

LUCRAREA PRACTICĂ NR. II

METODELE DE STUDIU HISTOLOGIC

Preparatul histologic

HISTOLOGIA

- Histologia este o ramură a științelor biologice care studiază morfologia, compoziția biochimică și funcțiile țesuturilor, organelor și sistemelor organismului.
- Compartimente:
 - Citologia: care se ocupă de studiul celulei;
 - Histologia generală (tisologia): studiul țesuturilor;
 - Histologia specială (organologia): studiul organelor:
- Legături:
 - Citologia -> Biologia celulară
 - Histopatologia (morfopatologia).

I. Metode utilizate în practica histologică

- Colorația uzuală – Hematoxină-eozină
- Colorațiile speciale
- Examenul microscopic extemporaneu
- Colorațiile imunohistochimice

II. Metode utilizate în cercetare

- Imunohistochimie;
- Imunofluorescența.

Norme de protecție:

- **Laboranții trebuie să-și facă periodic o fișă de sănătate cu control psihiatric deoarece lucrează constant cu substanțe periculoase(benzen, xilen, acizi anorganici);**
- **Depozitarea substantelor chimice: in dulapuri inchise, sub stricta supraveghere cantitativa si calitativa; -pe rafturi joase;**
- **Fumatul este interzis lângă substanțele inflamabile!**
- **Verificarea zilnică a temperaturii termostatlui;**
- **Purtarea echipamentului de protecție adecvat;**

- Pentru a fi examinate la microscop, țesuturile sau celulele sunt supuse unor operații speciale de pregătire, realizându-se “preparatul histologic”.
- Preparatul histologic reprezintă un fragment de țesut sau organ cu o grosime de câțiva microni, lipit pe o lamă de sticlă transparentă, colorat adecvat pentru studiul microscopic.



- **Preparatele histologice pot să fie:**
 - proaspete (temporare sau extemporanee)
 - permanente.
- **I. Preparatul histologic proaspăt:** este reprezentat de un fragment de țesut de mici dimensiuni, recoltat dintr-un organ viu prin puncție-biopsie sau dintr-o piesă operatorie, așezat pe lama port-obiect și acoperit de o lamelă. Fragmentul de țesut este suspendat într-un lichid fiziologic (ser fiziologic, ser glucozat, lichid cefalorahidian, plasmă, lichid amniotic pentru a prelungi durata de viață a celulelor).

- În practica curentă preparatul extemporaneu se utilizează cu precădere în serviciile de anatomie patologică, unde fragmentul de țesut sau organ, proaspăt recoltat prin puncție-biopsie sau din piesa de exereză chirurgicală este colorat cu “**coloranți vitali**” pentru un diagnostic de urgență.

- **Coloranții vitali pot fi:**

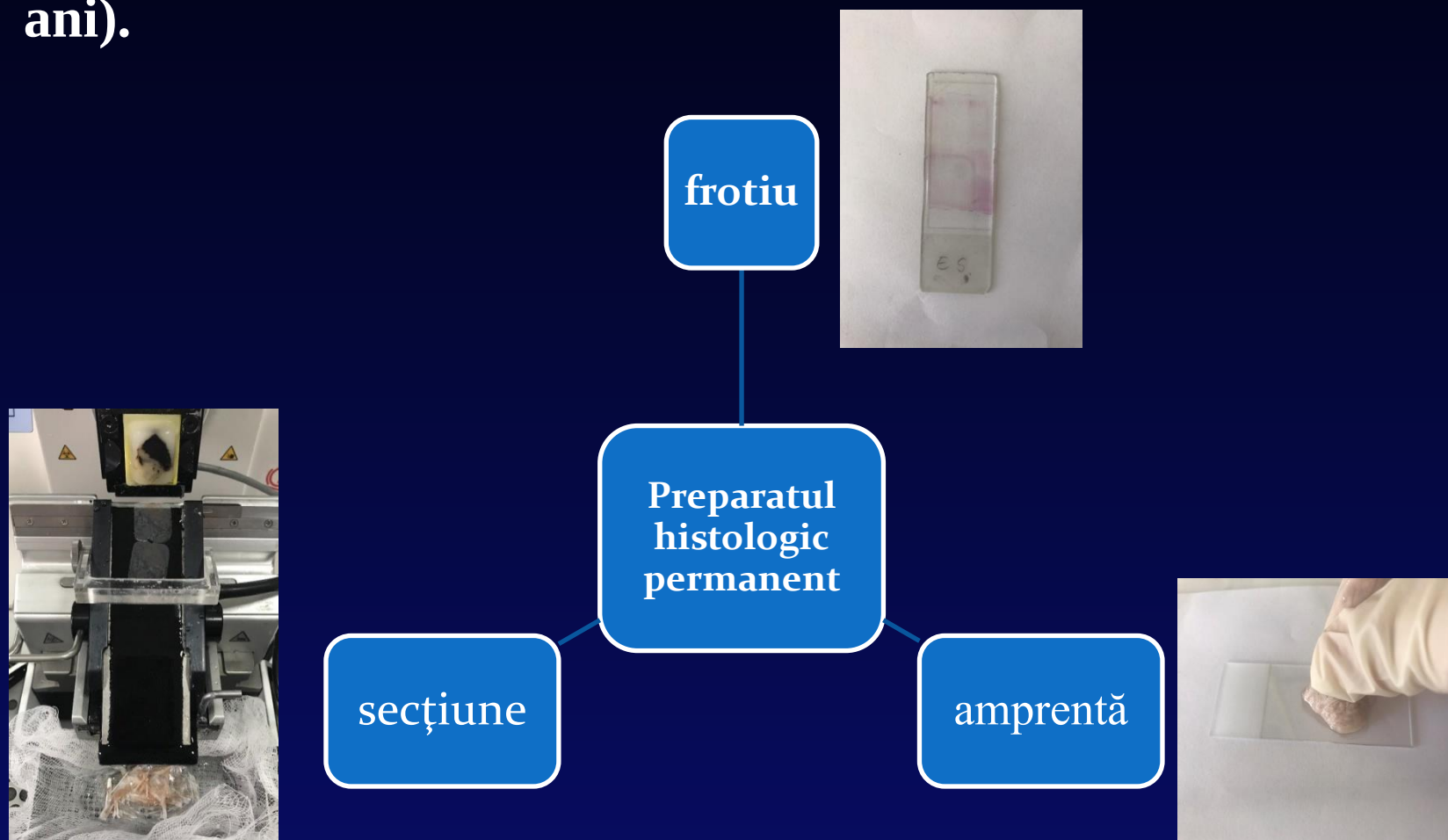
- coloranți vitali acizi (electronegativi);
- coloranți vitali bazici (electropozitivi),
- coloranți vitali neutri (indiferenți).

- *Coloranții vitali acizi* sunt reprezentați de: albastru de tripan, albastru pirol, roșu de Congo, roșu tripan, alizarina, tușul de China, carminul litinat, argintul coloidal etc.
- Coloranții vitali acizi realizează soluții coloidale apoase electronegative, fin granulare, pe care, celulele cu capacitatea de coloidopexie le endocitează. Celulele care au această capacitate sunt *celulele sistemului macrofagic*.
- Coloidopexia sau atrocitoza este o proprietate numai a celulei vii, de aceea coloranții vitali acizi se utilizează numai în colorațiile supravitale (intravitale)- *constau în injectarea colorantului în mai multe doze animalului de experiență încă în viață (intraperitoneal sau subcutanat).*



- *Coloranții vitali bazici* cei mai utilizați sunt: albastru de metilen, albastru de toluidină, metilen azur, roșu neutru, verdele Janus, nigozina, albastru de Nill, violet de metil, albastru de cresyl brilliant etc.
- *Coloranții vitali neutri* sau indiferenți sunt mai puțin reprezentați. Ei fac parte din grupa Sudan-ului și pot fi utilizați pentru evidențierea incluziilor lipidice.

- **II. Preparatul histologic permanent** - se mai numește și preparat durabil. El permite un examen detaliat și de lungă durată a unor celule țesuturi sau organe (ani sau zeci de ani).

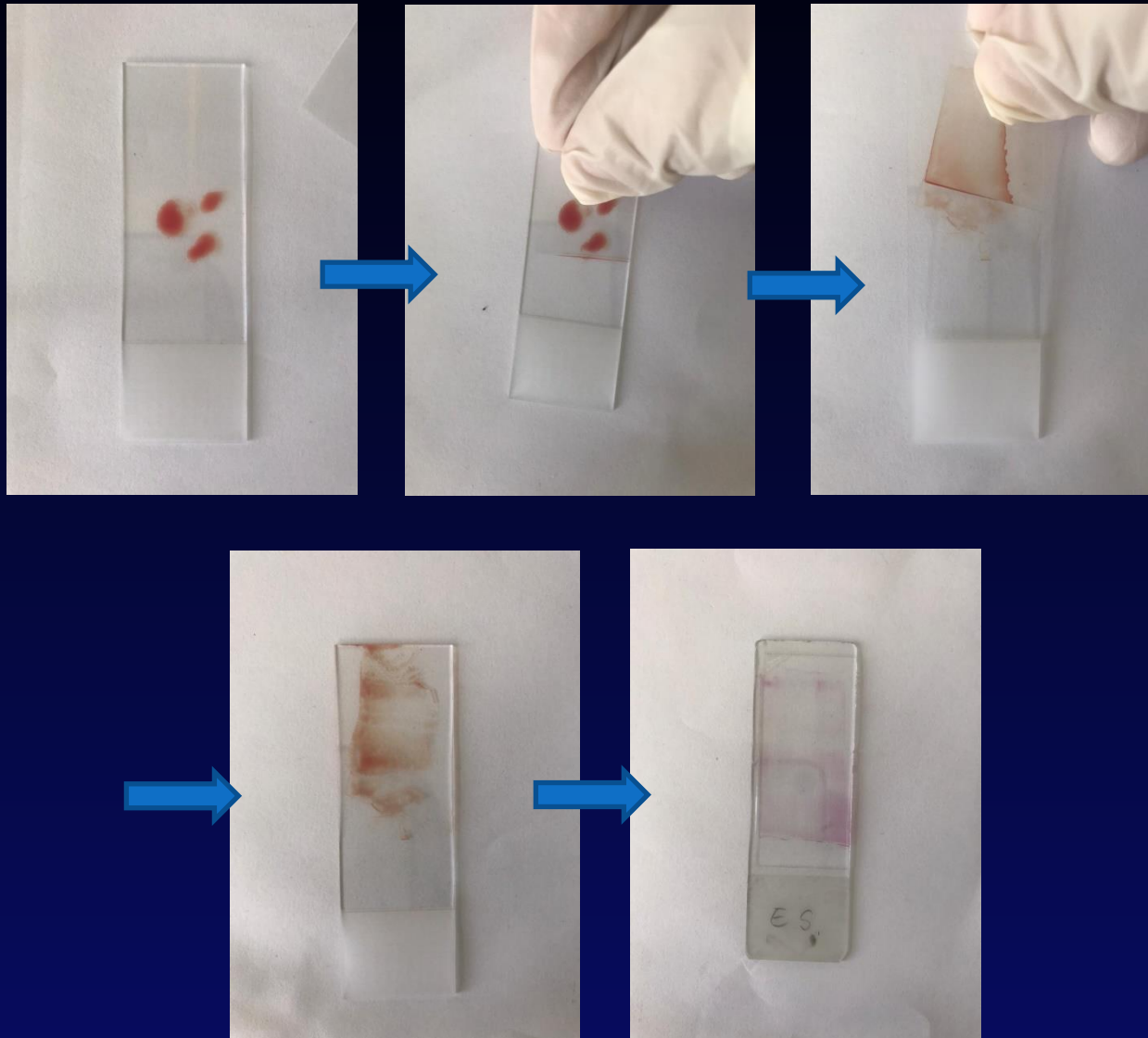


- **1. Frotiul** - este un preparat microscopic care reprezintă o picătură de lichid organic, normal sau patologic (sânge, limfă, lichid spermatic, lichid de ascită, lichid pleural, lichid articular, puroi, secreția vaginală etc) care se întinde într-o peliculă foarte fină pe suprafața unei lame de sticlă și care, după ce a fost fixat și colorat, se poate examina.
- În funcție de stucturile pe care dorim să le evidențiem se pot realiza colorații obișnuite sau colorații speciale.
- Exemple:
 - frotiul din sângele periferic
 - măduva osoasă roșie (hematogenă).

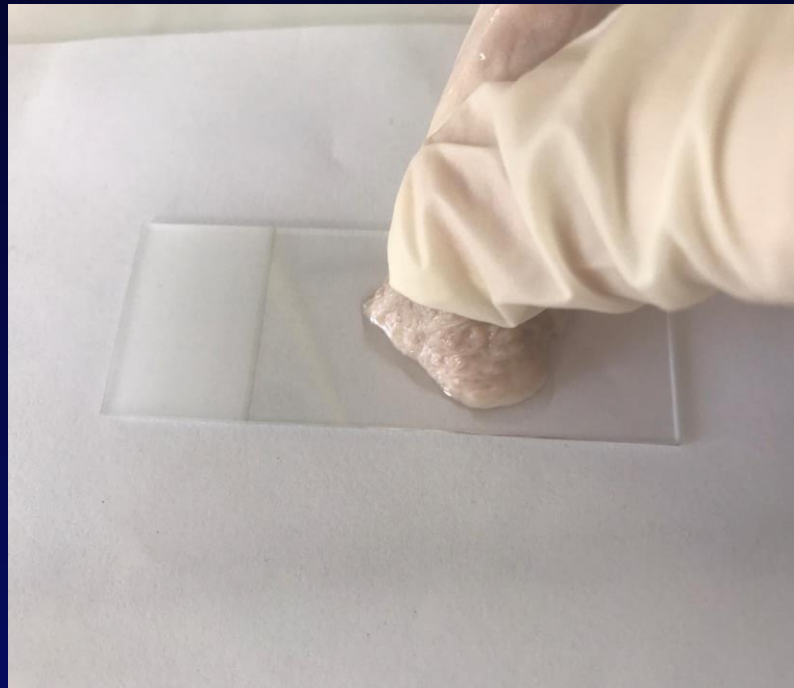
Colorații:

- obișnuite (hematoxină-eozină, tricromic) ;
- speciale tehnica May Grümwald Giemsa (colorația panoptică a lui Pappenheim).

Frotiul de sânge periferic



- **2. Amprenta** - se realizează prin aplicarea și ușoara apăsare a unei structuri tisulare (de obicei a unei limfoganglion secționat, un fragment de splină, un fragment biopsic dintr-un organ) pe o lamă de sticlă port obiect. Unele din celulele libere ale parenchimului tisular vor rămâne aderente de lama de sticlă. Preparatul astfel realizat se fixează și se colorează.



- **3. Secțiunea** - reprezintă o cupă, o felie dintr-un țesut sau organ cu grosimea de câțiva microni (3-5 mm), prelucrată în cursul unei tehnici speciale, numită tehnică histologică, făcând-o în final transparentă și aptă de a fi examinată la microscop.
- Secțiunea histologică este montată pe o lamă de sticlă “port obiect” și acoperită cu o lamelă cu ajutorul balsamului de Canada sau alt mediu de acoperire.



TEHNICA HISTOLOGICĂ are următorii timpi:

- - *recoltarea pieselor sau fragmentelor din țesuturi sau organe,*
- - *fixarea,*
- - *includerea*
- - *secționarea*
- - *colorarea*
- - *montarea secțiunii*

1. Recoltarea. Prelevarea.

- Obținerea unor fragmente sau părți din țesuturi sau organe, se realizează fie printr-un act operator important când se obțin piese operatorii, fie printr-un act operator mai redus când obținem un fragment din organul sau țesutul respectiv de dimensiuni mai mici, numit biopsie. Materialul astfel obținut poartă numele de piesă histologică.



RECOLTAREA:

- Se face cât mai curând după prelevarea probei;
- Cu deosebită atenție pentru a nu modifica histoarhitectura organului;
- Se pot recolta piese de la necropii, fragmente de organ recoltate intraoperator și de la animalele de experiență;

PRELEVAREA:

- Planul de secțiune trebuie orientat în funcție de structura organului;
- Trebuie să țină cont de:
 - orientarea secțiunilor histologice;
 - gresimea și suprafețele secțiunilor;
 - prezența și întinderea leziunii;
 - menținerea raporturilor anatomice și histologice cât mai aproape de starea "in vivo";

2. Fixarea

- Fixarea constituie operațiunea prin care piesa este conservată într-o substanță numită fixator și care are ca rezultat menținerea formei structurilor și raporturilor pe care le au celulele țesuturilor și organelor în timpul vieții. Trebuie realizată cât mai repede după recoltare;

- Exemple:

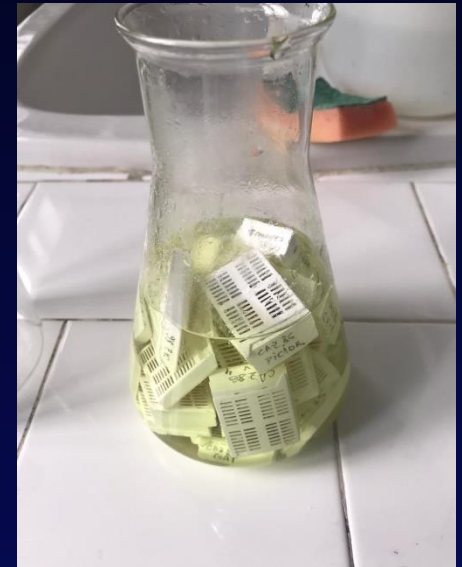
- soluție formol 10%;
- acid acetic;
- acetona anhidră;
- acidul tricloracetic;
- alcool etilic 96%-100%;
- alcool metilic pur;
- bicromat de potasiu sol. 2-4%;
- acid osmic sol. 1-2%;

Obiective:

- Oprirea proceselor vitale din celule și țesuturi;
- Impiedicarea alterării structurilor celulare și tisulare scoase din organism prin prevenirea fenomenelor de autoliză;
- Prevenirea alterării structurale ca urmare a unui atac bacterian;
- Pregătirea celulelor și țesuturilor pentru o colorare adecvată.

3. Fixarea, decalcifierea și prelucrarea țesuturilor dure

- Piesele formate din țesuturi dure, impregnate cu săruri de calciu, se fixează în totalitate (dinte, fragmente de os) sau se fragmentează înainte de a fi supuse fixării cu ajutorul unor freze, realizându-se piese cu grosimi de câțiva milimetri.
- După realizarea fixării și aceste piese sunt spălate iar apoi sunt decalcificate.
- Decalcificarea se poate realiza prin procedee chimice sau electrolitice.
- Decalcificarea chimică se poate realiza în:
 - - acid tricloracetic soluție apoasă 5-10%;
 - - acid formic soluție apoasă 5%;
 - - acid azotic soluție apoasă 5%,
 - - acid sulfuros soluție 5%;
 - - citrat de amoniu soluție apoasă 5%;
 - - sarea disodică a acidului etilen diamintetracetic (EDTA) soluție 5,5%;
 - - rășini schimbătoare de ioni etc.



- **4. Includerea** - este operațiunea histologică prin care piesa este impregnată și înglobată într-o anumită substanță solidificabilă și care în final transformă piesa într-un bloc cu o consistență omogenă și crescută ce permite secționarea la microtom fără a se sfărma și fără a deteriora structura piesei.
- Substanțele folosite pentru includere sunt: parafina, celoidina, gelatina, amestecul parafină-celoidină, rășinile sintetice.



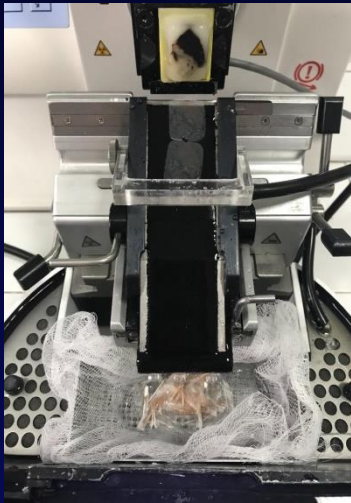
4. Includerea

- - deshidratarea,
- - clarificarea,
- - impregnarea cu parafină,
- - includerea în bloc.



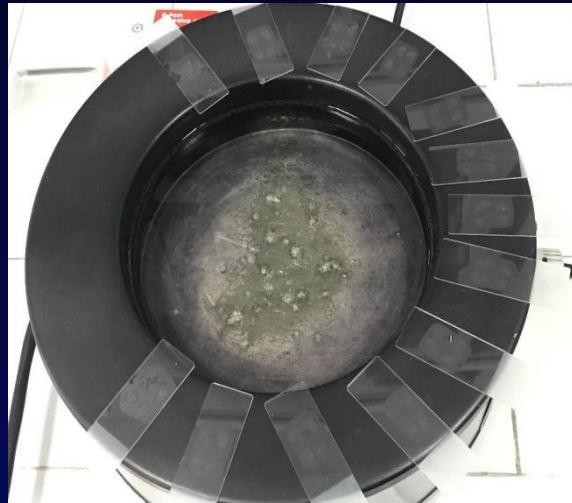
5. Secționarea

- Blocurile de parafină ce includ piesa se secționează cu ajutorul unui aparat numit microtom. Secțiunile histologice, denumite și cupe, pot avea grosimi variabile, dar cele mai bune rezultate se obțin pe secțiunile de 3-5 microni.



Microtom

=>



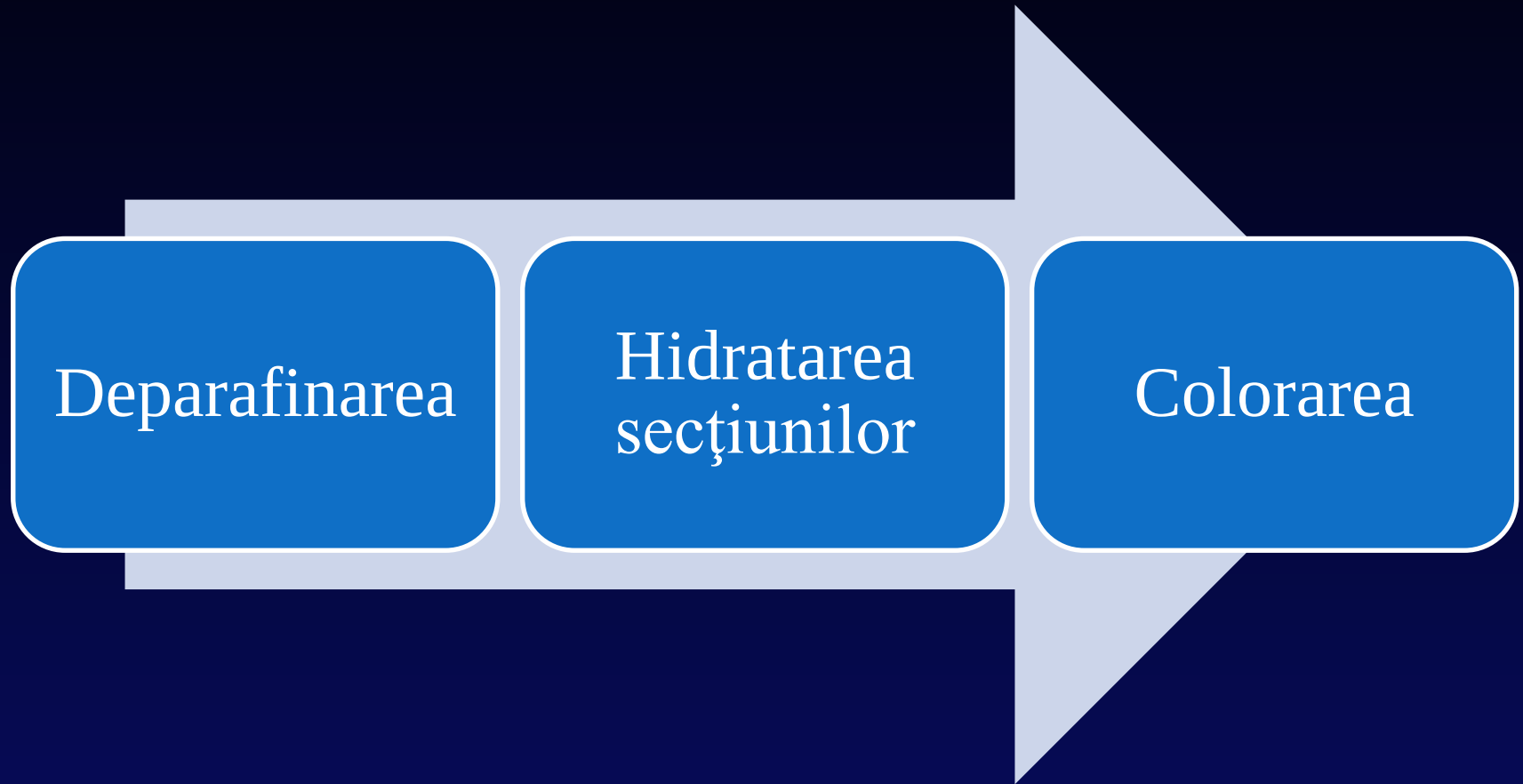
Uscarea lamelor

=>



Termostat

6. Colorarea preparatului permanent



În funcție de numărul de coloranți utilizați există:

- - **colorații monocrome** (albastru de metilen, albastru de toluidină eritrozină etc);
- - **colorații bicrome** (hematoxilină-eozină);
- - **colorații tricromice** (tricromicul Masson, Van Gieson, Goldner-Szeckeli etc);
- - **colorații policrome** (Azan, Hurdud).
- **Coloranți histologici pot fi de două feluri:**
 - - **coloranți naturali** (hematoxilină - substanță colorată de natură vegetală; carminul - substanță colorantă de origine animală);
 - - **coloranți artificiali** (culorile de anilină).
- **Unii coloranți au proprietăți bazice, alții acide și alții neutre.**
- **Coloranții bazici** se mai numesc și coloranți nucleari deoarece colorează structurile nucleare. Ex.: hematoxilina, safranina, fuxina bazică, albastru de metil, verde de metil, albastru de toluidină. Structurilor colorate li se spune bazofile.
- **Coloranții acizi** se mai numesc și coloranți citoplasmatici deoarece colorează structurile alcaline, citoplasmatiche. Ex.: eozina, orange G, verde de lumină, fuxina acidă, albastru de anilină. Structurile colorate se mai numesc acidofile.
- **Coloranții neutri** sunt amestecuri de coloranți acizi și alcalini și colorează incluziuni citoplasmatiche cu reacție neutră. Ex.: eozinatul de albastru de metilen.
- **Structurilor colorate li se spune neutrofile.**

COLORAȚIILE HISTOLOGICE

- **Colorațiile uzuale:** colorația Hematoxină-Eozină și colorațiile tricromice.
- **Colorații speciale:**
- *Fibre de colagen*- col. tricromice Masson, Van Gieson, Goldner-Szeckelly;
- *Fibre elastice*- col. cu orceina, rezorcin-fuxină;
- *Fibre de reticulină*- impregnație argentică;
- *Glicogen*- PAS, Carmin Best;
- *Membranele bazale*- PAS, impregnație argentică;
- *Adipocite*- Sudan III, Sudan IV, Acidul Osmic, Scarlath roth;
- *Corpusculii Nissl*- col. Cu albastru de metilen, gallocianina, thionină;
- *Neurofibrile*- impregnație argentică Bielschowsky;
- *Fibre musculare striate*- hematoxină ferică Heidenhain;
- *Sistemul nervos*- impregnări metalice (cu aur, mercur, acid osmic), col. Nissl, col. Weigert-Pal;
- *Colorații histochimice*- pentru cercetarea substanțelor organice (grăsimi, glicogen, derivații proteice), a hemoglobinei;
- *Reacții histoenzimatiche*- pentru evidențierea la nivel tisular a activității enzimatic (oxidaze, peroxidaze, fosfatază acidă și alcalină).

Colorația cu hematoxină-eozină (H.E.)

1. Deparafinarea (trei băi de benzen) :

- benzen I 5 min

- benzen II..... 5 min

- benzen III. 5 min

2. Hidratarea (în alcooluri de concentrație descrescândă)

- alcool etilic absolut 3 min

- alcool etilic 90° 3 min

- alcool etilic 80° 3 min

- alcool etilic 70° 3 min

3. Colorarea cu hematoxină Mayer 15 minute

4. Spălarea în apă de robinet;

5. Diferențierea în alcool clorhidric 2% 10-15 sec.;

6. Spălarea în apă de robinet;

7. Virarea în carbonat de litiu sol. saturată 10-15 sec.;

8. Spălarea în apă de robinet;

9. Colorarea cu eozină30-60 sec.;

10. Spălarea în apă de robinet;

11. Deshidratarea în 6 băi alcool etilic: 80°, 90°, 96°, absolut (I,II,III);

12. Clarificare - în trei băi xilol câte 15 minute;

13. Montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- nucleii apar colorați în albastru-violet;

- citoplasma în roz;

- eritrocitele în roșu deschis;

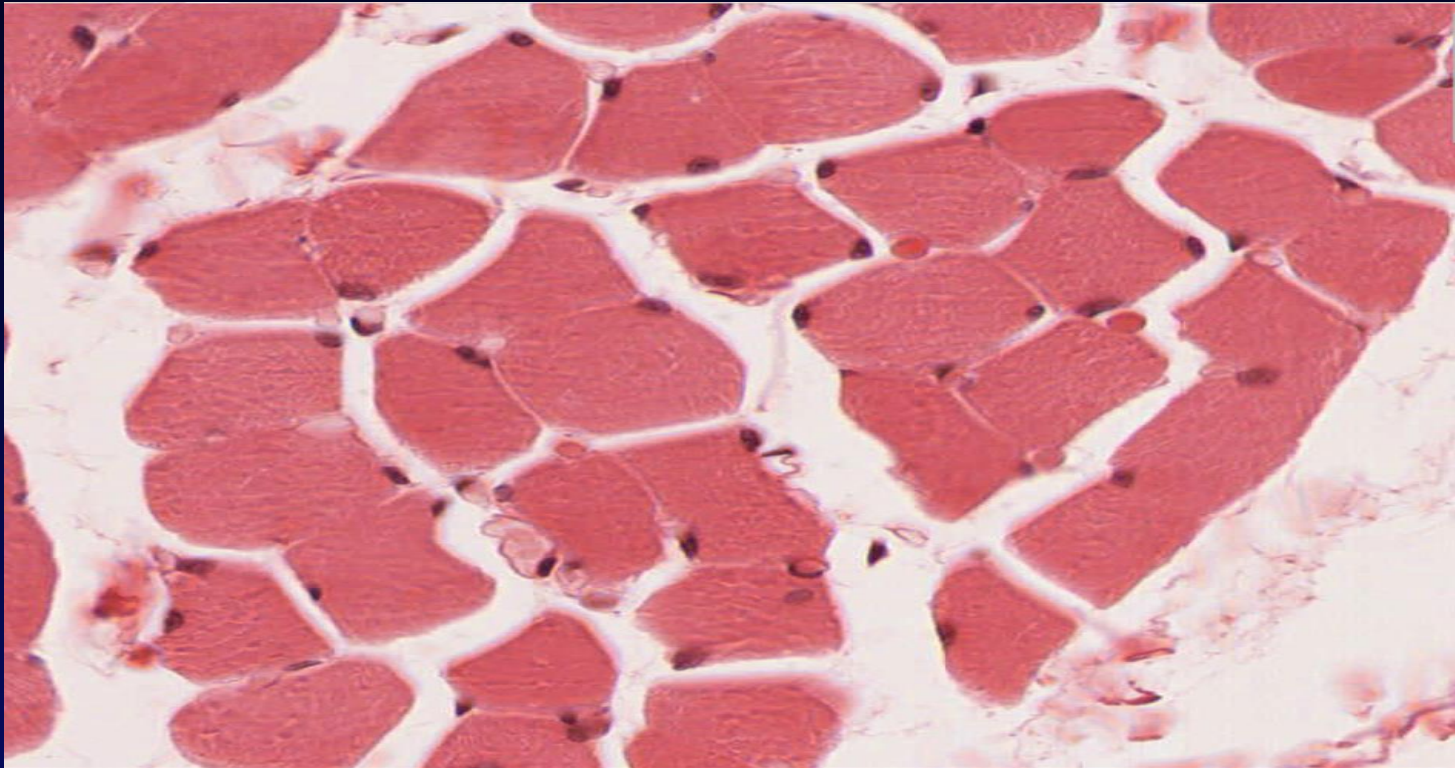
- colagenul în roz palid;

- substanța fundamentală cartilaginoasă, oseina în roșu.

COLORAȚIA HEMATOXILINĂ-EOZINĂ

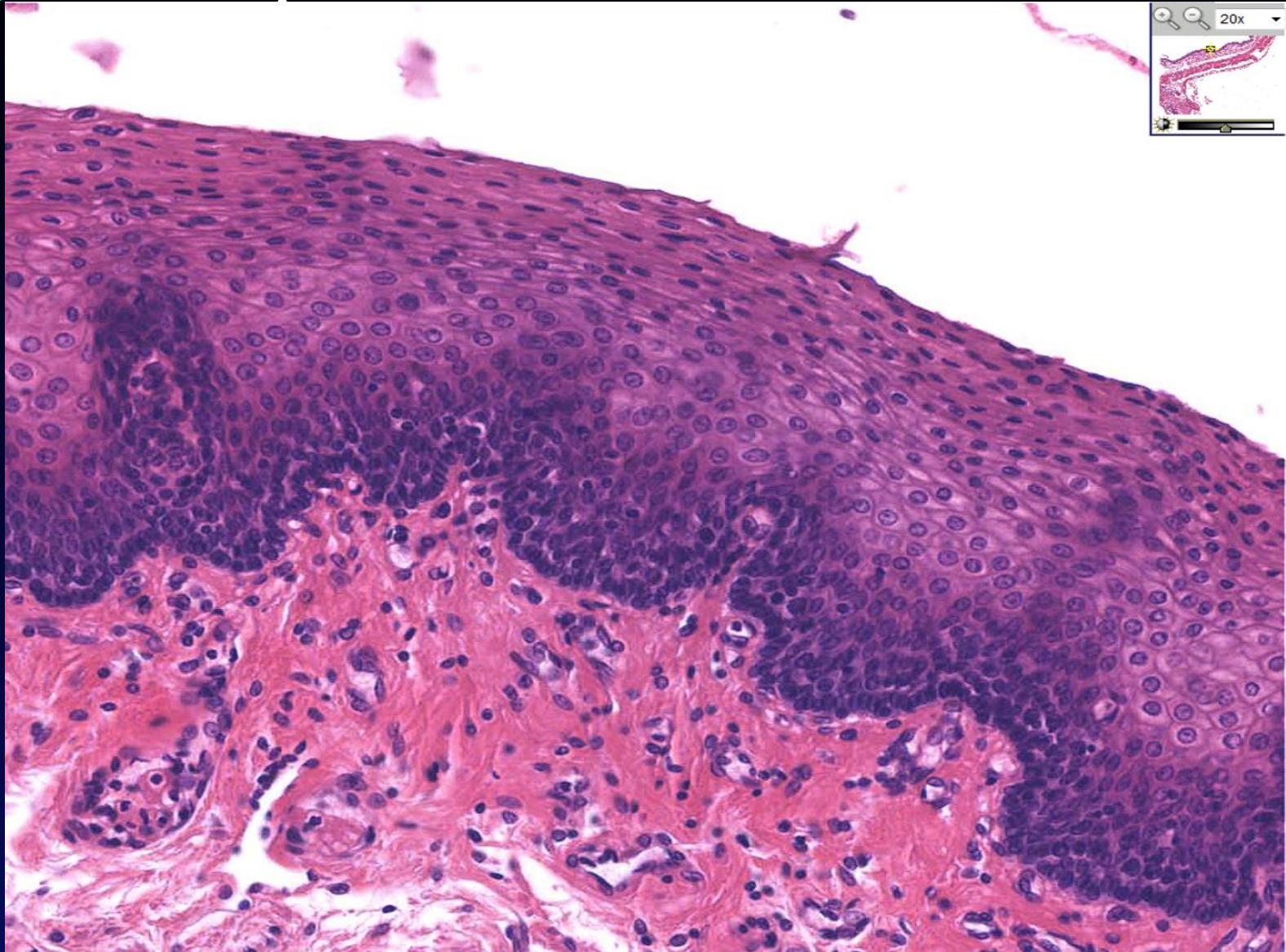
Hematoxilina-colorant bazic- colorează în **ALBASTRU** structurile bazofile: acizii nucleici- ADN-nucleu; ARN- ribozomi.

Eozina –colorant acid- colorează în **ROȘU** structurile acidofile sau eozinofile: proteinele – în citoplasmă și în matricea extracelulară.



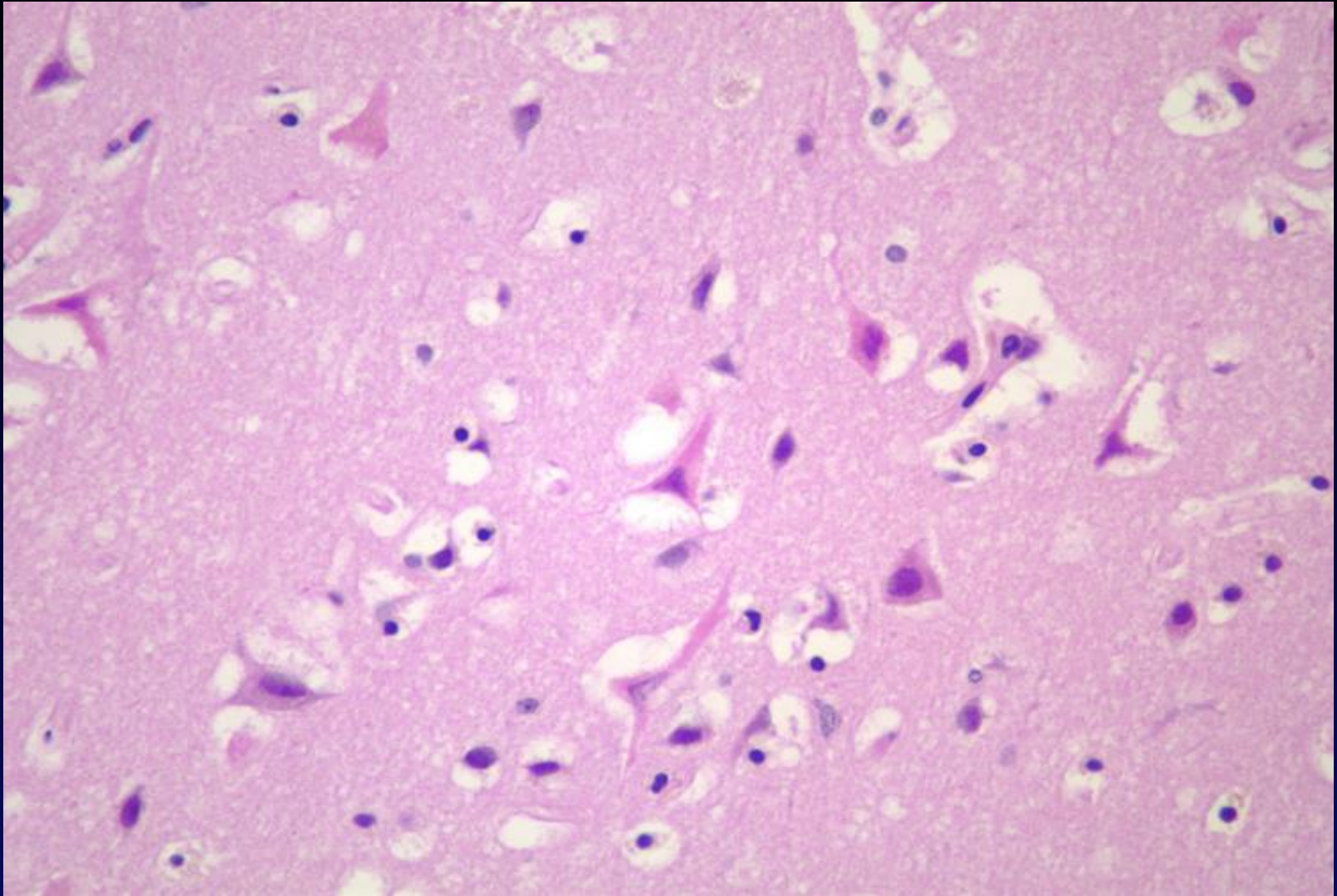
Țesut muscular striat scheletal, HE

COLORATIA HEMATOXILINĂ-EOZINĂ



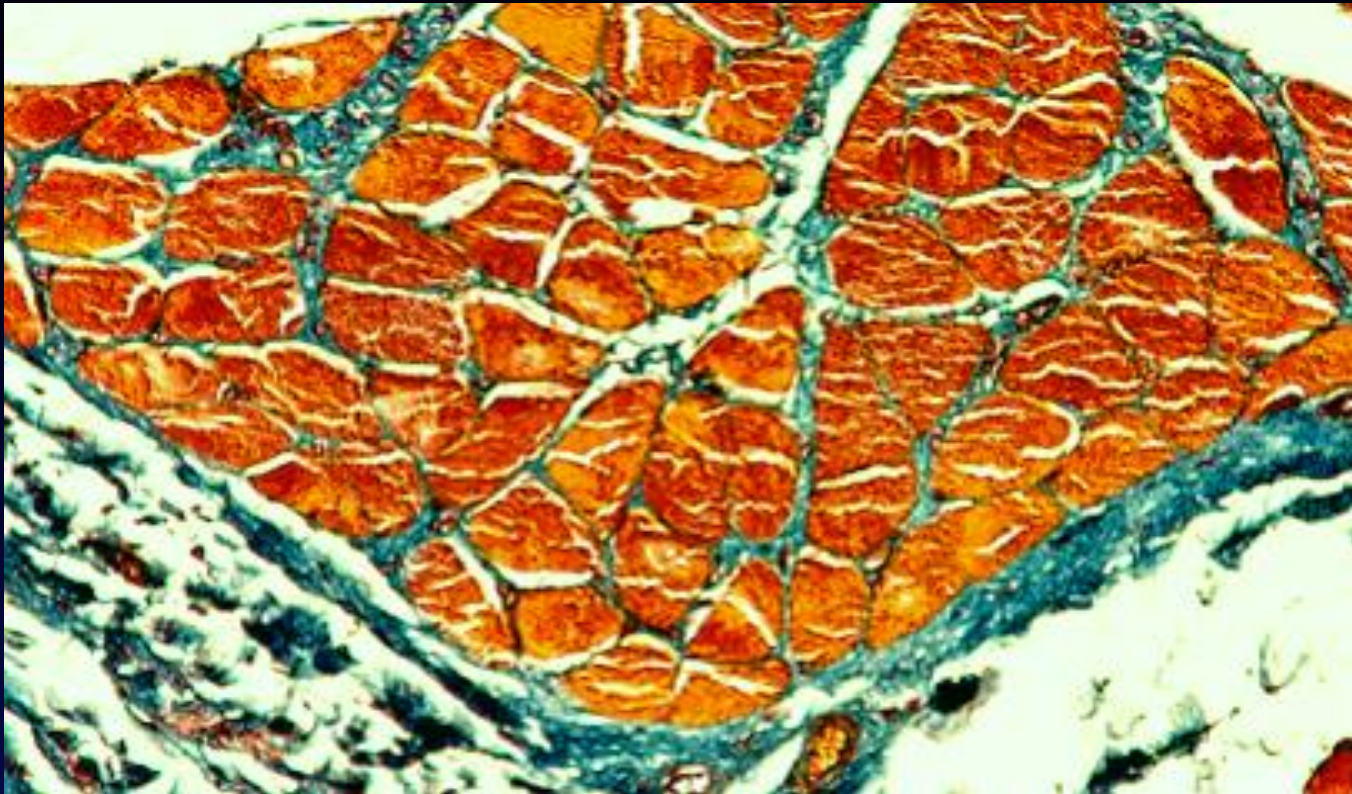
Epiteliu stratificat malpighian fără keratinizare, HE

COLORAȚIA HEMATOXILINĂ-EOZINĂ



Neuroni piramidali, HE

COLORAȚIA TRICROMICĂ MASSON



Țesut muscular striat scheletal, TM

Tesutul conjunctiv- albastru

Citoplasma- rosu-violet

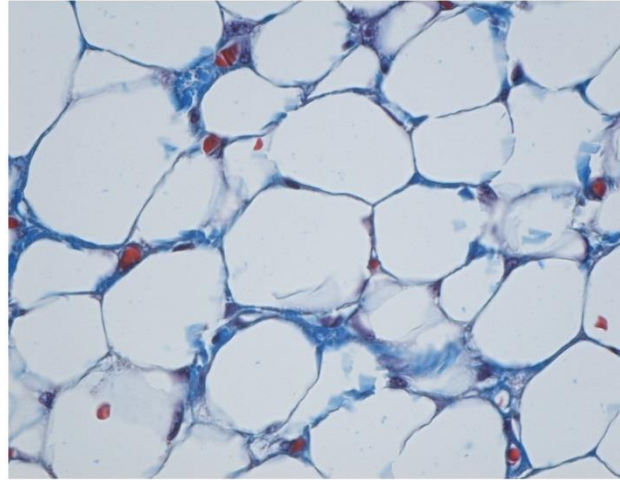
Nucleii- negru

Tesut muscular- rosu

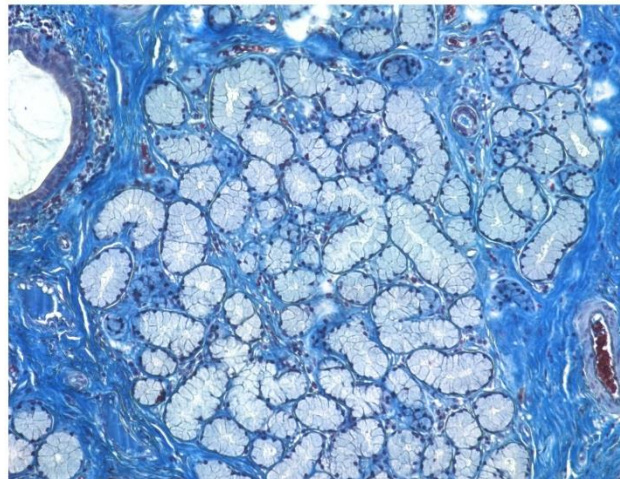
Hematii- rosu-potocaliu

COLORAȚIE TRICROMICĂ

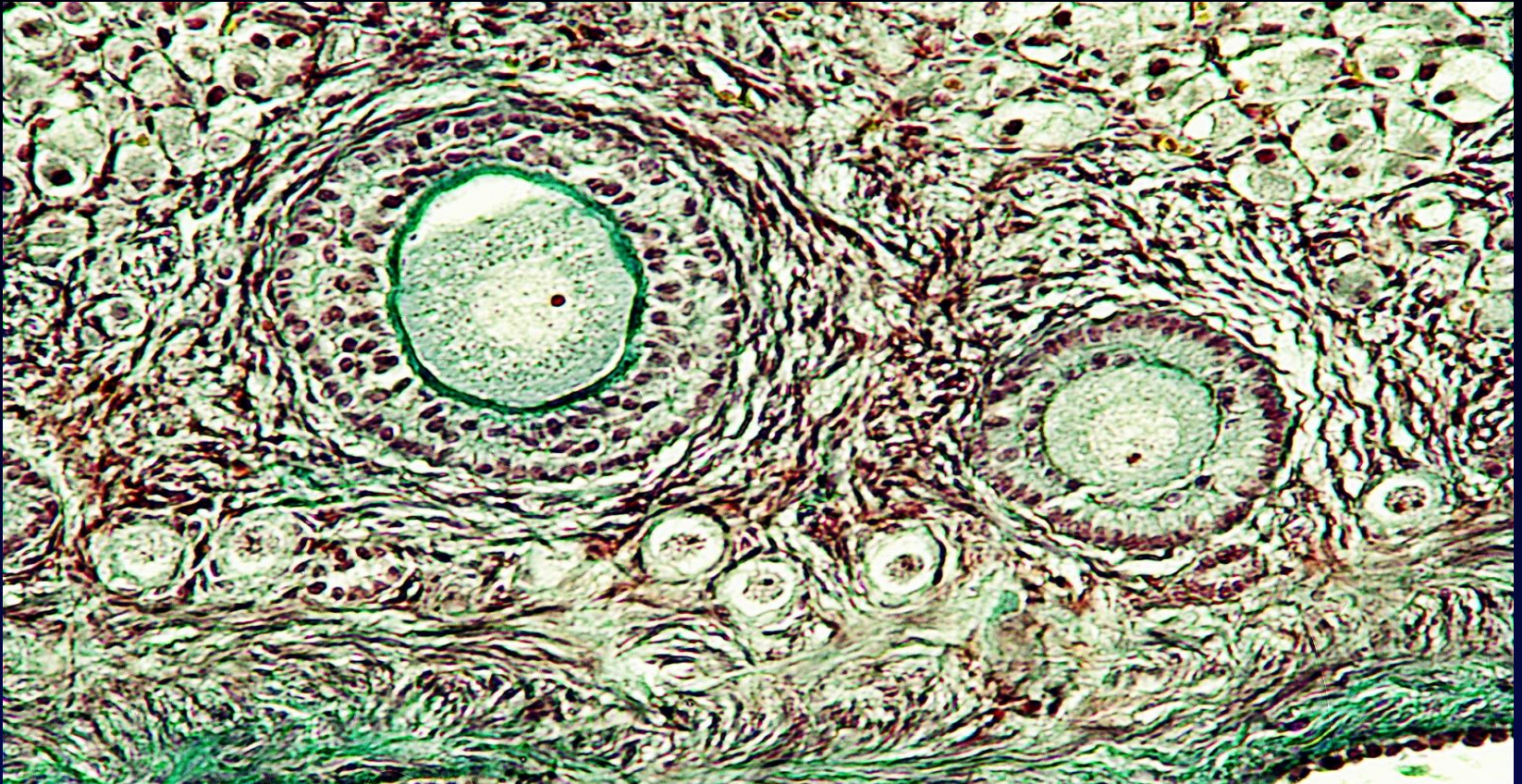
Tesut adipos



Glandă salivară



COLORAȚIA TRICROMICĂ GOLDNER-SZECKELLY (TGS)



Foliculi ovarieni, ovar, TGS.

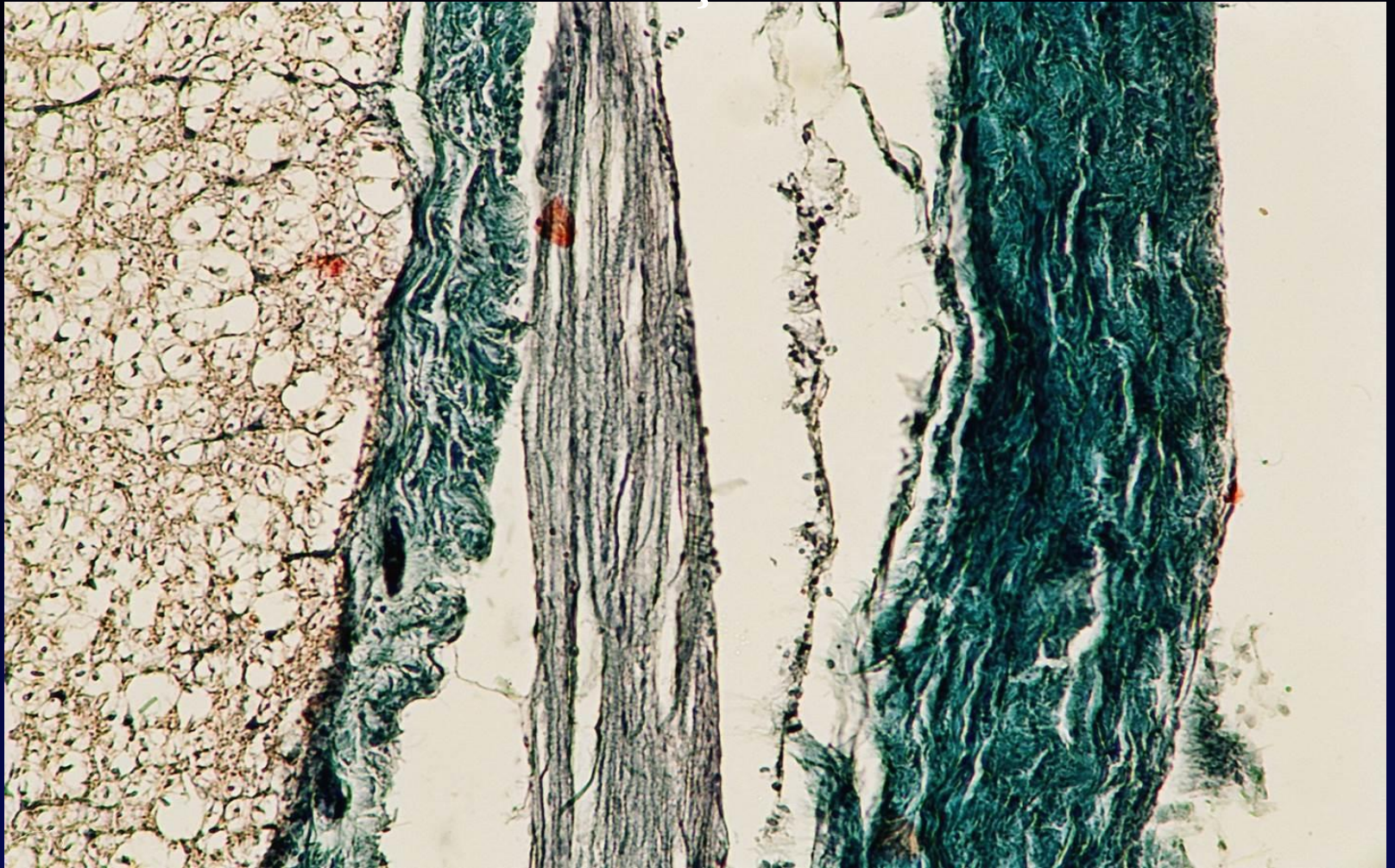
Nuclei- albastru-violet

Citoplasma- roz

Colagen- verde

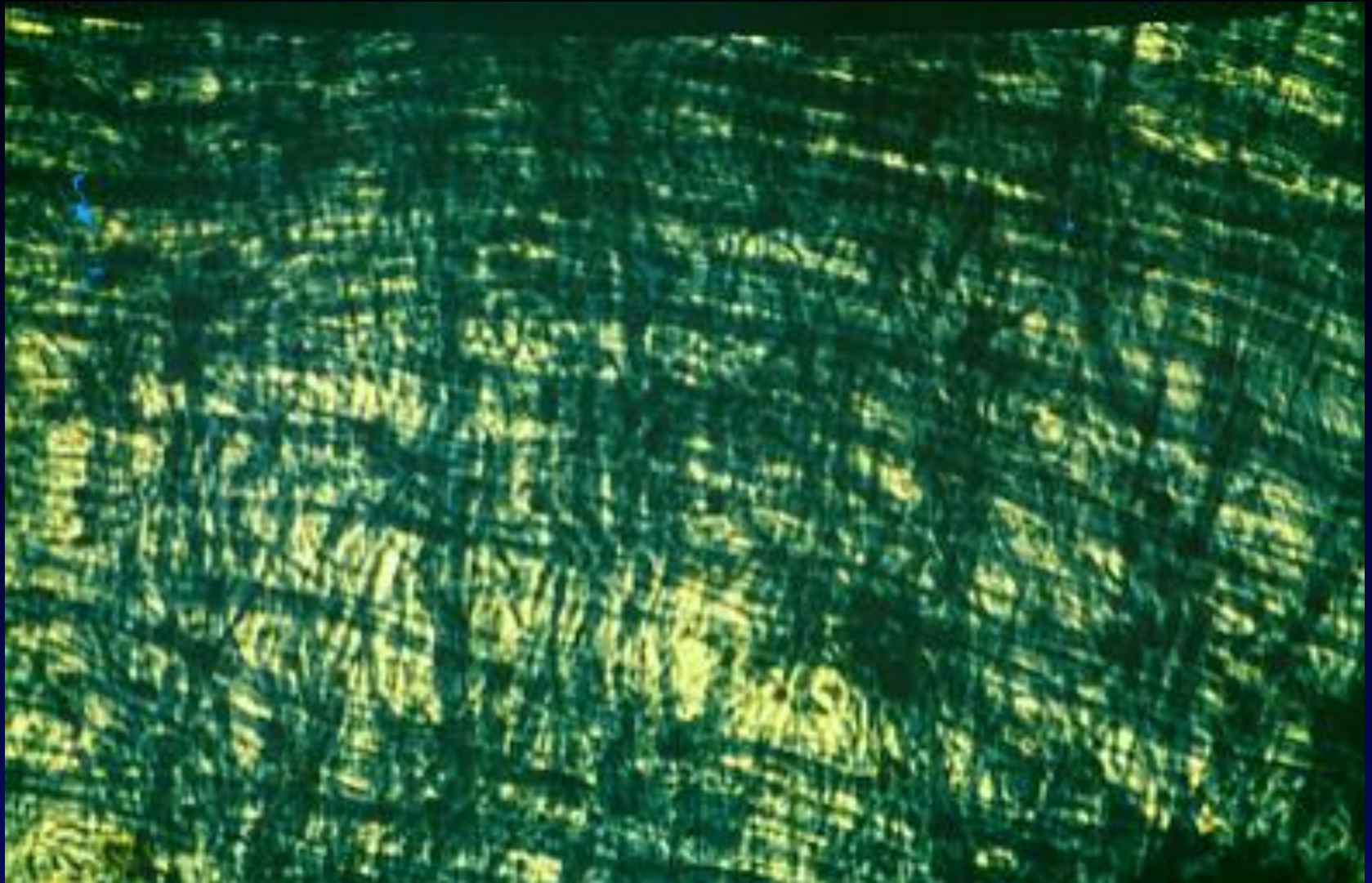
Hematii- galben-portocaliu

COLORAȚIA TGS



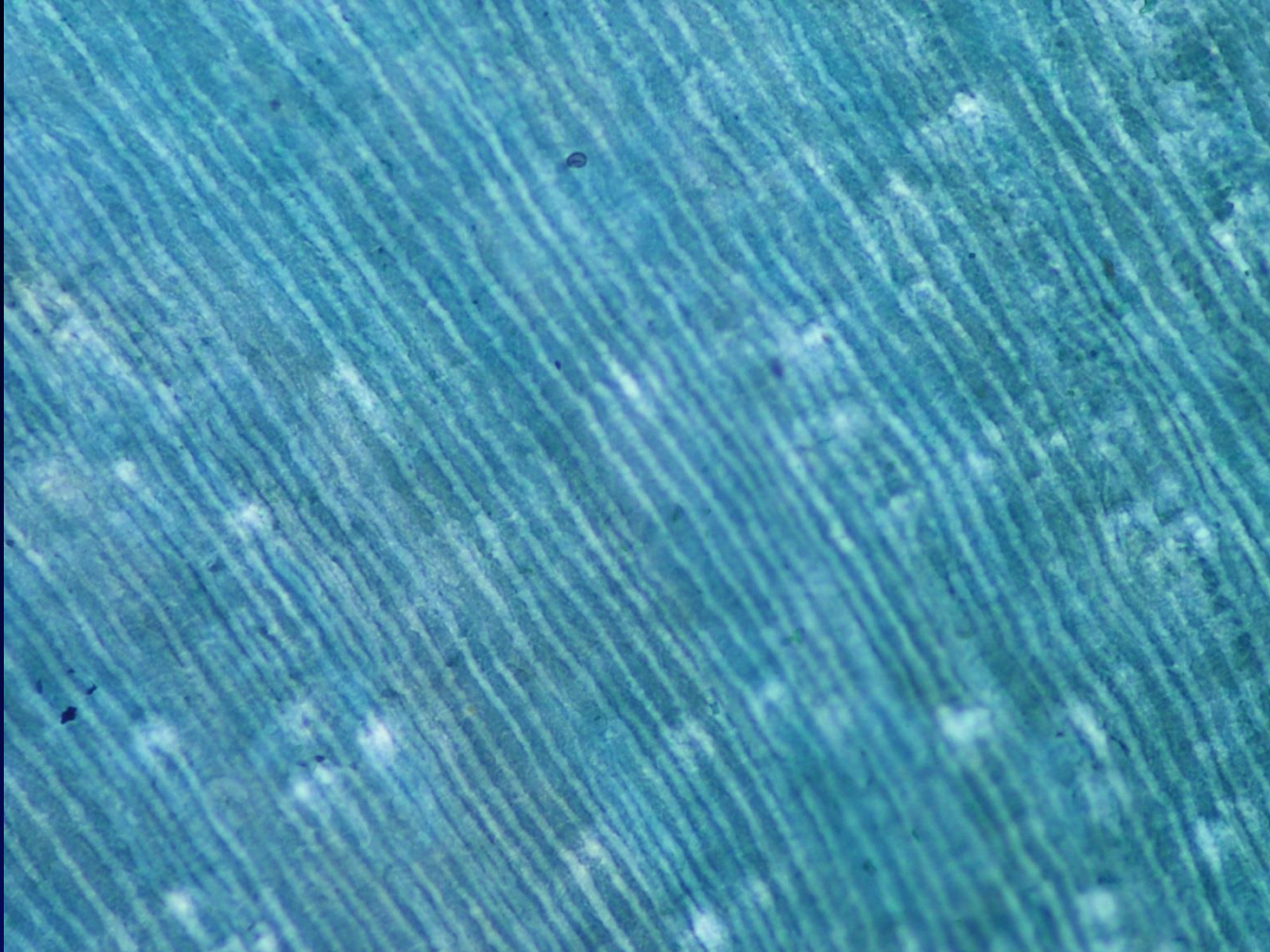
Nerv periferic, TGS

COLORAȚIA TGS



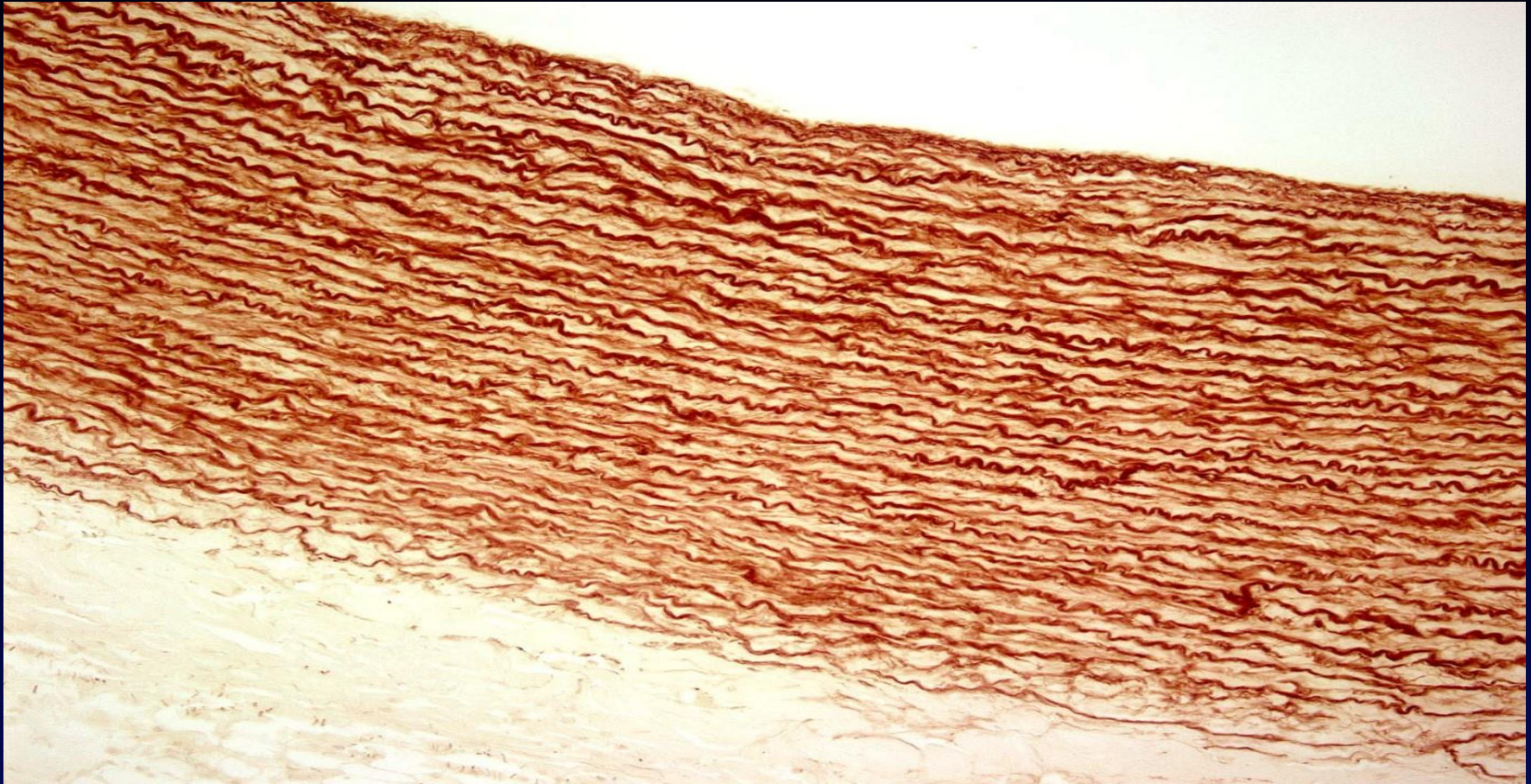
Aponevroză ,TGS

COLORAȚIA TRICROMICĂ MASSON (TM)



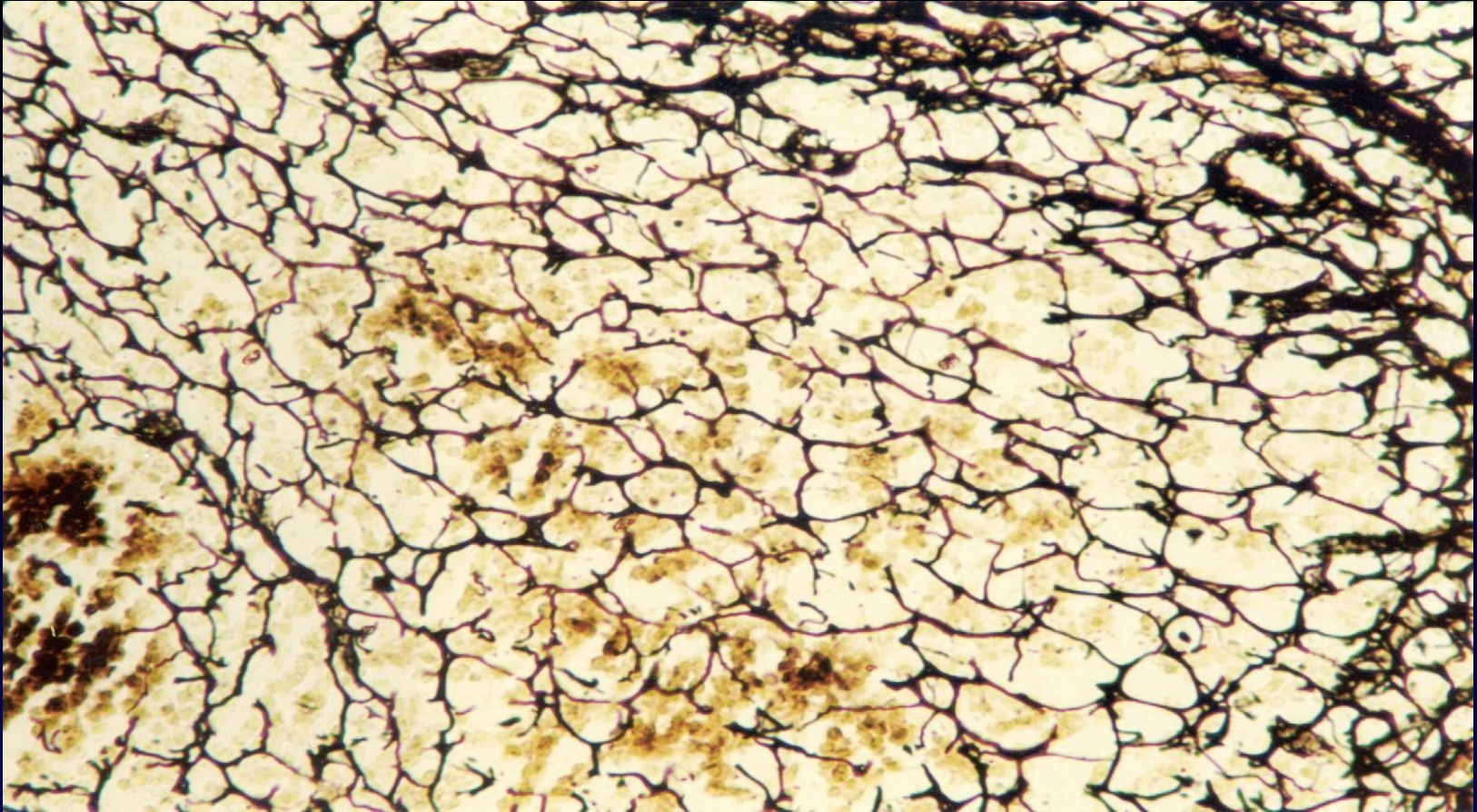
Dentina- canalicule dentinare, TM

COLORAȚIA CU ORCEINĂ



**Fibrele elastice, perete aortic, Orceina.
(roșu-brun)**

IMPREGNAȚIA ARGENTICĂ GÖMÖRI



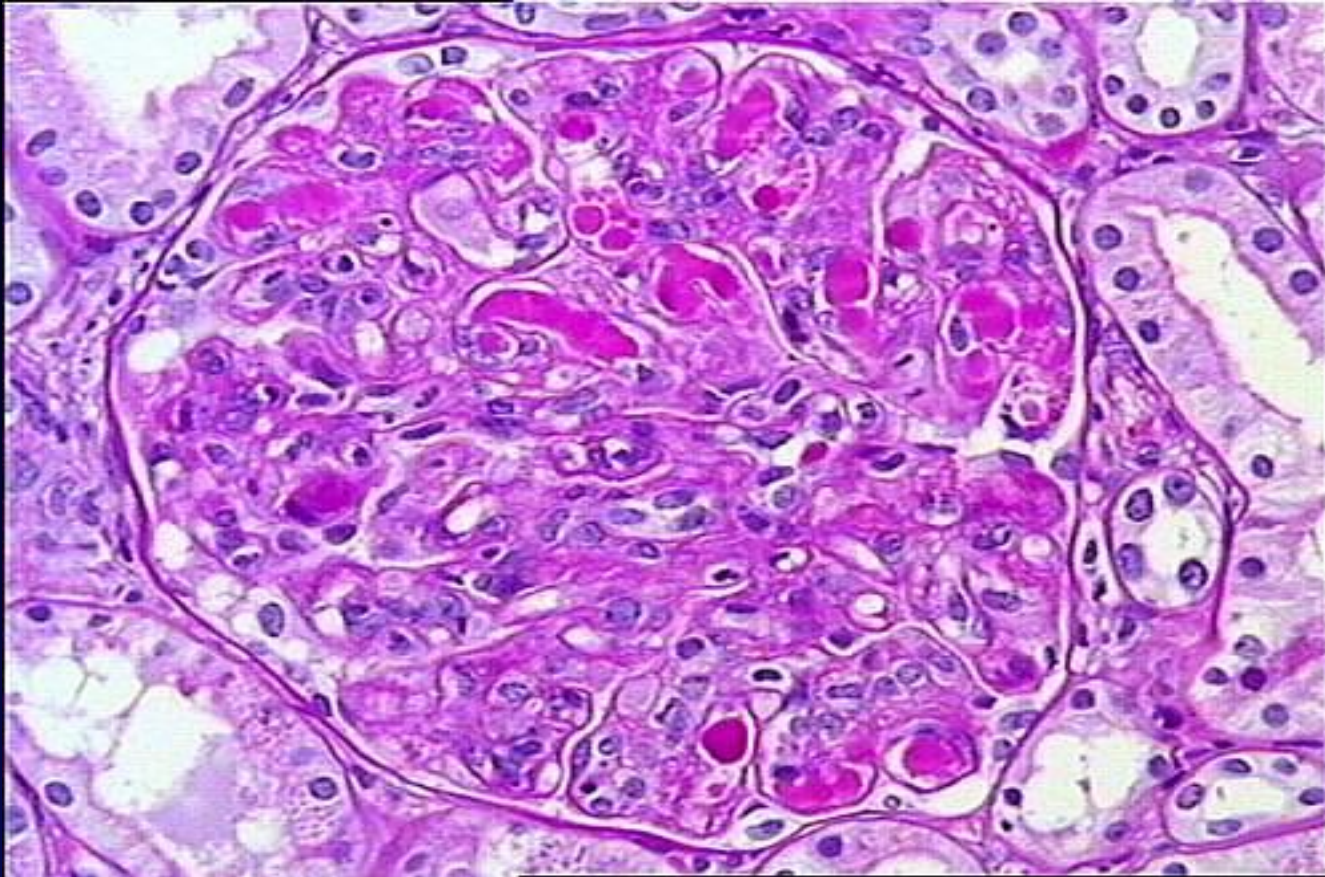
Fibre de reticulină- negru-intens

Fibre de collagen- galben-cenușiu

Nucleii- negru

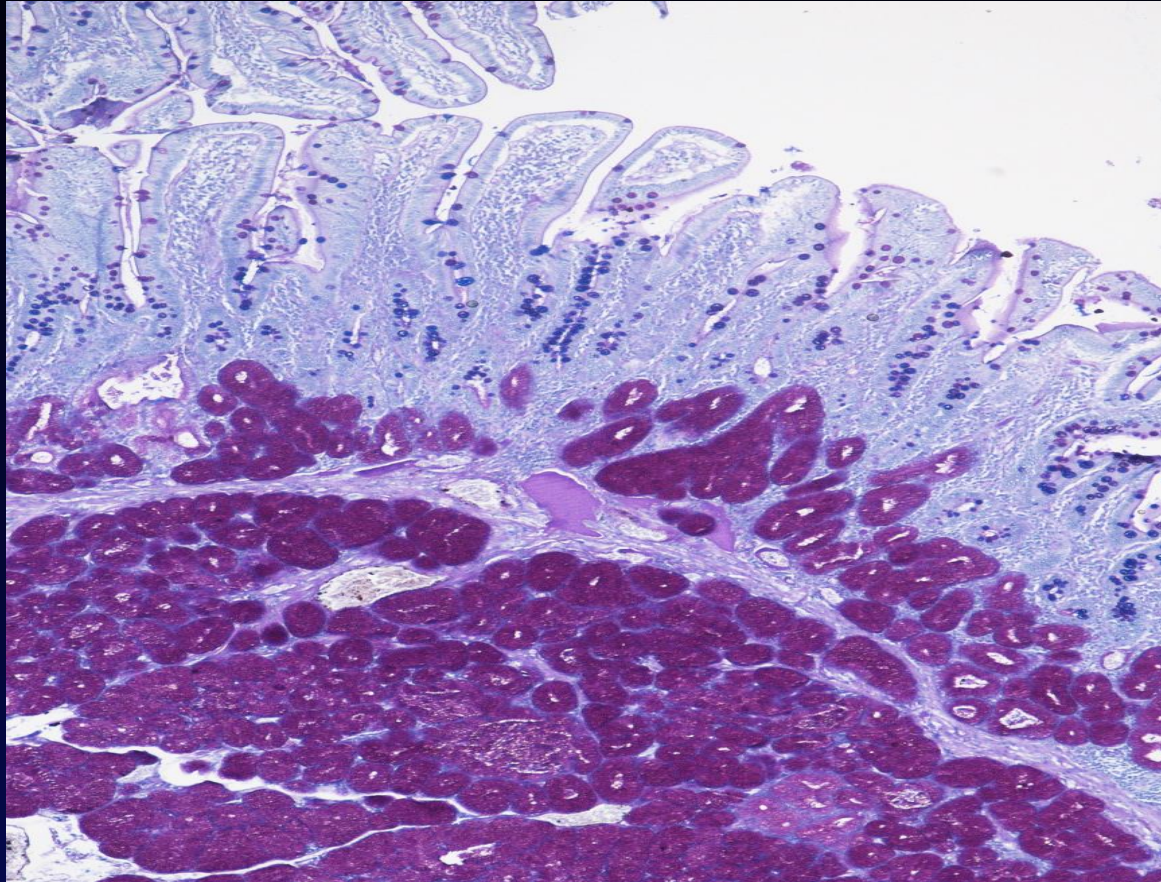
Citoplasma- cenusie

Tehnica colorației cu HEMATOXILINĂ (H) și ACIDUL PERIODIC SCHIFF (PAS)



Foița externă a capsulei Bowmann, PAS-Hematoxină
Glicozaminoglicanii- roșu-intens
Nucleii- albastru

Tehnica colorației cu HEMATOXILINĂ (H), ACIDUL PERIODIC SCHIFF (PAS) și ALBASTRU ALCIAN (AA)

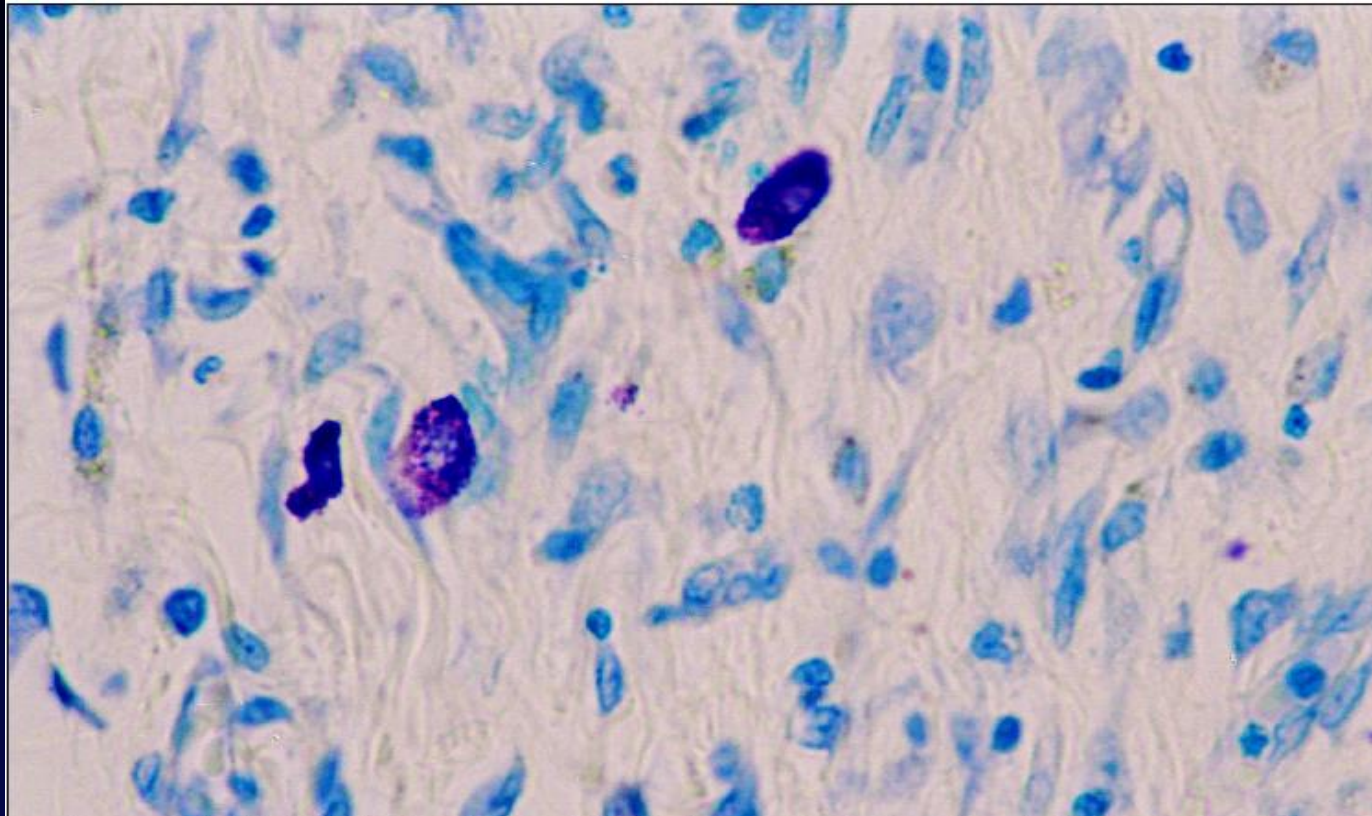


Mucoasă intestinală- epitelu simplu cilindric ciliat, cu celule caliciforme, PAS-H -AA

Glicozaminoglicanii- roșu-intens , albastru închis.

Nucleii- albastru

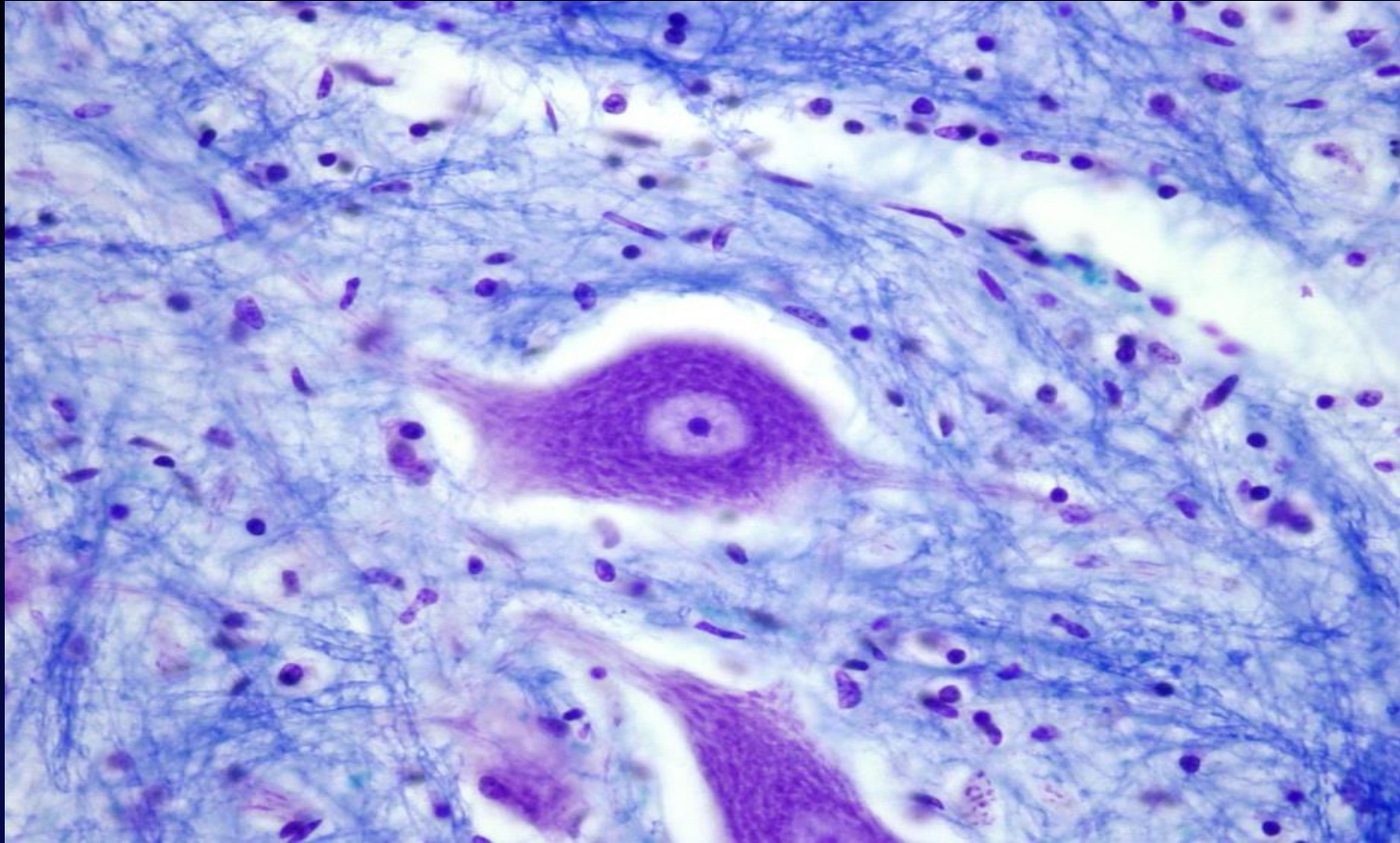
COLORATIA CU ALBASTRU DE TOLUIDINA



Țesut conjunctiv lax, Albastru de toluidină

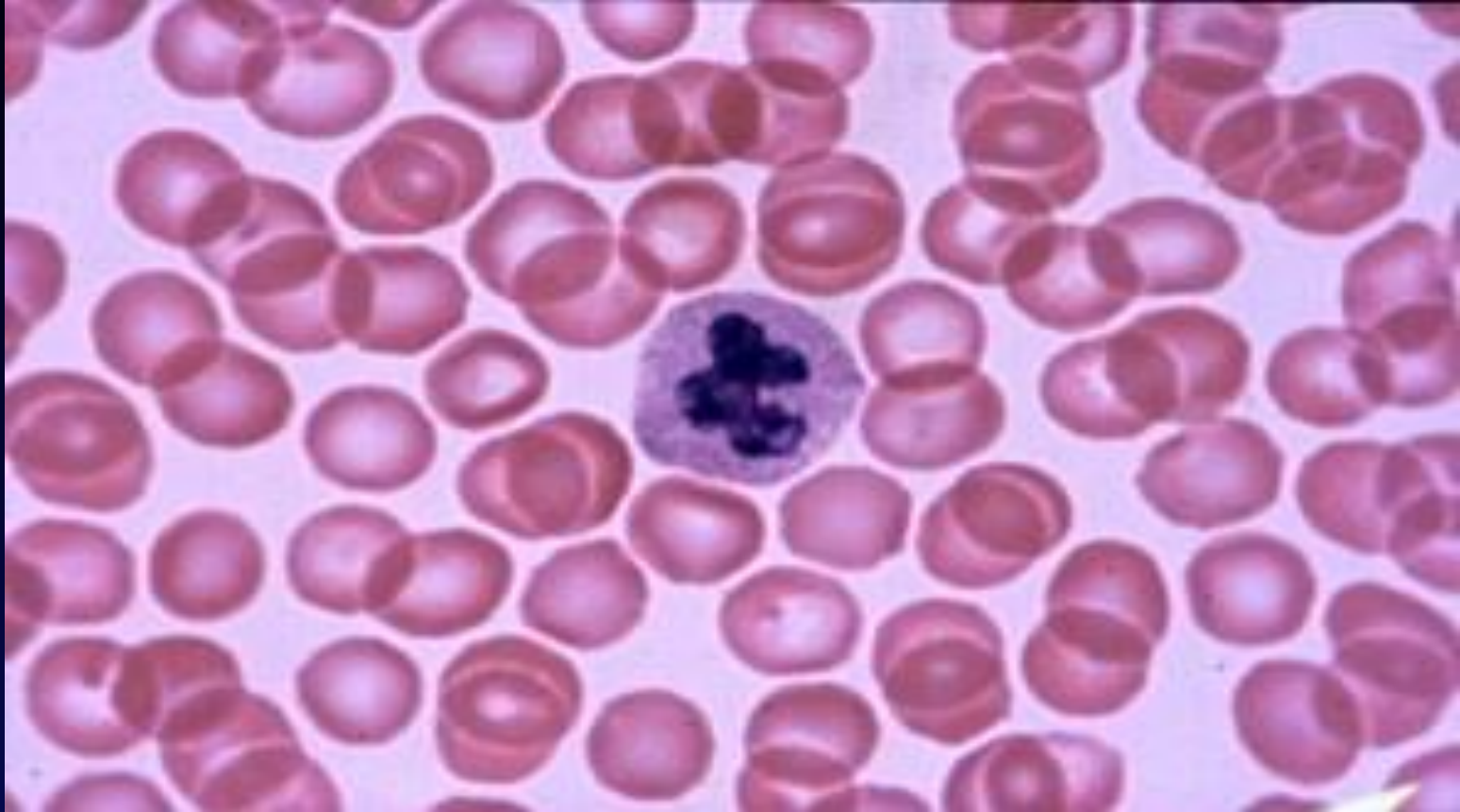
**Granulațiile mastocitelor (heparină, histamină) – violet (metacromazie)
Fondul (nucleii) – albastru (ortocromazie)**

COLORATIA CREZIL-VIOLET



Corpii Nissl – violet
Restul țesutului (nuclei) – albastru

COLORAȚIA MAY-GRUNWALD-GIEMSA (MGG)



Frotiu de sânge periferic , MGG

Nucleii – albastru-violet

Citoplasmele – roz -albastru

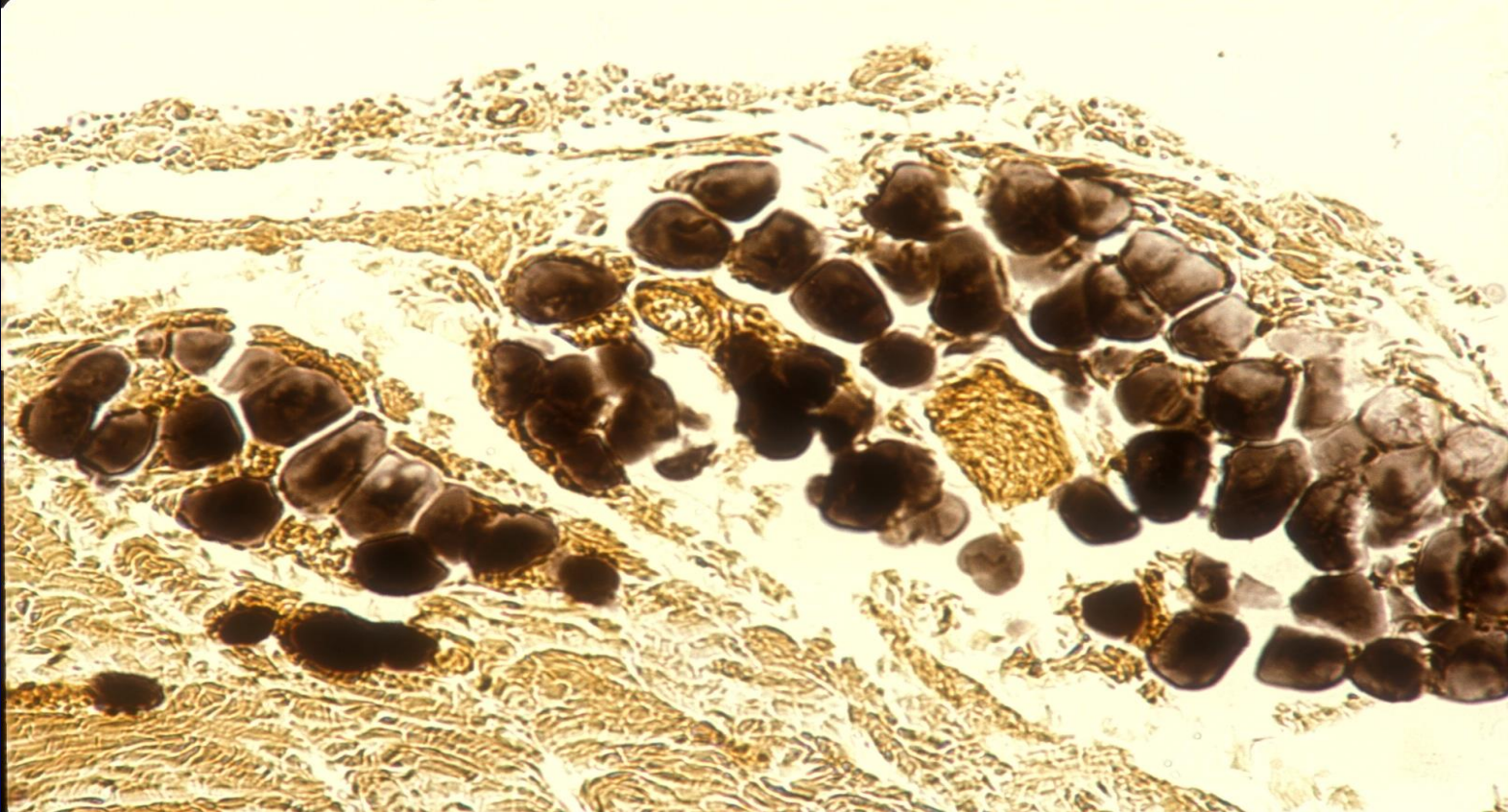
Hematiile – oranj

COLORAȚIA CU HEMATOXILINĂ FERICĂ HEIDENHAIN

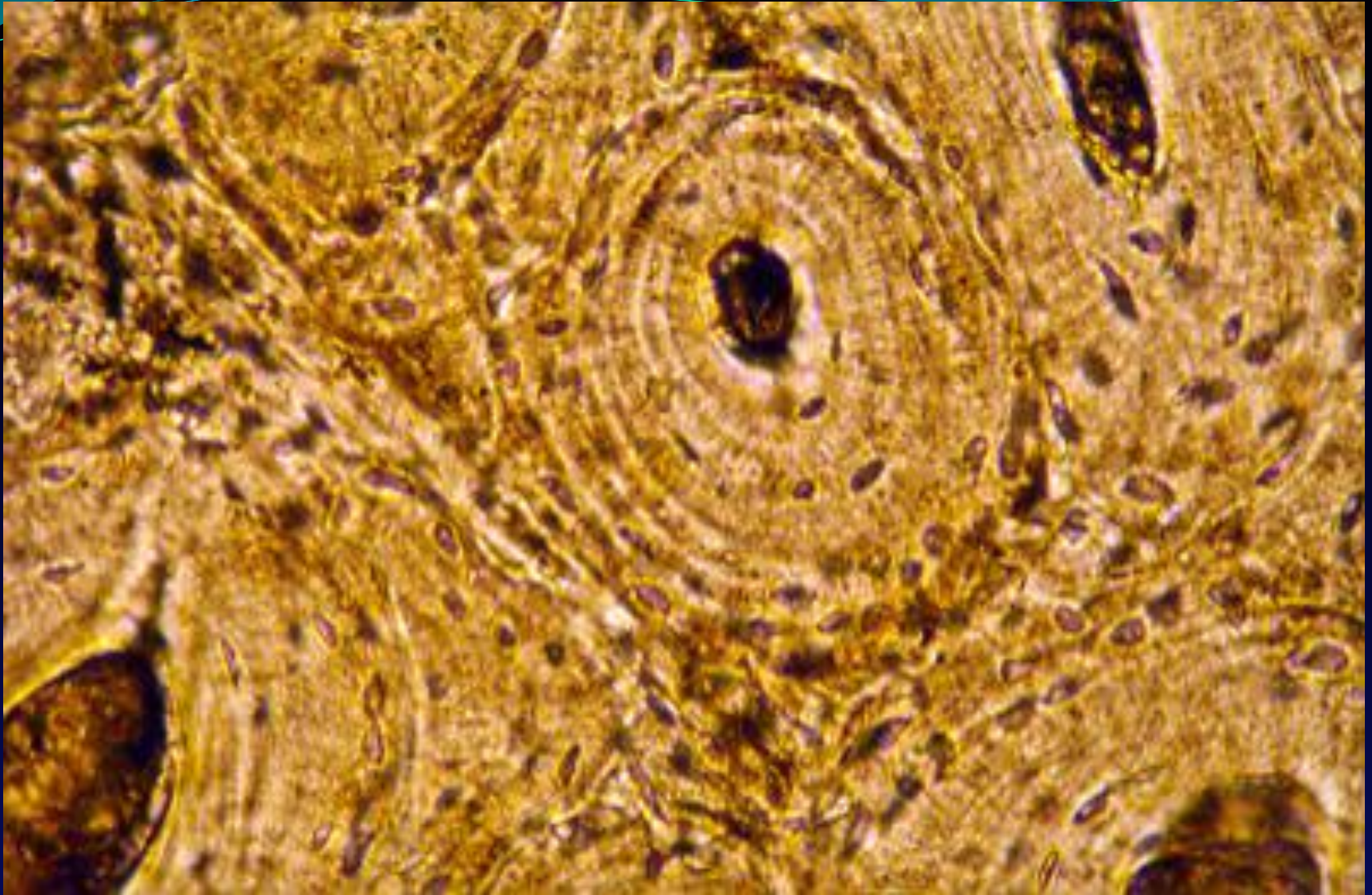


Fibra musculară striată scheletală, Hematoxilina Ferică Heidenhain.
Colorează în negru miofibrilele și evidențiază aspectul striat al fibrelor musculare.

COLORAȚIA CU ACID OSMIC

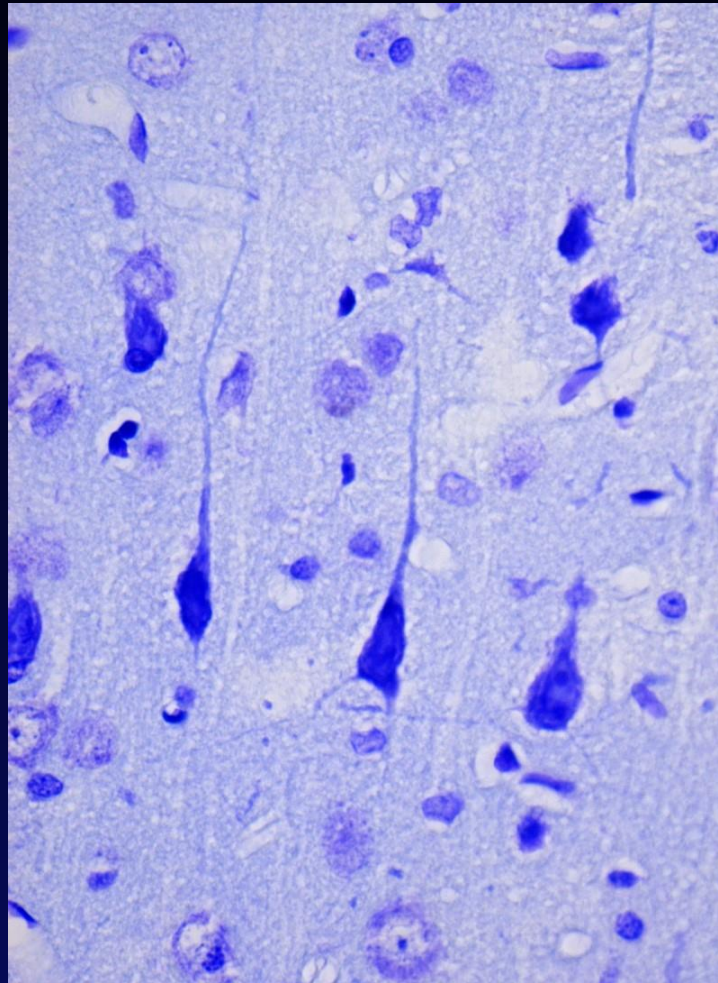


Țesut adipos, Acid osmic.
Colorează în brun-negru substanțele lipidice.



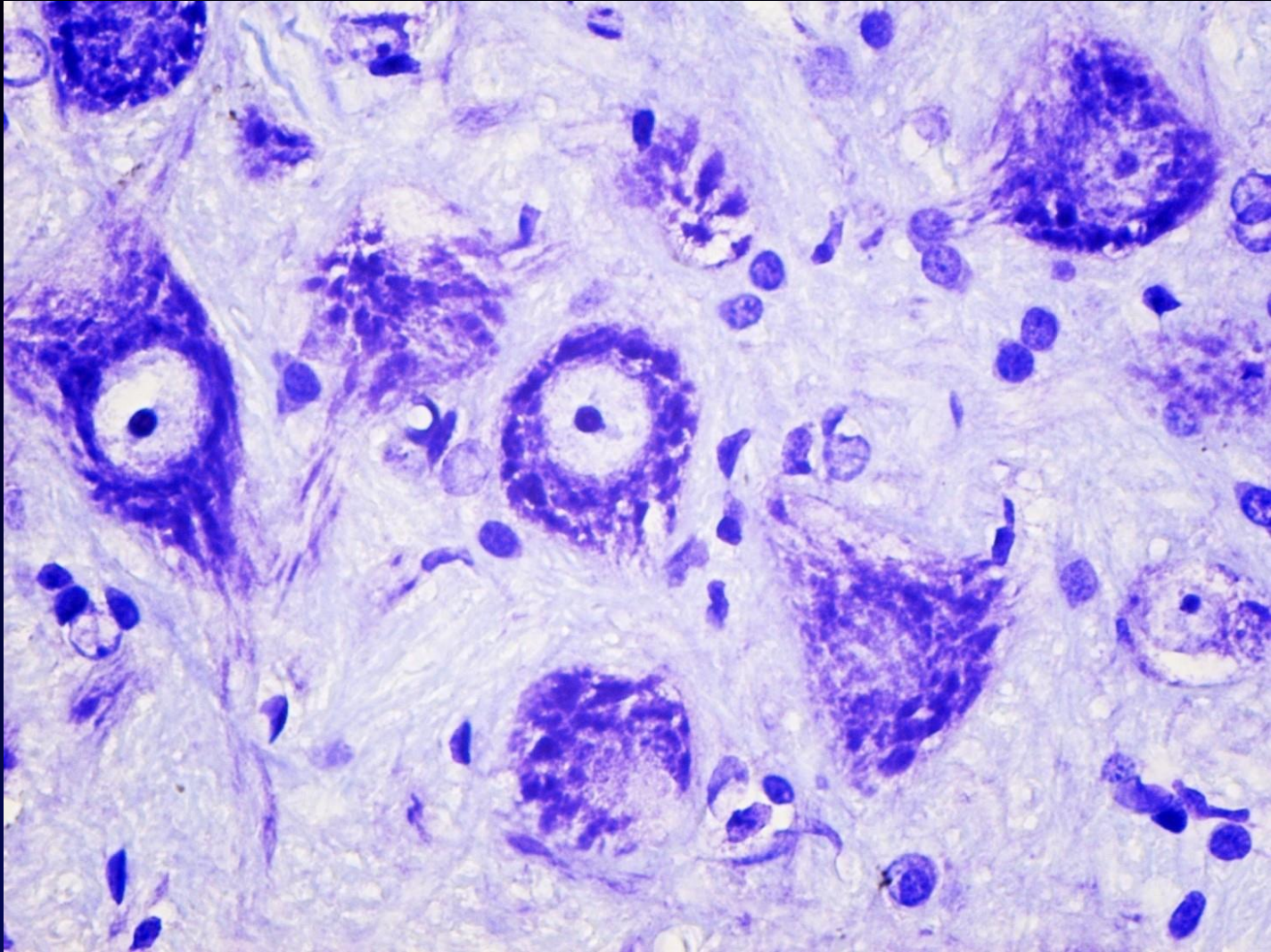
Țesut osos compact șlefuit, montat în balsam de Canada. Preparat necolorat.

COLORAȚIA CU ALBASTRU DE METILEN



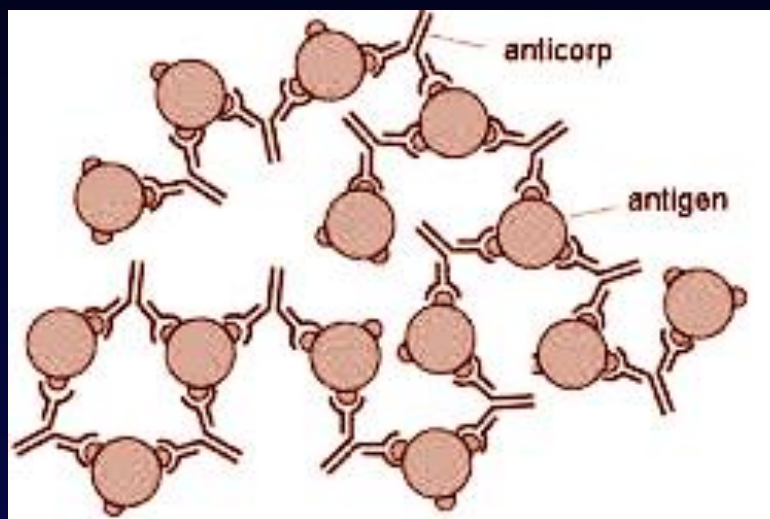
Neuroni piramidali, colorație cu Albastru de metilen

COLORAȚIA CU VIOLET- CRESYL



Neuroni, se observă corpui tigroizi, colorație cu Violet de Cresyl

- **IMUNOHISTOCHIMIA** este un procedeu de localizare a proteinelor în celule și țesuturi, utilizând ca principiu capacitatea anticorpilor de a se lega de antigeni specifici în țesuturi. Aceasta reacție ATG –ATC este marcată cu un cromogen făcând posibilă vizualizarea ei prin microscopie optică.



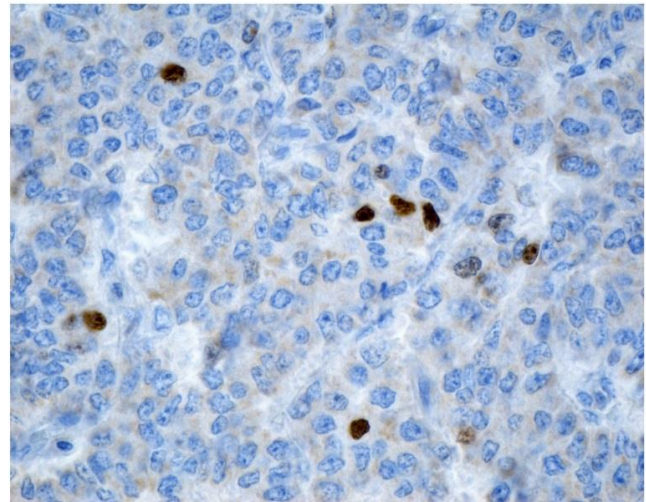
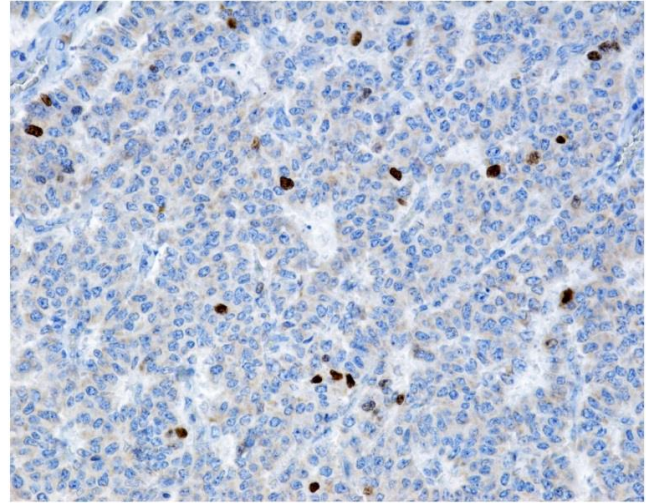
- Ea este foarte utilă în următoarele cazuri :
- - în stabilirea unui diagnostic pozitiv și diferențial al unor leziuni;
- - în stabilirea etiologiei sau histogenezei;
- - în diagnosticul metastazelor de origine primară necunoscută;
- - evaluarea unor markeri prognostici în cazul tumorilor;
- - în terapia unor afecțiuni.

KI 67

Antigenul este o proteina nucleara exprimata in fazele G1, S, G2 si M ale ciclului celular;

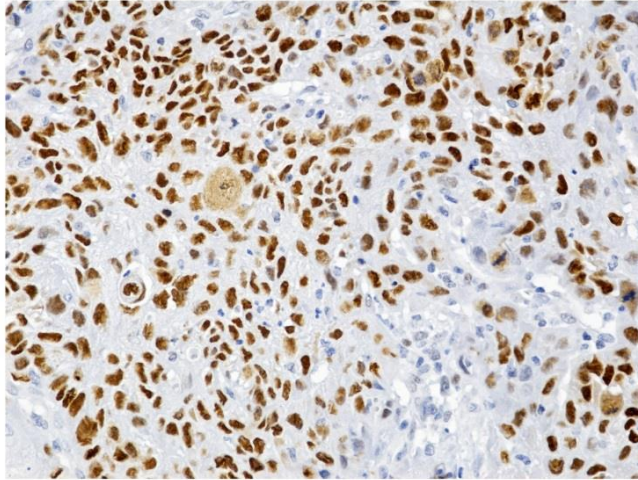
Anticorpul anti-KI67 este utilizat in diagnosticul histopatologic fiind un marker fidel al proliferării celulare normale si neoplazice.

COLORAȚIILE IMUNOHISTOCHIMICE

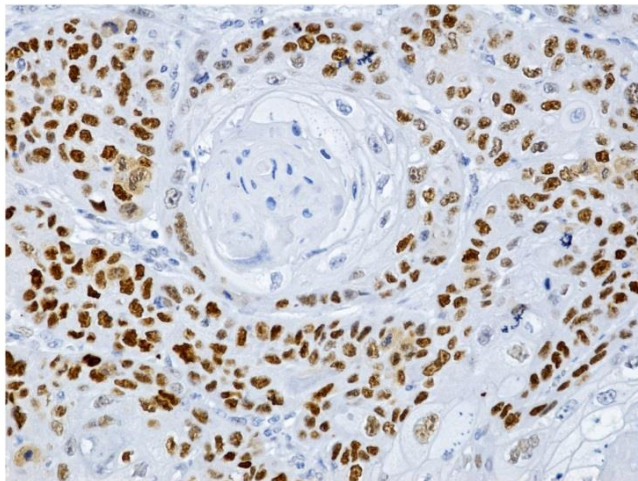


p 53

Anticorpul anti-p53 evidențiază mutațiile acestei gene, nedetectabile la celulele normale și prezente în cele tumorale. Este utilizat în tumorile vezicii urinare, aparatului digestiv, ovarului, prostatei, plămânului și altele.

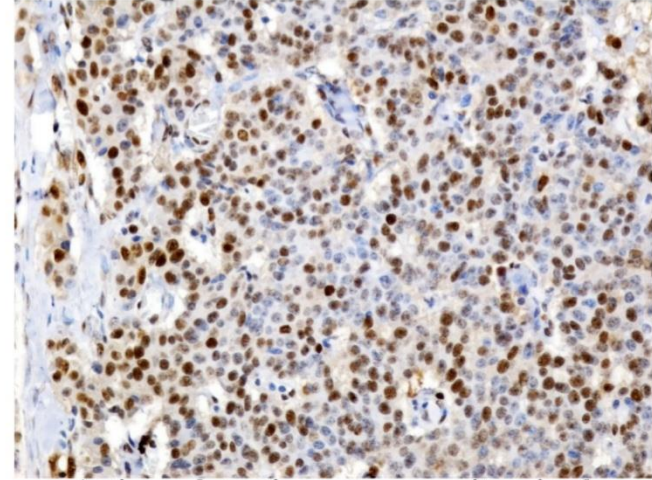


Este o genă supresoare tumorală activată de alterarea ADN-ului, semnale anormale de creștere și alte agresiuni extrinseci sau intrinseci.

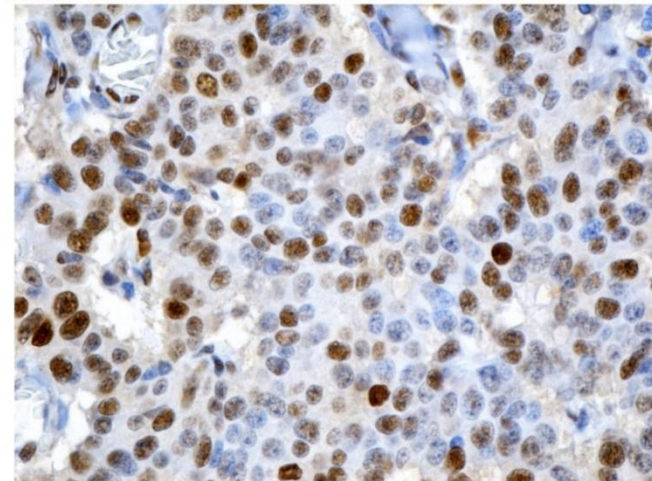


PCNA

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

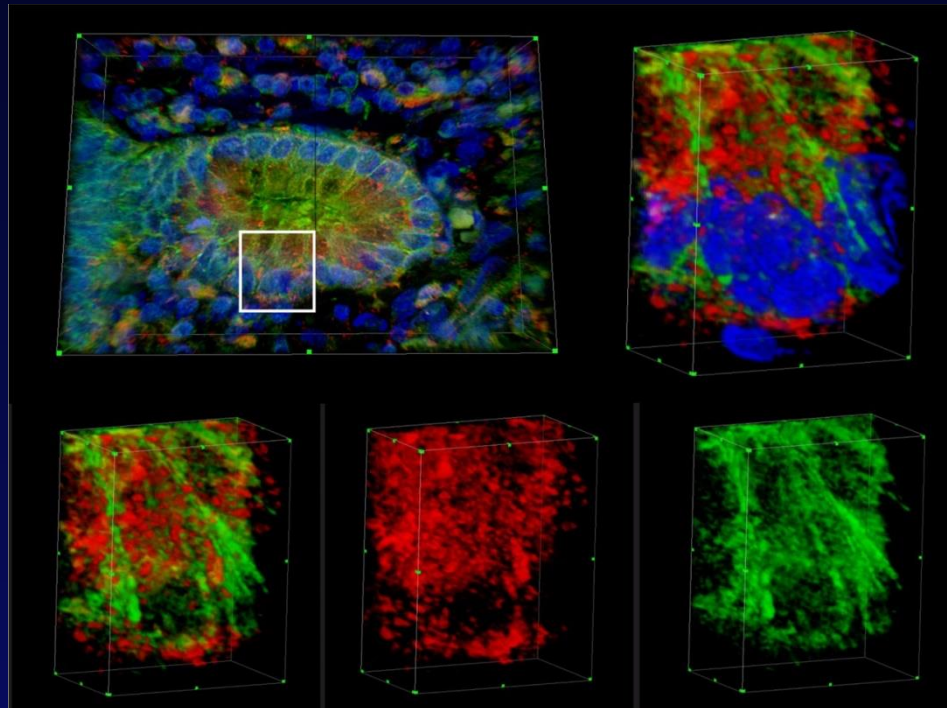


Anticorpul reacționează cu un epitop simplu, liniar al antigenului nuclear de proliferare celulară. PCNA este sintetizat la un nivel maxim în faza S a ciclului celular.



IMUNOFLUORESCENȚA = tehnică imunohistochimică ce utilizează anticorpi marcați fluorescent.

Reconstrucție tridimensională post-deconvoluție pe o glandă intestinală și respectiv un grup de enterocite, imunofluorescență pentru 2 glicoproteine cu localizare citoplasmatică și membranară.



BIBLIOGRAFIE

- Ghid de Tehnici de Histologie, Citologie si Imunohistochimie (Prof.Univ.Dr Laurentiu Mogoanta)
- <http://www.dako.com/>
- <http://www.umfcv.ro/laboratoarele-cmi>