
vol.
86/4

no.

Agosto
1994

Pathologica

ESTRATTO

PACINI EDITORE

Tecniche istologiche e istochimiche di seriatra e colorazione del sistema di conduzione e nervoso cardiaco

G. ALFONSI, M. CRIPPA

Istituto di Anatomia Patologica, Università di Milano

Sistema di conduzione cardiaco (SdC)

Per morte improvvisa si intende un evento del tutto inaspettato che coglie un soggetto in apparente stato di benessere, determinando la morte per cause naturali. Tuttavia esistono discordanze semantiche notevoli, per cui nel nostro Istituto si considerano anche casi deceduti improvvisamente entro 12 ore dall'esordio sintomatologico.

Questo rappresenta un importante problema con il quale l'anatomopatologo frequentemente, ed il medico legale quasi quotidianamente, si trovano a doversi confrontare nella necessità di riconoscere adeguatamente tutti gli aspetti anatomico-clinici di questa patologia ai fini di una diagnosi epicritica e/o medico forense corretta, documentata e, quindi ben attendibile.

Molti sono i fattori dei problemi fisiopatologici che intervengono nel determinismo della morte improvvisa: infatti se è ormai risaputo che la morte improvvisa di origine cardiaca, in soggetti in età matura ed anziana va ascritta, nella stragrande maggioranza dei casi, a patologia coronarica, è pur vero che la cosiddetta «sindrome della morte improvvisa del lattante» ed i numerosi casi di inaspettati, repentini decessi in età giovanile, specie in corso di pratica sportiva, rappresentano a tutt'oggi, dei significativi esempi di quadri morbosi i cui substrati anatomopatologici sono ancora da chiarire.

L'interesse che questa ricerca comporta è documentato dalla lunga serie di studi che, nel corso degli anni, in tutto il mondo, si sono fatti in merito alla problematica, studi volti ad identificare il substrato eziopatogenetico che sottende ad un così drammatico evento ricercandone i quadri morfologici più significativi.

È pertanto necessario, per il patologo chiamato ad esprimere un giudizio in merito alla causa di morte di un soggetto deceduto improvvisamente, conformarsi ai criteri più aggiornati

e dotarsi di strumenti e di metodologie nuovi; deve pertanto acquisire conoscenze approfondite, ponendosi in grado di cogliere, tutti quei segni che gli permettono di formulare una diagnosi il più possibile esauriente, anche se, purtroppo non sempre incontrovertibile. È a tal fine indispensabile ed inderogabile che il lavoro del patologo sia sempre supportato da un lavoro tecnico-istopatologico accurato e finalizzato atto a garantire un'ampia panoramica del materiale anatomico pervenuto all'esame.

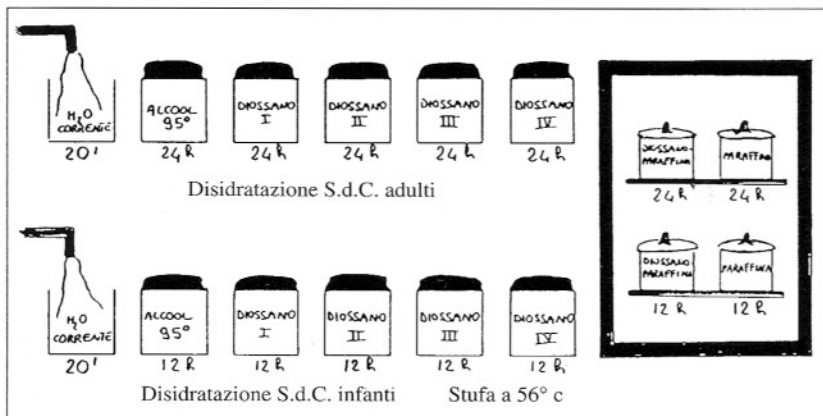
Per quanto concerne il campionamento vengono prelevati due blocchi piuttosto grossi di tessuto per permettere l'osservazione delle strutture anatomiche nella loro completezza: il primo contenente il nodo seno-atriale (NSA) e la cresta terminale con parte dei muscoli pettinati; il secondo contenente il sistema di conduzione atrio-ventricolare con il nodo atrio-ventricolare (NAV) e le sue connessioni atriali.

Tali pezzi vengono parzialmente ridotti e sfrondati delle loro parti inutili e successivamente fissati in formalina tamponata secondo Carson per vari giorni ed eventualmente sottoposti a processi di decalcificazione qualora la regione del trigono fibroso si presentasse calcifica.

Avvenuta la fissazione, si procede ad un breve lavaggio in acqua corrente per rimuovere la formalina e alla disidratazione del SdC che viene effettuata manualmente tramite un passaggio in etanolo 95 e quattro passaggi in diossano puro (dieteril-diossido), segue una parziale impregnazione in una soluzione composta per 1/3 da diossano e per 2/3 da paraffina (punto di fusione 56-58 C) ed infine una totale impregnazione di paraffina pura.

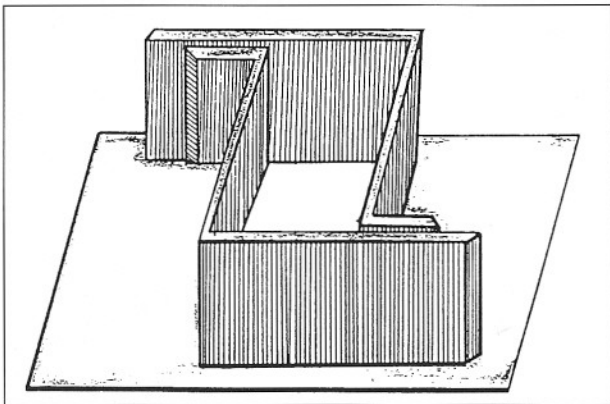
Si utilizza il diossano perché coarta ed indurisce meno dell'etanolo pur essendo più costoso.

Come vedete dallo schema i tempi di disidratazione ed impregnazione sono diversi a seconda che si tratti di adulti o di infanti.



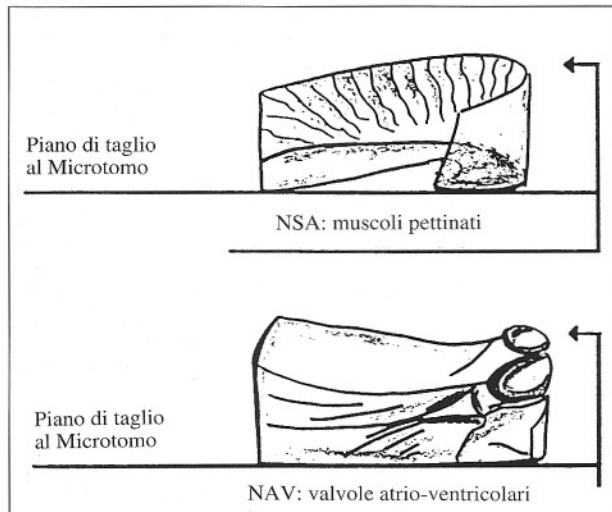
Tab. I.

Tab. II.
Forme metalliche per inclusioni in paraffina

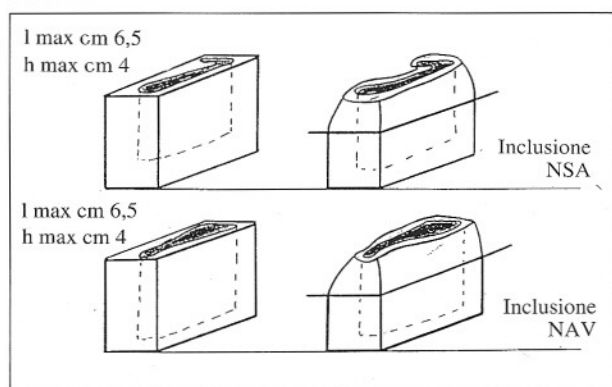


A questo punto si può procedere all'inclusione in paraffina con l'utilizzo di stampi metallici.

Tab. III.



Tab. IV.



Il NSA viene incluso con i muscoli pettinati all'opposto della sezione di taglio.

Il NAV viene incluso con le valvole semilunari aortiche all'opposto della sezione di taglio.

I blocchi così ottenuti vengono posti a raffreddare nel frigorifero.

Ogni inclusione viene previamente privata dallo strato superficiale della paraffina e modellata nella sua parte superiore in modo da limitare il più possibile la paraffina che circonda il pezzo per facilitare il taglio al microtomo e la distensione delle sezioni nel bagno stendifettine.

Per quanto concerne il taglio al microtomo dobbiamo adesso introdurre il concetto di taglio in serie che è peculiare dello studio del sistema di conduzione cardiaco e nervoso intrinseco ed estrinseco.

Questo tipo di taglio permette una «ricostruzione», nei limiti del possibile, coerente con le strutture che si vogliono studiare. Infatti, soltanto l'unione di un campionamento ampio e della seriatura sembrano consentire di superare l'inconveniente della grande variabilità individuale di tali strutture anatomiche.

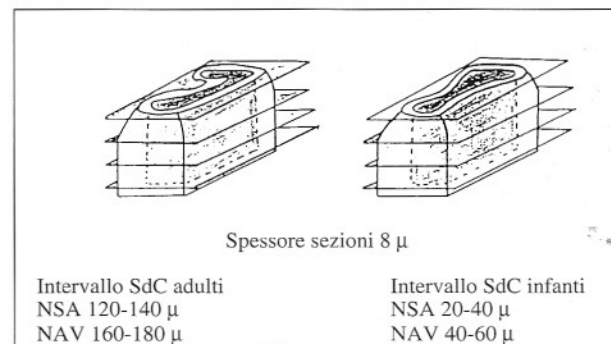
L'ideale sarebbe conservare ed esaminare tutte le sezioni della serie, ma un procedimento del genere comporterebbe difficoltà insormontabile di ordine pratico ed interpretativo, richiedendo l'impiego di vari operatori per periodi di tempo dell'ordine di mesi e la preparazione di un numero elevatissimo di sezioni dell'ordine di decine di migliaia.

È quindi del tutto logico ed opportuno ricorrere ad una riduzione dei tempi e dei modi di tale controllo istologico, riportando entro termini ragionevoli senza sacrificarne l'attendibilità.

Si utilizza quindi una seriatura ad intervalli raccogliendo due sezioni per ogni livello per uno spessore di 8 micron.

Tagliando i due blocchi nella loro totalità, è intuitivo che il materiale viene conservato come preparati istologici (colorati e bianchi) mentre l'inclusione è esaurita.

Tab. V.









Le sezioni così ottenute con il taglio al microtomo manuale (opportunamente modificato) vengono stese nel bagno stendifettine ad una temperatura di circa 40-50 C, raccolte su vetrini portaoggetti previamente contrassegnati dal numero del caso, del livello e della sequenza di sezione per livello, e posti ad asciugare in stufa a 37° C per tutta la notte.

A tutt'oggi non si conoscono colorazioni specifiche routinarie del SdC.

Esso appare riconoscibile soltanto in base alle sue caratteristiche cito-istologiche ed alla sua localizzazione topografica.

Volendo effettuare un primo screening del caso non è necessario colorare tutti i livelli ottenuti (mediamente il NSA 50-80, per il NAV 110-150 sia adulti che infanti) bensì si scelgono i vetrini ad intervalli di 5 livelli e le colorazioni impiegate sono ematossilina-eosina ed azan., usate alternativamente.

Tab. VI.

2 sezioni x ogni livello 1 sezione colorata colorazione a livelli alterni in		n° caso	
E.E.	AZAN	n° livello	n° sezione
1	3		
5	7		
10	12		
15	17		
20	22		
ecc.	ecc.		

La prima colorazione ematossilina-eosina è una colorazione istomorfologica globale che ci consente quindi di identificare tutte le strutture del tessuto ed in particolare il SdC.

È una colorazione nota per cui precisiamo solo che si impiega ematossilina di Mayer ed eosina in soluzione acquosa allo 0,5% (di nostra fattura).

La seconda azan (azocarminio-anilblau) sec. Heidenhein è un metodo di elezione per il tessuto connettivo, particolarmente indicato per le fibre muscolari.

Il metodo associa una colorazione citologica ottenuta tramite un colorante acido (azocarminio) ad una colorazione di contrasto effettuata con un altro colorante acido (blu di anilina) dopo mordenzatura con acido fosforotungstico. Per ottenere buoni risultati occorre sovracolorare un azocarminio quindi differenziare lentamente con alcool-anilina, al fine di evitare che il contrasto mascheri la colorazione del muscolo.

Nel caso dell'SdC differenzia bene il miocardio comune, che si colora con l'azocarminio di rosso intenso, dal miocardio specifico, che con lo stesso colorante appare più pallido per la minore presenza di fibre contrattili, mentre il connettivo da parte sua assume l'anilblau (miscela di blu di anilina e orange G) colorandosi in blu più o meno intenso (anche in questo caso i coloranti sono preparati in laboratorio).

Le sezioni in bianco vengono accuratamente archiviate per consentire, qualora il medico lo ritenga necessario, di essere a loro volta colorate a seconda del tipo di patologia riscontrata durante lo screening.

Diverse sono le colorazioni cosiddette «secondarie» utilizzate, in quanto sono in rapporto alle alterazioni riscontrate.

Occasionalmente vengono usate le seguenti colorazioni:

Metodo Weigert: specifico per le fibre elastiche che appaiono colorate in blu scuro, quasi nero sopra uno sfondo giallo dovuto all'impiego del Van Gieson, che mette in evidenza i fasci piuttosto grossolani del connettivo dagli altri tessuti.

Alcian blu e PAS: utilizzate per mettere in evidenza i mucopolisaccaridi acidi caratteristici del corpo fibroso del cuore dell'infante.

In particolare l'alcian mette in risalto la componente cartilaginea composta dagli acidi condroitinsolforici presenti nei centri tendinei dei lattanti (SIDS) con metaplasia cartilaginea responsabile di gravi aritmie.

PTAH: ottimo per le valutazioni morfometriche e per lo studio del sistema nervoso. Con questa colorazione infatti il muscolo striato, neuroglia, nuclei, eritrociti, fibre elastiche, fibrina cartilaginea appaiono blu intenso, mielina blu chiaro, citoplasm, fibre collagene elastiche e reticolari, membrane vasali, tessuto osteoide risultano rosso-arancio bruno pallido.

«Eosina-lenta»: considerata come variante alla colorazione di ematossilina-eosina nel caso di sospetta miocardite interstiziale. La definizione «lenta» sta ad indicare una lunga permanenza delle sezioni in eosina a bassa concentrazione (0,1%), circa 12 ore, per evidenziare chiaramente i granulociti eosinofili presenti nei processi infiammatori del tessuto miocardico.

Sistema Nervoso Cardiac Estrinseco

Abbiamo condotto studi specifici sul sistema nervoso cardiaco dato il sempre maggiore interesse che questo suscita in relazione, anche se il sistema nervoso svolge un'azione di modulazione dell'attività del muscolo cardiaco senza intervenire in quello che è il suo automatismo.

Infatti è possibile rilevare alterazioni alle strutture nervose cardiache intrinseche o estrinseche in casi di morti cardiache, documentate clinicamente laddove non si evidenzia nulla né a carico del miocardio comune e spesso nemmeno a carico di quello specifico.

Naturalmente è necessario utilizzare adeguate tecniche di prelievo e di esame istologico: a questo proposito si è già parlato del campionamento del sistema nervoso estrinseco cardiaco; introduciamo qui la tecnica istologica prendendo in esame i vari prelievi.

Plessi mediastinici

Il plesso coronarico ed il plesso intertruncale che sono conglobati da tessuto fibro-adiposo prelevato, il primo a livello dei rami coronarici principali, il secondo tra il cono aortico e polmonare. Passiamo poi ai gangli stellati: il sinistro, il più importante, è sicuramente la struttura anatomica meglio apprezzabile del plesso simpatico cardiaco, si presenta come un rigonfiamento allungato di cm. 2x0,5; il ganglio stella stellato destro è invece più piccolo. Accanto ai gangli stellati, altre strutture del plesso cervico-toracico sono state prese in esame nel nostro studio, ad esempio il glomo o paraganglio carotideo di destra e di sinistra: formazione ovoidale o fusiforme situata nell'angolo di biforcazione della carotide comune. Nel campionamento si utilizza il tratto di carotide posto poco prima l'inizio della biforcazione e 2 cm. sopra.

È necessario sottolineare che nel prelievo e nella sieratura del blocco intercarotideo, oltre il glomo si comprende il SENO CAROTIDEO, ovvero quella dilatazione della carotide interna iniziale dove hanno sede terminazioni nervose BAROMECCANORECETTORIALI importantissime; le relative colorazioni sono le stesse applicate al sistema nervoso.

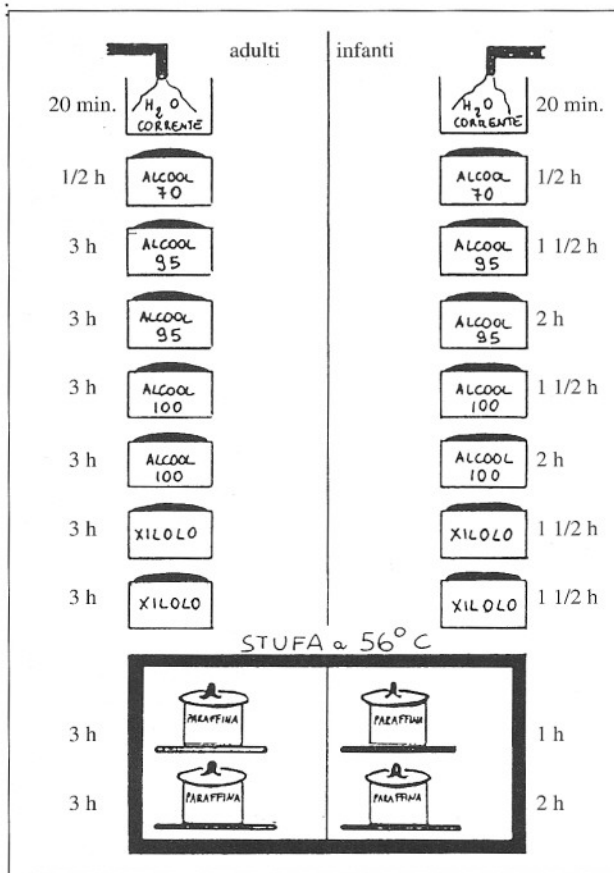
Per quanto riguarda il TRONCO CEREBRALE viene fatto un campionamento ampio che comprende l'intero IV ventricolo e i primi metameri cervicali; si ridurrà poi includendo un frammento con limite superiore a 8-10 mm sopra l'obex.

Tutti questi prelievi, opportunamente contrassegnati, vengono fissati correttamente in formalina tamponata secondo Car-

son: questa operazione è molto importante in quanto da essa dipende la buona riuscita dei successivi passaggi. Nel caso dei glomi carotidei con relativa carotide, è molto frequente trovare calcificazioni a livello della parete dell'arteria nell'adulto. Bisogna quindi decalcificare il pezzo impiegando una soluzione di EDTA (sale sodico dell'acido etilendiaminotetracetico) al 5,5% in tampone fosfato a pH 7,4. A fissazione, ed eventualmente decalcificazione avvenute si procede quindi ad un lavaggio in acqua corrente per togliere gli eventuali residui (fissativo e/o decalcificante). Per quanto concerne la disidratazione si impiega etanolo puro in quanto il diossano è l'ideale per campioni «duri» come il miocardio ma non si ottengono buoni risultati con questi tipi di prelievi costituiti da tessuto adiposo: l'etanolo ha un potere più indurente.

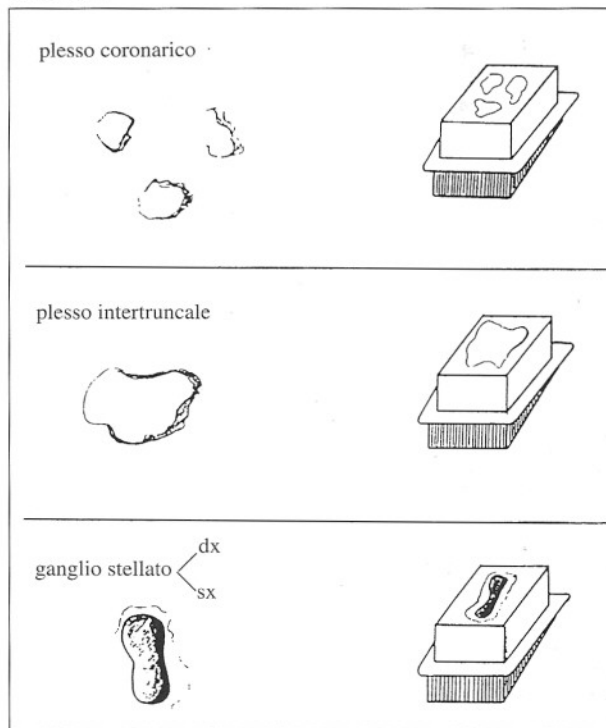
Si impiega alcool puro in concentrazioni crescenti fino all'assoluto. Segue la chiarificazione con 2 passaggi in: xilolo I cambio xilolo II cambio a 56° C in stufa. I tempi impiegati sono variabili: dipendono dalle dimensioni dei pezzi sia che si tratti di adulti o di infanti. Si effettua quindi l'inclusione che deve seguire un protocollo preciso.

Tab. VII.
Processazione dei prelievi del S.N. intrinseco ed estrinseco.



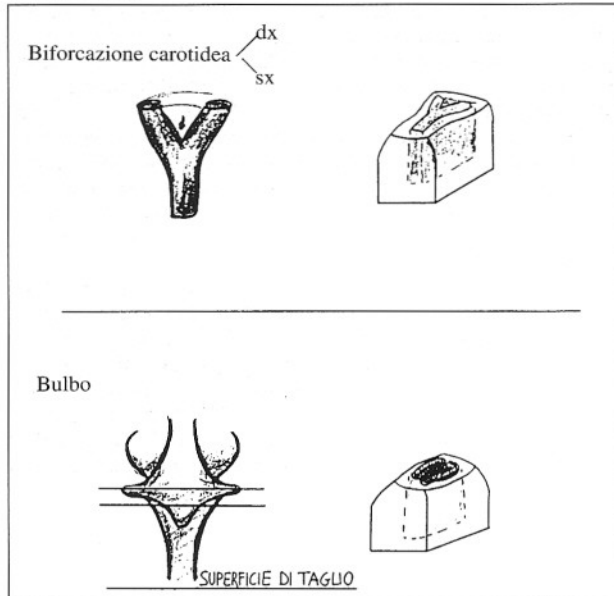
Come vediamo nella tabella VII si utilizza una scala di disidratazione con i seguenti passaggi che vengono effettuati a mano:
 alcool 70
 alcool 95 I cambio
 alcool 95 II cambio
 alcool 100 I cambio
 alcool 100 II cambio

Tab. VIII.



Consideriamo i vari prelievi: plesso coronarico, plesso intertruncale. Il materiale può essere in quantità variabile, in relazione all'età del soggetto o alla presenza o meno di obesità. Le strutture recettoriali non sono chiaramente visibili macroscopicamente e quindi si include schiacciando il più possibile il tessuto fibroadiposo alla superficie di taglio: in questo modo si hanno più probabilità di trovare neurorecettori con una seriazione moderata. Il ganglio stellato può essere incluso in toto oppure eventualmente diviso in due parti che però vengono incluse entrambe assieme: viene seriato per avere una visione più accurata in caso di alterazioni. La biforcazione carotide va inclusa di piatto perché il globo si trova tra i due bracci della carotide interna ed esterna poco sopra la biforcazione. Anch'esso non è visibile macroscopicamente. Se si volesse escludere dall'esame la parete della carotide ed in particolare il seno carotideo che è la parte che interessa, sarebbe possibile estrapolare il globo carotideo e il tessuto adiposo che lo circonda con l'aiuto dello stereo microscopio: in questo modo con un campionamento più mirato, si ottengono dei risultati

Tab. VIII bis.



superficiale della paraffina e, nel caso della carotide e del bulbo vengono eventualmente modellate per ridurre lo strato di paraffina che circonda il pezzo: questa operazione permette alle sezioni di stendersi meglio nel bagno stendifettine durante il taglio al microtomo.

Le inclusioni dell'oggetto vengono quindi tagliate in serie, come già discusso per il sistema di conduzione, il che consente al patologo di avere una visione tridimensionale del sistema nervoso cardiaco ma soprattutto di avere maggiori probabilità di reperire queste strutture neurorecettoriali che sono soggetti a notevoli variazioni individuali.

Vi sono però variazioni sia nel numero dei livelli che nelle sezioni per livello.

Esaminiamo i vari campioni nel dettaglio. Vedi Tabella IX. Plessi coronarici, plessi intertruncali: per convenzione si tagliano 6 livelli complessivi con 6 sezioni, dello spessore di 5 micron per livello: l'intervallo tra un livello e l'altro è di 20-40 micron.

Gangli stellati, biforcazione carotidea: il numero dei livelli è variabile, dipende dalle dimensioni del ganglio che viene di solito esaurito o da dove sono dislocati il glomo e il seno carotideo. Si fanno comunque 6 sezioni dello spessore di 5 micron per livello; intervallo tra i livelli 20-40 micron.

Il bulbo ha anch'esso un numero imprecisato di livelli (dipende oltre che dalle dimensioni del campione anche dal campio-

Tab. IX

Spessore sezioni 5 μ	
<p>Plessi coronarici e intertruncali</p> <p>6 sezioni per livello (2 EE + 4 bianchi)</p> <p>6 livelli</p> <p>Intervallo fra i livelli 20-40 μ</p>	
<p>Biforcazione carotidea</p> <p>6 sezioni per livello (2 EE + 4 bianchi)</p> <p>Livelli fino ad esaurimento del glomo</p> <p>Intervallo fra i livelli 20-40 μ</p>	
<p>Gangli stellati</p> <p>6 sezioni per livello (2 EE + 4 bianchi)</p> <p>Livelli fino ad esaurimento del ganglio</p> <p>Intervallo fra i livelli 20-40 μ</p>	
<p>Bulbo</p> <p>12 sezioni per livello (2 EE + 10 bianchi)</p> <p>Livelli fino ad esaurimento del bulbo</p> <p>Intervallo fra i livelli 20-40 μ</p>	

più veloci, riducendo il numero delle serie senza però avere una «visione panoramica».

Quanto al bulbo, esso viene incluso per convenzione, con la superficie del midollo allungato e viene seriato per vedere eventuali patologie.

Per l'inclusione dei plessi e dei gangli si utilizzano anelli di inclusione standard mentre per quella della biforcazione carotidea e del bulbo, che sono campioni fuori misura, si impiegano delle staffe come per il sistema di conduzione.

Le inclusioni ottenute, ormai fredde, vanno private dello strato

namento stesso: il bulbo va comunque esaurito); 12 sezioni dello spessore di 5 micron per livello intervallo 20-40 micron. Seguendo lo schema succitato le sezioni vengono raccolte su vetrini portaoggetti contrassegnati dal numero del caso, dal numero del prelievo, dal numero del livello e dal numero della sequenza per livello e poste in stufa a 37° C per una notte.

A questo punto viene effettuata una colorazione routinaria, ematossilina-eosina in ragione di 2 vetrini per livello per un primo screening dei campioni. Restano quindi dalle 4 alle 10 sezioni in bianco per livello che possono essere utilizzate per

colorazioni aggiuntive da effettuarsi in un secondo tempo, laddove si reperti una struttura neurorecettoriale ed altri eventuali fenomeni degenerativi.

La colorazione elettiva per i recettori dei plessi, dei glomi, gangli e/o nervi è il Grimelius per argentaffinità.

Il metodo classico di impregnazione argentea per argirofilia in due tempi è quello di Bielschowsky per gli assoni e i dendriti che si colorano in nero su uno sfondo violetto.

Per completare lo studio del cuore, oltre ai prelievi già citati in questa sede non dobbiamo dimenticare che ogni nostro caso viene corredato da una serie di prelievi diagnostici di routine. Brevemente questi comprendono:

Tab. X.
Campionamento standard del sistema di conduzione e nervoso cardiaco

1)	NSA
2)	NAV
3)	Plessi intertruncali
4)	Plessi coronarici
5)	Carotide destra: biforcazione
6)	Carotide sinistra: biforcazione
7)	Ganglio stellato destro
8)	Ganglio stellato sinistro
9)	Bulbo
Prelievi autopici cuore:	
10)	Ventricolo destro
11)	Ventricolo sinistro
12)	Atrio destro
13)	Atrio sinistro
14)	Coronaria sinistra, ramo discendente
15)	Coronaria sinistra, ramo circonflesso
16)	Coronaria destra

A seconda della patologia questi prelievi di base possono essere aumentati (ad esempio negli infarti miocardici acuti i prelievi delle coronarie sono multipli, oppure nelle SIDS di solito si fanno anche campioni di altri organi ad esempio il blocco laringe-trachea-polmone, i surreni, il timo, etc.

Questi prelievi vengono processati con le normali tecniche dell'istologia impiegando macchinari (processatori per tessuti, inclusori) e non vengono, naturalmente, tagliati in serie; ogni campione viene corredato dalle seguenti colorazioni di base ematossilina-eosina, azan e nelle coronarie alcian per l'evidenziazione dei mastociti dell'avventizia e ogni altra metodica a richiesta del patologo.

Per concludere si è visto che lo studio del sistema di conduzione e del sistema nervoso cardiaco è solo una modificazione delle comuni tecniche istologiche, per cui può venire praticata in un normale laboratorio di istopatologia: si tratta comunque di un lavoro abbastanza «indaginoso» in cui la mole dei vetrini tagliati, per ogni caso, è notevole (mediamente si preparano 2000 vetrini circa, di cui 580 colorati e 1420 bianchi), il che comporta un certo dispendio di tempo per l'allestimento di ogni cuore pervenuto.