Flowcytometry

03.05.2024

Video:

Funzionamento del citofluorimetro
https://www.youtube.com/watch?v=EQXPJ7eeesQ

Focalizzazione Acustica
https://www.youtube.com/watch?v=b2ilHEnugE0

Flowcytometry

Flow	cyto	metry
Flusso	Cellule	Misurazione

Flowcytometry

Misurazione | Cellule | Flusso

Tecnica di laboratorio <u>veloce ed automatica</u> che permette

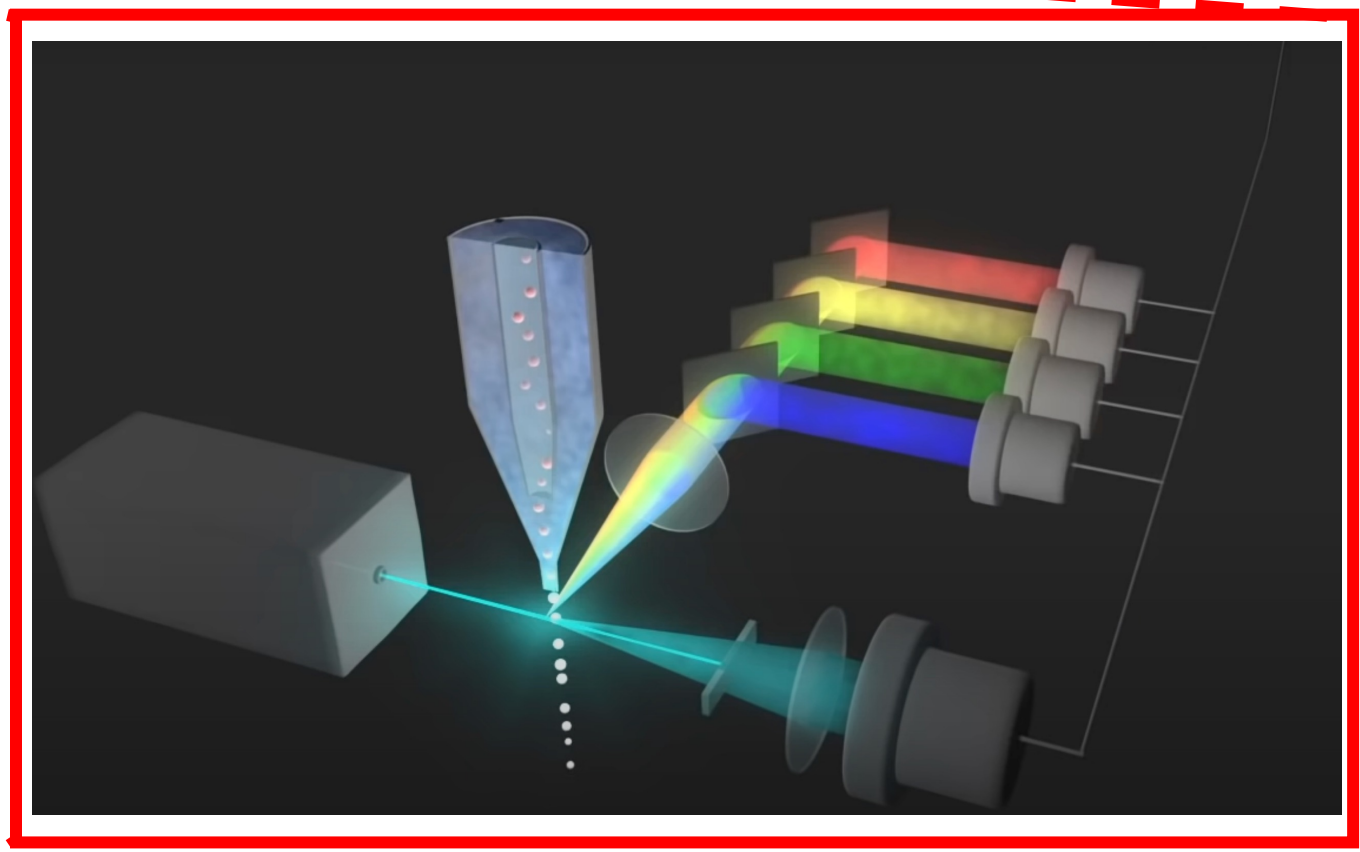
1. una misurazione
2. di particelle/cellule
3. in un **flusso**

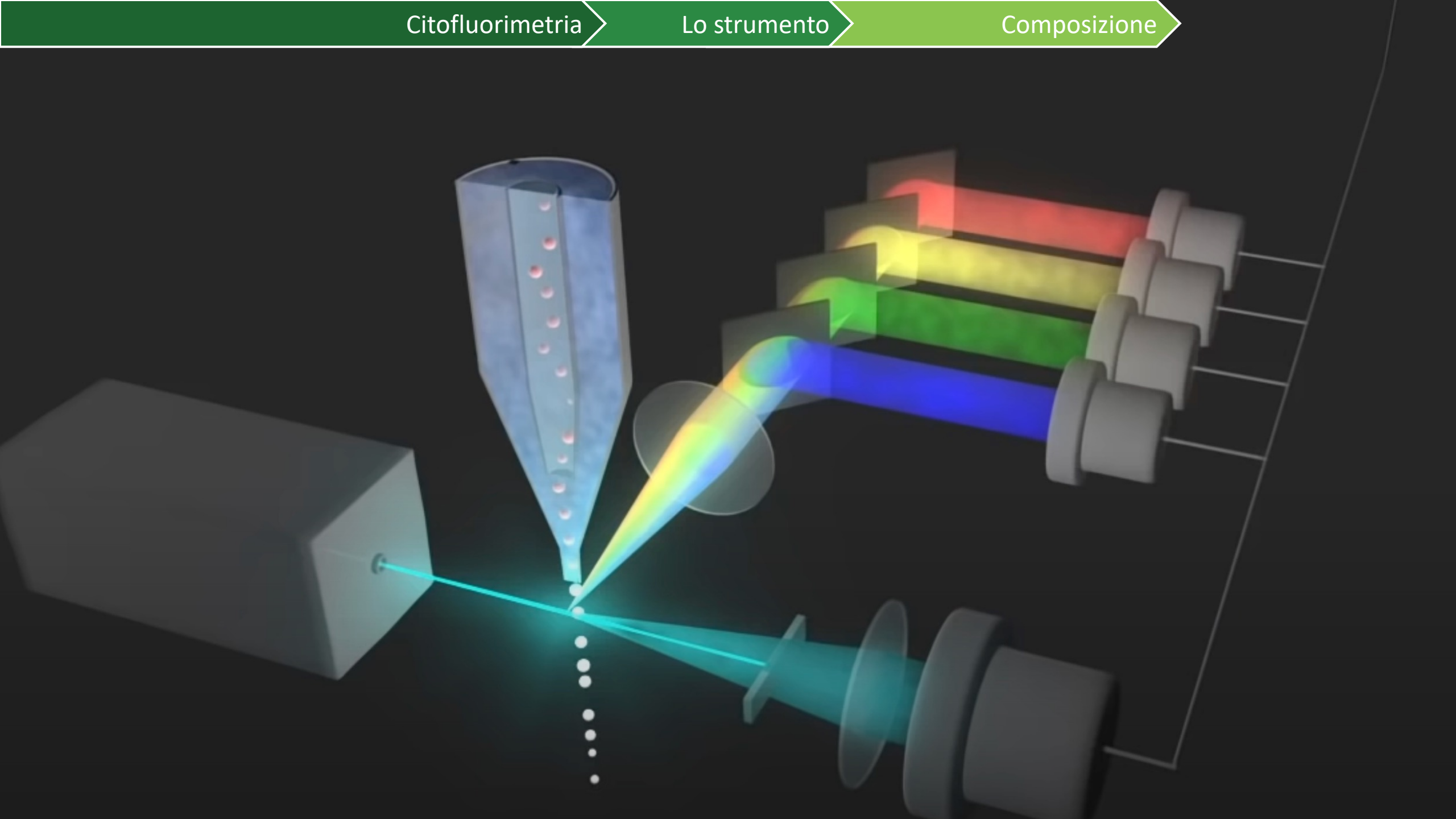
Il citofluorimetro consente di **quantificare e memorizzare contemporaneamente** le caratteristiche fisiche e/o biochimiche di ogni cellula che compone la popolazione, come:

- Volume,
- Granulosità,
- Fluorescenza,
- Numero,
- Salute…

e **analizzare** i dati ottenuti anche in un secondo momento

Attune NxT
invitrogen

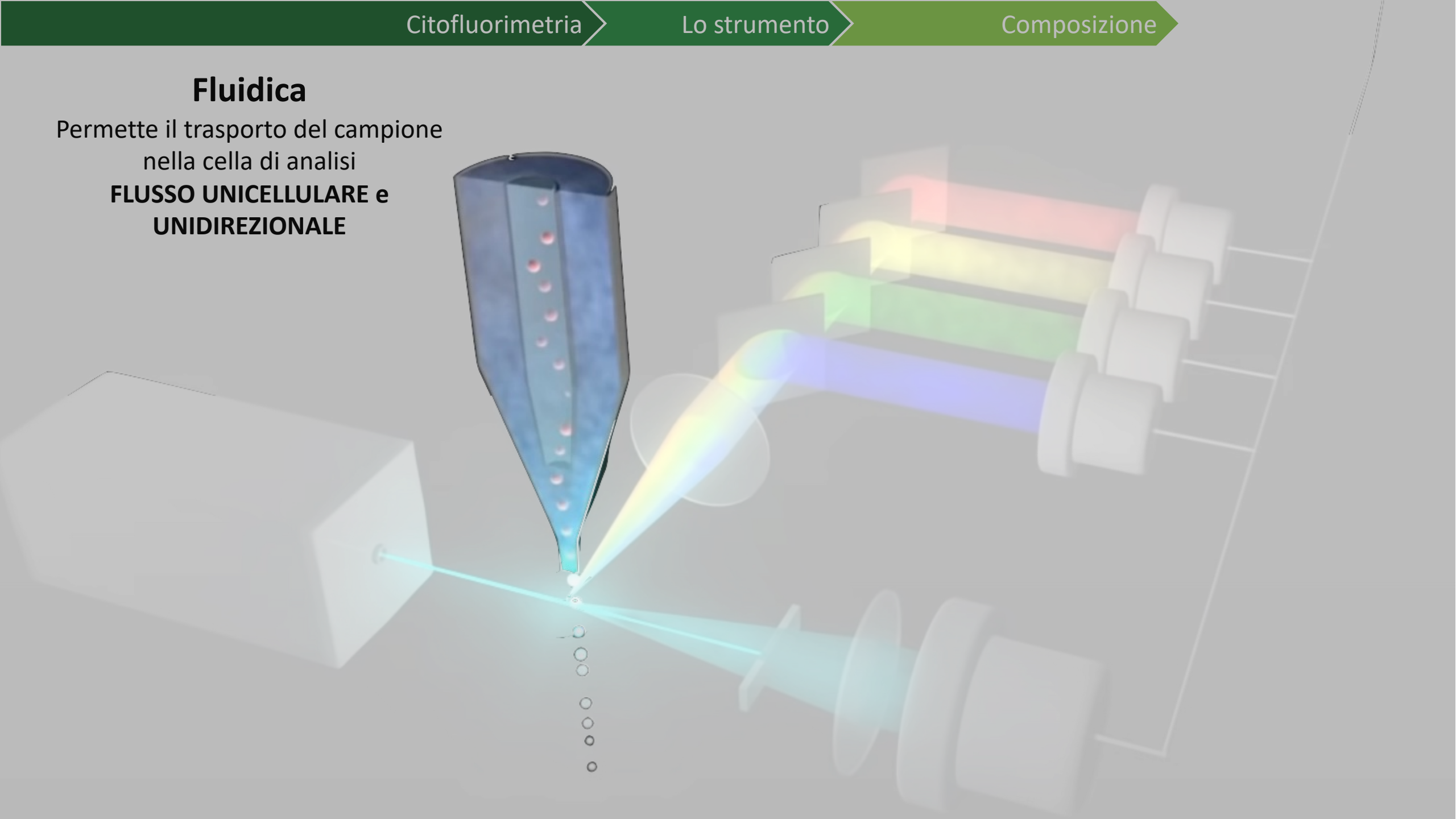


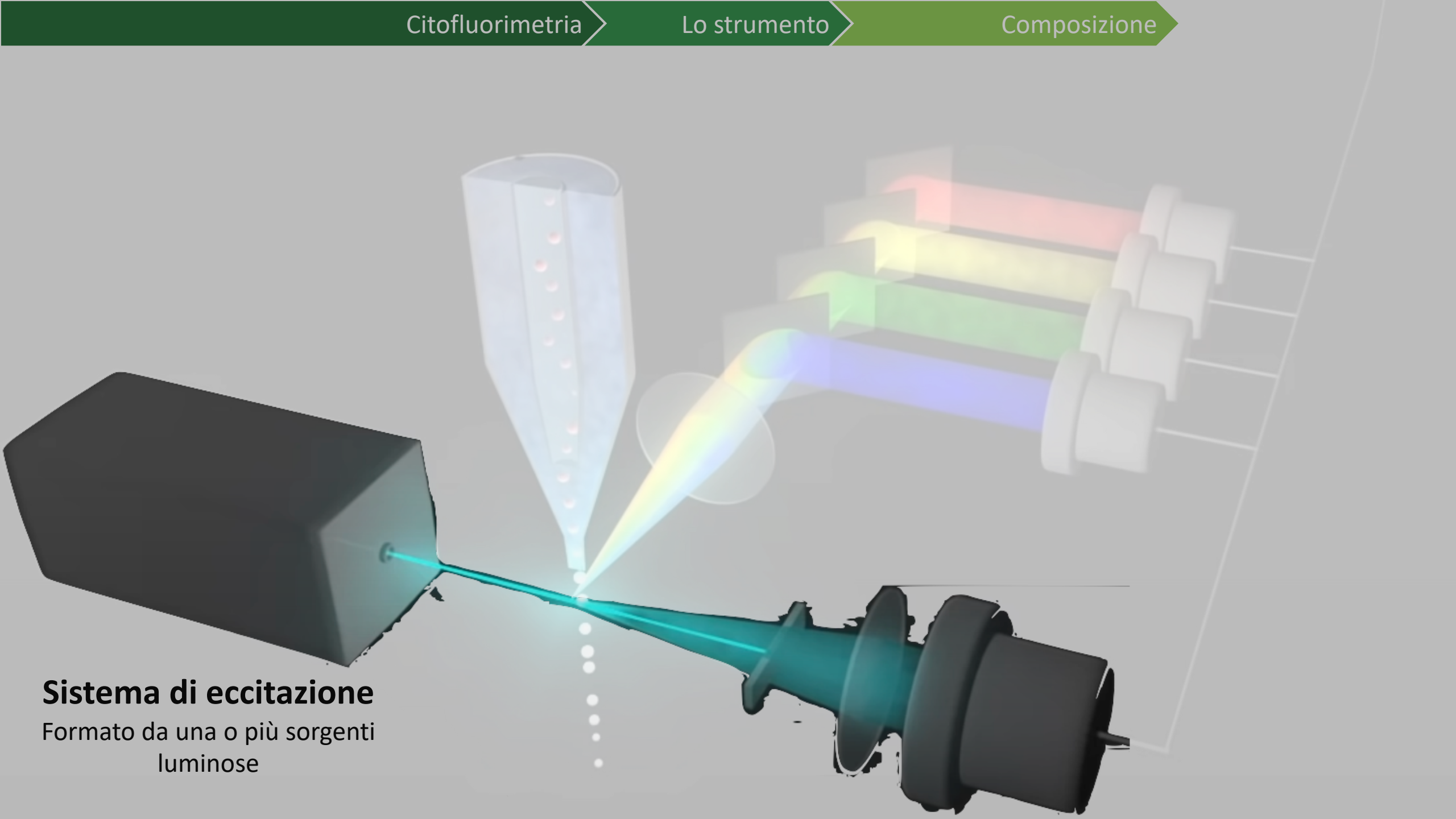


Fluidica

Permette il trasporto del campione nella cella di analisi

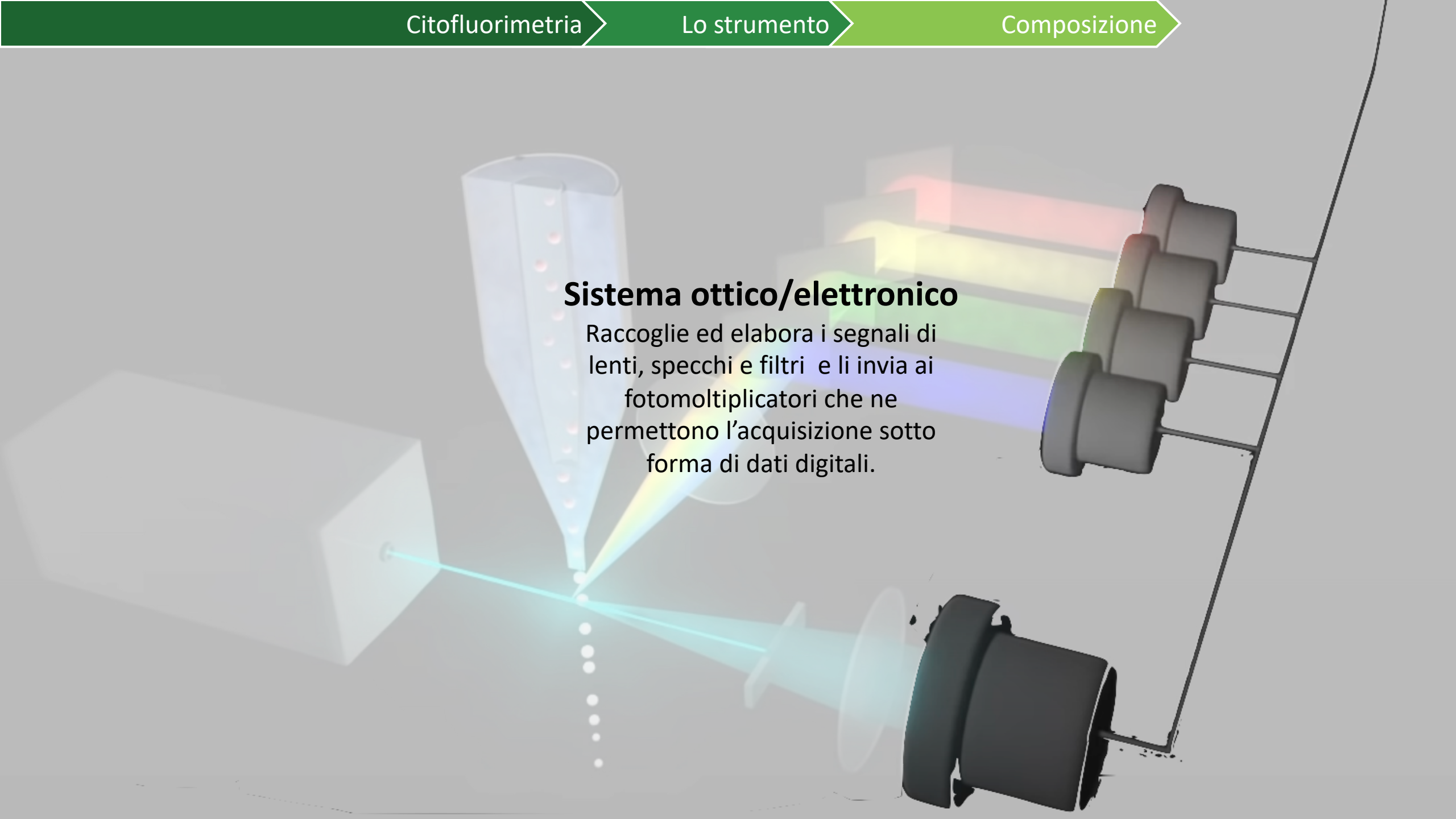
FLUSSO UNICELLULARE e UNIDIREZIONALE





Sistema di eccitazione

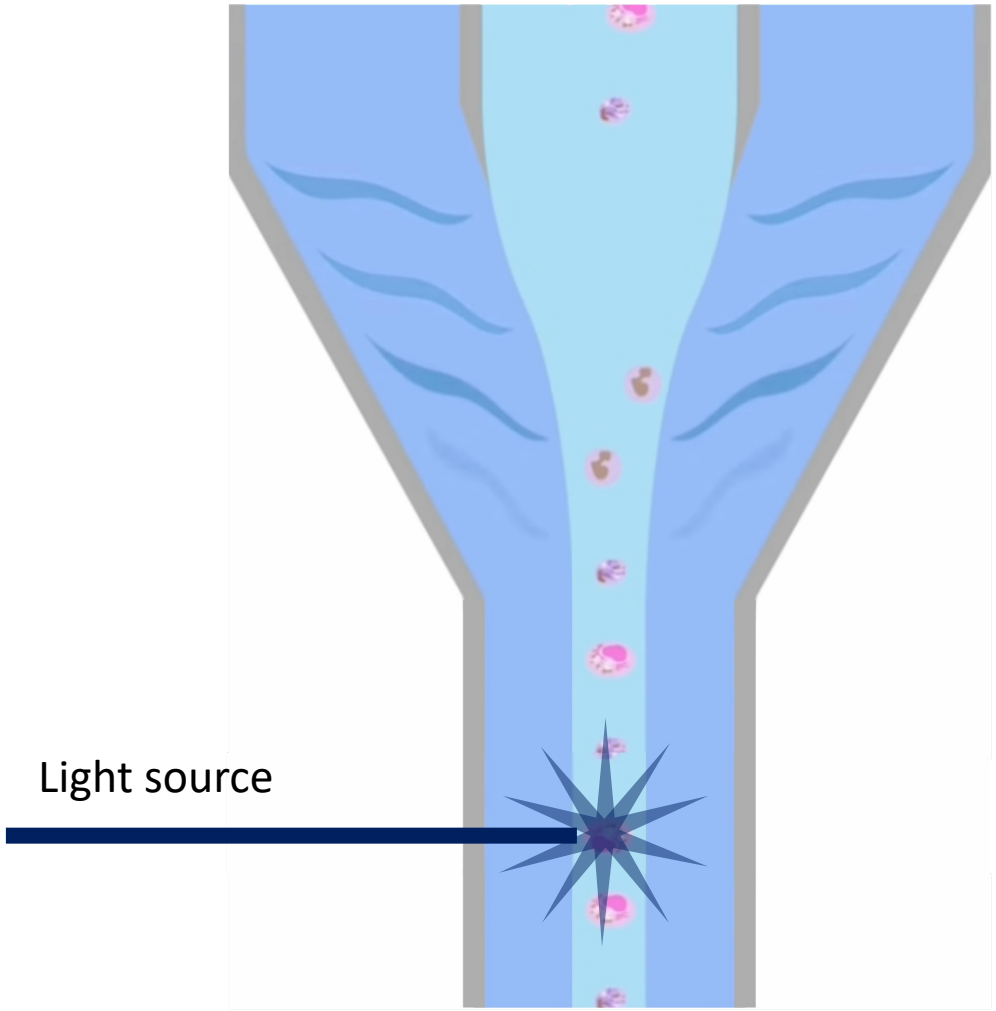
Formato da una o più sorgenti luminose



Sistema ottico/elettronico

Raccoglie ed elabora i segnali di lenti, specchi e filtri e li invia ai fotomoltiplicatori che ne permettono l'acquisizione sotto forma di dati digitali.

Tecnica di laboratorio veloce ed automatica che permette una misurazione di particelle/cellule in un flusso

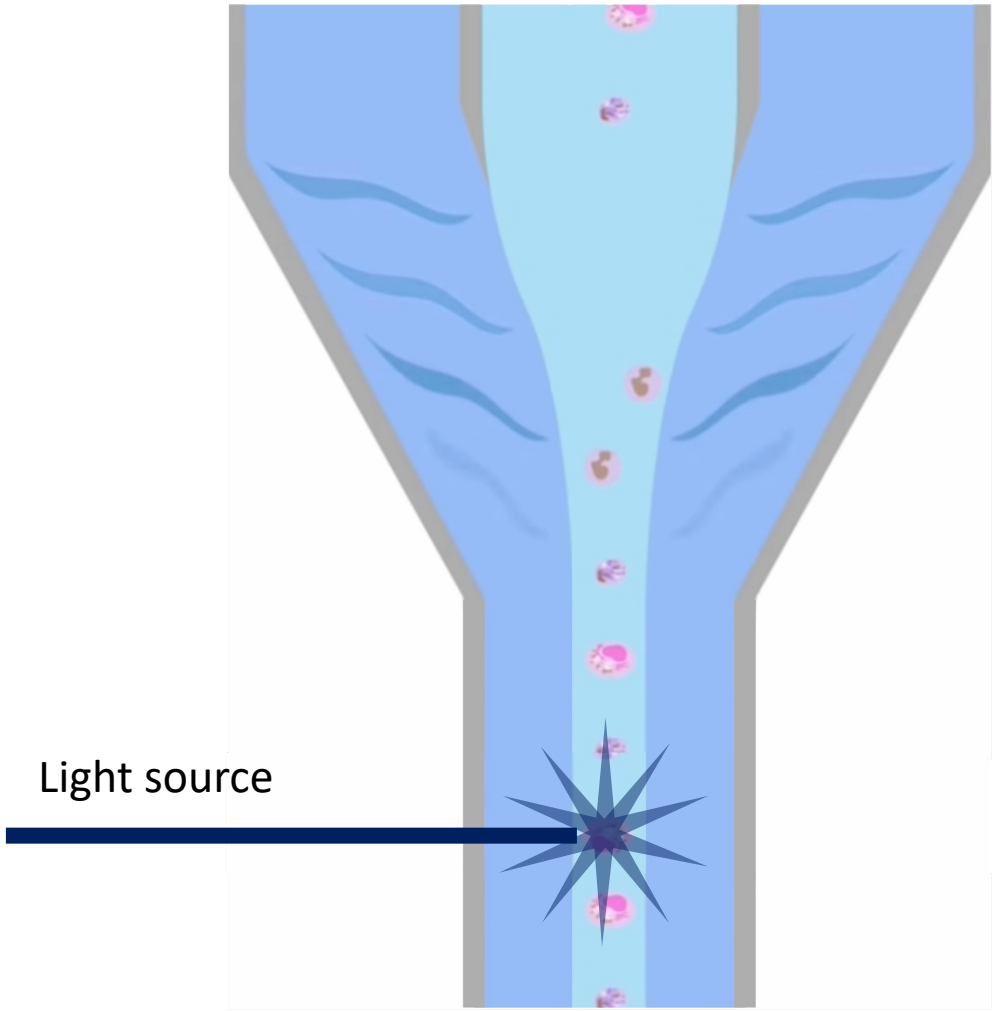


CENTINAIA DI CELLULE AL SECONDO

In sospensione

In “fila indiana”

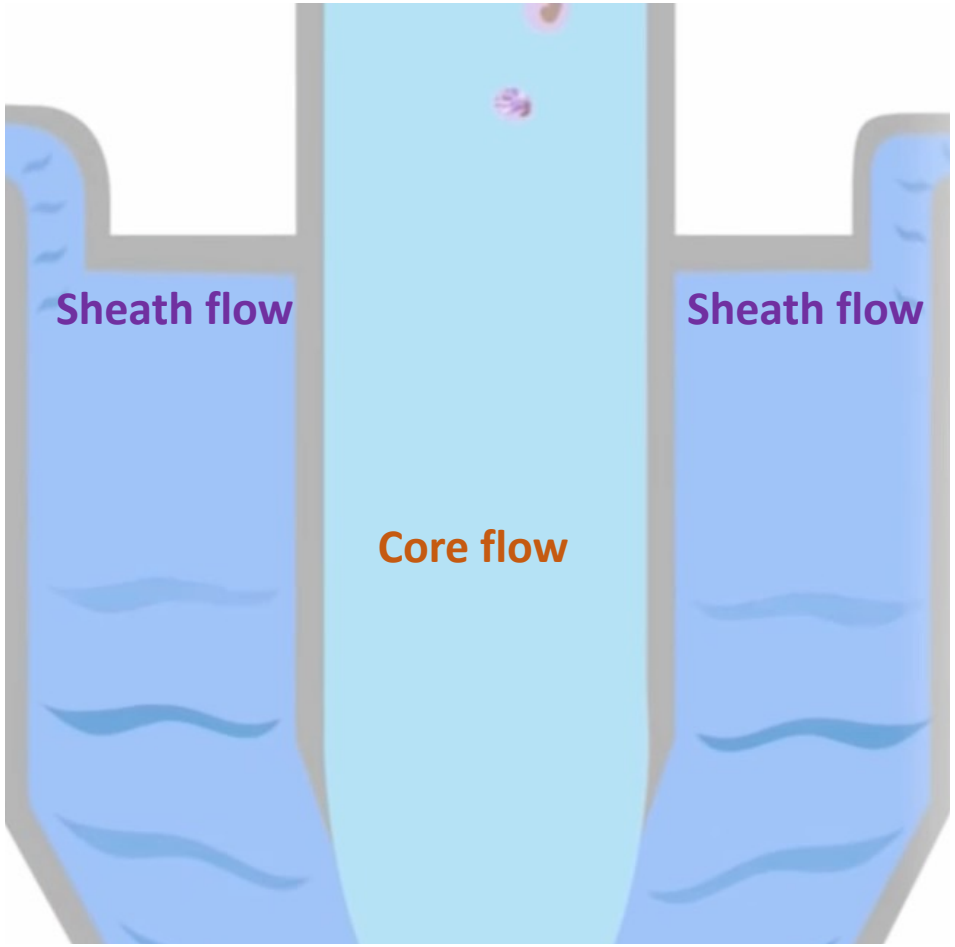
Tecnica di laboratorio veloce ed automatica che permette una misurazione di particelle/cellule in un flusso



Nel capillare il **flusso deve essere laminare (non turbolento)**

Le forze di inerzia idrodinamica esercitate sulle particelle le mantengono al **centro** del capillare (**idrofocalizzazione del flusso**).

In tali condizioni di flusso si possono considerare **due regimi fluidici** coassiali



Core flow (interno) → Contiene le particelle

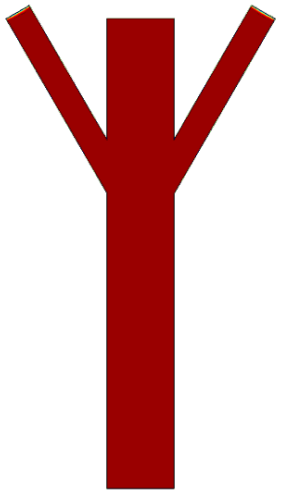
Sheath flow (esterno) → Mantiene le particelle lungo l'asse ideale di flusso

Focalizzazione del flusso

Idrodinamica

Descritta per la prima volta da Reynolds nel **1883**.

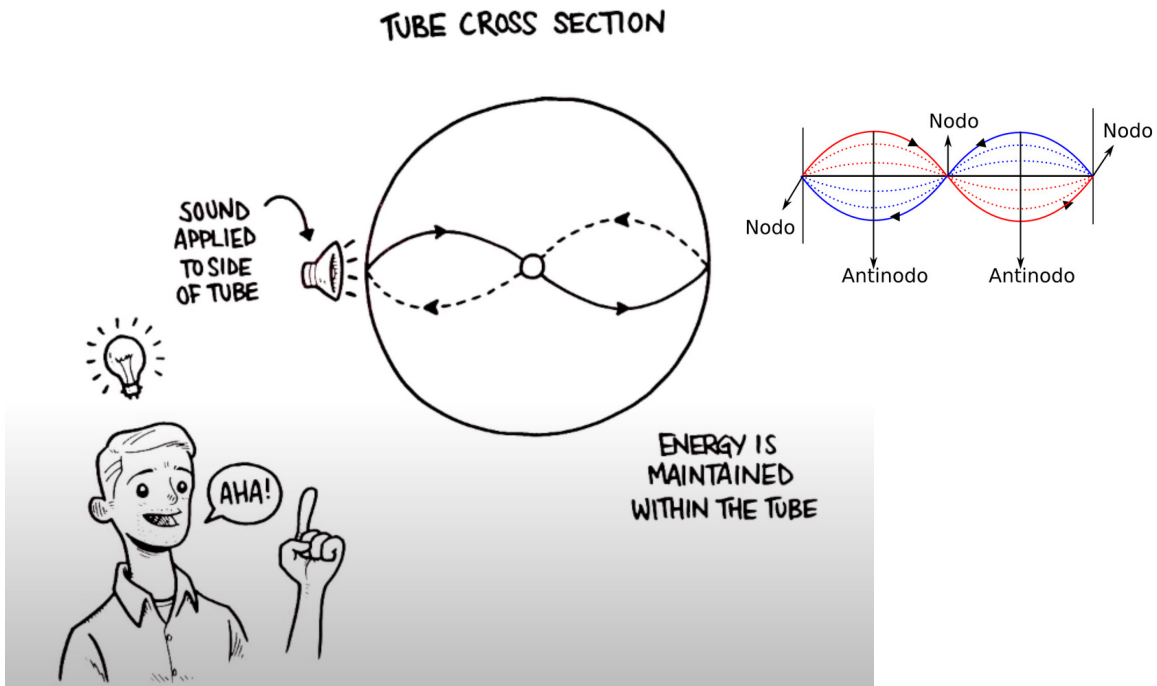
Diverse configurazioni di dispositivi microfluidici vengono utilizzate per eseguire la messa a fuoco idrodinamica, tuttavia, i sistemi di citometria a flusso utilizzano tipicamente la configurazione basata sul flusso laminare coassiale.



Acustica

Introdotta nella configurazione della citometria a flusso Attune® (ThermoFisher Scientific) nel **2009**.

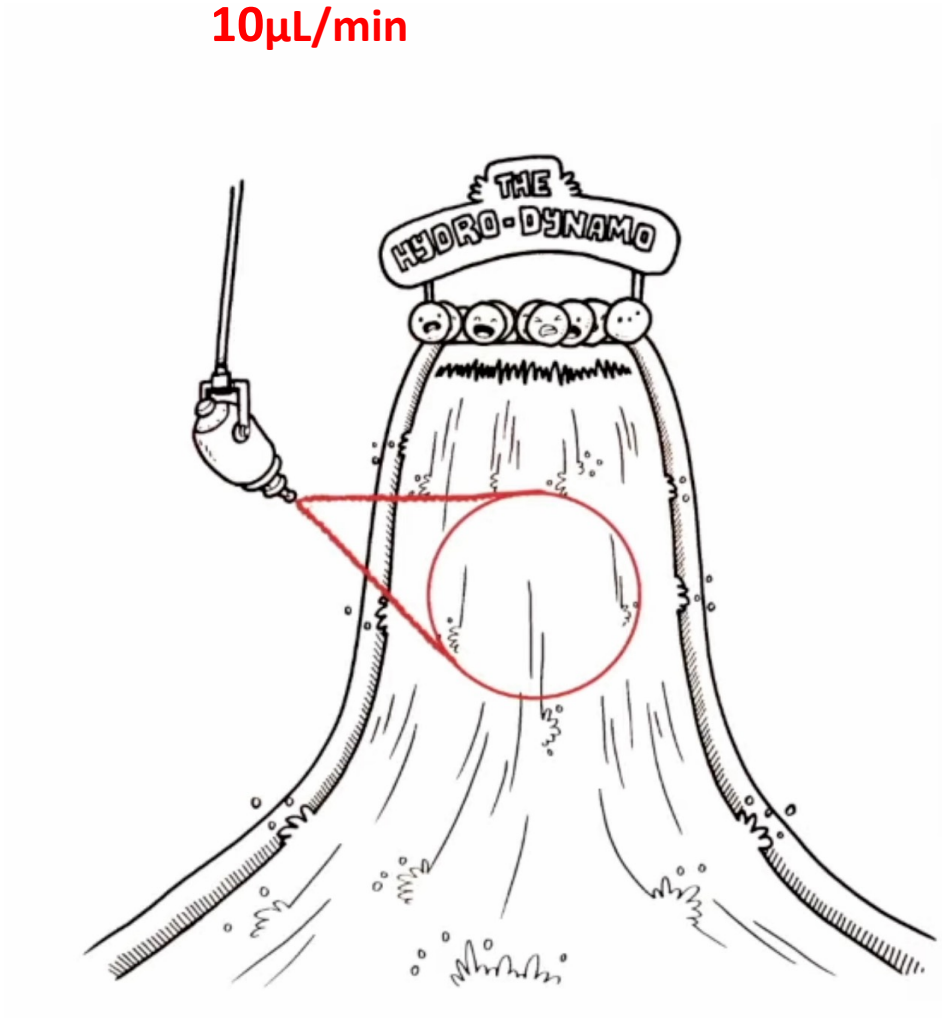
La focalizzazione acustica si basa sulla ridistribuzione di oggetti con diversa densità nei **nodi** e negli **antinodi** dell'onda acustica stazionaria.



Focalizzazione del flusso

Idrodinamica

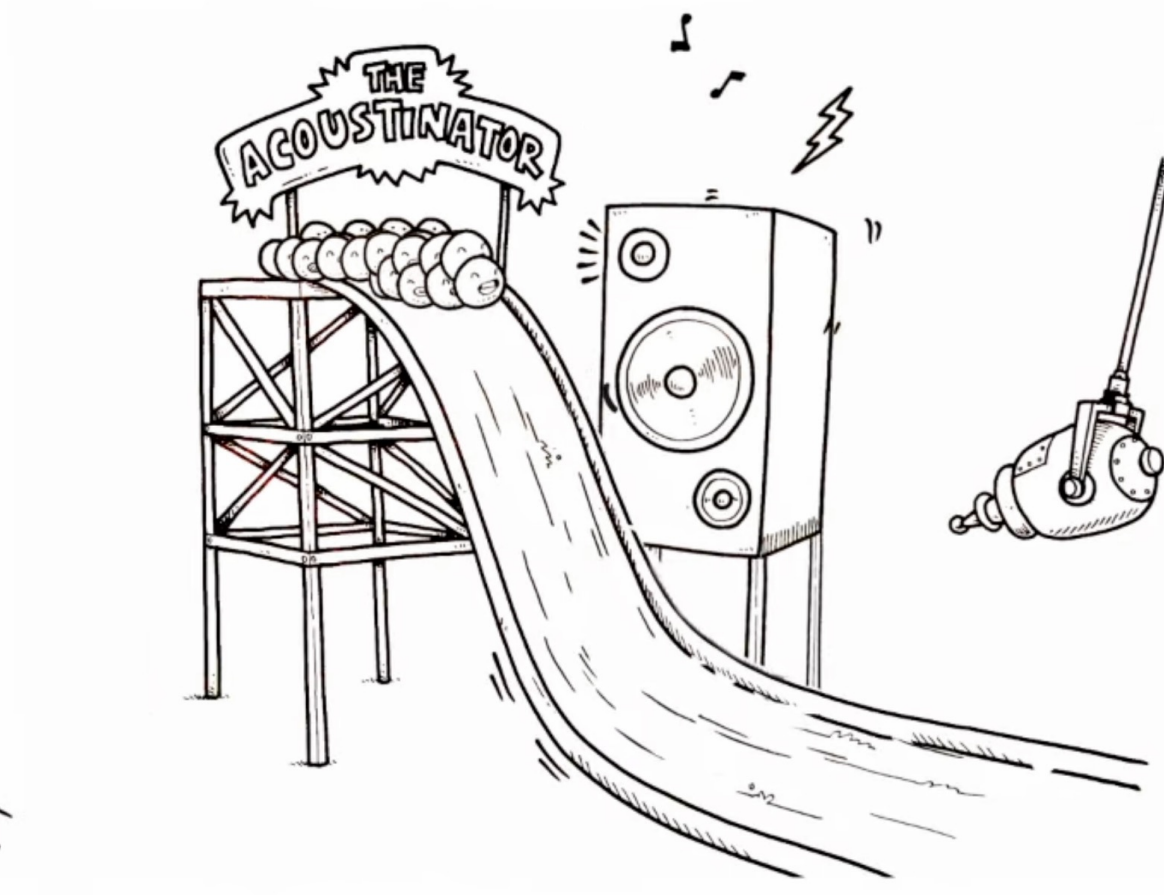
10µL/min

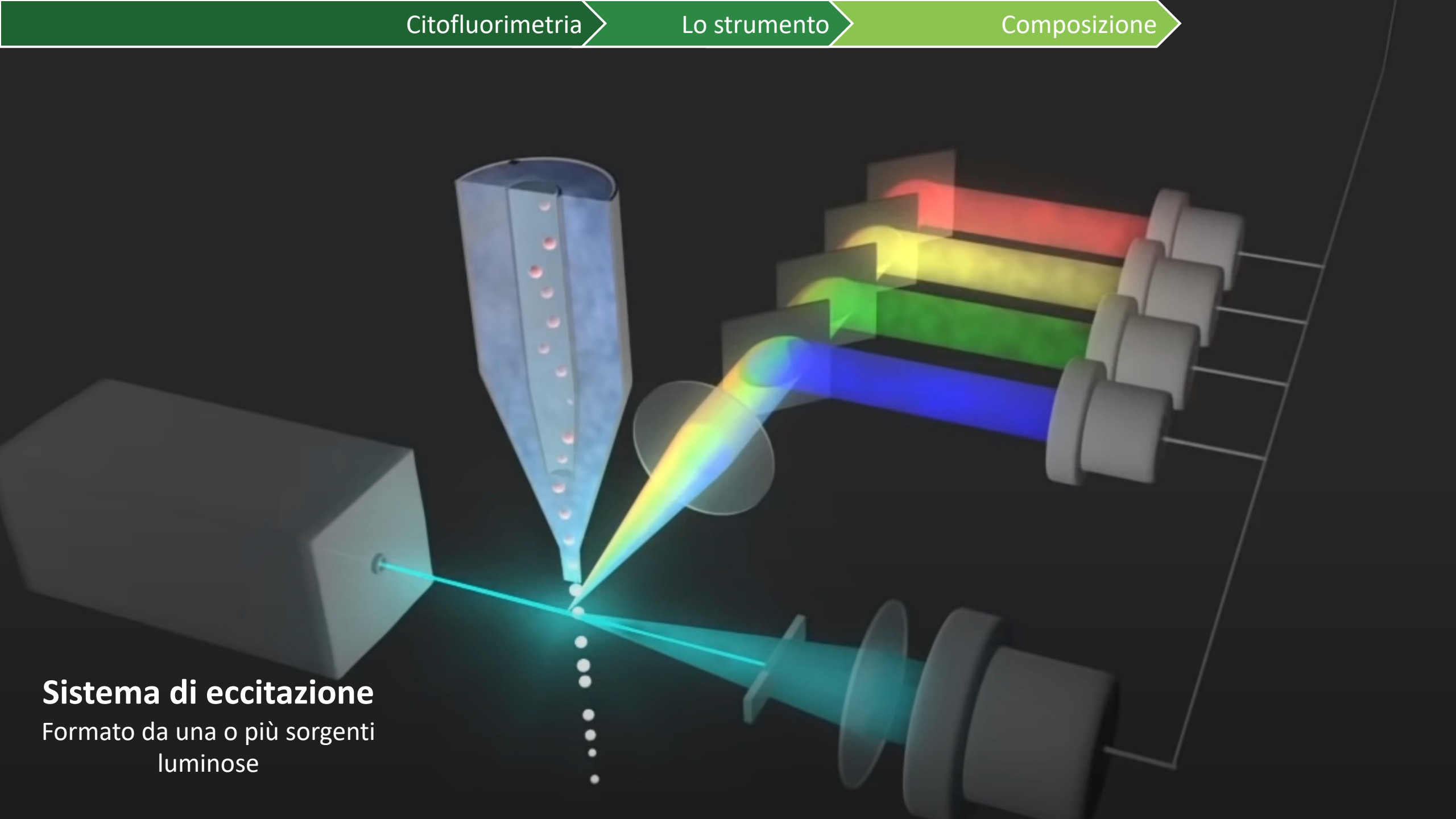


Acustica

Efficiente e poco costosa

1000µL/min





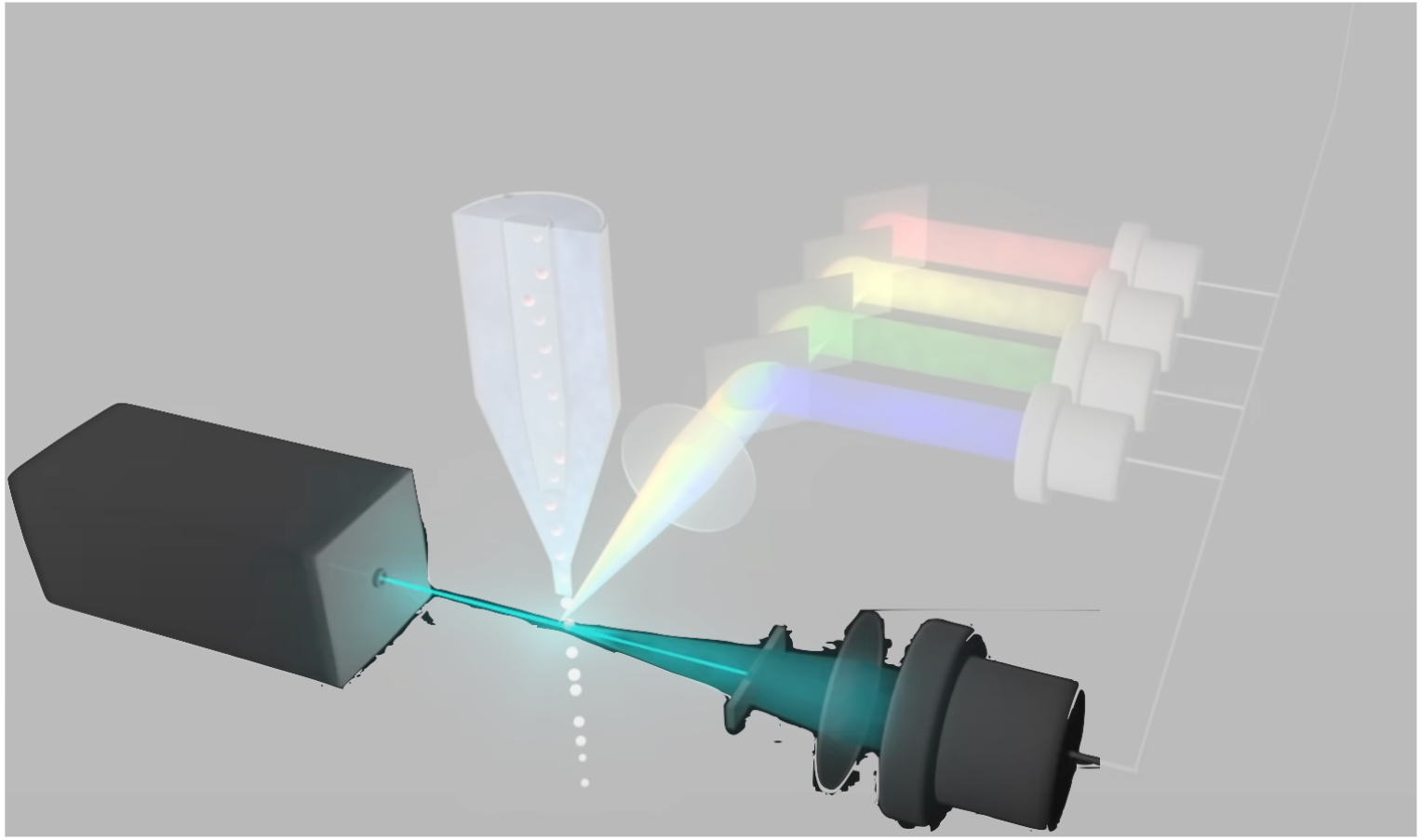
Sistema di eccitazione

Formato da una o più sorgenti luminose

Sistema di eccitazione

Formato da **una o più** sorgenti luminose

Generano segnali monocromatici e unidirezionali che intercettano le cellule nella cella di analisi

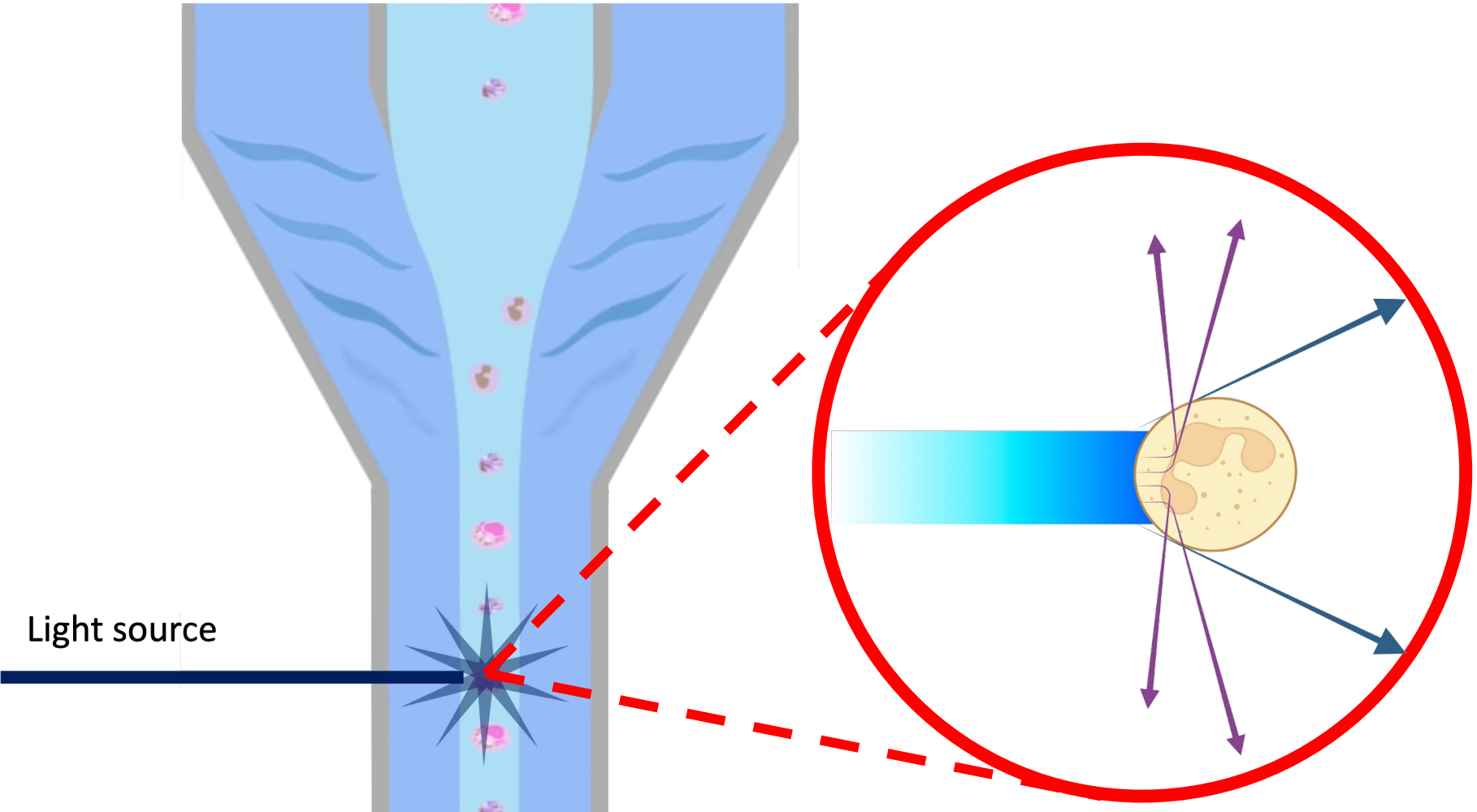


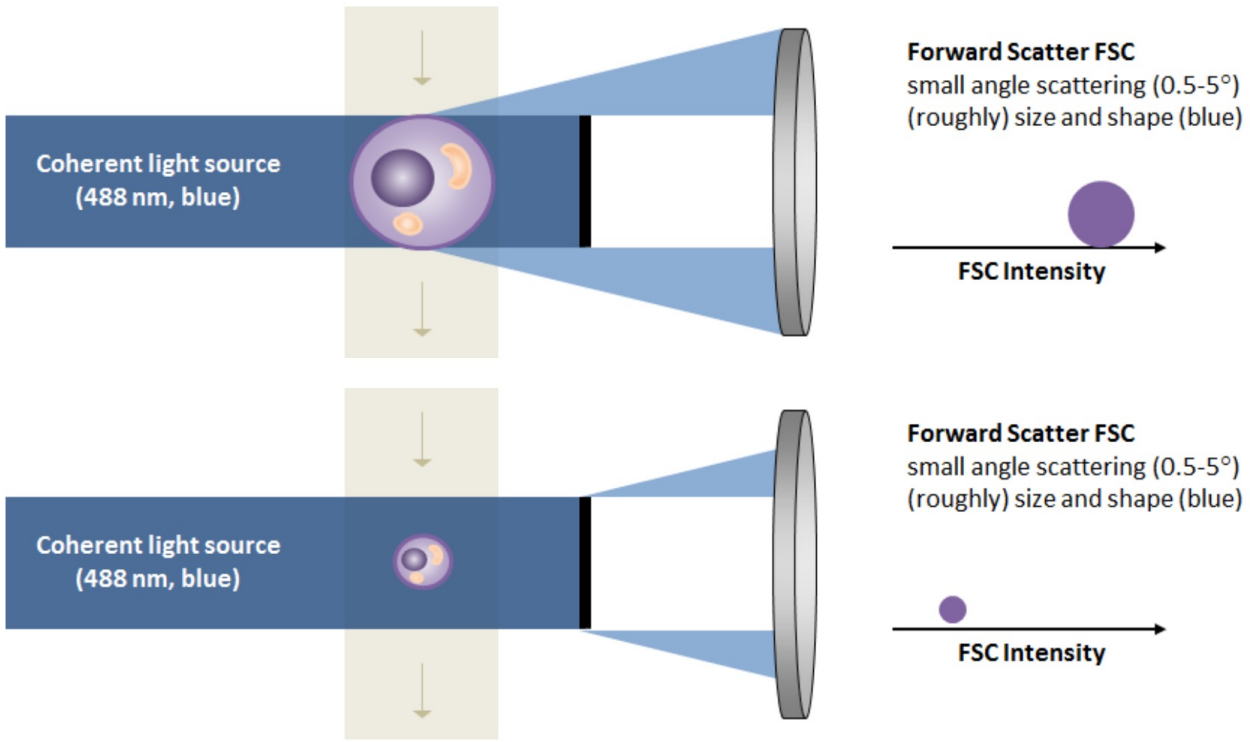
Light scattering

Legato alle caratteristiche fisiche della particella

Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

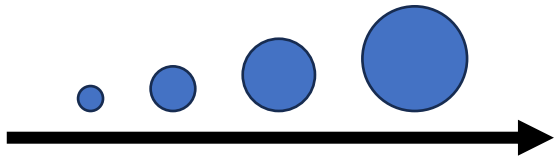




Light scattering

Legato alle caratteristiche fisiche della particella

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale



L'intensità del **Forward Scatter (FSC)** è proporzionale alla **dimensione** e alla **forma** delle cellule

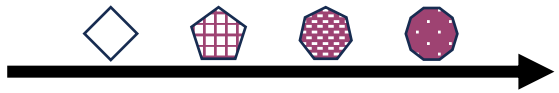
L'angolo di dispersione dipende dalle **dimensioni**

L'angolo di dispersione dipende dalla **composizione interna della cellula**

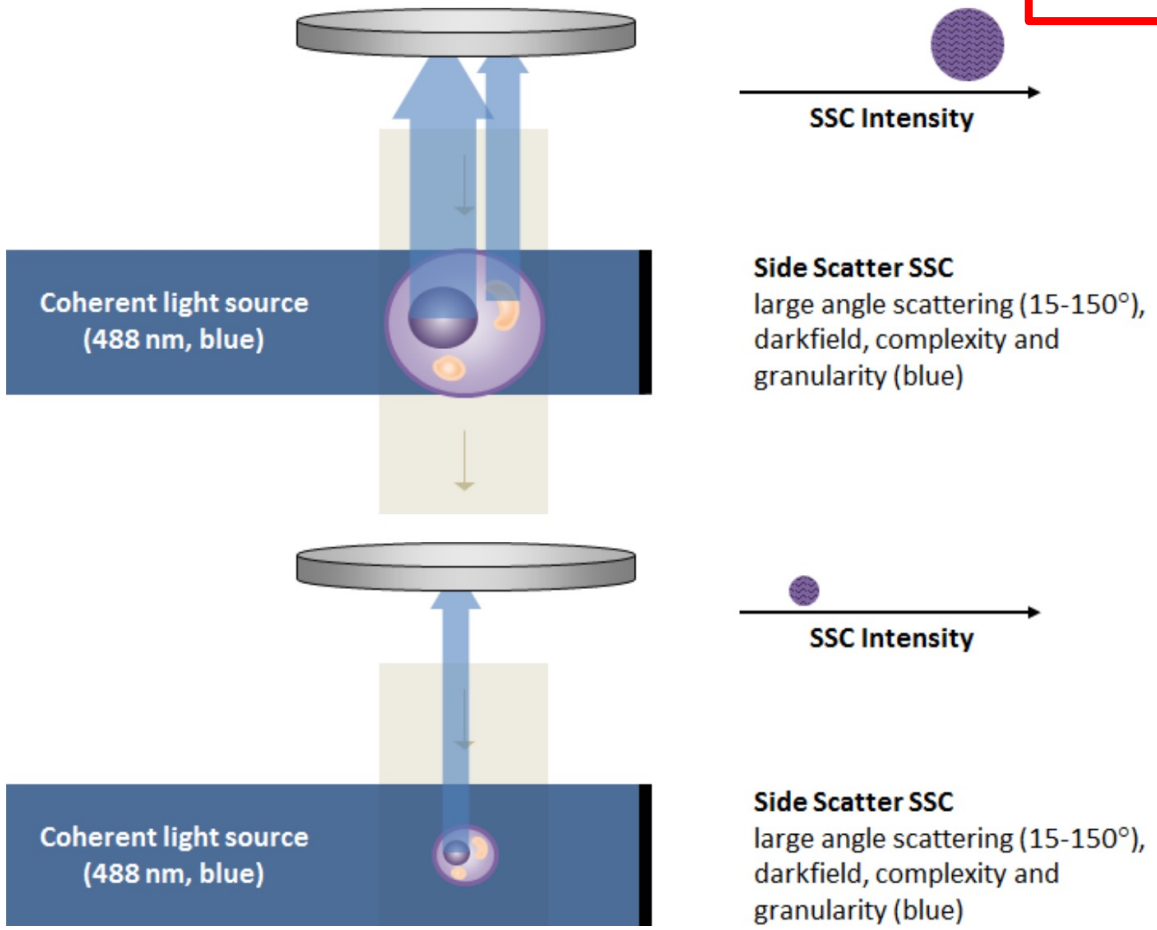
Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Light scattering

Legato alle caratteristiche fisiche della particella



L'intensità del **Side Scatter (SSC)** è proporzionale alla **densità/granularità** (compreso il rapporto nucleo/citoplasma) delle cellule



Light scattering

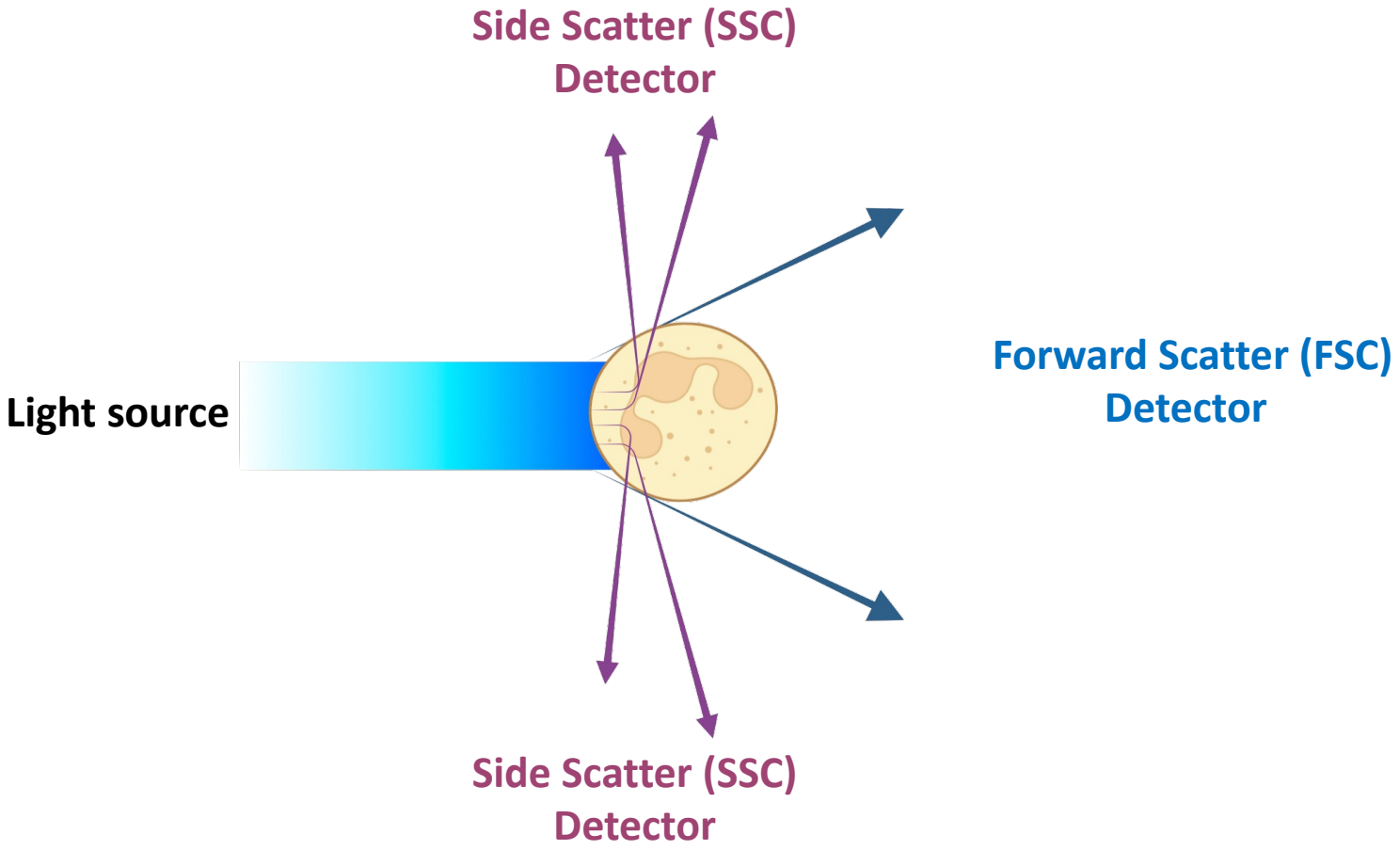
Legato alle caratteristiche fisiche della particella

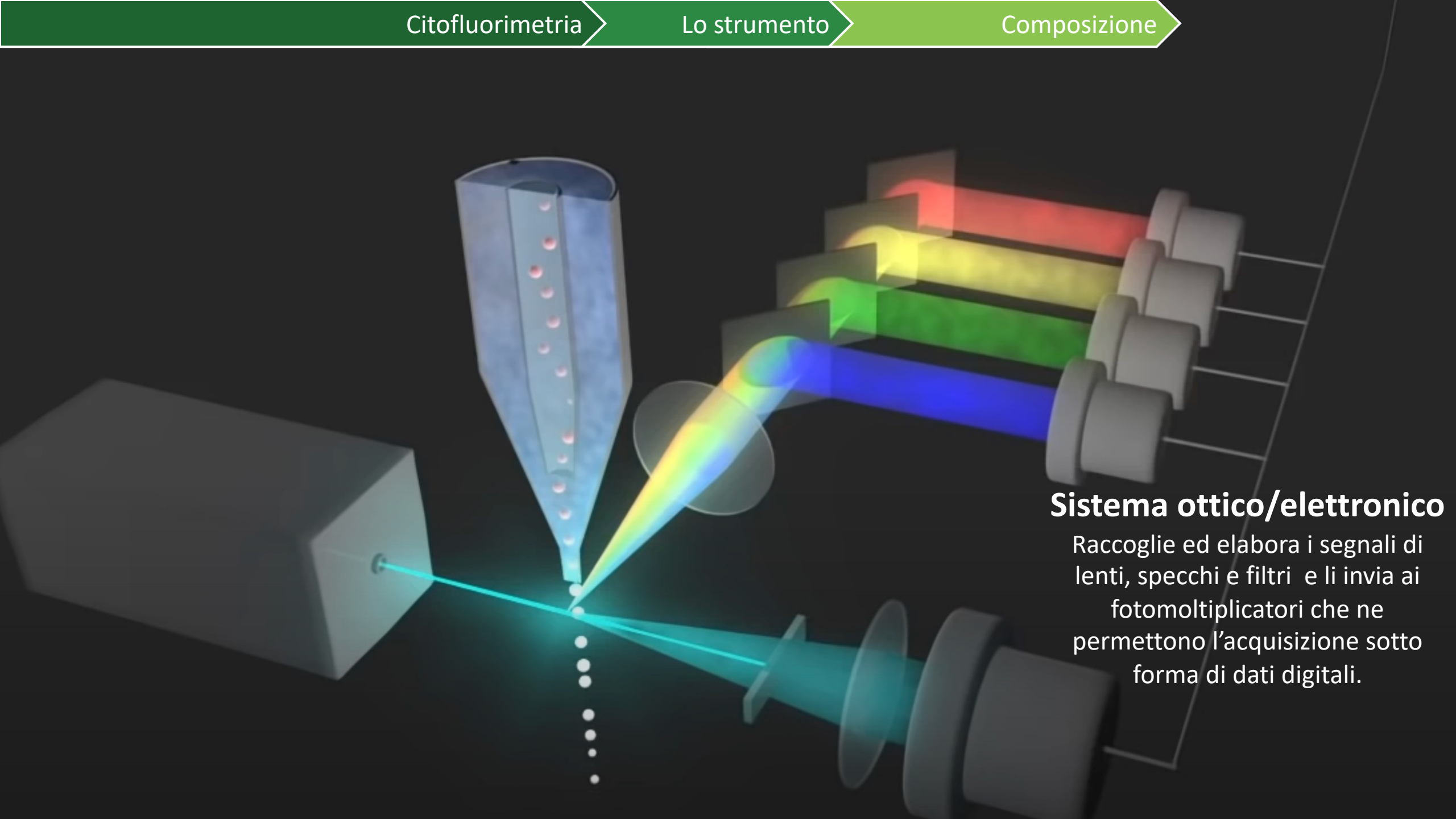
Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Complessità

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni





Sistema ottico/elettronico

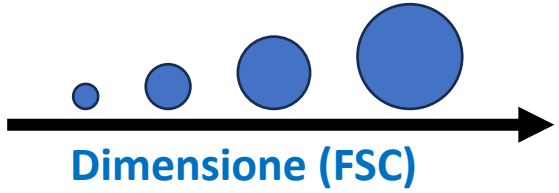
Raccoglie ed elabora i segnali di lenti, specchi e filtri e li invia ai fotomoltiplicatori che ne permettono l'acquisizione sotto forma di dati digitali.

Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Complessità

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni



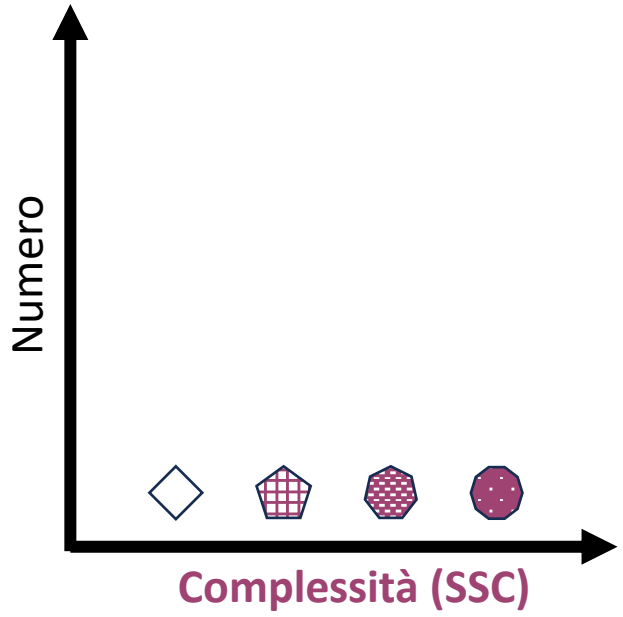
Ogni punto rappresenta una **singola** cellula

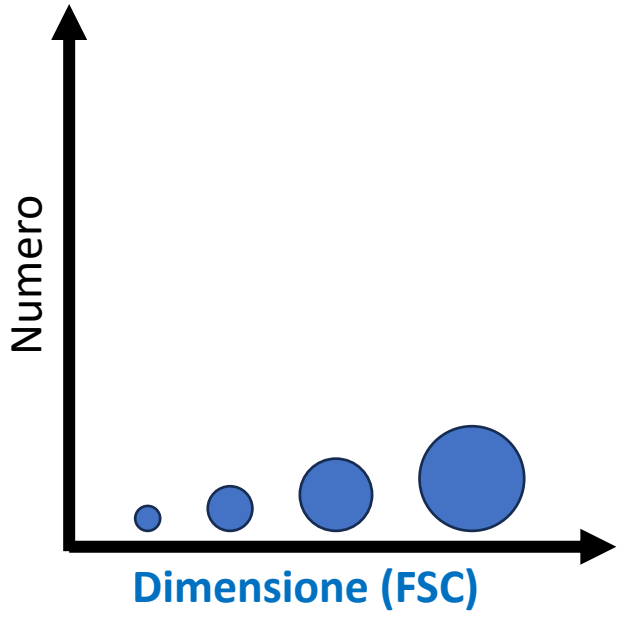
Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Complessità

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni





Ogni punto rappresenta una **singola** cellula

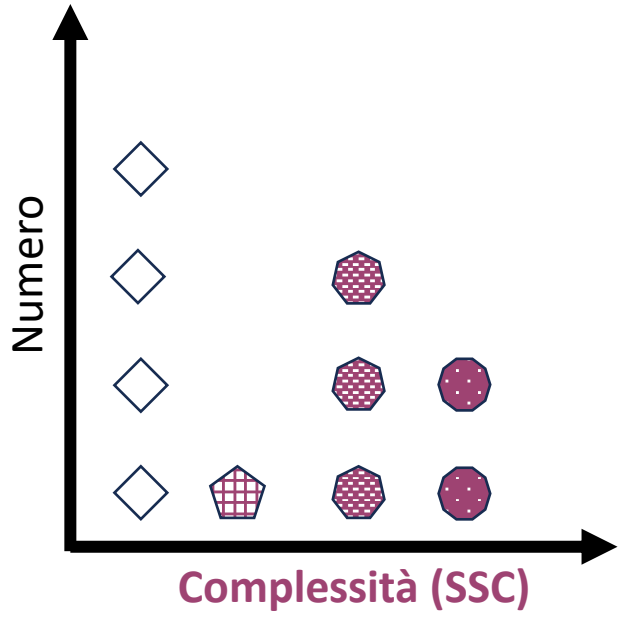
Grafico **monodimensionale** **o ISTOGRAMMA**

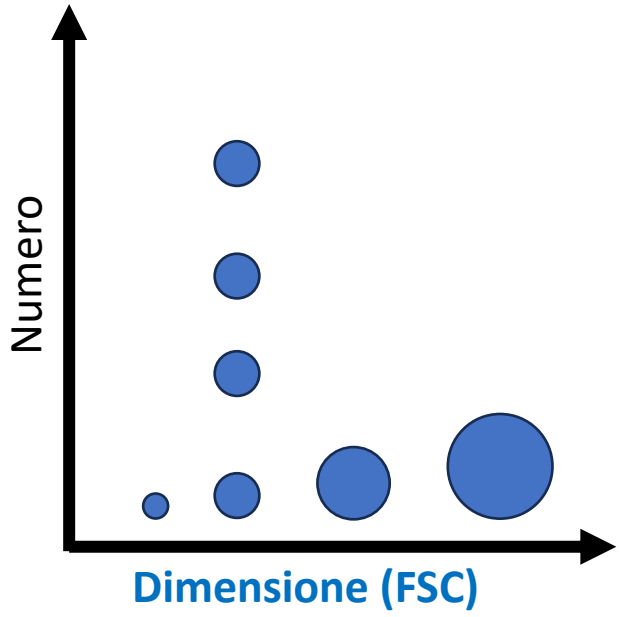
Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Complessità

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni



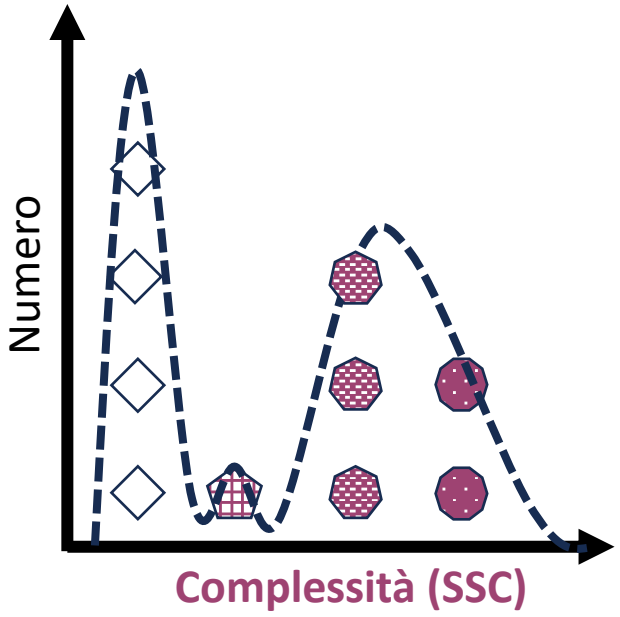


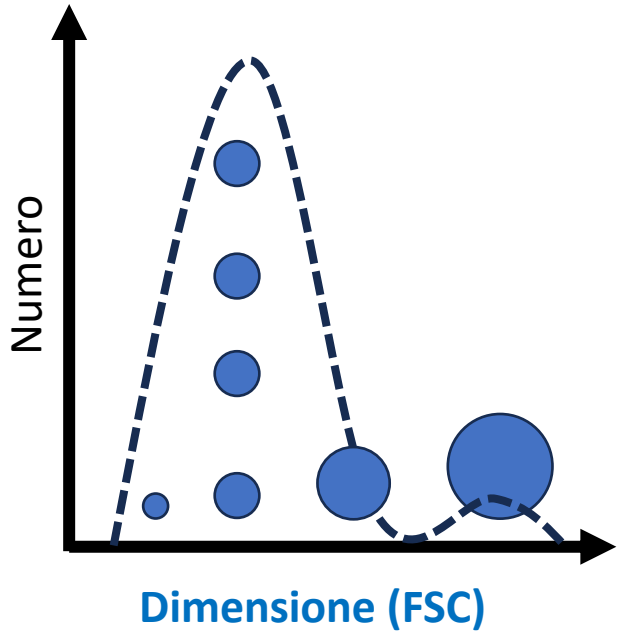
Ogni punto rappresenta una **singola** cellula

Grafico **monodimensionale** **o ISTOGRAMMA**

Complessità ← **Side scatter (SSC)**
Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale → **Dimensioni**





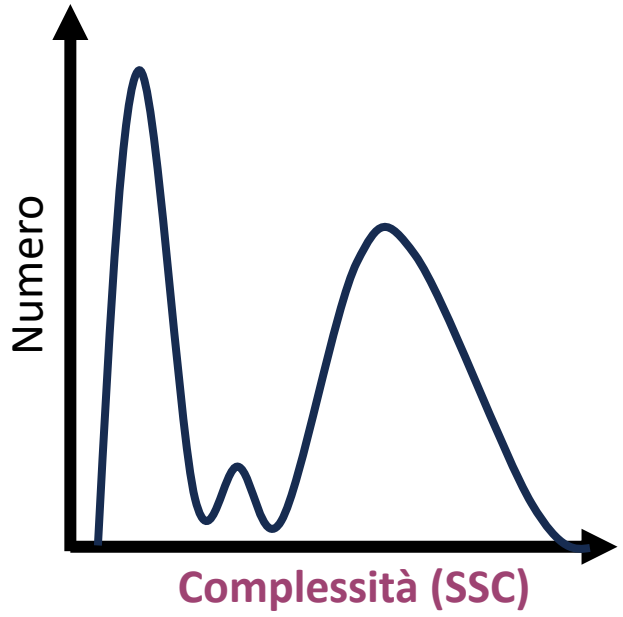
Ogni punto rappresenta una **singola** cellula → Grafico **monodimensionale** **o ISTOGRAMMA**

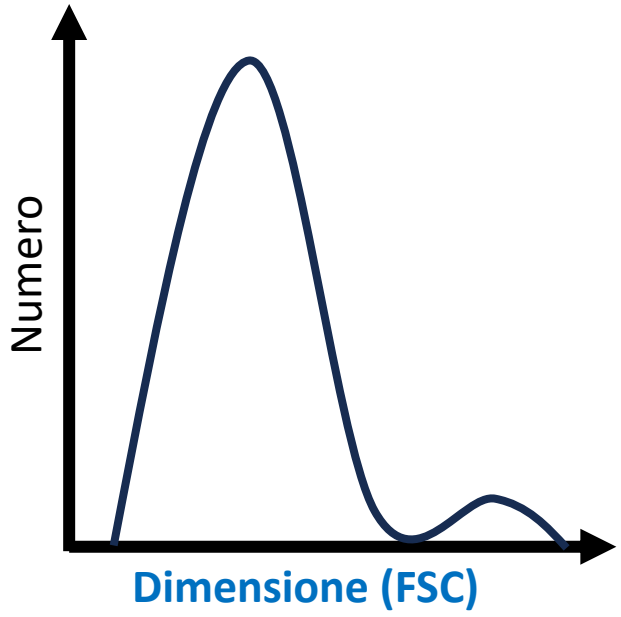
Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Complessità

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni



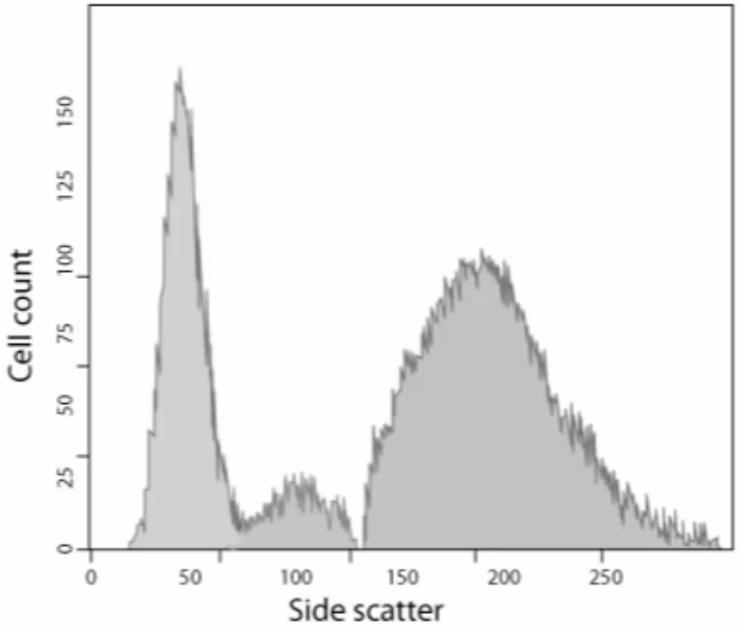


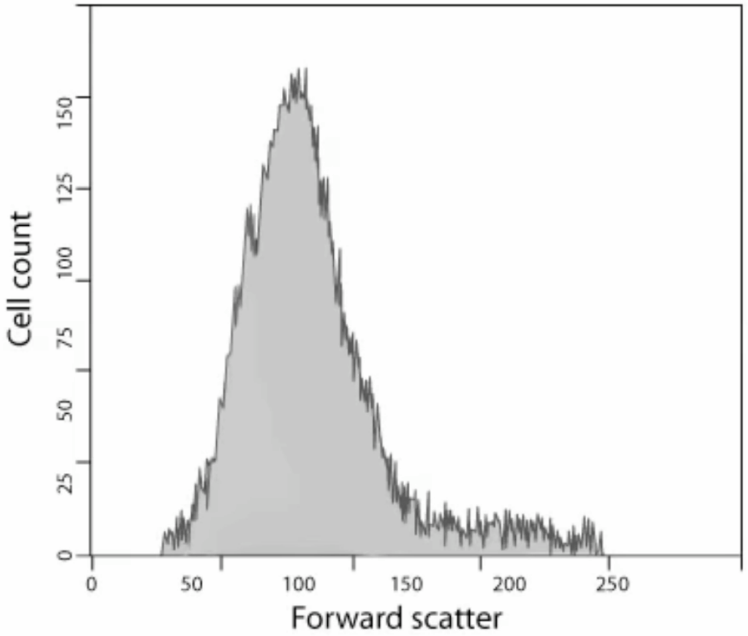
Ogni punto rappresenta una **singola** cellula

Grafico **monodimensionale** **o ISTOGRAMMA**

Complessità ← **Side scatter (SSC)**
Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale → **Dimensioni**



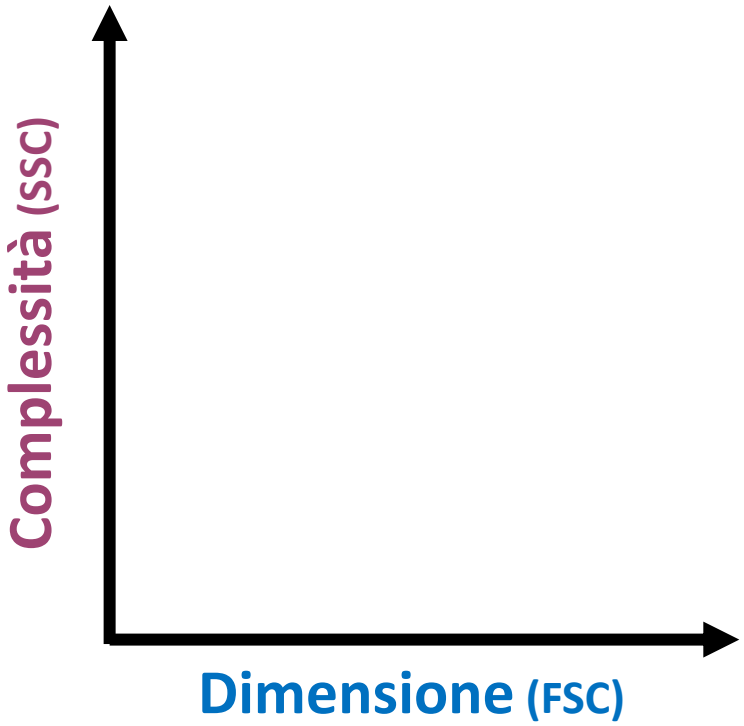


Ogni punto rappresenta una **singola** cellula → Grafico **monodimensionale** **o ISTOGRAMMA**

La **combinazione di due** citogrammi

Dot plot

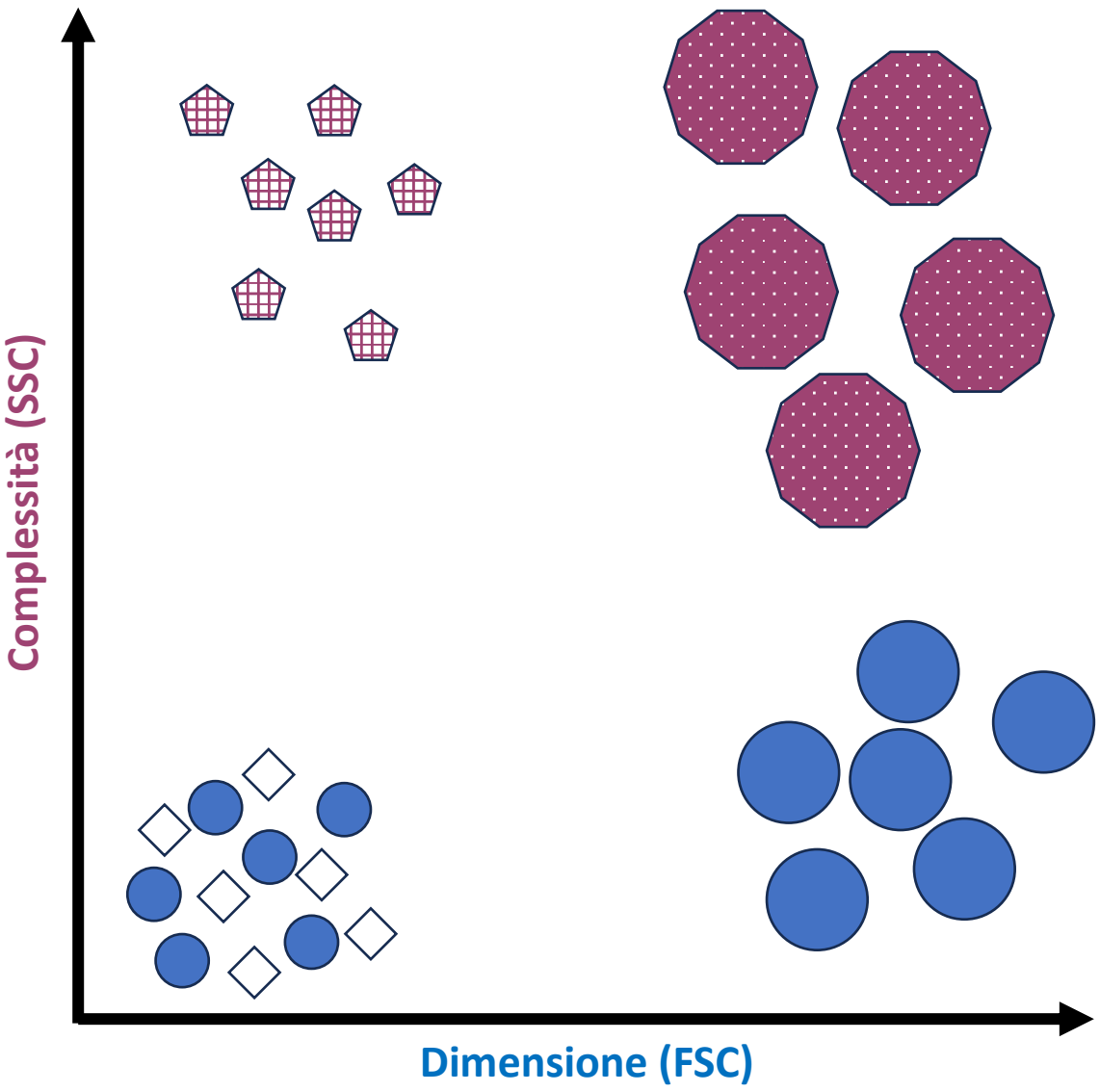
Bidimensionale

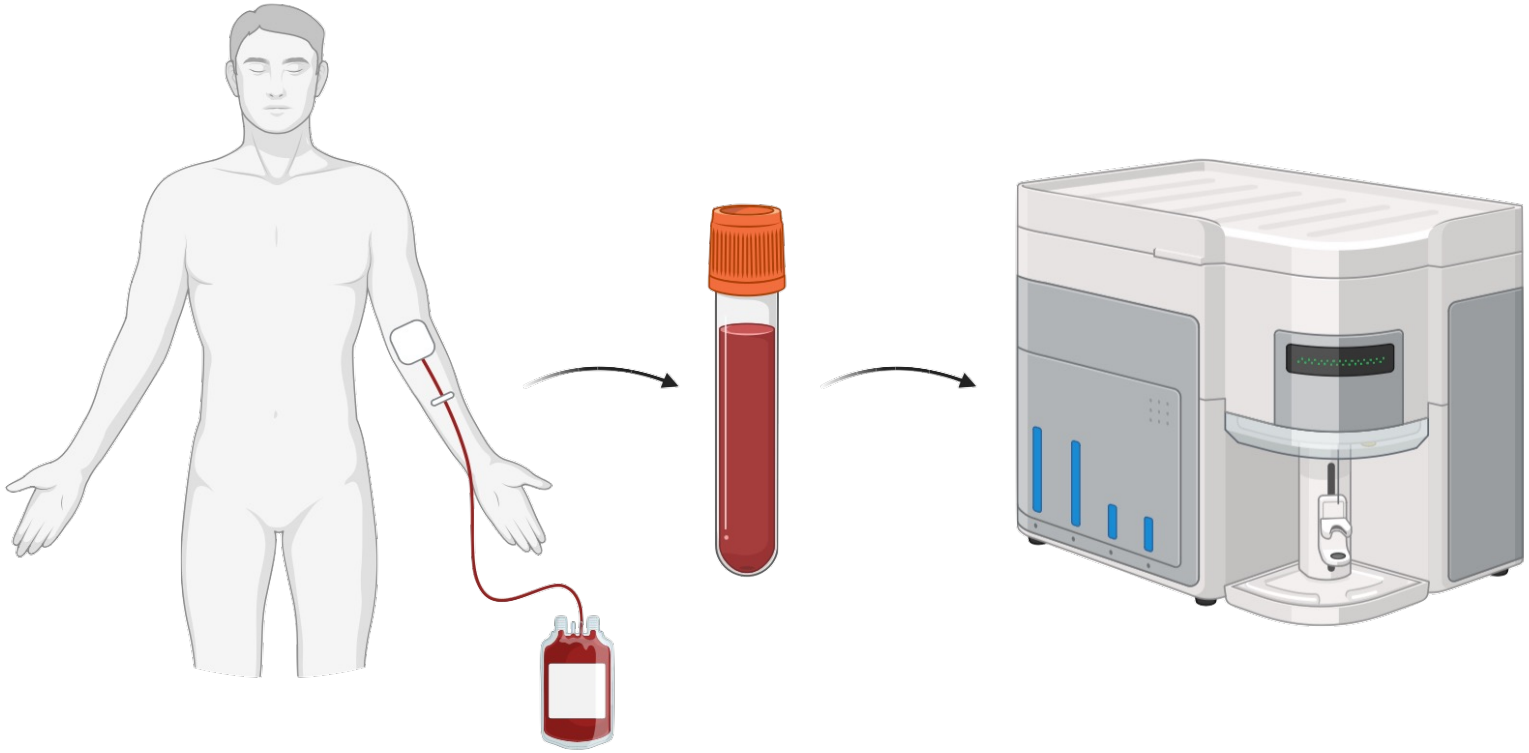


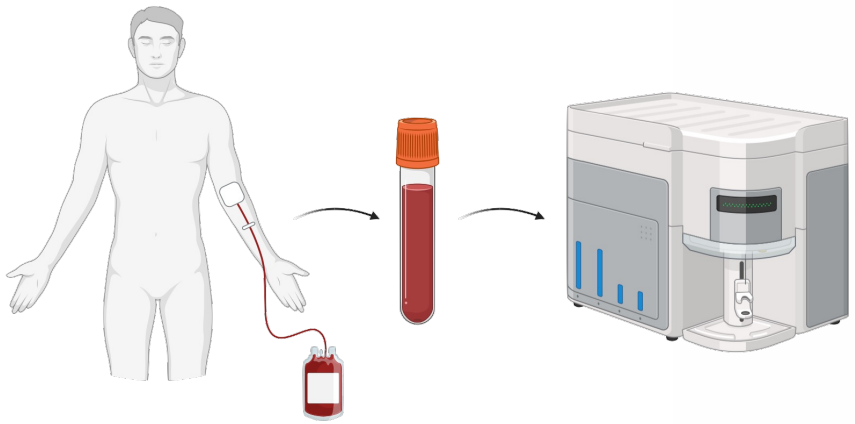
La **combinazione di due** citogrammi

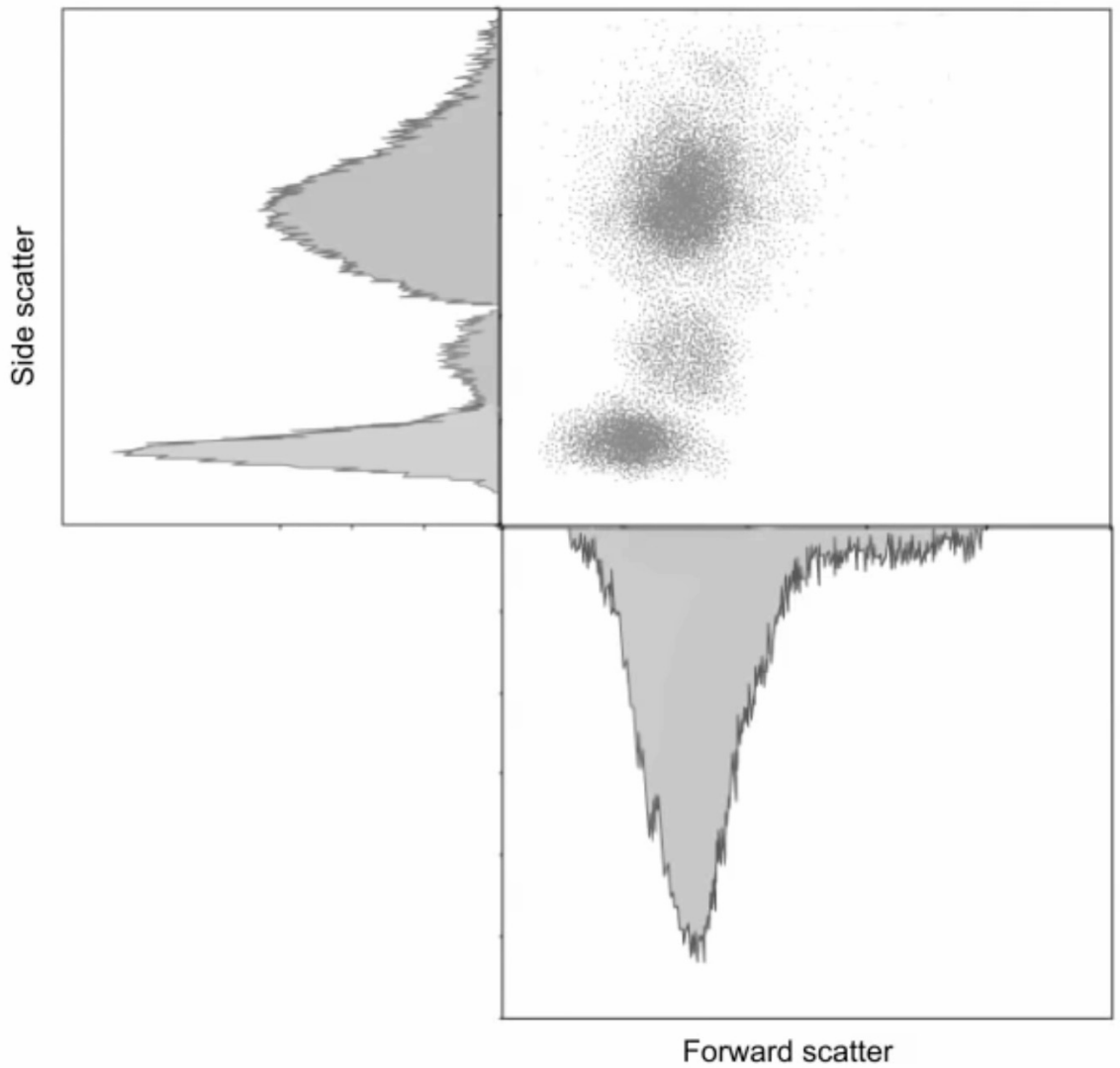
Dot plot

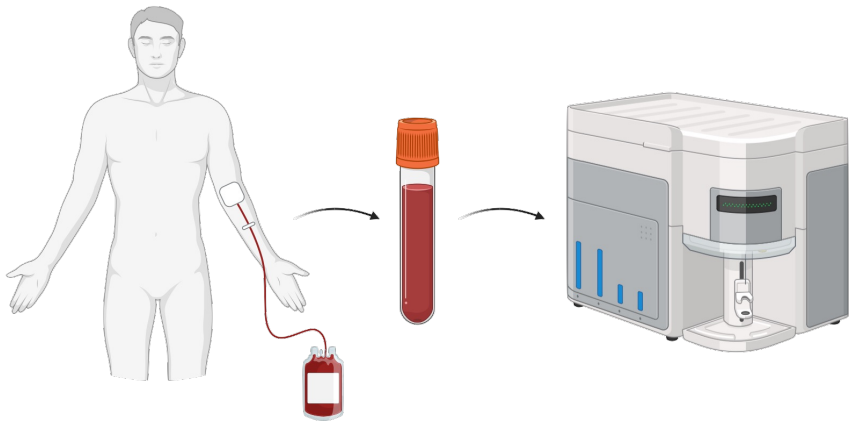
Bidimensionale

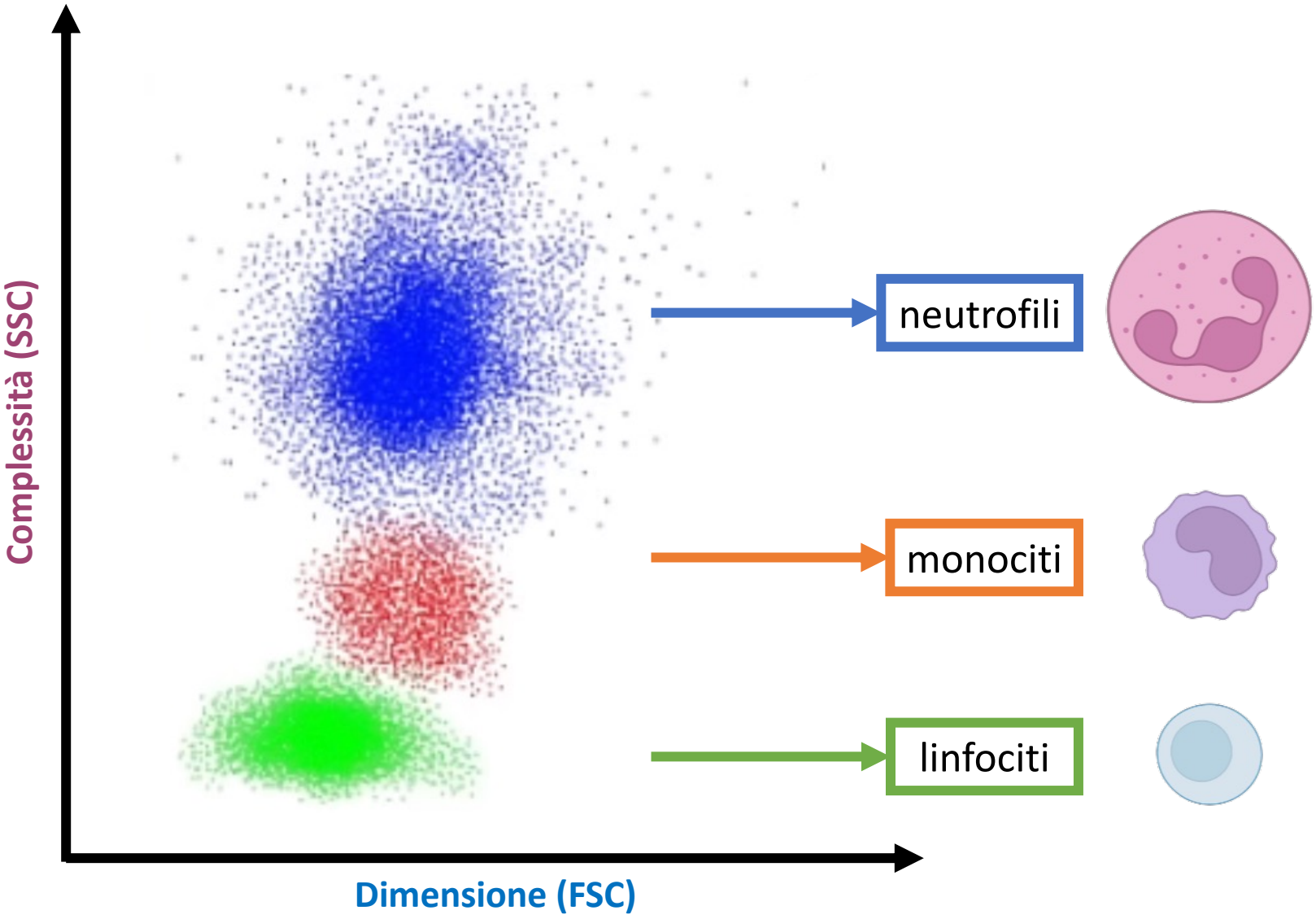







Side scatter
Forward scatter




Complessità (SSC)
Dimensione (FSC)
neutrofili
monociti
linfociti

Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Complessità

Light scattering

Legato alle

caratteristiche fisiche

della particella

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni

Grafico **monodimensionale**
o ISTOGRAMMA

Grafico **bidimensionale**
DOT PLOT

MARCATURA IN FLUORESCENZA

La fluorescenza

Permette di discriminare sottopopolazioni in base a specifici **marker**

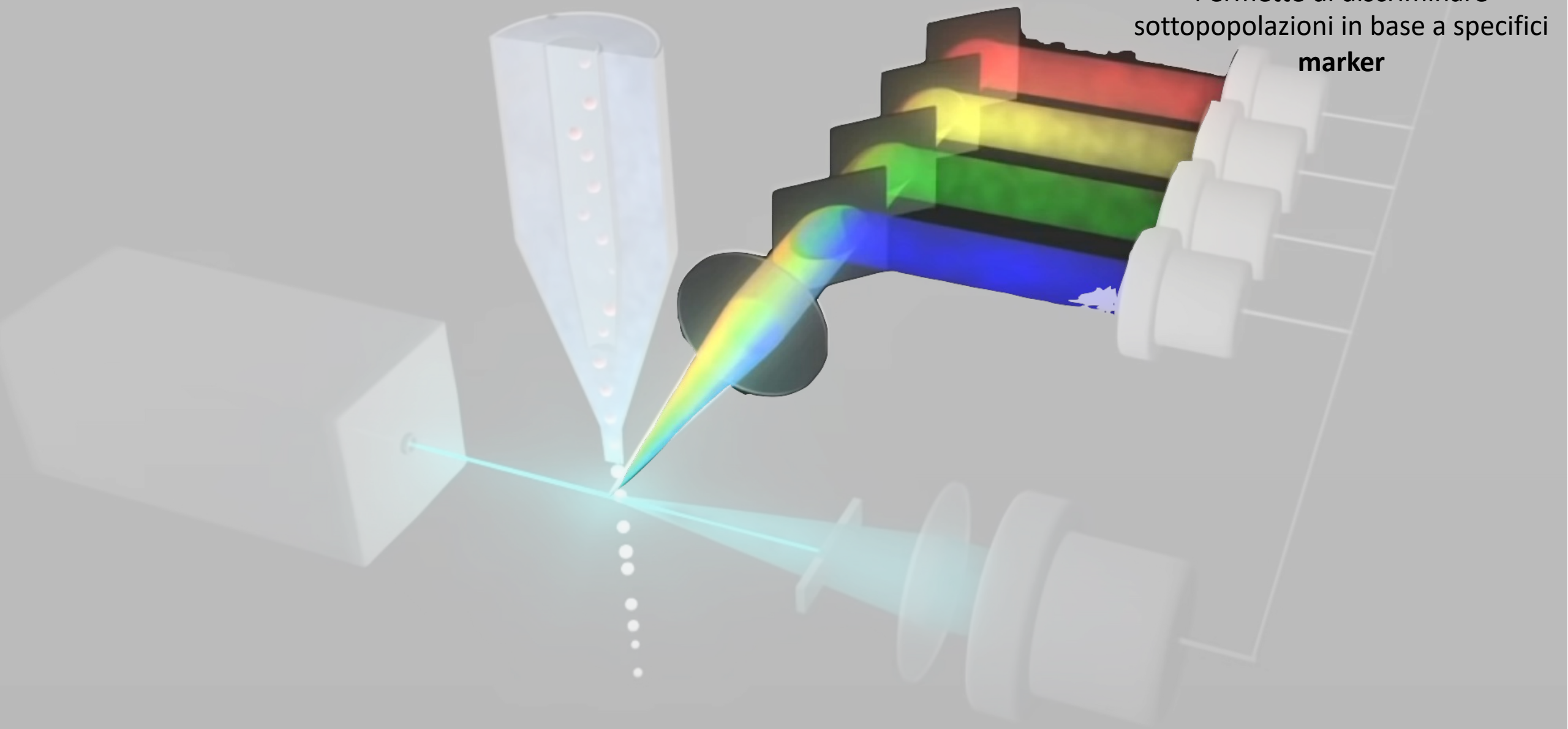


Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule

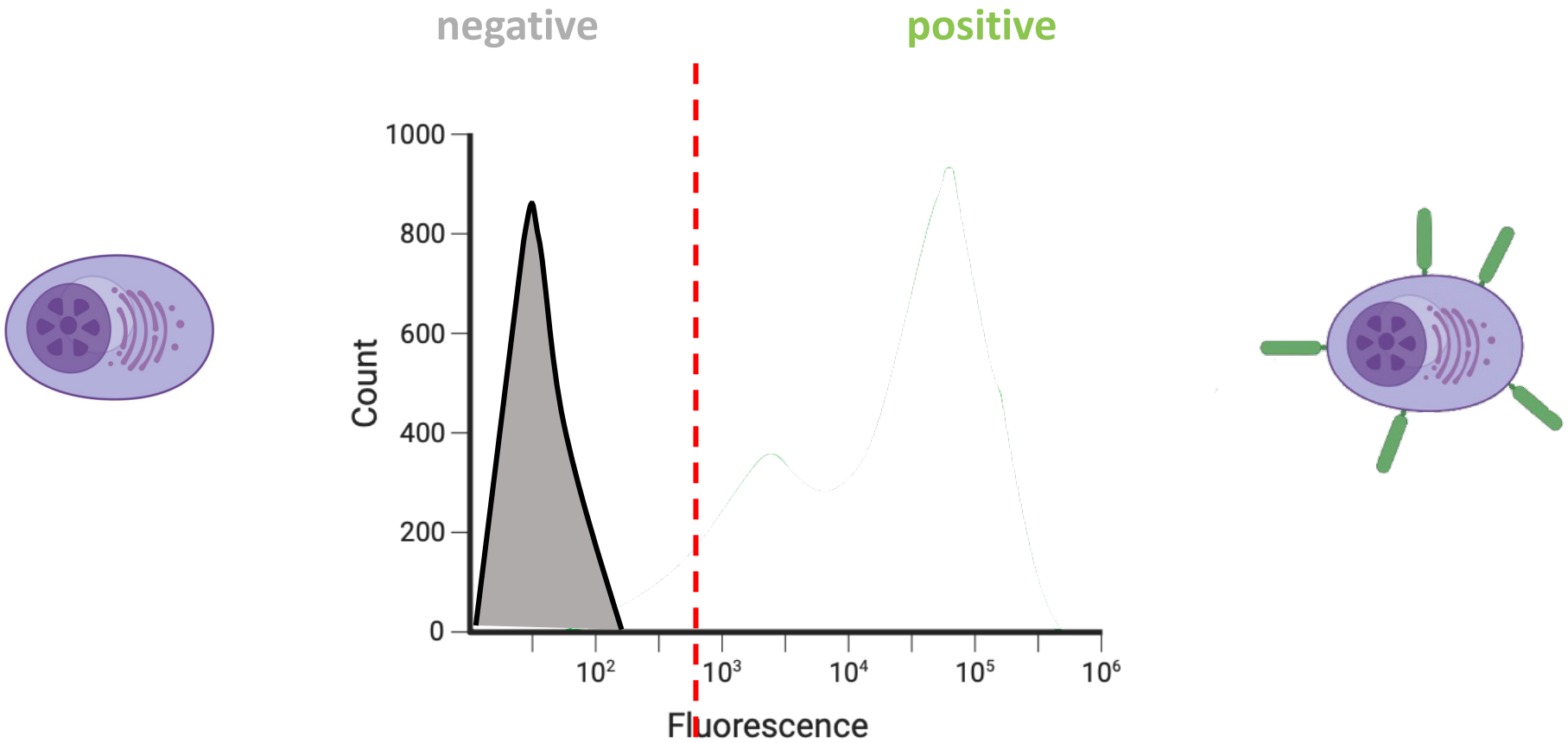
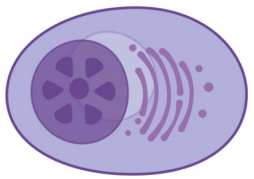
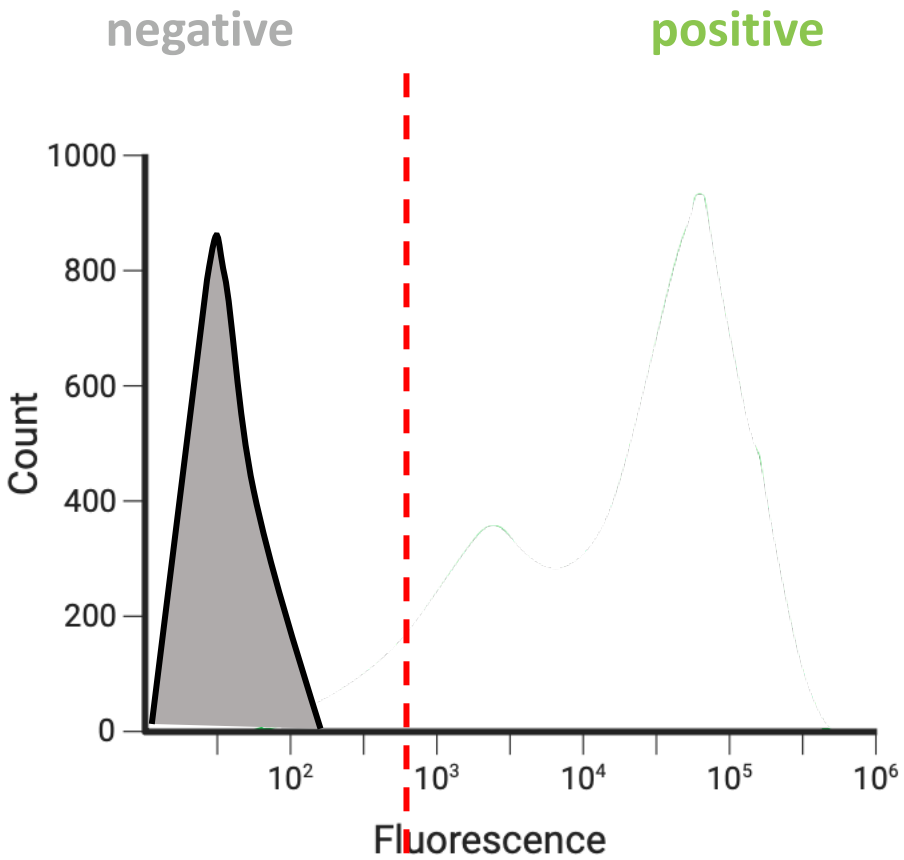


Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule





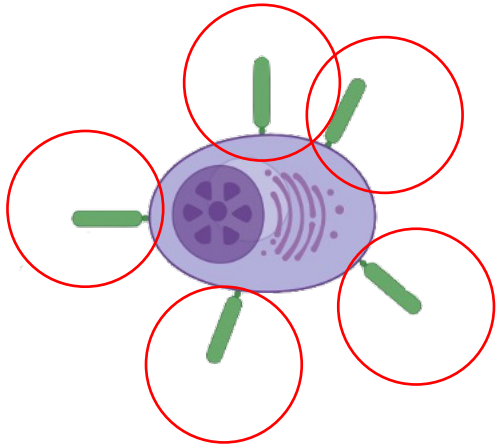
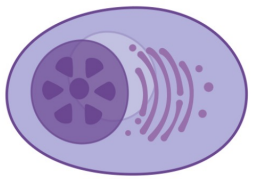
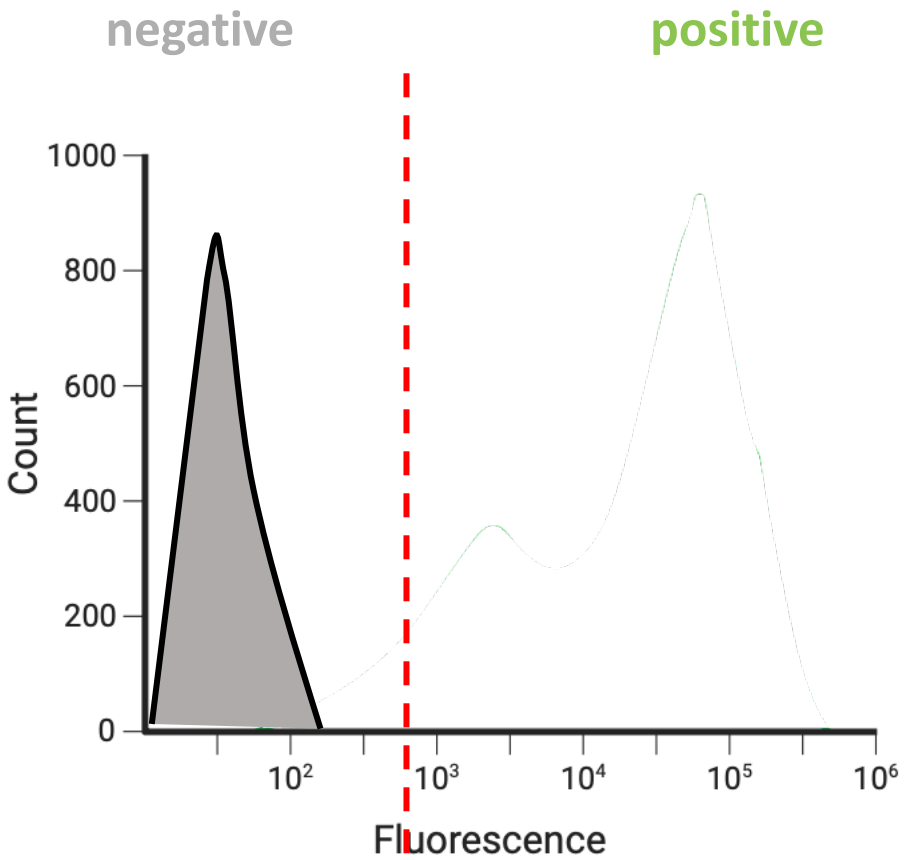


Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule





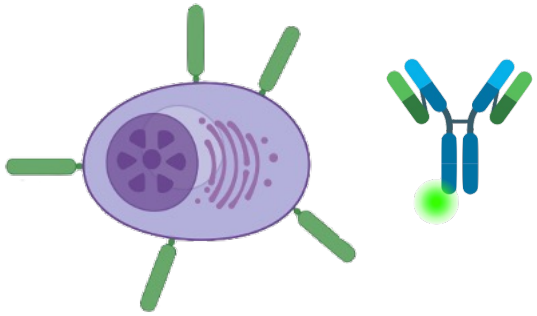
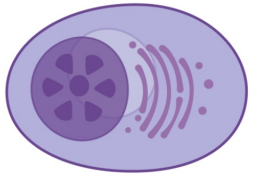
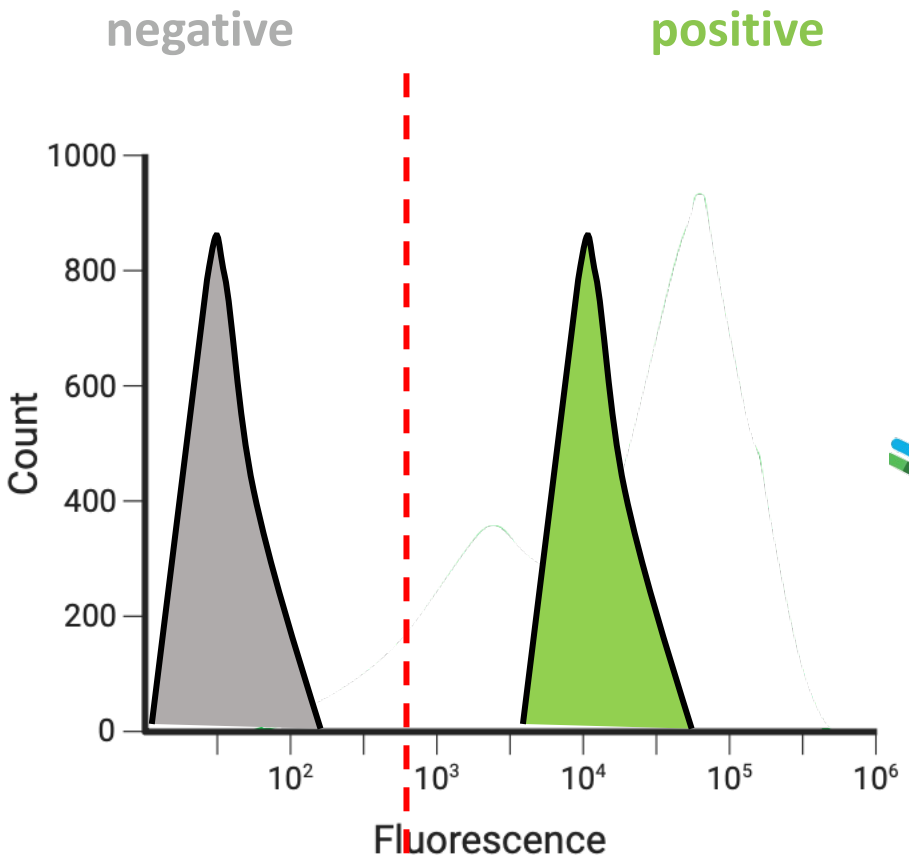


Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule





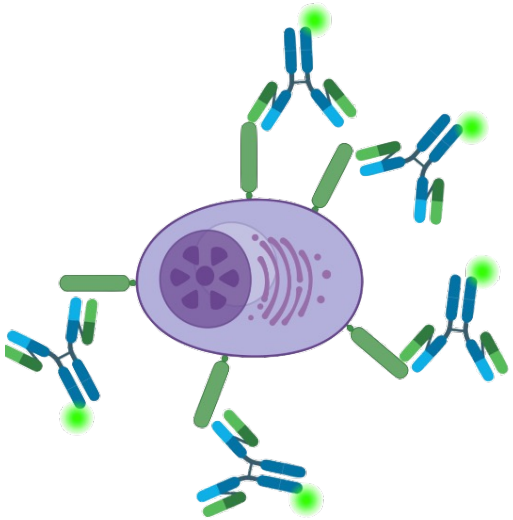
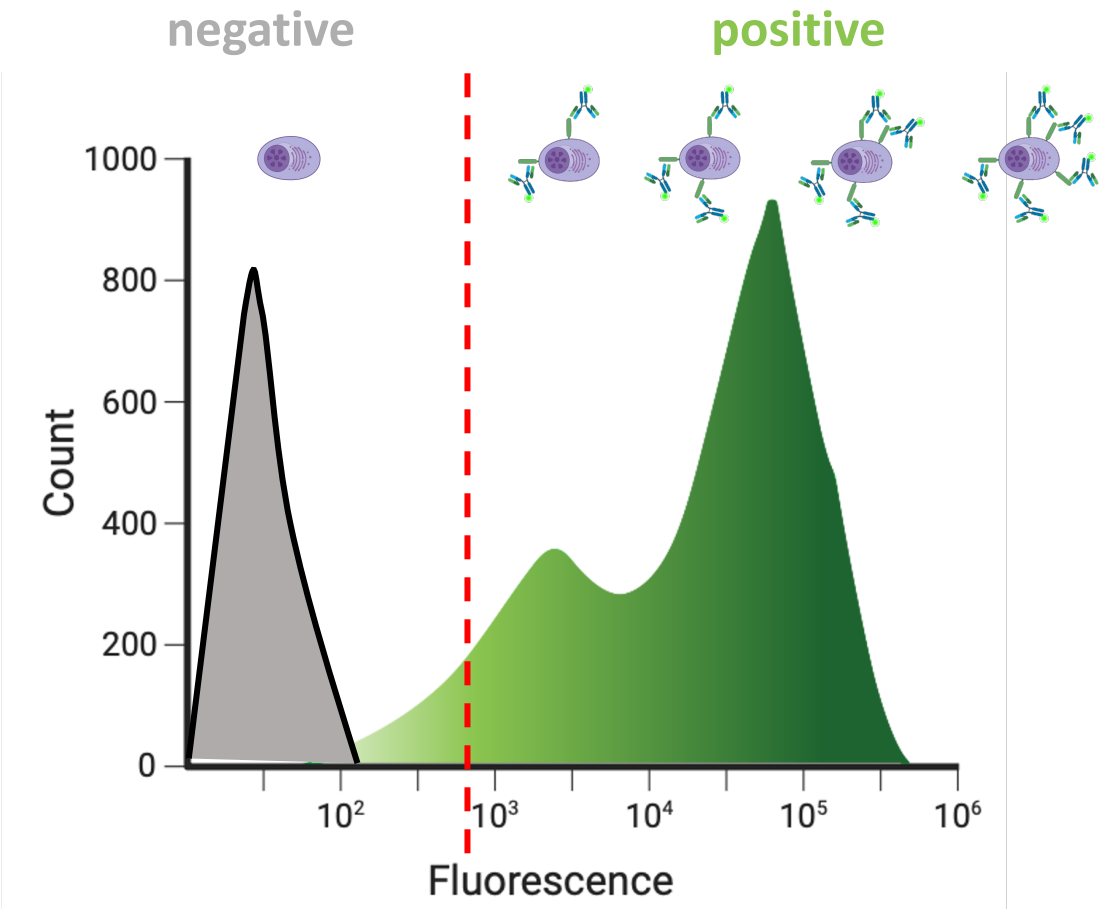


Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule



Light scattering

Legato alle **caratteristiche fisiche** della particella

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

→ **Dimensioni**

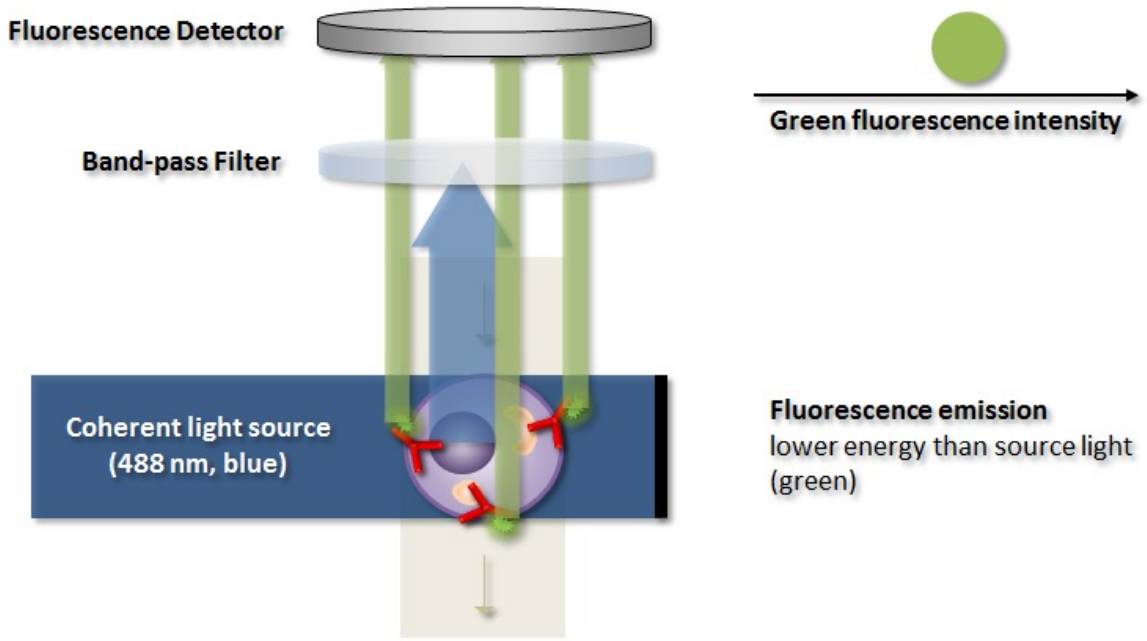
Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

↓

Complessità

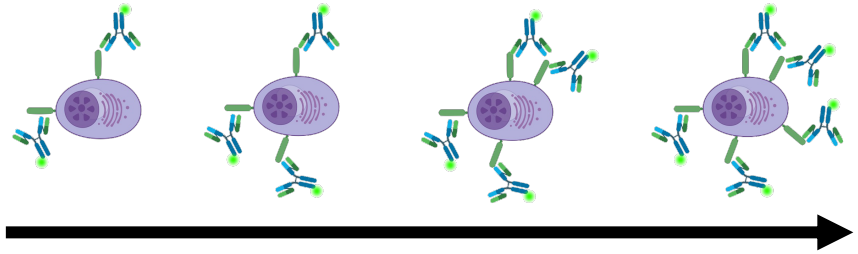
Si differenzia dalla

MARCATURA IN FLUORESCENZA



Intensità di fluorescenza

Blue laser (BL) detector
Posto a 90°



L'intensità del segnale fluorescente rilevato dal **laser blu (BL)** è proporzionale alla **quantità di antigene bersaglio presente sulla cellula**

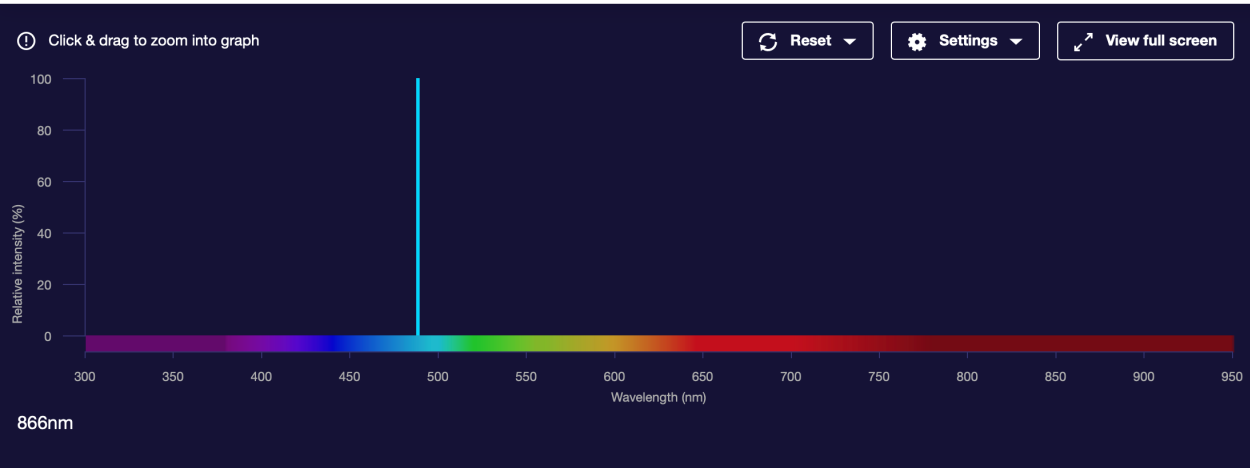
MARCATURA IN FLUORESCENZA

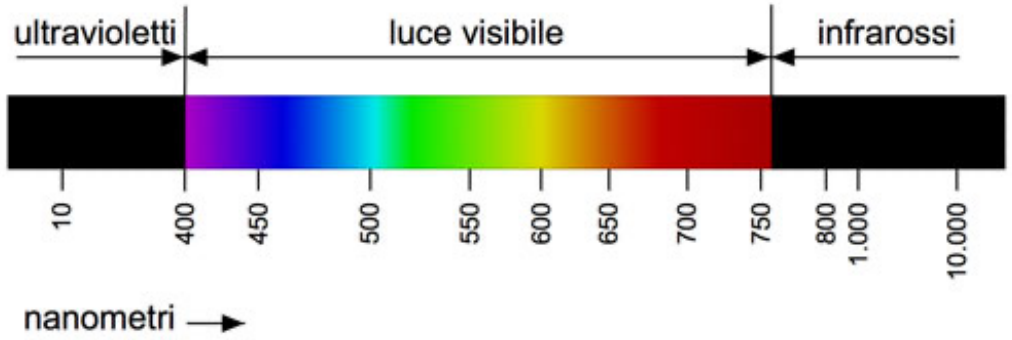
Il **laser** consente di misurare **minime quantità di fluorocromo**

Nella maggior parte degli strumenti è impiegato un laser a **ioni Argon**, di potenza variabile, centrato su una lunghezza di **488nm** (blu)

Normalmente legati ad un anticorpo che riconosce un antigene bersaglio sulla superficie o all'interno della cellula

Vasta gamma di fluorofori che possono essere utilizzati anche **contemporaneamente**



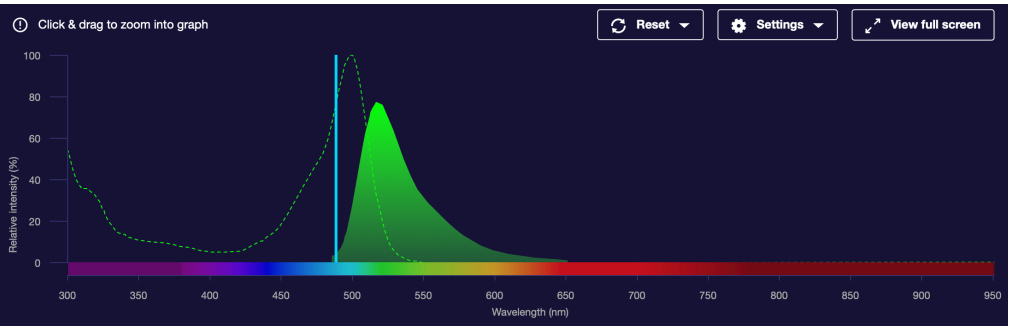


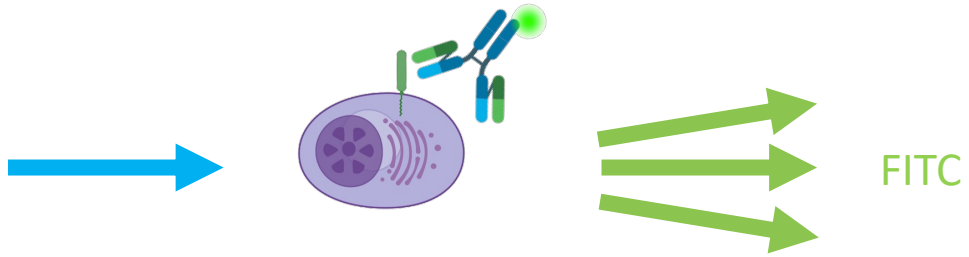
Il **laser** consente di misurare **minime quantità di fluorocromo**

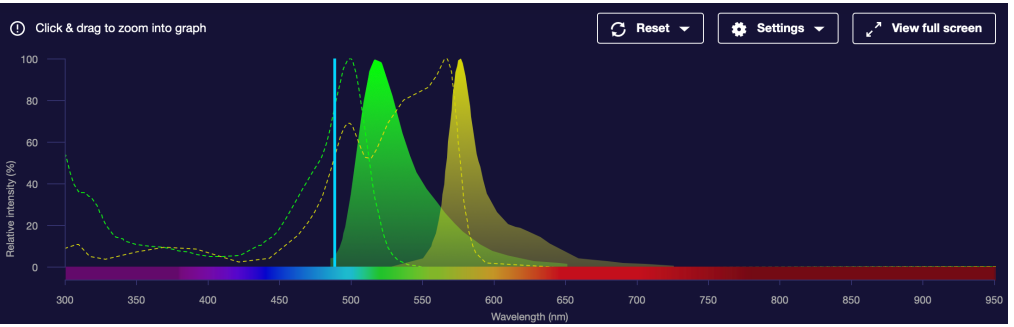
Nella maggior parte degli strumenti è impiegato un laser a **ioni Argon**, di potenza variabile, centrato su una lunghezza di **488nm** (blu)

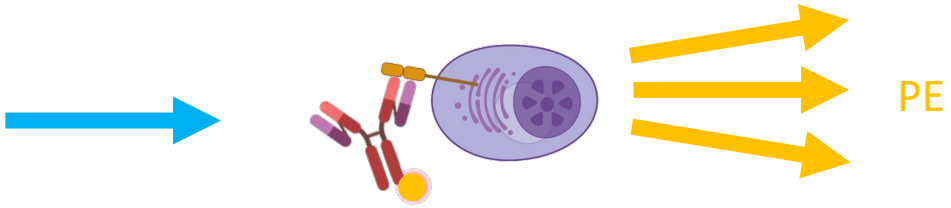
Normalmente legati ad un anticorpo che riconosce un antigene bersaglio sulla superficie o all'interno della cellula

Vasta gamma di fluorofori che possono essere utilizzati anche **contemporaneamente**









La fluorescenza è **quantitativa**

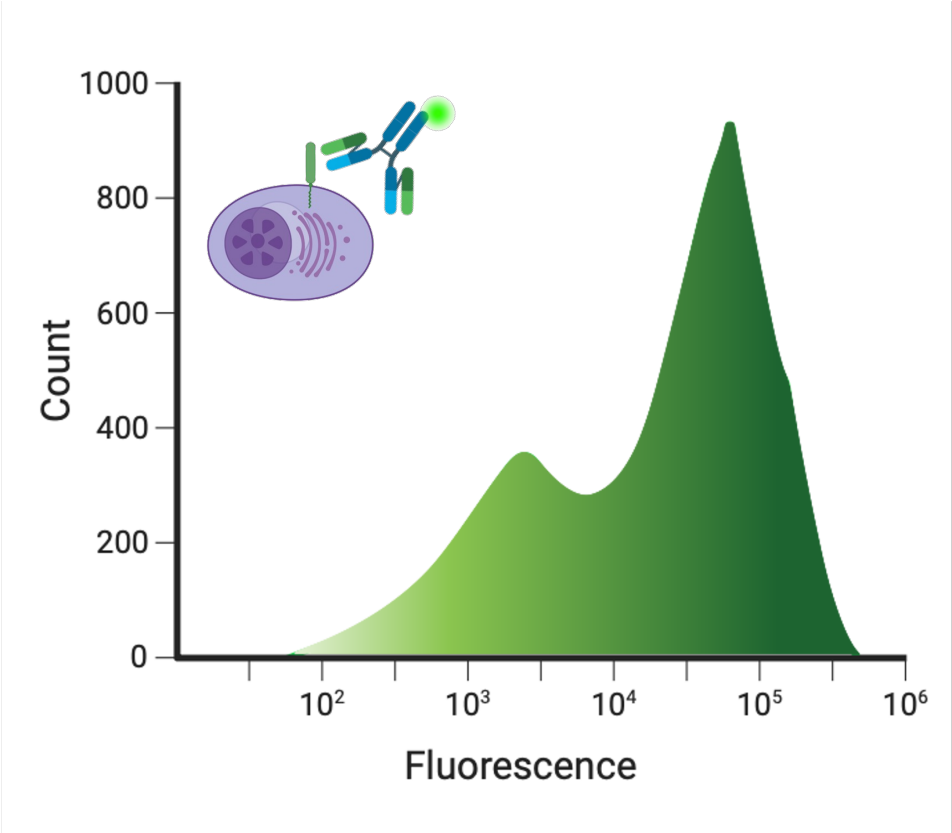
Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

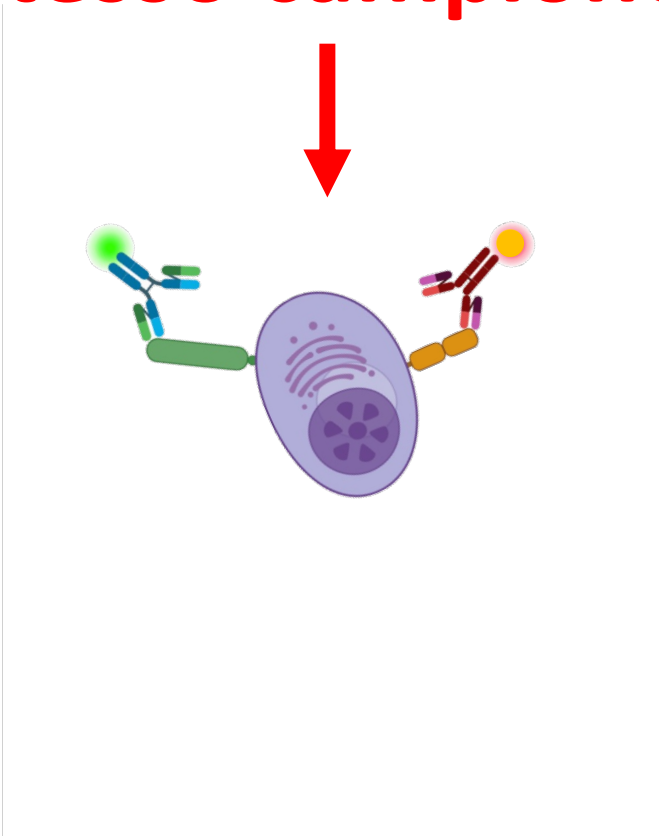
Grafico **bidimensionale DOT PLOT**

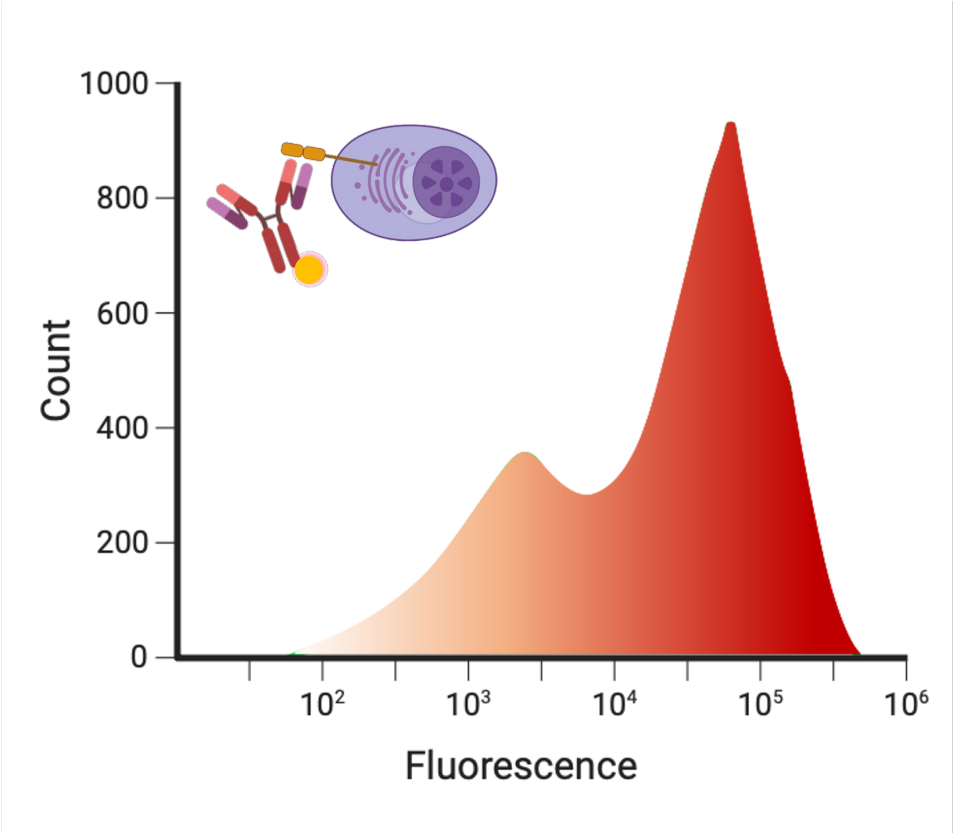
Posso marcare **antigeni diversi**

anche sullo

stesso campione





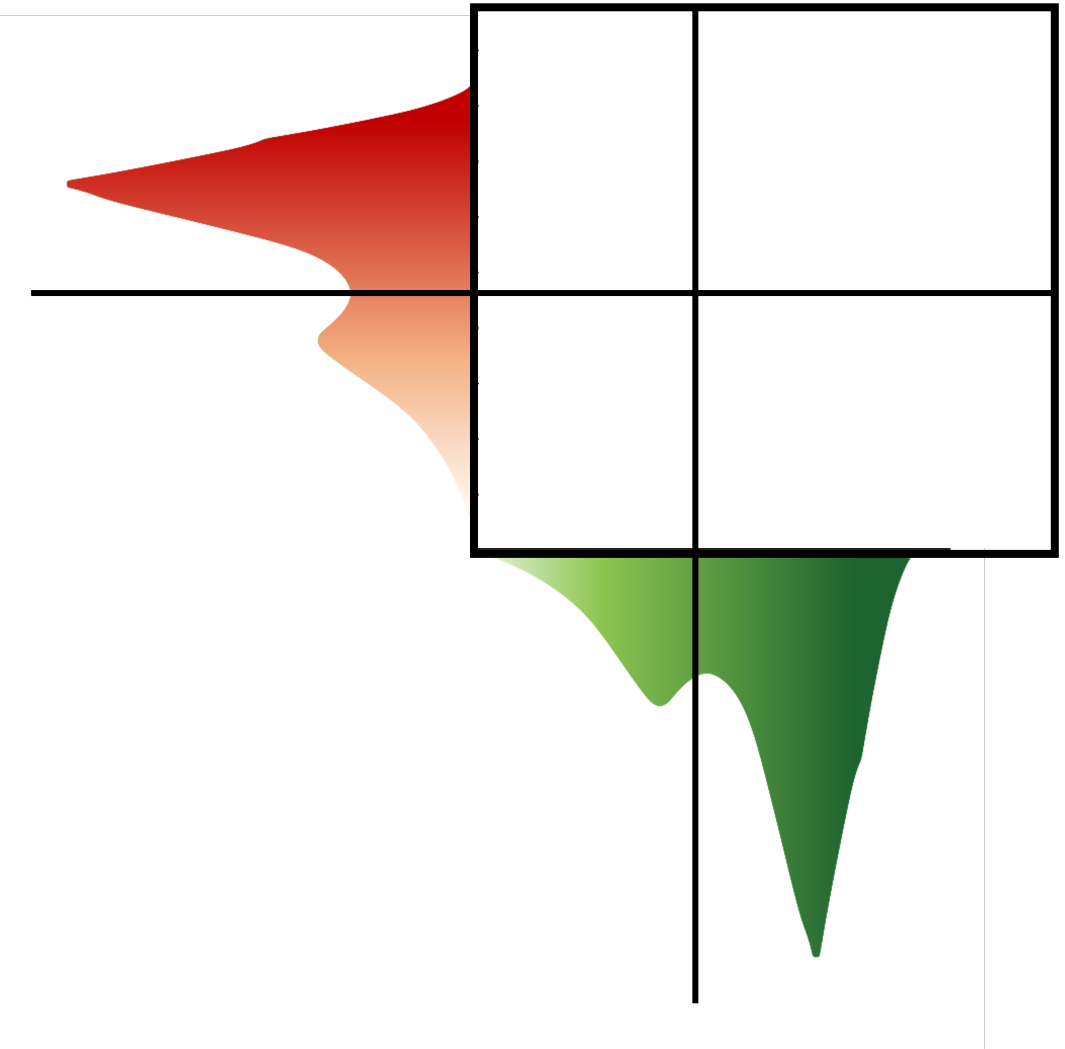


La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

Grafico **bidimensionale DOT PLOT**

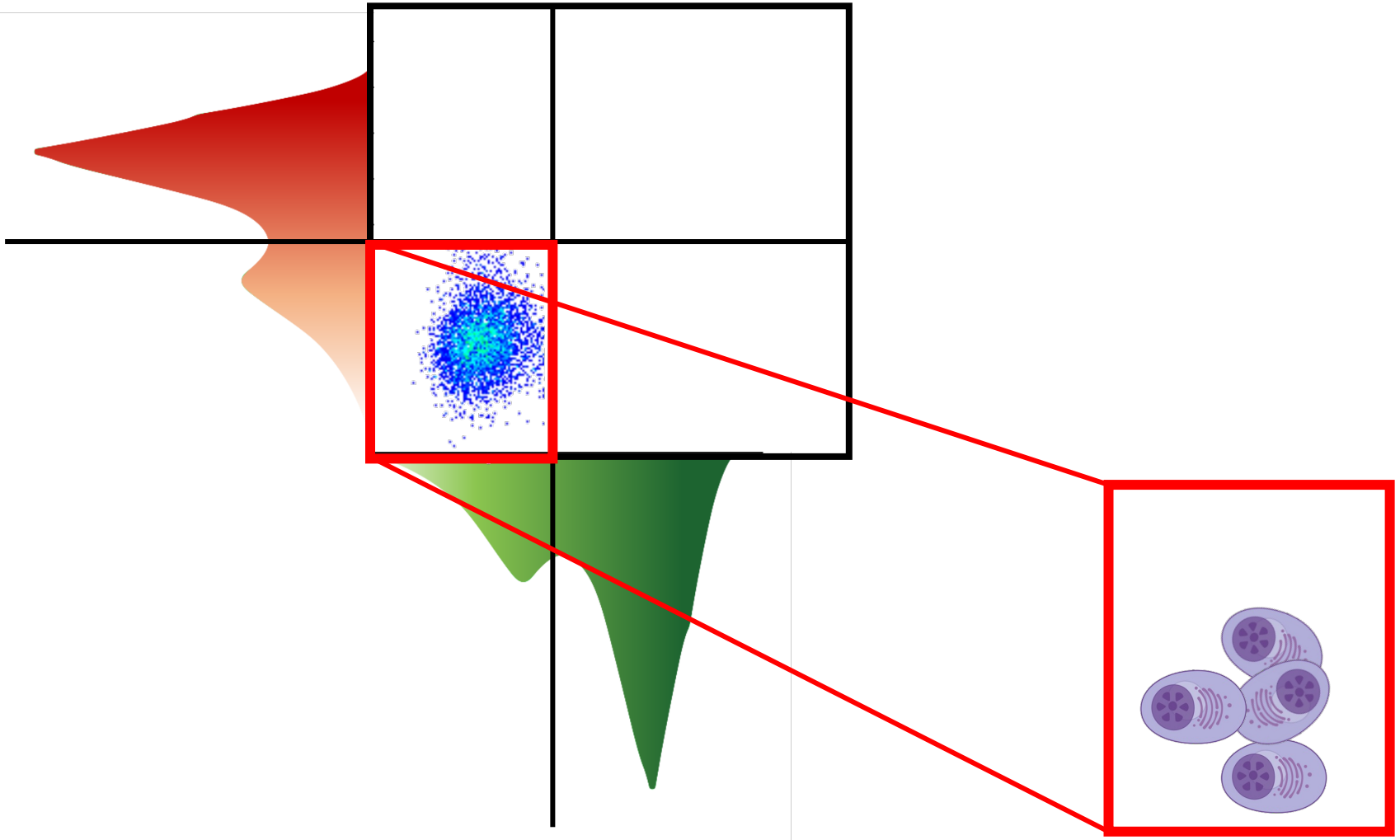
Posso marcare **antigeni diversi** anche sullo **stesso campione**



La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

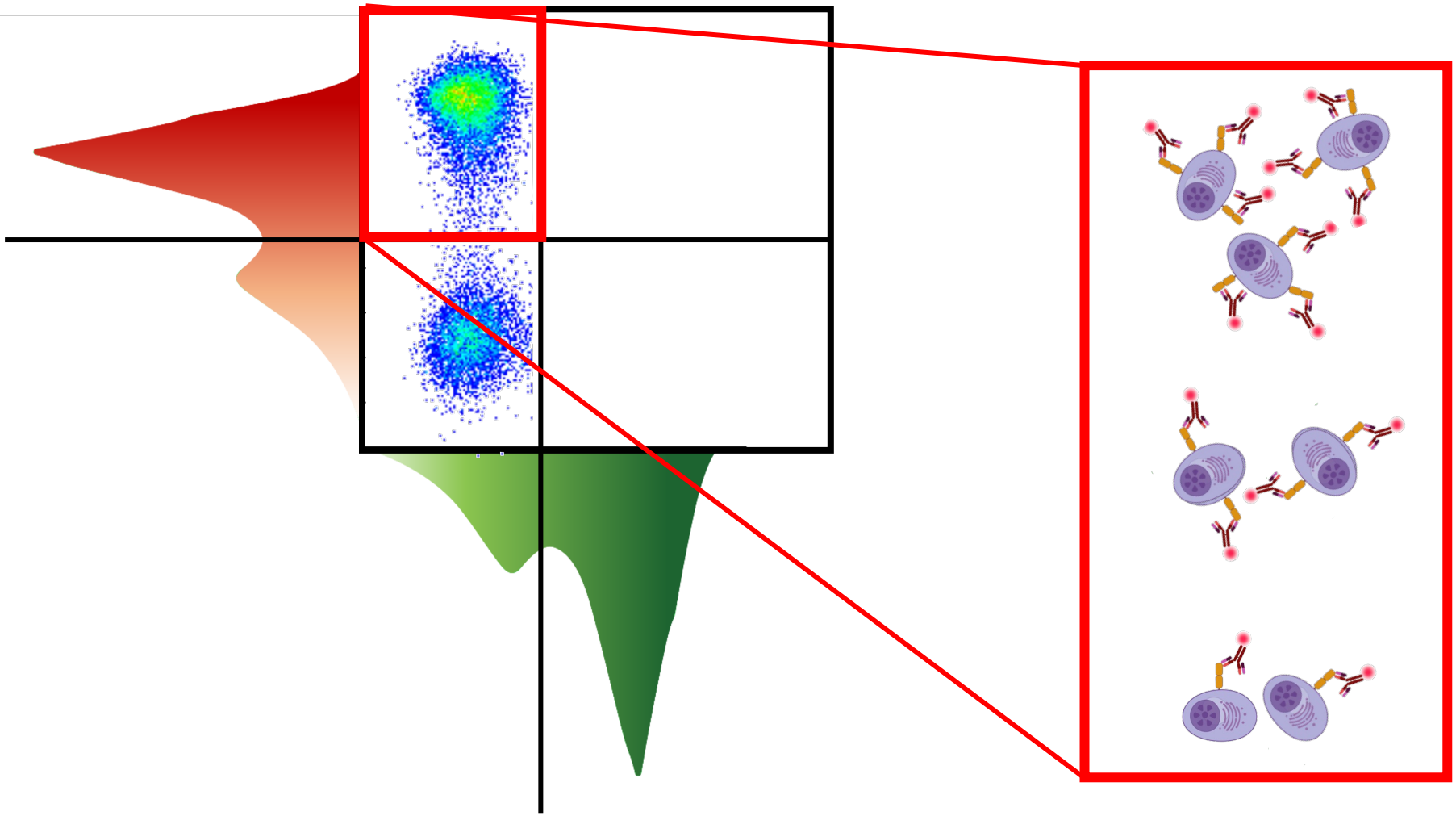
Grafico **bidimensionale DOT PLOT**



La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

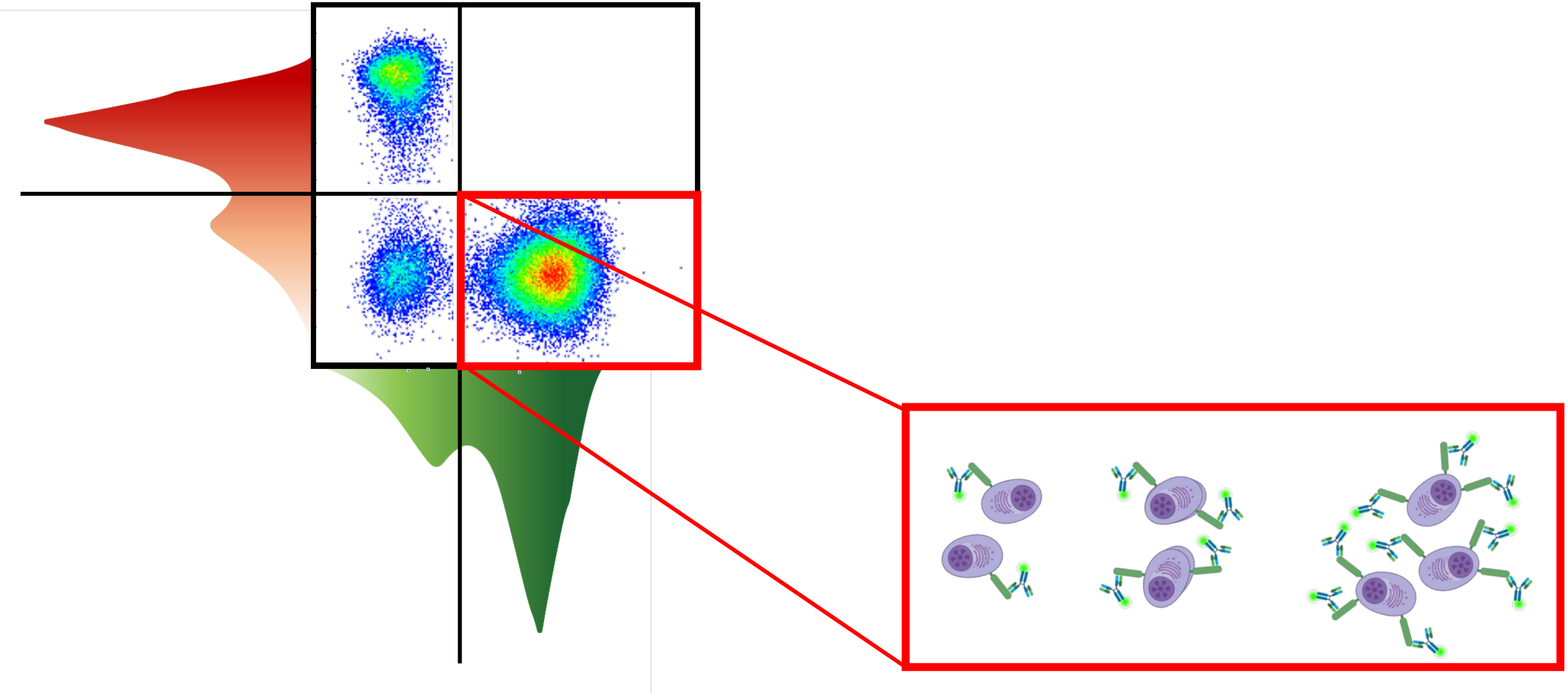
Grafico **bidimensionale DOT PLOT**



La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

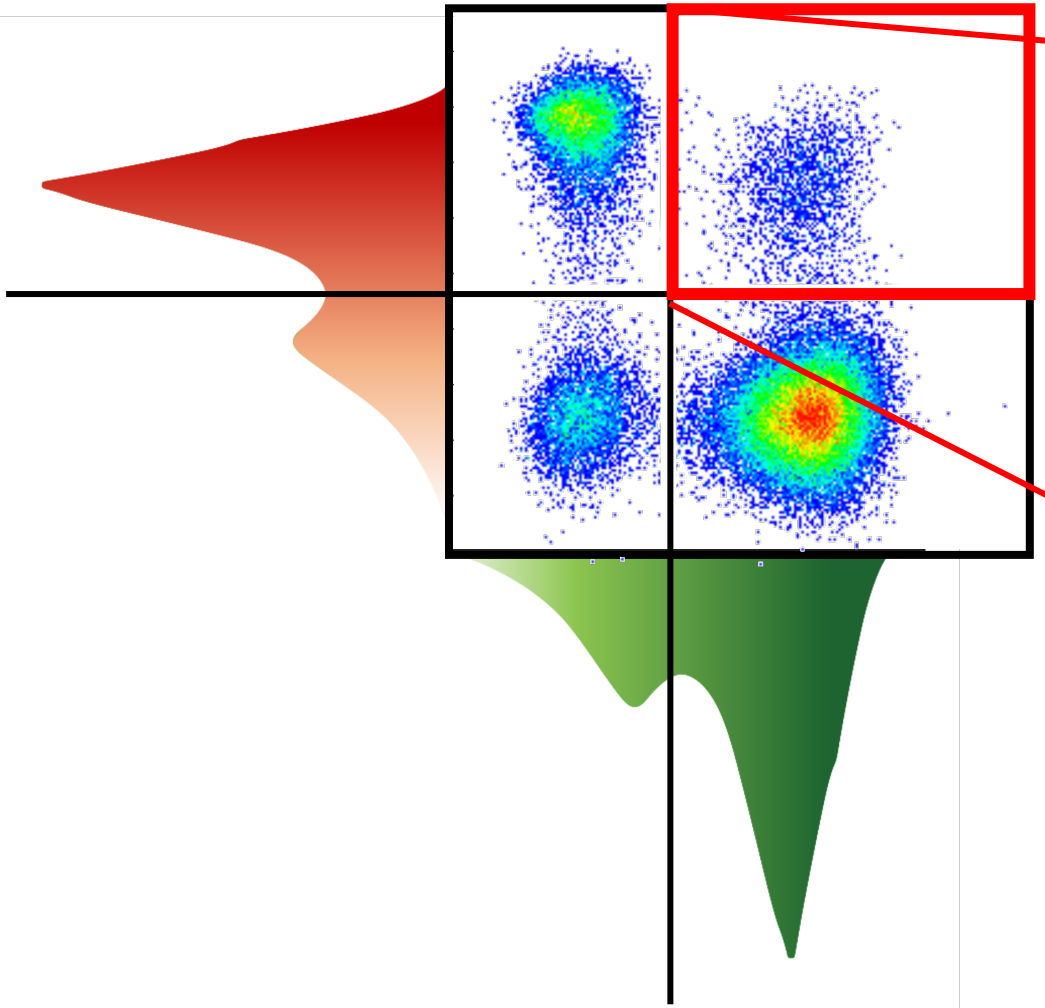
Grafico **bidimensionale DOT PLOT**

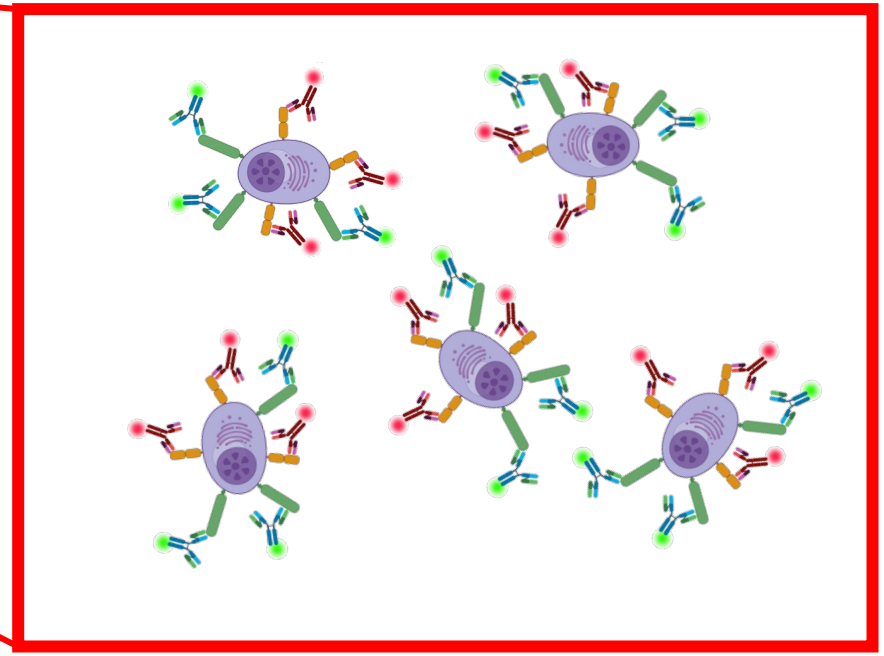


La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico **monodimensionale o ISTOGRAMMA**

Grafico **bidimensionale DOT PLOT**

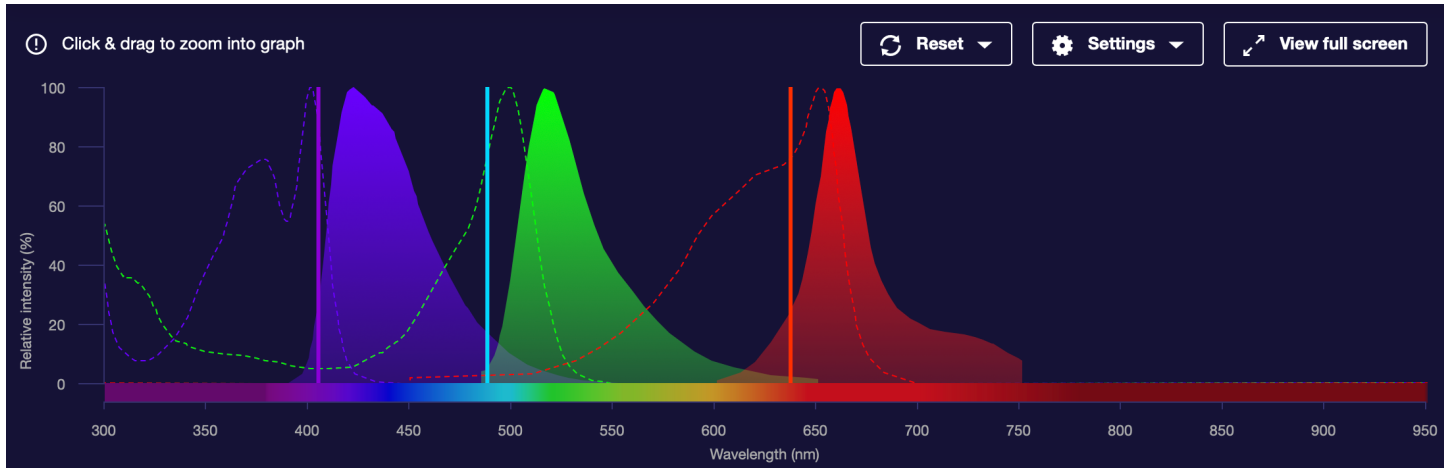




Attualmente, il massimo di **marcatori fluorescenti distinguibili** è **17/18**

La **combinazione** di marcatori che possono essere utilizzati dipende dalla **lunghezza d'onda del/dei laser** utilizzato/i per eccitare i fluorocromi
e dai rivelatori disponibili

Per altre lunghezze d'onda si usano laser al Kripton (350nm), Elio neon (630nm), ecc…



Attualmente, il massimo di **marcatori fluorescenti distinguibili** è **17/18**

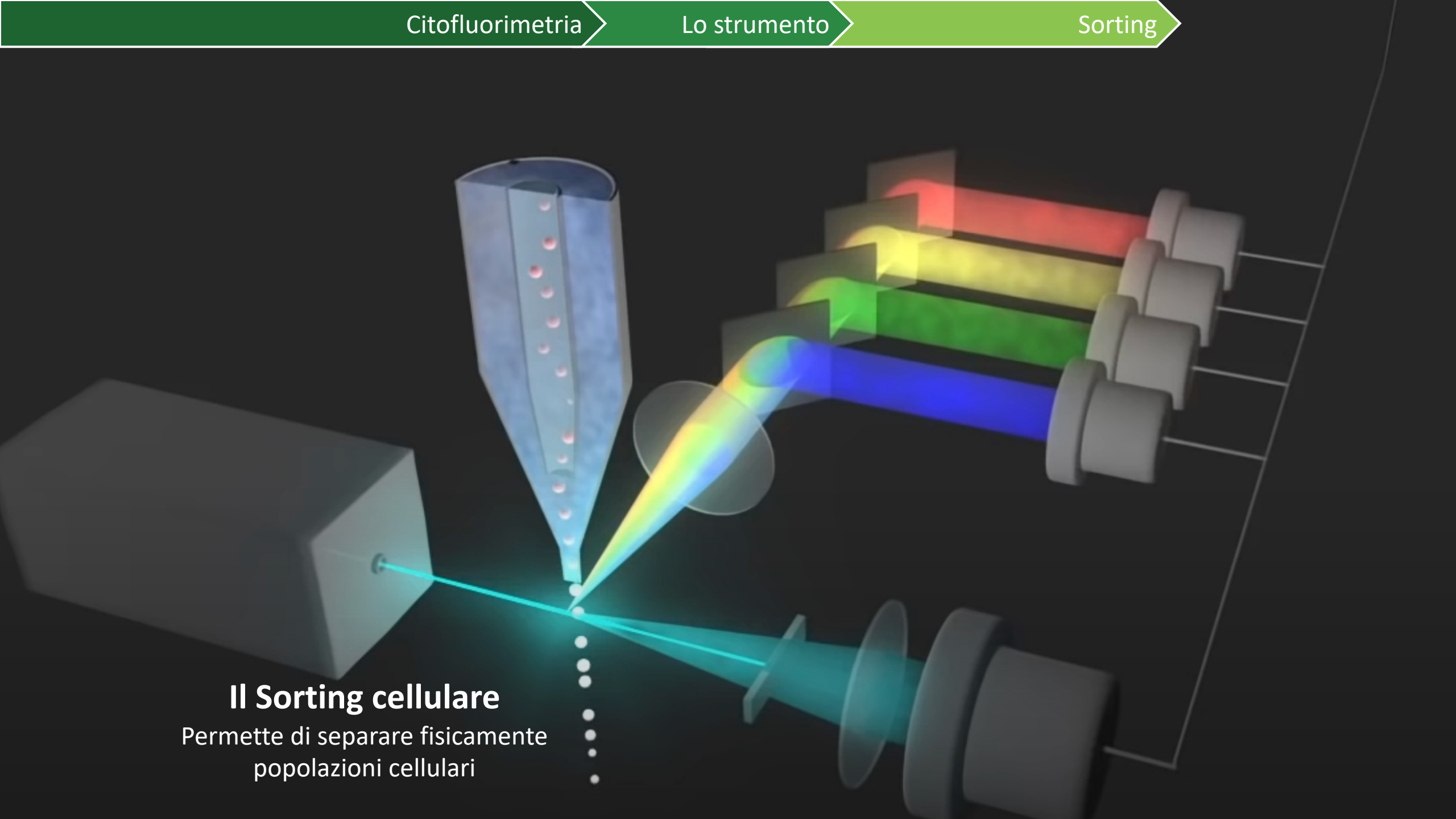
La **combinazione** di marcatori che possono essere utilizzati dipende dalla **lunghezza d'onda del/dei laser** utilizzato/i per eccitare i fluorocromi
e dai rivelatori disponibili

Per altre lunghezze d'onda si usano laser al Kripton (350nm), Elio neon (630nm), ecc…

La **sensibilità** della citofluorimetria è **ineguagliata** da altre piattaforme di rilevamento fluorescenti come la microscopia confocale

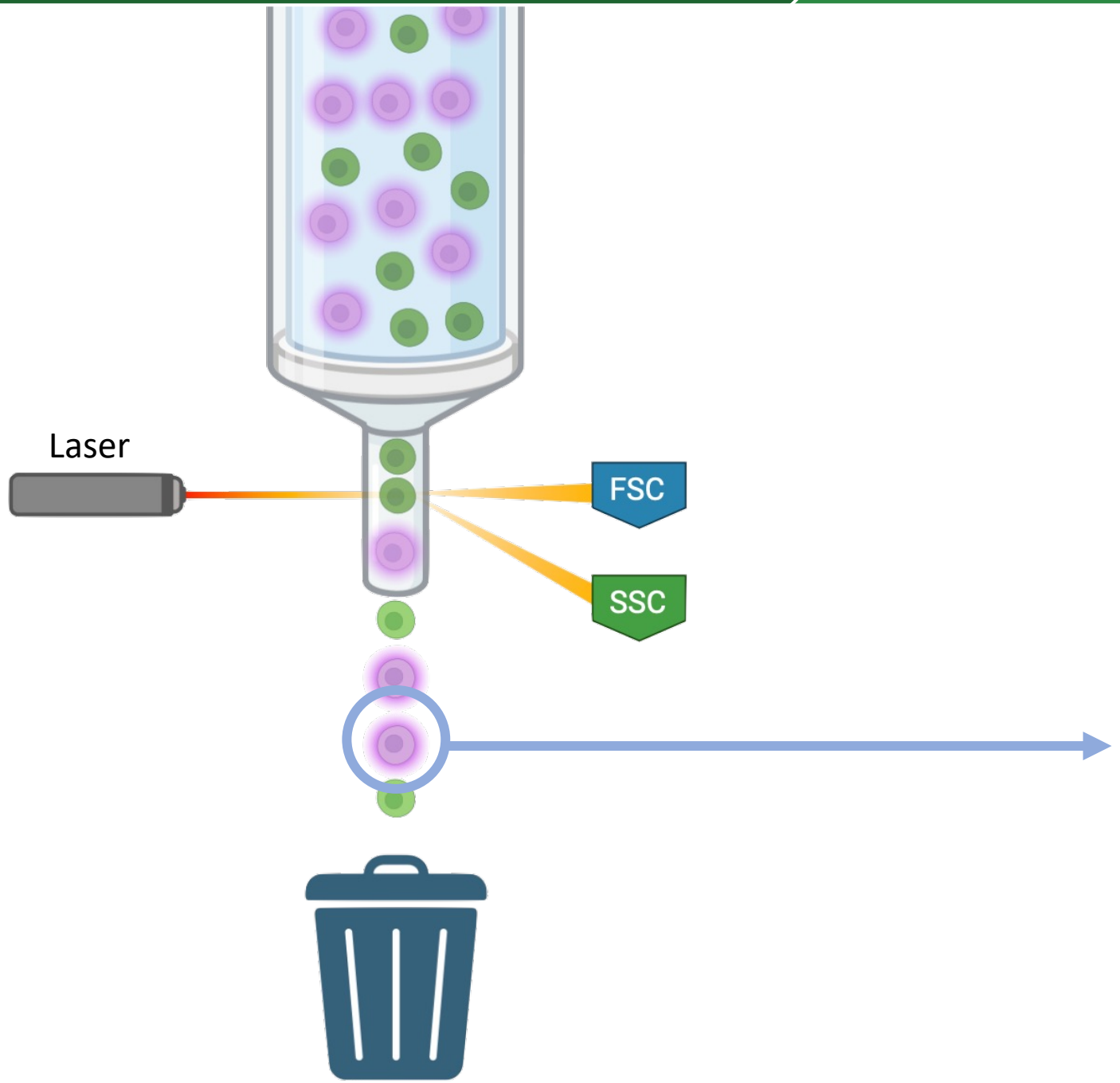
FACS

Fluorescence | **A**ctivated | **C**ell | **S**orting



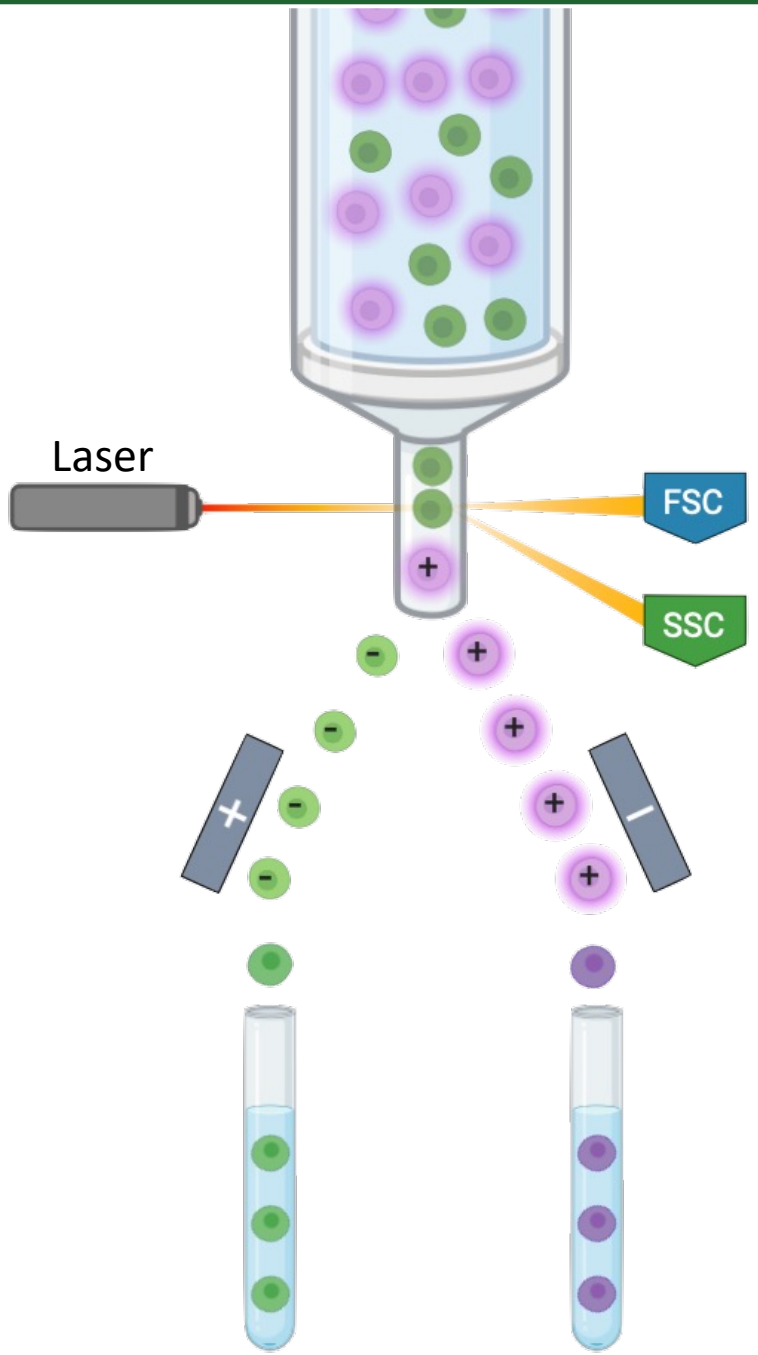
Il Sorting cellulare

Permette di separare fisicamente popolazioni cellulari



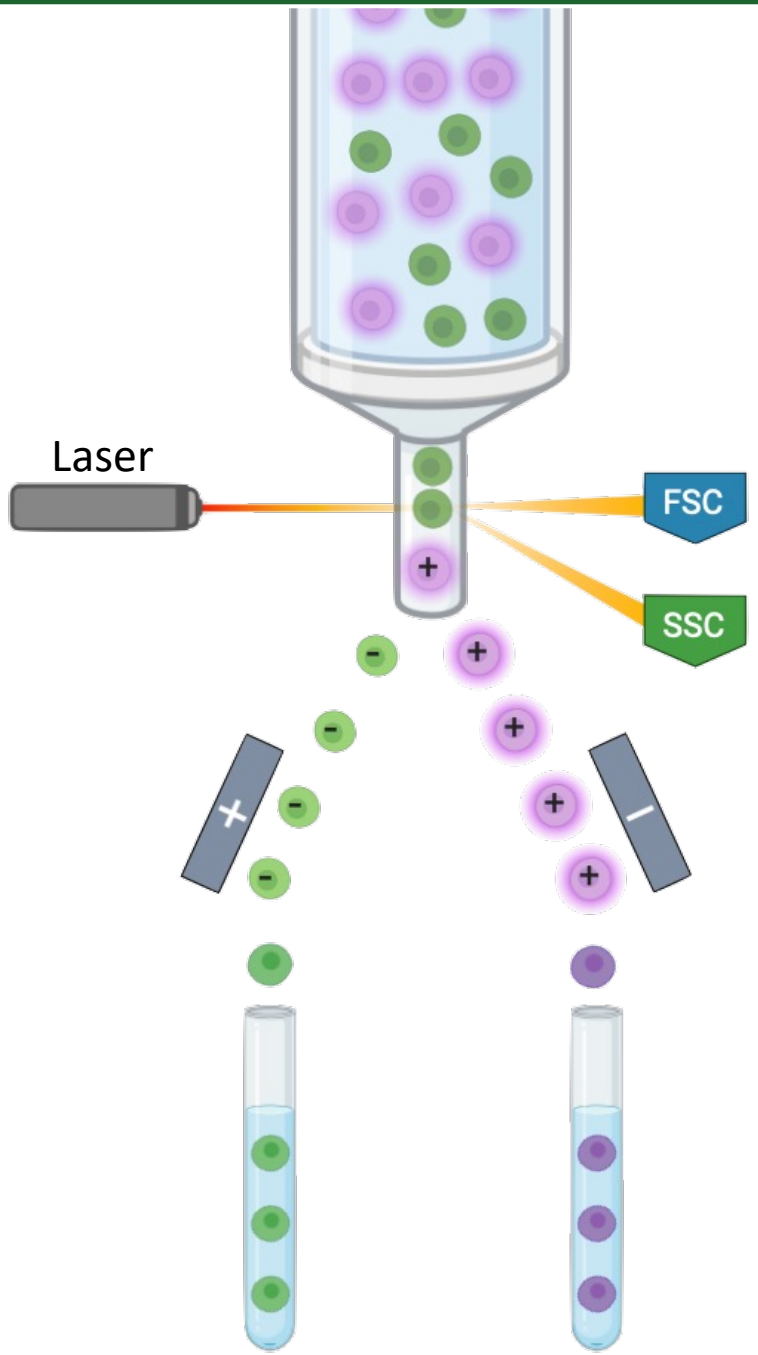
Popolazione **rara**
che vorrei conservare

...Come si fa?



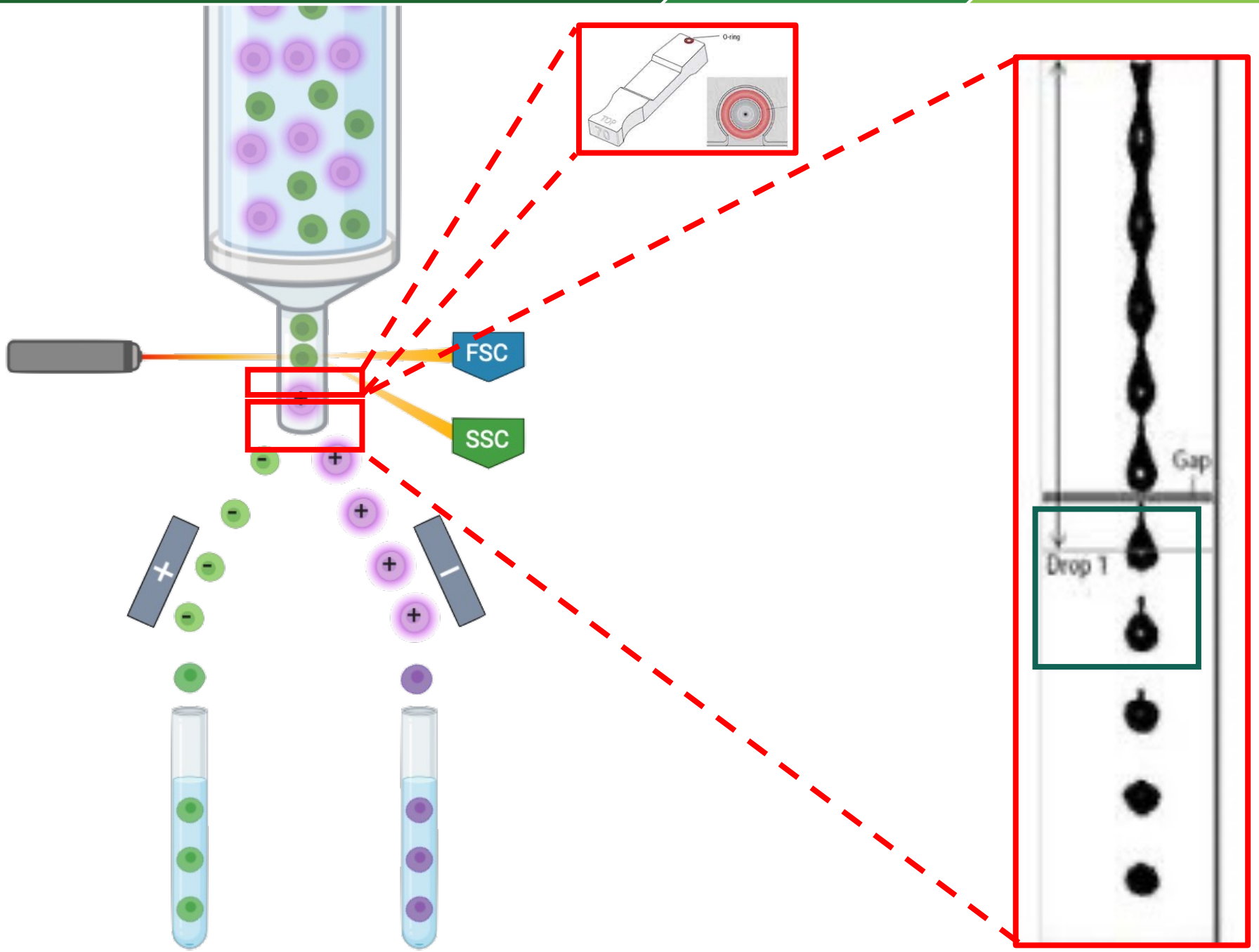
In base ai **parametri** scelti posso **fisicamente separare** una popolazione cellulare da un'altra

Parametri fisici
(FSC/SSC)
oppure in base a dei
marker di fluorescenza



In base ai **parametri** scelti posso **fisicamente separare** una popolazione cellulare da un'altra

OGNI SINGOLA CELLULA viene analizzata e **INDIRIZZATA**



OGNI SINGOLA CELLULA viene analizzata e **INDIRIZZATA**

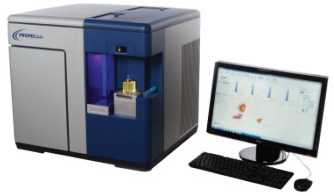
Il **nozzle** permette di creare delle **drops**, ognuna contenente **una singola cellula**

Le **drops** vengono **caricate elettricamente** e **deflesse** grazie a delle plate cariche

Cell Sorters

MoFlo
(Beckman Coulter)

Avalon
(Propel Labs)



Astrios
(Beckman Coulter)

SH800
(Sony)

FACSVantage
(BD Biosciences)

Synergy3200
(i-Cyt)

FACSJazz
(BD Biosciences)

Influx
(BD Biosciences)

FACSAria
(BD Biosciences)

JSAN
(Bay Bioscience)

DAL 1970 AD OGGI

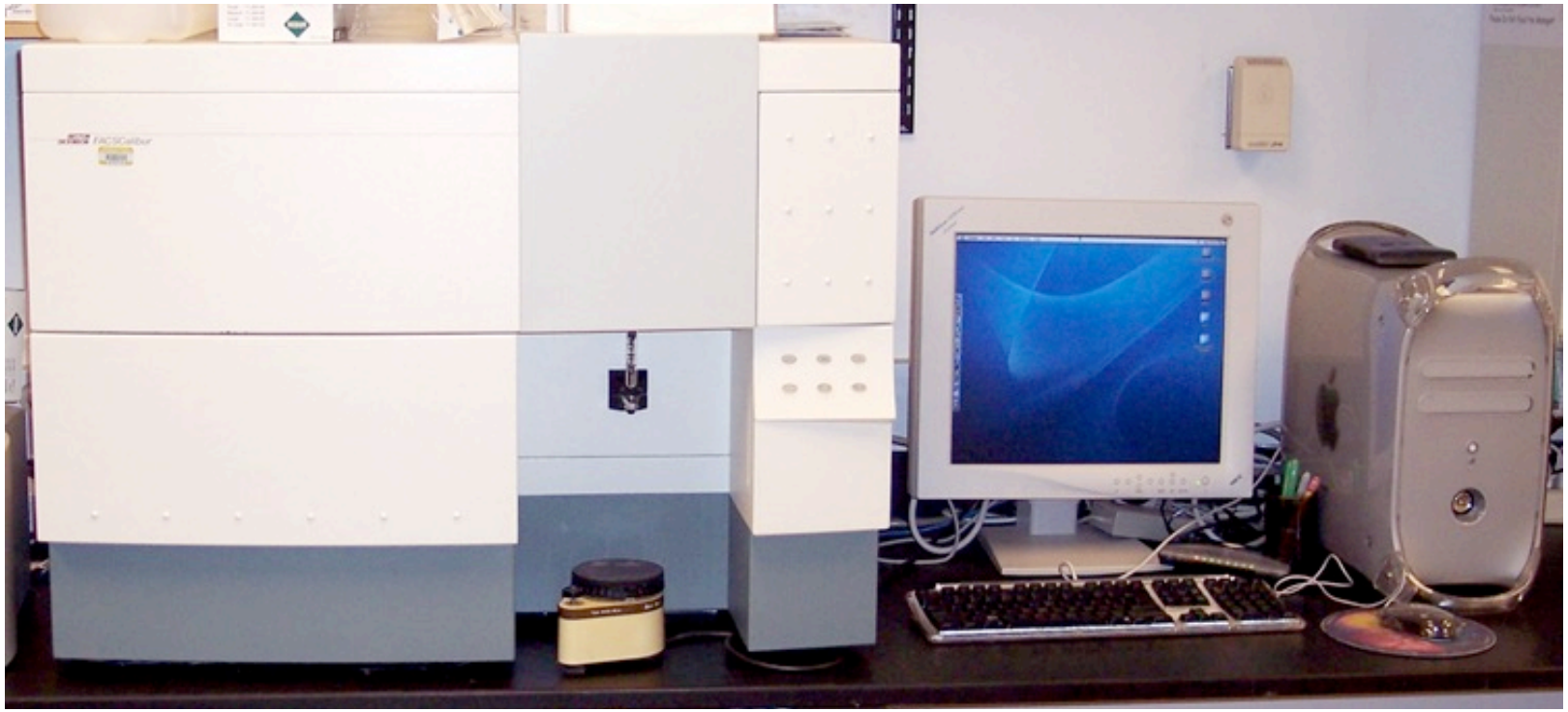
Comparsa della citofluorimetria a flusso avviene attorno agli anni 70, determinando un veloce e intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche.

Inizialmente misura di 1-2 parametri: uno per le misure fisiche e 1 per la fluorescenza

Fulwyler's original cell sorter – a 1967 model

DAL 1970 AD OGGI

FACScalibur



- 1 laser 488nm
- 3 parametri (fluorescenza) simultaneamente

DAL 1970 AD OGGI

FACScanto

- 3 laser
- 6/8 parametri simultaneamente

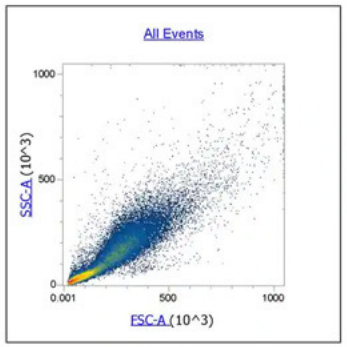
DAL 1970 AD OGGI

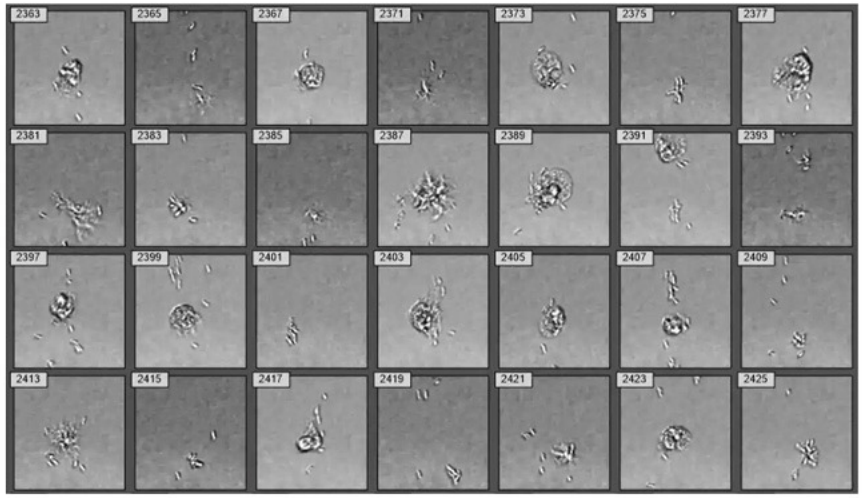
2017: BD LSRFORTESSA X-20.
5 laser e possibilità di analizzare 20 parametri simultaneamente (18 colori)

DAL 1970 AD OGGI

Invitrogen CytPix

Citofluorimetro accoppiato a microscopia brightfield
→ Permette la visualizzazione anche di interazioni cellula-cellula





Applicazioni della Citofluorimetria

- Determinazione dei marker cellulari:
  - Superficiali
  - Intranucleari
  - Intracitoplasmatici
- Discriminazione tra cellule vive, cellule apoptotiche e necrotiche
- Valutazione del contenuto cellulare di DNA
- Predisposizione per la separazione cellulare

Applicazioni della Citofluorimetria

- **Determinazione dei marker cellulari:**
  - Superficiali
  - Intranucleari
  - Intracitoplasmatici
- Discriminazione tra cellule vive, cellule apoptotiche e necrotiche
- Valutazione del contenuto cellulare di DNA
- Predisposizione per la separazione cellulare

Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

Come posso distinguere la

Leucemia Linfatica Cronica (LLC)/Piccolo Linfoma Linfocitico (SLL)

dal

Linfoma Mantellare (MCL)

in citofluorimetria?

Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

Leucemia Linfatica Cronica (LLC)/
Piccolo linfoma linfocitico (SLL)

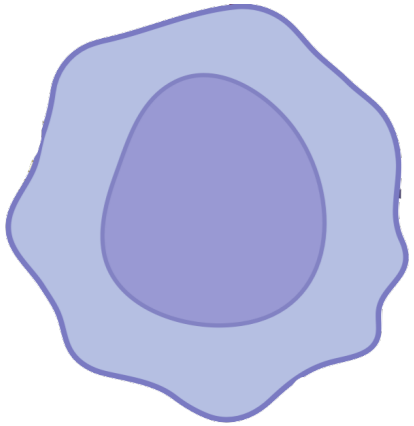
Linfoma Mantellare (MCL)

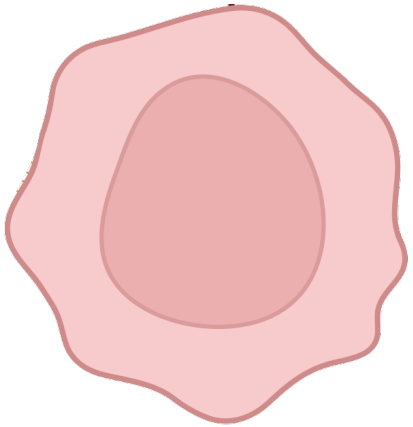
FSC e **SSC NON** sono di aiuto

DEVO usare dei MARKER fluorescenti

Cellule piccole

Cellule piccole





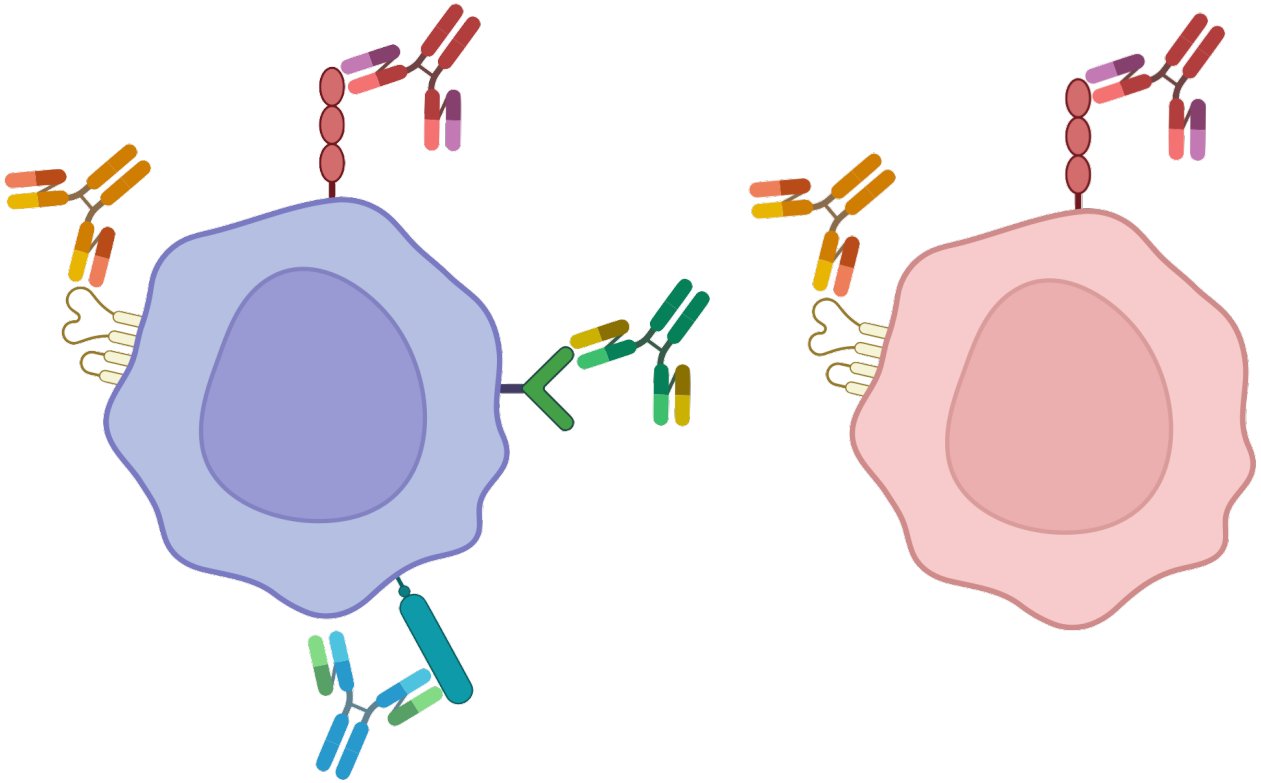
Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

Leucemia Linfatica Cronica (LLC)/ Piccolo linfoma linfocitico (SLL)

Linfoma Mantellare (MCL)

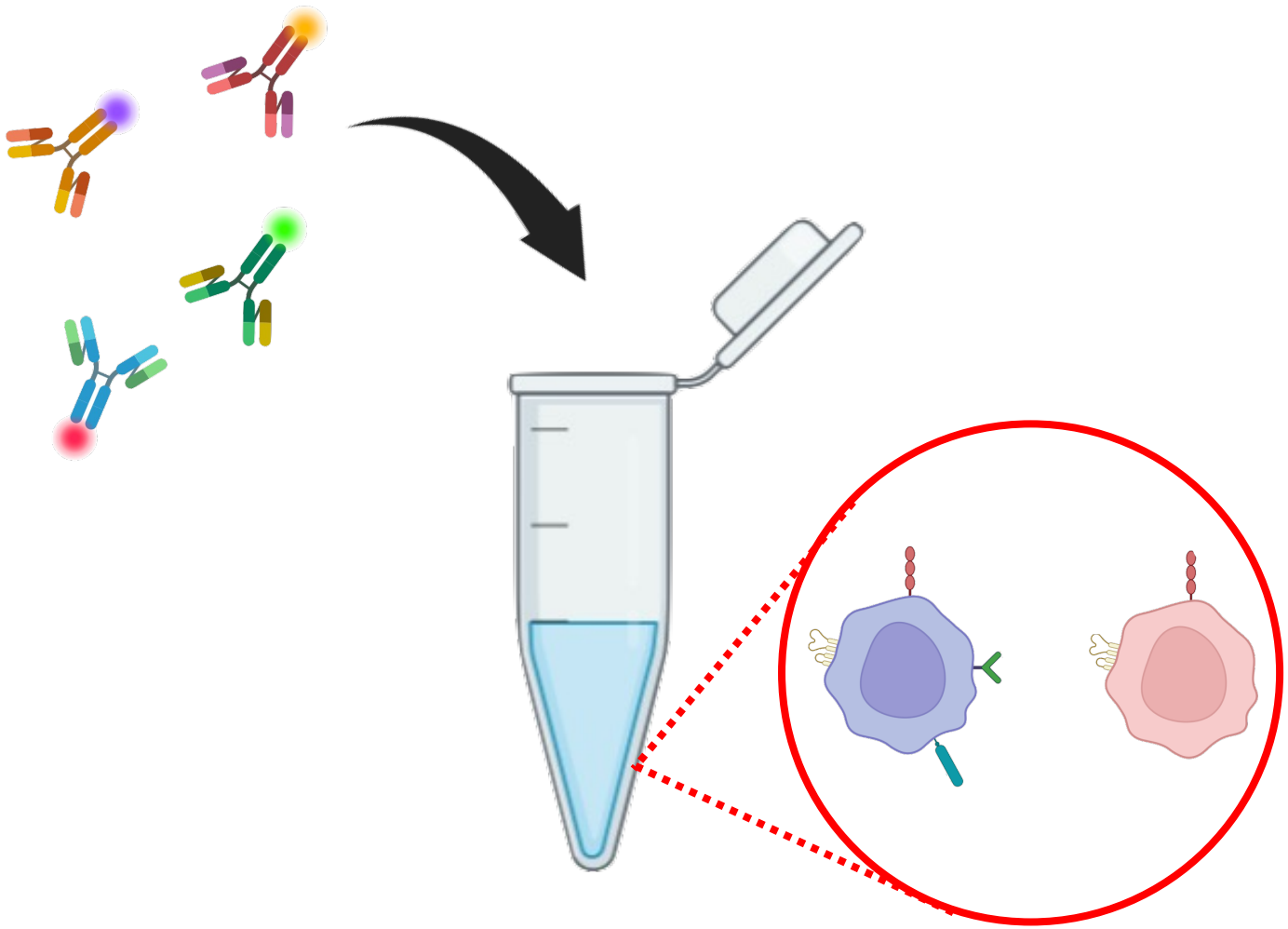
Cellule piccole
$CD5^+$
$CD23^+$
$CD10^-$
$CD20^+$
$CD200^+$



Cellule piccole
$CD5^+$
$CD23^-$
$CD10^-$
$CD20^+$
$CD200^-$

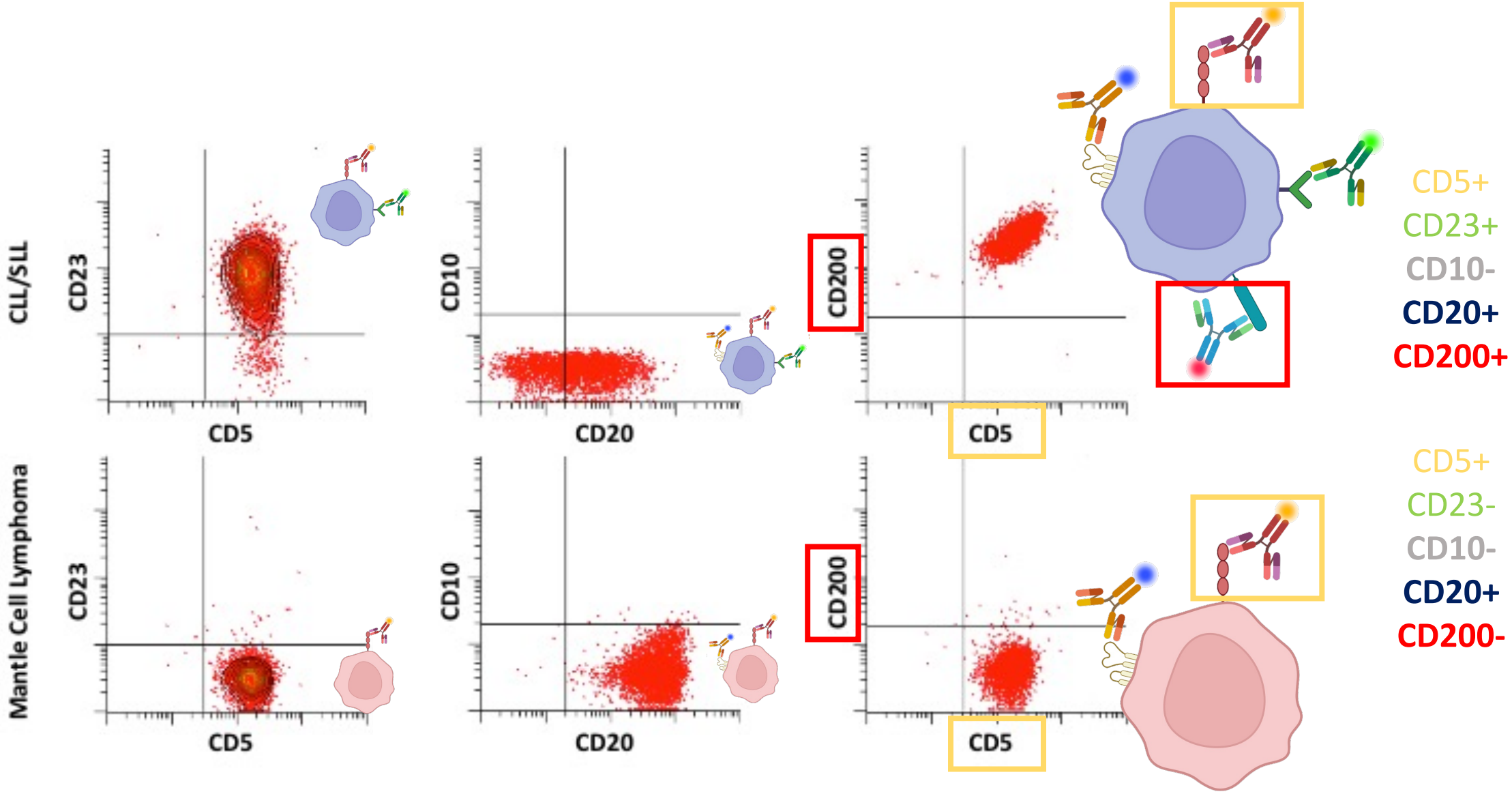
Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari



Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

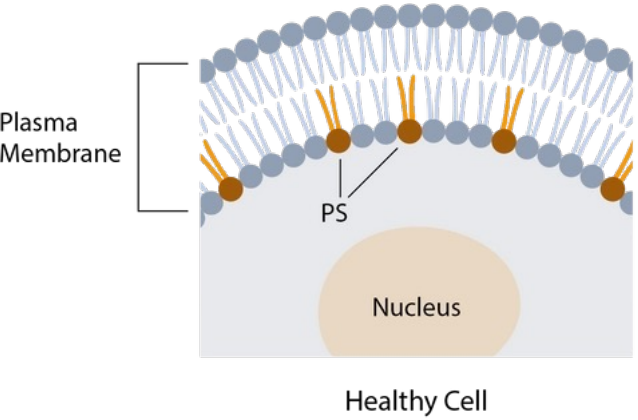


Applicazioni della Citofluorimetria

- Determinazione dei marker cellulari:
  - Superficiali
  - Intranucleari
  - Intracitoplasmatici
- **Discriminazione tra cellule vive, cellule apoptotiche e necrotiche**
- Valutazione del contenuto cellulare di DNA
- Predisposizione per la separazione cellulare

Applicazioni della Citofluorimetria

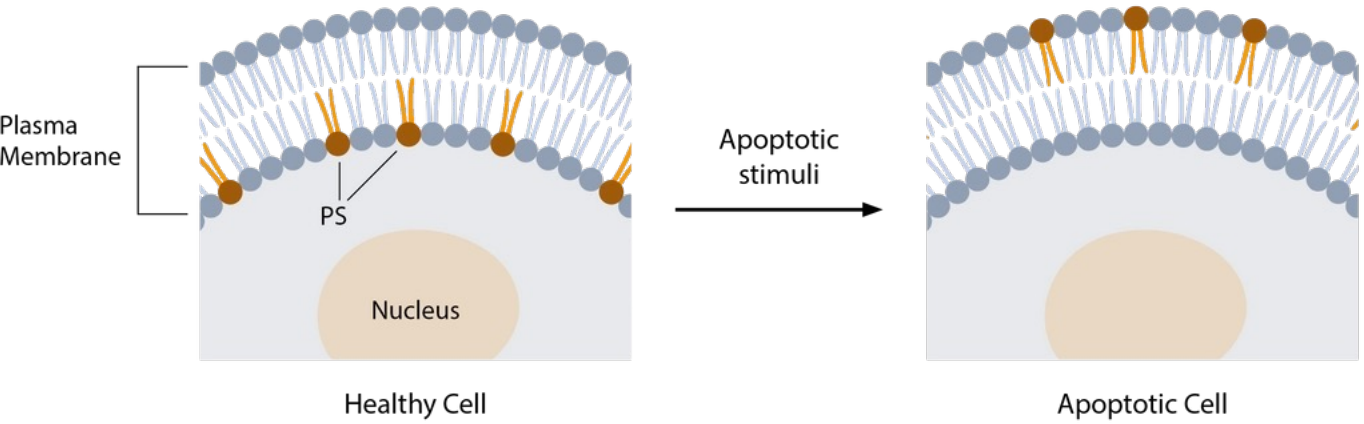
Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**



Nelle cellule **sane** la **fosfatidilserina** è localizzata nel lato **interno** della membrana cellulare

Applicazioni della Citofluorimetria

Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**

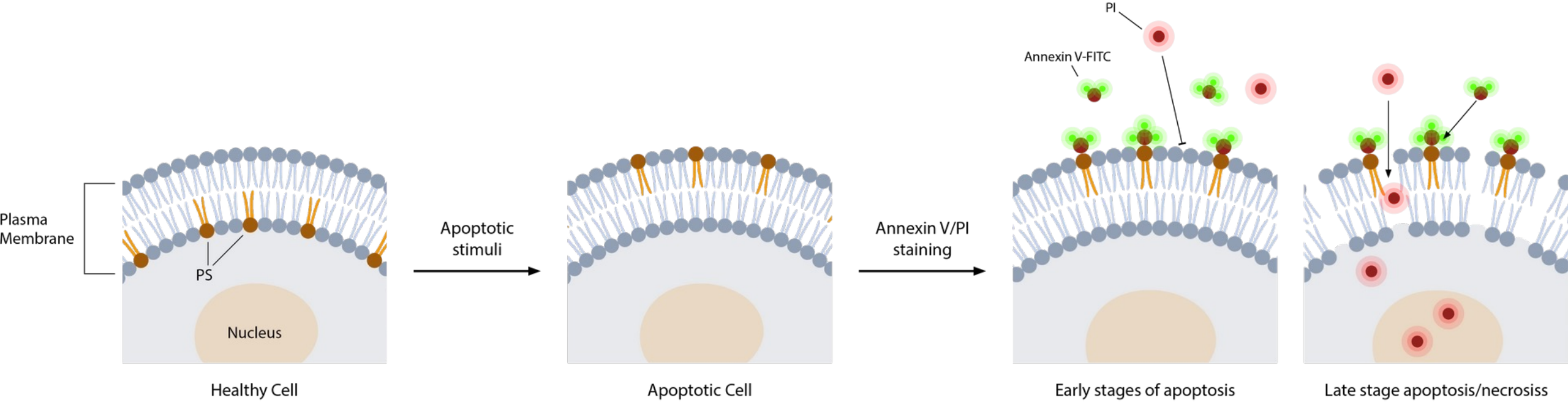


Nelle cellule sane la fosfatidilserina è localizzata nel lato interno della membrana cellulare

Nelle cellule **apoptotiche** la **fosfatidilserina** “esce” nel lato **esterno** della membrana cellulare

Applicazioni della Citofluorimetria

Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**



Nelle cellule sane la fosfatidilserina è localizzata nel lato interno della membrana cellulare

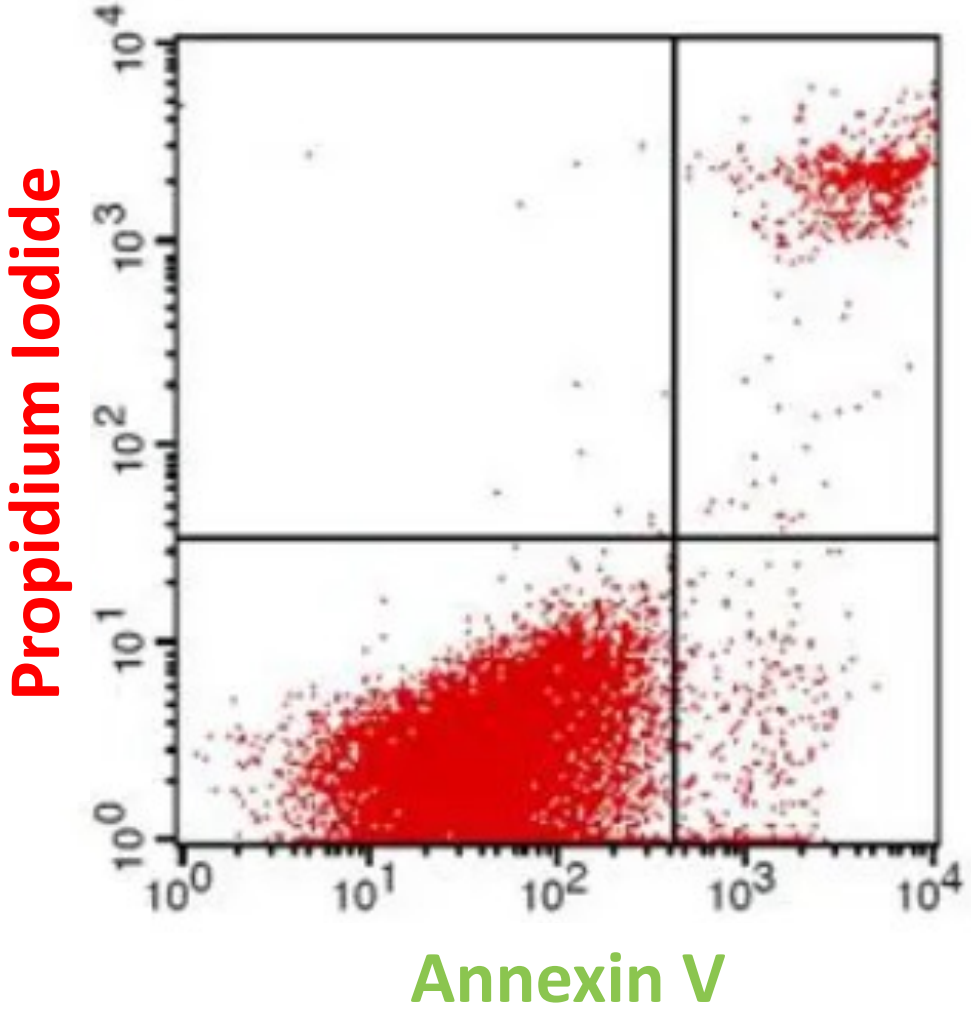
Nelle cellule apoptotiche la fosfatidilserina "esce" nel lato esterno della membrana cellulare

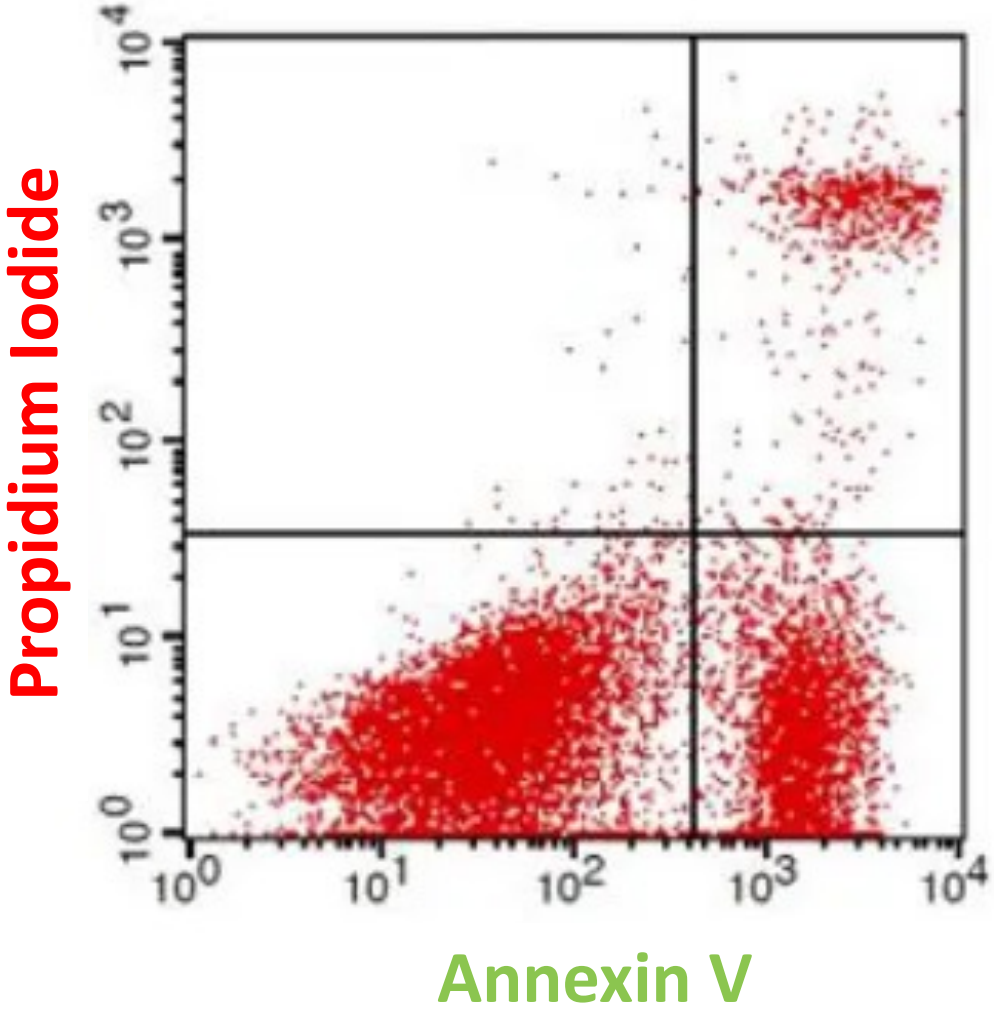
Early stage apoptosis
→ Annexin V +
→ PI -

Late-stage apoptosis/necrosis
→ Annexin V +
→ PI +

Applicazioni della Citofluorimetria

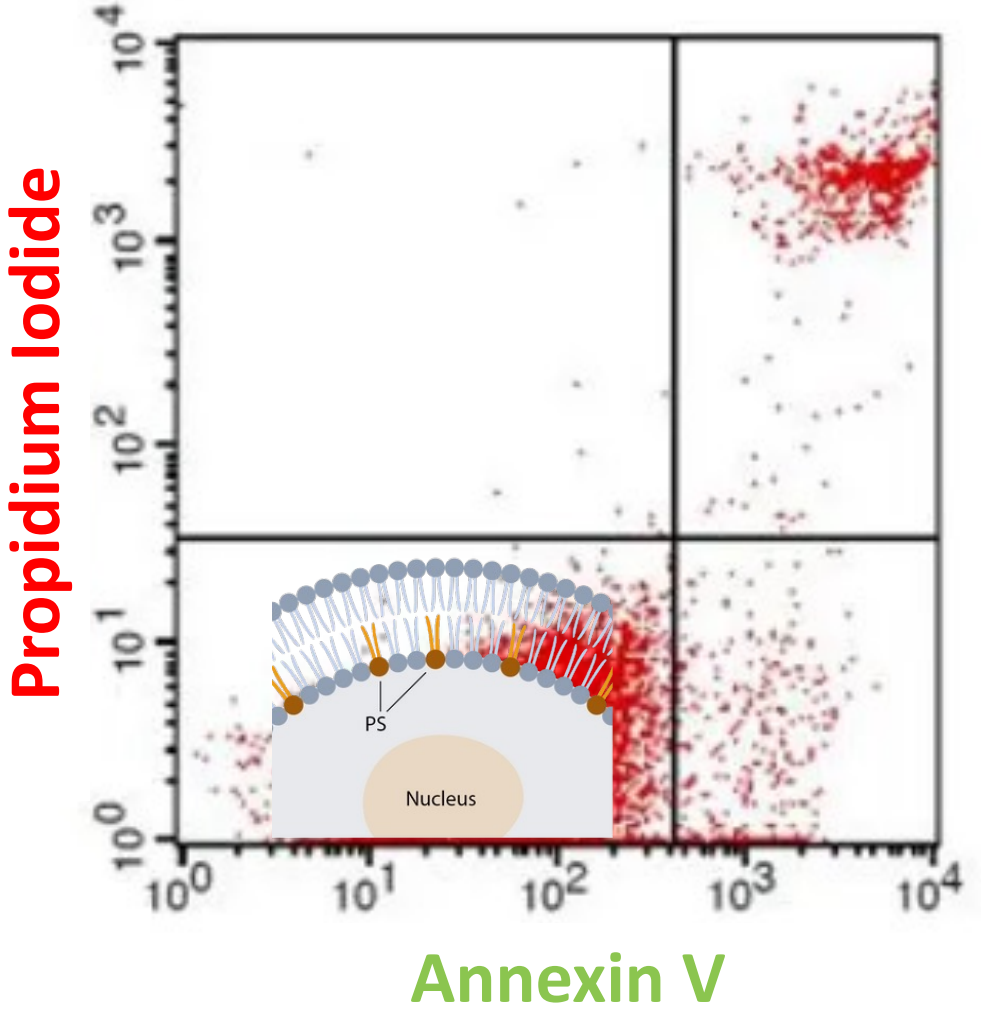
Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**

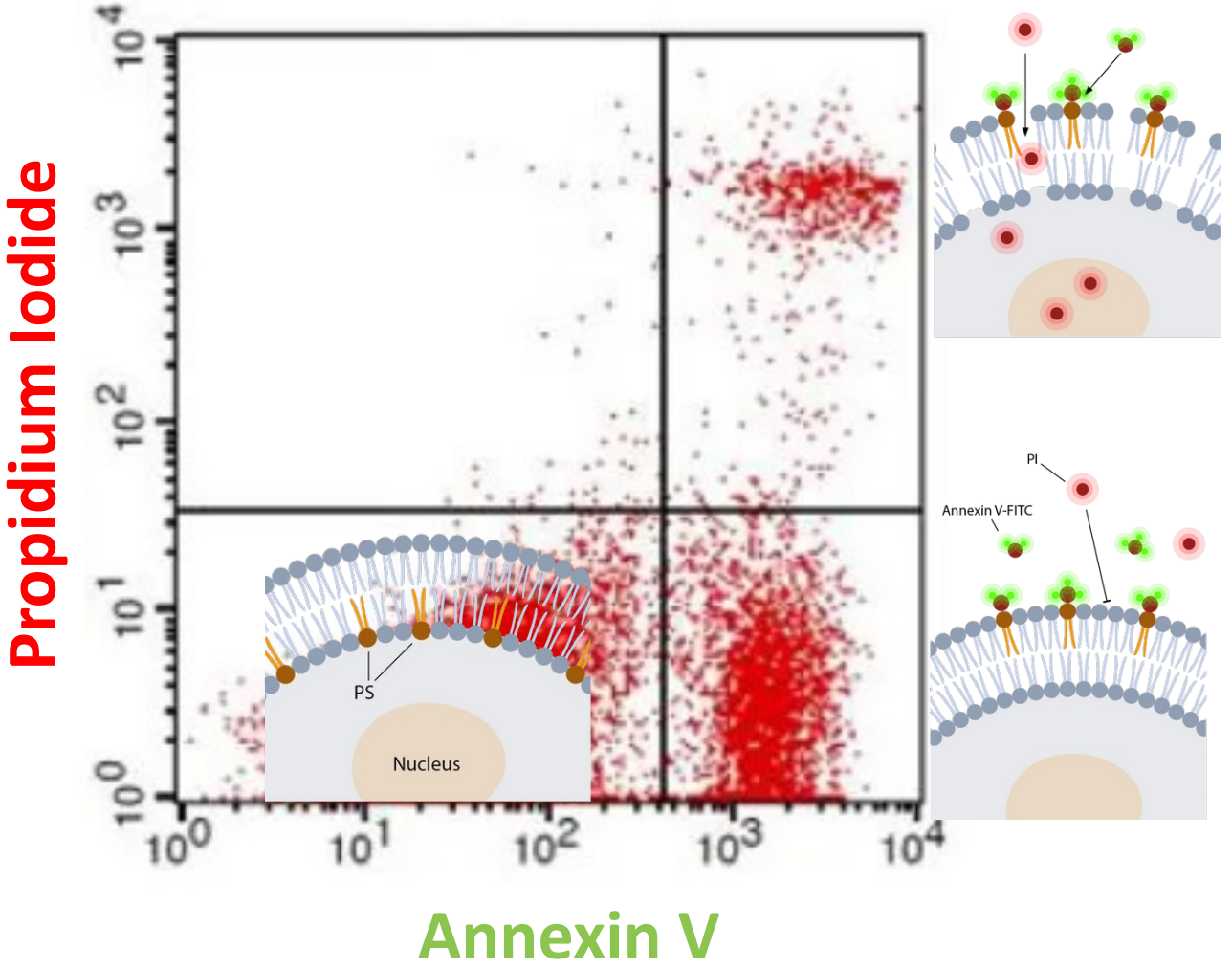




Applicazioni della Citofluorimetria

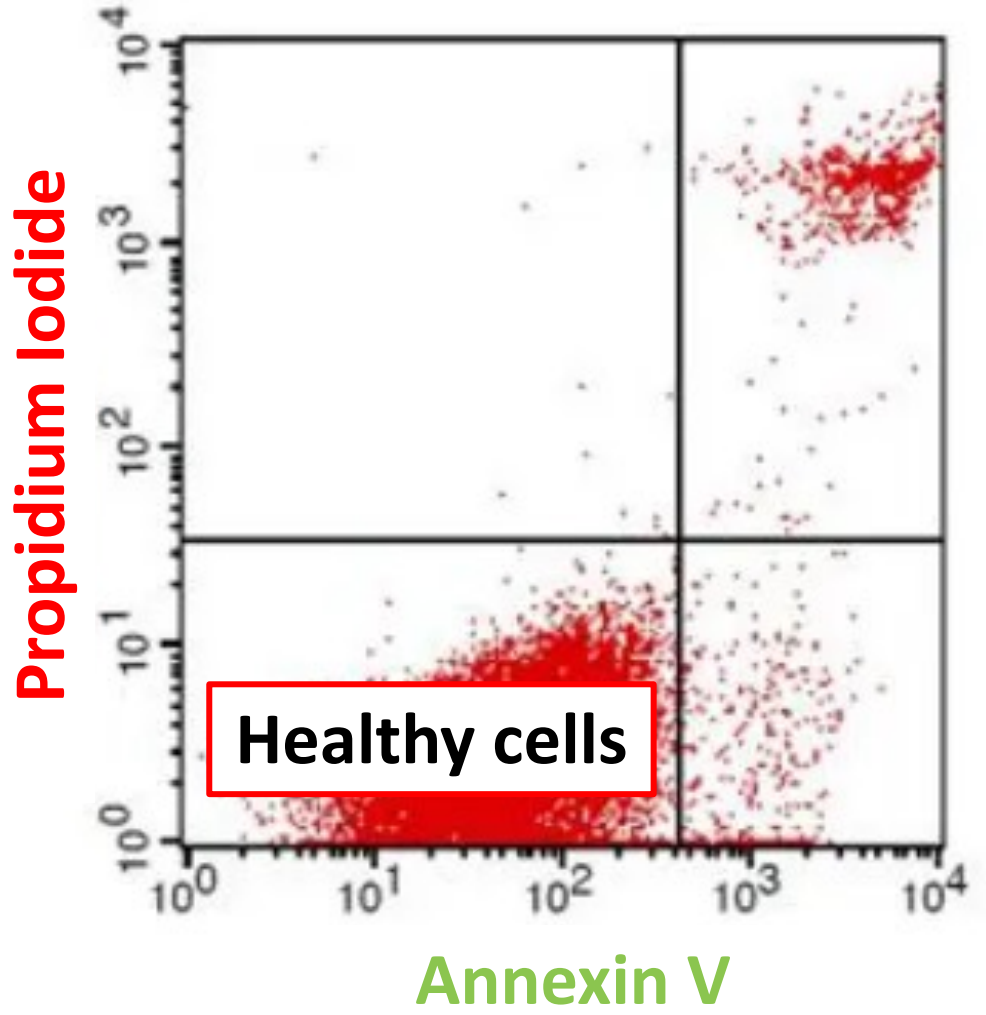
Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**

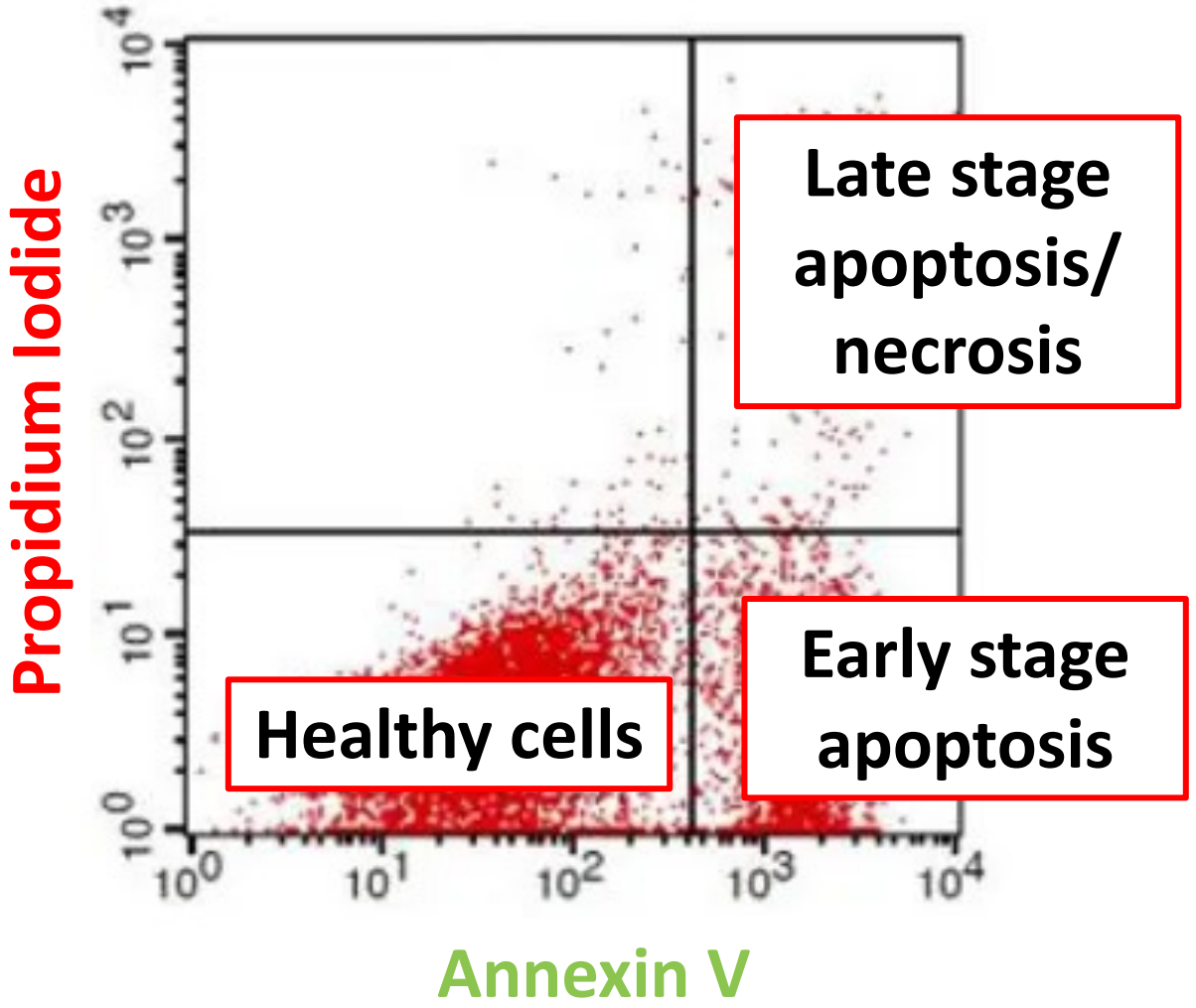




Applicazioni della Citofluorimetria

Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**





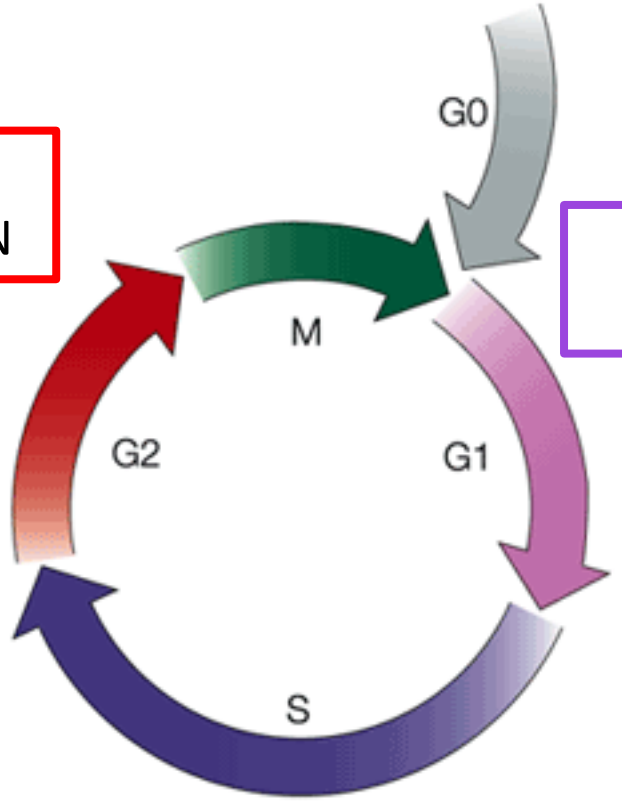
Applicazioni della Citofluorimetria

- Determinazione dei marker cellulari:
  - Superficiali
  - Intranucleari
  - Intracitoplasmatici
- Discriminazione tra cellule vive, cellule apoptotiche e necrotiche
- **Valutazione del contenuto cellulare di DNA**
- Predisposizione per la separazione cellulare

Applicazioni della Citofluorimetria

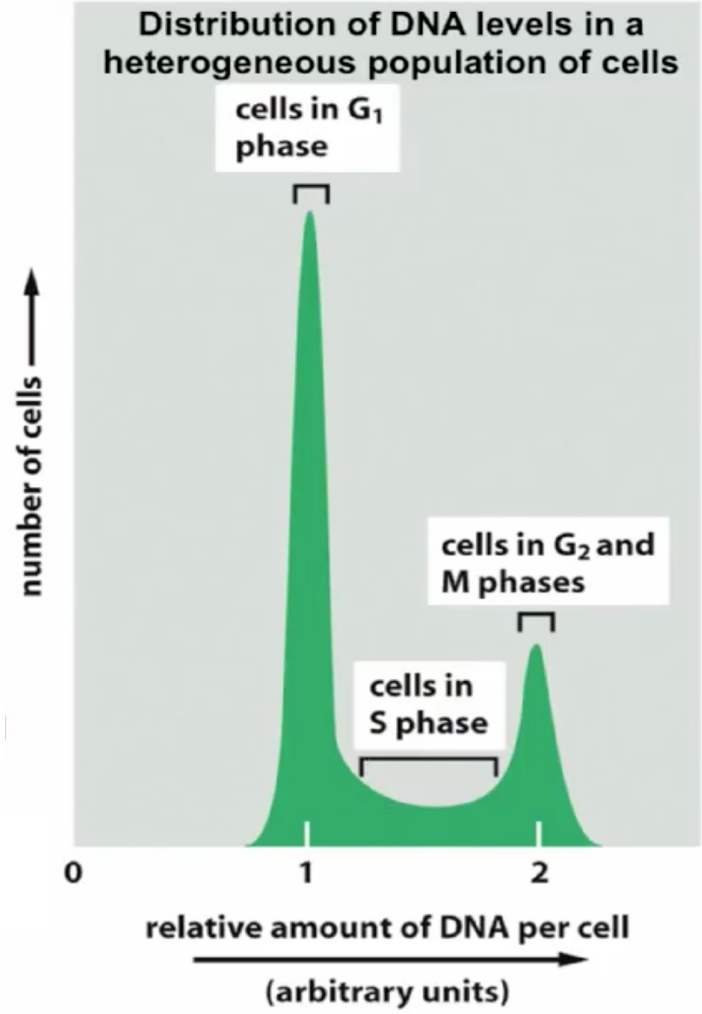
Valutazione del **contenuto** cellulare **di DNA**

G2: the cell ploidity if 2N



G1: the cell ploidity if N

DNA is replicated in S-phase

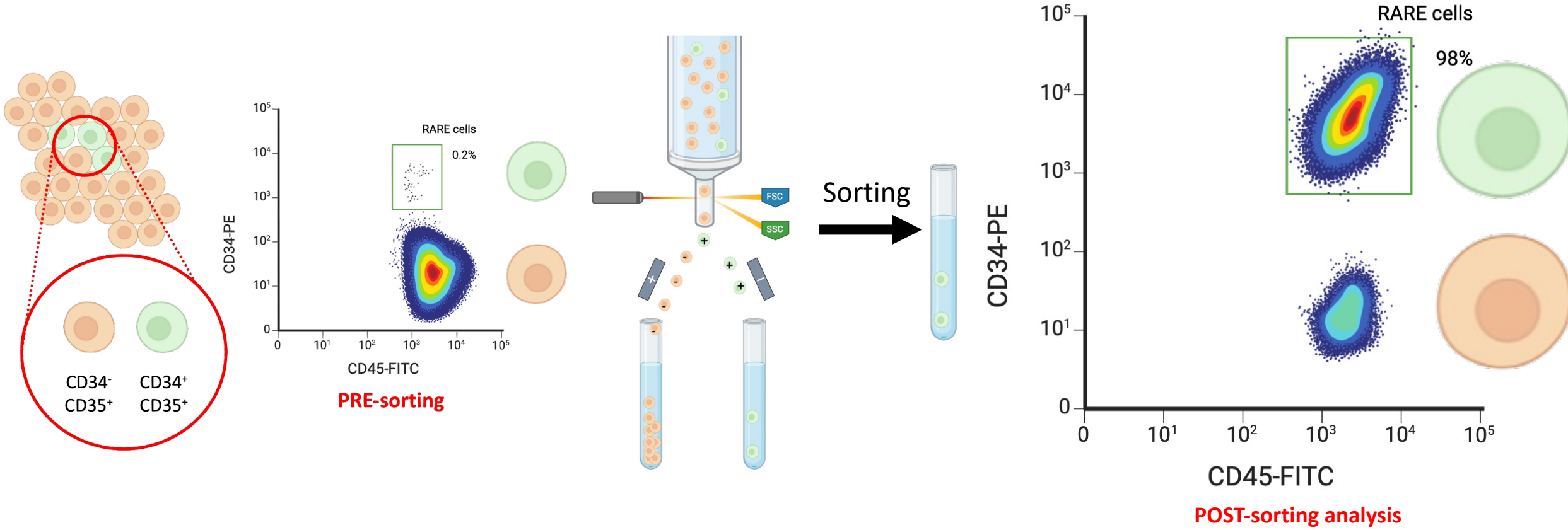


Applicazioni della Citofluorimetria

- Determinazione dei marker cellulari:
  - Superficiali
  - Intranucleari
  - Intracitoplasmatici
- Discriminazione tra cellule vive, cellule apoptotiche e necrotiche
- Valutazione del contenuto cellulare di DNA
- **Predisposizione per la separazione cellulare**

Applicazioni della Citofluorimetria

Predisposizione per la separazione cellulare



Vantaggi della tecnica

- Multiparametricità
  → possibilità di mettere in relazione più caratteristiche della stessa cellula
  (anche fino a 8-9 parametri contemporaneamente)
- Analisi di grandi quantità di cellule
- Riproducibilità ed affidabilità statistica delle acquisizioni
- Grande sensibilità
- Rapidità di analisi
- Possibilità di ulteriori analisi a posteriori
  DIVA, CELL QUEST, FLOW JO
- FACS: purificazione di una popolazione cellulare