

LA MICROSCOPIA ELETTRONICA NELLA RICERCA BIOLOGICA MODERNA

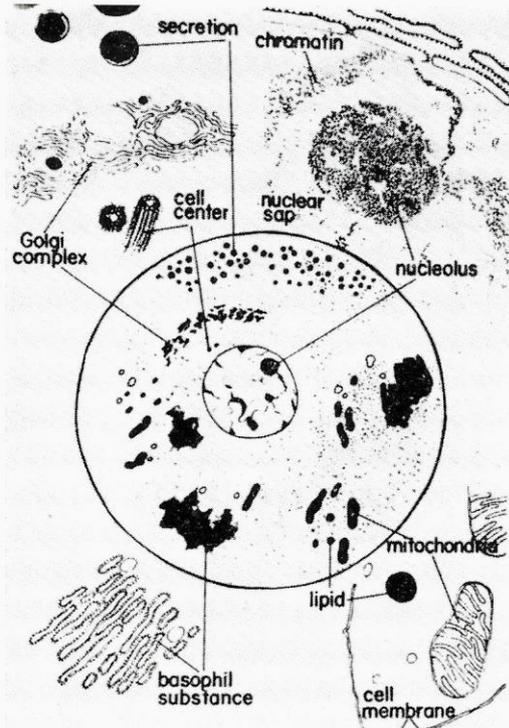
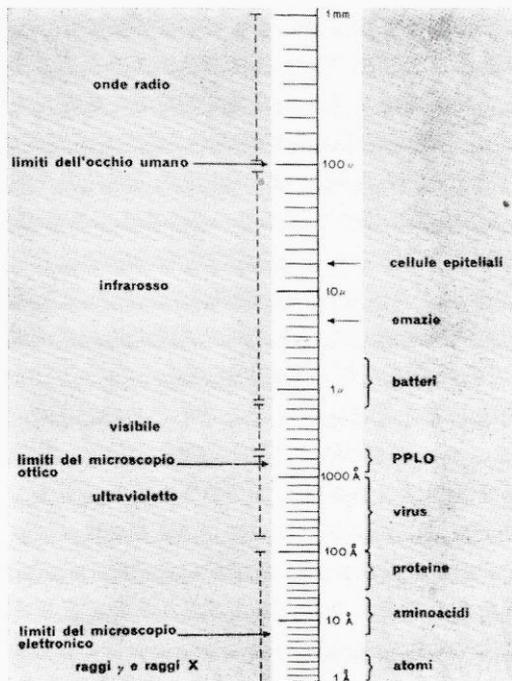
Il primo microscopio elettronico fu completato e presentato da RUSKA in Germania circa quaranta anni fa, e precisamente nel 1931. La realizzazione di tale strumento fu accolta con entusiasmo grandissimo e subito si pensò alle sue applicazioni nel mondo della biologia e della medicina, alle possibilità di scoperta immediata di nuove strutture cellulari, fino ad allora sconosciute. Fu invece molto diversamente, ed il tempo necessario alla sperimentazione del nuovo metodo di investigazione biologica è stato molto più lungo del previsto. Ciò fu in massima parte dovuto alle difficoltà innumerevoli incontrate fin dall'inizio nella preparazione dei campioni: le tecniche istologiche tradizionali, che erano state con pazienza messe a punto fra il 1840 e il 1900 per le necessità della microscopia ottica, non erano più utilizzabili se non con modificazioni notevoli, e così per vari anni i difetti di fissazione e di inclusione, lo spessore eccessivo delle sezioni, la mancanza di contrasto non consentirono di sfruttare quello che era il potere di risoluzione già relativamente elevato dei primi microscopi elettronici. Si dovettero introdurre e mettere a punto metodi di fissazione e di inclusione particolari, oltre che realizzare e lentamente perfezionare apparecchi per il taglio di sezioni estremamente sottili, sì da essere trasparenti al fascio elettronico.

Terminata col superamento delle difficoltà tecniche suddette quella che può essere considerata la sua era pionieristica, la microscopia elettronica ha successivamente avuto nel corso degli ultimi die-

ci anni uno sviluppo oltremodo entusiasmante, aprendo manifestamente le porte ad una nuova scienza: quella delle ultrastrutture.

Il microscopio elettronico è così diventato uno degli strumenti indispensabili nelle mani del biologo attuale, il quale è giunto con esso a colmare la grande frattura esistente fra i limiti della microscopia ottica e le nozioni fornite dalla biochimica e dalla biofisica; la microscopia elettronica ha infatti portato a una vera e propria rivoluzione morfologica, ha permesso di rifare l'istologia dei differenti organi a livello submicroscopico, ha evidenziato un mondo in cui morfologia e fisiologia, struttura e funzione, tendono a confondersi nella concezione di una citologia a livello macromolecolare.

La differenza fondamentale fra microscopio ottico e microscopio elettronico, il quale sfrutta l'assai più piccola lunghezza d'onda degli elettroni rispetto a quella della luce, consiste nel potere di risoluzione, che è la possibilità di vedere distintamente due punti separati. Mentre il potere di risoluzione del microscopio ottico è di circa $0,2 \mu$, insufficiente quindi per la visione della maggior parte dei componenti cellulari, di dimensioni molto minori, quello di un buon microscopio elettronico è inferiore a 10 \AA . La fig. 1 illustra chiaramente i limiti dell'occhio umano, del microscopio ottico e di quello elettronico, rapportati direttamente alle dimensioni di differenti sistemi biologici. La fig. 2 rappresenta schematicamente una cellula animale, al centro osservata con il microscopio ottico, mentre nei set-



(Da « General Cytology » di De Robertis, Nowinsky, Saez).

tori laterali sono evidenziate le strutture della stessa cellula osservate con il microscopio elettronico.

La conoscenza della organizzazione della cellula è così oggi sempre più vasta e più completa, ogni suo organulo accanto a una fine struttura ha un preciso significato funzionale ed è formato da numerosi altri costituenti composti di poche molecole soltanto che rappresentano a loro volta piccole unità morfologiche e funzionali. Sappiamo che la sede della memoria genetica e dell'informazione biochimica è il nucleo, ben differenziabile nelle sue varie strutture submicroscopiche, dai granuli di DNA cromatinico a quelli di RNA nucleolare, e pur ancora non completamente studiato; che il substrato morfologico degli avvenimenti biochimici che portano allo svolgimento della funzione respiratoria ed al rifornimento di energia è rappresentato dalle diverse membrane, compartimenti e granuli specifici di quei piccoli corpi citoplasmatici che sono i mitocondri; che il luogo di sintesi delle proteine della cellula sono piccolissimi

granuli, i ribosomi, spesso in rapporto stretto con le membrane del reticolo endoplasmatico, le cui cavità rappresentano un sistema di comunicazione intracellulare lungo il quale sembra avvenire l'apporto di materiale necessario alla cellula o la distribuzione di prodotti da essa fabbricati.

E' questa possibilità di localizzare con precisione nella cellula le sue unità funzionali specializzate l'acquisizione fondamentale che ci ha portato la microscopia elettronica. La complessa popolazione delle strutture intracellulari è la base dello studio quotidiano del microscopista elettronico, che giunge ad esse attraverso la osservazione di sezioni di 200-300 Å di spessore, ottenute da blocchetti di tessuto delle dimensioni di circa 1 mm³. E' tutto un mondo di cose estremamente piccole, al quale chi vi si dedica deve adattarsi con una psicologia adeguata. Desidero a questo proposito segnalare che gli italiani hanno senza dubbio mostrato una vera predisposizione per questa particolarissima tecnica, che richiede conside-

revole precisione, finezza di manualità ed anche un certo senso estetico nella ricerca di immagini ottimali; e infatti oggi in Italia, pur avendo iniziato notevolmente in ritardo rispetto ad altri Paesi, si è raggiunto da parte di più laboratori un livello tecnico e scientifico ragguardevole, ormai ben riconosciuto in campo internazionale.

Precisati, se pure molto brevemente, i notevoli progressi compiuti ed i traguardi raggiunti della microscopia elettronica, è necessario ora sottolinearne i principali limiti.

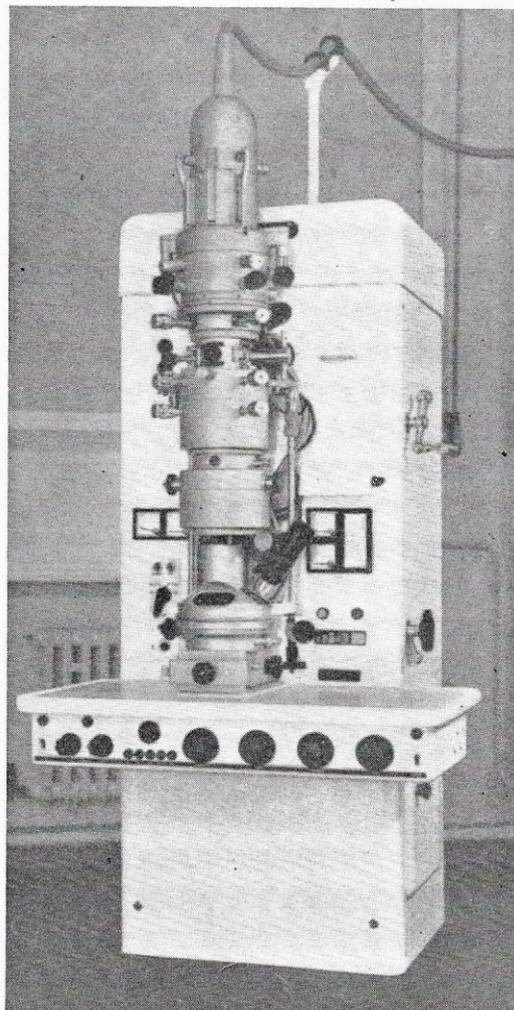
Anzitutto è indispensabile tenere presente che le dimensioni dei frammenti compatibili con una fissazione ed una inclusione soddisfacenti fanno sì che, anche esaminando un grande numero di blocchetti, le cellule osservate rappresentino sempre un campione limitatissimo della massa dell'organo oggetto di studio. Ciò assume particolare significato negativo negli studi di patologia, dove, sia nel caso di materiale trattato sperimentalmente che in quello di frammenti biotipici, la valutazione delle variazioni osservate è quasi sempre soggettiva e tutt'al più semi-quantitativa, senza possibilità alcuna di realizzare dati statistici.

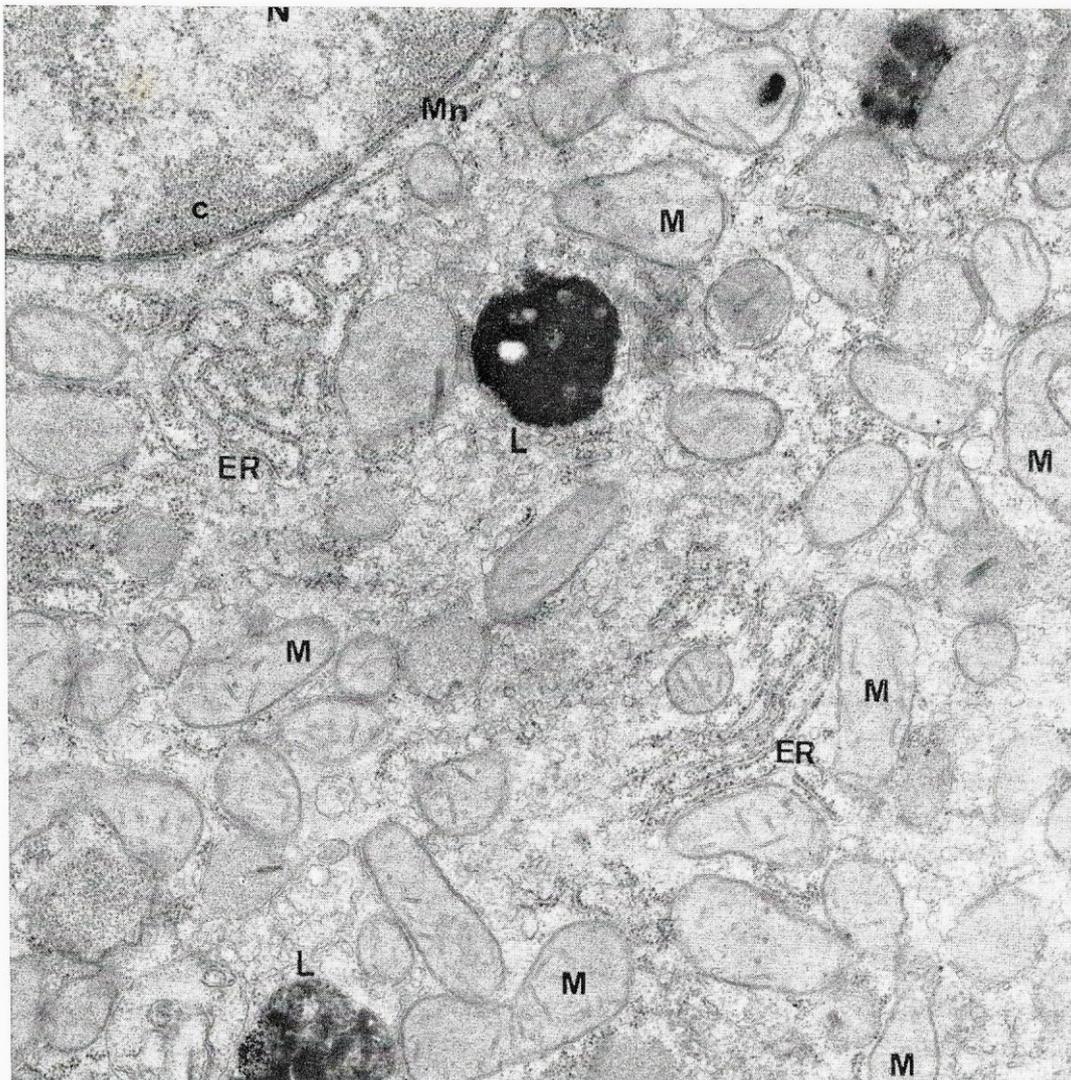
In secondo luogo la maggior parte delle osservazioni è puramente descrittiva, la sola indagine morfologica, pure a questi livelli, rimane statica e fine a se stessa, se non è affiancata e dinamicizzata da altre metodiche complementari che permettano di correlare l'organizzazione spaziale delle strutture subcellulari con il loro contesto fisiologico e biochimico. In tale senso sono state elaborate negli ultimissimi anni ed oggi sono in continuo se pur lento sviluppo nuove tecniche, in particolare di citochimica e di autoradiografia, utilizzabili nell'ambito dell'analisi ultrastrutturale.

La citochimica si propone la diagnosi di natura chimica dei differenti costituenti cellulari, portando a localizzare con esattezza a livello molecolare il maggior numero possibile di sostanze biologicamente attive. Risultati stimolanti sono già stati ottenuti applicando alla microscopia elettronica i metodi della istoenzimologia,

la maggioranza dei quali può essere considerata quali «metodi di colorazione», nel senso che un prodotto opaco agli elettroni si deposita nei punti della cellula sede di attività enzimatiche quale risultato dell'azione dell'enzima su uno specifico substrato. Naturalmente numerosi sono i problemi tecnici da tenere in considerazione per la validità del risultato finale: l'enzima deve essere fissato nella posizione che occupa in vivo senza essere inattivato, il tessuto deve essere permeabile sia al substrato che al reattivo «colorante», infine fra il prodotto della reazione enzimatica ed il colorante si deve formare un composto insolubile nei reattivi successivamente utilizzati per

Microscopio elettronico Siemens Elmiskop I.





Particolare di una cellula di fegato osservata col microscopio elettronico (x 25.000).
 N = nucleo; c = cromatina; Mn = membrana nucleare; ER = ergastoplasma; M = mitocondri; L = lisosomi.

la preparazione del tessuto per l'esame col microscopio elettronico, oltre che opaco agli elettroni.

Anche l'autoradiografia, nonostante di nuovo complessi problemi tecnici ne limitino ancora molto l'applicazione, sta diventando metodo insostituibile nel dare alle forme significato funzionale: visualizzando la distribuzione di molecole marcate nelle strutture cellulari ed i cambiamenti di localizzazione dell'isotopo nel tempo, essa permette di affrontare problemi dinamici del metabolismo della cellula. L'osservazione submicroscopica del-

le emulsioni fotografiche poste a contatto intimo con il materiale biologico ha già fornito e sono certo che fornirà sempre più nel prossimo futuro nozioni impossibili ad ottenersi in altro modo.

Tutto quanto detto è ulteriore convalida del concetto ormai di continuo meso in rilievo che morfologia e biochimica, che le scienze della forma e quelle della funzione, devono non solo procedere parallelamente ma fondersi in un mutuo costante rapporto, quale base indispensabile della biologia di oggi e dell'immediato futuro.