

L'esame morfologico strumentale delle cellule e dei tessuti può essere condotto con due diverse metodiche:

a – osservazione diretta, a fresco, in vivo,

b – osservazione di cellule o tessuti uccisi con procedimenti fisici o chimici che ne conservano le caratteristiche il più possibile vicine a quelle del vivente.

Teoricamente sarebbe preferibile utilizzare l'osservazione a fresco, ma questa presenta degli evidenti limiti dovuti a:

- limitata sopravvivenza delle cellule
- spessore eccessivo delle cellule
- scarso contrasto delle strutture cellulari

Si può, in parte, ovviare agli inconvenienti ricorrendo a colorazione con coloranti vitali:

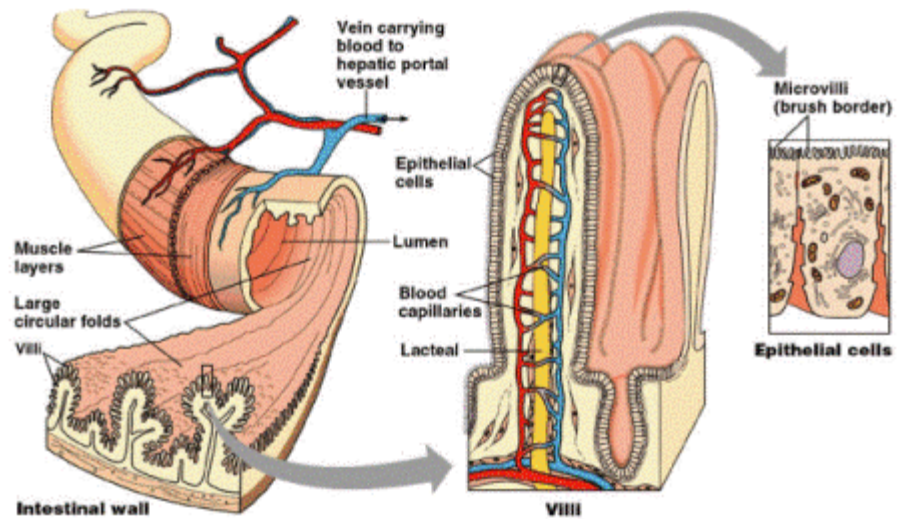
- colorazione intra vitam
- colorazione sopravvitali

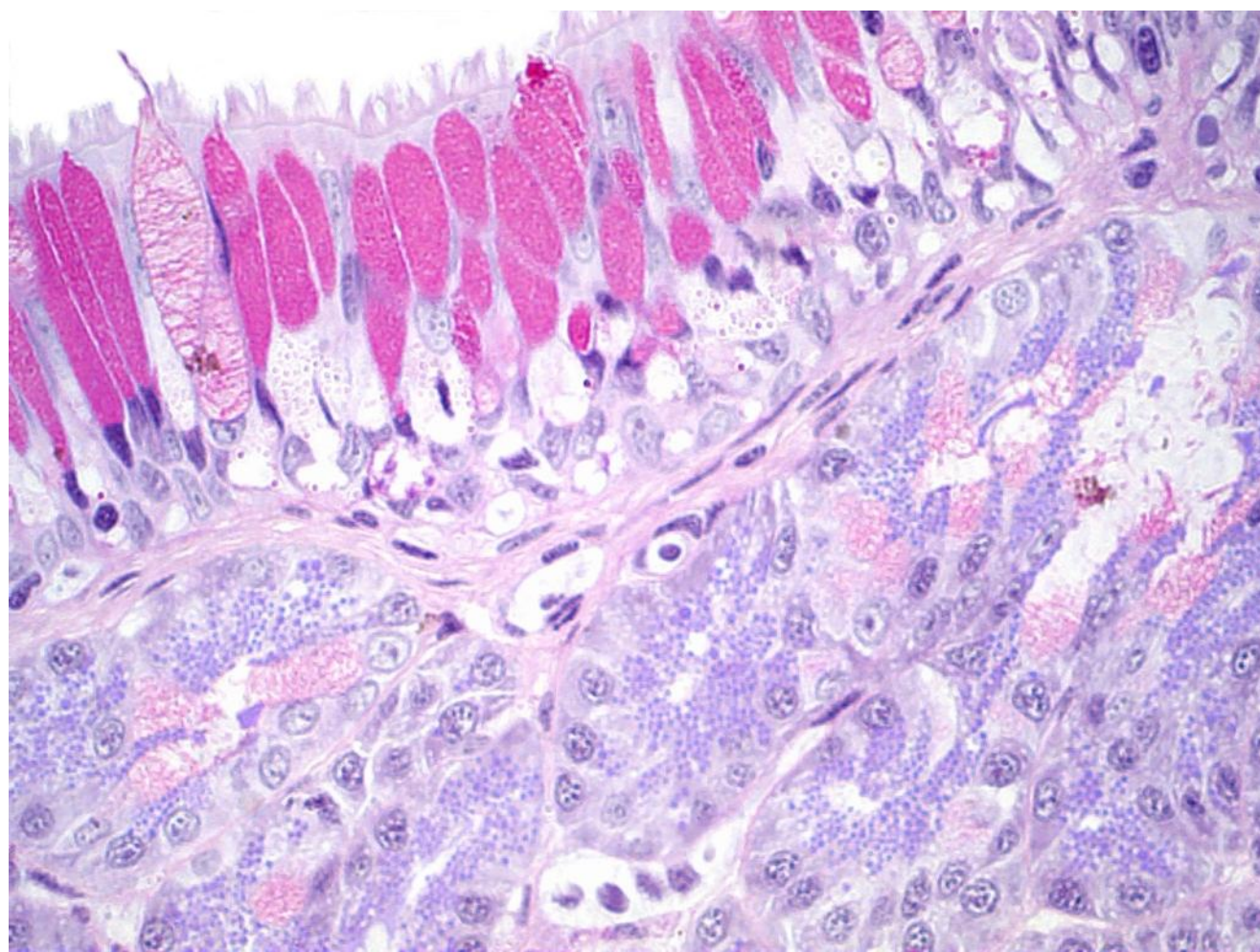
Sono coloranti vitali:

- blu tripano,
- litiocarminio,
- inchiostro china
- Rosso alizarina per l'osso in accrescimento
- Verde janus per i mitocondri
- Blu di metilene per gli assoni



La lunghezza di questo serpente è grossomodo pari a quella dell'intestino di un adulto





FASI PRINCIPALI DELL'ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO ISTOLOGICO

prelievo

fissazione

inclusione

Seziona-
mento

Colora-
zione

PRELIEVO DEI TESSUTI

Su animali anestetizzati o sacrificati in modo indolore si procede alla dissezione per prelevare gli organi o i tessuti da studiare. Salvo eccezioni il campione deve avere dimensioni inferiori al cm³. L'operazione va eseguita nel più breve tempo possibile riducendo al minimo i traumi mediante l'uso di lame affilatissime.

FISSAZIONE

Lo scopo della fissazione è quello di impedire la degenerazione dei tessuti, per autolisi e per degradazione batterica, e di mantenere il più possibile inalterato il quadro strutturale dei tessuti.

Si distinguono:

a- fissativi chimici

b- fissativi fisici

Fissativi chimici primari

1 - che coagulano (precipitano) le proteine

- - alcool etilico
- - acido acetico
- - acido picrico
- - cloruro di mercurio

2 - che non coagulano le proteine

- - formalina
- - tetrossido di osmio
- - bicromato di potassio

Miscela fissativa

- - formalina tamponata
- - alcool/formolo
- - Bouin
- - alcool/etere
- - Carnoy

ETANOLO

E' un mediocre fissativo generale e presenta l'inconveniente di indurire eccessivamente il materiale biologico sottoposto alla sua azione. Le sue caratteristiche migliori sono la rapidità della penetrazione e la buona stabilizzazione dei glucidi. Precipita le proteine, denaturandole in buona parte, cosa che porta all'annullamento o alla riduzione della reattività istochimica di queste molecole.

FORMALDEIDE

La formaldeide, gassosa allo stato naturale, viene commercializzata in soluzione acquosa al 40% col nome di formalina. E' largamente usata, anche da sola, per la sua elevata velocità di penetrazione, per la sua caratteristica di non indurire eccessivamente i tessuti e perché non dissolve i lipidi. E' irritante per le mucose e gli occhi.

ACIDO ACETICO

Usato soprattutto nelle miscele fissatrici, ha elevata capacità di penetrazione, non solubilizza i grassi, fa precipitare le nucleoproteine. Provoca, tuttavia, una alterazione dei mitocondri.

ACIDO PICRICO

E' una sostanza cristallina giallastra (può avere proprietà esplosive!). Si utilizza per lo più in soluzione acquosa satura ed entra a far parte di diverse miscele di fissazione. E' eccellente stabilizzatore delle proteine, con le quali forma dei picrati, parzialmente idrosolubili, che diventano insolubili in presenza di etanolo.

TETROSSIDO DI OSMIO

Detto anche, impropriamente, acido osmico ha scarsa capacità di penetrazione e costo elevato. Poco usato in microscopia ottica, è invece il miglior fissativo per la microscopia elettronica.

BICROMATO DI POTASSIO

Buon fissatore delle proteine, viene usato sia da solo che, soprattutto, in miscele fissatrici.

CLORURO DI MERCURIO

Conosciuto anche come sublimato corrosivo, è un eccellente stabilizzatore delle proteine. Viene usato soprattutto in miscele fissatrici. Penetra rapidamente ma non in profondità, per cui è necessario utilizzare campioni di tessuto di dimensioni ridotte. Un soggiorno troppo prolungato nel fissativo indurisce eccessivamente i campioni.

BOUIN

Soluzione satura acquosa di Acido Picrico15 ml

Formalina5 ml

Acido Acetico Glaciale1 ml

Note: Si prepara al momento dell'uso. Pezzi di normali dimensioni sono fissati in 24 - 48 ore e si passano direttamente in Alcool Etilico a 50° cambiato più volte fino a che i pezzi non cedono più colore (giallo, dovuto all'acido picrico). Poi si procede al completamento della disidratazione e all'inclusione

CARNOY

Alcool Etilico assoluto6 parti (60 ml)

Cloroformio3 parti (30 ml)

Acido Acetico Glaciale1 parte (10 ml)

Note: Si prepara al momento dell'uso. Piccoli pezzi sono fissati in 1 - 2 ore e si passano direttamente in Alcool Etilico a 75° per la conservazione altrimenti si passano in Alcool etilico a 95° per poi procedere al completamento della disidratazione e quindi all'inclusione.

Fissazione fisica

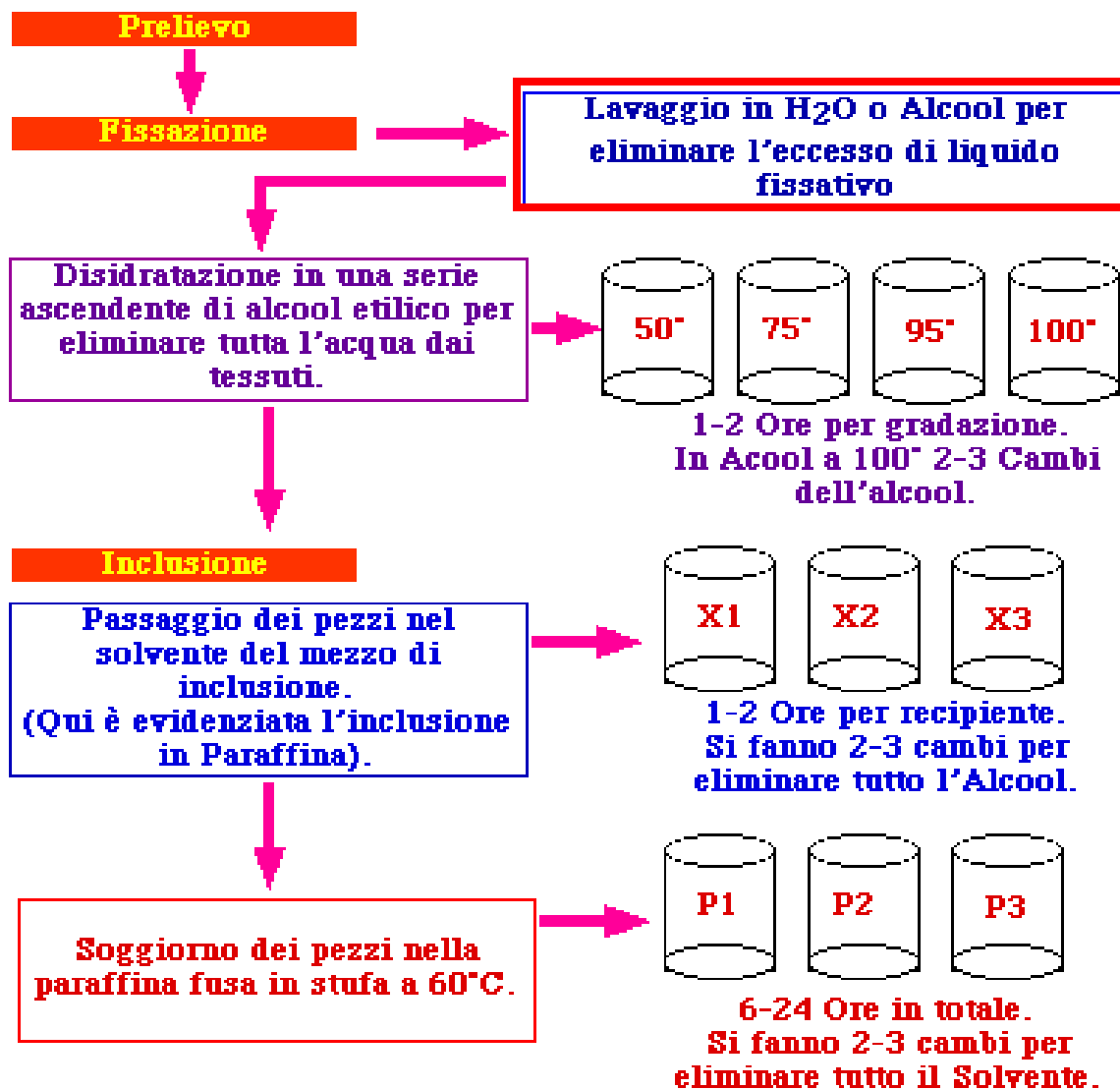
- **congelamento**
- **rapido riscaldamento**

Metodo del congelamento-essiccamento (freezing-drying)

- rapido congelamento in azoto liquido ($-170\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- disidratazione sotto vuoto spinto
- inclusione in paraffina

Metodo del congelamento-sostituzione

- rapido congelamento in azoto liquido ($-170\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- sostituzione dei cristalli di ghiaccio con un reattivo anidro (etanolo, acetone)
- inclusione in paraffina o in resina

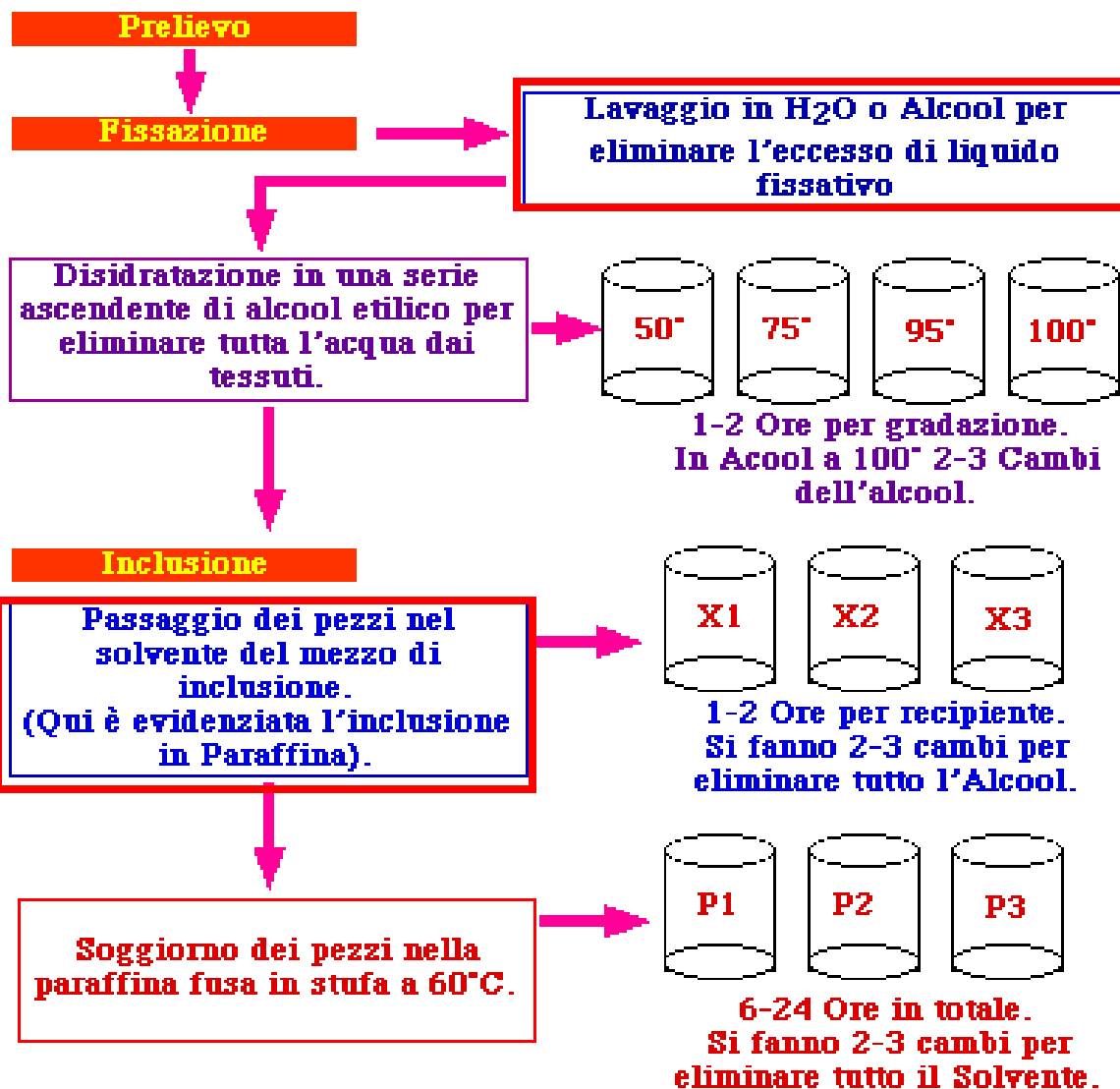


INCLUSIONE

Il suo scopo è quello di rendere il pezzo di consistenza tale da poter essere affettato allo spessore voluto (5-7 μm).

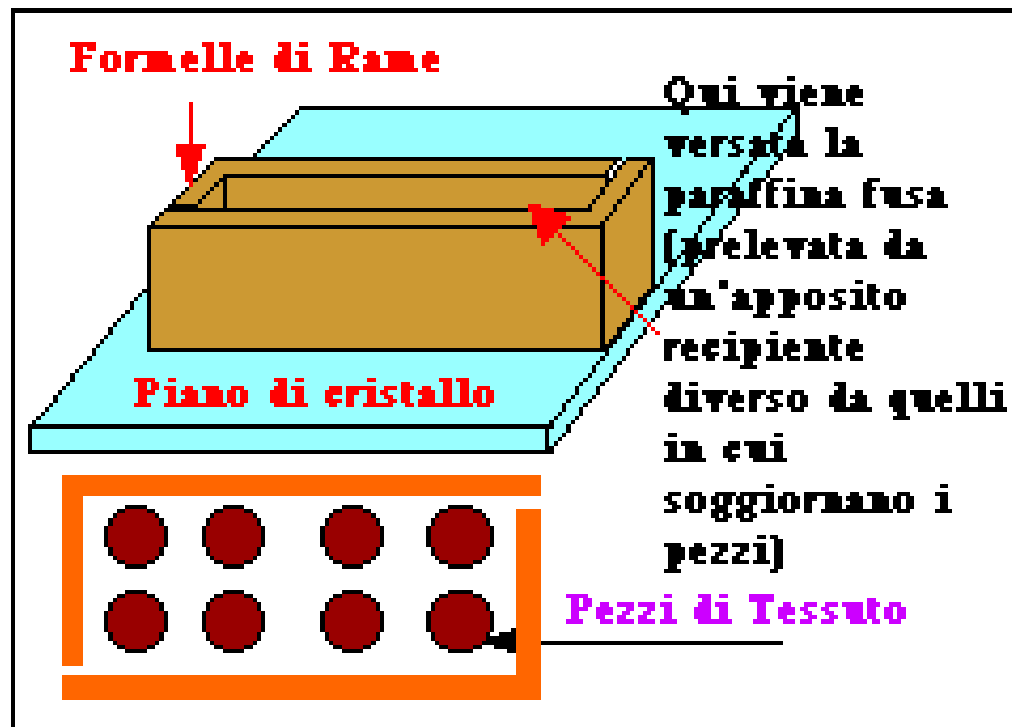
Mezzi di inclusione:

- paraffina
- resine idrofile
- resine epossidiche



Esecuzione della colata.

Essa ha lo scopo di far solidificare lentamente la paraffina in modo da compenetrare il pezzo in maniera omogenea.



Le formelle di rame e il piano di cristallo (che sono conservati in un'apposito scomparto della stufa) vengono preventivamente spalmati con glicerina allo scopo di facilitare il distacco del blocchetto di inclusione.

Viene poi versata la paraffina fusa e di seguito, abbastanza velocemente vengono allineati, i pezzi da includere con la faccia di taglio rivolta verso il cristallo.

Il tutto viene poi lasciato solidificare a temperatura ambiente.

SEZIONAMENTO

Il suo scopo è quello di affettare il pezzo allo spessore voluto (5-7 μm di norma) in modo da poter essere osservato al microscopio dopo opportuna colorazione.





Le sezioni in paraffina, una volta correttamente tagliate, restano adese alla lama e possono essere raccolte mediante un pennellino inumidito in acqua, per poi essere immerse in acqua tiepida (37°C) in modo che la dilatazione della paraffina consenta la distensione della sezione di tessuto.



Si raccoglie la sezione sulla superficie di un vetrino portaoggetti ben pulito e sgrassato, si lascia sgocciolare l'acqua residua lasciandolo in posizione verticale per qualche minuto, e poi lo si posiziona su una piastra calda, a temperatura regolabile (60°C circa), in modo che la paraffina si sciolga

LA COLORAZIONE ISTOLOGICA

H1 H2 % 95° 80° 70° 50° H₂O **Sparaffinatura
e idratazione**

C1 C2 **colorazione**

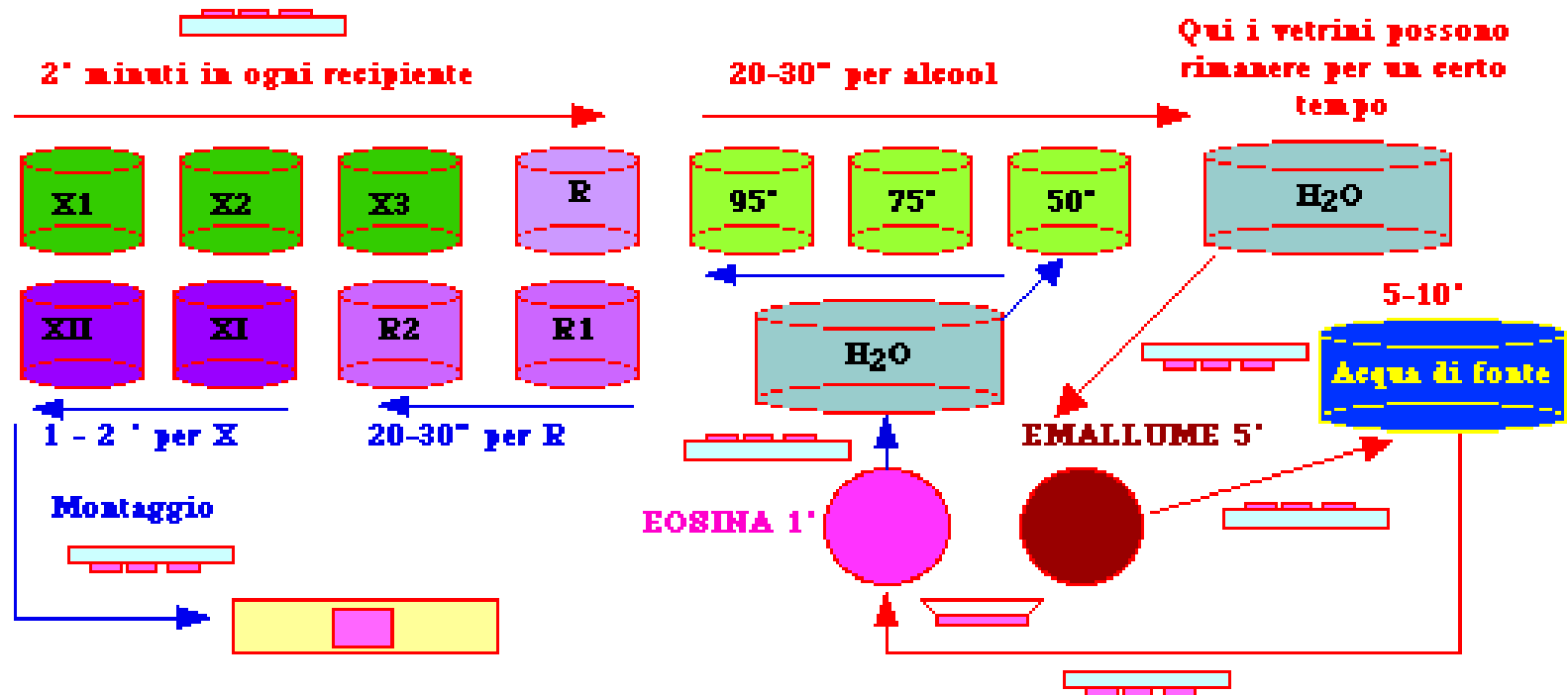
H₂O 50° 70° 80° 95° % H1 H2 **Disidratazione e
diafanizzazione**

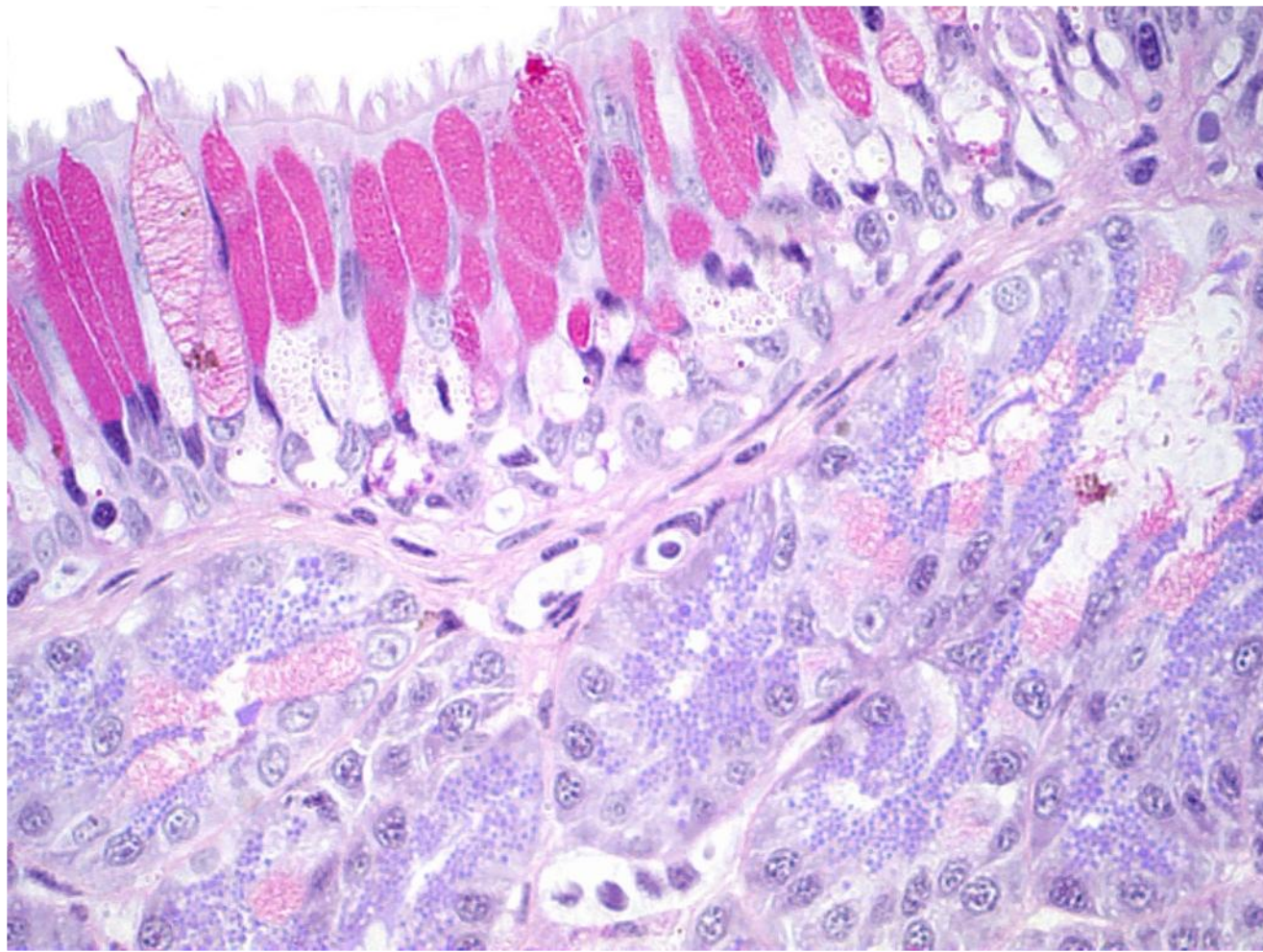


Vaschette di Hellendal per colorazioni istologiche



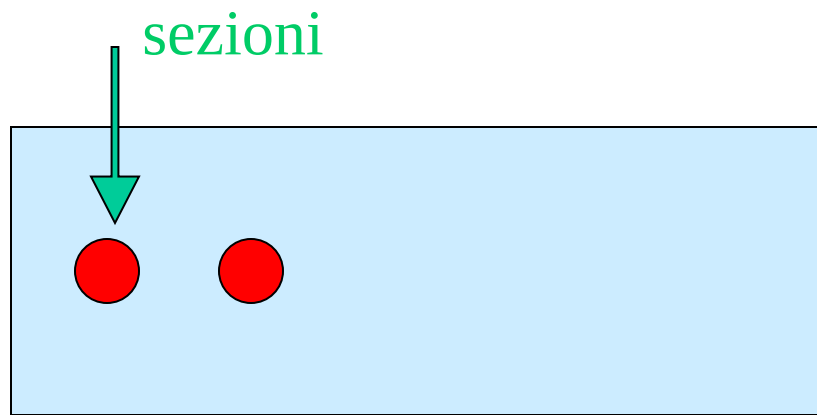
LA COLORAZIONE EMATOSSILINA - EOSINA



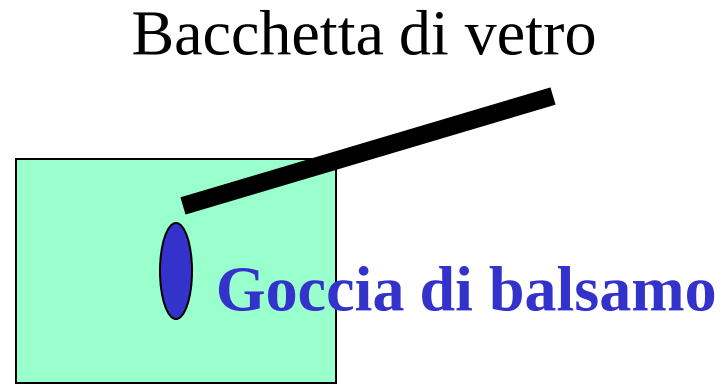


Il Montaggio dei Vetrini

Mentre i vetrini colorati soggiornano nell'ultimo recipiente contenente Xilolo si preparano i coprioggetti, adagiandoli su appropriati supporti, e dal recipiente contenente il "balsamo" se ne preleva una piccola quantità con una bacchetta di vetro e si pone una goccia al centro del coprioggetto:



Vetrino portaoggetto



Vetrino coprioggetto

