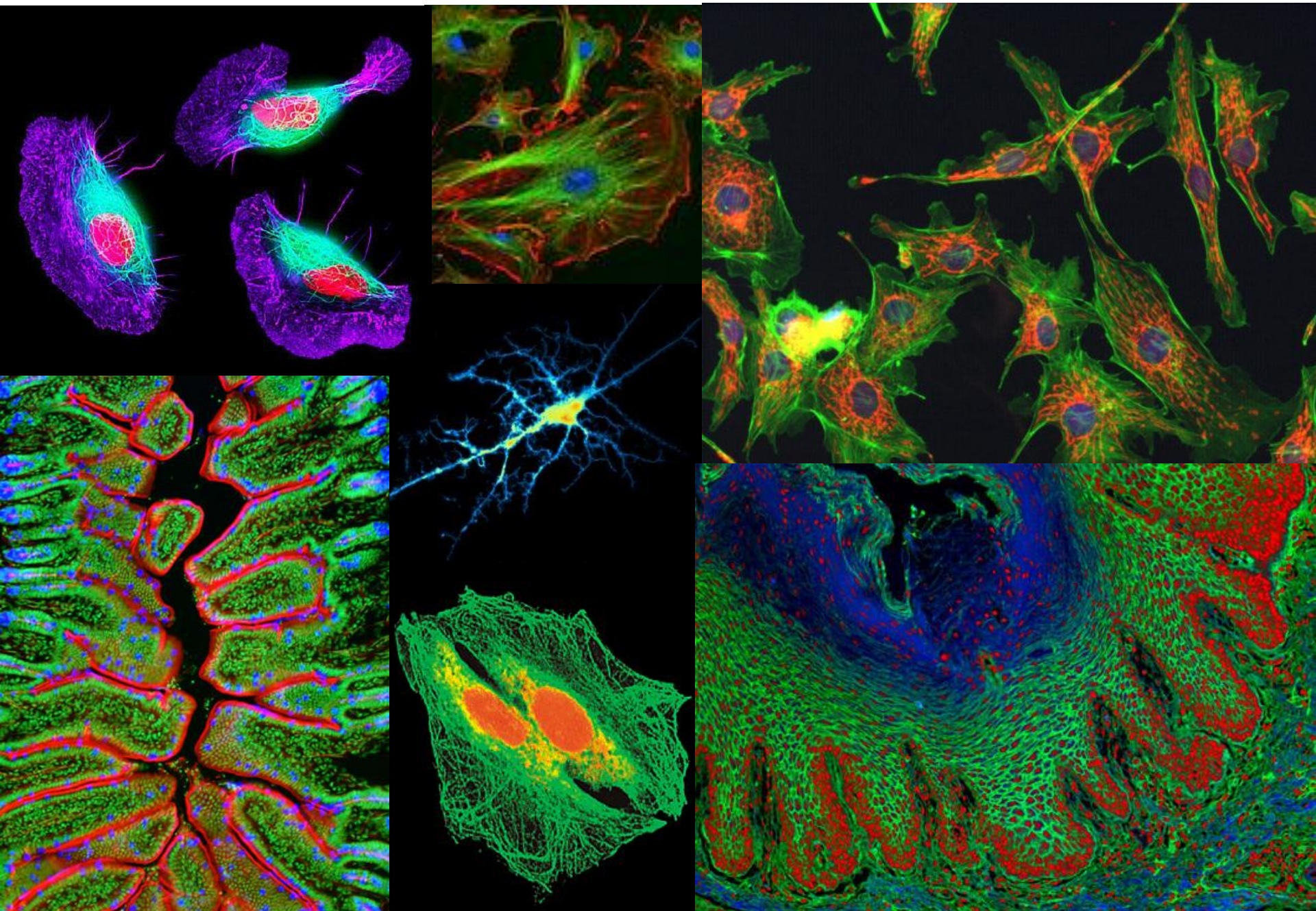


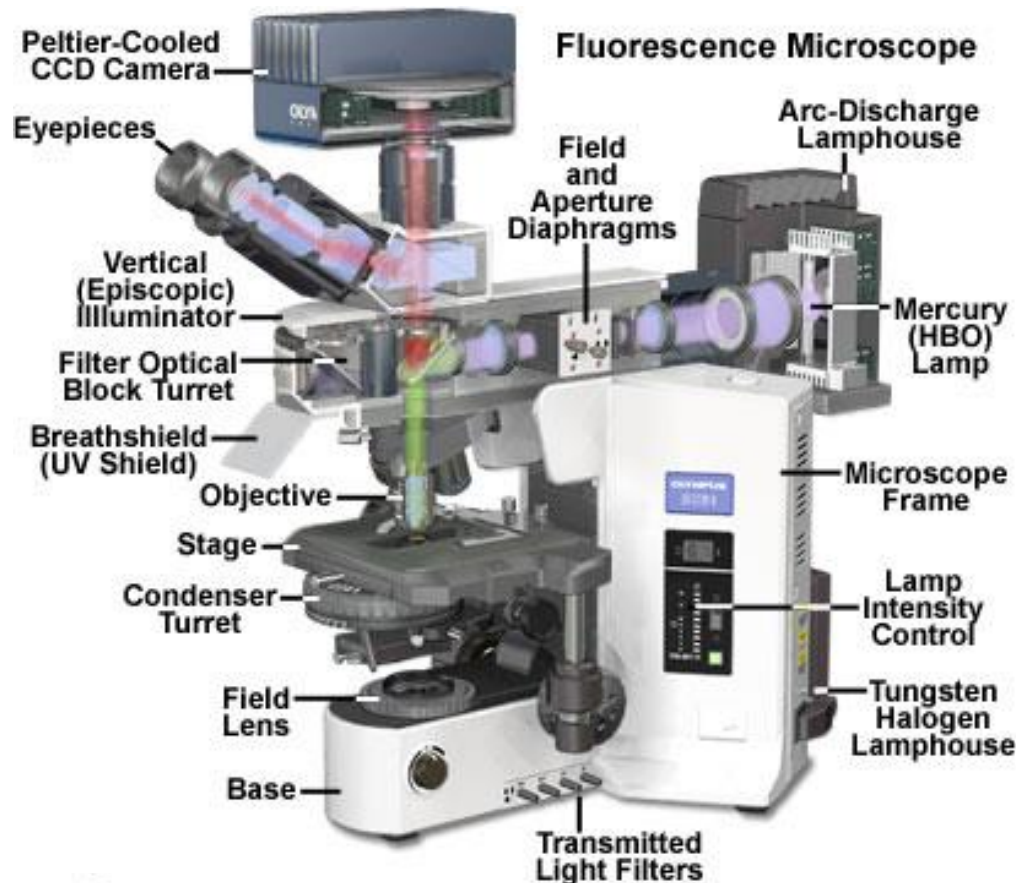
MICROSCOPIA A FLUORESCENZA



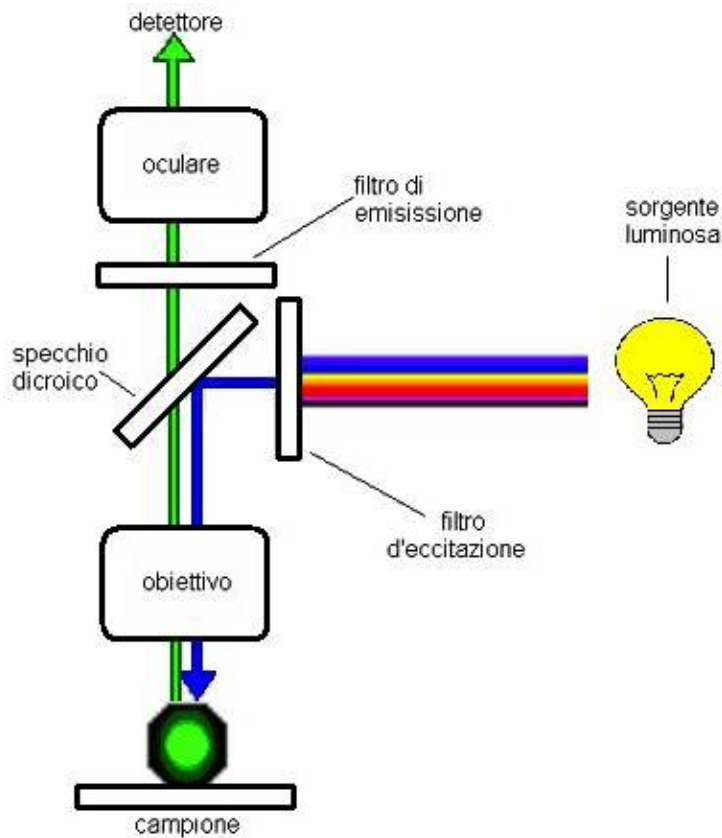
MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

STRUMENTAZIONE

Lo strumento utilizzato è un microscopio ottico, **modificato** per rilevare fenomeni di **fluorescenza**.



SCHEMA STRUTTURALE DI UN MICROSCOPIO A FLUORESCENZA



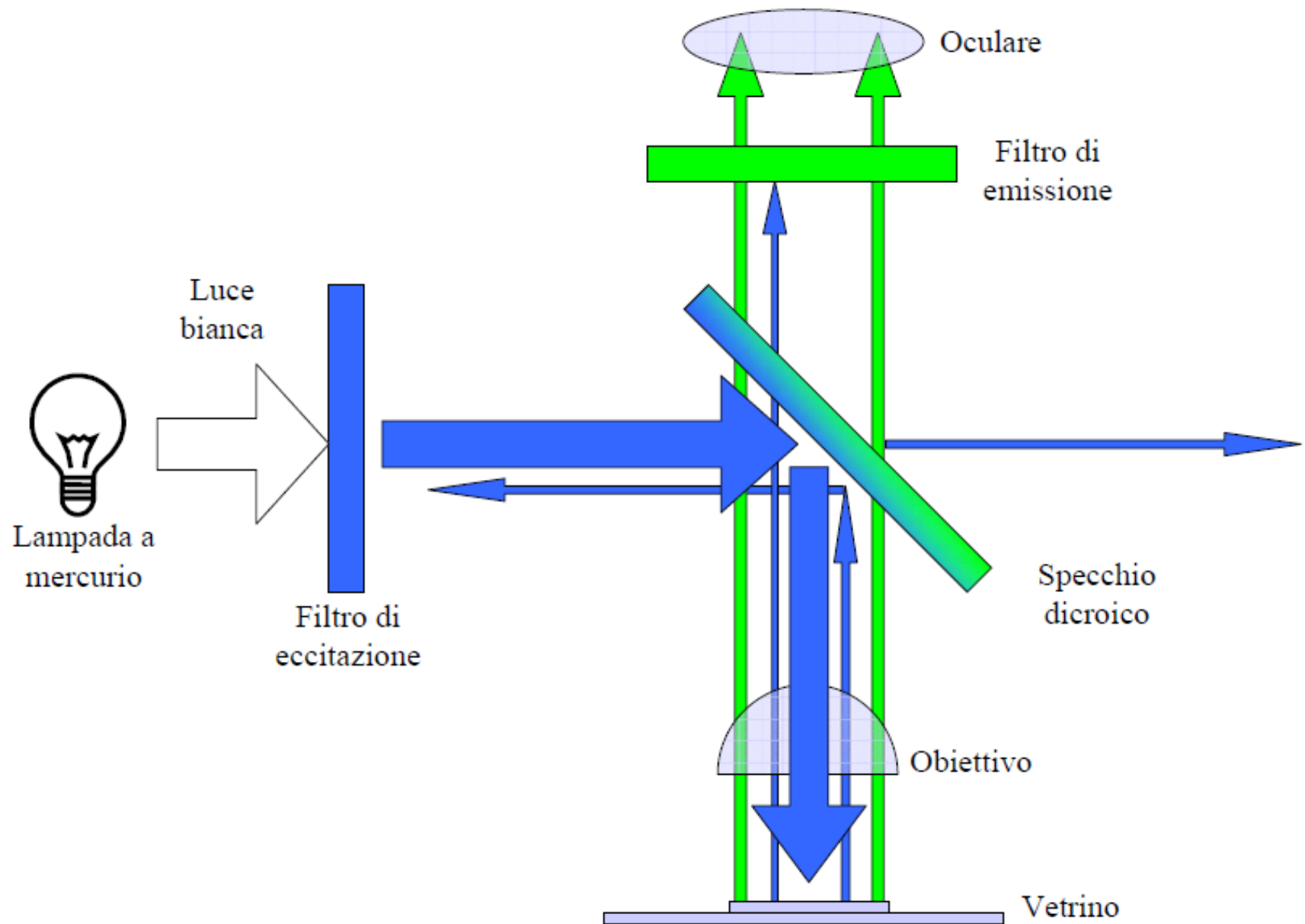
La **sorgente** è posizionata tra l'oculare e il portaobiettivi e dirige la luce sul campione usando l'obiettivo come un condensatore, **sfruttando poi lo stesso obiettivo per catturare la fluorescenza emessa.**

L'area **illuminata** corrisponde a quella **osservata**.

NON E' SOLO QUESTIONE DI «QUALITA'»
DELLA LUCE, MA ANCHE DI QUANTITA'



DISPERSIONI



SORGENTI

Poichè sono pochissimi i fotoni che raggiungono il detector occorrono **lampade potenti** per generare una eccitazione sufficientemente intensa.

Lampade a scarica per fluorescenza

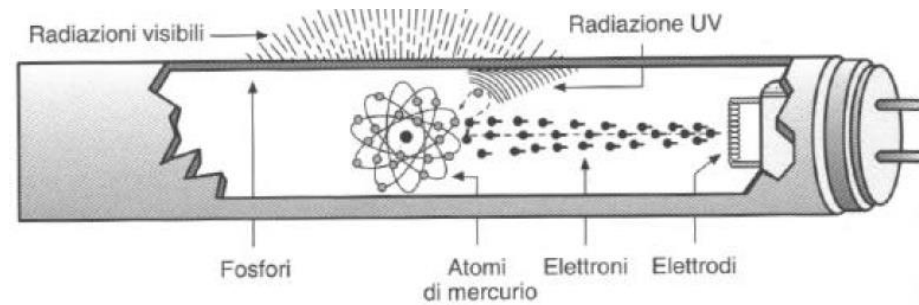


A mercurio



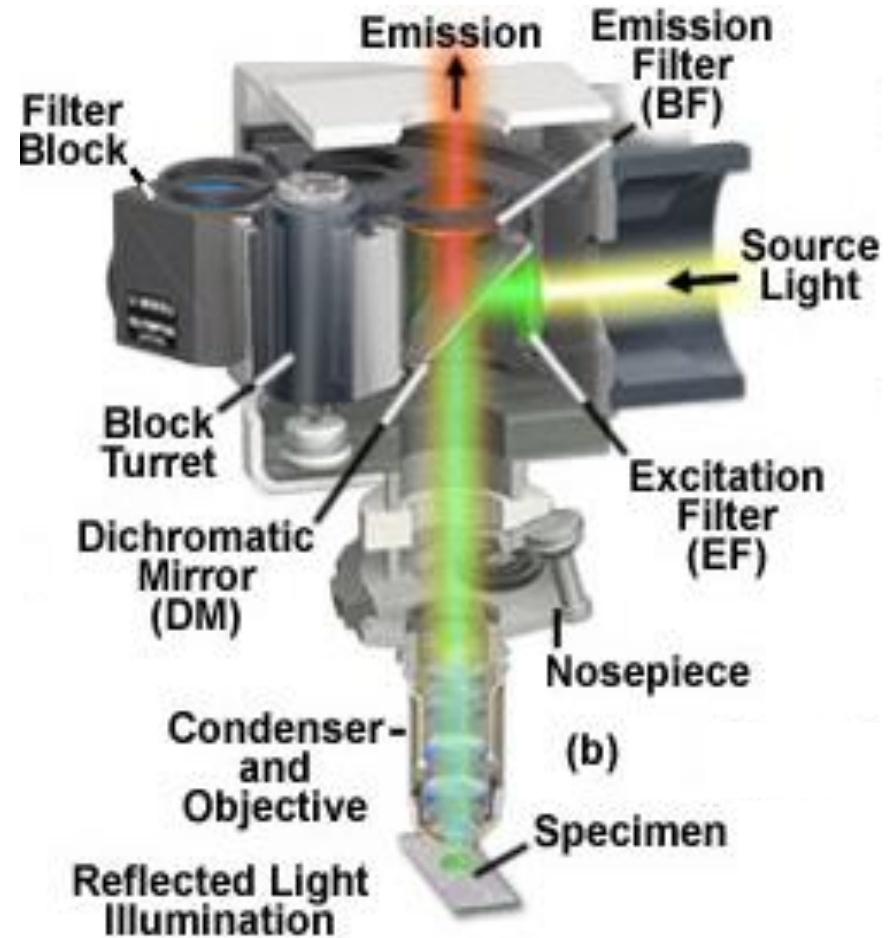
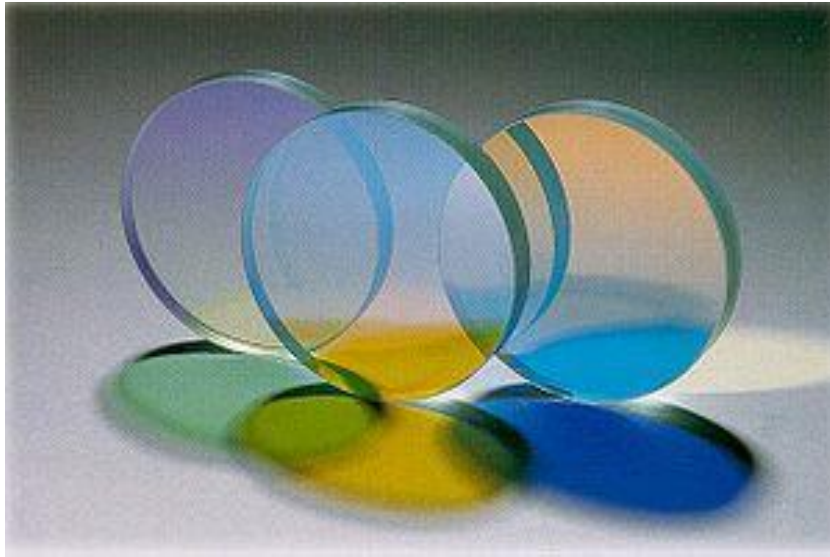
Allo Xeno

Le lampade hanno un **timer** che misura il loro **t di utilizzo**.



I portalampada sono a prova di **esplosione** della sorgente!

SPECCHIO DICROICO

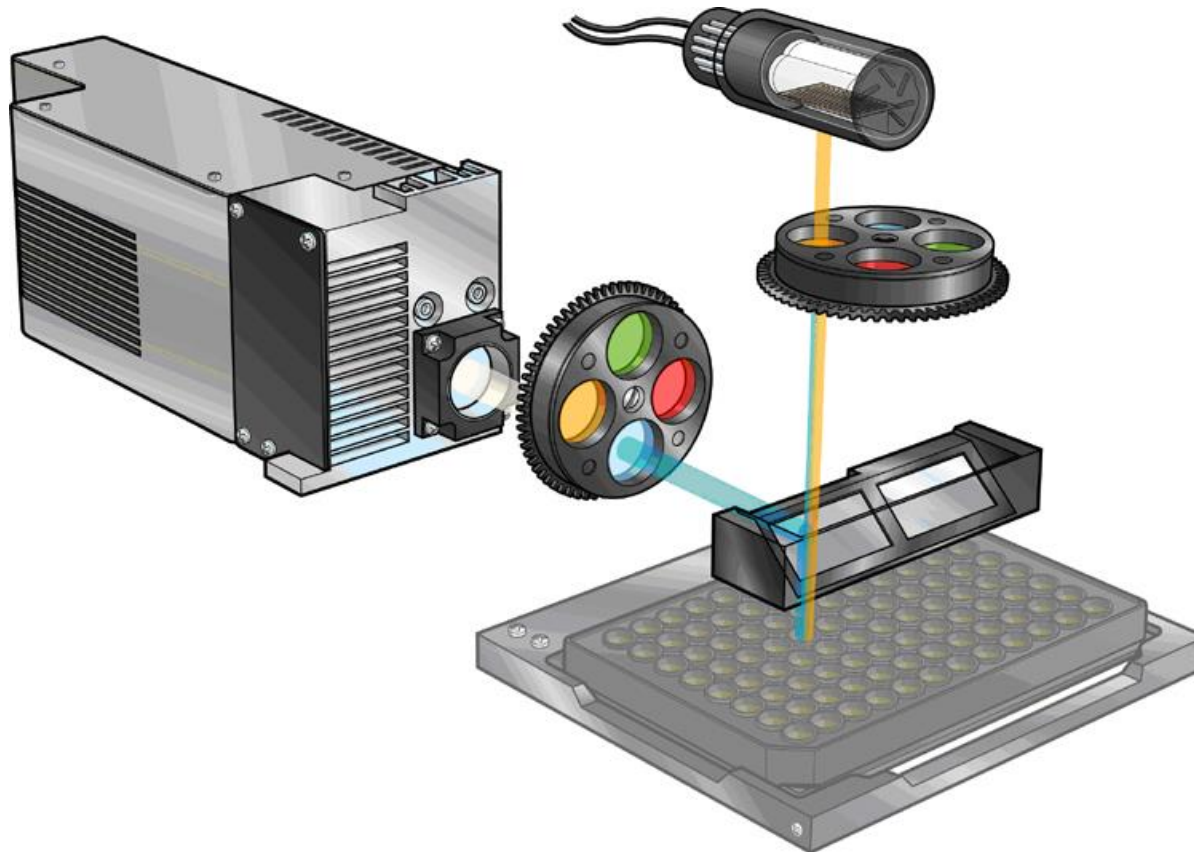


Riflette o lascia passare la luce a seconda della λ

SPECCHIO DICROICO UTILIZZATO ANCHE NEI FLUORIMETRI

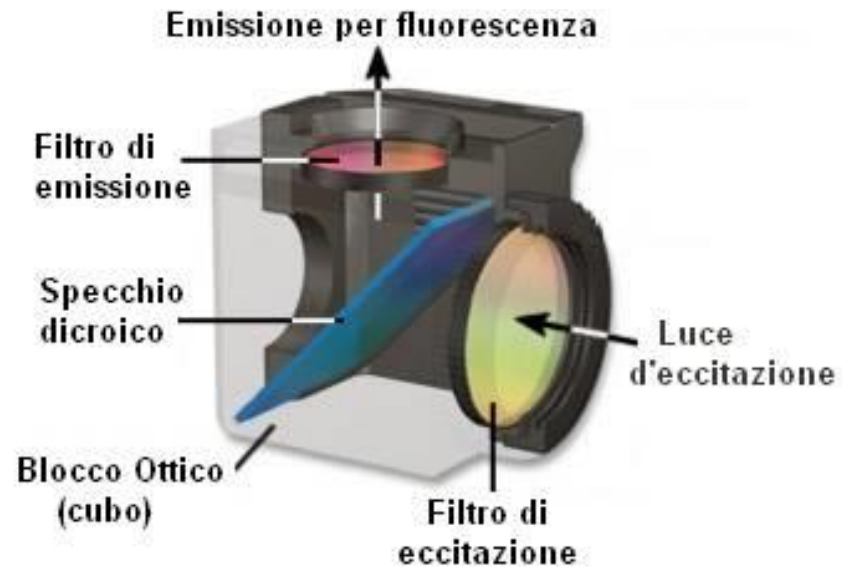


Deep blocking filters and dichroic mirrors



BLOCCO OTTICO (o cubo)

Filtro di eccitazione + specchio dicroico + filtro di emissione



Possono essere presenti fino a 6 cubi **intercambiabili**.

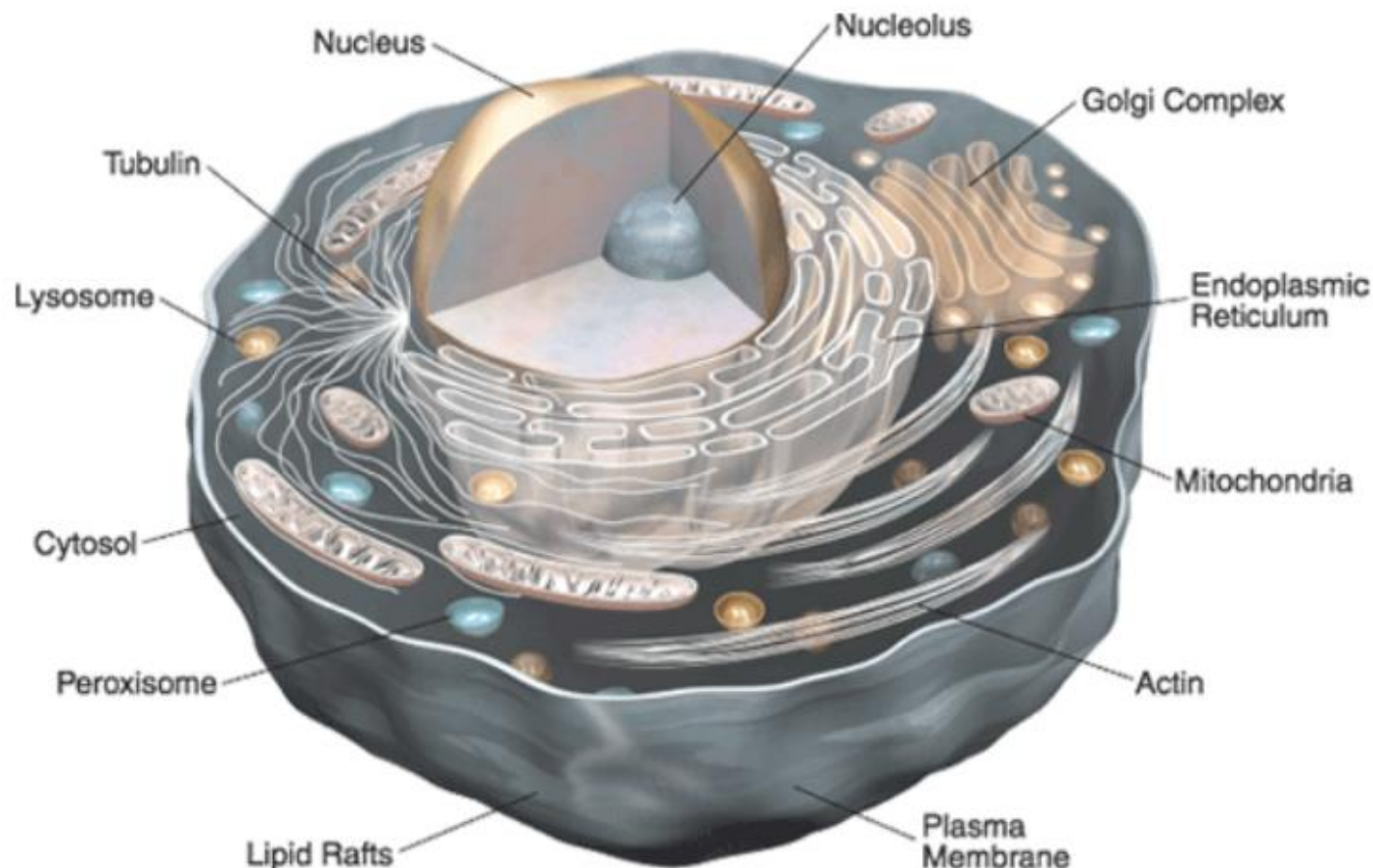
MISURAZIONI



Effettuate,
ovviamente,
in condizioni
di **scarsa luce
ambientale**.

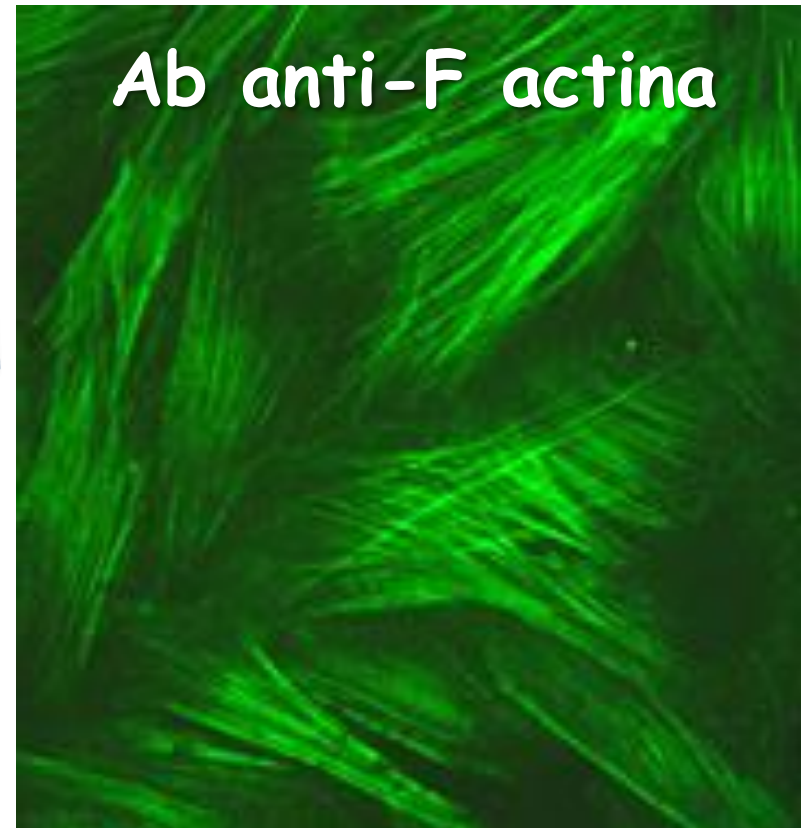
COLORANTI FLUORESCENTI

Organelle Stains Selection Guide for Fluorescence Imaging



- [Adiposomes](#)
- [Cytoplasm](#)
- [Cytoskeleton](#)
- [Endoplasmic reticulum](#)
- [Golgi complex](#)
- [Intracellular membranes](#)
- [Lysosomes](#)
- [Membrane trafficking](#)
- [Mitochondria](#)
- [Nuclear envelope](#)
- [Nucleoli](#)
- [Nucleus](#)
- [Peroxisomes](#)
- [Plasma membrane](#)
- [Whole-cell stains for image segmentation in HCS applications](#)

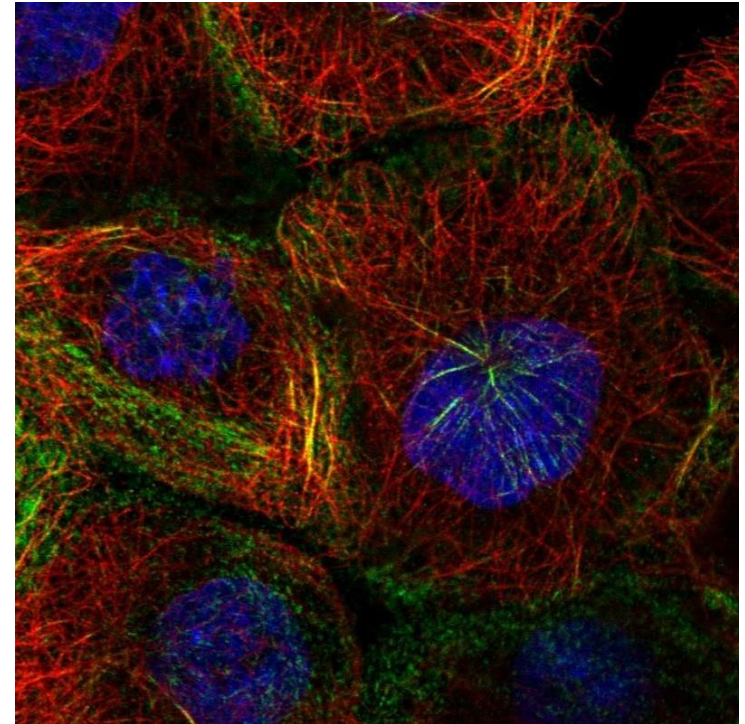
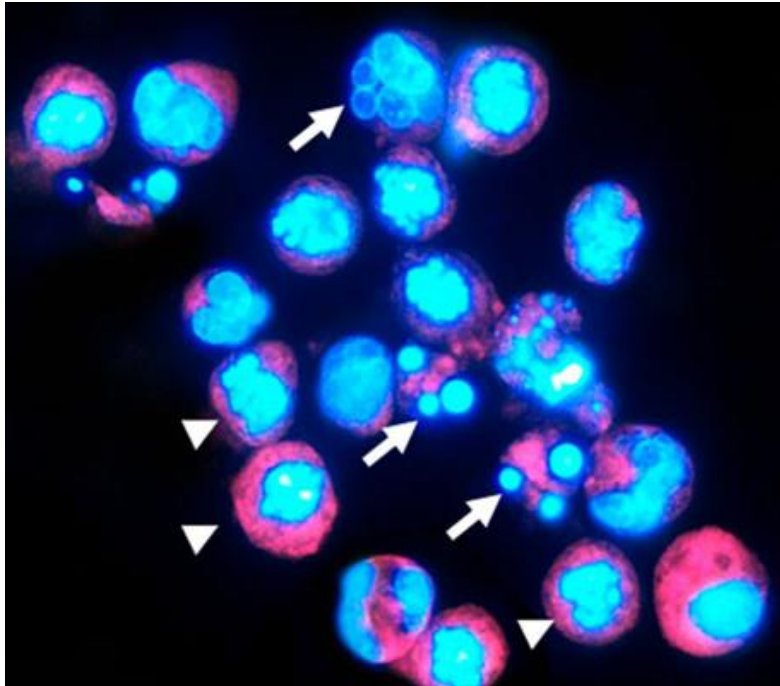
COLORAZIONI FLUORESCENTI



Non è più il fluorocromo a decidere dove "andare", ma l'anticorpo che lo **trasporta**.

POTENZIALITA' DELLA MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Identificare con certezza specifiche **cellule** all'interno dei tessuti, grazie a colorazioni multiple.



Identificare **processi cellulari** o **fasi** di questi.

Apoptotic nuclei stained with DAPI show intense fluorescence corresponding to chromatin condensation (arrow heads) and fragmentation (arrows). Wainer Zoli et al. Breast Cancer Res. 2005;7(5):R681-R689.

PROBLEMI GENERALMENTE ASSOCIATI ALLA MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Riassorbimento

Trasferimento
di energia

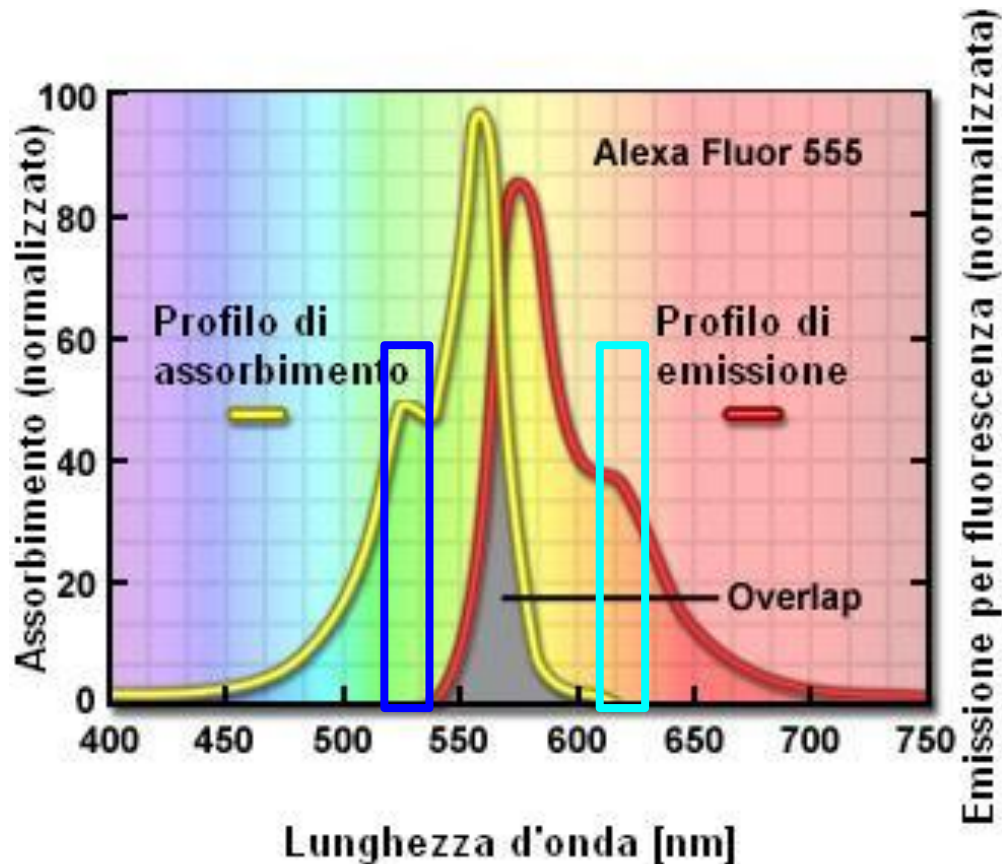
Presenza di
fluorescenze
aspecifiche

Effetto
quenching

Fotodecomposizione

RIASSORBIMENTO

Se lo spettro di assorbimento del fluorocromo si sovrappone parzialmente a quello di emissione, tale parte comune della emissione può essere **riassorbita**.

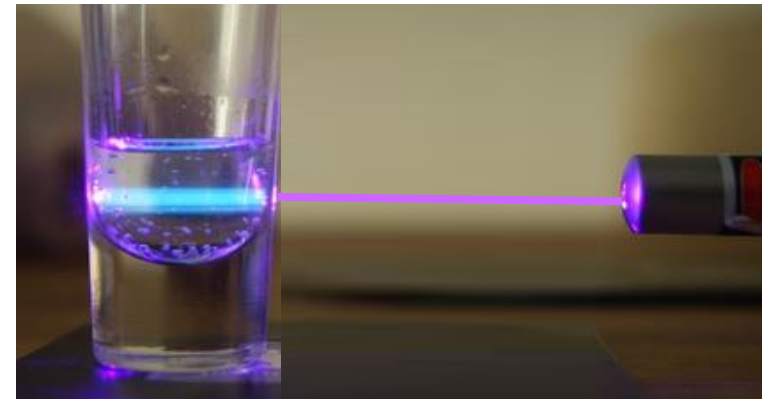


La separazione delle λ di emissione e λ di eccitazione è ottenuta mediante una opportuna **selezione dei filtri**.

EFFETTO QUENCHING

Riduzione dell'emissione di fluorescenza per effetto di una seconda sostanza (**quencher**) o di una particolare **condizione**.

- interazione fra fluoroforo e una seconda specie presente in soluzione con formazione di **complessi**,
- reazioni chimiche che avvengono quando il fluoroforo è nello stato eccitato,
- trasferimento di energia,
- collisioni.



Quenching della fluorescenza della **Chinina** (sinistra) con ioni cloruro (destra)

EFFETTO QUENCHING

Equazione di Stern-Volmer

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [C_q] = 1 + K_D [C_q]$$

- F ed F_0 : intensità di fluorescenza **in presenza** e **in assenza** e del quencher, rispettivamente.
- k_q : costante di quenching bimolecolare.
- τ_0 : tempo di vita del fluoroforo in assenza del quencher.
- $K_D = k_q \tau_0$: **costante di quenching di Stern-Volmer.**
- $[C_q]$: concentrazione del quencher.

FOTODECOMPOSIZIONE

(photobleaching)

L'intensità di fluorescenza di un campione, sottoposta ad eccitazione prolungata, **diminuisce nel tempo**.



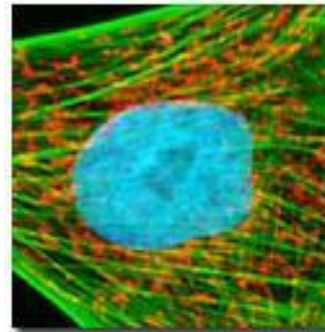
E' causata dalla
distruzione
fotochimica del
fluorocromo.

FOTODECOMPOSIZIONE (photobleaching)

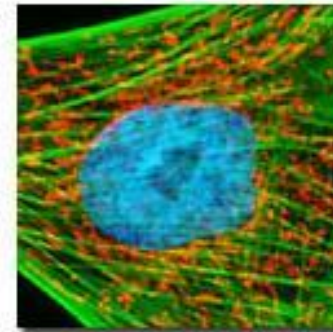


Fenomeno **non** chiarito.

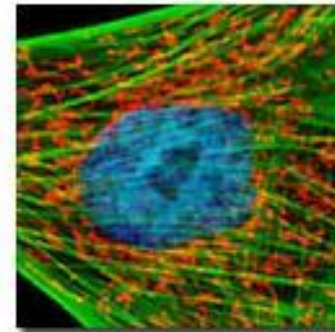
Durante l'irraggiamento una frazione di molecole, anzichè fluorescere, attiva **processi fotochimici** con produzione di nuove specie molecolari e formazione di **legami covalenti** che danneggiano il fluorocromo.



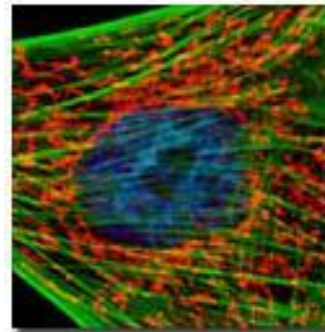
1



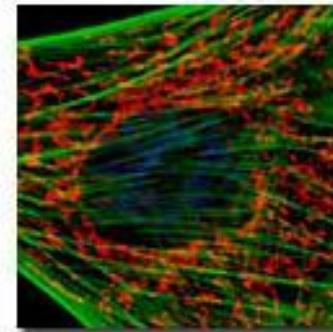
2



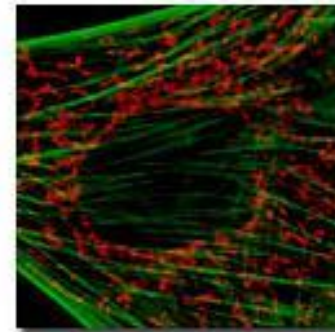
3



4



5



6

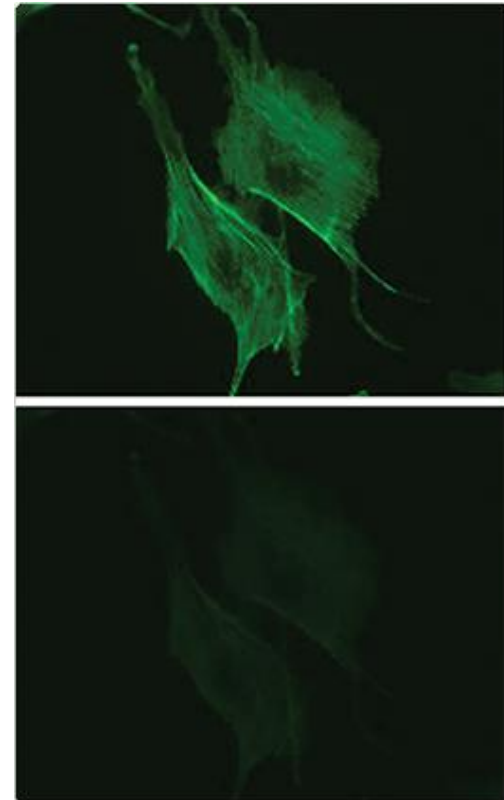
FOTODECOMPOSIZIONE

(photobleaching)

Controllabile:

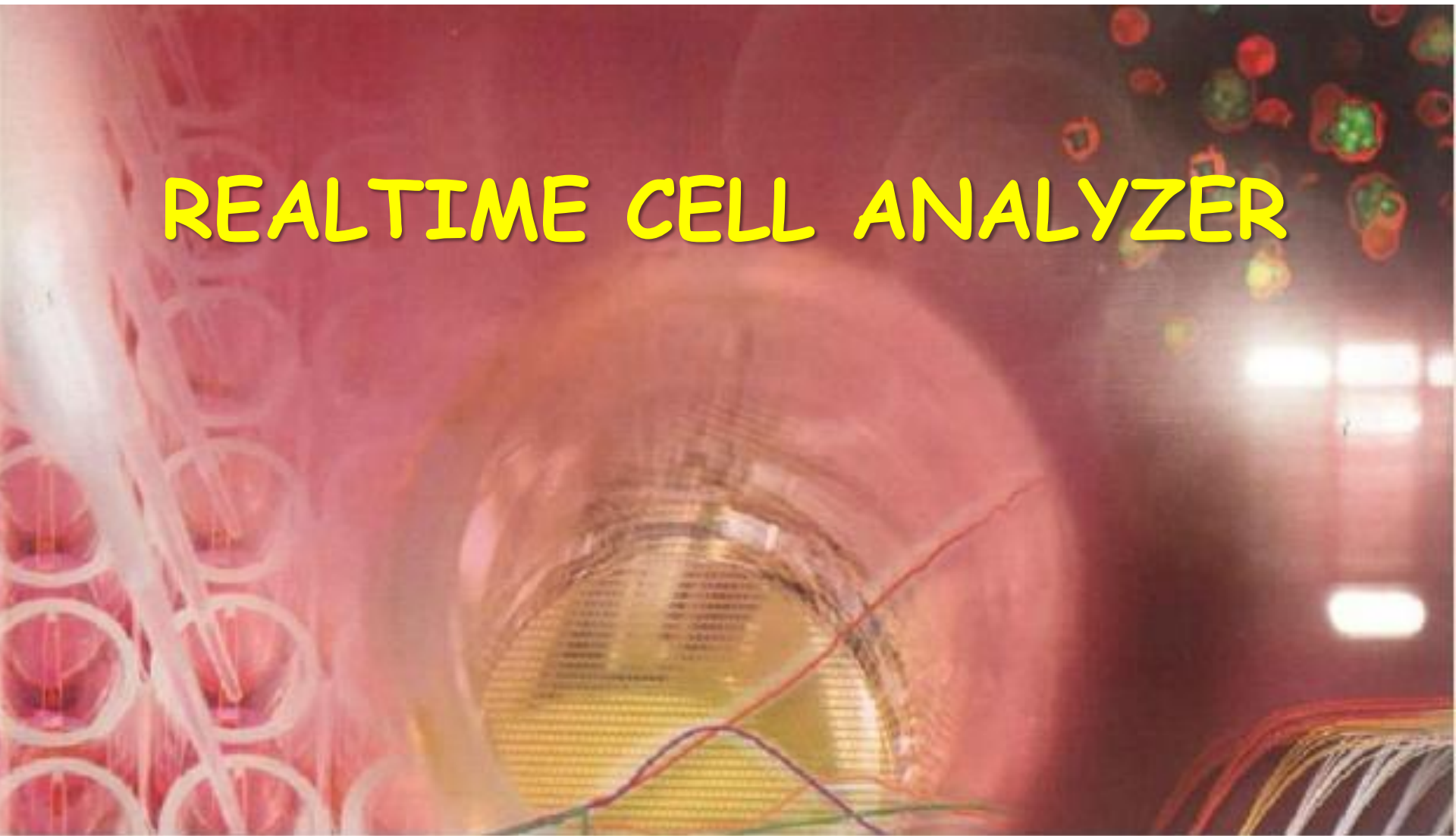
- riducendo l'**intensità** luminosa,
- riducendo il **tempo** di esposizione,
- incrementando la **concentrazione** di fluorocromi,
- utilizzando fluorocromi **meno suscettibili** al photobleaching.

APPLICAZIONE: utilizzabile per azzerare l'autofluorescenza di un campione.





REALTIME CELL ANALYZER



Strumento che può **monitorare nel tempo** alcuni parametri di cellule in **adesione**.

Funziona:

- senza uccidere le cellule,
- **senza marcarle**,
- fornendo dati quantitativi,
- misurando l'**impedenza elettrica**.

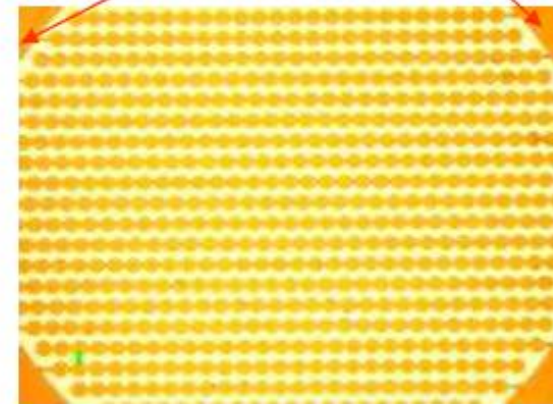
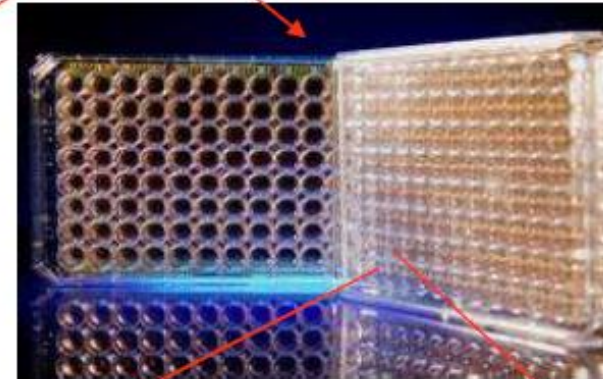


SISTEMA xCELLigence



Elaboratore del segnale

E-plate



Analizzatore

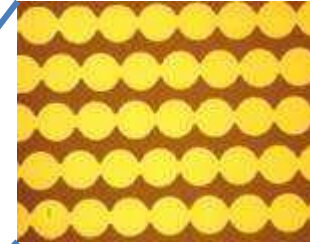
Letto di piastre (RTCA SP)
(in incubatore di CO₂)

Microelettrodi in oro.
Coprono l'80% della
superficie di un pozzetto.

PRINCIPIO DELL' xCELLigence



Corrente applicata: **10 mV**



Conduttività
basale



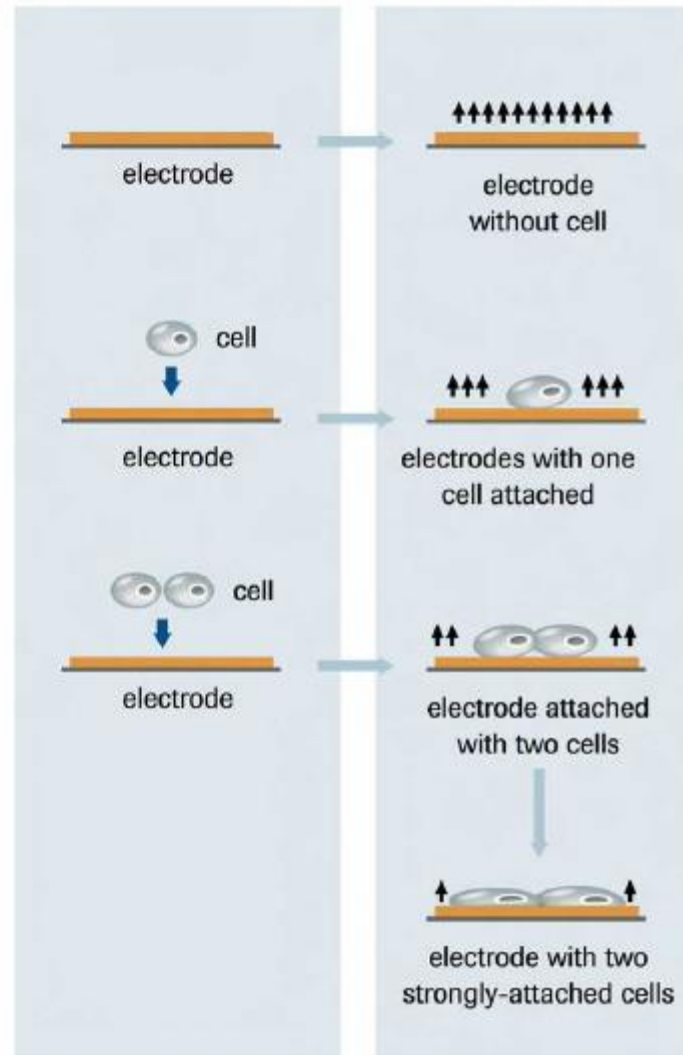
Aumento
della
impedenza

Biosensore microelettronico
inserito in ognuno dei 96
pozzetti del sistema.

VARIAZIONI NELL'IMPEDENZA

$$Z = Z_0$$

Conduttività basale



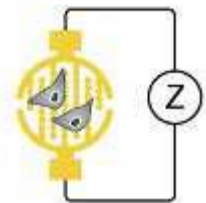
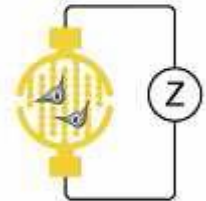
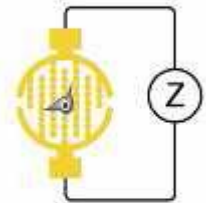
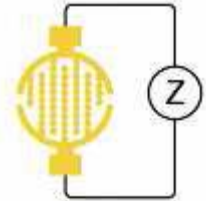
$$Z = Z_{\text{cell}}$$

Impedenza

$$Z = Z_{\text{cell } 2}$$

Impedenza
Raddoppiata

$$Z = Z_{\text{cell } 3}$$



MISURAZIONI DELL'IMPEDENZA

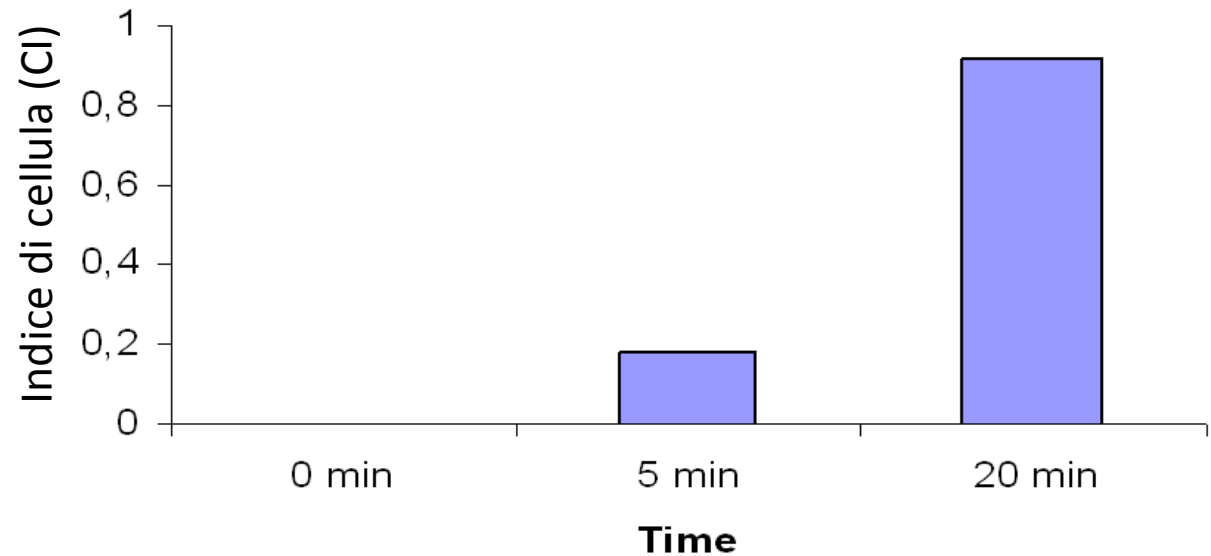
$$CI = (Z_i - Z_0) W / 15 W$$

Z_i = impedenza a un determinato tempo

Z_0 = impedenza all'inizio dell'esperimento

CI = parametro **ADIMENSIONALE** usato per misurare i cambiamenti nell'IMPEDENZA.

MISURAZIONI DELL'IMPEDENZA NEL TEMPO



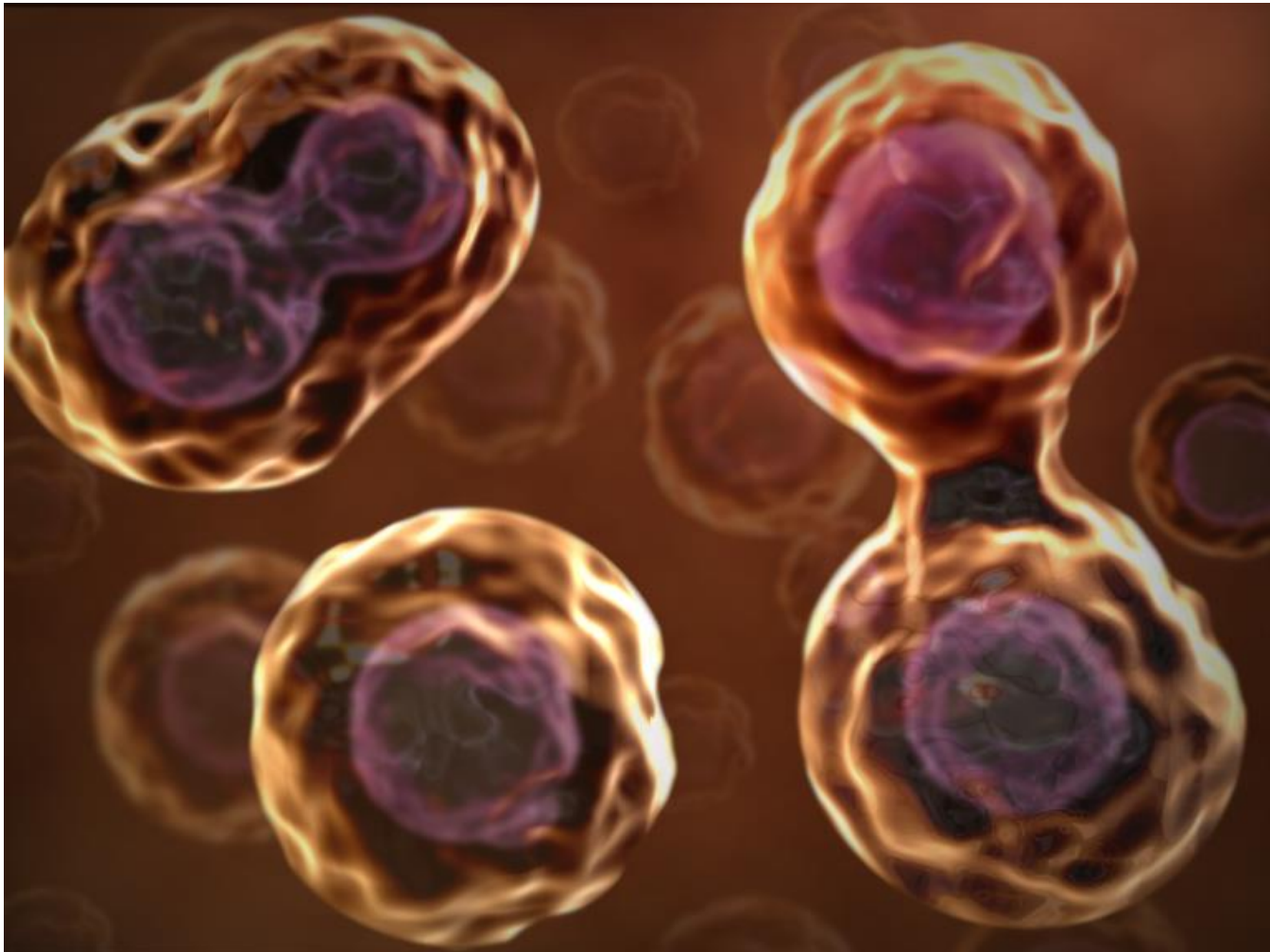
Variazioni di CI
nel tempo riflettono
cambiamenti in:

- N° di cellule
 - Adesione cellulare
 - Dimensione e morfologia cellulare
 - Vitalità cellulare



CRESCITA IN MULTISTRATO

Lo strumento non «vede» le cellule che crescono l'una sull'altra, ma solo lo strato a contatto con gli elettrodi.



TIPI DI PIASTRE



NORMALI



**PER OSSERVAZIONI
AL MICROSCOPIO**



PER STUDI DI MIGRAZIONE



Figure1: CIM-Plate 16



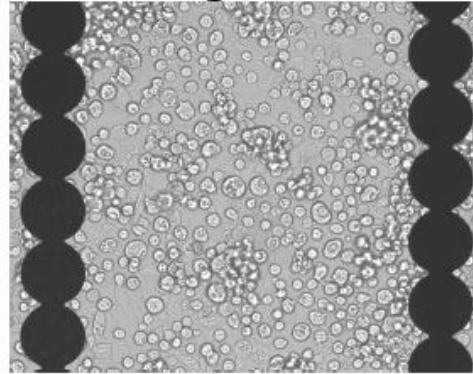
Figure 2

**TUTTI
MONOUSO**

PIASTRE PER OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO

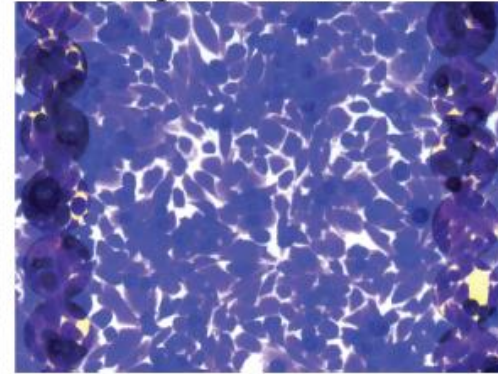


Brightfield

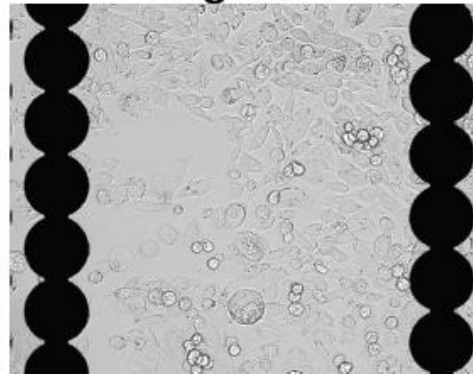


50,000 cells

Crystal Violet

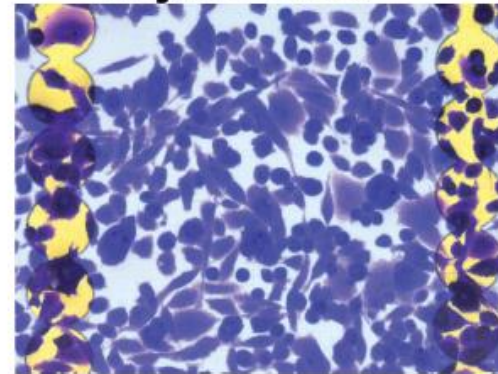


Brightfield



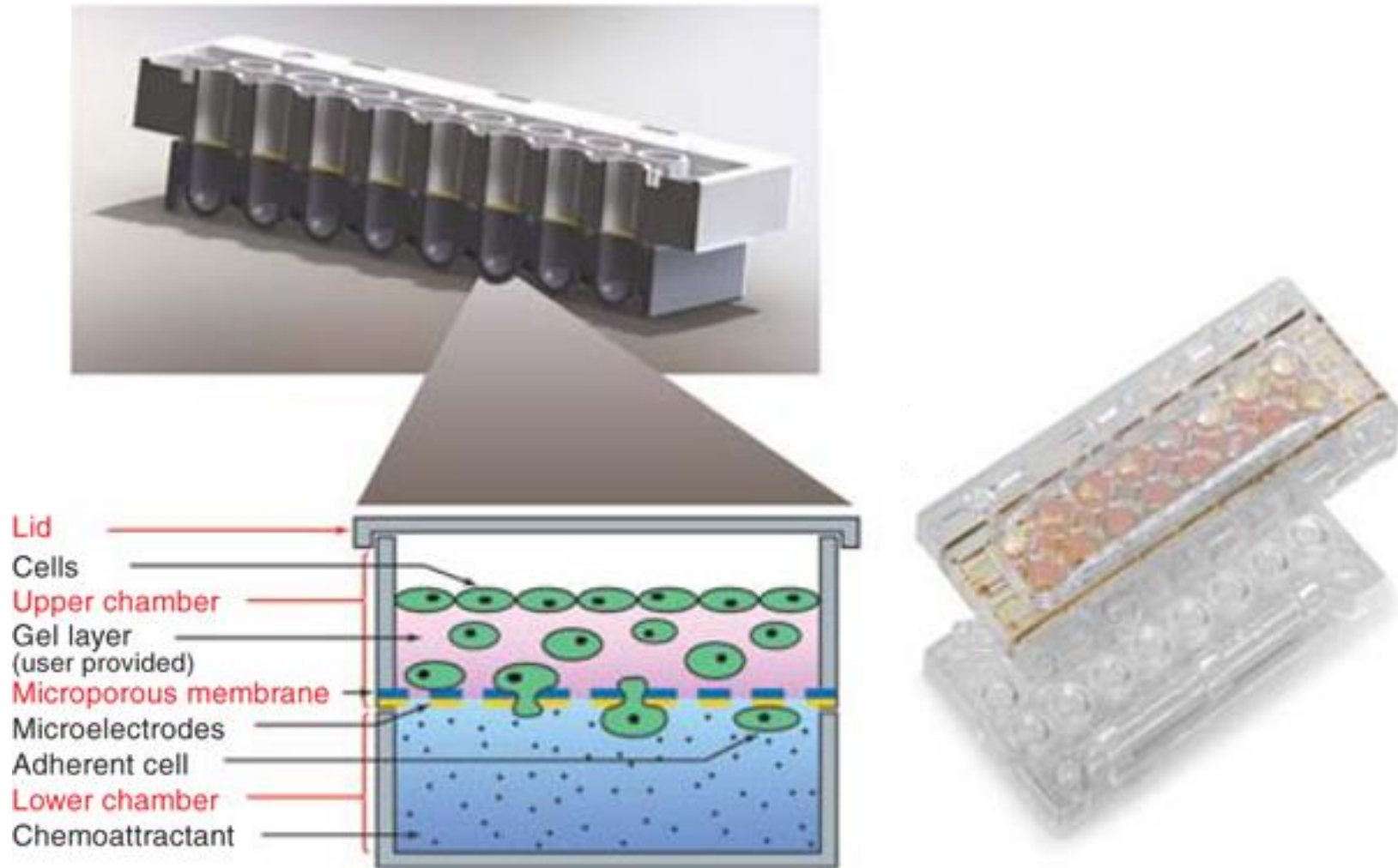
12,500 cells

Crystal Violet



Versione modificata della normale piastra, **priva di 4 righe di elettrodi** in ogni pozzetto.

PIASTRE PER STUDI DI MIGRAZIONE



Piastra comprensiva di coperchio, una camera superiore e inferiore, separate da una membrana porosa di polietilene tereftalato (PET) con gli elettrodi in oro nel lato inferiore.

CONFIGURAZIONI POSSIBILI



•Single Plate (SP) Station:

- Piastra 1x96 well
- Concepito per l'utilizzo da parte di un singolo gruppo per applicazioni di ricerca di base (essenzialmente)

•MultiPlate (MP) Station:

- Piastre 6x96 well
- Le piastre funzionano simultaneamente e indipendentemente
- Ideale per utilizzatori multipli (core lab) o progetti di screening che necessitano di un maggior throughput

CONFIGURAZIONE PRESENTE A FERRARA

3 postazioni da 16 pozzetti

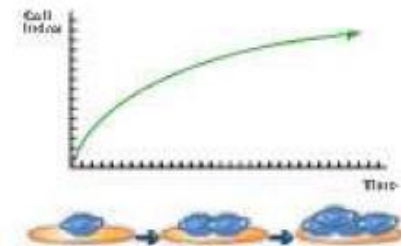


APPLICAZIONI dell'xCELLigence

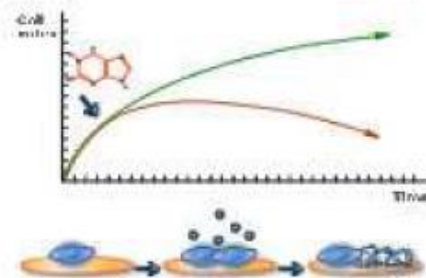
CONTROLLO QUALITÀ



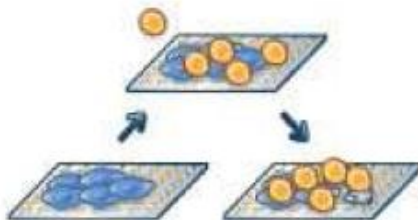
PROLIFERAZIONE CELLULARE



CITOTOSSICITÀ COMPOSTO - MEDIATA



CITOTOSSICITÀ CELLULA - MEDIATA



BIOLOGIA DEI RECETTORI



ADESIONE CELLULARE



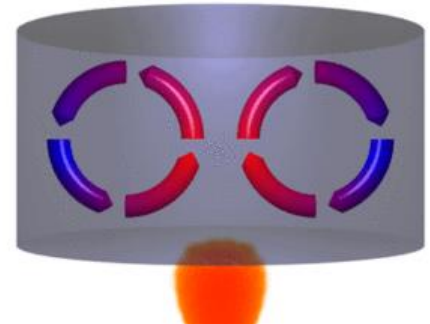
MIGRAZIONE CELLULARE



STABILIZZAZIONE DELLA TEMPERATURA

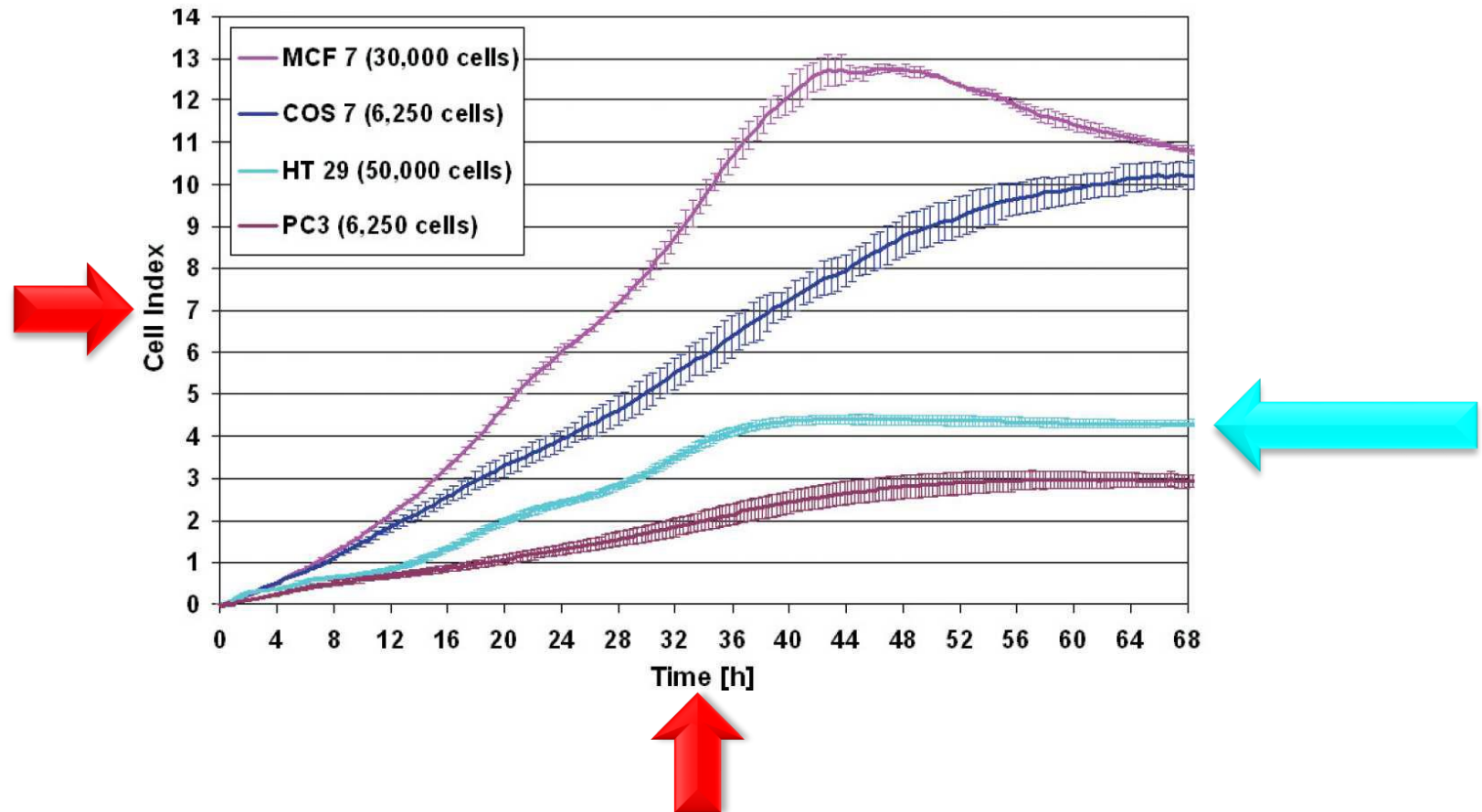
Attesa di 30', sotto
cappa, per far
sedimentare le cellule.

Moti microconvettivi che
ridurrebbero la presenza di cellule
e alimenti al centro della piastra.



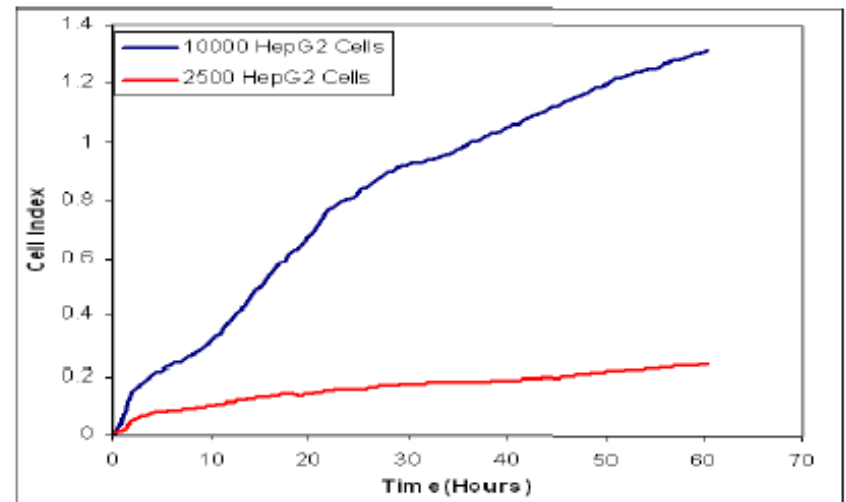
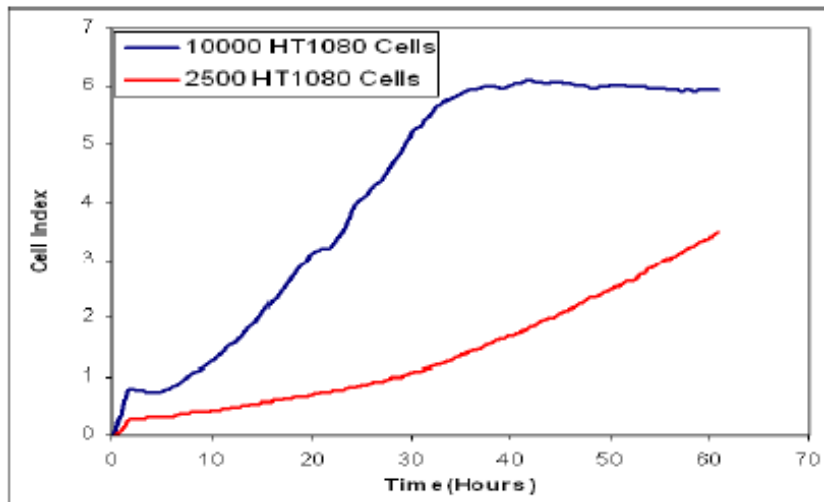
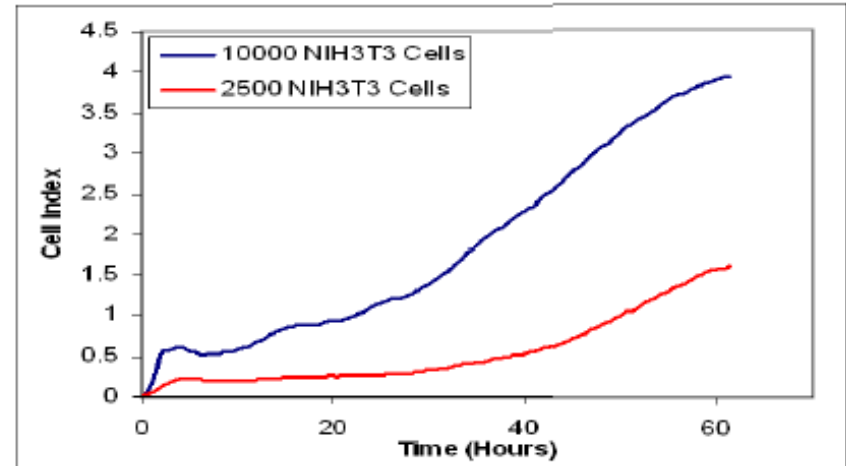
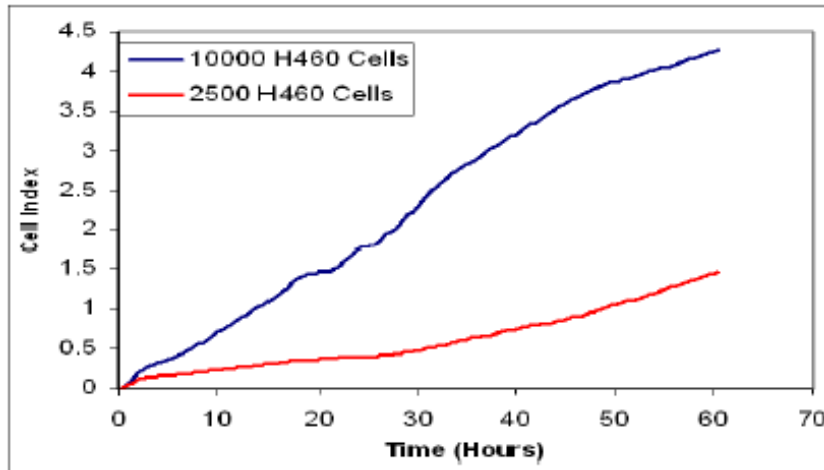
PROLIFERAZIONE CELLULARE

4 diverse linee cellulari



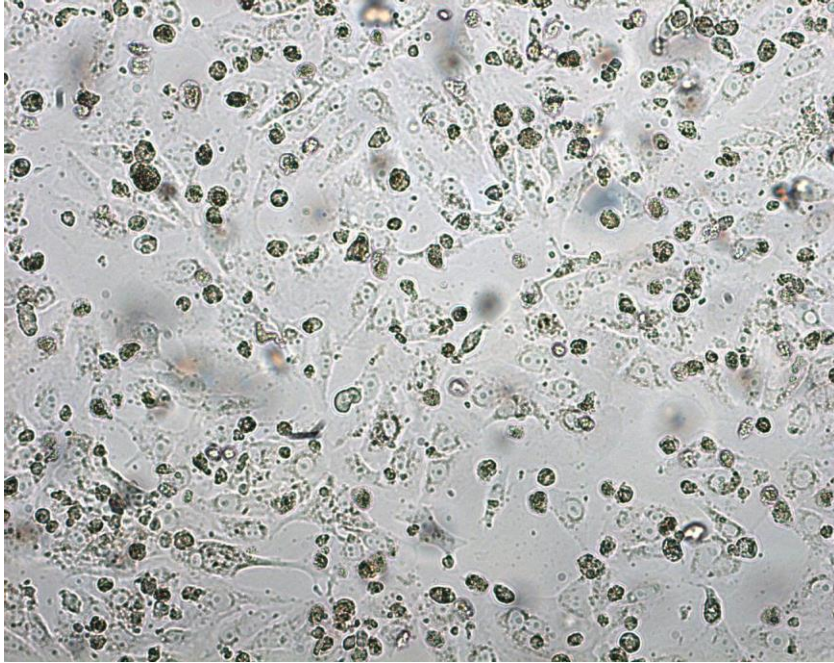
A seconda della linea cellulare si hanno **diversi** profili cinetici e valori massimi di Cell Index.

MONITORAGGIO DELLA PROLIFERAZIONE DI LINEE CELLULARI



Diversi **tipi** (e **quantità**) cellulari presentano differenti profili di crescita.

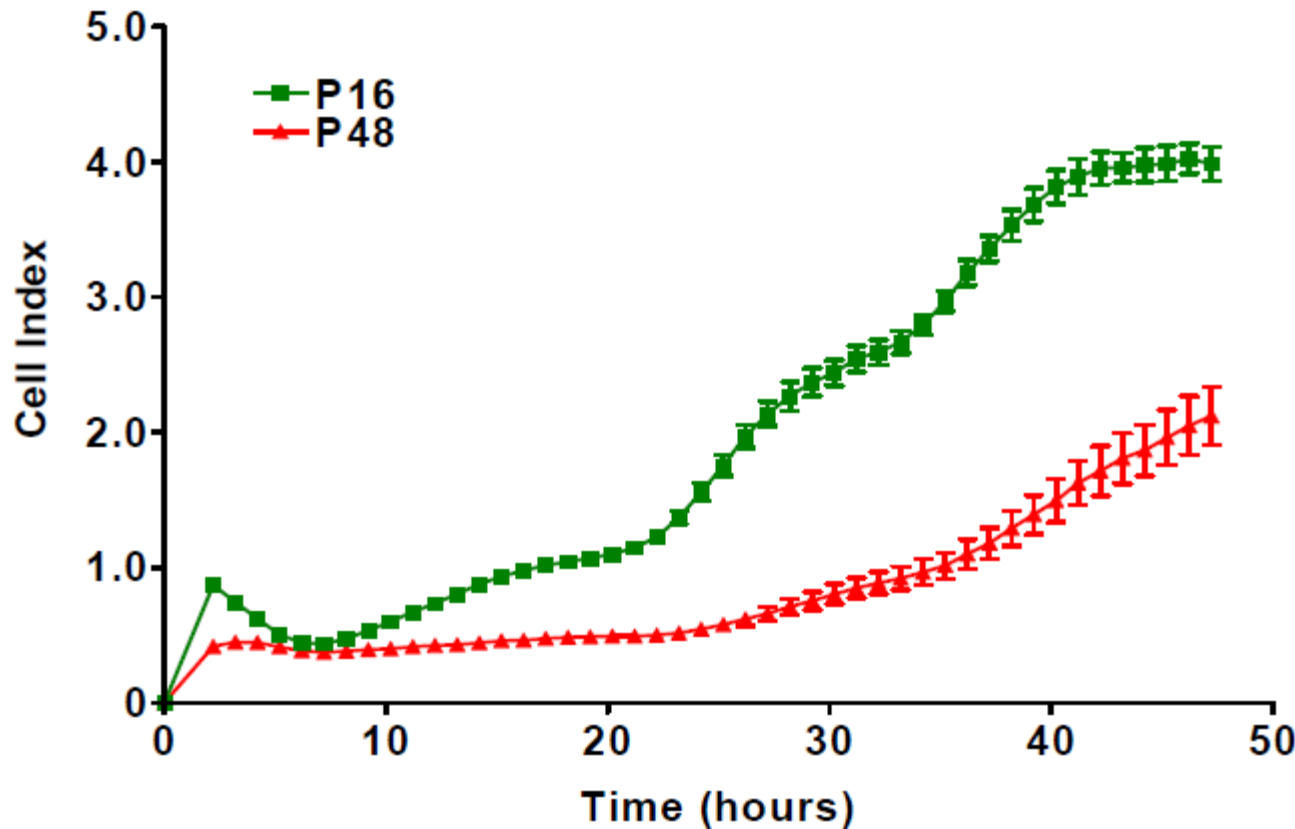
CONCETTO DI INIBIZIONE DA CONTATTO



La vicinanza di cellule della stessa specie porta al contatto fra **caderine**: **blocco** della proliferazione cellulare.



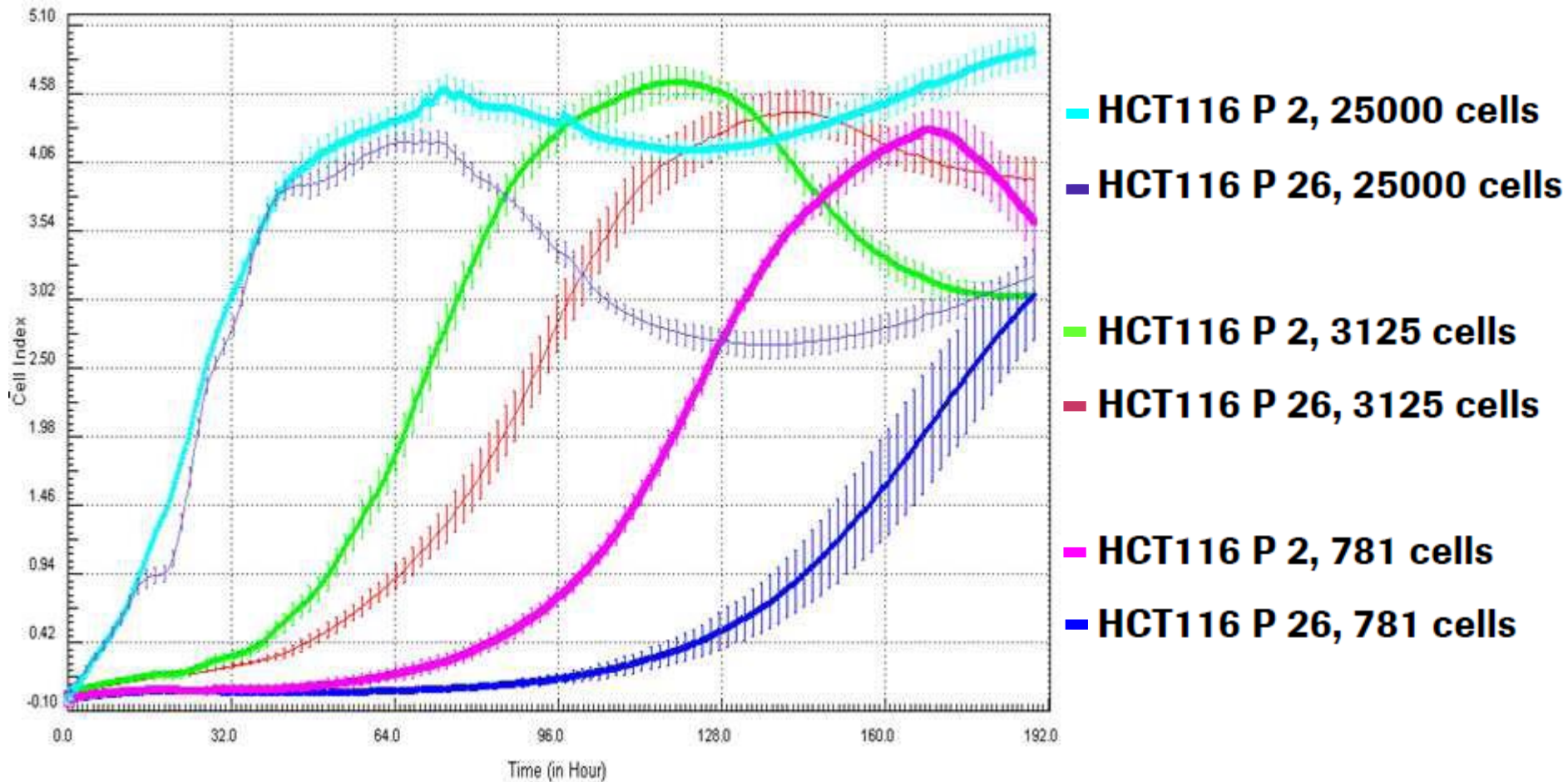
MONITORAGGIO DELLA PROLIFERAZIONE DI LINEE CELLULARI (cellule HT1080)



10000 cellule/pozzetto
al momento della
messa in coltura.

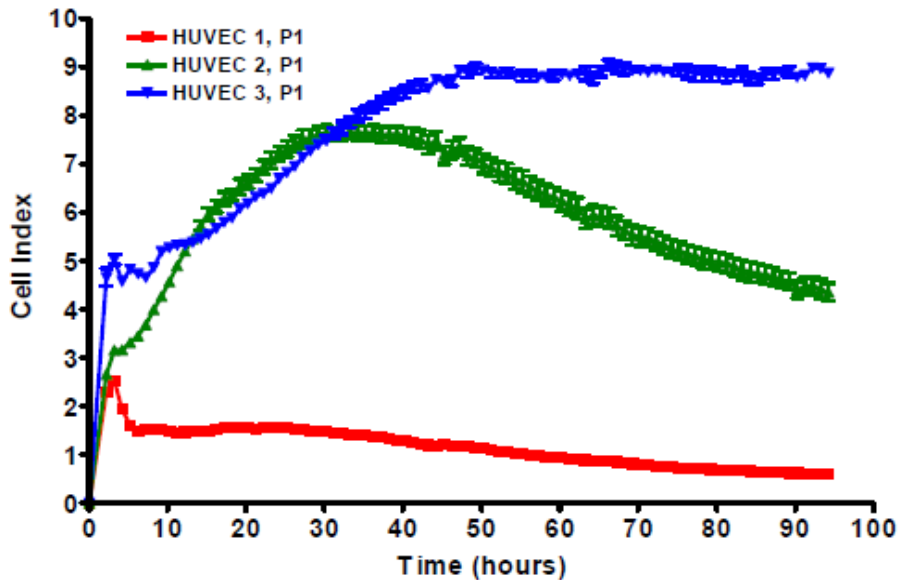
Effetto del **numero del passaggio** in coltura sulla cinetica di crescita.

MONITORAGGIO DELLA PROLIFERAZIONE DI LINEE CELLULARI (cellule HCT116)

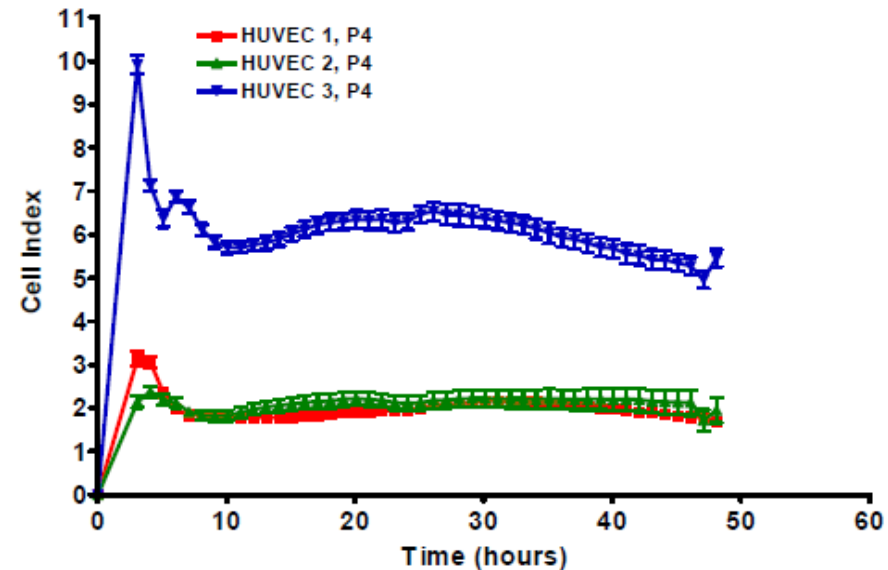


MONITORAGGIO CELLULE HUVEC

10000 cellule/pozzetto al momento della piastratura.



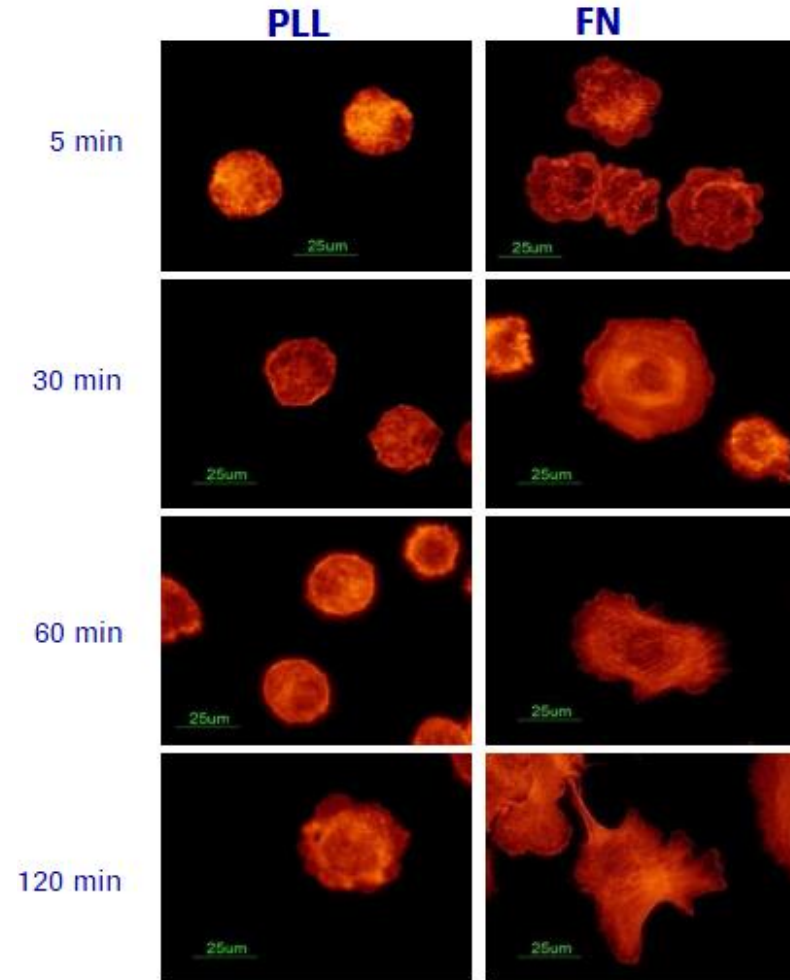
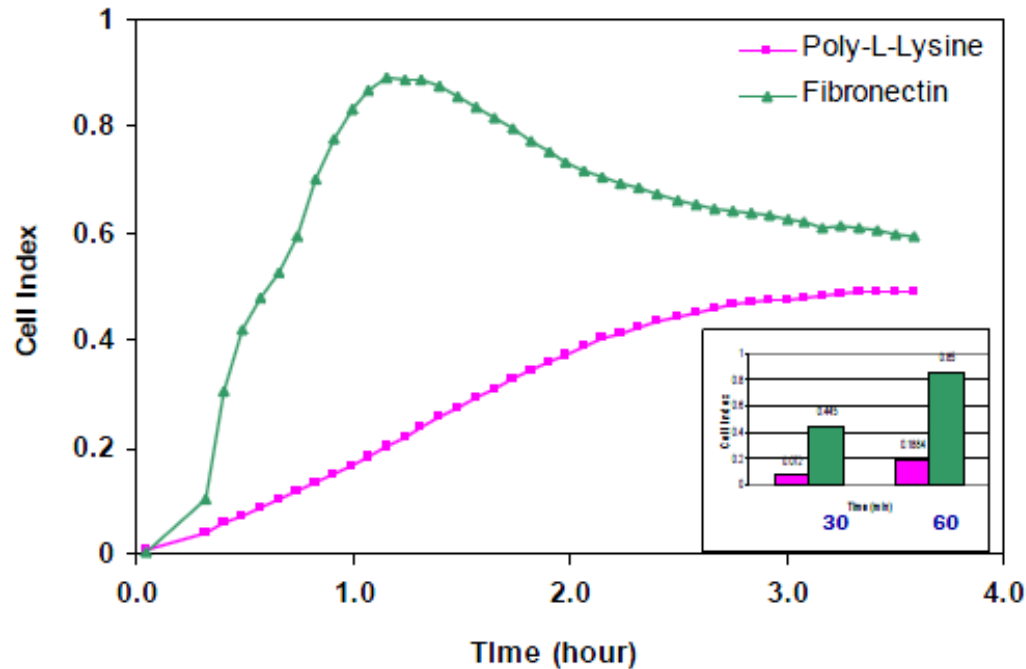
PASSAGGIO 1



PASSAGGIO 4

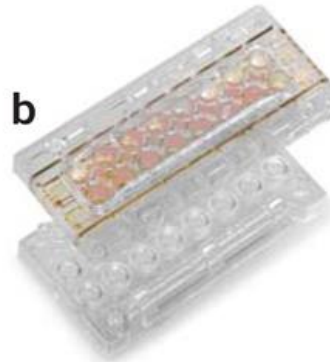
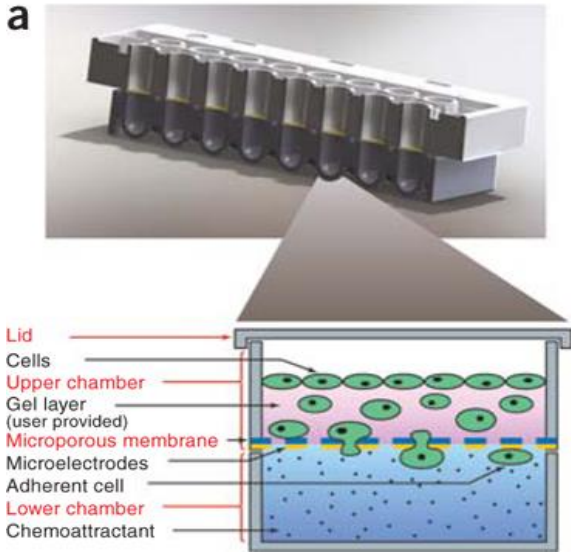
Monitoraggio dei profili di crescita delle **HUVEC** da diversi donatori.

ADESIONE CELLULARE

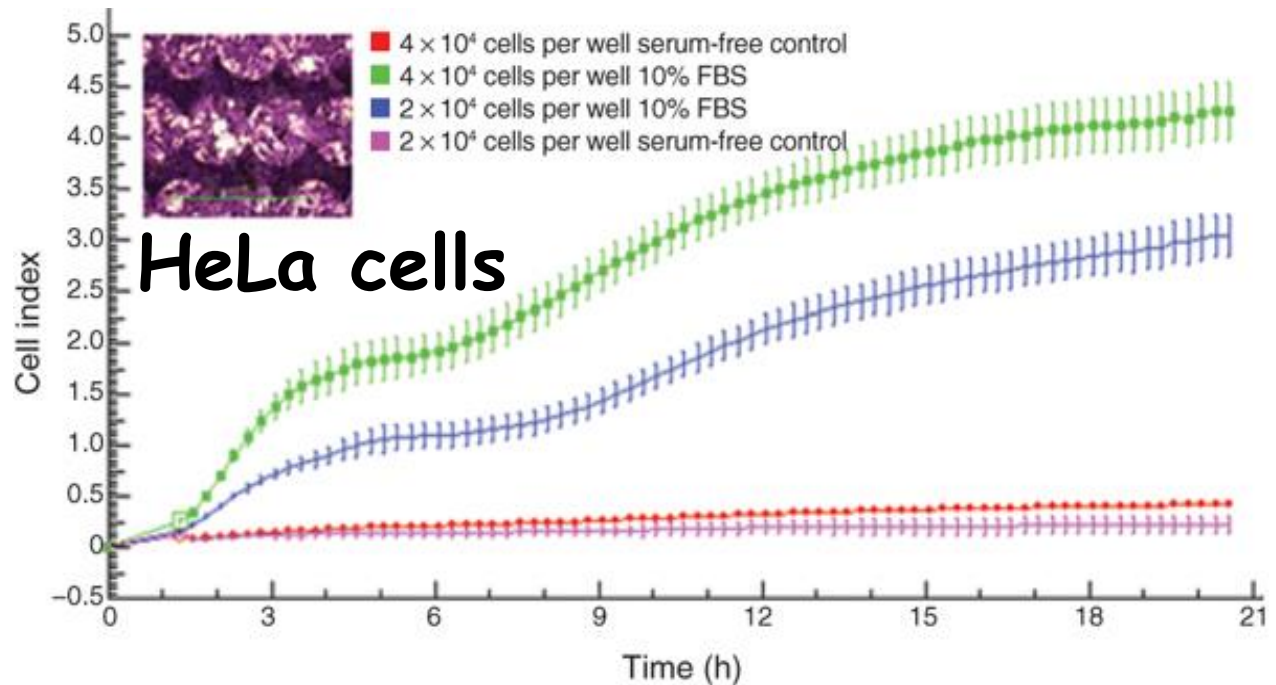


Analisi rapida; minuti anziché giorni.

MIGRAZIONE CELLULARE



Visualizzazione
della **cinetica di
migrazione** su
specifiche piastre.



CITOTOSSICITA' METODI CLASSICI

Inizio
esperimento



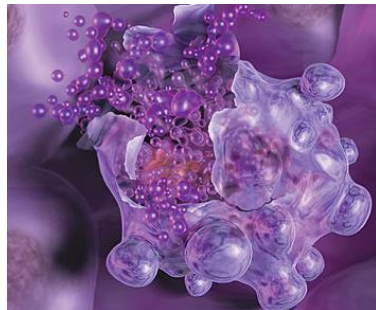
Fine
esperimento

Piastratura
cellule (18-24h)

Trattamento
(24-48h)

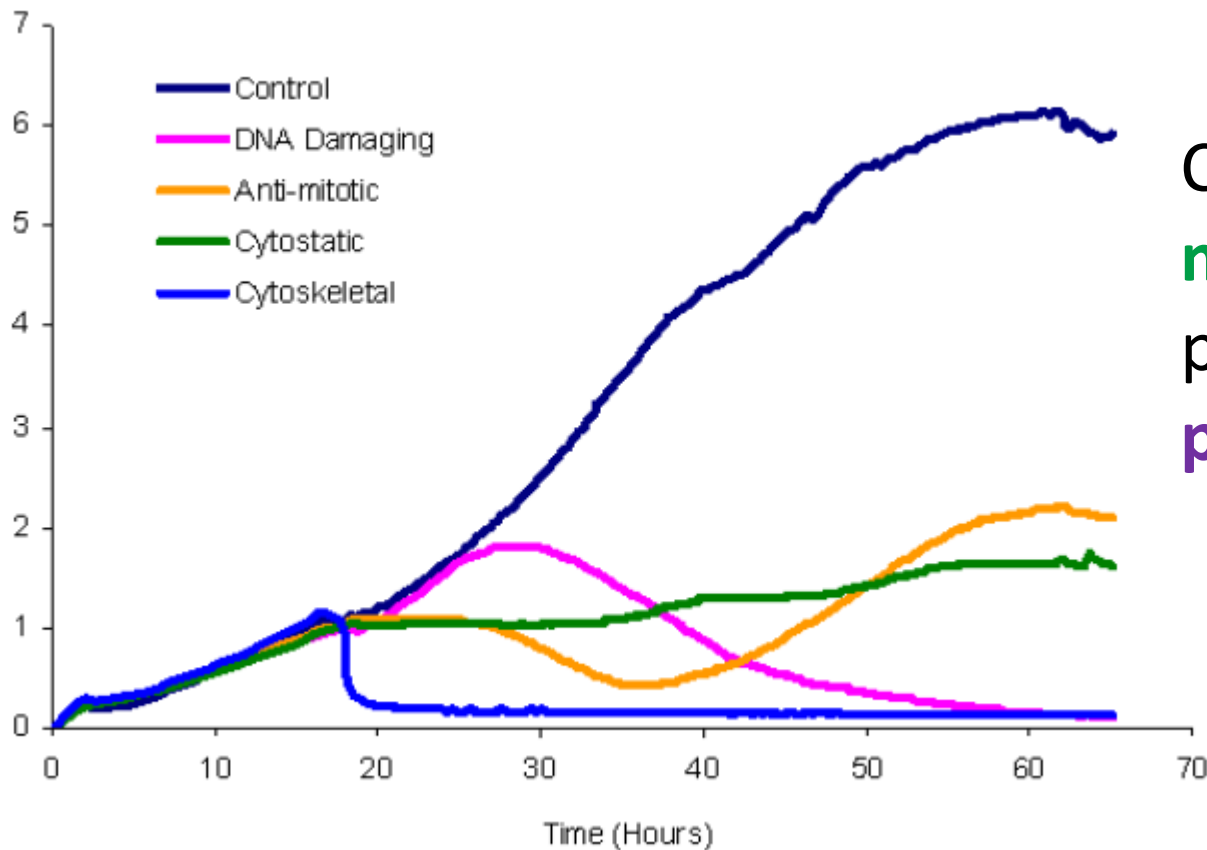
Vitalità:
Marcatura /
Substrato (1-24h)

Analisi
dati



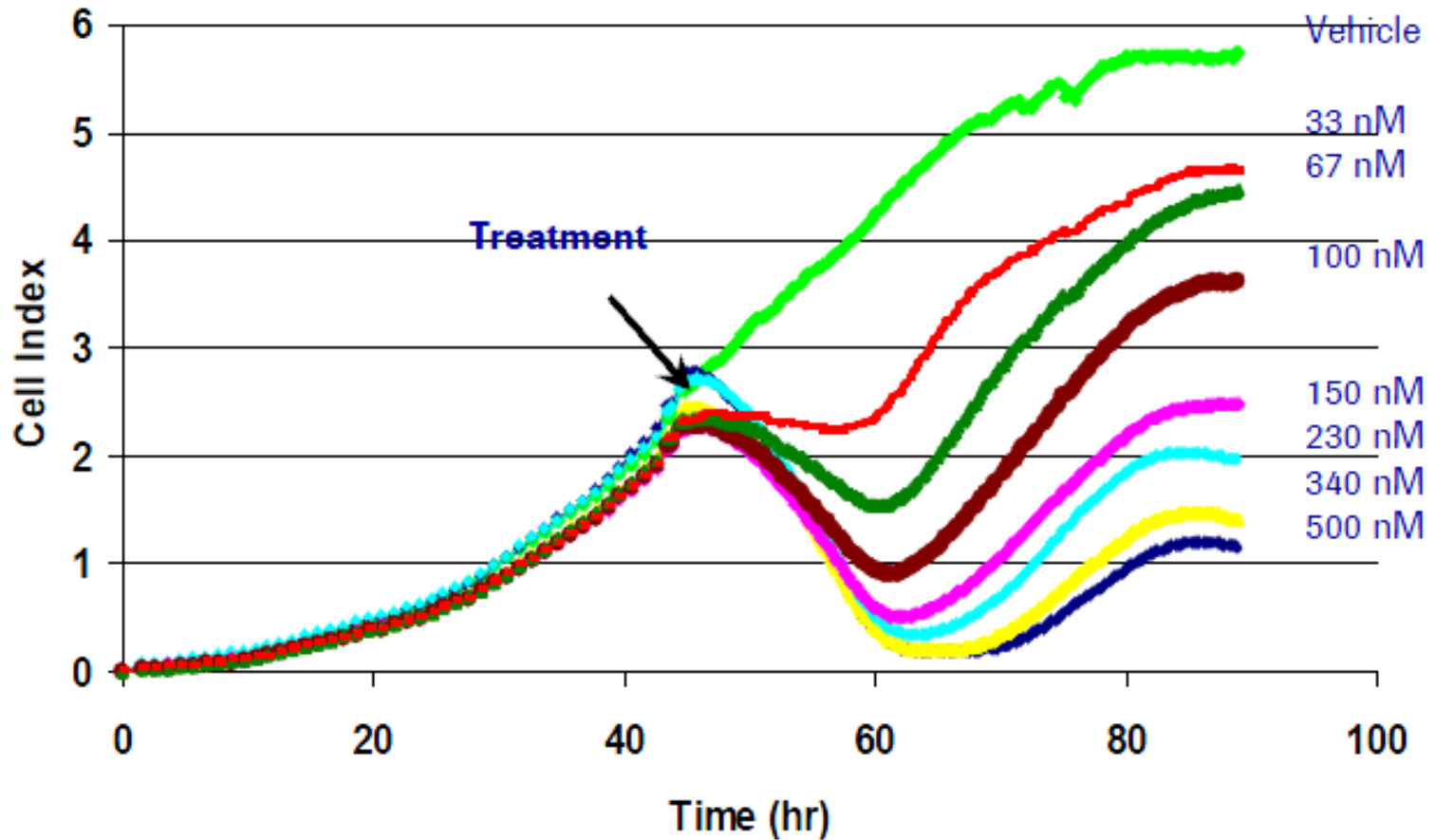
CITOTOSSICITA' CON xCELLigence

Vantaggio dello studio di cinetiche di azione.



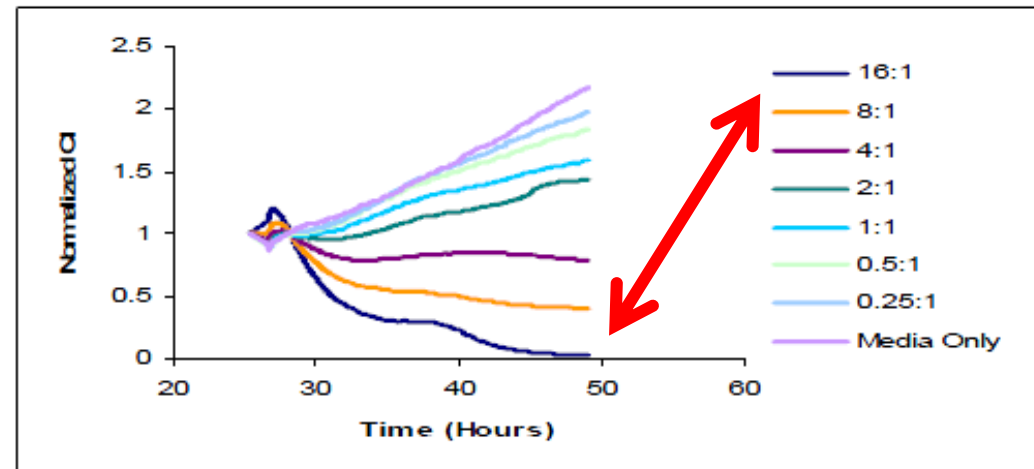
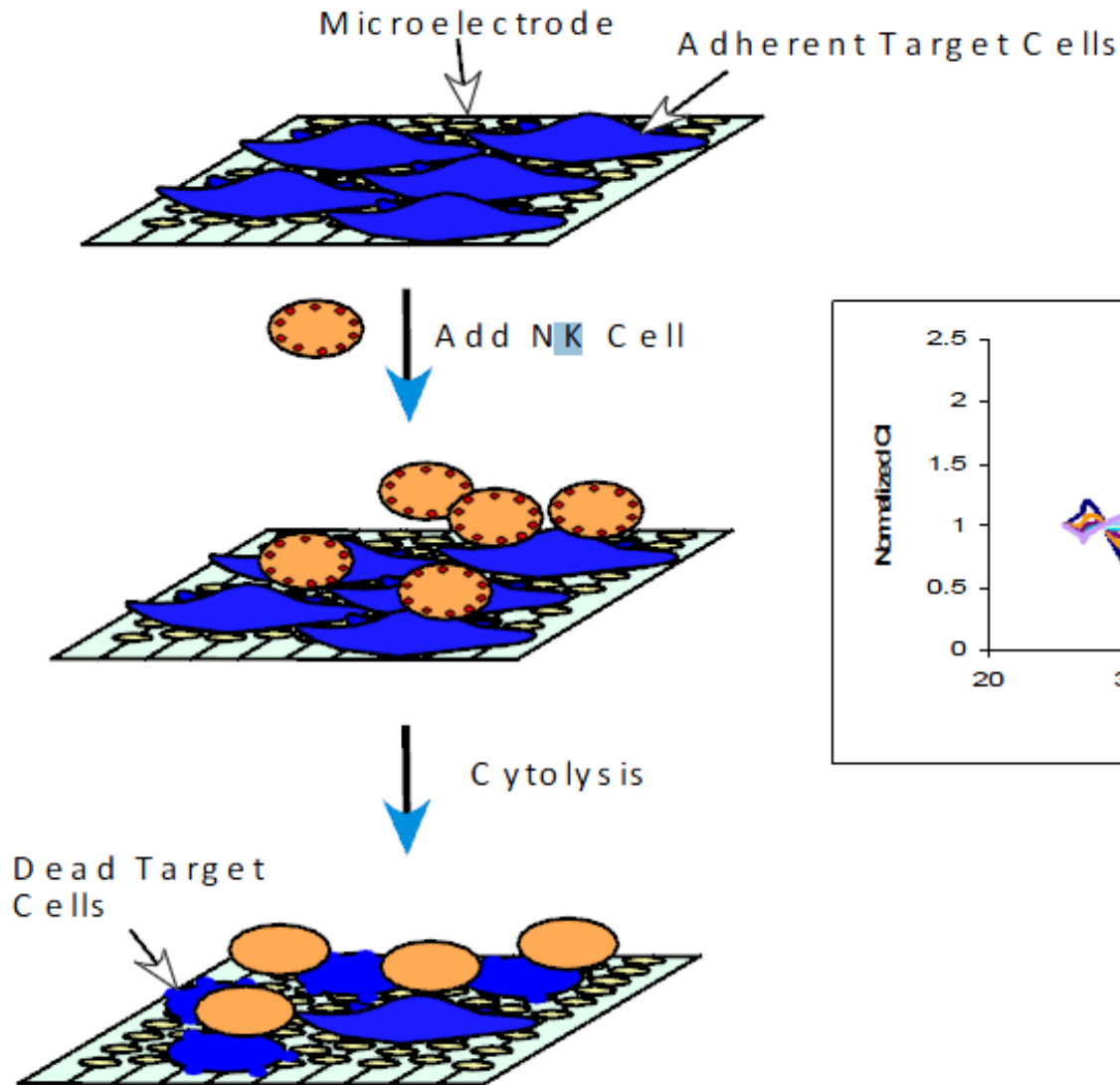
Composti con **diversi meccanismi d'azione** presentano **diversi profili di citotossicità**.

CITOTOSSICITA' DI UN ANTITUMORALE



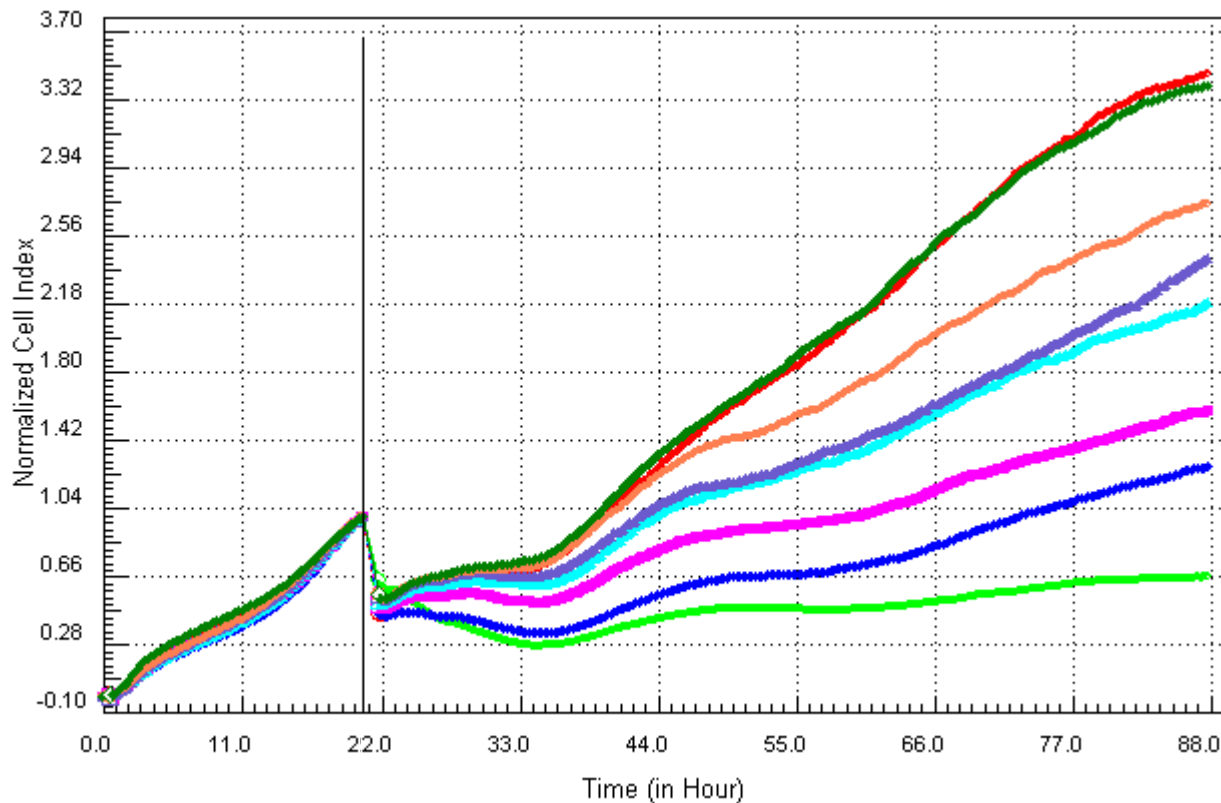
Saggio semplice: dati maggiormente attendibili.

CITOTOSSICITA' MEDIATA DA CELLULE



CITOTOSSICITA' MEDIATA DA CELLULE

Attività di NK su cellule DU145



DU145 only (Controllo)

E:T ratio = 0.47:1

E:T ratio = 0.94:1

E:T ratio = 1.88:1

E:T ratio = 3.75:1

E:T ratio = 7.5:1

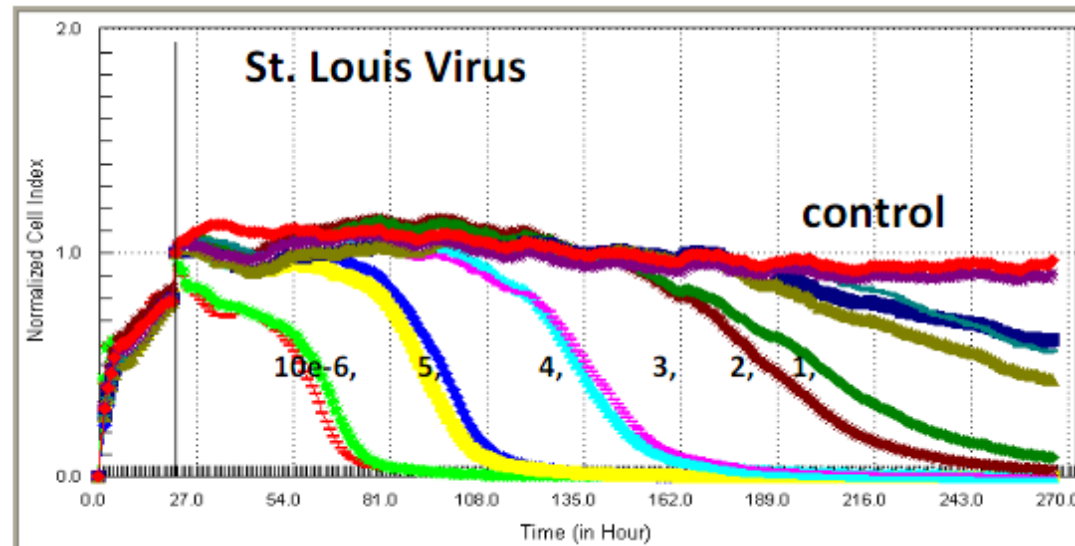
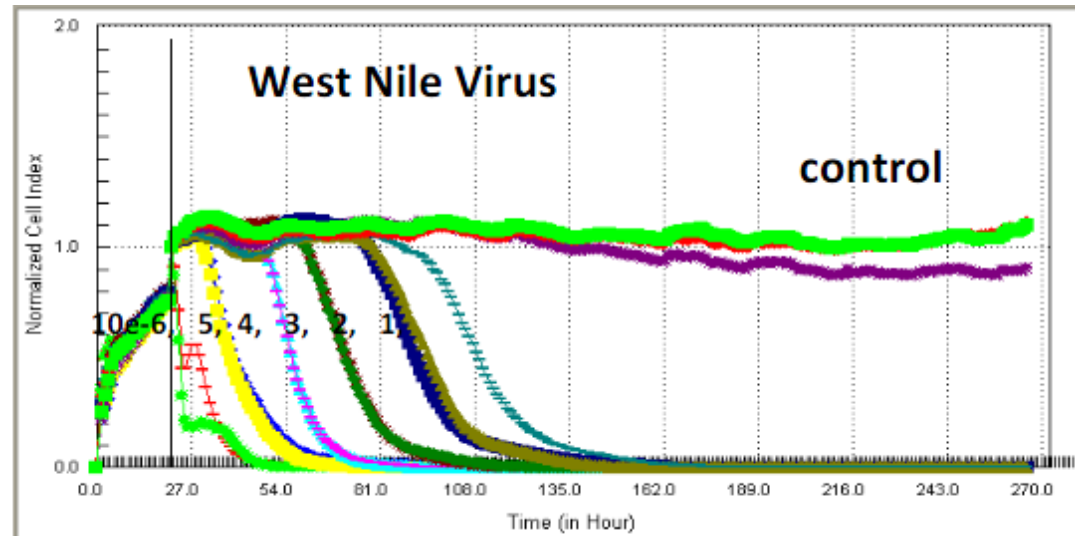
E:T ratio = 15:1

E:T ratio = 30:1

CITOPATOGENICITA' VIRALE

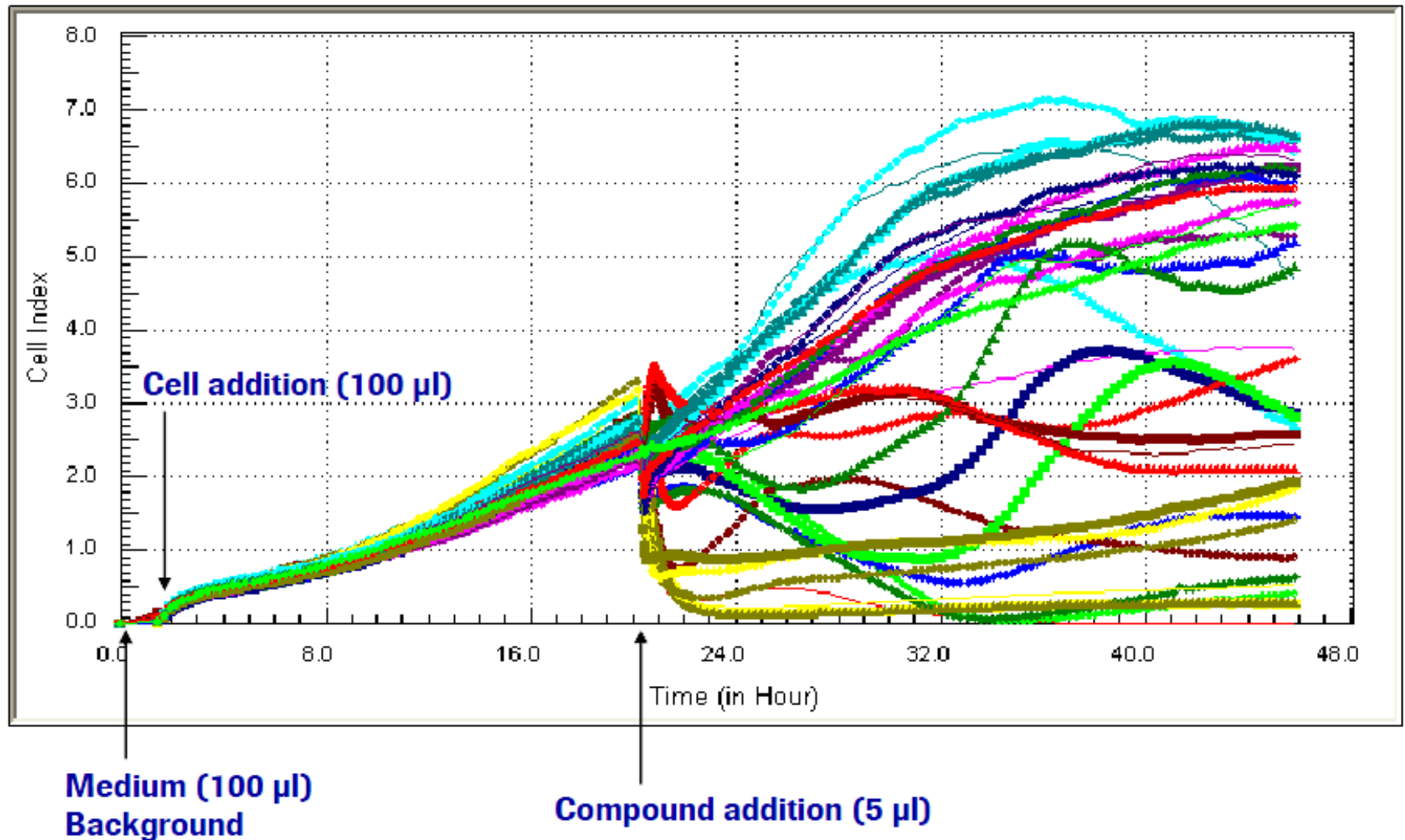
Stesso campione cellulare messo in contatto con **diverse concentrazioni di virus.**

Cellule monitorate per 10 giorni.

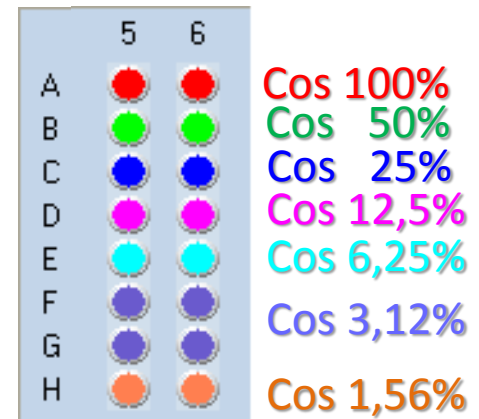
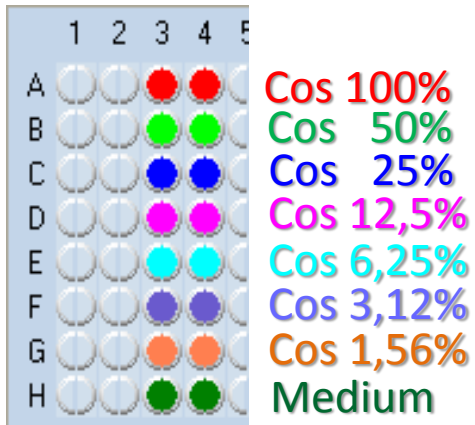
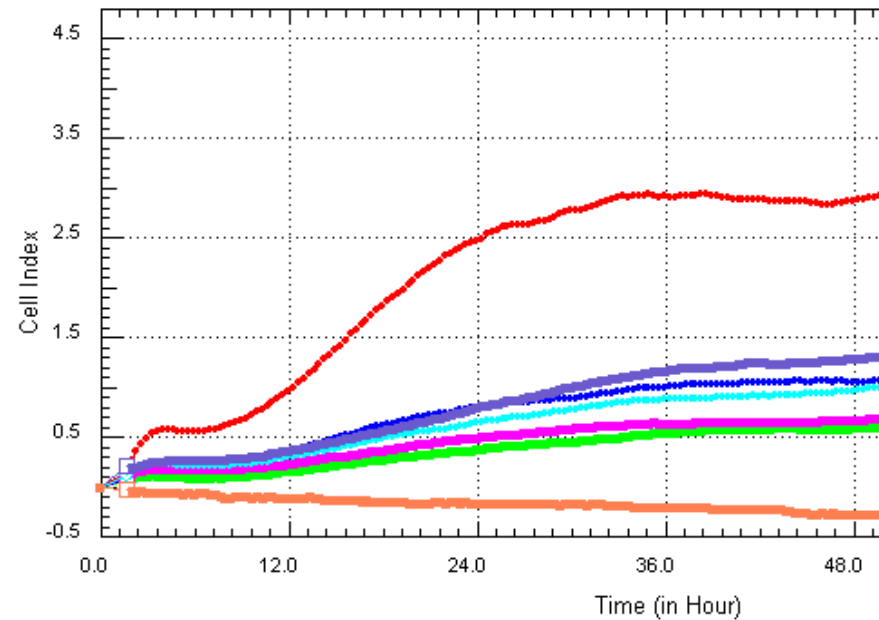
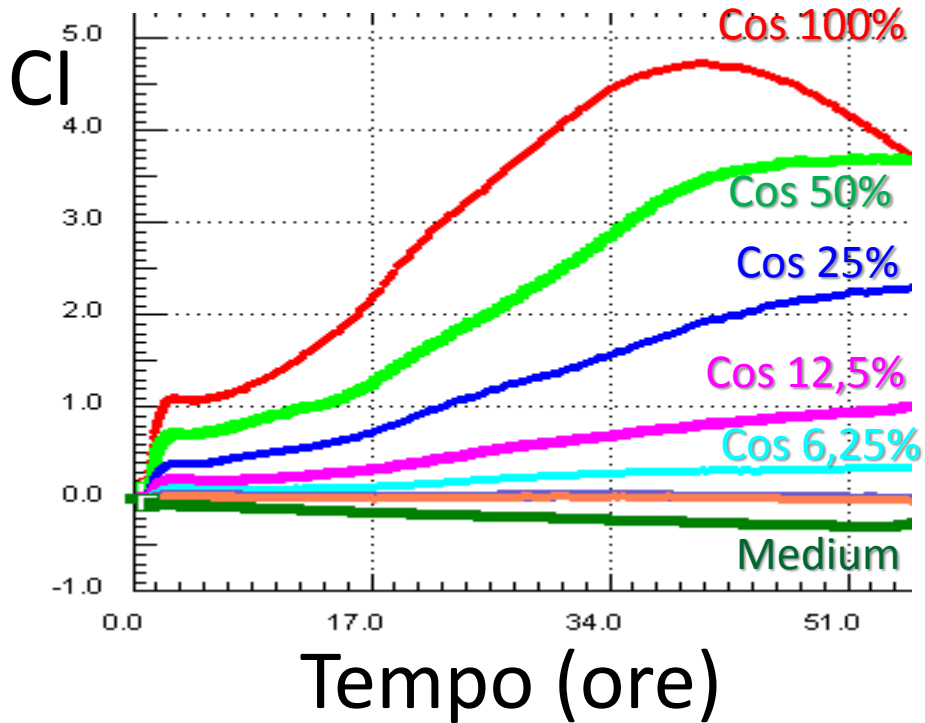


NUMEROSITA' DEI DATI

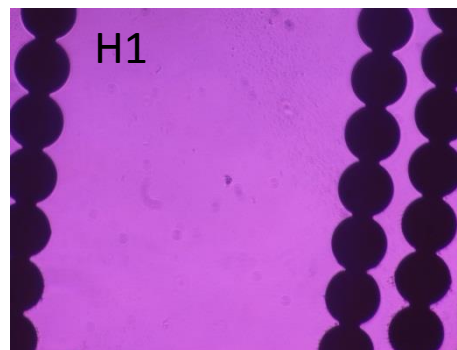
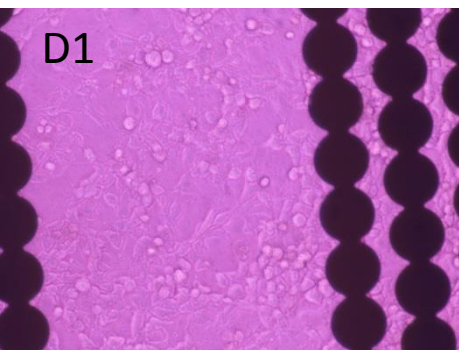
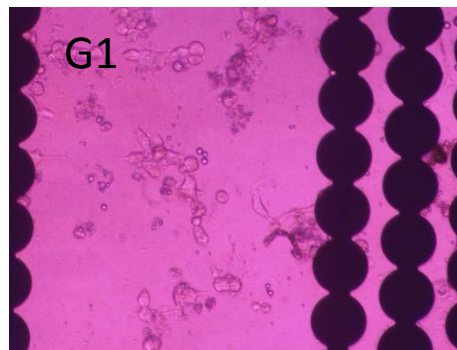
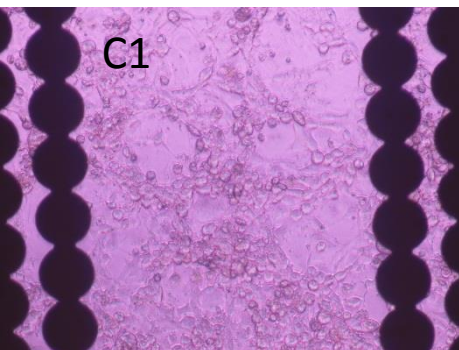
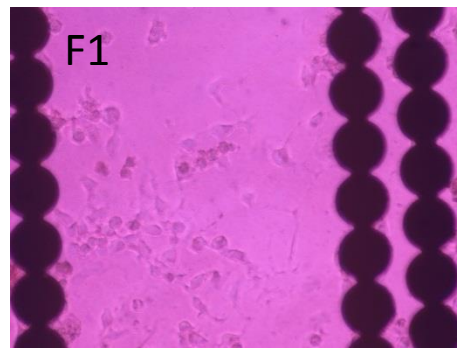
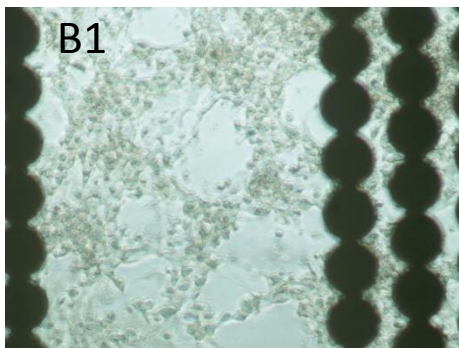
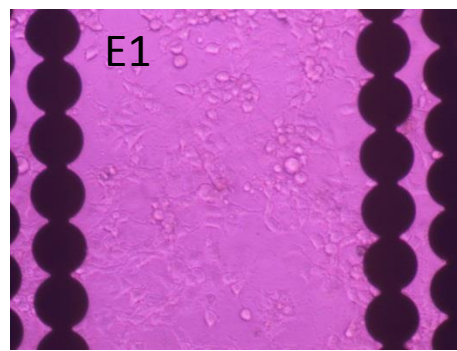
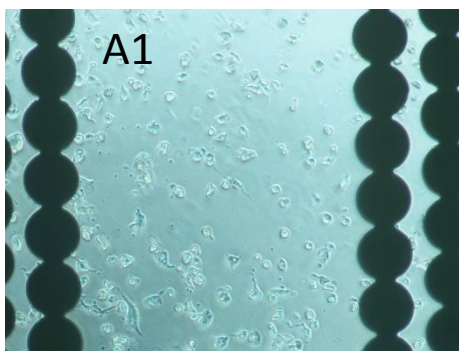
Piastra da 96 pozzetti



DALLA TEORIA AGLI ESEMPI REALI



Dai dati alle cellule



SISTEMA xCELLigence

VANTAGGI

- Facile da utilizzare.
- Numerosi campi di applicabilità.
- Studi personalizzabili.
- Condizioni fisiologiche, senza marcature.
- Maggior attendibilità.
- Time course sulle cellule vitali.
- Miglior comparabilità da saggio a saggio.
- L'analisi in cinetica fornisce informazioni aggiuntive

SVANTAGGI

- Costo di acquisto dello strumento.
- Risponde a più parametri contemporaneamente