur toegevoegd wordt. Het fosforwolraamzuur zorgt voor het rood kleuren van spierweefsel en cytoplasma. Het wolframaation wordt specifiek opgenomen door collageen en de bindweefselkleurstof wordt vervolgens gebonden aan dit complex waardoor het collageen groen of blauw kleurt afhankelijk van de tegenkleuring. (Ellis)

Tabel 4: Resultaten van de trichroomkleuring

Weefselcomponent	Kleur
Spiervezels	Rood
Kernen	Blauw/Zwart
Collageen	Groen

1.4.2.4. Reticuline

1.4.2.4.1. Doel

De reticuline kleuring wordt gebruikt voor het aanduiden van reticulinevezels.

1.4.2.4.2. Principe

Reticulinevezels hebben van nature uit een affiniteit voor zilveroplossingen dus moeten ze behandeld worden met kaliumpermanganaat om gesensibiliseerde plaatsen te produceren op de vezels waar de afzetting zilver kan plaatsvinden. Het zilver komt onder een vorm voor waarin het klaar is om te precipiteren als metallisch zilver (diamine zilveroplossing). De optimale pH voor de maximale opname van zilverionen is pH 9,0. Een reducerend middel, formaline, zorgt voor de afzetting van zilver onder de vorm van metaal. De overmaat aan zilver die niet geprecipiteerd is, wordt verwijderd. (Ellis). De resultaten van dergelijke kleuring zijn weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5: Resultaten van de reticulinekleuring

Weefselcomponent	Kleur
Reticulinevezels	Zwart
Kernen	Rood

1.4.3. Immunohistochemische kleuringen

1.4.3.1. Alfa inhibine R1

1.4.3.1.1. Doel

De alfa inhibine R1 kleuring wordt uitgevoerd om een peptide hormoon te herkennen dat zijn nut heeft bewezen in de differentiatie tussen bijnierschors tumoren en niercarcinoma. Ook ovarium en trofoblastische tumoren vertonen cytoplasmatische positiviteit met dit antilichaam. Het antilichaam wordt onder andere gebruikt als hulpmiddel bij het onderscheiden van binnenbaarmoederlijke- en buitenbaarmoederlijke zwangerschappen in endometrische curettages en voor de identificatie van ovariële granulosa cel tumoren en Sertolicele tumoren. (<http://www.ventana.com/product/111?type=105>)

1.4.3.1.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het peptide hormoon alfa inhibine gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan bijnierschors, placenta of testis gebruikt worden.

1.4.3.2. Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR)

1.4.3.2.1. Doel

De AMACR kleuring wordt uitgevoerd om AMACR te herkennen. AMACR is een mitochondriaal en peroxisomaal enzyme dat bijdraagt in de biosynthese van galzuur en in de beta-oxidatie van vertakte verzuren. AMACR is essentieel in het vetmetabolisme. Het komt normaal voor in hepatocyten, tubulair epitheel van de nier en epitheelcellen van de galblaas. Ook komt het voor in bronchiale epitheelcellen en oppervlakte epitheel van het colon. Er kunnen zowel granulaire als cytoplasmatische expressies voorkomen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van hepatocellulair carcinoma en nier carcinoma. Ook kan het in vele coloncarcinoma en prostaatcarcinoma voorkomen. (<http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/novocastra-reagents/primary-antibodies/details/product/alpha-methylacyl-coa-racemase-amacr-p504s/>)

1.4.3.2.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie waarbij anti-AMACR antistoffen worden gebruikt. Deze antistoffen zijn gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controleweefsel wordt lever, nier, galblaas, long of colon gebruikt.

1.4.3.3. Alfa smooth muscle (ASMA)

1.4.3.3.1. Doel

Deze ASMA kleuring wordt uitgevoerd om α -smooth antigenen te herkennen die vooral tot uiting komen in gladde spiervezels in de vaatwand, de darmwand en het myometrium. Ook myoepitheelcellen in borstweefsel en speekselklieren zijn positief bij deze kleuring. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de diagnose van tumors die ontstaan uit gladde spiervezels en myoepitheelcellen. (<http://www.ventana.com/product/9?type=4>)

1.4.3.3.2. Principe

Anti-ASMA antistoffen reageren met het desbetreffende antigeen. Deze antistoffen zijn gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controleweefsel wordt appendix of baarmoeder gebruikt.

1.4.3.4. Beta humaan choriongonadotrofine (βhCG)

1.4.3.4.1. Doel

De kleuring wordt uitgevoerd om het proteïne βhCG te herkennen. Dit komt in grote hoeveelheden voor bij normale trofoblasten. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van chorioncarcinoma. Ook bij grote cel carcinoma en adenocarcinoma van de long of plaveiselcel long carcinoma gaat er een positieve βhCG-reactie optreden. Als er een hCG expressie is door niet trofoblastische tumoren kan dit wijzen op een agressieve tumor. (<http://www.ventana.com/product/109?type=103>)

1.4.3.4.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het proteïne βhCG gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan placenta gebruikt worden.

1.4.3.5. Cluster of differentiation 3 (CD3)

1.4.3.5.1. Doel

De CD3 kleuring wordt uitgevoerd om de niet geglycolyseerde epsilon keten van het humaan CD3-molecule dat op de T-lymfocyten voorkomt te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de kwalitatieve identificatie van T- cellen. (<http://www.ventana.com/product/30?type=25>)

1.4.3.5.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen de niet geglycolyseerde epsilon keten van het humaan CD3-molecule gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kunnen milt of keelamandelen gebruikt worden.

1.4.3.6. Cluster of differentiation 20 (CD20)

1.4.3.6.1. Doel

De CD20 kleuring wordt uitgevoerd om een epitoom dat aanwezig is op humane B-lymfocyten te herkennen. Dit komt enkel voor bij rijpe B-cellen maar niet op plasmocyten. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de kwalitatieve identificatie van B-lymfocyten van de eerste lijn. (<http://www.ventana.com/product/36?type=31>)

1.4.3.6.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen een epitoom aanwezig op humane B-lymfocyten gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kunnen lymfeklieren of keelamandelen gebruikt worden.

1.4.3.7. Cluster of differentiation 23 (CD23)

1.4.3.7.1. Doel

De CD23 kleuring wordt uitgevoerd om CD23 positieve cellen te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de classificatie van kleine lymfocytair lymfomen of leukemiën van andere kleine B-cell lymfomen inclusief mantelcel en marginale zone lymfomen. (<http://www.ventana.com/product/39?type=34>)

1.4.3.7.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het CD23 gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kunnen keelamandelen gebruikt worden.

1.4.3.8. CDX2

1.4.3.8.1. Doel

De CDX2 kleuring wordt uitgevoerd om het CDX2 proteïne te herkennen. Het is een caudaal gerelateerde homeobox transcriptiefactor waarvan de expressie bij volwassenen normaal beperkt is tot het intestinaal epitheel. Het is betrokken bij de ontwikkeling en het onderhoud van het darmslijmvlies. Dit proteïne komt tot expressie in de kernen van normaal darmepitheel. Verlies van CDX2-expressie komt overeen met een verlies van de differentiatie van colorectale kankers. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van gastrointestinale metastatische adenocarcinomen en carcinoïden. Een hoog percentage van mucieuze carcinomen van de ovaria kleuren ook positief met dit antilichaam, net zoals carcinomen van de bovenste gastrointestinale zone. (<http://www.ventana.com/product/59?type=54>)

1.4.3.8.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het CDX2 proteïne gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan colon of adenocarcinoma van colon gebruikt worden.

1.4.3.9. Chromogranine

1.4.3.9.1. Doel

De chromogranine kleuring wordt uitgevoerd om het chromogranine proteïne te herkennen. Het chromogranine A proteïne komt op grote schaal tot uiting in neurologisch weefsel en in de secretoire genen van humane endocriene cellen. Het komt ook tot uiting in de bijnier (medulla), bijschilddklier, hypofysevoorkwab, eilandjes van Langerhans in de pancreas, gastrointestinale cellen, bronchiale endocriene cellen en c-cellen in de schildklier. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van tumoren van neuroendocriene afkomst zoals feochromocytomen, hypofyseadenomen, eilandjes van Langerhans cel tumoren, medullaire schildkliercarcinomen, carcinoïden en Merkel cel tumoren. (<http://www.ventana.com/product/60?type=55>)

1.4.3.9.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het chromogranine A proteïne gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan pancreasweefsel gebruikt worden.

1.4.3.10. Cytokeratine cam 5.2 (CK cam 5.2)

1.4.3.10.1. Doel

De CK cam 5.2 kleuring wordt uitgevoerd om het cytokeratine 7 en cytokeratine 8 te herkennen die aanwezig zijn op secretorisch epitheel, maar niet op het gestratificeerd plaveiselcelig epitheel. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de diagnose van tumoren van epitheliale oorsprong zoals colorectale-, pancreas- en niet-kleincellige longkanker en om verscheidene carcinoma van maligne tumoren van niet epitheliale oorsprong aan te tonen. (<http://www.ventana.com/product/1543?type=2003>)

1.4.3.10.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het cytokeratine 7 en 8 gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan pancreas carcinoma of colon gebruikt worden.

1.4.3.11. Cytokeratine 5/6 (CK 5/6)

1.4.3.11.1. Doel

De CK5/6 kleuring wordt uitgevoerd om het cytokeratine 5 en cytokeratine 6 te herkennen. Cytokeratine 5 is aanwezig in verschillende soorten epithelen en mesothel cellen. Cytokeratine 6 is aanwezig bij prolifererend plaveiselcelig epitheel. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de diagnose van plaveiselcelig carcinoma en in verschillende maligne mesothelioma van long adenocarcinomas. De detectie van cytokeratine 5 in myoepitheliale cellen met deze antistof kan ook gebruikt worden voor de bepaling van borst- en prostaat maligniteiten. (<http://www.ventana.com/product/1544?type=2004>)

1.4.3.11.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen cytokeratine 5 en 6 gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kunnen prostaatweefsel en keelamandelen gebruikt worden.

1.4.3.12. Cytokeratine 7 (CK 7)

1.4.3.12.1. Doel

De CK7 kleuring wordt uitgevoerd om het type II cytokeratine proteïne te herkennen dat vooral tot uiting komt in de meeste ductale-, klier- en overgangsepithelen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de diagnose van normaal of neoplastische cellen in het ovarium, long- en borstepitheel waarbij normaal CK7 tot uiting komt en colon- en prostaatepitheel waarbij normaal geen CK7 productie optreedt. (<http://www.ventana.com/product/71?type=66>)

1.4.3.12.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het type II cytokeratine proteïne gericht zijn. De antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan borstweefsel, speekselklier, klier- en ductaalepitheel of longweefsel gebruikt worden.

1.4.3.13. Cytokeratine 14 (CK 14)

1.4.3.13.1. Doel

De CK14 kleuring wordt uitgevoerd om het cytokeratine 14 te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van plaveiselcelcarcinoma en borst basaal-achtige carcinoma. (<http://www.ventana.com/product/1665?type=2133>)

1.4.3.13.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen cytokeratine 14 gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan prostaat, huid en plaveiselcelcarcinoma gebruikt worden.

1.4.3.14. Cytokeratine 20 (CK 20)

1.4.3.14.1. Doel

De CK20 kleuring wordt uitgevoerd om het type I cytokeratine proteïne van mature enterocyten en slijmbekercellen van de maag- en darmmucosa te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de diagnose van normaal cytokeratine 20 positieve cellen en neoplastische cellen van colonepitheliale oorspong. (<http://www.ventana.com/product/76?type=71>)

1.4.3.14.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen type I cytokeratine gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan een colon adenocarcinoma gebruikt worden.

1.4.3.15. Desmine

1.4.3.15.1. Doel

De desmine kleuring wordt uitgevoerd om het desmine te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulpmiddel bij de kwalitatieve identificatie van desmine in spiercellen. (<http://www.ventana.com/product/77?type=72>)

1.4.3.15.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het desmine gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan darmweefsel gebruikt worden.

1.4.3.16. EMA

1.4.3.16.1. Doel

De EMA kleuring wordt uitgevoerd om epitheliale membraan antigenen te herkennen. Deze komen voor op het apicaal oppervlak van klierepitheel. Dit glycoproteïne komt in eerste instantie voor op membranen van normaal en tumoraal weefsel, hoewel het ook kan voorkomen in een cytoplasmatische omgeving in minder ontwikkelde carcinomas. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van epitheliale membraan antigenen in adenomcarinomas afkomstig van secretoir eptiheel, maligne mesothelioom, niercelcarinomen en meningiomen. (<http://www.ventana.com/product/81?type=76>)

1.4.3.16.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen eptiheliale membraan antigenen gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan normale pancreas gebruikt worden.

1.4.3.17. Oestrogeenreceptor (ER)

1.4.3.17.1. Doel

De ER kleuring wordt uitgevoerd om een epitooop aanwezig op het humaan ER alfa proteïne te herkennen dat aanwezig is in de kern van ER-positieve normale of neoplastische cellen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulpmiddel bij de prognose en voorspelling van therapie bij borstkanker. Het is een farmacodiagnostische test. (<http://www.ventana.com/product/83?type=78>)

1.4.3.17.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen een epitooop van het humaan ER gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan borstweefsel gebruikt worden.

1.4.3.18. KI-67

1.4.3.18.1. Doel

De KI-67 kleuring wordt uitgevoerd om het Ki-67 antigen te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulpmiddel bij de beoordeling van de proliferatieve activiteit van normaal of neoplastisch weefsel. (<http://www.ventana.com/product/114?type=108>)

1.4.3.18.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het C-terminaal deel van het Ki-67 antigen gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan een lymfeklier of een keelamandel gebruikt worden.

1.4.3.19. MSH2

1.4.3.19.1. Doel

De MSH2 kleuring wordt uitgevoerd om het MSH2 antigen te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulpmiddel bij de identificatie van microsatelliet instabiliteit. (<http://www.ventana.com/product/126?type=120>)

1.4.3.19.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het MSH2 antigen gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan coloncarcinoom of colonmucosa gebruikt worden.

1.4.3.20. p57kip2

1.4.3.20.1. Doel

De p57kip2 kleuring wordt uitgevoerd om p57Kip2 antigenen te herkennen die vooral tot uiting komen in weefsel dat van maternale oorsprong is. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de diagnose van gedeeltelijke mola, compleet mola, en hydropische abortussen aangezien bij een molaire zwangerschap het genetisch materiaal van paternale oorsprong is. (<http://www.ventana.com/product/1596?type=2061>)

1.4.3.20.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het P57Kip2 gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan een placenta gebruikt worden.

1.4.3.21. PLAP

1.4.3.21.1. Doel

De PLAP kleuring wordt uitgevoerd om het PLAP te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van kiemceltumoren en kan het verschil maken tussen deze en andere gezwellen. Somatische gezwellen zoals borst, gastrointestinale, prostaat- en urinaire kankers kunnen ook reageren met PLAP. Het is zeer nuttig in de diagnose van zwangerschaps trofoblastziekte. (<http://www.ventana.com/product/147?type=141>)

1.4.3.21.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het PLAP gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan placenta gebruikt worden.

1.4.3.22. Progesteronreceptor (PR)

1.4.3.22.1. Doel

De PR kleuring wordt uitgevoerd om een epitoom aanwezig op het humaan PR proteïne te herkennen dat voorkomt in de kern van PR-positieve normale en neoplastische cellen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulpmiddel bij de prognose en voorspellen van de therapie bij borstcarcinoom. (<http://www.ventana.com/product/155?type=149>)

1.4.3.22.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen een epitoom op het humaan PR proteïne gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan borstweefsel gebruikt worden.

1.4.3.23. S100

1.4.3.23.1. Doel

De S100 kleuring wordt uitgevoerd om een epitoom op het S100 proteïne te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulpmiddel bij de identificatie van cellen van normale en abnormale neuronale en neuroendocriene lijn en als hulp in de diagnose van anaplastische tumoren. (<http://www.ventana.com/product/161?type=155>)

1.4.3.23.2. Principe

Het principe berust op een antigeen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen een epitoom op het S100 proteïne gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan melanoom gebruikt worden.

1.4.3.24. Synaptofysine

1.4.3.24.1. Doel

De synaptofysine kleuring wordt uitgevoerd om het synaptofysine te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulpmiddel bij de diagnose van neuroendocriene neoplasmen. (<http://www.ventana.com/product/1562?type=2025>)

1.4.3.24.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen synaptofysine gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kunnen eilandjes van Langerhans uit de pancreas gebruikt worden.

1.4.3.25. Thyroid transcription factor 1 (TTF1)

1.4.3.25.1. Doel

De TTF1 kleuring wordt uitgevoerd om het TTF1 proteïne te herkennen. Het antilichaam wordt gebruikt als hulp voor de identificatie en diagnose van gezwellen in de long en schildklier door een kern kleuringspatroon te vertonen. (<http://www.ventana.com/product/1674?type=2142>)

1.4.3.25.2. Principe

Het principe berust op een antigen-antistofreactie. Hierbij gaan antigenen bepaald worden doordat een antistof hieraan gaat binden. Bij deze test gaat de antistof tegen het TTF1 proteïne gericht zijn. Deze antistof is gelabeld met een bruin chromogeen en dit is zichtbaar bij het bekijken van de coupes. Als controle kan normale schildklier, normale long of longcarcinooma gebruikt worden.

1.5. Microgolven

1.5.1. Microgolven

Het microgolfspectrum komt voor in de orde van 0,3 GHz tot 300 GHz, hoewel sommige andere bronnen microgolfstalen beschrijven tussen 1 tot 100 GHz (Leong, 2009). In de industrie, wetenschap en medische technologieën worden microgolven gebruikt tussen 2,45 en 915 GHz. Elektromagnetische golven met een langere golflengte (kortere frequentie) dan microgolven worden radiogolven genoemd en deze met een kortere golflengte (langere frequentie) worden millimetergolven, tetrahertz straling of T-stralen genoemd. De microgolfrange kan verder verdeeld worden in ultra-high frequency (0,3-3,0 GHz), super high frequency (3,0-30 GHz) en extremely high frequency (30-300 GHz).

Microgolven zijn een vorm van niet ioniserende stralingen met een typische standaardfrequentie van 2,45 GHz, een golflengte van 12,2 cm en een fotonenergie van 10^{-5} elektronvolt. Als dipoolmoleculen zoals water of de polaire zijketens van proteïnen blootgesteld worden aan de snel wisselende elektromagnetische velden dan draaien ze 180° met een snelheid van 2,45 biljoen cycli per seconde. Omdat de meeste biologische moleculen asymmetrisch zijn en asymmetrische ladingen bezitten, bewegen ze in het wisselende elektromagnetische veld. Het is pas ontdekt dat dit fenomeen optreedt met asymmetrische anorganische molecules die polariteit vertonen (Leong, 2009). Dit wordt onder andere gebruikt voor de verwarming van verschillende metaaloxides zoals koperoxide, loodoxide, ijzeroxide voor de productie van

gemixte metaaloxiden. De moleculaire beweging of kinetika die opgewekt wordt, leidt tot onmiddellijke warmte die evenredig is met de energiestroom en die blijft bestaan tot de straling stopt. Terwijl dit de meest simplistische manier van begrijpen van de energie en warmte in het snel wisselende elektromagnetische veld is, zijn er nog vele aspecten van de energie overdracht niet helemaal begrepen. Een aantal hypothetische fysische mechanismen kunnen ook optreden door microgolfstraling. Veld geïnduceerde alternaties in macromoleculaire waterstofbindingen, protontunneling en verbreking van gebonden water kunnen alternaties in biologische systemen veroorzaken. Hoewel de fotonenergie die gegenereerd is door microgolven te klein is om een covalente binding te breken, kan een lage intensiteit van microgolfvelden reeds effect hebben op de integriteit van niet covalente secundaire bindingen zoals hydrofobe interacties, waterstofbindingen en van der Waals krachten die deel uit maken van de precieze sterische interacties die essentieel zijn voor de biologische functie en macromoleculaire samenstelling van de celmembranen.

Microgolfstraling is niet ioniserend en moet onderscheiden worden van ioniserende straling. Eigenlijk zijn de termen emissie en blootstelling meer geschikt als men naar microgolven verwijst. De energiekwanta die gepaard gaan met microgolven is veel kleiner dan de energie die nodig is om de zwakste moleculaire bindingen te ioniseren of te breken. Dus microgolven zijn niet zoals gamma-stralfotonen die genoeg energie hebben om permanente biologische schade toe te brengen door het ioniserend proces. Microgolven kunnen enkel de moleculaire rotaties in het elektromagnetisch veld aanwakkeren. De zeer snelle vibraties van moleculen en intermoleculaire botsingen veroorzaken een substantiële verhoging in de lokale temperatuur zodat deze methode van verwarming zeer efficiënt en snel is vergeleken met de conventionele verwarmingsmethoden (Leong, 2009).

Het is pas vrij recent ontdekt dat andere moleculen dan water en de polaire zijketens van proteïnen kunnen trillen in het elektromagnetische veld dat opgewekt is door microgolven. Moleculen met een oneven verdeling van de elektrische lading zoals anorganisch materiaal en kperoxides kunnen ook gedraaid worden. (Leong, 2009)

1.5.2. Methoden van gebruik van microgolven

Er zijn verschillende manieren waarop microgolven voor de fixatie en dehydratatie van weefsel kunnen dienen. Zo kan men microgolven gebruiken om het weefsel te fixeren zonder gebruik te moeten maken van een fixatief. Hierbij gaat men het weefsel bestralen met microgolven gedurende korte periodes bij een bepaalde temperatuur. Tijdens deze hele fixatie en dehydratatie wordt er geen enkel fixatief gebruikt, enkel een reagens waarin het weefsel gedompeld wordt.

Verder kan men ook gebruik maken van microgolven om de fixatie in een fixatief te versnellen. Dit is de manier die gebruikt wordt in de LOGOS, het toestel dat onderwerp is van dit werk. Het voordeel van het gebruiken van microgolven tijdens de fixatie en dehydratatie van weefsel is dat een cyclus veel sneller doorlopen kan worden. Dit is zo omdat bij deze methode de vloeistoffen sneller zullen diffunderen en de reacties sneller zullen optreden. Door verwarming met microgolven gaat de warmte niet van de buitenkant van het vat langzaam naar binnen dringen maar gaat de aanwezige vloeistof eerst verwarmd worden. Voor bepaalde stalen die snel behandeld moeten worden, zoals borstcilinders, kan dit dus erg voordelig zijn.

2. Materiaal en methoden

2.1. Conventionele methoden

2.1.1. Toestel

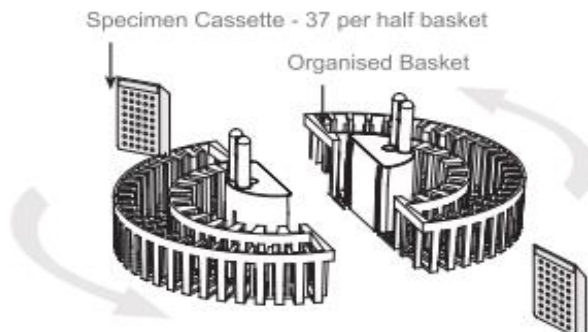
In het laboratorium anatomopathologie in het Mariaziekenhuis te Overpelt maken ze op dit moment gebruik van het toestel Shandon Excelsior SE (Thermo Scientific) voor de fixatie en dehydratie van de biopsies (Figuur 3). Het voordeel van dit toestel is dat het een bijna volledig afgesloten systeem is waarbij de reagentia onderin geplaatst worden. Nadat de reagentia vervuild zijn kunnen ze op een eenvoudige manier vervangen worden door nieuwe flessen met een minimale contaminatie voor de medewerkers.



Figuur 3: Shandon Excelsior SE van Thermo Scientific

2.1.1.1. Reactiekamer en mandjes

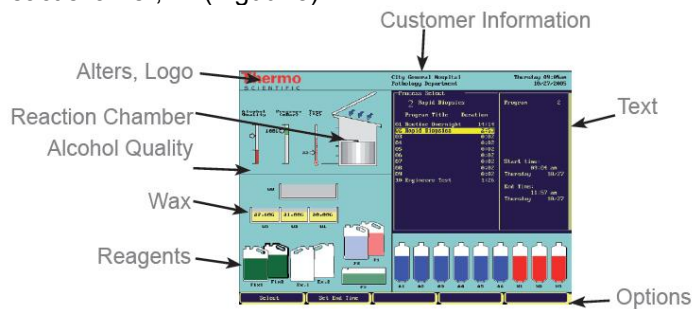
Als de mandjes vol zitten met cassettes worden deze in de reactiekamer ondergebracht. In elk mandje kunnen 37 cassettes geplaatst worden (Figuur 4). De mandjes worden in de reactiekamer vastgezet door de aanwezige opstaande pinnen. De reactiekamer is de plaats waar het weefsel daadwerkelijk gefixeerd en gedehydrateerd wordt.



Figuur 4: Mandjes voor het Shandon Excelsior SE toestel

2.1.1.2. Scherm

Op het beeldscherm kan men het programma , de start- en einddatum en tijd aflezen, Ook kan men de hoeveelheden van de reagentia bekijken, de temperatuur, het niveau in de reactiekamer, ... (Figuur 5).



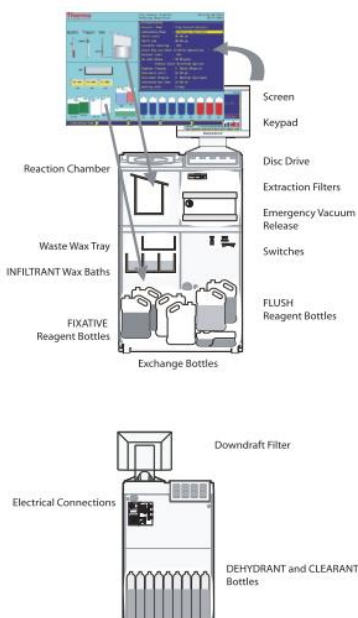
Figuur 5: Programma van het Shandon Excelsior SE toestel

2.1.1.3. Toetsen

Met deze toetsen kan men de gewenste functie selecteren zoals “deblokkeer deksel”, “vertraagde start”

2.1.1.4. Reagensgedeelte

In het reagensgedeelte van het toestel (Figuur 6) bevinden zich de reagentia voor het fixeren en dehydrateren van het weefsel. Dit zijn o.a. formol, methanol, xyleen en paraffine. Verder bevinden zich hier ook de afvalcontainers met het afval van de processen. De paraffine wordt bewaard in waxbaden, terwijl de fixator en spoelflessen zich in het voorste gedeelte bevinden.



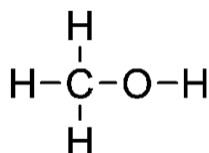
Figuur 6: Opbouw van het reagensgedeelte van het Shandon Excelsior SE toestel

2.1.2. Reagentia

2.1.2.1. Formol

Formol (Klinipath) is een kleurloze oplossing. Het bestaat uit een 37% oplossing van het kleurloze gas formaldehyde in water. Formol is het eenvoudigste aldehyde dat bestaat (Figuur 1). De gevaren en andere nadelen van formol worden uitgebreid besproken in het hoofdstuk "1.2.6.8 Formol". Formol wordt in de Excelsior gebruikt voor de verdere fixatie van het weefsel.

2.1.2.1.1. Methanol



Figuur 7: Structuurformule van methanol

Methanol (Klinipath) is een kleurloze oplossing. Het is het eenvoudigste alcohol dat er bestaat (Figuur 7). Methanol is erg ontvlambaar, toxisch en werken met methanol houdt dus gezondheidsrisico's in. Het kan blijvende letsels veroorzaken bij inhalatie, aanraking met de huid en opname door de mond. (Material Safety Data Sheet, Sigma-aldrich) Omwille van deze redenen is het nodig om met beschermende kledij en handschoenen te werken en methanol verwijderd te houden van ontstekingsbronnen. Methanol wordt in de Excelsior gebruikt als eerste stap om het water in het weefsel te vervangen door paraffine.

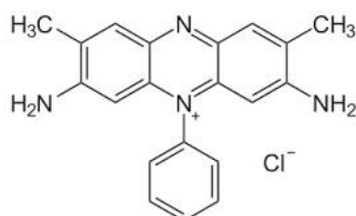
2.1.2.1.2. Xyleen

Xyleen (Klinipath) is een kleurloze oplossing. Xyleen heeft 3 optische isomeren, respectievelijk ortho-, metha- en paraxyleen zoals weergegeven in Figuur 2. De gevaren en andere nadelen van xyleen worden uitgebreid besproken in het hoofdstuk "1.3.2 Xyleen". De functie van xyleen gebruikt in de Excelsior is tweeledig. Enerzijds wordt het gebruikt als oplosmiddel om paraffine op te lossen en ten tweede om het water in het weefsel te vervangen door paraffine.

2.1.2.2. Paraffine

Paraffine (Klinipath) is een kleurloze vloeistof en witte stof in gestolde toestand behorend tot de alkanen. Aan paraffine zijn geen directe gezondheidsrisico's verbonden. Paraffine wordt in de Excelsior gebruikt om de plaats van water in te nemen zodat het weefsel in paraffine ingebed kan worden.

2.1.2.3. Safranine



Figuur 8: Structuurformule van safranine

Safranine (Sigma-aldrich) is een basische rode kleurstof (Figuur 8). Safranine kan ernstige schade aan de ogen veroorzaken. Daarom moet er oogbescherming gedragen worden indien men hiermee werkt. (Material Safety Data Sheet, Sigma-aldrich) Safranine wordt in de Excelsior in kleine hoeveelheid gebruikt om de weefsels een macroscopische roze kleur te geven. Dit gebeurt door dit te mengen met formol.

2.1.3. Werkwijze

Nadat de binnengekomen biopsies verkleind zijn, worden ze in cassettes gestoken waarop een metalen dekseltje geplaatst wordt. Deze cassettes worden in mandjes geplaatst en vervolgens in de reactiekamer van de Excelsior gebracht. De mandjes worden op de aanwezige pinnen geschoven zodat ze vaststaan. Hierna moet het niveau van de vloeistof aangepast worden. Dit niveau wordt aangepast omdat er formol in de reactiekamer aanwezig is van zodra er een mandje instaat tot het programma voor het fixeren en dehydrateren gestart wordt. Hier bevat formol safranine zodat de weefsels een macroscopische roze kleur krijgen, hetgeen het inbedden en versnijden van het weefsel met de microtoom vergemakkelijkt. Dit gebeurt omdat sommige weefsels zeer licht van kleur zijn en daardoor moeilijk zichtbaar zijn, zeker in gestolde paraffine. Als de mandjes in de reactiekamer geplaatst zijn, wordt een vertraagde start gekozen. Hierdoor kan het weefsel overnacht verder fixeren en dehydrateren.

Om het weefsel te fixeren en te dehydrateren wordt volgend programma automatisch doorlopen:

- 30 min. formol bij kamertemperatuur
- 60 min. methanol bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. methanol bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. methanol bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. methanol bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. methanol bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. methanol bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. xyleen bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. xyleen bij 30°C onder vacuüm
- 60 min. xyleen bij 30°C onder vacuüm
- 80 min. paraffine bij 60°C onder vacuüm
- 80 min. paraffine bij 60°C onder vacuüm
- 80 min. paraffine bij 60°C onder vacuüm

Na overnacht fixeren en dehydrateren worden de cassettes in het inbedstation overgebracht. De mandjes worden hierna gespoeld. Voor het spoelen wordt onderstaand programma automatisch doorlopen:

- 20 min. xyleen
- 3 min. methanol

Xyleen wordt gebruikt om resten paraffine op te lossen die nog aan de mandjes kunnen hangen. Methanol wordt vervolgens gebruikt om terug over te kunnen gaan naar formol. Nadat de weefsels allemaal zijn ingebed in paraffine worden de klemmetjes van de cassettes in een korf in de reactiekamer geplaatst en doorlopen de weefsels opnieuw het spoelprogramma. Hierna is het toestel klaar om deze beschreven werkwijze opnieuw te doorlopen.

2.2. Alternatieve methode

2.2.1. Toestel

Voor het onderzoek van dit eindwerk wordt het toestel LOGOS (Milestone) (Figuur 9) gebruikt voor de fixatie en dehydratie van weefsel. De LOGOS biedt vele mogelijkheden voor het fixeren en dehydrateren van weefsel. Men kan gebruik maken van zowel formol als een formolvervangend product. Voor dit onderzoek werd nagegaan of het formolvervangend product finefix kan gebruikt worden. Een ander voordeel van dit toestel is dat zowel microgolfverwarming als conventionele verwarming gebruikt kan worden. Als laatste voordeel heeft de LOGOS ook de mogelijkheid om 2 runs met elkaar te laten overlappen door na de dehydratie de korf manueel naar de paraffinekamer over te brengen. Hierdoor kan een nieuwe korf in de eerste kamer geplaatst worden om de eerste cyclus van fixatie en dehydratie te doorlopen. De verschillende onderdelen van het LOGOS toestel worden in verdere paragrafen besproken.



Figuur 9: LOGOS toestel (Milestone)

2.2.1.1. Reactiekamer en mandjes

Mandjes (Figuur 10) gevuld met cassettes worden in de reactiekamer, de plaats waar het weefsel gefixeerd en gedehydrateerd wordt, ondergebracht. In elk mandje kunnen 35 cassettes geplaatst worden.

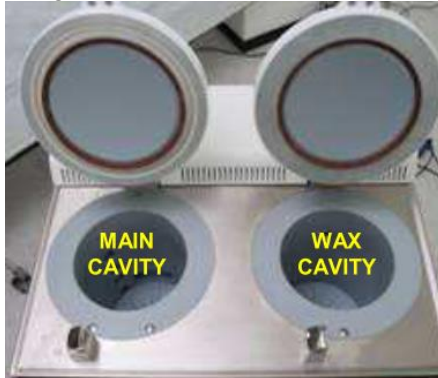
De mandjes worden in de reactiekamer (Figuur 11) gezet door ze rond de houder vast te maken en een zware schijf erop te brengen. Dit voorkomt dat de cassettes gaan drijven. Op deze manier kan het geheel in de reactiekamer geplaatst worden.



Figuur 10: Mandjes voor het LOGOS toestel

2.2.1.2. Paraffinekamer

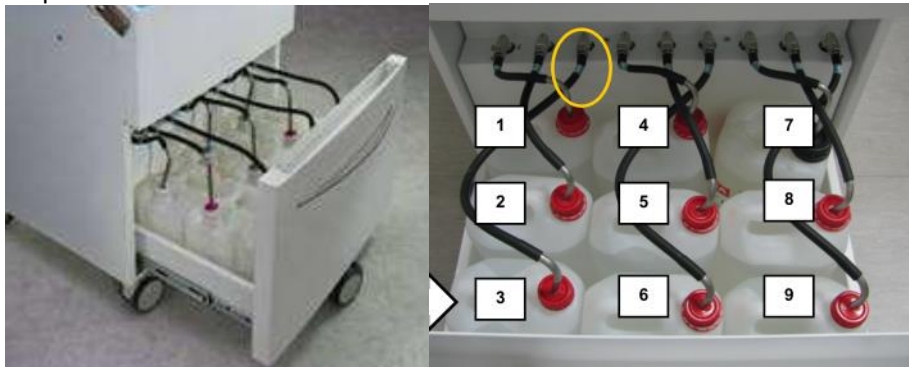
In de paraffinekamer (Figuur 11) bevindt zich de gesmolten paraffine waarin het weefsel wordt ingebed. Bij een dual run kunnen de mandjes met de houder manueel overgezet worden naar de paraffinekamer. Indien dit niet gebeurt of indien een overnacht programma gelopen wordt, gaat de paraffine uit de paraffinekamer naar de reactiekamer gepompt worden en daarna weer terug.



Figuur 11: De reactiekamer en paraffinekamer van het LOGOS toestel

2.2.1.3. Reagensgedeelte

In het reagensgedeelte bevinden zich de reagentiaflessen voor het fixeren en dehydrateren van het weefsel maar ook voor het reinigen van het toestel (Figuur 12). Alle reagentia uitgezonderd de paraffine bevinden zich hier.



Figuur 12: Het reagensgedeelte van het LOGOS toestel

2.2.1.4. Scherm

Het scherm van de LOGOS is een touchpad waar met een pennetje op getypt kan worden (Figuur 13). Hier kunnen de programma's bekeken, gestart en ingesteld worden, kunnen de reagentia bekeken worden ...



Figuur 13: Programma van het LOGOS toestel

2.2.2. Reagentia

2.2.2.1. Formol

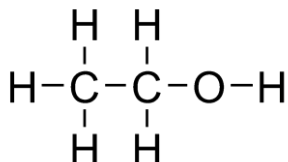
Zie hoofdstuk "2.1.6.8 Formol".

Formol wordt in de LOGOS gebruikt voor de verdere fixatie van het weefsel.

2.2.2.2. Finefix

Finefix (Klinipath) is een vervangproduct voor formol. Het is een kleurloze vloeistof die een fixerende werking heeft maar minder gevaarlijk is in gebruik dan formol. Als het op de juiste manier gebruikt wordt, houdt het weinig tot geen risico's in. Voor het gebruik van finefix moet het eerst verdund worden met ethanol. (Informatiebrochure finefix). Finefix wordt in de LOGOS gebruikt als vervanger van formol en dus ook voor de verdere fixatie van het weefsel.

2.2.2.3. Ethanol



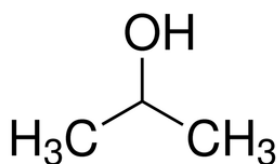
Figuur 14: Structuurformule van ethanol

Ethanol (Klinipath) is het bekendste en meest voorkomende alcohol (Figuur 14). Het is een kleurloze vluchtige vloeistof met een specifieke geur. Ethanol is een zeer ontvlambare vloeistof. Men moet de container goed gesloten houden en verwijderd houden van ontstekingsbronnen. (MSDS Sigma-aldrich). Ethanol wordt in de LOGOS gebruikt als eerste stap om het water in het weefsel te vervangen door paraffine.

2.2.2.4. Ethanol 60%

Ethanol 60% is een verdunde vorm van ethanol. Hierbij zijn er 3 eenheden ethanol gemengd met 2 eenheden water. Ethanol 60% wordt in de LOGOS gebruikt als spoelmiddel.

2.2.2.5. Isopropanol



Figuur 15: Structuurformule van isopropanol

Isopropanol (Klinipath) is een secundair alcohol dat zeer vluchtig is (Figuur 15). Het kan ook voor toxiciteit of irritatie zorgen. Het is irriterend voor de ogen en het inademen van isopropanol dampen kan zorgen voor duizeligheid en slaperigheid. (MSDS Sigma-aldrich). Isopropanol wordt in de LOGOS gebruikt als tweede stap om het water in het weefsel te vervangen door paraffine.

2.2.2.6. Paraffine

Zie hoofdstuk "2.1.2.2 Paraffine"

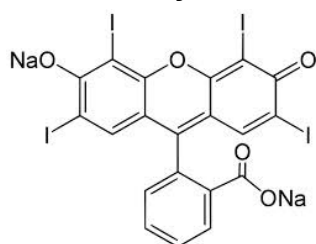
Paraffine wordt in de LOGOS gebruikt om de plaats van water in te nemen zodat het weefsel in paraffine ingebed kan worden.

2.2.2.7. Ultraclear

Ultraclear (Klinipath) is een kleurloze vloeistof op basisch van isoparaffine die ontvlambaar is en gezondheidsgevaar kan opleveren indien het terechtkomt in de luchtwegen. Het kan op lange termijn ook de huid beschadigen door de ontvettende werking. (Informatiebrochure ultraclear)

Ultraclear wordt in de LOGOS gebruikt ter vervanging van xyleen en dient dus als oplosmiddel voor paraffine.

2.2.2.8. Erythrosine



Figuur 16: Structuurformule van erythrosine

Erythrosine (Merck) is een kers-roze kleurstof die jodium bevat (Figuur 16). Het is schadelijk indien het doorgeslikt wordt. Erythrosine wordt in de LOGOS gebruikt om de weefsels een macroscopisch rode kleur te geven. Dit gebeurt door het te mengen in de ethanol die voor de laatste ethanolstap in de programma's gebruikt wordt.

2.2.2.9. Vergelijking reagentia Excelsior en LOGOS

Tabel 6: Vergelijking reagentia Excelsior en LOGOS

	Excelsior	Logos
Fixatief	Formol	Formol/finefix
Dehydratie	Methanol	Ethanol Isopropanol
Ontvetter	Xyleen	Isopropanol
Spoelmiddel	/	Ethanol 60%
Inbedmedium	Paraffine	Paraffine
Oplosmiddel	Xyleen	Ultraclear
Macroscopisch kleurmiddel	Safranine	Erythrosine

2.2.3. Werkwijze

Nadat de binnengekomen biopsies verkleind zijn, worden ze in plastieken cassettes met een plastic dekseltje gestoken. In tegenstelling tot de Shandon Excelsior worden de cassettes niet afgedekt met een metalen dekseltje aangezien het LOGOS toestel werkt met microgolven en metaal dus niet gebruikt kan worden. De cassettes worden in mandjes geplaatst en deze worden in de reactiekamer van de LOGOS gebracht. Hierna wordt er een programma gekozen. De keuze van het programma is afhankelijk van het aantal cassettes, de dikte van het weefsel en het moment wanneer de cyclus zal lopen. Hieronder worden de verschillende programma's die gebruikt zijn in dit onderzoek besproken. In elk van deze programma's wordt in de laatste stap ethanol erythrosine gebruikt aangezien dit ervoor zorgt dat de weefsels een macroscopisch roze kleur krijgen zodat ze makkelijker zichtbaar zijn.

2.2.3.1. Programma formol Eth-Iso overnacht 5mm

Bij dit programma wordt weefsel tot 5 mm dik overnacht gefixeerd en gedehydrateerd. Eventueel kan hierbij een vertraagde start ingesteld worden door het uur op te geven wanneer het programma voltooid moet zijn. Bij dit programma wordt het rekje in de linker reactiekamer geplaatst waarin het hele reactieproces zal plaatsvinden. De paraffine, die in de rechter kamer zit, wordt van de rechterkamer naar de linkerkamer gepompt op het moment dat dit nodig is. Bij dit programma wordt de traditionele verwarmingsmethode toegepast. Om het weefsel te fixeren en te dehydrateren wordt volgend programma automatisch doorlopen:

- Fixatie:
 - 20 min. formol bij 37°C
 - 40 min. formol bij 37°C
 - 10 min. formol bij 50°C
 - 50 min. formol bij 50°C
- Ethanol:
 - 10 min. ethanol bij 55°C
 - 50 min. ethanol bij 55°C
- Isopropanol:
 - 15 min. isopropanol bij 55°C
 - 105 min. isopropanol bij 55°C
- Isopropanol 2:
 - 15 min. isopropanol bij 65°C
 - 3u50 isopropanol bij 65°C
- Verdamping:
 - 1min30 bij 600 mBar
- Paraffine verzadiging:
 - 30 sec. bij 995 mBar bij 70°C
 - 25 min. bij 500 mBar bij 70°C
 - 15 min. bij 400 mBar bij 70°C
 - 15 min. bij 300 mBar bij 70°C
 - 15 min. bij 200 mBar bij 70°C
 - 2u50 bij 150 mBar bij 65°C
 - 19min30 bij 800 mBar bij 65°C

's Morgens worden de mandjes uit het toestel gehaald en de cassettes in het inbedstation overgebracht. Het mandje wordt hierna gespoeld in Histomate. Voor het spoelen wordt het mandje 7 min. op 55°C in ultraclear gebracht. Ook het toestel moet na dit programma gespoeld worden omdat de paraffine van het ene vat naar het andere gepompt wordt. Voor het spoelen van het toestel wordt onderstaand programma doorlopen:

- Isoparaffine 1:
 - 20 min. ultraclear op 70°C
 - 10 min. ultraclear op 70°C
- Isoparaffine 2:
 - 10 min. ultraclear op 65°C
 - 5 min. ultraclear op 65°C
- Isoparaffine 3:
 - 1 min. ultraclear spoelen
- Isoparaffine 4:
 - 1 min. ultraclear spoelen
- Isoparaffine 5:
 - 1 min. ultraclear spoelen
- Ethanol 1:
 - 1 min. ethanol spoelen
- Ethanol 2:
 - 1 min. ethanol spoelen
- Ethanol 3:
 - 1 min. ethanol spoelen
- Water 1:
 - 1 min. spoelen
- Water 2:
 - 1 min. spoelen

2.2.3.2. Programma formol up to 5mm

Bij dit programma wordt weefsel tot 5mm dik overdag gefixeerd en gedehydrateerd. Tijdens dit programma wordt het weefsel met behulp van de microgolfmethode verwarmd. Hierdoor duurt het programma minder lang. Bij dit programma bestaat ook de mogelijkheid om 2 runs tegelijkertijd te laten lopen. Hiervoor moet de laborant zelf voor de paraffinestap het mandje van de linker naar de rechterkamer overbrengen zodat er in de linkerkamer een nieuwe run gestart kan worden. Omdat de paraffine enkel in de rechterkamer zit, gaat er geen spoelcyclus nodig zijn. Voor dit programma wordt volgende cyclus doorlopen:

- Fixatie:
 - 15 min. formol/finefix bij 50°C
 - 45 min. formol/finefix bij 50°C
- Ethanol:
 - 15 min. ethanol bij 65°C
 - 20 min. ethanol bij 65°C
- Isopropanol:
 - 15 min. isopropanol bij 68°C
 - 1u40min. isopropanol bij 68°C
- Verdamping:
 - 1min.30 bij 600 mBar

Eventueel overzetten van mandje

- Paraffine verzadiging:
 - 30 sec. bij 995 mBar bij 70°C
 - 10 min. bij 500 mBar bij 70°C
 - 10 min. bij 400 mBar bij 70°C
 - 4 min. bij 300 mBar bij 70°C
 - 4 min. bij 200 mBar bij 70°C
 - 3 min. bij 150 mBar bij 70°C
 - 1u48min30sec bij 150 mBar bij 65°C

2.2.3.3. Programma finefix Eth-Iso overnacht 5mm

Weefsel tot 5 mm dikte wordt tijdens dit programma overnacht gefixeerd en gedehydrateerd. Eventueel kan de run vertraagd worden door het uur op te geven wanneer het programma voltooid moet zijn. Bij dit programma wordt het rekje in de linker reactiekamer geplaatst waar het hele reactieproces optreedt. De paraffine aanwezig in de rechter kamer wordt van de rechterkamer naar de linkerkamer gepompt op het moment dat dit nodig is. Bij dit programma wordt er gebruik gemaakt van de traditionele verwarmingsmethode. Hierbij wordt hetzelfde programma doorlopen als beschreven onder 2.2.3.1 'Programma formol Eth-Iso overnacht 5mm' mits enkele wijzigingen. Het verschil met het overnacht programma met formol is dat in deze cyclus finefix als fixatief gebruikt wordt en dat de fixatiestappen die bij formol op 50°C verlopen met finefix op 40°C uitgevoerd zullen worden.

2.2.3.4. Programma finefix up to 5mm

Bij dit programma wordt weefsel tot 5 mm dik overdag gefixeerd en gedehydrateerd en wordt finefix als formolvervangend product gebruikt. Tijdens dit programma gebeurt de verwarming van het weefsel door de microgolfmethode. Hierdoor gaat het programma veel sneller doorlopen kunnen worden. Bij dit programma bestaat ook de mogelijkheid om 2 runs tegelijkertijd te lopen. Hiervoor moet de laborant zelf voor de paraffinestap het mandje van de linker naar de rechterkamer overbrengen zodat er in de linkerkamer een nieuwe run gestart kan worden. Omdat de paraffine enkel in de rechterkamer zit, gaat er ook geen spoelcyclus nodig zijn. Hierbij wordt hetzelfde programma doorlopen als beschreven onder 2.2.3.2 'Programma formol up to 5mm' mits enkele wijzigingen. Het verschil met het overdagprogramma met formol is dat in deze cyclus finefix als fixatief gebruikt wordt en dat de fixatiestappen met finefix op 40°C uitgevoerd zullen worden in plaats van op 50°C zoals bij het gebruik van formol.

3. Resultaten

In de resultaten van dit eindwerk worden de 4 uitgevoerde fixatiemethoden vergeleken. Elke methode bant xyleen dat gebruikt wordt bij de dehydratatiestap. In run 1 wordt er gebruikt gemaakt van formol als fixatief en de conventionele verwarmingsmethode. In run 2 en 3 wordt er eveneens gebruik gemaakt van formol als fixatief, maar hier wordt een korte cyclus met microgolfverwarming gekozen. In de vierde run gaat finefix als fixatief gebruikt worden en wordt er verwarmd met de conventionele verwarmingsmethode. De vijfde en laatste run maakt eveneens gebruik van finefix, maar hier wordt voor een korte cyclus met microgolfverwarming gekozen.

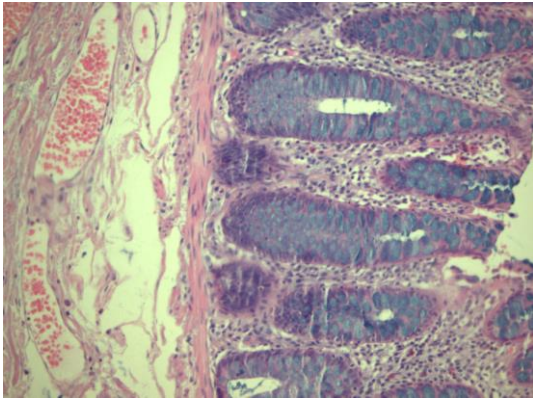
3.1. Run 1

Overnacht run met formol, conventionele verwarming en zonder xyleen te gebruiken tijdens de dehydratatiestap.

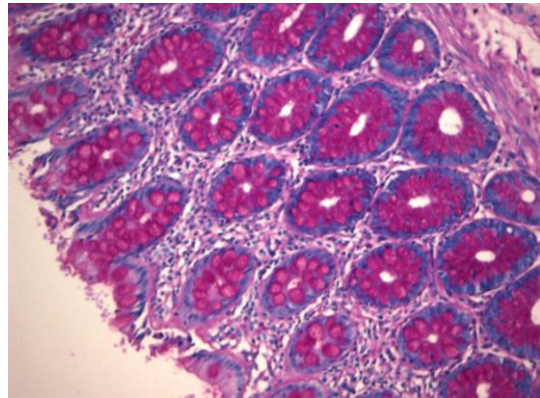
3.1.1. Routinekleuringen en histochemische kleuringen

3.1.1.1. Rectum

A



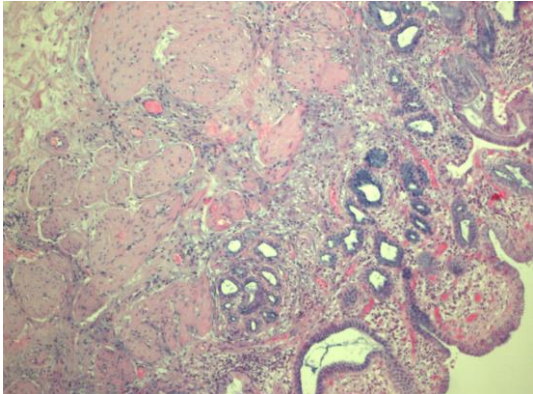
B



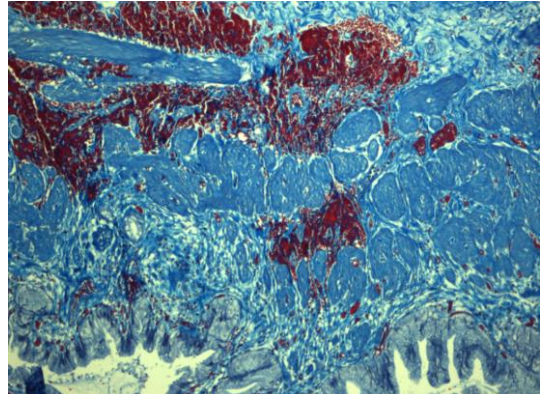
Figuur 17: Rectum, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10)

3.1.1.2. Galblaas

A



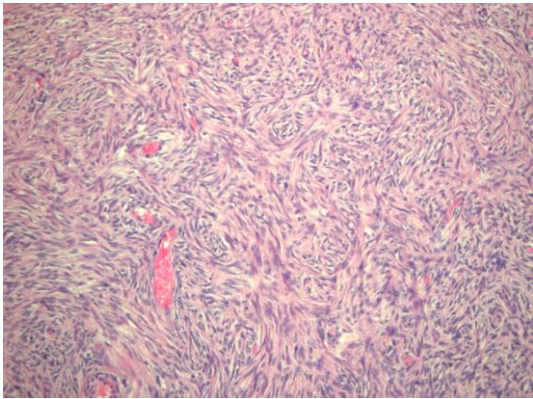
B



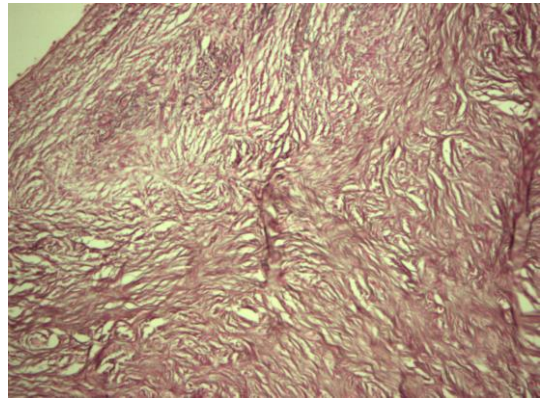
Figuur 18: Galblaas, A: HE-kleuring (10x10), B: trichroom-kleuring (10x10)

3.1.1.3. Ovarium

A



B

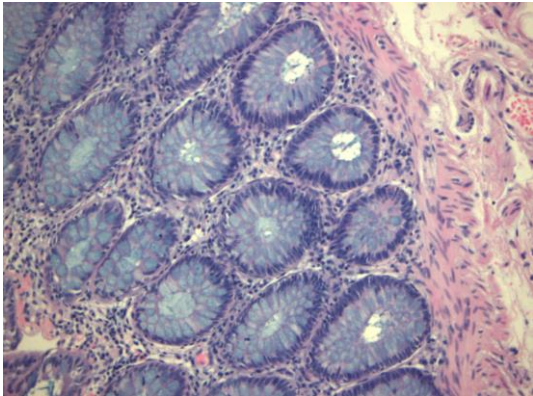


Figuur 19: Ovarium, A: HE-kleuring (20x10), B: reticuline-kleuring (20x10)

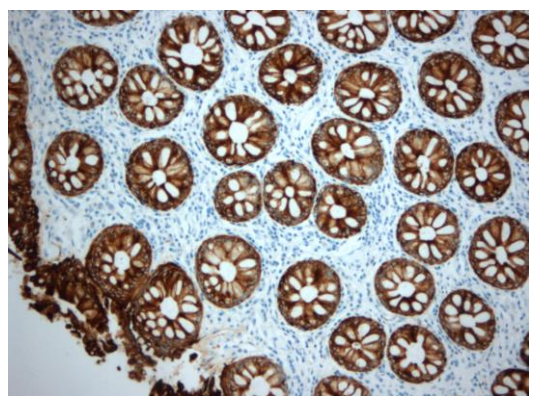
3.1.2. Immunohistochemische kleuringen

3.1.2.1. Rectum

A

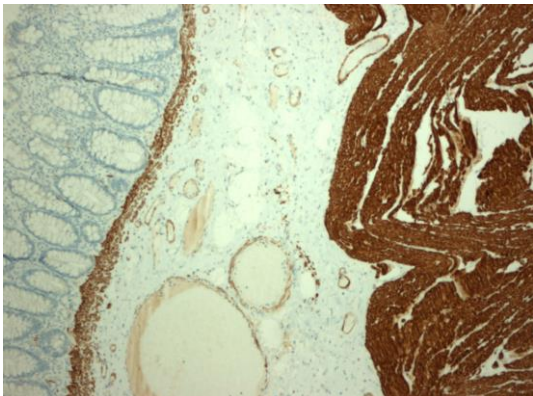


B

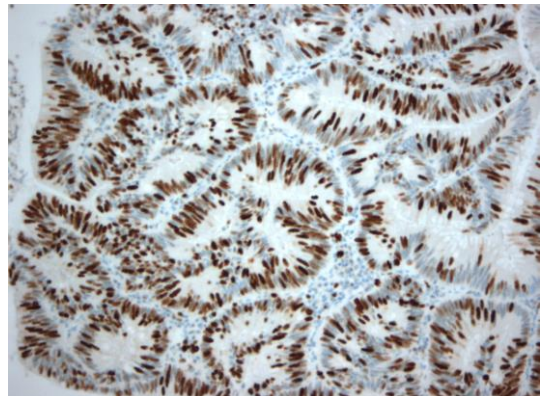


Figuur 20: Rectum, A: HE-kleuring (20x10), B: CK cam 5.2 kleuring (20x10)

C



D

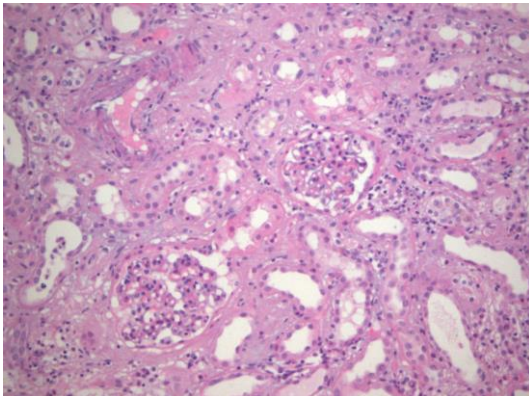


Figuur 21: Rectum, C: desmine-kleuring (10x10)

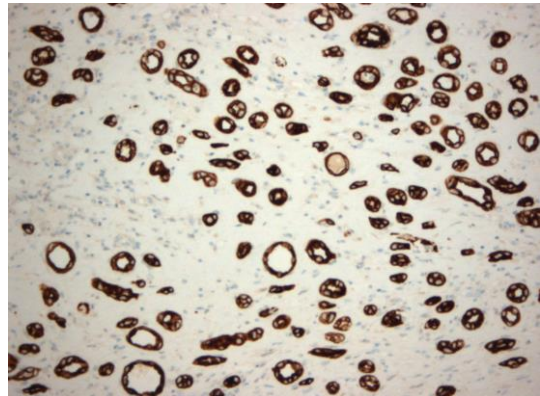
Figuur 22: Rectumpoliep, D: KI-67-kleuring (20x10)

3.1.2.2. Nier

A



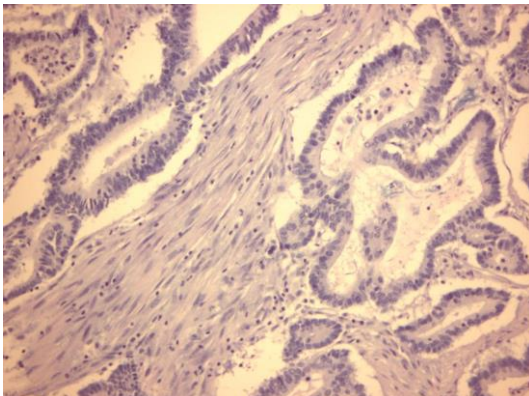
B



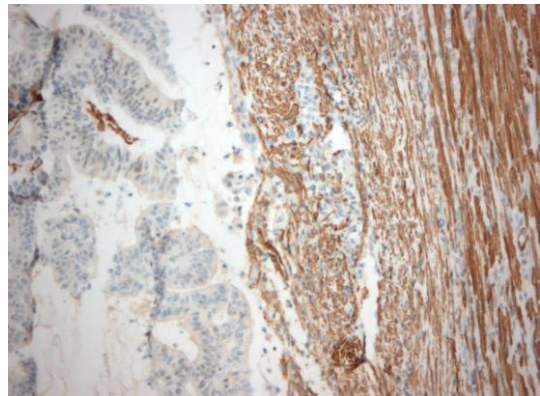
Figuur 23: Nier, A: HE-kleuring (20x10), B: CK7-kleuring (20x10)

3.1.2.3. Colon

A



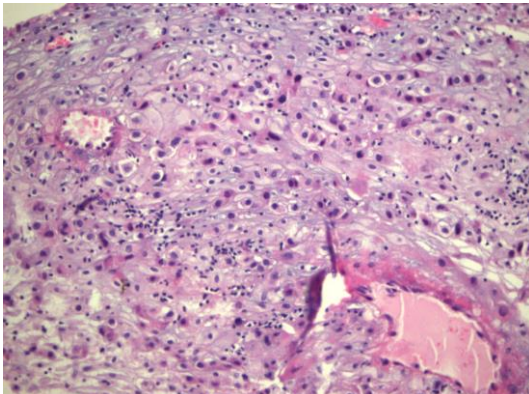
B



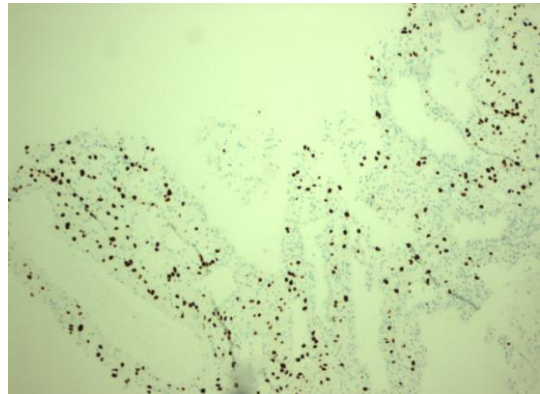
Figuur 24: Colon, A: HE-kleuring (20x10), B: ASMA-kleuring (20x10)

3.1.2.4. Curettage

A



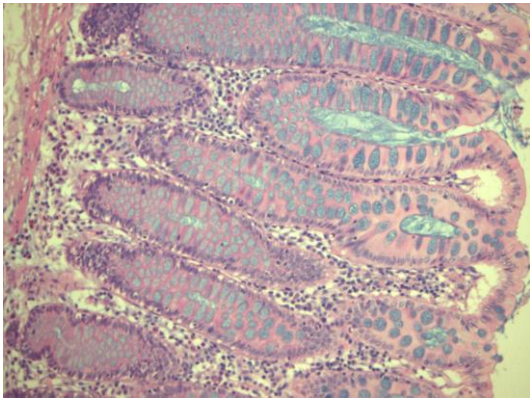
B



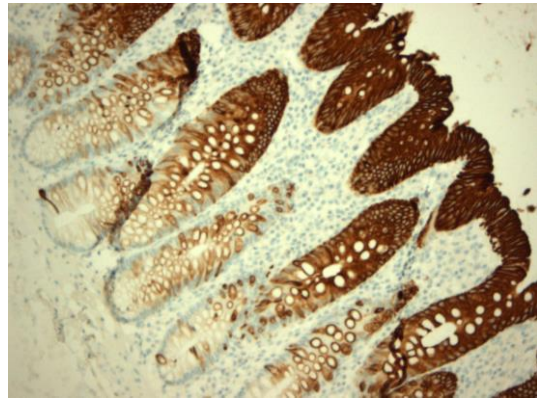
Figuur 25: Curettage, A: HE-kleuring (20x10), B: p57kip2-kleuring (10x10)

3.1.2.5. Darm

A



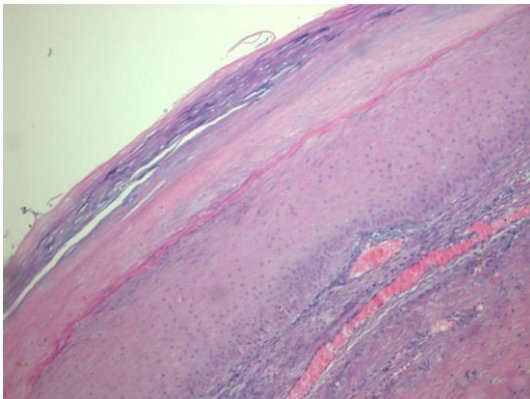
B



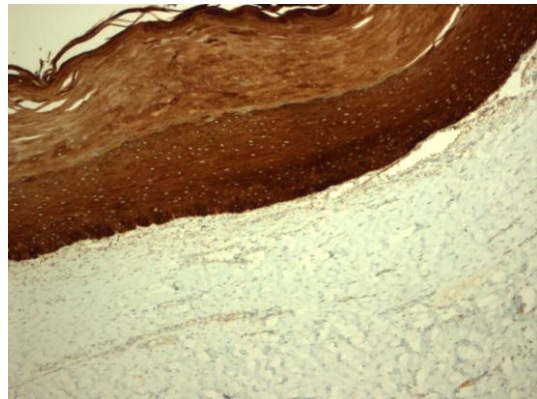
Figuur 26: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: CK20-kleuring (20x10)

3.1.2.6. Huid

A

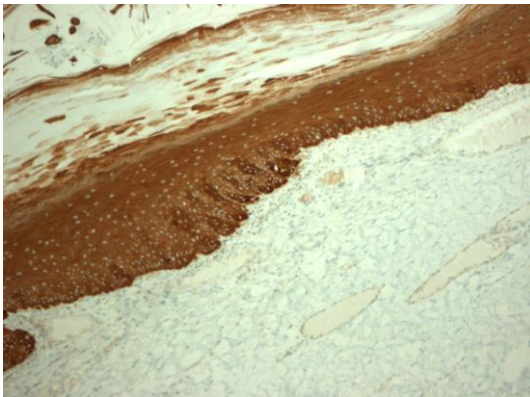


B



Figuur 27: Huidcyste, A: HE-kleuring (10x10), B: CK5/6-kleuring (10x10)

C



Figuur 28: Huidcyste, C: CK14-kleuring (10x10)

3.1.3. Resultaten run 1

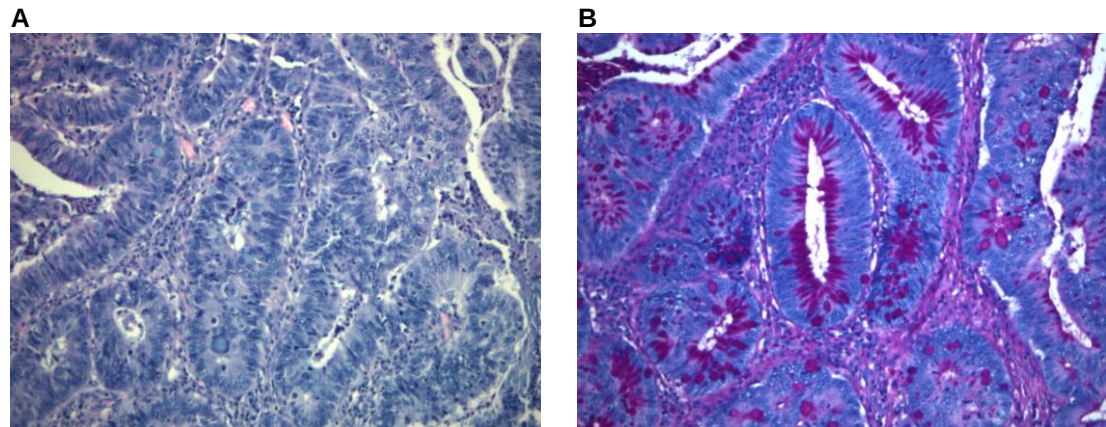
De eerste run levert goede resultaten op bij zowel de routinekleuringen, de histochemische- als de immunohistochemische kleuringen. Het bannen van xyleen uit het laboratorium levert geen problemen op.

3.2. Run 2 en 3

Overdag run met formol, microgolfverwarming en zonder xyleen te gebruiken tijdens de dehydratatiestap.

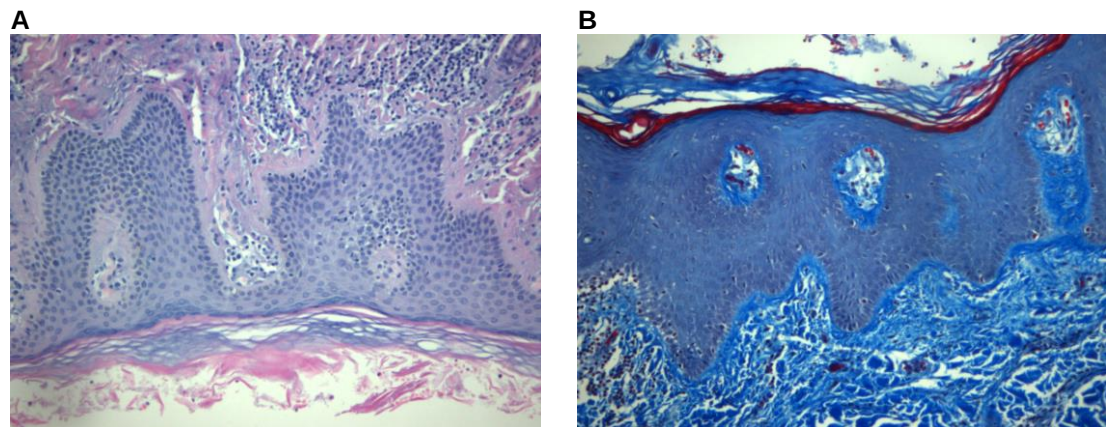
3.2.1. Routinekleuringen en histochemische kleuringen

3.2.1.1. Darm



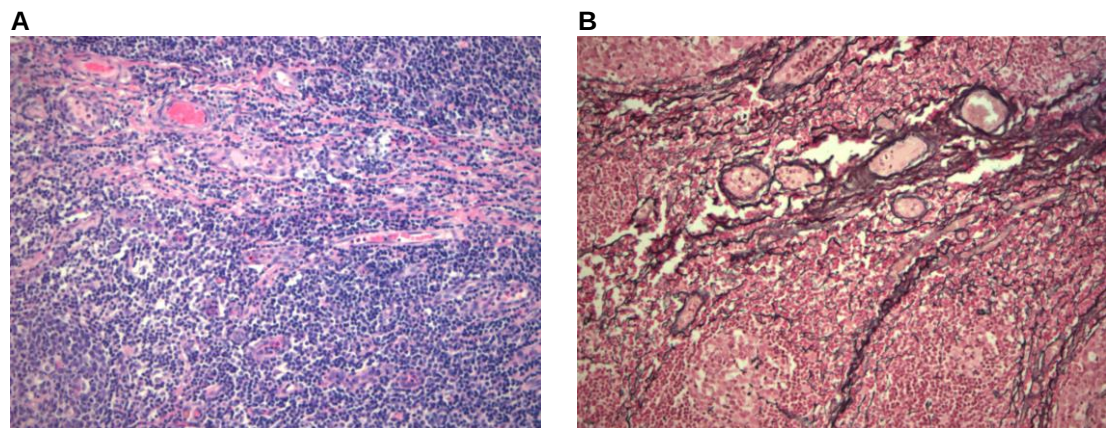
Figuur 29: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10)

3.2.1.2. Haarnestcyste



Figuur 30: Haarnestcyste, A: HE-kleuring (20x10), B: trichroom-kleuring (20x10)

3.2.1.3. Tonsil

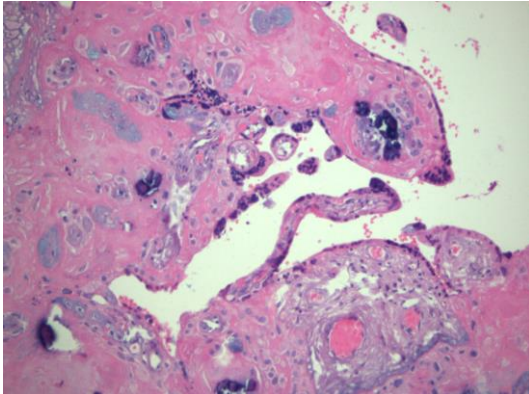


Figuur 31: Tonsil, A: HE-kleuring (20x10), B: reticuline-kleuring (20x10)

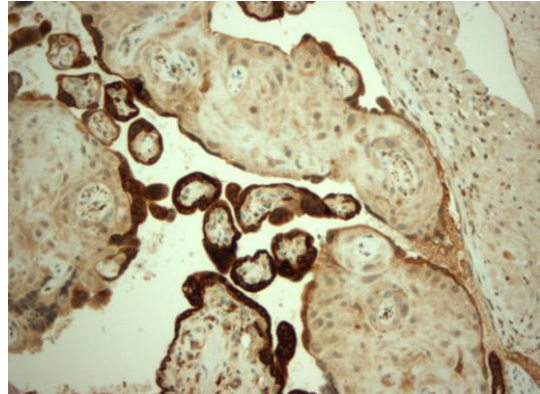
3.2.2. Immunohistochemische kleuringen

3.2.2.1. Placenta

A

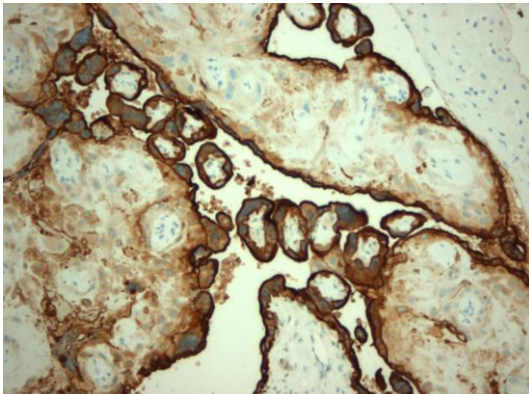


B



Figuur 32: Placenta, A: HE-kleuring (20x10), B: β HCG-kleuring (20x10)

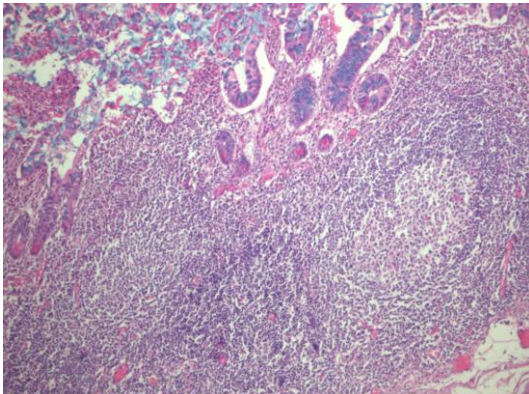
C



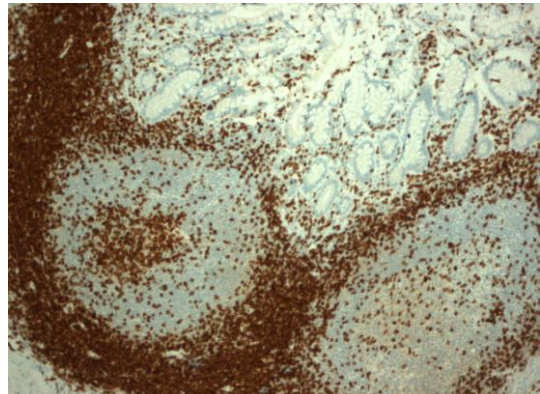
Figuur 33: Placenta, C: PLAP-kleuring (20x10)

3.2.2.2. Darm

A

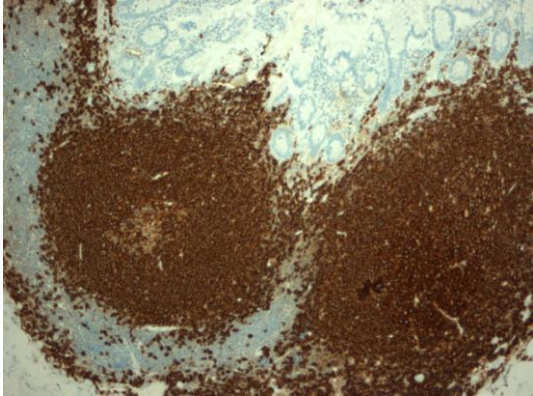


B

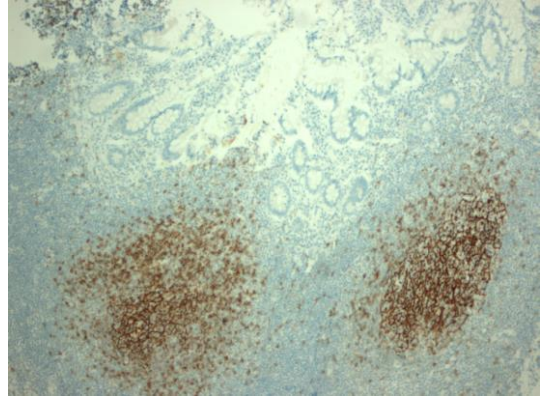


Figuur 34: Darm, A: HE-kleuring (10x10), B: CD3-kleuring (10x10)

C



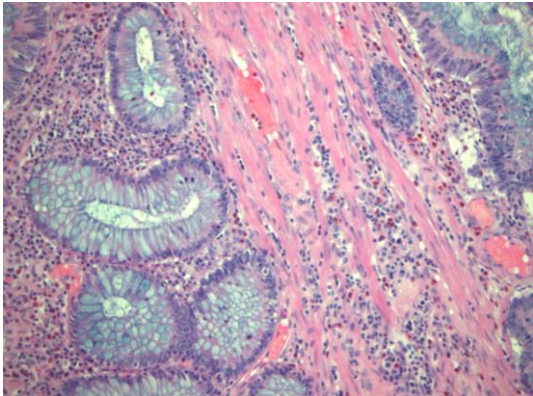
D



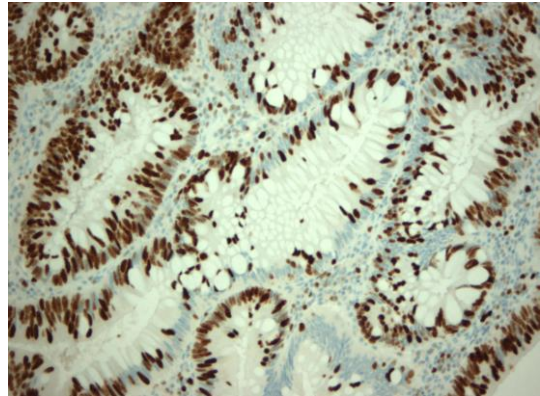
Figuur 35: Darm, C: CD20-kleuring (10x10), D: CD23-kleuring (10x10)

3.2.2.3. Darm

A



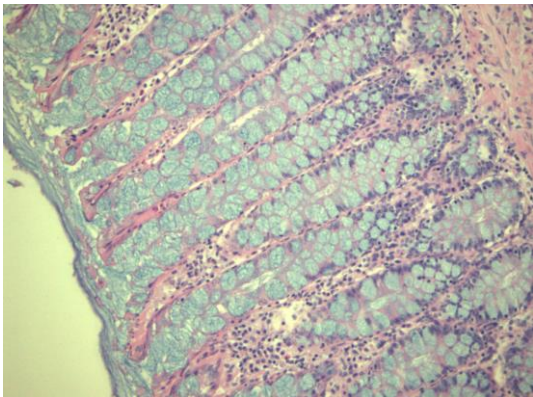
B



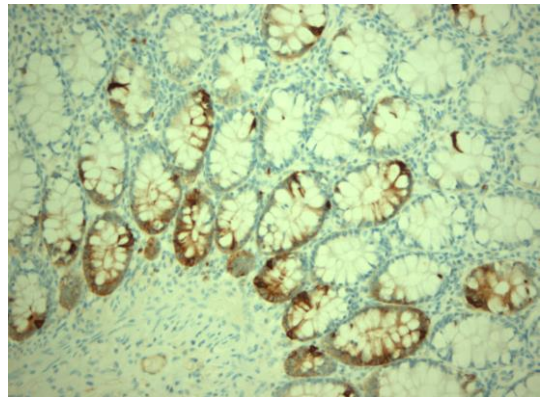
Figuur 36: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: KI-67-kleuring (20x10)

3.2.2.4. Darm

A



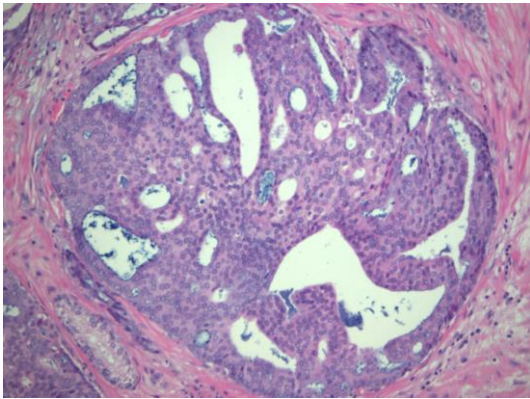
B



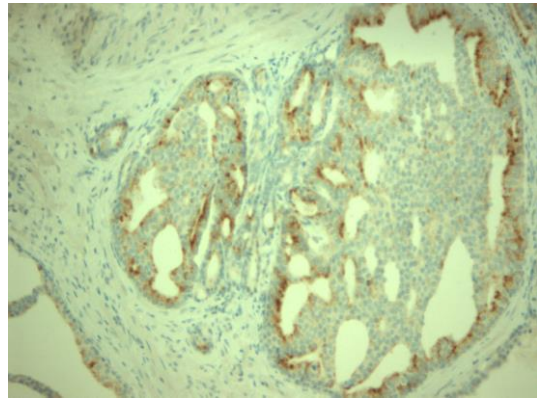
Figuur 37: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: chromogranine-kleuring (20x10)

3.2.2.5. Prostaat

A



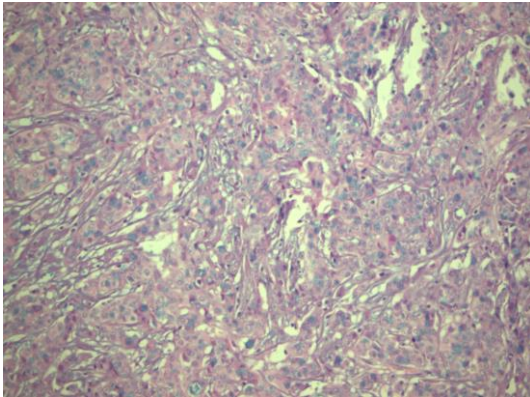
B



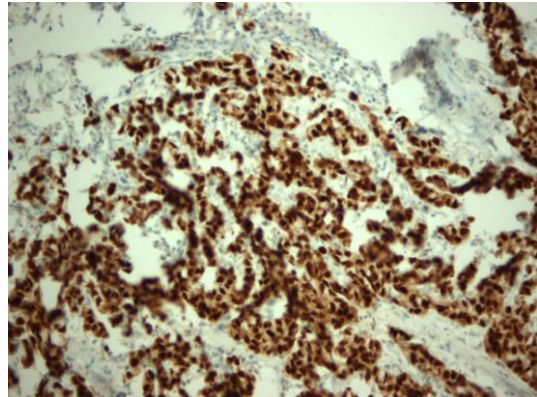
Figuur 38: Prostaatacarcinoom, A: HE-kleuring (20x10), B: AMACR-kleuring (20x10)

3.2.2.6. Darm

A



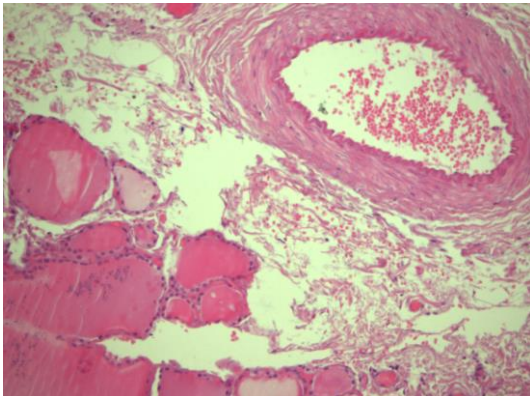
B



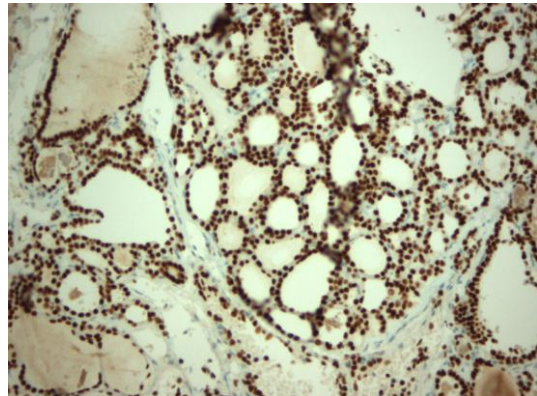
Figuur 39: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: CDX2-kleuring (20x10)

3.2.2.7. Schildklier

A



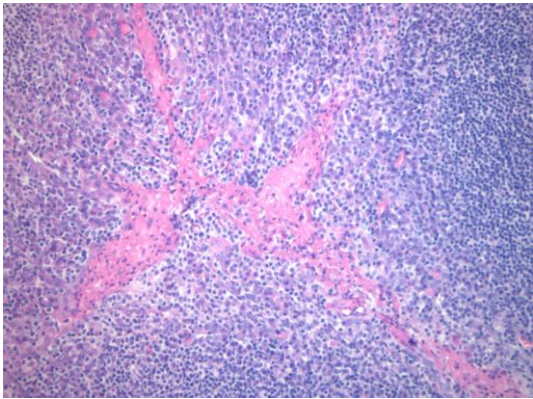
B



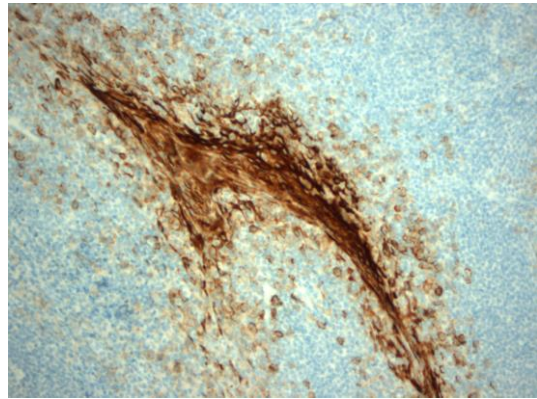
Figuur 40: Schildklier, A: HE-kleuring (20x10), B: TTF1-kleuring (20x10)

3.2.2.8. Tonsil

A

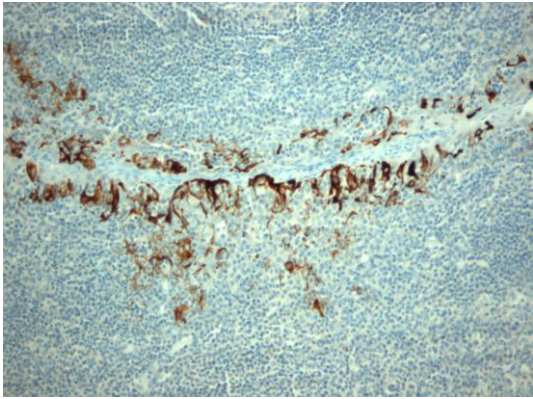


B



Figuur 41: Tonsil, A: HE-kleuring (20x10), B: EMA-kleuring (20x10)

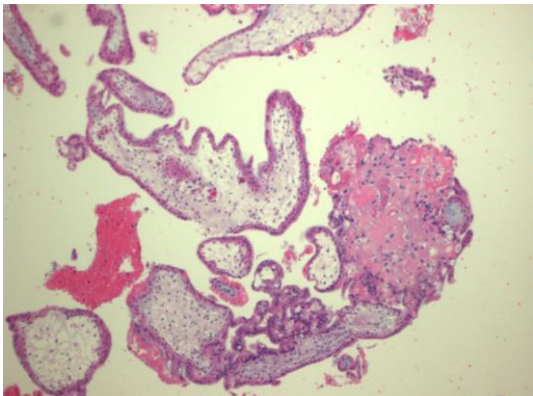
C



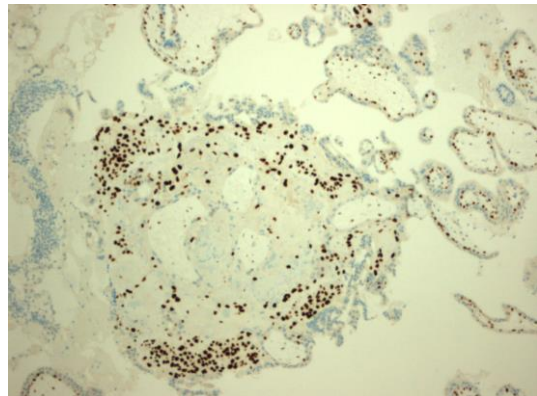
Figuur 42: Tonsil, C: CK cam 5.2-kleuring (20x10)

3.2.2.9. Curettage

A



B



Figuur 43: Curettage, A: HE-kleuring (10x10), B: p57kip2 (10x10)

3.2.3. Resultaten run 2 en 3

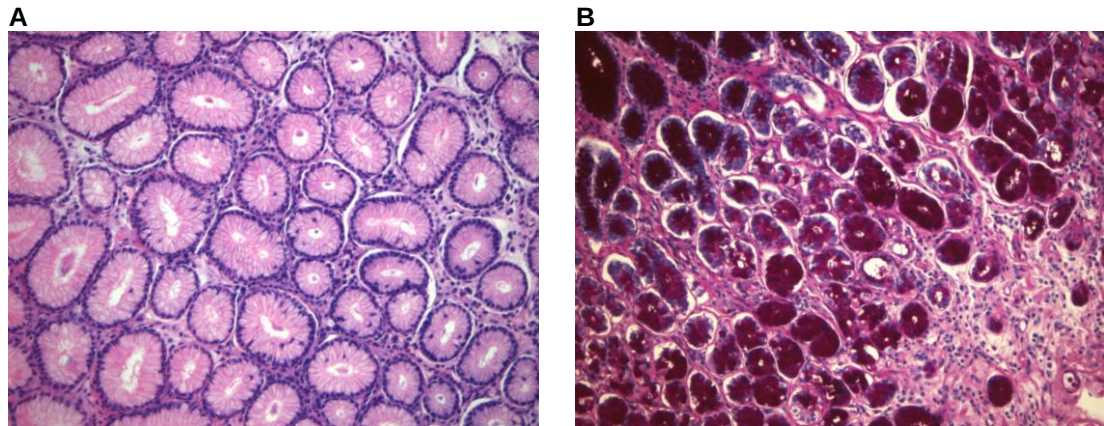
De tweede en derde run leveren ook goede resultaten op bij de 3 soorten kleuringen. De microgolfverwarming met formol als fixatief werkt uitstekend. Deze experimenten tonen aan dat korte cycli gebruikt kunnen worden in het laboratorium.

3.3. Run 4

Overnacht run met finefix, conventionele verwarming en zonder xyleen te gebruiken tijdens de dehydratatiestap

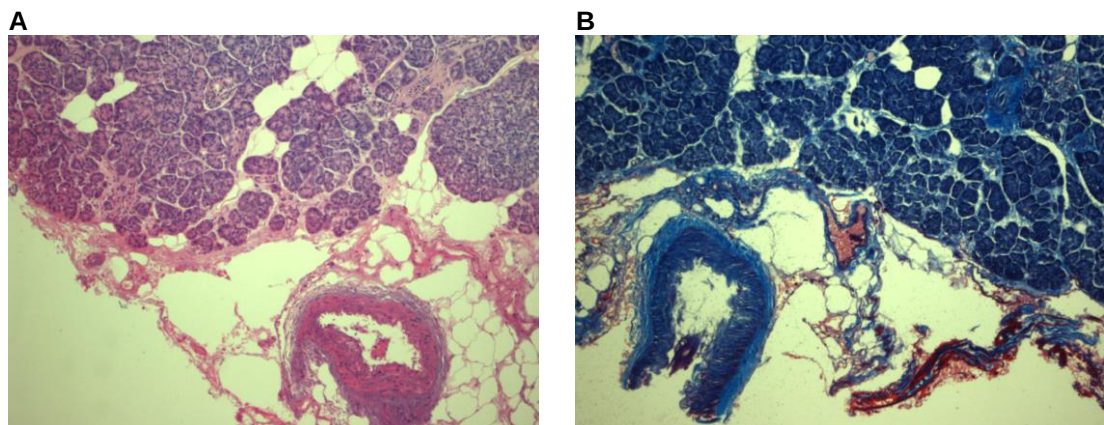
3.3.1. Routinekleuringen en histochemische kleuringen

3.3.1.1. Maagfundus



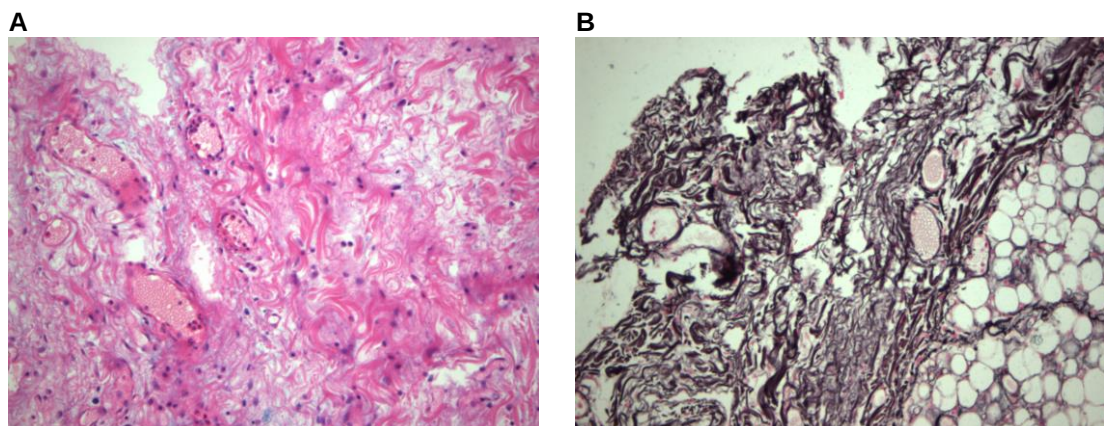
Figuur 44: Maagfundus, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10)

3.3.1.2. Pancreas



Figuur 45: Pancreas, A: HE-kleuring (10x10), B: trichroom-kleuring (10x10)

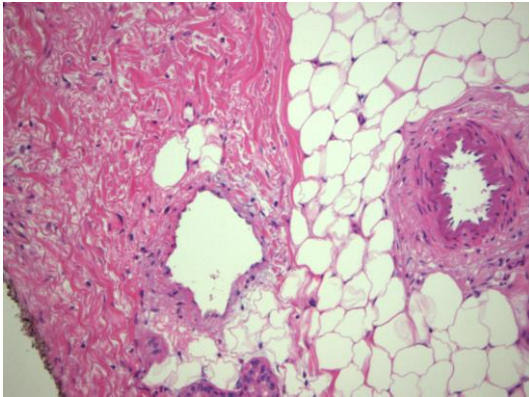
3.3.1.3. Darm



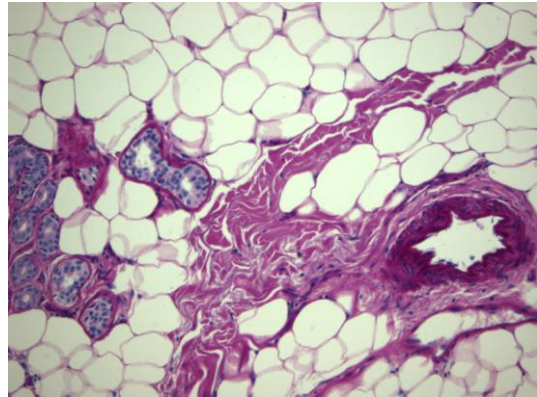
Figuur 46: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: reticuline-kleuring (20x10)

3.3.1.4. Huid

A



B

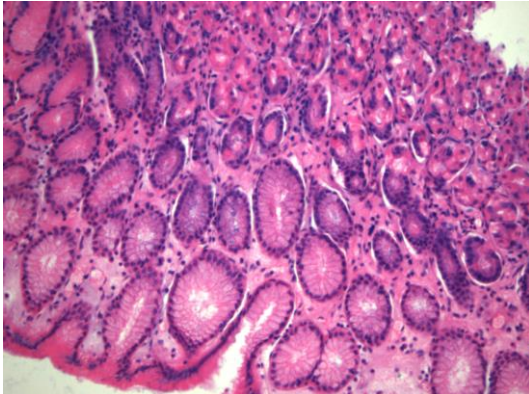


Figuur 47: Onderhuid, A: HE-kleuring (20x10), B: α -PAS-kleuring (20x10)

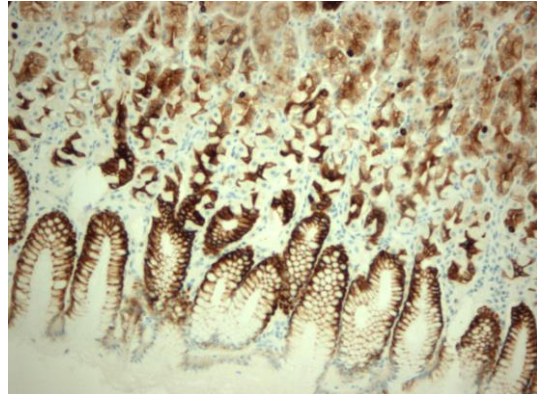
3.3.2. Immunohistochemische kleuringen

3.3.2.1. Maagfundus

A

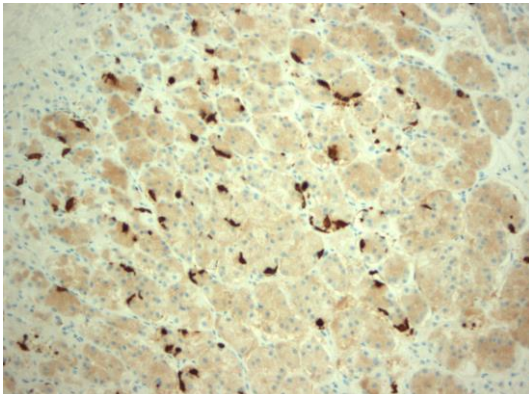


B



Figuur 48: Maagfundus, A: HE-kleuring (20x10), B: CK cam 5.2-kleuring (20x10)

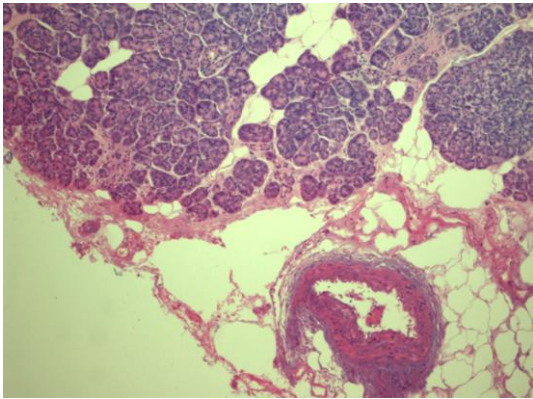
C



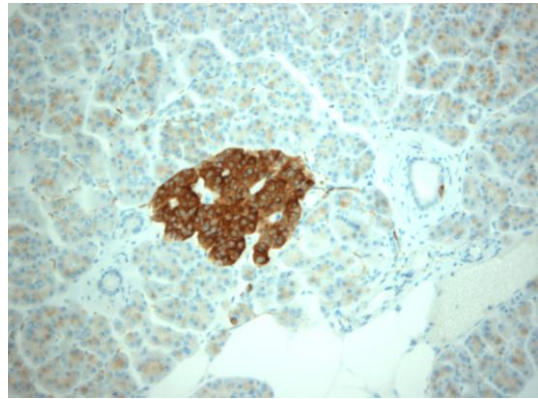
Figuur 49: Maagfundus, C: chromogranine-kleuring (20x10)

3.3.2.2. Pancreas

A

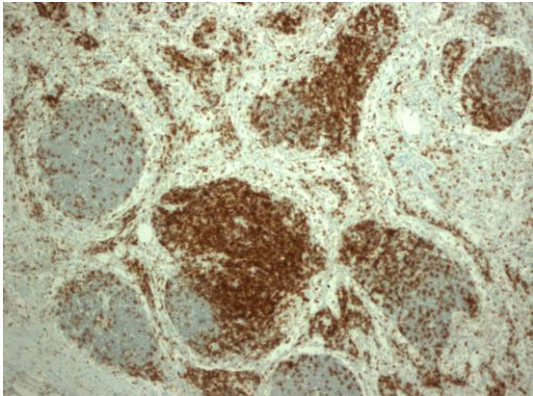


B

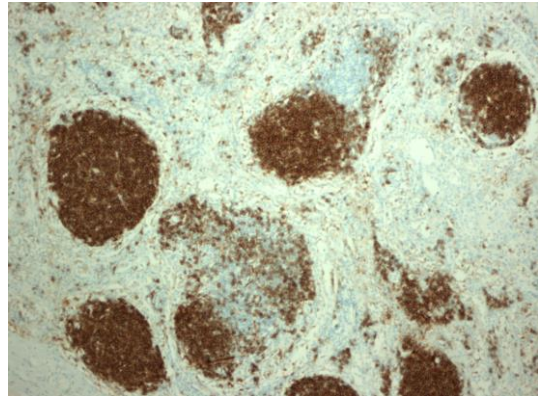


Figuur 50: Pancreas, A: HE-kleuring (10x10), B: synaptofysine-kleuring (20x10)

C

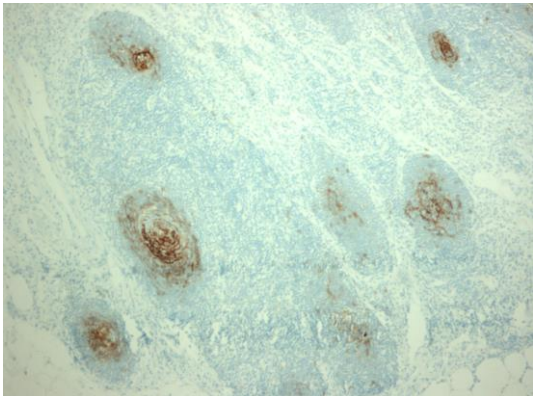


D



Figuur 51: Pancreas met klier, C: CD3-kleuring (10x10), D: CD20-kleuring (10x10)

E



Figuur 52: Pancreas met klier, E: CD23-kleuring (10x10)

3.3.3. Resultaten run 4

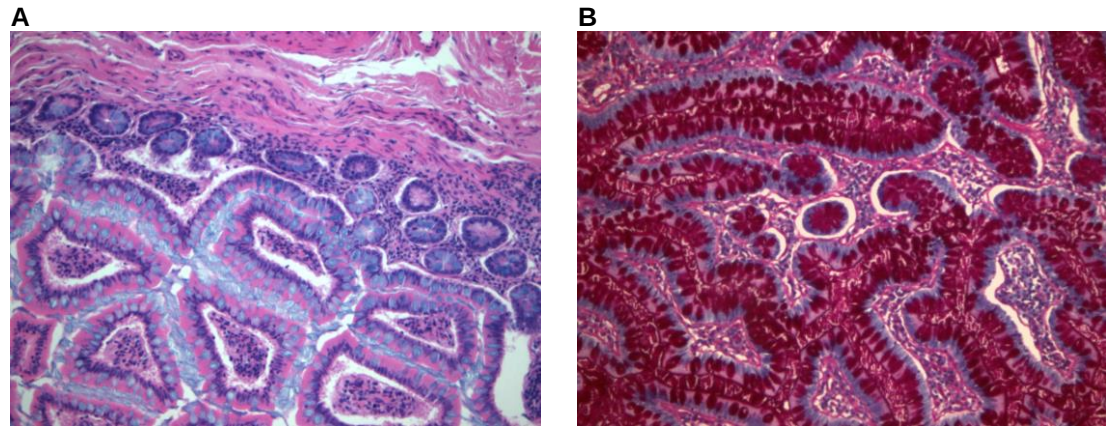
De vierde run levert eveneens mooie resultaten op bij de routinekleuringen, de histochemische- en immunohistochemische kleuringen. De HE-coupees vertonen een iets fellere kleur, maar zijn nog duidelijk te interpreteren. Het bannen van xyleen uit het laboratorium zou dus mogelijk zijn mits het uitvoeren van een groot aantal validatietesten.

3.4. Run 5

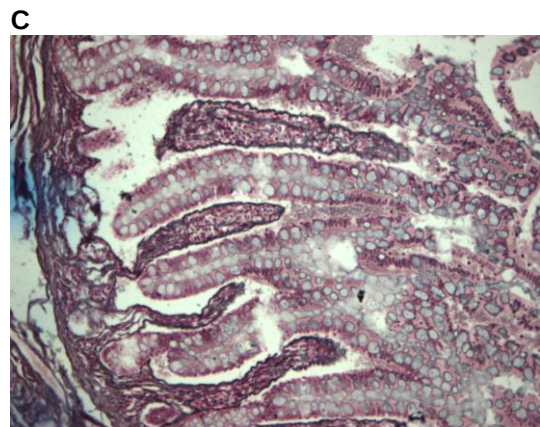
Overdag run met finefix, microgolfverwarming en zonder xyleen te gebruiken tijdens de dehydratatiestap.

3.4.1. Routinekleuringen en histochemische kleuringen

3.4.1.1. Darm

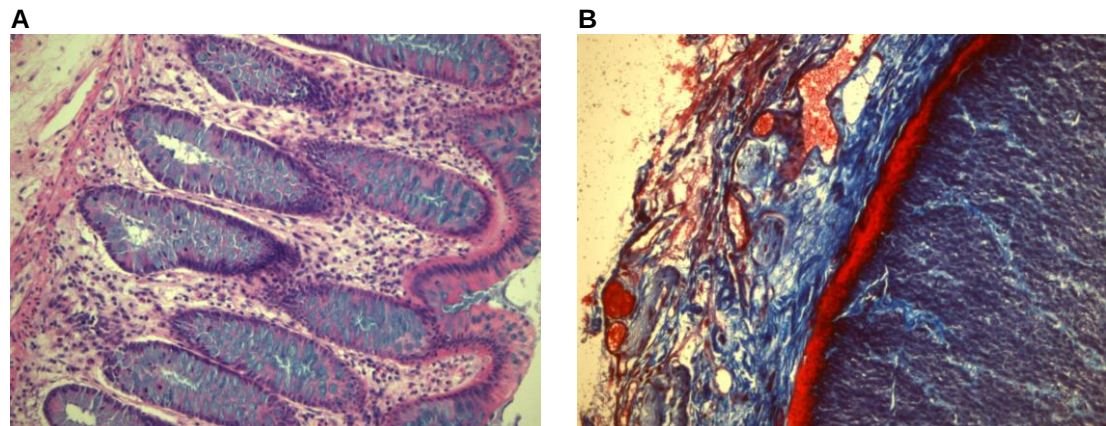


Figuur 53: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10)



Figuur 54: Darm, C: reticuline-kleuring (20x10)

3.4.1.2. Darm

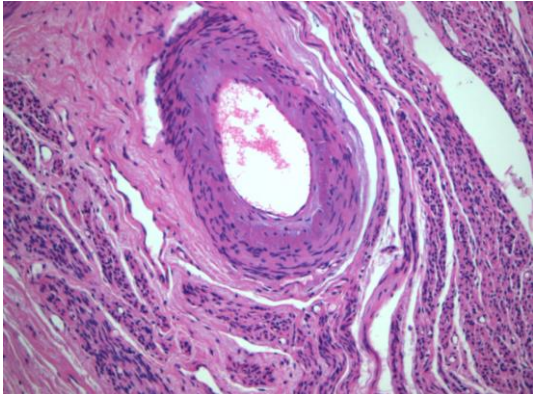


Figuur 55: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: trichroom-kleuring (20x10)

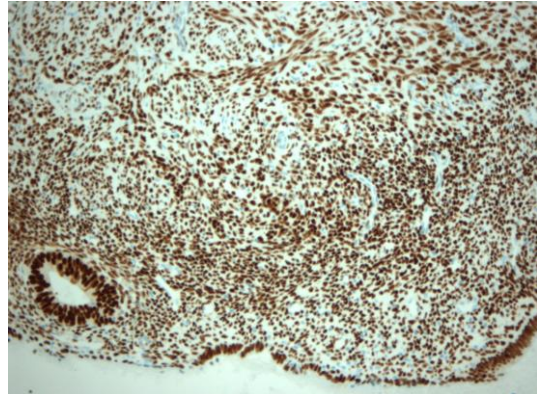
3.4.2. Immunohistochemische kleuringen

3.4.2.1. Uterus/adnex

A



B

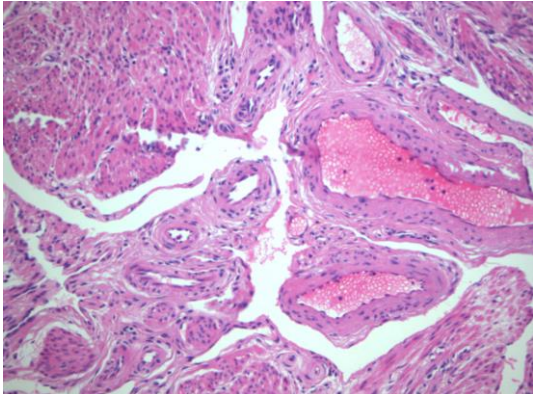


Figuur 56: Uteruswand met bloedvat, A: HE-kleuring (20x10)

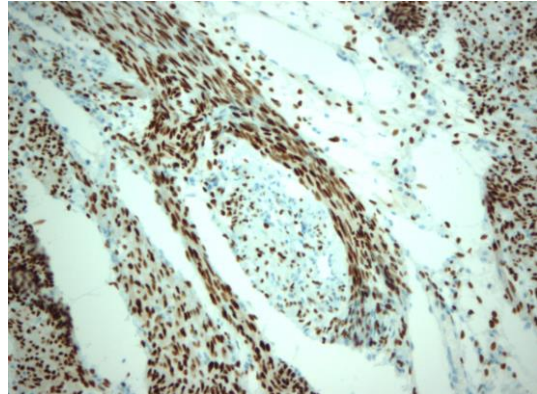
Figuur 57: Endometrium, B: ER-kleuring (10x10)

3.4.2.2. Uterus

A



B

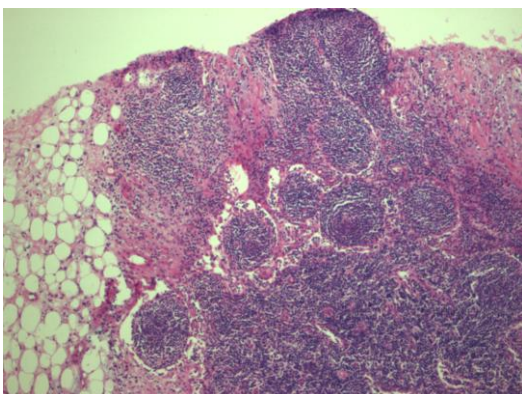


Figuur 58: Myometrium, A: HE-kleuring (20x10)

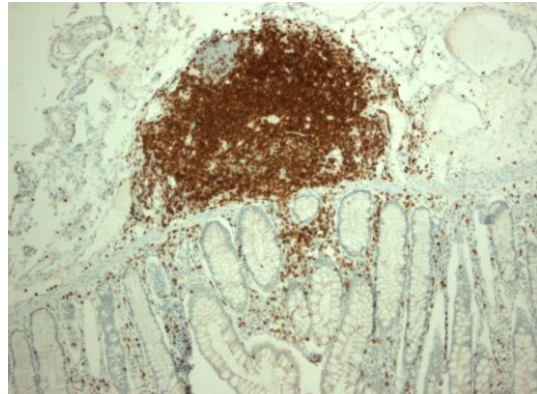
Figuur 59: Endometrium stroma, B: PR-kleuring (20x10)

3.4.2.3. Darm

A

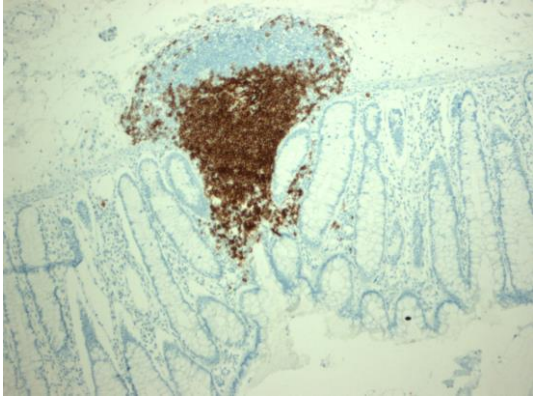
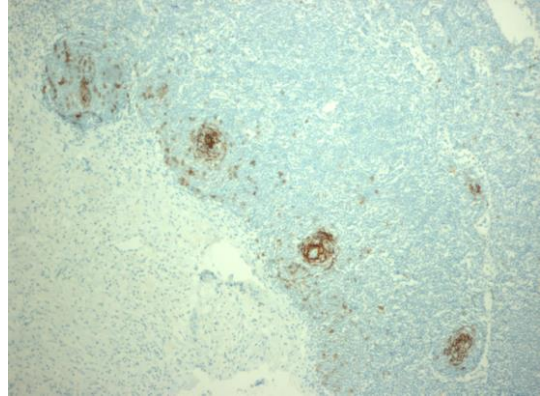


B

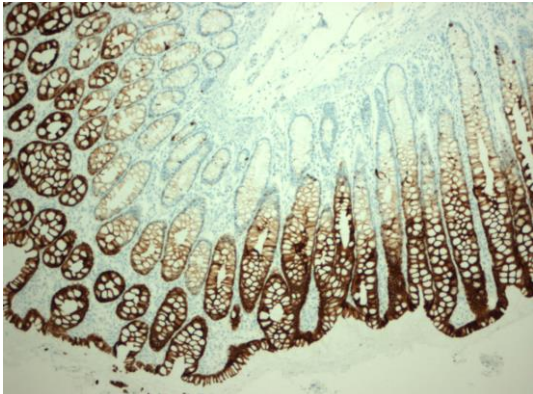


Figuur 60: Klier in darmwand, A: HE-kleuring (10x10)

Figuur 61: Darm, B: CD3-kleuring (20x10)

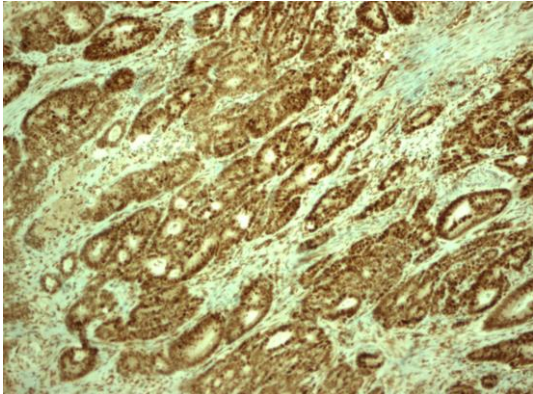
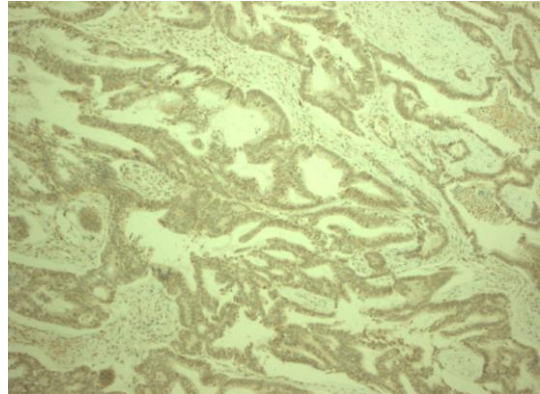
C**D**

Figuur 62: Darm, C: CD20-kleuring (10x10), C: CD23-kleuring (10x10)

E

Figuur 63: Darm, E: CK20-kleuring (10x10)

3.4.2.4. Twijfelachtige resultaten darm

A**B**

Figuur 64: Darm, A: positieve MSH2-kleuring Excelsior, B: negatieve MSH2-kleuring LOGOS

3.4.3. Resultaten run 5

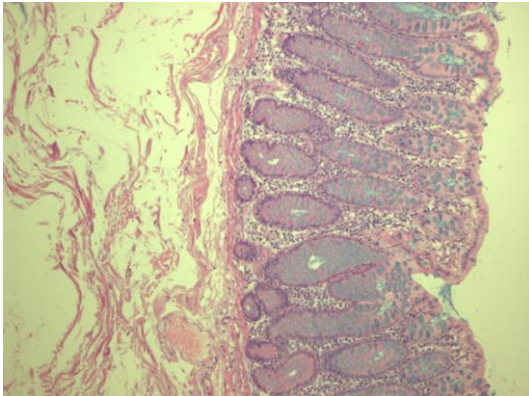
De vijfde en laatste run toont mooie resultaten voor zowel de routine als de histochemische kleuringen. Ook hier geven de HE-coupees een fellere kleur. De immunochemische kleuringen geven twijfelachtige resultaten waardoor er meer stalen getest moeten worden vooraleer hier een besluit uit getrokken kan worden. Dit moet zeker voor de farmacodiagnostische testen uitgevoerd worden. Voor de overschakeling naar finefix met de microgolfverwarming zou plaatsvinden, moeten er meer stalen getest en gevalideerd worden.

3.5. Vergelijking 4 methoden

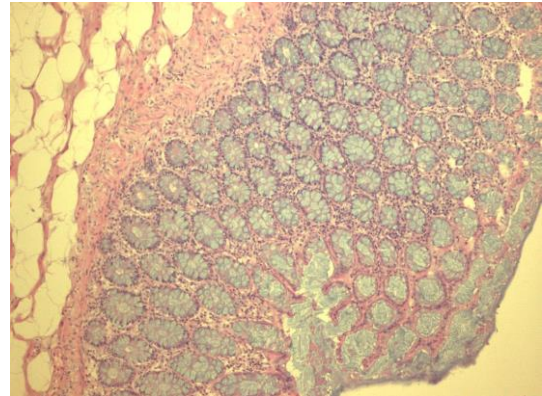
In de resultaten van dit eindwerk worden de 4 uitgevoerde fixatiemethoden vergeleken. Elke methode bant xyleen dat gebruikt wordt bij de dehydratatiestap. In run 1 wordt er gebruikt gemaakt van formol als fixatief en de conventionele verwarmingsmethode. In run 2 en 3 wordt er eveneens gebruik gemaakt van formol als fixatief, maar deze keer wordt een korte cyclus met microgolfverwarming gekozen. In de vierde run gaat finefix als fixatief gebruikt worden en wordt er verwarmd met de conventionele verwarmingsmethode. De vijfde en laatste run maakt eveneens gebruik van finefix, maar hier wordt voor een korte cyclus met microgolfverwarming gekozen.

3.5.1. Darm HE-kleuring

A

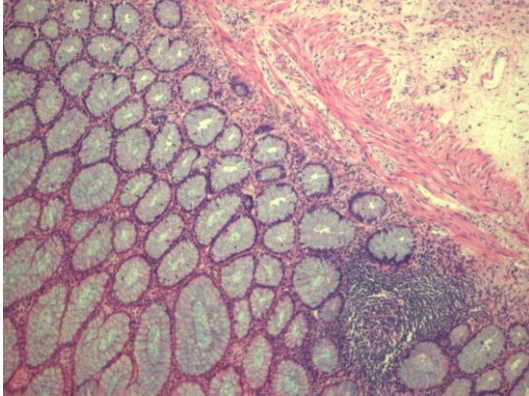


B

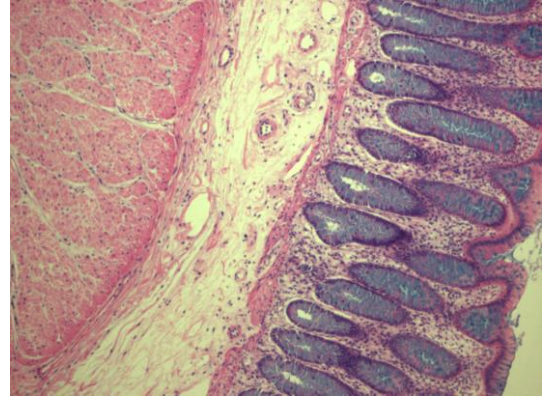


Figuur 65: Darm, A: run 1, B: run 2 en 3

C



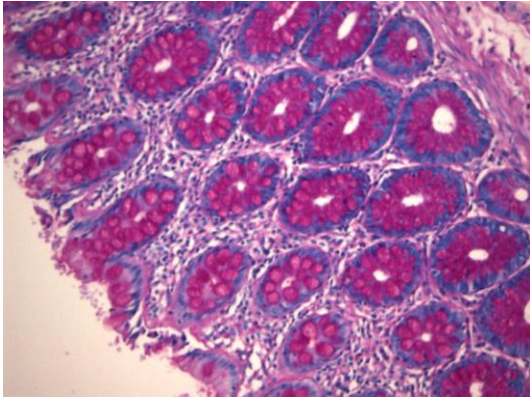
D



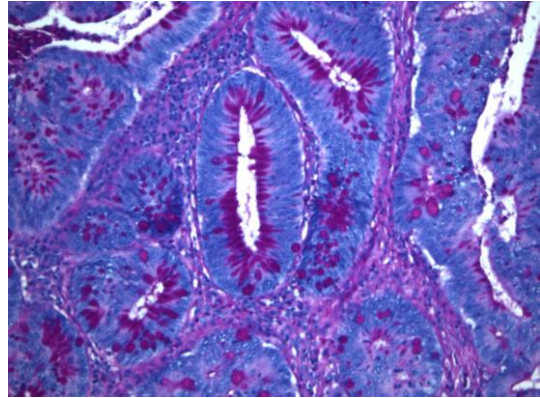
Figuur 66: Darm, C: run 4, D: run 5

3.5.2. Darm PAS-kleuring

A

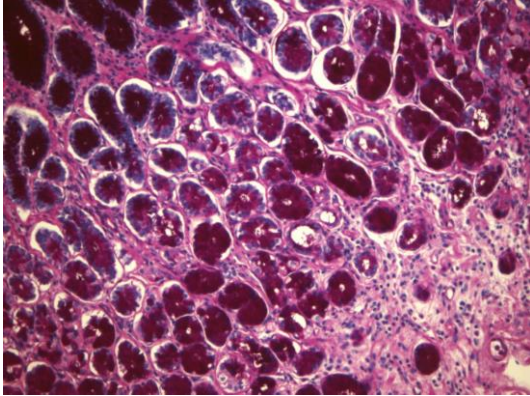


B

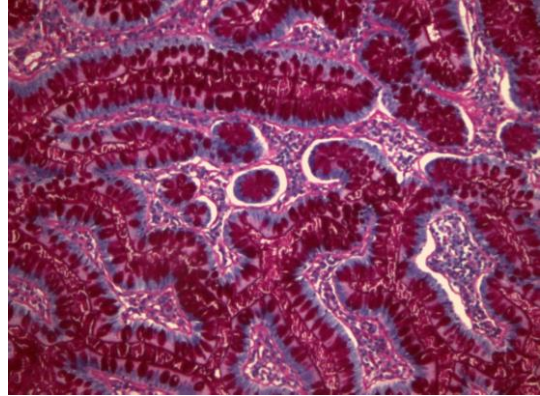


Figuur 67: Darm, A: run 1, B: run 2 en 3

C



D



Figuur 68: Darm, C: run 4, D: run 5

4. Besluit

Uit de resultaten kan besloten worden dat de LOGOS een bruikbaar toestel is in het labo anatomopathologie. De werking met formol als fixatief voldoet helemaal aan de verwachtingen. Ook de microgolffixatie overdag met formol leverde positieve resultaten op en is toepasbaar in het laboratorium, meer bepaald voor dringende stalen mits bijkomende validatietesten.

Het werken met finefix geeft ook bruikbare resultaten al is het beeld niet helemaal hetzelfde als met formol gefixeerd weefsel. Dit was te verwachten aangezien finefix een fixatief op basis van alcohol is en dus eerder een alcohol-gefixeerd beeld geeft. De HE-coupes geven een felle kleur maar zijn nog duidelijk interpreteerbaar. Hier zouden meer testen gedaan moeten worden voor de overnacht run als voor de microgolfmethode voor er kan besloten worden dat er zeer veel potentieel zit in de geteste methoden met de LOGOS. Het overschakelen naar dit toestel met finefix zal een arbeidsintensief proces zijn. Om de kwaliteit van farmacodiagnostische testen te garanderen moeten uitgebreide validatietesten uitgevoerd worden. Een bijkomend nadeel hiervan is dat finefix nog bereid moet worden.

Glossarium

Adhesie: vastgroeïing, vastkleving

Adnex: lichaamsdelen die bij de baarmoeder horen, zoals eileiders

Affiniteit: aantrekkingskracht voor

Anaplasie: verminderde kwaliteit van de celdeling en -groei, waardoor de structuur en de functie van de cellen verloren gaat

Apicaal: behorend tot de top

Appendix: blinde darm

B-lymfocyten: lymfocyten van de bursa-lijn

Carbohydraten: suikers

Carcinogeen: kankerverwekkend

CD: cluster of differentiation

Chromogeen: kleurstofvormer

Coagulatie: samenklontering

Colon: dikke darm

Corrosief: bijtend

Coupe: dun weefselschijfje dat bekomen wordt na het snijden van paraffineblokjes met de microtoom

Crosslinking: verbinding

Cryopreservatie: bij zeer koude temperatuur bewaren

Dehydrateren: onttrekken van water uit het weefsel

Denaturatie: structuurverlies van eiwitten

Deparaffineren: oplossen van paraffine

Diffunderen: procedé waarbij deeltjes zich mengen en zich verplaatsen van een gebied met een hogere concentratie naar een gebied met een lagere concentratie

Duodenum: dunne darm

Endometrium: slijmvlies van de baarmoeder

Epitoot: deel van een macromolecuul dat herkend kan worden door antilichamen

Fixeren: zorgen dat het weefsel in een staat blijft die zo dicht mogelijk bij deze in het lichaam aansluit

Fosfolipiden: vet dat bestaat uit een fosfaatgroep, een glycerolgroep, een stikstof bevattende alcoholgroep en een vetzuurgroep

Gastrointestinaal: met betrekking tot het maag-darmkanaal

Gesensibiliseerd: gevoelig gemaakt voor

Gestratificeerd: uit verschillende “straten” bestaande

HE-kleuring: haematoxyline eosine kleuring

Histochemische kleuringen: kleuring op basis van de histochemische eigenschappen

Homeobox: DNA-sequentie die in bepaalde genen wordt gevonden

Hydrofiel: waterlievend

Hydrofoob: watervrezend

Hydropisch: waterzuchtig

Hypertonisch: met verhoogde osmotische druk

Hypotonisch: met verlaagde osmotische druk

Immunohistochemische (IHC) kleuring: antigen-antilichaamreactie waarbij het antigen “iets” is waarmee histochemische eigenschappen aangeduid kunnen worden

Intermoleculair: tussen verschillende moleculen

Intestinaal: met betrekking tot de darm

Intramoleculair: binnen één molecule

Irreversibel: onomkeerbaar

Isotonisch: van gelijke osmotische druk als de omgeving

Koolhydraten: suikers

Lipiden: vetten

Maternaal: moederlijk

Mola: misvormd ongeboort kind, dat is ontwikkeld uit een eitje van de moeder waar geen of niet functionerende chromosomen aanwezig waren

Monohydraat: watermolecule bevattend

Myometrium: spierlaag in de baarmoeder

Nasopharynx: neus-keelholte achter het zachte verhemelte

Neoplastisch: gepaard gaand met nieuwvorming

Nucleotiden: bouwstenen van DNA en RNA

Osmolaliteit: concentratie van een oplossing weergegeven in aantal osmol per kg oplosmiddel

Osmotisch: door wederzijdse doordringing veroorzaakt

Ovarium: eierstok

PAS-kleuring: periodic acid Schiff kleuring

Paternaal: vaderlijk

Peptiden: ketens van aminozuren

Precipitatie: neerslaan

Probe: klein stukje DNA of RNA waarmee een specifiek DNA- of RNA-fragment herkend kan worden

Proteïnen: eiwitten

Pulmonaal: met betrekking op de longen

Reversibel: omkeerbaar

Solvent: oplosmiddel

Somatisch: met betrekking tot het lichaam

Testis: teelbal

T-lymfocyten: lymfocyten van de thymus-lijn

Tonsil: keelamandel

Trofoblast: het buitenste laagje cellen van het jonge embryo dat contact heeft met de baarmoederwand

Uterus: baarmoeder

Tabellenlijst

Tabel 1: Resultaten van de haematoxyline-eosinekleuring	20
Tabel 2: Resultaten van de α -PAS kleuring	21
Tabel 3: Resultaten van de PAS kleuring	21
Tabel 4: Resultaten van de trichroomkleuring	22
Tabel 5: Resultaten van de reticulinekleuring	22
Tabel 6: Vergelijking reagentia Excelsior en LOGOS	40

Figurenlijst

Figuur 1: Structuurformule van formol.....	17
Figuur 2: Structuurformules van respectievelijk ortho-, metha- en paraxyleen.....	19
Figuur 3: Shandon Excelsior SE van Thermo Scientific	33
Figuur 4: Mandjes voor het Shandon Excelsior SE toestel.....	33
Figuur 5: Programma van het Shandon Excelsior SE toestel.....	34
Figuur 6: Opbouw van het reagensgedeelte van het Shandon Excelsior SE toestel	34
Figuur 7: Structuurformule van methanol.....	35
Figuur 8: Structuurformule van safranine.....	35
Figuur 9: LOGOS toestel (Milestone).....	37
Figuur 10: Mandjes voor het LOGOS toestel.....	37
Figuur 11: De reactiekamer en paraffinekamer van het LOGOS toestel	38
Figuur 12: Het reagensgedeelte van het LOGOS toestel	38
Figuur 13: Programma van het LOGOS toestel.....	38
Figuur 14: Structuurformule van ethanol.....	39
Figuur 15: Structuurformule van isopropanol.....	39
Figuur 16: Structuurformule van erythrosine.....	40
Figuur 17: Rectum, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10)	44
Figuur 18: Galblaas, A: HE-kleuring (10x10), B: trichroom-kleuring (10x10).....	44
Figuur 19: Ovarium, A: HE-kleuring (20x10), B: reticuline-kleuring (20x10).....	45
Figuur 20: Rectum, A: HE-kleuring (20x10), B: CK cam 5.2 kleuring (20x10).....	45
Figuur 21: Rectum, C: desmine-kleuring (10x10)	45
Figuur 22: Rectumpoliep, D: KI-67-kleuring (20x10).....	45
Figuur 23: Nier, A: HE-kleuring (20x10), B: CK7-kleuring (20x10)	46
Figuur 24: Colon, A: HE-kleuring (20x10), B: ASMA-kleuring (20x10)	46
Figuur 25: Curettage, A: HE-kleuring (20x10), B: p57kip2-kleuring (10x10)	46
Figuur 26: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: CK20-kleuring (20x10)	47
Figuur 27: Huidcyste, A: HE-kleuring (10x10), B: CK5/6-kleuring (10x10).....	47
Figuur 28: Huidcyste, C: CK14-kleuring (10x10)	47
Figuur 29: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10).....	48
Figuur 30: Haarnestcyste, A: HE-kleuring (20x10), B: trichroom-kleuring (20x10).....	48
Figuur 31: Tonsil, A: HE-kleuring (20x10), B: reticuline-kleuring (20x10).....	48
Figuur 32: Placenta, A: HE-kleuring (20x10), B: β HCG-kleuring (20x10).....	49
Figuur 33: Placenta, C: PLAP-kleuring (20x10)	49
Figuur 34: Darm, A: HE-kleuring (10x10), B: CD3-kleuring (10x10).....	49
Figuur 35: Darm, C: CD20-kleuring (10x10), D: CD23-kleuring (10x10)	50
Figuur 36: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: KI-67-kleuring (20x10)	50
Figuur 37: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: chromogranine-kleuring (20x10).....	50
Figuur 38: Prostaatcarcinoom, A: HE-kleuring (20x10), B: AMACR-kleuring (20x10).....	51
Figuur 39: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: CDX2-kleuring (20x10)	51
Figuur 40: Schildklier, A: HE-kleuring (20x10), B: TTF1-kleuring (20x10).....	51
Figuur 41: Tonsil, A: HE-kleuring (20x10), B: EMA-kleuring (20x10)	52
Figuur 42: Tonsil, C: CK cam 5.2-kleuring (20x10).....	52
Figuur 43: Curettage, A: HE-kleuring (10x10), B: p57kip2 (10x10)	52
Figuur 44: Maagfundus, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10).....	53
Figuur 45: Pancreas, A: HE-kleuring (10x10), B: trichroom-kleuring (10x10).....	53
Figuur 46: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: reticuline-kleuring (20x10).....	53
Figuur 47: Onderhuid, A: HE-kleuring (20x10), B: α -PAS-kleuring (20x10)	54
Figuur 48: Maagfundus, A: HE-kleuring (20x10), B: CK cam 5.2-kleuring (20x10)	54
Figuur 49: Maagfundus, C: chromogranine-kleuring (20x10)	54
Figuur 50: Pancreas, A: HE-kleuring (10x10), B: synaptofysine-kleuring (20x10).....	55
Figuur 51: Pancreas met klier, C: CD3-kleuring (10x10), D: CD20-kleuring (10x10)	55
Figuur 52: Pancreas met klier, E: CD23-kleuring (10x10)	55
Figuur 53: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: PAS-kleuring (20x10).....	56
Figuur 54: Darm, C: reticuline-kleuring (20x10)	56
Figuur 55: Darm, A: HE-kleuring (20x10), B: trichroom-kleuring (20x10).....	56
Figuur 56: Uteruswand met bloedvat, A: HE-kleuring (20x10).....	57
Figuur 57: Endometrium, B: ER-kleuring (10x10)	57

Figuur 58: Myometrium, A: HE-kleuring (20x10).....	57
Figuur 59: Endometrium stroma, B: PR-kleuring (20x10)	57
Figuur 60: Klier in darmwand, A: HE-kleuring (10x10).....	57
Figuur 61: Darm, B: CD3-kleuring (20x10).....	57
Figuur 62: Darm, C: CD20-kleuring (10x10), C: CD23-kleuring (10x10)	58
Figuur 63: Darm, E: CK20-kleuring (10x10).....	58
Figuur 64: Darm, A: positieve MSH2-kleuring Excelsior, B: negatieve MSH2-kleuring LOGOS	58
Figuur 65: Darm, A: run 1, B: run 2 en 3	59
Figuur 66: Darm, C: run 4, D: run 5.....	59
Figuur 67: Darm, A: run 1, B: run 2 en 3	60
Figuur 68: Darm, C: run 4, D: run 5.....	60

Bibliografie

<http://www.abcam.com/alpha-smooth-muscle-actin-antibody-ab5694.html>

Bishop, P. (2012). *An immunohistochemical vade mecum*. http://e-immunohistochemistry.info/web/histopathology_help.htm

Boon, M.E. en Kok, L.P., *Microwave cookbook of Pathology*. Leiden: Coulomb press Leyden. p. 15-18

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ethanol_flat_structure.png

Ellis, R. *Gomori's Trichrome Staining Protocol for Connective Tissues*. http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/gomori's_trichrome_ellis.htm

Ellis, R. *Gordon & Sweet's Staining Protocol for Reticulin*. https://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/gordon_sweet's_ellis.htm

Ellis, R. *Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining Protocol*. http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/h&e_ellis.htm

Ellis, R. *PAS Diastase Staining Protocol*. http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/pas_diastase_ellis.htm

<http://en.wikipedia.org/wiki/Safranin>

Handleiding LOGOS

http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/pas.htm

Infoland Mariaziekenhuis

Informatiebrochure finexif

Informatiebrochure ultraclear

Jaspers, N.J.G. en Leenen, P.J.M., *CBG ATLAS hoofdstuk 1 - Microscopische Beeldvorming: histologische kleuringen*. http://coo.erasmusmc.nl/genetica/Atlas_Microscopie/1-2-2.htm

Kandyala, Raghavendra en Rajasekharan. *Xylene: an overview of its health hazards and preventive measures*. J. Oral Maxillofac. Pathol. 2010, 14: 1-5.

http://www.klinipath.nl/uploads/catalogus/product/4078_Formaldehyde_solution_4__NL_2012_KP_3.pdf

<http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/novocastra-reagents/primary-antibodies/details/product/alpha-methylacyl-coa-racemase-amacr-p504s/>

Leong, A., *Microwave applications in pathology*. New York: Nova Science Publishers. p. 5-7
http://www.medialabinc.net/spg572641/tissue_dehydration.aspx

http://www.merckmillipore.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-BE-Site/en_US/-/EUR/ViewPDF-Print.pdf?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=zyOb.s1LZb0AAA EWZuEfVhTI&ProductUUID=VScb.s1OZEkAAAEZI05yvM8Z&PortalCatalogUUID=t02b.s1LX0MAAAEWc9UfVhTI

<http://nl.wikipedia.org/wiki/Erythrosine>

<http://nl.wikipedia.org/wiki/Xyleen>

<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=4496&showAllSites=true>

Rolls, G. (2012)a. *Fixation and Fixatives (1) – The Process of Fixation and the Nature of Fixatives*. <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/>

Rolls, G. (2012b). *Fixation and Fixatives (2) – Factors influencing chemical fixation, formaldehyde and glutaraldehyde*. <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-2-factors-influencing-chemical-fixation-formaldehyde-and-glutaraldehyde/>

Rolls, G. (2012c). *Fixation and Fixatives (5) – Practical procedures to optimise quality, the effects of heat and microwaves*. <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-5-practical-procedures-to-optimise-quality-the-effects-of-heat-and-microwaves/>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/31031?lang=en®ion=BE>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/322415?lang=en®ion=BE>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/534056?lang=en®ion=BE>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/34923?lang=en®ion=BE>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w292907?lang=en®ion=BE>

<http://skinpathonline.wordpress.com/2011/05/23/periodic-acid-schiff-pas-special-stain-method-and-tips/>

Thermo Scientific, *Shandon Excelsior ES® Operator Guide – English*, 2006, <http://www.hospitecnica.com.mx/productos/patologia/pdf/EXCELSIOR.pdf>

<http://tpe-cancer-poumon-traitements-pss-1ere-s.e-monsite.com/pages/presentation-du-cancer-du-poumon/attitude-a-risque.html>

http://tvmouse.ucdavis.edu/bcancercd/52/prcl_trichrome.html

<http://www.ventana.com/product/9?type=4>

<http://www.ventana.com/product/30?type=25>

<http://www.ventana.com/product/36?type=31>

<http://www.ventana.com/product/39?type=34>

<http://www.ventana.com/product/59?type=54>

<http://www.ventana.com/product/60?type=55>

<http://www.ventana.com/product/71?type=66>

<http://www.ventana.com/product/76?type=71>

<http://www.ventana.com/product/77?type=72>

<http://www.ventana.com/product/81?type=76>

<http://www.ventana.com/product/83?type=78>

<http://www.ventana.com/product/109?type=103>

<http://www.ventana.com/product/111?type=105>
<http://www.ventana.com/product/114?type=108>
<http://www.ventana.com/product/126?type=120>
<http://www.ventana.com/product/147?type=141>
<http://www.ventana.com/product/155?type=149>
<http://www.ventana.com/product/161?type=155>
<http://www.ventana.com/product/1543?type=2003>
<http://www.ventana.com/product/1544?type=2004>
<http://www.ventana.com/product/1562?type=2025>
<http://www.ventana.com/product/1596?type=2061>
<http://www.ventana.com/product/1665?type=2133>
<http://www.ventana.com/product/1674?type=2142>
<http://wiki.aquatribu.com/Cat%C3%A9gorie:Formald%C3%A9hyde>

Bijlage 1: uitgevoerde testen

Run 1

Nummer	Weefsel	Kleuring
B/11401984A	Rectum	HE
B/11401984B	Rectum	HE
		PAS
B/11401984C	Rectum	HE
		CK cam 5.2
		Desmine
		KI67
B/11402028A	Nier	HE
		CK7
B/11402028B	Nier	HE
		Reticuline
B/11402030A	Omentum	HE
B/11402030B	Ovarium	HE
		Reticuline
B/11402030C	Colon	HE
		ASMA
B/11402063A	Curretage	HE
		P57KIP2
B/11402070A	Galblaas	HE
		Desmine
B/11402070B	Galblaas	HE
B/11402070C	Galblaas	HE
		Trichroom
B/11402095A	Huid met cyste	HE
		Trichroom
B/11402096A	Darmpoliep	HE
B/11402096B	Darmpoliep	HE
B/11402096C	Darmpoliep	HE
		CK20
B/11402104A	Appendix	HE
B/11402104B	Appendix	HE
		PAS
B/11402166A	Lipoom	HE
E/61400346A	Huid met cyste	HE
		CK5/6
		CK14
R/71400440A	Huid met poliep	HE

Run 2 en 3

Nummer	Weefsel	Kleuring
B/11402167A	Vliezen/navelstreng	HE
		PAS
B/11402167B	Placenta	HE
B/11402167C	Placenta	HE
B/11402167D	Placenta	HE
		β HCG
		PLAP
B/11402169A	Darm	HE
B/11402169B	Darm	HE
B/11402169C	Darm	HE
B/11402169D	Darm	HE
		CD3
		CD20
		CD23
B/11402170A	Appendix	HE
B/11402179A	Haarnetcyste	HE
		Trichroom
B/11402204A	Darm	HE
B/11402204B	Darm	HE
		KI67
B/11402204C	Darm	HE
B/11402204D	Darm	HE
		Chromogranine
B/11402205A	Prostaat	HE
		AMACR
B/11402205B	Prostaat	HE
B/11402209A	Galblaas	HE
B/11402213A	Darm	HE
		CDX2
B/11402213B	Darm	HE
		Trichroom
B/11402213C	Darm	HE
B/11402213D	Darm	HE
B/11402215A	Schildklier	HE
		TTF1
B/11402215B	Schildklier	HE
B/11402215C	Schildklier	HE
B/11402217A	Prostaat	HE
B/11402217B	Prostaat	HE
		Reticuline
B/11402218A	Tonsil	HE
		EMA
		CK cam 5.2
B/11402218B	Tonsil	HE
B/11402240A	Darm	HE
B/11402240B	Darm	HE
B/11402240C	Darm	HE
		PAS
B/11402240D	Darm	HE
B/11402242A	Tonsil	HE
		Reticuline

Nummer	Weefsel	Kleuring
B/11402242B	Tonsil	HE
B/11402245A	Tonsil	HE
B/11402245B	Tonsil	HE
B/11402248A	Huid met cyste	HE
B/11402249A	Placenta	HE
B/11402249B	Placenta	HE
B/11402251A	Curretage	HE
		βHCG
		P57KIP2
B/11402251B	Curretage	HE
B/11402253A	Galblaas	HE
B/11402253B	Huid	HE
B/11402255A	Tonsil	HE
B/11402255B	Tonsil	HE
B/11402256A	Peritoneum of Adnex	HE
B/11402257A	Ovariumcyste	HE
B/11402259A	Huid met cyste	HE
B/11402259B	Huid met cyste	HE
B/11402260A	Schildklier	HE
B/11402260B	Schildklier	HE
B/11402260C	Schildklier	HE
B/11402284A	Curretage	HE
B/11402284B	Curretage	HE
B/11402285A	Uterus	HE
B/11402285B	Uterus	HE
B/11402286A	Testis	HE
B/11402286B	Testis	HE
B/11402305A	Huid	HE
B/11402309A	Prostaat	HE
B/11402309B	Prostaat	HE
B/11402318A	Appendix	HE
B/11402320A	Appendix	HE
B/11402324A	Uterus met adnexen	HE
B/11402324B	Uterus met adnexen	HE
B/11402326A	Milt	HE
B/11402326B	Milt	HE
B/11402326C	Pancreas	HE
B/11402326D	Pancreas	HE
B/11402355A	Galblaas	HE
B/11402355B	Galblaas	HE
B/11402356A	Appendix	HE
B/11402356B	Appendix	HE
B/11402360A	Huidje met cyste	HE
B/11402367A	Galblaas	HE
B/11402367B	Galblaas	HE
B/11402367C	Galblaas	HE
E/61400389A	Lipoom	HE
R/71400485A	Cyste	HE

Run 4

Nummer	Weefsel	Kleuring
B/11402443A	Huid neus	HE
		Trichroom
B/11402444A	Huid carcinoom	HE
		PAS
		α -PAS
B/11402477C	Adnex	HE
B/11402509A	Plaveiselcelcarcinoom	HE
		Reticuline
B/11402522A	Maag fundus	HE
		CK cam 5.2
		Chromogranine
		Synaptofysine
B/11402522B	Maag fundus	HE
		PAS
B/11402522C	Duodenum	HE
B/11402522D	Pancreas	HE
B/11402522E	Pancreas	HE
		Trichroom
		CD3
		CD20
		CD23
		Chromogranine
		Synaptofysine
B/11402551A	Darm	HE
B/11402551B	Darm	HE
		Reticuline

Run 5

Nummer	Weefsel	Kleuring
B/11402551C	Darm	HE
		Trichroom
B/11402556A	Darm/poliep	HE
B/11402556B	Darm/poliep	HE
		Reticuline
		PAS
B/11402556C	Darm/poliep	HE
B/11402671A	Uterus	HE
		ER
		Inhibine
B/11402671B	Uterus	HE
		ER
		PR
B/11402671C	Uterus	HE
B/11402671D	Uterus	HE
		Reticuline
		ER
B/11402728A	Darm	HE
B/11402728B	Darm	HE
B/11402728C	Darm	HE
		S100
B/11402728D	Darm	HE
		CD3
		CD20
		CD23
		CK7
		CK20
		MSH2
B/11402799A	Uterus/adnex	HE
		PAS
		Trichroom
B/11402799B	Uterus/adnex	HE
		ER
		Inhibine

Bijlage 2: brochure LOGOS

