



Invito alla lettura

a cura di "Ale"

Haematologica Open Access Publication
the hematology journal
Official Journal of the European Hematology Association

Bone marrow mesenchymal stroma cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis

Vianello F, Villanova F, Tisato V, Lympéri S, Ka-Kei H, Gomes AR, Marin D, Bonnet D, Apperley J, Lam E W-F, Dazzi F.

Haematologica 2010; 95: 1081-1089

In questo interessante articolo viene approfondito il meccanismo di interazione tra cellule mesenchimali stromali umane (hMSC) di midollo e tumore, in particolare viene valutato il ruolo protettivo svolto da hMSC su cellule di leucemia mieloide cronica (CML) rispetto al processo di apoptosi indotto da imatinib. Le cellule tumorali reclutano attivamente le cellule stromali insieme con cellule infiammatorie e vascolari all'interno della massa tumorale e questo processo è essenziale per la formazione di un microambiente che attivamente favorisce la crescita del tumore stesso. In questo articolo per valutare le vie molecolari coinvolte nell'interazione MSC e cellule di CML a livello midollare, si sono utilizzate coculture di BM-hMSC con cellule BV173 (linea cellulare di CML) o con cellule di CML da sangue periferico di pazienti con CML in fase cronica o con cellule CD34⁺ ottenute mediante separazione magnetica da sangue periferico di pazienti con CML, dimostrando con analisi citofluorimetrica dell'apoptosi (ioduro di propidio-annexinaV) l'effetto protettivo esercitato da MSC sull'apoptosi indotta da imatinib; con esperimenti in transwell, è stato poi dimostrato come il meccanismo di protezione dall'apoptosi esercitato dalle MSC richieda il contatto cellulare. Per determinare i "pathways" coinvolti in questo processo, è stata valutata in western blot l'espressione di alcune proteine, implicate nei meccanismi di apoptosi quali Bax e Bcl-XL, Caspasi-3 e CXCR4, su lisati ottenuti da colture di 72 ore di BV173 dopo trattamento con 1 o 5 µM di imatinib, con o senza MSC. Bax e Bcl-XL appartengono alla famiglia Bcl-2 delle proteine pro- e anti-apoptotiche che hanno un ruolo chiave nella regolazione della morte cellulare per apoptosi e la modulazione di queste proteine può causare la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e quindi il rilascio di molecole solubili responsabili dell'attivazione della cascata delle Caspasi. Il ruolo della chemokina CXCL12/SDF-1 e il suo recettore CXCR4 è stato valutato per altri tumori ematologici. Si è così determinato che la morte delle cellule di CML indotta da imatinib è associata con una pesante attivazione della caspasi-3 mentre

le cellule di CML coltivate con le MSC presentano una più alta espressione di CXCR4, aumentando così l'interazione tra stroma e cellule. Quando le cellule di CML coltivate con MSC sono trattate con imatinib, si osserva che l'attivazione della caspasi-3 è inibita e le MSC sono in grado di aumentare l'espressione di Bcl-XL sulle cellule di CML così revertendo l'effetto inibitorio dell'imatinib su questa proteina antiapoptotica; inoltre l'alta espressione di CXCR4 data dalle MSC non si osserva in presenza di imatinib. Quando le coculture trattate con imatinib sono incubate con AMD1300, che è l'inibitore di CXCR4, l'espressione di Caspasi-3 viene riportata ad alti livelli ma non si osservano effetti sull'espressione di Bcl-XL indotta dalle MSC e questo effetto non correla con la ripristinata sensibilità all'imatinib successiva al blocco di CXCR4 mediante AMD3100. Si può così concludere che l'interazione fisica tra MSC e cellule di CML protegge le cellule tumorali dalla morte indotta dal farmaco secondo una modalità CXCR4/CXCL12, che è uno dei regolatori centrali della sopravvivenza cellulare nei tumori solidi. In relazione a questo aspetto, è stato dimostrato che le hBM-MSCs producono in coltura con cellule leucemiche la chemokina CXCL12 funzionale mentre le BV173 presentano il corrispondente recettore CXCR4 funzionale, valutato in un saggio di tras migrazione con gradiente di concentrazione di CXCL12. Quando le cellule di CML sono esposte all'imatinib mentre sono a contatto con le MSC, la loro capacità di attecchire in topi NOD/SCID è mantenuta, così indicando che le MSC proteggono le cellule di leucemia ripopolanti – e probabilmente le cellule progenitrici di CML- dall'effetto dell'imatinib mediante l'asse CXCR4/CXCL12 in quanto se le coculture di BV173 e MSC sono trattate con l'inibitore AMD3100 prima di essere esposte a imatinib si ottiene una significativa riduzione della percentuale di cellule CD19⁺ che attecchiscono nei topi NOD/SCID. Questo articolo pone in luce così il potenziale beneficio di una terapia antagonista di CXCR4 nella CML per distruggere l'asse CXCR4/CXCL12 e rendere così più efficace l'azione dell'imatinib anche nell'eradicare quella popolazione di cellule staminali leucemiche quiescenti BCR/ABL positive (Lin-CD34⁺CD38⁻) intrinsecamente resistenti all'imatinib; per cui eventuali agenti che siano indirizzati a quest'asse possono essere in grado di mobilitare le cellule di CML dal loro microambiente protettivo e aumentare l'efficacia terapeutica di imatinib. Il ruolo di CXCL12/SDF-1 e del suo recettore CXCR4 è stato precedentemente studiato in altri tumori ematologici e, in accordo con i risultati, AMD3100 distrugge l'interazione

delle cellule di MM con lo stroma di BM in vitro e in vivo, così migliorando la sensibilità al bortezomib.

Francesco Lanza e Anna Lisa Pasini
f.lanza@ospedale.cremona.it

Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasma cells

Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M for the Myeloma Stem Cell Network (MSCNET).

Haematologica

Questo lavoro si propone di caratterizzare le popolazioni linfocitarie umane circolanti B usando una tecnica citofluorimetria multiparametrica per definire la migliore combinazione di markers per la loro identificazione e per studiare la loro variazione in relazione all'età. Questo studio si pone inoltre come obiettivo quello di caratterizzare in dettaglio il fenotipo dello status di attivazione e di homing delle plasmacellule circolanti in fase steady-state. Nel sangue periferico esistono 4 diverse popolazioni di cellule B circolanti: 2/3 sono costituiti da linfociti B naive (CD27⁻ CD20⁺ CD19⁺ CD38⁻), 1/3 è rappresentato da linfociti B memory (CD27⁺ CD20⁺ CD19⁺CD38⁻), rare plasmacellule in fase "steady-state", caratterizzate dal seguente immunofenotipo: CD20⁻ CD19⁺ CD38^{high}, e una piccola quota (2-4%) di cellule B immature (CD10⁺, CD24^{high}, CD38^{high}). Questo paper ha valutato il sangue periferico di 106 donatori sani, adulti, mediante citofluorimetria utilizzando come marcatori varie combinazioni basate su il CD10, CD27 e CD38, i quali permettono la identificazione dei linfociti B immaturi (CD10⁺CD27⁻CD38⁻), naive (CD10⁻CD27⁻CD38⁻), e memory (CD10⁻CD27⁺CD38⁻). Il passaggio da linfociti B naive a memory è caratterizzato dall'aumento di CD24, CD25, CD27 e CD53 e down-regolazione di CD5 e CD23. Le plasmacellule (CD20⁻,CD38⁺⁺,CD27⁺⁺ e cyIg⁺) hanno una eterogenea positività per CD138 (CD138⁻: 57±12% e CD138⁺: 43±12%). Si è osservato che la produzione di linfociti B immaturi e naive non è significativamente influenzata dall'età mentre la differenziazione di linfociti B naive in linfociti B memory e poi in plasmacellule è chiaramente ridotta con l'età e ciò potrebbe potenzialmente essere dovuto a una più bassa esposizione a nuovi antigeni che si verifica nell'anziano. Per quanto riguarda la caratterizzazione dettagliata delle plasmacellule circolanti, esse mostrano differenze nell'indice di colorazione (Stained Index) delle CD138⁺ rispetto alle CD138⁻ in relazione ai markers CD38 (↑ 22%), catene leggere κ e λ delle cyIg (↑ 47% e ↑ 98%), CD27 (↑ 117%) e CD45 (↓ 24%). Non sembra che siano di origine mucosale perché solo 40-50% di tutte le plasmacellule del sangue periferico sono IgA⁺ e hanno il CCR10 solo debolmente espresso. Per quanto riguarda la loro origine e il loro comportamento, in base alla loro espressione di HLA-DR e CD45, si ritiene generalmente

che siano plasmoblasti di nuova generazione negli organi linfoidi. Ma una frazione delle plasmacellule circolanti potrebbero essere plasmacellule a lunga vita localizzate nel BM e/o nei tessuti linfoidi che sono indotte a ricircolare dalla loro nicchia in competizione con plasmoblasti circolanti di nuova generazione. Lo status di attivazione delle plasmacellule circolanti (KI-67⁺: 66.8 ± 29.7% per CD138⁻ e 76.2 ± 12.5% per CD138⁺) potrebbe indicare che sono state indotte a ricircolare da stimolazione locale.

Francesco Lanza
f.lanza@ospedale.cremona.it

Relationship between minimal residual disease measured by multiparametric flow cytometry prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia

Elorza I, Palacio C, Dapena JL, Gallur L, Sánchez de Toledo J and Díaz de Heredia C

Haematologica, 95,6, 936-41

In questo articolo viene utilizzata la citometria a flusso multiparametrica per valutare quantitativamente la Malattia Minima Residua (MRD) in 31 pazienti pediatrici (range di età: 10 mesi-16 anni) affetti da leucemia linfoblastica acuta (ALL) ad alto rischio, inizialmente resistente o ricaduta, prima di sottoporli a trapianto di cellule staminali (HSCs). La determinazione di MRD in questi pazienti risulta particolarmente importante per valutare la risposta al trattamento e rappresenta un indice prognostico sfavorevole per trapianto di HSC. Negli studi precedenti più recenti, a questo proposito, la valutazione di MRD viene fatta mediante amplificazione dei riarrangiamenti clonali dei geni del TCR e del gene per l'immunoglobulina con PCR ma si può osservare come le due metodologie non presentino discrepanze e inoltre la metodica basata su tecnica citofluorimetria sia rapida, prontamente disponibile e dia una quantificazione accurata della MRD, fornendo nel contempo informazioni sul normale status ematopoietico: dei 31 pazienti analizzati, 10 avevano MRD-positiva prima del trapianto (MRD ≥ 0.01%) mentre 21 non presentavano MRD (MRD < 0.01%). Questo studio conferma che la MRD determinata prima del trapianto costituisce un marker predittivo di ricaduta dopo trapianto stesso con una percentuale di sopravvivenza complessiva del 20% in pazienti MRD-positivi pre-HSCT rispetto ad un valore dell'80% per pazienti MRD-negativi per cui i pazienti con MRD-positiva presentano un più alto RR (risk ratio) di ricaduta di 10.5 e un RR di morte del 4.2 rispetto a pazienti senza MRD. Non è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa con altri fattori analizzati quali sesso, stato di remissione pre-HSCT, tipo e fonte del donatore, grado di GVHD e ricaduta rispetto a presenza di MRD pre-HSCT e GVHD severa che sono invece fattori significativamente predittivi di esito infuasto. Questo approccio di studio permette quindi di identi-

ficare i pazienti con un maggiore rischio di ricaduta per i quali si possono adottare regimi di trattamento più intensi. Bisogna però sottolineare il fatto che allo stato attuale non vi sono sufficienti conoscenze su come prevenire le ricadute di malattia, che sono il principale ostacolo per il successo dell' HSCT. Diversi approcci per migliorare l'esito dei trapianti dovrebbero includere strategie pre- e post-trapianto quali una addizionale terapia citoriduttiva prima del trapianto, l'uso di anticorpi monoclonali quali imatinib prima e dopo HSCT in caso di ALL Philadelphia-positiva, nuovi analoghi della purina e protocolli di HSCT che favoriscano l'effetto graft-versus-leukemia.

Francesco Lanza e Anna Lisa Pasini
f.lanza@ospedale.cremona.it



Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in Multiple Myeloma: the diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology.

Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, Hasserjian RP, Ferry JA, Dorn ME, Sadowski C, Bucci JJ, Carulli G and Preffer F.

Cytometry part B 2010, 78B,231-238

In questo articolo viene proposto un nuovo metodo per definire le caratteristiche citofluorimetriche di normalità di plasmacellule policlonali normali (PCs) rispetto a PCs patologiche monoclonali in Mieloma; questa informazione risulta molto utile per discriminare tra PCs neoplastiche e PCs normali e reattive quando i risultati di clonalità della catena leggera delle immunoglobuline prodotte da PCs non sono chiari. La metodica tradizionale, descritta in letteratura, prevede che se il 20% delle cellule analizzate esprimono un marker di interesse, questo è considerato un valore soglia per definire un antigene come positivo o negativo ma, a questo proposito, in letteratura ci sono discrepanze su quale sia l'esatto fenotipo di PCs normali e neoplastiche; inoltre un rapporto κ/λ delle catene leggere delle immunoglobuline tra 0.5 e 3 definisce una PCs policlonale. La metodica citofluorimetrica, tra le varie metodiche di laboratorio per la valutazione del Mieloma a plasmacellule (PCM), consente di discriminare tra PCs normali, reattive e maligne, di valutare il rischio di progressione da MGUS (gammopatia monoclonale di incerto significato) a PCM, di fornire informazioni di natura prognostica, di valutare la malattia minima residua (MRD) e di identificare nuovi target terapeutici. Sono stati utilizzati 15 campioni di midollo da pazienti normali come controllo in cui sono state identificate PCs policlonali (CD19⁺ CD56⁻) e sono stati raccolti invece i midolli di 46 pazienti con PCM. Per identificare le plasmacellule è stata usata la combinazione CD45-AmCyan-A, CD38-FITC, CD138PE.

% DI ESPRESSIONI DI ANTIGENI IN CAMPIONI DI CONTROLLO		
Antigeni	%	Range
CD19	86.6 ± 8.9	61-96
CD56	23.7 ± 11.1	2-45
CD27	93 ± 6.8	66-98
CD28	13.1 ± 8.3	0-27
CD33	9.3 ± 6.9	2-34
CD10	24.5 ± 18.6	0-55
CD20	56 ± 19.8	17-95
CD81	97.4 ± 3	87-100
Cyto- κ	48.1 ± 10.4	28-68
Cyto- λ	39.6 ± 11.8	16-63

In accordo con precedenti pubblicazioni, la maggior parte delle PCs normali esprimono CD19 e CD27 ma non CD33 né CD56; è stato comunque determinato un range variabile di espressione delle PCs normali tra gli antigeni studiati. Si è determinato se il range di espressione definito normale come criterio per valutare la presenza /assenza di malattia, sia correlato con l'analisi immunostochimica e si è osservato che CD19 e CD81 correlano meglio con i risultati istologici rispetto alla metodica tradizionale. I due metodi presentano circa la stessa correlazione con l'analisi istologica per CD27, CD56, CD28, CD20, CD33 e cyto- λ . La metodica tradizionale sembra correlare meglio con l'istologia per cyto- κ e CD10. Rispetto alla nuova metodica, cyto- λ , CD19 e cyto- κ concordano meglio con l'istologia, mentre CD27 e CD56 mostrano una simile moderata concordanza. Si è confermato che le catene leggere dell'immunoglobulina sono il principale antigene per determinare la presenza o l'assenza di malattia in PCM e il rapporto λ/κ compreso tra 0.5 e 3, rimane la metodica migliore per definire PCs normali. Dal punto di vista degli antigeni, la mancanza di espressione del CD19, antigene presente già negli stadi precoci di differenziazione della linea B, è utile per determinare la presenza di PCs neoplastiche. Il CD27 ha lo stesso ruolo del CD56 nel determinare la presenza di malattia e può essere considerato un antigene addizionale utile a questo proposito. CD56, che è una molecola di adesione coinvolta nell'ancoraggio delle PCs del mieloma allo stroma midollare, presenta un ampio range di espressione normale (0-47%) e la sua assenza è associata a infiltrati di PC extramidollari, malattia più aggressiva e prognosi sfavorevole.

L'espressione di CD20 risulta costante nei controlli con un ampio range di normalità (19-91%): CD20 sembra essere un antigene non significativo nel distinguere tra presenza e assenza di malattia.

Si può concludere che il nuovo metodo di espressione del "range di normalità" non risulta superiore al metodo tradizionale con soglia del 20% al fine di determinare la presenza di malattia in PCM: in particolare però, l'espressione del CD19 mostra una buona correlazione con la presenza di malattia con il metodo nuovo, per cui l'analisi citofluorimetrica potrebbe essere considerata

come un buon test di screening per determinare la presenza di plasmacellule neoplastiche.

Francesco Lanza e Anna Lisa Pasini
f.lanza@ospedale.cremona.it

Enumeration of the Absolute CD4 T-Lymphocyte Count by Cell-Bead Assay

Duangdao Nantakomol, Pornlada Nuchnoi, Egarit Noulsri, Surada Lerdwana, Sririma Krisin, Supantitra Chanprasert and Kovit Pattanapanyasat
Cytometry Part B 78B:260-266, 2010

Questo articolo del gruppo thailandese propone un metodo alternativo per il conteggio del numero assoluto dei linfociti CD4+, essenziale per il monitoraggio clinico del paziente HIV-positivo. Il gruppo mette a confronto il suo metodo con altri due approcci "commerciali": 1° metodo "lyse no wash" in tubi contenenti un numero noto di biglie liofilizzate (CLB); 2° metodo definito "flow rate-based calibration" (FR), si tratta di un approccio volumetrico che considera il volume di campione acquisito dallo strumento in 120 secondi e prevede l'utilizzo di biglie commerciali acquisite prima e dopo il campione. La strategia proposta dagli autori si ispira allo stesso principio del metodo FR, ma, anziché utilizzare biglie commerciali, impiega una preparazione di "cell bead", ovvero una sospensione di globuli rossi a concentrazione definita, che viene acquisita prima e dopo il campione in esame (FCB). Per confrontare l'approccio proposto con i metodi convenzionali di quantificazione dei linfociti TCD4+, il gruppo thailandese ha testato 20 campioni di soggetti sani e 80 campioni di pazienti HIV+, a diversi livelli di deplezione dei linfociti TCD4+, con le 3 diverse metodiche. Gli autori sostengono la validità del proprio sistema mostrando la mancanza di differenze statisticamente significative nelle determinazioni ottenute e soprattutto un'elevata correlazione tra i risultati ottenuti con FCB e le analisi con CLB. I vantaggi della proposta in esame sono di carattere squisitamente tecnico ed economico, infatti: a) l'utilizzo del metodo FCB rispetto a quello FB ha il vantaggio di non risentire delle differenze di viscosità che inevitabilmente sono da considerare nell'acquisizione di un campione biologico e della sospensione di biglie; b) rispetto all'approccio CLB la strategia proposta risulta meno laboriosa e meno costosa, in quanto le "cell bead" non vengono aggiunte in tutti i tubi. Il commento finale a questo lavoro metodologico, considerando l'importanza della determinazione dei linfociti CD4+ nei soggetti HIV-sieropositivi ai fini del management dell'infezione, è che l'utilizzo delle biglie commerciali risulta più laborioso e più costoso, ma le preparazioni di biglie godono della certificazione CE.

Daniela Fenoglio
daniela.fenoglio@unige.it

Godd cell, bad cell flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease

Pratip K. Chattopadhyay, Mario Roederer
Cytometry Part A 77A:614-622, 2010

Poche sono le malattie che hanno prodotto una mole di lavori scientifici quanto l'infezione da virus HIV-1, e la maggior parte di questi studi è profondamente legata allo sviluppo della citometria a flusso. In questa review Roederer e coll. rivedono la letteratura fiorita intorno ai dati citometrici sull'argomento ed analizzano in modo critico i numerosi markers proposti per l'analisi della componente linfocitaria T, dai marcatori di attivazione, a quelli di differenziazione, a quelli di senescenza, per terminare con le misure funzionali. I primi studi sull'argomento che impiegavano misure citometriche erano mirati a confermare la deplezione dei linfociti TCD4+, successivamente con il miglioramento tecnologico e l'ampliamento dei protocolli di indagine e dei reagenti a disposizione, i ricercatori hanno cercato di andare oltre per capire la biologia dell'infezione, e soprattutto per analizzare quali siano i cambiamenti che possono indicare la progressione della malattia. A questo scopo concordo con gli autori sull'importanza di inserire nel pannello dell'immunofenotipo marcatori utili per definire i livelli di attivazione dei linfociti T, in quanto l'"up-regolazione" di molecole come HLA-DR e CD38, può fornire la misura dei linfociti T attivati in vivo, chiara evidenza della progressione della malattia. Sicuramente meno indicativo è l'analisi dell'espressione di CD69, in quanto si tratta di un marker precoce e ad espressione transiente rispetto ad HLA-DR. Durante un'infezione cronica come quella da HIV occorre considerare anche il ruolo delle molecole costimolatorie molto importanti nel fornire il secondo segnale, che condiziona l'esito della risposta immune. Uno di questi marcatori è appunto la molecola CD28, la cui mancata espressione sui linfociti TCD8+ indica una popolazione senescente, con caratteristiche di anergia e con potenzialità regolatorie sulla funzione di altre cellule T, come è stato dimostrato da diversi lavori anche prodotti dal nostro gruppo. Meno chiarito è il ruolo dei segnali costimolatori negativi forniti dalle molecole PD-1 e CTLA-4, per i quali la letteratura a supporto è ancora scarsa.

Altro punto di discussione affrontato nel lavoro riguarda la difficoltà di definire dei marcatori di superficie idonei a discriminare i subsets T naive e memory, per i quali pare non esserci un consenso sull'espressione di particolari combinazioni di molecole che "fittino" con la definizione degli stati di maturazione (naive, central memory, effector memory, senescent/terminal), in quanto i marcatori proposti presentano un'espressione alquanto eterogenea. A questo riguardo l'unica osservazione comune ai diversi reports consiste nell'evidenza di una maggiore perdita di linfociti meno maturi ed un accumulo di cellule altamente differenziate durante l'infezione da HIV non-trattata, per cui gli autori propongono in modo minimale l'associazione di uno dei due classici markers di cellule T "antigen-experienced" (CD45RA o CD45RO), con due molecole chiave, quali CD127 (recettore per IL-7) e CD57 (marcatore di senescenza), per descrivere in modo strategico lo stato maturazionale del comparto T periferico. Coerentemente con le ultime conoscenze acquisite nel

campo immunologico, l'analisi fenotipica della popolazione T deve tenere conto anche dei linfociti T CD4+CD25+FOXP3+ regolatori (Treg), sui quali negli ultimi 10 anni si è focalizzato l'interesse dei ricercatori e, per quanto riguarda l'infezione da HIV i Treg sembrano contribuire all'immunodeficienza e alla progressione verso AIDS. Premettendo che l'approccio migliore per studiare i linfociti Treg è quello funzionale, la combinazione di marcatori aggiuntivi, quali CD127 e CD39 e GITR, suggerita da Roederer et coll pare la più adeguata per definire questo subset, in quanto è stato dimostrato da diversi autori come CD25 e FOXP3 siano ampiamente espressi anche da cellule T effettrici attivate, che sono molto frequenti nei campioni di sangue periferico del paziente HIV-positivo. Infine ampio spazio viene dato dagli autori alle misure funzionali dei linfociti T, dalla proliferazione alla produzione di citochine alla citotossicità, in quanto tali considerazioni sono basilari per capire come il virus abbia compromesso lo stato di immunocompetenza e abbia disregolato i processi immuni del paziente. A mio avviso sono molto interessanti le considerazioni riguardo la produzione delle citochine, in quanto l'utilizzo degli strumenti multicolore permette di testare la presenza di linfociti T polifunzionali (esprimenti più di 3 funzioni), che è non solo indicativa della qualità della risposta immune del soggetto, ma è pure un segnale importante sull'eventuale progressione della malattia. Infatti i dati raccolti sui soggetti "long-term nonprogressors" indicano che la frequenza di linfociti in grado di secernere citochine multiple è superiore nei soggetti che mantengono bassi livelli di viremia e normali livelli di linfociti TCD4+ per molti anni. Per concludere gli autori prendono in considerazione la ricaduta in clinica di tutti gli aspetti studiati grazie alla citometria a flusso, che fornisce all'infettivologo gli elementi per capire come venga rimodellato il comparto T dall'infezione. Tutte queste valutazioni possono costituire il gold-standard per l'inizio della terapia, ma, soprattutto con l'avvento della HAART, questi parametri possono essere mirati alla definizione dei benefici immunologici della terapia antiretrovirale. Quindi ritengo molto apprezzabile l'invito finale alla cautela fatto dagli autori sulla scelta ed uso delle misure citometriche, considerando le fini differenze evidenziate da ciascuno di questi parametri.

Daniela Fenoglio
daniela.fenoglio@unige.it

Viability states of bacteria-specific mechanisms of selected probes"

Di H. Sträuber e S. Müller
Cytometry Part A, 77A: 623-634, 2010

Questa review analizza in dettaglio i più comuni protocolli e le caratteristiche funzionali ed il modo d'azione di alcuni coloranti comunemente usati per determinare la vitalità (FDA e derivati), lo stato energetico (DiOC6 e DiBAC4), il metabolismo (composti legati a NBD) e l'integrità cellulare (PI) dei batteri. Gli autori si concen-

trano sulle applicazioni a due batteri comunemente usati in studi di microbiologia clinica, quali *Escherichia coli* e *Mycobacterium spp.*. Gli autori richiamano l'attenzione sulla necessità, spesso trascurata, di ottimizzare i protocolli alla specie usata, in quanto esiste un'enorme variabilità di struttura e risposte tra le diverse specie di batteri. Informazioni sulla composizione chimica dei coloranti sono presentate congiuntamente all'analisi della composizione strutturale della parete e della membrana batterica, in quanto la composizione di quest'ultima spesso determina il successo del protocollo di colorazione. Per semplicità, non sono presentati protocolli che utilizzano due o più coloranti in contemporanea, ma i principi esposti sono validi anche in questi casi. Inoltre, gli autori richiamano l'attenzione sull'eventuale autofluorescenza di alcune specie, e per questo motivo raccomandano di utilizzare sempre un controllo negativo rappresentato dalle stesse cellule analizzate senza alcun trattamento. Questa review è scritta in maniera molto chiara e identifica alcuni punti semplici ma fondamentali che ogni ricercatore dovrebbe prendere in considerazione quando utilizza un protocollo di colorazione e per la prima volta. Sono sicura che risulterà di interesse a molti operatori nel campo della microbiologia sia clinica che ambientale.

Raffaella Casotti
raffa@szn.it

Polish Journal of Microbiology

Composition of picocyanobacteria community in the Great Mazurian lakes: isolation of phycoerythrin-rich and phycocyanin-rich ecotypes from the system-comparison of two methods

Di I. Jasser et al.
Polish Journal of Microbiology 59(1): 21-31, 2010

Gli autori confrontano due metodi di isolamento di cianobatteri da un lago di acqua dolce in Polonia, il classico metodo di isolamento su piastra ed il sorting con citometria a flusso. Il secondo risulta ovviamente superiore, in quanto riesce a distinguere ecotipi diversi sulla base delle caratteristiche di scatter e fluorescenza. Inoltre, l'isolamento su piastra seleziona i ceppi più adatti alle condizioni di laboratorio, che nella maggior parte dei casi sono anche quelli meno rappresentati in natura. L'articolo delinea inoltre la composizione delle comunità batteriche in questi sistemi e rappresenta un buon esempio di come la citometria a flusso stia finalmente colonizzando anche gli ambienti di acqua dolce, come anche testimoniato da articoli pubblicati nel precedente numero della nostra rivista Lettere GIC.

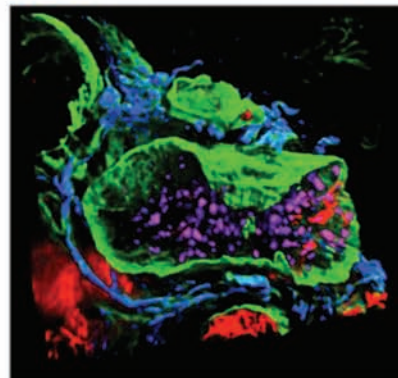
Raffaella Casotti
raffa@szn.it



Advanced 64-bit 3D-4D Cellular Imaging Solutions from PerkinElmer

PerkinElmer is proud to introduce you to our advanced, high performance 3D-4D imaging software Volocity®

Volocity® provides a full suite of tools for 3D image acquisition, volume visualization, restoration, publication, object measurement, tracking and charting.



Why should scientists be interested in 3D imaging?

3D imaging gives more information about cellular structure and function. It provides more morphological detail about the shape, size and location of cellular structures and the relationships between structures in the same sample. Time-resolved 3D imaging provides a better understanding of biological processes by providing more information and context to cellular changes over time. 3D analysis provides more accurate results. It helps avoid misinterpretation of data by providing more context.

World's first fully end-to-end 64-bit spinning disk confocal system the UltraVIEW VoX

PerkinElmer was the first company to bring you a 64-bit imaging analysis system, setting the industry standard for 3D imaging software. Pioneering once again, PerkinElmer propels imaging systems into the future bringing you tomorrow's technology today! Volocity can now acquire image images on a 64-bit operating system making it the most powerful acquisition system in the world. In delivering you the power of 64-bit acquisition we bring you the world's first fully end-to-end 64-bit spinning disk confocal system the UltraVIEW VoX. The UltraVIEW® VoX is a complete solution for advanced live cell 4D confocal imaging. Includes new spinning disk technology, the CSU-X1, for maximum optical efficiency, minimal phototoxicity and photobleaching; patented ProSync® unit for optimum synchronization of hardware; solid-state lasers and optional PhotoKinesis™ accessory for FRAP and related techniques. Controlled by Volocity, the system provides 4D image acquisition and analysis.

Importance of 64-bit Imaging

64-bit Windows® supports up to 128 GB RAM and 16 TB of virtual memory, 8 TB of which are available to the application. 32-bit Windows is limited to a maximum of 3 GB of virtual memory per application. This dramatically increases the virtual memory available to Volocity. For Volocity users this increases the maximum data size that may be handled by the application and allows you to drive your research by the demands of your biology and not by the restrictions of technology.

Key Benefits

Acquisition – The largest single time-point that may be acquired is increased in size.
Visualization - The size and complexity of data sets which may be rendered by the HR renderer is increased. Greater numbers of time points may be rendered without exceeding the virtual memory of the OS.

Quantitation – The complexity of measurement protocols applied and the size of data set which may be measured is increased.

Restoration – The size of data sets which may be deconvolved is increased.

For further information: www.perkinelmer.com