

*La "processazione" di un
campione biologico*

Prelievo dei tessuti

- Per ottenere buoni preparati, è necessario che il prelievo avvenga rapidamente, che il materiale sia molto fresco e che i pezzi non superino 1 cm di diametro, e che siano refrigerati prima di procedere ai trattamenti successivi.

Fissazione

- Essa consiste nel sottoporre il tessuto ad agenti chimici e talvolta ad agenti fisici che denaturano rapidamente le proteine, legandosi ai numerosissimi gruppi funzionali e che rendono insolubili gli altri costituenti per le successive fasi di disidratazione, inclusione e colorazione. I migliori fissativi sono quelli che precipitano le proteine nella forma più fine, possibilmente in allegati ultra microscopici, così che la morfologia non sia modificata.

Tutti i fissativi devono necessariamente essere preparati come soluzioni isotoniche e a pH 7.4, per impedire fenomeni di collassamento o di rigonfiamento dei campioni, legati agli stress osmotici.

La fissazione

- minimizza la degradazione dei tessuti, conseguente alla rimozione del tessuto dal suo ambiente vitale, in seguito alla variazione di temperatura e di pH;
- protegge dall'azione dei microrganismi che, asportato il tessuto, invadono il materiale biologico, nutrendosi delle strutture non più in grado di proteggersi;
- consente al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle successive fasi di disidratazione, inclusione e sezionamento.

Scopo della fissazione:

interrompere velocemente e completamente i processi autolitici che si sviluppano nella cellula e nei tessuti non più nutriti ed ossigenati; preservare i campioni dall'attacco di muffe e batteri che potrebbero proliferare nutrendosi delle strutture non più in grado di proteggersi; conservare al meglio la morfologia strutturale ed ultrastrutturale del tessuto e della cellula.

La scelta di un fissativo dipende:

- dalle dimensioni del campione;
- dalla natura dei costituenti chimici della cellula che si desiderano conservare: ad esempio, le strutture proteiche sono facili da preservare, mentre gli zuccheri semplici sono piuttosto labili;
- dal grado di preservazione strutturale richiesto dalle caratteristiche di risoluzione del microscopio ottico usato; ad esempio, la capacità di penetrazione di un fissativo deve essere molto elevata nel trattamento di campioni voluminosi.

Tempi di fissazione

- La durata della fissazione varia a seconda della natura del campione biologico in esame, della velocità di penetrazione del fissativo, ma soprattutto in base allo spessore del pezzo: uno spessore di 4 mm richiede dalle 12 alle 24 ore a temperatura ambiente. Prolungando i tempi, il fissativo tende ad indurire i pezzi e coartare i vasi linfatici e sanguigni eventualmente presenti.

Dalla fissazione dipende la buona riuscita di un preparato istologico poiché permette di mantenere il più possibile inalterato il quadro strutturale dei tessuti dunque la fissazione è l'operazione più importante della tecnica istologica.

J fissativi si dividono in:

- Fissativi Primari *coagulanti*, in grado di coagulare le proteine fra cui l'etanolo (*Usato a concentrazioni tra il 70-100%, è un fissativo generale piuttosto blando, essendo moderatamente penetrante e presenta l'inconveniente di indurire eccessivamente il materiale biologico sottoposto alla sua azione. Il suo effetto è quello di precipitare le proteine denaturandole, liberare i lipidi legati a proteine ed annullare quasi totalmente la reattività enzimatica. Può essere usato in miscele con formaldeide o acido acetico.*) e l'acido acetico (*ha un eccellente potere di penetrazione, non solubilizza i grassi, fa precipitare le nucleoproteine, provoca rigonfiamento del collagene e alterazioni dei mitocondri*).

- Tra i fissativi primari *non coagulanti*, denaturanti, ricorre la formaldeide (è un fissativo aldeidico, un gas incolore tossico usato in soluzione acquosa detta formalina, molto solubile in acqua; agisce lentamente, possiede un elevato grado di penetrazione, non provoca eccessivo indurimento dei tessuti, non dissolve i lipidi. Non è coagulante, infatti, rispetto alle proteine agisce come un additivo perché si unisce ai gruppi NH_2 in modo tale che i gruppi idrofili delle proteine conservino il loro rapporto con le molecole d'acqua; inoltre aumentano l'acidità delle proteine e questa spiega il motivo per cui i tessuti fissati in formalina hanno maggiore affinità per i coloranti basici piuttosto che per quelli acidi).

- Fissativi Semplici, contenenti oltre al composto primario anche dei sali indifferenti;
- Miscele Fissative costituite da due o più fissativi primari mescolati in precise proporzioni. Il fissativo più usato è il liquido di Bouin, molto penetrante, si usa per fissare anche pezzi voluminosi e permette l'uso di quasi tutti i metodi di colorazione.

Lavaggio

Dopo la fissazione, i preparati devono essere, nella massima parte dei casi, (tranne quelli fissati in fissativi contenenti acido picrico e bicromato di potassio) lavati accuratamente in acqua corrente. L'operazione viene eseguita per eliminare l'eccesso di fissativo che, non avendo interagito con i componenti tissutali, è rimasto all'interno dei campioni e potrebbe interagire con i reattivi impiegati nelle fasi successive, in particolare con le sostanze usate per la colorazione dei campioni. Il lavaggio dei campioni di grandi dimensioni può essere effettuato mantenendo i pezzi all'interno del contenitore ove si è effettuata la fissazione ed esponendoli direttamente al flusso di acqua corrente

disidratazione

Con la **disidratazione** si sottopone il tessuto ad un “*passaggio graduale nella serie degli alcoli*” a concentrazione progressivamente crescente, per tempi di permanenza in ciascuna concentrazione variabili a seconda delle dimensioni del pezzo



Perché si effettua la disidratazione?

Perché le **sostanze includenti** hanno lo svantaggio d'essere apolari, idrofobiche, insolubili nell'acqua di cui sono costituite le cellule dei tessuti. Affinché il mezzo d'inclusione possa penetrare nel tessuto, è necessario eliminare dal tessuto l'acqua

Il protocollo prevede:

- Alcool etilico 50°
- Alcool etilico 70°
- Alcool etilico 80°
- Alcool etilico 95°
- Alcool etilico 100° (due cambi)

L'Inclusione consta di due fasi:

- ***Infiltrazione del mezzo di inclusione***
- ***Indurimento del mezzo di inclusione***

Infiltrazione

- consiste nell'immersione del pezzo disidratato nel mezzo d'inclusione allo stato liquido per un periodo sufficientemente lungo da consentirne la penetrazione nei più profondi interstizi del campione.

Indurimento (polimerizzazione):

- permette di intrappolare, ossia includere, il campione in un materiale abbastanza duro e omogeneo tale da poter essere tagliato in sezioni di spessore solitamente non superiore a 10 μm . I mezzi d'inclusione fungono dunque da sostegno evitando che durante la fase di taglio, le sezioni perdano la consistenza necessaria per il loro mantenimento e per la successiva l'osservazione microscopica.

I mezzi d'inclusione

maggiormente usati sono:

- Paraffina: è una miscela di cere a vari punti di fusione, usata nell'allestimento di preparati istologici per la microscopia ottica, l'inclusione in paraffina permette generalmente di ricavare sezioni aventi spessore minimo pari a 1-2 μm ; inoltre è insolubile sia in acqua che in etanolo (per questo occorre inserire, dopo la disidratazione, la fase di chiarificazione con xilolo) e garantisce migliori dettagli morfologici. La paraffina, prima dell'uso, deve essere sciolta alla temperatura di circa 57-59 °C, e poi filtrata per eliminare eventuali impurità. Dopo la fase di infiltrazione, i campioni vengono alloggiati in contenitori sagomati in cui è fatta colare paraffina liquida ed il tutto è lasciato solidificare a temperatura ambiente. A completa solidificazione avvenuta, il blocchetto solido viene estratto dal contenitore e processato per la successiva fase di sezionamento.

I tempi minimi d'infiltrazione sono di tre ore; non esistono tempi massimi, perché il campione, una volta infiltrato dalla paraffina, non si deteriora.

- resine *idrofile* : valide per tessuti decalcificati o naturalmente non calcificati, richiedono un tempo di polimerizzazione variabile da 1 a 20 ore a seconda della temperatura ;
- resine *Epossidiche* : consentono il taglio di sezioni più sottili di quanto non sia possibile con l'inclusione in paraffina, dunque vengono utilizzate per la microscopia elettronica. Esse polimerizzano in modo omogeneo producendo un'eccellente conservazione dei dettagli strutturali; ma, a causa della loro elevata reattività, possono interagire con le strutture tissutali durante i processi di polimerizzazione;
- *metacrilati*, utilizzati sovente per sezioni calcificate come ossa e denti, tendono a polimerizzare in modo non uniforme e non copolimerizzano con i componenti tissutali; quindi possono causare contrazione del tessuto a scapito della morfologia.

resina idrofila Technovit-8100

Tale mezzo di inclusione, fornito in kit dalla casa produttrice (**Kulzer**), è costituito da tre componenti:

- Componente A: resina pura a base di idrossietilmetacrilato;
- Componente B: benzoin perossido (in bustine da 0,6g);
- Componente C: induritore liquido contenente tetrametilina;



Il protocollo d'inclusione prevede i seguenti passaggi:

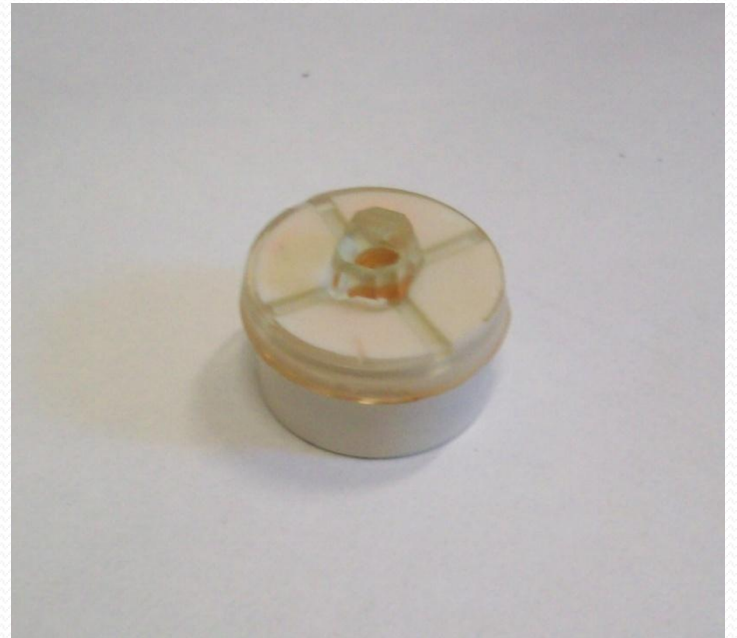
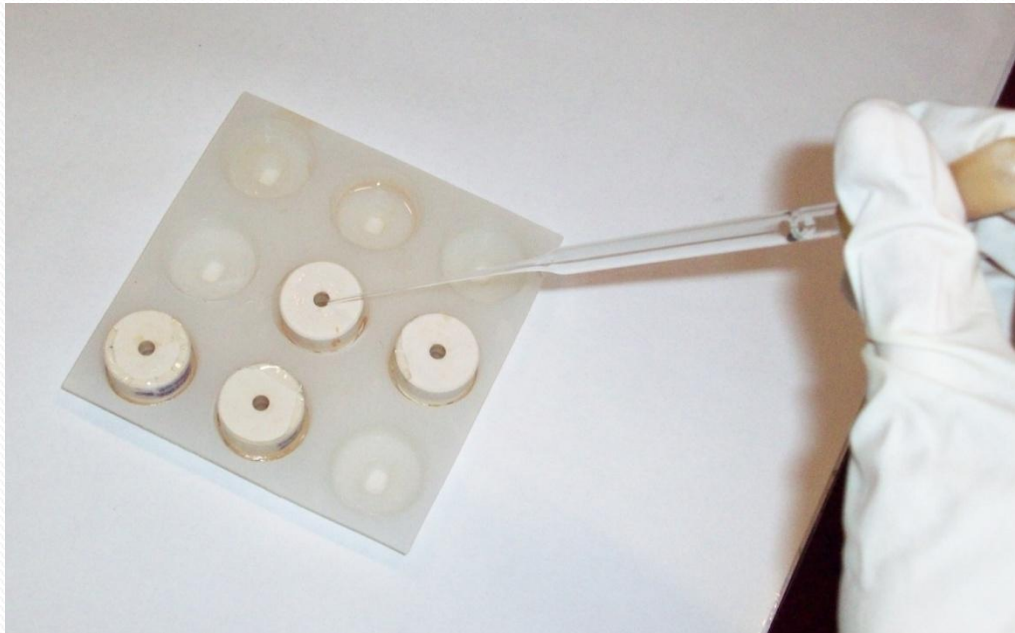
- **prima infiltrazione** con resina pura (è possibile utilizzare anche una resina pura di recupero);
- **seconda infiltrazione** in resina I (ottenuta addizionando **100 ml** di resina pura ad una bustina da **0,6 g** di benzoin perossido) Per ottenere una buona inclusione, è necessario che le due infiltrazioni durino complessivamente almeno 48 ore; Tempi più prolungati non inficiano la riuscita dell'inclusione.

Al fine di agevolare la penetrazione del mezzo di inclusione in ogni parte del campione, è consigliabile utilizzare uno strumento, denominato “*pompa da vuoto*”, che grazie all’azione di un motore aspirante, consente di ottenere il vuoto all’interno di una campana ad esso collegata. Dopo aver posizionato al di sotto della campana i campioni immersi in resina I, si aziona il motore fino al raggiungimento di una pressione pari a -800mBar . Raggiunto questo valore, occorre disattivare l’aspirazione dell’aria in modo tale che la pressione all’interno della campana risalga progressivamente fino a raggiungere nuovamente la pressione atmosferica.



- **Inclusione** con resina II (base ottenuta aggiungendo 7,5 ml di resina I a 0,25 ml d'induritore).

Ciascun frammento di cartilagine viene adagiato, sul fondo di uno dei 9 pozzetti costituenti la *formella d'inclusione* nel quale poi è stata immessa la soluzione di resina II; Normalmente, a temperatura ambiente, la polimerizzazione della resina **Tecnovit 8100** avviene nell'arco di due ore, ma poiché la reazione responsabile del passaggio dallo stato monometrico a quello polimerico è di tipo esotermico (circa 60-70°C), è necessario che la formella venga posta per 24h in freezer a -20°C: le basse temperature, in questo modo, compensano l'innalzamento termico scongiurando il danneggiamento tissutale..



Sezionamento

- consiste nella riduzione del campione, incluso in un blocchetto solidificato, in fette da 1-20 micrometri, mediante un microtomo, in modo da avere sezioni del campione penetrabili alla luce e dunque osservabili al microscopio. Per le sezioni incluse in metilmetacrilato, a causa dell'estrema durezza di questo materiale, è necessario utilizzare una sega circolare a lama diamantata refrigerata ad acqua.

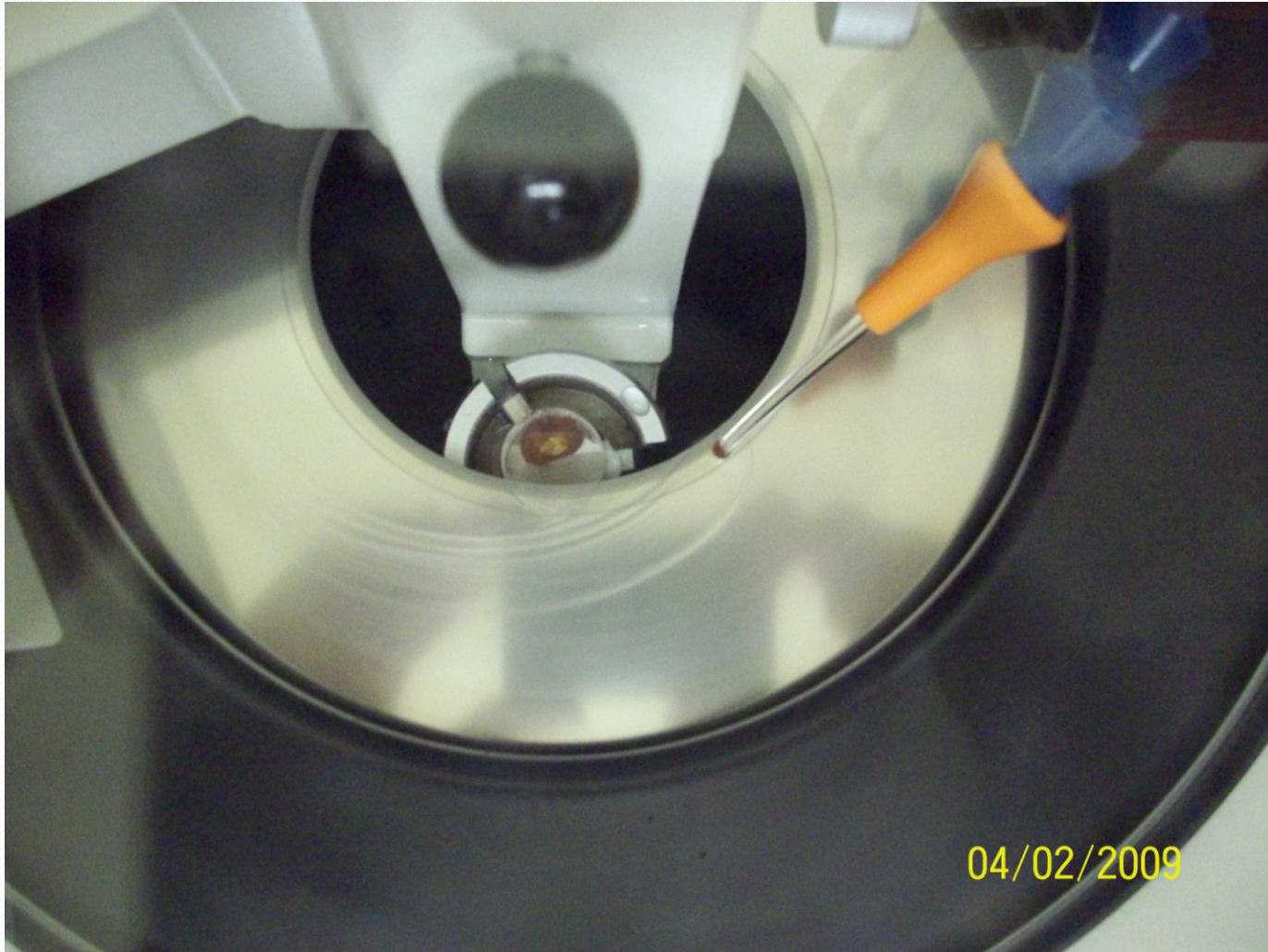
Microtomo rotativo



Sega circolare a lama diamantata



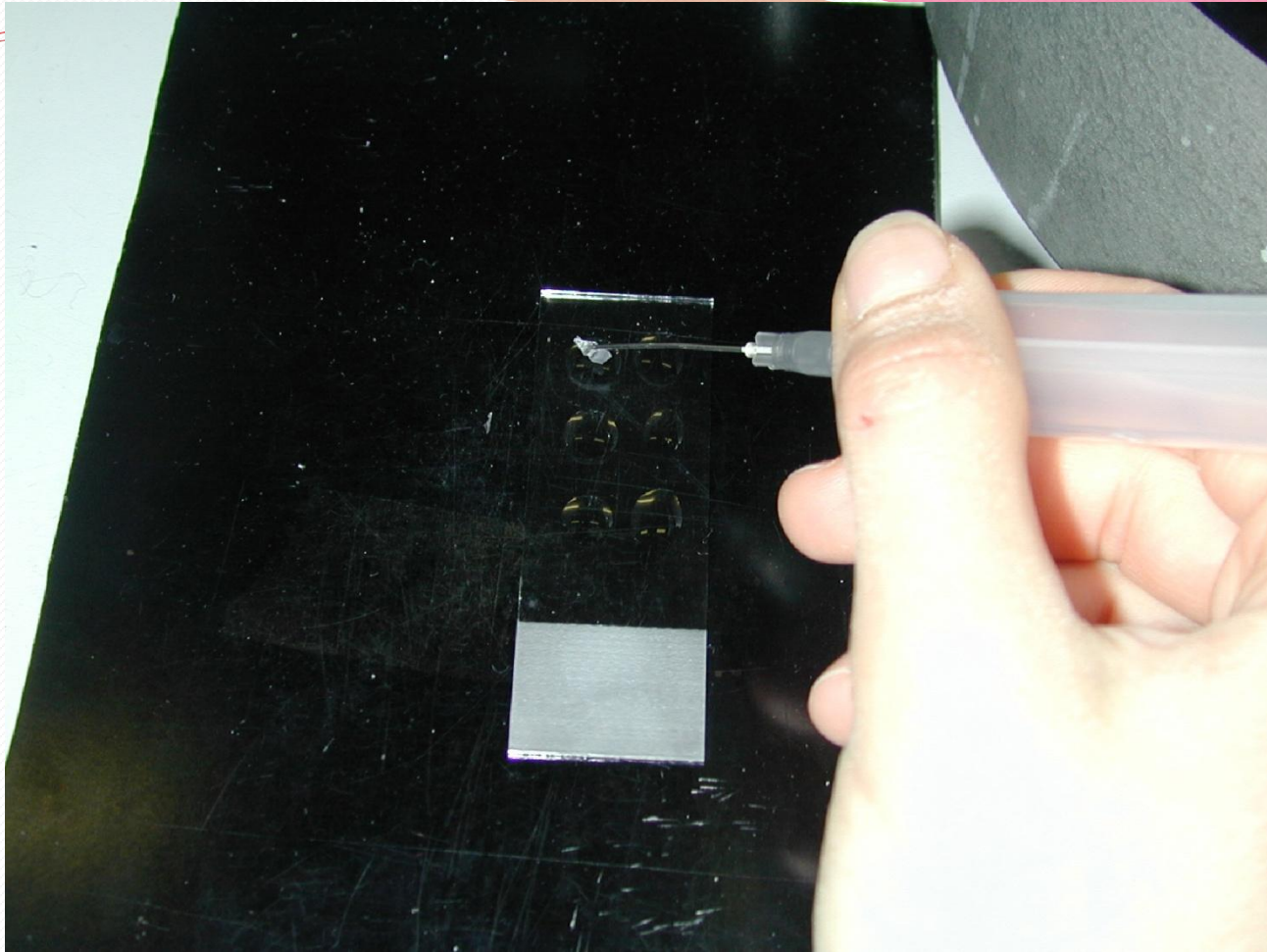
Sega circolare a lama diamantata



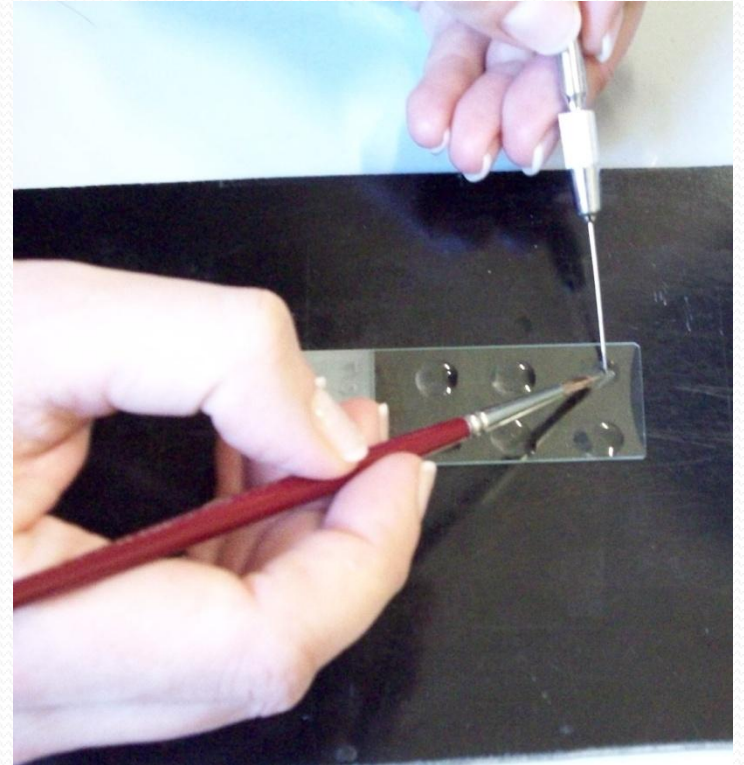
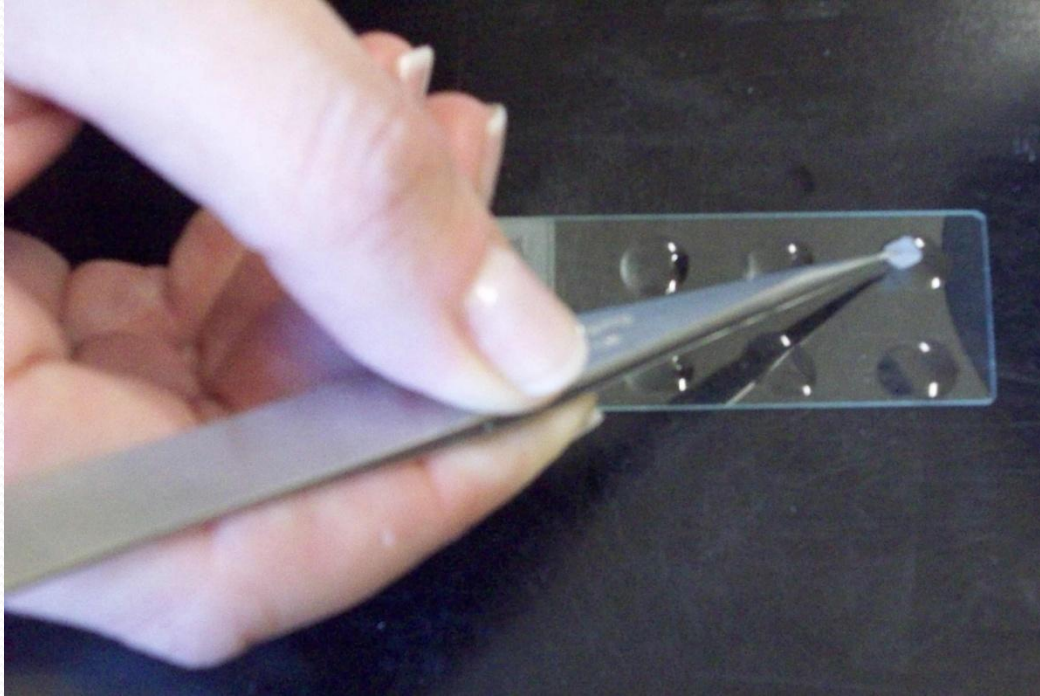
Taglio di un campione incluso in tecnovit 8100

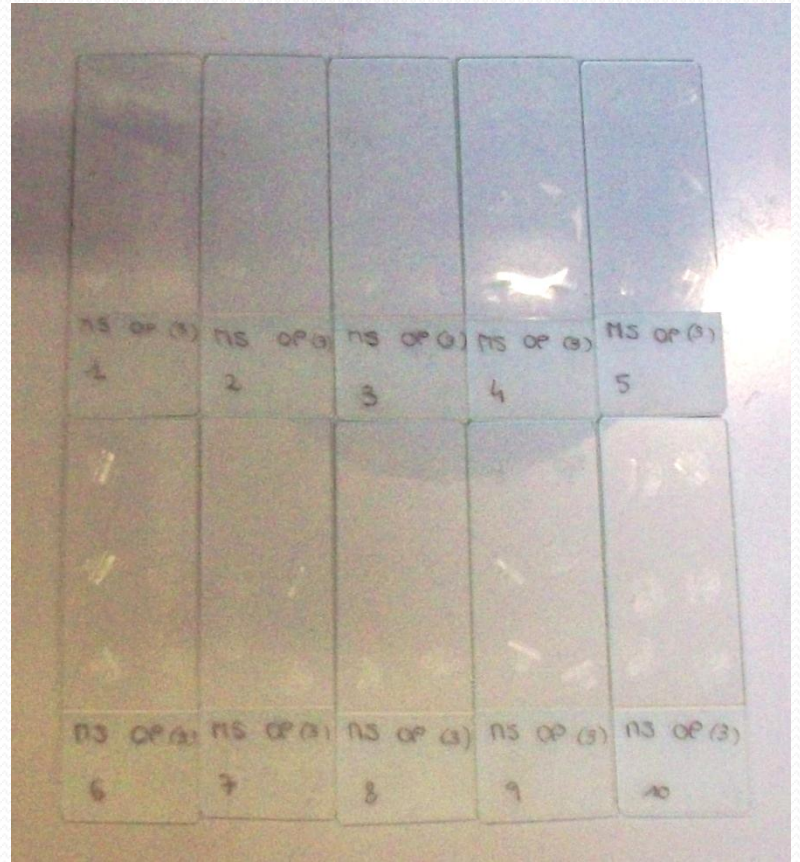
Le sezioni tagliate vengono raccolte delicatamente mediante una pinzetta a punta sottile . Onde evitare che in fase di taglio la sezione si deformi irreversibilmente, è bene accompagnarla nel suo percorso sulla lama con un pennellino asciutto.

- L'adesione di ciascuna sezione al vetrino portaoggetti è garantita da una goccia d'acqua distillata precedentemente posta su di esso. Poiché il mezzo d'inclusione utilizzato è fortemente idrofilo, idratandosi a contatto con l'acqua, si espande rapidamente .



le sezioni ricavate sono state immerse in una goccia d'acqua distillata posta sul vetrino, precedentemente pulito e sgrassato, in modo tale che la stessa acqua ne consenta la distensione e l'adesione.





La colorazione

- La **Colorazione** è un procedimento che aumenta il contrasto presente tra diverse strutture cellulari, tale da permetterne il riconoscimento delle sezioni istologiche, data la loro trasparenza; consiste nell'insieme dei passaggi in coloranti che evidenzino le strutture tissutali e cellulari delle sezioni.
- I coloranti usati in microscopia sono:
- naturali se si trovano in natura d'origine animale o vegetale (l'ematossilina è vegetale, ricavata dal legno di campeggio);
- sintetici se si distinguono in basici e acidi. Sono *basici* (es.: ematossilina, blu di metilene, blu di toluidina) se legano molecole acide come il DNA; *acidi* (es.: eosina, Trypan Bleu, blu pirrolo) se legano molecole basiche come gran parte delle proteine citoplasmatiche e sostanze connettive.

Le colorazioni possono essere:

- Dirette, quando le sezioni prendono direttamente il colorante dalla soluzione;
- Indirette, quando il colorante si unisce al substrato grazie all'intervento di sostanze dette mordenti che hanno il compito di rendere possibili i legami tra colorante e tessuto e di fissare stabilmente il colore. La maggior parte dei mordenti sono forti ossidanti o allumi;
- Progressive quando si lascia agire il colorante nelle sezioni fino a che non si è raggiunto il giusto grado di colorazione;
- Regressive, quando la sezione viene in un primo tempo sovracolorata per poi asportarne l'eccesso;

- Semplici, quando prevedono l'utilizzo di un solo colorante. A seconda della struttura colorata sono dette nucleari o citoplasmatiche. Per la natura del colorante sono invece distinte in monocromatiche se le strutture colorate hanno la stessa tonalità del colorante, e colorazioni metacromatiche se le strutture fanno variare le tonalità del colore secondo il principio della metacromasia. I coloranti che possiedono questa proprietà di viraggio tintoriale sono detti metacromatici, mentre le sostanze che subiscono il fenomeno, sono dette cromotrope. I principali coloranti metacromatici sono basici ed appartengono al gruppo del triaminofenilmetano (es. Violetto di metile, Cristal violetto), al gruppo delle azine (es. Rosso neutro, Safranina) e al gruppo delle tiazine (es. Blu di toluidina, Azzurr A, Tionina, Blu di metilene). Esempi di sostanze cromotrope sono: la cartilagine, l'amiloide, le mastzellen, i mucopolisaccaridi solfati, l'ac. Jaluronico per cui nell'allestimento di un preparato sono colorati con coloranti metacromatici;
- Combinare, complesse quando prevedono l'impiego di più coloranti in successione. Ogni colorante agisce per proprio conto fissando determinate strutture.

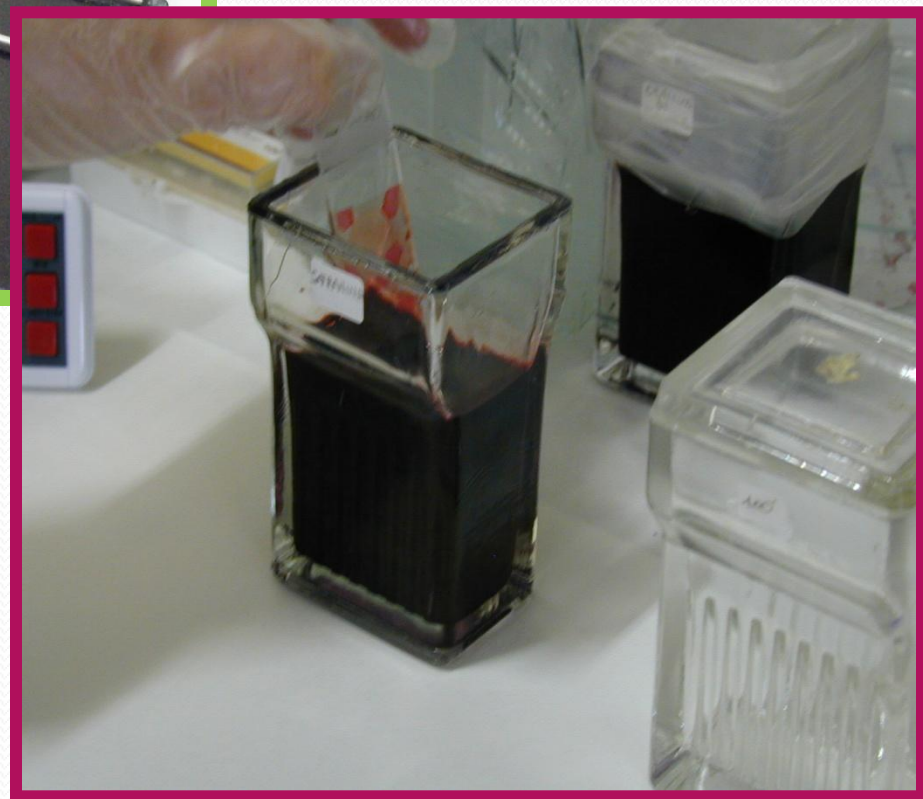
L'azione di un colorante dipende da fattori insiti nel tessuto: affinità chimica fra colorante e costituenti del tessuto; concentrazione dei costituenti e la loro permeabilità.

Gli scopi della colorazione sono:

- Per aumentare il contrasto dei vari componenti morfologici del tessuto favorendone l'identificazione morfologica le strutture; è la colorazione istologica;
- Per identificare la composizione chimica cellulare dei tessuti; è la colorazione istochimica.

colorazione con EMATOSSILINA- SAFRANINA su sezioni in Istoresina:

- Si immerge il vetrino, in emallume acido di Mayer per 15 min;
- Si elimina l'eccesso di colorante su carta assorbente, prima di mettere a contatto con acqua di fonte per 5 min (l'alcalinità debole dell'acqua di fonte consente il viraggio di colore dei nuclei da rosso a blu violetto);
- Si pone il vetrino nella vaschetta contenente safranina per 10 min;
- Si elimina l'eccesso di colorante su carta assorbente;
- Si disidrata in alcool 95°, 100° (2 cambi nell'alcool 100°) eseguendo passaggi di 2' ciascuno;
- Si chiarifica in xilolo per 4 minuti.

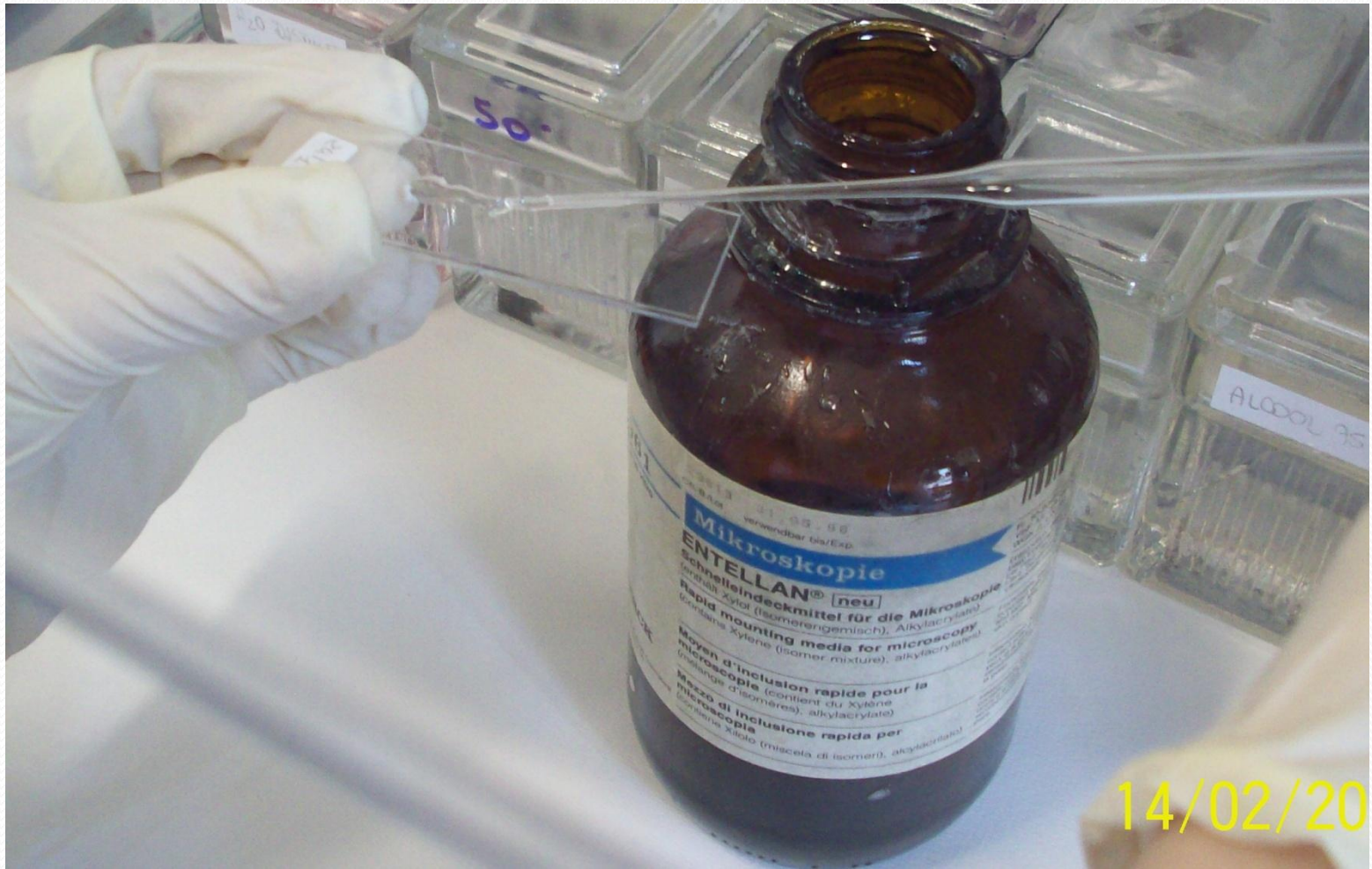


Disidratazione post. colorazione



Chiusura del vetrino

a colorazione terminata, si versa una o due gocce di soluzione “montante” sul vetrino portaoggetti e lo si copre con il vetrino coprioggetti imbevuto di xilene. Si attende che il montante si sia distribuito uniformemente tra i due vetrini, eventualmente esercitando una lieve pressione, si lascia asciugare a temperatura ambiente.



verwendbar bis/Exp.
Mikroskopie
ENTELLAN® [neu]
Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie
Schnell Xylol (Isomerengemisch), Alkylacrylate
Rapida mounting media for microscopy
Schnelle Xylol (Isomer mixture), alkylacrylates
Moyen d'inclusion rapide pour la
microscopie (contient du Xylène
Schnelle d'isomères), alkylacrylate)
Mezzo di inclusione rapida per
microscopia
Schnelle Xylol (miscela di isomeri), alkylacrylate)

14/02/20

