

Metodi per l'analisi morfo-funzionale delle cellule – Prof. Marisa Levi

Parte I

Le dimensioni delle cellule, a parte alcuni casi particolari, sono minori rispetto alla capacità visiva dell'occhio umano, perciò per studiare le cellule bisogna utilizzare opportuni strumenti.

Inoltre le cellule in genere non sono isolate, ma riunite in tessuti ed organi, e quindi per poterle osservare può essere necessaria anche qualche manipolazione.

L'osservazione delle cellule si basa principalmente sull'uso di MICROSCOPI. Non bisogna però pensare che il microscopio ci faccia vedere la cellula come è in realtà, semplicemente ingrandita. Quello che vediamo è il risultato dell'interazione fra lo strumento e l'oggetto reale, che spesso ha anche subito qualche trattamento prima dell'osservazione. Bisogna quindi stare attenti a possibili ARTEFATTI, cioè a eventuali modificazioni strutturali o chimiche provocate dalla manipolazione del tessuto (ad esempio: contrazione o rigonfiamento delle cellule, estrazione di sostanze, modificazione di strutture subcellulari, formazione di precipitati ecc.), e quindi non presenti nella cellula viva.

La preparazione di un campione per il microscopio (ottico od elettronico) dipende da molti fattori, e non ci sono ricette valide per qualsiasi campione.

Lo spettro elettromagnetico è composto da numerosi tipi di radiazioni, che differiscono per la loro lunghezza d'onda. La luce visibile costituisce solo una piccola parte dello spettro elettromagnetico. Se consideriamo la natura ondulatoria della luce, parleremo di **lunghezza d'onda** (λ , distanza fra due creste), di **ampiezza** (a , distanza fra il massimo e il minimo dell'onda) e **frequenza** (ν , numero di oscillazioni al secondo). La frequenza è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda. Se consideriamo la luce come insieme di particelle (**fotoni**), l'energia di un fotone è proporzionale alla frequenza ($E=h\nu$).

Un aumento di ampiezza comporta un aumento di intensità luminosa, che corrisponde ad un aumento dei quanti emessi nell'unità di tempo.

Interferenza

Se due onde luminose sono in concordanza di fase (cioè hanno uguale frequenza ed oscillazioni concordi) le loro ampiezze si sommano e la risultante dà luce più intensa; se le onde sono fuori fase, la risultante darà un diverso livello di luminosità a seconda del grado di sovrapposizione.

Diffrazione

Una sorgente luminosa teoricamente puntiforme in realtà genera delle onde sferiche che aumentano la dimensione apparente, per cui due punti luminosi vicini possono non vedersi distinti.

Si definisce **limite di risoluzione** di un sistema ottico la distanza minima alla quale due punti si vedono come distinti. Il limite di risoluzione dell'occhio umano è di circa 0.2 mm.

Il limite di risoluzione è $= \frac{0.612 \times \lambda}{A.N.}$ in cui A.N. è l'**apertura numerica**, che dipende dall'indice di ri-

frazione (n) e dal semiangolo di apertura α (angolo tra l'asse ottico e il raggio più esterno colto dalla lente) $A.N. = n \sin \alpha$

Essendo il limite di risoluzione la distanza minima alla quale due punti si percepiscono come distinti, più piccolo è il limite di risoluzione maggiore è il potere di risoluzione, e quindi la qualità dello strumento. Forti ingrandimenti senza adeguata apertura numerica non danno una buona immagine.

Il limite di risoluzione diminuisce aumentando l'apertura numerica (quindi aumentando n e $\sin \alpha$, o diminuendo λ). L'indice di rifrazione può essere aumentato utilizzando obiettivi ad immersione in olio, con indice di rifrazione elevato.

Microscopio ottico

Schematicamente il microscopio ottico a trasmissione è costituito da un obiettivo che dà un'immagine capovolta ed ingrandita dell'oggetto e da un oculare che dà un'immagine virtuale dritta ed ingrandita dell'immagine intermedia fornita dall'obiettivo. L'ingrandimento totale fornito dal microscopio è dato dal prodotto dell'ingrandimento fornito dall'obiettivo per quello fornito dall'oculare (e per altri eventuali ingrandimenti forniti da possibili lenti interposte).

Quando l'immagine viene fotografata o ripresa con una telecamera e stampata, intervengono altri fattori di ingrandimento o riduzione, che devono essere calcolati. Per dare un'idea dell'effettiva dimensione dell'oggetto, nelle foto è opportuno mettere una barra di riferimento che corrisponde a una certa lunghezza effettiva (es.: se l'ingrandimento finale è 100x, 10 mm corrispondono a 100 μ m). Questo permette di ingrandire o ridurre ulteriormente la foto senza perdere il riferimento del numero di ingrandimenti, perchè anche la barra viene automaticamente ingrandita o ridotta proporzionalmente.

Ogni lente dà delle aberrazioni, e gli obiettivi possono essere più o meno corretti per queste aberrazioni (e quindi di diversa qualità e costo).

Gli obiettivi ACROMATICI sono corretti per aberrazioni cromatiche verdi e gialle.

Gli obiettivi APOCROMATICI sono corretti per tutte le aberrazioni cromatiche.

Gli obiettivi PLANATICI sono corretti per le aberrazioni sferiche.

Gli obiettivi PLANAPOCROMATICI sono quelli che hanno la massima correzione per le aberrazioni cromatiche e sferiche.

Su ciascun obiettivo sono riportati: l'ingrandimento; l'apertura numerica, la possibilità di usarlo per contrasto di fase (vedi sotto), l'uso o meno di olio per immersione, la lunghezza del tubo ottico per cui sono adatti, lo spessore massimo del coprioggetto (per gli obiettivi a più alto ingrandimento).

Gli obiettivi possono avere distanza focale (cioè la distanza fra la lente e il fuoco del preparato) diversa. Tuttavia il revolver portaobiettivi è costruito in modo che, quando il preparato è a fuoco con l'obiettivo a minor ingrandimento, resta a fuoco con ingrandimenti superiori. Gli obiettivi a maggior ingrandimento hanno distanza focale piccola, molto vicina al coprioggetto. **Perciò la messa a fuoco va fatta sempre con l'ingrandimento più piccolo, e non bisogna abbassare il tavolino portaoggetti passando all'ingrandimento superiore**, altrimenti si perde il fuoco, e si rischia, cercando di rimettere a fuoco, di toccare il vetrino con l'obiettivo, danneggiando entrambi.

Gli obiettivi inoltre hanno una diversa profondità di fuoco, che è inversamente proporzionale all'apertura numerica e all'ingrandimento: con i piccoli ingrandimenti resta a fuoco uno spessore più ampio del preparato, mentre con il 100x resta a fuoco solo uno strato molto sottile.

Nel microscopio ottico a trasmissione la luce deve attraversare almeno in parte il preparato (altrimenti l'immagine sarebbe completamente nera), perciò il preparato viene posto su un vetrino trasparente (vetrino portaoggetto), coperto con un liquido (acqua o altro) e con un vetrino coprioggetto, e deve essere sufficientemente sottile.

Si pongono quindi alcuni problemi:

1. come si può fare un preparato sufficientemente sottile da un tessuto o organo spesso, e di solito anche molle?

Per questo sono state sviluppate tecniche di INCLUSIONE in materiali duri e strumenti specifici per il taglio delle sezioni (MICROTOMI).

2. come si fa a evitare che il materiale si modifichi o si degradi?

Per questo si sono sviluppate tecniche di FISSAZIONE dei campioni e di MONTAGGIO PERMANENTE dei vetrini.

3. se il preparato è troppo trasparente (troppo sottile o non colorato), e quindi lascia passare troppa luce, come si fa a distinguere l'immagine rispetto al fondo?

Sono stati ideati microscopi con ottiche speciali per aumentare il contrasto senza ulteriori trattamenti per il campione, e tecniche di colorazione che permettono di rendere visibile il preparato.

Fissazione

Un preparato (soprattutto se vegetale) può essere osservato “a fresco”, montato semplicemente in acqua o in una opportuna soluzione, ma in questo caso non può essere conservato.

Per fare dei preparati permanenti bisogna prima “fissare” il preparato. La **fissazione** ha lo scopo di bloccare il campione in un momento preciso, conservarlo nel tempo e permeabilizzarlo (facilitare cioè il passaggio all'interno del campione di coloranti ecc.).

I metodi di fissazione possono essere CHIMICI o FISICI. La scelta del modo di fissazione dipende dal materiale e dal tipo di studi che si intende fare.

Esistono diversi tipi di fissativi chimici, che possono essere divisi in due categorie:

FISSATIVI PRECIPITANTI etanolo, metanolo, acido acetico, acetone (questi sono anche dei solventi dei lipidi e quindi possono estrarli dal campione)

FISSATIVI CROSS-LINKING glutaraldeide, formaldeide (generano legami covalenti fra le molecole e le immobilizzano, preservano anche i lipidi).

In genere i fissativi chimici denaturano o fanno precipitare le proteine, e quindi bloccano i processi metabolici del tessuto.

Il tessuto viene tagliato in pezzetti e posto in un liquido di fissazione per un certo tempo, poi viene lavato, asportando il fissativo e sostituendolo più volte con un opportuno tampone.

I fissativi chimici richiedono un certo tempo per penetrare nel tessuto e bloccare completamente la cellula, e possono provocare delle alterazioni nello stato del tessuto. Per esempio, certi fissativi chimici vengono spesso usati a concentrazione ipertonica, che provoca una contrazione della cellula.

I metodi fisici includono il calore (per esempio fissazione alla fiamma di uno striscio batterico), l'essiccamento, e il congelamento rapido (**CRIOFISSAZIONE**). La crio-fissazione, per mezzo della quale le cellule vengono congelate in pochi millisecondi, evita le possibili alterazioni del tessuto che si possono manifestare durante il processo di fissazione chimica. Inoltre il tessuto congelato è sufficientemente duro per essere tagliato senza bisogno di inclusione. Perciò la crio-fissazione preserva le strutture molecolari che potrebbero degradarsi durante il trattamento con fissativi per tempi lunghi e durante la procedura di inclusione.

Inclusione

Per poter essere osservato al microscopio a trasmissione, il preparato deve essere sufficientemente sottile. E' spesso necessario fare delle sezioni. Se il materiale è sufficientemente resistente (come spesso è il materiale vegetale) si possono fare delle sezioni a mano con una lametta. Spesso però è necessario includere il materiale in una matrice dura, che faciliti il taglio di sezioni. L'**inclusione** consiste nel fare penetrare all'interno del tessuto una sostanza allo stato liquido, che una volta penetrata può essere fatta indurire variando la temperatura o utilizzando delle radiazioni. Mezzi di inclusione sono per esempio la paraffina, che si scioglie al di sopra di una certa temperatura e solidifica a temperatura ambiente, o vari tipi di resine, liquide a temperatura ambiente e che polimerizzano al calore o sotto raggi UV.

La procedura di inclusione è piuttosto laboriosa. Poiché la paraffina non è miscibile con l'acqua, il materiale fissato deve essere disidratato progressivamente passandolo in alcol a concentrazione sempre maggiore (scala ascendente di alcoli), poi deve essere preparato all'infiltrazione con dei solventi della paraffina e man mano con concentrazioni crescenti di paraffina a caldo, infine in paraffina pura fusa. La paraffina fusa con dentro i pezzetti di tessuto viene quindi versata in stampi, e viene fatta solidificare a temperatura ambiente.

Per quanto riguarda le resine, il procedimento di infiltrazione è analogo (pretrattamento con solvente della resina e concentrazioni crescenti di resina), anche se per certi tipi di resine non è necessaria la disidratazione. L'infiltrazione viene fatta però a temperatura ambiente, in quanto le resine utilizzate sono costituite da monomeri solubili, che solo a caldo o sotto luce UV polimerizzano indurendosi.

Le sezioni possono essere fatte con strumenti specifici detti **MICROTOMI**, dotati di una lama fissa e di un braccio che porta il pezzo da tagliare: il braccio si abbassa sulla lama, che fa la sezione, poi si rialza, avanza verso la lama di un tratto corrispondente allo spessore prefissato e poi si riabbassa sulla lama e così via: in questo modo vengono fatte sezioni seriali dello spessore voluto.

Colorazione

Quando la luce interagisce con il preparato si hanno fenomeni di assorbimento, riflessione, sfasamento della luce. Se la luce che arriva sul vetrino non viene sensibilmente trattenuta o modificata dal preparato prima di arrivare all'oculare, l'occhio non riesce a distinguere l'immagine del preparato dallo sfondo. Sezioni sottili di materiale biologico non colorato in genere provocano solo una piccola variazione di fase della luce, non percepibile dall'occhio umano. Per migliorare l'immagine è possibile ricorrere a sistemi ottici particolari che aumentano il contrasto (vedi sotto, microscopio a contrasto di fase) o alla COLORAZIONE del preparato. Per colorazione si intende il trattamento con una sostanza colorata capace di legarsi stabilmente al preparato, o con una sostanza che, reagendo con il preparato, dà origine ad un prodotto colorato.

Una sostanza risulta colorata quando assorbe selettivamente luce a specifiche lunghezze d'onda, sottraendole dallo spettro della luce incidente. Per esempio, una sostanza ci appare verde se assorbe preferenzialmente luce rossa e blu, e trasmette e riflette il verde.

Esistono cellule che sono colorate in natura (ad esempio cellule con pigmenti), oppure si può colorare il preparato per contrastarlo ed osservarlo meglio.

Si possono usare dei coloranti abbastanza generici (che si legano a tutta la struttura dando solo un contrasto rispetto al fondo), oppure coloranti più specifici, che hanno affinità prevalentemente per certe strutture. Alcune colorazioni sono molto selettive e permettono di riconoscere la presenza di specifiche sostanze (per esempio il Liquido di Lugol per l'amido o il Sudan per i grassi). Altri coloranti permettono di capire se la cellula è vitale o no (coloranti che penetrano solo nelle cellule morte, o che restano confinati solo nelle cellule vive).

Montaggio dei vetrini

Il preparato va montato fra un vetrino portaoggetto ed un vetrino coprioggetto in un liquido (MONTANTE) dello stesso indice di rifrazione del vetro. Per un'osservazione rapida si può usare una semplice goccia d'acqua; per preparati permanenti si possono usare glicerolo, gelatina, o resine che solidificano.

Microscopio a contrasto di fase

Questo microscopio permette di osservare cellule non colorate, ed è quindi particolarmente adatto all'osservazione di cellule vive. Esso sfrutta lo sfasamento della luce indotto dall'interazione dei raggi luminosi con il preparato. Questa variazione di fase, che non è sufficiente per causare una variazione d'intensità luminosa percepibile dall'occhio umano, viene ampliata in modo da essere percepibile come diversi livelli di grigio.

Il microscopio a contrasto di fase ha un condensatore che fa passare la luce attraverso un anello. In corrispondenza nell'obiettivo c'è un anello di fase, che sfasa ulteriormente le onde dirette (che non hanno attraversato il campione) rispetto a quelle diffratte dal preparato, in modo da rendere la differenza apprezzabile dall'occhio.

DIC (contrasto differenziale interferenziale) o Nomarski

Utilizza due raggi polarizzati su piani perpendicolari. Ciascuno dei due raggi entra nell'obiettivo portando un'immagine dell'oggetto; un prisma riunisce i due raggi che oscillano su un piano comune e interferiscono: ne risulta un'immagine con aspetto tridimensionale.

Microscopio rovesciato

Normalmente i microscopi ottici a trasmissione hanno la sorgente luminosa al di sotto del tavolino porta oggetti, e resta poco spazio fra il piano di lavoro e gli obiettivi. Possono perciò essere osservati solo preparati adagiati su un vetrino portaoggetti piuttosto sottile.

Per certe applicazioni è utile poter osservare le cellule all'interno di contenitori (per esempio piastre o bottiglie con cellule in coltura) o avere dello spazio di lavoro per manipolare il preparato. Per consentire questo esistono **microscopi rovesciati**, nei quali la sorgente luminosa è in alto e gli obiettivi sono al di sotto del preparato.