



ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

---

Scuola di Scienze  
Corso di Laurea in Fisica

**Integrazione di misure NMR e microscopiche per  
la descrizione quantitativa degli effetti di stress  
esterni su colture cellulari**

**Relatore:**

**Prof. Daniel Remondini**

**Presentata da:**

**Nico Curti**

**Correlatore:**

**Dott.ssa Isabella Zironi**

**Dott. Manuel Mariani**

**Sessione II**

**Anno Accademico 2013/2014**



*“The main object of physical science is not the provision of pictures, but is the formulation of laws governing phenomena and the application of these laws to the discovery of new phenomena. If a picture exists, so much the better.”*

---

Paul Dirac



# Abstract

La tesi si occupa dell'integrazione di misure NMR e microscopiche per la descrizione quantitativa degli effetti di stress esterni su colture cellulari. Una maggiore comprensione dei dati ricavati tramite NMR potrebbe consentire di interpretare la vitalità e funzionalità cellulare attraverso la localizzazione spaziale degli idrogeni. L'ipotesi di partenza è che la compartimentazione degli idrogeni (associati a molecole di acqua) nel citoplasma possa fornire una stima del numero di cellule vitali (e quindi in grado di mantenere l'acqua al proprio interno mediante processi attivi). I risultati NMR, prodotti dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Fisica e Astronomia dell'Università di Bologna della Prof.ssa Fantazzini, sono stati comparati con le informazioni acquisite dal candidato tramite metodologie di conteggio cellulare (sia vive che morte) presenti in un campione sottoposto a forte e prolungato stress (assenza di terreno di coltura e di bilanciamento del sistema tampone tramite CO<sub>2</sub> per 400 ore). Cellule da una linea di glioblastoma multiforme (T98G) mantenute in condizioni di coltura standard sono state preparate secondo lo stesso protocollo per entrambe le tecniche di indagine, e monitorate per intervalli di tempo paragonabili. Le immagini delle cellule ottenute al microscopio ottico in modalità "contrasto di fase" sono state acquisite e utilizzate per l'analisi. Una volta definito un metodo di conteggio sperimentale, è stato possibile dedurre il comportamento delle concentrazioni di cellule sopravvissute in funzione del tempo di campionamento. Da una serie ripetuta di esperimenti è stato caratterizzato un andamento nel tempo di tipo esponenziale decrescente per il numero di cellule vive, permettendo la stima della costante di decadimento in buon accordo tra i vari esperimenti. Un analogo modello esponenziale è stato utilizzato per la descrizione dell'aumento del numero di cellule morte. In questo caso, la difficoltà nell'individuare cellule morte integre (per la frammentazione delle membrane cellulari dopo la morte) ha contribuito a determinare una sistematica sottostima nei conteggi. Il confronto dei risultati NMR e microscopici indica che la diminuzione del numero di cellule vive corrisponde ad una analoga diminuzione degli <sup>1</sup>H compartimentalizzati fino ad un tempo specifico di circa 50-60 ore in tutti gli esperimenti. Oltre questo tempo, i dati di NMR mostrano invece un incremento di <sup>1</sup>H compartimentalizzati, quando invece

il numero di cellule vive continua a diminuire in modo monotono. Per interpretare i risultati ottenuti, è stato quindi ipotizzato che, a partire da cellule morte frammentate, strutture micellari e liposomiali formate dai lipidi di membrana in soluzione possano intrappolare gli  $^1H$  liberi, aumentando il segnale di risposta della componente compartimentalizzata come evidenziato in NMR.

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>9</b>
<b>1 La cellula</b>	<b>11</b>
1.1 Danno cellulare . . . . .	14
1.2 Morte cellulare . . . . .	15
1.3 Coltura Cellulare . . . . .	17
<b>2 Microscopia e conteggio cellulare</b>	<b>19</b>
2.1 Il microscopio Nikon Eclipse-Ti . . . . .	20
2.1.1 Microscopia in contrasto di fase . . . . .	22
2.2 Software NIS Element . . . . .	24
2.3 Conteggio cellulare . . . . .	27
2.3.1 Distribuzione di Poisson e decadimento esponenziale . . . . .	29
2.3.2 Concentrazione cellulare totale e crescita in mortalità . . . . .	31
<b>3 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)</b>	<b>33</b>
3.1 Aspetti fondamentali della tecnica NMR . . . . .	34
3.1.1 Rilassamento longitudinale ( $T_1$ ) . . . . .	37
3.1.2 Rilassamento trasversale ( $T_2$ ) . . . . .	39
<b>4 Materiali e Metodi</b>	<b>43</b>
4.1 Preparazione dei campioni cellulari . . . . .	43
4.2 Campioni cellulari per la microscopia . . . . .	44
<b>5 Risultati degli esperimenti in microscopia</b>	<b>47</b>
5.1 Confronto tra i risultati in microscopia . . . . .	54
<b>6 Risultati esperimento in NMR</b>	<b>59</b>
6.1 Apparato strumentale NMR . . . . .	59
6.2 Risultati sperimentali . . . . .	60
<b>7 Discussione</b>	<b>65</b>

8

*INDICE*

8 Conclusioni

67

Bibliografia

71



# Introduzione

Un approccio di tipo fisico ad un sistema ha la pretesa di descriverne il funzionamento attraverso leggi matematiche. Per la realizzazione di questo scopo è spesso necessario schematizzare un sistema più complesso in modo da poter applicare nozioni e modelli matematici già noti. A questo non fa eccezione il settore di studio della biofisica.

Diverse sono le tipologie di approccio ad un sistema in ambito di ricerca. Un approccio di tipo riduzionista pretende di identificare il comportamento generale del sistema una volta noto quello del singolo costituente. Numerose sono, infatti, le informazioni estrapolabili da uno studio delle unità fondamentali, le quali non solo dimostrano, spesso, affinità nei processi causa-effetto con i settori ad esse successive, ma sono in grado di creare un primo modello del settore di studio.

In conseguenza di ciò, per ottimizzare le informazioni deducibili da un tessuto, un organo o, ancor più in generale, da un organismo biologico come il corpo umano, occorre migliorare la propria conoscenza sul comportamento delle singole cellule costituenti. È possibile, infatti, identificare la cellula come la struttura biologica fondamentale di ogni essere vivente.

Questo processo di studio comporta non solo la discriminazione morfologica delle varie tipologie cellulari esistenti, ma, soprattutto, l'indagine delle loro funzionalità. Il comportamento cellulare è, infatti, descrivibile in funzione delle risposte manifestate in base a stimoli esterni delle varie parti costituenti. Di peculiare importanza e interesse per il nostro studio è stato il comportamento a livello della membrana cellulare. Lo stesso involucro esterno, infatti, in base alla sua composizione chimica, consente lo sviluppo ed il mantenimento della vitalità da parte del sistema cellulare.

La descrizione chimica della struttura di membrana è oramai consolidata nella letteratura scientifica. Il comportamento in seguito a stimoli esterni ed, in particolare, la sua degenerazione al seguito della morte cellulare è invece meno noto, ed è dunque uno dei fenomeni che ci si è proposti di indagare all'interno del progetto di tesi.

La maggior parte degli studi in ambito cellulare viene eseguita attraverso il monitoraggio di colture cellulari. Con il termine si identifica, per l'appunto, la

crescita di cellule in un ambiente isolato rispetto al tessuto di estrapolazione. Spesso quest'ultime vengono, inoltre, modificate a livello fenotipico in modo da permetterne un più duraturo periodo di studio ed utilizzo, al fine di alterarne la componente riproduttiva.

In questo modo è così possibile effettuare un continuo controllo dell'ambiente di coltura in funzione dei parametri fondamentali che ne consentono la vita. Avendo a disposizione sempre la medesima coltura cellulare (con identico patrimonio genetico), si è, inoltre, in grado di aumentare la riproducibilità dei dati sperimentali ottenibili, senza dover ricorrere a più colture primarie che potrebbero alterare la variabilità sperimentale (a causa della differente composizione genetica). Non solo, quindi, possono essere effettuati studi relativi alla risposta cellulare in funzione dell'alterazione di singoli parametri basali, ma ne viene consentito anche un immediato utilizzo e reperibilità.

Al fine di concepirne la costruzione di un modello, anche in funzione alle finalità di ricerca in settori quali la medicina, è necessario analizzarne i processi di crescita e mortalità. Lo studio effettuato ha utilizzato la linea cellulare T98G, cellule tumorali di glioblastoma multiforme, geneticamente modificate al fine di consentirne un'illimitata crescita e duplicazione (in gergo *immortalizzate*). Il comportamento di tali cellule è comunque comparabile in buona approssimazione con quello di cellule di normale fisiologia. La scelta è, quindi, stata dettata solamente in base alla loro facile reperibilità ed utilizzo.

Diverse sono le informazioni deducibili da un campione di studio. Nel nostro caso si è scelto di focalizzarsi sull'analisi del comportamento riscontrato in seguito ad un duraturo stress nel tempo. A tal fine è stato quindi necessario un monitoraggio, temporalmente intervallato, per lunghi periodi di tempo (comparati con la vita media delle cellule). In questo modo è stato possibile studiarne il complessivo andamento funzionale, potendo distinguere, attraverso metodi di conteggio manuale per colorazione, le cellule ancora in vita da quelle morte. L'obiettivo ultimo è così riposto nell'identificare non solo un valido metodo di conteggio, riutilizzabile in altri ambiti sperimentali, ma anche una generale descrizione funzionale degli andamenti di crescita/decrecita.

Con analogo scopo è stato effettuato in parallelo un protocollo per lo studio rilassometrico in NMR, in modo da poter confrontare gli stessi processi biologici con osservabili diversi. In ultima analisi si procederà, quindi, al confronto dei dati relativi allo studio rilassometrico con quello emerso dallo studio in microscopia.

# Capitolo 1

## La cellula

L'unità strutturale dei sistemi biologici è la cellula. Ogni organismo, ad eccezione dei virus, presenta morfologie e funzionalità dettate da questa unità biologica (unità morfofunzionale). La scoperta e successiva analisi della cellula, sino alla formulazione di una teoria cellulare, risale alla prima metà del 1800, anni in cui il botanico Robert Brown riuscì ad individuare organuli intracellulari quali il nucleo. Da allora l'analisi della cellula ha sempre rivestito un ruolo predominante per gli studi biologici e medici (vedi settori quali la patologia e la fisiologia).

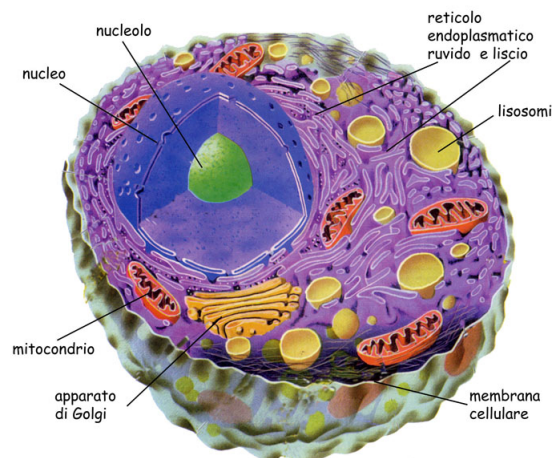


Figura 1.1: Schema strutturale di una cellula eucariote.

Una schematizzazione basilare dell'architettura cellulare, prevede una struttura di membrana esterna racchiudente al suo interno il nucleo, organulo principale e responsabile del possesso delle informazioni genetiche, ed un'altra serie di organuli quali mitocondri, lisosomi, reticolo liscio e rugoso e apparato del Golgi. Il tutto è immerso in un liquido, otticamente vuoto alla microscopia in luce trasmessa, denominato *citosaol*. L'assenza o meno di membrane separatrici tra nucleo e citosaol fornisce una distinzione primaria dell'unità cellulare in procariote (tipo-

logia a cui appartengono organismi monocellulari come i batteri) ed eucariote, tipicamente più voluminosa della precedente e caratteristica dei sistemi biologici più complessi.

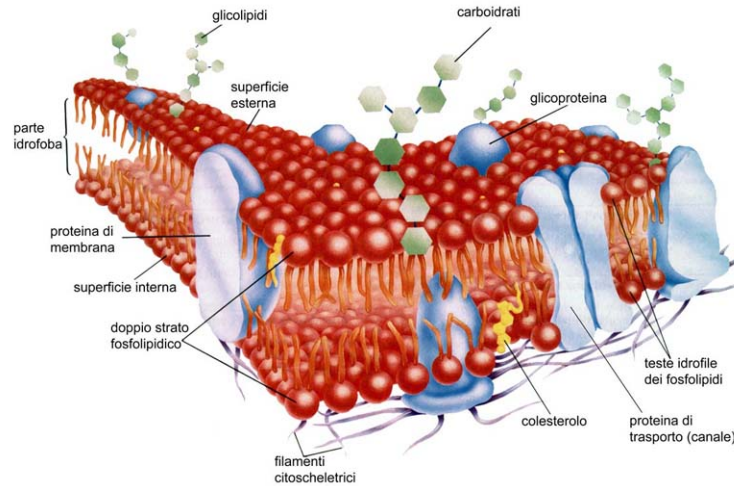


Figura 1.2: Schema strutturale della membrana cellulare eucariote.

Iniziando l'analisi strutturale dall'esterno, la membrana cellulare (o plasmatica) è descritta come un sottile involucro separatore tra interno ed esterno dell'unità cellulare, con la funzionalità di consentire o meno i passaggi di sostanze di sostentamento tramite processi di diffusione chimica e osmosi. A livello cellulare si parla di unità di membrana, in quanto tutte le cellule presentano la stessa conformazione per la membrana esterna (fattore non altrettanto verificato per le tipologie di membrane interne). La membrana è formata da un doppio strato fosfolipidico (lipidi legati con un gruppo fosfato) nel quale sono inserite molecole proteiche più complesse (modello a mosaico fluido). Queste proteine vengono ad assumere funzionalità di canali o pompe per la permeabilità della membrana. Le funzionalità di membrana sono dettate dalle caratteristiche chimiche dei suoi costituenti: in particolare, tramite la struttura fosfolipidica, sarà possibile il passaggio di gas (prevalentemente  $\text{CO}_2$  ed  $\text{O}_2$ ), mentre attraverso le proteine sarà in grado di annettere/espellere al suo interno/esterno ioni, molecole idrosolubili ed acqua. Tale trasporto di sostanze avviene in modo passivo, ossia per diffusione e osmosi, oppure attraverso un trasporto attivo, con relativo consumo di energia (ATP) da parte della cellula. È necessario notare come, mentre lo scambio passivo risulti possibile solamente a favore di un gradiente di concentrazione, come è fisicamente noto, attraverso un dispendio di energia (trasporto attivo) questo possa avvenire anche contro gradiente.

Per quanto riguarda i processi di annessione intracellulari di macromolecole più complesse, le sopracitate pompe proteiche non sono sufficienti, ma occorre un

lavoro di cooperazione tra membrana e citoplasma per la formazione di adeguate vescicole (trasporto vescicolare).

La costituzione fosfolipidica di membrana, inoltre, per mantenere un livello di compattezza deve prevedere un'ordinata disposizione delle componenti molecolari. A tal fine, secondo la propensione dei gruppi chimici legati nei fosfolipidi ai liquidi, interni e circostanti, si avrà una disposizione orientata delle teste (fosfato) idrofile verso interno ed esterno, rendendo il doppio strato legato attraverso le code (lipidi) idrofobiche. Per questo loro comportamento sono anche detti molecole anfipatiche.

Procedendo con l'analisi verso l'interno, troviamo il già citato liquido citoplasmatico, ossia una soluzione prevalentemente acquosa presente in tutta la sezione intracellulare. Questa soluzione è costituita anche dalle sostanze nutritive necessarie alla sopravvivenza, quali zuccheri, proteine ed enzimi, oltre alla maggior parte dell'RNA.

Il citoplasma (citosol + organuli) risulta di fondamentale importanza a livello funzionale poiché al suo interno vengono svolti tutti i processi metabolici e respiratori. Tali processi sono alla base della produzione e dispendio di energia per la cellula.

Si definisce con metabolismo cellulare l'insieme delle reazioni chimiche atte alla scomposizione di molecole complesse in elementi più semplici (catabolismo) o viceversa (anabolismo). Le conseguenze dei processi metabolici si ritrovano a livello energetico: nel primo caso la cellula accumula energia mentre nel secondo ne spende. Predisposte alla conservazione energetica, le cellule sintetizzano molecole di Adenosin Tri Fosfato (ATP) attraverso una reazione chimica tra Adenosin Di Fosfato (ADP) e fosforo inorganico. A livello di organuli, la reazione chimica energetica viene svolta dai mitocondri attraverso i processi di respirazione cellulare. Tramite essa, molecole derivanti dal metabolismo di glucidi e proteine sono ossidate con liberazione di  $H_2O$  e  $CO_2$  e conseguente rilascio di energia sia in forma disordinata (calore) che ordinata (ATP).

Il ruolo di organulo principale dell'unità cellulare (eucariote) è rivestito dal nucleo. La sua locazione spaziale ed il volume sono parametri non costanti ma dipendenti dal ruolo che la cellula assume all'interno del tessuto e dalla sua morfologia. Il nucleo cellulare assume importanza funzionale in quanto contenitore del patrimonio genetico (acidi nucleici) e duplicatore del DNA, funzione essenziale per la riproduzione della cellula. La comunicazione tra i compartimenti interni ed esterni al nucleo avviene ancora una volta tramite canali proteici.

Da un punto di vista fisiologico è importante notare come il mantenimento di un corretto funzionamento degli elementi strutturali sopracitati, consenta all'unità cellulare un ciclo vitale con nascita, progenie ed infine morte. Il mal-

funzionamento o danneggiamento di una delle sue funzionalità e, di conseguenza, di uno degli elementi strutturali, provoca situazioni di stress che, a seconda di intensità e persistenza temporale, possono condurre ad una precoce morte.

## 1.1 Danno cellulare

La cellula è in grado di adattarsi alle variazioni dell'ambiente interno o esterno. In questo modo anche in seguito alla presenza di condizioni di stress l'unità cellulare riesce a conservare la propria vitalità e funzione. Nel caso di forti stress (al di sopra di valori di soglia) o eccessiva persistenza di condizioni di adattamento possono insorgere danni cellulari.

La più comune fonte di danno è dovuta all'ipossia/ischemia, ossia la progressiva e prolungata mancanza di ossigeno e sostanze nutritive, in seguito alla quale viene esaurita la quantità di ATP immagazzinata, andando ad alterare il funzionamento delle pompe ioniche di membrana (pompa Na/Ca), con il conseguente aumento della permeabilità della membrana cellulare.

L'entità del danno cellulare può essere di tipo reversibile o irreversibile. In seguito ad un danno reversibile, l'unità cellulare è ancora in grado di ritornare allo stato iniziale. In caso di danno irreversibile, invece, insorge la morte cellulare. Sia lo stress che il danno cellulare non coinvolgono solamente l'aspetto morfologico della struttura ma anche la sua funzionalità. Le capacità di adattamento coinvolge variazioni in dimensioni, in fenotipo, attività metabolica, capacità replicativa o funzione. Tali cambiamenti possono essere distinti in quattro categorie principali:

- *Ipertrofia*: in questo caso la cellula aumenta la propria dimensione, tendendo a “gonfiarsi” e producendo in conseguenza un aumento delle dimensioni dell'organo a cui appartiene. Cause di ipertrofia sono l'aumento della richiesta funzionale, della nutrizione o dell'irrorazione. L'ipertrofia può essere di tipo fisiologico, come accade nell'utero durante la gravidanza femminile, o patologico.
- *Iperplasia*: tale fenomeno avviene solamente per cellule in grado di replicarsi. L'iperplasia, infatti, corrisponde ad un aumento in numero delle cellule danneggiate. In sostanza, la cellula sotto stress tende a moltiplicarsi attraverso divisioni mitotiche. Anch'essa può essere di tipo fisiologico, come per l'iperplasia ormonale o l'iperplasia compensatoria (ad es. nelle cellule epiteliali) o patologica, tipicamente in seguito ad eccessi ormonali.
- *Atrofia*: questa risposta cellulare è da considerarsi sommariamente opposta all'ipertrofia, poiché, a causa di stress quali la scarsità di sostanze nutritive

a disposizione o al diminuire della normale sintesi proteica, la cellula è in grado di rispondere diminuendo le proprie dimensioni e riducendo al minimo le proprie funzioni. Cause tipiche di atrofia sono, infatti, la perdita di innervazione e la perdita di stimolazioni endocrine. Ne è un tipico esempio la menopausa, con la perdita delle stimolazioni ormonali, o semplicemente l'atrofia senile.

- *Metaplasia*: è forse la più drastica delle risposte cellulari, poiché comporta il cambiamento da parte di una cellula adulta della propria funzione biologica. È possibile pensarla come una sorta di riprogrammazione genetica da parte della cellula per meglio adattarsi allo stress esterno. Ne è un esempio la metaplasia epiteliale, attraverso la quale l'epitelio dei bronchi dei fumatori assume un aspetto squamoso per meglio consentirne la respirazione cellulare.

## 1.2 Morte cellulare

Al seguito di un danno irreversibile, l'unità cellulare incorre inevitabilmente nel processo di morte. Lo stesso si manifesta per danni prolungati nel tempo o al di sopra dei valori di soglia, per i quali la cellula non è in grado di rispondere con i sopracitati processi di adattamento. Le forme di morte manifestabili sono distinguibili in due tipologie:

- *Apoptosi*: si definisce apoptosi la tipologia di morte, cosiddetta, programmata, messa in atto dalla cellula attraverso l'attivazione e coordinazione di una serie di eventi interni. Tutto il processo apoptotico è quindi controllato dalla cellula, la quale consuma ATP per il suo svolgimento.

Il fenomeno dell'apoptosi è relativamente rapido e gli eventi cellulari caratterizzanti sono legati principalmente al metabolismo cellulare ed alla quantità di ATP presente, entrambi fattori regolati dai mitocondri. Il ruolo dei mitocondri a livello metabolico comporta la produzione di radicali dell'ossigeno come sottoprodotti della respirazione cellulare, i quali sono fra i principali induttori dell'apoptosi. A questo è aggiunto anche un aumento nel rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  e successivo riassorbimento (recycling) da parte dei mitocondri, con il quale si ha una perdita del potenziale di membrana ed un calo delle riserve di ATP della cellula. L'abbassamento del potenziale di membrana in concomitanza con la produzione di radicali e la presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , produce un'alterazione della permeabilità di membrana dei mitocondri con una fuoriuscita di sostanze prima isolate, come il citocromo

C o l'AIF (apoptosis inducing factor). Queste sostanze a contatto a contatto con altri fattori citoplasmatici comportano l'innescare del processo di apoptosi.

La sequenza di eventi descrittivi il processo di apoptosi vede in un primo momento la perdita di contatto della cellula con le vicine a causa della produzione di enzimi (caspasi) che digeriscono le proteine del citoscheletro (struttura presente sia all'interno che all'esterno del citoplasma, la quale permette alla cellula i cambiamenti morfologici). In seguito ad una contrazione della cellula quindi, inizia un processo di vescicolazione della membrana cellulare il quale porta ad una frammentazione della cellula (frammentazione in corpi apoptotici).

Al termine delle sue fasi, i frammenti residui espongono sulla membrana marcatori che facilitano l'attività di fagocitosi delle cellule vicine. In questo modo le cellule morte vengono totalmente distrutte senza rischi di infiammazione tissutale.

- *Necrosi*: si definisce necrosi uno spettro di modificazioni morfologiche che segue la morte cellulare negli organismi viventi. La necrosi è dovuta in gran parte alla progressiva azione di degrado degli enzimi sulle strutture della cellula morta. Essa viene classificata come morte accidentale, ossia in conseguenza ad un danno esogeno a cui la cellula non è in grado di adattarsi o per il quale non presenta la prontezza sufficiente ad attuare un processo di morte organizzato.

La necrosi, in particolare, rappresenta sempre l'evoluzione irreversibile di un danno ed è invariabilmente dannosa per l'organismo. Normalmente il processo che conduce alla necrosi cellulare è anticipato da un processo di degenerazione o di rigonfiamento da parte della cellula, vissuto come evento passivo e non mediato da molecole proteiche codificate dal genoma cellulare.

Attraverso l'aumento della permeabilità di membrana, in seguito ad uno stimolo dannoso, accresce la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno della cellula, con conseguente danno lisosomiale e mitocondriale, fino ad una denaturazione delle proteine presenti. Più in dettaglio, il danno mitocondriale, a seguito di fattori quali l'ischemia, ad esempio, comporta un arresto della produzione di ATP all'interno della cellula che, quindi, va a bloccare il funzionamento delle pompe ioniche di membrana. In questo modo, all'interno della cellula si vengono ad accumulare quantità di  $\text{Na}^+$  ed  $\text{H}_2\text{O}$  che ne producono un forte rigonfiamento. In seguito alla dilatazione della cellula si osserva anche un aumento del volume degli organuli citoplasmatici



al suo interno che vanno a bloccare la sintesi proteica, incrementando le quantità di  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico. In seguito alla necrosi, la cellula esplose lateralmente, andando a disgregarsi in modo innaturale e incontrollato, con conseguente rilascio di citoplasma all'esterno, fattore che inevitabilmente comporta un'inflammatione del tessuto in cui risiede. Gli enzimi citosolici rilasciati all'esterno vengono utilizzati come marcatori plasmatici del danno, direttamente proporzionali all'entità della necrosi.

A livello morfologico si distinguono due tipologie di necrosi dettate dalla degenerazione delle proteine cellulari. Si parla quindi di *necrosi coagulativa* qualora si presenti una denaturazione delle proteine con conseguente indurimento del tessuto necrotico. In caso di digestione enzimatica (autolisi o eterolisi) delle proteine, invece, si avrà il caso di *necrosi colliquativa*, con la disintegrazione e liquefazione del tessuto.

## 1.3 Coltura Cellulare

Come accennato nel paragrafo introduttivo, le cellule considerate nella sperimentazione proposta sono state conservate in terreni di coltura fino all'inizio della valutazione microscopica (e rilassometrica).

Tutte le cellule hanno capacità di riproduzione limitata nell'arco del loro ciclo vitale. Il tempo di vita del, cosiddetto, ceppo cellulare risulta di breve durata per le necessità sperimentali biologiche. Per ovviare a ciò, in ambito sperimentale vengono abitualmente utilizzate linee cellulari, ossia colture cellulari nelle quali la popolazione ha subito modifiche genetiche al fine di consentirne un'illimitata riproduzione. Si parla quindi di linee cellulari continue in caso di trasformazioni oncogene della popolazione, definita immortalizzata in seguito alla perdita dell'inibizione da contatto.

Considerando cellule isolate dal tessuto di origine, per consentirne una sopravvivenza prolungata occorre operare sul mantenimento delle condizioni basali per la vitalità cellulare. Oltre che all'adeguato apporto nutritivo, è di peculiare importanza anche la prevenzione da particolari agenti esterni di danneggiamento. Estrapolate dal tessuto, quest'ultime avranno non solo bisogno di essere nutrite e mantenute ad adeguati parametri di pH e temperatura, ma dovranno anche essere protette da possibili infezioni e danneggiamenti che potrebbero provocarne stress.

Diverse sono le tipologie di colture attuabili in vitro, a seconda della mutazione genetica eseguita sulla linea in esame. Inoltre, sempre a seconda della tipologia, quest'ultime potranno proliferare rimanendo in sospensione nel liquido di coltura,

oppure aderire al fondo delle fiasche di coltura (substrato), andando a formare un monostrato. Creando le condizioni adeguate per la proliferazione, sarà possibile in ogni momento procedere all'analisi di quest'ultime, attraverso la creazione di campioni di sottocolture. A seconda poi della linea cellulare considerata, in analisi per lungo tempo, si potranno creare campioni con numero elevato di cellule o con le sole cellule resistenti a tali condizioni.

Nel nostro esperimento, è stata usata la linea cellulare T98G, denominazione attribuita alle cellule tumorali di un glioblastoma, trasformate geneticamente al fine dell'ottenimento di una linea cellulare continua. Per tale casistica è necessaria una coltura in adesione al substrato utilizzato.

Data l'elevata sensibilità dei parametri vitali ai possibili agenti esterni dannosi, è necessario eseguire in totale sterilità ogni operazione di mantenimento della popolazione. Per queste ragioni, anche nel nostro caso, ogni manipolazione della coltura, nonché la preparazione dei campioni da sottoporre all'analisi di microscopia, è stata eseguita sotto cappa a flusso laminare verticale.

## Capitolo 2

# Microscopia e conteggio cellulare

In seguito alla stime degli osservabili della coltura cellulare sottoposta a forte stress è possibile elaborare un modello che descriva gli effetti sulla vitalità della popolazione nel tempo. Al fine di valutarne la sopravvivenza, è indispensabile procedere a misurazioni che coinvolgano lunghe tempistiche di campionamento, a comparazione con i tempi di vita delle cellule.

Per tale tipologia di studio è necessario un esame visivo dei campioni cellulari. In questo modo è possibile ricavarne le curve caratteristiche di crescita e mortalità. Da prassi sperimentale, tutto questo viene eseguito attraverso un conteggio cellulare tramite acquisizioni di immagini al microscopio ottico.

Le prossime sezioni riporteranno le caratteristiche della strumentazione utilizzata. Si farà così riferimento al microscopio scelto per lo studio (2.1 Microscopio Nikon Eclipse-Ti) ed al programma ad esso associato (2.2 Programma NIS Element) utilizzato per l'analisi delle immagini prodotte. Per la valutazione del conteggio, infatti, sono state sfruttate le immagini dei campioni ottenute dal software. In tal modo ogni conteggio ed ogni dato sperimentale è stato salvato e reso disponibile per ulteriori studi. Lo stesso programma permette, inoltre, un utilizzo di apposite applicazioni per uno studio quantitativo delle immagini con esso generate.

Abitualmente la pratica di conteggio è eseguita su colture cellulari in fase di crescita. Un monitoraggio continuo nel tempo della vitalità e proliferazione cellulare permette, infatti, di ottenere una buona analisi numerica del campione. Questo tipo di valutazione è possibile effettuarla in diverse metodologie. La pratica scelta in questo ambito di tesi ha riguardato il conteggio tramite emocitometro (camera di Burker).

Volendo valutare anche il comportamento temporale della popolazione in termini di mortalità, il conteggio è stato effettuato con metodi di esclusione per colorazione. L'utilizzo del colorante trypan blue (marcatore per la mortalità

cellulare) ha, infatti, permesso di considerare in contemporanea sia la fase di decrescita della vitalità che la corrispettiva crescita di mortalità.

## 2.1 Il microscopio Nikon Eclipse-Ti

La sperimentazione effettuata in quest'ambito di tesi è stata realizzata mediante il microscopio *Nikon Eclipse-Ti* disponibile presso il Dipartimento di Fisica e Astronomia dell'Università di Bologna. Questo strumento, del tutto all'avanguardia nel settore, è ampiamente utilizzato in ambito di ricerca per misurazioni di carattere biologico e fisico.



Figura 2.1: Visione complessiva del microscopio rovesciato Nikon Eclipse-Ti.

Il microscopio Nikon Eclipse-Ti è in grado di effettuare analisi di campioni sia in campo chiaro o in contrasto di fase, che in fluorescenza. Esso è di tipo rovesciato, presentando quindi l'apparato ottico al di sotto del campione, il quale viene illuminato da una sorgente luminosa ad esso sovrastante. Caratteristiche innovative che consentono di ritenerlo uno strumento all'avanguardia in campo di ricerca, risiedono nella possibilità di effettuare misurazioni in *time lapse* (in dinamica) anche per numerose ore. Con esso, infatti, viene fornito un apposito incubatore, in grado di mantenere la vitalità del campione biologico durante le misurazioni. Tutto ciò permette di effettuare analisi del campione in vivo, andando così a considerare aspetti del sistema altrimenti difficilmente indagabili.

La possibilità di analisi biologica di sistemi in vivo è di ampio interesse per la moderna ricerca scientifica.

Grazie alla telecamera ad esso connessa è possibile ottenere immagini del campione che ne permettono lo studio anche a distanza di tempo, con un salvataggio di foto impiegabili per successive analisi. In particolare, a nostra disposizione è stato fornito il rivelatore CCD costituito dalla telecamera Qimaging, modello Retiga 2000RV. Quest'ultima risulta essere appropriata anche per studi di imaging dinamico ed in fluorescenza. In aggiunta, risulta predisposta di un sistema di raffreddamento in grado di regolarne la temperatura fino a 30° C sotto zero, al fine di minimizzare il rumore termico nella cattura di immagini. Per quanto riguarda la capacità di risoluzione, i dati della casa costruttrice forniscono valori pari a 1.92 megapixel con la produzione di un output a 12 bit in livelli di grigio.



Figura 2.2: Telecamera della Qimaging, modello Retiga 2000RV.

Lo studio di campioni in time lapse è consentito da questa strumentazione grazie ad una tecnica adeguata per il mantenimento del punto focale sul campione. Al passare del tempo, infatti, possono insorgere una serie di problematiche nell'analisi del campione, quali vibrazioni od instabilità meccaniche dell'apparato, oltre che alla naturale ed intrinseca perdita di focalizzazione dello strumento. Per ovviare a tutto ciò, il microscopio Nikon Eclipse-Ti presenta una componente hardware unica, denominata *Perfect Focus System* (PFS), realizzata per ovviare al problema. Essa, infatti, è in grado di contrastare gli spostamenti assiali del campione durante l'acquisizione nel tempo. Il tutto è realizzato attraverso un LED infrarosso, compatibile con l'utilizzo degli spettri luminosi delle misure in fluorescenza, ed un sensore CCD, in modo da mantenere controllata la distanza tra superficie dell'obiettivo e piano focale scelto.

Di interesse per la sperimentazione proposta risulta la descrizione teorica delle misurazioni di microscopia in contrasto di fase.

### 2.1.1 Microscopia in contrasto di fase

Partendo dalla teoria funzionale del microscopio a luce trasmessa, la quale fornisce l'ingrandimento del campione attraverso la particolare disposizione di lenti, è necessario considerare la casistica di campioni estremamente sottili. Essi, infatti, non riuscendo ad assorbire sufficiente luce visibile, non sarebbero in grado di essere visti con la microscopia in campo chiaro, risultando trasparenti. Per ovviare a questa problematica viene utilizzata il fenomeno dell'interferenza luminosa per ottenere delle immagini in contrasto di fase.

Il metodo venne formulato nel 1934 dal fisico Fritz Zernike (premio Nobel nel 1953), grazie al quale si realizzò una vera rivoluzione nella microscopia. Con tale metodo la somministrazione di coloranti al campione, spesso tossici per i sistemi biologici in esame, non risultò più necessaria.

Il contrasto di fase è la tecnica ideale per lo studio d'imaging di oggetti estremamente sottili, quali le cellule, che presentano spessori dell'ordine del  $\mu\text{m}$ . Se in campo chiaro l'occhio umano non riuscirebbe a distinguerli, attraverso la differenza di fase delle onde luminose al passaggio del campione, è possibile risolverli. Con tale metodo vengono, per l'appunto, sfruttate le differenze in indici di rifrazione del campione. È possibile riscontrare differenze minime negli indici di rifrazione tra la cellula stessa, ricca di citoplasma, e la soluzione in cui essa è immersa, prevalentemente acquosa. Tali differenze vengono rese visibili dal contrasto di fase con appositi dispositivi ottici.

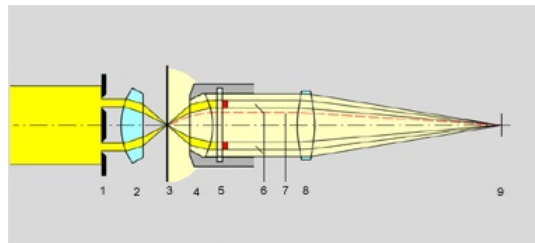


Figura 2.3: Schema ottico della realizzazione del contrasto di fase.

Potendo l'occhio umano distinguere solamente variazioni di intensità luminosa e non discrepanze di fase, è necessario tramutare gli sfasamenti in quantità otticamente visibili.

Partendo da una situazione iniziale di onde perfettamente in fase, prodotte dalla sorgente luminosa del microscopio, al passaggio nel campione, a seconda del mezzo incontrato nel loro percorso, subiranno leggeri sfasamenti. Gli sfasamenti saranno dettati dalla tipologia del mezzo incontrato e dalla permanenza dell'onda all'interno di esso, come dettato dalla teoria di rifrazione. Il tutto viene quindi

tramutato in un ritardo dell'onda alla lente obiettivo. Questo viene identificato come una differenza di fase dell'onda.

Al fine di rendere l'ammontare dello sfasamento visibile all'occhio umano, quest'ultimo viene convertito in una differenza in livelli di grigio, attraverso un filtro grigio posto nel diaframma anulare dell'obiettivo. Nella lente denominata condensatore, il diaframma di apertura viene sostituito da un diaframma anulare in grado di generare fasci d'onda paralleli. Oltrepassato il piano del campione, il fascio emergente entra nella lente dell'obiettivo, nella cui pupilla viene applicato un anello di fase in grado di attenuare il fascio. Esso agisce come filtro grigio, generando un ulteriore sfasamento dei fasci, raggiungendo il valore di  $\frac{3}{2}\pi$  (un  $\frac{\pi}{2}$  causato dal passaggio nel diaframma anulare ed un  $\pi$  per l'attraversamento del fuoco dell'apertura, detto sfasamento di Gouy).

La presenza di diversi indici di rifrazione comporta la deviazione di alcuni raggi, con conseguente impossibilità di ricezione nell'obiettivo. Questi, quindi, non passando nell'anello di fase dell'obiettivo subiranno solo un parziale sfasamento di  $\frac{\pi}{2}$ , ritrovandosi sfasati rispetto ai fasci non deviati di  $\pi$ .

In seguito, tutti i fasci vengono riuniti, creando, secondo le leggi di sovrapposizione ed interferenza, l'immagine intermedia che si troverà nella posizione focale dell'oculare, consentendone l'ingrandimento. Il risultato di questa serie di processi sarà proprio la creazione di zone chiare e scure, permettendo la risoluzione di cellule all'occhio umano.

Problematica fondamentale del metodo risiede nella creazione di innaturali aloni di luce in corrispondenza dei bordi delle strutture cellulari, soprattutto in prossimità di campioni più voluminosi. Per questa ragione, il metodo è applicabile ai soli campioni sottili e non troppo complessi.

## 2.2 Software NIS Element

Come anticipato in precedenza, il microscopio Nikon Eclipse-Ti è gestito mediante il software NIS Element. Tale programma, infatti, permette un completo utilizzo del microscopio direttamente dal pannello di controllo ad esso associato. La manovrabilità del microscopio viene, quindi, mantenuta tramite il programma, il quale non solo ne permette la regolazione, ma prevede anche un certo livello di programmazione per la gestione di sequenze di raccolta dati e successiva elaborazione. Il tutto è reso di facile utilizzo mediante l'intuitivo pannello di controllo (TiPad) presente nel software, il quale propone non solo la stessa pulsantiera presente nello strumento, ma anche la possibilità di controllo della luce (per l'acquisizione di immagini sia in contrasto di fase che in fluorescenza) e gestione degli ingrandimenti, potendo scegliere tra sei diversi obiettivi in ingrandimento crescente. Per quanto riguarda la programmazione delle sequenze, sono necessarie stringhe di codice, fornite dall'ampia disponibilità di librerie già implementate nel programma e consultabili.

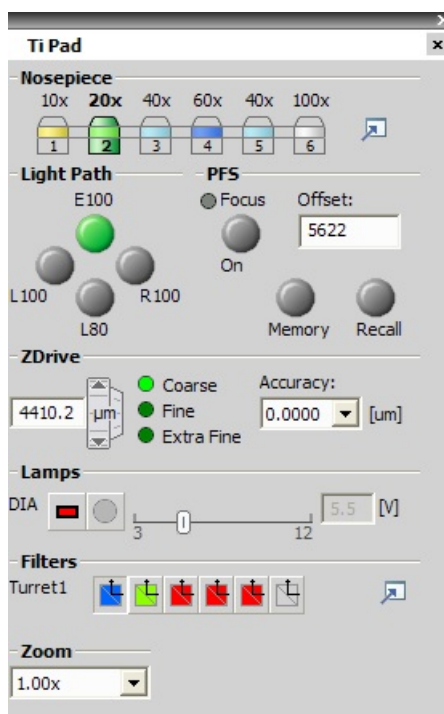


Figura 2.4: Microscope Control Pad (TiPad).

Le potenzialità di utilizzo del programma sono innumerevoli, sia per quanto riguarda la raccolta delle immagini del campione, che per la loro successiva elaborazione, grazie, soprattutto, alla possibilità di misurazioni sia in modalità *live* che al seguito di un precedente salvataggio. Attraverso tale metodologia, nel nostro caso è stato possibile applicare i metodi di conteggio anche al seguito dell'effettivo



campionamento, nonché mantenere copia dei dati-immagine per ulteriori e future elaborazioni ed indagini.

La programmabilità del microscopio comporta anche la possibilità di creare configurazioni d'utilizzo scelte e mirate alla ricerca che si vuole eseguire. Tutto ciò continua a valere sia per la microscopia in campo chiaro che per quella in fluorescenza, campo nel quale maggiormente viene sfruttata questa possibilità. Per ogni configurazione predisposta sono mantenuti i parametri imposti in un primo momento attraverso il pannello di controllo, oltre che le coordinate spaziali relative all'eventuale incubatore. In questo modo, eseguendo misurazioni nel tempo, si è in grado di ottenere dati relativi sempre alla stessa porzione di campione, constatando il mutamento effettivo dei singoli elementi. Tutto ciò è reso possibile anche grazie alla presenza della modalità Perfect Focus (PF). Nella nostra sperimentazione non è stato, tuttavia, necessario implementare tali sequenze, in quanto la raccolta dati veniva eseguita immediatamente dopo la preparazione del campione e lo studio era rivolto a serie di campioni singoli.

Ogni misurazione può, così, essere eseguita sia direttamente, attraverso gli oculari del microscopio, che attraverso la visualizzazione delle immagini mediante il programma. La telecamera a disposizione (Figura 2.2), seppur in grado di proporre immagini di alta risoluzione, presenta l'inconveniente di fornire quest'ultime solamente in livello di grigio, facendo perdere ogni tipo di colorazione del campione. Avendo in esame campioni cellulari discriminati in base a coloranti, l'analisi delle immagini è comunque resa possibile attraverso la differente risposta al contrasto di fase, ma è stato preferibile nondimeno applicare il metodo di conteggio direttamente con la visualizzazione mediante gli oculari, riservandosi la possibilità di rivedere la validità del dato in seguito, grazie al salvataggio delle immagini.

Per quanto riguarda studi più accurati, soprattutto per la casistica in vivo, è possibile anche la creazione di filmati (salvabili in formato .avi) e lo studio in quella che nel programma è chiamata modalità *Z serie*, ossia la cattura di serie di immagini del campione a differenti piani focali sequenziali, per una possibile ricostruzione in 3D attraverso altri software di elaborazione immagini. Il tutto, come sempre, con un'estrema libertà di programmazione dell'utente.

L'utilizzo del programma per l'analisi immagini coinvolge numerosi parametri d'indagine, i quali possono essere applicati manualmente o, anche in questo caso, "riassunti" attraverso una predisposta programmazione (sequenza *macro*) usufruibile anche per elaborazioni successive e/o ripetute. È possibile effettuare numerose misurazioni sull'immagine, sia a livello geometrico, comprendendo calcoli di distanze, aree, perimetri, angoli ecc., sia una vasta gamma di operazioni di elaborazione, andando a variare parametri di luminosità e contrasto, al fine

soprattutto dell'individuazione dei bordi degli elementi presenti. La possibilità di modifica del contrasto (funzione *Contrast*), con l'aggiunta di parametri quali l'individuazione automatica dei bordi (serie di algoritmi per la definizione e "pulitura" dei bordi degli elementi, quali *Detect Edges*, *Clean* ed *Erode*), sono di grande utilizzo per la valutazione dei metodi di conteggio. In aggiunta, è anche possibile andare a scegliere l'intervallo di tonalità di grigio che si vuole evidenziare, andando a restringere o dilatare direttamente lo spettro presente in ciascuna immagine.

Il conteggio mediante algoritmi programmabili attraverso NIS Element, è stato attentamente valutato anche per le metodologie scelte in sede sperimentale. Avendo a che fare con conteggi discriminati in tonalità di grigio, è infatti ipotizzabile la creazione di appropriate macro per la valutazione delle popolazioni in esame. Inoltre, lo stesso NIS Element predispose già in automatico una funzione di conteggio (funzione *Counting Objects*) degli elementi selezionati attraverso tale metodologia. La problematica sperimentale che ha portato ad optare per un conteggio manuale è stata la progressiva frammentazione nel tempo delle componenti cellulari morte. La raccolta di immagini, inoltre, coinvolge un'area del vetrino di campionamento superiore a quella del quadrante della camera di Burker (vedi paragrafo *Camera di Burker*). Per tali ragioni si è optato per un conteggio manuale, il quale avrebbe richiesto necessariamente più tempo in sede di analisi, ma avrebbe eliminato possibili errori di valutazione del software dovuti ad algoritmi non modificabili e non adeguati all'immagine ottenuta.

## 2.3 Conteggio cellulare

Per monitorare la proliferazione o la decrescita in seguito a somministrazione di agenti esterni, è necessario predisporre un apparato sperimentale atto al conteggio visivo o automatizzato (attraverso software).

Le misurazioni effettuate in sede sperimentale sono state svolte tramite una *camera di Burker*. Nel seguito verranno anche presentate le ipotesi di partenza su cui si è basato il modello elaborato per la descrizione dei risultati ottenuti in seguito al conteggio delle cellule.

### Camera di Burker

La camera di Burker è un particolare emocitometro, frequentemente utilizzato negli studi biologici. Consistente in un vetrino modificato, presenta, per l'appunto, una griglia incisa sulla superficie per l'effettuazione del conteggio. Tale griglia è descritta da caratteristiche superficiali standardizzate e note allo sperimentatore. Con un procedimento sperimentale accurato, risulta costante anche lo spessore fornito dal vetrino copri-camera, cosicché sia possibile operare sempre con lo stesso volume di campione liquido sulla griglia.

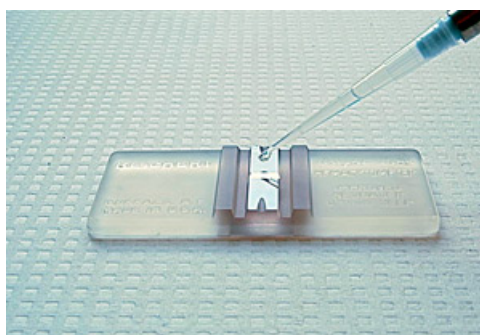


Figura 2.5: Visione complessiva della camera di Burker nel momento in cui viene inserita la soluzione da esaminare mediante pipetta Gilson.

Attraverso le caratteristiche geometriche del reticolo dell'emocitometro ed una volta noto il volume in cui si opera, è immediato il calcolo della densità cellulare nel campione. La camera di Burker, in particolare, presenta una struttura reticolare descritta da nove quadranti più grandi, a loro volta suddivisi in compartimenti più sensibili. A suddividere il reticolato più grande sono poste serie di tre righe parallele. Avendo a disposizione nove aree di indagine della medesima superficie, il calcolo in conteggio sarà effettuabile in diversi metodi.

Ogni quadrante più ampio presenta un lato di 1 mm e, considerando una preparazione ottimale, un'altezza, dettata dal vetrino copri-camera, pari a 0.100 mm ( $\pm 2\%$ ). In tal modo si avrà per ogni sezione un volume di campione di

0.1 ml. Solamente i quattro quadranti posti ai vertici della griglia, in aggiunta a quello centrale, mostrano una sottodivisione. Quest'ultima risulta distinguibile da doppie linee parallele, andando a creare sedici quadranti più piccoli la cui area è pari a  $\frac{1}{25}$  mm<sup>2</sup>. Tutti i valori riportati sono forniti dalla casa costruttrice dello strumento e dedotti dal *data sheet* in allegato con esso.

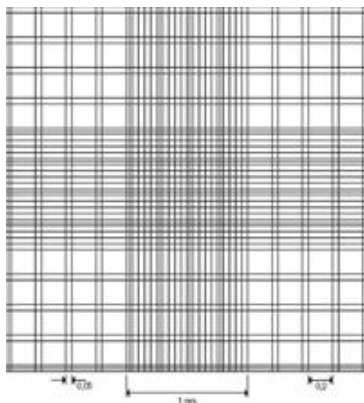


Figura 2.6: Schema della griglia presente in una camera di Burkler.

L'utilizzo più frequente di misurazioni attraverso emocitometri lo si ritrova per il conteggio dei globuli rossi, da cui prende, per l'appunto, il nome. Avendo alte concentrazioni di cellule, campioni di questo tipo necessitano di una risoluzione di misura più accurata. Per tale ragione solamente il quadrante centrale, presenta una griglia ancor più fine, con quadranti di area pari a  $\frac{1}{400}$  mm<sup>2</sup>.

### Conteggio in camera di Burkler

Avendo a disposizione diversi settori di area nota, a seconda della concentrazione scelta per la preparazione del campione, sarà opportuno procedere al conteggio su diversi quadranti. Come già accennato, per concentrazioni cellulari elevate come per i campioni di globuli rossi, è necessario optare per il quadrante centrale, più finemente suddiviso. Al contrario, con concentrazioni inferiori sono utilizzabili i quadranti più ampi, in modo da avere sempre un numero sufficiente di conteggi per ogni settore.

Il conteggio viene eseguito andando a valutare il numero di cellule presenti all'interno di un determinato settore. A livello standard, vengono considerati i quadranti relativi ai vertici con l'aggiunta di quello centrale. Questo metodo è, quindi, applicabile per entrambi gli ordini di grandezza dei quadranti in esame, che si tratti dei più ampi o no. Con questo metodo è necessario un valore di  $\sim 100$  conteggi perché la misura sia valida.

Un metodo alternativo corrisponde al conteggio di un numero scelto di quadranti. Utilizzando quest'ultimo è necessario procedere ad una media dei valori

trovati in base al numero di quadranti. Avendo a disposizione un numero non sufficientemente elevato di cellule per la valutazione nella griglia più fine, si è optato per questo metodo di conteggio in fase sperimentale. Come verrà poi riproposto nel seguito, il conteggio è stato effettuato andando a selezionare i quattro quadranti di vertice della griglia più ampia. In tal modo è sempre stato possibile ottenere un numero sufficiente di conteggi.

### Conteggio con colorante

Per effettuare misurazioni di vitalità cellulare, è necessario creare un metodo di discriminazione per la casistica di morte. I metodi più comunemente utilizzati riguardano l'impiego di coloranti.

Nel capitolo 1.2 si sono descritte le caratteristiche tipiche di stato di morte cellulare. Basando la vitalità cellulare sui corretti comportamenti di membrana, è possibile sfruttarli per la distinzione tra vive e morte. Coloranti quali il *trypan blue*, da noi utilizzato in fase sperimentale, sono in grado di penetrare la membrana cellulare solo in caso di mal funzionamento di essa. L'efficacia del colorante trypan blue si basa sul fatto che il suo cromoforo (la componente molecolare responsabile della sua colorazione) è carico negativamente e non riesce a penetrare la membrana cellulare se non quando il danno cellulare è tale da renderla permeabile a molecole cariche e di grandi dimensioni.

Membrane cellulari integre, quindi, non consentono il passaggio di colorante, facendo risultare le cellule otticamente chiare, mentre in caso di aumento di permeabilità di membrana e quindi morte cellulare, queste risulteranno colorate. Con tale metodologia non è, tuttavia, possibile distinguere tra le varie tipologie di morte incorse. Tale è il principio base dei test di esclusione.

#### 2.3.1 Distribuzione di Poisson e decadimento esponenziale

La distribuzione statistica di Poisson descrive i risultati di esperimento di conteggio, in cui gli eventi stocastici avvengono con una media temporale definita. Negli esperimenti di conteggio svolti in intervalli temporali, il valore ottenuto è certamente privo di incertezza (ipotizzando affidabile il contatore). Tuttavia, ripetendo l'esperimento, quasi certamente il valore ricavato risulterà diverso dal precedente, comportandone una variazione proprio a causa del carattere intrinsecamente casuale del sistema in esame. L'incertezza in tali distribuzioni non rappresenta, quindi, una fonte di errore sperimentale ma, bensì, la natura statistica intrinseca nel campione.

Simile alla distribuzione binomiale, la statistica di Poisson è attuabile a sistemi presentanti un ampio numero di elementi, ma con scarsa probabilità di successo

del fenomeno analizzato. Sotto queste condizioni, infatti, si dimostra il congiungimento tra i risultati delle due distribuzioni, facendo optare sperimentalmente per l'analiticamente più semplice poissoniana.

Matematicamente si definisce la distribuzione di Poisson come:

$$P_{\mu}(\nu) = e^{-\mu} \frac{\mu^{\nu}}{\nu!} \quad (2.1)$$

dove  $\mu$  è un parametro positivo dimostrabile, attraverso una banale dimostrazione algebrica, esser proprio il valor medio della distribuzione, mentre  $\nu$  identifica i conteggi in un intervallo definito.

Per quanto riguarda la stima della deviazione standard del valor medio, essa corrisponderà, come da definizione, alla radice degli scarti al quadrato. Per questa distribuzione si dimostra che tale valore corrisponda esattamente alla radice quadrata del valor medio di conteggio, quindi, per la notazione proposta, sarà  $\sqrt{\mu}$ .

Si dimostra inoltre che qualora il numero di eventi in un intervallo temporale segua una distribuzione poissoniana, il tempo di attesa tra due eventi successivi è descritto da una funzione esponenziale dello stesso parametro.

Preso un campione cellulare di valore iniziale  $N_0$ , sottoposto a stress duraturo nel tempo, il suo valore inizierà a diminuire progressivamente a causa della morte della popolazione del campione. Avendo una quantità elevata di cellule nel campione, queste presenteranno una probabilità di morte bassa e costante nel tempo. Il sistema quindi sarà descrivibile dalla relazione differenziale

$$\frac{dN_v}{dt} = -\lambda N_v \quad (2.2)$$

dove  $N_v$  identifica le cellule vive nel campione. Integrando per separazione di variabili, se ne ricava la relazione esponenziale:

$$N_v(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad (2.3)$$

dove si definisce come coefficiente di *vita media* della popolazione il reciproco di  $\lambda$ . Quindi la quantità di cellule vive decresce esponenzialmente nel tempo.

Per la creazione di questo approssimato modello, si è scelto di trascurare la probabilità di duplicazione delle cellule, in quanto, in condizioni di forte stress, essa può assumersi  $\ll 1$ .

### 2.3.2 Concentrazione cellulare totale e crescita in mortalità

Una volta costruito un modello descrivente l'andamento funzionale della vitalità cellulare, è possibile considerare anche lo studio della concentrazione totale del campione.

Per eliminare ogni possibile problematica relativa alla degenerazione biologica dei campioni, la quale comporta inevitabili difficoltà nel conteggio, è pratico considerare come valore più attendibile per la concentrazione totale, il primo conteggio della serie ( $T=0$ ).

Ad ogni misurazione però dovrà continuare a valere la relazione:

$$N_{tot} = N_v + N_m \quad (2.4)$$

Avendo a disposizione differenti campioni cellulari, quello che ci si aspetta teoricamente è, quindi, un valore pressoché costante per il numero totale di cellule. La suddivisione in campioni è, infatti, eseguita al meglio delle capacità sperimentali al fine di ottenere una serie di campioni tutti uguali a livello di concentrazione. La possibilità di utilizzare metodi di conteggio per esclusione, consente inoltre di valutare anche il numero di cellule morte per ogni campione le quali non devono essere dedotte per sottrazione.

Da questa analisi risulta immediata la stima dell'andamento funzionale per quanto riguarda la componente di mortalità cellulare. In base alle ipotesi proposte in precedenza per la popolazione cellulare sopravvissuta, si giunge alla descrizione della controparte come:

$$N_m = N_0(1 - e^{-\lambda t}) \quad (2.5)$$

È necessario notare come per la comparazione di risultati sperimentali provenienti da esperimenti caratterizzati da differenti concentrazioni iniziali, sia sempre indispensabile procedere alla normalizzazione dei dati di conteggio. A tal fine occorrerà semplicemente dividere ciascun andamento funzionale per il valore di  $N_0$  dedotto sperimentalmente a  $T=0$ .





## Capitolo 3

# Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

Il termine NMR identifica l'acronimo della tecnica sperimentale conosciuta come *Risonanza Magnetica Nucleare*. Nota al grande pubblico per le sue numerose applicazioni in ambito medico-diagnostico, risulta di fruttuoso utilizzo in numerosi settori scientifici. A rendere questo metodo così versatile è la sua capacità d'indagine su diversi ordini di grandezza.

Scoperta indipendentemente dai gruppi di ricerca guidati da Felix Bloch ed Edward Purcell, entrambi per questo premiati con il Nobel per la Fisica nel 1952, la tecnica NMR inizialmente fu utilizzata per lo studio nell'ambito della Fisica di base e soprattutto nella Fisica dello Stato Solido. Lo sviluppo sia dal punto di vista teorico che tecnologico ha permesso di estenderne l'applicazione anche in campo biologico e medico, partendo sempre dal medesimo principio fisico di base, e risulta tutt'ora una tecnica sempre più legata alla Fisica Applicata.

Inoltre, a differenza di tecniche altamente invasive quali quelle della Medicina Nucleare o della radiologia che sfruttano radiazioni ionizzanti dannose all'organismo, la NMR ha un carattere di non invasività che non ha eguali dal punto di vista biomedico. Scopo fondamentale della biologia-medica è, infatti, la ricerca di metodi di indagine che consentano un elevato numero di informazioni dal campione, con il minimo rilascio di dose.

Nel caso di NMR l'utilizzo di campi magnetici statici ed a radiofrequenza e la loro modulazione ed orientazione, costituiscono l'unica fonte di somministrazione di energia al campione. Applicando ai nuclei che posseggono proprietà magnetiche, tra i quali i più utilizzati nella ricerca sono i nuclei  $^2H$ ,  $^{31}P$ ,  $^{23}Na$ ,  $^{14}N$ ,  $^{13}C$ ,  $^{19}F$  ma soprattutto i nuclei di idrogeno ( $^1H$ ), è possibile indagare la struttura macroscopica attraverso il comportamento dell'insieme di una determinata famiglia di spin nucleari. Inoltre in campo biologico, la tecnica NMR risulta essere

molto vantaggiosa, in quanto, essendo i campioni biologici ricchi di  $\text{H}_2\text{O}$ , e quindi di  $^1\text{H}$ , permette di rilevare segnali di grande intensità derivanti dal campione allo studio, e di ottenere quindi misure con alto rapporto segnale/rumore anche con un numero esiguo di acquisizioni con un conseguente risparmio di tempo.

La scelta di questo metodo sperimentale per la valutazione di campioni cellulari risiede proprio nell'elevata presenza di acqua al loro interno. Gli stati di membrana ed il loro studio in funzione degli scambi tra interno ed esterno della cellula, risultano di grande e crescente interesse per la valutazione dell'efficienza nell'utilizzo di agenti di contrasto. Queste sostanze, composte essenzialmente da elementi paramagnetici o diamagnetici, sono spesso utilizzati nell'ambito della Risonanza Magnetica per Immagini (MRI). Per la particolare composizione chimica, la quale consente una risposta magnetica particolareggiata, è possibile andare ad aumentare i segnali di risposta del tessuto in esame, o solamente determinate frazioni. In base anche alla permeabilità di membrana cellulare ed agli scambi intra- ed extracellulari, si otterrà una differente risposta a tali sostanze. In alcune patologie coinvolgenti i danni di membrana cellulare dei tessuti, si avrà una risposta netta nelle localizzazioni in cui questi riescono a penetrarvi. Una volta dedotto questo comportamento cellulare, sarà possibile tenerne conto nella rilevazione di immagini bio-mediche.

Numerose sono le tipologie di studio effettuabili, nonché le informazioni ricavabili da un'indagine tramite tecnica NMR: in particolare nella tesi svolta si è analizzato il comportamento rilassometrico dei campioni studiati. Con il termine rilassometria si intende la misura dei tempi di rilassamento delle componenti trasverse ( $T_2$ ) e della componente longitudinale ( $T_1$ ) della magnetizzazione nucleare di una data specie chimica investigata, ovvero i tempi di ritorno all'equilibrio del vettore magnetizzazione a seguito di una perturbazione del sistema di spins con sequenze di impulsi a radiofrequenza che verranno esposte in seguito.

### 3.1 Aspetti fondamentali della tecnica NMR

La tecnica NMR viene applicata a nuclei che hanno proprietà magnetiche come sopra accennato e che quindi posseggono un momento angolare  $\vec{I}$  (spin) a cui è associato un momento magnetico  $\mu = \gamma \left(\frac{h}{2\pi}\right) \vec{I}$  ove  $\gamma$ , dipendente dal nucleo considerato, è il rapporto giromagnetico.

Trattando il problema da un punto di vista quantistico, per semplicità si consideri un insieme di  $^1\text{H}(I=1/2)$ , che è il nucleo investigato nelle misure di questa tesi. Se ai nuclei di idrogeno viene applicato un campo statico ed uniforme  $\vec{B}_0 = H_0 \hat{z}$ , diretto per convenzione lungo la direzione  $z$  di una terna di riferimento cartesiana fissa  $x, y, z$  definita sistema di laboratorio ( $\sum_{LAB}$ ), i momenti magnetici

nucleari, che a campo nullo erano orientati in modo casuale a causa dell'agitazione termica, tendono ad assumere due valori discreti di energia che corrispondono alla loro orientazione parallela od antiparallela rispetto al verso di applicazione del campo  $\vec{B}_0$ . Per la statistica di Boltzmann la maggioranza dei nuclei si disporrà in modo tale da avere energia minima orientandosi parallelamente a  $\vec{B}_0$ , con la creazione di una magnetizzazione netta.

La differenza tra i due livelli corrispondenti alle due orientazioni sarà data da:

$$\Delta E = \gamma \left( \frac{h}{2\pi} \right) B_0 = \left( \frac{h}{2\pi} \right) \omega_0 \quad (3.1)$$

dove  $\omega_0$  è la frequenza di Larmor.

Essendo più popolato il livello a più bassa energia, il sistema di nuclei tende ad assorbire energia. L'energia che deve essere fornita al sistema affinché venga perturbato dal suo stato di equilibrio deve soddisfare la condizione fondamentale di risonanza (3.1). In NMR la perturbazione del sistema di spin consiste nell'applicazione di onde elettromagnetiche in direzione perpendicolare del campo  $\vec{B}_0$  sottoforma di impulsi con un campo a radiofrequenza  $\vec{B}_1$  oscillante alla frequenza di Larmor del sistema. A seguito della rimozione della perturbazione, si misurano i tempi  $T_1$  e  $T_2$  di ritorno all'equilibrio della componente longitudinale e delle componenti trasversali della magnetizzazione nucleare, rispettivamente.

La trattazione semiclassica NMR, invece, utile in seguito per la spiegazione delle sequenze di impulsi usati nelle misure, considera i momenti magnetici degli spin e, generalizzando, la magnetizzazione nucleare come vettori.

Per i nuclei atomici, l'evoluzione temporale di  $\vec{\mu}$ , sottoposto al campo statico ed uniforme  $\vec{B}_0$ , precedentemente definito, è data in  $\sum_{LAB}$  dall'equazione:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (3.2)$$

che descrive come su  $\vec{\mu}$  agisca una coppia di forze dovuta al campo magnetico.

Scomponendo l'equazione precedente nelle sue componenti lungo gli assi di  $\sum_{LAB}$  si ottiene:

$$\frac{d\mu_x}{dt} = \gamma\mu_y B_0; \quad \frac{d\mu_y}{dt} = -\gamma\mu_x B_0; \quad \frac{d\mu_z}{dt} = 0 \quad (3.3)$$

da cui si può intuire come il momento magnetico compia un moto di precessione attorno all'asse  $z$ , con frequenza angolare pari a quella di Larmor  $\omega_0 = \gamma B_0$ .

Si aggiunga ora a  $\vec{B}_0$  un campo  $\vec{B}_1$  a radiofrequenza, con  $|\vec{B}_1| \ll |\vec{B}_0|$ , rotante con frequenza  $\omega$  nel piano  $xy$  perpendicolarmente alla direzione del campo

statico uniforme.  $B_1$  può essere ottenuto da un campo oscillante lungo una certa direzione, per esempio  $x$ , generato da una spira percorsa da corrente a radiofrequenza (RF). Questo campo è scomponibile in due vettori rotanti ed in condizioni di risonanza si può considerare solo una di queste due componenti.

In presenza di entrambi i campi si può introdurre una nuova terna di assi di riferimento  $x', y', z'$ , definita  $\sum_{ROT}$ , con  $z'$  coincidente con  $z$  di  $\sum_{LAB}$  ma rotante alla frequenza del campo  $\vec{B}_1$ . L'equazione del moto in  $\sum_{ROT}$  risulta essere:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma\vec{\mu} \times (\vec{B}_0 + \frac{\omega}{\gamma} + B_1) = \gamma\vec{\mu} \times \vec{B}_{eff} \quad (3.4)$$

Si osservi come l'utilizzo di una terna non inerziale introduca un campo efficace ( $B_{eff} = B_0 + \frac{\omega}{\gamma} + H_1$ ) in questa equazione, che viene ad assumere la stessa forma della (3.2). In condizioni di risonanza, cioè quando  $\omega = \omega_0 = -\gamma\vec{H}_0$ ,  $\vec{\mu}$ , in  $\sum_{ROT}$ , precessa intorno ad  $\vec{B}_1$ , unico campo di cui il momento magnetico risente l'effetto.

Come osservato in precedenza, è possibile prendere in considerazione solo uno dei due vettori rotanti in cui può essere scomposto il campo RF. Infatti la componente di  $\vec{B}_1$  rotante in senso opposto a quello di precessione è lontana dalla condizione di risonanza in modo consistente, ed il suo effetto non influenza la dinamica del vettore magnetizzazione.

Partendo dallo studio dello spin libero, si comprende quindi come sia possibile guidare la magnetizzazione prodotta da un campo uniforme e statico  $\vec{B}_0$  mediante un campo a radiofrequenza  $\vec{B}_1 \perp \vec{B}_0$  alla frequenza di Larmor, e di intensità di molto inferiore, applicato sottoforma di impulso dell'ordine di qualche microsecondo, in modo da ruotare la magnetizzazione dell'angolo desiderato, chiamato *flip angle*, definito dall'equazione:

$$\theta(t) = \gamma B_1 t \quad (3.5)$$

Gli impulsi maggiormente utilizzati nelle sequenze NMR descritte in seguito sono gli impulsi che ruotano la magnetizzazione di un angolo di  $\pi/2$  e  $\pi$  che portano rispettivamente la magnetizzazione nel piano  $xy$  ed in direzione del campo  $B_0$  ma in verso opposto.

Nel caso più generale della magnetizzazione nucleare, se il sistema è soggetto al campo  $\vec{B}_0$  ed all'impulso a radiofrequenza  $\vec{B}_1$ , esso si trova in una condizione di non-equilibrio descritta, nel  $\sum_{ROT}$ , dalle *equazioni di Bloch* per ciascuna componente che possono essere scritte:

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = -\frac{M_z(t) - M_z(0)}{T_1} \quad \text{rilassamento longitudinale} \quad (3.6)$$

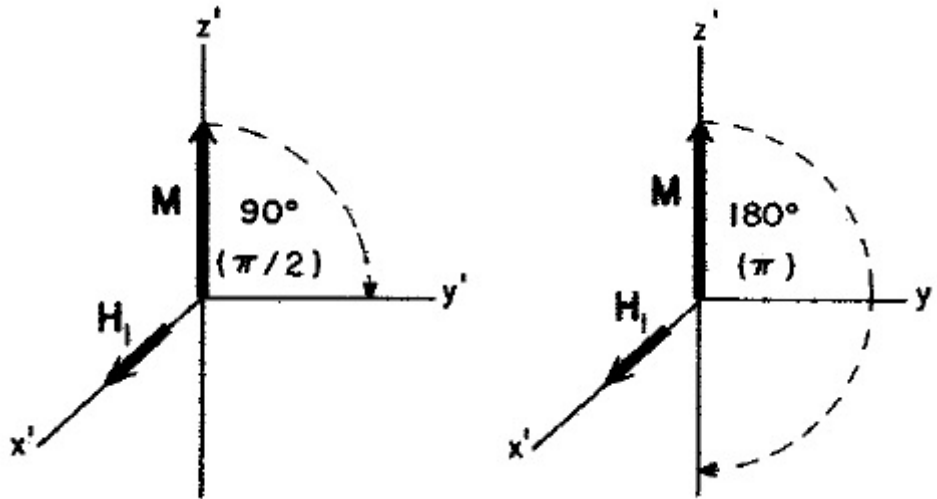


Figura 3.1: Dinamica della magnetizzazione nucleare a seguito degli impulsi di  $\pi/2$  e  $\pi$ .

$$\frac{dM_{x,y}(t)}{dt} = -\frac{M_{x,y}(t) - M_{x,y}(0)}{T_2} \quad \text{rilassamento trasversale} \quad (3.7)$$

L'integrazione di queste equazioni porta a:

$$M_z(t) = M_z(0)\exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) + M_0\left(1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right) \quad (3.8)$$

$$M_{x,y}(t) = M_{x,y}(0)\exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (3.9)$$

dove compaiono nuovamente le costanti fenomenologiche  $T_1$  e  $T_2$ , fondamentali per ricavare le principali proprietà del sistema allo studio in questo lavoro di tesi.

### 3.1.1 Rilassamento longitudinale ( $T_1$ )

Il tempo di rilassamento longitudinale corrisponde al tempo di ritorno all'equilibrio della componente della magnetizzazione nucleare lungo la direzione del campo statico  $B_0$ . Per seguire in modo completo la dinamica di questo processo si utilizza la cosiddetta sequenza di *Inversion Recovery* (IR) nella quale si applica un impulso di  $\pi$  in modo da invertire completamente la magnetizzazione facendole assumere un valore  $-M_0$ . Avendo per costruzione sperimentale una bobina ricevente in grado di leggere variazioni di flusso del campo magnetico ad essa concatenato solamente nel piano  $xy$ , si fa seguire a questo impulso un impulso di  $\pi/2$  per ruotare la magnetizzazione nel piano  $xy$  stesso, dove viene rilevato il segnale

di FID (*Free Induction Decay*) che è il segnale elettrico rilevato dal rilassometro legato alla forza elettromotrice indotta nella bobina trasmittente/ricevente dovuta alla variazione di flusso del campo magnetico legata alla precessione di Larmor della magnetizzazione fuori equilibrio intorno alla direzione del campo  $B_0$ . Un parametro fondamentale della sequenza è l'intervallo di tempi  $\tau$  che intercorre tra l'impulso di  $\pi$  e quello di  $\pi/2$  durante il quale parte della magnetizzazione inizia a rilassare a causa dell'effetto del campo magnetico  $B_0$ . Scegliendo quindi tempi progressivamente crescenti tra i due impulsi sarà possibile vedere un segnale di FID che partirà da  $-M_0$  e che progressivamente crescerà fino a raggiungere, per  $\tau=5T_1$  del campione analizzato, il valore di equilibrio  $M_0$ . Inoltre per migliorare il rapporto segnale/rumore di ciascuna misura, per ogni  $\tau$  si possono fare acquisizioni multiple del segnale che vanno a sommarsi: l'intervallo di tempo tra queste acquisizioni deve avere nuovamente un valore pari a 5 volte il  $T_1$  del campione per non incorrere in effetti di saturazione del segnale. Nella sequenza IR la relazione di Bloch assume la forma:

$$M_z(\tau) = M_0(1 - 2\exp(-\frac{\tau}{T_1})) \quad (3.10)$$

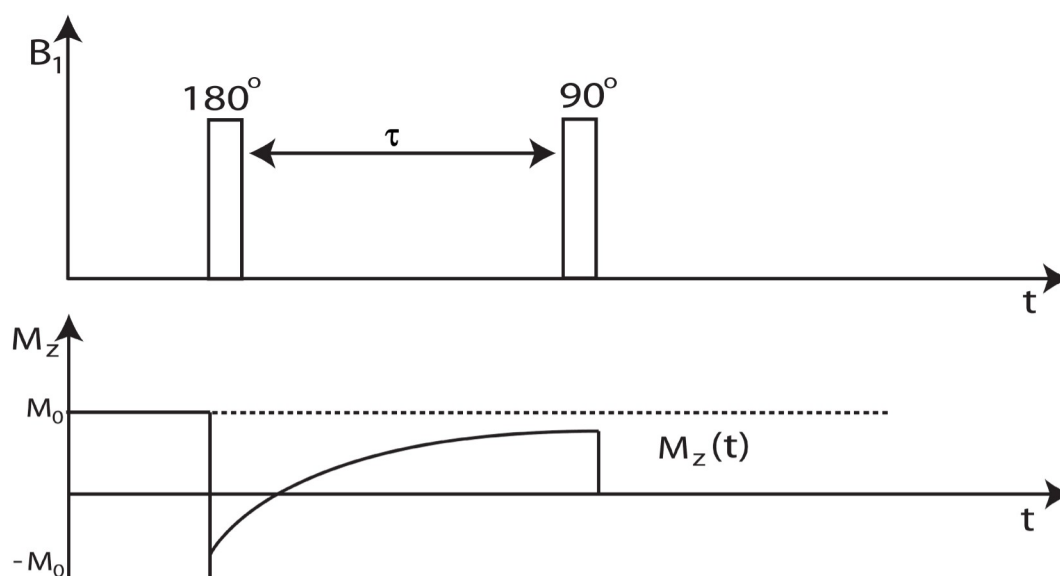


Figura 3.2: Schema della Sequenza di Inversion Recovery per la misura del tempo di rilassamento  $T_1$ .

Una sequenza alternativa a quella descritta consiste nella cosiddetta *Saturation Recovery* (SR) *sequence*. In questa sequenza si sostituisce semplicemente al primo impulso di  $\pi$  un impulso di  $\pi/2$ . In questo caso si va a monitorare solamente metà dell'intervallo di rilassamento rispetto al caso della sequenza IR,

infatti a tempi  $\tau$  brevi la magnetizzazione rilassata che, con il successivo impulso di  $\pi/2$ , viene nuovamente ruotata nel piano  $xy$ , sarà quasi nulla, mentre per tempi progressivamente più lunghi si avrà una componente sempre maggiore, arrivando, per  $\tau=5T_1$ , nuovamente al valore  $M_0$  di equilibrio. In questo caso la relazione di Bloch risulta essere:

$$M_z = M_0(1 - \exp(-\frac{\tau}{T_1})) \quad (3.11)$$

Un'ulteriore sequenza utilizzabile per l'analisi del  $T_1$ , la quale è poi stata utilizzata sui campioni biologici in questo lavoro di tesi, è data dalla *Aperiodic Pulse Saturation Recovery* (APSR), una versione modificata della precedente sequenza SR. In questa sequenza viene mandato un treno di  $N$  impulsi di saturazione  $\pi/2+(\pi/2)/N$  separati da intervalli di durata linearmente decrescente e seguiti da un intervallo variabile  $t_R$  prima dell'applicazione di un ulteriore impulso di  $\pi/2$  per l'acquisizione finale del segnale di FID (*Free Induction Decay*).

### 3.1.2 Rilassamento trasversale ( $T_2$ )

Il tempo di rilassamento  $T_2$  è quello che misura la velocità con cui le componenti trasversali (quelle nel piano perpendicolare alla direzione del campo magnetico statico  $\vec{B}_0$ ) si annullano. Il metodo più semplice di rilevazione del tempo di rilassamento trasversale consiste nel rivelare il tempo caratteristico di decadimento del segnale di FID ottenuto a seguito di un impulso di  $\pi/2$  che rovescia la magnetizzazione nucleare nel piano  $xy$ . Tuttavia, nella maggior parte dei casi, si riscontrano vari inconvenienti con l'utilizzo di questa sequenza, in quanto il tempo di decadimento del segnale può essere legato a fattori estrinseci dovuti alle disomogeneità del campo  $\vec{B}_0$ , che generano differenti campi locali ai diversi siti nucleari del sistema. Di conseguenza i momenti magnetici precedono con pulsazioni lievemente diverse ed accelerano lo sfasamento tra i gli spins dei vari nuclei comportando la misura di un tempo di rilassamento, definito come  $T_2^*$ , più veloce di quello reale posseduto dal campione.

Per ovviare a questa problematica, è necessario, come nel caso precedente relativo al rilassamento longitudinale, usare una sequenza impulsata chiamata *Spin Echo* (SE). Questa sequenza può essere schematizzata, in  $\sum_{ROT}$ , come segue (vedi Figura 3.3):

1. A seguito di un impulso di  $\pi/2$  lungo  $x'$  il vettore magnetizzazione  $M_0$  viene portato lungo  $y'$ .

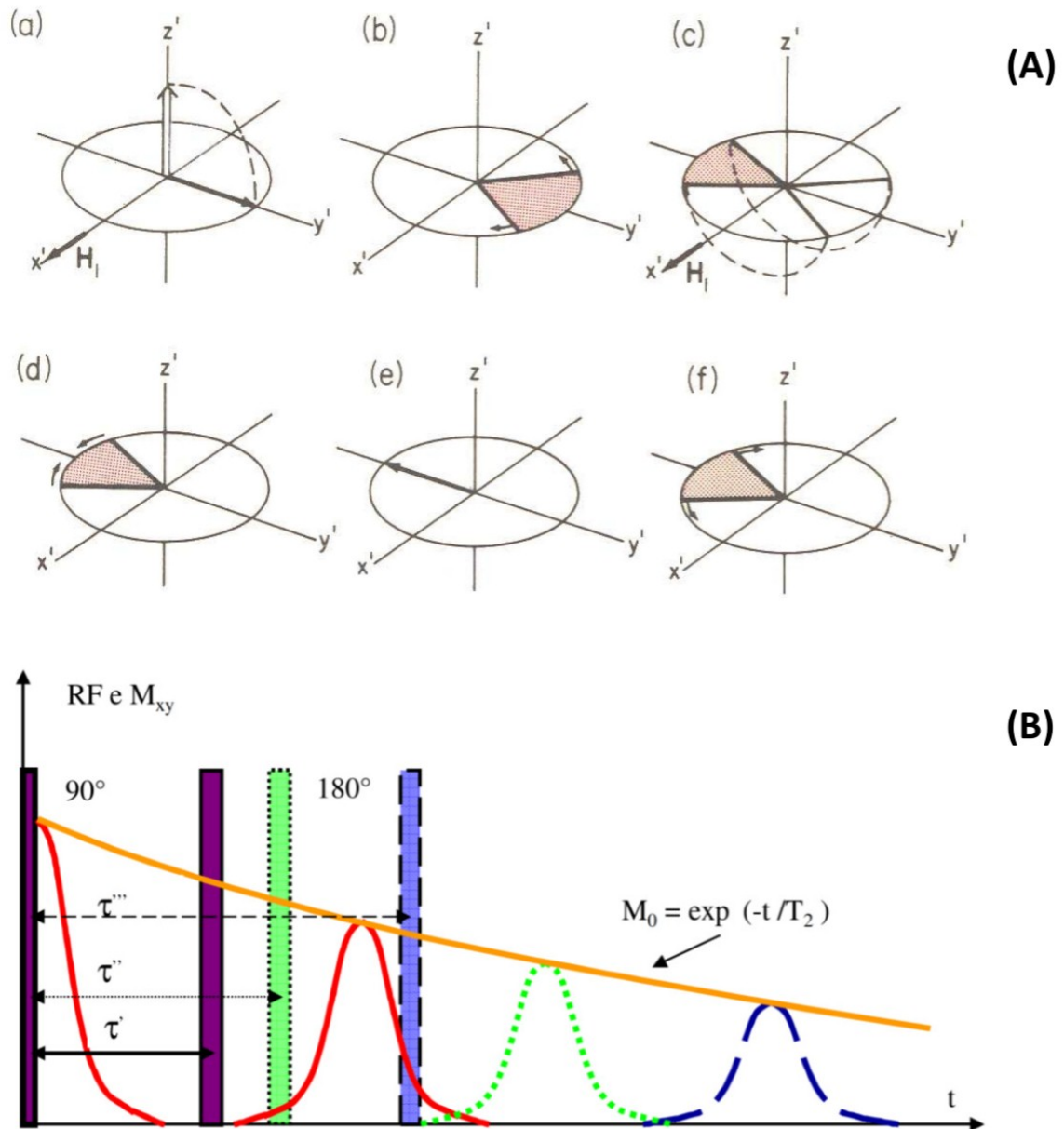


Figura 3.3: Rappresentazione vettoriale (A) e del segnale (B) di una sequenza Spin Echo per la misura del tempo di rilassamento  $T_2$ .



2. Dopo un tempo  $\tau$ , durante il quale i vari spins iniziano a sfasarsi per le disomogeneità di  $\vec{B}_0$ , si applica un nuovo impulso  $\pi$  sempre lungo  $x'$ , in modo che gli spins si ritrovino sempre nel piano  $x'y' \equiv xy$  ma dalla parte opposta rispetto a  $\vec{B}_1$  dove questi continuano a precedere ciascuno con la propria velocità angolare.
3. Dopo un ulteriore tempo  $\tau$ , in cui i momenti magnetici si rifocalizzano lungo  $y'$  ma nel verso negativo, avviene l'acquisizione del cosiddetto segnale di eco che ricostruisce il vettore magnetizzazione nucleare attenuato di un fattore legato al  $T_2$ , che tiene conto dei processi di decadimento irreversibili, generati ad esempio dall'interazione nucleare spin-spin.
4. Ripetendo la sequenza ed aumentando progressivamente il tempo  $\tau$  si ottiene un eco sempre di minore intensità, in quanto la componente trasversale della magnetizzazione rifocalizzata sarà sempre minore poiché decaduta per effetto del rilassamento trasversale stesso. Graficando l'altezza di ciascun eco in funzione del tempo  $2\tau$ , in cui avviene l'acquisizione del segnale, si ricava una serie di punti sperimentali che, interpolati, permetteranno di ottenere il valore reale di  $T_2$  del campione in esame.

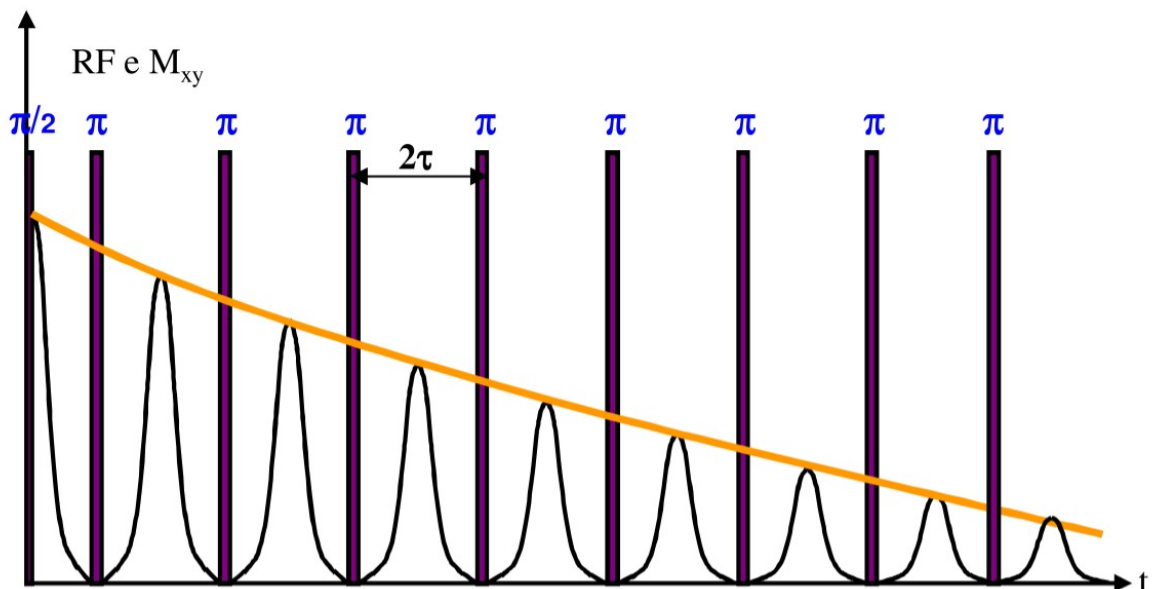


Figura 3.4: Schema della sequenza Carr-Purcell-Meiboom-Gill per la misura del tempo di rilassamento trasversale  $T_2$ .

La sequenza SE in realtà è adatta solamente per campioni solidi, in quanto nel caso di campioni liquidi si presenta un ulteriore problema legato alla diffusione

delle molecole del liquido che spostandosi all'interno in tempi paragonabili a quelli dell'esperimento NMR, sentono campi magnetici variabili e quindi contribuiscono nuovamente a falsificare la misura del tempo di rilassamento trasversale che, anche in questo caso, risulta inferiore rispetto al valore reale. Per ovviare agli effetti di diffusione viene utilizzata la sequenza Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG).

La sequenza CPMG vede la ripetizione per  $N$  volte dell'impulso di  $\pi$  che nella sequenza SE è fornito una sola volta  $\{\pi/2 - (\tau_x - \pi_y - \tau - \text{acquisizione Echo})_N - \text{TR}\}$ . In questo modo il valore di  $\tau$  rimane inalterato durante le acquisizioni e per questo è riducibile al meglio delle capacità sperimentali, andando così a minimizzare le disomogeneità di campo di cui risentirebbe la SE a causa degli effetti diffusivi che agiscono sulle molecole di un campione in fase liquida.

# Capitolo 4

## Materiali e Metodi

### 4.1 Preparazione dei campioni cellulari

Prima della suddivisione in campioni, le cellule sono state conservate in fiasche a confluenza (T25 propilene) in appositi incubatori ad atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> a 37° C. Il mantenimento e la proliferazione della coltura è avvenuta in terreno RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), con l'aggiunta di 10% di siero bovino fetale e 1% di L-glutamina. L'utilizzo di siero animale in colture fornisce un fattore eccellente per il mantenimento della coltura, in quanto fonte naturale di sostanze nutritive necessarie per il sostentamento e la proliferazione cellulare. In questo modo la vitalità delle cellule in coltura è ampiamente prolungata. In aggiunta, per la prevenzione da fattori esterni, sono stati uniti nel terreno anche 10% di piruvato di sodio ed antibiotici, in particolare 1% di penicillina e 1% di streptomina (nel seguito RPMI COMPLETO).

Per mantenere un pH fisiologico (7.0 - 7.4) si utilizzano sistemi tampone (ad esempio sodio o bicarbonate di potassio) che permettono di equilibrare gli idrogeni attraverso il controllo dell'ambiente all'interno dell'incubatore (temperatura e percentuale di CO<sub>2</sub>). Il pH può essere monitorato attraverso coloranti non tossici per la coltura, come, ad esempio, il rosso fenolo.

Le colture a nostra disposizione comprendevano quantità cellulari di circa 8 milioni per fiasca. Avendo con questa linea cellulare colture aderenti al substrato delle fiasche, per la creazione dei campioni, le cellule sono state staccate tramite l'enzima tripsina appena prima dell'indagine, per poi essere ri-sospese in terreno di coltura. Per l'indagine in microscopia da 2 ml di soluzione includente terreno di coltura, cellule e tripsina è stato ottenuto il numero di campioni (ciascuno con lo stesso numero di cellule) necessari per l'acquisizione temporale dei dati sperimentali. Per l'indagine in NMR l'intera soluzione è stata trasferita in una specifica provetta campione utilizzata dall'apparato in dotazione. Ciascuna campione è

stato centrifugato a 1200 rpm per 5 minuti, al fine di consentire la separazione del terreno dalla componente cellulare. In tal modo risulta possibile estrarre, al meglio delle capacità sperimentali, il supernatante, ottenendo un pellet stratificato con una percentuale minima ma non quantificabile di terreno residuo. Con tale procedura il terreno responsabile del mantenimento vitale delle cellule non è in quantità sufficiente per permettere la loro sopravvivenza, portando la popolazione ad una condizione di forte stress aggravata per l'assenza della CO<sub>2</sub> (sistema tampone). Al tempo indicato come nell'analisi T = 0 si assume che la popolazione si trovi in uno stato precedente all'inizio dello stress.

## 4.2 Campioni cellulari per la microscopia

Per quanto riguarda la valutazione microscopica, è necessario procedere alla diluizione del pellet secco all'interno di un liquido otticamente neutro e soprattutto non gravoso per la salute cellulare. A tal fine, ogni campione è stato preparato con l'aggiunta di 100  $\mu$ l di RPMI COMPLETO e successivamente mescolato per ridurre la fisiologica adesione delle cellule. Da quest'ultima soluzione solamente 50  $\mu$ l sono stati estratti e diluiti in proporzione 1:1 con il colorante trypan blue. La concentrazione di colorante da cui viene estratta la quantità da somministrare al campione è di 0.4% w/v. Al seguito della somministrazione del colorante, una volta che quest'ultimo è penetrato nelle membrane cellulari danneggiate delle cellule morte, è stata estratta la quantità standardizzata per la valutazione in camera di Burker (10  $\mu$ l) al fine di riempirla totalmente ed avere valori attendibili di conteggio. La sequenza precedentemente esposta è stata eseguita per la preparazione di ciascun campione.

Per il conteggio al microscopio si è scelto di utilizzare i quattro quadranti posti ai vertici della camera di Burker (inerenti la scala più grande). Questa scelta è stata attuata in sede sperimentale, notando valori di conteggio sufficienti per ogni campione. Come riportato nel *data sheet* dello strumento, si potrà stimare una concentrazione cellulare attraverso la relazione

$$\frac{N_{cell}^{\circ}}{ml} = \frac{\text{cellule conteggiate}}{4} * 10000 \quad (4.1)$$

dove 4 sono il numero di quadranti considerati (i vertici dell'emocitometro).

Per ciascuna serie di dati è stata effettuata una media dei conteggi inerenti i quattro quadranti in analisi. Potendo discriminare con facilità le cellule vive da quelle morte, i conteggi medi sono riferiti ai valori ottenuti da ciascun tipo

per ogni quadrante. Ogni conteggio medio è stato poi normalizzato per il valore totale di cellule presenti nella serie del campione.

Per la valutazione numerica si assume come valore ottimale per la stima della quantità totale di cellule della serie, quello ottenuto dalla somma di vive e morte ricavato a  $T=0$ . Questa valutazione è necessaria ed in seguito giustificata dai dati sperimentali, in quanto, al passare del tempo, si aggravano le problematiche di conteggio. Inizialmente, infatti, risulterà più facile il conteggio delle cellule morte poiché le vive tenderanno ad agglomerarsi al fine di prolungare la sopravvivenza del campione. Al contrario, al passare del tempo le cellule morte tenderanno a frammentarsi e deformarsi, mantenendo il legame con il colorante trypan blue. Questo comporta un aumento di probabilità nell'ottenere dati falsati sul loro numero, non potendo distinguere chiaramente la cellula ancora integra ma morta da un frammento o l'agglomerato di essi.

Nei casi più problematici, sono stati necessari conteggi differenti, al fine di ottenere il più veritiero dei valori. A scopo di chiarimento, viene proposto un esempio di conteggio effettuato su una frazione di un quadrante. Si prenda, quindi, in considerazione, a scopo illustrativo, la seguente immagine.

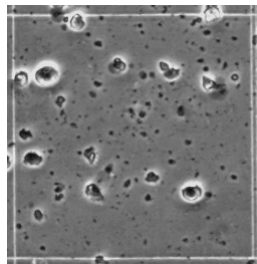


Figura 4.1: Frazione di quadrante della camera di Burker da analizzare.

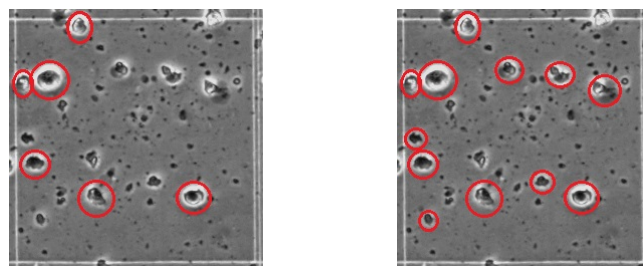


Figura 4.2: Confronto tra i metodi di conteggio applicati. Le cellule cerchiare sono quelle considerate nel conteggio. I frammenti non cerchiati non sono valutati nel conteggio.

La Figura 4.1 mostra chiaramente un campionamento cellulare con alta percentuale di cellule morte. Nell'immagine, infatti, non sono presenti componenti

della popolazione delle cellule vive. Per evidenziare i metodi di conteggio applicati in sede sperimentale, è necessario notare come alcune delle componenti cellulari più piccole siano indistinguibile dall'indagine microscopica condotta, dai possibili frammenti residui tipici della morte di precedenti cellule. Come già anticipato, per ottimizzare le misurazioni di conteggio, sono stati applicati due differenti metodi: il primo inerente il conteggio di cellule con grandezza comparabile con quelle iniziali, mentre il secondo prendendo in considerazione anche i frammenti "più ragionevoli". Nelle seguenti immagini vengono, quindi, messi a confronto i due metodi.

I due differenti metodi di conteggio, forniscono risultati ben differenti una volta applicati all'intero quadrante della camera di Burker. Andando a mediare i valori ricavati si avrà, tuttavia, una stima più accurata del dato ricercato.

# Capitolo 5

## Risultati degli esperimenti in microscopia

In sede sperimentale sono state eseguite tre serie di campionamenti al fine di avere una sufficiente statistica per l'analisi. Per praticità verranno presentati i tre esperimenti separatamente, riproponendosi di correlare tra loro i risultati e darne, quindi, comparazione nel termine del capitolo. Per semplicità verranno schematizzate le raccolte dati come:

	Concentrazione cellule ( $\frac{N^\circ}{ml}$ )	$N^\circ_{tot}$ cellule a T=0
Esperimento A	$(73 \pm 4)10^4$	$72.8 \pm 9.9$
Esperimento B	$(145 \pm 6)10^4$	$145 \pm 15$
Esperimento C	$(36 \pm 2)10^4$	$36 \pm 8$

dove vengono riportati, per comodità di consultazione, anche i relativi valori di concentrazione e conteggio totale, utilizzati nel seguito dell'elaborazione statistica.

Per quanto riguarda i primi due esperimenti, presentanti le più elevate quantità cellulari utilizzate, è stata necessaria l'applicazione di entrambi i metodi di conteggio. Ad elevate concentrazioni, infatti, è stata riscontrata una maggior difficoltà nella stima della popolazione delle cellule morte a causa della frammentazione (es. Figura 5.1). Nel seguito verrà riportata solamente la media normalizzata dei due conteggi. Per la stima degli errori, secondo la teoria statistica esposta in precedenza (paragrafo 2.3.1), ad ogni conteggio è stato associato come incertezza la radice quadrata del valore. Il valore conteggiato per le cellule totali, invece, è valutato come somma dei valori medi di vive e morte nei quattro quadranti con errore dato dalla somma delle incertezze di vive e morte.

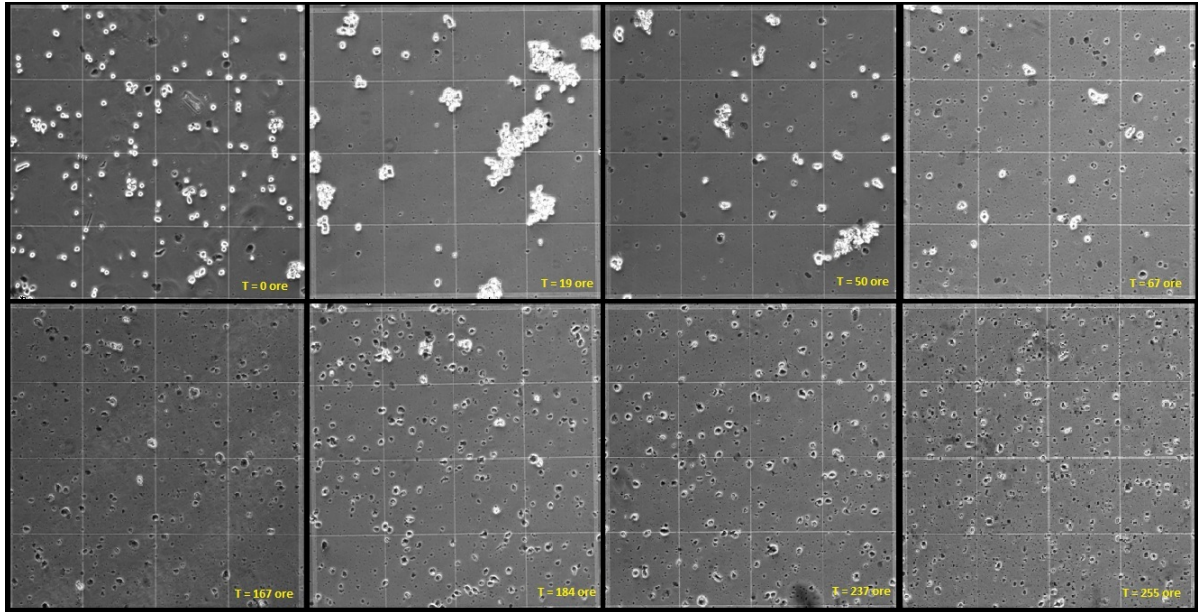


Figura 5.1: Sequenza temporale dei campionamenti relativi ad un solo quadrante della camera per uno degli esperimenti condotti. Risulta ben visibile la formazione di frammenti al seguito della morte con l'avanzare del tempo.

### Esperimento A

Per quanto riguarda i conteggi effettuati con la prima serie di campioni, viene proposto nella seguente tabella (Figura 5.1) il riassunto dei risultati ottenuti, mostrando i valori inerenti le due classi di cellule al variare del tempo. Si ricorda che i valori riportati sono stati dedotti da medie di conteggi dei quattro quadranti in analisi, ed in questo caso attraverso medie dei due metodi di conteggio. Inoltre tali valori, per poter essere comparati con quelli successivamente esposti, sono stati normalizzati rispetto al numero di cellule totali a  $T=0$  (ossia 72.8).

Con i dati in possesso è, quindi, possibile un'elaborazione grafica che permetta di verificare gli andamenti funzionali ipotizzati ed esposti nella Sezione ??.

Per l'interpolazione grafica è stato utilizzato il programma OriginPro, il quale permette un setting manuale della tipologia di funzione da utilizzare. In questo caso, avendo valori normalizzati, sono stati utilizzati rispettivamente

$$N_{\text{vive}} = e^{-\lambda t} \quad N_{\text{morte}} = 1 - e^{-\lambda t}$$

dove il coefficiente  $\lambda$  rappresenterà la costante di decadimento (reciproco del tempo di vita medio della popolazione).

Per una valutazione quantitativa più accurata del coefficiente di decadimento, è stato utilizzato il metodo statistico dei minimi quadrati, andando a ricondurre la funzionalità esponenziale ad una relazione lineare. In questo modo, applicando



Tempo (h)	Cellule vive	Cellule morte	Cellule totali
0	$0.97 \pm 0.12$	$0.03 \pm 0.02$	$1.00 \pm 0.13$
4	$0.58 \pm 0.09$	$0.04 \pm 0.02$	$0.63 \pm 0.11$
22	$0.36 \pm 0.07$	$0.024 \pm 0.018$	$0.38 \pm 0.09$
29	$0.29 \pm 0.06$	$0.06 \pm 0.03$	$0.35 \pm 0.09$
47	$0.7 \pm 0.1$	$0.05 \pm 0.03$	$0.73 \pm 0.12$
53	$0.31 \pm 0.06$	$0.08 \pm 0.03$	$0.4 \pm 0.1$
72	$0.25 \pm 0.06$	$0.27 \pm 0.06$	$0.52 \pm 0.12$
75	$0.39 \pm 0.07$	$0.36 \pm 0.07$	$0.75 \pm 0.14$
142	$0.017 \pm 0.015$	$0.37 \pm 0.07$	$0.38 \pm 0.09$
167	$0.022 \pm 0.018$	$0.47 \pm 0.08$	$0.5 \pm 0.1$
221	$0.005 \pm 0.008$	$0.37 \pm 0.07$	$0.37 \pm 0.08$
240	$0.003 \pm 0.007$	$0.80 \pm 0.11$	$0.81 \pm 0.11$
309	$0.009 \pm 0.011$	$0.59 \pm 0.09$	$0.6 \pm 0.1$
335	0	$0.45 \pm 0.08$	$0.5 \pm 0.08$

Tabella 5.1: Tabella riassuntiva dei conteggi relativi all'Esperimento A.

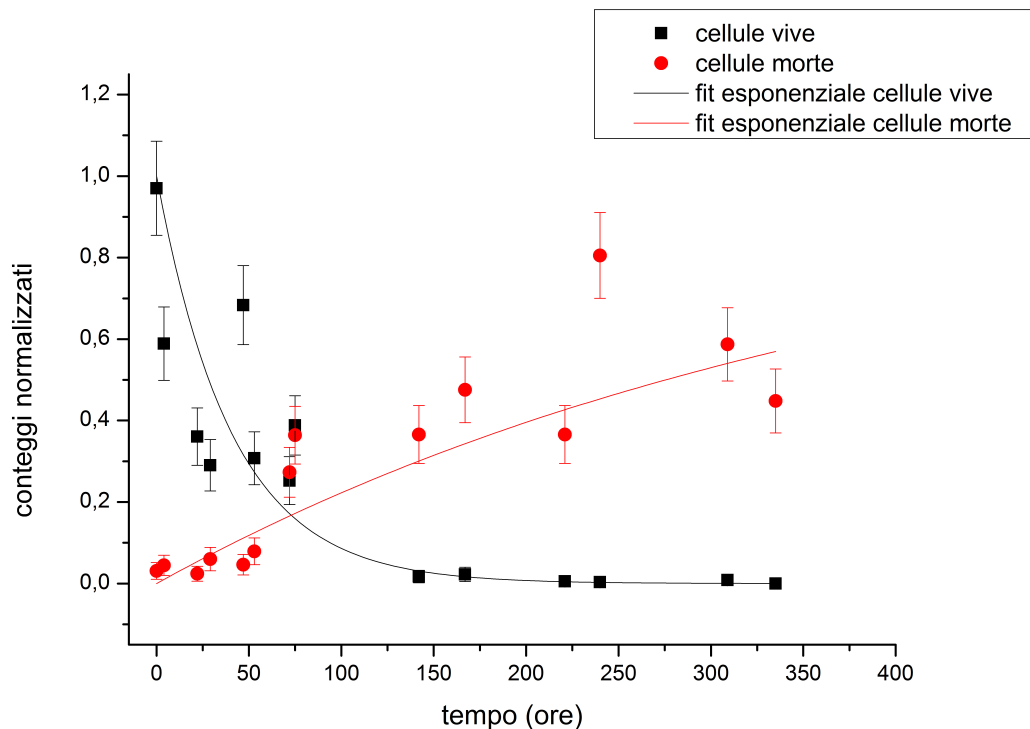


Figura 5.2: Andamento dei conteggi relativi alle cellule vive (nero) e morte (rosso) in funzione del tempo per l'Esperimento A.

le note relazioni matematiche, i coefficienti caratteristici della retta sono stati calcolati come

$$y = \ln\left(\frac{N_v}{N_0}\right) = -\lambda * t = -m * x \implies \lambda = 0.0147 \pm 0.0017 \quad (5.1)$$

dove la pendenza della retta individua la costante di decadimento.

### Esperimento B

Un'analoga analisi statistica è stata svolta anche per il secondo esperimento, andando a normalizzare i valori ottenuti secondo la rispettiva quantità totale di cellule a T=0 (ossia 145). Avendo una concentrazione cellulare più elevata, le relative "problematiche" di conteggio sono risultate senz'altro aggravate, rendendo indispensabile l'utilizzo di entrambi i metodi di conteggio. A seguito viene proposta la Tabella 5.2 inerente i valori ottenuti.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Cellule vive</b>	<b>Cellule morte</b>	<b>Cellule totali</b>
0	0.90 ± 0.08	0.10 ± 0.03	1.00 ± 0.10
19	0.37 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.51 ± 0.08
24	0.32 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.48 ± 0.08
43	0.18 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.31 ± 0.07
50	0.26 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.44 ± 0.08
67	0.21 ± 0.04	0.28 ± 0.04	0.48 ± 0.08
73	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.68 ± 0.10
97	0.06 ± 0.02	0.35 ± 0.05	0.40 ± 0.07
167	0.043 ± 0.017	0.52 ± 0.06	0.56 ± 0.08
184	0.06 ± 0.02	0.75 ± 0.07	0.81 ± 0.09
213	0.015 ± 0.010	0.64 ± 0.07	0.65 ± 0.08
237	0.012 ± 0.009	0.69 ± 0.07	0.70 ± 0.08
255	0.003 ± 0.005	0.49 ± 0.06	0.50 ± 0.06

Tabella 5.2: Tabella riassuntiva dei conteggi relativi all'Esperimento B.

Come per l'esperimento A, viene proposta l'analisi grafica e funzionale degli andamenti temporali delle cellule vive e morte (Figura 4.6).

Da questi, come in precedenza, è possibile ricavare l'andamento di regressione lineare con relativi parametri caratteristici, attraverso il metodo dei minimi

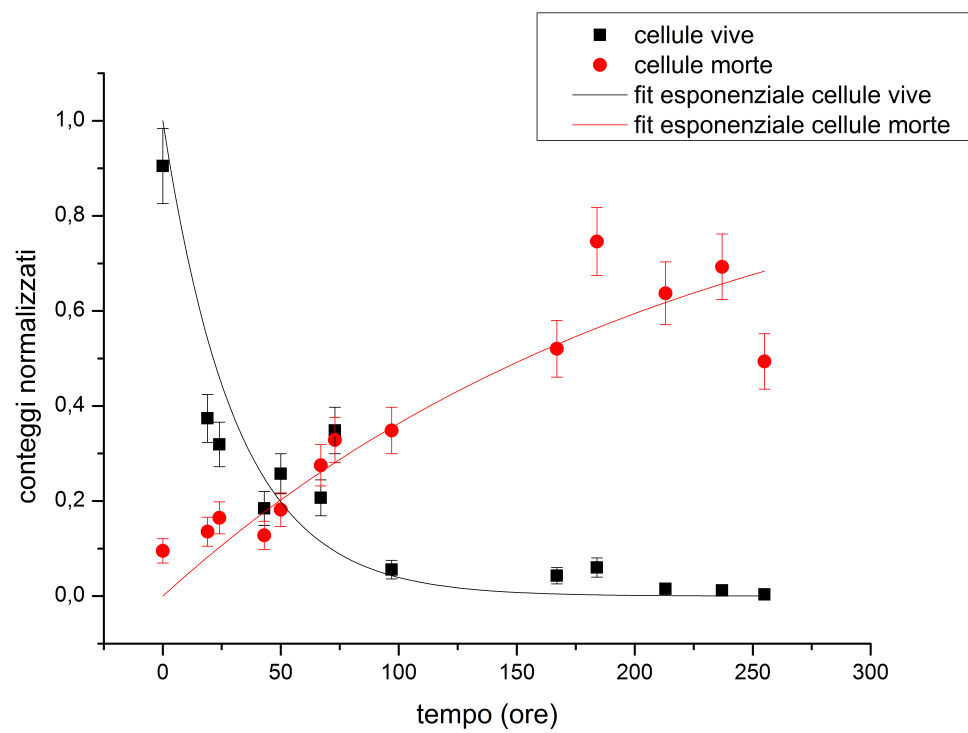


Figura 5.3: Andamento dei conteggi relativi alle cellule vive (nero) e morte (rosso) in funzione del tempo per l'Esperimento B.

quadrati.

$$y = \ln\left(\frac{N_v}{N_0}\right) = -\lambda * t = -m * x \implies \lambda = 0.0166 \pm 0.0011 \quad (5.2)$$

come in precedenza si focalizza l'attenzione sul valore del coefficiente angolare della retta.

### Esperimento C

Per quest'ultima serie di dati, vista la bassa concentrazione di cellule per campione, non è stato necessario andare a considerare i frammenti più piccoli valutati dal secondo metodo di conteggio. Avendo meno cellule per campione, infatti, quest'ultime hanno prodotto una quantità di frammenti inferiore ai casi precedentemente analizzati. A seguito viene proposta la Tabella 5.3 con i dati relativi.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Cellule vive</b>	<b>Cellule morte</b>	<b>Cellule totali</b>
0	0.91 ± 0.15	0.09 ± 0.05	1.0 ± 0.2
31	0.65 ± 0.13	0.05 ± 0.04	0.70 ± 0.17
48	0.69 ± 0.14	0.04 ± 0.03	0.73 ± 0.17
70	0.31 ± 0.09	0.17 ± 0.07	0.47 ± 0.16
148	0.12 ± 0.06	0.34 ± 0.10	0.46 ± 0.15
166	0.06 ± 0.04	0.38 ± 0.10	0.43 ± 0.14
220	0	0.82 ± 0.15	0.82 ± 0.15
241	0.007 ± 0.014	0.81 ± 0.15	0.82 ± 0.16
338	0	0.78 ± 0.15	0.78 ± 0.15
362	0	0.63 ± 0.13	0.63 ± 0.13
383	0	0.62 ± 0.13	0.62 ± 0.13

Tabella 5.3: Tabella riassuntiva dei conteggi relativi all'Esperimento C.

Come per le precedenti elaborazioni, viene proposto al seguito il grafico relativo agli andamenti delle due classi cellulari nel tempo (Figura 5.4).

Attraverso l'utilizzo del metodo dei minimi quadrati, i termini caratteristici della relazione lineare risultano

$$y = \ln\left(\frac{N_v}{N_0}\right) = -\lambda * t = -m * x \implies \lambda = 0.015 \pm 0.003 \quad (5.3)$$

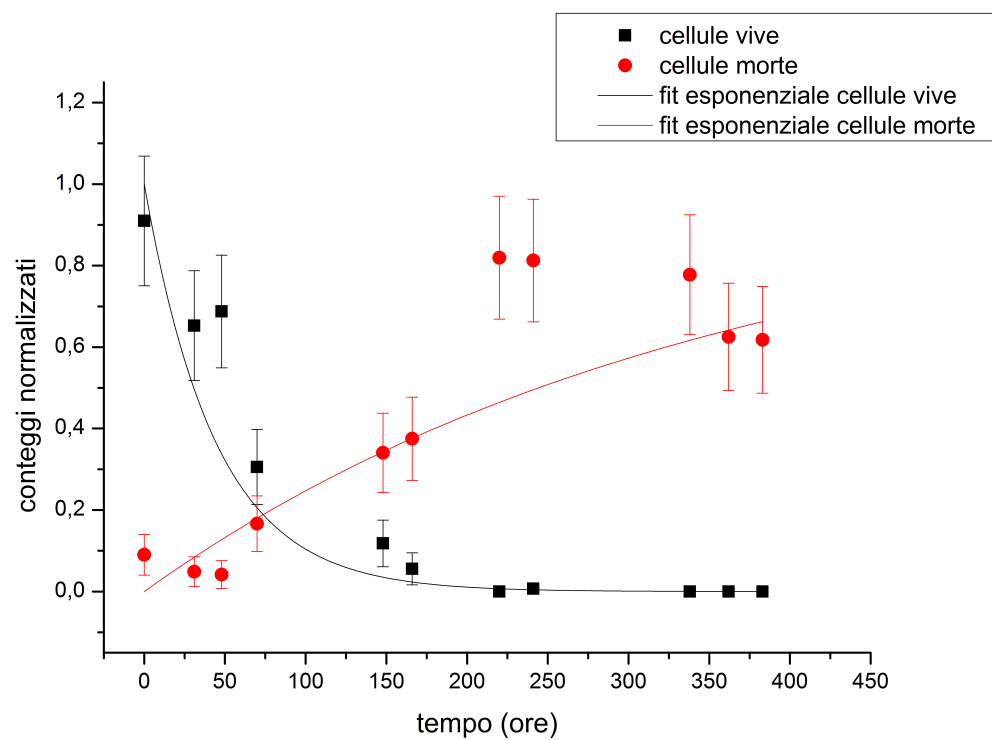


Figura 5.4: Andamento dei conteggi relativi alle cellule vive (nero) e morte (rosso) in funzione del tempo per l'Esperimento C.

## 5.1 Confronto tra i risultati in microscopia

Al termine dell'elaborazione statistica dei dati di conteggio ricavati, è possibile effettuare una comparazione tra i vari risultati, sia a livello analitico che grafico. L'andamento funzionale esponenziale ipotizzato nella Sezione ?? (per quanto concerne la sopravvivenza cellulare) può dirsi senz'altro soddisfatto dai dati in possesso. L'interpolazione attraverso le relazioni funzionali esposte è risultata riproducibile in tutte e tre gli esperimenti in modo analogo. Il tutto è reso consistente da un punto di vista analitico, attraverso la metodologia applicata con la relazione lineare e la statistica dei minimi quadrati. I coefficienti caratteristici delle rette ritrovate soddisfano, infatti, appieno le ipotesi sperimentali permettendo la descrizione del fenomeno come un classico decadimento esponenziale. In questo senso viene, di conseguenza, avvalorata l'interpretazione di tempo di vita medio della popolazione.

Per un'ulteriore conferma grafica degli andamenti riscontrati, vengono riassunte in Figura 5.5 le tre relazioni funzionali relative agli esperimenti effettuati.

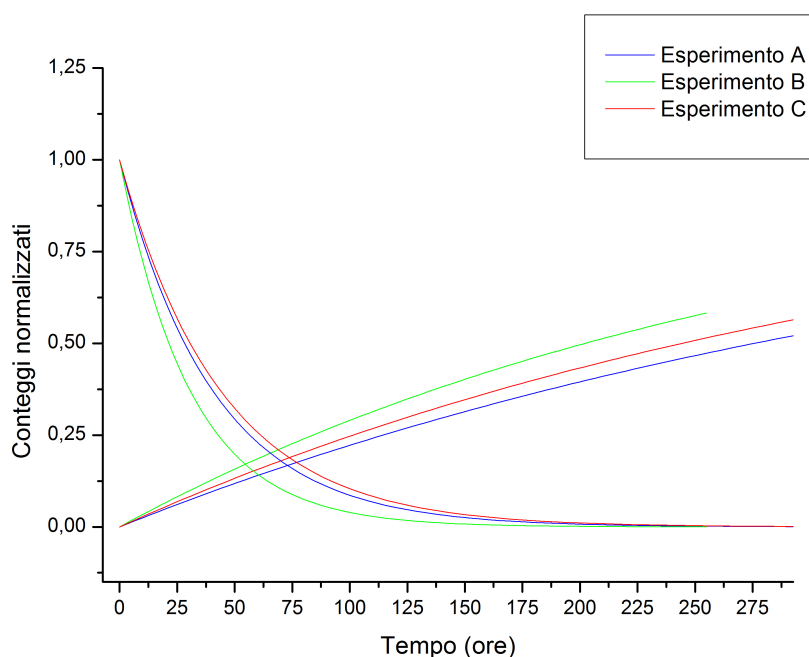


Figura 5.5: Comparazione tra i tre decadimenti esponenziali relativi agli esperimenti A, B e C.

Dalla comparazione dei valori relativi alle costanti di decadimento, ottenute dal modello per la descrizione della popolazione nel tempo applicato al conteggio delle cellule vive attraverso il metodo dei minimi quadrati, è evidente come i valori ricavati (risultati 5.1, 5.2, 5.3) siano in perfetto accordo tra loro entro gli errori

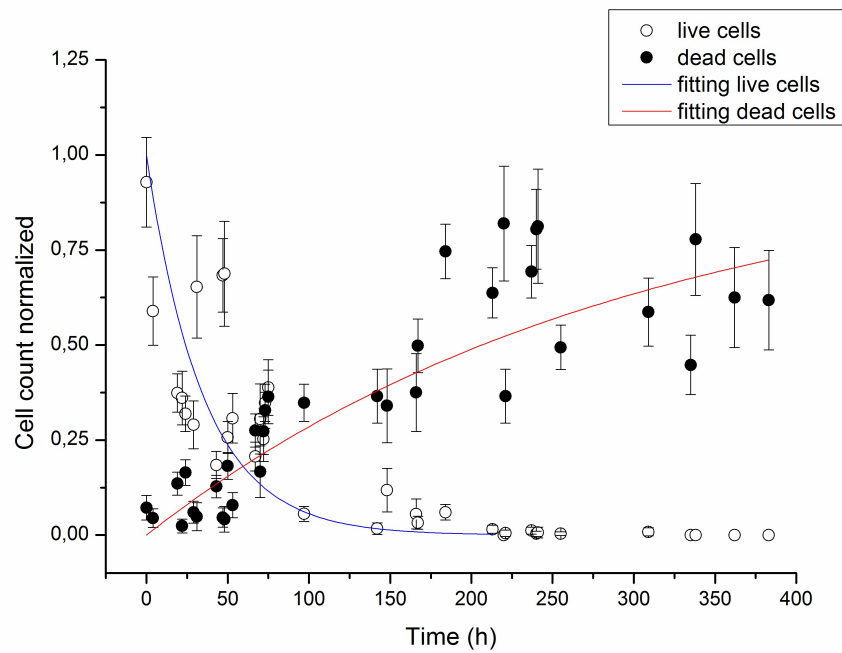


Figura 5.6: Andamento relativo all'unione di tutti gli esperimenti di studio (A, B e C) in un unico grafico. Si mette in evidenza il punto d'intersezione tra le due interpolazioni, corrispondente all'istante temporale in cui il numero di cellule vive diventa inferiore a quello delle morte.

sperimentali. Da tale risultato è possibile stimare in buona approssimazione la costante di vita media della popolazione cellulare, relativa al particolare tipo di stress a cui è stata sottoposta. Dall'immediato calcolo, se ne ricava un valore pari a

$$\tau = 64.795 \pm 0.002 \text{ (ore)} \quad (5.4)$$

Questo valore rappresenterà a livello grafico il punto d'intersezione tra gli andamenti della popolazione viva e morta nella Figura 5.6. Il dato mostra l'inversione tra le due popolazioni in esame, fornendo il momento temporale dopo il quale la quantità di cellule morte inizia a sovrastare il numero delle cellule ancora in vita. Questo risultato appare di preponderante interesse per il nostro studio, in quanto rappresenta il parametro fondamentale per il confronto con i risultati esposti dal metodo NMR.

Dalla Figura 5.5 si nota come i dati relativi agli esperimenti A e C forniscano relazioni funzionali quanto mai simili, con un discostamento dato dal solo esperimento B. Si ricorda al proposito che tale raccolta dati è relativa alla casistica di più alta concentrazione cellulare utilizzata, la quale, per conseguenza, comporta le più elevate difficoltà al conteggio.

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile stabilire che il conteggio effettuato attraverso il nostro metodo permette una buona stima del numero di cellule vive. Pur non utilizzando algoritmi di calcolo predisposti, il conteggio visivo della popolazione sopravvissuta allo stress, risulta, infatti, effettuabile in buona stima ad ogni intervallo temporale, potendo sempre discriminare gli elementi della popolazione in base alle caratteristiche morfologiche (colore e integrità di membrana) delle cellule.

Altrettanto non può, tuttavia, dirsi per la componente di mortalità: la frammentazione degli elementi della popolazione, infatti, non è valutabile attraverso un semplice metodo visivo della camera di Burker. La morte per frammentazione comporta così l'introduzione di una fonte di errore non trascurabile e sistematica, incidente sui vari conteggi effettuati e di conseguenza sulla descrizione funzionale del modello proposto (Sezione ??). Per una valutazione corretta, infatti, occorrerebbe affiancare le procedure di conteggio a metodi software più avanzati che tengano in considerazione i frammenti cellulari residui, i quali andrebbero sommati ai conteggi manuali. Per ottenere una stima approssimata della carenza del nostro metodo di conteggio, è stata effettuata un'analisi sulla concentrazione cellulare totale, una volta dedotta (attraverso il medesimo metodo dei minimi quadrati) la costante di decadimento relativa all'andamento funzionale della po-



	Costante di decadimento
Esperimento A	$(0.0023 \pm 0.0003)$
Esperimento B	$(0.0033 \pm 0.0003)$
Esperimento C	$(0.0022 \pm 0.0007)$

Tabella 5.4: Costanti di decadimento ottenute dal modello per la descrizione della popolazione nel tempo applicato al conteggio delle cellule morte attraverso il metodo dei minimi quadrati.

polazione morta. Le costanti ricavate dai tre esperimenti sono anch'esse, come verificato per le vive, approssimativamente comparabili entro gli errori:

Come si nota dalla Tabella 5.4, i valori riscontrati risultano differenti per un ordine di grandezza da quelli relativi al modello per la descrizione della popolazione nel tempo applicato al conteggio delle cellule vive.

Dall'analisi così effettuata si ottiene una convalida del metodo di conteggio effettuato, poiché l'interpolazione dei dati ottenuti dai conteggi di popolazioni a diverse concentrazioni iniziali è riproducibile e consistente nei tre esperimenti condotti. Risulta chiaro, tuttavia, come questo modello non sia in grado di descrivere effettivamente le cellule morte dei nostri campioni.

Di conseguenza il conteggio inerente la quantità totale delle cellule non ri-proporrà mai nel corso del tempo il valore stimato al tempo  $T=0$ , nel quale la componente di mortalità è pressoché assente. Tutto ciò avvalorava ancor più l'ipotesi effettuata inizialmente sulla valutazione del numero necessario per la normalizzazione dei campioni, considerando come maggiormente attendibile quello del primo conteggio.

Per quanto riguarda gli andamenti temporali della concentrazione cellulare totale, le fluttuazioni statistiche presentate dai dati in nostro possesso, non hanno permesso uno studio quantitativo accurato. La concentrazione totale dei campioni, fattore proposto come costante da ipotesi di lavoro iniziali, presenta, per l'appunto, ampie variazioni statistiche al variare del tempo. La valutazione della costanza lineare attraverso l'interpolazione dei punti sperimentali non ha, quindi, significato attendibile in sede conclusiva.

Procedendo a graficare la somma delle due relazioni esponenziali utilizzate per la precedente interpolazione, attraverso i valori delle costanti di decadimento individuate per le due popolazioni (vive e morte), è evidente come il mantenimento di un numero totale di conteggi cellulari nel tempo non sia ottenibile, vista la diversità dei termini calcolati con il metodo dei minimi quadrati. La differenza dall'andamento costante sarà dovuta alla presenza dei frammenti non conteggiati attraverso il metodo di conteggio visivo. In Figura ?? viene proposto lo studio

effettuato.

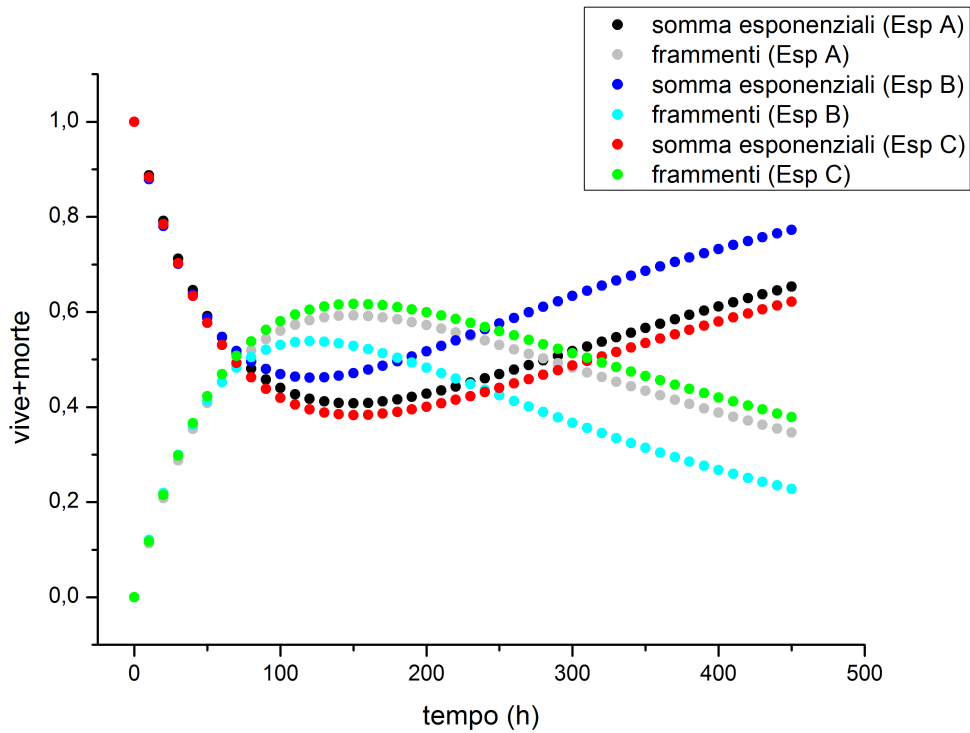


Figura 5.7: Andamento dei conteggi totali attraverso il modello esponenziale (curve nera, blu e rossa) e dei frammenti non considerati (curve grigia, azzurra e verde) in funzione del tempo.

La buona sovrapposizione delle curve mostra ancora una volta la validità del modello applicato per la descrizione delle cellule vive. Il discostarsi degli andamenti tra loro, sia in termini di somma di esponenziali che frammenti, è ritrovato al seguito delle 60 ore, ovvero dove risulta preponderante il conteggio delle cellule morte.

# Capitolo 6

## Risultati esperimento in NMR

### 6.1 Apparato strumentale NMR

I dati per lo studio NMR sono stati raccolti utilizzando l'apparecchiatura del gruppo MRPM della Prof. P. Fantazzini presso il Dipartimento di Fisica e Astronomia dell'Università di Bologna. La strumentazione consta di un elettromagnete C60 H-L Jeol in grado di generare un campo  $0 < B_0 < 1.5$  T statico al variare della corrente nelle sue bobine. Nel nostro caso si è utilizzato un campo  $B_0 \sim 0.473$  T a cui corrisponde una frequenza di Larmor  $\omega_0 \sim 20.15$  MHz per i nuclei  $^1H$  investigati ( $\gamma \sim 42.576$  MHz/T per i nuclei  $^1H$ , in seguito denominati anche "protoni").

I tempi di rilassamento nucleare longitudinale  $T_1$  sono stati misurati attraverso la sequenza *Aperiodic Pulse Saturation Recovery* (APSR) caratterizzata da un treno di dieci impulsi di saturazione  $\pi/2 + (\pi/2)/10$  e da un intervallo variabile  $\tau$  compreso tra i 5ms e i 12s. Per la ricostruzione della curva di rilassamento longitudinale sono stati utilizzati 64 valori di  $\tau$ .

Le curve di rilassamento trasversale, per la determinazione dei tempi  $T_2$ , sono state acquisite attraverso la sequenza *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG). Nel nostro caso si è scelto  $\tau = 100\mu s$ , ed è stata effettuata una raccolta totale di 32768 echi (raccolti quindi con un intervallo tra echi consecutivi di  $200\mu s$ ) al fine di coprire l'intero intervallo di rilassamento delle componenti trasversali della magnetizzazione nucleare.

I dati raccolti sono stati quindi analizzati con l'algoritmo di inversione UPEN (*Uniform PENalty*), implementato nel software UpenWin, che, attraverso la Trasformata di Laplace Inversa permette di ottenere una distribuzione quasi continua dei tempi rilassamento del campione ed i loro relativi pesi a partire dalle curve multiesponenziali di rilassamento.

Lo studio ha riguardato l'analisi di tre tipologie di campione:

1. Terreno di coltura (nel seguito TC)
2. Cellule T98G + terreno di coltura (nel seguito CELLULE)
3. Omogenato cellulare, ottenuto per forte centrifugazione (nel seguito OMOGENATO)

La scelta di utilizzare anche un omogenato cellulare come campione di prova, consente la convalida dei risultati ottenibili dai restanti campioni. Perdendo la compartimentazione cellulare, attraverso la rottura delle membrane, ci si aspetta di ottenere risultati simili a quelli inerenti la prima tipologia di campione, con differenze minime dovute a possibili cellule sopravvissute alla centrifugazione.

## 6.2 Risultati sperimentali

Ogni campione è stata analizzato più volte nel tempo per entrambe le tipologie di rilassamento, al fine di testare la ripetibilità delle misure. Ciascuna curva di rilassamento è stata analizzata con l'uso del software UpenWin per ottenere le corrispondenti curve di distribuzione dei tempi di rilassamento. Queste ultime mostrano sull'asse delle ordinate la densità di segnale in unità arbitrarie che è un numero proporzionale al numero di nuclei che posseggono il corrispondente tempo di rilassamento espresso sull'asse delle ascisse. Ne consegue che l'area sottesa alle curve di distribuzione dei tempi di rilassamento corrisponde alla percentuale delle diverse famiglie di idrogeni presenti in ciascuno dei campioni investigati.

Non avendo svolto in prima persona la sperimentazione e l'elaborazione dati, verranno presentati nel seguito solamente i risultati più significativi ed attinenti alla correlazione con i risultati in microscopia.

Le misure NMR principali sono state effettuate misurando i tempi di rilassamento trasversale  $T_2$  confrontando i risultati ottenuti per i tre campioni sopra citati ed in seguito concentrandosi sul comportamento del campione di CELLULE nel tempo, in un intervallo di tempo di 200 ore. In Figura 6.1 sono messi a confronto le curve di rilassamento trasversale dei tre campioni (inserto) e le loro corrispondenti curve di distribuzione dei tempi di rilassamento dopo l'analisi con UpenWin.

Come si può notare chiaramente dall'andamento pressochè monomodale della curva di rilassamento di TC, questo campione risulta caratterizzato da un'unica famiglia di protoni (l'area sottesa alla curva di distribuzione è proporzionale al numero di protoni di ciascuna famiglia) che presenta una distribuzione di tempi di rilassamento centrati attorno al valor di picco  $T_2=2.3s$  che è paragonabile ai tempi di rilassamento dei nuclei di Idrogeno dell'acqua libera (nel seguito  $^1H$

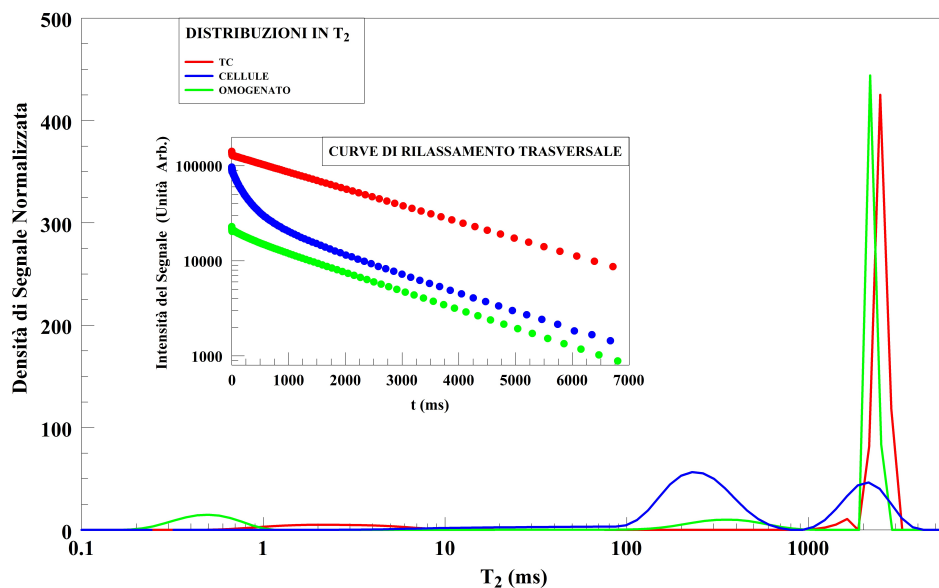


Figura 6.1: Curve di distribuzione del tempo di rilassamento  $T_2$  del segnale NMR degli  $^1H$  dei tre campioni analizzati a partire dalle curve di rilassamento mostrate nell'insero: TC (curva rossa), CELLULE (curva blu), OMOGENATO (curva verde).

LIBERI). Le altre componenti presenti nella curva di distribuzione, ma con basso peso all'interno del campione, rispecchiano le diverse sostanze presenti nel TC (RPMI COMPLETO).

L'andamento multiesponenziale della curva di rilassamento del campione CELLULE mostra la presenza di un sistema molto più complesso rispetto a TC. La presenza delle cellule nel campione viene evidenziata, nella curva di distribuzione dei tempi di rilassamento, dalla presenza di una nuova famiglia di protoni che presentano una distribuzione di tempi di rilassamento centrata attorno a  $T \sim 250$  ms. Nel caso del campione CELLULE quindi abbiamo due famiglie di  $^1H$ : la prima è quella dei protoni liberi del campione TC la cui percentuale relativa è però diminuita in seguito alla presenza delle cellule nelle quali il terreno di coltura è entrato ed ha abbassato i suoi tempi di rilassamento, in quanto confinato in strutture di dimensioni finite (effetto di superficie) a causa delle quali è limitata la mobilità dei protoni (nel seguito  $^1H$  CONFINATI).

A conferma dell'ipotesi interpretativa della compartimentazione, si nota come il comportamento dell'omogenato, nel quale la maggior parte delle cellule sono rotte, ripropone un aumento della quantità degli  $^1H$  LIBERI.

Il campione CELLULE in particolate è stato seguito nel tempo per circa 400 ore facendo ripetute misure CPMG nel tempo e la Figura 6.2 mostra le principali curve di distribuzione del campione. Quello che ne emerge è un progressivo spostamento dei tempi di rilassamento della famiglia di  $^1H$  LIBERI verso i tempi

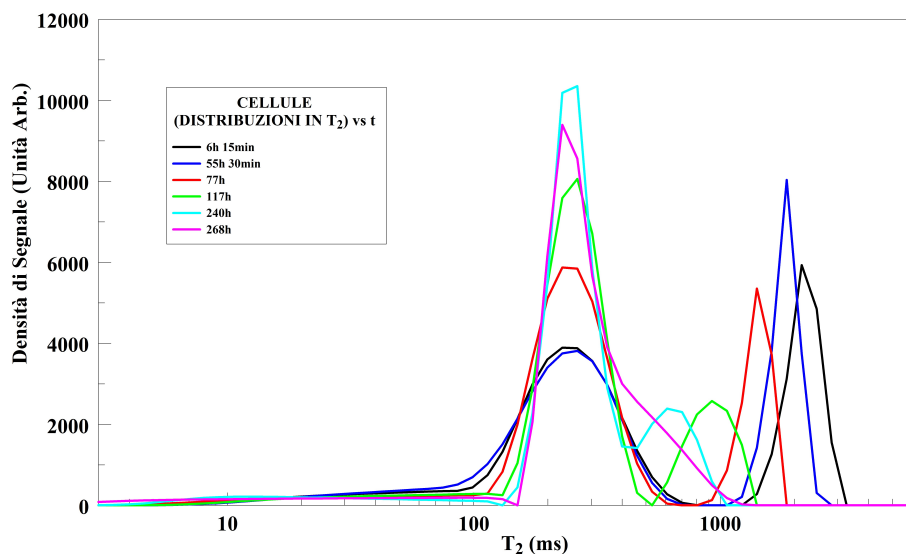


Figura 6.2: Principali curve di distribuzione in  $T_2$  del segnale NMR degli  $^1H$  del campione CELLULE misurate a vari tempi.

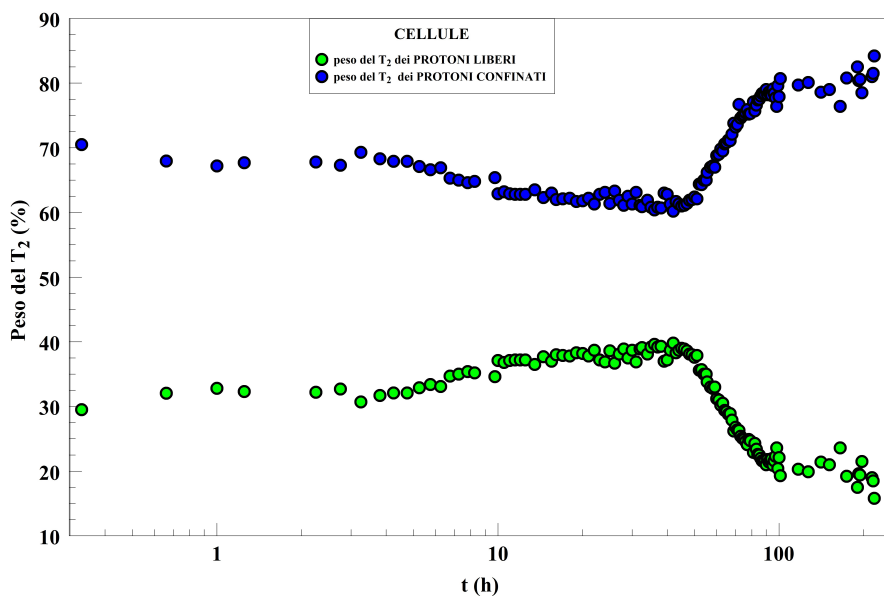


Figura 6.3: Peso relativo percentuale estratto dalle curve di distribuzione in  $T_2$  degli  $^1H$  CONFINATI (cerchi blu) e degli  $^1H$  LIBERI (cerchi verdi).

degli  $^1H$  CONFINATI. A questo effetto si aggiunge anche, a partire dalla cinquantesima ora una progressiva diminuzione del peso della componente a vantaggio della seconda. Per una visualizzazione più chiara del fenomeno è stato analizzato il processo anche in termini di peso percentuale delle due componenti principali del rilassamento in  $T_2$  appena citate e visualizzato in Fig. 6.3.

Dal grafico risulta che l'andamento delle percentuali relative alle due famiglie di protoni principali nel tempo è il seguente: nell'arco delle prime 40 ore (circa), la quantità di  $^1H$  LIBERI risulta monotona crescente anche se con lieve pendenza (situazione corrispondente alla fuoriuscita di acqua dalle cellule). Al raggiungimento della cinquantesima ora, la percentuale di  $^1H$  CONFINATI inizia a crescere. Questo processo continua fino al raggiungimento di un plateau di equilibrio finale alla centesima ora che resta invariato fino al termine dell'osservazione del campione.





# Capitolo 7

## Discussione

Secondo l'interpretazione redatta dal team MRPM che ha svolto l'esperimento in NMR, la componente cellulare subisce un drastico cambiamento in termini di compartimentazione degli  $^1H$  nell'intervallo temporale tra le 50-60 ore. Dallo studio attraverso le misure di microscopia possiamo concludere e confermare che, effettivamente, la componente cellulare subisca un cambiamento in termini di popolazione in tale intervallo temporale, dopo il quale la quantità di cellule morte inizia a prevalere sul numero di cellule vive. A conferma di ciò, il valore ritrovato per la costante di vita media della popolazione cellulare viva risulta in perfetto accordo con le misure rilassometriche.

Nonostante la conferma di un cambiamento nelle popolazioni del campione cellulare, una sua visualizzazione effettiva al microscopio consente una revisione riguardo all'ipotesi sulla compartimentazione degli  $^1H$ . L'analisi dei segnali in NMR prevede, infatti, un andamento monotono decrescente degli idrogeni intracellulari per le prime 50-60 ore, sintomo di una condizione progressiva di stress da parte delle cellule tra le quali inizia a crescere la popolazione morta. Una volta raggiunto un punto di minimo nelle 60 ore, la monotonia degli  $^1H$  intracellulari cambia drasticamente di segno, trovando una condizione di progressivo aumento fino al raggiungimento di un plateau al seguito delle 100 ore.

In un primo momento l'interpretazione del fenomeno prevedeva un rigonfiamento delle cellule morte, il cui segnale di rilassamento sarebbe stato dominante rispetto a quello delle vive (a conferma del cambiamento in monotonia). Attraverso l'analisi in microscopia possiamo escludere questa ipotesi, avendo riscontrato, al contrario, una progressiva frammentazione nel tempo degli elementi della popolazione morta.

A seguito dello studio effettuato, è quindi necessaria la valutazione di una differente interpretazione, la quale dovrà tener conto delle osservazioni effettuate. A tal fine è ipotizzabile la formazione di strutture micellari e liposomiali per

giustificare l'aumento in compartimentazione degli  $^1H$  intracellulari.

Le strutture denominate micelle e liposomi sono vescicole costituite da filamenti lipidici, che si distinguono per presenza o meno di soluzione al loro interno, dovuto alla composizione della loro membrana, a singolo o doppio strato. Come nelle cellule, lo strato fosfolipidico doppio è in grado di racchiudere al suo interno frazioni di liquido, dando vita ad un liposoma. Al contrario, con la presenza di un singolo filamento, non si ha materiale all'interno, generando la struttura di una micella.

La scoperta e la conseguente formulazione di un modello per la loro descrizione, si deve al chimico G.S. Hartley nel 1935, il quale interpretò queste strutture come aggregati simil-sferici, contenenti dai 50 ai 200 monomeri, orientati in modo ordinato secondo la propensione idrofila/idrocarburica. Successivamente modificato da Menger (1979), anche il modello micellare presenta capacità di immagazzinamento di soluzione acquosa. Per questa ragione, tra l'altro, c'è un crescente interesse in questi sistemi biologici legato alla possibilità di utilizzo come trasportatori di molecole farmacologiche dentro alle cellule.

È noto che con la presenza di fosfolipidi in soluzione, le molecole del liquido manifestano una riorganizzazione con conseguente incremento di energia libera. Al fine di minimizzare il costo energetico, le strutture fosfolipidiche presentano una naturale propensione all'ordinamento con conseguente costruzione di strutture chiuse.

# Capitolo 8

## Conclusioni

In conclusione, la nostra serie di esperimenti ha permesso di definire un modello interpretativo per l'effetto di stress esterni letali su colture cellulari, con l'osservazione di un andamento approssimativamente esponenziale decrescente per il numero di cellule vive in funzione del tempo.

Il metodo di conteggio delle cellule vive è risultato valido, essendo risultato riproducibile in tre differenti esperimenti, con condizioni identiche ma differenti concentrazioni cellulari iniziali.

Al contrario, il conteggio manuale non è risultato affidabile per la valutazione del numero di cellule morte, mostrando una sottostima sistematica significativa, giustificabile dal fatto che le cellule morte tendono a frammentarsi e quindi a non essere più rilevabili dal conteggio.

La descrizione del numero di cellule vive in funzione del tempo attraverso un modello di decadimento esponenziale ha permesso di ricavare una costante di decadimento comparabile entro gli errori per i tre esperimenti. Lo stesso modello applicato sul numero di cellule morte ha, invece, portato ad un risultato differente da quanto atteso dalle ipotesi.

La riproducibilità dei risultati consente comunque di ritenere il metodo di conteggio scelto come valido anche per ulteriori sperimentazioni, qualora si considerino solo cellule intatte.

Per comprendere il comportamento globale delle cellule intatte e frammentate in funzione del tempo (vive e morte insieme) sono stati implementati algoritmi di conteggio basati sull'istogramma di intensità delle immagini di microscopia acquisite. L'elaborazione dei dati di microscopia con questo metodo non è stato argomento della presente tesi, ma simulazioni numeriche hanno già fornito buoni risultati, che mostrano come il numero totale di pixel relativi alle cellule vive e morte sia approssimativamente conservato nel tempo, e che quindi la sottostima delle morte è effettivamente legata all'impossibilità di contare i frammenti troppo

piccoli.

L'associazione qualitativa tra il conteggio di cellule vive nelle prime 60 ore di registrazione e la risposta in termini di compartimentazione degli  $^1H$ , suggerisce di considerare la misura NMR come effettivamente sensibile alla vitalità cellulare.

L'ipotesi che la compartimentazione intracellulare degli  $^1H$  dopo le 60 ore sia legata al rigonfiamento cellulare è invece stata smentita. L'analisi delle immagini microscopiche ha infatti evidenziato una frammentazione delle cellule al seguito della morte. Per l'interpretazione dell'aumento di compartimentalizzazione osservata con la misura NMR si ipotizza invece la formazione di strutture micellari e liposomiali, in grado di confinare gli idrogeni dell'acqua analogamente alle cellule vive. La frammentazione delle cellule morte comporta, infatti, una disgregazione delle membrane cellulari ed una fuoriuscita delle componenti interne. Data la formazione di filamenti di membrana fosfolipidica nel terreno presente nella preparazione dei campioni, si ipotizza che quest'ultimi si siano richiusi su se stessi formando nuovi comparti.

A causa delle loro ridotte dimensioni, l'indagine in microscopia non permette l'osservazione di queste strutture, pertanto questa ipotesi per spiegare l'incremento della misura NMR rimane al momento solo una ipotesi speculativa, da verificare con ulteriori studi.

# Ringraziamenti

Finalmente dopo tanto lavoro, sono felice di essere arrivato al momento dei ringraziamenti. Rivolgerli alle sole persone che hanno contribuito a questo lavoro di tesi lo ritengo sbagliato, in quanto se sono giunto a questo punto è anche grazie al supporto di numerosissime persone esterne.

Sicuramente a proposito del lavoro di tesi non posso che ringraziare il Prof. D. Remondini che, oltre ad avermi offerto una sperimentazione nel settore di mio interesse, si è sempre reso disponibile per le mie innumerevoli domande e mi ha permesso di scorgere, anche se per poco, quale possa essere l'attività di ricerca a cui ambisco in un prossimo futuro. Un ringraziamento particolare è rivolto anche al Dott. M. Mariani, il quale, purtroppo, ho conosciuto solamente negli ultimi giorni di lavoro ma che è stato di grande aiuto e disponibilità.

Grazie al Prof. F. Bersani, che oltre alla passione per la fisica mi ha trasmesso anche quella per il volontariato in Africa. Probabilmente è anche merito suo (o colpa, a seconda dei punti di vista) se sono arrivato a questo traguardo. Per cui... asante sana bwana.

Grazie a tutti i miei compagni di corso che mi hanno sopportato in questi anni e con i quali ho vissuto sia i momenti belli che il terrore pre-esami.

Grazie soprattutto a Silvia, la nostra rinomatissima spacciatrice di appunti, e a Giango (o *Giangle Bell*, a seconda dei casi), i quali mi sono stati vicini come amici prima che come compagni di studio, sia dentro che fuori dall'università. Sono davvero felice di aver incontrato persone come voi.

Grazie ai miei coinquilini. Grazie a Pietro, che nonostante il mio brutto carattere, non solo mi ha sopportato per tre lunghi anni, ma c'è sempre stato nei momenti difficili e di sconforto dandomi la forza necessaria per stringere i denti ed andare avanti. Grazie a Boccio, che pur conoscendolo da meno tempo degli altri si è subito rivelato un amico ed una bellissima persona.

Grazie alle Frontine. Senza di loro davvero non ce l'avrei mai fatta! Grazie alla Sissi (o *Zu* anche qui a seconda delle preferenze) che è sempre stata una certezza ed una vera amica su cui poter contare. Grazie alla Fedi (UVDDMV), che nonostante le incomprensioni, le litigate e i pianti, è sempre riuscita a farmi sorridere: anche quando il mondo mi sembrava davvero grigio è sempre riuscita a

farmi scorgere un raggio di sole. Grazie alla Luci, che mi ha permesso di conoscere il dopo-scuola del Granello di Senape, facendomi capire che studiare fisica può aiutare anche i più piccoli. Grazie anche alla Panunz, che ogni tanto mi ha fatto staccare il muso dai libri per farmi smuovere un po'.

Grazie ai vecchi amici di Cattolica, che ormai ho perso di vista ma su cui so di poter sempre contare. In particolare Ghigo e Mary, sempre presenti nei rari momenti trascorsi a casa a Cattolica.

Grazie anche ai tanti che mi hanno sempre ostacolato e non hanno creduto in me, in quanto mi hanno dato la possibilità di mettere alla prova la mia forza di volontà. Laureandomi con questa tesi finalmente ve lo posso dire: alla faccia vostra!

Infine il mio ringraziamento più grande va alla mia mamma ed al mio papà. Coloro che mi hanno sempre capito e sostenuto. Coloro mi hanno sempre dato forza e amore. Coloro che mi hanno indicato una via quando mi sentivo perso. Coloro che mi hanno sempre detto di essere orgogliosi di me anche quando io non ne vedevo nessun motivo. Coloro che mi hanno permesso di arrivare a questo punto della mia carriera di studi. Coloro che ci sono sempre stati e sempre ci saranno. Per quanto sia assolutamente riduttivo: GRAZIE.

# Bibliografia

- [1] Campbell Reece Taylor Simon, *Immagini della biologia*, Zanichelli, (2008)
- [2] POF ELSEVIER, *Cell Injury, Cell Death, and Adaptation*
- [3] Giulio Cantara, *Appunti di Biologia: la cellula*
- [4] Claudio Santi, *Esperimenti NMR*
- [5] Mauro Tonellato, *Introduzione alla spettroscopia NMR*
- [6] Joseph P.Hornak, *The Basics of MRI*
- [7] John R.Taylor, *Introduzione all'analisi degli errori*, Zanichelli, (2010)
- [8] Michael W. Davidson, *Introduction to microscope objectives*.  
[www.microscopyu.com/articles/optics/objectiveintro](http://www.microscopyu.com/articles/optics/objectiveintro), Nikon
- [9] Michael W. Davidson, *Microscope objective specifications*.  
[www.microscopyu.com/articles/optics/objectivespecs](http://www.microscopyu.com/articles/optics/objectivespecs), Nikon
- [10] Michael W. Davidson Stanley Schwartz Douglas B. Murphy Ron, *Introduction to phase contrast microscopy*.  
[www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy](http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy), Nikon
- [11] Michael W. Davidson Stanley A. Schwartz Joel S. Silies Edward G. Lieser, *Nikon perfect focus system*.  
[www.microscopyu.com/articles/livecellimaing/perfectfocus](http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaing/perfectfocus), Nikon
- [12] C. Sala, *Microscopia dinamica in fluorescenza dei radicali liberi in cellule trattate con radiazioni ionizzanti*, Tesi di Laurea in Fisica (Università di Bologna)