

Substitution af xylen til vævspræparering af hjernevæv

Dette bachelorprojekt viser, at isopropanol kan anvendes som klaringsmiddel i vævspræpareringen af hjernevæv, hvorved det er muligt at afskaffe det sundhedsskadelige kemikalie xylen

Formålet med bachelorprojektet var at undersøge mulighederne for at afskaffe xylen fuldstændigt og udskifte det med isopropanol i vævspræpareringen af hjernevæv. Dette ønskes, idet isopropanol er mindre sundhedsskadeligt end xylen, og det vil derved gøre det muligt at mindske den sundhedsskadelige risiko for personalet.

Baggrund for forsøget

Xylen har været det foretrukne klaringsmiddel i vævspræpareringsprocessen verden over siden 1950'erne, men i løbet af 1970'erne blev sundhedsfaren i forbindelse med brugen af kemikaliet alment kendt, og flere forskellige substitutioner for xylen kom på markedet[1]. Mange patologiafdelinger, heriblandt Patologiafdelingen på Rigshospitalet, har substitueret xylen med mindre sundhedsskadelige kemikalier som Tissue Clear og isopropanol, men på hjernevæv, som er lipidholdigt, anvender man stadig xylen i vævspræpareringen grundet øget indhold af lipid i denne vævstype samt anvendelsen af andre inkubationstider.

Substitution af xylen ved præparering af hjernevæv er imidlertid også en nødvendighed, idet man trods udsugning i form af stinkske ikke kan undgå, at xylen udsender sundhedsskadelige dampe i laboratoriet ved fx indstøbning af væv. Xylen medfører samtidig en risikabel sundheds- og miljøfare under den industrielle transport og ved afskaffelse af kemikaliet efter endt brug i laboratoriet.

På andre patologiafdelinger i Europa, bl.a. i Wien, Amsterdam og Oslo, anvendes stadig xylen i vævspræpareringen af hjernevæv. I Danmark har man forsøgt at udføre en fuldstændig substituering af xylen med isopropanol, men dette er hidtil ikke lykkedes på hjernevæv.

Patologiafdelingen på Rigshospitalet anvender en særskilt vævspræpareringsprotokol for lipidholdigt væv, som indeholder isopropanol. Det er derfor yderst relevant at undersøge dette som en mulig substitut for klaringsmidlet xylen i alle klaringsstrin i vævspræpareringen af hjernevæv, idet hjernevæv er lipidholdigt.



Af bioanalytikerne //
Ann-Christina Toft Sørensen
 Patologiafdelingen,
 Diagnostisk Center,
 Rigshospitalet
Anita Fleischer, Klinisk Bio-
 kemisk Afdeling, Diagnostisk
 Center, Rigshospitalet

Klinisk vejleder: Camilla
Qvist, Patologiafdelingen,
 Diagnostisk Center, Rigshos-
 pitalet

Hjernen

I store træk kan hjernen opdeles i hjernestammen (truncus encephalicus), lillehjernen (cerebellum), mellemhjernen (diencephalon) og storehjernen (cerebrum). Både lille- og storehjernen består af grå og hvid substans. Den grå substans udgøres af det tynde cellerige lag lige under hjernebarken, og resten udgøres af den hvide substans (se fig. 1).[2]

Hjernens nervevæv udgøres af 120 mia. neuroner af to typer; nerveceller og støtteceller (glia-celler).

Nervecellen består af et cellelegeme, dendritter og én lang udløber, kaldet aksonet.[2]

Aksoner omgives som regel af såkaldte myelinsker, der fungerer som en slags isolering for aksonet. Den er nødvendig for, at nerveimpulserne fra hjernen ledes med høj hastighed til målcellen. De myeliniserede aksoner findes i høj koncentration i hjernens hvide substans [2], og da myelin består af protein samt adskillige lipider, som fx kolesterol og phospholipider, kaldes dette område den hvide substans [2].

Myelinskerne dannes af oligodendroglia-celler, af hvilke der findes to typer; astrocytter og oligodendrocytter. Begge fungerer som støtteceller for neuronerne, men det er selve oligodendrocytterne der danner myelinskerne i centralnervesystemet.[4]

Mængden af neuroner i hjernen betyder derfor, at hjernevæv er meget lipidholdigt.

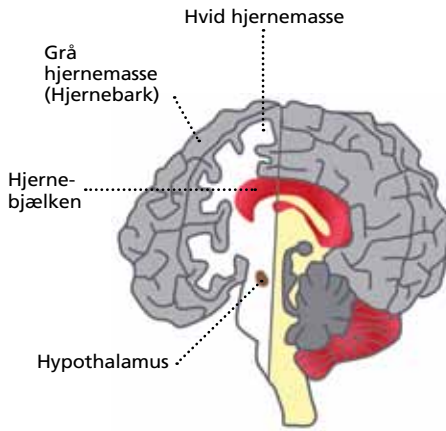
Xylen

Xylen er en organisk forbindelse, som består af en benzenring med to methylgrupper, og som har den kemiske formel $C_6H_4(CH_3)_2$. Xylen forekommer i tre isomere former; ortho-, meta- og paraxylen, afhængigt af placeringen af methylgruppen. [5]

Xylen er blandbart med både paraffin og de fleste organiske opløsningsmidler, men er ikke blandbart med vand. En af hovedfordelene ved xylen som klaringsmiddel er, at det effektivt opløser lipider. Det er essentielt, at lipider fjernes, da de har en negativ effekt på kvaliteten af vævsblokkene, hvorved det bliver sværere at udskeere vævssnit. En ulempe ved xylen er, at det kan lave skader på både hud, organer og nervesystem ved hudkontakt og/eller indånding og derfor er klassificeret som værende meget toksisk (se fig. 2). [5]

Isopropanol

Isopropanol er en alkohol med den kemiske formel C_3H_8O . Isopropanol er blandbart med både vand, acetone, ethanol og benzen. Isopropanol er ikke lige så effektivt til at fjerne lipider som xylen, men det er dog klassificeret som værende mindre toksisk end xylen (se fig. 3). [7]



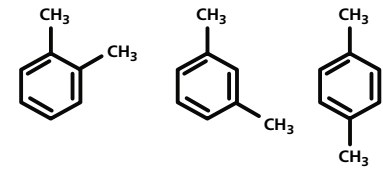
Figur 1: Hjernens grå og hvide substans[3]

Materialer og metode

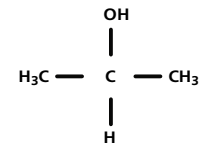
Forsøget blev udført på Patologiafdelingen, Rigshospitalet, og prøvematerialet blev indsamlet over en periode på ca. en måned. Der blev i alt indsamlet 21 hjernevævsstykker fra bl.a. sektion af parietal cortex fra voksne samt fostre/børn og hjernebiopsier fra to typer af primære hjernetumorer. Hvert af de 21 vævsstykker blev halveret og derefter præpareret på 2 forskellige vævspræpareringsmaskiner efter de pågældende protokoller; den ene indeholdende xylen og den anden indeholdende isopropanol. Dette udgjorde i alt 42 vævssnit.

Derefter udførte vi 5 forskellige rutinemæssigt anvendte farvninger; Hæmatoxylin-Eosin(HE), van Gieson(VG), Klüver samt 2 immunfarvninger; Neuronal Nuclei (NeuN) og Glial Fibrillary Acidic Protein (GFA-P).

For at sikre, at vores resultater var pålidelige, foretog overlæge Helle Broholm og afdelingslæge Eva Lund med speciale inden for neuropatologi en blindet vurdering samt scoring af vævssnittene ud fra afdelingens Gyldne Standard, i forhold til både farveresultat og morfologi. For det første har disse læger rutinemæssig erfaring med at bedømme hjernevævsnit, og for det andet vil en blindet vurdering af vævssnittene medfø-



Figur 2: Strukturformel for **xylen** i de 3 isomere former; ortho-, metha- og paraxylen[6]



Figur 3: Strukturformel for **isopropanol** [6]

re, at det ikke er forudindtaget, hvilket vævspræpareringsmiddel der er anvendt til de forskellige vævssnit.

Til sidst sammenholdt vi farveresultaterne for de forskellige præparerede hjernevævsstykker med henblik på optimal vævsmorfologi, skæring samt korrekt farvereaktion.

Diskussion

Vi har i denne artikel valgt at lægge vægt på resultaterne for vævsmorfologien, da det var inden for dette område, vi så den største forskel i resultaterne. Skærekvaliteten, HE-farvningerne, VG-farvningerne, Klüver-farvningerne samt de to immunfarvninger NeuN og GFA-P viste samlet set ens resultater, uanset om hjernevævet var blevet præpareret med xylen eller isopropanol som klaringsmiddel.

Ud fra projektets morfologiresultater tyder det på, at den optimale bevarelse af vævsmorfologien sker ved vævspræparering på Patologiafdelingens protokol for lipidholdigt vævs materiale indeholdende isopropanol, idet ingen af disse snit har fået en score på under 2 (se fig. 5).

19 % af snit, præpareret efter de anvendte vævspræpareringsprotokoller på Neuropatologisk Laboratorium indehol-

Resultater

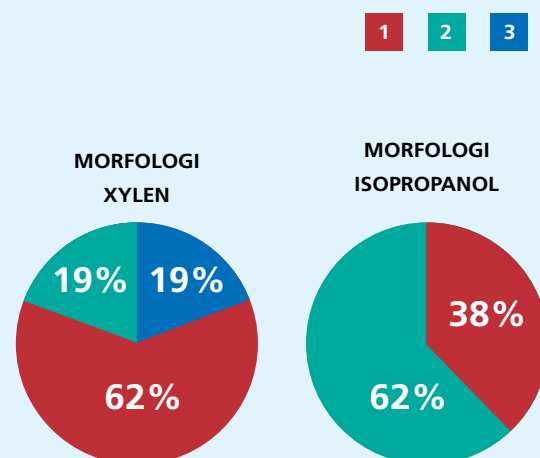
Tabel 1. Vævsmorfologien for hvert vævssnit blev scoret ud fra følgende scoresystem:

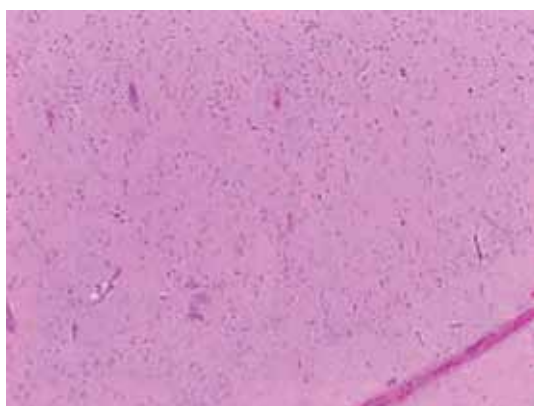
VÆVSMORFOLOGI	
SCORE	
3	Optimal morfologi – ingen morfologiske ændringer i vævet samt ingen skrump af kerner eller myelin. Fuldt acceptabel til diagnostik.
2	Moderat morfologi – svage morfologiske ændringer i vævet samt lettere skrump af kerner og/eller myelin. Acceptabel til diagnostik.
1	Ringe morfologi – udtalt skrump af kerner, ødelagt cytoplasma, udtalt skrump af myelin. Uacceptabel til diagnostik.

Tabel 2: Resultater for scoring af vævsmorfologien:

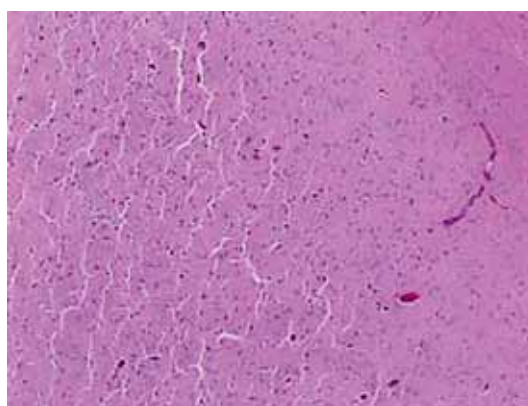
Klaringsmidlet xylen	Klaringsmidlet isopropanol
Score 1 = 19 %	Score 1 = 0 %
Score 2 = 62 %	Score 2 = 38 %
Score 3 = 19 %	Score 3 = 62 %

Fig. 4: Resultater for scoring af vævsmorfologien afbildet i cirkeldiagrammer:





Figur 5: Hjernevæv præpareret med isopropanol. Snittet blev tildelt en score på 3, idet vævsmorfologien er optimalt bevaret. Acceptabelt til diagnostik.



Figur 6: Hjernevæv præpareret med xylen. Snittet blev tildelt en score på 1, idet der ses huller og sprækker i vævet. Uacceptabelt til diagnostik.

dende xylen, fik imidlertid en score på 1, hvilket betyder, at disse 19 % er uacceptable til diagnostiske formål. Der sås eksempler på, at kerner samt myelin var skrumpet, cytoplasmaet ødelagt, og der var huller samt sprækker i vævssnittene (se fig. 6.) Desuden fik kun 19 % af vævssnit præpareret med xylen en score på 3. Dette resultat er overraskende, idet vi ikke havde regnet med, at vævssnit præpareret med xylen, som jo er den Gyldne Standard for vævspræparering af hjernevæv, ville få en markant lavere score end vævssnit præpareret med isopropanol

Vi mener, at forklaringen på morfologiresultaterne muligvis kan være isopropanols ringe evne til at opløse lipider. Xylen er kendt for at være et effektivt lipidopløsende middel[8], og idet hjernevæv er meget lipidholdigt i forhold til andet væv, kan den lange klarings- og tids i xylen (6 timer for voksen- samt fosterhjernevæv og 4 timer for hjernebiopsier) muligvis opløse lipiderne i en sådan grad, at der opstår huller og sprækker i vævet. Da dette ikke sker for det væv, der klares med isopropanol (ligeledes i 6 timer), viser det sig derfor fordelagtigt, at isopropanol ikke opløser lipider effektivt.

Andre faktorer end klaringsmidlet kan dog have spillet ind ved morfologiresultaterne, nemlig koncentrationen af ethanol i dehydreringsprocessen samt tiden i denne og infiltreringstemperatur og -tid. Det skal imidlertid nævnes, at fikseringsmiddel samt -tid var den samme for de to sæt af vævsprøver.

Ud over de gode morfologiske resultater ved vævssnittene præpareret med isopropanol fandt lægerne på Neuropatologisk Laboratorium desuden, at der ved mikroskopering fremkom et skarpt billede af disse snit end ved de snit, der var præpareret med xylen.

Konklusion

Ud fra dette forsøg kan det konkluderes, at ved udskiftning af xylen med isopropanol som klaringsmiddel i vævspræpareringen af hjernevæv er det muligt at opnå en optimal vævsmorfologi. I de fleste tilfælde endda bedre end ved anvendelse af xylen. Dette er en fordel i forhold til det sundhedsmæssige i laboratoriet, idet isopropanol klassificeres som værende mindre toksisk end xylen.

Perspektivering

Dette projekt er kun et skridt i retningen af at gøre landets patologiske afdelinger 100 % xylen-fri. Der anvendes nemlig stadig som oftest xylen i afparaffineringsproceduren og i monteringen af dækglasser med fx pertex.

Der vil derfor være brug for at udarbejde flere forsøg, så man i farvningens afparaffineringsprocedure også vil kunne erstatte xylen med et mindre sundhedsskadeligt kemikalie, som fx isopropanol, Tissue Clear eller Estisol.

Tak

Vi vil i forbindelse med udarbejdelsen af vores bachelorprojekt samt denne artikel sige stor tak til vores kliniske vejleder Camilla Qvist, Patologisk Afdeling, Rigshospitalet, og vores vejleder fra Professionshøjskolen Metropol, Merete Ringsholt, for deres gode råd, konstruktive kritik samt støtte gennem projektperioden. Desuden vil vi gerne takke alle bioanalytikere i laboratoriet for hjælp ved udførelse af forsøget.

Derudover vil vi gerne rette en særlig tak til overlæge Helle Broholm samt afdelingslæge Eva Lund for deres hjælp til vurdering og bedømmelse af snittene fra projektet. ■

Referencer

- 1 Buesa, R.J. & Maxim, V.P. (2009). *Histology without xylene. Annals of Diagnostic Pathology*, 13, 246-256.
- 2 Sand, O. et al. (2006). *Menneskets anatomi og fysiologi*. (2.udg.). København: Gads Forlag.
- 3 Sundhedsguiden. (2007). Lokaliseret den 25. november 2013 på <http://www.sundhedsguiden.dk>.
- 4 Nørgaard, J.R. (2009). *Medicinske Fagudtryk*. (1st. ed). København: Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck.
- 5 Kemibrug. (2011). *Xylen*. Lokaliseret d. 19. juni 2013 på <http://www.kemibrug.dk>.
- 6 Stainsfile.info. (2013). *Tissue Preparation*. Lokaliseret d. 13. november 2013 på <http://stainsfile.info/StainsFile/prepare/prepare.htm>.
- 7 Kemibrug. (2004). *Isopropanol*. Lokaliseret d. 25. juni 2013 på <http://www.kemibrug.dk>.
- 8 Bancroft, J.D. et al. (2002). *Theory and practice of Histological Techniques*. (5th. ed.). UK, London: Churchill Livingstone.