

LAURA GEORGIANA NECULA

ANA-IULIA NEAGU

DENISA DRAGU

ELEMENTE DE BAZĂ
ÎN
HISTOLOGIE

Editura Hamangiu
2023

1. METODE DE STUDIU ÎN HISTOLOGIE. PREPARATUL MICROSCOPIC

Histologia (*histos*- țesut și *logos*- cunoaștere), numită și anatomia microscopică, este o ramură a științelor medicale care studiază structura microscopică a țesuturilor și organelor corpului. Studiul histologiei include aspecte de biologie celulară și moleculară care contribuie la înțelegerea organizării celulare și a funcției.

Țesutul este un grup de celule cu aceeași structură și funcție, susținut de o matrice extracelulară. Cele patru tipuri fundamentale de țesuturi ale organismului uman sunt:

- țesutul epitelial
- țesutul conjunctiv
- țesutul muscular
- țesutul nervos

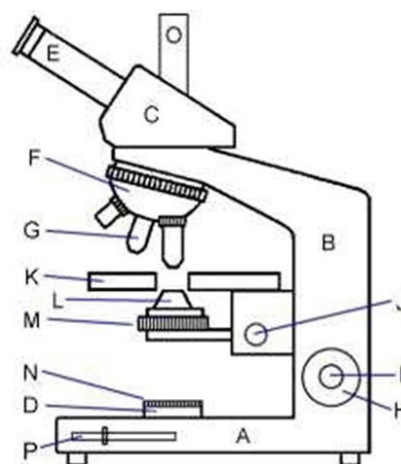
Țesuturile se asociază între ele în proporții variabile formând organe și sisteme.

Metodele de studiu în histologie sunt diverse, însă ele se bazează în principal pe microscopia optică. Microscopia electronică de baleiaj (SEM) și de transmisie (TEM), microscopia de forță atomică (MFA), utilizarea tehnicilor de histochimie și citochimie, imunohistochimie și hibridizare, autoradiografie, culturi de țesut și organ, tehnici de separare celulară și fracționare, oferă o rezoluție mai mare și localizare mai precisă.

Rezoluția reprezintă distanța minimă la care două puncte distincte pot fi văzute separat. Limita de rezoluție a ochiului uman este de 100 μm; întrucât dimensiunea celulelor este sub această limită de rezoluție, observarea lor este posibilă numai prin utilizarea tehnicilor de microscopie.

Microscopul este un instrument optic ce permite examinarea structurilor cu dimensiuni sub limita vizibilității cu ochiul liber. Un microscop optic este caracterizat prin putere de mărire și putere de rezoluție. Puterea de mărire a microscopului optic este dată de produsul dintre puterea de mărire a ocularului și puterea de mărire a obiectivului; pentru un microscop optic obișnuit valoarea sa maximă este cuprinsă între 500X și 1000X. Prin comparație, microscopul electronic are o putere de mărire de peste 160000X. Rezoluția microscopului optic este de 0,2 μm.

Examinarea morfo-funcțională a celulelor se face pe preparate microscopice. Preparatele microscopice reprezintă totalitatea obiectelor pregătite pentru a fi examinate cu aparate optice măritoare în vederea studierii structurii lor. Un preparat microscopic este reprezentat de proba de studiat așezată pe o lama de sticlă și acoperită cu o lamelă.



Microscopul optic. Componentele microscopului optic

A. Suportul microscopului; B. Brațul microscopului, C. Prisma, D. Filtru, E. Ocular, F. Dispozitiv “revolver”, G. Obiective, K. Platină, I. Viza micrometrică, J. Viza pentru control condensator, H. Viza macrometrică, L. Condensator, M. Diafragma iris, N. Sursa de lumină, O. Adaptor cameră P. Controlul iluminării

În funcție de starea celulelor de studiat, preparatele microscopice se clasifică în:

- Preparate proaspete, temporare sau extemporanee
- Preparate permanente care permit un studiu amănunțit al celulelor pe piese fixate și colorate; ele rezistă în timp și se pot realiza prin:
 - metoda efectuării secțiunilor fine
 - metoda etalării materialului biologic în monostrat (frotiu, amprente de organ)

Un preparat microscopic include următoarele componente:

- **obiectul de examinat** - reprezentat de un fragment de țesut sau o cantitate mică dintr-un lichid corporal, aduse prin secționare, respectiv etalare la o grosime de câțiva microni; la această grosime, lumina străbate proba - (transiluminare) - permițând studierea celulelor la microscopul optic.

- **suportul de montare** – format din **lamă și lamelă**.

Lama este numită și “lama port-obiect”, are laturi paralele și dimensiuni de 76/26mm și 1.5-2mm grosime; lamela din sticlă are formă pătrată sau dreptunghiulară, cu dimensiuni variabile de 18/18, 22/22 sau 22/32mm și o grosime de 0.16-0.18mm. În vederea examinării la microscop, obiectul de examinat este așezat pe lama de sticlă și este acoperit cu lamelă.

- **mediul de montare** (transparent)

Pregătirea unui preparat microscopic pentru examinare prin microscopie optică implică următoarele etape:

- Recoltarea
- Fixarea
- Includerea
- Secționarea
- Colorarea
- Montarea și etichetarea

1. **Recoltarea** reprezintă operația prin care fragmentul de țesut/organ este prelevat de la om, animal viu sau de la cadavru. Recoltarea este o etapă esențială pentru obținerea unui preparat microscopic de calitate; ea se poate face prin rezecție chirurgicală, rezecție endoscopică, biopsie de organ, puncție cu ac gros, puncție cu ac fin, recoltarea necroptică.

2. **Fixarea** este un proces prin care sunt oprite cât mai rapid procesele vitale celulare păstrându-se, cu alterări minime, volumul, forma, raporturile spațiale și moleculare. Este o etapă decisivă în obținerea unui preparat microscopic permanent.

Prin fixare se urmărește:

- conservarea țesuturilor pentru a împiedica apariția proceselor de putrefacție și autoliză
- prevenirea pierderii de constituenți celulari
- creșterea diferențierii optice a structurilor celulare în scopul realizării unei colorații selective
- mărirea consistenței țesuturilor în scopul de a facilita trecerea lor prin celelalte etape ale tehnicii și mai ales pentru secționare.

După reacția pe care o au cu proteinele solubile, fixatorii pot fi:

- coagulanți
- necoagulanți

Agenții fixatori pot fi:

- fizici - căldura, desicarea, congelarea rapidă
- chimici - simpli sau amestecuri fixatoare

Agenții fixatori:

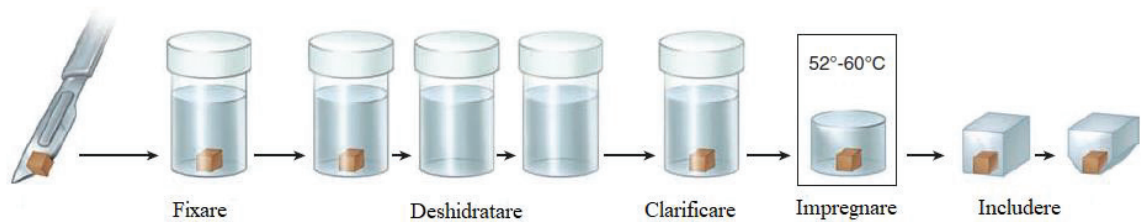
- simpli: formaldehida, glutaraldehida, acetona, acid tricloracetic, acid osmic, alcool metilic
- amestecuri fixatoare - utilizate datorită afinității inegale pentru diversele elemente structurale ale fixatorilor și a diferenței în puterea lor de penetrație.

3. **Includerea**

Includerea presupune încorporarea materialului biologic recoltat (fragment de organ/țesut) într-o substanță solidificabilă, denumită masă de incluziune, care să permită secționarea în secțiuni cât mai

subțiri, ce pot fi examinate la microscop. Masele de incluziune pot fi anhidre (parafina, celoidina) sau apoase (gelatina, polietilenglicol), pot penetra celula sau rămân în spațiul extracelular.

Cea mai folosită masă de incluziune este **parafina**. Incluziunea în parafină cuprinde mai multe etape:



A. Deshidratarea - țesuturile sunt trecute printr-o serie de soluții de alcool de concentrații crescătoare până la 100%, cu rol de îndepărtare completă a apei.

B. Clarificarea cu solvenți organici (xilen, toluen, benzen, cloroform) miscibili atât în alcool cât și în parafină, ce vor scoate alcoolul din țesut.

C. Impregnarea cu parafină: țesutul este introdus în parafina topită până ce este complet impregnat.

D. Incluziunea propriu-zisă/turnarea blocurilor (înglobare): țesutul impregnat cu parafină este plasat într-o casetă cu parafină topită și lăsat să se solidifice.

4. Secționarea

Secționarea materialului biologic este etapa în care piesa inclusă sau înghețată este tăiată în felii subțiri (cu grosimi de ordinul micronilor) cu ajutorul unui aparat numit microtom.

Piesele histologice pot fi secționate :

a) imediat după fixare, fără a fi incluse sau

b) imediat după ce au fost incluse

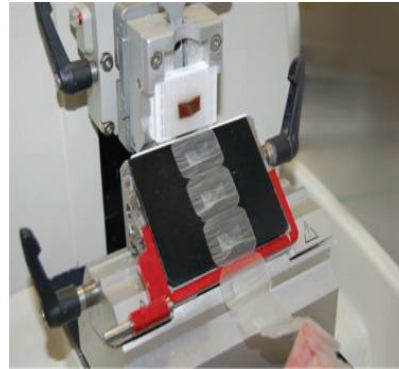
a) Secționarea piesei neincluse se face în urma întăririi ei prin congelare, cu un microtom special - microtom pentru secțiuni de gheață. Secționarea la gheață este folosită în histologie, histochimie, histoenzimologie, întrucât permite evidențierea unor componenți celulari: grăsimi, enzime, care dispar în metodele de incluziune. Secțiunile sunt în general groase, mai mari de 10 microni.

b) Secționarea pieselor incluse în parafină se realizează cu ajutorul unui microtom prevăzut cu un cuțit foarte ascuțit și care dispune de un mecanism care se deplasează de-a lungul blocului inclus în parafină, avansând cu o distanță controlată, de obicei între 1 și 10 μm . Prin mișcarea repetată a blocului în lungul cuțitului se obțin secțiuni seriate, cu grosime egală cu distanța cu care blocul avansează, care adera una de alta, formând o panglică.

Etalarea reprezintă etapa în care secțiunile obținute cu ajutorul microtomului se aplică pe lama de sticlă, sunt lăsate să adere, sunt deparafinate și rehidratate.



<https://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/microtomes/histocore-biocut/>



Microtom

Secțiunile fine realizate cu ajutorul microtomului formează panglici în timpul procesului de secționare, permițând o secvențiere a secțiunilor de la prima către ultima. Profilul fragmentului tisular este vizibil prin examinarea secvențială a acestor secțiuni seriale.

5. Întrucât celulele sunt adesea incolore, **etapa de colorare** are ca scop creșterea contrastului dintre diferitele componente tisulare prin modificarea indicilor de refracție ai substratului morfologic cu ajutorul coloranților, care se leagă electrostatic de preparate.

Colorantul histologic este o substanță chimică colorată, de obicei de natură organică, care poate intra în celulă atașându-se la nivelul componentelor celulare și permițând astfel diferențierea lor optică.

Din punct de vedere al **numărului de coloranți** folosiți colorațiile pot fi:

- **simple** - se folosește un singur colorant (ex: albastru de metilen)
- **bicrome** - utilizează 2 coloranți, unul acid pentru citoplasmă și unul bazic pentru nucleu (ex: H&E)
- **tricrome** - utilizează 3 coloranți, unul bazic și doi acizi, de regula al doilea pentru colagen (ex: Masson - colagenul se colorează în albastru/verde; Gomori - colagenul se colorează în verde, citoplasma în roșu aprins, nucleii în violet închis; van Gieson – nucleii se colorează în negru, citoplasma în galben, colagenul în roșu).

În funcție de **rezultatul colorării și culoarea colorantului**, colorațiile pot fi:

- **ortocromatice** - substratul se colorează în aceeași culoare cu a colorantului
- **metacromatice** - substratul se colorează într-o culoare diferită de cea a colorantului; exemplu: albastru de toluidină colorează mucusul în violet

În funcție de **tipul colorației** (colorarea propriu-zisă, reacția chimică, reacția imunologică) colorațiile pot fi:

1. **Morfologice**
2. **Histochimice**
3. **Histoenzimologie**
4. **Imunohistochimice**
5. **Citologice**

1. Colorațiile morfologice se utilizează în examinarea primară a țesuturilor, fiind adaptate pentru studiul nucleilor și a citoplasmelor. Cele mai utilizate colorații histologice permit diferențierea între componentele acide și bazice ale celulelor și țesuturilor.

Coloranții bazici au o încărcătură netă pozitivă și se leagă de componentele celulare sau tisulare încărcate negativ:

- grupări fosfat ale acizilor nucleici ADN și ARN
- grupări sulfat ale unor polizaharide (glicozaminoglicani) și unele proteine (mucus)

Componentele tisulare care se colorează cu coloranți bazici sunt denumite **bazofile**.

Coloranții acizi au o încărcătură netă negativă și se leagă de structurile celulare și tisulare încărcate pozitiv:

- grupări amino ionizate ale proteinelor (catene laterale bogate în lizină și arginină)

Componentele tisulare care se colorează cu coloranții acizi sunt denumite **acidofile**.

HEMATOXILINĂ-EOZINĂ (H&E)

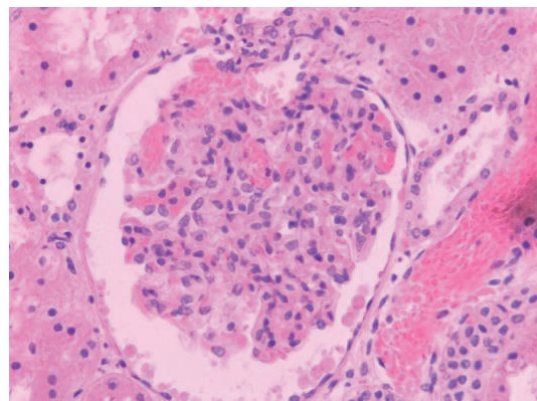
- este colorația cea mai des folosită în histologie pentru examinarea preparatelor la microscopul optic datorită simplității și capacității de a permite observarea diferitelor structuri (citoplasmatică, nucleare, ale matricei extracelulare).

- hematoxilina, compus cristalin, incolor, este un colorant bazic natural, extras din *Haematoxylum campechianum*, care se leagă de componentele acide (bazofile). Prin oxidare este convertită în hematicina care colorează nucleii, ribozomii și RER în albastru închis-violet. Nucleii celulelor tinere și metabolic active, bogăți în eucromatină, se colorează eucromatic sau hipocrom (eucromatina este palidă). Celulele adulte sau îmbătrânite, au o activitate metabolică redusă, nucleii prezintă heterocromatină inactivă și sunt hiperchromi (se colorează intens bazofil).

- eozina este încărcată negativ și colorează structurile acidofile (eozinofile) din citoplasmă și matricea extracelulară în roz-roșu. Celulele cu mitocondrii numeroase (celule ductale, osteoclaste, celule musculare, celulele parietale) se colorează intens cu eozină. Colagenul se colorează în roz sau orange cu eozina.

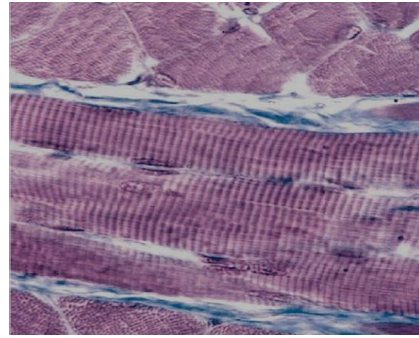
Hematoxină Eozină

- nucleii - albastru-violet
- citoplasma - roz
- structurile cu conținut ridicat de substanțe lipidice (celule adipoase, mielina) sunt optic vide
- fibre de colagen - roz



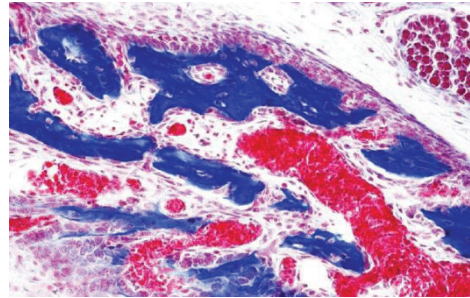
Colorația tricromă Masson

- nucleul - violet intens
- citoplasma - nuanțe de gri sau albastru palid,
- fibrele musculare - roșu,
- fibrele colagene - albastru



Colorația Mallory

- nucleii – roșu intens
- citoplasma – roșie
- fibre de collagen și reticulină – albastru
- țesut muscular neted – violet
- țesut muscular striat – roșu / portocaliu



2. Colorații histochimice - permit identificarea unui substrat (componente chimice sau enzimatică particulare ale celulelor) prin reacții de culoare sau de precipitare datorate unor grupări chimice ale acestuia.

- reacția Periodic Acid-Schiff (PAS) este o colorație histochimică pentru carbohidrați; identifică grupări aldehidice libere și le colorează în roșu-violet/magenta, permițând astfel vizualizarea glicogenului în celulă, mucusului în celule și țesuturi, membranei bazale și a fibrelor de reticulină în țesutul conjunctiv.

- albastru de toluidină identifică glicozaminoglicani din granulațiile mastocitelor și mucinelor prin metacromazie (violet).

- albastru alcian identifică mucinele acide, la PH scăzut, glicozaminoglicani sulfatați (heparina, condroitin sulfat).

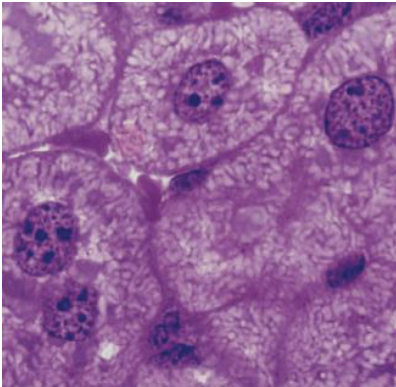
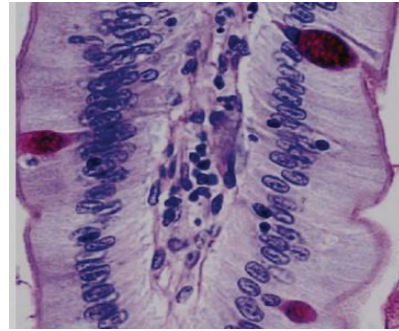
- mucicarmin: colorează mucusul în roșu.

- impregnări argente: pentru fibre de reticulină și membrana bazală, pentru componente ale neuronilor și celulelor gliale, pentru germeni, pentru celule neuroendocrine.

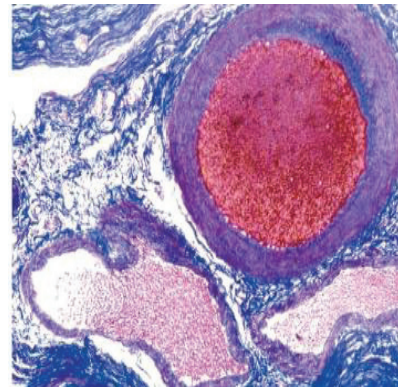
- orceină: colorează fibrele elastice în brun roșcat.

PAS

- glicogenul se colorează în roșu intens sau magenta.
- celulele caliciforme din intestin și epitelii respiratorii se colorează în roșu magenta.



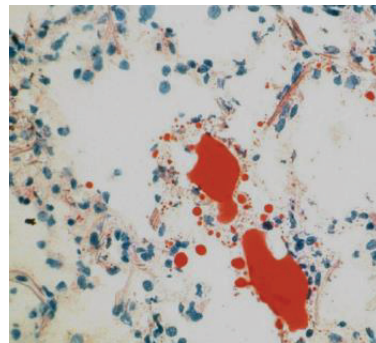
Albastru de toluidină



Albastru alcian

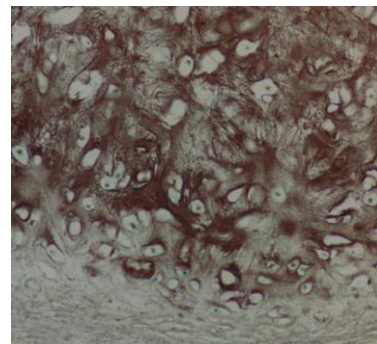
Mucicarmin

- colorație folosită pentru localizarea mucinelor – roșu aprins
- citoplasma – roz, nuclei – negru, țesut conjunctiv – portocaliu/galben



Orceină

- cartilaj elastic, epiglotă
- colorează brun fibrele elastice



3. Colorații histoenzimologice - evidențiază prezența enzimelor prin reacție de culoare; cele mai utile în practică: fosfataza alcalină, fosfataza acidă, adenzintrifosfataza, acetilcolinesteraza, ATP-aza

4. Colorații Imunohistochimice (IHC)

IHC este o reacție Antigen-Anticorp în care antigenul este un anumit component al celulei iar anticorpul obținut în laborator este îndreptat împotriva acestui component celular. Antigenul se cuplează cu anticorpul, produsul final de reacție putând fi vizualizat prin colorare cu diaminobenzidină (DAB) și este colorat în brun.

Exemple de markeri (antigene):

- citokeratina: exprimată de celulele epiteliale
- actina: exprimată de celulele musculare netede și mioepiteliale
- cromogranina A: exprimată de celulele sistemului neuroendocrin difuz
- colagen IV: exprimat de membranele bazale
- antigenul specific prostatei: exprimat de celulele glandulare prostatice

5. Colorațiile citologice se utilizează pentru colorarea frotiurilor. Frotiurile sunt forme de preparate histologice care nu necesită secționare, fiind obținute prin prelevare și întindere pe lama în strat subțire a unei picături dintr-un lichid biologic (sânge, LCR, secreție, urină), a unui produs patologic (puroi), a celulelor dintr-un țesut/organ-ganglion, vagin, în vederea examinării microscopice.

Exemple:

- Albastru policrom tanin-Drăgan (APT-Drăgan): nuclei - albastru-violet, citoplasma - albastru (ortocromatic) sau violet (metacromatic); este o colorație simplă, rapidă, care nu oferă multe detalii celulare

- Papanicolau: nuclei-albastru-violet, citoplasma-nuanțe de orange-verde-roșu; aceasta oferă mai multe detalii celulare

- Colorații de tip Romanovsky: May Grunwald Giemsa, Wright, Giemsa: nucleii - nuanțe de violet intens, citoplasma - violet deschis; ajută la identificarea granulațiilor din citoplasma elementelor figurate sanguine și a precursorilor medulari

Frotiu cervico-vaginal **Colorația Papanicolau** - test Babes-Papanicolau (PAP test) - metodă de examinare la microscop a materialului biologic recoltat de la nivelul colului uterin și a vaginului

