

La citofluorimetria quantitativa e le possibili applicazioni in reumatologia

Quantification of cellular antigens by means of flow cytometry and its role in rheumatology

A. Cauli, G. Dessole, G. Passiu, A. Mathieu

Cattedra di Reumatologia II, Università degli Studi di Cagliari

SUMMARY

Flow cytometric analysis is a technique which allows not only phenotypical characterization of cellular subsets but also allows quantitation of cellular antigens. In this paper we summarize the Molecules of Equivalent Soluble Fluorochromes (MESF) units and the Antibody Binding Capacity (ABC) methods.

Reumatismo, 2001; 53(1):14-17

La citofluorimetria a flusso (FMC) è una moderna tecnica di laboratorio che consente di ottenere informazioni sull'espressione di molecole di superficie e sul contenuto di molecole intracitoplasmatiche o intranucleari da parte di diverse popolazioni cellulari (1). Le grandi opportunità offerte da questa tecnica sono state fatte proprie anche dalla reumatologia italiana, come testimoniato dai primi lavori comparsi in letteratura agli albori della citofluorimetria (2), interesse oggi più vivo che mai (3). Durante l'analisi citofluorografica le cellule vengono analizzate sotto forma di sospensione cellulare in fase liquida, sia in base alle caratteristiche morfologiche di granulosità e dimensioni sfruttando la diversa diffrazione e assorbimento della luce incidente (scatter, citometria), sia in base all'espressione di diverse molecole intracellulari o di membrana (citofluorimetria) (1).

La rivelazione degli antigeni in esame si ottiene grazie a traccianti fluorescenti che generano un segnale il quale, captato dai fotodiodi del citofluorimetro, viene tradotto in termini di intensità media di fluorescenza (MFI). L'analisi citofluorimetrica dà luogo fondamentalmente a due possibili pattern di positività: bimodale o unimodale. Nel primo caso l'antigene in esame è chiaramente espresso da

una parte delle cellule (cellule positive) mentre è assente nelle rimanenti (cellule negative) (Fig. 1). Le cellule negative danno invece luogo a un segnale di fluorescenza molto basso (entro la prima decade logaritmica dei canali d'acquisizione) derivante dalla somma dell'autofluorescenza cellulare, dal legame specifico dell'anticorpo e dal rumore di fondo del citofluorimetro. Questo profilo citofluorografico non crea problemi di interpretazione dal momento che i positivi sono nettamente distinguibili. In molti casi invece la distribuzione della fluorescenza segue un andamento unimodale caratterizzato dall'assenza del picco dei negativi che si confondono senza soluzione di continuità con le cellule positive. Questo andamento è classico per le molecole di attivazione (Fig. 2).

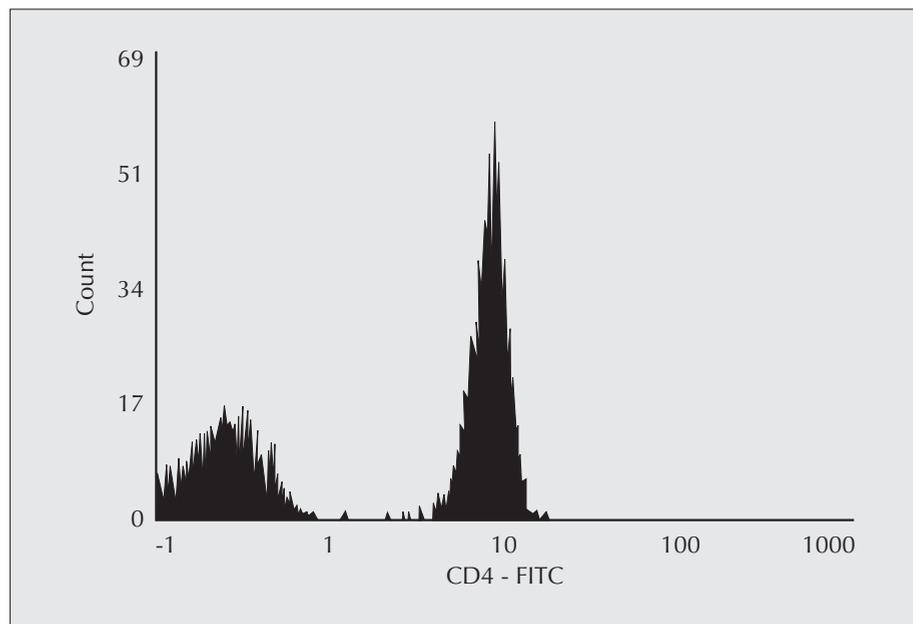
La valutazione della positività per un dato antigene viene comunemente espressa in valore percentuale sul totale delle cellule analizzate, fornendo quindi informazioni sul numero di cellule che esprimono l'antigene studiato ma non sul livello di espressione della molecola. In molte situazioni può essere però importante valutare non soltanto il numero di cellule che esprimono un dato antigene, ma anche la misura quantitativa di questa espressione. Per lungo tempo si è ovviato a questa esigenza ricorrendo a termini quali "bright" (intenso) o "dim" (debole), o esprimendo il dato come canale medio di fluorescenza. Questa soluzione è risultata però poco precisa, relativa allo strumento e al suo "setting", e non consente il confronto tra acquisi-

Indirizzo per la corrispondenza:

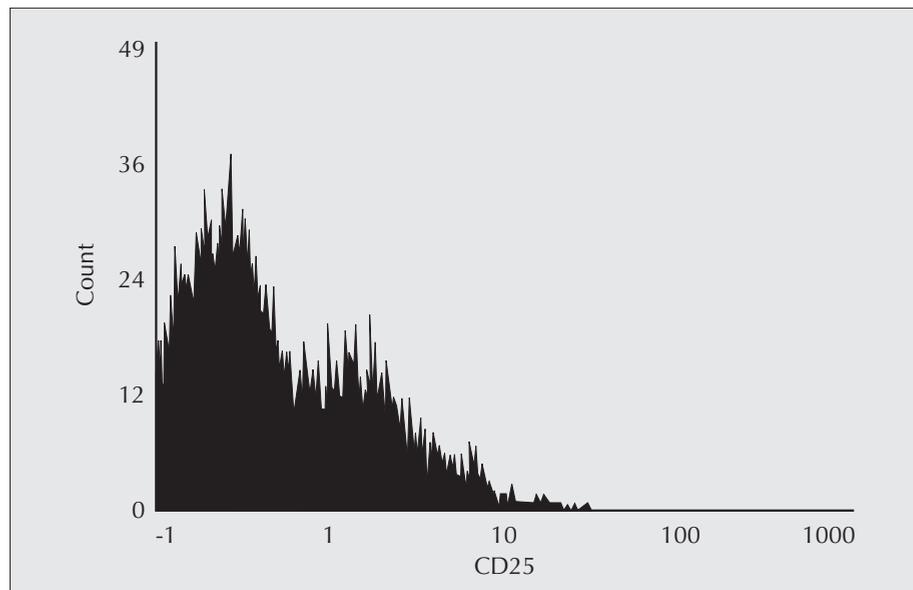
Dott. A. Cauli, Cattedra di Reumatologia II, Dipartimento di Medicina Interna, Policlinico Universitario di Cagliari, Via San Giorgio 12, 09124 Cagliari

Figura 1

Esempio di profilo citofluorografico bimodale. Il picco a destra rappresenta le cellule CD4 positive, il picco a sinistra le cellule CD4 negative

**Figura 2**

Esempio di profilo citofluorografico unimodale. Il picco delle cellule negative è in continuità con il picco delle cellule positive.



zioni di apparecchi diversi. Per questo motivo da alcuni anni si è prodotto un notevole sforzo per cercare di standardizzare alcune metodiche che consentono di esprimere in termini quantitativi assoluti l'espressione di Ag cellulari indipendentemente dal citofluorimetro impiegato, dal voltaggio dei fotomoltiplicatori e dall'operatore (4, 5).

L'esigenza di riuscire a quantificare l'espressione di molecole cellulari è stata avvertita da tempo anche in reumatologia, come testimoniato dalle prime valutazioni quantitative dell'effetto dei farmaci sull'espressione di recettori leucocitari, ricerche ef-

fettuate nei primi anni ottanta da Mathieu e coll. (6). Il problema di quantificare l'espressione di determinate proteine mediante citofluorimetria consiste in pratica nel tradurre un segnale di intensità di fluorescenza, che rappresenta quindi una misura relativa, in una unità di misura definita, ovvero indipendente dalle variabili strumentali (4). Questo risultato è stato ottenuto individuando una unità di misura per l'intensità di fluorescenza che è stata denominata Molecules of Equivalent Soluble Fluorochromes (MESF). La MFI del campione può essere espressa in unità MESF tramite acquisizione

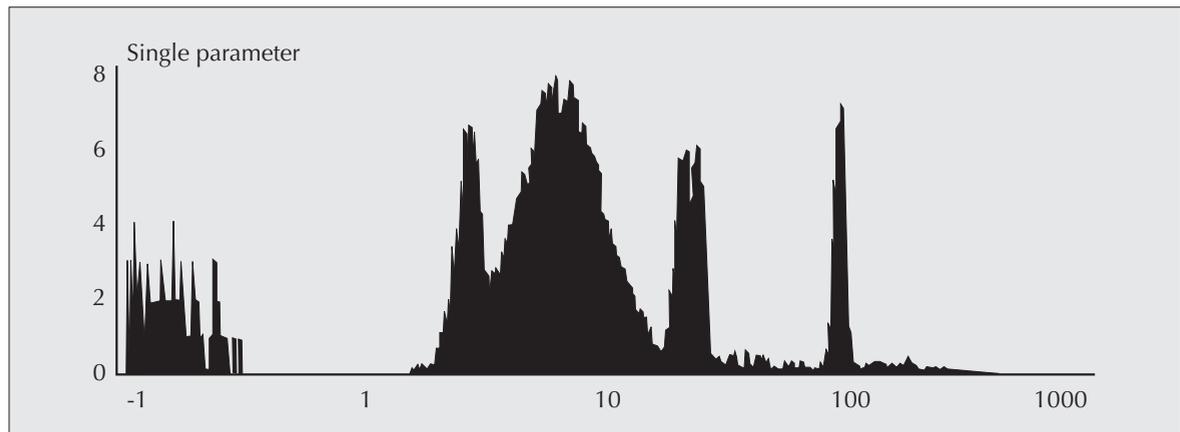


Figura 3 - Esempio di profilo citofluorografico delle cellule di sangue periferico marcate con anti-B27 (picco centrale chiaro). I rimanenti 5 picchi rappresentano gli standards di riferimento.

contemporanea o sequenziale di un certo numero di popolazioni di microsfere standard coniugate con lo stesso fluorocromo marcante l'antigene in esame ma in quantità diverse e note (7). Tra le popolazioni di microsfere è importante che ve ne sia una non marcata con fluorocromi allo scopo di poter valutare l'intensità del "rumore di fondo" dello strumento. Le microsfere sono particelle di lattice delle dimensioni dei linfociti (8- 0 μm), coniugate con fluorocromi in quantità crescente (entità espressa in unità MESF) in modo tale da consentire il calcolo di una retta di calibrazione dalla quale si può ottenere il valore in unità MESF del campione analizzato (Fig. 3 e 4).

Un ulteriore passo avanti è stato compiuto con la produzione di microsfere non fluorescenti ma rivestite da quantità crescenti e definite di immunoglobuline (esempio anticorpi di capra anti immunoglobuline di topo) capaci di legarsi con gli anticorpi monoclonali fluorescenti o non coniugati (nelle metodiche indirette) utilizzati per la rilevazione dell'antigene. In questo modo è possibile calcolare il numero di anticorpi primari che si legano alla popolazione cellulare in esame (Antibody Binding Capacity, ABC) confrontandolo con le capacità leganti note delle microsfere (8). Questi standard sono costituiti da microsfere non marcate per valutare il background dello strumento, e generalmente da quattro popolazioni di microsfere con diversa capacità legante gli anticorpi. Le microsfere e le cellule in esame devono essere acquisite nella stessa seduta analitica, inoltre devono essere trattate con le stesse modalità dei campioni cellulari. È importante che sia le cellule che le microsfere siano incubate con quantità di monoclonale sufficienti a saturare tutti gli antigeni espressi sulla su-

perficie cellulare o i siti leganti delle microsfere. Non sempre le due situazioni coincidono e sono necessarie apposite titolazioni. Queste condizioni sperimentali sono necessarie affinché il legame anticorpale sia di tipo monovalente e si verifichi quindi una relazione lineare tra ABC e MFI. In modo analogo a quanto detto per le unità MESF, è possibile calcolare una retta di regressione lineare degli standard e quindi arrivare dal confronto con le cellule in esame al valore di ABC in base alla emissione di fluorescenza proporzionale ai siti leganti. Per ogni campione è importante inoltre considerare un controllo negativo al fine di valutare l'entità dell'autofluorescenza (Background Antibody

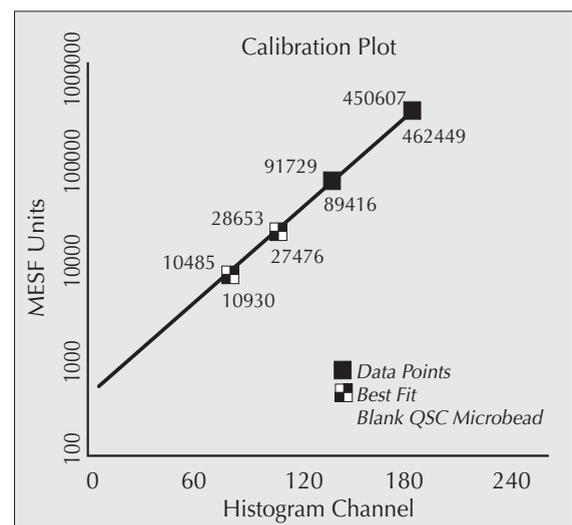


Figura 4 - Rappresentazione della retta di calibrazione ricavata plottando il valore dell'intensità di fluorescenza espressa come canale medio (Mn X) di ogni popolazione di microsfere contro il logaritmo del valore espresso in unità MESF.

Equivalent, BAE). Il valore di fluorescenza aspecifica viene quindi sottratto dal valore ABC dei positivi in modo da arrivare al valore di capacità legante specifica (SABC: ABC - BAE).

L'utilizzo delle unità MESF e ABC consente il confronto di dati ottenuti durante sedute di acquisizione diverse e persino con strumenti diversi opportunamente tarati secondo le direttive UWA, Unified Window of Analysis (9). È intuitivo che simili standardizzazioni sono di estrema importanza qualora si vogliano confrontare risultati ottenuti in laboratori diversi magari nell'ambito di studi collaborativi policentrici.

Queste possibilità tecniche sono state da noi sfruttate per trovare una risposta ad una ipotesi riguardante i meccanismi patogenetici delle artriti sieronegative correlate al gene HLA B27. Tali forme sono infatti associate in maniera strettissima a questo antigene HLA, anzi rappresentano la più forte associazione sinora descritta in patologia per un gene HLA. Nonostante ciò la maggior parte dei soggetti B27 positivi non si ammala di spondilite anchilosante, anche quando esposti a simili condizioni ambientali e agli stessi microrganismi. L'ipotesi di partenza prevedeva che una maggiore espressione delle molecole B27, in quanto coinvolte nella presentazione dell'antigene o come fonte essa stessa di au-

toantigeni, potesse costituire un ulteriore elemento di predisposizione alla malattia. Grazie all'utilizzo delle metodiche precedentemente descritte siamo riusciti a definire l'espressione di molecole B27 nella forma coniugata alla β 2-microglobulina e in quella libera (Hc) non coniugata, in una corte di pazienti affetti da Spondilite anchilosante e in un gruppo di soggetti sani ma B27 positivi. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza una maggiore espressione delle molecole HLA B27 sulla superficie delle PBMC nei pazienti con Spondilite Anchilosante rispetto ai controlli sani indipendente dallo stato di attivazione cellulare. Alla luce di questi dati abbiamo proposto che gli individui con elevata espressione di molecole HLA B27 possiedano un ulteriore elemento di suscettibilità allo scatenamento dei meccanismi alla base della malattia. Questo può essere spiegato con una più efficace risposta antigenica specifica da parte delle cellule T stimolate dalle cellule presentanti il presunto antigene artritogenico (A Cauli et al., manoscritto in preparazione).

In questo contesto possiamo dire che la citofluorimetria quantitativa rappresenta un fondamentale passo avanti tecnico a disposizione dei ricercatori sia per la valutazione dell'effetto biologico di nuovi o vecchi farmaci, sia nello studio dei meccanismi immunologici alla base di molte malattie reumatiche.

RIASSUNTO

La citometria a flusso è una tecnica che consente non solo la caratterizzazione fenotipica delle popolazioni cellulari ma consente inoltre la quantificazione degli antigeni cellulari. In questo articolo gli autori riassumono i metodi di quantificazione tramite unità MESF e ABC (Antigen Binding Capacity).

Parole chiave. Citofluorimetria, quantificazione, unità MESF, Antibody Binding Capacity (ABC).

Key words: Flow Cytometry, quantitation, MESF units, Antibody Binding Capacity (ABC).

BIBLIOGRAFIA

1. Shapiro HM. Practical Flow-Cytometry. 3rd Edition, Wiley-Liss edition New York 1995.
2. Mathieu A, Mereu MC, Pisano L. Ty lymphocytes of peripheral blood and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 658-61.
3. Iannone F, Acquista CA, Lapadula G. Applicazioni della citofluorimetria: citofluorimetria del liquido sinoviale. *Reumatismo* 1996; 48, Suppl N. 2: 113-8.
4. Shapiro HM. Putting the metry into the immunofluorescence flow cytometry. *Cytometry* 1991; 12 (suppl 5): 70.
5. Dessole G, Cauli A, Atzeni F, Nurchis P, Sanna G, Vacca A, et al. Quantificazione di antigeni di membrana mediante tecniche citofluorimetriche. Espressione in unità MESF (Molecules of Equivalent soluble fluorochromes). *Reumatismo, atti congresso SIR* 1998; 50: (suppl. 3) 245.
6. Mathieu A, Pitzalis C, Mazzoleni AP, Melis F, Pala R, Balestrieri A. Iperespressione del recettore granulocitario per il Fc delle IgG (Fc γ R) in pazienti affetti da artrite reumatoide attiva: regolazione da parte del trattamento corticosteroidico. *Terapeutika* 1985; 2: 286-90.
7. Schwartz A. Fluorescent microbeads standards. *Flow Cytometry Standard Corp Monograph*.
8. Dawson C, Scheppler JA, Nicholson JKA, Holman R. Enumeration of antigen sites by flow cytometry. *Pathobiology* 1991; 59: 57-61.
9. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, Shmitz G, D'Hautcourt JL, Arekrans A et al. Performance of Calibration Standards for Antigen Quantitation with flow cytometry. *Cytometry* 1998; 33: 188-96.