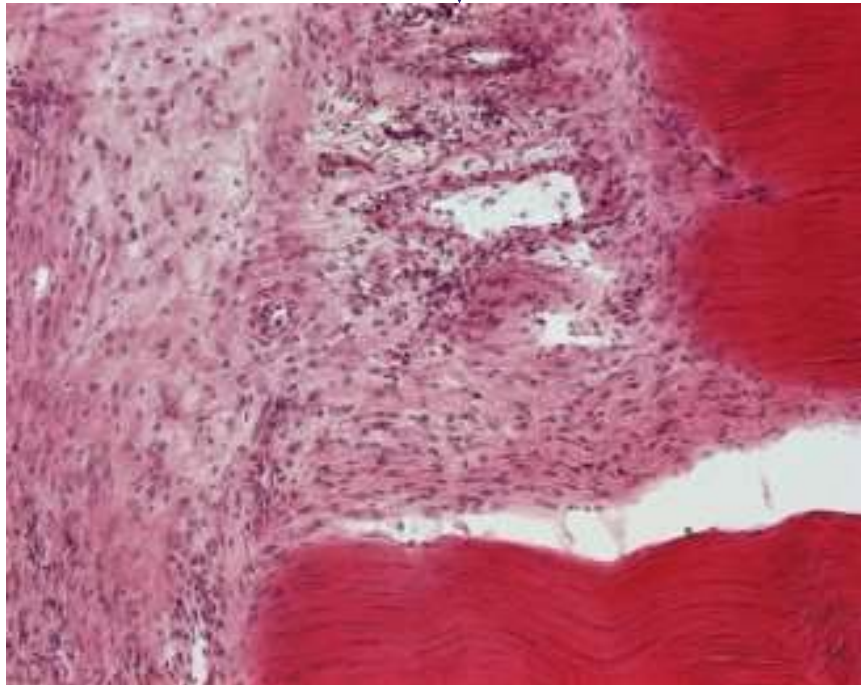


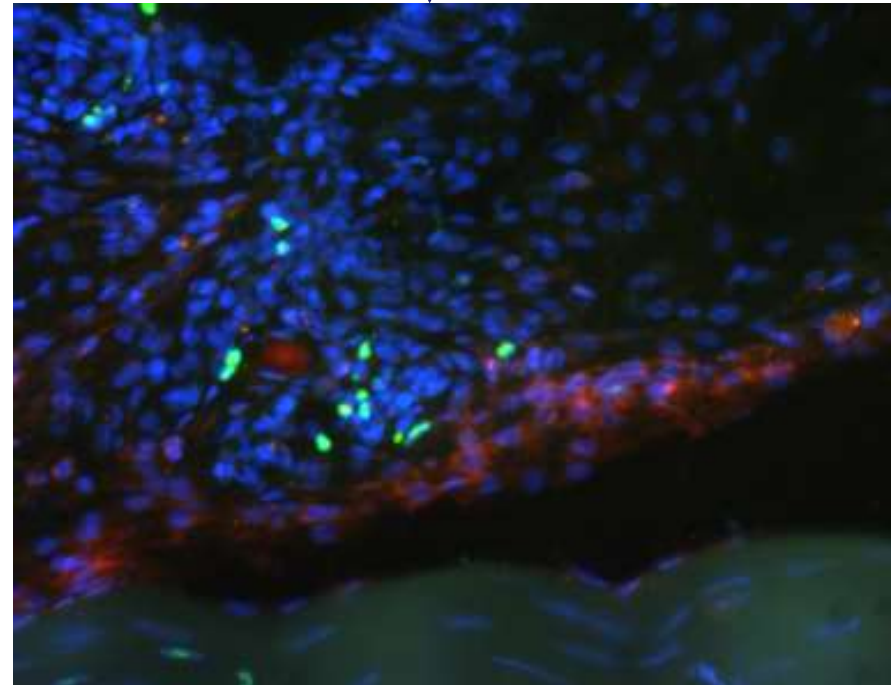
Osservazione Microscopica



M.OTTICO A LUCE TRASMESSA



M. OTTICO A FLUORESCENZA



ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO ISTOLOGICO

Per un esame dei tessuti è necessario allestire preparati istologici mediante:

PRELIEVO

FISSAZIONE FISICA

SEZIONAMENTO in fettine di minimo spessore e

COLORAZIONE selettiva che permette un aumento di contrasto delle diverse strutture cellulari.

...OSSERVAZIONE

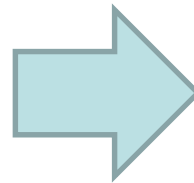
ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO ISTOLOGICO

PRELIEVO

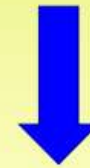
PRELIEVO DEI TESSUTI	OCCORRENTE	TEMPO
Su animali anestetizzati o sacrificati in modo indolore, o su materiale proveniente da macello, si procede alla dissezione per prelevare gli organi o i tessuti da studiare. Salvo eccezioni il campione deve avere dimensioni inferiori al cm³.	Forbici, pinze, bisturi, lame, piano o in materiale plastico, Guanti	L'operazione va eseguita nel più breve tempo possibile riducendo al minimo i traumi mediante l'uso di lame affilatissime.

...una Fissazione Fisica per RAFFREDDAMENTO o CONGELAMENTO

Riduzione a circa 1 cm³



FISSAZIONE FISICA
(congelamento)



- ghiaccio secco
- azoto liquido (-170°C)

Non si effettuano disidratazione
ed inclusione, direttamente si
passa al sezionamento

L'obiettivo è congelare rapidamente, utilizzando *accorgimenti particolari* tali che l'acqua nelle cellule e tessuti non ha il tempo di formare macrocristalli e rimane in una forma vetrosa che non si espande quando solidificata.

...è necessario infatti l'uso di CRIOPROTETTORI

CRIOPROTETTORI

I crioprotettori sono sostanze a diversa composizione chimica che hanno in comune un'elevata solubilità in acqua associata ad una tossicità dipendente dalla concentrazione di utilizzo.

La loro azione protettiva si esplica in vari modi:

- con un'azione diretta sulla membrana cellulare
- modificano l'ambiente intra ed extra cell. sostituendosi all'acqua e diminuendo la formazione di cristalli di ghiaccio
- abbassano il punto di congelamento della soluzione e permettono una maggiore disidratazione delle cell. durante il cong. lento.

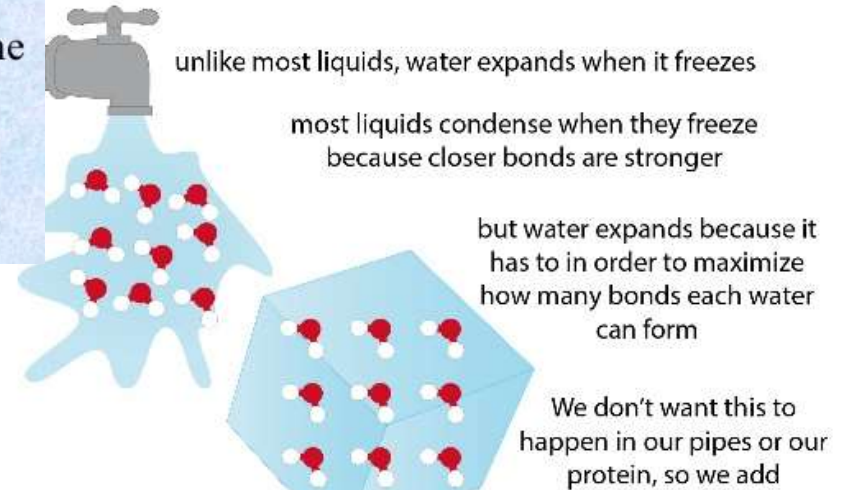
L'interazione tra crioprotettore e cellula è mediata da:

- tempo di esposizione all'agente chimico
- Temperatura a cui avviene l'esposizione

CRIOPROTETTORI

SOSTANZE PIU' UTILIZZATE

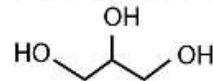
- Si dividono in due categorie :
- Crioprotettori in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari
- Crioprotettori non in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari



CRYOPROTECTANTS

the more particles you can stuff in, the lower the freezing point.

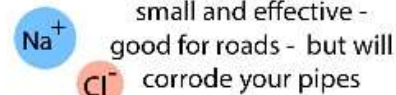
GLYCEROL



the biochemist's "go to" antifreeze

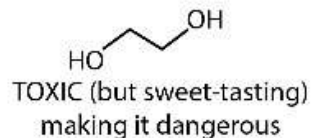
downsides: viscous (syrupy) & bacteria like it too...

SODIUM CHLORIDE



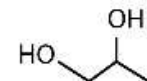
ETHYLENE GLYCOL

the "classic" antifreeze



PROPYLENE GLYCOL

less effective but
much less toxic!



Cryoprotectant Agents

- CPAs protect cells by reducing intracellular ice formation
- CPAs alter the kinetics of the cells
 - Ice formation
 - Membrane mass transport
- CPAs may be harmful to cells
 - Toxicity
 - Volume changes

Cryoprotectants

Permeable	Non permeable
Methanol CH_3OH	Polyethylenglycol
Ethanol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Polyvinyl pyrrolidone
Ethylenglycol $\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$	Ficoll
1-2 Isopropanol $\text{C}_3\text{H}_6(\text{OH})_2$	Sucrose
Glycerol $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_2$	
DMSO $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	

Fissazione per Congelamento

Metodi di congelamento

- Blocchi di metallo
- Produzione di "Neve CO₂"
- Ghiaccio secco
- Appar. Termo-elettrici
- Gas liquidi (N²)

METODO IDEALE

FREON

ISOPENTANO

**Conservazione di
tessuti e cellule**

METODI RAPIDI

	Metodo	T (°C)	Efficienza
Tessuti in liquidi refrigerati	Fluido organico ^a In gas liquido (N ₂)	- 196	Il più veloce
	Fluido organico ^a In ghiaccio secco Liquido organico ^b	- 79	Ottimale per la maggior parte delle applicazioni in M.O
Tessuti in contatto di metalli refrigerati	Raffreddamento Termo-elettrico	- 40	scarsa
	Supporto metallico Raffreddato per conduzione	- 30	scarsa

a: N-esano, isopentano, miscele di butano e pentano

b: ghiaccio secco in miscela con etanolo, metanolo o acetone

...SCOPO DELL'ALLESTIMENTO

DI UN PREPARATO ISTOLOGICO CONGELATO

TAGLIO	OCCORRENTE
Il suo scopo è quello di sezionare il pezzo allo spessore voluto (5-20 μm di norma) in modo da poter essere osservato al microscopio dopo opportuna colorazione.	Colla termosensibile OCT. Blocchetti di legno. Criostato. Lama dritta. Crioprotettori. Azoto liquido. Vetrini trattati o meno con adesivi.

Organizzazione e allestimento:

Scegliere il metodo di congelamento appropriato e, a seconda del metodo, si prepara azoto liquido, isopentano, ghiaccio secco.

-

Etichetta in anticipo: stampi per contenitori criogenici, fogli di alluminio, supporti per campioni a temperatura ambiente.

-

Prepara dispositivo di raffreddamento Dewar coperto per trattenere temporaneamente campioni congelati mentre si lavora.

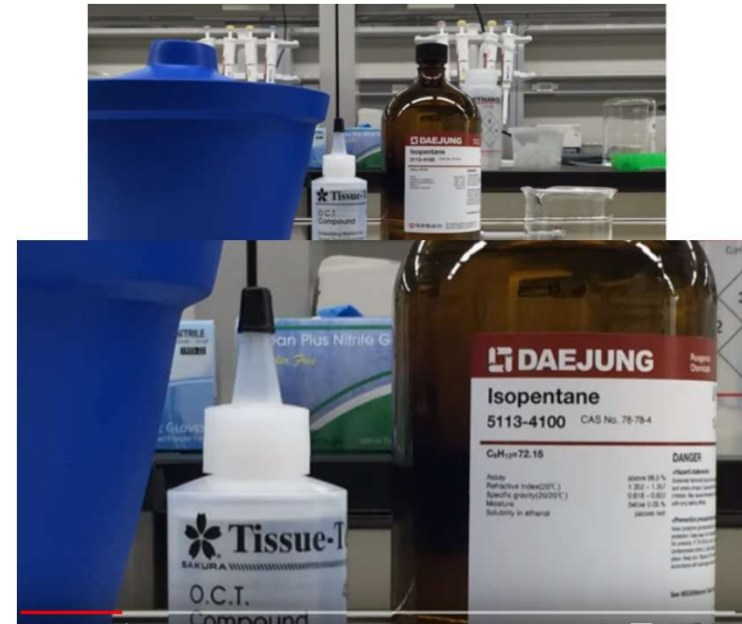
-

Prepara strumenti e altri materiali di consumo, pinze, etichetta piccola o piastre di Petri

..Come si procede in termini tecnico- operativi...

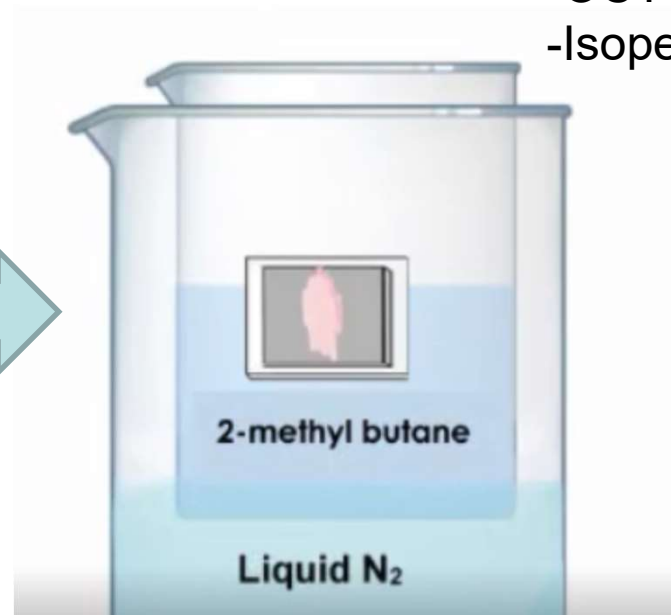
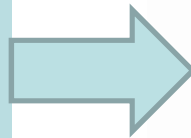


Allestimento della postazione: Guanti di protezione, Azoto liquido, Dewar, Pinze lunghe, becker



Crioprotettori:
 -OCT (termosensibile)
 -Isopentano

Viene creata una «camicia di congelamento» versando in un becker il *Crioprotettore*. Verrà poi immerso il tutto in Azoto Liquido (**Temp: -196 C°**) all'interno di un dispositivo di raffreddamento.





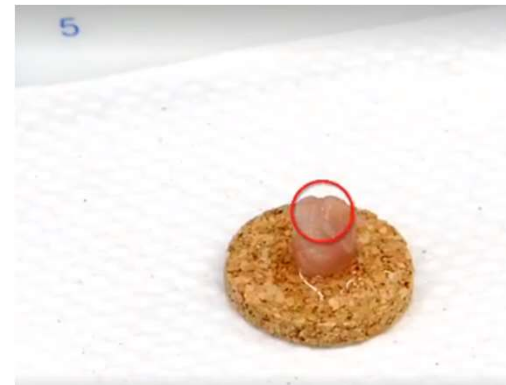
Riduzione del campione
a dimensioni di circa 1 cm³



Supporti di sughero



Piccole quantità di OCT versate sui supporti
e posizionamento del pezzo di tessuto



quindi...per la Procedura di congelamento dei tessuti freschi:

-

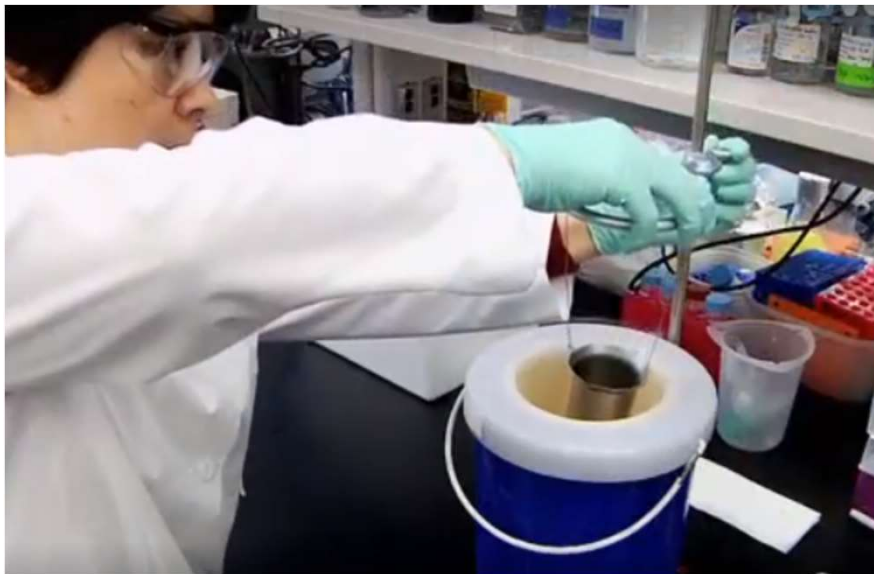
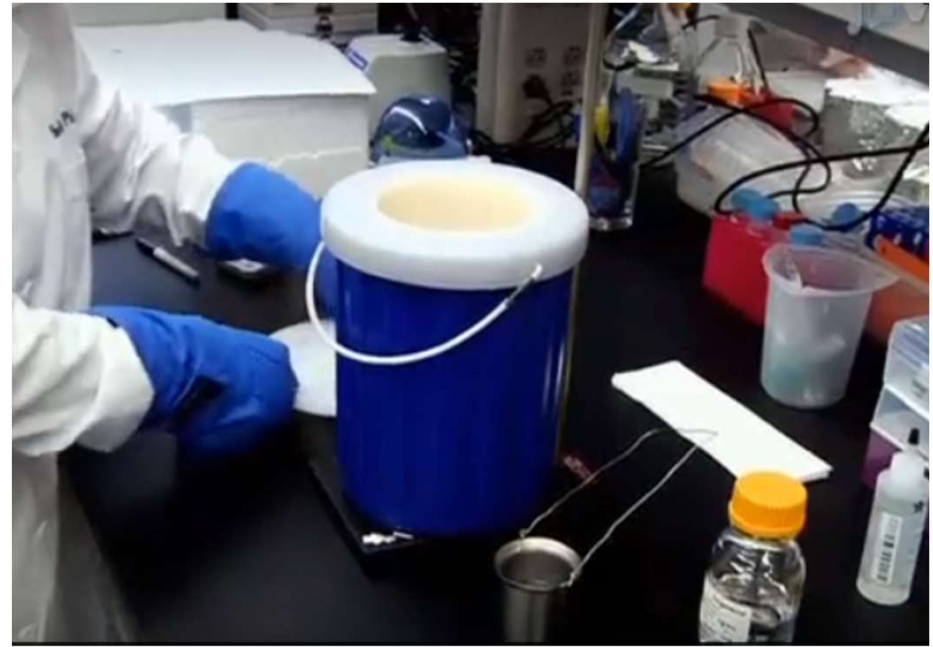
Un becher di metallo viene riempito per 2/3 di isopentano e collocato in un Dewar di azoto liquido abbastanza da raggiungere fino a circa 1/3 del becher di metallo. Preparare almeno 10 minuti prima di congelare il campione.

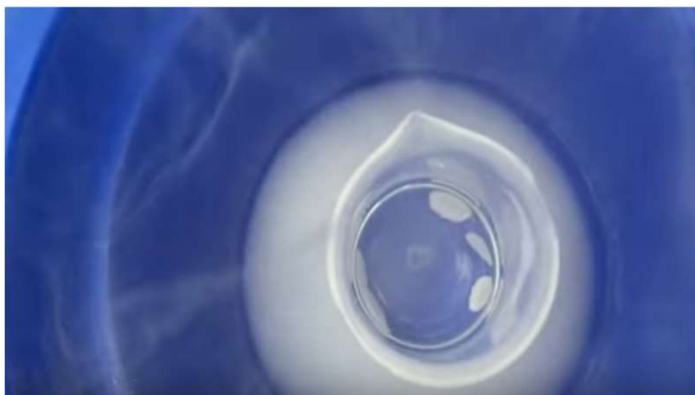
-

Con una pinza da 12 pollici congelare il campione preparato con lo stampo crio nella porzione trasparente di isopentano - non immergere completamente.

-

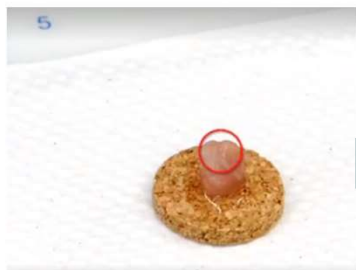
Evitare il crack cracking - quando c'è ancora una piccola goccia di campione di trasferimento OCT non congelato sul dispositivo di raffreddamento con schiuma di ghiaccio secco coperto mentre si continua su altri campioni.



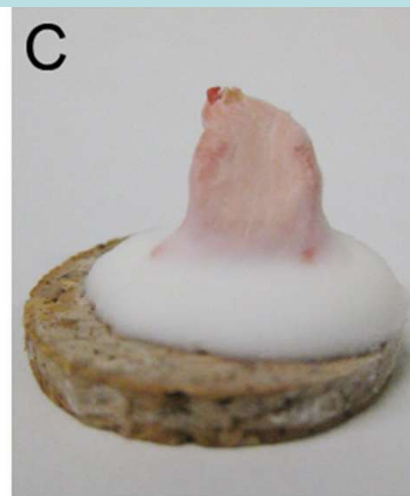


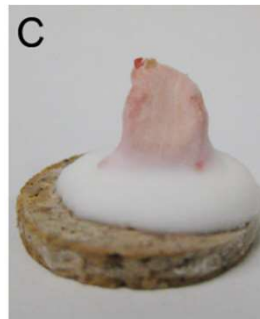
Congelamento
del crioprotettore ai bordi
esterni a contatto con le
pareti del becker

Temp: -80°C

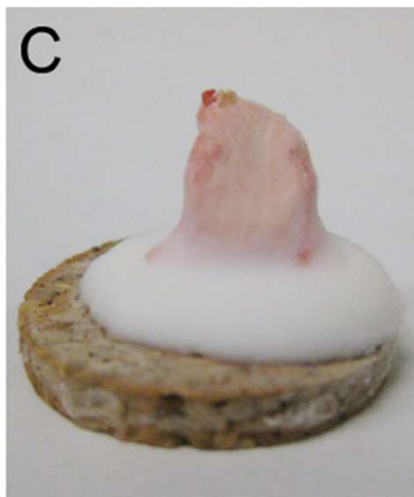


Con ausilio di pinze
lunghe il campione
sul supporto viene
immerso nel becker
per il congelamento
(in figura C)





Conservare temporaneamente i campioni congelati in un dispositivo di raffreddamento a schiuma coperto di ghiaccio secco continuando a congelare altri campioni



Avvolgere i singoli campioni in un foglio di alluminio etichettato, sigillarli in un sacchetto di plastica, metterli in una scatola del congelatore. Conservare a -80°C .



Video Tutorial delle fasi di congelamento

<https://www.jove.com/video/51586/tissue-triage-and-freezing-for-models-of-skeletal-muscle-disease>

Durante la lezione telematica

TAGLIO AL CRIOSTATO



Per il taglio dei pezzi fissati con congelamento viene utilizzato un particolare microtomo congelatore che differisce dai comuni microtomi in quanto il campione da sezionare e la lama di taglio vengono entrambi raffreddati in una camera termostata a valori variabili da -18°C – 30°C in modo da mantenere una maggiore consistenza del campione .

IL CRIOSTATO

Parti esterne del criostato



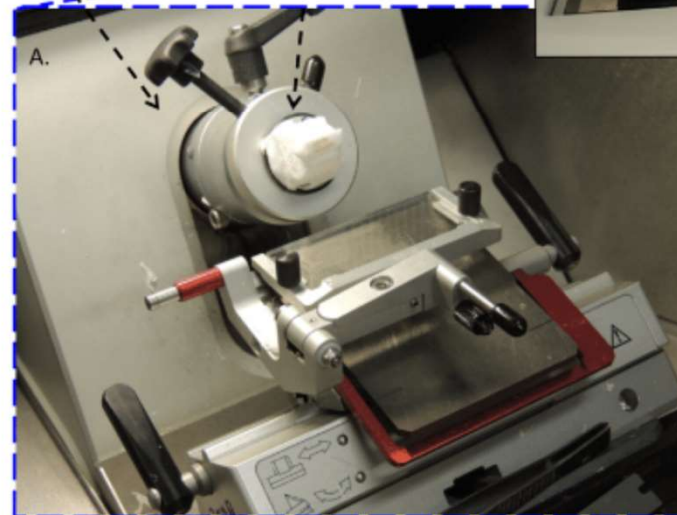
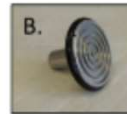
IL CRIOSTATO

Parti interne del criostato



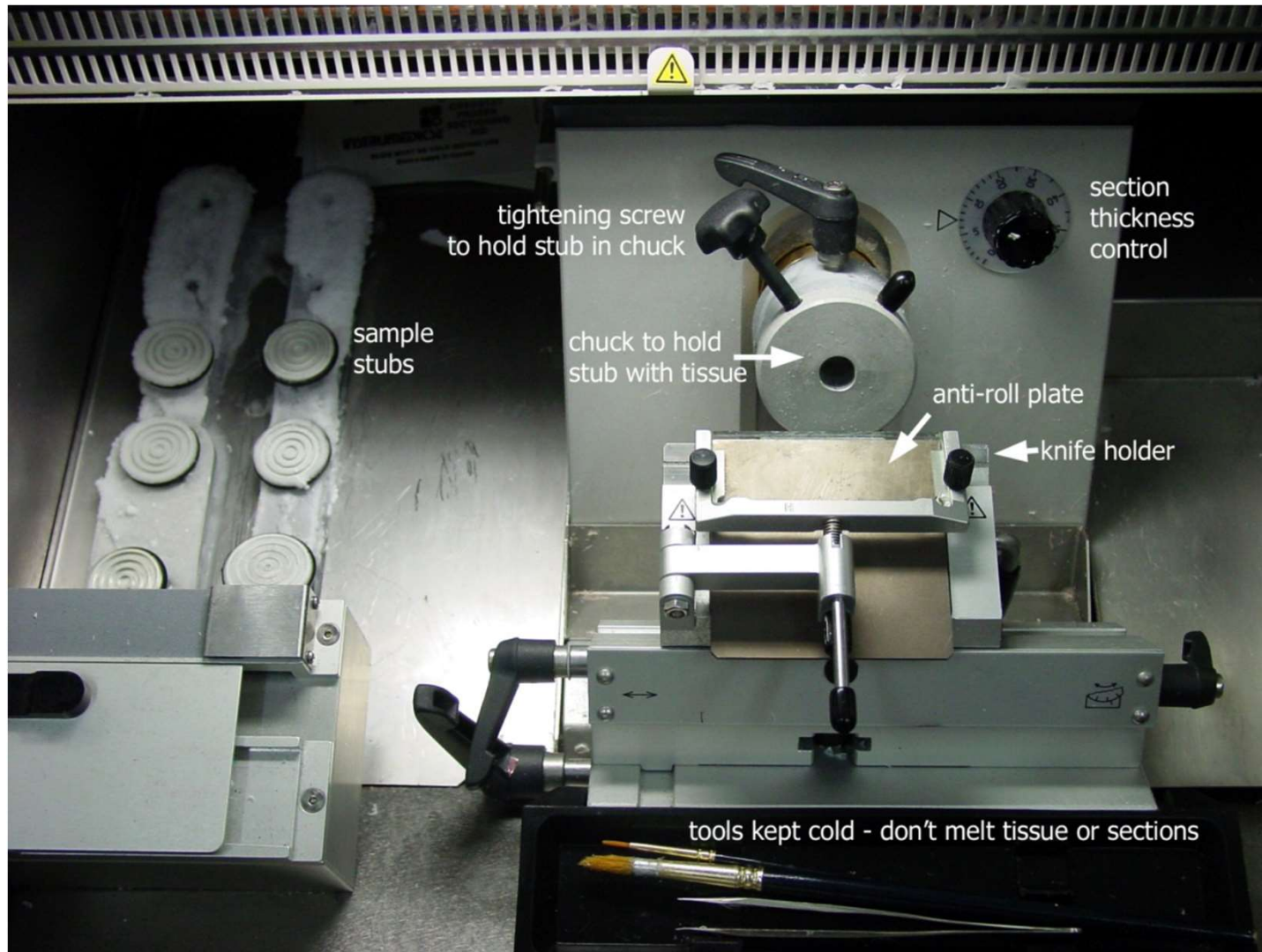
Microtome

Chuck



IL CRIOSTATO

Parti interne del criostato



Il campione congelato viene posto su un portacampione, anch'esso refrigerato, adeso ad esso con una colla termosensibile (OCT). Il campione passerà verticalmente sul filo di lama con inclinazioni variabili. Nella fase di risalita il braccio portacampione si retrarrà per consentire il passaggio del campione.

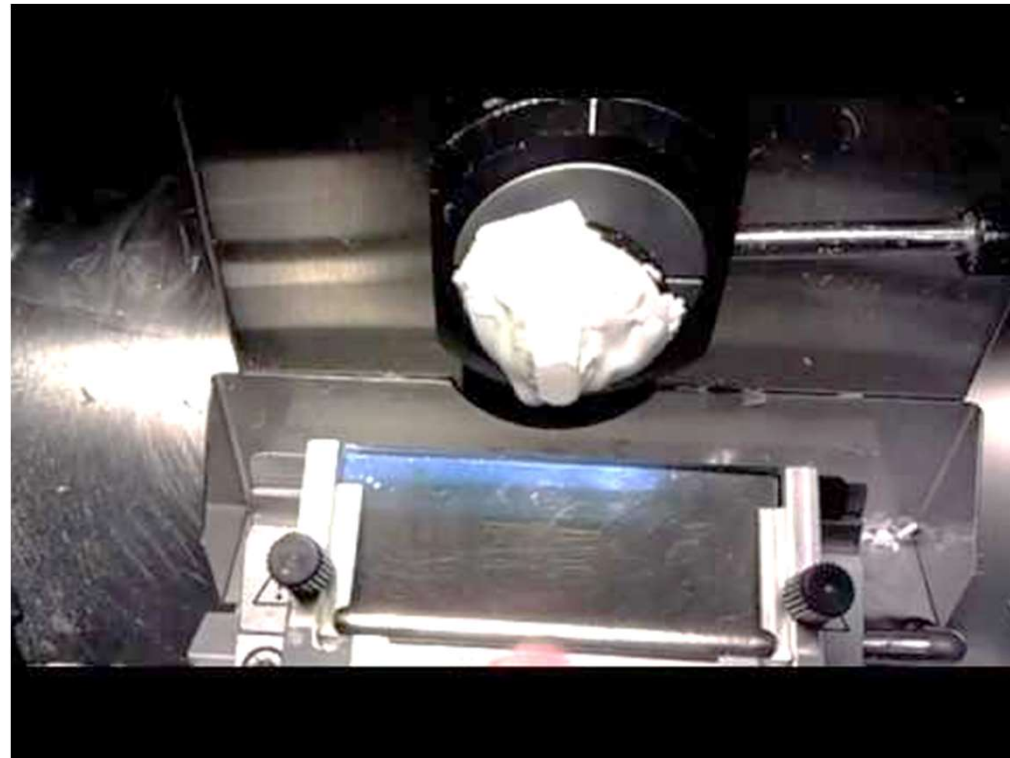
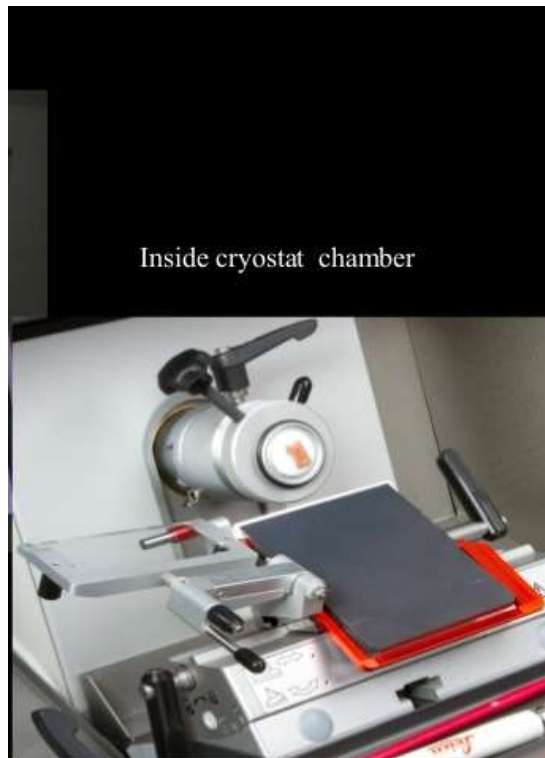
Le sezioni così ottenute andranno direttamente raccolte per adesione su vetrini trattati o meno con adesivi.



TECNICHE DI SEZIONE AL CRIOSTATO

-USO DI PENNELLI

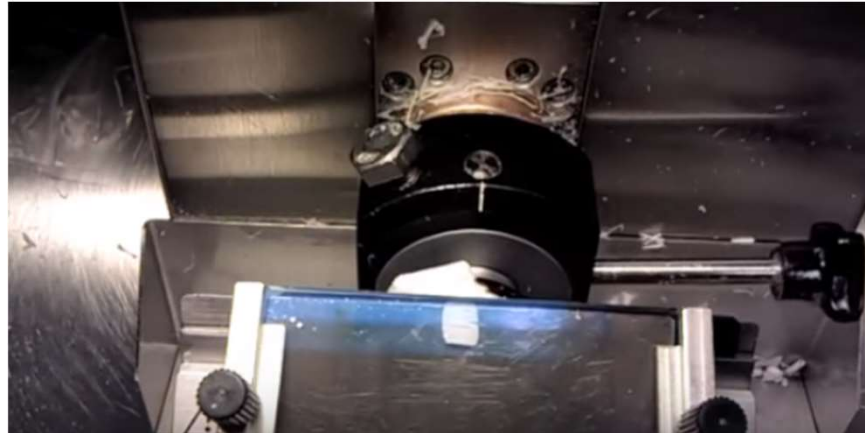
-UTILIZZO DELLA PIASTRA ANTIROLLIO



PIASTRA ANTI-ROTOLO PER SEZIONE CRIOSTATI



Taglio delle sezioni



La piastra antirollio è chiusa

Raccolta delle sezioni sul vetrino

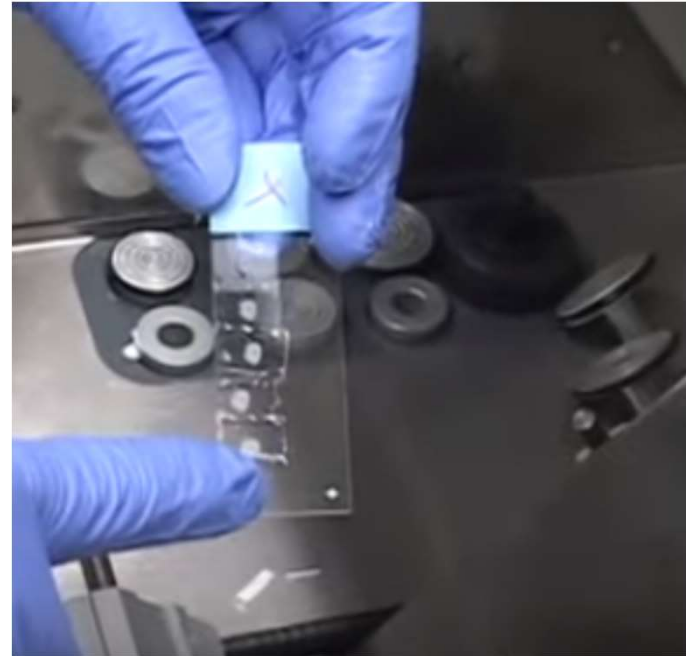


La piastra antirollio è aperta



Raccolta delle sezioni sul vetrino

Il vetrino si trova a temperatura ambiente. La differenza di temperatura tra superficie del vetrino e della sezione si crea una carica elettrostatica che fa aderire la sezione al vetrino



N.B.: Le sezioni non sono seriali...

Ogni sezione viene raccolta sul vetrino

Si possono perdere delle sezioni (quindi parti di tessuto) durante la raccolta

Le sezioni raccolte sul vetrino sono pronte per la colorazione perché già idratate

Video taglio al criostato tutorial

<https://www.youtube.com/watch?v=d43LFVV3h6w>

Durante la lezione telematica

Link video

Video fasi del congelamento del tessuto tutorial

<https://www.jove.com/video/51586/tissue-triage-and-freezing-for-models-of-skeletal-muscle-disease>

https://www.youtube.com/watch?v=L09teZ9mm_Y

Video taglio e raccolta delle sezioni al criostato tutorial

<https://www.youtube.com/watch?v=d43LFVV3h6w>

<https://www.youtube.com/watch?v=tA7S75MFdNk>

<https://www.youtube.com/watch?v=Gwrp40kxDMk>