

Lezione del Professor Illiano 11/11/08: LA CONTAGLOBULI AUTOMATICA

La lezione di oggi riguarda la citometria a flusso.

I conta globuli automatici sono i prototipi dei citometri a flusso.

Il principio è molto semplice, ci sono due camere che comunicano attraverso una fessura molto piccola, a livello della quale ci sono dei sistemi di osservazione.

Attraverso un sistema di pompe le cellule vengono fatte passare da un lato all'altro passando per questo punto di osservazione. Come devono essere le cellule per essere analizzate da un citometro a flusso? Le cellule devono essere separate. Il sangue si presta particolarmente perché abbiamo cellule separate le une dalle altre in un mezzo acquoso.

Quando noi andiamo a mettere un campione di sangue, attraverso un sistema di pompe, le cellule passano una alla volta, una dopo l'altra, da una cella all'altra.

Quando passano vengono osservate.

Siccome si è creata una differenza di potenziale fra le due camere (ci sono due elettrodi, c'è un generatore di corrente, ci sta un amperometro che segna il passaggio di corrente).

Quando la cellula passa attraverso quest'orificio, il volume cellulare occupa il posto della soluzione fisiologica per esempio, che è il mezzo che fa passare la corrente. Nel momento in cui passa la cellula ci sarà meno soluzione fisiologica e questo provoca un aumento di resistenza. Un opportuno apparecchio che si chiama impedenziometro registra l'aumento di resistenza.

Le cellule devono passare con una frequenza tale da dare il tempo all'apparecchio di registrare questo aumento di resistenza e per tornare alle condizioni di base.

Siccome gli apparecchi moderni sono molto veloci possiamo far passare anche 30.000-50.000 cellule al secondo.

L'apparecchio non solo mi segnala un aumento di resistenza ma mi dice anche questo aumento di resistenza di che entità è e la rapporta al volume cellulare, quindi l'apparecchio distingue il passaggio di una piastrina da quello di un macrofago o un globulo rosso.

Il conta globuli conta i globuli rossi e i globuli bianchi. Quando noi contiamo 5.000 globuli rossi conteremo anche 5.000 globuli bianchi

Apparecchi più moderni catalogano a seconda della grandezza le cellule, quando passa una cellula grossa capiscono che non è un globulo rosso ma quando passano i linfociti le cui dimensioni sono sovrapponibili a quelle di eritrociti più grandi o sono 4.500.000 o sono 4.500.000 più 3.000, 4.000 linfociti il conto non cambia.

Il discorso è molto diverso se parliamo del conto dei globuli bianchi poiché non deve essere inficiato dai globuli rossi perché i globuli bianchi sono da 6.000 a 8.000, se anche l'uno per mille dei globuli rossi (5.000) viene fatto passare come globuli bianchi, il numero dei globuli bianchi viene totalmente alterato.

Allora come si fa?

L'apparecchio sfrutta la differente resistenza ai detergenti delle membrane dei GR e dei GB.

Si usano dei lisanti che distruggono le membrane dei globuli rossi e non quelle dei globuli bianchi, per cui nel conto dei globuli bianchi vengono eliminati quelli rossi.

In base al volume l'apparecchio riesce a distinguere i linfociti dai macrofagi e polinucleati, ma come riesce a distinguere, nell'ambito dei polinucleati, gli eosinofili dai basofili ecc ecc?

Utilizza un raggio laser di una certa intensità che viene deviato dalla cellula in base alle caratteristiche della membrana.

Se la cellula è liscia viene deviato in un modo, se invece è granulosa, come capita coi polinucleati, perché ci sono tanti bitorzoli allora la deviazione è maggiore.

Questo fenomeno si chiama Light Scattering cioè ... laterale.

Allora noi possiamo catalogare le cellule in base a due parametri: volume e light scattering.

(il Prof. presenta e commenta un grafico) Sull'asse verticale mettiamo il volume, sull'asse orizzontale mettiamo il light scattering: e allora vedete, l'apparecchio ci dice che fra i globuli bianchi ci sono cellule di dimensioni differenti ma che hanno in comune capacità di deviare lateralmente la luce e ciò che significa?

Che hanno delle membrane che si somigliano, pertanto, possiamo avere cellule fra le quali una ha dimensioni doppie di un'altra però con una capacità di deviare la luce paragonabile; allora questi sappiamo che sono i linfociti ed i monociti: i linfociti hanno un enorme nucleo (relativamente al volume cellulare) con un alone di citoplasma; i monociti hanno anch'essi un bellissimo nucleo a luna piena o reniforme e con alone citoplasmatico; poi vengono tutte queste altre cellule che hanno volume paragonabile alle precedenti ma una

capacità di deviare la luce molto più spiccata perché questo riflette una maggiore irregolarità di superficie tipica dei polinucleati e allora noi qua sappiamo che ci stanno i neutrofili, gli eosinofili...

allora, guardate, l'apparecchio ci dice quanti globuli bianchi ci stanno, la percentuale dei neutrofili (61%), dei linfociti (30%), degli eosinofili (2-3%), dei basofili (0,1 % , significa che ci sta un basofilo ogni 1000 leucociti); qui vi dice anche quali sono i valori in assoluto: su 8400, se i neutrofili sono il 61%, ci sono 5000 neutrofili, vi fa pure il conto. Che altro vi dice quest'apparecchio? Vi dice che i globuli sono 5.380.000 ma tenete conto che su questi 5.380.000, se ci sta il contributo dei globuli bianchi il significato sicuramente non cambia (mentre il contrario non può avvenire perché noi i globuli rossi in quel caso non li contiamo proprio); questo apparecchio vi dice pure quant'è l'emoglobina in grammo per dl, questo è un dato molto importante perché valutare la quantità di emoglobina ci informa sulla possibilità di trasportare ossigeno (che è la funzione nella quale l'emoglobina è specializzata) ma l'emoglobina ha anche altre funzioni di tutto rispetto: l'emoglobina ha una funzione tampone . la quantità di emoglobina e quella dei globuli rossi è importante: se voi vedete un paziente che ha una elevata quantità di emoglobina voi vi dovete chiedere il perché; sicuramente dovete pensare alla funzione respiratoria, vi dovete chiedere se questo paziente respira bene o non respira bene; se siete davanti ad un paziente con broncopneumopatia cronica, enfisematoso che sapete che inizialmente aveva molta emoglobina e poi i suoi livelli di emoglobina si riducono dovete andare a vedere immediatamente la funzione renale: questo rene non è più in grado di sostenere con l'eritropoietina l'iperproduzione di globuli rossi = è un parametro importantissimo; l'apparecchio non solo vi dice che ci sono questi cinque milioni di globuli rossi ma (commentando un grafico) qui vi porta una curva, la curva dei globuli rossi nella quale vi dice il volume del globulo rosso (da 80 a 94 fentolitri), il volume corpuscolare medio: questo è molto importante perché voi sapete che esistono molte malattie caratterizzate da popolazioni eritrocitarie non omogenee dal punto di vista del volume e questo apparecchio ve lo dice; ora vi faccio vedere qualche esempio, se c'è qualche cosa che non va l'apparecchio ve lo dice, vi fa i commenti: (commentando un grafico) vedete, questa curva è spostata più a sinistra, sulla scala dei fentolitri la mediana non si trova sui novanta ma si trova sui 74 quindi l'apparecchio ve lo indica e vi dice: "microcytosis"; il volume dei globuli rossi viene misurato uno per uno (cellula per cellula) perché l'impulso dovuto all'aumento di resistenza viene registrato uno per uno (cellula per cellula) e poi si fa la somma; facendo la somma l'apparecchio ci dà l'ematocrito che è un ematocrito reale perché risulta dalle somme dei volumi delle cellule contenute in quel volume di sangue; non è come quando facevamo noi che centrifugavamo e poi vedevamo l'altezza della colonna rossa e l'altezza della colonna bianca e vedevamo qual era il per cento: quella era anche buona ai fini clinici ma era meno precisa perché in quella colonnina dei globuli rossi precipitati, impacchettati, era sicuramente inclusa una quota di molecole d'acqua, qua no! Il globulo rosso, qui, è stato registrato ed è stato salvato;

che altro vi dà l'apparecchio? Vi dà l'ematocrito reale, vi dà il volume corpuscolare medio, vi dà il contenuto medio di emoglobina per ogni globulo rosso; come fa a vedere quanta emoglobina ha ogni globulo rosso? vede in 100 cc quanti grammi di emoglobina ci stanno, li distribuisce per il numero di globuli rossi e si ha un valore medio per ciascun globulo rosso; l'apparecchio ha annesso uno spettrofotometro con una lunghezza d'onda in grado di mettere in evidenza l'emoglobina; l'apparecchio conta i globuli rossi ed i bianchi in modo separato e lo fa per tre volte (i tre risultati devono essere molto vicini fra di loro): se il sangue non è stato diluito bene le piastrine tendono ad agglutinarsi fra di loro e l'apparecchio rileva queste anomalie e invita a ripetere la misurazione;

questo apparecchio ci dà la quantità di emoglobina in grammi per 100 cc di globuli rossi e tutto questo è molto utile per valutare le anemie se io ho 4.600.000 globuli rossi però ho un ematocrito di 35 (%) mi trovo in presenza di un'anemia microcitica, non ci sono altre possibilità (se ho un ematocrito così basso significa che i globuli rossi sono più piccoli) e mi viene confermato dal fatto che il volume corpuscolare medio è di 74 fl quando dovrebbe essere fra 80 fl e 94 fl;

(il prof. propone altri quadri laboratoristici) questo pz ha 3.000.000 di globuli rossi, 8g/dl di Hb , il volume dei globuli rossi è di 79 fl, ai margini della normalità;

allora, questo è un apparecchio che ha parecchie benemerite perché sapere che un pz ha molti globuli bianchi, molti neutrofili ci indirizza verso la diagnosi;

qui vediamo dei globuli rossi con volume corpuscolare medio di 102 fl, è aumentato, quindi, si parla di macrocitosi; qui, ancora, la cosa importante da vedere è il numero dei globuli bianchi che sono 16.000 ma ciò che ci sorprende è questa grandissima popolazione che ha il volume abbastanza grosso ma la capacità di deviare la luce è poca e allora l'apparecchio ci dice che di questi 16.000 globuli bianchi solo il 2,7 % sono neutrofili; ora vediamo se questo valore percentuale (bassissimo) com'è in valore assoluto: corrisponde a 400 neutrofili e sono bassissimi perché in condizioni normali dovremmo avere, come minimo, 3200 neutrofili =

questo è pz che va protetto, può prendere infezione e, pur avendo parecchi globuli bianchi, ha pochi neutrofili; che tipo di globuli bianchi ha? Per il 31% ha linfociti (e sembrerebbe un valore giusto) ma, se i leucociti sono 16.000, il 31% sarà moltissimo e, infatti, in valore assoluto, i linfociti sono 5.000 (il valore massimo è 3000, quindi, 5000 sono moltissimi); ancora più importante è questo 66% di monociti (sono più di 10.000 di monociti), la diagnosi è fatta: il pz ha una linfomonocitosi, se ha anche la linfadenopatia ha la linfomonocitosi adenopatia infettiva; questo apparecchio, quindi, vi dà delle importantissime informazioni; quando la cellula passa può essere investita da una corrente a intensità più forte che attraversa il corpo cellulare e questa corrente, a seconda della cellula che passa, trova una maggiore o minore resistenza: la resistenza maggiore è offerta dal nucleo: le cellule che sono tutto nucleo offrono una resistenza maggiore (i linfociti ed i monociti), le cellule che hanno un miglior rapporto nucleo/citoplasma offrono una resistenza minore relativamente; un altro meccanismo è il "forward scattering", per spiegarla in maniera semplice fa in modo che una cellula venga illuminata quando passa, allora proietta su uno schermo l'ombra e quest'ombra riflette la forma e le dimensioni della cellula.

Tutti questi dati vengono messi insieme in modo tale da permettere la distinzione delle diverse cellule e vi assicuro che è affidabile come il più esperto degli istologi.

A volte potrebbero essere necessarie altre informazioni. Immaginate di stare analizzando il sangue di una donna gravida. Sapete che negli ultimi mesi di gravidanza i globuli rossi non sono tutti della madre, qualcuno è anche del feto. Più si dilata la placenta, più si rompe qualche capillare.

Normalmente, negli ultimi mesi di gravidanza, l'uno per mille dei globuli rossi può essere rappresentato da globuli rossi fetali.

Quest'uno per mille, negli ultimi mesi può anche diventare il sei per mille, ma se sono di più significa che qualcosa non va bene, significa che c'è sofferenza placentare, questo indipendentemente dalle reazioni immunologiche che possono verificarsi nelle gravidanze successive.

In quella determinata gravidanza se si supera i sessantamila globuli rossi fetali per mm cubo siamo in presenza di sofferenza placentare.

Le conseguenze per il nascituro possono essere gravissime. Questa situazione è difficile da individuare, almeno in un comune reparto ospedaliero, perché si tratta di individuare sessantamila globuli rossi fetali su cinque milioni di globuli rossi totali.

Come si può distinguere un globulo rosso fetale da uno materno?

C'è un marker specifico: il GR materno ha da 30 a 40 picogrammi di Hb adulta, quello fetale avrà l'Hb fetale che ha un'altra catena. Questo è evidenziato da un anticorpo marcato, fluorescente.

Un anticorpo capace di riconoscere la catena gamma per esempio va a legarsi solo al globulo rosso fetale.

Tutto sta però a pescare le migliaia di globuli rossi fetali tra i cinque milioni di globuli materni.

Un citofluorimetro lo può fare benissimo perché riesce ad esaminare 50.000 cellule al secondo ma noi dobbiamo aver trattato preventivamente questo nostro campione con l'anticorpo verso la catena gamma.

Sulla porzione costante dell'anticorpo abbiamo legato un segnale fluorescente che deve contenere qualcosa per cui alcune componenti si eccitano, gli elettroni passano da un certo orbitale ad uno più esterno.

Quando l'elettrone torna al livello iniziale cede energia luminosa e questa energia luminosa può essere registrata.

L'apparecchio ci dà la possibilità di eccitare questi proto??? A seconda del tipo di proto c'è bisogno di una luce eccitante con una certa energia.

Si utilizza un raggio LASER acronimo di *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*.

Nell'apparecchio c'è un tubo in cui c'è un gas neutro, per esempio il neon e ci sono due elettrodi che producono elettroni i quali vanno ad eccitare gli atomi di neon e producono radiazioni visibili (a seconda del gas che uso la radiazione sarà diversa).

L'apparecchio per dare risposte giuste deve essere tarato bene.

Per quanto riguarda il numero delle cellule è importante che passino una alla volta e che tutte le cellule che passano vengano illuminate alla stessa maniera.

Il citofluorimetro rileverà l'emissione del segnale del globulo rosso fetale che avrà trattenuto l'anticorpo marcato contro la catena gamma.

Poi c'è la possibilità del "sorting", cioè del raccogliere separatamente le cellule che danno un diverso segnale.

Questo è importante se pensiamo al caso di un trapianto di midollo, necessario perché vengono prodotte cellule patologiche. Con questa tecnica vengono separate dalle altre le cellule giovani, non dico quelle staminali ma cellule già differenziate per poter diventare un determinato tipo cellulare e queste vengono

conservate. Tutto il resto viene distrutto con la chemio o radioterapia dopo di che le cellule giovani sono restituite al paziente e vengono stimulate a differenziarsi.

Queste cellule sono scelte in base a certi criteri, dei markers di differenziazione cellulare.

La tecnologia della separazione ricorda un po' quella della stampante dei vostri computer, la stampante a getto d'inchiostro = quando le cellule ricevono un certo segnale magari vengono caricate perché quando passano attraverso un campo elettrico vengono deviate a destra o a sinistra. C'è un certo rapporto tra il numero di cellule contenute nella nostra sospensione e il numero di cellule che passano per secondo.

Se io faccio passare 500 cellule al secondo l'apparecchio deve essere in grado di ... e rilevare il segnale???

Però per far passare 500 cellule al secondo, se ho una sospensione e il numero di cellule che passano attraverso il sensore (?); se io faccio passare, ad esempio, 500 cellule al secondo, l'apparecchio non deve avere nessuna inerzia, deve essere tale che raccoglie il segnale e lo converte; Per far passare cinquecento cellule, ad esempio, se ho una sospensione cellulare molto ricca, questo lo ottengo con un diametro di flusso molto, molto piccolo, man mano che diminuisce la superficie cellulare il diametro di flusso deve essere più grande.

Cos'è questo diametro di flusso? (il prof. indica il grafico) E' questa corrente centrale; deve essere un compromesso tra il numero di cellule che passano e la necessità di far passare una cellula alla volta.

Se aumenta di molto la corrente di entrata non passa più una cellula alla volta ma ne passano due e allora il segnale che ho è dovuto a due cellule e non a una;

Le cellule passano in una corrente centrale, circondata da un'altra corrente, una specie di camicia di ...(?), se io allargo troppo questo flusso, questa corrente centrale, corro il rischio che invece che una cellula alla volta ne passano due; un altro problema importante è che le cellule devono essere tutte quante illuminate alla stessa maniera, la differenza deve risiedere nella diversa quantità di anticorpi legati, non nel fatto che una ha avuto più luce e l'altra meno. Il raggio luminoso deve avere non solo un opportuno diametro ma anche un'opportuna forma perché se il diametro è troppo piccolo la cellula viene illuminata solo perifericamente, se il diametro è molto più largo le diverse cellule vengono illuminate diversamente = il raggio deve essere tale che ogni cellula che passa riceva la stessa quantità di luce;

L'apparecchio che cosa registra? L'apparecchio registra un'intensità di fluorescenza; come la registra? Come si fa a registrare la fluorescenza? non è un valore assoluto, come moltissime altre cose, per cui leghiamo alle cellule una sostanza che emette fluorescenza a questa intensità; il segnale è da dieci volte a cento volte più intenso quindi, se le cellule sono state colpite dalla stessa quantità di luce, non c'è possibilità di confondersi; (il prof. confida molto sul potere descrittivo delle immagini che sta mostrando limitandosi, pertanto, ad integrarle appena con qualche commento.....).

Fra le sostanze fluorescenti sicuramente avete sentito parlare dello ioduro di propidio che si eccita ai 480 ed emette una luce verde; la cellula che ha potuto trattenere dello ioduro di propidio la vediamo durante il flusso; che cos'è questa sostanza? È una sostanza che è in grado di attraversare la membrana cellulare ed essere intrappolata negli acidi nucleici, pertanto, più acidi nucleici ci stanno e più ioduro di propidio c'è nella cellula; direte voi: ma se entra liberamente, che cosa succede? Perché una parte verrà trattenuta nel nucleo mentre un'altra rimane nel citoplasma: questa sostanza diventa fluorescente solamente quando è intercalata nel DNA, mentre, quella che resta nel citoplasma, non ci dà fastidio, non la vediamo; allora, quando la cellula passa attraverso il punto di osservazione e viene colpita da una luce con una certa lunghezza d'onda avremo una luce rossa la cui intensità è in rapporto alla quantità di DNA marcato e allora: se la cellula ha due nuclei emette un segnale maggiore, se la cellula si trova in uno stato di riposo emette un segnale ridotto, se la cellula è in fase di sintesi emette un segnale più intenso, se la cellula ha appena raddoppiato il suo patrimonio nucleare perché sta per entrare in mitosi emette un segnale doppio, se la cellula è stata frantumata come capita nell'apoptosi, pertanto ci sono solo dei residui di nucleo, emette un segnale più basso; la mia applicazione mi può dire se una certa popolazione cellulare è in fase quiescente, se è in fase di sintesi, se è in fase di mitosi, se è in fase di apoptosi; allora vi rendete conto che questa non è una curiosità ma ha una utilità per seguire una terapia chemioterapica in un soggetto che ha un tumore perché ci permette di capire se le cellule tumorali vengono bloccate durante il processo replicativo, se si fermano a livello di mitosi, se noi incrementiamo la morte per apoptosi;

(il prof. mostra una serie di immagini e le commenta per ribadire i concetti appena esposti) Nella popolazione di cellule tumorali si osserva, oltre all'aumento della fluorescenza dovuto alle cellule che sono in moltiplicazione anche un aumento delle cellule con una fluorescenza inferiore a quella normale in quanto sono in apoptosi, si tratta, quindi, di corpuscoli apoptotici, ognuno con una parte di nucleo; abbiamo detto che molte volte non ci basta sapere il numero delle cellule ma dobbiamo sapere anche la qualità delle cellule; sappiamo che i linfociti sono il 30% dei globuli bianchi (da 1.800 a 2.400 in valore

assoluto); questi linfociti, morfologicamente, sono tutti uguali, però, ognuno di loro, può essere diverso dall'altro perché ha acquistato una certa specializzazione, cioè, si è specializzato nel produrre una determinata proteina, per cui si parla di CD (cluster of differentiation), CD8, CD4; noi sappiamo che certe malattie cambiano decorso a seconda dell'assenza o della riduzione del numero di un certo tipo di cellule; una di queste, tipica, è l'AIDS; sappiamo che è una malattia stranissima perché è caratterizzata dal fatto che il paziente sta bene poi, improvvisamente, inizia a stare male e muore; se voi andate a vedere il numero di globuli bianchi notiamo che non cambiava di molto (il numero totale di linfociti) ma si vedeva che il paziente stava bene fin quando, nell'ambito dei linfociti, erano rappresentati adeguatamente quelli CD4 +: fino a che erano intorno a 600 il paziente stava bene; quando da 600 diventavano sotto i 400, diventavano 300, il paziente stava male;

Allora, per capire se quello è un paziente che va protetto e tenuto sotto la campana di vetro non ci basta più conoscere l'emocromo ma dobbiamo prendere i suoi globuli bianchi, trattarli con l'anticorpo anti-CD4 e vedere, così, se ci sta un numero adeguato di linfociti CD4 positivi;

questo apparecchio ha il grande vantaggio di permettere di porre la diagnosi ancora prima delle modificazioni cliniche e prima ancora che il numero di globuli bianchi aumenti (nella registrazione non si capisce bene a quale malattia si stia riferendo) significativamente perché denuncia la comparsa di cellule immature che esprimono proteine tipiche della forma alterata e la mancanza di proteine tipiche delle cellule normali;

il concetto di malattia residua è importante: più messaggero ci sta e maggiore è la possibilità di ricadute e, di conseguenza, bisogna mantenere la terapia; di questo ne parleremo meglio quando faremo la lezione sulla biologia molecolare clinica.