

**Richiesta per implementazione sistema microscopio confocale spettrale ad alta risoluzione con tecnologia Airyscan**

Il Dipartimento intende realizzare il progetto PREMIA (PREcision Medicine Approach: bringing biomarker research to clinic) "Dipartimento di Eccellenza" per sostenere lo sviluppo delle competenze e delle infrastrutture che sono trasversali e sinergiche alla ricerca sui biomarcatori e alla medicina personalizzata. L'Azione Trasversale di sviluppo inclusa nell'area AT2 prevede lo sviluppo di una core facility per la ricerca di laboratorio da me diretta.

Nel 2009 il dipartimento grazie ai fondi di Ateneo per le grandi attrezzature ha acquistato un microscopio confocale spettrale Zeiss LSM710.

Nel corso degli anni tale strumento è stato utilizzato da molti gruppi afferenti al nostro dipartimento e anche da gruppi esterni grazie a collaborazioni scientifiche interdipartimentali.

Da un'analisi dello "stato di salute" dello strumento eseguita durante l'ultima manutenzione sono emersi alcuni problemi che già alcuni utilizzatori avevano ravvisato e segnalato.

Nello specifico:

- la linea laser per la lunghezza d'onda 488, che già aveva ridotto la sua efficienza del 70% si è rotta e deve essere sostituita per permettere il funzionamento dello strumento che al momento non è utilizzabile
- la necessità di sostituire il modulo che regola la termostatazione e la regolazione della CO<sub>2</sub> durante gli esperimenti in vivo.
- un'instabilità dell'unità software per l'acquisizione e la successiva analisi delle immagini che richiede l'aggiornamento del programma e al sostituzione del PC di controllo.

Attraverso una valutazione dei progetti attualmente in corso e le esigenze di molti gruppi è emersa la sicura utilità di un upgrade del sistema con tecnologie di acquisizione più avanzate rispetto a quelle che lo strumento è in grado di fornire.

Le implementazioni proposte consentirebbero al dipartimento di avere al suo interno delle strumentazioni di ultima generazione garantendo un avanzamento tecnologico nel campo dell'imaging e una migliore competitività nella realizzazione di svariati progetti di ricerca che si basano sull'utilizzo di queste metodiche.

In particolare l'implementazione del sistema che qui si propone si basa su una nuova tecnologia di rilevamento confocale, denominata **AiryScan**, che offre sia la maggiore sensibilità sul mercato che le caratteristiche proprie della super risoluzione.

Infatti l'implementazione del sistema che si richiede si basa su una nuova tecnologia di rilevamento confocale, denominata AiryScan, che consente una risoluzione quasi doppia rispetto alla normale microscopia confocale, abbattendo quindi la barriera del limite di risoluzione di Abbe (200 nm) consentendo un'acquisizione con una risoluzione 1.7x più elevata nelle tre dimensioni x, y, z rispetto ai canonici sistemi in commercio.

Il costo complessivo dell'implementazione del sistema e della manutenzione ordinaria ad esso connessa comprenderebbe:

- sostituzione del laser 488 non più funzionante con uno più potente per la gestione delle esigenze della nuova testa di scansione aggiuntiva
- sostituzione del modulo che regola la termostatazione e la regolazione della CO<sub>2</sub> durante gli esperimenti in vivo.
- sostituzione del PC di controllo del software a installazione dell'ultima versione completamente aggiornata dello stesso
- aggiunta della testa di scansione AiryScan

#### Valenza scientifica dell'acquisizione

Nella microscopia ottica a fluorescenza un posto irrinunciabile è senza dubbio riservato alla microscopia confocale, con la quale è possibile marcare una particolare struttura (quali cromosomi, strutture mitotiche, mitocondri, filamenti di actina e tubulina, proteine di specifico interesse, ecc.) ed ottenere un'immagine tridimensionale della cellula o di un tessuto e delle sue strutture interne senza danneggiare il campione stesso

Negli ultimi anni si è potuto assistere ad un impressionante impiego della microscopia confocale mirata a determinare una relazione struttura-attività sia in cellule fissate che in cellule vive, utile a comprendere i meccanismi molecolari responsabili del complesso funzionamento cellulare, sia in condizioni normali che trattate. Poiché la cellula è organizzata in comparti cellulari la cui dimensione è dell'ordine di nanometri, e poiché i livelli di segnale nei campioni biologici può essere molto basso, è nata l'esigenza di uno strumento che garantisse un'elevata risoluzione, sensibilità e velocità. Queste caratteristiche verrebbero soddisfatte con l'implementazione del sistema confocale a rivelazione spettrale già presente presso il nostro dipartimento

con il sistema di acquisizione AIRYSCAN (Carl Zeiss S.p.A) la quale è in grado di garantire risoluzione, sensibilità e velocità lineari non riscontrate negli altri sistemi attualmente sul mercato.

L'acquisizione del sistema confocale Airyscan porterà dei sicuri vantaggi a tutte le linee di ricerca che attualmente basano una parte dei propri studi sull'utilizzo dell'imaging poiché esso si posiziona al vertice della strumentazione confocale attualmente in commercio, sia in termini di sensibilità, risoluzione, e precisione meccanica. Lo strumento non solo è perfettamente compatibile con la dotazione già in nostro possesso ma è l'ultimo nato anche rispetto alle macchine concorrenti e presenta, grazie all'elevata tecnologia impiegata, una semplicità d'uso inimmaginabile per un sistema di questo livello. Nell'attuale panorama scientifico, dove la rapida evoluzione della tecnica si riversa sul progresso della scienza stessa, in un circolo virtuoso, diviene fondamentale poter accedere il prima possibile alle nuove tecnologie.

La sensibilità Airyscan, lavorando in parallelo, è superiore a quelle disponibili, con diretto vantaggio per il campione in termini di foto-danneggiamento ed artefatti. In particolare consente di applicare potenze laser fino a 10 volte inferiori rispetto alla tradizionale microscopia confocale, a diretto vantaggio di campioni sensibili e soprattutto per l'imaging cellulare dal vivo. (2,3)

La risoluzione è quasi doppia rispetto alla normale microscopia confocale, abbattendo quindi la barriera del limite di risoluzione di Abbe (200 nm) permettendo di apprezzare meglio le co-localizzazioni ed i dettagli fini, altrimenti molto più difficilmente interpretabili se non utilizzando complicate tecniche di super-risoluzione alternative. In particolare l'utilizzo dell'Airyscan consente un'acquisizione con una risoluzione 1.7x più elevata nelle tre dimensioni x, y, z (3,4,5). Un aspetto particolarmente importante, soprattutto nello studio di campioni biologici, è che l'aumento della risoluzione non avviene né a scapito della sensibilità, né della foto-tossicità (6,7) in cellule vive, come avviene per altri sistemi confocali in commercio. Con la tecnologia **Airyscan** possono essere utilizzati gli stessi coloranti e le stesse tecniche che normalmente vengono utilizzate per la microscopia a fluorescenza e confocale standard, non sono necessari complicati passaggi di colorazione e non ci sono limitazioni aggiuntive.

Tutte le implementazioni al sistema sopradescritte porterebbero un enorme vantaggio alla già vasta gamma di progetti attualmente in corso che basano parte dei loro esperimenti su tecniche di microscopia, ma permetterebbero anche nuovi approcci metodologici consentendo da un lato l'aumento dei potenziali utilizzatori del sistema e dall'altro una maggiore competitività a livello di richieste di finanziamento facendo valere il peso di strumentazioni nuove e innovative a favore di una migliore e più incisiva produzione scientifica.

Monza, 28 Maggio 2018

Prof Brambilla Paolo  
