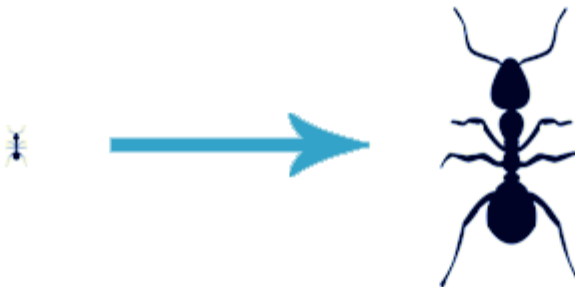


Osservare quel che non si vede.....

La MICROSCOPIA



La Biologia è un campo ricco di immagini. Molti dei fenomeni biologici e strutture non sono visibili dall 'occhio umano senza un aiuto.

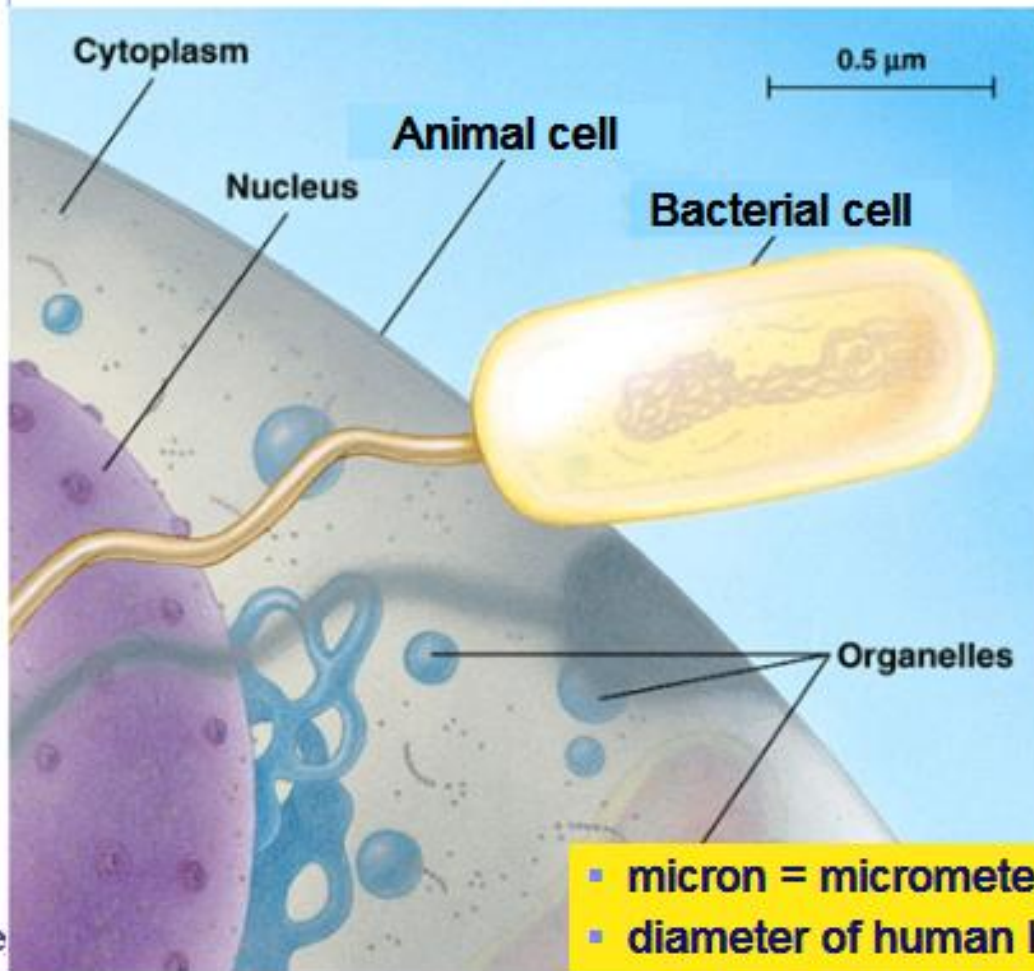
Infatti, l'occhio umano ha una risoluzione di circa 0,1 mm (100 μm).

Dimensioni delle cellule e suoi componenti



RISOLUZIONE: la capacità di vedere due punti vicini come 2 punti distinti e non come un unico punto

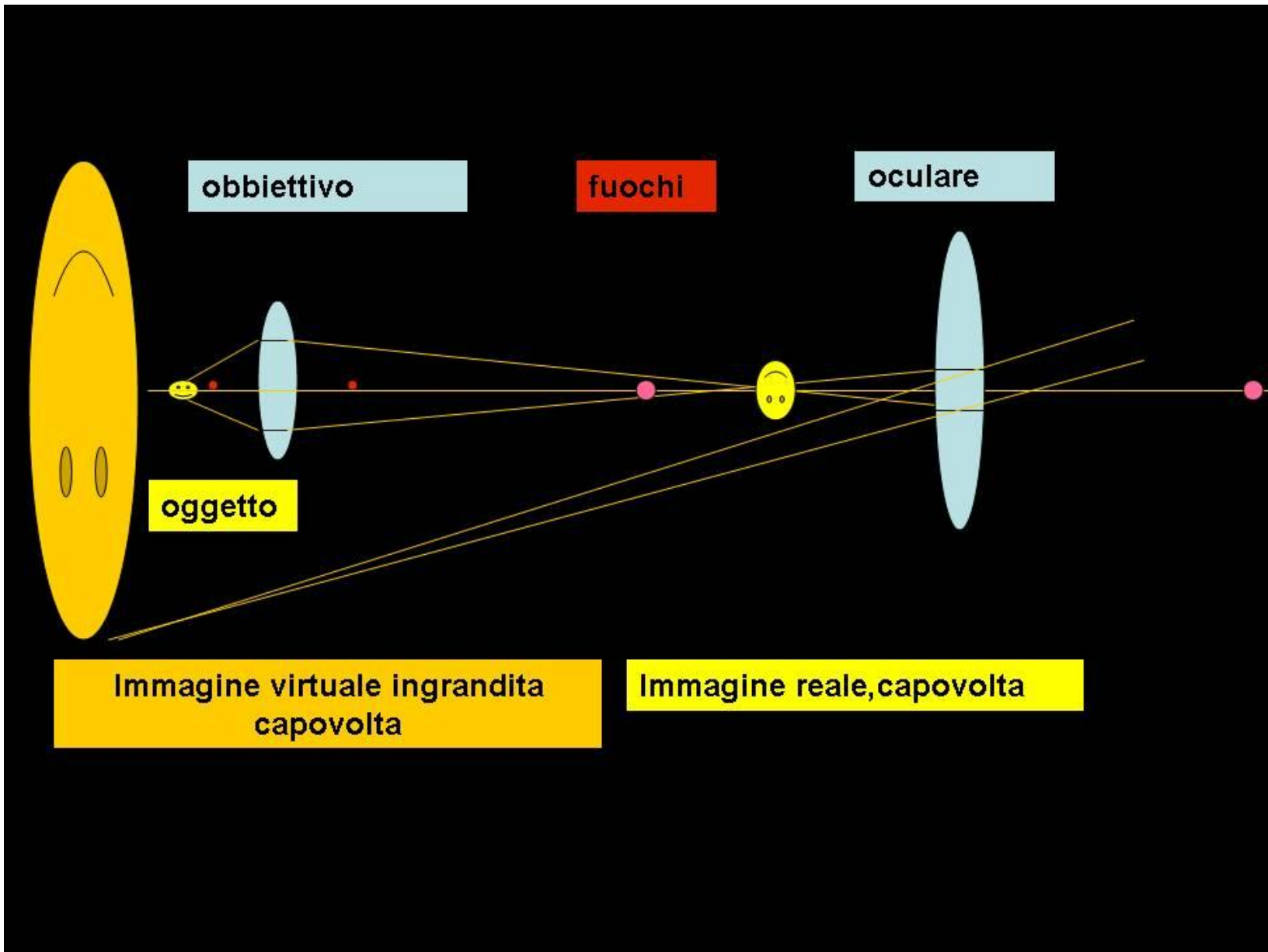
Cell size comparison



most bacteria

- 1-10 microns
- eukaryotic cells
- 10-100 microns

- micron = micrometer = 1/1,000,000 meter
- diameter of human hair = ~20 microns



obbiettivo

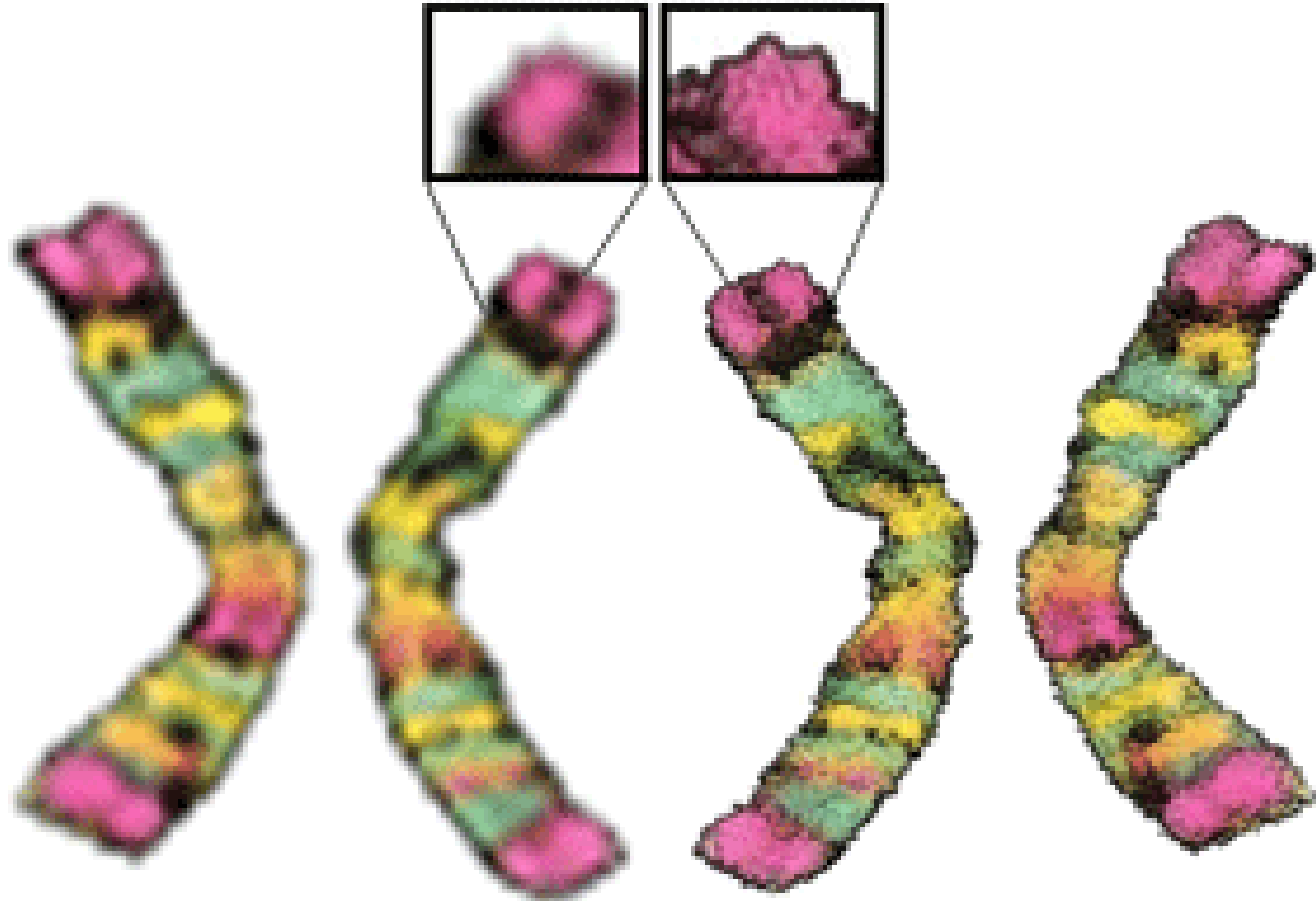
fuochi

oculare

oggetto

Immagine virtuale ingrandita
capovolta

Immagine reale, capovolta



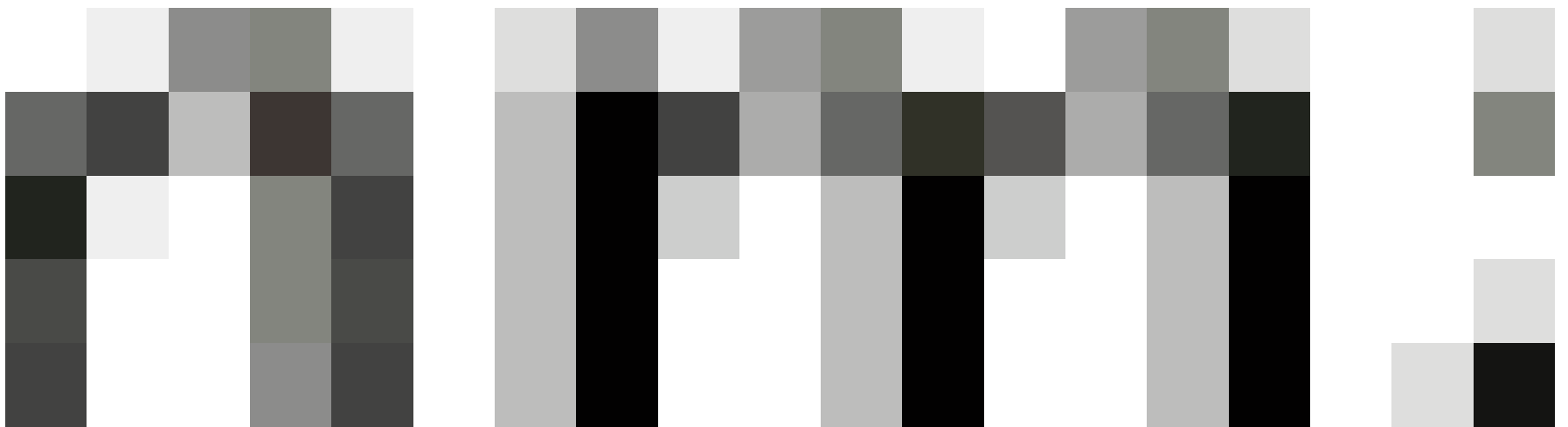
Risoluzione. La stessa immagine è vista con due risoluzioni differenti.

Risoluzione. La stessa immagine è vista con due risoluzioni differenti.

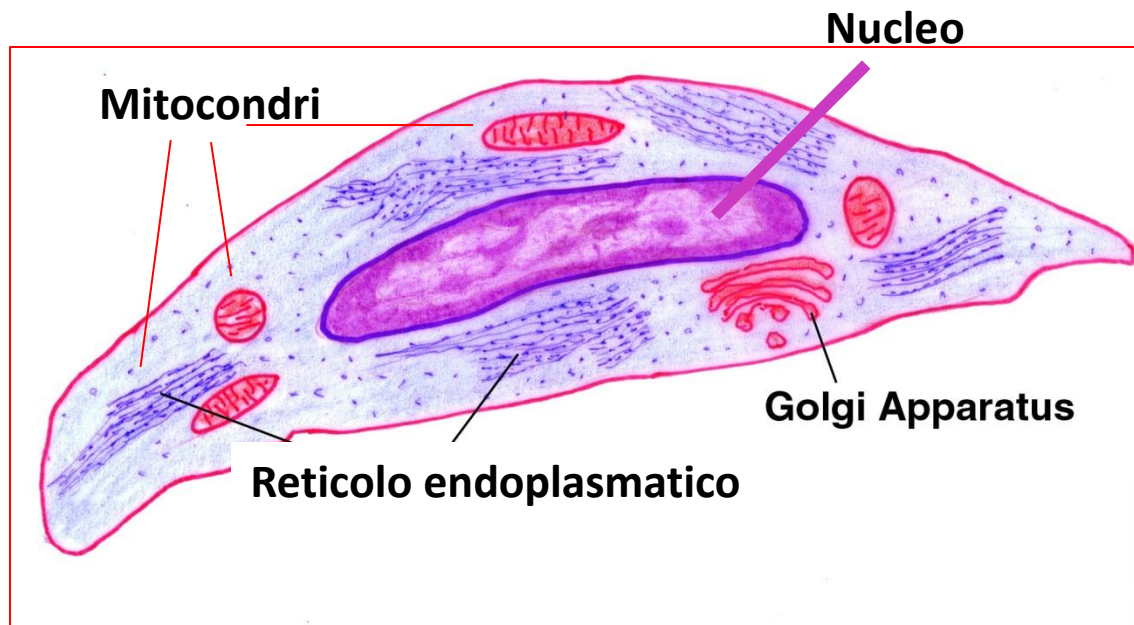
Risoluzione. La stessa immagine è vista con due risoluzioni differenti.

immagine è vista con

immagine



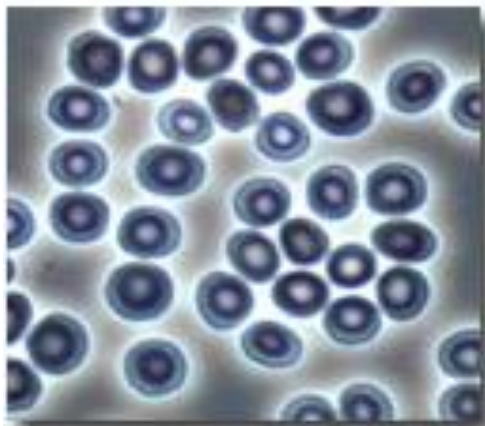
Le cellule



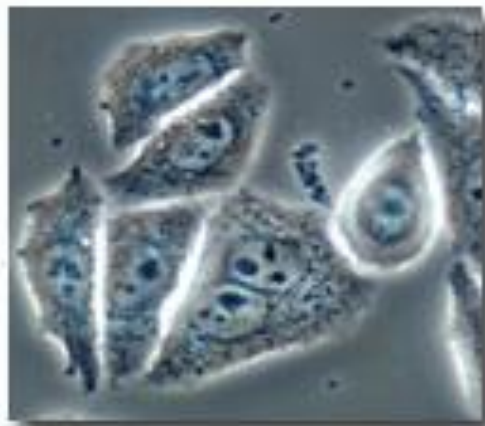
Dimensioni dei globuli rossi: tra 7 e 9 micrometri di diametro

Cellule di osso (SAOS-2): anche 40-50 micron per la dimensione maggiore

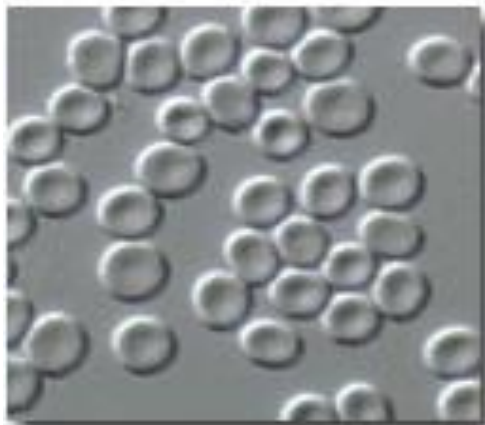
5 micrometri



(a)



(c)



(b)

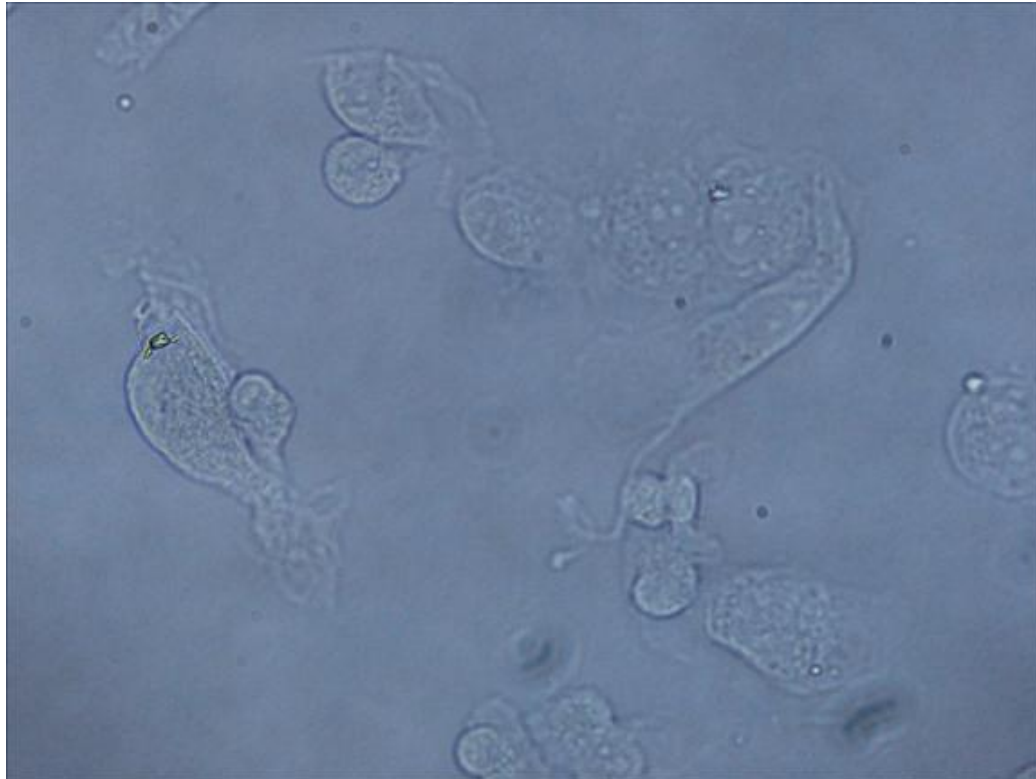


(d)



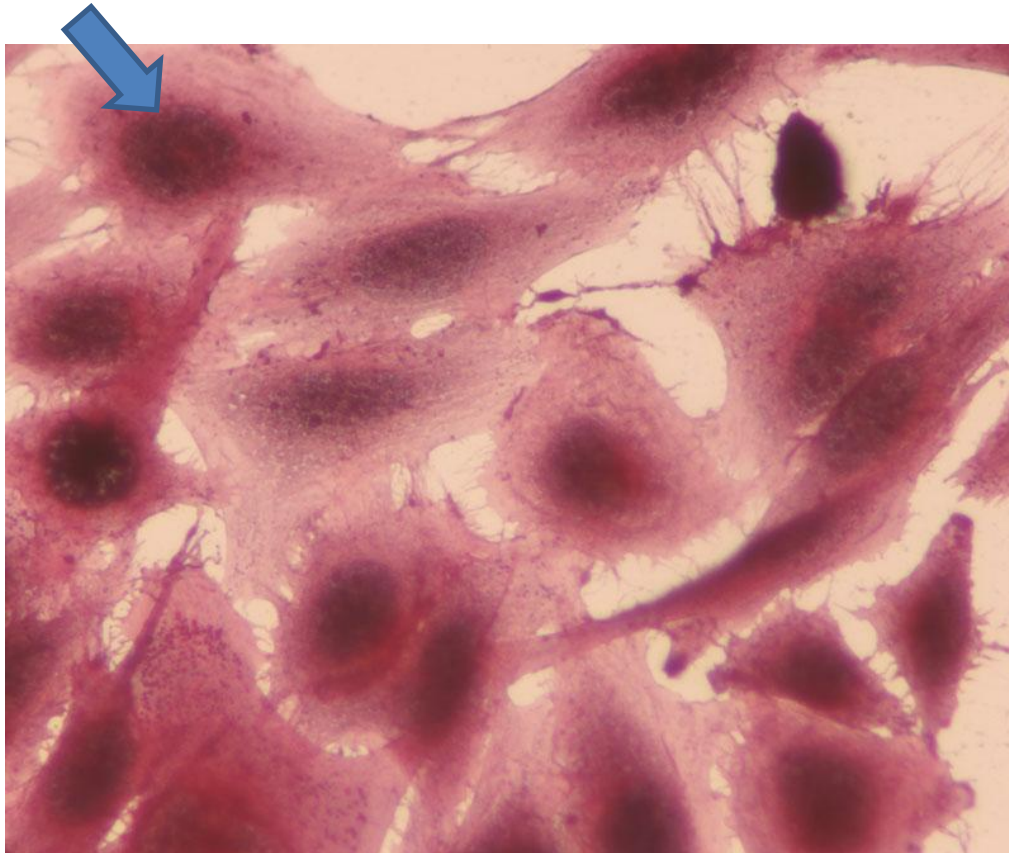
Microscopia in campo chiaro

cellule umane non colorate (fissate in paraformaldeide): risultano molto trasparenti, non si riconosce nessun organello

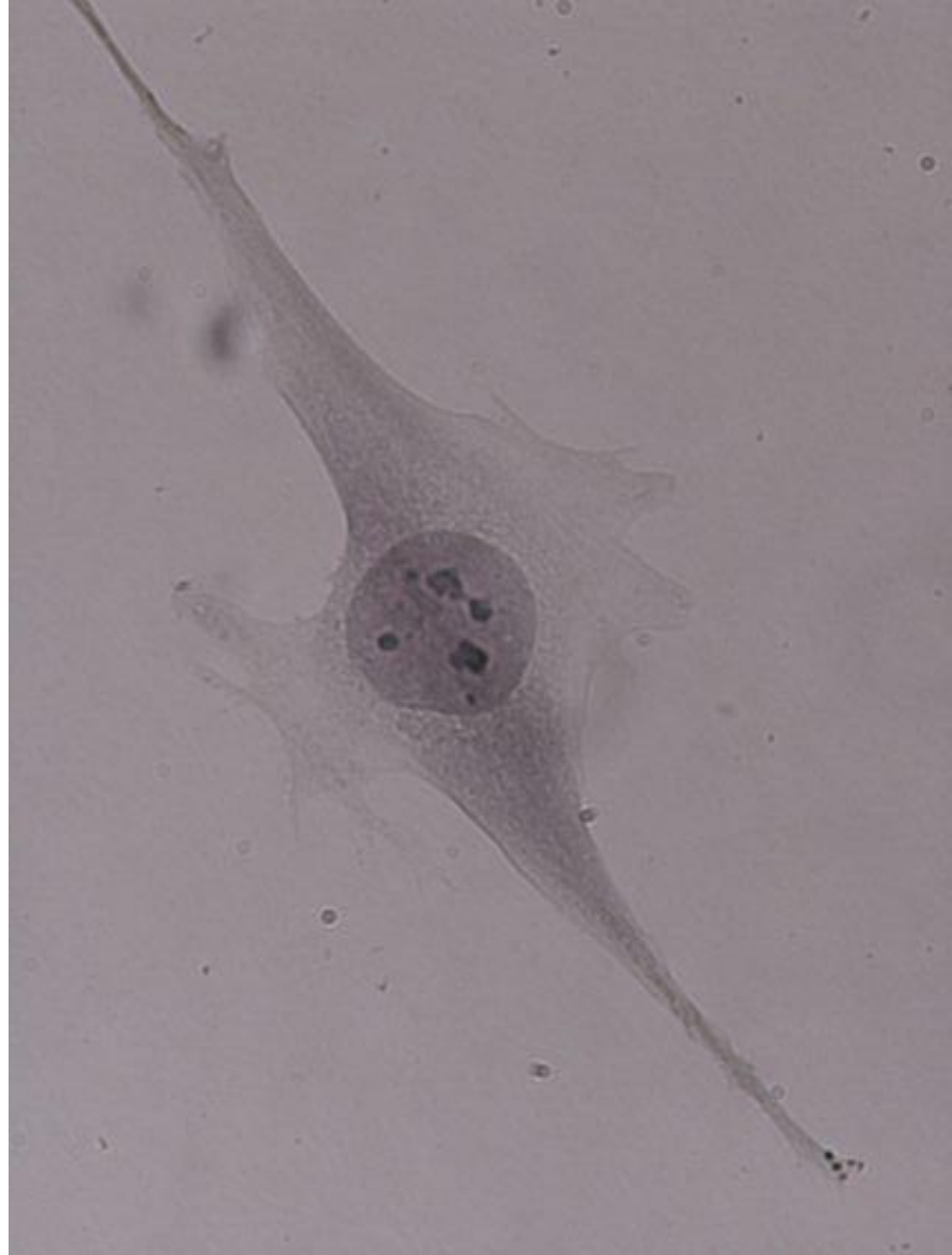


Microscopia in campo chiaro

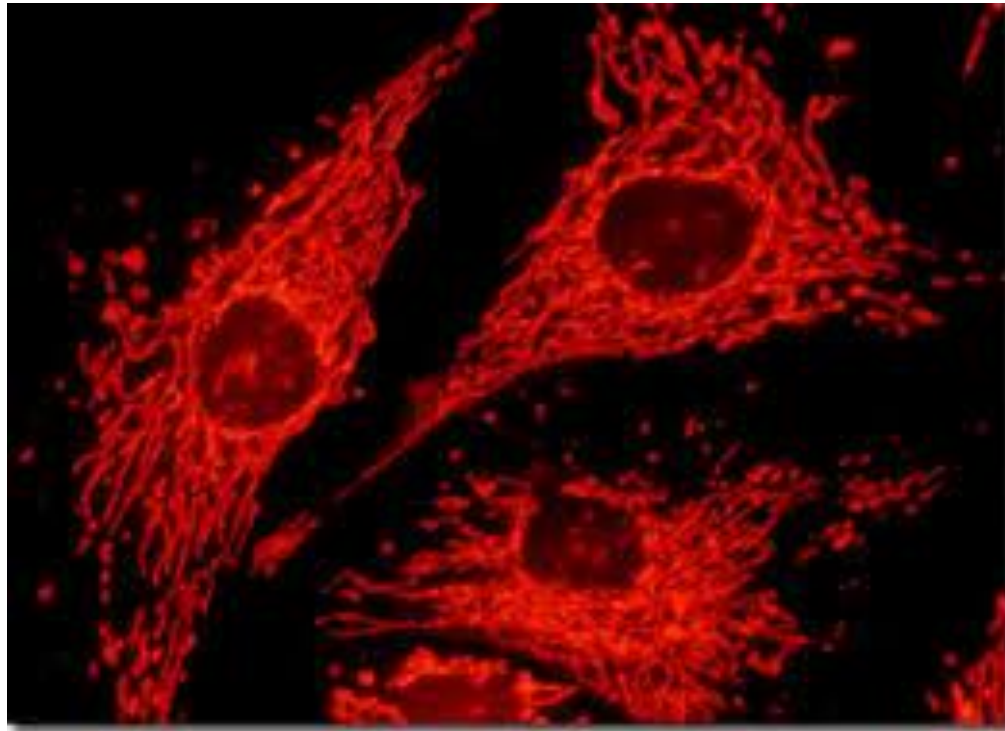
cellule umane di osso fissate e colorate: il nucleo appare come una zona densamente colorata e tondeggiante (indicata ad es. dalla freccia blu), i puntini sono le zone dove vengono depositi i sali minerali che compongono l'osso



I mitocondri e gli altri organelli sono SOTTO il limite di risoluzione del microscopio ottico, quindi anche con elevatissimi ingrandimenti non si distinguono. In questa foto si e' usata una colorazione evidenziare i mitocondri che appaiono come una colorazione diffusa grigia all'interno della cellule. E una colorazione che evidenzia il nucleo, la parte centrale tonda. I punti scuri nel nucleo sono i NUCLEOLI, dove e' presente una elevata sintesi delle molecole che servono a formare i ribosomi.



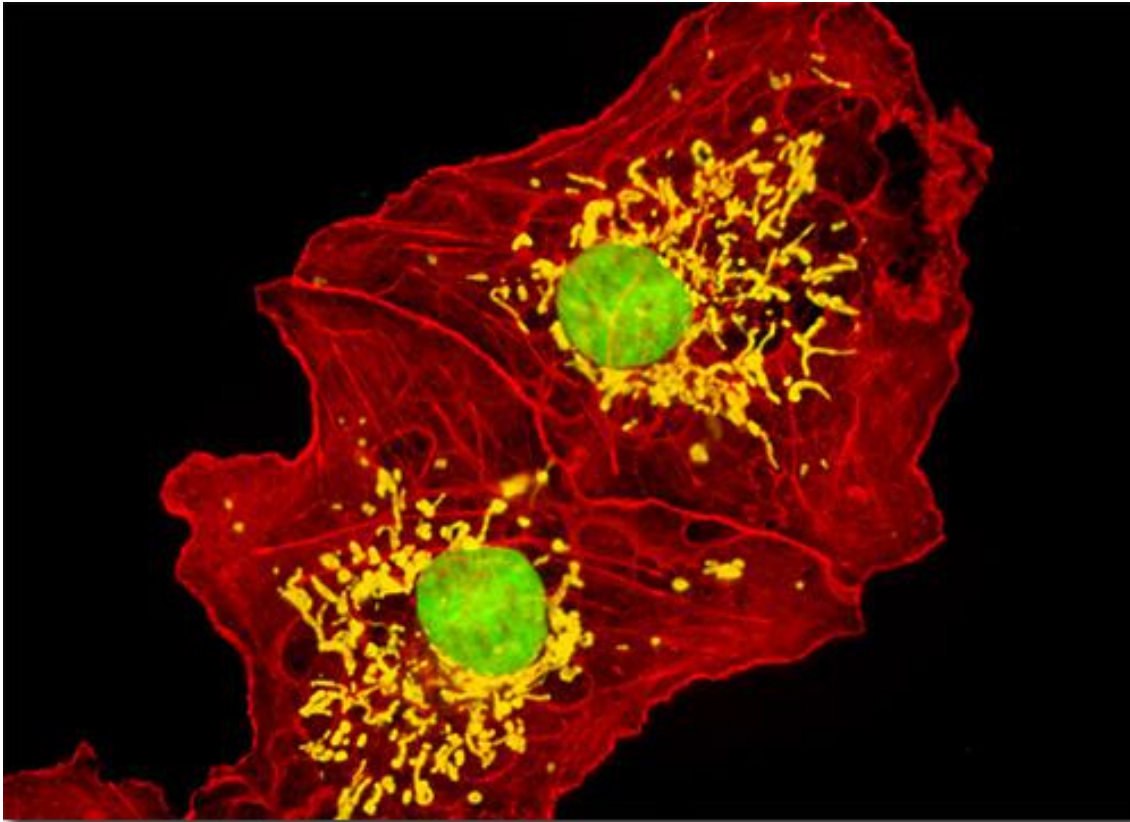
Per evidenziare gli organelli anche con i microscopi ottici posso però usare dei coloranti fluorescenti che si leghino in modo specifico agli organelli che voglio evidenziare..... queste sono cellule in cui sono stati colorati solo i mitocondri, e tutto il resto appare nero



La fluorescenza permette di fare questo perché è come se ogni molecola fluorescente fosse una lampadina che emette luce...E come quando di notte vedo delle case molto lontane perché hanno le luci accese, ma non le riesco a vedere di giorno perché la luce diffusa intorno mi impedisce di notare quella emessa dalle case.....



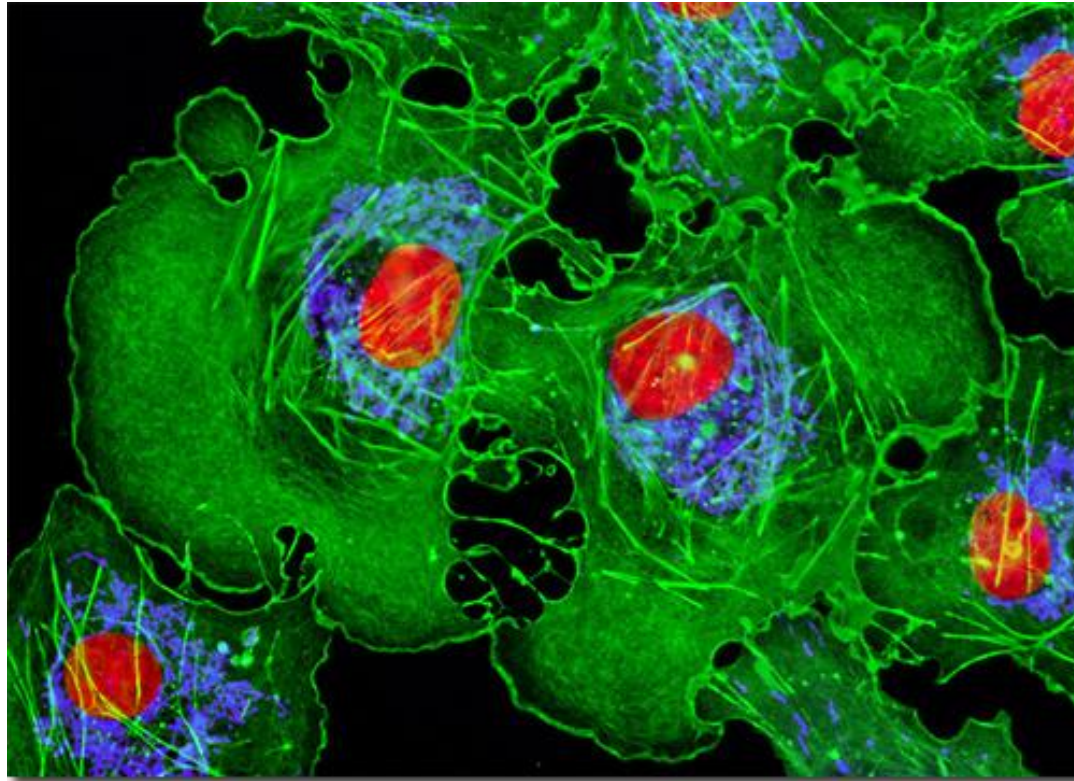
Cos-7
Cellule trasformate
di rene di scimmia.



Microscopia di fluorescenza
Immagine a falsi colori
mitocondri giallo
citoscheletro rosso
DNA verde

Microscopia a fluorescenza: Posso usare dei cocktail di coloranti per vedere diverse cose in una stessa cellula....

Cos-7 Cellule trasformate di rene di scimmia.



nucleo rosso

mitocondri blu

citoscheletro verde

ATTENZIONE all'uso corretto del microscopio:

Campioni non colorati: UTILIZZARE IL CONTRASTO DI FASE, FACENDO ATTENZIONE CHE GLI ANELLI DI FASE DEL CONDENSATORE SIANO GLI STESSI DELL'OBIETTIVO

Campioni colorati: UTILIZZARE IL CAMPO CHIARO controllare che almeno il condensatore non sia posizionato sul contrasto di fase.....

Campioni in fluorescenza: controllare di avere un microscopio adatto....



CFI Achromat Series

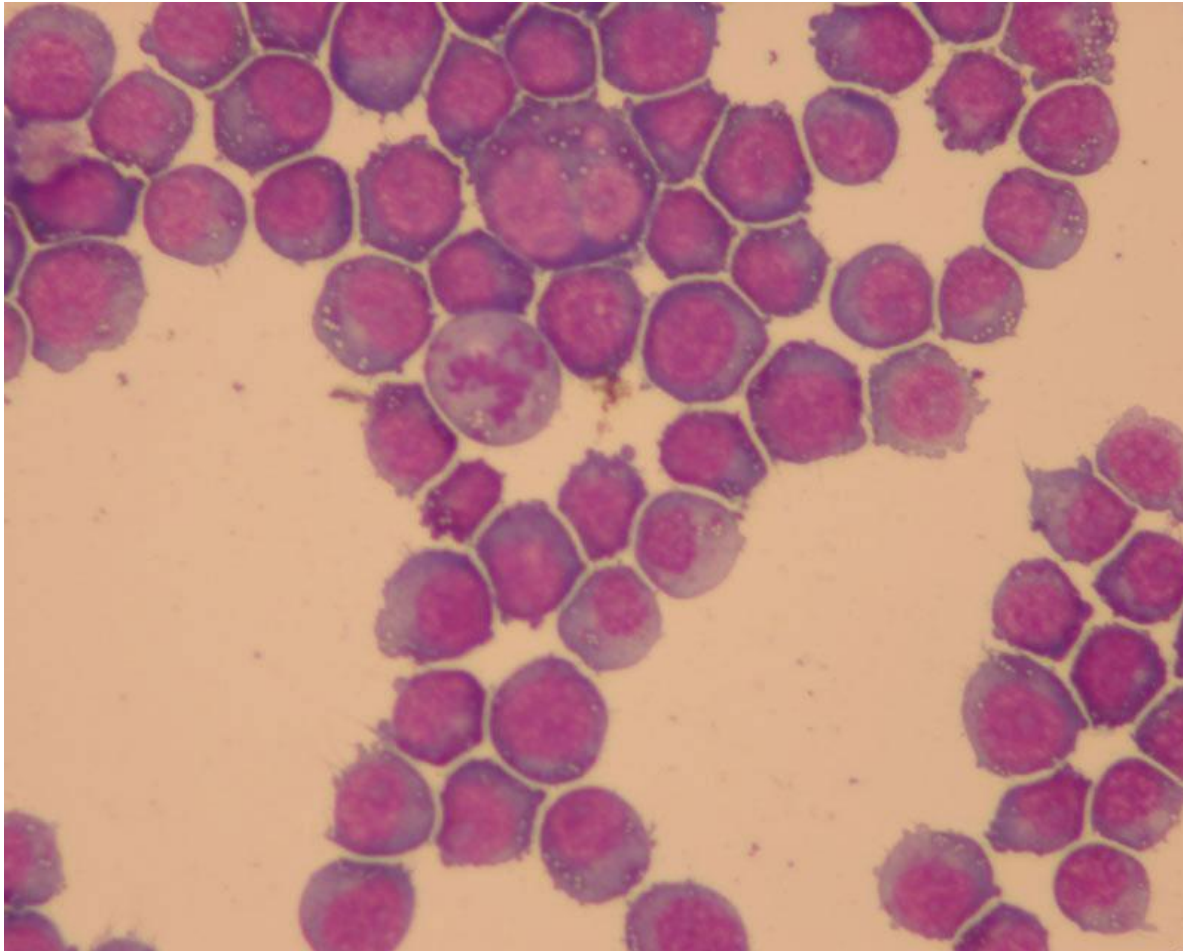
Objectives for
Phase Contrast Microscopy



CFI60
Optics



Colorazione con May-Grunwald / Giemsa cellule Jurkat (derivate da linfociti T)

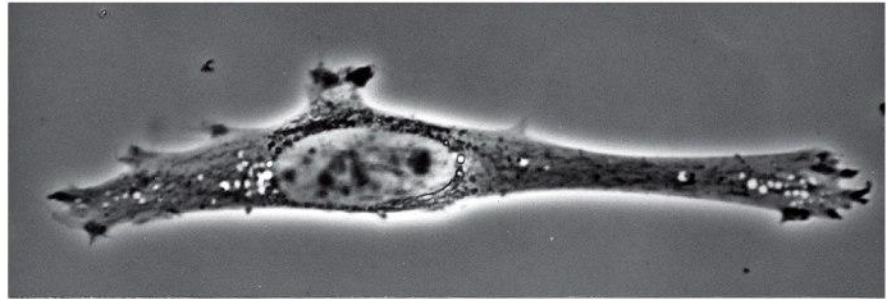


CAMPO CHIARO

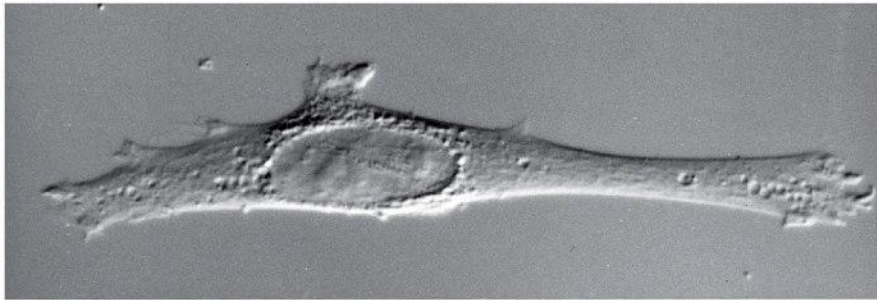


(A)

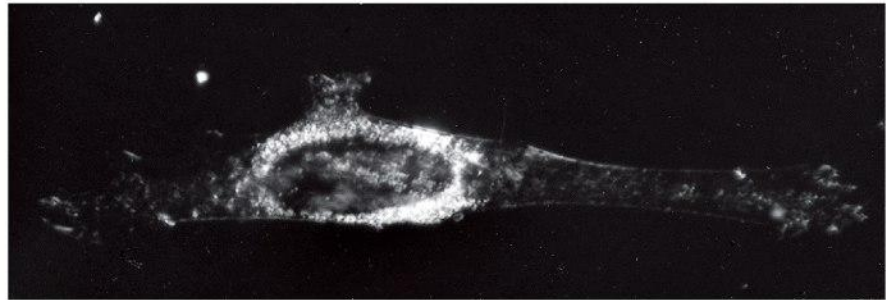
CONTRASTO DI FASE



(B)



(C)



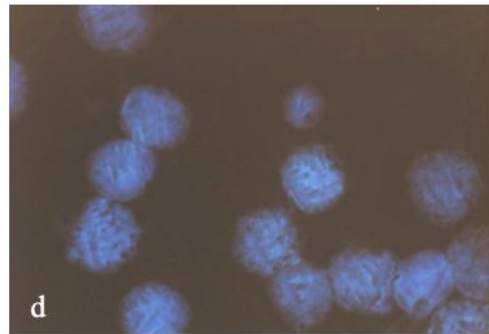
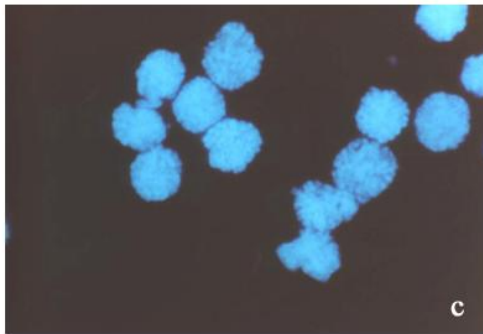
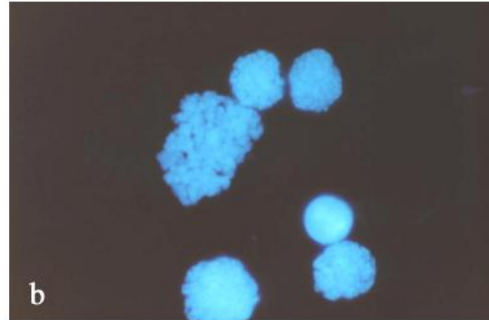
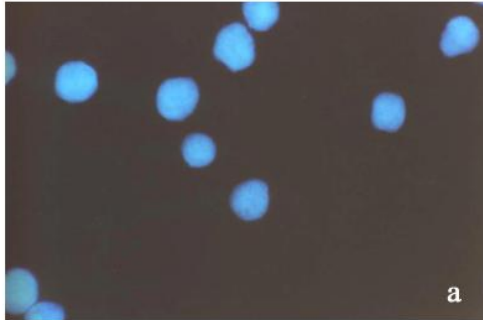
(D)

50 μ m

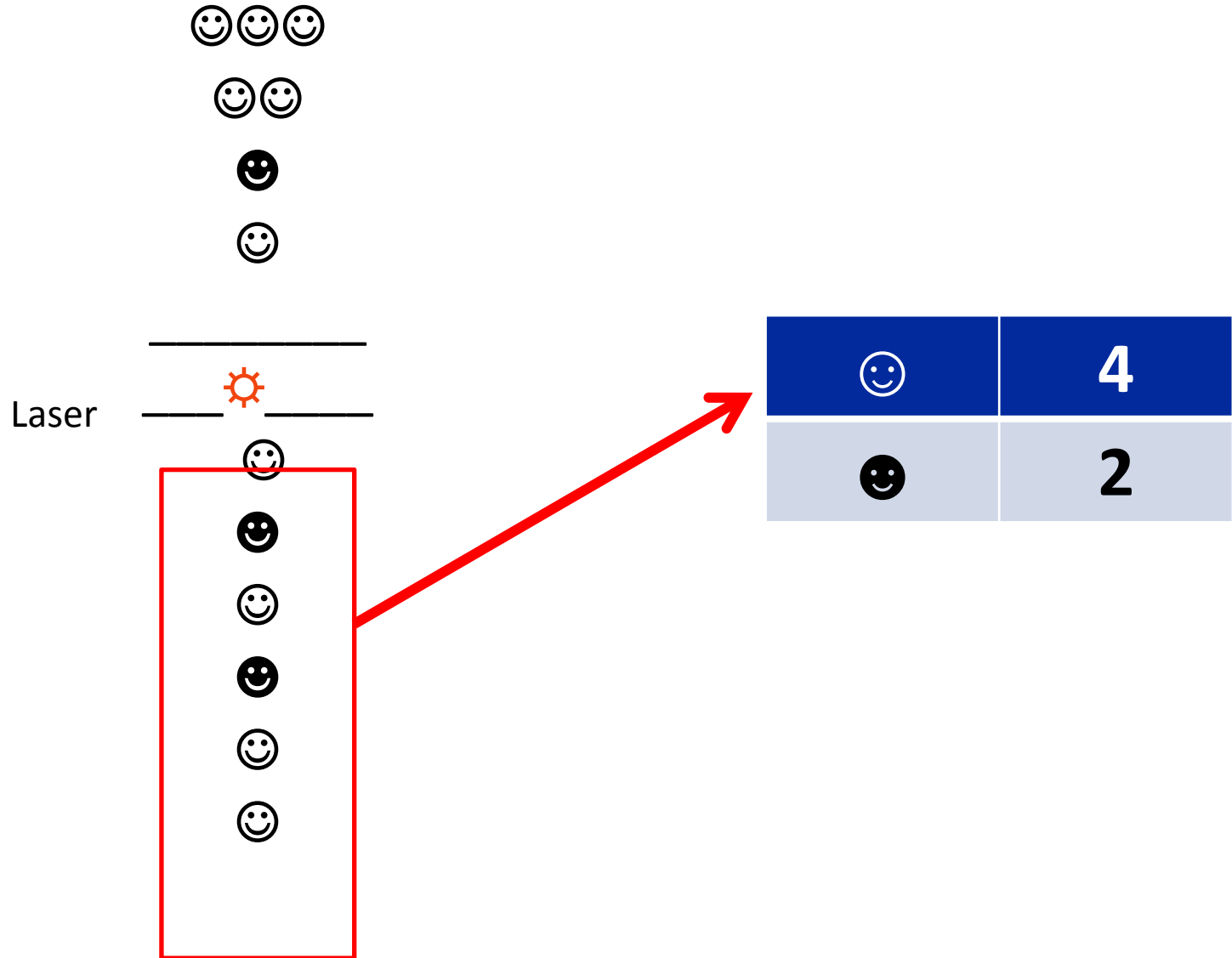
DIC

CAMPO SCURO

Nuclei di HL60 colorati con HOECHST 33342 1 microgrammo/mL e trattate con in modo da bloccarle in mitosi.



Citofluorimetria a flusso



CITO **FLUORI**METRIA

VUOLE OVVIAMENTE MISURARE

PRINCIPALMENTE LA **FLUORESCENZA**

EMESSA DA OPPORTUNI FLUOROCROMI
INTRINSECI O ESTRINSECI PRESENTI IN

QUALCHE COSA DI **PARTICOLATO**

QUINDI IN UNA CELLULA, IN UN ORGANELLO, IN
UN CROMOSOMA, IN UN ORGANISMO
PLURICELLULARE O IN PARTICELLE NON
BIOLOGICHE

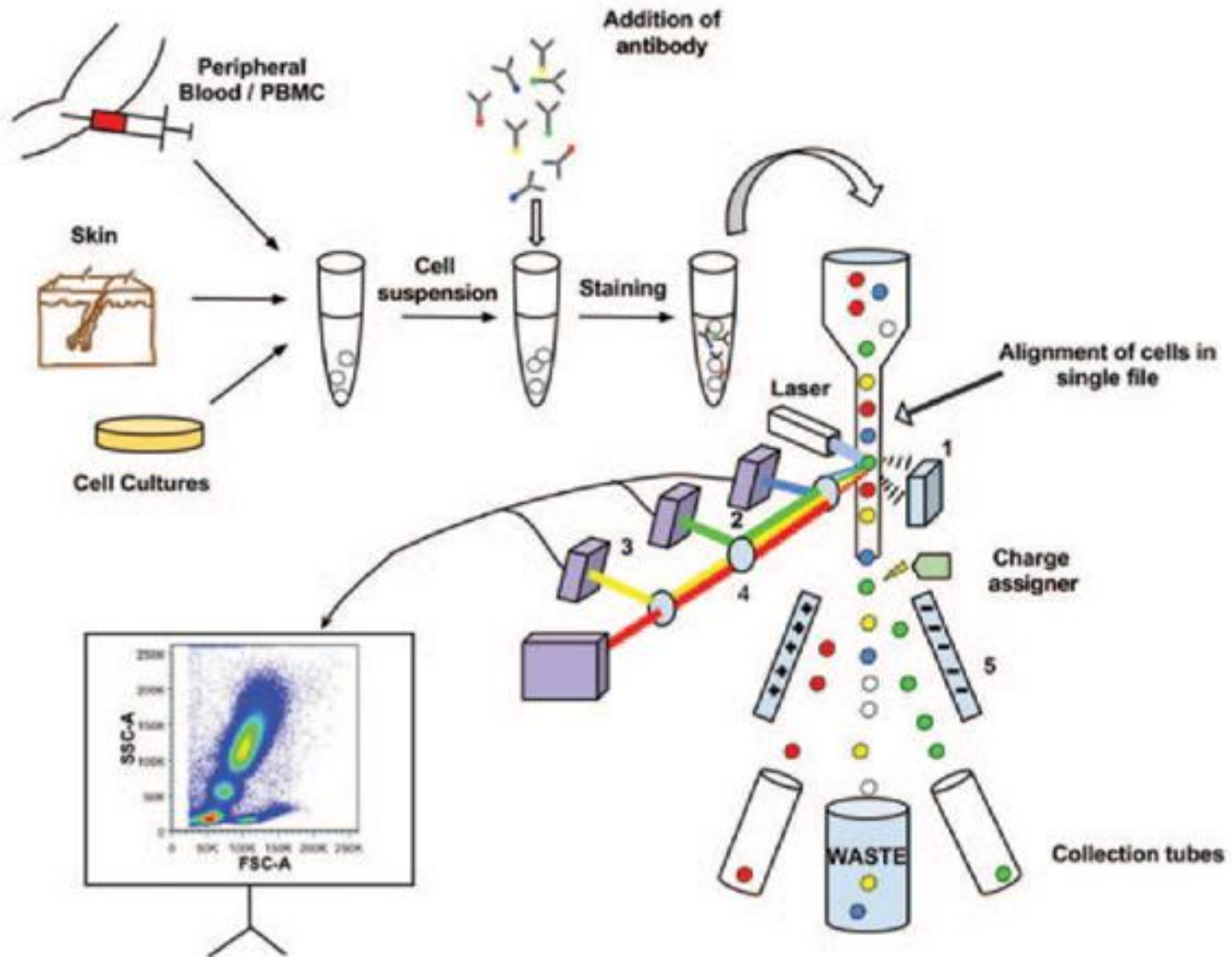
CITOFUORIMETRIA A FLUSSO

E' una tecnica che permette la misurazione di diversi parametri e la caratterizzazione di cellule **monodisperse** sospese in un mezzo fluido.

Consente di misurarne le caratteristiche fisiche e/o biochimiche all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente di eccitazione

Rende possibile la misurazione di **proprietà multiple** di singole cellule ad una velocità molto elevata (5000 cell/ secondo), permettendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa.

NON SOLO ANALISI MA ANCHE RECUPERO DI CAMPIONI CELLULARI SELEZIONATI: CELL SORTER



Measurable parameters

[edit]



Use of flow cytometry to measure copy number sequence (Flow-FISH)

This list is very long and constantly expanding.

- used for confirming diagnosis of chronic lymphocytic leukemia
- volume and morphological complexity of cells
- cell pigments such as chlorophyll or phycoerythrin
- total DNA content (cell cycle analysis, cell kinetics, proliferation, ploidy, aneuploidy, endoreduplication, etc.)
- total RNA content
- DNA copy number variation (by Flow-FISH or BACs-on-Beads technology)
- chromosome analysis and sorting (library construction, chromosome paint)
- protein expression and localization
- Protein modifications, phospho-proteins
- transgenic products *in vivo*, particularly the Green fluorescent protein or related Fluorescent Proteins
- cell surface antigens (Cluster of differentiation (CD) markers)
- intracellular antigens (various cytokines, secondary mediators, etc.)
- nuclear antigens
- enzymatic activity
- pH, intracellular ionized calcium, magnesium, membrane potential
- membrane fluidity
- apoptosis (quantification, measurement of DNA degradation, mitochondrial membrane potential, permeability changes, caspase activity)
- cell viability
- monitoring electroporation of cells
- oxidative burst
- characterising multidrug resistance (MDR) in cancer cells
- glutathione
- various combinations (DNA/surface antigens, etc.)
- cell adherence (for instance pathogen-host cell adherence)

The technology has applications in a number of fields, including [molecular biology](#), [pathology](#), [immunology](#), [plant biology](#) and [marine biology](#). It has broad application in [medicine](#) (especially in transplantation, hematology, tumor immunology and chemotherapy, prenatal diagnosis, genetics and [sperm sorting](#) for [sex preselection](#)). In marine biology, the autofluorescent properties of photosynthetic [plankton](#) can be exploited by flow cytometry in order to characterise abundance and community structure. In protein engineering, flow cytometry is used in conjunction with [yeast display](#) and [bacterial display](#) to identify cell surface-displayed protein variants with desired properties.

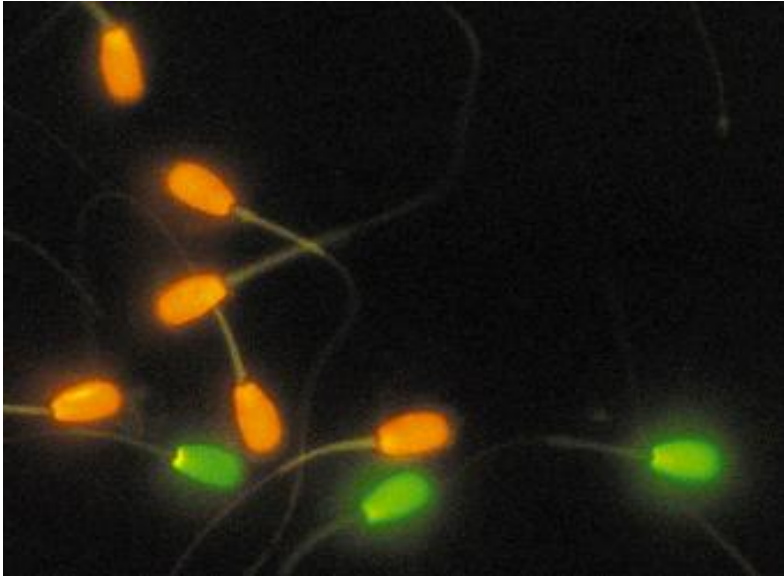
Ad esempio....

Come posso valutare gli effetti di un potenziale farmaco antitumorale?

Valuto in cellule tumorali e normali:

- Gli effetti antiproliferativi
- L'induzione di apoptosi e/o autofagia
- Lo stress ossidativo
- Il potenziale mitocondriale
- L'espressione di proteine coinvolte in cascate di trasduzione del segnale

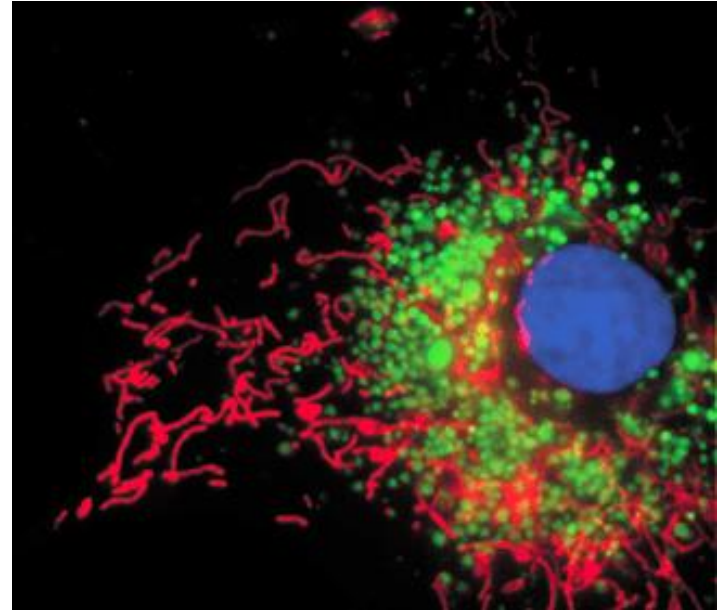
Se ho un singolo parametro o al massimo due posso anche contare al microscopio ma se ne ho di piu'?



Vitalità di spermatozoi bovini

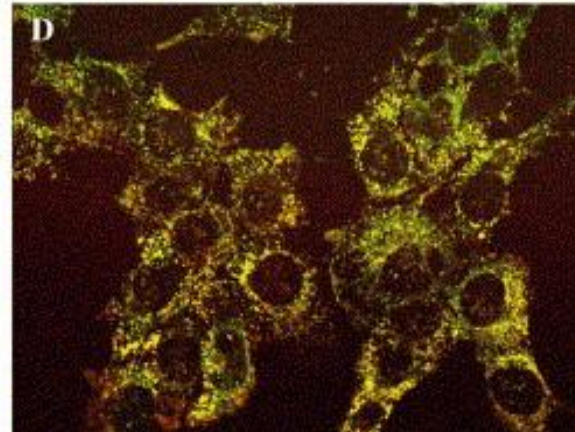
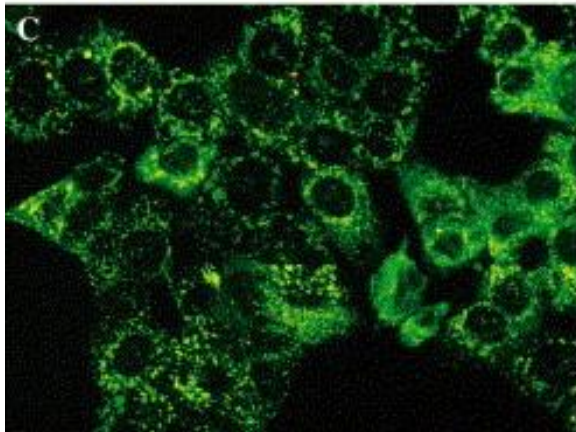
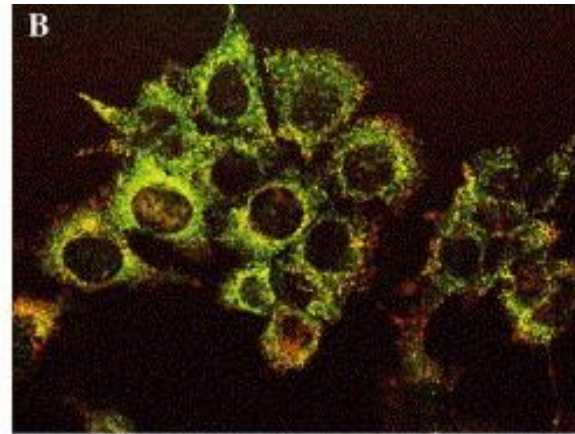
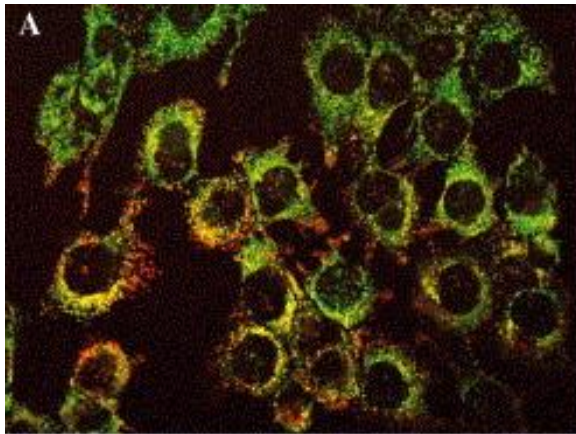
**Cellule vive con membrane intatte:
verde**

Cellule morte: arancio (PI)

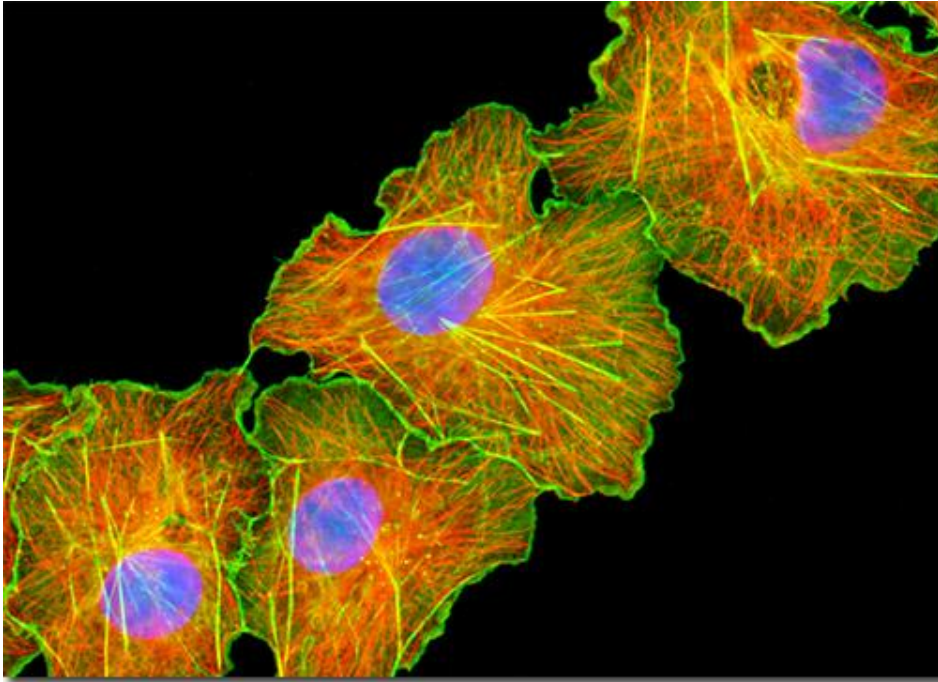


Mitocondri, lisosomi e nucleo

E se le variazioni dell'intensita' del segnale sono piccole?



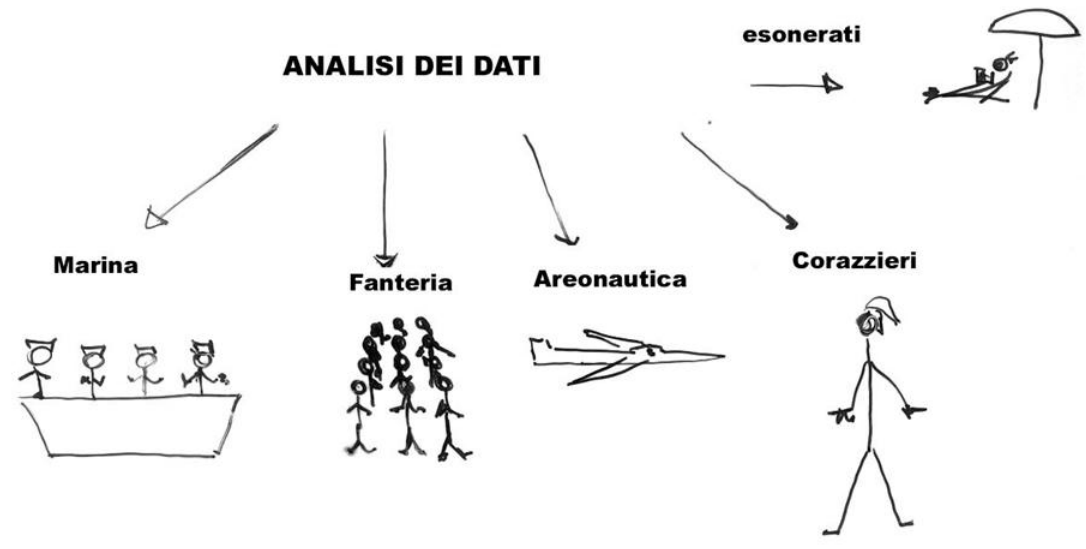
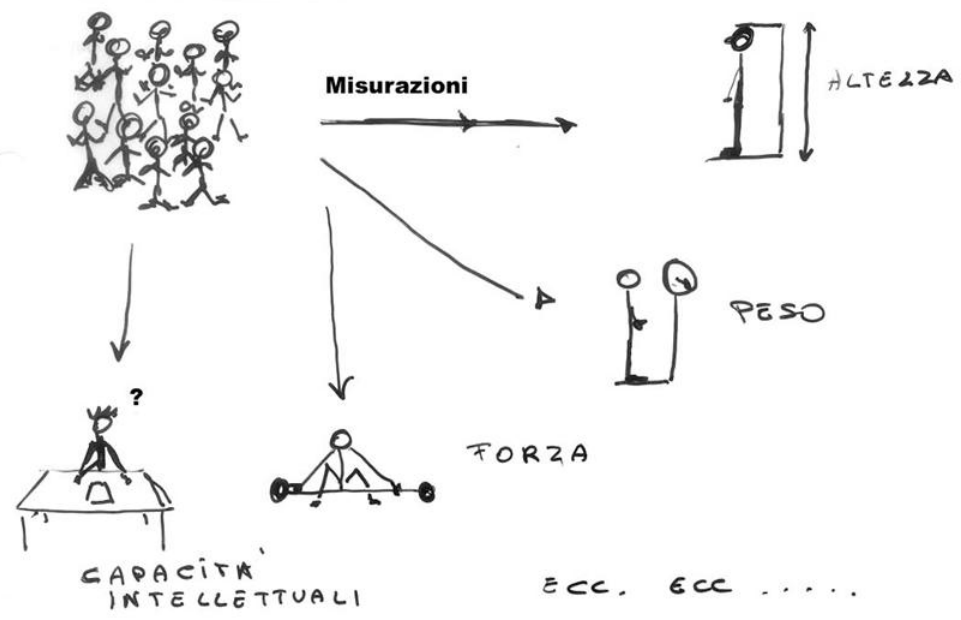
O se ho molti parametri da considerare contemporaneamente?



Cos-7

Cellule trasformate
di rene di scimmia.

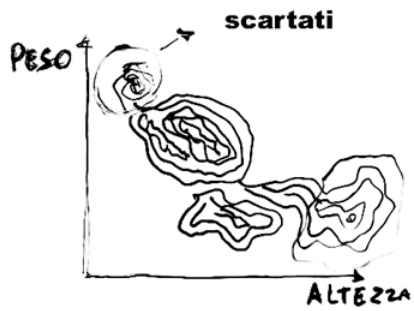
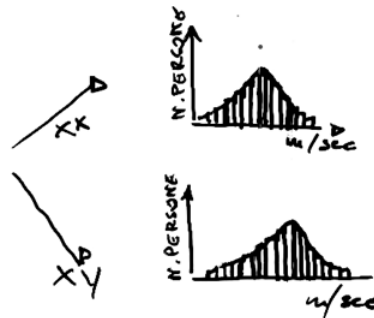
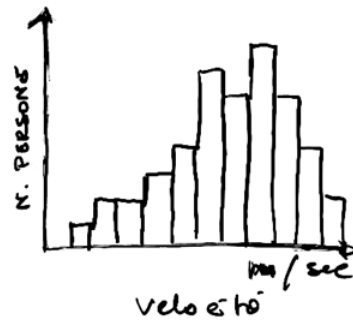
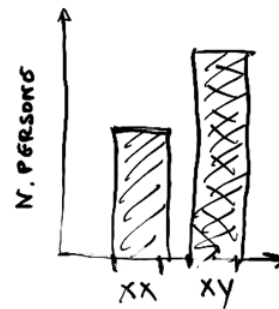
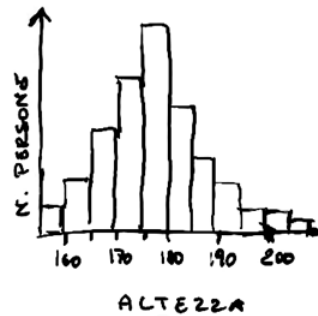
Se posso “misurare” le diverse fluorescenze all’interno di ciascuna cellula posso creare delle distribuzioni statistiche dei diversi parametri nella mia popolazione



Variabili continue

**Tutto o nulla
(presenza del cromosoma y)**

Distribuzione di frequenza



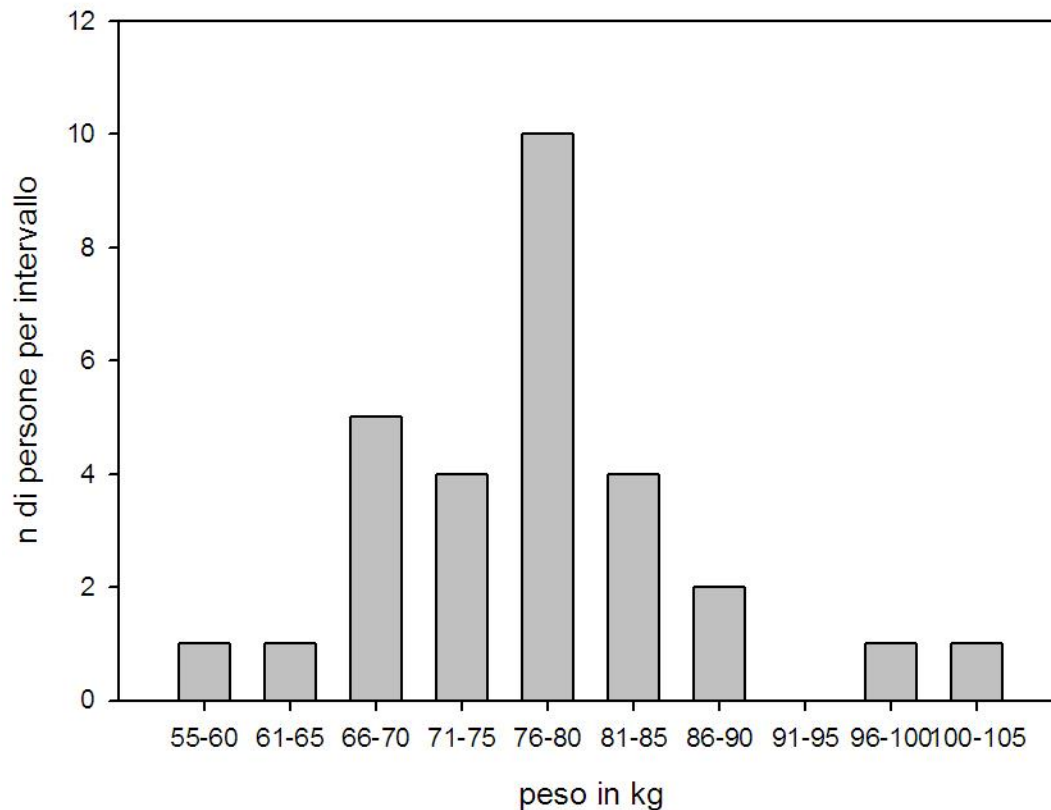
**Analisi tridimensionali
(curve di livello -
dobbiamo immaginare il numero
di cellule sull'asse z)**

analizzati per
corazzieri

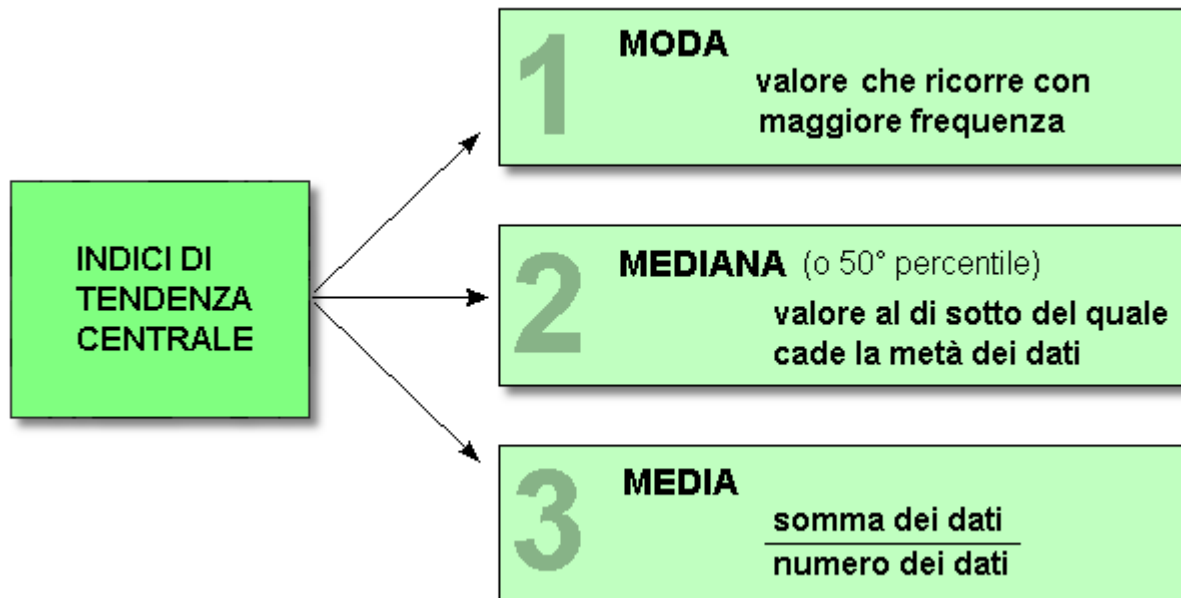
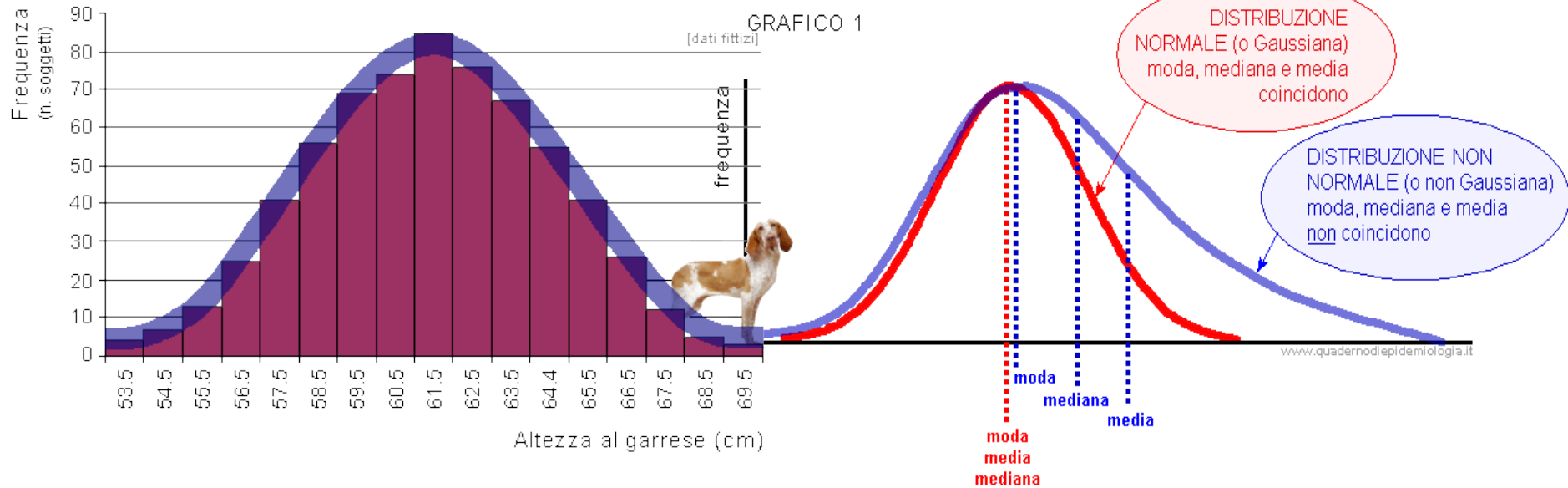
Cos'è un istogramma

Peso: 58, 62, 67, 69, 68, 69, 70, 72, 73, 73, 75, 76,
76, 77, 77, 78, 78, 78, 78, 80, 80, 81, 83, 84, 85,
86, 87, 96, 102

Canale 55-60 = 1
Canale 61-65 = 1
Canale 66-70 = 3
Canale 71-75 = 2
Canale 76-80 = 10
Canale 81-85 = 4
Canale 86-90 = 2
Canale 90-95 = 0
Canale 95-100 = 1
Canale 101-105 = 1



Istogramma della altezza al garrese di 659 cani di razza *Bracco Italiano*



La variabilità dei nostri dati può essere misurata dalla deviazione standard

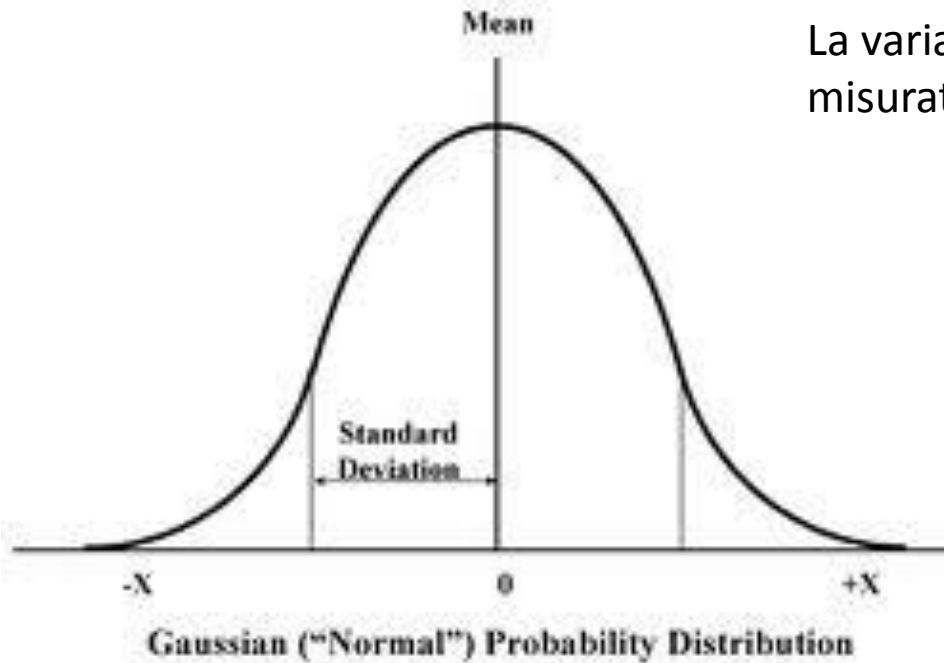


Figure 1

Coefficiente di variazione può essere valutato come deviazione standard / media * 100

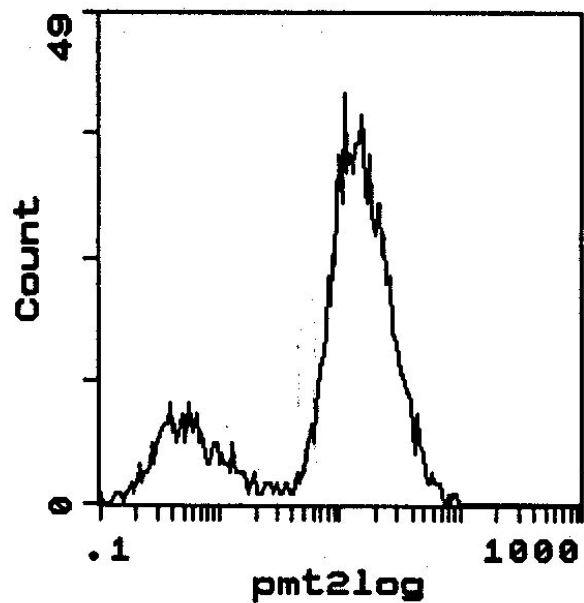
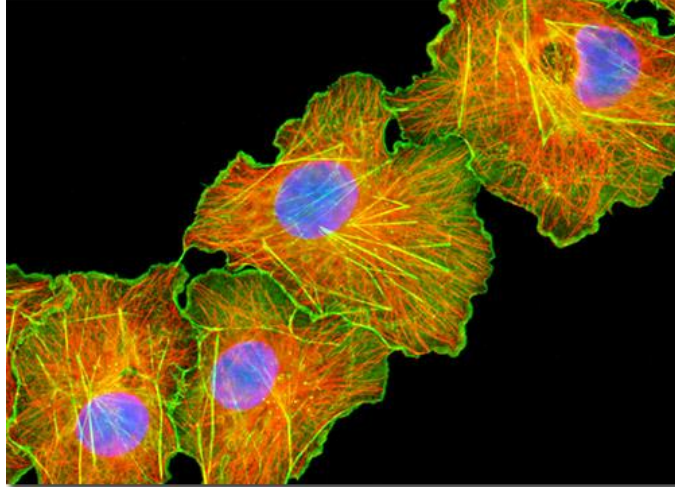
E può essere utile per indicare la variabilità della distribuzione in modo non dipendente dal valore assoluto dei dati

esempio

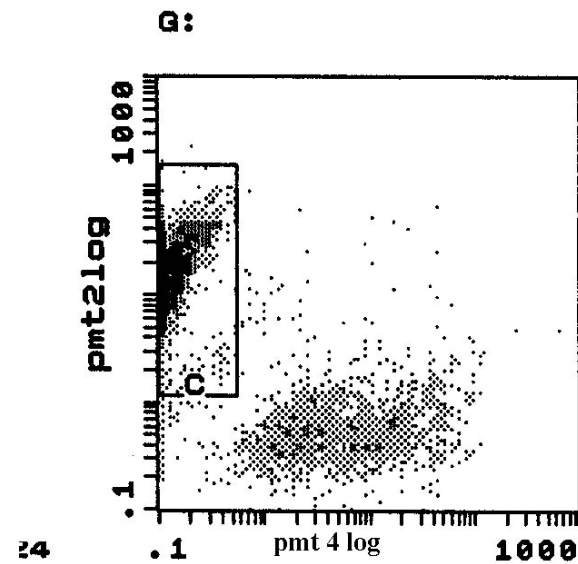
- Se due distribuzioni hanno deviazioni standard di 100 sono due distribuzioni che hanno la stessa variabilità? Forse sono molto diverse....

20.000 \pm 100 coeff. di variazione % = 0,5%

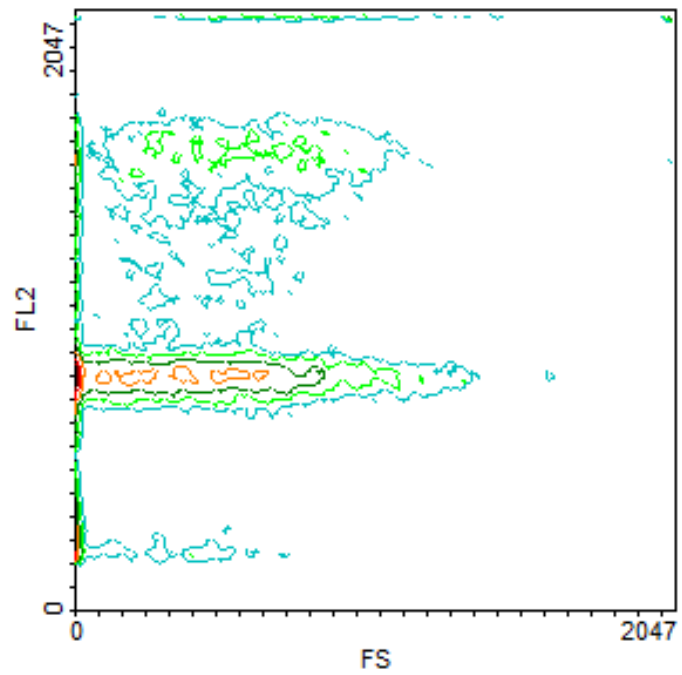
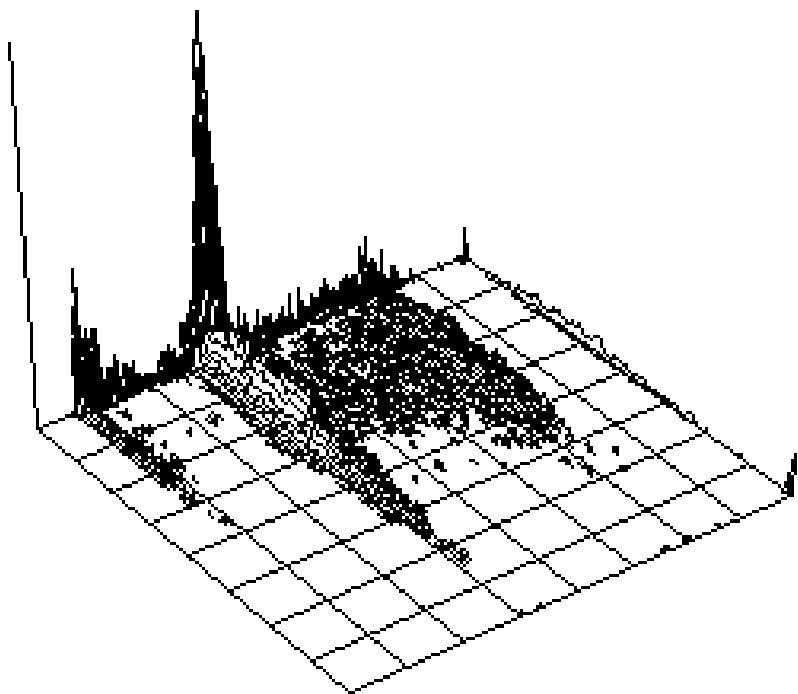
300 \pm 100 coeff. di variazione % = 33,33%



Istogramma o
Citogramma monoparametrico

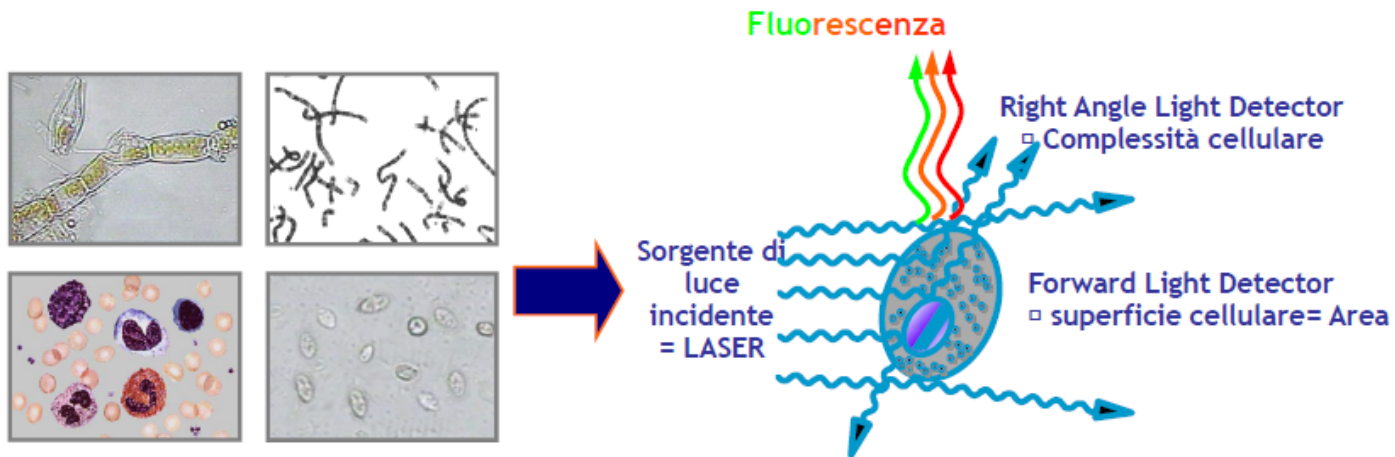


Citogramma biparametrico



Passiamo ora alla tecnica....

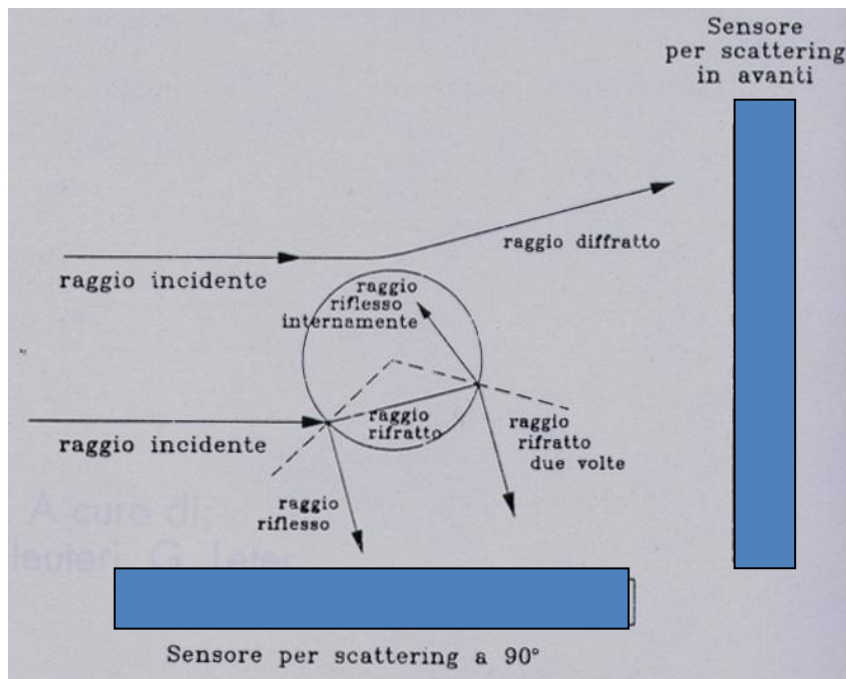
Il citofluorimetro consente di valutare:



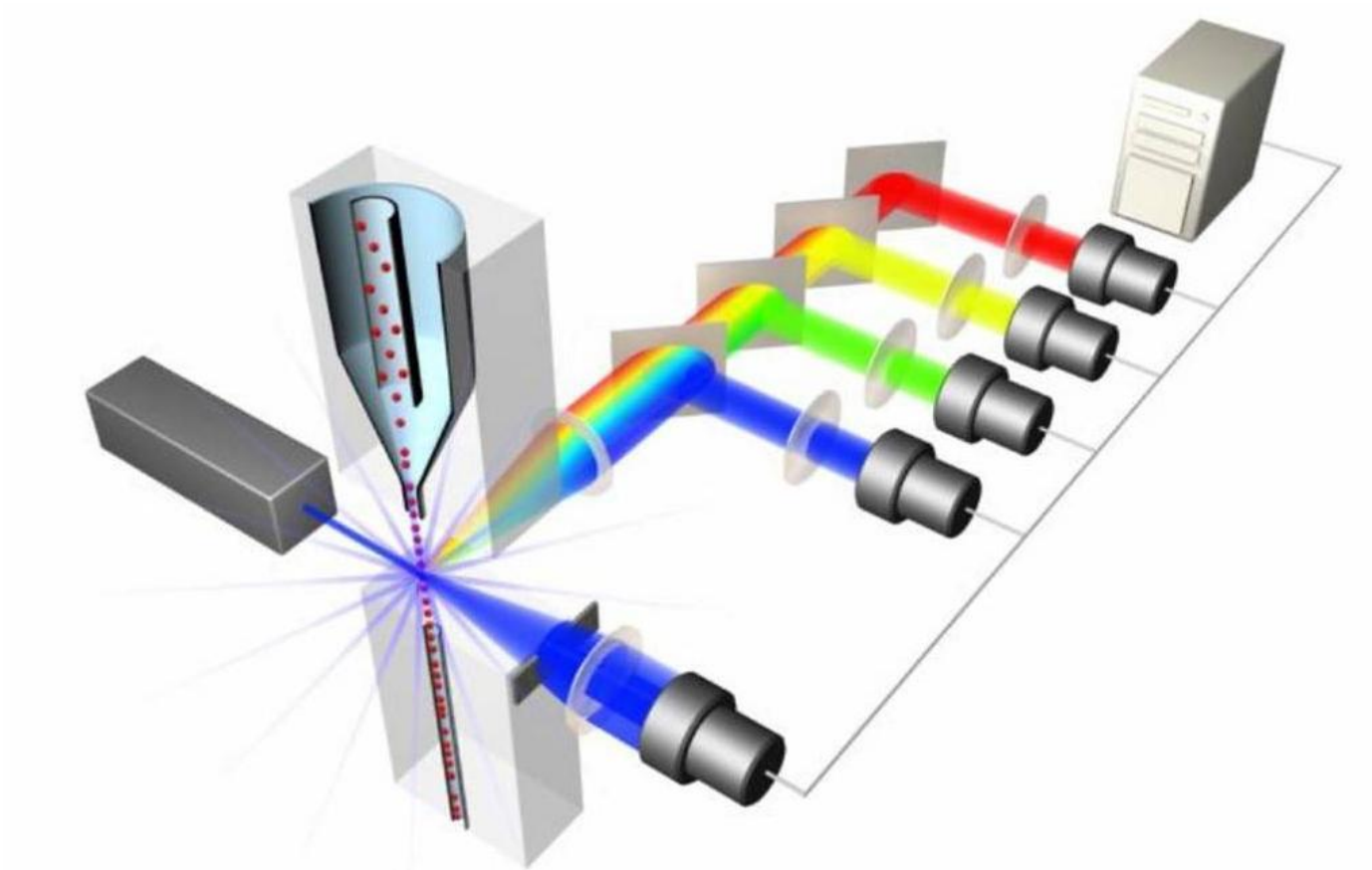
- **Dimensioni relative (FSC)**
- **Complessità interna / Granularità relativa (SSC)**
- **Intensità di fluorescenza relativa (FL1, FL2, FL3 ...)**

Luce diffusa

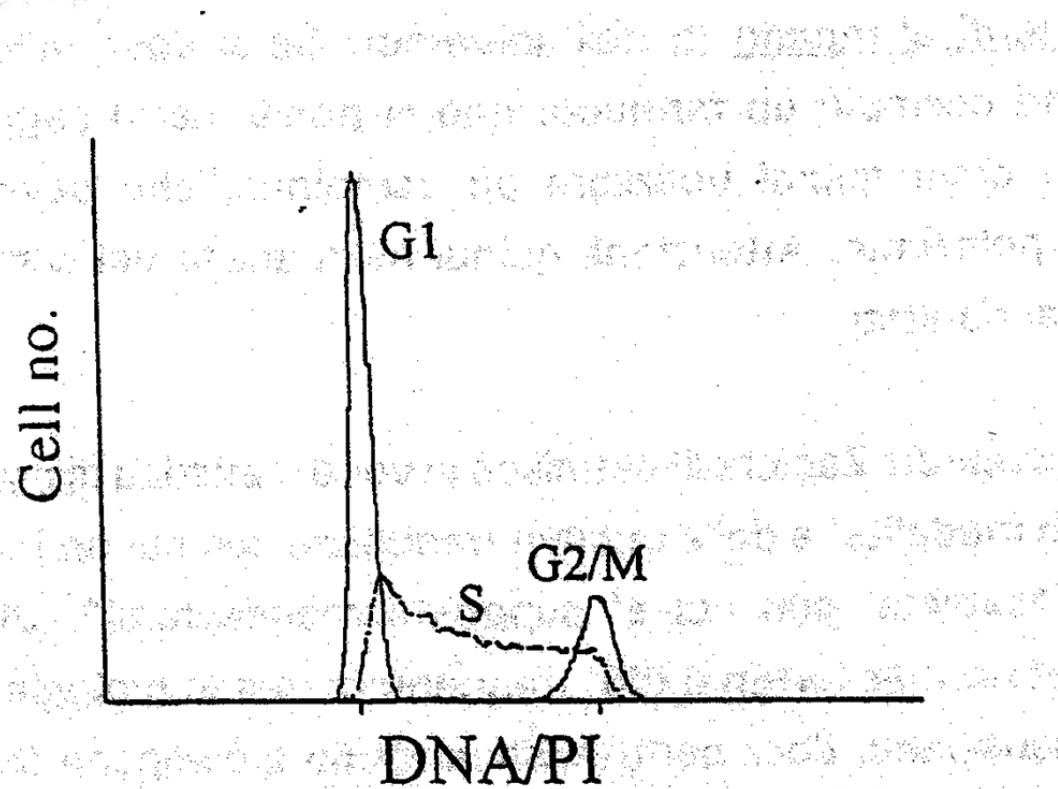
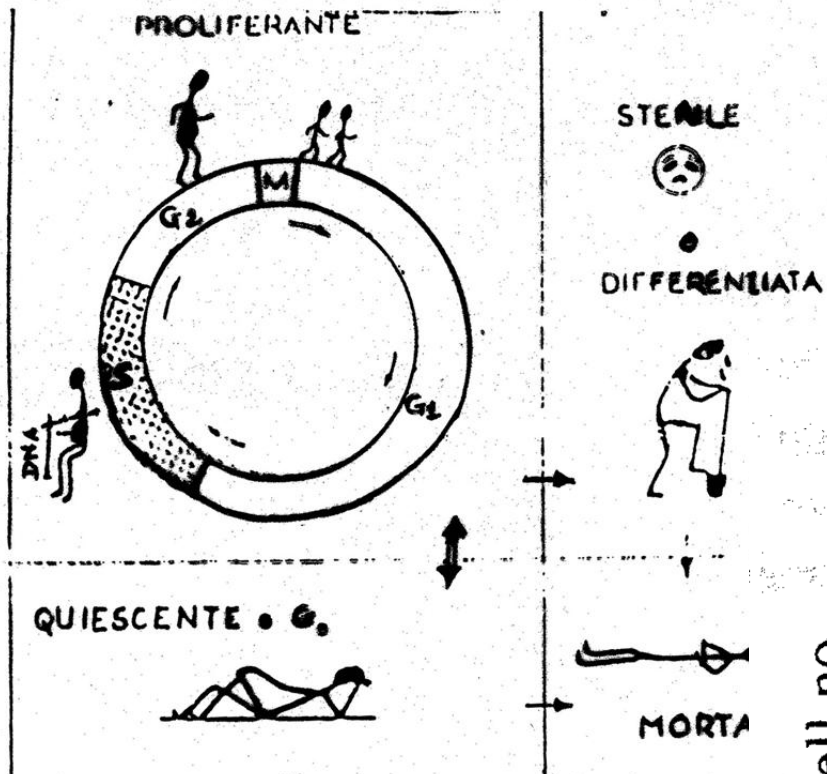
- Scatter in avanti (FALS o FLS o LS1)
- Scatter laterale (SS o LS2)



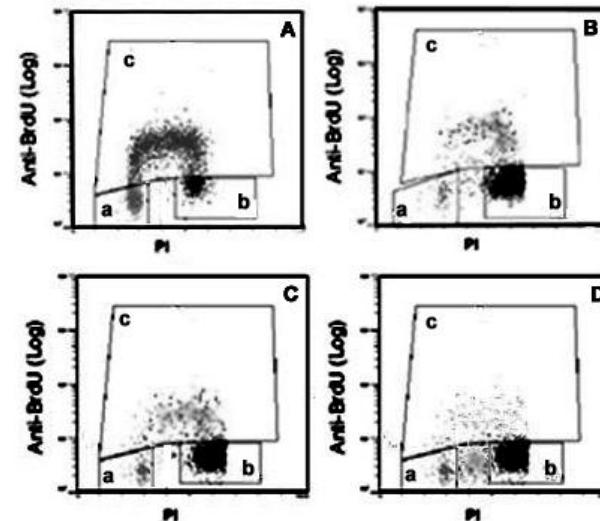
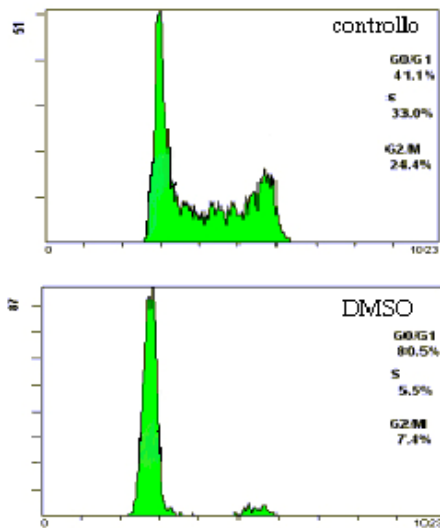
FLUORESCENZA

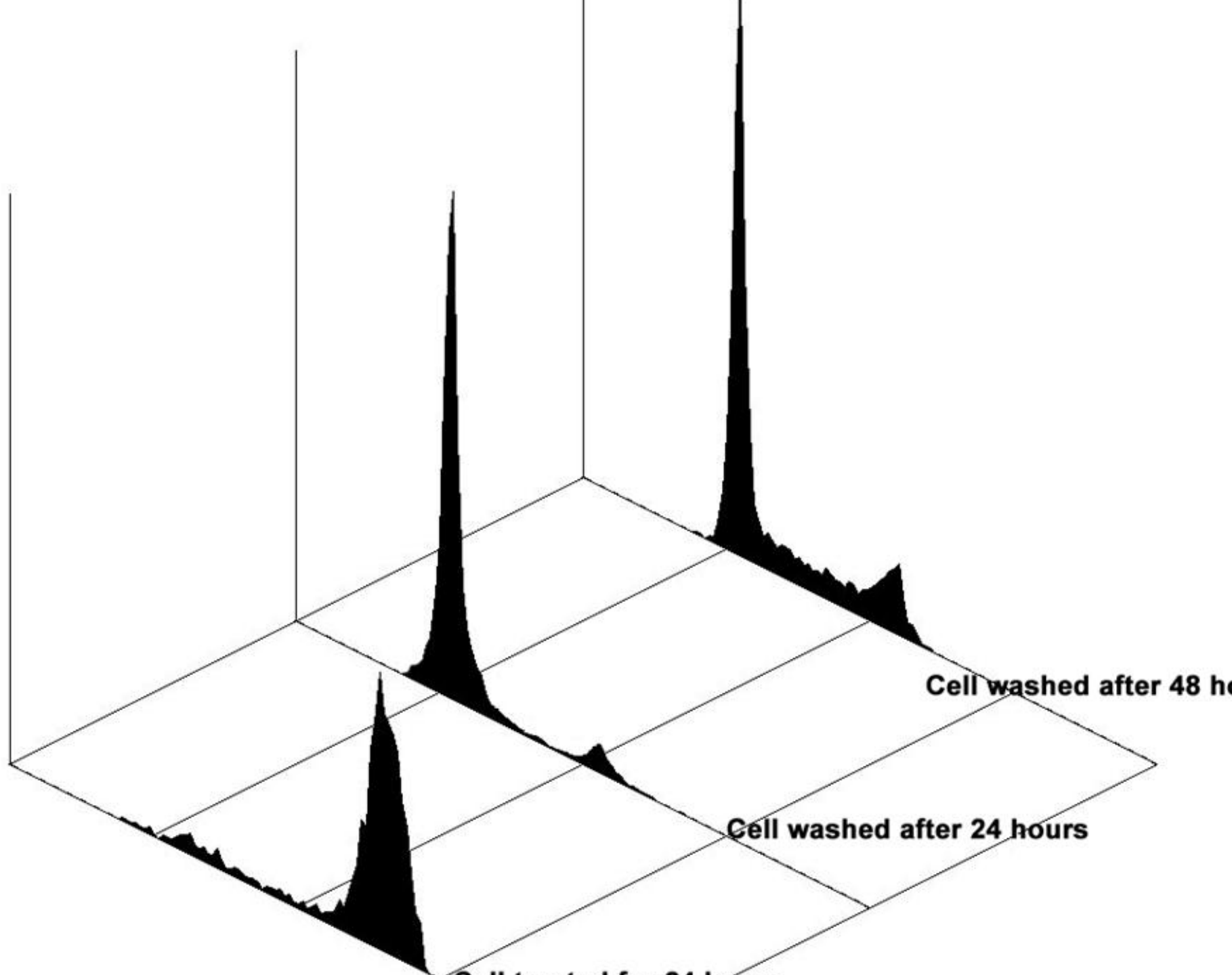


Ciclo cellulare



Dovendo valutare la quantità di DNA per nucleo, possiamo utilizzare o cellule intere (normalmente permeabilizzate per permettere l'accesso ai coloranti) o nuclei isolati, di solito in tampone citrato che ne preserva l'integrità'

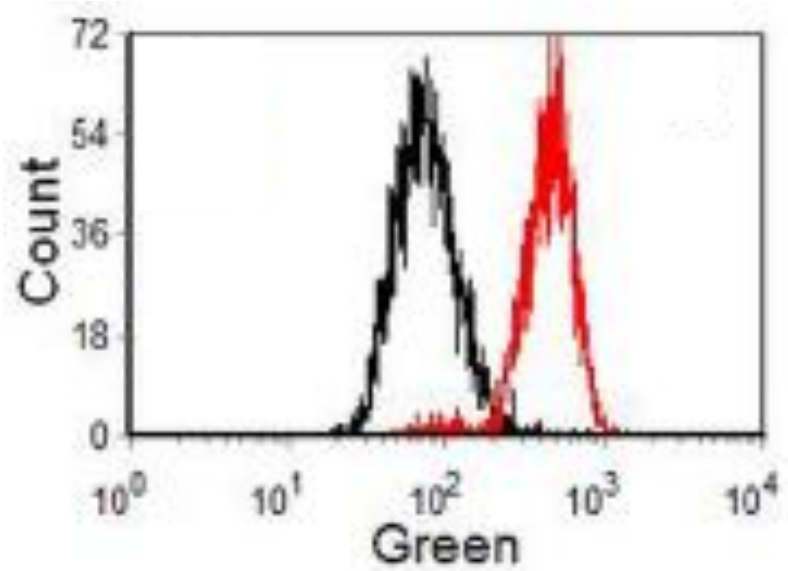
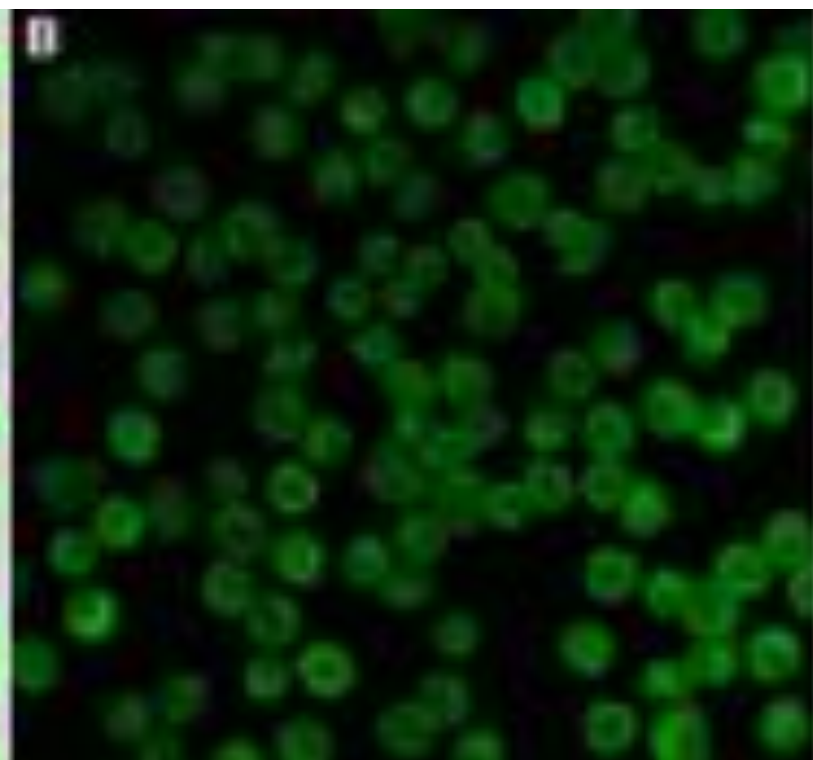
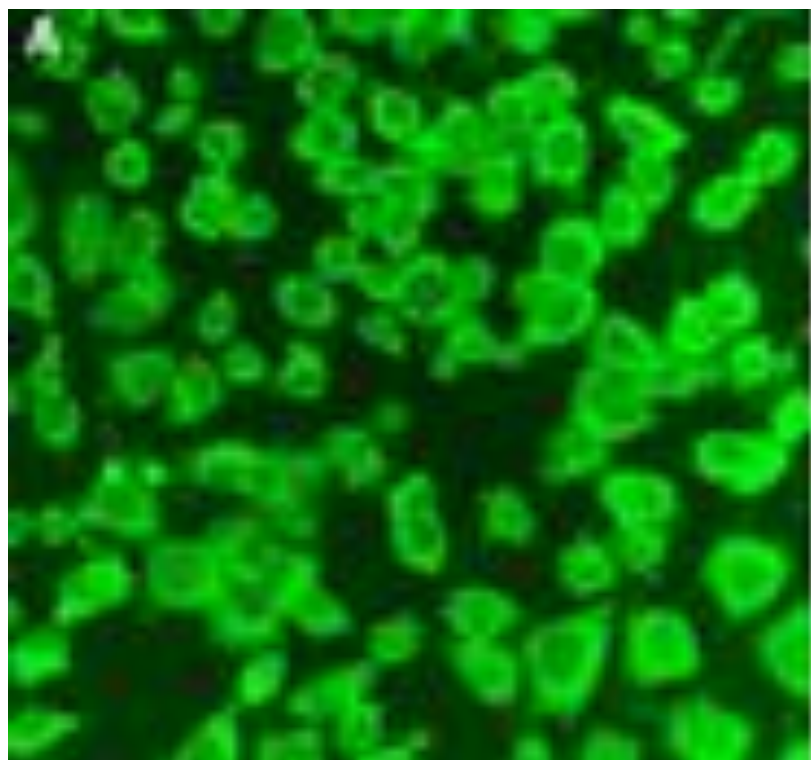




Potenziale mitocondriale

Sfrutta sonde cationiche che vengono accumulate nei mitocondri la cui l'attività, estrudendo i protoni nello spazio intermembrane, lascia la matrice carica negativamente.

Per la maggior parte delle sonde l'intensità della fluorescenza è direttamente proporzionale all'attività mitocondriale.



Possiamo accoppiare a queste sonde una sonda che penetri solo nelle cellule permeabilizzate (quindi morte o morenti) per avere una migliore analisi della

