

Flowcytometry

10.04.2025

Sara Bozzer

sara.bozzer@burlo.trieste.it

Flowcytometry

Misurazione

Cellule

Flusso

Tecnica di laboratorio veloce ed automatica che permette

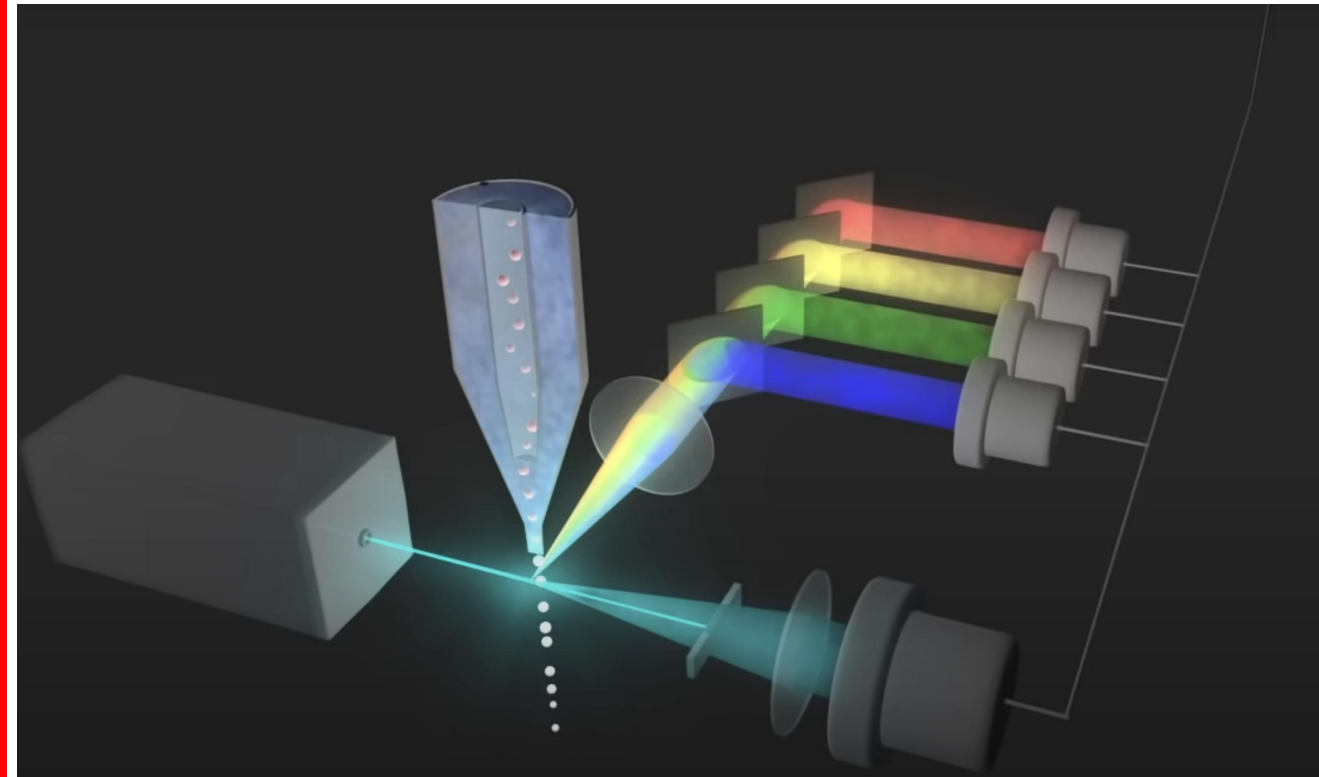
1. una misurazione
2. di particelle/cellule
3. in un **flusso**



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...

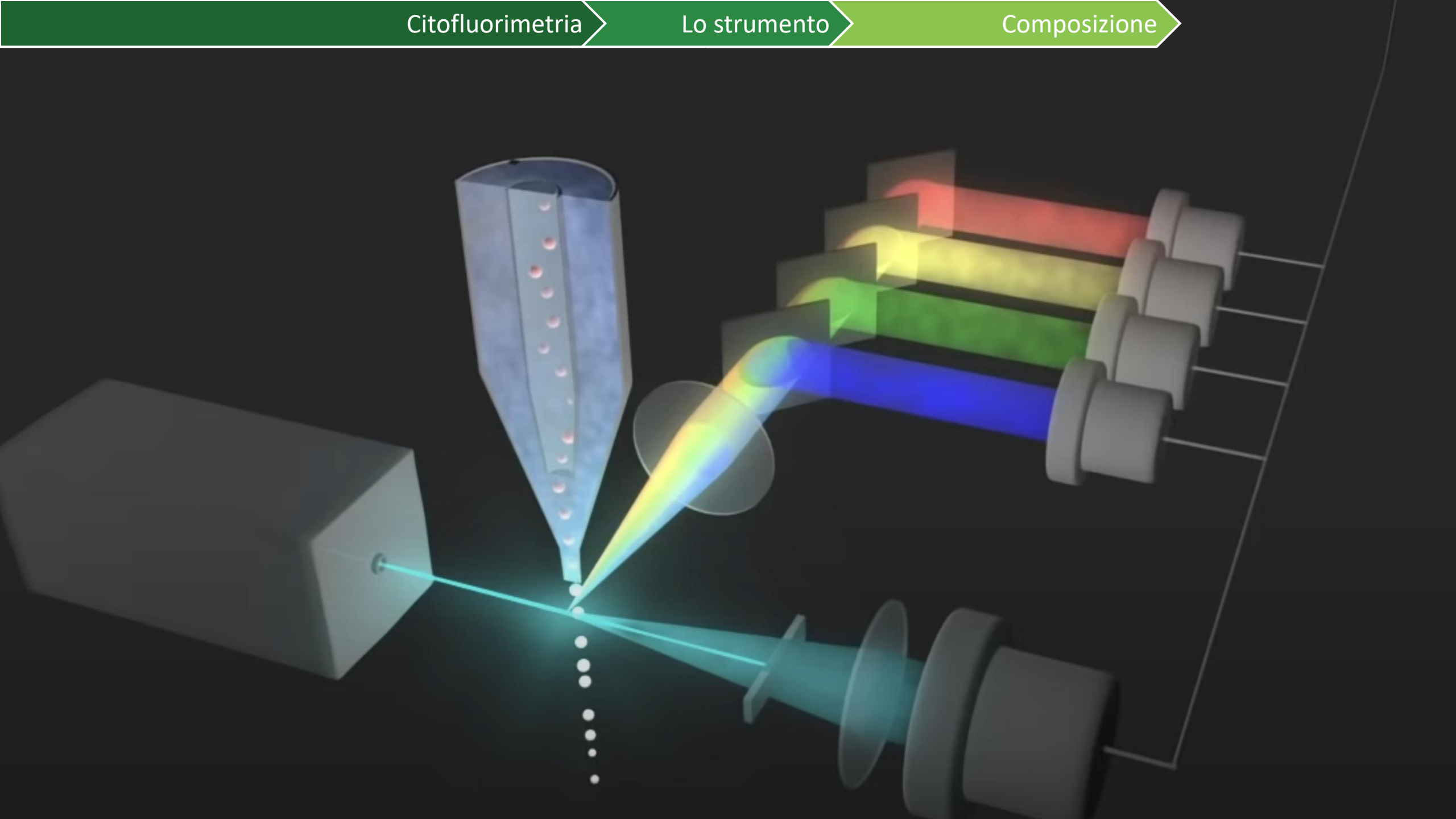
e **analizzare** i dati ottenuti anche in un secondo momento



Citofluorimetria

Lo strumento

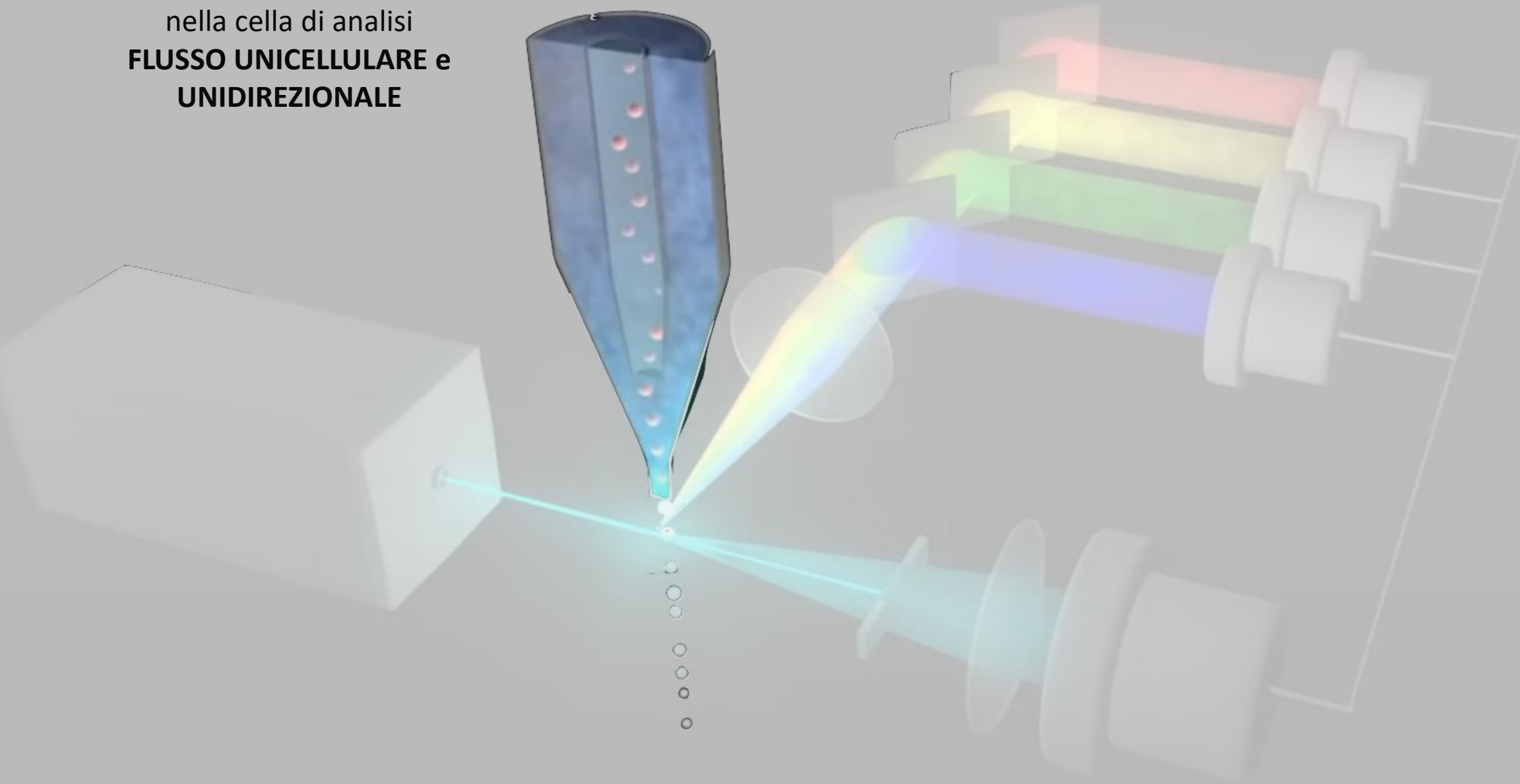
Composizione

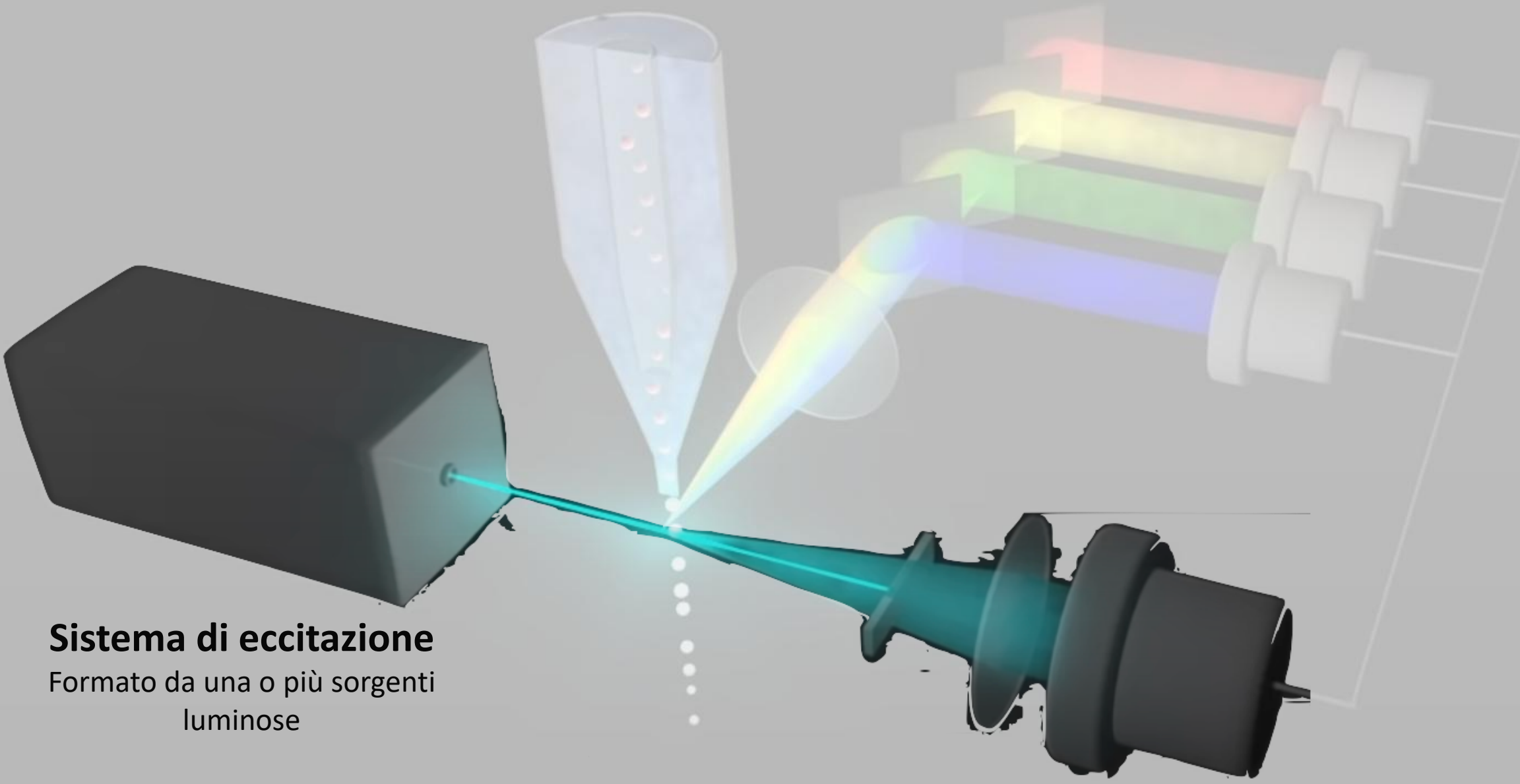


Fluidica

Permette il trasporto del campione
nella cella di analisi

**FLUSSO UNICELLULARE e
UNIDIREZIONALE**





Sistema di eccitazione

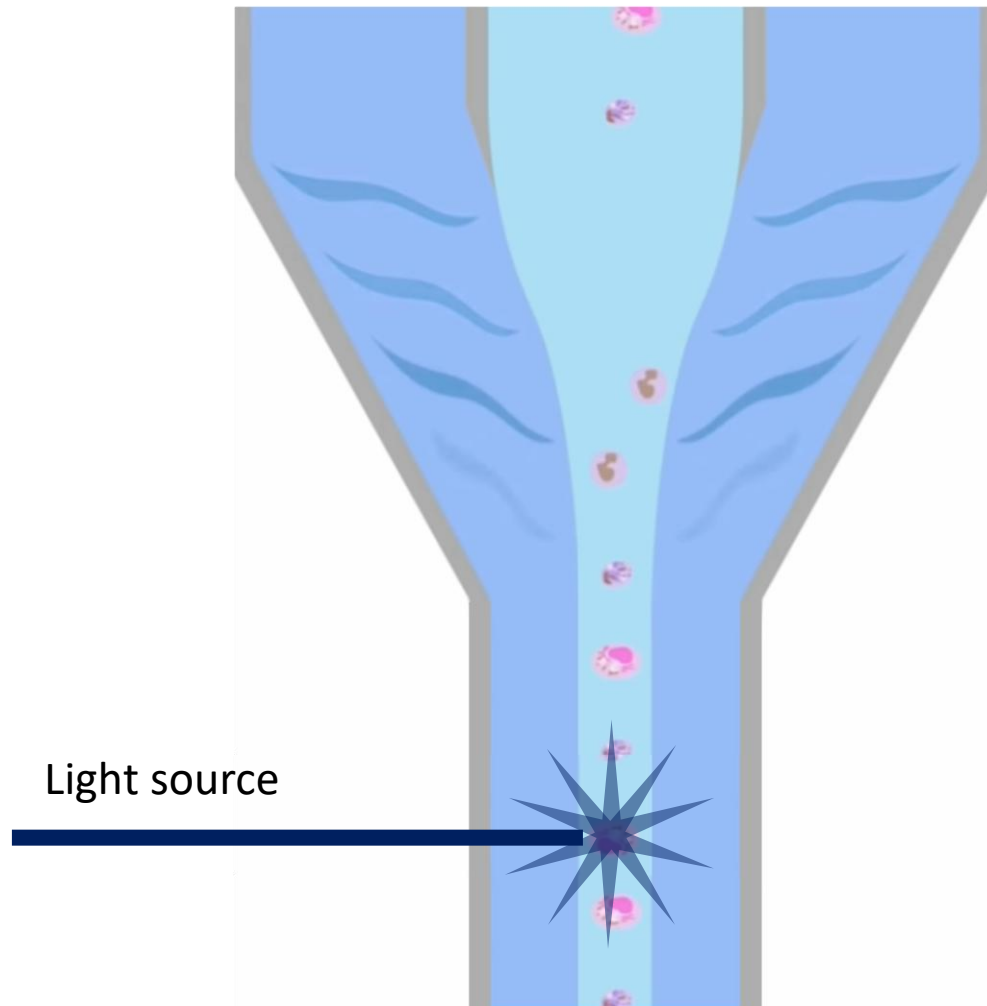
Formato da una o più sorgenti
luminose

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**

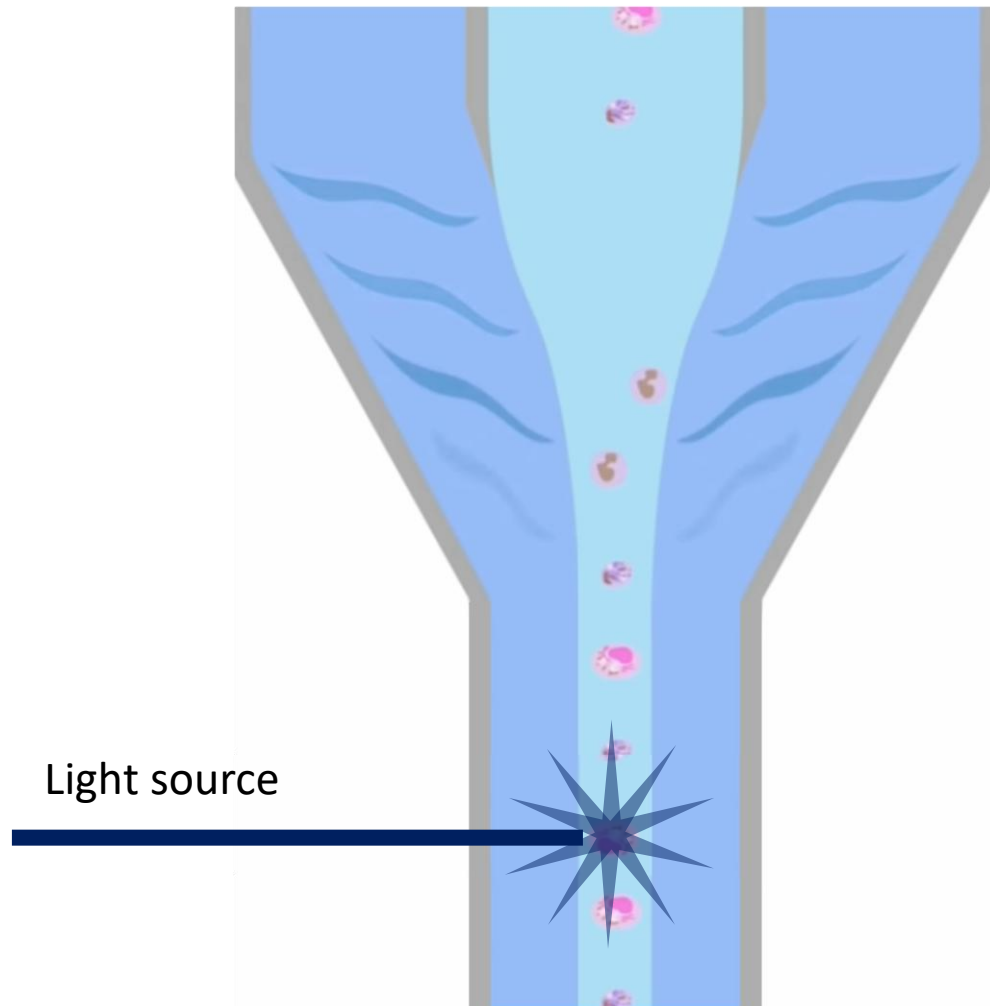


**CENTINAIA DI CELLULE AL
SECONDO**

In
sospensione

In "fila
indiana"

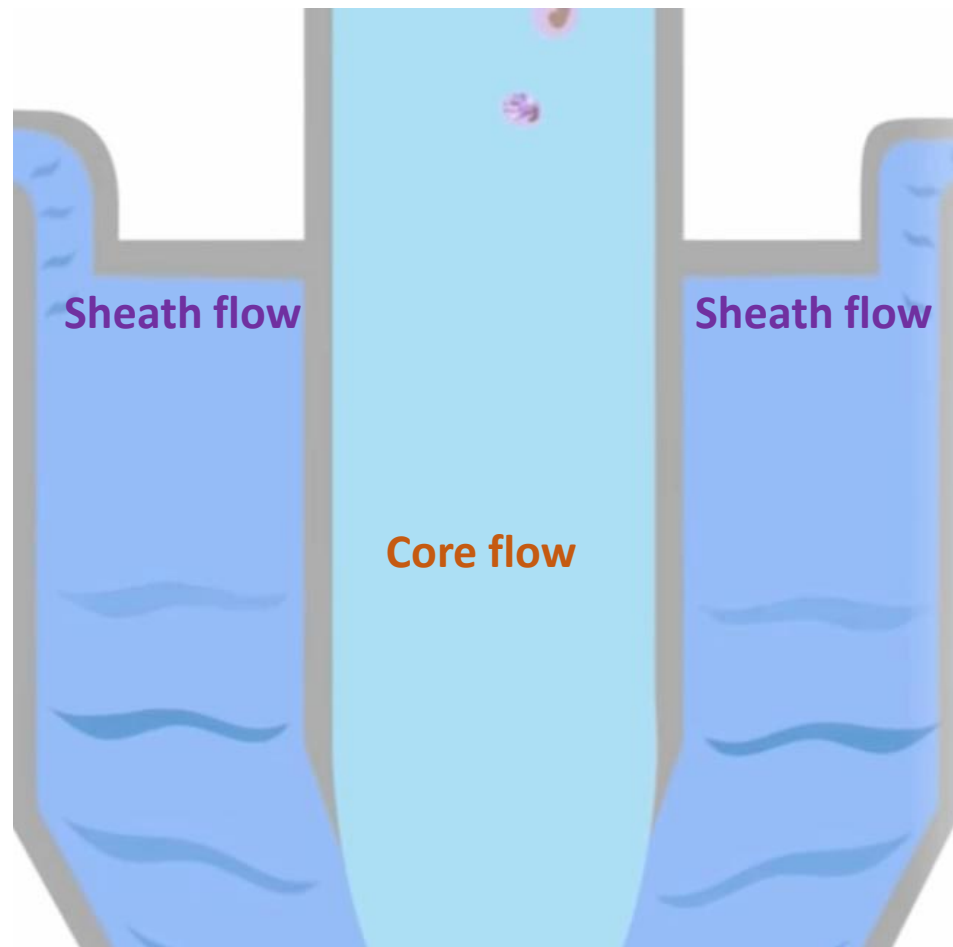
Tecnica di laboratorio **veloce ed automatica** che permette una misurazione di particelle/cellule in un **flusso**



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

Citofluorimetria

Lo strumento

Fluidica

Idrodinamica

Focalizzazione del flusso

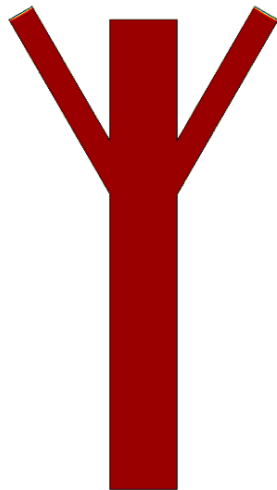
Idrodinamica

Focalizzazione del flusso

Acustica

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.



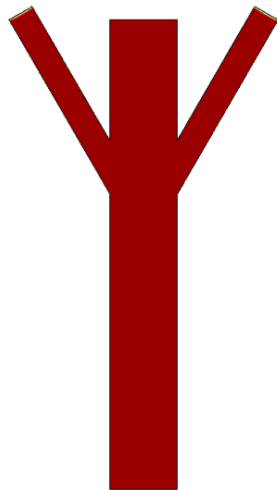
Idrodinamica

Focalizzazione del flusso

Acustica

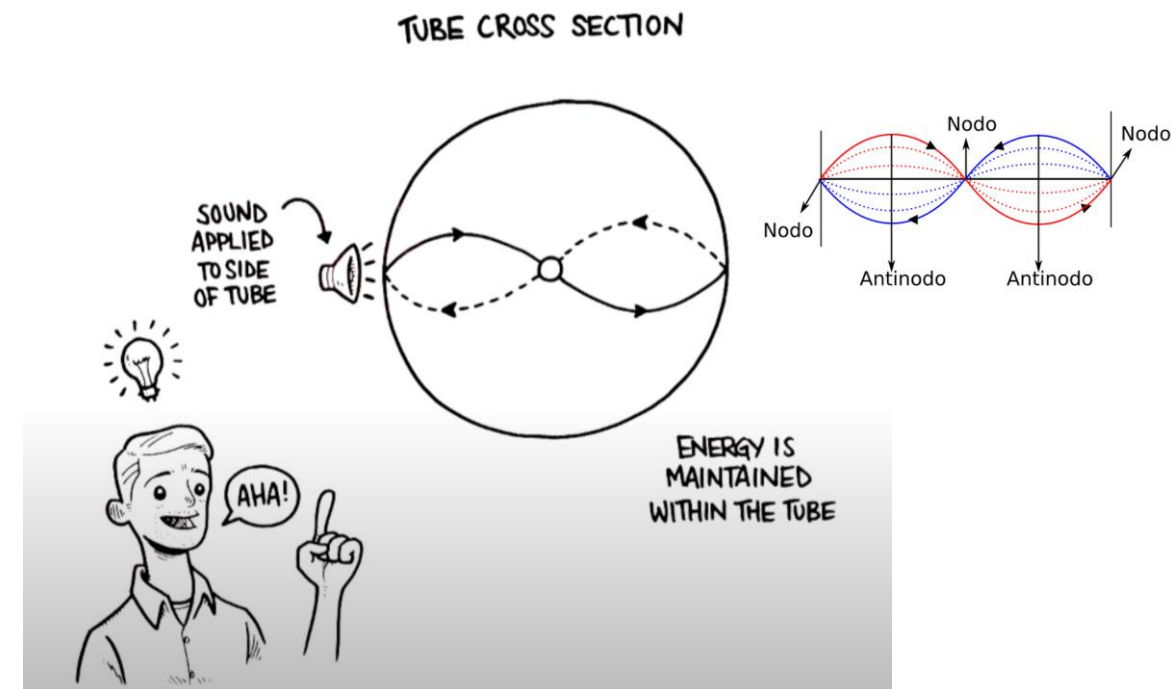
Descritta per la prima volta da Reynolds nel **1883**.

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.



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

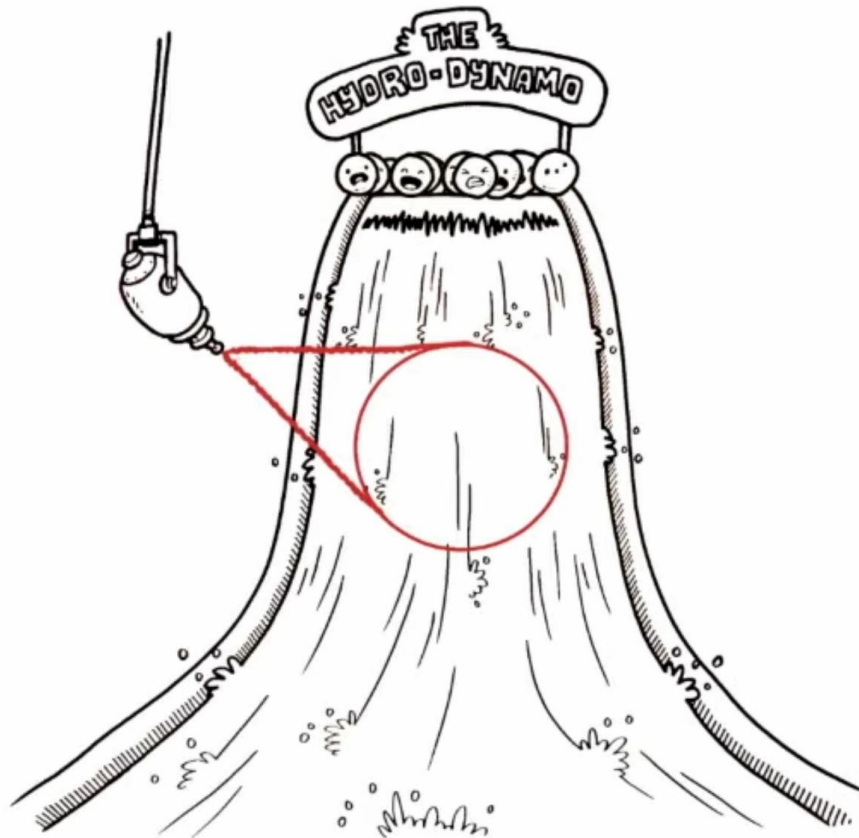
La focalizzazione acustica si basa sulla ridistribuzione di oggetti con diversa densità nei **nodi** e negli **antinodi** dell'onda acustica stazionaria.



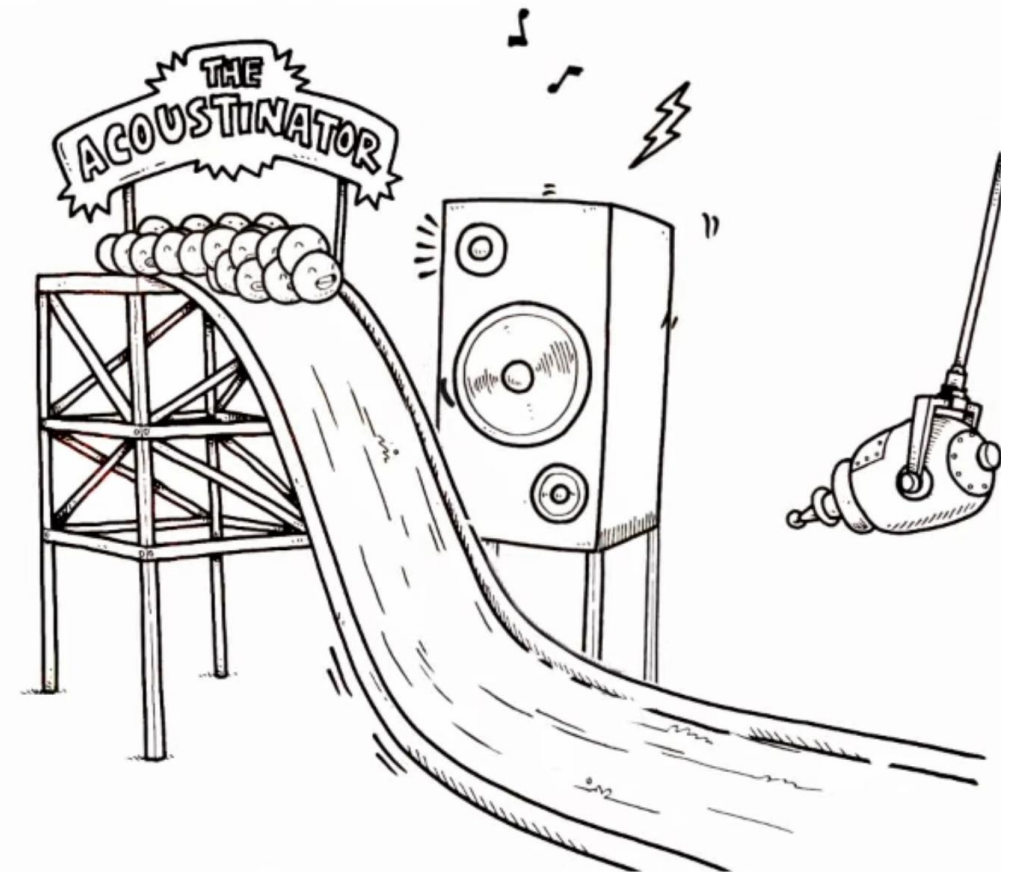
Idrodinamica

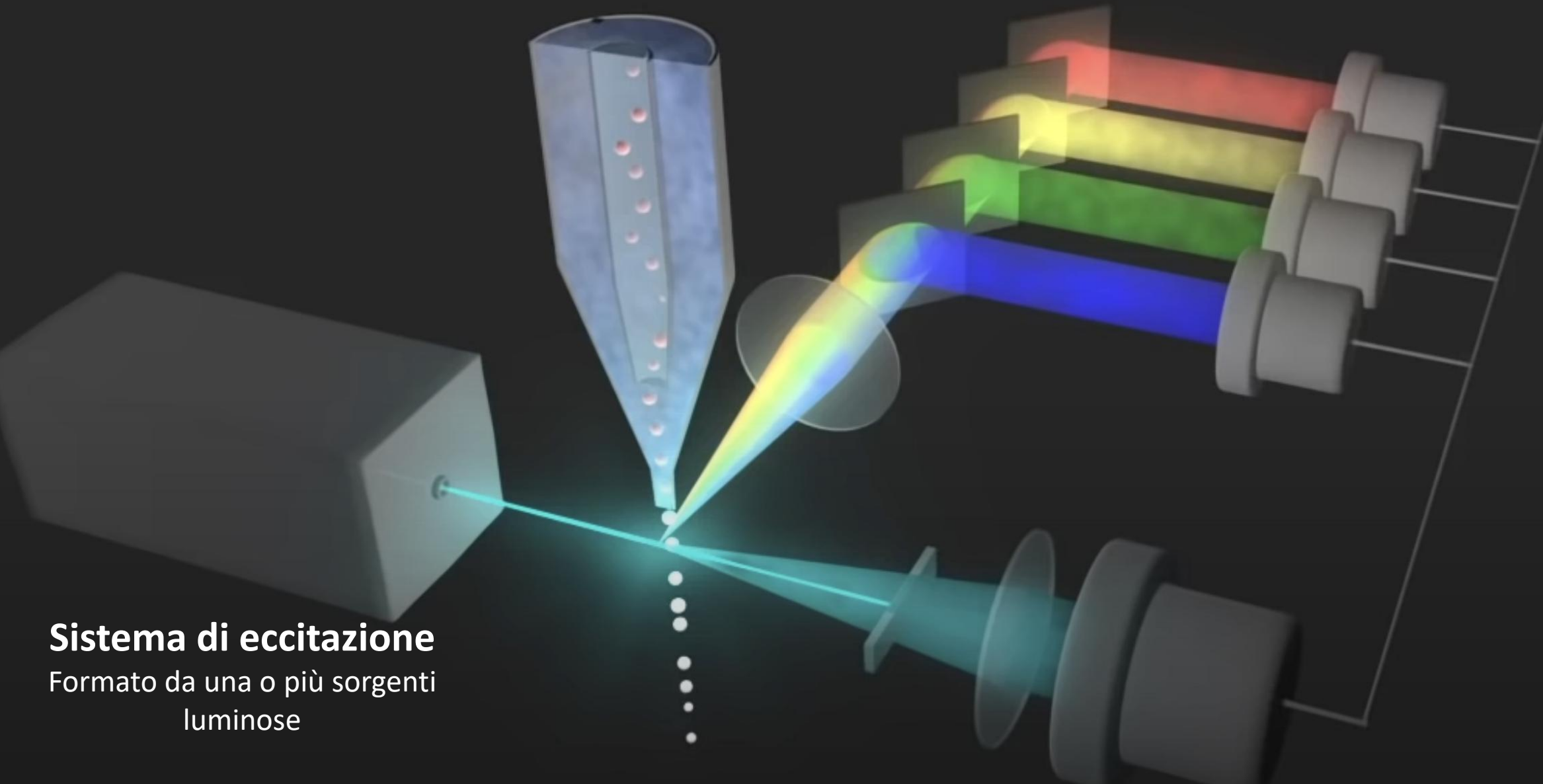
Focalizzazione del flusso

Acustica

 $10\mu\text{L}/\text{min}$ 

Efficiente e poco costosa

 $1000\mu\text{L}/\text{min}$ 

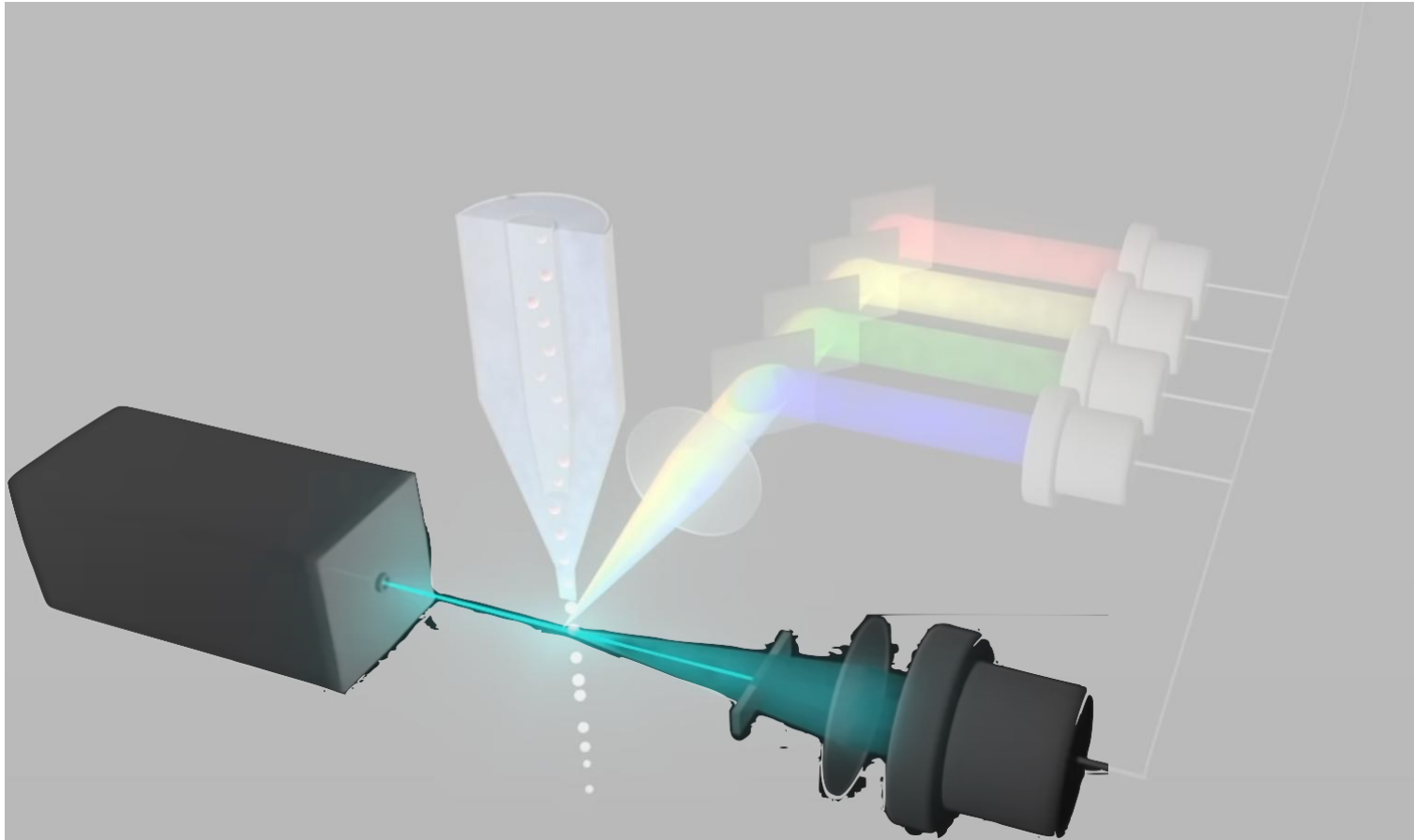


Sistema di eccitazione

Formato da una o più sorgenti
luminose

Sistema di eccitazione

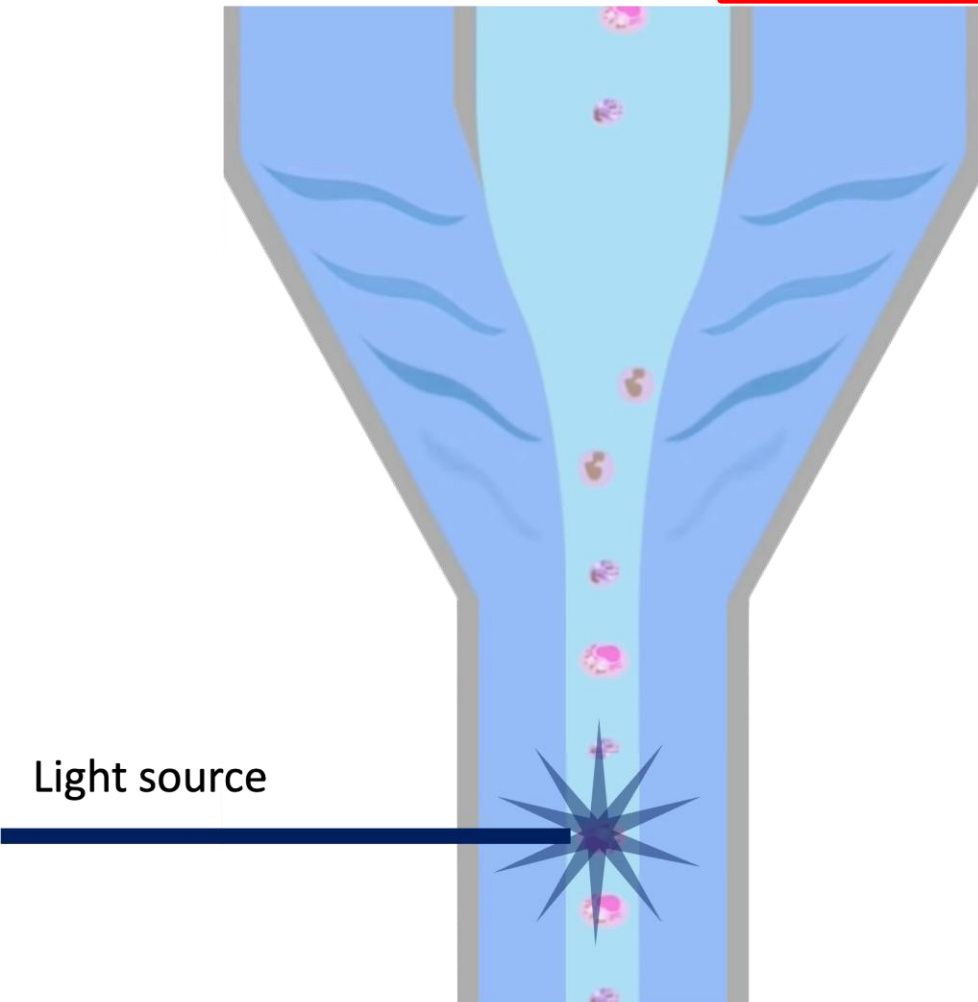
Formato da **una o più**
sorgenti luminose



Sistema di eccitazione

Formato da **una o più** sorgenti luminose

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

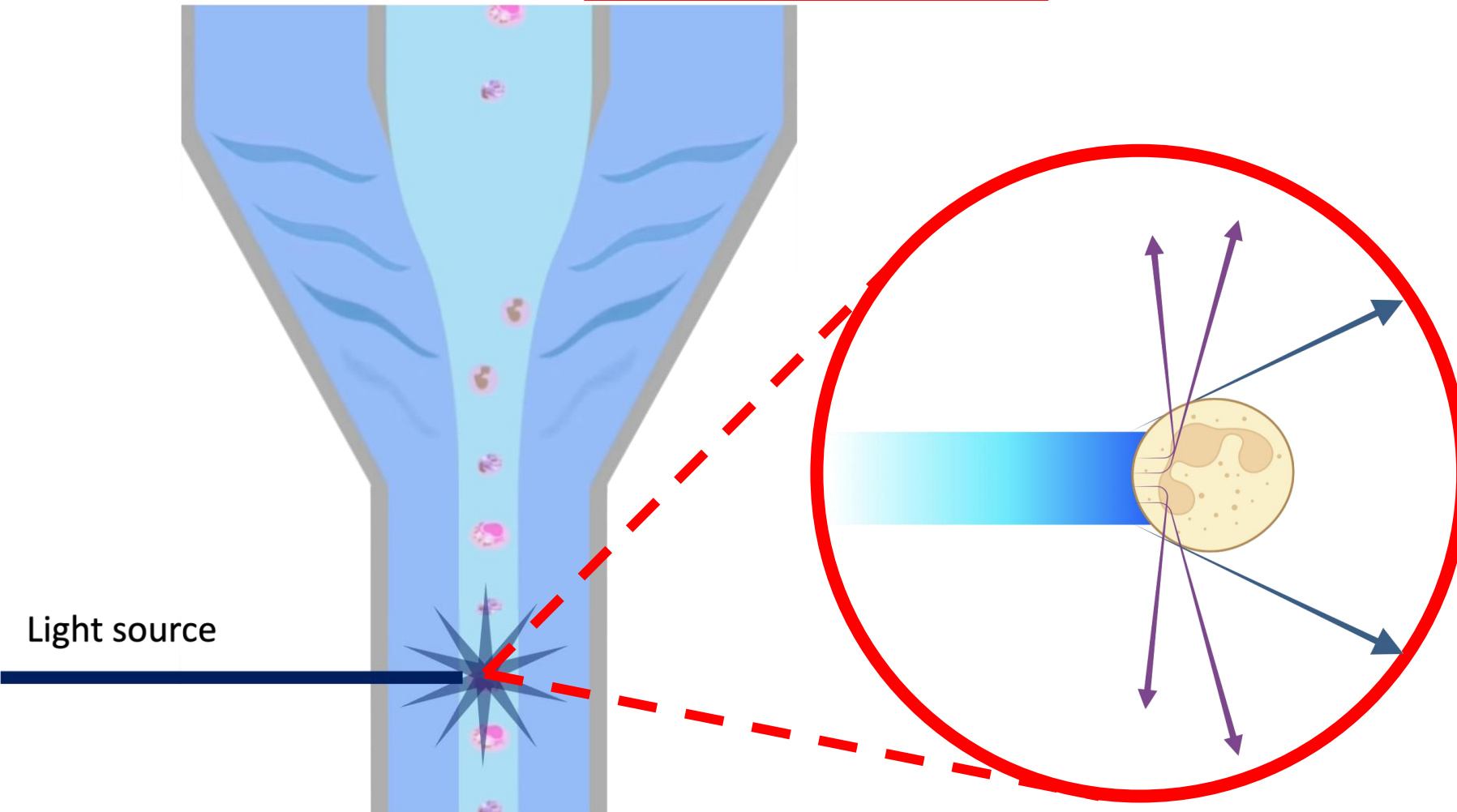


Sistema di eccitazione

Formato da **una o più** sorgenti luminose

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

L'**interazione** tra il **fascio di luce** con una **cellula** dà luogo a fenomeni di



Sistema di eccitazione

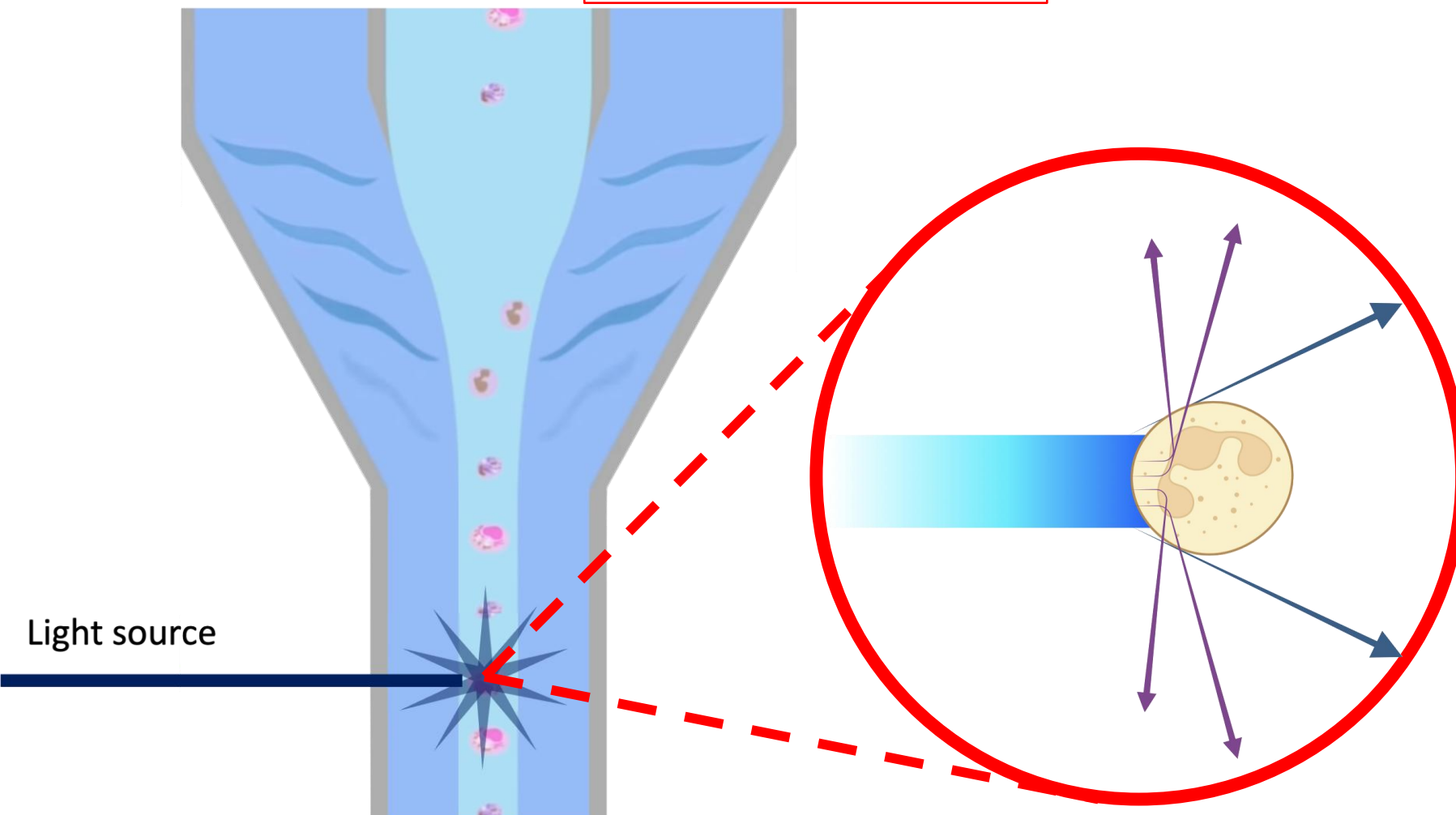
Formato da **una o più** sorgenti luminose

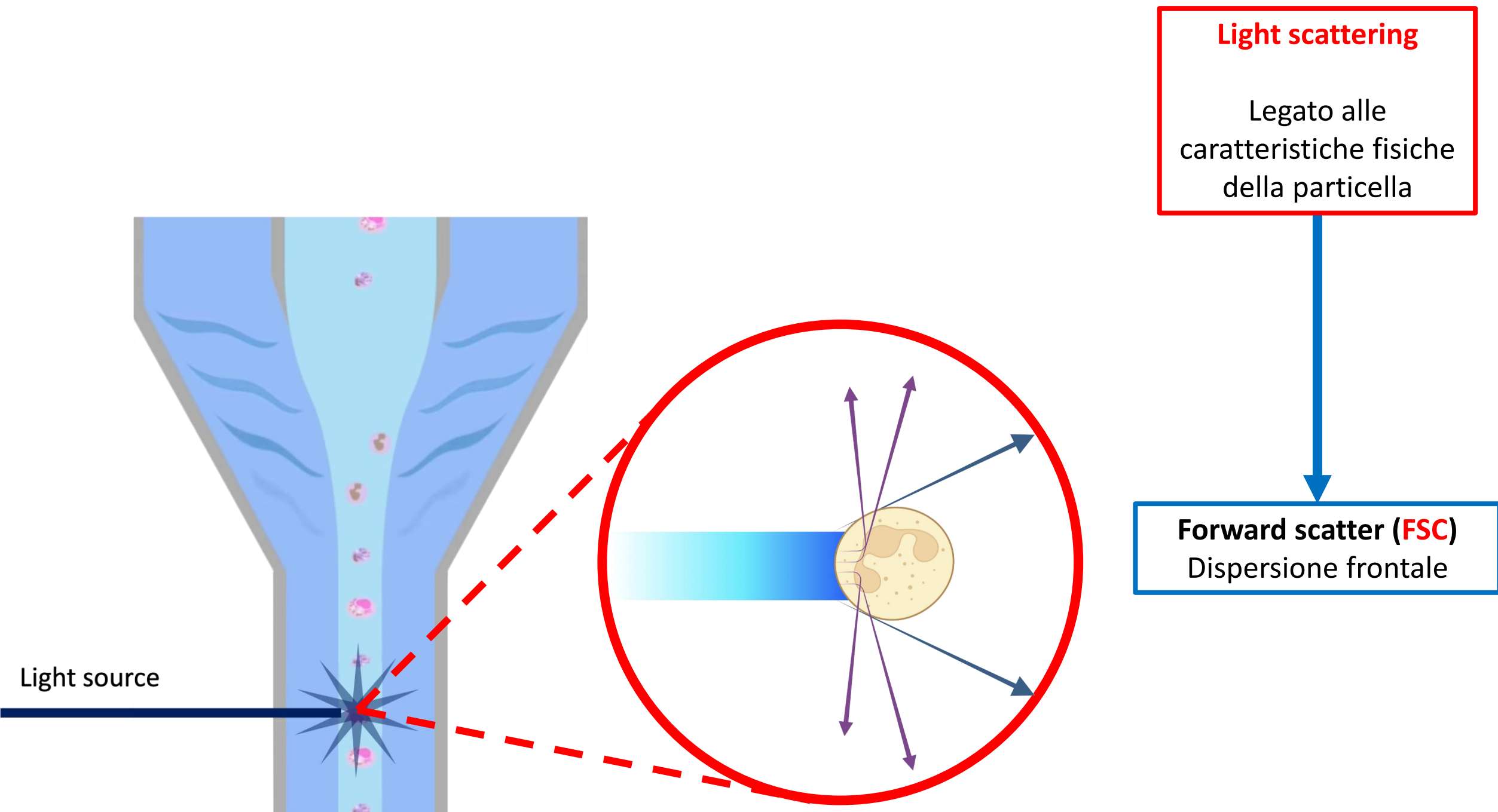
Generano segnali monocromatici e unidirezionali che intercettano le cellule nella cella di analisi

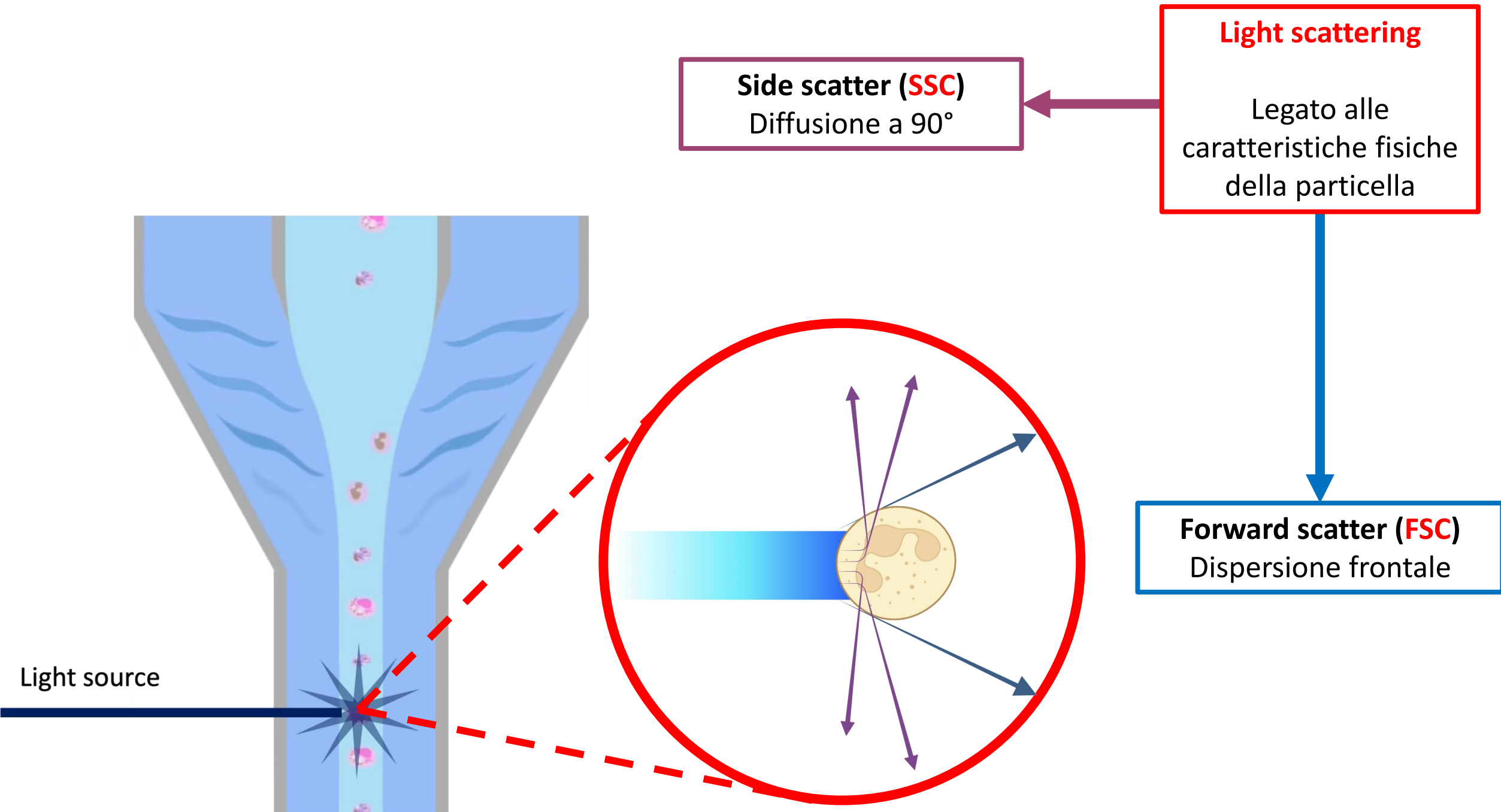
L'**interazione** tra il **fascio di luce** con una **cellula** dà luogo a fenomeni di

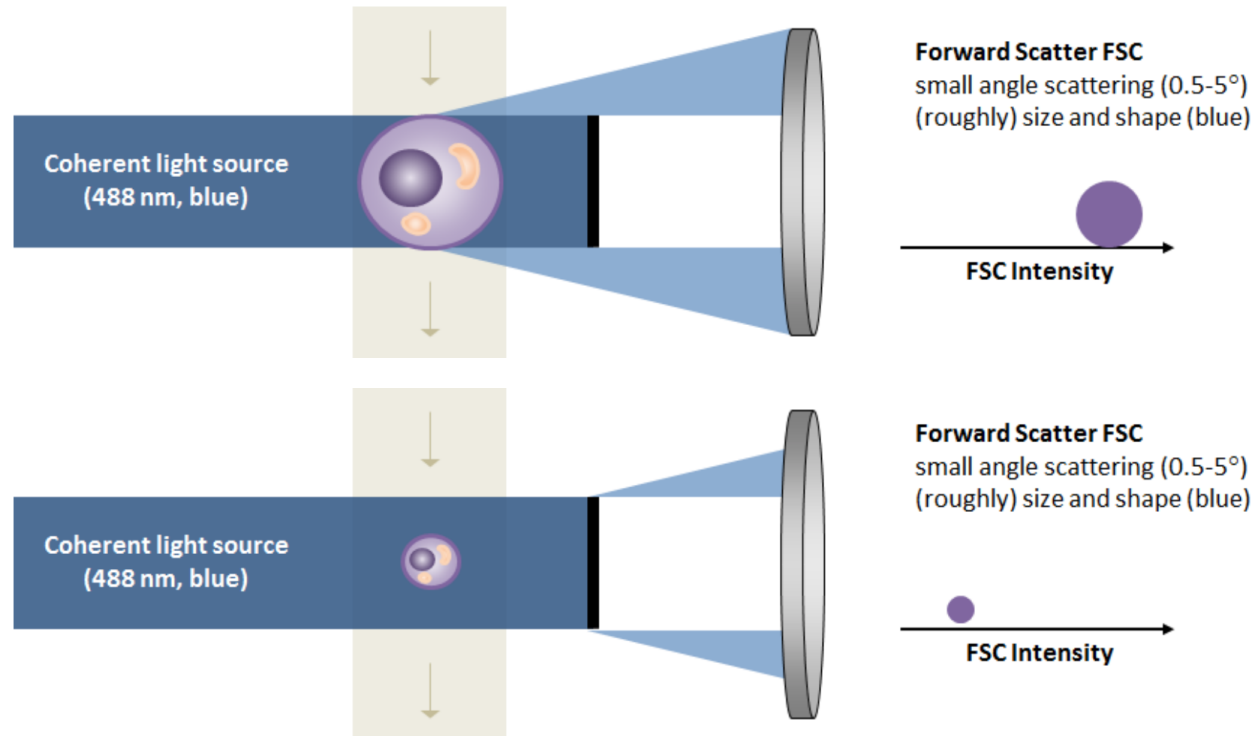
Light scattering

Legato alle caratteristiche fisiche della particella





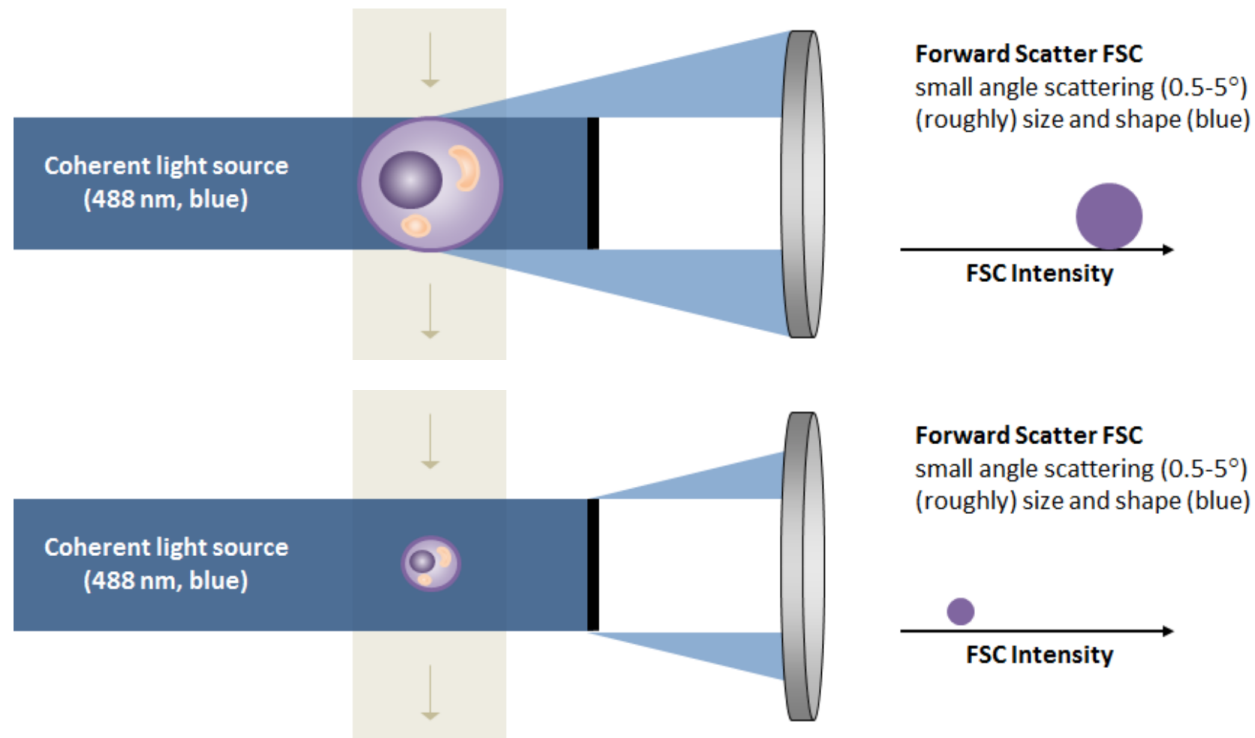


**Light scattering**

Legato alle
caratteristiche fisiche
della particella

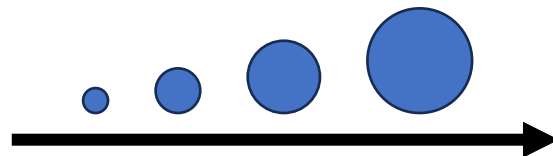
Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

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

**Light scattering**

Legato alle
caratteristiche fisiche
della particella

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

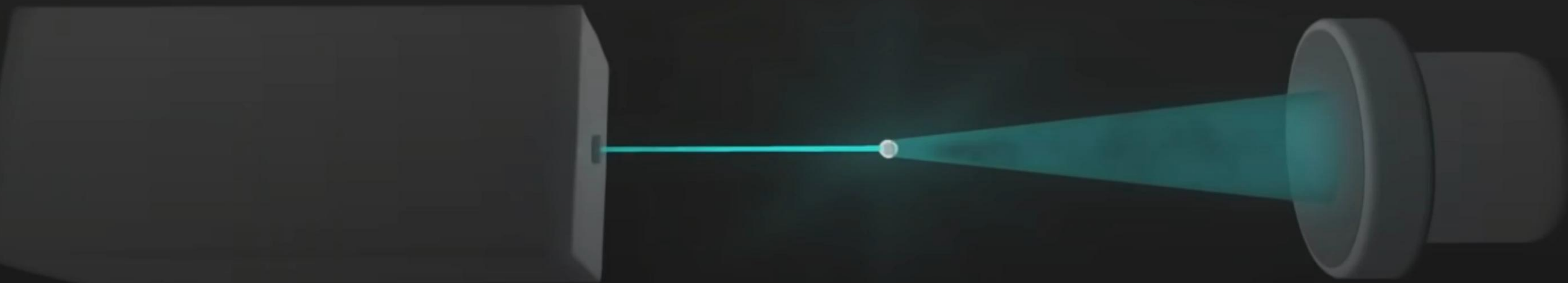


L'intensità del
Forward Scatter (FSC)
è proporzionale alla
dimensione e alla **forma**
delle cellule

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

Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

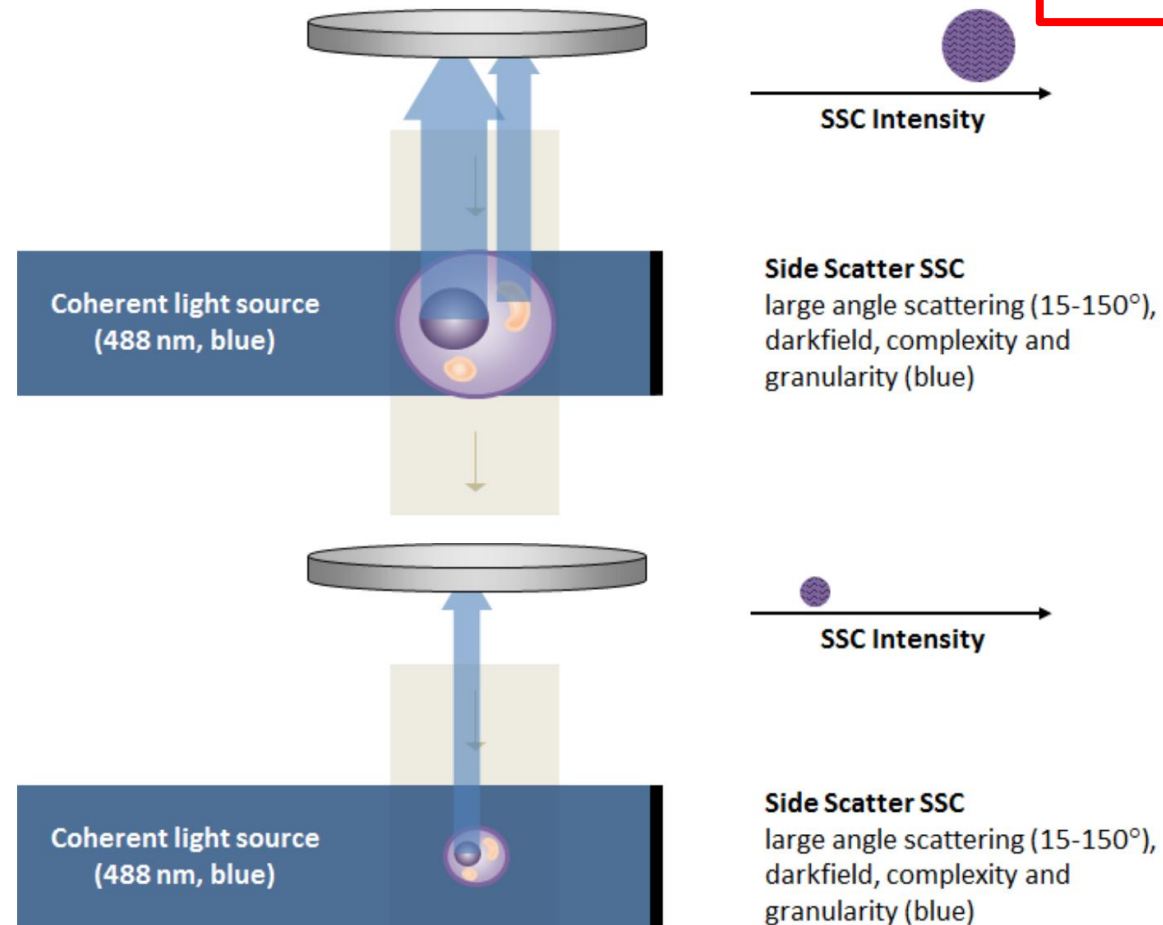


L'angolo di dispersione dipende dalla
composizione interna della cellula

Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

Light scattering

Legato alle
caratteristiche fisiche
della particella



L'angolo di dispersione dipende dalla
composizione interna della cellula

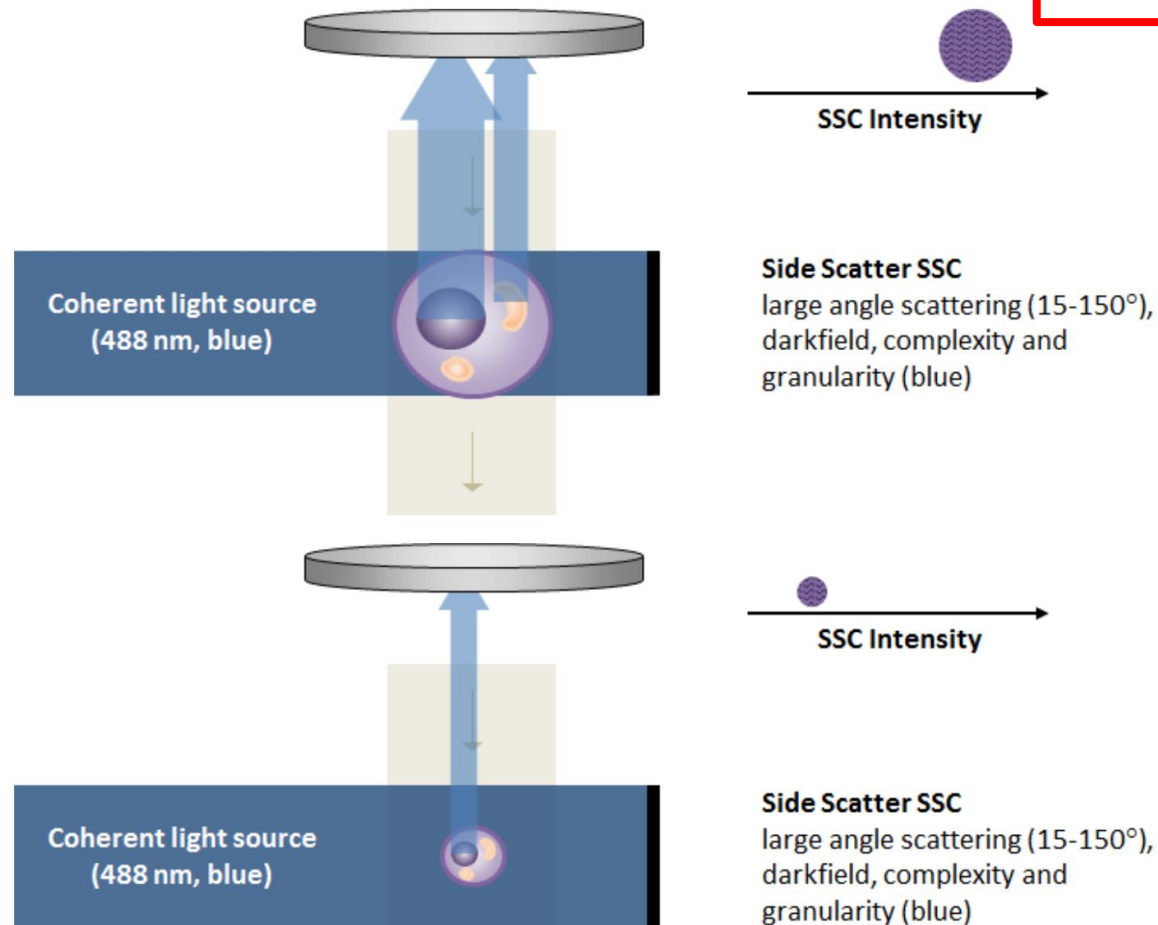
Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

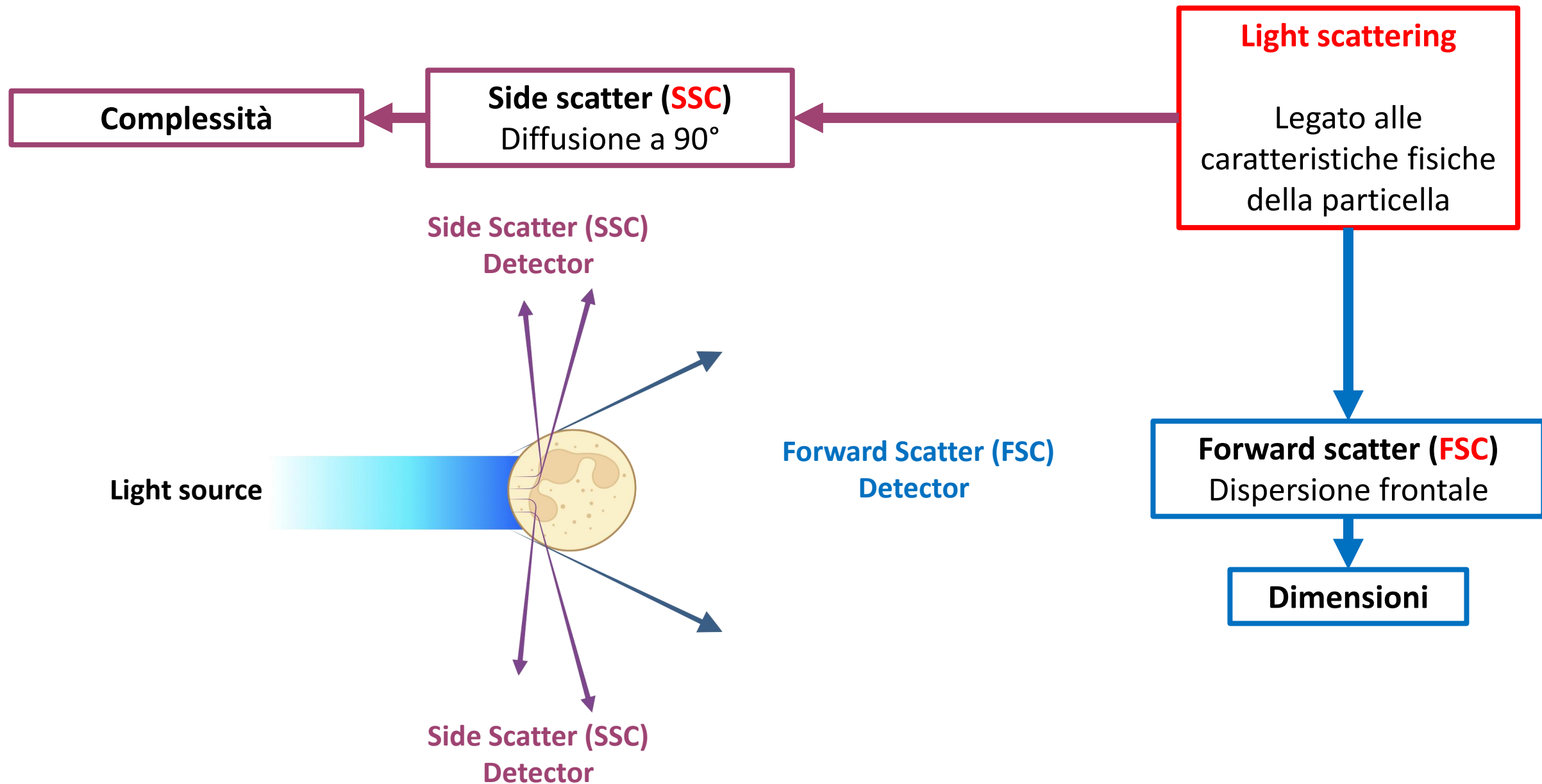
Light scattering

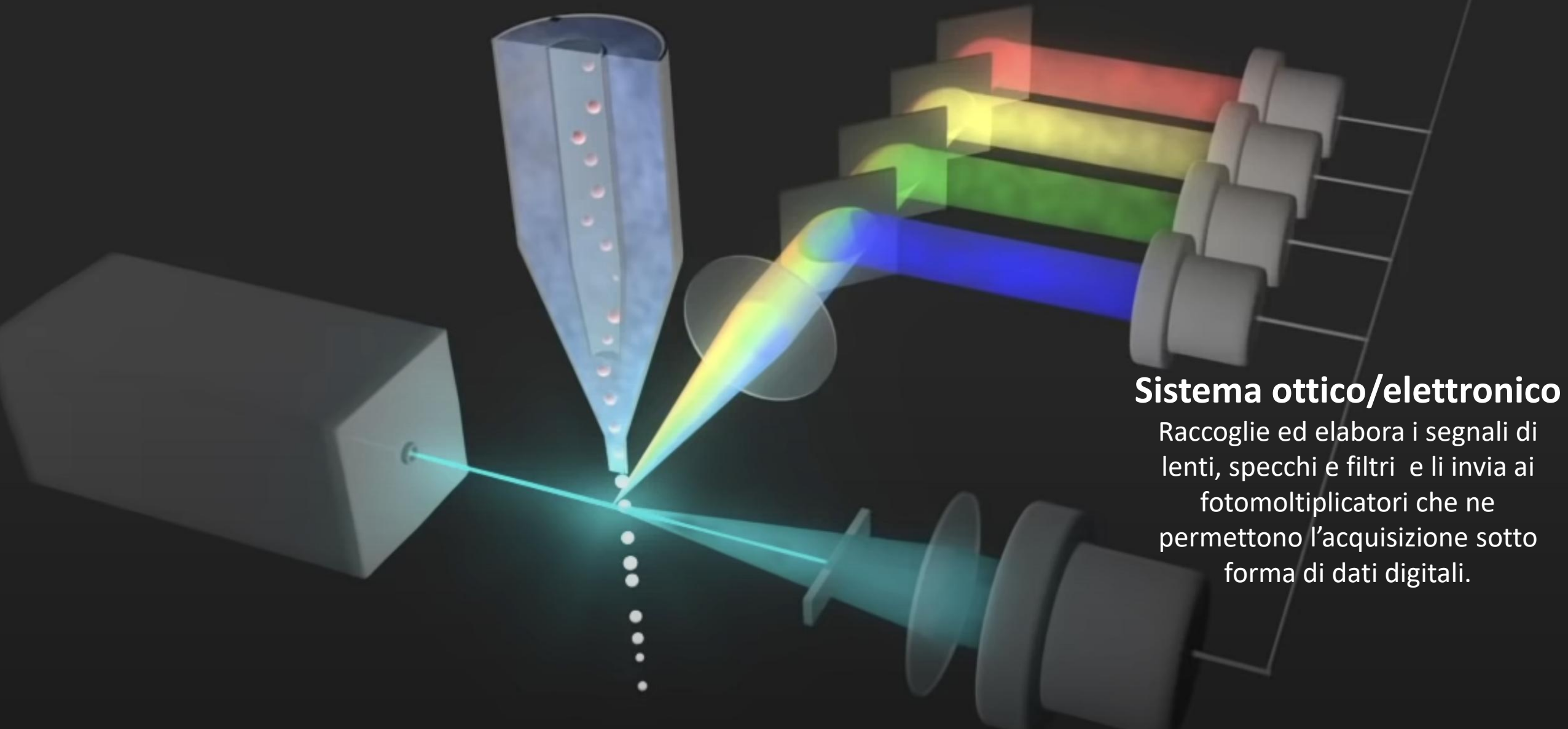
Legato alle
caratteristiche fisiche
della particella



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







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.

Citofluorimetria

Lo strumento

Sistema ottico/elettronico

Complessità

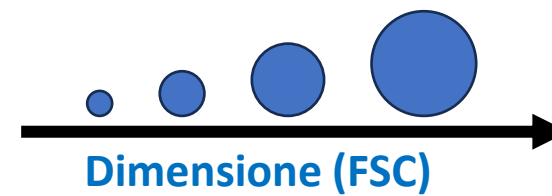
Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)

Dispersione frontale

Dimensioni



Ogni punto rappresenta una **singola**
cellula

Complessità

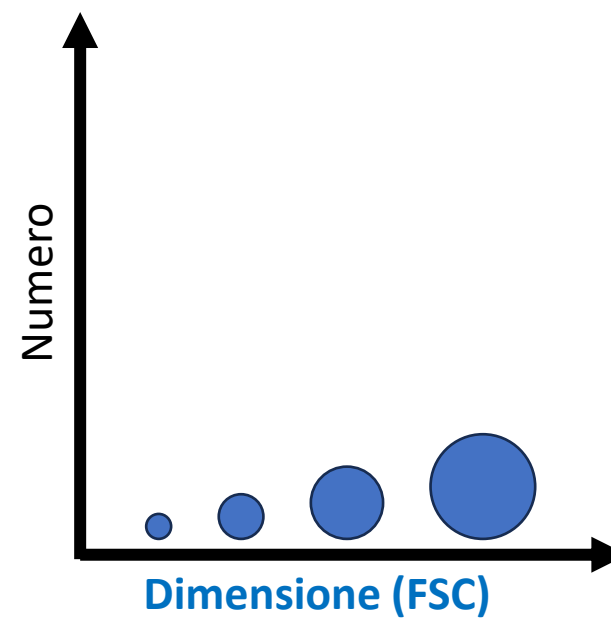
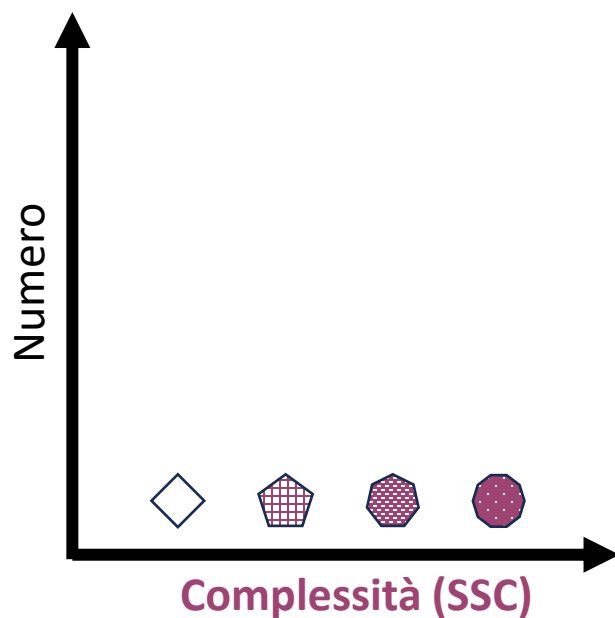
Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)

Dispersione frontale

Dimensioni



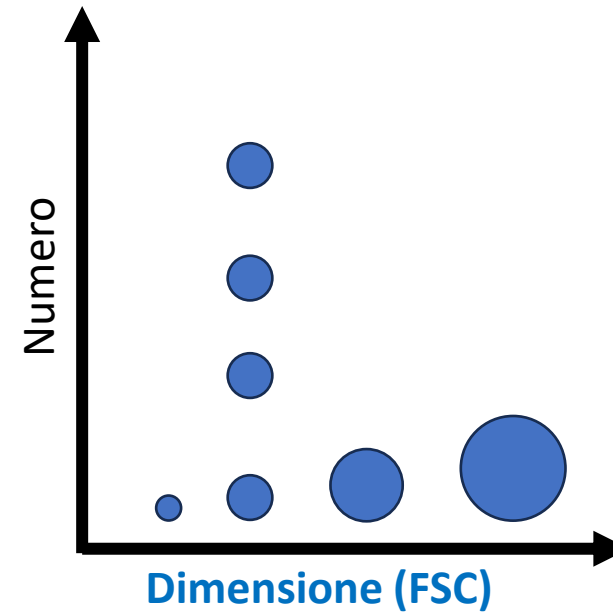
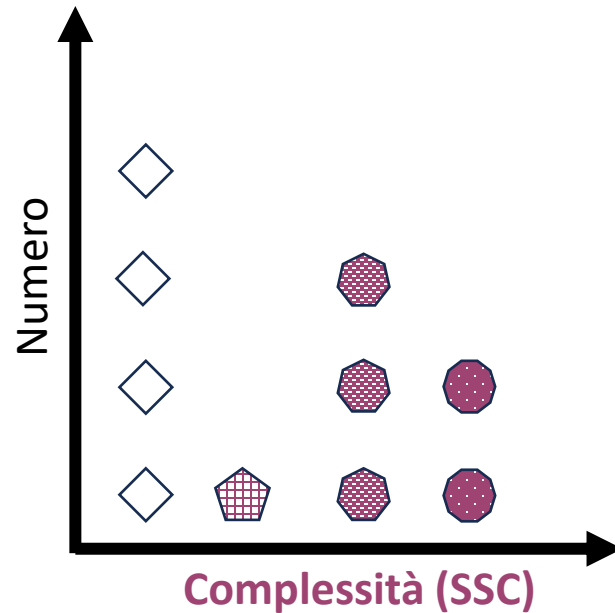
Ogni punto rappresenta una **singola**
cellula

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**

Complessità

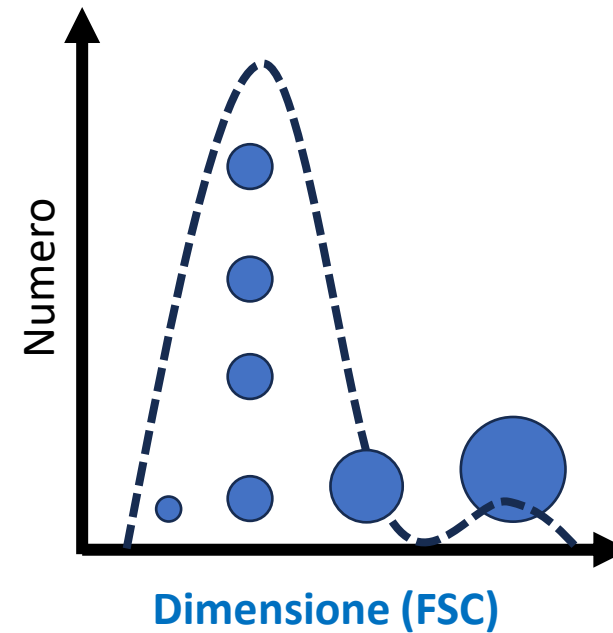
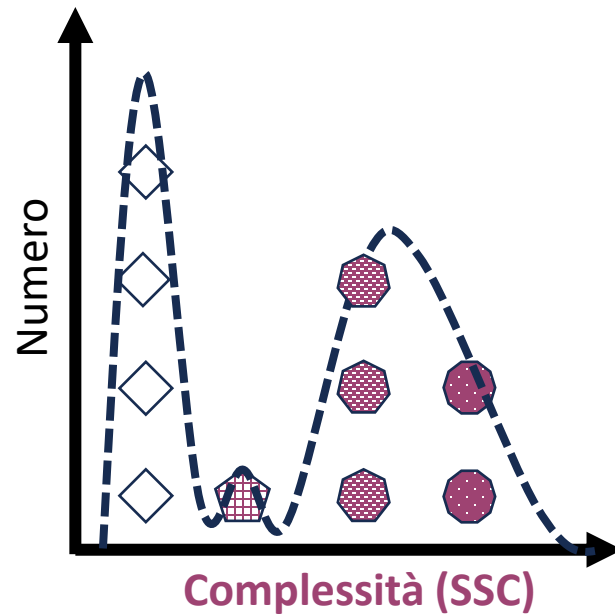
Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)

Dispersione frontale

Dimensioni



Ogni punto rappresenta una **singola** cellula

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

Complessità

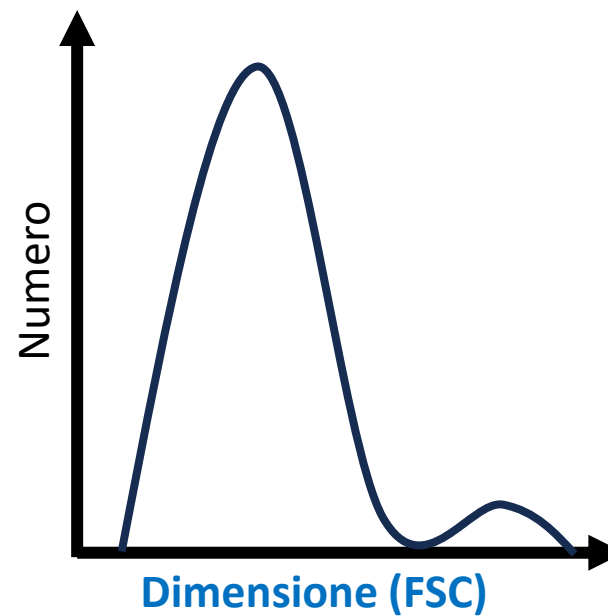
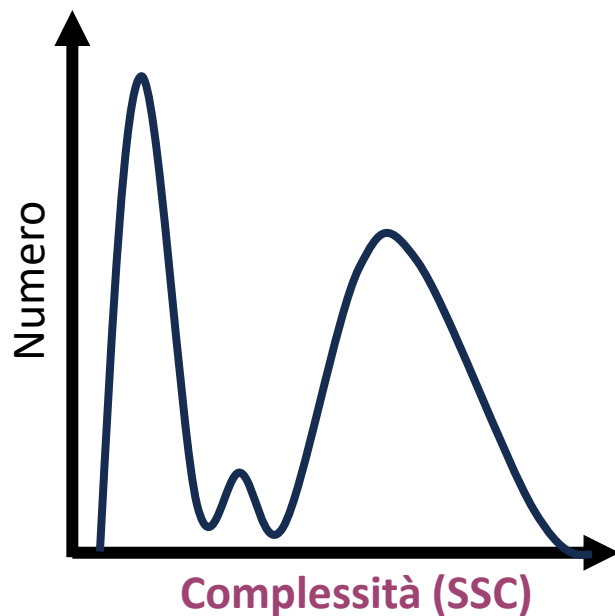
Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)

Dispersione frontale

Dimensioni



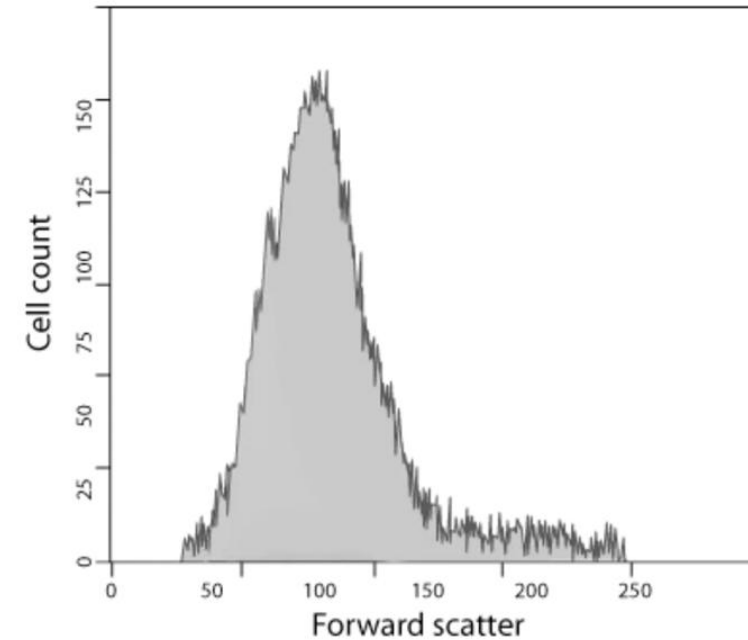
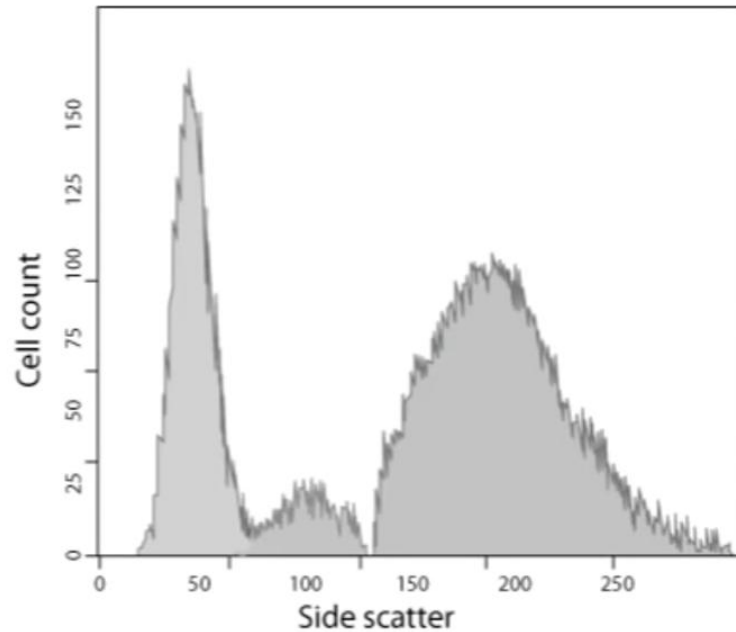
Ogni punto rappresenta una **singola**
cellula

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

Complessità

Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°**Forward scatter (FSC)**
Dispersione frontale

Dimensioni



Ogni punto rappresenta una **singola**
cellula

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

Complessità

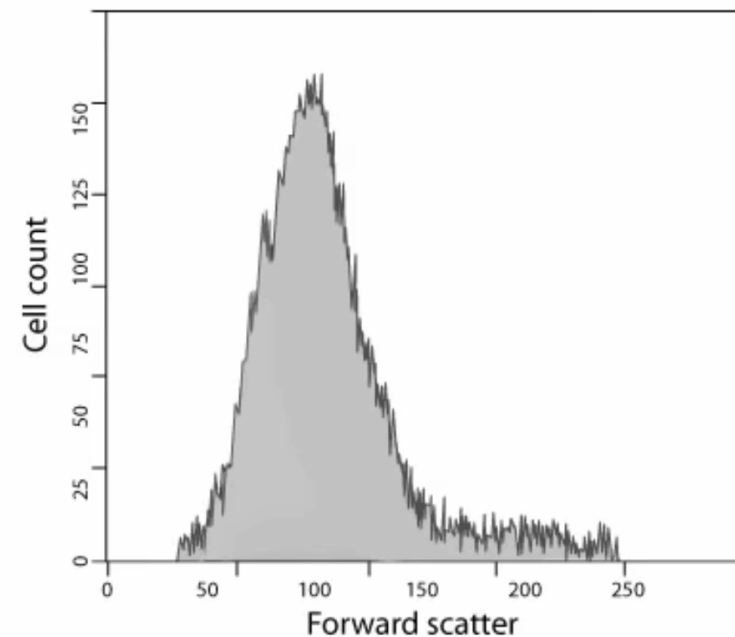
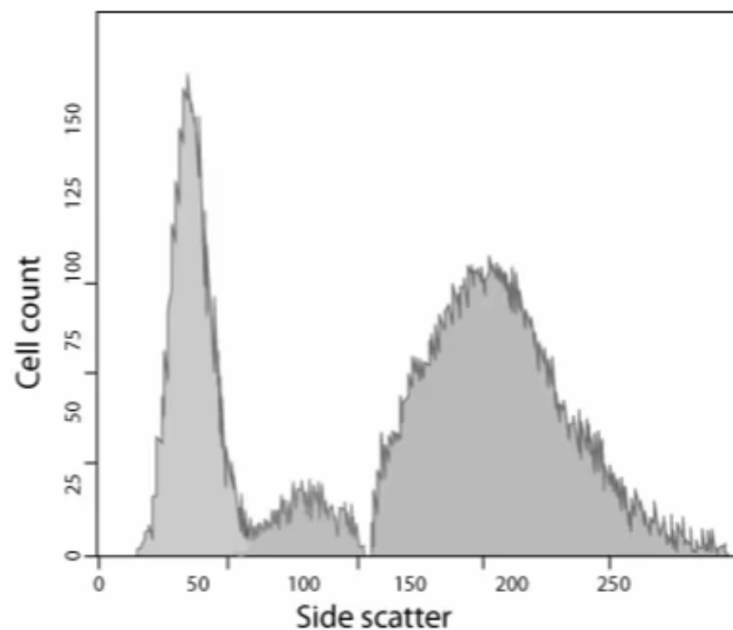
Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

Forward scatter (FSC)

Dispersione frontale

Dimensioni



Ogni punto rappresenta una **singola** cellula

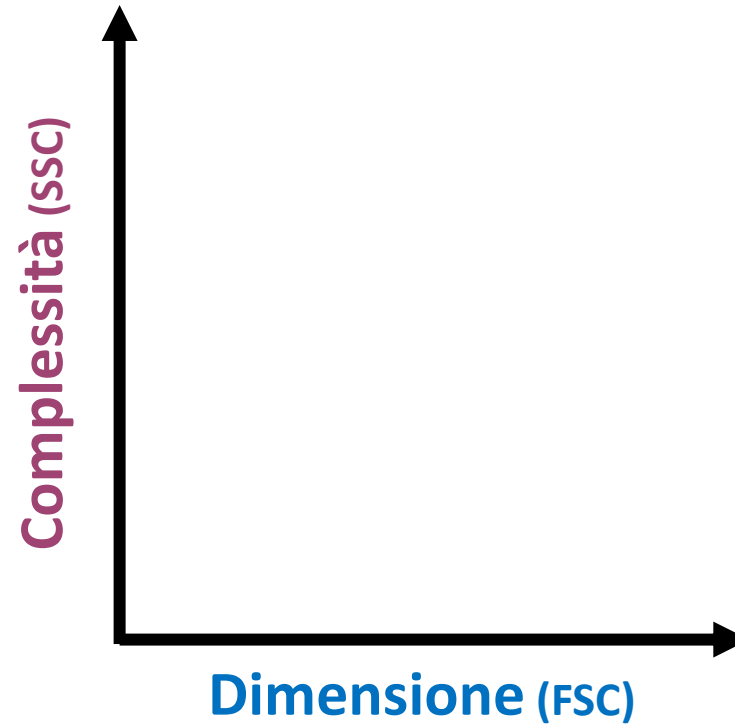
Grafico **monodimensionale**
o **ISTOGRAMMA**

La **combinazione di due**
citogrammi



Dot plot

Bidimensionale

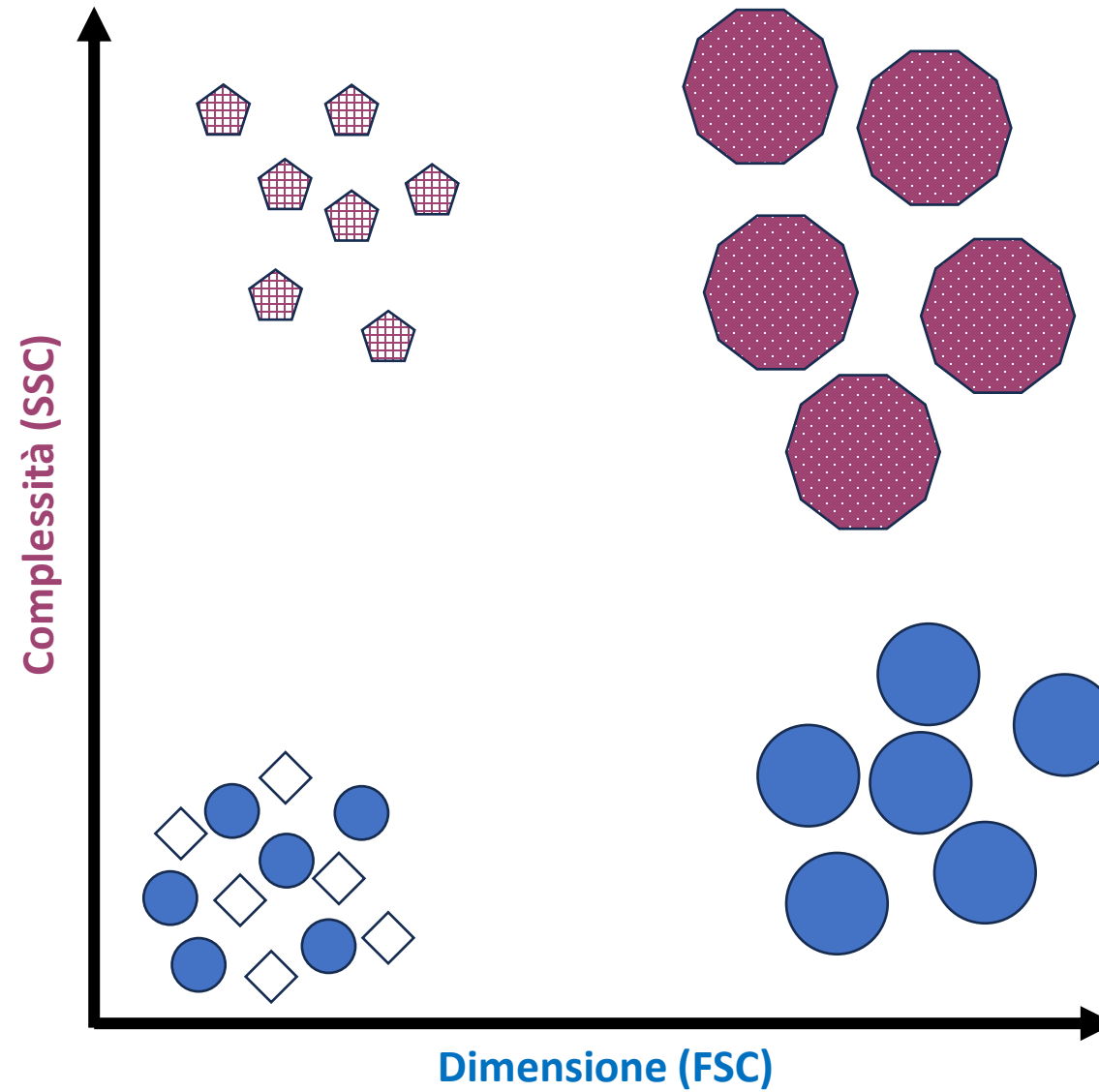


La **combinazione di due**
citogrammi



Dot plot

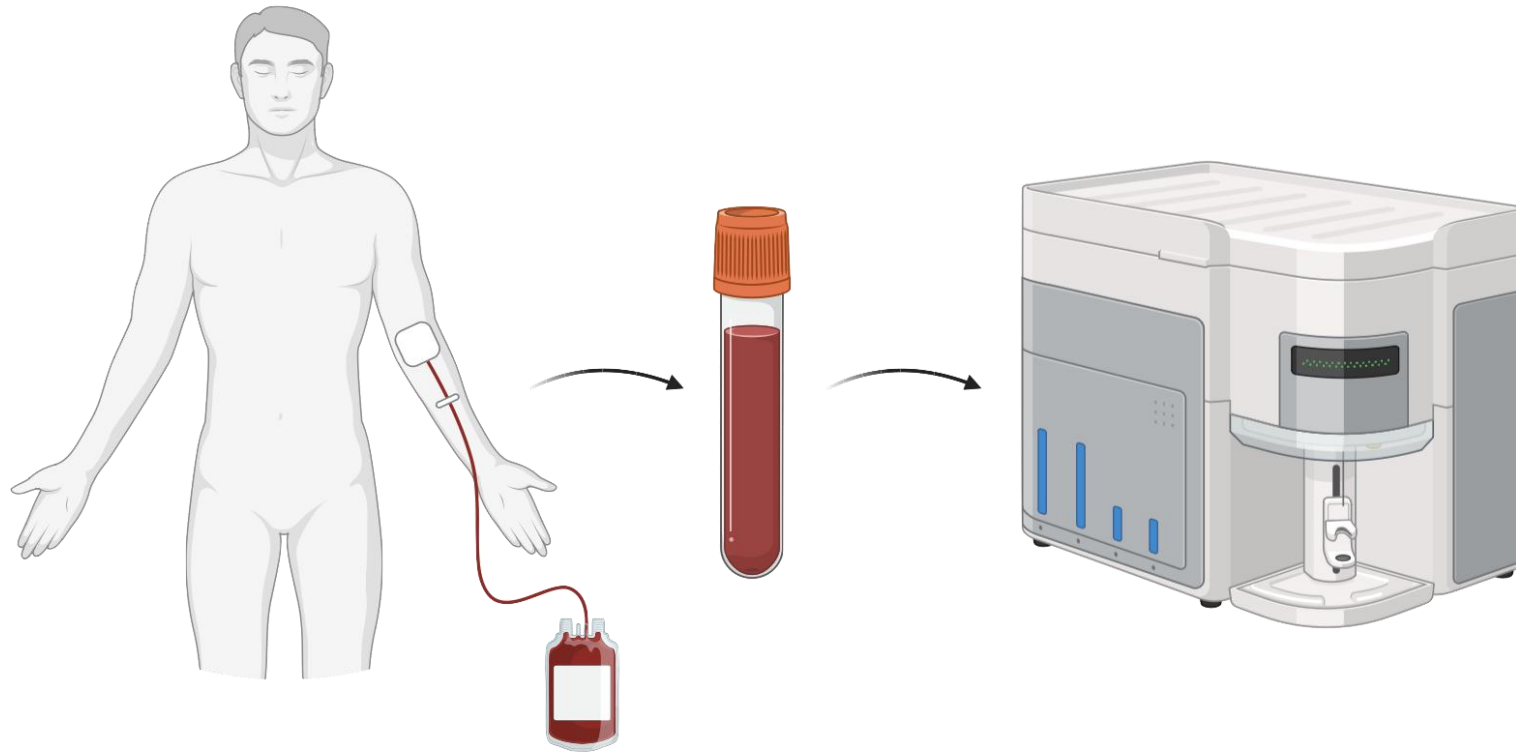
Bidimensionale

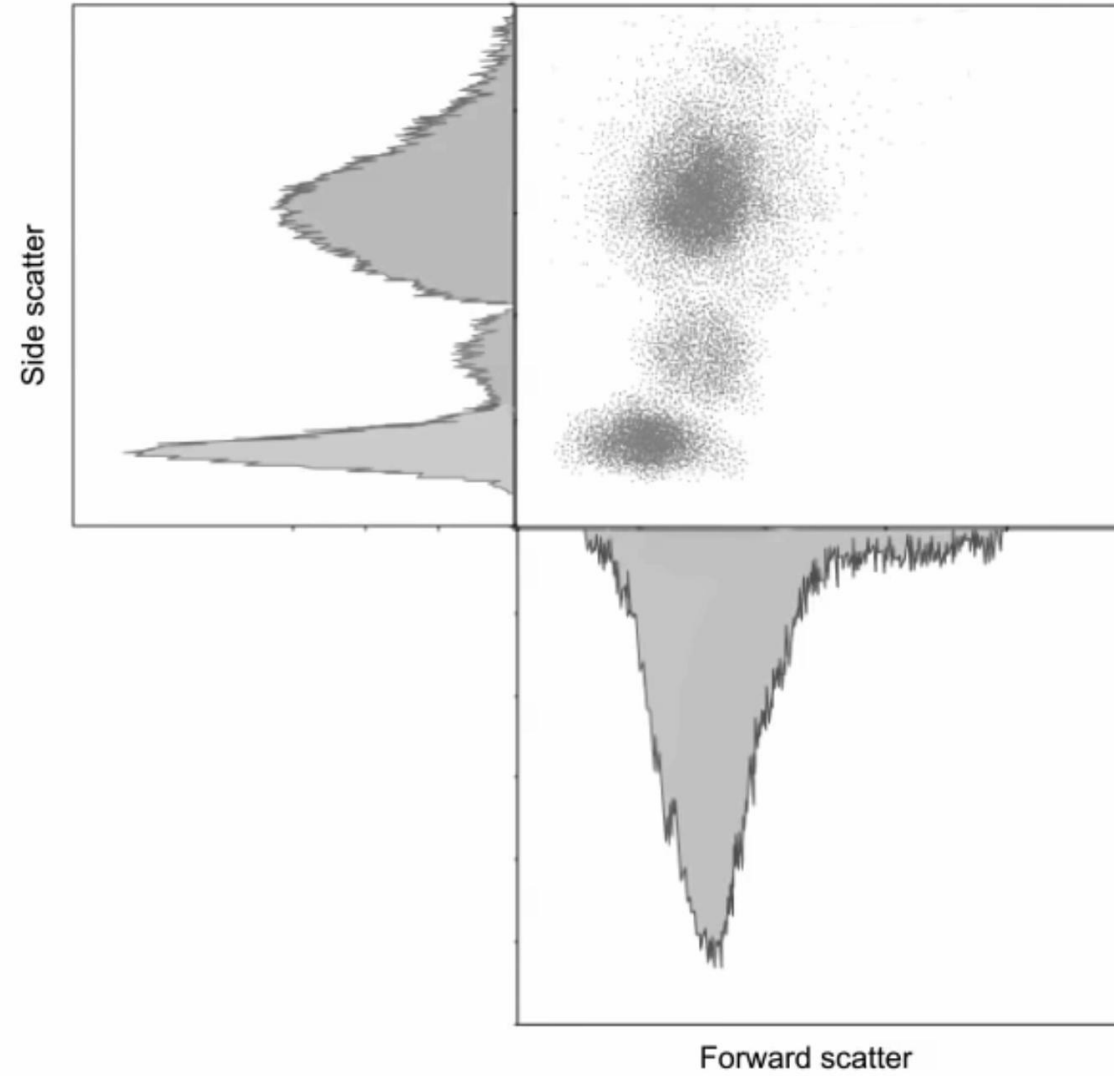
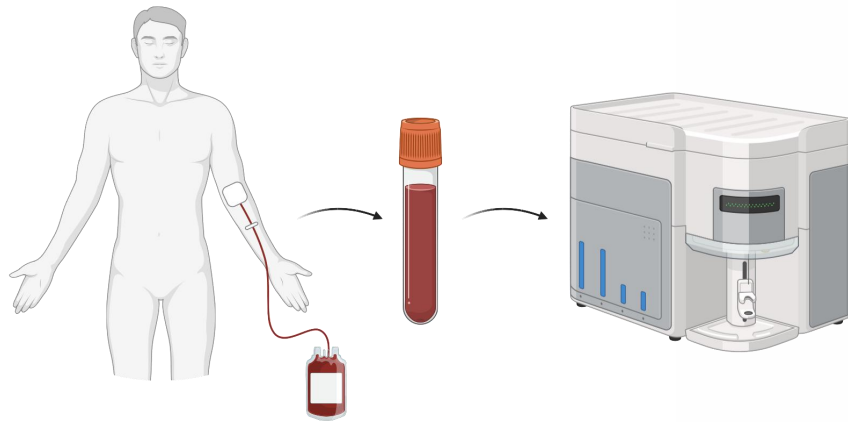


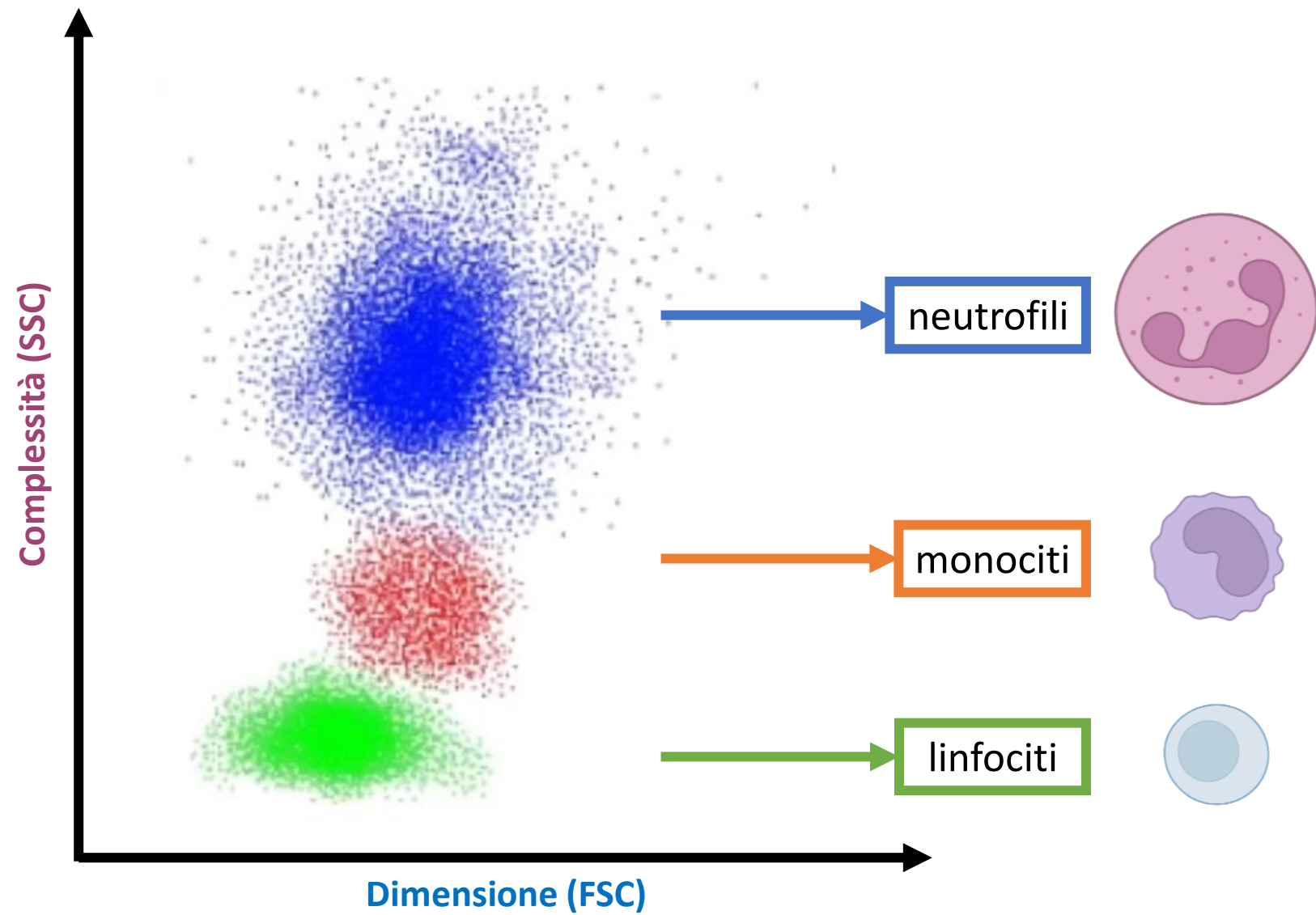
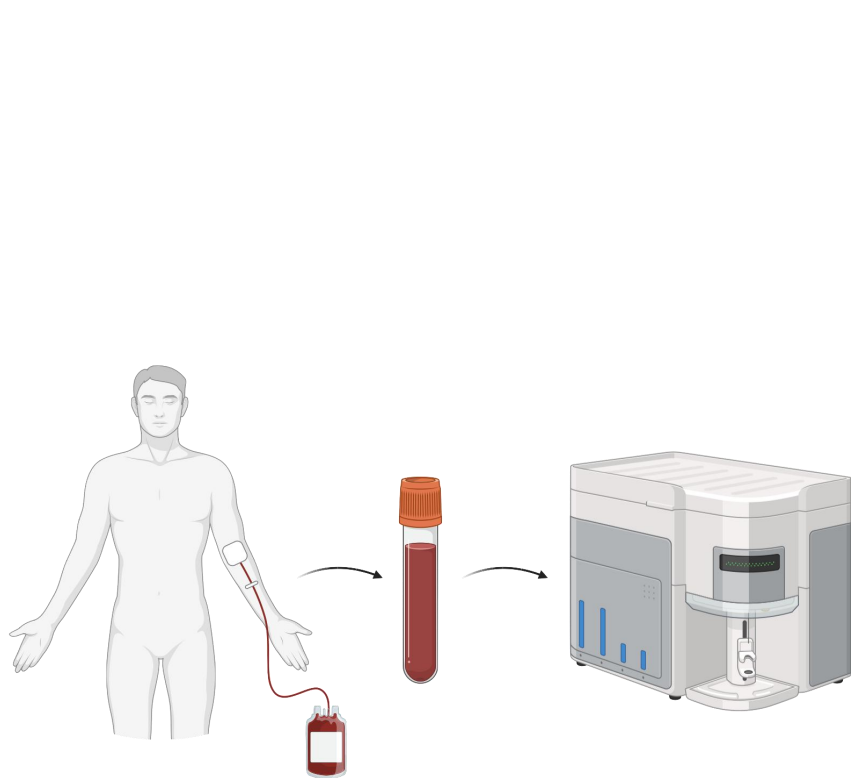
...ma dal punto di vista pratico...

Posso analizzare il sangue umano?









Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

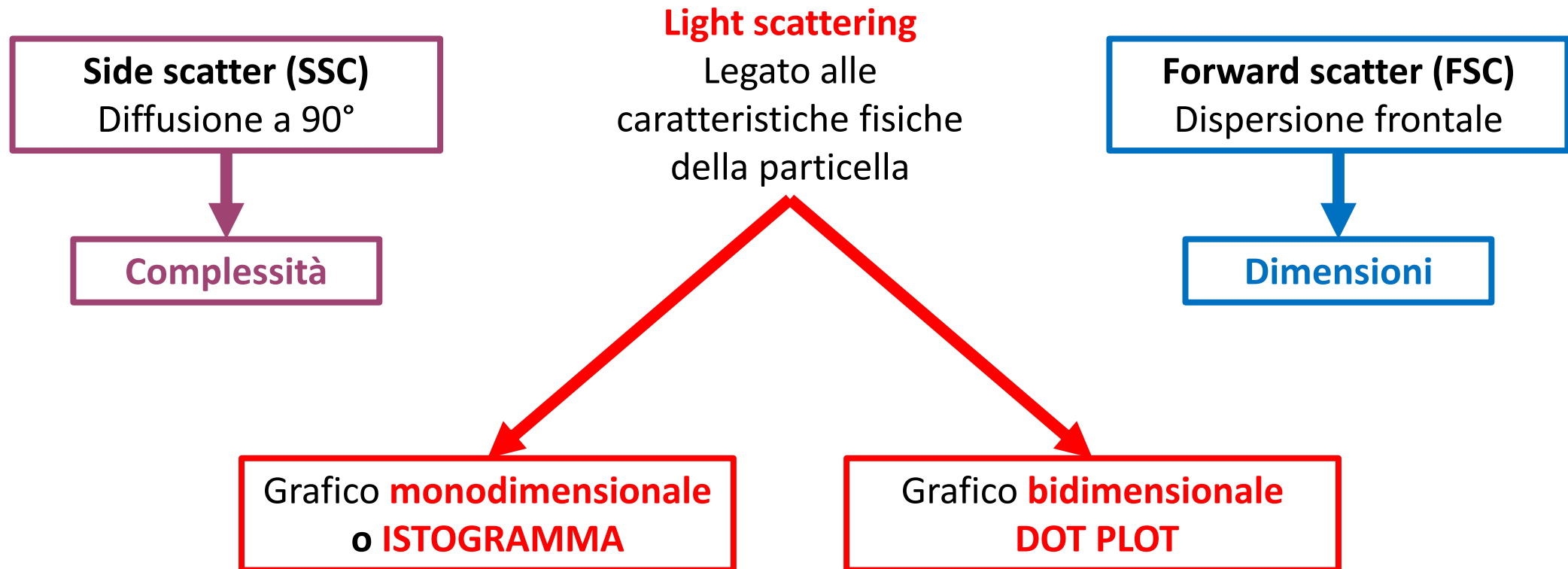
**Complessità****Light scattering**

Legato alle
caratteristiche fisiche
della particella

Forward scatter (FSC)

Dispersione frontale

**Dimensioni**



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

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

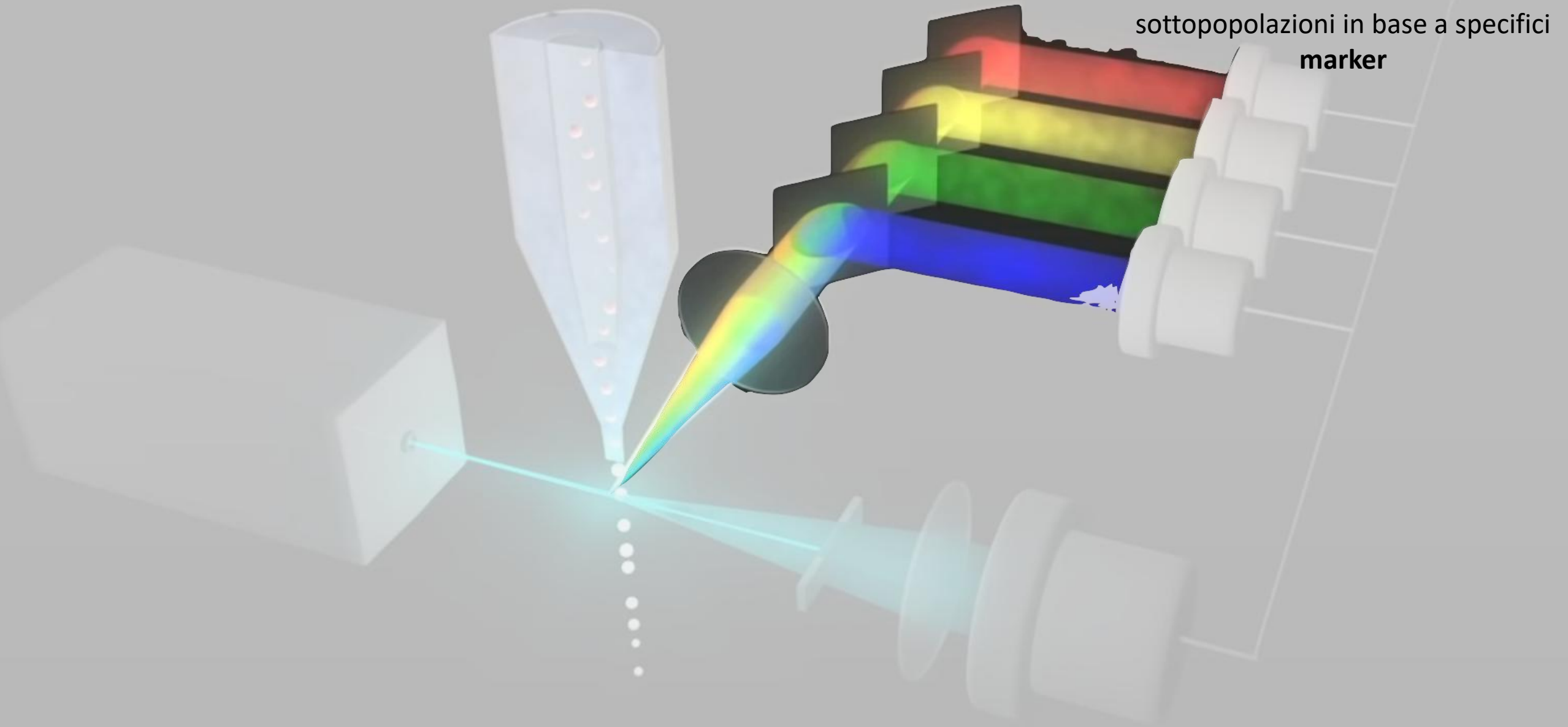


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule

Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule

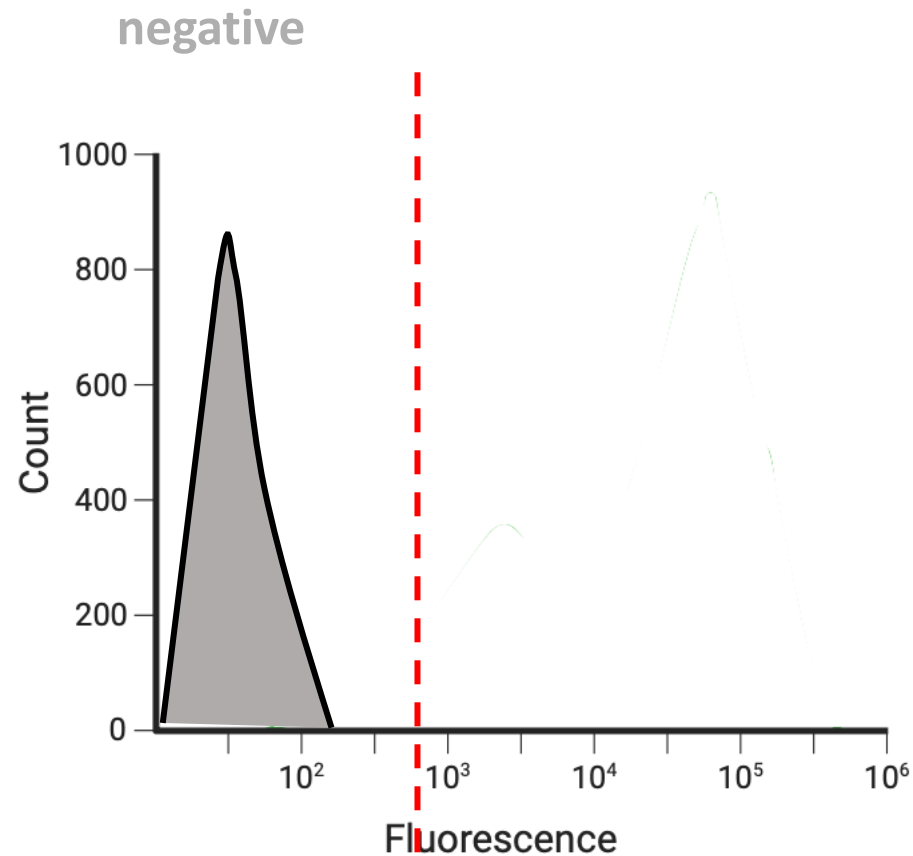
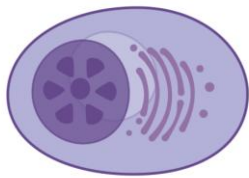


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule

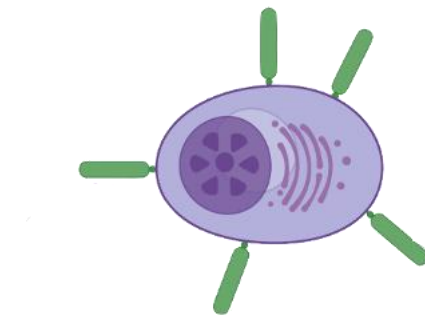
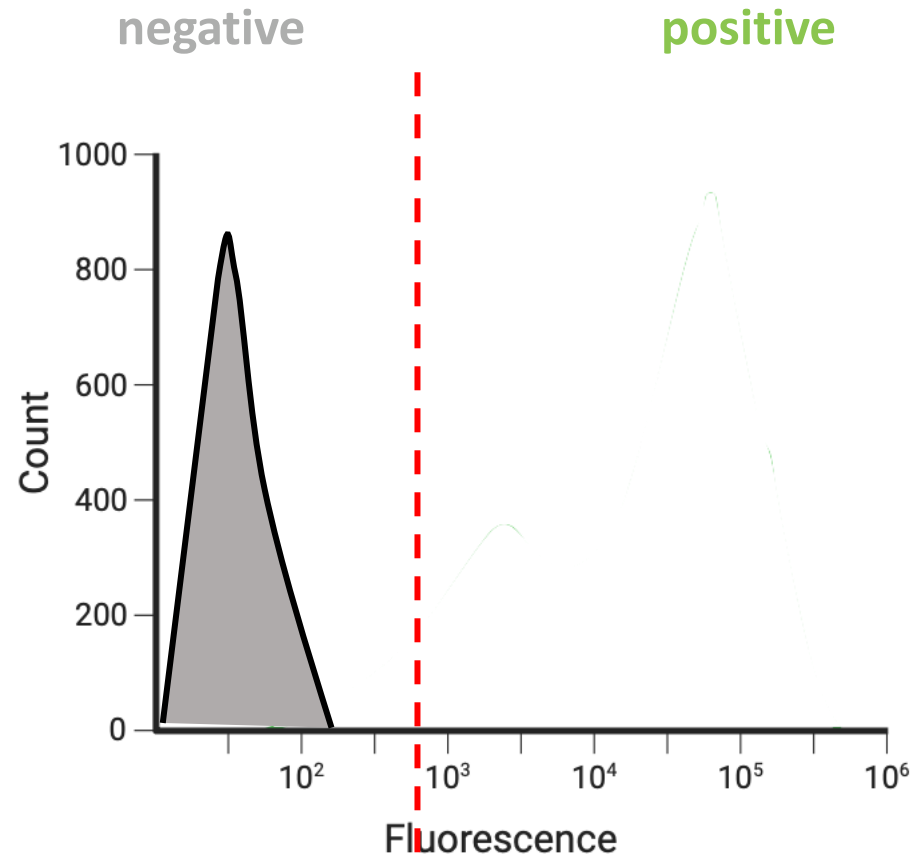
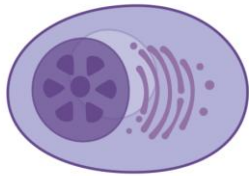


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule

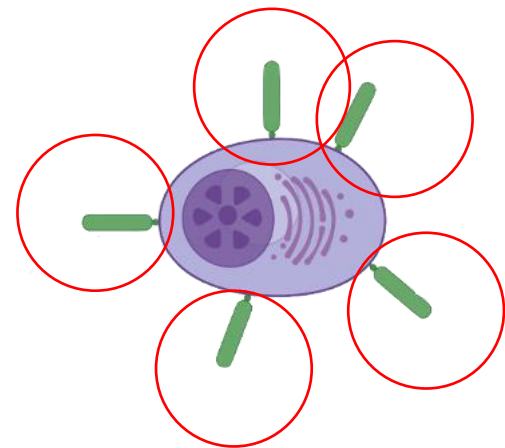
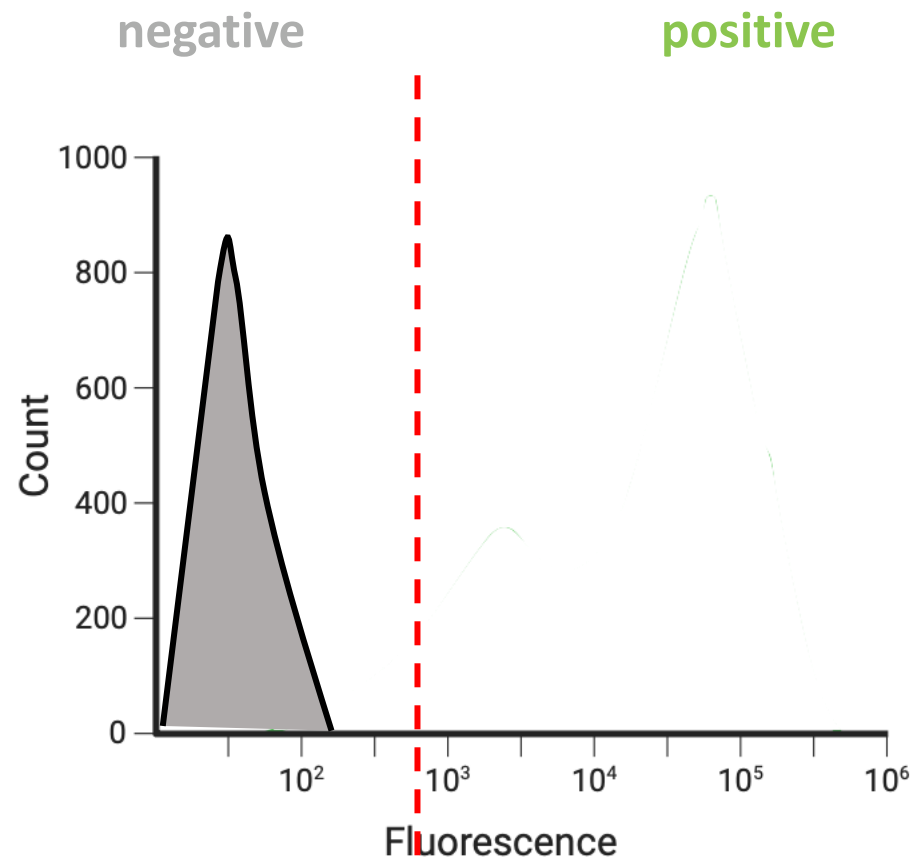
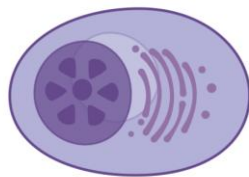


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule

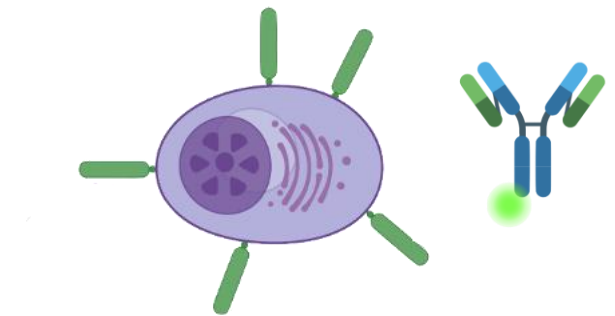
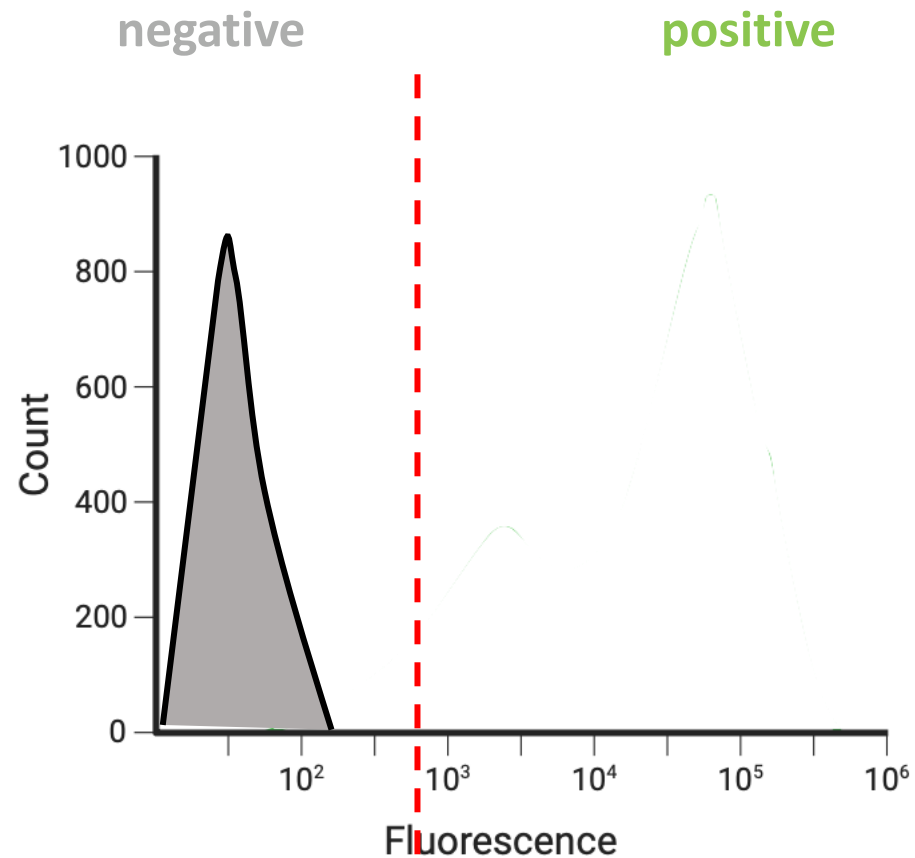
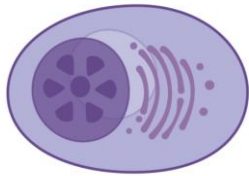


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule

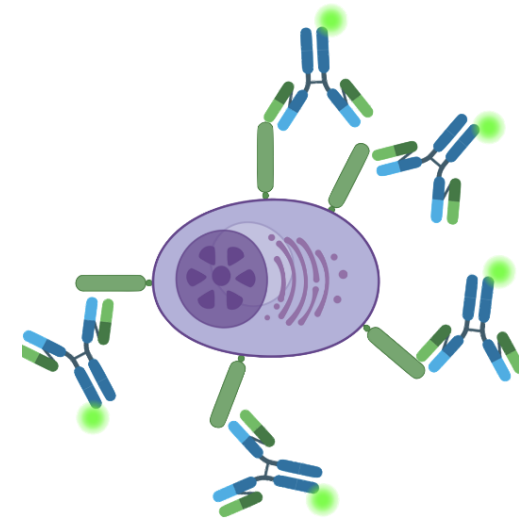
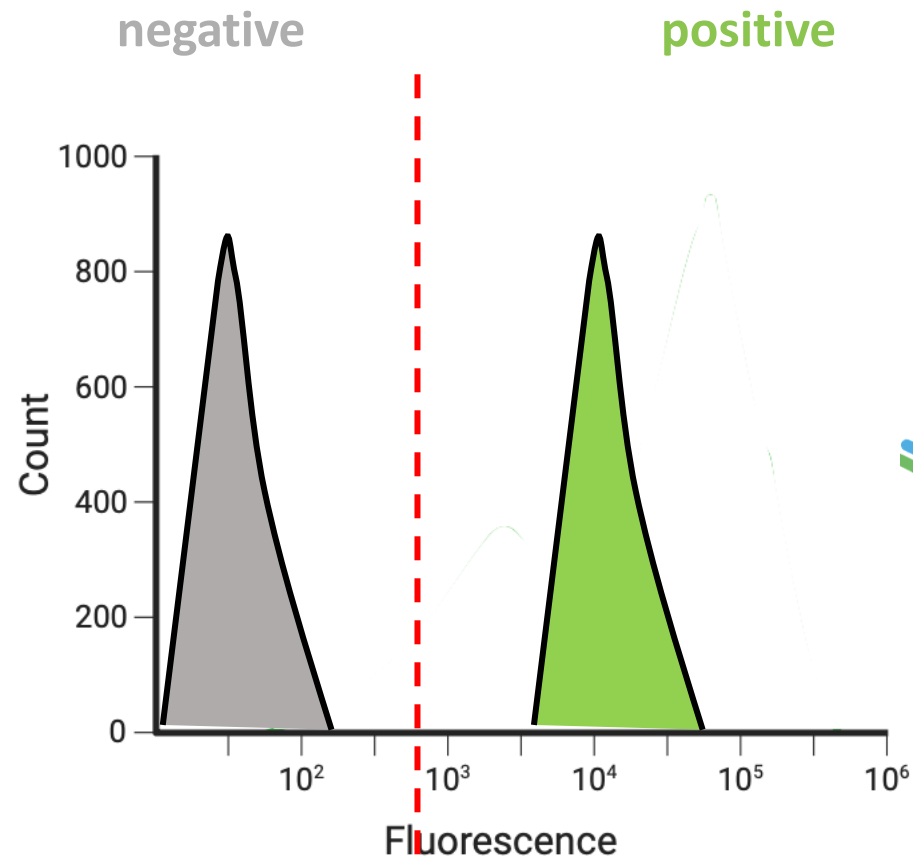
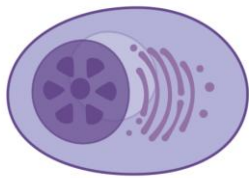
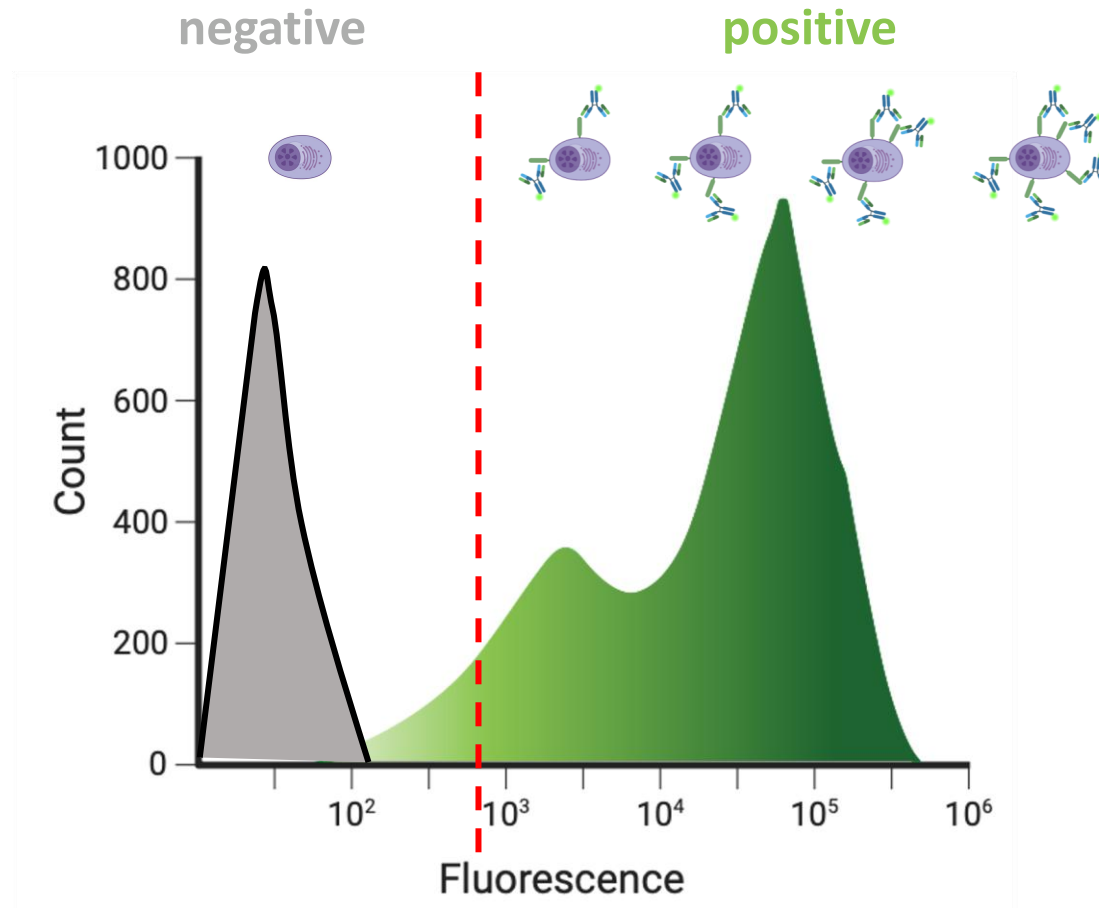


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Permette di discriminare cellule



Light scattering

Legato alle **caratteristiche
fisiche**
della particella

Side scatter (SSC)

Diffusione a 90°

Complessità

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni

Light scattering

Legato alle **caratteristiche
fisiche**
della particella

Side scatter (SSC)
Diffusione a 90°

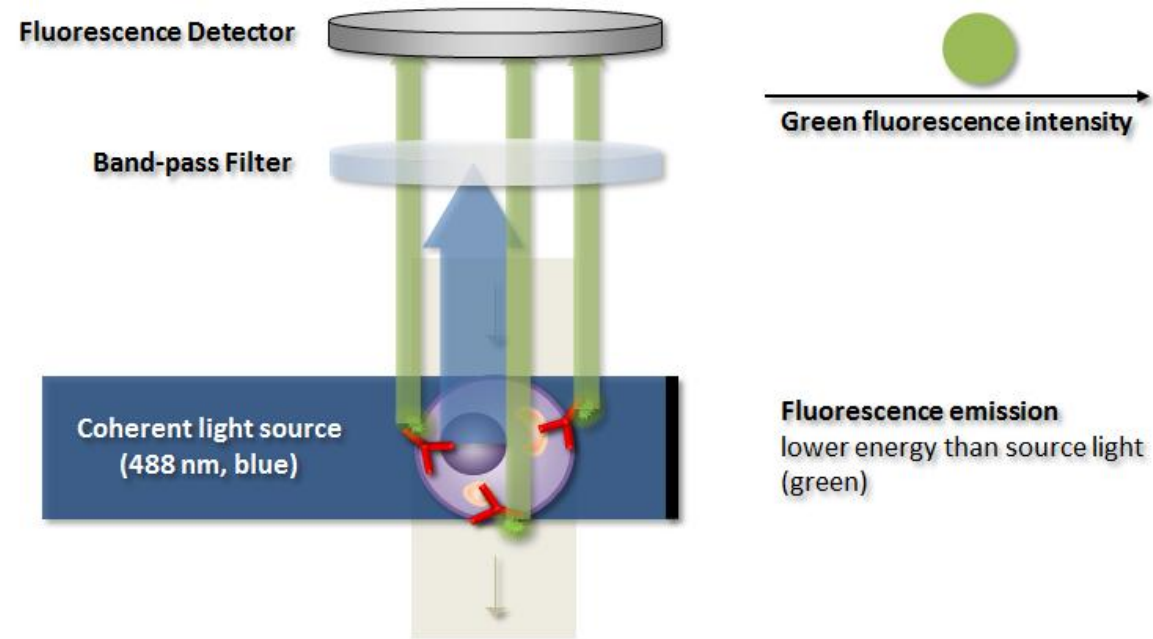
Complessità

Forward scatter (FSC)
Dispersione frontale

Dimensioni

Si differenzia dalla

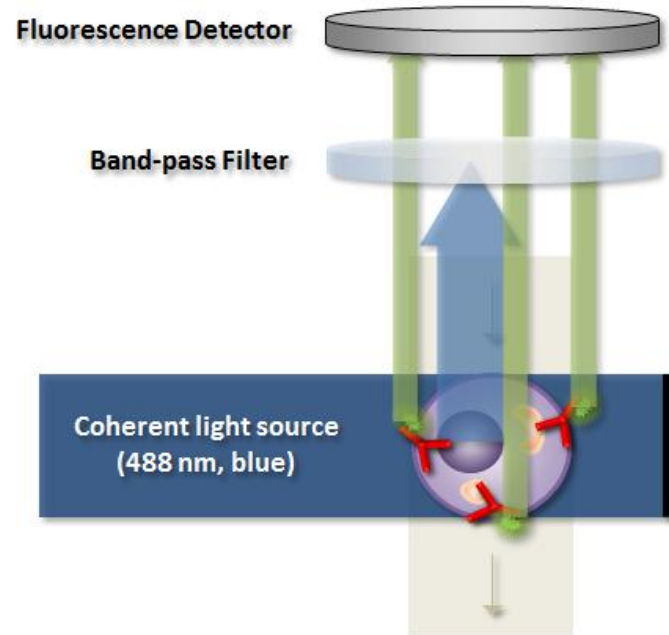
**MARCATURA
IN
FLUORESCENZA**



**Intensità di
fluorescenza**

Blue laser (BL) detector
Posto a 90°

**MARCATURA
IN
FLUORESCENZA**

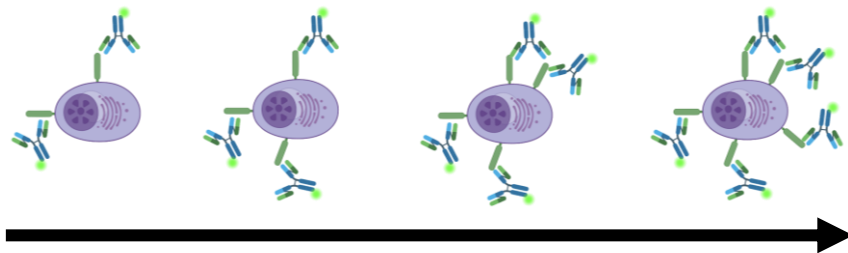


Fluorescence emission
lower energy than source light
(green)

Intensità di
fluorescenza

Blue laser (BL) detector
Posto a 90°

MARCATURA
IN
FLUORESCENZA



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

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

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

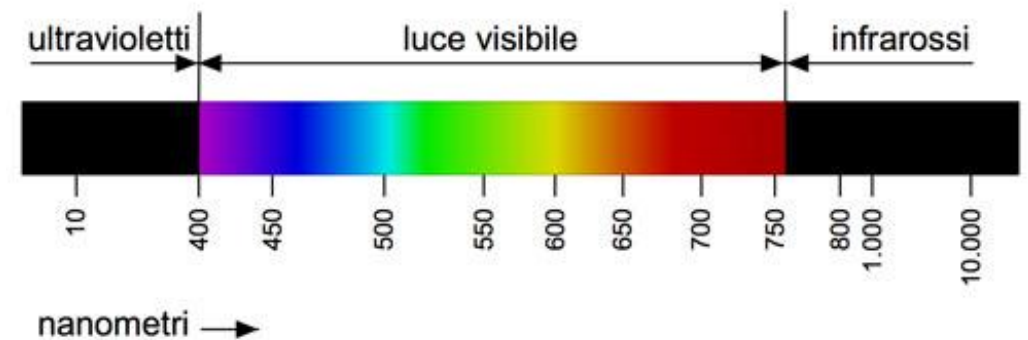


Normalmente legati ad un anticorpo che riconosce un antigene bersaglio sulla superficie o all'interno della cellula

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

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**

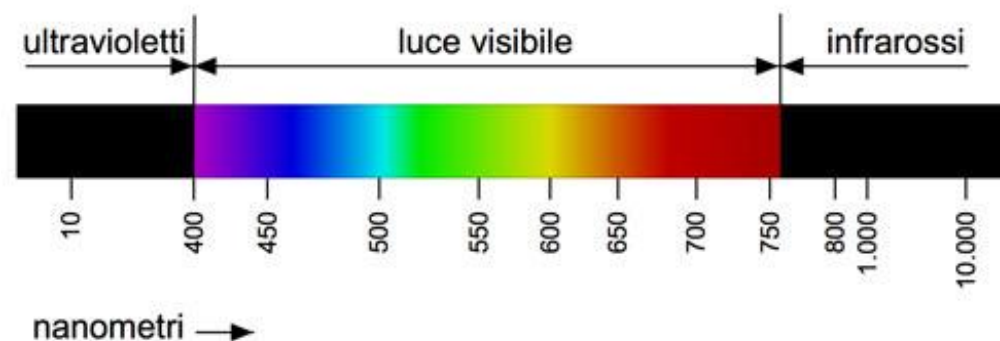
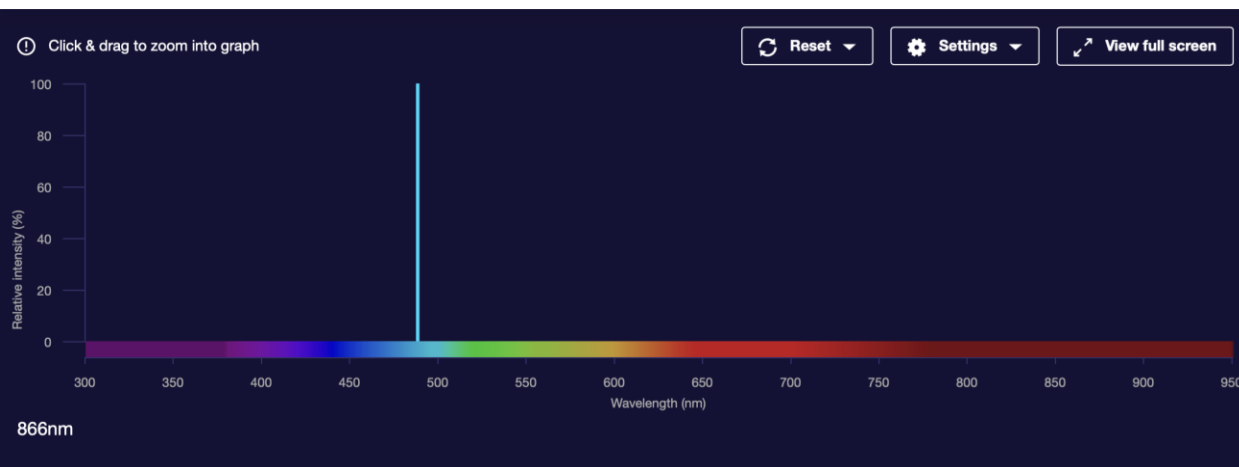


Il **laser** consente di misurare **minime quantità di fluorocromo**

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**



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**

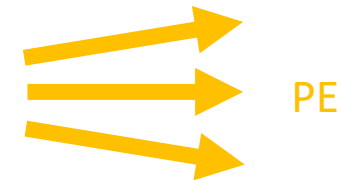
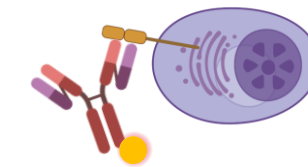
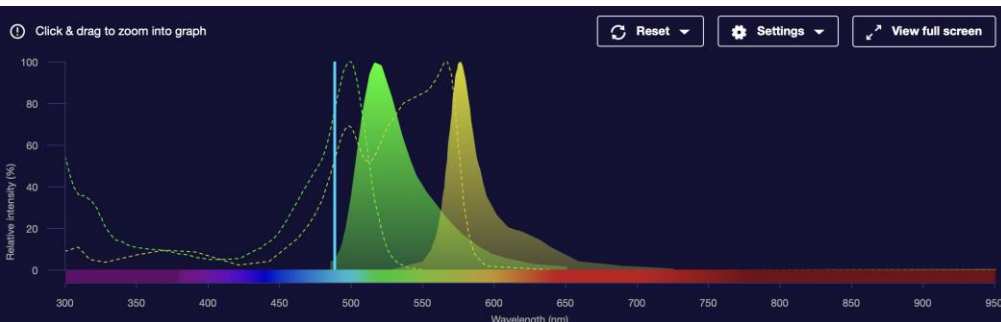
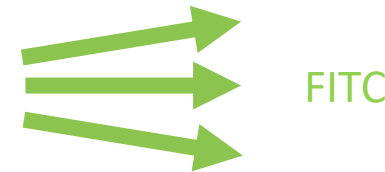
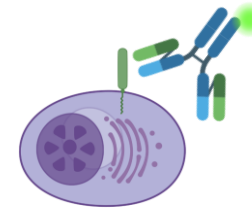
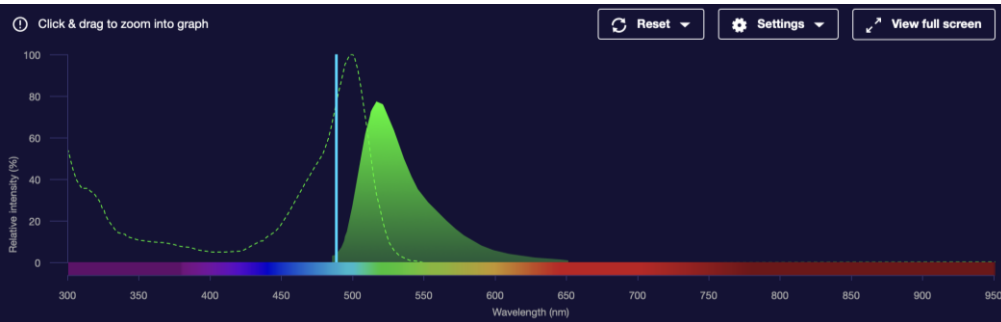


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**
Posso marcare **antigeni diversi**

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT

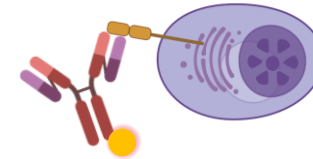
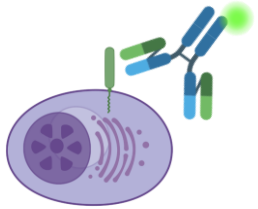


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**
Posso marcare **antigeni diversi**

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT

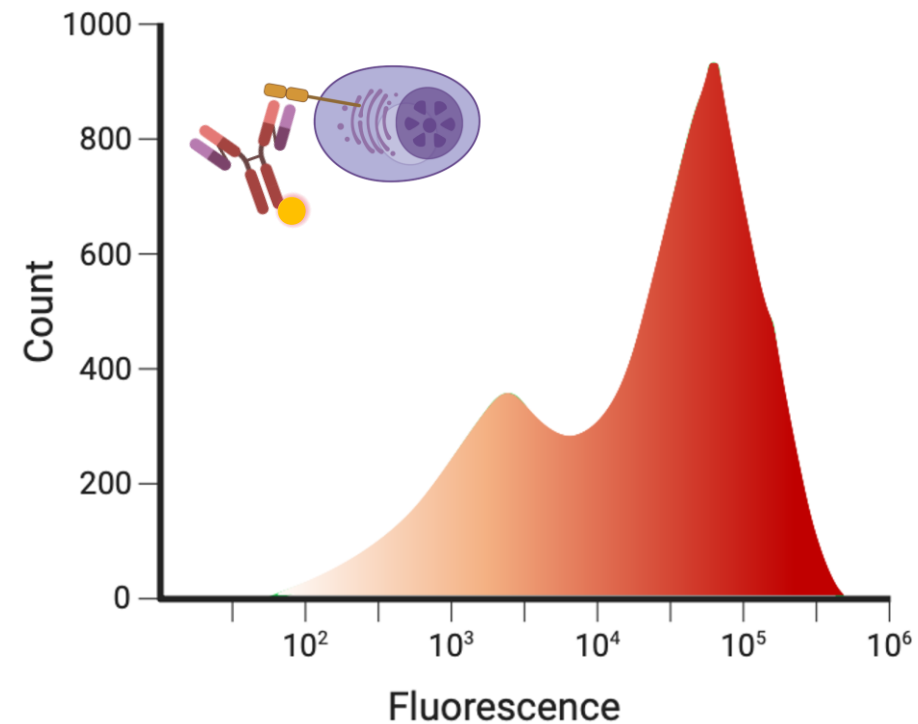
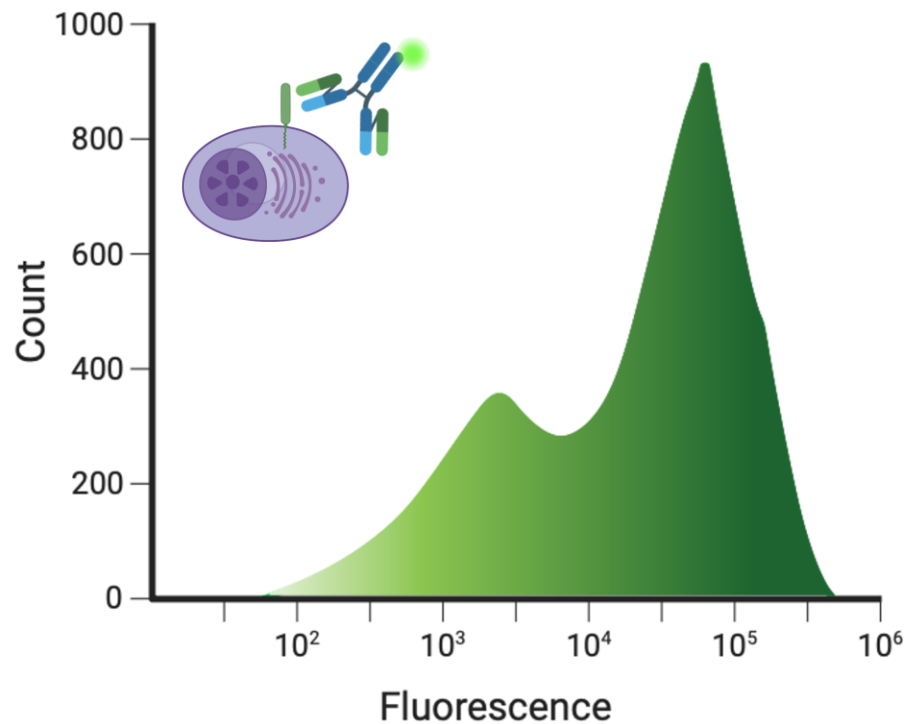


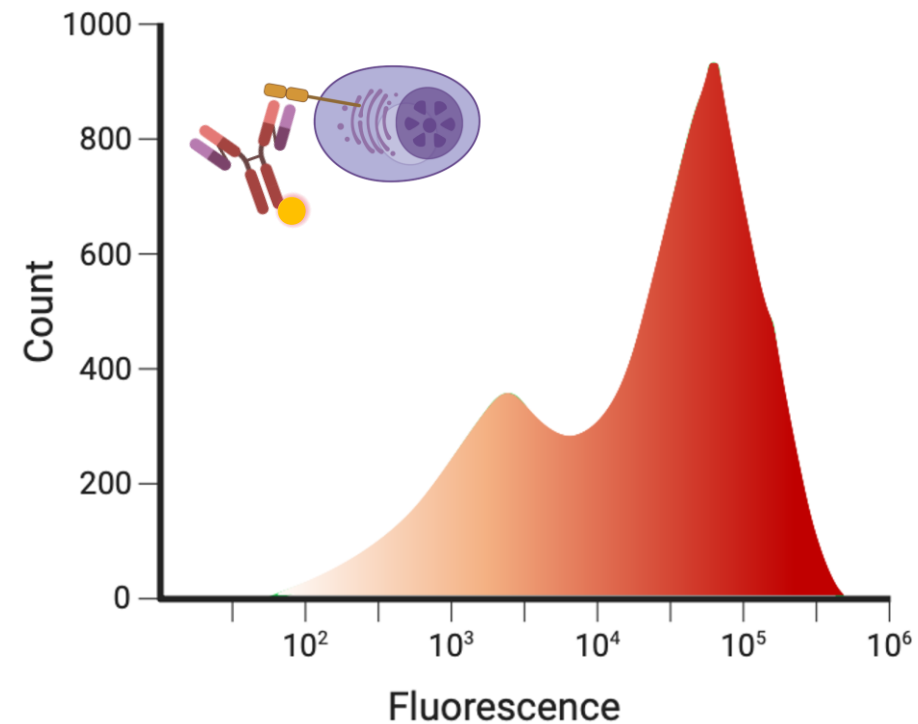
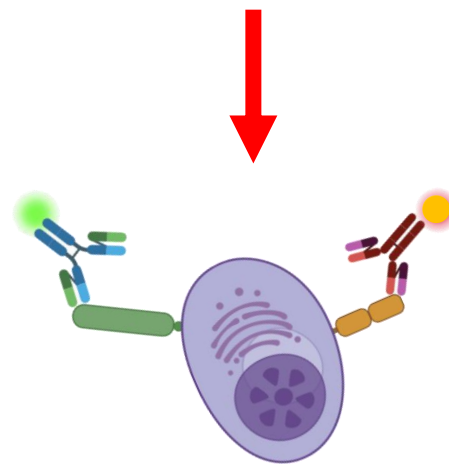
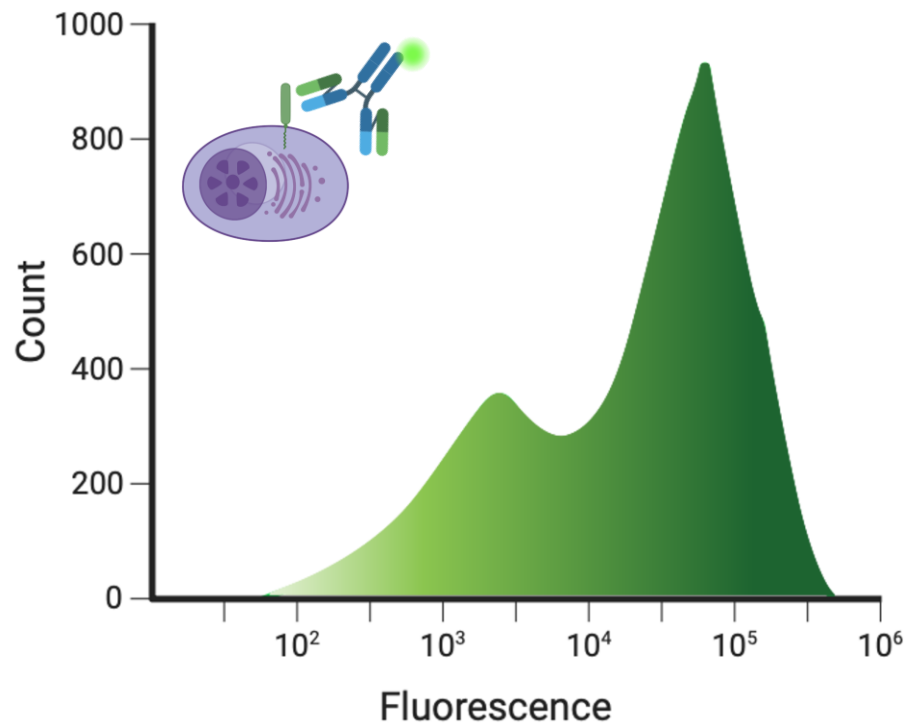
Grafico
monodimensionale
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Posso marcare **antigeni diversi**

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT

anche sullo
stesso campione



Citofluorimetria

Lo strumento

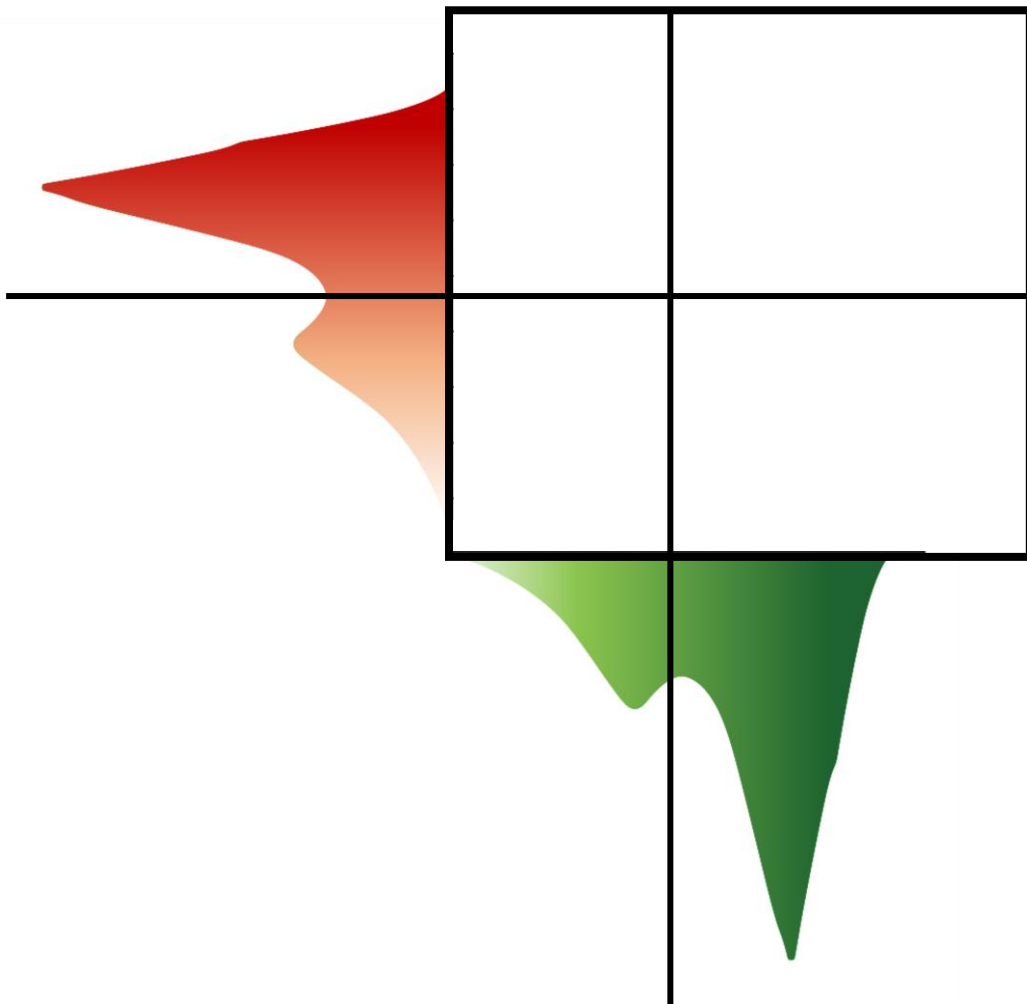
Fluorescenze

Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

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

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT



Citofluorimetria

Lo strumento

Fluorescenze

Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT

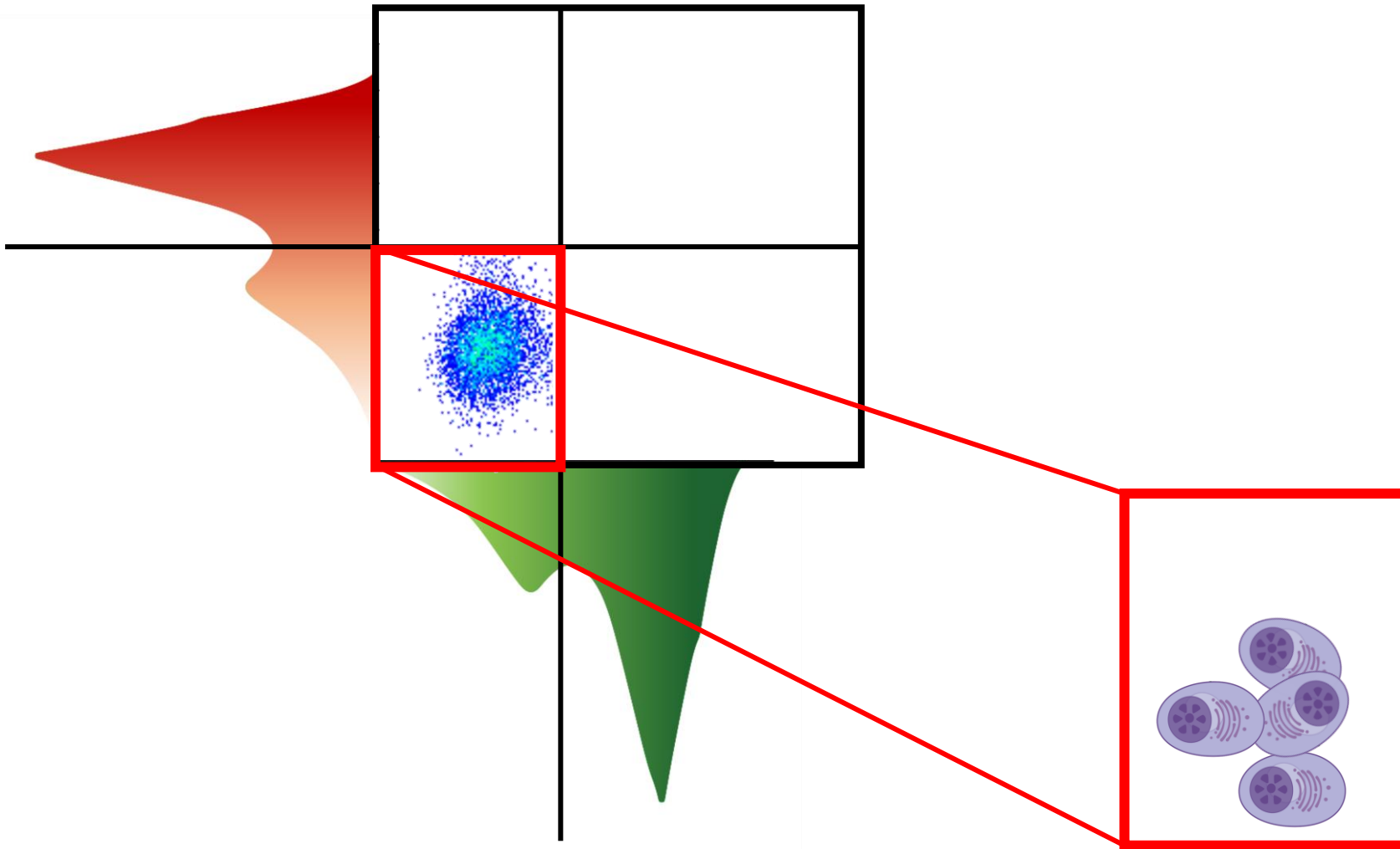


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT

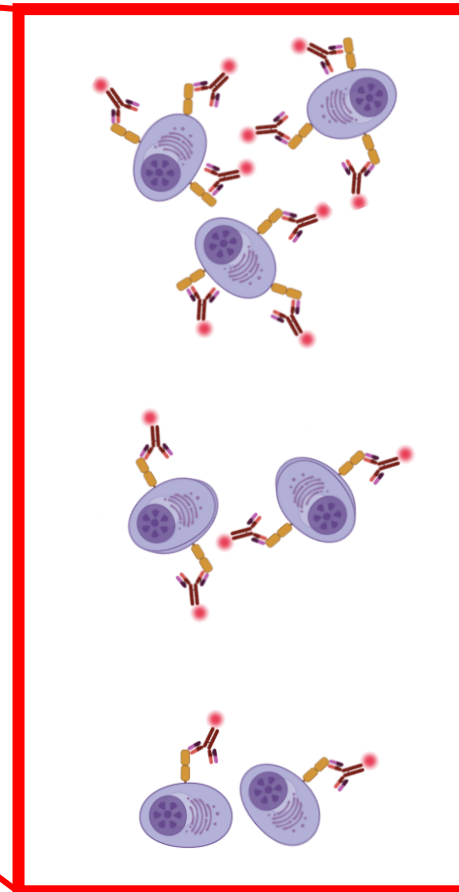
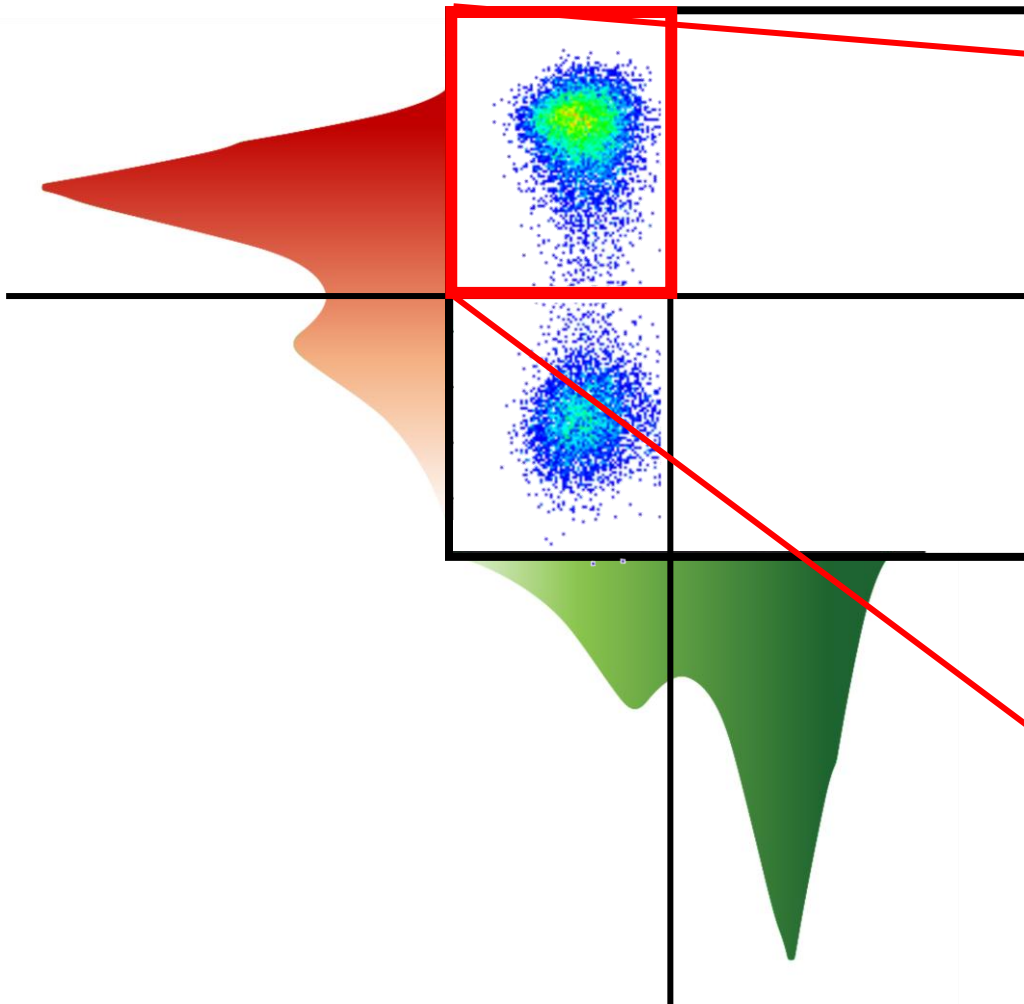


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT

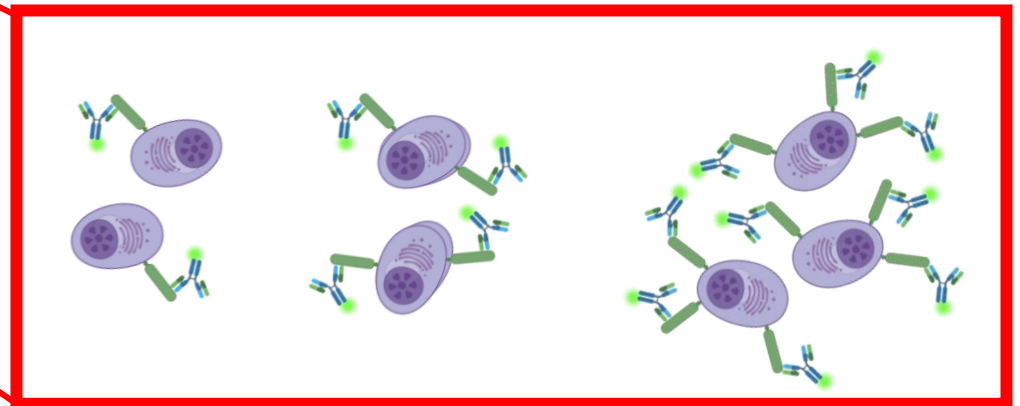
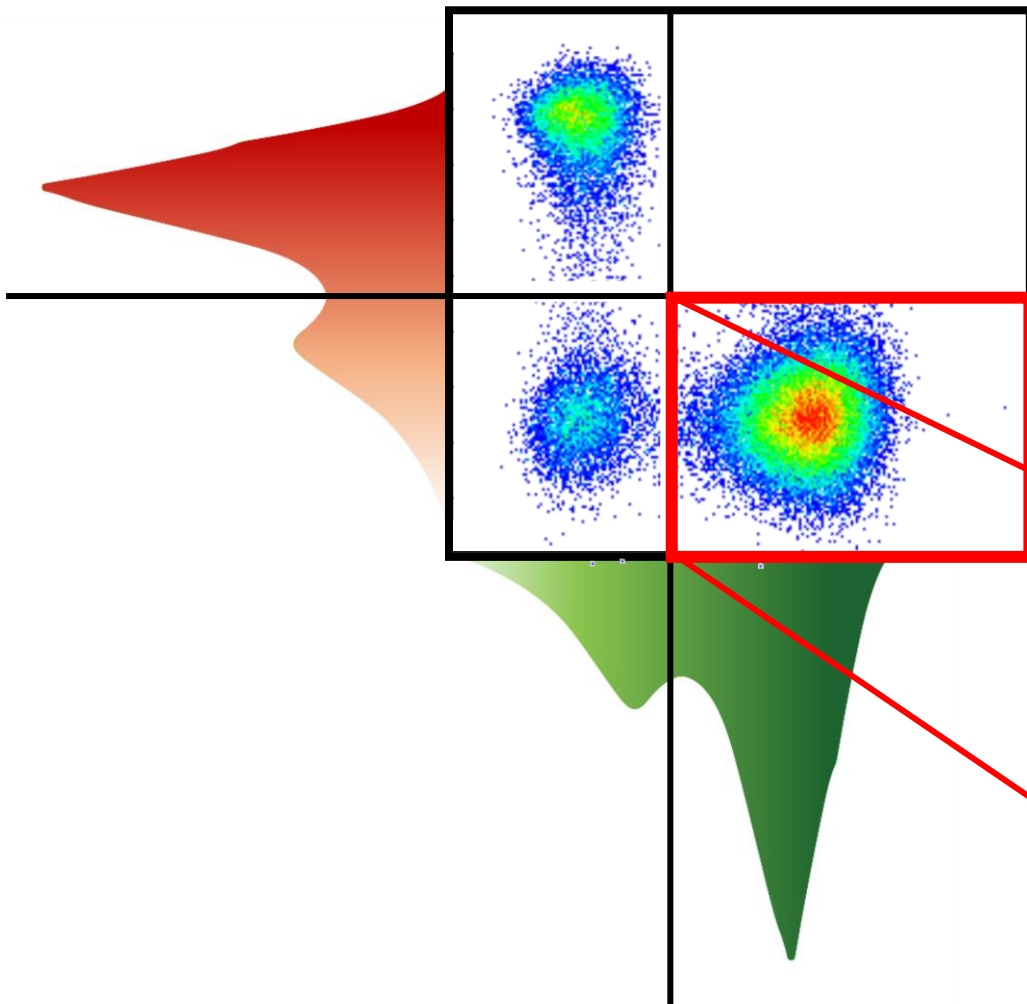
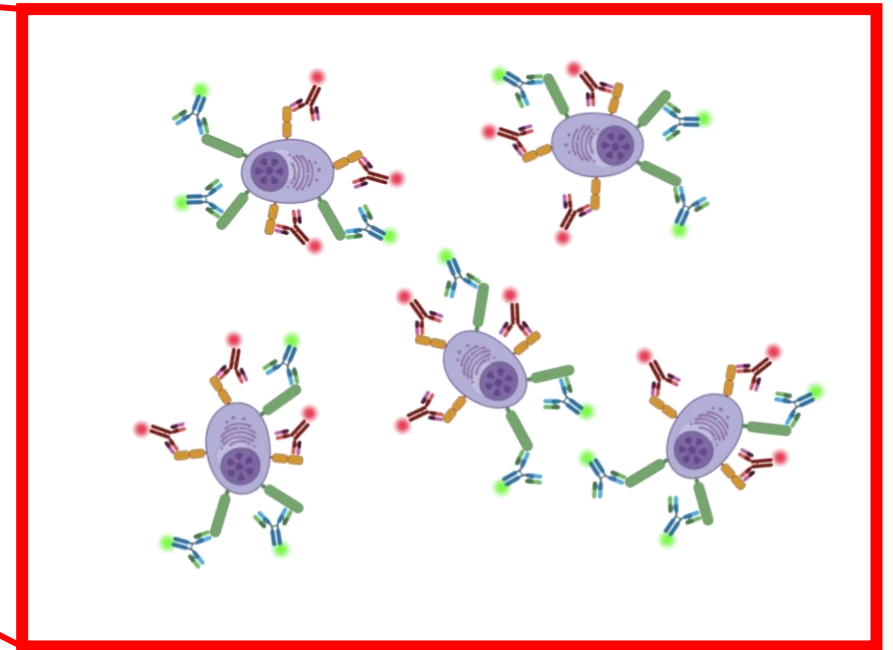
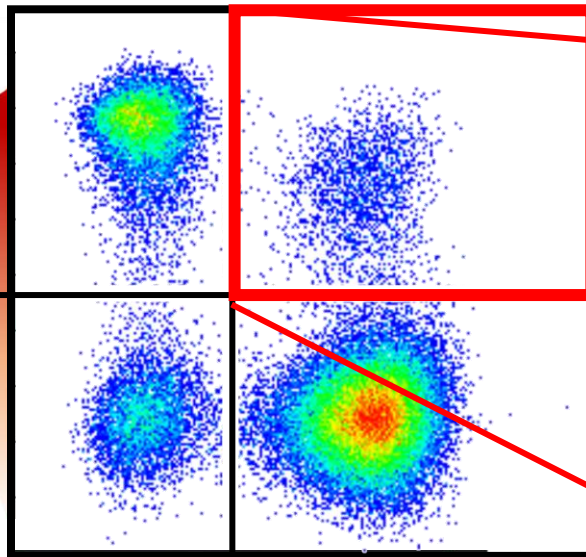


Grafico
monodimensionale o
ISTOGRAMMA

La fluorescenza è **quantitativa**

Grafico
bidimensionale
DOT PLOT



Attualmente, qual è il numero massimo di marcatori fluorescenti **distinguibili**?

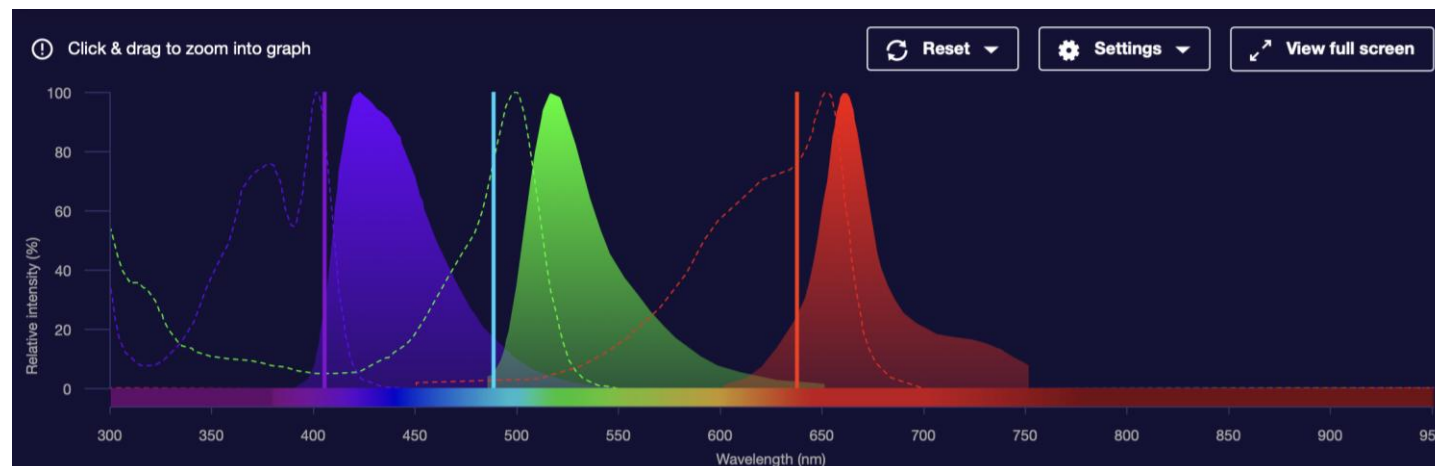


Attualmente, il massimo di **marcatori fluorescenti distinguibili** è

40

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 Krypton (350nm), Elio neon (630nm), ecc...

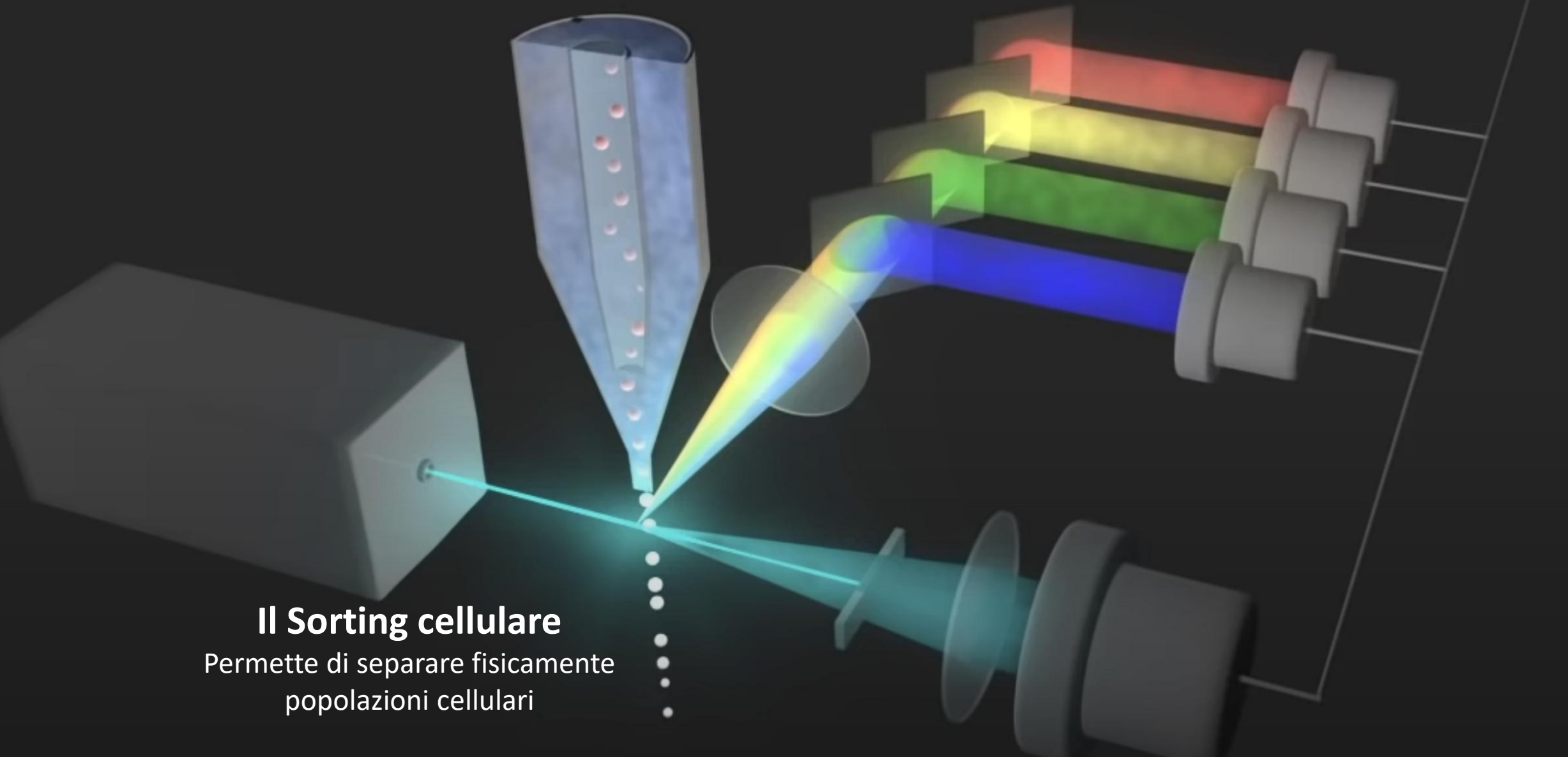


Attualmente, il massimo di **marcatori fluorescenti distinguibili** è
40

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 Krypton (350nm), Elio neon (630nm), ecc...

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

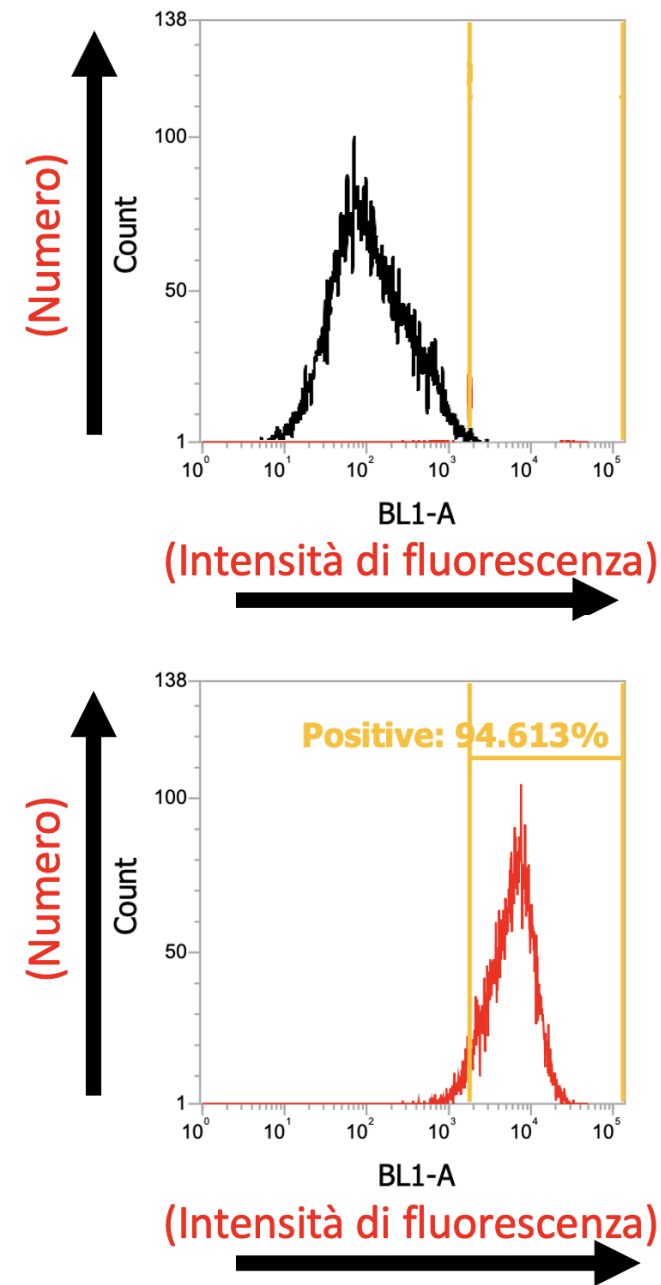
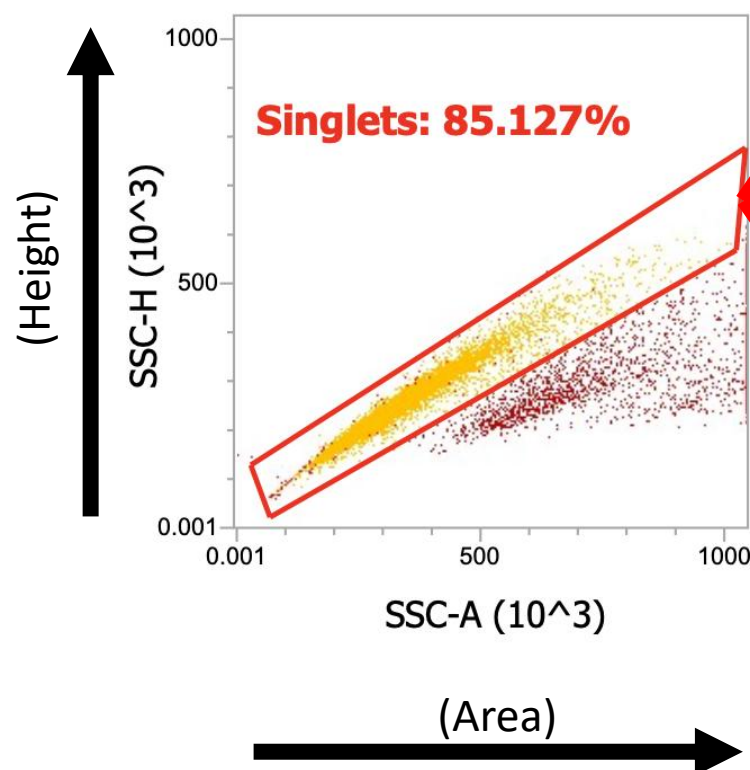
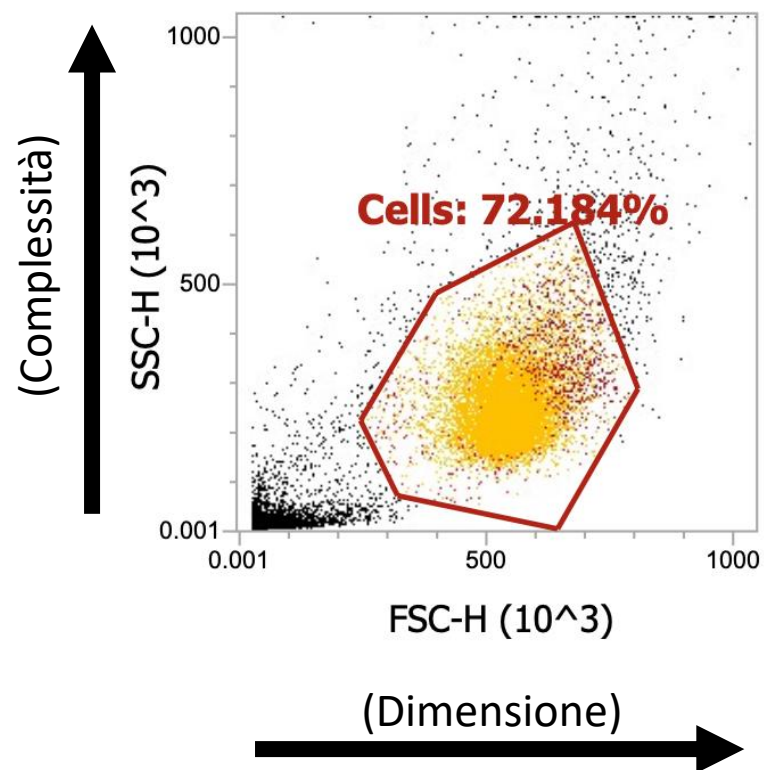


Il Sorting cellulare

Permette di separare fisicamente
popolazioni cellulari

Come vengono **visualizzati** i dati?

Ogni cellula/particella viene rappresentata come un **puntino** e le sue coordinate **dipendono dai parametri presi in esame**



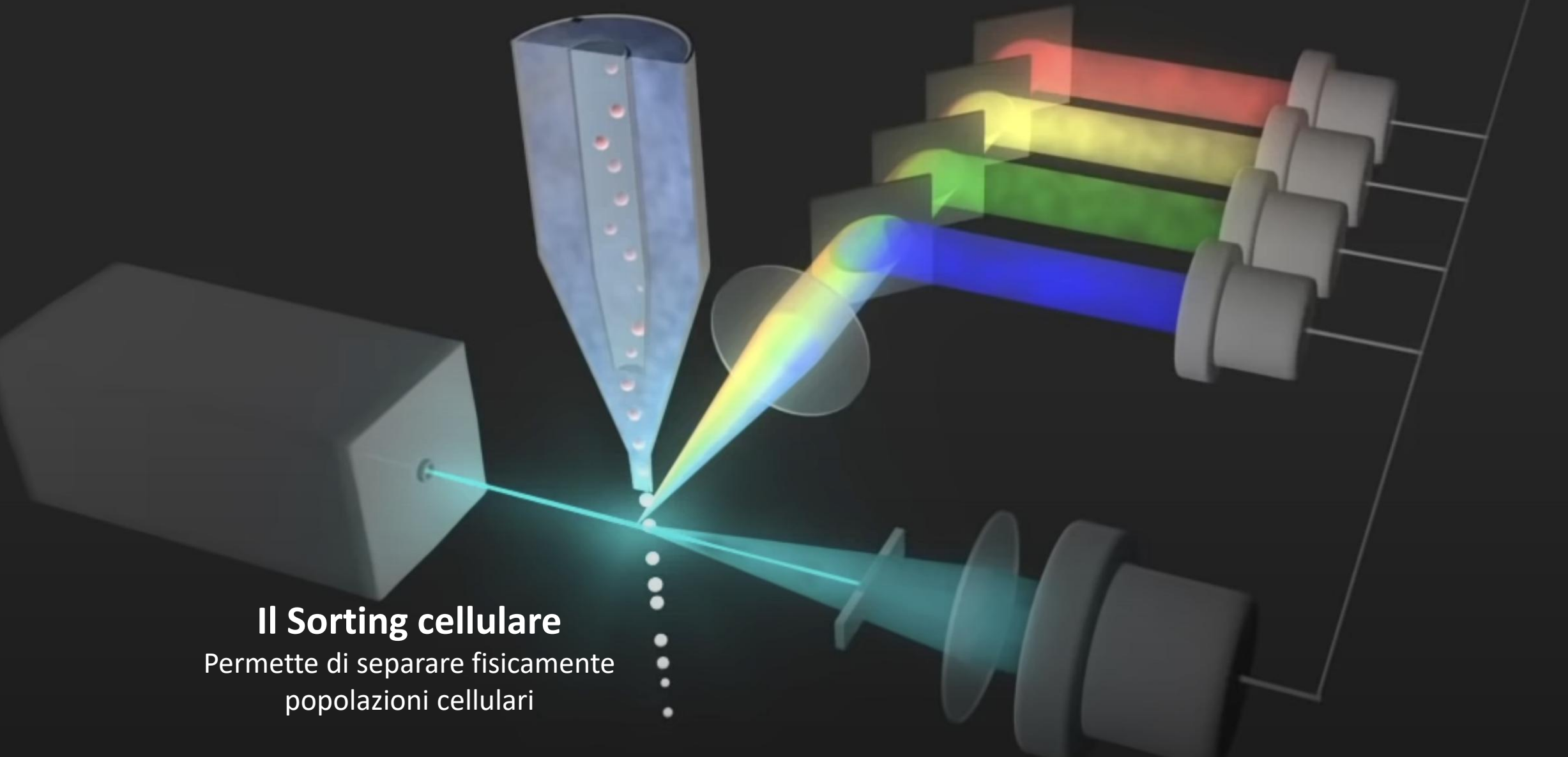
FACS

Fluorescence

Activated

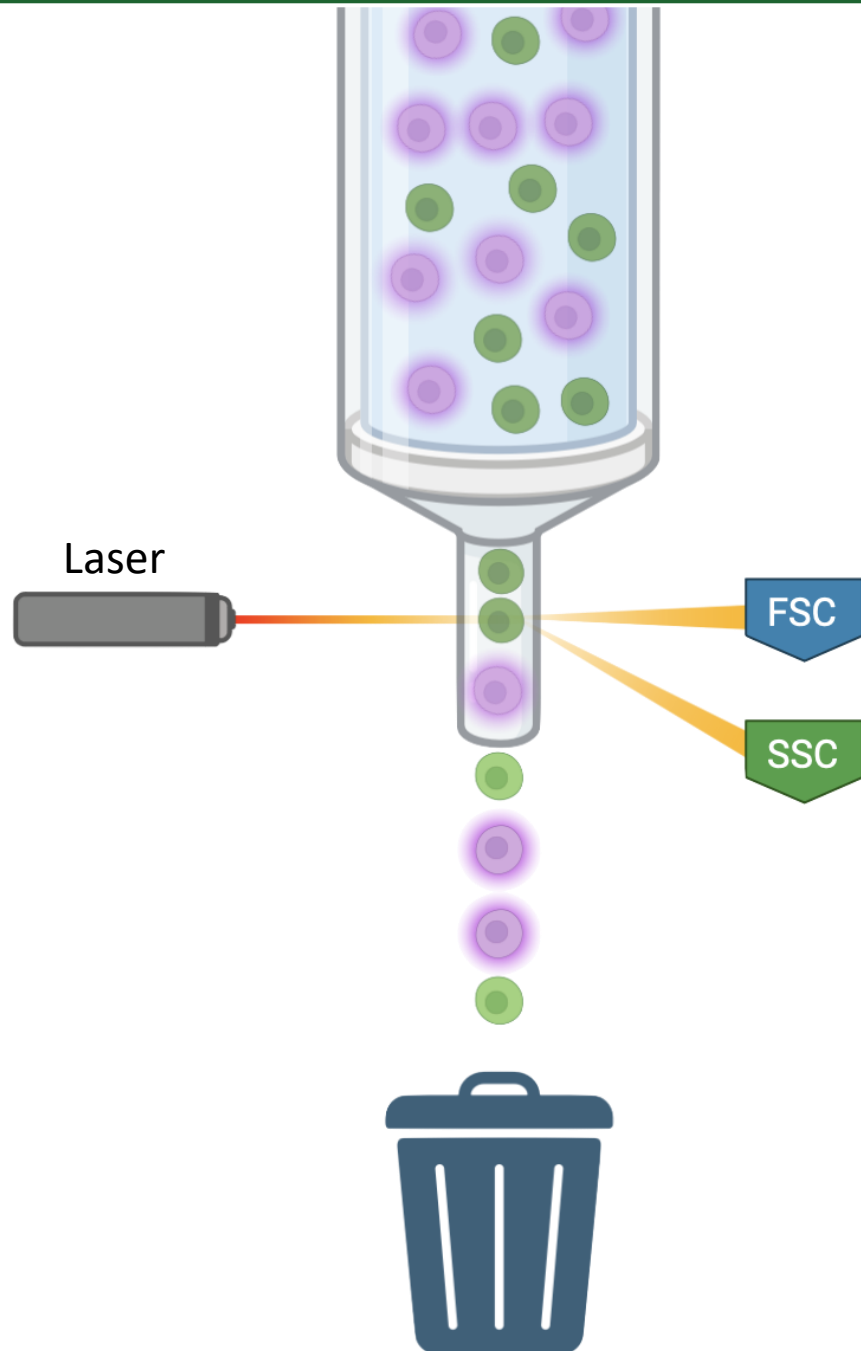
Cell

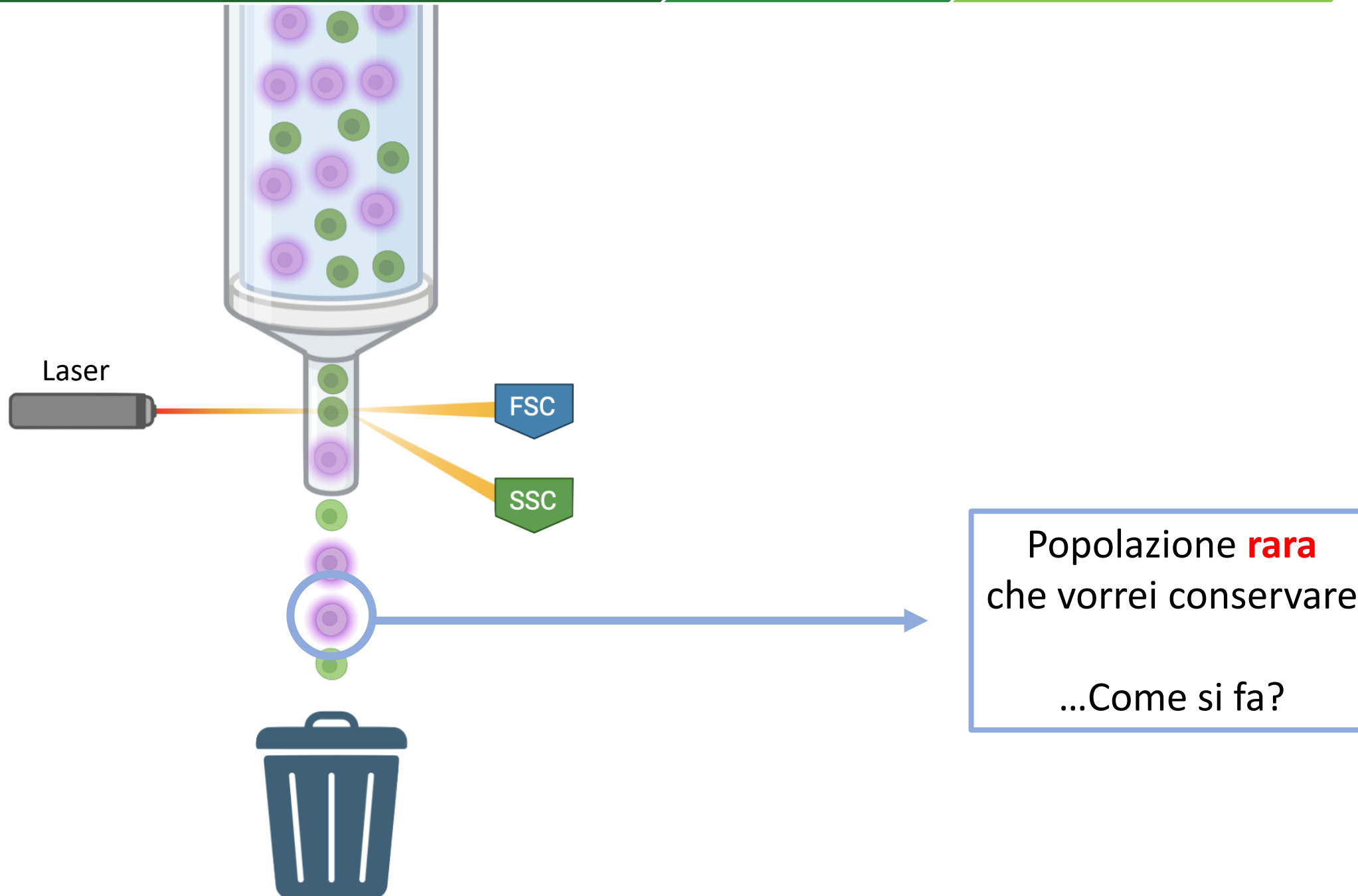
Sorting

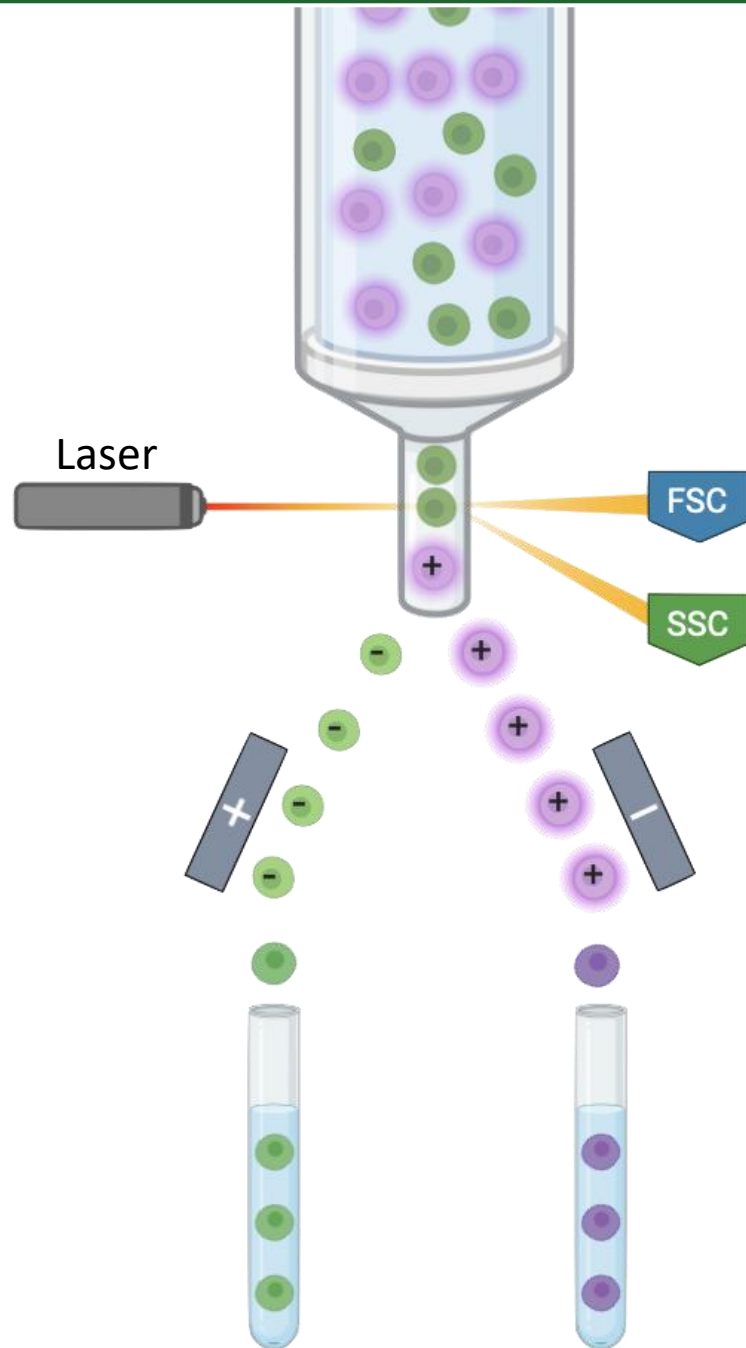


Il Sorting cellulare

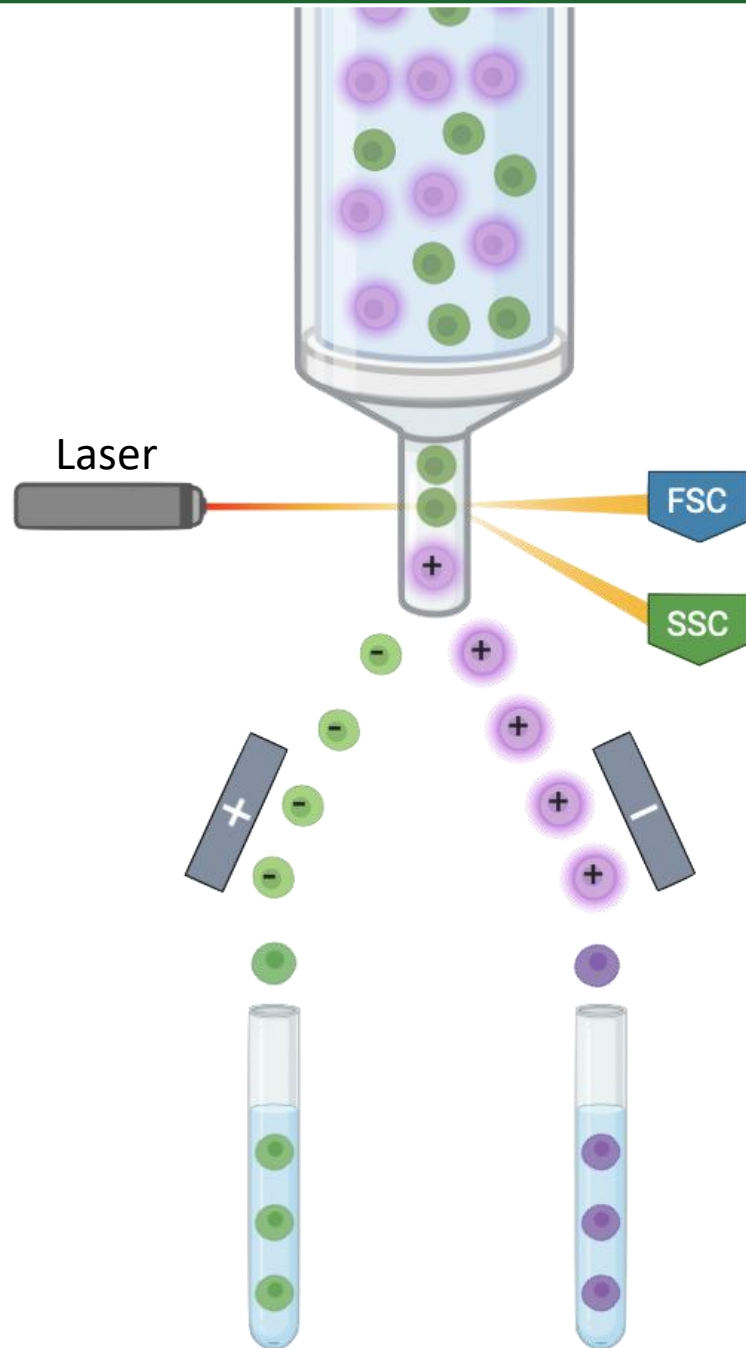
Permette di separare fisicamente
popolazioni cellulari





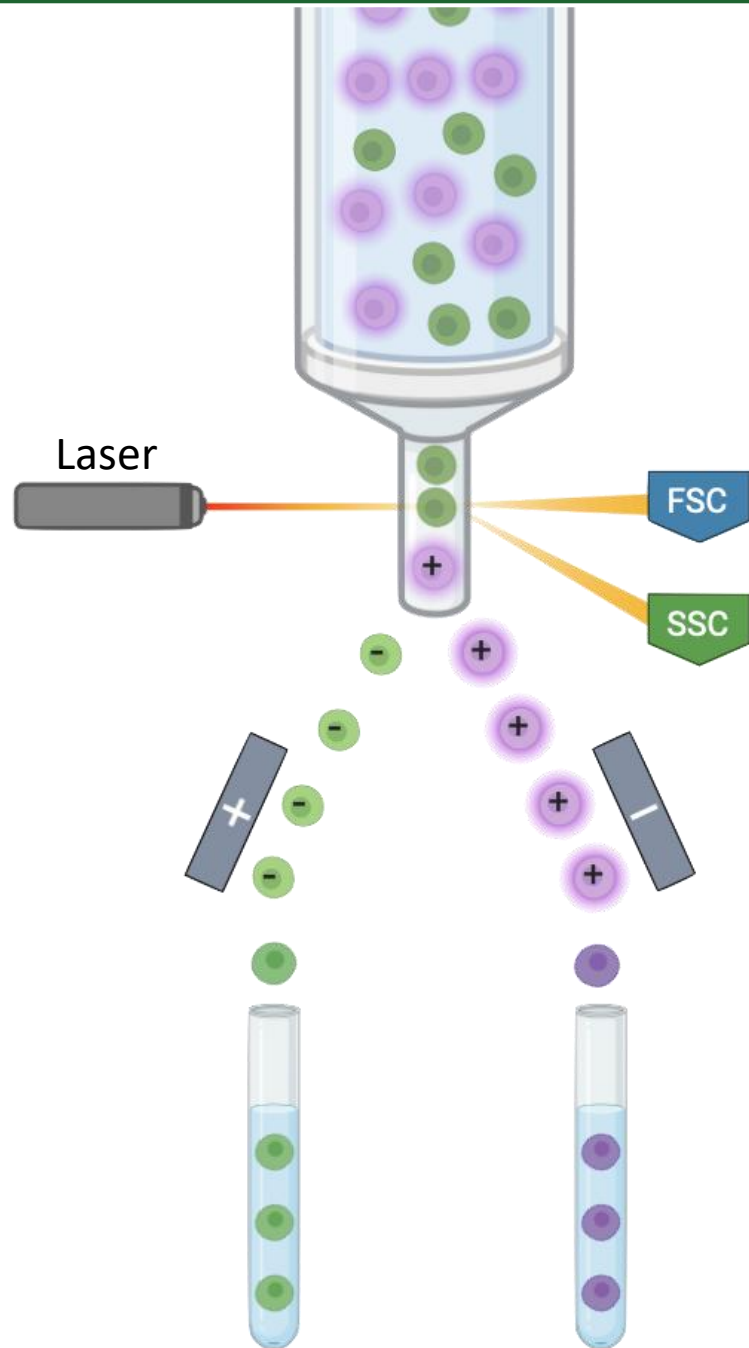


In base ai **parametri**
scelti posso
fisicamente separare
una popolazione
cellulare da un'altra



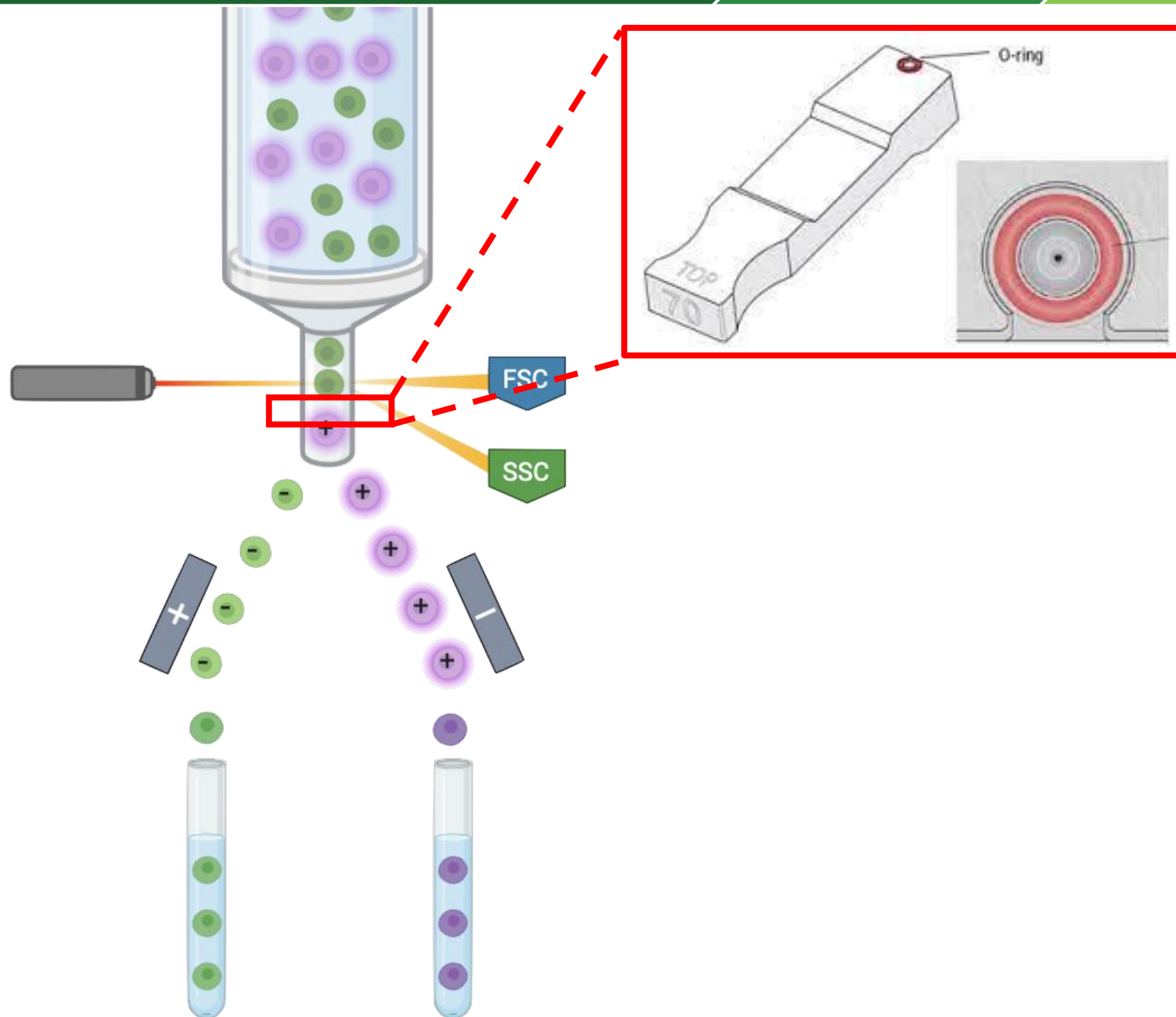
In base ai **parametri**
scelti posso
fisicamente separare
una popolazione
cellulare da un'altra

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



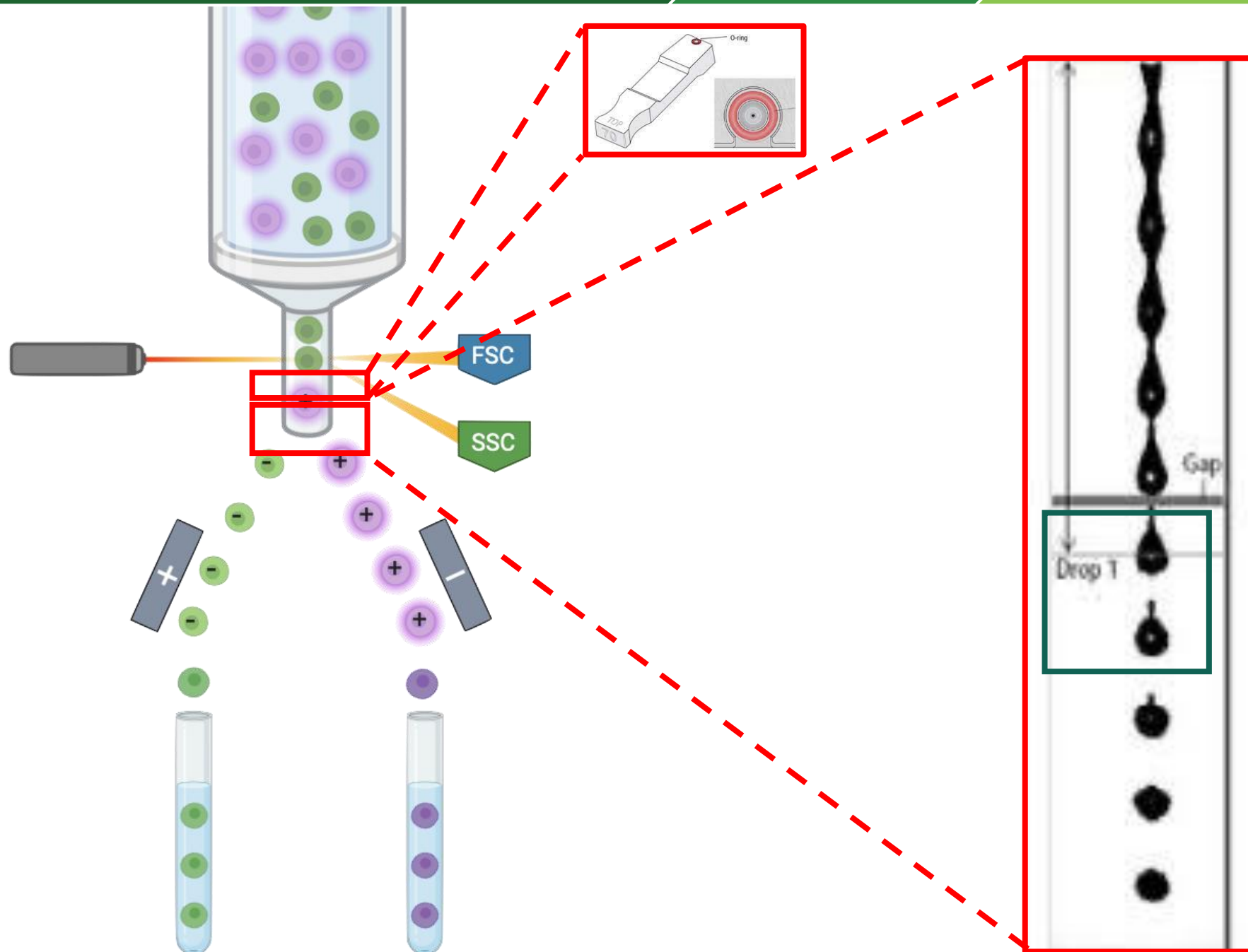
In base ai **parametri**
scelti posso
fisicamente separare
una popolazione
cellulare da un'altra

**OGNI SINGOLA
CELLULA** viene
analizzata e
INDIRIZZATA



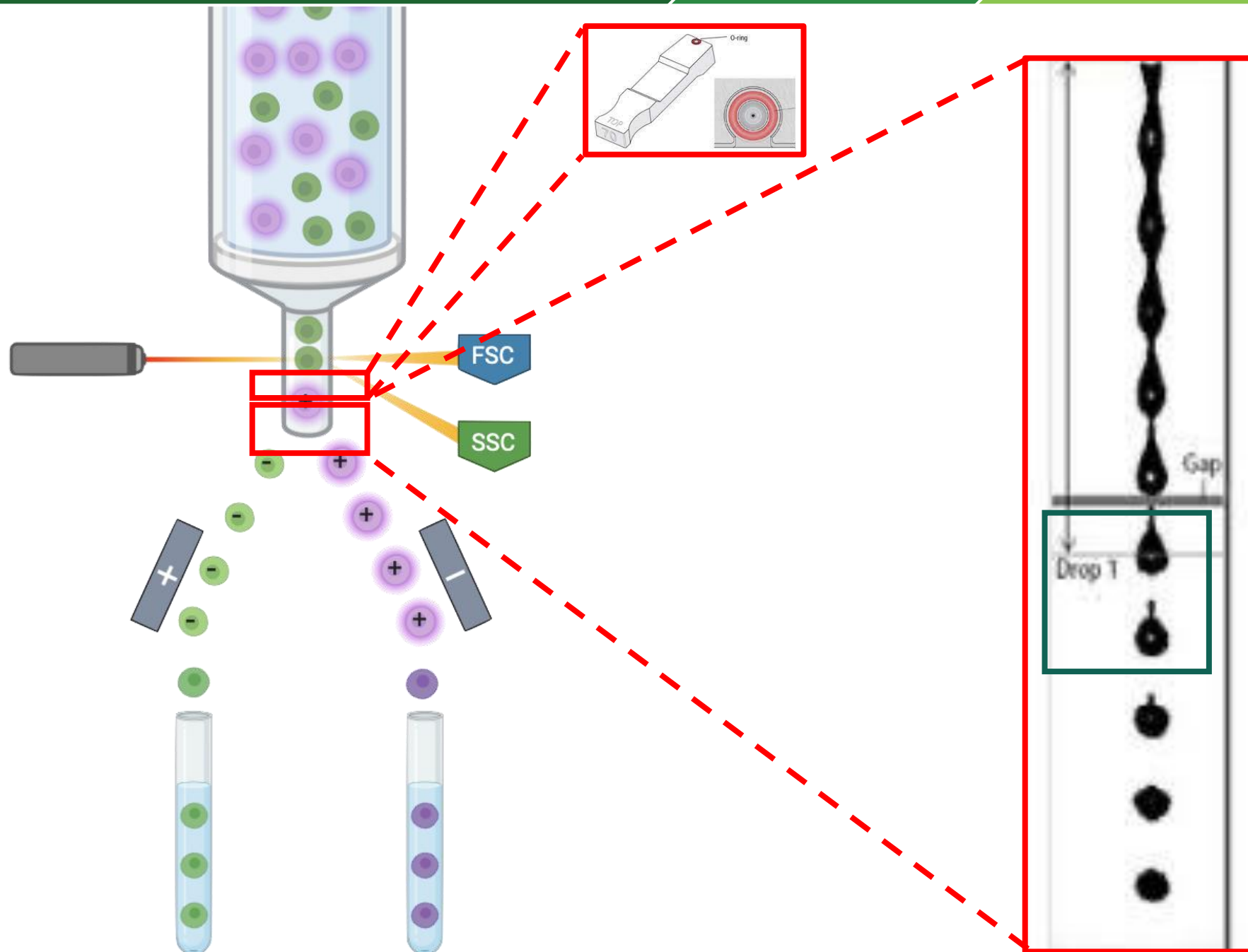
**OGNI SINGOLA
CELLULA** viene
analizzata e
INDIRIZZATA

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



**OGNI SINGOLA
CELLULA** viene
analizzata e
INDIRIZZATA

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



OGNI SINGOLA CELLULA viene analizzata e **INDIRIZZATA**

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

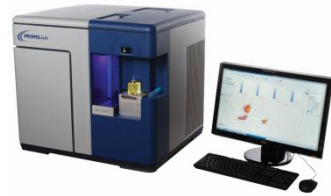
Le **drops** vengono **caricate elettricamente** e **deflesse** grazie a delle plate cariche

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.

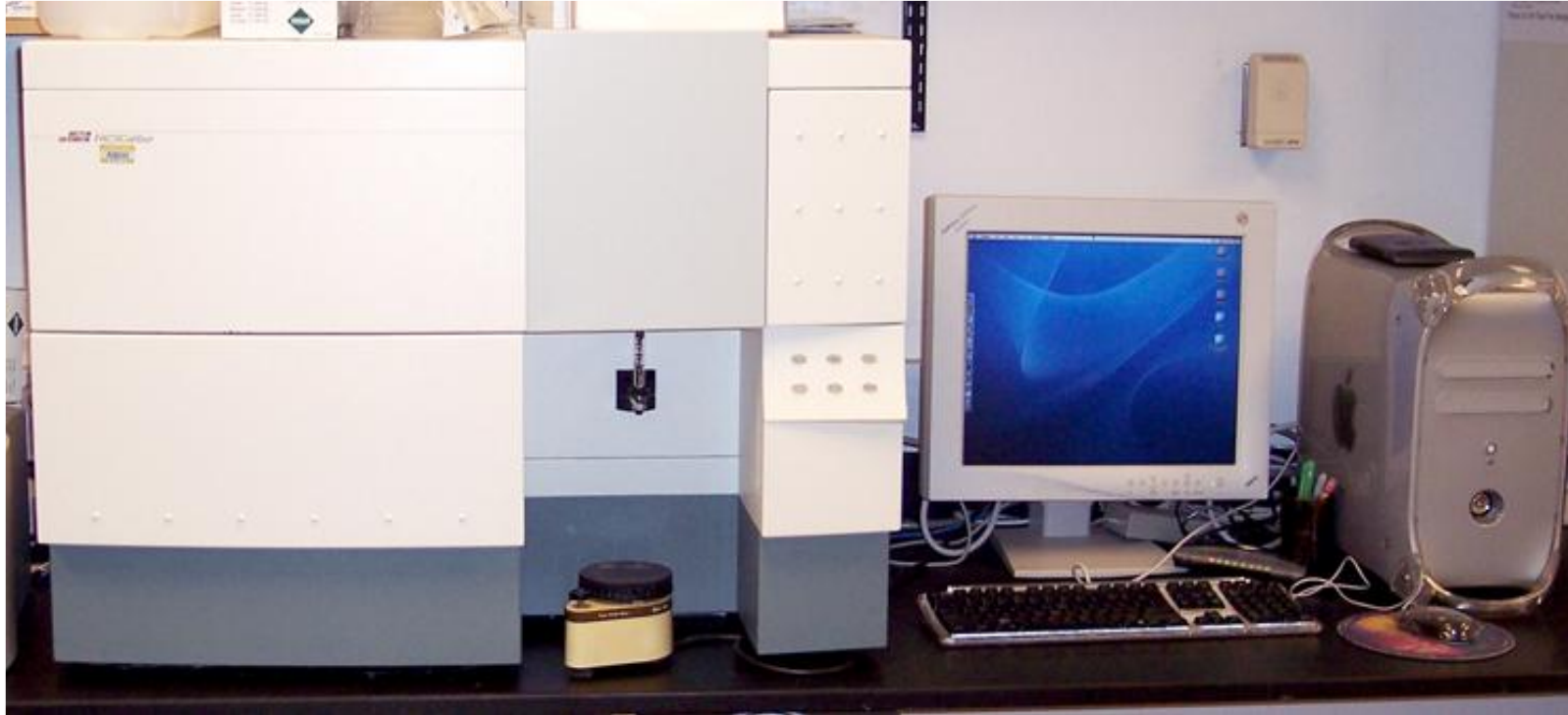
Inizialmente misura di 1-2 parametri: uno per le misure fisiche e 1 per la fluorescenza



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)

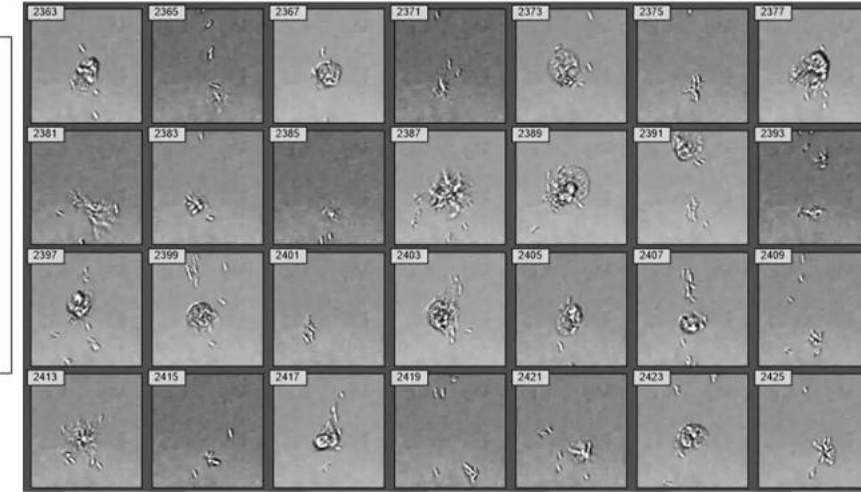
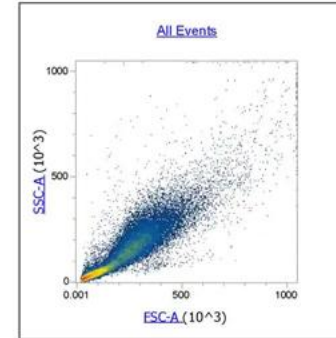


DAL 1970 AD OGGI

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

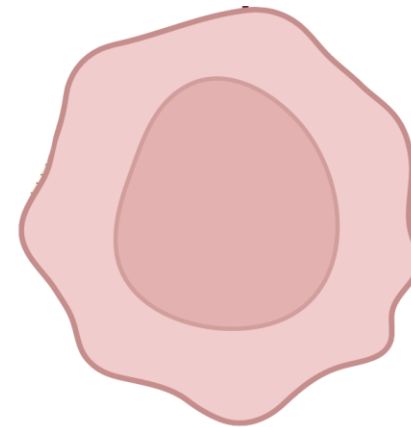
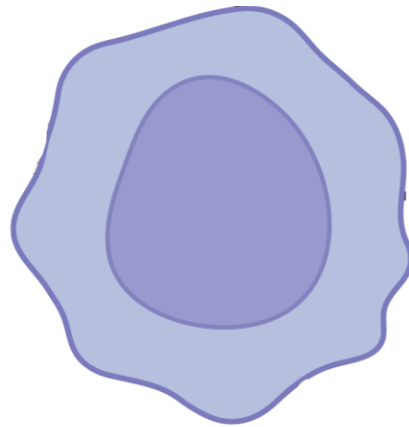
Determinazione dei **marker** cellulari

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

Linfoma Mantellare (MCL)

Cellule piccole

Cellule piccole



Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

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

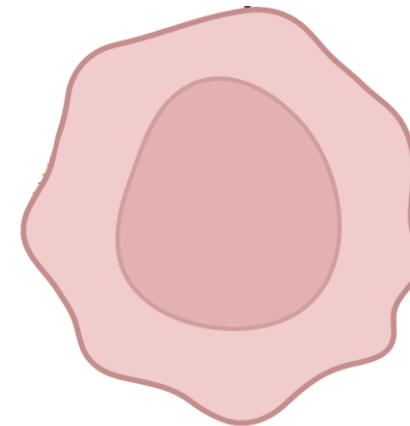
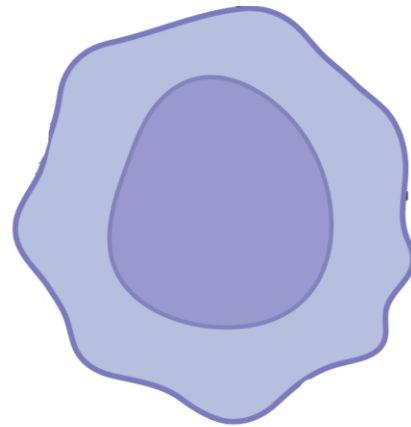
Linfoma Mantellare (MCL)

Cellule piccole

FSC e SSC NON sono di aiuto

**DEVO usare dei MARKER
fluorescenti**

Cellule piccole



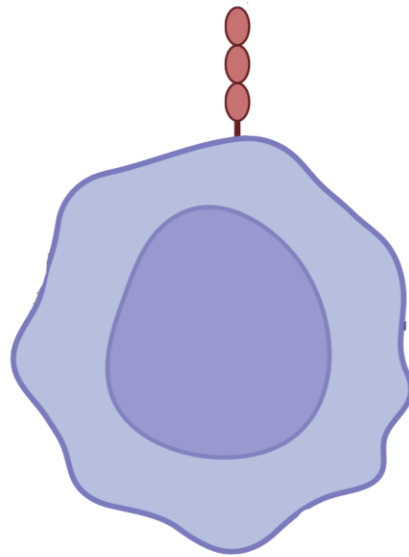
Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

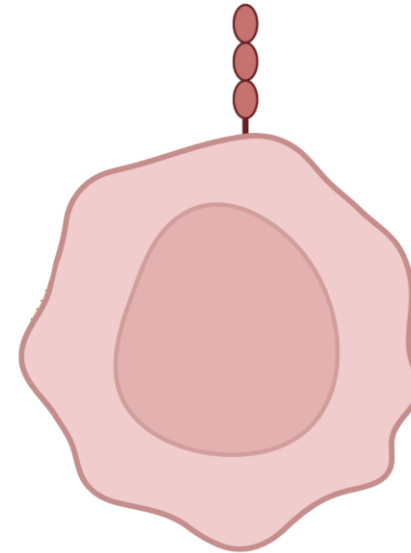
**Leucemia Linfatica Cronica (LLC)/
Piccolo linfoma linfocitico (SLL)**

Linfoma Mantellare (MCL)

Cellule piccole
CD5⁺



Cellule piccole
CD5⁺



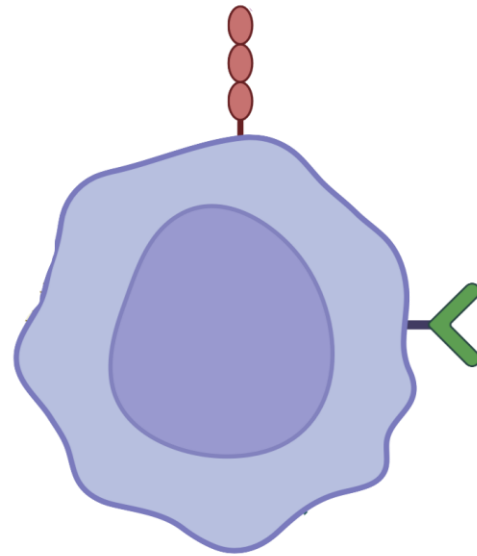
Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

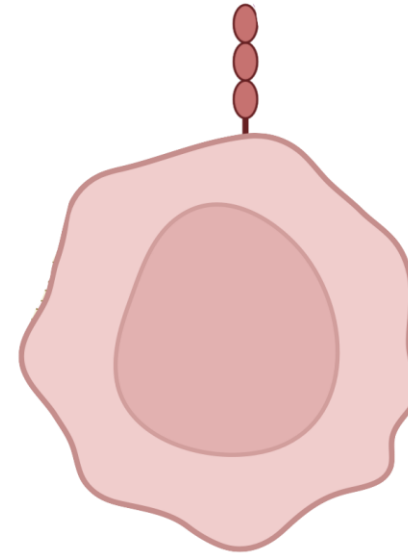
**Leucemia Linfatica Cronica (LLC)/
Piccolo linfoma linfocitico (SLL)**

Linfoma Mantellare (MCL)

Cellule piccole
CD5⁺
CD23⁺



Cellule piccole
CD5⁺
CD23⁻



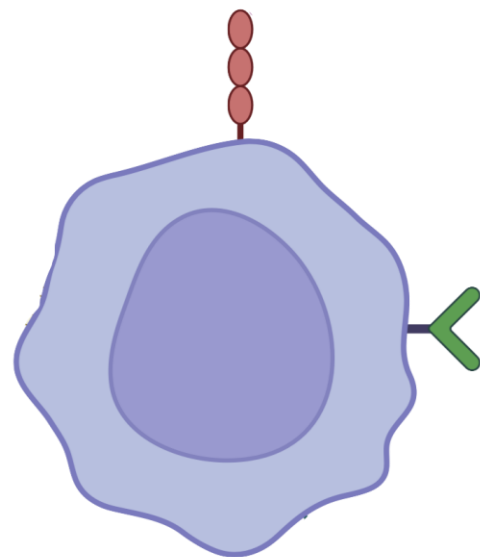
Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

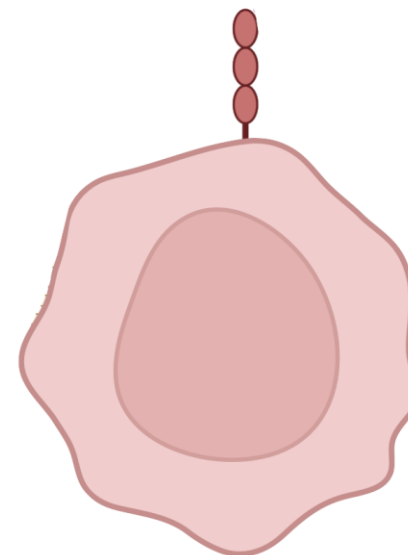
**Leucemia Linfatica Cronica (LLC)/
Piccolo linfoma linfocitico (SLL)**

Linfoma Mantellare (MCL)

Cellule piccole
CD5⁺
CD23⁺
CD10⁻



Cellule piccole
CD5⁺
CD23⁻
CD10⁻



Applicazioni della Citofluorimetria

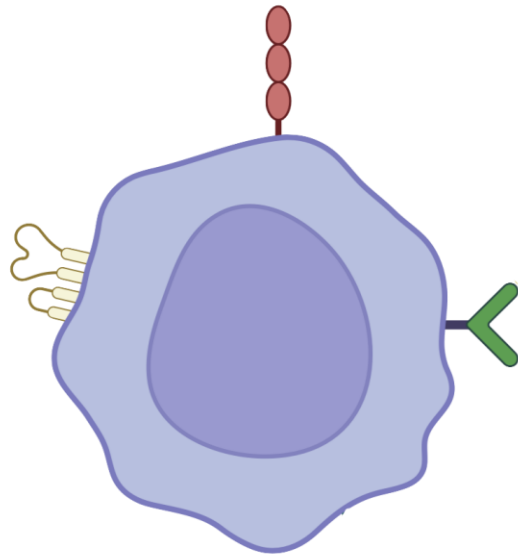
Determinazione dei **marker** cellulari

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

Linfoma Mantellare (MCL)

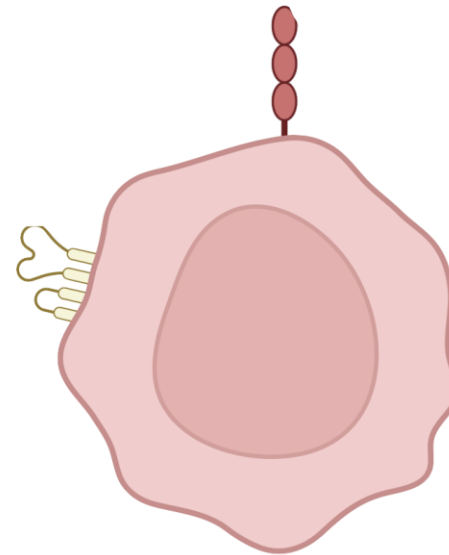
Cellule piccole

CD5⁺
CD23⁺
CD10⁻
CD20⁺



Cellule piccole

CD5⁺
CD23⁻
CD10⁻
CD20⁺



Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

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

Linfoma Mantellare (MCL)

Cellule piccole

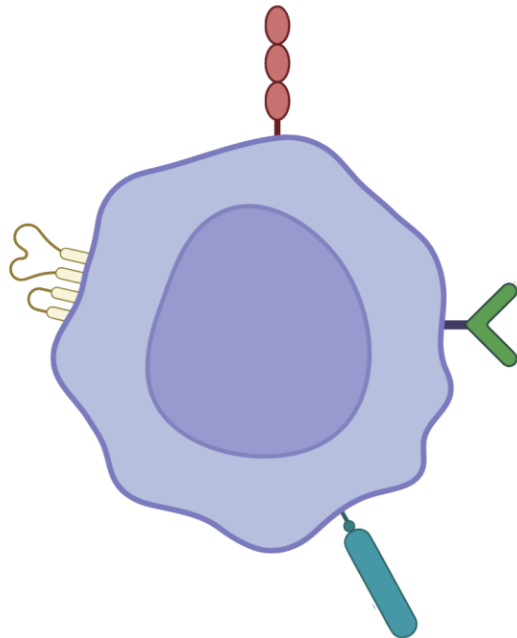
CD5⁺

CD23⁺

CD10⁻

CD20⁺

CD200⁺



Cellule piccole

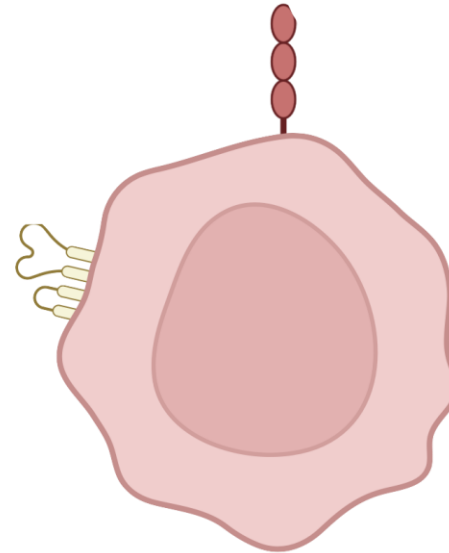
CD5⁺

CD23⁻

CD10⁻

CD20⁺

CD200⁻



Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

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

Linfoma Mantellare (MCL)

Cellule piccole

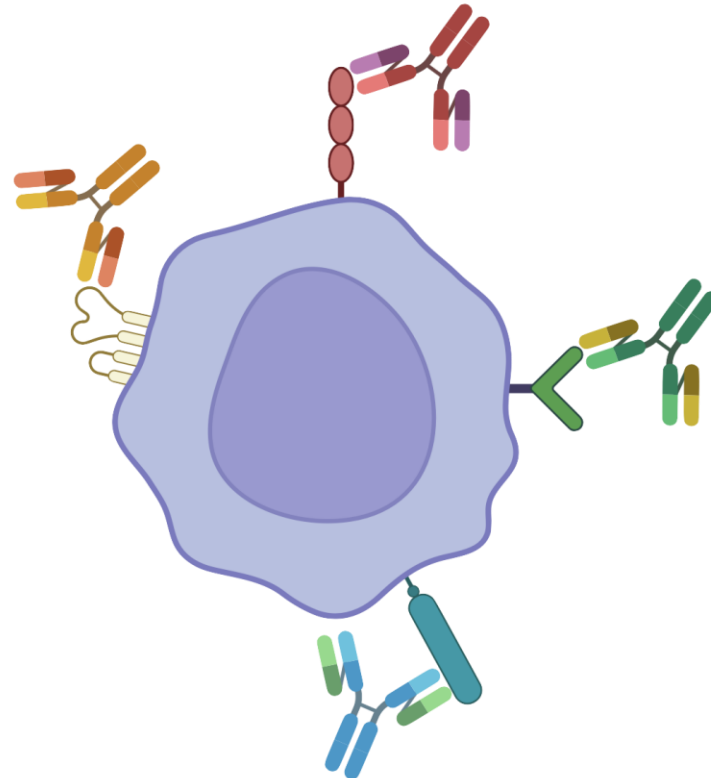
CD5⁺

CD23⁺

CD10⁻

CD20⁺

CD200⁺



Cellule piccole

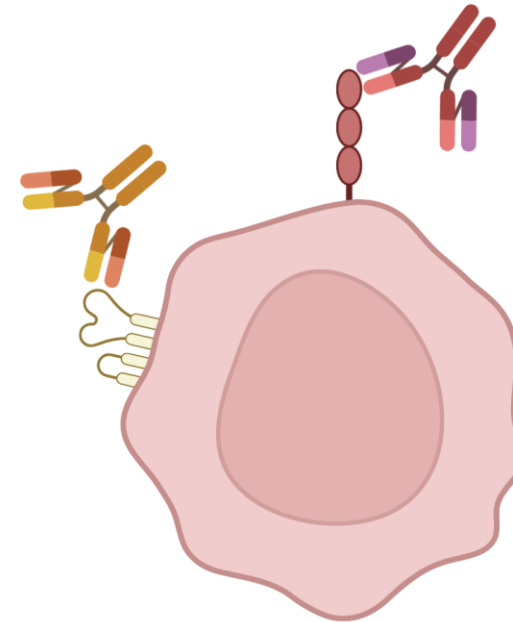
CD5⁺

CD23⁻

CD10⁻

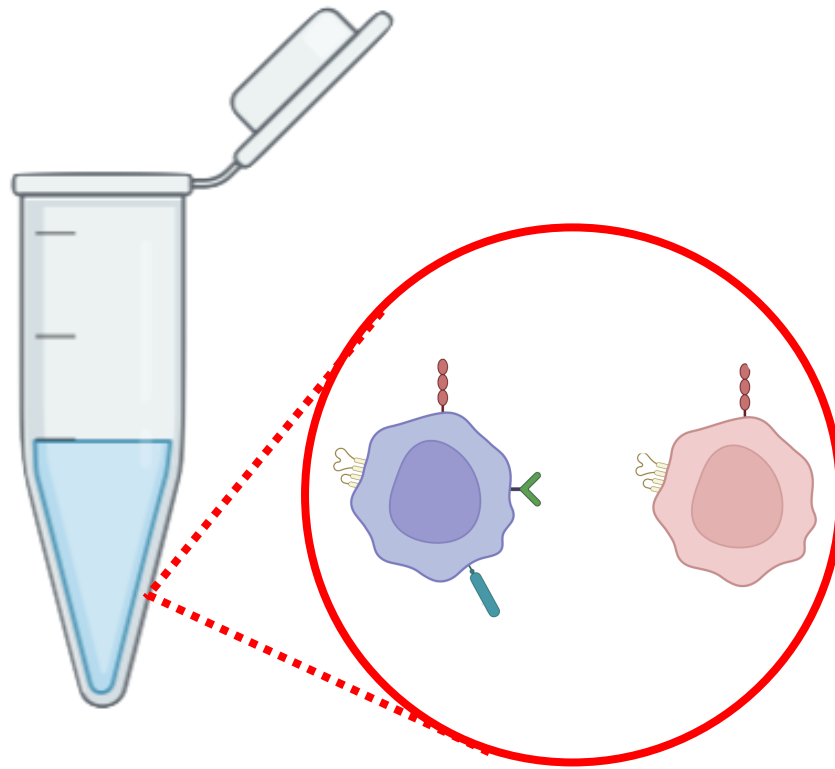
CD20⁺

CD200⁻



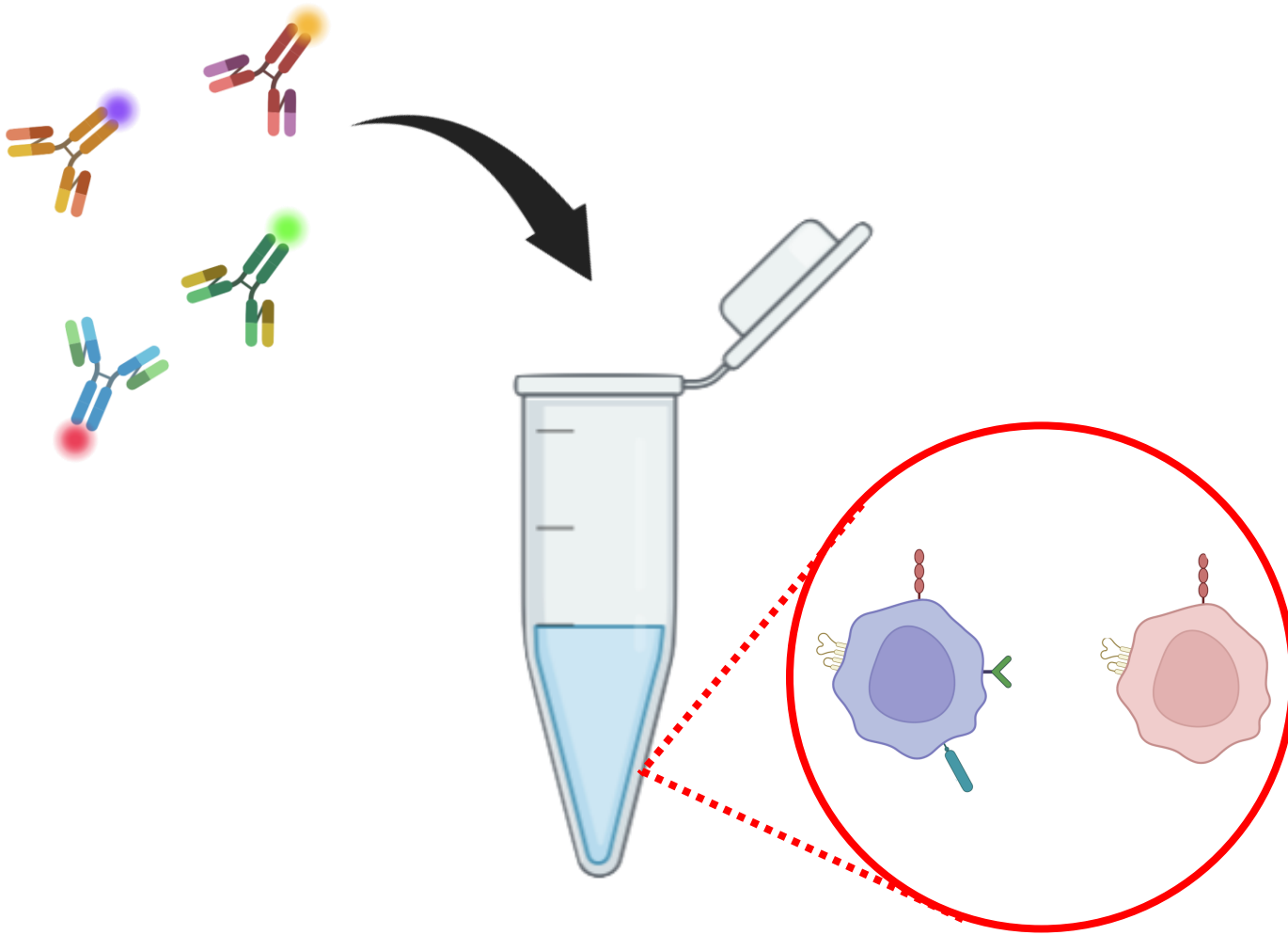
Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari



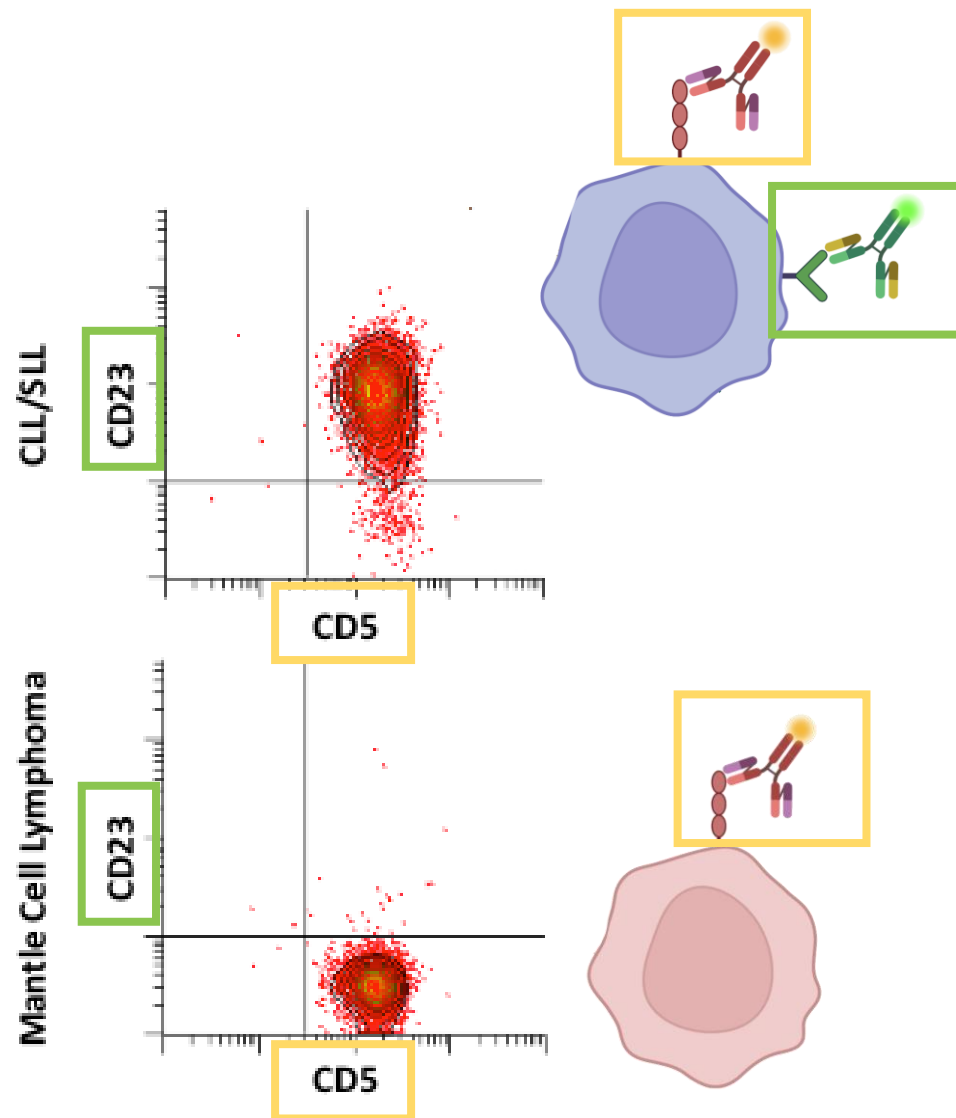
Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari



Applicazioni della Citofluorimetria

Determinazione dei **marker** cellulari

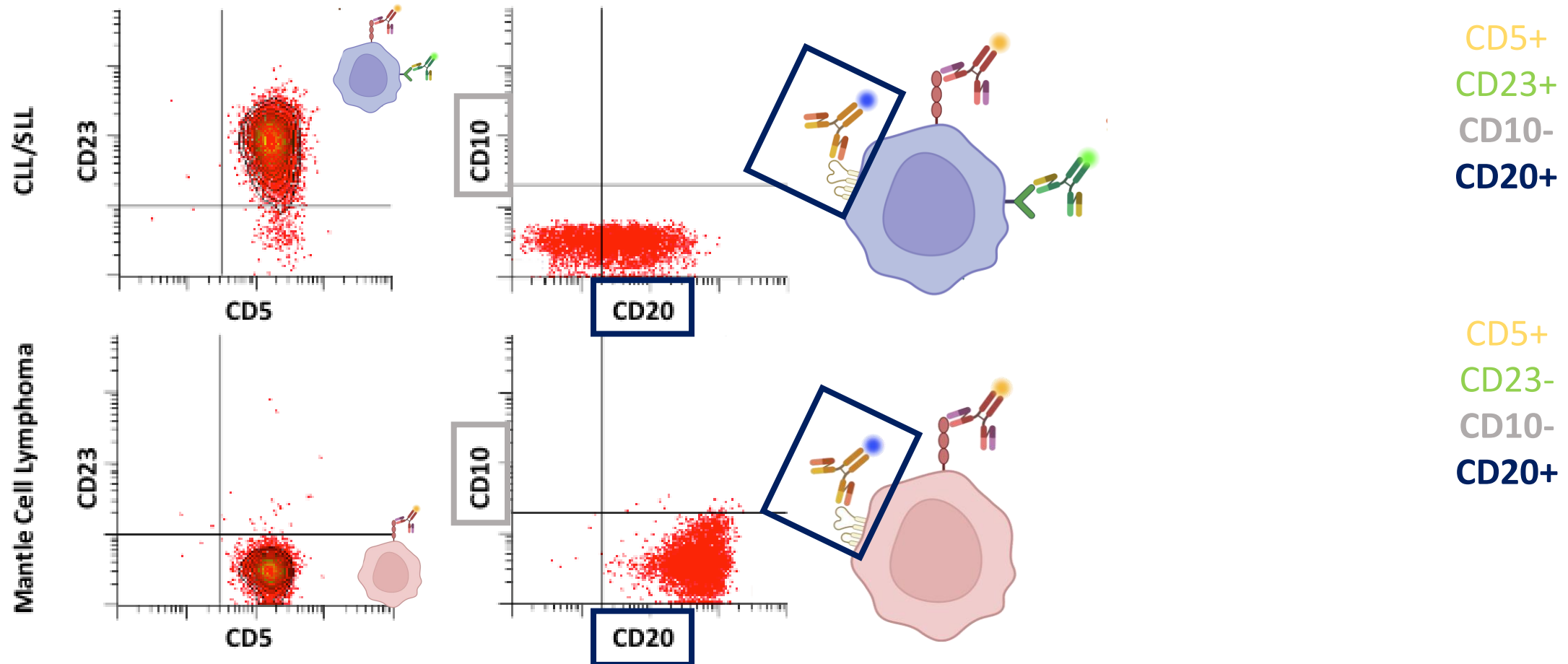


CD5+
CD23+

CD5+
CD23-

Applicazioni della Citofluorimetria

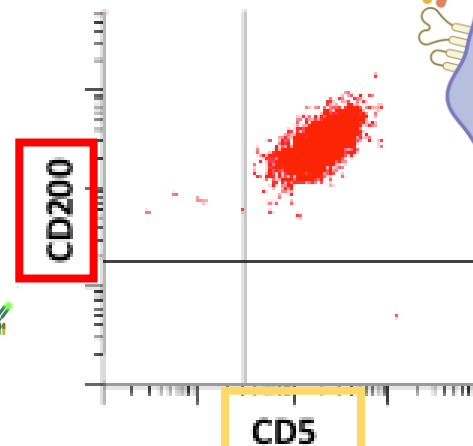
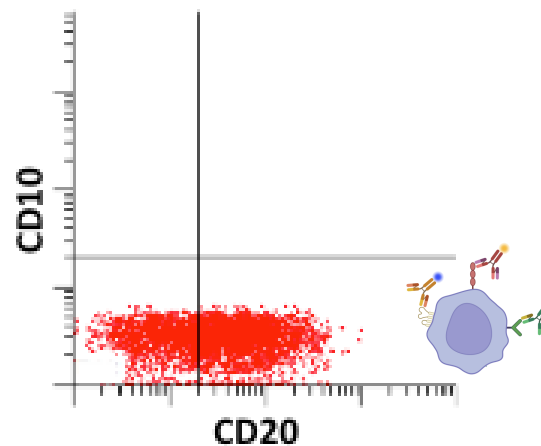
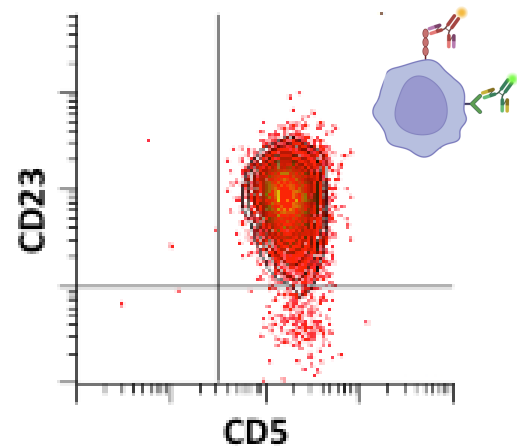
Determinazione dei **marker** cellulari



Applicazioni della Citofluorimetria

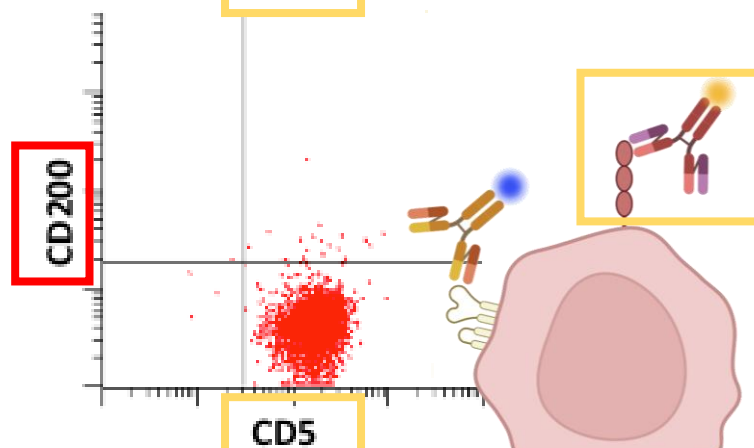
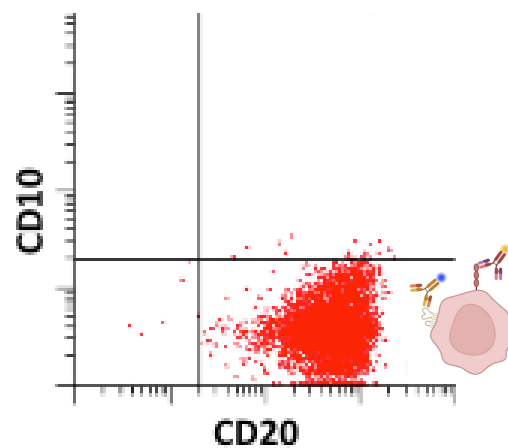
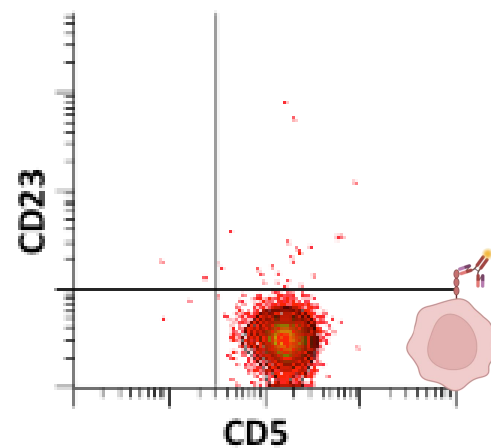
Determinazione dei marker cellulari

CLL/SLL



CD5+
CD23+
CD10-
CD20+
CD200+

Mantle Cell Lymphoma



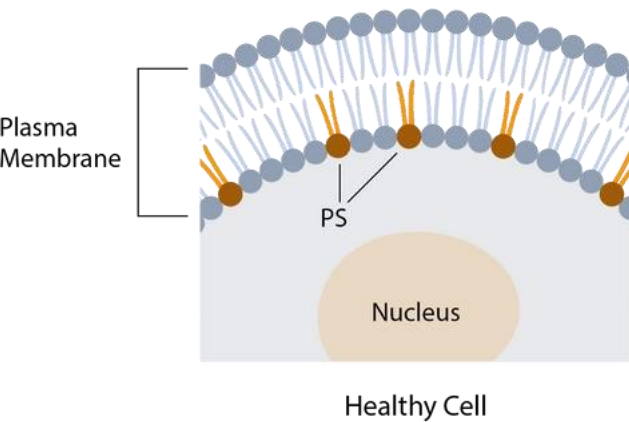
CD5+
CD23-
CD10-
CD20+
CD200-

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

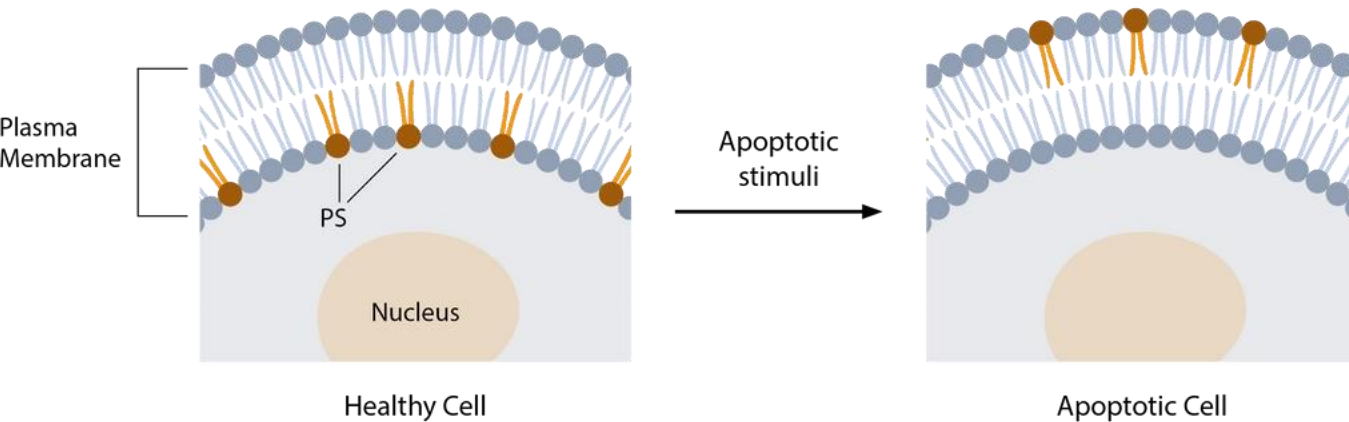
Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**



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

Applicazioni della Citofluorimetria

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

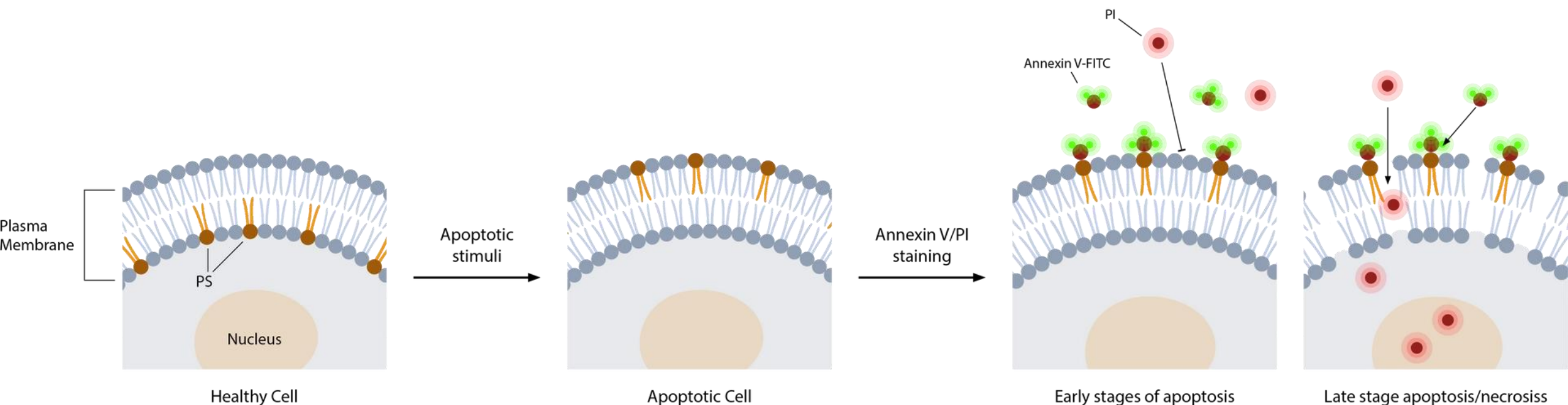


Nelle cellule sane la fosfatidilserina è localizzata nel lato interno della membrana cellulare

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

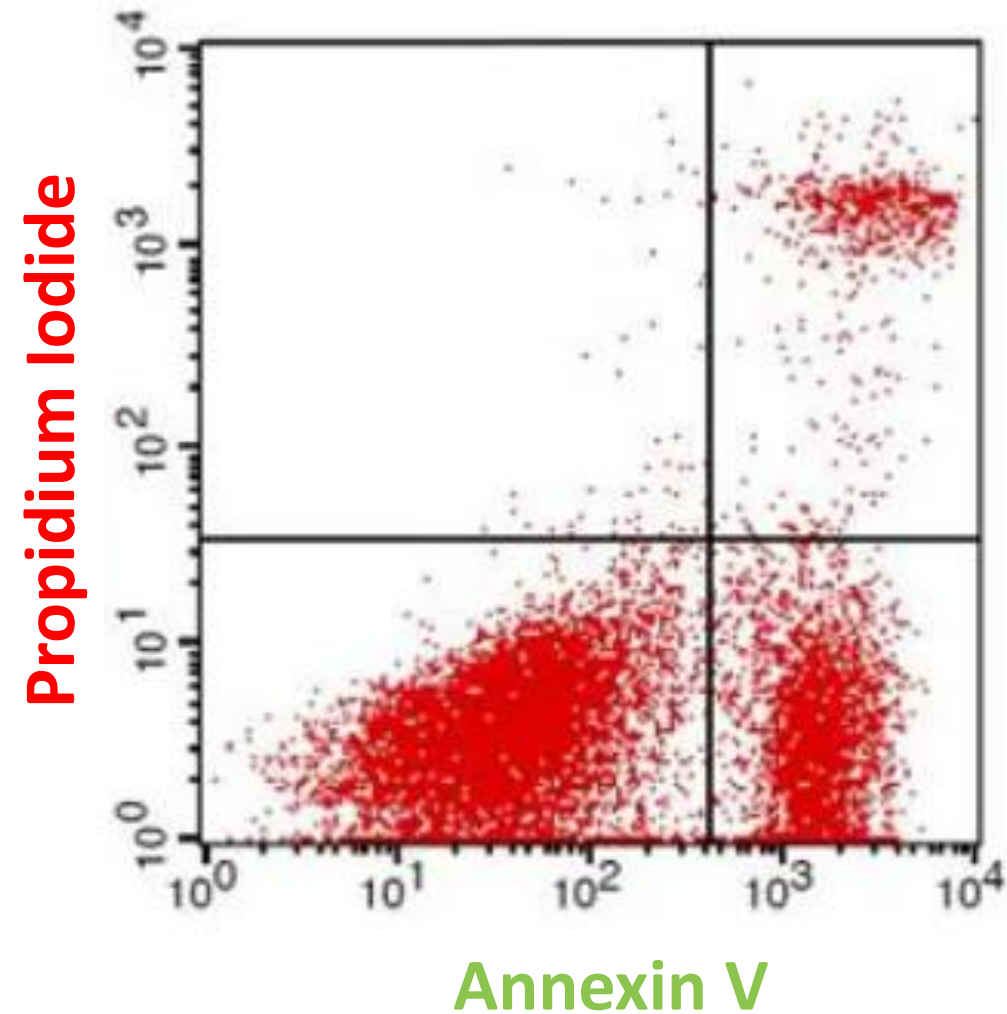
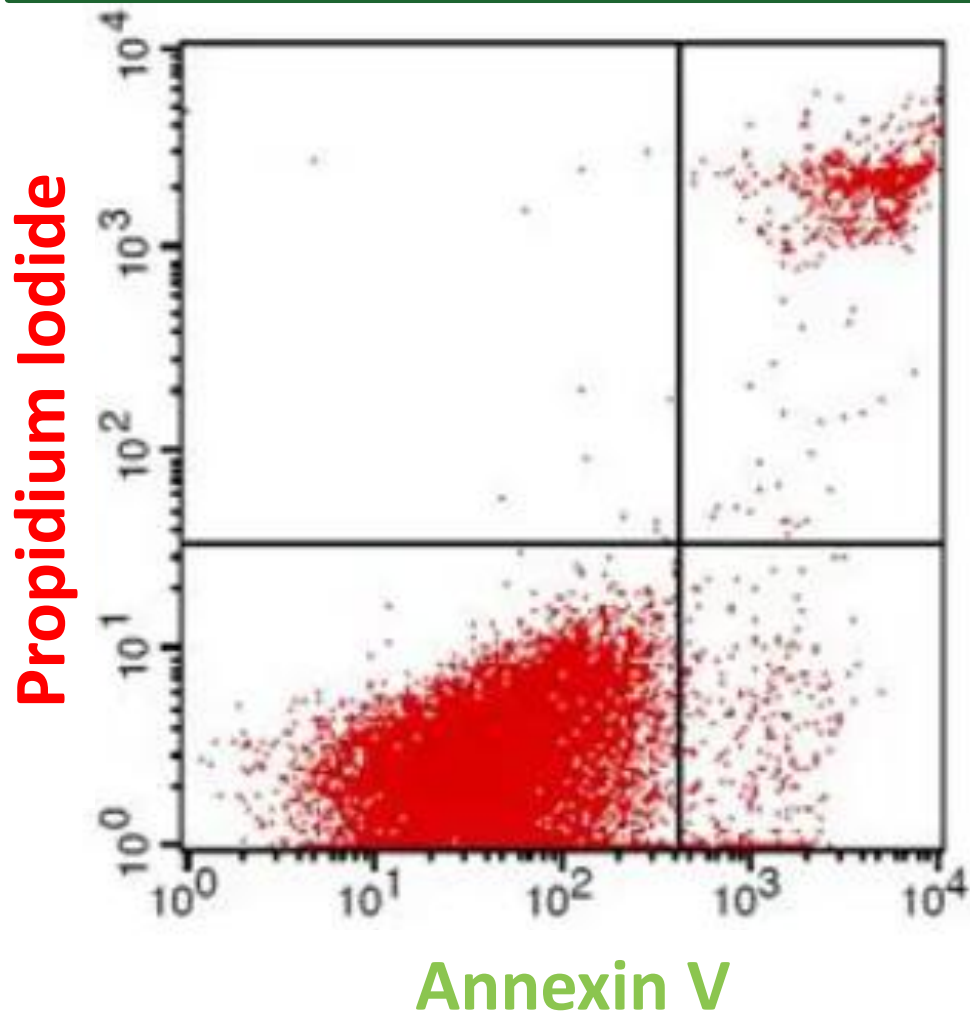
Nelle cellule apoptotiche la fosfatidilserina “esce” nel lato esterno della membrana cellulare

Early stage apoptosis
→ Annexin V +
→ PI -

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

Applicazioni della Citofluorimetria

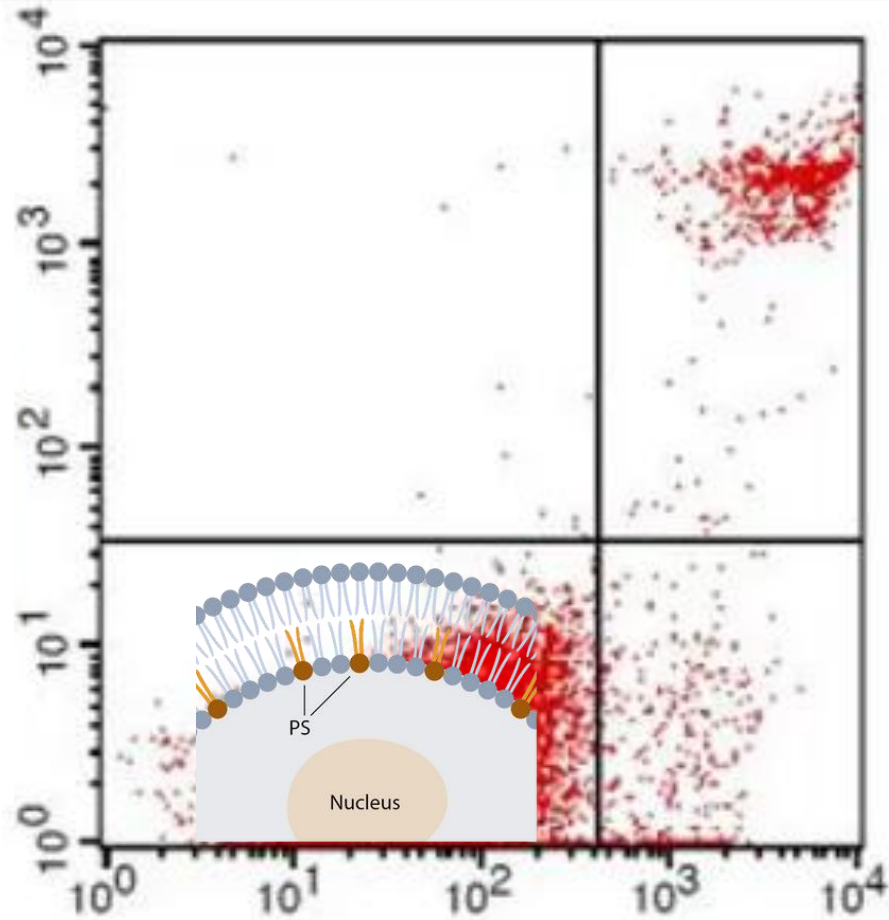
Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**



Applicazioni della Citofluorimetria

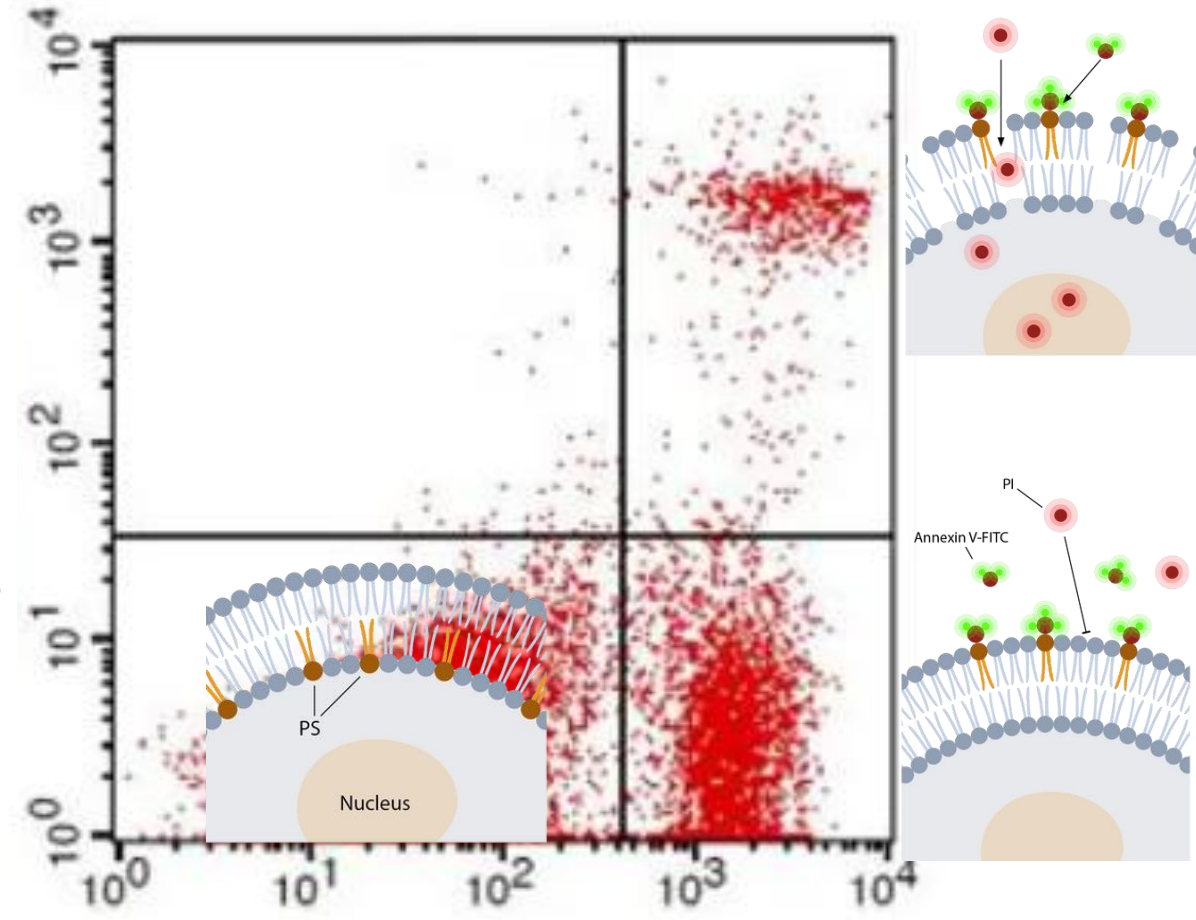
Discriminazione tra cellule **vive**, cellule **apoptotiche** e **necrotiche**

Propidium iodide



Annexin V

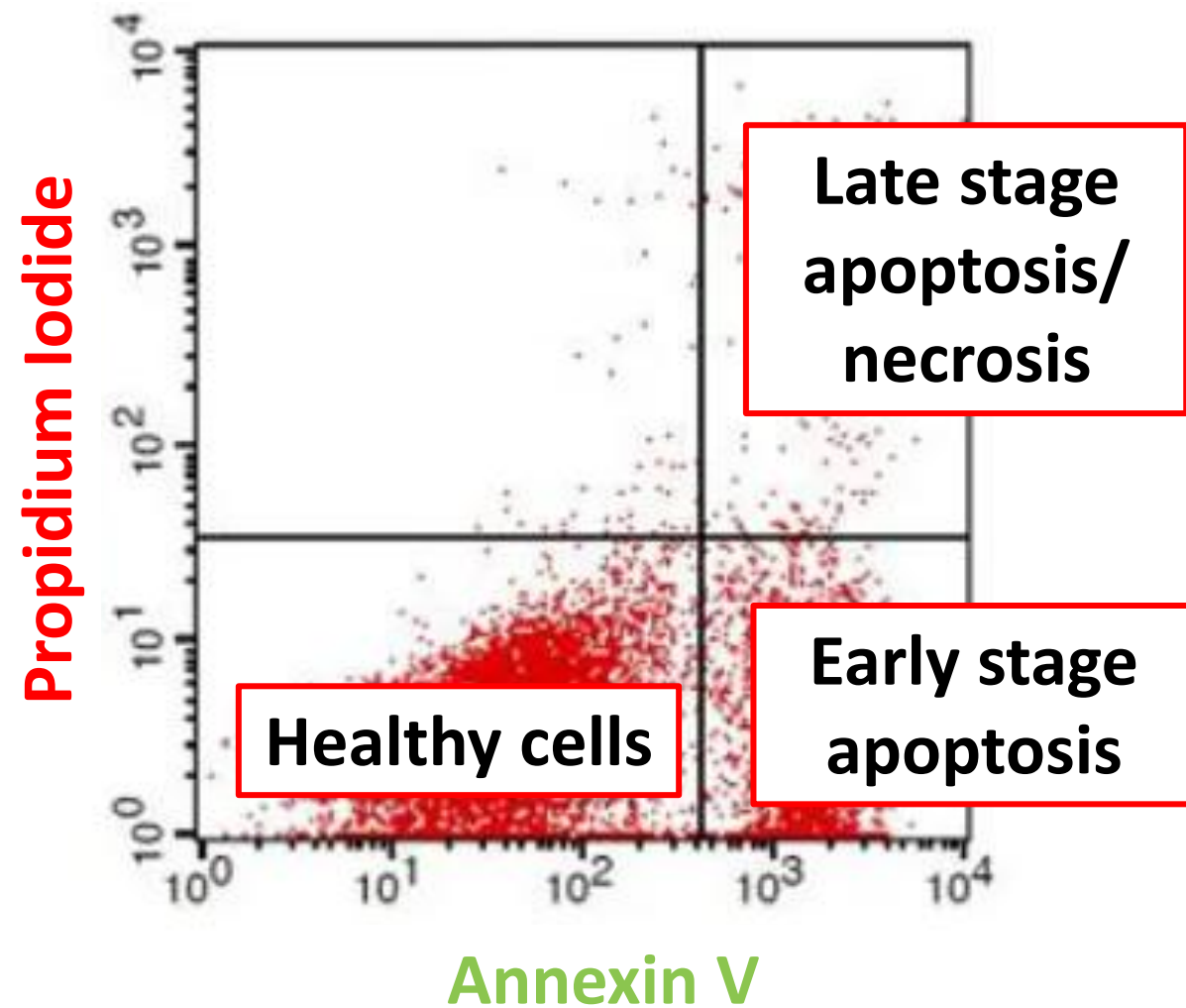
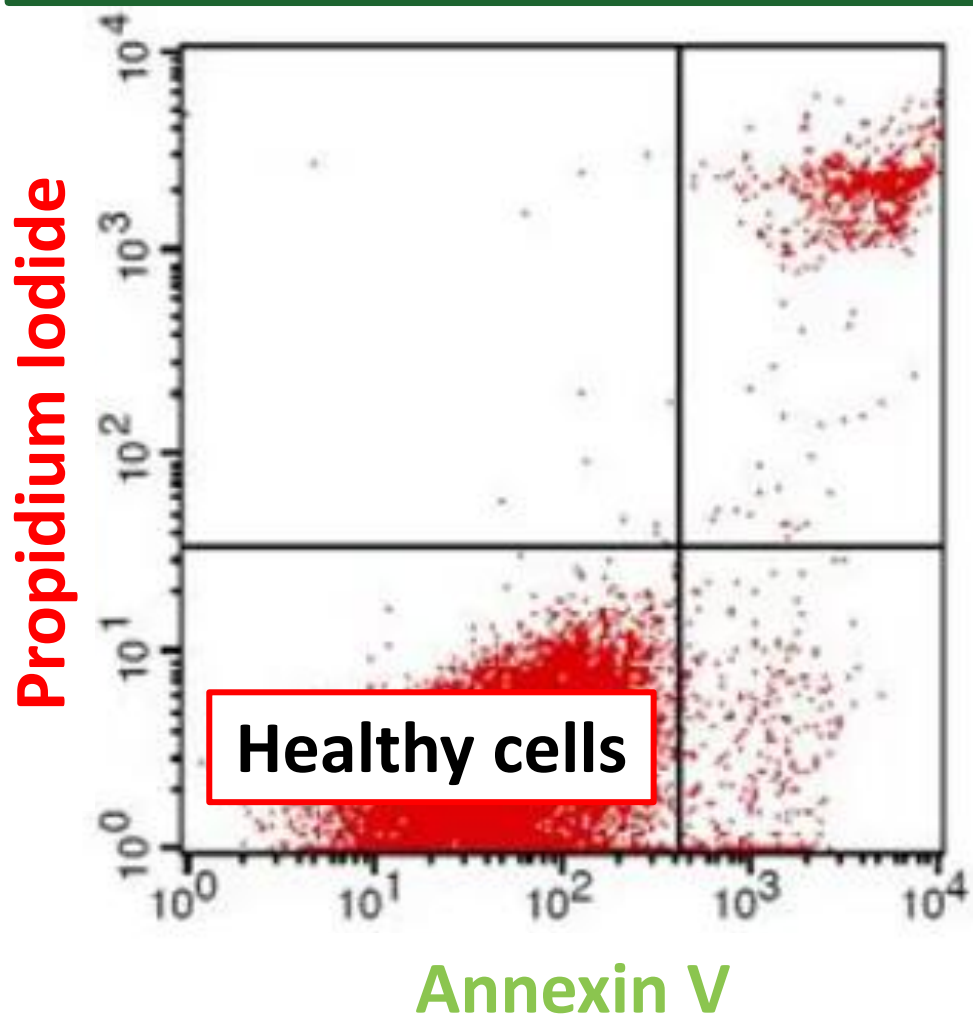
Propidium iodide



Annexin V

Applicazioni della Citofluorimetria

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

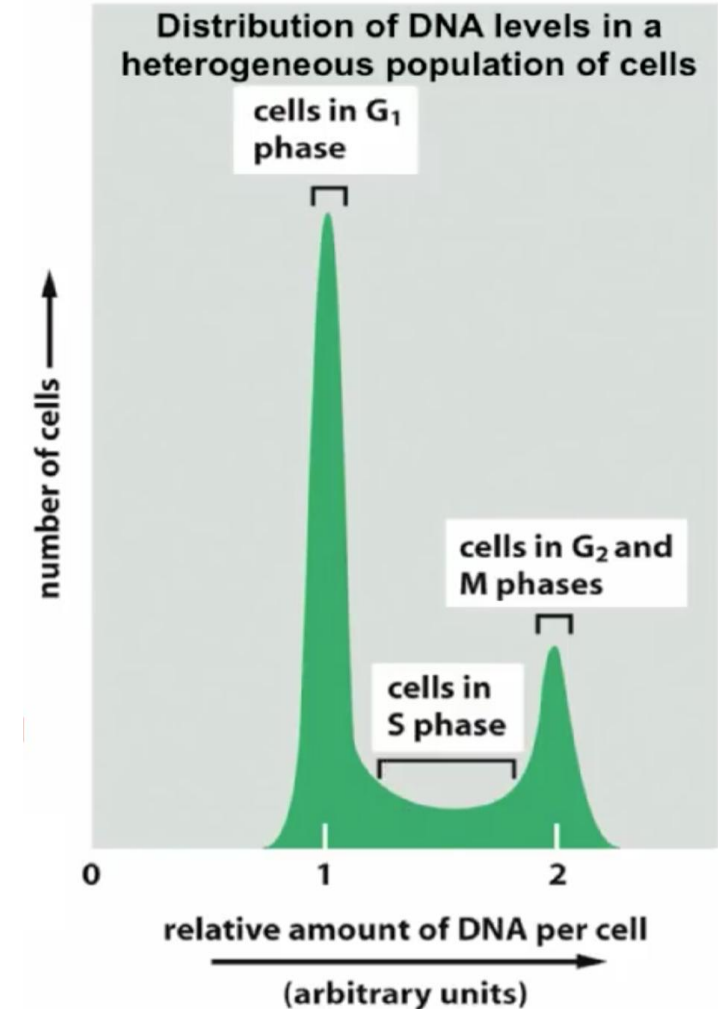
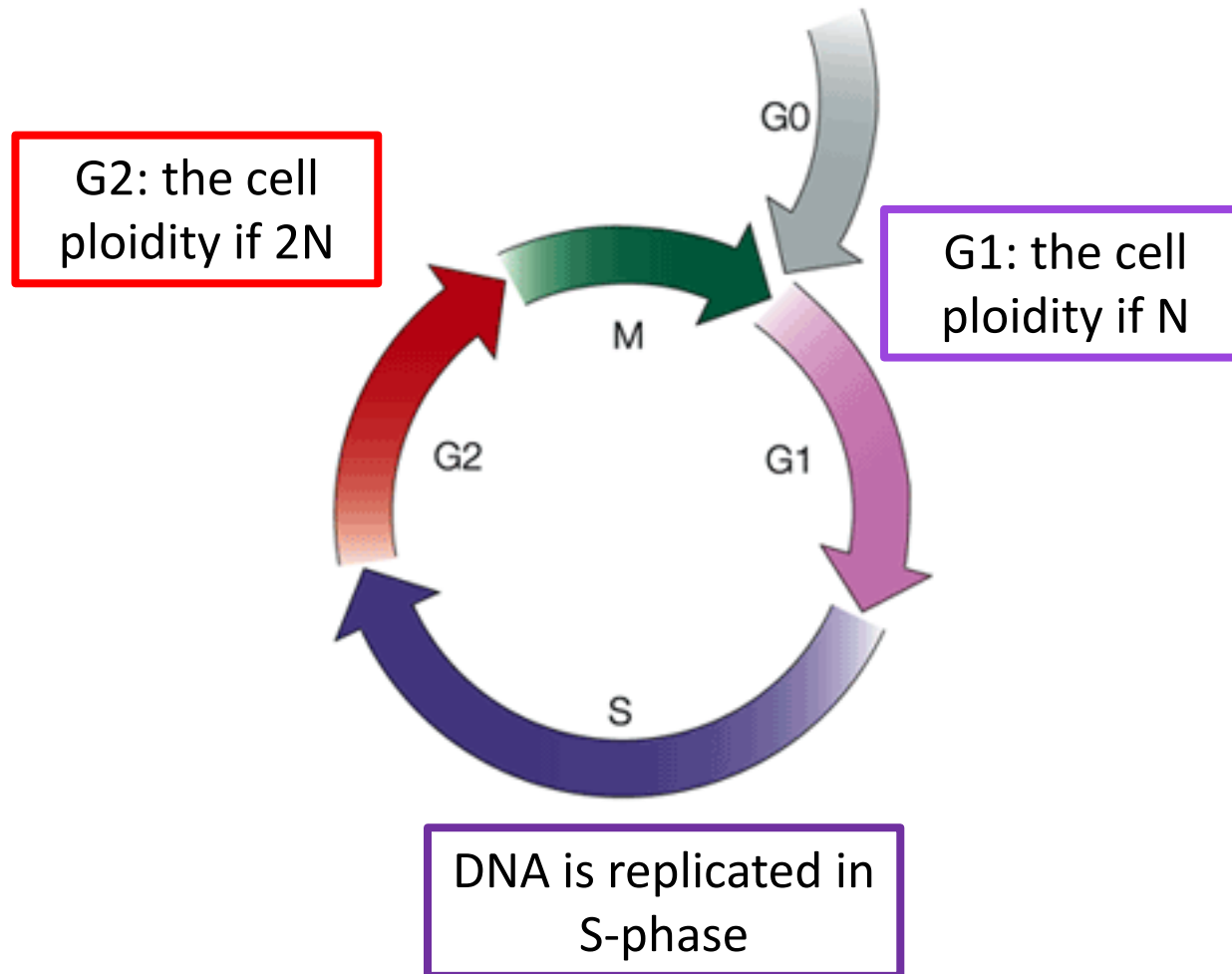


Applicazioni della Citofluorimetria

- 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

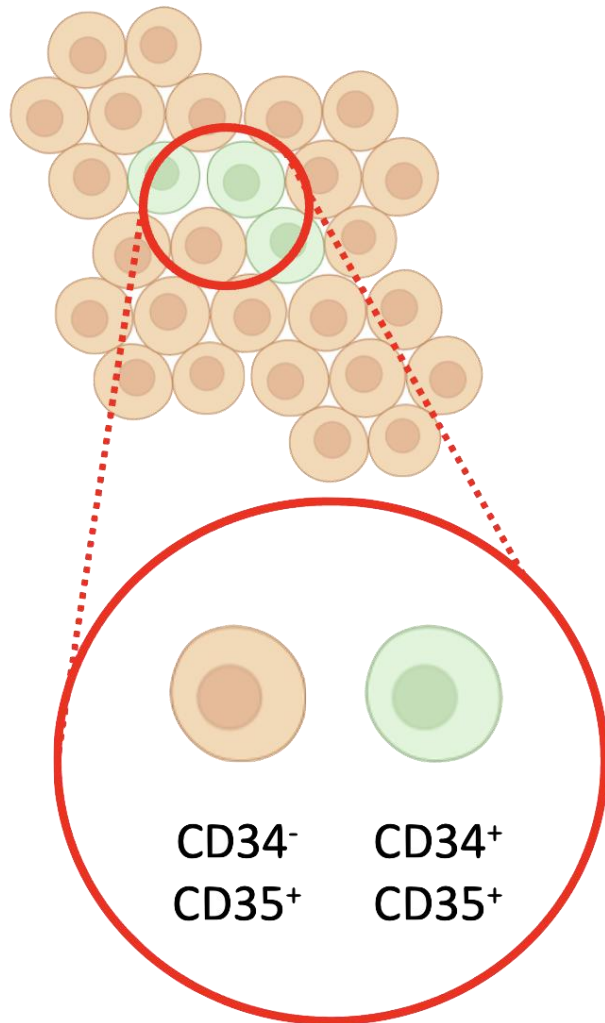


Applicazioni della Citofluorimetria

- 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**

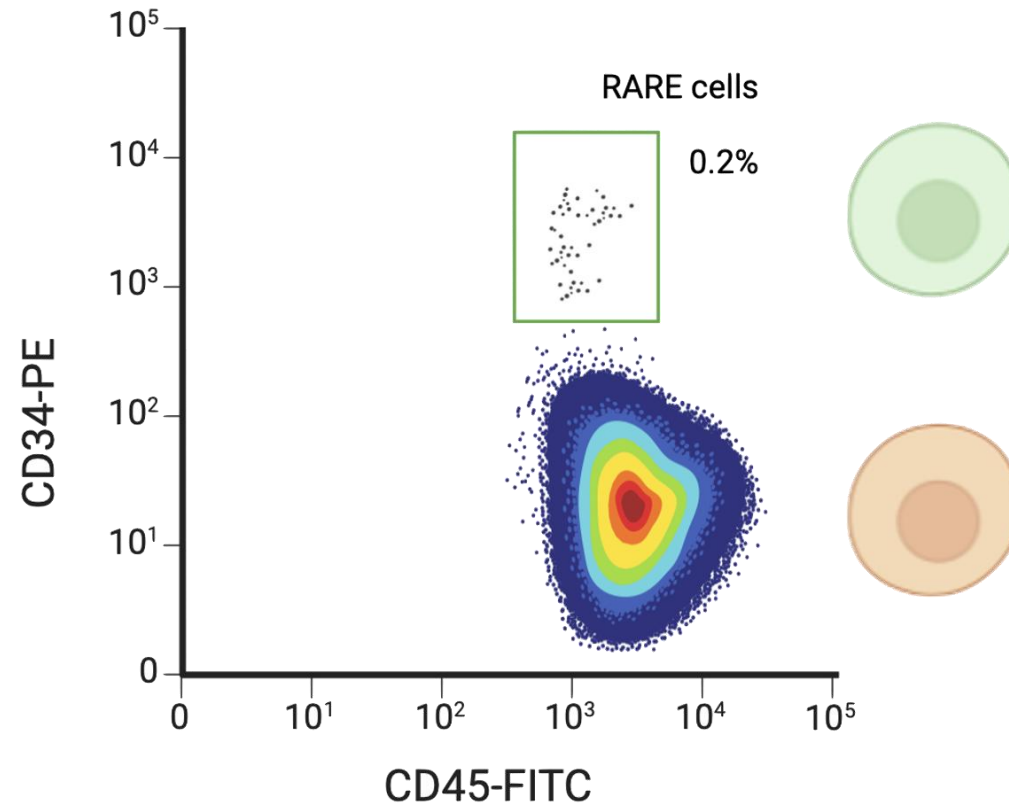
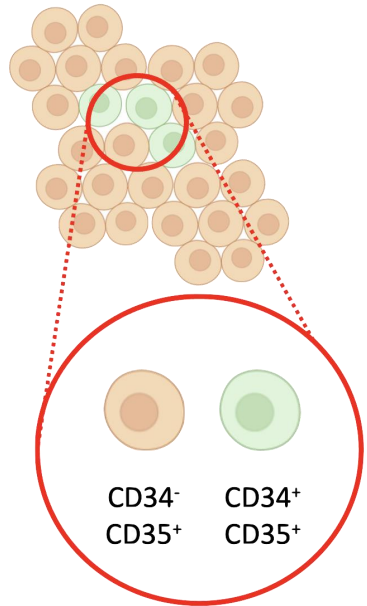
Applicazioni della Citofluorimetria

Predisposizione per la separazione cellulare



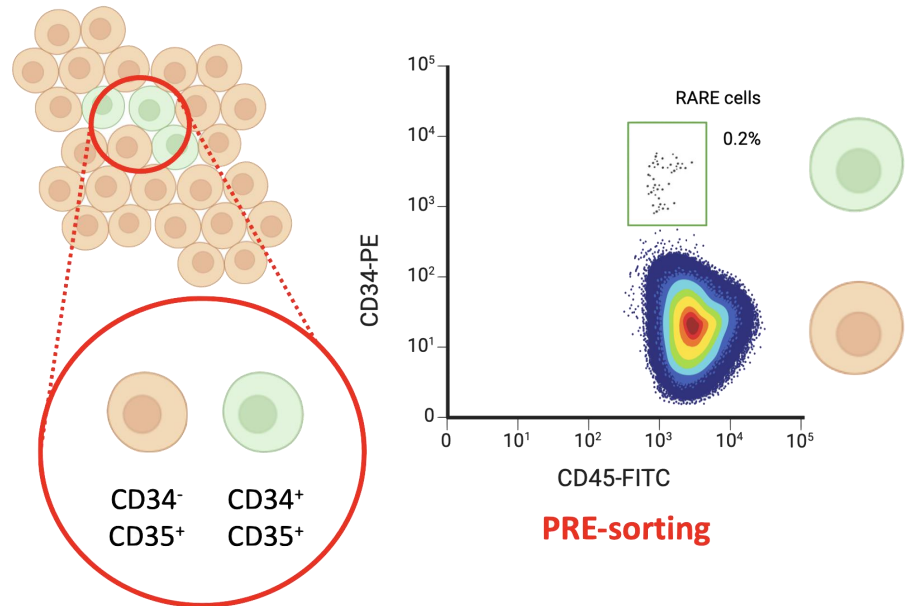
Applicazioni della Citofluorimetria

Predisposizione per la separazione cellulare



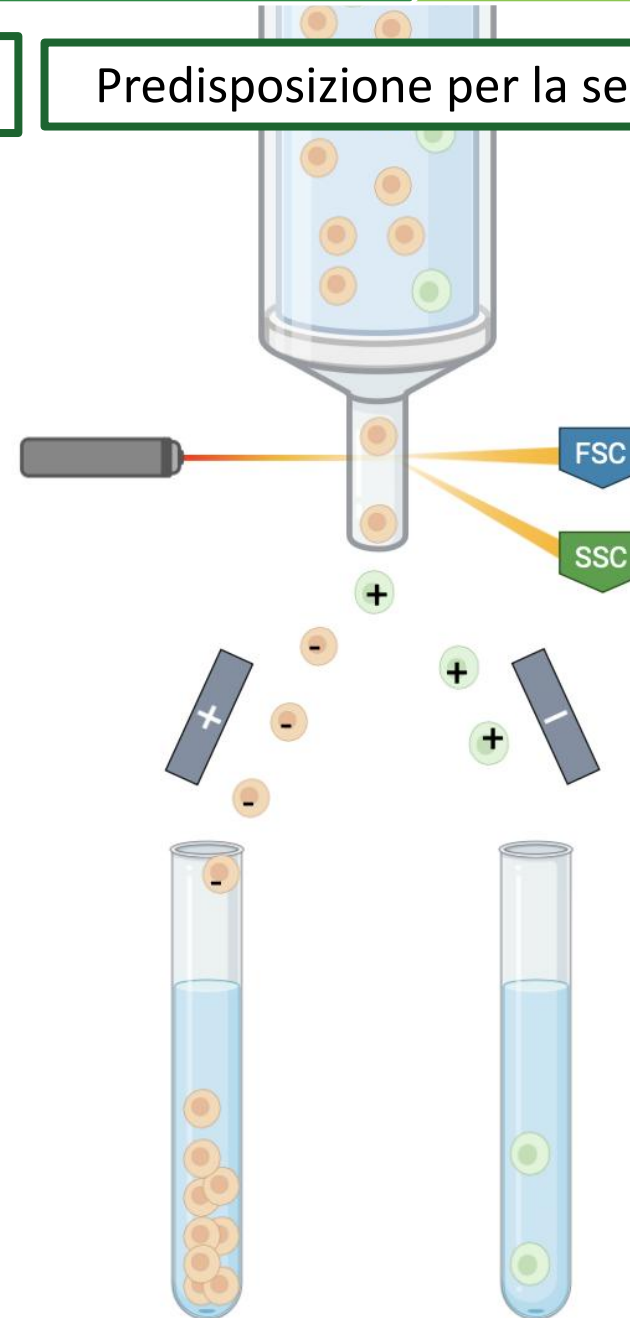
PRE-sorting

Applicazioni della Citofluorimetria



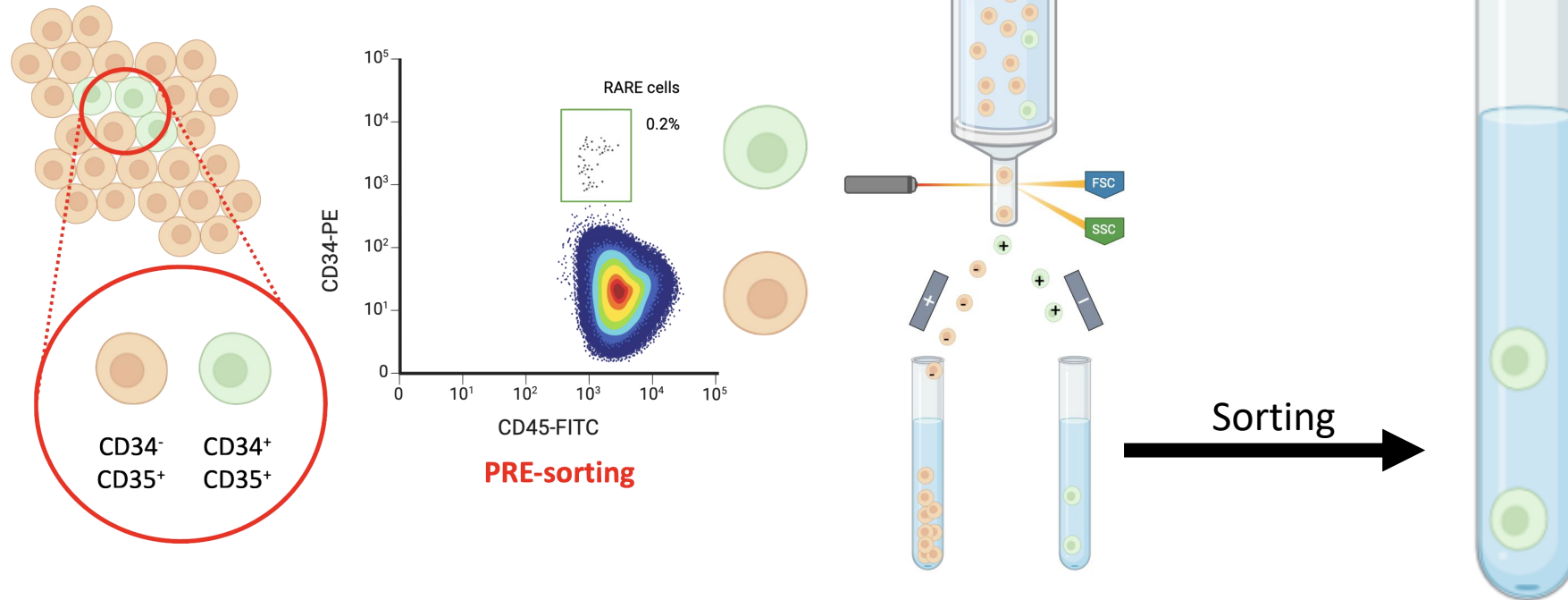
PRE-sorting

Predisposizione per la separazione cellulare



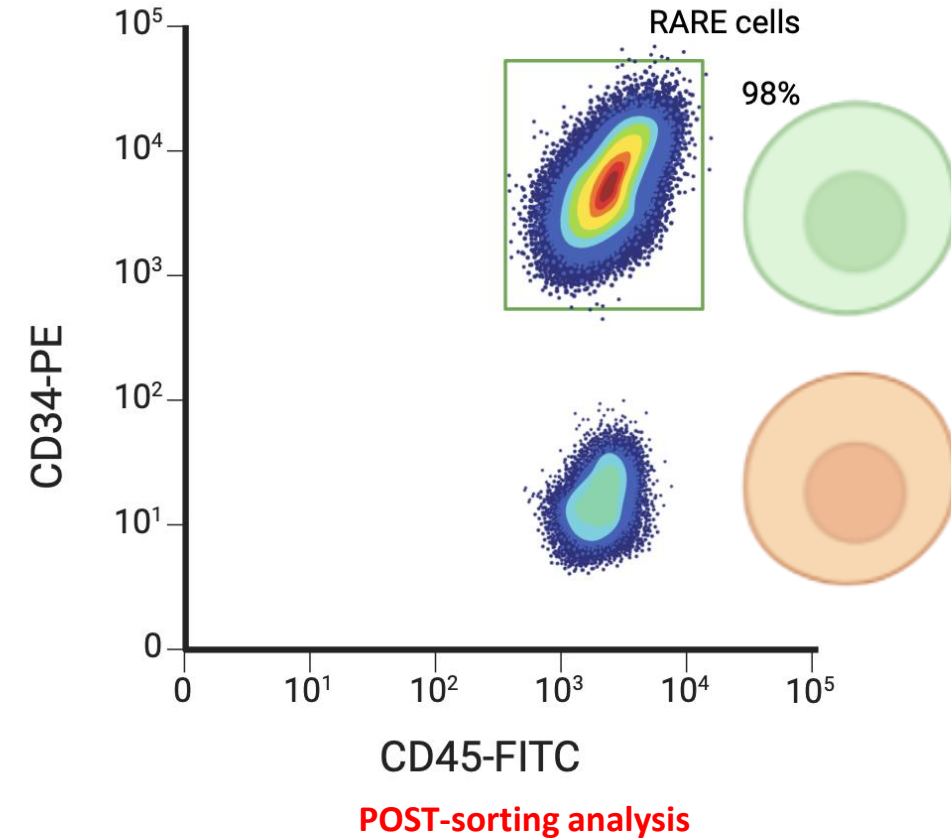
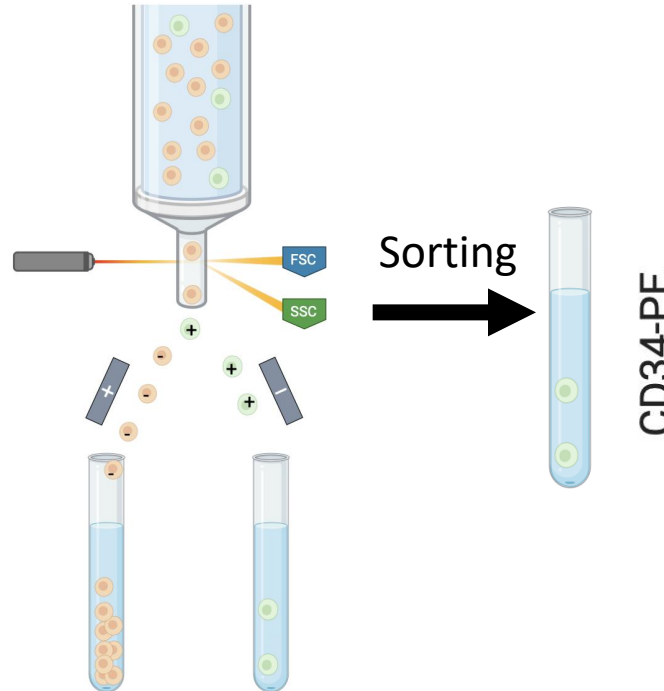
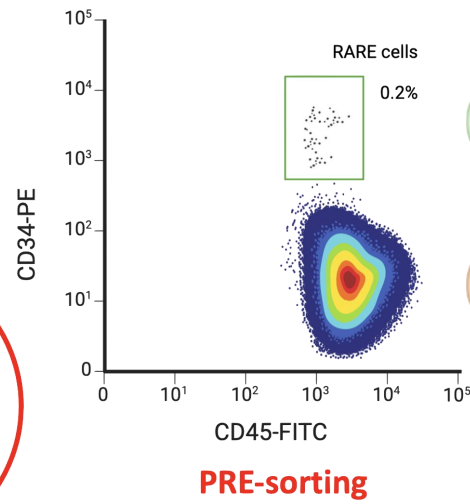
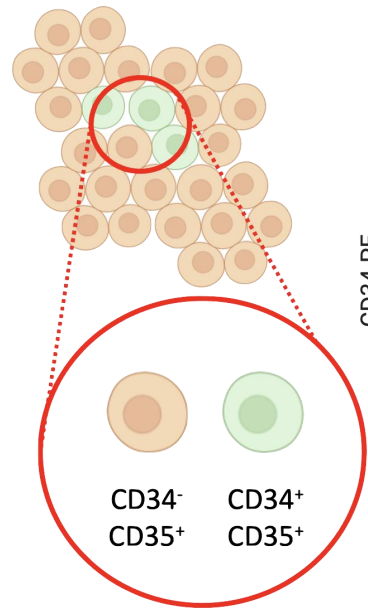
Applicazioni della Citofluorimetria

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