Osservazione microscopica dei tessuti umani

Tecniche di indagini

Le tecniche di indagini dell'istochimica sono fondamentali per lo studio della sostanza nutriente, questo perché le cellule svolgono le loro funzioni grazie a dei costituenti (strutture biologiche) a loro interno, quindi è importante trovare un collegamento tra le strutture biologiche e la sostanza biologica, questo è possibile facendo della indagini.
Le principali indagini sulle cellule e sui tessuti sono: l'**esame a fresco** e la **tecnica delle fette**.

ESAME A FRESCO

L'**esame a fresco** prevede l'utilizzo, in genere, del microscopio a contrasto di fase, usato per osservare le cellule viventi, i microorganismi e/o i frammenti di tessuti; quest'ultimi vengono espiantati dell'animale, non sono trattati con fissativi (=ovvero evita tutti i trattamenti/metodiche che portano ad alterare i ricostituenti della materia vivente) né con coloranti e ottenuti dopo dissociazione.
La dissociazione può essere distinta in due tipologie: *meccanica*, in cui, in pratica il tessuto viene preso per essere posto all'interno di colini dove viene pestato, in modo da ottenere una sospensione cellulare, che sarà poi centrifugata (=>quindi gli strumenti sono aghi, pestagli, setaccio-colini, centrifuga). Nel caso si debba trattare un tessuto costituito da strutture fibrose, prima di operare la *dissociazione meccanica*, è necessario eseguire un'altra macerazione, ossia la *dissociazione chimica*, anche se, nella maggior parte dei casi provoca delle alterazione profonde a livello cellulare. Le sostanze che vengono utilizzate per la *dissociazione chimica* del tessuto sono: acqua bollente, alcool a 95° e acqua distillata in rapporto 1:2 (→noto come alcool al terzo di Ranvier), basi forti come soda e potassa caustica al 30%, acidi forti come l'acido nitrico e l'acido cloridrico al 30° anche acido solforico, acido picrico (→consiste in una soluzione satura ed è molto esplosivo) e infine enzimi come tripsina, peptina, papaina, jaluronidasi utilizzati per ottenere le cellule da un tessuto.
Per osservare un preparato al microscopio, non colorato, viene usato un particolare tipo di microscopio, il **microscopio a contrasto di fase**, analogo al microscopio a luce trasmessa, dato che lavora sul campo della luce visibile, ma con un principio diverso perché basata sull'interferenza luminosa. L'interferenza luminosa è la sovrapposizione di più onde luminose e, solitamente, la risultante, ovvero l'ampiezza dell'onda, è a una intensità diversa rispetto alla somma delle onde (→ avviene un gioco di interferenze che permette all'occhio di rendere visibile le componenti che risulterebbero trasparenti). Il campione sul vetrini, posto sotto il microscopio, viene illuminato da un fascio luminoso, suddiviso in due fasci, perché al livello del condensatore è presente un diaframma di fase, con una sola zona anulare trasparente, in questo modo il raggio attraversa il diaframma di fase forma un cono cavo, quando il fascio luminoso incontra il campione subisce un cambiamento di fase, cioè il preparato presenta diverso numero di rifrazione, per cui quando incontra il raggio esso viene deviato e ricalibrato, in questo modo, grazie al microscopio, è possibile percepire differenze di densità; cioè la maggior parte dei componenti cellulari è trasparente alla luce visibile a causa dell'elevata presenza di acqua, ma le radiazioni luminose una volta oltrepassata una componente o organello cellulare, subiscono dei cambiamenti di fase che dipendono dallo spessore e dal diverso ordine di rifrazione della struttura da oltrepassare, ottenendo l'immagine del campione dalle differenze di densità, quindi il microscopio a contrasto di fase somma il raggio che attraversa il campione (=raggio deviato e rifratto) con la luce non rifratta, e dà il terzo raggio luminoso percepibile all'occhio. Con l'utilizzo del microscopio a contrasto di fase si evita di

l'utilizzo di coloranti e fissativi che spesso comportano notevoli alterazioni strutturali ottenendo così dei dati molto più reali di quella che è l'organizzazione cellulare.
Nell'esame a fresco il campione va mantenuto in un mezzo omogeneo che non alteri la trama strutturale, a tale scopo vengono utilizzate delle soluzioni, note come **soluzioni indifferenti** (isotoniche) che hanno la proprietà di avere la stessa pressione osmotica rispetto al mezzo circostante (=viene mantenuto l'equilibrio). Le **soluzioni indifferenti** che si possono usare sono:

- *Soluzioni liquide naturali* come il succo/liquido dei tessuti, umor acqueo (=soluzione contenente pochi sali e poche proteine che si trova tra la cornea e il cristallino), liquido amniotico, albume d'uovo filtrato e siero di sangue (=plasma privato del fibrinogeno e fattori della coagulazione).
- *Soluzioni saline* come soluzioni fisiologiche NaCl 0,9% in H_2O distillata (=per i vertebrati omeotermi), soluzione di Ringer (=pH di 7-7,4 neutro, costituita da vari sali: NaCl 0,9 g, KCl 0,042 g, $NaHCO_3$ 0,02 g, $CaCl_2$ secco 0,025 g e H_2O distillata 100 mL; viene preparata al momento dell'uso e sciolta a freddo, come ultimo sale che viene aggiunto è $CaCl_2$ secco, ma questa formula cambia nella concentrazione di NaCl per i diversi animali come nel caso gli urodeli 0,8 g o gli anuri 0,64 g), soluzione di Locke (=pH di 7-7,8 neutro, costituita da: NaCl 0,85 g, KCl 0,042 g, $NaHCO_3$ 0,02 g, $CaCl_2$ 0,024 g e H_2O distillata 100 mL; vengono preparati sciogliendo i sali a freddo e aggiungendo per ultimo il $CaCl_2$) e soluzione di Tyrode (=pH di 7,5-7,8 neutro, si compone di: NaCl 0,8 g, KCl 0,02 g, $NaHCO_3$ 0,1 g, $CaCl_2$ 0,02 g, $MgCl_2$ 0,01 g, NaH_2PO_3 0,005 g, D-glucosio 0,1 g e H_2O distillata 100 mL; per aumentare la viscosità di queste soluzioni viene utilizzato una sostanza inerte, come il polivinilpirrolidone, in una proporzione di 6 g ogni 100 mL di liquido).

Il preparato, quindi, viene mantenuto in condizioni normali per evitare lo shock osmotico.
Il vetrino che permette la visione del campione può essere costituito da:

- Un vetrino portaoggetti (76 x 26 mm) su cui verrà aggiunta 1 goccia della sospensione cellulare, poi coperto da vetrino coprioggetto (molto sottile standard 18 x 18 mm e spessore 0,14-0,17 mm), per garantire che resti sigillato è possibile usa sostanza che gelifichi e poi solidifichi (come anche lo smalto).
- Posizionamento del campione in una camera umida e l'esempio è il vetrino goccia pendente, in questo caso il campione viene posto sopra il vetrino coprioggetto, questo verrà capovolto su un vetrino porta oggetto che è incavo, in questo modo viene mantenuto il liquido e permette la sopravvivenza dei piccoli organismi più allungo.

A volte negli esami a fresco vengono utilizzate delle **colorazioni vitali**, cioè coloranti che vengono usati per evidenziare le cellule con attività fagocitaria/granulopessiche (=cellule che possono inglobare il colorante, come un macrofago, il colorante si lega a recettori che si trovano sulla membrana del macrofago, entra in forma di fagosoma, quale sarà degradato ed entrerà nella cellula) e le strutture del citoplasma cellulare (come mitocondri e vacuoli), per colorare in toto embrioni in via di sviluppo e per mettere in evidenza proprietà delle membrane biologiche (permeabilità, assorbimento e trasporto). Tali coloranti devono, solitamente, essere utilizzate nell'animale vivente quindi non devono essere sostante tossiche ma innocue (solitamente sono sospensioni gialli di anioni) e vengono anche utilizzate su cellule e/o tessuti, levati dall'animale, ma con ancora funzioni vitali. I coloranti vitali possono essere:

- *Acidi* che possono essere alizarina (=utilizzata per l'osso di formazione), blu tripano (=tipicamente, entra nelle cellule morte, fa da discriminante tra le cellule apoptotiche e mecrotiche/vive), blu pirrolo (=solubile in alcool ma non acqua), rosso congo (=nocivo/carcerogeno, viene utilizzata per la colorazione utilizzato per la formazione di amiloidi), inchiostro di china (=utilizzato per osservare la capsula batterica), litio carminio e carminato.

- *Basici* che possono essere blu di metilene, blu toluidina (=quando va a legarsi con grandi molecole il colore da blu diventa fucsia), azzurro di metilene, solfato di blu di Nilo, bruno di Bismark (=utilizzato nell'animale vivente), blu di cresile brillante, verde Janus (=utilizzato nell'animale vivente).
- *Neutri* come rosso neutro (=utilizzato per la colorazione all'interno di cellule viventi).

TECNICA DELLE FETTE

La **tecnica delle fette** permette di ottenere delle sezioni di tessuto (con spessore da nm a µm) e visualizzato con il **microscopio ottico** e il **microscopio a trasmissione** (rispettivamente a seconda dello spessore). Questo metodo di indagine prevede che il costrutto abbia caratteristiche di compattezza e plasticità tali che nella preparazione delle fette questo non si frammentano né si deformino dall'azione esercitata dal taglio. Ci possono essere 3 tipi di *sezioni*:

- ❖ Sezioni criostatiche derivano da un blocchetto che è stato congelato, incorporato in una sostanza, chiamata OCT, che condizioni di temperatura ambiente è ha una consistenza gelatinosa ma a temperatura di 4°-5° si solidifica, permettendo al campione di proteggerlo dal problema del congelamento e, in contemporanea, di creare un materiale solido da tagliare; blocchetto risultante sarà poi tagliato col criostato (=strumento che contiene all'inteno di una camera refrigerata il microtomo).
- ❖ Sezioni da inclusioni in paraffina, generalmente, subiscono un taglio dallo spessore di qualche µm con il microtomo.
- ❖ Sezioni da inclusione in resina, principalmente utilizzati in microscopia elettronica, dove il taglio deriva da particolari microtomi, gli ultramicrotomi, che permettono di ottenere sezioni dello stesso di pochi nm. Le resine che vengono utilizzate in microscopia elettronica possono essere di vario tipo: metacrilati (=polimero di metacrilato di metile), glicolico polietilene (=polimeri derivati dall'ossido di etilene), celloidina (=costituita da nitrocellulosa) e la resina commerciale epon™.

La **tecnica delle fette** prevede una preparazione del campione, infatti deve essere definito per poter essere tagliato mediante un processo di inclusione (ciò permette la preservare il campione, che evita la sua degradazione e la sua frammentazione nel taglio). Per essere incluso, il campione deve mantenuto in uno stato il più vicino, possibile, allo materia vivente, quindi deve essere *fissato*; la **fissazione** può avvenire con metodi **chimici** o con metodi **fisici**. Una volta che il preparato è fissato (tipicamente 4° per i fissativi fisici), è necessario il lavaggio del fissativo, di solito per il fissativo chimico, con SDS ogni 15 minuti. Una volta terminato il lavaggio il pezzo deve essere conservato, tipicamente in alcool 70% restare per anni. Segue l'inclusione e il taglio con il microtomo, il tagliato ottenuti verranno poi montati sul vetrino, il quale rimarrà, per garantire l'adesione, una notte in stufa.

Nel caso delle cellule vengono usati i metodi citologici si basano sull'utilizzo della citocentrifuga (velocità di 800 a non superiore al 1000 pmb per 7 minuti), apparecchiatura che permette di depositare in un area concentrata sul vetrino una sospensione cellulare, ciò è permesso la sospensione cellulare nella cuvetta verrà posizionata all'interno, come anche il vetrino, dopodiché viene avviata la citocentrifuga che dalla rotazione farà sì che la cellula sparata/splitata sul vetrino (la parte in eccesso viene assorbita), quindi si formeranno 2 spot dove verranno fatte le diverse analisi. Una volta terminata questa procedure il campione deve essere *fissato*, per 3-5 minuti, con alcool di metanolo, poi segue la *colorazione*, di vario genere, a seconda della ricerca nella cellula. Per poter visualizzare il preparato è necessario *montare* il vetrino e infine l'osservazione al microscopio. Il caso particolare è il tessuto del sangue dove viene utilizzata la tecnica dello striscio, essa prevede di posare una goccia di sangue fresco su un bordo del vetrino e molto velocemente viene "strisciata" la goccia verso il senso opposto. A questo punto segue la fissazione di 3-5 minuti con alcool, etanolo

o metanolo, poi successivamente la colorazione. Per poter visualizzare il preparato è necessario *montare* il vetrino e infine l'osservazione al microscopio.
La ***fissazione*** del tessuto è importante perché è necessario mantenere uno stato molto vicino alla materia vivente, infatti lo scopo della fissazione è quello di stabilizzare fisicamente e chimicamente tutti i costituenti cellulari e tessutali. Pertanto, la fissazione determina nel tessuto il cambiamento verso uno stato il più vicino possibile a quello della materia vivente, così da consentire l'allestimento di preparati microscopici, altrimenti le degenerazioni potrebbero inficiare l'analisi microscopica; un'altra caratteristica è che la fissazione rende insolubili i costituenti chimici della sostanza vivente. È necessario la fissazione per evitare l'alterazione della cellula, dopo l'espianto, determinata da: *enzimi autolitici/litici* che intervengono quanto la cellula muore, *enzimi litici di singoli organi* (esempio l'acido cloridrico e gli enzimi idrolitici del succo gastrico) e gli *enzimi litici esogeni* prodotti dai patogeni. La fissazione prevede metodi **fisici** o metodi **chimici**.

Fissazione fisica

I metodi di **fissazione fisici** sono rappresentati dal:

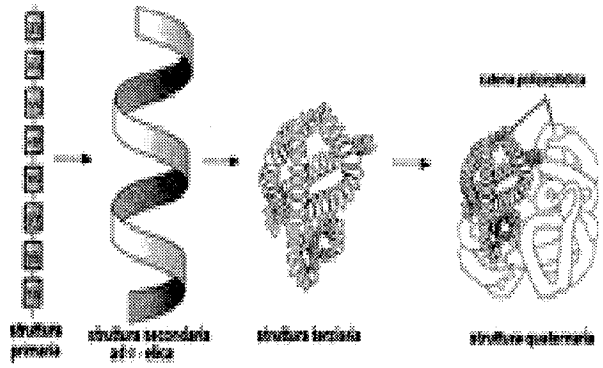
- *Calore/essiccamento* tipicamente sono impiegati sono in strisci di sangue ed in apposizioni di midollo osseo, questi necessitano di un ulteriore fissazione di chimica, definita post-fissazione, perché il ritorno a temperature ambiente si verificherebbero delle alterazioni.
- *Raffreddamento/congelamento*: il freddo (=>*raffreddamento*) non va da considerarsi come fissativo ma come conservante, importante nell'istochimica perché permette di conservare i tessuti e indurirli che porta all'ottenimento delle sezioni, una volta ottenute le sezioni esse vengono fissate con metodi chimici, perché quando i tessuti vengono riportati a temperatura ambiente possono aver luogo tutte le modifiche degenerative che intervengono dopo la morte del tessuto. Il *congelamento* (= temperatura varia a seconda del tessuto, in base al rapporto tra acqua e lipidi, per esempio il rapporto a un valore elevato corrisponde un alta temperatura) deve essere il più rapido possibile per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio (=>artefatti visibili nell'analisi microscopica) che alterano la struttura dei tessuti, la formazione dei cristalli di ghiaccio perché coesistono la fase liquida e la fase solida, per motivi termodinamici, è favorita la dissoluzione dei cristalli piccoli a favore dell'accrescimento di quelli più grandi, quindi un *congelamento* rapido impedisce la formazione di cristalli d'acqua e la stabilizza in uno stato amorfo (come il vetro, infatti è noto come ghiaccio vetroso). Per ottenere un congelamento rapido si devono trattare mezzi molto piccoli (non più spessi di 1-3 mm) a basse temperature. Negli studi più delicati, il congelamento può essere ottenuto mediante azoto liquido a -170°, isopentano, propano e i derivati degli alogenati del metallo e dell'etano (noti come freon); mentre negli studi meno raffinati/grossolani il congelamento rapido può avvenire spruzzando sopra un gas che, espandendosi, sottrae calore (freon o anidride carbonica) oppure introducendo il pezzo di campione in una camera refrigerante, quale quella del *criostato*. Quest'ultimo è un apparecchiatura usata per sezionare i tessuti congelati, costituito da una camera refrigerata contenente il microtomo, cioè strumento refrigerato responsabile dell'ottenimento delle sezioni istologiche, dette sezioni criostatiche, questa sezione viene montato su un vetrino portaoggetto e lasciata essiccare, ha cui segue una rapida fissazione con soluzioni alcoliche o formalina. Queste sezioni criostatiche servono per preservare strutture molecolari labili (come, per esempio, molecole della matrice extracellulari, recettori di membrana, enzimi, ...) degradabili a seguito dell'impiego di fissativi di tipo chimico per tempi lunghi e delle tecniche della inclusione, ma anche hanno la caratteristica di essere molto rapide (utile nella diagnostica intraoperatoria estemporanea).
- *Per congelamento ed essiccamento (freeze-drying)*, tecnica complessa che richiede l'impiego di apparecchiature costose, fu proposta da Altmann alla fine del 1890 e ripresa nel 1930 da

Bensley, Gersch e Hoerr, e ulteriormente sviluppata nei tempi più recenti. Essa ha il vantaggio di non richiedere l'uso preventivo di liquidi fissativi (=che potebbere provocare delle alterazioni) e trova impiego nelle ricerche citologiche, istochimiche e, con particolari accorgimenti, in microscopia elettronica. Tale metodo prevede:

a) *Rapido prelievo del tessuto*
b) *Raffreddamento con azoto liquido (o isopentano)*, rappresenta il passaggio più delicato del metodo (=da esso dipende la buona riuscita della conservazione), in questo passaggio è necessario evitare la formazione di grossolani cristalli di ghiaccio, che provocano profonde alterazioni nelle cellule e lasciano tracce ben visibili all'analisi microscopica, perciò il prezzo deve essere raffreddato il più veloce possibile (alla temperatura dell'azoto). Nella pratica si impiegano pezzi piccoli (1 mm) e un liquido raffreddante con conduttività alta anche a basse temperature ottenendo così il ghiaccio vetroso.
c) *Disidratazione a una temperatura compresa tra -60 °C e -30 °C*, essa viene effettuata in base al principio "un pezzo di tessuto congelato esposto a una pressione di vapore inferiore a quella della pressione di equilibrio del ghiaccio, quest'ultimo sublima con il conseguente essiccamento del tessuto", quindi il pezzo viene posto in un recipiente adeguatamente raffreddato posto sottovuoto di 0,1-0,01 atm grazie a una pompa a vuoto, il vapore d'acqua viene allontanata dalla pompa a vuoto, ciò garantisce non solo la disidratazione ma anche si liofilizza (→sicurezza di aver eliminato tutta l'acqua solo con questa certezza si prosegue la fase successiva altrimenti non sarebbe possibile).
d) *Inclusione in paraffina o carbowax e successivo taglio*: i pezzi ottenuti verranno lasciati cadere in un recipiente contenete paraffina (o carbowax) portato al punto di fusione ai 60 °C; negli apparecchi più perfezionati l'inclusione avviene nello stesso recipiente nel quale è stata effettuata la disidratazione.
e) *Taglio*

Fissazione chimica

La **fissazione** è importante per mantenere il campione il più vicino possibile alle condizioni vitali, per fissare un preparato occorre fissare le *proteine*, perché sono le principali responsabili delle caratteristiche morfologiche-funzionali della sostanza vivente, quindi una buona fissazione prevede una fissazione delle proteine e ciò avviene mediante denaturazione delle proteine.
La fissazione delle proteine comporta, in grado più o meno elevato, la fissazione di altri tipi di molecole, che solitamente sono le molecole legate chimicamente alle proteine che vengono fissate e le molecole trattenute all'interno delle maglie di gel proteico determinato dalla fissazione stessa, perché i **fissativi chimici** che vengono utilizzati sono caratterizzati da gruppi chimici che reagiscono con gruppi delle proteine, in questo modo si crea un ingombro sterico ed è facile che le molecole legate alle proteine rimangono imbrigliate nel gel che si forma durante la fissazione.



Le proteine sono macromolecole biologiche che presentano un struttura primaria costituita da una sequenza ripetute di L-amminoacidi, essi formano dei legami a idrogeno tra i gruppi amminici e i gruppi carbossilici di amminoacidi vicini, questo porta alla formazione di un α-elica (=>rappresenta la struttura secondaria della proteina), successivamente la proteina si ripiega su sé stessa per effetto della creazione di legami tra i gruppi residui degli amminoacidi (=>raffigura la struttura terziaria) e, infine, le proteine possono essere formate da più subunità che