



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ
ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ ΣΕ ΦΟΡΜΟΛΗ ΣΤΙΣ
ΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ**

ΜΑΝΤΕΛΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ
ΜΠΟΥΜΠΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ – ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατά τη διάρκεια της μελέτης και της συγγραφής, της διπλωματικής εργασίας μου, συνέβαλαν καθοριστικό ρόλο πάρα πολλοί άνθρωποι, διάφορες συνθήκες και παράγοντες, που με βοήθησαν να διεκπεραιώσω τη διπλωματική εργασία μου.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, την κ. Μπούμπα Βασιλική, καθηγήτρια Ιατροδικαστικής – Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον ευχαριστώ από καρδιάς την κ. Μπούμπα για την απεριόριστη κατανόηση που μου έδειξε, την πολύτιμη βοήθεια της, καθώς και την μεγάλη προθυμία της να με βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειάστηκα. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη κ. Γούσια Άννα, διευθύντρια του τμήματος μου, και το κ. Ορφανίδη Αμβρόσιο, για την συμβολή τους στην τριμελή επιτροπή.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Bumci Redi ειδικευόμενο ιατρό του εργαστηρίου μου (παθολογοανατομικό εργαστήριο του ΠΓΝ Ιωαννίνων), για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε σε επιστημονικό αλλά και σε οργανωτικό επίπεδο. Ευχαριστώ θερμά επίσης, την ειδικευόμενη ιατρό του τμήματος μου κ. Τραγάνη Ιουλία για τη συνεισφορά της σε βιβλιογραφικό υλικό.

Επιπρόσθετα, οφείλω να ευχαριστήσω για την κατανόηση και τη στήριξη που μου έδειξαν, τους συναδέλφους μου στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του ΠΓΝ Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην αδελφική μου φίλη Κατερίνα και στη συμφοιτήτρια μου Ανδρομάχη για την έμπρακτη και ουσιαστική υποστήριξη και βοήθεια που μου παρείχαν όλους αυτούς τους μήνες.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου και ιδιαίτερος τα παιδιά μου για την απεριόριστη κατανόηση, υπομονή και στήριξη που μου παρείχαν.

«Η ευγνωμοσύνη είναι το σημάδι μιας ψυχής που θυμάται τις ευεργεσίες που έχει δεχτεί...»

*Αφιερώνω αυτή τη διπλωματική εργασία μου στα παιδιά μου...
Θάνο και Δήμητρα.. σας ευχαριστώ για όλα!*

*Στο παππού μου και στη γιαγιά μου,
που δεν είναι πια εδώ,
που τόσο θα ήθελαν,
για να μοιραστούν αυτή τη στιγμή...*

Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1. ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	8
2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ	10
3. ΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	14
3.1 ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ, FFPE(FORMALIN-FIXED-PARAFFIN-EMBEDDED) ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΧΡΩΣΗ.....	14
4. ΕΙΔΙΚΑ ΘΕΜΑΤΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ	15
4.1 ΤΥΠΟΙ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	17
5. Η ΦΟΡΜΟΛΗ ΩΣ ΚΛΑΣΙΚΟ ΜΕΣΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΣΤΩΝ	20
5.1 ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΙΣΤΩΝ ΦΟΡΜΑΛΔΕΪΔΗΣ.....	21
5.1.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	22
5.2 ΕΙΔΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	25
5.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΙΣΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ.....	26
5.4 ΣΥΝΗΘΕΙΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΗΣ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	27
5.5 ΤΥΠΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	30
5.6 ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΙΣΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (ARTIFACTS).....	31
6. ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ ΣΕ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ	38
6.1 ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ.....	42
6.1.1 ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ.....	42
6.1.2 ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΜΕ ΕΠΑΓΩΓΗ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ.....	42
6.1.3 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΠΕΨΗ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	42
6.1.4 ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΣΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ.....	43
6.1.5 ΒΕΛΤΙΣΤΗ ΑΡΑΙΩΣΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ.....	44
6.1.6 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΙΣΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	45
7. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΣΕ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ	48
7.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA.....	48
7.2 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΕ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	50
7.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ DNA.....	52
7.4 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ DNA ΣΕ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	55
7.5 ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΙΣΤΟ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΕ ΦΟΡΜΟΛΗ ΚΑΙ ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ HANSPAL.....	56
8. ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΙΣ ΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ	61
9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ ΣΤΗ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ	63
9.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΑΡΙΧΕΥΣΗΣ Ή ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΤΕΡΕΩΣΗΣ.....	63
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	66

Εισαγωγή

Η εφαρμογή της ιστοπαθολογίας στις Ιατροδικαστικές Επιστήμες αποτελεί έναν ολοκληρωμένο πόρο που καλύπτει θεμελιώδεις γνώσεις και δεξιότητες, καθώς και βασικές τεχνικές διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την αποτελεσματική εφαρμογή τους. Οι πολλές επιστημονικές εξελίξεις, η συνεχής και εκτεταμένη συνεργασία μεταξύ των παγκόσμιων εταιρειών δικαστικής τοξικολογίας και ιατροδικαστικής, καθώς και οι νέες κανονιστικές οδηγίες που έχουν προκύψει έκτοτε, δείχνουν την αξία της συνεργασίας των επαγγελματιών των Δικαστικών επιστημών.

Πρώτον, οι τοξικολόγοι και οι ιατροδικαστές είναι συνήθως εξειδικευμένοι, κυρίως στη βιοχημεία και ανοσολογία του ανθρώπου. Ως εκ τούτου, μπορούν να συναρμολογήσουν μια σύνθετη εικόνα που ενσωματώνει τόσο λειτουργικά όσο και μορφολογικά δεδομένα για να προσδιορίσουν την ατομική υγεία ενός ατόμου ή τη συλλογική ευαλωτότητα μιας ομάδας θεραπείας μετά από έκθεση σε διάφορα παθογόνα ερεθίσματα.

Δεύτερον, οι τοξικολόγοι κυρίως αλλά και οι ιατροδικαστές είναι άρτια καταρτισμένοι στις αρχές της εργαστηριακής ιατρικής που περιλαμβάνουν μια σειρά από εργαλεία και πρωτόκολλα διαδικασιών.

Αυτή η εκπαίδευση τους καθιστά επαρκείς στην αξιολόγηση πειραματικών δεδομένων για τον εντοπισμό κινδύνων, την αξιολόγηση της ασφάλειας και τη διαχείριση πιθανών κινδύνων.

Τρίτον, οι τοξικολόγοι και οι ιατροδικαστές συνεργάζονται με επιστήμονες που είναι ειδικοί σε άλλους κλάδους των βιοεπιστημών.

Η Δικαστική τοξικολογία και η δικαστική παθολογική ανατομία ενσωματώνουν τους κλάδους της ιατρικής, της παθολογικής ανατομίας και της τοξικολογίας, τη μελέτη της δυναμικής βάσης της υγείας, της ασθένειας και του θανάτου. Οι παθολογοανατόμοι αξιολογούν τις αλλαγές που παράγονται σε κύτταρα, ιστούς, όργανα ή σωματικά υγρά ως απάντηση σε «μείζονες προκλήσεις», είτε αυτές προκύπτουν εσωτερικά (π.χ., ανοσολογικά διαμεσολαβούμενη, μεταβολική ή νεοπλασματική αιτία) είτε εξωτερικά (π.χ., μολυσματικός, φυσικός ή τοξικός παράγοντας). Όπως και με άλλες αιτιολογίες, οι περισσότερες ασθένειες αφήνουν σημαντικές «υπογραφές» στα κύτταρα, τα υγρά και τους ιστούς.

Από την άλλη πλευρά, οι ιατροδικαστικές επιστήμες επικεντρώνονται στη βιοχημική βάση και τον μεταβολισμό προϊόντων με γνωστό ή άγνωστο παθολογενετικό δυναμικό. Ενώ βασίζονται στην ιατρική, η τοξικολογία και η ιατροδικαστική απαιτούν επίσης εξοικείωση με άλλους σχετικούς κλάδους, όπως η μοριακή βιολογία, οι εργαστηριακές τεχνικές και η στατιστική.

Γεννημένη από την ανάγκη για δικαιοσύνη, η νομική ιατρική έπρεπε να προσαρμοστεί σε μια διαδοχή επιστημονικών, τεχνολογικών, κοινωνικοπολιτισμικών και νομικών πλαισίων σε όλη την ιστορία. Ως κλάδος της επιστήμης, βρίσκεται σε συνεχή εξέλιξη και, ως εκ τούτου, έχει αποδειχθεί πηγή έμπνευσης και αλλαγής για το δίκαιο, ενθαρρύνοντας βελτιώσεις, τροποποιήσεις και νομοθετικές καινοτομίες.

Η εξειδικευμένη ιατροδικαστική εργασία περιλαμβάνει την εμβάθυνση σε μυστήρια του αγνώστου, την επίλυση των αινιγμάτων της ύπαρξης και την αναζήτηση απαντήσεων για τα μεγάλα (και μικρά) ερωτήματα της ζωής. Αφορά επίσης την προσθήκη στην πραγματικότητα, την επανεφεύρεση του κόσμου που έχουμε κληρονομήσει.

Η νομική ιατρική έχει μια αποστολή που δεν είναι καθόλου εύκολη, μια αποστολή που ήταν πάντα (και θα είναι πάντα) θεμελιώδης για την ορθή εφαρμογή της δικαιοσύνης. Από αυτήν εξαρτώνται η τιμή και η ελευθερία των ανθρώπων. Η νομική ιατρική μας φέρνει σε επαφή με ανθρώπους που κουβαλούν μαζί τους τα τραύματα μιας ζωής που χτυπήθηκε από ατυχία, ανθρώπους που μερικές φορές έχουν τη μυρωδιά του θανάτου ποτισμένη στο δέρμα τους. Η νομική ιατρική είναι ένας τομέας σπουδών γεμάτος αμφιβολίες, αβεβαιότητες, αγωνία και εφιάλτες. Ωστόσο, σε συνδυασμό με αυτό, υπάρχουν και στιγμές μεγάλης εκπλήρωσης, έντονης επαγγελματικής και προσωπικής συνειδητοποίησης - καθώς πρόκειται για μια δραστηριότητα που αναμφισβήτητα βοηθά τους άλλους. Όλοι όσοι την ασκούν έχουν σίγουρα εμπειρίες με ανθρώπους και καταστάσεις που έχουν εμπλουτίσει βαθιά τη ζωή τους από ανθρώπινη και πνευματική άποψη.

Καθώς η νομική ιατρική είναι θεμελιώδης για την ορθή εφαρμογή της δικαιοσύνης, μπορεί να επιτύχει το υψηλότερο επίπεδο της μόνο με τη συνεργασία άκρως εξειδικευμένων νομικών ιατρικών τμημάτων που πάλλονται με τον ρυθμό της ζωής και είναι σε αρμονία με τις δικαστικές απαιτήσεις. Χωρίς καλή νομική ιατρική δεν μπορεί ποτέ να υπάρξει καλή δικαιοσύνη. Διότι αυτός είναι ο μόνος τομέας γνώσης που μπορεί πραγματικά να ρίξει φως σε καταστάσεις τόσο ποικίλες και πολύπλοκες όσο η σεξουαλική κακοποίηση, το σωματικό και ψυχολογικό τραύμα, η επίδραση τοξικών ουσιών, η ταυτότητα και η συγγένεια, ο θάνατος από φόνο, η αυτοκτονία και το ατύχημα, κ.λ.π. Η εξαιρετική πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια σε πολλούς τομείς της νομικής ιατρικής έχει αποφέρει ολοένα και πιο σημαντικά αποτελέσματα, επιτρέποντας στο δικαστικό σύστημα να γίνει ταχύτερο και πιο αποτελεσματικό και να εκδίδει αποφάσεις που είναι πιο κατάλληλες και επιστημονικά τεκμηριωμένες. Ως επιστήμη σε συνεχή εξέλιξη, η νομική ιατρική απαιτεί συνεχή επαφή με τις τελευταίες νομικές, επιστημονικές, τεχνολογικές και δικαστικές εξελίξεις, καθώς και προώθηση της συζήτησης μεταξύ των επαγγελματιών της, προκειμένου να επιλύσει κοινά προβλήματα, να μοιραστεί εμπειρίες και γνώσεις, να εναρμονίσει τη μεθοδολογία και να συγκρίνει τα αποτελέσματα.

Παρόλο που η νομική ιατρική έχει επιτύχει πολλά τις τελευταίες δεκαετίες, υπάρχει ακόμη πολύς δρόμος μπροστά μας. Ο δρόμος που ανοίγεται μπροστά μας δεν θα τελειώσει ποτέ, επειδή θα απαιτεί συνεχείς προσαρμογές και βελτιώσεις, αλλάζοντας αλλά παραμένοντας πάντα ο ίδιος. Όσοι τον διανύουν θα πρέπει να ακολουθήσουν την πορεία του. Τα βιβλία είναι απαραίτητα για αυτό αποτελούν το κινκίδωμα στην σκάλα, την συνεχή επαγγελματική κατάρτιση που ο καθένας ακολουθεί σε όλη του τη ζωή προσφέροντας ένα μέσο για την ανταλλαγή ιδεών, για την απόκτηση και εδραίωση γνώσεων και δεξιοτήτων, για την επαφή με διαφορετικές προοπτικές και πρόσφατες δογματικές, τεχνολογικές και επιστημονικές εξελίξεις και για την κατανόηση τόσο των δυνατοτήτων όσο και των περιορισμών της εξειδικευμένης δραστηριότητας, καθώς και των νέων προκλήσεων που εμφανίζονται συνεχώς.

Παρά την αδιάκοπη ροή δημοσιεύσεων που εξυμνούν την αξία της νεκροψίας, το ποσοστό νεκροψίας στα νοσοκομεία συνεχίζει να μειώνεται. Οι εκτιμήσεις, που δημοσιεύθηκαν τη δεκαετία του 1990, για το συνολικό ποσοστό νεκροψίας στις

Ηνωμένες Πολιτείες είναι μόλις 5%, με το ποσοστό στα ακαδημαϊκά ιδρύματα να εκτιμάται στο 11%. Σε αυτό συμβάλλουν διάφοροι παράγοντες. Ένας είναι η άποψη ότι η νεκροψία δεν θα αποκαλύψει πληροφορίες πέρα από αυτές που αποκτώνται από τις τρέχουσες εξελιγμένες απεικονιστικές μελέτες. Ένας άλλος είναι η ανησυχία των κλινικών γιατρών για τις επακόλουθες δικαστικές διαμάχες. Ένας πιο θεμελιώδης λόγος, ωστόσο, είναι η έλλειψη σθένους εκ μέρους του κλινικού γιατρού να ζητήσει άδεια από την οικογένεια. Ο γιατρός που παρακολουθεί τον θάνατο μπορεί να αποσπαστεί πολύ γρήγορα από άλλες ανταγωνιστικές ανησυχίες και ευθύνες ή πιο πιθανό, να μην είναι εξοικειωμένος με την οικογένεια του αποθανόντος. Αυτή η τελευταία κατάσταση είναι συχνή στα πανεπιστημιακά νοσοκομεία, όπου ένας υπάλληλος χωρίς προηγούμενη επαφή με τον ασθενή να παρακολουθεί τον θάνατο και αισθάνεται άβολα ζητώντας άδεια για νεκροψία. Παρά τα εμπόδια αυτά, ο συγγραφέας πιστεύει ότι κάθε ακαδημαϊκό νοσοκομείο πρέπει να καταβάλλει μια γνήσια και επίμονη προσπάθεια για να επιτύχει ποσοστό αυτοψίας στα νοσοκομεία τουλάχιστον 25%.

Επιπλέον, οι περισσότερες υπηρεσίες νεκροψίας στα νοσοκομεία συντάσσουν μια προκαταρκτική έκθεση. Αυτή η έκθεση των κύριων μακροσκοπικών ευρημάτων, κατά προτίμηση οργανωμένη παθογενετικά, θα πρέπει να διανέμεται εντός 24 ωρών από την αρχική νεκροψία. Οι ειδικευόμενοι θα πρέπει να εντυπωθούν στη σημασία της αποστολής αντιγράφων αυτής και της τελικής έκθεσης στον/στους παραπέμποντα/ους ιατρό/ούς του ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων από εξωτερικά νοσοκομεία.

Τέλος, ένας σύντομος χρόνος διεκπεραίωσης μεταξύ της αρχικής ανατομής και της διανομής, της τελικής έκθεσης νεκροψίας θα εκτιμηθεί επίσης πολύ από τους κλινικούς ιατρούς. Πολλοί κλινικοί ιατροί θεωρούν τις εκθέσεις νεκροψίας που λαμβάνονται μετά από ένα μήνα άχρηστες και άσχετες, καθώς έχουν ήδη συναντηθεί με την οικογένεια. Αυτές οι προσπάθειες για έγκαιρη επικοινωνία, η προθυμία επίδειξης των παθολογοανατομικών ευρημάτων στους κλινικούς ιατρούς, η παροχή μακροσκοπικών φωτογραφιών και η άμεση διανομή της τελικής έκθεσης, θα βοηθήσουν τους θεράποντες ιατρούς να κατανοήσουν την αξία της υπηρεσίας και να τους κάνουν πιο δεκτικούς στην αναζήτηση αδειών νεκροψίας στο μέλλον.

1. Δικαστική Ιστοπαθολογία

Η σημασία των μορφολογικών ερευνών στην απονομή της δικαιοσύνης επισημάνθηκε πριν από δύο δεκαετίες (*Janssen 1988*), όπως και η ανάγκη για κανόνες που διέπουν την εκτέλεση ιατροδικαστικών νεκροψιών, για τις οποίες έχουν έκτοτε καθοριστεί κατευθυντήριες γραμμές. Σκοπός της ιατροδικαστικής νεκροψίας είναι η αναγνώριση και η ταξινόμηση αφύσικων θανάτων και η διαπίστωση γεγονότων για περαιτέρω συμπεράσματα. Τις τελευταίες δεκαετίες, στα περισσότερα μέρη της Ευρώπης, οι εισαγγελείς έχουν αυξήσει το όριο για τη διενέργεια ιατροδικαστικής νεκροψίας και τα ποσοστά νεκροψίας έχουν μειωθεί. Ωστόσο, μια ιατροδικαστική νεκροψία μπορεί όχι μόνο να είναι απαραίτητη για την αναγνώριση και τη σωστή διερεύνηση ενός εγκλήματος, αλλά μπορεί επίσης να εντοπίσει, π.χ., μια γενετική διαταραχή και ως εκ τούτου, να βοηθήσει τους πάσχοντες συγγενείς (*Klitschar et al. 2009*).

Η ιατροδικαστική κοινότητα δεν έχει καταφέρει μέχρι σήμερα να συμφωνήσει σχετικά με την ανάγκη διενέργειας ιστολογικής εξέτασης κατά την ιατροδικαστική νεκροψία. Μερικοί συγγραφείς θέλουν η μικροσκοπική εξέταση να χρησιμοποιείται μόνο όταν χρειάζεται, αλλά όχι ως θέμα ρουτίνας (*Molina et al. 2007*).

Άλλοι καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό ασυμφωνίας μεταξύ των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών ευρημάτων στην ιατροδικαστική νεκροψία.

Η ιστολογία είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό όσον αφορά την ποιότητα της νεκροψίας και είναι απαραίτητη για την επιβεβαίωση, τη βελτίωση ή την απόρριψη των μακροσκοπικών ευρημάτων (*Madadin et al. 2017; de la Grandmaison et al. 2010*).

Ωστόσο, η χρησιμότητα της συστηματικής ιστολογικής εξέτασης αποδείχθηκε σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη προοπτική μελέτη που διεξήχθη σε 428 περιπτώσεις νεκροψίας (*de la Grandmaison et al. 2010*):

- Ένας μηχανισμός θανάτου που δεν αποδεικνύεται από τα μακροσκοπικά ανατομικά ευρήματα ανακαλύφθηκε ιστολογικά σε περίπου 40% των περιπτώσεων.
- Η αιτία θανάτου προσδιορίστηκε μόνο με ιστολογία σε 8,4% των περιπτώσεων.
- Τα μικροσκοπικά ευρήματα επηρέασαν τον τρόπο θανάτου σε 13% των περιπτώσεων.
- Η ιστολογία παρείχε πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την προηγούμενη ιατρική κατάσταση του αποθανόντος σε περίπου 49% των περιπτώσεων.
- Οι τραυματικές αλλοιώσεις τεκμηριώθηκαν καλύτερα με ιστολογία σε περίπου 22% των περιπτώσεων.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η συστηματική τυπική ιστολογία για τα κύρια όργανα θα πρέπει να χρησιμοποιείται στις συνήθεις ιατροδικαστικές νεκροψίες (*de la Grandmaison et al. 2010*). Επιπλέον, οι ιστολογικές εξετάσεις μπορεί να είναι

απαραίτητες σε περιπτώσεις πολλαπλών ανταλλαγών δειγμάτων ιστών (*Banaschak et al. 2000*).

Περιττό να πούμε ότι υπάρχουν πολλά άλλα ιστολογικά, ανοσοϊστοχημικά και κυτταρολογικά ερωτήματα. Πολλές ασθένειες μπορούν να εξηγήσουν τον αιφνίδιο απροσδόκητο θάνατο, συμπεριλαμβανομένων συγκεκριμένων συνδρόμων με ενδιαφέροντα μικροσκοπικά ευρήματα.

Εδώ θα παρουσιαστούν και θα συζητηθούν ιστολογικά ευρήματα σε μια σειρά από σύνδρομα. Ωστόσο, για πιο λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με την πληθώρα των συνδρόμων και των σπάνιων λοιμώξεων, ο αναγνώστης παραπέμπεται στην εξειδικευμένη βιβλιογραφία, π.χ.: σύνδρομο Williams ή σύνδρομο Williams-Beuren (WBS), το οποίο μπορεί να προκαλέσει αιφνίδιο θάνατο σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες ειδικότερα.

Οι ιατροδικαστικές νεκροψίες συχνά περιλαμβάνουν ιστολογική ανάλυση, ωστόσο, αυτό δεν συμβαίνει πάντα. Τα πρότυπα για την πρακτική της ιατροδικαστικής παθολογίας προτάθηκαν από την Επιτροπή Ιατροδικαστικής Παθολογίας του Κολλεγίου Αμερικανών Παθολόγων. Σύμφωνα με αυτήν την πρόταση, η έκταση της ιστολογικής εξέτασης των ιστών της νεκροψίας εναπόκειται στη διακριτική ευχέρεια του παθολόγου (*Randall et al. 1998*).

Τα Πρότυπα Απόδοσης Ιατροδικαστικής Νεκροψίας της Εθνικής Ένωσης Ιατροδικαστών (NAME) απαιτούν ιστολογική εξέταση σε περιπτώσεις χωρίς μακροσκοπική ανατομική αιτία θανάτου, εκτός εάν τα λείψανα είναι σκελετωμένα (*NAME 2006*).

Παρόλο που υπάρχουν μελέτες σχετικά με την αξία της ιστολογικής εξέτασης (*Molina et al. 2007; Langlois 2006; Bernardi et al. 2005; Roulson et al. 2005; Zaitoun and Fernandez 1998*), η χρησιμότητα της συστηματικής ιστολογίας στις ιατροδικαστικές νεκροψίες θα πρέπει να καθορίζεται ανεξάρτητα από την αιτία και τον τρόπο θανάτου (*de la Grandmaison et al. 2010*). Φυσικά, τα δείγματα νεκροψίας πρέπει να είναι επαρκή σε ποσότητα και ποιότητα. Στο μέλλον, τα πρωτόκολλα και οι οδηγίες νεκροψίας θα πρέπει να περιλαμβάνουν συμβατική ιστολογία και όπου είναι απαραίτητο ανοσοϊστολογικές τεχνικές.

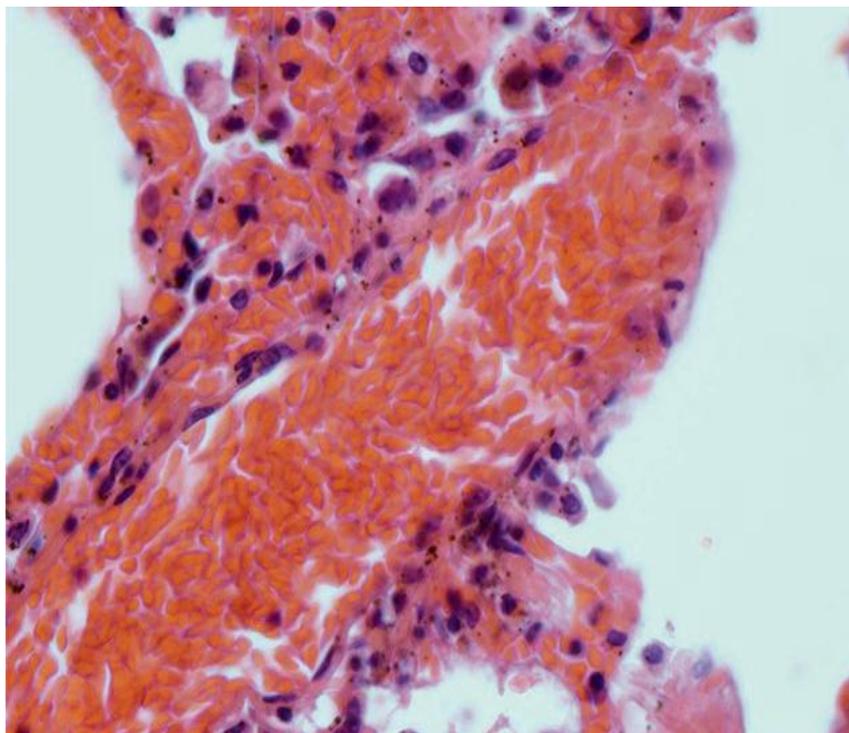
Οι νεκροψίες στην ιατροδικαστική εγείρουν πολλά διαγνωστικά ερωτήματα, όπως αυτά που παρατηρούνται στη γενική παθολογία. Ακόμη και τα στοιχεία ενός φυσικού θανάτου μπορούν να έχουν ιατροδικαστική σημασία, π.χ., στο πλαίσιο της απαλλαγής ενός υπόπτου. Επιπλέον, παρέχουν στους συγγενείς μια εξήγηση για τον συχνά ξαφνικό και απροσδόκητο θάνατο ενός ατόμου. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ιστομορφολογική διάγνωση είναι σε μεγάλο βαθμό πανομοιότυπη με τη διάγνωση τόσο στη γενική όσο και στην εξειδικευμένη παθολογία. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν πολλά ειδικά ιατροδικαστικά ερωτήματα και ιστοπαθολογικά ευρήματα που είναι συχνότερα ή αποκλειστικά σημαντικά στην ιατροδικαστική. Εκτός από τα ειδικά ερωτήματα που αντιμετωπίζονται στην ιατροδικαστική πρακτική, το γεγονός ότι ο συχνά αυτολυτικός ή έντονα σάπιος ιστός απαιτεί διερεύνηση, παρουσιάζει ιδιαίτερες προκλήσεις όσον αφορά τη διάγνωση.

2. Εφαρμογές της Δικαστικής Ιστοπαθολογίας

Σήμερα στην ευρωπαϊκή ιατροδικαστική, οι ιστολογικές εξετάσεις οργάνων και ιστών διεξάγονται ή διατάσσονται από τις αρχές (Ferrara et al. 2010) μόνο σε περίπου 50% όλων των νεκροψιών. Οι ενζυμικές και ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ακόμη λιγότερο συχνά, ενώ η υβριδοποίηση in situ, οι μοριακές παθολογικές εξετάσεις και η ηλεκτρονική μικροσκοπική διάγνωση είναι και πάλι λιγότερο συχνές. Σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι απαραίτητο να τονιστεί η χρησιμότητα της συμβατικής ιστολογικής μικροσκόπησης εξαρχής, με την ελπίδα ότι θα υποστηρίξει και την προηγμένη διάγνωση με τις άλλες μεθόδους. Άλλωστε, υπάρχουν πολυάριθμες ασθένειες που μπορούν να διαγνωστούν μόνο μέσω μικροσκοπικών εξετάσεων, συμπεριλαμβανομένης όχι μόνο της ιογενούς μυοκαρδίτιδας αλλά και εξαιρετικά σπάνιων ασθενειών, π.χ. του συνδρόμου Williams-Campbell ως αιτία θανάτου στα νεογνά (Bohnert et al. 2003), και άλλες σχετικά σπάνιες ασθένειες που προσελκύουν το γενικό επιστημονικό ενδιαφέρον όσον αφορά την έρευνα. Ακριβώς τέτοιοι ασυνήθιστοι και ξαφνικοί θάνατοι λόγω σπάνιων αιτιών πρέπει να διερευνηθούν και να διευκρινιστούν από τους ιατροδικαστές (Ondruschka et al. 2016; Tong et al. 2016; Dean et al. 2014; Duan et al. 2013; Roll et al. 2009).

Επομένως, προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η συζήτηση σχετικά με την αξία των ιστολογικών εξετάσεων συνεχίζεται (Byard and Winskog 2012; Corder 2012; Davis 2012; Hunsaker 2012; Lau 2012; Pollanen 2012; Fronczek et al. 2014; de Giorgio and Vetrugo 2014).

Πνευμονικός ιστός που εμφανίζει οξεία συμφόρηση αίματος και δρεπανοειδή ερυθρά αιμοσφαίρια σε δρεπανοκυτταρική αναιμία (H&E X400) (Εικόνα 1^η)



Τα άρθρα επισκόπησης στις εξειδικευμένες δημοσιεύσεις για την ιατροδικαστική, δίνουν παραδείγματα των πλεονεκτημάτων της ιατροδικαστικής ιστοπαθολογίας, ακόμη και για την ανίχνευση ασθενειών όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η οποία επηρεάζει περίπου 300 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως (Εικ. 1. *Poddaturi και Guileyardo 2015*).

Παραδοσιακά, η ιατροδικαστική ιστοπαθολογία αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της διαγνωστικής όχι μόνο για τον προσδιορισμό των αιτιών θανάτου αλλά και για την απάντηση σε μια πληθώρα άλλων νομικά σχετικών ερωτημάτων:

- Ιστομορφολογική χρονολογία μιας νόσου.
- Μεταθανάτια ιστολογικά ευρήματα ως ένδειξη ενός ενδοζωικού συμβάντος, δηλαδή, ένδειξη ζωτικής κατάστασης.
- Ιστομορφολογικός προσδιορισμός ηλικίας, π.χ., εμφράγματος του μυοκαρδίου, τραυματισμού ή δερματικού τραύματος.
- Ταξινόμηση μικροσκοπικών ευρημάτων στο πλαίσιο του ιστορικού του ασθενούς, μεταθανάτια βιοχημικά και χημικοτοξικά ευρήματα, καθώς και αποτελέσματα εγκληματολογικών ερευνών (π.χ., μακροχρόνια ενδοφλέβια κατάχρηση ναρκωτικών ουσιών, κατάσταση μετά από υποτροπιάζον τραύμα, σε περιπτώσεις τελικά θανατηφόρας κακοποίησης παιδιών, βαθιά φλεβική θρόμβωση μετά από κατάγματα κάτω άκρων που προκαλούνται από τροχαία ατυχήματα, σωματίδια καύσης πυρίτιδας στο σημείο εισόδου της σφαίρας, προσδιορισμός της ηλικίας του κρανιοεγκεφαλικού τραύματος, κ.λπ.).
- Μικροσκοπική ταυτοποίηση θραυσμάτων ιστών και κυττάρων για προηγμένη ανάλυση ιχνών.
- Μικροσκοπική ανίχνευση υφαντικών ινών που μεταφέρονται στο ίχνος της σφαίρας για τη διαφοροποίηση μεταξύ του εντοπισμού εισόδου και εξόδου του πυροβολισμού.
- Ιστοκυτταρολογική ανίχνευση κυττάρων, π.χ., σπερματοζωαρίων μετά από σεξουαλικά αδικήματα ή για μοριακή γενετική ανάλυση.
- Ιστομορφολογική διάγνωση για τη διευκρίνιση των θανατηφόρων αποτελεσμάτων σε επαγγελματικές ασθένειες, π.χ., θανατηφόρο μεσοθηλίωμα υπεζωκότα που σχετίζεται με τον αμίαντο (*Woitowitz et al. 1986; Churg 1982*).

Η συμβατική ιστολογία, συμπεριλαμβανομένων των τυπικών μεθόδων χρώσης, έχει αποτελέσει τη βάση της μικροσκοπικής διάγνωσης εδώ και δεκαετίες. Με βάση την ιστολογία και ανάλογα με τα ερωτήματα που απαιτούν διευκρίνιση, λαμβάνονται υπόψη οι ενζυμικές ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι για την ανίχνευση λεπτών ιστών ή ειδικών αντιγόνων. Στην καθημερινή πρακτική, πρέπει να λαμβάνονται αποφάσεις σχετικά με το ποιες μέθοδοι θα οδηγήσουν τόσο σε επιστημονικά όσο και σε νομικά σχετικές γνώσεις. Έτσι, η καλή γνώση της ιστολογίας και της ανοσοϊστοχημείας είναι απαραίτητη σχετικά με την αιτιότητα και την παροχή συμβουλών σε δικαστικά όργανα (αστυνομία, εισαγγελείς, δικαστήρια) ή ασφαλιστικά ιδρύματα (ιδιωτικές ασφαλιστικές εταιρείες ζωής ή ατυχημάτων,

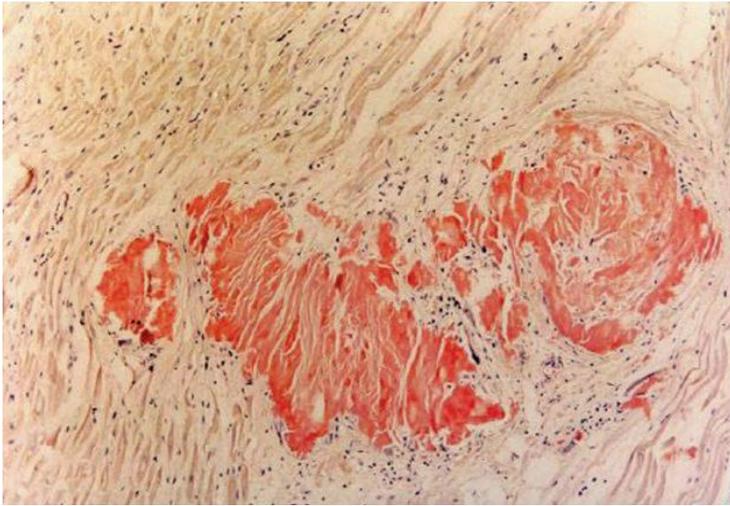
ασφαλιστικές ενώσεις αστικής ευθύνης εργοδότη που ενεργούν ως ασφαλιστές ατυχημάτων), όσον αφορά τα διαγνωστικά μέτρα που απαιτούνται μετά την νεκροψία. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητες όλες οι ιστολογικές ή ανοσοϊστοχημικές έρευνες. Η διάγνωση λεπτών ιστών συχνά παρέχει ακριβώς τις πρόσθετες πληροφορίες ή ενδείξεις, που στο πλαίσιο μεμονωμένων περιπτώσεων, μπορούν να επιτρέψουν σε μια επαρκώς εύλογη γνώμη εμπειρογνώμονα να ικανοποιήσει τα αυστηρά πρότυπα απόδειξης στο ποινικό δίκαιο ή να συμβάλει καθοριστικά στην πειστικότητα ενός δικαστηρίου.

Οι συστάσεις σχετικά με τη διενέργεια ιστολογικών ή ανοσοϊστοχημικών εξετάσεων περιλαμβάνουν τα ακόλουθα σημεία (*de la Grandmaison et al. 2010*):

- Τα τραύματα που εντοπίζονται κατά την αυτοψία, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα για ιστολογική μελέτη.
- Σε αιφνίδιο καρδιακό θάνατο, η έγκαιρη διάγνωση της οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας με ανοσοϊστοχημεία θα πρέπει να περιλαμβάνει μυοσφαιρίνη, δεσμίνη, καρδιακή τροπονίνη I και το σύμπλεγμα C5b-9(m) (*Dettmeyer 2009, Campobasso et al. 2008*).
- Σε κλειστό τραύμα κεφαλής, η διάχυτη αξονική βλάβη (DAI) μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας την έκφραση της πρόδρομης πρωτεΐνης β-αμυλοειδούς (*Sheriff et al. 1994*).
- Για την εκτίμηση της ηλικίας των δερματικών τραυμάτων, ανοσοϊστοχημικοί δείκτες όπως κολλαγόνα, φιμπρονεκτίνη, μόρια προσκόλλησης, φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες μπορεί να είναι χρήσιμοι (*Cecchi 2010; Kondo 2007*).

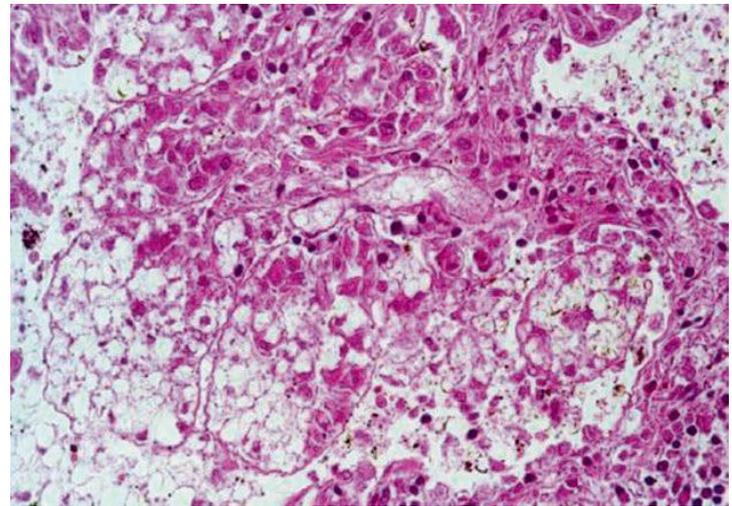
*Περίπτωση ιατρικής αμέλειας:
Θανατηφόρα αιμορραγία 7 ημέρες μετά την
αμυγδαλεκτομή σε 12χρονο αγόρι
με περιγεγραμμένη πυώδη τήξη
αρτηριακού αγγειακού τοιχώματος
στην αμυγδαλή, όπως αποδείχθηκε
ιστολογικά (H&E X40) (εικόνα 2^η)*



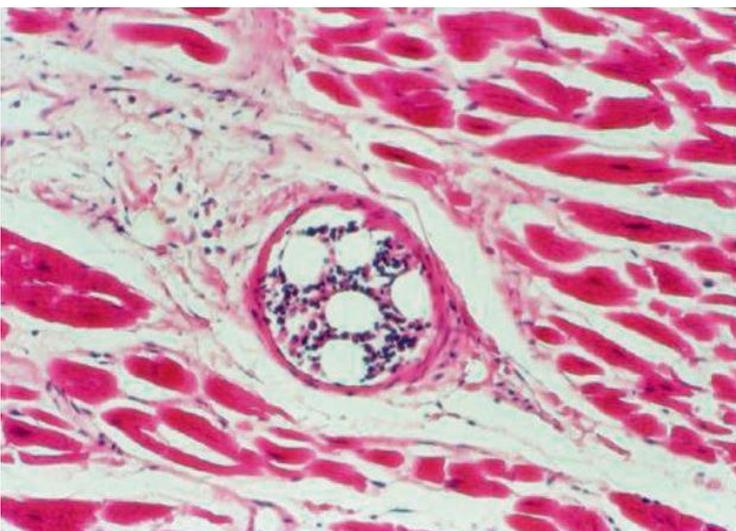


Ιστολογικά, παρατηρήθηκε εκτεταμένη καρδιαγγειακή αμυλοείδωση με πολλαπλές αμυλοειδείς πλάκες στο μυοκάρδιο με χρώση κόκκινου Κονγκό, καθώς και περιβάλλουσα διάμεση ίνωση σε περιοριστική μυοκαρδιοπάθεια (X200) (εικόνα 3^η)

Θανατηφόρα αναρρόφηση αίματος μετά από βρογχοσκοπική βιοψία από έναν μικρό κόμβο στην περιοχή του πνεύμονα ύποπτο για όγκο. Η μετάσταση ενός μερικώς διανογκυτταρικού, καλά αγγειωμένου νεφρικού καρκινώματος αποδείχθηκε ιστολογικά (H&E X400) (εικόνα 4^η)



Ιστολογικά αποδεδειγμένη ενδομυοκαρδιακή εμβολή μυελού των οστών, σύμφωνα με κλινικές πληροφορίες, οξεία διεγχειρητική ασυστολία που εμφανίστηκε στη φάση Palacos κατά τη διάρκεια ενδοπρόθεσης μηριαίας κεφαλής (H&E X200) (εικόνα 5^η)



3. Δικαστικές Ιστοπαθολογικές Τεχνικές

- **Μονιμοποίηση, FFPE(Formalin – Fixed Paraffin Embedded) and Conventional Histological Staining** αναφέρεται σε μεθόδους ρουτίνας όπως η χρήση φορμόλης ως κυριότερο μέσο μονιμοποίησης, προετοιμασία των μπλόκ παραφίνης (FFPE) και πλακιδίων Hematoxylin and Eosin (H&E), τα οποία χρησιμοποιούν χρωστικές για να τονίσουν την βασική αρχιτεκτονική των ιστών και τις κυτταρικές δομές για μικροσκοπική εξέταση και διάγνωση.
- **Οι ιστοχημικές τεχνικές** χρησιμοποιούν χημικές αντιδράσεις και κηλίδες για τον εντοπισμό και τον εντοπισμό συγκεκριμένων μορίων (όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες ή DNA) μέσα στα κύτταρα και τους ιστούς, καθιστώντας τα ορατά στο μικροσκόπιο.
- **Οι ανοσοϊστοχημικές τεχνικές** περιλαμβάνουν τη χρήση ειδικών, επισημασμένων αντισωμάτων για την ανίχνευση και τον εντοπισμό αντιγόνων-στόχων (όπως πρωτεΐνες) μέσα σε δείγματα ιστών.
- **Ειδικές Τεχνικές Εξέτασης** (συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας TUNEL, της υβριδοποίησης *in situ*, της ομοεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με λέιζερ, της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και της μικροανατομίας με λέιζερ, της απεικόνισης *in vivo*, της ψηφιακής παθολογίας και μορφομετρίας)
- **Οι Μοριακές Μέθοδοι είναι τεχνικές** που αναλύουν νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) ή πρωτεΐνες για τη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενειών, την αναγνώριση παθογόνων ή την κατανόηση βιολογικών διεργασιών.

3.1 Μονιμοποίηση, FFPE και Συμβατική Ιστολογική Χρώση

Ιδανικό μονιμοποιητικό μέσο

Ένα ιδανικό μονιμοποιητικό θα πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Πρόληψη της αυτόλυσης των κυττάρων ή του ιστού.
- Πρόληψη της αποσύνθεσης του ιστού από βακτήρια.
- Διατήρηση του όγκου και του σχήματος του κυττάρου όσο το δυνατόν περισσότερο.
- Σταθερά υψηλής ποιότητας χρώση.
- Ταχεία δράση.

- Φθηνό.
- Μη τοξικό.

Στην αγορά διατίθεται μεγάλος αριθμός μονιμοποιητικών. Κάθε μονιμοποιητικό έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του. Είναι δύσκολο να βρεθούν παγκοσμίως αποδεκτά ιδανικά μονιμοποιητικά μέσα. (Eltoum *et al.*, 2001a, 2001b; Grizzle *et al.*, 2001)

4. Ειδικά θέματα Βιοχημείας στην Ιστοπαθολογία

Είναι δίκαιο να πούμε ότι η κατάλληλη μονιμοποίηση των ιστών για ιστολογική εξέταση είναι κεντρικής σημασίας για όλες τις ιστολογικές εξετάσεις, καθώς χωρίς αυτή τη διαδικασία όλοι οι ιστοί θα αποικοδομούνταν και η ανάλυση θα ήταν άχρηστη. Τον τελευταίο αιώνα αναπτύχθηκε μια σειρά από μονιμοποιητικά, με λίγες πρόσφατες τροποποιήσεις. Οι μηχανισμοί και οι αρχές με τις οποίες δρουν συγκεκριμένα μονιμοποιητικά εμπίπτουν σε διάφορες ευρείες ομάδες. Αυτές περιλαμβάνουν την ομοιοπολική προσθήκη δραστικών ομάδων και διασυνδέσεων, την αφυδάτωση, τις επιδράσεις των οξέων, τον σχηματισμό αλάτων και τη θερμότητα. Τα σύνθετα μονιμοποιητικά μπορούν να λειτουργήσουν χρησιμοποιώντας αρκετούς από αυτούς τους μηχανισμούς.

Κατά την επιλογή ενός μονιμοποιητικού, υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων που διαθέτει κάθε μονιμοποιητικό. Αυτά περιλαμβάνουν μοριακές αλλαγές ή απώλειες από μονιμοποιημένους ιστούς, πρήξιμο ή συρρίκνωση των ιστών, διακυμάνσεις στην ποιότητα της ιστοχημικής και ανοσοϊστοχημικής χρώσης, την επίδραση στη βιοχημική ανάλυση και την ικανότητα διατήρησης της δομής των κυτταρικών οργανιδίων.

Ο κύριος στόχος της μονιμοποίησης στην παθολογία είναι η διατήρηση σαφών και συνεπών μορφολογικών χαρακτηριστικών (Eltoum *et al.*, 2001a, 2001b; Grizzle *et al.*, 2001).

Η ανάπτυξη συγκεκριμένων μονιμοποιητικών ήταν συνήθως εμπειρική, αν και μεγάλο μέρος της κατανόησης των μηχανισμών της μονιμοποίησης βασίστηκε σε πληροφορίες που ελήφθησαν από τη βυρσοδεψία δέρματος και την παραγωγή εμβολίων. Προκειμένου να οπτικοποιηθεί η μικροανατομία των χρωματισμένων τομών ιστού, οι αρχικές μικροσκοπικές σχέσεις μεταξύ των κυττάρων, των κυτταρικών συστατικών (π.χ. του κυτταροπλάσματος και των πυρήνων) και του εξωκυτταρικού υλικού πρέπει να διατηρούνται με μικρή διαταραχή στην οργάνωση του ιστού.

Πρέπει επίσης να διατηρείται η τοπική χημική σύνθεση του ιστού. Πολλά συστατικά των ιστών είναι διαλυτά σε υδατικό, όξινο ή άλλο υγρό περιβάλλον και για να γίνει αξιόπιστη η μικροανατομία και το μικροπεριβάλλον αυτών των ιστών, τα διαλυτά συστατικά δεν πρέπει να χάνονται κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης και της επεξεργασίας των ιστών. Η ελαχιστοποίηση της απώλειας κυτταρικών συστατικών, τα οποία περιλαμβάνουν μεγάλες πρωτεΐνες, μικρά πεπτίδια, mRNA, DNA και λιπίδια, αποτρέπει την καταστροφή μακρομοριακών δομών όπως οι

κυτταροπλασματικές μεμβράνες, το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, το τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, οι πυρηνικές μεμβράνες, τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια.

Κάθε μονιμοποιητικό, σε συνδυασμό με το πρωτόκολλο επεξεργασίας ιστών, διατηρεί ορισμένες μοριακές και μακρομοριακές πτυχές του ιστού καλύτερα από άλλους συνδυασμούς μονιμοποιητικού/επεξεργασίας. Εάν χαθούν διαλυτά συστατικά από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, το χρώμα του κυτταροπλάσματος στη χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης (H&E) θα μειωθεί ή θα τροποποιηθεί και πτυχές της εμφάνισης της μικροανατομίας του ιστού, π.χ. τα μιτοχόνδρια, θα χαθούν ή θα καταστραφούν.

Ομοίως, οι ανοσοϊστοχημικές αξιολογήσεις της δομής και της λειτουργίας μπορεί να μειωθούν ή να χαθούν. Σχεδόν κάθε μέθοδος μονιμοποίησης προκαλεί συρρίκνωση ή πρήξιμο, σκλήρυνση των ιστών και χρωματικές παραλλαγές σε διάφορες ιστοχημικές χρώσεις (Sheehan & Hrapchak, 1980; Horobin, 1982; Fox et al., 1985; Carson, 1990; Kiernan, 1999; O'Leary & Mason, 2004).

Διάφορες μέθοδοι μονιμοποίησης παράγουν πάντα κάποιες αλλοιώσεις (artifacts) στην εμφάνιση του ιστού κατά τη χρώση. Ωστόσο, για τη διαγνωστική παθολογία είναι σημαντικό τέτοια artifacts να είναι συνεπή, προβλέψιμα και κατανοητά. Το επιλεγμένο μονιμοποιητικό δρα ελαχιστοποιώντας την απώλεια ή την ενζυματική καταστροφή κυτταρικών και εξωκυτταρικών μορίων, διατηρώντας μακρομοριακές δομές και προστατεύοντας τους ιστούς από την καταστροφή από μικροοργανισμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια εικόνα ενός δυναμικά μεταβαλλόμενου, βιώσιμου ιστού (Grizzle et al., 2001). Το μονιμοποιητικό θα πρέπει επίσης να αποτρέπει την επακόλουθη διάσπαση του ιστού ή των μοριακών χαρακτηριστικών από την ενζυμική δραστηριότητα ή και μικροοργανισμούς κατά τη μακροχρόνια αποθήκευση. Αυτοί οι ιστοί που αφαιρούνται από ασθενείς αποτελούν σημαντικό πόρο που μπορεί σε μεταγενέστερο στάδιο να υποβληθεί σε περαιτέρω εξειδικευμένες εξετάσεις, π.χ. ανάλυση DNA ή γονιδιακή ανάλυση.

Ένα μονιμοποιητικό όχι μόνο αλληλεπιδρά αρχικά με τον ιστό στο υδατικό του περιβάλλον, αλλά έχει επίσης συνεχή αντιδραστικότητα με οποιοδήποτε μη αντιδραστικό μονιμοποιητικό και τους χημικά τροποποιημένους ιστούς. Η μονιμοποίηση αλληλεπιδρά με όλες τις φάσεις της επεξεργασίας και της χρώσης, από την αφυδάτωση έως τη χρώση των ιστών χρησιμοποιώντας ιστοχημικές, ενζυματικές ή ανοσοϊστοχημικές χρώσεις (Eltoum et al., 2001b; Rait et al., 2004). Συνεπώς, κάθε χρωματισμένο τμήμα ιστού, που παράγεται μετά από ειδική μονιμοποίηση σε συνδυασμό με επεξεργασία ιστού, είναι ένας συμβιβασμός σταθερών αλλαγών ιστού που σχηματίζονται από τον φυσικό ζωντανό ιστό. Μέχρι σήμερα, δεν έχει εντοπιστεί ένα καθολικό ή ιδανικό μονιμοποιητικό. Τα μονιμοποιητικά επιλέγονται επομένως με βάση την ικανότητά τους να παράγουν ένα τελικό προϊόν που απαιτείται για να αποδειχθεί ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό ενός συγκεκριμένου ιστού (Grizzle et al., 2001).

Στη διαγνωστική παθολογία, το μονιμοποιητικό επιλογής για τους περισσότερους παθολόγους είναι η φορμαλδεΰδη με 10% ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα (Grizzle et al., 2001). Ένας σημαντικός περιορισμός στη χρήση φορμαλδεΰδης είναι η απώλεια ανοσοαναγνώρισης αντιγόνου λόγω αυτού του τύπου μονιμοποίησης σε συνδυασμό με την επεξεργασία του ιστού σε παραφινικό κερί (Eltoum et al., 2001a, 2001b). Ωστόσο, από κλινική άποψη, η εμφάνιση μεθόδων ανάκτησης επιτόπων με επαγωγή θερμότητας, που ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1990, έχει ξεπεράσει πολλούς από αυτούς τους περιορισμούς (Shi et al., 1991). Ομοίως, η ανάλυση του mRNA και

του DNA από ιστό μονιμοποιημένο με φορμαλίνη και ενσωματωμένο σε παραφίνη ήταν προβληματική (Grizzle *et al.*, 2001; Jewell *et al.*, 2002; Steg *et al.*, 2006; Lykidis *et al.*, 2007).

Όλα τα ευρέως χρησιμοποιούμενα μονιμοποιητικά επιλέγονται επομένως με συμβιβασμό, με τα θετικά τους στοιχεία να εξισορροπούνται με τα λιγότερο επιθυμητά χαρακτηριστικά τους. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό ενός μονιμοποιητικού είναι η υποστήριξη υψηλής ποιότητας και συνεπούς χρώσης με H&E, τόσο αρχικά όσο και μετά την αποθήκευση των μπλοκ παραφίνης για τουλάχιστον μια δεκαετία, αν και οι νέες οδηγίες στο Ηνωμένο Βασίλειο συνιστούν πλέον τα μπλοκ που έχουν υποστεί επεξεργασία με παραφίνη να διατηρούνται για 30 χρόνια. Το μονιμοποιητικό πρέπει να έχει την ικανότητα να αποτρέπει τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη καταστροφή της μικροαρχιτεκτονικής του ιστού σταματώντας τη δράση των καταβολικών ενζύμων και επομένως την αυτόλυση, ελαχιστοποιώντας τη διάχυση των διαλυτών μορίων από τις αρχικές τους θέσεις. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό ενός καλού μονιμοποιητικού, το οποίο βοηθά στη διατήρηση της ακεραιότητας των ιστών και των κυττάρων, είναι η μονιμοποίηση και η απενεργοποίηση μολυσματικών παραγόντων. Είναι επίσης σημαντικό να υπάρχουν καλά τοξικολογικά και ευφλεκτικά προφίλ που επιτρέπουν την ασφαλή χρήση του μονιμοποιητικού (Grizzle & Fredenburgh, 2005).

Επίσης άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά ενός ιδανικού μονιμοποιητικού περιλαμβάνουν τη χρησιμότητα για μια μεγάλη ποικιλία ιστών, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, λεμφοειδών και νευρικών ιστών. Θα πρέπει να διατηρεί μικρά και μεγάλα δείγματα για να υποστηρίζει ιστοχημικές, ανοσοϊστοχημικές, *in situ* υβριδοποιήσεις και άλλες εξειδικευμένες διαδικασίες. Το μονιμοποιητικό θα πρέπει να διεισδύει και να στερεώνει τους ιστούς γρήγορα, να έχει διάρκεια ζωής τουλάχιστον ενός έτους και να είναι συμβατό με τους σύγχρονους αυτοματοποιημένους επεξεργαστές ιστών. Θα πρέπει να είναι εύκολα αναλώσιμο ή ανακυκλώσιμο, να υποστηρίζει τη μακροχρόνια αποθήκευση ιστών, για να παρέχει εξαιρετική μικροτομία των μπλοκ παραφίνης και θα πρέπει να είναι οικονομικά αποδοτικό (Dapson, 1993).

Η εμφάνιση νέων βιολογικών μεθόδων, η αυξημένη κατανόηση του ανθρώπινου γονιδιώματος και η ανάγκη ταχείας αξιολόγησης της βιολογίας των ανοσολογικών διεργασιών, σημαίνουν ότι τα μονιμοποιητικά θα πρέπει να επιτρέπουν την ανάκτηση μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, mRNA και DNA, από σταθεροποιημένους και ενσωματωμένους σε παραφίνη ιστούς χωρίς εκτεταμένες βιοχημικές τροποποιήσεις.

4.1 Τύποι μονιμοποίησης

Η μονιμοποίηση των ιστών μπορεί να επιτευχθεί με φυσικές ή χημικές μεθόδους. Οι φυσικές μέθοδοι όπως θέρμανση, φούρνος μικροκυμάτων και λυοφιλοποίηση, είναι ανεξάρτητες διαδικασίες και δεν χρησιμοποιούνται συνήθως στην καθημερινή πρακτική της ιατρικής ή κτηνιατρικής παθολογίας, ανατομίας και ιστολογίας. Εξαιρετική αποτελεί η χρήση ξηρής θερμικής μονιμοποίησης μικροοργανισμών πριν από τη χρώση Gram. Οι περισσότερες μέθοδοι μονιμοποίησης που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία ιστών για ιστοπαθολογικές διαγνώσεις βασίζονται στη χημική μονιμοποίηση που πραγματοποιείται με υγρή μονιμοποίηση. Η αναπαραγωγικότητα

των μικροσκοπικών εμφανίσεων των ιστών μετά τη χρώση H&E είναι η κύρια απαίτηση των μονιμοποιητικών που χρησιμοποιούνται για διαγνωστική παθολογία. Οι μέθοδοι μονιμοποίησης που χρησιμοποιούνται σε ερευνητικά πρωτόκολλα περιλαμβάνουν τη χρήση ατμών και όταν απαιτείται, μονιμοποίηση ολόκληρου του ζώου ή την έγχυση του αγγειακού συστήματος του ζώου, με ένα μονιμοποιητικό (Eltoum *et al.*, 2001a, 2001b).

Αρκετές χημικές ουσίες ή οι συνδυασμοί τους, μπορούν να λειτουργήσουν ως καλά μονιμοποιητικά και να επιτύχουν πολλούς από τους δηλωμένους στόχους της μονιμοποίησης. Ορισμένα μονιμοποιητικά προσθέτουν ομοιοπολικές αντιδραστικές ομάδες που μπορούν να προκαλέσουν διασυνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών, μεμονωμένων πρωτεϊνικών τμημάτων εντός νουκλεϊκών οξέων και μεταξύ νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών (Horobin, 1982; Eltoum *et al.*, 2001a, 2001b; Rait *et al.*, 2004, 2005).

Τα καλύτερα παραδείγματα τέτοιων «μονιμοποιητικών διασύνδεσης» είναι η φορμαλδεΰδη και η γλουταραλδεΰδη. Μια άλλη προσέγγιση στη μονιμοποίηση, είναι η χρήση παραγόντων που απομακρύνουν το ελεύθερο νερό από τους ιστούς και καθιζάνουν και πήζουν τις πρωτεΐνες. Παραδείγματα αυτών των αφυδατικών, περιλαμβάνουν την αιθανόλη, τη μεθανόλη και την ακετόνη. Αυτοί οι παράγοντες μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες διασπώντας τους υδρόφοβους δεσμούς που είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών.

Επίσης, άλλα μονιμοποιητικά, π.χ. το οξικό οξύ, το τριγλωροξικό οξύ, το χλωριούχο υδράργυρο και ο οξικός ψευδάργυρος δρουν μετουσιώνοντας πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα μέσω αλλαγών στο pH ή μέσω σχηματισμού αλάτων. Ορισμένα μονιμοποιητικά είναι μείγματα αντιδραστηρίων και αναφέρονται ως σύνθετα μονιμοποιητικά, π.χ. η αλκοολική φορμόλη στερεώνει τους ιστούς με δύο τρόπους: πρώτον, προσθέτοντας ομοιοπολικές υδροξυμεθυλομάδες και διασυνδέοντας πρωτεΐνες και δεύτερον, μέσω της πήξης και της αφυδάτωσης.

Φυσικές μέθοδοι μονιμοποίησης

1. Θερμική μονιμοποίηση.
2. Μονιμοποίηση με μικροκύματα.
3. Λυοφιλοποίηση και υποκατάσταση με κατάψυξη.
4. Χημική μονιμοποίηση.

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί οργανικά ή μη οργανικά διαλύματα για τη διατήρηση επαρκούς μορφολογικής διατήρησης. Τα χημικά μονιμοποιητικά μπορούν να θεωρηθούν ως μέλη τριών κύριων κατηγοριών: πηκτικά, διασταυρούμενα και σύνθετα (Baker, 1958).

• Πηκτικά μονιμοποιητικά

Τόσο τα οργανικά όσο και τα μη οργανικά διαλύματα μπορούν να πήξουν πρωτεΐνες καθιστώντας τις αδιάλυτες. Η κυτταρική αρχιτεκτονική *in vivo* διατηρείται κυρίως από λιποπρωτεΐνες και ινώδεις πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο. Η πήξη αυτών των πρωτεϊνών διατηρεί την ιστομορφολογία των ιστών σε επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου.

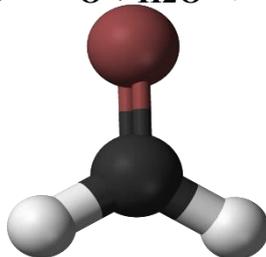
Δυστυχώς, επειδή τα πηκτικά μονιμοποιητικά έχουν ως αποτέλεσμα κυτταροπλασματική συσσωμάτωση και κακή διατήρηση των μιτοχονδρίων και των εκκριτικών κοκκίων, αυτά τα μονιμοποιητικά δεν είναι χρήσιμα στην υπερδομική ανάλυση.

- *Μη πηκτικά μονιμοποιητικά*

Επιλέχθηκαν αρκετές χημικές ουσίες ως μονιμοποιητικά δευτερογενώς λόγω των πιθανών δράσεων τους να σχηματίζουν διασυνδέσεις τόσο εντός όσο και μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Η διασύνδεση μπορεί να μην είναι ένας σημαντικός μηχανισμός με σύντομους χρόνους μονιμοποίησης και επομένως τα «ομοιοπολικά πρόσθετα μονιμοποιητικά» μπορεί να είναι μια καλύτερη ονομασία για αυτήν την ομάδα. Παραδείγματα περιλαμβάνουν φορμαλδεΰδη, γλουταραλδεΰδη και άλλες αλδεΰδες, π.χ. ένυδρη χλωράλη και γλυοξάλη, καθώς και μεταλλικά άλατα, όπως το χλωριούχο υδράργυρο και ο ψευδάργυρος, καθώς και άλλες μεταλλικές ενώσεις όπως το τετροξείδιο του οσμίου. Οι ομάδες αλδεΰδης είναι χημικά και βιολογικά αντιδραστικές και είναι υπεύθυνες για πολλές ιστοχημικές αντιδράσεις, μία εκ των οποίων είναι η αντίδραση αργενταφίνης (*Papanikolau & Kokkinidis, 1997*).

5. Η Φορμόλη ως κλασικό μέσο μονιμοποίησης ιστών

Η φορμαλδεΰδη, ως 10% ουδέτερη φορμαλίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα (NBF), είναι το πιο συνηθισμένο μονιμοποιητικό, που χρησιμοποιείται στη διαγνωστική παθολογία. Η καθαρή φορμαλδεΰδη είναι ένας ατμός, που όταν διαλύεται πλήρως σε νερό, σχηματίζει ένα διάλυμα που περιέχει 37-40% φορμαλδεΰδη και αυτό το υδατικό διάλυμα είναι «φορμόλη». Η συνήθης «φορμόλη 10%» που χρησιμοποιείται στη μονιμοποίηση ιστών είναι ένα διάλυμα φορμόλης 10%, το οποίο περιέχει περίπου 4% κατά βάρος προς όγκο φορμαλδεΰδη. Οι αντιδράσεις της φορμαλδεΰδης με μακρομόρια είναι πολυάριθμες και πολύπλοκες. Οι French και Edsall (1945) και οι Fraenkel-Conrat και οι συνεργάτες του (1948a, 1948b, 1949) ταυτοποίησαν σχολαστικά τις περισσότερες αντιδράσεις της φορμαλδεΰδης με αμινοξέα και πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας απλή χημεία. Σε ένα υδατικό διάλυμα, η φορμαλδεΰδη σχηματίζει ένυδρο μεθυλένιο, μια μεθυλενογλυκόλη ως το πρώτο βήμα στη μονιμοποίηση (Singer, 1962).



Το ένυδρο μεθυλένιο αντιδρά με αρκετές πλευρικές αλυσίδες πρωτεϊνών για να σχηματίσει δραστικές υδροξυμεθυλικές πλευρικές ομάδες (-CH₂-OH). Όταν χρησιμοποιούνται οι τρέχοντες σε σχετικά σύντομους χρόνους μονιμοποίησης με 10% ουδέτερη φορμόλη σε ρυθμιστικό διάλυμα (ώρες έως ημέρες), ο σχηματισμός υδροξυμεθυλικών πλευρικών αλυσίδων είναι η κύρια και χαρακτηριστική αντίδραση και ο σχηματισμός πραγματικών διασυνδέσεων μπορεί να είναι σπάνιος. Η φορμαλδεΰδη αντιδρά επίσης με πυρηνικές πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (Kok & Boon, 2003; Leong, 2005). Επίσης Δεισδύει μεταξύ νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών και σταθεροποιεί το κέλυφος νουκλεϊκού οξέος - πρωτεΐνης, τροποποιώντας τα νουκλεοτίδια αντιδρώντας με τις ελεύθερες αμινομάδες όπως κάνει με τις πρωτεΐνες. Στο γυμνό και ελεύθερο DNA, οι αντιδράσεις διασύνδεσης πιστεύεται ότι ξεκινούν σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη-θυμιδίνη και η διασύνδεση αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (McGhee & von Hippel, 1975a, 1975b, 1977a, 1977b).

Η φορμαλδεΰδη αντιδρά με δεσμούς C=C και -SH σε ακόρεστα λιπίδια, αλλά δεν αλληλεπιδρά με υδατάνθρακες (French & Edsall, 1945; Hayat, 1981). Οι πλευρικές αλυσίδες πεπτιδίων ή πρωτεϊνών που είναι πιο δραστικές με το ένυδρο μεθυλένιο έχουν την υψηλότερη συγγένεια για τη φορμαλδεΰδη. Αυτές περιλαμβάνουν τη λυσίνη, τη κυστεΐνη, την ιστιδίνη, την αργινίνη, τη τυροσίνη και τις δραστικές υδροξυλομάδες της σερίνης και της θρεονίνης (Means & Feeney, 1995). Ο Gustavson (1956) ανέφερε ότι μία από τις σημαντικότερες διασυνδέσεις στην «υπερ-μονιμοποίηση», δηλαδή στη βυρσοδεψία, είναι μεταξύ της λυσίνης και της αμιδικής ομάδας της πρωτεϊνικής ραχοκοκαλιάς, αλλά και πάλι με τους τρέχοντες μικρότερους

χρόνους μονιμοποίησης αυτό είναι απίθανο να συμβεί (French & Edsall, 1945; Fraenkel-Conrat et al., 1945, 1947; Fraenkel-Conrat & Olcott, 1948a, 1948b; Fraenkel-Conrat & Mecham, 1949; Gustavson, 1956).

5.1 Μακρομοριακές αντιδράσεις ιστών - φορμαλδεΐδης

Οι αντιδραστικές ομάδες μπορούν να συνδυαστούν με ομάδες υδρογόνου ή μεταξύ τους, για να σχηματίσουν γέφυρες μεθυλενίου. Εάν η φορμόλη ξεπλυθεί, οι αντιδραστικές ομάδες μπορεί να επιστρέψουν γρήγορα στην αρχική τους κατάσταση, αλλά οποιαδήποτε γεφύρωση που έχει ήδη συμβεί μπορεί να παραμείνει. Το πλύσιμο για 24 ώρες απομακρύνει περίπου τις μισές από τις αντιδραστικές ομάδες και μετά από 4 εβδομάδες απομακρύνεται έως και 90% (Helander, 1994). Αυτό υποδηλώνει ότι η πραγματική διασύνδεση είναι μια σχετικά αργή διαδικασία και το μεγαλύτερο μέρος της «μονιμοποίησης» με φορμαλδεΐδη πριν από την επεξεργασία των ιστών στη διαγνωστική παθολογία σταματά με το σχηματισμό αντιδραστικών υδροξυμεθυλομάδων. Κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας αποθήκευσης σε φορμόλη, οι αντιδραστικές ομάδες μπορεί να οξειδωθούν στις πιο σταθερές ομάδες (π.χ. οξέα – NH–COOH) οι οποίες δεν απομακρύνονται εύκολα με πλύσιμο σε νερό ή αλκοόλη.

Η επιστροφή του δείγματος σε νερό ή αλκοόλη μετά τη μονιμοποίηση μειώνει επομένως την περαιτέρω μονιμοποίηση του δείγματος, επειδή οι αντιδραστικές ομάδες που παράγονται από την αρχική αντίδραση με φορμόλη μπορεί να αντιστραφούν και να απομακρυνθούν. Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι η διασύνδεση ήταν η πιο σημαντική διαδικασία στη μονιμοποίηση ιστού για βιολογικές χρήσεις (βάσει του περιορισμένου αριθμού διασύνδεσης σε σύντομες περιόδους μονιμοποίησης), είναι πιθανό ο σχηματισμός αυτών των υδροξυμεθυλομάδων στην πραγματικότητα να μετουσιώνει τα μακρομόρια και να τα καθιστά αδιάλυτα. Καθώς αυτά τα πειράματα πλύσης δεν έχουν αναπαραχθεί, οι πραγματικοί μηχανισμοί και η σημασία τους στη μονιμοποίηση από φορμαλδεΐδη παραμένουν αβέβαιοι. Η υπερμονιμοποίηση του ιστού μπορεί επίσης να διορθωθεί εν μέρει με εμβάπτιση του ιστού σε συμπυκνωμένη αμμωνία συν 20% ένυδρη γλωράλη (Lhotka & Ferreira, 1949). Ο Fraenkel-Conrat και οι συνεργάτες του σημείωσαν ότι οι αντιδράσεις προσθήκης και συμπύκνωσης της φορμαλδεΐδης με αμινοξέα και πρωτεΐνες ήταν ασταθείς και μπορούσαν να αντιστραφούν εύκολα με αραίωση ή διαπίδυση (Fraenkel-Conrat et al., 1945, 1947; Fraenkel-Conrat & Olcott, 1948a, 1948b; Fraenkel-Conrat & Mecham, 1949).

Ο κύριος τύπος διασταυρούμενης σύνδεσης στη βραχυπρόθεσμη μονιμοποίηση θεωρείται ότι είναι μεταξύ της υδροξυμεθυλομάδας σε μια πλευρική αλυσίδα λυσίνης και αργινίνης (μέσω δευτεροταγών αμινομάδων), ασπαραγίνης και γλουταμίνης (μέσω δευτεροταγών αμιδικών ομάδων) ή τυροσίνης (μέσω υδροξυλομάδων) (Tome et al., 1990). Για παράδειγμα, μια λυσινο-υδροξυμεθυλαμινομάδα μπορεί να αντιδράσει με μια αργινο-ομάδα και να σχηματίσει διασταυρούμενη σύνδεση λυσίνης-CH₂-αργινίνης. Ομοίως, μια τυροσινο-υδροξυμεθυλαμινομάδα μπορεί να συνδεθεί με μια κυστεΐνη και να σχηματίσει διασταυρούμενη σύνδεση τυροσίνης-CH₂-κυστεΐνης. Κάθε μία από αυτές τις διασταυρούμενες συνδέσεις μεταξύ μακρομορίων έχει διαφορετικό βαθμό σταθερότητας, ο οποίος όμως μπορεί να τροποποιηθεί από τη θερμοκρασία, το pH και τον τύπο του περιβάλλοντος που περιβάλλει και διαπερνά τον ιστό (Eltoum et al., 2001b).

Ο χρόνος κορεσμού των ανθρώπινων και ζωικών ιστών με δραστικές ομάδες από τη φορμόλη είναι περίπου 24 ώρες, αλλά η διασύνδεση μπορεί να συνεχιστεί για πολλές εβδομάδες (Helander, 1994). Όταν η φορμαλδεΐδη διαλύεται σε ένα μη ρυθμισμένο

υδατικό διάλυμα, σχηματίζει ένα όξινο διάλυμα (pH 5,0 - 5,5) επειδή το 5-10% της εμπορικά διαθέσιμης φορμαλδεΰδης είναι μυρμηκικό οξύ.

Η όξινη φορμόλη μπορεί να αντιδράσει πιο αργά με τις πρωτεΐνες από το NBF επειδή οι αμινομάδες φορτίζονται, π.χ. $-NH_3$. Σε διάλυμα, αυτό απαιτεί πολύ χαμηλότερο pH από 5,5. Οι ομάδες μπορεί να μην είναι ισοδύναμες με αυτές που απαιτούνται στα πεπτίδια. Η όξινη φορμόλη διατηρεί επίσης την ανοσοαναγνώριση καλύτερα από την NBF (Arnold *et al.*, 1996). Πράγματι, η επιτυχία των πρώιμων ανοσοϊστοχημικών μεθόδων για την απόδειξη ανοσοσφαιρινών σε τομές ιστών που έχουν υποστεί επεξεργασία με παραφίνη πιθανότατα βασίστηκε στη μονιμοποίηση των ιστών σε όξινη φορμόλη (Taylor & Burns, 1974). Το μειονέκτημα της χρήσης όξινης φορμόλης για μονιμοποίηση είναι ο σχηματισμός μιας καφέ/μαύρης χρωστικής με αποικοδομημένη αιμοσφαιρίνη. Αυτή η χρωστική που σχετίζεται με την αίμη και σχηματίζεται στον ιστό δεν αποτελεί πρόβλημα εκτός εάν οι ασθενείς έχουν κάποια ανωμαλία του αίματος, όπως δρεπανοκυτταρική αναιμία ή ελονοσία. Η φορμαλδεΰδη διατηρεί κυρίως τους δεσμούς πεπτιδίου-πρωτεΐνης και τη γενική δομή των κυτταρικών οργανιδίων. Μπορεί να αλληλεπιδράσει με νουκλεϊκά οξέα, αλλά έχει μικρή επίδραση στους υδατάνθρακες και διατηρεί τα λιπίδια εάν τα διαλύματα περιέχουν ασβέστιο (Bayliss High & Lake, 1996).

5.1.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα της μονιμοποίησης

Ρυθμιστικά διαλύματα και pH

Η επίδραση του pH στη μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη μπορεί να είναι έντονη ανάλογα με τις εφαρμογές στις οποίες θα εκτεθούν οι ιστοί. Σε ένα έντονα όξινο περιβάλλον, οι ομάδες - στόχοι πρωτοταγών αμινών ($-NH_2$) προσελκύουν ιόντα υδρογόνου και καθίστανται μη αντιδραστικές ($-NH_3$) στην ενυδατωμένη φορμαλδεΰδη (ένυδρη μεθυλενογλυκόλη ή μεθυλενογλυκόλη), και οι καρβοξυλικές ομάδες ($-COO^-$) χάνουν τα φορτία τους ($-COOH$). Αυτό μπορεί να επηρεάσει τη δομή των πρωτεϊνών. Ομοίως, οι υδροξυλικές ομάδες των αλκοολών ($-OH$), συμπεριλαμβανομένης της σερίνης και της θρεονίνης, μπορεί να γίνουν λιγότερο αντιδραστικές σε ένα έντονα όξινο περιβάλλον. Η έκταση του σχηματισμού δραστικών υδροξυμεθυλικών ομάδων και η διασύνδεση μειώνεται σε μη ρυθμισμένη φορμαλδεΰδη 4% (Means & Feeney, 1995), η οποία είναι ελαφρώς όξινη (French & Edsall, 1945), επειδή οι κύριες διασυνδέσεις μεθυλενίου βρίσκονται μεταξύ της λυσίνης και της ελεύθερης αμινομάδας, στις πλευρικές αλυσίδες. Η μείωση της αποτελεσματικότητας, της σταθεροποίησης της φορμαλδεΰδης και της διασύνδεσης σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον έχει οδηγήσει ορισμένους συγγραφείς να υποστηρίξουν ότι η μη ρυθμισμένη φορμόλη είναι καλύτερο σταθεροποιητικό από το NBF για την ανοσοαναγνώριση πολλών αντιγόνων (Arnold *et al.*, 1996; Eltoun *et al.*, 2001b). Αυτό βοήθησε στην ανίχνευση αντιγόνων πριν από την εμφάνιση μεθόδων ανάκτησης αντιγόνων με επαγωγή θερμότητας στην ανοσοϊστοχημεία. Ωστόσο, η ελάχιστη καθυστέρηση στην αποτελεσματική μονιμοποίηση ασταθών αντιγόνων, όπως ο υποδοχέας οιστρογόνων, είναι ζωτικής σημασίας στις ανοσοϊστοχημικές δοκιμές για μια σειρά κλινικά σημαντικών προγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών. Ενώ η μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη παραμένει η συνιστώμενη μέθοδος για τη βέλτιστη διατήρηση μορφολογικών χαρακτηριστικών, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων σε ένα κλινικό περιβάλλον. Ο πιο αξιόπιστος τρόπος επίτευξης

βέλτιστης μονιμοποίησης φορμαλίνης είναι μέσω της ρύθμισης σε pH 7,2–7,4, δηλαδή NBF.

Στο όξινο pH της μη ρυθμισμένης φορμαλδεΐδης, τα μεταβολικά προϊόντα της αιμοσφαιρίνης τροποποιούνται χημικά για να σχηματίσουν μια καφέ-μαύρη, αδιάλυτη, κρυσταλλική, διπλοθλαστική χρωστική. Αυτή η χρωστική σχηματίζεται σε pH μικρότερο από 5,7 και η έκταση του σχηματισμού της αυξάνεται στην περιοχή pH από 3,0 έως 5,0. Η χρωστική φορμόλης αναγνωρίζεται εύκολα και δεν θα πρέπει να επηρεάζει τις διαγνώσεις εκτός από ασθενείς με μεγάλες ποσότητες προϊόντων διάσπασης αιμοσφαιρίνης δευτερογενώς σε αιμοποιητικές παθήσεις. Η χρωστική απομακρύνεται εύκολα με ένα αλκοολούχο διάλυμα πικρικού οξέος. Η χρήση NBF αποφεύγει τον σχηματισμό χρωστικής φορμόλης και χρησιμοποιείται ως το προτιμώμενο σταθεροποιητικό με βάση τη φορμαλδεΐδη. Το οξικό οξύ και άλλα οξέα λειτουργούν κυρίως μέσω της μείωσης του pH και της διατάραξης της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Τα ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιούνται για τη διατήρηση του βέλτιστου pH. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος εξαρτάται από τον τύπο του σταθεροποιητικού και του αναλύτη. Τα συνήθως χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα είναι τα φωσφορικά, κακοδυλικά, διττανθρακικά, τρις και οξικό άλας.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται φορμόλη χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα, σε ρυθμιστικό διάλυμα, στους νέους πολύπλοκους επεξεργαστές ιστών, προκειμένου να διατηρείται το μηχάνημα «καθαρό» και να μειώνονται τα προβλήματα στη λειτουργία του.

Διάρκεια μονιμοποίησης και μέγεθος δειγμάτων

Οι παράγοντες που διέπουν τη διάχυση ενός μονιμοποιητικού στον ιστό διερευνήθηκαν από τον Medawar (1941). Διαπίστωσε ότι το βάθος σε mm, d , που επιτυγχάνεται από ένα μονιμοποιητικό είναι άμεσα ανάλογο με την τετραγωνική ρίζα της διάρκειας μονιμοποίησης σε ώρες, t , και εξέφρασε αυτή τη σχέση ως:

$$d = k\sqrt{t}$$

Η σταθερά, k , είναι ο συντελεστής διαχυσιμότητας που είναι ειδικός για κάθε μονιμοποιητικό. Παραδείγματα είναι 0,79 για 10% φορμαλδεΐδη, 1,0 για 100% αιθανόλη και 1,33 για 3% διχρωμικό κάλιο (Hopwood, 1969). Έτσι, ο χρόνος μονιμοποίησης είναι περίπου ίσος με το τετράγωνο του βάθους στο οποίο πρέπει να διεισδύσει το μονιμοποιητικό και τα περισσότερα μονιμοποιητικά, όπως το NBF, θα διεισδύσουν στον ιστό σε βάθος περίπου 1 mm σε μία ώρα, π.χ. για μια σφαίρα 10 mm, το μονιμοποιητικό δεν θα διεισδύσει στο κέντρο μέχρι (5)²,25 ώρες μονιμοποίησης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα συστατικά ενός σύνθετου μονιμοποιητικού διεισδύουν στον ιστό με διαφορετικούς ρυθμούς, επομένως είναι καλύτερο αυτά τα μονιμοποιητικά να χρησιμοποιούνται με λεπτά δείγματα. Τα μακροσκοπικά δείγματα δεν πρέπει να ακουμπούν στον πυθμένα δοχείου μονιμοποιητικού, αλλά θα πρέπει να διαχωρίζονται από τον πυθμένα με χαρτί ή ύφασμα εμποτισμένο με βαμβάκι, επιτρέποντας τη διείσδυση του μονιμοποιητικού προς όλες τις κατευθύνσεις. Επιπλέον, τα μη μονιμοποιημένα μακροσκοπικά δείγματα που πρόκειται να κοπούν και να αποθηκευτούν στο μονιμοποιητικό πριν από την επεξεργασία, δεν πρέπει να έχουν πάχος μεγαλύτερο από 5 mm. Όταν τα χειρουργικά δείγματα πρόκειται να υποστούν επεξεργασία σε μπλοκ παραφίνης, ο χρόνος διείσδυσης του μονιμοποιητικού είναι πιο κρίσιμος. Συγκεκριμένα ζητήματα

που σχετίζονται με την επεξεργασία των ιστών έχουν εξεταστεί από τους Grizzle et al. (2001) και Jones et al. (2001).

Η μονιμοποίηση προχωρά αργά, η περίοδος μεταξύ του σχηματισμού των δραστικών υδροξυμεθυλομάδων και του σχηματισμού ενός σημαντικού αριθμού διασυνδέσεων είναι άγνωστη. Το ενενήντα τοις εκατό των δραστικών ομάδων μπορεί να απομακρυνθεί μέσα σε 4 εβδομάδες πλύσης (Helander, 1994), επιβεβαιώνοντας ότι η διασύνδεση δεν είναι μια ταχεία διαδικασία και μπορεί να απαιτήσει εβδομάδες για την ολοκλήρωση πιθανών δεσμών. Οι πρωτεΐνες απενεργοποιούν τα μονιμοποιητικά, ειδικά στο αίμα ή σε αιματηρά υγρά, επομένως αυτά τα μακροσκοπικά δείγματα πρέπει να πλένονται με φυσιολογικό ορό πριν τοποθετηθούν στο μονιμοποιητικό. Ο όγκος του μονιμοποιητικού πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές ο όγκος του δείγματος ιστού για βέλτιστη, γρήγορη μονιμοποίηση. Επί του παρόντος, σε ορισμένα εργαστήρια, τα λεπτά δείγματα μπορούν να στερεωθούν σε NBF μόνο για 5-6 ώρες, συμπεριλαμβανομένου του σύντομου χρόνου μονιμοποίησης σε επεξεργαστές ιστών. Η έκταση του σχηματισμού διασυνδέσεων κατά τη διάρκεια μιας τέτοιας ταχείας μονιμοποίησης NBF είναι αβέβαιη. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός υδροξυμεθυλομάδων μπορεί να υπερισχύει σε αντίθεση με την ανθεκτική διασύνδεση. Έχει προταθεί ότι η ταχεία μονιμοποίηση είναι αποδεκτή εφόσον η ιστοχημική χρώση παραμένει επαρκής και ότι η ανοσοϊστοχημεία και άλλες μοριακές τεχνικές πιθανώς ενισχύονται από μικρότερους χρόνους μονιμοποίησης χρησιμοποιώντας ένα μονιμοποιητικό με βάση την αλδεΐδη, π.χ. φορμαλδεΐδη. Ωστόσο, μελέτες που διερευνούν τον χρόνο που απαιτείται για την επαρκή μονιμοποίηση κλινικών περιπτώσεων ιστού καρκίνου του μαστού για επακόλουθη ανοσοϊστοχημική ανίχνευση υποδοχέων οιστρογόνων δείχνουν ότι αυτή η πρακτική μπορεί να είναι επιζήμια για τη βέλτιστη διατήρηση σημαντικών αντιγόνων και θα πρέπει να αποφεύγεται. Οι Goldstein et al. (2003) διαπίστωσαν ότι 6-8 ώρες ήταν ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για την επαρκή μονιμοποίηση του ιστού του μαστού για ανοσοϊστοχημική εξέταση υποδοχέων οιστρογόνων, ανεξάρτητα από το μέγεθος και τον τύπο του δείγματος. Κατά συνέπεια, οι οδηγίες για τη δοκιμή υποδοχέων οιστρογόνων και υποδοχέων προγεστερόνης που εκδόθηκαν από την Αμερικανική Εταιρεία Κλινικής Ογκολογίας (ASCO) και το Κολλέγιο Αμερικανών Παθολόγων (CAP) συνιστούν αυτόν τον ελάχιστο χρόνο μονιμοποίησης σε ουδέτερη φορμόλη σε ρυθμιστικό διάλυμα για όλα τα κλινικά δείγματα καρκίνου του μαστού (Hammond et al., 2010).

Θερμοκρασία μονιμοποίησης

Η διάχυση των μορίων αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας λόγω της ταχύτερης κίνησης, δηλαδή ο ρυθμός διείδυσης της φορμαλδεΐδης σε έναν ιστό είναι ταχύτερος σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Επομένως, τα μικροκύματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιτάχυνση της μονιμοποίησης της φορμαλδεΐδης αυξάνοντας τόσο τη θερμοκρασία όσο και τις μοριακές κινήσεις. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα ατμών αποτελούν πρόβλημα ασφάλειας (Grizzle & Fredenburgh, 2001, 2005). Οι περισσότερες χημικές αντιδράσεις συμβαίνουν ταχύτερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες και επομένως η φορμαλδεΐδη αντιδρά ταχύτερα με τις πρωτεΐνες σε αυτές τις συνθήκες (Hopwood, 1985). Οι κλειστοί επεξεργαστές ιστών έχουν τον αποστακτήρα επεξεργασίας τους ακριβώς πάνω από τους σταθμούς συγκράτησης παραφίνης, οι οποίοι διατηρούνται στους 60–65°C, καθιστώντας τον αποστακτήρα ελαφρώς θερμότερο από τη θερμοκρασία δωματίου.

Συγκέντρωση μονιμοποιητικού

Η αποτελεσματικότητα και η διαλυτότητα καθορίζουν κυρίως την κατάλληλη συγκέντρωση μονιμοποιητικών. Συγκεντρώσεις φορμόλης άνω του 10% τείνουν να προκαλούν αυξημένη σκλήρυνση και συρρίκνωση (Fox et al., 1985). Επιπλέον, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η φορμόλη υπάρχει στην πολυμερική της μορφή, η οποία μπορεί να εναποθεθεί ως λευκό ίζημα, σε αντίθεση με τη μονομερή της μορφή HO(H₂CO)H, η οποία στο 4% είναι πιο διαλυτή (Baker, 1958).

Οσμωτικότητα των μονιμοποιητικών και ιοντική σύνθεση

Η οσμωτικότητα του ρυθμιστικού διαλύματος και του μονιμοποιητικού είναι σημαντική, τα υπερτονικά και υποτονικά διαλύματα οδηγούν σε συρρίκνωση και διόγκωση αντίστοιχα. Τα καλύτερα μορφολογικά αποτελέσματα λαμβάνονται με διαλύματα που είναι ελαφρώς υπερτονικά (400-450 mOsm), αν και η οσμωτικότητα για 10% NBF είναι περίπου 1500 mOsm. Ομοίως, διάφορα ιόντα (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ και Mg²⁺) μπορούν να επηρεάσουν το σχήμα και τη δομή των κυττάρων ανεξάρτητα από την οσμωτική επίδραση. Η ιοντική σύνθεση των υγρών θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ισοτονική με τους ιστούς που σταθεροποιούνται.

Πρόσθετα

Η προσθήκη ηλεκτρολυτών και μη ηλεκτρολυτών στα μονιμοποιητικά μπορεί να βελτιώσει τη μορφολογία του μονιμοποιητικού ιστού. Αυτά τα πρόσθετα περιλαμβάνουν χλωριούχο ασβέστιο, θειοκυανικό κάλιο, θειικό αμμώνιο και δισόξινο φωσφορικό κάλιο. Οι ηλεκτρολύτες μπορούν να αντιδράσουν είτε άμεσα με πρωτεΐνες προκαλώντας μετουσίωση, είτε ανεξάρτητα με τα μονιμοποιητικά και τα κυτταρικά συστατικά (Hayat, 1981). Η επιλογή των ηλεκτρολυτών που θα προστεθούν στα μονιμοποιητικά που χρησιμοποιούνται σε έναν επεξεργαστή ιστών μπορεί να ποικίλλει. Τα μονιμοποιητικά που έχουν ρυθμιστεί με ηλεκτρολύτες όπως τα φωσφορικά άλατα μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα σε ορισμένους επεξεργαστές λόγω της καθίζησης των αλάτων. Η προσθήκη μη ηλεκτρολυτικών ουσιών όπως η σακχαρόζη, η δεξτράνη και το απορρυπαντικό έχει επίσης αναφερθεί ότι βελτιώνει τη μονιμοποίηση (Hayat, 1981).

5.2 Ειδικές παρατηρήσεις για μονιμοποιημένους ιστούς

Μάτια

Ο βολβός πρέπει να μονιμοποιηθεί σταθερά για να κοπούν καλά τμήματα για ενσωμάτωση. Τα μάτια μπορούν να μονιμοποιηθούν σε NBF, συνήθως για περίπου 48 ώρες. Για να επιταχυνθεί η μονιμοποίηση, ένα ή δύο μικρά παράθυρα μπορούν να

κοπούν στον βολβό, αποφεύγοντας τον αμφιβληστροειδή και την ίριδα, μετά από 24 ώρες.

Εγκέφαλος

Το πρόβλημα της μονιμοποίησης ολόκληρου του εγκεφάλου, είναι να γίνει αρκετά σταθερός, για να διερευνηθεί η νευροανατομία και για να είναι δυνατή η παραγωγή τομών για ιστοπαθολογία και πιθανή ανοσοϊστοχημεία. Συμβατικά, αυτή η μονιμοποίηση διαρκεί 2-6 εβδομάδες. Οι Adickes et al. (1997) πρότειναν μια τεχνική έγχυσης που επιτρέπει την επίτευξη όλων των παραπάνω και την έκδοση της έκθεσης σε 5-6 ημέρες.

Μαστός

Τα κλινικά δείγματα θα πρέπει να μονιμοποιούνται σε 10% NBF για τουλάχιστον 6 - 8 ώρες, έως μέγιστο 72 ώρες και θα πρέπει να κόβονται σε διαστήματα 5 mm μετά από κατάλληλη μακροσκοπική επιθεώρηση και προσδιορισμό των ορίων.

Πνεύμονες

Οι βιοψίες πνευμόνων συνήθως σταθεροποιούνται σε NBF. Οι πνεύμονες από λοβεκτομή, πνευμονεκτομή και νεκροψίες μπορεί να διογκωθούν και να σταθεροποιηθούν σε NBF που ενσταλλάσσεται υπό ήπια πίεση μέσω της τραχείας ή των κύριων βρόγχων.

Λεμφοειδής ιστός

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται σε όλους τους λεμφικούς ιστούς καθώς πολλοί οργανισμοί, π.χ. Mycobacterium tuberculosis και ιοί μπορεί να υπάρχουν στο λεμφοδικτυωτό σύστημα. Υπάρχει πάντα πιθανός κίνδυνος μόλυνσης σε τέτοιες περιπτώσεις.

Όρχεις

Οι βιοψίες των όρχεων σταθεροποιούνται συνήθως σε ουδέτερη ρυθμιστική φορμόλη (NBF).

Μυϊκές βιοψίες

Αυτές λαμβάνονται φρέσκες και ένα τμήμα διαχωρίζεται για ενζυμική ιστοχημεία. Ο ιστός για την ιστολογική αξιολόγηση ρουτίνας σταθεροποιείται σε NBF και ενσωματώνεται έτσι ώστε οι ίνες του δείγματος να εξετάζονται σε εγκάρσια τομή και διαμήκως.

Νεφρικές βιοψίες

Οι βιοψίες νεφρικού πυρήνα πρέπει να υποδιαιρούνται σε τρία και κάθε κομμάτι πρέπει να περιέχει επαρκή αριθμό σπειραμάτων, π.χ. 6-10 για οπτική μικροσκοπία, 1 - 2 για ηλεκτρονική μικροσκοπία και 3-6 για ανοσοφθορισμό.

5.3 Μορφολογικές μεταβολές Ιστών κατά τη Μονιμοποίηση

Οι ακόλουθες αλλαγές μπορεί να συμβούν στον ιστό λόγω της μονιμοποίησης:

1. *Αλλαγές όγκου*: Τα μονιμοποιητικά μπορεί να αλλάξουν τον όγκο των κυττάρων. Ορισμένα μονιμοποιητικά όπως το τετροξειδίο του οσμίου προκαλούν οίδημα των κυττάρων. Ο ακριβής μηχανισμός της αλλαγής όγκου δεν είναι σωστά κατανοητός. Ωστόσο, η αλλαγή όγκου μπορεί να οφείλεται (α) σε αλλοιωμένη διαπερατότητα μεμβράνης, (β) στην αναστολή των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αναπνοή και (γ) σε αλλαγή στη μεταφορά ιόντων Na^+ . Η φορμαλδεΰδη μπορεί να προκαλέσει συρρίκνωση του όγκου κατά 33%. Σε ένα πείραμα, οι Bahr et al. σημείωσαν ότι η συρρίκνωση των ιστών είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση φορμαλδεΰδης. Ομοίως, η γλουταραλδεΰδη προκαλεί επίσης σημαντική συρρίκνωση των ιστών. Ωστόσο, όταν η γλουταραλδεΰδη ακολουθούμενη από τετροξειδίο του οσμίου χρησιμοποιείται ως μονιμοποιητικά σε εποξειδική ρητίνη, τότε παρατηρούνται αυξήσεις 70% στο μέγεθος των κυττάρων.

2. *Σκλήρυνση του ιστού*: Η μονιμοποίηση αλλάζει τη συνοχή του ιστού και εμφανίζεται κάποια σκλήρυνση λόγω της μονιμοποίησης.

3. *Παρεμβολή στη χρώση*: Η μονιμοποίηση μπορεί να προκαλέσει παρεμπόδιση στη χρώση των ενζύμων. Η φορμαλδεΰδη απενεργοποιεί το 80% του ενζύμου ριβονουκλεάση. Έχει παρατηρηθεί ότι το τετροξειδίο του οσμίου αναστέλλει τη χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης.

4. *Αλλαγές στην οπτική πυκνότητα λόγω μονιμοποίησης*: Η μονιμοποίηση μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στην οπτική πυκνότητα των πυρήνων και οι πυρήνες μπορεί να φαίνονται συμπακνωμένοι και υπερχρωματικοί.

5.4 Συνήθειες τεχνικές της Μονιμοποίησης

Οι πιο συνήθεις τεχνική είναι η *Μονιμοποίηση με εμβάπτιση* που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια. Σε αυτήν την τεχνική, ολόκληρο το δείγμα βυθίζεται στο υγρό μονιμοποιητικό, όπως δείγματα ιστών που βυθίζονται σε 10% ουδέτερη φορμόλη ή κυτταρολογικό επίχρισμα σε 95% αιθυλική αλκοόλη.

Επίσης άλλη τεχνική είναι η *Μονιμοποίηση με επικάλυψη* που χρησιμοποιείται συνήθως στα κυτταρολογικά δείγματα. Το μονιμοποιητικό ψεκασμού χρησιμοποιείται για εύκολη μεταφορά της αντικειμενοφόρου πλάκας. Τα κύρια πλεονεκτήματα των μονιμοποιητικών ψεκασμού είναι:

(α) Μονιμοποίηση των κυττάρων.

(β) Να προσδώσουν ένα προστατευτικό κάλυμμα πάνω από το επίχρισμα.

Φορμαλδεΰδη

Η καθαρή φορμαλδεΰδη διαλυμένη στο νερό διατίθεται ως φορμαλδεΰδη σε συγκέντρωση 37 έως 40%. Αυτή είναι επίσης γνωστή ως φορμαλίνη και θεωρείται 100% φορμαλδεΰδη. Το 10% αυτής της φορμαλίνης χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για την παρασκευή ουδέτερης ρυθμισμένης φορμαλίνης για το συνήθη εργαστηριακό μονιμοποιητικό.

Ρυθμός διείσδυσης: Η φορμαλίνη διεισδύει περίπου 1 mm/h και συνήθως απαιτούνται 24 ώρες για τη μονιμοποίηση ενός ιστού 1 cm³.

Ο όγκος της φορμαλίνης: Για σωστή μονιμοποίηση, το δείγμα πρέπει να κοπεί σε απόσταση 5 mm και η ποσότητα της φορμαλίνης πρέπει να είναι 20 φορές ο όγκος του ιστού. Το δείγμα πρέπει να βυθιστεί πλήρως στη φορμαλίνη και δεν πρέπει να βρίσκεται σε άμεση επαφή με το δοχείο. Θα πρέπει να υπάρχουν υφάσματα εμποτισμένα με φορμαλίνη ανάμεσα στο δοχείο και τον ιστό. Απομάκρυνση της φορμόλης από τον ιστό: Η διασύνδεση των αμινοξέων και των πρωτεϊνών είναι μια αργή διαδικασία, επομένως εάν ο ιστός πλυθεί για 24 ώρες στο νερό, τότε αφαιρείται το 50% της φορμόλης από τον ιστό.

Προφύλαξη: Η φορμαλδεΰδη είναι ερεθιστική για τα μάτια και το δέρμα και τοξική για εισπνοή. Είναι καρκινογόνο στοιχείο.

Πλεονεκτήματα:

- Ο ρυθμός διείσδυσης της φορμόλης είναι υψηλός
- Η μορφολογία των κυττάρων διατηρείται καλά στη φορμόλη
- Φθινό
- Σταθερό
- Εύκολη παρασκευή διαλύματος
- Η φορμόλη είναι ένα αποτελεσματικό μονιμοποιητικό για τη συνήθη εργαστηριακή χρώση του ιστού

Μειονεκτήματα:

- Αργή μονιμοποίηση
- Η αντίδραση της φορμόλης με τον ιστό είναι αναστρέψιμη και μπορεί να αφαιρεθεί με πλύσιμο.
- Η φορμόλη δεν διατηρεί τους όξινους βλεννοπολυσακχαρίτες.
- Ο ιστός με υψηλή αγγείωση μπορεί να έχει σκούρους καφέ κόκκους (artifact).
- Η έκθεση στο δέρμα μπορεί να προκαλέσει δερματίτιδα.
- Η χρόνια εισπνοή μπορεί να προκαλέσει βρογχίτιδα.

Η προετοιμασία των ιστών για μικροσκοπική εξέταση ξεκινά τη στιγμή που οι ιστοί εκτίθενται σε μονιμοποιητικό. Το κατάλληλο μονιμοποιητικό θα εξαρτηθεί από τον τύπο της μελέτης, τα τελικά σημεία που θα εξεταστούν, τα κύρια όργανα και την προτιμώμενη μέθοδο στερεώσεως (δηλαδή, εμβάπτιση, φούσκωμα ή έγχυση). Η σωστή μονιμοποίηση, είναι ίσως η πιο κρίσιμη πτυχή της διασφάλισης υψηλής ποιότητας, ιστών για ιστοπαθολογική ανάλυση.

Η εμβάπτιση είναι η πιο συχνή τεχνική που χρησιμοποιείται για συνήθεις μελέτες τοξικότητας. Αυτή η μέθοδος προτιμάται επειδή είναι γρήγορη, δεν απαιτεί εξειδικευμένη εκπαίδευση και απαιτεί ελάχιστη έως καθόλου προετοιμασία ιστών. Οι ιστοί απλώς τοποθετούνται στο διάλυμα μονιμοποίησης.

Η διόγκωση είναι η προτιμώμενη μέθοδος μονιμοποίησης για τους πνεύμονες. Χρησιμοποιείται επίσης συχνά για κοίλα όργανα, όπως το πεπτικό σύστημα και το ουροποιητικό σύστημα, ουροδόχου κύστης, για να διασφαλιστεί ότι οι ευαίσθητες βλεννογονικές επενδύσεις θα στερεωθούν γρήγορα. Η διόγκωση αυτών των οργάνων έχει ως αποτέλεσμα καλύτερη μονιμοποίηση και αποτρέπει τον σχηματισμό τεχνουργημάτων, όπως η ατελεκτασία (κατάρρευση των κυψελίδων) στον πνεύμονα ή το παχύ επιθήλιο στην άδεια ουροδόχο κύστη, τα οποία και τα δύο μπορεί να είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν από ιστοπαθολογικές αλλαγές. Η ιδανική μέθοδος για τη διόγκωση των πνευμόνων είναι η έγχυση μονιμοποιητικού σε πίεση νερού 20 mm και στη συνέχεια η βύθιση της τραχείας και των πνευμόνων στο μονιμοποιητικό για 48 ώρες. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται συχνότερα σε μεγαλύτερα είδη, όπως σκύλους και μη τρωκτικά. Σε τρωκτικά και άλλα μικρότερα είδη που δεν είναι τρωκτικά (κουνέλια), οι πνεύμονες διογκώνονται συχνότερα εισάγοντας μια αμβλεία βελόνα 14 έως 18 gauge στην τραχεία, είτε με τους πνεύμονες στη θέση τους είτε μετά την αφαίρεση του "αποσπάσματος" (το οποίο αποτελείται από τη γλώσσα, τον φάρυγγα, τον λάρυγγα, τον οισοφάγο, την τραχεία, τους βρόγχους του κύριου στελέχους και τον πνεύμονα αφαιρεμένα en bloc) και στη συνέχεια η αργή διόγκωση των πνευμόνων (χωρίς μέτρηση της πίεσης) μέχρι να επιτευχθεί ο κανονικός εισπνευστικός τους όγκος (όπως υποδεικνύεται από την πλήρη διαστολή του οργάνου). Οι ποσότητες μονιμοποιητικού που απαιτούνται για τα τρωκτικά είναι περίπου 1–2 mL για ενήλικα ποντίκια και 2–4 mL για ενήλικους αρουραίους. Για οποιαδήποτε από τις δύο μεθόδους σε τρωκτικά, ορισμένες εγκαταστάσεις θα απολινώσουν την τραχεία (περίπου 0,5–1,0 cm από τον πνεύμονα) μετά τη διόγκωση για να διατηρηθεί το μονιμοποιητικό εντός των διευρυμένων κυψελιδικών χώρων. Ωστόσο, τα εργαστήρια νεκροψίας υψηλής απόδοσης ενδέχεται να παραλείψουν αυτό το βήμα. Η πεπτική οδός συνήθως διογκώνεται με έκπλυση από το ένα άκρο κοπής και η ουροδόχος κύστη φουσκώνεται μέσω της ουρήθρας. Η έγχυση είναι η προτιμώμενη μέθοδος για ορισμένες ειδικές μελέτες τοξικότητας οργάνων – στόχων όπου ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός είναι το κύριο επίκεντρο της νεκροψίας. Αυτή η μέθοδος συνήθως περιλαμβάνει ενδοαγγειακή έγχυση μονιμοποιητικού σε ολόκληρο το σώμα με την τοποθέτηση ενός καθετήρα στην αριστερή κοιλία της καρδιάς. Στη συνέχεια, γίνεται μια σχισμή στον δεξιό κόλπο για να επιτραπεί η παροχέτευση αίματος (*Bolon & Butt, 2014*). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το βάρος ορισμένων οργάνων (ειδικά του σπλήνα) μπορεί να επηρεαστεί από αυτήν την τεχνική. Ορισμένες εγκαταστάσεις περιορίζουν τέτοιες ανησυχίες σχετικά με το βάρος των οργάνων, "σφίγγοντας" την αορτή ακριβώς περιφερικά των καρωτιδικών αρτηριών, πραγματοποιώντας έτσι μια έγχυση μόνο από την κεφαλή (*Musigazi et al., 2018*).

Δυστυχώς, δεν υπάρχει ένα μονιμοποιητικό που να παρέχει βέλτιστη μονιμοποίηση για όλους τους ιστούς και τις διαδικασίες. Για τις περισσότερες μελέτες σε ζώα, τα μονιμοποιητικά διασύνδεσης με βάση τις αλδεύδες, όπως η ουδέτερη φορμόλη 10% σε ρυθμιστικό διάλυμα, θα είναι το μονιμοποιητικό επιλογής. Το NBF είναι ευρέως διαθέσιμο, οικονομικό και παρέχει καλή γενική μονιμοποίηση για τα περισσότερα όργανα.

Το μονιμοποιητικό Zenker παρέχει επίσης βαθύτερη διείσδυση από το NBF, χρησιμοποιείται σπάνια επειδή περιέχει τοξικά συστατικά (χλωριούχο υδράργυρο και διχρωμικό κάλιο) που καθιστούν την απόρριψη δύσκολη και ακριβή.

Η αιμάτωση για την αξιολόγηση του κεντρικού νευρικού συστήματος χρησιμοποιεί συνήθως φορμαλδεΰδη 4% χωρίς μεθανόλη (συνήθως ονομάζεται παραφορμαλδεΰδη 4% [PFA]) επειδή η μεθανόλη περιλαμβάνεται σε εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα NBF ως σταθεροποιητικός παράγοντας, μπορεί να εξαγάγει λιπίδια από το παρέγχυμα του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, προκαλώντας τεχνητή κενотоπία στη

λευκή ουσία αυτών των ιστών. Μείγματα PFA και γλουταραλδεΐδης (π.χ., μονιμοποιητικά Karnovsky και Trump) χρησιμοποιούνται επίσης για την ολική αιμάτωση του σώματος, ειδικά όπου η συλλογή ιστών για μικροσκοπήση είναι ένα πρωταρχικό τελικό σημείο μελέτης, καθώς το PFA παρέχει γρήγορη διείσδυση και μονιμοποίηση, ενώ η γλουταραλδεΐδη παρέχει καλύτερη μοριακή διασύνδεση και υπερδομική διατήρηση (*McDowell και Trump, 1976*).

Για να επιτραπεί η επαρκής μονιμοποίηση των βυθισμένων ιστών, οι ιστοί πρέπει να κόβονται σε πάχος 1/2 cm και να τοποθετούνται σε ένα δοχείο που περιέχει τουλάχιστον αναλογία 10:1 στερητικού προς ιστό. Είναι καλή πρακτική να αλλάζετε το NBF μετά από 24-48 ώρες, ειδικά εάν υπάρχει μεγάλη ποσότητα ιστού ή ουσιαστική απελευθέρωση αίματος στο δοχείο, καθώς αυτό εξασφαλίζει επαρκή διείσδυση του μονιμοποιητικού στον ιστό.

Παρόλο που οι υπηρεσίες ταχυμεταφορών με νυχτερινή παράδοση έχουν βελτιώσει τις επιλογές αποστολής τους, η απρόβλεπτη φύση μπορεί περιστασιακά να εμποδίσει τις καλύτερες προσπάθειες κάποιου. Με τους αυξανόμενους κανονισμούς για τη μεταφορά επικίνδυνων υλικών, μπορεί να γίνει πιο δύσκολη η αποστολή σταθερών ιστών αεροπορικά. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγαλύτερους χρόνους μεταφοράς, καθώς και σε επιπλέον γραφειοκρατία (ειδικά εάν διασχίζονται τα εθνικά σύνορα) και σε πιο περίπλοκο συντονισμό μεταξύ των ιδρυμάτων. Ορισμένοι αποστολείς έχουν επίσης εφαρμόσει αυστηρούς κανονισμούς όσον αφορά τις αποστολές που περιέχουν μονιμοποιητικά ή σταθερούς ιστούς. Αυτοί οι κανονισμοί μπορούν να περιλαμβάνουν τους τύπους δοχείων που είναι αποδεκτοί και εάν είναι απαραίτητο να γίνει δευτερογενής συγκράτηση (συσκευασία σε σακούλες) ή και μέτρα ελέγχου διαρροών. Επομένως, είναι κρίσιμο να πληρούνται οι συγκεκριμένες απαιτήσεις του αποστολέα πριν από την αποστολή δειγμάτων σε ένα μακρινό εργαστήριο. Ορισμένα εργαστήρια με σύμβαση παρέχουν υπηρεσία ταχυμεταφορών για την παραλαβή ιστών. Αυτή η μέθοδος είναι επωφελής, καθώς παρέχει έλεγχο της θερμοκρασίας και του χρόνου μεταφοράς και επιτρέπει μια αυστηρή αλυσίδα φύλαξης για όλα τα υλικά. Γενικά, δεν συνιστάται η αποστολή σταθερών δειγμάτων κατά τη διάρκεια του Σαββατοκύριακου, καθώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες αποθήκευσης και παραλαβής ενδέχεται να μην είναι κατάλληλες και θα μπορούσαν ακούσια να οδηγήσουν σε υλικά που έχουν υποστεί ζημιά ή έχουν τοποθετηθεί σε λάθος θέση. Οι μονιμοποιημένοι ιστοί πρέπει να υποβληθούν σε περαιτέρω επεξεργασία για να επιτραπεί η ενσωμάτωση, μια διαδικασία που είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση της δομής των κυττάρων και των ιστών. Αυτό το βήμα συνήθως πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μια σειρά από διαβαθμισμένες αλκοόλες (ξεκινώντας από 50% ή 70% και στη συνέχεια αυξάνοντας σταδιακά έως 100%) ακολουθούμενες από οργανικούς διαλύτες (π.χ., τολουόλιο ή ξυλόλιο) για τη σταδιακή αφαίρεση του νερού από τον μονιμοποιημένο ιστό.

Αυτά τα βήματα εκτελούνται γενικά σε αυτοματοποιημένους επεξεργαστές σε σύγχρονα ιστολογικά εργαστήρια.

5.5 Τυπικές Διαδικασίες ελέγχου της εγκυρότητας της μονιμοποίησης

Είναι επίσης σημαντικό να υπάρχουν μέτρα ελέγχου ποιότητας που να επαληθεύουν ότι υπάρχουν όλοι οι απαιτούμενοι ιστοί και οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις και ότι η ποιότητα των ιστών και των τομών που προκύπτουν είναι επαρκής. Πολλά εργαστήρια επεξεργάζονται ιστούς με σειρά ομάδας, καθώς αυτό μπορεί να διευκολύνει την τεκμηρίωση. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση μπορεί να δημιουργήσει ένα ψευδές εφέ που σχετίζεται με τη θεραπεία σε περίπτωση που προκύψει κάποιο τεχνητό σφάλμα επεξεργασίας που επηρεάζει μόνο μία ομάδα. Μια λύση σε αυτό είναι η «αντιστάθμιση», η οποία περιλαμβάνει την επεξεργασία των ζώων είτε με σειρά επαναλήψεων (επεξεργασία ενός ζώου από κάθε ομάδα πριν μετακινηθεί στο δεύτερο ζώο οποιασδήποτε ομάδας) είτε με τυχαία σειρά για να διασφαλιστεί ότι κάθε εκτέλεση επεξεργασίας περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα ζώα από κάθε ομάδα θεραπείας.

Ένας άλλος πιθανός τομέας όπου οι ιστοί μπορούν να προετοιμαστούν λανθασμένα για εξέταση είναι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ενσωμάτωσης. Αυτό το βήμα είναι όταν οι ιστοί διηθούνται με παραφίνη και στη συνέχεια τοποθετούνται σε μπλοκ παραφίνης για να διευκολυνθεί η τομή. Είναι σημαντικό τα μπλοκ να περιέχουν ιστούς παρόμοιας σκληρότητας. Η τοποθέτηση οστού (σκληρού) και πνεύμονα (μαλακού) στην ίδιο μπλοκ θα μπορούσε να προκαλέσει πρόβλημα στο μικροτόμο και κατά συνέπεια πρόβλημα στη τομή. Αυτό θα προκαλούσε artifacts που προκαλούνται από τη δύναμη, όπως σημάδια κυματισμού, λόγω των διαφορών στη σύνθεση και την πυκνότητα του ιστού. Επιπλέον, τα μπλοκ δεν πρέπει να γεμίζονται με ιστό, καθώς τα καπάκια των υπεργεμισμένων μπλοκ θα εντυπώσουν ένα πλέγμα σαν σχέδιο αυλακώσεων στην επιφάνεια μαλακών οργάνων (εγκέφαλο, ήπαρ και πνεύμονας) που παραμορφώνει τις δομές στις τελικές τομές ιστών.

Πρόσθετες προβληματικές περιοχές στο ιστολογικό εργαστήριο μπορούν να εντοπιστούν σε ελαττωματικό εξοπλισμό (όπως ανακριβή έλεγχο θερμοκρασίας ή κενού) ή σε έλλειψη εκπαίδευσης από τους χειριστές. Για παράδειγμα, εάν τα μπλοκ ιστών δεν ψυχθούν σωστά και δεν ενυδατωθούν πριν από την τομή τους, οι προκύπτουσες ταινίες ιστού μπορεί να τεντωθούν ή να σχιστούν, με αποτέλεσμα την τεχνητή θραύση των τομών. Αλλοιώσεις (όπως χρώση ιζημάτων πάνω από τις τομές, χρήση ληγμένων αντιδραστηρίων) μπορούν επίσης να προκύψουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χρώσης (Chlipala et al., 2020).

Coolidge & Howard, 1979; Suvarna, Layton, & Bancroft, 2019). Fixation and histologic fixation (Haschek Rousseax Toxicology)

5.6 Αλλοιώσεις Ιστών κατά την μονιμοποίηση (Artifacts)

Η ακριβής διάγνωση διαφόρων αλλοιώσεων στο μικροσκόπιο απαιτεί την προετοιμασία ιστών, συνήθως χρωματισμένων. Η προετοιμασία ιστών υψηλής ποιότητας απαιτεί δεξιότητες και εμπειρία στον τομέα της εργαστηριακής πειθαρχίας. Τις περισσότερες φορές, οι παθολογοανατόμοι συναντούν περιστατικά πλακιδίων ιστών, που είτε δεν έχουν μονιμοποιηθεί σωστά είτε έχουν υποστεί λανθασμένο χειρισμό κατά την επεξεργασία αυτών, με αποτέλεσμα αλλοιώσεις στις λεπτομέρειες των ιστών. Τέτοιες αλλαγές ταξινομούνται ως «artifacts» αλλοιώσεις. Το τεχνητό αντικείμενο αναφέρεται σε «Μια τεχνητή δομή ή αλλοίωση ιστού σε μια προετοιμασμένη μικροσκόπηση ως αποτέλεσμα ενός εξωγενούς παράγοντα». Αποτελούν την κύρια πηγή διαγνωστικού προβλήματος. Στόχος του να εξετάσει τις

διάφορες αιτίες των αλλοιώσεων και τον τρόπο αναγνώρισης και αποτροπής τους από το να παρεμβαίνουν στην ακριβή διάγνωση αυτών.

Ταξινόμηση αλλοιώσεων (artifacts):

1. Αλλοιώσεις προθέματος
2. Αλλοιώσεις μονιμοποίησης
3. Αλλοιώσεις που σχετίζονται με οστίτη ιστό
4. Αλλοιώσεις επεξεργασίας ιστών
5. Αλλοιώσεις που σχετίζονται με μικροτομία
6. Αλλοιώσεις που σχετίζονται με επίπλευση και τοποθέτηση
7. Αλλοιώσεις χρώσης
8. Αλλοιώσεις τοποθέτησης

Αλλοιώσεις μονιμοποίησης

Χρωστικές φορμαλίνης

Η αίμη από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και η φορμαλίνη συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν σύμπλοκο φορμαλίνης-αίμης που εμφανίζεται ως καφέ-μαύροι άμορφοι μικροκρυσταλλικοί κόκκοι ιστών. Η χρωστική είναι παράγωγο της αιματίνης και παρουσιάζει πολλές φυσικές και ιστοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με τις χρωστικές που παράγονται από ορισμένα ζωικά παράσιτα, όπως στην ελονοσία, το σχιστοσωμάτωμα και τα πνευμονικά ακάρεια.

Χρωστικές υδραργύρου

Το μονιμοποιητικό που περιέχει χλωριούχο υδράργυρο συνήθως, αλλά όχι πάντα, παράγει σκούρες καφέ κοκκώδεις εναποθέσεις. Η χρωστική χλωριούχου υδραργύρου είναι εξωκυτταρική και μπορεί να απομακρυνθεί με επεξεργασία σε αλκοολικό ιώδιο.

Ωσμωτικότητα του διαλύματος μονιμοποίησης

Τα υπερτονικά διαλύματα μονιμοποίησης προκαλούν κυτταρική συρρίκνωση και αυξημένους εξωκυτταρικούς χώρους, ενώ τα ισότονα (300-320 mOsm) και υποτονικά μονιμοποιητικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε οίδημα των κυττάρων. Τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ελαφρώς υπέρτονο διάλυμα (400-450 mOsm).

Αλλοιώσεις παγοκρυστάλλων

Προκύπτουν από αργή κατάψυξη ιστού, ακατάλληλες τεχνικές απόσβεσης ή επιλογή δειγμάτων ιστού που είναι πολύ μεγάλα για να επιτρέψουν ταχεία κατάψυξη. Εμφανίζονται ως μεσοκυττάρειες σχισμές σε ιστούς υψηλής κυτταροβρίθειας και ενδοκυτταρικές σχισμές και κενोटόπια στον σκελετικό μυ. Οι καταψύκτες διαστολής

διοξειδίου του άνθρακα είναι αρκετά ικανοποιητικοί για την πρόληψη μακροσκοπικών κρυστάλλων πάγου σε ιστό, συμπεριλαμβανομένων υλικών για ταχεία διάγνωση πριν από την κρυστατική μικροτομία.

Αλλοιώσεις κατάψυξης

Εμφανίζονται ως τρύπες ελβετικού τυριού στο επιθήλιο (διάμεσα κενोटόπια μαζί με κενोटόπια μέσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων) και στους χώρους των ιστών. Αντιπροσωπεύουν τις περιοχές όπου οι κρύσταλλοι πάγου διαρρηγνύουν τον ιστό. Αυτός ο μηχανισμός αποτελείται κυρίως από ωσμωτική βλάβη που προέρχεται από τον σχηματισμό πάγου στο μονιμοποιητικό διάλυμα στο οποίο συνήθως χορηγούνται οι βιοψίες.

Ροή τεχνητού υλικού

Αυτό οφείλεται στη διάχυση μη στερεωμένου υλικού για να δώσει ψευδή εντοπισμό, καθώς ακινητοποιείται σε μια θέση διαφορετική από την αρχική του θέση, για παράδειγμα, ψευδής εντοπισμός με γλυκογόνο και ένζυμα στην ιστοχημεία. Παρατηρείται συχνότερα σε ιστό μονιμοποιημένο με φορμαλίνη. Μπορεί να αποφευχθεί χρησιμοποιώντας μονιμοποιητικά γλυκογόνου (φορμόλη, αλκοόλη ή Bouin) ή με λυοφιλίωση.

Τεχνητό στοιχείο μονιμοποίησης μικροκυμάτων

Η βέλτιστη θερμοκρασία για μονιμοποίηση σε μικροκύματα είναι 45°C–55°C. Η υποθέρμανση έχει ως αποτέλεσμα κακή ποιότητα τομής, ενώ η υπερθέρμανση προκαλεί κενοτοπίωση, υπερχρωματισμένο κυτταρόπλασμα και πυκνωτικούς πυρήνες.

Αλλοιώσεις που σχετίζονται με τον οστικό ιστό:

Αλλοιώσεις οστικής σκόνης

Αφαλοποίηση

Υπερασβεστοποίηση

Επίδραση ατελούς αφαλάτωσης

Αλλοιώσεις επεξεργασίας ιστού:

Ακατάλληλη αφυδάτωση

Ακατάλληλη εκκαθάριση

Ακατάλληλη ενσωμάτωση

Αλλοιώσεις προσανατολισμού

Απώλεια διαλυτών ουσιών

Αλλοιώσεις που σχετίζονται με μικροτομία:

Χαρακτηριστικά και σχίσιμο σε τομές

Ταλαντώσεις
Αλλοιώσεις συμπίεσης
Φαινόμενο φαγωμένου από σκόρο (οπές από τραχύτητα)
Αλλοιώσεις πλεύσης
Εναλλακτικές παχιές και λεπτές τομές

Αλλοιώσεις που σχετίζονται με την επίπλευση και την τοποθέτηση:

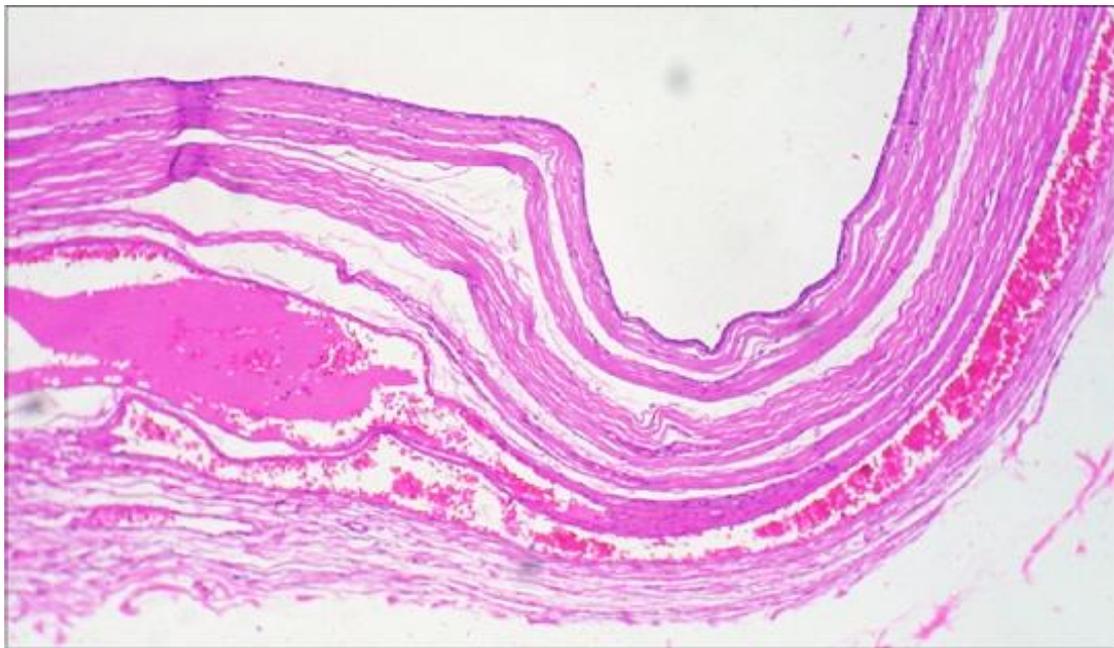
Παρατεταμένη επίπλευση τομών στο υδατόλουτρο
Πτυχώσεις και ρυτίδες στην τομή
Μόλυνση
Φυσαλίδες αέρα

Αλλοιώσεις χρώσης:

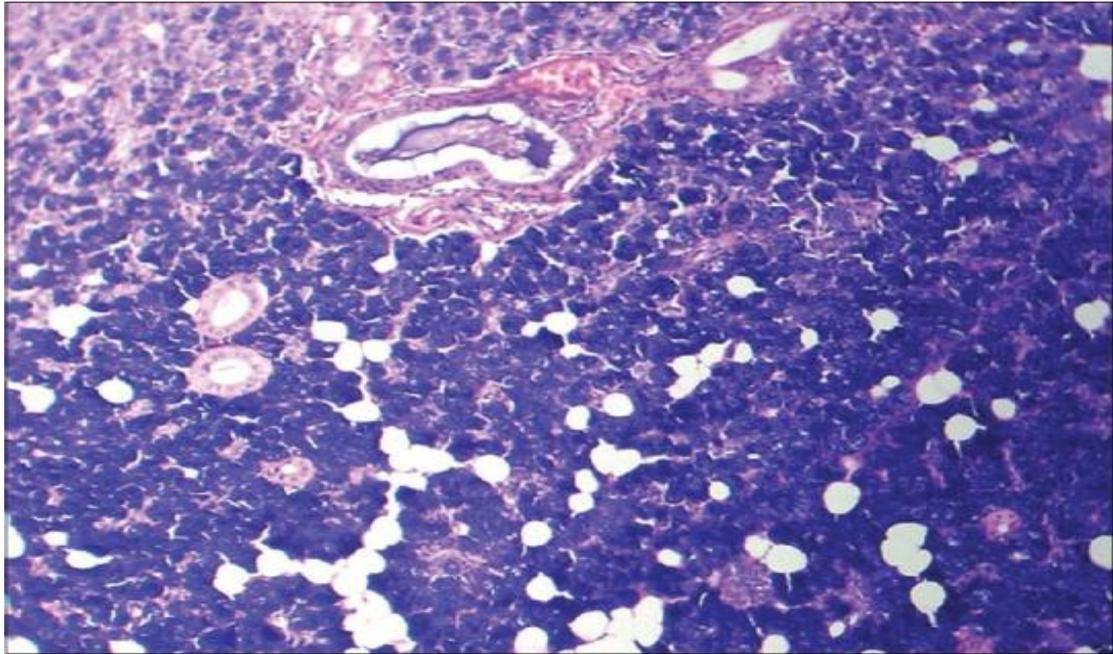
Υπολειμματική παραφίνη
Αλλοιώσεις που σχετίζονται με την προσθήκη οξικού οξέος στην ηωσίνη
Αλλοιώσεις λόγω αιματοξυλίνης
Αλλοιώσεις λόγω φθορίζουσας λάμπης αιματοξυλίνης

Αλλοιώσεις τοποθέτησης:

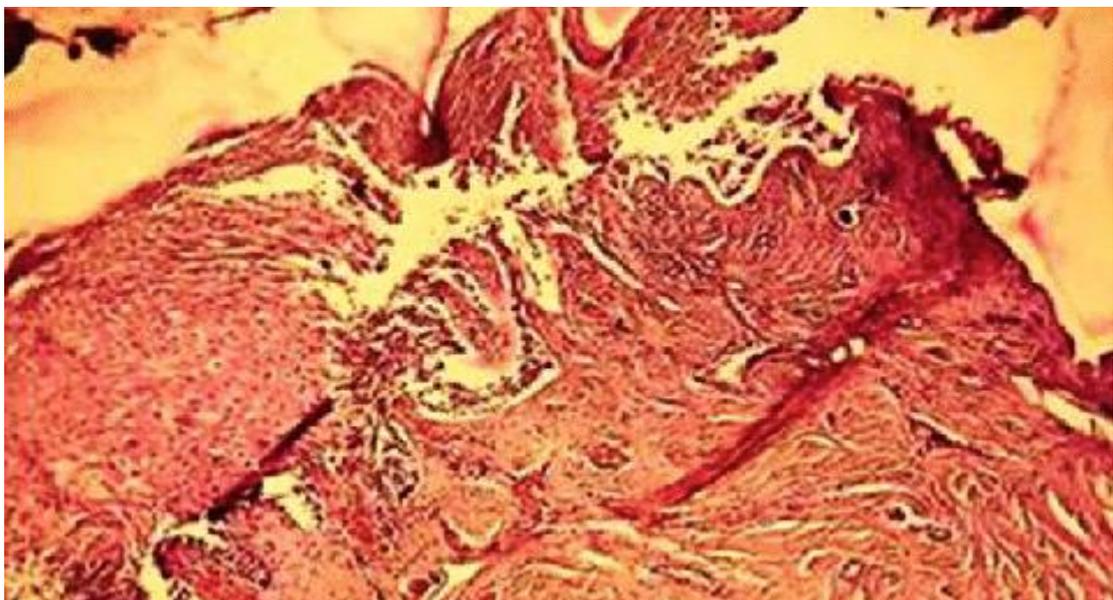
Υπολειμματικό νερό και φυσαλίδες αέρα
Αλλοίωση που σχετίζεται με υπερβολική χρήση μέσων μονιμοποίησης



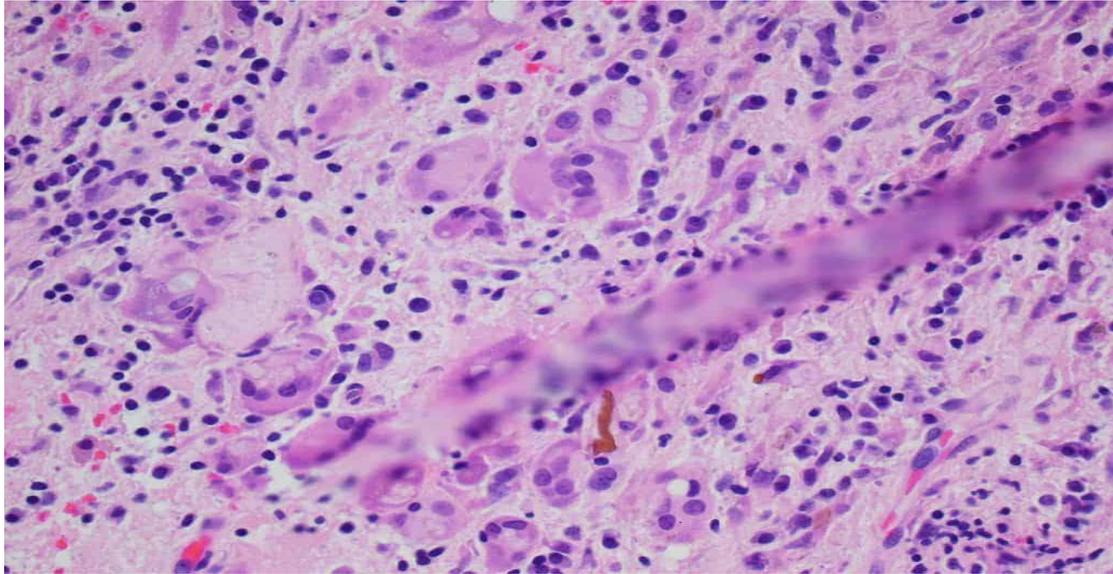
Αλλοιώσεις έγχυσης: Η ενδοβλαβική έγχυση αναισθητικού διαλύματος θα πρέπει να αποφεύγεται, καθώς μπορεί να προκαλέσει αιμορραγία με εξαγγείωση και διαχωρισμό των ζωνών του συνδετικού ιστού, με κενотоπίωση. Για παράδειγμα, σχηματισμός φυσαλίδων στον ιστό των ούλων ή οίδημα που μπορεί να οδηγήσει σε σύγχυση στη διάγνωση της νόσου του Crohn ή της στοματοπροσωπικής κοκκιωμάτωσης. (εικ.: Massoumeh, Zargaran, 2019).



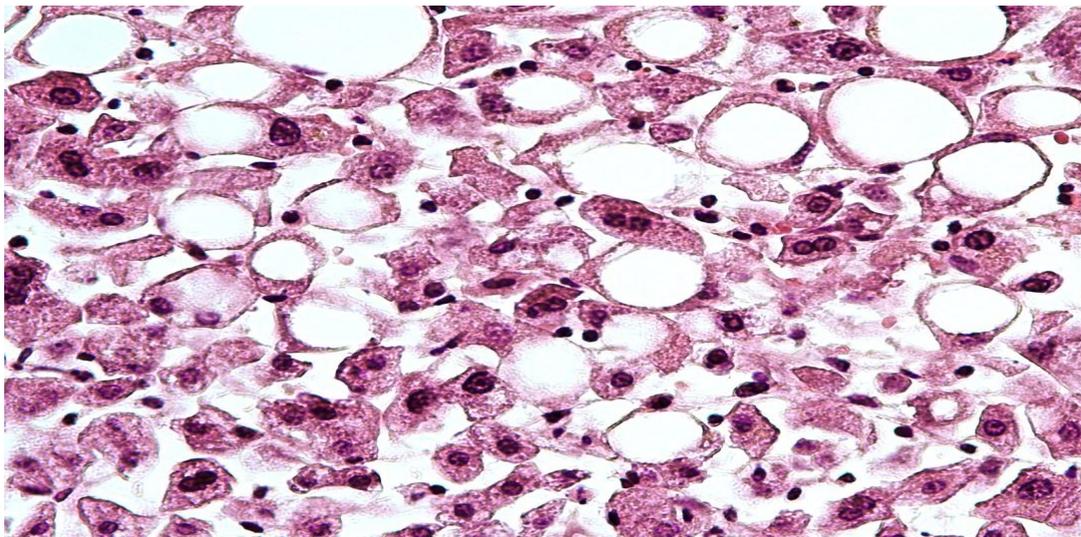
Αλλοιώσεις συμπίεσης: Αυτή είναι η μορφή παραμόρφωσης του ιστού που προκύπτει ακόμη και από την πιο ελάχιστη συμπίεση του ιστού με λαβίδα ή άλλο χειρουργικό εργαλείο. Περιλαμβάνει σύνθλιψη, αιμορραγία, σχισμές, κατακερματισμό και ψευδοκύστεις. Μικροσκοπικά, στα τεχνητά αντικείμενα σύνθλιψης, οι κυτταρικές λεπτομέρειες δεν είναι αναγνωρίσιμες και οι πυρήνες εμφανίζονται σκουρόχρωμες και παραμορφωμένες. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί τοποθετώντας ένα ράμμα μέσα στον βλεννογόνο που πρόκειται να αφαιρεθεί και συγκρατώντας τα άκρα του με μια αρτηριακή λαβίδα. (εικ.: *Massoumeh, Zargaran, 2019*).



Αλλοιώσεις φουλγκουραρισμού: Εμφανίζεται κατά την ηλεκτροχειρουργική ή την κοπή ιστού με λέιζερ, με αποτέλεσμα μια ζώνη θερμικής νέκρωσης και παραμόρφωσης του ιστού. Το επιθήλιο και ο συνδετικός ιστός εμφανίζουν άμορφη εμφάνιση λόγω της πήξης των πρωτεϊνών. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζονται αποκομμένα από τον συνδετικό ιστό και οι πυρήνες αποκτούν μια ατρακτοειδή διαμόρφωση. Αυτό μπορεί να αποτραπεί χρησιμοποιώντας την κοπή και όχι τα ηλεκτρόδια πήξης κατά τη λήψη του δείγματος. (εικ.: *Massoumeh, Zargaran, 2019*).



Αλλοιώσεις αμύλου: Η σκόνη αμύλου, ένα λιπαντικό των χειρουργικών γαντιών, είναι ένας κοινός μολυσματικός παράγοντας κυτταρολογικών και ιστολογικών δειγμάτων. Σε τομές που έχουν χρωματιστεί με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, εμφανίζονται ως πολυάριθμες μπλε, μικρές, σφαιρικές δομές. Στο κυτταρόπλασμα εμφανίζονται διαθλαστικά, υαλώδη, πολυγωνικά σώματα διαμέτρου 5-20 μm, με μια κεντρική κουκκίδα ή δομή σε σχήμα Y που μπορεί να ερμηνευτεί εσφαλμένα ως πυκνωτικός πυρήνας ή για κύτταρο που υποβάλλεται σε μίτωση. Αυτά μπορεί επίσης να μοιάζουν με επιθηλιακά κύτταρα. Είναι θετικά σε περιοδικό οξύ-Schiff (PAS) και υπό μικροσκοπία πολωμένου φωτός εμφανίζουν μοτίβο διπλής διάθλασης "σταυρού Μάλτας". Άλλα ξένα σώματα, όπως θραύσματα υλικού ράμματος, μπορούν περιστασιακά να βρεθούν σε ιστολογικές τομές.
(εικ : Texas A&M University Baylor College of Dentistry).



Αλλοιώσεις αυτολύσης: Ιδανικά, οι ιστοί θα πρέπει να μονιμοποιούνται αμέσως και πλήρως από την ζωντανή τους κατάσταση για να αποτραπεί η απώλεια ενζύμων, η μιτοχondριακή βλάβη, η αποικοδόμηση RNA και πρωτεϊνών και η μείωση της μίτωσης λόγω της επακόλουθης ανοξίας. Ο αυτολυμένος ιστός εμφανίζει αυξημένη ηωσινοφιλία λόγω της απώλειας της φυσιολογικής βασεοφιλίας που προσδίδεται από

το RNA στο κυτταρόπλασμα και της αυξημένης σύνδεσης της ηωσίνης με το μετουσιωμένο ενδοκυτταροπλασματικό. (εικ: *Alex Williamson*).

6. Ιστοχημεία και Ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένους Ιστούς

Η Ιστοχημεία είναι ο κλάδος της ιστολογίας που μελετά τη χυμική σύσταση των κυττάρων και των ιστών, μέσω της χρήσης χημικών αντιδράσεων και χρωστικών. Εστιάζει στον εντοπισμό συγκεκριμένων ουσιών όπως σάκχαρα, πρωτεΐνες, λίπη και ένζυμα πάνω στη δομή του ιστού.

Χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια που συνδέονται επιλεκτικά με συγκεκριμένα χημικά συστατικά, καθιστώντας τα ορατά στο μικροσκόπιο. Η ενζυμική Ιστοχημεία εστιάζει στον εντοπισμό συγκεκριμένων ενζύμων μέσα στα κύτταρα – ιστούς.

Έχει κλινική σημασία για τη ταυτοποίηση όγκων, φλεγμονών ή μεταβολικών διαταραχών που δεν είναι εμφανείς με τις βασικές χρώσεις (Αιματοξυλίνη – Ηωσίνη).

Χρησιμοποιείται για τη μελέτη μοριακών αλλοιώσεων σε περιπτώσεις καρκίνου για πιο στοχευμένη θεραπεία. Οι πιο γνωστές ιστοχημικές χρώσεις που πραγματοποιούνται σε παθολογοανατομικά εργαστήρια είναι η Pas και η Giemsa.

Η ανοσοϊστοχημεία (IHC) σε ιστούς με φορμόλη και παραφίνη (FFPE) είναι μια επικυρωμένη τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση και τον προσδιορισμό προγνωστικών ή προγνωστικών παραμέτρων τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό περιβάλλον. Αυτή η ευρεία χρήση απαιτεί τυποποιημένες λειτουργικές διαδικασίες προκειμένου να διασφαλιστεί η βέλτιστη ποιότητα και οι αξιόπιστες διαγνώσεις (True 2014). Ορισμένες μελέτες τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν αναφέρει ότι οι τροποποιήσεις στην αντιγονικότητα των ιστών μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα τόσο σε μοριακές αναλύσεις, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων υβριδισμού (Lisowski et al. 2001; Nuovo et al. 2013; Karlsson and Karlsson 2011) όσο και σε IHC (Jacobs et al. 1996; Bertheau et al. 1998; Mirlacher et al. 2004; Wester et al. 2000), σε κλινικό περιβάλλον.

Επιπλέον, η αποθήκευση μη χρωματισμένων πλακιδίων παρέχει εύκολη πρόσβαση σε τομές που χρησιμοποιούνται ως θετικοί ανοσοϊστοχημικοί έλεγχοι όταν χρειάζεται σε συνήθειες δραστηριότητες σε εργαστήρια IHC. Αρκετές εργασίες έχουν δείξει ότι η ένταση της ανοσοχρωμάτωσης επηρεάζεται από τη διάρκεια του χρόνου αποθήκευσης, ότι αυτή η αστάθεια του επιτόπου μπορεί να ξεκινήσει ήδη από 2 εβδομάδες μετά την τομή και ότι ελάχιστα βοηθά στην αποφυγή αυτού του φαινομένου (Olapade-Olaopa et al. 2001; Shin et al. 1997; van den Broek and van de Vijver 2000; Olapade-Olaopa et al. 1998). Ο λόγος για αυτή την ηλικιακή αποσύνθεση των ιστών δεν έχει μέχρι στιγμής χαρακτηριστεί επαρκώς. Η φωτοοξείδωση και η ξήρανση των ιστών (Blind et al. 2008), καθώς και η υδρόλυση λόγω ανεπαρκούς επεξεργασίας ιστών ή υγρασίας περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα την κατακράτηση νερού (Xie et al. 2011), έχουν εξεταστεί, αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί είναι ακόμη άγνωστοι. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην χρονικά εξαρτώμενη απώλεια ανοσοαντιδραστικότητας χρησιμοποιώντας αρχαιακό υλικό με μη τυποποιημένες προαναλυτικές μεταβλητές. Επιπλέον, οι περισσότερες μελέτες έχουν διερευνήσει μικρά πάνελ αντισωμάτων και, ως εκ τούτου, πληροφορίες σχετικά με το ποια αντισώματα επηρεάζονται περισσότερο από αυτόν τον μηχανισμό δεν είναι ευρέως διαθέσιμες. Μόνο σε μερικές από αυτές έχει αποδειχθεί εδώ και καιρό ότι η μονιμοποίηση με φορμαλίνη και η ιστολογική επεξεργασία μπορεί να οδηγήσουν σε κάλυψη ή μετουσίωση επιτόπων, απαιτώντας, σε ορισμένες περιπτώσεις, ανάκτηση αντιγόνου, η οποία μπορεί να βασίζεται σε ενζυμική πέψη ή σε θερμότητα (Puchtler και Meloan 1985; Werner et al. 2000). Μια περαιτέρω αιτία μειωμένης ανοσοαντιδραστικότητας ή αποσύνθεσης αντιγόνου είναι η αποθήκευση ιστών FFPE

σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου. Πράγματι, η χρησιμότητα αντικειμενοφόρων πλακών είναι μια κοινή πρακτική στα περισσότερα διαγνωστικά ή ερευνητικά εργαστήρια (Mirlacher et al. 2004; Prioleau και Schnitt 1995).

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους στον χαρακτηρισμό των μοριακών χαρακτηριστικών διηθητικών και προδιηθητικών νεοπλασματικών αλλοιώσεων, όπως είναι το πορογενές καρκίνωμα του μαστού και το πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS). Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση βιοδεικτών χρησιμοποιείται πλέον για να βοηθήσει στην έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση. Πιο πρόσφατα, η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση έχει επεκταθεί στην ανάλυση βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα τελικά σημεία στην αξιολόγηση θεραπειών (γονιδιακή θεραπεία) καθώς και στην πρόβλεψη κλινικών αποκρίσεων σε διάφορες θεραπείες (προγνωστική). Έτσι, η ανοσοϊστοχημεία έχει σημαντικό ρόλο τόσο στην ιατρική όσο και στην έρευνα. Ενώ η απόδοση των ανοσοϊστοχημικών μεθόδων θεωρείται ρουτίνα, το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης επηρεάζεται από πολλαπλές αλληλεξαρτώμενες μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένης της ποιότητας των πρωτογενών αντισωμάτων και της ενίσχυσης των δευτερογενών συστημάτων ανίχνευσης (Grizzle et al. 1998).

Επίσης, η ανοσοϊστοχημεία επηρεάζεται έντονα από τη μονιμοποίηση, ειδικά τη μονιμοποίηση με βάση τις αλδεΰδες και από πιθανές αλληλεπιδράσεις της μονιμοποίησης με τα αθροιστικά βήματα της επεξεργασίας των ιστών και της ανάκτησης αντιγόνου (AR) (Grizzle et al. 2001, 2008). Η μονιμοποίηση με φορμόλη έχει εμπλακεί στην απώλεια ή την κάλυψη των επιτόπων (αντιγονικοί καθοριστικοί παράγοντες) κατά τη διάρκεια της ανοσοϊστοχημείας. Η μονιμοποίηση με φορμόλη προκαλεί μετουσίωση των περισσότερων μορίων (Dapson 2007). Είτε προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών μαζί με τους επίτοπους τους, είτε τροποποιεί τους επίτοπους απευθείας συνδεδεμένους με αυτούς (Bogen et al. 2008), είτε εμποδίζει την πρόσβαση αντισωμάτων ή συστημάτων ανίχνευσης σε αυτούς τους επίτοπους (O'Leary et al. 2008). Τέτοιες αλλαγές εμποδίζουν το αντίσωμα να αναγνωρίσει ή να συνδεθεί με τροποποιημένους ή κρυμμένους επίτοπους (Hayat 2001). Επίσης, η μονιμοποίηση με αλδεΰδη μπορεί να επηρεάσει το δευτερογενές σύστημα ανίχνευσης με παρόμοιες αλλαγές.

Οι κύριες επιδράσεις της μονιμοποίησης με αλδεΰδες έχουν θεωρηθεί ότι είναι η διασύνδεση των αντιγόνων, η οποία δρα αλλάζοντας τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών ή των πεπτιδίων και καθιστά τα επίτοπα μη ανιχνεύσιμα ή μη προσβάσιμα από συγκεκριμένα αντισώματα. Ωστόσο, επί του παρόντος, οι περισσότεροι χρησιμοποιούν σχετικά σύντομο χρόνο μονιμοποίησης (< 12 ώρες) ο οποίος μπορεί να είναι πολύ σύντομος ακόμη και για βέλτιστη ιστοχημική χρώση (Dapson 2007). Η μονιμοποίηση για αυτό το χρονικό διάστημα μπορεί να μην οδηγήσει σε εκτεταμένη διασύνδεση και πολλές αλλαγές στη μονιμοποίηση αλδεΰδης που αποδίδονται επί του παρόντος στη διασύνδεση είναι πιθανότερο να οφείλονται στην προσθήκη δραστικών υδροξυμεθυλομάδων.

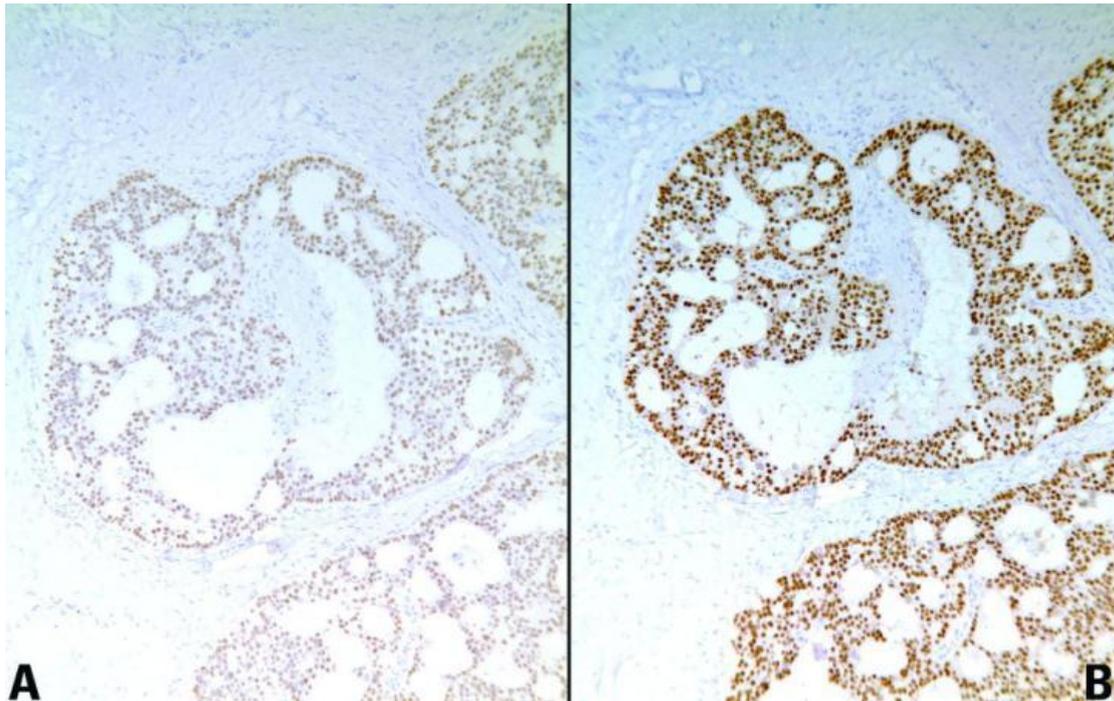
Η απώλεια ανοσοαναγνώρισης σε ιστό που έχει υποστεί επεξεργασία με παραφίνη έχει τεκμηριωθεί επαρκώς (Arnold et al. 1996, Eltoun et al. 2001a, 2001b; Grizzle et al. 2001, 2008; Namimatsu et al. 2005; Rait et al. 2004a; Rait et al. 2004b). Ενώ αυτό συνήθως αποδίδεται στη μονιμοποίηση σε 10% ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης, οι συνεισφορές της επεξεργασίας των ιστών στην απώλεια ανοσοαναγνώρισης δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Εκτός από τη μονιμοποίηση, τα βήματα που εμπλέκονται στην επεξεργασία των ιστών περιλαμβάνουν την αφυδάτωση σε αλκοόλες, τη δημιουργία ενός υδρόφοβου περιβάλλοντος που

παράγεται με διείσδυση με έναν υδρόφοβο διαλύτη, όπως το ξυλόλιο, και τον εμποτισμό του ιστού στο υδρόφοβο περιβάλλον με παραφίνη (Grizzle et al. 2008; Spencer και Bancroft 2008).

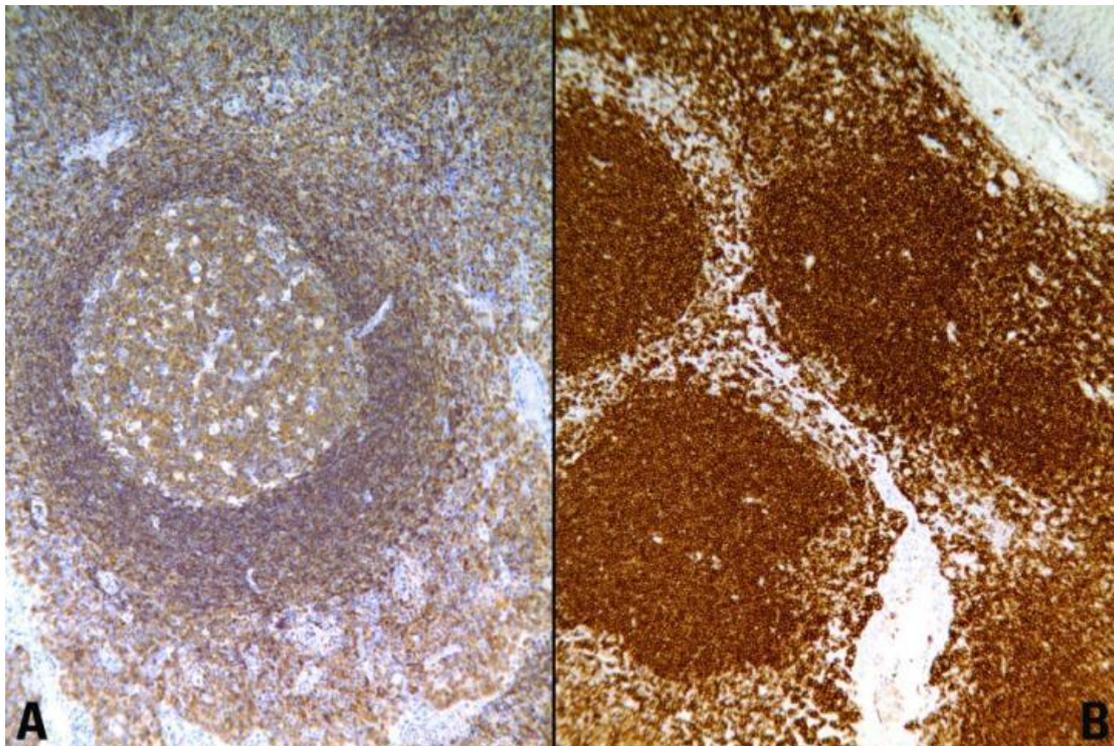
Είναι προφανές ότι κατά τη διάρκεια ενός ή περισσότερων από αυτά τα βήματα επεξεργασίας ιστών, ορισμένοι επίτοποι ενδέχεται να τροποποιηθούν (Dapson, 2007). Επίσης, ο σχηματισμός μεγάλων συμπαγών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων ή η αναδίπλωση της πρωτεΐνης μπορεί να εμποδίσει τη σύνδεση του αντισώματος και να καλύψει τον επίτοπο (Hayat 2001, βλ. Guest Editorial, Grizzle 2008). Επιπλέον, η χημική τροποποίηση της αφυδάτωσης συν τη δημιουργία ενός υδρόφοβου περιβάλλοντος μπορεί να συμβάλει σε μη αναστρέψιμη αλλοίωση του επιτόπου και να αναστείλει τη σύνδεση του πρωτογενούς ή δευτερογενούς αντισώματος ή του συστήματος ανίχνευσης. Παρόλο που τόσο η μονιμοποίηση όσο και η επεξεργασία των ιστών μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, οι επιδράσεις καθενός από τα βήματα μονιμοποίησης και επεξεργασίας των ιστών στην ποιότητα των χρώσεων αυτών, δεν έχουν αξιολογηθεί επαρκώς.

Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση των επιδράσεων της μονιμοποίησης, της επεξεργασίας ιστών και της AR στο αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Για αυτές τις μελέτες, χρησιμοποιήθηκε ιστός, του οποίου τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν ως μονοστιβάδες σε αντικειμενοφόρες πλάκες που διατηρούνταν σε τρυβλία Petri. Μετά το ξέπλυμα, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε μονιμοποίηση για διαφορετικές χρονικές περιόδους σε συνδυασμό με τα μεμονωμένα αθροιστικά βήματα επεξεργασίας ιστών πριν από την ανοσοϊστοχημική χρώση με και χωρίς AR. Δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, η DU145 (καρκίνος του προστάτη) και η SKOV3 (καρκίνος των ωοθηκών) χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες. Συγκρίθηκαν οι επιδράσεις στην ανίχνευση του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαστικών κυττάρων (PCNA) και του Ki67/MIB-1. Το PCNA και το Ki67 είναι και τα δύο πυρηνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση της έκτασης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά το καθένα παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο κάλυψης επιτόπου κατά τη μονιμοποίηση και την επεξεργασία σε παραφίνη. Η χρώση για PCNA πραγματοποιείται μερικές φορές χωρίς AR, ενώ η ανίχνευση του επιτόπου MIB-1 του Ki67 σε ιστούς μονιμοποιημένους με φορμόλη και ενσωματωμένους σε παραφίνη απαιτεί AR (Grizzle et al. 2001).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι τα αθροιστικά βήματα στην επεξεργασία των ιστών επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ανοσοαναγνώριση και ότι οι επιδράσεις διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο κυττάρου. Ωστόσο, η δημιουργία του υδρόφοβου περιβάλλοντος ήταν συνήθως πιο επιζήμια για την ανοσοαναγνώριση από ό,τι η αφυδάτωση. Επιπλέον, οι επιδράσεις της δημιουργίας ενός υδρόφοβου περιβάλλοντος εμπόδισαν την αναγνώριση του Ki67/MIB-1 σε κύτταρα DU145 ακόμη και όταν τα κύτταρα δεν είχαν μονιμοποιηθεί σε μονιμοποιητικό με βάση την αλδεΰδη. Αντίθετα, η χρώση Ki67/MIB-1 δεν εμποδίζεται όταν οι κατεψυγμένες τομές σταθεροποιούνται για 24 ώρες σε 10% NBF πριν από την ανοσοϊστοχημική χρώση (Stockard et al. αδημοσίευτο).



Χρώση καρκινώματος μαστού με υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Α. Μπλοκ ιστού σε 3 ώρες σε φυσιολογικό ορό 10% και εμφάνισε ασθενή ένδειξη θετικών για ER κυττάρων. Β. Μπλοκ ιστού σε 8 ώρες σε φυσιολογικό ορό 10% και εμφάνισε ισχυρή ένδειξη θετικών για ER κυττάρων.



Χρώση LCA (CD45) σε αντιδραστική αμυγδαλή. Α. Μονομερές μπλοκ για 3 ώρες σε 10% φυσιολογικό ορό που δείχνει ασθενή εμφάνιση λεμφοκυττάρων. Β. Μονομερές μπλοκ για 8 ώρες σε 10% φυσιολογικό ορό που δείχνει ισχυρή χρώση λεμφοκυττάρων.

6.1 Στάδια Ανοσοϊστοχημείας

6.1.1 Ανάκτηση αντιγόνου

Η τεχνική ανάκτησης αντιγόνου είναι μια μη ενζυμική προεπεξεργασία για τη μείωση ή την εξάλειψη αυτών των χημικών τροποποιήσεων που προκαλούνται από φορμόλη μέσω θέρμανσης σε υψηλή θερμοκρασία ή ισχυρού αλκαλικού διαλύματος (χωρίς θέρμανση). Αυτή η διαδικασία ανακτά τα αντιγόνα που καλύπτονται από τη μονιμοποίηση με φορμόλη. Ως αποτέλεσμα, επιτρέπει την επιτυχή εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας σε ιστούς που έχουν ενσωματωθεί σε παραφίνη και έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη. Χωρίς ανάκτηση αντιγόνου, οι περισσότερες ανοσοϊστοχημικές χρώσεις σε ιστούς με παραφίνη, που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη δεν εμφανίζουν χρώση.

6.1.2 Ανάκτηση αντιγόνου με επαγωγή θερμότητας

Η ανάκτηση αντιγόνου με επαγωγή θερμότητας είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη προεπεξεργασία στην ανοσοϊστοχημεία για ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη και είναι ενσωματωμένες σε παραφίνη. Απαιτεί βρασμό αποπαραφινωμένων ιστών που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη και είναι ενσωματωμένες σε παραφίνη είτε σε νερό είτε σε διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα. Λόγω της περιορισμένης εφαρμογής της μη θερμαινόμενης AR και της επικράτησης της θερμικά επαγόμενης AR, ο όρος "Ανάκτηση Αντιγόνου" (AR) χρησιμοποιείται συχνότερα για να αναφερθεί στην θερμικά επαγόμενη AR.

(Shi, Shan-Rong; Cote, Richard J.; Taylor, Clive R. 1997)

6.1.3 Ενζυμική πέψη στην Ανοσοϊστοχημεία

Οι βασικοί παράγοντες για την ενζυμική πέψη στην ανοσοϊστοχημεία είναι:

1. Θερμοκρασία
2. pH
3. Συγκέντρωση ενζύμου
4. Διάρκεια πέψης

Για βέλτιστη ανοσοϊστοχημική χρώση, ο χρόνος πέψης είναι κρίσιμος και εξαρτάται από τη διάρκεια της μονιμοποίησης σε φορμαλδεΰδη. Οι ιστοί που μονιμοποιούνται σε φορμαλίνη για μεγάλα χρονικά διαστήματα συνήθως απαιτούν παρατεταμένη έκθεση σε πρωτεολυτικό ένζυμο. Μπορεί να διαπιστωθεί ότι ο χρόνος πέψης ποικίλλει λόγω της διακύμανσης της ενζυμικής δραστηριότητας από παρτίδα σε παρτίδα. Ένα άλλο μειονέκτημα της ενζυματικής ανάκτησης αντιγόνου είναι ότι οι κακώς μονιμοποιημένοι ιστοί υπερχωνεύονται εύκολα με αποτέλεσμα την απώλεια μορφολογικών λεπτομερειών.

Όπου δεν είναι γνωστά τα στάδια μονιμοποίησης και επεξεργασίας παραφίνης, όπως στην περίπτωση των αναφερόμενων μπλοκ και ιστών, μπορεί να είναι απαραίτητο να εκτελεστεί μια σειρά χρόνων πέψης προκειμένου να επιτευχθούν βέλτιστα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα.

Υπάρχουν ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της HIER. Το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι οι χρόνοι θέρμανσης για την ανάκτηση αντιγόνων τείνουν να είναι τυπικοί, ανεξάρτητα από τη διάρκεια της μονιμοποίησης.

Άλλα πλεονεκτήματα περιλαμβάνουν:

- Αυξημένη ένταση χρώσης
- Παρουσίαση αντιγόνων που κανονικά δεν είναι ανιχνεύσιμα σε ιστό μονιμοποιημένο με φορμόλη
- Παραγωγή συνεπούς, αξιόπιστης, υψηλής ποιότητας ανοσοϊστοχημικής χρώσης αντιγόνων ιστών ευαίσθητων στη φορμόλη.

6.1.4 Τυποποίηση Βασικών Διαδικασιών

Η τυποποίηση των βασικών διαδικασιών που χρησιμοποιούνται στην ιστοπαθολογία, όπως η μονιμοποίηση, η επεξεργασία ιστών και η επεξεργασία ιστών πριν από την ανοσοϊστοχημική χρώση, θα πρέπει να συμβάλει σημαντικά στη βελτίωση της απόδοσης του εργαστηρίου. Ωστόσο, η επεξεργασία ιστών απέχει πολύ από το να είναι τυποποιημένη. Η σύνθεση του μονιμοποιητικού που χρησιμοποιείται, δηλαδή NBF, φορμόλης ή η χρήση άλλων διαλυμάτων φορμόλης όπως φορμόλης ασβεστίου, παραδοσιακά αφήνεται σε κάθε εργαστήριο. Το ίδιο ισχύει και για την επιλογή των αντιδραστηρίων επεξεργασίας ιστών και τη διάρκεια της επεξεργασίας ιστών. Αυτή η έλλειψη τυποποίησης των θεμελιωδών διαδικασιών της ιστολογίας κορυφώνεται με την παρασκευή ενός μοναδικού παρασκευάσματος ενός μπλοκ ιστού που είναι μοναδικό και χαρακτηριστικό του εργαστηρίου που το παράγει. Στη συνέχεια, οι τομές που κόβονται από ένα τέτοιο μπλοκ θα παρέχουν υποστρώματα για ανοσοϊστοχημικές έρευνες που μπορεί να είναι πολύ διαφορετικές από τις τομές που κόβονται από υλικό που έχει μονιμοποιηθεί, υποστεί επεξεργασία και τομή αλλού. Κατά την επεξεργασία τέτοιου υλικού, είναι απαραίτητο το προσωπικό του εργαστηρίου να κατανοεί τα προβλήματα και τις παγίδες που σχετίζονται με το υλικό που αναφέρεται και να γνωρίζει πλήρως τους καθιερωμένους τρόπους χειρισμού των πρωτοκόλλων προκειμένου να παράγει ανοσοϊστοχημική χρώση υψηλής ποιότητας.

Η επιτυχής ανοσοϊστοχημεία μπορεί να θεωρηθεί ως η σωστή ενσωμάτωση διαφόρων τεχνικών παραμέτρων. Στόχος της ανοσοϊστοχημείας είναι η επίτευξη αναπαραγωγίσιμης και συνεπούς επίδειξης αντιγόνων με την ελάχιστη δυνατή χρώση υποβάθρου, διατηρώντας παράλληλα την ακεραιότητα της αρχιτεκτονικής των ιστών. Η μονιμοποίηση και η επακόλουθη επεξεργασία με παραφίνη αποτελούν ουσιαστική παράμετρο.

Η επαρκής και κατάλληλη μονιμοποίηση αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο όλων των ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών παρασκευασμάτων. Η ιδανική μονιμοποίηση είναι η ισορροπία μεταξύ καλής μορφολογίας και καλής αντιγονικότητας. Η κακή μονιμοποίηση, ή η καθυστέρηση στη μονιμοποίηση, προκαλεί απώλεια αντιγονικότητας ή διάχυση αντιγόνων στους περιβάλλοντες ιστούς. Τα κακώς μονιμοποιημένα μπλοκ δεν υποβάλλονται σε επαρκή επεξεργασία για παραφινολοποίηση. Η αλκοόλη που χρησιμοποιείται στα στάδια αφυδάτωσης της επεξεργασίας ιστών είναι ένα εξαιρετικό μονιμοποιητικό και ένας εξαιρετικός παράγοντας αφυδάτωσης. Ωστόσο, εάν ζητηθεί να λειτουργήσει τόσο ως μονιμοποιητικό όσο και ως παράγοντας αφυδάτωσης, όπως με τα κακώς μονιμοποιημένα μπλοκ ιστών, δεν επιτυγχάνεται κανένα από τα δύο και έτσι το τελικό προϊόν είναι ένα μπλοκ που δεν έχει υποστεί καλή επεξεργασία και επομένως δεν έχει εμποτιστεί επαρκώς με παραφίνη. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπως αυτές, όλα μπορεί να μην χαθούν, καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί επανεπεξεργασία και να επιτευχθεί λογική ανοσοϊστοχημική χρώση για τα περισσότερα αντιγόνα.

Το Κολλέγιο Αμερικανών Παθολόγων (οδηγίες ASCO-CAP) έχει προσπαθήσει να αντιμετωπίσει την τυποποίηση της μονιμοποίησης στον ιστό του μαστού στις ΗΠΑ. Οι συστάσεις τους είναι ότι οι ιστοί πρέπει να στερούνται για τουλάχιστον 6 ώρες και το πολύ 48 ώρες σε NBF3. Η ουδέτερη φορμόλη σε ρυθμιστικό διάλυμα πρέπει να είναι ηλικίας μικρότερης του 1 μηνός. Οι μονιμοποιημένοι ιστοί που δεν μπορούν να υποβληθούν σε άμεση επεξεργασία σε παραφίνη θα πρέπει να φυλάσσονται σε αλκοόλη 70% μέχρι την επεξεργασία. Ακόμα και σήμερα, στο Ηνωμένο Βασίλειο δεν υπάρχουν επίσημες συστάσεις σχετικά με τον τύπο του μονιμοποιητικού ή τη διάρκεια της μονιμοποίησης. Μια μελέτη που διεξήχθη από τους Goldstein et al 2003 έδειξε ότι θα μπορούσε να προκύψει ψευδώς αρνητικό ανοσοϊστοχημικό υποδοχέα οιστρογόνων, εάν οι βιοψίες μαστού, οι βιοψίες με βελόνα και τα δείγματα εκτομής μονιμοποιηθούν για λιγότερο από 6-8 ώρες. Επομένως, γενικά θεωρείται καλύτερο να μονιμοποιούνται οι ιστοί όλη τη νύχτα παρά να βιάζεται το δείγμα να υποβληθεί σε επεξεργασία με παραφίνη την ίδια εργάσιμη ημέρα. Η ποσότητα του μονιμοποιητικού που χρησιμοποιείται θα πρέπει ιδανικά να είναι 15-20 φορές το βάρος του ιστού που πρόκειται να μονιμοποιηθεί. Οι ιστοί που επιλέγονται για τομή θα πρέπει να είναι αρκετά λεπτοί ώστε να μονιμοποιούνται επαρκώς σε εύλογο χρονικό διάστημα. Ο όγκος του ιστού καθορίζει τον όγκο του απαιτούμενου μονιμοποιητικού και το πάχος του δείγματος θα καθορίσει την ταχύτητα μονιμοποίησης.

6.1.5 Βέλτιστη Αραίωση Πρωτογενούς Αντισώματος

Η βέλτιστη αραίωση του πρωτογενούς αντισώματος για την ανοσοϊστοχημεία είναι η συγκέντρωση του πρωτογενούς αντισώματος που δίνει τη βέλτιστη ειδική χρώση με τη μικρότερη ποσότητα χρώσης υποβάθρου. Η βέλτιστη αραίωση θα εξαρτηθεί από τον τύπο και τη διάρκεια της μονιμοποίησης. Επομένως, είναι ύψιστης σημασίας για τα μεμονωμένα εργαστήρια να βρουν την αραίωση (τίτλο) του πρωτογενούς αντισώματος που δίνει το καλύτερο αποτέλεσμα χρησιμοποιώντας το προτιμώμενο ανοσοϊστοχημικό σύστημα αντίχενωσης. Έτσι, είναι σπάνιο τα μεμονωμένα εργαστήρια να χρησιμοποιούν πανομοιότυπες αραιώσεις πρωτογενών αντισωμάτων,

παρόλο που μπορεί να χρησιμοποιούν πανομοιότυπη ανοσοϊστοχημική μεθοδολογία επίδειξης.

(Dennis Otali1, Cecil R. Stockard1, Denise K. Oelschlager1, Wen Wan3, Upender Manne1, Stephen A. Watts2, and William E. Grizzle1 / Biotech Histochem. 2009 October)

6.1.6 Επιδράσεις της μονιμοποίησης και της επεξεργασίας Ιστών στην Ανοσοϊστοχημεία

Μία από τις πρώτες χρήσεις της φορμαλδεΰδης ως μονιμοποιητικό για δείγματα ιστών ανακαλύφθηκε τυχαία από τον Δρ. F. Blum προς τα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα. Ο Δρ. Blum δεν ήταν παθολόγος, αλλά ενδιαφερόταν για τη βακτηριολογία. Όταν του ζητήθηκε από μια χημική εταιρεία να αξιολογήσει ένα νέο εμπορικό προϊόν ως αντισηπτικό (διάλυμα φορμαλδεΰδης), το αραιώσε 1:10 για να παράγει ένα διάλυμα 4% και ανακάλυψε ότι το διάλυμα ήταν καλό αλλά βραδείας δράσης μικροβιοκτόνο. Σημείωσε επίσης ότι όταν το διάλυμα παρέμενε στα δάχτυλά του για μικρό χρονικό διάστημα, αυτά γίνονταν άκαμπτα. Αυτή η ακαμψία ήταν ο ίδιος τύπος ακαμψίας που είχε βιώσει με άλλα μονιμοποιητικά όπως το αλκοόλ. Με βάση τις παρατηρήσεις του Blum, αυτό το διάλυμα 4% παρέμεινε το ποσοστό που συνιστάται για τη μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη και δεν έχει αμφισβητηθεί παρά τις καλά τεκμηριωμένες αρνητικές επιπτώσεις που έχει η μονιμοποίηση με φορμαλδεΰδη στην ανοσοαντιδραστικότητα των ιστών.

Ωστόσο, από την άποψη της συνέπειας της μικροσκοπικής εμφάνισης μετά την επεξεργασία με παραφίνη και τη χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη, η μονιμοποίηση με φορμόλη αποτελεί την επιλογή των παθολογοανατόμων τον τελευταίο αιώνα. Οι παθολογοανατόμοι είναι εκπαιδευμένοι να ερμηνεύουν ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη και οι αποκλίσεις από αυτό προκαλούν αλλαγές στη μορφολογία των ιστών και μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στη διάγνωση. Με την αυξημένη χρήση της ανοσοϊστοχημείας στη διάγνωση, το πρόβλημα της μειωμένης ανοσοαναγνώρισης σε ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη και έχουν υποστεί επεξεργασία με παραφίνη θα μπορούσε να είχε οδηγήσει σε αλλαγή στην επιλογή του μονιμοποιητικού, εάν δεν είχαν αναπτυχθεί τεχνικές ανάκτησης αντιγόνου.

Ανοσοαντιδραστικότητα

Ο κύριος στόχος των ανοσοϊστοχημικών μεθόδων είναι να επινοήσουν πρωτόκολλα που παράγουν τη μέγιστη ευαισθησία χωρίς να διακυβεύεται η εξειδίκευση. Η ποιότητα των πρωτογενών αντισωμάτων έχει τεράστια επίδραση στην εξειδίκευση, αλλά η μονιμοποίηση των ιστών έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην ευαισθησία των ανοσοϊστοχημικών μεθόδων.

Η μονιμοποίηση από μόνη της δεν προκαλεί χαρακτηριστικά απώλεια της ανοσοαναγνώρισης των αντιγόνων των ιστών. Η ανοσοαναγνώριση για ορισμένα αντιγόνα χάνεται μετά από συγκεκριμένους συνδυασμούς μονιμοποίησης, επεξεργασίας ιστών και ενσωμάτωσης σε παραφίνη. Ένα αντιγόνο που αποδεικνύεται με ένα μονιμοποιητικό που χρησιμοποιείται σε κατεψυγμένες τομές μπορεί να μην είναι αποδεικτέο μετά τη χρήση του ίδιου μονιμοποιητικού συν την επακόλουθη

επεξεργασία, ενσωμάτωση σε παραφίνη και προετοιμασία τομών παραφίνης, ακόμη και όταν το ίδιο αντίσωμα χρησιμοποιείται και στις δύο διαδικασίες χρώσης.

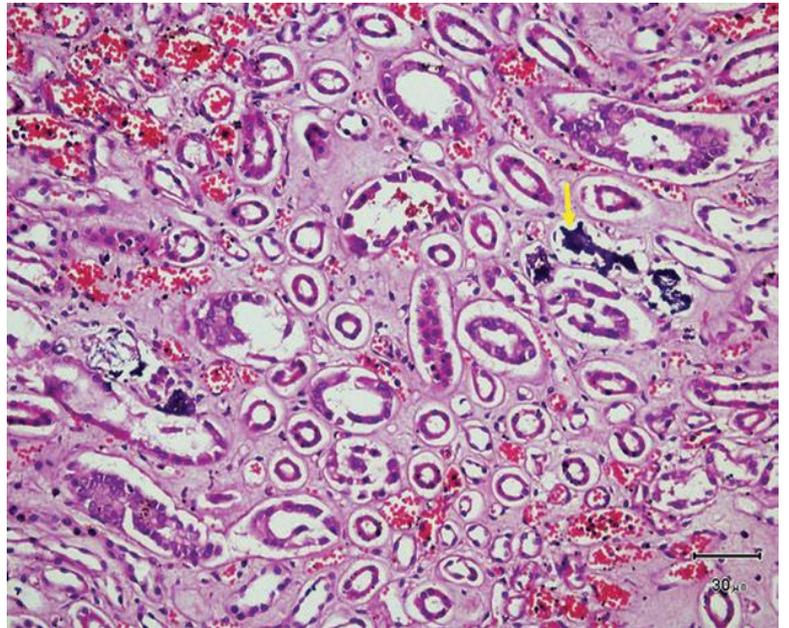
Η φορμαλδεΰδη μετουσιώνει τα μακρομόρια των ιστών, καθιστώντας έτσι τις πρωτεΐνες των ιστών που αποτελούν την πλειονότητα των αντιγόνων των ιστών απρόσιτες στα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία (μάσκα αντιγόνου). Έχει αποδειχθεί ότι οι διασταυρούμενες συνδέσεις που προκαλούνται από αλδεΰδη θα μπορούσαν να αντιστραφούν με θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες ή με επεξεργασία με ισχυρά αλκάλια. Οι Shi et al1 εφάρμοσαν αυτές τις τεχνικές σε ιστούς και απέδειξαν ότι η προεπεξεργασία ιστών που βυθίζονται σε διαλύματα βαρέων μετάλλων και θερμαίνονται σε φούρνο μικροκυμάτων αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής. Ονόμασαν την τεχνική τους μέθοδο «ανάκτησης αντιγόνου» και έκτοτε έχουν αναφερθεί ότι μια σειρά από άλλες συσκευές θέρμανσης, όπως η χύτρα ταχύτητας, το αυτόκλειστο, το ατμόλουτρο και το υδατόλουτρο, επιτυγχάνουν παρόμοια αποτελέσματα. Ο όρος «ανάκτηση αντιγόνου που προκαλείται από θερμότητα» ή HIER έχει γίνει ένας ευρέως αποδεκτός περιγραφικός όρος. Πριν από την HIER, η χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων ήταν η πιο δημοφιλής προσέγγιση για την αντιστροφή των επιδράσεων της μονιμοποίησης με φορμόλη. Η επιλογή της πρωτεάσης, η συγκέντρωσή της και η διάρκεια της πέψης της είναι σε μεγάλο βαθμό εμπειρικές. Ωστόσο, είναι σημαντικό να βελτιστοποιηθεί η χρήση του ενζύμου επιλογής, αντί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα ενζύμων.

Η βάση όλων των καλών ιστολογικών παρασκευασμάτων είναι η επαρκής μονιμοποίηση και η καλή επεξεργασία των ιστών. Οι πρόσφατες απαιτήσεις στα εργαστήρια για μείωση των χρόνων διεκπεραίωσης των δειγμάτων για ιστολογική διάγνωση συχνά οδηγούν στη μείωση του χρόνου που πρέπει να επιτραπεί σε ένα δείγμα για να μονιμοποιηθεί σε φορμόλη.

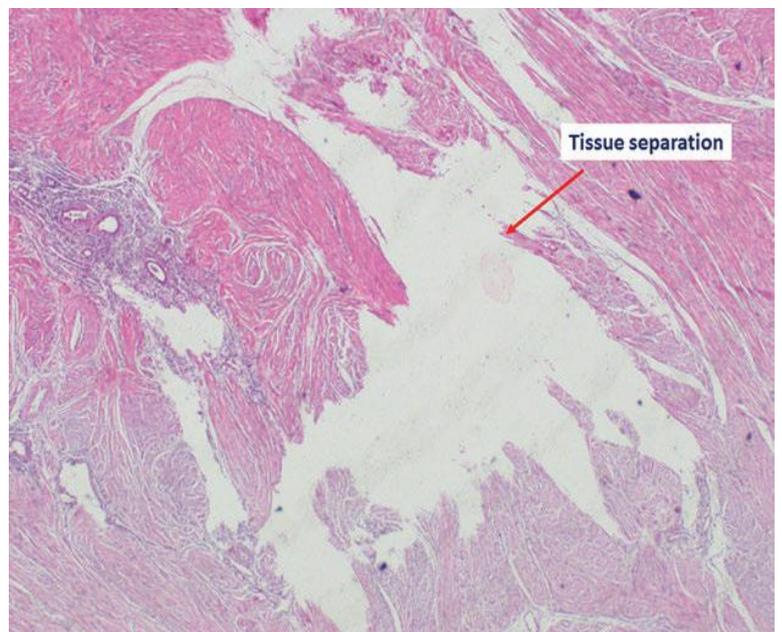
Η κακή ή ανεπαρκής μονιμοποίηση οδηγεί σε κακή ενσωμάτωση σε παραφίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή τομών παραφίνης κακής ποιότητας. Οι τομές που κόβονται από κακώς επεξεργασμένα μπλοκ ιστού παρουσιάζουν κακή αντοχή στις δυσκολίες των τεχνικών ανάκτησης αντιγόνου και χάνονται εύκολα. Η μορφολογία επηρεάζεται επίσης και τα αντιγόνα μπορεί να χαθούν ή να γίνουν διάχυτα.

Παρά τα προβλήματα που σχετίζονται με τη μονιμοποίηση με φορμόλη, η σημασία αυτής της πτυχής της βασικής ιστολογικής τεχνικής δεν πρέπει ποτέ να διακυβεύεται εάν πρόκειται να επιτευχθεί ανοσοϊστοχημική χρώση υψηλής ποιότητας

Η μικροφωτογραφία δείχνει καφέ-μαύρη κοκκώδη χρωστική φορμόλης. Αυτή είναι διαθλαστική διπλοθλαστική χρωστική. (Χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης ×400)



Διαχωρισμός ιστού λόγω παρατεταμένης μονιμοποίησης. Ο ιστός εμφανίζει οπές και κενά κενά μέσα του. (Χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης ×200)



7. Μοριακές εξετάσεις σε μονιμοποιημένους Ιστούς

7.1 Πυρηνικό και Μιτοχονδριακό DNA

Στη σύγχρονη πρακτική είναι σύνηθες να αποθηκεύονται δείγματα ιστών που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμαλίνη από νεκροψίες για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Η φορμαλίνη αντιδρά με το ανθρώπινο DNA μέσω αλληλεπίδρασης με τους δεσμούς υδρογόνου, μονιμοποίησης και μετουσίωσης των πρωτεϊνών του DNA, διασύνδεσης μεταξύ πρωτεϊνών και DNA και ακόμα μεθυλίωσης του νουκλεϊκού οξέος (*Hamazaki et al. 1993; Koshiba et al. 1993; Karlsen et al. 1994*).

Λόγω αυτού, η μεταγενέστερη ανάλυση DNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την εξακρίβωση της ταυτότητας, επιτυγχάνει μόνο αποσπασματικά αποτελέσματα και επομένως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με κανένα βαθμό βεβαιότητας. Χρησιμοποιώντας υπάρχουσες μελέτες (*Ben-Ezra et al. 1990; Greer et al. 1991; Wiegand et al. 1996*) ως σημείο αναφοράς, διευρύνανε την έρευνα. Πρώτον, η διάρκεια της έρευνας παρατάθηκε έτσι ώστε να καλύπτει πλέον έως και 1 έτος μονιμοποίησης. Δεύτερον, δοκιμάστηκαν και άλλα διαλύματα εκτός από τα «τυπικά» ή συνήθη μονιμοποιητικά. Διερευνήσανε την επίδραση αυτών των μονιμοποιητικών στο πυρηνικό, ιδιαίτερα, στο μιτοχονδριακό DNA (mt-DNA), καθώς και στις ιστολογικές δομές και τη σημασία τους όσον αφορά την πιθανή εφαρμογή τους στην πράξη. Για να ληφθεί το απαιτούμενο υλικό DNA, αφαιρέθηκαν ιστοί κατά τη διάρκεια νεκροψίας ενός σώματος που ελήφθη από το γενικό υλικό νεκροψίας του Ινστιτούτου Νομικής Ιατρικής. Οι ιστοί που εξήχθησαν ήταν οι εξής: καρδιακός μυς, σκελετικός μυς, ήπαρ, νεφρός και εγκέφαλος. Για την επιλογή του υλικού χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα κριτήρια: ηλικία 40 ετών, υγιής, ιστοί άθικτοι και εξαγωγή ιστού, 48 ώρες μετά τη νεκροψία. Τα μονιμοποιητικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (*Romeis και Bock 1989*) 4% φορμόλη με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, 4% μη ρυθμισμένη φορμόλη (σύνθεση: 35% μη ρυθμισμένη φορμόλη με 1ml απεσταγμένο νερό), διάλυμα αλκοόλης - μυρμηκικού οξέος (σύμφωνα με τον Schaffer) (σύνθεση: ένα μέρος 35% μη ρυθμισμένη φορμόλη δύο μέρη 80% αλκοόλη), διχρωμικό κάλιο, οξικό οξύ (σύμφωνα με το μονιμοποιητικό του Tellyesniczky) (σύνθεση: 3 g διχρωμικό κάλιο διαλυμένο σε 100 ml απεσταγμένο νερό και 1,5 ml οξικό οξύ), διάλυμα Davidson (σύνθεση: 30 ml 96% αλκοόλη, 20 ml 35% μη ρυθμισμένη φορμόλη, 10 ml 100% οξικό οξύ, 10 ml απεσταγμένο νερό), Διάλυμα Carnoy (σύνθεση: 60 ml απόλυτης αλκοόλης, 30 ml χλωροφόρμιο, 10 ml 100% οξικό οξύ), γλουταραλδεΐδη (σύνθεση: 15,5 ml 25% γλουταραλδεΐδη, 12,5 ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, απεσταγμένο νερό προς 100 ml). Επιλέξανε αυτά τα μονιμοποιητικά για να διερευνήσουνε την επίδραση των μονιμοποιητικών που χρησιμοποιούνται συνήθως, των μονιμοποιητικών που δεν χρησιμοποιούνται πλέον και ορισμένων νέων μονιμοποιητικών που δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί. Η διάρκεια της μονιμοποίησης ήταν η εξής: 1, 3, 5, 7, 14, 28, 56, 84, 168 και 336 ημέρες. Μετά από αυτό το διάστημα, τα μπλοκ ιστού αφαιρέθηκαν από το μονιμοποιητικό και πλύθηκαν για 3 έως 4 ώρες σε ισότονο αλατούχο διάλυμα. Στη συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 25°C μέχρι τη χρήση.

Το DNA εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας το QIAamp DNA Mini Kit (*Qiagen, Hilden, Γερμανία*). Για να ελεγχθεί η ύπαρξη πλήρους, μη αποικοδομημένου DNA στα δείγματα, τα δείγματα ενισχύθηκαν με PCR για το σύστημα FGA (θραύσματα 2800-bp, εκκινητής FGA F88/R82). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Οι συνθήκες κύκλου σε έναν κυκλοποιητή PTC-200 (*MJ Research, Watertown, MA*) ήταν οι εξής: 94°C για 3 λεπτά εμβάπτισης, 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 60°C για 30 δευτερόλεπτα, 72°C για 1 λεπτό, 30 κύκλοι και τελική επέκταση στους 72°C για 30 λεπτά. Ο εμπρόσθιος εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 59-ATG GAC AGC GAG TCT AGG GA-39 και ο αντίστροφος εκκινητής ήταν 59-GGG ACC ACA GCC ACA TAC TT-39. Τα προϊόντα PCR έγιναν ορατά χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (PAGE) και χρώση με άργυρο. Εάν ληφθεί αρνητικό αποτέλεσμα, διεξήχθη ξανά PCR στην οποία το σύστημα TC11 με μικρότερο αριθμό ζευγών βάσεων (z150 σε θραύσματα 170-bp, ο εκκινητής TC11) ενισχύθηκε όπως περιγράφεται από τους Edwards et al. (1992). Τα ενισχυμένα δείγματα ανιχνεύθηκαν μέσω ανίχνευσης φθορισμού λέιζερ. Στη συνέχεια, η ανίχνευση του mt-DNA πραγματοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είχαν δώσει αρνητικά αποτελέσματα TC11. Αυτό έγινε μέσω ενίσχυσης PCR της περιοχής HV1 του mt-DNA (θραύσματα z220-bp, εκκινητής HV1 L16190/H16410) όπως περιγράφεται από τους Anderson et al. (1981) και μέσω επακόλουθης PAGE και χρώσης με άργυρο. Για όλα τα δείγματα PCR, χρησιμοποιήθηκαν 25 mg DNA. Ως δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκε γενικό υλικό DNA από το Ινστιτούτο Νομικής Ιατρικής. Για να διερευνηθεί η επίδραση του μονιμοποιητικού στις ιστολογικές δομές, κάθε δείγμα χρωματίστηκε χρησιμοποιώντας αιματοξυλίνη ηωσίνη (HE) και εξετάστηκε υπό μικροσκόπιο. Οι πιο κατάλληλες ουσίες για μακροχρόνια μονιμοποίηση με πιθανή επακόλουθη ανάλυση DNA ήταν το διάλυμα Carnoy και η γλουταραλδεΐδη. Με αυτά τα δύο διαλύματα, ήταν δυνατό να ενισχυθεί και να ανιχνευθεί τόσο πυρηνικό DNA (με θραύσματα έως και 800 bp) όσο και mt-DNA σε κάθε έναν από τους ιστούς που εξετάστηκαν, ακόμη και μετά από μονιμοποίηση για μια περίοδο 336 ημερών. Στους ιστούς που είχαν μονιμοποιηθεί με φορμόλη και είχαν ρυθμιστεί με φωσφορικά, το πυρηνικό DNA μπορούσε να ανιχνευθεί σε όλους τους ιστούς έως και 28 ημέρες, αλλά μόνο σε μήκος θραυσμάτων 150 έως 170 bp (TC11). Από την 56η ημέρα της μονιμοποίησης, η ενίσχυση του πυρηνικού DNA δεν ήταν πλέον δυνατή σε ορισμένους ιστούς (ήπαρ και εγκέφαλο), και την 84η ημέρα δεν μπορούσε να ανιχνευθεί πυρηνικό DNA σε κανέναν από τους πέντε εξεταζόμενους ιστούς. Έτσι, βρέθηκαν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά τη διάρκεια της μονιμοποίησης και την ανίχνευση του DNA, όπως αναφέρθηκε, από τους Greer et al. (1991) και Wiegand et al. (1996). Ωστόσο, το mt-DNA μπορούσε να ανιχνευθεί ακόμη και εδώ μετά από μια περίοδο έως και 336 ημερών. Οι λιγότερο κατάλληλες ουσίες βρέθηκαν να είναι η μη ρυθμισμένη φορμόλη και το διχρωμικό κάλιο - οξικό οξύ. Και στα δύο δείγματα ανιχνεύθηκε κάποια απώλεια ακόμη και μετά από μόλις 3 ημέρες. Από την 14η ημέρα, το πυρηνικό DNA δεν μπορούσε πλέον να ανιχνευθεί. Στην περίπτωση της φορμόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα, το mt-DNA μπορούσε να ανιχνευθεί ακόμη και μετά από 336 ημέρες. Τα αποτελέσματα των δοκιμών για κάθε ανάλυση DNA δίνονται στον Πίνακα 1. Όταν τα διάφορα δείγματα ιστών

Σε σύγκριση, ο σκελετικός μυς και ο νεφρός ήταν ιδιαίτερα κατάλληλοι, όπως και με τους Wiegand et al. (1996). Ωστόσο, αυτοί οι δύο ιστοί παρουσιάζουν ορισμένα

προβλήματα όσον αφορά την επεξεργασία και την κυτταρική λύση με την πρωτεΐνωση K, επειδή δεν μπορούσε να επιτευχθεί πλήρης λύση. Ο εγκεφαλικός ιστός έδειξε έντονες διακυμάνσεις στα αποτελέσματα των δοκιμών, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην ανομοιομορφη διείσδυση των αντίστοιχων μονιμοποιητικών και στις διαφορές στον αριθμό των κυττάρων. Κατά τη διερεύνηση της επίδρασης των μονιμοποιητικών στις ιστολογικές δομές, τόσο το διάλυμα Carnoy όσο και η γλουταραλδεΐδη προκαλούν σημαντική βλάβη στις μεμονωμένες δομές των ιστών. Η χρήση αυτών των μονιμοποιητικών σε σχέση με την πιθανή ιατροδικαστική ιστολογική αξιολόγηση είναι επομένως απίθανο να είναι εφικτή. Το οξικό οξύ διχρωμικού καλίου ήταν επίσης μη πρακτικό επειδή το δικό του χρώμα είναι πολύ έντονο και η ιστολογική χρώση (HE) δεν ήταν πλέον δυνατή.

Από όλα τα μονιμοποιητικά που ερευνήθηκαν, η φορμόλη με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα είχε τη μικρότερη επίδραση στις ιστολογικές δομές του ιστού.

Συνοψίζοντας, το διάλυμα Carnoy και η γλουταραλδεΐδη έχουν σαφή πλεονεκτήματα για την αποικοδόμηση του DNA. Ένα μειονέκτημα, ωστόσο, είναι η πολύ περίπλοκη διαδικασία παραγωγής αυτών των δύο διαλυμάτων, η οποία δυσχεραίνει τη χρήση τους στην πράξη. Ένα περαιτέρω μειονέκτημα είναι αναμφίβολα το κακό αποτέλεσμα που επιτεύχθηκε στην ιστολογική ανάλυση. Από αυτή την άποψη, πολύ καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με 4% φορμόλη με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, η οποία χρησιμοποιείται ήδη συχνά στην πράξη. Με αυτό το διάλυμα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης DNA είναι επίσης ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, το mt-DNA μπορούσε να ανιχνευθεί ακόμα και μετά από 336 ημέρες, όπως στην περίπτωση των προαναφερθέντων διαλυμάτων. Όσον αφορά την εξακρίβωση της ταυτότητας, επειδή το mt-DNA μπορούσε ακόμα να ανιχνευθεί μετά από 1 έτος μονιμοποίησης με αυτό το μονιμοποιητικό, φαίνεται ότι η ταυτοποίηση θα ήταν δυνατή εάν υπήρχε διαθέσιμο συγκριτικό υλικό. Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα ελήφθη από τους Sano et al. (2000) σε μια έρευνα μονιμοποιημένου ιστού χρησιμοποιώντας STR και εκκινητές mt-DNA. Τα υπόλοιπα μονιμοποιητικά πρέπει να θεωρηθούν ακατάλληλα για τον εν λόγω σκοπό, επειδή ορισμένα αποκάλυψαν σχεδόν πλήρη αποικοδόμηση του DNA ακόμη και μετά από λίγες ημέρες και επειδή τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης δεν ήταν ικανοποιητικά.

(Greer et al. 1991; Gino et al. 2004).

(Franziska Miething, Sandra Hering, Barbara Hanschke, and Jan Dressler, 2006)

7.2 Ποιότητα γενετικού υλικού σε μονιμοποιημένους Ιστούς

Οι ιστοί που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη και έχουν ενσωματωθεί σε παραφίνη (FFPE) αποτελούν μια εξαιρετικά πολύτιμη πηγή γενετικού υλικού για μοριακές αναλύσεις τόσο στην έρευνα όσο και στην κλινική διαγνωστική. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση ιστών FFPE για μοριακή παθολογική ανίχνευση, όπως μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με όγκους και η μοριακή ανίχνευση στοχευμένων φαρμάκων, έχει εξελιχθεί ραγδαία από την επιστημονική έρευνα στην παθολογική διάγνωση *in vitro*. Πράγματι, η αναδρομική γονιδιακή έρευνα χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στη μοριακή βιολογία των όγκων.

Ωστόσο, επειδή τα δείγματα ιστών που συλλέγονται κατά τη διάρκεια της επιστημονικής έρευνας είναι ως επί το πλείστον FFPE, η ποσότητα DNA και RNA

που παράγουν θα επηρεάσει άμεσα το αποτέλεσμα των μοριακών πειραμάτων. Μέσω ενός συνδυασμού μακροχρόνιας πειραματικής εξερεύνησης και δημοσιευμένων μελετών, έχουν προσδιοριστεί οι βέλτιστες μέθοδοι εκχύλισης DNA και RNA. Η τεχνική βελτιστοποίησης περιλαμβάνει την αποφυγή της χρήσης μπλοκ παραφίνης με αιμορραγία, νέκρωση ή αυτόλυση, την επιλογή περιοχών με υψηλή κυτταρική πυκνότητα, την προτίμηση πάχους 8 έως 10 mm, τη χρήση φετών 20 έως 30 mg για κάθε εκχύλιση, την επιλογή αποκήρωσης με ξυλόλιο και τη χρήση πεπτικού ενζύμου σε συγκέντρωση 20 g/L για 3 έως 5 ώρες. Το κατά πόσον το DNA και το RNA που εξάγονται από μακροχρόνια διατηρημένους ιστούς FFPE πληρούν τις απαιτήσεις των πειραμάτων μοριακής βιολογίας έχει γίνει το επίκεντρο πολλών μελετών. Εδώ, συγκρίναμε την έκταση της αποικοδόμησης, τη συγκέντρωση, την καθαρότητα και την ικανότητα ενίσχυσης του DNA και του RNA που εξάγονται από ιστούς FFPE που αποθηκεύτηκαν για αρκετά χρόνια υπό τυπικές συνθήκες. Στόχος της μελέτης ήταν να προσδιορίσουν τις επιπτώσεις του χρόνου αποθήκευσης στην ποσότητα του DNA και του RNA που εξάγονται από ιστούς FFPE.

Για ακριβή γενετική ανάλυση, είναι απαραίτητο να ληφθεί DNA και RNA επαρκούς ποσότητας. Το DNA που εξήχθη από δείγματα ιστών ενσωματωμένα σε παραφίνη και διατηρημένα για περισσότερο από 1 έτος προηγουμένως έδειξε διαφορετικό φαινόμενο υποβάθμισης, με χαμηλότερη ποιότητα από το DNA που εξήχθη από νέο ιστό. Ωστόσο, είναι δύσκολο να ληφθεί νέος ιστός και το κόστος συντήρησης με υγρό άζωτο είναι σχετικά υψηλό. Αντίθετα, τα δείγματα FFPE μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατά τα οποία η ποιότητα του DNA δεν επηρεάζεται. Συνήθως, ένας μεγαλύτερος χρόνος αποθήκευσης οδηγεί σε αυξημένη υποβάθμιση και μειώνει τα μήκη των θραυσμάτων αλληλουχίας που μπορούν να ενισχυθούν. Σε μια μελέτη, το DNA εξήχθη από φρέσκα δείγματα FFPE και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -20°C για 3 χρόνια και συγκρίθηκε με DNA που εξήχθη από δείγματα FFPE που είχαν διατηρηθεί για 3 χρόνια. Παρόλο που δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην ποιότητα ή τη συγκέντρωση του DNA μεταξύ των δύο μεθόδων, τα θραύσματα που εξήχθησαν χρησιμοποιώντας την πρώτη τεχνική είχαν μήκος 100 έως 500 bp, ενώ αυτά που εξήχθησαν χρησιμοποιώντας τη δεύτερη τεχνική είχαν μήκος 100 bp. Αυτό υποδηλώνει αύξηση στον κατακερματισμό των θραυσμάτων DNA που εξήχθησαν από δείγματα FFPE μετά από 3 χρόνια συντήρησης. Ομοίως, οι Nam et al.¹⁹ αξιολόγησαν την επίδραση του χρόνου αποθήκευσης των δειγμάτων στην ποιότητα του RNA. Τα δείγματα FFPE αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 μήνα έως 5 χρόνια και αυτά που αποθηκεύτηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έδωσαν χαμηλότερη απόδοση RNA, ενώ η αποικοδόμηση DNA και RNA ήταν υψηλή. Συνολικά, το 58,3% των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν για 3 έως 5 χρόνια μπόρεσαν να υποβληθούν σε ενίσχυση του γονιδίου β-ακτίνης σε σύγκριση με το 62,5% των δειγμάτων που αποθηκεύτηκαν για 1 μήνα έως 1 έτος. Ωστόσο, ως και σήμερα, λίγα είναι γνωστά για το εάν δείγματα παραφίνης που έχουν διατηρηθεί για περισσότερα από 5 χρόνια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτόχρονη εξαγωγή DNA και RNA για ανάλυση PCR.

Οι ιστοί FFPE χρησιμοποιούνται συχνά σε αναδρομικές μελέτες, αν και παρουσιάζουν αξιοσημείωτη υποβάθμιση του DNA και του RNA. Διαπιστώθηκε ότι η μακροχρόνια αποθήκευση ιστών FFPE αύξησε το επίπεδο υποβάθμισης του DNA και του RNA και μείωσε την ποσότητα του DNA και του RNA που εξήχθη. Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην καθαρότητα του DNA ή του RNA που εξήχθη από ιστούς FFPE που αποθηκεύτηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και περισσότερο από το 99% των δειγμάτων απέδωσε νουκλεϊκά οξέα που θα

μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση θραυσμάτων γονιδίων-στόχων μικρότερων από 300 bp.

Συμπερασματικά, τα δείγματα ιστών FFPE που αποθηκεύτηκαν για έως και 8 χρόνια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση μικρών θραυσμάτων DNA και RNA. Ωστόσο, οι προκαταρκτικές έρευνες θα ήταν ωφέλιμες πριν από τη γενετική ανάλυση για την επιλογή των καταλληλότερων δειγμάτων FFPE ανάλογα με το μέγεθος του γονιδίου-στόχου. Η χρήση δειγμάτων ιστών FFPE παρέχει μια γρήγορη, οικονομική και πρακτική μέθοδο για την ανίχνευση DNA και RNA σε κλινικά περιβάλλοντα.

7.3 Μορφολογία απομόνωσης πυρηνικού DNA

Η εξαγωγή DNA από ιστό μονιμοποιημένο με φορμόλη και ενσωματωμένο σε παραφίνη (FFPE) παραμένει μια πρόκληση, παρά τις πολυάριθμες προσπάθειες ανάπτυξης μιας πιο αποτελεσματικής μεθόδου. Τα ποσοστά επιτυχίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με DNA που εκχυλίστηκε με τις τρέχουσες μεθόδους παραμένουν χαμηλά. Εκχυλίστηκαν DNA από 140 μακροχρόνια αρχειοθετημένα δείγματα FFPE χρησιμοποιώντας μια απλή αλλά αποτελεσματική μέθοδο αποπαραφινποίησης, αφαιρώντας τη παραφίνη με ορυκτέλαιο και ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ εξαγωγής DNA. Η ποιότητα του DNA στη συνέχεια ελέγχθηκε σε ένα πείραμα γονότυπου με 14 μικροδορυφορικούς δείκτες. Λήφθηκε DNA υψηλής ποιότητας με μέσο ποσοστό επιτυχίας PCR 97% (εύρος: 88–100%) σε όλους τους δείκτες. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το DNA που εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας αυτή τη νέα μέθοδο είναι πιθανό να είναι κατάλληλο για γενετικές μελέτες που περιλαμβάνουν θραύσματα DNA <200 bp.

Η μονιμοποίηση με φορμόλη και η ενσωμάτωση σε παραφίνη (FFPE) είναι μια τυπική μέθοδος για τη μακροχρόνια διατήρηση των περισσότερων αρχειοθετημένων παθολογικών δειγμάτων. Τέτοια δείγματα παρέχουν έναν ανεκτίμητο πόρο για επακόλουθες μοριακές μελέτες κλινικών φαινοτύπων, ειδικά γενετικές μελέτες στις οποίες το DNA δεν είναι διαθέσιμο από φρέσκο ή κατεψυγμένο ιστό/ιστούς επειδή τα άτομα δεν είναι πλέον εν ζωή. Ο ιστός FFPE είναι μια εξαιρετική πηγή DNA, αλλά η εξαγωγή του παραμένει μια πρόκληση. Η φορμαλδεΰδη, το αποτελεσματικό συστατικό της φορμόλης, οδηγεί στη δημιουργία διασύνδεσης μεταξύ νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών και προκαλεί τον κατακερματισμό των νουκλεϊκών οξέων λόγω των συνθηκών της διαδικασίας μονιμοποίησης, του εξαιρετικά χαμηλού pH (<1) δηλαδή. Αυτό καθιστά πολύ δύσκολη την ενίσχυση του υψηλού μοριακού βάρους DNA. Η διασύνδεση όχι μόνο προκαλεί προβλήματα στην εξαγωγή DNA, αλλά εμποδίζει την ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Παρά τα προβλήματα αυτά, τα δείγματα FFPE χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς το περιεχόμενό τους στο DNA, ακόμη και σε μικρότερα θραύσματα, είναι συχνά ανεκτίμητο για τη μελέτη γενετικών ασθενειών και είναι κατάλληλο για PCR που απαιτεί σχετικά μικρά θραύσματα DNA.

Έχει καταβληθεί σημαντική προσπάθεια για τη βελτιστοποίηση των μεθόδων εξαγωγής DNA υψηλής ποιότητας από δείγματα FFPE. Πράγματι, αρκετοί ερευνητές έχουν εξαγάγει με επιτυχία γονιδιωματικό DNA που έχει αποθηκευτεί για 20-25 χρόνια με αποπαραφίνωση χρησιμοποιώντας ξυλόλιο/αιθανάλη και εξαγωγή DNA χρησιμοποιώντας καθαρισμό με αλάτι ή φαινόλη. Ο Shi et al. υπέδειξε ότι η θέρμανση δειγμάτων FFPE σε υψηλότερη θερμοκρασία σε διάλυμα NaOH 0,1 αύξησε σημαντικά την αποτελεσματικότητα της εξαγωγής DNA. Μεγαλύτερα θραύσματα DNA (έως 1182 bp) έχουν ενισχυθεί και προσδιοριστεί με επιτυχία, η αλληλουχία τους από πρόσφατα αποθηκευμένο ιστό FFPE (2-4 ετών) που έχει

εξαχθεί με θέρμανση και επακόλουθη χρήση ενός τροποποιημένου αυτόματου συστήματος απομόνωσης DNA. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την εξαγωγή DNA από δείγματα FFPE και χρησιμοποιούνται ευρέως, είναι γενικά χρονοβόρες και περιλαμβάνουν τοξικές χημικές ουσίες όπως ξυλόλιο και φαινόλη. Περιγράφουμε ένα νέο, απλό αλλά αποτελεσματικό πρωτόκολλο αποπαραφίνωσης το οποίο, όταν συνδυάζεται με την τυπική απομόνωση DNA χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ, παρείχε DNA υψηλής ποιότητας κατάλληλο για πειράματα προσδιορισμού γονότυπου. Αρχαιοθετημένοι ιστοί FFPE (νεφροί και ήπαρ, διατηρημένοι μεταξύ 1981 και 2005) ελήφθησαν από 140 πιθήκους (*Macaca mulatta*) στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Πρωτευνόντων του Ουισκόνσιν (WNPRC), στο πλαίσιο μιας μελέτης σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο της ενδομητρίωσης. Το γονιδιωματικό DNA εκχυλίστηκε από 3 έως 4 (πάχους 5 m) διαδοχικές τομές για καθένα από τα 140 δείγματα FFPE. Η παραφίνη αφαιρέθηκε από τα δείγματα προσθέτοντας 300 l παραφινέλαιου σε έναν μικροφυγοκεντρικό σωλήνα 1,5 ml που περιείχε 3-4 τομές ιστού εγκλεισμένου σε παραφίνη και επωάζοντας στους 90C για 20 λεπτά για να διαλυθεί η παραφίνη. Στη συνέχεια, το DNA εκχυλίστηκε με ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ, το DNeasy Blood & Tissue Kit (*Qiagen Ltd., West Sussex, Ηνωμένο Βασίλειο*), χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα του κατασκευαστή, χωρίς να αφαιρεθεί το παραφινέλαιο που χρησιμοποιήθηκε για την αποπαραφίνωση, και εκλούστηκε χρησιμοποιώντας 50 ll ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης. Η ποιότητα του εκχυλισμένου DNA εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, και οι συγκεντρώσεις αξιολογήθηκαν με OD260 (Φασματοφωτόμετρα NanoDrop 1000, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA). Για να ελεγχθεί η καταλληλότητα του εκχυλισμένου DNA για ανάλυση PCR, επιλέχθηκε DNA από οκτώ δείγματα FFPE σε όλο το εύρος των χρονικών διαστημάτων από την πρώτη τους συντήρηση, δηλαδή, το 1982, 1985, 1987, 1990, 1992, 1998, 2001 και 2005, αντίστοιχα. Τα θραύσματα βήτα-ακτίνης ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας ένα σύνολο εκκινήτων, 1 προς τα εμπρός και 5 προς τα πίσω, παράγοντας μεγέθη θραυσμάτων από 109 έως 609 bp, με βάση την αλληλουχία γονιδίων που λήφθηκε από τη βάση δεδομένων Ensembl: www.ensembl.org (Αναφ.: NP_001028256.1). Το σύστημα PCR με τελικό όγκο 15 ll περιείχε περίπου 25 ng εκχυλισμένου DNA, 0,2 U DNA πολυμεράσης HotStarTaq (*Qiagen, Ηνωμένο Βασίλειο*), 0,3 IM για κάθε εκκινήτη, 0,2 IM μείγμα dNTP και 1,5 mM MgCl₂. Όλες οι PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή G-Storm GS1 (GRI, Ηνωμένο Βασίλειο): 15 λεπτά στους 95C για την ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης HotStarTaq, ακολουθούμενες από 45 κύκλους μετουσίωσης για 45s, ανόπτηση για 45s, επέκταση για 45s και τελική επέκταση για 10 λεπτά στους 72C. Τα αμπλικόνια αναλύθηκαν σε πηκτές αγαρόζης 2% χρωματισμένες με βρωμιούχο αιθίδιο. Το DNA που εξήχθη από ιστούς FFPE στις δοκιμασίες βήτα-ακτίνης ήταν επαρκούς απόδοσης. Όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα από το έτος στο οποίο μονιμοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν, μπορούσαν να ενισχυθούν αποτελεσματικά έως και 191 bp. Για τα δείγματα που μονιμοποιήθηκαν και αποθηκεύτηκαν το 2001 και το 2005, ακόμη και το θραύσμα των 606 bp μπορούσε να ενισχυθεί ειδικά και αποτελεσματικά. Μετά τις δοκιμασίες PCR με βήτα-ακτίνη, διεξήχθη ένα πείραμα γονοτύπησης χρησιμοποιώντας DNA από όλα τα 140 δείγματα FFPE, που περιελάμβανε 14 μικροδορυφορικούς δείκτες σε δύο περιοχές ορθόλογες προς τα ανθρώπινα χρωμοσώματα 7 και 10 (που προηγουμένως συνδέονταν με ενδομητρίωση στις γυναίκες. Οι εκκινήτες σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τον Εκκινήτη 3 για να διασφαλιστεί ότι όλα τα αμπλικόνια είχαν μήκος περίπου 100 bp, έτσι ώστε τα περισσότερα δείγματα να μπορούν να ενισχυθούν με επιτυχία. Τα 50 άκρα κάθε

εμπρόσθιου δείκτη επισημάνθηκαν με φθορίζουσα χρωστική (6FAM, VIC, NED ή PET) για πολλαπλή γονοτύπηση. Δείγματα DNA από όλα τα δείγματα FFPE συμπεριλήφθηκαν στο ίδιο σύστημα PCR, με τις συνθήκες αντίδρασης όπως περιγράφονται παραπάνω, και η συγκέντρωση MgCl₂ προσαρμόστηκε για διαφορετικούς δείκτες (από 1,5 έως 2,5 M). Τα αμπλικόνια PCR δεικτών αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας έναν αναλυτή DNA ABI 3700 (*Applied Biosystems, Foster City, CA*).

Για κάθε έναν από τους δείκτες, η PCR και η γονοτύπηση ήταν επιτυχείς για το 88-100% των δειγμάτων, με μέσο ποσοστό επιτυχίας 97% και στους 14 δείκτες. Για να διερευνηθεί η επίδραση του έτους αρχειοθέτησης, υπολογίστηκε επίσης το ποσοστό επιτυχίας PCR σε όλους τους δείκτες για κάθε μεμονωμένο δείγμα. Το μέσο ετήσιο ποσοστό επιτυχίας PCR συσχετίστηκε σημαντικά με το έτος αρχειοθέτησης. Ωστόσο, αυτή η συσχέτιση καθοδηγήθηκε από τα ποσοστά επιτυχίας PCR 100% στα δείγματα που αρχειοθετήθηκαν για λιγότερο από 10 χρόνια (n = 20), όταν περιορίστηκε η ανάλυση στα έτη 1980-1995, δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη αναφορά χρήσης ορυκτέλαιου ως αντιδραστήριου αποπαραφίνωσης. Τόσο το ορυκτέλαιο όσο και η παραφίνη χρησιμοποιούνται στην PCR εδώ και πολλά χρόνια και ήταν ήδη γνωστό ότι κανένα από τα δύο δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της PCR.

Επιπλέον, η παραφίνη μπορεί να διαλυθεί πλήρως σε ορυκτέλαιο. Για αυτούς τους λόγους, υποθέσαμε ότι το ορυκτέλαιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αποτελεσματική απομάκρυνση της παραφίνης από δείγματα FFPE χωρίς να επηρεαστεί η ποιότητα του DNA για πειράματα PCR. Μια ανησυχία σχετικά με αυτήν την απλή μέθοδο ήταν ότι το αντιδραστήριο μονιμοποίησης, η φορμόλη, ενδέχεται να μην αφαιρεθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποπαραφίνωσης και μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της PCR. Ωστόσο, στα πειράματα γονοτύπησης που πραγματοποιήσαμε δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Μεγάλος αριθμός ιστών FFPE φυλάσσεται σε αρχεία παθολογοανατομικών τμημάτων παγκοσμίως, καθώς αποτελεί μια τυπική μέθοδο διατήρησης στην κλινική πρακτική. Αυτά τα δείγματα αντιπροσωπεύουν μια ανεκτίμητη τράπεζα DNA για γενετικές μελέτες.

Για την επεξεργασία τέτοιων δειγμάτων απαιτείται μια αποτελεσματική μέθοδος εξαγωγής DNA που περιλαμβάνει ελάχιστο χειρισμό. Σε σύγκριση με την πιο συχνά υιοθετούμενη μέθοδο ξυλενίου - αιθανόλης, η προσέγγιση που περιγράφεται εδώ είναι πολύ απλή και αποτελεσματική. Το παρατηρούμενο ελάχιστο ποσοστό επιτυχίας 88% για 140 δείγματα που εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας 14 μικροδορυφορικούς δείκτες ήταν σημαντικά υψηλότερο από ορισμένα αναφερόμενα αποτελέσματα: το 69% επιτεύχθηκε με τη μέθοδο ξυλενίου - φαινόλης με δείγμα αρχειοθετημένο για 20-25 χρόνια και το 75% χρησιμοποιώντας μια εμπορική κλίμακα kit.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η μέθοδός μας μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε δείγματα που έχουν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα πάνω από 25 χρόνια σε ορισμένες περιπτώσεις εφόσον δεν απαιτούνται μεγάλα θραύσματα μορίων DNA. Το DNA που εξάγεται από δείγματα FFPE συνήθως επιτρέπει την ανάλυση PCR μόνο σε σχετικά μικρές αλληλουχίες-στόχους, που σπάνια υπερβαίνουν τα 300 bp, λόγω του κατακερματισμού του DNA κατά τη διάρκεια των διαδικασιών μονιμοποίησης και ενσωμάτωσης. Τα αποτελέσματα της εξαγωγής DNA στην παρούσα μελέτη συμφωνούσαν με αυτήν την παρατήρηση: η πλειονότητα των θραυσμάτων είχε μήκος περίπου 200 bp.

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών βήτα-ακτίνης και η ανάλυση συσχέτισης μεταξύ του έτους αρχειοθέτησης και του ποσοστού επιτυχίας της PCR έδειξαν ότι ο χρόνος

αποθήκευσης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ακεραιότητα του DNA και την ενίσχυση PCR. Επομένως, τα δείγματα DNA που εξάγονται από ιστούς FFPE που έχουν αποθηκευτεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα ενδέχεται να μην είναι κατάλληλα για ανάλυση εάν απαιτούνται μεγαλύτερα μόρια DNA, όπως σε μελέτες επαναπροσδιορισμού αλληλουχίας. Ωστόσο, τα μικρότερα τμήματα DNA που απομονώνονται από δείγματα ιστών FFPE μπορεί να είναι κατάλληλα για τις περισσότερες γενετικές αναλύσεις που απαιτούν μόνο μικρά μόρια DNA (δηλαδή, πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου, αναλύσεις μικροδορυφόρου και κατάσταση μεθυλίωσης). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ακεραιότητα του DNA επηρεάζεται κρίσιμα από τη μέθοδο μονιμοποίησης, δηλαδή το μονιμοποιητικό και τη διαδικασία μονιμοποίησης, που χρησιμοποιείται κατά τη συντήρηση ιστών. Ο Lydidis και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν πρόσφατα μια τροποποιημένη μέθοδο μονιμοποίησης με βάση τον ψευδάργυρο, η οποία αυξάνει σημαντικά την ποιότητα και την ποσότητα του DNA που ανακτάται από διατηρημένους ιστούς που έχουν αποθηκευτεί για έως και 14 μήνες. Αυτό δείχνει ότι η βελτίωση της διαδικασίας μονιμοποίησης για τη συντήρηση ιστών θα βοηθήσει επίσης πολύ στην ανάκτηση γενετικού υλικού αρχειοθετημένων δειγμάτων στο μέλλον.

Συνοψίζοντας, η νέα μέθοδος αποπαραφίνωσης με ορυκτέλαιο που εισάγεται εδώ είναι απλή και αποτελεσματική. Τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι σε συνδυασμό με εμπορικά διαθέσιμα κιτ εξαγωγής DNA, αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των πειραμάτων ανάκτησης DNA από δείγματα FFPE, ακόμη και όταν αρχειοθετούνται για έως και 27 χρόνια.

7.4 Γενετικές και Επιγενετικές Αναλύσεις DNA σε μονιμοποιημένους Ιστούς

Η ανάπτυξη και η εξέλιξη ασθενειών χαρακτηρίζονται από συχνές γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων χρωμοσωμικών αναδιατάξεων και απωλειών αριθμού αντιγράφων και μεθυλίωσης DNA. Οι εξελίξεις τις τεχνολογίες υψηλής απόδοσης και προσδιορισμού προφίλ σε ολόκληρο το γονιδίωμα, τις οι μικροσυστοιχίες, έχουν βελτιώσει σημαντικά την ικανότητά τις να εντοπίζουμε και να ανιχνεύουμε αυτές τις συγκεκριμένες αλλοιώσεις. Ωστόσο, καθώς η τεχνολογία συνεχίζει να βελτιώνεται, τις περιοριστικός παράγοντας παραμένει η ποιότητα και η διαθεσιμότητα των δειγμάτων. Επιπλέον, οι κλινικές πληροφορίες παρακολούθησης και η έκβαση τις νόσου συλλέγονται συχνά χρόνια μετά την αρχική συλλογή δειγμάτων. Τα δείγματα, συνήθως μονιμοποιημένα με φορμόλη και ενσωματωμένα σε παραφίνη (FFPE), αποθηκεύονται σε νοσοκομειακά αρχεία για χρόνια έως δεκαετίες. Το DNA μπορεί να ανακτηθεί αποτελεσματικά και αποτελεσματικά από δείγματα ενσωματωμένα σε παραφίνη, εάν εφαρμοστεί η κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης. Το DNA υψηλής ποιότητας που εξάγεται από σωστά διατηρημένα και αποθηκευμένα δείγματα μπορεί να υποστηρίξει ποσοτικές δοκιμασίες για συγκρίσεις φυσιολογικών και νοσούντων ιστών και δημιουργία γενετικών και επιγενετικών υπογραφών.

Για την εξαγωγή DNA από δείγματα που έχουν ενσωματωθεί σε παραφίνη, οι πυρήνες ιστών ή ο μικροδιαχωρισμένος ιστός υποβάλλονται σε επεξεργασία με ξυλόλιο, η οποία διαλύει την παραφίνη από τον ιστό και στη συνέχεια επανυδατώνεται χρησιμοποιώντας μια σειρά πλύσεων με αιθανόλη. Οι πρωτεΐνες και

τα επιβλαβή ένζυμα, τις οι νουκλεάσες, στη συνέχεια χωνεύονται από την πρωτεΐνάση K. Η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος λύσης, το οποίο περιέχει μετουσιωτικούς παράγοντες τις το δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), διευκολύνει την πέψη. Τα νουκλεϊκά οξέα καθαρίζονται από το προϊόν λύσης ιστού χρησιμοποιώντας φαινόλη κορεσμένη με ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκέντρωση υψηλής ταχύτητας, η οποία παράγει ένα διφασικό διάλυμα. Το DNA και το RNA παραμένουν στην ανώτερη υδατική φάση, ενώ οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι πολυσακχαρίτες απομονώνονται τις διαοργανικές και οργανικές φάσεις αντίστοιχα. Η συγκράτηση τις υδατικής φάσης και οι επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις με φαινόλη δημιουργούν ένα καθαρό δείγμα. Μετά τις εκχυλίσεις με φαινόλη, προστίθεται Rnase A για την εξάλειψη του μολυσματικού RNA. Πρόσθετες εκχυλίσεις με φαινόλη μετά την επώαση με Rnase A χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση τυχόν υπολειπόμενου ενζύμου. Η προσθήκη οξικού νατρίου και ισοπροπανόλης καθίζει το DNA και χρησιμοποιείται φυγοκέντρωση υψηλής ταχύτητας για τη σφαιροποίηση του DNA και τη διευκόλυνση τις απομάκρυνσης τις ισοπροπανόλης. Η περίσσεια αλάτων που μεταφέρονται από την καθίζηση μπορεί να επηρεάσει τις επόμενες ενζυματικές δοκιμασίες, αλλά μπορεί να απομακρυνθεί από το DNA με έκπλυση με 70% αιθανόλη, ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση για την επανασφαιροποίηση του DNA. Το DNA επαναιωρείται σε απεσταγμένο νερό ή στο ρυθμιστικό διάλυμα τις επιλογής, ποσοτικοποιείται και αποθηκεύεται τις -20°C. Το καθαρισμένο DNA μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές PCR, συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση συστοιχίας 4 (συστοιχία CGH), ανοσοκατακρήμνιση μεθυλιωμένου DNA (MeDIP) και αλληλούχιση, επιτρέποντας μια ολοκληρωμένη ανάλυση δειγμάτων ιστών – όγκων.

Οι ιστοί που λαμβάνονται με βιοψία ή οι χειρουργικά αφαιρεμένοι ιστοί για ιστοπαθολογική ανάλυση και διάγνωση συχνά είναι μονιμοποιημένοι με φορμόλη και ενσωματωμένοι σε παραφίνη (FFPE) για μακροχρόνια αποθήκευση. Με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατανόηση τις γενετικής βάσης των ασθενειών, η δυνατότητα εξαγωγής DNA από αυτά τα δείγματα αποτελεί μια ανεκτίμητη πηγή διαγνωστικού υλικού που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γονιδιωματική ανάλυση και μεταφραστικές μελέτες. Ιστορικά, τα δείγματα FFPE δεν θεωρούνταν βιώσιμη πηγή για μοριακή ανάλυση, καθώς τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να τροποποιηθούν σε μεγάλο βαθμό από τη διασύνδεση πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέος και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Η εξαγωγή DNA από ιστούς που έχουν ενσωματωθεί σε παραφίνη είναι μια ισχυρή διαδικασία που βασίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα για τον καθαρισμό του DNA. Η ποιότητα και η ποσότητα του εκχυλισμένου DNA και η επιτυχία τις επακόλουθης ενίσχυσης του DNA εξαρτώνται από μια σειρά παραμέτρων πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την εξαγωγή. Αυτές περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων: τον τύπο και την ποσότητα του ιστού, τον τύπο του μονιμοποιητικού που χρησιμοποιείται για τη συντήρηση των ιστών, τη διάρκεια τις μονιμοποίησης, την ηλικία του μπλοκ παραφίνης και τις συνθήκες αποθήκευσης, καθώς και το μήκος του επιθυμητού τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Η αφαίρεση τις παραφίνης από τον ιστό είναι το πιο κρίσιμο βήμα για την επιτυχή εξαγωγή, καθώς η αδιάλυτη παραφίνη οδηγεί σε κακή ποιότητα δείγματος και αναστολή τις ενίσχυσης PCR.

7.5 Μια νέα προσέγγιση για την εξαγωγή DNA από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και ενσωματωμένο σε παραφίνη χρησιμοποιώντας μικροκύματα HANSPAL(μέθοδος)

Το 2020, οι **H. Singh, S. Hanspal** και συνεργάτες δημοσίευσαν μια πρωτοποριακή μελέτη στο [Medical Journal Armed Forces India](#) προτείνοντας μια νέα μέθοδο εκχύλισης DNA από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμαλίνη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPE) με τη χρήση **μικροκυμάτων**.

Η προσέγγιση αυτή αξιοποιεί την ενέργεια των μικροκυμάτων για να σπάσει τους ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς (διασταυρώσεις/cross-links) που σχηματίζει η φορμαλίνη μεταξύ των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, οι οποίοι συνήθως εμποδίζουν την ανάκτηση DNA υψηλής ποιότητας

Τα βασικά βήματα της μεθόδου είναι:

1. **Αποπαραφίνωση:** Τα δείγματα ιστού αποπαραφινώνονται και τοποθετούνται σε διάλυμα φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος.
2. **Θέρμανση με Μικροκύματα:** Τα δείγματα θερμαίνονται σε δύο στάδια για τη σταδιακή αποσταθεροποίηση των δεσμών:
 1. **2 λεπτά στα 400 MW** (για τη δημιουργία αστάθειας στις διασταυρώσεις).
 2. **2 λεπτά στα 800-850 MW** (μέγιστη ισχύς) για το σπάσιμο των δεσμών χωρίς την καταστροφή των νουκλεϊκών οξέων.
3. **Ομογενοποίηση & Λύση:** Τα δείγματα ομογενοποιούνται και αναμιγνύονται με **buffer λύσης** (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS) και **Πρωτεΐνάση K**.
4. **Τελική Εκχύλιση:** Ακολουθούνται βήματα παρόμοια με τη συμβατική μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου (PC) για τον καθαρισμό του DNA

Η μέθοδος αυτή, των μικροκυμάτων συγκρίθηκε με τα εμπορικά κιτ π.χ QIAamp DNA FFPE και με άλλες μεθόδους και ανέδειξε σημαντικές διαφορές όπως:

- **Υψηλότερη Απόδοση:** Η συγκέντρωση DNA που ανακτήθηκε ήταν **100–150 ng/μL**, η υψηλότερη μεταξύ όλων των μεθόδων που δοκιμάστηκαν.
- **Καλύτερη Ποιότητα:** Ο λόγος απορρόφησης A260:A280 κυμάνθηκε μεταξύ **1.70–2.00**, υποδηλώνοντας καθαρό DNA χωρίς σημαντική αποδόμηση.
- **Ανώτερη Ενίσχυση:** Τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με μικροκύματα έδωσαν πιο έντονες και καθαρές ζώνες σε δοκιμές PCR (π.χ. για το γονίδιο της β-ακτίνης ή του p53), επιβεβαιώνοντας τη χρηστικότητα του DNA σε κατάντη (downstream) εφαρμογές.

Ανάλυση της μεθόδου HANSPAL

Υλικά και μέθοδοι

Δέκα δείγματα FFPE ανακτήθηκαν από τα αρχεία του Τμήματος Στοματικής Παθολογίας και Μικροβιολογίας, Ινστιτούτο Οδοντιατρικών Επιστημών Maulana Azad, Νέο Δελχί. Τα 10 δείγματα περιελάμβαναν 4 καλοήθειες οδοντογενείς κύστεις, 2 αδαμαντινοβλάστωμα, οδοντογενείς όγκους, 2 κερατοκυστικούς οδοντογενείς όγκους και 2 στοματικές υποβλεννογόνιες ίνωσεις, δυνητικά κακοήθη διαταραχή. Το γονιδιωματικό DNA από τα ίδια δείγματα ιστών εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας έξι διαφορετικές μεθόδους. Το συνολικό DNA εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας τα εμπορικά διαθέσιμα κιτ, τη μέθοδο φαινολεχλωροφορμίου (PC), τη μέθοδο ορυκτέλαιου, τη μέθοδο διαλύματος M/10 NaOH και τη μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα. Πέντε διαδοχικές τομές πάχους 5 mm με επιφάνεια (16-20 mm²) ανά δείγμα ελήφθησαν σε μικροφυγοκεντρικούς σωλήνες και πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση.

Μέθοδος εξαγωγής DNA

Εμπορικά διαθέσιμα κιτ

α) Κιτ ιστού QIAamp DNA FFPE και

β) Κιτ ιστού Norgen DNA FFPE

γ) Μέθοδος PC

Το συνολικό γονιδιωματικό DNA εκχυλίστηκε από ιστούς FFPE ακολουθώντας ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο χρησιμοποιώντας ξυλόλιο για αποπαραφίνωση

δ) Μέθοδος ορυκτέλαιου

Τις 90C για 20 λεπτά, οι ιστοί FFPE αποπαραφινώθηκαν σε ορυκτέλαιο ακολουθούμενοι από τη συμβατική μέθοδο PC.³

Πεντακόσια μικρολίτρα M/10 NaOH προστέθηκαν σε κάθε μικροσωλήνα που περιείχε δύο τομές ιστού πάχους 10 mm. Το μείγμα θερμάνθηκε τις 120 C χρησιμοποιώντας αυτόκλειστο για 20 λεπτά και στη συνέχεια ψύχθηκε για 15 λεπτά. 0,2 ml του διαλύματος ανάκτησης αναρροφήθηκαν για δοκιμή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ενώ το υπόλοιπο δείγμα αποθηκεύτηκε τις 4 C για περαιτέρω χρήση.

Ε) Μέθοδος μικροκυμάτων

Αποτελέσματα

Η αξιολόγηση ποσότητας και ποιότητας έδειξε ότι το συνολικό DNA που εξήχθη με το κιτ ιστών QIAamp DNA FFPE commercial ήταν σε καλή ποσότητα σε σύγκριση με το κιτ ιστών Norgen DNA FFPE και τις μεθόδους εκχύλισης, εκτός από τη μέθοδο μικροκυμάτων που απέδωσε μέγιστη συγκέντρωση DNA. Οι αποδόσεις DNA που ελήφθησαν με τη μέθοδο μικροκυμάτων ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις μεθόδους, ενώ η ποιότητα ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με το ορυκτέλαιο. Εμφανείς και αιχμηρές ζώνες παρατηρήθηκαν στο DNA που εξήχθη με τη μέθοδο μικροκυμάτων και σε λίγες περιπτώσεις με το κιτ ιστών QIAamp DNA FFPE, ενώ τις υπόλοιπες μεθόδους παρατηρήθηκε διάτμηση του DNA. Ένα

επιθυμητό αμπλικόνιο 280 ζευγών βάσεων απεικονίστηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Με βάση την απόδοση ενίσχυσης PCR, τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο μικροκυμάτων και δύο δείγματα με το κιτ εμπορίου έδειξαν θετικά αποτελέσματα.

Table 1 – Concentration and quality of DNA by different methods.

S. No	Protocol used	No. of samples	Total time duration	Concentration of nDNA (ng/mL)	A260/280 (range)
1.	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	10	3 h	95-135	1.75-2.10
2.	Norgen DNA FFPE Tissue Kit	10	3 h	28-50	1.55-2.05
3.	PC method	10	15 h	50-98	1.65-2.23
4.	Mineral oil	10	15 h	21-63	1.50-2.30
5.	M/10 NaOH	10	45 min	12-25	2.08-2.40
6.	Microwave method	10	15 h	100-150	1.70-2.00

PC, phenolechloroform; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded.
Bold values indicate highest values in respective headings

Η φορμαλδεΰδη, τις γνωρίζουμε, είναι ένα αντιδραστικό ηλεκτροφιλικό είδος που μονιμοποιεί τον ιστό μέσω διασταυρούμενης σύνδεσης. Ανάλογα με τη συγγένεια των πρωτεϊνών με τη φορμαλδεΰδη, μπορούν να σχηματιστούν τρεις τύποι αντιδραστικών ομάδων, οι οποίοι είναι οι εξής: (1) μεθυλολικές ομάδες, (2) βάσεις Schiff και (3) γέφυρες μεθυλενίου. Η αρχική διασταυρούμενη σύνδεση που συμβαίνει τις πρώτες 24-48 ώρες είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία και περιλαμβάνει μεθυλολικές ομάδες και βάσεις Schiff. Σε διάστημα 30 ημερών, σχηματίζονται μη αναστρέψιμοι δεσμοί μεθυλενίου. Αυτοί οι ομοιοπολικοί δεσμοί είναι δύσκολο να διασπαστούν, με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό του DNA κατά τη διαδικασία εκχύλισης. Η διάσπαση αυτών των διασταυρούμενων συνδέσεων πριν από την εκχύλιση του DNA είναι η σημαντική πτυχή για την επίτευξη DNA καλής ποιότητας. Ως εκ τούτου, εδώ και αιώνες, προσπαθούμε να εξαγάγουμε DNA από ιστούς FFPE με διάφορα μέσα.

Table 2 - Comparison of DNA concentration and quality of DNA by microwave method with other methods using unpaired student t test

Methods	Comparison of DNA concentration of different methods with microwave method			Comparison of OD value of different methods with microwave method		
	Mean difference	t value	p value	Mean difference	t value	p value
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	16.3	12.041	0.032*	0.008	0.183	0.857
Norgen DNA FFPE Tissue Kit	86.7	2.323	<0.001*	0.059	1.107	0.283
PC method	53.5	13.947	<0.001*	0.004	0.054	0.958
Mineral oil	83.0	12.041	<0.001*	0.168	1.77	<0.001*
M/10 NaOH	106.7	19.041	<0.001*	0.378	7.794	0.104

PC, phenolechloroform; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded.
 *p value < 0.05 is considered as statistically significant.

Σε διάφορες μελέτες, χρησιμοποιήθηκε βρασμός του ρυθμιστικού διαλύματος στο αντίστοιχο σημείο βρασμού τους στις μέγιστες ρυθμίσεις ισχύος για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων.

Συμπερασματικά, η εξαγωγή νουκλεϊκού οξέος από ιστούς FFPE είναι πολύ κουραστική, καθώς η μονιμοποίηση με φορμόλη έχει ως αποτέλεσμα ισχυρές διασυνδέσεις πρωτεϊνών με DNA. Η μέθοδος μικροκυμάτων που χρησιμοποιούμε έχει δείξει εξαιρετικά πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για την εξαγωγή DNA καλής ποιότητας από ιστούς FFPE. Περαιτέρω μελέτες σε μεγάλο μέγεθος δείγματος θα μπορούσαν πιθανώς να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στην παρούσα μελέτη.

Όπως περιγράφεται λεπτομερώς παραπάνω, μια πληθώρα παραγόντων έχει δημοσιευμένες επιπτώσεις στην ανάλυση σε ιστό FFPE: χρόνος ισχαιμίας, μέγεθος δείγματος, ρυθμιστικό διάλυμα μονιμοποίησης, μέθοδος χορήγησης μονιμοποίησης, θερμοκρασία και διάρκεια μονιμοποίησης, απασβέστωση, αποθήκευση μπλοκ, πάχος τομής και αποθήκευση τομής. Είναι σημαντικό ότι αυτές οι παράμετροι μπορούν να επηρεάσουν την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και της μορφολογίας με διαφορετικούς τρόπους και σε διαφορετικό βαθμό. Για να δείξουμε, δείγματα ανθρώπινου ιστού FFPE μεγέθους 3 mm³ που υποβλήθηκαν σε PMI λιγότερο από 4 ώρες ή χρόνο ισχαιμίας λιγότερο από 1 ώρα και διατηρήθηκαν σε NBF για 8 έως 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή 48°C θα πρέπει να αποδίδουν αποδεκτά δεδομένα DNA, RNA, πρωτεΐνης και μορφολογίας εάν τα μπλοκ αποθηκεύονται για λιγότερο από 1 έτος και εάν οι τομές ιστού τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρο πλάκα αποθηκεύονται για λιγότερο από 1 εβδομάδα. Ωστόσο, τα κατώφλια επίδρασης για έναν συγκεκριμένο προαναλυτικό παράγοντα ήταν συχνά μοναδικά για κάθε αναλυόμενο και σε ορισμένες περιπτώσεις για κάθε αναλυτική πλατφόρμα.

Πρόσθετες πηγές προαναλυτικής μεταβλητότητας, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων εξαγωγής, των τεχνικών ανάκτησης αντιγόνου και των μη διερευνημένων μεταβλητών, δεν εξετάστηκαν σε αυτήν την ανασκόπηση και μπορεί να χρησιμεύσουν ως πρόσθετες συγχυτικές μεταβλητές

Συνολικά, πρέπει να σταθμίσουμε τα οφέλη έναντι των συνεπειών της χρήσης αρχαικού ιστού FFPE όταν οι παράμετροι χειρισμού, μονιμοποίησης, επεξεργασίας και αποθήκευσης ενός δείγματος είναι άγνωστες. Η χρήση ιστού FFPE που έχει υποστεί ακατάλληλο χειρισμό ενδέχεται να μην παράγει δεδομένα ή να αποφέρει δεδομένα που είναι αντιπροσωπευτικά των συνθηκών επεξεργασίας FFPE που εφαρμόστηκαν και όχι της πάθησης του δότη βιολογικών δειγμάτων. Με συντονισμένη προσπάθεια και προσοχή στη λεπτομέρεια, την ακρίβεια και την ευαισθητοποίηση, τα βιολογικά δείγματα FFPE μπορούν να χρησιμεύσουν ως σημαντικός πόρος για τις κλινικές και ερευνητικές κοινότητες.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τον πλούτο των δημοσιεύσεων, παρόλο που η συμβατική ιστολογική εξέταση (FFPE) αποτελεί την απαραίτητη και απαραίτητη βάση της διάγνωσης, δόθηκε προσοχή ώστε να συμπεριληφθούν πρόσφατες επιστημονικές μελέτες στην επιλογή των αναφορών. Αυτό αποσκοπεί στην υποστήριξη της αξίας περαιτέρω ιστολογικών, ανοσοϊστοχημικών και ερευνών για την ενθάρρυνση της διαχείρισης περιστατικών.

8. Ειδικές μοριακές μελέτες στις Δικαστικές Επιστήμες

Είναι εντυπωσιακό, αλλά ναι, το DNA που απομονώνεται από ιστούς που είναι μονιμοποιημένοι σε φορμαλίνη και εγκλεισμένοι σε παραφίνη (FFPE - Formalin-Fixed Paraffin-Embedded), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ιατροδικαστικές μελέτες, ακόμη και μετά από 30 ή περισσότερα χρόνια.

Ωστόσο, η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από σημαντικές τεχνικές προκλήσεις λόγω της φύσης της συντήρησης που χρειάζεται.

Οι προκλήσεις του DNA από δείγματα FFPE, περιορισμοί:

Η φορμαλίνη είναι εξαιρετική για τη διατήρηση της δομής των κυττάρων, αλλά είναι "εχθρός" του DNA. Έτσι με την πάροδο των δεκαετιών, συμβαίνουν τα εξής:

- **Κατακερματισμός (Fragmentation):** Το DNA σπάει σε πολύ μικρά τμήματα (συνήθως κάτω από 300 ζεύγη βάσεων).
- **Χημικές τροποποιήσεις:** Η φορμαλίνη προκαλεί "δεσμούς" (cross-linking) μεταξύ πρωτεϊνών και DNA, καθώς και απαμίνωση των κυτοσινών (μετατρέποντάς τις σε ουρακίλη), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα κατά την ανάγνωση της αλληλουχίας.

- **Χαμηλή απόδοση:** Η εξαγωγή καθαρού DNA είναι δύσκολη επειδή η παραφίνη πρέπει να αφαιρεθεί πλήρως χωρίς να καταστραφεί περαιτέρω το ήδη επιβαρυσμένο γενετικό υλικό.

Γιατί είναι εφικτό μετά από 30 χρόνια όμως;

Παρά τις δυσκολίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, η τεχνολογία έχει προχωρήσει σε σημείο που επιτρέπει την αξιοποίηση αυτών των δειγμάτων:

1. **Next-Generation Sequencing (NGS):** Σε αντίθεση με τις παλιές μεθόδους, το NGS ευδοκμεί σε μικρά κομμάτια DNA. Μπορεί να "διαβάσει" εκατομμύρια σύντομα θραύσματα ταυτόχρονα και να ανασυνθέσει το γενετικό προφίλ.
2. **Ανάλυση SNP:** Στις ιατροδικαστικές έρευνες, αντί για τα κλασικά STRs (που απαιτούν μακρύτερες αλυσίδες DNA), οι επιστήμονες εστιάζουν πλέον σε **SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)**, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν ακόμη και σε πολύ κατεστραμμένο υλικό.
3. **Βελτιωμένα Πρωτόκολλα Εκχύλισης:** Σύγχρονα κιτ χρησιμοποιούν ειδικά ένζυμα (όπως η πρωτεΐνάση K) και θερμική επεξεργασία για να "σπάσουν" τους δεσμούς της φορμαλίνης και να απελευθερώσουν το DNA.

Εφαρμογές στην Ιατροδικαστική

- **Cold Cases:** Ταυτοποίηση θυμάτων ή δραστών από παλιά αρχεία βιοψιών ή παθολογοανατομικά δείγματα.
- **Ταυτοποίηση Λειψάνων:** Σύγκριση γενετικού υλικού από παλιά νοσοκομειακά δείγματα ενός αγνοουμένου με σκελετικό υλικό που βρέθηκε πρόσφατα.

Το συμπέρασμα είναι ότι η επιτυχία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες φύλαξης των μπλοκ παραφίνης. Αν φυλάσσονται σε δροσερό και ξηρό περιβάλλον, η πιθανότητα επιτυχούς ανάλυσης αυξάνεται κατακόρυφα.

9. Εφαρμογές μονιμοποιημένων Ιστών στη Δικαστική Τοξικολογία

Κατά τη διάρκεια νεκροψίας σε ιατροδικαστικές υποθέσεις, όταν δεν υπάρχει υποψία της χρήσης ναρκωτικών ή της έκθεσης σε χημικές ουσίες, δεν επιτρέπεται η λήψη βιολογικών υγρών για τοξικολογική ανάλυση. Σε εγκληματολογικές υποθέσεις όμως, η τοξικολογική ανάλυση αποδεικνύεται απαραίτητη λόγω μεταγενέστερης υποψίας για χρήση ναρκωτικών και μπορεί να χρειαστεί εκταφή του πτώματος ή ανάλυση δειγμάτων ή ιστών που έχουν συλλεχθεί και διατηρηθεί σε διάλυμα φορμόλης για ιστολογική εξέταση. Η ταρίχευση είναι μια συνήθως χρησιμοποιούμενη τεχνική στον κλάδο των κηδειών για τη διατήρηση ενός πτώματος. Μετά την ταρίχευση ενός νεκρού σώματος, συνήθως δεν υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα αίματος ή ούρων και οι μετρούμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου στους ταριχευμένους ή μονιμοποιημένους με φορμόλη ιστούς δεν αντιστοιχούν σε αυτές που παρατηρήθηκαν πριν από την ταρίχευση, καθώς μπορεί να είναι μειωμένες ή αυξημένες (G. Viel, A. Nalesso, G. Cecchetto, M. Montisci, S.D. Ferrara, R. Suma, P.K. Sai Prakash et al 2009).

Ο προσδιορισμός των επιπέδων του φαρμάκου τόσο σε σταθερούς ιστούς όσο και σε διαλύματα φορμόλης είναι απαραίτητος, προκειμένου να εκτιμηθούν οι σχετικές συγκεντρώσεις στους διαφορετικούς ιστούς πριν από τη μονιμοποίηση (M. Cingolani, R. Froidi, R. Mencarelli, D. Mirtella, D. Rodriguez et al 1999). Η ανάλυση φαρμάκων με χρήση ιστών που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη ή έχουν ταριχευτεί και διαλυμάτων φορμόλης αποτελεί πρόκληση για τους ιατροδικαστές τοξικολόγους.

Ταριχευμένοι ιστοί

Όταν υπάρχει υποψία μέθης μετά την ταφή του θύματος η εκταφή του πτώματος είναι απαραίτητη. Ανιχνεύονται διάφορες τοξικές ουσίες στην καρδιά, σε αιματηρά υγρά, ούρα, χολή, ήπαρ, εγκέφαλο και νεφρό. 52 ώρες μετά την ταρίχευση του σώματος τα επίπεδα τοξικότητας διατηρούνται μόνο στη χολή και σε λίγους περιορισμένους άλλους ιστούς.

Οι Kuo προσδιόρισαν το paraquat σε μονιμοποιημένους ιστούς (πνεύμονες, νεφρά και ήπαρ) που αποθηκεύτηκαν σε διαλύματα φορμόλης (10%) 1 μήνα μετά τον θάνατο, όταν υπήρχε υποψία δηλητηρίασης (T.L. Kuo, C.Y. Kuo et al 1988).

9.1 Μελέτες σταθερότητας φαρμάκων και άλλων ουσιών μετά τη διαδικασία ταρίχευσης ή χημικής στερέωσης

Οπιοειδή

Έχουν διεξαχθεί μελέτες σταθερότητας της μορφίνης, της μεπεριδίνης, της νορ-μεπεριδίνης και της τετραμίνης, αμέσως μετά την αυτοψία και μετά τη στερέωση σε διάλυμα φορμόλης (10%, pH 7). Η μορφίνη προσδιορίστηκε επίσης στα διαλύματα φορμόλης στα οποία αυτοί οι ιστοί διατηρήθηκαν για 12 εβδομάδες. Διαπίστωσαν ότι οι συγκεντρώσεις μορφίνης ήταν υψηλότερες στα διαλύματα φορμόλης από εκείνες που ανακτήθηκαν στους ίδιους σταθερούς ιστούς (M. Cingolani, R. Frolidi, R. Mencarelli, D. Mirtella, D. Rodriguez et al 1999).

Μια μελέτη σταθερότητας της φαιτανύλης σε ταριχευμένους ηπατικούς ιστούς, μετά την εκταφή, πραγματοποιήθηκε από τον Rohrig, συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις φαιτανύλης πριν και 2 χρόνια μετά την ταρίχευση. Διαπιστώθηκε μείωση περίπου 26% (T.P. Rohrig et al 1998).

Διεγερτικά ΚΝΣ

Διεγερτικά τύπου αμφεταμίνης

Μια μελέτη της μεθαμφεταμίνης ανέλυσε ιστούς μονιμοποιημένους με φορμόλη (εγκέφαλο, πνεύμονα, ήπαρ, νεφρό και σκελετικό μυ) από κουνέλια, μετά από χορήγηση μεθαμφεταμίνης και από ένα νεκροτομημένο πτώμα (T. Takayasu, T. Ohshima, J. Nishigami, T. Kondo, Z. Lin, M. Ohtsuji, T. Nagano et al 1994).

Παρατηρήθηκε ότι η σταθερότητα της μεθαμφεταμίνης σε περιβάλλον φορμόλης για 30 ημέρες μειώθηκε και ότι η αποσύνθεσή της εξαρτάται από τον χρόνο, το pH και τη συγκέντρωση φορμόλης.

Κοκαΐνη

Η κοκαΐνη βρέθηκε μόνο σε δείγμα ήπατος κατά τη στιγμή της νεκροψίας. Δεν ανιχνεύθηκε σε σταθερούς ιστούς και διαλύματα φορμόλης, επειδή η κοκαΐνη υδρολύεται σε βενζοϋλεκγονίνη. Η κοκαΐνη θεωρείται ασταθής, καθώς αυτός ο μετασχηματισμός μπορεί να συνεχιστεί και μετά θάνατον (M. Cingolani, M. Cippitelli, R. Frolidi, V. Gambaro, G. Tassoni et al 2005)

Ηρεμιστικά του ΚΝΣ

Βαρβιτουρικά

Οι συγκεντρώσεις των βαρβιτουρικών βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερες στους ιστούς ήπατος στερεωμένους με φορμόλη από εκείνες που βρέθηκαν στους ίδιους ιστούς κατά τη στιγμή της νεκροψίας. Τα βαρβιτουρικά έδειξαν καλή σταθερότητα σε ιστούς που υποβλήθηκαν σε χημική στερεοποίηση σε ουδέτερο pH, καθώς τα συνολικά ποσά βαρβιτουρικών σε ιστούς στερεωμένους με φορμόλη και διαλύματα φορμόλης ήταν συγκρίσιμα με τις αρχικές ποσότητες κάθε ουσίας σε νέο ιστό (M. Cingolani, M. Cippitelli, R. Froidi, G. Tassoni, D. Mirtella et al 2005).

Βενζοδιαζεπίνες

Η σταθερότητα της διαζεπάμης σε διαλύματα φορμόλης χάνεται, ενώ σε διατηρημένους ζωικούς ιστούς (εγκέφαλος, πνεύμονας, ήπαρ, νεφρός και σκελετικός μυς), το αποτέλεσμα φαίνεται σαφώς πιο θετικό σε περιπτώσεις φορμόλης με ρυθμιστικό διάλυμα σε σύγκριση με μη ρυθμισμένο διάλυμα ή παραφορμαλδεΰδη (T.S. Tracy, B.F. Rybeck, D.G. James, J.B. Knopp, P.M. Gannett et al 2001).

Αντικαταθλιπτικά–αντισπασμωδικά–αντιψυχωσικά

Οι Winek μελέτησαν τη σταθερότητα της φαινοτοΐνης και της δεσιπραμίνης σε σταθερούς ιστούς ήπατος σε διαλύματα φορμόλης-νερού (5 και 8%) για 4 εβδομάδες. Παρατήρησαν μικρή αλλαγή στις συγκεντρώσεις φαινοτοΐνης και απώλεια άνω του 70% για τη δεσιπραμίνη (C.L. Winek, F.M. Esposito, D.P. Cinicola et al 1990).

Φυτοφάρμακα

Προσδιορίστηκε ότι η στρυχνίνη σε ιστούς ήπατος και νεφρού, που διατηρήθηκαν για 8 εβδομάδες, κατά τη στιγμή της νεκροψίας και μετά τη μονιμοποίηση της σε φορμόλη (10%, pH 7, μειώθηκε, αλλά η συγκέντρωση στρυχνίνης σε διαλύματα φορμόλης βρέθηκε υψηλότερη από αυτή σε σταθερούς ιστούς. Η στρυχνίνη παρουσιάζει καλή σταθερότητα σε βιολογικά δείγματα που υποβλήθηκαν χημική στερέωση.

(M. Cingolani, R. Froidi, R. Mencarelli, D. Rodriguez et al 2001)

Πτητικές ουσίες

Η σταθερότητα του κυανίου και του μονοξειδίου του άνθρακα σε διάλυμα φορμόλης επηρεάζεται σημαντικά από τη χημική στερέωση, καθώς το κυάνιο δεν μπορεί να ανιχνευθεί μετά την προσθήκη φορμόλης και η καρβοξυαιμοσφαιρίνη ήταν μόλις ανιχνεύσιμη μετά από μία εβδομάδα (C.L. Winek, F.M. Esposito, D.P. Cinicola et al 1990).

Βαρέα μέταλλα και ιχνοστοιχεία

Οι συγκεντρώσεις πέντε βασικών (Ca, Cu, Fe, Mg και Zn) και έξι δυνητικά τοξικών στοιχείων (Al, As, Cd, Hg, Mn και Pb) σε μονιμοποιημένους με φορμόλη ιστούς δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση όλων των στοιχείων εκτός από το Al

και το Mn, 1 χρόνο μετά τη μονιμοποίηση (*V.J. Bush, T.P. Moyer, K.P. Batts, J.E. Parisi et al 1995*).
(*P. Nikolaou et al. / Forensic Science International 233 (2013)*)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Δικαστική τοξικολογία και η δικαστική παθολογική ανατομία εντάσσονται στους κλάδους της ιατρικής, της παθολογικής ανατομίας και της τοξικολογίας. Οι συμβολή τους έχει καθοριστικό ρόλο για τη μελέτη της υγείας, της ασθένειας και του θανάτου. Μια ιατροδικαστική νεκροψία είναι άκρως απαραίτητη για την αναγνώριση και τη διερεύνηση ενός εγκλήματος, για την αναγνώριση και ταξινόμηση αφύσικων θανάτων και γεγονότων.

Για τη διεκπεραίωση μιας ιστολογικής εξέτασης χρειάζεται να διεγερθεί σωστή μονιμοποίηση του ιστού ή των ιστών αντίστοιχα.

Αναφέρθηκαν παραπάνω διάφορα μονιμοποιητικά ωστόσο το πιο συνηθισμένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο σε εργαστηριακούς χώρους είναι η φορμαλδεΐδη. Η τελευταία βρίσκει εφαρμογές στη διαγνωστική κλινική και ιατροδικαστική παθολογία. Η μονιμοποίηση των ιστών μπορεί να επιφέρει και σημαντικές αλλαγές όπως στον όγκο των κυττάρων, να δημιουργήσει σκλήρυνση του ιστού καθώς και να προκαλέσει παρεμπόδιση στη χρώση των ενζύμων για ανοσοϊστοχημική διαδικασία.

Όπως αναφέραμε, οι ιστοί που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη ή έχουν ταριχευτεί, μερικές φορές είναι τα μόνα διαθέσιμα βιολογικά δείγματα για τοξικολογική ανάλυση. Έτσι, το πιο σημαντικό ζήτημα είναι η σταθερότητα μιας δεδομένης ουσίας σε περιβάλλον φορμόλης. Η αστάθεια μπορεί να προκύψει από φυσικές, χημικές ή βακτηριδιακές διεργασίες (*G. Skopp, et al 2005*).

Η σταθερότητα των φαρμάκων στο διάλυμα φορμόλης και ο προσδιορισμός των προϊόντων αντίδρασης αποτελούν σημαντικά ζητήματα στην εγκληματολογική τοξικολογία και πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την διερεύνηση μιας εγκληματολογικής υπόθεσης (*T.S. Tracy, B.F. Rybeck, D.G. James, J.B. Knopp, P.M. Gannett et al 2001*). Έτσι, η σταθερότητα των φαρμάκων σε περιβάλλον φορμόλης καθώς και η αντιδραστικότητά τους με τη φορμαλδεΐδη, σε διαφορετικές

συγκεντρώσεις και τιμές pH, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης ιστών ή βιολογικών δειγμάτων μετά την ταρίχευση, που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη (R. Suma, H. Kosanam, P.K. Sai Prakash et al 2006).

Είναι σημαντικό να έχουμε κατά νου ότι η ανάλυση δειγμάτων που έχουν μονιμοποιηθεί με φορμόλη ή έχουν ταριχευτεί μπορεί να δώσουν αξιόπιστα θετικά ποιοτικά αποτελέσματα, αλλά τα ποσοτικά αποτελέσματα θα πρέπει να είναι ανοιχτά προς συζήτηση. Όταν τα αποτελέσματα είναι θετικά, η αξιολόγηση τόσο των συγκεντρώσεων που βρίσκονται σε μονιμοποιημένους ιστούς όσο και σε διαλύματα φορμόλης, με τον περιορισμό του χρονικού πλαισίου που προτείνουν οι μελέτες σταθερότητας για κάθε φάρμακο και όχι μόνο, μπορεί να παράσχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την αρχική ποσότητα του φαρμάκου κατά τη στιγμή της νεκροψίας. Επιπλέον, αυτή η αξιολόγηση μπορεί να συμβάλει σημαντικά στον προσδιορισμό όχι μόνο της αιτίας αλλά και του τρόπου θανάτου. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα, ειδικά όταν η ανάλυση λαμβάνει χώρα εκτός του χρονικού πλαισίου που προτείνεται από τις μελέτες σταθερότητας για κάθε φάρμακο ή δηλητήριο, δεν θα πρέπει να αξιολογείται.

Οι Δικαστικές Επιστήμες συνεργάζονται με τους κλάδους της Ιστοχημείας και της Ανοσοϊστοχημείας για την επίτευξη αναπαραγωγίμης και συνεπούς επίδειξης αντιγόνων.

Μετά τη πάροδο αρκετών ερευνών για τη μεθοδολογία απομόνωσης DNA σε μονιμοποιημένους ιστούς, διεκπεραιώθηκε με τις κατάλληλες μεθόδους η ανάλυση θραυσμάτων DNA. Βέβαια υπάρχουν και περιορισμοί όπου το DNA είναι ο «εχθρός» της φορμόλης με συνέπεια το κατακερματισμό του, τις χημικές τροποποιήσεις που μπορεί να συμβούν στο DNA ακόμα και τη χαμηλή απόδοση αυτού.

Με τη τεχνολογία όμως να εξελίσσεται, γίνεται εφικτό η απομόνωση του DNA και μετά από αρκετά χρόνια με τις μεθόδους NGS, την ανάλυση SNP και τα βελτιωμένα Πρωτόκολλα Έκχυσης όπως αναφέρονται παραπάνω.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Allen, G. *Protein*. Elsevier, 20 Apr. 1999.
2. Antonio, Amorim, and Budowle Bruce. *Handbook of Forensic Genetics: Biodiversity and Heredity in Civil and Criminal Investigation*. World Scientific, 30 Aug. 2016.
3. BAKER. *Cancer Chemotherapy Reports*. 1959.
4. Ballantyne, Bryan, et al. *General and Applied Toxicology*. 2009.
5. Bancroft, John D, and Marilyn Gamble. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, 2008.
6. Bogdan Beirowski, et al. “Non-Nuclear Wld^SDetermines Its Neuroprotective Efficacy for Axons and Synapses *in Vivo*.” *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 3, 21 Jan. 2009, pp. 653–668, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3814-08.2009>. Accessed 13 Feb. 2024.
7. Bouchard, Page R, et al. *Toxicologic Pathology*. CRC Press, 23 June 2025.
8. Clark, Melody. *Comparative Genomics*. Berlin, Springer Sciences+Business

- Media, 2000.
9. Dabbs, David J. *Diagnostic Immunohistochemistry : Theranostic and Genomic Applications*. Philadelphia, Pa, Elsevier, 2018.
 10. Demain, Arnold L, et al. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1999.
 11. Dettmeyer, Reinhard B. *Forensic Histopathology*. Springer Science & Business Media, 27 Aug. 2011.
 12. ---. *Forensic Histopathology*. Springer Science & Business Media, 27 Aug. 2011.
 13. ---. *Forensic Histopathology : Fundamentals and Perspectives*. Cham Springer International Publishing Springer, 2018.
 14. ---. *Forensic Medicine : Fundamentals and Perspectives*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2014.
 15. Eds, Al. *The Basic Science of Oncology*. Mcgraw-Hill.
 16. Gelboin, Harry. *Molecular and Cell Biology*. Elsevier, 2 Dec. 2012.
 17. Giberson, Richard T, and Richard S Demaree. *Microwave Techniques and Protocols*. Springer Science & Business Media, 9 May 2008.
 18. Goldstein. *Differential Equations with Applications in Biology, Physics, and Engineering*. S.L., Crc Press, 2017.
 19. "Guest Editorial." *Sight and Life Magazine Issue No 2/2008*, vol. 2008, no. 02, 23 Feb. 2008, <https://doi.org/10.52439/mkmaq3622>. Accessed 13 Dec. 2021.
 20. Hames, Ali D, et al. *Immunochemistry LabFax*. Kent, Elsevier Science, 2014.
 21. Hayat, M.A. *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods*. Springer Science & Business Media, 8 May 2007.
 22. Helms, Janet E. "How Multiculturalism Obscures Racial Factors in the

- Therapy Process: Comment on Ridley et Al. (1994), Sadowsky et Al. (1994), Ottavi et Al. (1994), and Thompson et Al. (1994).” *Journal of Counseling Psychology*, vol. 41, no. 2, 1994, pp. 162–165, <https://doi.org/10.1037//0022-0167.41.2.162>. Accessed 1 Mar. 2019.
23. Hering, Sandra, et al. “Identification of More Sequence Variations in the D8S1179 Locus.” *Forensic Science International*, vol. 149, no. 2-3, May 2005, pp. 275–278, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.07.011>. Accessed 10 Apr. 2025.
24. Innis, Michael A, et al. *PCR Strategies*. Elsevier, 6 July 1995.
25. *International Review of Cytology*. Academic Press, 1 Jan. 1955.
26. Jasani, Bharat, and Kurt W Schmid. *Immunocytochemistry in Diagnostic Histopathology*. W.B. Saunders Company, 1993.
27. Kiernan, J. A. *Histological and Histochemical Methods : Theory and Practice*. Scion, 2015.
28. Klaus Ruckpaul, and Horst Rein. *Medicinal Implications in Cytochrome P-450 Catalyzed Biotransformations*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 31 Dec. 1993.
29. Lee, He-Jin, et al. “Formation and Removal of α -Synuclein Aggregates in Cells Exposed to Mitochondrial Inhibitors.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 7, Feb. 2002, pp. 5411–5417, <https://doi.org/10.1074/jbc.m105326200>. Accessed 1 Dec. 2021.
30. Markham, George D., et al. *Structural Chemistry*, vol. 10, no. 4, 1999, pp. 263–276, <https://doi.org/10.1023/a:1022042917688>.
31. McGhee, James D., and Peter H. Von Hippel. “Formaldehyde as a Probe of DNA Structure. 4. Mechanism of the Initial Reaction of Formaldehyde with

- DNA.” *Biochemistry*, vol. 16, no. 15, 26 July 1977, pp. 3276–3293,
<https://doi.org/10.1021/bi00634a002>. Accessed 7 May 2025.
32. Montisci, Massimo, et al. “GAF vs. Formalin: A Turning Point in Forensic Tissue Preservation.” *Forensic Science International*, vol. 377, 12 Sept. 2025, p. 112654, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073825002981,
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2025.112654>.
33. Otali, Dennis, et al. “Abstract 3380: Loss of Immunorecognition of Selected Molecules during Long-Term Storage of Paraffin Blocks.” *Cancer Research*, vol. 75, no. 15_Supplement, 1 Aug. 2015, pp. 3380–3380,
<https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2015-3380>. Accessed 8 Feb. 2026.
34. Pankaj Shrivastava, et al. *Forensic DNA Typing: Principles, Applications and Advancements*. Singapore, Springer Singapore, 2020.
35. Pikor, Larissa A, et al. “DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 49, 26 Mar. 2011, <https://doi.org/10.3791/2763-v>. Accessed 8 Oct. 2024.
36. Riggs, Karen Jeanette. *Molecular Analysis of a DNA Binding Protein Recognizing Sites in the C-Myc Promoter, the Skeletal Alpha-Actin Gene Promoter, and the Immunoglobulin Heavy Chain Enhancer*. 1992.
37. S Kim Suvarna. *Bancroft’s Theory and Practice Of histological Techniques [Electronic]*.
38. Setlow, Jane K. *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Springer Science & Business Media, 20 July 2004.
39. Seviour, R J. *The Microbiology of Activated Sludge*. London, Iwa, 2010.
40. Shi, Shan-Rong, and Clive R Taylor. *Antigen Retrieval Immunohistochemistry Based Research and Diagnostics*. John Wiley & Sons, 14 Jan. 2011.

41. Shukla, Ritesh K, et al. *Forensic Microscopy*. CRC Press, 12 July 2022.
42. Sinnott, Michael. *Comprehensive Biological Catalysis*. Academic Press, 1998.
43. Srinivasan Yegnasubramanian, and William B Isaacs. *Modern Molecular Biology*: Springer Science & Business Media, 2 Sept. 2010.
44. Stoward, P J. *Fixation in Histochemistry*. Springer, 11 Nov. 2013.
45. Suvarna, Kim S, et al. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed., Elsevier, 2019.
46. *Toxicological Profile for Formaldehyde*. 1999.
47. *Toxicological Profile for Radon*. 1990.
48. University of Chicago. *Announcements*. 1929.
49. Wagemans, Jan, and Hamid Ait Abderrahim. *Reactor Dosimetry in the 21st Century*. World Scientific, 2003.
50. Anthony L. Mescher, Junqueira's *Βασική Ιστοπαθολογία*, 2015
51. National Research Council. *DNA Technology in Forensic Science*. Washington, D.C., National Academy Press, 1992.
52. Nader Rifai. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - E-Book*. Saintt Louis Elsevier Health Sciences, 2017.
53. Dr. Syed Ahmed Taqi, Department of Oral and Maxillofacial Sciences, Division of Oral Pathology, Najran University College of Dentistry, Najran, Saudi Arabia. "A review of artifacts in histopathology", 2018
54. William E. Grizzle, MD, PhD, Department of Pathology, University of Alabama at Birmingham, "THE COMBINED EFFECTS OF FORMALIN FIXATION AND INDIVIDUAL STEPS IN TISSUE PROCESSING ON IMMUNORECOGNITION", Biotech Histochem. 2009 October
55. Burkhard Madea. *Handbook of Forensic Medicine*. John Wiley & Sons, 16 Aug. 2022.
56. Nikolaou, Panagiota, et al. "Toxicological Analysis of Formalin-Fixed or Embalmed Tissues: A Review." *Forensic Science International*, vol. 233, no. 1-3, Dec. 2013, pp. 312–319, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.10.006>. Accessed 2 Apr. 2019.