

CITOFUORIMETRIA

Tecnica computerizzata che consente l'analisi della morfologia e della fluorescenza di un gruppo di cellule in "flusso"



BASI DELLA CITOMETRIA A FLUSSO

- ✓ Cellule in sospensione scorrono in singola fila attraverso un punto di interrogazione illuminato dove...
- ✓ “riflettono” luce ed emettono fluorescenze che vengono raccolte, filtrate e...
- ✓ convertite in segnali digitali che sono elaborati e memorizzati

Fluidica

Ottica

Elettronica



Oggetto biologico



Allestimento del campione



Misura citometrica



Analisi delle distribuzioni



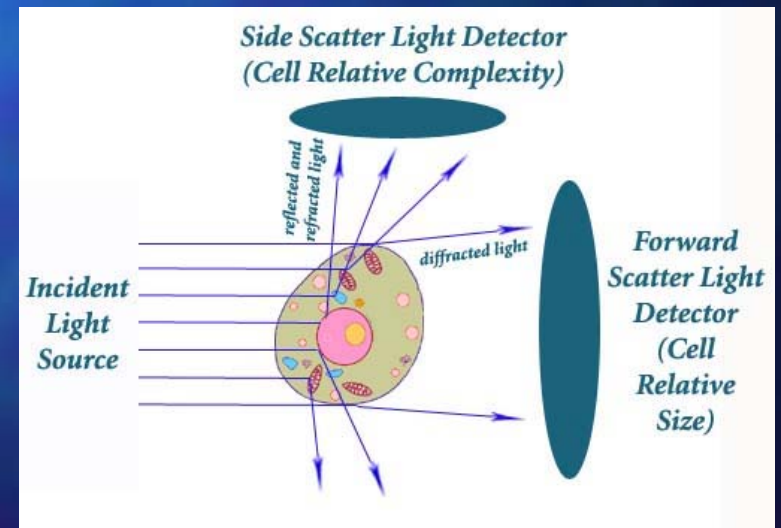
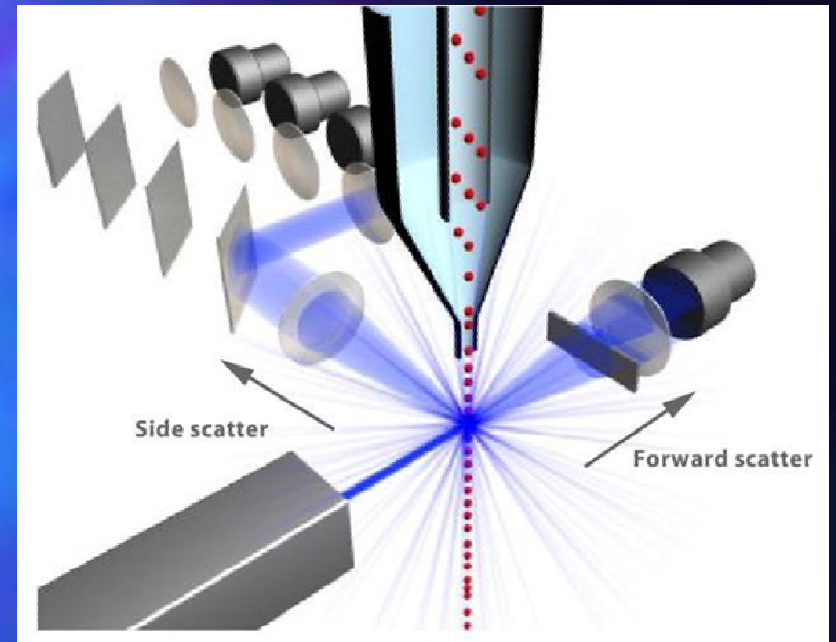
Interpretazione, risultato



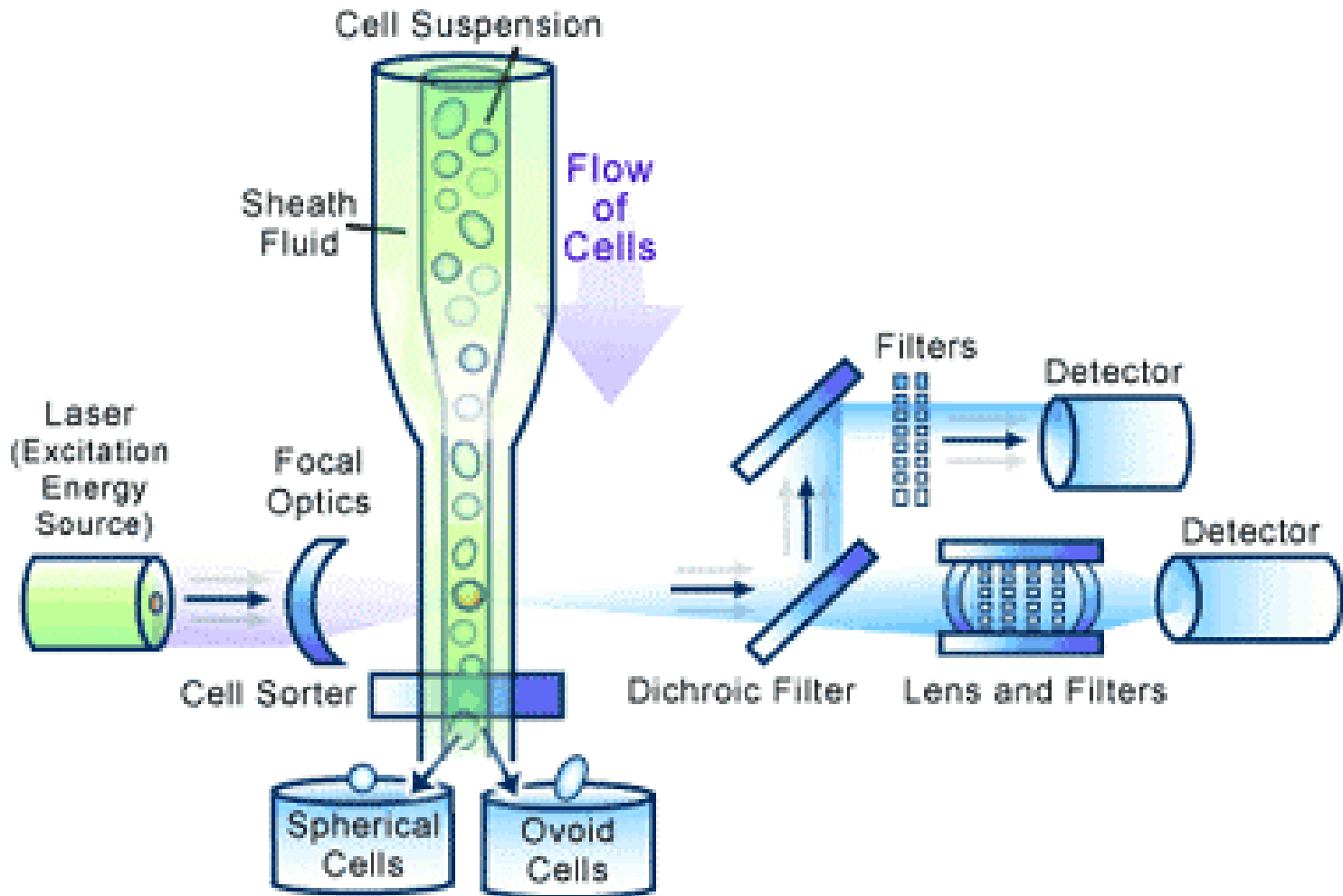
Campione
(V minimo: 500
 μ litri; V max: 3
ml) in
provette in
polipropilene

SEGNALI RISULTANTI

- 1) Segnali fisici (Forward scatter, side scatter):
 - Forma
 - Dimensioni
 - Architettura della cellula
- 2) Segnali di fluorescenza



PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO



Componenti di un citometro a flusso

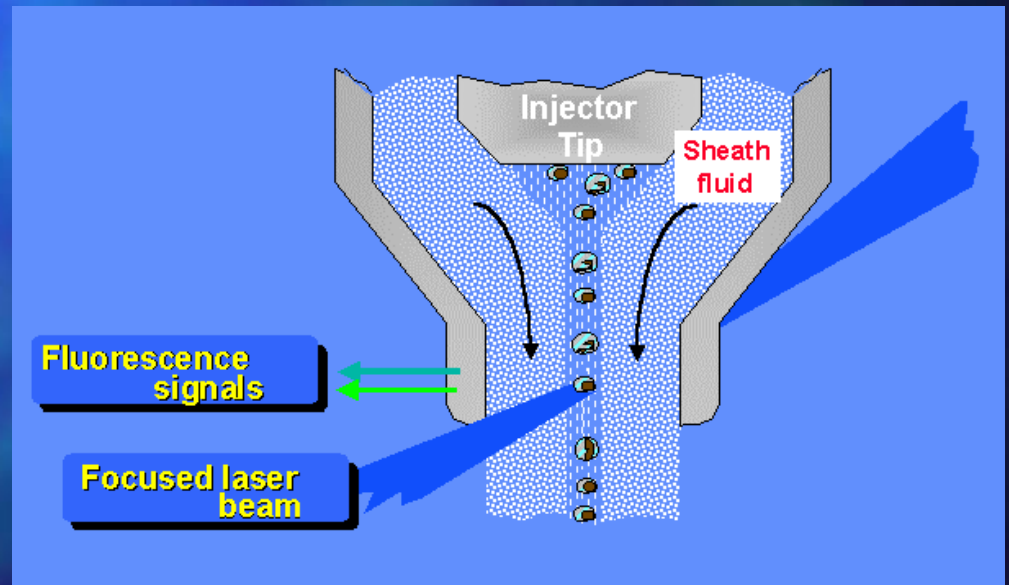
Sorgente luminosa

Ioni Argon

- lunghezza d'onda di 488 nm
- Possibilità di utilizzare più fluorocromi

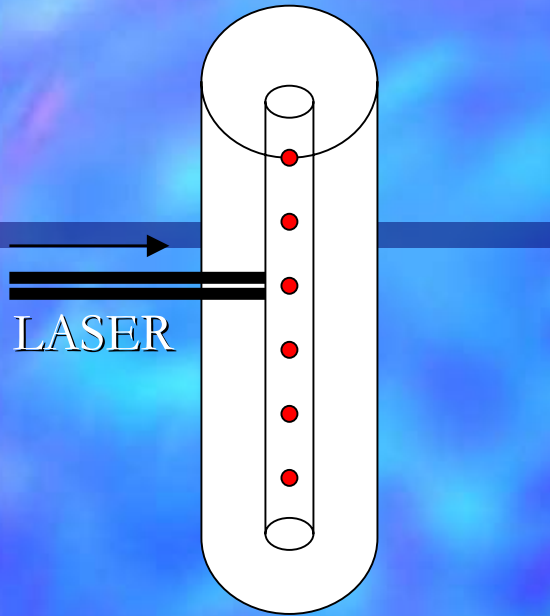
Sistema fluidico

Focalizzazione idrodinamica: le singole cellule devono attraversare il punto di intersezione con un raggio di luce, anch'esso focalizzato, mantenendosi allineate lungo l'asse di un filetto fluido di piccole dimensioni



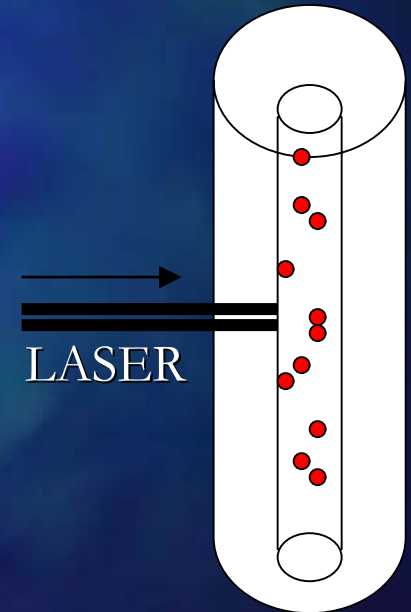
RATE basso (200-500
eventi/sec):

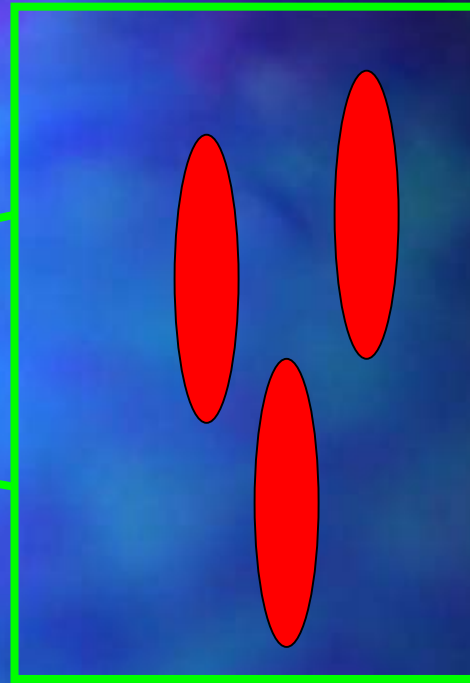
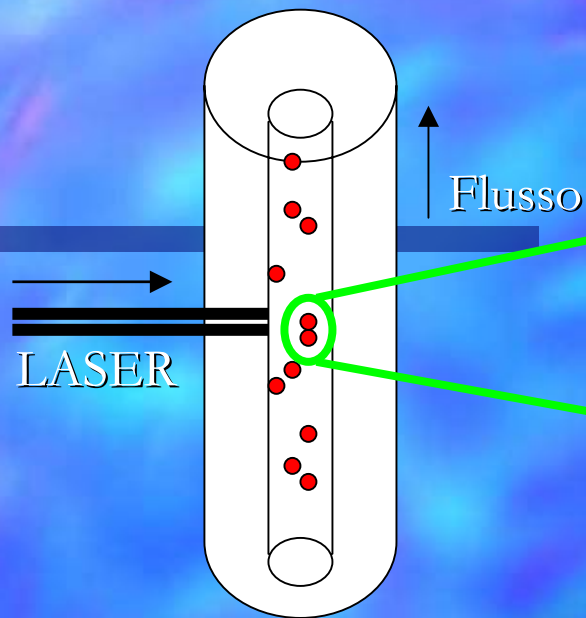
Le cellule vengono “centrate”
regolarmente dal laser e
generano segnali uguali a parità
di caratteristiche



RATE alto (2000-
3000eventi/sec):

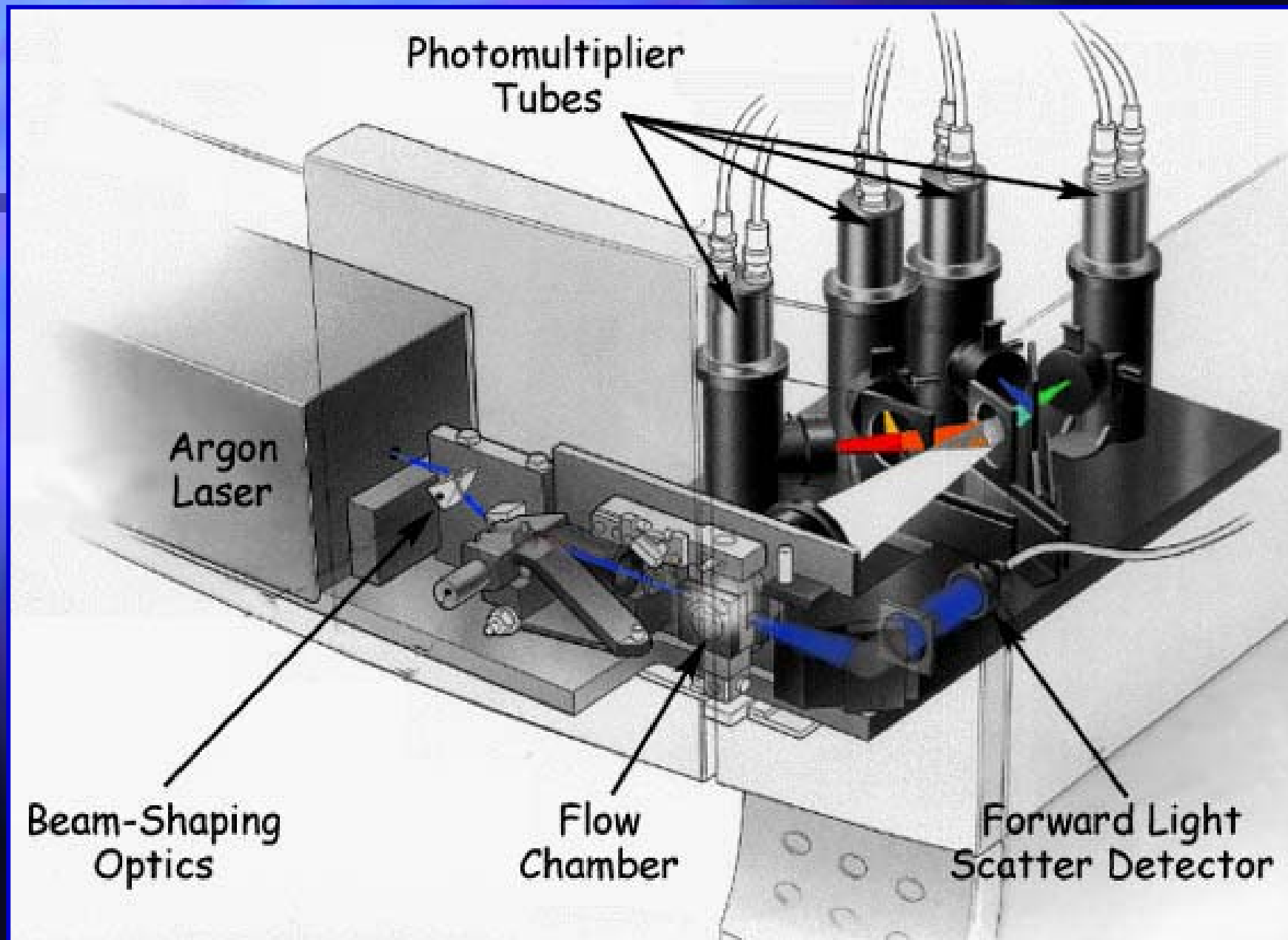
Le cellule scorrono in zone
diverse dal core e vengono
“centrate” irregolarmente dal
laser. A parità di caratteristiche
vengono generati segnali
disuguali



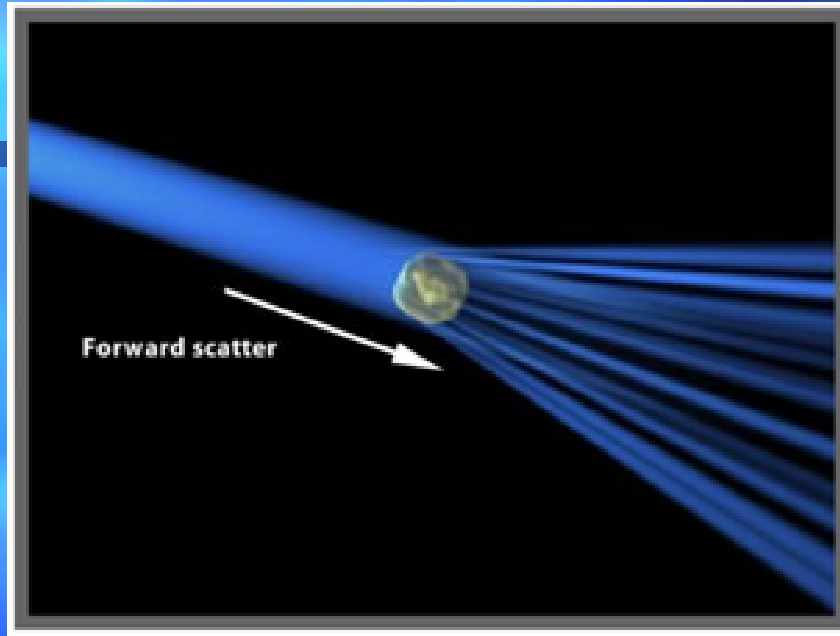


RATE alto
(2000-3000eventi/sec)

Le cellule tendono ad allungarsi secondo l'asse del flusso (forma "a sigaro"). Ne risulta una diversa esposizione temporale alla luce di eccitazione, con generazione di segnali di maggiore ampiezza



Segnali di scatter

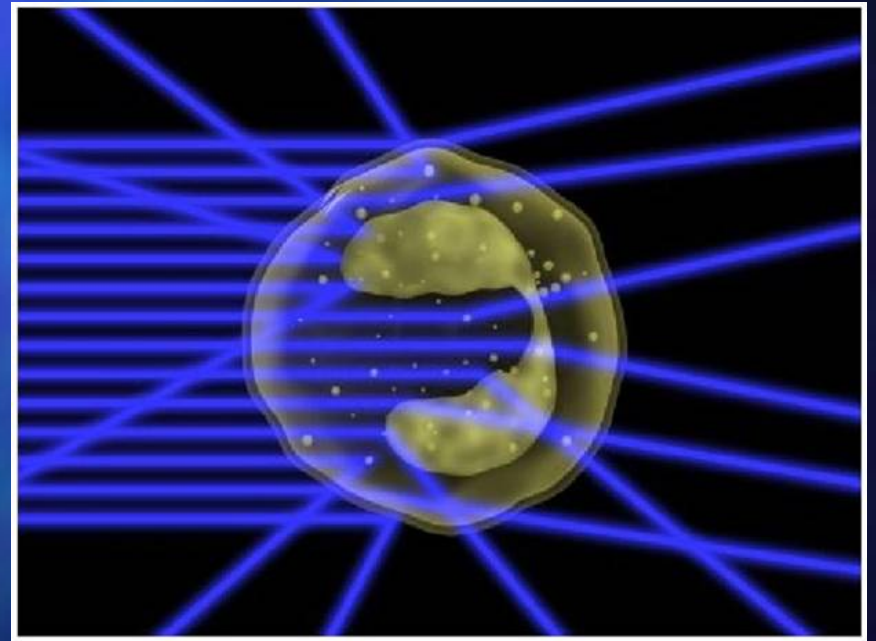
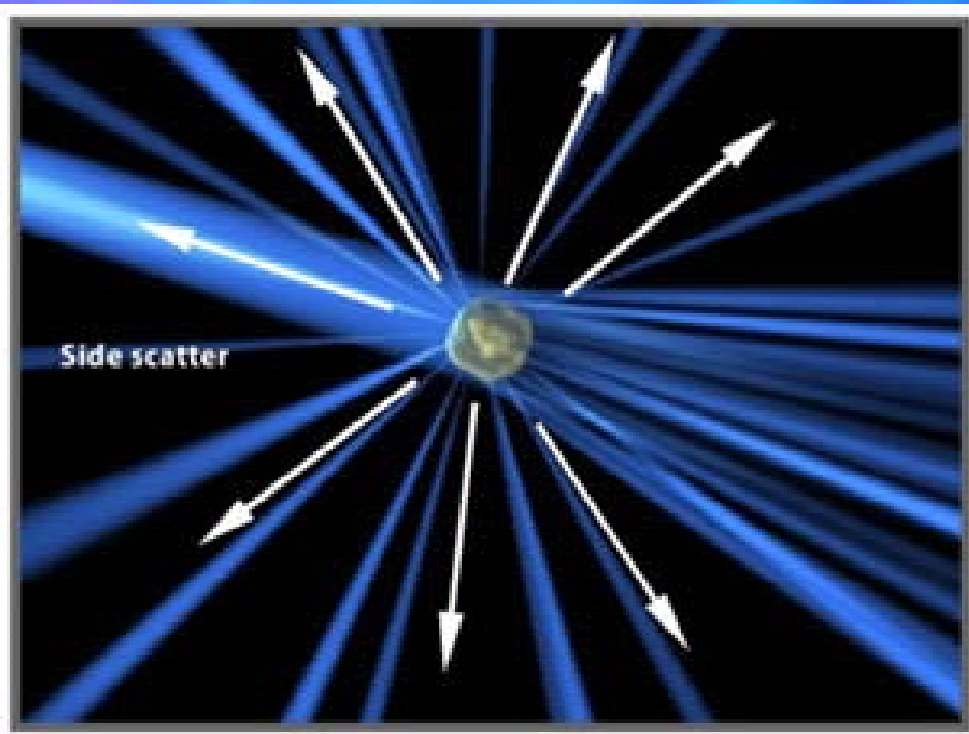


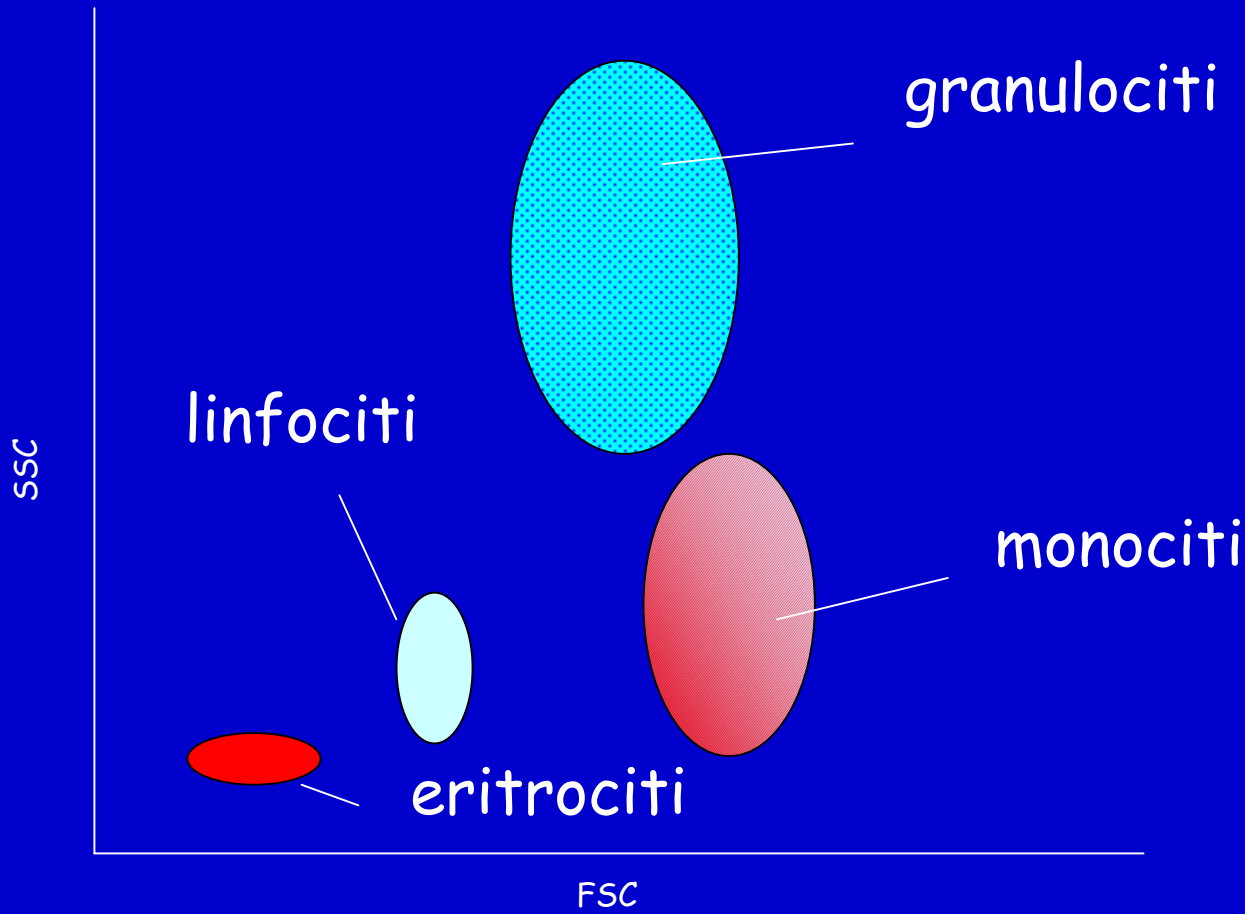
Forward scatter (diffusione anteriore):

- Misurazione della quantità di luce dispersa in avanti (lungo lo stesso asse di direzione del fascio)
- In funzione del diametro (**volume**)
- Si riduce nelle cellule morte

Side scatter (diffusione laterale):

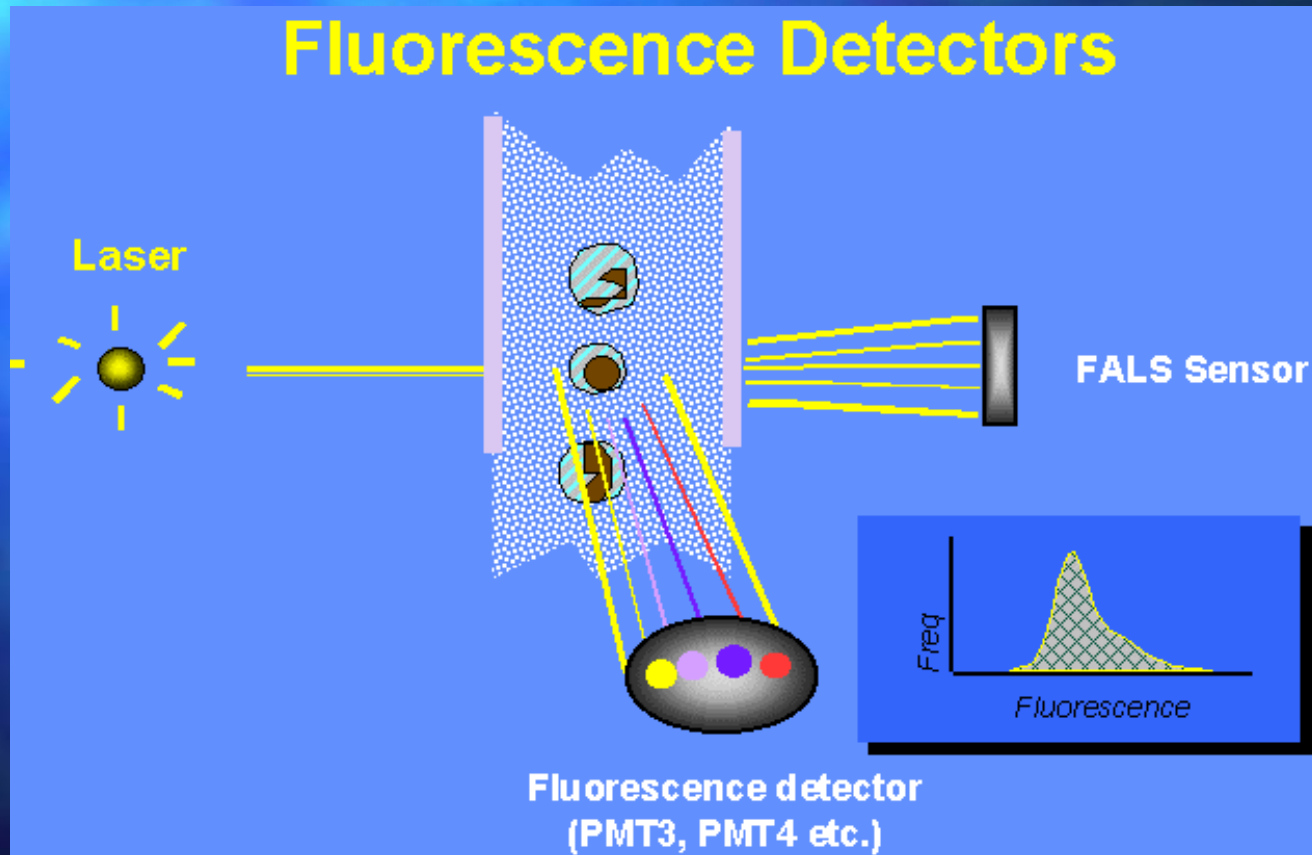
Molto sensibile alla granularità interna delle cellule;
indicatore della complessità strutturale delle
cellule





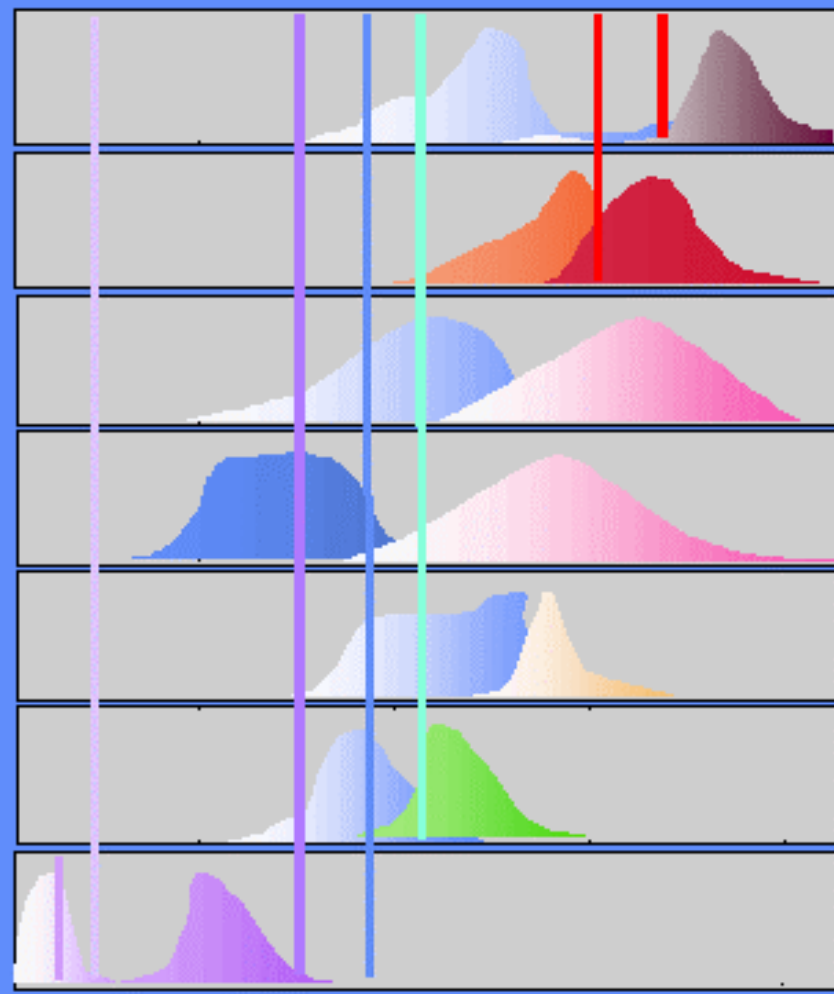
Fluorescenza

Uso di fluorocromi



**Common
Laser
Lines**

350 457 488 514 610 632
300 nm 400 nm 500 nm 600 nm 700 nm



PE-TR Conj.

Texas Red

PI

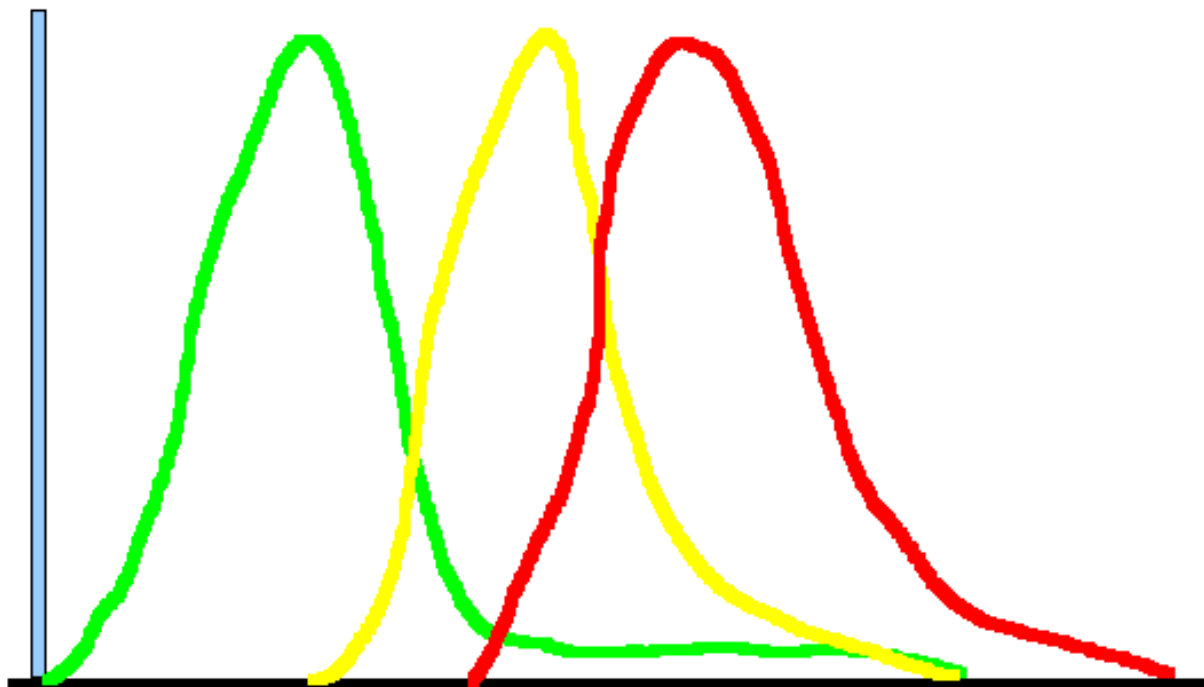
Ethidium

PE

FITC

cis-Parinaric acid

Sovrapposizione degli spettri di emissione ("code di emissione")



Compensazione

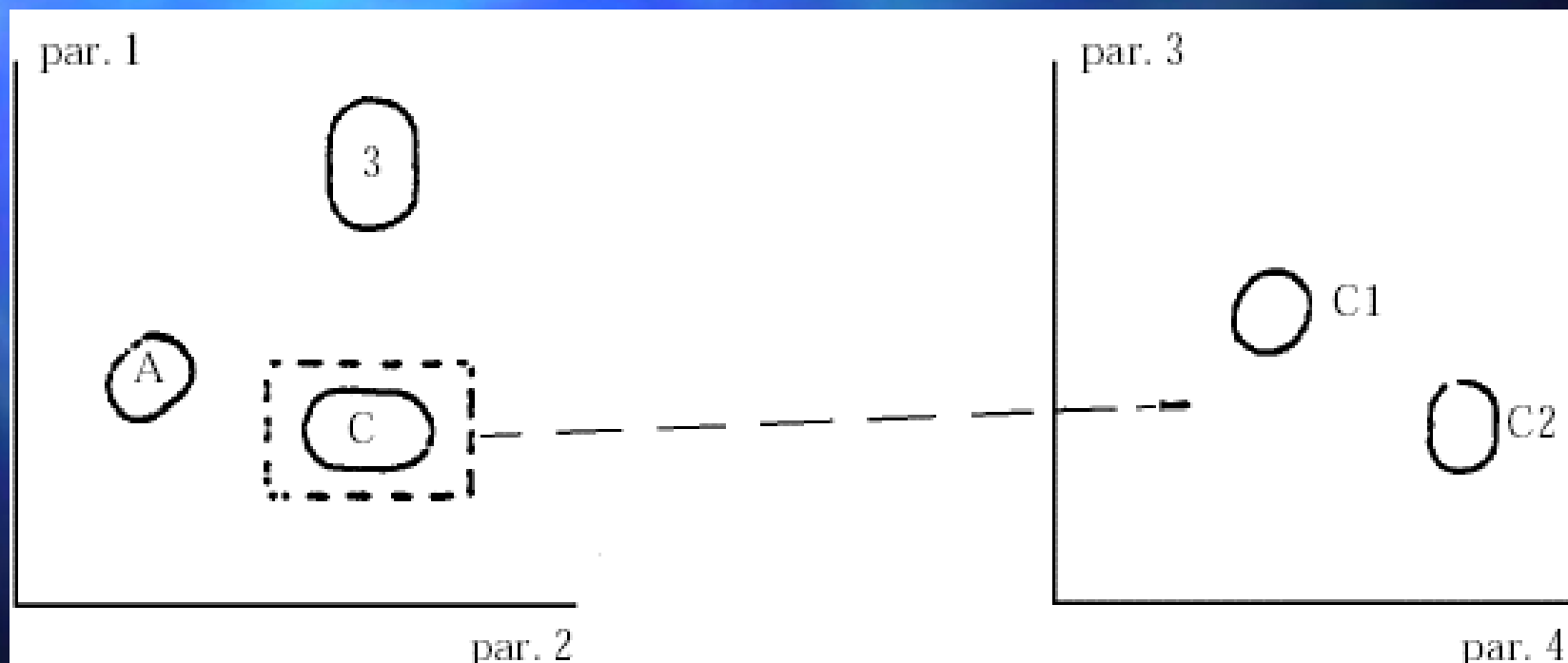
- *Scopo*: sottrarre elettronicamente dal canale rosso (PE), una quota fissa di segnale relativo alla lettura parassita del verde (FITC) e viceversa.
- Regola delle 4 F: *“La compensazione deve essere fatta con strumento perfettamente allineato e rimane Fissa per quella data combinazione di Fluorocromi, per quel dato set di Filtri e per quella data regolazione dei Fotomoltiplicatori”*

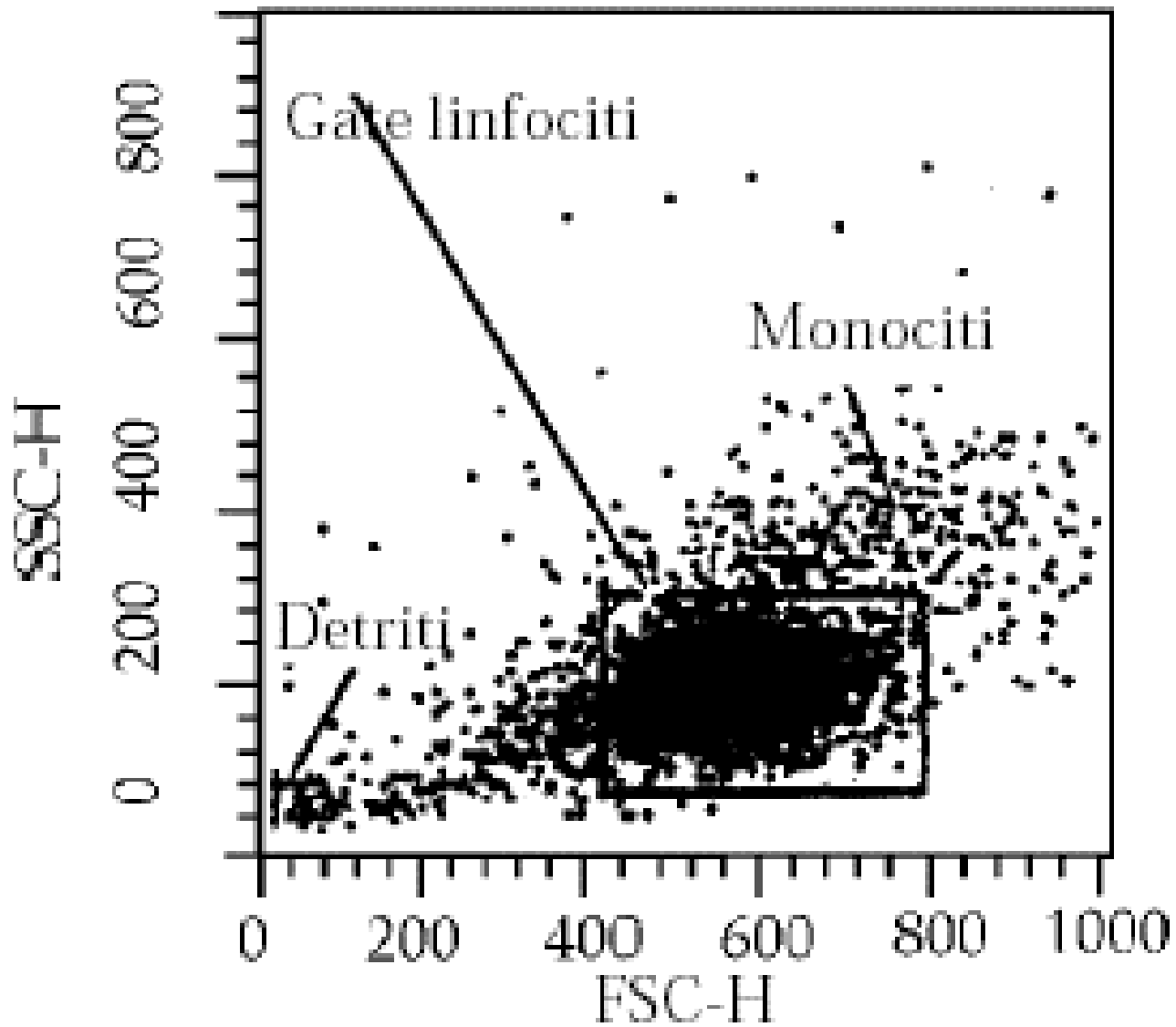
Autofluorescenza (o bianco)

- Qualsiasi oggetto, colpito da qualsiasi luce incidente, emette un segnale di fluorescenza misurabile su tutti i canali, per quanto di debole intensità
- L'intensità dell'a. dipende dal tipo di cellula
- Alcune condizioni patologiche aumentano l'autofluorescenza (iperbilirubinemia, trattamento con vit.B, emolisi spontanea...)
- L'attacco specifico di Abs coniugati, i fluorocromi liberi in soluzione, fissativi cellulari aumentano l'a.
- L'a. è ineliminabile e costituisce l'obbligato termine di paragone di ogni marcatura cellulare

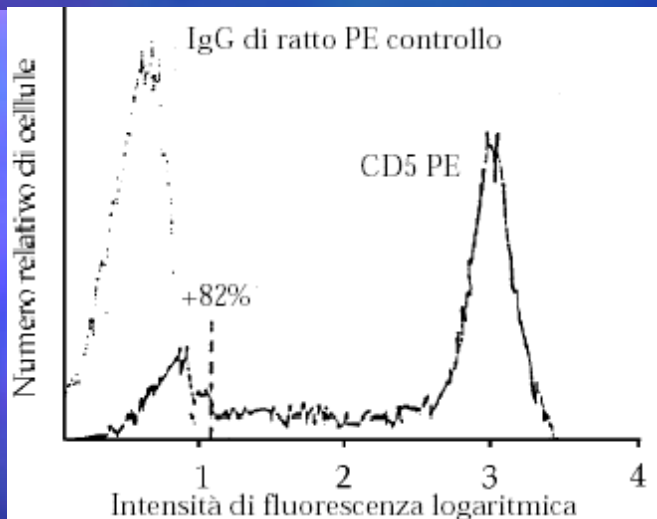
Gating

Selezione elettronica delle cellule da esaminare

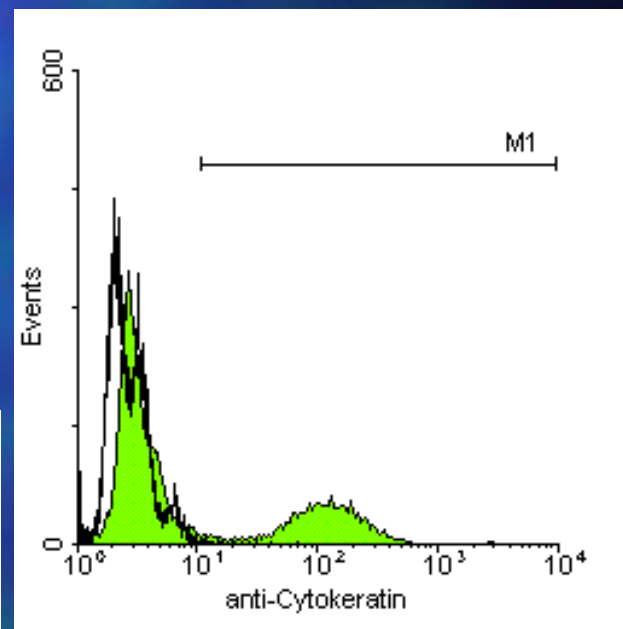
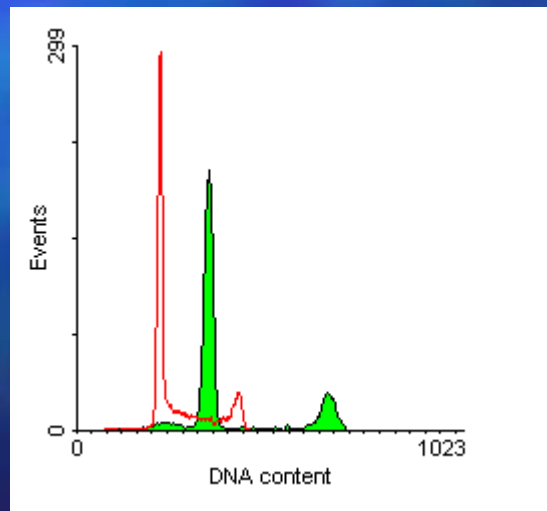




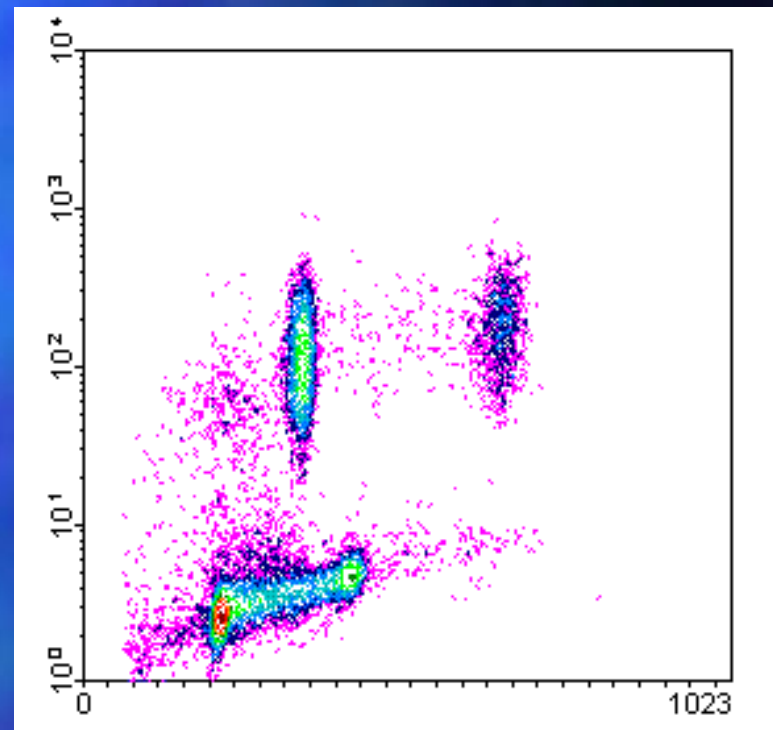
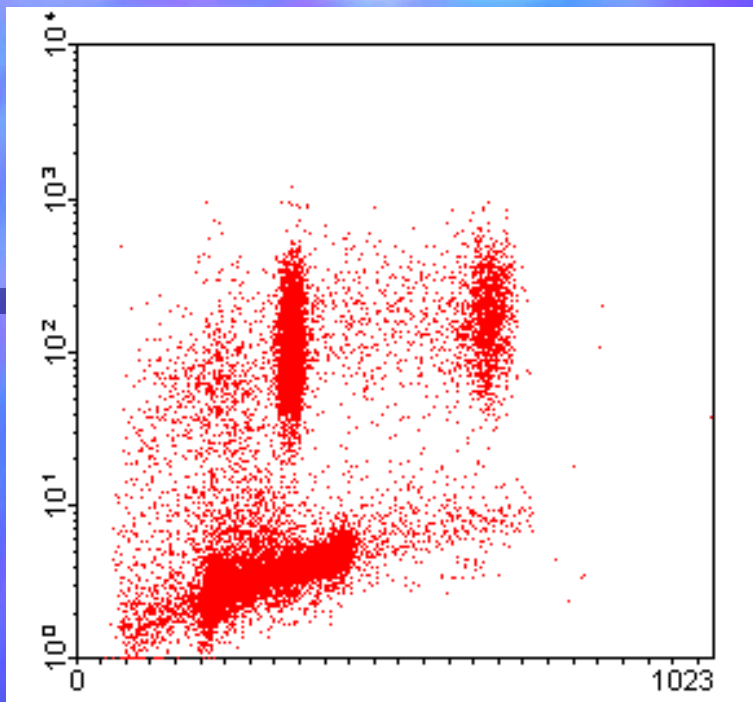
Rappresentazione dei dati



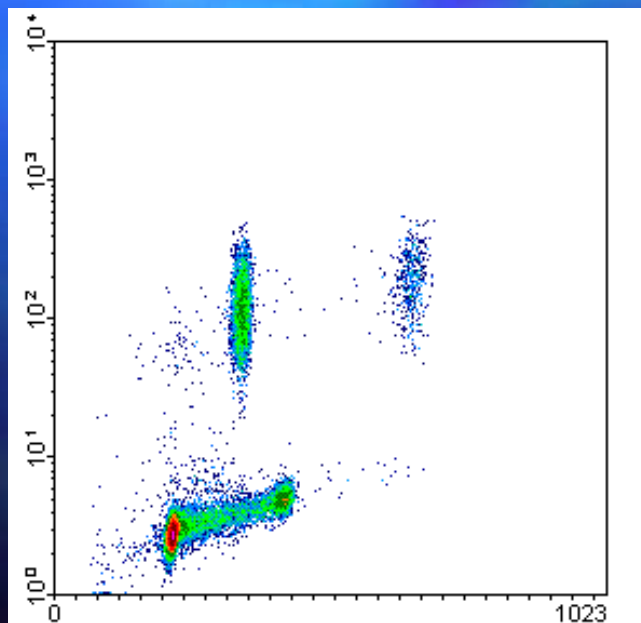
Istogramma



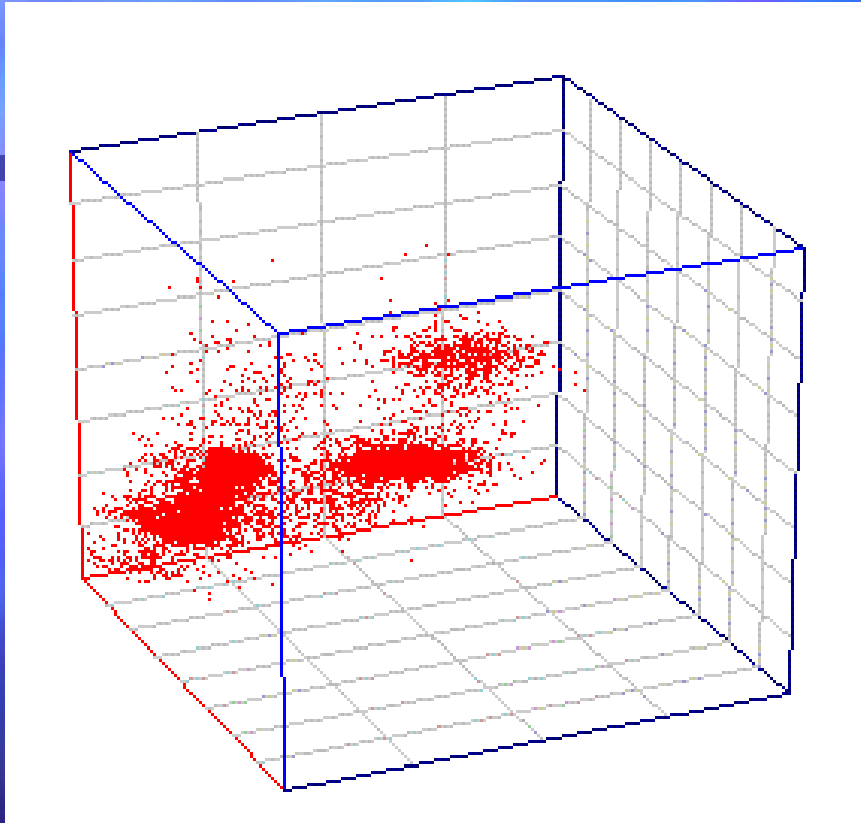
Dot plot



Contour plot

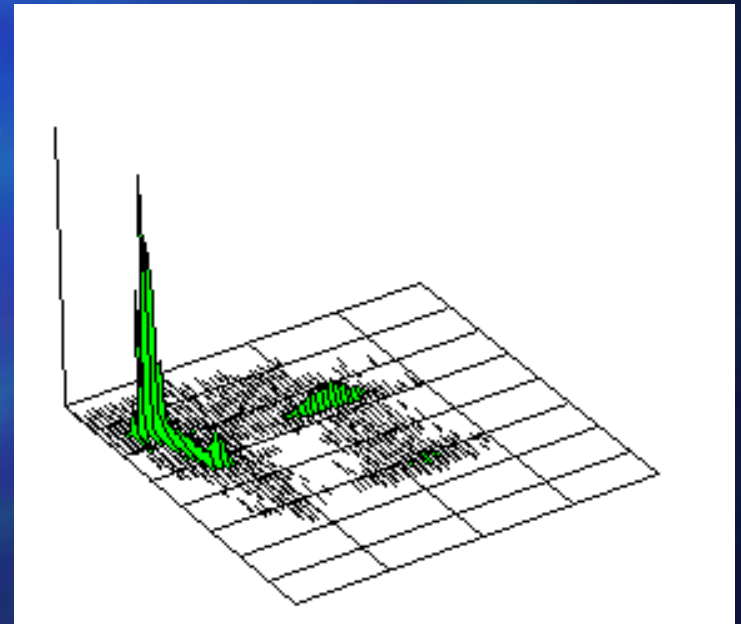


Density plot



3D plot

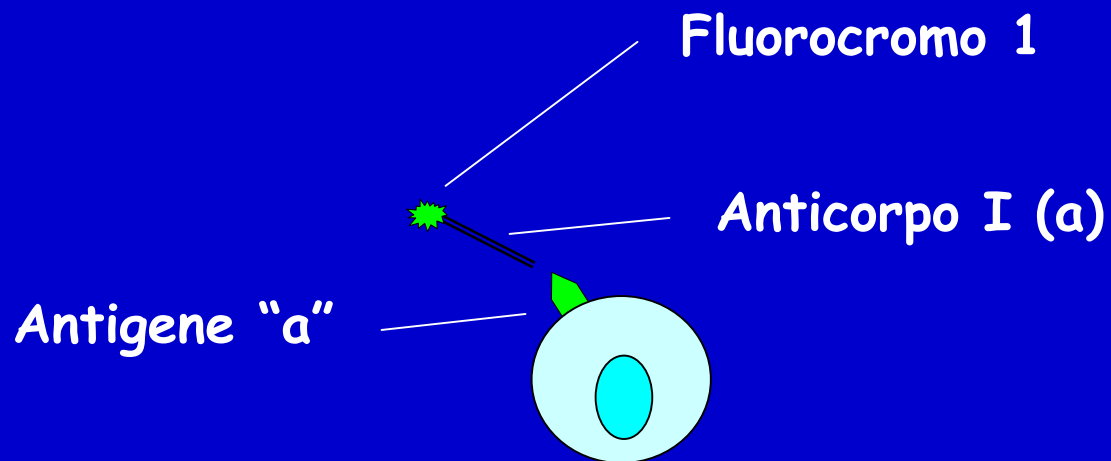
Isocontour plot



IMMUNOFLUORESCENZA

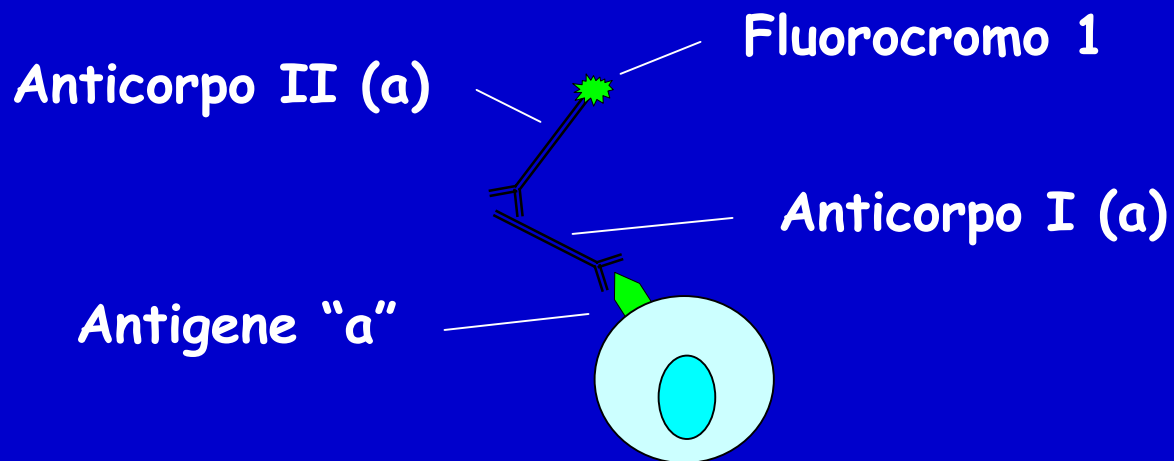


Immunofluorescenza singola diretta



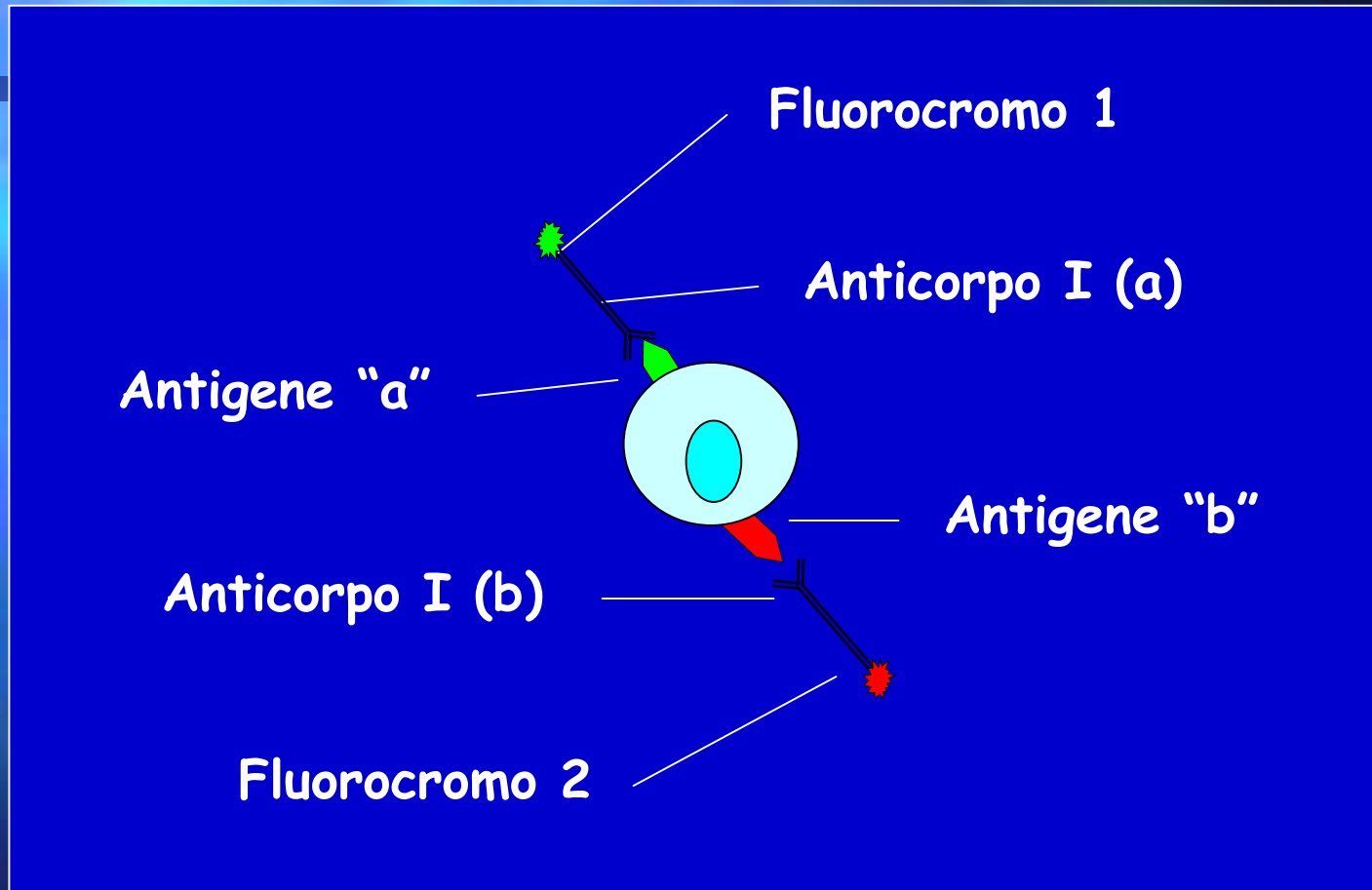
Es. Fluorocromo 1 → FITC

Immunofluorescenza singola indiretta



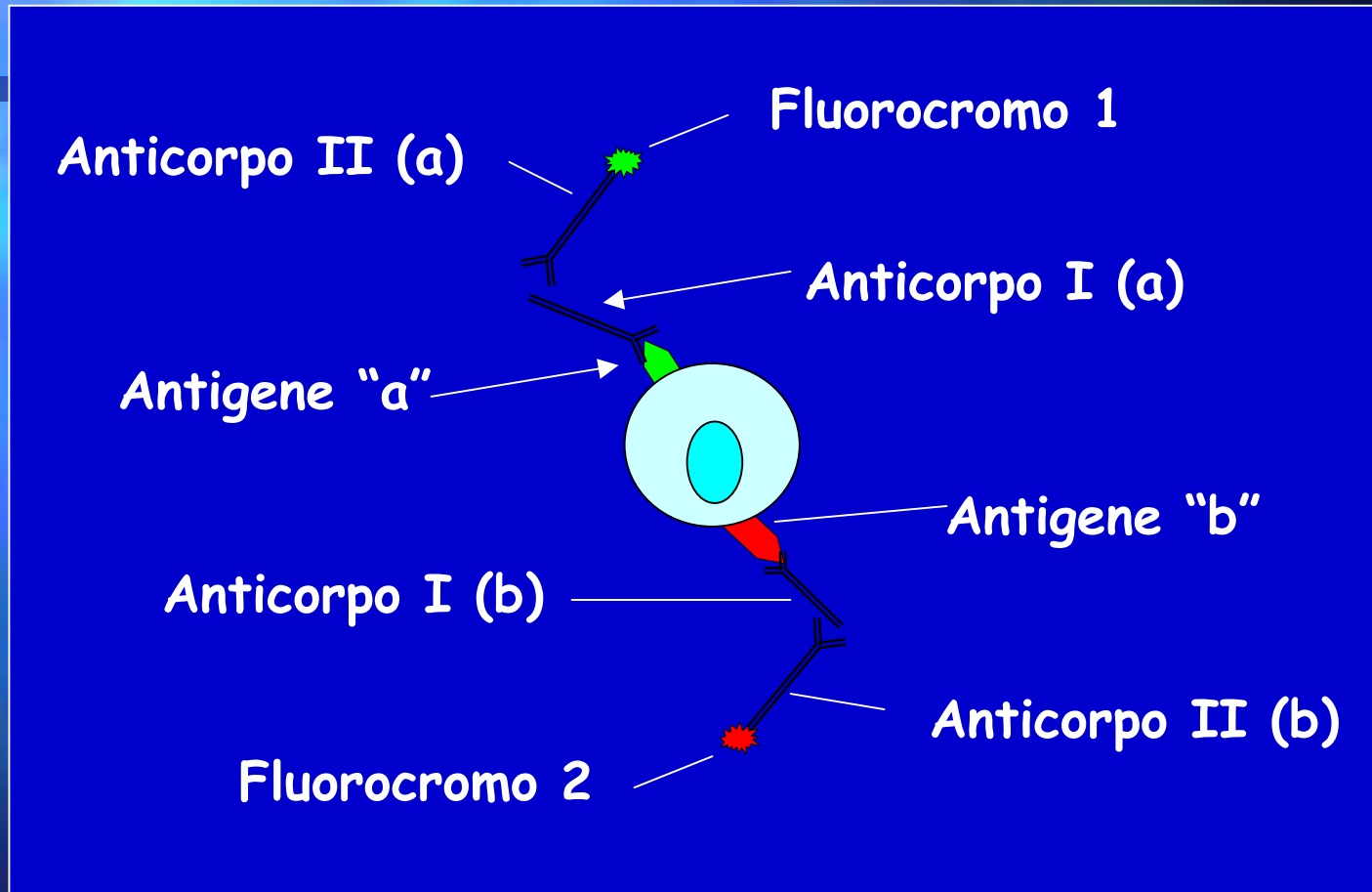
Es. Fluorocromo 1 \rightarrow FITC

Immunofluorescenza doppia diretta



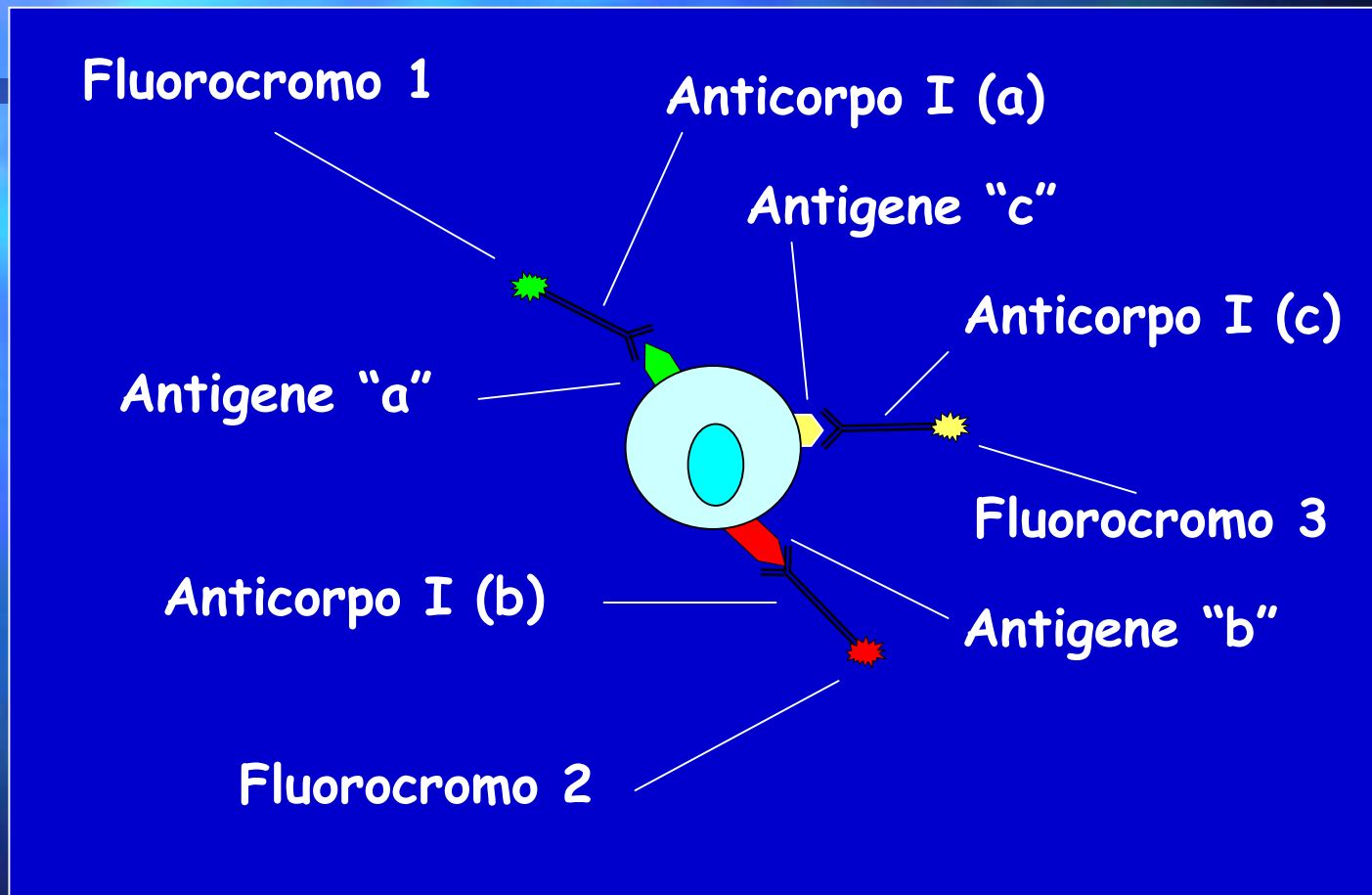
Es. Fluorocromo 1 → FITC; Fluorocromo 2 → PE

Immunofluorescenza doppia indiretta



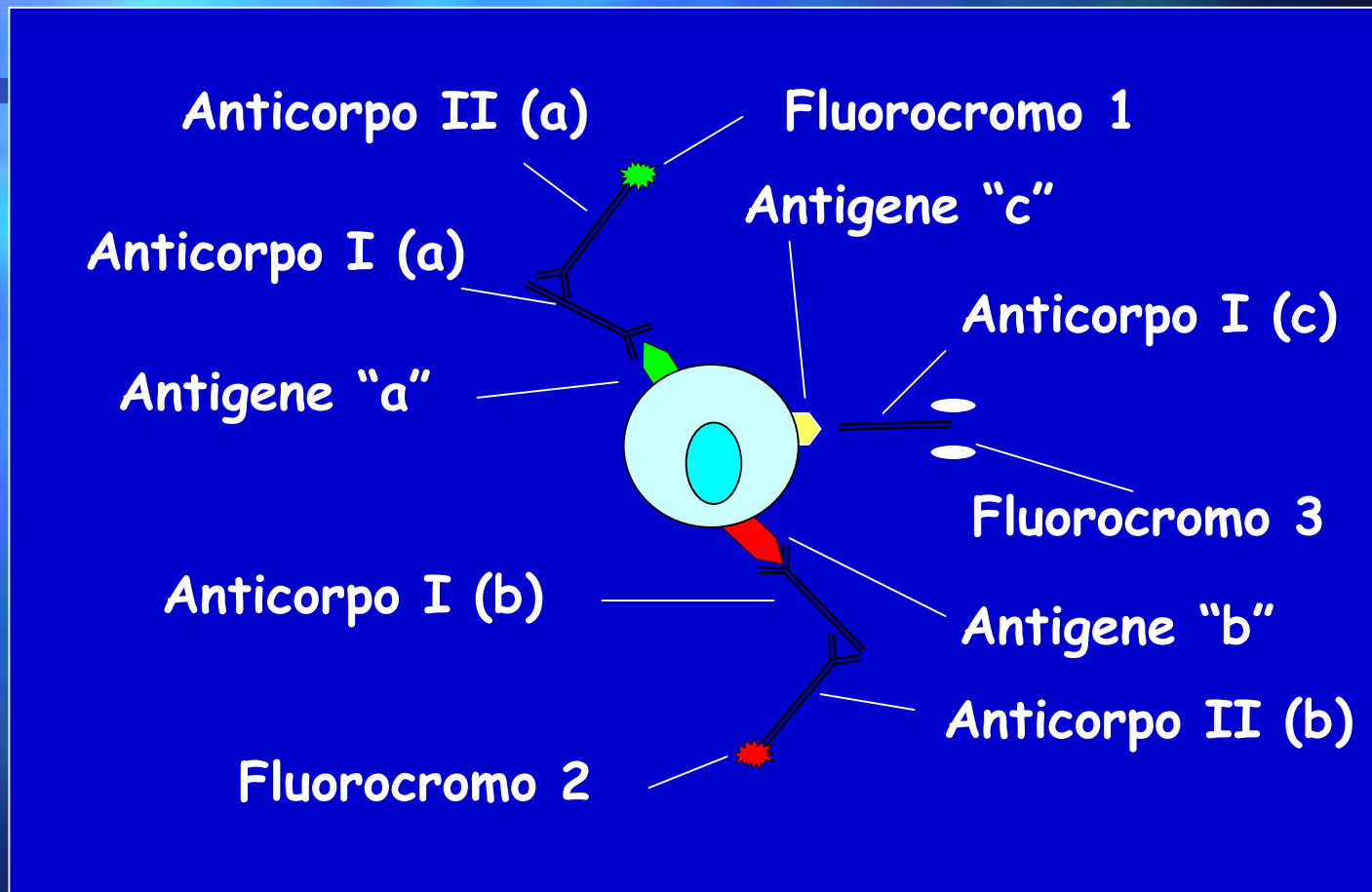
Es. Fluorocromo 1 \rightarrow FITC; Fluorocromo 2 \rightarrow PE

Immunofluorescenza tripla diretta



Es. Fluorocromo 1 → FITC; Fluorocromo 2 → PE; Fluorocromo 3
→ Duo-CHROME (PE-Texas red)

Immunofluorescenza tripla indiretta



Es. Fluorocromo 1 → FITC; Fluorocromo 2 → PE; Fluorocromo 3 →
biotina legata a streptavidina coniugata con APC

APPLICAZIONI

- ✓ Analisi degli antigeni cellulari di superficie
- ✓ Diagnosi più accurata di leucemie e linfomi
- ✓ Analisi del contenuto di DNA dei tumori
- ✓ Definizione più corretta delle cellule neoplastiche
- ✓ Misurazione dei sottotipi linfocitari nei pazienti affetti da HIV

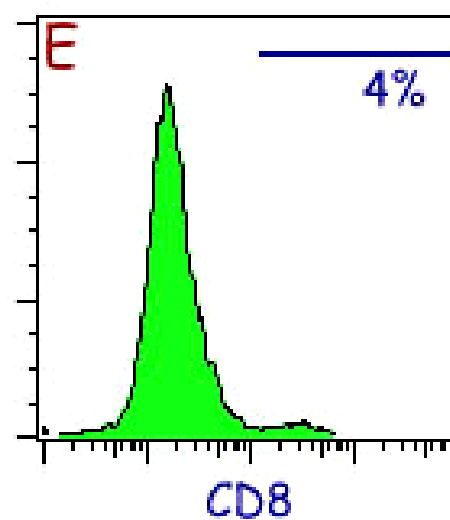
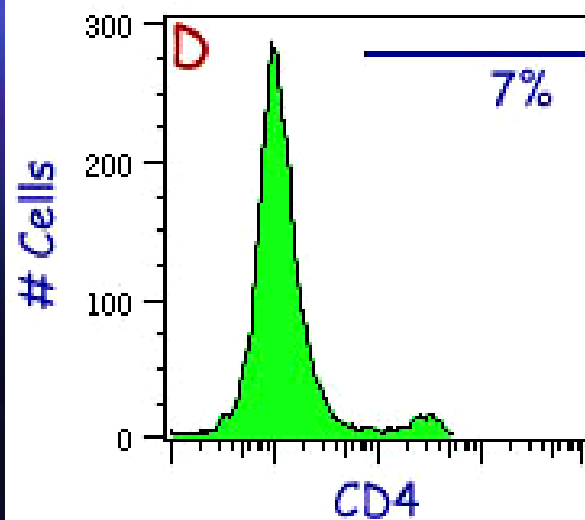
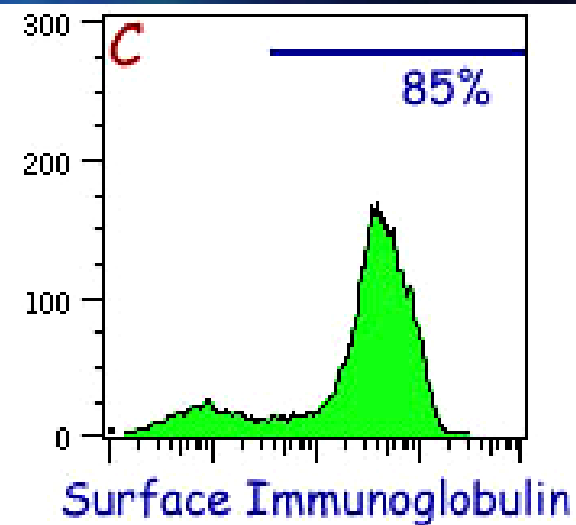
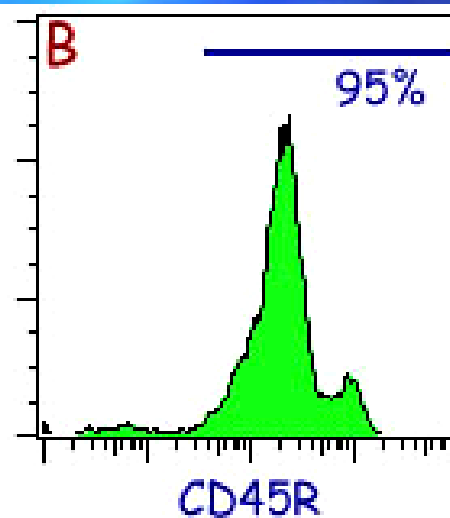
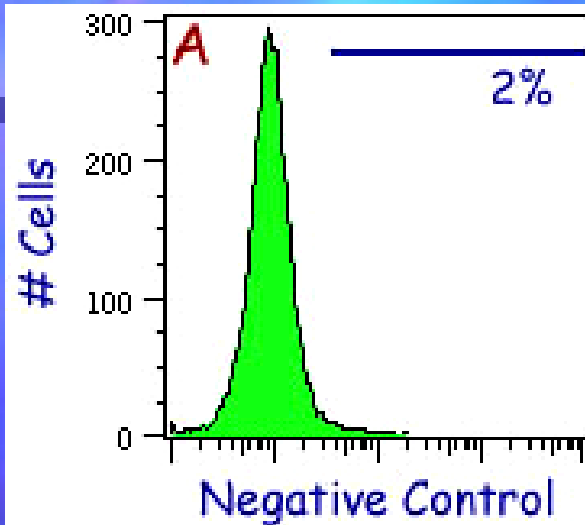
Svantaggi:

- Alto costo
- Alta complessità strumentale
- Difficoltà nell'applicazione allo studio di tessuti solidi

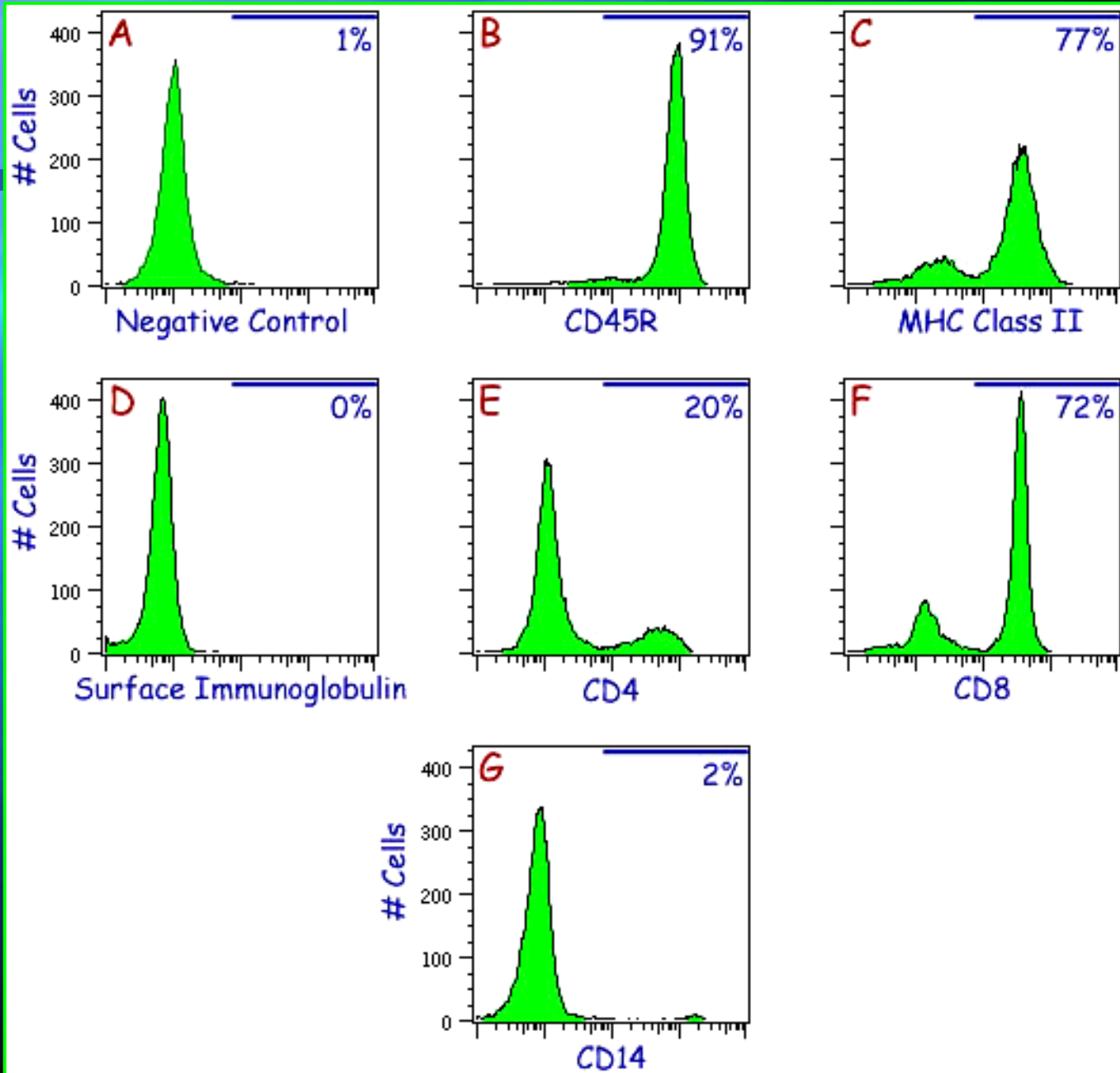
Vantaggi:

- Possibilità di analizzare simultaneamente diverse popolazioni cellulari
- Analisi multiparametrica
- Elevato numero di cellule esaminate
- Rapidità dei tempi di analisi
- Semplicità di processazione dei campioni

Leucemia



Leucemia



La citofluorimetria nello studio della ploidia e della proliferazione cellulare

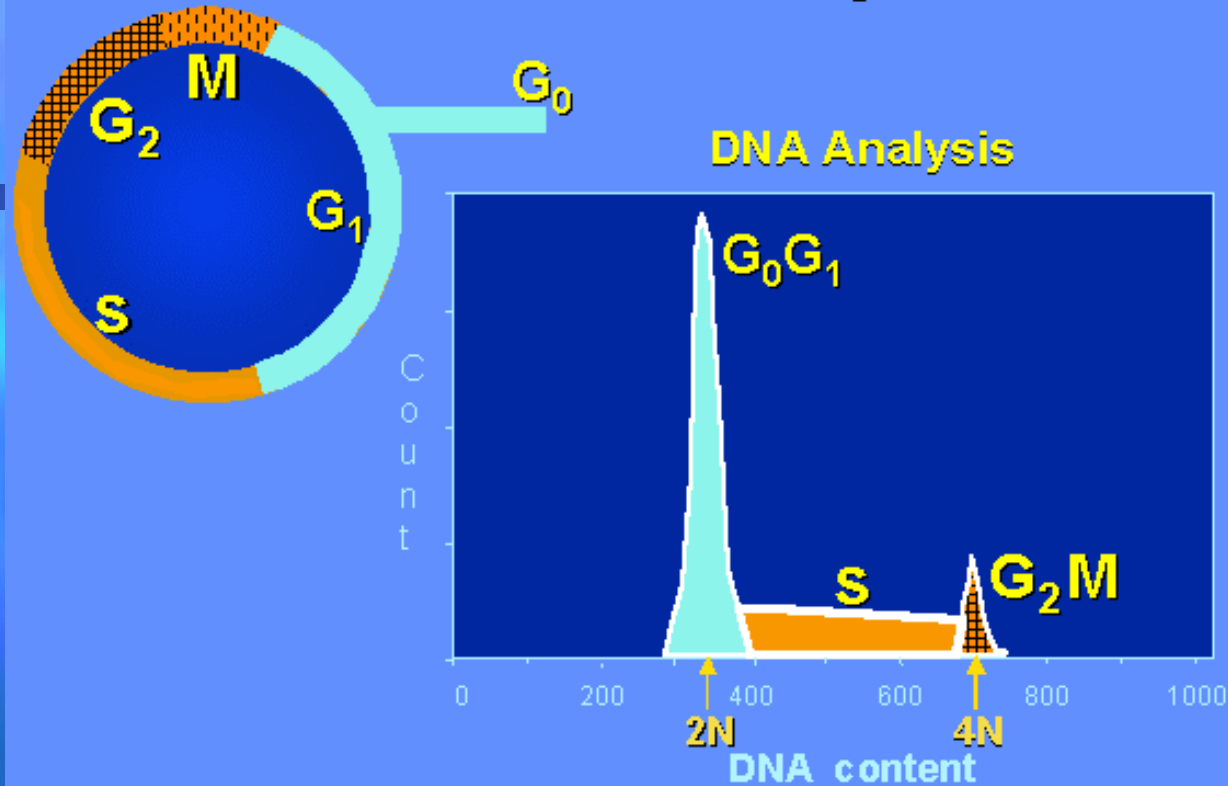
Nelle neoplasie: mutamenti genetici cromosomici con variazione del contenuto di DNA (ploidia)

Cambiamenti del numero di cromosomi:

aneuploidie

- Ipodiploidie = perdite di materiale genetico
- Iperdiploidie = aggiunte di materiale genetico

Normal Cell Cycle



- Per marcare il DNA si utilizza lo *ioduro di propidio*, colorante intercalante del DNA che viene eccitato a 488 nm ed emette nello spettro del rosso (625 nm).
- Lo ioduro di propidio è in grado di penetrare esclusivamente nelle cellule permeabilizzate.

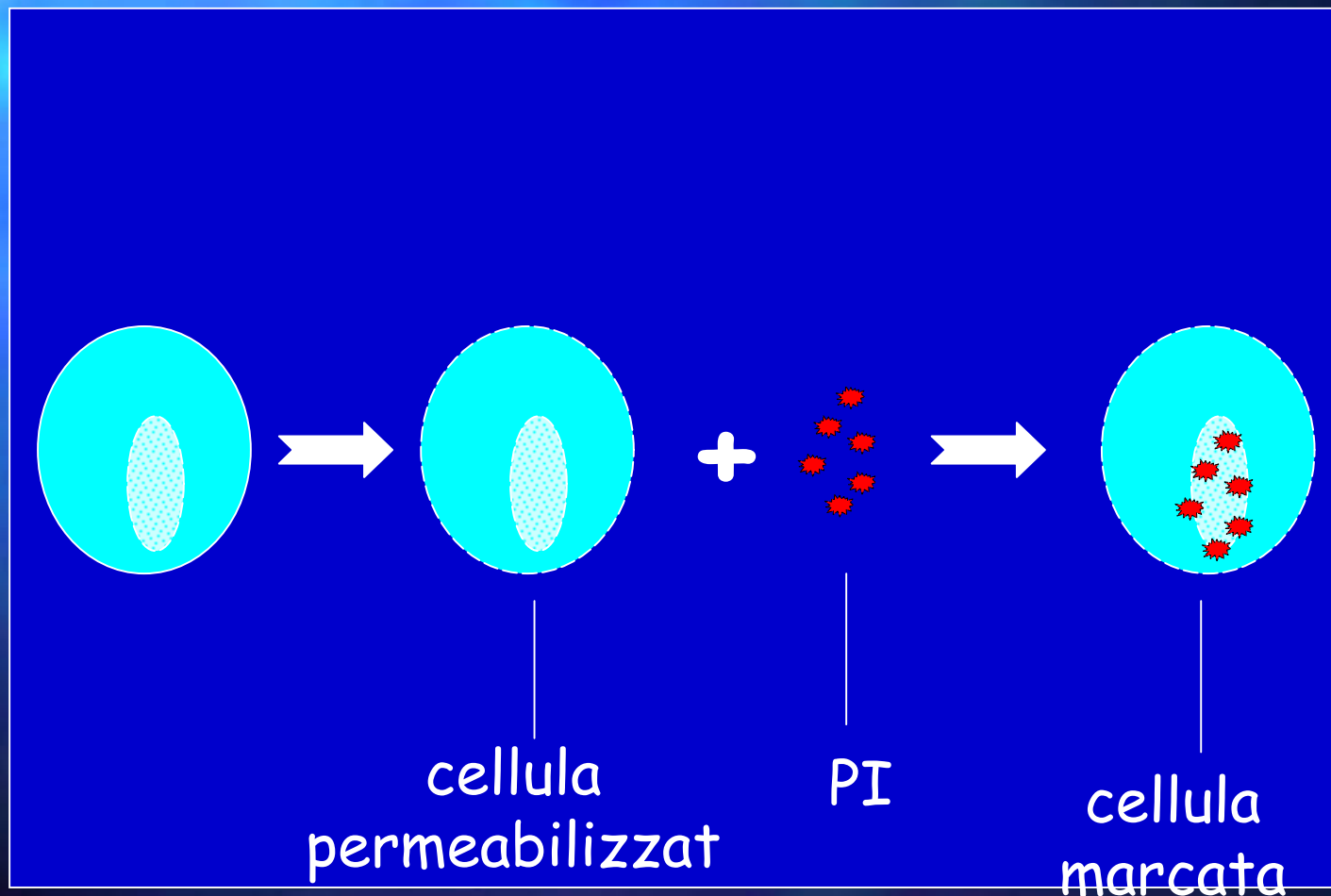
preparare la
linea cellulare



preparare la
soluzione
permeabilizzante le
cellule (Triton X-100)
contenente PI



unire la
soluzione di PI
alla linea
cellulare



a

L'istogramma di frequenza del DNA di una popolazione aneuploide ottenuto con la citofluorimetria, mostrerà almeno un picco di cellule in fase G0-G1 soprannumeraria rispetto ad una normale popolazione diploide, a distribuzione di DNA unimodale, con un solo picco di cellule in fase G0-G1

Parametro: FL2 -A
Scala: Auto
Gate Set: Off

Modello: SFIT

Picchi G1 G2M CV

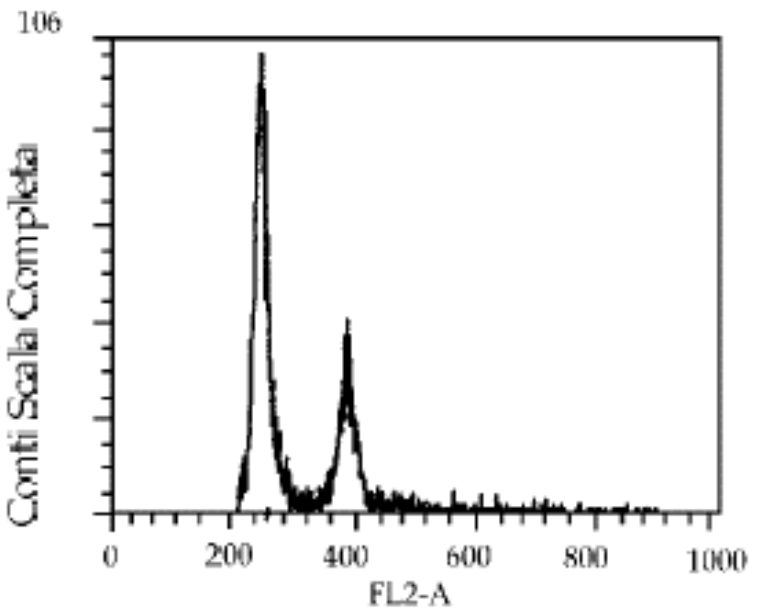
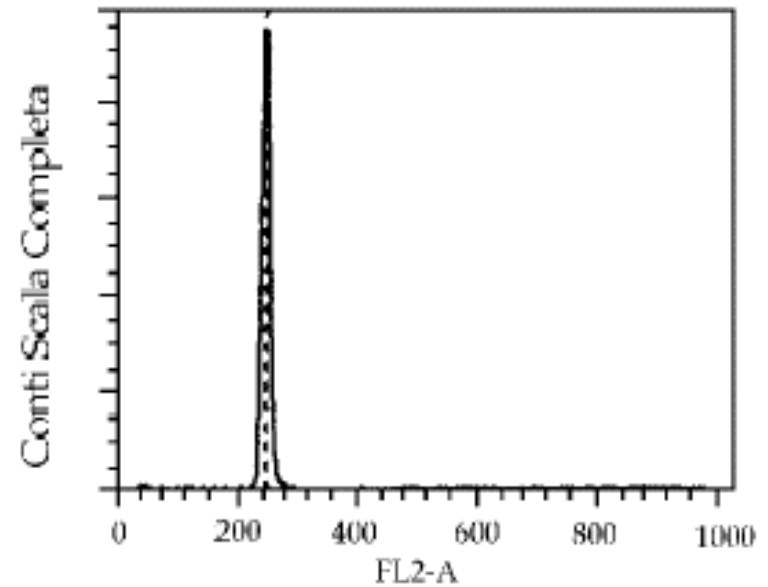
Rifer.:0

Pop.1: 247 0 2.83

Background

Sinistra: 0 0

Destra: 0 0



Ulteriore applicazione

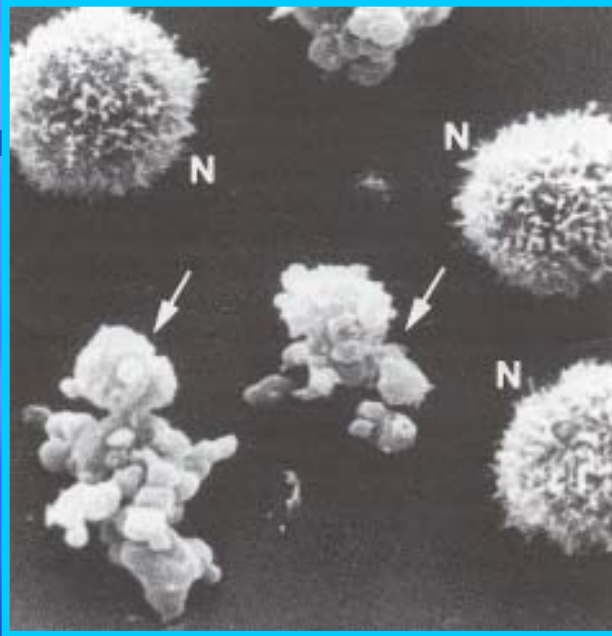
Immunofenotipo nei soggetti con infezione da HIV:

- deplezione linfociti CD4+

Monitoraggio dei linfociti in soggetti HIV+ogni 36 mesi mediante:

- 1) Conteggio dei leucociti (WBC)
- 2) Percentuale dei linfociti
- 3) Percentuale dei linfociti CD4+ (con CF)

Studio dell'apoptosi



- coartazione cellulare
- condensazione cromatinica
- blebbing

↓ FS
↑ SS

- Colorazione con PI di cellule fissate in etanolo:
 - Ridotto contenuto di DNA nelle cellule apoptotiche

Citofluorimetria in onco-ematologia

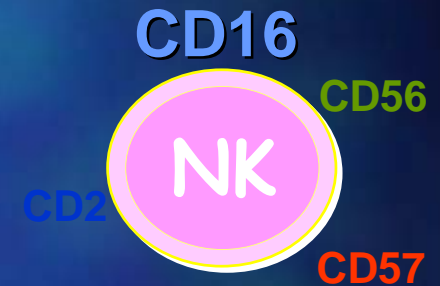
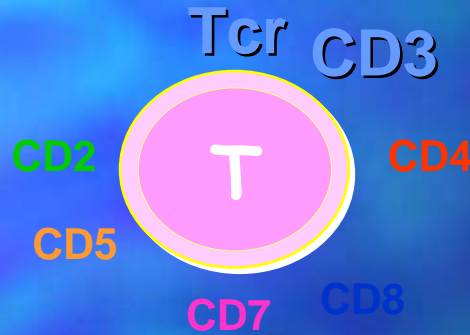
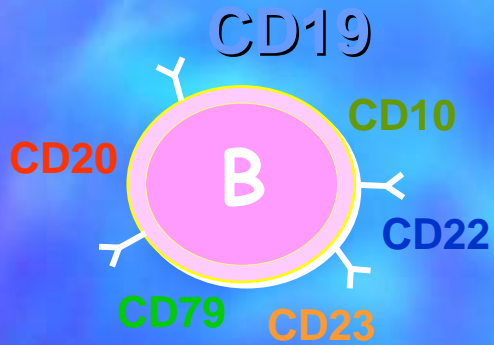
DIAGNOSI

MONITORAGGIO DELLA MALATTIA

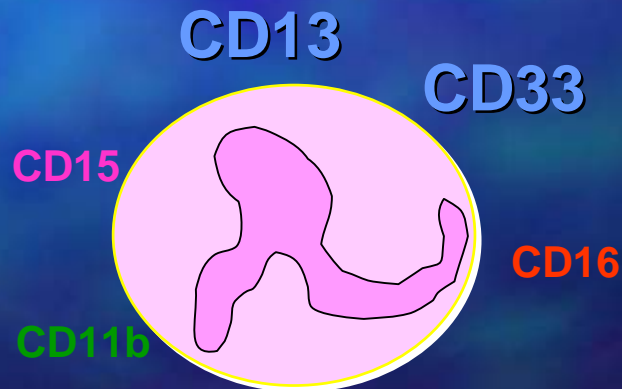
STUDIO DI FATTORI PROGNOSTICI

Marcatori specifici

Linfociti



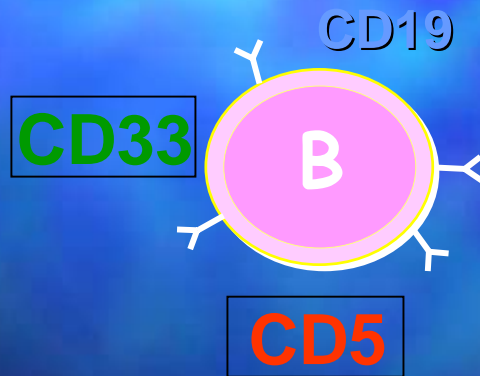
Cellule mieloidi



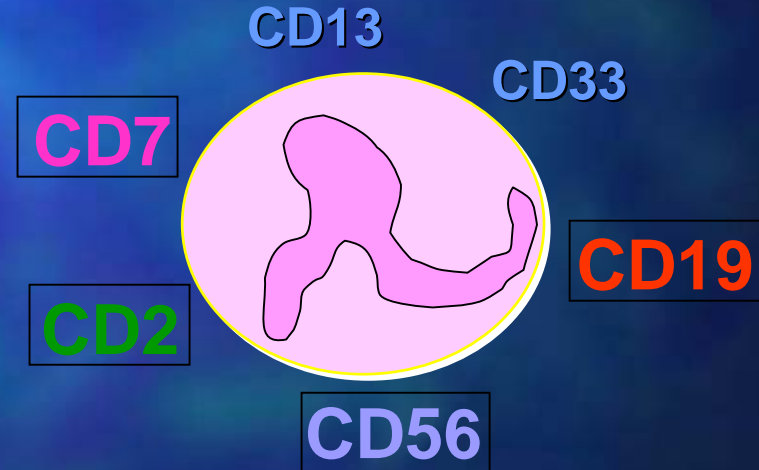
Marcatori aberranti

Nella LA associati ad anomalie citogenetiche e prognosi

Linfociti

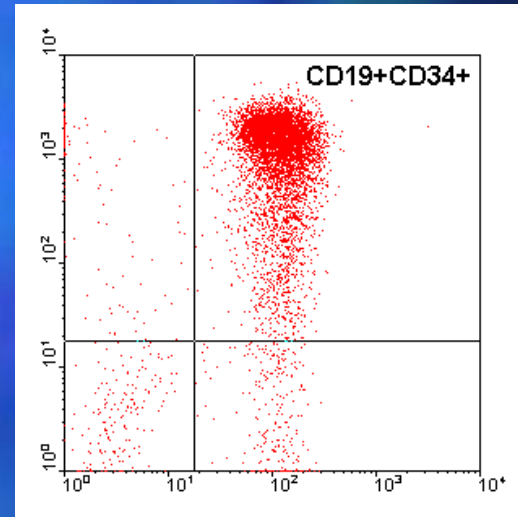
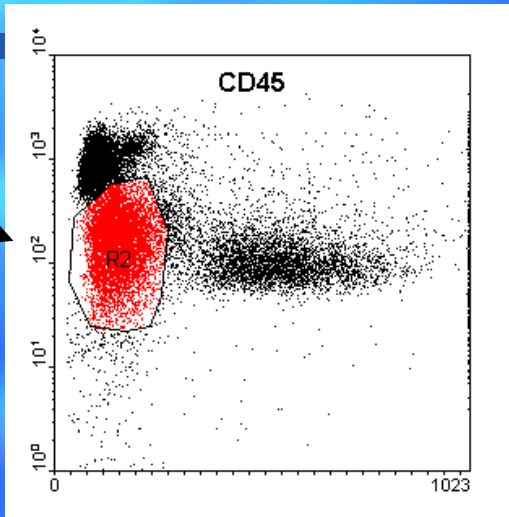


Cellule mieloidi

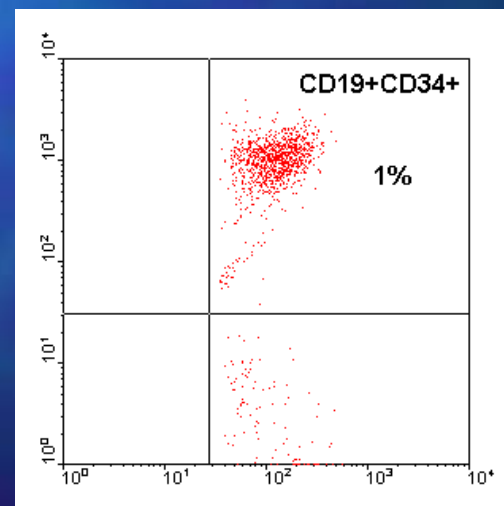
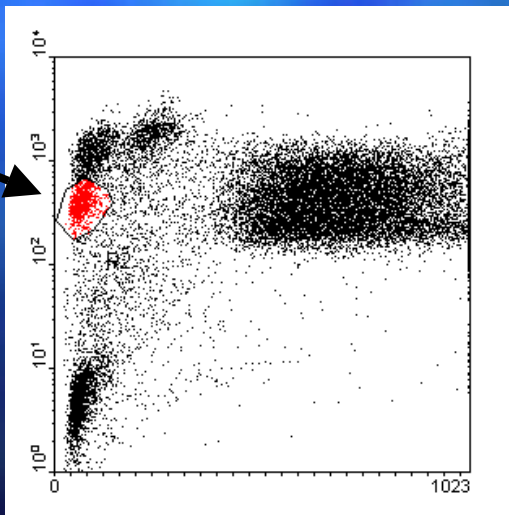


Monitoraggio durante la terapia (LLA)

blasti
linfoidi



blasti
linfoidi



Your work is going to fill a large part of your life, and the only way to be truly satisfied is to do what you believe is great work. And the only way to do great work is to love what you do. If you haven't found it yet, keep looking. Don't settle. As with all matters of the heart, you'll know when you find it. And, like any great relationship, it just gets better and better as the years roll on. So keep looking until you find it.

