



LUCRAREA PRACTICĂ NR. 1

INTRODUCERE ÎN TEHNICILE DE STUDIU HISTOLOGIC

STUDIUL MORFOLOGIC AL ȚESUTURILOR/CELULELOR

Se face cu ajutorul :

Microscopiei optice - MO

Microscopiei electronice - ME:

- **de transmisie – TEM**
- **de baleiaj (scanning) – SEM**

Folosind tehnici:

- **tehnica histologică uzuală urmată de diferite colorații**
- **tehnici histologice speciale**
- **citochimie, histochimie**
- **imunohistochimie**
- **hibridizare” in situ”**
- **autoradiografie**
- **culturi de celule**

TEHNICA PREPARĂRII ȚESUTURILOR FOLOSIND TEHNICA HISTOLOGICĂ UZUALĂ PENTRU STUDIUL ÎN MICROSCOPIE OPTICĂ

1. **Recoltarea** – țesuturile odată recoltate poartă denumirea de *piesă histologică*

2. **Fixarea**

Fixator uzual:

Soluție de formaldehidă 37% (formalină, formol).....10 volume

Apă distilată90 volume

(conține aproximativ 4% formaldehidă).

Formalină tamponată

fosfat acid de sodiu

fosfat disodic

Alți fixatori:

Zenker, Bouin, Regaud

Timp: 12-24 h, în funcție de dimensiunea și densitatea țesuturilor

3. **Spălarea**

- apă de robinet/tampon fosfat Ph 7,4

TEHNICA PREPARĂRII ȚESUTURILOR FOLOSIND TEHNICA HISTOLOGICĂ UZUALĂ PENTRU STUDIUL ÎN MICROSCOPIE OPTICĂ

4. Deshidratarea

Metoda cea mai obișnuită este deshidratarea cu **alcool etilic**. Pentru aceasta sunt necesare mai multe băi de alcool de concentrații diferite. Piesa este trecută prin alcooli de concentrații crescătoare. Durata menținerii preparatului la fiecare baie este determinată de mărimea și duritatea preparatului. Cu cât piesa este mai mare, cu atât durata menținerii în alcool este mai mare.

Serii de alcooli:

- alcool etilic 80⁰..... 3 ore
- alcool etilic 90⁰.....3 ore
- alcool etilic 96⁰ I..... 3 ore
- alcool etilic 96⁰ II..... 3 ore
- alcool etilic absolut I..... 3 ore
- alcool etilic absolut II..... 3 ore
- alcool etilic absolut III..... 3 ore

Durata menținerii piesei în alcool nu trebuie să depășească 24 ore.

La trecerea dintr-o baie în alta piesele trebuie ușor tamponate pe hârtie de filtru.

TEHNICA PREPARĂRII TESUTURILOR FOLOSIND TEHNICA HISTOLOGICĂ UZUALĂ PENTRU STUDIUL ÎN MICROSCOPIE OPTICĂ

5. Clarificarea

Este necesară, deoarece alcoolul nu este miscibil cu parafina. Lichidul clarificator trebuie să scoată alcoolul din piesă, să îmbibe piesa și să fie miscibil cu parafina.

Se folosesc hidrocarburi aromatice: **xilolul (xilenul)**, **toluenul** sau **benzenul**, după cum urmează:

- benzen I..... 2 ore
- benzen II..... 2 ore
- benzen III..... 2 ore

Se consideră clarificarea terminată în momentul în care piesele capătă un aspect curat, translucid.

6. Parafinarea (impregnarea cu parafină)

După deshidratare și clarificare, piesele îmbibate cu lichid miscibil cu parafina (toluen xilol) vor fi trecute în băile de parafină lichidă la 56°C (**la termostat**)

TEHNICA PREPARĂRII TESUTURILOR FOLOSIND TEHNICA HISTOLOGICĂ UZUALĂ PENTRU STUDIUL ÎN MICROSCOPIE OPTICĂ

3 băi de parafină, timpul de menținere de aproximativ 6 ore pentru fiecare baie:

- parafină I..... 6 ore
- parafină II..... 6 ore
- parafină III..... 6 ore

Timpii pot de asemenea varia în funcție de tipul de piesă histologică.

7. Include re a propriu-zisă (formarea blocului)

După impregnarea pieselor cu parafină la termostat, ele trebuie incluse în **blocuri de parafină** spre a putea fi ulterior secționare și colorate.

În acest scop se **forme speciale de plastic cu sau fără capac pe care sunt inscripționate referințele piesei.**

8. Secționarea se face cu ajutorul microtomului

Inițial se fac secțiuni de 20 μ m pentru nivelare și pătrunderea suficientă în piesă, apoi se continuă secționarea la 4-5 μ m.

TEHNICA PREPARĂRII ȚESUTURILOR FOLOSIND TEHNICA HISTOLOGICĂ UZUALĂ PENTRU STUDIUL ÎN MICROSCOPIE OPTICĂ

7. Lipirea secțiunilor pe lame de sticlă (lame portobiect)

Înainte de a întinde secțiunile, lamele trebuie unse cu **albumină Mayer** (amestec în părți egale de albuș de ou cu glicerină) pe una din fețe. Lamele astfel unse sunt lăsate câteva minute înainte de a fi folosite.

Există și lame port obiect care sunt pretratate cu polilizină sau silanate, astfel încât asigură o foarte bună aderență a secțiunii și nu mai necesită aplicarea de albumină Mayer.

Se pune apă caldută într-un vas de sticlă, se lasă secțiunile câteva secunde pentru a se întinde cât mai mult țesutul și parafina iar apoi și secțiunile „se pescuiesc”.

După ce lamele au fost lăsate un timp scurt să se usuce, se introduc la termostatul reglat la 37°C sau pe o plită caldă și se lasă 12-24 ore. După scoaterea din termostat lamele sunt perfect uscate și secțiunile întinse și aderente pe lamă.

TEHNICA PREPARĂRII ȚESUTURILOR FOLOSIND TEHNICA HISTOLOGICĂ UZUALĂ PENTRU STUDIUL ÎN MICROSCOPIE OPTICĂ

8. Colorarea secțiunilor

Secțiunile se colorează în funcție de ceea ce urmărim să evidențiem.

Coloranții :

- **Origine:** produse naturale (orceina, hematoxilina, carminul, etc.) sau coloranți sintetici (albastru de metilen, eozina, etc.).

- **D.p.d.v. histologic** coloranții pot fi:

Bazici: (denumiți impropriu și nucleari) : hematoxilina, albastru de metilen, etc.

Acizi : (denumiți impropriu și citoplasmatici): eozina, orange G, anilina, etc.

Neutri: eozinatul de albastru de metilen, etc.

- **Colorații simple și combinate:**

Simple: un singur colorant (contrastarea nucleilor)

Combinat : secțiunile se introduc succesiv într-o serie de cel puțin doi coloranți

TEHNICA PREPARĂRII ŢESUTURILOR FOLOSIND TEHNICA HISTOLOGICĂ UZUALĂ PENTRU STUDIUL ÎN MICROSCOPIE OPTICĂ

- **Colorații generale și specifice:**

Generale (uzuale) : dau o imagine de ansamblu asupra ţesuturilor

Specifice : fixarea unui colorant pe o anumită structură (PAS pentru membranele bazale, impregnație argentică pentru fibrele de reticulină, Heidenheim pentru fibrele muculare striate, mucicarmin pentru mucus, etc).

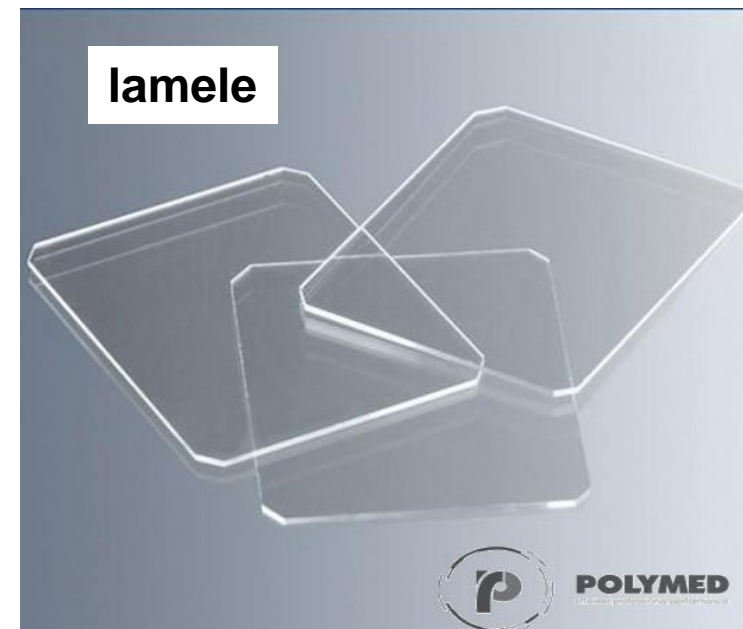
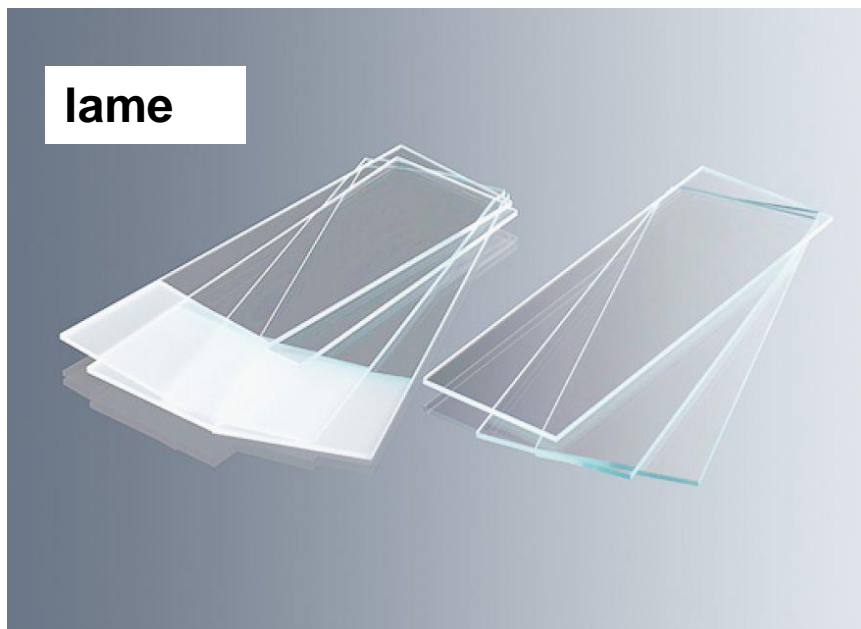
Tehnică colorării cu hematoxină-eozină

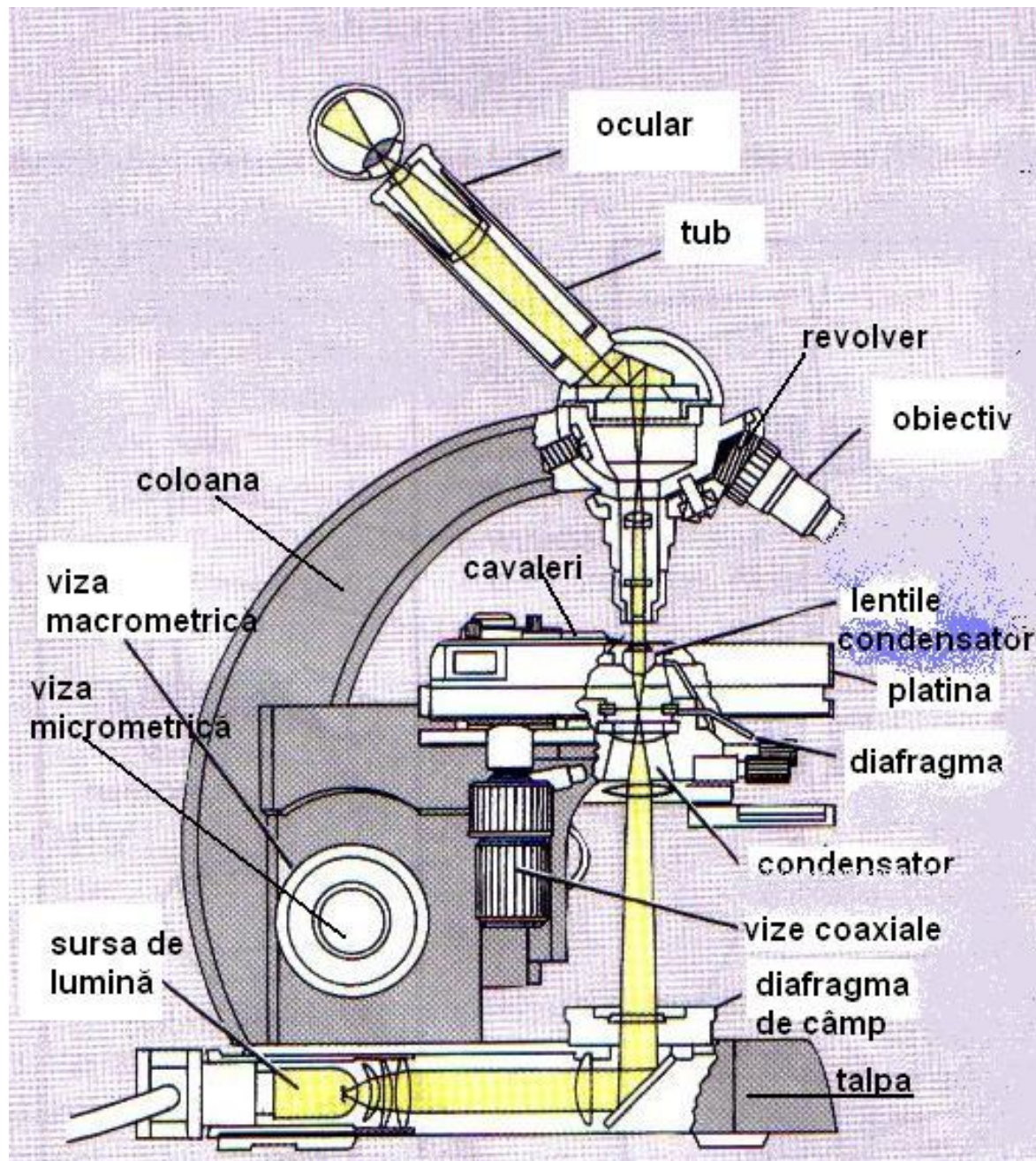
Comportă următorii timpi:

1. **Deparafinarea** (3 băi benzen):
 - benzen I..... 5 minute
 - benzen II..... 5 minute
 - benzen III..... 5 minute
2. **Deshidratarea** (alcooluri de concentrații des crescânde):
 - alcool etilic absolut..... 5 minute
 - alcool etilic 90⁰..... 5 minute
 - alcool etilic 80⁰..... 5 minute
 - alcool etilic 70⁰..... 5 minute
3. **Spălarea** în apă de robinet
4. **Colorarea nucleilor** cu hematoxină Mayer..... 5 minute
5. **Spălarea** în apă de robinet
6. **Diferențierea** în alcool clorhidric, după formula:
 - alcool etilic 96⁰..... 100cc
 - acid clorhidric concentrat..... 5 picături
 - (timp de acționare..... 2-3 secunde)
7. **Spălare** în apă de robinet
8. **Virare în carbonat de litiu** (sol. Sat.)..... 2-3 secunde
9. **Spălare** în apă de robinet
10. **Colorare** cu eozină..... 5 secunde
11. **Spălare** cu apă de robinet
12. **Spălare** în alcool etilic până nu mai iese eozină
13. **Deshidratare** în alcool etilic 96⁰ (2 băi)..... 5 minute
14. **Deshidratare** în 3 băi alcool etilic absolut..... 15 minute
15. **Clarificare** în xilol fenicat..... 15 minute
16. **Clarificare** în 3 băi xilol..... câte 5 minute
17. **Montare** în balsam de Canada sub o lamelă de sticlă
18. **Termostat la 37⁰C** (24 ore).

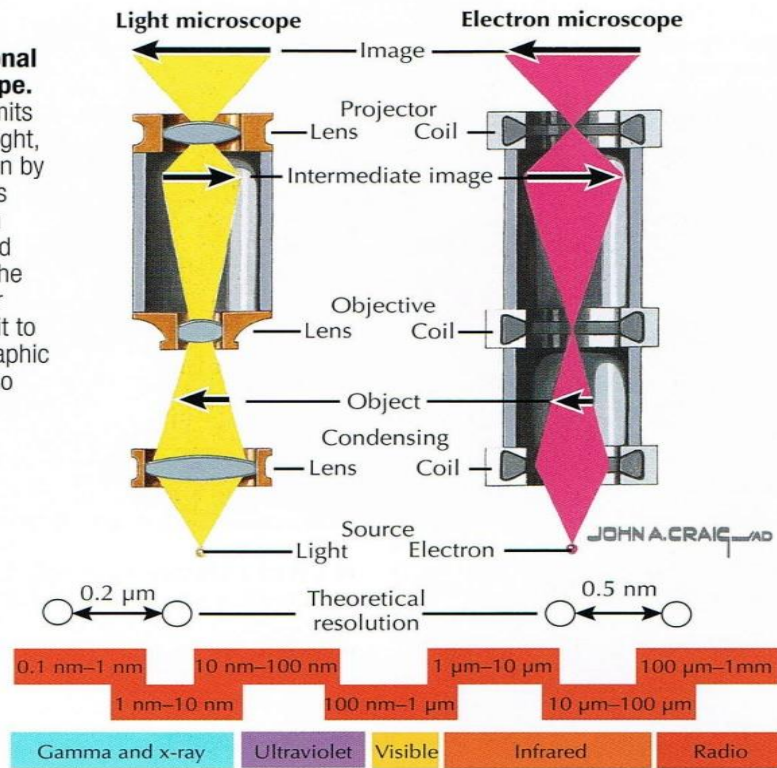
- **Microscopia optică**

- **Microscop optic obișnuit (microscop cu lumină transmisă)**
- Observă detalii structurale care se află la distanță de **0,2 μm**
- Se studiază țesuturile fixate și colorate.
- Permite observarea unor procese celulare
- **Microscop cu contrast de fază** permite observarea celulelor vii: mișcarea celulară, diviziunea, fagocitoza)
- **Microscop cu fluorescență**

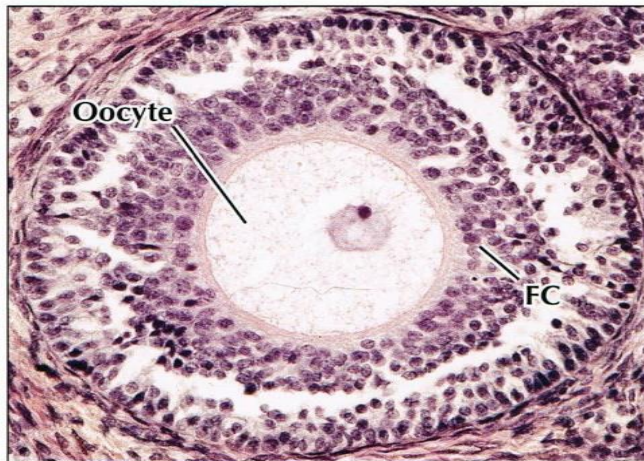




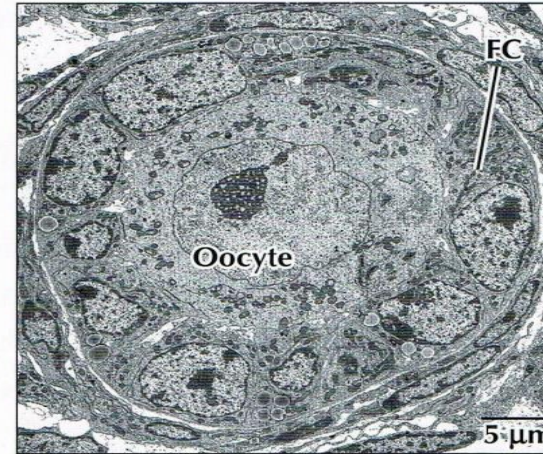
► **Optical parts of a conventional light (or bright-field) microscope.** This compound microscope transmits light through three glass lenses. Light, first focused on a stained specimen by a substage condenser lens, passes through the specimen and then an objective lens, which magnifies and projects the illuminated image to the ocular lens. The ocular lens further magnifies the image and projects it to the eye of the viewer or a photographic plate. Most tissues are colorless, so color dyes serve as stains that differentially absorb light so that structures in specimens may be distinguished.



◄ **Optical parts of a transmission electron microscope (TEM).** A TEM transmits a beam of electrons through an ultrathin section of tissue that has been cut via an ultramicrotome. Severely coiled electromagnetic lenses deflect electrons and use the same principle as that of light microscope lenses to condense, focus, and magnify images. Electrons from a heated tungsten filament (or cathode) are drawn toward an anode within a vacuum column. Electrons are not visible to the naked eye, so a fluorescent screen or photographic plate records the image as a black and white electron micrograph (EM). The advantage of the TEM is great resolving power.

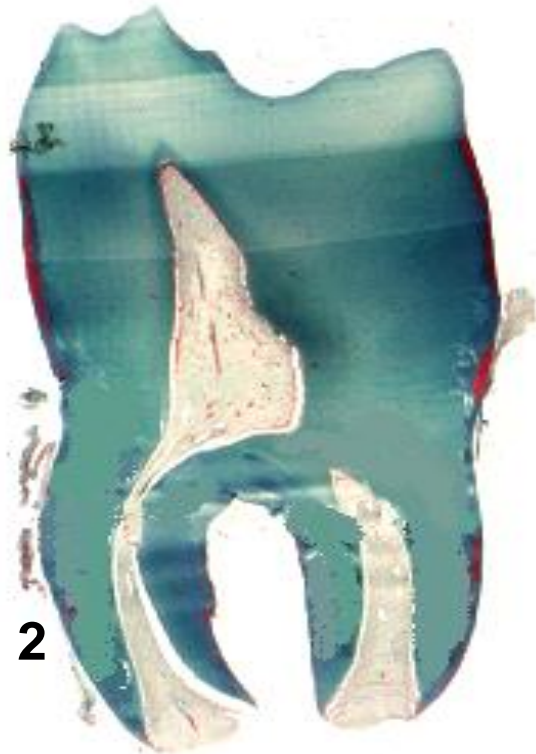


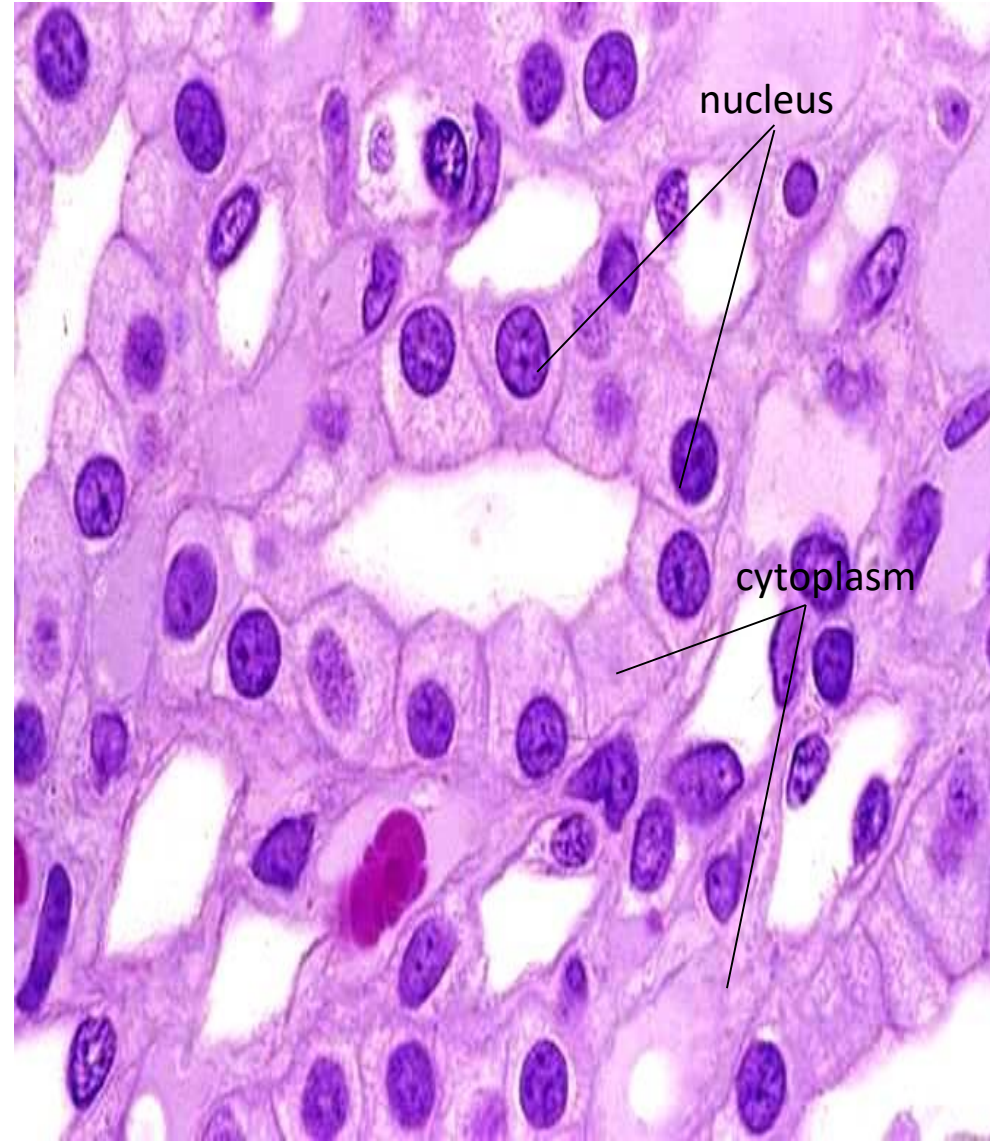
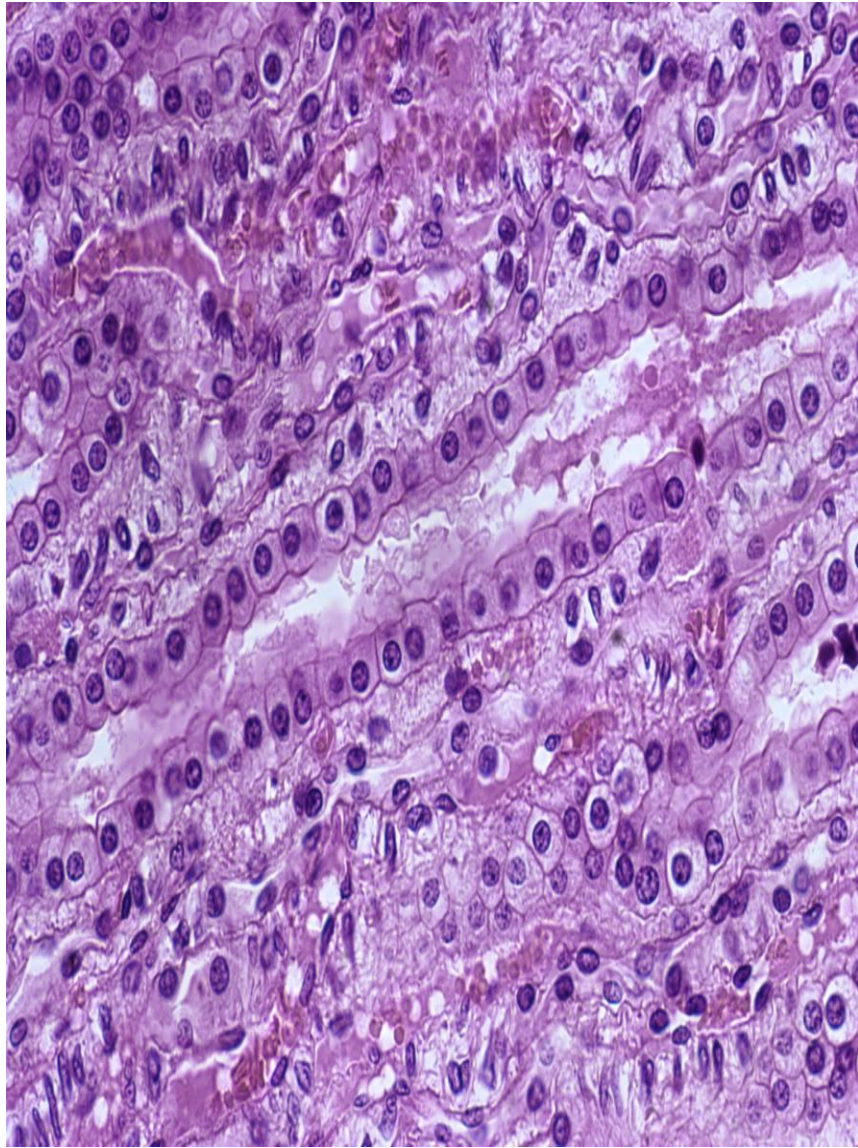
◄ ► **Comparative views of the ovary as seen with light (Left) and electron (Right) microscopes.** Images show a large oocyte surrounded by smaller follicular cells (FC). The LM is a paraffin section stained with hematoxylin and eosin (H&E). Hematoxylin, a blue cationic stain, binds to anionic (negatively charged) basophilic sites in tissue sections. Eosin, a pink anionic stain, binds to acidophilic (positively charged) tissue components. The EM is a thin plastic section stained with heavy metals (lead citrate and uranyl acetate). **Left:** 200×; **Right:** 1800×.



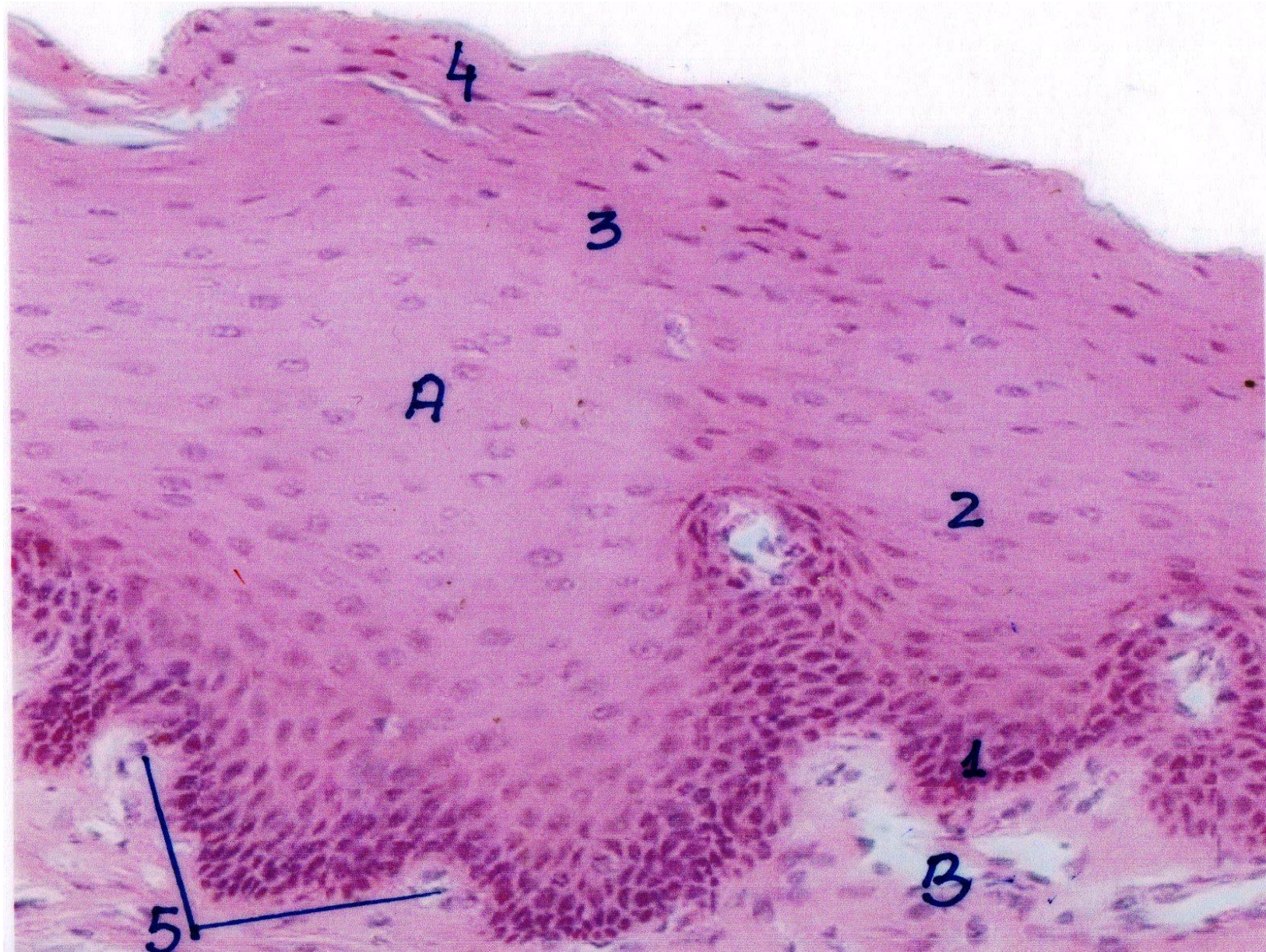
PREPARATUL HISTOLOGIC. TEHNICI HISTOLOGICE. COLORAȚII

Metode de prelucrare dinte : șlefuire (1) și demineralizare (de exemplu în soluție de acid tricloracetic), urmată de colorații uzuale (2,3)

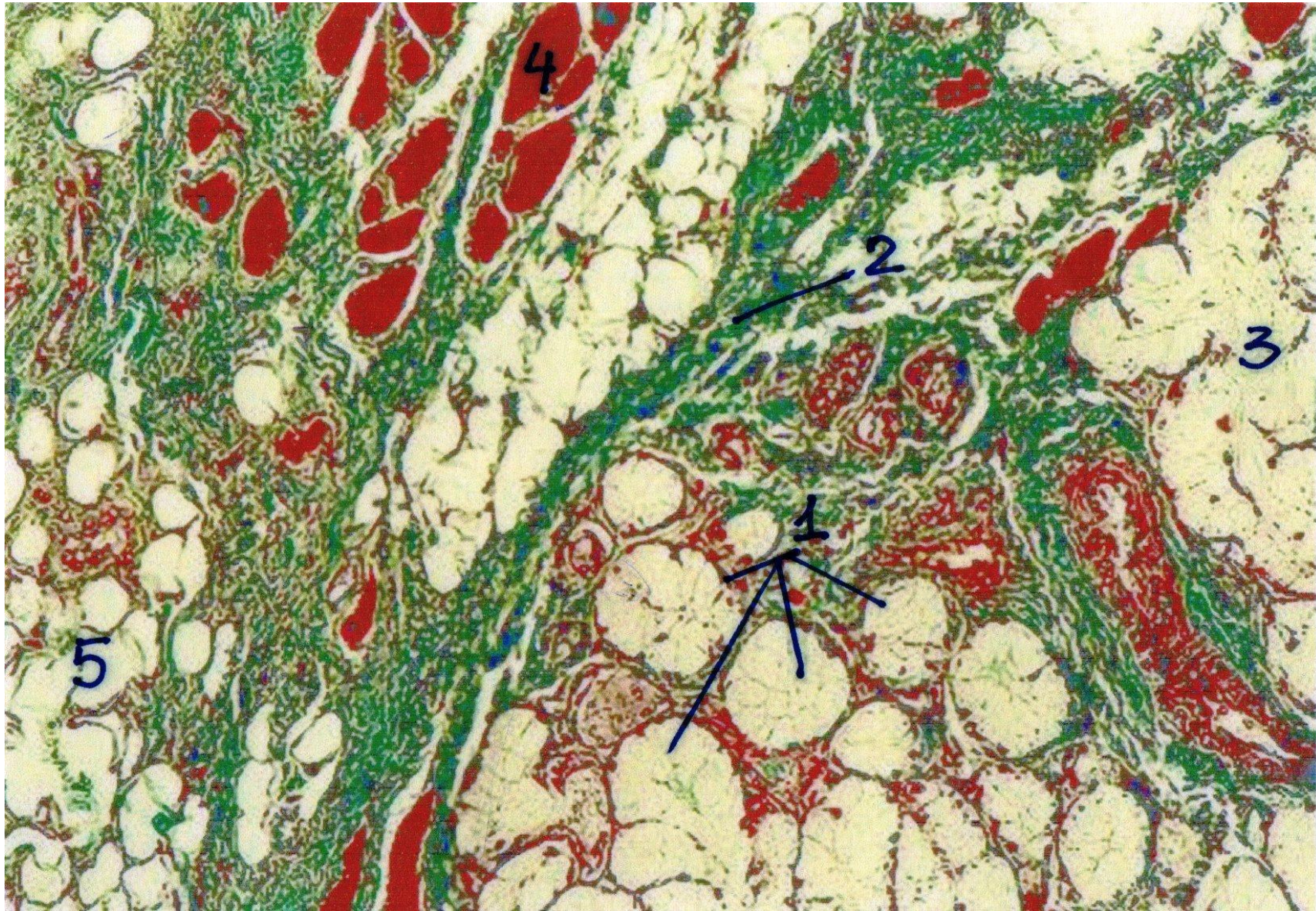




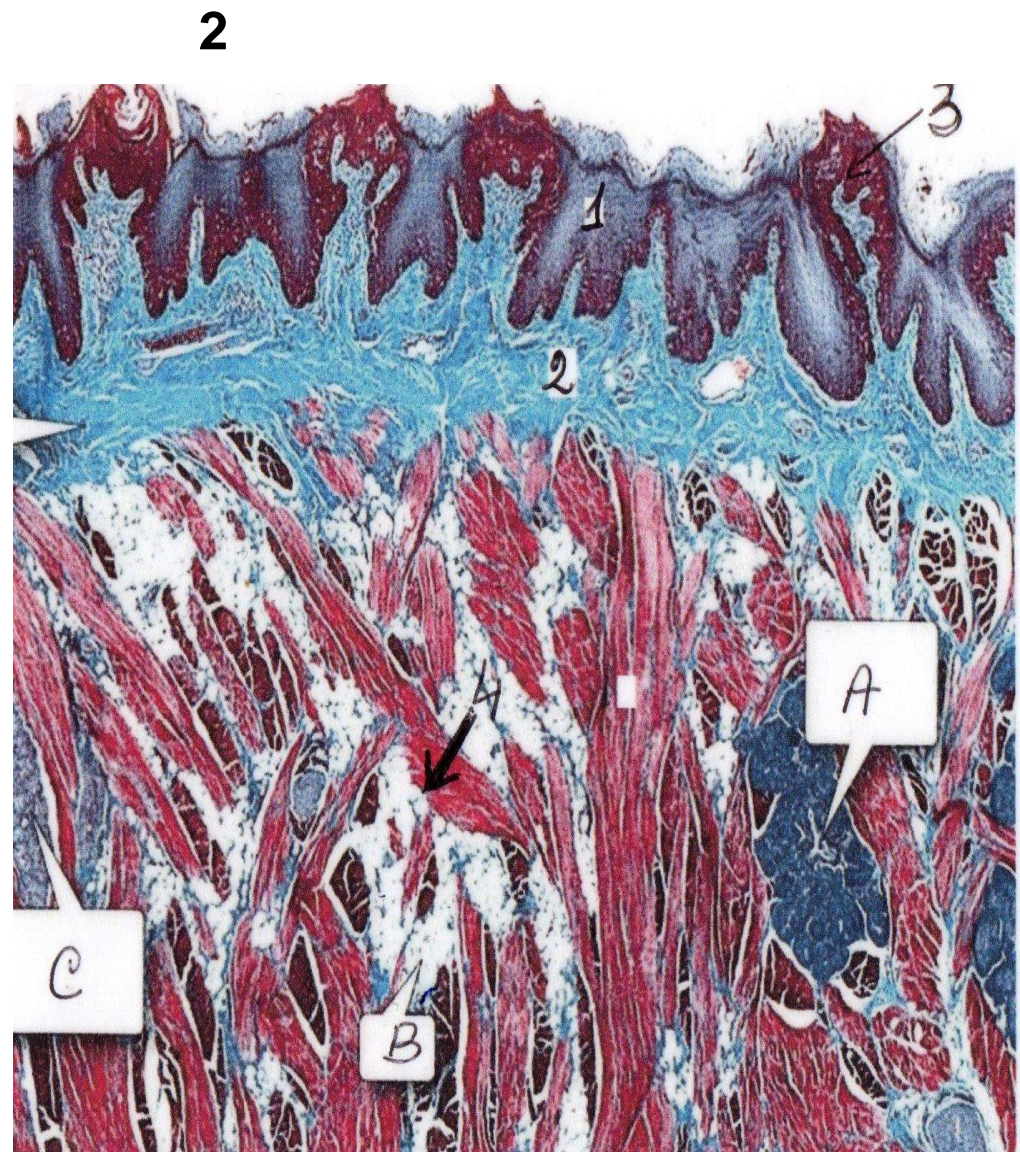
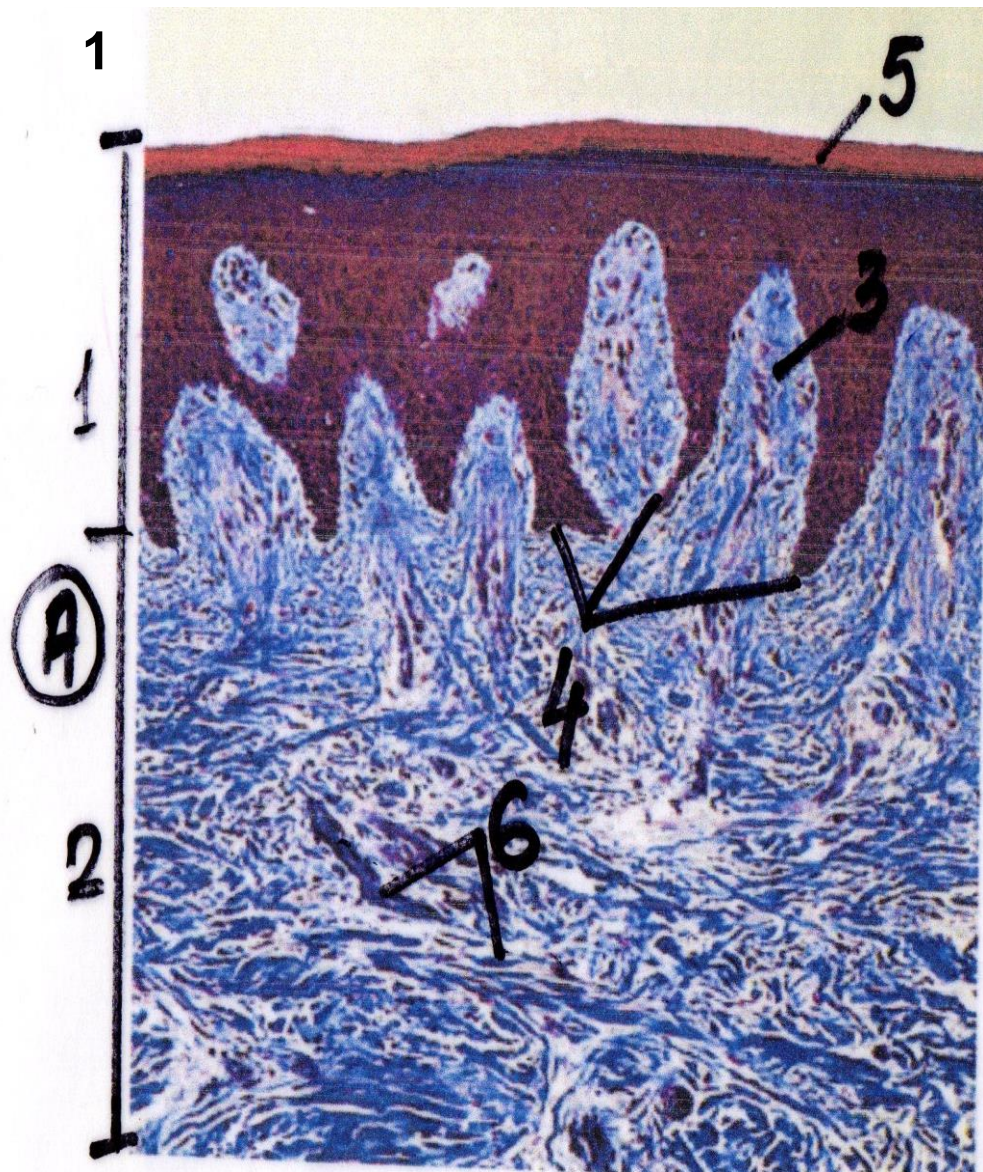
Colorație HE (Hematoxină-eozină)



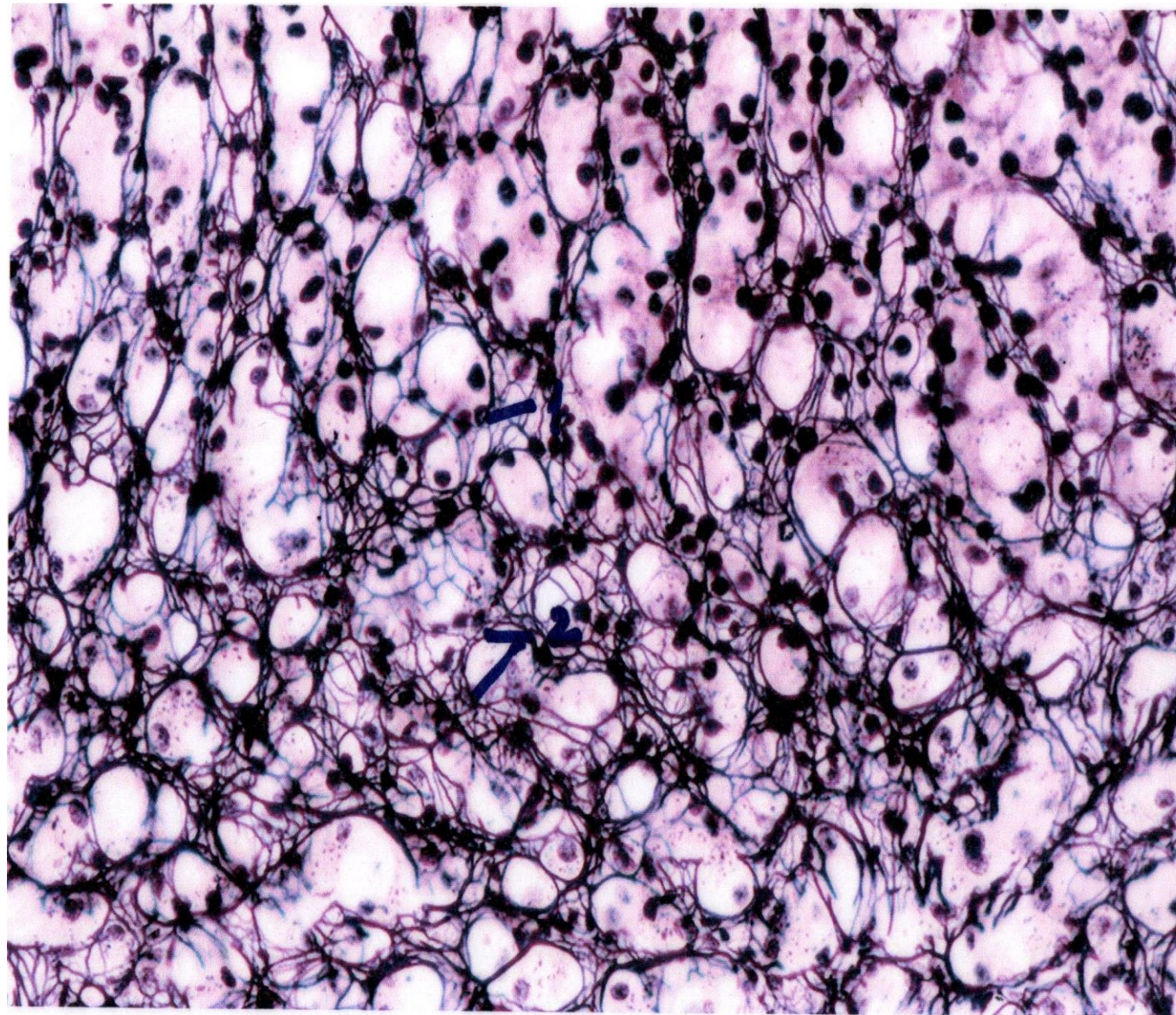
Colorație HE (Hematoxină-eozină). Mucoasă orală



Colorație tricromic Goldner Sze Kelly

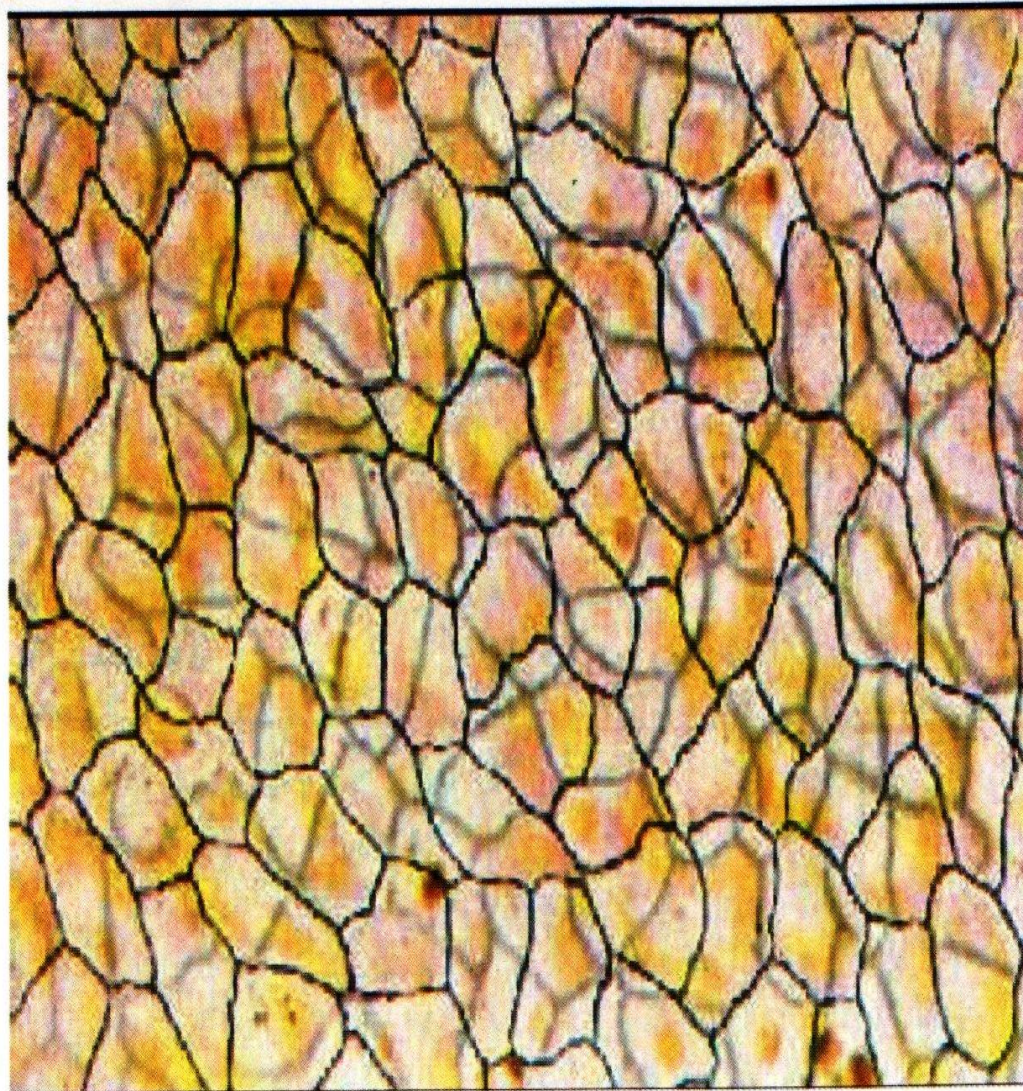


Colorație tricromic Masson
 1. mucoasă gingivală
 2. organ lingual



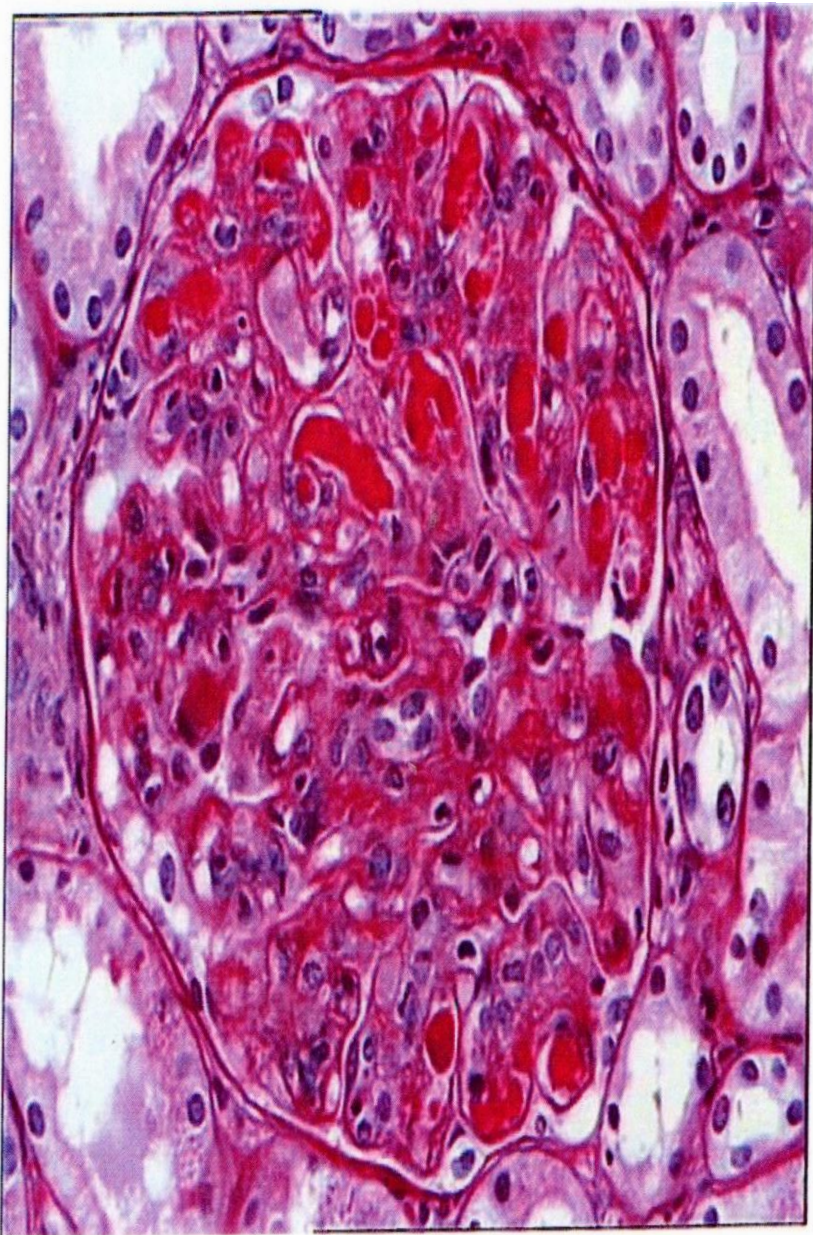
Impregnație argentică. Fibre de reticulină – stromă organ limfoid

Impregnație argentică Gomory



Fibrele de reticulină – **negru**
Citoplasma - **cenușiu**
Fibrele de colagen – **galben**
cafeniu
Nucleii – **negru**

Endoteliu

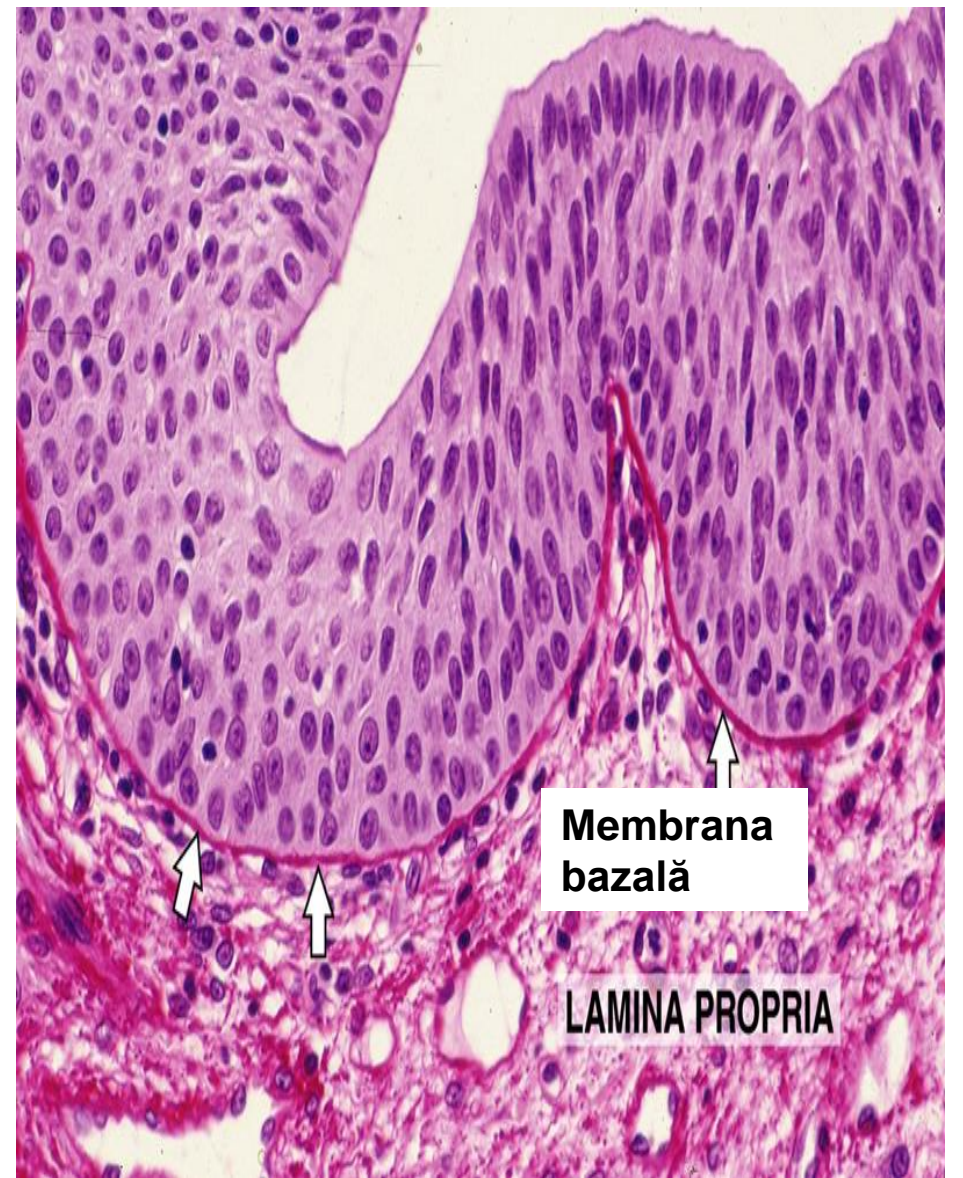


Mucopolizaharidele neutre din
celulele caliciforme, glicogenul,
membranele bazale, fibrele de
reticulină, - roșu violet

PAS -hematoxină

Numeroși trombi la nivel glomerular

Rinichi



**Membrana
bazală**

LAMINA PROPRIA

**Epiteliu stratificat cilindric.
Colorație PAS- hematoxină**

Orceină

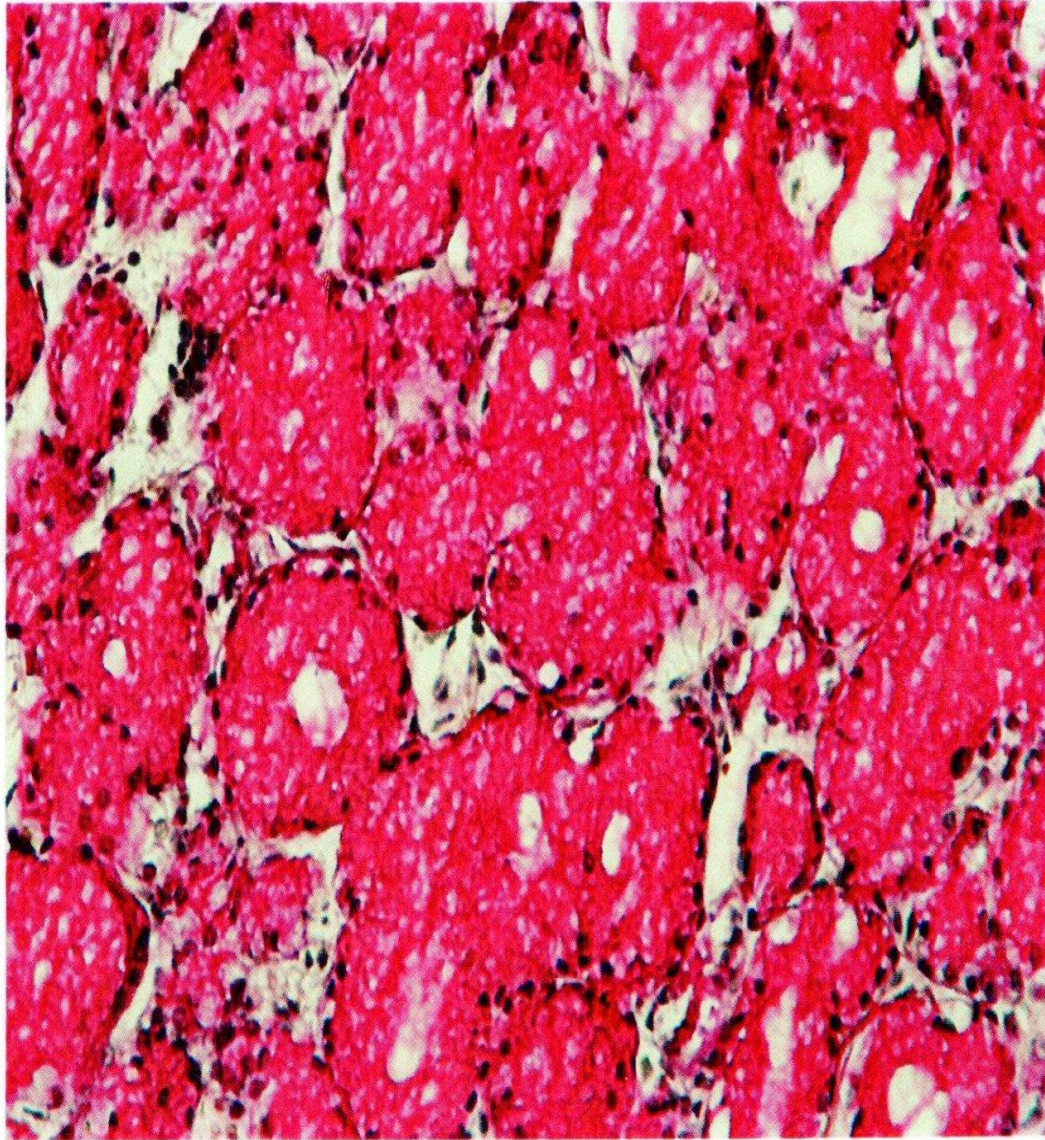


Fibrele elastice, cartilaj, mucus acid,
cromatina – **roșu brun**

Aortă – tunica medie

Fibre elastice

Mucicarmin



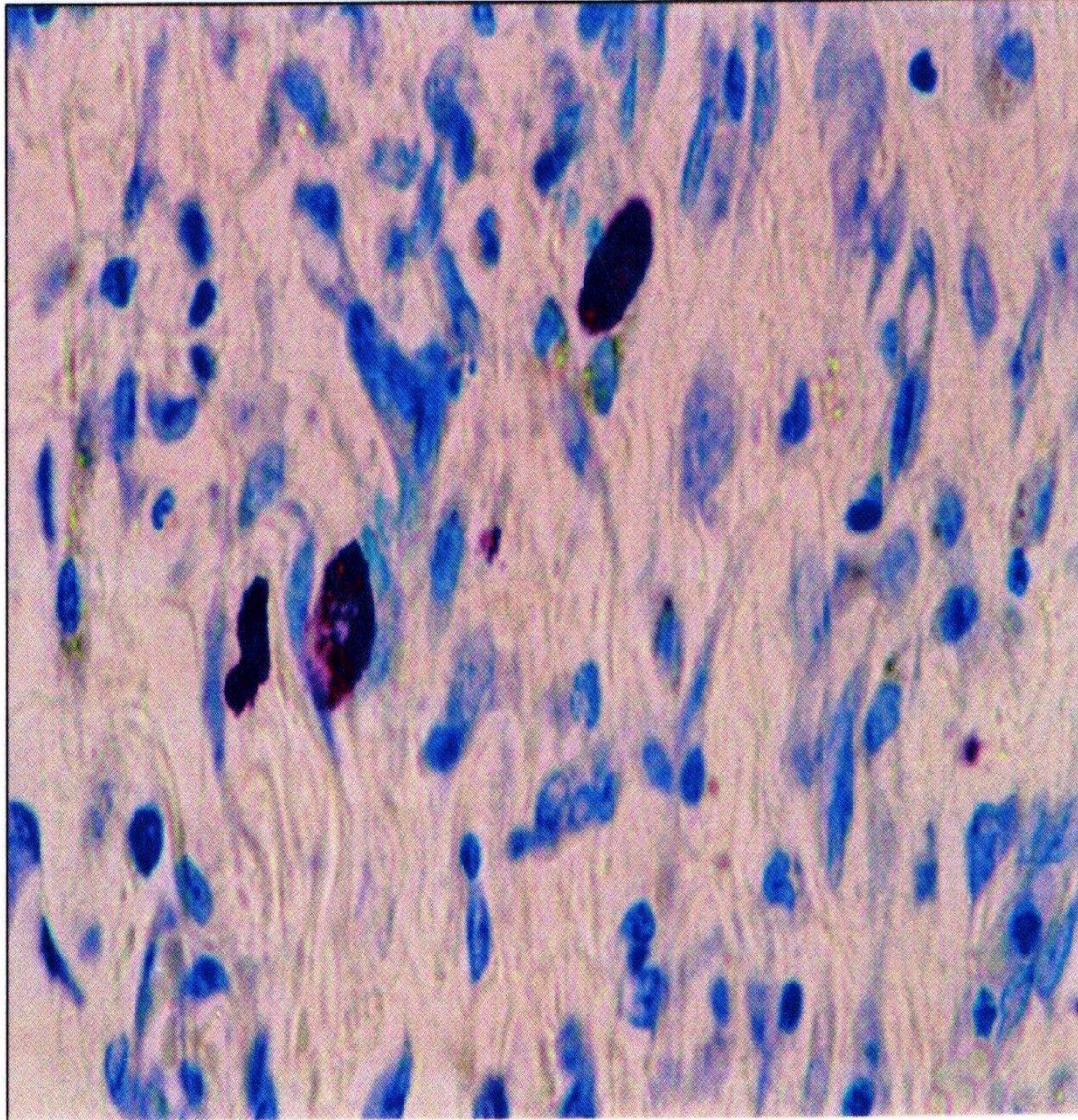
Mucusul - roșu-violet

Nucleii- negru

Alte elemente tisulare - galben.

Glande salivare

Albstru de toluidina

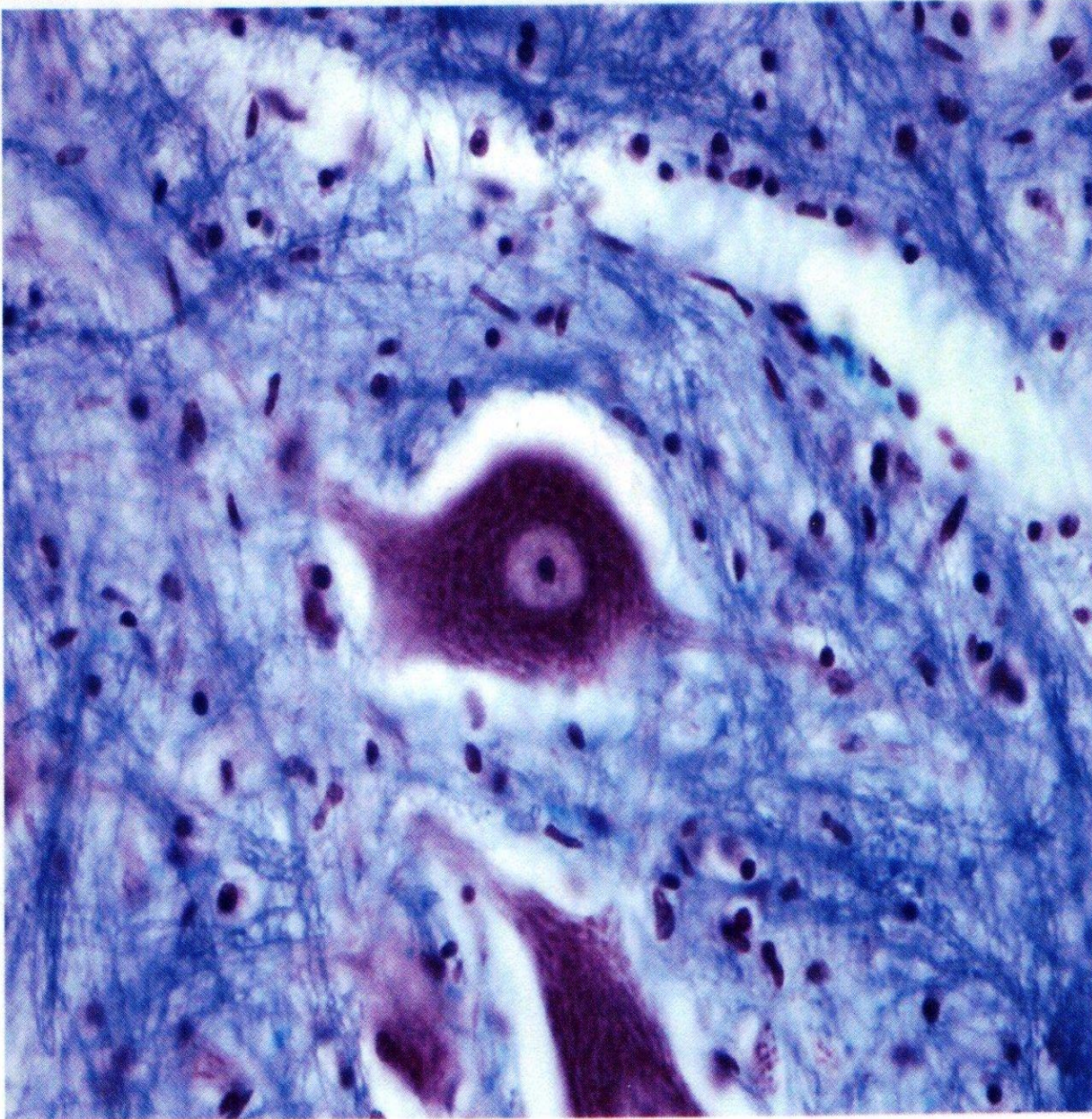


Granulațiile mastocitelor
(heparină, histamină) – **violet**
(**metacromazie**)

Fondul (nucleii) – **albastru**
(**ortocromazie**)

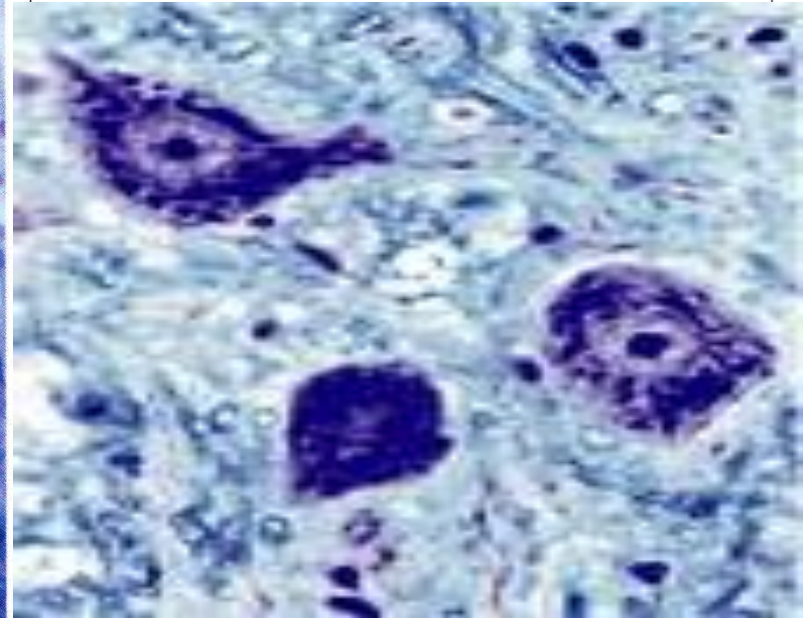
Mastocite

Crezil violet

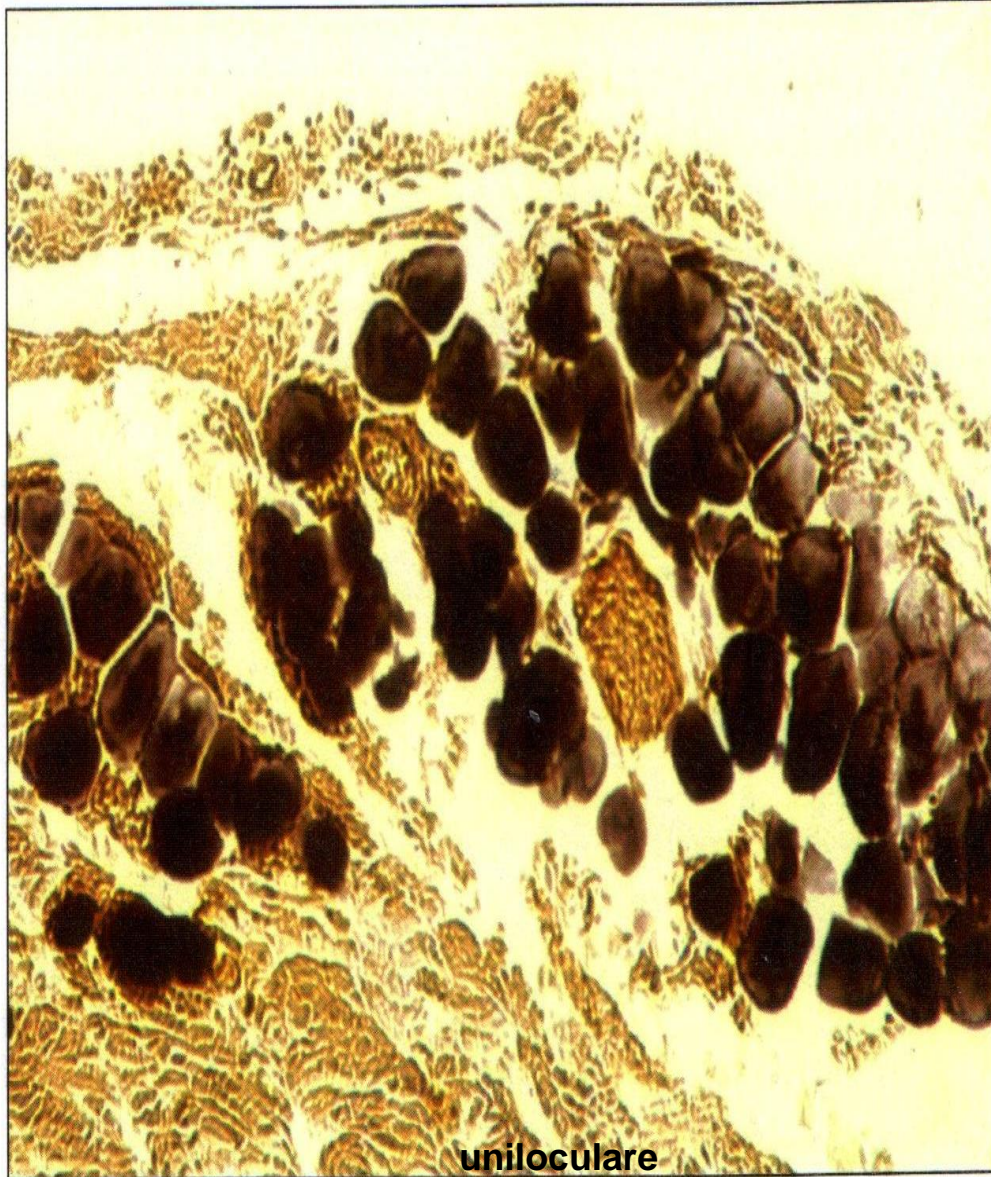


Corpii Nissl – **violet**

Restul țesutului (nuclei) – **albastru**



Acid osmic



uniloculare

Adipocite

Lipide nesaturate – negru-brun