

# LABORATORIO DI TECNICHE CITOLOGICHE, MORFOLOGICHE E MORFOMETRICHE

**Strumenti di indagine  
e metodi di studio  
delle cellule**

# Strumenti di indagine delle cellule

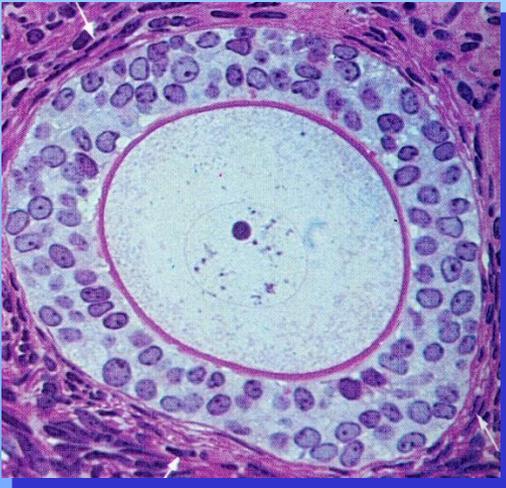
1. Metodi diretti all'analisi strutturale

→ in vivo

→ su cellule fissate

1. Metodi diretti all'analisi delle funzioni → in vivo

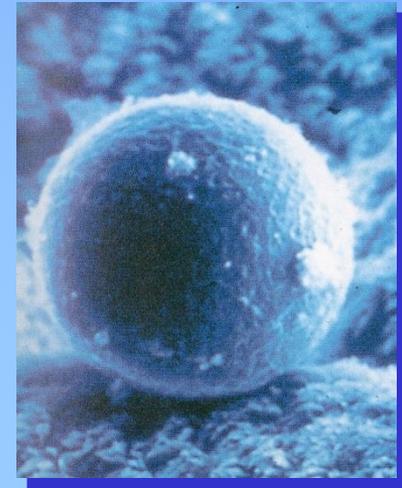
# Analisi strutturale



Follicolo X 200



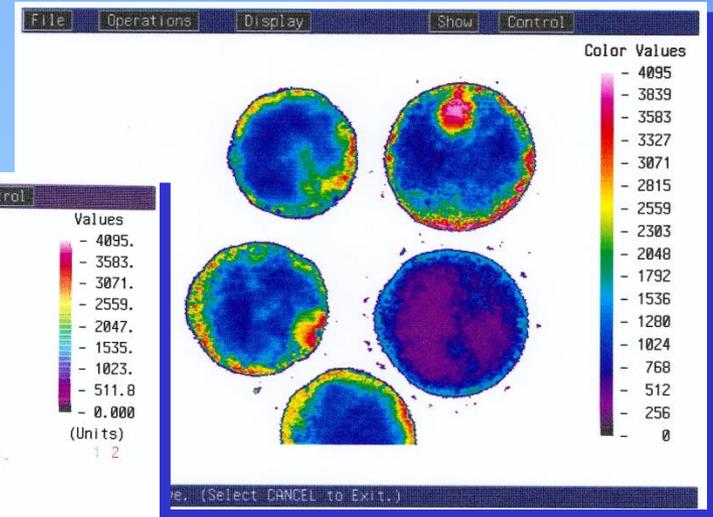
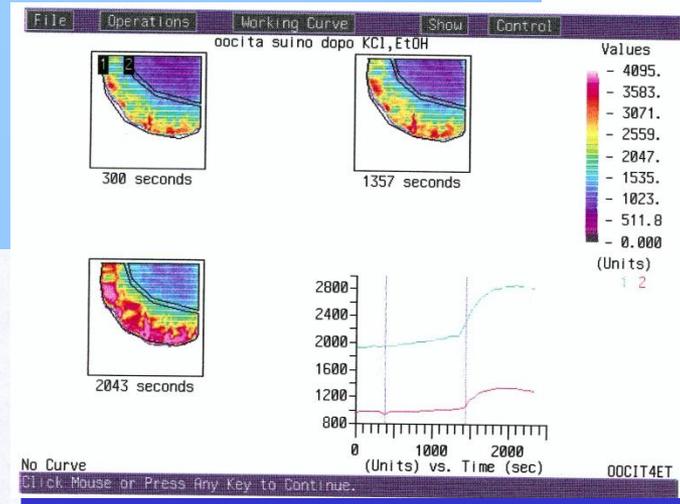
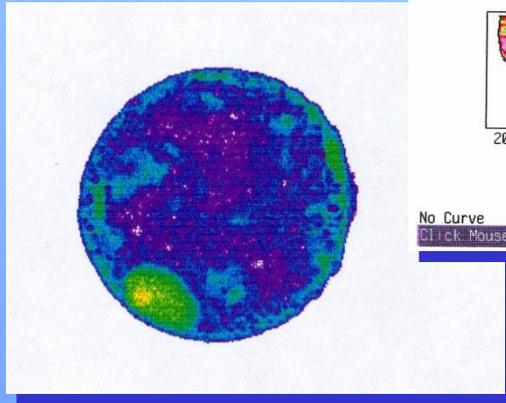
Oocita X2000



Oocita X2000

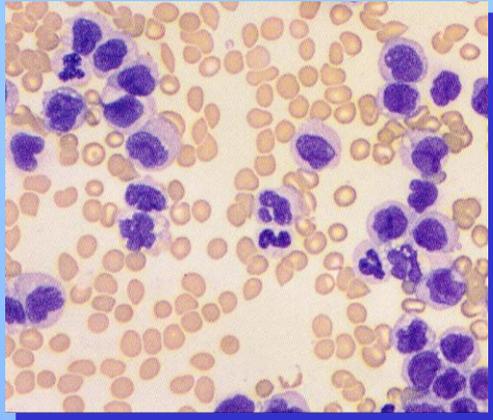
Tende a definire la **forma**, le **dimensioni** e la **densità** delle cellule e delle loro parti quali organelli o specializzazioni della superficie cellulare.

# Analisi funzionale



Cerca di definire le modalità con cui i tessuti, le cellule e i loro costituenti subcellulari interagiscono nel complesso dei fenomeni dinamici che garantiscono la vita biologica.

# Strumenti per l'analisi morfologica e strutturale



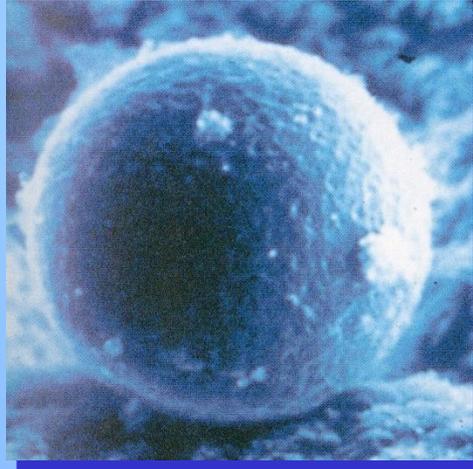
Striscio di sangue X 100



Striscio di sangue X400

Lo studio dei caratteri morfologici della quasi totalità delle cellule e dei costituenti intracellulari è possibile a condizione di ingrandire al MO od al ME degli oggetti al di sotto del limite di visibilità dell'occhio umano (0.2mm)

# Strumenti per l'analisi morfologica e strutturale



Eccezione alla regola!

# Strumenti per l'analisi morfologica e strutturale

**Ingrandimento,  
potere di risoluzione e  
contrasto**

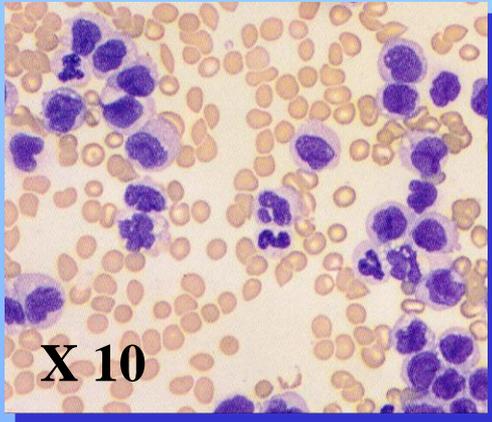
Una immagine ingrandita consentirà di discriminare gli elementi costitutivi presenti nell'oggetto in funzione del potere di risoluzione dipendente dallo strumento ed in funzione del contrasto dipendente dall'oggetto osservato.

# Strumenti per l'analisi morfologica e strutturale

- **Ingrandimento**
- **Potere di risoluzione**
- **Contrasto**

Rappresentano i tre parametri essenziali a cui si deve far riferimento osservando preparati biologici sfruttando le tecniche microscopiche.

# Ingrandimento



Rappresenta il rapporto fra la dimensione dell'immagine ottenuta con qualsivoglia strumento e la dimensione reale dell'oggetto.

# Ingrandimento vs potere risoluzione

Aumentando l'ingrandimento oltre un certo limite è possibile osservare che non si distinguono i particolari dell'immagine; non cresce il potere di risoluzione.



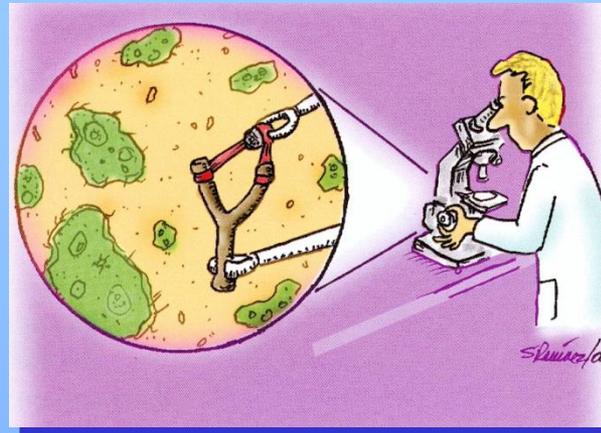
Non si possono distinguere come separati due punti che distano fra loro meno di 0,2  $\mu\text{m}$

# Potere di risoluzione

Il potere di risoluzione del microscopio ottico arriva circa a  $0.2 \mu\text{m}$  (200 nm)

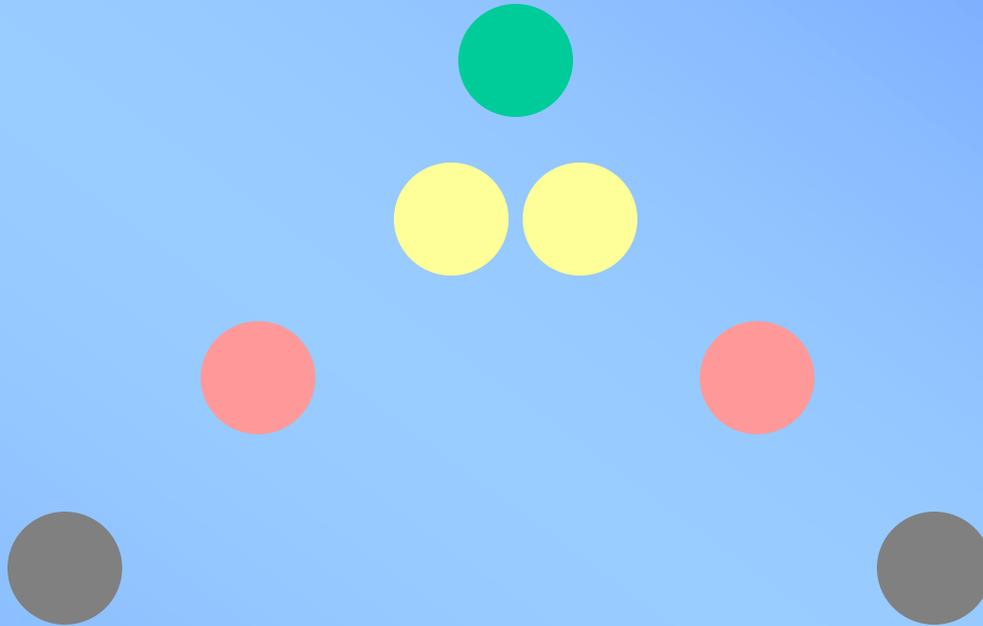
Non si possono risolvere oggetti distanti meno di  $0.2 \mu\text{m}$

Il limite di risoluzione del microscopio elettronico è  $0,2 \text{ nm}$



Rappresenta la capacità di un sistema ottico (occhio, lente, microscopio) di apprezzare come distinte le immagini di due punti vicini fra loro.

# Potere di risoluzione



E' la distanza minima alla quale due punti si apprezzano come distinti.

# Potere di risoluzione

0,2 mm



Occhio umano

0,2  $\mu\text{m}$



Microscopio  
ottico

0,2 nm



Microscopio  
elettronico

# Potere di risoluzione: formula di Abbe

$$\text{Potere di Risoluzione (in } \mu\text{m)} = \frac{\lambda}{2 n \text{ sen } \alpha}$$

*Sen*  $\alpha$  = metà dell'ampiezza angolare del cono di raggi raccolti dalla lente dell'obiettivo provenienti da un punto rappresentativo del campione (poiché l'ampiezza massima è 180°, *sen*  $\theta$  vale al massimo 1)

$n$  = l'indice di rifrazione del mezzo (solitamente aria o olio) che separa il campione dalle lenti dell'obiettivo e del condensatore

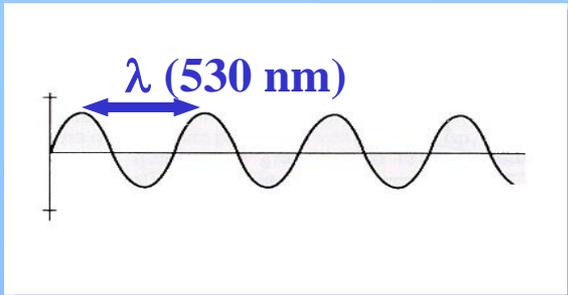
$\lambda$  = la lunghezza d'onda della luce impiegata (per quella bianca si assume comunemente la cifra 0,53  $\mu\text{m}$ )

$\lambda$  = lunghezza d'onda della luce

$n$  = indice di rifrazione del mezzo

*Sen*  $\alpha$  = apertura numerica delle lenti

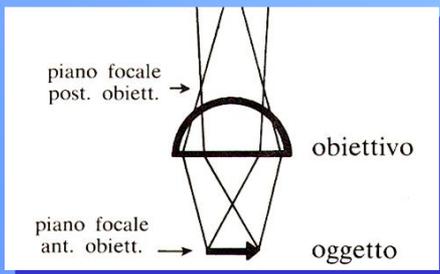
# Variabili del potere di risoluzione



Lunghezza d'onda della luce



Indice di rifrazione del mezzo (aria, olio)

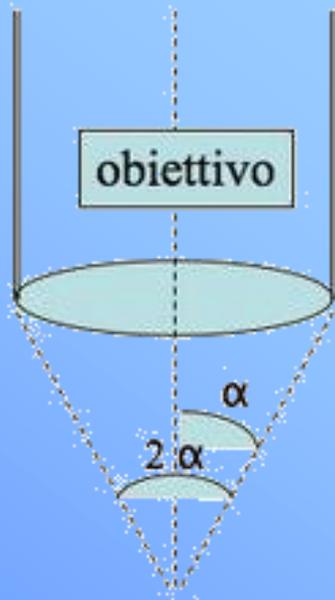


Apertura numerica della lente frontale

# Potere di risoluzione: formula di Abbe

$$\text{Potere di Risoluzione} = \frac{\lambda}{2 n \sin \alpha}$$
$$\text{Apertura numerica (A.N.)} = n \sin \alpha$$

$\lambda$  = lunghezza d'onda della sorgente luminosa



$\alpha$  = semiangolo del cono di luce che penetra nell'obiettivo

$\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$  (v.m. 550 nm circa)

$n = 1,53$  (olio immersione)

$\alpha = 70^\circ$

$$\text{P.R.} = \frac{550 \text{ nm}}{2 \times 1,53 \times \sin 70} = \frac{550 \text{ nm}}{2,75} \cong 200 \text{ nm}$$

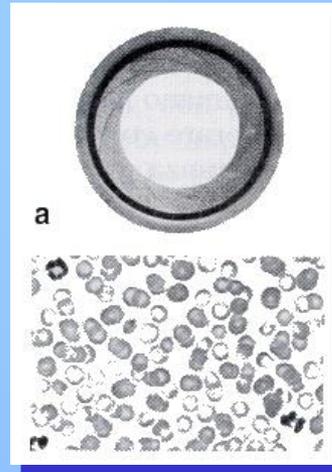
# Contrasto

Il **contrasto** in un'immagine è il rapporto o differenza tra il valore più alto (punto più luminoso) e il valore più basso (punto più scuro) della luminosità nell'immagine

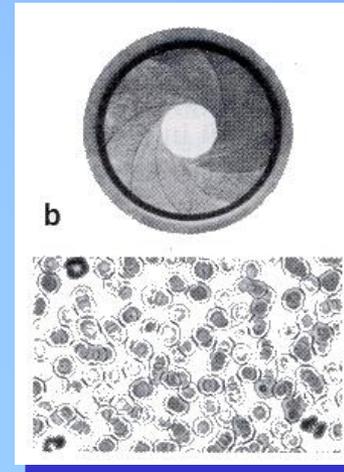


# Contrasto

Il contrasto può dunque essere influenzato dalla quantità di luce indirizzata sul preparato ed assorbita dallo stesso.



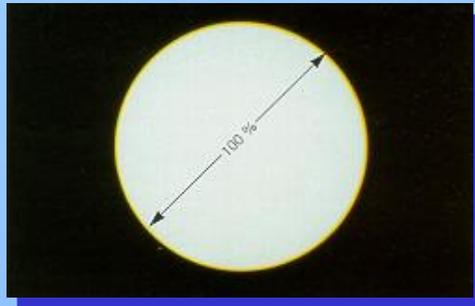
Diaframma aperto



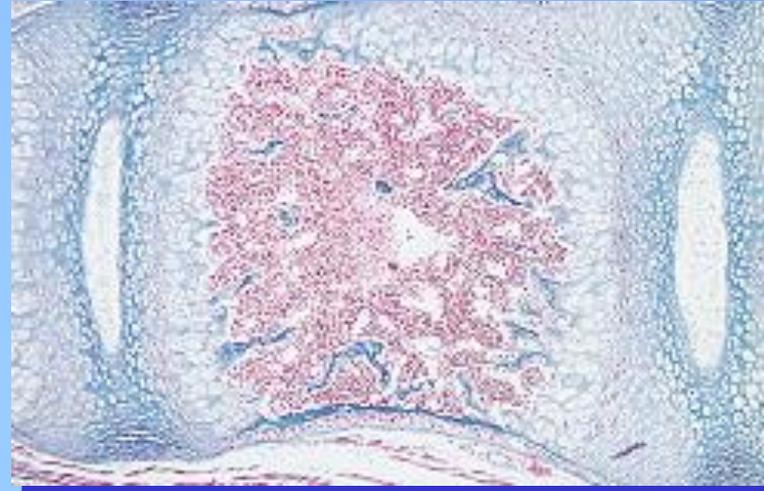
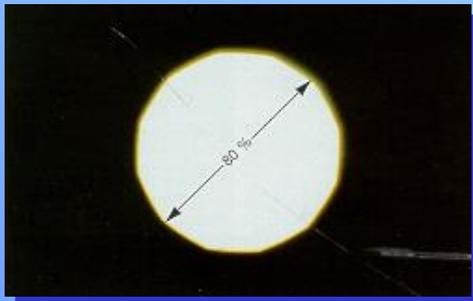
Diaframma chiuso

I campioni biologici hanno basso contrasto a causa dell'elevata idratazione ed all'aumentare della luce incidente manifestano un differente assorbimento dei fotoni (o elettroni) da parte dei differenti punti dell'oggetto.

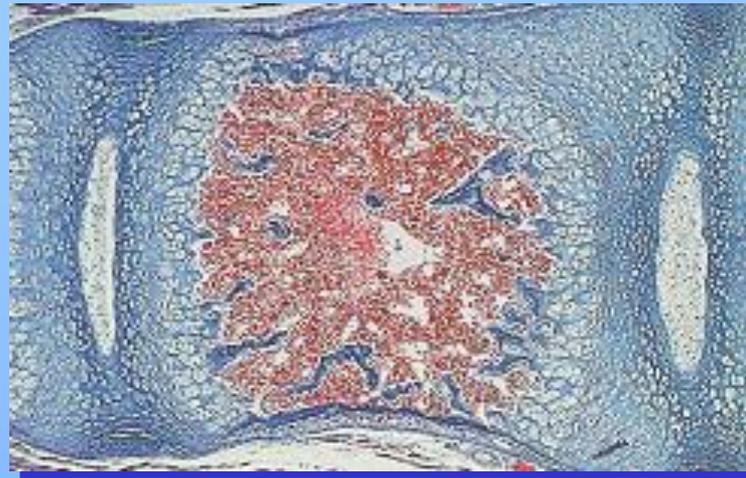
# Contrasto



Diaframma di apertura



Diaframma  
aperto



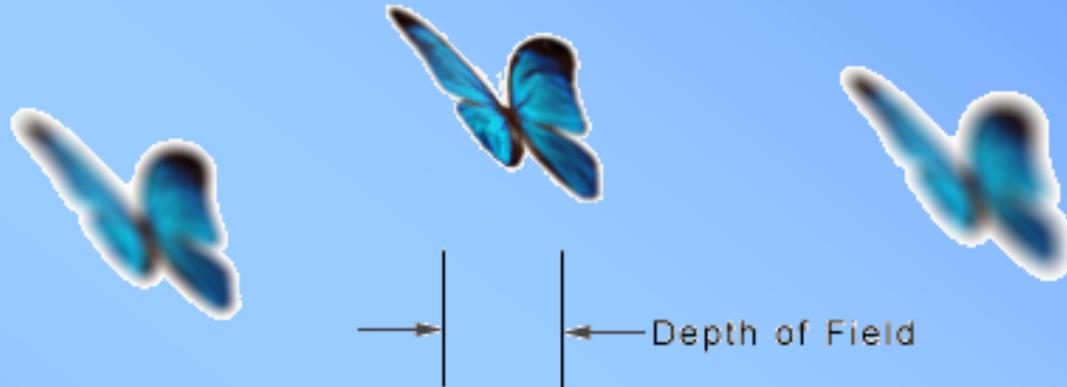
Diaframma  
chiuso

# Contrasto e risoluzione

Contrasto e risoluzione sono inversamente proporzionali ed il miglioramento dell'uno inficia sull'altro.

È sempre necessario trovare un compromesso dipendente dal risultato desiderato.

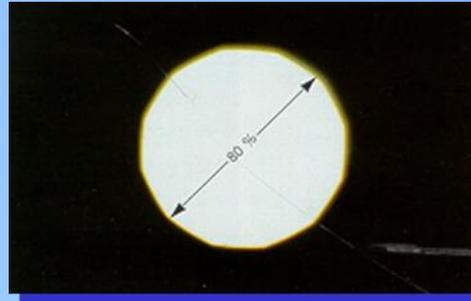
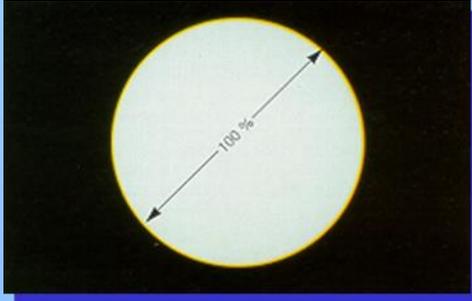
# Profondità di campo



La **profondità di campo nitido** o semplicemente **profondità di campo** (abbreviato in PdC o DoF ) è la distanza davanti e dietro al soggetto principale che appare nitida (a fuoco).



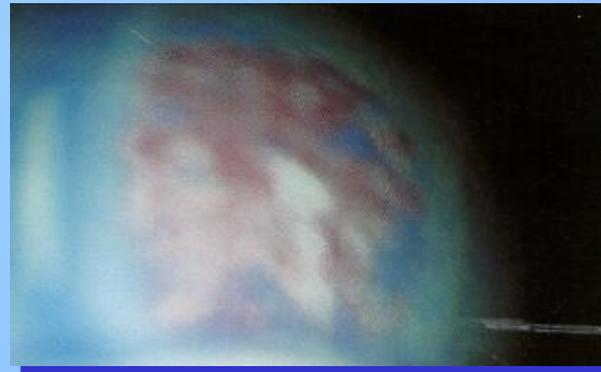
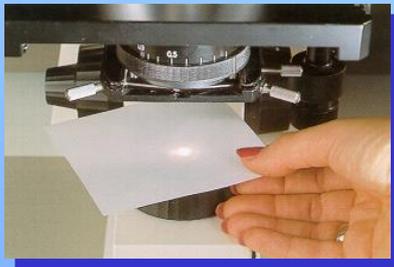
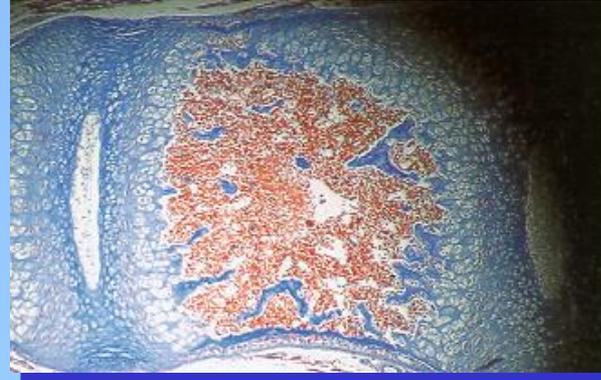
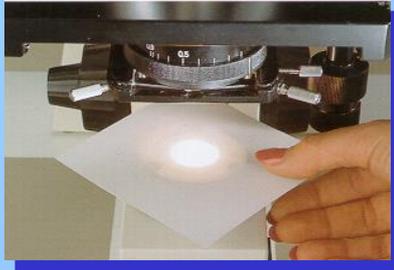
# Profondità di campo



Il formato del diaframma di apertura influisce anche sulla profondità di campo:

- sx) la profondità di campo è estesa (lo sfondo e il soggetto sono nitidi)
- dx) la profondità di campo è ridotta (il soggetto è nitido, ma lo sfondo è sfuocato)

# Profondità di campo



Più si stringe il diaframma più il fascio ottico di formazione dell'immagine si stringe e aumenta così lo spessore dell'oggetto riprodotto.

In questo modo si riduce la risoluzione.