

La citometria a flusso

La citometria a flusso è in grado di rilevare le proprietà individuali di singole particelle sospese in un liquido. Il dispositivo che consente tale studio è il citometro che utilizza un sistema fluidico, un'ottica di rilevamento, un sistema di elaborazione del segnale, un sistema di ordinamento elettrostatico delle particelle, delle sonde fluorescenti denominate fluorocromi ed un software di gestione che permette anche di creare e stampare vari tipi di istogrammi a partire dai dati ottenuti dalle altre sue componenti.

Il citometro

Il sistema fluidico

Esso è costituito da una camera esterna che ingloba una camera interna. Tra le pareti di queste due camere si fa scorrere un fluido in modo tale che in esso non si formino né turbolenze né vortici. All'interno della camera centrale si colloca il liquido da esaminare. Naturalmente, le sue particelle si disporranno disordinatamente e casualmente nello spazio. Ma il fluido esterno scorrendo nel sistema provoca un'aspirazione sul fluido della camera interna, conica, determinando l'allineamento delle sue particelle in una sola colonna [focalizzazione idrodinamica]. È importante sottolineare che, in tali circostanze, i due fluidi non si mescolano ma scorrono separatamente.

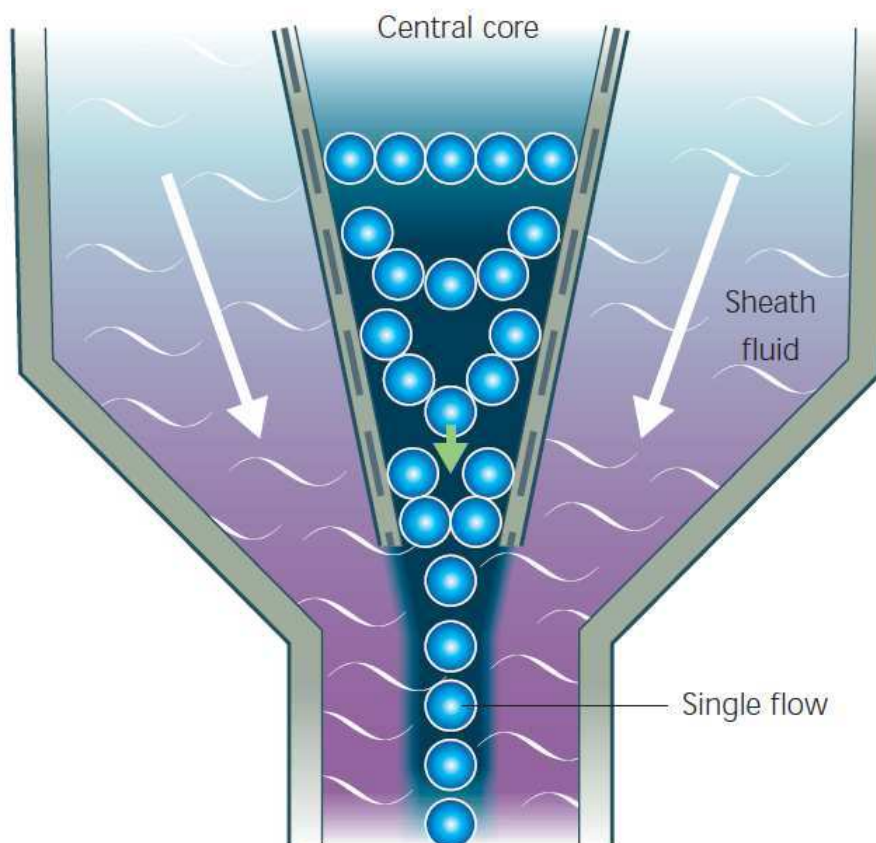


FIGURE 1

Hydrodynamic focusing produces a single stream of particles

L'ottica di rilevamento

Quindi le particelle fuoriescono una per volta dall'ugello della camera interna e vengono investite da uno o più fasci luminosi originati da una o più sorgenti laser. Ogni laser emette un fascio di luce ad una frequenza specifica. La luce che colpisce le particelle viene raccolta ed analizzata da fotorecettori posti longitudinalmente o perpendicolarmente al fascio luminoso. I valori di trasmissione longitudinale permettono di distinguere i detriti dalle particelle intere, mentre quelli della riflessione perpendicolare danno informazioni sul contenuto in granuli della particella.

Utilizzando laser che emettono a differenti lunghezze d'onda (colore) si possono ottenere informazioni qualitative e quantitative sui recettori di superficie della cellula o sulle molecole citoplasmatiche.

Per poter utilizzare solo determinate lunghezze d'onda, lungo il percorso della luce laser si possono collocare dei filtri ottici i quali fanno passare la luce a lunghezza d'onda superiore ad un certo valore [filtri a trasmissione lunga], al di sotto di un certo valore [filtri a trasmissione corta] o compresa tra un minimo ed un massimo [filtri a trasmissione compresa in questa larghezza di banda o, meglio, filtri detti più propriamente a banda passante].

Se la superficie di tali filtri è disposta a 45° rispetto all'asse del fascio luminoso [filtri dicroici] la luce è contemporaneamente trasmessa longitudinalmente e riflessa perpendicolarmente.

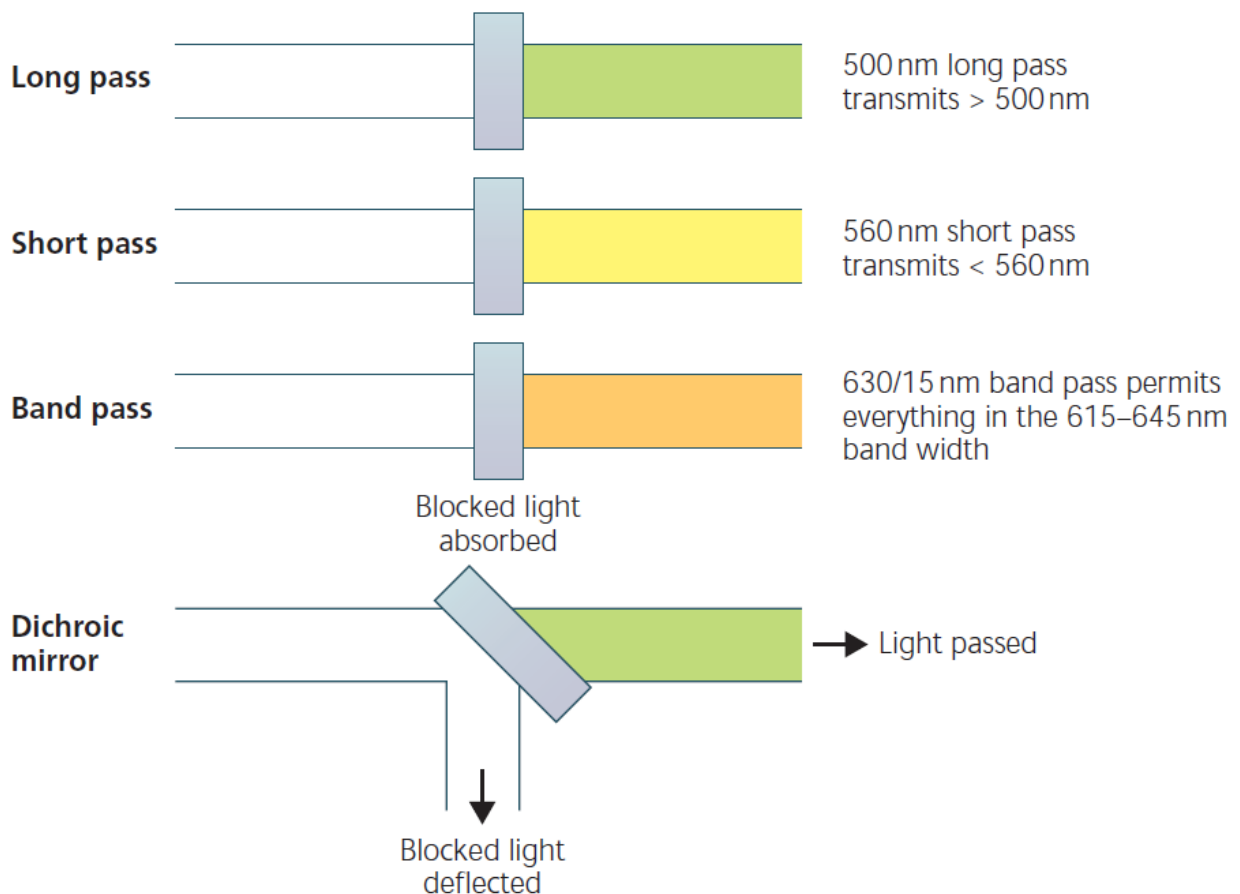


FIGURE 2 Different types of optical filters

L'elaborazione del segnale

Quando un fotorecettore viene colpito da un fascio luminoso esso genera un piccolissimo potenziale elettrico [parametro] che deve essere amplificato opportunamente prima di poter essere utilizzato per costruire un grafico. I dati provenienti da ciascun parametro sono detti "eventi", essi rappresentano l'insieme delle particelle che esibiscono la caratteristica in esame.

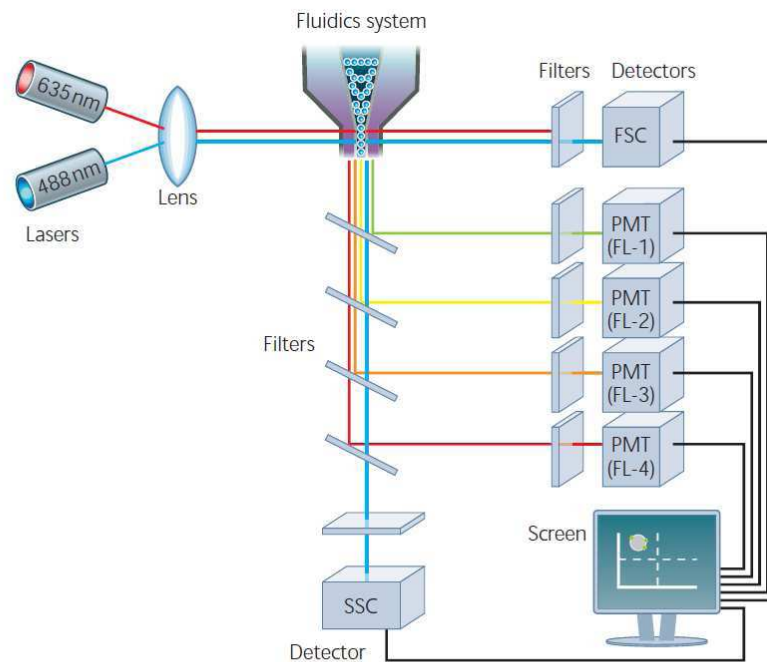


FIGURE 3 Schematic overview of a typical flow cytometer setup

L'ordinamento elettrostatico delle cellule

Se la particella esaminata soddisfa i criteri di ordinamento del citometro allora essa viene caricata elettricamente esattamente nel momento in cui si distacca dalla corrente fluida [punto di break-off]. Allo scopo di far avvenire tale distacco sempre alla stessa distanza dalla punta dell'ugello e per mantenere costanti le dimensioni delle goccioline l'ugello viene fatto vibrare ad alta frequenza. Quindi le particelle cariche elettricamente attraversano un campo elettrostatico intenso che le deflette in base alla loro carica.

La velocità di ordinamento del fluido è, tra l'altro, funzione delle dimensioni delle goccioline e della loro velocità di formazione. Un tipico ugello di 50 - 70 micrometri può permettere l'ordinamento di 30.000 - 100.000 cellule al secondo.

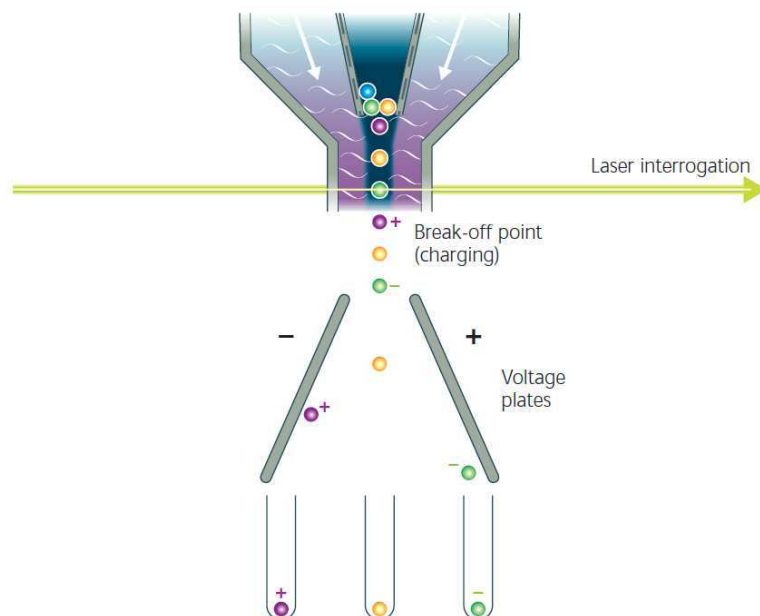


FIGURE 4 Electrostatic flow sorting

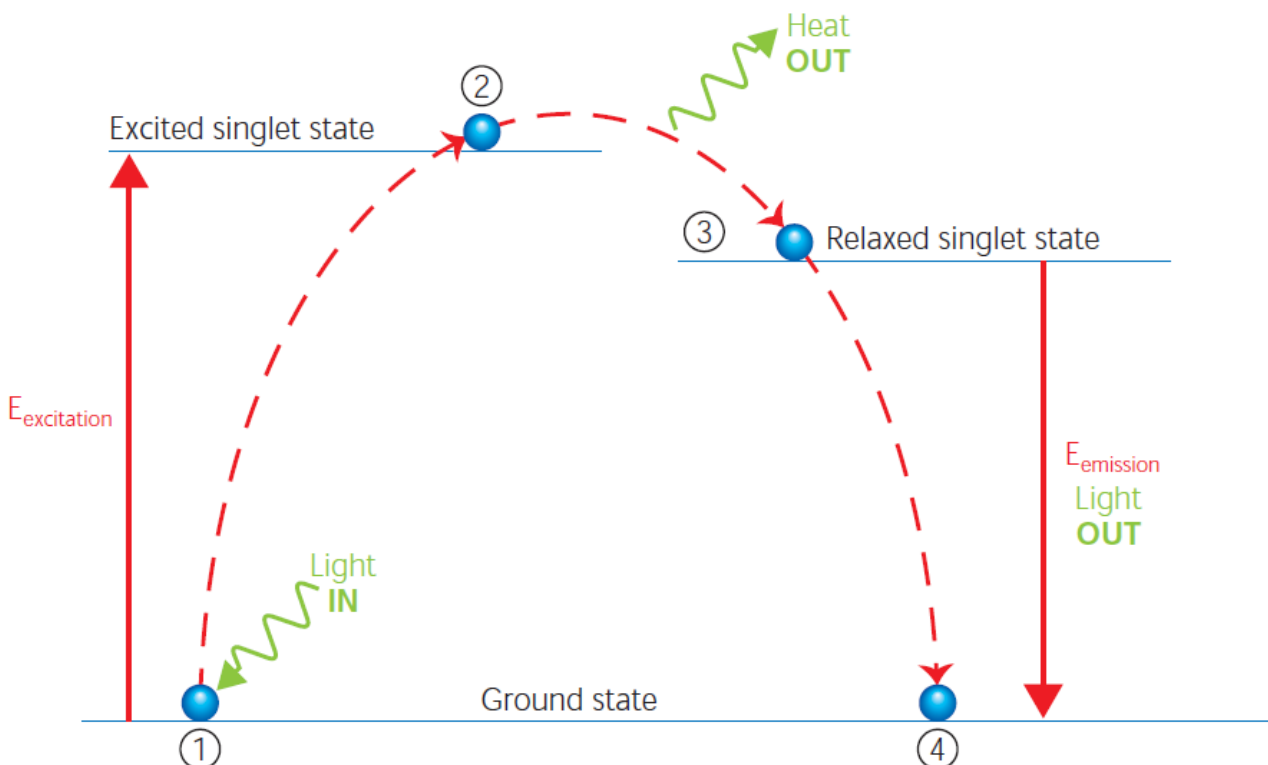
I fluorocromi e la luce

I fluorocromi sono quei pigmenti che assorbono la luce laser di una determinata frequenza [eccitazione] e dopo un intervallo brevissimo di tempo la emettono sotto forma di fluorescenza, cioè luce con una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella della luce assorbita. Ma qual è la fisica di questi fenomeni?

La luce è una forma di energia elettromagnetica che si propaga per onde, che possiedono una frequenza ed una lunghezza. La luce dello spettro visibile ha una lunghezza d'onda che è compresa tra 380 e 700 nanometri, cioè tra l'ultravioletto e l'infrarosso e l'occhio umano la percepisce nei colori rosso, arancione, giallo, verde, blu ed indaco [sequenza di colori a frequenza crescente ed a lunghezza d'onda decrescente]. La luce rossa ha una lunghezza d'onda maggiore e l'indaco minore, ma l'indaco ha più energia del rosso.

Stokes Shift

Quando un fluorocromo viene investito da una sorgente luminosa i suoi elettroni vengono eccitati e passano dallo stato di riposo allo stato di massima energia. Dopo pochi nanosecondi viene rilasciata, sotto forma di calore, una prima parte di questa energia di eccitazione ed infine il fluorocromo torna allo stato di riposo iniziale emettendo l'energia residua sotto forma di fluorescenza. Poiché la fluorescenza è dovuta alla seconda emissione di energia che è minore dell'energia di eccitazione, per la quota eliminata come calore, essa avrà un'energia minore e perciò un colore diverso da quello della luce di eccitazione. La differenza tra la lunghezza d'onda della luce di eccitazione e di quella della luce di emissione prende il nome di Stokes shift e se lo Stokes shift è ampio allora è molto agevole distinguere i due tipi di luce.



Assorbimento ed emissione massimi.

Generalmente un fluorocromo può essere eccitato da fasci luminosi le cui lunghezze d'onda ricadono in un ambito più o meno ristretto. Ma per ognuno di essi vi è un valore di lunghezza d'onda del fascio di luce di eccitazione per il quale l'assorbimento è massimo e di conseguenza è massima anche la fluorescenza. Si parla quindi di lunghezza d'onda di assorbi-

mento massimo e di emissione massimo e in base all'assorbimento massimo si sceglie la sorgente laser da utilizzarsi per l'eccitazione del fluorocromo. Ad esempio se l'assorbimento massimo ricade nella zona blu dello spettro allora si utilizzerà un laser che emette a questa lunghezza d'onda.

Possibili impieghi di una sonda fluorescente.

Un anticorpo coniugato con un fluorocromo costituisce una sonda fluorescente. Questa sonda, unitamente alla citometria a flusso, consente di individuare l'epitopo che ci interessa e misurarne le proprietà biochimiche e biologiche. Ecco i principali campi di applicazione di tali sonde:

- Identificazione e quantificazione di:
 - popolazioni cellulari specifiche
 - recettori della superficie cellulare
 - organuli intracellulari
- Ordinamento cellulare
- Identificazione immunofenotipica
- Determinazione della quantità di acidi nucleici
- Quantificazione dell'attività enzimatica
- Studi sull'apoptosi

Tipi di fluorocromi

I fluorocromi utilizzabili in citometria a flusso sono numerosi ed in continuo aumento numerico. Essi sono di tipo singolo o di tipo tandem.

Fluorocromi singoli

Sono fluorocromi costituiti da una singola molecola fluorescente come l'isotiocianato di fluoresceina o gli Alexa Fluor[®]. Questi ultimi possiedono caratteristiche migliori.

Fluorocromi tandem

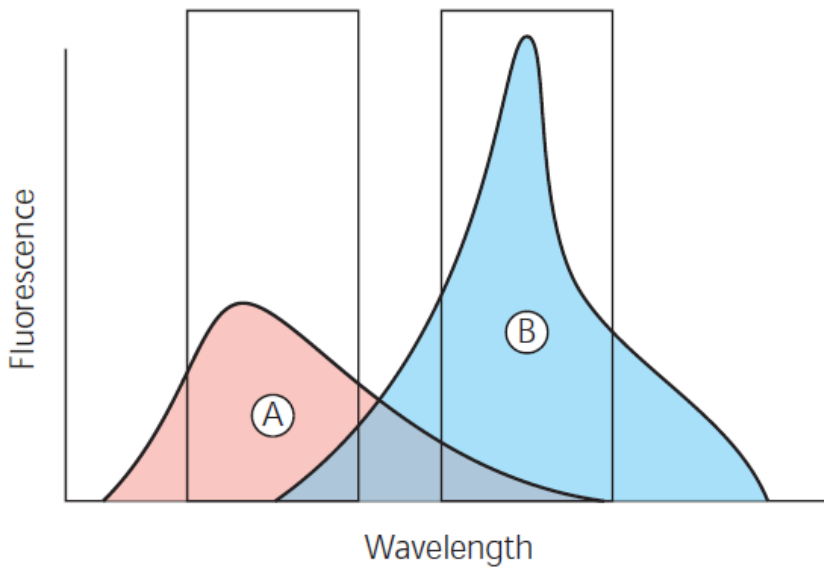
In questo tipo di fluorocromo viene accoppiato un piccolo fluorocromo ad uno di dimensioni maggiori. Quando la luce eccita il primo fluorocromo, esso raggiunge il livello di energia massima ed eccita il secondo fluorocromo, che gli è vicino ed emette la sua fluorescenza. Tale processo prende il nome di *trasferimento di energia per risonanza della fluorescenza*.

I fluorocromi tandem possiedono Stokes shift maggiori e consentono di utilizzare una quantità maggiore di colori per singola lunghezza d'onda laser.

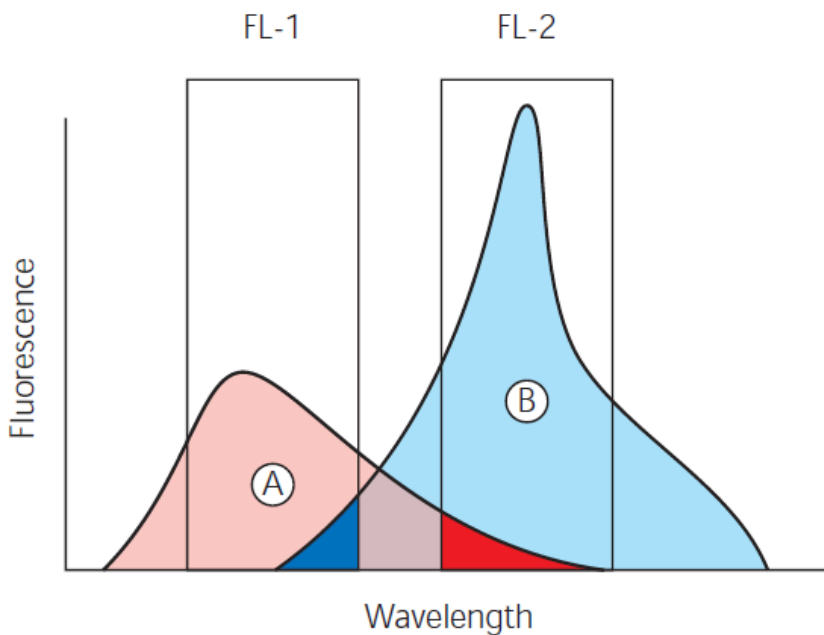
Compensazione della fluorescenza

Se si utilizzano due o più fluorocromi allora può succedere che le loro emissioni (= fluorescenze) si sovrappongano per cui sia difficile capire quale quota di fluorescenza sia propria di un fluorocromo e quale dell'altro. Una possibile soluzione è quella di utilizzare fluorocromi le cui fluorescenze non si sovrappongono perché essi hanno una diversa colorazione (posizione lontana nello spettro luminoso).

Invece, con la compensazione della fluorescenza, che i moderni citometri eseguono automaticamente mediante il loro software, è possibile attribuire ad ogni fluorocromo il suo valore appropriato di fluorescenza. A questo scopo, per ogni fluorocromo, viene sottratta la fluorescenza "marginale", cioè quella che si allontana dall'emissione massima e si sovrappone a quella dell'altro fluorocromo.



Spectral properties of two imaginary fluorochromes, 'A' and 'B'.
 (A) is measured in the FL-1 channel and (B) in the FL-2 channel.



Spectral overlap.
 Dark blue shade represents the proportion of (B) that overlaps into the FL-1 channel.
 Red shade represents the proportion of (A) that interferes with FL-2 channel measurements.

Fluorescence compensation

I grafici

I grafici costituiscono lo scopo ultimo della citometria a flusso. Per ottenere il grafico del tipo cellulare in esame dobbiamo eliminare selettivamente tutto ciò che non ci interessa (cellule morte, detriti cellulari). Tale procedura di selezione prende il nome di gating.

Le cellule sono state individuate sempre in base alle loro caratteristiche fisiche. I detriti subcellulari e gli ammassi possono essere distinti dalle cellule normali in base alla loro grandezza rilevabile con la trasmissione frontale della luce. Le cellule morte trasmettono frontalmente meno luce delle cellule viventi, mentre le diverse cellule bianche sono distinguibili fra loro e dai contaminanti in base alle diverse caratteristiche fisiche.

I risultati possono essere rappresentati con diagrammi a densità o a contorno. Nel grafico del primo tipo, ogni punto rappresenta una cellula che ha attraversato lo strumento. Il colore giallo o verde rappresentano le aree di maggiore densità di eventi.

Nei grafici a contorno le aree unite da una stessa linea contengono lo stesso numero di cellule.

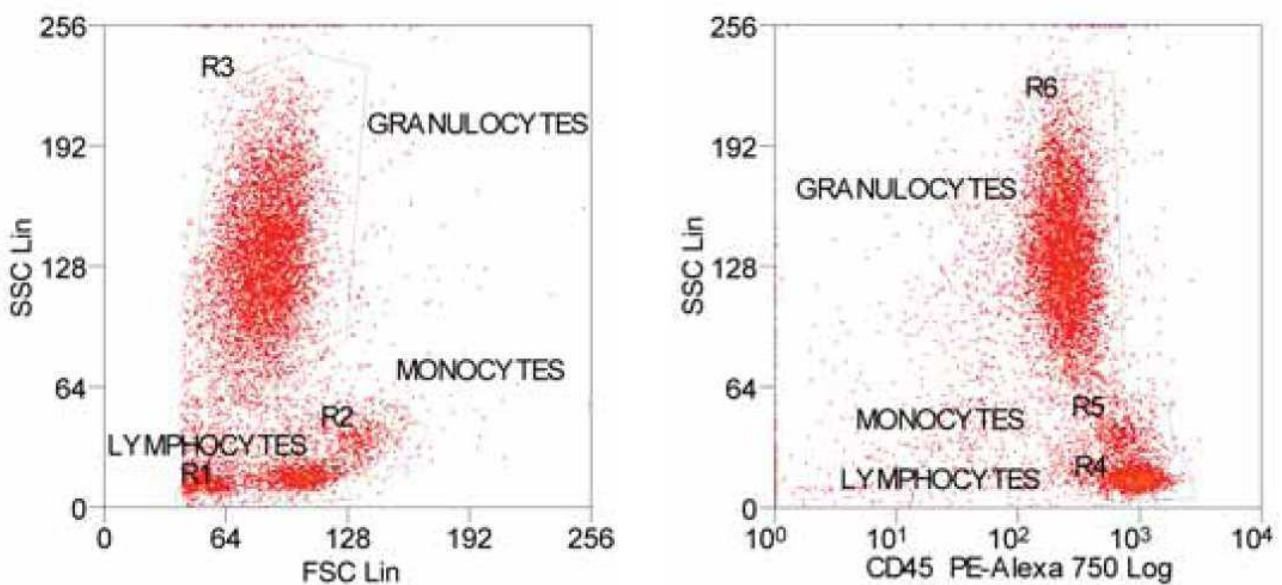


FIGURE 10 Lysed whole blood analysis using scatter and fluorescence

Istogrammi ad un solo parametro ed a due parametri

Sull'asse delle ordinate viene creata una scala che rappresenta la quantità di cellule che soddisfano il requisito della grandezza rappresentata in ascissa. Mentre negli istogrammi a due parametri le grandezze rappresentate sono due, ognuna riferita ad un asse cartesiano.

Gli antigeni intracellulari

Per rilevare gli antigeni intracellulari occorre sospendere in soluzione le cellule e poi renderle permeabili e quindi aggiungere gli anticorpi ed i fluorocromi. Ciò consente alle sonde di accedere alle

strutture intracellulari lasciando intatte le caratteristiche morfologiche di trasmissione e di riflessione delle cellule. Oggi sono disponibili molti kit commerciali che forniscono reagenti adatti a questo scopo come ad esempio Leucoperm™.

Immunofenotipizzazione

Tutte le cellule normali esprimono una grande varietà di marcatori della loro superficie, in funzione del tipo specifico di cellule ed al suo grado di maturazione. Tuttavia, la crescita anomala può interferire con l'espressione naturale dei marcatori col risultato che alcuni di essi sono espressi oltre misura mentre altri sono poco espressi. La citometria a flusso può essere utilizzata per immunofenotipizzare le cellule ed in tal modo distinguere le cellule malate da quelle sane.

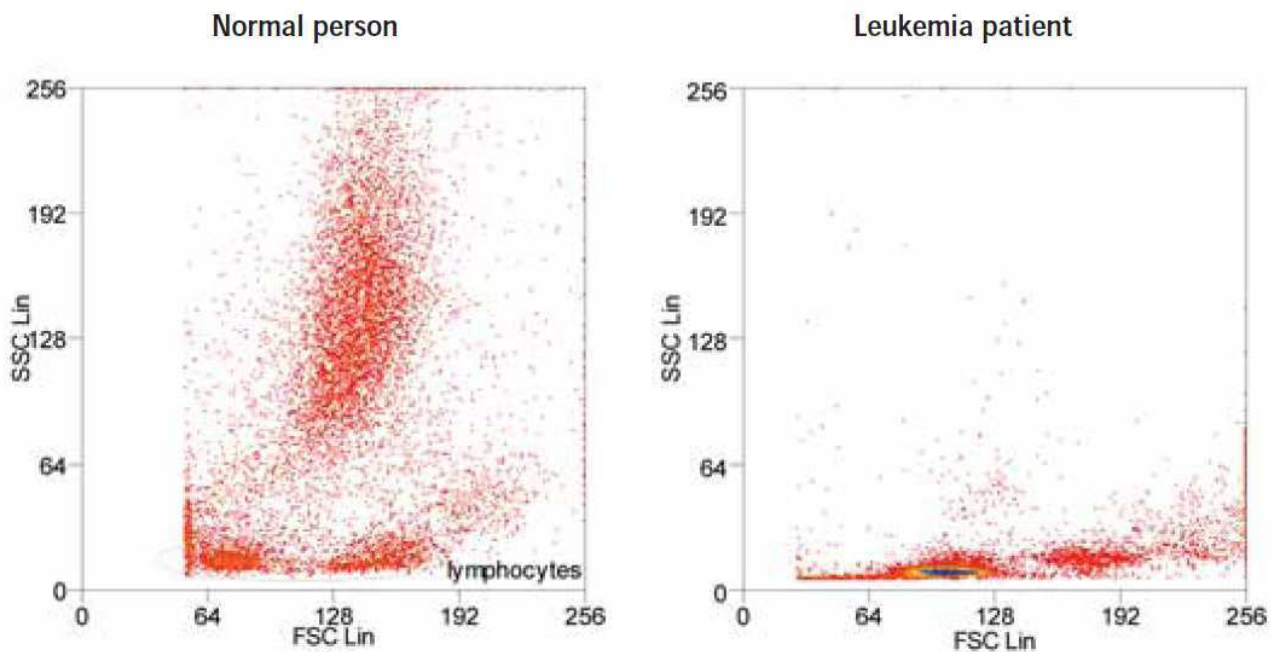


FIGURE 16 Immunophenotyping

L'esame dei linfociti del paziente secondo un marcatore specifico della superficie rivela in aggiunta altre informazioni sulla malattia.

CD3

Una persona normale ha una quantità significativa di linfociti positivi al CD3. In un paziente con leucemia, la colorazione per il CD3 è assente.

CD20

Nel paziente leucemico vi sono grandi quantità di cellule che si colorano positivamente per il CD20 mentre nella persona sana solo alcune di queste cellule sono positive.

HL-DR

Il paziente leucemico è HL-DR positivo mentre nelle persone sane soltanto una piccola quantità di cellule si colora positivamente.

Se un paziente è CD3 negativo, CD20 positivo ed HL-Dr positivo, un clinico può porre con certezza la diagnosi che tale paziente è affetto da una leucemia della filiera cellulare B o da un linfoma. La classificazione esatta della malattia può essere determinata utilizzando anche altri anticorpi.

Gli anticorpi monoclonali

Generalità

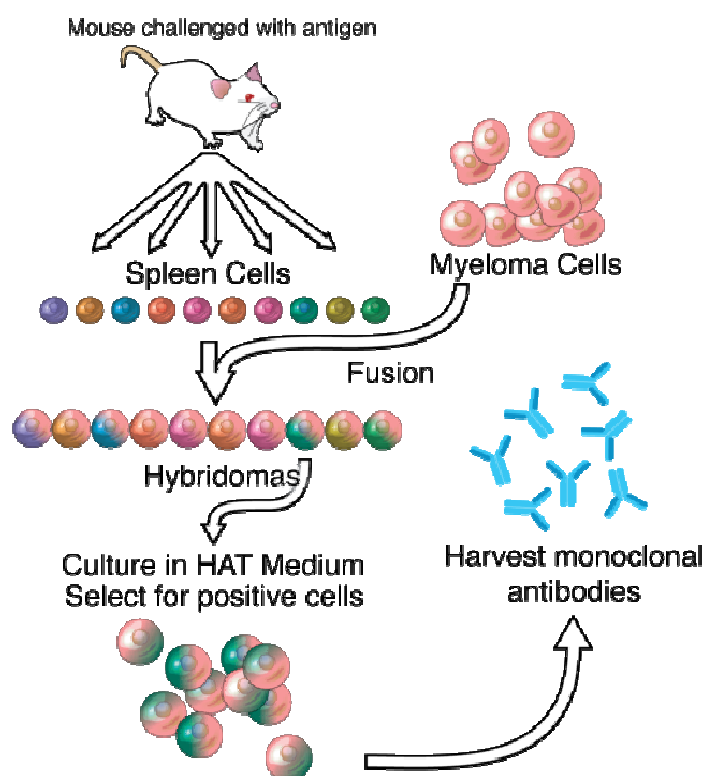
Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi monospecifici prodotti da cellule che derivano tutte da una unica cellula immunitaria progenitrice [= clone]. Come conseguenza essi possono legarsi al medesimo epitopo o determinante antigenico. È, naturalmente, possibile produrre anticorpi monoclonali contro qualsiasi molecola. In questo caso tale anticorpo, legandosi al suo bersaglio, ne consente l'individuazione. Tali proprietà trovano comune e proficuo impiego in biochimica, in biologia molecolare ed in medicina.

Il nome farmacologico degli anticorpi monoclonali impiegati in medicina termina col suffisso -mab.

Storia

Paul Ehrlich, agli inizi del XX secolo, postulò che si può combattere un microrganismo patogeno mediante una “pallottola magica”, cioè una molecola in grado di distruggere selettivamente quel germe specifico. La prima pallottola magica trovata è rappresentata dal Salvarsan (o arsfenamina o composto 606) che si è rivelata utile contro la sifilide. Lui ed Élie Metchnikoff ricevettero nel 1908 il premio Nobel per questa scoperta.

Ma solo con l'avvento degli anticorpi monoclonali, il concetto di pallottola magica ha raggiunto il suo pieno significato.



Negli anni 70 ottenne l'individualità nosologica il mieloma multiplo, un cancro che origina dai linfociti B e che produce enormi quantità di proteine [la cosiddetta paraproteina] che altro non sono che anticorpi tutti dello stesso tipo. Questi anticorpi vennero subito studiati e fu possibile comprenderne la struttura molecolare. Non fu invece possibile produrli su vasta scala, scegliendone il tipo in base al bersaglio desiderato.

Successivamente, si riuscì a produrre anticorpi monoclonali mediante colture cellulari ibride uomo-topo. Tali colture, denominate ibridomi, sono costituite da cellule ibride ottenute per fusione di una cellula di mieloma con una cellula B, produt-

trice dell'anticorpo desiderato.

La tecnologia dell'ibridoma

In primo luogo si inocula, per diverse settimane, un animale da laboratorio come il topo, con un antigene contro cui si vuole indurre una risposta anticorpale. Poi dalla milza di questo animale vengono prelevati gli splenociti, cellule che producono anticorpi, che si riproducono con difficoltà in un mezzo di coltura.

Dall'altro canto il mieloma viene selezionato alla ricerca di cellule che non secernono anticorpi e che inoltre non possiedono l'enzima HGPRT [ipoxantina-guanina-fosfo-ribosil-transferasi]. Le cellule del mieloma sono cellule che hanno acquisito, come altre cellule cancerose, la proprietà dell'immortalità: esse, cioè, possono riprodursi all'infinito nei mezzi di coltura.

L'ibridoma unisce la capacità degli splenociti di produrre l'anticorpo all'immortalità della cellula mielomatosa.

Per ottenere l'ibridoma è necessario fondere gli splenociti con le cellule mielomatose. Ciò si ottiene aggiungendo alla coltura polietilen-glicole o il virus Sendai, un virus sinciziale.

A questo punto si procede all'incubazione di queste cellule in un terreno di coltura HAT [ipoxantina-aminopterin-timidina] per farle riprodurre. Poiché l'aminopterin inibisce la sintesi di DNA bloccando l'attività della diidrofolato reductasi ne consegue che tali cellule possono sintetizzare il DNA che necessita loro per duplicarsi solo attraverso la via di salvataggio che utilizza le purine presenti nel mezzo. Ma questa via metabolica richiede l'intervento dell'HPGRT. Perciò le cellule mielomatose non possono duplicarsi perché sono carenti di questo enzima, mentre le cellule ibride si riproducono normalmente.

Un'ultima fase consiste nel selezionare i cloni alla ricerca di quelli che producono l'anticorpo desiderato. Sono queste le cellule a cui far produrre le quantità desiderate di anticorpo che è pertanto monoclonale. Una volta prodotti gli anticorpi, si procede alla loro purificazione liberandoli dai contaminanti.

Anticorpi monoclonali ricombinanti

Questi anticorpi monoclonali si ottengono mediante colture di fagi o di lieviti invece che con colture di cellule di topo. È possibile in un secondo tempo procedere alla produzione di massa.

Anticorpi monoclonali chimerici

Con la tecnica dell'ibridoma gli anticorpi monoclonali che vengono prodotti sono quelli del topo, che pur essendo simili a quelli umani, possono tuttavia scatenare una reazione immune dell'ospite umano contro di essi. Per cercare di superare questo problema si sono prodotti degli anticorpi monoclonali detti chimerici o umanizzati che hanno parti umane e parti di topo.

Anticorpi monoclonali completamente umanizzati

Oggi si producono anticorpi monoclonali che sono del tutto di tipo umano. Per questo scopo si utilizzano colture di fagi e colture di cellule di topo geneticamente ingegnerizzate.

Usi

In **immunoistochimica** gli anticorpi monoclonali consentono di identificare la presenza di molecole specifiche nel campione di tessuto.

In **laboratorio** vengono usati come nel test diagnostico Western Blot e nei dot blot immuni consentendo di identificare le molecole delle membrane cellulari.

In **citometria**, coniugati con i fluorocromi, consentono l'individuazione di molecole specifiche nelle particelle del fluido in esame.

In **medicina** vengono usati come farmaci nei seguenti casi:

come antinfiammatori

- l'infliximab, l'adalimumab (inibiscono il TNF- α): nell'artrite reumatoide, nel morbo di Crohn e nella colite ulcerosa
- il basiliximab, il daclizumab (inibiscono l'IL-2 sulle cellule T attivate): nel rigetto acuto del trapianto di rene
- l'omalizumab (inibisce le Ig-E umane): nell'asma allergica moderata o grave

come antitumorali

- il gemtuzumab (si lega all'antigene di superficie CD33 delle cellule leucemiche): nella leucemia mieloide acuta recidivante
- alemtuzumab (si lega all'antigene CD52 dei linfociti T e B): nella leucemia a cellule B
- rituximab (si lega alla fosfoproteina CD20 sui linfociti B): nei linfomi non-Hodgkin
- trastuzumab (si lega al recettore HER2/neu (erbB2)): nel cancro della mammella con iperespressione HER2/neu
- nimotuzumab (inibisce l'EGFR): nei carcinomi a cellule squamose, nei gliomi
- cetuximab (inibisce l'EGFR): nei carcinomi a cellule squamose, nel carcinoma coloretale
- bevacizumab (inibisce il VEGF): nella terapia anti-angiogenetica dei tumori

usi diversi

- palivizumab (inibisce la proteina F di fusione del virus sinciziale respiratorio): nelle infezioni pediatriche da virus sinciziale respiratorio
- abciximab (inibisce il recettore GpIIb/IIIa sulle piastrine): prevenzione della coagulazione nell'angioplastica coronarica
- eculizumab (inibisce la subunità C5 del complemento): nell'emoglobinuria parossistica notturna.

Cluster di differenziazione

I Cluster di Differenziazione (CD) sono antigeni espressi da diverse cellule del sistema immunitario di cui ne consentono l'individuazione o la funzione. Sono marcatori delle superfici cellulari che vengono riconosciuti da anticorpi specifici utilizzati per identificare il tipo di cellule, il loro stadio di differenziazione e la loro attività. Finora ne sono stati individuati circa 360.

La nomenclatura CD è stata proposta e tracciata nel 1982 a Parigi nell'ambito della conferenza internazionale sugli antigeni dei leucociti umani. Questo sistema cercò di classificare i numerosi anticorpi monoclonali prodotti da svariati laboratori sparsi in tutto il mondo. Tali anticorpi sono attivi contro gli antigeni della superficie cellulare dei leucociti.

Le molecole CD hanno una grande importanza nella citometria a flusso. Col segno + si indica la presenza del relativo CD e col segno - la sua assenza. Ad esempio una popolazione cellulare CD3+CD8- esprime sulla superficie cellulare il CD3 mentre è assente il CD8.

I CD3, CD4 e CD8 sono utilizzati per determinare la formula linfocitaria, indispensabile per sorvegliare l'evoluzione delle infezioni da HIV. Alcuni CD sono così specifici di un tipo cellulare al quale danno addirittura il nome: è il caso dei linfociti T «CD4» o «CD5». Così una cellula CD3+ è un linfocita T. Ma questa è più un'eccezione che la norma, infatti uno stesso CD può essere espresso da numerose cellule diverse.

Alcune molecole identificate da un CD sono essenziali ad alcune funzioni cellulari come l'attivazione, la migrazione, l'adesione... ma in molti casi la loro funzione non è nota. Esistono anche delle isoforme di alcuni CD, il che complica ulteriormente la situazione. Inoltre la presenza di un CD sulla superficie di una cellula non determina automaticamente la sua funzione anche se è già nota la funzione del marcatore. È difficile, anche per uno specialista, determinare la loro interazione. È una pecca di questo sistema. Come scoprire che il ligando del CD27 è il CD70 e che i CD80, CD86 sono i ligandi di CD28 e CD152? Per questo motivo si è soliti denominare alcuni CD «ligando di CDXX».

Qualche notizia su alcuni CD:

CD1: è una molecola del tipo del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) che presenta le molecole lipidiche.

CD2: proteina transmembrana dei timociti, delle cellule T e di alcune cellule NK (Natural Killer), è un ligando di CD58 e CD59, è implicata nell'adesione cellulare, è espressa nella leucemia linfoblastica acuta a cellule T e nei linfomi a cellule T.

CD3: la componente di segnalazione del complesso del recettore della cellula T.

CD4: T-Helpers, Monociti.

CD8: cellule T citotossiche.

CD9: appartiene alla superfamiglia della Tetraspanina espressa in diverse cellule quali: cellule B, eosinofili, basofili e piastrine.

CD16: FcγRIII, a bassa affinità per il recettore Fc delle IgG. Trovato nelle cellule NK, nei macrofagi e nei neutrofilii.

CD20: proteina transmembrana di tipo III presente sulle cellule B che forma un canale per l'ingresso del calcio necessario all'attivazione della cellula. È espressa nei linfomi B, nella leucemia a cellule capellute e nella leucemia linfatica cronica a cellule B. È importante ricordare che l'anticorpo monoclonale Rituximab è efficace contro queste forme patologiche perché si dirige contro il CD20.

CD27: recettore per il TNF, è presente sulle cellule B di memoria, allo stato di quiescenza.

CD33: marcatore, di cui non si conosce la funzione, che si reperta nelle cellule mieloidi immature, inclusi i blasti della leucemia mieloide acuta e nei monociti maturi.

CD35: recettore 1 del Complemento.

CD143: Angiotensin-converting enzyme

CD220: il recettore per l'insulina (INSR) è un recettore transmembrana con attività intrinseca di tipo tirosin chinasi il cui ligando è l'insulina. Ha un ruolo cruciale nella regolazione di svariate vie metaboliche come pure nella regolazione del ciclo cellulare [crescita della cellula, sua differenziazione ed apoptosi]. Nel diabete mellito sia di tipo 1 che di tipo 2 sono state individuate diverse mutazioni a suo carico.

...