

Università DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

Tecniche Citologiche ed Istologiche

dr.G.Iazzetti

Programma

Anno Accademico 2012-2013

Ordinamenti N88 e N99 (6 crediti)

Introduzione

Terminologia utilizzata in ambito microscopico:

- * Istologia / Citologia / Ultrastruttura
- * Istochimica / Citochimica
- * Microscopio Ottico / Elettronico
- * Microscopia in Trasmissione / Riflessione
- * Campione, Preparato, Oggetto
- * In toto / Sezione / Striscio
- * Morfologia / Morfometria
- * In Vivo / In Vitro
- * Immagine / Micrografia

Ingrandimento di una immagine. Scala dimensionale di riferimento per microscopia ottica ed elettronica.

Panoramica degli strumenti di indagine microscopica, con esempi delle immagini prodotte.

Unità di misura utilizzate nei diversi ambiti microscopici.

Fisica della luce

La radiazione elettromagnetica vista come fenomeno corpuscolare ed ondulatorio; significato dei parametri che la caratterizzano, lunghezza d'onda, velocità e frequenza.

Le diverse componenti dello spettro elettromagnetico.

La percezione della luce come fenomeno fisico e fisiologico; l'occhio e la retina.

Percezione del colore. Sintesi additiva e sottrattiva del colore.

Ottica

Riflessione e rifrazione di un'onda elettromagnetica. La legge di Snell, l'indice di rifrazione, il calcolo dell'angolo critico. Comportamento della luce nel passaggio attraverso due interfacce parallele fra loro e non.

Il prisma: funzionamento ed esempi di applicazione sia per riflessione che per rifrazione. Parallelo fra il comportamento di un raggio di luce nell'attraversamento di un prisma ed il funzionamento della lente.

Le lenti convergenti e divergenti; lenti sottili e lenti reali. Il funzionamento di una lente ideale nella formazione di immagini reali e virtuali: significato, differenze, applicazioni.

Utilizzo di diaframmi in vari punti del percorso ottico e loro effetto.

Ingrandimento lineare e visuale.

Le aberrazioni ottiche: aberrazioni in asse, fuori asse e di campo.

I fenomeni di diffrazione ed interferenza, i dischi di Airy. La polarizzazione della luce, filtri interferenziali e prisma di Nicol.

I microscopi

La struttura ottica del microscopio semplice e composto in campo chiaro; schema del percorso ottico in microscopi dotati di illuminatore con sistema diascopico ed episcopico.

Formazione dell'immagine microscopica, ruolo della diffrazione.

L'Apertura Numerica ed il Potere Risolutivo: loro significato e formule per il calcolo; uso degli oli da immersione: significato teorico e circostanze di utilizzo pratico.

Parti meccaniche ed ottiche in microscopi composti reali.

Schema dell'illuminazione secondo Kohler, piani e campi coniugati.

Microscopi con apparati per la esaltazione del contrasto

Miglioramento delle immagini microscopiche attraverso l'uso di microscopi ottici composti speciali: loro necessità e casi di utilizzo.

Schema ottico, funzionamento ed applicazioni dei microscopi in

- * campo oscuro,

- * contrasto di fase,
- * contrasto di polarizzazione,
- * contrasto da interferenza differenziale.

Microscopia in fluorescenza

Meccanismo fisico della emissione della fluorescenza; emissione di fluorescenza per eccitazione con singolo e doppio fotone.

Struttura del microscopio per fluorescenza: caratteristiche, posizionamento, ed uso dei filtri per la fluorescenza. Microscopi in fluorescenza ad ipo- ed epi-illuminazione.

Lampade a mercurio e LASER, loro principi di funzionamento e caratteristiche di emissione.

Il microscopio confocale LASER a scansione: struttura e funzionamento; significato e caratteristiche del sistema confocale di formazione dell'immagine; motivazioni e funzionamento del sistema di scansione.

Confronto fra il microscopio in fluorescenza classico e quello confocale LASER a scansione.

Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) ed a Scansione (SEM)

L'uso degli elettroni nella formazione delle immagini, loro motivazione.

Calcolo della lunghezza d'onda in relazione alla differenza di potenziale.

Modalità di formazione delle immagini nella microscopia elettronica a trasmissione ed a scansione.

Schema ottico dei microscopi SEM e TEM: somiglianze e differenze con i microscopi ottici a trasmissione ed a luce riflessa.

Generalità sul funzionamento e sulle applicazioni dei microscopi elettronici a trasmissione (TEM) e scansione (SEM).

Preparazione di campioni biologici per la microscopia

Osservazione al microscopio di materiale biologico in vivo. Utilità e problematiche. Colorazione dei campioni in vivo: i coloranti vitali, loro caratteristiche.

Preparazione di tessuti uccisi: la fissazione:

* metodi fisici: a freddo (freeze-drying e freeze-substitution) ed a caldo (essiccamento: gli strisci). Descrizione delle modalità operative, campi di utilizzo delle tecniche fisiche, limiti nella loro applicazione.

* Metodi chimici di fissazione: i fissativi primari: caratteristiche chimico fisiche delle varie classi di fissativi (gelificanti e coagulanti) ed esempi di sostanze utilizzate. Uso dei fissativi primari nelle miscele fissative: componenti aggiuntivi e loro significato. Tecnica di fissazione per perfusione e per immersione; modalità di preparazione del campione in relazione alla capacità di penetrazione del fissativo.

Descrizione e significato dei passaggi necessari per l'inclusione ed il sezionamento di campioni in paraffina per microscopia ottica ed in resina per microscopia TEM; differenze e concordanze delle due tecniche e degli apparati utilizzati per il taglio (microtomi a slitta e rotativi ed ultramicrotomo).

Colorazione di campioni per esame istologico ed ultrastrutturale

Metodi di colorazione delle sezioni per l'istologia e l'ultrastruttura al TEM, passaggi necessari e loro significato.

Quali sono le sostanze utilizzate come coloranti in istologia: struttura fisica: l'anello benzenico e le sue modifiche rispetto alla capacità di assorbire radiazioni elettromagnetiche e generare colore; particolarità chimiche: funzione dei cromofori, cromogeni e auxocromi nella struttura della molecola del colorante istologico.

Le lacche e l'uso di mordenzanti ed ossidanti nelle colorazioni.

Classificazione dei coloranti in base alla loro affinità chimica.

La variazione del pH come sistema per variare l'affinità dei coloranti con le proteine.

Il processo di colorazione come reazione di massa. Colorazione progressiva e regressiva.

La metacromasia.

Ematossilina ed eosina come esempi di coloranti classici, particolarità strutturali ed affinità per le diverse componenti della cellula.

Passaggi necessari alla esecuzione della colorazione istologica nella pratica fino alla osservazione del campione.

Particolarità dei metodi di aumento del contrasto ("colorazioni") per microscopia TEM, meccanismo di azione, esempi delle sostanze utilizzate (piombo, uranile).

Immunofluorescenza ed altre tecniche di localizzazione in situ

Tecniche diverse di colorazione e ricerca di sostanze all'interno delle sezioni:

* Le tecniche istochimiche: significato delle tecniche istochimiche; generalità sull'utilizzo della PAS reazione: l'ossidazione con l'acido periodico, modalità di colorazione da parte della fucsina.

* Le tecniche istoautoradiografiche: modalità di applicazione e di rivelazione.

* Le tecniche di immunofluorescenza diretta e indiretta: produzione ed utilizzo degli anticorpi mono- e poli-clonali, disegno sperimentale. Metodi pre- e postembedding.

La fluorescenza: meccanismo di emissione da parte delle molecole fluorescenti, differenze e somiglianze con la fosforescenza e con l'assorbimento di alcune lunghezze d'onda

elettromagnetica da parte di sostanze colorate.

* Il metodo ABC: sostanze utilizzate e tecnica di applicazione.

* La tecnica di ibridazione in situ con sonde fluorescenti o legate ad enzimi.

Strumenti e tecniche di acquisizione delle immagini istologiche

La macchina fotografica: principi di funzionamento della camera oscura a foro stenopeico e con obiettivo. Funzione del diaframma e dell'otturatore. Coppie tempo/diaframma. Il sistema Reflex.

Supporti fotosensibili e fotografia analogica: emulsioni e sensibilità all'esposizione alla luce. Il difetto di reciprocità.

Pellicole in B/N e colore, diapositive e negative. Il processo di rivelazione dell'immagine latente. Metodi di stampa.

Limiti all'ingrandimento delle immagini.

Le immagini digitali. Il concetto di risoluzione, significato del pixel, la profondità colore. Immagini indicizzate ed RGB.

I sensori CCD e CMOS. Il photosite e il photodetector: modalità di acquisizione del segnale luminoso.

Interpolazione del colore non rilevato.

Modalità di salvataggio dell'immagine in un file: compressione dei dati lossless e lossy; rischi di deterioramento del segnale.

Tipi di file utilizzati comunemente nel salvataggio con e senza compressione dei dati.

Il problema del calcolo degli ingrandimenti con immagini analogiche e digitali.

Testo consigliato: *Appunti del corso disponibili on line a cura del docente (<http://www.docenti.unina.it>)*