

Realizarea unui preparat histologic

În funcție de durata viabilității lor, preparatele microscopice sunt de 2 tipuri: temporare (câteva ore) și permanente (zeci, sute de ani).

Realizarea unui preparat histologic permanent

Procesarea unui țesut în vederea obținerii unor preparate histologice permanente subțiri și clare pentru evaluarea microscopică este un proces extrem de laborios. Diferite seturi sau combinații de metode pot da rezultate diferite pentru fiecare laborator de cercetare, acestea din urmă având protocoale proprii, testate în timp, pentru realizarea preparatelor microscopice. Presupune o serie de etape, prezentate în cele ce urmează.

1. Recoltarea materialului biologic

Se face cu ajutorul instrumentarului specific și poate proveni din mai multe surse: de ex. biopsie, necropsie, plante proaspăt culese etc. Se are în vedere faptul că recoltarea trebuie să aibă loc cât mai rapid, pentru a preveni degradarea produsului și introducerea de artefacte. În orice caz, unele artefacte nu pot fi evitate (degradarea membranei bazale).

2. Fixarea

Este o etapă ce trebuie realizată imediat după recoltare. Are ca scop omorârea celulelor și prezervarea tuturor caracteristicilor țesutului, cu blocarea fenomenelor de alterare continuă. Fixarea oprește toate procesele metabolice. Fixarea durează 24-48 ore, în funcție de grosimea probei recoltate. În concordanță cu tipurile de țesut, fixarea se poate face cu ajutorul unei game vaste de metode de fixare, precum cele **chimice** (substanțe denumite **fixatori**):

-aldehida formică (formaldehida sau formalina, cel mai adesea 10%); formaldehida poate fi utilizată în conjunctură cu acidul picric și acidul acetic, formând fixatorul Bouin;

-alcool etilic;

-azot lichid;

sau prin metode **fizice**, cum ar fi fixarea prin înghețare, atunci când fixatorii chimici ar modifica structura preparatului (ar putea interacționa cu unele molecule de interes).

Proba de țesut trebuie să fie imersată complet în soluțiile de fixatori chimici.

3. Includerea

Următorul pas după fixare este, de obicei, reprezentat de includerea (cel mai adesea) în parafină a preparatului. Includerea se referă la infiltrarea preparatului cu o substanță lichidă care se va întări ulterior (parafina) sau va polimeriza (rășini). Duritatea preparatului astfel obținut este direct proporțională cu posibilitatea de a secționa foarte fin țesutul. Înghețarea poate fi folosită și în acest pas. Includerea are două etape diferite:

-**impregnarea cu parafină**, se realizează într-un termostat la 55-59°C, pentru a favoriza pătrunderea parafinei lichidei în tot volumul țesutului;

-**turnarea blocurilor de parafină** - cu ajutorul matrițelor speciale. Se lasă la răcit și se etichetează corespunzător.

Întrucât compușii de includere nu sunt, de regulă, hidrofilii, apa din preparat trebuie mai întâi eliminată înaintea includerii și înlocuită cu un solvent lipofil. Acesta din urmă va fi înlocuit de parafină. Acești pași suplimentari sunt **deshidratarea** (se face cu alcool etilic în concentrații crescânde: 70%, 90%, 95%, 100%) și **clarificarea** (cu alcool aminic sau hidrocarburi benzenice: toluen, benzen, xilen).

4. Secționarea

Are ca obiectiv obținerea de secțiuni cât mai fine din probele provenite din pasul anterior. Se realizează cu ajutorul aparatelor dedicate, denumite microtomuri, ce permit obținerea unor secțiuni cu grosimi de ordinul zecilor de nanometri – zecilor de micrometri. O secțiune normal subțire poate avea între 3-10 μm . Cele mai mari de 10 μm se consideră a fi groase; atunci când grosimea lor este între 0,5-2 μm se denumesc secțiuni semi-subțiri; secțiunile ultra-subțiri au mult sub 500 nm grosime. Secțiunile realizate se dispun pe lame de microscop curate. Lipirea lor pe lamă se face cu diferite substanțe (albumină).

Secționarea preparatelor înghețate se poate realiza cu criomicrotomuri.

5. Colorarea

Are rolul de a pune în evidență structurile biologice dorite. Colorațiile pot fi simple (un singur colorant) sau multiple (mai mulți coloranți). Dacă secțiunile obținute sunt semi-subțiri, coloranții ar putea pătrunde în țesut fără înlăturarea parafinei (dependent de tipul de colorant). Dar în multe cazuri, secțiunea trebuie mai întâi să treacă prin **deparafinare** (hidrocarburi benzenice) și **rehidratare** (concentrații scăzând de alcool etilic, apoi apă), înainte de colorarea propriu-zisă. În cazul fixării preparatului prin înghețare, etapa de colorare poate avea loc direct după secționare.

6. Montarea

După colorare, preparatul va fi din nou deshidratat, introdus în hidrocarburi benzenice și apoi supus ultimei etape, denumită **montare**. Montarea conservă preparatul definitiv cu ajutorul substanțelor specifice, precum balsamul de Canada sau rășini sintetice (dispuse între lamă și lamelă). Montarea conservă colorația, asigură integritatea preparatului și conferă un mediu transparent pentru vizualizarea la microscopul optic. Lamele se etichetează.

Realizarea unui preparat histologic vegetal temporar

Vom utiliza un microtom manual pentru a realiza secțiuni prin diverse tulpini de plante, pe care le vom observa la microscop. Fixarea preparatului în microtomul manual se poate face cu ajutorul unor bucăți de plută, pentru a facilita tăierea precisă. Acestea se vor înlătura după realizarea secțiunilor.

Secțiunile obținute vor fi transferate cu ajutorul unui ac sau a unei pensete pe o lamă curată și uscată.

Colorația se va face folosind albastru de toluidină (TBO). Soluția de TBO se poate prepara extemporaneu. Cântărim 25 mg de pulbere TBO și preparăm 50 ml soluție tampon acid acetic – acetat de Na 0,1M (93.047 mg acetat de Na și 232.1 mg acid acetic). Ajustăm aciditatea până obținem pH=4. TBO se adaugă în soluția preparată și se agită cu ajutorul unui agitator magnetic.

Se aleg cele mai subțiri secțiuni pentru dispunere pe lamă și se acoperă cu o lamelă. Între lamă și lamelă se adaugă apă până la crearea unei pelicule complete. Colorantul se dispune la un capăt al lamelei (câteva picături) până când toate secțiunile vor fi imersate în colorant. Așteptăm două-trei minute, apoi îndepărtăm excesul de TBO de pe lamă cu ajutorul hârtiei de filtru la capătul opus al lamelei. Facilităm eliminarea colorantului în exces prin adăugarea câtorva picături de alcool etilic 15%, așteptăm câteva secunde, apoi extragem etanolul folosind hârtie de filtru. Rehidratăm cu apă și vizualizăm la microscop.

Referințe

AAT Bioquest Acetate Buffer Preparation <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/acetate-buffer-ph-3-6-to-5-6>

Universitat Vigo – Atlas of Plant and Animal Histology <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/6-tecnicas/1-introduccion.php>