
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

PIERGIOVANNI GRIGOLATO

**Applicazione di alcune recenti tecniche istochimiche
e istofisiche alla tradizionale microscopia elettronica
a trasmissione (TEM)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 65 (1978), n.3-4, p.
163–167.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_3-4_163_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Patologia. — *Applicazione di alcune recenti tecniche istochimiche e istofisiche alla tradizionale microscopia elettronica a trasmissione (TEM).* Nota (*) di PIERGIOVANNI GRIGOLATO, presentata dal Socio A. GIORDANO.

SUMMARY. — The X-ray microanalysis technique applied to a conventional transmission electron microscope is presented.

This is a new way for the pathologist to recognize the composition (= the elements) of a definite area in the specimen.

This technique originates from the X-ray fluorescence principle and gives us a qualitative and semi-quantitative analysis: with the simultaneous application of ultrastructural tracers we gain some information on many subjects of ultrastructural pathology.

L'impiego dei traccianti ultrastrutturali è da qualche tempo in fase di studio nel nostro laboratorio con l'intento di trasferirne il carattere segnale ad alcuni importanti argomenti di istopatologia.

In tema di patologia neoplastica, per esempio, le cellule tumorali in sede primitiva e metastatica hanno dimostrato significative modificazioni delle loro caratteristiche di superficie, oggetto di fondamentali ricerche biochimiche.

L'accostamento morfologico alla membrana cellulare normale e neoplastica rappresenta un argomento di grande stimolo anche per l'anatomo patologo che, di fronte ad una serie di interrogativi di natura prevalentemente biochimica e macromolecolare, deve adeguare le sue tecniche « morfologiche » ad esigenze di istochimica ed istofisica ultrastrutturale.

Tra le numerose caratteristiche attribuite al così detto « complesso di membrana », alcune ci sono sembrate di significativa importanza e già da qualche tempo sono oggetto di studi comparativi sistematici. Il primo tema riguarda la permeabilità di membrana che mostra gradienti importanti nell'ambito della sdifferenziazione neoplastica, il secondo prende in considerazione i più superficiali componenti di membrana, cui per altro spettano determinanti funzioni anche nell'ambito di numerose reazioni antigene-anticorpo, e che sono noti come glicosio-amino-glicani (GAG).

Con la nuova tecnica del « tannino-ferro cloruro » si sono studiati i gradienti di permeabilità che vengono dimostrati dalla intensa perossidazione dei substrati cui si lega il tannino (glucoside dell'acido meta-digallico) che successivamente reagisce con il ferro cloruro.

Con il metodo al « lantanio nitrato » si tracciano particolari substrati di membrana (epitelio bronchiale ed intestinale) che vengono allontanati da

(*) Pervenuta all'Accademia il 12 settembre 1978.

predigestioni in acetilcisteina: come è noto, essa annulla la positività al PTA di questi componenti di superficie attaccando i legami solforati e permette quindi di interpretare tali substrati di membrana come glicoso-amino-glicani (GAG).

È da ricordare, in tema di traccianti, un metodo ben collaudato, di non più recentissima introduzione, e a cui spetta il merito di aver aperto un capitolo nuovo per la moderna topocitochimica ultrastrutturale: il Potassio-

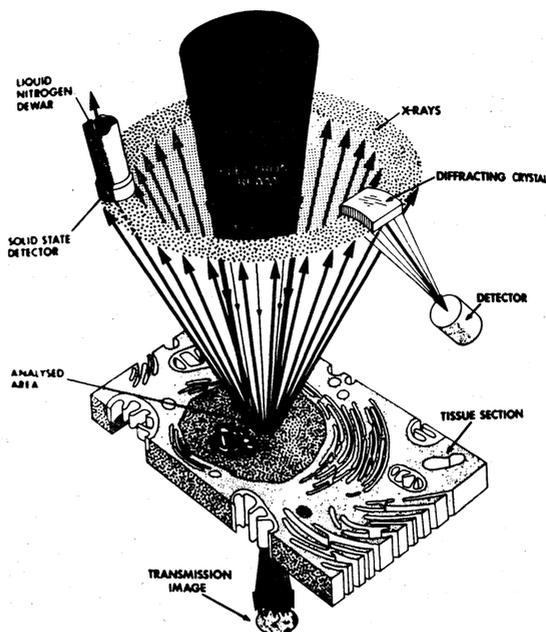


Fig. 1. - Il fenomeno della « fluorescenza » dei raggi x : il fascio incidente di elettroni genera un « cono di emissione » raccolto dal rivelatore. (Da CHANDLER J. A.).

Piroantimonato è il più collaudato dei precipitanti (ioni Calcio, Magnesio, ...) e ci permette di localizzare alcuni substrati di membrana la cui importanza ricorre in numerosi temi di patologia ultrastrutturale.

A queste tecniche istochimiche ultrastrutturali che hanno confermato l'incremento complessivo di permeabilità delle membrane cellulari neoplastiche, la riduzione degli ioni Calcio e significativi riarrangiamenti del complesso di membrana anche nella componente superficiale riferibile ai glicoso-amino-glicani, oggi possiamo affiancare una nuova metodologia istofisica.

È noto che ogni campione durante il « bombardamento elettronico » emette un debole segnale sotto forma di raggi x , che può essere captato da un opportuno rivelatore e successivamente amplificato.

Siamo nel campo della spettrometria di fluorescenza dei raggi x o più brevemente spettrometria x che studia le energie di emissione dovute alla sollecitazione di diverse orbite elettroniche (K, L, M).

Il segnale x che ogni campione emette può essere costituito da una sola gamma di energia (sostanze pure), ma più sovente è rappresentato da un vasto spettro di energie (segnale modulato) di varia intensità cui corrispondono segnali diversi e propri per ciascun elemento costituente.

La spettrometria di massa applicata al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) rappresenta una tecnica relativamente nuova (microanalisi

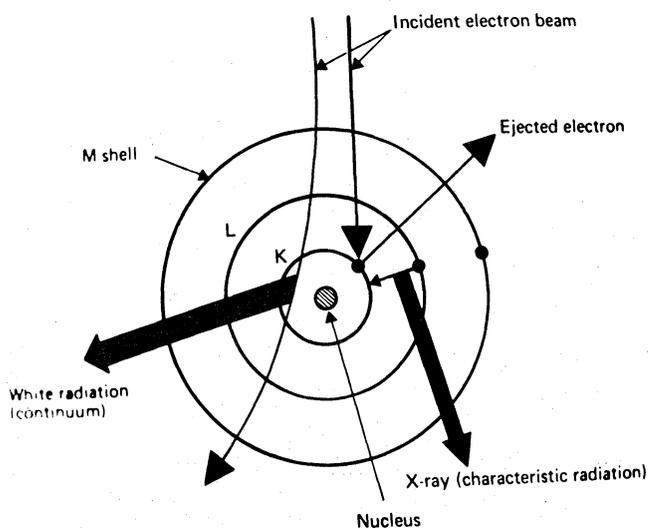


Fig. 2. — Il rapporto tra l'energia del cono di emissione (misurata in ev) e il substrato è dovuto alla sollecitazione di ben precise orbite elettroniche in elementi con un determinato numero atomico. (Da CHANDLER J. A.).

in trasmissione), mentre siamo in possesso di apprezzabili risultati da essa forniti in microscopia elettronica a scansione (SEM) (microanalisi di superficie).

In ogni caso essa può fornire preziose informazioni sulla composizione in « elementi » di singole e ben circoscritte aree cellulari: tali reperti vanno inseriti in un più ampio riscontro istochimico di « sostanze » note realizzando così un valido sistema di ricerca e localizzazione topografica intracellulare.

I primi risultati a nostra disposizione riguardano una serie di controlli su campioni noti e già studiati con la microanalisi di superficie (SEM): essi confermano la riduzione degli ioni calcio lungo le membrane cellulari neoplastiche e sottolineano l'importanza di altri costituenti cellulari che tuttavia si dimostrano assai più variabili nella loro distribuzione e concentrazione rispetto a quanto sembrava di poter dedurre dalla esplorazione di superficie.

Il fosforo, per esempio, pare relativamente più abbondante in sede nucleare (Tavv. I e II, fig. 1) mentre il cloro si distribuisce in modo più uniforme. Lo zolfo predilige il citoplasma, abbonda nel pigmento melanico di cui rappresenta la quota più significativa.

Di valido aiuto, in questo tipo di indagine, si dimostrano i traccianti ultrastrutturali citati nelle due precedenti tecniche istochimiche: sia il ferro cloruro (permeabilità di membrana) (Tav. I, fig. 2), che il lantanio nitrato (glicosio-amino-glicani) (Tavv. I e II, fig. 1) si leggono bene con bande di energie apparentemente prive di interferenza che permettono di compiere analisi qualitative topograficamente assai precise e, con la giusta conside-

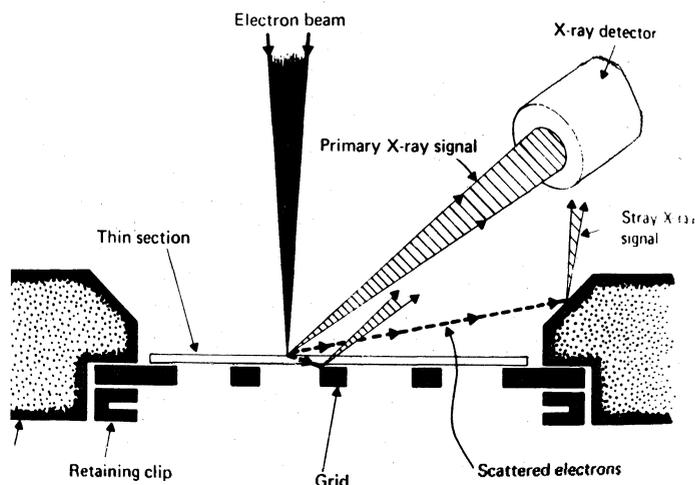


Fig. 3. - La geometria del sistema con i rapporti griglia-cono solido di emissione-rivelatore. (Da CHANDLER J. A.).

razione di alcuni parametri di riferimento, prospettano la possibilità di valutazioni quantitative del substrato in esame. Altrettanto buono è il segnale fornito dai precipitati indotti dal K piroantimonato per la visualizzazione degli ioni calcio (Tav. II, fig. 2).

Numerose sono le difficoltà tecniche della spettroscopia x in microscopia elettronica a trasmissione e pur tralasciando i problemi relativi alla scelta e al mantenimento a « freddo » del rivelatore al silicio-litio (Si-Li detector) ed allo studio della complessa geometria del sistema formato dal microscopio elettronico a trasmissione con lo spettrometro di massa, un punto critico è rappresentato dalla preparazione delle sezioni adibite alla indagine microanalitica.

Il materiale esaminato nel nostro laboratorio è tutt'ora rappresentato da campioni inclusi in resina che purtroppo contiene tracce, a volte non trascurabili, di elementi anche importanti: di questi il cloro è uno dei più abbondanti e della sua concentrazione in qualità di « inquinante » si deve in ogni caso tenere conto.

Queste considerazioni introducono altre possibili varianti tecniche nella preparazione dei campioni quali, per esempio, la ultracriotomia.

Si tratta, in ogni caso, di una metodica istofisica di recente introduzione che, per quanto delicata e di non semplice interpretazione, può fornire un valido contributo al morfologo nella interpretazione di numerosi temi di patologia ultrastrutturale.

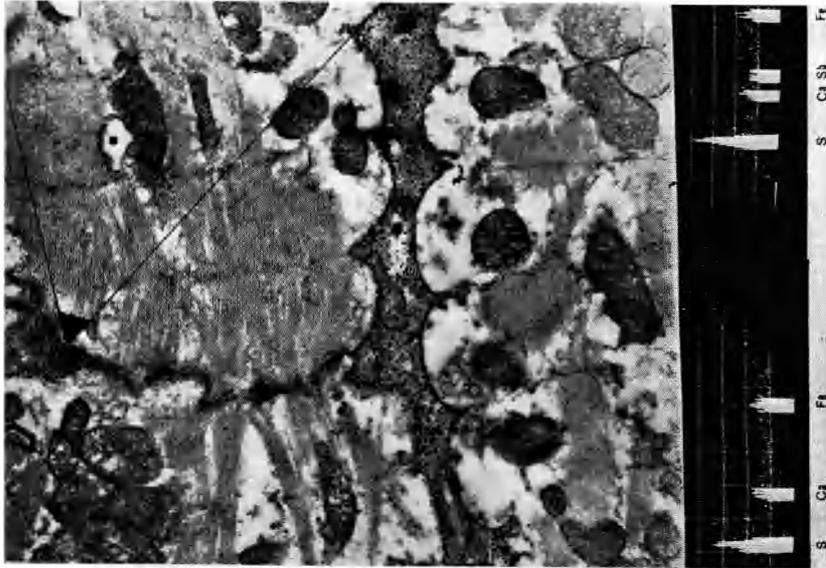


Fig. 2.

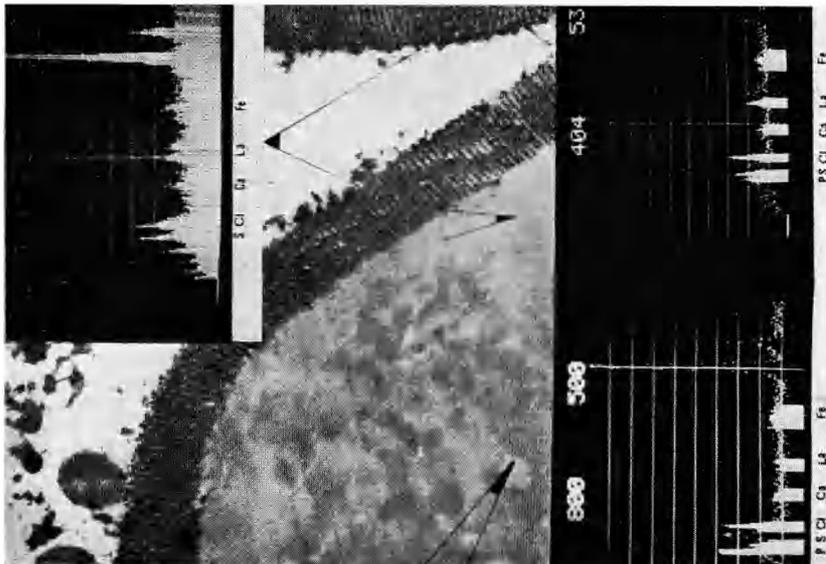


Fig. 1.

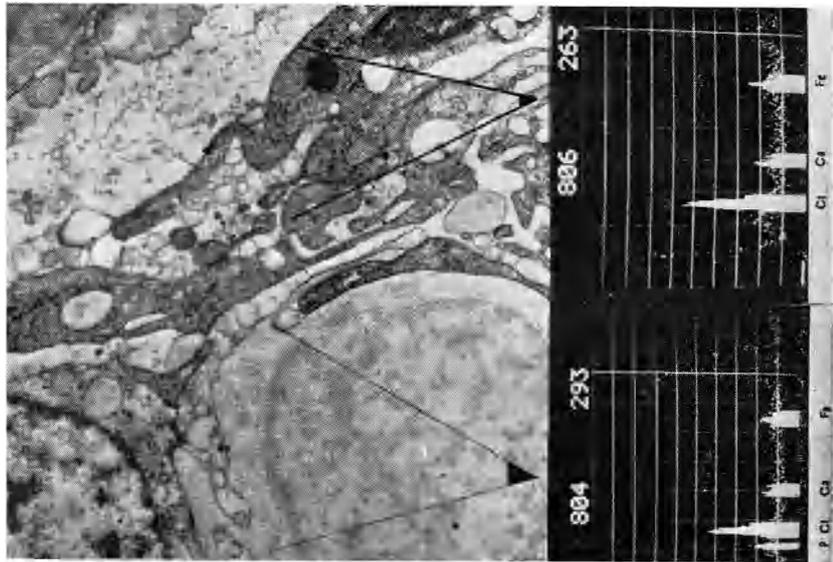


Fig. 2.

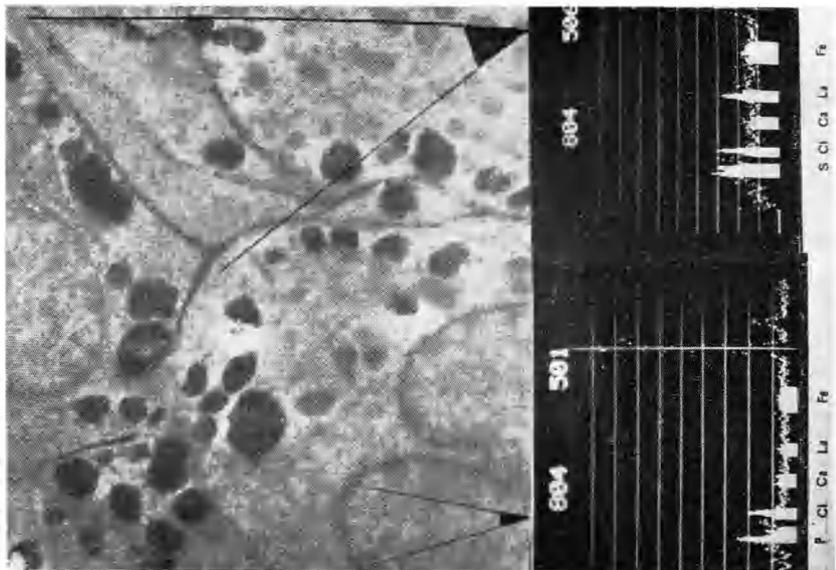


Fig. 1.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. A. CHANDLER e S. BATTERSBY (1976) - *X-ray microanalysis of zinc and calcium in ultrathin sections of human sperm cells using the pyroantimonate technique*, « J. of Histochem. and Cytochem. », 24 (6), 740-748.
- [2] J. A. CHANDLER (1977) - *X-ray microanalysis in the electron microscope*. Ed.: Audrey M. Glauert, North Holland.
- [3] E. MARTHA FEDORKO e F. RICHARD LEVINE (1976) - *Tannic acid effect on membrane of cell surface origin in guinea pig megakaryocytes and platelets*, « J. of Histochem. and Cytochem. », 24 (4), 601-605.
- [4] MATITYAHU SHAKLAI e MEHDI TAVASSOLI (1977) - *A modified technique to obtain uniform precipitation of lanthanum tracer in the extracellular space*, « J. of Hystochem. and Cytochem. », 25 (8), 1013-1015.
- [5] J. A. U. SIMSON e S. S. SPIGER (1975) - *Selective subcellular localization of cations with variants of the potassium (pyro)antimonate technique*, « J. of Histochem. and Cytochem. », 23 (8), 575-598.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Melanoma della coroide (metodo al Lantanio nitrato): l'immagine ottenuta con la cartuccia da microanalisi, reperto costante per questo tipo di indagine, è a basso contrasto e di scarsa risoluzione; lo spettro di destra è riferibile ad una zona comprendente membrane positive al lantanio e premelanosomi ricchi di zolfo. Lo spettro di sinistra riguarda una porzione di nucleo e rivela un relativo incremento del fosforo presumibilmente riferibile alla quota fosforata degli acidi nucleici.
- Fig. 2. - Meningioma (metodo al tannino-ferro cloruro): gradienti di permeabilità della membrana cellulare con elementi chiari frammisti ad altri scuri con spettri di emissione diversi e significativi nella concentrazione del ferro. Lo spettro di sinistra, prevalentemente orientato sul nucleo presenta una evidente banda del fosforo.

TAVOLA II.

- Fig. 1. - Epitelio di rivestimento intestinale (metodo al lantanio nitrato): si registrano tre spettri ottenuti in tre sedi topograficamente diverse della stessa cellula. Lungo l'orletto a spazzola si riconosce il segnale del lantanio e del calcio. Dalla porzione citoplasmatica più esterna, immediatamente sotto l'orletto a spazzola, proviene lo spettro in basso a destra in cui si riconosce ancora il segnale del lantanio mentre quello del calcio è significativamente ridotto. Dalle porzioni più profonde e presumibilmente più vicine all'area nucleare, si ottiene un buon segnale del fosforo mentre del tutto prive di significato sono le bande del calcio e del lantanio.
- Fig. 2. - Miocardio (metodo al Potassio-Piroantimonato): si osservano densi precipitati elettrodensi lungo le membrane cellulari cui corrispondono i grafici di sinistra e di destra: nel primo è stato marcato il picco del calcio, nel secondo sono evidenziati il calcio e l'antimonio.