

# MICROSCOPIA ÎN CERCETARE ȘI DIAGNOSTIC

## Tipuri de microscopie utilizate în activitățile de cercetare și diagnostic în Laboratorul de Patologie Ultrastructurală

Laura Cristina Ceafalan, Mihaela Gherghiceanu

### Microscopie optica

- Camp luminos
- Contrast de faza
- De fluorescență
  - o Epifluorescență
  - o Microscopie confocală
  - o Microscopie de superrezoluție

### Microscopie electronica

- Microscopie electronica de transmisie
- Microscopie electronica de baleiaj
- Electrono-tomografie
- Crio-electronmicroscopie

## MICROSCOPIA OPTICA

Tehnicile de microscopie optică pot fi împărțite în două categorii: microscopia în câmp luminos și de fluorescență.

### Microscopia în câmp luminos

Deoarece majoritatea celulelor sunt subțiri și transparente, ele nu absorb multă lumină și astfel sunt greu de văzut fără colorare, Prin colorare se crește contrastul dintre componentele celulare/tisulare. Culoarea unui colorant derivă din faptul că acesta absoarbe toate lungimile de undă, cu excepția celei care îi dă culoarea. Aceasta va străbate preparatul și va ajunge la ochiul observatorului.

În microscopia cu câmp luminos, sursa de lumină și obiectivul sunt plasate pe părțile opuse ale probei, iar proba este înregistrată prin efectul său asupra lumii care trece prin ea deoarece eșantionul absoarbe, împrășteie sau deflectă lumina.

### Microscopia în contrast de fază

Preparatele necolorate, chiar vii și nefixate, pot fi analizate în microscopie optica prin montarea unei piese în condensor care generează o diferență de  $\frac{1}{2}$  din lungimea de undă între lumina difractată de structurile din preparat și lumina care trece nedeviată prin acesta, ceea ce permite vizualizarea schimbării de fază a luminii induse de celule. Cele mai utilizate tehnici sunt microscopia în contrast de fază, care face ca detaliile din imagine să apară întunecate pe un fundal mai luminos și microscopia în contrast de interferență diferențială (DIC), care generează un aspect pseudo-tridimensional (3D).

## MICROSCOPIA DE FLUORESCENȚĂ

Se folosește pentru examinarea celulelor vii sau fixate, prin recunoașterea specifică a anumitor epitopi din componența acestora cu ajutorul anticorpilor cuplați cu molecule fluorescente numite fluorocromi/fluorofori.

Fluorocromii absorb lumină de o anumită lungime de undă provenită, de regulă, de la un laser sau un filtru care lasă să treacă doar o anumită lungime de undă și emit apoi lumină la o lungime de undă superioară

Principiu de construcție al microscopului de fluorescență presupune existența următoarelor componente atașate microscopului optic:

- **Sursa luminii de excitați:**

- **Lampa de mercur** nu generează radiație cu intensitate constantă între spectrul ultraviolet și infraroșu, prezentând vârfuri de emisie la 313, 334, 366, 405, 436, 546 și 578nm, deci mai mult spre zona radiațiilor ultraviolete.
- **Lampa xenon** are o emisie continuă de la 350 la 700nm.

- **Casete filtru, mai multe în funcție de spectrul de emisie al fluoroforilor utilizați:**

- **Filtrul de excitație** este cel care selectează radiația de excitație cu o anumită lungime de undă (de obicei radiație ultravioletă sau din zona albastru/verde a spectrului vizibil)
- **Oglinda dicroică** reflectă radiația de excitație, cu o lungime de undă inferioară și o dirijează prin obiectiv spre probă permițând însă accesul radiației emise, care are o lungime de undă superioară, care va fi colectată de către același obiectiv,.
- **Filtrul de emisie** permite accesul radiației emise într-un interval limitat, care variază în funcție de spectrul pe care dorim să îl selectăm pe un anumit canal.

- **Obturator** plasat între sursă și filtrul de excitație care permite blocarea iluminării probei în pauzele de examinare.

## **MICROSCOPIE CONFOCALĂ**

O limitare majoră a microscopiei de epifluorescență convențională este aceea că lumina excită fluoroforii în întreaga probă și camera de detecție nu poate distinge această lumină care nu se concentrează de lumina emisă de planul focal al eșantionului. Prin urmare, structurile pe care încercăm să le detectăm sunt ascunse de imaginile neclare ale regiunilor din afara planului focal. Pentru probele care nu sunt prea groase, această lumină care nu se concentrează nu este o problemă majoră. Cu toate acestea, pentru eșantioanele groase, sau în cazul în care dorim să realizăm imagini 3D cu rezoluție superioară, această lumină neconcentrată poate ascunde informații valoroase. Au fost dezvoltate numeroase tehnici pentru a elimina această lumină care nu se concentrează. Cel mai frecvent utilizat este microscopia confocală, în care proba este iluminată de un fascicul laser focalizat la un singur punct din planul focal al eșantionului. **Laserele** emit radiație monocromă de foarte mare intensitate, liniile de excitație fiind foarte bine separate.

Lumina din acest punct este detectată după trecerea printr-un orificiu, astfel încât numai lumina emisă de planul focal să o treacă prin apertură și să fie înregistrată pe detector. O tehnică înrudită este microscopia cu două fotoni care este utilizat în principal pentru analiza specimenelor foarte groase (> 200 μm).

## **Microscopia de superrezoluție**

Această variantă permite o rezoluție dincolo de cea a microscopiei optice convenționale care poate ajunge până la 20 nm în XY și 50 nm în Z, deși acestea necesită adesea tehnici speciale de preparare a probelor, microscopie speciale sau fluorofori speciali și e mai dificil de utilizat în cazul celulelor vii.

## MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

### Principii de funcționare și tipuri de microscopie electronice

În cazul microscopului electronic în locul radiației luminoase fotonice este folosit un fascicul de electroni. Electronii sunt generați de un filament din wolfram sau molibden (o sursă de electroni) și apoi supuși unei puternice accelerări, generată de un ansamblu de piese supuse unei înalte diferențe de potențial (tensiune de accelerare de ordinul zecilor sau sutelor de KV) într-o încălțăminte numită „tun” electronic. Generat astfel și apoi concentrat, fasciculul de electroni traversează preparatul. Imaginea finală se formează prin trecerea succesivă a electronilor prin câmpuri electromagnetice sau electrostatice care îi dispersează sau îi focalizează în funcție de ordinul de mărire dorit. Aceste câmpuri electrice se comportă ca niște lentile, similare cu cele de cristal utilizate la microscopul optic clasic. Imaginea finală este proiectată de obicei pe un ecran fluorescent, sau pe plan-film, sau este preluată de o camera digitală (CCD, CMOS).

În funcție de scopul urmărit într-un studiu electrono-microscopic al probelor biologice există mai multe tipuri de microscopie electronice: de transmisie (TEM), de baleiaj/scanare (SEM), de baleiaj și transmisie (STEM).

O altă clasificare a microscopelor electronice se face pe baza temperaturii la care sunt analizate probele: la temperatura camerei sau la temperaturi criogenice (crio-electrono-microscopie).

### Electrono-tomografia

Metodele tradiționale oferă doar vizualizarea unor secțiuni foarte subțiri, și obținerea unor imagini bidimensionale (2D). Microscopul electronic înregistrează de obicei proiecția unei imagini, ceea ce înseamnă că aceste imagini conțin informații din toată grosimea probei prin care trece fasciculul. Prin urmare, fiecare imagine 2D conține informații din adâncimea, toate adunate pe un singur plan. Tomografie electronică (ET) oferă o modalitate de analiză 3D, la rezoluțiile care ar putea ajunge la 50Å, suficient de mare pentru a identifica macromolecule individuale.

Microscopia electronică este încă o metodă de diagnostic de elecție în:

- **patologia renală non-tumorală glomerulară** - pentru a pune în evidență prezența și localizarea depozitelor formate de imunoglobuline și complement din glomerulonefritele imune sau defectele structurale de cauză genetică. Microscopia electronică aduce informații complementare celor obținute prin imunofluorescență și microscopie optică sau imunohistochimie.
- **boli genetice** cum ar fi:
  - bolile lizozomale cu acumulări anormale generate de deficiențe enzimatică (peste 50 de entități distincte; Iancu 1992; Fernandez 2005; Goebel 2013),
  - bolile mitocondriale (se descriu câteva sute de defecte genetice care stau la baza patologiei mitocondriale; Kyriacou 2006; Meyers 2013),
  - boli neuromusculare (Fernandez 2005; Dickersin 2000)
  - boli ciliare (Stirling 2013)
- **patologie tumorală** (Eyden B 2014) atunci când celulele implicate sunt puțin diferențiate iar examenul imunohistochimic nu este destul de sensibil,
- **patologie virală** - pune în evidență particulele virale la nivel celular și extracelular (Goldsmith și Miller 2009), metodă esențială de identificare primară a virusurilor noi apărute (Goldsmith et al. 2013).

Mihaela Gherghiceanu, CS I

# MICROSCOPIA ÎN CERCETARE ȘI DIAGNOSTIC

Tipuri de microscopie utilizate în Laboratorul de Patologie Ultrastructurală

Laura Ceafalan, CS I

*"It is entirely possible that behind the perception of our senses, worlds are hidden of which we are unaware!"*  
Albert Einstein

## SEING IS BELIVING

<https://www.youtube.com/watch?v=yfWYXY85mBk>

**HUBBLE SPACE TELESCOPE**

Embark on a Journey of Discovery

Meter = m = 1

Prefix	Symbol	Multiplier (Scientific Notation)	Multiplier
Exa	E	$10^{18}$	1,000,000,000,000,000,000
Peta	P	$10^{15}$	1,000,000,000,000,000
Tera	T	$10^{12}$	1,000,000,000,000
Giga	G	$10^9$	1,000,000,000
Mega	M	$10^6$	1,000,000
Kilo	k	$10^3$	1,000
Hecto	h	$10^2$	100
Deka	da	$10^1$	10
Deci	d	$10^{-1}$	0.1
Centi	c	$10^{-2}$	0.01
Milli	m	$10^{-3}$	0.001
Micro	$\mu$	$10^{-6}$	0.000,001
Nano	n	$10^{-9}$	0.000,000,001
Pico	p	$10^{-12}$	0.000,000,000,001
Femto	f	$10^{-15}$	0.000,000,000,000,001
Atto	A	$10^{-18}$	0.000,000,000,000,000,001

1A = 0,1nm =  $10^{-10}$  m

<https://www.youtube.com/watch?v=oRmhW12ZITM>

**LIGHT**

**ELECTRON**

**d=200 nm**

**d=10 nm**

**d=A**

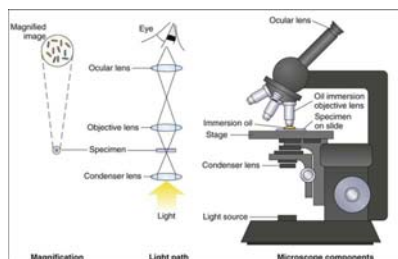
**AUGUST 1940**

**Light Microscope**

## MICROSCOPIA OPTICĂ

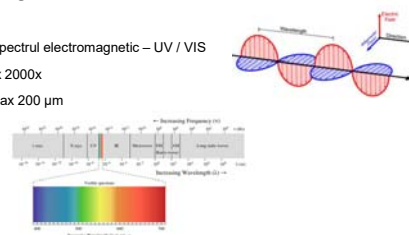


## PRINCIPIU DE FUNCȚIONARE AL MICROSCOPULUI OPTIC



## CARACTERISTICI

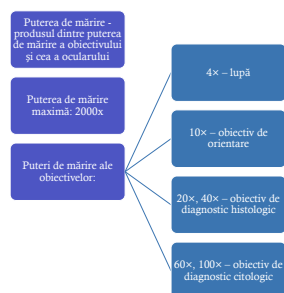
- Folosește radiația din spectrul electromagnetic – UV / VIS
- Puterea de mărire: max 2000x
- Puterea de rezoluție: max 200  $\mu\text{m}$



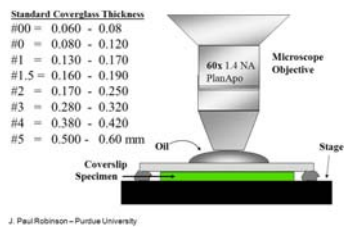
## SURSE DE ILUMINARE

- Lampă cu incandescență - tungsten-halogen
- Lampă cu vapori de mercur
- Lampă cu vapori de xenon
- Lampă cu halogenuri metalice
- LED - light-emitting diode
- Laser - Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

## PUTEREA DE MĂRIRE



## OBIECTIVE PENTRU MICROSCOPIA OPTICĂ



## REZOLUȚIE



### Formula lui Abbé:

- $d = \lambda / n (\sin \alpha)$
- NA = apertură numerică a obiectivului

$\lambda = 0,55$  (constantă)

$n = 1$  (aer)

$\sin \alpha = 1$  ( $\alpha$  maxim = 90)

$\alpha$  = apertură unghiulară

Rezoluția maximă = 0,2  $\mu$ m

## REZOLUȚIE

apa (IR = 1.33),

glicerină (IR = 1.47),

ulei de imersie (IR = 1.51).

## TIPURI DE MICROSCOAPE OPTICE

### Cu lumină transmisă

- Stereomicroscop
- Microscop cu câmp luminos
- Microscop cu contrast de fază

### Microscop de fluorescență

- Epi-fluorescență
- Cu scanare laser/confocal

### Variante de construcție

- Direct
- Ranversat

### STEREOMICROSCOPUL ZEISS STEMI DV4 STEREO MICROSCOPE

#### • Aplicații

- analiza preparatelor groase
- disecție
- microchirurgie



<https://www.thorlabs.com/collections/1531919-USA/Zeiss-000001050141000-Stemi-DV4-Stereo-Microscope.html>

### MICROSCOPUL CU CÂMP LUMINOS

#### • Aplicații

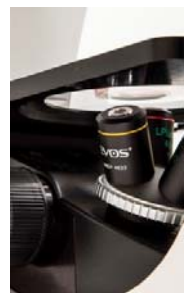
- Cercetare
- Diagnostic

analiza arhitecturii tisulare și a distribuției celulare pe baza unor criterii morfologice și a afinității față de diferiți coloranți, la mărimi superioare

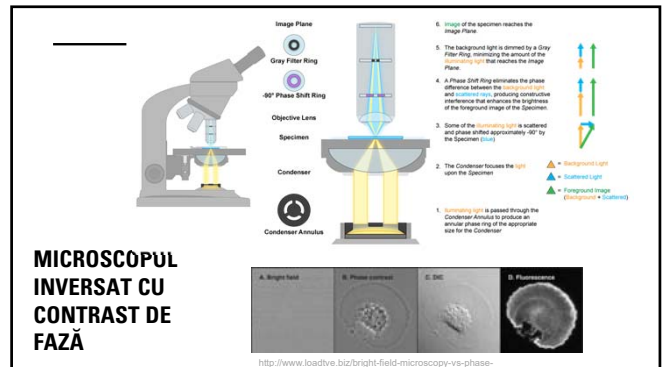
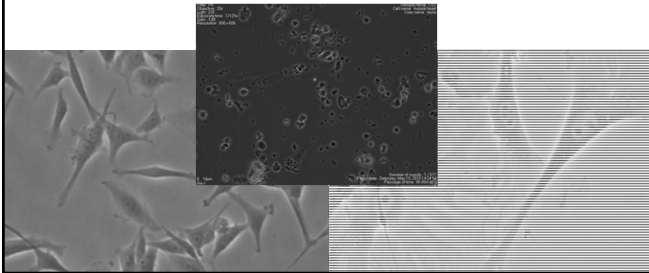


### PREPARATUL MICROSCOPIC PERMANENT

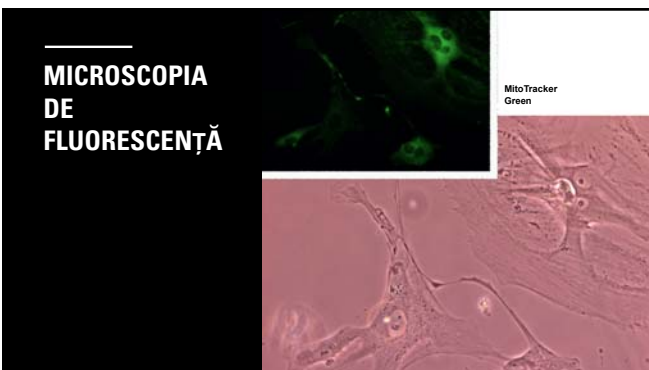
### MICROSCOPUL INVERSAT CU CONTRAST DE FAZĂ



## MICROSCOPUL INVERSAT CU CONTRAST DE FAZĂ



## MICROSCOPIA DE FLUORESCENȚĂ



## MICROSCOPIA DE FLUORESCENȚĂ

Aplicații *in vitro* sau *in situ*

Studii calitative

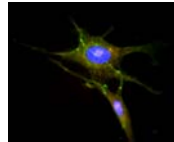
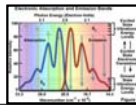
- distribuția unor molecule,
- localizarea subcelulară a moleculelor.
- studii de colocalizare și interacțiune moleculară
- determinarea concentrației de ioni, pH, indice de refracție, potențiale de membrană

Fluorescență cantitativă – "tehnicile F":

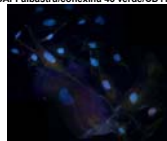
- FLIM – Fluorescence Lifetime Measurement
- FRET – Fluorescent Resonant Energy Transfer,
- FRAP – Fluorescence Recovery after Photo Bleaching

## FLUORESCENȚA

- O variantă de luminiscentă
- Grupul funcțional al unei molecule care, excitat cu o anumită lungime de undă, va emite o radiație electromagnetică cu o lungime superioară de undă, în spectrul vizibil = *fluorofor*
- Parametrii:
  - Spectru de absorbție/excitație
  - Spectru de emisie
  - Intensitate
  - Durată

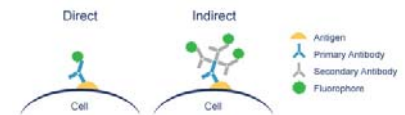


DAPI albastru/conexina 43 verde/CD117 rosu



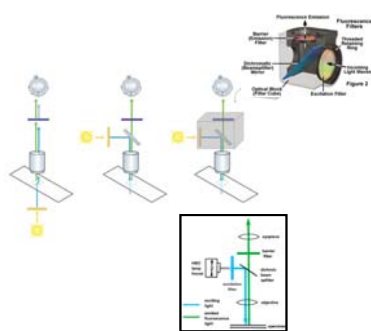
DAPI & SMA albastru/CD117verde/caveolină1 rosu

## IMUNOFLOURESCENȚA



## MICROSCOPUL DE (EPI)-FLUORESCENȚĂ

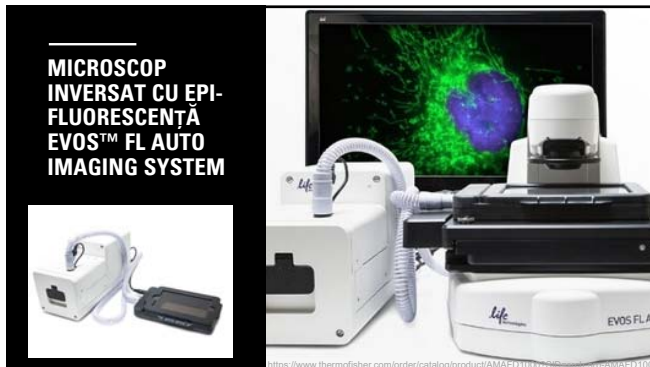
- Principiu de funcționare – componente
- *Sursa*
  - Lampă tungsten-halogen
  - Lampă cu vapori de mercur/xenon
  - LED
- *Cavete filtru*
  - Filtrul de excitație
  - Oglină dichroică – separator de fascicule
  - Filtrul de emisie
- *Detector*
  - Ochidul examinatorului
  - Camera digitală monocromă de mare viteză cu racie



## MICROSCOP OPTIC DIRECT DE FLUORESCENȚĂ LEICA DM6 B



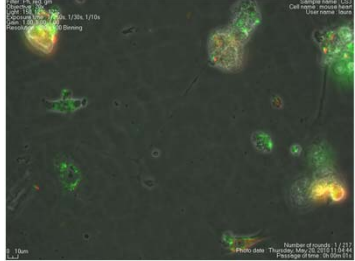
DFC7000 T Camera and LAS X Software



MytoTracker Green/LysoTracker Red  
Cultură de celule interstițiale din cord

**MICROSCOPIE  
ÎN TIMP REAL**

- Utilizează microscopia temporală (time-lapse)
- pH/DIC +/- fluorescență
- **Aplicații:**
  - Observarea dinamicii celulare
  - Observarea dinamicii moleculare la nivel subcelular



The image shows a time-lapse fluorescence microscopy image of interstitial cells from heart culture. The cells are stained with MytoTracker Green (green) and LysoTracker Red (red). The image displays the dynamic behavior of the cells over time, with a scale bar indicating 10 μm.

**MICROSCOPIE  
CONFOCALĂ**

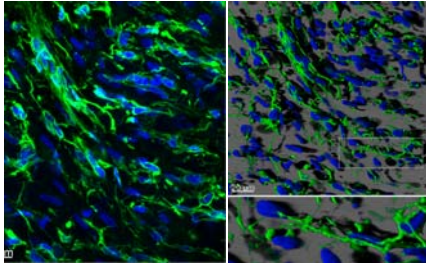
**Avantaje:**

- lumina de emisie provenită din planurile adiacente este eliminată
- mai mulți fluorofori pot fi excitați și detectați simultan
- rezoluție axială excelentă
- eșantionare foarte bună semnal/zgomot
- achiziția de imagini multidimensionale, spațiale (x, y, z) și temporale (timp)

**Dezavantaje**

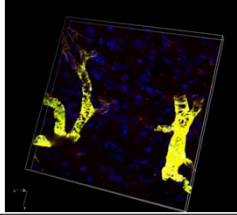
- rezoluție temporală mai slabă – compensată de scanările ultrarapide - Leica SP8 - scanner rezonant

**MICROSCOPIE  
CONFOCALĂ +  
DECONVOLUȚIE**

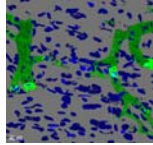


The image shows two panels of confocal microscopy images. The left panel is a 3D reconstruction of the data, showing a complex, interconnected network of cells. The right panel is a deconvolution of the data, showing the individual cells and their internal structures. The images are labeled "Reconstrucție 3D" and "Anti-vimentina – AF488".

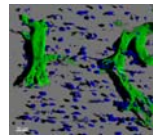
## MICROSCOPIE CONFOCALĂ + DECONVOLUȚIE



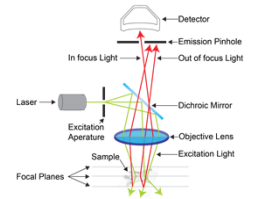
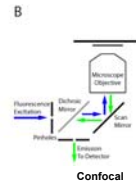
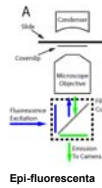
Smooth muscle actin – AF488/  
Myosin light chain – AF546



Smooth muscle actin – AF488



## MICROSCOPIE CONFOCALĂ



## LEICA SP8

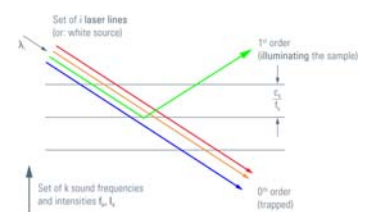
- Un singur laser alb
- Acoperă spectrul vizibil între 470 și 670 nm, la intervale de 1 nm
- 8 linii de excitație simultan



Filtru electronic  
acusto-optic  
**AOTF** (acousto-  
optic tunable  
filter)

- controlul culorii selectate și al intensității iluminării pentru toate lungimile de undă de excitație
- modularea frecvenței și amplitudinii undelor acustice
- posibilitatea de selecție rapidă a liniilor de excitație 8 linii de excitație simultan

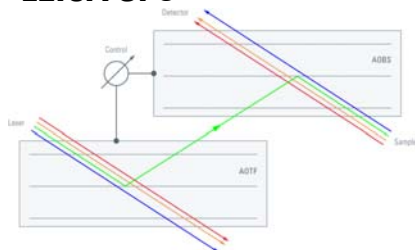
## LEICA SP8



Separator de fascicule acusto-optic  
AOBS (acousto-optic beam splitter)

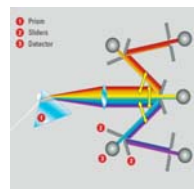
- controlat simultan cu AOTF prin selectarea lungimii de unda de excitație
- permite combinații multiple ale lungimilor de excitație și supresarea substanțială a luminii laser pentru a diminua fenomenul de fotostingere și a menține viabilitatea celulelor în cazul culturilor vii

## LEICA SP8



Detectori spectrali

## LEICA SP8



- Sensibilitate crescută
- înregistrează intensitatea fluorescenței pentru fiecare punct
- intervalul de detecție poate fi selectat cu rezoluție de maximum 5 nm
- posibilitatea de ajustare a capacității de fotomultiplicare

## LEICA TCS SP8X STED 3X



microscop inversat complet motorizat

sursă de iluminare:

- halogen - pentru lumina transmisă
- lampa cu halogenuri metalice pentru epi-fluorescență
- sursă modul confocal/SR - dioda 488nm / laser alb leica

microscopie de epi-fluorescență standard (DAPI/GFR/TXR/TRITC)

DIC - Differential Interference Contrast

obiective 10x-100x cu corecții pentru vici de refracție

detectori

- PMT pentru imagini în lumina transmisă
- Sistem spectral de detecție (400-800nm) cu 3 detectori - PMT și HyD

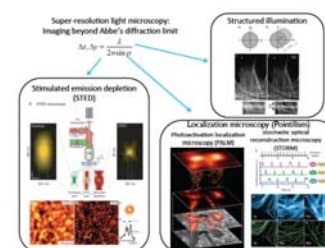
filtru electronic acusto-optic (AOTF)

inșul de scanare în tandem

separator de fascicule (beam-splitter) AOBS

modul de super-rezoluție 3D (XY și Z) STED

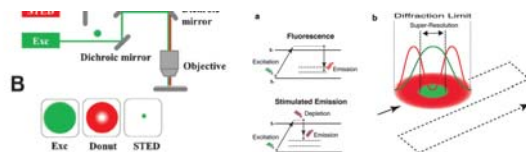
## NANOSCOPIE DE FLUORESCENȚĂ



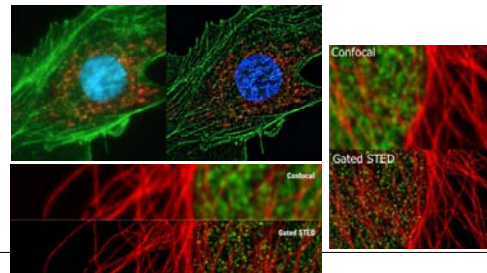
Superresolution microscopy - three major concepts



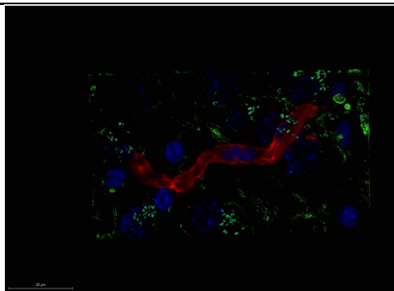
# STED – STIMULATED EMISSION-DEPLETION (~50 NM)



## Aplicații - STED



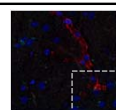
STED



24 month-old mice

BODIPY / LAMININ / DAPI

STED



24 month-old mice

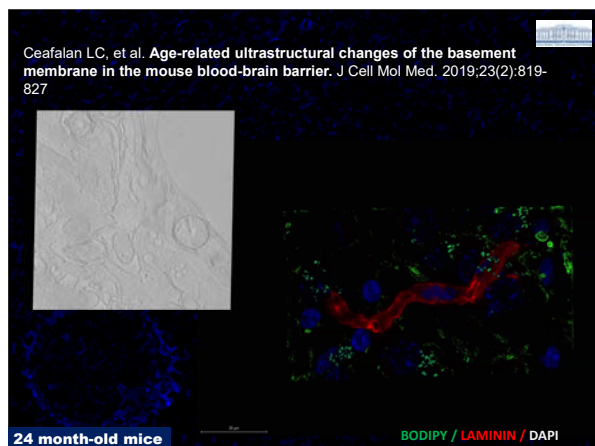
BODIPY / LAMININ / DAPI

**STED (PROS & CONS)****Avantaje**

- (co)localizarea precisă a moleculelor cu dimensiuni mai mici de 200 nm și înțelegerea corectă a interacțiunilor moleculare în dinamica
- $\pm 10 \mu\text{m}$  în adâncimea probei
- nu necesită prelucrare după achiziție

**Dezavantaje**

- Maximum 2 culori (fără UV!)
- Fluorocromi speciali necesari pentru o performanță optimă
- Viteza de scanare e invers proporțională cu dimensiunea imaginii → cadru complet destul de lent!
- Rezoluția axială este de obicei confocală (600-800 nm)
- Energie relativ mare de energie → consumarea fluorescenței
- Nu este ideal pentru imagistica 3D și a celulelor vii
- Prețuri




---

---

---

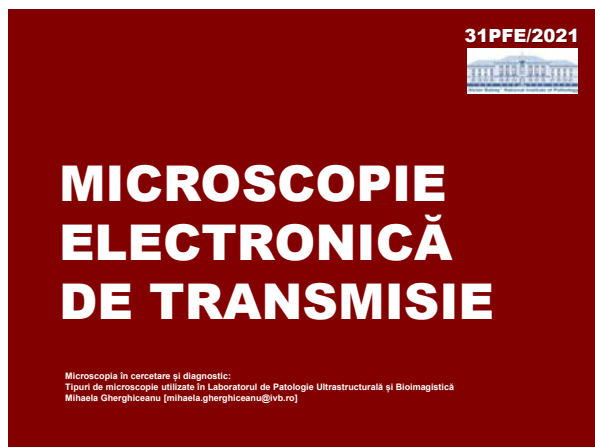
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

## REZOLUȚIE

<p><b>Microscopul optic</b> Formula lui Abbé:</p> $d_{min} = \frac{\lambda}{2(n \times \sin \alpha)}$ <p><math>\lambda</math> = lungimea de undă (verde monocrom. - 550nm) <math>n</math> = indice de refracție (aer ≈ 1) <math>\sin \alpha \approx 1</math> (<math>\alpha \approx 90^\circ</math>)</p> <p><b>Rezoluția MO ~ 0,2 μm</b></p>	<p><b>Microscopul electronic</b> Formula lui de Broglie:</p> $\lambda = \frac{h}{m \times v}$ <p><math>h</math> = constanta lui Planck (<math>4,135 \times 10^{-15}</math> eV·s) <math>m</math> = masa particulei (0.511 MeV) <math>v</math> = viteza particulei/electronilor (<math>c \sim 3 \times 10^8</math> m/s // <math>v</math> la 100kV)</p> <p><b>Rezoluția ME ~ 0,2 nm/pm</b></p>
---	---

---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

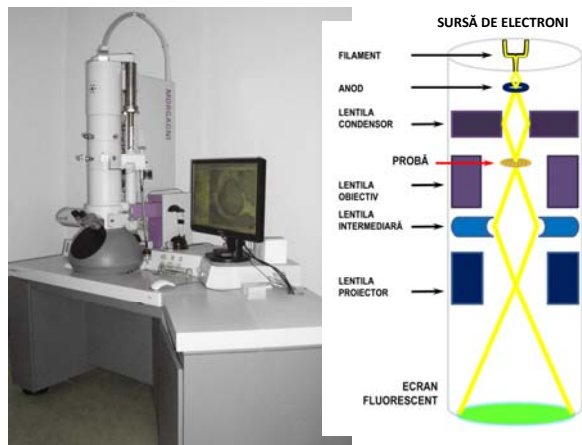
---

---

---

---

---




---

---

---

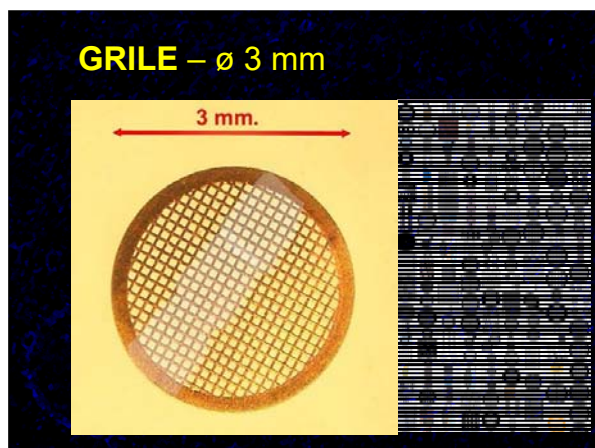
---

---

---

---

---




---

---

---

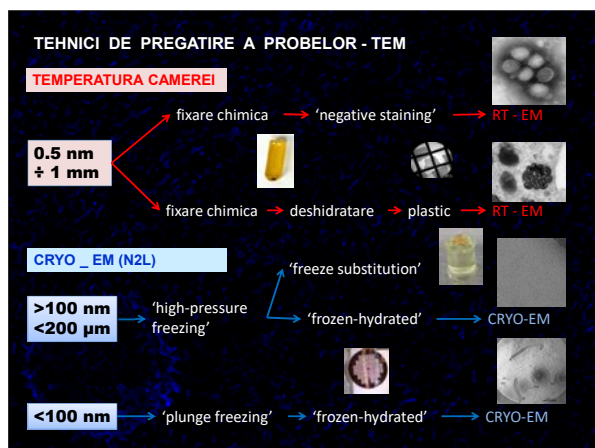
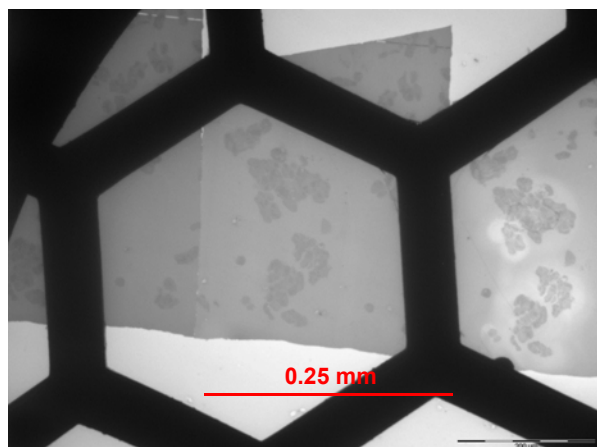
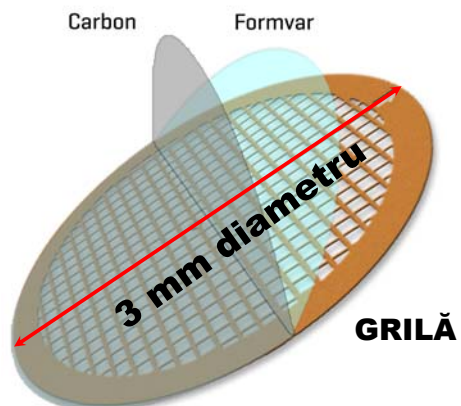
---

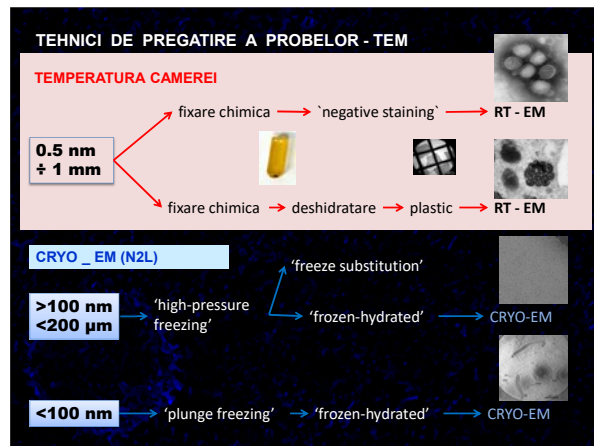
---

---

---

---






---

---

---

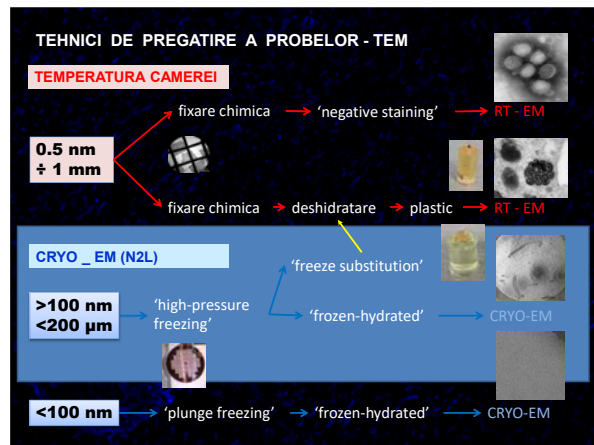
---

---

---

---

---




---

---

---

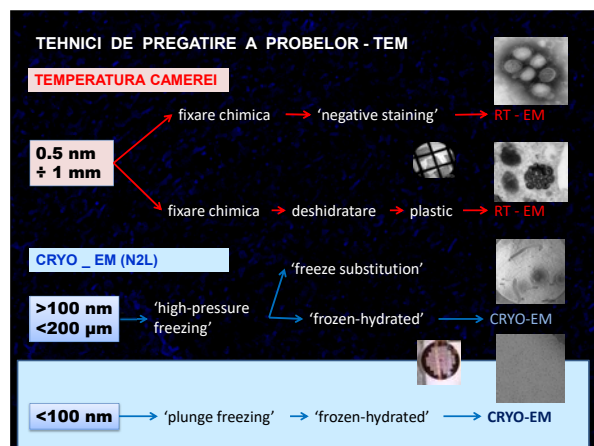
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

*temperatura camerei (RT)*

- MICROSCOPIE ELECTRONICA DE TRANSMISIE (TEM)
- ELECTRONO-TOMOGRAFIA (ET)
- SCANNING-TRANSMISIE (STEM)

*crio-electronmicroscopie (-186°C)*

- ELECTRONO-MICROSCOPIE (CRYO-EM)
- EM PE SECȚIUNI VITRIFICATE (CEMOVIS)
- ANALIZĂ MOLECULARĂ (SP)

---

---

---

---

---

---

---

---

## MICROSCOAPE ELECTRONICE de TRANSMISIE




---

---

---

---

---

---

---

---

2D

---

---

---

---

---

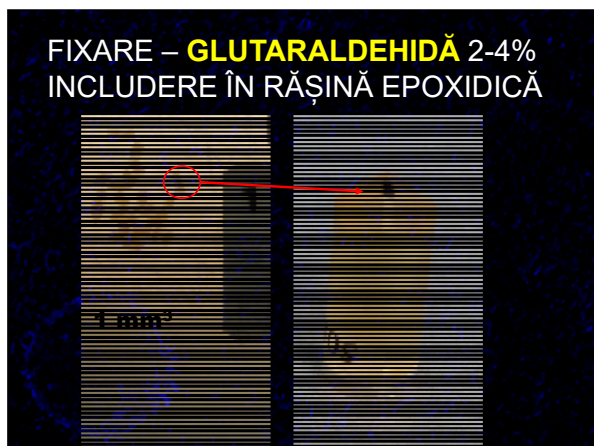
---

---

---



## FIXARE – **GLUTARALDEHIDĂ** 2-4% INCLUDERE ÎN RĂȘINĂ EPOXIDICĂ




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

<b>Includerea TESUTURILOR în rasina epoxidica</b>		Temp	Timp
Fixarea țesutului în glutaraldehidă 4% tamponată TCS 0,1M			minimum 4 ore
Spălare în TCS 0,1 M			2 x 1 h
Post-fixare cu tetraoxid de osmiu 0,1 M			sau peste noapte
Spălare în TCS 0,1 M			2x 10-15min
Deshidratare alcool etilic 30°			15-30 min
Deshidratare alcool etilic 50°			15-30 min
Deshidratare alcool etilic 70°		4 °C	15-30 min
Deshidratare alcool etilic 90°		4 °C	15-30 min
Deshidratare alcool etilic 96°		TC	2x15 min
Deshidratare alcool etilic 100°		TC	3x15 min
Propilen oxid		TC	2x15 min
Baia I: Propilen oxid		TC	2 h
Baia II: Propilen oxid		TC	peste noapte
Baia III: Rășină epoxidică		TC	2-3 h
Includere în rășină epoxidică proaspăt preparată		TC	-
În capsule de plastic etichetate			
Polimerizarea rășinii epoxidice		60°C	48 h

**1+6+4 ore**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

<b>Includerea CELULELOR ADERENTE în cultura</b>		Temp	Timp
se adauga 0.1 M TCS cu 1.4% sucroza pH 7.4		37 °C	x 2
NB: pre-incalzit la 37 °C			
se inocuieste cu <b>2.5% GA</b> in 0.1 M TCS cu 1.4% sucroza pH 7.4		37 °C	20 min
se inocuieste cu 0.1 M TCS cu 1.4% sucroza pH 7.4		37 °C	5 min
se inocuieste cu 0.1 M TCS pH 7.4		37 °C	5 min
se inocuieste cu 1% OsO4 in 0.1 M TCS		TC	15 min
se inocuieste cu 0.1 M TCS pH 7.4		TC	5 x 2min
se inocuieste cu alcool 30°		TC	2 x 5 secunde
se inocuieste cu alcool 50°		TC	2 x 5 secunde
se inocuieste cu alcool 70°		TC	2 x 5 secunde
se inocuieste cu alcool 90°		TC	2 x 5 secunde
se inocuieste cu alcool 96°		TC	3 x 5 secunde
se inocuieste cu alcool 100°		TC	3 x 5 secunde
se inocuieste cu propilen oxid		TC	3 x 5 secunde
se inocuieste cu baia I: propilen oxid		TC	30 minute
se inocuieste cu baia II: propilen oxid		TC	1 ora
se inocuieste cu baia III: rășină epoxidică		TC	1 ora
se inocuieste cu rășină epoxidică		60 °C	24-48 ore

**6 ore**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



**Proble care contin CELULE suspendate intr-un fluid se includ in AGAR pentru a avea consistenta necesara includerii in rasina epoxidica**

**Specificatii**

se fixeaza proba prin adaugare in mediu a GA 2,5% - 2½ h

se centrifugheaza proba aflata in fixator 1.250 rpm / 15 min, 4 °C

se reia peletul celular in TCS 0,1M 4 °C, 10 min

se centrifugheaza 1.250 rpm / 15 min, 4 °C

Se suspenda in TCS 0,1M 4 °C, 10 min

se centrifugheaza 1.250 rpm / 15 min, 4 °C

Post-fixare cu tetraoxid de os 0,1M 4 °C, 30 minute

se centrifugheaza 3.000 rpm / 15 min, 4 °C

se suspenda proba in TCS 0,1M 4 °C, 10 minute

se centrifugheaza 3.000 rpm / 15 min, 4 °C

se suspenda proba in TCS 0,1M 4 °C, 10 minute

In acest moment se poate intrerupe procesul 24 h



**5 ore**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Proble care contin CELULE suspendate intr-un fluid se includ in AGAR pentru a avea consistenta necesara includerii in rasina epoxidica**

**Specificatii**

se centrifugheaza 3.000 rpm / 15 min, 4 °C

Se suspenda peletul intr-o picatura de fluid

se pun in frigider – in 4°C / 20 min

se taie proba inclusa in fragmente de 1mm³

se imerseaza fragmentele in TCS 0,1M 4°C 10 min



**1~2 ore**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Proble care contin CELULE suspendate intr-un fluid se includ in AGAR pentru a avea consistenta necesara includerii in rasina epoxidica**

**Specificatii**

Deshidratare alcool etilic 30° 4°C 15 min

Deshidratare alcool etilic 50° 4°C 15 min

Deshidratare alcool etilic 70° 4°C 15 min

Deshidratare alcool etilic 90° 4°C 15 min

Deshidratare alcool etilic 96° TC 15 min

Deshidratare alcool etilic 100° TC 2 x 15 min

Propilen oxid TC 3x10 min

Baia I: Propilen oxid/ răsina TC 1-2 h

Baia II: Propilen oxid/ răsina TC peste noapte

Baia III: Rășină epoxidică/ răsina neacoperite TC 2 -3 h

Includere intr-o picatura de rasina epoxidica TC

Polimerizarea rășinii epoxidice I – in picatura 60°C 24 h

Umplerea capsulelor cu rășină epoxidică TC

Polimerizarea rășinii epoxidice II 60°C 24 h

**4+2 ore**

---

---

---

---

---

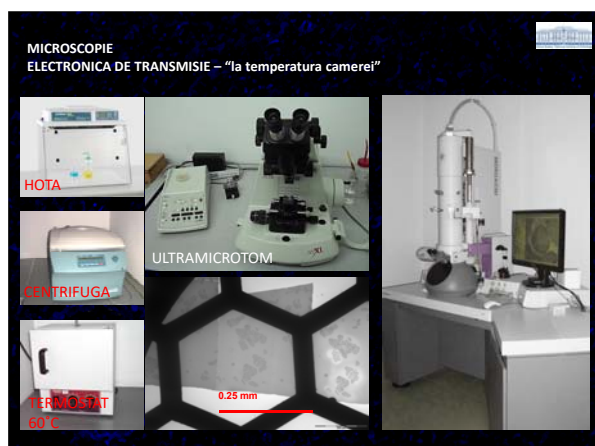
---

---

---

---

---




---

---

---

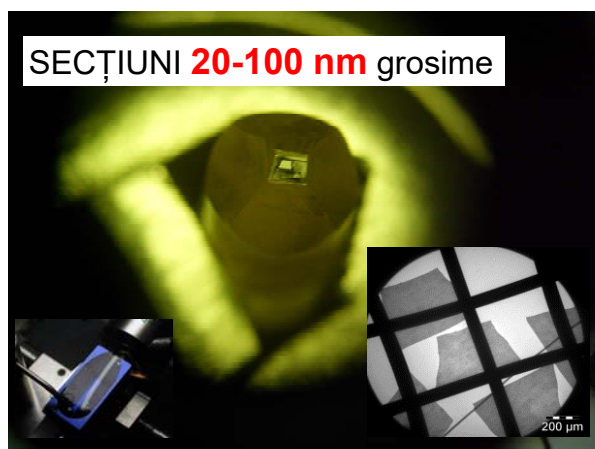
---

---

---

---

---




---

---

---

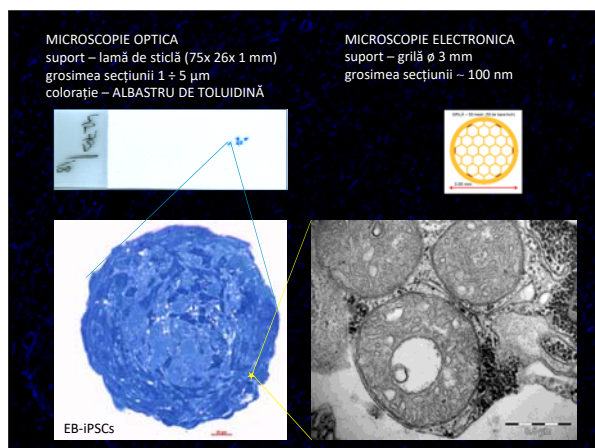
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

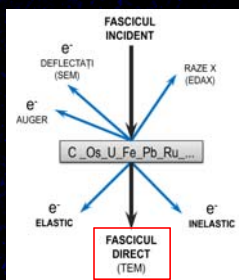
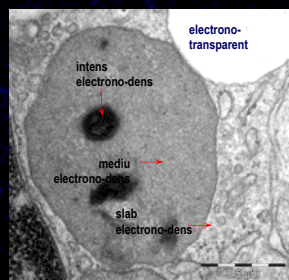
---

---

### interacțiunea electronilor cu nucleii și electronii atomilor din probă

Funcție de densitatea de nucleilor grei din preparat:

- componentele ce leagă mulți nuclei grei vor produce dispersia  $e^-$  – zone **electronodense**, întunecate
- componentele care nu leagă nuclei grei vor permite trecerea  $e^-$  – zone **electronoclare**, luminoase




---

---

---

---

---

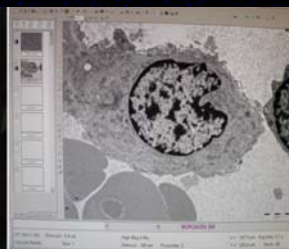
---

---

---

ECRAN FLUORESCENT

DETECTOR (FILM/CCD/CMOS/DDD)




---

---

---

---

---

---

---

---

**2D**




---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

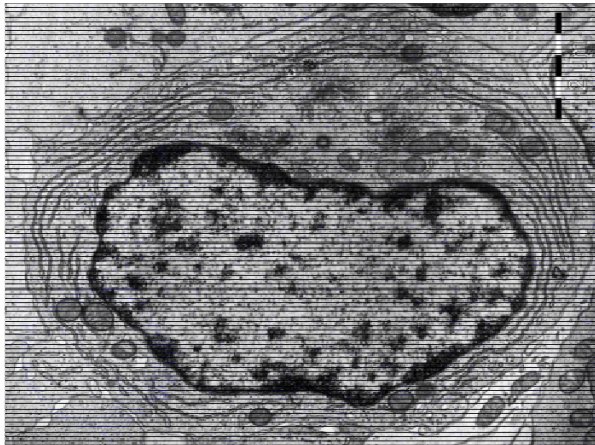
---

---

---

---

---



---

---

---

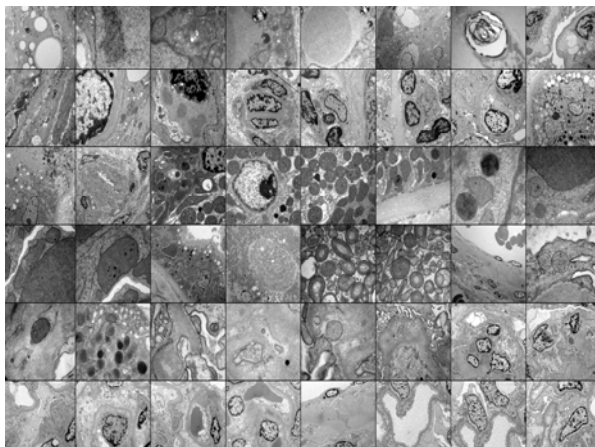
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

# 3D

---

---

---

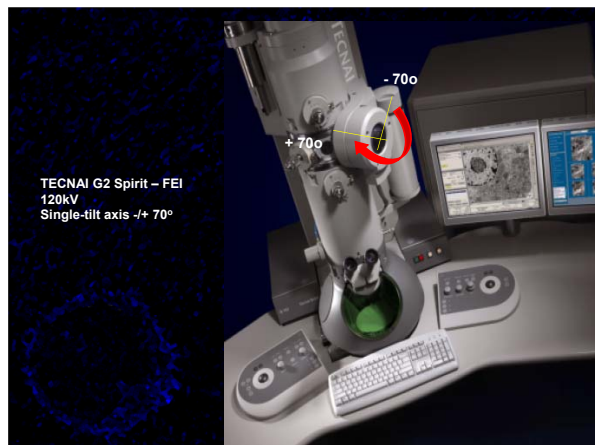
---

---

---

---

---




---

---

---

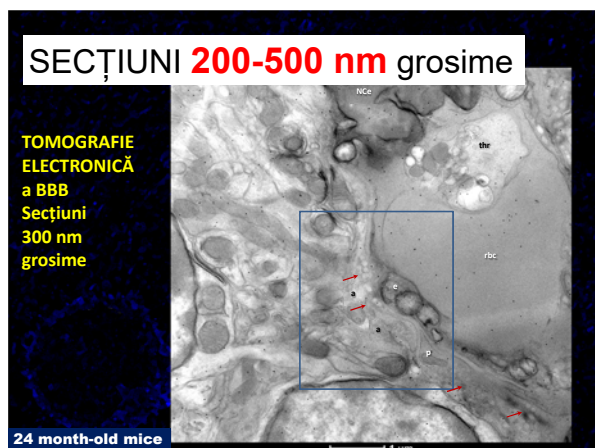
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

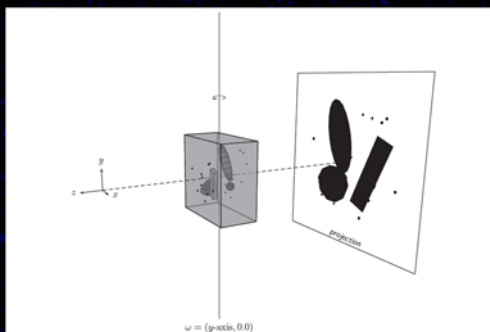
---

---

---



## Tomografie electronica



<https://confluence.crbs.ucsd.edu/display/hcmir/Electron+Tomography>

---

---

---

---

---

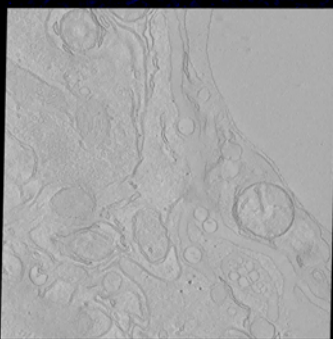
---

---

---

Ceafalan LC, et al. Age-related ultrastructural changes of the basement membrane in the mouse blood-brain barrier. J Cell Mol Med. 2019;23(2):819-827

**Reconstrucție 3D  
a BBB  
Secțiuni digitale  
2-6nm grosime!**



**24 month-old mice**

---

---

---

---

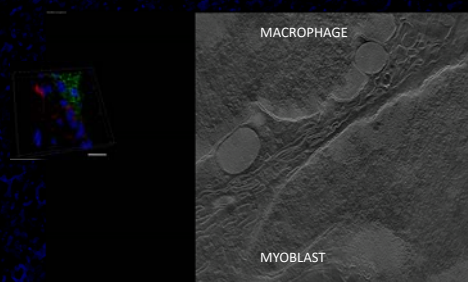
---

---

---

---

## CELL-TO-CELL INTERACTIONS



Ceafalan LC, Fertig TE, Popescu AC, Popescu BO, Hinescu ME, Gherghiceanu M. Skeletal muscle regeneration involves macrophage-myoblast bonding. Cell Adh Migr. 2018;12(3):228-235.

---

---

---

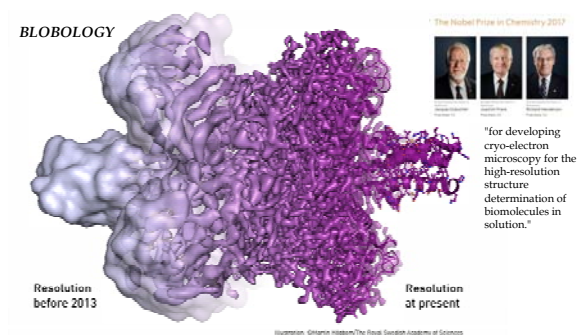
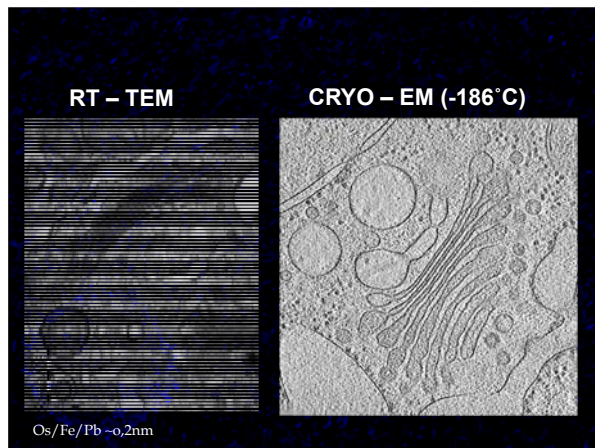
---

---


---

---

---



**Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel 2017**

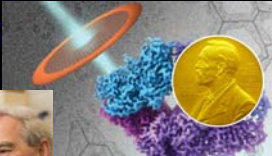


**"cool method"**  
decisive for both the basic understanding of life's chemistry and for the development of pharmaceuticals

**Jacques Dubochet** - vitrified water  
University of Lausanne, Switzerland

**Joachim Frank** - image processing method  
Columbia University, New York, USA

**Richard Henderson** - three-dimensional imaging  
MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK




---

---

---

---

---

---

---


---

---

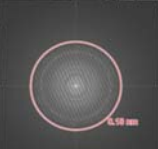
---

INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE "VICTOR BABES"

TALOS F200C - STEM CryoEM (BF/DF/HAADF/PP/LD)  
rezoluție 0.18 nm (1.8 Å)



200kV



Microscop electronic – folosește un fascicul de electroni și lentile electromagnetice pentru a forma imaginea unei probe (in vid)

---

---

---

---

---

---


---

---

---

---

INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR BIOMEDICALE "VICTOR BABES"



VITRIFICARE LA PRESIUNE MARE

±CRIOSUBSTITUȚIE



CRYO EM



VITRIFICARE



CRIOSECTIONARE

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---






---

---

---

---

---

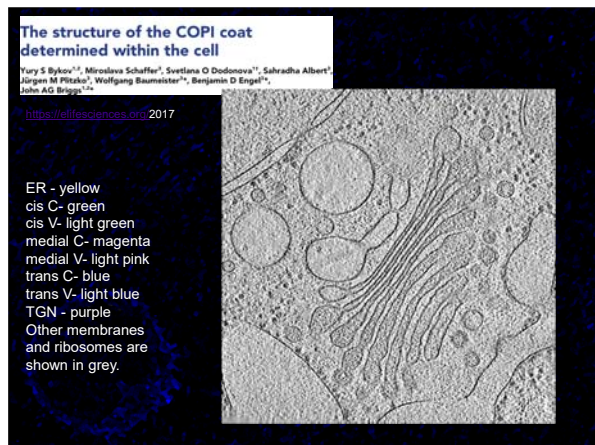
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

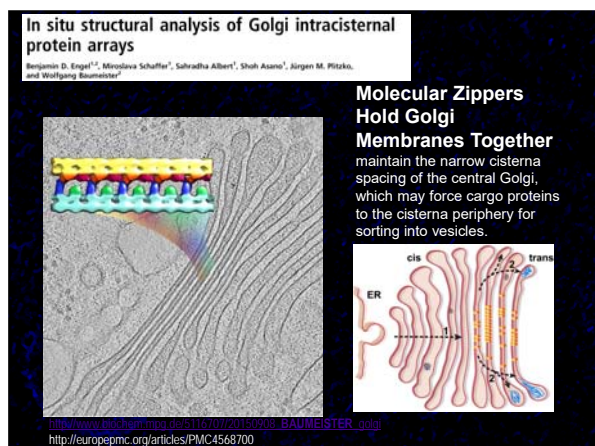
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

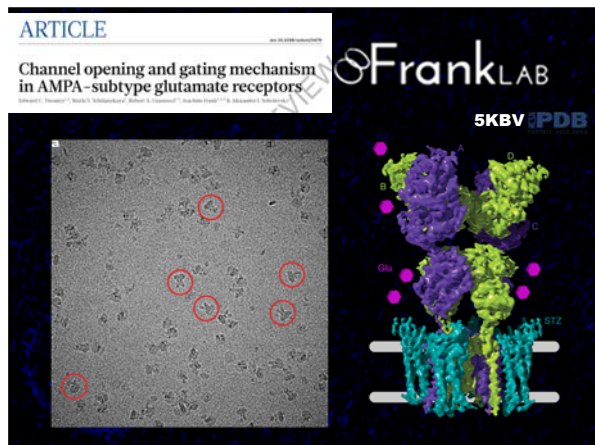
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

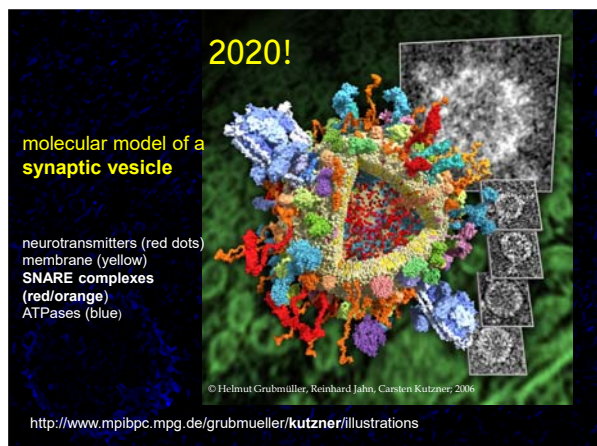
---

---

---

---






---

---

---

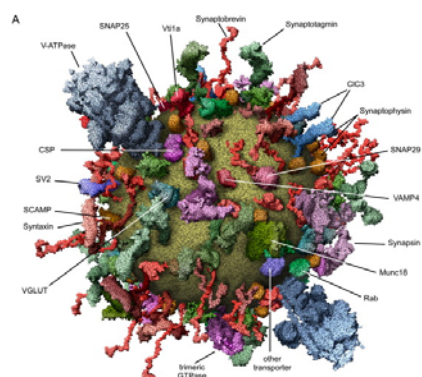
---

---

---

---

---



Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>

---

---

---

---

---

---

---

---

# **MICROSCOPIE ELECTRONICĂ - REEVALUAREA LA NIVEL MOLECULAR A CELULEI**

---

---

---

---

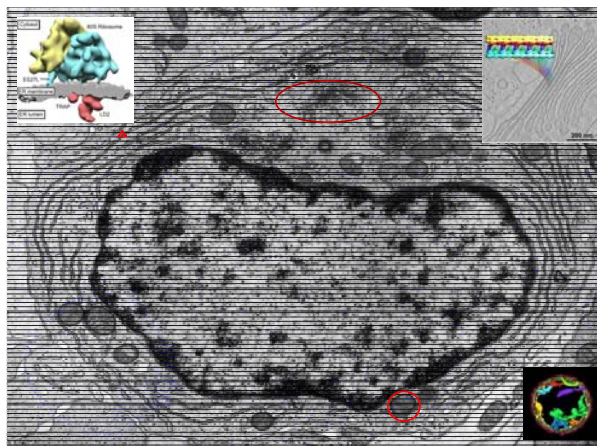
---

---

---

---






---

---

---

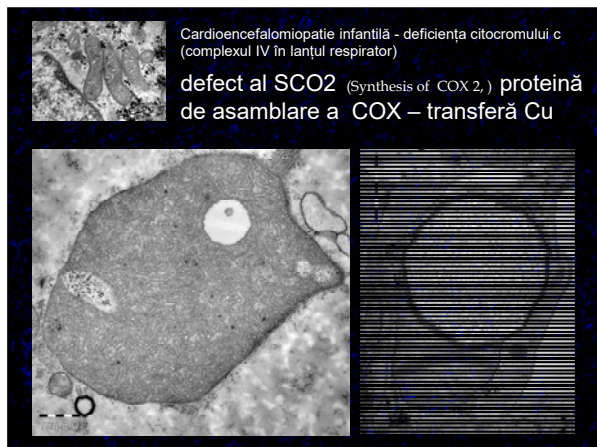
---

---

---

---

---




---

---

---

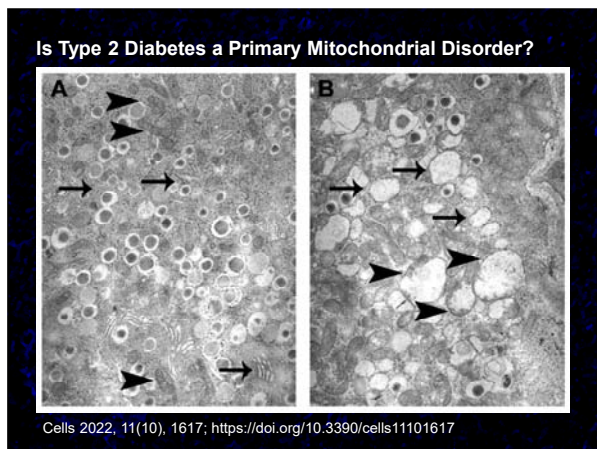
---

---

---

---

---




---

---

---

---

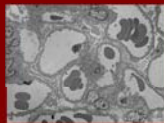
---

---

---

---

## DIAGNOSTIC ULTRASTRUCTURAL



- PATOLOGIE GLOMERULARĂ - non-tumorală
- TEZAUISMOZE – biopsie piele / hepatică
- PATOLOGIE CILIARĂ – citologie mucoasă nazală
- PATOLOGIE NEUROMUSCULARĂ – biopsie mușchi/nerv
- MALADII BULOASE – biopsie cutanată
- INFECTII – bacteriene, virale
- PATOLOGIE TUMORALĂ – tumori neuroendocrine, cu celule mici, etc
- PATOLOGIE CARDIACĂ – biopsie cardiacă

---

---

---

---

---

---

---

---

## DIAGNOSTIC ULTRASTRUCTURAL

### CITOPLASMA

- citoschelet
- ribozomi
- reticul endoplasmic
- structuri tubuloreticulare
- mitocondrii
- lizozomi Δ
- vacuole lipidice
- melanozomi
- granule secretorii Δ
- granule Weibel Palade
- granule Birbeck
- ...

specializări de membrană  
jonctiuni intercelulare  
incluzii celulare  
(citoplasmice/nucleare)  
particule virale

### MATRICE EXTRACELULARA

Δ collagen  
fibrina  
fibronectina ...  
amiloid

---

---

---

---

---

---

---

---

## DIAGNOSTIC ULTRASTRUCTURAL

### Obiective

- Detectia și analiza organelor citoplasmice și a matricei extracelulare

**NORMAL** **ANORMAL**  
НОРМАЛ АНОРМАЛ

### Interpretarea imaginilor

- identificare organelor
- integrarea analizei ultrastructurale cu datele clinice, IF, IHC, genetice, ...

### Limitări ale ME

- piese foarte mici - absența organelor caracteristice pentru diagnostic

---

---

---

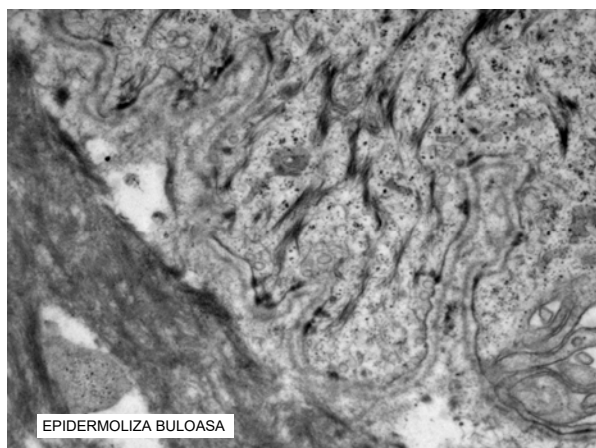
---

---

---

---

---




---

---

---

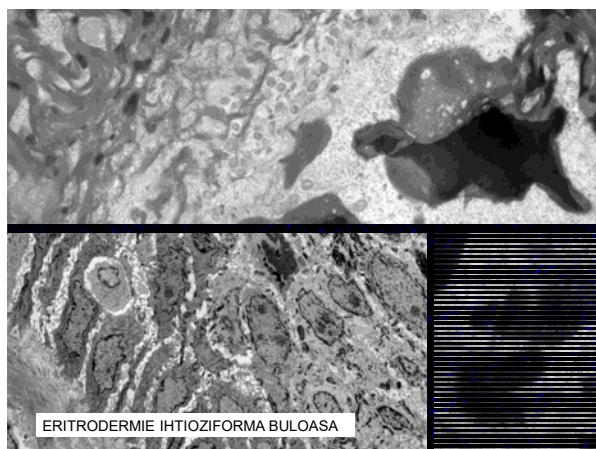
---

---

---

---

---




---

---

---

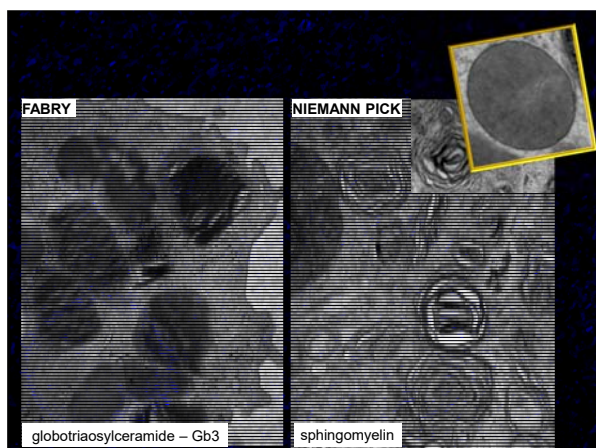
---

---

---

---

---




---

---

---

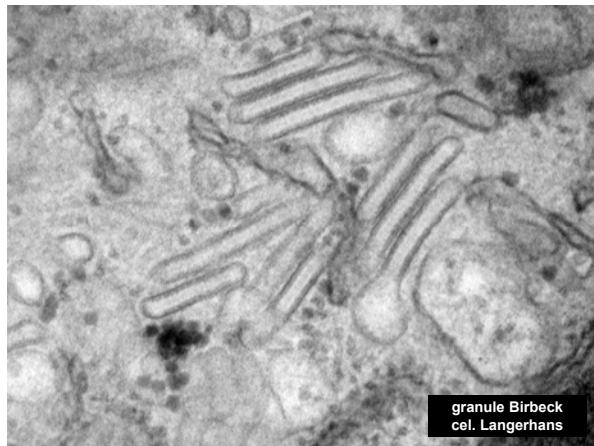
---

---

---

---

---




---

---

---

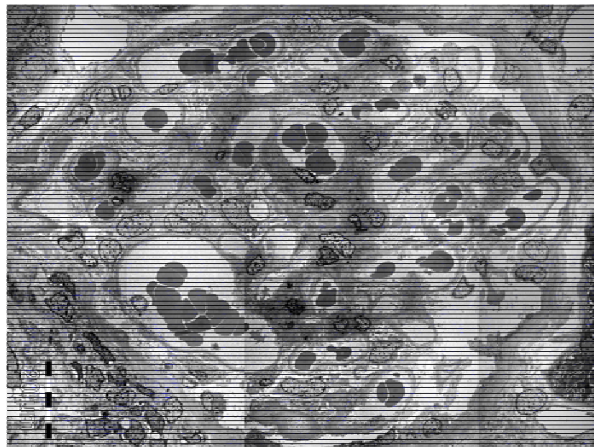
---

---

---

---

---




---

---

---

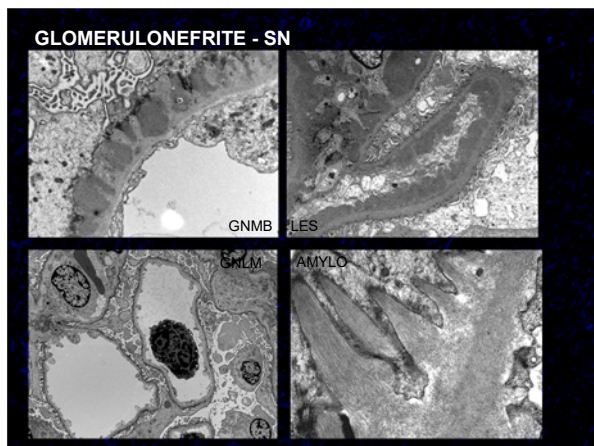
---

---

---

---

---




---

---

---

---

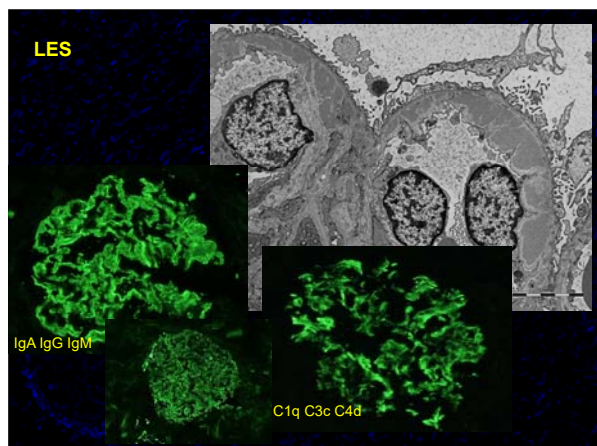
---

---

---

---






---

---

---

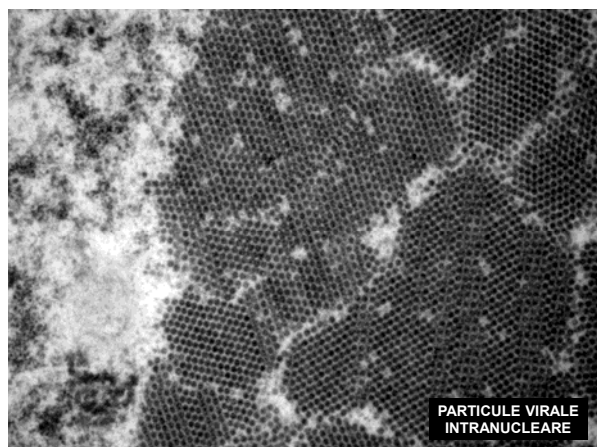
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

**MICROSCOPIE  
ELECTRONICĂ -  
IDENTIFICAREA  
VIRUSURILOR  
în infecții cu agent  
necunoscut (încă)**

---

---

---

---

---

---

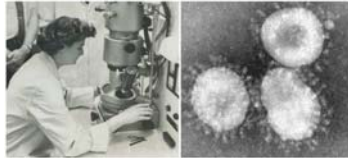
---

---

# A NEGATIVE STAINING METHOD FOR CELL-ASSOCIATED VIRUS

JUNE D. ALMEIDA and ALLAN F. HORWATSON, From the Ontario Cancer Institute and the Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Canada

June Almeida –  
coronavirus, 1966



*“Virus, virus shining bright,  
In the phosphotungstic night,  
What immortal hand or eye,  
Dare frame thy fivefold symmetry.”*  
(with apologies to William Blake [1757-1827])

June D. Almeida. **A Classification of Virus Particles Based on Morphology.** *The Canadian Medical Association Journal.* 1963; 89(16): 787-798.

June D. Almeida. **A Classification of Virus Particles Based on Morphology.** *The Canadian Medical Association Journal.* 1963; 89(16): 787-798.

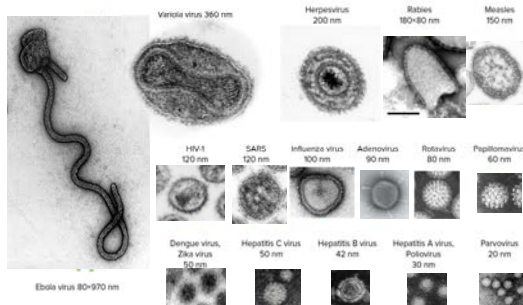
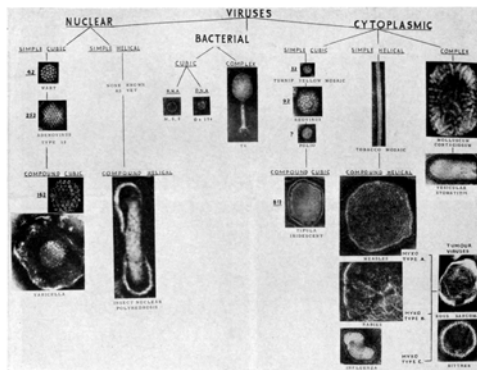
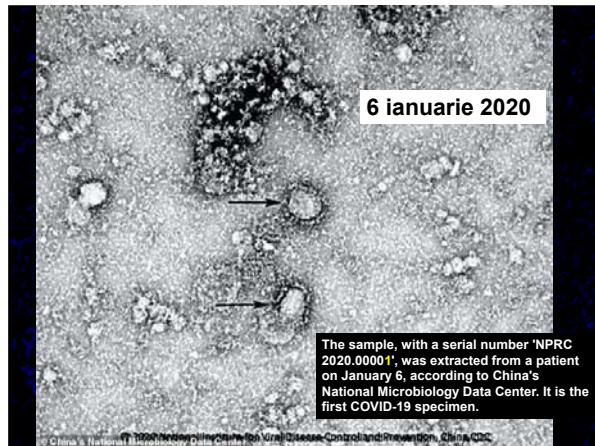


Image by Lecturio. License: CC BY-NC-SA 4.0  
<http://www.virology.ac.uk/teaching/binda-stannard/electron-micrograph-images>  
<https://phl.cdc.gov/>  
<https://www.euro.who.int/en/>




---

---

---

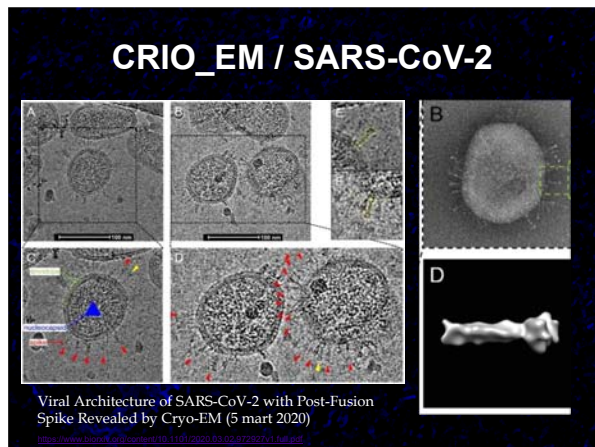
---

---

---

---

---




---

---

---

---

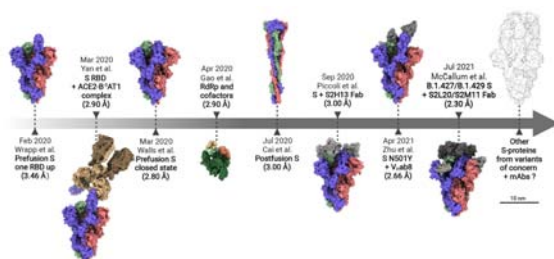
---

---

---

---

# Brief timeline of cryo-EM milestones in the study of SARS-CoV-2



Fertig et al. J Cell Mol Med. 2022; 26(1): 25-34. doi: 10.1111/jcmm.17103

---

---

---

---

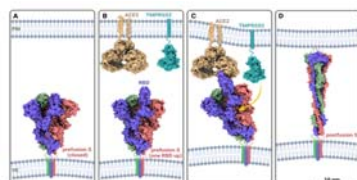
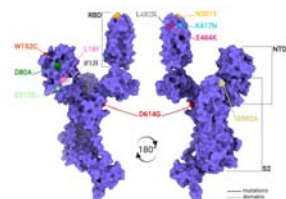
---

---

---

---

Locations of key mutations within the RBD and NTD domains of the S-protein protomer. Diagrams are based on the cryo-EM 3D structure deposited to PDB at 6VSB. RBD – receptor-binding domain, NTD – N-terminal domain. A – alanine; C – cysteine; D – aspartic acid; E – glutamic acid; G – glycine; F – phenylalanine; I – isoleucine; K – lysine; L – leucine; N – asparagine; R – arginine; S – serine; T – threonine; Y – tyrosine; W – tryptophan




---

---

---

---

---

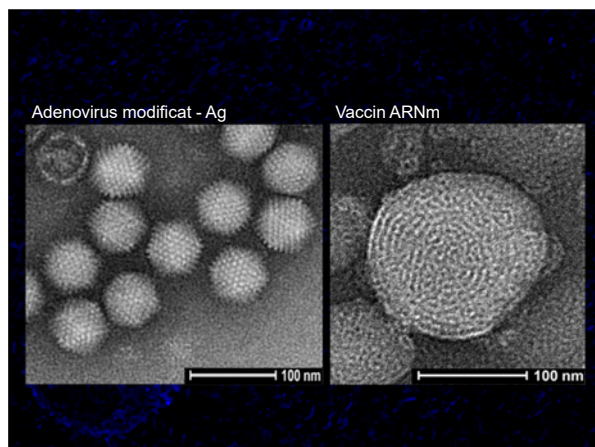
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

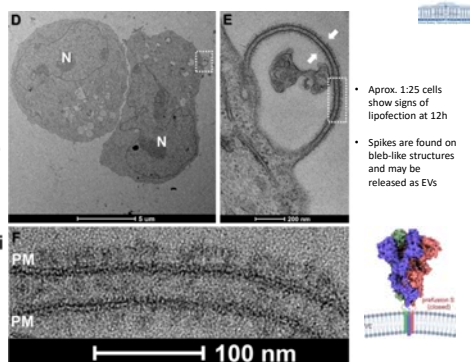
---

---

---

---

Proteina 'spike' pe membrana celulelor expuse vaccinului ARNm



- Aprox. 1.25 cells show signs of lipofection at 12h
- Spikes are found on bleb-like structures and may be released as EVs

Fertig TE, et al. Vaccine mRNA Can Be Detected in Blood at 15 Days Post-Vaccination. *Biomedicines*. 2022;10(7):1538. doi: 10.3390/biomedicines10071538.

---

---

---

---

---

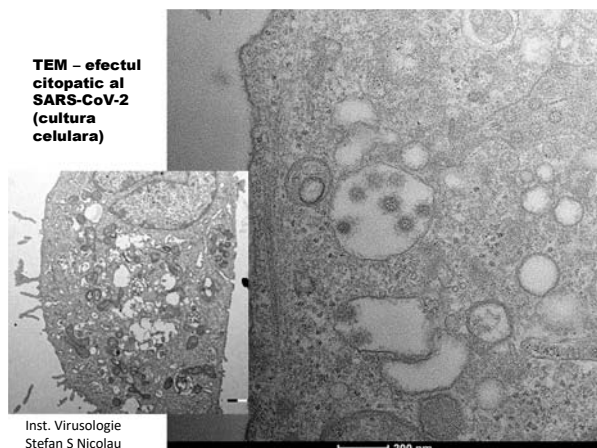
---

---

---

---

---




---

---

---

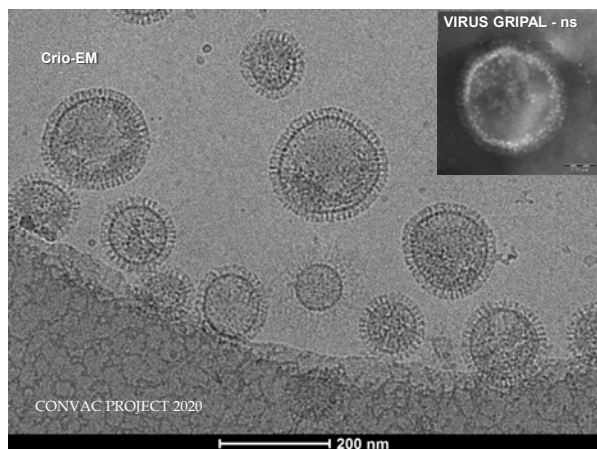
---

---

---

---

---




---

---

---

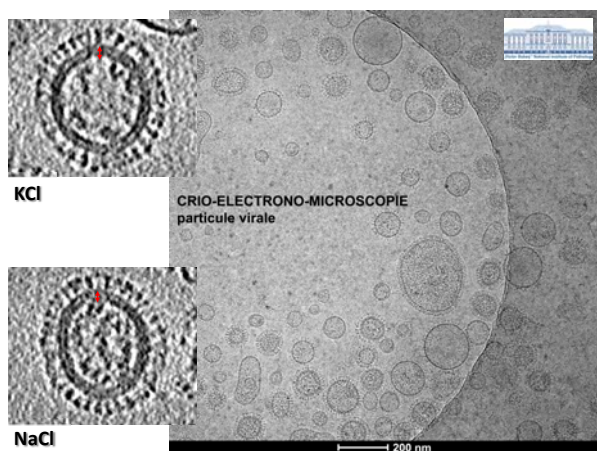
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---



[www.ivb.ro](http://www.ivb.ro)  
[www.cell-imaging.ro](http://www.cell-imaging.ro)



**Mariana Șerbănescu, PhD**  
 Assistant Professor  
 Department of Pathology  
 Cantacuzino Institute  
[mariana.serb@cantacuzino.ro](mailto:mariana.serb@cantacuzino.ro)



**Tudor Șerbanescu, PhD**  
 Assistant Professor  
 Department of Pathology  
 Cantacuzino Institute  
[tudor.serbanescu@cantacuzino.ro](mailto:tudor.serbanescu@cantacuzino.ro)



**Victor Șerbanescu, PhD**  
 Assistant Professor  
 Department of Pathology  
 Cantacuzino Institute  
[victor.serbanescu@cantacuzino.ro](mailto:victor.serbanescu@cantacuzino.ro)



**Mariana Șerbănescu, PhD**  
 Assistant Professor  
 Department of Pathology  
 Cantacuzino Institute  
[mariana.serb@cantacuzino.ro](mailto:mariana.serb@cantacuzino.ro)



**Mariana Șerbănescu, PhD**  
 Assistant Professor  
 Department of Pathology  
 Cantacuzino Institute  
[mariana.serb@cantacuzino.ro](mailto:mariana.serb@cantacuzino.ro)



**Mariana Șerbănescu, PhD**  
 Assistant Professor  
 Department of Pathology  
 Cantacuzino Institute  
[mariana.serb@cantacuzino.ro](mailto:mariana.serb@cantacuzino.ro)

#### Cantacuzino Institute

**Prof. Adrian Onu**  
**Cătălin Tucureanu**  
**Ana Șerbănescu**

Project funded by the Ministry of  
 Research and Innovation, CCCDI -  
 UEFISCDI, project number PN-III-  
 P1-1.2-PCCDI-2017-0529 /  
 62PCCDI / 2018, from PNCDI III.



**MD students:**  
**Marian Cloșca**  
**Giulia Angheluta**  
**Teodora Ciobotă**  
**Filip Mureșan**

