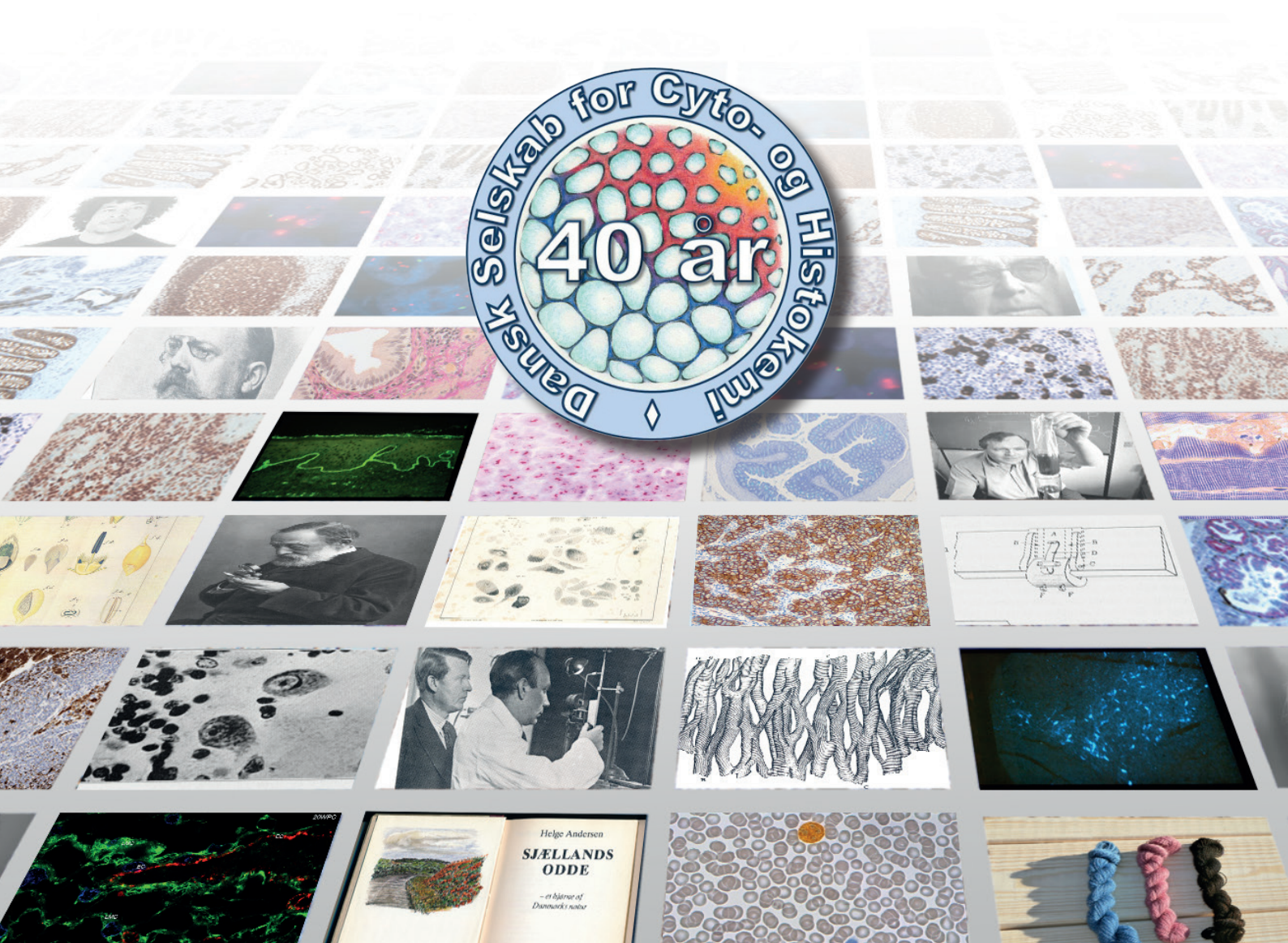


TRÆK AF HISTOKEMIENS HISTORIE I DANMARK

Festskrift udgivet i anledning af Dansk Selskab
for Cyto- og Histokemis 40-års jubilæum

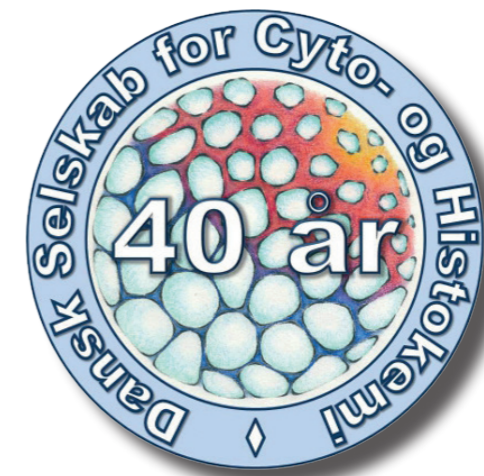


Redaktion

Per Prætorius Clausen, Karina Norring Hjort,
Hans Olaf Lyon og Ole Nielsen

TRÆK AF HISTOKEMIENS HISTORIE I DANMARK

Festskrift udgivet i anledning af Dansk Selskab
for Cyto- og Histokemis 40-års jubilæum



TRÆK AF HISTOKEMIENS HISTORIE I DANMARK

Copyright© 2016,
Dansk Selskab for Cyto- og Histokemi, København

Omslag: Sara Rørvig, Holte og Peter Staben, Jyllinge

Layout: Peter Staben, Jyllinge

Korrektur: Annie Larsen, Vallensbæk

Tryk: Eurographic

1. udgave, 1. oplag, 300 stk.

Trykt Maj 2016

ISBN 978-87-998854-0-4

Redaktion

**Per Prætorius Clausen, Karina Norring Hjort,
Hans Olaf Lyon og Ole Nielsen**

Redaktionen takker følgende personer, der har bidraget til festskriftet ved tilladelse til brug af billeder, levering af billeder og tekstindsat, udførelse af farvninger, gennemlæsning af udvalgte afsnit, kommentarer, supplerende oplysninger, gode råd og som påvirkningsagenter:

- Agnete Ingild
- Birgitte Preiss
- Janne Jensen
- Michael Bzorek
- Camilla Grandal
- Maria Pedersen
- Sanne Malig
- Louise Pedersen
- Martin Bak
- Annelise Olsen
- Kirsten Dahl
- Henrik Daa Schrøder
- Kirsten Hartmann
- Lisbet Mortensen
- Lone Christiansen
- Tina Rask
- Susanne Esmann
- Marianne Pedersen
- Marianne Rasmussen
- Lene Lütken Sørensen
- Jess Pilgaard
- Karsten Nielsen
- Tine Meyer
- Viggo Harboe
- Hans Peter Philipsen
- Poul Prentø
- Niels & Lis Thommesen
- Hans & Susanne Schierbeck
- Keld Zeruneith
- Thomas Schnalke, Berliner Medizinhistorisches Museum, Berlin
- Christian Adamsen, Forlaget Wormianum, Århus
- Thomas Söderquist og Niels Vilstrup, Medicinsk Museion, København

Endvidere tak for lån af billeder til:

Dako
Ventana Medical Systems
POLFOTO-Politiken

Det har ikke været muligt at finde rettighedshaveren til figur 2 i Indledning. Hvis ophavsretten er krænket, er det utilsigtet. Retsmæssigt, dokumenteret krav vil blive honoreret efter gældende regler.

DSCH TAKKER AXLAB, ROCHE, NORDIC BIOSITE SAMT DAKO FOR ØKONOMISK STØTTE TIL UDGIVELSEN AF DETTE FESTSKRIFT.



INDHOLDSFORTEGNELSE

Bestyrelsens forord	9
Redaktionelt forord - af Per Prætorius Clausen	10
Indledning - af Per Prætorius Clausen	12
1: Histokemi – hvad er det ? - af Per Prætorius Clausen.....	15
2: De histokemiske farvemetoders udvikling - af Per Prætorius Clausen.....	16
2.1: De histokemiske farvemetoders udvikling indtil midten af 1900-tallet.....	16
2.2: Enzymhistokemi	32
2.3: Immunhistokemi	35
2.3.1: Immunfluorescensmetoder	35
2.3.2: Enzym-immunhistokemiske metoder.....	35
2.4: In situ-hybridisering	40
3: Histokemiske metoder i forskning og diagnostik	42
3.1: Cyto- og histokemisk forskning ved Medicinsk Anatomisk Institut på Københavns	
Universitet - af Kjeld Møllgård og Ole William Petersen.....	42
3.1.1: Helge Andersen, histokemi-pionér og human-embryolog og Cyto- og Histokemisk Laboratorium	42
3.1.2: Om Kjeld Møllgårds forskningsarbejde på CHL	45
3.1.3: Om Ole William Petersens forskningsarbejde på CHL	47
3.1.4: Fra CHL til ICMM.....	48
3.2: Histokemiske metoders anvendelse på undersøgelser af centralnervesystemet	
- af Morten Møller.	49
3.2.1: De klassiske sølvimprægningsteknikker	49
3.2.2: Falck-Hillarp fluorescenssteknikken	50
3.2.3: Egne undersøgelser af hjernens fotoneuroendokrine-system gennem brug af histokemiske metoder	51
3.3: Immunfluorescensfarvningen i Danmark - af Jørgen Rygaard og Erik Dabelsteen	55
3.3.1: Første gang jeg så et fluorescensmikroskop var i februar 1964	55
3.3.2: Påvisning af ABO antigener i normal og malign mundslimhinde	57
3.3.3: Immunfluorescensfarvning ved diagnostik af bulløse hud- og slimhindsygdomme.....	59
3.3.4: Anvendelsen af immunfluorescensfarvning i nefropatologi	60
3.4: Histokemi og diagnostisk histopatologi - af Per Prætorius Clausen og Ole Nielsen	63
3.4.1: Diagnostisk histopatologi	63
3.4.2: Farvemetoder i diagnostisk histopatologi	64
3.5: Farmakodiagnostiske test og nyere molekylærdiagnostiske teknikker	
- af Jan Trøst Jørgensen	67

4: Kvalitetssikring, certificering og standardisering.....	70
4.1: Dansk deltagelse i internationalt kvalitetssikringsarbejde - af Hans Olaf Lyon.....	70
4.1.1: Starten på internationalt kvalitetssikringsarbejde	70
4.1.2: Hvordan et DSCH bestyrelsesmedlem blev involveret i internationalt kvalitetssikringsarbejde	70
4.1.3: Europæisk standardiseringsarbejde.....	71
4.1.4: Internationalt standardiseringsarbejde	71
4.2: Den vestdanske ERFA-gruppe og ekstern kvalitetssikring - af Ole Nielsen.....	73
4.2.1: Starten på undersøgelser af metodeparametre	73
4.2.2: IHC-ERFA	73
4.2.3: Fra IHC-ERFA til NordiQC	75
4.3: NordiQC og ekstern kvalitetssikring af immunhistokemi	
- af Søren Nielsen og Mogens Vyberg	76
4.3.1: Optakten til NordiQC.....	76
4.3.2: Etableringen af NordiQC.....	76
4.3.3: Publikation af resultater i NordiQC.....	77
4.3.4: Undervisning og videnskabelig publikationsvirksomhed i NordiQC.....	78
5: Uddannelse og efteruddannelse i histokemi i Danmark - af Inger Lindebo Holm,	
Anne Palle Andersen og Hans Olaf Lyon	80
5.1: Vejen til en grunduddannelse for histolaboranter.....	80
5.2: Specialespecifik uddannelse til histo-cyto hospitalslaborant	83
5.3: Generalistuddannelserne til hospitalslaborant/bioanalytiker	84
5.4: Generalist og professionsbachelor bioanalytikerens histokemi	84
5.5: Undervisningsmateriale i histokemi	85
5.6: Efteruddannelse i histokemi	86
5.6.1: Videreuddannelse i histokemi - IL kurser 1973-1990	86
5.6.2: Modulopbygget videreuddannelse - IL 1990-1994 (-98)	87
5.6.3: Diplomuddannelse for bioanalytikere (HLD) 1998-2001	87
5.6.4: De sundhedsfaglige diplomuddannelser/SD 2002 – 2011- ”Biomedicin og laboratorietechnologi” → ”professionspraksis”	87
5.6.5: Ikke formaliseret efteruddannelse i histokemi	88
5.6.6: Ikke formaliseret efteruddannelse i immunhistokemi	88
5.6.7: Undervisning i histokemi i speciallægeuddannelsen.....	89
6: Dansk selskab for cyto- og histokemi’s (DSCH) historie - af Karina Norring Hjort.....	90
6.1: Starten på DSCH	90
6.2: Opdatering af formålsparagraffen i 2004.....	91
6.3: Det nye DSCH.....	92
6.4: Møder og aktiviteter.....	92

BESTYRELSENS FORORD

Det er med stolthed, at DSCH kan fejre 40 års jubilæum som en aktiv videnskabelig forening. Vi oplever stor interesse for vores møder, som over årene har ændret karakter fra at være meget forskningsorienteret til i dag i højere grad at tage udgangspunkt i den diagnostiske relevans ved anvendelsen af de histokemiske analyser.

Danske histokemikere har siden det 19. århundrede haft en meget stor betydning for faget globalt, uanset at histokemien repræsenterer et snævert videnskabeligt område set i det store perspektiv. En forening, som sin lidenhed til trods, har vist sig livskraftig. Vore medlemmer, videnskabelige interessenter og frivillige aktører er ikke mange i antal, men aktive og stærke af natur. Småt kan også være stærkt og godt. Det er DSCH et bevis på.

Bestyrelsen vil overbringe en stor tak til **Per Prætorius Clausen**, som er idémanden bag festskriftet og en meget vedholdende redaktør, som har sikret projektets gennemførelse. Uden ham, var der ikke blevet noget festskrift, som vi alle i dag kan være stolte af på fagets vegne.

Vi glæder os til at videreføre DSCHs høje videnskabelige niveau og er sikre på, at der er mange gode jubilæer at vente i fremtiden.

Stor tak til alle som i årenes løb har bidraget med aktivt medlemskab, foredrag eller som aktive i bestyrelsen. Det er jeres fortjeneste at DSCH har overlevet og i dag er i fin form.

På bestyrelsens vegne

Karina Norring Hjort, formand
Hans Olaf Lyon, næstformand
Tove Kirkegaard, sekretær
Marianne Pedersen, kasserer
Marianne Rasmussen, webmaster
Sara Rørvig



REDAKTIONELT FORORD

af Per Prætorius Clausen

Det er fristende ved en lejlighed som denne, at parafrasere en udtalelse af et tidligere dansk folketingsmedlem om Den Kongelige danske Ballet og mene, *"at Danmark er for lille et sprogområde til at have sin egen histokemi"*. Ligesom det var relativt nemt at tilbagevise udtalelsen om Den Kongelige Ballet er det vort håb, at vi med dette skrift kan vise, at Danmark sin lidenhed til trods, såvel historisk som aktuelt har ydet og stadig yder bemærkelsesværdige bidrag til histokemiens udvikling og gør sig stærkt gældende også internationalt.

Efter **Indledning** og emneafgrænsning i **kapitel 1** følger i **kapitel 2** en historisk gennemgang af de histokemiske farvemethoders udvikling, funderet på biografiske skildringer af 7 markante danske forskere, der på forskellig vis har leveret bidrag til denne udvikling. **Adolph Hannover**, der desværre først meget sent i sit liv også herhjemme fik anerkendelse for sin enorme videnskabelige indsats, kan ikke blot betegnes som "Danmarks første mikroskopiker", men også som en pioner indenfor histokemisk metodik. **H.C. Gram**, **Frederik C.C. Hansen** og **Lárus Einarson** har lagt navn til farvemethoder og modifikationer af disse, som stadig er knyttede til deres navne. **Kai Ulrik Linderstrøm-Lang**, **Heinz Holter** og **Niels Harboe** er navne, man måske ikke umiddelbart ville sætte i forbindelse med histokemi, men som det vil fremgå, har de på forskellig vis haft stor betydning for histokemisk metode og anvendelse af den.

I **kapitel 3** gives en bred oversigt over nyere histokemisk relateret forskning, med en indledende omtale af dansk histokemis pioner i nyere tid **Helge Andersen** og det cyto- og histokemiske laboratorium han opbyggede. Denne skildring følges op af en historisk oversigt over de histokemiske metoders anvendelse i neuroanatomi og eksempler på aktuel forskning inden for dette område.

Dernæst følger personlige beretninger om immunfluorescensfarvningens udvikling i Danmark fra den spæde start i 1960'erne, som fører over til en kort omtale af den diagnostiske anvendelse af histokemi i Danmark. Det er en anvendelse, der i dag indgår som et helt centralt og nødvendigt led i moderne cancerdiagnostik- og terapi, som det er beskrevet i kapitlets slutafsnit.

Også inden for metodeudvikling, kvalitetssikring og standardisering er Danmark fremme i forreste internationale felt som det fremgår af **kapitel 4**.

Det er en særlig glæde, at der med dette skrift er lejlighed til at give en fyldigere omtale af det enormt betydningsfulde arbejde, der siden 1960'erne er foregået inden for undervisning i histokemi i Danmark. I **kapitel 5** skildres udviklingen inden for laborant- og bioanalytikeruddannelserne og de ildsjæle, der har æren af, at vi i dette land har en laboratorietechnisk standard af højeste karat.

Kapitel 6 fortæller til sidst om det nærmest naturstridige faktum, at der endnu 40 år efter dets stiftelse, stadig eksisterer et Dansk Selskab for Cyto- og Histokemi. I en tid, hvor den overvejende del af faglig erfaringsudveksling og vidensdeling foregår enten på internettet eller ved store internationale kongresser, kan dette utroligt sejlivede lille selskab fremvise en imponerende liste af aktiviteter gennem hele sin levetid, som kan læses på rulleteksterne i slutningen af kapitlet.

Der skal på dette sted rettes en varm tak til alle forfatterne, der med kort varsel sagde ja til at bidrage til, at dette festskrift fik en så fagligt bred repræsentation af emnet, som det nu er muligt.

Ligeledes en stor tak til den store skare af personer, der på anden vis har bidraget i forbindelse med udarbejdelsen af skriftet.

Det er med velberåd hu, at redaktionen har værnet om, at fremstillingerne får lov til at veksle mellem personlige og ofte muntre beretninger til mere halvkedelige og faktuelle fremstillinger. Sådan har Dansk Histokemi også været.

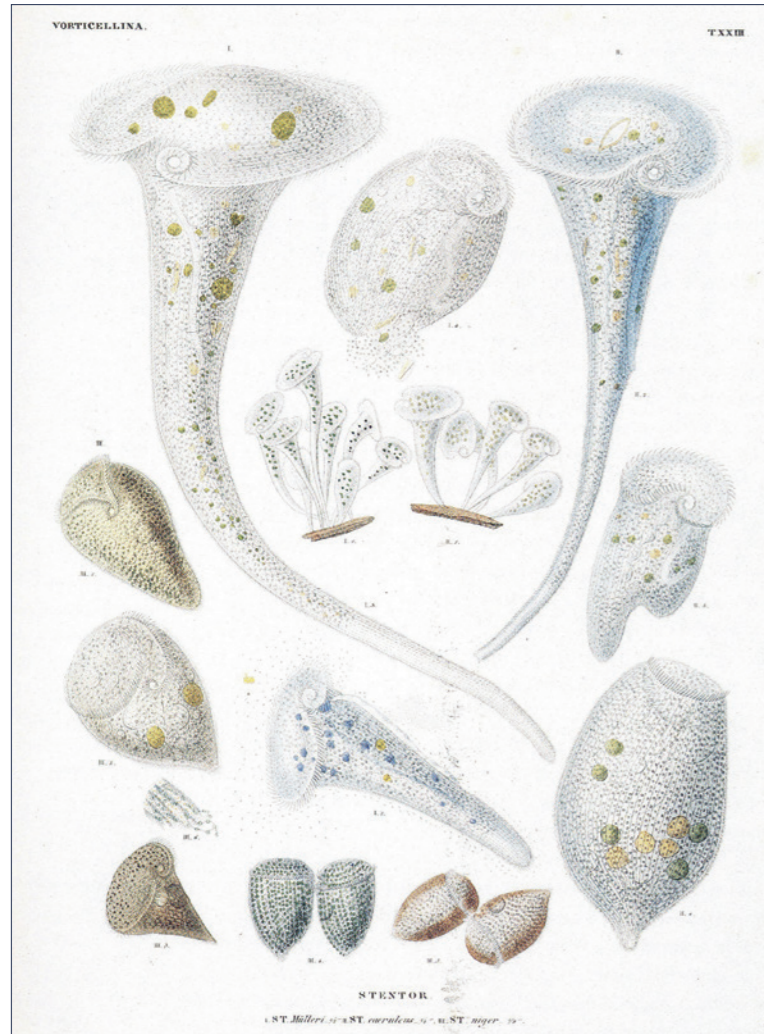
Endelig en hjertelig tak til bestyrelsen for Dansk Selskab for Cyto- og Histokemi for deres uforbeholdne positive modtagelse af forslaget om at markere 40 års jubilæet med dette festskrift.

På redaktionens vegne
Per Prætorius Clausen

INDLEDNING

af Per Prætorius Clausen

I 1847 offentliggjorde **H. C. Andersen** sit eventyr *Vanddråben*. Det er fortællingen om troldmanden Krible-Krable, der en dag sidder og holder sit forstørrelsesglas for øjet og ser på en vanddråbe, der var taget ude af en pyt vand i grøften... og iagttager de tusinde smådyr deri. "Jeg må give dem Couleur, at de kan blive tydeligere!" sagde han, og så hældte han ligesom en lille Dråbe rød Viin i Vanddråben, men det var Hexeblod, den allerfineste Slags til to Skilling; og så blev alle de underlige Dyr rosenrøde over hele Kroppen, det så ud som en hel By af nøgne Vildmænd." (1).



Figur 1. Udsnit af tavle fra Ehrenbergs: *Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen*.

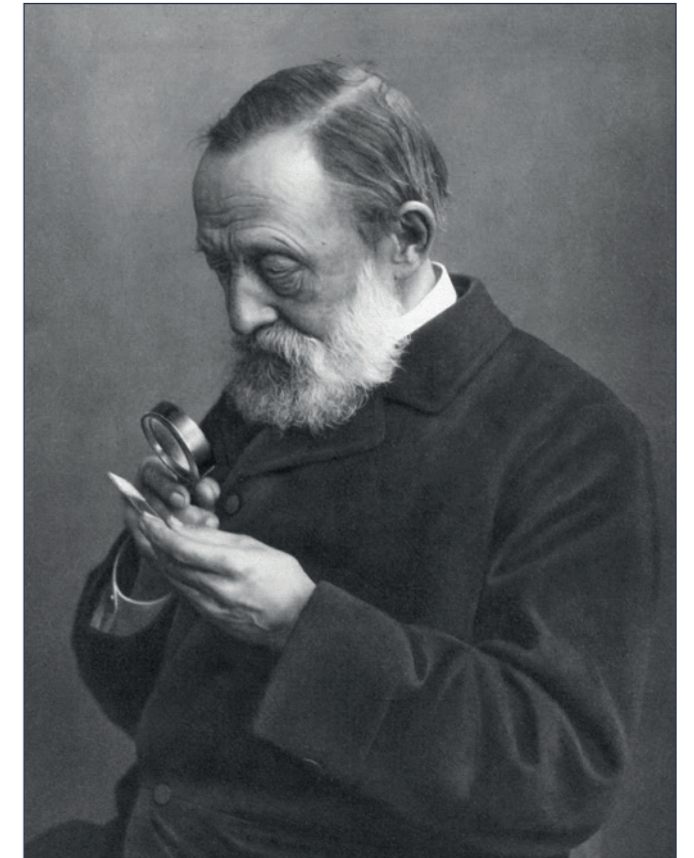
Dette er den første gang at farvning af mikroskopiske objekter omtales i skønlitteraturen (2). Inspirationen til eventyret fik H.C. Andersen utvivlsomt under et besøg på herregården Hoffmangave på Nordfyn i 1830. I et brev d. 15. juli til sin ven **Ludvig Læssøe** skrev han: ". den sidste Dag jeg var på Hoffmangave havde jeg en sand Nydelse, nemlig jeg saae Infusionsdyr; tænk Dem en lille Vanddråbe kun, på Glas og det var en verden med Skabninger, hvor de største præsenterede sig som Græshopper, de mindste som Knappenaalsbøveder... jeg så Infusionsdyr i mit eget Blod, det vrimlede med Aal og Torsk, og Alt i det Uendelige... kort sagt der aabnede sig en Uendelighed for mig, der bragte mig til at svimle." (3).

Det er mere usikkert, hvorfra H. C. Andersen hentede ideen med at farve dyrene. Han kan være inspireret ved at overvære et populærvidenskabeligt foredrag af anatom og fysiolog **D. F. Eschricht** i det af denne stiftede selskab Den naturhistoriske Forening. Eschricht havde forbindelse til den tyske naturforsker **C.G. Ehrenberg**, der i 1838 udgav et værk om infusionsdyr (4), som han bl.a. farvede med karmin (Figur 1). Ehrenberg havde to år før været i København (2). Der er således næppe tvivl om, at det hekseblod Krible-Krable anvendte var karmin.

Det er tankevækkende at samme år 1847, som H. C. Andersen udgav sit eventyr udgav en af patologiens (og meget andet) største skikkelser **Rudolf Virchow** (1821-1902) (Figur 2) i samarbejde med sin ven og kollega **Benno Reinhardt** det første nummer af tidsskriftet *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. Tidsskriftet udkommer endnu i dag under titlen "Virchows Archiv".

I første nummer af tidsskriftet rettede Virchow et kraftigt angreb på den humoralpatologiske tænkemåde, som har sin oprindelse i den græske oldtid, men endnu i midten af 1800-tallet var fremherskende i en modificeret form. Den forklarede, at sygdomsårsagerne var relateret til ubalance i legemets vævsvæsker. Virchow fulgte kritikken op i de følgende år og udgav i 1858 bogen: *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre* (5), som omtales som den nye patologiske kanon (6). Han betonedede, at livsprocesserne er bundet til cellerne og de fysiologiske og patologiske processer, der udspiller sig i dem. Det er disse processer, der følger almindelige fysiske og kemiske love, det gælder om at udforske. Patologiens mål må være at skabe en fysiologisk patologi og biologiens at skabe en fysiologisk histologi (7).

Som det vil fremgå af de følgende kapitler, er det i høj grad de histokemiske metoder i bred forstand, der efterfølgende kommer til at befordre dette mål op til i dag såvel indenfor histopatologi som almen cellebiologi.



Figur 2. Nej, det er ikke Krible-Krable, selv om det ligner. Det er den 70-årige Rudolf Virchow, der betragter et snitpræparat i lupforstørrelse.

Litteratur

1. Andersen H.C. Eventyr og Historier I, 1830-1850. I H.C. Andersens samlede værker. København: Gyldendal, 2003; side 432-3.
2. Okkels H. Farveteknikken i den mikroskopiske anatomi. København: Københavns Universitets festskrift, 1947.
3. Bille CSA og Bøgh N, red. Breve fra H.C. Andersen. København: Aschehoug, 2000; side 49.
4. Ehrenberg DCG. Die Infusionstierchen als Vollkommene Organismen. Leipzig 1838.
5. Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer begründung auf physiologische und pathologische gewebelehre. Berlin: Verlag von August Hirschwald, 1858.
6. Gotfredsen E. Medicinens historie. København: Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck, 1964.
7. Virchow R. Über die neueren fortschritte in der pathologie. Rede auf der naturforscher-versammlung in Frankfurt a.m. 1867. I: Rudolf Virchow und die deutschen naturforscherversammlungen. Akademische Verlags gesellschaft m.b.H. in Leipzig, 1922.

KAPITEL 1: HISTOKEMI - HVAD ER DET?

af Per Prætorius Clausen

Histokemi (af græsk: ἵστός = væv og Χημεία = kunsten at legere metaller) er den videnskabelige disciplin, der beskæftiger sig med at undersøge og beskrive den kemiske sammensætning af de levende organismers celler og væv.

Den mikroskopiske histokemi har samme formål, med den indskrænkning, at de kemiske bestanddeles tilstedeværelse skal kunne iagttages i mikroskop.

Traditionelt har man skelnet mellem **histokemiske** og **histologiske** metoder. De **histokemiske** metoder belyste vævsbestanddelenes kemiske sammensætning og lokalisering og mekanismen bag den reaktion, der muliggjorde synliggørelse skulle være kendt. De **histologiske** havde primært til formål at synliggøre og differentiere mellem vævsbestanddele uden krav til oplysning om kemisk sammensætning eller kendskab til farvningsmekanisme.

I tidens løb har grænsen mellem de to metoder ofte vist sig uskarp og vi vil i det følgende anvende betegnelsen histokemiske metoder om alle metoder, der på den ene eller anden måde giver oplysning om cellers og vævs sammensætning, opbygning og funktion, forudsat at morfologien er intakt.

KAPITEL 2: DE HISTOKEMISKE FARVEMETODERS UDVIKLING af Per Prætorius Clausen

2.1: DE HISTOKEMISKE FARVEMETODERS UDVIKLING INDTIL MIDTEN AF 1900-TALLET

Farvning af organisk materiale har været kendt siden oldtiden i form af farvning af garn, stof og klæder. Hyppigst anvendtes naturfarver fra dyr og planter. Fx angiver en dansk farvebog fra 1700-tallet (Figur 2.1.1) opskrifter på farvning med Indigo udvundet fra vaidplanten, Cochenille, der udvindes fra hunner af skjoldlus og indeholder farvestoffet karmin og farvning med spåner af blå- eller blodtræ (Hæmatoxylon campechianum), der oprindeligt voksede i Mexico og Mellemamerika og indeholder hæmatoxylin.

Det var **Robert Hooke** (1635-1703), der som den første i 1660 beskrev at planterne under mikroskop sås opbygget af kamre, som han kaldte *celler*.

Den første der anvendte farvning i forbindelse med mikroskopiske undersøgelser var den hollandske klædehandler og amatørinseglasliber **Antony van Leeuwenhoek** (1632-1723), der konstruerede det for sin tid kraftigste mikroskop og i 1696 blandt utallige andre ting mikroskoperede trævler af andehjerte, som

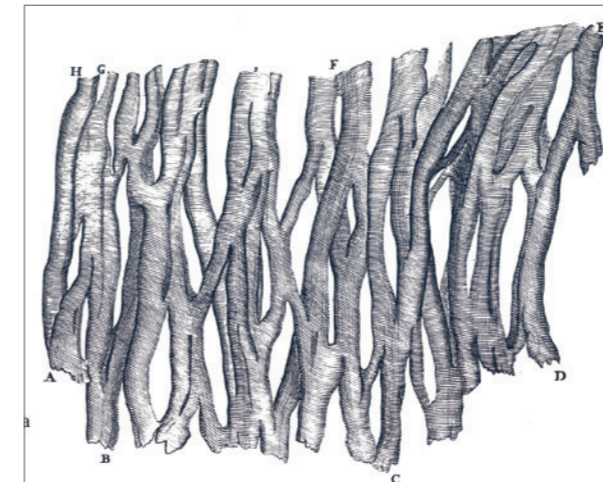


Fig. 2.1.2. Leeuwenhoeks afbildning af muskelbjælker fra et andehjerte.

han farvede med safran ved hjælp af krokusblomster oplødt i vin (Figur 2.1.2). Botanikeren **John Hill** (1714-1775) anvendte en alkoholisk cochenille-tinktur til farvning af plantestængler, hvorfra han skar tynde snit og mikroskoperede.

Frem til begyndelsen af 1800-tallet var mikroskoperne af forholdsvis ringe kvalitet pga. linsesystemernes sfæriske og kromatiske aberration, hvilket medførte, at billedet blev meget sløret. I begyndelsen af 1800-tallet konstrueredes mikroskoper med akromatiske linsesystemer, og kvaliteten øgedes hermed mærkbart.

Det er også i begyndelsen af 1800-tallet, at histokemien som videnskab bliver grundlagt. Det var franskmænd **Francois-Vincent Raspail** (1794-1878), der fra 1825 (1) udførte en række forbløffende originale og omfattende arbejder, hvis resultater han i 1830 samlede i værket: *Essai de Chimie Microscopique Appliquée a la Physiologie* (2). Han beskrev heri bl.a., hvorledes han anvendte farvning med jod til påvisning af stivelse i korn (Figur 2.1.3), angav metoder til påvisning af proteiner og kulhydrater i væv og anbefalede nedfrysning af væv før skæring ”for at undgå at kvæste vævet med kniven”. Raspails arbejder fik dog kun begrænset opmærksomhed, for snart overskyggedes de af lanceringen af en sand strøm af andre nye farvemetoder.



Fig. 2.1.1. Forsiden af En Dansk Farve-Bog fra 1768, ved siden af garn farvet med Indigo, Cochenille og Hæmatoxylin. (Wormianum, Per P. Clausen)

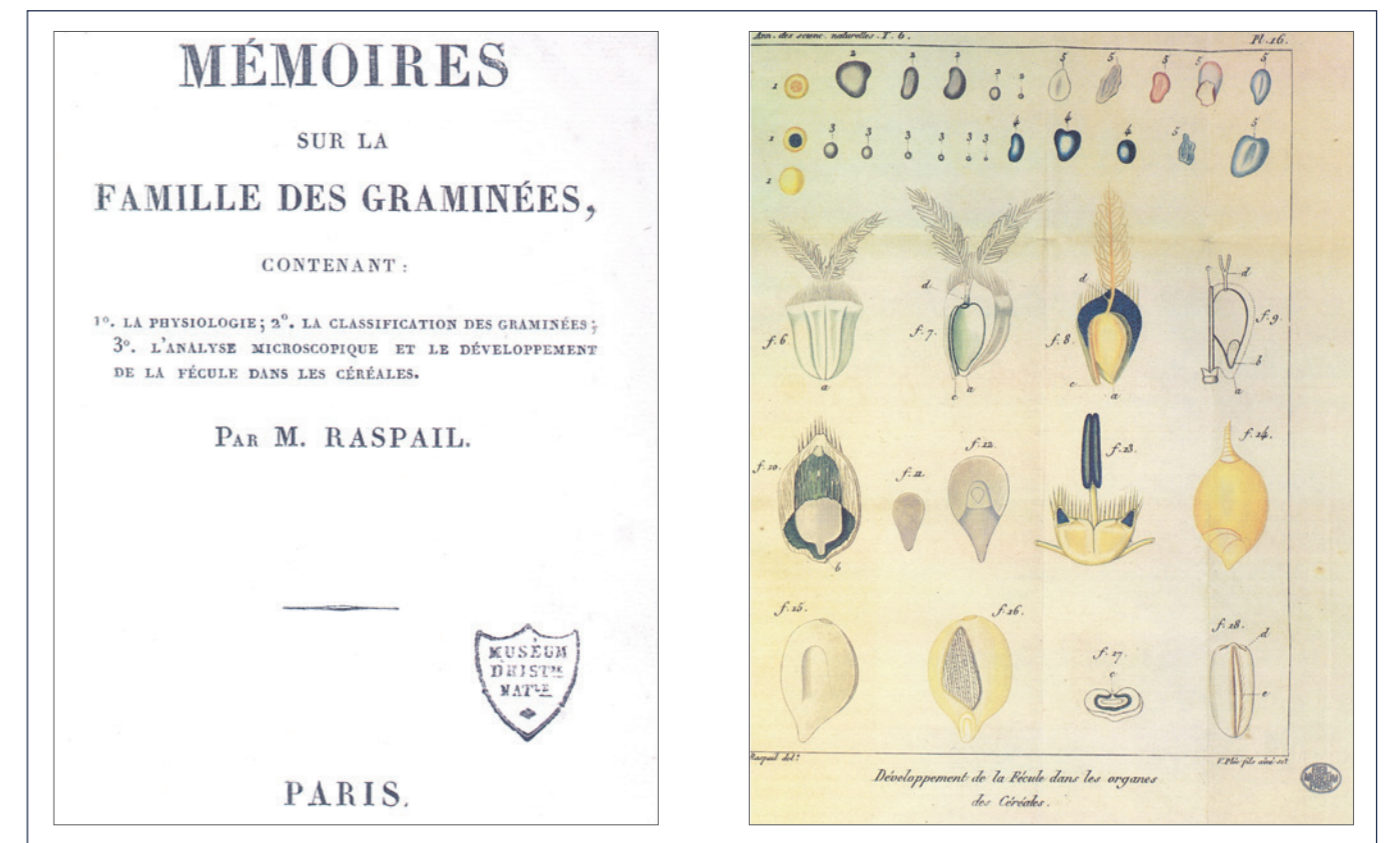


Fig. 2.1.3. Her begynder histokemien. I 1825 påviste F-V Raspail hvordan stivelse udvikles i spirende frø ved hjælp af farvning med jod, der farvede stivelsen blå. Tegningerne er udført af Raspail selv. (1)

Vævsbehandling

Med fremkomsten af forbedrede mikroskoper skærpedes samtidig kravet til kvaliteten af de præparater, der skulle mikroskoperes. Specielt animalsk materiale kræver dels en form for fiksering for at hindre autolyse og dels hærkning for at muliggøre egnede snit. Snit foretoges på daværende tidspunkt på fri hånd, med en skarp barberkniv, der enten skræbede hen over overfladen eller lagde tynde snit i vævet. Først senere i midten af 1800-tallet blev mikrotomen almindelig. Paraffinindstøbning blev beskrevet af **Klebs** i 1869. Som fikseringsmiddel havde alkohol været kendt og anvendt længe, men det var danskerne **Ludvig Levin Jacobsen** og **Adolph Hannover** (Boks 2.1), der i 1832 og 1840 beskrev den første velegnede fiksering (3), ved anvendelse af fortyndet chromsyre, der både hærder og samtidig bevarer vævets struktur. Senere publiceredes en række fikseringsvæsker, hvoraf de vigtigste er anført i **Tabel I**.

Primære fikseringsmidler

Middelem	Kendt siden oldtiden som konserveringsmiddel	Anvendt i histologi fra ca. 1743
Ethanol	Kendt siden oldtiden som konserveringsmiddel	Anvendt i histologi fra ca. 1743
Eddikesyre	Kendt siden oldtiden som vineddike	Anvendt i histologi fra 1663 (Robert Boyle)
Chromtrioxid	Hannover	1840
Mercurichlorid	Blanchard	1846
Kaliumdichromat	Müller	1860
Osmiumtetroxid	Schultze	1864
Picrinsyre	Ranvier	1875
Formaldehyd	Blum	1893
Glutaraldehyd	Sabatini	1963

Fikseringsmiddelblandinger

Navn	År	Udvikler	År
Clarke	1851	Bouin	1897
Flemming	1882	Heidenhain SUSA	1916
Carnoy	1887	Karnovsky	1965
Zenker	1894	Stefanini (Zamboni)	1967

Tabel I. Primære fikseringsmidler og fikseringsmiddelblandinger, med angivelse af den der beskrev dem og hvornår.

Adolph Hannover

(1814-1894)

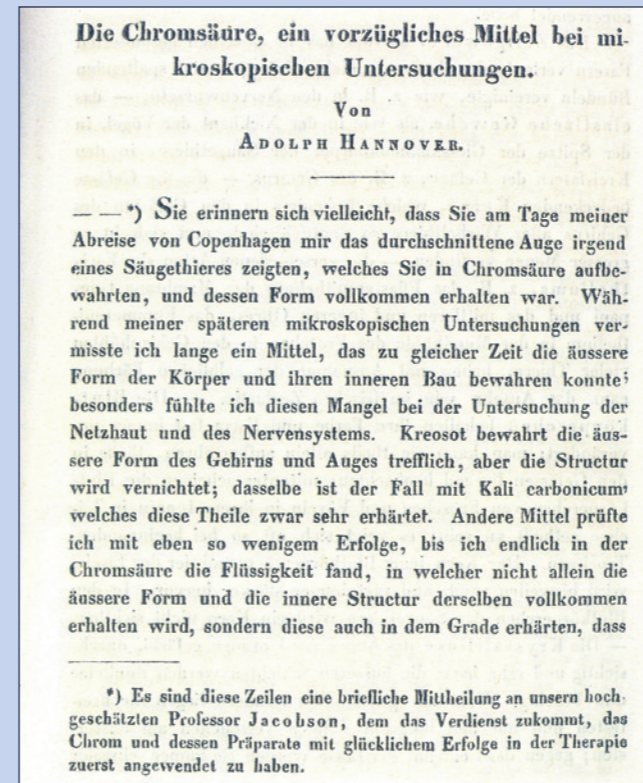


Figur 1. Adolph Hannover afbildet i 1854. Litografi af Fortling efter maleri af Monies. (Fra Adolph Hannover og hans fædre og mødrene slægt, udg. af Martin Ad. Hannover, København 1914)

Boks 2.1

Adolph Hannover (Figur 1) kaldes ofte "Danmarks første mikroskopiker". Det er ikke helt korrekt, men man kan roligt kalde ham Danmarks første histopatolog. Han blev student i 1832 og læste i begyndelsen naturhistorie. Han knyttede i den forbindelse et livslangt venskab med studiekammeraten **Japetus Steenstrup** (1813-1897), der senere bliver professor i zoologi. Hannover skiftede imidlertid spor og læste derefter lægevidenskab. Allerede som studerende fik Hannover Universitetets guldmedalje for en afhandling om mikroskopiske undersøgelser af nervesystemets ganglier. Efter lægeeksamen i 1838 fik han i 1839 licentiatgraden (ph.d.) for en sammenlignende anatomisk undersøgelse af det ydre øre. Allerede i 1832 havde hans ven og noget ældre kollega **Ludvig Levin Jacobsen** (1783-1843) i forbindelse med undersøgelser af den chromsure kalis fysiologiske virkninger fundet, at for anatomien og naturforskeren besidder dette stof den vigtige egenskab "at man i en meget fortyndet Opløsning af dette Salt kan conservere de Gjenstande man undersøger eller vil bevare i Samlinger" (1). Dette er den første beskrivelse af adækvat fiksering (2).

Med bl.a. denne viden tog Hannover i 1839 på en toårig studierejse i Europa, som bl.a. førte ham til Berlin og Paris. Specielt opholdet i Berlin hos anatomen og fysiologen **Johannes P. Müller** (1801-1858) fik afgørende betydning. Under dette ophold videreførte Hannover L.L. Jacobsons undersøgelser af chromsyrens anvendelse som fikseringsvæske og offentliggjorde i 1840 resultaterne i Müllers tidsskrift (Figur 2) (3).

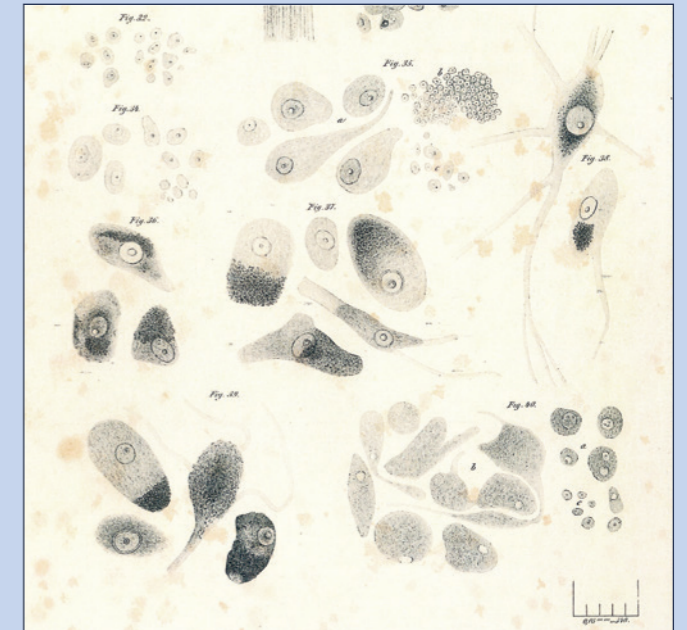


Figur 2. Forside af Hannover's beskrivelse af chromsyre som fiksativ. Artiklen er udformet som brev til hans læremester L.L. Jacobson. (1)

Efter hjemkomsten fra studierejsten begyndte Hannover sin kliniske uddannelse på Frederiks Hospital. Sideløbende hermed udførte han en række mikroskopiske undersøgelser af øjet og nervesystemet, som publiceredes i: *Mikroskopiske undersøgelser af Nervesystemet*, 1842, som blev illustreret med særdeles smukke plancher, som han selv tegnede (Figur 3). I 1847 udgav han bogen: *Om mikroskopets Bygning og dets brug*, som blev oversat til engelsk, tysk, fransk og hollandsk. I arbejdet *Om Epithelioma, en særegen svulst* fra 1852 anbefalede han, som den første i Danmark, biopsitagning i forbindelse med diagnostik: "Man kan allerede med nytte, ofte anvende mikroskopet, førend svulsten er fjernet fra legemet, når man kan erholde mindre Dele til undersøgelse..... Dog må man ikke lade sig nøje med Undersøgelsen af meget overfladiske Partier".

Litteratur

- Jacobsen LL. I Det kgl. Danske Videnskabelige Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematisk afhandlinger, 5te del-1832, p.LXXXXI-LXXXXIII.
- Bracegirdle B. A history of microtechnique. New York: Cornell University Press, 1978.
- Hannover A. Die Chromsäure, ein vorzügliches Mittel bei mikroskopischen Untersuchungen. Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliches Medicin 1840:549-58.



Figur 3. Udsnit af tavle fra Hannover's bog Mikroskopiske undersøgelser af Nervesystemet, 1842.

Han havde herefter næsten indtil sin død en omfattende videnskabelig produktion, som dækker emner inden for patologi, mikrobiologi, medicin, medicinsk statistik, invaliditet, fattigvæsen og hygiejne m.m. Trods denne omfattende videnskabelige aktivitet lykkedes det ham ikke at få fast ansættelse på Københavns Universitet, hverken da han i 1843 søgte om lektoratet i patologisk anatomi eller i 1846 om lektoratet i deskriptiv og mikroskopisk anatomi. Han tjente til brødet resten af livet som praktiserende læge, visitator ved Københavnske hospitaler, militær- og choleralæge.

Fra udlandet modtog han adskillige hædersbevisninger og han var ved den store internationale lægekongres i København i 1884 ubetinget den, af de danske læger, der var mest kendt i udlandet. (Under kongressen husede han Sir **James Paget** (1814-1899), som foruden at være kirurg også var en af Englands største patolog anatomer, og som har lagt navn til flere sygdomme i mamma og knogler.)

I 1984 blev et auditorium på Panum Institutet ved Københavns Universitet navngivet efter Hannover.

Frederik Carl Christian Hansen (1870-1934)



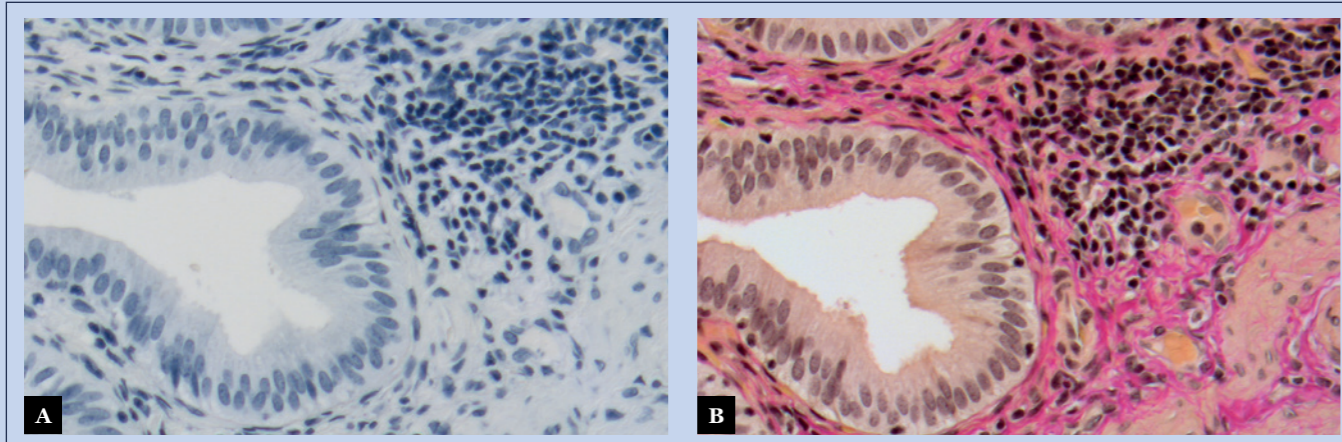
Figur 1. Frederik C.C. Hansen. (Hospitalstidende, 6. februar 1934)

Boks 2.2

Frederik Carl Christian Hansen (Figur 1) tog lægeeksamen i 1894. Både i studie- og kandidattiden interesserede han sig for mikroskopisk anatomi. I kandidattiden studerede han hos **Rudolph Sofus Bergh**, der som zoolog var docent i histologi og embryologi og var den første, der indførte mikroskopi i zoologiundervisningen. I 1897 blev Fr. C. C. Hansen prosector anatomia ved Universitetet, hvor han fortsatte sine mikroskopiske og histologisk-tekniske studier.

I 1900 skrev han disputats: *Undersøgelser over Binde vævsgruppen, 1. del, Den hyaline Bruskgrundsubstans*. I 1901 blev han professor i anatomi og hans videnskabelige hovedinteresse var i disse år histologiske farvetekniske problemer specielt vedrørende hæmatoxylinfarvningerne. I 1905 publicerede han en større oversigtsartikel (1), hvor han bl.a. beskrev sin udgave af jernhæmatoxylin farvningen, der siden, specielt i Danmark, har været anvendt som kernefarvning i forbindelse med Van Giesons picro-fuchsinfarvning til at skelne mellem muskulatur og bindevæv. Denne metode bærer derfor herhjemme navnet Van Gieson-Hansen (Figur 2).

Som professor inddrog Fr. C. C. Hansen histologien i langt højere grad end det tidligere havde været tilfældet, uden at reducere pensum i makroskopisk anatomi tilsvarende. Det blev han ikke populær på blandt studenterne. Fra 1908 skiftede han videnskabelig hoved interesse og publicerede en del antropologiske arbejder.



Figur 2. Jern-hæmatoxylin farvning. A: Farvning alene med jernhæmatoxylin a.m. Hansen. B: Samme farvning anvendt i kombination med van Giesons picro-fuchsin farvning (1889), der farver kollagen rødt og muskulatur gult. (Ole Nielsen)

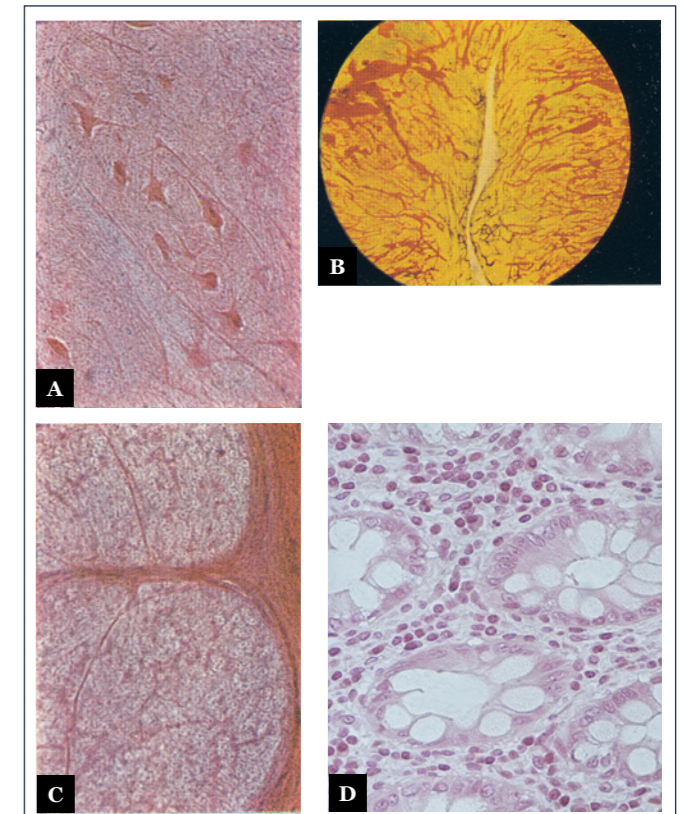
Litteratur

1. Hansen FCC. Über Eisenhämatein, Chromalaunhämatein, Tonerdealaunhämatein, Hämateinlösungen und einige Cochenillefarblösungen. Zeitschrift für Wissenschaftliches Mikroskopie und mikroskopische Technik 1905;22:45-90.

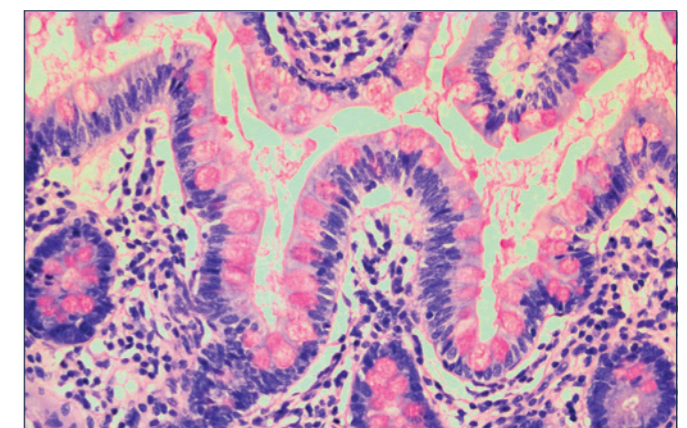
Farvning med karmin og hæmatoxylin

Som beskrevet havde karmin været kendt og anvendt i lang tid til farvning af præparater til mikroskopi, og i første del af 1800-tallet var det nærmest synonymt med en histologisk farvning. **Alfonso Corti** (1822-1876), som er kendt for sine undersøgelser af det indre øre og beskrivelsen af det organ, der bærer hans navn fra 1851, anvendte chromsyre som fiksering og hærkning og en karminopløsning til farvning af cellekerner. Det var **Joseph von Gerlach** (1820-1896), der i 1858 gav den optimale opskrift på en karminfarvning (4), da han over natten havde glemt en kaliumdikromatfikseret cerebellum i en ekstremt fortyndet opløsning af karmin og efterfølgende fik den flotteste kernefarvning (Figur 2.1.4). Endvidere fandt han at farvningen ikke lykkedes på ufikseret væv, hvilket indikerede at chromfikseringen var nødvendig som farvningsbejdse. Karminfarvningen vedblev op til 1880'erne at være den foretrukne histologiske farveteknik og i senere modifikationer anvendtes den til slimfarvning: Mucikarmin (Figur 2.1.5) og påvisning af glykogen: Best karminfarvning.

Fra tekstilfarvehåndværket havde man længe vidst, at når man anvendte hæmatoxylin, var det nødvendigt at de opløste spåner af blåtræ henstod i flere dage under påvirkning af lys og luft, og at tøjet skulle forbehandles med en alunbejdse for at opnå et optimalt farvningsresultat. Denne viden anvendte **F. Böhmer**, da han i 1865 beskrev sin alun-hæmatoxylinfarvning (5). Det var dog først **Paul Mayer** (1848-1923), der i 1891 påviste at det er oksidationsproduktet af hæmatoxylin, hæmatein der farver, og at dette kan opnås ved tilsætning af fx jodat (6). Omkring århundredeskiftet gennemprøvede **F. C. C. Hansen** (Boks 2.2) en lang række hæmatoxylinopskrifter og publicerede sin jernhæmatoxylinfarvning. Hæmatoxylinfarvninger overtog i slutningen af 1800-tallet rollen, som den fortrukne kernefarvning.



Figur 2.1.4. Karmin farvning. A+C: Billeder af snit af medulla spinalis, skåret på fri hånd og farvet omkring 1860. Snittet blev fundet på Anatomisk Institut, Kirurgisk Akademi (nu Medicinsk Museion) i 1942 og menes fremstillet af Goll i Zürich. B: Snit af uterus slimhinde, hvor blodkar er injiceret med karmin-gelatine. (Gengivet efter planche i Harald Okkels: Farveteknikken i den mikroskopiske anatomi, København 1947). D: Snit af colonslimhinde farvet i 2016. (Janne Jensen)



Figur 2.1.5. Mucikarmin farvning af tyndtarms slimhinde. (Lene Lütken Sørensen, Jess Pilgaard)

Anilinfarvestofferne og hvad deraf fulgte...

I påsken marts 1856 prøvede den 18-årige **William Henry Perkin** (1838-1907) at fremstille kinin, som englænderne havde hårdt brug for til bekæmpelse af malaria i deres kolonier. Hans udgangsstof var anilin, som han fremstillede ved nitrering af benzen udvundet fra stenkulstjære. Han fik nu ikke lavet noget kinin ved den lejlighed, men derimod et lilla farvestof mauvein eller mauve, som tekstilfarveindustrien modtog med begejstring.

Det blev startskuddet til den industrielle farveindustri og også den kemiske industri. Snart dryppede det også på de histologiske farvninger. Mauve blev afprøvet i 1862 og herefter gik det slag i slag ikke blot med anilinfarvederivater, men også med en lang række andre syntetisk fremstillede farvestoffer. **Tablet II** giver en oversigt over et udvalg af de farvestoffer, der fandt anvendelse til histologisk brug.

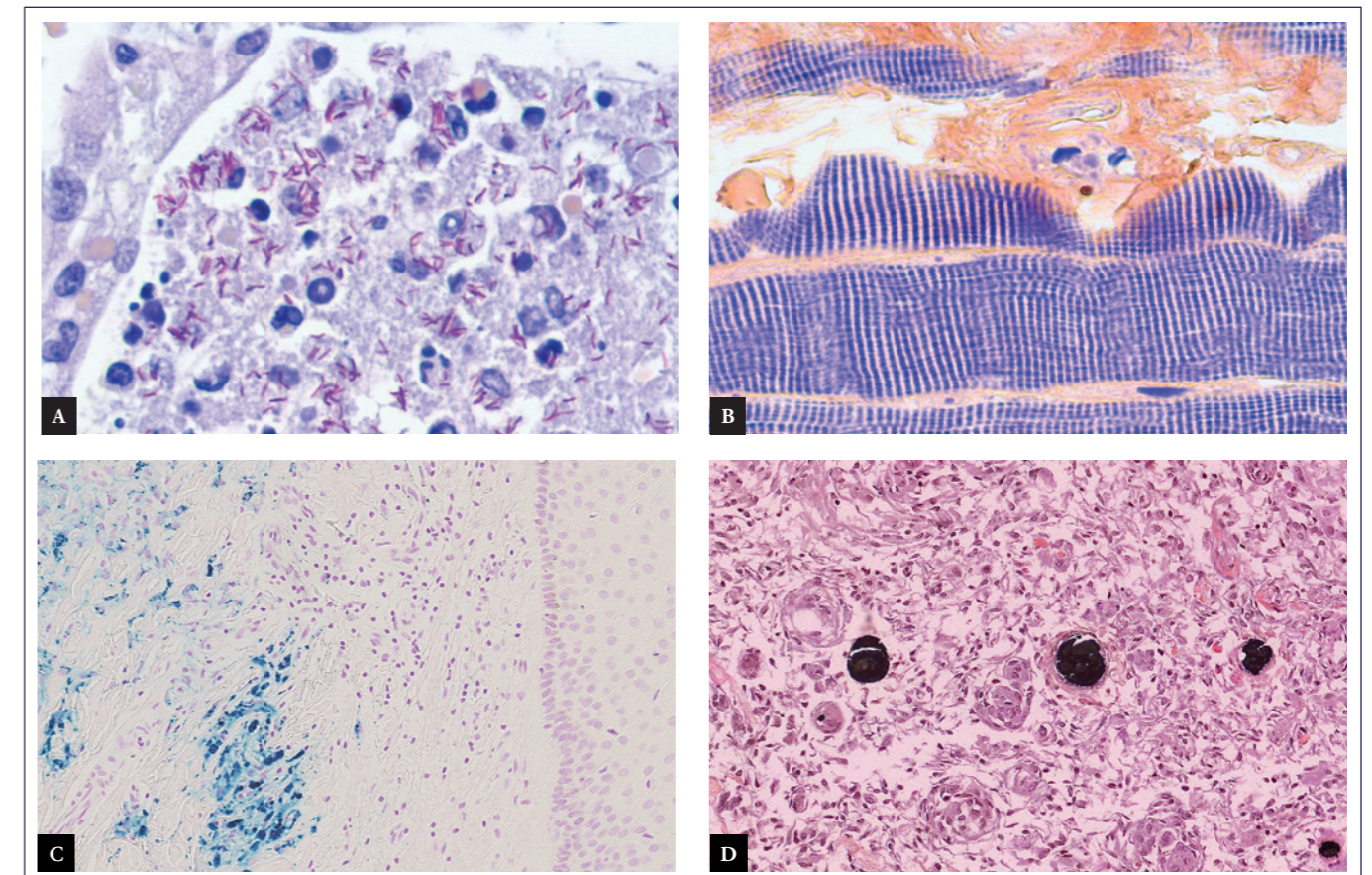
Gustav Mann beskrev i 1902 denne periode således: ”farvemethoderne blev flere og flere til et punkt, hvor det at være histolog var praktisk talt synonymt med at være farver, med den forskel at de professionelle farvere vidste, hvad de havde med at gøre, mens histologerne, med få undtagelser ikke gjorde...” (7).

Perkin's mauve	1862	Beneke
Paris blue	1863	Waldeyer
Aniline blue	1863	Waldeyer, Frey, Roberts
Basic fuchsin	1863	Roberts
Picric acid	1863	Roberts
Indigocarmine	1864	Chrzonszczewsky
Cyanine	1874	Ranvier
Iodine violet	1874	Zuppinger, Huguenin
Alizarin	1874	Lieberkuhn
Methyl violet	1875	Cornil
Eosin	1875	Fischer
Safranin	1877	Ehrlich
Methyl green	1877	Calberla
Bismarck brown	1878	Weigert
Methyl blue	1879	Ehrlich
Nigrosin	1879	Ehrlich
Aurantia	1879	Ehrlich
Tropaeolin	1879	Ehrlich
Acid fuchsin	1879	Ehrlich
Orange G	1879	Ehrlich
Bordeaux	1879	Ehrlich
Methylene blue	1880	Ehrlich
Biebrich scarlet	1880	Schwarze
Iodine green	1881	Stirling, Richardson
Magdala red	1881	Flemming
Chrysoidin	1883	Griesbach
Malachite green	1884	Beneden and Julin
Erythrosin	1885	Gierke
Thionin	1885	Ehrlich
Light green	1886	Griesbach
Congo red	1886	Griesbach
Benzopurpurin	1886	Griesbach
Toluidine blue	1890	Hoyer
Neutral red	1893	Ehrlich
Sudan III	1896	Daddi
Janus green	1898	Ehrlich
Sudan IV	1901	Michaelis
Azocarmine	1905	Heidenhain
Nile blue	1908	Smith
Trypan blue	1909	Goldmann

Tablet II. Oversigt over udvalgte farvestoffer, med angivelse af den, der første gang beskrev den histologiske brug af dem og hvornår.

En af undtagelserne var **Paul Ehrlich** (1854-1915), der i 1877-1880 foretog en systematisk undersøgelse af anilinfarverne og beskrev den principielle forskel mellem sure og basiske farvestoffer både kemisk og histologisk (8,9). Han introducerede begrebet metachromasi, opdagede tuberkelbakteriernes syrefasthed og var ophavsmand til en lang række farvemethoder.

En ikke ubetydelig del af de farvemethoder, der blev beskrevet i sidste halvdel af 1800-tallet er stadig i brug. Figur 2.1.6 giver en farverig oversigt over et udvalg af disse, som også inkluderer Gram farvningen (Boks 2.3).



Figur 2.1.6. Tableau der viser udvalgte farvemethoder, som blev beskrevet i sidste halvdel af 1800-tallet, og som stadig anvendes. **A:** Ziehl-Neelsens farvning (1882/1883) af syrefaste stavbakterier. **B:** Mallory's PTAH farvning (1897), der demonstrerer tværstriberne i skeletmuskulatur. **C:** Perl's farvning (1867) for jernpigment og **D:** Von Kossa's farvning (1901) for kalk. (Ole Nielsen).

Hans Christian Joachim Gram (1853-1938)



Figur 1. Christian Gram fotografert i 1880'erne, hvor han arbejdede med sin farvemethode. (Medicinsk Museion)

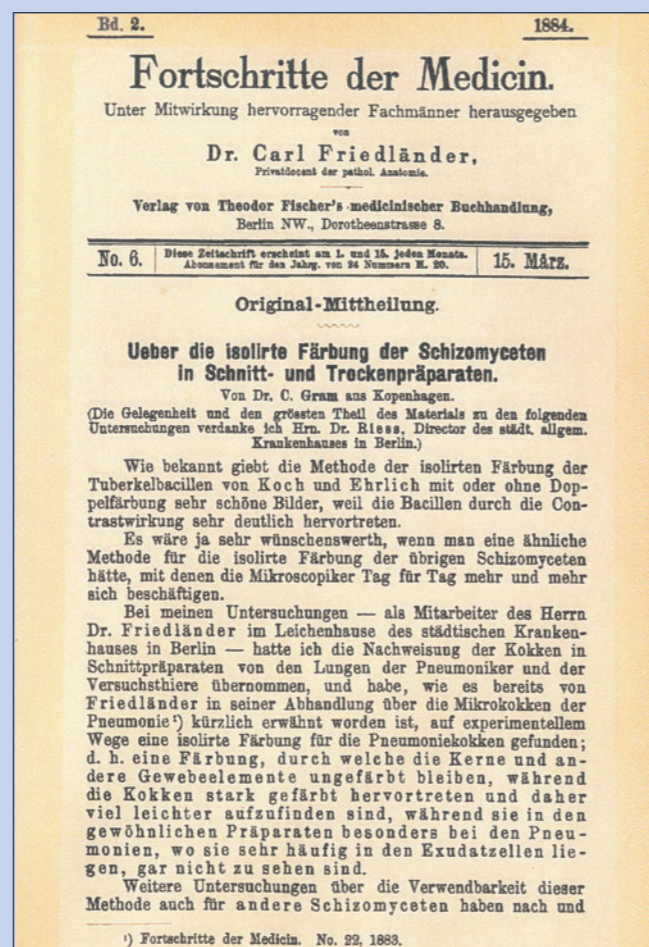
Boks 2.3

Hans Christian Joachim Gram (Figur 1) begyndte efter studentereksamen i 1871 at læse naturhistorie, men tog samtidig den medicinske forberedelseksamen, kantussen. I den forbindelse fulgte han **Japetus Steenstrups** forelæsninger. Steenstrup opfordrede ham til at fortsætte medicinstudiet, hvilket han gjorde, men fortsatte under studiet som Steenstrups assistent i Zoologisk Studiesamling, hvor han fik erfaring i mikroskopi. Efter lægevidenskabelig embedseksamen i 1878 skrev han i kandidattiden både guldmedaljeafhandling (1882) og doktordisputats (1883).

Begge afhandlinger handlede om de røde blodlegemers størrelse bestemt under mikroskop, og blev rost for deres store præcision. I kandidattiden fulgte han et bakteriologisk kursus hos dansk bakteriologisk pioner **Carl Julius Salomonsen**. På dennes anbefaling rejste Gram efter kandidattiden i 1883 på studierejse til Berlin hos **Carl Friedländer**, der var prosektor ved Städtisches Allgemeines Krankenhaus. Friedländer arbejdede på at afklare årsagen til lungebetændelse, og Gram fik til opgave at farve og mikroskopere vævsnit fra patienter, der var døde af lungebetændelse.

Det er i forbindelse med dette arbejde, at det efter kort tid lykkedes ham at finde frem til den farvemethode til påvisning af pneumokokker, som eftertiden har givet hans navn (1). Han beskriver selv, at han fandt frem til metoden ved et tilfælde, idet han forsøgte at lave en

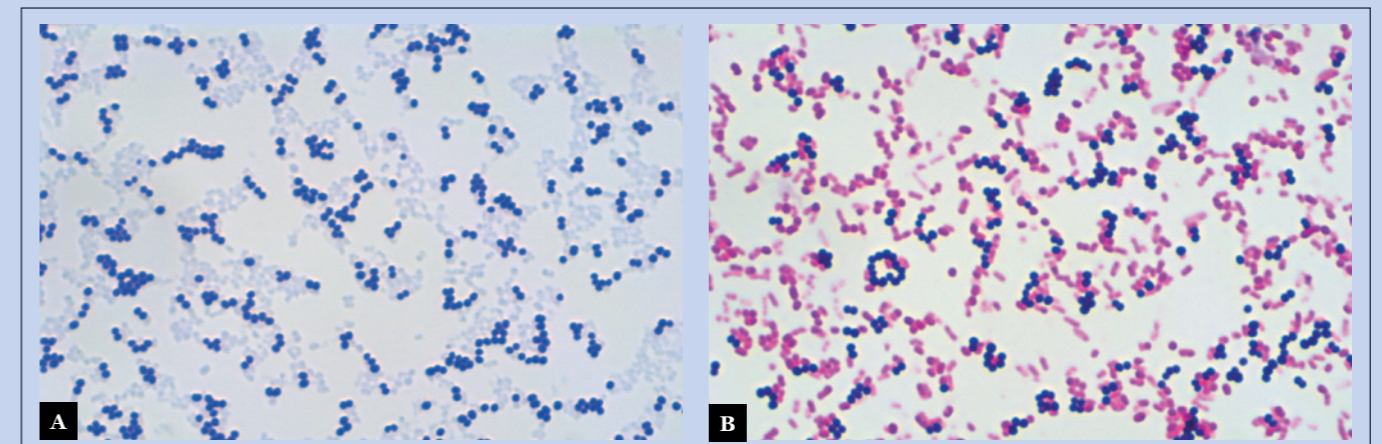
dobbeltfarvning af nyresnit, hvor kernerne skulle være blå og urincylindre brune. Dette er således et af flere eksempler i videnskabshistorien på, hvad man kalder *serendipitet*: *At man gør en vigtig opdagelse, mens man er i gang med at lede efter noget helt andet.* (Opdagelsen af penicillin er et andet eksempel). Han fandt frem til en farvemethode, hvor, med Grams egne ord: *"kerner og andre vævelementer er ufarvede mens coccer fremtræder stærkt farvede og derfor er langt lettere at se, mens de i de sædvanlige præparater specielt ved pneumonier, hvor de ofte ligger i eksudatceller, slet ikke er til at se"*. Farvemethoden blev publiceret i Friedländers tidsskrift (Figur 2).



Figur 2. Forsiden af Christian Grams beskrivelse af sin farvemethode til påvisning af bakterier (1).

Gram afprøvede metoden på en lang række af betændelsestilstande og fandt, at i nogle tilfælde farvedes bakterierne, i andre ikke. **Weigert** supplerede senere Grams originalopskrift ved tilsætning af Safranin, hvorved de bakterier, der var ufarvede efter Grams metode blev røde. Metoden, der således opdeler bakterierne i to store ubeslægtede grupper, grampositive og gramnegative, har siden og op til i dag haft stor diagnostisk og differentialdiagnostisk betydning (Figur 3).

Da Gram forlod Friedländer og Berlin efter 4 måneders ophold, forlod han også bakteriologien. I maj 1884 opholdt han sig hos farmakologen **Oswald Schmiedeberg** i Strassbourg og helligede sig herefter farmakologien. Efter hjemkomsten til Danmark blev han i 1891 professor i farmakologi, men var samtidig overlæge på medicinsk afdeling på Frederiks Hospital. I 1900 overtog han professoratet i medicin, som han varetog til sin pension i 1924.



Figur 3. A. Gram farvning, som han selv beskrev den. Kun gram-positive bakterier er farvet blå. B: Gramfarvning modfarvet a.m. Weigert. Gram-positive bakterier farves blå, gram-negative røde. (Sanne Malig, Louise Pedersen, Ole Nielsen)

Litteratur

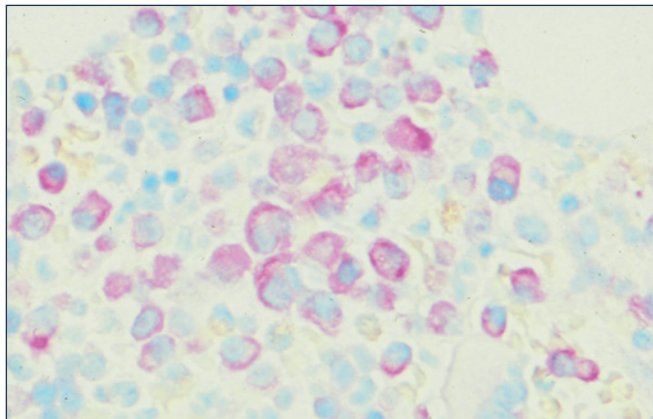
1. Gram HC. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. Fortschritte der Medicin 1884;2:185-9.

Ved udgangen af det 19. århundrede kunne man se tilbage på en epoke, hvor celledoktrinen var blevet grundlagt. Den fastslog at alle planter (**Schleiden**, 1838) og dyr (**Schwann**, 1839) var opbygget af celler. **Virchow** formulerede sin aforisme: "Omnis cellula e cellula" eller "alle celler udvikles fra celler" som grundlag for vævsdannelsen. Den fremsattes i artiklen Cellularpathologie fra 1855 (10), men **Raspail** havde allerede beskrevet det i 1825 (1), hvilket var glemt i ca. 40 år.

Mod slutningen af århundredet var hovedparten af cellernes organeller beskrevet: Endoplasmisk reticulum (1897), mitochondrier (1898) og samme år beskrev **Camillo Golgi** det apparat som i dag bærer hans navn. Lysosomet blev først beskrevet og navngivet af **Christian de Duve** i 1955. Det fik han Nobelprisen for i 1974.

I 1879 gav **Walther Flemming** det stof i kernerne, der farvedes med basiske farvestoffer navnet chromatin. Han beskrev og navngav mitose og omformulerede Virchows aforisme til: "omnis nucleus e nucleo". **Wilhelm Waldeyer** navngav i 1888 kromosomerne.

I det næste århundrede blev histokemiske og biokemiske undersøgelser af kernematerialet et videnskabeligt hovedfokusområde og er det stadig med foreløbige kulminationer i 1953 med beskrivelsen af DNA strukturen ved **Watson & Crick** og fastlæggelsen af det humane genom i 2003.



Figur 2.1.7. Unna-Pappenheims methyl grøn-pyronin farvning for DNA og RNA. Her i en udgave fra laborantelevkasse i 1983. (Tine Meyer)

Farvemethoder til påvisning af nucleinsyrer

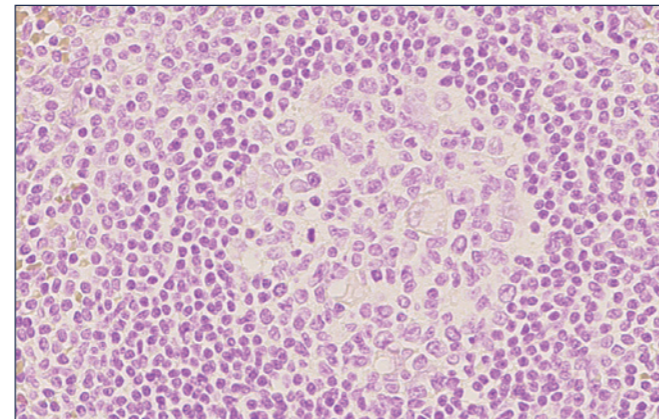
Methyl grøn-pyronin farvningen, der farver DNA grønt og RNA rødt, blev oprindeligt udviklet af **Ehrlich** i 1898, men er bedst kendt i den modifikation som **Pappenheim** 1899 (11) og **Unna** 1902 (12) beskrev (Figur 2.1.7).

Metoden blev hyppigt anvendt i tidlige histokemiske undersøgelser af nucleinsyrer og **Jean Brachet** anvendte den, da han i 1939-1940 beskrev relationen mellem cytoplasmatiske RNA og proteinsyntese, som var med til at bane vejen for det, der kaldes molekylærbiologiens hoveddogme:

DNA \longrightarrow RNA \longrightarrow protein (13).

Metodens specificitet blev undertiden betvivlet pga. urenheder i de anvendte reagenser. **Hans Lyon** (1932-) og medarbejdere viste i undersøgelser fra 1980'erne, at anvendelse af rene farvestoffer muliggjorde en specifik histokemisk påvisning af DNA og RNA, og at DNA reaktionen kunne kvantiteres (14,15).

I 1924 beskrev **Robert Feulgen** (1884-1955) i samarbejde med sin assistent **Rossenbeck** en metode til påvisning af DNA (Feulgens nuclealreaktion) (16). Metoden er formentlig den histokemiske metode, der har haft størst betydning for afklaring af biologiske forhold i det 20. århundrede.



Figur 2.1.8. Feulgens farvning til påvisning af DNA. (Ole Nielsen)

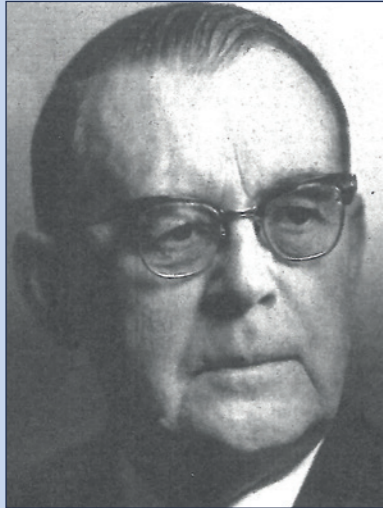
Adskillige undersøgelser har vist, at under standardiserede og kontrollerede forhold er metoden specifik for DNA og kan kvantiteres cytofotometrisk (Figur 2.1.8).

Blandt de mange forhold metoden har været med til at afklare kan nævnes: 1: At kerner i både dyr og planter indeholder DNA, 2: At de båndfarvede områder på kromosomerne indeholder DNA og er det materielle grundlag for de arvelige egenskaber, 3: At der er et 1:1 forhold mellem DNA indhold i kerner og kromosomantal, 4: At DNA indholdet er det samme i alle somatiske celler, 5: At DNA indholdet i kernerne fordobles før mitose.

I forbindelse med tumorforskning har metoden været anvendt til at bestemme ploidi i benigne og maligne tumorer og givet værdifulde prognostiske oplysninger.

I 1932 beskrev **Lárus Einarson** (Boks 2.4) sin galloxyanin-chromalunfarvning, der både påviser DNA og RNA med stor specificitet.

Lárus Einarson (1902-1969)



Figur 1. Lárus Einarson.

Boks 2.4

Lárus Einarson (Figur 1) blev født i Reykjavik og tog medicinsk embedseksamen dér i 1928. Under studiet fattede han interesse for neuroanatomi og fik efter lægeeksamen ansættelse hos **F. C. C. Hansen** på Anatomisk Institut i København. Det var en kontakt, som ifølge Einarson fik stor betydning for ham selv. Det var formentlig Hansens arbejder med hæmatoxylinfarvninger, der inspirerede Einarson til at arbejde på at finde frem til en velegnet farvning til at påvise nervecellernes tigroid eller Nissl substans.

Efter sit 1-årige ophold hos **F. C. C. Hansen** var Einarson i 1929-1931 på studieophold i München og senere U.S.A., hvor han fortsatte sine eksperimenter med Nissl farvningen og i 1932 publicerede han resultaterne i *American Journal of Pathology* (1). Han fandt frem til at en gallocyanin-chromalun opløsning var den mest velegnede og fortsatte med at videreudvikle metoden de følgende år (Figur 2).

A METHOD FOR PROGRESSIVE SELECTIVE STAINING OF NISSL AND NUCLEAR SUBSTANCE IN NERVE CELLS*

LÁRUS EINARSON, M.D.

FELLOW OF THE ROCKEFELLER FOUNDATION

(From the Anatomical Institute, Munich, Pathological Laboratory of the Bispebjerg Hospital, Copenhagen, and the Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Mass.)

The usual staining methods for the demonstration of Nissl substance suffer from a variety of technical defects and difficulties. I have succeeded in devising a progressive selective method for staining this substance, which I believe to be of both practical utility and of some theoretical importance.

TECHNIQUE

The Nissl substance is a constant histological element in nerve cells, which has a marked affinity for basic dyes. As yet, however, every method for demonstrating it has depended upon the "regressive principle of staining," i. e., overstaining and then differentiating in alcohol. The basic anilin dyes have been the most useful, and yet generally speaking they do not stick firmly enough to the tissue elements and are too readily removed by alcohol. In this respect there is only a difference of degree between these various dyes. It is clear that the differentiation profoundly influences the results, and the hurry with which the preparation must be passed through the alcohols and xylols is a great disadvantage. Following an extensive study of the literature I arrived logically at the following method, which eliminates nearly all of the above difficulties.

Becher¹ introduced the use of certain dyes from the groups of anthraquinones, naphthoquinones and oxazines. These dyes are combined with a metallic element forming a soluble "lack," and this now basic dye becomes bound by the fixed acid nuclei (see also Romeis²).

The dyes † we have used are:

1. Naphthazarin (1, 2 - dioxynaphthoquinone).
2. Alizarincyanin R (1, 2, 4, 5, 8 - pentaoxyanthraquinone).

* Received for publication January 8, 1932.
† Nos. 1, 3 and 4 were obtained from Dr. Hölborn (Grübner-Höllborn, Leipzig), and No. 2 from Dr. G. Grübner & Co., Leipzig.

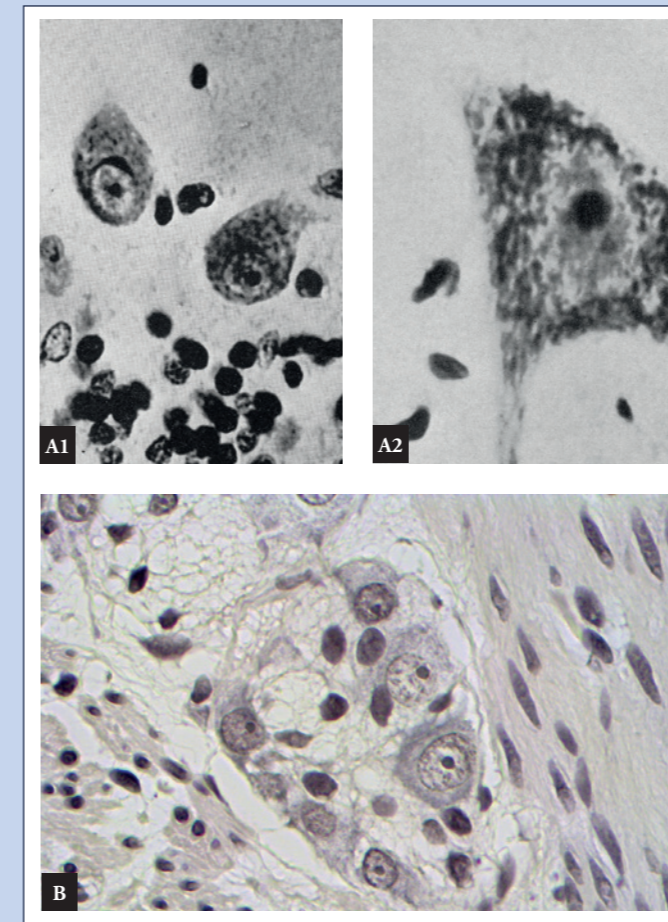
205

Figur 2. Forsiden af Lárus Einarsons artikel, hvor han beskriver gallocyaninfarvningen første gang. (1)

Han påviste at Nissl substansen varierede i forskellige nerveceller. Han mente at det skyldtes en cyklisk variation, således at Nissl substansen blev brugt, hvis nervecellerne stimuleredes til aktivitet og i hvile

gendannedes efter en restitutionsfase. Da han i 1933 fremsatte denne teori, var man langt fra klar over Nissl substansens kemiske natur. Senere undersøgelser har vist at Nissl substansen består af ribosomalt RNA og at Einarson havde ret (Figur 3).

Einarson blev i 1935 assistent ved Psykiatrisk Laboratorium i København og påbegyndte her sine arbejder med histopatologiske forandringer ved multipel sclerose, E-vitamin mangel m.m. Fra 1945 var han konsulent ved Hjernepatologisk Institut i Århus.



Efter at Einarson i 1936 var blevet professor i anatomi ved Århus Universitet, fortsatte han og hans elever med omfattende undersøgelser af nukleinsyreomsætningen både i nerveceller og andre celler i organismen. Einarson mente selv, at bindingen mellem gallocyanin-chromalun komplekset og nukleinsyre var støkiometrisk og konstruerede sammen med sin laboratoriemester et cytofotometer til kvantitative bestemmelser af cellernes nukleinsyreindhold (2,3).

Litteratur

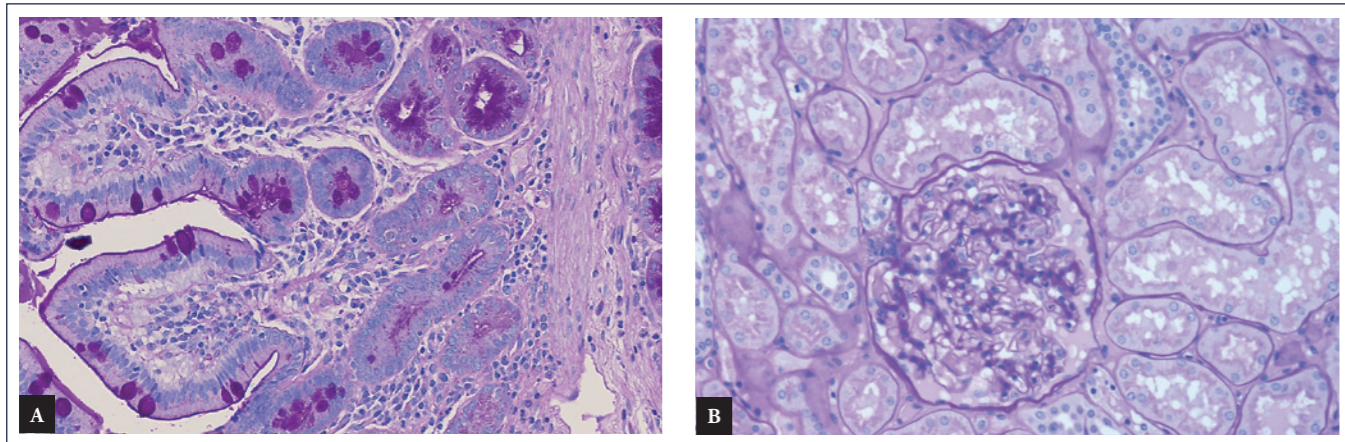
1. Einarson L. A method for progressive staining of Nissl and nuclear substance in nerve cells. *Am. J. Pathol.* 1932;8:295-307.
2. Einarson L. On the theory of gallocyanin-chromalun staining and its application for quantitative estimation of basophilia; a selective staining of exquisite progressivity. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1951;28:82-102.
3. Einarson L, Hansen E. An apparatus for cytophotometry; determination of the relative degree of basophilia of cell structures with special reference to the nerve cells. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl.* 1956;108:151-68.

Figur 3. Billeder af gallocyanin-chromalunfarvning. **A1**: Purkinje celler fra kanin cerebellum, **A2**: Forhorns celler fra medulla spinalis fra hund. Begge fra Einarsons originalartikel (1). **B**: Farvning af ganglieceller i plexus myentericus i colon. Fra elevkasse i forbindelse med hospitalslaborantuddannelsen i 1982. (Annelise Olsen)

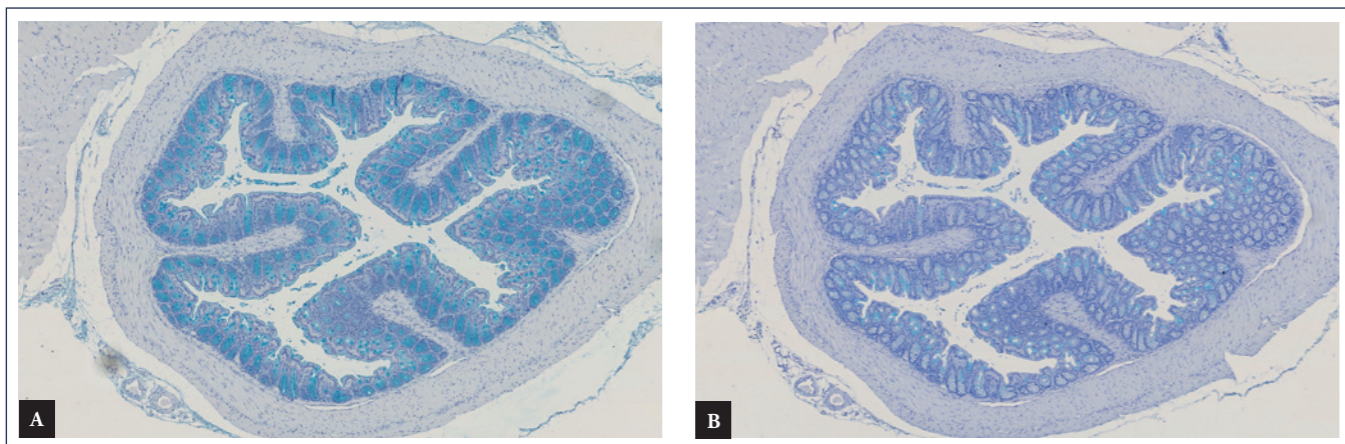
Kulhydratfarvninger

Vi afslutter gennemgangen af de histokemiske farvemethoders udvikling indtil midten af 1900-tallet med 2 farvemethoder, der blev beskrevet netop på dette tidspunkt og begge anvendes som mucinfarvninger: PAS og alcian blue.

PAS (Periodic-Acid-Schiff) blev blandt andre beskrevet af **McManus** i 1946 (17) og har siden været den fortrukne farvemethode til påvisning af glykogen og neutrale glykoproteiner (Figur 2.1.9).

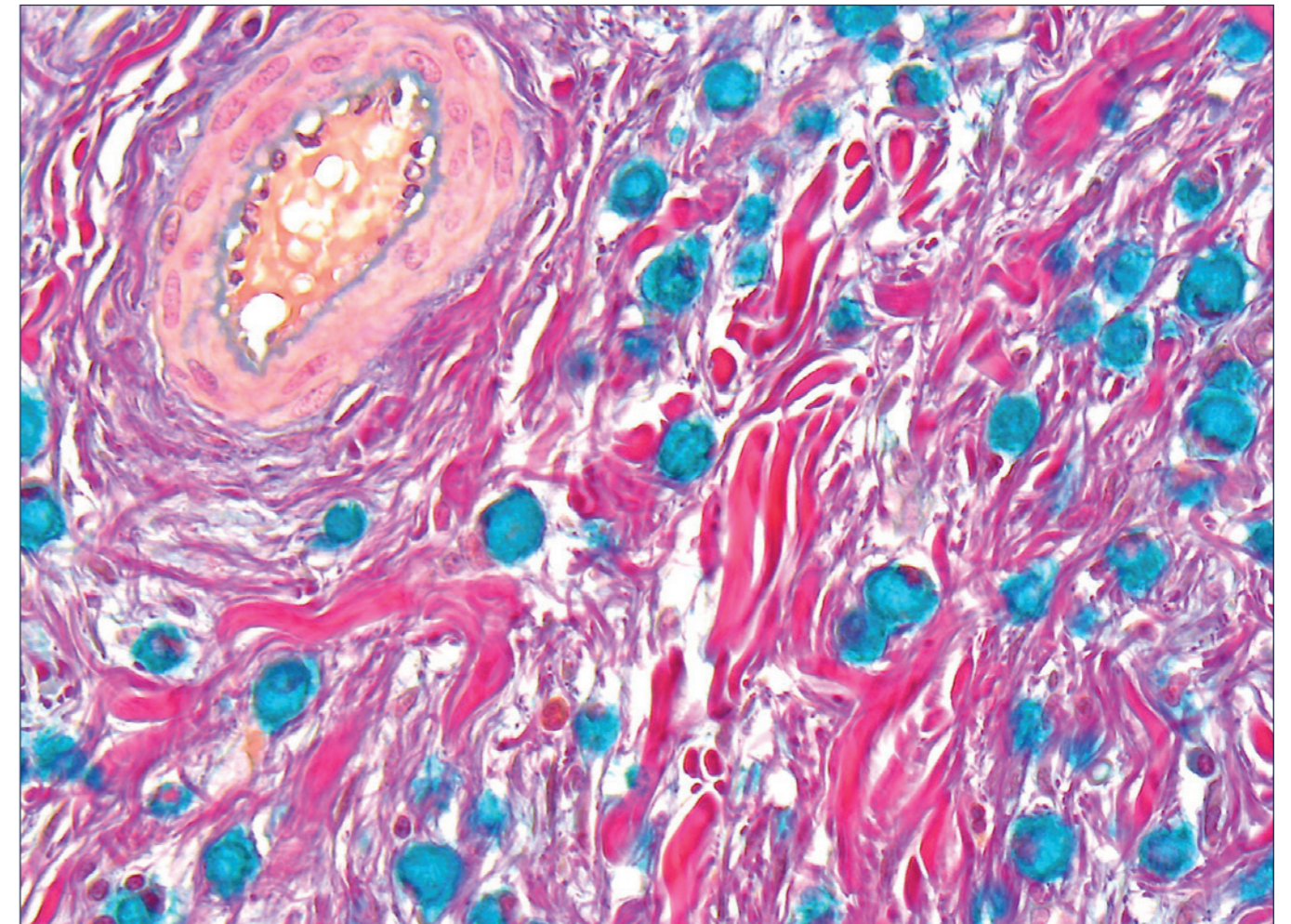


Figur 2.1.9. PAS farvning der i **A** påviser neutrale muciner i duodenalslimhinde og **B** påviser glykoproteiner i basalmembraner og mesangialområdet i nyreglomerulus. (Ole Nielsen)



Figur 2.1.10. Alcian blue farvning af rectumslimhinde hos mus. **A:** Snit farvet ved pH 2.7, hvorved såvel carboxylerede sialomuciner som sulfomuciner påvises. **B:** Farvning ved pH 1, hvor kun sulfaterede muciner farves. (Ole Nielsen)

Alcian blue er et eksempel på et farvestof, der først blev produceret til brug i tekstilfarveindustrien og senere anvendt til histokemisk farvning. Til histologisk brug blev metoden beskrevet af **Steedman** i 1950 (18) og har siden fundet udbredt anvendelse til påvisning af carboxylerede og sulfaterede mucosubstanser (Figur 2.1.10 og 2.1.11).



Figur 2.1.11. Eskelund farvning



Viggo Eskelund (1893-1972) var lektor ved Københavns Universitets Patologisk-anatomiske Institut fra 1944. Han var specielt interesseret i farvemethoder og publicerede i 1957 (19) denne pentakromfarvning, som er en variant af alcian blue-farvningen, og bl.a. farver mukosubstanser blå-grønt, muskellvæv gult, kollagen rødt og elastin violet. Billedet viser farvning af sigillocellulært carcinom, hvor det mucinholdige cytoplasma i tumorcellerne farves grøn-blåt, det omgivende bindevæv rødt. Opadtil til venstre ses en arteriole med gulfarvet muskulatur og violet elastin. (Ole Nielsen)

2.2: ENZYM HISTOKEMI

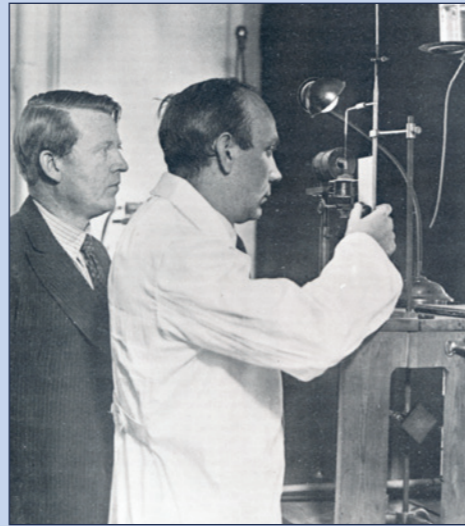
Den første meddelelse om en enzymhistokemisk farvning var formentlig da **E. Klebs** i 1868 beskrev blåfarvning af granulocytter med gujak, en reaktion der skyldes peroxidase (20).

Efterhånden som både kemisk og biokemisk forskning i begyndelsen af 1900-tallet havde klarlagt enzymernes betydelige rolle for cellers og vævs stofskifte, opstod naturligt et ønske om at bestemme deres lokalisation og således beskrive det strukturelle grundlag for cellernes enzymatiske aktivitet.

Et væsentligt bidrag til denne beskrivelse blev de undersøgelser, der i perioden fra 1930 og derefter blev udført på Carlsberg Laboratorium i et tæt samarbejde mellem **Kaj Linderstrøm-Lang** og **Heinz Holter** (Boks 2.5) og medarbejdere. Det blev til publikationsrækken *Bidrag til den enzymatiske Histokemi*, hvor man opfandt og udviklede mikrometoder til påvisning af enzymatisk aktivitet i kvantiteter, der var en tusindedel af, hvad de dengang gængse metoder krævede. I nogle tilfælde kvantiteredes enzymaktiviteten på enkelt celle niveau. I 1934 udkom arbejder der for første gang beskrev fordelingen af pepsin, syre, esterase og peptidase producerende celler i maveslimhinden hos svin (21). Det var ikke in situ metoder, idet enzymundersøgelser og histomorfologisk vurdering blev udført på naboseriernit skåret på cryostat. Undersøgelserne fortsatte de følgende år, og i 1950'erne kunne man bidrage til at påvise på organelfraktioner, at dehydrogenase var relateret til mitochondrierne, mens hydrolytiske enzymer som sur fosfatase og cathepsin var lokaliseret i lysosomer.

Gomori (22) og **Takamatsu** (23) beskrev i 1939 uafhængigt af hinanden den første *in situ* reaktion til påvisning af alkalisk fosfatase, og beskrivelsen af azo-farvestofreaktionerne i 1944 blev starten til den nye hydrolasehistokemi. Efter midten af 1950'erne gik udviklingen af nye metoder stærkt.

Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang (1896-1959)



Figur 1. Linderstrøm-Lang og Holter fotograferet i 1936, hvor deres enzymhistokemiske undersøgelser er godt i gang. (Ugejournalen, 19.april 1936).

Boks 2.5

Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang blev uddannet som kemiingeniør i 1919 og fik samme år ansættelse på Carlsberg Laboratorium hos **S.P.L. Sørensen** (1868-1939), der var leder af kemisk afdeling (og er kendt for at have introduceret pH-begrebet). Lang forblev ansat på Carlsberg Laboratorium resten af livet og var fra 1938 professor og leder af kemisk afdeling. Han foretog en række banebrydende fysisk-kemiske undersøgelser af proteiner og enzymer. Han er kendt for at have introduceret betegnelserne primær, sekundær og tertiær struktur om proteinstoffernes rumlige opbygning.

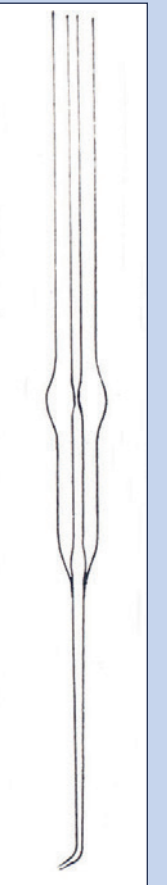
Et stort proteinforskningscenter ved Københavns Universitet er opkaldt efter ham: <http://www1.bio.ku.dk/english/research/bms/research/llc/>

Heinz Holter (1904-1993)

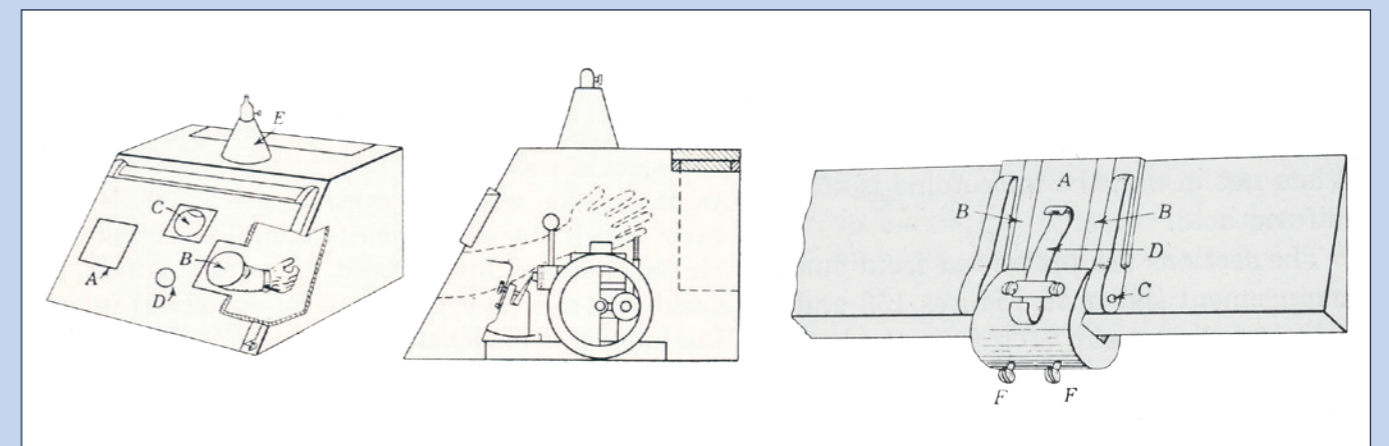
Heinz Holter blev født i det daværende Østrig-Ungarn og læste kemi ved Wiens Universitet, hvorfra han erhvervede doktorgraden i 1928. Han begyndte da at interessere sig for biokemi, og kom i 1930 til Carlsberg Laboratorium på et et-årigt Rockefeller-stipendiat. Han forblev i Danmark og på Carlsberg Laboratorium resten af livet, fik dansk statsborgerskab i 1939, blev leder af cytokemisk afdeling i 1944 og professor og leder af fysiologisk afdeling fra 1956 (Figur 1)

Ved ankomsten til Danmark i 1930 luftede Holter overfor Lang sine tanker om at lokalisere enzymer i væv og celler. Lang greb begejstret ideen og det blev starten på et ca. 20 år langt samarbejde, der medførte en lang række af publikationer: *Bidrag til den enzymatiske Histokemi*. Arbejderne rummede ikke blot væsentlige afklaringer af

enzymhistokemiske forhold i planter og dyr, men også beskrivelser af en række laborietekniske nyskabelser. Foruden opfindelse af geniale mikrometoder til påvisning af enzymaktivitet ned til celleniveau (1), konstrueredes også cryostaten med tilhørende rulleplade (Figur 2), som blev prototype for senere kommercielt producerede cryostater (2). Ligeledes blev restriktionspipetten (Carlsberg pipetten) (Figur 3) opfundet i denne periode. Pipetten fandt vid udbredelse i laboratorier verden over indtil den blev afløst af engangspipetterne.



Figur 3. Carlsberg restriktionspipetten.



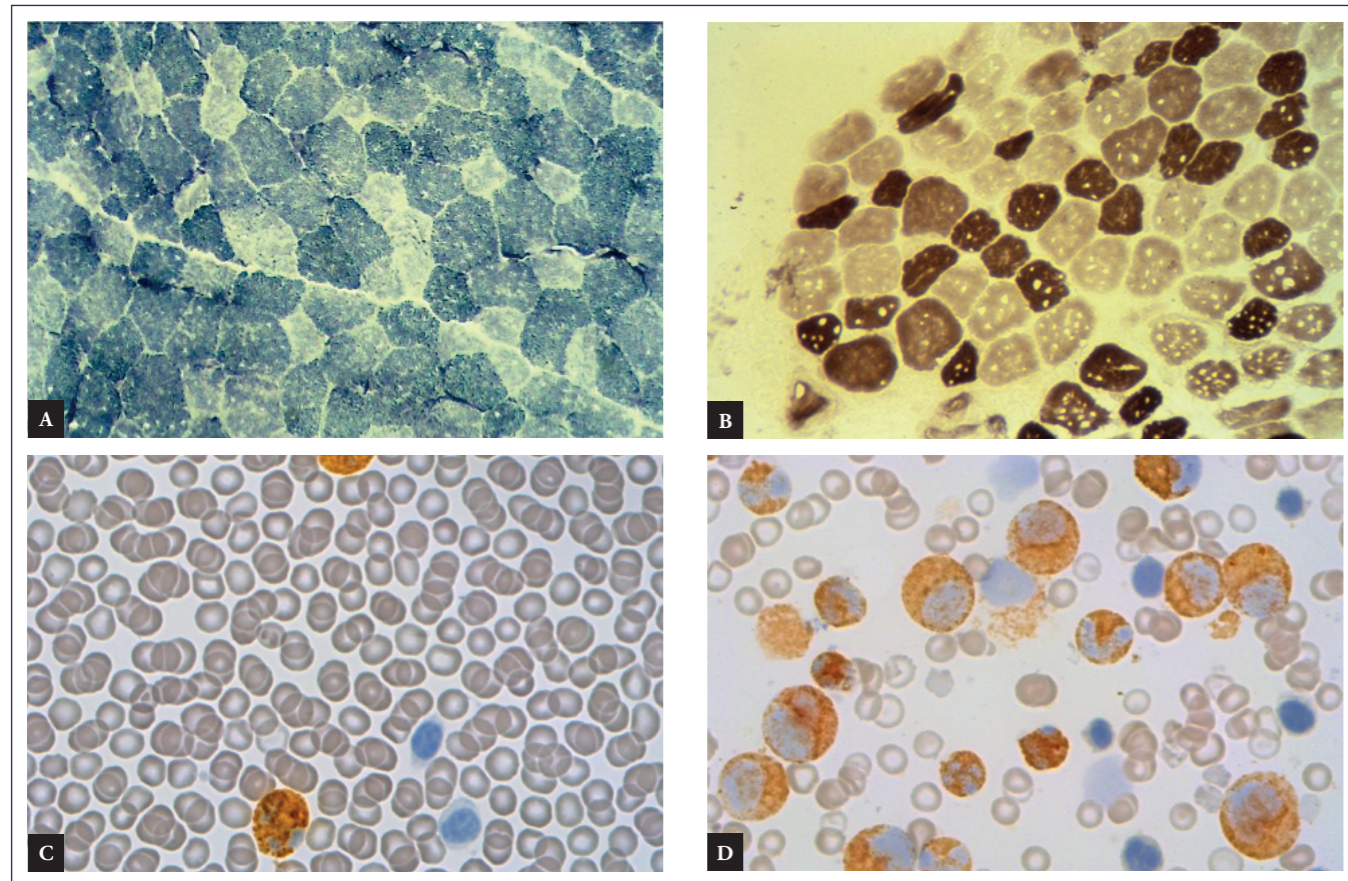
Figur 2. Lang-Mogensen cryostaten med tilhørende rulleplade. (2)

Litteratur

1. Holter H, Linderstrøm Lang K. Micromethods and their application in the study of enzyme distribution in tissues and cells. *Physiol Rev* 1951;31:432-48.
2. Linderstrøm-Lang K, Mogensen KR. Studies on enzymatic histochemistry XXXI: Histological control of histochemical investigations. *C R Trav Lab Carlsberg Chim* 1938;23:27-34.

A.G. Everson Pearse skrev i førsteudgaven af sin *Histochemistry, theoretical and applied* fra 1953, at der nogle år før udgivelsen kun kendtes metoder til påvisning af 2-3 enzymer, men at antallet da var omkring 18. 5 år senere var antallet 45 og yderligere 8 år efter kunne 75 enzymer påvises og yderligere ca. 30 kunne lokaliseres ved simple tilpasninger af eksisterende teknikker.

De enzymhistokemiske metoder blev anvendt i betydelig grad i forskning også på ultrastrukturelt niveau. Fra dansk side forligger flere disputatsarbejder inden for embryologi (se 3.1), hæmatologi (24) og mammapatologi (25), hvor enzymhistokemiske metoder er anvendt. I diagnostisk histopatologi er det specielt inden for hæmatologi og muskelpatologi at metoderne har fundet anvendelse (Figur 2.2.1).



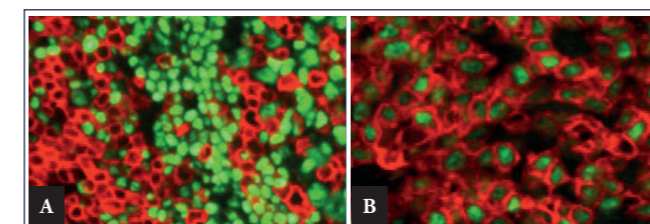
Figur 2.2.1. Enzymfarvninger. **A+B:** Farvning af snit af tværstribet muskulatur. **A:** NADH-dehydrogenase og **B:** ATP-ase. **C+D:** Farvning for peroxidase. **C:** Normalt blod med positiv reaktion i neutrofile granulocytter og negativ reaktion i lymfocytter. **D:** Knoglemarvsceller med positiv reaktion reaktion i myeloide celler. (Henrik Daa Schröder, Ole Nielsen, Annelise Olsen)

2.3: IMMUNHISTOKEMI

Tanken om at drage fordel af antistoffernes umådelige specificitet over for deres respektive antigener og ved passende mærkning af antistofferne, at udnytte dem som "farvereagenser" er ikke ny. I 1930 kunne **L. Reiner** vise, at det var muligt at koble diazoteret atoxyl (natriumsalt af aminophenylarsonsyre) til antistoffer mod pneumokokker og på denne måde fremstille et "antibody dye" der bibeholdt immunreaktiviteten (26). Det blev bekræftet i 1934 af **John Marrack** (27) og i 1941 tog **Albert H Coons** og medarbejdere ideen op (28) og afprøvede den på histologisk materiale. Den farvereaktion, der opnåedes var dog for svag til at gøre den anvendelig som histokemisk metode.

2.3.1: Immunfluorescensmetoder

Coons anvendte i stedet kobling med det blå fluorescerende β -anthryl isocyanat og opnåede anvendelige resultater i ultraviolet lys. For at opnå større kontrast til vævets autofluorescens skiftede han i 1942 til det grønt fluorescerende fluorescein-4-isocyanat, der gav et tilfredsstillende resultat (29). Efter en forsigtig start i 1940'erne, der vanskeliggjordes af, at de fleste var nødt til at lave antistoffer og konjugater selv, blev metoden fra midten af 1950'erne anvendt i tiltagende grad. Medvirkende hertil var nye mere velegnede og efterhånden kommercielt tilgængelige konjugater bl.a. FITC (fluorescein isothiocyanat), TRITC (tetramethyl rhodamin isothiocyanat) og Texas Red (sulforhodamin 101) (Figur 2.3.1.1) og udvikling af fluorescensmikroskoper med interferensfiltre (se 3.3.1).



Figur 2.3.1.1. Immunfluorescensfarvninger anvendt som dobbeltfarvninger. **A:** Snit fra reaktiv lymfeknude. **B:** Snit fra lymfeknude hos patient med B-CLL. Snittene er farvet for PAX-5 (grønt) med Alexa Fluor 488 (FITC), og for CD5 (rødt) med Alexa Fluor 594 (Texas Red). (Michael Bzorek)

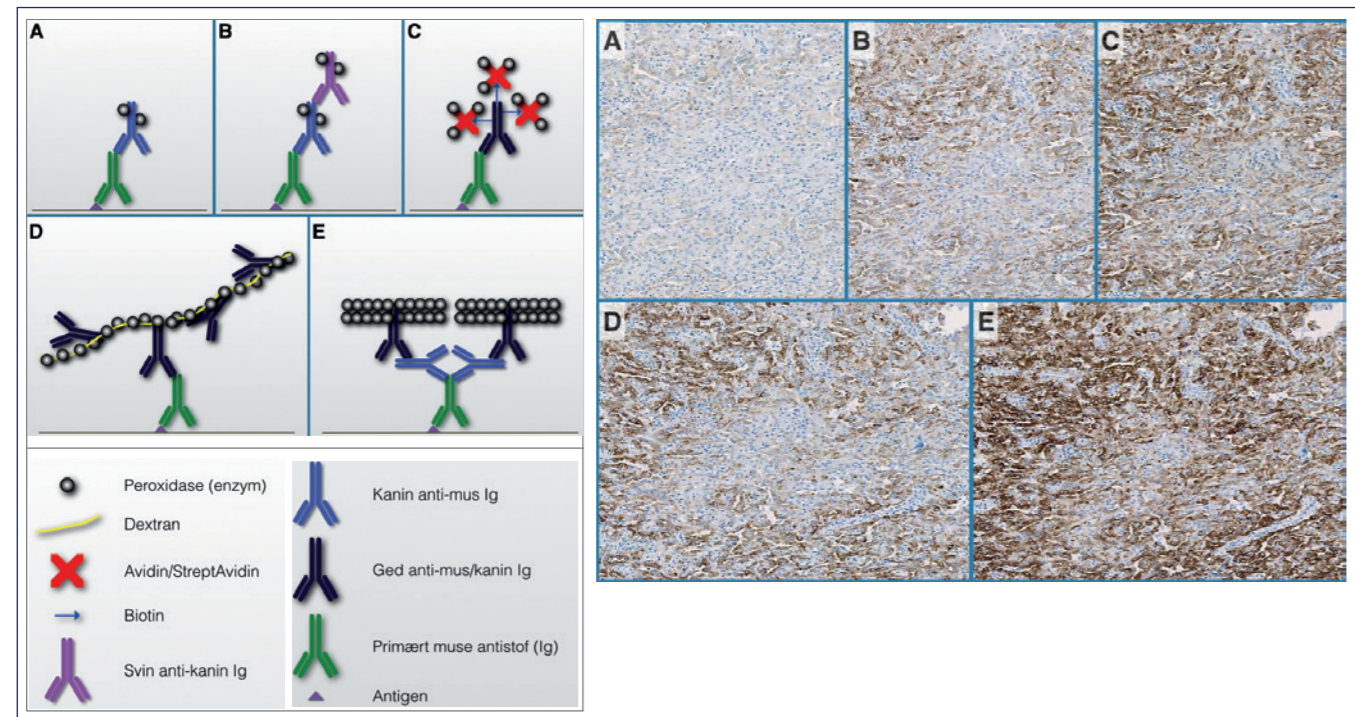
Metoden er blevet anvendt og anvendes udbredt inden for forskning og diagnostik, såvel på væv som cellekulturer. Blandt talrige områder kan nævnes påvisning af mikroorganismer, påvisning af hormoner i hypofyse, pancreas, gastrointestinalkanal og thyreoidea, enzymer og blodtypeantigener i væv (se 3.3.2) og plasmaproteiner herunder specielt immunglobuliner under fysiologiske og patologiske forhold. Klinisk og diagnostisk anvendes metoderne til påvisning af autoantistoffer og ved differentialdiagnostik af glomerulonefritter og bulløse hudsygdomme (se 3.3.3 og 3.3.4). I forbindelse med flowcytometri til differentialdiagnostik af hæmatologiske lidelser.

2.3.2: Enzym-immunhistokemiske metoder

I 1966 indledtes en ny epoke i immunhistokemien, da **Nakane & Pierce** beskrev anvendelsen af enzymerkede antistoffer til lokalisation af antigener i væv (30). Blandt de enzymer, der derefter blev afprøvet er det især peroxidase (udvundet fra peberrod) og i mindre udstrækning alkalisk fosfatase, der har fundet anvendelse. Til immunhistokemisk brug frembyder enzymerkede antistoffer en række fordele. Reaktionsproduktet, der er permanent, kan betragtes i almindeligt lysmikroskop og tillader således samtidig vurdering af vævets morfologi, på linie med de "klassiske" farvemetoder. Yderligere kan metoden, da reaktionsproduktet er elektrontæt, anvendes i forbindelse med elektronmikroskopi, hvor også ferritin og specielt guld anvendes.

De enzymimmunhistokemiske metoder har siden 1966 gennemgået en række modifikationer, der har tilsigtet at øge metodernes sensitivitet (Figur 2.3.2.1).

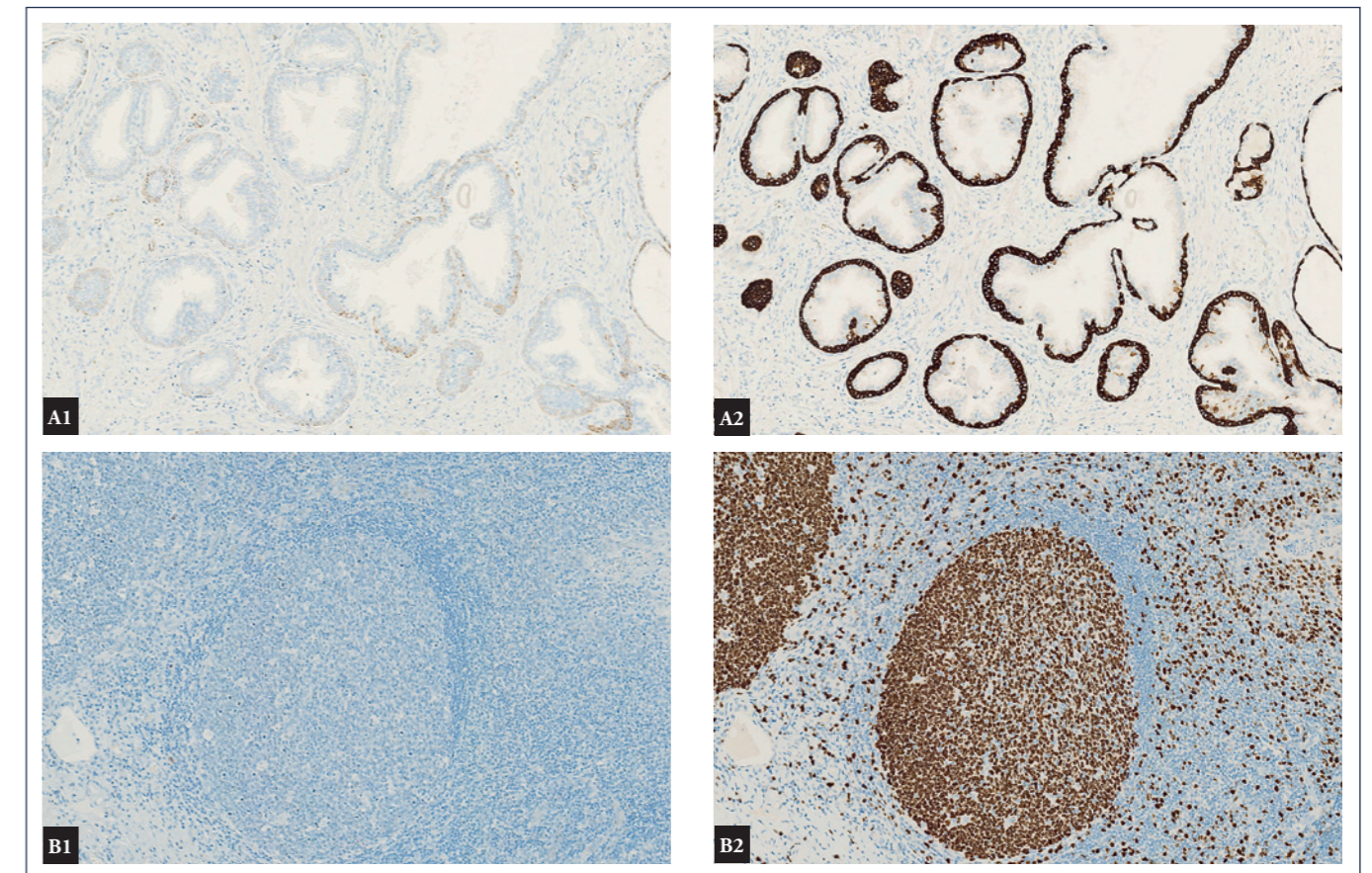
En vigtig parameter i forbindelse med immunhistokemi er **vævsbehandlingen**, der så vidt muligt skal muliggøre bevarelse af den antigene reaktivitet af de strukturer og stoffer, der ønskes farvet. Fra starten blev frysesnit med evt. efterfølgende fiksering i acetone eller ethanol anset for mest skånsom og nødvendig. En metode, der anvendte 75% ethanolfiksering og efterfølgende paraffinindstøbning er især blevet anvendt af nordmanden **Per Brandtzaeg** til påvisning af immunglobuliner.



Figur 2.3.2.1. Udviklingen af de enzymimmunhistokemiske detektionssystemer har tilsigtet at opnå så stort et antal af signalgivende enzymer pr primært antistof som muligt. **A-E** viser til venstre principperne i et udvalg af de systemer, der har været introduceret siden begyndelsen af 1970'erne. **A:** To-lags teknik, **B:** Tre-lags teknik, **C:** Labelled streptavidin-biotin (LSAB), **D:** EnVision (2-lags polymer teknik), **E:** PowerVision (3-lags polymer teknik). Til højre ses de tilsvarende farvningsresultater af renalcellecarcinom farvet for cytokeratin 19, hvor alle metodeparametre inklusive primært antistofkoncentration er konstante, mens detektionssystemerne varierer. (Ole Nielsen).

Afgørende for metodernes anvendelse i diagnostisk histopatologi blev **Clive R. Taylor** og **John Burns** meddelelse i 1974 (31) om at det var muligt at farve plasmaceller og andre immunglobulinholdige celler i formalinfikseret og paraffinindstøbt væv. Det viste sig dog, at ikke alle antigener tålte denne behandling lige godt. Det blev der siden rettet op på, da **Huang** i 1975 (32) fandt at trypsinbehandling af vævet kunne genoprette skaden i det mindste for nogle antigeners vedkommende. Senere beskrev **Shi** et al. i 1991 (33) at forbehandling af paraffinsnittene i passende buffere i temperatur over 100 °C. i mikroovn, kunne "genopvække" antigen reaktiviteten for en lang række af antigener, og denne antigen retrieval-metode indgår nu som standardmetode (Figur 2.3.2.2).

Et væsentligt dansk bidrag til at metoderne hurtigt efter 1974 vandt indpas i diagnostisk histopatologi var, at proteinforskeren **Niels Harboe** (Boks 2.6) få år forinden havde startet sin virksomhed DAKOPATTS. Udbuddet af kommercielt tilgængelige antistoffer og konjugater, der i årene forinden havde været begrænset, blev ved DAKOPATTS' hjælp øget betragteligt og snart kom flere udenlandske firmaer til. Et yderligere skub i udbuddet af antistoffer kom med lanceringen af de monoklonale antistoffer i 1980'erne.

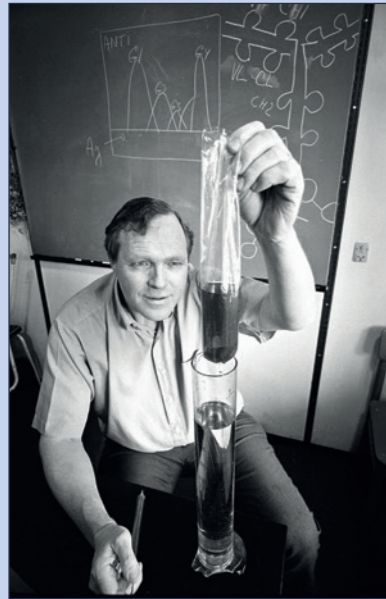


Figur 2.3.2.2. Antigen retrieval. **A:** Immunhistokemisk farvning af prostatavæv farvet for CK14 uden (A1) og med (A2) retrieval. **B:** Farvning af kimcenter i lymfeknude farvet for Ki-67 uden (B1) og med (B2) retrieval. (Ole Nielsen)

Dette voldsomme udbud af antistoffer medførte imidlertid også at man undertiden stødt på reagenser, der ikke fungerede tilfredsstillende og øgede behovet for systematisk kvalitetssikring. Væsentlige danske bidrag hertil er beskrevet i afsnit 4.

Den betydelige øgning i antallet af immunhistokemiske farvninger på patologiske afdelinger har nødvendiggjort en automatisering af farvningerne, og flere forskellige apparaturer er i dag kommercielt tilgængelige.

Niels Mathias Gunnersen Harboe (1918-2006)



Figur 1. Niels Harboe i laboratoriet i 1975. Bag ham ses skitseret på tavlen en krydset immunelektroforese samt den generelle grundstruktur af et immunglobulinmolekyle. (Morten Langkilde-POLFOTO)

Boks 2.6

Niels Mathias Gunnersen Harboe (Figur 1) var efter lægeeksamen i 1945 i årene 1946-1949 på studieophold i, hvad han selv har betegnet som "proteinkemiens Mekka": Uppsala Universitets Fysikalisk-kemiska och biokemiska institutionen. Her blev han oplært i proteinanalyse og proteinseparationsmetoder af danskeren **Kai O. Pedersen**. Instituttet blev ledet af Nobelpristageren **The Svedberg** samt **Arne Tiselius**, der modtog Nobelprisen i 1948, medens Harboe stadig arbejdede på instituttet. Hjemme i Danmark igen i 1949 grundlagde Harboe Elektroforeselaboratoriet ved Københavns Universitet. Det blev senere omdøbt til Proteinlaboratoriet, og Harboe var leder af dette laboratorium indtil 1979.

Foruden en omfattende forskningsaktivitet, der gennem årene kastede en del doktordisputater af sig, havde laboratoriet også i mere end 20 år indtægtsgivende virksomhed ved at udføre analyser af plasma- og urinproteiner for danske hospitaler. Det var analyser, der på daværende tidspunkt krævede stor ekspertise, kostbart udstyr og var meget tidskrævende.

I årene 1965 til 1966 introducerede svenskeren **C.-B. Laurell** den såkaldte "krydsede immunelektroforese" samt "raketimmunelektroforese". Disse teknikker repræsenterede nærmest et kvantespring inden for proteinforskningen og den kliniske immunkemi, idet de muliggjorde hurtig og simpel storskala-analyse og koncentrationsbestemmelse af individuelle proteiner i komplekse proteinopløsninger. Problemet var, at der krævedes mange specifikke antistoffer af høj kvalitet, noget der kun i mindre grad var tilgængeligt på markedet. Ydermere var de antistoffer, man kunne købe, uoverstigeligt kostbare i forhold til et universitetslaboratoriums budget. Helst havde Niels Harboe set, at en antistofproduktion blev etableret i Københavns Universitets regi. Imidlertid var universitetet ikke på nogen måde interesseret. Niels Harboe så derfor ikke anden udvej end i samarbejde med sin bror, **Gunner Harboe**, der var landmand, selv at iværksætte en produktion af antistoffer i kaniner, og i 1966 grundlagdes firmaet DAKOPATTS (de sidste 7 bogstaver er initialerne på Harboes gamle læremestre).

Med udgangspunkt i Niels Harboes store proteinkemiske ekspertise blev monospecifikke, polyklonale kanin-antistoffer med ensartet titer fra batch til batch nu for første gang tilgængelige på markedet, og forskere på Proteinlaboratoriet og fra mange andre laboratorier blev gavmildt forsynet med billige eller gratis antistoffer. Firmaet voksede siden under navnet Dako til et verdensomspændende foretagende, hvor hovedfokus efterhånden skiftede til produktion af antistoffer og andre reagenser til det immunhistokemiske område. Dako udvikler og producerer dog stadig antistoffer til brug for klinisk immunkemi og flowcytometri, samt reagenser og kits til molekylærpatologi.

Tidsmæssigt afspejler og præger Dakos produkt-lanceringer på mange måder udviklingen inden for immunhistokemien: 1971 kom de første fluorochromkonjugerede antistoffer efterfulgt i 1972 af enzymkonjugater. 1974 var året, hvor Dakos nye, følsomme peroxidase-anti-peroxidase-visualiseringsreagens (PAP), oprindeligt beskrevet af **Sternberger** i 1970 (1), blev udviklet. Med dette Dako-reagens lykkedes det **Clive R. Taylor** fra Oxford at påvise immunglobuliner i arkiveret, formalinfikseret væv på mere overbevisende måde, end det tidligere havde været muligt (2). Herefter tog interessen for og salget af antistoffer til enzymimmunhistokemi for alvor fart. PAP var et dominerende visualiseringsreagens på markedet i ca. 12 år, hvorefter det blev suppleret med og efterhånden afløst af en række Dako-visualiseringsreagenser med endnu større følsomhed og hver deres fordele.

Som indikatorer for en ny, banebrydende udvikling inden for antistofproduktionen blev Dakos første 10 monoklonale museantistoffer sendt på markedet i 1983. Produktporteføljen blev udvidet med et instrument til delvis automatiseret immunfarvning i 1995. Det foreløbige højdepunkt mht. apparatur blev præsenteret i 2014 i form af et fuldautomatisk instrument, der med anvendelse af validerede protokoller udfører alle immunhistokemiske processer - fra afparaffinering over

immunfarvning til modfarvning - på op til 60 vævssnit ad gangen inden for to en halv time.

I 1973 producerede Dako antistoffer mod 23 specifikke antigener/targets. I 2015 var antallet vokset til 225 med en fordeling på 44 polyklonale og 181 monoklonale primære immunhistokemiantistoffer. I alt rummer 2015 kataloget 810 produkter - heraf 11 instrumenter - dedikeret til brug i patologilaboratorier.

Dako har siden 2007 været på udenlandske hænder og blev i 2012 solgt til Agilent Technologies for 12,8 milliarder kroner.

Niels Harboe blev i 1989 udnævnt til æresdoktor ved Københavns Universitet.

Agnete Ingild

Litteratur

1. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18:315-33.
2. Taylor CR. The nature of Reed-Sternberg cells and other malignant "reticulum cells". *Lancet* 1974;2:802-7.

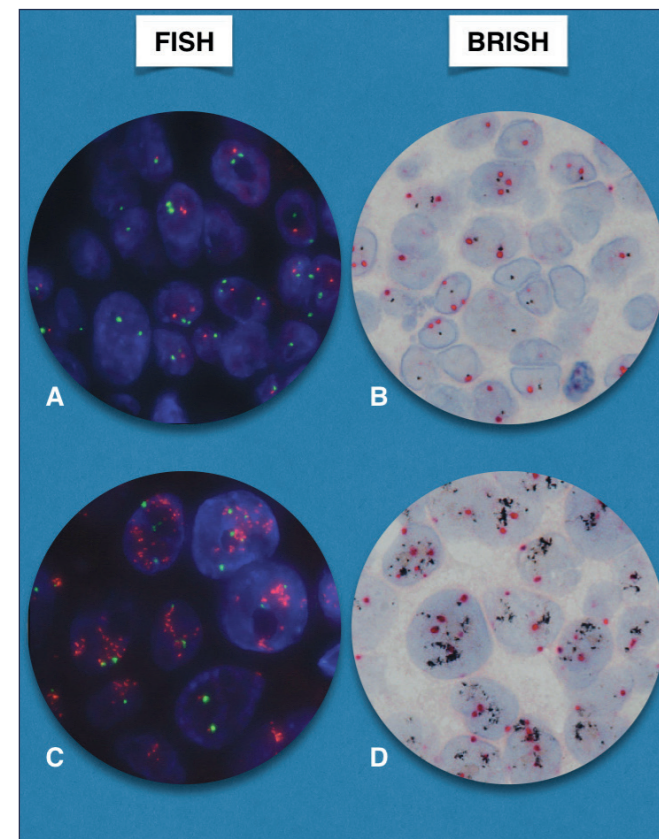
2.4: IN SITU- HYBRIDISERING

Vi afslutter denne historiske gennemgang af de histokemiske metoders historie med en omtale af den nyeste, men næppe den sidste metode: *In situ*-hybridisering, som blev beskrevet første gang i 1969 (34,35).

Metoden muliggør en lokalisering og visualisering af afgrænsede områder af DNA og RNA molekylerne i vævssnit, cytologisk materiale eller dele heraf fx. kromosomer. Dette gøres ved at anvende komplementære nucleotidsekvenser (prober) rettet mod større eller mindre dele af DNA eller RNA enkeltstrengenes nucleotidsekvenser. Proberne mærkes med markører og bringes herefter til at reagere med deres respektive komplementære partnere på nukleinsyrestrengene (hybridiseres), hvorefter reaktionen kan iagttages. Hvis proberne mærkes med fluorescerende farvestoffer (FISH= fluorescens *In situ*-hybridisering), skal reaktionen ses i fluorescens mikroskop. Hvis proben mærkes på en måde, hvor slutreaktionen farves med et chromogen (CISH=

chromogen *in situ*-hybridisering), kan reaktionen ses i almindeligt lysmikroskop, med de fordele dette indebærer som tidligere beskrevet under immunhistokemi. En variant, der anvender sølv betegnes Silver-ISH (SISH). CISH og SISH er begge brightfield *In situ*- hybridiseringsmetoder (BRISH) (Figur 2.4.1).

Metoderne har vundet vid udbredelse inden for mange områder af forskning og diagnostik i cellebiologi, medicin og patologi. De kan bl.a. anvendes til at lokalisere bestemte geners lokalisation eller mangel heraf på kromosomer, til at påvise virus og oncogener i celler og vævssnit, til at påvise forskellige typer af RNA (mRNA, lncRNA og miRNA) i celler, cirkulerende tumorceller og i vævssnit. Inden for cancerforskning og diagnostik anvendes metoderne i stigende grad til at vurdere prognose og remission af sygdom. En del af de nyere anvendelsesområder er beskrevet i kapitel 3.5.



Figur 2.4.1. Eksempler på fluorescens *in situ*-hybridisering (FISH) (A og C) og brightfield *in situ*-hybridisering (BRISH) (B og D) af HER2 og CEN17 påvisning i formalin fikserede paraffinindstøbte xenograft tumorer. MCF7 xenograft viser ikke-amplificeret HER2 gen og kromosom 17 polysomi (A og B). BT-474 xenograft viser amplificeret HER2 gen og kromosom 17 polysomi (C og D). I BRISH teknikken ses HER2 gen signalet som små sorte sølv spots, mens CEN 17 signalet ses som lidt større røde signaler. HER2 FISH signalet er orange-rødt, mens CEN 17 er grønt. (Ventana Medical Systems)

Litteratur

- Raspail FV. L'analyse microscopique et le développement de la fécule dans les cereales. I: Memoires sur la famille des graminées. Paris, 1825.
- Raspail FV. Essai de chimie microscopique appliquée à la physiologie, ou l'art de transporter le laboratoire sur le porte-objet dans l'étude des corps organisés. Paris: Meilhac, 1830.
- Bracegirdle B. A history of microtechnique. New York: Cornell University Press, 1978.
- Gerlach J von. Mikroskopische studien aus dem gebiete der menschlichen morphologie. Erlangen: Enke, 1858.
- Böhmer F. Zur pathologischen anatomie der meningitis cerebromedullaris epidemica. Ärtzl Intelligensbl München 1865;12:539-50.
- Mayer P. Über das färben mit hämatoxylin. Mitt Zool Neapel 1891;10:170-86.
- Mann G. Physiological histology. Oxford: Clarendon Press, 1902.
- Ehrlich P. Beiträge zur kenntnis der anilinfärbungen und ihrer verwendung in der mikroskopischen technik. Arch Mikr Anat 1877;13:263-77.
- Ehrlich P. Methodologische beiträge zur physiologie und pathologie der verschiedenen formen der leukocyten. Z Klin Med 1879;1:553-60.
- Virchow R. Cellularpathologie. Arch Path Anat 1855;8:3-39.
- Pappenheim A. Vergleichende untersuchungen über die elementare zusammensetzung des rothen knochenmarkes einige säugethiere. Arch Pathol Anat Physio 1899;157:19-76.
- Unna PG. Eine modifikation der pappenheimische färbung auf granuplasma. Monatschr Prakt Dermatol 1902;35:76-80.
- Brachet J. Reminiscences about nucleic acid cytochemistry and biochemistry. Trends Biochem Sci 1987;12:244-6.
- Høyer PE, Lyon H, Jakobsen P, Andersen AP. Standardized Methyl-Green-Pyronin Y procedures using pure dyes. Histochem J 1986;18:90-4.
- Schulte EKW, Lyon HO, Høyer PE. Simultaneous quantification of DNA and RNA in tissue sections. A comparative analysis of the Methyl-Green-Pyronin technique with the Gallocyanin-chromalun and Feulgen procedures using image cytometry. Histochem J 1992;24:305-10.
- Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nucleinsäure vom typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive färbung von zellkernen in mikroskopischen präparaten. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1924;134:203-48.
- McManus JFA. Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature 1946;158:202.
- Steedman HF. Alcian Blue 8GS: a new stain for mucin. Q J Microsc Sci 1950;91:477-9.
- Eskelund V. Mucin staining with Alcian blue. Acta Pathol Microbiol Scand 1957;40:107-9.
- Klebs E. Die pyrogene substanz. Z Wiss Med 1868;6:417-8.
- Linderstrøm-Lang K, Holter H, Søeborg Ohlsen A. The distribution of enzymes in the stomach of pigs as a function of its histological structure. Compt Rend Lab Carlsberg 1934;227:1-50.
- Gomori G. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue. Proc Soc Exp Biol Med 1939;42:23-6.
- Takamatsu H. Histologische und biochemische studien über die phosphatase. Trans Soc Pathol Japon 1939;29:492-8.
- Wulff HR. Morphological and histochemical features of leukocytes in experimental inflammation and in disease. Thesis. Copenhagen: Munksgaard, 1967.
- Jensen H. Enzymhistokemiske undersøgelser af fibroadenomatose og mammacarcinom. Disputats. København: F.A.D.L., 1973.
- Reiner L. On the chemical alteration of purified antibody-proteins. Science 1930;72:483-4.
- Marrack J. Nature of antibodies. Nature 1934;133:292-3.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing fluorescent group. Proc Soc Exp Biol Med 1941;45:200-2.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. J Immunol 1942;45:159-170.
- Nakane P, Pierce GB. Enzyme-labelled antibodies. Preparation and application for the localization of antigens. J Histochem Cytochem 1966;14:929-31.
- Taylor CR, Burns J. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase labelled antibody. J Clin Pathol 1974;27:14-20.
- Huang S, Minassian H, More JD. Application of immunofluorescent staining in paraffin sections improved by trypsin digestion. Lab Invest 1976;35:383-91.
- Shi SR, Key ME, Kaira KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave ovenheating of tissue sections. J Histochem Cytochem 1991;39:741-8.
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci 1969;63:378-83.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 1969;223:582-7.

KAPITEL 3: HISTOKEMISKE METODER I FORSKNING OG DIAGNOSTIK

3.1: CYTO- OG HISTOKEMISK FORSKNING VED MEDICINSK-ANATOMISK INSTITUT PÅ KØBENHAVNS UNIVERSITET

af Kjeld Møllgård og Ole William Petersen

3.1.1: Helge Andersen, histokemi-pionér og human-embryolog og cyto- og histokemisk laboratorium

Efter Fr. C. C. Hansens omfattende arbejder vedrørende hæmatoxylinfarvninger omkring århundredeskiftet (se Boks 2.2) var der med enkelte undtagelser (**Harald Okkels** (1898-1970)) relativ beskeden aktivitet indenfor histokemisk relateret forskning på Anatomisk Institut i København det næste halve århundrede.

Dette forhold ændredes radikalt, da **Helge Andersen** (1929-1995) (Boks 3.1) efter medicinsk embedseksamen i 1957 blev ansat ved instituttet som videnskabelig assistent i 1959. Allerede året efter oprettede han og ledede derefter *Cyto- og Histokemisk Laboratorium* ("Laboratory of Cyto- and Histochemistry") (CHL).

Han var mht. histokemi autodidakt og uden egentlig støtte eller oplæring fra ældre forskere eller kolleger, og han må betegnes som den nyere histokemis pionér og grundlægger i Danmark. Fra instituttets tredeling i 1965 og til sin pensionering 1983 var han lektor og afdelingsleder ved Medicinsk Anatomisk Institut A. Hans hovedforskningsområde var histokemiske undersøgelser af embryologiske forhold, specielt vedrørende led- og knogleudvikling, hvilket resulterede i disputatsen "*Histokemiske undersøgelser over udviklingen af led- og knoglesystemet hos humane fostre i første halvdel af den prenatale periode*", som indleveredes til Københavns Universitet i 1968 og blev forsvaret i 1970 (1).

Boks 3.1

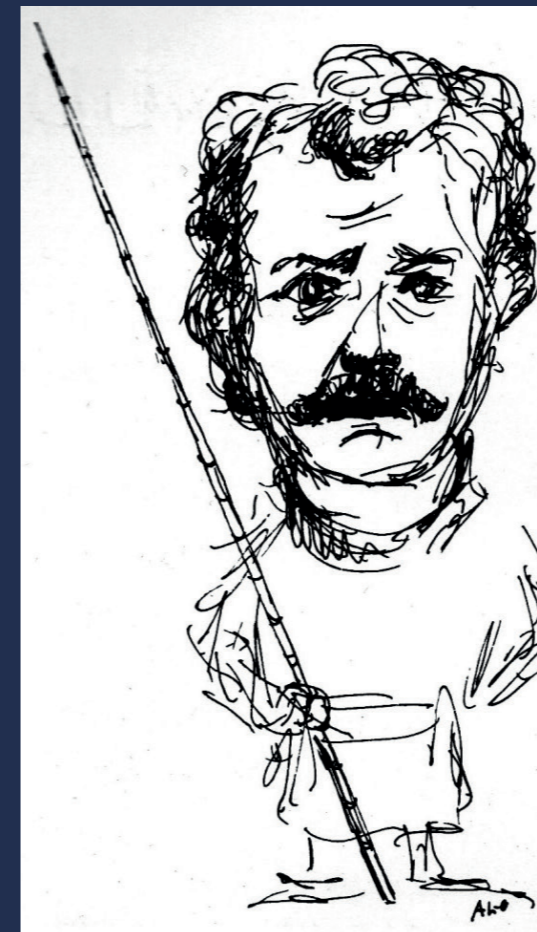
Ojenvidneberetninger fra Troldmandens værksted

Nørre Alle anno 1968 ved *Kjeld Møllgård*

Jeg blev i sommeren 1968 ansat som videnskabelig assistent på Medicinsk Anatomisk Institut A direkte fra eksamensbordet, dog efter 4 års ansættelser ved instituttet som demonstrator og instructor anatomiae. Helge Andersen havde indvilget i at oplære mig i histokemi og embryologi, så i modsætning til autodidakten Helge kom jeg i mesterlære i selveste troldmandens værksted. I hans laboratorier var der utallige hylder med flasker fyldt med diverse basiske substanser og naturligvis med svovlsyre, salpetersyre, saltsyre, ja selv pikrinsyre ved siden af den uundværlige is-eddikesyre. Og der var store metalbøtter med rigtig mange forskellige farvestoffer i pulverform, f.eks. 3 kg Alcian blue fra G. T. Gurr ved siden af Astrablau og det obligatoriske toluidin blå; og desuden allehånde

kemikalier, utallige enzymer - især mange fosfataser, peptidaser og dehydrogenaser -, sjældne mineraler, og godt med cyan-forbindelser og andre giftstoffer, dog oftest i aflåste giftskabe! Her huserede Helge, kærligt portrætteret i de medicinstuderendes årsskrift 'Bugpressen' (Figur 1) med sort rullekravesweater og brun duvetinejakke, blandt rygende kvælstof- og CO₂ bomber, og selv rygende med ild i snadden, når der ankom frisk abortmateriale fra Storkøbenhavns gynækologiske afdelinger afhentet i bil af afdelingens histolaboranter.

På instituttets cyto- og histokemiske afdeling herskede et frugtbart miljø skabt af engagerede forskere og laboranter. Alle trådte til når der kom frisk materiale. Der blev ringet rundt, og forskere fra nær og fjernt dukkede op for at få hver deres del af "kagen" - dvs. materiale til deres specifikke forskningsområder.



STORE MÆND I SVØB 2

ANDERSEN, HELGE

(Danmarks svar på George Brassens).

Blå bog: Fisket op i det sydfynske øhav, solgt for spotpris til Anatomisk Institut, hvor han indlemmedes i studiesamlingen. Har siden glædet mange generationer af vordende dumpekandidater med sine underholdende foredrag. Hans store interesse for selv de mindste detaljer førte ham naturligt over i histologien og videre til histokemien. Er karakteriseret ved autonom vækst og stor flid, selv om han ikke kan betegnes som Moe-rakker.

Valgsprog: Man ka' godt spotte folk, u'en å se ne' på dem!

Adresse: Anatomisere-instituttet.

Figur 1. Fra 'Bugpressen, Våren 1965', hvor det antydes at Helges opvækst som skipperson på Ærø afspejlede sig i han umiskendelige sy-fynske accent.

Fra Nørre Alle til Panum Institutet ved Ole William Petersen

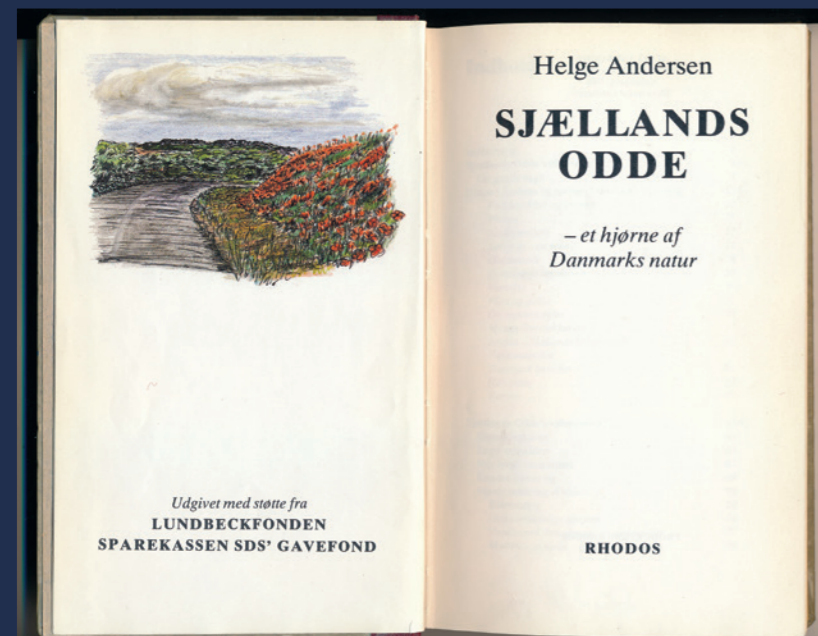
Det tidsmæssige continuum og harmoniske helhedspræg på Cyto- og histokemisk Laboratorium der ovenfor er beskrevet, blev på mange måder afbrudt ved overflytningen af de anatomiske institutter fra Universitetsparken og Rådmandsgadekomplekset til Panum Institutet fra 1979. Panum med dets brutale betonudtryk blev aldrig rigtig adopteret af Helge og afdelingen uddifferentieredes, således at cytokemien i sin rene form foruden af Helge kun blev forestået af Charly Garbarsch og Poul Erik Høyer.

Jeg havde fornøjelsen at starte som stud. med. 1981 som hjælpelærer i speciel histologi med Helge Andersen, som lærer. Jeg kan bekræfte det narrative i Helges måde at docere faget på. En fortællekunst og en evne til at tegne på tavlen, som var meget få beskåret og som tryllebandt lytteren. Jeg var meget beæret over at være hjælpelærer og opsnappede mange pædagogiske fif, som jeg har haft glæde af i mit eget virke senere i livet. Helge må have opfanget min interesse, for jeg blev inviteret op i de "hellige haller" i bygning 18 på 4. sal., som jeg med glæde og stor forventning tog i mod i sommeren 1981. Det gik hurtigt op for mig at Helges indsigt i den humane histologi kun var en flig af hans enorme viden,

og at hans egentlige passion var validiteten af de histokemiske teknikker og ikke mindst de potentielle fejlkilder som knyttede sig til dem. På den måde blev jeg begunstiget med en kritisk sans for histokemiske metoder, som jeg aldrig vil glemme, og som viste sig i det hele taget at karakterisere histo- og cytokemikere. Netop derfor kunne det slå gnister selv i det lille miljø, som nu karakteriserede afdelingen, for jeg kom på et tidspunkt, hvor de gudbenådede mikroskopikere – hvad enten det foregik i real tid ved 37 C varmerum eller ved 4 C i kølerum – skulle konkurrere med mikrospektrofotometerets velsignelser. Plusser og tider blev diskuteret intenst mod tal med mange decimaler. Jeg lærte begge dele og værdsætter den dag i dag, hvorledes man opnår det bedste resultat ved både at iagttage instrumenternes begrænsninger og blænde sine observationer. Jeg var det meste af tiden den eneste student i den rene histo- og cytokemi og blev "forkælet" med vejledning fra alle sider, som set i bakspejlet ikke står mål med noget man kan opleve i dag. Selvfølgelig fordrede det også en diplomatisk tilgang til vejlederne udover hvad der måtte knytte sig til måden at evaluere resultaterne på.

Når jeg for eksempel var i laboratoriet med Helge, så var de her "moderne" plasticpipetter bandlyst. I det hele taget skulle man ikke blande plastic sammen med cytokemi. Men jeg kunne jo godt se på hylderne hvordan glasvarerne stille og roligt blev udkonkurreret af engangsvarerne og hvordan forsøgene med Poul Erik Høyer blev udført mere liberalt i den henseende.

Som det turde fremgå af ovenstående romantiserer jeg tiden på 18.4 under min studietid, men jeg kan ikke andet, for sådan var det at stå i lære blandt så begavede og generøse mennesker herunder ikke mindst Helge Andersen. Heldigvis nåede jeg at modtage en bog om Odsherreds flora og fauna forfattet af Helge i gave ved min disputats i 1990 med et tillykke med "de fem bogstaver og to punktummer" (dr.med.). En bog skrevet med akkurat samme nidkærhed som var det histo- og cytokemiske observationer der skulle beskrives – og nu uden smålig skelen til kvantitative målinger (Figur 2).



Figur 2.

Allerede fra starten af 1960'erne arbejdede andre kolleger med histokemi og fosterudvikling på CHL tiltrukket af Helges entusiasme og meget store viden. **ME Matthiessen**, tandlæge og læge og fra 1967 afdelingsleder og lektor, begyndte allerede i 1962 som frivillig assistent ved CHL sit store arbejde med tandudviklingen hos humane fostre. I alt 9 artikler blev sammenfattet til disputatsen, der blev forsvaret i 1973 (2). Også **Charly Garbarsch**, lektor ved instituttet fra 1967, startede primært med histokemiske undersøgelser af humane fostre, især med henblik på tarmudviklingen (3), før han gav sig i kast med eksperimentelle undersøgelser af kaninens aortavæg, som senere blev hans disputats emne. Men han fortsatte instituttets bindevævsforskning bl.a. i samarbejde med Ib Lorenzen og hans gruppe.

Niels Ehlers, senere professor i øjensygdomme ved Aarhus Universitet, startede først i 1960'erne i CHL med at beskrive *Histokemien og udviklingen af humane øjenlåg* i samarbejde med Helge Andersen og ME Matthiessen. Senere blev det til mange histokemiske arbejder især om corneas udvikling (4).

I 1968 blev **Kjeld Møllgård** ansat (se nedenfor).

Da **Poul Erik Høyer** kom til først i 1970'erne, kom der for alvor gang i udviklingen af den kvantitative histokemi, steroiddehydrogenase undersøgelser (5,6) og gonadeudvikling, dette sidste i et frugtbart samarbejde med AnneGrete Byskov fra Laboratoriet for Reproduktionsbiologi på Rigshospitalet. Høyer blev laboratoriets histokemiker par excellence. Han arbejdede gennem alle årene på fagets videreudvikling og trådte også naturligt til som rådgivende redaktør af tidskriftet *Histochemical Journal*, da Helge Andersen fratrådte. Høyer bibeholdt sin interesse for stamceller herunder kønsstamceller i hele sin karriere (7-9), men en hovedinteresse gennem alle årene var selve grundlaget for histokemien, herunder fikseringens betydning og brugen af forskellige blokeringsmidler (10,11). Poul Erik var altid villig til at vejlede såvel yngre som ældre forskere med deres forskellige histokemiske problemstillinger, bl.a. med en uhyre grundig gennemgang af deres artikler. Den gamle redaktør fornægtede sig ikke.

Morten Møller startede ligeledes i afdelingen først i 1970'erne (se 3.2).

Bo van Deurs startede på Anatomisk Institut midt i 1970'erne. Han specialiserede sig i immunhistokemi på ultrastrukturelt niveau og skrev disputats i 1981 (12). Hans forskningsområde fokuserede på endo- og exocytose af proteiner. I et stort mangeårigt internationalt samarbejde, specielt med Kirsten Sandvig ved Universitetet i Oslo, og brug af forskellige muse knock out modeller og *in vivo* manipulation af dyrkede celler, har han bidraget til forståelsen af mekanismer bag proteinsekretion.

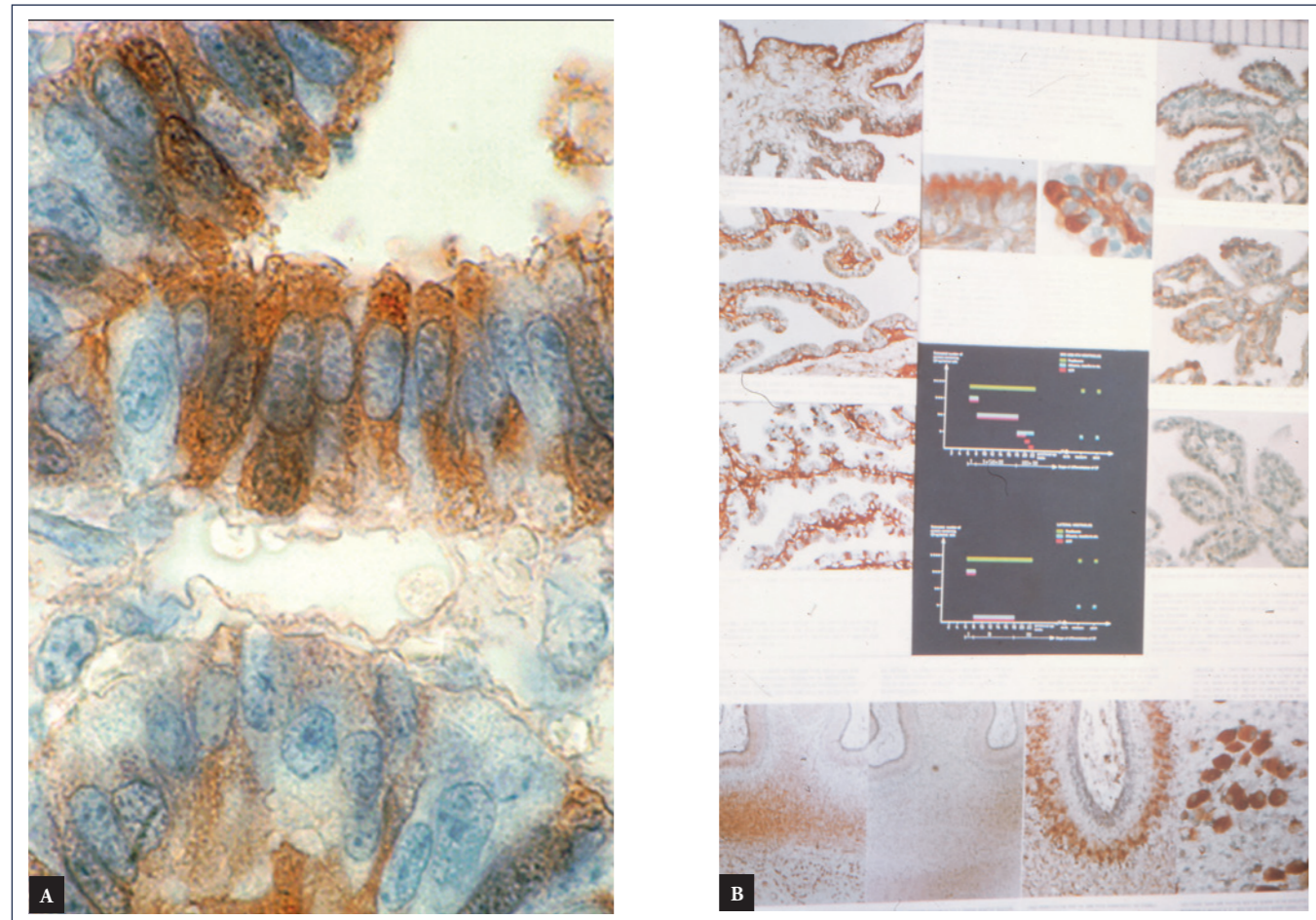
Ole William Petersen blev ansat på afdelingen i 1983 (se nedenfor).

3.1.2: Om Kjeld Møllgårds forskningsarbejde på CHL

I august 1968 stod **Helge Andersen** med et stort afsluttet disputatsprojekt, samt med en opfordring til at beskrive den histokemiske baggrund for den humane adenohipofyses udvikling. Denne anmodning kom fra redaktionskomiteen (Graumann, Lojda, Pearse, Schiebler) bag et nystartet ambitiøst histokemisk tidskrift *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, Gustav Fischer Verlag.

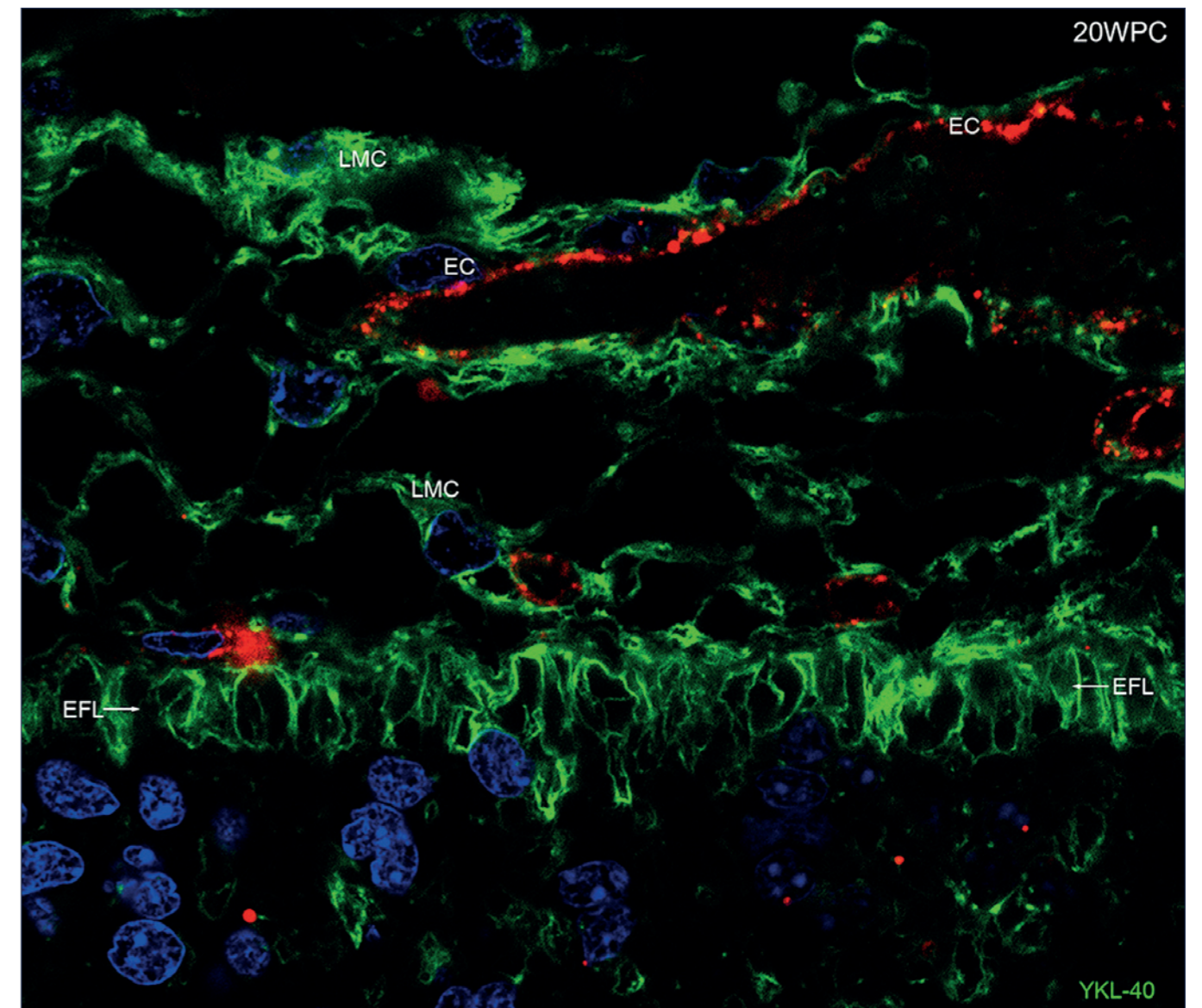
Kjeld Møllgård (KM) havde udtrykt interesse for at arbejde med human hjerneudvikling, hvis det kunne lade sig gøre, så en indføring i histokemi og human embryologi med udgangspunkt i hypofyseudviklingen var lige, hvad han trængte til på daværende tidspunkt (13-15). Fremtidsudsigten var lovende. Helge Andersen havde et utal af histokemiske metoder kørende, men også basismaterialet i form af hundredevis af paraffinblokke fra yderst velfikserede humane fostre, altså en fostersamling baseret på tidligere indsamlede embryoner og fostre fra gynækologiske afdelinger i Københavnsområdet. Dertil kom en ugentlig tilgang af nyt fostermateriale bl.a. til brug for direkte frysemikroskopi og også elektronmikroskopi, som magister **F v. Bülow** kom til at stå for. KM opdagede tidligt i forløbet et yderst aktivt og ret ukendt område i menneskefosterhjerne, det subcommissurale organ, der lå oven for hypofysen og anvendte, med stor hjælp af Helge, alle laboratoriets histokemiske metoder til nærmere karakterisering af organet (16). Det blev starten til et senere disputatsarbejde, der inkluderede fluorescens mikroskopi af organets serotoninerge innervation samt elektronmikroskopi. Disputatsen (17) blev forsvaret ved Lunds Universitet i 1979.

I løbet af de næstfølgende år afholdt afdelingen brede kurser i basal histokemi, hvorved der knyttedes kontakt til andre aktive forskergrupper. De yngre aktive patologer **Per P. Clausen**, **Grete Krag Jacobsen** og **Marianne Jakobsen** deltog i kursusaktiviteten som undervisere i immunhistokemi og så fulgte forskningssamarbejder som bl.a. resulterede i den første påvisning af plasmaproteiner, inklusive alfa-føtoprotein i fosterhjernen (18). Immunhistokemien blev herefter for alvor taget i brug i CHL. Marianne Jacobsen kom jævnligt på besøg, og der blev publiceret en jævn strøm af artikler (19,20) i starten af 1980'erne, som førte frem til Marianne Jacobsens disputats, der blev forsvaret sommeren 1986 (21). I publikationerne indgik omfattende tællinger af plasma protein-positive epitelceller fra humant føtalt plexus choroideus (Figur 3.1.2.1).



Figur 3.1.2.1. Figuren viser til venstre immunperoxidasefarvning af albumin-positive epitelceller i plexus choroideus fra et tidligt menneskefoster. Albumin transporteres gennem en subpopulation af epitelcellerne fra blod til cerebrospinal væske. Til højre foto af posterpræsentation af resultaterne beskrevet i ref. 18.

De histokemiske arbejder, der i midt-firserne udgik fra CHL, afspejlede udviklingen i faget og omfattede såvel klassisk histokemi som fluorescenshistokemi, immunhistokemi og kvantitativ histokemi suppleret med 'up-to-date' EM metoder, bl.a. med immunoguld mærkning. Helge Andersens daglige engagerede indsats gennem alle årene var helt uvurderlig. KM 'arvede' hans fostersamling og udbyggede den gennem årene med god hjælp fra mange kolleger til at omfatte flere tusinde paraffinblokke og mere end 100.000 paraffinsnit. I løbet af de senere år er KM nået frem til den konfokale mikroskopiske æra med daglig brug af hjernesnittene fra de mange menneskefostre (Figur 3.1.2.2) og en fortsat høj publikationsrate (22, 23).



Figur 3.1.2.2. Menneskefosterhjernens ydre overflade inklusive de bløde hjernehinder er aktivt signalerende via morfogener og forskellige hormoner. Billedet, der er optaget med konfokal mikroskopi, viser et dobbelt immunmærket snit fra hjernebarken fra et 21 uger gammelt foster. WPC står for weeks post conception. Farvning for YKL-40 er grøn og for von Willebrand faktor rød. YKL-40 farver membraner i endefods laget (EFL) samt i leptomeningeal cellerne (LMC). Endotelcellerne (EC) farves rødt (22, 23).

3.1.3: Om Ole William Petersens forskningsarbejde på CHL

Ole William Petersen (OWP) havde sideløbende med sin gang på Anatomisk Institut også vagter på det daværende Finsen Institut på Strandboulevarden. Her lærte han om kræftsygdomme og blev introduceret til Fibiger Instituttet, som lå på samme matrikel. Fibiger Instituttet var Kræftens Bekæmpelses forskningscenter i København. Han opsøgte her Afdeling for Brystkræft, efter at have læst en artikel i Ugeskrift for Læger om

problemerne med dyrkning af celler fra kræftpatienter herunder problemer med identifikation af cellerne.

Det forekom ham, at man måtte kunne bruge nogle af de fantastisk optimerede metoder, som man havde udviklet på CHL. I et vist omfang havde man allerede taget ideen op inden for patologien, hvor overlæge **Henning Jensen** på Rigshospitalet havde skrevet en disputats om enzymhistokemiske farvninger af brystkræft (*Enzymhistokemiske undersøgelser af fibroadenomatose og*

mammapcarcinoma) med henblik på at finde nye markører for forstadier – i øvrigt med Helge Andersen som den ene af de officielle opponenter. Netop forstadier havde Professor **Torben Schiødt**s interesse på Rigshospitalet og OWP blev introduceret for dem begge.

Det blev starten på OWPs disputatsprojekt, hvor han også havde stor glæde af jævnlig kontakt med overlæge **Dorthe Francis** på Bispebjerg Hospital og overlæge **Klaus Hou-Jensen** på Finseninstituttet. OWP etablerede primærkulturer fra brystkræftbiopsier og karakteriserede cellerne ved sammenligning med deres oprindelsesvæv i samarbejde med **Bo van Deurs**. Metoderne var en videreudvikling af de velkarakteriserede enzymhistokemiske metoder, som han blev introduceret til på CHL. En særlig interesse fik han for oxidoreduktaser og herunder især glucose-6-phosphat dehydrogenase samt dennes påvirkelighed af oxygen. Stringensen blev indpodet af Poul Erik Høyer, for hvem akkuratse og detalje var *raison d'être*. Disputatsen publiceredes i 1990 (24).

Litteratur

- Andersen H. Histokemiske undersøgelser over udviklingen af led- og knoglesystemet hos humane fostre i første halvdel af den prenatale periode. Disputats. Axelholms Bogtrykkeri, 1970.
- Matthiesen ME. Histokemiske og morfologiske undersøgelser af tandudviklingen hos humane fostre. Disputats. FADLs Forlag, 1973.
- Garbarsch Ch. Histochemical studies on the early development of the human small intestine. Acta anat 1969;72: 357-75.
- Ehlers N.: Morphology and histochemistry of corneal epithelium of mammals. Acta Anat 1970;75:161-98.
- Høyer PE, Andersen H.: Specificity in steroid histochemistry, with special reference to the use of steroid solvents. Distribution of 11-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase in kidney and thymus from the mouse. Histochemie 1970;24:292-306.
- Andersen H, Høyer PE.: Studies in succinate dehydrogenase histochemistry. Histochemie. 1973;35:173-88.
- Høyer PE, Byskov AG, Møllgård K.: Stem cell factor and c-kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. Mol. Cell Endocrinol 2005;234:1-10.
- Johansen JS, Høyer PE, Larsen LA, Price PA, Møllgård K.: YKL-40 protein expression in the early developing human musculoskeletal system. J Histochem Cytochem 2007;55:1213-28.
- Lyngholm M, Høyer PE, Vorum H, Nielsen K, Ehlers N, Møllgård K. Immunohistochemical markers for corneal stem cells in the early developing human eye. Exp Eye Res 2008;87:115-21.
- Høyer PE, Kirkeby S.: The impact of fixatives on the binding of lectins to N-acetyl-glucosamine residues of human syncytiotrophoblast: a quantitative histochemical study. J Histochem Cytochem 1996;44: 855-63.
- Moos T, Høyer PE: Detection of plasma proteins in CNS neurons: conspicuous influence of tissue-processing parameters and the utilization of serum for blocking nonspecific reactions. J Histochem Cytochem 1996;44:591-603.
- Van Deurs B. Elektronmikroskopiske undersøgelser af permeabilitet og barriereforhold i rottehjernens mikrovaskulatur og plexus choroideus. Disputats. Medicinsk-Anatomisk Institut A, Panum Institutttet. København, 1981.
- Andersen, H, von Bülow, FA, Møllgård K. The histochemical and ultrastructural basis of the cellular function of the human foetal adenohypophysis. Prog. Histochem. Cytochem 1970;1:153-84.

3.1.4: Fra CHL til ICMM

De metoder og holdninger til videnskabeligt arbejde som Helge Andersen grundlagde i begyndelsen af 1960'erne på CHL videreudvikledes i de næste årtier med en omfattende forskningsaktivitet og adskillige disputatser til følge.

I 2007 samledes dele af hhv. Institut for Medicinsk Biokemi, Medicinsk Fysiologisk Institut og Medicinsk Anatomisk Institut i *Institut for Cellulær og Molekylær Medicin (ICMM)* med forskningsområderne morfogenese og differentiering, medicinsk genetik, RNA og genetisk medicin, glycomics og molekylær aldring.

Lederen af ICMM er i dag **Ole William Petersen**.

De fleste metoder er nye, men ånden fra Helge Andersens tid lever stadig i bedste velgående.

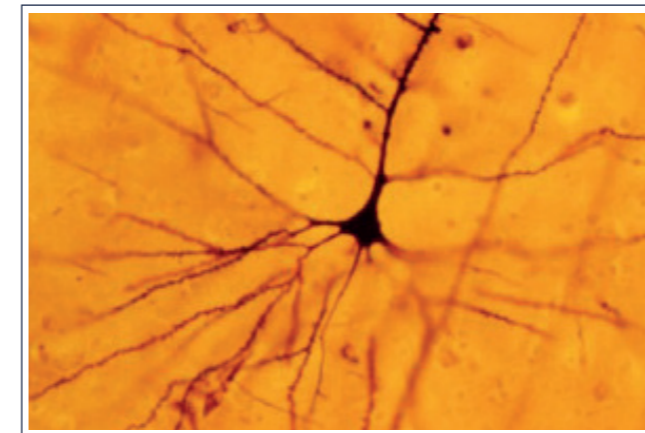
Yderligere oplysninger findes på <http://icmm.ku.dk/>.

- Andersen H., Møllgård K, von Bülow FA. On the specificity of staining by Alcian blue in the study of human, foetal adenohypophysis. Histochemie 1970;22:362-75.
- Andersen H, von Bülow FA, Møllgård K. The early development of the pars distalis of human foetal pituitary gland. Z. Anat. Entw. Gesch 1971;135:117- 38.
- Møllgård K. Histochemical investigations on the human foetal subcommissural organ. I. Carbohydrates and mucosubstances, proteins and nucleoproteins, esterase, acid and alkaline phosphatase. Histochemie 1972;32:31-48.
- Møllgård K. Serotonergic regulation of secretory activity of the subcommissural organ in some rodents. Disputats. Histologiska Institutionen, Lunds Universitet, Sverige, 1979.
- Møllgård K, Jacobsen M, Jacobsen GK, Clausen PP, Saunders, N.R.: Immunohistochemical evidence for an intracellular localization of plasma proteins in human foetal choroid plexus and brain. Neurosci Lett 1979;14:85-90.
- Jacobsen, M, Clausen, PP, Jacobsen, GK, Saunders NR, Møllgård K.: Intracellular plasma proteins in human fetal choroid plexus during development. I. Developmental stages in relation to the number of epithelial cells which contain albumin in telencephalic, diencephalic and myelencephalic choroid plexus. Dev Brain Res 1982;3:239-50.
- Jacobsen M, Jacobsen GK, Clausen PP, Saunders NR, Møllgård, K.: Intracellular plasma proteins in human fetal choroid plexus during development. II. The distribution of prealbumin, alpha fetoprotein, transferrin, IgG, IgA, IgM, and alpha1 antitrypsin. Dev Brain Res 1982;3:251-62.
- Jacobsen M. The occurrence and localization of certain plasma proteins in the developing brain, their possible origin and functional significance – an immunohistochemical study. Disputats. København, 1986.
- Brøchner CB, Holst CB, Møllgård K.: Outer brain barriers in rat and human development. Front Neurosci. 2015 16;9:75.doi:10.3389
- Brøchner CB, Møllgård K. SSEA-4 and YKL-40 positive progenitor subtypes in the subventricular zone of developing human neocortex. Glia 2016;64:90-104
- Petersen OW. Primærkulturer af humant mammaepitel: Karakterisering og dyrkning i serum-frit medium. Disputats . København, 1990.

3.2: HISTOKEMISKE METODERS ANVENDELSE PÅ UNDERSØGELSER AF CENTRALNERVESYSTEMET af Morten Møller

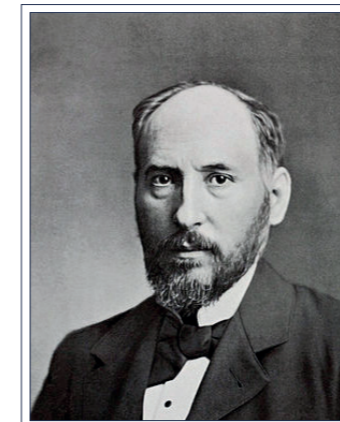
3.2.1: De klassiske sølvimprægnerings-teknikker

I sidste halvdel af attenhundredetallet udvikledes den klassiske sølvimprægneringsmetode for nerveceller af den italienske læge **Camillo Golgi** (1843–1926). Ved at imprægnerer tykke snit af nervevæv med kaliumdikromat og sølvnitrat fik han i 1873 (1) udfældet mikrokrytaller af sølvkromat på nervecellelegemerne og deres udløbere (Figur 3.2.1.1).



Figur 3.2.1.1. Pyramidecelle fra human hjernebark farvet med Golgis sølvimprægneringsteknik.

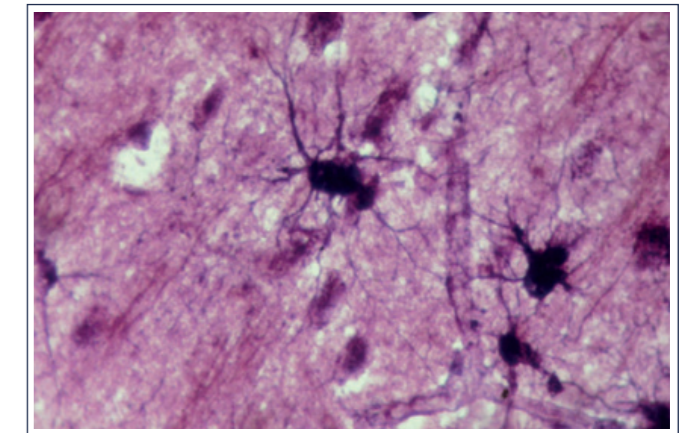
Denne reaktion giver en meget smuk visualisering af hele neuronet, men imprægnerer desværre kun få procent af nervecellerne.



Figur 3.2.1.2A. Santiago Ramón Y Cajal

Golgis farvemethode blev benyttet af den spanske neuroanatom **Santiago Ramón y Cajal** (1852–1934) (Figur 3.2.1.2A), som kortlagde en meget stor del af nervesystemet med denne metode. Santiago Ramón y Cajal betegnes med rette som faderen til den moderne "neuroscience".

Cajal forbedrede senere Golgis farvemethode idet han satte osmium tetroxid til kaliumdikromat-opløsningen (rapid Golgi method). Senere udviklede Cajal selv en neuronfarvemethode (2), hvor sølvnitrat udfældes på neurofibrillerne i nervecellen og dette sølv blev så "fremkaldt" med en fotografisk fremkalder. Endelig, udviklede han en metode for farvning af astrocytter, hvor han imprægnerede vævet med guldklorid og kviksølvklorid (Figur 3.2.1.2B).



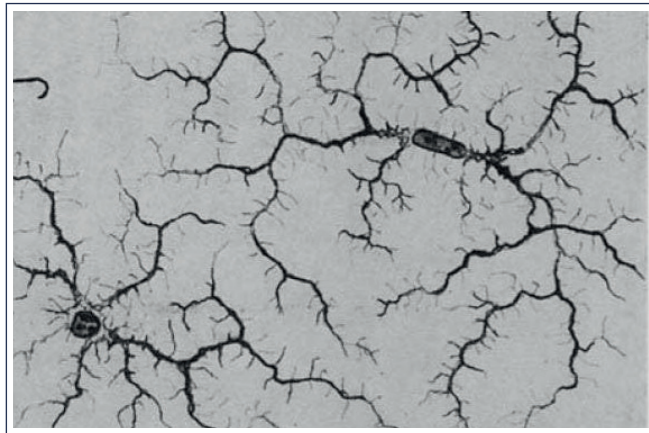
Figur 3.2.1.2B. Cajals guldsublimatemetode for astrocytter. Bemærk fodprocesserne fra astrocytterne, der beklæder kapillærets overflade.

Cajal delte i 1906 Nobelprisen med Camillo Golgi.

En af Cajals elever, **Pío del Río Hortega** (1882-1945) udviklede omkring 1920 en sølvkarbonat imprægneringsmetode for den tredje gliacelle i nervesystemet (Figur 3.2.1.3), - mikrogliaellen (3).

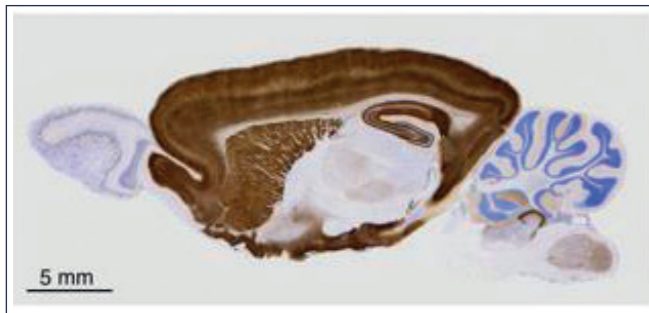
Senere modifikationer af sølvimprægneringsteknikkern har resulteret i at man kan farve degenererende myelin (Marchi) eller degenererende axoner (Nauta). Dette blev i forrige århundrede brugt til eksperimentelt at vise forbindelser i hjerne og rygmarv.

Da mange hjernesygdomme medfører degeneration i centralnervesystemet resulterende i forskellige udfældninger i hjerneparenchymet, har neuropatologer senere udviklet modificerede imprægneringsteknikker for patologiske aflejringer i hjernen, fx. Bielschowsky-metoden for neuritiske plaque (Alzheimers og Picks sygdom) og Gallyas farvning for neuronale plaques og "neurofibrillary tangles".



Figur 3.2.1.3. Mikroglia-celle farvet med Rio Hortegas sølvkarbonatmetode.

I forlængelse af de klassiske metalimpregneringsteknikker af neuroner udviklede prof. **Gorm Danscher** og medarbejdere i den sidste del af det tyvende århundrede en række teknikker (autometallografi) til detektion af forskellige metaller i hjernens celler. Den meget specifikke lokalisering af Zink kan ses i Figur 3.2.1.4.

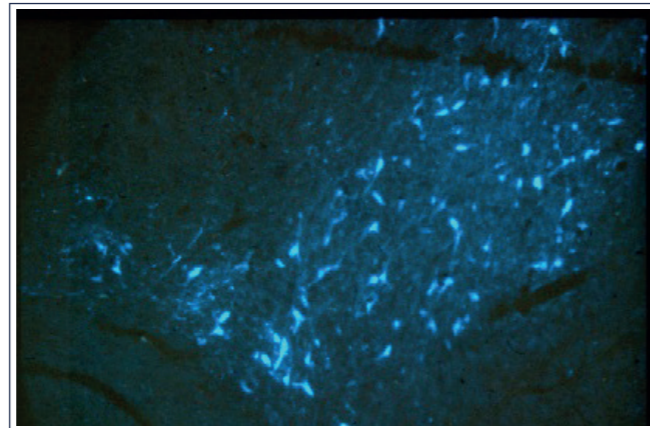


Figur 3.2.1.4. Sagittalsnit gennem rottehjernen hvor Zn-holdige neuroner (brunt reaktionsprodukt) er visualiseret med autometallografi og snittet kontrafarvet med toluidinblåt. (Danscher F, Stoltenberg M. Progr Histochem Cytochem 2006;41:57-139).

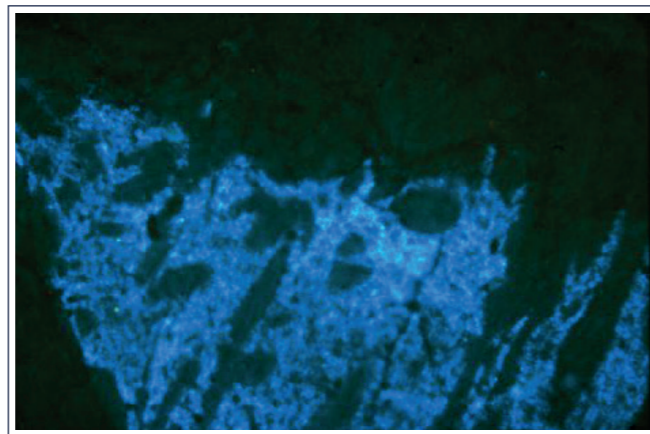
3.2.2: Falck-Hillarp fluorescenceteknikken

Før den immunhistokemiske metode udviklede sig med fremkomsten af selektive og følsomme antistoffer, der tillader næsten ethvert protein at blive visualiseret, udviklede de svenske forskere **Bengt Falck** og **Nils-Åke Hillarp**, arbejdende på det histologiske institut i Lund, i begyndelsen af 1960'erne en histofluorescensmetode for visualisering af monoaminer (dopamin (Figur 3.2.2.1 og 3.2.2.2), noradrenalin og serotonin).

Den oprindelige Falck-Hillarp metode var baseret på eksponering af frysetørret væv til formaldehyddampe,



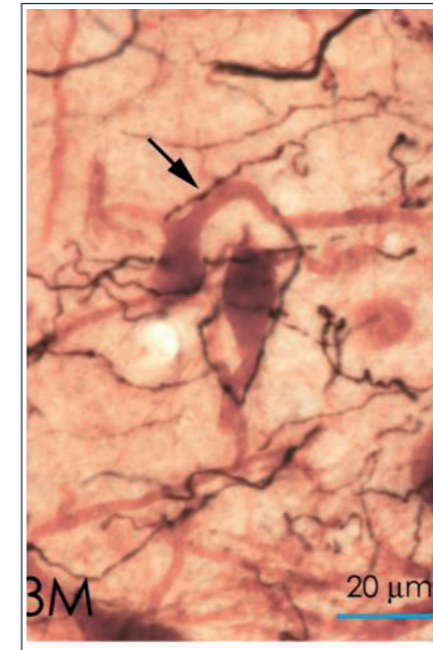
Figur 3.2.2.1. Dopaminerge neuroner i substantia nigra. Falck-Hillarp teknik. (Møller, upubliceret).



Figur 3.2.2.2. Dopaminerg innervation af striatum. Falck-Hillarp teknik. (Møller, upubliceret).

således at dopamin, noradrenalin og serotonin, omdannedes til iso-quinolin-molekyler, der udsender en henholdsvis gulgrøn og ren gul fluorescens i mikroskopet. Kjeld Møllgård og jeg rejste i vore unge dage til Lund for at lære denne teknik, som vi satte op på Anatomisk Institut, og som blev brugt til undersøgelser af bl.a. innervationen af koglekirtlen (corpus pineale). Problemet med Falck-Hillarp teknikken er, at baggrunden er mørk, og at det derfor er vanskeligt at orientere sig i snittet.

Til trods for, at man forsøgte at udvikle nye fluorescenceteknikker for andre transmittere end indol- og catecholaminerne lykkedes disse tiltag dog ikke. I stedet for udviklede immunhistokemien sig, specielt grundet fremkomsten af antistoffer med stigende specificitet og aviditet. Antistoffer mod serotonin er bl.a. anvendt af **Finn Geneser, Jens C. Sørensen og Carsten Reidies Bjarkam**, alle fra Århus Universitet, som bl.a. har kortlagt den serotonerge



Figur 3.2.2.3. Billede fra kaninens hippocampus visende to calbindin-positive neuroner (brune) som kontaktes af mørktfarvede varikøse serotonerge fibre. (fra Bjarkam CR, Sørensen JC & Geneser FA. Hippocampus 2003;13(1):21-37).

innervation af hippocampus hos kaninen (Figur 3.2.2.3).

3.2.3: Egne undersøgelser af hjernens fotoneuroendokrine-system gennem brug af histokemiske metoder

Baggrund for laboratoriets forskning

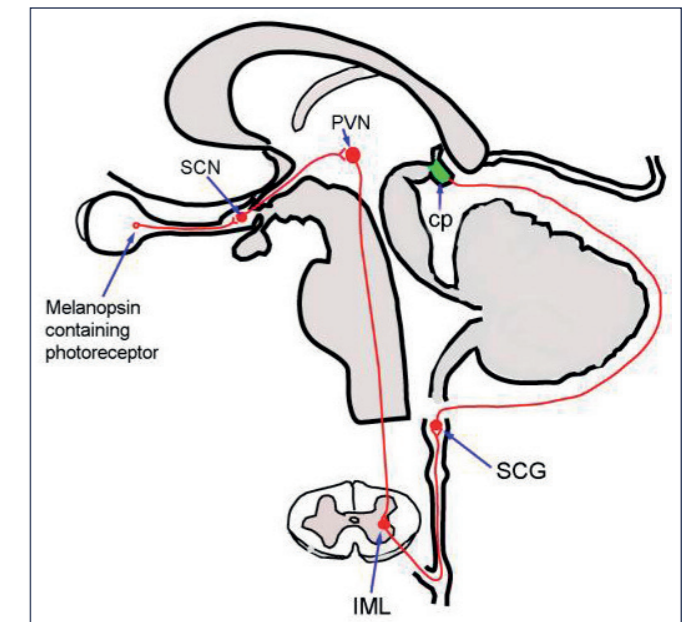
Hjernens fotoneuroendokrine-system består af

- en cellulær oscillator i mellemhjernen, som påtrykker en 24-timers rytme på andre områder af centralnervesystemet,
- samt øjet, gennem hvilket lys transmitteres til oscillatoren. Lys fra øjet kan faseskifte rytmen i oscillatoren selv.

Oscillatoren ligger i en samling nerveceller (en kerne) i mellemhjernen (diencephalon), kaldet den suprachiasmatiske kerne (SCN) (Figur 3.2.3.1 og 3.2.3.3), fordi den ligger over synsbanens krydsning (chiasma opticum). Den vigtigste projektion fra SCN går til den

paraventriculære kerne i den del af hjernen, som hedder hypothalamus. Herfra går nervetråde hele vejen ned gennem hjernestammen ned til en kerne i laterallhornet i rygmargens thorakale segmenter, og videre ud til grænsestrengen (truncus sympathicus), hvor næste synapse ligger i det øverste sympatiske halsganglion (Figur 3.2.3.1).

Herfra løber sympatiske nervetråde med arteria carotis interna ind i kraniet og stimulerer koglekirtlen til dannelse af hormonet melatonin (4).



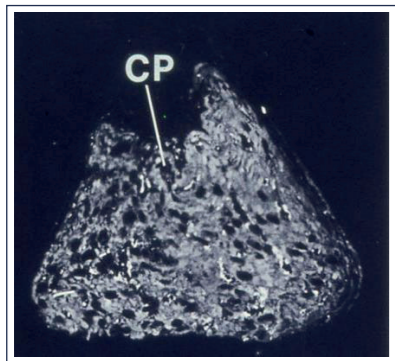
Figur 3.2.3.1. Tegning af de anatomiske baner fra retina til corpus pineale. Melanopsinholdige fotoreceptorer i retina sender via den retinohypothalamiske bane i nervus opticus information om lysforholdene i omgivelserne til de suprachiasmatiske kerner (SCN) i hypothalamus. Fra SCN sendes impulser videre via den paraventriculære kerne i hypothalamus (PVN) til autonome nerveceller (den intermedio laterale kerne (IML)) beliggende i sidehornet i rygmargens øverste brystsegmenter. Herfra sendes præganglionære nervetråde til det øverste halsganglion (ganglion cervicale superius (SCG)) i den sympatiske grænsestreng, hvorfra postganglionære sympatiske neuroner forløber til corpus pineale (cp). Signalmolekylet noradrenalin bindes til β_1 -receptorer på de melatonin-producerende pinealocytter, hvorved frigørelsen af melatonin stimuleres.

I retina findes, foruden stavene og tappene, specifikke fotoreceptorer, som rummer fotopigmentet melanopsin. Disse receptorer, der er opdaget inden for de sidste 5 år, sender nervetråde til SCN og kan, som ovenfor nævnt, faseskyde aktiviteten i nervecellerne i denne kerne.

Egne undersøgelser

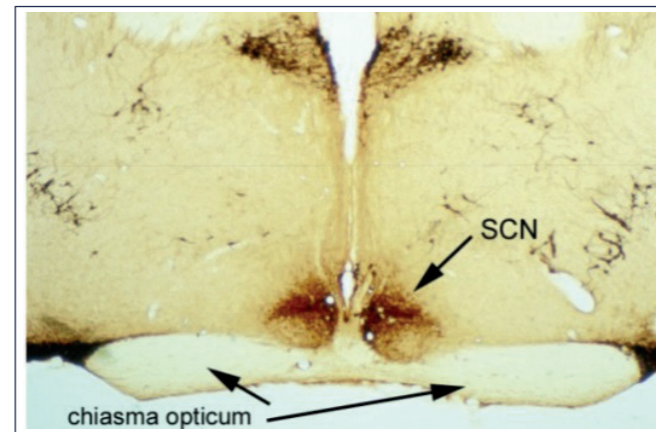
I vore undersøgelser af det fotoneuroendokrine system har vi brugt Falck-Hillarp fluorescenceteknikken, immunhistokemiske metoder samt *in situ*-hybridisering til at:

1. Kortlægge neuroanatomiske forbindelser fra øjet til den suprachiasmatiske kerne (SCN), og videre fra SCN til den paraventriculære kerne i hypothalamus. Videre fra denne kerne til rygmargens lateralhorn og herfra til ganglion cervicale superius, hvorfra sympatiske tråde når koglekirtlen (Figur 3.2.3.1 og 3.2.3.5) (4- 7).
2. Detektere neurotransmittere og receptorer i SCN og koglekirtel (Figur 3.2.3.2, Figur 3.2.3.3 og 3.2.3.4) (8- 12).
3. Detektere døgnrytmer i ekspresion af gener i SCN, koglekirtlen samt hjerne- og lillehjernebarken (Figur 3.2.3.6) (13- 18).

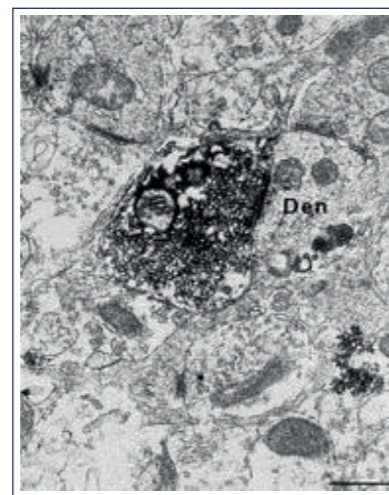


Figur 3.2.3.2. Histofluorescensbillede af koglekirtlen hos en ørkenrotte. De kraftigt fluorescerende nervetråde, rummende noradrenalin, ses som perlekæder mellem de svagere fluorescerende pinealocytter.

Visualisering af den suprachiasmatiske kerne gennem immunhistokemisk demonstration af neuroner, der rummer neuropeptidet vasopressin (Figur 3.2.3.3), vasoaktivt intestinalt polypeptid (VIP), gastrin releasing peptide (GRP) og pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) (Figur 3.2.3.4). Alle disse peptider har indflydelse på SCN's funktion. PACAP har vist sig at være neurotransmitter i bane, fra øjet til SCN (Figur 3.2.3.4) (12).

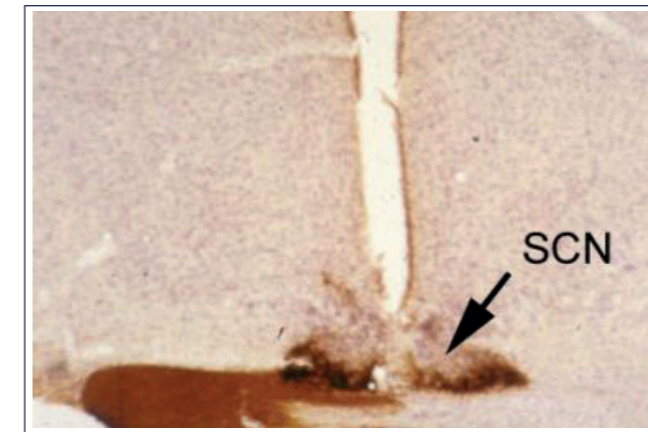


Figur 3.2.3.3. Koronalt snit gennem rottens forhjerne, som rammer chiasma opticum (synsbanens krydsning). Den suprachiasmatiske kerne (SCN) ligger lige over synsbanen og er visualiseret immunhistokemisk med et antistof mod vasopressin.



Figur 3.2.3.4. Immuncytokemisk reaktion på elektronmikroskopisk niveau. Billedet viser en nerveterminal i SCN, som er positiv (den sorte farve) og omkring de små neurotransmittervesikler for neuropeptidet PACAP. Den=dendrit.

Kortlægning af forbindelsen fra øjet til den suprachiasmatiske kerne ved neuronal *in vivo* injektion af traceren, - cholera toxin (Figur 3.2.3.5). Traceren optages af celler i retina og transporteres anterogradt til den suprachiasmatiske kerne. Traceren detekteres ved hjælp af en immunhistokemisk reaktion med et antistof mod cholera toxin.



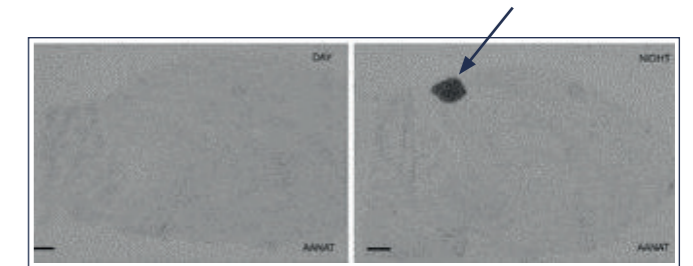
Figur 3.2.3.5. Traceren cholera toxin er lokaliseret i chiasma opticum og den ventrale del af den suprachiasmatiske kerne (SCN) efter injektion i højre øje hos en ørkenrotte. Koronalt snit gennem hypothalamus.

Demonstration af dag og nat variation i genekspression i SCN, koglekirtel, hjernebark og lillehjernebarken

Fremkomsten af *in situ*-hybridiseringsteknikken (Figur 3.2.3.6) var en revolution i laboratoriets forskning. For første gang havde vi fået en teknik, som kunne kvantitere en biokemisk parameter i kryostat og paraffinsnit. Det kræver dog, at man bruger en radioaktiv probe, hvor det radioaktive signal kan kvantiteres på en film, som anslås af den radioaktive stråling. Samtidig kan man kontrollere signalet ved at måle mængden af mRNA ved den metode som kaldes qRT-PCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction), og proteinmængden kan kvantiteres ved western blots.

Ved at udsætte mus for lys har vi kunnet vise, at denne lysstimulation ændrer expressionen af gener, som er involveret i, at "klokken" i SCN fungerer normalt (13).

I koglekirtlen har vi vist dag og nat variation i genekspression af aralkylamine N-acetyltransferase, - det rate limiterende enzym i melatoninsyntesen (14). Disse forsøg viser at den højere sekretion af melatonin om natten skyldes nydannelse af enzymet. Hvis det sympatiske input til koglekirtlen fjernes, forsvinder stigningen i ekspresion af mRNA og dermed også enzymet selv.



Figur 3.2.3.6. Mediansnit gennem rottehjernen, som er blevet hybridiseret med en radioaktiv cDNA-probe der binder sig til mRNA kodende for aralkylamine N-acetyltransferase, det rate-limiterende enzym i melatoninsyntesen. Billedet til venstre er fra en rotte slået ned i lys midt på dagen, mens billedet til højre er fra en rotte slået ned lige efter midnat i mørke. Pilen markerer koglekirtlen med høj densitet, som udtryk for tilstedeværelse af meget mRNA om natten. Bar=1mm.

Vi har yderligere vist tilstedeværelsen af flere transkriptionsfaktorer i koglekirtlen, som modulerer dannelsen af melatonin (15- 17).

Endelig har vi vist, at der findes "perifere klokker" i storhjernebarken og lillehjernebarken (18), hvis aktivitet styres af den central klokke i SCN, men som har sin egen rytme efter læsion af SCN. Den perifere "klokke" i storhjernebarken (neocortex) kunne være involveret i sjælelige lidelse, idet flere af disse udviser døgnrytme i deres symptomer.

3.3: IMMUNFLUORESCENSFARVNINGEN I DANMARK

af Jørgen Rygaard og Erik Dabelsteen

Denne artikel er blevet til i et samarbejde mellem **Erik Dabelsteen** (ED) og **Jørgen Rygaard** (JR). Når arbejdet er fordelt sådan, skyldes det, at en del (3.3.1) er rent teknologisk (opkomsten af interferensfiltrene), som JR tager sig af, mens den raffinerede anvendelse af teknikken inden for udvalgte områder af forskning og diagnostik er ED's del (3.3.2-3.3.3). Afsnit 3.3.4 er forfattet af JR. Når sandheden skal frem, var JR på det tidspunkt mere optaget af en nøgen mus uden thymus. – Det er han for den sags skyld stadig...

3.3.1: Første gang jeg så et fluorescensmikroskop var i februar 1964...

Jeg blev kandidat i juni 1962 og startede min karriere som turnuskandidat ved Frederiksværk Sygehus. Det var et lille lokalsygehus med fire læger: en overlæge, en 1. reservelæge, en årskandidat og mig, sagde hunden. Toskiftet vagt – og i sommertiden en fordobling af patientunderlaget pga. horder af sommergæster. Der var ikke råd til laboratorie- og røntgenvagt uden for dagarbejdstiden, så derfor fik jeg en betydelig øvelse i – og smag for – laboratoriarbejde. Efter et par måneder som værnepligtig sergentelev søgte jeg en stilling på Statens Seruminstitut, bakteriologisk afdeling. Den blev ”besat med anden ansøger”, men jeg fik et venligt brev om, at der ville blive en stilling i Treponemato-seafdelingen om tre måneder. Jeg sagde pænt ja tak og brugte de tre måneder som freelancer på TV (3 programmer om sindslidelser!).

Efter disse hektiske aktiviteter: turnustid, militær og tv-producer, var kontrasten til den rolige tilværelse på Amager Boulevard fra den 1. februar 1964 nærmest chokerende. Jeg fik overladt en stak bøger om afdelingens spidskompetence: Viden om Treponema pallidum. Giv dig nu bare god tid og læs de her igennem.

- Først på sommeren var jeg mør. Jeg savnede i den grad aktivitet. Så i Ugeskrift for Læger, at der var en ledig stilling som kommunelæge på Fur. Proppede familien i bilen og af sted nordpå...

- Afgørelsen kom som et lyn. Da billetmanden ved færgen i Branden spurgte: Enkelt eller retur? – var der ingen tvivl: Retur!

Så var jeg altså tilbage i Treponemato-seafdelingen. Den varetog al syfilisdiagnostik i Danmark med nordlige tilliggende og førte kartotek over alle positive WR- tests fra tidernes morgen. Var desuden internationalt WHO-reference center. Ingen borger, spæd eller olding, kunne indlægges på et dansk sygehus uden at der blev ordineret WR og Hgb-procent. Grundstammen i de ’serologiske undersøgelser’ var Wassermann testen, der var en komplementbindingsreaktion med brug af et antigen, cardiolipin, der blev udvundet af oksehjerter. Testen var også positiv i forbindelse med en række autoimmune lidelser. Til at afgøre specificiteten var der to tests: TPI (Treponema pallidum Immobilisationstest) og TPA (Treponema pallidum (fluorescent) Antibody test). Det var i forbindelse med sidstnævnte, at afdelingens ene fluorescensmikroskop kom ind i billedet. Det var et ikke særlig raffineret Leitz mikroskop med en højtryks kviksløvlampe på 100 Watt (HBO100W).

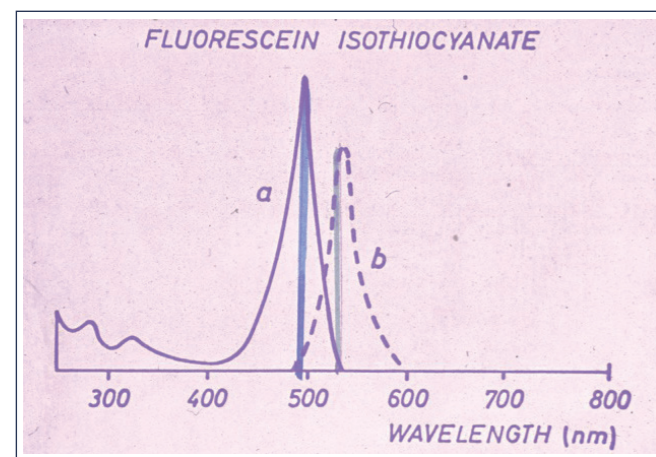
De bakterier, der anvendtes i de to tests, dyrkedes ved injektion i kanintestikler. Jeg følte empati med de stakkels kaniner og arbejdede intenst på at dyrke treponemerne i diffusionskamre og på andre måder. Det lykkedes ikke. Det trøster mig lidt at se, at det her – mere end 50 år senere – stadig ikke er lykkedes.

- Mit næste projekt var at se, hvordan treponemerne fordelte sig i kaninerne. Afdelingen rådede over mange, kraftigt positive patientsera. Såre enkelt: tag et imprint- eller frysesnitpræparat som antigen, patientserum i første lag og derefter FITC-konjugeret anti-humant kanin-IgG. Sidstnævnte opnået ved gentagne immuniseringer af kaniner. (Disse konjugater kunne nå forbløffende styrke, kunne fortyndes helt op til 800 gange). Men lige meget hjalp det. Jeg havde i mit laboratorium et stort, nyt Zeiss forskningsmikroskop, også det udstyret med en HBO 100 Watt lyskilde og et BG5 glasfilter som primærfilter. Resultatet lader sig bedst beskrive ved at henvise til H C Andersens ’Det døende barn’: Grønt og Guult og rødt for Øiet svæver. Det er Blomster, Engelen udstrøer. – Nej, - det var ikke engleblomster, men autofluorescens, den plage, som fulgte med de gamle glasfiltre med et meget bredt transmissionsområde. BG5 filteret transmitterede rub og stub fra omkring 350 nm til lige over 500 nm.

Litteratur

- Golgi C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gaz Med Lamb* 1873;33244-6.
- Ramón y Cajal, S. Estructura de los centros nerviosos de las aves, *Rev Trim Histol Norm Pat* 1888;1:1-10.
- Río-Hortega P. El "tercer elemento de los centros nerviosos". IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglia. *Bol Soc Esp Biol* 1919;VIII:155-66.
- Møller M, Baeres FMM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 2002;309:139-50.
- Nielsen JT, Møller M. Innervation of the pineal gland in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). A fluorescence microscopical study. *Cell Tissue Res* 1978;187:235-50.
- Vrang N, Larsen PJ, Møller M, Mikkelsen JD. Topographical organization of the rat suprachiasmatic-paraventricular projection. *J Comp Neurol* 1995;353:585-603.
- Larsen PJ, Møller M, Mikkelsen JD. Efferent projections from the periventricular and medial parvocellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat. A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHAL) tracing study. *J Comp Neurol* 1991;306:462-79.
- Cozzi B, Mikkelsen JD, Merati D, Capsoni S, Møller M. Vasoactive intestinal peptide like immunoreactive nerve fibers in the pineal gland of the sheep. *J Pineal Res* 1990;8:41-7.
- Cozzi B, Mikkelsen JD, Ravault J.-P, Locatelli A, Fahrenkrug J, Zhang E-T, Møller M. The density of peptide histidine-isoleucine (PHI)- and vasoactive intestinal peptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in the sheep pineal gland is not affected by superior cervical ganglionectomy. *J Comp Neurol* 1994;343:72-82.
- Cozzi B, Mikkelsen JD, Ravault J-P, Møller M. Neuropeptide Y (NPY) and C flanking peptide of NPY in the pineal gland of normal and ganglionectomized sheep. *J Comp Neurol* 1992;316:238-50.
- Zhang E, Mikkelsen JD, Møller M. Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats follow-ing removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res* 1991;265:63-71.
- Hannibal J, Møller M, Ottersen OP, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate activating polypeptide (PACAP) and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* 2000;418:147-55.
- Rovsing L, Møller M. Photic stimulation of the suprachiasmatic nucleus via the non-visual optic system. A gene expression study in the blind *Crx*^{-/-} mouse. *Cell Tissue Res* 2014;358:239-48.
- Bailey MJ, Coon SL, Carter DA, Humphries A, Kim JS, Shi Q, Gaildrat P, Morin F, Ganguly S, Hogenesch JB, Weller JL, Rath MF, Møller M, Baler R, Sugden D, Rangel ZG, Munson PJ, Klein DC. Night/day changes in pineal expression of >600 genes: Central role of adrenergic/cAMP signaling. *J Biol Chem* 2009;284:7606-22.
- Rath MF, Bailey MJ, Kim JS, Ho AK, Gaildrat P, Coon SL, Møller M, Klein DC. Developmental and diurnal dynamics of Pax4 expression in the mammalian pineal gland: Nocturnal down regulation is mediated by adrenergic-cyclic AMP signaling. *Endocrinology* 2009;150:803-11.
- Rath MF, Bailey MJ, Kim JS, Coon SL, Klein DC, Møller M. Developmental and daily expression of the Pax4 and Pax6 homeobox genes in the rat retina: localization of Pax4 in photoreceptor cells. *J Neurochem* 2009;108:285-94.
- Rath MF, Rohde K, Klein DC, Møller M. Homeobox genes in the rodent pineal gland: roles in development and phenotype maintenance. *Neurochem Res* 2013;38:1100-12.
- Rath MF, Rovsing L, Møller M. Circadian oscillators in the mouse brain: expression of molecular clock components in the neocortex and cerebellar cortex. *Cell Tissue Res* 2014;357:743-55.

Et par år i forvejen havde afdelingen lagt hus til et WHO-kursus i immunfluorescenceteknik, ledet af den skotsk-australske professor **R. C. Nairn** fra Monash University i Melbourne. Nairn havde skrevet biblen i fluorescenceteknik, *Fluorescent Protein Tracing*. Den havde jeg fået i forbindelse med kurset. Stor var min forbløffelse, da jeg så divergensen mellem BG5-filterets transmissionskurve og absorptionskurven for FITC, en ganske distinkt kurve med toppunkt i 488 nm. Som vi alle ved nu... (Figur 3.3.1.1).



Figur 3.3.1.1. Absorptions (a) - og emissionskurver (b) for FITC. Illustration fra Rygaard & Olsens første publikation (1).

Filterkatalogerne bød ikke på noget bedre end BG5. – ATV, Akademiet for de Tekniske Videnskaber, drev en række specialinstitutter, bl.a. Belysningsteknisk Institut. Jeg ringede til dem. Havde de en lyskilde med maksimum ved 488 nm? – De forstod godt problemet, men nej. Du skal ringe til Optisk Laboratorium.

Som sagt så gjort. Instituttets boss, civilingeniør **Werner Olsen** (WO) (1927-2015) kunne straks bekræfte, at et smalbåndfilter med transmissionsmaksimum på 488 nm havde de skam.

De havde for den sags skyld filtre til alle mulige bølgelængder (Figur 3.3.1.2).

- Hvad bruger I dem til, spurgte jeg forbløffet.

- Ikke noget, - de ligger bare i skuffen!

Næste dag kom WO ud på Serumintitutet med sit filter.

– Og jeg så lyset!



Figur 3.3.1.2. Et udvalg af Optisk Laboratoriums mange filtre.

Optisk Laboratorium på DTU bestod ud over WO af en norsk ingeniør, **Rofsdahl**, med Aspergers Syndrom og udstyret med den mest avancerede Texas Instrument regnemaskine til en astronomisk pris og formentlig med en kapacitet mindre end mit yngste barnebarns iPad.

Filtrene, som han beregnede, blev skabt ved pådampning i vakuum af skiftevis højt- og lavtbrydende salte. Processen blev styret via en referencestråle efter Rofsdahls beregninger. Den praktiske gris var civilingeniør Poul Smith, og derudover var der en sekretær. Da vævet i præparaterne takket være filtrene var sort som natten, ønskede jeg mig et filter med lidt orienteringslys. Det blev til en lille sprække omkring 630 nm, der gav samme effekt som senere Evan's blue i sidste hold skyllevand.

- Filtre til Rhodamin? - Værsgo, jeg kunne bare åbne munden.

- Når jeg i dag, små halvtreds år senere, ser mig omkring i instrumentverdenen, ser jeg interferensfiltre overalt. Og jeg kan et kort øjeblik ærgre mig over, at vi ikke tog patent på filtrene. I dag ville det være et naturligt krav fra de bevilgende instanser. Sådan var det ikke dengang. Og WO var lodret imod: Det koster en masse tid og en masse penge. Og de, der vil bryde patentet, gør det bare alligevel!

Det var formentlig rigtigt, så i stedet skrev vi en lille artikel til *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica: Interference filters for improved immunofluorescence microscopy* (1-3).

- Så nu var katten ude af sækken, og det gjaldt om at finde potentielle købere/brugere. Jeg ringede til Zeiss' danske afdeling i København. Deres meget kompetente sælger, hr. **Heger**, meldte sin ankomst til et besøg på Serumintitutet. Jeg riggede et mikroskop til med en almindelig 60 Watt pære, et 488 nm filter med lidt rødt og et gult glasfilter som sekundærfilter. Af **Allan Wiik** på Autoimmunlaboratoriet på SSI lånte jeg nogle snit, der havde været brugt til undersøgelse for ANF, antinuklear faktor.

Mikroskopet stod tændt. Hr. Heger kom ind ad døren, kastede et blik i mikroskopet, snurrede om på hælen og nåede på udturen at få sagt: "Det er fantastisk!" – Få dage efter meldte han sin ankomst sammen med Zeiss' udviklingsdirektør fra Göttingen, Dr. **Kraft** med ledsager.

Inden besøget var omme, var der truffet aftale med WO om levering af et større antal filtre til Göttingen...

Den anden store mikroskopleverandør, Leitz, reagerede helt anderledes. I to følgende numre af *Leitz Mitteilungen* rykkede Leitz ud med det svære skyts og leverede talrige 'argumenter' mod interferensfiltre overhovedet. Deres argumenter stred lodret mod fysikkens love. Formentlig sad de inde med et større antal HBO 100 højtrykskanoner, som de skulle af med, inden de – efter to numres dårlige argumenter – også overgav sig til fysikkens love og interferensen.

WO og jeg meldte os til forårsmødet i The Royal Microscopical Society i London. Dr. **A H Tomlinson** fra Radcliffe Infirmary, Oxford, viste venlig interesse. Han havde selv puslet med nogle ikke så gode metal-interferensfiltre. Mødets øvrige deltagere værdigede ikke de to idioter fra *The Continent* et blik.

I maj 1970 tog vi håbefulde til et møde i Stockholm, arrangeret af The Swedish Society for Microbiology og The New York Academy of Sciences. Mødet blev afholdt i Wenner-Gren Centret. Noget provokerende stillede vi vores mikroskop med 60 Watt pæren og interferensfiltret samt et af Allan Wiiks ANF-præparater op i undertagen lige inden for den 4-5 meter høje endevæg i glas. Folk anså os formentlig for lidt skøre og gad dårligt kigge i røret!

- Som et smukt socialt indslag i mødet blev deltagerne inviteret til middag hos svenske kolleger. WO og jeg havnede hos **Eva** og **Georg Klein** i deres smukke hjem på Lidingö. Vi fortalte værterne om interferensfiltrenes velsignelser og blev inviteret til at besøge Tumörbiologen på Karolinska. Her sad flittige unge forskere i små, sorte huller og så på overfladeantigener på Burkitt's lymfom. De prøvede høfligt interferensfiltrene, men droppede dem forfærdede igen: Detektionsgrænsen flyttede sig helt ud af deres arbitrære skala. Så skulle de jo til at begynde helt forfra!

I juli 1967 var jeg begyndt som yngste reservelæge på Patologisk-anatomisk Institut på Københavns Kommunehospital (KH). Sideløbende havde jeg indtil 1969 et deltidsjob på Serumintitutet. For at komme videre i historien sidder jeg en dag i mit reservelægekantor på KH. Døren går op og overlæge, dr. med. **Per Christoffersen** siger uden overflødige omsvøb: "Rygaard, De skal ta' over på Tandlægeskolen og tale med Tandlæge Dabelsteen". Døren lukkes. Forstået?

OK, så tog jeg da over på Tandlægeskolen i Universitetsparken.

– Erik og jeg har nu arbejdet sammen i over 45 år.

3.3.2: Påvisning af ABO antigener i normal og malign mundslimhinde

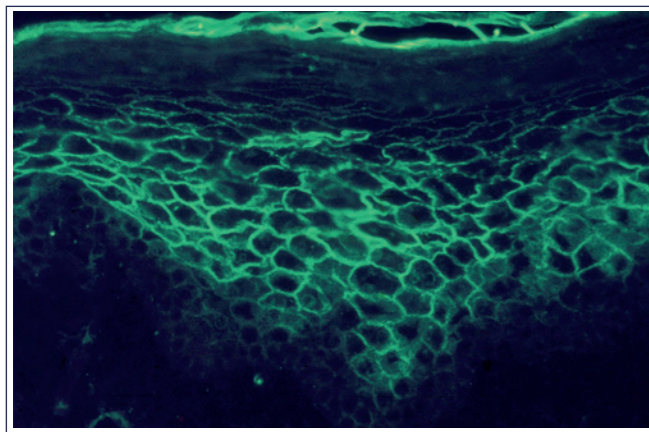
I mundslimhinden optræder en række forandringer, der er potentielt maligne. Undersøgelser har vist, at kun 10% af disse forandringer udvikler sig til egentlig karcinom; der er derfor et ønske om at kunne udpege netop de forandringer, der senere udvikler sig malignt (4).

I den sidste halvdel af 1960'erne havde professor på Tandlægeskolen **J. J. Pindborg** en forskningsbevilling fra NIH til studiet af sådanne potentielt maligne tilstande i mundslimhinden. Et af projekterne havde til formål at finde histologiske markører på tidlig malign udvikling.

Karl Landsteiner viste så tidligt som 1926, at normalt epitel indeholder blodtypeantigenerne ABO (5). **Olaf Thomsen**, der var ansat på Rigshospitalet, fandt i 1930 ved hjælp af vævsekstrakter og immunologiske metoder, at disse antigener forsvandt i forbindelse med karcinomudvikling (6). I 1969 ledte dette fund til nye undersøgelser, og det blev vist ved hjælp af en agglutinationstest på histologiske snit, at A og B blodtype antigenet ikke kun forsvinder i karcinomer på cervix, men også i deres histologiske forstadier (7). Der opstod derfor et ønske om at undersøge, om ændringer i forekomsten af blodtypeantigenerne A og B kunne anvendes som markør for begyndende malign udvikling i præmaligne mundslimhindeforandringer.

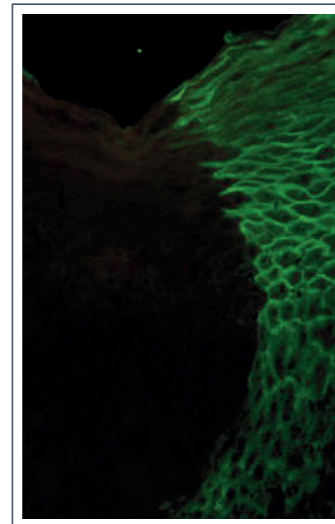
Studiet blev startet med anvendelse af en traditionel dobbeltlags immunfluorescensfarvemethode med blodtypeantistoffer fra blodbanken på Seruminstuttet og med FITC-mærkede antistoffer, der var indkøbt kommercielt. Fluorescensmikroskopet var udstyret, som de var normalt i midten af 60'erne, med primærfilter i glas og en traditionel mørkefeltkondensator. Formalinfikseret og paraffinindstøbt væv kunne anvendes, da ABO antigenerne er kulhydratstrukturer og ikke påvirkes af histologiske rutine præparationsmetoder. En række problemer opstod imidlertid. Blodbankens bedste antistoffer var af IgM-typen, da de var udvalgt på grund af deres evne til at agglutinere erythrocytter. De sekundære antistoffer, der skulle anvendes til immunfluorescensfarvemethoden, var hovedsagelig af IgG-typen, og konjugeringen var dårlig. Samtidig var intensiteten af fluorescensen svag, da primærfiltrene ikke var velegnede til FITC, og mørkefeltkondensatoren blokerede for det meste af det lys, som udsendtes fra den anvendte lyskilde.

Efter at en kontakt var blevet etableret til **Jørgen Rygaard** og **Werner Olsen**, der havde udviklet nye primære



Figur 3.3.2.1. Blodtype A-antigen i normal læbeslimhinde.

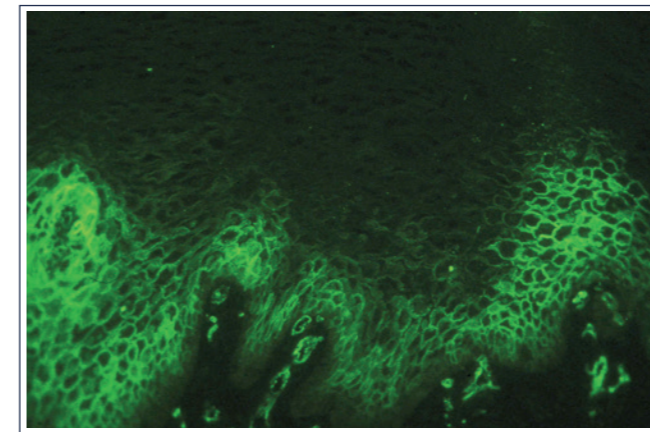
fluorescensfiltre (1), **Agnete Ingild** og **Niels Harboe** fra Proteinlaboratoriet, der havde højtiter og vel konjugerede sekundære antistoffer, og reservelæge **Henning Sørensen** fra Retsmedicinsk Institut, lykkedes det at vise, at blodtypeantigenerne A og B findes i normal mundslimhinde som et membranantigen i pladeepitelet (Figur 3.3.2.1), og at forekomsten i epitelet var reguleret af sekretorgerne, der ligeledes regulerer forekomsten af blodtypeantigener i spytet (8,9). Ved hjælp af ferritin-mærkede antistoffer og elektronmikroskopi blev cellemembran-lokalisationen bekræftet (10). Endvidere lykkedes det at vise, at de fleste karcinomer mister deres ABO antigen, og at en række af de potentielt maligne lidelser ligeledes mister antigenet (Figur 3.3.2.2) (11).



Figur 3.3.2.2. Farvning for blodtype A-antigen i overgangen mellem normal og malign slimhinde, hvor reaktionen er negativ.

ABO antigendeterminanten er den terminale del i en kulhydratkæde, der er opbygget trinvis med addition af enkelte kulhydratstrukturer, en proces, der er katalyseret af mere end 200 kendte glykosyltransferaser.

Sen-itiroh Hakomori, der i Seattle arbejdede med ændringer af cellemembranens glykolipider i forbindelse med malignitet, var i stand til at isolere de forskellige stadier i blodtypeantigensyntesen og havde i 1982 produceret monoklonale antistoffer svarende til hvert enkelt trin i denne syntese (12). I et samarbejde mellem Københavns Tandlægeskole og Sen-itiroh Hakomori blev det muligt at følge syntesen af blodtypeantigenerne i flerlaget pladeepitel. Det blev vist, at forstadier til blodtypeantigener fandtes i de basale og parabasale cellelag, (Figur 3.3.2.3) hvorimod det fulde antigen blev udtrykt i mere differentierede celler. De forandringer, man fandt i maligne væv, svarede til at syntesen stoppede, og der kom en ophobning af forstadier til blodtypeantigenet (12).



Figur 3.3.2.3. Farvning for forstadie til blodtype A eller B: H-antigen (hos 0 personer). Farvningen er lokaliseret til parabasale celler i epitelet.

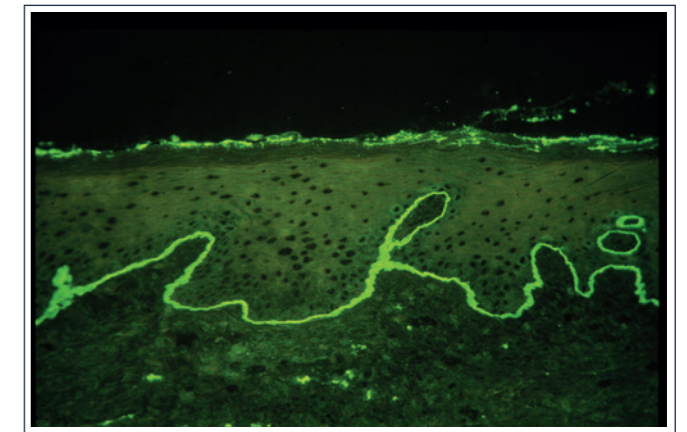
Der er således en fin regulering af blodtypeantigensyntesen, der følger den epiteliale differentiering. I København deltog **Poul Vedtofte**, **Erik Dabelsteen** og i Seattle foruden **Sen-itiroh Hakomori**, **Henrik Clausen** og **Ulla Mandel**, der var gæsteforskere fra København.

Henrik Clausen klonede i samarbejde med Hakomori ABO genet, der er det gen, der kodede for glykosyltransferasen, der sætter den terminale sukker på kulhydratkæden (13). Ved hjælp af antistoffer mod A-genets transferase og immunfluorescensfarvning kunne man således følge syntesen af kulhydratstrukturerne på de epiteliale celleoverflader, ikke alene med henblik på antigenet selv, men også med hensyn til det enzym, der var ansvarlige for syntesen af antigenet (14). Ved at kombinere immunhistokemi med "laser capture mikroskopi", hvor udvalgte områder af det histologiske snit skæres ud med henblik på molekylærbiologisk analyse, kunne det vises, at mange, men ikke alle, tilfælde med tab af A eller B blodtypeantigenet i mundhulecarcinomer kunne forklares ved LOH involverende kromosom 9q34, hvilket er locus for ABO genet eller ved hypermethylering af ABO genpromoteren (15).

Studiet af blodtypeantigenerne i væv ved hjælp af immunhistokemiske metoder blev hurtigt udvidet til at omfatte en række andre væv (16), der blev således udført omfattende undersøgelser på blærecarcinomer, endometriet, spytkirtler, ventriklen, colon, larynx, prostata og hud (17-22). De fleste undersøgelser inddrog ikke kun blodtypeantigenerne AB og deres enzymer, men undersøgte også for Lewis antigenerne, der er relaterede til ABO systemet (23).

3.3.3: Immunfluorescensfarvning ved diagnostik af bulløse hud- og slimhindedygdomme

Beutner viste i midten af 1960'erne, at patienter med de bulløse hudsygdomme pemfigus og pemfigoid har autoantistoffer i blodet, der reagerer henholdsvis med pladeepitelets cellemembraner og basalmembranen. Det blev vist ved hjælp af immunfluorescens teknik, at patientens kliniske symptomer i hovedsagen kunne korreleres til antistoftiteren i patientserum. Ved den bulløse tilstand benign slimhindepemfigoid, som hovedsagelig afficerer øjne og mundslimhinde, var man imidlertid ikke i stand til at finde autoantistoffer på samme måde, som man havde fundet det ved pemfigoid. Det lykkedes imidlertid ved anvendelse af det af **Jørgen Rygaard** og **Werner Olsen** konstruerede fluorescensmikroskop suppleret med den japanske Tiyoda mørkefeltkondensator (der anvendte toriske linser støbt i plastik) at påvise antistoffer også hos disse patienter (Figur 3.3.3.1) (24).



Figur 3.3.3.1. Bulløs slimhindepemfigoid. Patient antistoffer bundet til marsvin underlæbe. Dobbeltlags farvemethode. Den røde baggrundsfarve skyldes en "sprække" i det anvendte Rygaard/Olsen interferensfilter..

Antistofferne fandtes imidlertid i lave titre, hvilket formentlig er årsagen til, at man med traditionelle immunfluorescenssystemer ikke havde kunnet påvise dem. Det har senere vist sig, at patienter med benign slimhindepemfigoid i nogle tilfælde har antistoffer mod laminin-5 (laminin 332), medens andre har antistoffer mod andre basalmembranproteiner. Det tyder på, at patienter med laminin-5 antistoffer har et sygdomsforløb med alvorligere ardannelser. I dag anvendes dette i diagnostikken, idet der som antigen anvendes et hudpræparat, hvor epitelet er skilt fra bindevævet med f.eks. EDTA. Antigenet laminin-5 vil befinde sig på den epiteliale side, hvilket ses i en fluorescensfarvning ved anvendelse af patientens serum.

3.3.4: Anvendelsen af immunfluorescensfarvning i nefropatologi

Indtil midten af 1900-tallet var kendskabet til de morfologiske forandringer ved nyresygdomme overvejende baseret på autopsimateriale og undersøgelser af operationspræparater.

Med introduktionen af perkutan nålebiopsi, der som et af de første steder i verden blev udført første gang i Danmark i 1949 af overlæge, senere professor **Poul Iversen** (1889-1966) og daværende reservelæge **Claus Brun** (1914-2014) på Københavns Kommnehospitals(KH) 3.afdeling (25), åbnedes mulighed for at opnå frisk materiale fra patienter med kliniske tegn på nyresygdom. Det gjorde det muligt at korrelere patientens symptomer og kliniske data med de lysmikroskopiske forandringer, specielt i forbindelse med akutte stadier af glomerulonefritis.

Siden begyndelsen af 1900-tallet havde eksperimentelle undersøgelser og kliniske observationer sandsynliggjort, at glomerulonefritis var forårsaget af to forskellige immunologiske mekanismer: Anti-glomerulær basalmembran glomerulonefritis og immunkomplex nefritis.

Ved hjælp af immunfluorescensfarvning kunne der påvises immunglobulin- og complementaflejringer i glomeruli med henholdsvis lineært og granulært farvningsmønster ved de to typer af glomerulonefritis (26).

Claus Brun blev i 1956 overlæge på Centrallaboratoriet (Klinisk-kemisk afdeling) på KH og opbyggede her et Nefropatologisk Laboratorium, der gennem årene bidrog med stor viden i vurdering af lysmikroskopiske forandringer ved glomerulonefritis. Claus Brun må betegnes som dansk nefropatologis nestor, og hans afdeling var uddannelsessted for en række af landets førende nefropatologer. Den, der her i landet har udført de mest omfattende immunfluorescensundersøgelser af nyrebiopsier ved glomerulære sygdomme, er **Svend Larsen** (1932-).

Svend Larsen kom efter skolen i lære som møbelsnedker. Fik i 1952 svendebrev (med sølvmedalje!). Fik mesterbrev i 1956, hvorefter han arbejdede i - og i en periode ledede - faderens store bygnings-snedkeri. Han ville meget gerne prøve at mikroskopere og gik på kursus på Teknologisk Institut i København - og så på snit af bøger og eg med flere udmærkede træer.

Det var ikke sagen. - Han ville se på rigtige celler og væv fra mennesker. Tog studentereksamen fra Ahms kursus i 1962 og blev cand. med. fra Københavns Universitet i 1969.

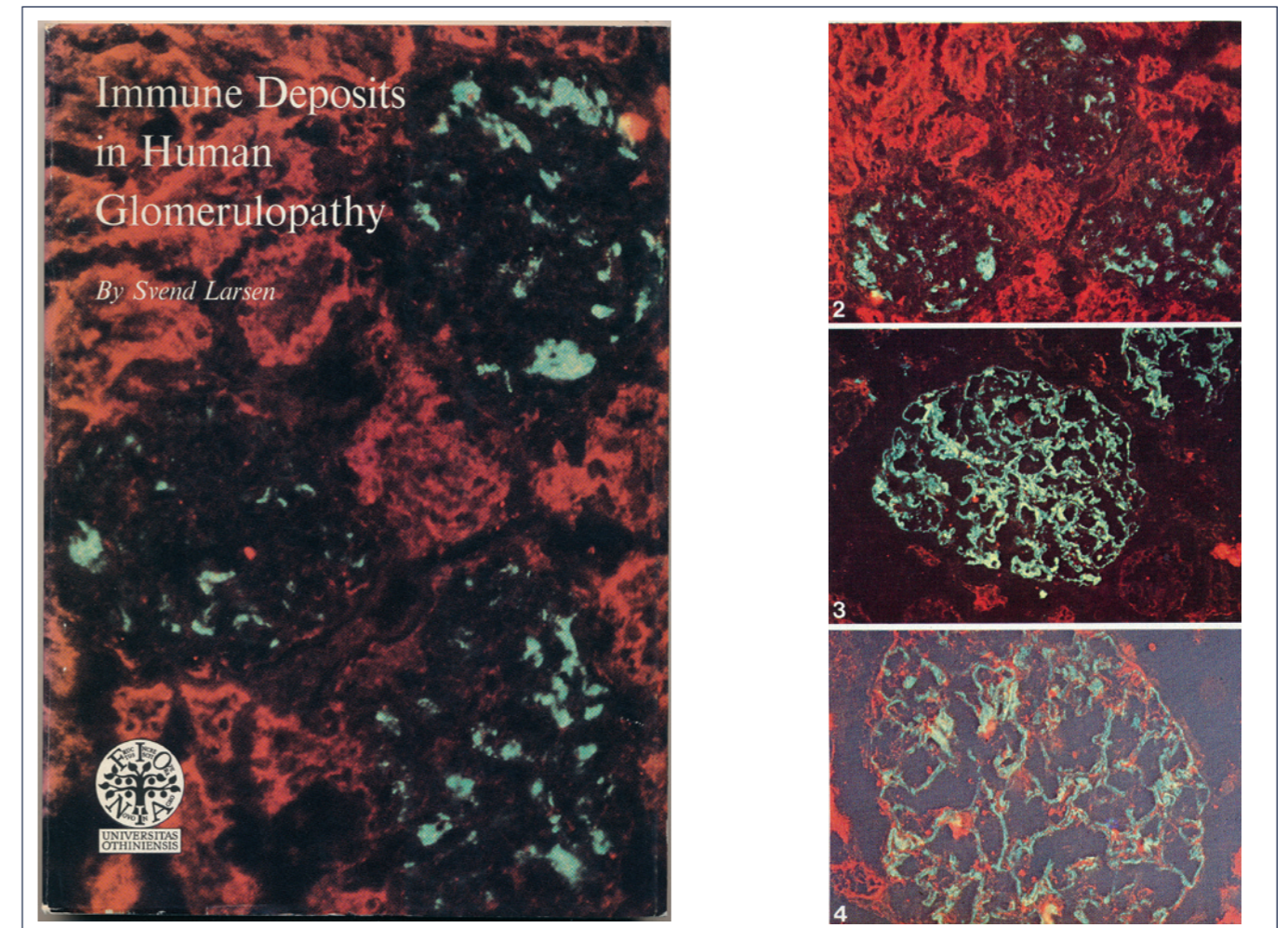
(Det skal indskydes, at Svend Larsen sammen med sin kone Rudy var en ivrig konkurrencedanser i de glade ungdomsår og sled 4-5 kjolesæt op på dansegulvet.)

Men nu var han læge, og nu ville han mikroskopere.

Som turnuskandidat og senere reservelæge på KH's 3. Afdeling fangedes hans interesse af nefrologien. På Claus Bruns afdeling rådede man over stor histologisk og elektronmikroskopisk ekspertise. Her i afdelingen etablerede Svend i 1973 med bistand fra Jørgen Rygaard et avanceret immunfluorescens-laboratorium, specialiseret i nyrepatologi. Arbejdet førte i 1981 til disputatsarbejdet *Immune Deposits in Human Glomerulopathy* (27), som forsvarede med glans ved Odense Universitet (Figur 3.3.4.1).

Han uddannede sig videre i patologi på Gentofte og senere Herlev hospitaler. Blev i 1983 overlæge på patologisk institut, KAS Herlev, fra 1986 administrerende overlæge sammesteds. Og så 1987-2002 professor i patologisk anatomi og histologi ved KU.

Gennem årene er det blevet til talrige videnskabelige arbejder, først og fremmest inden for nefro-patologien, hvor han i denne bogs sammenhæng især skal hyldes for sin forfinede immunpatologiske teknik.



Figur 3.3.4.1. Svend Larsens disputats fra 1981. Afhandlingen beskrev immunfluorescensundersøgelser af nyrebiopsier fra 290 patienter med glomerulonefritis. Der blev påvist to typer af farvningsreaktioner: Lineær og granulær. De to farvningsreaktioner fandtes ikke relateret til hverken histologiske forandringer, kliniske symptomer eller klinisk forløb. Til højre ses granulære aflejringer i glomeruli. 2 viser aflejringer af IgA i mesangiet. 3 viser aflejring af complement C3 i mesangiet og basalmembran, mens 4 viser aflejring af IgG overvejende i basalmembran.(28)

Litteratur

- Rygaard J, Olsen W Interference filters for improved immunofluorescence microscopy. Acta Pathol Microbiol Scand 1969;76:146-8.
- Rygaard J, Olsen W. Toward quantification of excitation. Annals of The New York Academy of Science 1971;177:410-13.
- Rygaard J, Olsen W. Determination of characteristics of interference filters. Annals of The New York Academy of Science 1971;177:430-33.
- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. J Oral Pathol Med 2008;37:127-33.
- Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wien Klin Wochenschr 1901;14: 1132-4.
- Thomsen O. Untersuchungen über die serologische Gruppendifferenzierung des Organismus. Acta Pathol Microbiol Scand 1930;7:258-65.
- Davidsohn I, Kovarik S, Ni LY. Isoantigens A, B, and H in benign and malignant lesions of the cervix. Arch Pathol 1969;87:306-14.
- Hartmann G. Group Antigens in human organs. Disputats. København 1941.
- Dabelsteen E, Rygaard J. A sensitive immunofluorescence technique for detecting blood group substances A and B. Findings in oral epithelium. Acta Pathol Microbiol Scand A 1972;80:433-9.
- Dabelsteen E, Fejerskov O, Francois D. Ultrastructural localization of blood group antigen A and cell coat on human buccal epithelial cells. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol 1974;82:113-21
- Dabelsteen E. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. J Pathol 1996;179:358-69. Review.
- Dabelsteen E, Vedtofte P, Hakomori S, Young WW Jr. Accumulation of a blood group antigen precursor in oral premalignant lesions. Cancer Res 1983;43:1451-4.
- Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. Nature 1990;345:229-33.
- Mandel U, White T, Karkov J, Hakomori S, Clausen H, Dabelsteen E. Expression of the histo-blood group ABO gene defined glycosyltransferases in epithelial tissues. J Oral Pathol Med 1990;19:251-6

15. Dabelsteen E, Gao S. ABO blood-group antigens in oral cancer. J Dent Res 2005 Jan;84:21-8. Review.
16. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. APMIS 2000;108:1-28. Review
17. Dabelsteen E, Broby-Johansen U, Jeppe-Jensen D, Mandel U. Cell surface glycosylation patterns in psoriasis. APMIS 1990;98:221-8.
18. Orntoft TF, Hvid H, Clausen H, Hakomori S, Dabelsteen E. Loss of blood group ABO-related antigen expression in urothelium from patients with chronic cystitis. Lab Invest 1989;60:305-10.
19. Mandel U, Langkilde NC, Orntoft TF, Therkildsen MH, Karkov J, Reibel J, White T, Clausen H, Dabelsteen E. Expression of histo-blood-group-A/B-gene-defined glycosyltransferases in normal and malignant epithelia: correlation with A/B-carbohydrate expression. Int J Cancer 1992;52:7-12.
20. Juhl BR. Methodologic and genetic influence on immunohistochemical demonstration and semiquantitation of blood group antigen A in human ureter urothelium. J Histochem Cytochem 1985;33:21-6.
21. Ravn V, Mandel U, Svenstrup B, Dabelsteen E. Expression of type-2 histo-blood group carbohydrate antigens (Le(x), Le(y), and H) in normal and malignant human endometrium. Virchows Arch 1994; 424:411-9.
22. Therkildsen MH, Mandel U, Christensen M, Barfoed C, Dabelsteen E. Altered expression of ABO (H) carbohydrate antigens is seen in pleomorphic adenomas. APMIS 1992;100:415-23.
23. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Mouillac-Vaidye B, Clément M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. APMIS 2001;109:9-31.
24. Dabelsteen E, Ullman S, Thomsen K, Rygaard J. Demonstration of basement membrane autoantibodies in patients with benign mucous membrane pemphigoid. Acta Derm Venereol 1974;54:189-92.
25. Iversen P, Brun C. Aspiration biopsy of the kidney. Am J Med 1951;11:324-30.
26. Dixon FJ. The pathogenesis of glomerulonephritis. Am J Med 1968;44:493-98.
27. Larsen S. Immune deposits in human glomerulopathy. Disputats. København 1981.
28. Larsen S. Immunofluorescent microscopy findings in minimal or no change-disease and slight generalized mesangioproliferative glomerulonephritis. Acta Pathol Microbiol Scand A 1978;86:531-42.

3.4: HISTOKEMI OG DIAGNOSTISK HISTOPATOLOGI af Per Prætorius Clausen og Ole Nielsen

3.4.1: Diagnostisk histopatologi

Ved diagnostisk histopatologi forstås mikroskopisk undersøgelse af væv med henblik på at fastslå sygdomskaraktter og prognose som led i behandlingsstrategi.

De første beskrivelser af diagnostiske histopatologiske undersøgelser er af **Bennet** i Edinburgh i 1845 (1) og **Donaldson** i Baltimore i 1853 (2). I begge tilfælde var der tale om celleudstrygninger og ikke snitpræparater, som kom til en del år senere. Starten på den diagnostiske histopatologi er således også starten på den diagnostiske cytologi.

I Danmark var det, som tidligere beskrevet (Boks 2.1), **Adolph Hannover**, der i 1852, som den første herhjemme, anbefalede vævsbiopsi i forbindelse med tumordiagnostik (3). Der skulle imidlertid gå knapt et halvt århundrede før metoden begyndte at få større udbredelse. Histopatologiske undersøgelser blev i denne periode helt overvejende udført i forbindelse med autopsier og udviklingen af faget herhjemme var i det hele taget i sidste halvdel af 1800-tallet meget langsom (4).

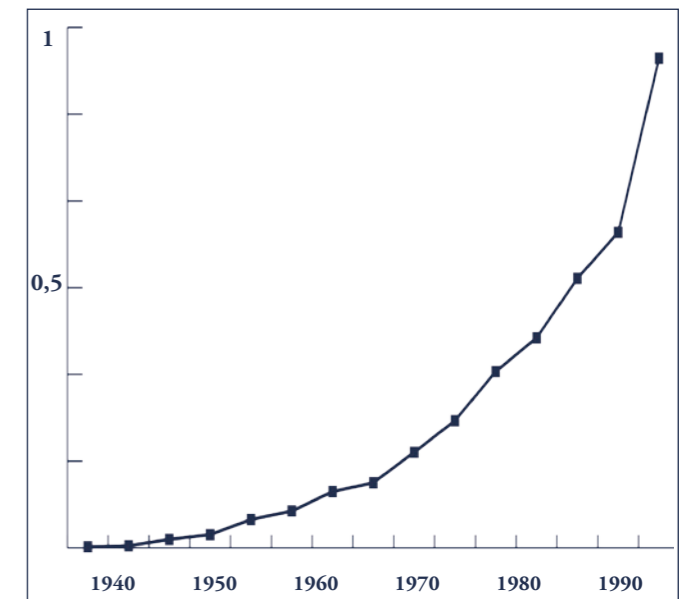
Da **Johannes Fibiger** (1867-1928) i 1900 blev udnævnt til professor i patologisk anatomi, indledtes en markant udvikling af faget ikke blot inden for undervisning og forskning, men også vedrørende diagnostiske vævsundersøgelser.

I 1905 blev *Lægeforeningens Cancerkomité* dannet. Den havde til formål at arbejde for at kræft blev diagnosticeret så tidligt som muligt, for herigennem at reducere dødeligheden. I 1908 foretoges en optælling af kræftpatienter i Danmark, som viste 1135 tilfælde, hvoraf 35 % var mikroskopert. I 1909 indførte man vederlagsfri mikroskopering under ledelse af Fibiger, hvorved også uformuende patienter fik adgang hertil (5).

De mikroskopiske undersøgelser fortsatte efter Fibigers død i 1928. I 1938 var der foretaget i alt

48000 undersøgelser, og på dette tidspunkt blev undersøgelserne inddraget under de tre radiumstationer i København, Odense og Århus. På dette tidspunkt var der etableret patologiske institutter i alle tre byer, og fra dette tidspunkt er det udelukkende speciallæger i patologisk anatomi, der foretager undersøgelserne, som indtil da nogle steder også blev foretaget af kliniske assistenter på kirurgiske afdelinger (4). I de næste tre årtier oprettes patologiske institutter overalt i landet.

Udviklingen i antallet af mikroskopiske undersøgelser fra slutningen af 1930'erne til i dag er illustreret i Figur 3.4.1.1. Den nærmest eksponentielle vækst skyldes dels demografiske forhold (befolkningstilvækst og ændret alderssammensætning), men især den øgede brug af perkutan nålebiopsi og biopsitagning i forbindelse med endoskopiske undersøgelser.



Figur 3.4.1.1. Antallet af rekvisitioner (x 10⁶) af mikroskopiske histologiske undersøgelser modtaget på Patologisk Institut, Odense Universitetshospital fra instituttets start i 1937 til 1995. (6)

3.4.2: Farvemethoder i diagnostisk histopatologi

Både hæmatoxylin og eosin farvningerne var allerede introduceret som histologiske farvemethoder hver for sig, da **Wisowsky** i 1876 beskrev anvendelsen af de to farvestoffer som dobbeltfarvning (7). Anvendelsen af den kombinerede hæmatoxylin-eosin (HE) farvning har siden uomtvisteligt været den hyppigst anvendte farvemethode i diagnostisk histopatologi. En overvejende del af de mikroskopiske vurderinger og diagnoser baseres også i dag alene på morfologisk vurdering af HE farvede snit.

Som beskrevet i kapitel 2 forelå der i første halvdel af 1900-tallet en bred palet af farvemethoder (specialfarver) der belyste vævsstrukturernes sammensætning på en mere specifik måde end HE farvningen muliggjorde, og som stadig er i brug. Groft taget kan disse specialfarver kategoriseres i følgende grupper: Farvninger for nucleinsyrer, bindevævskomponenter, kulhydrater, herunder mukosubstanser, lipidfarvninger, farvning for amyloid og farvninger for endogene aminer, pigmenter, mineraler og mikroorganismer, samt farvning af hæmatologiske præparater.

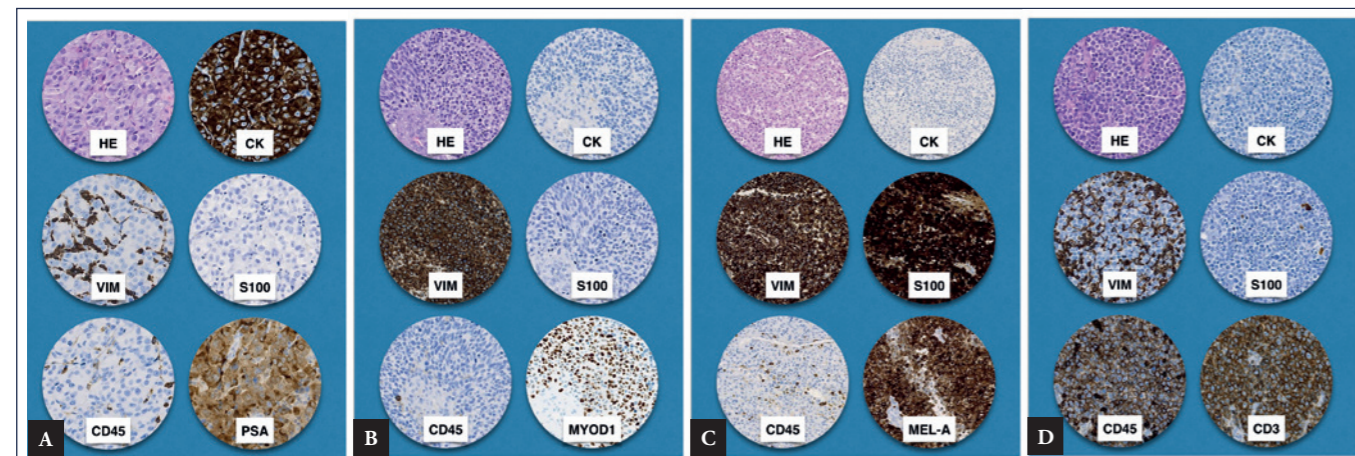
Almindeligvis foretages den primære mikroskopiske undersøgelse på et HE farvet snit, og herefter udvælges om nødvendigt specialfarvninger, afhængigt af den pato-anatomiske problemstilling. Det er overvejende ved fremhævelse af vævsstruktur og identifikation af stofelementer, at disse farvemethoder har deres styrke. Inden for diagnosticering af neoplasier yder de "klassiske" specialfarvninger begrænset information.

Med enzymfarvningernes fremkomst fra 1940 og frem knyttedes store forhåbninger til at disse farvemethoder ville bidrage til at belyse neoplastiske forandrings histogenese og biologi. Der blev udført omfattende forskningsarbejder i de næste årtier (8), hvis resultater desværre ikke levede op til forhåbningerne. Kun i forbindelse med klassifikation af leukæmier, har enzymfarvninger indgået som standardmetode (9).

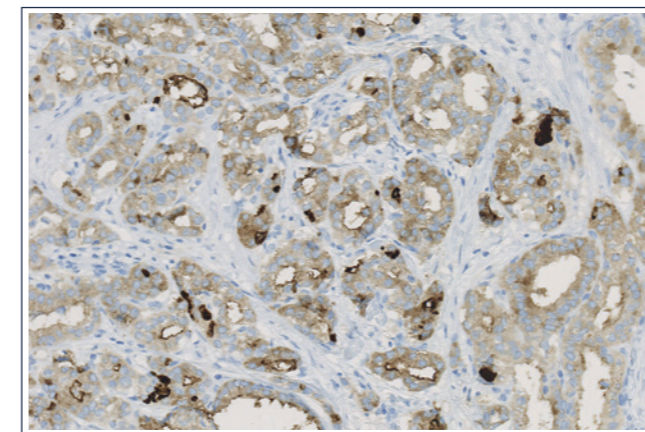
Derimod er enzymfarvninger fortsat en vigtig metode i forbindelse med vurdering af muskelbiopsier og diagnosticering og klassifikation af myopatier (se figur 2.11).

Immunhistokemiske farvemethoder i form af immunfluorescensfarvninger blev i diagnostisk sammenhæng i begyndelsen helt overvejende anvendt i forbindelse med diagnosticering af nyre- og hudbiopsier, specielt i forbindelse med immunologisk betingede tilstande. En metode der, som anført i 3.3, stadig anvendes.

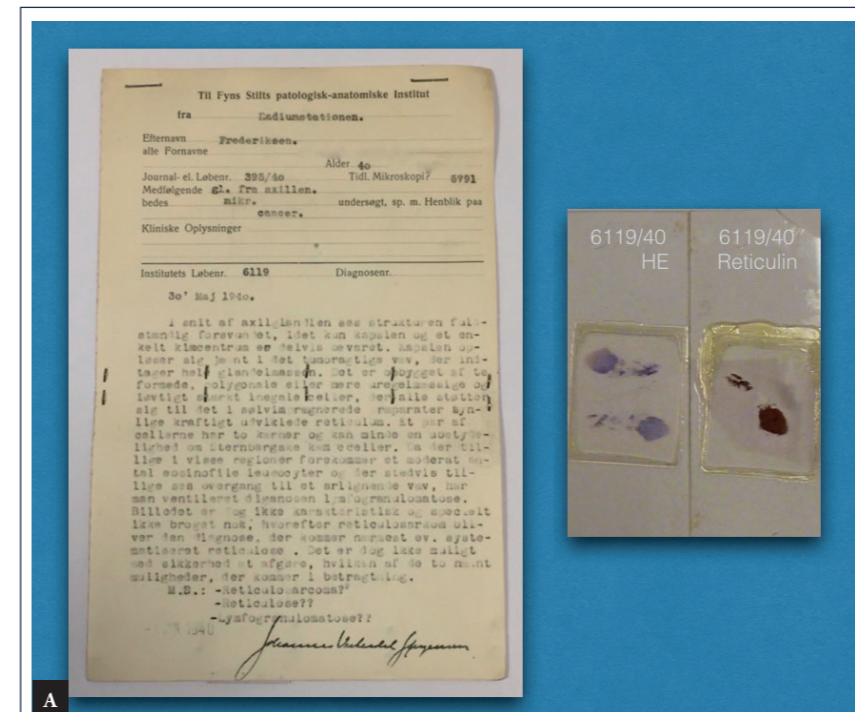
Med introduktionen af enzymimmunhistokemiske metoder anvendt på formalinfikseret og paraffinindstøbt væv skete en nærmest revolutionær udvikling i anvendelsen af immunhistokemi ved diagnosticering af neoplastiske forandringer. Immunhistokemisk karakterisering af tumorer indgår nu som et helt uundværligt værktøj, specielt ved klassifikation af lavtdifferentierede tumorer (Figur 3.4.2.1), bestemmelse af metastasers udgangspunkt (Figur 3.4.2.2) og klassifikation af lymfomer (Figur 3.4.2.3) (10).



Figur 3.4.2.1. Farvning af lavtdifferentierede tumorer. Ved hjælp af et afgrænset panel af antistoffer: Cytokeratin (CK), Vimentin (VIM), S-100 og CD45 er det muligt med stor sikkerhed at klassificere lavtdifferentierede tumorer, som kan være vanskelige at klassificere på basis af det morfologiske billede, som det fremtræder i et hæmatoxylin-eosinfarvet snit (HE). Det primære antistofpanel er suppleret med antistoffer, der gør klassificeringen yderligere sikker. **A:** Prostatacarcinom (CK+, VIM-, S-100-, CD45-). Positiv for prostataspecifikt antigen (PSA). **B:** Rhabdomyosarkom (CK-, VIM+, S-100-, CD45-) positiv for MyoD. **C:** Malignt melanom (CK-, VIM+, S-100+, CD45-). Positiv for Melan-A. **D:** T-lymfom (CK-, VIM-, S-100-, CD45+). Positiv for CD3. (Ole Nielsen)



Figur 3.4.2.2. Metastase fra folliculært thyroideacarcinom farvet for thyroideaglobulin. (Ole Nielsen).



Figur 3.4.2.3. Historien om et malignt lymfom.

Disse billeder siger mere end mange ord, hvilken betydning nyere immunhistokemiske undersøgelser har for en sikker lymfomklassifikation.

I 1937 åbnede Patologisk Institut på Odense Amts og Bys Sygehus, og 3 år efter modtog instituttets første prosector Johannes Vesterdal Jørgensen (1901-1976) en lymfeknude, hvorfra snit blev beskrevet som anført (A).

76 år senere skæres nye snit fra de oprindelige vævsklodser, og ny HE-farvning (B) samt supplerende immunhistokemiske farvninger (C), muliggør nu en præcis klassifikation af lymfomet, som beskrevet af Birgitte Preiss. (Ole Nielsen, Birgitte Preiss)

Revision 4. februar 2016.

Der ses en lymfeknude med ophævet arkitektur og store områder med nekrose. På en baggrund af eosinofile granulocytter samt spredtliggende små lymfocytter ses en del store celler. Nogle af disse ligner Reed-Sternberg celler, mens andre ligner Hodgkinceller, og atter andre er pleomorfe med flere kerner. Immunhistokemisk er de store celler positive for CD30, CD15, IMP3, p53 delvis, og de har nedsat ekspresion PAX5. De er negative for CD20, CD79a, BOB1, OCT2 og EBV. De spredtliggende små lymfocytter i baggrunden er overvejende T-lymfocytter positive for CD3.

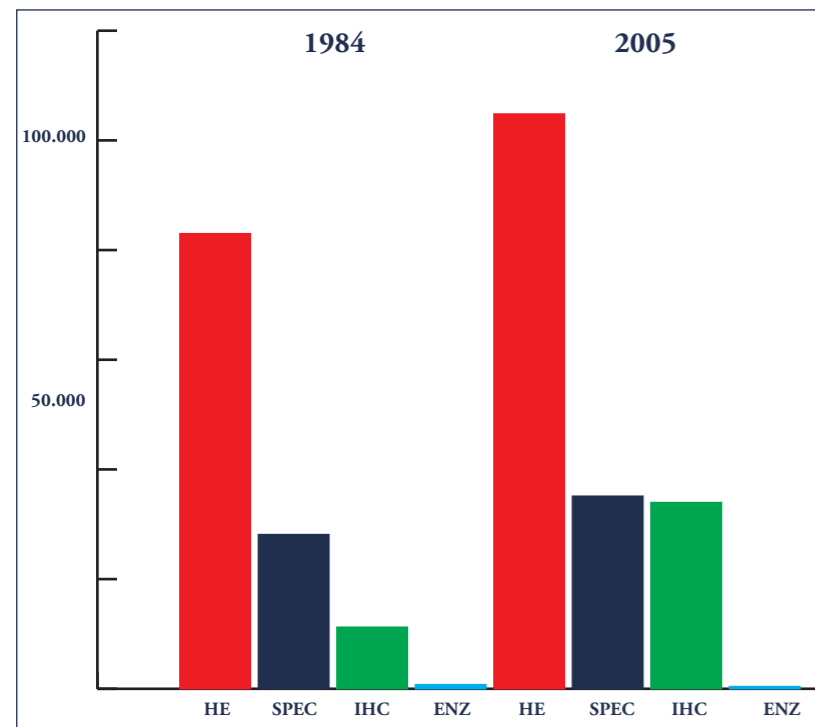
Konklusion: I lymfeknude fra aksel ses forandringer forenelige med et klassisk *Hodgkins lymfom*. Vækstmonstret har et sarkomatøst præg, og der ses mange Hodgkinceller. Subtypen vurderes derfor at være *lymfocyte depletion*.

D Birgitte Preiss

Anvendelsen af de forskellige typer af farvemetoder har ændret sig med tiden, og specielt immunhistokemiske metoder indtager nu en relativt mere dominerende plads, således som det fremgår af Figur 3.4.2.4.

Da man i 1990'erne afdækkede, at der i maligne tumorer ofte forekommer aktivering af onkogene, inaktivering af suppressorgener og ændring i DNA reparationsmekanismer, opstod behovet for at kunne visualisere disse forandringer. Visualiseringen foregår enten ved immunhistokemisk at

påvise den ændrede proteinekspression eller ved hjælp af *in situ*-hybridisering direkte at påvise den genetiske ændring. Disse undersøgelser indgår nu rutinemæssigt i karakterisering og klassifikation af maligne tumorer og dermed som grundlag for specifik behandlingsstrategi. Anvendelsen af immunhistokemiske metoder i kombination med *in situ*-hybridisering i forbindelse med farmakodiagnostiske tests er beskrevet i 3.5.



Figur 3.4.2.4. Antallet af farvninger fordelt på de forskellige histokemiske farvemetoder udført på Patologisk Institut, Odense Universitetshospital i hhv 1984 og 2005. HE: Hæmatoxylin-eosin, SPEC: Specialfarvninger (se tekst), IHC: Immunhistokemiske farvninger, ENZ: Enzymfarvning. (6)

Litteratur

- Bennet JH. Introductory address to a course of lectures on histology and the use of the microscope. *Lancet* 1845;1:517-22.
- Donaldson F. The practical application of the microscope to the diagnosis of cancer. *Am J Med Sci* 1853;25:43-70.
- Hannover A. Om epithelioma, en særegen svulst. København 1852.
- Genner J, Schiødt T. Patologisk anatomi. I: Københavns Universitet 1479-1979, bind VII: Det lægevidenskabelige fakultet. København 1979.
- Secher K. Nobelpristageren Johannes Fibiger. Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck 1945
- Data indhentet, registreret og formidlet af Kirsten Dahl, Tina Rask, Ole Nielsen, Martin Bak og Annelise Olsen, Afdeling for Klinisk patologi, Odense Universitetshospital 2015.
- Wissowsky A. Über das eosin als reagenz auf Hämoglobin und die bildung von blutgefäßen und blutkörperchen bei säugetier und hünereibryonen. *Arch Mikr Anat* 1876;13:479-96.
- Burstone MS. Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. New York & London: Academic Press, 1962.
- Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT et al.-French-American-British (FAB) co-operative group. Proposals for the classification of acute leukemias. *Br J Haematol* 1976;33:451-8.
- Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry, 4th edition. Saunders, 2013

3.5: FARMAKODIAGNOSTISKE TEST OG NYERE MOLEKYLÆR-DIAGNOSTISKE TEKNIKKER

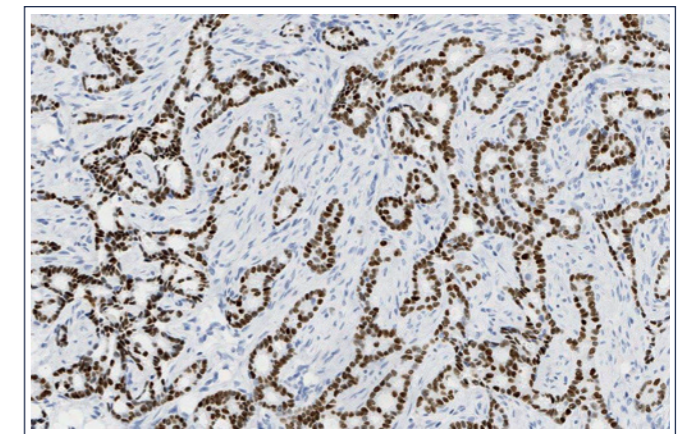
af Jan Trøst Jørgensen

Inden for de sidste 10-15 år har en ny type prædiktive histokemiske test set dagens lys, de såkaldte farmakodiagnostiske test, der har vundet indpas ved behandling af visse onkologiske sygdomme. En sådan test anvendes til at identificere de patienter der vil være mest tilbøjelige til at drage fordel af en givet lægemiddelbehandling. Udviklingen af disse test bygger på et indgående kendskab til det specifikke lægemiddels virkningsmekanisme og de molekulære forudsætninger, som må være til stede i tumoren for at opnå effekt. I den engelsksprogede litteratur omtales disse test som "companion diagnostics". De farmakodiagnostiske test udvikles oftest i et tæt parallelt forløb med det givne lægemiddel, og er derfor specifikt knyttet til brugen af dette (1). I Figur 3.5.1 er vist en model for hvordan et sådant prospektivt udviklingsforløb mellem et lægemiddel og en farmakodiagnostisk test kan se ud (2).

Sammenkædningen af molekylærtesting og lægemiddeludvikling ser vi første gang i 1970'erne i forbindelse med udviklingen af antiøstrogen tamoxifen (Nolvadex) til behandling af kvinder med brystcancer. Her var der dog ikke tale om et parallelt udviklingsforløb, men mere en eksplorativ undersøgelse af østrogenreceptor status hos nogle af de patienter, der indgik i de kliniske forsøg (3). Hormonreceptorstatus (østrogen/progesteron) blev

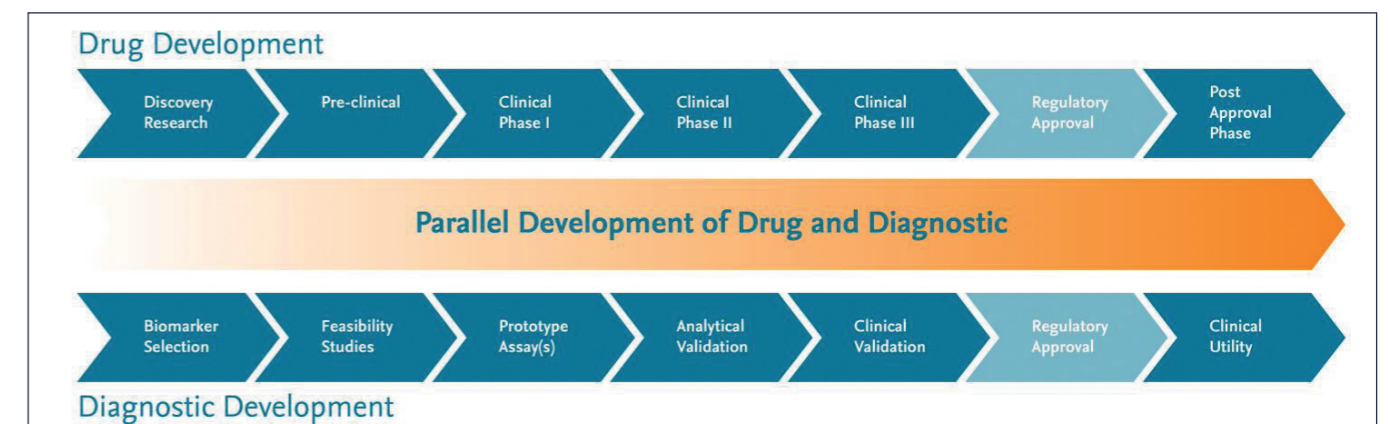
på det tidspunkt bestemt ved hjælp af en biokemisk test, og ikke som i dag med immunhistokemi.

Med udviklingen af de immunhistokemiske assay blev bestemmelsen af hormonreceptorstatus standard ved udredningen af patienter med brystcancer (Figur 3.5.2).



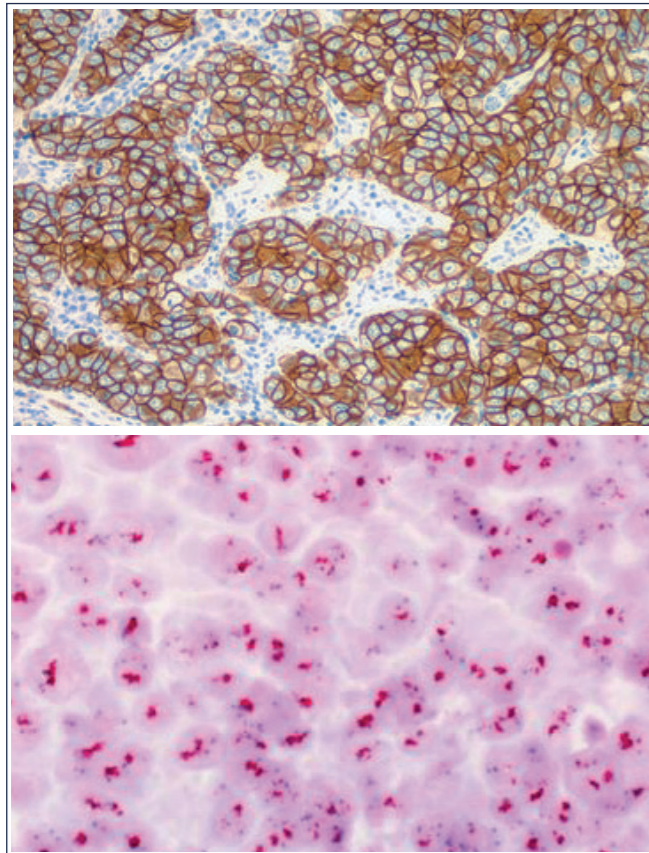
Figur 3.5.2. Farvning af mamma karcinom for østrogenreceptor, der viser positiv reaktion i 100% af kernerne. Immunperoxidase farvning med klon EP1 (Dako).

En positiv hormonreceptorstatus, specielt østrogen, er ligeledes en forudsætning for effekt af endokrin behandling med antiøstrogen eller aromatasehæmmere (4, 5).



Figur 3.5.1. Parallelt udviklingsforløb mellem et lægemiddel og en farmakodiagnostisk test (2). Figuren er trykt med tilladelse fra Elsevier B.V. (Copyright Elsevier, 2015).

Det første eksempel på et parallelt udviklingsforløb af lægemiddel og diagnostisk test ser vi i 1990'erne da den amerikanske biotekvirksomhed Genentech udvikler trastuzumab (Herceptin) til behandling af kvinder med fremskreden HER2-positiv brystcancer. Her udvikles sammen med lægemidlet et immunhistokemisk assay til detektion af HER2 ekspression (HercepTest, Dako) (5) (Figur 3.5.3).



Figur 3.5.3. Farvning for HER2 i mammakarcinom. Øverst immunoperoxidase farvning, der viser kraftig membranrelateret positiv reaktion, (HercepTest, Dako). Nederst *in situ*-hybridisering, der viser amplifikation af HER2 genet (røde prikker) i kernerne (*HER2* CISH pharmDx kit, Dako).

Siden begyndelsen af dette århundrede har en række targeterede onkologiske lægemidler været igennem et tilsvarende parallelt udviklingsforløb, og i Tabel 1 er en del af disse listet sammen med deres respektive farmakodiagnostiske test (6). Fælles for de i Tabel 1 nævnte test er at de alle bygger på forskellige histokemiske metoder.

Test	Metode	Lægemidler
ALK Break Apart FISH Probe Kit	FISH	Crizotinib (Xalkori)
ALK (D5F3) CDx Assay	IHC	Crizotinib (Xalkori)
c-Kit pharmDx Kit	IHC	Imatinib (Glivec)
EGFR pharmDx Kit	IHC	Cetuximab (Erbix) Panitumumab (Vectibix)
ER/PR pharmDx Kit	IHC	Tamoxifen (Nolvadex) Letrozol (Femar) Anastrozol (Arimidex) Exemestan (Aromasin)
HercepTest	IHC	Trastuzumab (Herceptin) Pertuzumab (Perjeta) Ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla)
<i>HER2</i> FISH pharmDx Kit	FISH	Trastuzumab (Herceptin) Pertuzumab (Perjeta) Ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla)
<i>HER2</i> CISH pharmDx Kit	CISH	Trastuzumab (Herceptin)
PD-L1 IHC 22C3 pharmDx	IHC	Pembrolizumab (Keytruda)

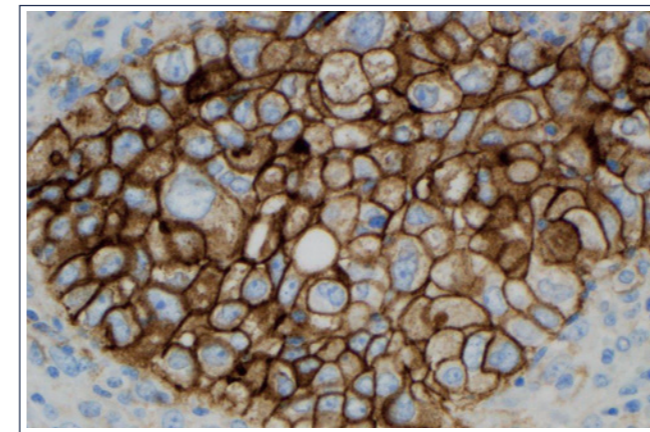
FISH = Fluorescens In-situ hybridisering
CISH = Chromogen In-situ hybridisering
IHC = Immunhistokemi

Tabel 1. Farmakodiagnostiske test.

Inden for det seneste år har vi set immunterapi vinde indpas ved behandling af onkologiske sygdomme. For PD-1 hæmmeren pembrolizumab (Keytruda) spiller ekspressionen af PD-L1 en rolle for effekten ved behandling af ikke-småcellet lungecancer.

I oktober 2015 blev pembrolizumab godkendt i USA til behandling af ikke-småcellet lungecancer sammen med det immunhistokemiske assay PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako) (7) (Figur 3.5.4).

Ud over protein-ekspression, antallet af genkopier og gentranslokation kan genmutationer også spille en rolle for effekten af en række targeterede onkologiske lægemidler. For eksempel har et lægemiddel som vemurafenib (Zelboraf), til behandling af metastatisk melanom, kun effekt hos de patienter hvis tumorer er *BRAFV600*-mutationspositive. Til detektion af om patienterne er mutationspositive anvendes COBAS 4800 *BRAF V600* Mutation (Roche) testen, som er et



Figur 3.5.4. Ikke-småcellet lungekarcinom (NSCLC) farvet for PD-L1 med immunoperoxidasefarvning, (PD-L1 IHC 22C3, pharmDx, Dako)

polymerase-kædereaktionsassay (Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay) (8).

For langt de fleste onkologiske sygdomme optræder der samtidigt en række forskellige genforandringer, og her vil det ofte være ønskeligt at kunne detektere disse ved én analyse. En sådan mulighed tilbyder DNA-sekventering, og her vil specielt højkapacitets teknologien "next generation sequencing" (NGS) være attraktiv. Endnu findes der ingen myndighedsgodkendte farmakodiagnostiske test byggende på NGS teknologien, men det er formentlig kun et spørgsmål om tid, før det sker. Et andet sted hvor både PCR og NGS teknologien utvivlsomt vil spille en rolle, er i forbindelse med analyse af frit cirkulerende tumor DNA (ctDNA). Forskning har vist, at ctDNA detekteret i plasma kan vise, om der er udviklet resistens over for en igangværende behandling (9). Ligeledes vil måling af ctDNA kunne anvendes til monitorering af recidiv, som det for nyligt er vist ved mammacancer (10).

I disse år ser vi at onkologiske sygdomme mere og mere klassificeres i overensstemmelse med deres molekylære karakteristika, og her vil både de traditionelle histokemiske metoder sammen med de nyere molekylærdiagnostiske teknikker spille en afgørende rolle. Denne nye molekylære sygdomsklassifikation vil ligeledes spille en afgørende rolle ved udviklingen af nye og mere effektive onkologiske lægemidler.

Litteratur

- Jørgensen JT. Clinical application of companion diagnostics. Trends Mol Med 2015;21:405-7.
- Interview med Jan Trøst Jørgensen. Elsevier R&D Solution – Pharma & Biotech, Elsevier B.V., 2015. (https://www.elsevier.com/_data/assets/pdf_file/0003/98436/Elsevier-Interview-Dr-Jorgensen-May-2015.pdf)
- Lerner HJ, Band PR, Israel L et al. Phase II study of tamoxifen: report of 74 patients with stage IV breast cancer. Cancer Treat Rep 1976;60:1431-5.
- Rose C, Thorpe SM, Andersen KW et al. Beneficial effect of adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients with high oestrogen receptor values. Lancet 1985;1:16-9.
- Jørgensen JT, Nielsen KV, Ejlertsen B. Pharmacodiagnosics and targeted therapies - a rational approach for individualizing medical anticancer therapy in breast cancer. Oncologist 2007;12:397-405..
- US FDA. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). October 14, 2015. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm>
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2015;372:2018-28.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation N Engl J Med 2011;364:2507-16.
- Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature 2013;497:108-12.
- Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. Sci Transl Med 2015;7(302):302ra133.

KAPITEL 4: KVALITETSSIKRING, CERTIFICERING OG STANDARDISERING

4.1: DANSK DELTAGELSE I INTERNATIONALT KVALITETSSIKRINGSARBEJDE

af Hans Olaf Lyon

4.1.1: Starten på internationalt kvalitetssikringsarbejde

Med den overvældende tilgang af nye farvestoffer i slutningen af 1800-tallet og begyndelsen af 1900-tallet (se 2.1), blev det snart evident, at der var behov for en eller anden form for sikring af kvaliteten af farvestofferne, for at man kunne have tillid til, at man kunne opnå reproducerbare resultater ved anvendelsen af dem.

Det første tiltag til kvalitetssikring af farvestoffer blev foretaget af **Carl Weigert** (1845-1904), der tilskyndede sin elev **Georg Grübler** til at påbegynde arbejdet med at afprøve farvestofferne systematisk, for at sikre nogenlunde ensartede resultater. "Grübler mærkningen" blev et kvalitetsstempel og tysk producerede farvestoffer fik herigennem nærmest verdens monopol.

Med udbruddet af 1. verdenskrig blokeredes tilgangen af tysk producerede farvestoffer. Dette nødvendiggjorde, at man i U.S.A. startede en produktion af farvestoffer, som i begyndelsen mildt sagt ikke var nogen succes. Kvaliteten af de producerede farvestoffer var så ringe, at hovedparten var uanvendelig til bakteriologisk og histologisk brug og kunne slet ikke leve op til "den tyske kvalitet".

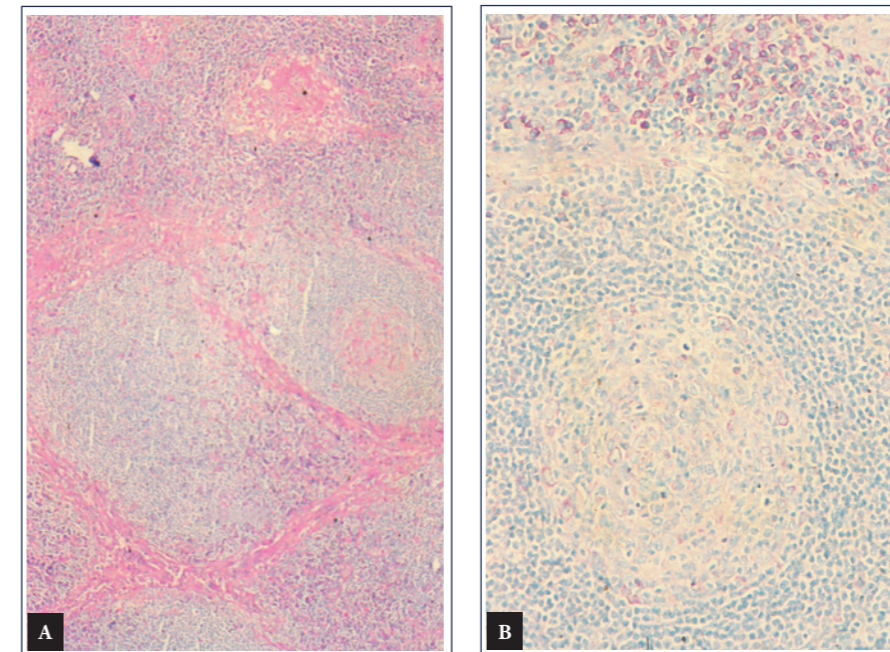
Da lageret af tysk producerede farvestoffer fra før 1. verdenskrig var ved at være udtømt, nedsattes i U.S.A. en kommission bestående af eksperter inden for bakteriologi, zoologi, botanik og laboratoriearbejde, der i 1921 afholdt to konferencer om farvestofstandardisering. Denne "**Commission on the Standardization of Biological Stains**" begyndte herefter en systematisk afprøvning af farvestofprodukter i veldefinerede tests. Laboratoriearbejdet finansieredes efterhånden

med indtægter fra salg af certificeringsmærkater, som farvestoffabrikkerne kunne påsætte farvebøtterne som kvalitetsgaranti.

I forbindelse med 2. verdenskrig øgedes kommissionens arbejde og dermed indtjening væsentligt. Kommissionen omdannedes i 1944 til aktieselskab og ændrede navn til **Biological Stain Commission (BSC)**, et navn den stadig bærer. Foruden løbende afprøvninger og certificering af farvestoffer publicerer BSC også bog og tidsskrift. I 1925 udgav **H. J. Conn**, som på daværende tidspunkt var formand for BSC, 1. udgaven af bogen *Biological Stains*. Bogen er et standardreferenceværk om farvestoffer til brug i bakteriologiske og histologiske laboratorier. Den seneste udgave (10th edition) udkom i 2002 (1). Endvidere startede Conn i 1925 udgivelsen af tidsskriftet *Stain Technology*, der løbende publicerer resultaterne af BSC's arbejde og resultater fra andre laboratoriers arbejde. I 1991 ændrede tidsskriftet navn til *Biotechnic & Histochemistry* og bliver siden 2012 udelukkende udgivet som online tidsskrift.

4.1.2 Hvordan et DSCH bestyrelsesmedlem blev involveret i internationalt kvalitetssikringsarbejde

Ved VIth International Histochemistry and Cytochemistry Congress, der blev afholdt i Brighton, England i dagene 17-22. August 1980, fremlagde **Hans Lyon** resultaterne af analyser af flere farvestoffer fra forskellige producenter udført i henhold til forskrifter fra Biological Stain Commission (BSC). Især resultaterne for pyronin Y viste store variationer med hensyn til koncentration af farvestof i prøverne (2) (Figur 4.1.2.1).



Figur 4.1.2.1. Methyl grøn-pyronin farvninger med anvendelse af to forskellige fabrikater af pyronin i 1978. A: Farvning med pyronin fra GURR, der viser udtalt uspecifik farvning i bl.a. bindevæv. B: Farvning med pyronin fra BDH, med tilfredsstillende farvning af RNA. (Per P.Clausen)

Præsentationen blev godt modtaget, især af ordstyreren, som var professor i anatomi **Dietrich Wittekind** fra Freiburg i Tyskland. Wittekind havde i adskillige år beskæftiget sig med farvestoffer og farvningsmekanismer og er bl.a. kendt for at have demonstreret, at den såkaldte *Romanowsky-Giemsa effekt* alene skyldes en reaktion mellem vævs- og celleelementer og farvestofferne azur B og eosin (3).

Efter foredraget havde Hans Lyon og Dietrich Wittekind en god samtale om betydningen af rene farvestoffer til biologisk brug. Dette resulterede i, at Hans Lyon fik invitation til Freiburg for at deltage i en gruppe, der bestod af folk med lignende interesse i farvestofrenhed. Gruppen bestod blandt andre af **Erik Schulte** fra Tyskland, **Andreas De Leenheer** fra Holland og **Richard Horobin** og **Michael Barer** fra England.

4.1.3: Europæisk standardiseringsarbejde

I 1987 blev gruppen anerkendt som arbejdsgruppe under *European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS)*. Arbejdsgruppen publicerede en del artikler om standardisering af specifikke farvestoffer i *Histochemical Journal* (4).

I begyndelsen af 1990erne tog Wittekind og Schulte initiativ til via det tyske standardiseringsorgan DIN og Lyon via Dansk Standard (DS) at overføre gruppens arbejde til European Committee for Standardization (CEN), der varetager standardisering indenfor EU og EFTA. Efter en del til dels vanskelige forhandlinger lykkedes det i 1999, bl.a. ved stor hjælp ved **Lars Vejens** fra Sverige, at få arbejdsgruppens standard godkendt som EN 19001 under CENs tekniske komite: *TC 140, In vitro diagnostic devices*.

4.1.4: Internationalt standardiseringsarbejde

Indenfor *International Organization for Standardization (ISO)*, der med 162 medlemslande formidler koordineringen af ensretning af industrielle standarder, oprettedes kort tid efter en teknisk komite: *ISO/TC 212: Clinical tests*. Idet Hans Lyon af DS fik bemyndigelse til at repræsentere Danmark i *ISO/TC 212* blev CEN dokumentet konverteret og godkendt som *EN-ISO 19001* i 2002. Dokumentet er beregnet for fabrikkerne af reagenser og omhandler reagenser og udvalgte procedurer, med information om renhed og anvendelse i in vitro diagnostiske tests. Det blev senere revideret og godkendt som *EN-ISO 19001:2014*.

Dette dokument suppleredes i 2015 med et dokument beregnet for brugere, godkendt som *ISO-17459, Medical Laboratories - Reagents used for staining in biology - Guidance for users*.

I november 2015 er der på et møde af *ISO/TC 212* foreslået et nyt projekt: *Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination processes for FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) tissue-Part 4: Diagnostic Staining*. De tidligere dele af projektet omfatter en 1. del for DNA, 2. del for RNA og en 3. del for proteiner.

I 1998 blev Wittekind indvalgt som bestyrelsesmedlem af BSC. Han foreslog at Schulte og Lyon skulle forelægge noget af det ovenfor beskrevne arbejde på det årlige møde i BSC. I 2002 blev Lyon valgt som bestyrelsesmedlem, hvor han bl.a. har bidraget til publikationer for BSC (1,5-16).

Litteratur

- Horobin R, Kiernan J (editors). Conn's Biological Stains: A Handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in Biology and Medicine, 10th. Edition. Taylor & Francis, 2002.
- Lyon H, Andersen A-P, Clausen PP, Herold B. Certified and non-certified dyes. A physical, chemical and biological investigation. Abstracts of the Vth International Histochemistry and Cytochemistry Congress 1980. The Royal Microscopical Society, Oxford; p238.
- Zipfel E, Grezes JR, Naujok A, Seiffert W, Wittekind DH, Zimmermann HW. Romanowsky dyes and the Romanowsky-Giemsa effect. 3. Microspectrophotometric studies of Romanowsky-Giemsa staining. Spectroscopic evidence of a DNA-azure B-eosin Y complex producing the Romanowsky-Giemsa effect. Histochemistry 1984;81:337-51.
- Lyon H, Schulte E, De Leenheer A, Lewis S, Friemert V, Struck C, Gadson D, Allison R, Brunk U, van Liedekerke B, Hasselager E, Horobin R, Husain O, Wittekind D, Zschoach H. Dye standards. Part I. Terminology and general principals. Part II. 1. Pyronin Y (CI 45005); 2. Methyl green (CI 42585) and ethyl green (CI 42590); 3. Thionin (CI 52000); 4. Victoria blue B (CI 44045); 5. Pararosanilin (CI 42500); 6. Rosanilin (CI 42510); 7. Magenta II (No CI number); 8. New fuchsin (CI 42520). European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS), Subcommittee on reference Materials for Tissue Stains (SRMTS). Histochem J 1992;24:217-42.
- Lyon HO, Kiernan J. News from the Biological Stain Commission. Biotech & Histochem 2008;83:201-3.
- Lyon HO, Kiernan J. News from the Biological Stain Commission. Biotech & Histochem 2008;83:285-88.
- Lyon HO, Dapson RW. News from the Biological Stain Commission No 5. Biotech Histochem. 2009; 84:117-20. doi: 10.1080/10520290902846820. Epub 2009 Apr 2.
- Lyon HO, Horobin RW. News from the Biological Stain Commission no. 6. Biotech Histochem. 2010; 85:149-51. doi: 10.3109/10520291003648474. No abstract available.
- Lyon HO. News from the Biological Stain Commission No. 10. Biotech Histochem. 2011; 86:61-3. doi: 10.3109/10520295.2010.511567. Epub 2010 Aug 31.
- Lyon HO, Horobin RW. News from the Biological Stain Commission No. 11. Biotech Histochem 2012; 87:72-7. doi: 10.3109/10520295.2011.634376.
- Lyon HO. News from the Biological Stain Commission no. 12. Biotech Histochem 2012; 87:235-9. doi: 10.3109/10520295.2012.657244. Epub 2012 Feb 2.
- Lyon HO. News from the Biological Stain Commission no. 13. Biotech Histochem 2013; 88:54-8. doi: 10.3109/10520295.2012.741263. Epub 2012 Dec 5.
- Lyon HO. News from the Biological Stain Commission No. 14. Biotech Histochem 2013; 88:208-12. doi: 10.3109/10520295.2013.767477. Epub 2013 Mar 5.
- Lyon HO, Horobin R. News from the Biological Stain Commission no. 15. Biotech Histochem 2014;89:232-9. doi: 10.3109/10520295.2014.895044.
- Lyon HO. News from the Biological Stain Commission, no. 16. Biotech Histochem 2015; 90:231-8. doi: 10.3109/10520295.2014.1000969. Epub 2015 Mar 6.
- Lyon HO. News from the Biological Stain Commission, No. 17. Biotech Histochem 2016; Mar 4:1-8. [Epub ahead of print].

4.2: DEN VESTDANSKE ERFA-GRUPPE OG EKSTERN KVALITETSSIKRING

af Ole Nielsen

4.2.1: Starten på undersøgelser af metodeparametre

Efter Taylor og Burns som de første i 1974 (1) beskrev anvendelsen af immunperoxidase teknikken til påvisning af antigener i formalin fikserede, paraffinindstøbte vævssnit og **Huang** et. al i 1976 (2) supplerede med opdagelsen af proteolytiske enzymeres demaskerende effekt, var vejen banet for de immunhistokemiske (IHC) metoders anvendelse i den patoanatomiske rutinediagnostik. De første år var udbuddet af diagnostisk relevante antistoffer dog begrænset, men i starten af 1980'erne tog anvendelse af immunperoxidase farvninger fart - også på paraffinsnit.

Da Hvidovre Hospital åbnede i 1976 etablerede daværende reservelæge **Per Prætorius Clausen** (PPC) i samarbejde med laboranterne **Niels Johansen** og **Annelise Petersen** en mindre IHC laboratorieenhed der. Man blev i det daglige arbejde hurtigt opmærksom på fiksatorenns indflydelse på farvningreaktionerne. I slut 1970'erne fortog PPC i samarbejde med **Marianne Jacobsen** og **Grete Krag Jacobsen** på patologisk institut, Herlev Hospital en række systematiske undersøgelser af fikseringens betydning for påvisningen af et stort antal antigener (3, 4).

I forbindelse med sin ansættelse som overlæge ved patologisk institut, Odense Universitetshospital (OUH), etablerede PPC i tæt samarbejde med instruktionslaborant, senere projektkoordinator **Ole Nielsen** (ON) i midt 1980'erne et IHC-laboratorium. Laboratoriet startede en omfattende systematisk gennemgang og undersøgelse af en lang række vigtige metodeparametres betydning for det endelige farvningsresultat. Parametre, der blev undersøgt, var bl.a. betydning af valg af fiksativ, fikseringstid, proteolytisk forbehandling, inkubationstider for det primære antistof, sammensætning af vaskebuffer og skylletider efter antistofinkubation, samt forskellige metoder for visualisering (detektionssystemer).

Resultaterne af disse mange undersøgelser blev ikke publiceret, men dannede i starten 1990'erne basis for en række IHC-workshops i DSCH-regi. Den første workshop blev afholdt januar 1991 på Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole på Frederiksberg under titlen: *Workshop i anvendt immunhistokemi. Metoder og diagnostik*. Den diagnostiske del af workshoppen blev varetaget af **Mogens Vyberg**, mens PPC og ON netop med afsæt i de foregående års metodeundersøgelser – primært gennem mikroskopiøvelser - ”demonstrerede de immunhistokemiske farvningsreaktioners afhængighed af vævspræparation, fiksering, reagenser og teknikker”. Workshoppen blev lidet af et tilløbsstykke og blev derfor gentaget en del gange over de følgende år, ligesom tilsvarende kurser blev afholdt i perioden 1991-2012 i Danske Bioanalytikeres (dbio) regi.

4.2.2: IHC-ERFA

I 1990 – samme år som DSCH workshoppen blev planlagt – tog patologiafdelingen på OUH med Dako som sponsor initiativ til etablering af et ”IHC-ERFA”-samarbejde for de vstdanske patologiafdelinger. Formålet var at skabe et forum, hvor laboratorierne kunne dele ”ERFAringer” relateret til IHC og immunhistokemiske metodeparametre. En tilsvarende ERFA-gruppe blev etableret i det sjællandske. De første år i den vstdanske ERFA-gruppe mødtes patologer og bioanalytikere 1-2 gange om året til ERFA-møde, hvor IHC-relaterede emner blev præsenteret og drøftet. Efter den sjællandske ERFA-gruppe nedlagde sig selv for ca. 10 år siden, er det vstdanske ERFA samarbejde nu udvidet til at omfatte alle danske patologiafdelinger samt beslægtede laboratorier med interesse for IHC.

Møderne holdes nu én gang om året – altid første tirsdag i oktober og altid på Vejle Sygehus, hvor bioanalytikerunderviser **Judith Jensen** og hendes kolleger skaber de hyggelige rammer for afvikling af møderne. Programmet for møderne planlægges dels på ERFA-møderne og dels af en ERFA-styregruppe, der

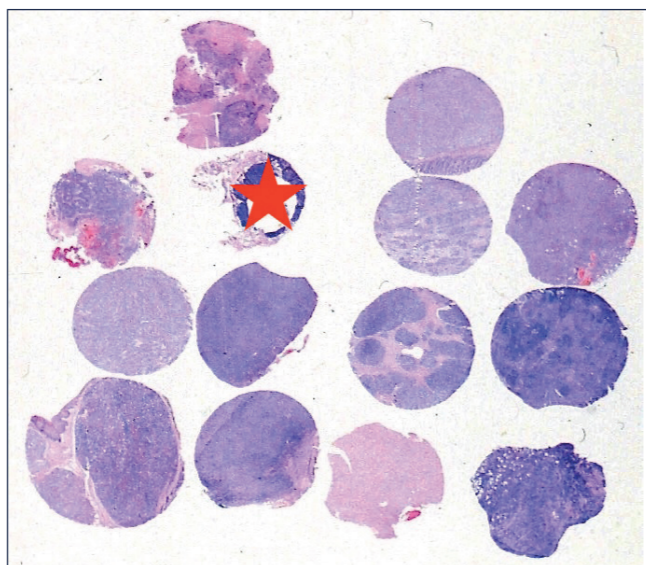
gennem årene har talt mange engagerede medlemmer (ingen nævnt-ingen glemt!). I mere end 15 år har professor **Stephen Hamilton** på møderne fungeret som en inspirerende moderator. ERFA-møderne har efter "fusionen" med den sjællandske gruppe stadig som overordnet mål – gennem erfaringsudveksling - at bidrage til høj og ensartet kvalitet af den diagnostiske immunhistokemi på de danske patologiafdelinger.

Den vstdanske ERFA-gruppe kunne i 2015 fejre 25 års jubilæum. I disse 25 år har immunhistokemien budt på væsentlige landvindinger med stor betydning for den patoanatomiske diagnostik. Således rykkede **Shi** et al's opfindelse af varmeinduceret epitop retrieval ("HIER") i 1991 (5) betydeligt på grænserne for, hvad der immunhistokemisk kan lade sig gøre på paraffinsnit. I 1995 dannede **Katherine Knight** og hendes kollegers arbejde (6) basis for produktion af monoklonale kanin antistoffer. Dako lancerede i 1998, som de første, et polymerbaseret detektionssystem. EnVision, som systemet kom til at hedde, eliminerede med ét problemet med "uspecifik baggrundsfarvning" relateret til endogent biotin, som var (og stadig er) et "indbygget" problem for de avidin-biotin baserede detektionssystemer (ABC- og LSAB-systemer). Halvfemserne blev ligeledes det årti, hvor de første halv-automatiske immunostainers ramte de danske patologiafdelinger med forbedring af IHC-farvningernes reproducerbarhed og af laboratoriernes farvningskapacitet som følge. Alle disse landvindinger har naturligvis gennem årene sat sit præg på indholdet af ERFA-møderne, hvor mange patologer og bioanalytikere har bidraget med deres viden (Figur 4.2.2.1).

Udover at skabe et forum for udveksling af IHC erfaringer har der alle år også været et solidt fokus på ekstern kvalitetssikring. I årene 1990 til 2001 blev forskellige modeller for ekstern kvalitetssikring afprøvet. Det mest ambitiøse projekt blev søsat i 1992 med alle de – på daværende tidspunkt - 13 vstdanske patologiafdelinger, som deltagere. Dette eksterne kvalitetsstudie involverede, således 57 patologer på 13 forskellige afdelinger, der fik tilsendt 12 ufarvede paraffinsnit fra en multiblok (Figur 4.2.2.2) indeholdende væv fra 13 forskellige tumorer, der skulle diagnosticeres via laboratoriernes selvvalgte antistofpaneler. Valg af antistoffer, metoder mv. blev sammen med diagnoser indsamlet og bearbejdet.



Figur 4.2.2.1. Udvalgte eksempler på præsentationer afholdt ved møder i den (vest)danske ERFA-gruppe.

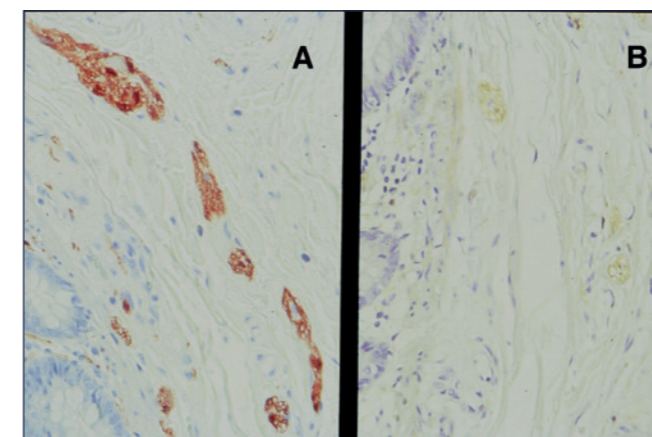


Figur 4.2.2.2. HE-snit af multiblok med 13 forskellige tumorer.

Studiet gjorde det således ikke alene muligt at vurdere en række tekniske parametres betydning for det diagnostiske resultat men også dele af den fortolkningsmæssige side af IHC-analyserne. Ikke uinteressant viste dette kvalitetsstudie "at vigtigst af alt for korrekt diagnose var valget af passende antistofpaneler og fortolkningen af IHC-farvningerne" (7).

4.2.3: Fra IHC-ERFA til NordiQC

Frem til 2001 blev en række mere klassiske eksterne kvalitetsundersøgelser af laboratoriernes IHC-farvninger foretaget i ERFA-gruppen. Disse undersøgelser bestod primært i, at de deltagende laboratorier fik tilsendt et antal ufarvede snit af paraffin multiblokke. Opgaven for laboratorierne var så, at farve for en række – i gruppen aftalte - diagnostisk relevante antigener. Farvningerne blev sammen med data vedr. farvningsproceduren returneret til en arbejdsgruppe, der så vurderede og sammenlignede kvaliteten af de returnerede snit. Resultaterne blev præsenteret på det næstfølgende ERFA-møde, hvor laboratorier således kunne se eksempler på de antistoffer/metoder, der gav de bedste resultater og dem der var knapt så gode (Figur 4.2.3.1). Disse såkaldte "antistof-assessments" (se afsnit 4.3) havde patologiafdelingerne i Aarhus, Odense eller Aalborg som tovholdere. I Aalborg blev opgaven primært varetaget af **Mogens Vyberg** og **Søren Nielsen**.



Figur 4.2.3.1. Eksempler på S-100 farvninger fra ERFA-gruppens første antistof-assessment i 1990. Lab "A" præsenterer den forventede kraftige S-100 reaktion i de perifere nerver (schwanske celler) i colon. Lab "B" underpræsenterer uacceptabelt på den samme opgave.

Efter at have "øvet sig" nogle år i det vstdanske ERFA-samarbejde, har Vyberg & Nielsen som bekendt været med til at starte den uafhængige, videnskabelige og meget velansete organisation NordiQC, der på internationalt plan leverer ekstern kvalitetssikring indenfor immunhistokemi (se 4.3). ERFA-gruppen har siden opstarten af NordiQC været heldig, at kunne bevare en tæt kontakt til organisationen. ERFA-møderne har således siden 2004 haft et fast "NordiQC-programpunkt" på dagsordenen, hvor Vyberg & Nielsen har præsenteret resultaterne af de foregående 12 måneders NordiQC assessments.

Med udgangen af 2015 stod ERFA-gruppen stærkere end længe. Årets møde trak ca. 110 engagerede deltagere til Vejle fra hele landet. Meget tyder derfor på, at IHC-ERFA møderne fortsat vil være et vigtigt forum for udveksling af erfaringer vedrørende diagnostisk immunhistokemi.

Litteratur

1. Taylor CR, Burns J. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. *J Clin Pathol* 1974;27:14-20.
2. Huang S, Minasian H, More JD. Application of immunofluorescent staining in paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest* 1976;35:383-91.
3. Jacobsen M, Clausen PP, Smidt S. The effect of fixation and trypsinization on the immunohistochemical demonstration of intracellular immunoglobulin in paraffin-embedded material. *Acta Pathol Microbiol A* 1980;88:399-76.
4. Jacobsen M, Clausen PP, Jacobsen GK. The influence of fixation on the antigenicity of different plasma proteins and oncofetal proteins in paraffin embedded material. I: Avrameas S, et al., eds.: *Immunoenzymatic Techniques- Proceedings of the Second International Symposium on Immunoenzymatic Techniques* 1983:17-20.
5. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-8.
6. Spiekker-Polet H, Sethupathi P, Yam PC, Knight KL. Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:9348-52.
7. Jensen ML, Nielsen O, Johansen P, Clausen PP. Immunohistochemistry in tumor diagnosis: External quality assessment of 13 departments of pathology in Western Denmark. *Appl Immunohistochem* 1997;5:35-44.

4.3: NORDIQC OG EKSTERN KVALITETSSIKRING AF IMMUNHISTOKEMI

af Søren Nielsen og Mogens Vyberg

4.3.1: Optakten til NordiQC

Gennem 1980'erne havde Dako, Glostrup, indledt et samarbejde med flere immunlaboratorier om afprøvning af antistoffer og reagenser, hvilket bl.a. udmøntede sig på Patologisk Institut i Aalborg, hvor **Mogens Vyberg** i 1988 blev ansat som overlæge og fik det lægefaglige ansvar for immunhistokemi (IHC). Samtidigt tog interessen for ekstern kvalitetssikring/kvalitetsbedømmelse (external quality assessment, EQA) af IHC sin spæde begyndelse med etablering af den vestdanske ERFA-gruppe for IHC (se afsnit 4.2). Delvis inspireret heraf blev der på initiativ af Dako Norden i 1999 arrangeret et møde i forbindelse med European Congress of Pathology i Barcelona, hvor repræsentanter fra 9 nordiske patologi-afdelinger, herunder Aalborg, drøftede mulighederne for etablering af et nordisk kvalitetssikringsprojekt i stil med *United Kingdom National External Quality Assessment for Immunocytochemistry* (UK NEQAS ICC). I en række forsøgsrunder med deltagelse af op til 55 nordiske laboratorier blev der påvist uacceptabelt store variationer i farvningsresultaterne for selv velkarakteriserede immunmarkører. Erfaringerne fra disse runder både viste et behov og gav et erfaringsgrundlag for en fast organisation, *Nordic Immunohistochemical Quality Control* (NordiQC), som startede sit virke 01.01.2003 (Figur 4.3.1.1).



Figur 4.3.1.1. NordiQCs logo med en "isbjørnefod", der illustrerer antigen-antistofreaktionen som prikken over i'et.

4.3.2: Etableringen af NordiQC

NordiQC blev fra starten af ledet af en styregruppe (core group) bestående en patolog-repræsentant fra hvert af de nordiske lande Danmark (**Mogens Vyberg**), Finland (**Heikki Helin**, fra 2011 **Ari Ristimäki**), Norge (**Emina Torlakovic**, fra 2003 **Bjørn Risberg**, og fra 2009 **Jan Klos**) og Sverige (**Tomas Seidal**, fra 2012 **Viktoria Gaspar**). Organisationen blev forankret på Patologisk Institut, Aalborg, med afdelingsbioanalytiker **Søren Nielsen**, Aalborg, som teknisk leder.

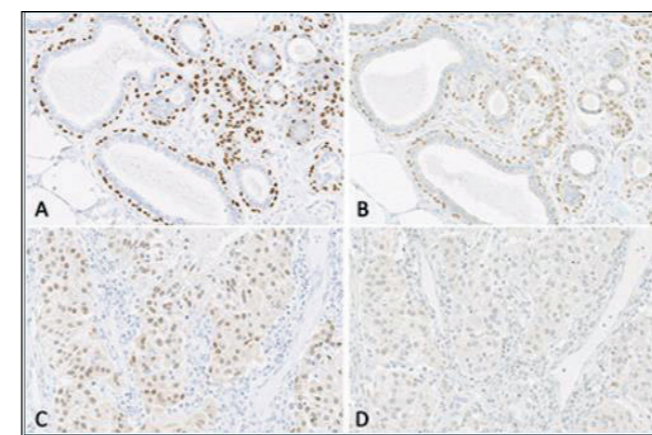
De primære fokusområder for NordiQC har siden opstarten været at definere og identificere optimale farvningsresultater, identificere de antistoffer, protokoller og platforme, der syntes væsentlige for optimale henholdsvis insufficiante farvningsresultater, identificere kontrolmateriale til at vurdere kvalitet og reproducerbarhed, og beskrive alle disse forhold på sin hjemmeside, samt give individuelle rekommandationer til laboratorierne som anført nedenfor.

Styregruppen fastlagde 3 årlige runder med kvalitetstest af farvninger for 5-6 almindeligt brugte immunmarkører baseret på paraffinsnit af multivævsblokke konstrueret til formålet. Som forudsætning for at kunne deltage har laboratorierne fra starten på NordiQCs hjemmeside, www.nordiqc.org, skulle indrapportere centrale protokolparametre (i alt ca. 50) inklusive antistoffer/kloner, forbehandlingsmetoder, detektionskit og farvningsplatforme. Styregruppen har sammen med Søren Nielsen udgjort en bedømmergruppe (assessor group), som senere har suppleret sig med projektkoordinator **Ole Nielsen**, Odense, og bioanalytiker **Michael Bzorek**, Næstved. Gruppen har gennemgået alle de modtagne farvninger i plenum ved hjælp af et multihovedmikroskop. Hver farvning er tildelt et score (optimal, good, borderline eller poor), og bedømmelserne e-mailed til de deltagende laboratorier, idet et insufficient (borderline eller poor) resultat altid ledsages af en forklaring og anbefaling med hensyn evt. ændring af antistof og/eller andre centrale protokolparametre.

På grund af et særligt behov for kontinuerlig bedømmelse af påvisning af prädiktive markører (estrogen receptor og HER2), blev der etableret et separat modul for IHC i mammapatologi. I dette modul fungerede fra Danmark overlæge **Birgitte Bruun Rasmussen** (Roskilde), fra 2010 overlæge **Vibeke Jensen** (Århus). I tillæg blev der dannet et separat modul med fokus på *in situ*-hybridisering for HER2, hvor Ole Nielsen, Michael Bzorek og overlæge **Anne-Vibeke Lænkholm** (RH, senere Slagelse Sygehus) er tilknyttet.

4.3.3: Publikation af resultater i NordiQC

På NordiQCs hjemmeside publiceres alle de generelle resultater af kvalitetsbedømmelserne med en detaljeret gennemgang af de centrale protokolparametre som (på basis af den systematiske analyse af IHC resultaterne og de anvendte metoder) anses for at kunne påvirke farvningsresultaterne for de enkelte immunmarkører. For hver immunmarkør er der således identificeret og beskrevet de mest pålidelige antistoffer og "best practice" parametre på de mest udbredte platforme. Desuden præsenteres eksempler på anbefalede kontrolmaterialer og billeder af forventede reaktionsmønstre i disse samt eksempler på optimale og insufficiante farvningsreaktioner i de cirkulerede vævssnit (Figur 4.3.3.1).



Figur 4.3.3.1. Illustration af forskelle på en optimal og suboptimal farvning for SOX10. Til venstre den optimale reaktion i mammavæv (øverst) og malignt melanom (nederst). Se http://www.nordiqc.org/Run-45-B20-H8/Assessment/Run45_SOX10.pdf.

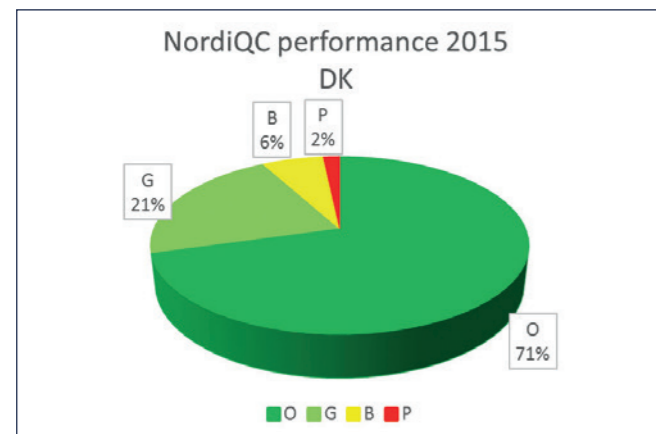
Hjemmesiden er frit tilgængelig, således at alle laboratorier og firmaer kan udnytte informationerne. I 2003 deltog 70 nordiske laboratorier (næsten alle, der

udførte IHC analyser i væsentligt omfang) i NordiQC. Laboratorier uden for Norden begyndte herefter at søge optagelse, således at NordiQC i 2015 nåede op på over 700 deltagende laboratorier fra mere end 80 lande. Frem til 2015 har NordiQC gennemført 45 runder i det generelle modul, 20 runder i mammacancermodul, 8 runder i HER2 ISH modul, og tests for ca. 90 forskellige IHC-markører op til 20 gange er blevet gennemført. Det samlede antal immunfarvede snit bedømt frem til 2015 udgør godt 30.000 (svarende til ca. 150.000 vævssnit).

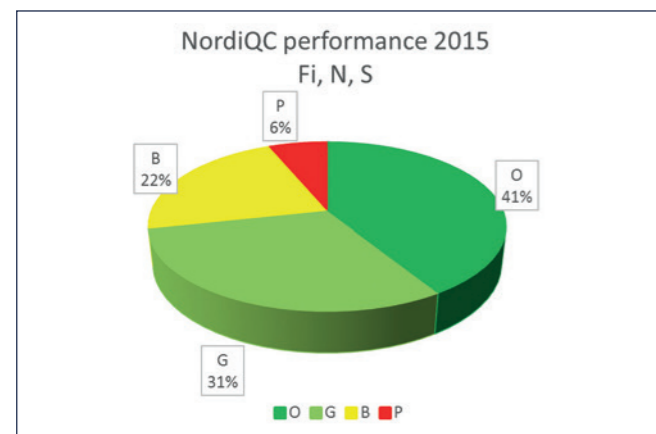
Overordnet er ca. 30% af alle immunfarvninger i det generelle modul insufficiante, det samme gælder ca. 20% af farvningerne i mammacancermodul. Blandt de ca. 9.000 insufficiante farvninger er ca. 90% karakteriseret ved at være for svage eller helt falsk negative. I langt de fleste tilfælde har det været muligt at udpege den eller de vigtigste årsager (dårligt antistof, dårligt kalibreret ready-to-use produkt, antistof følsomt for en bestemt platform, fejlagtig antistoffortynding, utilstrækkelig demaskering, og insensitivt visualiseringssystem).

Individuelle vejledninger og protokolanalysen synes at have en effekt: Laboratorier, der har været med i flere runder, har en 'pass rate', der ligger ca. 20 procentpoints højere end laboratorier, som deltager for første gang. Laboratorier, der efter et insufficient resultat ændrer deres procedurer i henhold til NordiQCs anbefalinger forbedrer resultatet med ca. 50 procentpoints over de laboratorier, der ikke følger anbefalingerne. Resultaterne for 14 HER2-runder i mammacancer modul viser, at laboratorier, der – formentlig for at spare penge – udvikler egne HER2-protokoller, klarer sig markant dårligere end laboratorier, der anvender CE-mærkede og FDA-ankendte kits, hvilket ud over de menneskelige omkostninger også påfører sundhedsvæsenet store tab, hvilket er publiceret. NordiQC er i løbende dialog med firmaer, der fortsætter med at sælge dårlige antistoffer eller give vildledende protokol-anvisninger, og har i enkelte tilfælde måttet rette henvendelse til FDA for at trænge igennem.

I Danmark har vi qua ERFA-møder og adskillige lokale kurser, primært initieret af Ole Nielsen (Odense) haft en årelang tradition for en systematisk gennemgang af immunhistokemiens muligheder og udfordringer og overordnet har dette haft en afsmittende effekt på danske laboratoriers 'pass-rate' i NordiQC jævnført med de øvrige nordiske lande. Dette illustreret i nedenstående figurer.



Figur 4.3.3.2a. Fordeling af score for danske laboratorier i NordiQC "General module" 2015.



Figur 4.3.3.2b. Fordeling af score for øvrige nordiske laboratorier i NordiQC "General module" 2015. (O: Optimal, G: Good, B: Borderline, P: Poor).

Aktuelt omfatter NordiQCs faste stab (alle ansat på Aalborg Universitets hospital) en scheme director (Mogens Vyberg), en scheme manager (Søren Nielsen) og en scheme organizer (**Rasmus Røge**), 2 bioanalytikere (**Lise Emanuelsen** og **Jesper Lund Lauridsen**) og 2 sekretærer (**Maria Lund Nielsen** og **Lilli Guldager Malaca**), alle deltidsansatte i NordiQC.

4.3.4: Undervisning og videnskabelig publikationsvirksomhed i NordiQC

NordiQC har gennem alle årene arrangeret eller medvirket til møder og korte kurser i de nordiske lande, bl.a. i forbindelse med patologiselskabernes årsmøder og firmaernes brugermøder. Uden for de nordiske lande har en eller flere af NordiQCs patologer (Søren Nielsen, Jan Klos, Rasmus Røge og Mogens Vyberg) undervist i bl.a. Polen, Italien, USA, Canada, Rusland, Kina og Australien. Fra 2008 har der i Aalborg for bioanalytikere, scient'er og patologer været afholdt årlige 3-dages workshops med fokus på anvendelse af immunmarkører til tumordiagnostik, gennemgang af præanalytiske, analytiske og postanalytiske parametre, protokoloptimering og anvendelse af kontroller, samt tekniske og diagnostiske faldgruber. Deltagerne har især været fra de nordiske lande, men nogle er kommet helt fra Nord- og Sydamerika, Asien og Australien. Antallet af pladser har været begrænset til 50, hvilket har givet ventetider på op til 2 år. Fra 2014 er Aalborg-workshops (under Søren Niensens ledelse) blevet mere rettet mod bioanalytikere, idet der parallelt hermed er etableret årlige workshops i Krakow (under Jan Klos' ledelse) primært rettet mod patologer. I 2013 og 2015 har der været arrangeret internationale IHC konferencer i Aalborg med omkring 300 deltagere. Den næste konference er i 2017.

På grundlag af de mange data genereret i NordiQC regi er der publiceret flere artikler med tests af specifikke immunmarkører og med generelle retningslinjer for IHC, bl.a. i samarbejde med IHC EQA organisationer i Canada, UK og Australien (se nedenstående referencer). I 2015 blev der med afsæt i European Society of

Pathology (ESP) dannet en paraplyorganisation, *International Quality Network Pathology* (IQN Path), med NordiQC, UK NEQAS ICC og 7 andre internationale organisationer for kvalitetssikring af IHC og molekylærbiologi, som grundlæggere. Organisationen er indregistreret i Luxembourg med **Han van Krieken**, Holland, som præsident og **Jacqueline Hall**, England, som direktør. Formålet med IQN Path er at skabe et forum for udvikling af internationale guidelines for patoanatomiske laboratorieundersøgelser (i samarbejde med bl.a. WHO). I 2016 er NordiQC endvidere medstifter af et nyt videnskabeligt selskab, *International Society for Immunohistochemistry and Molecular Morphology* (ISIMM) med **Clive R. Taylor** som første præsident. Selskabets primære opgave er at fremme forskning og uddannelse inden for IHC.

Litteratur

1. Vyberg M, Nielsen S, Røge R, Sheppard B, Ranger-Moore J, Walk E, Gartemann J, Rohr UP, Teichgräber V. Immunohistochemical expression of HER2 in breast cancer: socioeconomic impact of inaccurate tests. *BMC Health Serv Res*. 2015 Aug 29;15:352. doi: 10.1186/s12913-015-1018-6. PubMed PMID: 26318869; PubMed Central PMCID: PMC4553016.
2. Vyberg M, Nielsen S. Proficiency testing in immunohistochemistry-experiences from Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiQC). *Virchows Arch*. 2015 Aug 26. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26306713.
3. Torlakovic EE, Nielsen S, Vyberg M, Taylor CR. Getting controls under control: the time is now for immunohistochemistry. *J Clin Pathol*. 2015 Nov;68(11):879-82. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202705. Epub 2015 Aug 18. Review. PubMed PMID: 26286753; PubMed Central PMCID: PMC4680144.
4. Torlakovic EE, Nielsen S, Francis G, Garratt J, Gilks B, Goldsmith JD, Hornick JL, Hyjek E, Ibrahim M, Miller K, Petcu E, Swanson PE, Zhou X, Taylor CR, Vyberg M. Standardization of positive controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015 Jan;23(1):1-18. doi: 10.1097/PAI.0000000000000163. Review. PubMed PMID: 25474126.
5. Torlakovic EE, Francis G, Garratt J, Gilks B, Hyjek E, Ibrahim M, Miller R, Nielsen S, Petcu EB, Swanson PE, Taylor CR, Vyberg M; International Ad Hoc Expert Panel. Standardization of negative controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the international ad hoc expert panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Apr;22(4):241-52. doi: 10.1097/PAI.0000000000000069. PubMed PMID: 24714041; PubMed Central PMCID: PMC4206554.
6. Borrishtolt M, Nielsen S, Vyberg M; Demonstration of CDX2 is highly antibody dependant. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013 Jan;21(1):64-72. doi: 10.1097/PAI.0b013e318257f8aa. PubMed.PMID: 24714041; PubMed Central PMCID: PMC4206554.
7. Røge R, Nielsen S, Vyberg M; Carb-3 is the superior anti-CD15 monoclonal antibody for immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Jul;22(6):449-58. doi: 10.1097/PAI.0b013e318292b764. PubMed PMID: 24714041; PubMed Central PMCID: PMC4206554.

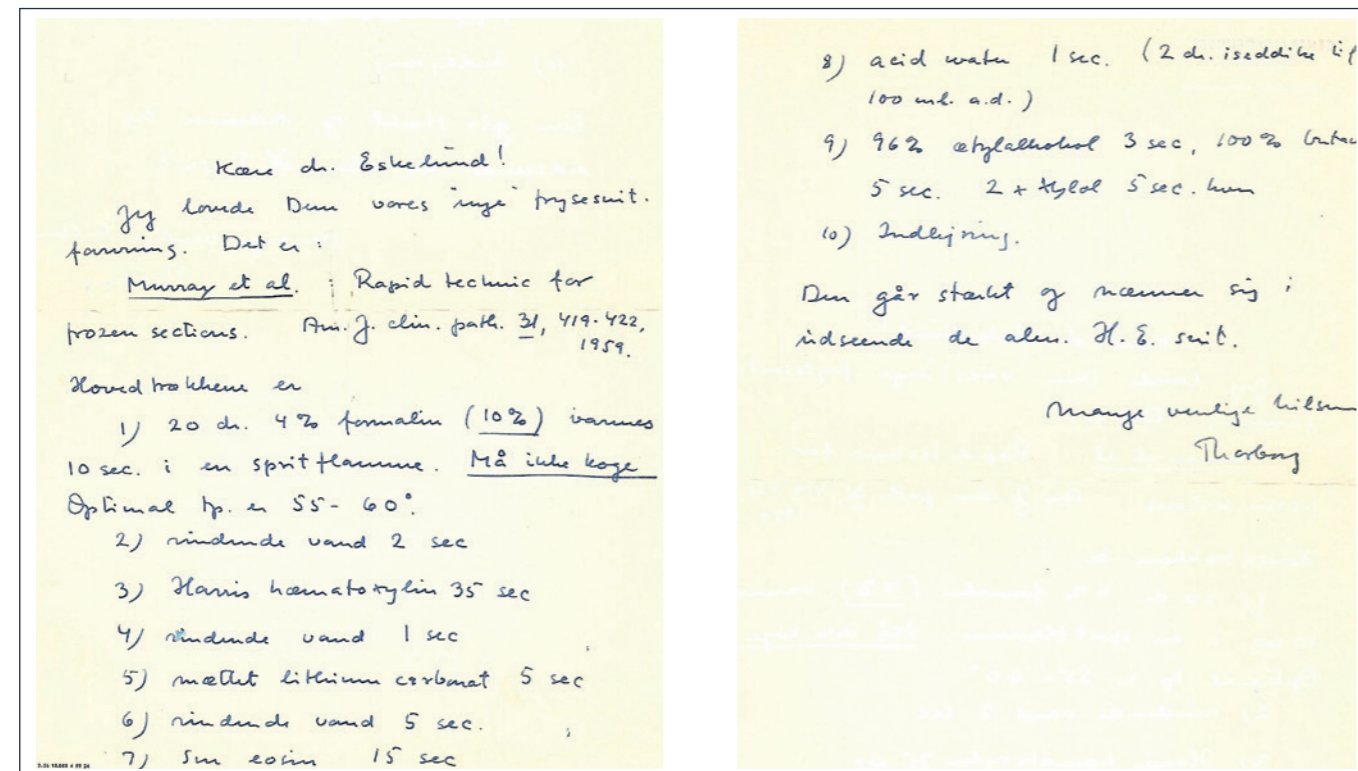
KAPITEL 5: UDDANNELSE OG EFTER- UDDANNELSE I HISTOKEMI I DANMARK

af *Inger Lindebo Holm, Anne Palle Andersen*
og *Hans Olaf Lyon*

5.1: VEJEN TIL EN GRUNDUDDANNELSE FOR HISTOLABORANTER

Vidensdeling og erfaringsudveksling indenfor histokemi imellem laboratorierne fandt i tiden op til 1960'erne hyppigst sted ved personlige kontakter (Figur 5.1.1). Oprindeligt var det de unge reservelæger, der udførte hospitalernes analysearbejde. I perioden 1920-1950 blev analysearbejdet efterhånden overtaget af

sidemandsoplærte "laboratorieassistenter" og i takt med at analyserepertoiret voksede og egentlige kliniske laboratorieafdelinger blev etableret, opstod behovet for en formel og standardiseret uddannelse. I løbet af 50'erne startede der forskellige uddannelsesforløb for hospitalslaboranter (mest klinisk kemi), og i



Figur 5.1.1. Erfaringsudveksling og vidensdeling imellem landets laboratorier foregik og foregår i vid udstrækning i form af personlige kontakter. Her ses et "staldtips" fra prosektor J.V. Thorborg i Randers til lektor Viggo Eskelund (se Figur 2.1.11) på Rigshospitalet en gang i slut-1950'erne om en hurtigfarvning til frysensnit. (Fundet i farvningsopskriftsbog, som har tilhørt Viggo Eskelunds laborant Kit Brest-Nielsen)

1958 kom den første formaliserede uddannelse til Hospitalslaborant (klinisk kemi). I 1960 begyndte man at overveje en uddannelse til Histolaborant og i løbet af 60'erne udbød Landsforeningen af Hospitalslaboranter (LaH) kurser for hospitalslaboranter der arbejdede som histolaboranter.

Komponenterne til en histokemisk uddannelse i verdensklasse var: Faglig ekspertise, ildsjæle, god koordinering og et godt samarbejde med laboratorierne/klinikken.

Det faglige grundlag for uddannelsen i histokemi - udenfor laboratorierne blev løbet i gang af lektor **Knud Jørgen Pedersen** på Institut for Almen Zoologi, Københavns Universitet (KU). K.J. Pedersen forskede og underviste i vævsbiologi og havde derfor både stor interesse for og indsigt i histokemi. Han oprettede tilvalgskurser på KU i "Histologisk-histokemisk metodik" i begyndelsen af 1960'erne - kurser som blev meget vigtige for de senere undervisere i histokemi på hospitalslaborant/bioanalytikeruddannelsen.

På kurset kom man alle de gængse farvemetoder igennem teoretisk og praktisk med K. J. Pedersen - og nogle år senere suppleret med magister **Poul Prentø** - som undervisere. Vævet var ganske vist ikke humant, men kanin, mus, rotte og regnorm, men den histologisk/histokemiske fagekspertise var suveræn. Samtidig var reservelæge **Hans Lyon** begyndt at interessere sig for histologisk teknik/histokemi og traf sammen med K.J. Pedersen og Poul Prentø på deres Histologisk-histokemisk metodik kursus i 1965. Et par år senere kom civilingeniør **Anne Palle Andersen** (retningskoordinator for histo-uddannelse (1967-1989) på kurset og i 1973 blev det cand. scient. **Inger Lindebo Holms** (retningskoordinator/afdelingsleder 1989-1995) tur.

Anne Palle Andersen blev i 1966 ansat på Hospitalslaborantskolen og fik fra 1967 ansvaret for histolaboranternes uddannelse. Ansættelsen var lidt af en tilfældighed, da man gerne ville ansætte en læge - men en sådan kunne ikke ansættes, da ministeriet

ikke ville bekoste en afdelingslederstilling, der var nødvendig, da skolens leder **Johan Larsen** "kun" var cand. pharm. Hans Lyon blev i 1967 bogstaveligt talt trængt op i en krog i en kupe i lyntoget, på vej fra et kursus i nyrepatologi for patolog-anatomer i Århus, af professor, dr. med. **Hemming Poulsen**, som var overlæge på patologisk institut på Københavns Kommnehospital (PI-KH). Hans lovede at påtage sig lederskabet af et histokemisk laboratorium på PI-KH og tage sig af uddannelsen på Hospitalslaborantskolen indenfor dette felt.

De første der blev histo-uddannet, var allerede autoriserede histolaboranter og dermed var aktørerne til en histo-uddannelse i verdensklasse på Hospitalslaborantskolen i København linet op: Laboratorierne med histo-uddannede undervisere og en uddannelsesinstitution med histo-ildsjæle: **Anne Palle Andersen** som den engagerede leder, koordinator med laboratorierne og underviser (perioden 1966-1989), **Hans Lyon** som gennemgående histokemisk ekspert fra klinikken og underviser (perioden 1967-2002), **Poul Prentø** som fagekspert og underviser (perioden 1967-2005 on and off) og **K. J. Pedersen** som censor ved hovedkursus eksamen (indtil 1996). Cand. vet. **Erik Hasselager** var timelærer i mange år og som histo-instruktionslaboranter på skolen blev et fremragende team ansat: **Jette Aarsø, Birgitte Overgård Nielsen** og **Else Krasnik** (der først forlod histoundervisningen i 2013) (Figur 5.1.2).



Figur 5.1.2. Aktørerne til en histo-uddannelse i verdensklasse. Fra venstre: a) Hans Lyon, Erik Hasselager, Poul Prentø, b) Anna Palle Andersen, c) Inger Lindebo Holm, d) Jette Aarsø, e) Birgitte Overgaard Nielsen og f) Else Krasnik. (Inger Lindebo Holm)

5.2: Specialespecifik uddannelse til histo-cyto hospitalslaborant

I 1964 kom den første midlertidige uddannelsesplan for histolaboranter, i 1965 afholdtes det første hovedkursus, i 1968 blev planen formaliseret (1) og endelig 1. april 1975 kom *Indenrigsministeriets cirkulære om uddannelse af patolog-anatomiske hospitalslaboranter* (2), en uddannelse der først blev ændret radikalt mht. histologisk teknik/histokemi 21 år senere i 1996, da man gik over til en generalist uddannelse af hospitalslaboranter/bioanalytikere.

Uddannelsen af patologisk-anatomiske/histo-cyto hospitalslaboranter blev placeret i København - og *uddannelsen var nok den bedste af sin art i Europa - måske i verden.*

Uddannelsen var en 3-årig vekseluddannelse med hovedvægt på uddannelsen i klinikken (26 mdr. klinik - 10 mdr. på skole). Adgangskravet var realeksamen, studentereksamen eller tilsvarende. Eleverne blev ansat på en patolog-anatomisk afdeling og fik løn under hele uddannelsen.

Målet med uddannelsen var, at eleven efter endt uddannelse kunne gå direkte ind og varetage en arbejdsfunktion på laboratoriet, så cirkulærets beskrivelser (2) var præcise angivelser af hvilke teknikker og analyser den færdiguddannede elev skulle have kendskab til og skulle kunne udføre.

I cirkulæret var der endvidere krav om, at analysepertoirer blev ajourført i takt med den teknologiske udvikling, samt at underviserne i klinikken skulle have såvel en pædagogisk som en faglig videreuddannelse. Der kom et nyt cirkulære i 1980 (3) hvor undervisning i klinisk cytologi blev indføjet, og i alle årene blev udmøntningen af cirkulæret ajourført, når nye analyser eller teknikker vandt indpas på de patolog-anatomiske afdelinger (så som immunhistokemi, mikrobølgeovne, *in situ*-hybridisering, xylenfri præparation), ligesom der blev indført projektarbejde i histologisk/cytologisk teknik (1984) i takt med de pædagogiske strømninger.

Uddannelsen blev overordnet styret af et Patolog-anatomisk undervisningsråd med repræsentanter

fra klinikken (læge, instruktionslaborant, ledende laborant), fra skolens undervisere (akademisk underviser og instruktionslaborant), fra LaH samt skolens patolog-anatomiske retningskoordinator/afdelingsleder. Retningskoordinatoren havde den daglige ledelse (administration, økonomi, pædagogik) af uddannelsens skoledel samt den vigtige koordinering med laboratorierne.

Det var let at dokumentere overfor udenlandske laboratorier, at de med fordel kunne ansætte danske "histo-cytter", ligesom der faldt mange rosende ord, når undervisningsplaner og projektrapporter blev fremvist ved besøg fra europæiske og amerikanske institutter – samt en vis bestyrtelse over at resultaterne fra de mange projektforsøg ikke blev publiceret (Figur 5.2.1).

De færdiguddannede histo-cyto hospitalslaboranter



Figur 5.2.1. Et blandt mange forsøg, der indgik i den metodologisk omfattende uddannelse til histo-laborant. Her er det en undersøgelse af cosin farvningens afhængighed af pH. (Inger Lindebo Holm)

kunne virkelig deres profession, ikke kun den praktiske del, men også vurdering og tolkning af farvningerne, så der kunne fejlfindes og kvalitetssikres. De kunne også udvikle professionens metoder og formidle, hvilket alle projektrapporterne fra perioden 1984-1996 er et tydeligt bevis for. Ser man på de histokemiske rapporter (150-250s.) "kassen" (se figurene: Boks 2.4 - Figur 3 og Figur 2.1.7) fra de afsluttende praktiske eksaminer, kan de hvad videnskabeligt professionsniveau og faglig kreativitet angår, godt måle sig med nutidens bachelorrappporter. Hvad angår specifik professionsfaglig viden var niveauet højere end nu, ligesom evnen til at vurdere analyseresultaterne

var sikrere - en naturlig følge af en større rutine og et snævert professionsfelt på højt niveau.

5.3: Generalistuddannelserne til hospitalslaborant/bioanalytiker

I 1995 (4) blev alle de specialespecifikke hospitalslaborant uddannelser revideret efter lange og trange forhandlinger. Den teknologiske og samfundsmæssige udvikling krævede modernisering af de gamle cirkulærer, og der var behov for en mere fleksibel uddannelse af hospitalslaboranter til alle laboratoriemedicinske specialer. De tre hidtidige specialeretninger (klinisk kemi, blodtypeserologi og patolog-anatomisk) blev nedlagt, og i stedet blev uddannelsen en generalistuddannelse, der uddannede til alle fem specialer (klinisk biokemi, patologisk anatomi, blodtypeserologi, mikrobiologi, klinisk fysiologi og nuclearmedicin).

De studerende blev fra 1996 ansat via den koordinerede tilmelding og fik SU og var indtil 2001 ansat af en laboratoriemedicinsk afdeling. I praktikperioderne var de studerende tilknyttet et amt eller en kommune og efterhånden kom der flere uddannelsesinstitutioner til (ud over København og Århus kom Odense, Næstved og Esbjerg), ligesom uddannelsesinstitutionerne i år 2001 blev lagt ind under CVU'erne og i 2008 Professionshøjskolerne. I 2001 (5) blev uddannelsen en semesteropdelt professionsbachelor og i 2008 (6) en modulopdelt professionsbachelor.

Uddannelsen var ikke mere målrettet specifikke arbejdsfunktioner, men rettede sig primært mod at *kvalificere den studerende til efter endt uddannelse at fungere selvstændigt som bioanalytiker og herunder indgå i tværfagligt samarbejde.*

5.4: Generalist og professionsbachelor bioanalytikerens histokemi

I den første generalistuddannelse (1996-2001) rummede faget Histokemi/histologisk teknik ud over celle- og vævspræparering alle analyseprincipper udført *in situ* på celler og væv, dvs. alm. klassisk histokemi/farvebinding, enzymhistokemi, immunhistokemi og -cytokemi og *in situ*-hybridisering. Undervisningen lå forholdsvis sent i uddannelsen og specialets nye analysemetoder blev

inddraget i pensum og justeringer og prioriteringer foretaget i forhold til den teknologiske udvikling. I klinikken (hvis man kom på patolog-anatomisk afd.) havde man stadig tid til en grundig oplæring både teoretisk og praktisk.

Desværre var det allerede ved overgangen til generalistuddannelsen i 1996 blevet politisk ukorrekt at tale om specialespecifikke analyser, og ved udfærdigelsen af professionsbachelor studieordningen i 2001, måtte analysernes speciale tilhørsforhold helst ikke fremgå.

For histokemien betød det at histokemi nu blev en biomolekylær kemisk biokemisk analyse (KBA) placeret på 2. semester og at analysemetoderne indenfor enzymhistokemi, immunhisto- og cytokeremi og molekylærbiologisk histokemi blev flyttet til andre analyseområder, der ikke relaterede sig til væv. Enzymhistokemien forsvandt helt og immunhistokemien (der jo fyldte mere og mere i professionen) blev indskrænket til 2 timers forelæsning og én øvelse i forbindelse med et *Problem Baseret Lærings* (PBL) forløb på 4. semester.

Den molekylærebiologiske histokemi - ligeledes i rivende udvikling- blev repræsenteret ved en én øvelse på 4. semester koblet på et klinisk cytologisk PBL forløb.

I den nuværende modulopdelte (2 moduler/semester) professionsbachelor uddannelse hedder de biomolekylær kemisk biokemisk analyse (KBA) igen Histokemi, men ellers er der ikke ændret meget: På modul 3 er der gennemgang af vævspræparering og en fikseringsøvelse, farvebindingsteori og gennemgang af HE og PAP farvningerne incl. praktisk øvelse – et forløb på 36 timer. På modul 6 ligger en forelæsning og en øvelse i bindevævsfarvninger og en forelæsning og en øvelse i kulhydratfarvninger. Immunhistokemien og de molekylærebiologiske *in situ* metoder ligger på modul 8 og 10 med hver en forelæsning og en øvelse. I forbindelse med den immunhistokemiske øvelse er tilføjet en forelæsning i billedanalyse og en praktisk analyse i bestemmelse af antal østrogenreceptor-positive celler.

For de studerende, der vælger at udføre deres bachelor projekt på en patolog-anatomisk afdeling indenfor histokemi, er der yderligere 2/3 semester (20 European Credit Transfer System (ECTS)) specialuddannelse.

Det er klart, at der ved overgangen til en generalistuddannelse må ske store ændringer og nedskæringer af specialerelaterede

fagområder i forhold til deres omfang i en specialespecifik uddannelse. I histokemi er målet nu kendskab til analyseprincipper, der kan udmøntes på mange forskellige vævsfarvninger, der er baseret på samme princip – og på kvalitetssikring af analyserne. Desværre kræver forståelse for den klassiske histokemis principper et stort kendskab til almen-, organisk- og biokemi samt fysisk kemi og histologi. Disse naturvidenskabelige fag er som histokemien selv stærkt beskåret i den nuværende bacheloruddannelse (i forhold til speciale uddannelsen), og det er slet ikke let for den studerende at spille med alle de bolde, der på en gang er nødvendige for at forstå selv en hæmatoxylin-eosin farvning på formalinfikseret væv.

Alligevel er status ikke så ringe endda, og det skyldes som tidligere nævnt fagkyndige og engagerede undervisere på skole og i klinik og ikke mindst undervisningsmaterialet, der i takt med at undervisningstimerne er blevet beskåret, er blevet gjort mere læsevenligt og mere visuelt.

Mht. uddannelsen i klinikken kan det ikke vurderes højt nok, at underviserne har haft fagspecifik videreuddannelse (IL) eller diplomuddannelse så både teori, vejledning og praktisk oplæring har været højt kvalificeret.

5.5: Undervisningsmateriale i histokemi

Histokemien i Danmark har pga. de engagerede underviseres skrivelyst altid haft et undervisningsmateriale på dansk, der til enhver tid har kunnet måle sig med den udenlandske litteratur. Undervisningsmaterialet er startet som noter - der blev udleveret - og efterhånden skrevet færdig som kompendier og bøger (Figur 5.5.1.). Rækken af udgivelser ser sådan ud:

- *Det teoretiske grundlag for histologiske og histo-kemiske metoder* af Hans Lyon og Poul Prentø, 1969

Dette kompendium blev udvidet til 2 lærebøger:

- *Histokemi I og Histokemi II* af Hans Lyon, Anne Palle Andersen, Erik Hasselager, Poul Erik Høyer, Morten Møller, Poul Prentø og Bo van Deurs, DSR forlag Landbohøjskolen 1985.

- *Theory and Strategy in Histochemistry. A Guide to the Selection and Understanding of Techniques* af Hans Lyon, Anne Palle Andersen, Erik Hasselager, Poul Erik Høyer, Morten Møller, Poul Prentø og Bo van Deurs . Springer Verlag 1991.

Med hospitalslaboranternes generalistuddannelse blev Histokemi I og II for omfattende og derfor udkom:

- *Kompendium i Kemiske og Biokemiske Analyseprincipper (KBA)*
 - *Celle- og vævspræparation*
 - *Vævsfarvning og farvningsmekanismer*
 - *Farvning af væv på basis af covalent binding og redoxprocesser*
 af Hans Lyon og Poul Prentø, 1998, Bioanalytikeruddannelsen.

Med bacheloruddannelsens nedskæringer i de naturvidenskabelige basisfag og i histokemi pensum blev dette kompendium også for svært. Derfor kom til brug på Professionshøjskolen Metropol:

- *Kompendium i Histokemi*
 - *Vævspræparation og vævsfarvning,*
 - *Bindevævs- og kulhydratfarvninger*
 af Inger Holm, Bioanalytikeruddannelsen 2013.

På Via University College benyttes:

- *Noter i farvning af celler og væv, november 2006* af K. Hallager, V. Jelsbak og T. Meyer.

Til undervisningen i immunhistokemi anvendes begge steder:

- *Anvendt Immunhistokemi* (pt. 7. udgave, 2007) Bioanalytikeruddannelsen, København. af Mogens Vyberg.

Undervisningsmaterialet har ud over bøger og kompendier naturligvis også omfattet øvelsesvejledninger, opgaver og illustrationer for at lette forståelsen og indlæringen, og efter professionsbachelor uddannelsen har animationer af farvebindingsmekanismer og sidst (2013) virtuel mikroskopi

med histokemiske annotationer været med til at lette tilegnelsen af et svært stof på kort tid.

Endvidere skal det nævnes, at der fra Hospitalslaborantuddannelsen er udgivet en række artikler publiceret i internationale tidsskrifter (7-14)

Sammenfattende kan det siges at selvom Danmark ikke længere har en grunduddannelse i histokemi i verdensklasse, kan en studerende der kommer i klinik på en patolog-anatomisk afdeling og udfører sit bachelorprojekt her stadig regnes blandt de bedste histo-uddannede.

5.6: Efteruddannelse i histokemi

Efteruddannelse i histokemi kan deles i to kategorier. Den ca. 1 årige formelle videreuddannelse til instruktionslaborant/bioanalytikerunderviser, hvor man skal have 2 års laboratorieerfaring før optagelse, og efteruddannelse i form af diverse kurser udbudt fra skoler, fagforening, faglige selskaber og private.

5.6.1: Videreuddannelse i histokemi - IL kurser 1973-1990

I 1960 kom det første kursus for ledende og instruerende hospitalslaboranter – dog med klinisk biokemisk indhold ud over ledelse og pædagogik, men i 1973 blev det første videreuddannelses kursus med et fagspecifikt modul i patologisk anatomi afholdt og i 1976 kom det næste. I 1975 blev der nedsat en arbejdsgruppe, der i januar 1978 barslede med en *Betænkning vedrørende videreuddannelse af hospitalslaboranter*.

Underarbejdsgruppen vedrørende det patolog-anatomiske område bestod af ledende laborant **Ingeborg Eilertsen**, instruktionslaborant **Ingelise Rohleder**, professor dr.med. **Steen Olsen**, overlæge dr.med. **Ulrik Henriques**, skoleleder **Johan Larsen** og overlæge **Hans Lyon**. De foreslog et fagspecifikt modul i patolog-anatomisk/histokemisk retning på 615 undervisningstimer indeholdende naturvidenskabelige støttefag og histokemi/histologisk teknik (270 undervisningstimer). Undervisningen skulle forestås af akademikere med undervisningserfaring og størst mulig fagspecifik uddannelse.

I juni 1979 kom så *Indenrigsministeriets cirkulære vedrørende videreuddannelse af hospitalslaboranter* (15), og her blev det udpenslet hvilke analytiske og diagnostiske øvelser (ud over den teoretiske undervisning) de kommende instruktionslaboranter i histokemi skulle igennem. Blandt de 20 nævnte eksempler på analytiske øvelser var f.eks.: eosiners struktur, ionisering og farvebinding, reaktive gruppers blokering/deblokering og immunhistokemi på korrekt og

ukorrekt fikseret væv. Blandt eksemplerne på diagnostiske øvelser: lipidsammensætningen i medulla spinalis og lipidforekomster i binyre, forekomst af hydrolaser i mave/tarm kanalen og aminosyrer i tandanlæg! Alle sten blev vendt.

De patolog- anatomiske IL-kurser blev afholdt ved Hospitalslaborantskolen i København med 3-5 års mellemrum. I 1988 blev området klinisk cytologi inddraget og timetallet for det fagspecifikke patolog-anatomiske modul blev forlænget til 735 undervisningstimer. Samtidig blev undervisningen moderniseret med værkstedsundervisning, elev foredrag, og analytisk diagnostisk projekt.

5.6.2: Modulopbygget videreuddannelse - IL 1990-1994 (-98)

I slutningen af 1980'erne startede Københavnerskolen og Århuskolen et fælles revisionsarbejde af videreuddannelsen indenfor rammerne af cirkulæret, hvilket resulterede i *Modulopbygget Videreuddannelse til Ledende og Instruerende Hospitalslaborant*. Uddannelsen varede et år og bestod af 4 moduler: et fællesfagligt modul med naturvidenskabelige basisfag (300 t) samt et modul med specialespecifik videreuddannelse (400t.) inden for patologisk anatomi (alternativt klinisk kemi, blodtypeserologi, klinisk mikrobiologi, klinisk fysiologi og nuklearmedicin). De to sidste moduler var ledelse (120t.) og pædagogik (140t.). Det første patolog-anatomiske/histo modul blev afviklet i 1993 og indeholdt ud over klassisk histokemi: genteknologi, epitopkemi/immunhistokemi, flowcytometri, konfokal laser scanning mikroskopi, klinisk patodiagnostiske seminarer, emnearbejder og projekt.

Fra og med 1995 blev videreuddannelsen omstruktureret til tre moduler. Modulerne blev vekslende udbudt i Århus og København, men denne model af videreuddannelsen var ikke videre succesrig, og samtidig nedsatte undervisningsministeriet en arbejdsgruppe, der skulle udforme videreuddannelsen til en diplomuddannelse specielt for bioanalytikere.

5.6.3: Diplomuddannelse for bioanalytikere (HLD) 1998-2001

I september 1997 (16) kom undervisningsministeriets bekendtgørelse, der gjorde den modulopbyggede

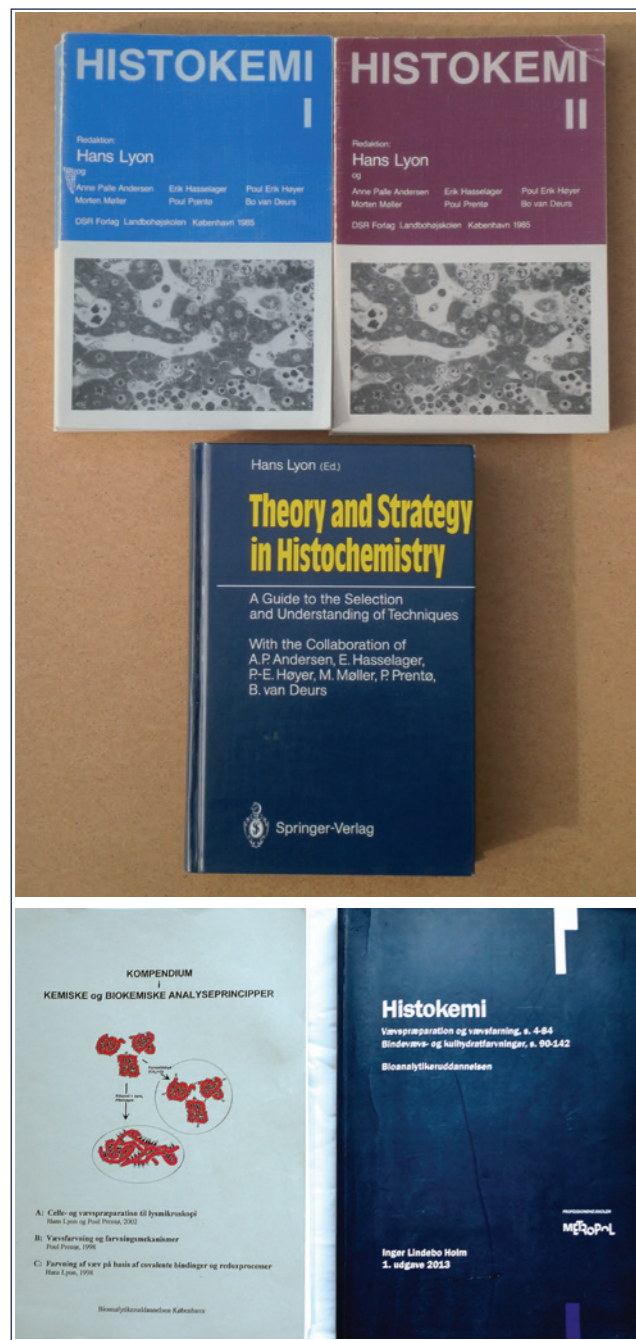
videreuddannelse/IL til en etårig diplomuddannelse/HLD. Der var stadig de samme tre moduler, men emnerne i den fællesfaglige del gav indblik i alle specialers analysemetoder og den specialespecifikke del blev optimeret. Undervisningen i histokemi indeholdt: vævsfarvning, kvalitetssikring, billedanalyse og screeningsmetoder, molekylær genetiske metoder, immuncyto- og histokemi, mikrobiologi og klinisk patodiagnostiske seminarer - i alt ca. 200 timer på modul III. Herefter 50-60 timer til en patolog- anatomisk hovedopgave. I de følgende 4 år blev der afholdt specialespecifikke moduler i patologisk anatomi hvert år.

Denne diplomuddannelse var næsten optimal på trods af det lidt knebne fagspecifikke timetal. Det faglige indhold var krævende, men relevant, og det var muligt at få selv små specialers diplomstuderende igennem hvert år, da der kunne afholdes specialespecifikke moduler med kun 3-5 studerende (skolerne styrede selv økonomien og diplomuddannelsen skulle ikke nødvendigvis give overskud).

Blandt de mange fremragende undervisere i histokemi på de vekslende videreuddannelseskurser kan nævnes: **Hans Lyon**, **Poul Prentø**, **Per Prætorius Clausen**, **Mogens Vyberg** og **Ole Nielsen**.

5.6.4: De sundhedsfaglige diplom-uddannelser/SD 2002 – 2011- ”Biomedicin og Laboratorietechnologi” ”Professionspraksis”

I år 2000 besluttede undervisningsministeriet, at diplom-uddannelsen for bioanalytikere skulle erstattes af en etårig modulopbygget sundhedsfaglig diplomuddannelse med tværfaglig integration af sundhedsprofessionerne. Det var samtidig med CVU dannelserne, hvor udbud af efter- og videreuddannelse fra alle sundhedsuddannelserne blev centraliseret (EVU) - altså fjernet fra grunduddannelsen. Bekendtgørelsen om de sundhedsfaglige diplom-uddannelser kom i maj 2002 (17) og blev først udmøntet i 8 forskellige 1 årige uddannelsesretninger. Den studieordning, der passede bedst til bioanalytikere hed ”biomedicin og medicinsk laboratorietechnologi”.



Figur 5.5.1. Et udvalg af de dansk producerede lærebøger i histokemi.

Kendetegnende for de nye sundhedsfaglige diplomuddannelser er at uddannelserne i høj grad lægger op til erhvervelse af langt bredere kompetencer i forhold til bioanalytikerprofessionen end tidligere. Det var dog stadig muligt at vælge et fagspecifikt modul (Speciel biomedicin: Patologisk anatomi på 9 ECTS/6 uger) og et afgangsprøve indenfor f. eks. histokemi (15 ECTS/10 uger). Der var bare det problem, at patologisk anatomi modulet kun blev oprettet, hvis der var studerende nok (>12), hvilket kun skete en gang i perioden 2002-2011.

I 2011 blev de 8 uddannelsesretninger ændret til 3, og bioanalytikerne falder nu bedst ind under ”SD i Professionspraksis”. Indholdet af fagspecifik histokemi kan ligge på et meget lille sted, men det er muligt at vælge moduler (svarende til i alt 20 ECTS/13 uger) som fx Biomedicin og bioanalytisk fortolkning, Laboratorieanalytisk kvalitetssikring og – udvikling, Bioanalytisk forståelse af analyser. Endelig kan man stadig lave afgangsupgave (15 ECTS) indenfor det histokemiske område.

Den nuværende diplomuddannelse giver således ikke mulighed for fagspecifikke kompetencer indenfor histokemi, men for brede kompetencer i forståelse, analyse, tolkning og kvalitetssikring af bioanalyser.

5.6.5: Ikke formaliseret efteruddannelse i histokemi

Indenfor **klassisk histokemi** har der ikke været så mange kurser i årenes løb.

Københavns Universitet havde i slutningen af 1960’erne og op gennem 70’erne det tidligere nævnte omfattende kursus i *Histologisk, Histokemisk Metodik* med **K.J. Pedersen** og **Poul Prentø** som undervisere.

Hospitalslaborantskolen i København har kun afholdt 2-3 histokemikurser med **Hans Lyon** og **Poul Prentø** som undervisere og har vel haft en snes kursister i årenes løb, der har fulgt Histokemiundervisningen som ”tompladskursister” på grunduddannelsens histokemi.

Helge Andersen og medarbejdere afholdt en række kurser i histokemi på Medicinsk Anatomisk Institut ved Københavns Universitet i 1970’erne og 1980’erne.

Siden 2003 har der i dbio’s regi været planlagt og afholdt temadage i histokemi ved bioanalytikerunderviserne **Inge Marie Bayer**, **Janne Jensen**, **Tine Meyer** og **Esben Skovsted**.

Poul Prentø har i årene 1999–2012 hos Kielberg Consult, og senere hos MSCConsult afholdt 3 dages, senere 2-dages kurser i ”Lysmikroskopiske præparations- og farvningsmetoder.

5.6.6: Ikke formaliseret efteruddannelse i immunhistokemi

Anderledes står det til med **immunhistokemien**, hvor der været rigtig mange kurser.

I forbindelse med udvikling af immunfluorescensmikroskopet med interferensfiltre som primære filtre i slutningen af 1960’erne og påvisningen af antistoffer i blodet hos patienter med bulløse lidelser og AB0 antigenernes optræden i præmaligne og maligne mundslimhindeleidelser (se 3.3), blev der etableret en kursusvirksomhed. Sammen med **Agnete Ingild (AI)** fra Proteinlaboratoriet, **Jørgen Rygaard (JR)**, **Svend Larsen** og **Allan Wiik** blev der i Dansk Selskab for Patologi fra 1970 arrangeret årlige kurser i immunfluorescenssteknik.

JR og **Erik Dabelsteen (ED)** blev senere inviteret af The American Academy of Oral Pathology til at holde kurser i hhv. New Orleans og Kansas City (1974 & 1975) i anvendelse af immunfluorescenssteknik til diagnostik af sygdomme i mundslimhinden samt til forskningsanvendelse.

I forbindelse med indvielsen af *The Sino-Danish Biomedical Postgraduate Training Centre* i Beijing blev der i 1985, 1987 og 1990 afholdt kurser for patolog-anatomer under ledelse af hhv **JR** og **Grete Krag Jacobsen**. I kurserne indgik undervisning og laboratorieøvelser i immunhistokemi forestået af **ED**, **Gorm Pallesen (GP)**, **Per Prætorius Clausen (PPC)**, **Margit Bæksted (MB)** og **Ole Nielsen (ON)**.

Fra 1986 til 1992 afholdt Dansk selskab for Patologi postgraduate kurser i immunhistokemi.

I LaH-regi afholdtes i perioden 1979-1988 kurser i immunhistokemi ved AI, PPC, **Morten Møller** og **Hans Henrik Nielsen**.

Danske Bioanalytikere (dbio) afholdt i perioden 1991-2012 kurser i hhv Metodeparametre og Anvendt immunhistokemi ved **AI**, **Karl Johan Pluzek**, **MB**, **ON**, **PPC** og **Mogens Vyberg**.

Kielberg Consult, og senere MSCConsult afholdt i perioden 1997-2009 kurser i Immuncytokemi og -histokemi. Blandt de mange undervisere var bl.a. **Lars-Inge Larsson**, **Bo van Deurs**, **MV**, **Ole William Petersen**, **Hans Lyon**, **Claus Koch**, **Niels Heegaard** og **ON**.

I NordiQC’s regi er der siden starten i 2003 været afholdt en række kurser (se 4.3.4).

For *in situ* molekylærbiologiske analyser, har der de sidste 25 år været et stigende udbud af kortere kurser i skolernes, og dbios’ regi.

I perioden 2000-2011 afholdtes ved det Sundhedsvidenskabelige fakultet på Aarhus Universitet forskerkurser for PhD studerende under titlen: *Immunhistokemi, In situ-hybridisering og PCR på histologisk materiale* Planlægger og hovedunderviser var alle år **Stephen Hamilton Dutoit**, suppleret af en lang række interne og eksterne undervisere som f. eks. **Henrik Hager**, **Vibeke Jensen**, **Carsten Brandt**, **Tom Nordfeld** og **ON**.

5.6.7: Undervisning i histokemi i speciallægeuddannelsen

Med indførelsen af den nye speciallægeuddannelse i 1970 (18), blev der oprettet et teoretisk uddannelsesprogram, bestående af en række delkurser, hvori indgik undervisning i histokemi i specialet patologisk anatomi og histologi.

Undervisningen blev i begyndelsen varetaget af **Hans Lyon (HL)** og **Poul Prentø**, fra 1979 suppleret med **Per Prætorius Clausen (PPC)** og vekslende laboranter. Den teoretiske undervisning var i begyndelsen forholdsvis omfattende og programmet ændredes efterhånden med mere vægt på problemorienteret undervisning og sideløbende praktisk laboratorieundervisning på ansættelsesstederne.

Undervisning i immunhistokemi indgik i begyndelsen i kurset i immunpatologi og blev varetaget af **Jørgen Rygaard (JR)**, **Erik Dabelsteen (ED)** og **Svend Larsen (SL)**.

Senere oprettedes et kursus i Diagnostiske metoder, hvori indgik undervisning i histokemi og immunhistokemi ved **HL**, **PPC**, **JR**, **Gorm Pallesen**, **Elisabeth Ralfkjær**, **ED** og **SL**.

Siden 1991 er undervisningen i histokemi blevet varetaget af hhv **HL**, **PPC**, **Thomas Hasselager** og fra 2010 **Henrik Hager**. Undervisningen i immunhistokemi er i samme periode varetaget af **Mogens Vyberg** og **Ole Nielsen**.

Undervisningen i *in situ*-hybridisering er siden 1991 varetaget af hhv. **Claus Bøgelund Andersen**, **Helle Broholm**, **Mette Klarskov Andersen** og **Birgitte Preiss**.

Litteratur

1. Indenrigsministeriets cirkulære af 1. juni 1968 om uddannelsesplan for histolaboranter.
2. Indenrigsministeriets cirkulære af 1. april 1975 om uddannelse af patolog-anatomiske hospitalslaboranter (histolaboranter).
3. Indenrigsministeriets af cirkulære af 12. februar 1980 om uddannelse af patolog-anatomiske hospitalslaboranter (kombineret histo- og cytologlaborantlinje).
4. Undervisningsministeriets bekendtgørelse nr. 705 af 24. august 1995 om hospitalslaborantuddannelsen.
5. Undervisningsministeriets bekendtgørelse nr. 235 af 30. maj 2001 om bioanalytikeruddannelsen.
6. Undervisningsministeriets bekendtgørelse nr. 652 af 29. juni 2009 om uddannelsen til professionsbachelor i biomedicinsk laboratorieanalyse.
7. Lyon H, Andersen AP, Andersen I, Clausen PP, Herold B. Purity of Commercial non-certified European samples of PyroninY. Histochem J 1982;14:621-30 .
8. Lyon H, Jakobsen P, Andersen I, Clausen PP, Andersen AP. Methyl green - PyroninY staining with pure PyroninY. Histochem J 1983;13:605-6.
9. Jakobsen P, Andersen AP, Lyon H, Treppendahl S. Preparation and characterization of PyroninY. Microsc Acta 1983;87:41-7.
10. Jacobsen P, Andersen AP, Lyon H. Preparation and characterization of Methylgreen. Histochemistry 1984;1:177-912.
11. Prentø P. Van Gieson’s picrofuchsin. The staining mechanisms for collagen and cytoplasm, and an examination of the dye diffusion rate model of differential staining, Histochemistry 1993;99:163174.
12. Lyon H, Holm I, Prentø P, Balslev E. Non-hazardous organic solvents in the paraffin technique. Histochem Cell Biol 1995;103:263-9.
13. Prentø P. A contribution to the theory of biological staining based on the principles for structural organization of biological macromolecules (Invited review). Biotech Histochem 2001;76:137-161
14. Prentø P. Theory of biological staining. Staining of macromolecules, possible mechanisms and examples. Biotech Histochem 2009;84:139-58.
15. Indenrigsministeriets cirkulære nr. 110 af 26. juni 1979 vedrørende videreuddannelse af hospitalslaboranter til ledende laborant og instruktionslaborant.
16. Undervisningsministeriets bekendtgørelse nr.725 af 15. september 1997 om diplomuddannelse for hospitalslaboranter.
17. Undervisningsministeriets bekendtgørelse nr. 307 af 16. maj 2002 om sundhedsfaglig diplomuddannelse.
18. Sundhedsstyrelsens bekendtgørelse af 1. februar 1967, med senere ændringer 1968,1970 og 1974. Indenrigsministeriets bekendtgørelse nr. 202 af 25. V. 1970 om speciallæger.

KAPITEL 6: DANSK SELSKAB FOR CYTO- OG HISTOKEMI'S (DSCH) HISTORIE

af Karina Norring Hjort

6.1: STARTEN PÅ DSCH

Dansk Selskab for Cyto- og Histokemi (DSCH) blev stiftet 1976. **Hans Lyon** og **Poul Prentø** deltog i et møde afholdt af Royal Microscopical Society i Nottingham, England den 16.-18. september 1975. Blandt hovedemnerne for mødet var en uformel diskussion af muligheden for tættere samarbejde blandt de europæiske selskaber og muligheden for dannelse af en europæisk føderation af histokemikere. Det blev besluttet at den endelige stiftelse skulle foregå på den kommende kongres i Bukarest i august 1976.

Herefter blev en lille gruppe danske histokemikere under ledelse af **Helge Andersen** inspirerede til at undersøge interessen for dannelsen af et dansk selskab for histokemi. Det viste sig, at der var et stort ønske, og ca. 12 personer (repræsenterende mange specialer) deltog i et stiftende møde den 9. november 1975 i København.

Den 30. april 1976 blev det den stiftende generalforsamling afholdt, og den første bestyrelse blev valgt. Foreningens første bestyrelse bestod af:

- Formand **Poul Erik Høyer**, adjunkt, Medicinsk Anatomisk Institut, Københavns Universitet
- Næstformand **Hans Peter Philipsen**, professor, Tandlægehøjskolen i Århus
- Kasserer **Helge Andersen**, lektor, Medicinsk Anatomisk Institut, Københavns Universitet,
- Sekretær **Hans Lyon**, overlæge, Patologisk institut, Københavns Kommunehospital (fortsat medlem af DSCHs bestyrelse og æresmedlem)

- Sekretær **Poul Prentø**, lektor, Institut for almen zoologi, Københavns Universitet
- Revisor **Henning Jensen**, overlæge, Patolog-anatomisk afdeling på Rigshospitalet
- Revisorsuppleant **Johan Larsen**, cand. pharm., leder af Hospitalslaborantskolen, København

Den officielle tilknytning til *The International Committee for Histochemistry and Cytochemistry* (ICHC) blev foretaget i august 1976 i Bukarest under afholdelse af 5th International Congress on Histochemistry and Cytochemistry med deltagelse af Helge Andersen, Poul Erik Høyer, Hans Lyon og **Bo van Deurs**.

ICHC blev dannet i 1960 i Paris og vedtægterne blev godkendt på kongressen i Frankfurt i 1964. Organisationen er en paraplyorganisation med repræsentation af selskaber over hele verden i flg. lande: Bulgarien, Danmark, England, Finland, Holland, Israel, Italien, Japan, Kina, Polen, Rumænien, Rusland, Slovakiet, Spanien, Tjekkiet, Tyrkiet, Tyskland, Ungarn og USA.

På kongressen afholdt i Brighton i England 1980, blev foreningens navn ændret til *The International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry* (IFSHC) <http://ifshc.com>. DSCH har i alle årene været medlem af IFSHC og sendt repræsentant til Congress on Histochemistry and Cytochemistry som afholdes ca. hver 4. år.

Selskabets oprindelige formålsparagraf fra 1976

Foreningens oprindelige formål var:

1. at korrelere cyto- og histokemiske data med biokemiske celle- og vævsbiologiske data
2. at medvirke til udvikling, præcisering og standardisering af cytokemiske metoder med speciel vægt på kontrolanalyser og kvantitering
3. at varetage cytokemiske arbejdende forskeres interesser og kontakt til foreninger i andre lande, herunder internationale møder etc.
4. at lette udvekslingen af information mellem danske forskere med hensyn til metoder, apparatur, forskningsproblematik etc.

Medlemskab blev givet til medlemmer, der havde produceret mindst 1 artikel. Andre kunne optages som foreløbige eller associerede medlemmer.

6.2: Opdatering af formålsparagraffen i 2004

I 2004 besluttede bestyrelsen at modernisere foreningens formålsparagraf. Den nye formålsparagraf blev efterfølgende godkendt på generalforsamlingen i 2004.

Det er nu foreningens opgave gennem et tværfagligt samarbejde mellem personer med en biologisk/diagnostisk orienteret baggrund at virke for:

1. Udbredelsen af kendskabet til reagenser og metoder der benyttes ved cyto- og histokemi i videste forstand.
2. Udbredelsen af kendskabet til resultater opnået ved cyto- og histokemiske metoder i forsøg på at være med til at optimere processer og procedurer.
3. Integrering af cyto- og histokemiske resultater i diagnostisk arbejde inden for biologien i videste forstand.
4. Vi henvender os til både bioanalytikere og akademikere, og det er vores formål, at der i foreningens bestyrelse sidder repræsentanter fra begge grupper.
5. Foreningen afholder ca. 2 møder årligt, hvoraf et møde forsøges planlagt på Fyn eller i Jylland.

Der blev i DSCHs nye formålsparagraf åbnet op, for et mere bredt og klinisk fokus samt, at alle kan blive medlemmer, både af bestyrelsen og af DSCH. I det nye DSCH har vi fokuseret på at have en bred repræsentation i bestyrelsen, så både patologer, akademikere/forskere og bioanalytikere er repræsenteret.

I hele foreningens historie har der jævnligt været inviteret internationale foredragsholdere, og det har givet et frisk og internationalt pust til møderne.

Foreningens formænd har vist sig ganske langtids-holdbare. Der har i foreningens historie blot været 3:

- 1976 **Poul Erik Høyer**
- 1985 **Hans Lyon**
- 2003 **Karina Norring Hjort**



Figur 6.2.1. De tre formænd for Dansk Selskab for Cyto- og Histokemi og én undervisningskoordinator på Hospitalslaborantuddannelsen. Fra venstre Karina Hjort, Poul Erik Høyer, Inger Lindebo Holm og Hans Lyon. (Inger Lindebo Holm)

6.3: Det nye DSCH

DSCH har været en meget stabil organisation, stabilt kontingent og afholdelse af i gennemsnit 2-3 møder årligt. Der er dog sket nogle forandringer for at modernisere foreningen.

- DSCH fik sit første website i 2001 www.dsch.dk
- Vi moderniserede lovene i 2005, så de blev mere tidssvarende og korreleret til vores nye formålsparagraf
- Vi har introduceret netværk sessioner efter alle videnskabelige møder, hvor deltagerne inviteres til en sandwich og et glas vin/vand, mens der livligt udveksles erfaringer og diskuteres med ligesindede
- Vi har åbnet op for firmamedlemskaber og har i dag 7 firmamedlemskaber og har ligeledes introduceret regler for udstillere. Dette har også bidraget til at, vores økonomi er sund og vi har derfor i år til vores 40 års jubilæum råd til at lave et flottere jubilæumsmøde og udgive dette festskrift

Med altid flot deltagerantal til vores møder (gennemsnitlig omkring 60-70 personer), så er der en lys fremtid for DSCH i de næste mange år. Dette kræver selvfølgelig en konstant modernisering i relation til fagets udvikling og de mange forandringer der naturligt sker.

6.4: Møder og aktiviteter

Udvalg af DSCHs møder og kurser siden foreningens oprettelse

- 1976 En nyudviklet billedanalysator, Zeiss-microvideomat 2
- 1977 Enzymhistokemiske studier af segmentationen i nyrens proximale tubulus. Autoradiografisk påvisning af den natrium/kalium følsomme ATPase. Glutamatdehydrogenase i den histokemiske procedure. Studier over laktatdehydrogenase isoenzymer i aorta
- 1977 Histokemisk påvisning af døgnsvingninger i ravsyre dehydrogenase aktiviteten og den endogene Coenzym Q koncentration i corpus pineale hos rotter

- 1978 Metodologiske betragtninger ved immunhistokemiske studier af immunoglobuliner
- 1978 Indoxyl-metoder til histokemisk påvisning af hydrolaser
- 1978 En funktionel beskrivelse af den cellulære population i den humane lymfeknude
- 1978 Methods of quantification in enzyme histochemistry
- 1978 Fysisk/kemisk analyse af forskellige farvestofprøver. Pyroninfarvning ved standardiseret farvestofkoncentration. Immunhistokemisk påvisning af oncoføtale antigener i testistumorer
- 1979 The cytochemical approach to hormone assay
- 1979 Histochemistry is the question of localization. An example is the use of radioactive labeled inhibitors. Advantages of cytochemistry
- 1979 Videregående fysiske undersøgelser af pyronin Y
- 1980 Formaldehyd induceret fluorescens i carcinoide tumorer indlejret i hydrofile plastikmedier
- 1980 Er xylen nødvendig ved dehydrering af snit forud for montering
- 1982 Quantitative cytochemical studies of the metabolism of synovial lining cells with special reference alterations in rheumatoid arthritis
- 1983 Fibronectin – immunhistokemisk påvirkning og forekomst i normalt og inflammert væv
- 1983 Bestemmelse af østrogen- og progesteronreceptorer i cancer mammae
- 1984 Ultrastrukturel lokalisering af beta-galactosidase aktivitet i peritoneale makrofager fra C57B1 mus. En kvantitativ cytokemisk metode til måling af beta-galactosidase i dyrkede humane fibroblaster. En mikrofluorometrisk metode til bestemmelse af aktiviteten af alpha-galactosidase i dyrkede fibroblaster og fostervandsceller fra Fabry patienter og normale.
- 1984 Recent developments in DNA cytochemistry, with particular reference to in situ hybridization with non-radioactive labels
- 1985 Autoradiografisk demonstration af receptorer for vasoaktivt intestinalt polypeptid (VIP) i corpus pineale. Amygdala kindling af benzodiazepinreceptorer. Receptorbinding målt ved computer-assisteret autoradiografi

- 1986 A historic survey of the development of the Romanowsky-Giemsa method. The use of Romanowsky-Giemsa method in veterinary practice, advantages and problems. The use of the Romanowsky-Giemsa method for staining fine-needle aspiration biopsies, advantages and problems. Problems with the Giemsa stain. The Romanowsky-Giemsa stain, Standardization and reproducibility as a cytological and histological stain.
- 1987 Stereologi. Oversigt, muligheder, eksempler og perspektiver
- 1987 Lektiner, oversigt, muligheder, eksempler og perspektiver
- 1988 Kursus i mikrobølgeovnstekning (2 dage)
- 1988 In situ-hybridization
- 1990 Organiske opløsningsmidler i histologien
- 1990 Autometallographic silver enhancement – en histokemisk teknik til påvisning af guld, sølv, kviksølv og zink
- 1991 Workshop i anvendt immunhistokemi
- 1991 Metodologiske problemer i immunhistokemi (2 kurser i januar og august)
- 1991 Minisymposium og præsentation af Bartholin Institutet. Diabetes forskning, immunologi og cancer og neurologisk forskning
- 1991 Det terminale komplement kompleks – ven eller fjende?
- 1992 Kvalitetssikring indenfor histopatologi – Nyttigt eller kun besværligt
- 1993 Workshop i anvendt immunhistokemi.
- 1993 Metodologiske problemer i immunhistokemi
- 1993 Billedanalyse
- 1993 Substitution af xylen i klarings af afparaffineringsprocessen
- 1993 Workshop i immunhistokemi
- 1994 Enzymhistokemi i diagnostisk patologi. Moderne synspunkter
- 1994 Praktiske erfaringer omkring anvendelsen af mikrobølgeovn på patologiske institutter
- 1994 Aktuelle projekter ved det netop afholdte kursus for ledende og instruerende laboranter
- 1995 Kvalitetssikring i patologisk anatomi. Intentioner og erfaringer fra Sverige og Danmark

- 1995 Opportunistiske infektioner: En fælles opgave for klinikere, mikrobiologer og patologer
- 1995 Hidtidige erfaringer med Estisol 220
- 1995 PAPNET – System til diagnostik eller kvalitetssikring?
- 1995 Quantitation in Immunohistochemistry
- 1995 Workshop – Quantitation in immunohistochemistry
- 1996 Oversigt over genteknologiens anvendelse
- 1996 Formalin-frie fikseringsmidler. Kan de anvendes med godt resultat?
- 1996 Epitop-Retrieval
- 1997 Den neuronale regulation af melatonin fra koglekirtlen
- 1997 Immunostainers – fordele og ulemper
- 1997 Cyclins – Diagnostic and prognostic relevance
- 1997 Immunenzymatiske dobbeltfarvningsteknikker – en oversigt
- 1997 *In situ*-hybridisering: Kvantitative aspekter
- 1997 CYTO97 i York med deltagelse af Margit Bæksted, Hans Lyon og Erik Hasselager
- 1998 PNA – Peptide Nucleic Acid
- 1998 We do have controls, but do we have quality control
- 1999 Immunhistokemisk visualisering af receptorer
- 1999 Nye teknikker ved diagnostisk cervix cytology: monolag/tyndtlag præparation og automatiseret screening
- 2000 Kvalitetssikring ved IHC – fællesmøde med DSP og DSPAC
- 2000 Kursus i PCR Teknik
- 2000 Immunohistochemical quality assurance and standardization
- 2000 The role of telomeres and telomerase in cancer aging
- 2001 Konfokal mikroskopi
- 2001 Gene Display Systems
- 2001 Genteknologiens anden fase: Nye teknikker – nye tænke måder
- 2002 DNA analysis med flow- og imagecytometry fællesmøde med DSFCM
- 2003 HPV p16
- 2003 Molekylærbiologi og molekylærbiologiske teknikker (5 kursusdage)

- 2003** Mammacancer. Udvalgte prognostiske og prediktive markører samt bud på nye behandlingsmetoder
- 2004** New Tools in the Diagnosis of Lymphomas and Leukemias
- 2004** GIST (gastrointestinal stromal tumor), CML og imatinib: definitioner, diagnoser og behandling
- 2004** Kvalitetssikring Fællesmøde med NordiQC
- 2004** Nyt fra fortiden
- 2005** Angiogenese og endotelcellebiologi
- 2006** Nordic IHC Quality Control – fælles møde med NordiQC
- 2006** Molekylære teknikker
- 2007** Stamcelleforskning
- 2007** Advanced fluorescence imaging techniques
- 2008** Nordic Mammarcarinom: IHC Quality Control – fælles møde med NordiQC
- 2008** Arbejde og studere i udlandet
- 2008** Computer-baseret kvantitativ mikroskopi – med focus på tumor markører
- 2009** Bridging Oncology and Pathology - fælles møde med DBCG med gæsteforedragsholder prof. Giuseppe Viale, Milano, Italien
- 2010** Coloncancer: Patoanatomiske undersøgelser – diagnostiske, prognostiske og terapeutiske markører
- 2011** Best Laboratory Practice and Standardization of IHC Testing – fælles møde med NordiQC
- 2012** Maligne melanomer patoanatomiske undersøgelser og behandling
- 2013** 1st Nordic Conference on Standardization in applied IHC
- 2013** HER receptors and their role in cancer
- 2014** Targeteret behandling indenfor lunge cancer – patologien møder onkologien
- 2015** Prostatacancer. Diagnosticering, udfordring og nye tiltag
- 2015** Genprofilerings-tests – er de klar til klinikken
- 2016** HPV Disease and prevention: Screening and vaccine

**TRÆK AF HISTOKEMIENS
HISTORIE I DANMARK**

Copyright © 2016,
ISBN 978-87-998854-0-4