

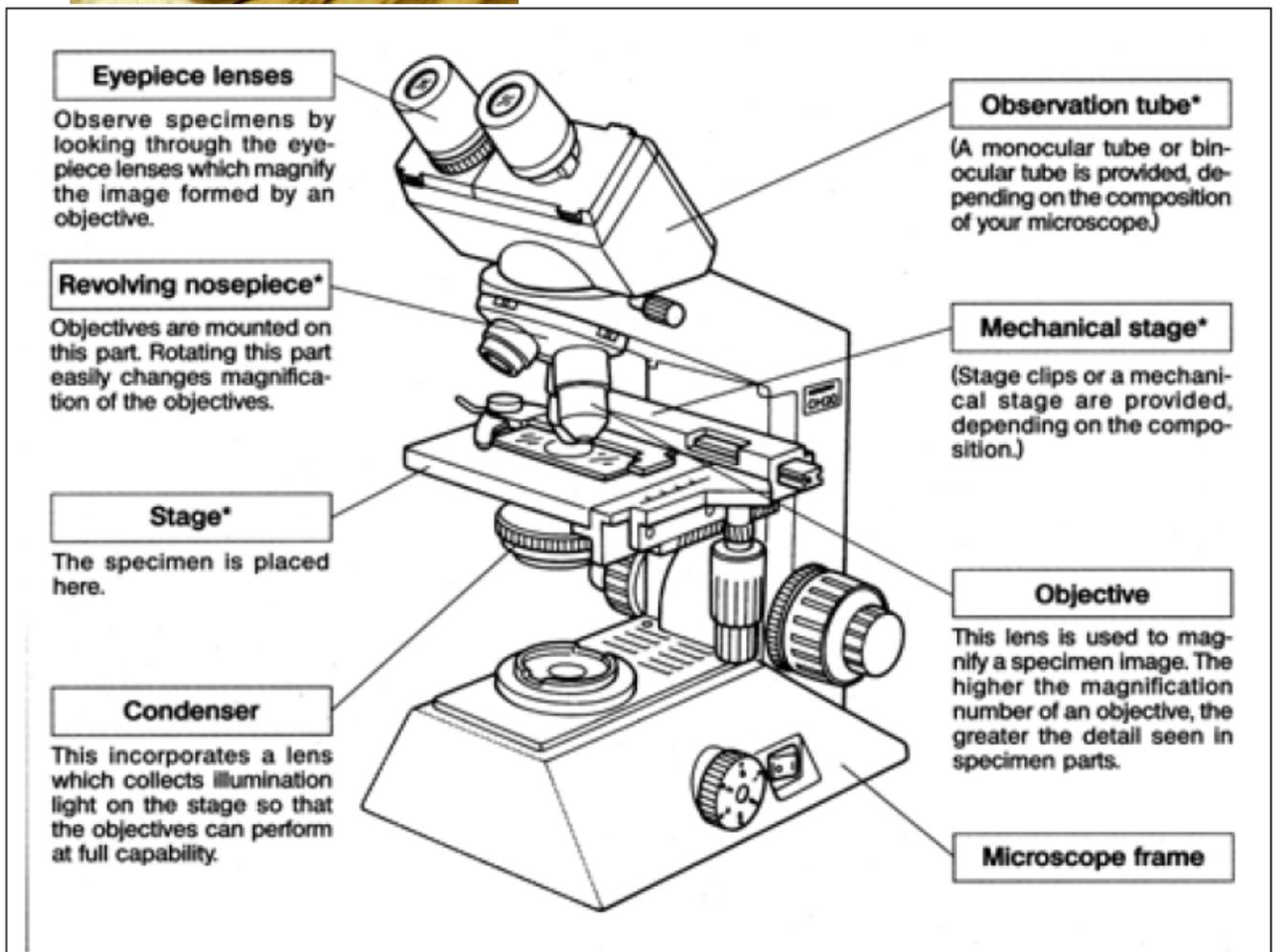
ISTRUZIONI PER L'USO DEL MICROSCOPIO OTTICO

1) Collocare il vetrino sul tavolino portavetrini; 2) inserire l'obbiettivo 10 X (piccolo); 3) centrare la sezione affinché sia in asse con l'obbiettivo; 4) mettere a fuoco muovendo lentamente la vite macrometrica, aggiustando poi con la vite micrometrica;



5) cambiare obbiettivo (medio 20 X o grande 40 X) mettendo a fuoco solamente con la vite micrometrica; 6) ruotando la vite del condensatore si può aumentare la luminosità o il contrasto dell'immagine; 7) accertarsi che la fonte luminosa sia nella giusta posizione (e non sia ruotata lateralmente). *N.B. L'ingrandimento totale si calcola moltiplicando il valore dell'ingrandimento scritto sull'oculare per quello scritto sull'obbiettivo.*

**Microscopio ottico
a luce bianca**



ALLESTIMENTO DI PREPARATI ISTOLOGICI

La preparazione di una sezione istologica richiede diverse tappe:

01) Fissazione

Il prelievo appena prelevato dall'organo che si desidera esaminare, deve essere fissato mediante un liquido fissativo. I più usati sono la formalina (formaldeide al 4%); la paraformaldeide al 4%; la glutaraldeide; il tetrossido di Osmio (per la stabilizzazione dei lipidi); la miscela di Bouin (soluzione di formalina, acido picrico e acido acetico glaciale), la miscela di Carnoy (soluzione di alcol assoluto, acido acetico glaciale e cloroformio). La fissazione serve a bloccare le attività vitali della cellula, rendendo insolubili i componenti strutturali, stabilizzando le proteine e inattivando gli enzimi idrolitici.

02) Lavaggio

Per togliere il fissativo in eccesso (possibilmente in soluzione tampone fosfato salino).

03) Disidratazione

Mediante la scala ascendente degli alcoli (alcol etilico a 70°-80°-90°-100°) per eliminare la componente acquosa, che non permetterebbe l'entrata della paraffina nel tessuto (l'acqua non è un solvente della paraffina).

04) Diafanizzazione

In solventi della paraffina (ad esempio toluolo, benzolo, xilolo) che rendono il pezzo, già privato dell'acqua, diafano (trasparente) e penetrabile da parte della paraffina (lo xilene permette la sostituzione dell'alcol assoluto non miscibile con la paraffina).

05) Infiltrazione

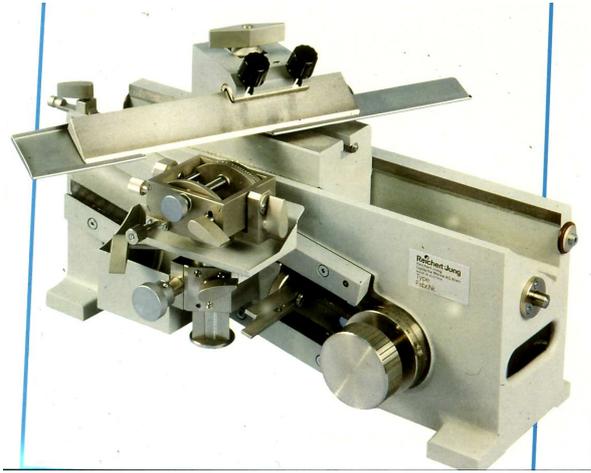
In paraffina fusa a 60°C (in stufa, tarata secondo il punto di fusione della paraffina, fra i 58°C e 60°C) per permetterle di sostituirsi allo xilene, all'interno del pezzo istologico.

06) Inclusione

In paraffina all'aria (temperatura ambiente), in modo che questa solidifichi - intorno ed all'interno del prelievo. La durezza della paraffina solida ci permette di realizzare le sezioni istologiche. Il blocchetto di paraffina è poi montato su supporto solido per permettere l'affettatura.

07) Taglio

Con il microtomo per paraffina (a slitta o rotativo) in sezioni sottili di 4-8 µm. Le sezioni vengono distese sull'acqua distillata alla temperatura di circa 40-45°C e poi fatte aderire al vetrino portaoggetti.



Microtomo a slitta per paraffina.



Bagnetto stendifette.

L'adesione avviene in stufa a 37°C.

Le sezioni in paraffina aderenti sui vetrini portaoggetto, affinché possano essere colorate con coloranti istologici (quasi sempre in soluzioni acquose), debbono prima subire i seguenti passaggi;

08) Deparaffinazione

Con toluolo, o xilene per allontanare la paraffina dalla sezione istologica;

09) Reidratazione

Con la scala discendente degli alcoli (per ridare gradualmente acqua alla sezione);

10) Lavaggio

Con acqua distillata

11) Colorazione

Viene eseguita la colorazione desiderata (vedi pag. 1-2).

Eseguita l'operazione di colorazione dei preparati, le sezioni sono sottoposte a:

12) Disidratazione

Mediante la scala ascendente degli alcoli (alcool etilico a 70°-80°-90°-100°).

13) Chiarificazione

In solventi organici (toluolo o benzolo o xilene);

14) Montaggio

Con un vetrino coprioggetto con interposta una goccia di alcune resine naturali (ad es. Balsamo del Canada), o sintetiche (Eukitt), che hanno lo stesso indice di rifrazione del vetro.

SCHEMA DI INCLUSIONE IN PARAFFINA DI UN FRAMMENTO D'ORGANO O DI TESSUTO

N.B.: i tempi qui sotto riportati sono puramente indicativi e in ogni caso, va tenuto ben presente che essi possono variare in funzione delle dimensioni dei pezzi trattati.

- 1) **PRELIEVO** del frammento d'organo o di tessuto;
- 2) **FISSAZIONE:** in formalina al 10% tamponata (concentrazione pari a 13,7%) 10 minuti;
- 3) **LAVAGGIO:** in acqua corrente alcuni minuti;
- 4) **DISIDRATAZIONE:** nella serie ascendente degli alcoli: etanolo 70° 1 min.; etanolo 80° 1 min.; etanolo 90° 10 min.; etanolo assoluto I 5 min.; etanolo assoluto II 10 min.; xilolo I 7 min.; xilolo II 7 min.;

etanolo 70	1 min.
etanolo 80	1 min.
etanolo 90	10 min.,
etanolo assoluto I	5 min.
etanolo assoluto II	10 min
xilolo I	7 min.
xilolo II	7 min.

- 5) **INFILTRAZIONE:** in paraffina liquida, a 60°C 15 min. X 2 volte;
- 6) **INCLUSIONE:** confezione del blocchetto di paraffina solidificata.

SCHEMA DI ESECUZIONE DI COLORAZIONI ISTOLOGICHE

1) *Sparaffinazione e reidratazione delle sezioni:*

Xilolo I	7 min.
Xilolo II	7 min.
Etanolo assoluto I	5 min.
Etanolo assoluto II	5 min.
Etanolo 90 °C	5 min.
Etanolo 80 °C	5 min.
Etanolo 70 °C	5 min.
H ₂ O distillata	Lavaggio

2) *Ematossilina-Eosina:*

Ematossilina	10 min.
H2O di fonte	10 min.
Eosina	2-4 min.
H2O distillata	Lavaggio

3) *Disidratazione:*

Etanolo 70°C	5 min.
Etanolo 80°C	5 min.
Etanolo 90°C	5 min.
Etanolo assoluto I	5 min.
Etanolo assoluto II	5 min.

4) *Chiarificazione:*

Xilolo I	7 min.
Xilolo II	7 min.

5) *Montaggio:*

in balsamo del Canada
o resine sintetiche.

A) *Blu di Toluidina*

Porre i vetrini reidratati alcuni minuti nel tampone al pH prescelto (buffer Mc Ilvaine = acido citrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,2 M, pH 4).

Immergere in Blu di Toluidina per 10 min.

Lavare in tampone a pH prescelto.

Differenziare in alcol isopropilico (o isobutilico) per 1 min. alzando e abbassando il vetrino per evitare la formazione di bolle d'aria.

Immergere in xilolo per 1 min. (alzando e abbassando il vetrino).

Montare direttamente in balsamo del Canada.

B) Colorazione Azan- Mallory

Mettere in stufa (a 60°C) il colorante azocarminio.

Acidificare al momento con acido acetico 1%.

Mettere i vetrini a colorare a temperatura ambiente per 10 min. ed osservare l'andamento della colorazione al microscopio ottico.

Gettare il colorante e lavare in acqua distillata per qualche minuto.

In olio di anilina 0,1% in alcol 95% per 30 sec. a differenziare, controllare al microscopio ottico ed eventualmente proseguire.

Passare in alcol acidulato al 95% + acido acetico 1%.

Immergere nell'acido fosfotungstico al 5% (30 min. possono bastare).

Lavare velocemente in acqua distillata.

Aggiungere la miscela colorante di Mallory per 2 min. (si può riutilizzare).

Lavaggio in acqua distillata.

Differenziare in alcol al 95% controllando il colore del connettivo al microscopio ottico.

Disidratare in alcol assoluto (5 min X 2 volte), poi in xilolo (5 min. X 2 volte).

Montare in balsamo o resine sintetiche.

TECNICA VELOCE AL CRIOSTATO

Allestimento di preparati con l'uso del CRIOSTATO (microtomo congelatore) che lavora alla temperatura da -5°C fino a -60°C. La metodica dell'inclusione in paraffina, sopra descritta, in alcuni casi non è applicabile, ad es. quando si vogliono studiare i lipidi, perché le componenti lipidiche vengono disciolte durante i processi di fissazione e inclusione in paraffina. Il preparato al congelatore risolve anche problemi diagnostici per pezzi operatori (è molto veloce), per lo studio di particolari enzimi o per alcune tecniche immunocitochimiche.

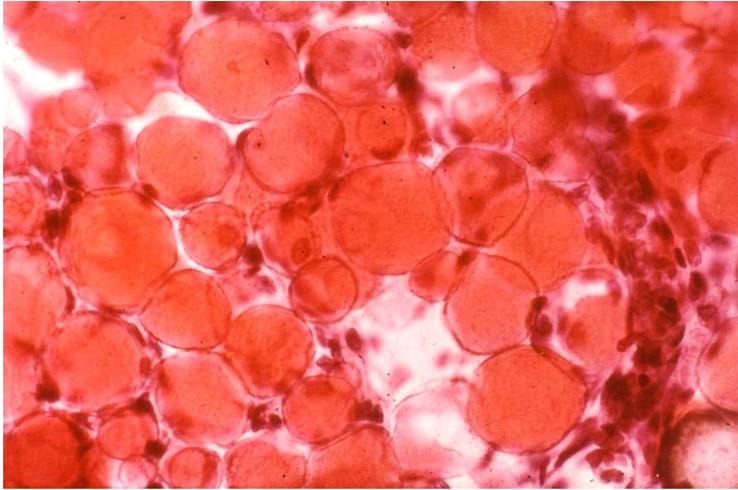


Il pezzo appena prelevato viene fissato per immersione in azoto liquido o con un getto di CO2 compressa che lo raffredda molto rapidamente, senza farlo cristallizzare, quindi viene tagliato al criostato. Le sezioni così ottenute sono pronte per le colorazioni sia istologiche che istochimiche.

Criostato

Colorazioni per i grassi

Le sezioni ottenute al criostato si colorano con i vari SUDAN



(Sudan III, Sudan IV per i grassi neutri; Sudan Nero B per i lipidi in genere). I nuclei vengono colorati con l'ematossilina. Le sezioni, infine, vengono montate in gelatina glicerinata (mezzo acquoso).

**Tessuto adiposo bianco
Sudan III + Ematossilina**

COLORAZIONI ISTOLOGICHE

1) Ematossilina-Eosina (E.E.)

L'ematossilina (emallume, colorante basico) si lega con un legame non ben precisato a strutture con radicali liberi acidi. Colora, perciò, in viola i nuclei delle cellule (presenza di DNA), il nucleolo (presenza di RNA ribosomiale), aree basofile nel citoplasma (per presenza eventuale di ribosomi), la sostanza fondamentale della cartilagine (presenza di glicosaminoglicani e proteoglicani, contenenti radicali liberi carbossilici e solforici) e a volte la mucina delle ghiandole esocrine (per la presenza di glicosaminoglicani e proteoglicani). Eosina: (colorante acido) colora le strutture basiche in rosa. Evidenzia il citoplasma delle cellule (per prevalente presenza di proteine basiche) e le fibre collagene.

**Gh. salivare
Ematossilina
Eosina**

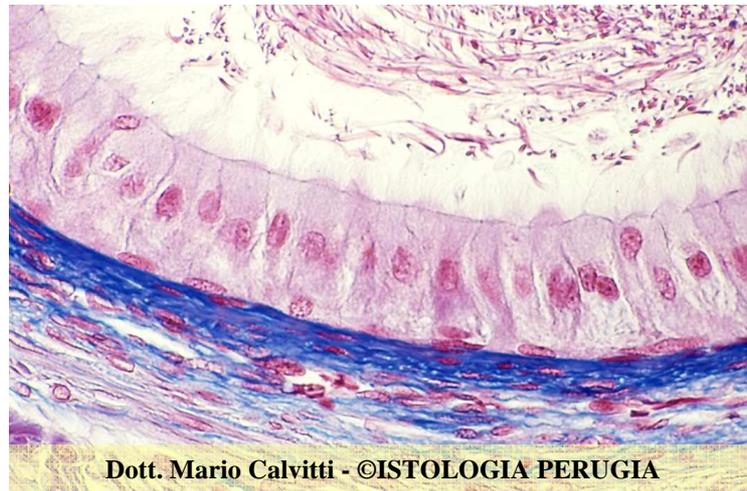


Dott. Mario Calvitti - ©ISTOLOGIA PERUGIA

2) Azan-Mallory (A. M.)

Colorazione elettiva per evidenziare le fibre collagene del tessuto connettivo fibrillare. I coloranti usati in sequenza sono: a) l'*Azocarminio* che colora in rosso i nuclei delle cellule, gli eritrociti e in rosso tenue il citoplasma; b) la *Miscela di Mallory* (Blu di anilina, Orange G e acido ossalico) che colora in blu forte le fibre collagene, in azzurro le mucine. Le cellule del sangue e le fibre muscolari in arancio.

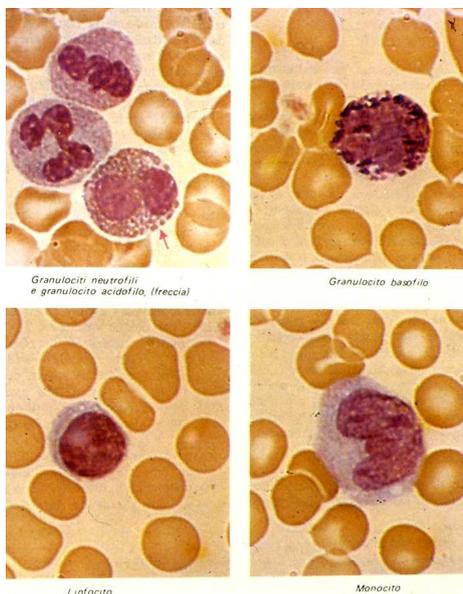
**Dotto deferente
Azan-Mallory**



Dott. Mario Calvitti - ©ISTOLOGIA PERUGIA

3) May-Grünwald-Giemsa (M.G.G.)

E' una doppia colorazione utilizzata normalmente per colorare gli strisci di sangue. Il sangue viene strisciato su un vetrino portaoggetto, fissato per almeno 30' min. all'aria e in un luogo privo di vapori acidi. Viene poi colorato prima con la miscela May-Grünwald (Bleu di metilene, colorante basico, ed Eosina, colorante acido che formeranno un sale). Quando si aggiunge una piccola quantità d'acqua, i due coloranti di cui è composto l'eosinato si separano e colorano le strutture acidofile e quelle basofile. Segue, poi, un lavaggio ed una colorazione con l'eosinato di azzurro (colorante di Giemsa) composto da eosina giallastra, blu di metilene, azzurro A e B e violetto di metilene.



Risultati:

gli eritrociti appaiono di un colore rosa arancio; i nuclei dei leucociti bleu porpora; il citoplasma nei neutrofili marrone leggero con granuli violetto rosa e lilla, mentre i granuli eosinofili avranno un colore arancio-rosso brillante ed, infine, i granuli basofili mostreranno un colore blu oltremarino.

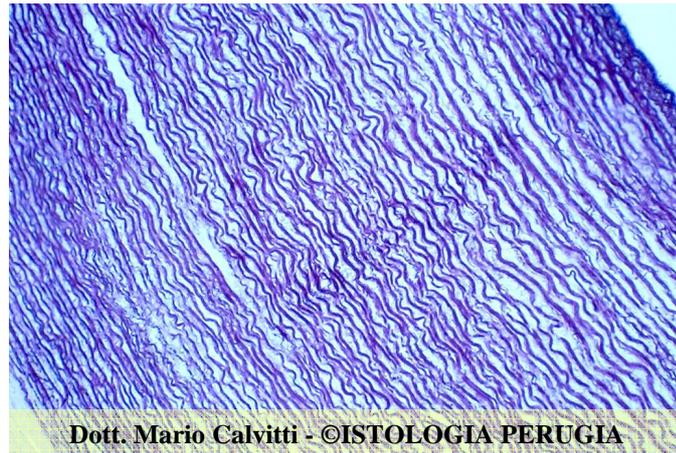
**Striscio di sangue
May-Grünwald-Giemsa**

4) Weigert-Van Gieson (W.-V.G.)

Sono due colorazioni abbinatae (Weigert-Van Gieson). Mediante la miscela di Weigert, contenente fucsina basica e resorcina, vengono colorate in nero le fibre elastiche; con la miscela di Van Gieson, contenente fucsina acida e acido picrico, vengono colorate le fibre collagene in rosso magenta, mentre altre cellule (ad es.: cellule muscolari o del sangue) divengono giallo-arancio. Come colorante di contrasto per il nucleo è impiegata l'ematossilina ferrica, che colora i nuclei in marrone-nero.

Arteria aorta

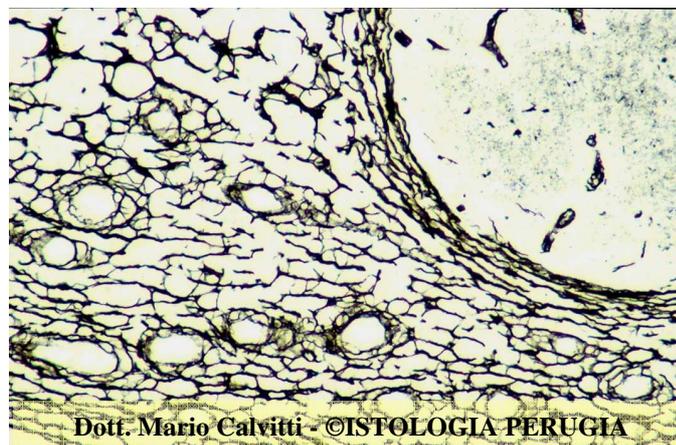
**Solo
Resorcina-Fucsina
di Weigert**



5) Impregnazione Argentica (I.A.)

Colorazione secondo James, per il tessuto reticolare. In questa colorazione si utilizza un sale di un metallo pesante (ad esempio nitrato d'argento) che viene depositato su alcuni componenti tissutali allo stato colloidale. In seguito il tessuto è sottoposto all'azione di una soluzione riducente ed il metallo viene ridotto allo stato elementare. Si evidenziano così le fibre reticolari (fibre collagene di tipo III) in marrone scuro o nero.

**Linfonodo
Impregnazione
Argentica**



COLORAZIONI ISTOCHEMICHE

1) Blu di Toluidina (B.T.)

Essendo un colorante basico, si lega a strutture con radicali acidi liberi (elettricamente negativi, quindi anionici). Quando la densità di tali gruppi anionici fortemente dissociati è elevata come nei polianioni, si ha il fenomeno della metacromasia, cioè il colorante vira da celeste (colore ortocromatico) al verde Indaco, al violetto, al rosso porpora (colori metacromatici). Pertanto possono essere evidenziati: gli acidi nucleici (DNA: - nucleo; RNA: nucleolare e citoplasmatico, ad es. sostanza tigroide delle cellule nervose), ma soprattutto i glicosaminoglicani e proteoglicani (presenti nella sostanza fondamentale della cartilagine e nel muco delle ghiandole mucipare e mucose).

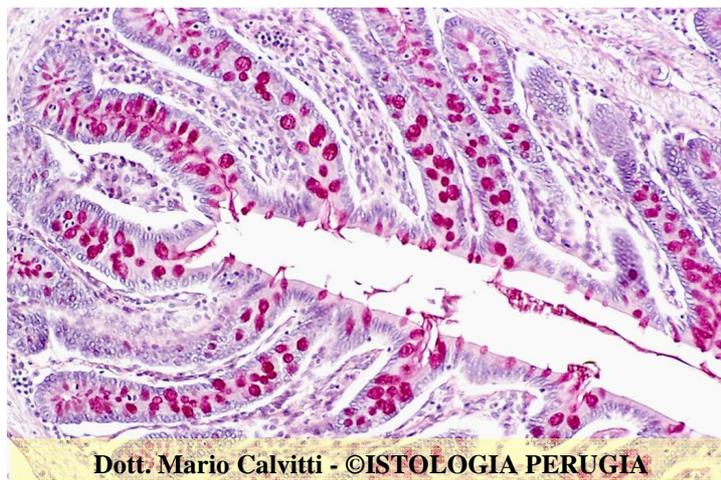
**Cartilagine
Blu di Toluidina**



2) PAS (Periodic Acid Schiff)

Colorazione per le glicoproteine ed il glicogeno. L'ossidazione con acido periodico opera la rottura di un legame tra due atomi di Carbonio adiacenti della molecola del carboidrato e liberazione di un gruppo aldeidico che, mediante formazione di una base di Schiff, viene rivelato dal reattivo di Schiff, in presenza di anidride solforosa, in ambiente acido. Strutture contenenti le molecole in oggetto si colorano in varie gradazioni, di rosso-violetto (magenta).

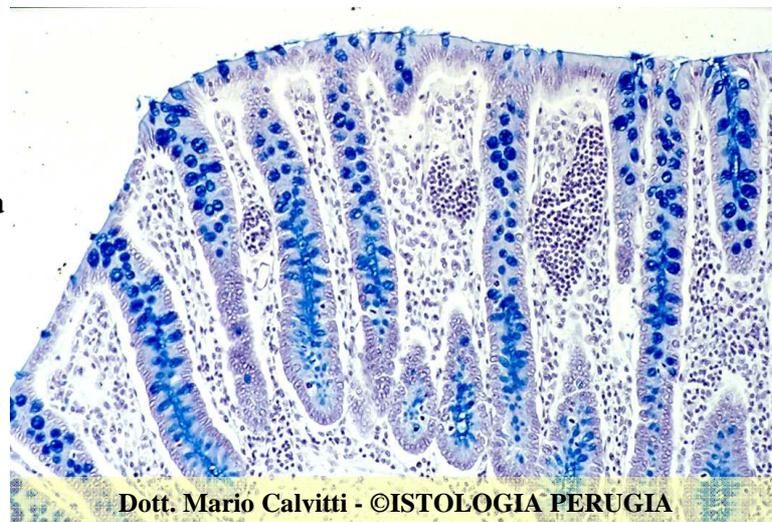
**Colon
PAS + Ematossilina**



3) Alcian-blu (A.B.)

E' una ftalocianina rameica per la colorazione dei glicosaminoglicani (GAG) e proteoglicani. E' un colorante specifico per le macromolecole sopradette, ma più in generale si lega, in quanto colorante carico positivamente, a tutti i composti aventi radicali acidi liberi (carbossilici, solforici, fosforici) cioè ai polianioni. Pertanto, in determinate condizioni tecniche (pH acidi diversi, o in presenza di diverse concentrazioni di $MgCl_2$), mediante uso di Alcian blu vengono evidenziate in blu strutture contenenti DNA, RNA e GAG o solo GAG. Da ricordare che i GAG sono molecole a peso molecolare molto elevato, costituite, da unità disaccaridiche ripetitive, formate da derivati carbossilici e amminici di zuccheri a 6 atomi di C (acido uronico+esosamina), contenenti quantità variabili di gruppi acidi solforici legati alle esosamine. I GAG (acido ialuronico, condroitin solfati A, B, C, eparansolfato, eparina, cheratosolfato) costituiscono, associati alle proteine, i proteoglicani che insieme alle glicoproteine (GP) sono parte fondamentale della sostanza fondamentale dei tessuti connettivi, della sostanza cementante tra le cellule epiteliali, delle secrezioni mucose.

Colon
Alcian-blu + Ematossilina



4) Alcian blu – PAS

E' una colorazione sequenziale. Con tale colorazione, possono essere messi in evidenza GAG in blu e GP in rosso magenta contemporaneamente.

ESAME AL MICROSCOPIO OTTICO

Tale esame va iniziato col più piccolo degli ingrandimenti disponibili. Gli ingrandimenti maggiori servono per precisare aspetti minuti della morfologia delle singole cellule o di gruppi di cellule; vanno utilizzati pertanto a tale scopo, ma è consigliabile tornare poi ad ingrandimenti minori, perché essi consentono la visione d'insieme dei preparati, al fine della diagnosi di tessuti e di organo. Dopo aver messo a fuoco il preparato è bene spostare lentamente il vetrino per osservare tutto il campo della sezione, compresi i margini. Dopo questo esame preliminare si dovranno riconoscere i tessuti presenti e la loro "distribuzione topografica" nel preparato.

A questo punto è opportuno che ognuno di voi abbia in mente una classificazione schematica dei tessuti stessi. I tessuti del corpo, infatti, non sono molti, ma si presentano in diverse varietà in dipendenza della posizione, dei rapporti e della funzione che assumono nei vari organi. Ricordate che avrete a che fare col tessuto epiteliale (di rivestimento e ghiandolare), coi tessuti a funzione trofica e di sostegno (connettivi propriamente detti, cartilagine ed osso), coi tessuti muscolari (liscio e striato) e col tessuto nervoso e la glia. Considerate la possibile esistenza, nel preparato, degli elementi del sangue. Può trattarsi di uno striscio di sangue o di accumuli e infiltrazioni di cellule (normalmente i linfociti) del sangue in altri tessuti. Fra l'altro, in ogni organo è possibile notare la presenza di vasi contenenti globuli rossi. La presenza dei globuli rossi, specialmente di quelli osservati a piatto, è utile poichè il diametro di ogni globulo rosso si aggira sui 7 - 8 μm e questo serve come riferimento utile a farsi una opinione della grandezza degli elementi cellulari presenti.

PIANI DI SEZIONE

