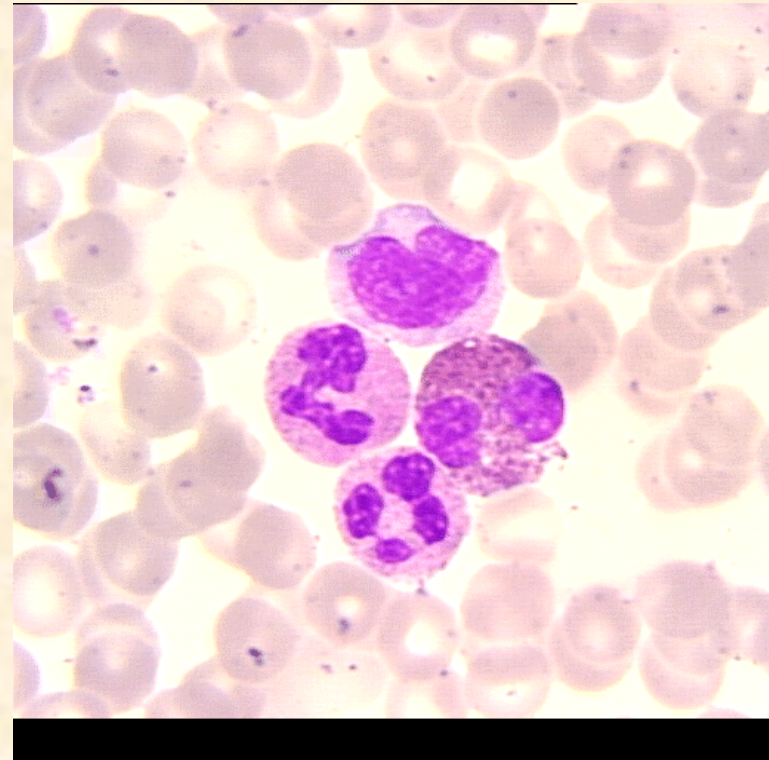


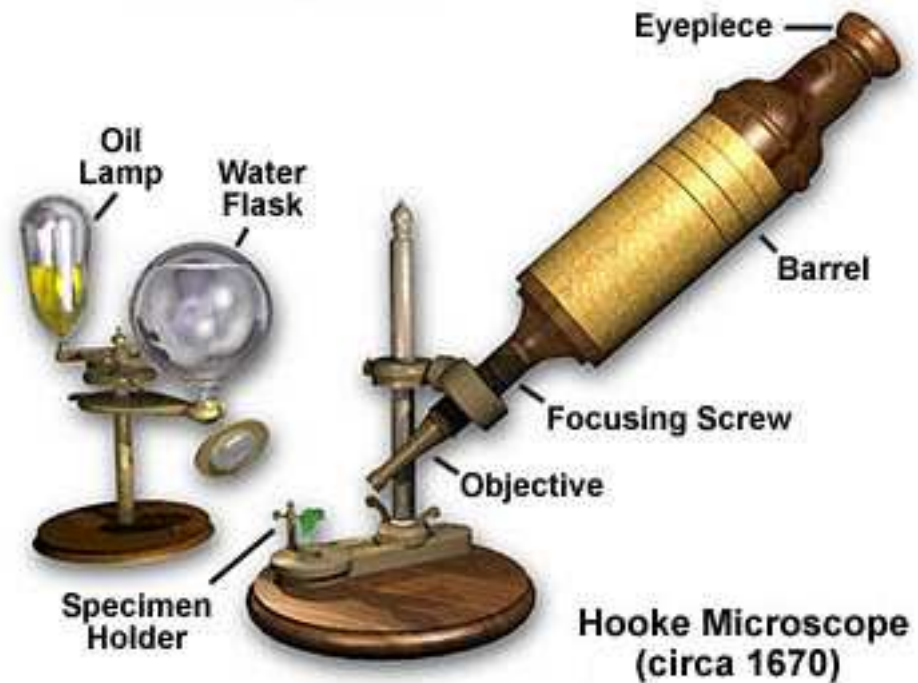
IL MICROSCOPIO



Lo studio delle cellule iniziò con l'invenzione del microscopio composto (formato da più lenti) per mezzo del quale si poterono osservare strutture molto più piccole di quelle visibili ad occhio nudo.

Le prime lenti furono costruite tra il 1100 e il 1200.

Leonardo da Vinci fu il primo, nel 1508, a proporre l'uso di lenti a contatto per correggere i difetti della vista





Nel 1590 i fratelli JANSSEN mettendo insieme due lenti all'interno di un tubo, costruirono un rudimentale microscopio composto. All'inizio del XVII secolo, anche GALILEO GALILEI costruì un microscopio inserendo due lenti in un cilindro e con questo strumento riuscì ad osservare prima e descrivere poi la struttura geometrica degli occhi delle mosche

Nel 1674 ANTON VAN LEEUWEHOEK , commerciante olandese, molto abile nella costruzione di lenti, fabbricò un microscopio formato da una lente oculare e da una lente obiettivo



English Tripod Microscope
made and sold by
John Yarwell in the 1680s.
The microscope is constructed of lignum vitae,
pasteboard, and gold-tooled leather.



**Galileo
Microscope**
(circa late 1600s)

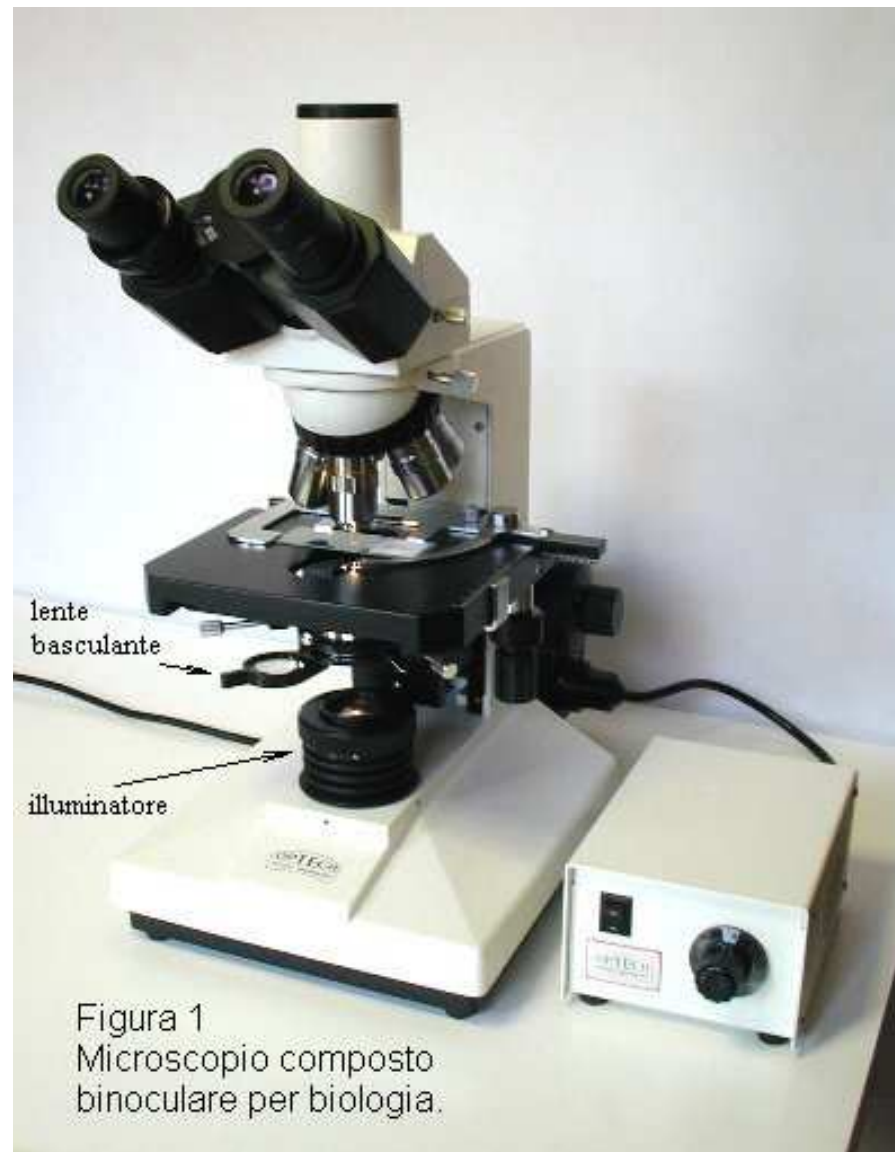
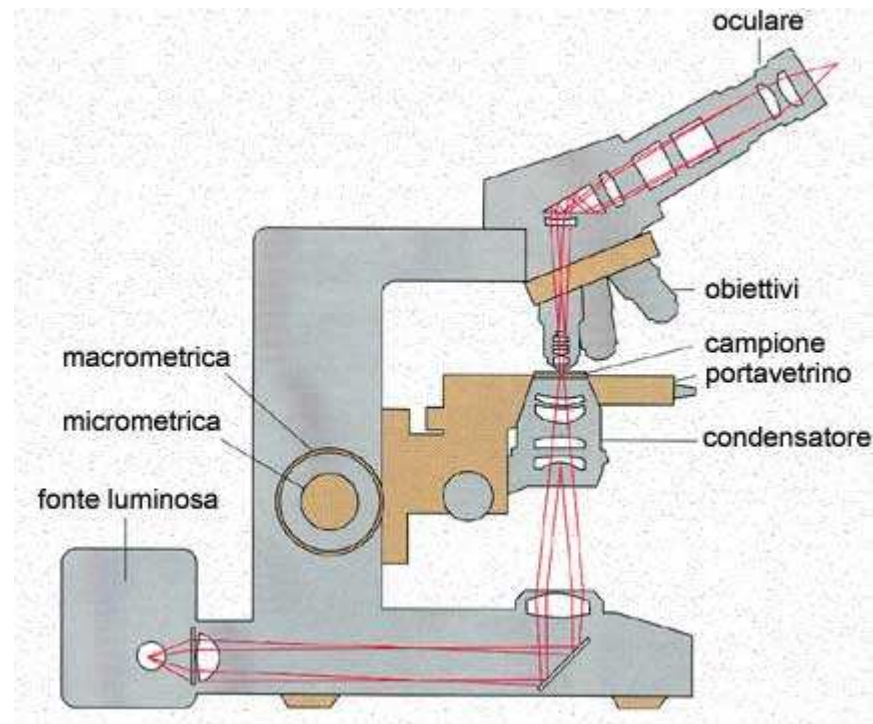
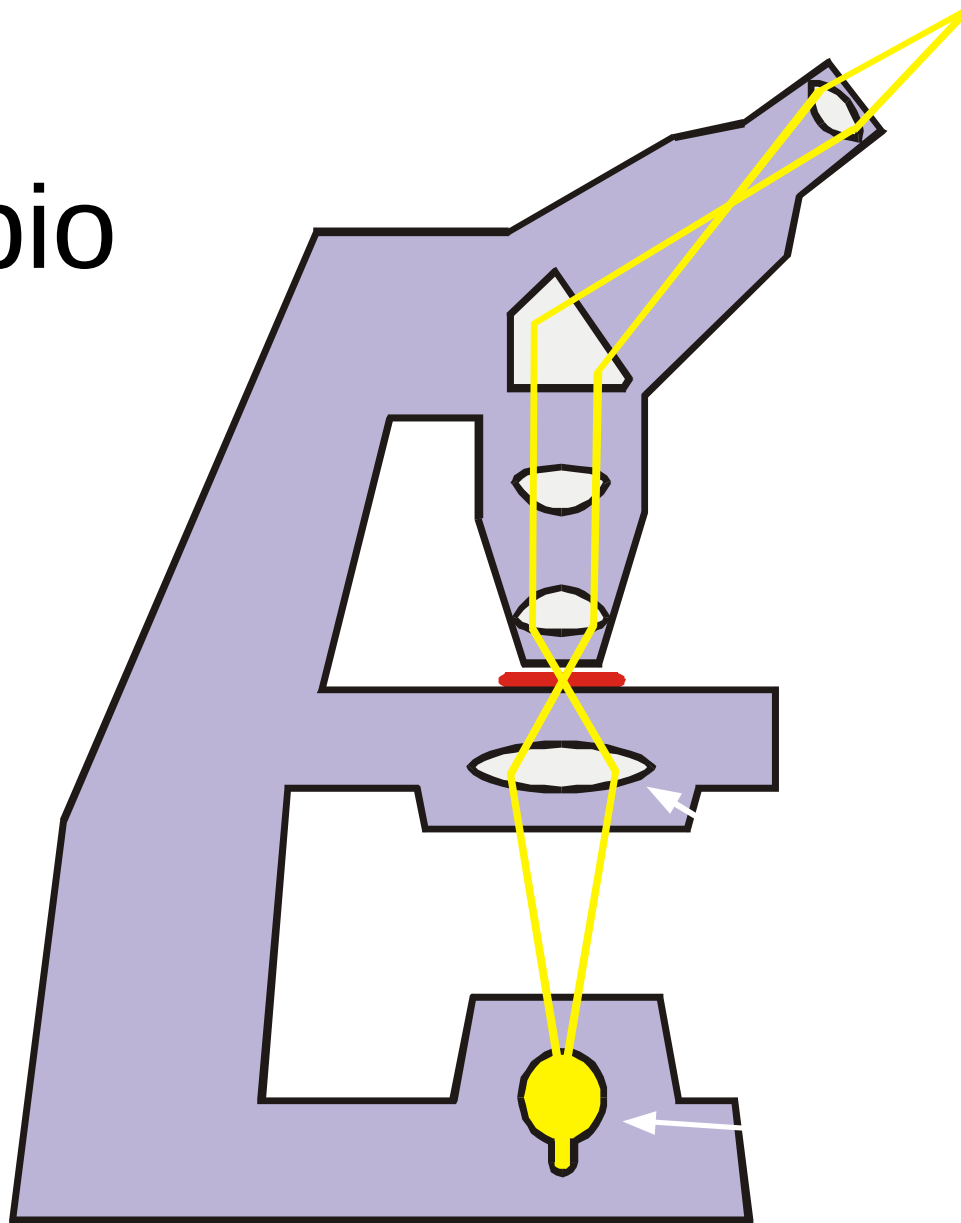


Figura 1
Microscopio composto
binoculare per biologia.

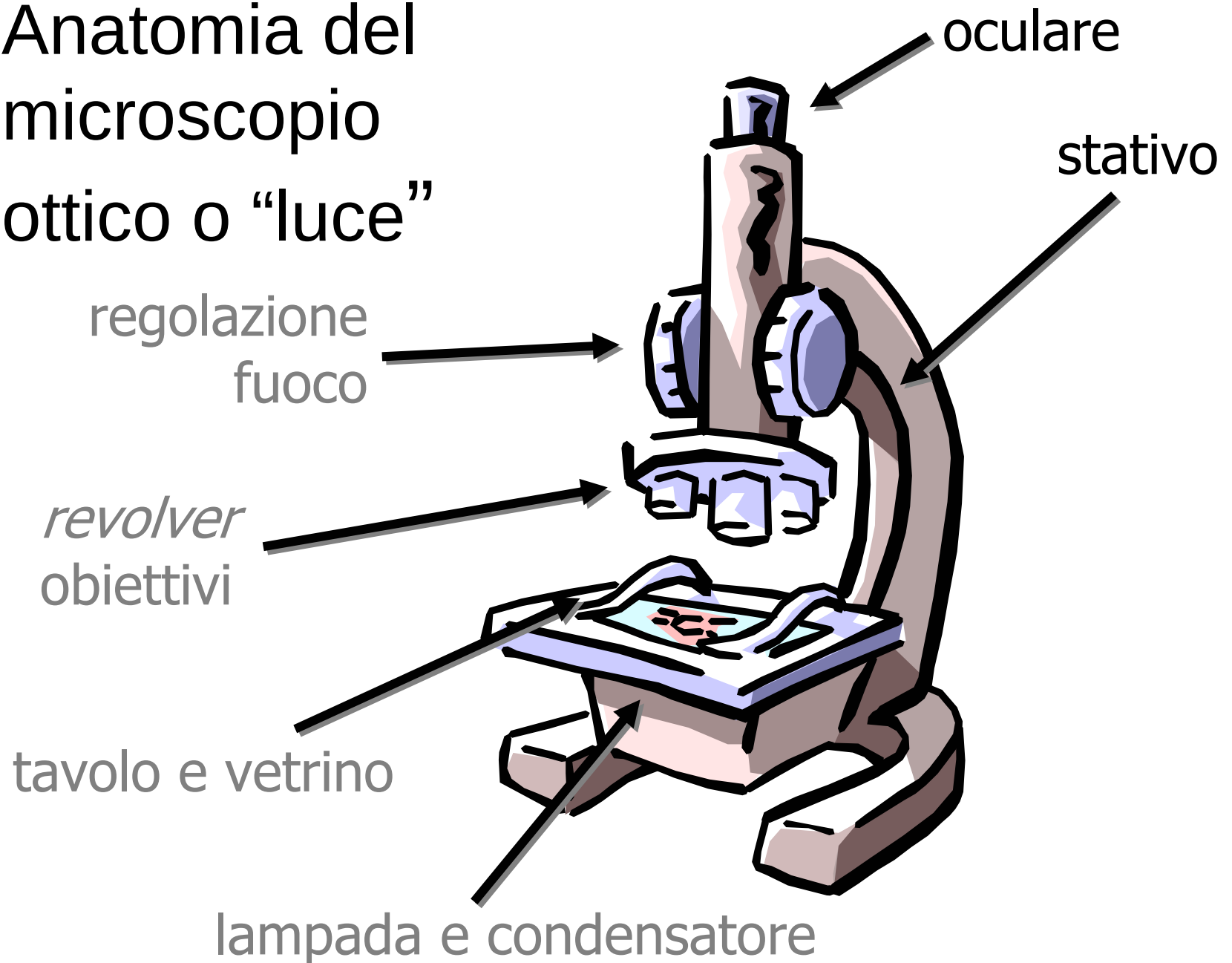
Il microscopio ottico



“Istologia” del microscopio ottico o “luce”



Anatomia del microscopio ottico o “luce”



Parti componenti

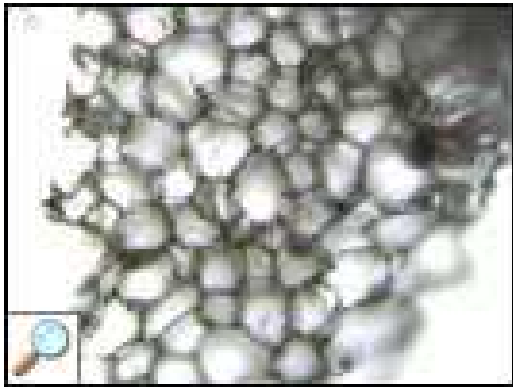
- **Sistema di illuminazione** = costituito da una lampada al disopra della quale si trova un condensatore che serve per concentrare il fascio luminoso sul preparato. Spesso è presente anche un diaframma a iride che può allargare o restringere il fascio emesso dalla lampada
- **Sistema di sostegno** = costituito dalla stativo e dal tavolino portaoggetti
- **Sistema di osservazione** = costituito dal tamburo che porta superiormente l'oculare e inferiormente una serie di obiettivi montati su supporto girevole a revolver che ruotando consente di cambiarli

Messa a fuoco

- Un oggetto può essere osservato chiaramente solo quando si trova a una certa distanza dall'obiettivo.
- Tale distanza non è costante ma decresce all'aumentare dell'ingrandimento
- La sua regolazione è detta messa a fuoco e si effettua per mezzo di due viti situate ai lati dello stativo: la vite macrometrica e la vite micrometrica
- Quest'ultima si usa spesso durante l'osservazione perché con piccoli spostamenti consente di mettere a fuoco i vari livelli del preparato (fochettatura)

IMMAGINI AL MICROSCOPIO OTTICO





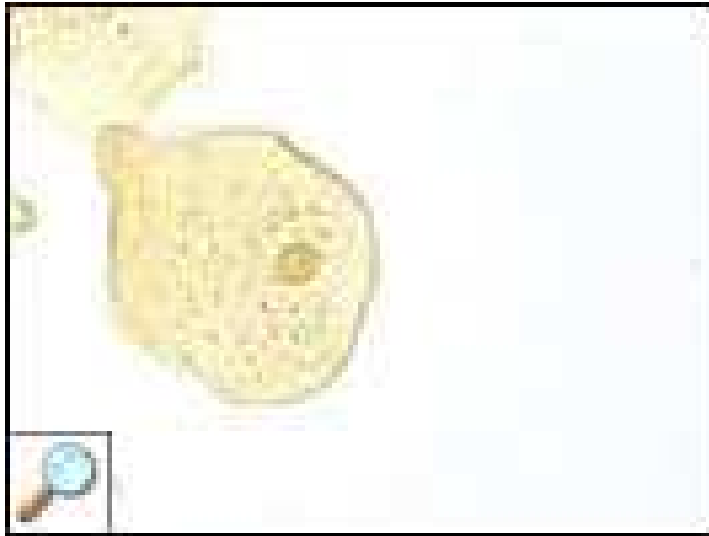
Sughero 200x



Sughero 200x



Sambuco 200x



Mucosa 400x

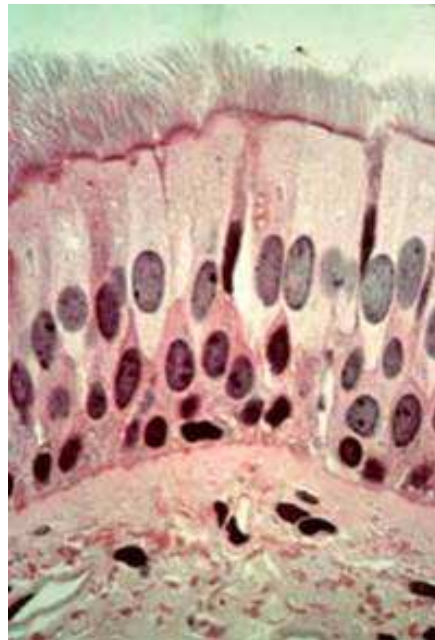
Cipolla 100x



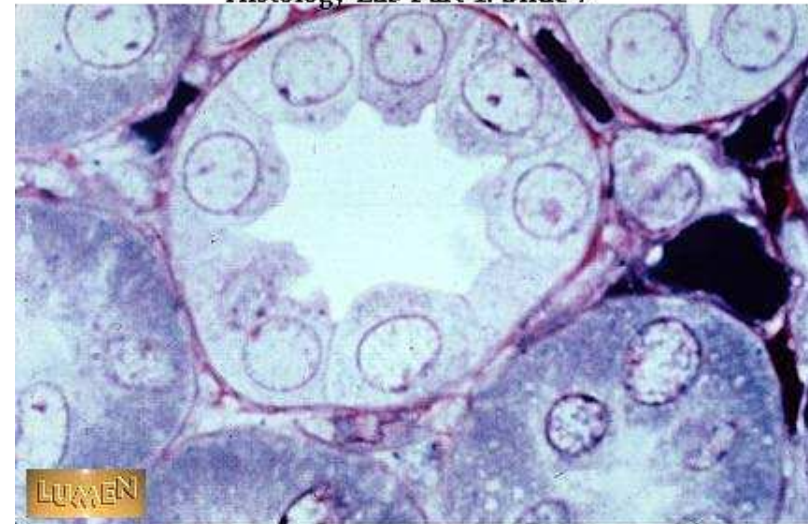
Histology Lab Part 3: Slide 9

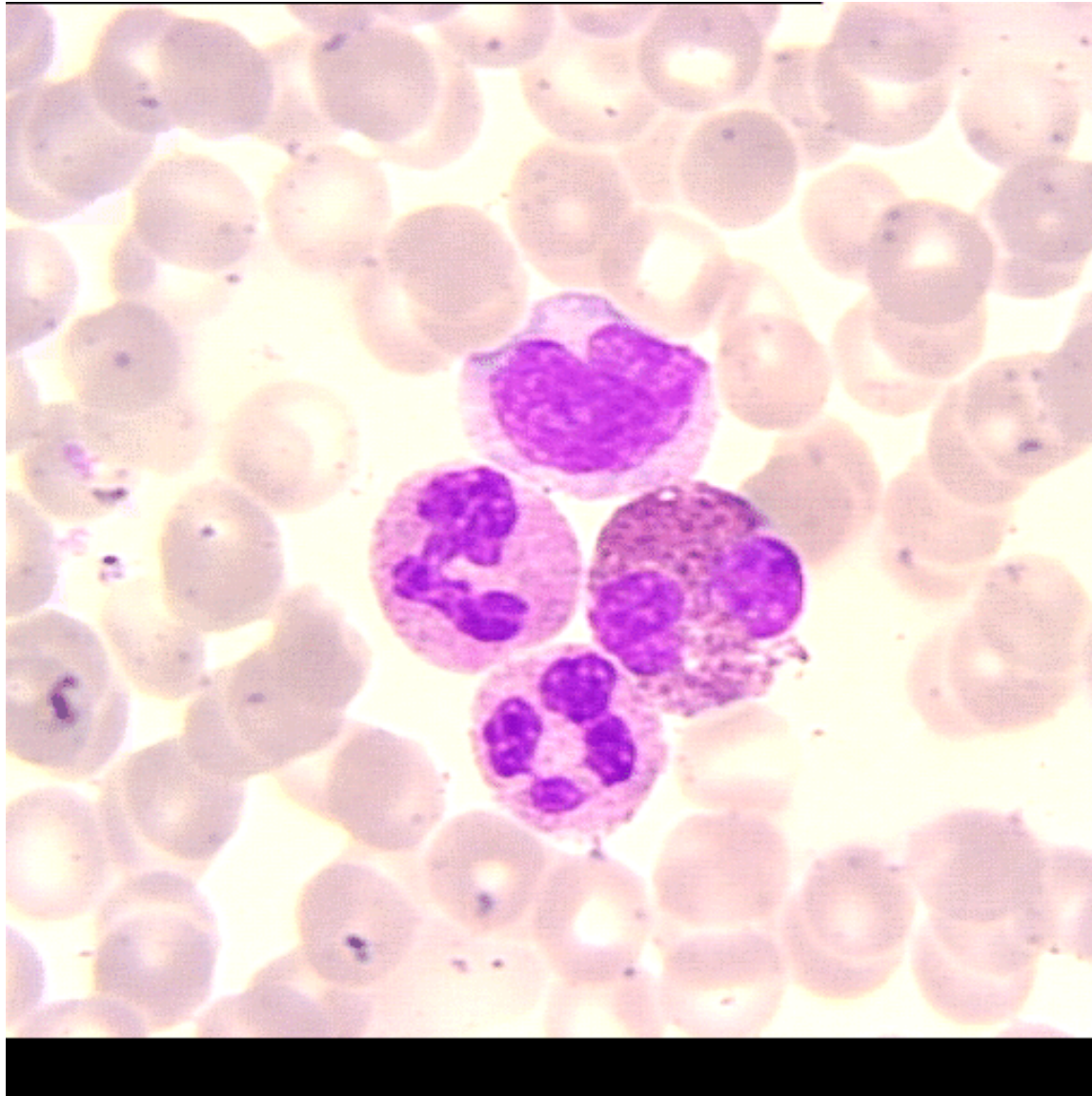


Histology Lab Part 1: Slide 8

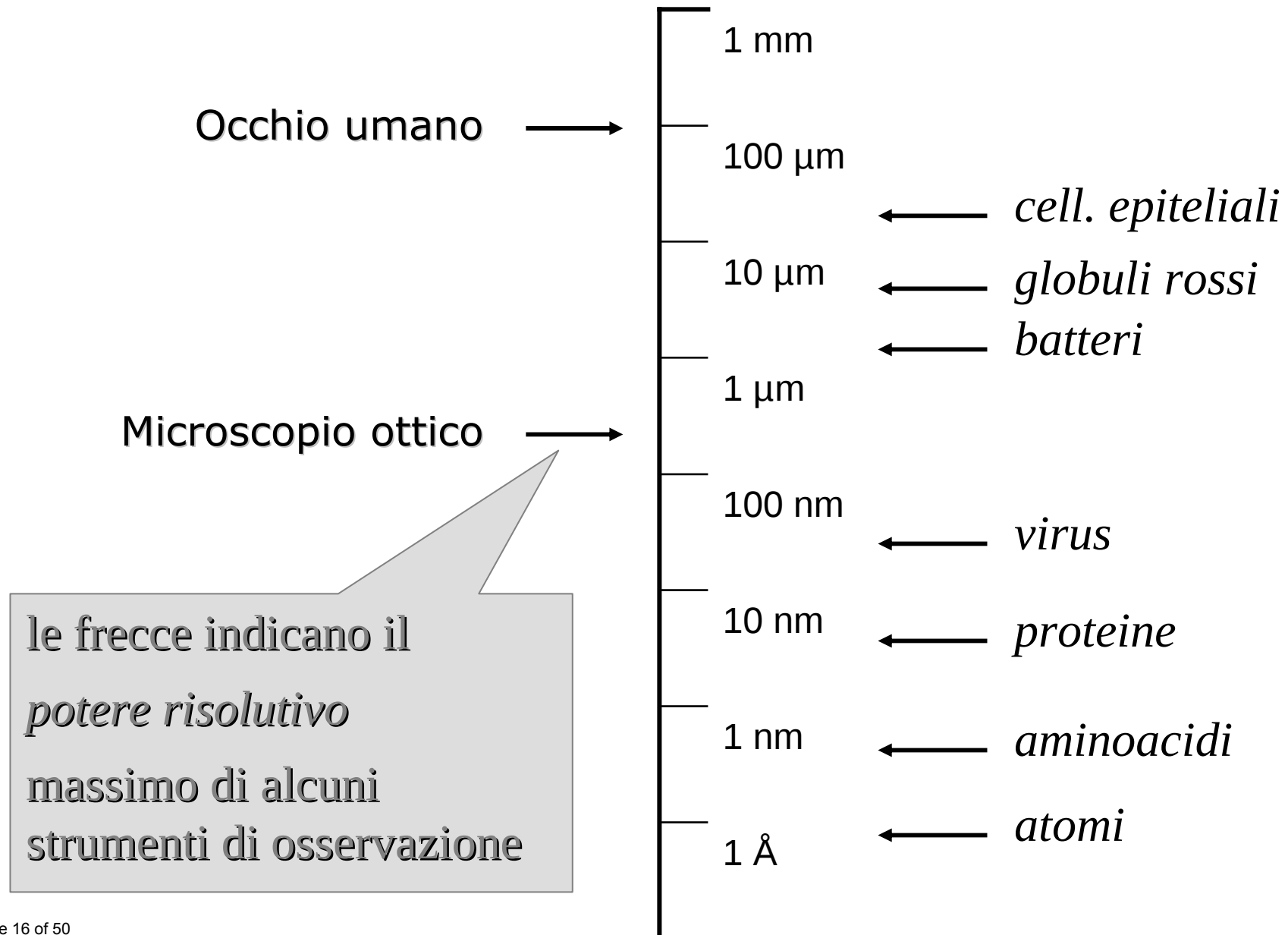


Histology Lab Part 1: Slide 7





Questione di dimensioni...



il potere risolutivo

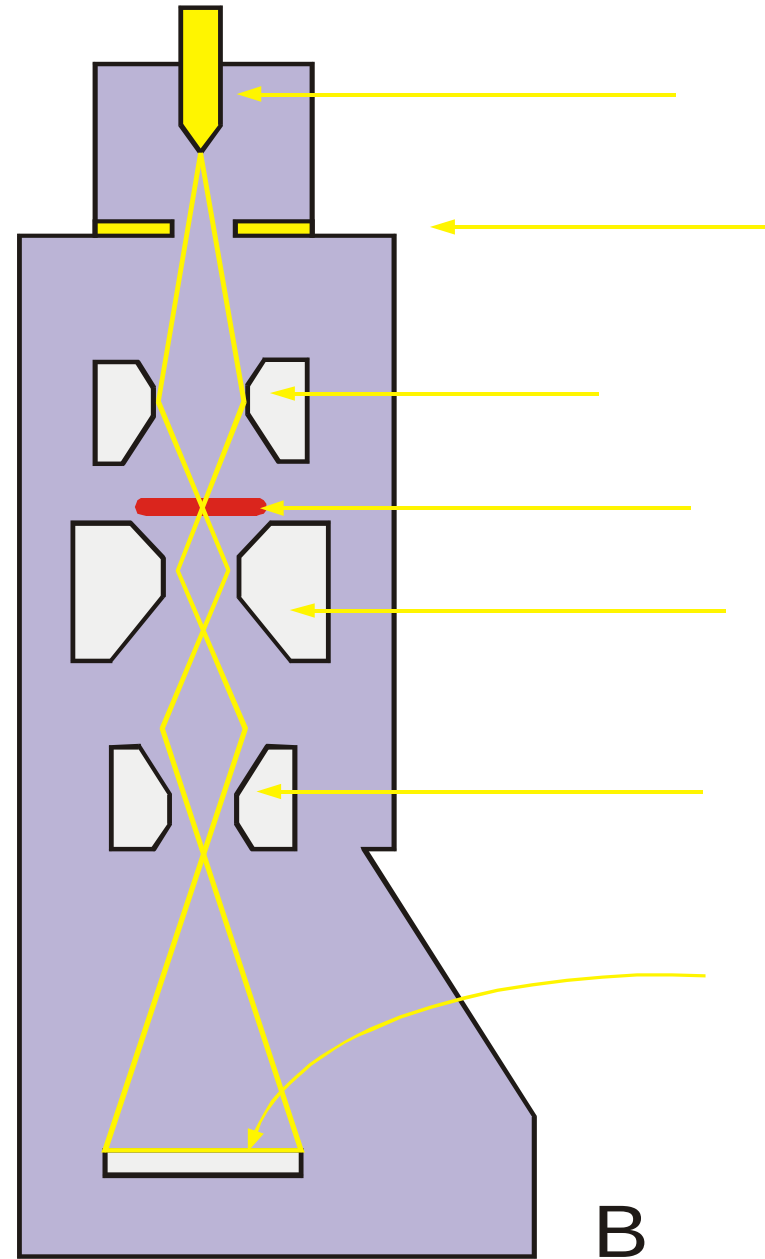
di uno strumento

(e non l'ingrandimento)

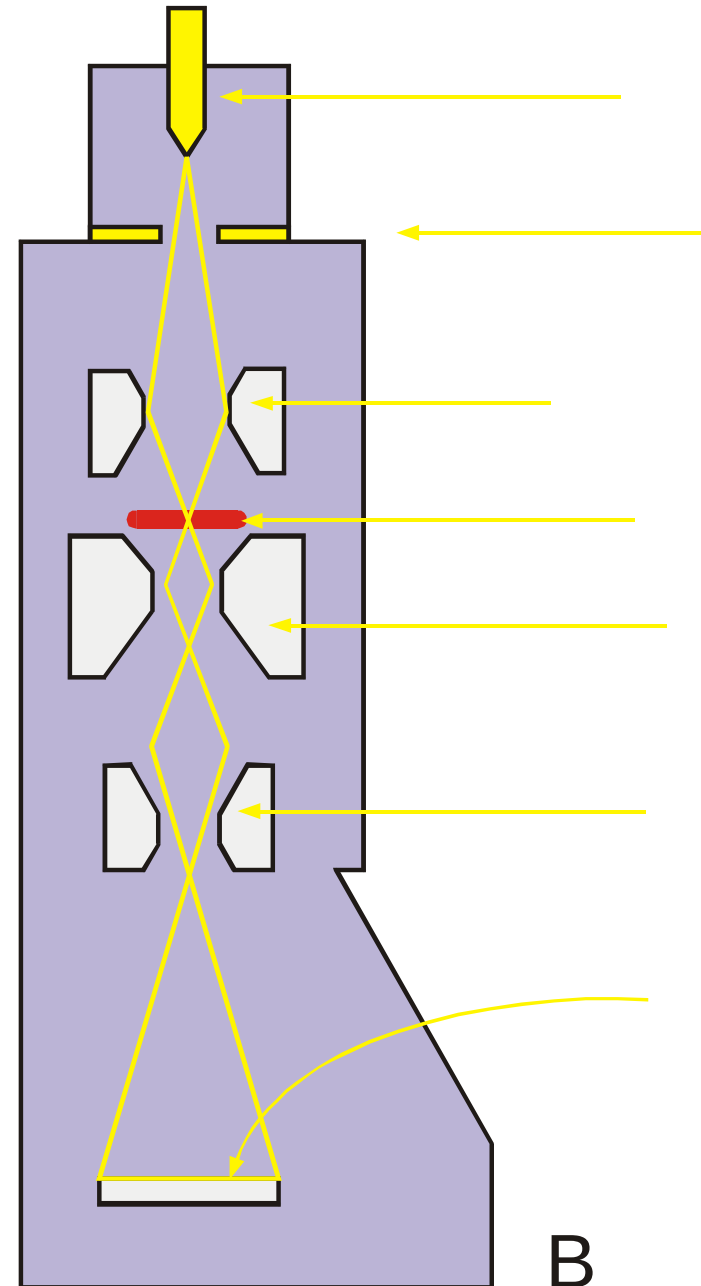
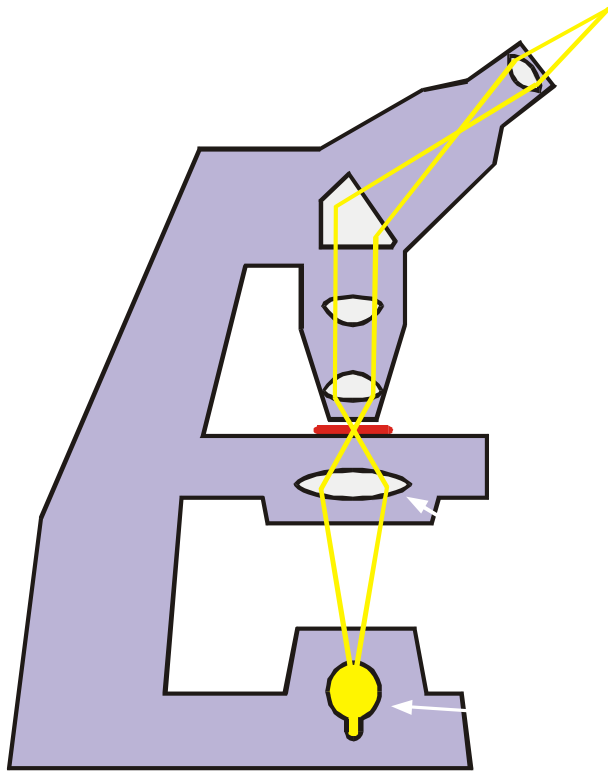
determina il massimo livello di
dettaglio che si può ottenere
nell'immagine

per fortuna esiste...

il microscopio
elettronico a
trasmissione



m. ottico e m. elettronico a confronto



Il microscopio elettronico a trasmissione (TEM)



Negli anni 50 si diffonde un potente strumento per l'analisi delle strutture cellulari: il Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM), ideato da Manfred von Ardenne ed Ernst Ruska ed apparso nel 1931. Il TEM sfrutta la disomogeneità di trasparenza agli elettroni dei materiali biologici opportunamente trattati per produrne immagini ingrandite. Con il TEM diviene possibile studiare in dettaglio anche le strutture interne delle cellule

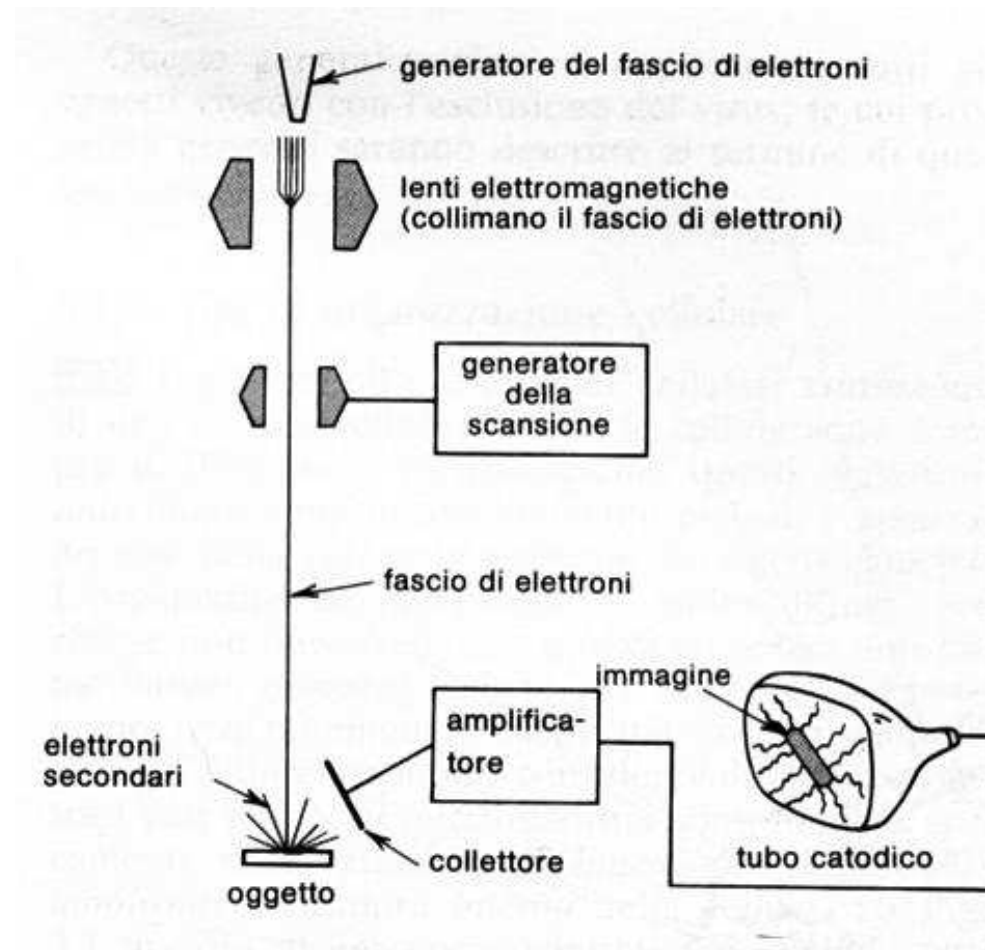


**Siemens Elmiskop IA
Transmission
Electron Microscope
(circa 1964)**

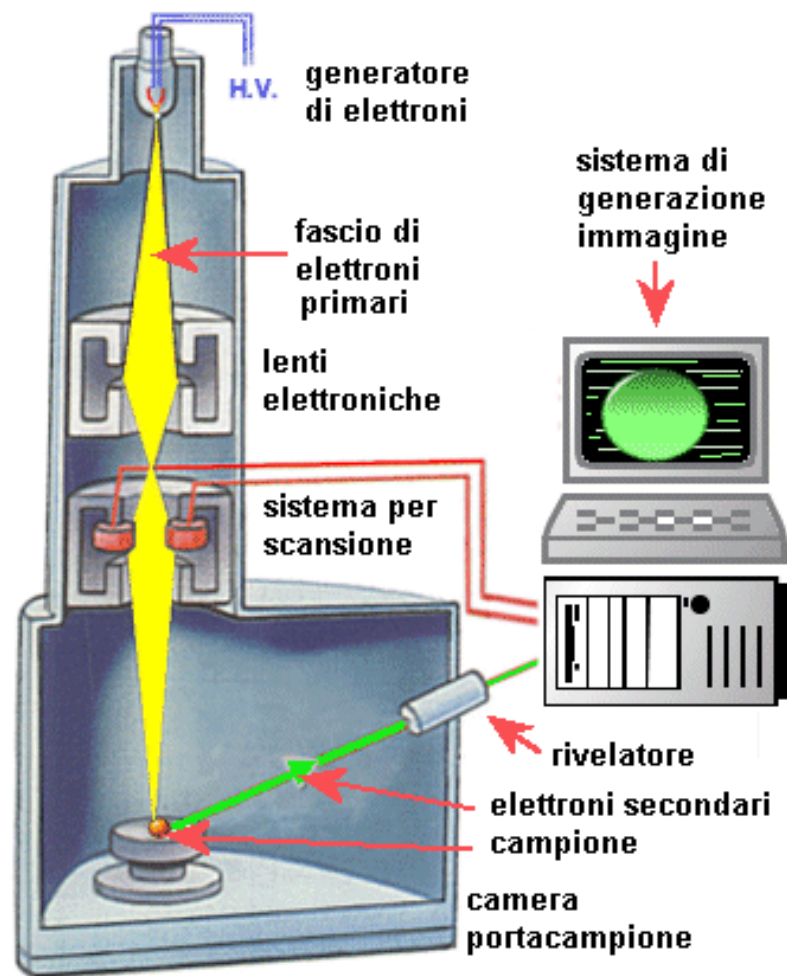
Microscopio elettronico a scansione

- Risoluzione piu' bassa rispetto alla ME a trasmissione
- Consente di valutare il rilievo degli oggetti
- Usata per lo studio delle superfici cellulari

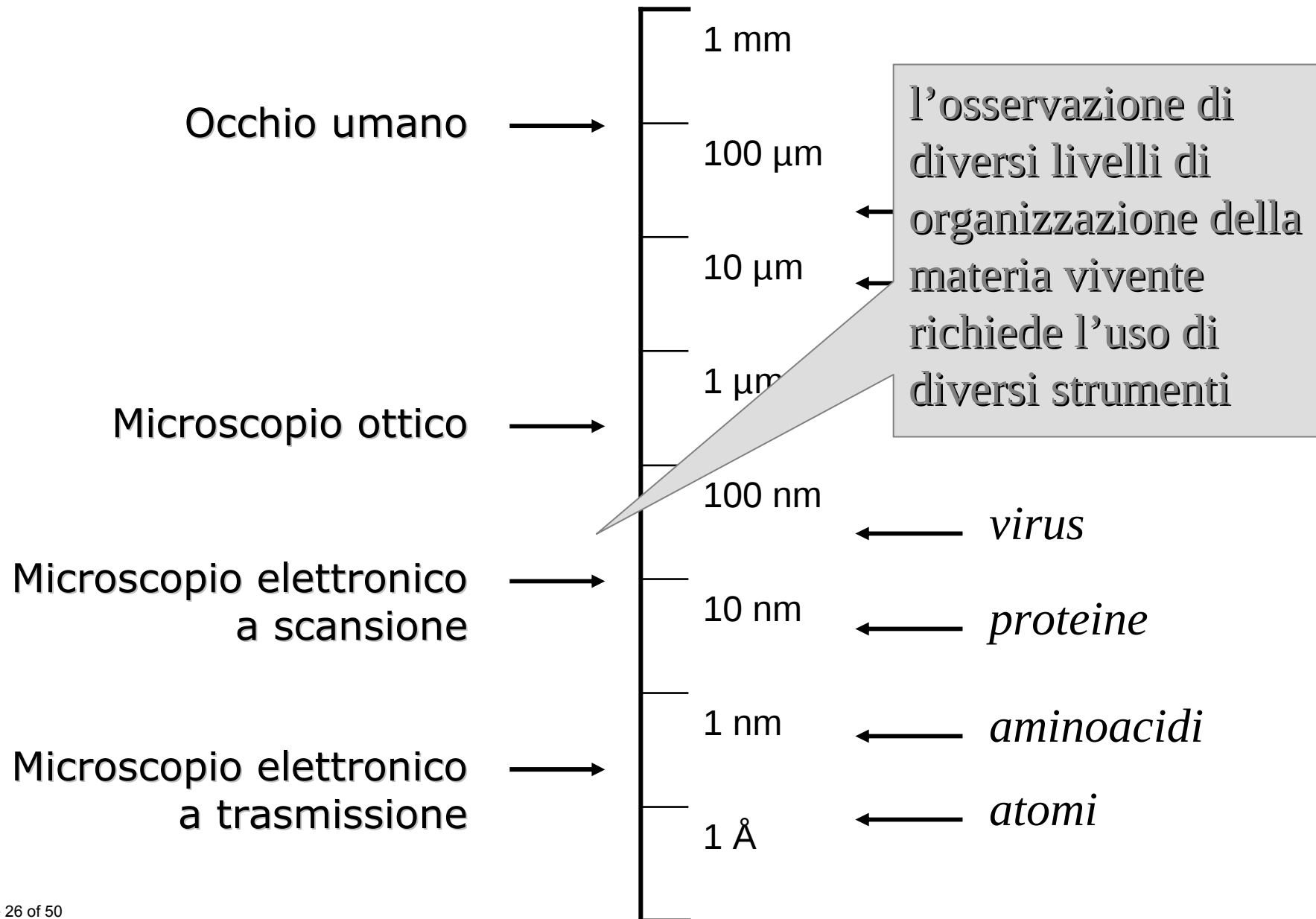
Il microscopio elettronico a scansione (SEM)



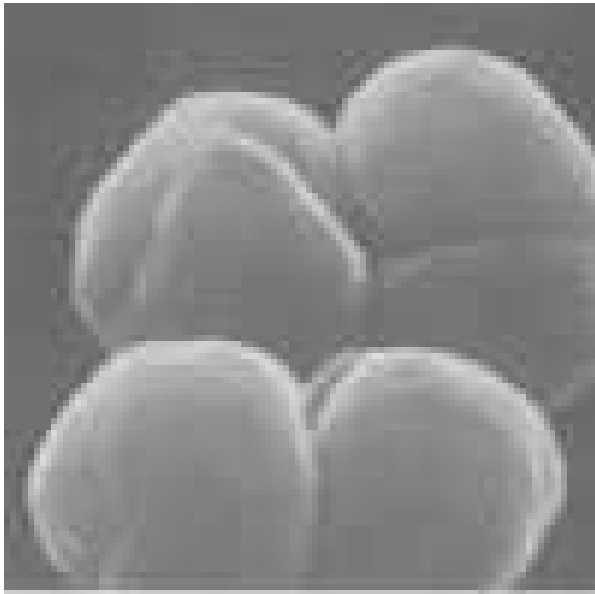
Nel microscopio SEM il campione da osservare, disidratato e reso conduttivo, è posto in una camera all'interno della quale viene fatto il vuoto. Un fascio di elettroni primari, opportunamente focalizzato da lenti elettroniche, viene inviato sul campione muovendolo, con un sistema generatore di scansione, così da farlo scorrere sulla superficie dell'oggetto in esame. Il fascio di elettroni durante la scansione del campione colpisce la sua superficie generando degli elettroni secondari. La quantità e l'energia degli elettroni secondari retrodiffusi da ogni punto del campione colpito dal fascio elettronico dipendono dalla morfologia, oltre che dalla natura chimica, del campione in quel punto. Un rivelatore di elettroni secondari retrodiffusi provvede a raccogliere il segnale generato da ogni punto del campione durante la sua scansione con il fascio di elettroni primari. Un sistema di generazione dell'immagine acquisisce il segnale fornito dal rivelatore durante la scansione del campione e lo invia su uno schermo, ove viene così tracciata l'immagine del campione esaminato.



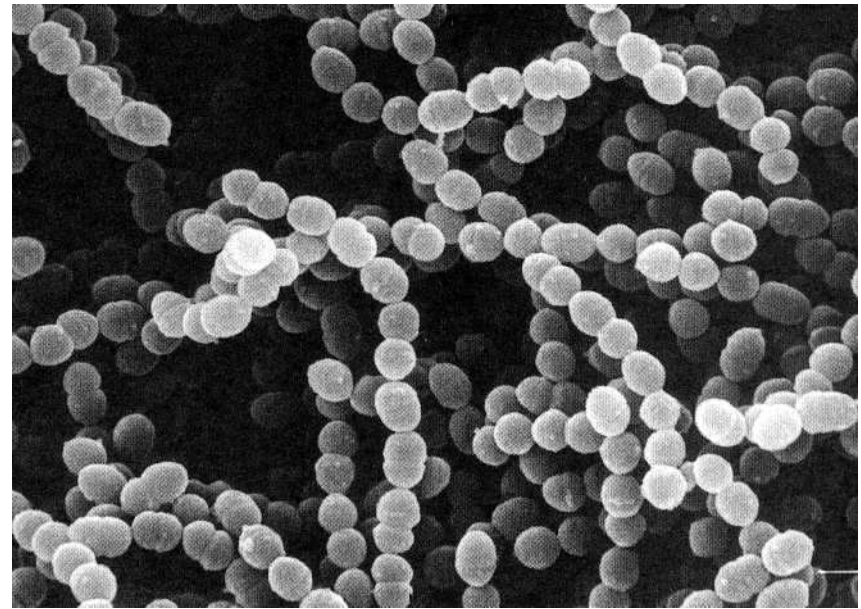
Questione di dimensioni...



Immagini di microrganismi al microscopio elettronico a scansione

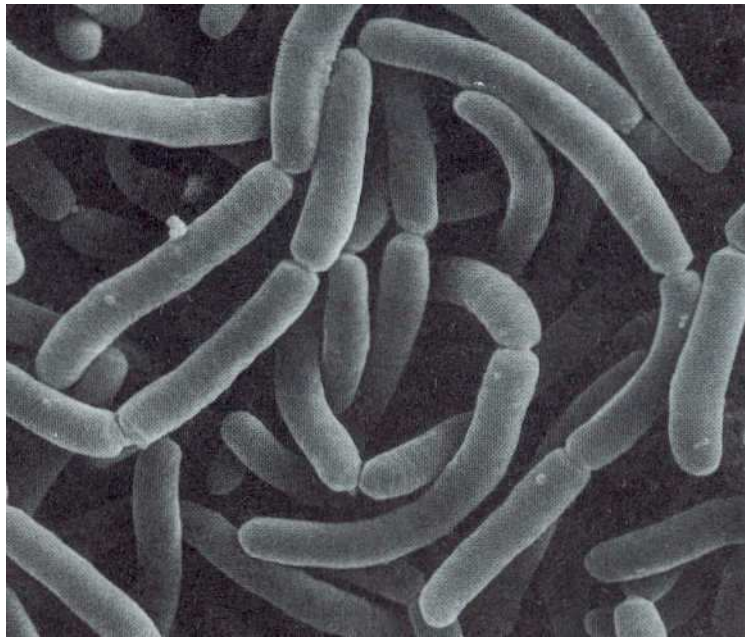


Un archeobatterio:
Methanosarcina barkeri

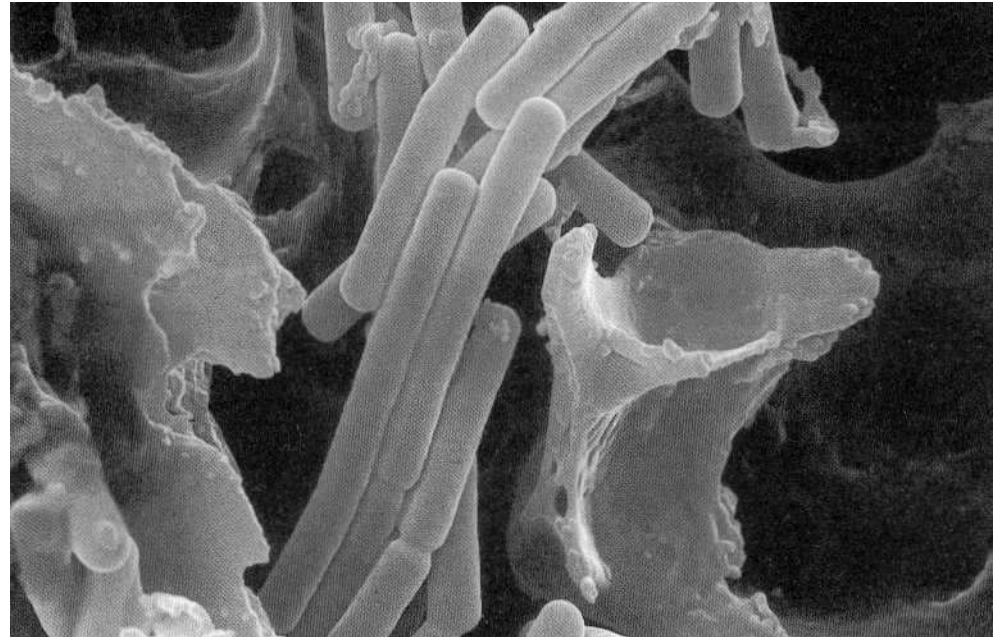


un eubatterio:
Streptococcus thermophilus

Immagini di microrganismi al microscopio elettronico a scansione

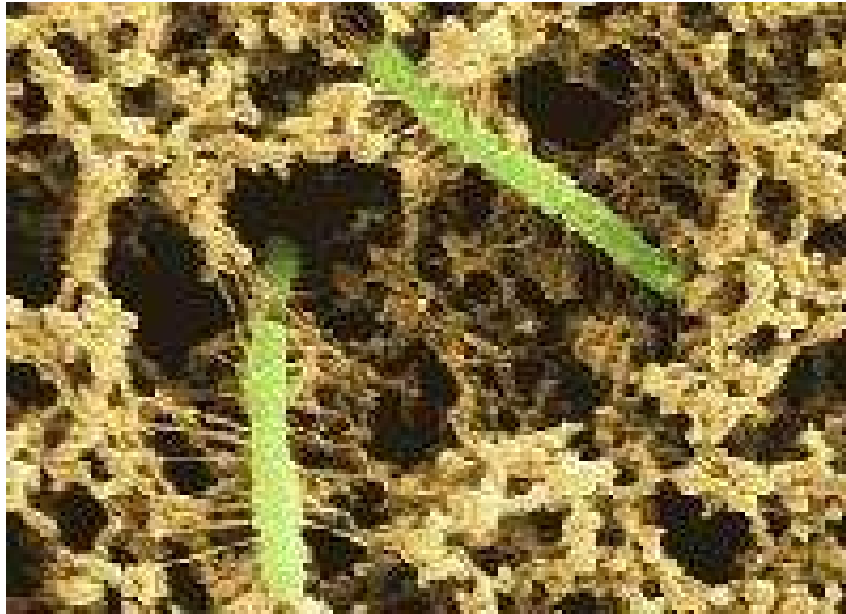


un eubatterio:
Lactobacillus delbrueckii
ssp. bulgaricus

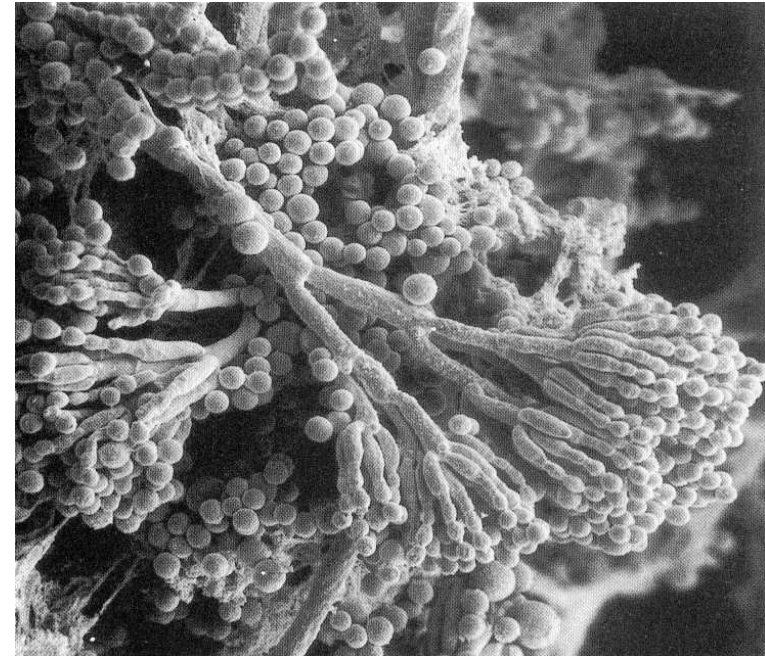


microcolonie di lattobacilli
in formaggio

Immagini di microrganismi al microscopio elettronico a scansione



un eubatterio: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
con filamenti di
esopolisaccaridi

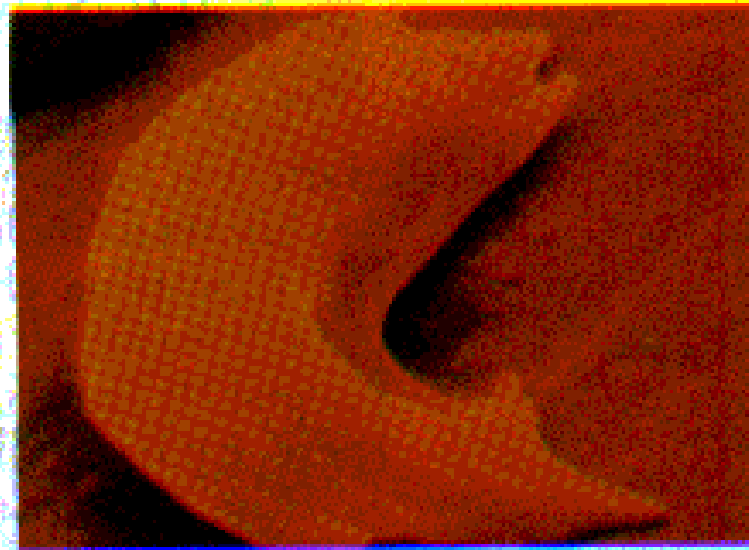
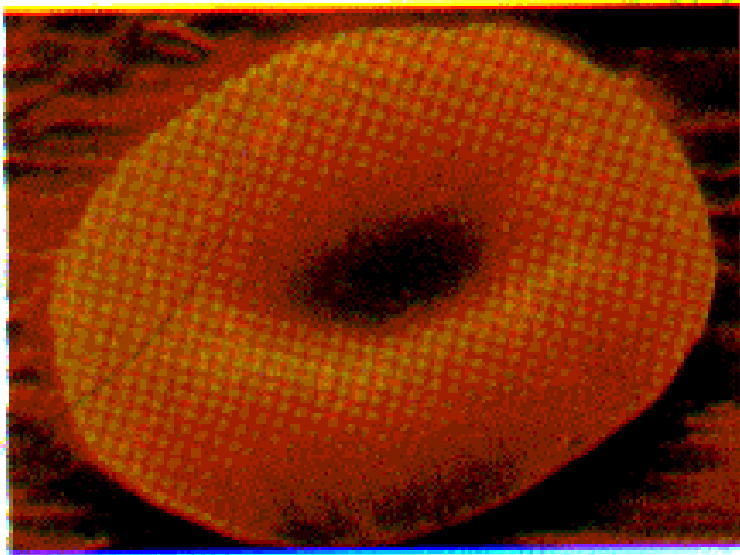


conidiofori di *Penicillium roquefortii* in gorgonzola

alcuni esempi di
microscopia
elettronica a
scansione...



Questa è una zecca



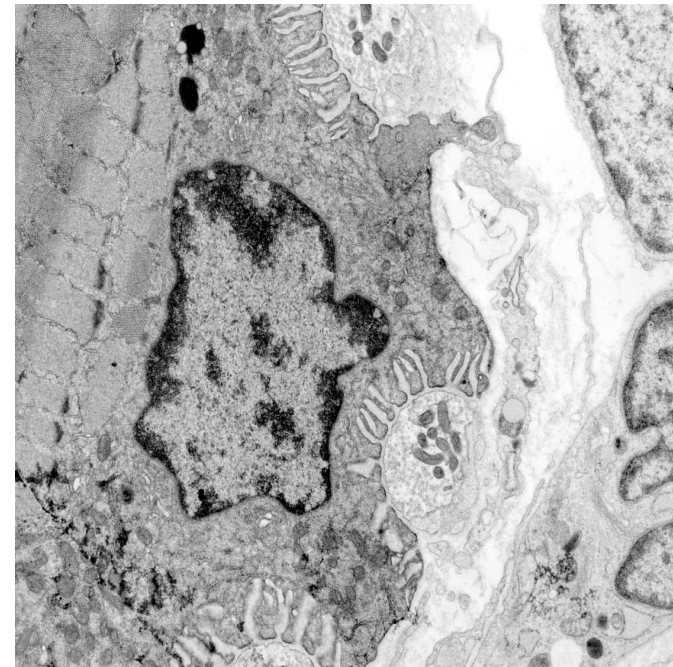
GLOBULI ROSSI

Esempio di microscopia elettronica a trasmissione

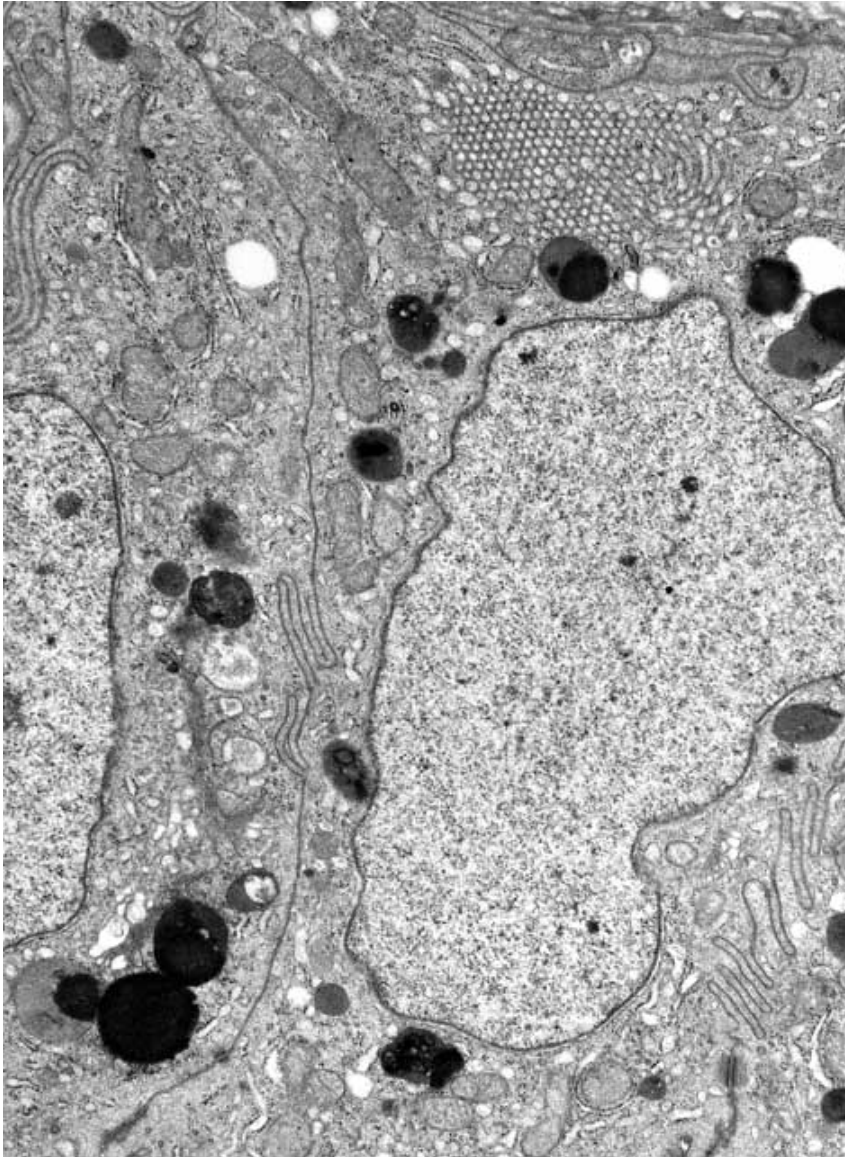
Le immagini di
microscopia elettronica
sono “in bianco e nero”.

Le parti “scure” si
dicono *elettrondense*.

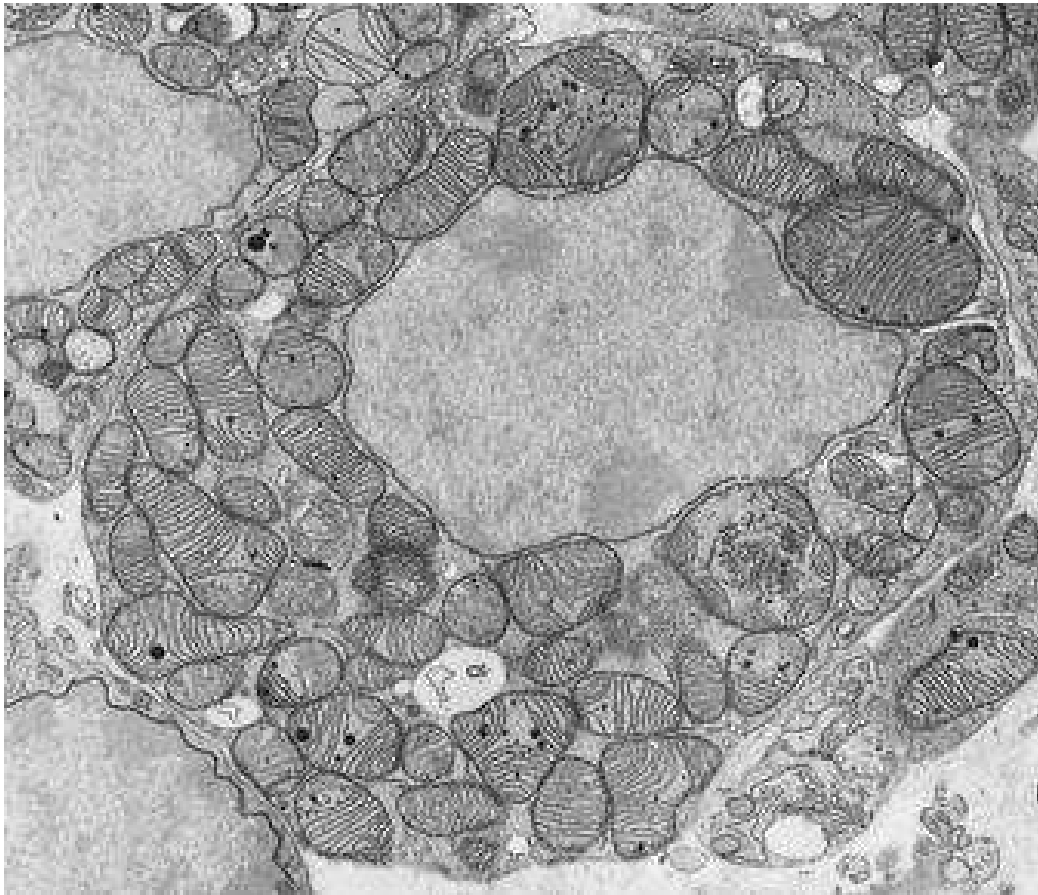
L’altissimo potere
risolutivo del ME
consente di distinguere
numerosi componenti
subcellulari.



Giunzione neuromuscolare



**sezione di placenta al
TEM**

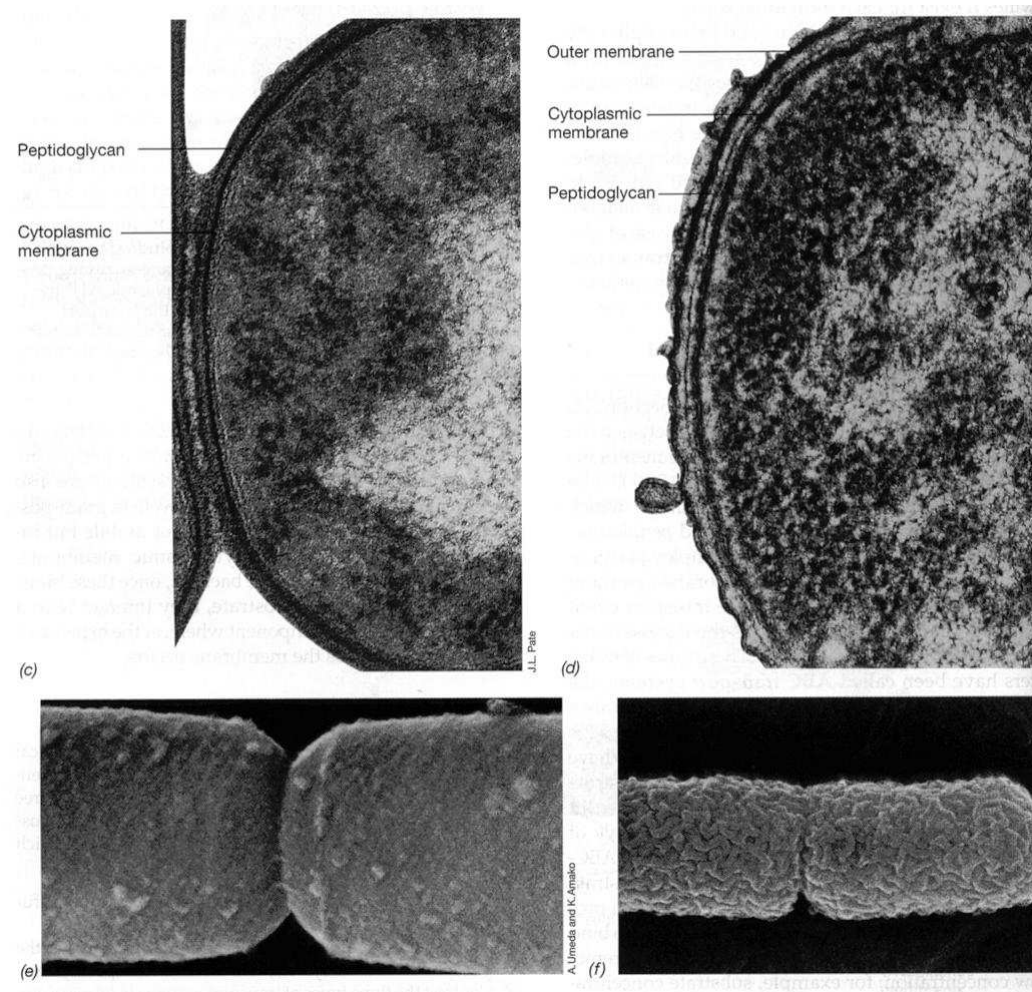


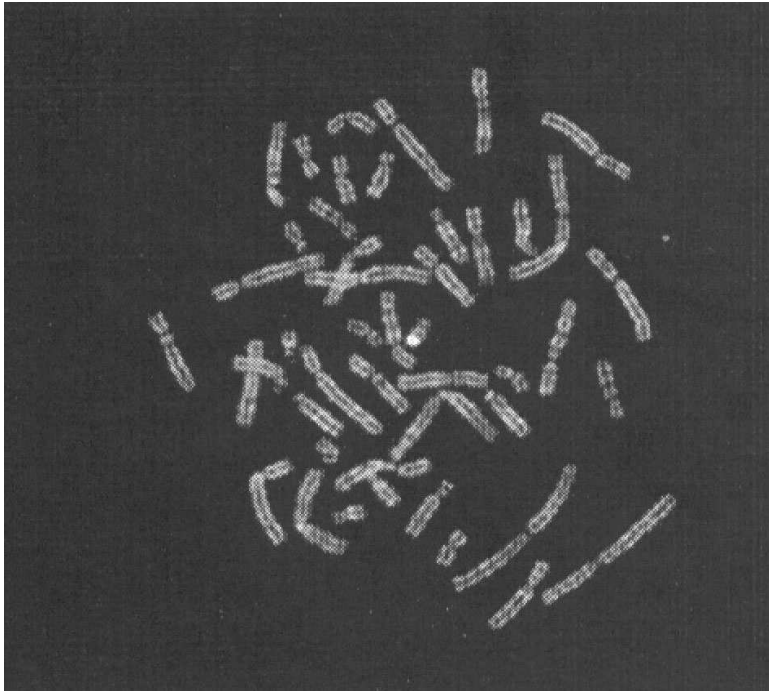
**Sezione di cellula –sono visibili
molti mitocondri**



BACTERI

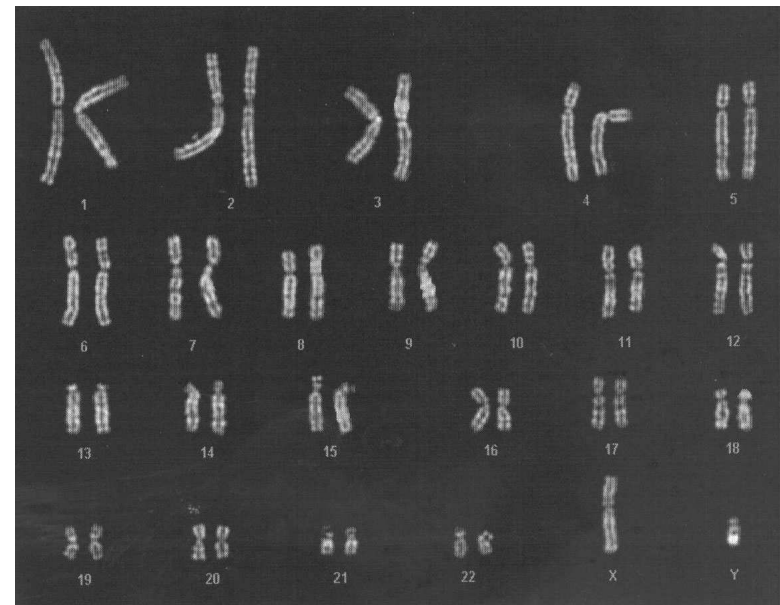
Confronto fra immagini di microrganismi al SEM e al TEM





**Grazie alle tecniche di
microscopia elettronica si
può studiare il cariotipo
umano**

CROMOSOMI

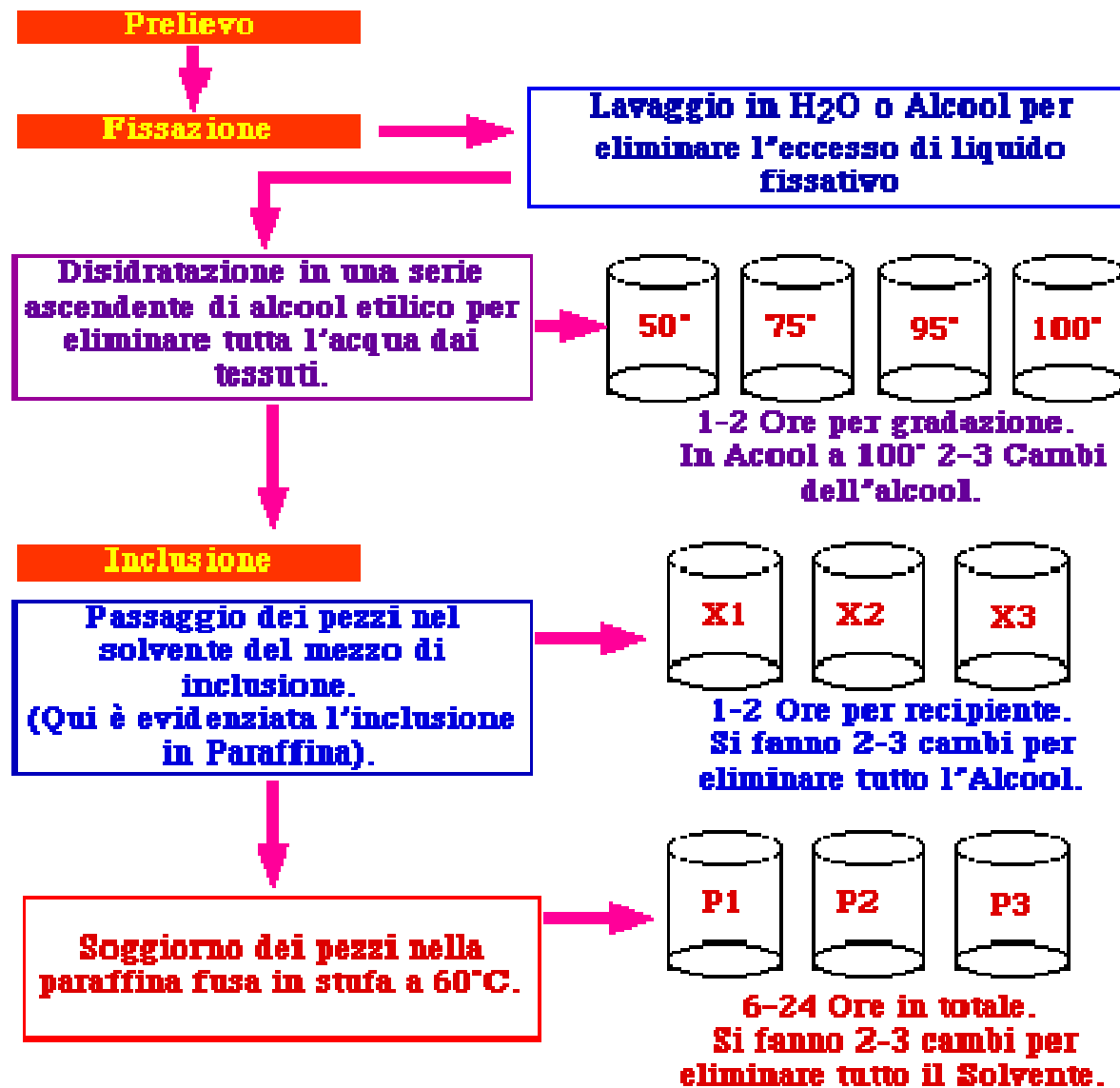


sequenza dei passaggi in una tipica procedura istologica

1. fissazione di un campione di tessuto in formaldeide
2. congelamento o inclusione del pezzo
3. taglio al microtomo
4. montaggio su vetrino
5. “bagni” in soluzioni di coloranti
6. disidratazione e *coverslipping*

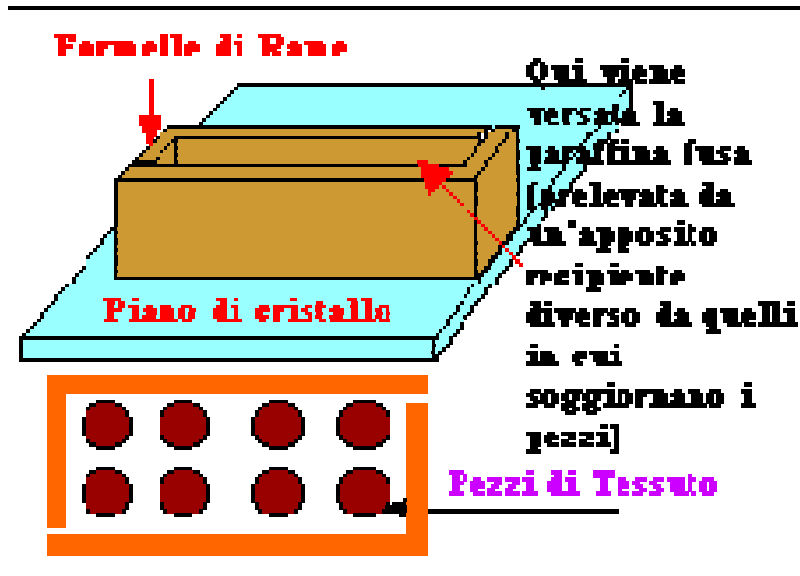
La preparazione del materiale istologico

- la maggioranza dei tessuti biologici sono molli
- prima del taglio, il tessuto deve essere indurito utilizzando sostanze particolari. Le fasi sono quindi:
 - Fissazione con aldeidi
 - Inclusione
 - Congelamento



Lo scopo dell'inclusione è di rendere il pezzo di consistenza tale da poter essere tagliato

Esecuzione della colata.
Essa ha lo scopo di far solidificare lentamente la paraffina in modo da compenetrare il pezzo in maniera omogenea.



Le formelle di rame e il piano di cristallo (che sono conservati in un'apposito scomparto della stufa) vengono preventivamente spalmati con glicerina allo scopo di facilitare il distacco del blocchetto di inclusione. Viene poi versata la paraffina fusa e di seguito, abbastanza velocemente vengono allineati, i pezzi da includere con la faccia di taglio rivolta verso il cristallo. Il tutto viene poi lasciato solidificare a temperatura ambiente.

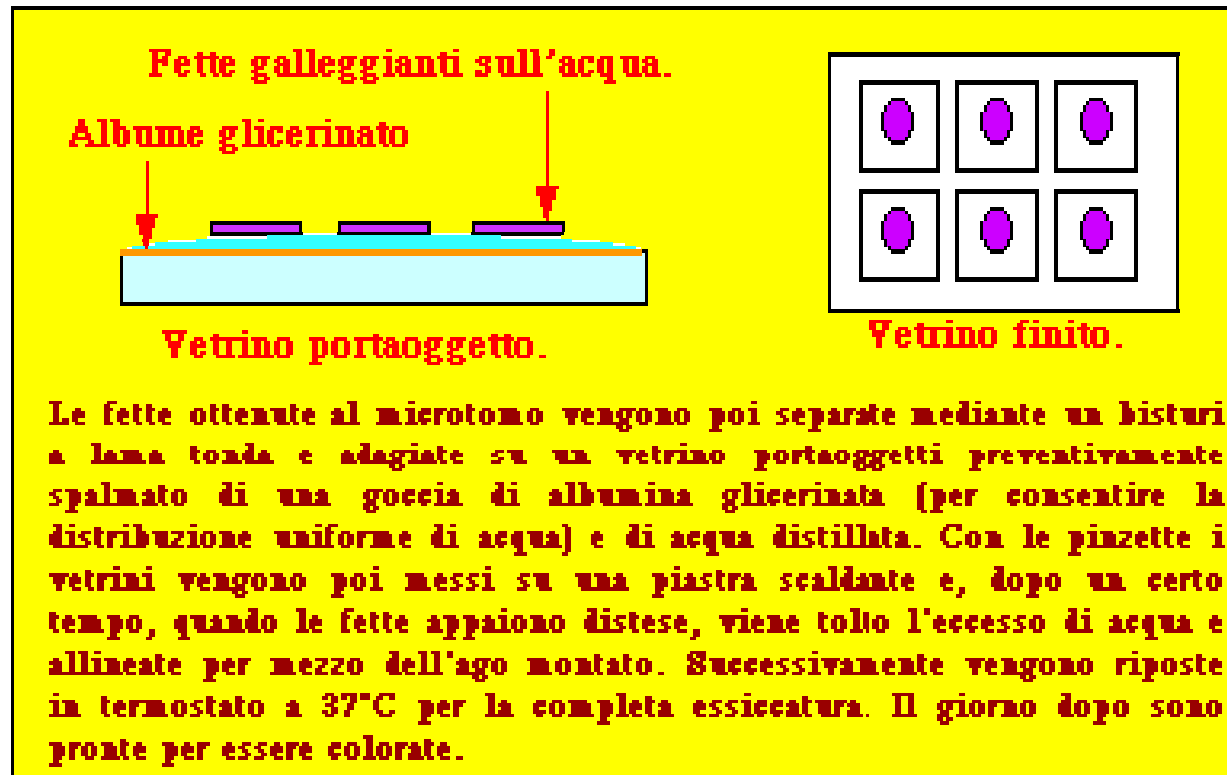
- la luce del microscopio può attraversare solo materiale di spessore molto ridotto
- il tessuto deve essere quindi sezionato mediante speciali apparecchi, detti microtomi



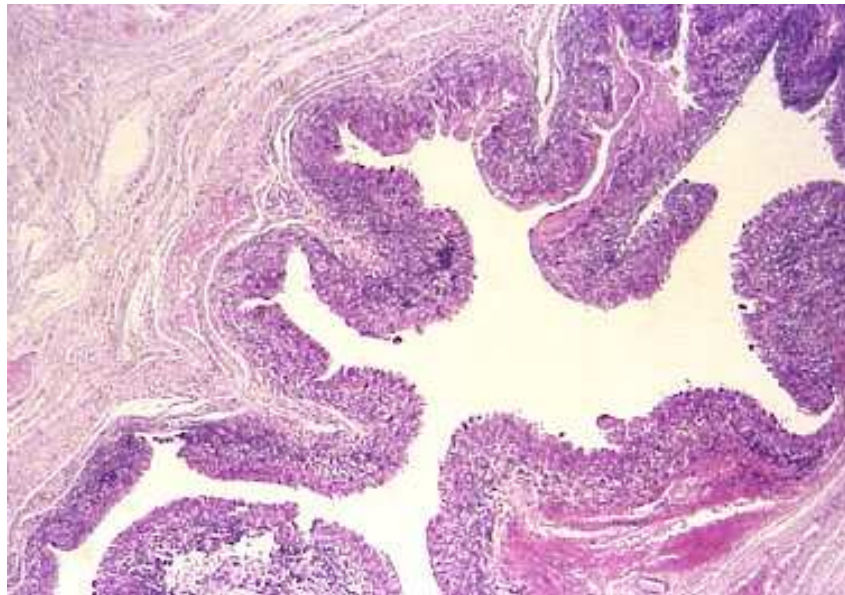
Lo scopo del taglio è quello di affettare il pezzo allo spessore voluto (5-7 μm di norma) in modo da poter essere osservato al microscopio dopo opportuna colorazione



MONTAGGIO



- prima dell'osservazione al microscopio, il tessuto deve essere colorato perchè i tessuti sono normalmente quasi incolori e privi di contrasto
- Si usano coloranti con affinità per componenti cellulari e tissutali diverse che possono essere combinati nella stessa sezione istologica





Le numerosissime sostanze coloranti impiegate in istologia hanno lo scopo di colorare le varie parti della cellula e le sostanze intercellulari, aumentandone il contrasto e favorendone il riconoscimento. Alcuni dei coloranti più comuni sono i seguenti: ematossina ed eosina, ematossina ferrica, blu di metilene, blu di toluidina, miscela Mallory – Azan, orceina, fucsina acida e basica, Sudan nero e Sudan rosso. Molte sostanze o miscele coloranti colorano in maniera più o meno elettiva i vari componenti della cellula o dei tessuti

lo striscio di sangue

Lo “striscio”, una delle tecniche istologiche più diffuse, consente lo studio microscopico delle cellule del sangue e si distingue dal protocollo “generico” appena delineato perché, ovviamente, non richiede il taglio del tessuto.

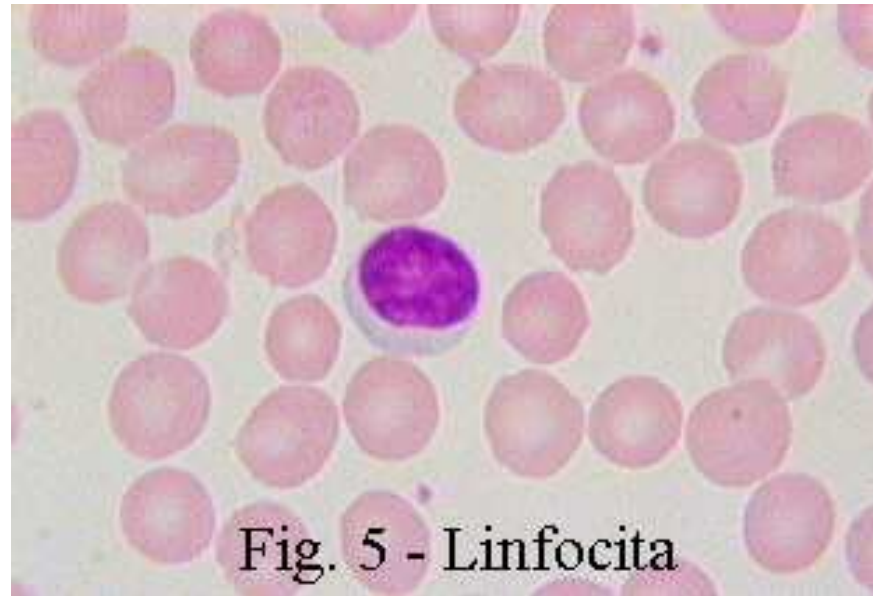
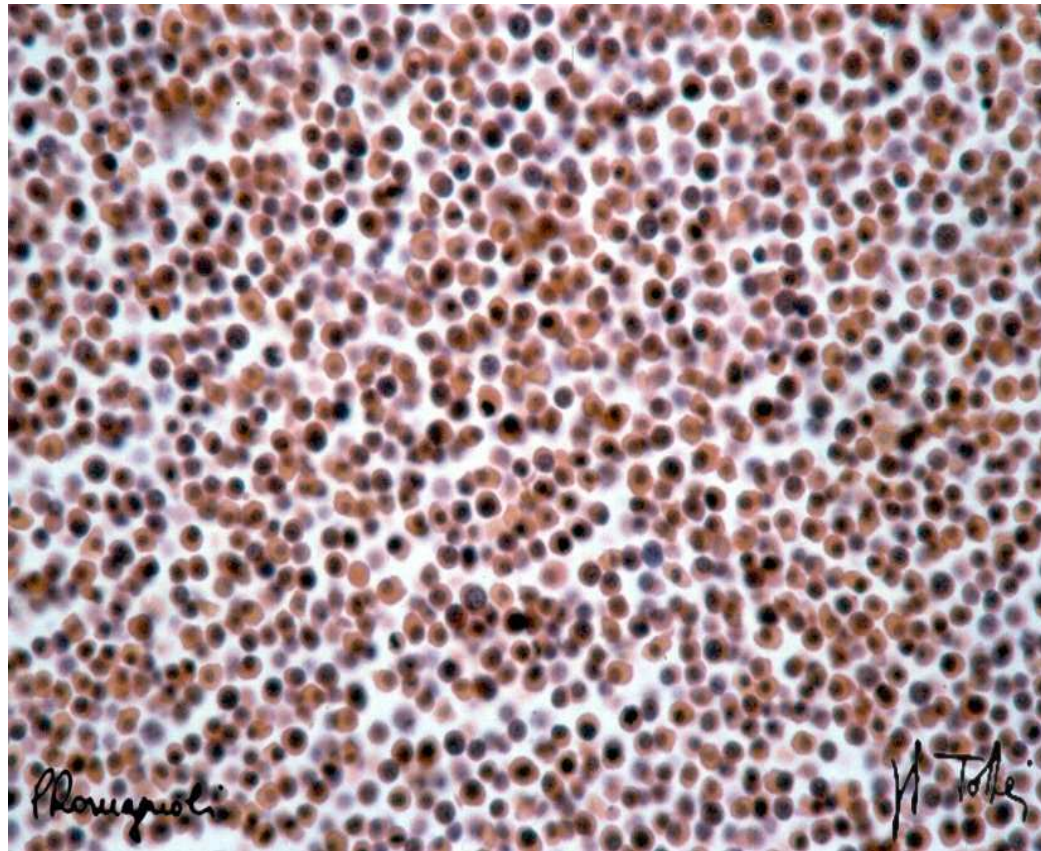


Fig. 5 - Linfocita



STRISCIO DI SANGUE

TECNICA A FRESCO

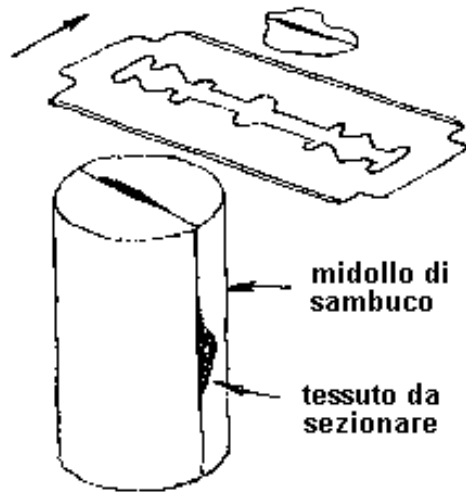


Fig. 11 - Come ottenere una sezione sottile di un tessuto vegetale.

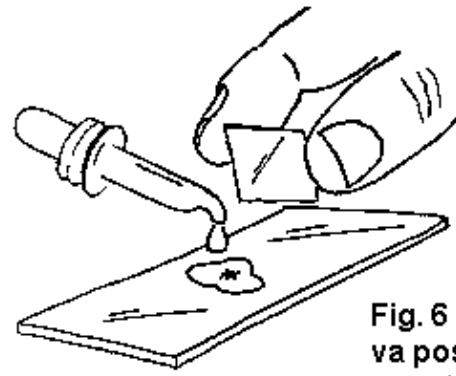
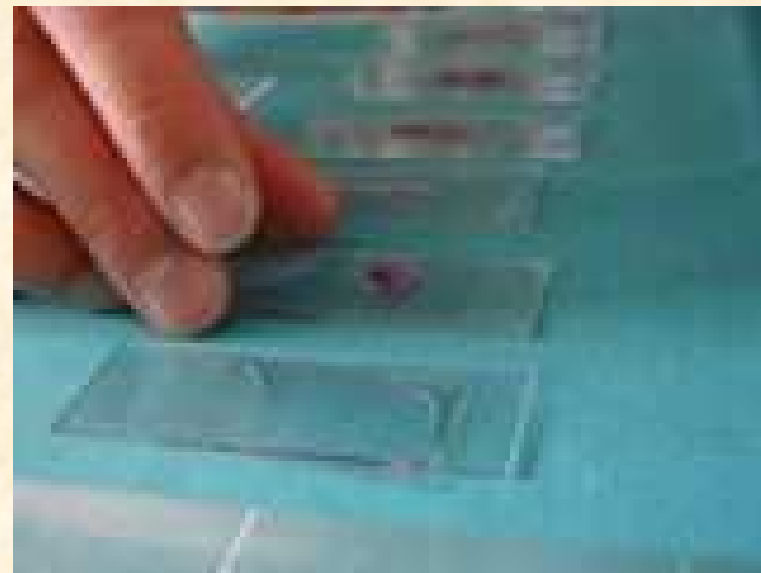


Fig. 6 - Il campione da osservare va posto tra i vetrini coprioggetti e portaoggetti insieme con due gocce d'acqua.



Microscopia elettronica

- **Preparazione del tessuto**
 - Fissazione in glutaraldeide
 - Postfissazione in tetrossido di osmio
 - Disidratazione con alcol
 - Inclusione in plastiche acriliche o resine epossidiche
- **Taglio all'ultramicrotomo**
 - Sezioni di 20-40 nm
- **Aumento del contrasto**
 - Coloranti elettronici come acetato di uranile o citrato di piombo