IL TAGLIO DI PREPARATI BIOLOGICI AL MICROTOMO

PERCHÉ TAGLIARE COSÌ SOTTILE? COME TAGLIARE?

Lorenzo Conti, Milano[1]

1. INTRODUZIONE

I tessuti biologici animali o vegetali sono in genere opachi; di solito la luce percorre[2] agevolmente non più di 100μ all'interno dei tessuti, ma di solito la permeabilità luminosa degli organi è molto minore.

L'unico modo per osservarli in diascopia[3] consiste nel tagliarne una fetta che sia trasparente alla luce[4].

a. Le proprietà ottiche dei tessuti biologici

L'opacità del tessuto è data da fenomeni di riflessione, rifrazione, di assorbimento selettivo della luce da parte di molecole biologiche (primariamente emoglobina, mioglobina, melanina, lipidi, DNA, proteine, ecc.), "scattering"[5] e, per quanto attiene alla microscopia in contrasto di fase, da fenomeni di modifica di fase delle onde luminose che attraversano le varie componenti cellulari del tessuto[6 7 8].

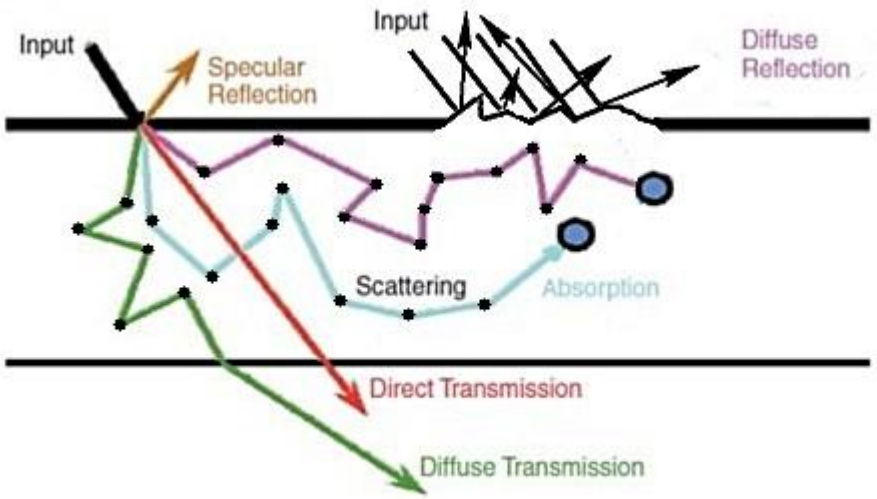


Figura 1 da: Diffuse Optical Tomography (DOT) Modeling and Reconstruction - M. Rajendra Kumar School of Medical Science and Technology, Indian Institute of Technology Kharagpur. (modificato)

- Rifrazione: la rifrazione avviene quando la luce è diretta in modo incidente al confine tra due zone di differente indice di rifrazione. L'indice di rifrazione medio per la maggior parte dei tessuti biologici è di 1,4[9].
- Assorbimento: estrazione dell'energia della luce da parte delle molecole (cromofori). I composti dei tessuti che assorbono energia luminosa sono chiamati cromofori [10]. Avviene quando la frequenza del fotone corrisponde alla frequenza di transizione energetica della molecola assorbente (un elettrone della molecola "cromoforo" assorbe l'energia e la trasforma in vibrazione ed in ultimo in energia termica che viene dissipata). Acqua, emoglobina e lipidi assorbono gli infrarossi vicini, il DNA, l'emoglobina, i lipidi, le proteine, assorbono la banda visibile e gli UV.

Il coefficiente di assorbimento **μa (**per l'area interessata all'attraversamento dei raggi luminosi) è ricavato dall'equazione sottostante:

$$\mu a = \sigma a \cdot N$$

dove **σa** è l'area di effettivo assorbimento lungo la sezione trasversale del tessuto, **N** è il numero di molecole che assorbono la luce per unità di volume ($1/cm^3$)

- Scattering elastico ed anelastico (Raman)[11] [12]: cambio di direzione di propagazione e/o di energia della luce. Lo scattering elastico può essere del tipo Rayleigh (dovuto a particelle piccolissime con diametro < $\lambda/10$) e Lorenz-Mie (dovuto a particelle di diametro uguale o superiore alla lunghezza d'onda λ). Nella cellula le strutture inferiori ad 1 micron e superiori a 0,1 micron sono responsabili di scattering tipo Lorenz-Mie (lisosomi, vescicole, strie delle fibrille di collagene, aggregati macromolecolari); le strutture comprese tra 0,1 micron e 0,01 micron sono responsabili del "Rayleigh scattering". Nei tessuti biologici prevale il fenomeno di scattering sul fenomeno "assorbimento"[13].

- L'anisotropia (**g**) è la misura della capacità del fotone di mantenere una direzione anterograda dopo un evento di scattering. Se il fotone viene deflesso da uno scatter con un angolo θ, la componente della nuova traiettoria sarà data dalla misura del coseno di θ.[14] Il valore di anisotropia (coseno dell'angolo di scattering θ) nei tessuti biologici è circa 0,9[15] e quindi la nuova direzione presa dal fotone sarà anterograda (per l'appunto "anisotropica")[16]. L'effetto pratico dello scattering e dell'assorbimento da parte di una particella su di un raggio luminoso che si propaga in una data direzione consiste in una riduzione dell'intensità luminosa nella direzione originaria del raggio di luce. La luce che è assorbita viene convertita in energia termica, mentre la luce sottoposta a "scattering" mantiene la propria intensità ma si propaga in un'altra direzione. La misura dell'anisotropia dello scattering è data dal "coefficiente **g**" di anisotropia, che rappresenta il valore medio del coseno dell'angolo di scattering. Il valore medio di **g** nei tessuti biologici è 0,69-0,99. [17]

- Modifica di fase[18]: se due treni d'onda provenienti da percorsi differenti arrivano in fase (cioè con le creste dell'onda coincidenti) in un unico punto la luminosità aumenta; se invece sono fuori fase esse interferiscono negativamente tra loro e l'intensità luminosa diminuisce. Quando la luce passa attraverso una cellula, la fase delle onde luminose cambia a seconda dell'indice rifrattivo; quando passa attraverso una parte spessa o densa delle cellula (nucleo) l'onda contiene una componente con fase ritardata di circa ¼ di lambda, differentemente da quanto avviene alla luce che attraversa una parte meno densa o meno spessa, che risulta meno ritardata. Le modifiche di fase delle onde luminose non sono percettibili all'occhio umano[19], che è sensibile solo alla frequenza (colore) e all'ampiezza (intensità) della radiazione luminosa. In realtà, in microscopia a contrasto di fase tra onde di fase differente si ha una modifica dell'ampiezza dell'onda, e quindi della luminosità e del contrasto della stessa[20].

Riassumendo, i tessuti biologici[21] sono dei mezzi ottici semiopachi, nei quali il trasporto della luce è dominato da fenomeni di scattering elastico. Il principale mezzo di scattering è dato dal collagene, con la sua rete di fibre della matrice extracellulare, seguito dai mitocondri e da tutte le strutture intracellulari di dimensione minore della lunghezza d'onda (λ) della luce[22]. Anche le strutture più grandi, come i nuclei delle cellule, possono determinare scattering dei fotoni.

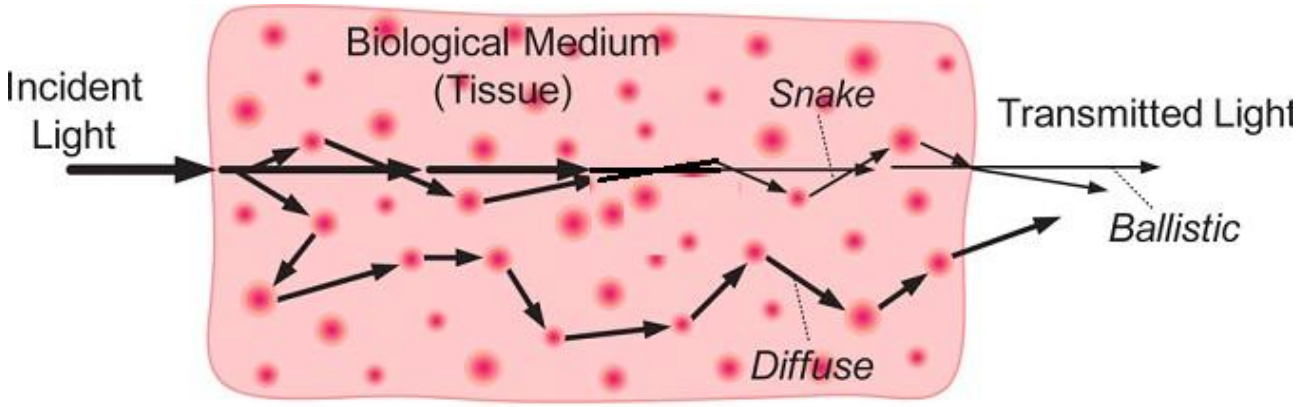


Figura 2 da Jinfeng Yang, Ben Zhang and Yihua Shi - Scattering Removal for Finger-Vein Image Restoration *Sensors*2012, *12*(3), 3627-3640; (modificata)

Dal punto di vista fisico, un raggio di luce incidente sulla superficie di un tessuto biologico si propaga in modo non casuale solamente entro il primo millimetro di spessore; oltre questa profondità, la luce si diffonde nel tessuto in modo caotico perché i ripetuti fenomeni di scattering determinano una randomizzazione della direzione di propagazione del fotone.[23] Il primo millimetro di tessuto, definito "(Foton) Transport Mean Free Path" - ovvero la distanza entro cui prevalgono fenomeni di scattering con propagazione anterograda del fotone, può essere suddiviso in 3 regioni[24]:

1. Il Mean Free Path (MFP): una prima regione di circa 100 μ in cui prevale un comportamento "balistico" del fotone [25], che viaggia in linea retta quasi indisturbato; in realtà non tutti i fotoni viaggiano in linea retta, per cui il restante comportamento fotonico è di scattering Mie e Raleigh;

2. una regione più ampia, compresa tra 0,1 e 1mm (Scattering Mean Free Path) in cui prevalgono i fenomeni di scattering;

3. una regione al di là del millimetro di profondità in cui i fotoni vagano in modo randomico[26]

Oltre questo limite c'è il Mean Absorbtion Lenght (tratto medio oltre il quale si ha un totale assorbimento del fotone) che è di 10-100 millimetri.[27]

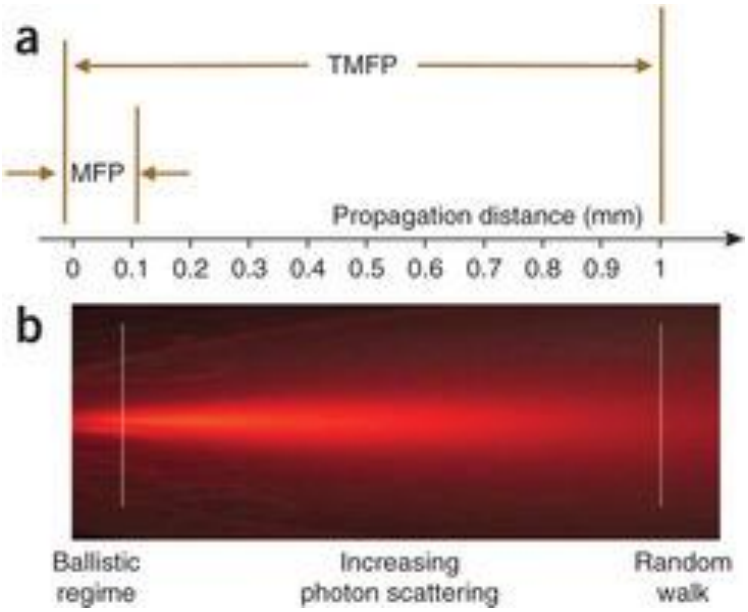


Figura 3 - **Vasilis Ntziachristos - Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology - *Nature Methods* 7, 603–614 (2010)**

Dal punto di vista microscopico i concetti di MFP e TMFP sono importanti perché la propagazione "relativamente indisturbata" del fotone è limitata al TMFP.

Ne deriva che la microscopia convenzionale trova un limite fisico a penetrare al di là del MFP/TMFP; come si è visto, in questa zona i fenomeni di scattering anterogrado ed anisotropia sono ancora presenti, ma oltre tale limite prevale un "caos" correlato con la casualità della traiettoria fotonica. Tuttavia, come si evince dalla figura sottostante, esistono metodiche di Mesoscopia/Macroscopia[28] che superano tale confine.[29]

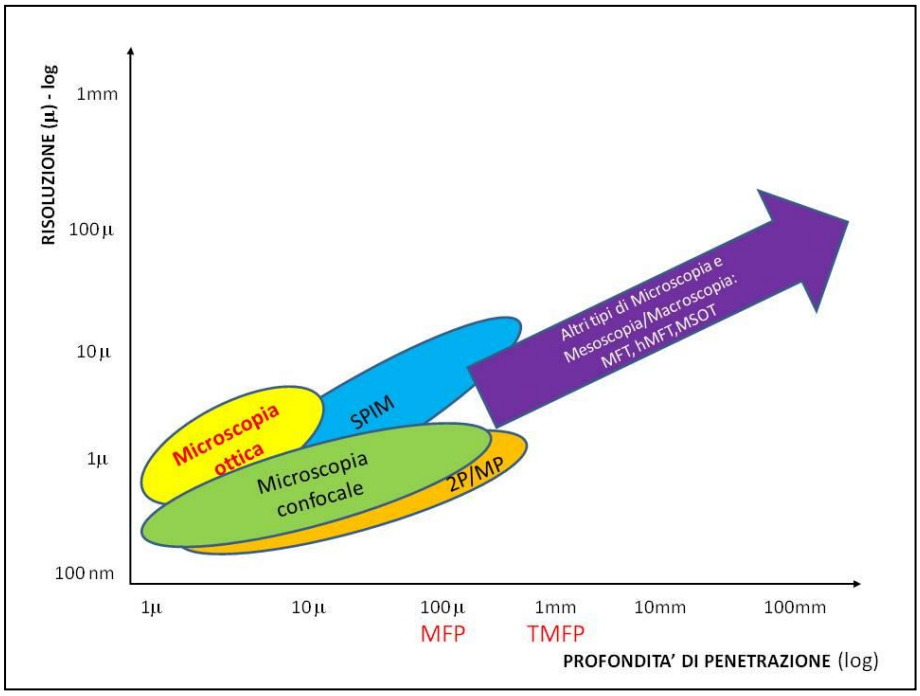


Figura 4 Vasilis Ntziachristos - Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology - *Nature Methods* 7, 603–614 (2010) – modificato – SPIM: Selective Plane Illumination Microscopy; 2P/MP: Two Photon Excitation Microscopy – Multipboton Excitation Microscopy; MSOT Multispectral Optoacustic Tomography

La microscopia confocale[30] di fatto penetra all'interno di fette microtomiche di tessuto, ricostruendo un'immagine tridimensionale ad alta risoluzione del tessuto stesso, risoluzione che dipende dalla lunghezza d'onda utilizzata. Trattandosi di una fetta microtomica, il range di penetrazione è interno alla MFP.

Altre tecniche di imaging biologico sono in grado di superare tale limite andando oltre la MFP. La MSOT[31] (Multispectral Optoacustic Tomography) è una tecnica di mesoscopia utilizzata nella ricerca biologica.

In oculistica viene comunemente utilizzata la OCT- [32]Tomografia Ottica a Coerenza di Fase, esame non invasivo della retina che permette la visualizzazione in sezione del tessuto retinico. Non è un'indagine microscopica "tout cour", ma restituisce un'immagine in sezione della retina che, se ingrandita, è assimilabile ad una tecnica di macroscopia.

b. Perché e' necessario "affettare il tessuto al microtomo"?

Lo spessore del preparato influisce sui fenomeni di attenuazione della luce che lo attraversa; lo spessore medio di una cellula in un organismo eucariota e' di 10-30 micron.[33] Ne consegue che volendo visualizzare in diascopia un solo strato di cellule la fetta non possa essere più spessa di 10 micron. L'osservatore infatti di solito predilige potere osservare un "tappeto" di cellule ben distinte, per meglio apprezzare l'architettura tissutale in un solo piano di osservazione. Troppi strati di cellule impilate creano confusione e tolgono dettaglio e luminosità alla struttura.
Per questi motivi il blocchetto di tessuto biologico, fissato ed incluso in un mezzo di inclusione, deve essere tagliato nel modo più sottile possibile. Per i tessuti vegetali lo spessore ottimale e' di 10-15 micron[34] mentre per i tessuti umani inclusi in paraffina lo spessore di taglio routinariamente eseguito nel Servizi di Anatomia Patologica e' di 3-7 micron.[35] [36] [37] Non infrequentemente si tagliano fette di 1-2 micron. Per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) lo spessore di taglio e' usualmente compreso tra 20 e 150 nanometri[38], ovvero 0,02-0,15 micron. Nella TEM, dove la luce e' sostituita dagli elettroni, per formare un immagine del preparato gli elettroni devono penetrare all'interno del tessuto senza rilevanti perdite di velocità. La permeabilità di un preparato agli elettroni dipende dalla massa, dallo spessore, ed in parte dalla quantita' di accelerazione degli elettroni (nel TEM la velocità degli elettroni e' determinata dal voltaggio impostato sul microscopio elettronico). Gli elettroni assorbiti dal preparato possono determinare un aumento del calore locale e conseguentemente la creazione di artefatti.[39] Ecco perche' le fette debbono essere piu' sottili.

c. Storia dei microtomi

Il taglio manuale di fettine di tessuto senza microtomo o con microtomi rudimentali, un tempo tappa obbligata per le ben note limitazioni tecniche[40], non permette una precisione di taglio ed una sottigliezza adeguate. Per tagliare in modo uniforme fette dello spessore di pochi millesimi di millimetro ci vuole una macchina di precisione. La macchina, detta microtomo[41] e' stata appositamente sviluppata per la bisogna e oggi nessuna fetta di materiale biologico per osservazione professionale in microscopia ottica od elettronica può essere tagliata senza un microtomo.

Già agli inizi del 700 i microscopisti si resero conto di avere bisogno di un metodo meccanico per tagliare fette più sottili di 100 micron e per questo vennero sviluppati i primi strumenti per il taglio automatizzato[42]. Uno dei primi microtomi manuali fu sviluppato nel 1770 da George Adams Jr., ma tale strumento venne ulteriormente perfezionato da Alexander Cummings. Il termine microtomo venne

introdotto solo nel 1839 da Chevalier, prima venivano nominati “motori da taglio”.[43] Il primo microtomo da banco fu costruito nel 1835 da Andrew Pritchard. L’anatomista Wilhelm His, quello del celeberrimo Fascio di His nel cuore, e’ accreditato come inventore del primo microtomo moderno nel 1865, ma altri scienziati, tra cui Jan Evangelista Purkyne[44], si sono occupati di microtomia.

Le tappe principali[45] nella evoluzione tecnica del microtomo sono:

- 1770 George Adams Jr. – primo microtomo noto
- 1770 Alexander Cummings – cutting engine – sistema fisso da tavolo con lama rotante su di un piano fisso fissata ad un perno e vite micrometrica di alzo del pezzo
- 1789 Alexander Cummings – primo microtomo a slitta
- 1799 Robert Custance – microtomo a slitta con coltello di taglio fissato alla struttura
- 1835 Andrew Pritchard - microtomo da tavolo a vite micrometrica e coltello da taglio a due manici
- 1848 John Queckett – microtomo a slitta con coltello mobile ad arco di cerchio
- 1866 Baker microtomo da tavolo con parte superiore a zona di taglio obliqua
- 1850 M. Schanze – microtomo a slitta con portalama orientabile (tilting e angolo di taglio)
- 1848 G.F. de Capanema – microtomo a slitta con alzo del pezzo su piano inclinato
- 1881 Caldwell e Trefall –rocking microtome
- 1886 Minot/Pfeifer – microtomo rotativo

Come si vede già alla fine dell’800[46] erano in vendita microtomi di struttura e meccanismo uguale a quelli odierni, dotati dello stesso tipo di lame che oggi sono reperibili sul web a basso costo. Anche Sigmund Freud, medico, che prima di “inventare” la psicanalisi si occupava di neurologia[47], possedeva un microtomo a slitta[48] apparentemente del tutto simile a quelli venduti a fine anni 70. Ovviamente il perfezionamento tecnico dei microtomi e delle lame ha oggi reso possibile spessori di taglio inimmaginabili a quei tempi, ma la forma ed il meccanismo rimane quasi invariato.

Figura 5 Il microtomo di Sigmund Freud – (http://himetop.wikidot.com/sigmund-freud-museum)

2. IL MICROTOMO

I Microtomi sono classificabili in varia maniera[49]:

OGGETTO CHE ESEGUE IL TAGLIO	
MICROTOMO A LAMA	E' LA LAMA CHE VENENDO IN CONTATTO COL PEZZO ESEGUE IL TAGLIO (LA LAMA SI MUOVE OD IL PEZZO SI MUOVE)
MICROTOMO LASER	UN RAGGIO LASER INFRAROSSO AD ALTA POTENZA DETERMINA LA FOTO-ROTTURA[50] DELLE STRUTTURE CELLULARI SEZIONANDO IL TESSUTO – TAGLIA ANCHE TESSUTI NON PREPARATI – SPESSORE >1 MICRON
MICROTOMO A SEGA	AGISCE MEDIANTE UNA SEGA ROTANTE (USATO PER TAGLIARE OSSA O DENTI O MATERIALI NON BIOLOGICI) – TAGLIA FETTE > DI 30 MICRON
MICROTOMO A LAMA VIBRANTE (VIBRATOME)	LA VIBRAZIONE TRASMESSA ALLA LAMA AIUTA LA AZIONE DI TAGLIO – UTILE PER IL TAGLIO DI PREPARATI A FRESCO – TAGLIA FETTE NON MOLTO SOTTILI (>10 MICRON PER TESSUTI INCLUSI E >30 MICRON PER TESSUTI FRESCHI)
MICROTOMO A LAMA VIBRANTE TIPO "COMPRESSTOME"	IL TESSUTO VIENE COMPRESSO IN UN DISPOSITIVO A TUBO IN MODO SIMILE A QUANTO AVVIENE IN UN TUBETTO DI DENTIFRICIO. LA COMPRESSIONE IRRIGIDISCE IL TESSUTO ED AIUTA IL TAGLIO DA PARTE DELLA LAMA VIBRANTE

MODALITA' DI SCORRIMENTO LAMA/PEZZO E POSIZIONE DELLA LAMA	
MICROTOMO A SLITTA – MODELLO CON LAMA MOBILE "SLEDGE MICROTOME"	LA LAMA SI MUOVE CONTRO IL PORTAPEZZI CHE E' FISSO E SI ALZA AD OGNI TAGLIO – LA LAMA E' FISSATA DI LATO RISPETTO AL PEZZO – TAGLIA FETTE DA 1 A 60 MICRON
MICROTOMO A SLITTA – MODELLO CON LAMA FISSA ("BASE SLEDGE MICROTOME")	LA LAMA E' FISSA, DI SOLITO POSTA "A PONTE" AL CENTRO DELLO STRUMENTO, ED IL PORTAPEZZI SI ALZA AD OGNI TAGLIO
MICROTOMO ROTATIVO (MINOT[51])	LA AZIONE ROTATIVA DI UNA MANOVELLA SPOSTA CICLICAMENTE IN MODO TANGESZIALE IL MORSETTO PORTAPEZZO CONTRO LA LAMA CHE E' FISSA – IL PEZZO SI ALZA AD OGNI PASSATA – TAGLIA FETTE DA 0,5 A 60 MICRON
MICROTOMO OSCILLANTE - ROCKING MICROTOME (CAMBRIDGE)	IL PEZZO VIENE A CONTATTO CON LA LAMA COMPIENDO UN ARCO DI CERCHIO REALIZZATO DALLA OSCILLAZIONE A PENDOLO DI UN BRACCIO MECCANICO

TEMPERATURA DI TAGLIO	
CRIOSTATO	E' DI FATTO UN FRIGORIFERO ALL'INTERNO DEL QUALE SI TROVA IL MICROTOMO
MICROTOMO A LAMA RAFFREDDATA (SIA A SLITTA CHE "SLEDGE")	E' UN MICROTOMO CHE HA LA LAMA ED IL PEZZO OPPURE LA SOLA LAMA RAFFREDDATA (CON APPOSITI SISTEMI FRIGORIFERI SEPARATI CHE RAFFREDDANO LA SOLA LAMA O ANCHE IL MORSETTO PORTAPEZZO) LA LAMA ED IL PEZZO SONO RAFFREDDATI (DI SOLITO CON UN GETTO DI ANIDRIDE CARBONICA) IN ALCUNI MODELLI (DA BANCO) LA LAMA E' FISSATA AD UN MECCANISMO "A CERNIERA" E TAGLIA COMPIENDO UN ARCO DI CERCHIO

SOTTIGLIEZZA DEL TAGLIO	
ULTRAMICROTOMO	PUO' TAGLIARE FETTE SOTTILISSIME SINO A 10 NANOMETRI - DI SOLITO USA LAME DI VETRO O DI DIAMANTE

Figura 6 da: Ruchi Sharma – Micrototmy - https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029 (modificato)

Figura 7 da: Ruchi Sharma – Micrototmy - https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029 (modificato)

Figura 8 : da Ruchi Sharma – Micrototmy - https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029 (modificato)

Figura 9 da Ruchi Sharma – Micrototmy - https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029 (modificato)

Il classico microtomo di routine per taglio di tessuti inclusi in paraffina e' il microtomo a slitta o la moderna versione automatica del microtomo rotativo tipo Minot. Di solito il taglio di grosse fette di tessuto (ad esempio encefalo in toto) avviene con microtomi a slitta con lama fissa trasversale.

I microtomi rotativi automatizzati sono utili per affrancare gli operatori dallo sforzo fisico delle manovre di taglio, essendo comandati da motori elettrici. Essi hanno micromotori e sistemi elettronici che regolano lo spessore di taglio, la progressione della pinza portapezzi, la velocità di taglio, il numero di fette da tagliare, ecc.
In un microtomo a slitta o rotativo il meccanismo che presiede alla variazione dello spessore di taglio e' in genere formato da:

- Vite micrometrica – la rotazione della vite all'interno di una parte filettata micrometricamente solidale col corpo del microtomo e connessa al portapezzi determina l'alzo del pezzo (per una vite micrometrica ad un solo principio una rotazione di 360° alza il pezzo di una frazione di millimetro pari al passo della vite stessa)[52]; rotazioni minori di 360° alzeranno i pezzo di frazioni variabili della misura del passo della vite. (dal punto di vista fisico la vite infatti e' un piano inclinato avvolto su se stesso che fa avanzare il pezzo verso l'alto come un masso trascinato su di una rampa in salita …)
- Meccanismo a ruote dentate e nottolini di arpionismo[53]: le ruote dentate permettono la demoltiplica della rotazione e il nottolino (o i nottolini) agiscono sulla ruota dentata solidale con la vite micrometrica; il nottolino si impegna in un numero di denti variabile a seconda dello spessore di taglio selezionato, permettendo una rotazione frazionata della ruota/vite micrometrica (se ad esempio si decide di tagliare a 7 micron il nottolino "scavalca" 7 dentini dell'ingranaggio e poi si fissa, muovendo la ruota per la "distanza" selezionata; ad 8 micron "scavalca" 8 denti e così via). La selezione dello spessore di taglio (con cursore a settore semilunare in alcuni microtomi o con manopola in altri) agisce sul sistema dei nottolini che scorrono sulla ruota dentata. Contando i "salti" del nottolino durante la passata di taglio si può anche grossolanamente sapere se il microtomo funziona bene o no.

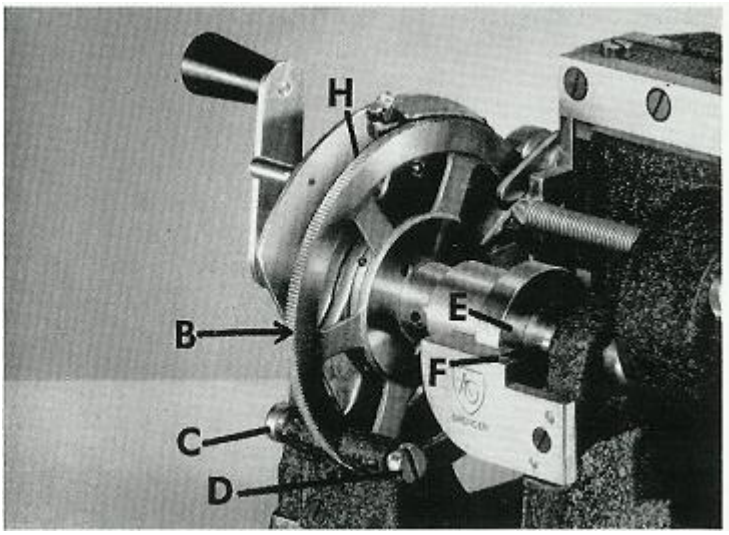


Figura 10 da: Oscar W. Richards - American Optical – Effective Use and Proper Care of the Microtome – 1959 (modificato)

Il sistema di alzo della vite micrometrica può essere differente, a seconda del produttore. Nei microtomi da me osservati nel corso degli anni (Leitz, Reichert, Galileo) il sistema sembra essere quello di vite senza fine e nottolini di arpionismo.

Lo sviluppo negli anni 50 dei primi ultramicrotomi da parte di K. Porter e J. Blum, successivamente perfezionati da F. S. Sjostrang, introdusse il meccanismo di avanzamento del pezzo basato sulla dilatazione termica del braccio portapezzo.[54] A quei tempi un avanzamento di pochi nanometri era di difficile realizzazione con gli usuali sistemi a vite micrometrica, per cui venne perseguita la strada della dilatazione termica dei metalli. Una bobina elettrica riscaldante dilatava il braccio metallico di una frazione variabile di lunghezza, dipendente dalla temperatura e dal coefficiente di dilatazione del metalli, mentre un sistema di elettrocalamite retraeva la lama durante la fase di ritorno dopo il taglio evitando che il pezzo, fissato in modo stabile al braccio portapezzo, si incastrasse nella lama. Successivamente con il progredire della meccanica fine vennero prodotti ultramicrotomi con avanzamento meccanico, abbandonando la dilatazione termica.

Le parti costituenti di un microtomo "standard" per uso routinario in anatomia patologica sono:

- Base: di solito in ghisa pesante o acciaio, deve essere stabile e quindi pesante per evitare vibrazioni. Ampia superficie di appoggio sul tavolo di lavoro. Spessi pilastri in acciaio ricavati nella base sostengono lama e slitta portapezzo. Nei microtomi a slitta e' un solido blocco di metallo pieno, nei microtomi rotatori e' cava e contiene il sistema di rotazione/alzo del pezzo
- Pinza portapezzo: e' formata dal morsetto che trattiene la cassetta di inclusione e dal sistema di orientamento del pezzo che consente di adattare la posizione del blocchetto di paraffina rispetto la lama di taglio, allo scopo di ottenere fette tangenziali al senso di taglio
- Lama: un tempo erano solamente pluriuso, riaffilate periodicamente. Erano solidi prismi di acciaio rigidi e pesanti con una sola faccia di taglio. Dalla metà degli anni 70 sono state sostituite da lame monouso, sottili strisce di acciaio ricoperte da materiali di varia natura per facilitare il distacco della fetta, sempre affilatissime e monouso. Per sezioni di piccoli pezzi inclusi in materiale plastico si utilizzano ancora oggi lame di vetro, ricavate dalla rottura precisa di grosse lastre di cristallo. L' ultramicroscopia utilizza lame di vetro, diamante.
- Portalama: e' il sistema che accoglie e rende stabile la lama. Nel caso di lame pluriuso la lama e' trattenuta da morsetti, guide o altri sistemi di fissaggio. Nel caso di lame monouso la lametta e' trattenuta, immobilizzata e stabilizzata da un lungo morsetto di metallo detto portalama. La lama o il portalama può essere sospesa trasversalmente sopra il portapezzi, oppure si muove lateralmente al portapezzi od ancora può essere ancorata alla base del microtomo come nel caso dei microtomi rotativi automatici
- Manopole di regolazione dello spessore di taglio e comandi dell'alzo automatico del pezzo: permettono anche il taglio veloce di grossi spessori per lo sgrossamento o trimming del pezzo

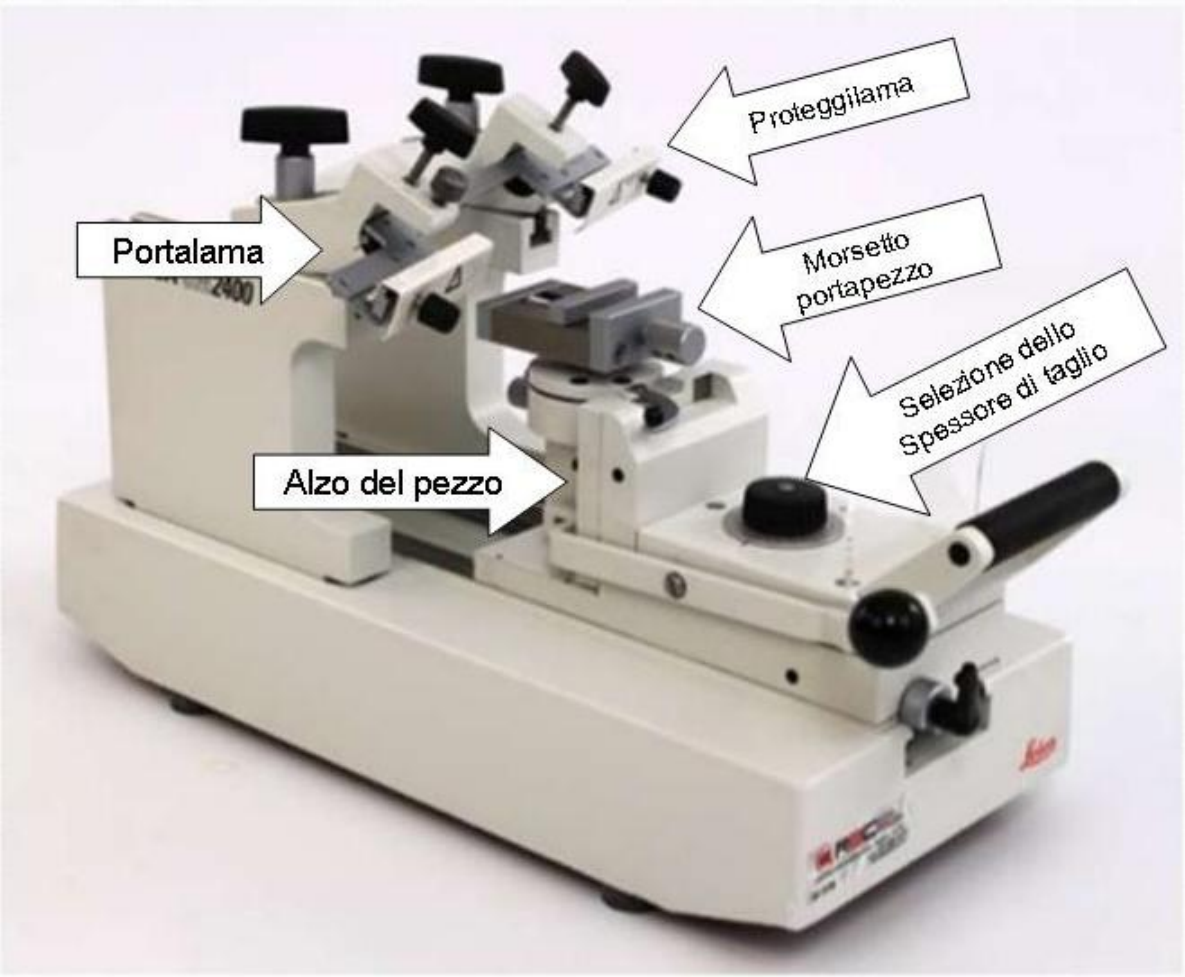


Figura 11 da Ruchi Sharma – Micrototmy - https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029 (modificato)

Accanto a queste parti base ci sono altri dispositivi accessori che in alcuni casi possono mancare o essere di uso sporadico:

- Consolle e pedale di comando: nei microtomi automatici la consolle elettronica può essere separata dal corpo del microtomo e connessa con un cavo; tramite questa si variano i parametri di taglio. Un pedale può servire per azionare il taglio al fine di lasciare la mani libere per raccogliere la fetta di tessuto
- Protezioni trasparenti sul manico del carrello portapezzo: servono per evitare tagli accidentali
- Protezioni laterali della lama: evitano tagli accidentali nelle parti esposte della lama che sporgono dai morsetti portalama
- Nastro raccogli fette: ora in disuso, un tempo era accessorio comune. E' un nastro di tessuto sintetico che ruotando raccoglie le fette appena tagliate e le dispone in una striscia continua pronta per essere raccolta (in ultramicrotomia stante la piccolezza delle fette e la loro estrema sottigliezza si usa una piccola "vaschetta" di acqua adesa alla lama di taglio)
- Lente di ingrandimento: utile per tagliare fette sottilissime di campioni di piccole dimensioni. Negli ultramicrotomi e' sostituita da un microscopio stereoscopico
- Pennelli e pinzette: utili per raccogliere le fette (nell'ultramicrotomia sono sostituiti da un ciglio fissato su di uno stuzzicadenti)[55]
- Lampade
- Gocciolatori di alcool per umettare la lama durante il taglio di preparati inclusi in celloidina

- Sistemi di raffreddamento del pezzo e della lama
- Macchine tagliavetro: servono per troncare in triangoli dai lati acuminati e taglienti le apposite strisce di vetro per ottenere le lame da ultramicrotomia

3. LE LAME

Le lame per microtomia sono realizzate in vari materiali: acciaio, carburo di tungsteno, vetro, diamante, zaffiro. Le lame metalliche, che sono di più comune uso nel taglio di sezioni incluse in paraffina, sono di due tipi: monouso e pluriuso.

Attualmente le lame monouso (che in caso non siano più affilatissime possono poi essere riciclate come coltelli per il taglio macroscopico delle parti anatomiche pervenute in laboratorio) hanno quasi dappertutto sostituito le lame pluriuso per i seguenti motivi:

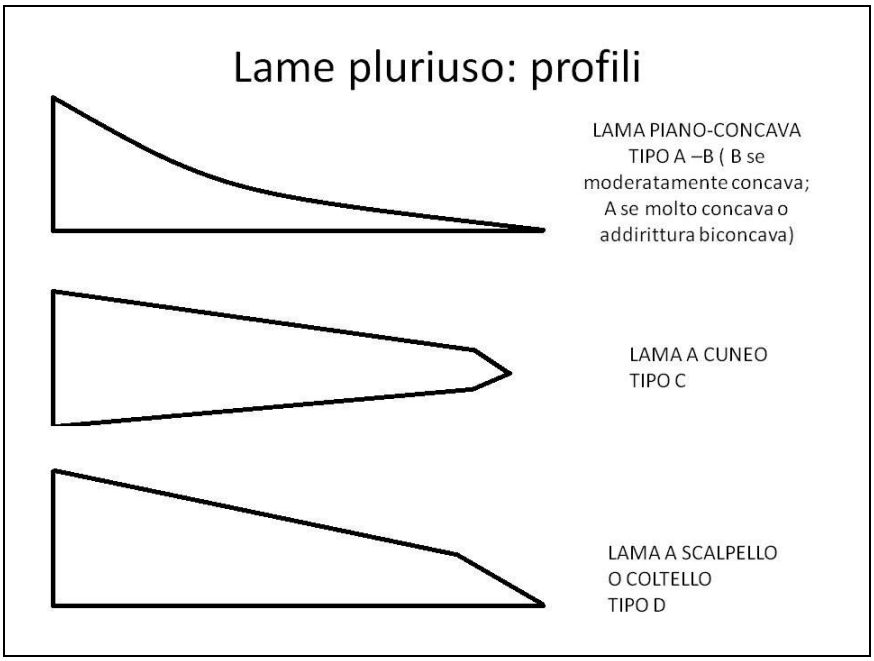
- Sono sempre affilate (quando non tagliano bene si buttano)
- Sono più sicure perché si debbono maneggiare poco durante il montaggio sul microtomo (sono contenute in scatole tipo dispenser che rendono quasi automatico l'inserimento della lama nel portalama)
- Sono ricoperte da materiali che facilitano lo scorrimento ed il distacco della fetta (teflon, materiali ceramici, platino, cromo, titanium nitride, ecc.)
- Hanno profili di taglio differenti
- Evitano di dover ricorrere ad un servizio di affilatura esterno all'ente

Le lame monouso vanno inserite in un apposito portalama, che di solito e' un pezzo meccanicamente complesso e costoso.

In microscopia dilettantistica di solito si utilizzano le vecchie lame pluriuso, semplicemente per un motivo di facile reperibilità e basso costo (il portalama per le lame monouso e' un pezzo a parte non fornito coi microtomi e di solito e' costoso perché meccanicamente complicato.) Sono lame di acciaio pesante, spesso lunghe parecchi centimetri, dotate di una costolatura ampia per renderele più rigide ed evitare vibrazioni.

Le lame pluriuso vengono classificate a seconda del profilo di taglio:

LAME A	LAME B	LAME C	LAME D
Fortemente Piano-concava	Debolmente pianoconcava	A Cuneo	A Scalpello o a coltello
Per il taglio di preparati inclusi in celloidina[56] o preparati soffici Le lame biconcave sono classicamente usate nei microtomi oscillanti (Rocking Microtome), spesso sono delle lame da rasoio a mano libera modificate La lama deve essere tenuta obliqua rispetto la faccia di taglio del blocchetto[57]	Per il taglio di preparati inclusi in celloidina[58] o preparati soffici e vegetali[59]. La lama deve essere tenuta obliqua rispetto la faccia di taglio del blocchetto	Inizialmente concepite per i preparati congelati non inclusi. Di uso generale per ogni tipo di microtomo. Per preparati inclusi in paraffina, per il legno[60], gomma, ecc.	Per plastica e preparati duri Spesso sono realizzate in metalli duri come il tungsteno



La lama pluriuso deve essere periodicamente riaffilata. Gli angoli di affilatura ed il profilo pre-ordinato dalla casa produttrice devono essere rispettati durante la azione di riaffilatura perché l'angolo di taglio determina la corretta posizione della lama durante il taglio ed e' importante per ottenere fette regolari.

In brevi termini gli angoli della lama predisposti dal produttore sono:

Edge o Bevel angle – angolo di affilatura	**Wedge angle – angolo generale della lama**
E' l'angolo formato dalle due facce che formano il tagliente	E' l'angolo dovuto alla forgiatura stessa del blocco di acciaio della lama
Di solito 27-32°	Di solito 15°
La ampiezza delle due facce taglienti e' di solito di 0,1-0,6mm	La larghezza e' pari alla larghezza di tutta la lama, filo compreso

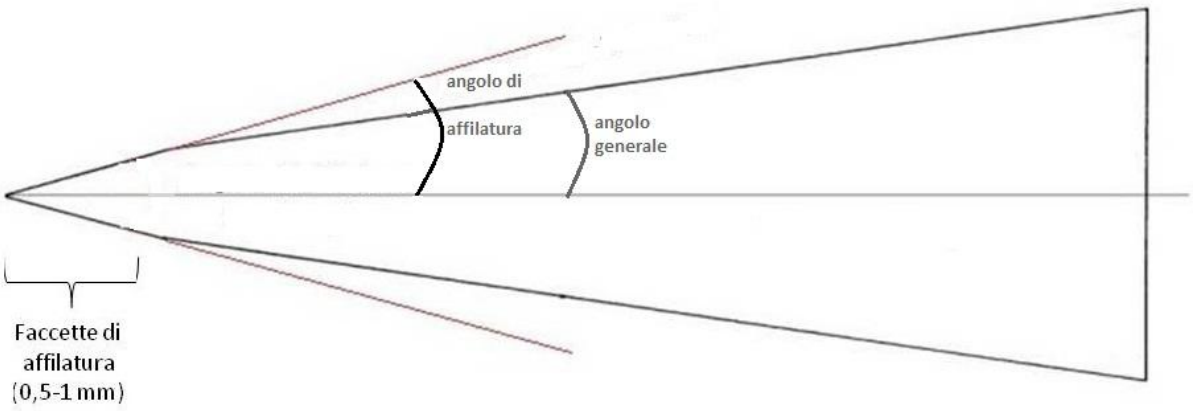


Figura 12 angoli di una lama "wedge" – da http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artfeb07/yl-para2.html

4. POSIZIONAMENTO CORRETTO DELLA LAMA – INCLINAZIONE VERTICALE ED ORIZZONTALE DELLA LAMA DURANTE IL TAGLIO

Il taglio microtomico ha caratteristiche meccaniche simili al taglio al tornio o all'intaglio (di un legno, di un cibo) con un coltello. [61]
La forza e' trasmessa al materiale da tagliare dalla estrema porzione anteriore affilata della lama, e questa forza distacca uno strato superficiale di materiale dal blocchetto di paraffina.

a. Angoli della lama in relazione con l'angolo del portalama (Clearance e Rake angle)

Come già detto, una lama da microtomo del tipo a cuneo "wedge", quelle più comuni in microtomia, per motivi di costruzione ed affilatura presenta due angoli diversi: un angolo "generale" dato dalla forgiatura del blocco di acciaio (Wedge angle) ed un angolo di affilatura "Bevel" che interessa l'ultima parte (circa 0,5-1 mm) della lama. E' quindi un sistema di due diversi prismi a due angoli differenti.

Poiché la zona di affilatura di solito si estende per non più di 1 mm (a seconda degli Autori la ampiezza della zona di taglio "ideale" varia da 0,1 a 0,6 mm[62]) appare ovvio che l'angolo di riferimento sia quello determinato dalle due faccette di affilatura e che quindi per l'orientamento verticale della lama nel microtomo si debba considerare come riferimento la bisettrice dell'angolo bevel passante per il dorso della lama. Fortunatamente la bisettrice dell'angolo generale delle lama (wedge) e la bisettrice dell'angolo di affilatura (bevel) passano entrambi per la metà del dorso della lama.

In microtomia gli angoli ricavati durante la forgiatura e la affilatura della lama sono solamente una parte del problema; per tagliare in modo efficace una fetta da un blocchetto di paraffina la lama deve essere posizionata ad un preciso angolo rispetto la faccia superiore del preparato incluso in paraffina. Gli angoli che vengono coinvolti nel corretto meccanismo del taglio sono:

- Bevel angle o angolo di affilatura
- Clearance angle, angolo esistente tra la faccetta inferiore di affilatura ed il piano del blocchetto di paraffina
- Rake angle, angolo tra un piano perpendicolare al blocchetto di paraffina e la faccetta superiore di affilatura

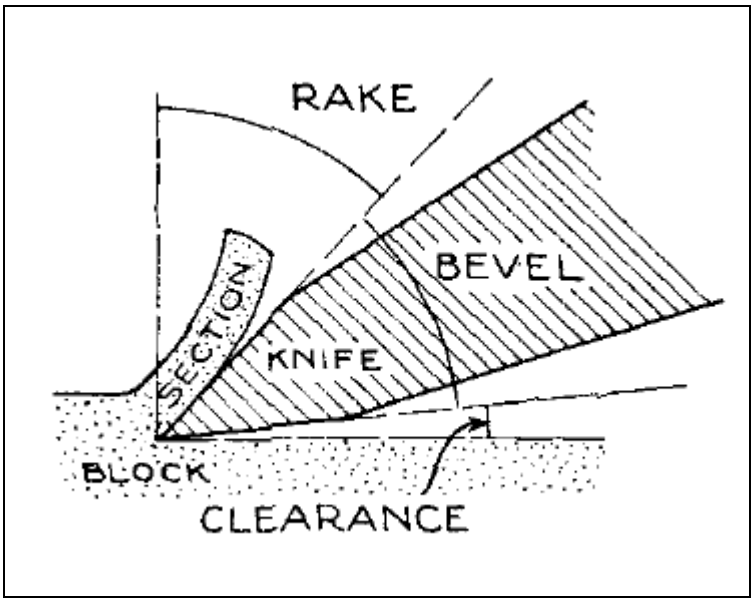


Figura 13 da Wilfrid Taylor Dempster – The Mechanism of Paraffin Sectioning by the Microtome (modificato)

La lama pluriuso (ma anche il portalama della lama monouso) deve essere inserita nel microtomo ad un preciso angolo, per evitare che l'angolo di taglio sia troppo acuto o troppo ottuso.

Figura 14 da: Ruchi Sharma – Micrototmy - https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029 (modificato)

Se l'angolo di taglio e' troppo acuto si rischia che la lama si "incastri"nel pezzo; se e' troppo ottuso la lama scorrerà sul pezzo deformandolo senza tagliarlo. L'angolo di taglio (clearance angle) e' estremamente importante[63] [64] nel determinare una forza efficace da parte della lama stessa.

Idealmente l'accoppiata "lama perfetta/angolo di taglio perfetto" dovrebbe essere quella in cui una lama con angolo di affilatura infinitesimo (il filo dovrebbe essere uno strato monoatomico di atomi di ferro) scorre quasi parallela alla superficie di taglio[65], ma lame così affilate di fatto non esistono.

Ne consegue che una lama "reale" con angolo di affilatura ("bevel") di 27-32° debba essere posizionata contro la superficie del pezzo da tagliare con un angolo (4-10°) tale da portare la faccia di affilatura il più possibile tangente al pezzo, ma con un angolatura non così parallela da far scorrere la lama sulla paraffina senza tagliare.

Quando si parla di angolo di inclinazione della lama (angolo di spoglia- Clearance angle) si intende l'angolo che la bisettrice dell'angolo di affilatura "bevel" fa con la faccia superiore del blocchetto. Se la lama avesse un unico profilo angolare, con una continuità tra le facce superiore ed inferiore della lama e la zona di taglio, l'angolo generale "wedge" corrisponderebbe all'angolo di affilatura "bevel", ma ciò non e'. Quindi si deve considerare il piano passante per la bisettrice del angolo di affilatura "bevel" come piano da inclinare più o meno rispetto il piano orizzontale della faccia superiore del blocchetto di paraffina. Attenzione! alcune fonti presenti sul web indicano come angolo di inclinazione l'angolo che la faccia inferiore del "bevel" deve avere rispetto il piano di taglio. Ma considerando che la ampiezza della faccia di affilatura che genera il "bevel" e' di pochi millimetri, appare difficile stimare ad occhio la inclinazione di tale faccia rispetto il blocchetto di taglio. Ne consegue che di solito si considera il piano passante per la bisettrice dell'angolo di affilatura (che cade esattamente a metà del dorso della lama) come linea di riferimento per la angolatura corretta della lama.

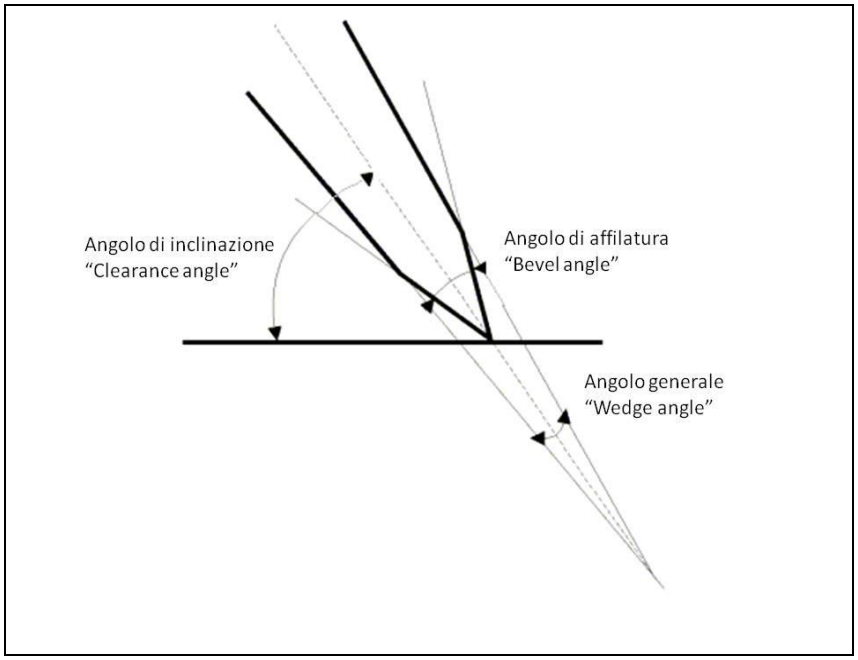


Figura 15 Angolo di taglio "clearance angle" – da https://www.labce.com/spg605385_instrumentation_for_microtomy_knife_angles.aspx - modificato

La figura 12 mostra come un angolo di taglio (Clearance angle) sbagliato possa determinare un errore di taglio con conseguente compressione/distorsione del pezzo.

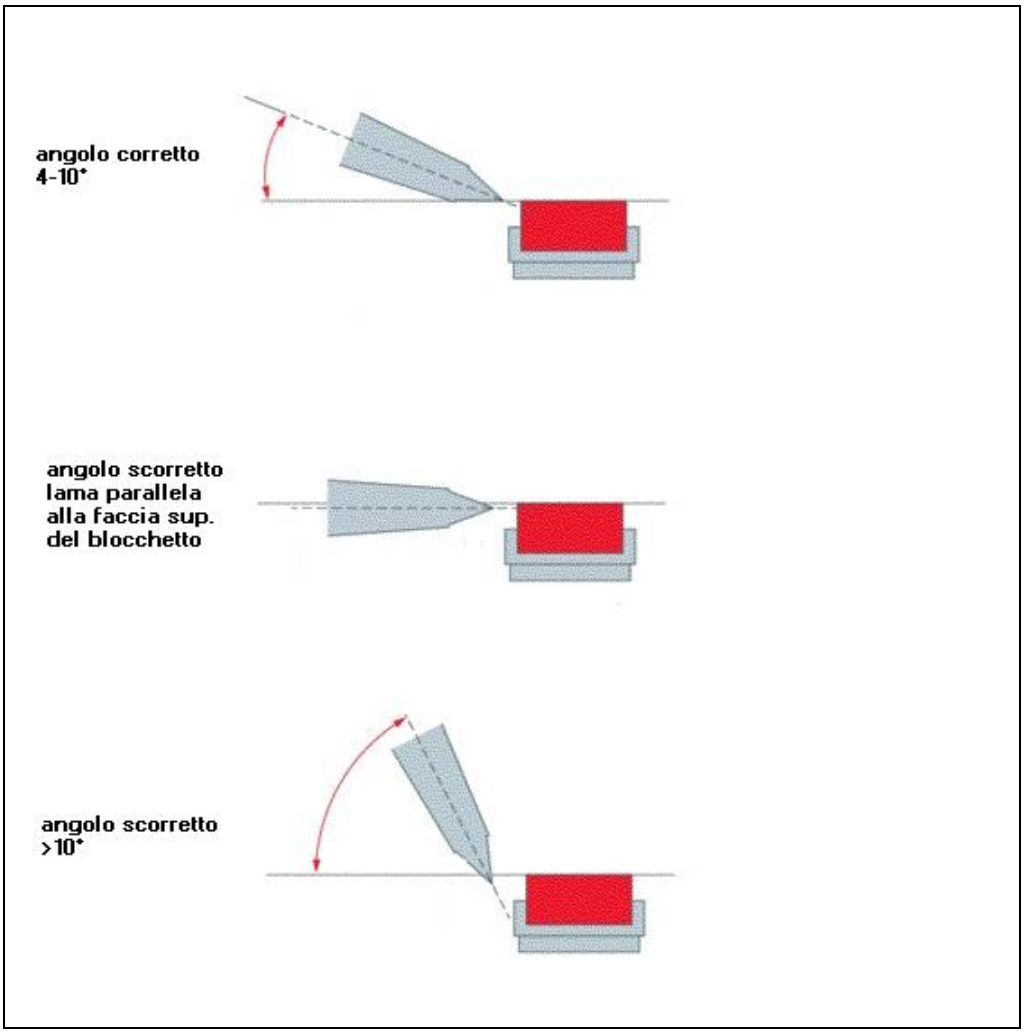


Figura 16 da: http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/knife-angle-in-microtomy/ (modificato)

Nella figura 12 si nota come , in un microtomo rotativo in cui la lama e' ferma ed il blocchetto scorre in modo tangenziale al portapezzi, l'inclinazione della lama e' fondamentale per minimizzare distorsioni da compressione; gli artefatti da taglio sono minimi per un corretto angolo "clearance" (4-10°) e sono massimi per un angolo < 4° >10° (sino al paradosso di una lama del tutto parallela alla faccia superiore del blocchetto di paraffina che comprimerebbe la paraffina senza tagliare oppure una lama a 90° rispetto il pezzo che raschierebbe senza effettivamente ottenere fette istologicamente valide).

Dire che l'angolo di inclinazione deve essere compreso tra 4-5 e 10° e' una semplificazione utile ma non del tutto corretta. La durezza del pezzo e della paraffina, la forma del blocchetto, l'orientamento del pezzo rispetto il piano di taglio e la tipologia del profilo di affilatura sono tutti fattori che debbono essere presi in considerazione per decidere un corretto angolo di taglio.

Riassumendo: gli angoli a cui la lama deve essere correttamente posizionata sono:

a) **Angolo di declinazione**: indica quanto "storta" debba essere la lama rispetto l'asse trasversale del blocchetto.[66] Guardando il microtomo dall'alto, nei microtomi a slitta con lama fissa "a ponte" o nei microtomi rotativi la lama e' in genere trasversale alla slitta portapezzo, quindi l'angolo di declinazione e' di 90°.

Nei microtomi a slitta con lama mobile la lama può essere angolata a piacere. Il taglio con lama inclinata e' utile per tessuti inclusi in celloidina o tessuti duri.[67] Gli angoli di declinazione consigliati possono di solito essere di 45° per blocchetti a sezione quadrata e di 30° per blocchetti a sezione rettangolare[68].

b) **Angolo di inclinazione** (clearance angle): e' l'angolo con cui la lama "striscia" sulla faccia superiore del blocchetto da tagliare – di solito e' di 4-10°. Un angolo di inclinazione di 2-4° e' utilizzato per i tessuti inclusi in paraffina mentre un angolo di 5-7° viene usato per le sezioni congelate[69] Per microtomi rotativi automatici con lama monouso l'angolo consigliato e' 1-5°. [70]Angoli troppo inclinati (>10°) determinano una deformazione del pezzo durante il taglio, angoli troppo poco pronunciati (<4°) comportano la compressione del pezzo con artefatti da taglio.

c) **Rake angle**: angolo tra la faccetta superiore di affilatura ed un piano verticale posto a 90° rispetto la superficie di taglio del blocchetto di paraffina[71]. Il suo massimo valore e' di 72° [72]. Quanto maggiore e' il Rake Angle tanto minore e' la compressione e distorsione del pezzo (anche perché incrementandosi il Rake Angle si determina un corrispettiva diminuzione del Clearance Angle)[73] Ovviamente il Rake angle non deve essere portato ad un valore tale da azzerare l'angolo Clearance. In quanto si farebbe strisciare parallelamente la lama sul blocchetto di paraffina.

Per quanto attiene all'angolo di inclinazione (clearance angle) altre fonti consigliano [74] quanto segue:

- Posizionare la lama con la faccia dell'angolo di affilatura/bevel parallelo alla faccia superiore del blocchetto e del conseguente piano di taglio
- Inclinare verso l'alto la lama di ½ grado
- Eseguire dei tagli di prova
- Adattare l'angolo di inclinazione alla tipologia di fette ottenute aumentando via via l'inclinazione

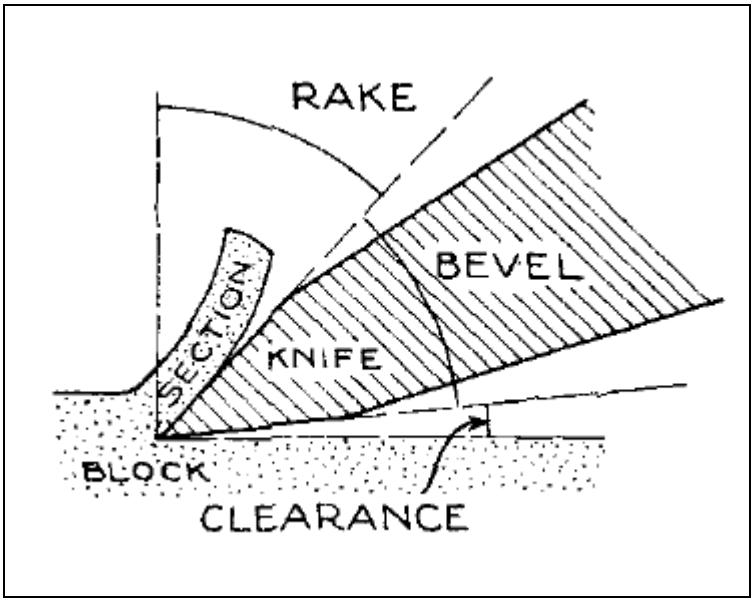


Figura 17 da Wilfrid Taylor Dempster – The Mechanism of Paraffin Sectioning by the Microtome (modificato)

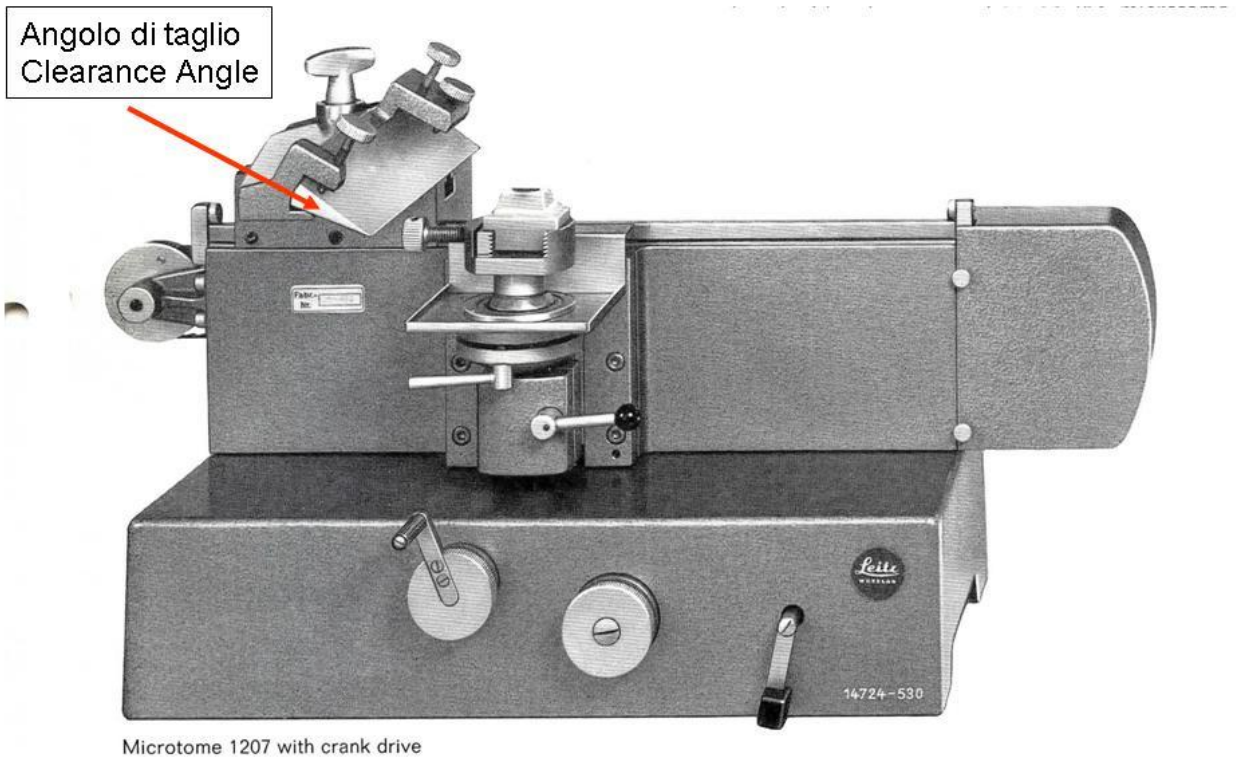


Figura 18 Da Brochure Leitz 580/8 – d (modificato)

b. Fattori accessori che interferiscono sull'angolo Clearance

Una lama con affilatura insufficiente ha, come si e' già visto, una parte distale "arrotondata" con un profilo che grossolanamente potrebbe essere identificato come un piccolissimo arco di cerchio. Vari Autori hanno calcolato che il raggio di curvatura di tale estremo arrotondato varia, in una lama ben affilata, da 0,1 a 0,35 micron.[75] [76]

Lame non ben arrotate con arco di cerchio ben maggiore determinano un comportamento di taglio che simula un angolo Clearance/Rake maggiore rispetto quello impostato sul portalama, per vie del differente angolo delle lama nel punto in cui esercita la propria azione di taglio.

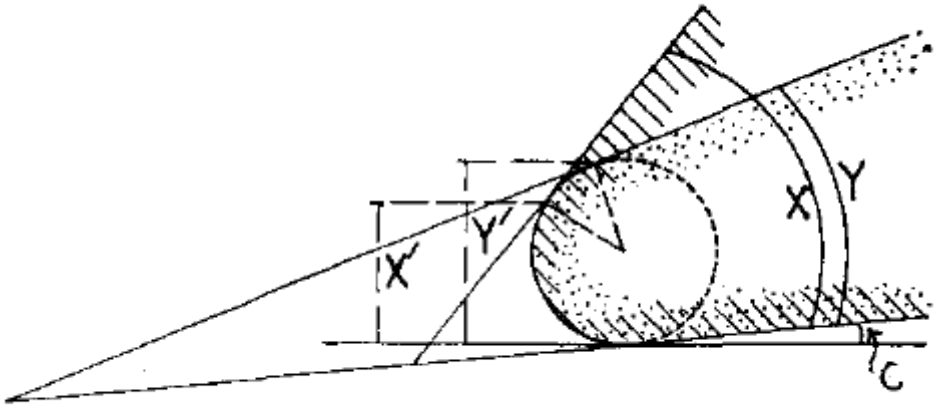


Figura 19 da Wilfrid Taylor Dempster – The Mechanism of Paraffin Sectioning by the Microtome –(modificato) "…If a widely and a narrowly beveled knife of the same average radius of curvature are compared , it will be seen that the nominal rake angle is actually interrupted less in the case of the small rake (X') than where the rake is large (Y')…"

Un ulteriore fenomeno che interferisce con il taglio microtomico e' la oscillazione dell'apice della lama durante la progressione di taglio. Quanto più e' acuta e sottile la lama tanto più saranno presenti micro-oscillazioni dell'apice della lama.[77] Come e' noto le oscillazioni della lama determinano difetti di taglio delle fette sottili. Lo Stropping[78] a fine affilatura serve proprio ad evitare di avere un apice della lama troppo sottile e debole.

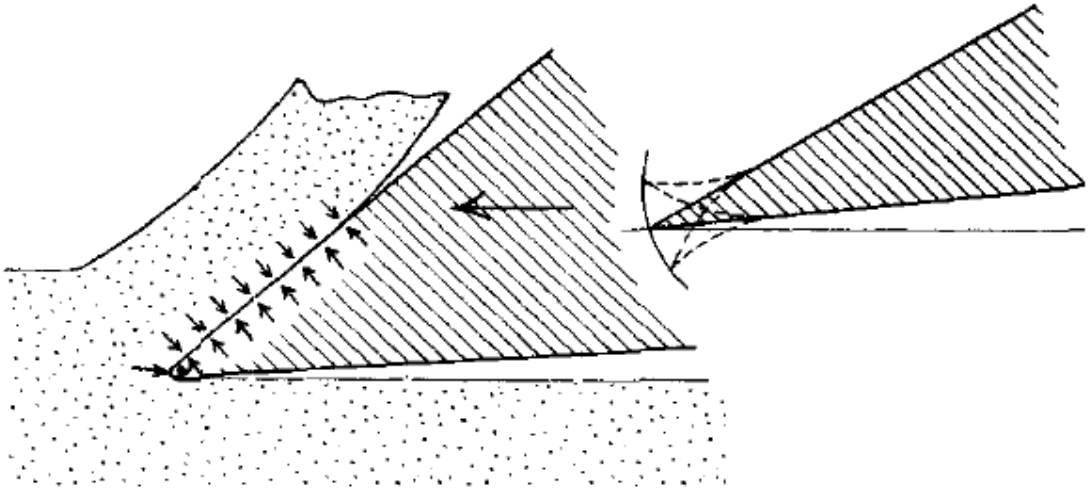


Figura 20 W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

5. MECCANICA E FISICA DEL TAGLIO MICROTOMICO

Le leggi fisiche che regolano la azione di taglio di qualsiasi materiale sono ben note[79]; La azione di taglio può essere definita come un processo nel quale nuove superfici vengono create in un solido mediante l'uso di uno strumento. La azione del tagliare può essere considerate come un processo meccanico di tipo

fratturativo nel quale la energia “in entrata” e’ fornita, almeno in parte, dallo strumento di taglio.[80] Il parametro fisico che genera il taglio e’ la forza di taglio F_c, che da origine ad una forza trasversale, normale a F_c,, chiamata F_t. F_c genera il lavoro esterno utile al verificarsi del processo di taglio; tale lavoro viene dissipato sotto forma di lavoro di frattura G_c, ma anche come lavoro di frizione e deformazione plastica.

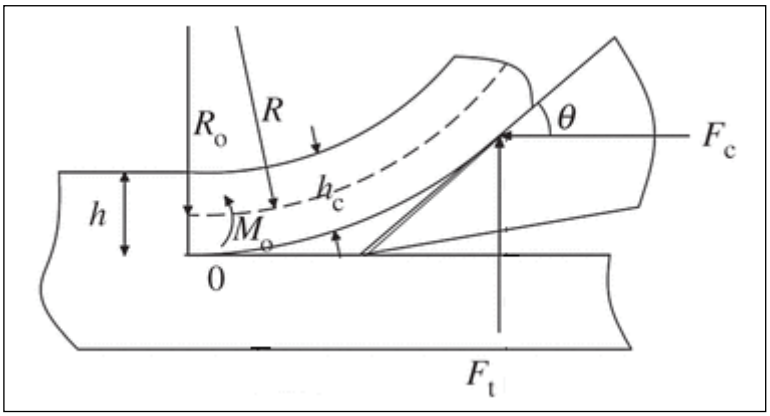


Figura 21 - http://rsfs.royalsocietypublishing.org/content/6/3/20150108 - J. G. Williams, and Y. Patel Fundamentals of cutting. Interface Focus 2016;6:20150108 – (modificata)

La Figura 18 mostra le varie energie attive durante la azione di taglio; profondità di taglio, h, spessore della fetta h_c, angolo dell’utensile di taglio ϑ. Le forze generate dall’utensile che si muove a velocità costante sono: F_c (nella direzione di taglio) (forza di taglio); F_t forza trasversale. L’angolo di taglio (clearance angle) e’ rappresentato alla faccia inferiore dell’utensile. La risultante delle forze : F_c ed F_t e’ la forza di separazione (shear force) S.

Una nota: in realtà la fetta non si stacca dalla lama ancora prima che questa “tocchi” il “fondo” del cuneo di separazione tra strati di paraffina, ma si stacca al fondo dell’angolo lama-fetta in distacco (meglio la figura 20). La figura 18 riassume la complessità delle forze agenti durante il taglio di materiali metallici senza dare una reale raffigurazione di ciò che avviene nella paraffina cristallina.

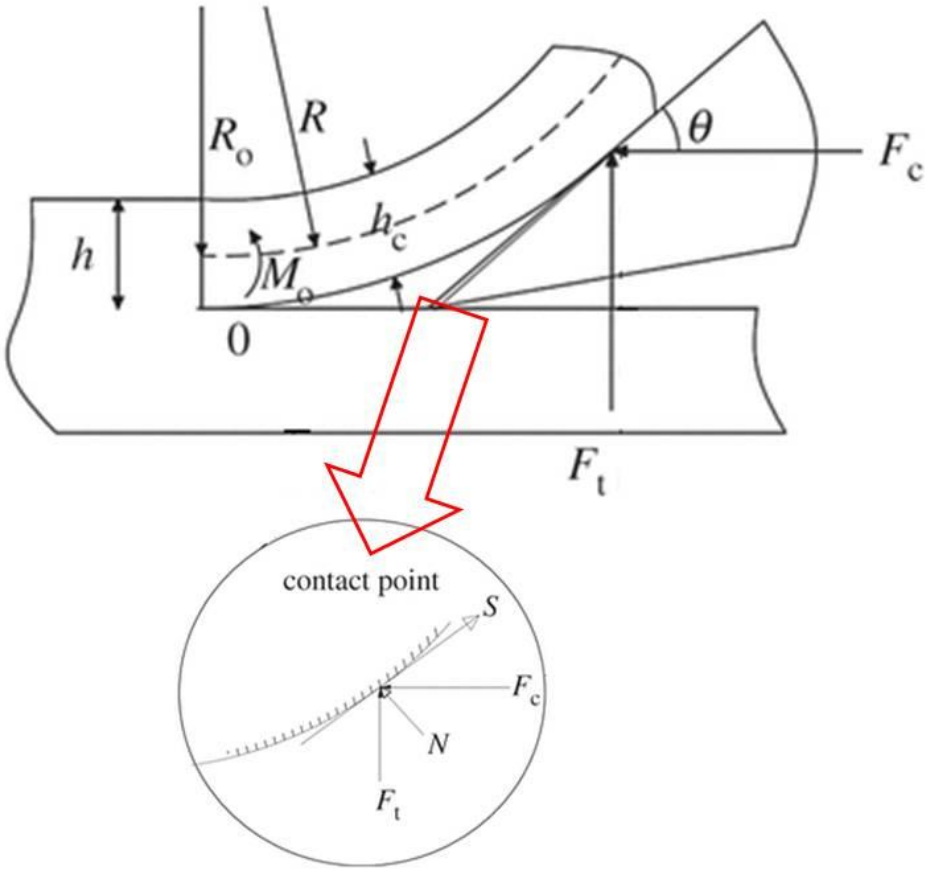


Figura 22 - http://rsfs.royalsocietypublishing.org/content/6/3/20150108 - J. G. Williams, and Y. Patel Fundamentals of cutting. Interface Focus 2016;6:20150108 – (modificata)

Legenda: h, the chip thickness, h_c, the specimen width, b, and the tool angle, ϑ. F_c force in the cutting direction, (the cutting force), transverse force F_t. A clearance angle; forces F_c and F_t acting at the contact point of the tool and the chip.

In una lama "ideale" (quella nella quale la affilatura ha determinato la esatta coincidenza in un unico e solo punto dei due piani di affilatura creando un filo monoatomico) le micro forze hanno identica direzione lungo l'intera linea di contatto della estremità della lama con la paraffina (vedi figura 18). Nelle lame reali invece la estremità della lama e' arrotondata (vedi figura 12) (anche se a piccolissimi raggi di curvatura inferiori al micron) e questo altera la direzione delle forze. [81] Questa curvatura altera anche il "rake angle" che per un taglio efficace dovrebbe essere il più ampio possibile. (figura 9). Dempster ha sperimentalmente[82] dimostrato che sezionando blocchetti di paraffina senza tessuto si aveva un range di compressione minore se la lama era tenuta ad un rake angle alto. Per il massimo grado di rake angle (72°) la distorsione e la compressione della fetta era nettamente minore (per un motivo geometrico all'aumentare del rake angle diminuiva il clearance angle).[83]

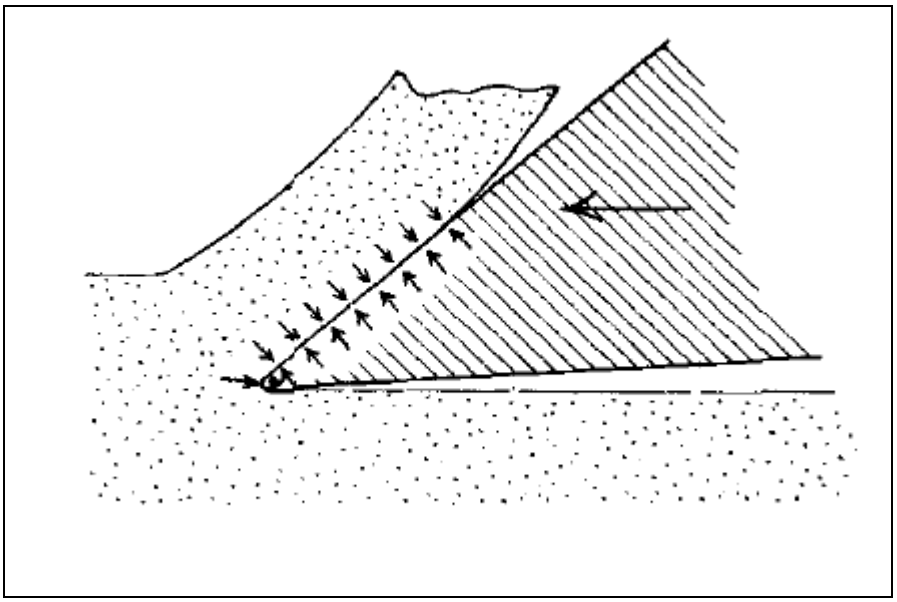


Figura 23 da Wilfrid Taylor Dempster – The Mechanism of Paraffin Sectioning by the Microtome – (modificato) " … the total forces exerted by the knife in cutting are diagrammed as a series of forces (arrows) normal to the surface of contact between the knife bevel and the paraffin. Opposing forces are also shown…"

Energia e lavoro di taglio

A. Griffith[84], ingegnere impiegato nel settore aeronautico, ha calcolato nel 1921 la quantità di energia necessaria per determinare cricche[85] nei metalli e nel vetro[86]. Studiando il problema delle cricche nei materiali aeronautici Griffith definì il valore $\mathbf{G_c}$ "Critical Strain Energy Release Rate" per ogni metallo. Nei materiali aeronautici può essere espresso in valori di pressione (psi per inch)[87] a cui viene sottoposto il metallo stesso durante il volo, valori oltre i quali si verifica una cricca[88].

La quantità di energia richiesta per determinare una frattura nella unità di area e' chiamata $\boldsymbol{G_c}$**.** $\mathbf{G_c}$ può anche essere visto come un fattore che esprime la "resistenza alla frattura" (fracture thoughness).

Quando un utensile di taglio si muove di una distanza ***dx*** effettuando il taglio, le variazioni energetiche [89]derivate dall'azione di taglio sono le seguenti:

Lavoro esterno $\boldsymbol{dU_{ext} = F_c . dx}$ (dove F_c e' la cutting force – forza di taglio)

Energia di frattura $\boldsymbol{dU_c = G_c . bdx}$ (dove G_c e' la energia per unita' di area e b e' la larghezza del taglio)

Energia di frizione $\boldsymbol{dU_f = S . dx}$ **(for** $\boldsymbol{h_c = h}$**)** (S e' la shear force – forza di distacco per una scheggia di spessore h_c pari alla profondita' di taglio h)

Energia di deformazione plastica $\boldsymbol{dU_d}$**.**

Il bilancio energetico durante il taglio di materiale caratterizzato da una frizione interna e capacita' di deformazione plastica e' dato dalla equazione:

$$dU_{ext} = dU_c + dU_f + dU_d$$

Nel caso di taglio di un materiale che determini una frizione nell'area di taglio (μ coefficiente Amontons/Coulomb di frizione = 0,2)[90] l'angolo di taglio (tool angle - Rake angle) θ determina una variazione della "efficienza" del taglio (F_c /G_c forza di taglio/ resistenza alla frattura) secondo il grafico sotto riportato

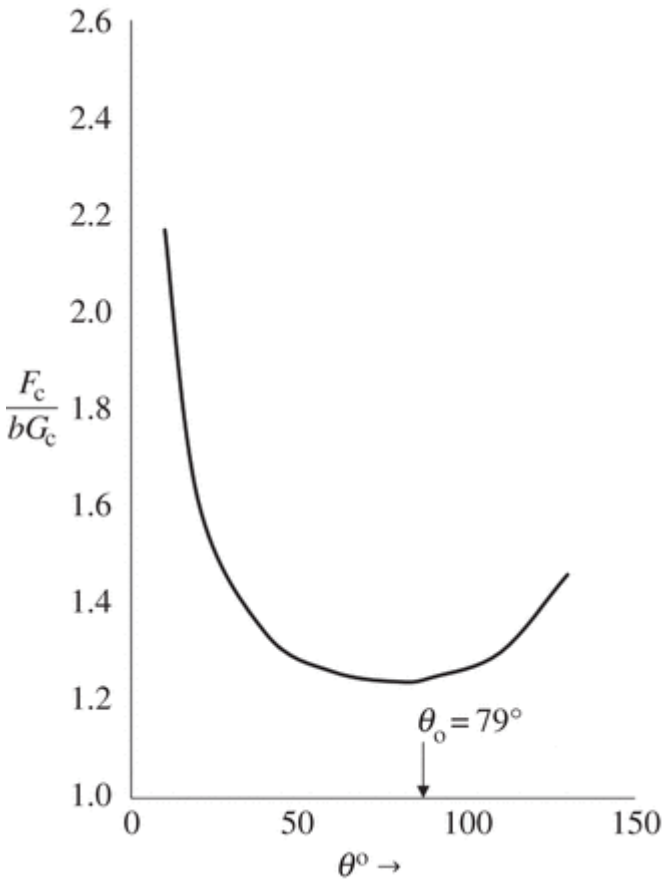


Figura 24 http://rsfs.royalsocietypublishing.org/content/6/3/20150108 - J. G. Williams, and Y. Patel Fundamentals of cutting. Interface Focus 2016;6:20150108 – (modificata)

Questo avviene anche in microtomia dove a parità di forza impressa al portalama il taglio sarà più o meno facile a seconda della inclinazione della lama (Clearance angle).

Il seguente grafico mostra la forza necessaria al taglio (resistenza al taglio) in relazione con l'angolo Clearance (qui definito Knife Tilt) per differenti tipi di tessuto biologico (cuore, utero, ecc.) incluso in paraffina – come si vede la resistenza (che e' alta per angoli minori di 2°) decresce bruscamente al di la di una inclinazione di almeno 5° e continua a decrescere sino ad una soglia di circa 10°, innalzandosi subito dopo.

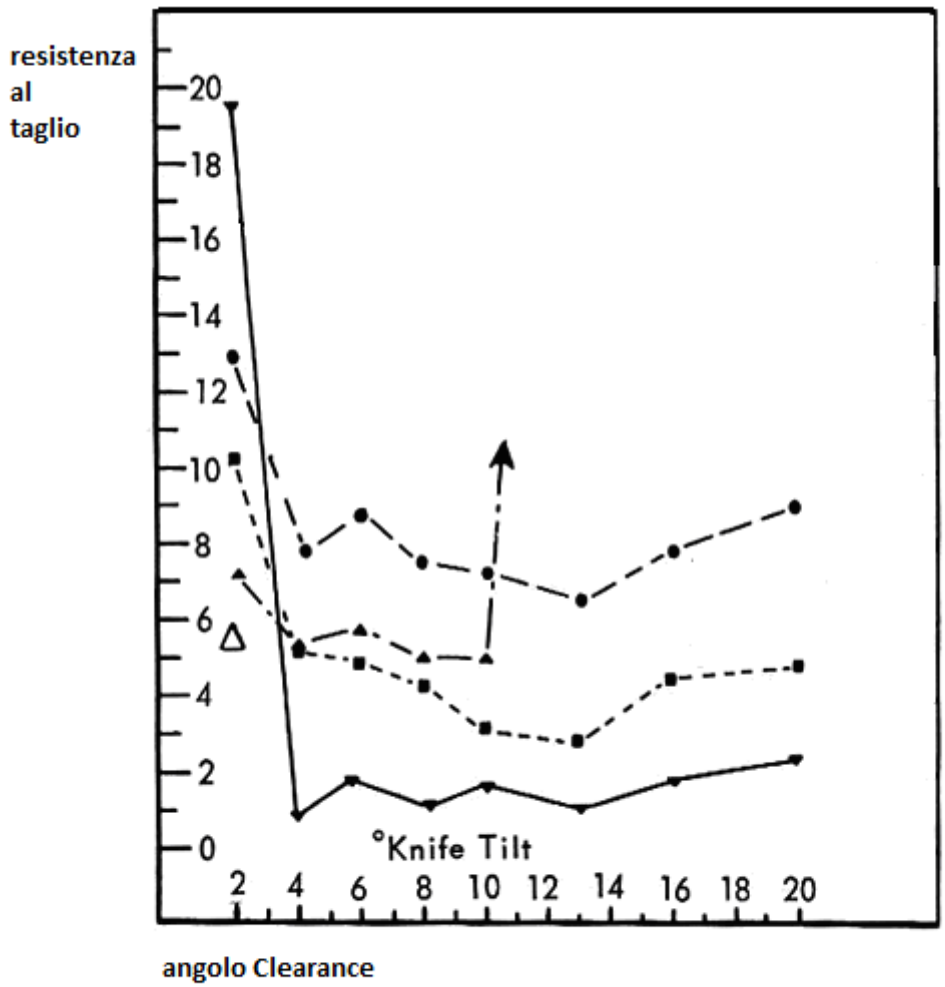


Figura 25 da Effective Use and Proper Care of Microtome – AO Optical 1975 – modificato- (Le diverse curve sono relative a vari tipi di tessuto biologico)

Una equazione[91] esprime i parametri fisici del lavoro relativo al taglio perpendicolare di materiale soffice ma dotato di una qualche forma di frizione(taglio paragonabile al taglio microtomico):

$$F_c d\delta = Rwd\delta - \mu N(d\delta/\cos\theta) = Rwd\delta + [\mu F_c/(\mu\cos\theta + \sin\theta)](d\delta/\cos\theta)$$

F_c e' la forza di taglio, ma essendo relativa al lavoro incrementale applicato alla lama in progressione (lunghezza = **d**δ) diviene $\mathbf{F_c d\delta}$.

R e' il lavoro di separazione della fetta di taglio, ma essendo applicato ad una fetta tridimensionale diviene **Rwd**δ, in quanto il lavoro **R** agisce su di una fetta di larghezza **W** e profondità **dA**, (o meglio, **d**δ considerando che la lunghezza della fetta e' pari alla distanza incrementale che la lama fa nella sua progressione di taglio) – **Rwd**δ e' il lavoro incrementale per una fetta di larghezza w e lunghezza **d**δ.

Trattandosi di un materiale dotato di una certa frizione, nella equazione deve comparire il fattore F. Quando la lama si muove lungo una distanza incrementale $\mathbf{d\delta/\cos\theta}$, la forza di frizione **F** (che si ricorda essere pari a μN) viene espressa come $\mathbf{\mu N(d\delta/\cos\theta)}$ dove **N** e' la forza di contatto della lama contro la

superficie di taglio e μ e' il coefficiente di frizione Amontons Coulomb. Il lavoro incrementale **μN** di frizione per la distanza **$d\delta/\cos\theta$** e' espresso nella equazione da: **μ N($d\delta/\cos\theta$)**

θ (e $\cos\theta/\sin\theta$) sono relativi all'angolo di taglio e alla distanza percorsa dalla lama avente angolo θ

Tradotto in parole molto povere la equazione ci dice che la forza di taglio, per una progressione della lama pari ad una distanza incrementale **$d\delta$**, (e per una fetta larga **w**) e' uguale lavoro di separazione della fetta **R** per la lunghezza e larghezza della fetta stessa meno il lavoro di frizione **μN** che la lama ha generato nel suo progredire per la distanza **$d\delta/\cos\theta$.**

Con ulteriori semplificazioni matematiche la equazione diviene:

$$F_c/w=RH_0\tan\theta$$

Se la frizione e' trascurabile la equazione diviene:

$$R=F_c/w$$

Durante il taglio di un materiale vi sono casi particolari che si possono riscontrare anche in microtomia (si pensi ad esempio al taglio microtomico della gomma o dei tessuti a fresco o della paraffina troppo molle). Esistono fondamentalmente due comportamenti nella zona di taglio, dipendenti dalla durezza e plasticità del materiale: il distacco di una scheggia (chip shearing) e la deformazione plastico/elastica di una parte del materiale che si viene poi a staccare (chip bending).

- deformazione elastica con o senza frizione
- curvatura plastico-elastica
- taglio plastico

La forza di taglio in microtomia e' stata calcolata inserendo dei sensori nella zona del portalama. In sezioni congelate la forza varia da 78,6 microjoules a 568 microjoules per blocchetti di 1mm^2 e spessore di taglio 0,5μ. La forza agente sul pezzo e' responsabile anche di una emanazione di calore per frizione (trasformazione in calore della forza di taglio)[92]

5. PARAFFINA: STRUTTURA E RESISTENZA AL TAGLIO

La paraffina istologica lasciata raffreddare nelle "cassette" e' formata da un insieme di cristalli finemente agglomerati.[93] Ogni cristallo ha un centro circondato da lamelle concentriche formate alternativamente dalle componenti soffici e dure delle varie sostanze che formano la mistura di paraffina. La grandezza del tipico cristallo di paraffina e' di circa 4x0,1mm. I cristalli di paraffina sono orientati in maniera differente all'interno del blocchetto; quelli periferici sono orientati parallelamente alle facce del blocchetto, quelli interni formano una rete aggrovigliata.[94]

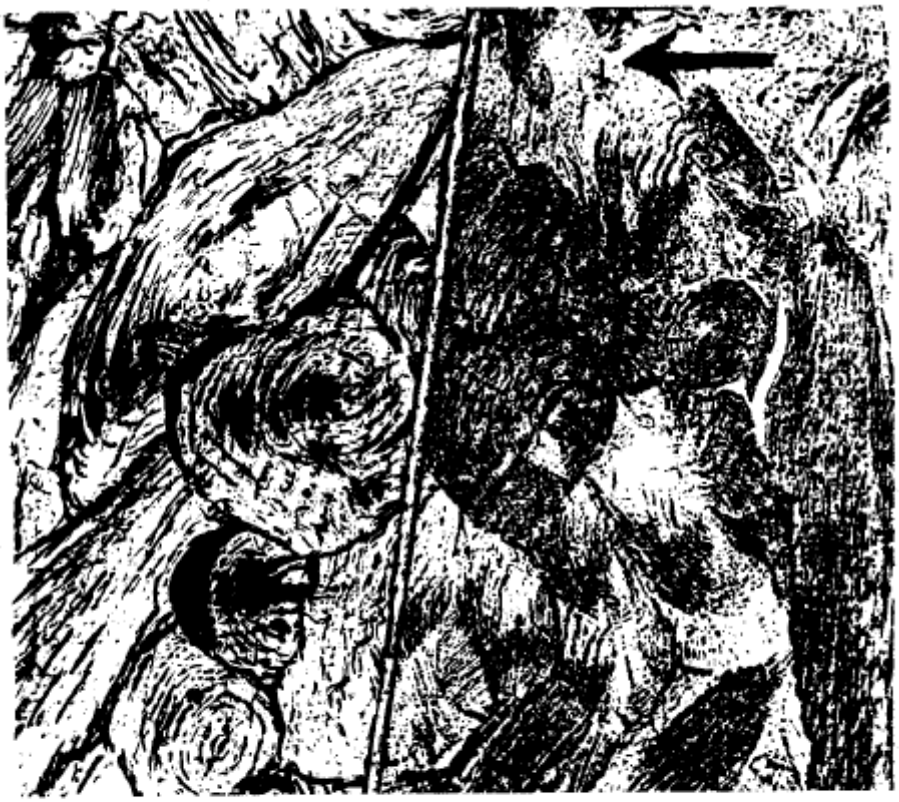


Fig. 3 Mosaic of paraffin crystal slices as seen in a 20 μ section of 53-5°C., m.p. paraffin. × 150. Oblique, longitudinal and cross sections show suggestions of lamellar pattern. Black splotches and heavy lines indicate opacity deformation. At the right, flooding of the section with amyl acetate brings out the lamellar structure. Check lines, mostly transverse to direction of cutting (arrow), and stippling suggest disintegrative action of the knife on the lamellar pattern.

Figura 26 da Wilfrid Taylor Dempster – The Mechanism of Paraffin Sectioning by the Microtome

Quando la lama “aggredisce” il blocchetto si notano delle linee di separazione tra i cristalli di paraffina che si estendono a tutto il blocchetto con un angolo di 45°.[95] Nel frattempo si formano “vuoti” tra I cristalli di paraffina, segno di un movimenti tra i cristalli (che precede la rottura dei legami tra I cristalli di paraffina). La separazione tra I cristalli avviene lungo il piano di progressione della lama. La lama quando si impegna in un cilindro di paraffina si osserva un fronte di compressione che si dirama al davanti della lama ed una zona di tensione alle “spalle” della lama.[96]

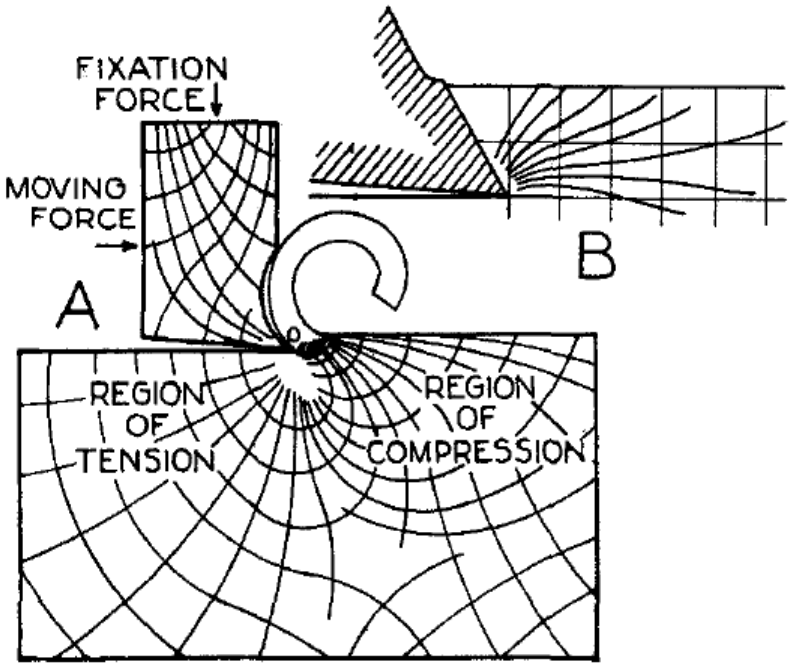


Figura 27 A. Grafico dello "stress" di un utensile di macchina fresatrice che taglia una scaglia di metallo (modificato da Coker and Filon). L'area in grigio accanto ad 0 indica la regione di deformazione plastica . B. Linee di separazione nella regione davanti all'apice dell'utensile (da Okoshi and Fukui). – da W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

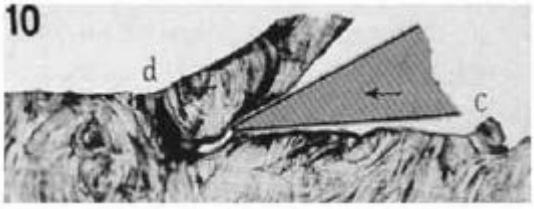


Figura 28 "… nella figura 10, la separazione tra I cristalli alla estremità della lama dimostra ulteriormente il movimento inter-cristallino – movimento tuttavia in questo caso associate con la rottura a livello dei confine tra cristalli…" da Wilfrid Taylor Dempster – The Mechanism of Paraffin Sectioning by the Microtome

Esistono altresì fenomeni di deformazione plastica oltre che di separazione tra cristalli e sono visibili al davanti della fetta che si sta formando. Parte del lavoro di taglio viene trasformato in calore e ciò contribuisce a determinare una modificazione plastica.

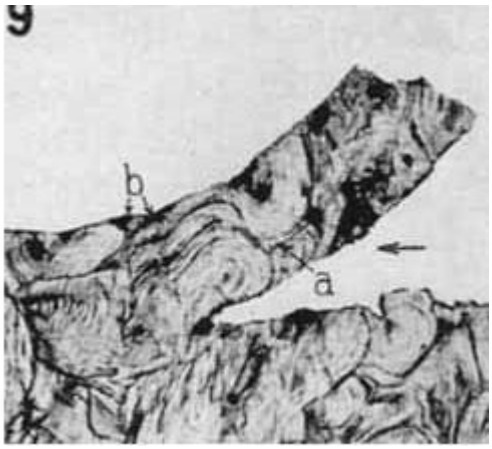


Figura 29 "… la Figura 9 mostra un taglio spesso dallo stesso blocchetto con evidenza di scivolamento intercristallino (in a) e flusso plastico (in b)…" - da W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

Il taglio dei tessuti inclusi in paraffina altera le proprietà sopra descritte (relative a blocchetti di paraffina senza tessuto incluso). Il blocchetto istologico e' di fatto una rete di tessuto (con proprietà di gel o colloide[97]) all'interno della quale si trovano i cristalli di paraffina.[98] In generale i piani di separazione non si formano omogeneamente come nella sola paraffina, perché il tessuto incluso si comporta in modo diverso. A seconda del tipo di tessuto il taglio può avvenire per separazione nel tessuto mentre la circostante paraffina subisce una deformazione plastica, oppure al contrario si ha deformazione plastica del tessuto e taglio della circostante paraffina. Il taglio dipende dalle differenti proprietà elastiche e plastiche delle componenti del blocchetto (tessuto e paraffina).[99]

Dempster[100] conclude raccomandando i seguenti passi nel taglio microtomico:

- Lama con angolo di affilatura stretto, con un raggio di curvatura piccolo e bassa deflessione dell'apice durante la progressione
- Lama acuta; un basso angolo di curvatura della estremità della lama, un angolo bevel acuto e faccette di affilatura strette permettono di incrementare l'angolo Rake (e di conseguenza diminuire l'angolo Clearance)
- Bassa resistenza alla progressione della lama; pulizia da detriti, assenza di indentature da scarsa affilatura
- Lama fredda: permette di dissipare il calore da frizione durante il taglio

I primi 3 punti permettono di ridurre la componente di forza compressiva diretta in senso anterogrado alla lama. L'affilatura della lama e il basso raggio di curvatura della parte affilata diminuiscono tale componente compressiva. Il basso calore di lama e paraffina sono importanti perché diminuiscono l'adesione della paraffina alla lama

5. FORMATURA DEL BLOCCHETTO E SGROSSATURA ("TRIMMING")

Come già detto, il campione biologico una volta fissato viene incluso in paraffina fusa[101] per "sostenere" la struttura anatomica del pezzo che altrimenti si strapperebbe e deformerebbe durante la azione di taglio.

Un tempo la paraffina veniva versata all'interno di una forma metallica rimovibile composta da due pezzi di bronzo od ottone a L (Leuckhart's L pieces)[102] oppure in micro-vassoi metallici. Oggi viene versata in una piccola vaschetta con coperchio ("cassetta") di materiale plastico traforato che fungerà anche da supporto durante il taglio.

Figura 30 "cassette" monuso per inclusione in paraffina

Il blocco di paraffina contenente il preparato un tempo veniva fatto aderire ad un pezzetto di legno che serviva da supporto e che veniva serrato tra le ganasce della morsa del porta-pezzi.

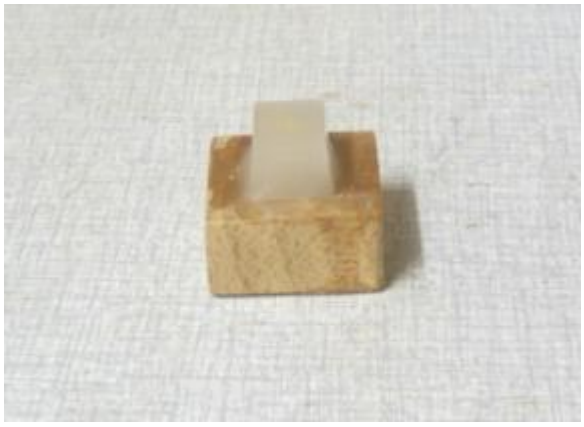


Figura 31 – da http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artfeb07/yl-para2.html

Appena formato il blocchetto di paraffina e' ridondante rispetto al preparato perché di solito la forma della cassetta (o dello stampo metallico) e' standard e di molto superiore alla dimensione del preparato; troppa paraffina ai bordi del pezzo determina un difetto di formazione del "nastro" e difficoltà di appianamento della fetta nel bagno di distensione. Bisogna quindi togliere la paraffina in eccesso ai bordi del pezzo e conformare il blocchetto in modo adeguato rispetto la direzione di taglio. L'eccesso di paraffina non solo determina la creazione di un nastro curvo, ma aumenta anche la distorsione del pezzo.[103]

- I lati del blocchetto da tagliare devono essere paralleli per ottenere un nastro regolare e dritto
- La paraffina che circonda il preparato non deve essere più larga di 1/8 di pollice[104]

Il pezzo incluso in paraffina e' "annegato" nella stessa e per decidere quale sia il migliore orientamento di taglio (ed anche per determinare il corretto piano di taglio) bisogna far emergere la faccia di taglio dalla paraffina. La azione di asportazione della paraffina in eccesso e' detta "trimming". Molti microtomi hanno la possibilità di selezionare uno spessore di taglio standard di 30 micron per il trimming, ma viene raccomandato di non eccedere nella asportazione di grosse fette di paraffina, limitandosi a togliere 10-30 micron alla volta.[105] Una volta raggiunta la quota adeguata bisogna asportare qualche fetta sottile per "lucidare" la superficie definitiva di taglio.

6. ORIENTAMENTO DEL TESSUTO RISPETTO LA LAMA

Dopo lo sgrossamento dalla paraffina in eccesso emerge chiaramente la forma del tessuto ivi incluso perché la faccia superiore del campione viene evidenziata dalla asportazione della paraffina sovrastante. Qualora non si sia già provveduto a ciò prima dello sgrossamento, a questo punto e' possibile orientare in modo corretto il campione rispetto la lama, al fine di evitare artefatti da taglio.

Il seguente grafico mostra come la forza di taglio applicata ad una lama orientata a 90° rispetto la direzione di taglio debba essere minore quando la lama affronta la sola paraffina e debba aumentare quando incontra il tessuto qualora si voglia tagliare con velocità costante.

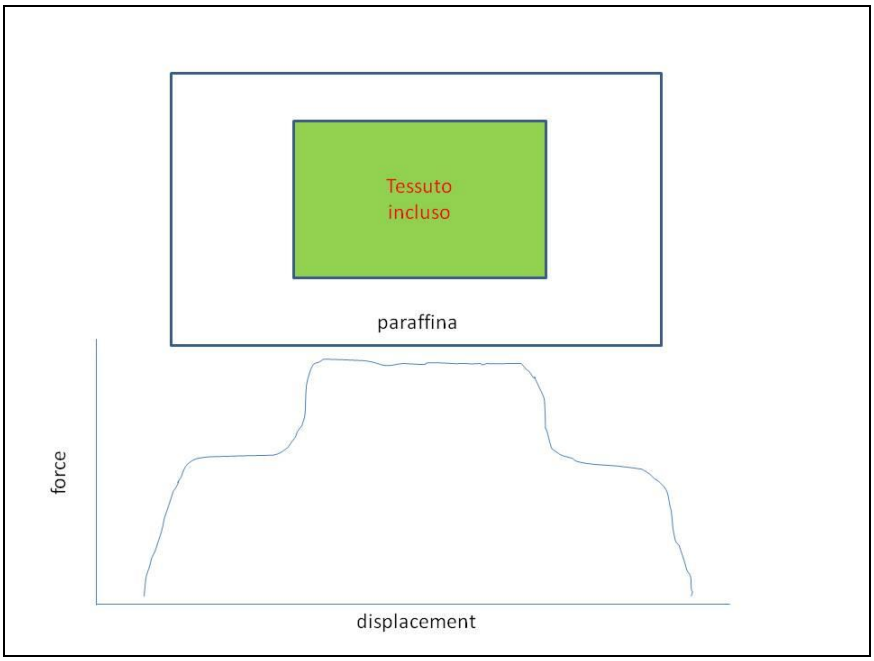


Figura 32 da Willis e Vincent 1995 (modificato) – pubblicato su T. Atkins – The Science and Engineering of Cutting – Elsevier 2009

Il campione da tagliare, inoltre, può avere parti più dure e parti più molli oppure ha una forma che presenta una faccia angolata ed una più rettilinea. Il pezzo quindi andrebbe orientato in modo adeguato[106] per evitare che la lama possa provocare compressione/distorsione sul pezzo durante il suo avanzamento.

- Campioni duri come l'osso andrebbero orientati obliquamente
- Strutture cave di tipo cistico o intestino andrebbero orientati verso una estremità del campione
- Intestino: la lama deve passare sulla mucosa per ultima

- Cute: la lama deve passare sull'epidermide per ultima
- Cervice uterina: la lama deve trovare per prima una zona ad angolo, poi può affrontare la faccia rettilinea

7. TAGLIO

La velocità di progressione della lama durante il taglio deve essere adeguata, ne troppo veloce ne troppo lenta. Non si dovrebbe esitare durante il taglio, ma tagliare con un movimento fluido senza interruzioni. La velocità di taglio raccomandata in microtomi rotativi a motore non deve superare i 60 tagli al minuto.[107]

Raffreddare il blocchetto con ghiaccio e alitare sopra il blocchetto sono metodi per "bagnare" la paraffina. L'uso di acqua sulla lama durante il taglio potrebbe derivare dalla necessità di ridurre la adesione della lama alla paraffina[108] e quindi migliorare la scorrevolezza del taglio.

Come minimizzare la distorsione del pezzo durante il taglio? Come si e' visto le forze agenti sulla paraffina determinano una compressione nella direzione di progressione della lama ed una deformazione elastica della zona di penetrazione della lama, oltre che la genesi e propagazione di linee di separazione dei cristalli di paraffina che si diramano a circa 45° al davanti della lama. La distorsione produce fette che sono lievemente più corte della grandezza originaria e lievemente più spesse.[109] I fattori determinanti[110] una compressione (che comporta tralaltro la irregolarità dello spessore della fetta) sono:

- Conformazione della parte affilata delle lama
- Tilt della lama (Clearance e Rake angle) (Clearance angle raccomandato da 2 a 6°)
- Temperatura della paraffina
- Tipo di paraffina utilizzata

Il nastro che si forma durante il taglio va maneggiato con un pennello , se possibile di pelo di cammello,[111] e la estremità va tenuta con un ago da dissezione. I nastri tagliati possono essere temporaneamente riposti su di un foglio di carta od in una scatola.

8. ARTEFATTI DURANTE IL TAGLIO[112]

- Fetta troppo spessa nonostante si sia scelto uno spessore di taglio adeguato: si e' alitato sul blocchetto nel tentativo di riscaldare una paraffina troppo fredda, progressione della lama in modo troppo veloce, errore di calibrazione del microtomo che va aggiustato
- Buchi grossolani nella fetta: durante la azione di sgrossatura (trimming) si e' ecceduto nell'asportare materiale oppure si e' andati troppo veloci nella sgrossatura. Non si e' provveduto a tagliare qualche fetta sottile dopo la sgrossatura lasciando il blocchetto grezzo. Blocchetto troppo freddo che si e' "criccato"
- Linee parallele verticali dovute alla azione della lama: lama da riaffilare, materiale duro strappato dal tessuto durante il taglio (calcio), residui contaminanti non adeguatamente filtrati nella paraffina , sali derivanti da sostanze tampone che sono precipitati nelle fasi di fissazione
- Fetta "stracciata": maltrattamento durante la sgrossatura
- Piccole cricche (micro- chatters): blocchetto toppo freddo, alta velocità di taglio, vibrazioni dovute alla lama/portapezzi non sufficientemente stretti, angolo della lama non adeguato

- Sezione a gradini o a “tapparella”: dovuta alle vibrazioni del pezzo o della lama o allo scorretto angolo della lama. Anche il blocchetto troppo largo influisce.
- Pieghe durante il taglio: blocchetto troppo caldo, sezioni troppo sottili, angolo di inclinazione troppo elevato

Rimedi: stringere i fermi della lama e del portapezzi; ridurre l’angolo di inclinazione della lama; usare un liquido umettante sulla faccia del blocchetto che va tagliata; usare una parte della lama fresca e sicuramente affilata; togliere i residui di paraffina dalla lama; raffreddare il blocchetto

- Fetta deformata dalla compressione: blocchetto troppo caldo, taglio troppo veloce, lama poco affilata, angolo di inclinazione troppo accentuato

Rimedi: raffreddare il blocchetto, cambiare la lama

- Fette arrotolate: dovute all’eccessivo angolo di declinazione della lama o alla lama non affilata

Rimedi: ridurre angolo di declinazione e cambiare lama

Alcuni suggerimenti sul taglio microtomico sono riportati nella tabella sottostante:

Fissare adeguatamente Il preparato	Fissare troppo a lungo rende il campione fragile e friabile
Umidificare il pezzo	Se il tessuto e’ duro (connettivo) oppure friabile si può umidificare il pezzo con acqua distillata. Usare un tamponcino di cotone umidificato da passare sopra il pezzo tra una passata di taglio e l’altra. Soluzioni alternative per ammorbidire sono l’ammorbidente per tessuti[113] e una soluzione di detergente delicato
Raffreddare il blocchetto	Appoggiare il blocchetti su di un pezzo di ghiaccio coperto da un foglio di alluminio per 5 minuti. NON mettere in frigorifero o congelatore! Tendono a rompersi
Usare lame nuove	Usare lame nuove di buona qualità NON tagliare con la parte di lama precedentemente usata per il trimming
Provare a tagliare a spessori diversi	Spesso le sezioni più buone emergono a spessori lievemente più spessi o sottili dello “standard” Provare ad alternare spessori di taglio differenti
Adeguato bagno di distensione	Acqua distillata tenuta ad una temperatura di 5-9 gradi inferiore al punto di fusione della paraffina Asciugare le fette poste su vetrino a 37° per una notte
Trovare il ritmo di taglio adeguato	Una passata di taglio progressiva, lenta, senza pause e’ la più adeguata
Rimuovere i residui dalla lama e dal blocchetto	I residui che aderiscono al blocchetto o alla lama impediscono la formazione del nastro – pulire frequentemente la lama

Figura 33 Dr. Jennifer Redig Advanced Sectioning Techniques: How to Section Difficult Tissues. – (modificato)
http://bitesizebio.com/13470/advanced-sectioning-techniques-how-to-section-difficult-tissues/

9. FORMAZIONE DEL NASTRO

Solitamente si tagliano numerose fette di seguito, formando un nastro di fette, tutte adese le une alle altre. Questo perché dal nastro di più fette contigue si possono preparare più vetrini con sezioni seriali di un tessuto (per valutare la profondità di disseminazione di eventi patologici all’interno del tessuto) oppure più

banalmente per scegliere la fetta migliore tra le numerose appena tagliate. Il nastro di fette dovrebbe essere dritto e ben svolto. Le fette dovrebbero essere rettangolari o quadrate e di spessore uniforme.

Problemi durante la formazione del nastro[114]:

- Nastro curvato verso un lato oppure fette curve e non rettangolari: lama non affilata; troppa paraffina attorno al pezzo; blocchetto non sgrossato adeguatamente prima del taglio con lati non paralleli; lama non parallela ai lati del blocchetto
- Alternanza di sezioni sottili e spesse: paraffina troppo calda, angolo di inclinazione non sufficiente; problemi del microtomo
- Impossibilità di ottenere un nastro: paraffina troppo dura; angolo di inclinazione non corretto; detriti sulla lama
- Fette che si attaccano alla lama durante la passata di ritorno: paraffina troppo calda

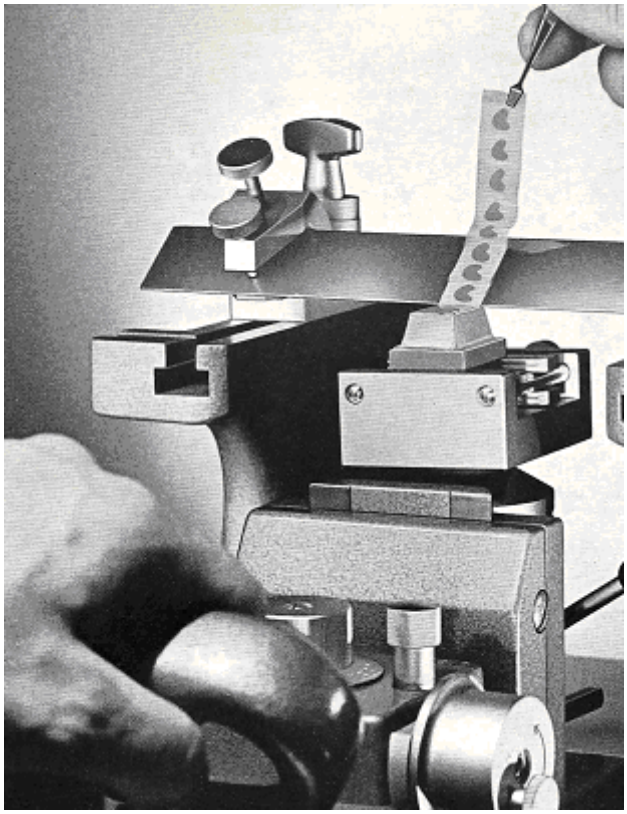


Figura 34 Brochure Leitz 530-8/d (modificato) – attenzione! La lama non e' protetta da coprilama e ogni movimento accidentale vicino alla lama scoperta puo' essere causa di gravi tagli alle mani dell'operatore

10. PRELEVAMENTO DELLA FETTA

Il prelevamento della fetta o del nastro appena formato avviene con un pennellino inumidito oppure con una pinzetta; e' il momento più critico per l'operatore inesperto poiché il bordo della lama, specie se si usano le lunghe lame dei microtomi a slitta, e' molto vicino al dorso della mano che preleva la fetta. Se la lama non e' protetta adeguatamente c'e' il rischio di toccare col la mano la lama stessa.

11. DISTENSIONE

La fetta appena prelevata (o il nastro di fette) e' di solito un poco "accartocciata" per via delle forze di compressione e deformazione plastica; il nastro o la fetta va adagiato nel bagno stendi fette per poterla distendere adeguatamente.

Figura 35 da http://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/microtome-accessories/products/leica-hi1210/ (modificato)

Anche durante la fase di distensione delle fette ci possono essere dei problemi che trovano soluzioni adeguata[115] (basta saperlo!)

- Pieghe nella fetta: bagno di distensione troppo caldo; errori durante la distensione della fetta
- Bolle sotto la fetta adesa al vetrino: non si sono eliminate le bolle d'aria nel bagno di distensione
- Eccessiva espansione della fetta: acqua troppo calda, fetta lasciata troppo a lungo nel bagno di distensione, residui di solventi nella paraffina della fetta appena tagliata
- Fetta non piatta: acqua del bagno troppo calda, vetrino non adeguatamente sgocciolato dopo la raccolta della fetta; asciugatura a temperatura troppo bassa

12. ADESIONE AL VETRINO PORTAOGGETTO

Le fette appena tagliate e prelevate dal bagno stendifette aderiscono naturalmente al vetrino; L'adesione può essere dovuta alle forze agenti sulle due superfici piatte. Un largo contatto tra vetro e fetta consente che le forze di attrazione non ioniche (forze di van der Waals e legami idrogeno) diventino predominanti facendo aderire le fette. Anche le forze di tipo ionico contribuiscono alla adesione della fetta al vetrino, poiché il silicio del vetro e' caricato negativamente ed I gruppi basici delle proteine sono caricati positivamente.

Un ulteriore metodo per facilitare l'adesione delle fette al vetrino e quello di utilizzare vetrini ricoperti di polilisina[116]. La polilisina ha una carica positiva ed attrae le proteine della fetta, tendenzialmente caricate negativamente.

---

[1] Lorenzo Conti, Medico Chirurgo, specialista in anestesia e rianimazione; avendo un lontano passato di tirocinante in un servizio di anatomia patologica, ho mantenuto la passione per la microscopia ottica, preparando a casa i vetrini che amo osservare. Poiché posseggo dei microtomi professionali reperiti sul web, mi sono posto il problema di redigere alcune note tecniche per eventuali appassionati che siano interessati alla problematica del taglio microtomico dei preparati per la microscopia ottica.

[2] Light and Tissue1 - Benjamin Judkewitz – Postdoctoral Fellow Biophotonics Laboratory California Institute of Technology - http://www.its.caltech.edu/~bi177/private/L6_handout.pdf

[3] δια σκοπειν – guardo attraverso – metodica di osservazione in cui la luce attraversa (di solito dal basso) il preparato e lo illumina per trasparenza.

[4] In realtà, esistono altri metodi per osservare in diascopia le singole cellule di un tessuto: la tecnica di frammentare apici di radice dopo averli trattati con acido per osservare le mitosi cellulari e la realizzazione di strisci ematici o di cellule esfoliate od ancora la realizzazione di strisci di batteri e l'osservazione in vivo di cellule in sospensione acquosa sono esempi di metodiche utili a separare le singole cellule in uno strato sottile atto ad essere osservato in diascopia. http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-specimen-preparation/

[5] "…L'interazione dei fotoni con differenti strutture cellulari dà origine ad un scattering elastico. Lo scattering è un processo di assorbimento e riemissione del fotone senza perdita di energia ma può essere associato ad un cambiamento della direzione del fotone. Per le strutture biologiche la ri-emissione ha un'alta probabilità di essere "in avanti" per ogni evento di scattering. Nonostante ciò, l'accumulo di multipli eventi di scattering comporta una graduale randomizzazione della direzione di propagazione…" Vasilis Ntziachristos: Going Deeper than microscopy; the optical imaging frontier in biology - Nature Methods 7 - 603-614 (2010)

[6] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell, 4th edition - Looking at the Structure of Cells in the Microscope - New York: Garland Science; 2002

[7] http://www.eng.ucy.ac.cy/cpitris/courses/ECE477/presentations/English/05.%20Tissue%20Optics.pdf

[8] https://www.slideshare.net/roadtorajendra/diffuse-optical-tomography

[9] http://heelspurs.com/a/led/skullbook.pdf - Chapter 2 Fundamentals of Tissue Optics

[10] http://heelspurs.com/a/led/skullbook.pdf - Chapter 2 Fundamentals of Tissue Optics

[11] Steven L Jacques Optical properties of biological tissues: a review 2013 *Phys. Med. Biol.* 58 R37

[12] Scattering anelastico (inelastic/incoherent scattering): è quella forma di scattering in cui, a differenza dello scattering elastico, l'energia del fotone cambia dopo l'interazione con la materia. Si distingue in Compton scattering e Fluorescenza. The Compton Scattering is an inelastic scattering of a photon by a free charged particle, usually an electron. It results in a decrease of the photon's energy/momentum (increase in wavelength), called the Compton effect. Part of the energy/momentum of the photon is transferred to the scattering electron ('recoil'). Fluorescence:

this is an inelastic (incoherent) scattering mechanism, in which a photon excites an electron by at least two energy states, and the spontaneous de-excitation occurs to one or more of the intermediate energy levels. Consequently, the photon that is 'scattered' (i.e., absorbed and re-emitted) has changed its energy. http://www.astro.yale.edu/vdbosch/astro320_summary23.pdf

[13] Light and Tissue1 - Benjamin Judkewitz – Postdoctoral Fellow Biophotonics Laboratory California Institute of Technology - http://www.its.caltech.edu/~bi177/private/L6_handout.pdf

[14] http://omlc.org/classroom/ece532/class3/gdefinition.html

[15] Idem

[16] Se g è compreso tra -1 e 0 lo scattering è anisotropico ma la direzione della luce sarà verso l'indietro; se g = 0 si ha uno scattering unidirezionale (isotropico); se **g** è compreso tra 0 e 1 lo scattering è anisotropico, ma la direzione sarà anterograda - http://www.its.caltech.edu/~bi177/private/L6_handout.pdf

[17] http://heelspurs.com/a/led/skullbook.pdf - Chapter 2 Fundamentals of Tissue Optics

[18] "…Because of its wave nature, light does not follow exactly the idealized straight ray paths predicted by geometrical optics. Instead, light waves travel through an optical system by a variety of slightly different routes, so that they interfere with one another and cause *optical diffraction* effects. If two trains of waves reaching the same point by different paths are precisely *in phase*, with crest matching crest and trough matching trough, they will reinforce each other so as to increase brightness. In contrast, if the trains of waves are *out of phase*, they will interfere with each other in such a way as to cancel each other partly or entirely…" "…When light passes through a living cell, the phase of the light wave is changed according to the cell's refractive index: light passing through a relatively thick or dense part of the cell, such as the nucleus, is retarded; its phase, consequently, is shifted relative to light that has passed through an adjacent thinner region of the cytoplasm..." Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell, 4th edition - Looking at the Structure of Cells in the Microscope - New York: Garland Science; 2002

[19] http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/phasecontrast/phase.html

[20]"… In effect, the phase contrast technique employs an optical mechanism to translate minute variations in phase into corresponding changes in amplitude, which can be visualized as differences in image contrast…" https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy

[21] L. T. Perelman, V. Backman, M. Wallace2 G. Zonios R,. Manoharan, A. Nusrat, S. Shields, M. Seiler, C. Lima, T. Hamano, I. Itzkan, J. Van Dam, J. M. Crawford, and M. S. Feld - Observation of Periodic Fine Structure in Reflectance from Biological Tissue: A New Technique for Measuring Nuclear Size Distribution - Physical Review Letters Vol. 80 Number 3 January 1998

[22] Si ricorda che la lunghezza d'onda della luce visibile è compresa tra 400 e 700 nanometri (0,4-0,7 μ).

[23] Vasilis Ntziachristos - Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology - *Nature Methods* 7, 603–614 (2010)

[24] http://www.its.caltech.edu/~bi177/private/L6_handout.pdf

[25] Ballistic photons are the light photons that travel through a scattering (turbid) medium in a straight line. https://en.wikipedia.org/wiki/Ballistic_photon

[26] Light and Tissue1 - Benjamin Judkewitz – Postdoctoral Fellow Biophotonics Laboratory California Institute of Technology - http://www.its.caltech.edu/~bi177/private/L6_handout.pdf

[27] Lihong V. Wang e Hsin I Wu – Biomedical Optics Wiley 2007

[28] Si parla di **scala macroscopica** (o **punto di vista macroscopico**) quando l'indagine del sistema viene svolta da un osservatore (reale o immaginario) posizionato rispetto al sistema ad una distanza così lontana da riuscire a coglierne le caratteristiche globali; si parla invece di **scala microscopica** (o **punto di vista microscopico**) quando l'indagine del sistema viene svolta da un osservatore (reale o immaginario) posizionato così vicino al sistema in esame da potere cogliere le caratteristiche delle parti più elementari (ad esempio struttura cristallina, molecole o atomi) che costituiscono il sistema; si parla infine di **scala mesoscopica** (o **punto di vista mesoscopico**) in tutti i casi intermedi tra macroscopico e microscopico. La **scala nanoscopica** (o **punto di vista nanoscopico**) corrisponde inoltre al limite inferiore della scala mesoscopica, vicina alla scala microscopica. - https://it.wikipedia.org/wiki/Scala_di_lunghezza

[29] SPIM selective plane illumination microscopy

[30] Confocal microscopy, most frequently confocal laser scanning microscopy (CLSM), is an optical imaging technique for increasing optical resolution and contrast of a micrograph by means of adding a spatial pinhole placed at the confocal plane of the lens to eliminate out-of-focus light.[1] It enables the reconstruction of three-dimensional structures from sets of images obtained at different depths (a process known as optical sectioning) within a thick object. https://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_microscopy

[31]MSOT: The method operates through several millimeters to centimeters of tissue enabling tomographic three-dimensional imaging with optical contrast, significantly deeper than even the most advanced forms of modern

microscopy. - MSOT allows safe power delivery in tissue by operating in the near-infrared (NIR) spectral region, where low light attenuation allows deep penetration in tissue. High detection specificity is achieved by resolving multiple spectral signatures through tissues and accurately decomposing the biodistribution of relevant molecules from non-specific background contributions.- Principle of MSOT operation: Pulsed light of time-shared multiple wavelengths illuminates the tissue of interest and establishes transient photon fields in tissue. In response to the fast absorption transients by tissue elements, acoustic responses are generated via the photoacoustic phenomenon, which are then detected with acoustic detectors. By modelling photon and acoustic propagation in tissues and using inversion methods, images can then be generated and spectrally unmixed to yield the biodistribution of reporter molecules and tissue biomarkers. Light of different wavelengths is selected to target the absorption transient of the chromophore or fluorochrome, as selected for spectral differentiation.

[32] Optical coherence tomography (OCT) is an established medical imaging technique that uses light to capture micrometer-resolution, three-dimensional images from within optical scattering media (e.g., biological tissue)…" "…An optical beam is directed at the tissue, and a small portion of this light that reflects from sub-surface features is collected. Note that most light is not reflected but, rather, scatters off at large angles. In conventional imaging, this diffusely scattered light contributes background that obscures an image. However, in OCT, a technique called interferometry is used to record the optical path length of received photons allowing rejection of most photons that scatter multiple times before detection. Thus OCT can build up clear 3D images of thick samples by rejecting background signal while collecting light directly reflected from surfaces of interest…." - https://en.wikipedia.org/wiki/Optical_coherence_tomography

[33] https://en.wikibooks.org/wiki/Cell_Biology/Introduction/Cell_size

[34] http://www.woodanatomy.ch/preparation.html

[35] http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-specimen-preparation/

[36] https://www.researchgate.net/post/does_anyone_what_is_the_best_cutting_Thickness_for_microtome

[37] David H Cormack Essential Histology – Lippincott 2001

[38] http://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-ultramicrotomy/

[39] http://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-ultramicrotomy/

[40] Anche oggi sono disponibili sul mercato microtomi per il taglio a mano; sono essenzialmente delle viti micrometriche che innalzano un pistone che protrude il pezzo al di sopra di un piatto cilindrico sul quale si fa scorrere un rasoio od una lametta da barba. Per tutti i motivi che vengono descritti in questo articolo tale sistema non puo' realizzare fette adeguate. Il vantaggio e' il loro basso costo.

[41] μιχροσ – τεμνειν – tagliare piccolo

[42] https://en.wikipedia.org/wiki/Microtome

[43] Effective use and proper care of the microtome – American Optical 1975

[44] Jan Evangelista Purkyně (o Johannes Evangelista Purkinje; Libochovice, 17 dicembre 1787 – Praga, 28 luglio 1869) era un anatomista e neurofisiologo Boemo. Fece numerose scoperte tra cui le cellule del Purkinje del cervelletto, neuroni inibitori del cervelletto che contribuiscono a modulare il movimento.

[45] Effective use and proper care of the microtome – American Optical 1975

[46] http://www.sciencemuseum.org.uk/ broughttolife /objects /display?id=5771 - http://www.museumsinisrael.gov.il/en/items/Pages/ItemCard.aspx?IdItem=ICMS-MTC-2794 - http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/objects/display?id=3871 - http://www.leitzmuseum.org/getcontents-date.html - https://www.slideshare.net/Ectise/ichst-2009-budapest

[47] https://www.theguardian.com/science/neurophilosophy/2014/mar/10/neuroscience-history-science

[48] http://himetop.wikidot.com/sigmund-freud-museum

[49] https://www.researchgate.net/publication/258221245_Microtomes_and_Microtome_Knives_-_A_Review_and_Proposed_Classification

[50] La foto-rottura (photodisruption – optical break down) avviene mediante la liberazione di plasma all'interno del tessuto per effetto dell'assorbimento non lineare del raggio laser ad infrarossi. Il plasma genera onde d'urto che formano fenomeni di cavitazione che generano bolle di cavitazione che portano alla rottura controllata del tessuto

[51] Microtomo rotativo inventato nel 1885-1886 dall'embriologo Charles Sedgwick Minot (1852-1914)

[52] http://dismac.dii.unipg.it/common_files/disegno/_11_FilettatureECollegamentiFilettati.pdf

[53] Con il termine Arpionismo si intende, in meccanica, un dispositivo che permette un movimento (generalmente rotatorio) in un senso ma lo impedisce nel senso opposto - https://it.wikipedia.org/wiki/Arpionismo

[54] J J Bozzola LD Russel Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists- Jones and Bartletts edt. 1999

[55] http://users.unimi.it/cmena/microscopio/libro/fini.htm

[56] Celloidina – nitrocellulosa - https://stainsfile.info/StainsFile/prepare/process/celloidin.htm

[57] faculty.ksu.edu.sa/29792/.../histo%20%202%20.do
[58] Celloidina – nitrocellulosa - https://stainsfile.info/StainsFile/prepare/process/celloidin.htm
[59] The Science of Laboratory Diagnosis - John Crocker, David Burnett -John Wiley & Sons, 17 dic 2005
[60] http://www.woodanatomy.ch/preparation.html
[61]W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942 - https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/49745/1090840303_ftp.pdf;sequence=1
[62] Effective use and proper care of microtome – American Optical 1975 - http://www.science-info.net/docs/Microtechnique/microtome.pdf
[63] A.J. Saubermann W D riley R Beeuwkes - Cutting work in thick sections criotomy - Journal of Microscopy Vol 111 Issue 1 September 1977 Pages 39-49
[64] T. Atkins – The Science and Engineering of Cutting – Elsevier 2009
[65] http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/knife-angle-in-microtomy/
[66] Quando si parla di "blocchetto" o "cassetta" si intende il blocco di paraffina nel quale e' incluso il pezzo fissato e disidratato. La cassetta e' semplicemente un piccolo vassoietto traforato di materiale plastico con coperchio nel quale sin dalla fissazione si inseriscono i pezzi da tagliare, allo scopo di non perderli nei bagni di processazione. A fine fissazione/chiarificazione vengono inclusi in paraffina colando paraffina fusa nella cassetta, ed i pezzi rimangono adesi alla parte inferiore della "cassetta"
[67] Effective use and proper care of the microtome. American optical corporation 1972- Buffalo - USA
[68] Idem
[69] https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029
[70] http://docplayer.it/13990-Microtomia-e-preparazione-delle-sezioni-in-paraffina.html
[71] https://www.slideshare.net/swatiwadhai/microtomy-25706041
[72] W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942
[73] Idem
[74] http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/knife-angle-in-microtomy/
[75] Effective use and proper care of microtome – American Optical 1975 - http://www.science-info.net/docs/Microtechnique/microtome.pdf
[76]W.T. Dempster: The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/49745/1090840303_ftp.pdf;sequence=1
[77]W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942
[78]Lo stropping ha la funzione di eliminare le bave (burr in inglese) che si formano per il processo di accumulo dei detriti di molatura e di piegamento plastico del profilo di taglio. - https://prezi.com/4ky3-1rdf_4z/honing-and-stropping
[79] http://rsfs.royalsocietypublishing.org/content/6/3/20150108 - Williams JG, Patel Y. 2016 - Fundamentals of cutting. Interface Focus 6: 20150108. http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2015.0108
[80]Idem
[81]Wilfrid Taylor Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942 -
[82] Dempster W, . T. Paraffin compression due to the rotary microtome, Stain Tech (in press).- Properties of paraffin relating to microtechnique. pp. **450,** John Wiley and Sons, N. *Y.* vol. **18.**
[83]Wilfrid Taylor Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942 -
[84]Griffith A.A. . 1921 The phenomena of rupture and flow in solids. Phil. Trans. R. Soc. Lond. A **221**, 163–179.
[85] Cricca: fenditura sottile e profonda in un materiale metallico - https://it.wikipedia.org/wiki/Cricca
[86]https://ocw.mit.edu/ courses/ materials-science-and-engineering/ 3-11-mechanics-of-materials-fall-1999/ modules/ MIT3_11F99_frac.pdf
[87] Psi = pound per square inch – libbre per pollice quadrato – unita' anglosassone di misura dell pressione - https://it.wikipedia.org/wiki/Psi_(unit%C3%A0_di_misura)
[88] A questo proposito si consideri l'evento di decompressione esplosiva avvenuto negli anni 50 in due aviogetti De Havilland Comet; come e' noto l'aereo esplose quando le cricche, provocate dai reiterati cicli di compressione e decompressione generati dal volo in quota, raggiunsero gli angoli dei finestrini rettangolari determinandone il cedimento. L'alluminio che componeva la fusoliera aveva un Critical Strain Energy Release Rate di 300 inch-psi ma il carico aerodinamico e la pressurizzazione in quota determinavano un Critical Strain Energy Release Rate di 20.000 inch-psi, con la conseguente rottura delle lamiere in corrispondenza degli angoli dei finestrini, zona critica dal punto di vista geometrico. Da allora i progettisti di aeromobili hanno disegnato finestrini ad angoli curvi. – Introduction to

Fracture Mechanics - David Roylance - Department of Materials Science and Engineering - Massachusetts Institute of Technology Cambridge,MA 02139 June14,2001

[89] http://rsfs.royalsocietypublishing.org/content/royfocus/6/3/20150108.full.pdf

[90] Amontons/Coulomb friction is often assumed and is given by F=μN dove N e' la forza di contatto del bevel della lama, F la frizione e m il coefficient frizionale del materiale

[91] T. Atkins – The Science and Engineering of Cutting – Elsevier 2009

[92] A.J. Saubermann W D riley R Beeuwkes - Cutting work in thick sections criotomy - Journal of Microscopy Vol 111 Issue 1 September 1977 Pages 39-49

[93] W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

[94] Dempster 1941-42 in: Effective Use and Proper Care of Microtome – AO Optical 1975

[95] Idem

[96]"…Material ahead of the knife bevel is subjected to horizontal compressive stress. Behind the knife edge, in the region of the new surface, the material exhibits horizontal tensile stress. Material at and below the knife edge is lifted in a vertical direction by tensile forces. The resultant of forces ahead of the knife bevel may be shown as lines of principal shear as in figure 6, B. Movements of material due to sectioning may be expected to follow such shear lines…" W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

[97] Material embedded in paraffin may be considered as a gel in which the aqueous phase has been largely replaced by paraffin. It acts as a resilient web following the movements of the paraffin matrix but increasing the resistance to shearing flow. - W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

[98] W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

[99] idem

[100] idem

[101] Come si diceva in un altro articolo, il dilettante puo' anche prepararsi da solo la paraffina per inclusione: Embedding wax local preparation in laboratory. Method (A) 1. Paraffin wax (Candle) 1 Kg. 2. Bees Wax 25gm – Melt and filter. Method (B) 1. Paraffin wax 1kg 2. Liquid paraffin 5-10 ml Melt and filter. http://www.rajswasthya.nic.in/RHSDP%20Training%20Modules/Lab.%20Tech/Histo/Introduction.pdf

[102] http://www.rajswasthya.nic.in/RHSDP%20Training%20Modules/Lab.%20Tech/Histo/Introduction.pdf

[103] [103] Effective Use and Proper Care of Microtome – AO Optical 1975

[104] https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029

[105] http://docplayer.it/13990-Microtomia-e-preparazione-delle-sezioni-in-paraffina.html

[106] https://www.slideshare.net/magdyabdelghany1/technical-faults-in-histopathology-lab

[107] Effective Use and Proper Care of Microtome – AO Optical 1975

[108] The effectiveness of the water-on-the knife method of sectioning with the sliding microtome is probahly as much due to the prevention of adhesion of sections to a knife as to surface tension effects. – da W.T. Dempster : The Mechanism of Paraffine Sectioning by the Microtome – The Anatomical Record Vol 84 Issue 3 pagg 241-267 1942

[109] Effective Use and Proper Care of Microtome – AO Optical 1975

[110] Effective Use and Proper Care of Microtome – AO Optical 1975

[111] Effective Use and Proper Care of Microtome – AO Optical 1975

[112] https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029

[113]https://www.researchgate.net/post/Does_anyone_have_any_tips_on_sectioning_formalin-fixed_paraffin_embedded_tendon_sections.

REAGENT:
Downy Fabric Softener 5.0 ml (obtain through Hospital Stores)
Distilled water 100.0 ml
Mix well
PROCEDURE
1. Face into block.
2. Place face down into solution.
3. Allow to soak for 5-10 minutes.
4. Can be used to wipe the face of the block prior to each section.
a. Squeeze out all excess solution from Kim Wipe.

b. wipe face of block, section, repeat for as many sections as needed on ribbon.

[114] https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029
[115] https://www.slideshare.net/candysharma777/microtomy-67236029
[116] The precursor amino acid lysine contains two amino groups, one at the α-carbon and one at the ε-carbon. Either can be the location of polymerization, resulting in α-polylysine or ε-polylysine... Polylysine is a homopolypeptide belonging to the group of cationic polymers: at pH 7, polylysine contains a positively charged hydrophilic amino group. α-Polylysine is commonly used to coat tissue cultureware as an attachment factor which improves cell adherence. This phenomenon is based on the interaction between the positively charged polymer and negatively charged cells or proteins… https://en.wikipedia.org/wiki/Polylysine