

Venut de la
Păcă Laura
Jentiană Maria
Popa Aurora

GHID de TEHNICI

de
HISTOLOGIE, CITOLOGIE ȘI IMUNOHISTOCHEMIE

Ediția a II-a

AUTORI

Prof. univ. dr. LAURENȚIU MOGOANȚĂ
disciplina Histologie - UMF. CRAIOVA

Dr. CARMEN FLORINA POPESCU
medic primar Anatomie Patologică
SPITALUL DE URGENȚĂ CRAIOVA

Șef lucrări dr. CLAUDIA VALENTINA GEORGESCU
medic primar Anatomie Patologică
SPITALUL DE URGENȚĂ CRAIOVA

Dr. VIOLETA COMĂNESCU
medic primar Anatomie Patologică
SPITALUL DE URGENȚĂ CRAIOVA

Prep dr. DANIEL PIRICI
disciplina Imunohistochimie - UMF. CRAIOVA

EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ
CRAIOVA, 2007

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

Ghid de tehnici de histologie, citologie și imunohistochimie /
Laurențiu Mogoanță, Carmen Florina Popescu, Claudia Valentină
Georgescu, - Craiova : Editura Medicală Universitară, 2007

Bibliogr.

ISBN 978-973-106-073-6

I. Mogoanță, Laurențiu

II. Popescu, Carmen Florina

III. Georgescu, Claudia Valentină

611.018(075.8)

616-018.1(075.8)



EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ CRAIOVA

Accreditată CNCSIS Nr. 54/2001

Str. Petru Rareș 4, 200654 Craiova

Tel / Fax: +40 251 502 179

e-mail: emuc@umfocv.ro; editura.medicala.universitara@gmail.com



Copyright © 2007 Editura Medicală Universitară

Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate EMUC. Orice reproducere integrală sau parțială, prin orice procedeu, a unor pagini din această lucrare, efectuate fără autorizația editorului este ilicită și constituie o contrafacere. Sunt acceptate reproduceri strict rezervate utilizării individuale sau citării justificate de interesul științific, cu specificarea respectivei citări.

Copyright © 2007 Editura Medicală Universitară

All rights reserved. This book is protected by copyright. No part of this book may be reproduced in any form or by any means, including photocopying, or utilized by any information storage and retrieval system without written permission from the copyright owner.

Tipar:

Printex srl, Craiova

Tel./Fax: 0251.580.431

www.printex.ro

CIP/ARINS

Introducere 9

PARTEA I. TEHNICI DE HISTOLOGIE

CAPITOLUL I

Substanțele toxice și periculoase utilizate în laboratoarele de histologie și histopatologie (dr. L. Mogoanță)

Fixatorii	13
Solvenții	13
Metale, acizii și sărurile lor	15
Coloranții	17
Agenti explozivi	18
Alte substanțe periculoase	18
Agenții infecțioși	19
Măsuri și norme de protecție	19

CAPITOLUL II

Preparatul histologic (dr. L. Mogoanță, dr. Claudia Georgescu)

Recoltarea și prelevarea materialului biologic	21
Fixarea materialului biologic	24
Clasificarea fixatorilor	25
Factori fizici implicați în fixarea materialului biologic	29
Artefacte datorate fixării	31
Principali fixatori utilizați	31
Procedee pentru îndepărtarea pigmentului	41
Fixatori recomandați pentru colorații speciale	41
Tehnici de includere	43

CAPITOLUL III

Colorații nucleare (dr. L. Mogoanță, dr. Carmen Popescu)

I. Hematoxilina	47
II. Alte colorații nucleare	58
- carminul	58
- colorația cu roșu nuclear (Kernechtrot)	60
- colorația cu Cresyl violet	60
- colorația nucleară cu verde de metil pironină	61
- colorația nucleară cu acridin oranj	61
- colorația nucleară Giemsa	62
- metoda Feulgen pentru evidențierea ARN-ului	63

CAPITOLUL IV

<i>Colorații pentru țesuturile conjunctive (dr. L. Mogoantă)</i>	64
Colorația cu Hemalaun-Eozină (Hemalaun MAYER)	64
Colorația van Gieson	65
Colorația Mallory	66
Colorația tricromică Masson	67
Colorația tricromică Masson, modificată de Goldner	68
Colorația tricromică după metoda Goldner-Szeckeli	70
Colorația azan Heidenhain	71
Metoda de impregnație argentică Gömöri	73
Tehnica colorării cu orceină (Metoda Tanzer-Unna)	74
Metoda cu fuxină-paraldehidă (Gömöri)	75
Metoda cu rezorcin-fuxină (Weigert)	76
Metoda de colorare Gawlik (pentru fibrele de oxytalan)	77
Colorația cu albastru de toluidină (pentru mastocite)	78
Tehnici pentru evidențierea celulelor sistemului macrofagic	78
Metoda Cajal (Magenta Picro-Indigo Carmin)	79
Metoda cu roșu de Congo după Higmans (pentru amiloid)	80
Metoda de colorare cu Albastru de Prusia (pentru fier)	80

CAPITOLUL V

<i>Colorații speciale pentru mucopolizaharide (dr. L. Mogoantă, dr. D. Pirici)</i>	87
Colorația cu Acidul Periodic Schiff	87
Tehnica de colorare cu Acidul Periodic Schiff (PAS) și hematoxilină Mayer	89
Metoda de colorare cu Carmin Best	90
Metoda-CARDNO	91
Colorația cu Albastru Alcian	92
Colorația cu Albastru Alcian - metoda concentrației critice electrolitice	92
Metoda PAS-albastru alcian pH 2,5 sau 1,0	94
Colorația cu albastru de toluidină pH 0,5 sau 4-4,5	95
Colorația cu mucicarmulin MAYER	96
Metoda HALE cu fier coloidal	97
Metoda Mowry pentru evidențierea polizaharidelor	98
Metoda Horobin și Kevili cu fuxină bazică	98

CAPITOLUL VI

<i>Tehnici pentru evidențierea lipidelor (dr. L. Mogoantă)</i>	101
Metoda de colorare cu Sudan III sau cu Schanlach roth	102
Colorația cu Sudan IV	103
Colorația cu Sudan Black B	104
Colorația cu acid osmic	104
Colorația Lillie cu sulfatul albastru de Nil	105

CAPITOLUL VII

<i>Colorații pentru țesutul muscular scheletic (dr. L. Mogoantă)</i>	107
Metoda Heidenhain	107
Colorația Pasini	107
Colorația acid tanic- acid fosfomolibdenic-roșu de tiazină	108
Metoda de colorare cu soluția Giemsa tamponată	109
Metoda Heidenhain (azo-carmin-azan)	109
Metoda Heidenhain cu azocarmin, varianta Schleicher	110

CAPITOLUL VIII

<i>Metode pentru evidențierea celulelor endocrine și neuroendocrine (dr. L. Mogoantă, dr. Carmen Popescu)</i>	113
Metode histochimice fluorescente. Tehnica fluorescenței induse cu formaldehidă	113
Metode tinctoriale	114
- Metoda PAS-orange G	114
- Metoda OFG pentru hipofiza anterioară	115
- Metoda AB-OFG pentru adenohipofiză	116
- Colorația hematoxilină -floxină pentru adenohipofiză	117
- Metoda de colorare cu aldehyd-fuxină pentru adenohipofiză	118
Metode de impregnație argentică	119
- Metoda argentafină	119
- Metoda argirofilă	119
- Metoda cu nitrat de argint pentru celulele argirofile, celulele D (alfa-1) ale pancreasului endocrin	120
- Metoda de impregnație argentică Fontana - Masson	121
- Metoda Asojo	122
- Metoda Friedberg pentru evidențierea rapidă a granulelor aparatului juxtaglomerular	123
- Metoda Harado pentru evidențierea granulelor aparatului juxtaglomerular	123
- Metoda Heidenhain modificată de Gabe, pentru pancreasul endocrin	124
- Metoda Henle pentru evidențierea celulelor cromafine	124
- Metoda de colorare cu nitrat de argint Bielschowsky	125

CAPITOLUL IX

<i>Tehnici de colorare pentru țesutul nervos (dr. L. Mogoantă, dr. D. Pirici)</i>	127
Colorarea cu hematoxilină plumbică (tehnica Mac Conaill)	127
Metoda Woelcke (pentru colorarea mielinei)	128
Metoda de colorare cu nitrat de argint Bielschowsky	129
- varianta I	129
- varianta II	129
- varianta III	130
Colorația Cherveau și Merty pentru nervii periferi modificată de Kluver și Barrera	132

Metoda Palmgren pentru fibrele nervoase	132
Metoda Descin pentru butonii terminali	133
Metoda Donovick pentru țesutul nervos	134
Metoda Kluver și Barrera cu Luxol Fast Blue pentru colorarea mielinei	135
Colorarea cu Luxol Fast Blue, acidul Periodic Schiff și albastru de toluidină pentru evidențierea mielinei și celulelor gliale	136
Metoda Fischinger pentru evidențierea corpusculilor Nissl	137
Colorația cu galocianină pentru corpusculii Nissl	137
Colorația cu Cresyl violet pentru corpusculii Nissl	138
Metoda de colorare cu thionină pentru evidențierea corpusculilor Nissl	138
Colorația cu hematoxilină – acid fosforungstic pentru evidențierea mielinei	139
Colorația cu hematoxilină – acid fosforungstic pentru evidențierea nervoșilor din sistemul nervos central	140
Metoda Linder pentru nervi pe secțiuni la parafină	141
Tehnici pentru colorarea fibrelor nervoase degenerate	142
- Metoda Eager pentru axoni degenerați	142
- Metoda Weil pentru mielina degenerată	143
- Metoda de colorare hematoxilină – acid fosforungstic pentru evidențierea astrocitelor	143
- Metoda Cajal aur-sublimat pentru astrocite	144
- Metoda de colorare cu carbonat de argint pentru microglie	145
- Tehnica HIOLMES cu nitrat de argint – Luxol Fast Blue	146
- Tehnica BODIAN pentru fibre nervoase, neurofibrile și terminații nervoase	148
- Tehnica BODIAN (variante I și II)	149

PARTEA A II-A. TEHNICI DE CITOLOGIE

CAPITOLUL X	
<i>Citologia cervico-vaginală (dr. Carmen Popescu)</i>	155
Metodologie	157
Recoltarea de la nivelul altor zone anatomice genitale	160
Prelucrarea frotiurilor	163
CAPITOLUL XI	
<i>Tehnici de prelucrare a altor produse citologice în afara celor din sfera ginecologică (dr. Carmen Popescu)</i>	167
Prelucrarea revărsatelor pleurale, peritoneale și pericardice	167
Prelucrarea probelor obținute din tractul genito-urinar	171
Prelucrarea lichidului cefalorahidian	177
Prelucrarea probelor mucoide	178
Punctia aspirativă cu ac fin	181
Puncte fină aspirativă ecoghidată endoscopic (EUS-FNA)	185

CAPITOLUL XII

<i>Metode de colorare a frotiurilor (dr. Carmen Popescu)</i>	201
Metoda May – Grunwald – Giemsa	201
Metoda Papanicolaou	202
Metoda Diff-Quick	210
Colorații Supravitale	211
Erori de colorare și modalități de evitare a acestora	213
Metode de decolorare	214
CAPITOLUL XIII	
<i>Automatizarea și alte metode citologice moderne (dr. Carmen Popescu)</i>	219

CAPITOLUL XIV

<i>Asigurarea și îmbunătățirea calității în citologie (dr. Carmen Popescu)</i>	227
--	-----

PARTEA A III-A. IMUNOHISTOCHEMIE

CAPITOLUL XV

<i>Tehnici de imunohistochimie (dr. Claudiu Georgescu, dr. D. Pirici)</i>	233
Introducere	233
Anticorpi și antigene	233
Prelucrarea țesuturilor pentru imunohistochimie	249
- Specimene utilizate în imunohistochimie	249
- Fixarea țesuturilor și frotiurilor	252
- Demascarea antigenică	255
- Soluții tampon și de diluție	260
- Surse și metode de blocare a semnalelor nespecifice de fond	263
Detecția semnalului în imunohistochimie	267
- Detecția enzimatică	265
- Detecție fluorescentă	272
- Marcarea cu particule de aur	273
Tehnici de lucru	275
Detecția unui singur antigen	275
Detecția de antigene multiple pe aceeași secțiune	291
Controlul reacțiilor IHC	298
Probleme tehnice în IHC și modalitățile de rezolvare	299

CAPITOLUL XVI

<i>Tehnici pentru studiul apoptozei (dr. D. Pirici, dr. L. Mogoantă)</i>	309
Introducere	309
Semnificația apoptozei	309
Modificări ultrastructurale în apoptoză	310
Mecanismele moleculare ale căilor de semnalizare ale apoptozei	311
Tehnici și protocoale folosite pentru evidențierea apoptozei	314

CAPITOLUL XVII

<i>Tehnici speciale de imunohistochimie și biologie moleculară în patologia mamară</i> (dr. Carmen Popescu, dr. Claudia Georgescu).....	319
Hibridizarea in situ cu fluorescență (FISH).....	321
Hibridizarea in situ cu cromogen (CISH).....	326

CAPITOLUL XVIII

<i>Aplicațiile imunohistochimiei în diagnosticul histopatologic</i> (dr. Violeta Comănescu).....	341
Rolul imunohistochimiei în histogeneza și diagnostic.....	341
Tumorile maligne cu celule mici rotunde.....	344
Tumorile cu celule mari poligonale (epitelioide).....	346
Tumori maligne cu pattern fuziform.....	347
Tumori maligne cu pattern pleomorf.....	348
Tumori hematopoietice.....	349
Metastaze.....	354
Evaluarea unor markeri prognostici.....	355
Imunohistochimia în terapie.....	356
BIBLIOGRAFIE	359

INTRODUCERE

Progresele înregistrate în domeniul cunoașterii din ultimele decenii sunt de-a dreptul uluitoare. Aproape zilnic asistăm la noi descoperiri în diverse domenii.

Medicină modernă a urmat, în ultimul secol, același ritm accelerat de continuă acumulare de date, care i-au permis realizarea unor progrese evidente atât în plan diagnostic cât și terapeutic. Toate progresele realizate în domeniul medical au la bază ani de cercetări fundamentale, realizate în laboratoare dotate cu tehnică foarte performantă.

La ora actuală dezvoltarea cunoștințelor în domeniul medicinei au la bază investigațiile microscopice și de biologie moleculară care au atins performanțe extraordinare. Descifrarea genomului uman, a moleculelor unor receptori sau unor „transmițători”, a unor „lanțuri de semnălizare” au permis elaborarea unor noi metode terapeutice care au salvat viața a numeroși bolnavi.

Histologia și histopatologia au făcut progrese evidente în ultimele două decenii. Îmbunătățirea metodelor „clasice” de prelucrare și prelevare a materialului biologic, perfecționarea tehnicilor de examinare, introducerea tehnicilor de imunohistochimie și de diagnostic molecular, au reprezentat un salt calitativ extraordinar care a permis descoperirea de noi celule, caracterizarea lor morfofuncțională, îmbunătățirea calității diagnosticului histopatologic și chiar formularea unor ipoteze predictive cu privire la evoluția unor leziuni.

Pe lângă aspectele clasice de anatomie microscopică, histologia și histopatologia operează astăzi cu date de biologie celulară și moleculară, de fiziologie și biochimie. Examinările de-microscopie optică atât pentru cercetare cât și pentru diagnostic, trebuie uneori completate cu studii de microscopie electronică, citochimie, imunohistochimie, imunofluorescență, hibridizare *in situ*, etc. Pornind de la aceste considerente, autorii, în manualul de față și-au propus să prezinte unele aspecte practice de lucru, subliniind evoluția dinamică a tehnicilor de histologie, imunohistochimie și hibridizare *in situ*, așa cum sunt ele utilizate în centrele cu tradiție în aceste domenii.

Cartea se adresează tuturor celor care lucrează în domeniul morfologiei microscopice, atât în domeniul cercetării cât și al diagnosticului histopatologic.

Interesul medicilor de specialitate pentru prima ediție a „Ghidului de tehnici de histologie, citologie și imunohistochimie” ne-a confirmat faptul că este o carte necesară în practica medicală curentă.

Mulțumim tuturor celor care au sprijinit și încurajat apariția acestei lucrări și în primul rând Autorității Naționale pentru Cercetare Științifică.

PARTEA I
TEHNICI DE HISTOLOGIE



CAPITOLUL I

SUBSTANȚELE TOXICE ȘI PERICULOASE UTILIZATE ÎN LABORATOARELE DE HISTOLOGIE ȘI HISTOPATOLOGIE

În laboratoarele de anatomie patologică, de histologie și de medicină legală sunt utilizate numeroase substanțe care periclitează starea de sănătate și implicit viața celor care le utilizează.

Fiecare persoană care lucrează într-un laborator de cercetare și diagnostic trebuie să fie conștientă că multe din substanțele folosite zilnic sunt periculoase: unele sunt inflamabile, altele explozive sau altele toxice generale sau locale (iritante pentru piele și mucoase). Toate persoanele care mănâncă aceste materiale sau vin în contact direct sau indirect cu acestea (medici, laboranți, tehnicieni, îngrijitori, magazioneri) sunt expuși riscului de a se îmbolnăvi. De aceea, cunoașterea modului de utilizare, păstrare, depozitare sau de realizare a unor soluții sau a unor combinații chimice, precum și a modului de apariție și de prevenire a îmbolnăvirilor este obligatorie pentru categoriile de personal amintite mai sus. Responsabilități sporite revin medicilor șefi de departamente sau de laboratoare care, în cadrul sarcinilor de serviciu, au și obligația de a instrui personalul din subordine (laboranți, tehnicieni, personal de îngrijire) în direcția prevenirii accidentelor de la locul de muncă.

Efectele unor substanțe chimice, utilizate de multă vreme în laboratoarele de microscopie, sunt în cea mai mare parte cunoscute. Apariția unor tehnici noi de studiu microscopic (histoenzimologia, imunohistochimie, hibridizarea "in situ", etc.) a dus la utilizarea de noi substanțe anorganice sau organice (substanțe fluorescente, seruri, anticorpi enzimice, etc.) al căror impact asupra stării de sănătate nu este suficient cunoscut.

De aceea, în cele ce urmează, prezentăm câteva din substanțele cu efecte nocive asupra sănătății.

I. FIXATORII

Formaldehida sau aldehida formică este un gaz cu miros înțepător, perceptibil la concentrații foarte mici. În medicină este utilizată ca dezinfectant al încăperilor și ca fixator al structurilor biologice în laboratoarele de anatomie, morfopatologie, histologie, medicină legală, biologie, etc. (în soluție apoasă, în concentrații variabile de la 2% la 40%). Aldehida formică, cunoscută sub

denunțarea comercială de formol, este cel mai utilizat fixator în laboratoarele din întreaga lume.

Formolul determină atât leziuni locale cât și sistemice. Este iritant local pentru piele (în contact cu pielea determină întărirea acesteia), mucoasa căilor respiratorii și ochi. Expunerile cronice determină întărirea pielii prin modificări ale epidermului și dermului, fisuri și chiar ulcerații. La nivelul aparatului respirator formaldehida este captată de mucusul căilor respiratorii și determină laringite, bronșite sau pneumonia. Expunerea cronică poate duce la fibroză pulmonară.

Expunerea la concentrații mari poate provoca moarte subită prin edem și spasm glotic. Ingestia accidentală de formol determină leziuni ale mucoaselor bucale, esofagiene și gastrice, de la o iritație simplă până la necroza acestora.

Acțiunea toxică sistemică se exercită asupra sistemului nervos central, determinând apariția depresiei, iar la nivelul ficatului, rinichului sau inimii produce leziuni degenerative.

Ultimele cercetări indică capacitatea acesteia de a determina sau favoriza apariția cancerelor.

Glutaraldehida este o substanță puternic iritantă pentru piele și ochi; ingestia accidentală determină intoxicații grave.

Fenolul, numit și acid fenic, se prezintă ca o masă cristalină, albă sau sub formă de cristale higroscopice, translucide. În condiții de laborator, depozitat în vase deschise, emite vapori care sunt iritanți pentru ochi și mucoasa respiratorie. În contact prelungit cu pielea determină arsuri tegumentare, dermatite, necroza tegumentului și chiar tulburări digestive, renale sau hepatice datorită faptului că se absoarbe cu ușurință pe toate căile: transcutanat, gastrointestinal și pulmonar.

Soluțiile de fenol 10% determină constant leziuni corozive după expuneri de scurtă durată, iar soluția de 1% poate provoca necroza pielii, dacă nu este îndepărtată imediat.

Ingestia accidentală de soluții de fenol determină zone de necroză la nivelul buzelor, mucoaselor bucală, esofagiană și gastrică.

Aspirarea de fenol poate provoca edem laringian și chiar edem pulmonar.

Principalele efecte toxice ale fenolului sunt cele sistemice. Ele apar atât în intoxicații acute cât și la expunerii cronice, prelungite.

Persoanele intoxicate pot prezenta:

- depresie severă până la comă,
- hipotensiune arterială până la șoc;
- bradicardie severă;
- stop respirator;
- insuficiență renală cronică prin necroză tubulară.

Acidul picric este utilizat în laboratoarele de anatomie patologică și histologie ca fixator. El se găsește sub formă de cristale care conțin 10% apă (arată asemănător nisipului umed).

Acidul picric este un exploziv mai puternic decât trinitrotoluenul și de aceea este finit în mediu umed. Sărurile de acid picric (picrați) sunt mult mai explozivi și mult mai sensibili la șocuri mecanice sau la temperaturi ridicate. De aceea acidul picric trebuie finit la distanță de foc sau de contactul cu metalele grele. Acidul picric trebuie păstrat în cartușe rezistente la ardere și în anti-

detonatoare. În condiții de șoc mecanic explodează (deci: Nu scăpați din mână sticla în care este depozitat acidul picric!).

În formă umedă reactivul este mai puțin exploziv. Dacă apa se evapora după ce conținutul a fost deschis și cristalele de acid picric arată uscate, adaugă apă distilată picătură cu picătură până când cristalele arată din nou asemenea nisipului umed. Nu se utilizează niciodată cristalele de acid picric lăuate surse de foc.

Acidul picric este utilizat ca fixator sub formă de soluții apoase-saturate. Acestea pot fi păstrate îndelungat. Soluțiile apoase saturate se obțin turnând 1 litru de apă distilată fierbinte peste 15 g acid picric. Se lasă să se răcească, timp în care pe fundul vasului apar cristale arciforme, galbene de acid picric.

Acidul picric poate fi absorbit prin piele. Efectele sunt locale și manifestă prin apariția unor dermatite de contact, dar și sistemice (după expunere prelungită) manifestându-se prin dureri de cap, vărsături și diaree. Ingestia de acid picric determină apariția unei colorații galben-deschis a tegumentelor și sclerei ceea ce pretează la confuzii cu icterul din hepatite.

Bicromatul de potasiu este utilizat în diverse amestecuri fixatoare. El este iritant al ochilor și al mucoasei arborelui respirator. După un contact prelungit pielea determină leziuni locale și afectarea secundară a ficatului și rinichilor. Este **carcinogenic** și reacționează prin explozie în contact cu hidroxilamina.

II. SOLVENȚII

Benzenul și omologii acestuia (toluenul, xilenu, etilbenzenul, propilbenzenul, izopropilbenzenul și stirenul) sunt hidrocarburi aromatice. Benzenul este un lichid incolor, volatil, cu miros specific, solubil în solvenți organici, utilizat în laboratoarele de anatomie patologică în calitate de solvent parafinei sau ca mediu de clarificare.

Benzenul se absoarbe pe cale pulmonară, digestivă și transcutană. Intoxicațiile apar accidental prin pătrunderea unor cantități mari de vapori de benzen pe cale inhalatorie; calea digestivă și transcutanată sunt de importanță minoră. Pătruns în mediul intern, benzenul se fixează pe lipoproteine și este transportat spre organele bogate în lipide: măduvă osoasă, țesut adipos, ficat, țesut nervos.

Efectele toxice ale benzenului sunt datorate acțiunii directe a toxicului și acțiunii metabolizării lui. Local determină iritații la nivelul pielii, mucoaselor conjunctivei. În cazul expunerii cronice provoacă amețeli, dureri de cap, pierdere a cunoștinței, și chiar leziuni tisulare și boli ale sistemului hematopoietic. Bolile sângelui sunt datorate reducerii capacității de proliferare, regenerare și mananță a măduvei hematogene, prin **leziuni cromozomiale și afectarea diviziunii celulei**. Benzenul poate acționa simultan asupra tuturor sriilor hematopoietice determinând anemie microcitară, trombocitopenie și în final leucopenie.

Este **carcinogenic** prin efect direct, determinând anomalii cromozomiale și inhibiția sintezei nucleoproteinelor, și indirect prin reducerea cantitativă a celulelor implicate în sistemul imunitar al organismului (leucocitelor). **Anomalii cromozomiale care apar prin expunere la benzen sunt foarte asemănătoare cele obținute prin iradiere.**

În intoxicații acute afectează și sistemul nervos central, inducând manifestări diverse (amețeli, cefalee, grețuri, palpitații, transpirații, stare ebrioasă) până la narcoză și convulsii.

Este foarte inflamabil; poate exploda ușor în combinație cu unele substanțe oxidante.

Toluenul sau metil-benzenul este utilizat, ca și benzenul, în calitate de solvent și agent clarificator. Este un lichid incolor cu miros asemănător cu cel al benzenului, insolubil în apă, solubil în alcool, eter etilic sau benzen.

Toluenul se absoarbe pe cale respiratorie și mai puțin pe cale cutanată. Toxicitatea toluenului este mai mare decât a benzenului. Între concentrația acestuia din aer și concentrația din sânge există, la om, o corelație aproape liniară.

În contact prelungit cu pielea provoacă iritații locale, degresarea pielii, apariția de fisuri și infecții locale secundare. Vaporii de toluen în contact cu mucoasele determină fenomene congestive și iritarea acestora (chiar la nivelul conjunctivei, mucoasei nazale, faringiene sau traheobronșice). Inhalarea provoacă amețeli, greață, somolență, confuzii, stare de slăbiciune, mers ebrios, parestezii, tulburări de coordonare neuro-motorie și chiar comă. Ca și benzenul determină boli de sânge, dar este mai puțin agresiv asupra măduvei hematogene decât benzenul. Este foarte inflamabil.

☞ Xilenul numit și xilol sau dimetil-benzen este utilizat ca solvent și agent de clarificare. Este un lichid incolor, transparent, insolubil în apă, solubil în solvenți organici.

Xilenul pătrunde în organism pe cale respiratorie și transcutanată.

Toxicitatea xilenului este asemănătoare cu a benzenului. Irită ochii și mucoasele, în special mucoasa respiratorie, iar după expuneri prelungite determină dermatite chimice. Inhalarea sau absorbția cutanată pot provoca amețeli, dureri de cap, tremurături, dispnee, greață, vomă, oboseală accentuată și chiar comă. În caz de expunere prelungită pot apare fenomene de insuficiență hepatică, insuficiență renală, tulburări nervoase, cardiovasculare, anemie cu leucopenie. Este foarte inflamabil.

Eterul este utilizat ca solvent și anestezic. În concentrații mari produce amețeli, dureri de cap, pierderea cunoștinței; efectele cronice duc la scăderea apetitului, fătăgabilitate, greață. Este foarte inflamabil și, expus la aer sau lumină, formează peroxizi explozivi. Fiind foarte exploziv, eterul trebuie mănuit cu mare atenție. O concentrație mai mare de 1% eter în aer este suficientă pentru producerea unor incendii sau a unor explozii. Deci într-o încăpere în care este folosit eterul nu pot fi utilizate țigările aprinse, focul, becul de gaz sau recipientele fierbinți. Eterul trebuie stocat într-un loc răcoros sau într-un refrigerat rezistent la explozii.

Este iritant pentru mucoase și piele.

Metanolul, utilizat ca solvent și fixator, este un lichid incolor, volatil, inflamabil, cu miros asemănător alcoolului etilic. Este miscibil cu apa și cu solvenții organici. Alcoolul metilic pătrunde în organism pe cale cutanată, respiratorie sau digestivă. Cea mai frecventă și cea mai periculoasă cale de intoxicație este cea digestivă (accidentală sau voluntară) deoarece se confundă cu alcoolul etilic.

După absorbție alcoolul metilic se răspândește în toate țesuturile datorită hidrosolubilității sale, acumulându-se în concentrații mai mari în rinichi, tractul digestiv, țesutul nervos și țesutul adipos.

El este metabolizat la nivelul ficatului de alcooldehidrogenază rezultând aldehida formică și acidul formic, metaboliți răspunzători de efectele toxice ale metanolului. Toxicitatea alcoolului metilic este atribuită acidozei severe provocată de acidul formic și în mai puțină măsură formaldehidei.

Este un toxic cu efecte întârziate. Leziunile inițiale apar la nivel cerebral sub formă de edem, apoi sub formă de leziuni cu caracter inflamator și în final leziuni atrofice. În unele zone cerebrale (putamen) au fost remarcate și leziuni necrotice.

Cele mai intense leziuni apar la nivelul **celulelor ganglionare (neuronilor multipolari din retina)** unde, după o fază de edem și congestie se instalează leziuni degenerative, cu atrofie optică bilaterală, definitivă.

În afara leziunilor nervoase pot apare leziuni degenerative la nivelul ficatului, rinichiului, miocardului și plămânului.

Intoxicațiile acute pot determina pierderea cunoștinței și chiar moarte:

Intoxicațiile acute apar la cantități mici de metanol 30-50 ml, bolnavul prezentând cefalee, amețeli, vărsături, epigastralgie, agitație, delir, convulsii și comă profundă. Ulterior se instalează insuficiența cardio-respiratorie cu evoluție imprevizibilă.

☞ **Acetona** este utilizată ca solvent și deshidratant. Pătrunde în organism pe cale respiratorie sau prin alte mucoase. În caz de expunere prelungită afectează puternic ochii; pătrunsă pe cale inhalatorie determină amețeli, narcoză și comă. Este foarte inflamabilă și reacționează violent cu clorofornul.

☞ **Piridina** este utilizată în calitate de solvent dar și colorant argentic. Expunerea la doze mari determină iritații ale tegumentului și mucoaselor, cauzează apariția de conjunctivite, dermatite, cefalee, greață, amețeli, vomă. Este puternic inflamabilă.

III. Metalele, acizii și sărurile lor

Acidul acetic glacial - are o puternică acțiune corozivă locală. În contact cu pielea produce inițial entem, apoi vezicule (arsuri chimice). Ingestia de acid acetic concentrat produce leziuni ulcero-necrotice severe ale tractului digestiv. Secundar determină hemoliză și leziuni renale.

Expunerea cronică determină edeme palpebrale, hipertrofia ganglionilor limfatici, fărângită cronică, bronșită catarală și leziuni ale dinților. Reacționează puternic cu acidul nitric, acidul cromic, cu hidroxidul de sodiu și potasiu.

Acidul cromic este utilizat ca fixator în amestecuri fixatoare sau în calitate de colorant al celulelor cromafine. Acidul cromic este foarte iritant; expunerea cronică poate da ulcerări ale tegumentelor și mucoaselor. Este **carcinogenic**. În amestec cu acidul acetic poate exploda. Poate aprinde acetona, glicerolul, metanolul, butanolul, etanolul și piridina.

Acetatul de plumb (utilizat ca fixator sau colorant) determină intoxicații cronice deoarece se acumulează în organism. Simptomatologia este nespecifică și

asemănătoare intoxicației cu Pb: pierderea apetitului, vomă, diaree, colaps, leziuni ale sistemului nervos. *Este carcinogenetic.*

Mercurul (utilizat sub formă de săruri, ca fixator sau colorant) formează vapori toxici care duc la apariția gustului metalic, dezorientare, vomă, cefalee, dureri abdominale. Expunerea cronică determină pierderea dinților, salivăție excesivă, dermatite, leziuni ale rinichului, tulburări nervoase severe.

Permanganatul de potasiu (fixator și colorant) determină arsuri tegumentare după contacte repetate cu pielea sau la concentrații mari (concentrații mai mari de 1:1000). Devine exploziv în combinație cu acidul acetic diluat și anhidru, acidul clorhidric sau sulfuric. Provoacă incendii în combinație cu glicerol și permanganat de potasiu solid.

Nitratul de argint (utilizat în calitate de colorant și antiseptic) după contacte repetate irită ochii, provoacă pigmentarea pielii sau arsuri. Poate exploda în combinație cu etanolul sau cărbunele (mangal).

Acetatul de uraniu (colorant). Inhalarea de acetat de uraniu irită plămâni și poate determina acumularea de uraniu în rinichi, producând leziuni ireversibile. *Este radioactiv.*

IV. Coloranții

Anilina reprezintă principalul aminoderivat al benzenului. Este un lichid incolor, puțin solubil în apă, solubil în alcool și eter, intens volatil, utilizat la fabricarea coloranților. Anilina se absoarbe prin piele, pe cale respiratorie și digestivă. Anilina determină methemoglobinemie, anemie hemolitică, oligurie, insuficiență renală, insuficiență respiratorie și cardiacă. În intoxicații acute poate determina alterarea rapidă a stării de sănătate ducând la convulsii și comă.

Coloranții acridinici (acridin orange, acriflavin hidroclorid) sunt mutageni și suspecți ca fiind agenți cancerigeni.

Auramina 0. Este cunoscut ca agent cancerigen.

V. Agenți Explozivi

Benzen, eter, glicerol, metanol, acidul picric, nitratul de argint.

Sunt substanțe care se aprind ușor și explodează.

Nitroceluloza este puternic explozivă în stare uscată.

Glicerolul (solvent, agent de închidere, mediu de montare) reacționează violent, exploziv, cu agenți oxidanți.

Acidul percloric (utilizat în extracția acizilor nucleici). Asemănător tuturor acizilor poate să ardă și să corodeze. Potențialul său exploziv apare la concentrații mari, de peste 70%. Agitarea (împărșierea) sa mărește concentrația acestuia în mediul inconjurător și trebuie evitată. Reacționează violent cu acidul acetic, alcoolii, formaldehida, agenții de deshidratare, carbon, eter, glicoli și eterii lor, ioduri.

VI. Alte Substanțe periculoase

Diaminobenzidina (colorația peroxidazei). *Este cancerigenă.* Reactivi alternativi pot fi benzidina dilucloridică, tetrametoxibenzidina, parafenilendiamina.

Hidrogenul peroxid (perhidrolul, apa oxigenată 10-30%) este foarte periculos deoarece în caz de lovire, șoc sau contaminare, materialul concentrat poate exploda sau poate produce incendii.

Acizii tari (hidrocloric, sulfuric, nitric, acid acetic glacial). Acești acizi trebuie stocați întotdeauna în carușe sub nivelul ochiului, pentru că dacă sticla cu reactiv alunecă din mână și acidul se împrăștie să nu cauzeze orbirea celui care lucrează. Sticlele mari trebuie depozitate la nivelul podelei, preferabil în ambalajele originale. *Nu se adaugă niciodată apă peste acizii tari*; rezultatul poate fi dezastruos. Dacă trebuie preparată o soluție diluată de acid, se adaugă încet acid peste apă; asemenea mixturi pot deveni foarte fierbinți și trebuie tratate cu atenție. *Nu agitați niciodată acizii tari.* De exemplu, dacă este agitat acidul clorhidric se produc puternici vapori de clorină care corodează țesuturile, în special plămânul, cauzând edem pulmonar acut mortal. În caz de accidente se recomandă să nu se respire și să se deplaseze persoanele afectate într-o zonă curată.

VII. Agenții infectanți (conservați în țesuturile umane)

Un virus care produce boala Creutzfeldt-Jakob supraviețuiește în țesutul nervos uman (creier) timp de 7 luni, în 10% formol salin. De asemenea rezistă la vapori de formaldehidă și alcoolul de 70%. Virusul produce degenerarea progresivă a neuronilor sistemului nervos central, putând merge până la deces.

Un virus similar, Scrapie, poate să supraviețuiască în fenol 2% și se poate transmite prin fisuri ale tegumentului.

Agenții infectanți, în special virali, pot să fie transmiși prin seruri de la animale (ser de capră, porc, cal, utilizate în imunohistochimie) și să contamineze persoanele din laboratoare în lipsa măsurilor de protecție adecvate.

☛ MĂSURI ȘI NORME DE PROTECȚIE

Laboratoarele care dețin reactivi deosebit de toxici sau periculoși (mercur, clorură de mercur, oxid de mercur, fericianură de potasiu, acid picric etc.) trebuie să fie autorizate de Poliție (Serviciul arme, droguri, substanțe toxice și muniții), de Centrul de Medicină Preventivă și Poliție Sănătăre și de Inspectoratele teritoriale de Protecția Muncii, iar persoanele care le utilizează, în special laboranții, trebuie să-și facă periodic fișă de sănătate cu control psihiatric, să fie instruiți permanent în acest sens.

Substanțele deosebit de periculoase se păstrează în dulapuri închise sub cheie și strictă supraveghere cantitativă și calitativă.

Toți reactivii periculoși se depozitează în rafturi, cât mai aproape de podca, sub nivelul ochiului, pentru ca în caz de accidente să fie protejați cel puțin ochii și fața. Chimicalele se pot vărsa chiar în deposit și pot produce leziuni dezastruase.

Nu se va fuma niciodată în zonele unde se găsește acid picric, alcool, xilen, benzen sau eter. De aceea ele trebuie ținute depozitate într-o cameră separată, departe de sursele de foc.

La echipamentele cu termostate se verifică zilnic temperatura pentru că termostatele defecte pot duce la supraîncălzirea preparatelor, distrugerea țesuturilor și chiar pot să ia foc; parafina arsă va fi îndepărtată după decuplarea aparatului de la rețeaua electrică;

Alte măsuri de protecție:

- dacă în laborator miroase a gaz, nu se aprinde sau stinge lumina, nu se folosește nici o sursă de foc pentru că orice scănteie poate duce la apariția unei explozii.
- se deschid ferestrele dacă s-au vărsat chimicale inflamabile, explozibile sau alte chimicale.
- dacă pe piele s-au vărsat acizi, substanțe alcaline, peroxid de hidrogen sau alte chimicale, se spală rapid zona cu apă din abundență.
- se vor purta întotdeauna halate, mănuși din plastic, încălțăminte adecvată pentru a proteja țăesuturile de o posibilă contaminare.

CAPITOLUL II

PREPARATUL HISTOLOGIC

I. Recoltarea și prelevarea materialului biologic

Materialele biologice prelucrate și studiate în laboratoarele de histologie, histopatologie și biologice sunt reprezentate de fragmente de țesuturi, fragmente de organe, organe întregi sau diverse lichide biologice. Ele sunt recoltate atât de la animal, cu ocazia unor studii experimentale cât și de la om, fie cu ocazia unor intervenții chirurgicale, fie la necropsie.

Pentru evidențierea unor structuri microscopice, pentru realizarea unor preparate histologice de bună calitate, este necesar ca recoltarea să se facă cât mai curând după sacrificarea animalului de experiență sau cât mai curând după scoaterea țesutului sau fragmentului de organ din organism (în cazul intervențiilor chirurgicale) sau cât mai curând după instalarea morții biologice, pentru a reduce cât mai mult alterările structurale postmortem. Trebuie ținut cont că structura unor organe (glandele suprarenale, mucoasa gastrică, mucoasa intestinală) se alterează rapid mai ales dacă temperatura mediului ambiant este crescută. În acest sens se recomandă depozitarea cadavrelor, după instalarea morții biologice, în lăzi frigorifice adecvate care să reducă procesele de citoliză postmortem.

Recoltarea pieselor histologice trebuie făcută cu atenție deosebită. Se recomandă folosirea unor instrumente adecvate, deoarece tracțiunile brutale, compresivă sau sfâșierea cu instrumente neadecvate vor modifica histoarhitectura organelor sau țesuturilor, făcând uneori imposibil diagnosticul histopatologic.

De cele mai multe ori la laboratoarele de anatomie patologică sunt trimise diverse piese histopatologice recoltate de medici, laboranți sau tehnicieni care nu au pregătirea necesară unei astfel de operații, piese care pot sau nu să conțină leziunea pentru care este consultat medicul anatomopatolog. În aceste situații diagnosticul este îngreunat, mai ales pe piesele histologice de mici dimensiuni, când fragmentul recoltat conține alte țesuturi și nu leziunea pentru care se solicită un diagnostic anatomopatologic.

În spitale, majoritatea pieselor de histopatologie sunt recoltate din sălile de operație. Pentru elaborarea unui diagnostic anatomopatologic cât mai corect este necesară o colaborare strânsă între medicul curant și medicul anatomopatolog; anatomopatologul trebuie să vadă nu numai aspectul microscopic al leziunii ci și aspectul macroscopic al acesteia, raporturile cu alte organe și țesuturi, datele clinice și paraclinice consemnate în foaia de observație. Toate aceste date, absolut necesare, îi orientează diagnosticul microscopic.

Piesele recoltate din sălile de chirurgie pot avea dimensiuni foarte mari sau foarte mici. De aceea medicul anatomopatolog trebuie să execute o prelevare cu mare atenție a materialului biologic din piesa trimisă, deoarece poate rata diagnosticul histologic dacă nu identifică cu exactitate leziunea sau zona de interes histopatologic.

Recoltarea pieselor histopatologice în timpul necropsiei prezintă avantajul că pennite medicului anatomopatolog să observe întinderea leziunii, aspectul microscopic, relațiile cu organele învecinate, leziunile diseminatate la distanță etc. și-i permit acestuia elaborarea unui diagnostic histopatologic complet și corect.

Prelevarea materialului biologic se execută în laboratoarele de histologie sau anatomie patologică. Prelevarea este o etapă esențială pentru studiul histologic și histopatologic.

După P. Masson, "prelevarea pieselor este cu siguranță actul cel mai delicat al tehnicii. Ea cere celui care o efectuează o îndemănare deosebită, cunoștințe multiple, prudență și fler".

Prelevarea în laboratoarele de histologie sau histopatologie trebuie să se facă pe o placă de lemn moale (brad) sau chiar plută, fixată într-un suport etanș (poate fi o tavă din plastic sau metal) unde se pot colecta lichidele fixatoare sau produsele lichidiene patologice.

Pentru o bună prelevare histologică sau histopatologică are nevoie de:

- lumină adecvată, naturală sau artificială,
- ventilație adecvată,
- apă curată,
- recipiente de mărimi diferite cu fixatori diverși;
- balanță cu afișaj electronic;
- lupă montată la placa de prelevare;
- microscop raversat (pentru piesele histologice foarte mici) cu obiective de 2,5; 4; 6; și 10X;
- riglă gradată transparentă din material plastic;
- sondă butonată, pense anatomice și chirurgicale, cuțite de disecție cu lamă lungă, bisturie, lame de ras, etc. (toate din material inoxidabil).

Prelevarea materialului biologic pentru studiu microscopic va fi precedată de un studiu microscopic al piesei recoltate, care se va consemna în buletinul anatomo-patologic. Se vor menționa dimensiunile piesei, greutatea, aspectul microscopic, prezența și aspectul leziunilor macroscopice, întinderea acestora, rapoartele cu alte structuri sau organe, etc.

Prelevarea trebuie să țină cont de:

- orientarea secțiunilor histologice;
- grosimea și suprafețele secțiunilor;
- prezența și întinderea leziunii;
- menținerea raporturilor anatomice și histologice cât mai aproape de starea "in vivo".

În timpul prelevării materialului biologic se va ține cont de incidența secțiunilor care se vor executa la microtom. Prin organele parenchimatose se vor realiza secțiuni plane, paralele între ele sau perpendiculare, cu grosimea de 3-5 mm; aceste suprafețe de secțiune vor servi la orientarea piesei în momentul

includerii în blocul de parafină. Deci orientarea planului de secțiune la microtom se va stabili chiar din momentul prelevării. Pentru organele cavitare, tubulare (tub digestiv, vase de sânge de calibru mare, arbore traheobronșic) secțiunile vor fi perpendiculare pe lumenul organului, astfel încât secțiunile la microtom să cuprindă peretele organului în întregime (de la mucoasă la seroasa peritoneală pentru stomac, intestin, apendice; de la tunică internă la adventice pentru vase etc.). Pentru scoarța cerebrală, scoarța cerebeloasă planul de secțiune va fi perpendicular pe suprafața externă pentru ca secțiunile histologice să permită vizualizarea completă a arhitecturii acestor organe. Pentru mușchi, miocard etc. se pot realiza atât secțiuni longitudinale cât și transversale.

În cazul unor organe parenchimatose cu o consistență foarte redusă (timus, encefal) este foarte greu de a realiza secțiuni cu o anumită incidență fără a le traumatiza. De aceea se recomandă introducerea întregului organ în soluția fixatoare (de obicei formol 10-20%), în vase adecvate ca mărime, timp de 2 până la 24 de ore, timp în care consistența acestora crește iar secțiunile se pot realiza mai ușor.

Grosimea secțiunilor realizate în timpul prelevării variază de la un organ la altul, dar este indicat ca toate piesele prelevate să aibă o grosime sub 5 mm deoarece peste această valoare fixarea materialului histologic se va face cu dificultate, în centrul piesei rămânând zone nefixate care se prețază la multiple artefacte. Suprafața piesei nu împiedică o bună fixare, dar o piesă cu suprafață prea mare se va secționa greu la microtom și se va etala cu dificultate pe lama port-obiect. De aceea se recomandă ca suprafața pieselor histologice să nu depășească 4-5 cm².

În cazul prelevării de piese pentru uz didactic sau pentru studii de morfologie cantitativă trebuie evitate pe cât este posibil modificările de formă sau retracția lor indusă de fixator. Aceste piese vor fi fixate mecanic pe un dop de plută cu ajutorul unor ace de sticlă și abia apoi vor fi introduse în soluția fixatoare.

Retracția mușchilor, tendoanelor sau nervilor poate fi prevenită prin legarea capetelor lor pe o baghetă de sticlă și apoi introduse în fixator. Piesele recoltate de la nivelul tubului digestiv vor fi spălate cu ser fiziologic cald, imobilizate pe fragmente de plută și apoi supuse fixării.

În cazul prezenței în structura piesei recoltate a unor leziuni macroscopice se recomandă ca prelevarea să se facă în așa fel încât piesele prelevate să cuprindă leziunea în întregime sau o parte cât mai mare din ea. De asemenea, este recomandat ca piesele prelevate să cuprindă și o parte din țesuturile normale, vecine cu leziunea pentru a putea studia extinderea microscopică a leziunii sau reacția țesuturilor din jurul leziunii.

Piesa prelevată va purta un număr (scris cu creionul pe o bucată de hârtie, corespunzător cu numărul din registrul de evidență. În registrul de evidență trebuie să se descrie locul de unde a fost prelevată piesa histologică (regiunea anatomică) mărimea, grosimea, planul de secțiune față de axele anatomice ale organului etc. Toate acestea vor fi utile în stabilirea unui diagnostic corect histopatologic și vor evita erorile și confuziile.

II. Fixarea materialului biologic este o altă operație esențială în realizarea unor preparate histologice de bună calitate.

Ea are ca obiective:

- oprirea proceselor vitale din celule și țesuturi într-o anumită etapă biologică, atunci când se lucrează pe culturi de celule, culturi de țesuturi sau experimental pe animale;
- împiedicarea alterării structurilor celulare și tisulare scoase din organism prin prevenirea fenomenelor de autoliză;
- prevenirea alterărilor structurale ca urmare a unui atac bacterian;
- pregătirea celulelor și țesuturilor pentru o colorare adecvată.

Un bun fixator trebuie să îndeplinească mai multe condiții:

- să păstreze cât mai aproape de starea "in vivo" structurile țesuturilor biologice ce urmează a fi fixate, să nu altereze raporturile dintre diversele componente tisulare, deci să nu producă artefacte;
- să ofere o anumită consistență materialului biologic, necesară secționării și prelucrării în continuare;
- să aibă o mare putere de pătrundere în materialul biologic recoltat;
- să nu fie toxic pentru cei care-l utilizează;
- să permită evidențierea structurilor histologice prin tehnica de colorare doniță;
- să fie în cantitate suficientă (volumul său să depășească de 10-20 de ori volumul piesei de fixat).

Fixarea trebuie efectuată cât mai repede după recoltare, dacă recoltarea s-a făcut în urma unui act chirurgical, sau cât mai repede cu putință de la decesul persoanei dacă recoltarea are loc în timpul necropsiei, deoarece anoxia poate duce la alterări celulare prin activarea enzimelor lizozomale.

Ideal ar fi ca țesuturile recoltate în stare de "in vivo" să fie imediat și omogen fixate, mai ales atunci când se efectuează studii de histoenzimologie, imunohistochimie sau de microscopie electronică. Acest lucru este aproape irealizabil, deoarece celulele și structurile din centrul piesei vor fi supuse operației de fixare mult mai târziu decât cele de la periferia piesei, oricât de repede ar pătrunde fixatorul în țesuturi. Se poate spune că fixarea va fi neomogenă.

Celulele din centrul piesei vor trăi o perioadă de timp în hipoxie și apoi în anoxie înainte de a fi penetrat de fixator. În acest interval de timp pot apare modificări ale enzimelor sau organelor celulare. După 10 minute de anoxie apar modificări mitocondriale vizibile la microscopul electronic, iar după o oră enzimele implicate în fosforilarea oxidativă sunt distruse în cea mai mare parte. Aceste modificări enzimactice și ultrastructurale sunt mai intense dacă materialul biologic este păstrat la temperatura camerei decât dacă este păstrat la frigider.

Materialul biologic recoltat în timpul necropsiei prezintă și mai multe dezavantaje. De obicei cadavrul este ținut mai mult timp la temperatura camerei, iar necropsia nu se efectuează decât după 24 de ore de la instalarea morții biologice. În acest interval de timp, mai ales dacă temperatura mediului ambiant este ridicată, iar morma nu dispune de camere frigorifice, apar multiple artefacte.

De aceea se recomandă ca piesele supuse fixării să aibă o grosime de câțiva mm (maxim 3-4 mm) pentru tehnicile de microscopie optică și de maximum

1 mm pentru cele de microscopie electronică. În plus, piesele pentru microscopie electronică vor fi fixate imediat după recoltare la temperatura de 4°C pentru a diminua modificările produse de anoxie asupra organelor celulare. Dacă recoltarea se face de la cadavre se indică folosirea unei tehnici de puncție biopsie pentru recoltarea unor țesuturi (ficat, rinichi, splină, măduvă osoasă roșie) cât mai curând după moartea pacientului, tocmai pentru a prevenii apariția unor artefacte induse de anoxia prelungită.

Dezvoltarea tehnicilor de microscopie optică, histoenzimologie, histochimie, imunohistochimie și microscopie electronică, a dus la apariția a numeroase substanțe fixatoare care să permită vizualizarea structurilor tisulare, celulare, intracelulare sau moleculare.

În ceea ce privește fixatorii trebuie notat că toate substanțele fixatoare simple prezintă atât avantaje cât și dezavantaje. De aceea s-a încercat realizarea unor anestecuri fixatoare prin care dezavantajele unui fixator să fie înlăturate prin adăugarea altuia. Cu toate aceste eforturi, deși au trecut mai bine de 150 de ani de la utilizarea fixatorilor în studiul histologic și histopatologic, nici la ora actuală nu există un fixator ideal. De aceea, în cele ce urmează, încercăm să prezentăm principalii fixatori cu avantajele, dezavantajele, indicațiile și contraindicațiile lor.

Majoritatea fixatorilor acționează asupra proteinelor tisulare și celulare determinând formarea unor legături între fixator și acestea, sau legături între diverse proteine. Lipidele, în tehnicile histologice de rutină, sunt în cea mai mare parte dizolvate, iar hidrații de carbon (glicogenul) se evidențiază utilizând fixatorii alcoolici.

Trebuie acordată o atenție mare recipientelor în care se pun piesele recoltate sau prelevate. Recipientele de dimensiuni mici vor determina o compresie a materialului biologic și o modificare a raporturilor față de starea "in vivo" și pot conduce la interpretări greșite histopatologice. În plus, fiecare vas cu fixator va avea pe fund una sau mai multe bucăți de hârtie de filtru care se va îmbiba cu fixator și va permite pătrunderea omogenă a fixatorului din toate direcțiile în piesa supusă fixării, în caz contrar, partea inferioară a piesei (mai ales atunci când se fixează piese mai mari) nu va fi impregnată cu fixator în același mod ca celelalte părți sau poate rămâne nefixată.

CLASIFICAREA FIXATORILOR

După mecanismul principal de acțiune, fixatorii au fost clasificați în:

- aldehide;
- agenți oxidanți;
- agenți coagulanți
- alți fixatori.

1. Aldehidele.

Cele mai utilizate aldehide sunt: formaldehida, paraformaldehida, glutaraldehida și acroleina. Aldehidele determină formarea unor legături încrucișate între proteine, legând unele proteine solubile de proteinele structurale. Aceste reacții sunt mai intense când proteinele prezintă aminoacizii lizini în structura lor.

incrușișate între proteine, deoarece se constată o creștere a vâscozității soluțiilor de proteine în prezența acestor tipuri de fixatori.

Cel mai eficient dintre agenții oxidanți este **tetraoxidul de osmiu**. El este unul dintre cei mai buni fixatori celulari; nu produce precipitate și permite evidențierea incluziunilor lipidice și a tecilor de mielină.

Se găsește sub formă de pulbere cristalină în fiole de 1 sau 5 g și se utilizează în soluție apoasă în concentrație de 1-2%. Prepararea soluției fixatoare se realizează cu anumite precauții deoarece acidul osmic este foarte volatil și iritant pentru mucoase, iar pe de altă parte, în contact cu urme de substanțe organice este redus, soluția se înnegrește și își pierde calitățile fixatoare. Practic, se procedează astfel: se spală bine fiola care conține acid osmic pentru a nu conține pe suprafața ei nici un fel de substanțe organice sau alte substanțe chimice; se spală foarte bine și o sticlă cu dop rotat, în care va fi realizată soluția de 1-2%. Se introduce fiola cu tetraoxidul de osmiu în sticla cu dop rotat, se pune dopul și se agită puternic până când se sparge fiola; fără a scoate cioburile, se introduce în sticlă cantitatea de apă distilată necesară.

Soluția fixatoare trebuie să se păstreze la frigider, în flacoane de culoare închisă, foarte curate, fără urme de acizi sau substanțe organice deoarece lumina și o serie de substanțe organice reduc tetraoxidul de osmiu, la osmiu metalic.

Puterea de penetrare a tetraoxidului de osmiu este foarte redusă pentru că el difuzează lent prin membrane.

Tetraoxidul de osmiu este utilizat în etapa de postfixare pentru preparatele de microscopie electronică. Foarte rar se utilizează în microscopia optică deoarece este scump, iar majoritatea coloranților reușesc cu greutate după fixare în tetraoxid de osmiu. Este utilizat pentru evidențierea lipidelor în adipocite pe care le colorează în brun spre negru.

Durata fixării este de 1-3 zile în funcție de grosimea piesei. Soluția 2% este mai penetrantă decât soluția 1%. Oprirea fixării se face prin spălarea piesei în apă curgătoare 1-2 zile.

Pentru fixarea amprentelor sau froturilor se recomandă să se pună pe o sticlă "de ceasornic" câteva picături de acid osmic soluție 1 - 2% și să se țină froturile sau amprentele câteva minute deasupra soluției; vaporii de acid osmic vor fixa rapid celulele, inclusiv prelungirile acestora (pseudopodele).

Bicromatul și permanganatul de potasiu sunt utilizați numai în amestecuri fixatoare din cauza artefactelor pe care le produc.

3. Agenții coagulanți

Agenții coagulanți sunt reprezentati de **acidul acetic**, **alcooolul metilic**, **alcooolul etilic**.

Acidul acetic este un fixator slab, cu putere de difuziune redusă. De aceea nu este utilizat simplu ci în diverse amestecuri fixatoare.

Alcooolurile sunt puțin utilizate ca soluții fixatoare simple în histologie și histopatologie. De obicei alcooolurile se găsesc în diverse procente în compoziția unor amestecuri fixatoare. Acțiunea fixatoare este dată de procesul de deshidratare a țesuturilor, structurile proteice fiind puțin sau deloc alterate, ceea ce face ca alcooolul să fie utilizat pentru fixarea țesuturilor ce urmează a fi examinate în

Formaldehida este un fixator mai blând, reacția de legare a proteinelor fiind reversibilă după 24 de ore dacă se spală în apă piessa supusă fixării. Această proprietate permite utilizarea formaldehidei ca fixator pentru tehnicile de histochimie, imunohistochimie și chiar microscopie electronică.

Formaldehida este cel mai utilizat fixator, deoarece este ieftin, este puțin toxic, permite realizarea unui număr mare de colorații histologice, este ușor de manevrat și dă puține artefacte.

În comerț formaldehida se găsește în concentrație de 36-40% (formalină, formol comercial). Pentru fixarea țesuturilor se folosește o soluție apoasă de 10%, iar pentru fixarea creierului se folosec soluții mai concentrate 15%.

Soluția de formaldehidă concentrată poate să conțină acid formic, metanol sau alte impurități care o fac improprie pentru unele tehnici de imunohistochimie. Pentru aceste tehnici se recomandă ca formaldehida în concentrație de 10% să fie preparată din paraformaldehidă pulbere sau să se utilizeze o formaldehidă tamponată cu tampon fosfat, la pH-7. De asemenea, formaldehida acidă, neamponată duce la formarea unor cantități mari de pigment hematoc, negricios. Pentru prevenirea acestor neajunsuri se recomandă utilizarea formaldehidei tamponate cu tampon fosfat, pH-7, urnată de o postfixare a materialului biologic în amestecul fenol-formaldehidă timp de 6 ore. Prin această tehnică de fixare se împiedică formarea pigmentului hematoc și se mărește viteza de fixare. În plus, materialul astfel fixat poate fi utilizat pentru studii de imunohistochimie și chiar de microscopie electronică.

Formaldehida în amestec cu alcooolul este recomandată pentru fixarea țesuturilor în care se urmărește evidențierea glicogenului, iar în combinație cu calciu (formol-calcu) este recomandată pentru fixarea țesuturilor bogate în lipide.

Glutaraldehida este un fixator utilizat relativ recent în tehnicile de microscopie. Ea se găsește în soluții apoase de 25% sau 50%. Ca fixator este utilizată soluția de 3-5%. Este un fixator care reacționează mult mai puternic și mult mai rapid cu proteinele celulare și extracelulare, decât formaldehida. Ea induce modificări ale structurii terțiare și cuaternare a proteinelor, iar fixarea este ireversibilă. Se consideră ca glutaraldehida determină modificarea a cel puțin 30% din structura proteinelor. Ea nu poate fi utilizată pentru tehnicile de imunohistochimie deoarece duce la pierderea rapidă a activității enzimatică și imunologice. În schimb este larg utilizată ca fixator pentru tehnicile de microscopie electronică. Pentru microscopie electronică se utilizează cel mai frecvent soluția de 3% de glutaraldehidă în tampon cacodilat, la pH de 7,2 - 7,4.

Acroleina este o aldehidă introdusă de curând în tehnica histologică. Ea este de obicei utilizată în amestec cu formaldehida și glutaraldehida. Are o putere mare de penetrare în țesuturi, păstrează morfologia lor și nu alterează enzimele, motiv pentru care este recomandată pentru studii de histoenzimologie.

2. Agenții oxidanți

Sunt reprezentați de **bicromatul de potasiu**, **permanganatul de potasiu** și **tetraoxidul de osmiu**. Modul în care agenții oxidanți reacționează cu proteinele este mai puțin cunoscut. Se pare că și aceștia determină formarea unor legături

imunofluorescență. De asemenea, alcoolul nu extrage din țesuturi mucusul, glicogenul, calciu sau fierul și este indicat ca fixator atunci când trebuie evidențiate aceste componente celulare și tisulare. În schimb alcoolul extrage din celule grăsimile neutre, sterolii, modifică unele lipoproteine membranare și poate rata țesuturile citoplasmele când fixarea este prelungită, ceea ce face ca fixatorii pe bază de alcool să fie contraindicați în aceste situații. Prelungirea fixării în alcool etilic absolut determină o întărire excesivă a piesei care devine sfărâmiată în momentul secționării.

Cel mai utilizat fixator este *alcoolul etilic* absolut sau de 95%. Alcoolul etilic absolut are o mare putere de penetrare în țesuturi, datorită difuziunii rapide prin membrane. După fixare în alcool etilic absolut piesele pot fi trecute în clarificator și introduse pentru includere în baia de parafină.

Alcoolul etilic se utilizează ca fixator în special pentru țesutul nervos, pentru studiul corpusculilor Nissl, dar și pentru studiul fibrelor și elementelor conjunctive, a vaselor de sânge și a parenchimelor glandulare. Durata fixării variază de la 1 oră la 24 de ore în funcție de grosimea piesei, alcoolul etilic având o putere de penetrare de circa 1 mm pe oră.

Alcoolul etilic mai este utilizat ca fixator atunci când se evidențiază în celule sau țesuturi prezența mucusului, glicogenului, ureei, fierului, calciului, deoarece nu distruge aceste componente ca alți fixatori.

Alcoolul etilic determină distrugerea aparatului reticular Golgi, a mitocondriilor și dizolvă în mare parte incluziile lipidice. De aceea nu trebuie utilizat când se dorește evidențierea lipidelor sau a unor granule de secreție învelite în membrane aparținând ARG.

Alcoolul metilic este mai puțin utilizat ca fixator în calitate de fixator, comparativ cu alcoolul etilic. Este utilizat în special pentru fixarea froțiilor care ulterior vor fi colorate prin metoda May-Grunwald-Giemsa sau Papanicolaou.

4. Alți fixatori

Acetona

Este utilizată pentru fixări rapide (atunci când este necesar un diagnostic rapid) și pentru unele reacții histochemice. Durata fixării, pentru piesele histologice de 2-3 mm grosime, este de 1-3 ore. Prelungirea fixării duce la ratarea materialului biologic. Pentru a evita asemenea accidente, acetona este utilizată cel mai frecvent în combinații cu alcoolul etilic.

Acidul picric este utilizat ca fixator simplu în soluții apoase saturate, dar mai ales în combinații cu formolul, acidul acetic, acidul azotic sau clorura de mercur. El are și o ușoară acțiune decalcifiantă. Utilizat simplu, acidul picric ratarea citoplasmele, determină reducerea de volum a țesuturilor și le colorează în galben. Un alt inconvenient este faptul că penetrează greu în țesuturi. Se știe că acidul picric reacționează cu histonele și proteinele bazice formând picrați cristalini cu aminoacizii. Din acest motiv țesuturile fixate în acid picric au afinitate scăzută pentru coloranții bazici.

Este util în fixarea țesuturilor în care trebuie evidențiat glicogenul.

Soluția apoasă saturată se realizează prin adăugarea a 1000 ml de apă distilată fierbinte peste 20 g de acid picric. La 100°C se dizolvă aproximativ 12 g

de acid picric la 1000 ml apă distilată. Se agită soluția și se lasă să se răcească. Soluția apoasă saturată de acid picric se păstrează timp nelimitat.

După realizarea fixării în acid picric sau amestecuri fixatoare ce conțin acid picric, este obligatorie îndepărtarea resturilor de acid picric din țesuturi pentru a facilita colorarea nucleilor. Îndepărtarea resturilor de acid picric se realizează fie prin spălarea pieselor înainte de includere în alcool etilic 70-80°, timp de 10-24 ore, fie finând secțiunile deparafinate într-un amestec în părți egale de alcool și soluție saturată de carbonat de litiu, aproximativ 10-30 min.

Acidul tricloracetic este utilizat ca fixator în soluție apoasă 5-10% pentru fixarea mușchilor striați și pentru decalcifierea țesutului osos. Este un fixator foarte bun și pentru țesuturile conjunctive. Durata fixării variază de la 1 oră la 24 de ore în funcție de grosimea pieselor: piesele mici, de 1-2 mm, se fixează într-o oră, iar cele de 6-8 mm se fixează în aproximativ 24 de ore.

După terminarea fixării, pentru îndepărtarea acidului tricloracetic din țesuturi, acestea se spală în mai multe băi de alcool etilic de 96°, după care se continuă dehidratarea piesei cu alcool absolut, clarificare cu toluen și includerea în parafină.

Clorura de mercur (sublimatul) este rar utilizată ca fixator simplu deoarece produce reducerea volumului piesei histologice; mai frecvent este utilizată în amestecuri fixatoare (Zenker, Susa, Helly). Ea acționează prin precipitarea proteinelor tisulare și celulare, iar în soluție saturată poate determina retracții puternice ale citoplasmei. Afinitatea tinctorială a țesuturilor este foarte bună după utilizarea sublimatului în soluții fixatoare.

Soluția apoasă saturată de clorură de mercur se obține prin dizolvarea a 60 g de clorură de mercur în 1000 ml apă distilată fierbinte. Durata fixării este în general scurtă deoarece clorura de mercur are o mare putere de difuzibilitate. După fixarea țesuturilor în soluție saturată de clorură de mercur, pot apare precipitate negre formate de mercurul metallic sau de clorura de mercur. Acestea trebuie îndepărtate prin trecerea pieselor înainte de includere sau a secțiunilor după deparafinare, printr-o soluție de alcool iodat (2 g iod, 3 g iodură de potasiu, 100 ml alcool 90%) sau printr-o soluție Lugol (1 g iod, 2 g iodură de potasiu, 200 ml apă). În continuare trebuie îndepărtat și iodul prin trecerea preparatelor histologice printr-o soluție apoasă de tiosulfat de sodiu 1% - 5%, urmată de spălare abundentă în apă de robinet.

Sublimatul este un fixator excelent pentru citoplasmă, cromatină, granule de secreție, hemoglobină, fibre elastice și adipocite deoarece nu dizolvă grăsimile.

FACTORI FIZICI IMPLICAȚI ÎN FIXAREA MATERIALULUI BIOLOGIC

Cei mai importanți factori fizici implicați în procesele de fixare ale fragmentelor de țesuturi și organe sunt:

- temperatura;
- valoarea pH-ului (concentrația ionilor de hidrogen);
- difuzibilitatea;

- osmolaritatea;
- durata fixării.

Temperatura la care se face fixarea pieselor pentru studii de microscopie optică este, de obicei, temperatura camerei de laborator. Unii cercetători recomandă ca fixarea să se facă la temperatura scăzută deoarece în acest fel sunt reduse artefactele date de autoliza materialului biologic și este păstrată mai bine arhitectura celulară și tisulară. Totuși, temperatura scăzută prelungeste durata de fixare datorită reducerii penetrabilității fixatorului și reducerii reacțiilor chimice de fixare.

De asemenea, pentru o fixare rapidă, unii autori recomandă folosirea soluției apoase de formol 10% încălzită la 55-60° C în termostat. Temperatura ridicată mărește puterea de difuzibilitate a fixatorului în țesuturi.

Pentru tehnicile de microscopie electronică și pentru unele tehnici de histochimie, temperatura recomandată pentru realizarea unei fixării optime a materialului biologic este de 0-4°C.

Valoarea pH-ului soluțiilor fixatoare are o importanță deosebită în prevenirea artefactelor postfixare. O fixare optimă are loc la pH de 6-8. Dacă soluția fixatoare are un pH mai mic apar modificări ale structurii terțiare și cuaternare a majorității proteinelor celulare și extracelulare, sau va apare o precipitare intensă a acestora. De aceea, în cazul unor soluții fixatoare acide este recomandată utilizarea unor soluții tampon, dintre care cele mai utilizate sunt soluțiile de fosfați, carbonați, bicarbonați, cacodilat sau tris. Trebuie avut grijă ca sistemul tampon să nu reacționeze cu fixatorul și să nu-i anuleze sau să-i diminueze capacitatea fixatoare.

Unele țesuturi necesită, pentru o mai bună conservare, pH-uri acide. Astfel, mucoasa gastrică este fixată cel mai bine la pH acid (5,5); reacția cromafină pentru evidențierea granulelor de adrenalină și noradrenalină este optimă dacă fixarea s-a efectuat la pH de 6,5.

Difuzibilitatea fixatorilor este un element foarte important pentru realizarea unei fixări uniforme și de bună calitate. Fiecare fixator are un coeficient propriu de difuzibilitate în țesuturi. Acest coeficient de difuzibilitate reprezintă distanța în milimetri la care a difuzat fixatorul în țesut, într-o oră. Evident că țesuturile mai laxe vor permite o difuzibilitate mai mare a fixatorilor decât țesuturile dense. Coeficientul de difuzibilitate în ficat pentru principalii fixatori este: acidul picric: 0,5; tetraoxidul de osmiu: 0,3-0,6; formaldehida: 0,78; glutaraldehida: 0,5-1; alcoolul etilic: 1; acidul acetic: 1,2; bicromatul de potasiu: 1,33; clorura de mercur: 2,2.

Se impune, pentru realizarea unei fixări omogene, realizarea unor preparate histologice de grosimi reduse și prezența unui volum mare de fixator.

Osmolaritatea are, de asemenea, o importanță deosebită pentru realizarea unei fixări de bună calitate. Soluțiile hipertone determină scăderea duratei de viață a celulelor sau produc ratații ale elementelor celulare, în timp ce soluțiile fixatoare hipotone produc umflarea celulelor sau a elementelor extracelulare. În plus, soluțiile hipotone determină eliberarea fosfatarei acide din lizozomi care produc vacuolizări ale citoplasmei, vizibile la microscopul electronic. Osmolaritatea optimă a soluțiilor fixatoare este de circa 240-400 mOsm.

Durata fixării. Cele mai multe laboratoare utilizează ca fixator formaldehida tamponată, timp de 2, 6 sau 24 de ore, în funcție de grosimea piesei, de densitatea țesutului, de temperatura laboratorului. Fixarea în formaldehidă tamponată poate fi prelungită până la câteva zile fără ca structurile histologice să sufere modificări semnificative. Pentru fixarea encefalului în totalitate în formalină tamponată sunt necesare aproximativ 3 săptămâni. Totuși, fixarea prelungită în formaldehidă duce la înlăturarea țesutului, inhibiția activității enzimatică și blocarea receptorilor imunohistochimici.

Fixarea prelungită cu fixatori oxidanți degradează țesuturile prin scindarea oxidativă a proteinelor și pierderea peptidelor.

ARTIFACTE DATORATE FIXĂRI

Fixatorii determină mai multe tipuri de artefacte:

- modificări de volum (fixarea în formaldehidă determină o reducere de până la 33% a volumului piesei față de fixarea prin congelare) și implicite modificări ale raporturilor celulare față de starea "in vivo";
- apariția unor precipitate (hematice, mercurice, etc.);
- dizolvarea sau extragerea unor fracțiuni lipidice din membranele celulare sau celulele adipose (în special fixatorii pe bază de alcool);
- dizolvarea unor componente celulare sau a granulelor de secreție (glicogenul este dizolvat de fixatorii apoși, în timp ce fixatorii pe bază de alcool sau sublimat păstrează mai bine glicogenul).

PRINCIPALII FIXATORI UTILIZAȚI

A. FIXATORI SIMPLI

Cel mai utilizat fixator pentru tehnicile de histologie, histopatologie, imunohistochimie, imunocitochimie și imunofluorescență este formaldehida. De aceea prezentăm în continuare unele aspecte teoretice și practice în legătură cu acest fixator.

Tehnicile actuale utilizează formaldehida sub mai multe forme, fiecare cu avantajele și dezavantajele, cu indicațiile și contraindicațiile lor.

1. Formalina 10% netamponată

Formaldehida 100% este un gaz solubil în apă până la o concentrație de 36 - 40%. Reactivul comercial, cunoscut și sub denumirea de formol comercial sau formalină, conține 10-15% metanol care acționează ca un stabilizator al soluției și previne polimerizarea formaldehidei. Polimerizarea formolului concentrat apare dacă acesta este ținut la temperaturi joase și în sticle transparente. De aceea se recomandă păstrarea formolului în sticle de culoare închisă, la temperaturi mai mari de 9°C.

Când este proaspătă, soluția de formol concentrat conține mici cantități de acid formic, ceea ce-i conferă un pH acid, unul din inconvenientele folosirii formalinei concentrate și mai ales netamponate. Acidul formic se poate forma

spontan ca urmare a oxidării formaldehidei în prezența oxigenului atmosferic, chiar în soluțiile apoase 10% dacă diluția s-a realizat cu apă distilată și nu a fost introdus un sistem tampon. Diluarea formolului concentrat cu apă de robinet determină o ușoară creștere a pH-ului prin sărurile alcaline pe care le conține.

Paraformaldehida este forma pudră, polimerizată, a formaldehidei. Spre deosebire de formaldehidă, paraformaldehida este mult mai pură din punct de vedere biochimic.

Soluția de formaldehidă netamponată 10% se obține după formula:

- formaldehidă concentrată (36-40%) 10 ml.
- apă distilată 90 ml.

Concentrația acestei soluții este în realitate de 4% formaldehidă. (formaldehidă comercială este considerată 100%)

⊗ Timpul de fixare este variabil în funcție de mărimea piesei histologice, de temperatura mediului ambiant, de prospețimea soluției fixatoare. În general, timpul de fixare este de 24-48 de ore. În mod uzual formalina 10% penetrează piesele histologice în 48 de ore la temperatura laboratorului (20-25°C) și în 24 de ore la 35°C; formalina 20% fixează același țesut în 3 ore la 55°C. Trebuie notat că aceste creșteri de temperatură sau concentrație pot determina artefacte prin autoliza țesuturilor.

⊗ Pentru piese mici se poate obține o fixare rapidă prin introducerea materialului biologic în formol fierbinte câteva minute.

După terminarea fixării, piesa histologică este spălată în apă curgătoare timp 24 de ore pentru a înlătura excesul de formaldehidă.

Utilizarea largă a formaldehidei pentru fixare are o serie de **avantaje**:

- cost redus;
- nu întârște excesiv piesele;
- permite realizarea unui număr mare de colorații histologice;
- deformează (contractă) puțin piesele;
- penetrează și conservă bine sângele și țesutul adipos;
- culorile normale sunt mai bine conservate decât cu alți fixatori;
- fixează bine proteinele, inhibând astfel pierderea glicogenului din țesut în soluții apoase;
- se utilizează și pentru secțiunile la gheață și evidențierea lipidelor; (secțiunile la gheață se taie mai bine).

Printre **dezavantajele** fixării în formaldehidă menționăm:

- reduce cantitatea de ADN/ARN în celule (lichidul Carnoy conservă mai bine acizii nucleici);
- vaporii de formaldehidă sunt supărători și iritanți, în special pentru ochi și căile respiratorii;
- poate provoca reacții alergice pe piele (mâini);
- fiind un fixator blând, uneori nu fixează adecvat structurile citoplasmice pentru includerea la parafină; postfixarea și deshidratarea în alcool 80% completează procesul de fixare;
- este inferior alcoolului în fixarea fierului și a altor pigmenți;
- schimbă adesea culoarea secreției biliare, de la galben la verde;

- poate produce în țesuturi precipitate neplăcute negre-brun prin descompunerea (lăcuirea) hemoglobinei; pigmentul poate fi confundat cu cel din malarie sau cu hemosiderina.

Din cauză faptului că formalina 10% este un fixator blând, țesuturile pot fi păstrate în el timp îndelungat. Alternativ, pentru păstrarea țesuturilor se utilizează alcoolul etilic 70-80%.

Formalina fixează țesuturile reacționând în principal cu proteinele. Ea realizează legături cu 11 grupuri chimice reactive terminale ale proteinelor, cu excepția grupărilor acide. Cea mai mare parte a punțiilor sau legăturilor sunt slabe sau reversibile prin spălare. Aceste legături se formează cu grupările amino, imino, guanidil, amido, peptidil, hidroxil, carboxil, sulfhidril și cu grupurile aromatice. Reacții ireversibile se realizează cu tiroxina, triptofanul, fenilalanina și histidina.

În urma expunerii la aer formaldehida se oxidează și formează treptat acid formic, chiar în soluția diluată, netamponată. pH-ul acid exercită o acțiune distructivă asupra țesuturilor supuse fixării. În timpul fixării în această soluție acidă, prin distrugerea globulelor roșii, se formează un pigment negricios (hemateina) prin reacția dintre acidul formic și hemoglobina rezultată. Fixarea țesuturilor bogate în sânge în soluție de formalină cu pH-5 determină formarea unei mari cantități de pigment ca urmare a lizei eritrocitelor. Acest pigment este de culoare negru-brun, microcristalin. El poate fi dizolvat și înlăturat în soluții alcaline sau prin tratarea cu soluție de alcool-acid picric (se dizolvă 10-12 g acid picric în 100 ml de alcool etilic absolut) sau cu o soluție alcoolică de picrat de amoniu.

Deoarece "pigmentul formalinic" se poate forma în țesuturile tratate cu fixatori acizi cum sunt fixatorii Carnoy și Methacarn, care nu conțin formaldehidă, s-a sugerat că mediul acid este cel care determină formarea pigmentului hemateinic. Mecanismul chimic de îndepărtare al pigmentului este necunoscut.

Cea mai importantă metodă de a îndepărta pigmentul formalinic este prevenirea formării sale prin utilizarea unei formaline tamponate cu pH mai mare de 6.

2. Formalina 10% tamponată pH 7-7,2 (Fixatorul Lillie)

Se realizează după formula:

- formaldehidă 36-40% 100 ml;
- fosfat monosodic (NaH₂PO₄) 4 g;
- fosfat disodic (Na₂HPO₄) 6,5 g;
- apă distilată 900 ml.

Pentru îndepărtarea urmelor de acid formic și aducerea formalinei la pH de 7-7,2 se mai pot utiliza (sub controlul pH-ului), carbonatul de sodiu sau clorura de calciu, în soluții apoase.

Unii autori recomandă adăugarea de carbonat de calciu anhidru până la un strat de 1-2 cm grosime la fundul vasului în care este păstrat formolul concentrat.

Pentru realizarea unui pH optim se impune determinarea acestuia cu ajutorul pH-metrelor înainte de fiecare fixare (mai ales pentru tehnicile de histoenzimologie și imunohistochimie).

3. **Formolul salin** se obține după formula:

- formaldehidă 10%.....1000 ml;
- clorură de sodiu (NaCl)..... 9 g.

4. **Formolul neutru** se obține după formula:

- formol comercial..... 100 ml;
- apă curentă..... 900 ml;
- carbonat de calciu.....10 g.

5. **Formalină acidă pH-2** se obține după formula:

- formalină 10% sau 20%99 ml;
- acid acetic glacial1 ml.

6. **Formalina Cajal (formol-bromură de amoniu pH - 2)**

- formol comercial 40% 15 ml;
- amoniu bromid 2 g;
- apă distilată 85 ml.

7. **Fixatorul formol-sucroză (sol Holt și Hicks)**

- formol comercial100 ml;
- sucroză 75 g;
- tampon fosfat M/15, pH 7,4 q.s..... 1000 ml.

8. **Formalina alcoolică** se obține după formula:

- alcool etilic absolut 90 ml;
- formaldehidă 38-40% 10 ml.

Acest fixator prezintă o serie de avantaje, dar și dezavantaje.

Avantaje:

- formalina alcoolică este un fixator rapid datorită faptului că penetrează repede;
- deshidratarea este rapidă ea putând fi trecută în alcool absolut după terminarea fixării.

Dezavantaje:

- descompune hemoglobina din globulele roșii;
- lizează globulele roșii;
- retracă țesutul.
- nu conferă o consistență atât de bună ca alți fixatori.

9. **Formalina-alcool-acid acetic**

- formaldehidă 38-40% 10 ml;
- acid acetic glacial5 ml;
- alcool 100% 85 ml.

Fixatorul formalină-alcool-acid acetic este superioră fixatorului Carnoy pentru evidențierea glicogenului, citoplasmei celulelor și ARN-ului. Fixarea este de 6-12 ore pentru piesele mici și de 12-24 de ore pentru piesele mari.

10. **Fixatorul formol-calcium sau formalina Backer (pentru fosfolipide și enzime):**

- formol comercial.....100 ml;
- clorură de calciu 10 g;
- apă distilată900 ml;

Soluția Backer formol-calcium utilizează formalină neutră 10%, conținând 1% CaCl₂. Backer a arătat că adăugarea de CaCl₂ îmbunătățește fixarea și împiedică sigur desfășurarea lipidelor. Ioni de Ca²⁺ previn, de asemenea, tendința de distorsionare a fosfolipidelor și de a se extinde în afara ariei sau suprafeței în care sunt cantonate, când pieselele histologice sunt îmbibate în apă.

Varianta Lillie folosește 2% acetat de calciu monohidrat în 10% formalină netamponată. Sarea de acetat de calciu acționează asemănător tamponului fosfat și împiedică formarea acidului formic.

B. AMESTECURI FIXATOARE

Amestecurile fixatoare reprezintă combinații, în diferite proporții, ale fixatorilor simplii. Scopul lor este de a însuma calitățile fixatorilor componenți și de a conserva cât mai bine și cât mai multe structuri morfologice. Ca și la fixatorii simplii, se recomandă ca amestecurile fixatoare să se prepare imediat înainte de fixare, deoarece lumina, variațiile de temperatură ale mediului sau condițiile de păstrare (evaporarea unor componente) duc la pierderea calităților fixatoare.

Fixatorul Allen

- soluție apoasă saturată de acid picric 75 ml;
- formol concentrat 40% 25 ml;
- acid acetic glacial5 ml;
- încălzire la 38° C, după care se adaugă:
- acid cronic cristalizat 1,5 g;
- uree cristalizată 2 g.

Durata fixării 2-3 ore la 37 C. Se prepară numai în momentul utilizării.

Este unul dintre cei mai buni fixatori nucleari, mai ales atunci când trebuie evidențiate mitozele celulare. Permite toate tipurile de colorații uzuale. După secționare trebuie îndepărtat acidul picric din țesuturi (ca la amestecul Bouin).

Fixatorul Bensley

- soluție apoasă de acid osmic 2 %-38° 20 ml;
- soluție apoasă de bicromat de potasiu 2,5% 80 ml;
- acid acetic..... 10 picături.

Durata fixării: 1-3 zile; la finalul fixării se spală piesa în apă curentă timp de 24 de ore.

Fixatorul Benoit

- soluție apoasă de bicromat de potasiu 5% 60 ml;
- soluție salină de bicromat de mercur 5% 50 ml;
- soluție apoasă de nitrat de uraniu 4% 40 ml;

- soluție apoasă de acid osmic 2% 40 ml.
Durata fixării: 24-48 de ore.

Fixatorul Bouin

- acid acetic glacial 5 ml;
- formol neutru 40% 25 ml;
- soluție saturată acid picric 75 ml;

Durata fixării: 2 - 24 - 72 de ore în funcție de mărimea piesei. Este un fixator universal. (Acidul acetic glacial trebuie adăugat în momentul folosirii).

Fixarea în lichidul Bouin permite efectuarea a numeroase colorații uzuale. Nu este indicat pentru studiul sângelui sau al organelor hemolimfopoietice deoarece acidul picric determină hemoliza hematilor.

După fixare, piesele se spală în alcool, iar după efectuarea secțiunilor și depărafinare, preparatele histologice trebuie spălate într-o soluție în părți egale de alcool 90% și soluție apoasă saturată de carbonat de litiu, pentru a îndepărta acidul picric din structura țesuturilor.

Fixatorul Bouin - Hollande

- acetat de cupru 2,5 g;
- apă distilată 100 ml;
- acid picric (cristale) 4 g;
- formol concentrat 10 ml;
- acid acetic glacial 1 ml.

Durata fixării este de 3 zile. După fixare piesele se spală în apă curgătoare 24 de ore și apoi în alcool pentru înlăturarea acidului picric și a acetatului de cupru. Are aceeași indicații ca și lichidul Bouin, dar se poate conserva indefinit.

Fixatorul Cajal

- nitrat de uraniu 1 g;
- formol neutru 40% 15 ml;
- apă distilată 80 ml;
- alcool etilic 96° 30 ml.
Durata fixării 10-14 ore. După fixare piesele se spală în apă distilată.

Fixatorul Cajal cu alcool amoniacal

- alcool etilic 96° 50 ml;
- amoniac 4-5 pic.

Durata fixării 24-48 ore în funcție de mărimea piesei; țesutul nervos poate fi trecut direct în nitrat de argint.

Fixatorul Carnoy

- alcool etilic absolut 60 ml;
- cloroform 30 ml;
- acid acetic glacial 10 ml;

Este indicat pentru fixarea nucleilor, a glicogenului, a acizilor nucleici, a corpusculilor Nissl. Durata fixării 1-3 ore; dacă se prelungeste fixarea piesele se

întăresc prea mult din cauza alcoolului, se secționează greu sau apar artefacte. După fixare piesele sunt trecute direct în alcool absolut pentru deshidratare, clarificate și incluse la parafină. Acest fixator permite efectuarea tuturor tehnicile histologice curente de colorare.

Fixatorul Champy

- bicromat de potasiu 3% 35 ml;
- acid cromic 1% 35 ml;
- acid osmic 2% 20 ml.

Durata fixării: 24-48 ore; după fixare se spală în apă curentă 24 de ore.

Fixatorul Clark

- alcool etilic absolut 75 ml;
- acid acetic glacial 25 ml.

Fixatorul Coujard

- formol neutru 10% 2 părți;
- soluție apoasă saturată de iodat de potasiu 1 parte.
Durata fixării: 48 de ore.

Fixatorul Da Fano

- nitrat de cobalt 1 g;
- apă distilată 100 ml;
- formol neutru 40% 10-15 ml (adăugat în momentul fixării).

Durata fixării: 6-8 ore. După fixare se indică spălare abundentă în apă distilată

Fixatorul Dubosq - Brasil sau Bouin - Dubosq

- alcool 80° 150 ml;
- formol comercial 40% 60 ml;
- acid acetic cristalizabil 15 ml;
- acid picric 1 g.

Fixatorul Eifftman

- clorură de mercur 5 g;
- bicromat de potasiu 2,5 g;
- apă curentă 100 ml.

Durata fixării: 3 zile la temperatura camerei. Este indicat pentru fixarea lipidelor.

Fixatorul Al. Eskenasy

- alcool metilic 100 ml;
- acid trichloroacetic 4,5 g;
- sublimat 3 g;

Este indicat pentru organele hematopoietice (este și decalcifiant)

Fixatorul Flemming

- acid acetic glacial 1 ml;
- acid cronic sol apoasă 1% 15 ml;
- acid osmic sol apoasă 2% 4 ml.

Este considerat un bun fixator citologic și al granulelor de secreție. Din cauza difuzibilității reduse se recomandă să se utilizeze pentru piese de dimensiuni mici, maxim 3 mm-grosime. Durata fixării este de 24-72 de ore.

Fixatorul Gendre

- soluție saturată de acid picric în alcool de 95° 80 ml;
- formol comercial 40% 15 ml;
- acid acetic glacial 5 ml.

Durata fixării: 1-4 ore. După fixare piesele se spală bine în alcool etilic de 80%, 95% și absolut.

Fixatorul Heidenhain - Sușa

- sublimat (clorură mercurică) 45 g;
- clorură de sodiu 5 g;
- acid tricloracetio 20 ml;
- apă distilată 800 ml,

După dizolvare se adaugă:

- formol comercial 40% 200 ml;
- acid acetic 40 ml.

Durata fixării: 4-24 ore. Tratare cu soluții iodate pentru înlăturarea clorurii de mercur.

Fixatorul Helly

- formol concentrat 5 ml;
- bicromat de potasiu 2,5 g;
- sulfat de sodiu 1 g;
- apă distilată 100 ml;
- sublimat 5 g.

Durata fixării 1-6 ore. Este un fixator citologic, indicat pentru fixarea organelor hematopoietice.

Fixatorul Lacassagne

- sublimat 5 g;
- formaldehidă 40% 20 ml;
- acid tricloracetio 2,5 g;
- apă 100 ml.

(se dizolvă sublimatul în apă caldă; după răcire se adaugă formolul și acidul tricloracetio)

Durata fixării 4-24 de ore. Fixatorul poate fi conservat indefinit.

Fixatorul Lillie

- alcool etilic absolut 80 ml;
- apă distilată 10 ml;
- formaldehidă 40% 10 ml;
- nitrat de plumb 8 g.

Durata fixării: 24 de ore la 25-30° C; 2-3 zile la 0-5° C. Se utilizează pentru colorațiile care pun în evidență mucopolizaharidele.

Fixatorul Maximov

- formol concentrat 10 ml;
- bicromat de potasiu 2,5 g;
- sulfat de sodiu 1 g;
- apă distilată 100 ml;
- sublimat 5 g;
- acid osmic sol apoasă 2% 10 ml.

Durata fixării: 1-48 de ore în funcție de mărimea piesei. Este indicat pentru organele hematopoietice și pentru grăsimi.

Fixatorul Muller

- bicromat de potasiu 2,5 g;
- sulfat de sodiu 1 g;
- apă distilată 100 ml;

Durata fixării 1-3 zile, în funcție de mărimea piesei. Este indicat pentru structuri osoase, sistem nervos, organe parenchimatose.

Fixatorul Orth

- soluție apoasă de bicromat de potasiu 3% 90 ml;
- formaldehidă 40% neutră 10 ml.

Fixatorul nu poate fi conservat mai mult de 24 de ore. Durata fixării 24 de ore. Este un fixator indicat pentru piesele de necropsie datorită puterii mari de penetrabilitate.

Fixatorul Palade

- acid osmic 2 g;
 - tampon de acetat de veronal pH 7,2 100 ml
- (este utilizat frecvent pentru fixări în microscopia electronică).

Fixatorul Regaud

- sol apoasă de bicromat de potasiu 3% 80 ml;
- formol neutră 20 ml;

(se prepară în momentul folosirii)

Durata fixării: 24 de ore; după fixare se recomandă spălare intensă în apă curentă minim 12 ore.

Fixatorul Rossmann

- soluție saturată de acid picric în alcool absolut 90 ml;

- formol 10 ml.
Durata fixării: 12-24 de ore.

Fixatorul San Félice

- tetraoxid de crom (acid cromic) 1% 160 ml;
- formol 40% 80 ml;
- acid acetic glacial 10 ml.

Amestecul se realizează în momentul utilizării.

Durata fixării: 12-24 ore. După fixare se spală materialul biologic în apă curentă 24 de ore.

Fixatorul Schaudinn

- soluție apoasă saturată de sublimat (clorură mercurică) 2 părți;
- alcool absolut 1 parte.

Durata fixării: 6-16 ore; după fixare se recomandă tratarea pieselor cu iod

pentru îndepărtarea resturilor de sublimat (soluție Lugol, urmată de soluție apoasă de tiosulfat de sodiu).

Fixatorul Simionescu

- Soluțiile stoc:

a). soluție de formaldehidă 3% + glutaraldehidă 5%;

b). soluție de tetraoxid de osiniu 2%;

c). soluție saturată de citrat de plumb (acestea se prepară în tampon fosfat sau cacodilat la pH 7,2 și se păstrează la gheață)

Soluția fixatoare se obține la rece, din amestecul:

- soluția a 3 volume;
- soluția b 2 volume;
- soluția c 1 volum.

(fixarea trebuie efectuată într-un vas cu gheață).

Durata fixării 1-2 ore. Se recomandă pentru fixarea glicogenului și dextranilor.

Fixatorul Van Tellyesniczky

- bicromat de potasiu 3 g;
- acid acetic cristalizabil 5 ml;
- apă distilată 100 ml.

Durata fixării: 1-2 zile; spălare în apă curentă 24 de ore.

Fixatorul Zenker

- acid acetic glacial 5 ml;
- bicromat de potasiu 2,5 g;
- sulfat de sodiu 1 g;
- apă distilată 100 ml;
- sublimat 5 g;

Durata fixării: 6-48 de ore, în funcție de mărimea piese. Fixatorul Zenker pătrunde rapid în țesuturi, favorizează toate colorațiile, fiind indicat în special

pentru parenchimele glandulare și organele hematopoietice. După fixare piesele se spală 24 de ore în apă curgătoare pentru eliminarea bicromatului și apoi într-o soluție Lugol urmată de soluție de tiosulfat de sodiu pentru îndepărtarea sublimatului.

PROCEDEE PENTRU ÎNDEPĂRTAREA PIGMENTULUI

Pentru piesele fixate în formalină, după deparafinarea secțiunilor și începerea deshidratării, din soluția de alcool 95% preparatele histologice se trec direct pentru 5 minute într-o soluție saturată de alcool - acid picric (vezi mai jos formula) după care se spală în apă de robinet 10 minute.

Pentru piesele fixate în soluția Zenker, după deparafinare și hidratare preparatele histologice se spală bine (10 min) în apă, după care se trec în soluția Gram pentru 10 minute, apoi în soluția de tiosulfat de sodiu 5% până când țesuturile sunt clare, după care se spală din nou în apă de robinet 10 minute.

Alte soluții utilizate pentru îndepărtarea pigmentului:

Soluția Lugol:

- iod metallic 1 g;
- iodură de potasiu 2 g;
- apă distilată 100 ml.

Soluția Gram:

- iod metallic 1 g;
- iodură de potasiu 2 g;
- apă distilată 300 ml.

Soluția Langeron:

- iod metallic 1 g;
- iodură de potasiu 2 g;
- apă distilată 200 ml.

Soluția de tiosulfat de sodiu 5%:

- tiosulfat de sodiu 5 g;
- apă distilată 100 ml.

Soluția saturată de alcool - acid picric:

- alcool 95% 400 ml.
- acid picric cristalizat 9 g.

FIXATORI RECOMANDAȚI PENTRU COLORAȚII SPECIALE

Fixatori pentru structurile fibrilare din mușchi:

- acidul tricloracetic 5 %;
- lichidul Susa
- lichidul Lang;
- lichidul Schaffer.

Fixatori pentru evidențierea mitocondriilor (condriomului):
- Lichidul Regaud;

TEHNICI DE INCLUDERE

Pentru țesuturile recoltate de la autopsie, fixate în formalină, Zenker sau soluție Helly, după spălare în apă curgătoare, se poate utiliza următoarea schemă pentru includere:

- alcool etilic 80% 2 ore;
- alcool 95% 3 băi a câte 2 ore;
- alcool absolut 3 băi a câte 1 oră;
- xilen 3 băi a câte 1 oră;
- xilen - parafină 1 baie X 1 oră,
- parafină 3 băi a câte 1 oră.

Pentru țesuturi de autopsie fixate în Carnoy și transferate direct în alcool metilic absolut poate fi utilizată următoarea schemă:

- metanol 2 băi a câte 2 ore;
- benzoat de metil 2 băi a câte 2 ore;
- xilen 1 oră;
- xilen - parafină 1 oră;
- parafină 3 băi a câte 1 oră.

* Pentru fragmentele mici de biopsie, sub 2 mm, fixate în formalină tamponată, se poate utiliza următoarea schemă:

- alcool 80% 30 min;
- alcool 95% 3 băi a câte 15 min;
- alcool absolut 3 băi a câte 15 min;
- xilen 2 băi a câte 20 min;
- parafină 2 băi a câte 30 min.

Pentru fragmente de biopsie mai mari se poate utiliza următoarea schemă:

- alcool 80% 2 ore;
- alcool 95% 4 băi a câte 30 min;
- alcool absolut 3 băi a câte 30 min;
- xilen 3 băi a câte 30 min;
- parafină 2 băi a câte 60 min.

Pentru piese de rezecție chirurgicală sau biopsiile mari poate fi utilizată următoarea schemă:

- alcool 80% 3 1/2 ore;
- alcool 95% 4 băi a câte 1 oră;
- alcool absolut 3 băi a câte 1 oră;
- alcool absolut/xilen 1 baie X 1 oră;
- xilen 1 oră;
- xilen/parafină 1 oră;
- parafină 2 băi a câte 1 oră.

- lichidul Tupa;
- lichidul Champy.

Fixatori pentru lipide:

- formol neutru;
- fixatorul Maximov.

Fixatori pentru glicogen:

- alcool absolut;
- lichidul Carnoy;
- lichidul Susa.

Fixatori pentru evidențierea corpusculilor Nissi:

- alcoolul etilic 96% sau absolut;
- lichidul Carnoy.

Fixatori pentru sânge și organe hematopoietice:

- lichidul Helly;
- lichidul Maximov;
- lichidul Eskenasy.
- lichidul Scaffer;
- lichidul Tellyesuicsky.

Fixatori pentru sistemul nervos:

- formol 10%;
- lichidul Boiuu.

Fixatori pentru celulelor adenohipofizei și din pancreasul endocrin

- fixatorul Boiuu;
- fixatorul Carnoy

Pentru fixarea țesuturilor de la autopsie sunt recomandați fixatorii:

- formalină netamponată, 10% 28-48 de ore; păstrare în alcool 70-80% în laboratorul de histologie;

- fixatorul Zenker-formol (lichidul Helly): se utilizează 5 ml formaldehidă concentrată (37-40%) cu 95 ml soluție Zenker-stoc. Piesele mici de 3-4 mm se vor fixa 6-8 ore, piesele mari 15-18 ore. Se spală în apă curgătoare 24 ore; păstrare în alcool 70-80% în laboratorul de histologie;

- fixatorul Zenker-acid acetic (pentru măduva osoasă): se adaugă 5 ml aci acetic glacial la 95 ml de soluție Zenker stoc. (soluția nu se păstrează după adăugarea acidului.) Fixarea pieselor mici de 3-4 mm se face în 6-8 ore, iar a pieselor mari în 15-18 ore. Spălare în apă curgătoare 24 de ore. Decalcifiere, clătire în sulfat de sodiu 5%, spălare în apă 24 de ore. Păstrare în alcool 70-80% în laborator.

TEHNICA DE CRIOCONGELARE A ȚESUTURILOR

O alternativă a tehnicii de includere la parafină este congelarea țesuturilor, tehnică care permite oprirea procesele vitale într-o anumită fază de demulare a acestora, previne degradarea materialului biologic prin blocarea activității enzimelor hidrolitice și conferă țesuturilor o anumită consistență necesară secționării la microtom.

Țesuturile nefixate sau fixate pot fi prelucrate prin tehnică congelării pentru:

- elaborarea unui diagnostic rapid pentru consultații intraoperatorii;
- evidențierea lipidelor (tehnica includerii la parafină determină dizolvarea lipidelor prin reacții folosind la dehidratare și clarificare);
- păstrarea proprietăților antigenice pentru studii de imunohistochimie;
- conservarea enzimelor și a unor compuși solubili pentru studii de imunohistochimie;
- conservarea materialului pentru o perioadă mai lungă sau mai scurtă pentru studii de imunohistochimie, biologie moleculară, genetică, biochimie sau histologie;
- conservarea cu acuratețe a morfologiei celulare;

În practica medicală curentă, principala aplicație a tehnicilor de înghețare este realizarea unui diagnostic rapid (extemporaneu) ca parte a unui consult intraoperator.

Folosind temperaturi scăzute pot fi eliminate multe din problemele care apar în practică standard ale fixării chimice sau ale includerii în parafină sau rășini sintetice.

Totuși, trebuie să menționăm că acest procedeu de conservare și prelucrare a materialului biologic are și dezavantaje, pentru că transformarea apei în gheață poate altera puternic structura fizică și chimică a celulelor și țesuturilor. Când apa distilată este răcită se formează cristale hexagonale de gheață. Această transformare a apei în cristale de gheață are loc la temperatura de 0°C și la presiunea de 1 atm. Când temperatura de răcire scade foarte repede, atunci se formează cristale hexagonale de sau cubice gheață.

La temperatura de 0°C apa pură se poate găsi sub forma lichidă, sub forma de cristale hexagonale sau cubice, dar în țesuturi și celule tranziția apei intracelulare de la forma lichidă la cea solidă are loc la temperaturi mai mici, datorită faptului că aici nu se găsește în stare pură.

Formarea de cristale ca rezultat al congelării produce, în primul rând, o concentrare a fluidului extracelular. Aceasta „fugă” lichidiană antrenează o diferență osmotică între fluidul extracelular și cel intracelular care are ca rezultat reducerea apei intracelulare urmată de deshidratarea celulei prin dezechilibrarea balanței osmotice. Creșterea concentrației ionice intracelulare determină rupțiuri ale membranelor celulare și denaturarea protoplasmului.

Formarea cristalelor de gheață intracelulară când fluidul intracelular îngheață poate determina fracturarea mecanică a celulei. Aceste efecte sunt cunoscute sub numele de artefacte generate de cristalele de gheață.

Distrugerile provocate de cristalele de gheață depind de mărimea și de tipul de cristale formate în timpul procesului de congelare. Cristalele de gheață hexagonale mari vor produce leziuni structurale majore în celule și țesuturi, pe când cristalele de gheață mici, cubice, vor cauza leziuni celulare minime.

Ideal ar fi ca metoda de congelare să nu determine formarea de cristale de gheață care să producă modificări celulare.

Este posibil să reducem nivelul de formare al cristalelor de gheață prin reducerea punctului de răcire. Aceasta se poate realiza prin mai multe metode:

utilizarea unor factori crioprotectori. Acești factori cresc vâscozitatea sub temperatura de 0°C reducând mobilitatea moleculelor de apă. „Constrângând” moleculele de apă să rămână pe loc, este prevenită formarea cristalelor de gheață și conglomerarea acestora sub forma nucleelor de cristale. Crioprotectorii folosiți curent sunt de tip nepenetrant (polivinil-pirrolidona, dextranul, hidroxietil-amidonul, sucroza) sau de tip penetrant (dimetilsulfoxid-ul (DMSO), glicerolul, etilenglicolul, și dimetilformamida). Majoritatea autorilor recomandă pentru congelarea țesuturilor la temperaturi mari, o soluție de 0,5 mol/l de sucroză în 3,5 mol de dimetilsulfoxid, care să impregneze materialul biologic înainte de congelare;

selecția atentă a criogenilor, pentru că sunt disponibili un număr mare de criogeni cu temperaturi și rate de transfer a căldurii, absolute diferite. Menționăm că nitrogenul lichid (azotul lichid -196°C) produce înghețarea rapidă a țesutului putând cauza leziuni celulare și tisulare foarte mari, mergând până la fracturarea celulei. Practic, acest criogen nu ar putea fi utilizat. Totuși, el este mult utilizat pentru conservarea probelor biologice timp îndelungat deoarece stratul de nitrogen gazos care se formează la suprafața probei imediat după imersia acesteia, reduce considerabil transferul brusc de căldură, reducând leziunile celulare și moleculare. De asemenea, folosind talcul ca înveliș al probei (țesutului) se poate reduce acest efect. Alți criogeni utilizați frecvent în laboratoarele de cercetare sunt: nitrogenul lichid izopentan (-150°C), dioxidul de carbon (-70°C) și refrigeratorul de contact (-30°C), care este cel mai simplu și cel mai utilizat criogen.

Realizarea unor secțiuni histologice de bună calitate folosind microtomul cu răcire pe preparatele nefixate este totuși foarte dificilă deoarece trebuie menținută temperatura optimă de secționare dar și temperatura camerei. În plus, cupele histologice congelate, secționate, tind rapid să se dezghețe și să devină lipicioase din cauza proteinelor nefixate. De aceea este preferabil ca țesutul să fie fixat înainte de a fi congelat, în formalina 10%, normală sau saina, caldă sau fierbinte, 1-2 minute. Fixatorul formol-calcium este, de asemenea, indicat. Fixatorii alcoolici trebuie evitați, alcoolul perturbând punctul de înghețare al țesutului.

Utilizarea unor medii infiltrante. Secțiunile anumitor țesuturi fixate ca: ficatul, splina, creierul, au tendința de a se sfărâma. Pentru a reduce aceasta fragilitate țesuturile pot fi infiltrate cu un mediu

protector. Dintre acestea cele mai utilizate sunt: sucroza 30% în formaldehidă 10%; glicerol 10% în formaldehidă 4% și dimetilsulfoxidul 2%, sau o mixtură apoasă de glicerina și gelatina. Cea mai utilizată este metoda de infiltrare cu gelatina (se dizolvă 16 g gelatina în 70 ml apă distilată; se adaugă 15 ml de glicerina și un cristal de tymol; se stochează la 4°C. Se fixează țesutul în formalina 10% 3-12 ore, se spală apoi în apă curgătoare 6-8 ore, se transferă țesutul într-o mixtură proaspătă de gelatină-glicerina într-o forma potrivită ca să se formeze un bloc, se pune apoi blocul congelare peste noapte după care se poate secționa.

utilizarea criostatului. Pentru a obține secțiuni cu grosimea de 5 microni sau mai puțin, este necesar să se utilizeze un criostat. Criostatul rezolvă problema menținerii temperaturii constante a probei în timpul secționării, cât și a mediului ambiant. Temperatura mediului este de -40°C. Cuțitul de microtom trebuie curățat cu xilen după fiecare utilizare, urnat de ștergere cu alcool etilic. Pentru reducerea frecării dintre secțiune și cuțit se recomandă acoperirea suprafeței cuțitului cu spray de teflon sau polișarea cuțitului cu polish metalic.

CAPITOLUL III

COLORAȚII NUCLEARE

Pentru studul celulelor, majoritatea cercetătorilor au căutat să găsească metode de diferențiere cât mai evidente a cele două elemente componente fundamentale ale acesteia: nucleul și citoplasma. De-a lungul timpului au fost descoperiți și utilizați mai mulți coloranți nucleari.

Cei mai cunoscuți coloranți nucleari sunt: hematoxilina, tionina, albastru de metilen, albastru de toluidină, tionina, carminul, galocianina, safranina, Kernechtrot, metil piroina, naftazarina ș.a. Unii dintre aceștia sunt coloranți naturali (hematoxilina, carminul), alții sunt sintetici (tionina, albastru de toluidină, albastru de metilen)

Coloranții nucleari sunt substanțe cu reacție bazică care se cuplează chimic cu acizii nucleari.

I. HEMATOXILINA

La ora actuală cel mai utilizat colorant nuclear este hematoxilina.

Hematoxilina este un colorant natural extras din lemnul copacului *Haematoxylon campechianum*. Extrasele conțin cantități considerabile de impurități ca de exemplu tanini, substanță rășinoasă, carbohidrați etc. Chiar și compoziția preparatelor comerciale variază mult de la o serie la alta. În comerț hematoxilina se găsește sub formă de pulbere de culoare galben pai și nu colorează țesutul.

Hematoxilina singură nu este un colorant. Pentru a deveni colorant ea trebuie oxidată la hemateină.

Capacitatea de colorare a hemateinei și a altor coloranți.

Hemateina singură este un colorant slab acid. Ea are capacitatea de a colora secțiunile tisulare în tonuri diferite de la galben la roșu pal. În structura sa ea conține un nucleu parachinoid numit cromofor, care conferă capacitatea de colorare a diferiților compuși chimici. Structural, el este înrudit cu benzenul, o structură ciclică de 6 atomi de carbon în care toate legăturile sunt egale dar pot să-și schimbe poziția fără să modifice configurația moleculei. Poziționarea reversibilă a legăturilor, denumită o modificare "în rezonanță" apare când câmpurile electromagnetice sunt absorbite de electroni dispuși de-a lungul lanțurilor de legături duble conjugate.

Pentru a fi clasificat ca și colorant un compus nu trebuie să aibă doar un cromofor ci și un grup de ionizare (auxocrom) care permite substanței colorante să se atașeze de diferite grupări terminale tisulare. Auxocromii (cum ar fi terminația -

NH_2) pot avea de asemenea tendința de a crește intensitatea culorii. În cazul hemateinei, aceasta se poate transforma într-un intens colorant nuclear prin combinarea ei cu un metal (aluminu, crom, fier), prin procesul de chelare. Majoritatea coloranților nucleare utilizați în mod curent sunt compuși de aluminu ai hemateinei, denumiți frecvent "hematoxiline alau".

Hemateină + alau = Hemalaun

Se cunosc puține studii chimice referitoare la reacția dintre alau și hemateină.

Se presupune că aluminu (Al^{3+}) reacționează cu hemateina în următorul mod: $2\text{Al}^{3+} + \text{Hemateină (slab acidă)}$ rezultă Hemalaun (un compus intens bazic). El este capabil să se combine cu grupările acide din celulă și țesuturi (ADN nuclear, ARN citoplasmatic, unele polizaharide acide și unele proteine prezente în citoplasmă). În soluție complexul metallic acționează ca un indicator, devenind roșu la un pH mai mic de 3 și violet închis spre albastru la un pH mai ridicat.

Selectivitatea nucleară. Pentru a obține o colorare nucleară mai bună se poate adauga:

- un exces de acid, sau
- un exces de alau (sulfat de aluminu și potasiu, sau sulfat de aluminu amoniacal).

Colorarea cu soluții de hemalaun intens acide permite acidului să elibereze grupările slab acide în secțiunea tisulară, protejându-le astfel de fixarea lor de către complexul hemalaun. Adăugând acid la soluția de hematoxilina-alau sunt împiedicate, de asemenea, efectele oxidante rapide ale unor agenți oxidanți chimici. Aceasta permite soluției de hemalaun să mențină o parte din hematoxilina neoxidată în echilibru cu forma sa oxidată, hemateina, asigurând astfel o mai bună colorare.

Folosirea alauului în exces pentru a intensifica colorarea nucleară permite selectiv ionilor pozitivi (cationilor Al^{3+} , K^+ sau NH_4^+) să concureze cu hemalaunul pentru situsurile de legare de secțiunea tisulară. Astfel, reacția cu hemalaunul este încetinită.

Correspondența formulei de mai sus, 1 g de hematoxilina va lega 0,15 g aluminu. Soluțiile de hemalaun cel mai frecvent folosite, conțin următoarele cantități (în g) de aluminu per g de hematoxilina:

- hemalaunul acid Mayer	2,8 g Al/g de hematoxilina;
- hemalaunul acid Ehrlich	0,08 g Al/g de hematoxilina;
- hemalaunul Harris	0,6 g Al/g de hematoxilina;
- hemalaunul Delafield	0,6 g Al/g de hematoxilina;
- hemalaunul Hansen	1,1 g Al/g de hematoxilina.

Hemalaunul acid Ehrlich are conținutul cel mai scăzut de aluminu dar acest dezavantaj este bine compensat prin conținutul ridicat de acid, alcool și glicerol.

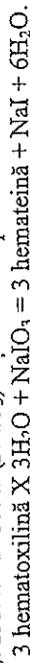
Încetinirea colorării poate fi obținută adăugând alcool sau glicerol soluției de hemalaun. Ambele substanțe împiedică ionizarea și astfel diminuează reactivitatea. Deși aceste principii sunt cunoscute încă de la sfârșitul secolului al XIX-lea, ele au fost repede uitate în prezent.

Alcoolul acționează în plus și ca un conservant. Glicerolul are un efect stabilizator care protejează soluția împotriva supraoxidării și previne evaporarea rapidă.

Înainte de folosire, soluția de hemalaun trebuie filtrată deoarece se poate forma un precipitat albastru negricios care va acoperi secțiunile colorate.

Intensitatea colorației albăstrui a soluției de hemalaun depinde de prospețimea mordantului alau. Soluțiile de hemalaun mai vechi pot forma acid sulfuric liber din alau, determinând astfel virarea culorii soluției spre roșu.

Principiile chimice ale oxidării complete. Calitatea unei soluții de hematoxilina depinde nu numai de folosirea unui mordant, dar și de oxidarea sa corespunzătoare. În primul rând, pentru a colora situsurile tisulare, ea trebuie să fie oxidată la hemateină. Procesul, cunoscut și sub denumirea de "maturizare", implică de obicei oxidarea lentă a hematoxilinei în soluții de către oxigenul din aer. Acest proces durează de la 10 zile la câteva săptămâni. Maturizarea mai rapidă poate fi obținută chimic prin adăugarea diferiților oxidanți (iodat de sodiu, permanganat de potasiu, bicromat de potasiu, clorat de potasiu, perclorat de potasiu, iodat de potasiu). Iodatul de sodiu (NaIO_3) acționează după formula:



O moleculă de iodat de sodiu va oxida 3 molecule de hematoxilina la hemateină. Cantitativ, 0,187 g NaIO_3 vor oxida 1 g de cristale de hematoxilina. Dacă este adăugat mai mult iodat de sodiu, oxidarea va continua dincolo de stadiul de hemateină. Acești produși de oxidare mai accentuată colorează slab nucleii și dau o culoare maronie difuză secțiunilor tisulare. Ca rezultat al supraoxidării, nucleii pot să apară "maro" în loc de albaștri.

Concentrația oxidantului chimic este critică. Orice exces va supraoxida hematoxilina și soluția se va deteriora în câteva zile.

Când se realizează oxidarea hematoxilinei în hemateină prin adăugarea unui oxidant chimic, soluția trebuie lăsată cel puțin 10 minute pentru ca iodatul de potasiu să poată realiza oxidarea, după care se poate adăuga glicerolul sau alte ingrediente.

Sunt recomandate următoarele cantități de oxidanți chimici pentru 1 g de hematoxilina:

- iodat de sodiu	0,20 g (sau 2 ml în soluție apoasă 10%);
- permanganat de potasiu	0,177 g;
- bicromat de potasiu	0,28 g;
- cloratul de potasiu	0,11 g;
- percloratul de potasiu	0,01 g;
- iodatul de potasiu	0,20 g;
- oxidul mercuric	0,50 g.

Deoarece cantitatea de hemateină dintr-o hematoxilina îmbuteliată este variabilă și necunoscută, supraoxidarea poate să apară chiar și la aceste cantități. Unii autori recomandă cantități mai mici.

Rata oxidării va fi de asemenea influențată de tipul de solvent folosit: soluțiile apoase neutre permit formarea hemateinei în câteva ore; soluțiile acide încetinesc procesul de oxidare; soluțiile alcaline îl accelerează. Soluțiile alcoolice,

aceea s-ar putea să devină dificil să întrerupem diferențierea acidă exact la momentul potrivit.

Pentru o colorare adecvată se recomandă să nu se coloreze țesuturi diferite în același timp.

Gradul de diferențiere se va urmări la microscop, deoarece diferitele țesuturi captează hemalaunul mai mult sau mai puțin. De exemplu, splina și timusul necesită o diferențiere mai mare decât ficatul sau rinichiul. De asemenea calitatea secțiunii (grosimea, finețea) ar putea juca un rol important în modul în care țesutul eliberează hemalaunul în soluții acide. Ca o concluzie, colorarea regresivă nucleară diferă de la o secțiune la alta și de la o tehnică la alta. De aceea pare rezonabil să evităm supracolorarea dacă este posibil încorporând un acid direct în soluția de hemalaun. Această abordare reduce semnificativ variațiile individuale provenite din diferențiere și necesită o atenție mult mai redusă.

VARIANTE DE HEMALAUN

Cărțile de histologie și histochimie citează o varietate largă de colorații bazate pe hematoxilină, printre care includ hematoxilinele MAYER, HARRIS, BOHMER, HANSEN, BULLARD, etc. Deși cel mai frecvent sunt denumite colorații cu hematoxilină, din punct de vedere chimic sunt soluții de hemalaun. Așa cum am mai afirmat, proprietățile colorante ale soluțiilor hemalaun diferă destul de mult de cele ale soluțiilor de hematoxilină neoxidată.

Comparând numeroasele sluzi hemalaun s-a observat ca marea majoritate a laboratoarelor prefera variantele HARRIS, MAYER, LILLIE pentru colorațiile hematoxilină-eozină uzuale. În SUA, hematoxilina HARRIS este metoda de colorare cea mai răspândită, în special pentru piesele chirurgicale. Pentru colorațiile de rutină pe țesuturile provenite de la autopsie se folosește cel mai frecvent hematoxilina MAYER. Cu toate acestea alegerea hematoxilinei este o preferință a fiecărui laborator. De aceea considerăm că următoarele date vor fi utile în alegerea uneia dintre soluțiile de hemalaun.

1. Hemalaunul MAYER este foarte selectiv pentru cromatina nucleară și nu necesită operațiuni de diferențiere (este o colorație progresivă). Secțiunile pot fi lăsate în soluția de hemalaun timp de câteva ore fără a se supracolora. Tehnica este simplă și permite instruirea rapidă a tehnicienilor, laboranților și studenților. De asemenea, permite și o reducere considerabilă a timpului necesar obținerii unei colorații de calitate. Un dezavantaj ar fi că anumiți paraziți sau/și microorganisme încapsulate nu se colorează suficient de intens.

Hemalaunul MAYER conține:

- hematoxilină cristalizată	1 g;
- apă distilată	1000 ml;
- iodat de sodiu (NaIO ₃)	0,2 g;
- alaiun de aluminiu sau potasiu	50 g;
- acid citric	1 g;
- cloral hidrat (optional)	50 g.

Preparare: se dizolvă hematoxilina în apă distilată, se fierbe 15 min, apoi se adaugă iodatul de sodiu și se amestecă 10 min. Apoi se

care conțin și glicerină, întârzie procesul de oxidare și asigură astfel o valabilitate mai lungă soluției de hemalaun.

Tehnica preparării și folosirii unui hemalaun. Atunci când se prepară o soluție de hemalaun trebuie să adăugăm ingredientele respectând strict ordinea indicată.

Fiecare ingredient trebuie să se dizolve complet înainte de adăugarea următorului.

Soluția de colorare trebuie schimbată săptămânal indiferent de rata de utilizare a acesteia, cu excepția hemalaunului LILLIE.

În timpul colorării, cele mai multe soluții de hemalaun se diluează. Acest proces de diluare este din ce în ce mai accentuat pe măsură ce hemalaunul se leagă de țesut și, după folosire îndelungată, dispare progresiv din soluția de colorat.

Consecutiv, concentrația de colorant devine din ce în ce mai mică de-a lungul folosirii. Această pierdere a colorantului din soluție se manifestă printr-o colorație palidă a nucleului. O altă cauză de diluare a hemalaunului este și introducerea de apă în soluția de hemalaun, deoarece preparatele, înainte de colorare, sunt hidratate și oricât de bine ar fi scurse tot mai rămâne o cantitate mică de apă care ajunge în baia de colorant.

Supraoxidarea (supramaturarea) se poate produce după expunere prelungită a soluției la oxigenul din aer. Aceasta determină o colorație maronie a soluției. Adăugarea unui oxidant chimic în cantitate mai mare va conduce la același rezultat. În fiecare caz, nucleii din țesutul colorat cu asemenea soluții se colorează mai degrabă maron decât albastru.

Uneori colorarea slabă a nucleilor este datorată altor cauze. Astfel, colorarea palidă a nucleilor din osul decalcificat se datorează reducerii cantității de ADN nuclear de către soluția acidă de decalcifiere. În ciuda extragenii parțiale a ADN-ului, soluțiile colorante de tip Fe-hemateină (Fe-hemateină Weigert), colorează acești nucleii destul de bine.

Țesuturile fixate în soluții Zenker pe perioade lungi (săptămâni sau luni), sau depozitate în alcool timp de ani, prezintă inegalități de colorare nucleară. În mod obișnuit, colorarea țesuturilor suprafixate poate fi îmbunătățită prin tratarea anterioară cu acid nitric diluat 1/10, timp de 5 minute urmată de o bună uscare înainte de colorarea cu soluția de hemalaun.

Tipuri de colorații nucleare. Colorarea nucleilor poate fi progresivă sau regresivă. Colorarea progresivă se realizează sub control microscopic urmărind la anumite intervale de timp aspectul nucleilor, coroborat cu aspectul general al țesutului, oprind colorarea când nucleii sunt bine evidențiați, iar citoplasmele sunt albastru-palid sau necolorate.

Pentru a obține o colorare nucleară selectivă se recomandă o supra-colorare a secțiunilor tisulare, urmată de înlăturarea excesului de colorant prin diferențiere în soluții slab acide. În acest fel se realizează o colorație regresivă.

Soluțiile de decolorare sunt acide și de aceea pot înlătura excesul de hemalaun prin competiție cu grupările acide care leagă moleculele de colorant în țesut. Înlăturarea inițială a hemalaunului legat de țesut, se produce de pe grupările stabilite legături relativ slabe cu complexul colorant (ex. grupările

adaugă celelalte substanțe în ordinea indicată mai sus. În final soluția trebuie să aibă o culoare roșie spre violet. Se poate utiliza după 3-4 zile.

Varianța LILLIE a hemalaunului Mayer

Hemalaunul Lillie este o colorație excelentă, selectivă pentru nucleu, atât de intensă încât sunt suficiente 5 minute de expunere. Este de amintit faptul că hemalaunul Lillie își menține stabilitatea o perioadă mai mare. Ea poate fi folosită continuu timp de trei luni dacă se completează pierderile prin evaporare. Dacă se adaugă acid acetic glacial în soluție, se elimină necesitatea diferențierii în acid-alcool.

2. Hemalaunul HARRIS

Este utilizat pentru colorații regresive. Rezultatele foarte bune se obțin când secțiunile sunt diferențiate cu atenție. Din păcate este greu să obținem rezultate identice de la același specimen pe secțiuni colorate în timpi diferiți. Este o tehnică de colorare excelentă, dar necesită atenție sporită și un tehnician bine pregătit, care să oprească colorarea și diferențierea la momentele oportune.

Hemalaunul Harris conține:

- hematoxilina cristalizată 5 g
- alcool etilic absolut 50 ml;
- alaua de amoniu sau potasiu 100 g;
- apă distilată 1000 ml;
- oxid roșu de mercur 2,5 g;
- acid acetic glacial 20 ml.

Preparare: se dizolvă hematoxilina în alcool; se dizolvă alaua în apă fierbinte; se îndepărtează de pe foc și se amestecă cele două soluții. Se încălzește soluția rapid circa 1 min, după care se înlătură de pe foc și se adaugă, puțin câte puțin, oxidul de mercur. Se răcește rapid într-un bazin cu gheață sau apă rece; se adaugă acidul acetic glacial. Se filtrează înainte de utilizare.

Hemalaunul Harris modificat

O metodă modificată a hemalaunului Harris constă în înlocuirea oxidului de mercur din conținut, extrem de toxic, cu un alt agent oxidant, și anume cu iodatul de sodiu ($0,37 \text{ g NaIO}_3$). Acesta din urmă este folosit în cantități mici pentru a matura soluția de hemalaun.

3. Hemalaunul Delafield

- hematoxilina cristale 5 g;
- alcool etilic 95% 250 ml;
- iodat de sodiu 10% 10 ml.

După 10 minute se adaugă:

- soluție apoasă saturată de amoniu (circa $15 \text{ g}/100 \text{ ml}$) 800 ml.

Se agită 1 minut pentru omogenizarea soluției, după care se adaugă:

- glicerina 200 ml.

Colorantul poate fi utilizat imediat; soluția trebuie filtrată înainte de utilizare.

4. Hemalaunul acid Ehrlich

- hematoxilina cristale 4 g;
- alcool etilic 95% 200 ml;

Se dizolvă hematoxilina în alcool, apoi se adaugă:

- apă distilată 200 ml;
- iodat de sodiu 10% 8 ml.

Se lasă 10 minute după care se adaugă:

- alaua de amoniu sau potasiu 6 g;
- glicerina 200 ml;
- acid acetic glacial 20 ml.

Poate fi utilizată imediat.

5. Hemalaunul Böhmer

- hematoxilina cristale 5 g;
- alcool etilic 95% 60 g;
- apă distilată 1000 ml;
- iodat de sodiu 10% 10 ml.

Se lasă 10 minute după care se adaugă:

- alaua de amoniu 100 g.

Se agită până când alaua de amoniu se dizolvă complet.

Se poate folosi după 10 minute.

6. Hemalaunul feric Heidenhain

- hematoxilina 0,5 g;
- alcool etilic 95% 10 ml.

Se dizolvă hematoxilina în alcool apoi se adaugă:

- apă distilată 90 ml;
- iodat de sodiu 10% 1 ml;

Se lasă 10 minute, după care se adaugă:

- alaua de fier (facultativ) 2 g.

7. Hemalaunul Hansen

- hematoxilina cristalizată 1 g;
- alaua de potasiu 20 g;
- permanganat de potasiu 1 g.

Preparare: se dizolvă hematoxilina în 10 ml de apă distilată; separat se dizolvă alaua de potasiu în 200 ml de apă distilată. După 12 ore se amestecă cele două soluții și se adaugă, pentru maturare rapidă, 3 ml dintr-o soluție ce conține 1 g de permanganat de potasiu dizolvat în 16 ml de apă distilată. Se amestecă bine, după care se fierbe 1 min. Se lasă să se răcească și se filtrează.

8. Hemalaunul feric Weigert

- hematoxilina 1 g;
- alcool etilic 95% 100 ml;
- iodat de sodiu 10% 2 ml;

Se dizolvă hematoxilina în alcool după se adaugă iodatul de sodiu. Se lasă 10 minute după care se adaugă 2,5% clorură de fier.

Alte complexe colorante hemateină-metal

Și alte săruri de metale (Pb, Cu, Tu, Fe, Cr, Mb) se pot combina cu coloranții ca hemateina. Aceste săruri metalice sunt denumite "mordanți". Tipic, sărurile metalice sunt folosite sub forma sulfatilor sau, mai frecvent, a sulfatilor dubli care sunt cunoscuți ca "alauni". Cei mai folosiți alauni sunt:

- alaunul de potasiu: $Al_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 24 H_2O$;
- alaunul de amoniu: $Al_2(SO_4)_3 \cdot (NH_4)_2 SO_4 \cdot 24 H_2O$;
- alaunul de fier: $Fe_2(SO_4)_3 \cdot (NH_4)_2 SO_4 \cdot 24 H_2O$;
- alaunul de crom: $Cr_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 24 H_2O$.

Pot fi folosite și alte tipuri de săruri ($FeCl_3$).

Combinarea unui mordant cu un colorant (hemateina) formează un lac colorant care se poate lega la componentele tisulare realizând un depozit colorant insolubil. Coloranții capabili să formeze chelatori posedă o grupare fenolică (-OH).

Așa cum s-a mai arătat, complexul alaun-hemateină acționează ca un indicator virând în roșu la un pH mai mic de 3 și în violet spre albastru la un pH mai ridicat.

9. Hemalaunul crom-alaun

Lacul hematoxilină - crom alaun se prepară astfel:

- se dizolvă alaun de crom 10g în 250 ml apă distilată; se fierbe amestecând bine până când soluția virează în verde;
- se dizolvă 1 g de hematoxilină în 15 ml de apă distilată fierbinte, după care se adaugă la soluția de crom alaun de mai sus și se fierbe bine;
- se adaugă 5 ml de acid sulfuric 10%;
- se adaugă picurând treptat și amestecând în vârtejuri 0,552 g bicromat de potasiu dizolvat în 20 ml de apă distilată;
- se fierbe amestecul 1-2 minute până la dizolvare completă. Se răcește și se filtrează înainte de fiecare utilizare.

Notă: culoarea citoplasmei poate fi accentuată prin scăderea cantității de acid sulfuric cu 1-3 ml, sau prin adăugarea în soluție a amoniacului sau a carbonatului de sodiu.

Soluția de hemalaun crom-alaun se păstrează bine și colorează nucleii în albastru închis în 30 secunde până la 5 minute. Supracolorarea structurilor tisulare se realizează greu.

Tehnica de colorare

- deparafinarea și hidratarea secțiunilor ca de obicei;
- colorarea secțiunilor cu hemalaun de alaun de crom până la 1 oră;
- spălare rapidă în acid clorhidric 0,36N (aproximativ 3-3,2% HCl);
- spălare în apă curgătoare până când secțiunile devin albastre;
- contrastare (de preferință cu eozină-floxină);
- deshidratare,
- clarificare și montare;

Rezultate: nucleii și corpusculii Nissl se colorează în albastru închis (negricios).

Notă: în cazul soluției de hematoxilină pe bază de crom-alaun, cromul este mordantul în locul aluminiului.

Observații

Ca și aluminiul, metalele crom și fier sunt trivalente. În fiecare caz cationul (+) sării de mordant este interesant din punct de vedere histochimic. Cationul fieric (Fe^{3+}) determină culoarea violet a cristallului de hemalaun, iar cationul de crom determină culoarea violet închis a cristallului de alaun de crom.

Atașarea de țesut a lacurilor colorante de metal

Atașarea mordanților de situsurile tisulare este complicată. Ea este asemănătoare legăturii dintre metal și molecula de colorant. Deoarece sunt cationice, complexele hemateină-metal prezintă unele proprietăți de colorare ale coloranților bazi. Ele prezintă afinitate pentru grupările tisulare încărcate negativ (-). Atât coloranții bazi simpli cât și complexele colorant-mordant (care sunt cationice) au o atracție electrostatică pentru grupările tisulare încărcate negativ (anionice). Totuși, cele două clase de coloranți nu sunt compatibile direct. În cazul complexelor mordant-colorant, atracția electrostatică inițială slabă este înlocuită printr-o legătură covalentă mai puternică, permanentă. Astfel, în timp ce coloranții bazi legați electrostatic pot fi îndepărtați din țesut cu soluții mai alcoolice, complexele mordant-colorant rezistă. Astfel, coloranții compuși pe bază de metale pot forma și alte legături de tip chelat cu grupările anionice corespunzătoare din secțiunile tisulare. Această tendință este mai accentuată în cazul complexelor din fier și crom decât a celor cu aluminiu.

Un situs de legare comun este nucleul celulei deoarece el conține ADN. Complexele colorante metal-colorant se leagă de structurile nucleare chiar și după ce acizii nucleici (ADN; ARN) au fost extrași (ex. în țesuturile decalcificate). Se pare că în aceste cazuri complexele colorante se leagă de proteinele baze (histone) care rămân după extragerea acizilor nucleici.

10. Hematoxilina Weigert (clorură acidă de fier-hemalaun)

Soluția de hematoxilină Weigert se prepară astfel

Soluția A (maturizare în 1-5 zile):

- hematoxilină 1 g;
- alcool etilic 95% 100 ml.

Soluția B (preparată proaspăt):

- clorură ferică în soluție apoasă 29% 4 ml;

sau

- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2,48 g;

sau

- clorură ferică anhidră 1,5 g;
- apă distilată până la 100 ml.
- se adaugă acid clorhidric concentrat 1 ml.

Pentru a obține soluția de lucru se amestecă în părți egale soluția A și B (preparare proaspătă pentru cele mai bune rezultate).

Notă: După amestecul soluțiilor apar modificări rapide de culoare de la albastru închis la roșietic și la maroniu închis.

Soluția de lucru este destul de instabilă. De ceea se recomandă schimbarea acesteia după 2-3 săptămâni. Colorarea nucleară efectivă poate fi obținută în 3-5 minute. Țesuturile nu se supracolorează nici după 30 min. Supracolorarea nu apare

nici când țesuturile rămân în hematoxilină fericică Weigert mai mult timp decât este necesar.

Tehnica de colorare

- deparafinare și hidratare ca de obicei în apă distilată;
- colorare cu soluția de lucru Weigert - timp de 5-10 min;
- spălare bine în apă curgătoare;
- contrastare (preferențial);
- deshidratare;
- clarificare, montare.

Rezultate: nucleii se colorează în albastru-negricesc.

Notă: Soluțiile de fier-hemalaun sunt folosite în special pentru colorarea nucleilor pe secțiunile tisulare care vor fi contrastate cu soluții slab acide (metoda van Gieson și alte metode tricromice). Soluțiile slab acide dizolvă cu ușurință lacul de aluminiu din hemateina și astfel decolorează nucleii. Fierul este mai rezistent la acizii slabi. El nu poate fi îndepărtat din țesut nici de acizii puternici.

Observații. Sărurile ferice (Fe^{3+}) care sunt folosite ca mordant pot și ele să oxideze hematoxilina. În schimb ioni ferici (Fe^{2+}) sunt reduși la forma de ioni ferosi (Fe^{2+}) și hematoxilina se supraoxidează rapid. Creșterea acidității soluției de hematoxilină fericică îi conferă acesteia o rezistență mai mare la oxidare și, în plus, reduce tendința soluției de hematoxilină-ferică de a precipita. Lillie a aplicat acest principiu în formularea variantei sale de hematoxilină fericică Weigert, dublând conținutul de HCl al soluției de fier, oferindu-i concomitent și selectivitate nucleară. Pentru a stabili soluția și a-i crește valabilitatea, el a adăugat fier în forma Fe^{2+} (sulfat feros). Mai târziu a adăugat cantități suplimentare de Fe^{2+} în timp ce a redus conținutul de Fe^{3+} ($FeCl_3$). A rezultat o durată de viață mai lungă a soluției. În trecut Fe^{2+} a fost adăugat în forma de albastru feros de amoniu.

În mod cert rolul fierului ca mordant diferă de rolul său în oxidare. Slidders a verificat acest fenomen folosind sulfatul feros ca mordant și iodatul de sodiu (în loc de săruri ferice) pentru a oxida o soluție acidificată de hematoxilină. În plus el a adăugat clorură de aluminiu pentru a acidifica mai mult soluția; alternativ, aceasta a acționat ca un competitiv metalic pentru complexul Fe^{3+} -hemateină. Pentru complexul Fe^{3+} -hemateină, fierul feros va trebui să fie transformat în fier feric. După colorarea secțiunilor tisulare mai este necesară totuși diferențierea în acid alcool. Valabilitatea soluției de hemateină-ferică este crescută.

II. Colorația cu hemalaunul Harris și eozină

Se folosește pentru colorații regresive ale nucleilor și citoplasmei.

Hematoxilina Harris (folosind ca oxidant oxidul mercuric) conține:

- hematoxilină cristalină 5,0 g,
- alcool 100% 50 ml;
- albastru de potasiu sau amoniu 100 g
- apă distilată 1000 ml
- oxid mercuric (roșu) 2,5 g

Metoda de preparare:

- se dizolvă hematoxilina în alcool;
- se dizolvă complet albaunul în apă distilată fierbinte;

- se îndepărtează de pe foc și se amestecă cele două soluții;
- se pune din nou pe foc, agitând continuu, timp de 1 minut;
- se îndepărtează de pe foc și se adaugă oxidul mercuric "puțin câte puțin";

- se reincălzește vasul până la fierbere (soluția devine roșu-închis sau purpuriu;

- se înlătură după foc imediat și se răcește rapid prin trecerea vasului într-un bazin cu gheață sau apă rece.

Soluția este gata de utilizare după ce s-a răcit. Se filtrează înainte de folosire.

Se poate folosi ca oxidant și iodatul de sodiu: 0,37 g sau 3,7 ml soluție 10% $NaIO_3$ pentru a elimina din rețetă oxidul mercuric care prezintă o toxicitate foarte mare.

Notă: Adăugarea a 2-4 ml de acid acetic glacial la 100 ml de soluție colorantă crește calitatea colorației nucleare și elimină necesitatea diferențierii.

Soluția Acid-alcool:

- alcool 70% 1000 ml;
- acid clorhidric concentrat 10 ml.

Soluția apă amoniacală:

- apă de robinet 1000 ml;
- hidroxid de amoniu concentrat 28% 2-3 ml.

Tehnica de colorare

- deparafinare și hidratare obișnuite în apă distilată;
- colorare cu hemalaunul Harris 8-10 min;
- spălare scurtă în apă distilată;
- diferențiere în acid-alcool 3-10 cufundări rapide; (diferențierea trebuie controlată la microscop: nucleii trebuie să se vadă bine, iar fondul să fie puțin colorat sau necolorat. Este foarte dificil de a întrerupe diferențierea în alcool-acid în momentul optim).
- spălare rapidă în apă distilată;
- contrastarea în apă amoniacală până când secțiunile se colorează în albastru luminos. Pot fi utilizate și soluția de bicarbonat de sodiu 1% sau soluție saturată de carbonat de litiu;
- spălare în apă curgătoare la robinet 10-20 min;
- colorare cu eozină-floxină 15 sec;
- deshidratare;
- clarificare, montare.

Observații

Procedul de colorare cu hemalaunul Harris este o metodă de colorare regresivă. Hemalaunul supracolorează țesutul după care este îndepărtat excesul prin diferențiere în soluția de alcool-acid. Se presupune că diferențierea desface legăturile dintre țesut și mordant sau dintre mordant și colorantul însăși. Totuși, mecanismul precis de diferențiere este necunoscut.

Deoarece soluțiile de hemalaun acționează ca și coloranți bazici în care ei se leagă mai strâns de grupările tisulare acide (ADN), se pot folosi acizi slabi pentru diferențiere și înlăturarea excesului de colorant. Odată plasat în soluția de diferențiere, țesutul își schimbă culoarea în roșu; probabil această culoare apare

deoarece complexul hemalaun-mordant acționează ca un indicator care devine roșu la pH acid.

Spre deosebire de hematoxilina, eozina și floxina sunt coloranți artificiali sau sintetici (Xantene sau, mai exact, hidroxantene sau fluorone). Eozina, în ciuda dimensiunii sale mari este o substanță foarte difuzibilă care pătrunde rapid în țesuturile compacte ca și în hematii; pătrunde mai puțin în fibrele de collagen. Eozina este un colorant acid care se atașează puternic de reziduurile bazeice (histidină, lizină, arginină) ale proteinelor tisulare. Deoarece este un colorant acid eozina poate fi diferențiată într-o bază slabă după supracolorare. În acest sens poate fi utilizat alcoolul sau hidroxidul de amoniu. Deoarece coloranții de tip eozină sunt mai puțin solubili în alcool decât în apă, alcoolul încetinește rata de diferențiere față de soluțiile apoase.

În tehnicile hematoxilina-eozină, eozina Y este cea mai folosită. Ea are culoare roșu-gălbui. Floxina determină o culoare roșie în plus. Eozina B poate înlocui eozina Y, deoarece ea produce o culoare roșie intensă spre roșu-albăstrui a citoplasmelor.

Eozina și floxina posedă trei grupări aril. Diferența de colorabilitate a lor depinde de numărul de atomi de halogen conținuți. Eozina Y are 4 atomi de brom în moleculă, eozină B are 2 atomi de brom în moleculă, în timp ce floxina are 2 atomi de clor și 4 atomi de brom în moleculă.

Capacitatea acestor coloranți de a pătrunde în structurile histologice compacte derivă din tendința acestora de a rămâne în stare ionizată.

II. ALTE COLORAȚII NUCLEARE

În afara diferitelor tipuri de colorații cu hematoxilina, pot fi folosiți și alți coloranți pentru a evidenția nucleii. Dintre aceștia amintim: albastru alizarin S, albastru celestin S și galocianina. În plus nucleii și citoplasma pot fi evidențiați prin verde de metil pironina, Giemsa și metodele cu azur-eozină. Cu toate că nici una dintre aceste colorații nu este cu adevărat specifică pentru ADN nuclear, reacția Feulgen poate fi responsabilă pentru aceste colorații. Ca o reacție de identificare rapidă a nucleilor se poate folosi "roșu nuclear" (kernchtrot), în care nucleii se colorează în roz în loc de albastru (contrast bun pentru țesuturile supuse unor reacții ale fierului). În fesiutul nervos central violetul cresyl pune în evidență destul de bine atât nucleii cât și corpusculii NISSL. Diferențele colorații și mecanismele lor vor fi prezentate în continuare.

I. Carminul

Carminul este cel mai vechi colorant nuclear utilizat în tehnicile de histologie, citologie și histopatologie. Pentru colorarea nucleilor carminul se dizolvă într-un mediu puternic acidulat prin adăugarea de albastru de potasiu sau sulfat de aluminiu. Carmalaunul sau paracarminul colorează nucleii în roșu, iar carminul cu albastru de crou sau cu sulfat de aluminiu colorează nucleii în negru sau albastru-violet.

1.1. Carmalaunul Mayer

Preparare: se dizolvă în 200 ml apă distilată încălzită 10 g albastru de potasiu și 1 g de carmin acid. După răcire se filtrează și se adaugă 0,2 g de acid salicilic sau 1 ml de formol concentrat.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare cu carmalaunul Mayer - 15 minute;
- spălare în apă distilată - 2-3 minute;
- decolorarea citoplasmei cu soluție apoasă de albastru de potasiu 1% timp de 30-60 secunde, sub control microscopic;
- spălare abundentă în apă distilată;
- deshidratare;
- montare.

1.2. Paracarminul oferă o colorație a nucleilor mai bună decât carmalaunul Mayer.

Preparare: se dizolvă la cald în 100 ml alcool etilic 70% 1 g carmin acid, 0,5 g clorură de aluminiu și 4 g de clorură de calciu. Se lasă să se răcească și să se sedimenteze, după care soluția se filtrează.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare cu soluția de paracarmin - 15-30 minute;
- spălare în alcool etilic 70%;
- deshidratare în alcool;
- clarificare în xilen;
- montare în balsam.

1.3. Carminul - cromalaun. Colorează nucleii într-o nuanță de albastru închis spre negru.

Preparare: se dizolvă la cald în 100 ml apă distilată 6 g de albastru de crou. După dizolvare completă se adaugă 1 g de carmin. Se fierbe amestecul 15 minute, se lasă să se răcească și se filtrează. Se adaugă o granulă de timol. Soluția colorantă are o culoare albastru-închis și este foarte stabilă.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare în apă distilată;
- colorare cu soluția de carmin-cromalaun - 30-60 minute;
- diferențiere în alcool - acid clorhidric 0,5%;
- spălare bine în apă distilată;
- deshidratare în alcool etilic;
- clarificare;
- montare în balsam

2. Colorația cu roșu nuclear (Kernechtrot)

Soluția de roșu nuclear se obține astfel:

- roșu nuclear 0,5 g;
- sulfat de aluminiu soluție apoasă 5% 100 ml.

Se fierbe sulfatul de aluminiu, se înlătură de pe sursa de căldură și se adaugă roșu nuclear. Se dizolvă la cald timp de 10 minute după care se răcește și se filtrează soluția. Se adaugă câteva cristale de timol pentru conservare.

Tehnica de colorare:

- deparafinarea și hidratarea secțiunilor ca de obicei;
- colorarea cu roșu nuclear 5 minute;
- clătire în apă distilată;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate: nucleii se vor colora în nuanțe de roz până la roșu.

Deoarece are mare afinitate pentru nucleii, acest colorant poate fi folosit în combinație cu orice colorație. Nu colorează celelalte structuri celulare sau tisulare.

3. Colorația cu cresyl violet. Este o colorație pentru nucleii și corpusculii NISSL din țesutul nervos.

Fixatori preferați: formolul; acceptabil amestecul Bouin.

Soluții:

- Soluția stoc de cresyl violet.
- se încălzește apă distilată 800 ml;
- se adaugă violet de cresyl 5 g;
- se adaugă alcool absolut 200 ml.

- Soluția de lucru, pH 2,5:
- se filtrează soluție stoc de cresyl violet 120 ml;
- se adaugă acid acetic glacial 40 pic.

Tehnica de colorare:

- deparafinarea și hidratarea secțiunilor ca de obicei;
- colorarea cu soluție de lucru - 5-8 minute (pentru morfologie generală);
- contrastare 2-3 minute sau chiar mai puțin (30 secunde) în metoda imunoperoxidazei.

- deshidratare, clarificare, montare obișnuită.

Rezultate:

- nucleii și corpusculii Nissl se colorează purpuriu (ADN, ARN);
- citoplasma rămâne necolorată, eritrocitele se colorează palid;
- cartilajele, mastocitele și amiloizidul se colorează violet metacromatic până la roșu.

Notă: dacă țesuturile au fost supracolorate, se scoate colorantul (solubil în apă) în soluție de alcool de concentrație mai mică 70° în timpul deshidratării.

Observații: se colorează numai structurile ADN și ARN datorită pH-ului acid.

4. Colorația nucleară cu verde de metil pironină

Colorează ADN-ul nuclear în verde-albastru, iar ARN-ul citoplasmatic în roșu.

Fixatori: Zenker sau Carnoy care păstrează aciditatea nucleară; formolul 10% sau formolul tamponat.

Soluții:

- 1. Soluția verde de metil 2%:
 - verde de metil 2 g;
 - apă distilată 100 ml.
- 2. Soluția pironină Y 2%:
 - pironină Y 2 g;
 - apă distilată 100 ml.
- 3. Soluția de lucru de verde de metil pironină:
 - verde de metil 2% 22,5 ml;
 - pironină Y 2% 37,5 ml;
 - apă distilată 90 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare și hidratare în mod uzual;
- colorare cu verde de metil pironină - 6 minute;
- înlăturăți excesul dar nu până la uscare completă;
- deshidratare în alcool absolut;
- clarificare în xilen 2 băi a 2 minute;
- montare în Pertex.

Rezultate:

- ARN citoplasmatic în roșu;
- ADN nuclear în albastru - verde;
- mucusul verde până la albastru.

5. Colorația nucleară cu acridin oranj

Fixatori: sunt preferați fixatorul Carnoy sau alți fixatori care conțin alcool; formolul sau amestecul Bouin dau rezultate inferioare;

Soluții:

- 1. Tampon fosfat (pH 6)
 - fosfat de sodiu anhidru (Na_2HPO_4) 15 ml;
 - fosfat acid de potasiu (KH_2PO_4) 85 ml.
- 2. Acridin oranj 0,1%
 - acridin oranj 0,1 g;
 - tampon fosfat (pH 6) 100 ml.
- 3. Clorură de calciu 0,1M
- 4. Acid acetic 1%

Tehnica de colorare:

- deparafinare și hidratarea țesuturilor uzual;
- clătire în acid acetic 1% - 6 secunde;
- clătire în apă distilată, 2 băi;
- colorare cu soluția de acridin oranj 0,1% - 3 minute;
- clătire în tampon fosfat - 1 minut;

- diferențiere în clorură de calciu 0,1M - 30 secunde;
- se acoperă preparatul cu o picătură de tampon fosfat;
- se examinează la microscopul cu fluorescență.

Rezultate:

- ADN-ul prezintă fluorescență verde;
- ARN-ul prezintă fluorescență roșie.

6. Colorația nucleară Giemsa

Giemsa este un colorant complex denumit cozinat-azur utilizat pentru colorarea elementelor figurate ale sângelui. Poate fi folosit și pentru colorarea unor celule din țesuturi în special pentru evidențierea mastocitelor.

Fixatori: oricare; este preferat amestecul Zenker-acid.

Soluții:

- soluție Giemsa;
- soluția tampon fosfat pH 6,5:
 - fosfat de sodiu anhidru (Na_2HPO_4) 4,12 g;
 - fosfat acid de potasiu (KH_2PO_4) 5,13 g;
 - apă distilată 200 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare obișnuită și hidratarea secțiunilor în apă distilată; pentru frotiurile proaspete nu se execută această operație; se indică totuși ca frotiurile să fie uscate lent la temperatura camerei și nu la o sursă de căldură pentru că deformează celulele (eritrocitele iau forme variate: cu incizuri, de seceră, etc.) ceea ce pretează la confuzii cu anumite stări patologice în special prezența unor hemoglobine patologice.

- clătire în alcool acid - 1-2 minute;
- se acoperă fiecare lamă cu 2-3 picături de soluție Giemsa și se lasă 2 minute;
- se adaugă apoi peste colorant câte 4 picături de soluție tampon pentru fiecare picătură de colorant sau se pun 8-12 picături de soluție tampon; se lasă preparatul acoperit 10 minute;
- se clătește rapid în apă distilată;
- se deshidratează rapid, apoi se clarifică și se montează.

Rezultate:

- eritrocitele se colorează roz spre galben;
- polimorfonuclearele neutrofile prezintă nucleii colorați în albastru închis, citoplasma în roz, iar granulele în violet;
- eozinofilele prezintă nucleii colorați în albastru, citoplasma roz palid uneori spre albastru, iar granulele se vor colora în roșu-oranj;
- bazofiele vor prezenta nucleul colorat în albastru închis iar granulele în albastru spre negru;
- limfocitele vor prezenta nucleii albastru spre violet iar citoplasma albastru azur;
- plachetele sangvine se vor colora în violet.

Soluția Giemsa este un colorant cunoscut ca cozinat-azur. Ea se prepară din cozină Y (yellowish) sau cozină B la care se adaugă un alt colorant: tiazina. Pentru stabilizarea soluției, se adaugă glicerol și alcool metilic. Soluțiile Giemsa

diferă de la un laborator la altul în ceea ce privește cantitatea de cozină și tiazină. De aceea rezultatele nu sunt uneori constante.

Pentru frotiurile de sânge alcoolul metilic acționează și ca fixator celular.

7. Metoda Feulgen pentru evidențierea ARN-ului

Tehnica:

1. deparafinare;
2. hidratare;
3. trecere în soluție de acid clorhidric normal la 60° C 5 -10 min.
 - acid clorhidric pur 8,25 ml;
 - apă 100 ml;
4. oprirea hidrolizei prin imersie în apă;
5. clătire susținută în apă distilată;
6. trecere în reactiv Schiff - o oră și 30 de minute (se dizolvă în apă clocoțită 1 g de fuxină bazică în 200 ml apă distilată; se filtrează, se lasă să se răcească și se adaugă 2 g de metabisulfid de Na și 10 ml de acid clorhidric normal; se agită bine, se lasă în repaus câteva ore). Lichidul trebuie să fie incolor sau colorat ușor în galben-pai. Poate fi conservat timp îndelungat la rece și în flacon bine închis.
7. spălare timp de 2 minute în 3 băi consecutive de apă sulfuroasă, pregătită în momentul folosirii:
 - soluție de bisulfid de Na 10% 5 ml;
 - acid clorhidric normal 5 ml;
 - apă 90 ml.

8. spălare în apă curentă;

9. colorare de fond cu verde de lumină;

- verde de lumină soluția stoc:

- verde de lumină 0,2 g;
- apă distilată 100 ml;
- după dizolvare se adaugă acid acetic glacial 0,2 ml.

- verde de lumină- soluția de lucru:

- verde de lumină soluție stoc 20 ml;
- apă distilată 100 ml;

10. deshidratare;

11. montare în balsam.

Rezultate: nucleii se vor colora foarte bine în violet.

CAPITOLUL IV

COLORAȚII PENTRU ȚESUTURILE CONJUNCTIVE

1. Colorația Hemalaun-Eozină (Hemalaun MAYER)

Colorația cu Hemalaun-Eozină se utilizează pentru colorarea progresivă a nucleilor și citoplasmei.

Fixatori: colorația reușește după oricare fixator.

Soluțiile folosite:

Hemalaunul Mayer acid:

- hematoxilina cristalizată 1,0 g;
- apă distilată 1000,0 ml;
- iodat de sodiu (NaIO_3) 0,2 g;
- alaua de amoniu sau potasiu (aluminiu sulfat) 50,0 g;
- acid citric 1,0 g;
- clorhidrat (opțional) 50 g;

Adăugarea cu precizie a cantității de NaIO_3 este foarte importantă. O cantitate mai mare va supraoxida hematoxilina și în consecință nucleii se vor colora în maroniu palid. (Soluția de hemalaun supraoxidată va avea o culoare maronie).

Preparare: se dizolvă hematoxilina în apă distilată, se fierbe 15 minute. Se lasă să se răcească. Când s-a răcit se adaugă NaIO_3 și se lasă la cald 10 minute. Se adaugă apoi celelalte substanțe în ordinea indicată mai sus numai după ce ne-am asigurat că cel adăugat anterior s-a dizolvat complet. Se utilizează un agitator magnetic (nu se încălzește). În final, soluția are o culoare violet-roșieatică.

Notă: Soluția este stabilă și poate fi păstrată luni de zile. Totuși, în timpul folosirii îndelungate, hemalaunul este îndepărtat din soluție prin legarea de țesuturi în timpul colorării, reducând concentrația de hemalaun din soluție. De aceea nucleii vor fi colorați mai palid.

Soluția Eozină-Floxină

a. Soluția stoc Eozină Y

- eozină 1 g;
- apă distilată 100 ml;
- alcool 96% 300 ml;

Se dizolvă eozina în apă caldă. După răcire se adaugă alcoolul.

b. Soluția stoc Floxină

- floxină 1 g;
- apă distilată 100 ml;
- alcool 96% 300 ml.

Pentru dizolvarea floxinei trebuie, de asemenea, să se încălzească soluția.

c. Soluția de lucru eozină-floxină:

- eozină stoc 450 ml;
- floxină stoc 50 ml;
- acid acetic glacial 2 ml.

Notă: pentru țesuturile fixate în soluție de formalină se poate adăuga opțional soluție apoasă saturată de acid picric 5 ml la 500 ml soluție de colorat.

Tehnica de colorare:

- deparafinarea țesutului în trei băi succesive de benzen;
- hidratare în 3 băi de alcool (absolut, 95%, 80%);
- înlăturarea pigmentului hemosiderinic din țesut (vezi procedeele de îndepărtare a pigmentului);
- colorare cu hemalaunul Mayer 10-20 min (după fixare în soluție Zenker timpul de colorare poate fi mai lung, iar dacă am utilizat ca fixator formalina timpul de colorare este mai scurt);
- spălare în apă de robinet curgătoare 15-20 min (nu mai puțin);
- colorare cu soluție de lucru eozină-floxină 15 sec (10-30 sec);
- spălare scurtă în apă;
- deshidratare prin trecere rapidă: printr-o baie de alcool 80%, 2 băi de alcool 95% și 3 băi de alcool absolut;
- clarificare în amestec de alcool absolut/xilen (1/1) și apoi în câteva băi de xilol;
- montare.

Rezultate: nucleii se vor colora în albastru, citoplasma și diferite elemente ale țesutului conjunctiv în nuanțe de roz.

Observații:

Prelungirea fixării fără o spălare minuțioasă a țesutului poate afecta colorarea țesutului. Trebuie să se caute și să se găsească o formulă potrivită pentru fiecare tip de țesut sau organ, prin variația diferitelor ingrediente ale soluției de hemalaun Mayer și prin variația timpilor de colorare.

2. Colorația VAN GIESON

Coloranți și reactivi:

- hematoxilină Weigert sau Groat;
- picrofuxină van Gieson (soluție de fuxină acidă 1%, 10 ml);
- apă acidifiată 1/500 (cu acid acetic glacial);
- alcool acidulat 0,5% (cu HCl).

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- colodinare (facultativ);
- supracolorarea nucleilor cu hematoxilină Weigert sau Groat 10-15 min;
- diferențiere cu alcool acidulat (sub control microscopic, până rămân coloranți doar nucleii);
- văzarea colorației nucleare timp de 20-30 min în apă curentă sau în apă caldă;
- câteva minute în apă lătinată;
- diferențiere în apă acidifiată (dacă este cazul) sau trecere directă în alcool absolut pentru deshidratare;

- clarificare cu xilol-fenol și xilol,
- montare în balsam de Canada.

Rezultate: nucleii se colorează în negru, citoplasmele în galben, fibrele de collagen în roșu, membranele bazale și substanța fundamentală (bogată în mucopolizaharide acide) în roz, mucusul în gălbui sau roșu deschis, mușchiul și hematii, galben.

Observații

Dacă nucleii sunt palid colorați este semn că durata colorării cu hematoxilină a fost prea scurtă sau diferențierea cu alcool acidulat prea puternică sau, în sfârșit, colorarea cu picrofuxină prea lungă, astfel că acidul picric a putut decolora nucleii. Decolorarea citoplasmelor poate fi prevenită dacă în alcoolul pentru deshidratare se dizolvă puțin acid picric.

Preparatele se decolorează cu timpul, fapt ce poate fi amânat dacă montarea se face într-un balsam acid (în balsamul neutru se adaugă câteva picături de soluție saturată de acid salicilic dizolvat în xilol) sau dacă păstrarea lor se face la întuneric.

Hornowsky a recomandat combinarea colorației cu rezorcină-floxină Weigert (pentru fibrele elastice) cu colorația van Gieson, după metoda:

- deparafinare;
- colorare cu rezorcină-floxină Weigert - 15 minute;
- spălare cu apă curentă și apoi cu apă distilată;
- colorarea nucleilor cu hematoxilină Weigert - 3-5 minute;
- clătire cu apă distilată și apoi virare în apă curgătoare - 10-20 minute;
- colorare cu picrofuxină van Gieson - 30-60 secunde;
- spălare rapidă cu apă distilată;
- diferențiere rapidă în alcool 96°;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate: ca în metoda van Gieson; în plus, fibrele elastice apar colorate în albastru-violet.

3. Colorația Mallory

Se utilizează mai ales pe secțiuni la parafină, după fixări în amestecuri pe bază de sublimat. Evidențierea fibrelor de collagen este deosebit de accentuată.

Reactivi și coloranți:

- soluție apoasă de fuxină acidă (Rubin S) 0,5%;
- albastru Mallory:
 - albastru de anilină 0,5g,
 - oranj G 2g,
 - acid fosfomolibdenic sau fosfonungstic 1g,
 - apă distilată 100 ml.

dizolvare la cald, filtrare.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare și eliminarea precipitatelor mercurice;
- colorare 5 minute cu fuxină acidă;
- sugativare atentă cu hârtie de filtru;

- colorare cu albastru Mallory -10-20 minute;
- clătire cu alcool 96°;
- deshidratare cu alcool;
- clarificare cu xilol;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate: fibrele colagene se colorează intens în albastru, cartilajul, oscina și mucinele în diferite nuanțe de albastru; hematii și tecile de mielină în galben; fibrina, nucleii și citoplasmele în roșu.

Observații: după fixarea cu formol, se obțin rezultate bune numai dacă secțiunile hidratate se mordansează timp de 12-18 ore în amestecul: apă distilată 100 ml, bicromat de potasiu 2,5 g, acid acetic 5 ml. După spălare abundentă cu apă se poate începe colorarea.

3.1. Varianta Mallory-Endes este mai complicată dar evidențiază bine fibrina, fibrinoidul și hialinul. Se practică după fixare cu formol, pe secțiuni subțiri la parafină.

- secțiunile hidratate se tratează cu alcool anilinat -1 minut;
- clătire cu alcool etilic 96° și apoi cu apă distilată;
- colorare 45 minute cu soluția azocarmin pentru metoda Azan, la temperatura de 56°C. După răcire la temperatura camerei, diferențiere cu alcool anilinat, urmată de spălare 1 minut cu alcool acid și din nou clătire cu apă distilată;
- colorare 6-12 ore cu hematoxilina Mallory (hematoxilina 1g, acid fosfowolframic 20 g, apă distilată 1000 ml, hiperanganat de potasiu 0,177 mg);
- clătire cu alcool etilic 96°;
- colorare 1-2 minute cu albastru Heidenhain diluat în proporție 1/7;
- diferențiere cu alcool 96°;
- deshidratare,
- clarificare,
- montare.

Rezultate: nucleii se colorează în albastru-cenușiu, citoplasmele în violet, hematii în roșu-viu, collagenul și hialinul vechi în albastru, hialinul recent în roșu, fibrina și fibrinoidul în violet.

4. Colorația tricromică MASSON

Pentru obținerea unor rezultate corespunzătoare se recomandă ca fixarea preparatelor să se realizeze în amestecuri pe bază de sublimat, bicromat și acid picric. După fixare în formol, colorarea collagenului este necorespunzătoare. Acest neajuns se poate înlătura dacă secțiunile deparafinate și hidratate se mordansează peste noapte în lichidul Zenker.

Reactivi și coloranți:

- hematoxilina ferică Weigert;
- HCl în alcool etilic 96° în proporție de 0,5%;
- apă litmată;
- soluție colorantă A:
- ponceau R 2 g;

- fuxină acidă, 1 g;
- acid acetic 4 ml;
- apă distilată 300 ml,

Se filtrează.

- acid fosfomolibdenic soluție apoasă 1%;
- soluție colorantă B:

- albastru de anilină de metil 0,5 g,
- oranj G 2 g,
- acid acetic 2,5 ml,
- apă distilată 100 ml

Se filtrează.

- apă acetificată 1/500.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- îndepărtarea pigmentului: mercuric cu iod-tiosulfat de sodiu, urmată de spălare abundentă cu apă (numai dacă este cazul);
- colorare 10-20 minute cu hematoxilina Weigert;
- clătire cu apă distilată;
- diferențiere în alcool clorhidric sub control microscopic;
- clătire în apă;
- virare în apă litmată;
- colorare pe lamă cu soluția A timp de 10-15 minute;
- spălare abundentă cu apă distilată;
- mordansare cu acid fosfomolibdenic - 5 minute;
- fără spălare prealabilă, colorare în soluția B, 1-5 minute, în funcție de abundența țesutului conjunctiv;
- spălare în apă distilată;
- diferențiere în apă acetificată 3-5 minute;
- deshidratare cu alcool;
- clarificare cu xilol;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate: nucleii se colorează în roșu, nucleolii în negru, citoplasmele în roșu-violet deschis, hematii în portocaliu, collagenul, cartilajul, mucina și granulele bazofile în albastru, mușchii în roșu.

Observații: rezultatele satisfăcătoare se obțin și dacă soluția colorantă A conține numai fuxină sau numai ponceau R. De asemenea, soluția B poate fi înlocuită cu o soluție de verde lumină 2% în acid acetic cu care se colorează 5 minute. În acest caz, cartilajul, collagenul, mucina, granulele bazofile și amiloizidul se colorează în diferite nuanțe de verde.

5. Colorația tricromică MASSON, modificată de GOLDNER

Se realizează după fixarea preparatelor în fixatori apoși (formol, neurol, Zenker, Bouin), pe secțiuni la parafină groase de 5 microni.

Reactivi și coloranți:

Soluția I (trioxihemateina ferică a lui Hansen) este formată din:

- soluția A:
 - alaua feroamoniacial 10 g,
 - sulfat de anoniu 1,4 g,
 - apă distilată 150 ml;

Se încălzește ușor.

- soluția B:
 - hematoxilină 1,6 g,
 - apă distilată 75 ml;

Se dizolvă la cald.

După răcire se toarnă soluția A în soluția B (nu invers!) agitând continuu; soluția inițial albastră devine treptat de culoare violet închis. În acest moment soluția se încălzește treptat și se urmărește momentul în care culoarea soluției devine maroniu-inchis sau sepia, cu ajutorul unei bucățele de hârtie de filtru. Dacă virarea culorii nu se produce până în momentul atingerii punctului de fierbere, atunci fierberea nu va mai dura mai mult de 30-60 secunde, după care va fi răcită brusc și turnată într-o sticlă până la dop, pentru a preveni supraoxidarea. Virarea culorii soluției spre verde indică o supraoxidare ce se poate remedia picurând atâtea soluție de acid oxalic 10% până când soluția dobândește culoarea sepia. Durata de conservare este de 6 săptămâni. Înainte de utilizare se va filtra.

Soluția II (apă acetificată):

- acid acetic glacial 0,2 ml,
- apă distilată 100 ml;

Soluția III:

- ponceau de xylidină 0,2 g,
- fuxină acidă 0,1 g,
- soluție II 300 ml.

Soluția IV:

- acid fosforic 5 g,
- oranj G 2 g,
- apă distilată 100 ml;

Se lasă 24 ore, apoi se filtrează.

Soluția V:

- verde lumină 0,1-0,2 g,
- soluția II 100 ml.

Pentru colorare, soluțiile III și V se diluează de 10 ori cu apă acetificată (soluția II).

Tehnica de colorare:

- deparafinare
- hidratare;
- colorare cu soluția I 1-5 minute sub control microscopic;
- clătire cu apă curentă;
- colorare cu soluția III 5 minute;
- clătire în soluția II;
- diferențiere cu soluția IV 15 secunde - 30 minute;
- clătire în soluția II;
- colorare cu soluția V 5 minute;

diferențiere în soluția II 5 minute (aici secțiunile pot fi lăsate în așteptare 10-30 minute fără să le dăuneze);

- deshidratare cu alcool;
- clarificare cu xilol;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- nucleii se colorează negru-cenușu sau negru;
- citoplasmele - roșu-cărămiziu;
- unele granule de secreție - galben-auriu;
- hematile - galben-portocaliu;
- colagenul și mucusul - verde-albăstrui;
- fibrinoidul roșu-portocaliu strălucitor;
- alte structuri, în diferite tonuri de cenușiu-roșcat; striatiile fibrelor musculare normale și patologice se evidențiază deosebit de net.

6. Colorația tricromică după metoda Goldner-Szeckeli

Tehnica de colorare:

- deparafinare - 3 băi de benzen;

- hidratarea cu:

- alcool etilic absolut 5 min;
- alcool etilic 90° 5 min;
- alcool etilic 80° 5 min;
- alcool etilic 70° 5 min;

- spălare cu apă de robinet;

- colorarea nucleilor cu hematoxilina Mayer 15 min;

- spălare prelungită în apă de robinet (10-20 min);

- diferențiere în alcool clorhidric după formula:

- alcool etilic 96° 100 ml;
- acid clorhidric concentrat 5 picături;

Timpe de acționare: 2-3 secunde;

- spălare în apă de robinet;

- virare în soluție saturată de carbonat de litiu 30-60 sec;

- spălare în apă de robinet;

- colorarea secțiunilor cu soluția A:

- orange G 3 g;
- ponceau R 2 g;
- fuxină acidă 1 g;
- acid acetic glacial 3 ml;
- apă distilată 300 ml;

Timpe de acționare: 1-3 minute.

- spălare în 3 băi de apă acidificată cu acid acetic glacial 0,1% - 5 min;

- colorarea cu soluția B:

- verde de lumină 3 g;
- orange G 2 g;
- acid fosfomolibdenic 8 g;
- apă distilată 300 ml;

Timpe de acționare: 10-20 minute.

- spălare în 3 băi de apă acidifiată;
- deshidratare în două băi alcool etilic 96° 10 min;
- deshidratare în 3 băi alcool etilic absolut 15 min;
- clarificare în xilol fenicat 15 min;
- clarificare în 3 băi de xilol 15 min;
- montare în balsam de Canada;

Se păstrează la termostat la 37°C timp de 24 de ore.

Rezultate

- nucleii apar colorați în roșu închis sau maron;
- nucleolii în negru;
- citoplasmele roz-vioacei;
- eritrocitele în roșu portocaliu;
- fibrele de collagen în verde;
- fibrele musculare în roșu-brun.

7. Colorația azan Heidenhain

Deși mai dificil de executat, azan-ul este metoda de colorație generală cu cele mai spectaculoase rezultate, deseori în funcție de anumite adaptări, având și atribuțiile unei colorații citologice. Colorația reușește după majoritatea fixatorilor uzuali. După fixatori acizi sau în cazul pieselor supuse decalcifierii, secțiunile se colorează corespunzător, doar dacă sunt tratate, după hidratare, cu alcool anilinat timp de 30 minute.

Reactivi și coloranți:

- soluție apoasă saturată de azocarmin G (aproximativ 0,05-0,1%) acetificată cu 1-2 ml acid acetic la 100 ml soluție colorantă;
 - alcool anilinat (alcool etilic 70° 100 ml + anilină 1 ml);
 - alcool acetificat (alcool etilic 96° 100 ml + acid acetic 1 ml);
 - soluție apoasă 5% de acid fosforungstic;
 - albastru Heidenhain: se dizolvă la cald 0,5g albastru de anilină și 2g oranj G în 100 ml apă distilată; după răcire se adaugă 8 ml acid acetic; pentru colorare se face diluția: 1 parte colorant și 2-3 părți apă distilată.
- Toate soluțiile se conservă foarte bine: soluția azocarmin un an la temperatura laboratorului, dar numai 10 zile în etuvă la 60°C; soluția albastru Heidenhain 2 ani.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- eliminarea pigmentului mercuric (dacă este cazul);
- colorare timp de 1 oră, în etuvă, cu soluția azocarmin G în prealabil încălzită la 60°C;
- clătire cu apă distilată;
- diferențiere cu alcool anilinat, sub control microscopic, circa 2-3 min;
- oprirea diferențierii cu alcool acetic 30 sec-1 min;
- clătire cu apă distilată;
- decolorarea collagenului cu acid fosforungstic 30-60 min;
- clătire cu apă distilată;
- colorare timp de 30-60 minute cu soluția albastru Heidenhain diluată;

- în funcție de rezultat, clătire cu apă distilată, sau direct cu alcool 96°;
- deshidratare în alcool absolut;
- clarificare în xilen;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- nucleii se colorează intens în roșu-viu,
- citoplasmele în majoritatea lor se colorează în galben,
- fibrele collagene și de reticulină în albastru închis,
- diferitele granule de secreție în albastru închis, violet, galben, roz sau roșu,
- structurile conținând mucosubstanțe acide abundente (mucina) se colorează în albastru deschis,
- oseina în roșu sau galben,
- fibrele musculare striate, în funcție de gradul diferențierii apar în roșu, oranj sau galben,
- fibrele elastice nu se colorează,
- nevrogiiile apar adesea colorate în roșu deschis,
- hematiiile în roșu.

Observații

O primă precauție constă în a nu lăsa secțiunile după colorare la cald să stea în azocarmin la temperatura camerei, ci să fie imediat puse în apă distilată. Aici pot fi lăsate fără riscuri în așteptare. Colodina în strat subțire a secțiunilor este foarte utilă, căci previne dezlipirea lor la cald. Cele două diferențieri, cu alcool anilinat și acid fosforungstic trebuie bine corelate. În general, diferențierea cu alcool anilinat este suficientă după 2-3 minute, rareori mai mult. Extragerea azocarminului continuă în soluția de acid fosforungstic. Aici se decolorează fibrele collagene, musculare și citoplasmele. Dacă în alcoolul anilinat citoplasmele s-au diferențiat puternic, atunci tratarea cu acid fosforungstic nu va trece peste 20-30 minute; dimpotrivă, dacă după alcool anilinat persistă o tentă roșie, diferențierea cu acid fosforungstic se va prelungi la 2-3 ore și chiar mai mult. La sfârșitul colorației, o diferențiere insuficientă se traduce printr-o tentă predominantă roșie, nucleii fiind roșu "murdar", iar o diferențiere exagerată, printr-o dominanță de galben și albastru, căci albastru de anilină prinde în acest caz și pe nucleii. Clătirea cu alcool acetificat va fi de minimum 30 secunde, dar aici preparatele pot sta în așteptare, fără riscuri, chiar câteva ore. Durata colorării cu albastru Heidenhain depinde și ea de felul în care au fost conduse diferențierile premergătoare. Dacă s-a produs o diferențiere puternică în alcool anilinat și deci una mai scurtă în acidul fosforungstic, atunci colorarea conjunctivului va trebui scurtată și invers. În preparatele colorate cu albastru Heidenhain proaspăt, predomină tenta galbenă. La sfârșit, atunci când se dorește o colorare intensă a collagenului sau când durata colorării cu soluția Heidenhain a fost scurtă, preparatele vor fi trecute, fără spălare, direct în alcool absolut, care nu extrage deloc albastrul de anilină. Dimpotrivă, atunci când nu urmărim evidențierea prea intensă a collagenului se obține prin spălare cu apă distilată. O precauție hotărâtoare este aceea de a face toate spălările numai cu apă distilată neutră, apa alcalină fiind decolorată. De altfel, dacă dorim decolorarea completă a preparatelor, aceasta se obține fie cu o soluție apoasă 1% amoniac, fie cu apă litinată.

Variante: pentru evitarea colorației nucleare la cald s-a propus înlocuirea azocarminului G cu azocarmin B (apă distilată 100 ml, azocarmin B 0,1g, acid acetic 1-2 ml), cu care colorarea se face la temperatura laboratorului. Alcoolul anilinat trebuie de asemenea modificat: alcool 96° 100 ml, anilina 0,1 ml. În rest toți se face conform tehnicii descrise anterior.

- O variantă mai rapidă înlocuiește azocarminul cu Kernechtrot:
- colorarea nucleilor timp de 5 minute cu Kernechtrot 0,1g dizolvat în soluție apoasă 5% sulfat de aluminiu la cald, filtrare;
- spălare cu apă distilată;
- acid fosfomolibdenic 5 minute;
- spălare cu apă distilată;
- colorare 2 minute în albastru Mallory (albastru de anilină 0,5g, oranj G 2g, acid oxalic 2g, apă distilată 100 ml);
- clătire cu apă distilată;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare.

8. Metoda de impregnare argentică GÖMÖRI pentru fibrele de reticulină (în detaliu)

Fixatori indicați: Carnoy, Bouin, Susa, formol 10%.

Tehnica de colorare:

1. Deparafinare (trei băi de benzen) - 15 minute;
2. Hidratare (în alcooluri de concentrație descrescând)
 - alcool etilic absolut 3 min;
 - alcool etilic 90° 3 min;
 - alcool etilic 80° 3 min;
 - alcool etilic 70° 3 min;
3. Spălare în apă de robinet 10 min;
4. Oxidare cu soluție de permanganat de potasiu 1% 1 min;
5. Spălare cu apă de robinet 5 min;
6. Albire cu metabisulfat de sodiu 3% 5 min;
7. Spălare în apă de robinet 10 min;
8. Mordansare cu alaua de fier 2% 1 min;
9. Spălare în apă de robinet 10 min;
10. Spălare cu apă distilată (2 băi) 5 min.
11. Impregnare cu soluție argento-amoniacală 5-10 min.
12. Clătire rapidă cu apă distilată 3-5 sec.
13. Reducere cu formol 10% 5 min.
14. Spălare cu apă de robinet 5 min.
15. Tonare cu clorură de aur 10 min.
16. Spălare rapidă cu apă distilată 1-3 min.
17. Reducere cu metabisulfat de sodiu 3% 1 min.
18. Fixare cu tiosulfat de sodiu 1 min.
19. Spălare în apă de robinet 10-15 min.
20. Spălare în alcool etilic 70° 5 min.
21. Deshidratare în alcool etilic 80° 5 min.

22. Deshidratare în alcool etilic 90° 5 min.
23. Deshidratare în alcool etilic 96° 5 min.
24. Deshidratare în alcool etilic Absolut I 5 min.
25. Deshidratare în alcool etilic Absolut II 5 min.
26. Deshidratare în alcool etilic Absolut III 5 min.
27. Clarificare în xilol-fenicat (3 băi) 30 min.
28. Montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- fibrele de reticulină se evidențiază în negru intens;
- fibrele de collagen în galben-cafeniu;
- nucleii în negru;
- citoplasmele în cenușiu.

Notă personală: Punctul 12 (Clătire rapidă cu apă distilată) poate fi modificat cu: clătire rapidă cu apă de robinet. Se formează un precipitat alb-lăptos care înăltură excesul de soluție argento-amoniacală și permite realizarea unor colorații foarte bune fără punctul 15 (Tonare cu clorură de aur).

În funcție de timpul de clătire cu apă de robinet se pot evidenția:

- numai fibrele de reticulină dacă timpul de clătire este prelungit;
- fibrele de reticulină și cele de collagen, dacă timpul de clătire este mai scurt;
- fibrele de reticulină, collagen și celele, dacă timpul de clătire este foarte scurt.

9. Tehnica colorării cu orceină pentru evidențierea fibrelor elastice (Metoda Tanzer-Ujma)

Fixatori indicați: Carnoy, Bouin, Susa, formol 10%.

Soluții:

- Soluția de orceină 1%.
- orceină pulbere 1 g;
 - alcool etilic 700 100 ml;
- Se agită bine până la dizolvare completă.
După dizolvare se adaugă:

- acid clorhidric concentrat 1 ml.

Tehnică:

- deparafinarea (trei băi de benzen):
 - benzen I 5 min.
 - benzen II 5 min.
 - benzen III 5 min.
- hidratarea (în alcooluri de concentrație descrescătoare):
 - alcool etilic absolut 3 min.
 - alcool etilic 90° 3 min.
 - alcool etilic 80° 3 min.
 - alcool etilic 70° 3 min.
- spălare în apă de robinet 20 min.
- colorare cu orceină 1% - 12 ore la temperatura laboratorului sau 30-60 de minute la termostat la temperatura de 56°C.

- diferențiere în alcool etilic absolut 10 min
- clarificare în xilol 30 min
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- fibrele elastice se colorează în maroniu-roșcat.
- nucleii apar colorați slab în maron.

10. Metoda cu fuxină-paraldehidă (Gömöri)

Se aplică după fixări uzuale (formol, Bouin, Carnoy, Susa etc.), exceptând amestecurile ce conțin bicromat de potasiu, pe secțiuni la parafină. Este considerată ca fiind în prezent metoda cea mai specifică și foarte simplă ca execuție.

Reactivi:

- soluție Lugol:
 - iod metallic 1 g;
 - iodură de potasiu 2 g;
 - apă distilată 100 ml.
- soluție 5% tiosulfat de sodiu:
 - tiosulfat de sodiu 5 g;
 - apă distilată 100 ml.
- soluție fuxină-paraldehidă:
 - fuxină bazică 0,5 g;
 - apă distilată 100 ml;
 - acid clorhidric concentrat 1 ml;
 - paraldehidă 1 ml.

Prepararea soluției: se dizolvă fucsina în apă distilată, se adaugă acidul clorhidric concentrat și apoi paraldehida; se lasă la temperatura laboratorului 24 ore, până când soluția devine violet închis; periodic se poate verifica progresia reacției depunând pe o hârtie de filtru o picătură de colorant; soluția este maturată atunci când haloul roșu de la periferia petei nu mai apare sau este foarte redus.

Continuarea reacției este acum oprită prin filtrare, filtratul spălat de câteva ori cu apă distilată și apoi uscat la 50-60°C; substanța se poate conserva uscată (cu 1 g fuxină se obține 1 g fuxină-paraldehidă).

Pentru lucru se dizolvă 0,125 g fuxină-paraldehidă în 100 ml alcool etilic 70°, se poate utiliza la 24 ore după dizolvare. Prioritățile soluției se conservă timp foarte îndelungat, mai ales dacă soluția alcoolică este acidulată cu acid acetic glacial 1 ml la 100 ml de soluție colorantă sau dacă se păstrează în frigider.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- oxidare cu soluție Lugol 10-30 min;
- albire cu tiosulfat de sodiu 3-5 min; (cu acest prilej se elimină și precipitatul mercuric dacă fixatorul a conținut sublimat);
- spălare cu apă distilată 3 min;
- colorare cu fuxină-paraldehidă 0,125 g% acidulată 5-10 min;
- spălare cu alcool etilic 96°;

- diferențiere 10-20 secunde cu alcool 96° care conține 0,5 ml% acid clorhidric concentrat;
- clătire cu apă distilată;
- colorare de fond cu hematoxilină-eozină sau tricromicul Goldner;
- spălare;
- deshidratare în alcool etilic în concentrații crescătoare;
- clarificare în xilol;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate: fibrele elastice și structurile bogate în mucosubstanțe acide (granulele mastocitelor, substanța fundamentală a cartilajului și anumite mucine) se colorează în violet închis.

11. Metoda cu rezorcin-fuxină (Weigert)

Colorația se realizează pe preparate fixate uzual (în special cu alcool sau formol), obținute prin secțiuni histologice la parafină.

Prepararea colorantului:

- se dizolvă 1 g fuxină bazică și 2 g rezorcină în 20 ml apă distilată;
- se dizolvă 4 g de clorură ferică în 20 ml de apă distilată;
- se încălzește soluția de fuxină-rezorcină până la fierbere;
- se adaugă soluția de clorură ferică și se fierbe la flacără mică încă 5 minute;
- după răcire se filtrează, iar precipitatul cules pe hârtia de filtru se introduce împreună cu aceasta într-un recipient cu capacitatea de 400 ml în care se află 200 ml alcool etilic 96°;
- se fierbe pe o baie de apă până la dizolvarea completă a precipitatului;
- se scoate hârtia de filtru, iar după răcire se adaugă 1,4 ml acid clorhidric concentrat.

Soluția se poate conserva aproximativ 1 lună.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
 - colodinare (facultativ);
 - hidratare;
 - colorare cu soluția rezorcină-fuxină 10-30 min;
 - clătire cu apă distilată;
 - diferențiere cu alcool 96° controlată la microscop;
- (dacă fondul nu se decolorează suficient se poate recurge la alcool etilic 96° acidulat cu acid clorhidric în proporție de 1%);
- clătire cu apă;
 - colorarea nucleilor cu Kemechtrot;
 - deshidratare;
 - clarificare;
 - montare.

Rezultate: fibrele elastice se colorează intens în albastru închis, iar nucleii în roșu.

12. Metoda de colorare Gawlik (pentru fibrele de oxytalan)

Fibrele oxytalanice sunt o varietate de fibre elastice mai groase, mai rigide, mai neuniforme, mai elastice și foarte rezistente la hidroliza acidă. Aceste fibre sunt rezistente și la acțiunea elastazei. Ele se pot colora cu coloranții specifici fibrelor elastice (orceină, fuxină) numai după tratarea țesuturilor cu acid peracetic, acid permanganic sau performic. Nu se colorează nici dacă țesuturile au fost supuse digestiei cu lizozim, betagluconidază sau hialuronidază, ceea ce demonstrează natura proteică și mucopolizaharidică a lor.

Descrise pentru prima dată de Fullmer și Lillie în 1958, fibrele oxytalanice sunt considerate la ora actuală ca elemente preelastice sau ca fibre intermediare de organizare macromoleculară între fibrele de collagen și elastice. Se găsesc repartizate în anumite țesuturi a căror elasticitate nu este prea solicitată: ligamente dentare, gingii, tendoane, țesuturi mucoide. În procesele inflamatorii sau tumorale ale parodontiului, ca și în procesele de regenerare, se constată o creștere locală a fibrelor oxytalanice.

Soluția oxidantă de acidul peracetic conține:

- acid acetic glacial 95,6 ml;
 - apă oxigenată 30% 259 ml;
 - acid sulfuric concentrat 2,2 ml;
- Se amestecă cele trei componente și se așteaptă 2-3 zile, apoi se adaugă:
- fosfat disodic 40 mg;

se conservă la frigider câteva luni.

Tehnica de colorare:

- deparafinare,
- hidratare;
- oxidare cu acid peracetic 20 min;
- spălare cu apă curentă 3 min;
- colorare cu cresyl violet 5-10 min;
- clătire rapidă cu apă distilată;
- deshidratare cu alcool;
- clarificare cu xilol;
- montare în balsam.

Rezultate:

- collagenul se colorează în cenușiu-albastru;
- oxytalanul în violet;
- nucleii în albastru.

Observații: soluția de cresyl violet se prepară astfel: se dizolvă 20 ml colorant în 100 ml apă distilată după care se filtrează. Se diluează înainte de folosire cu alcool 96°, în părți egale.

Tehnici histologice pentru evidențierea mastocitelor

Mastocitele se pun în evidență prin reacția metacromatică pe care o dau mucopolizaharidele sulfatate din granulații, cu anumiți coloranți ca: **albastru de toluidină, tionina, azur, eozinații de azur (Giemsa) sau violet cresyl**. Se poate deci recurge la metoda Mann-Dominci sau Romanowsky.

13. Colorația cu albastru de toluidină

Reactivi:

- soluție albastru de toluidină 0,2% în tampon Walpole pH 4,2 (73 ml acid acetic 1,2%, 23 ml acetat de sodiu tribidratat 2,7%);
- soluție apoasă 5% molibdat de amoniu.

Tehnica de colorare:

- deparafinare, colodinare, hidratare;
- colorare 5 minute cu albastru de toluidină;
- clătire rapidă cu soluția tampon pH 4,5;
- tratare 5 minute cu molibdat de amoniu;
- spălare 3-5 minute cu apă curentă;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate: granulațiile mastocitelor se colorează în violet sau roșu violet. Tehnica se poate aplica și pe secțiuni la gheață sau celoidină.

Granulațiile mastocitelor mai pot fi evidențiate prin metoda cu paraldehidă-fuxină, prin tehnica cu albastru alcian și uneori prin metoda PAS.

14. Tehnici pentru evidențierea celulelor sistemului macrofag (histiocitelor)

Se pun în evidență prin colorații vitale cu coloranți coloidal electronegativi.

Negrul de fum comercial se amestecă în cantitatea de 0,4g cu 100 ml apă distilată în care s-au dizolvat 2g de gelatină. Soluția se încălzește la temperatura corpului animalului și apoi se injectează de mai multe ori subcutanat în cantitate de 0,2-0,5 ml la șoarece, 1-3 ml la șobolan și 10-15 ml la iepure.

Histiocitele din viscere se evidențiază mai rapid prin injectarea intravenoasă sau intraperitoneală (0,2 ml la șoarece, 1 ml la șobolan, 5-10 ml la iepure, zilnic, timp de 3-4 zile). Prelucrarea ulterioară constă în fixare cu un fixator uzual (formol, Bouin, Susa), includere în parafină, secționare și eventual colorare cu Kernchitrot sau hematoxilină-eozină.

Carminul lătinat se prepară fierbând 10-15 minute 2,5g carmin în 100 ml soluție apoasă saturată de carbonat de litiu (aproximativ 1g %), urmată de răcire și filtrare: Soluția concentrată se diluează cu apă distilată în proporție de 1:5 sau 1:4 pentru injectări subcutanate și 1:10 pentru cele intraperitoneale sau intravenoase. Cantitățile pentru o doză sunt aceleași ca la negrul de fum, colorația generală obținându-se prin injectări succesive timp de 6-8 zile.

Tratamentul ulterior al pieselor:

- fixare cu formol 10%, alcool 96° sau formol-sublimat,
- includere în parafină,
- secționare,
- colorare nucleară cu hemalaun.

Albastrul tripan și roșul tripan se utilizează în soluții apoase 0,5% preparate extemporaneu și sterilizate prin fierbere timp de 10 minute. Se administrează subcutanat, intraperitoneal sau intravenos, în cantitate de 0,5-1 ml la șoarece; 2,5-5 ml la șobolan și 10-15 ml la iepure, repetat la intervale de 3-5 zile. Sacrificarea se face la 24 de ore după ultima doză.

Tratamentul ulterior al pieselor:

- fixatorul indicat este amestecul Bouin sau formol,
- secționare la gheață sau includere în parafină,
- colorare nucleară cu Kernechtrot pentru albastrul tripan și cu hemalaun pentru roșul tripan.

Fixatorii cu sublimat se vor evita, deoarece tratamentul secțiunilor cu Lugol duce la dizolvarea tripanului.

Zaharatul de oxid de fier se injectează în soluție apoasă 10-25% în cantitate de 0,3 ml la șoarece, 1,5 ml la șobolan și 5 ml la iepure, administrată intraperitoneal sau intravenos în 1-2 reprize. Fixarea se face în formol 10% sau alcool absolut, includerea în parafină, iar evidențierea fierului, prin reacția cu albastru de Prusia sau Turnbull.

Plasmocitele se pun în evidență cel mai bine prin colorația cu verde de metil-pironină după Unna Papanheim.

15. Metoda Cajal (Magenta Picro-Indigo Carmin)

Tehnică

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare cu soluție Magenta 10 min;
- soluție saturată de fuxină bazică în alcool 95% 15 ml;
- apă distilată 75 ml.
- spălare în apă curentă;
- diferențiere în apă acetifiată 1% până nu mai iese colorant;
- colorare cu soluția Cajal (filtrată proaspăt) - 10 minute:
- indigo carmin 0,25 g;
- soluție apoasă saturată de acid picric 100 ml.
- clătire în apă distilată;
- diferențiere în apă acetifiată 0,5% până ce albastrul din țesut devine pur (curat);
- deshidratare și oprirea diferențierii în alcool absolut sub control microscopic;
- imersie bruscă în toluen pentru a opri diferențierea;
- montare în balsam -oxid sau rășini sintetice;

Rezultate:

- nucleii în roșu;
- citoplasmele în galben sau roz,
- fibrele musculare în galben - verde;
- conjunctivul în albastru;
- hematiele în roșu;
- mușchii în oranj.

15. Metoda cu roșu de Congo după Higmans (pentru amiloid)

Se practică după fixarea preparatelor cu alcool sau formol, pe secțiuni la gheață:

- colorare 5 minute în soluție 0,5% roșu de Congo în alcool etilic 50°;
- spălare cu apă distilată;
- diferențiere (controlată la microscop) cu soluția 0,2% hidroxid de potasiu
- spălare cu apă distilată;
- colorare cu hematoxilină Mayer 2 minute;
- spălare cu apă;
- diferențiere cu alcool 96° acidulat cu acid clorhidric în proporție de 0,5 ml%;
- spălare cu apă distilată;
- etalare și lipire pe lamă;
- deshidratare cu alcool;
- clarificare cu xilol;
- montare.

Rezultat: amiloidul apare roșu-oranj iar nucleii albaștri.

16. Metoda de colorare cu Albastru de Prusia (pentru fier)

Detecția fierului în țesuturi constituie prima reacție clasică de histochimie descrisă. Depozitele de fier non-hemic sunt transformate în prezența HCl în clorură ferică iar aceasta este transformată în prezența ferocianidei de K în ferocianidă ferică, un compus albastru precipitabil și insolubil în solvenți organici.

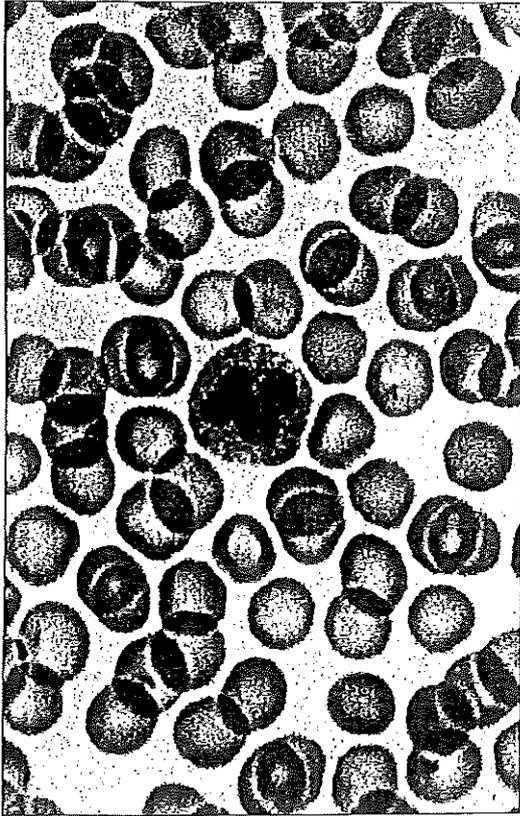
Soluții de lucru

- sulfat de amoniu (NH₄)₂S, 10% în apă distilată;
- soluție proaspătă de K₃Fe(CN)₆, 20%. Se amestecă sub hotă cu un volum egal de HCl 1%;
- roșu nuclear 0,1%

Tehnică:

- deparafinare 3x5 minute în băi de xilen.
- rehidratare prin trecere consecutivă câte 5 minute în etanol de concentrație descrescândă (100%, 90%, 70% și respectiv 50%).
- spălare 5 minute în apă distilată.
- incubare o oră în soluția de sulfat de amoniu, sub hotă.
- spălare o oră în apă distilată.
- incubare 10 minute în K₃Fe(CN)₆/HCl, sub hotă.
- spălare o oră în apă distilată.
- contrastare cu roșu nuclear 10 minute.
- spălare o oră în apă distilată.
- deshidratare în etanol (câte 5 minute în soluții de 70%, 90%, 100%, 100%).
- clarificare 3x5 minute în xilen.
- montare cu DPX.

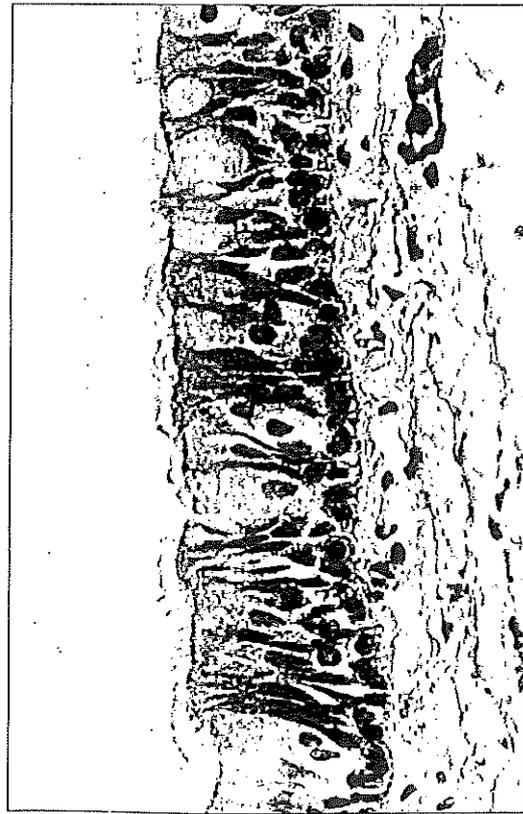
Rezultat: Depozitele de fier feric sunt colorate în albastru



*Frotiu de sânge periferic
Colorația May - Grünwald Giemsa*



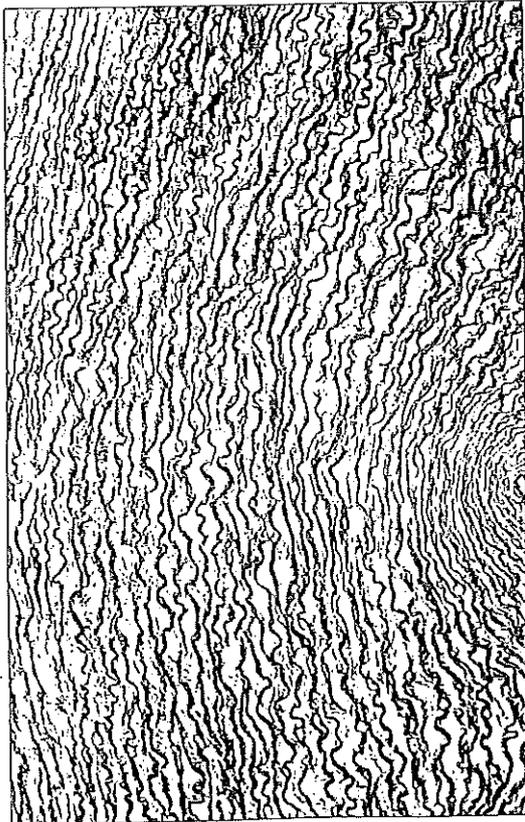
*Fibre de collagen - țesut de granulat
Colorația tricromică Goldner - Szeckeli*



*Mucoasă traheobronșică
Colorația hematoxilină - eozină*



*Fibre de reticulină - ganglion limfatic
Impregnație argentică Gömöri*



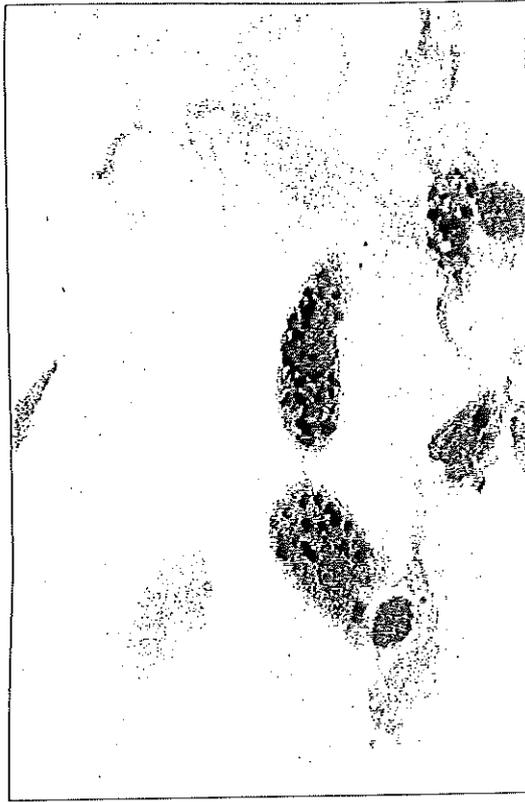
Fibre elastice
Colorația cu orceină



Adipocite
Colorația cu acid osmic



Mastocite - țesut de granulație
Colorația Giemsa



Colorația intravitală cu albastru de tripan
și colorarea nucleară cu Kernechtrot

CAPITOLUL V

COLORAȚII SPECIALE PENTRU MUCOPOLIZAHARIDE

Hidrații de carbon sunt larg răspândiți atât în țesuturile animale cât și în cele vegetale. Denumite și zaharuri, aceste substanțe chimice reprezintă aldehide sau cetone ale alcoolilor, conținând un număr mai mare de grupări hidroxil (-OH). Ele prezintă formula generală $C_n(H_2O)_m$.

După complexitatea lor, carbohidrații pot fi împărțiți în câteva categorii

- monohazaridele, reprezentate de pentoze (fructoza, riboza) și hezoxe (glucoza);
- dizaharidele - rezultate din combinarea a două molecule de monozaharide;
- polizaharidele reprezentate de glicogen (rezultat al polymerizării glucozei).

Glicogenul, prezent în ficat, mușchi, cartilaje și în alte organe, se depolimerizează prin hidroliză, rezultând glucoza.

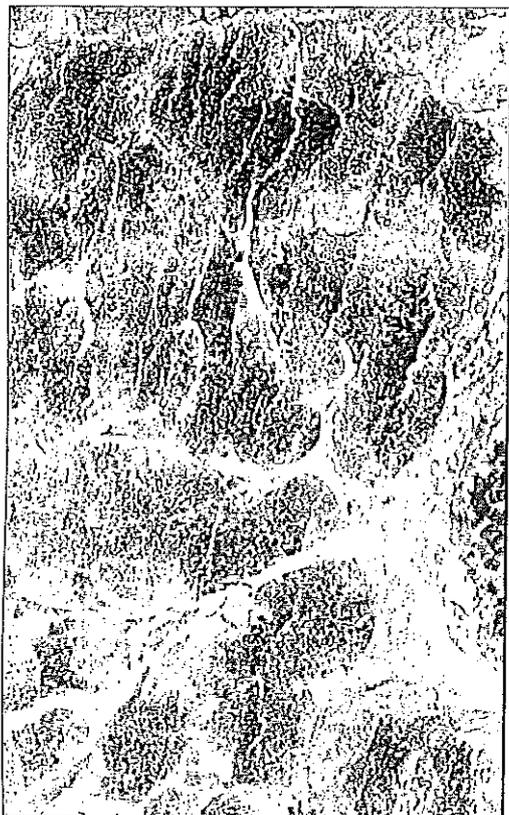
Unele zaharuri prezintă o solubilitate înaltă. Ele se pot lega covalent de alte componente tisulare (de collagen, membranele bazale ale glomerului renal, proteine, etc.).

Unele polizaharide se combină cu proteinele formând substanțe biochimice complexe cunoscute sub numele de mucopolizaharide sau glicozaminoglicani. Mucopolizaharidele sunt formate din unități de dizaharide de hexozamine și acid hialuronic; ele sunt ușor acide sau neutre. Mucopolizaharidele neutre se întâlnesc în mucoasa gastrică a anumitor animale. Ele pot fi împărțite suplimentar în mucoproteine (mucine), glicoproteine și glicolipide (cerebrozidele, gangliozidele). Mucopolizaharidele sunt sulfatate sau nesulfatate. Ele sunt reprezentate în principal de acidul hialuronic, condroitin-sulfatul, keratansulfatul, heparina sau heparin-sulfatul. În organismul uman sunt larg răspândite, dar se găsesc în cantități mai mari în cordoul ombilical, vasele de sânge, țesutul osos, țesutul cartilajinos, pielea, etc.

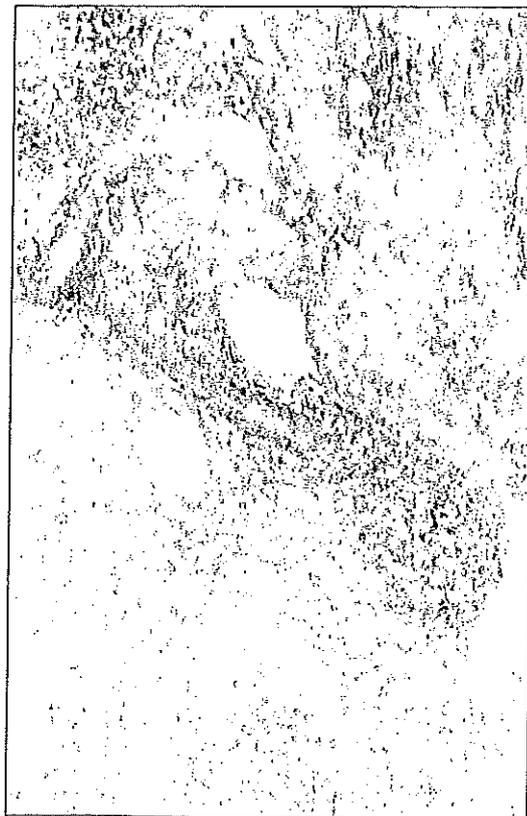
Mucopolizaharidele neutre pot fi puse în evidență prin reacția cu Acidul Periodic Schiff (PAS), iar cele acide se evidențiază prin reacția cu Alabastru alcian.

1. Colorația cu Acidul Periodic Schiff

Fixatori cei mai indicați sunt: formolul 10% sau soluțiile Bouin, Carnoy, Zenker; nu se recomandă utilizarea fixatorilor care conțin acid cronic sau săruri de crom, osmiu, glutaraldehidă sau alcool etilic.



*Pancreasa exocrin - granule de zimogen
Colorația Bensley*



*Fier feric - hemangiom.
Colorație cu Alabastru de Prusia*

Soluții:

1. Reactivul Schiff (Schiff Reagent) se obține din:

- pararozanilină 1,0 g;
- metabisulfid de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 1,9 g;
- acid clorhidric 0,15 N 100 ml.

(Această soluție se obține prin diluarea a 12,0 ml HCl concentrat în 1000 ml apă distilată).

Soluția de reactiv Schiff se prepară în vase de culoare închisă învelite în folii de aluminiu pentru a fi ferite de lumină. Substanțele se agită până la dizolvarea completă a reactanților (circa 2 ore) pe un agitator mecanic.

Se adaugă 500 mg de cărbune activat, proaspăt.

Se agită 1-2 minute, după care se filtrează soluția într-un cilindru gradat. Se adaugă gradual apă distilată peste reziduum filtrat până se obține un volum de 100 ml de reactiv Schiff. Soluția preparată trebuie să fie limpede și incoloră. Dacă are o culoare galbenă se adaugă din nou cărbune activat proaspăt și se filtrează din nou.

Cu un pH-metru se controlează pH-ul soluției și se ajustează cu HCl 1N, în funcție de fixatorul utilizat pentru fixarea materialului biologic, deoarece pentru preparatele fixate în formol 10%, pH-ul optim al reactivului Schiff trebuie să fie 2,2, în timp ce pentru preparatele fixate în fixatorul Zenker pH-ul optim este de 1,5.

Soluția se păstrează în frigider, în sticle de culoare închisă (brună, neagră). Valabilitatea soluției este de circa 2 luni de zile.

Soluția veche de reactiv Schiff are o culoare roșietică. Pentru îmbropsărtarea reactivului, la 100 ml de reactiv Schiff se adaugă 1 ml HCl 1N și 0,5 g bisulfid de sodiu (NaHSO_3). Culoarea roșie trebuie să dispară; se folosesc numai soluții incolore.

2. Acid clorhidric 1N:

- acid clorhidric concentrat 83,5 ml;
- apă distilată 816,5 ml

3. Metabisulfid de sodiu 0,5%:

- metabisulfid de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 5 g;
- apă distilată 1000 ml.

4. Acid periodic 1%:

- acid periodic 1 g;
- apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinarea secțiunilor;
- hidratare (uzual);
- oxidare în acid periodic 1% 10 minute;
- spălare în 3 băi de apă distilată a câte 2 minute fiecare;
- colorare cu reactivul Schiff 10 min;
- trecere prin 3 bai a câte 2 minute de metabisulfid de sodiu;
- spălare în apă curgătoare 10-15 minute;
- colorare (facultativ) cu hematoxilina Mayer 3 minute;
- spălare în apă curgătoare 15 minute;
- deshidratare;

- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- mucusul din celulele caliciforme se colorează în roșu închis;
- glicogenul, în roșu purpurii;
- membranele bazale, fibrele de reticulină din rinichi, piele, splină se colorează în roșu purpurii;
- glicolipidele, fosfolipidele se colorează în roșu purpurii;

Observații

Mai există alte componente tisulare care sunt PAS pozitive și anume: acidul hialuronic, fibrina din trombi, coloidul tiroidian sau hipofizar, hialinul din ateroscleroză, hialinul depozitat în glomeruli, amiloizidul, celulele granulare din arteriolele renale, collagenul (este slab PAS-positiv).

Reactivul Schiff este utilizat cel mai adesea ca reacție histochimică pentru a demonstra prezența aldehidelor în structurile tisulare și celulare deoarece soluția apoasă de acid periodic (HIO₃) oxidează grupările 1,2-glicol ale polizaharidelor la aldehide.

2. Colorația cu Acidul Periodic Schiff (PAS) și hematoxilina Mayer

1. Deparafinarea (trei băi de benzen) :

- benzen I 5 min.
- benzen II 5 min.
- benzen III 5 min.

2. Hidratarea (în alcooluri cu concentrație descrescătoare) :

- alcool etilic absolut 3 min.
- alcool etilic 90° 3 min.
- alcool etilic 80° 3 min.
- alcool etilic 70° 3 min.
- 3. Spălare în apă de robinet 10 min.
- 4. Oxidare cu acid periodic 1 % 10 min.
- 5. Spălare cu apă distilată 5 min.
- 6. Tratare cu reactivul Schiff 20 min.
- 7. Spălare cu apă sulfuroasă 0,5 % 6 min.

- soluție 10 % metabisulfid de sodiu 10 ml
- acid clorhidric normal 10 ml
- apă de robinet 200 ml
- 8. Spălare abundentă în apă de robinet (15-20 minute)

- 9. Colorare cu hematoxilina Mayer 15 min.
- 10. Spălare în alcool etilic 70° 3 min.
- 11. Deshidratare în alcool etilic 80° 3 min.
- 12. Deshidratare în alcool etilic 90° 3 min.
- 13. Deshidratare în alcool etilic 96° 3 min.
- 14. Deshidratare în alcool etilic absolut I 3 min.
- 15. Deshidratare în alcool etilic absolut II 3 min.
- 16. Deshidratare în alcool etilic absolut III 3 min.
- 17. Clarificare în xilol-fenicat (3 băi) 30 min.

18. Montare în balsam de Canada.

Rezultatele colorării:

- glicozaminoglicanii se colorează în roșu intens;
- nucleii în albastru.

3. Colorația cu CARMIN BEST

Este utilizată pentru punerea în evidență a granulelor de glicogen.

Fixatori: Carnoy, formol-alcool, alcool absolut, Bouin.

Soluții:

a. Hematoxilina Mayer;

b. Soluția carmin stoc;

- carmin 2,0 g;
- carbonat de potasiu 1,0 g;
- clorură de potasiu 5,0 g;
- apă distilată 60 ml.

Preparare: se fierb câteva minute toate componentele soluției, încet și cu atenție până când soluția se încheie la culoare. Se răcește și se adaugă 20 ml hidroxid de amoniu concentrat (28%). Se lasă la maturare 24 de ore după care se păstrează la frigider la 0°-5°C. Soluția este stabilă câteva săptămâni.

c. Soluția carmin de lucru:

- soluție carmin stoc 10,0 ml;
- hidroxid de amoniu concentrat 28% 15,0 ml
- alcool metilic 15,0 ml

Se amestecă bine.

c. Soluția diferențiator:

- alcool etilic 20 ml;
- alcool metilic 10 ml;
- apă distilată 25 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare cu apă distilată, două băi a câte 5 min;
- colorare cu hematoxilina 5 min;
- spălare în apă de robinet 5 min;
- clătire în apă distilată;
- colorare cu soluția carmin de lucru (proaspătă) 30 min;
- trecere prin soluția de diferențiere pentru câteva secunde;
- trecere directă în alcool etilic absolut (2 băi) a câte 3 min;
- deshidratare în alcool absolut 2 min;
- clarificare în xilen;
- montare.

Rezultate: glicogenul se colorează în roșu, iar nucleii în albastru.

Discuții

Publicată pentru prima dată în 1906, colorația carmin Best a fost considerată ca o colorație specifică pentru glicogen. Totuși, s-a demonstrat ulterior că această colorație evidențiază și alte structuri ca: granulele mastocitelor, mucusul, stratul lucidum al epidermului, osteoidul, și ocazional amiloïdul și

depozitele de calciu. Totuși, cei mai mulți autori consideră colorația Carmin Best ca o metodă cu înaltă selectivitate pentru granulele de glicogen.

4. Colorația CARDNO

Se utilizează pentru evidențierea glicogenului (pe cupe semifine).

Fixatori: formol-alcool, alcool absolut, Carnoy, Bouin.

Soluții:

1. Soluția de acid periodic 1%
 - acid periodic 1 g;
 - apă distilată 100 ml.
2. Soluția de apă sulfuroasă:
 - soluție de metabisulfid de sodiu 10% 5 ml;
 - acid clorhidric normal 5 ml;
 - apă distilată 90 ml.
3. Soluția de albastru de toluidină:
 - albastru de toluidină 5 g;
 - carbonat de sodiu 5% 100 ml.

Se dizolvă la cald și se filtrează după răcire.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratarea secțiunilor;
- tratare cu soluție de acid periodic 1% 15 min.;
- clătire prin două băi de apă distilată;
- tratare cu Reactivul Schiff 30 min.;
- clătire în două băi succesive de apă sulfuroasă 2 min.;
- contracolorare cu soluție de albastru de toluidină 1-5 min
- clătire în apă distilată până când nu mai iese colorant în apă;
- uscare;
- montare pe lamă.

Rezultate:

- glicogenul se colorează în roșu;
- nucleul și citoplasma în nuanțe de albastru.

5. Colorația cu ALBASTRU ALCIAN

Fixarea materialului biologic se poate realiza folosind oricare fixator.

Soluții:

1. Soluția de acid acetic 3%
 - acid acetic glacial 3 ml;
 - apă distilată 97 ml.
2. Soluția de albastru alcian 1% pH 2,5, pentru mucopolizaharide acide:
 - albastru alcian, 8GX 1,0 g;
 - acid acetic glacial 3% 100 ml.

După realizarea ei, soluția colorantă se filtrează. Este stabilă circa 2-4 săptămâni. Trebuie, de asemenea, filtrată înainte de a fi utilizată.

3. Soluția de albastru alcian 1%, pH 1, pentru mucopolizaharidele acide sulfatate:

- albastru alcian, 8GX 1,0 g;
 - acid clorhidric 0,1 N (aproximativ 1% HCl) 100 ml
- Se filtrează înainte de folosire;

4. Soluția fosfat - acid clorhidric:

- acid clorhidric concentrat (12 N) 42 ml;
- fosfat de sodiu monobazic 13,8 g;
- apă distilată până la 1000 ml.

5. Soluția de albastru alcian 1%, pH 0,4:

- albastru alcian, 8 GX 2,5 g;
- soluția fosfat - acid clorhidric 250 ml.

Se filtrează înainte de utilizare.

6. Kernechtrot (roșu nuclear) pentru contrastare.

Tehnica de colorare:

1. deparafinarea secțiunilor;
 2. hidratare în apă distilată;
- apoi:
- pentru pH 2,5 se trec preparatele în soluție de acid acetic 3% 3 min;
 - pentru pH 0,4 se trec în soluția fosfat-acid clorhidric 3 min;
 - 3. colorare cu albastru alcian 30 min.
 - 4. spălarea secțiunilor și îndepărtarea excesului de colorant:
- pentru pH 2,5 și 0,4, se spală preparatele în apă curgătoare 10 min.
 - apoi se clătesc în apă distilată;
 - pentru pH 1,0 se scurg preparatele, după care se sugativează cu hârtie de filtru;

5. colorarea nucleilor cu soluția Kernechtrot, pentru pH 2,5 și 0,4, 5 min, după care se spală în apă curgătoare 1 min;
6. deshidratare;
7. clarificare;
8. montare.

Deshidratarea pentru pH 1,0 se face rapid în alcool 95% și alcool etilic absolut, iar clarificare se execută în 2 băi de xilen).

Rezultate:

- la pH 2,5 mucosubstanțele slab sulfatate se colorează în albastru turcoaz;
- la pH 1,0 și 0,4 mucosubstanțele puternic sulfatate (acidul hialuronic, sialomucinele) se colorează în albastru turcoaz;
- nucleii se colorează în roz;
- substanțele mucoide acide ale țesutului conjunctiv, mucusul celulelor epiteliale, celulele caliciforme, granulele celulelor mastocitare și capsulele microbiene se colorează în albastru-turcoaz deschis.

6. Colorația cu ALBASTRU ALCIAN. metoda concentrației critice electrolitice.

Se folosește pentru evidențierea histochimică a diferitelor varietăți de glicozaminoglicani (mucopolizaharide).

Soluții:

Albastru alcian - soluție stoc:

- albastru alcian, 8GX 50 mg;
- soluție tampon acetat 0,025 M, pH 5,8 100 ml.

În această soluție stoc se adaugă **clorură de magneziu** până la o anumită molaritate, în funcție de obiectivele urmărite. Pentru a se obține molaritățile dorite, se adaugă la 100 ml de soluție stoc de Albastru Alcian următoarele cantități de clorură de magneziu:

Clorura de magneziu (MgCl ₂) g	Molaritate (M)
1,2 g	0,06 M;
6,1 g	0,3 M;
10,15 g	0,5 M;
14,2 g	0,7 M;
18,3 g	0,9 M.

Soluția de tampon acetat 0,025 M, pH 5,8:

Soluția A:

- acetat de sodiu 16,4 g;
- apă distilată 1000 ml.

Soluția B:

- acid acetic glacial 60,0 ml
- apă distilată 960 ml.

Soluția de lucru de tampon acetat 0,025 M, pH 5,8:

- soluția A 19 ml;
- soluția B 1 ml;
- apă distilată 180 ml.

Atenție: Se verifică și se corectează pH-ul.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratarea secțiunilor;
- colorare cu soluție de albastru alcian cel puțin 4 ore (se poate lăsa peste noapte);
- spălare în apă distilată;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- mucosubstanțele sulfatate și carboxilate sunt pozitive la 0,06M, MgCl₂.
- mucosubstanțele slab sulfatate sunt pozitive la 0,3M, MgCl₂;
- mucosubstanțele puternic sulfatate sunt pozitive la 0,5M, MgCl₂;
- mucinele înalt sulfatate din țesutul conjunctiv sunt pozitive la 0,7M, MgCl₂.
- Keratan-sulfatul este pozitiv numai la 0,9 M, MgCl₂.

Discuții. Tehnica se bazează pe ipoteza că acest electrolit (clorura de magneziu), când este încorporat în colorația cu albastru alcian, concurează cu moleculele de Albastru Alcian pentru constituenții reactivi ai mucosubstanțelor acide. Sub 0,06 mol/l MgCl₂ se colorează atât mucosubstanțele carboxilate cât și

cele sulfatate. Peste 0,3M se evidențiază numai mucosubstanțele sulfatate, care se colorează cu albastru alcian.

Rezultate false pot apare când fixarea este incorectă sau penetrarea colorantului în țesuturi nu are loc, datorită unui defect de tehnică.

7. Metoda PAS-ALBASTRU ALCIAN pH 2,5 sau 1,0

Este folosită pentru evidențierea mucopolizaharidelor acide și intens acide.

Soluții:

1. Soluție apoasă 1% acid periodic;
2. Reactiv Schiff;
3. Metabisulfid de sodiu (Na₂S₂O₅):
 - metabisulfid de sodiu (Na₂S₂O₅) 5 g;
 - apă distilată 1000 ml;
4. Soluție albastru alcian 1%, pH 2,5, pentru mucopolizaharide acide:
 - albastru alcian, 8GX 1 g;
 - acid acetic glacial 3% 100 ml.
5. Soluție albastru alcian 1%, pH 1, pentru mucopolizaharidele acide sulfatate:

- albastru alcian, 8GX 1 g;
 - acid clorhidric 0,1 N (aproximativ 1% HCl) 100 ml;
- Se filtrează înainte de folosire;

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratarea secțiunilor cu apă distilată;
- colorare cu albastru alcian (pH 2,5 sau 1) 30 min;
- sugativarea secțiunilor cu hârtie de filtru pentru pH 1 sau spălare în apă distilată pentru pH 2,5 5 min;
- oxidare cu acid periodic 1% 10 min;
- spălare în apă distilată 5 min;
- trecerea în reactiv Schiff 10 min;
- trecere în 3 băi de metabisulfid de sodiu, a câte 2 minute;
- spălare în apă curgătoare 10-15 min;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare.

Rezultatele colorației:

- a. PAS-albastru alcian, pH 2,5:
 - toate polizaharidele sau mucopolizaharidele neutre conținând hexoze (glicogenul, glandele Brunner, mucinele) se vor colora în roșu-magenta;
 - mucopolizaharidele acide, acidul hialuronic, sialomucinele și toate mucosubstanțele sulfatate puternic acide se vor colora în turcoaz-albastru;
 - fungii - în roșu purpuriu;
- b. PAS-albastru alcian pH 1,0
 - mucosubstanțele sulfatate se colorează în albastru.

8. Colorația cu ALBASTRU DE TOLUIDINĂ pH 0,5 sau 4-4,5

Fixatori - se poate utiliza oricare fixator.

Soluții:

1. Albastru de toluidină 0,5%, pH 0,5
 - albastru de toluidină O 0,5 g;
 - HCl, 0,5 N 100 ml.
2. HCl, 1 N
 - HCl concentrat 83,5 ml;
 - apă distilată 916,5 ml.
3. Albastru de toluidină 0,5% pH 4-4,5
 - albastru de toluidină O 0,5 g;
 - tampon acetat 0,01 M, pH 4-4,5 100 ml.

4. Tamponul acetat 0,01 M, pH 4-4,5:
 - acetat de sodiu 16,4 g;
 - apă distilată 1000 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratarea secțiunilor în apă distilată;
- colorarea cu albastru de toluidină 20-30 min;
- deshidratare rapidă în acetonă (3 băi);
- trecere în acetonă / xilen: 50 / 50%;
- clarificare în xilen;
- montare.

Rezultate:

- a. Albastru de toluidină pH 0,5:
 - mucopolizaharidele acide se vor colora în roșu până la roz-purpuriu;
 - nucleii în albastru-verzui;
 - granulele mastocitelor în roșu strălucitor sau purpuriu;
 - eritrocitele - verde spre galben.
- b. Albastru de toluidină pH 4-4,5:
 - mucopolizaharidele acide și matricea cartilajinoasă apar în roșu purpuriu;
 - citoplasma în albastru deschis;
 - nucleii în albastru intens;
 - granulele mastocitelor în violet intens;
 - eritrocitele în verde spre galben pal.

Discuții

- folosind albastru de toluidină în tampon acetat la pH 5, mușchii și țesutul conjunctiv se colorează în albastru-verde;
- la pH 3 mucinele se colorează parțial, iar la pH 1-2 metacromazia este evidentă numai în cartilaj și granulele mastocitelor.

9. Colorația cu MUCICARMINUL MAYER

Fixatori - se poate utiliza oricare fixator.

Soluții:

1. Soluția de hematoxilină ferică Weigert:

- Sol. A: - hematoxilină cristalizată 1 g;
- alcool etilic 95% 100 ml.
- Sol. B: - soluție apoasă de clorură ferică 29% 4 ml;
- apă distilată 95 ml;
- acid clorhidric concentrat 1 ml.

Soluția de lucru proaspăt preparată:

- se prepară în părți egale: 50% din soluția A + 50% soluția B. Această hematoxilină este un colorant foarte bun pentru nucleii.

2. Soluția de mucicarmin stoc:

- carmin 1 g;
- clorură de aluminiu anhidră 0,5 g;
- apă distilată 2 ml.

Se amestecă într-un vas carminul cu clorura de aluminiu după care se adaugă apa distilată și se amestecă pe flacără mică timp de câteva minute până când lichidul devine siropos și de culoare roșu-închis spre negru. Apoi se adaugă, agitând continuu, 100 ml de alcool 50%. După dizolvare completă se lasă 24 de ore la temperatura laboratorului, după care soluția se filtrează. Soluția este stabilă câteva luni.

Soluția mucicarmin de lucru (proaspăt preparată):

- o parte soluție mucicarmin stoc + 4 părți apă distilată.

Soluția de lucru se deteriorează în câteva ore.

3. Soluția de contrastare cu galben de metanil:

- galben de metanil 0,25 g;
- apă distilată 100 ml;
- acid acetic glacial 0,25 g.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare în apă distilată;
- colorare cu hematoxilină Weigert 7 min;
- spălare în apă de robinet 10 minute;
- contrastare (facultativ) cu galben de metanil 30 sec - 1 min până la 3-5 min;
- spălare în apă distilată 2-3 min;
- colorare cu soluție de mucicarmin 30-60 min, sub control microscopic;
- spălare rapidă în două băi de apă distilată;
- deshidratare în alcool;
- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- mucusul apare colorat în roșu;
- nucleii în negru;
- alte elemente tisulare în galben.

10. Colorația HALÉ cu fier coloidal

Fixatori: sunt preferate amestecurile fixatoare pe baza de bicromat, dar pot fi utilizați oricare din fixatorii cunoscuți.

Soluții:

1. Soluția de clorură de fier 29%

2. Soluția Müller - Oxid de fier coloidal (stoc):

- 250 ml apă distilată se încălzesc până la fierbere; când s-a fierț, se toarnă în 4,4 ml de clorură de fier 29%, după care se agită. Când soluția a devenit roșu-închis, se îndepărtează de pe foc și se lasă să se răcească.

Soluția este stabilă pentru mai multe luni.

3. Soluția de lucru de fier colodal (preparată proaspăt):

- soluție Müller stoc 40 ml;
- apă distilată 30 ml;
- acid acetic glacial 10 ml.

Se amestecă bine înainte de utilizare.

4. Soluția de acid acetic 12%:

- acid acetic glacial 12 ml;
- apă distilată 88 ml.

5. Soluția de ferocianură de potasiu 5%:

- ferocianură de potasiu 5 g;
- apă distilată 100 ml.

6. Soluția de acid clorhidric 5%:

- acid clorhidric concentrat 5 ml;
- apă distilată 95 ml.

7. Soluția de lucru: ferocianură de potasiu - acid clorhidric:

- soluție de ferocianură de potasiu 5% 50 ml;
- soluție de acid clorhidric 5% 50 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare și hidratare; dacă este necesar se va îndepărta pigmentul;
- clătire în soluția de acid acetic 12% 3 min;
- imersie în soluția de lucru de fier coloidal 1-2 ore;
- spălare în acid acetic 12%, 4 băi câte 3 min în fiecare;
- spălare în apă curgătoare și apoi în apă distilată câte 5 min;
- imersie în soluția acid clorhidric-ferocianură de potasiu... 20 min;
- spălare în apă curentă 5 minute;
- contrastare în hematoxilină Harris sau Mayer 5 min; se poate utiliza și soluția Kernschrot;
- spălare și diferențiere la nevoie;
- deshidratare;
- clarificare;
- montare.

Rezultate:

- mucopolizaharidele acide, sialomucinele, țesutul conjunctiv și tumorile mucigene, celulele caliciforme carcinoamele mucipare se colorează în albastru intens;

- nucleii, citoplasmele apar colorate în albastru sau roșu (cu Kernechtrot);
- granulele mastocitelor apar colorate în albastru,
- hemosiderina – albastru.

11. Colorația MOWRY pentru evidențierea polizaharidelor

Tehnica:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare sub control microscopic cu soluție de albastru alcian -5 minute.
- alcian blau 8GX 1 g;
- apă distilată 100 ml;
- acid acetic cristalizabil 3 ml.
- pH-ul trebuie să fie mai mic sau egal cu 2,6.
- spălare în apă distilată;
- tratare cu soluție de acid periodic 1% - 2 minute;
- spălare în apă distilată;
- tratare cu reactivul Schiff - 5 minute;
- clătire în apă sulfuroasă;
- spălare în apă curentă - 10 minute;
- colorarea nucleilor cu hematoxilină Groat - 2 minute:
- a. soluția A:
- apă distilată 50 ml;
- alaun de fier 1 g;
- După dizolvare se adaugă:
- b. soluția B:
- hematoxilină 1% în alcool de 96°,

- Se amestecă în părți egale soluția A cu soluția B, se filtrează la nevoie;
- se conservă mai multe luni.
- spălare în apă curentă - 2 minute;
- deshidratare direct în alcool absolut;
- 13. montare în balsam sau rășini sintetice.

Rezultate:

- nucleii se colorează în negru;
- polizaharidele acide și PAS negative se colorează în albastru;
- polizaharidele neutre se colorează în roșu.

12. Metoda HOROBIN și KEVILLI pentru evidențierea

polizaharidelor prin fuxină bazică

Tehnica:

- deparafinare;
- hidratare;
- tratare cu amestecul acid periodic – fucsina bazică 30 min:
- fuxină bazică 0,5 g;

- acid periodic 1 g;
- alcool absolut 80 ml;
- apă distilată 20 ml.

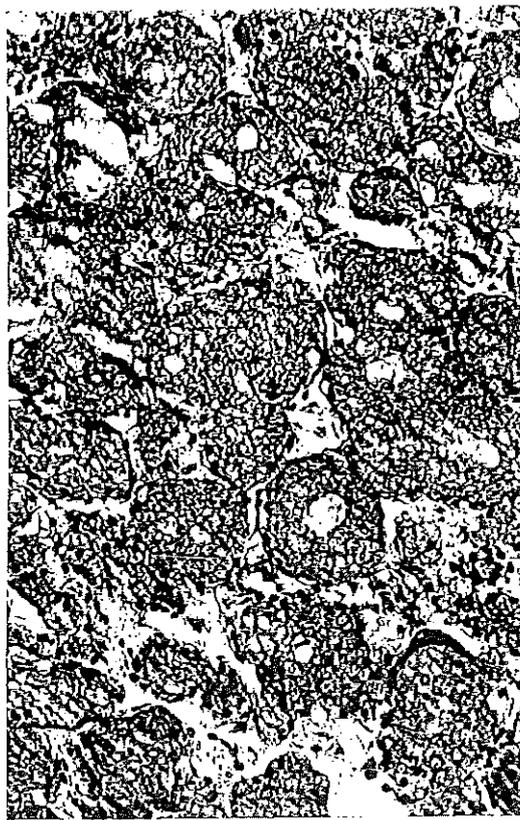
(Soluția este stabilă mai multe luni).

- spălare în alcool absolut pentru a înlătura excesul de colorant;
- clarificare în toluen;
- montare în rășini sintetice.

Rezultate: polizaharidele se colorează în roșu.

Precauții:

- pot fi utilizați numai fixatorii: formol pH=7; Carnoy, Susa, Zenker.
- cupetele histologice vor avea circa 6 microni grosime;
- se poate contrasta cu albastru alcian, hematoxilina Harris.



*Colorația mucicarmin
Glande salivare*

CAPITOLUL VI

TEHNICI PENTRU EVIDENȚIEREA LIPIDELOR

Lipidele sunt substanțe naturale solubile total sau parțial în solvenți organici: alcool, benzen, eter, xilen, cloroform, etc. În țesuturi lipidele se găsesc sub formă de trigliceride, colesterol, sau combinate cu alte substanțe nelipidice, sub formă de lipoproteine, glicolipide, fosfolipide, etc.

Cele mai multe lipide se găsesc localizate intracelular unde formează depozite energetice sau intră în structura unor membrane celulare.

Pentru studiul lipidelor, formaldehida netampônată este fixatorul cel mai indicat. Se presupune că adărgarea de clorură de calciu (pentru corectarea pH-ului) determină pierderea unor fosfolipide din țesuturi. Tetraoxidul de osmiu reacționează cu legăturile duble ale acizilor grași nesaturați și poate fi utilizat în calitate de fixator, dar este utilizat mai frecvent ca un colorant histochimic.

Fixatorii pe bază de alcool sunt contraindicați deoarece cele mai multe lipide sunt solubile în fixatorii alcoolici.

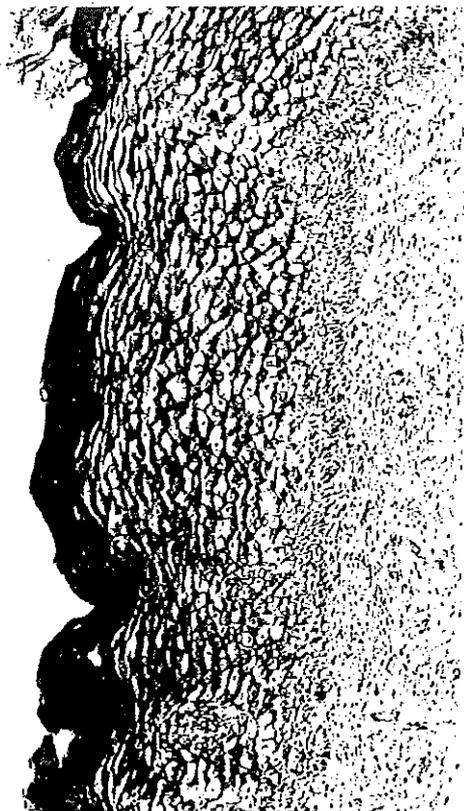
Fixatorii pe bază de clorură de mercur reacționează cu fosfolipidele hidrolizând componentele plasmalemale. În plus reacția determină modificarea țesuturilor care devin sferămicase, rezultând dificultăți la tăiere. Similari clorurii mercurice, bicromatul de potasiu oxidează anumite lipide și se poate lega de acestea sub formă de crom.

Lipidele pot fi clasificate în:

- acizi grași: palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, arahidonic;
- grăsimi neutre (trigliceride);
- fosfaide sau fosfolipide (etanolamina, serina, colina, lecitina):
 - derivați de glicerol fosfat;
 - derivați de sfingozine;
- glicolipide:
 - derivați de sfingozină,
 - derivați de glicerol;
- alcooli alifatici sau ceruri;
- steroizi (estrogeni, androgeni, corticosteroidi, progesteronul, acizii biliari, colesterolul, etc.).

În general, lipidele simple sunt esteri alcoolici ai acizilor grași cu lanț lung. Acizii grași sunt lanțuri neramificate monociclice ale unui număr par de atomi de carbon și conțin o grupare carboxil. Ei pot fi saturați sau nesaturați.

Grăsimile nesaturate au una sau mai multe legături duble care scad punctul de topire al acizilor grași și le cresc solubilitatea în solvenți nepolari; ei rămân lichizi la temperatura camerei. Din moment ce acizii grași obișnuiți sunt neutri, ei



Colorația PAS - hematossilimă
Epiteliu de exocol



Colorația PAS- hematossilimă
Epiteliu de mucoasă gastrică

pot fi denumiți lipide neutre (stearic, palmitic, oleic), fiind forma principală de stocare a grăsimilor (reprezintă mai mult de 90% din țesutul adipos al corpului uman). Deoarece din punct de vedere chimic ei sunt esteri ai acizilor grași atașați la o catenă de glicerol în proporție 3/1, sunt denumiți trigliceride.

Alte lipide simple includ esteri cerurilor. Aceștia sunt esteri ai diverșilor acizi grași combinați cu un alcool sterolic, colesterol.

Colorantul Sudan și sulfatul albastru de Nil vor pune în evidență lipidele simple.

Lipidele compuse (fosfolipide, glicolipide) conțin acizi grași cu lanț lung și un alcool alături de o grupare non lipidică. După hidrolizare pun în libertate un acid gras alături de un acid fosforic legat de o catenă nitrogenă și un alcool, de obicei glicerol. Ele se găsesc în multe țesuturi, în special creier, ficat, mușchii cardiaci. Din moment ce sunt considerate ca esteri ai acidului fosfatidic, pot fi denumite glicerolfosfatide (lecitine, encefaline, sfingomielină și unele fosfolipide plasmatic).

Glicolipidele se pot găsi sub formă de cerebrozide (care conțin un singur lanț de acid gras, un alcool complex de obicei sfingozină și una sau mai multe hexoze, de obicei galactoză), sau ca gangliozide (asemănătoare chimic cu cerebrozidele, dar conținând în plus un acid neuraminic sau derivate ale acestuia). Înfățișate în țesutul cerebral, glicolipidele pot fi evidențiate prin reacția PAS care nu colorează fosfolipidele.

Ca și glucidele, lipidele au o rată rapidă a turn-over-ului. De aceea lipidele funcționează ca un rezervor important de energie și căldură.

Diversele lipide pot fi identificate printr-o varietate de tehnici histochemice. De obicei, lipidele compuse conțin lipide hidrofile, solubile în apă. Ele pot fi transformate în lipide insolubile prin fixare în formal-calcium.

Lipidele simple solubile în solvenți organici necesită secționare la gheață. Pentru studiu și identificarea lipidelor pot fi folosite tehnicile de extragere chimică a lipidelor.

Majoritatea lipidelor pot fi extrase din țesuturi de către cloroform-metanol: în raport 2 / 1, la 60°, în 48 de ore.

Cerebrozidele pot fi extrase prin acetonă fierbinte, colesterolul și esterii lui cu acetonă rece, iar fosfolipidele cu eter cald.

Colorarea generală a lipidelor este realizată cu ajutorul coloranților Sudan (III, IV, Sudan Black) și Oil red O. Acești coloranți acționează într-un mod asemănător.

1. Metoda de colorare cu SUDAN III sau cu SCHARLACH ROTHE

Tehnica de colorare

- secțiuni la gheață;
- întinderea secțiunilor pe o baie de apă distilată;
- trecerea rapidă a secțiunilor prin alcool 70%;
- colorarea cu Sudan III într-un cristalizor acoperit 20-30 min:
 - Sudan III 0,3 g;
 - alcool 70% 100 ml;
- se încălzește soluția în etuva de parafină - câteva ore;

- după răcire se filtrează și poate fi utilizată.

sau

- colorare cu Scharlach roth într-un cristalizor acoperit 20-30 min:
 - Scharlach roth 0,3 g;
 - alcool 70% 50 ml;
 - acetonă 50 ml.

Soluția se filtrează.

- trecere rapidă prin alcool 70%;
- clătire cu apă de robinet;
- colorare cu hematoxilină Mayer 3-5 min;
- trecere prin soluție saturată de carbonat de litiu 15-30 sec;
- montare în glicerină sau gelatină.

După montare se parafinează periferia lamelei.

Rezultate:

- grăsimile neutre se colorează în roșu portocaliu cu Sudan III și în roșu deschis cu Scharlach roth;
- nucleii se colorează în albastru violet.

2. Colorafia cu SUDAN IV

Soluții utilizate:

1. Sudan IV:
 - Sudan IV 1 g;
 - acetonă 50 ml;
 - alcool etilic 70% 50 ml.
2. Bicromat de potasiu:
 - gelatină 0,2 g;
 - bicromat de potasiu 0,2 g;
 - apă distilată 1000 ml.

3. Hematoxilina Mayer

Tehnica de colorare:

- secționare la gheață sau la parafină;
- deparafinare și hidratare rapidă la nevoie (trecere rapidă prin alcool);
- se trec prin soluție de bicromat de potasiu sau se pune câte o picătură de bicromat de potasiu pe preparat;
- se lasă preparatul să se usuce la aer;
- imersie în alcool 70% 5-10 min;
- colorarea cu Sudan IV 5 min.

(30 minute pentru secțiunile la parafină);

- imersie în alcool 70%;
- clătire în apă distilată;
- contrastare cu hematoxilina Mayer 5-10 min;
- spălare în apă distilată 10 minute;
- montare în glicerină.

Rezultate:

- lipidele se colorează în roșu - oranj;
- nucleii în albastru.

3. Colorația cu SUDAN BLACK B

Soluții:

1. Soluția de Sudan Black:
 - Sudan Black 0,7 g;
 - propilen glicol 100 ml.

Se încălzește la 100-110°C câteva minute, după care se răcește la temperatura camerei; se filtrează.

2. Soluția de Propilen glicol 85%:

- propilen glicol 85 ml;
- apă distilată 15 ml.

3. Soluție de Roșu nuclear (Kernechrof) 0,1%:

- Kernechrof 0,1 g;
- sulfat de aluminiu 5% 100 ml.

Se filtrează.

Tehnica de colorare:

- secțiuni la gheață;
- se întind pe o baie de apă distilată;
- se trec în propilen glicol 100% - 5-10 minute;
- colorare cu Sudan Black - 30 minute;
- diferențiere în soluție de propilen glicol 85% - 3 minute;
- clătire în apă distilată;
- contrastare cu Kernechrof 5 minute;
- spălare bine în apă distilată;
- montare în jeleu de glicerină.

Rezultate:

- lipidele neutre, mielina, mitocondriile sau alte lipide se colorează în verde-închis spre negru sau albastru închis spre negru.
- nucleii se colorează în roșu.

4. Colorația cu ACID OSMIC

Această colorație necesită fixarea preparatelor în soluție acid osmic 1%, 24

de ore.

Tehnică:

- includere la parafină;
- secționare,
- deparafinare;
- clarificare, montare.

Acidul osmic acționează ca fixator și colorant. Atenție deosebită trebuie să se acorde deshidratării pentru includerea la parafină deoarece toluenul, benzenul, xilenul și alcoolul dizolvă grăsime. De aceea se recomandă secționarea la criotom pentru a evita includerea la parafină.

Rezultate: grăsimile neutre și mielina se colorează în brun-negricios.

5. Colorația LILLIE cu SULFATUL ALBASTRU DE NIL

Permite diferențierea acizilor grași de grăsimile neutre.

Tehnica de colorare:

- secționarea fragmentelor tisulare la criotom;
- întinderea secțiunilor pe baie de apă distilată;
- colorarea cu soluție de sulfat albastru de NIL 20 min.
 - albastru de Nil 0,1 g;
 - apă distilată 198 ml;
- acid sulfuric concentrat 2 ml.
- spălare în apă curgătoare
- montare în glicerol-gelatină 10 min;

Rezultate:

- acizii grași se vor colora în albastru închis;
- grăsimile neutre se vor colora în roz sau roșu.

CAPITOLUL VII

COLORAȚII PENTRU ȚESUTUL MUSCULAR SCHELETIC

1. Metoda HEIDENHAIN

Se aplică după fixarea cu acid tricloracetic pe secțiuni la parafină deparafinate, colorate și hidratate:

- colorarea se face cu o soluție 1% roșu tiazină până când secțiunile sunt intens colorate în roșu;
- clătire cu apă distilată;
- colorare 12 ore cu o soluție 1% albastru de metilen;
- clătire cu apă distilată;
- diferențiere cu alcool 96°, controlată la microscop, iar dacă secțiunile apar supracolorate se pot diferenția mai energic fie cu alcool metilic, fie cu o soluție, 0,2-0,5% acid acetic;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate: structura periodică a miofibrilelor apare foarte net.

2. Colorația PASINI

Reactivi și coloranți:

- albastru de anilină-orceină:
 - soluția A: se dizolvă 1g albastru de anilină în 100 ml apă distilată;
 - soluția B: se dizolvă 1gorceină în 50 ml alcool absolut și se adaugă apoi 5 ml acid acetic și 20 ml glicerină;
 - se amestecă soluția A cu soluția B;
- soluția 2% eozină alcoolo-solubilă în alcool 50%;
- soluția apoasă saturată de fucsină acidă;
- soluție apoasă 2% de acid fosfotungstic.

Tehnica de lucru:

- deparafinare; hidratare;
- secțiunile hidratate se mordansează 20 min în acid fosfotungstic;
- clătire cu apă distilată;
- colorare 15-20 min cu amestecul:
- albastru de anilină-orceină 30 ml;
- eozină 30 ml;
- fucsină acidă 4 ml,
- glicerină neutră 25 ml;
- spălare cu apă distilată;

- diferențiere cu alcool absolut (control la microscop);
- clătire câteva secunde cu soluție de acid fosfotungstic;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate:

- epiteliobrițele, miofibrilele, keratohialinul și nucleii se colorează în roșu;
- citoplasme în albastru deschis;
- collagenul în albastru închis;
- granulele de secreție în roșu, galben sau albastru.

3. Colorația cu acid tanic - acid fosfomolibdenic - roșu de tiazină

Fixatori: Carnoy

Soluții:

- hematoxilina Mayer;
- soluția apoasă de acid tanic 5%;
- soluția apoasă 1% de acid fosfomolibdenic preparată proaspăt;
- soluție stoc de roșu de tiazină:
- roșu de tiazină 4 g;
- metanol 90 ml.
(se dizolvă lent)
- soluție de lucru de roșu de tiazină:
- soluție stoc de roșu de tiazină 90 ml;
- acid acetic glacial 10 ml.

(soluția are stabilitate redusă - doar 1 oră)

Tehnică:

- deparafinarea și hidratarea secțiunilor;
- spălare în apă distilată 5-10 min;
- colorarea nucleilor cu hematoxilina Mayer;
- mordansare în acid tanic 5% - 10 min;
- spălare rapidă în trei băi de apă distilată;
- transferare în soluție de acid fosfomolibdenic 1% - 10 min;
- spălare în trei băi de apă distilată;
- clătire în metanol;
- colorare cu roșu de tiazină - 5 min;
- deshidratare rapidă în metanol;
- clarificare în xilen;
- montare în rășini sintetice - Entellan.

Rezultate:

- benzile A și Z ale fibrelor musculare, miofibrilele, celulele mioepiteliale se vor colora în roșu;
- citoplasma celulelor și țesutul conjunctiv se vor colora în galben;
- nucleii în albastru;
- limitele intercelulare se vor colora în roz.

4. Metoda de colorare cu soluția GIEMSA diluată în tampon fosfat

Tehnica:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare timp de 1 ora cu soluție Giemsa:
 - colorant Giemsa 0,5 ml;
 - soluție de acid citric 0,1M 1,2 ml;
 - soluție de fosfat de sodiu 0,2M 0,8 ml;
 - acetonă 5 ml;
 - apă distilată 25 ml.
- deshidratare cu acetonă;
- clarificare în acetonă-toluen în părți egale;
- clarificare în toluen;
- montare exclusiv în rășini sintetice.

Rezultate:

- nucleii se colorează în albastru;
- citoplasmele în albastru clar;
- fibrele musculare în roșu;
- țesutul conjunctiv albăstrui;
- hematiele în oranj.

5. Metoda HEIDENHAIM (azo-carmin-azan)

Tehnica:

- deparafinare;
 - hidratare;
 - colorare la 56°C cu soluție de azocarmin G 20-60 min;
- Se dizolvă la cald 0,1 g azocarmin G în 100 ml de apă distilată; după răcire se adaugă 1 ml acid acetic glacial; se conservă în flacon bine închis.
- clătire cu apă distilată;
 - diferențiere într-o soluție de anilină 1/1000 în alcool de 95°C până citoplasmele devin roșu-pal, iar nucleii roșu;
 - spălare în alcool acetic 1% pentru a opri diferențierea - 1 minut;
 - clătire în apă distilată;
 - mordansare în soluție apoasă de acid fosfotungstic 5% - 54 min;
 - clătire rapidă în apă distilată;
 - colorare cu soluția Heidenhaim diluată de 1-2 ori - 30 min:

- albastru de anilină 0,5 g;
- orange G 2 g;
- acid acetic glacial 8 ml;
- apă distilată 100 ml.

Se dizolvă la cald și se adaugă acidul acetic după răcire.

- clătire foarte rapidă în apă distilată;
- diferențiere în alcool de 95°;
- deshidratare în alcool absolut;

- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- nucleii se colorează în roșu;
- citoplasmele în roz sau galben;
- mușchii în roșu, oranj sau galben;
- țesutul conjunctiv în albastru;
- produșii de secreție în roșu sau albastru;
- țesutul osos în roșu.

6. Metoda HEIDENHAIM cu azocarmin, varianta Schleicher

Tehnica:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare cu Azocarminul B 1.5-20 min;
0,1 g;
- azocarmin B 0,5 ml;
- acid acetic cristalizat 100 ml.
- apă distilată

Se dizolvă azocarminul fără încălzire, apoi se adaugă acidul acetic; soluția trebuie să fie clară.

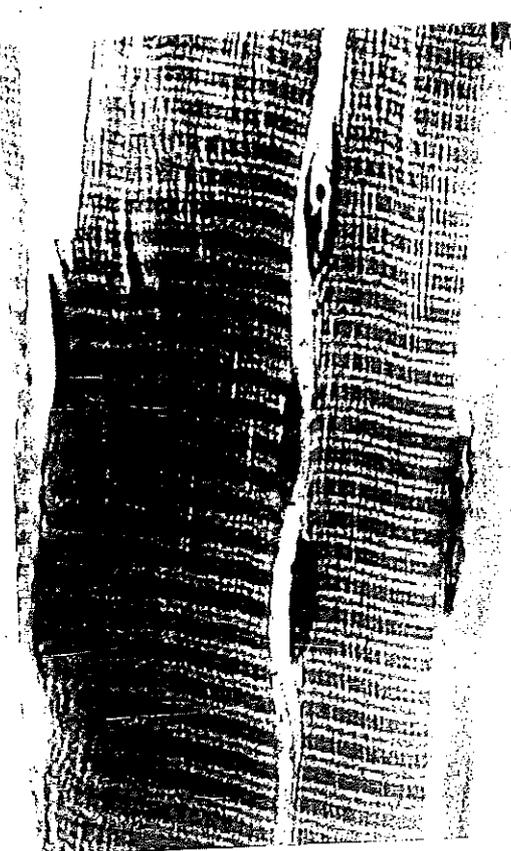
- spălare în apă distilată;
- diferențiere în soluție de acid fosforungstic 5% - 1-2 ore;
- colorare cu sol de albastru de anilină-oranj G - 30 min:
0,2 g;
- albastru de anilină 0,4 g;
- orange G 1 ml;
- acid acetic cristalizabil 100 ml.

Se dizolvă la început orange G fără încălzire, se adaugă 0,5 ml acid acetic;

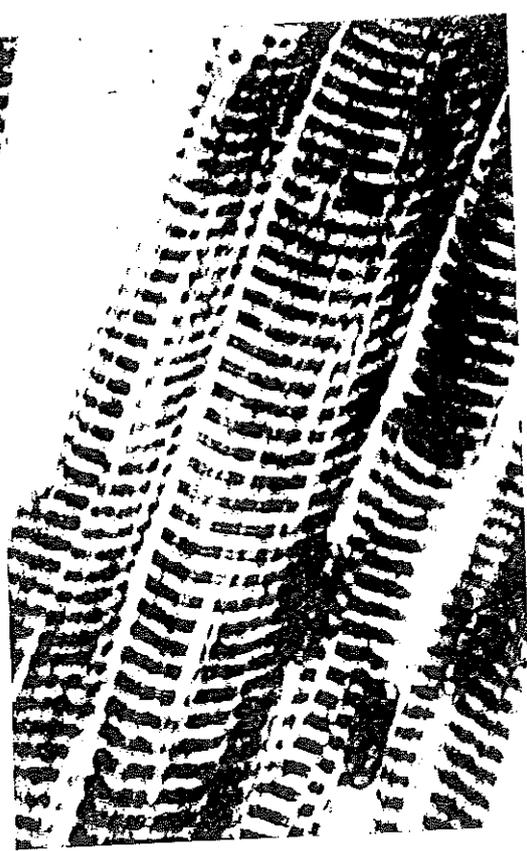
- se agită bine; se adaugă restul de acid acetic, apoi se adaugă albastru de anilină.
- spălare în apă distilată;
 - deshidratare;
 - montare în balsam sau în rășini sintetice.

Rezultate:

- nucleii și hematiele se colorează în roșu intens;
- citoplasmele în roz sau galben;
- țesutul muscular în roșu, oranj sau galben;
- țesutul conjunctiv în albastru;
- țesutul osos în roșu;
- produsele de secreție în roșu sau albastru.



Colorația hematoxilină - eozină
Mușchi striat scheletic



Colorația Heidenhaim
Mușchi striat scheletic

CAPITOLUL VIII

METODE PENTRU EVIDENȚIEREA CELULELOR ENDOCRINE ȘI NEUROENDOCRINE

Înainte de dezvoltarea imunohistochemiei, demonstrarea celulelor neuroendocrine se realiza folosind un număr limitat de metode bine stabilite, dezvoltate pe baze empirice. Deși principiul de colorare a rămas necunoscut, se crede că majoritatea acestor tehnici depind de prezența anumitor amine și peptide reziduale produse de celulele neuroendocrine. În următoarea secțiune descriem diverse metode dând exemplu de protocoale tehnice, metode care le considerăm cele mai utile. Nu există o tehnică unică care să permită evidențierea tuturor celulele neuroendocrine. Trebuie menționat că demonstrarea caracteristicilor celulelor neuroendocrine ar putea fi dificilă în tumorile slab diferențiate.

I. METODE HISTOCHIMICE FLUORESCENTE

Aceste metode sunt, în marea majoritate, metode istorice, care identifică monoaminele (catecolaminele, serotonina) și reziduuri specifice ale peptidelor, prin inducerea fluorescenței în ultraviolete. După cum majoritatea aminelor difuzează rapid din granule în celula lor de origine, sunt necesare uscarea rapidă la gheață și fixarea în vapori pentru a le conserva. 5-HT, cea mai folosită amină în diagnosticul patologic, difuzează ceva mai încet decât celelalte amine. Aminele bioactive ca 5-HT, reacționează cu paraformaldehida sau formaldehida și formează B-carboline. Acest compus produce o fluorescență galben deschisă (vârful de absorbție la 410 nm, vârful de emisie la 525 nm) când este văzută în lumină ultravioletă.

Tehnica fluorescenței induse cu formaldehidă

Fixarea. Țesutul înghețat este transferat într-o cutie închisă cu capacitate de 1l, conținând 5 g de paraformaldehidă pudră. Asigurându-ne că dopul este ermetic închis, se pune containerul într-un termostat la 60° C timp de 1-3 ore.

Secționarea. După fixare, se scoate țesutul din container și se introduce în baia de parafină. Unii tehnicieni preferă să folosească o baie de parafină cu adăugarea unei concentrații crescute de polimer plastic pentru a reuși să realizeze secțiuni mai subțiri. După secționare, se realizează montarea pe lame curate.

După uscarea secțiunilor la 60° C în termostat, se deparafinează secțiunile în xilen și se montează într-un mediu potrivit.

Se examinează secțiunile la microscopul cu fluorescență folosind filtre baneră, BG38 și UG1.

Rezultat: aminele bioactive devin fluorescente galben deschis.

II. METODELE TINCTORIALE

De-a lungul anilor au fost folosite mai multe metode pentru evidențierea și caracterizarea diferitelor celule ale sistemului neuroendocrin. Aceste colorații nu sunt specifice pentru toate celulele endocrine sau peptidice produse de acestea; ele au fost folosite în special pentru demonstrarea celulelor glandei hipofize și celulelor pancreatice. Unele metodele sunt încă folosite ca metode de rutină în laboratoare, dar pentru cercetarea avansată se utilizează metode moderne de imunohistochimie, microscopie electronică, hibridizare in situ etc.

Redăm în continuare câteva dintre acestea metode.

1. Metoda PAS-orange G (după Hotchiss 1948)

Fixatori: oricare.

Secțiunile potrivite sunt secțiunile la parafină sau la gheață.

Soluții:

Soluția de acid periodic:
 - acid periodic 0,4 g;
 - alcool etilic 35 ml;
 - apă distilată 10 ml.

Soluția de acetat de sodiu 0,2M (27,2 g se vor dizolva într-un litru de apă distilată)

..... 5 ml;

Se dizolvă acidul periodic în amestecul de apă și etanol, apoi se adaugă soluția 0,2M de acetat de sodiu; se depozitează la întuneric la 0°C, dar se folosește la temperatura camerei. Se aruncă dacă apare o colorație maronie.

Soluția reducătoare:

- iodură de potasiu 1 g;
 - tiosulfat de sodiu 1 g;
 - alcool etilic absolut 30 ml,
 - apă distilată 20 ml;
 - acid clorhidric 20% 20 ml.

Se dizolvă iodura de potasiu și tiosulfatul de sodiu în amestecul de etanol și apă distilată. Se adaugă acidul clorhidric și se depozitează la 0°C până la folosire. Se aruncă după 14 zile.

Soluția orange G:

- orange G 2 g;
 - acid fosforic 5% 100 ml

După amestecare se lasă la maturare 24 de ore. Se filtrează înainte de folosire.

Reactiv Schiff

Tehnica de colorare:

- hidratare în apă distilată;
 - spălare în etanol 70%;
 - tratare cu soluția de acid periodic 5 min;
 - spălare în etanol 70%
 - tratare cu soluție reducătoare 3-5 min (2-3 băi);
 - spălare în alcool 70%;
 - tratare cu reactivul Schiff 6 min;

- spălare în jet de apă 10 min;
 - colorarea nucleilor cu hematoxilina ferică;
 - spălare în apă de robinet până se albăstresc nucleii;
 - colorarea cu soluția de orange G 10 secunde;
 - diferențiere în apă 30 de secunde, până când celulele acidofile sunt roșii iar hematiele devin galbene.
 - deshidratare în alcool etilic;
 - clarificare și montare într-un mediu cu rășini.

Rezultate:

- coloidul veziculelor lobului intermediar hipofizar și celulele bazofile se colorează violet;
 - nucleii în albastru închis;
 - hematiele și celulele acidofile în galben;
 - celulele cromofobe în gri - albăstrui, palid.

Notă: Metoda este utilizată pentru evidențierea diferitelor celule din adenohipofiză; ea nu este recomandată pentru a demonstra prezența glicogenului sau a altor substanțe PAS- pozitive.

2. Metoda OFG pentru hipofiza anterioară (după Slidders 1961)

Fixatori: - preferabil sublimat, formaldehidă;

- acceptabile: Helly și Bouin.

Se realizează secțiuni la parafină, cu grosime de 3-4 microni.

Soluții:

Soluția de Orange G:

- orange G 500 mg;
 - acid fosforic 2 g;
 - alcool absolut 95 ml;
 - apă distilată 5 ml.
Soluția de fuxină acidă:
 - fuxină acidă 500 mg;
 - acid acetic glacial 0,5 ml;
 - apă distilată 99,5 ml.

Tehnica de colorare:

- hidratare în apă curentă;
 - colorarea nucleilor cu hematoxilina-celestină blue;
 - spălare în apă curentă;
 - diferențiere în soluție de alcool-acidă;
 - spălare în apă curgătoare;
 - trecere în alcool 95%;
 - colorare cu soluția de orange G 2 min;
 - spălare în apă distilată;
 - colorare cu soluția de fuxină acidă 2-5 min;
 - spălare în apă curentă;
 - tratare cu acid fosforic 1% 5 min;
 - spălare în apă curentă;
 - colorare cu soluție verde de lumină 1,5% în acid acetic 1,5% ... 1 min;
 - clătire în apă curentă pentru îndepărtarea excesului de colorant;

- spălare în alcool absolut;
- clarificare în xilen;
- montare în DPX.

Rezultate:

- celulele acidofile se vor colora în galben-portocaliu;
- bazofilele în roșu-violet;
- celulele cromofobe în gri-verzui palid;
- nucleii în albastru închis.

3. Metoda AB-OFG pentru adenohipofiză (după Slidders, 1961)

Fixatori : oricare.

Soluții:

- Apă bromică: acid hidrobromic 10% 45 ml;
- Permanganat de potasiu 2,5% 5 ml;

Soluție de albastru alcian:

- albastru alcian 100 mg;
- acid sulfuric concentrat 1 ml;
- acid acetic glacial 9 ml;
- apă distilată 90 ml;

Cu mare atenție, se amestecă colorantul cu acidul sulfuric, folosind o baghetă de sticlă; se adaugă încet acidul acetic glacial; se amestecă din nou; se completează până la 100 ml cu apă distilată și apoi se filtrează.

Tehnică:

- hidratarea secțiilor;
- tratare cu apă bromică 5 min;
- spălare în apă curgătoare 5 min;
- spălare în apă distilată;
- colorare cu soluția de albastru alcian 1 oră;
- spălare bine în apă curentă;
- colorare nucleilor cu hematoxilină-celestină blue;
- spălare în apă curentă;
- diferențiere în soluție de alcool-acid;
- spălare în apă curgătoare;
- trecere în alcool 95%;
- colorare cu soluția de orange G 2 min;
- spălare în apă distilată;
- colorare cu soluția de fuxină acidă 2-5 min;
- spălare în apă curentă;
- tratare cu acid fosforic 1% 5 min;
- spălare în apă curentă;
- colorare cu verde de lumină 1,5% în acid acetic 1,5%... 1 min;
- clătire în apă curentă pentru îndepărtarea excesului de colorant;
- spălare în alcool absolut;
- clarificare în xilen;
- montare în DPX.

Rezultate:

- celulele acidofile se colorează în galben portocaliu;
- celulele bazofile S se colorează verde-albăstrui închis;
- celulele bazofile R se colorează în roșu-violet;
- celulele cromofobe se colorează gri-verzui palid;
- nucleii se colorează gri-albăstrui;
- hematiele devin galbene.

4. Colorația hematoxilină-floxină pentru adenohipofiză

(după Gömöri, 1941)

Fixatori: - este indicat să se utilizeze fixatorii Bouin sau Helly,

- rezultate bune se obțin și după fixare în formaldehidă, dacă se face o postfixare în Bouin sau lichid Helly.

Soluții:

Hematoxilina crom-alaua:

- hematoxilină 500 mg
- alaua de crom 1,5 g;
- bicromat de potasiu 5% 2 ml;
- acid sulfuric 0,5 M 2 ml;
- apă distilată 100 ml.

Soluția se lasă la maturat 48 de ore și poate fi folosită când la suprafața ei apare un film continuu metallic.

Tehnica de colorare:

- hidratarea secțiilor;
 - trecere în lichid Bouin 16-24 de ore;
 - spălare prelungită în apă pentru înlăturarea acidului picric;
 - tratarea secțiilor cu o mixtură în părți egale de permanganat de potasiu 0,3% și acid sulfuric 0,5% 1 min;
 - decolorare cu soluție de bisulfid de sodiu 5%;
 - spălare minuțioasă în apă curgătoare;
 - colorare cu hematoxilină cromică 10-15 min, sub control microscopic;
 - spălare în apă;
 - diferențiere în alcool acid 1% 1 min;
 - spălare în apă curgătoare, până ce secțiunile devin albastre;
 - colorare cu soluție apoasă de floxină 0,5% 5 min;
 - spălare în apă curgătoare până nu mai curge colorant;
 - diferențiere în alcool etilic 95%;
 - deshidratare în alcool etilic absolut;
 - clarificare în xilen;
 - montare.
- Rezultate:**
- celulele B se colorează în albastru;
 - celulele A se colorează în roșu;
 - celulele D se colorează în roz spre roșu.

5. Metoda de colorare cu aldehyd-fuxină pentru adenohipofiză

(după Halami, 1952)

Fixare: formol salin sau lichid Bouin.

Soluții:

- Aldehyd-fuxină:**
- fuxină bazică 1 g;
 - paraldehidă 2 ml;
 - acid clorhidric concentrat 1 ml;
 - alcool etilic absolut 60 ml;
 - apă distilată 40 ml.

Se dizolvă fuxina bazică în alcool-apă distilată, se adaugă acidul clorhidric și apoi paraldehida. Se lasă la maturare 2-7 zile, la temperatura camerei, se filtrează. Se păstrează la 4°C.

Soluția de contrastare:

- verde de lumină 200 mg;
- orange G 1 g;
- acid fosforungstic 500 mg;
- acid acetic glacial 1 ml;
- apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- hidratare;
- oxidare cu soluție Lugol, 10 min;
- spălare în apă;
- decolorare cu soluție de tiosulfat de sodiu 2,5%;
- spălare în apă;
- trecere în alcool 70%;
- colorare cu aldehyd-fuxină, 15-30 min;
- spălare în alcool 95% și apoi în apă;
- colorarea nucleilor cu albastru de celestină sau hematoxilină;
- spălare în apă;
- diferențiere scurtă în alcool și apoi spălare bine în apă;
- spălare cu apă distilată;
- contrastare cu soluție de orange G-verde de lumină, 45 sec;
- spălare rapidă în acid acetic 0,2% și apoi în alcool 95%;
- deshidratare în alcool absolut;
- clarificare în xilen;
- montare.

Rezultate:

- celulele B apar colorate în purpuriu-violet;
- celulele A apar colorate în galben;
- celulele D apar colorate în verde;
- nucleii apar colorați în albastru închis.

III. METODE DE IMPREGNAȚIE ARGENTICĂ

Aceste tehnici sunt printre cele mai folosite pentru evidențierea non-
imunohistochimică a celulelor neuroendocrine fiind utilizate și azi ca metode de
rutină în multe laboratoare de histologie și histopatologie. Principiul de bază al
acestor tehnici se bazează pe capacitatea unor celule neuroendocrine de a absorbi
ionii de argint dintr-o soluție. Acele celule care pot reduce ionii la argint metallic se
numesc *argentafine*, pe când cele care au nevoie de un agent reductor care să
precipite argintul metallic se numesc *argirofile*. Reacția argentafină rezultă din
reacția ce are loc între aldehide și aminele biogene, pe când argirofilia este produsă
de cromogranina A.

1. Metoda argentafină Singh (1964)

Fixatori: formaldehidă, glutaraldehidă, alcool picric.

Soluții:

- soluție de nitrat de argint 10% proaspăt preparată;
- nitrat de amoniu concentrat;
- (la 10 ml de soluție de nitrat de argint 10% se adaugă picătură cu picătură amoniu concentrat până ce precipitatul format abia se dizolvă. În această soluție clară se adaugă soluție apoasă de nitrat de argint 10% picătură cu picătură până când apare un fin voal opalescent. Apoi se dizolvă 1/10 soluția obținută în apă distilată. Soluția de lucru trebuie să fie întotdeauna proaspăt preparată).

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- rehidratarea secțiunilor trecându-le prin alcool și apă distilată;
- trecere în soluția de nitrat de argint 15-30 min, la 60°C;
- se examinează secțiunile din 5 în 5 min până când capătă o culoare brun deschis;
- spălare intensă în apă distilată;
- imersie 1 minut în soluție apoasă de tiosulfat de sodiu 1%;
- spălare intensă în apă curentă;
- contrastare cu soluție apoasă de roșu neutru 0,5%;
- spălare în apă curentă;
- deshidratare, clarificare, montare în rășini.

Rezultate:

- granulele argentafine se colorează în negru;
- nucleii se colorează în roșu.

2. Metoda argirofilă Grimelius (1968)

Fixatori: formaldehidă sau amestecul Bouin.

Soluții:

Soluția de nitrat de argint:

- soluție apoasă 1% de nitrat de argint proaspăt preparată 3 ml;
- tampon acetat (pH 5,6) 10 ml;
- apă bidistilată 87 ml;

Soluția reducătoare:

- hidrochinonă 1 g;
- sulfat de sodiu - cristale 5 g;
- apă distilată 100 ml.

Tehnica de colorare:

- rehidratarea secțiunilor în alcool și apoi în apă distilată;
- trecerea secțiunilor în soluția de nitrat de argint 3 ore la 60°C;
- se scot secțiunile și se scurg bine;
- trecere în soluția reducătoare la 45°C 1 min;
- spălarea secțiunilor în apă distilată;
- examinarea la microscop, pentru a verifica impregnația. Dacă secțiunile sunt puțin impregnate, se întorc în soluția de argint pentru 5-10 min;
- îndepărtarea soluției de argint și repetarea reducerii;
- spălare în apă distilată 1 min;
- spălare bine în apă curentă;
- deshidratare, clarificare, montare în rășini.

Rezultate:

- granulele argirofile apar în negru-brun;
- **Notă:** metoda nu va colora celulele care conțin insulină sau somatostatină.
- Contrastarea se poate face cu soluție apoasă de verde de lumină 0,5%.

3. Metoda cu nitrat de argint în soluție alcoolică pentru celulele argirofile în special celulele D (alfa-1) ale pancreasului endocrin (Hellerstrom și Hellman)

Fixatori: Bouin sau formaldehidă (urmată de o postfixare în Bouin 2 ore la 37°C).

Soluții:

- Soluția de nitrat de argint:
- nitrat de argint 10 g;
- apă distilată 10 ml;
- alcool etilic 95% 90 ml;
- acid citric 1M 0,1 ml.

Soluția oxidantă:

- acid pirogalic 5 g;
- alcool etilic 95% 95 ml;
- formaldehidă concentrată (40%) 5 ml.

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- rehidratare în alcool etilic în concentrație descrescândă;
- spălare în apă curentă 1 oră;
- deshidratare parțială în alcool 95%;
- trecere în soluția de nitrat de argint la 37°C peste noapte la întuneric;
- spălare rapidă în alcool 95% nu mai mult de 10 secunde;
- trecere prin soluția oxidantă 1 min;
- spălare în trei băi de alcool 95% 1 min;
- spălare în alcool absolut (3 băi) câte 1 minut în fiecare;
- montare în rășini.

Rezultate:

- granulele celulelor D din pancreas (alfa-1) se colorează în maron;
- celulele A și B pancreatică rămân necolorate.

4. Metoda de impregnație argentică FONTANA - MASSON

Fixatori: formaldehidă.

Soluții:

- Soluția de nitrat de argint:
- nitrat de argint 10 g;
- apă distilată 100 ml;
- La 95 ml din această soluție se adaugă hidroxid de amoniu până se obține o soluție clară, fără precipitat; se adaugă apoi picătură cu picătură din restul de 5 ml de nitrat de argint până când soluția care începe să devină opalescentă rămâne clară. Se lasă peste noapte înainte de utilizare.

Soluția de lucru:

- nitrat de argint 25 ml;
- apă distilată 75 ml.

Soluția de clorură de aur:

- clorură de aur soluție apoasă 1% 10 ml;
- apă distilată 40 ml.

Soluția de tiosulfat de sodiu 5%:

- tiosulfat de sodiu 5 ml;
- apă distilată 100 ml.

Soluția de Roșu Nuclear:

- roșu nuclear (Kernechrot) 0,1 g;
- sulfat de aluminiu soluție apoasă 5% 100 ml;

Se fierbe sulfatul de aluminiu, se retrage de pe foc și se adaugă roșu nuclear; se dizolvă la cald timp de 10 min; se răcește și se filtrează. Se adaugă un cristal de timol pentru conservare.

Tehnica de colorare:

- deparafinare și hidratare în apă distilată;
- colorare cu soluția de nitrat de argint la 56°C timp de 1 oră în baie fierbinte de lumină;
- spălare în apă distilată;
- imersie pentru 10 min în soluția de clorură de aur;
- spălare în apă distilată - 3 băi;
- trecere în tiosulfat de sodiu 5% - 5 min;
- spălare în apă distilată;
- contrastare cu roșu nuclear - 5 min;
- spălare în apă distilată - 2 băi;
- deshidratare, clarificare, montare.

Rezultate:

- graulele argentașine și melanina se colorează în negru;
- nucleii în roșu deschis.

5. Metoda Asojo (pentru celulele mucoasei gastrice)

Tehnica de colorare:

- deparafinare;
- hidratare;
- tratare 5 minute la temperatura laboratorului cu amestecul (preparat extemporaneu):
 - soluție de permanganat de potasiu 0,3% 1 vol;
 - acid sulfuric soluție 0,3% 1 vol.
- decolorare cu soluția de metabisulfid de sodiu 3% până se albesc secțiunile,
- spălare în apă curentă 5 min;
- colorare cu soluția de albastru alcian 1% 30 min;
- clătire în apă distilată;
- spălare în apă curentă 5 minute;
- colorare cu albastru celestin:
 - albastru celestin B sau R 1 g;
 - acid sulfuric concentrat 0,5 ml;
 - soluție apoasă de alaiun de fier 2,5% 86 ml;
 - glicerină 14 ml

(se amestecă albastru celestin cu acidul sulfuric, după care se adaugă puțin câte puțin alaiunul de fier și se agită permanent; se adaugă glicerina, după care se pune tot amestecul la etuvă la 56°C până la dizolvarea completă a componentelor; se lasă să se răcească după care se filtrează).

- colorare cu hemalaunul Mayer, 2 min la temperatura laboratorului;
- spălare în apă;
- diferențiere în sol. de alcool-acid clorhidric 1% -10 secunde;
- virare în albastru în apă curentă;
- colorare cu soluție tartrazină 2%, 30 sec. la temperatura laboratorului:
 - tartrazină 2 g;
 - apă acetifiată 1% 100 ml.

- clătire în apă distilată;
- dehidratare rapidă direct în alcool 95%;
- clarificare în xilen;
- montare în balsam de Canada sau în rășini sintetice.

Rezultate:

- nucleii se colorează în negru;
- limitele celulare se colorează în verde;
- celulele mucoase în albastru sau verde palid;
- granulele de secreție ale celulelor principale în verde închis;
- celulele marginale și globulele roșii în galben.

6. Metoda Friedberg pentru evidențierea rapidă a granulelor aparatului juxtaglomerular

Tehnica:

- fixare 24 ore în formol 10% tamponat (pH = 7,3);
- includere în Carbowax;
- secționare la 2-3 micromi;
- înlăturarea mediului de includere prin alcool metilic;
- colorare cu soluție de cristal violet 2-2,5 min:
 - soluție de cristal violet 1% 25 pic;
 - alcool etilic 20% 100 ml.
- colorare cu soluție de roșu neutru 5-10 sec;
- soluție de roșu neutru 1% 40 pic;
- apă distilată 100 ml.
- clătire în apă distilată;
- montare în mediu Apathy (solubil în apă):
 - gumă arabica 50 ml;
 - zahăr 50 g;
 - apă 50 ml.

Se dizolvă guma într-o parte de apă și zahărul în restul de apă. Se amestecă cele două soluții și se adaugă un cristal de timol pentru împiedicarea dezvoltării bacteriilor sau mucegarului.

Rezultate:

- granulațiile juxtaglomerulare apar purpuriiu;
- mitocondriile se colorează în albastru-mov;
- mitocondriile din tubul distal în albastru intens;
- nucleii în roșu;
- hematitele în albastru.

7. Metoda Harado pentru evidențierea granulelor aparatului juxtaglomerular

Tehnica:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare cu soluție apoasă de cristal violet 1% ... 30 - 60 sec;
- clătire în apă;
- tratare cu soluție de potasiu 0,01N 1-3 min:
 - potasiu caustic 0,56 g;
 - apă distilată 1000 ml.
- trecere prin amestecul anilina-xilen în părți egale;
- clarificare în xilen;
- montare în rășini sintetice.

Rezultate:

- granulele juxtaglomerulare și eritrocitele apar în violet intens;
- citoplasmele și țesutul conjunctiv în violet-pal.

8. Metoda Heidenhaim modificată de Gabe, pentru pancreasul endocrin

Tehnică:

- deparafinare;
- hidratare;
- oxidare 1 min la temperatura laboratorului cu amestecul:
 - soluție de permanganat de potasiu 2,5% 10 ml;
 - acid sulfuric 5% 10 ml;
 - apă distilată 80 ml.
- spălare în apă curentă;
- decolorare cu metabisulfid de sodiu 5%;
- spălare 10 minute în apă curentă;
- colorare 15 minute cu azocarmin B:
 - azocarmin B 0,10 g;
 - apă distilată 100 ml.

Se încălzește până la fierbere, după care se răcește și se adaugă:

- acid acetic glacial 1 ml.
- spălare în apă distilată;
- tratare cu amestecul albastru de anilină - orange - 15 minute:
 - albastru de anilină 5 g;
 - orange G 2 g;
- apă distilată 100 ml;

Se dizolvă la cald coloranții, după răcire se adaugă 8 ml acid acetic glacial.

- deshidratare directă în alcool absolut;
- montare în balsam de Canada.

Rezultate:

- celulele A se colorează în roșu intens;
- celulele B se colorează în albastru.

9. Metoda Henle pentru evidențierea celulelor cromafine

Tehnică:

- fixare 1-3 zile la temperatura laboratorului într-un fixator bicromat (Regaud) care să nu conțină sublimat;
- deshidratare;
- includere în parafină;
- secționare;
- deparafinare;
- montare în balsam sau rășini sintetice;

Rezultate:

- granulele sunt colorate în brun intens;
- se poate accentua contrastul prin supracolorare cu Giemsa (granulele devin albastru - verde).

10. Metoda de colorare policromă Herlant pentru hipofiză

Tehnică:

- deparafinare;
- hidratare;
- colorare cu soluție de entrozină 1% - 10 minute:
 - entrozină 1 g;
 - tampon Walpole pH 6,5 1 ml;
 - apă distilată q.s 100 ml.

Tamponul Walpole se prepară astfel:

- soluție acid acetic 0,2M (12 g/1000 ml apă distilată);
- soluție de acetat de sodiu 0,2M.

4,8 ml soluție acid acetic + 45,2 ml soluție acetat de sodiu (pH 5,6) + 100 ml apă distilată;

- spălare în apă distilată;
- colorare cu amestecul Mallory
 - albastru de anilină 10 min;
 - orange G 0,5 g;
 - apă distilată 2 g;
 - acid acetic 100 ml;
 - acid acetic (pH-ul trebuie să fie aproximativ 2,5) 2 ml;
- tratare cu sol de acid fosfomolibdenic 5%
- colorare cu albastru acid de alizarină 10 min;
- albastru acid de alizarină BB 0,5 g;
- sulfat de aluminiu 10 g;
- apă distilată 100 ml.

Se fierbe 10 minute; se completează cu apă distilată până la 100 ml, se lasă să se răcească. Soluția se conservă mai multe luni.

- spălare rapidă în apă distilată;
- tratare cu soluție apoasă de acid fosfomolibdenic 5% .. 10 min;
- deshidratare;
- diferențiere;
- montare în balsam sau rășini sintetice.

Rezultate:

- celulele alfa se colorează în orange;
- celulele beta se colorează în albastru;
- celulele gama se colorează în violet;
- celulele delta se colorează albastru intens;
- celulele epsilon se colorează în roșu.

Precauții:

- calitatea coloranților este în funcție de oranje G;
- se va folosi acid fosfomolibdenic de bună calitate;
- se utilizează albastru acid de alizarină și nu alizarină S;
- dacă diferențierea este prea rapidă se poate utiliza ca diferențiator și deshidratant amestecul alcool 70° și acid fosfomolibdenic 5%, apoi alcool 95° și acid fosfomolibdenic 5%; apoi alcool absolut.