

CITOMETRIA A FLUSSO

E' una tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido.

Rende possibile la misurazione di proprieta' multiple di singole cellule ad una velocita' molto rapida, permettendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa.

Un po' di storia

La comparsa della citofluorimetria a flusso (CFM) avviene intorno agli anni 70, determinando un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche. Inizialmente era limitata alla misura di 1-2 parametri: uno per le misure fisiche e l'altro per la fluorescenza.

La CFM porto' grande impulso allo studio del sistema immunitario, grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con fluoresceina (FITC). La grande complessita' del sistema immunitario e la presenza di diverse subpopolazioni che reagivano con lo stesso anticorpo stimolarono:

- lo sviluppo di MoAb sempre piu' specifici;
- la ricerca di nuovi coloranti fluorescenti da coniugare agli anticorpi;
- la creazione di citofluorimetri a flusso multiparametrici

Hemalog D

Technicon - Hemalog D - 1974 - first commercial **differential flow cytometer** - light scatter and absorption at different wavelengths - chromogenic enzyme substrates were used to identify neutrophils and eosinophils by peroxidase and monocytes by esterase, basophils were identified by the presence of glycosaminoglycans using Alcian Blue - the excitation for all measurements was a **tungsten-halogen lamp**



Image from Shapiro “Practical Flow Cytometry”, 3rd Ed.
Wiley-Liss, 1994

I PRIMI PROBLEMI.....

- trovare coloranti che potevano essere coniugati agli Ab senza modificare la loro capacità di legame all'antigene;
- selezionare fluorocromi con spettri distinti di emissione.

E LE SOLUZIONI!!!

un punto di svolta nella CFM fu lo sviluppo di coloranti come le ficobiliproteine, fluorocromi naturali solubili in acqua, fluorescenti a pH neutro, facilmente coniugabili con MoAb, con elevate rese quantiche.

Ficoeritrina (PE): viene eccitata dalla stessa lunghezza d'onda del FITC (488 nm), quindi possono essere usati insieme per realizzare un sistema di rilevazione molto sensibile in doppia marcatura.

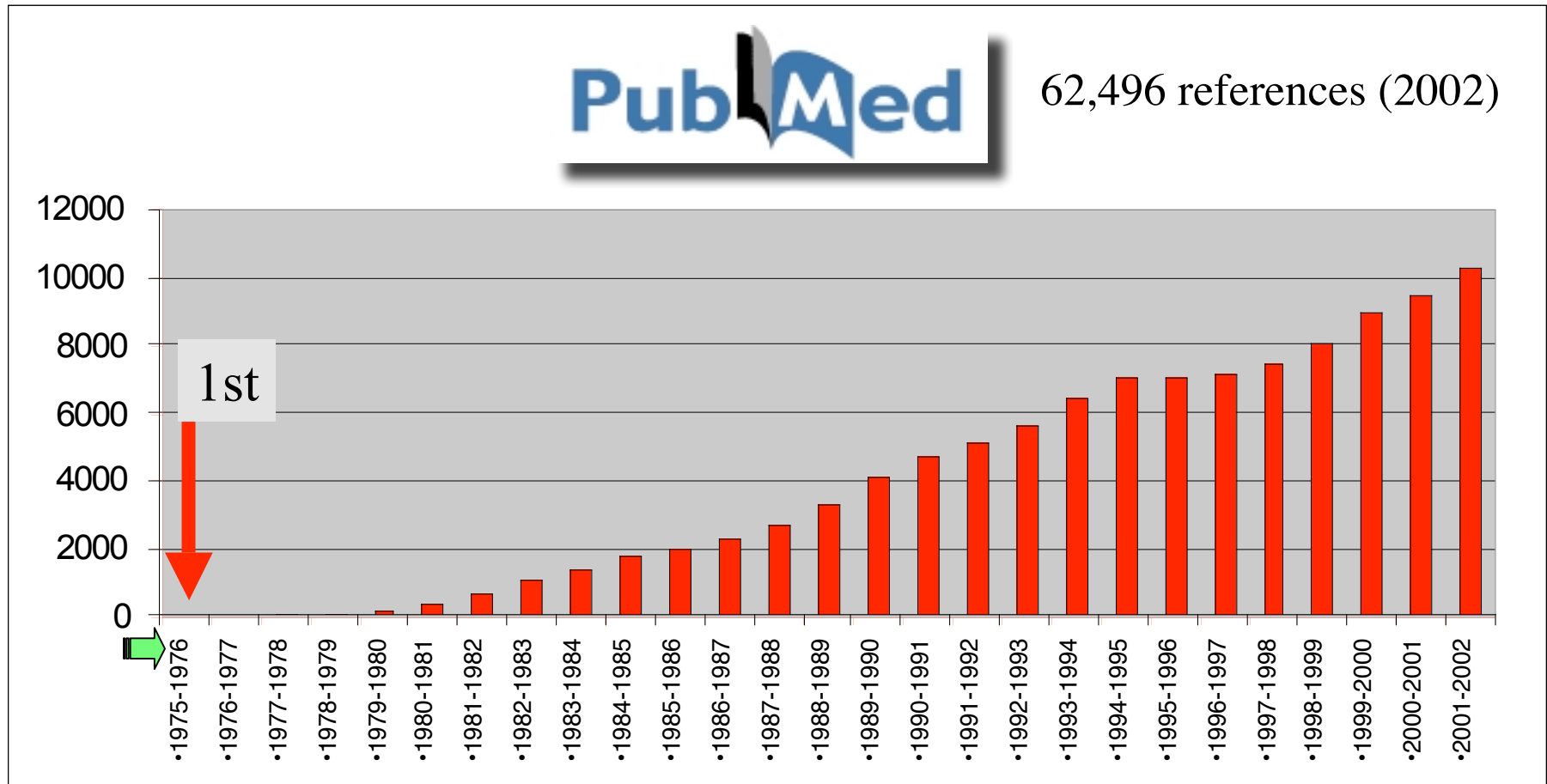
Citofluorimetria a flusso oggi

Negli ultimi anni la CFM ha raggiunto una notevole diffusione, sia in laboratori clinici che in laboratori di ricerca.

Fattori che hanno contribuito a questo notevole sviluppo:

- la possibilità di utilizzare più laser di emissione, che permette di effettuare analisi multiparametriche a 4 e più colori;
- la disponibilità di MoAb marcati con un'ampia gamma di fluorocromi e diretti contro una larghissima varietà di Ag di membrana e/o intracellulari;
- la riduzione dei costi e della complessità nell'utilizzo dello strumento.

Publications using the keyword "flow cytometry"



APPLICAZIONI

Permette di analizzare un elevato numero di cellule in breve tempo (50.000 cellule in pochi secondi), quantificando numerosi parametri per ogni singola cellula.

Permette ad es. di determinare il contenuto di DNA, di RNA, i diversi sottotipi cellulari, gli organelli intracellulari, l'attività di alcuni enzimi.

- Studio della ploidia e della proliferazione cellulare;
- Analisi del ciclo cellulare;
- Analisi immunofenotipica multiparametrica;
- Risposta del sistema immunitario alla somministrazione di vaccini (cellule antigene specifiche, produzione di citochine, ecc);
- Livelli di apoptosi in patologie associate a deplezione cellulare (es AIDS) o accumulo cellulare (tumori);
- ecc ecc!!!!

Vantaggi

- possibilità' di analisi multiparametrica
- elevato numero di cellule esaminate
- rapidita' dei tempi di analisi (oltre 1000 cellule/sec)
- obiettività', riproducibilità' e affidabilità' statistica delle letture
- i campioni possono essere processati senza perdere la vitalità' cellulare

Limiti

- analisi di cellule molto rare, che a causa del loro ridotto numero in confronto agli eventi analizzati potrebbero essere difficilmente separabili dal "rumore di fondo"
- necessita' di dover lavorare con campioni in fase monodispersa
- Impossibilità' di localizzare la sede di provenienza del segnale in caso di contemporanea presenza di marcatori nei diversi compartimenti cellulari

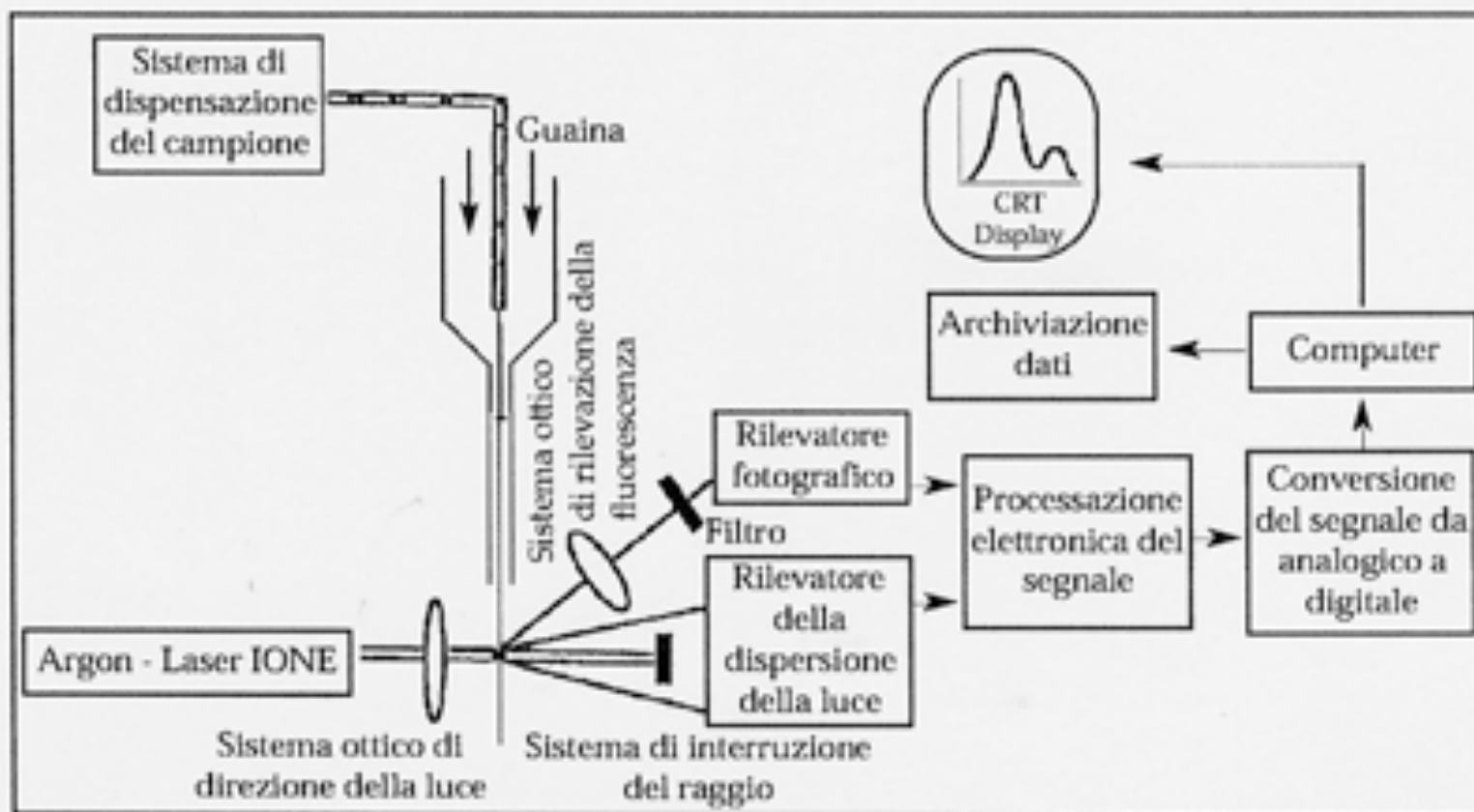
Principi di funzionamento della CFM

Una sospensione cellulare monodispersa (cellule da sangue periferico, aspirato midollare, ecc) viene iniettata in un sistema fluidico il quale tende, in opportune condizioni idrodinamiche, a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misura, dove incontra il fascio di luce focalizzata proveniente dal laser. L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula presente nel flusso cellulare genera dei segnali.

Questi segnali sono legati alle caratteristiche fisiche della cellula e alla presenza di molecole fluorescenti. I segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità.

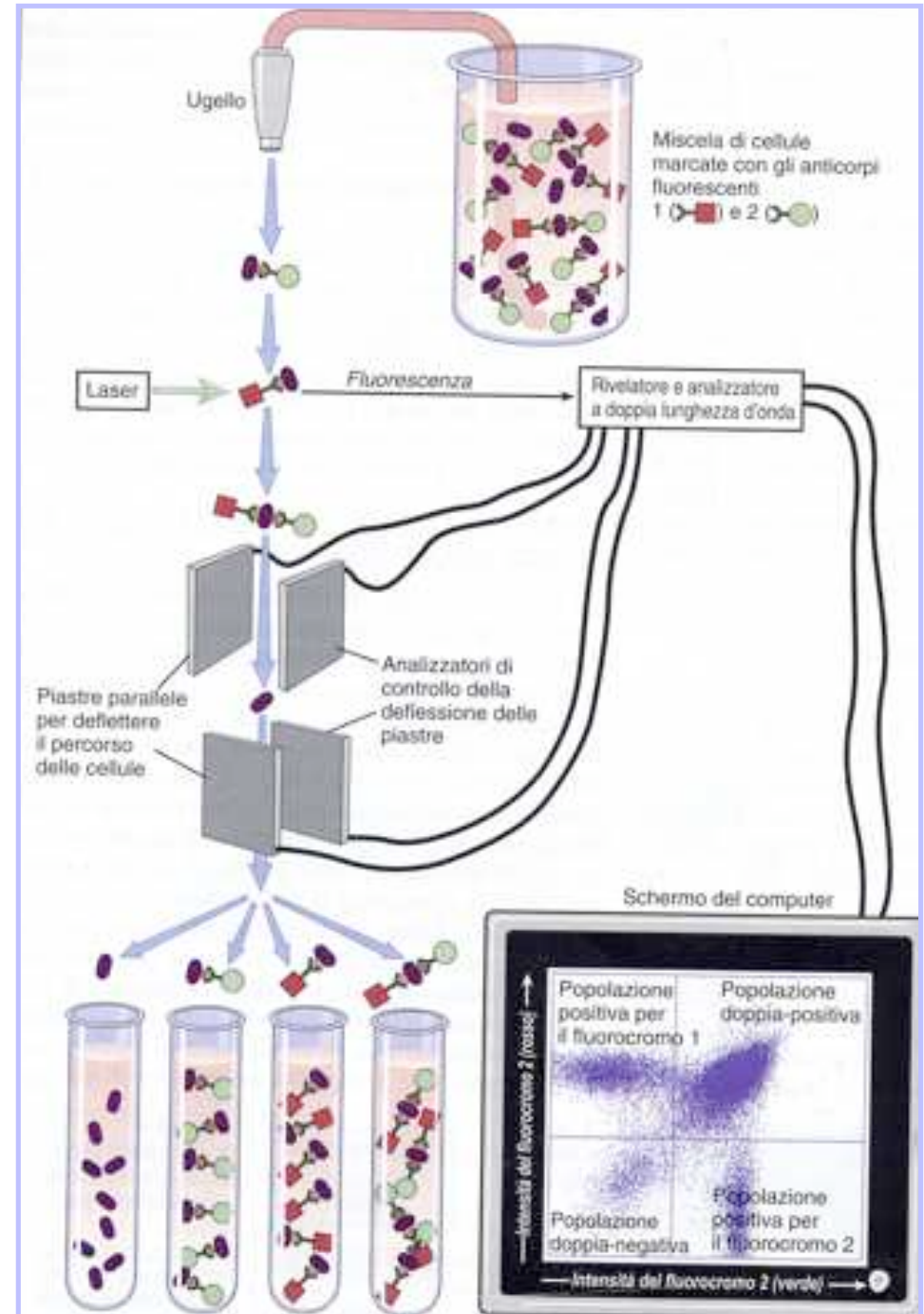
I segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati ad un analizzatore di dati che provvede alla loro visualizzazione su monitor, rappresentazione grafica, e definizione statistica.

Componenti di un citofluorimetro a flusso



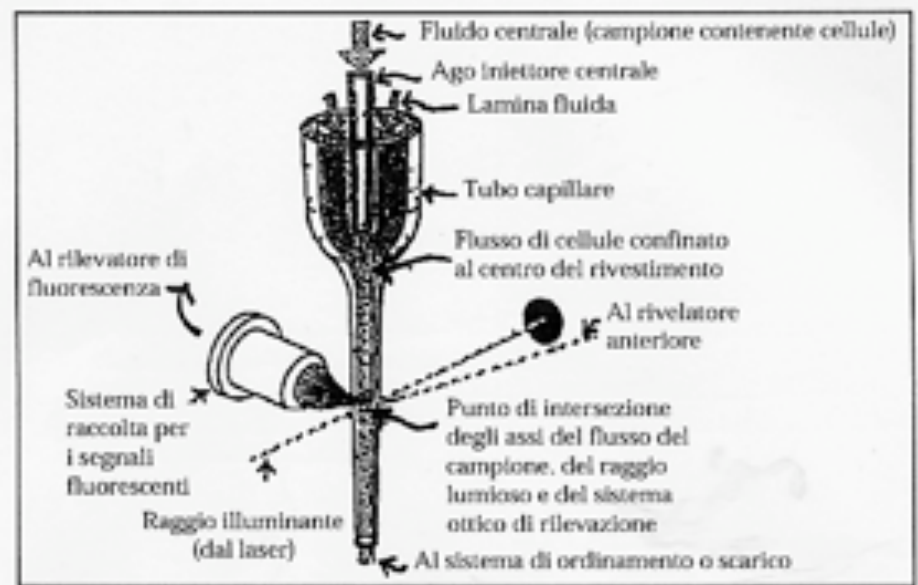
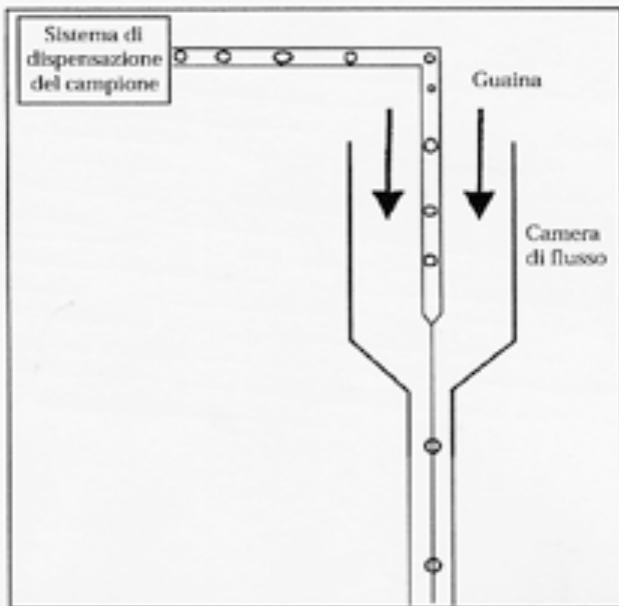
Principio di funzionamento della citometria a flusso

- 1) Le cellule di una popolazione eterogenea vengono aspirate dalla provetta e immesse in una **camera di flusso** dove vengono separate le une dalle altre.
- 2) Ogni singola cellula viene poi attraversata da un fascio di luce che eccita i fluorocromi e determina **l'emissione di un segnale fluorescente**
- 3) Il segnale passando attraverso un **sistema di filtri e specchi** raggiunge **un rivelatore**.
- 4) Viene quindi processato elettronicamente, trasformato da **analogico a digitale** e inviato all'analizzatore, che elabora il dato e lo visualizza tramite un **grafico**.
- 5) Attraverso piastre di deflessione le cellule analizzate possono essere raccolte separatamente tramite un processo definito **"sorting"**.



Componenti di un citofluorimetro a flusso

Il sistema fluidico: il sistema di dispensazione del campione liquido fornisce un efficiente mezzo in grado di presentare individualmente le cellule del campione alla stazione di misura, dove intersecano il raggio di luce emesso dal laser. E' importante evitare la formazione di aggregati cellulari.

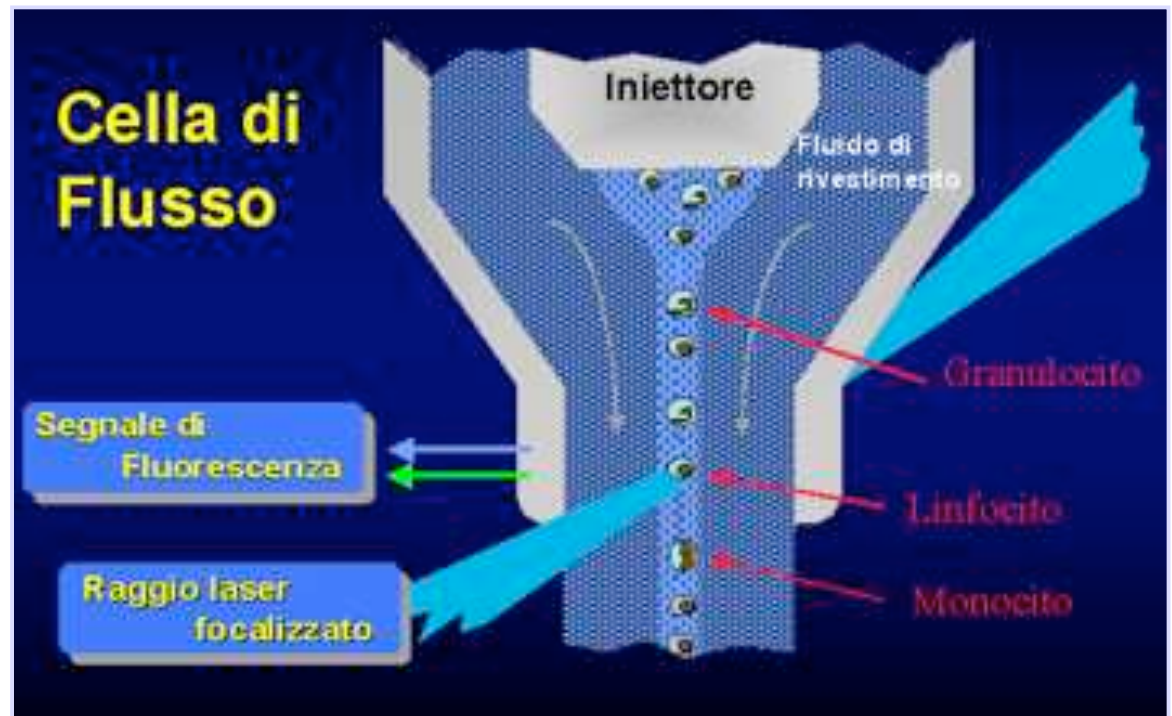


La velocità di efflusso delle cellule viene valutata come **numero di eventi al secondo:**
numero di particelle che hanno incontrato il raggio di luce nell'unità di tempo

Camera a flusso

Le cellule **monodisperse** (da sangue periferico, da aspirato midollare, agoaspirato da tessuti solidi...) vengono aspirate in una camera a flusso, dove vengono diluite e allineate tramite **un sistema fluidico a flusso laminare**.

Nel flusso coesistono una corrente interna ed una esterna, la quale confina la sospensione cellulare al **centro del flusso**. La pressione di spinta e la diluizione del campione consentono di contare fino a qualche migliaia di cellule al secondo.



Sorgenti luminose

Nella grande maggioranza dei citofluorimetri si utilizza una sorgente luminosa ad ioni Argon centrata su una lunghezza d'onda di 488 nm (blu). Tale luce consente una efficace misura dei parametri fisici, inoltre permette la contemporanea eccitazione di diversi fluorocromi.

Se e' necessario utilizzare altre lunghezze d'onda bisogna utilizzare altri tipi di laser (es Krypton, Elio Neon, ecc)

I laser hanno costi molto elevati!!!

Un'alternativa piu' economica e' costituita dall'uso dei **citometri a lampada**, che hanno come fonte di eccitazione una lampada a vapori di Mercurio o Xenon che non richiede particolari sistemi di raffreddamento. Sono utili per le applicazioni che riguardano particolari fluorocromi (es quelli utilizzati per la marcatura del DNA).

LIMITI: bassa potenza erogata, scarsa stabilita' della luce di emissione, rapido decadimento

Argon & Krypton Lasers



Lasers:

Coherent Enterprise laser - UV-visible



Helium-Neon Lasers

- He-Ne - low power, no cooling needed
- Cheap, mostly emit red light at 633 nm



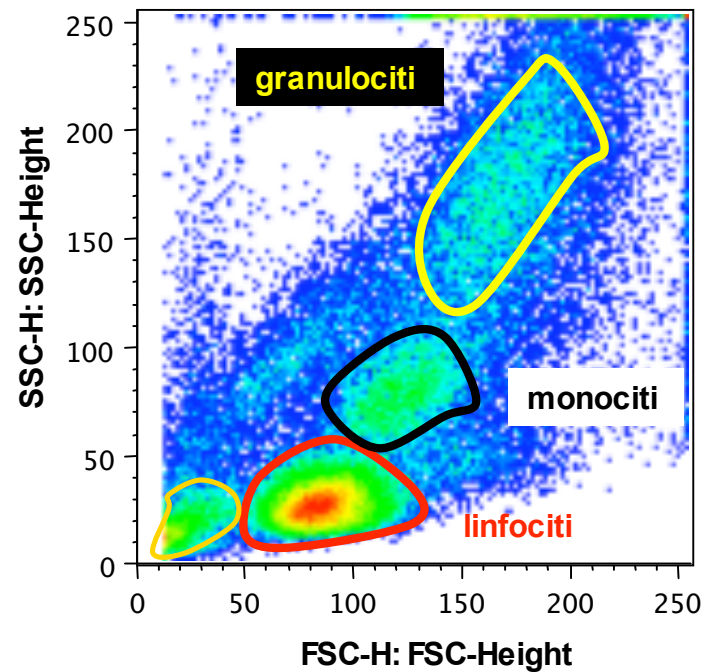
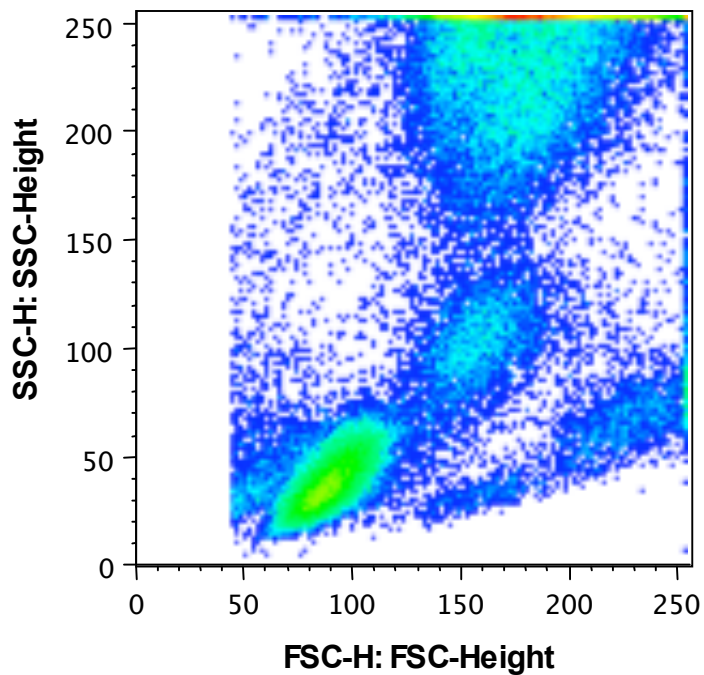
Componenti di un citofluorimetro a flusso

Parametri fisici: quando viene colpita dal fascio di luce emesso dal laser, la cellula emette segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni di rifrazione, riflessione, e diffrazione. In particolare la luce dispersa in avanti (forward scatter) e' legata alle dimensioni delle cellule, mentre la luce riflessa a 90° (side scatter) e' da attribuire a parametri della morfologia cellulare come la granulosita' del citoplasma, il rapporto nucleo/citoplasma, la rugosita' di superficie.

Citogramma: diagramma bidimensionale ottenuto dalla combinazione di questi due tipi di segnale. Permette di discriminare tra diverse popolazioni cellulari basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche.

Esempi di citogramma

Citogramma: diagramma bidimensionale ottenuto dalla combinazione del forward (dimensioni) e del side (granulosita') scatter. Permette di discriminare tra diverse popolazioni cellulari basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche.



Componenti di un citofluorimetro a flusso

Segnali di fluorescenza: in citofluorimetria vengono rilevati segnali fluorescenti generati:

- dall'utilizzo di MoAb marcati con fluorocromi (FITC, PE, PerCp, APC, ecc) specifici per antigeni presenti sulla membrana, nel citoplasma, nel nucleo;
- da fluorocromi che si legano in maniera stechiometrica a determinate sostanze come il DNA e l'RNA.

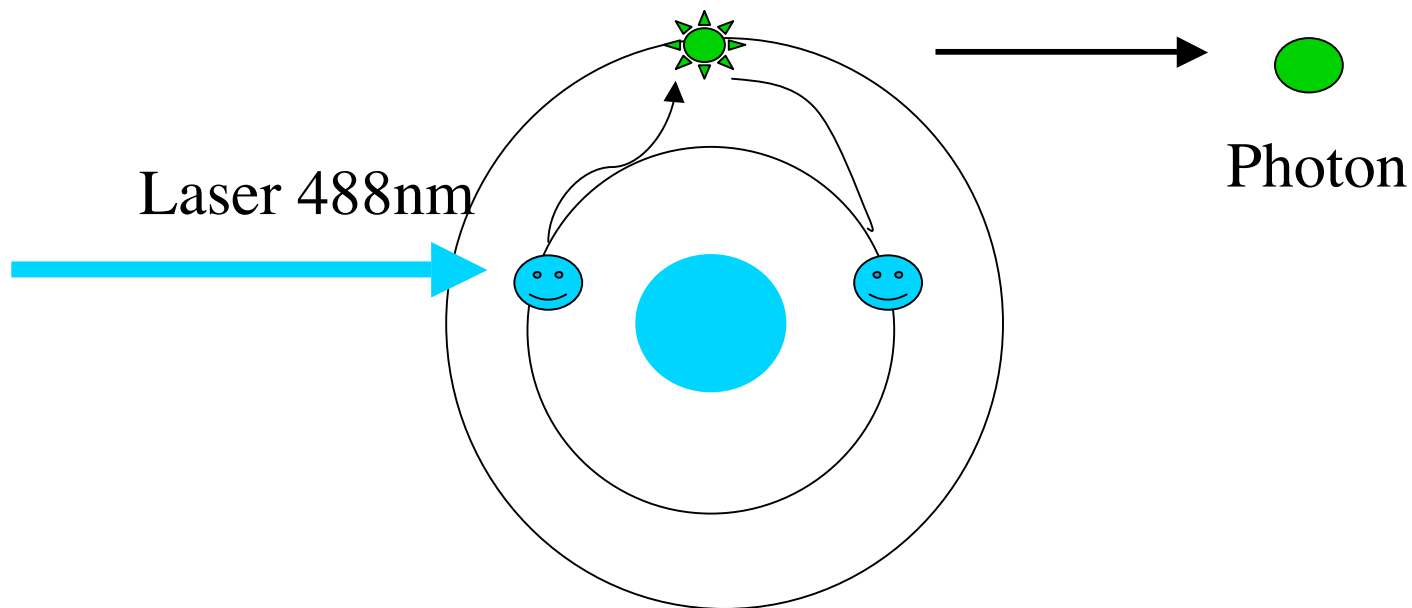
Ogni fluorocromo presenta una caratteristica lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione.

Limiti alla scelta di fluorocromi da utilizzare in combinazione:

- La lunghezza d'onda di eccitazione
- Le bande di emissione devono essere sufficientemente separate da permettere la loro appropriata misurazione.

Come lavorano i fluorocromi?

- Un laser eccita il fluorocromo
- il fluorocromo eccitato sale nel livello successivo della nuvola elettronica
- il fluorocromo ritorna al livello originale e rilascia l'energia in eccesso come fotone
- i fotoni emettono a lunghezze d'onda maggiori rispetto a quelle a cui vengono eccitati



fluorescein: assorbe blu chiaro ed emette verde

Come è possibile ottenere colori distinti?

- fluorocromi diversi hanno lunghezze d'onda diverse
- L'eccitazione proviene dal laser. Ci sono 4 diverse opzioni: 488nm Blue, 633nm Red, 405nm violet, 350nm UV.
- La lunghezza d'onda di emissione è più alta di quella di eccitazione.
- Usando filtri e specchi è possibile separare le diverse lunghezze d'onda ed inviarle a diversi detectors

I fluorocromi “tipici” per ogni laser

488nm Blue


FITC
PE
PerCp
PE Cy-7

663nm Red


APC
Alexa 680
APC Cy-7

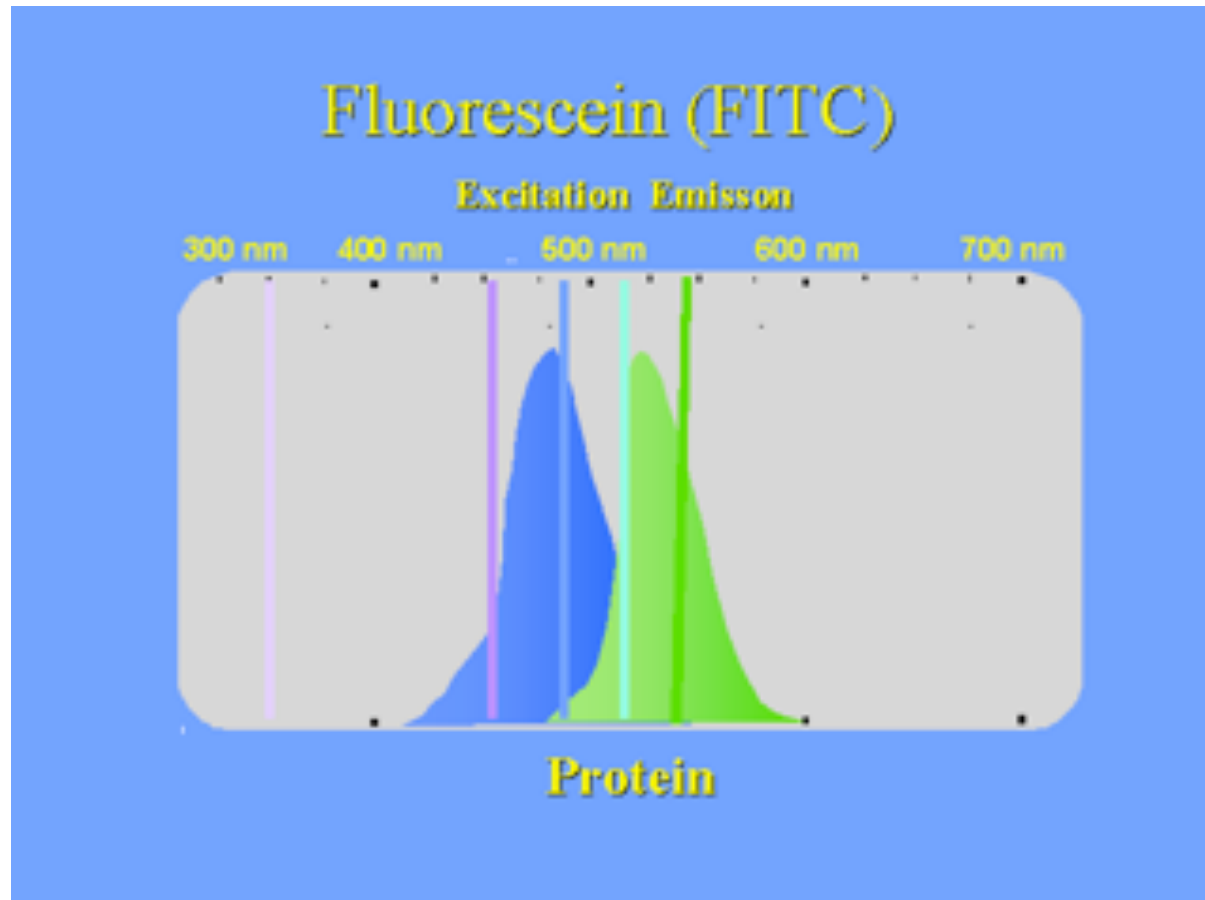
405nm Violet


Pacific Blue
AmCyan
Alexa 405

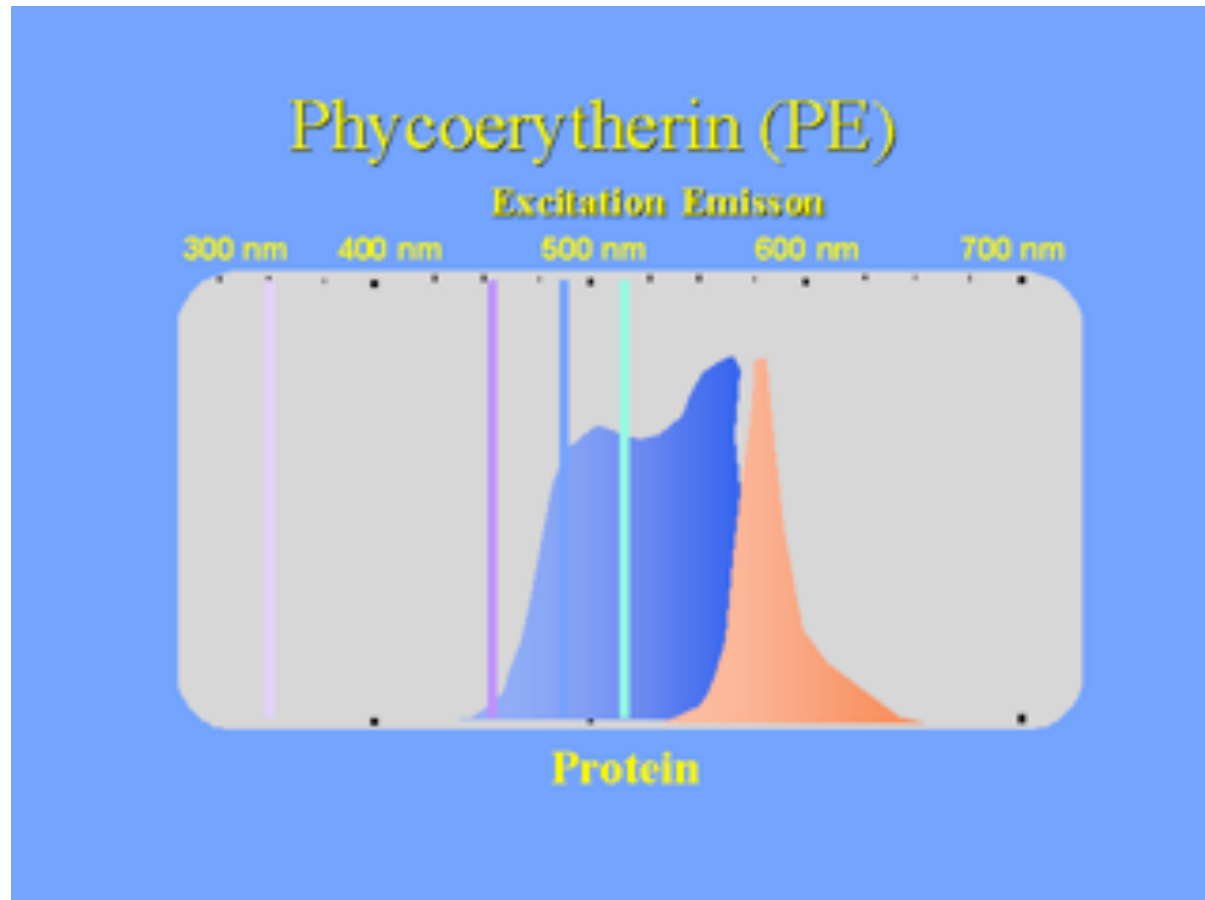
350nm UV


Hoescht
DAPI
MDC

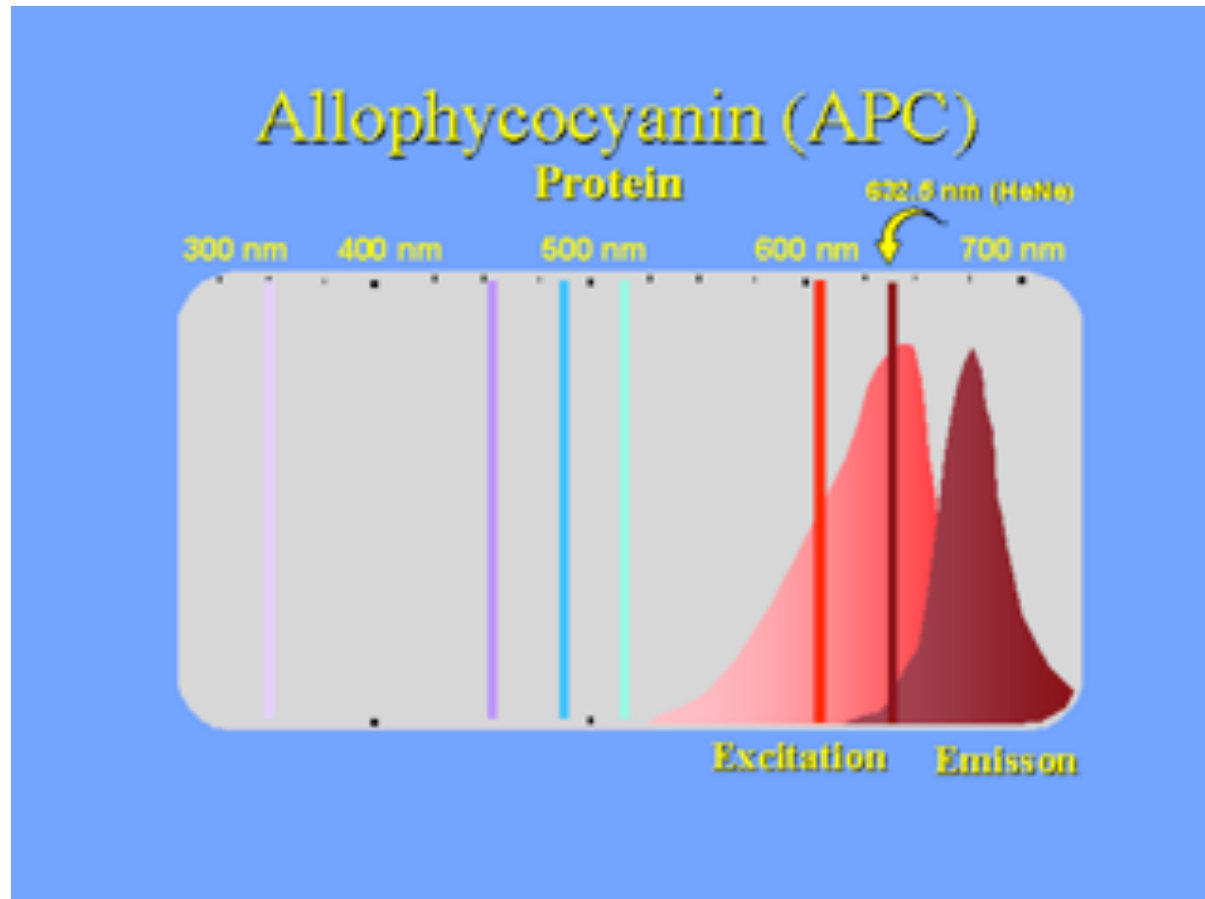
FLUOROCROMI



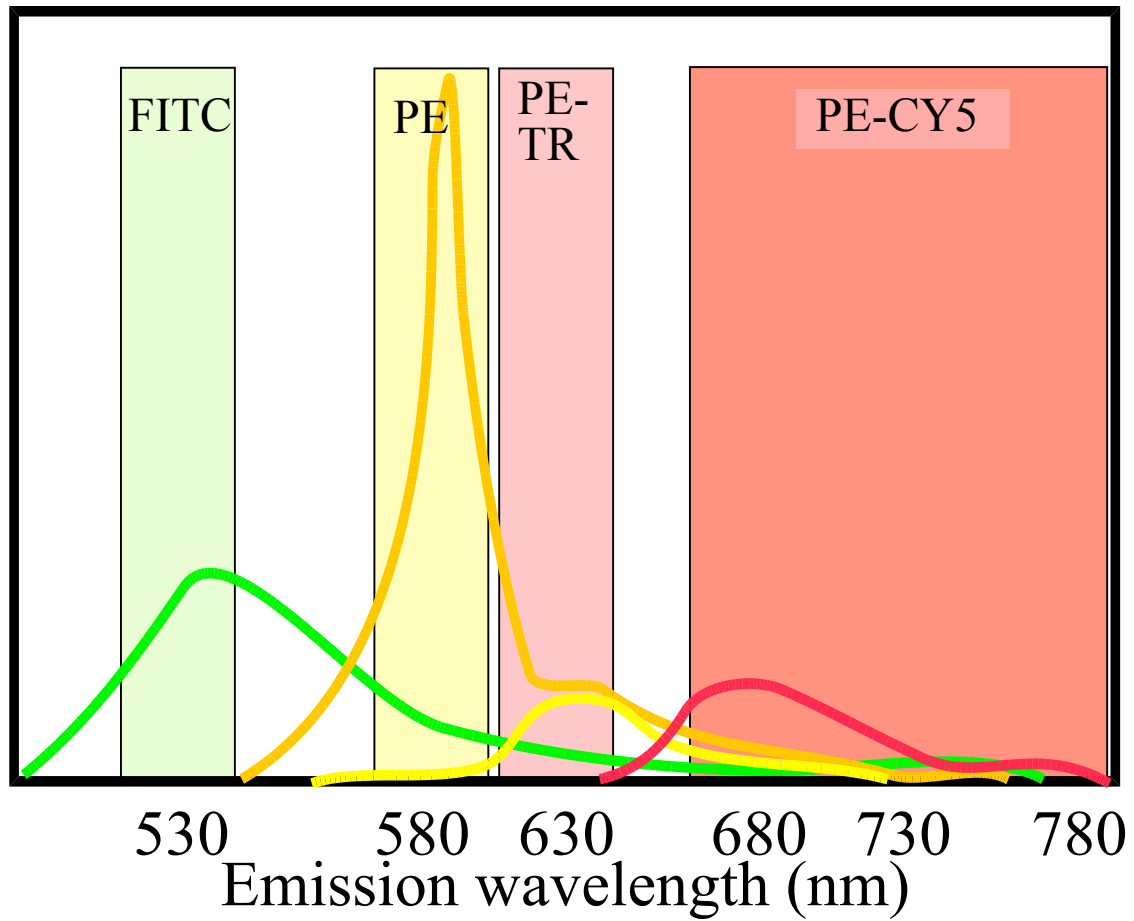
FLUOROCROMI



FLUOROCROMI



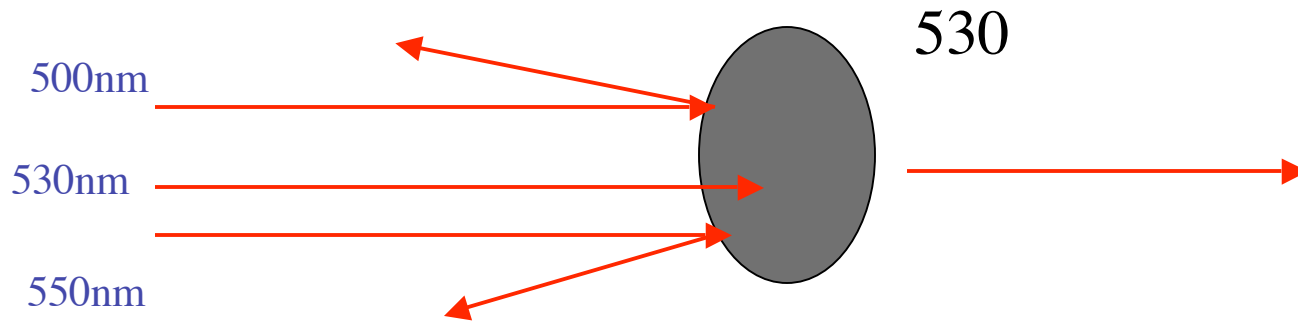
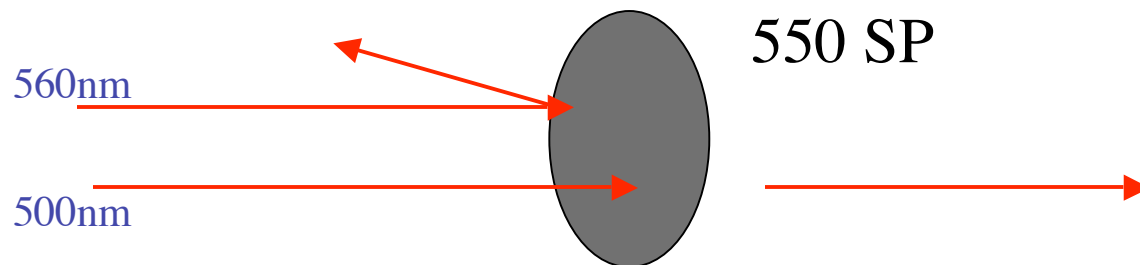
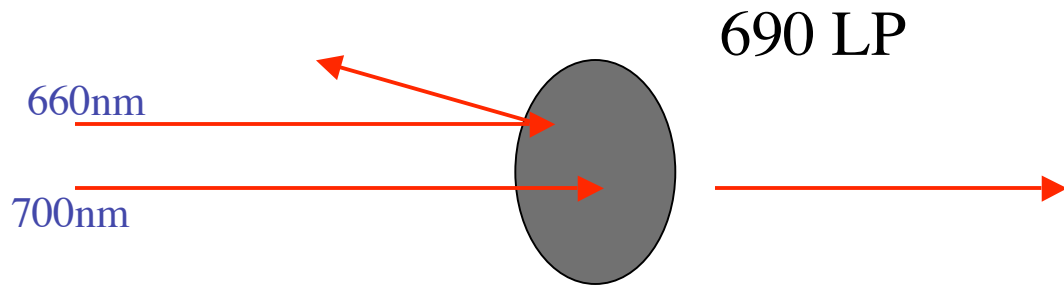
4 colors collection



Filtri utilizzati in citofluorimetria

- Ci sono 3 tipi di filtri:
 - Long pass
 - Short pass
 - dichroics
- Long Pass: passano le lunghezze d'onda **superiori** al filter number
- Short Pass: passano le lunghezze d'onda **inferiori** al filter number
- Dichroics: riflettono le lunghezze d'onda superiori e inferiori al filter number

Filtri utilizzati in citofluorimetria



LONG & SHORT PASS FILTERS

Standard Long Pass Filters



Standard Short Pass Filters



CITOMETRIA A FLUSSO OGGI



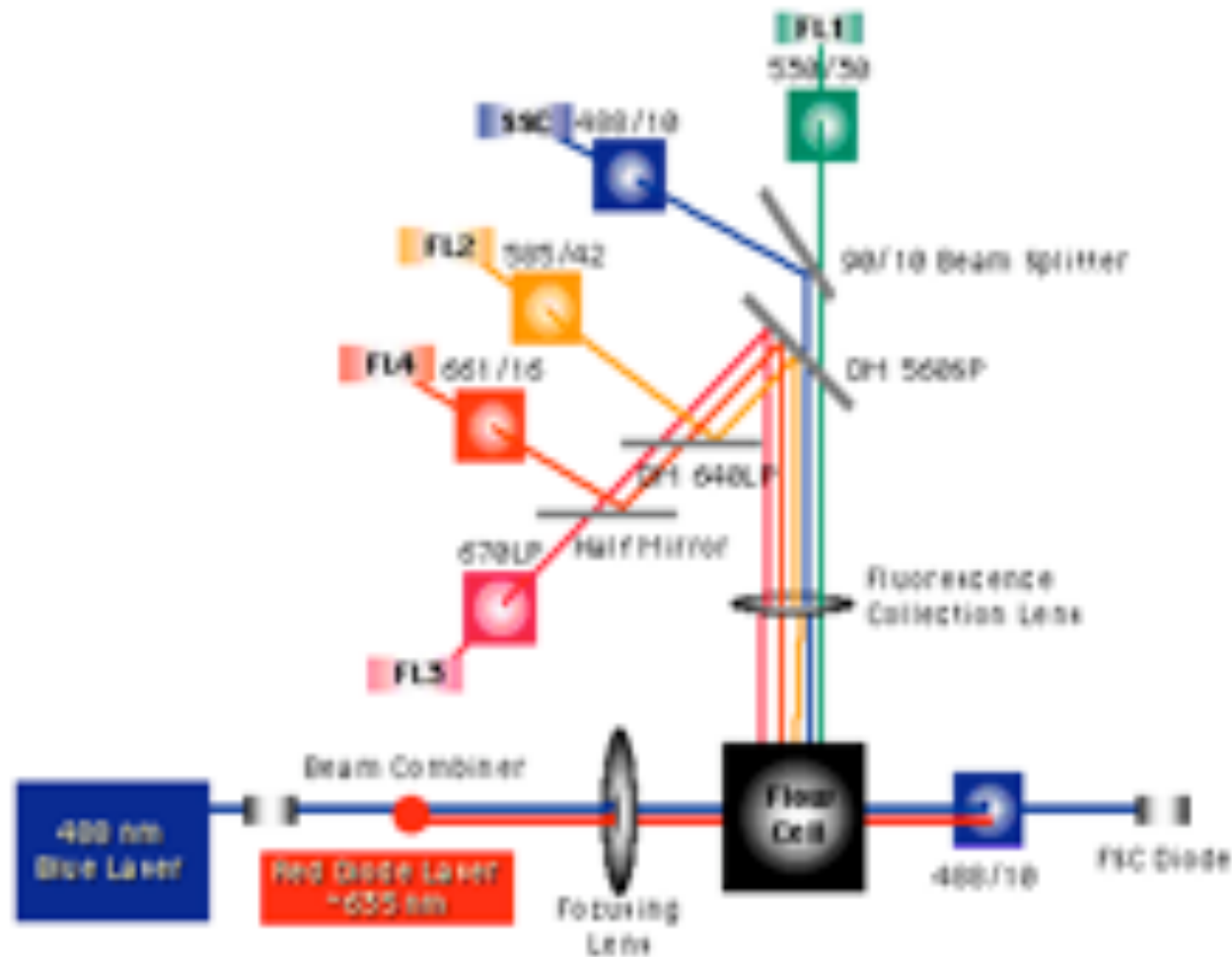
The BD FACSCalibur™ system: the only four-color, dual-laser system available today that is capable of both cell analysis and sorting. Designed specifically to support a wide range of applications, the BD FACSCalibur system is a fully integrated multiparameter system.

The BD FACSCalibur system combines unique dual-laser technology, an automated sample loader option, and powerful software to provide the high throughput necessary to meet productivity requirements of clinical laboratories.

BD FACSCalibur System

- * Three- or four-color fluorescence capability
- * BD FACStation™ System Data Management System
- * dual-laser technology

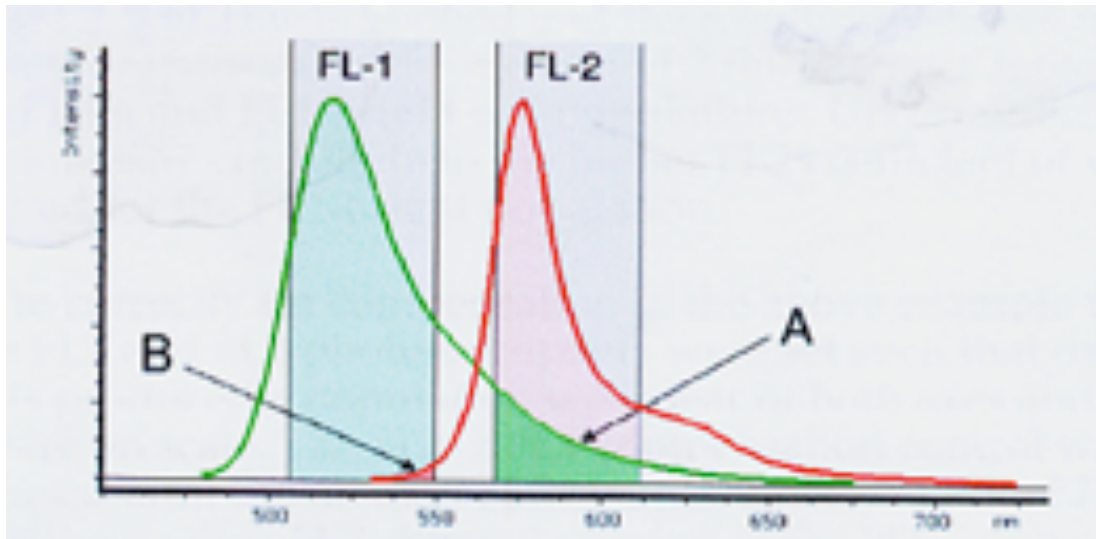
COMPONENTI DEL FACSCalibur



Compensazione

Compensazione: processo che ha lo scopo di sottrarre da un certo canale una quota fissa di segnale relativo all'emissione di un altro fluorocromo.

Nonostante il complesso sistema di lenti, specchi e filtri, e l'attenzione posta nella selezione di fluorocromi con spettri di emissione separati, succede infatti che una radiazione di una certa intensità di un fluorocromo si sovrappone alla lunghezza d'onda del fluorocromo successivo.

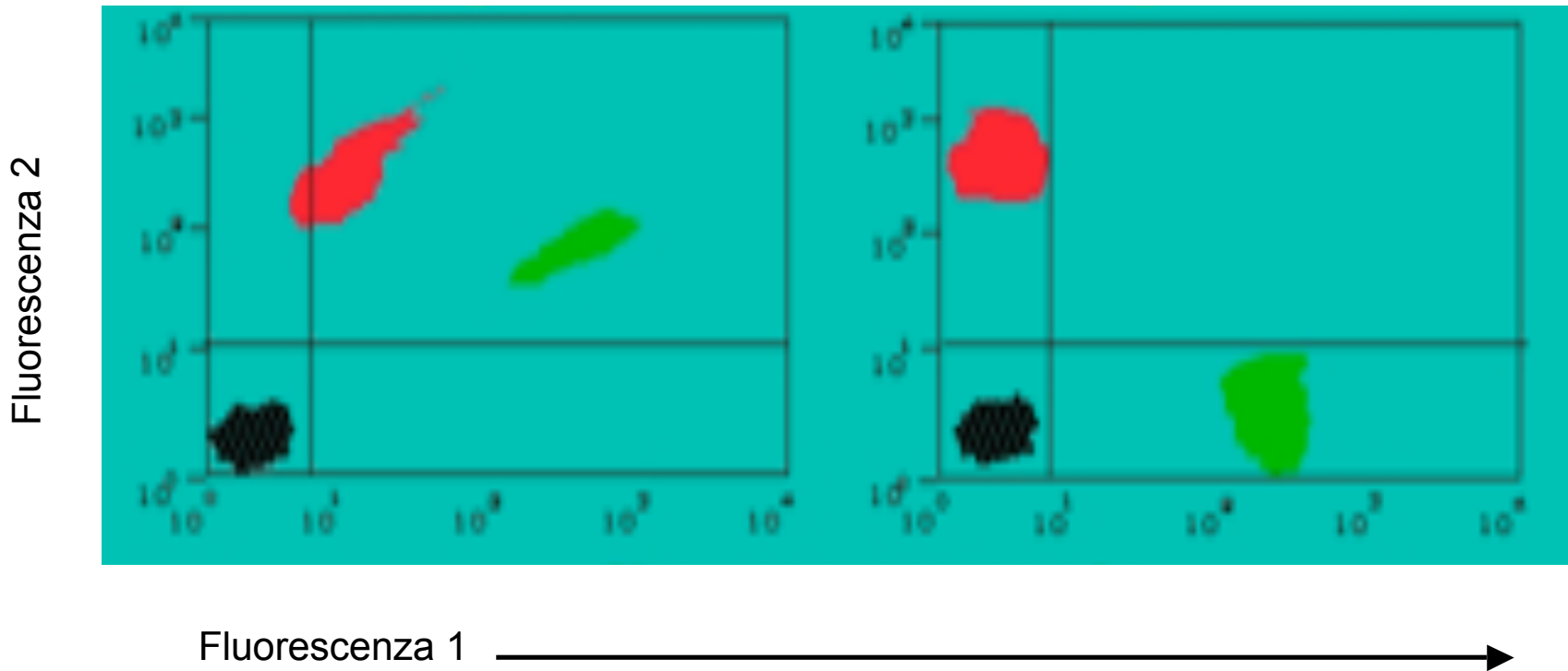


Es: si sottra dal canale del PE (rosso), una quota fissa di segnale dovuto alla interferenza del FITC (verde), e viceversa.

Importanza della Compensazione

Non compensato

Compensato



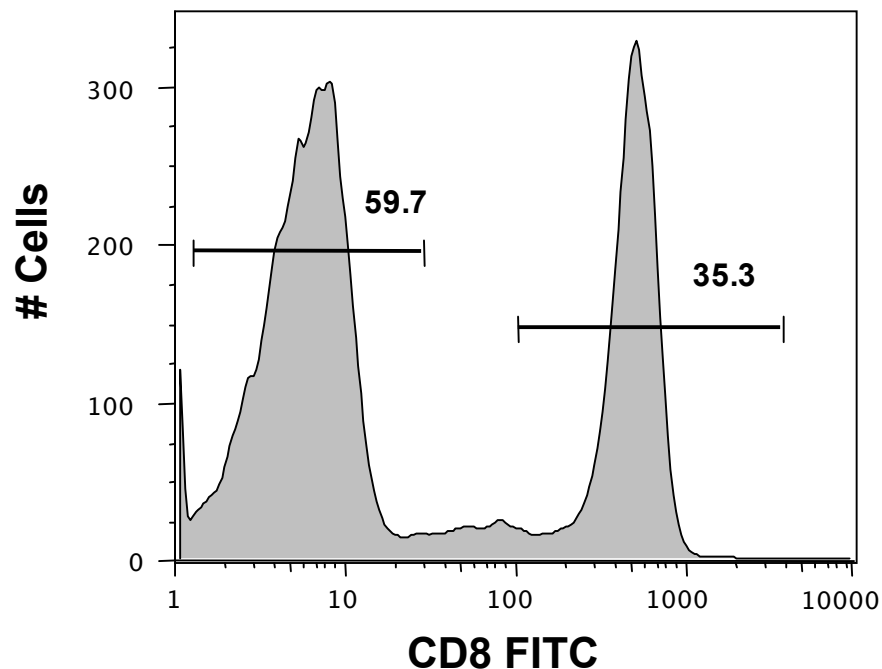
Elaborazione e rappresentazione dei dati

L'elaborazione dei dati e' eseguita grazie al computer collegato allo strumento, che tramite specifici software provvede a tradurre i segnali in grafici e alla loro rappresentazione su display video in tempo reale.



Rappresentazione dei dati

Esistono diversi modi per rappresentare un dato citofluorimetrico. La rappresentazione piu' semplice e' costituita dall'**istogramma** dove l'ascissa riporta l'intensita' di fluorescenza e l'ordinata il numero di cellule che esprimono o meno l'antigene (**diagramma di distribuzione**).



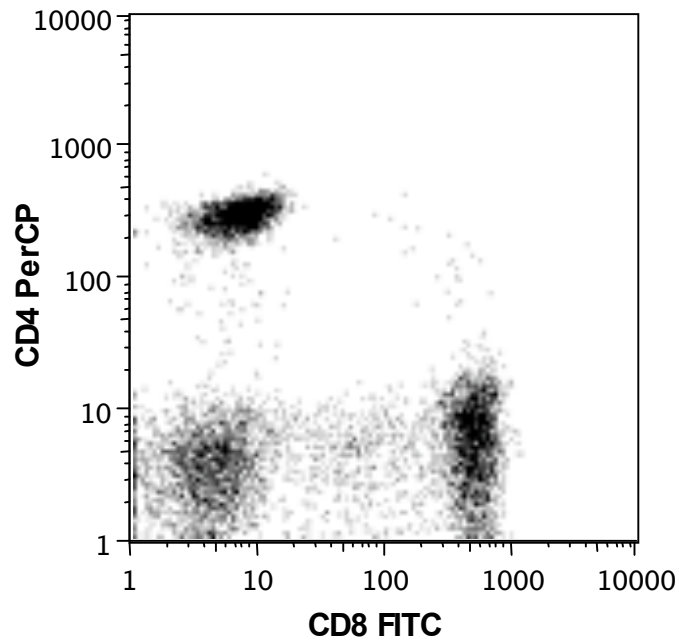
L'analisi statistica si basa sull'impostazione di cursori che delimitano le aree di interesse, e sulla quantificazione degli eventi cellulari che rientrano in tali aree. Per ogni picco e' possibile calcolare dati statistici (valore medio, deviazione standard, coefficiente di variazione, ecc)

Rappresentazione bidimensionale

Oltre all'istogramma, e' possibile utilizzare una serie di **rappresentazioni bidimensionali**, che permettono di mettere in correlazione due parametri tra di loro.

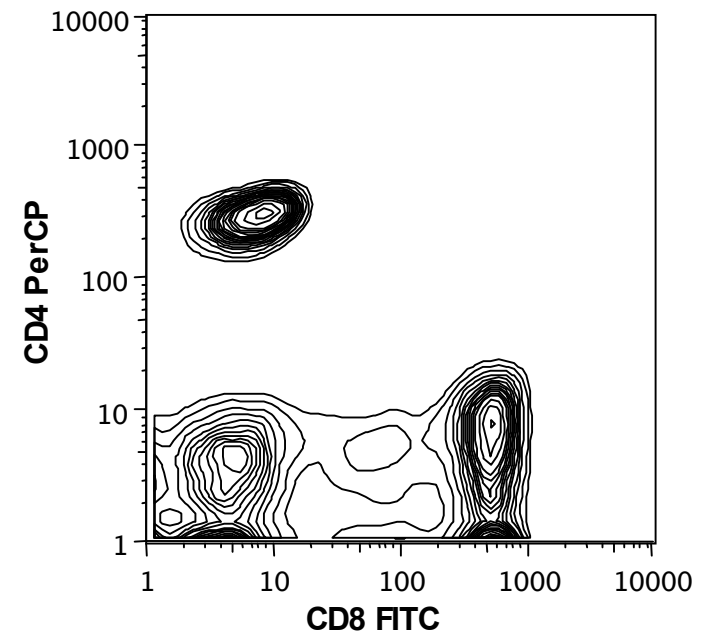
Dot-plot:

ogni singolo punto rappresenta un evento



Contour-plot:

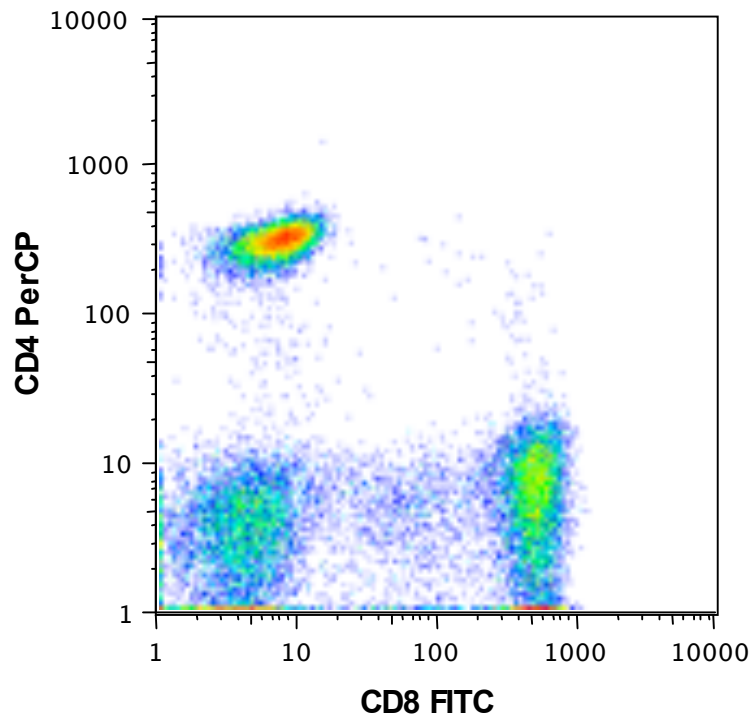
Visualizzano aree aventi la stessa densita' mediante linee concentriche



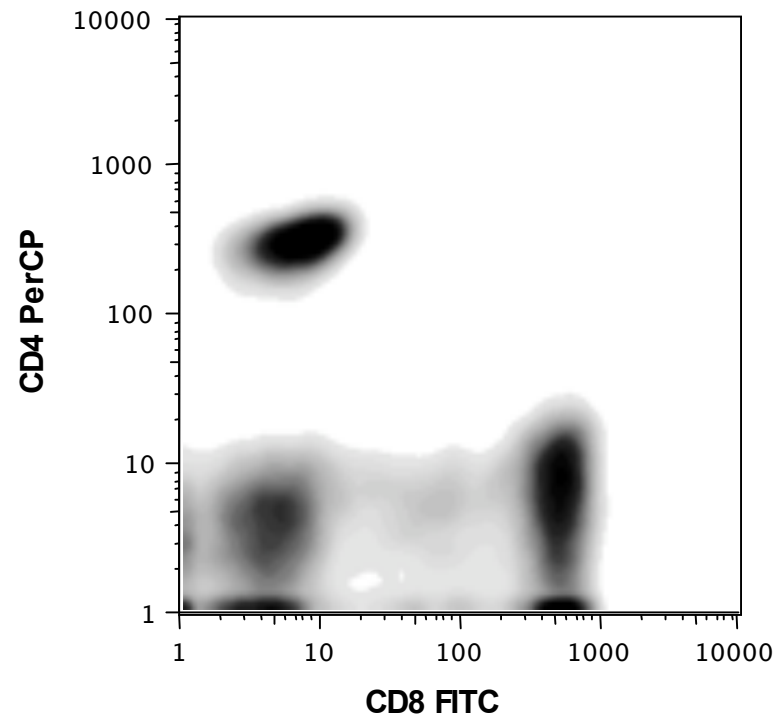
Rappresentazione bidimensionale

Si possono utilizzare altre rappresentazioni dove l'intensità del colore è proporzionale alla densità degli eventi

Pseudo color-plot:



Density-plot:



Colorazione dei linfociti del sangue periferico:

- Marcare in maniera appropriata i tubi utilizzati per la colorazione;
- Aggiungere le quantità di anticorpi nei rispettivi tubi come riportato nel pannello;

	FITC	PE	PerCP	APC
1)	Unstained			
2)	CD8 10 μ l			
3)		CD28 10 μ l		
4)			CD8 10 μ l	
5)				CD3 10 μ l
6)	CD8 10 μ l	CD127 20 μ l	CD4 10 μ l	CD3 10 μ l
7)	CD8 10 μ l	CD28 10 μ l	CD4 10 μ l	CD3 10 μ l
8)	Ki67 10 μ l	CD127 20 μ l	CD8 10 μ l	CD4 10 μ l
9)	Ki67 10 μ l	CD28 10 μ l	CD8 10 μ l	CD4 10 μ l

- aggiungere 250 μ l di sangue in ogni tubo
- vortexare, incubare 20 min a 4°C al buio

- aggiungere RBC lysis solution, 2 ml per ogni tubo. Vortexare ed incubare 10 min a RT al buio
- lavare con 2 ml FACS buffer (PBS+ BSA 0.5%), centrifugando 5 min 1500 rpm a 4°C

Tubi 1-7:

- ripetere il lavaggio dello step precedente con 3 ml FACS buffer
- fissare le cellule con FIXING buffer (PBS + 0.5% paraformaldeide)

Tubi 8-9:

- permeabilizzare le cellule incubandole in 700 μ l permeabilization buffer 1X per 15 min a RT al buio
- lavare con 3 ml FACS buffer, centrifugando 5 min 1500 rpm a 4°C
- aggiungere l'anticorpo contro l'antigene intracellulare (Ki67)
- vortexare, incubare per 20 min a 4°C al buio
- lavare con 3 ml FACS buffer, centrifugando 5 min 1500 rpm a 4°C
- fissare le cellule con FIXING buffer
- le cellule devono essere acquisite al citofluorimetro entro 48 ore

Lysing Solution

Partendo da sangue periferico una efficiente determinazione dei linfociti dipende dall'eliminazione di cellule interferenti. Utilizzeremo FACS Lysing Solution, che grazie a particolari condizioni ipotoniche lisa i globuli rossi mentre preserva i leucociti. L'uso di questo buffer fornisce risultati riproducibili e naturalmente preserva le proprietà di light scattering dei leucociti.

Il buffer è fornito 10X concentrato, e deve essere diluito con dH₂O. Una volta diluito è stabile per un mese a RT.

Permeabilizing buffer

Utilizzeremo Permeabilizing Solution 2, che permette di rendere la membrana cellulare permeabile agli anticorpi. Ciò permette l'identificazione di antigeni intracellulari, sia citoplasmatici che nucleari.

Il buffer è fornito 10X concentrato, e deve essere diluito con dH₂O.