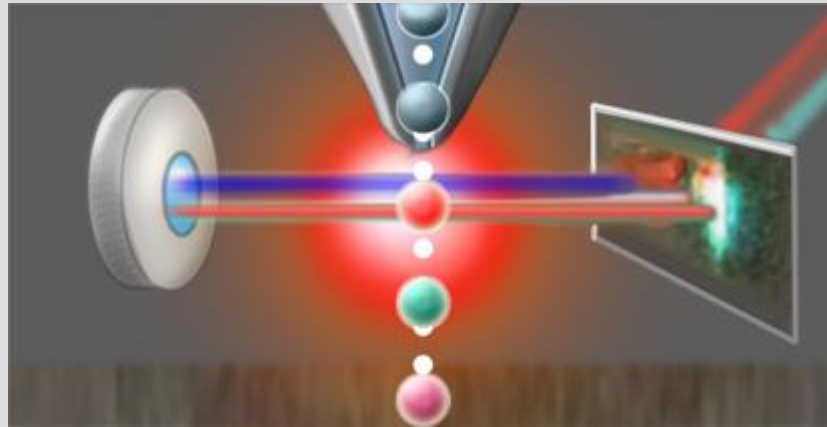


CITOMETRIA



DE FLUX

CE ESTE CITOMETRIA DE FLUX?

- ❑ Metodă de măsurare a caracteristicilor fizice și/sau biochimice ale particulelor (**celule**, nucleii, organite celulare)
 - **Flow** ~ celule în mișcare
 - **Cyto** ~ celulă
 - **Metry** ~ măsură
- ❑ Măsurarea proprietăților celulelor într-un sistem fluid

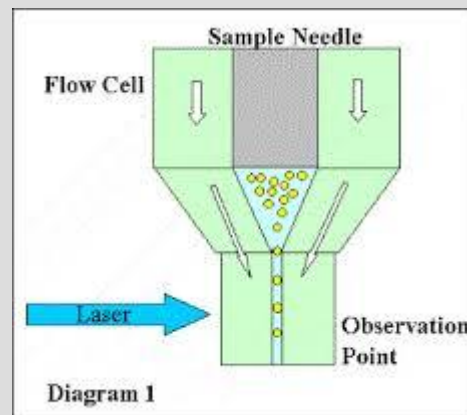


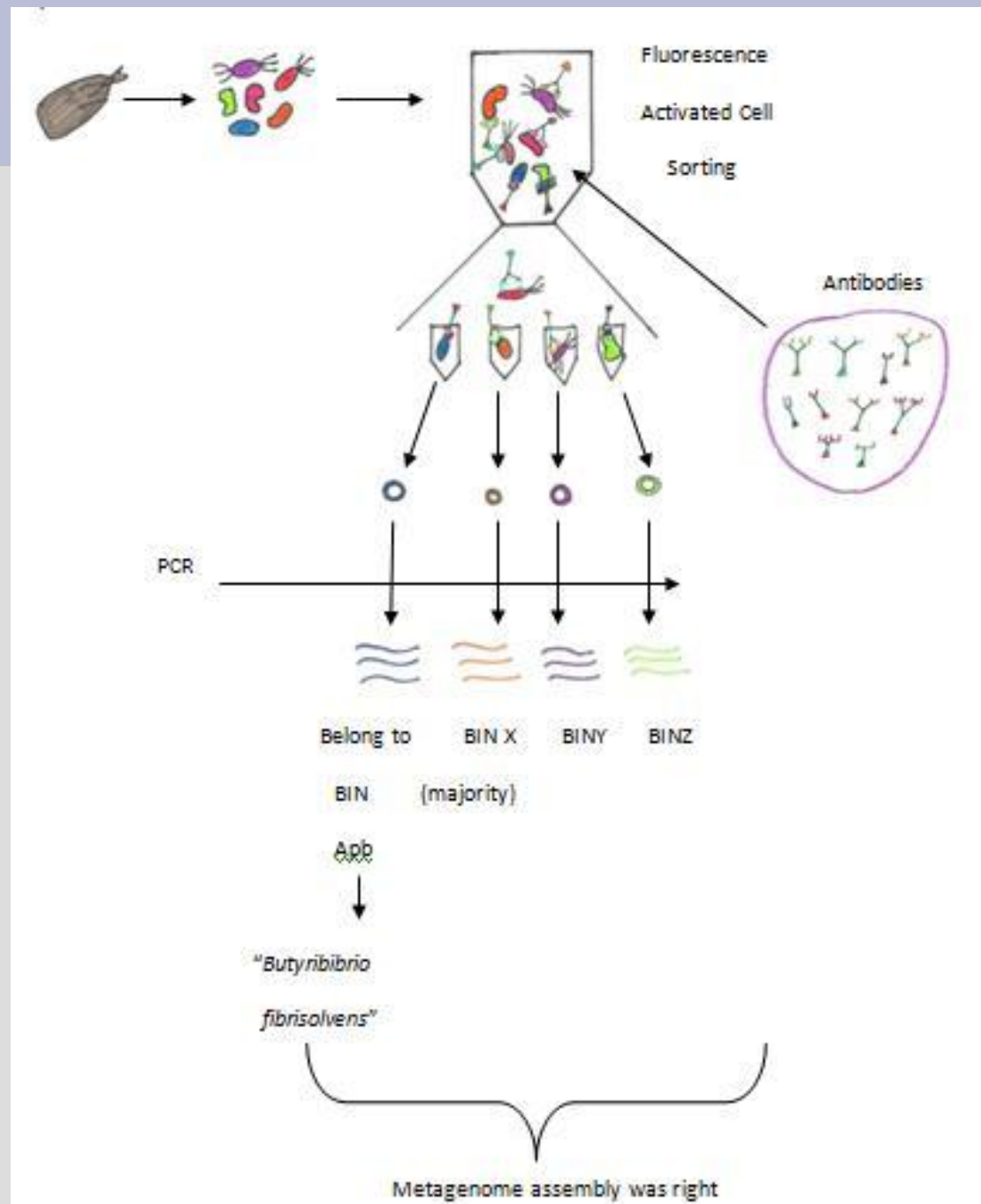
Diagram 1

➤ Citometria de flux este o metodă modernă, complexă și performantă de analiză celulară, ce asigură obținerea unor măsurători rapide cu rezoluții superioare metodelor clasice separate pentru fiecare celulă:

- **Mărimea**
- **Granularitatea**
- **Cantitatea de ADN**
- **Antigene de suprafață**

➤ Astfel se pot efectua analize multiparametrice simultane, ale unui număr mare de particule 400 - 3000 de particule/secundă, ale căror caracteristici au coeficienți mici de variație.

➤ Metodă de sortare a celulelor



- Realizând o comparație între citologia clasică și citometria în flux putem observa

Citologia clasică	Citometria de flux
Localizarea antigenelor celulare este posibilă.	Localizarea antigenelor celulare NU este posibilă
Subtipurile celulare sunt greu de cuantificat.	Nr.de celule analizat în timp scurt este foarte mare
Numărul de măsuratori multiparametrice este mic.	Analizele multiparametrice sunt posibile.

ETAPE

1. Prepararea suspensiei de celule
2. Marcarea celulelor
3. Achiziția datelor
4. Stocarea datelor
5. Interpretarea datelor



1. Prepararea suspensiei de celule

- De ex (caracterizarea limfocitelor prin analiza markerilor de suprafață= **imunofenotipizare**)
 - Sângele se recoltează pe anticoagulant.
 - Sângele este o suspensie de celule care poate fi folosită pentru analiză ca atare.
-
- Sunt necesare metode de îmbogățire a probei în aceste celule.
 - Se recurge la **simpla liză a eritrocitelor** din probă (soluție liză) sau prin **separarea mononuclearelor** prin centrifugare în gradient de densitate .

2. Marcarea celulelor

- Proba îmbogățită —→ contact cu anticorp monoclonal sau combinație de anticorpi monoclonali (combinații de 2, 3, 4 anticorpi monoclonali).
- De ex: directă cu anticorpi cuplați cu fluorocromi: izotiocianat de fluoresceină (FITC), phycoeritrină (PE)

2. Marcarea celulelor

- Această metodă este aplicabilă în cazul în care fluorocromul este direct legat de anticorpul primar adică conjugatelor PE, FITC si Alexa Fluor®
- 1.Sângele periferic se recoltează pe anticoagulant (EDTA sau heparină);
- 2.Un volum de 100 µl se pipetează în tuburile de testat;
- 3.Se adaugă anticorpii la diluțiile recomandate (specificațiile tehnice ale reactivilor respectivi) ; omogenizare și incubare la temperatura camerei timp de 30 de minute ;

2. Marcarea celulelor

- 4. Se spală celulele cu 2 ml PBS, se centrifughează la 400 g pentru 5 minute și se elimină supernatantul;
- 5. Se adaugă 2 ml tampon de liză proaspăt preparat; se incubează 10 minute la temperatura camerei ; se centrifughează la 400 g pentru 5 minute și se îndepartează supernatantul;
- 6. Celulele se resuspendă în 0.2 ml de PBS
- 7. Se achiziționează datele la citometru de flux

3. Achiziția (analiza instrumentală)

- ❑ Proba cu celulele marcate este achiziționată cu ajutorul citometrului de flux.
↓
- ❑ Se realizează injecția celulelor într-un curent unicelular intersectat într-un punct determinat din spațiu de fasciculul luminos.
↓
- ❑ Dispersia luminii și emisia de fluorescență
↓
- ❑ Semnalele luminoase captate de dispozitive speciale —→ convertirea semnalelor optice în semnale electronice și apoi digitalice.

4. Stocarea și analiza datelor achiziționate

Stocarea:

- În fișiere
- datele achiziționate sunt afișate pe calculatorul ecranului
- histograme
- grafice dot- plot

5. Interpretarea și raportarea datelor

- Se face în contextul clinic al bolii și examenelor paraclinice efectuate
- Citometria de flux este utilizată pentru:
 - ❑ confirmarea unui diagnostic
 - ❑ urmărirea în dinamică a unui tratament specific
 - ❑ precizarea prognosticului și evoluției afecțiunii

PRODUCEREA ANTICORPILOR MONOCLONALI

- Principiul de bază al citometriei de flux este cuplarea unor epitopi prezenți pe suprafața sau în interiorul particulei de analizat cu anticorpi monoclonali.
- Anticorpi monoclonali-anticorpi care sunt identici, provin din același clon plasmocitar și care au aceeași specificitate pentru un anumit antigen.
- Sunt folosiți în cercetare pentru identificarea unui anumit tip de antigen dintr-un amestec, pentru obținerea de vaccinuri, iar actualmente sunt utilizați experimental în terapia cancerului.

PRODUCEREA ANTICORPILOR MONOCLONALI

- ❑ Prima încercare reușită de producere a **AMC** - **Milstein** și **Köhler**, 1975 - (**Nobel, 1984**).
- ❑ Ei au reușit fuzionarea unor celule dintr-o **linie celulară de mielom de șoarece**, care sintetizează propria lor **Ig** omogenă, cu **limfocite din splina unui șoarece** imunizat cu hematii de oaie (un imunogen foarte puternic) și au obs. că celulele de fuziune, pe care le-au denumit **hibridoame**, sintetizează în cantitate mare **atc. cu specificitatea dorită** (antihematii de oaie).

Practic metodologia de obținere a AMC include următoarele etape:

1. Obținerea celulelor de mielom (tumorale).

Cel. de mielom cresc pe termen nelimitat într-un mediu de cultură, spre deosebire de LB mature care *in vitro* mor după un anumit nr. de diviziuni, sau de plasmocite, care nu pot fi crescute în cultură.

Deși există linii de șoareci la care incidența naturală a plasmocitoamelor este destul de ridicată, în tehnologia hibridomului se preferă totuși inducerea lor artificială.

În acest scop, cei mai folosiți sunt șoarecii BALB/c. Ei sunt injectați i.p. cu un ulei mineral (Pristane, -2,6,10,10-tetrametil pentadecan), pentru ca în 120-130 de zile să se dezvolte tumora.

ANTIGEN



2. Prep. antigenului contra căruia dorim să producem un **AMC** - este de dorit ca atg să fie foarte bine purificat.

3. Inocularea antigenului la șoareci din linii pure - pentru a induce expansiunea LB specifice, se fac 2 sau mai multe imunizări cu atg dorit.

Se pot folosi atg de natură variată și de dif. dimensiuni moleculare – inoculate pe cale i.p. sau i.v., ambele căi fiind la fel de eficiente.

4. Recoltarea splinei - de la șoarecii inoculați.

5. Recoltarea LB din splină - prin disocierea mecanică a splinei, la un anumit interval de timp de la imunizare, care variază în funcție de natura antigenului.

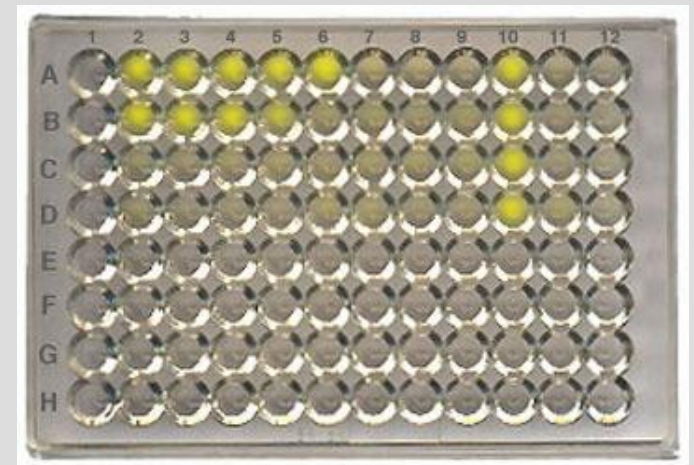
6. Fuziunea celulelor și obținerea hibridoamelor - prin cultivarea cel. B splenice împreună cu cel. tumorale în prezența unor atg (ex. virusuri) care asigură activ. fuzionării.

<https://www.youtube.com/watch?v=GyKx5FrQbvU>

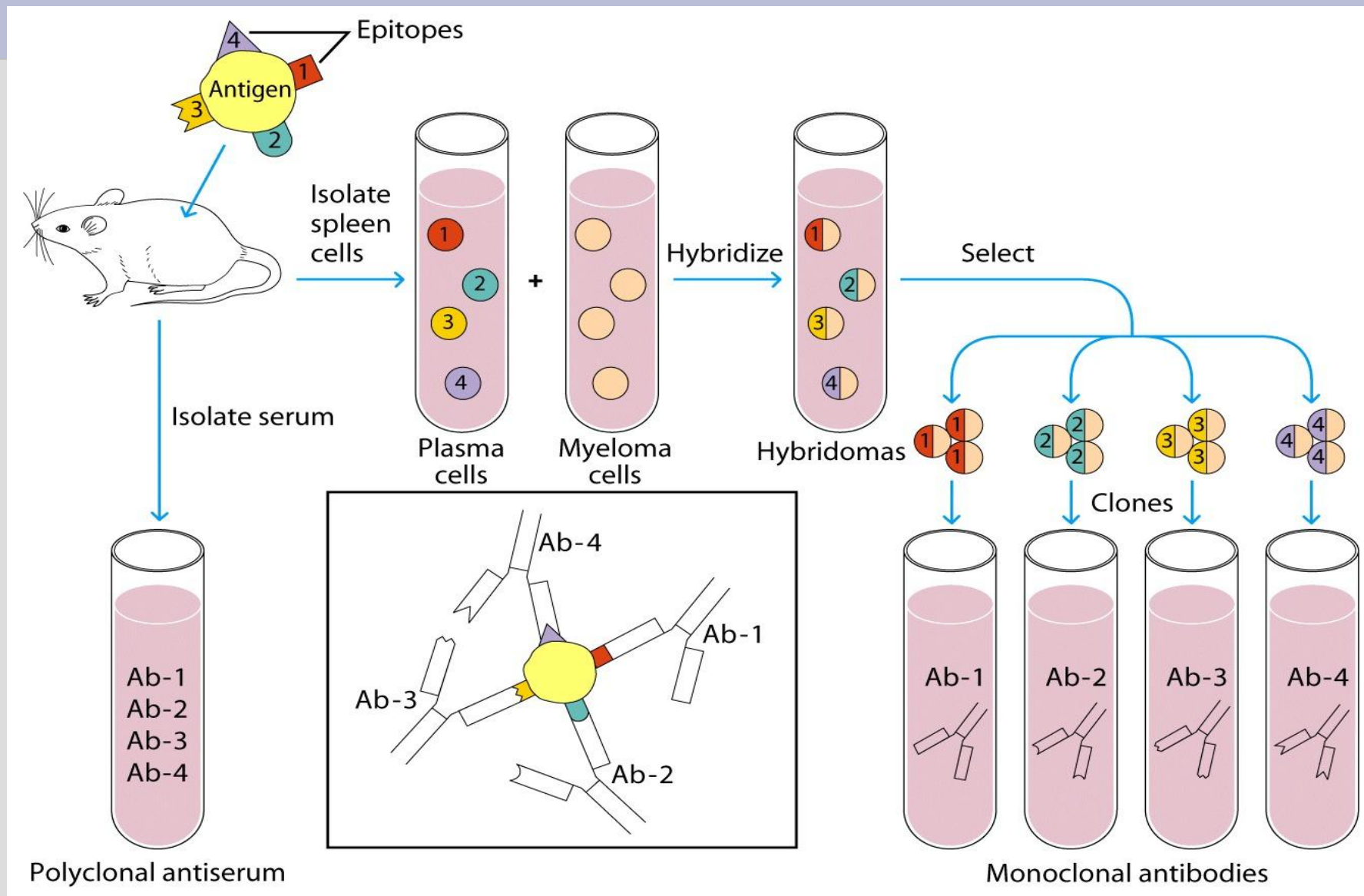


Monoclonal Antibody.mp4

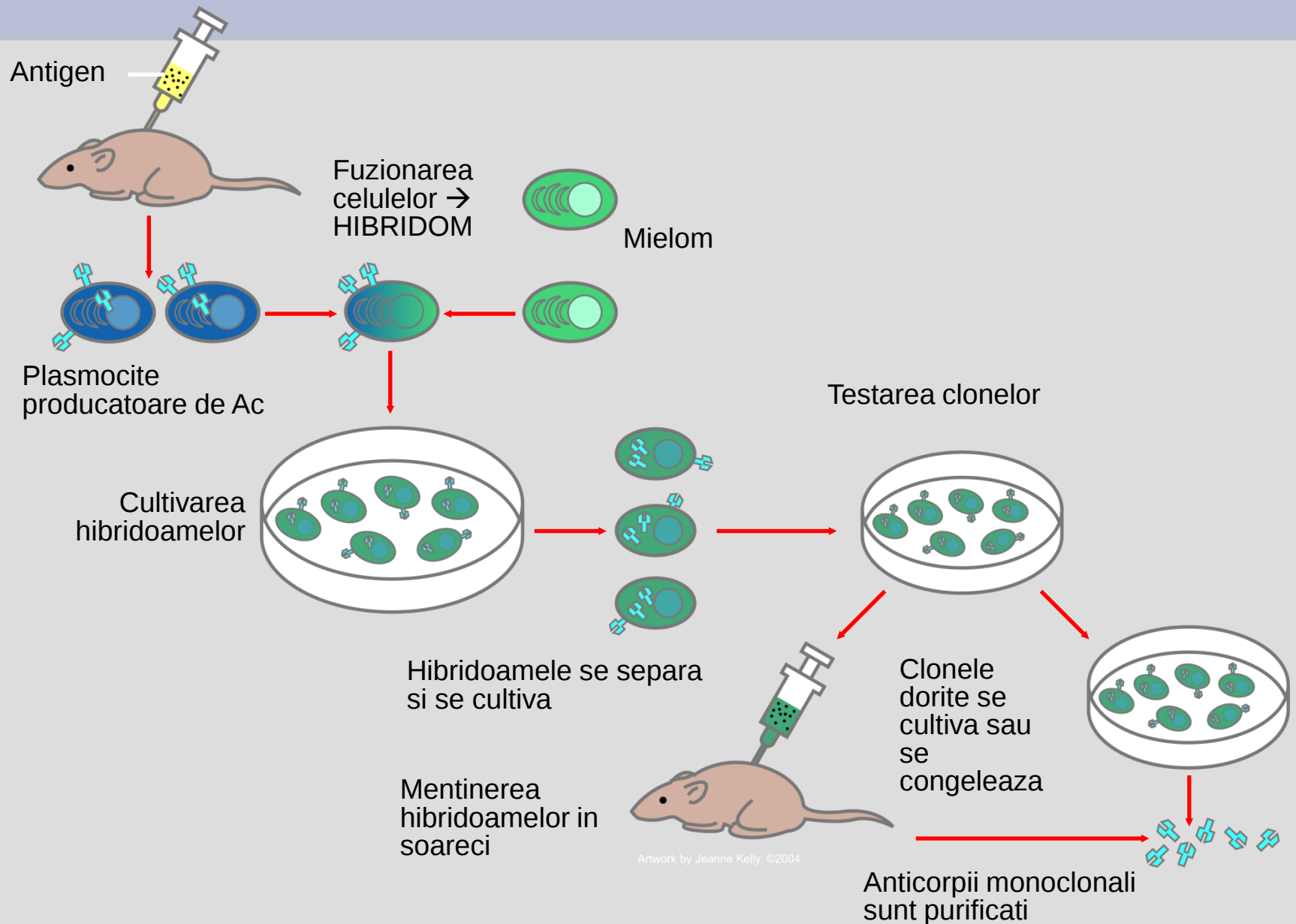
7. Selectarea clonei de LB care produce **anticorpii de interes** - după ce fuziunea și cultivarea în mediu HAT s-a realizat, urmează screening-ul hibridoamelor, prin analiza specificității Ig-lor prelevate din supernatant (prin **ELISA**). Vor fi păstrate doar acele hibridoame care produc AMC doriți.



OBȚINEREA ANTICORPILOR MONOCLONALI



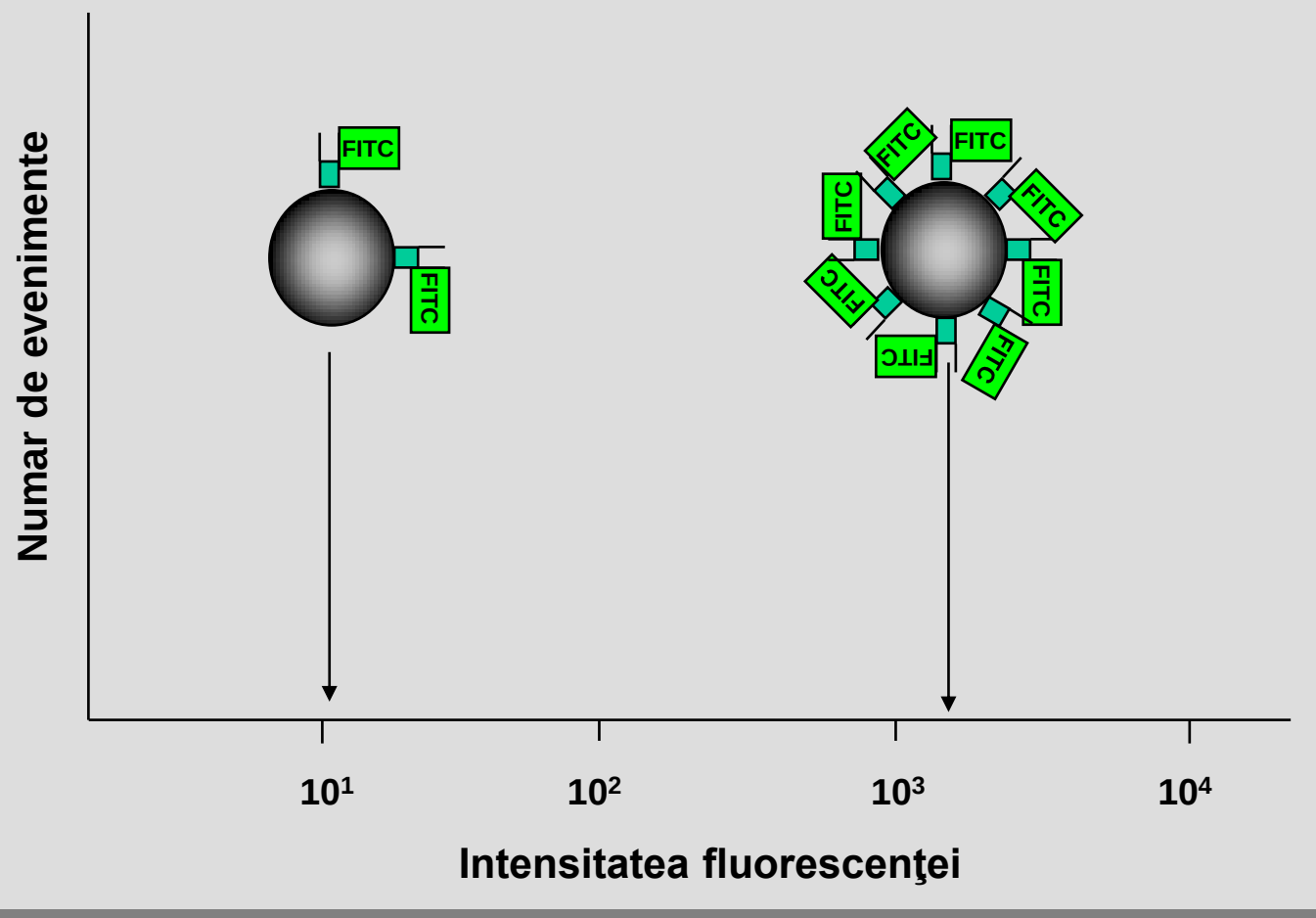
PRODUCEREA ANTICORPILOR MONOCLONALI



FLUOROCROMII

- AcM sunt conjugați cu fluorocromi
- Compușii fluorescenți absorb energie într-un spectru= spectru de absorbție (excitație)
- Emisia se produce într-un spectru caracteristic pentru fiecare fluorocrom= spectru de emisie
- Pentru 2 parametri – 2 AcM cuplați cu 2 fluorocromi cu spectre de emisie diferite:
 - Izotiocianat de fluoresceină (FITC)
 - Phycoeritrină (PE)Cei doi se folosesc frecvent pentru determinarea antigenelor de suprafață

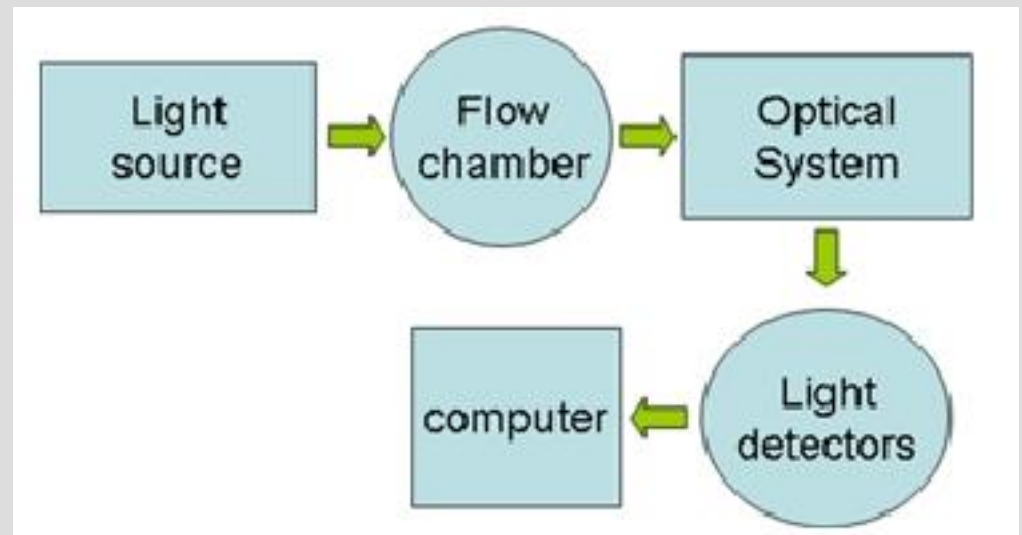
IMUNOFLOURESCENȚA



COMPONENTELE CITOMETRULUI DE FLUX

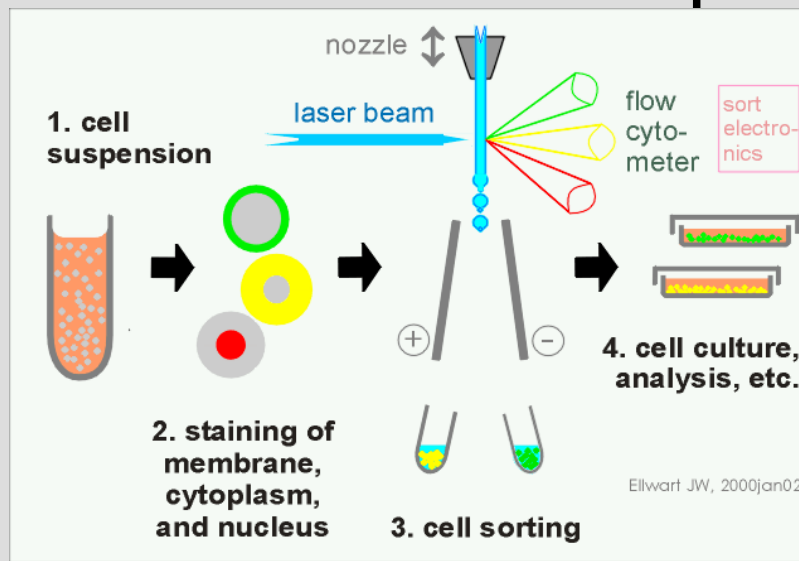
Un citometru de flux este compus din 3 sisteme principale:

- Sistem fluidic
- Sistem optic
- Sistem electronic



Sistemul fluidic (hidraulic)

- ❑ Rolul sistemului fluidic este de a transporta celulele în curentul lichid spre fasciculul laser.
- ❑ Pentru o iluminare optimă curentul lichid care transportă particulele trebuie poziționat în centrul razei laser. Doar o singură celulă sau particulă trebuie să se deplaseze prin raza laser.



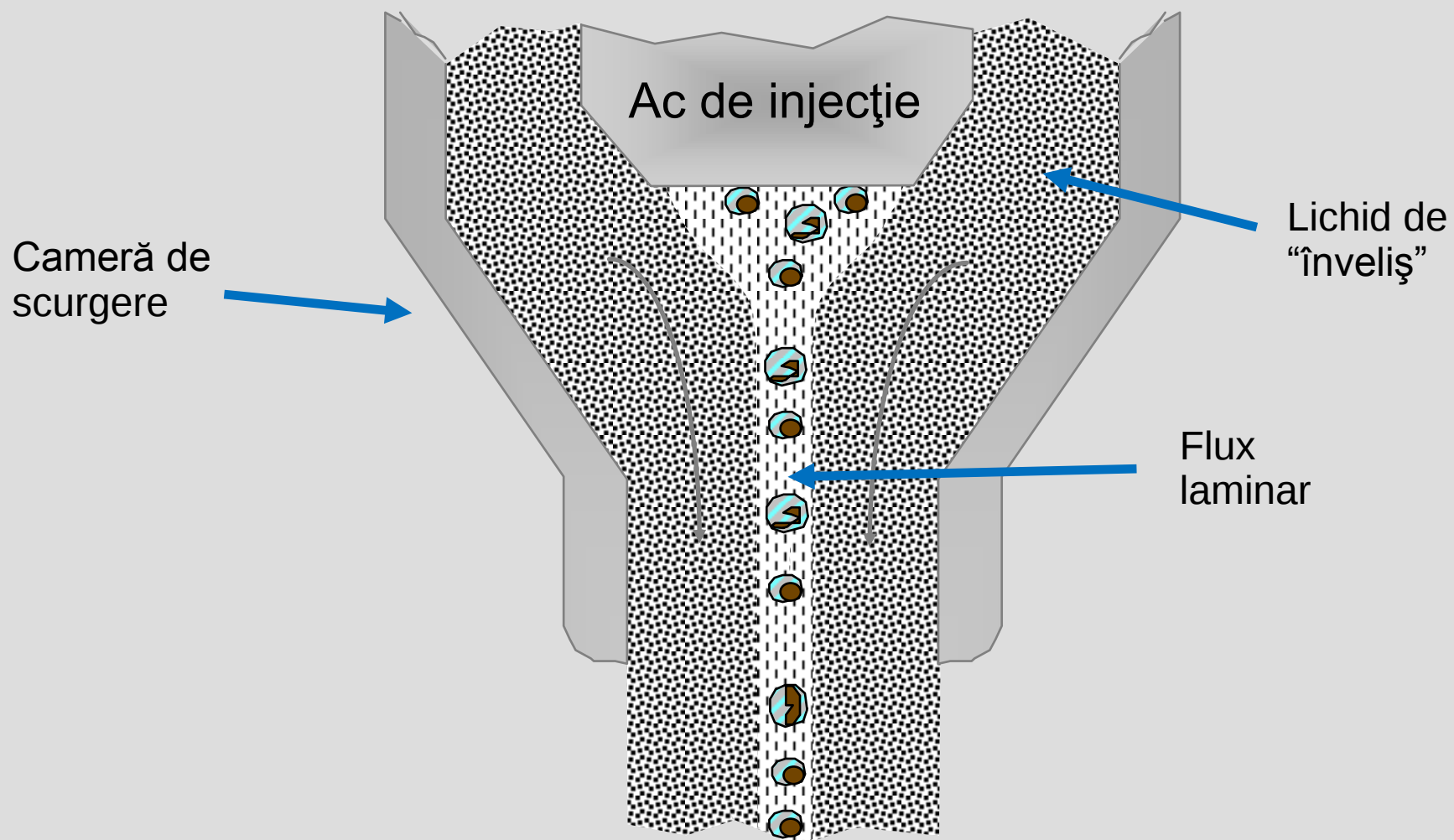
Sistemul fluidic (hidraulic)

- Celule aflate în suspensie:
 - Sânge
 - Lichid sinovial
 - LCR
 - Ganglioni limfatici
 - Tumori solide
- Lichid de “înveliș”
- Curent intern unicelular – “șir indian”
- Intersectare cu un fascicul de lumină

Sistemul fluidic (hidraulic)

- Proba este injectată într-un curent al unui fluid de înveliș (sheet fluid) in camera de flux. Designul camerei de flux face că proba să fie concentrată în centrul fluidului de înveliș pentru că apoi fasciculul laser să interacționeze cu particulele.
- Proba reprezentată de celule pe baza principiilor referitoare la fluxul laminar rămâne separată de fluidul de inveliș. Fluidul de inveliș asigură migrarea celulelor și le direcționează spre centrul curentului .

SISTEMUL FLUIDIC



SISTEMUL OPTIC DE EXCITAȚIE

- Este reprezentat de sursa luminoasă și de elementele optice de focalizare
- Sunt utilizate mai multe tipuri de surse luminoase:
 - **lămpile voltaice** (lămpile cu mercur și xenon)
 - **laserele** (emit lumină monocromă, lungime de undă bine stabilită, coerentă, unidirecțională, cu argon, heliu-neon, heliu-cadmiu, diodice)

SISTEMUL OPTIC DE EXCITAȚIE

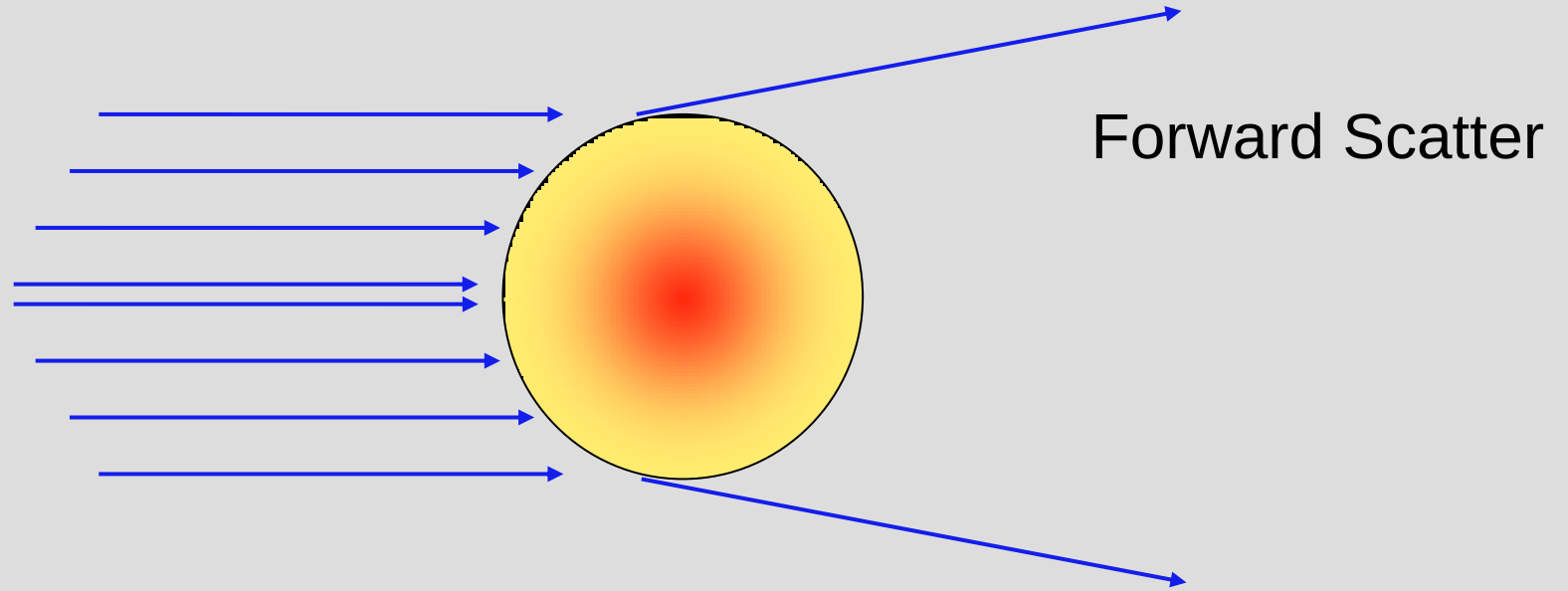
- Sursa laser (Ar $\lambda=488$ nm) = laserul cu argon
- În urma intersecției particulei cu fasciculul luminos → **dispersie și stimularea fluorocromilor**
- Dispersia luminii:
 - lumina nu este dispersată în mod egal în toate direcțiile iar intensitatea luminii dispersate depinde de unghiul de dispersie (unghiul format de direcția luminii incidente).

SISTEMUL OPTIC DE EXCITAȚIE

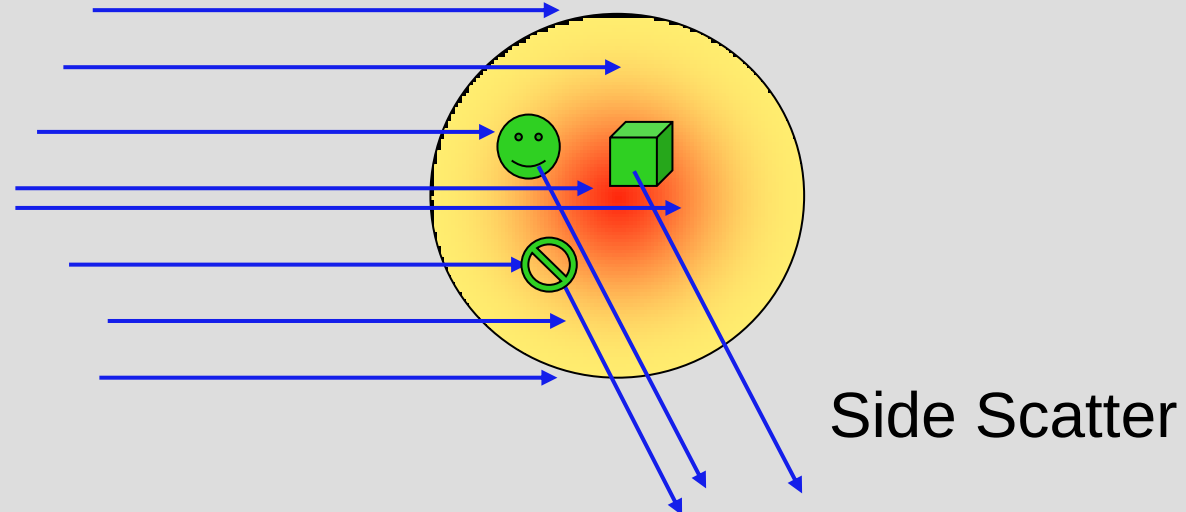
- Pentru $\alpha=0$ (direcția paralelă a fasciculului dispersat cu direcția fasciculului incident) → dispersia este maximă, lumină dispersată în față, **Forward Scatter (FS)** → intensitatea luminii dispersate pe această direcție este proporțională cu dimensiunea particulei.
- Pentru $\alpha=90^\circ$ (direcția luminii dispersate este relativ perpendiculară pe direcția fasciculului incident) → lumină dispersată lateral, **Side Scatter (SS)** → informații despre granularitatea particulei

FS ŞI SS

LASER



LASER



SISTEMUL OPTIC DE EXCITAȚIE

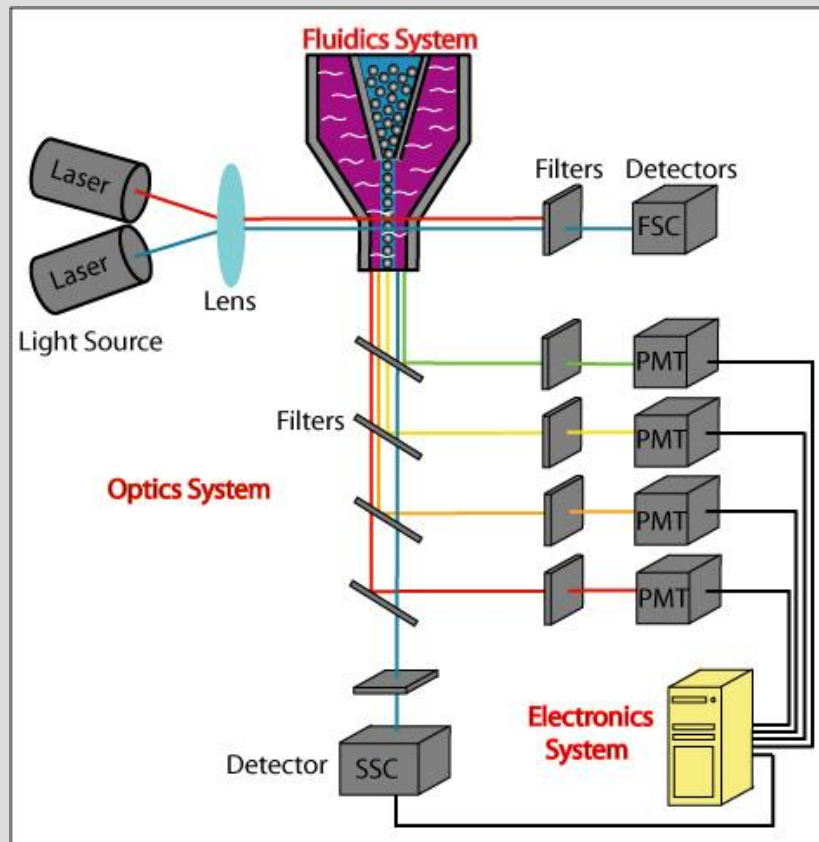
- Emisia luminii fluorescente:
 - proporțional cu cantitatea de fluorocromi (la nivelul particulei analizate, cu nr. antigenilor determinanți) → info calitative (prezența sau absența determinantului antigenic) și cantitative.

SISTEMUL OPTIC DE EXCITAȚIE

- Rolul sursei luminoase este de a emite un fascicul luminos de o anumită intensitate și lungime de undă:
- stimularea fluorocromilor utilizați
- producerea dispersiei determinabile

SISTEMUL OPTIC DE EXCITAȚIE

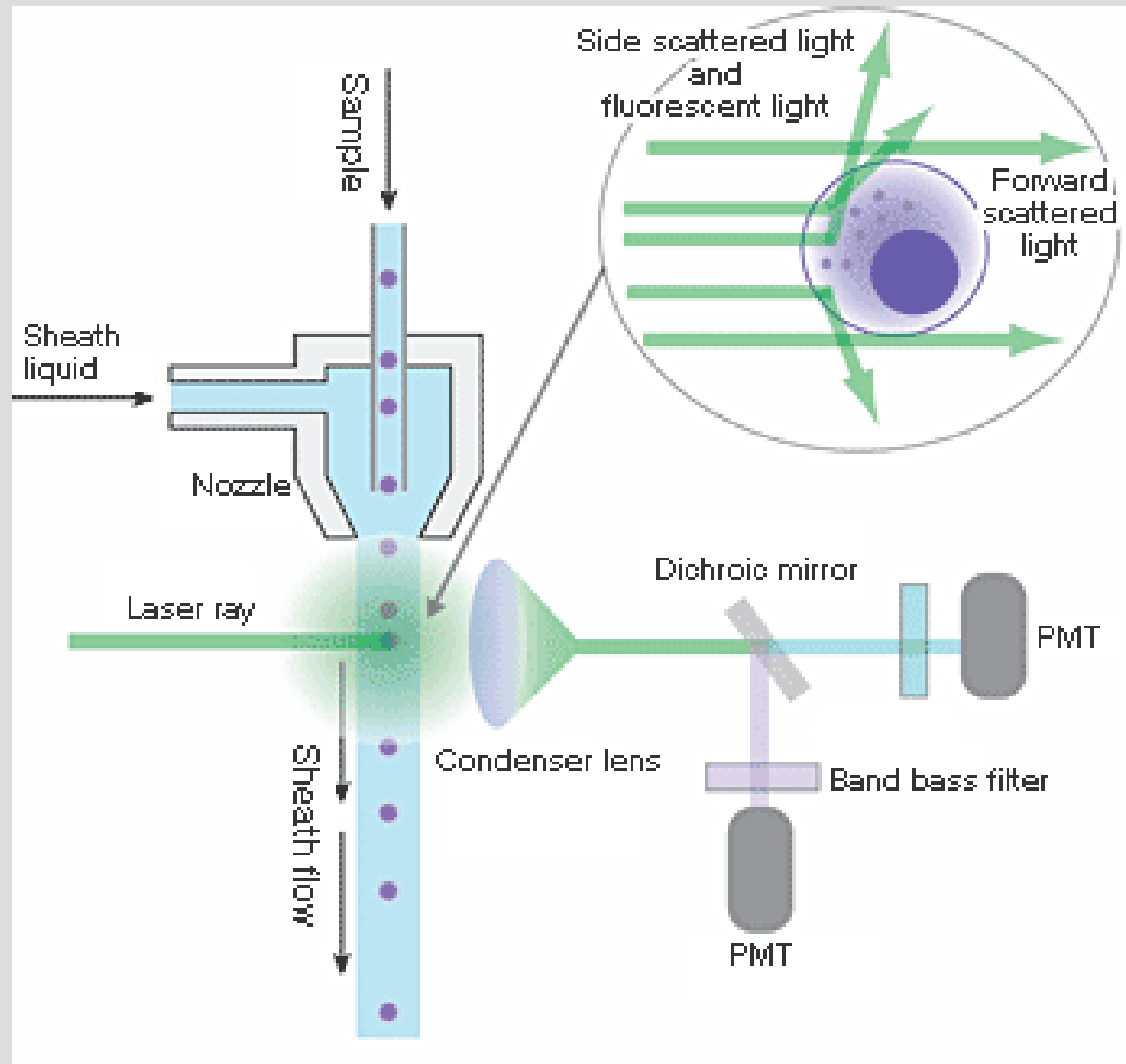
- Elemente optice de focalizare (lentile)- realizarea unei iluminări uniforme a fiecărei celule care este intersectată de fasciculul luminos



SISTEMUL OPTIC DE COLECTARE

- Rolul:
 - conversie semnal optic → semnal electronic
- Detectori pentru:
 - Lumina dispersată: în față, lateral
 - Emisia de fluorescență
 - Filtre optice (de absorbție și de interferență)

CITOMETRUL DE FLUX



SISTEMUL ELECTRONIC

- Semnalul electric este amplificat
- ↓
- Transformarea semnalelor de natură electrică în valori digitale
- ↓
- Prelucrate și stocate
- ↓
- Afișate de către calculatorul sistemului
- ↓
- Analizate prin programe speciale (LYSIS, Multicycle etc.)

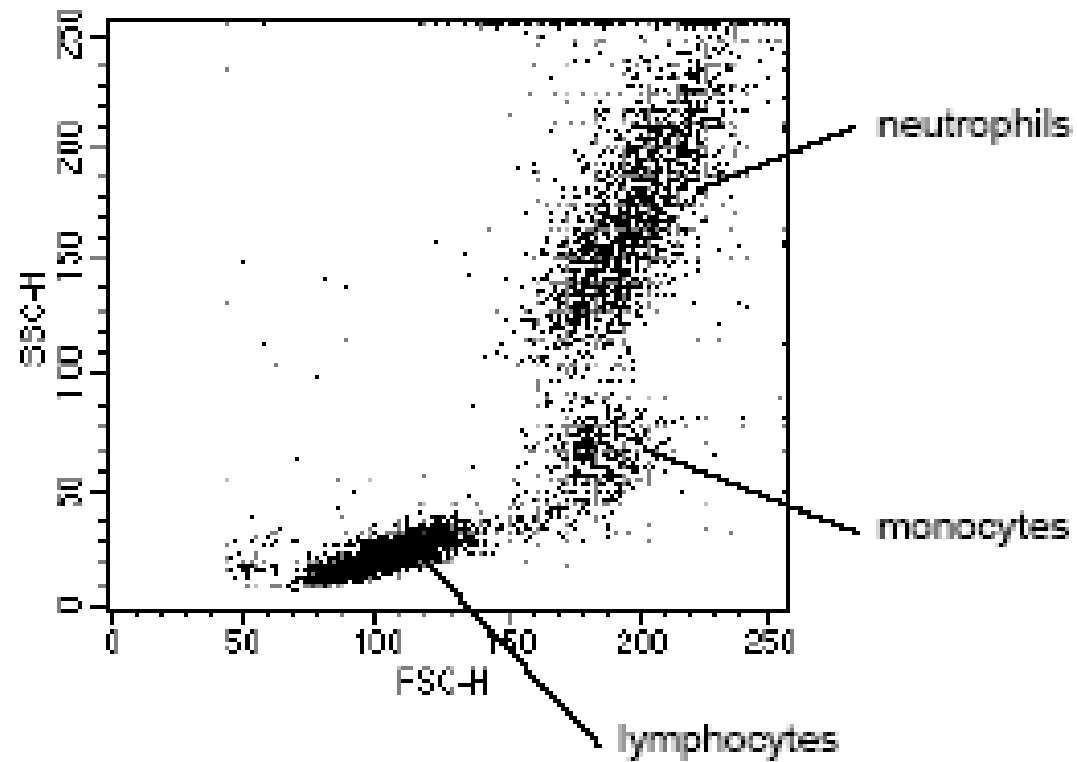


SISTEMUL ELECTRONIC

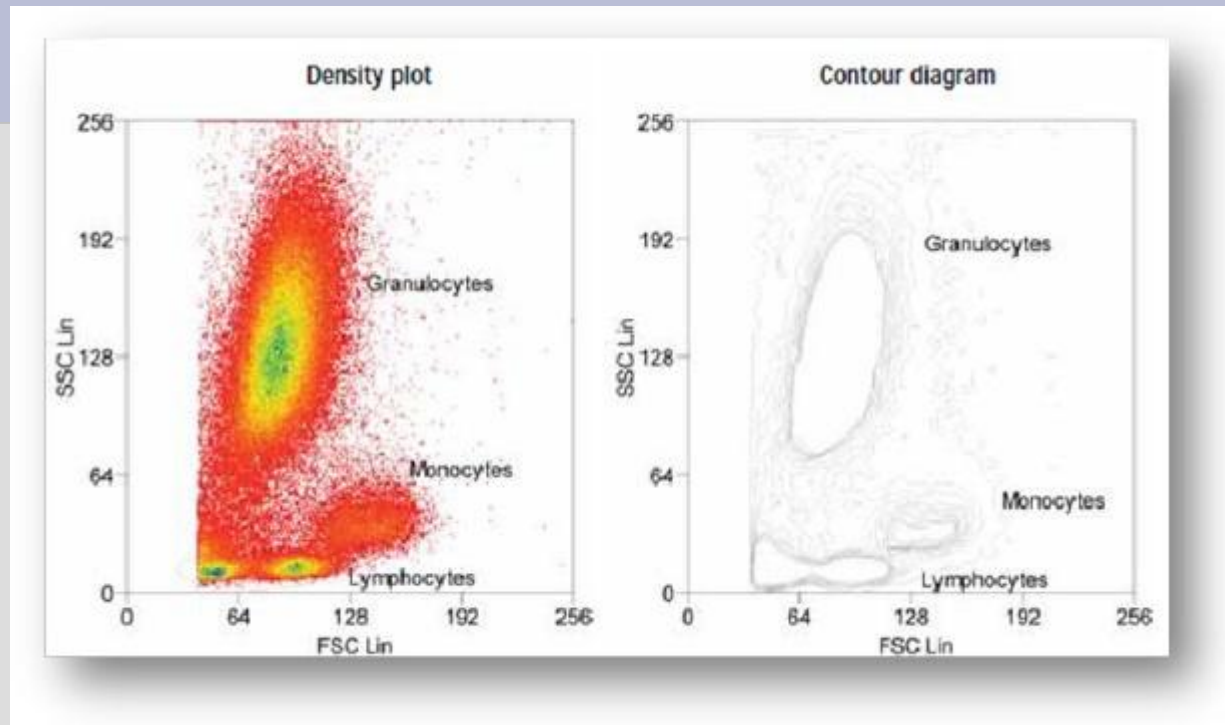
Prezentarea rezultatelor:

- **Histograme** – informații despre 1 parametru determinat
- **Grafice** – informații despre 2 parametri: 1 punct = 1 particulă (dot-plot)
- Graficele dot –plot – formate dintr-o mulțime de puncte iar fiecare punct de pe ecran este reprezentarea grafică a unei particule din proba analizată și se caract. prin 2 parametrii reprez pe axa ox și oy.

ELEMENTE FIGURATE



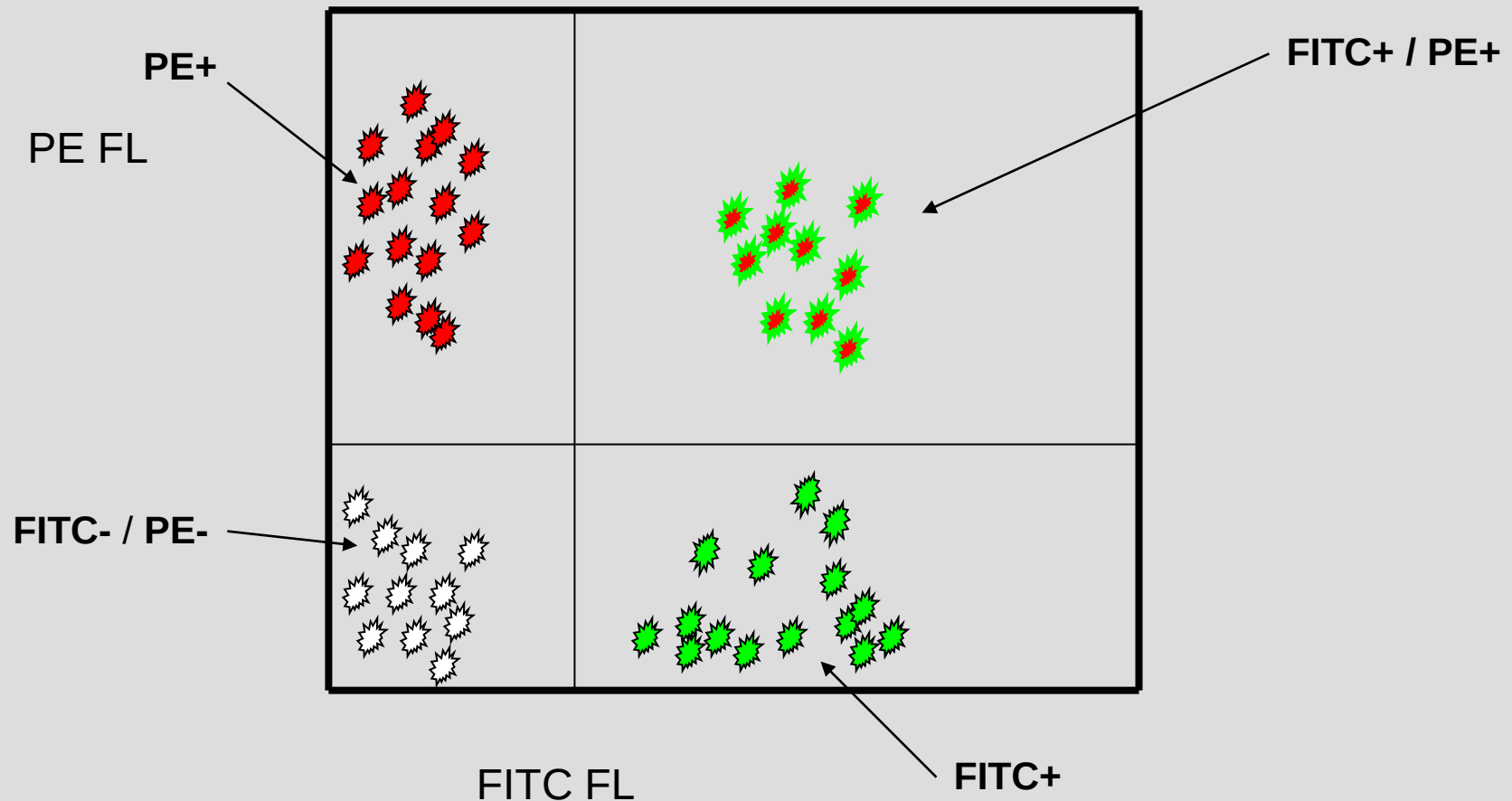
ELEMENTE FIGURATE



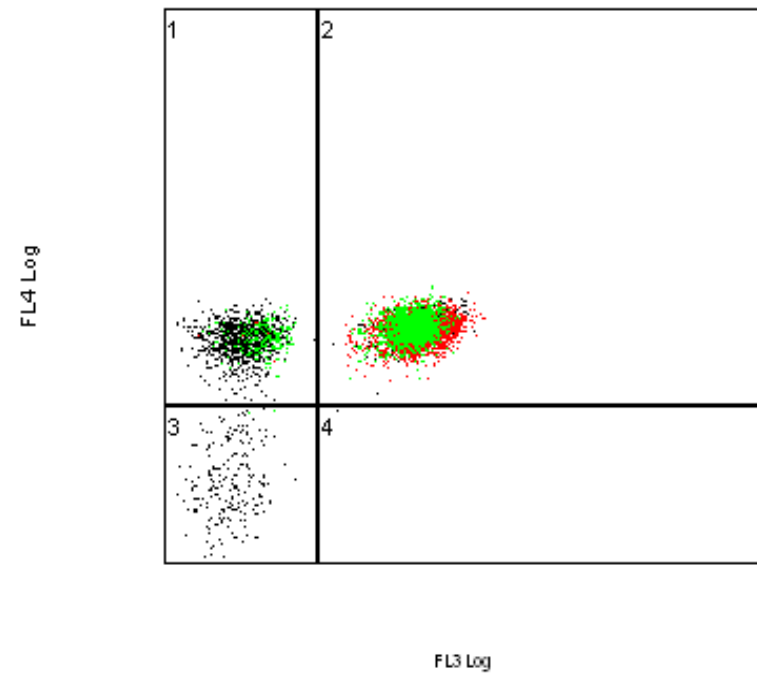
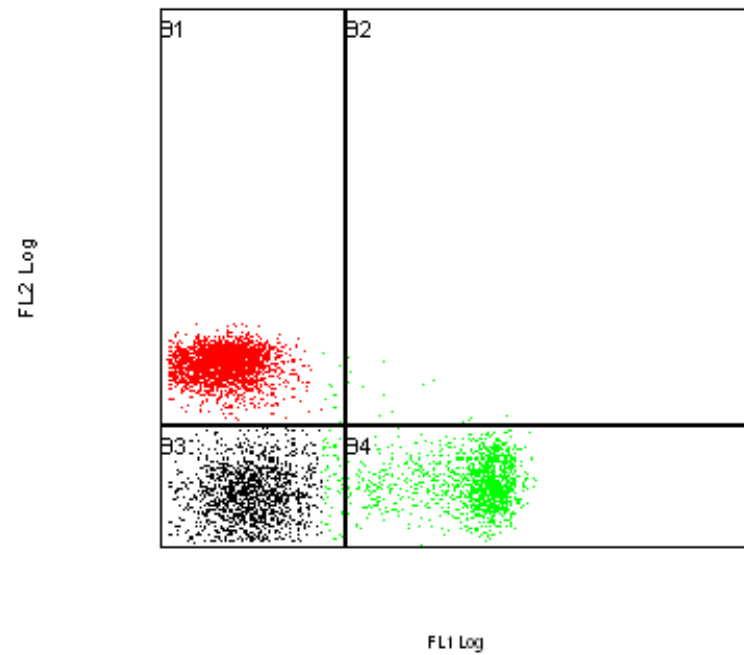
Pe histogramă, fiecare punct reprezintă o singură celulă care a trecut prin raza laser. Punctele roșii/galbene reprezintă un număr mare de evenimente dintr-o populație celulară. Culoarea dau impresia unui aspect 3D.

Histogramele de contur reprezintă o altă modalitate pentru a demonstra același lucru. Graficul se aseamănă în acest caz cu o harta geografică care, în principiu este foarte asemănătoare cu histograma density plot. Uneori populațiile celulare discrete sunt mai ușor de vizualizat prin intermediul histogramei de contur.

GRAFIC DOT-PLOT PENTRU FITC ȘI PE



FITC / PE



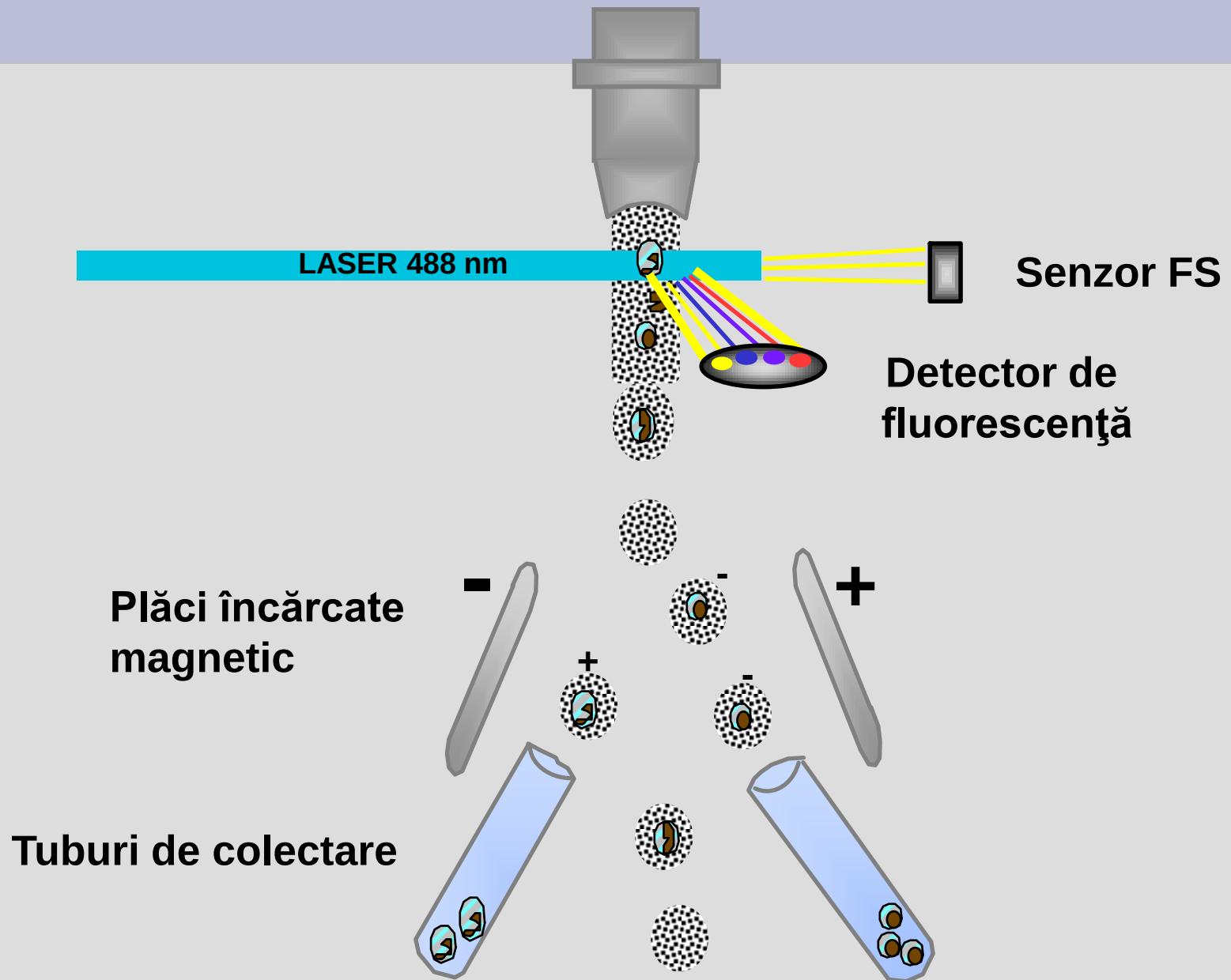
SORTAREA CELULELOR

- Separarea unei (sub)populații celulare dintr-un amestec:
 - Mărime
 - Granularitate
 - Antigene de suprafață

SORTAREA CELULELOR - ETAPE

1. Identificarea criteriului
2. Marcarea cu AcM+fluorocromi
3. Identificarea celulei – e de interes?
4. Încărcare cu sarcini pozitive/negative/fără
5. Câmp magnetic – deflectare spre tuburi colectoare
6. Centrifugare

SORTAREA CELULELOR



APLICAȚII

- Analiza subpopulațiilor limfocitare
- Diagnosticul hemopatiilor maligne
- Identificarea unor molecule HLA
- ▣ Determinarea unei game diverse de autoanticorpi (anti-eritocitari, anti-trombocitari)
- ▣ Numărătoarea reticulocitelor

APLICAȚII

- Genetică
- Biologie moleculară

Ex: analizele cromozomiale, analiza ARN, determinări enzimatică, radicali liberi, analiza potențialului de membrană, a pH-ului celular și a organitelor celulare

- Studiul ciclului și al funcțiilor celulare
- Microbiologie

Domenii de utilizare a citometriei de flux

■ Analiza subpopulațiilor limfocitare:

- diagnosticul și monitorizarea bolilor autoimune,
- imunodeficiențe,
- infecția cu HIV,
- pre și post transplant.

Domenii de utilizare a citometriei de flux

■ Diagnosticul hemopatiilor maligne

- Pentru diagnosticul limfoamelor maligne și a tipului de leucemie se face o imunofenotipare a celulelor neoplazice care prezintă la suprafața membranei celulare markeri patologici.
- Pentru monitorizarea tratamentului cu citostatice
- Pentru diagnosticul precoce al recurențelor

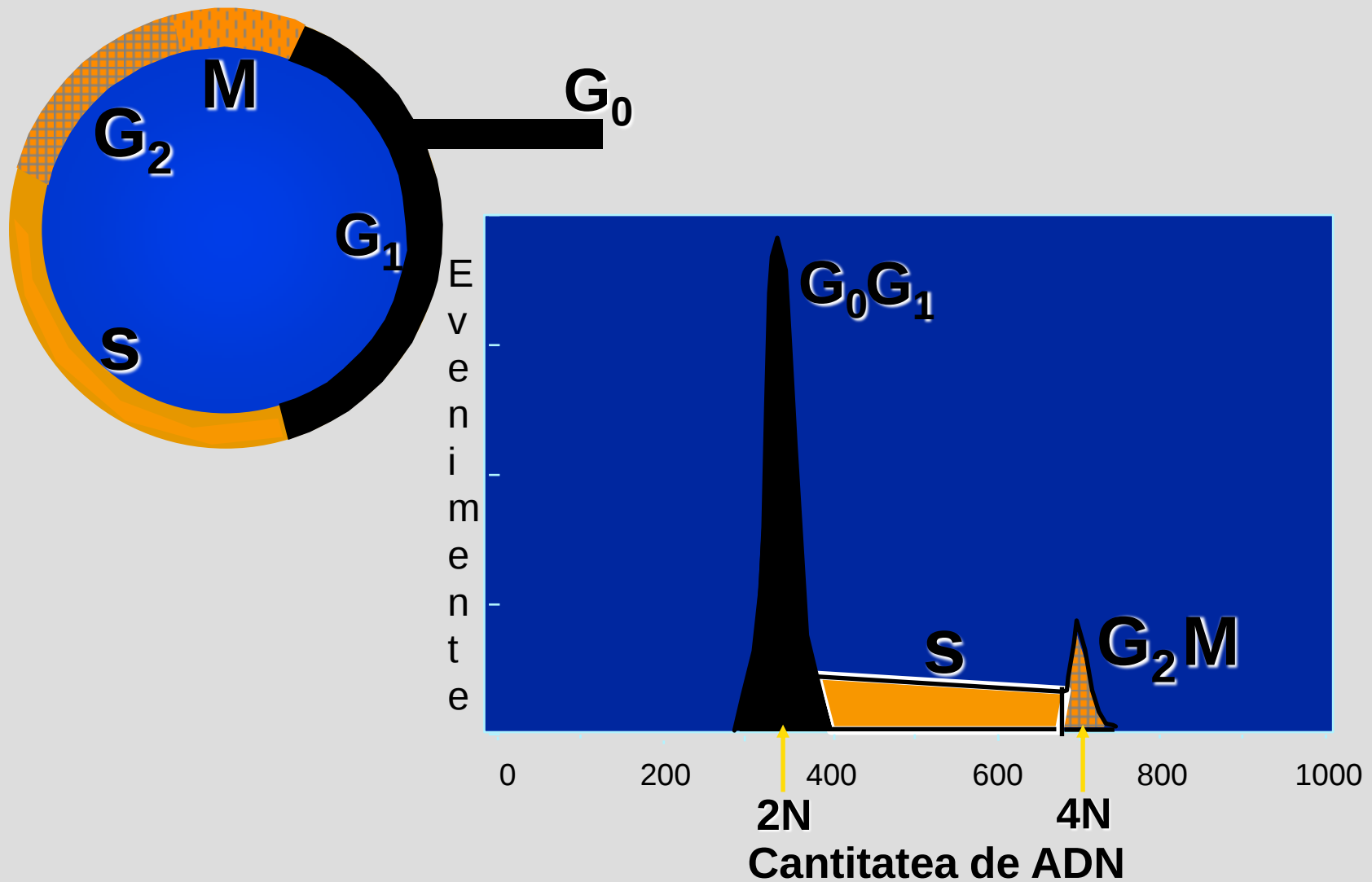
Domenii de utilizare a citometriei de flux

- **Identificarea unor molecule HLA, markeri cu mare specificitate pentru unele boli autoimune**
- Determinarea antigenului HLA-B27 – la pacienții cu spondilită anchilozantă, poliartrită reumatoidă, alte boli autoimune
- Prezența antigenului —→ evoluție gravă a afecțiunii (factor de prognostic negativ)

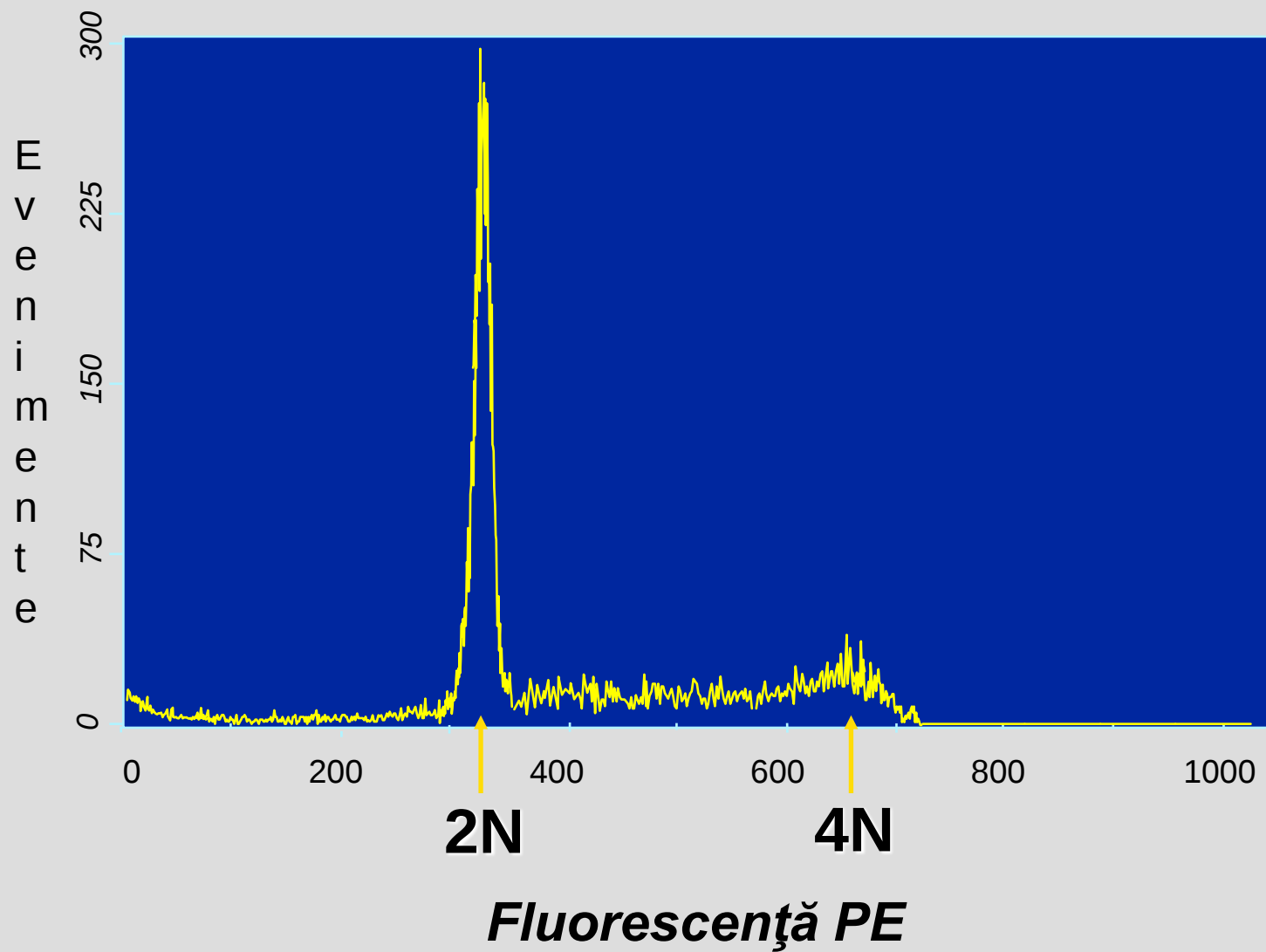
Domenii de utilizare a citometriei de flux

- **Diagnosticul, evoluția și prognosticul tumorilor maligne solide**
 - Analiza ADN-ului dublu catenar (marcarea se face cu propidium iodid, lungimea de undă de excitație de 488 nm)
 - Informații despre ploidia tumorii, numărul populațiilor celulare aneuploide și rata de proliferare a celulelor maligne

ANALIZA ADN



ANALIZA ADN



ANALIZA ADN

