

TECNICA E PROSPETTIVE DI UTILIZZO DELLA CITOMETRIA A FLUSSO PER LA TIPIZZAZIONE LINFOCITARIA DEL LIQUIDO SINOVIALE DI CANE

TECHNIC AND USE'S EXPECTATION OF FLOW CYTOMETRY IN LYMPHOCYTE TYPING OF SYNOVIAL FLUID OF DOG

VERONICA MARCHETTI ⁽¹⁾, SILVIA SBRANA ⁽²⁾, MARIO MODENATO ⁽¹⁾,
PATRIZIA ISOLA ⁽³⁾, MAURO PISTELLO ⁽³⁾, ELENA LUCHETTI ⁽¹⁾,
GIOVANNI CARDINI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

L'utilizzo della citometria a flusso, o fluorimetria, per l'immunofenotipizzazione linfocitaria è una metodica in uso in medicina umana soprattutto nel settore reumatologico, dove riveste un'importanza notevole nella comprensione dei meccanismi degenerativi cartilaginei in corso di artrite reumatoide, mentre è poco utilizzata nella più comune artrosi. In medicina veterinaria la tecnica non è a tutt'oggi utilizzata nella diagnostica collaterale dei problemi ortopedici e reumatologici. Sono disponibili solo due segnalazioni di lavori sperimentali in argomento.

Sono state fatte numerose prove su campioni di liquido sinoviale di cane, prelevato sia durante la visita clinica che in sede intraoperatoria, in corso di patologie articolari diverse. Il liquido è stato sottoposto a conta cellulare con contaglobuli elettronico; per essere processato a tal fine e per l'analisi citofluorimetrica, è stato sottoposto a pretrattamento con ialuronidasi. La componente cellulare mononucleata è stata quindi separata e concentrata mediante centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep™ (Ficoll-Isopaque) e studiata con citofluorimetro. Contemporaneamente l'immunofenotipizzazione linfocitaria è stata condotta anche su un campione di sangue periferico.

Prove successive finalizzate a rendere il campione un fluido acquoso hanno permesso di evidenziare l'assoluta necessità di pretrattare il campione con 2 gocce di ialuronidasi alla concentrazione di 150UI/ml per 0,25 cc di liquido sinoviale. La quantità di liquido prelevabile è in generale scarsa nei fatti degenerativi cronici, più abbondante nei fenomeni infiammatori acuti, e questo può rappresentare un limite nell'applicazione di questa metodica nella pratica clinica. Per ottenere una buona lettura è necessario avere infatti almeno 1cc di liquido articolare e/o almeno 1000 cellule/μl. La distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie CD3⁺ e CD21⁺, ed in particolare del rapporto fra i linfociti CD4⁺ e CD8⁺ nel liquido sinoviale e nel sangue, si presenta indicativamente diversa nei fenomeni prevalentemente degenerativi rispetto a quelli squisitamente infiammatori.

⁽¹⁾ Dipartimento di Clinica Veterinaria, Direttore Prof. Fabio Carlucci.

⁽²⁾ Collaboratore Esterno.

⁽³⁾ Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia e Epidemiologia, Direttore Prof. Alessandro Casini.

La tipizzazione linfocitaria nel liquido sinoviale del cane può aprire la strada ad ulteriori indagini per studiare più a fondo i meccanismi eziopatogenetici alla base della condrodegenerazione e della risposta locale e sistemica nei fenomeni osteoartritici e immunitari, oltreché fornire un ausilio nell'individuazione e nel monitoraggio delle terapie.

Parole chiave: liquido sinoviale, immunofenotipizzazione, citofluorimetria, osteoartrite, cane.

SUMMARY

The use of flow cytometry, also called cytofluorimetry, for lymphocyte immunophenotyping is a technique adopted in human medicine, especially in the rheumatoid field, where it is of paramount importance to understand the cartilage degenerative mechanisms during rheumatoid arthritis, while it is less used in degenerative joint disease. Till now in veterinary medicine this technique is not included in the ancillary diagnostic methods for orthopaedic and rheumatologic problems. To date only two papers are available about its experimental use.

Several tests were done on canine synovial fluid samples, collected during the clinical examination or intraoperatively, in subjects with different joint diseases. The synovial fluid was submitted for total cell count with electronic cell-counter; for this purpose and for cytofluorimetric examination too was pre-treated with hyaluronidase. The mononuclear cell phase was then separated and concentrated by centrifugation on Lymphoprep™ (Ficoll-Isopaque) and studied with cytofluorimetry. In the meantime the lymphocyte immunophenotyping was performed also on a peripheral blood sample.

Further tests aimed to transform the sample in an aqueous fluid has shown the absolute necessity to pre-treat the sample with two drops of hyaluronidase 150 UI/ml in 0,25 cc of synovial fluid. In chronic degenerative joint disease only few drops of synovial fluid can be collected from joints, while more abundant quantities could come from acute inflammatory cases, and this could represent a limit for the applications of the technique in the clinical practice. To perform a good examination we need at least 1cc of synovial fluid and/or at least 1000 cells/μl. Lymphocyte CD3⁺ and CD21⁺ subpopulation distribution, and especially CD4⁺/CD8⁺ ratio in blood and synovial fluid, shows differences in prevalently degenerative and mainly inflammatory phenomena.

The lymphocyte immunophenotyping of canine synovial fluid can represent an alternative instrument to deeply analyze the aetiopathogenetic mechanisms settled at the basis of chondrodegeneration and of the local and systemic response to osteoarthritic and immunological phenomena, and to help in therapeutic choice and monitoring.

Key words: synovial fluid, immunophenotyping, cytofluorimetry, osteoarthritis, dog.

INTRODUZIONE

La citometria a flusso, o citofluorimetria, è una moderna tecnica per la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido. Il citofluorimetro, infatti, è uno strumento in grado di analizzare singolarmente ogni cellula per una serie di parametri strutturali, e di andare a misurare l'intensità di fluorescenza da questa emessa in seguito a stimolazione. Differenti sottotipi cellulari possono essere quindi

distinti tra loro sulla base di tali parametri (Valtriani, 1997).

Una delle principali applicazioni cliniche e sperimentali della citofluorimetria riguarda l'immunofenotipizzazione linfocitaria, che consiste nell'utilizzazione di anticorpi specifici diretti verso i diversi marcatori di membrana CD (Cluster of Differentiation) al fine di differenziare, all'interno di un pool di linfociti provenienti da un dato campione, le diverse sottopopolazioni. I linfociti, infatti, indistinguibili tra loro da un punto di vista morfologico, sono in realtà costituiti da diverse sottopopolazioni, ciascuna con un ruolo specifico nella complessa risposta immunitaria.

I linfociti B, coinvolti nell'immunità di tipo umorale, sono caratterizzati dal possedere alcuni specifici marcatori, tra cui i CD19 e i CD21. I linfociti T, responsabili della risposta immunitaria di tipo cellulare, invece, oltre a possedere il marcatore di membrana CD3, sono divisi in due sottopopolazioni: i CD4⁺, o linfociti T *helper*, che tramite la secrezione di particolari mediatori chimici, detti citochine, svolgono principalmente la funzione di regolazione dell'attività delle altre cellule del sistema immunitario, e i CD8⁺, o citotossici, capaci essenzialmente di attaccare in modo diretto specifiche cellule bersaglio, esempio quelle infettate da virus. (Berkovitz e coll., 1996).

L'immunofenotipizzazione linfocitaria consente quindi di valutare, all'interno di un campione, la diversa percentuale di queste sottopopolazioni linfocitarie.

Questa tipizzazione risulta particolarmente importante nelle patologie che coinvolgono direttamente il sistema immunitario, come infezioni da virus dell'immunodeficienza, leucemie o malattie autoimmunitarie, le quali sono precocemente caratterizzate da una alterazione dei rapporti tra le sottopopolazioni linfocitarie, in particolare del rapporto CD4⁺/CD8⁺. Ad esempio, nell'infezione da HIV nell'uomo, il virus attacca selettivamente e distrugge i linfociti CD4⁺. Il valore della percentuale di CD4⁺ e del rapporto CD4⁺/CD8⁺ è estremamente utile nella diagnosi precoce di infezione e nel monitoraggio del sistema immunitario (Taylor e coll., 1989). Nel caso specifico delle malattie articolari, un aumento del rapporto CD4⁺/CD8⁺ nell'artrite reumatoide è correlata ad una prognosi peggiore poiché i linfociti CD8⁺ svolgono una funzione di inibizione e quindi controllo del processo patologico (Taneja e coll., 2002).

L'immunofenotipizzazione può essere effettuata su campioni cellulari provenienti da distretti corporei diversi: sangue periferico, midollo osseo, linfonodi, milza; oppure su liquidi biologici quali liquor, versamenti cavitari, liquido sinoviale.

In medicina umana sono stati effettuati numerosi studi per cercare di capire i meccanismi eziopatogenetici responsabili dei danni irreversibili alla cartilagine articolare che si verificano in corso delle diverse artropatie. Usando anticorpi monoclonali e tecniche di citofluorimetria è possibile studiare il ruolo delle diverse sottopopolazioni linfocitarie nella patogenesi della sinovite infiammatoria cronica, osservata classicamente in corso di artrite reumatoide, ma che svolge un ruolo fondamentale anche nel corso di altre patologie articolari infiammatorie nonché in patologie di tipo degenerativo (Kuryliszyn-Moskal, 1995). In medicina veterinaria sono stati pubblicati a tutt'oggi solo due lavori sull'argomento. Tali studi, pubblicati entrambi da Faldyna e coll. (Faldyna e coll., 2004a 2004b), riguardano

l'immunofenotipizzazione del liquido sinoviale di cane, in particolare proveniente da articolazioni non patologiche e da articolazioni affette da osteoartrosi secondaria a rottura del legamento crociato anteriore.

A questo proposito è opportuno far luce su alcune contraddizioni presenti in bibliografia fra i lavori effettuati in medicina umana e veterinaria. In umana è riportata la necessità di un pretrattamento del liquido sinoviale con l'enzima ialuronidasi per eliminare la viscosità (Moreno e coll., 2000), nonché l'opportunità di valutare contestualmente il fenotipo dei linfociti del liquido sinoviale e dei linfociti presenti nel sangue periferico (Beacock-Sharp e coll., 1998); tali procedure non vengono menzionate nei succitati lavori di Faldyna e coll.

In effetti il liquido sinoviale, soprattutto se proveniente da articolazioni artrosiche di cani di piccola taglia, presenta delle peculiarità tali (scarso volume, elevata viscosità, pochezza cellulare) (Bojrab, 2001) che impongono un pretrattamento del campione prima dell'esecuzione dell'indagine citofluorimetrica.

Alla luce di queste considerazioni, lo scopo del nostro studio è stato quello di mettere a punto la metodica per l'immunofenotipizzazione linfocitaria dei linfociti presenti nel liquido sinoviale prelevato da cani affetti da diverse forme di artropatie e contestualmente dei linfociti ematici, al fine di possedere uno strumento che consenta di indagare i meccanismi eziopatogenetici coinvolti nel danno articolare, nonché fornire in futuro elementi utili alla prognosi e alla terapia.

MATERIALI E METODI

In seguito a numerosi tentativi eseguiti, siamo riusciti ad identificare i materiali e le procedure indispensabili al fine di ottenere una lettura citofluorimetrica interpretabile e ripetibile.

I campioni di liquido sinoviale, prelevati tramite artrocentesi oppure in sede intraoperatoria previa artrotomia, vengono immediatamente posti in provette contenenti EDTA e sottoposti ad esame fisico, chimico e citologico secondo i protocolli descritti in letteratura (Boon, 2000).

I campioni, costituiti da almeno 1 ml di liquido e/o 1000 cellule/ μ l, vengono sottoposti a trattamento con l'enzima ialuronidasi (Hyaluronidase[®]) per eliminare la viscosità del liquido sinoviale e consentire la successiva estrazione delle cellule mononucleate dai campioni. La quantità di ialuronidasi necessaria a sciogliere 0,25 cc di liquido sinoviale equivale a due gocce di soluzione enzimatica alla concentrazione di 150 unità/ml.

A questo punto sul liquido sinoviale viene effettuata la conta totale delle cellule nucleate tramite contaglobuli elettronico (Hemat 8, SEAC).

L'isolamento delle cellule mononucleate è ottenuto tramite centrifugazione in gradiente di densità su Lymphoprep[™] (Ficoll-Isopaque). Con questo procedimento le cellule della linea monocitico-macrofagica e i linfociti, di nostro interesse, vanno a costituire un anello biancastro ben isolato dagli altri componenti del campione (Fig. 1), e

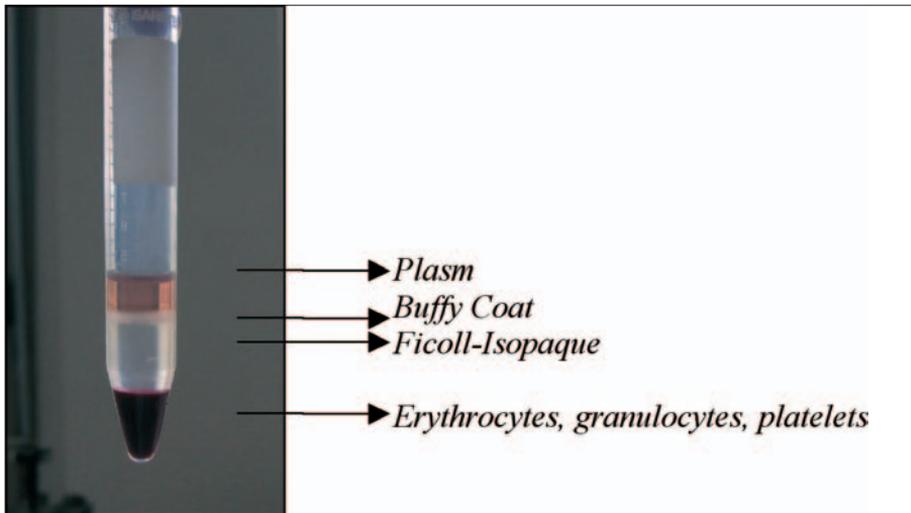


Fig. 1. Campione di sangue periferico dopo centrifugazione su Ficoll-Isopaque, sul quale è messa in evidenza la stratificazione dei diversi elementi e l'anello contenente i linfociti. *Sample of peripheral blood after centrifugation on Ficoll Isopaque. The separation of the different elements and the Buffy coat that contains lymphocytes are shown.*

possono essere così agevolmente prelevati utilizzando una pipetta Gilson da 200 μ l.

Dopo aver effettuato un lavaggio mediante centrifugazione con 10 ml di tampone PBS 1X, essenziale per eliminare dal campione prelevato i residui di Ficoll, il pellet è stato risospeso in PBS 1X e aliquotato in tubi da 5 ml per la successiva marcatura.

Nell'arco delle 24 ore successive viene eseguita l'immunofenotipizzazione linfocitaria.

Per la marcatura delle sottopopolazioni linfocitarie viene utilizzata la metodica dell'immunofluorescenza indiretta, utilizzando come anticorpo primario uno dei seguenti anticorpi monoclonali: Mouse Anti Canine CD4, Rat Anti Canine CD8, Rat Anti Canine CD21, Mouse Anti Canine CD3, forniti dalla ditta Serotec®. Come secondari sono stati utilizzati gli anticorpi: Rat Anti Mouse IgG1 Heavy Chain: FITC e Mouse Anti Rat IgG1 Heavy Chain: FITC (Serotec®).

Al termine del procedimento le cellule marcate sono risospese in 0,5 ml di tampone contenente paraformaldeide, e conservate a +4°C. Viene inoltre allestito un controllo negativo, senza l'aggiunta dell'anticorpo primario, essenziale al momento della lettura citofluorimetrica, per stabilire quale segnale sia effettivamente emesso dalle cellule marcate e quale invece sia dovuto a fenomeni di autofluorescenza dei campioni. La lettura dei campioni è stata effettuata utilizzando il citofluorimetro FACScalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA). I dati letti dallo strumento

sono stati elaborati e rappresentati dal software CELLQuest.

Contestualmente dallo stesso paziente viene prelevato un campione di sangue periferico, ed anch'esso sottoposto a conta cellulare automatica ed immunofenotipizzazione linfocitaria.

RISULTATI

La metodica di immunofenotipizzazione linfocitaria messa a punto è stata applicata a campioni di liquidi sinoviale e sangue prelevati da cani affetti da patologie articolari di varia natura. Nella Fig. 2 è rappresentata a titolo di esempio la lettura citofluorimetrica di un campione di liquido sinoviale; nella porzione sinistra è rappresentato il citogramma in cui sono visibili le diverse sottopopolazioni cellulari separate sulla base di parametri fisici quali dimensione e granulosità. Su di esso vediamo che è possibile evidenziare agevolmente ed isolare la nuvola corrispondente all'intera popolazione linfocitaria che rappresenta il gate. All'interno di questa nuvola

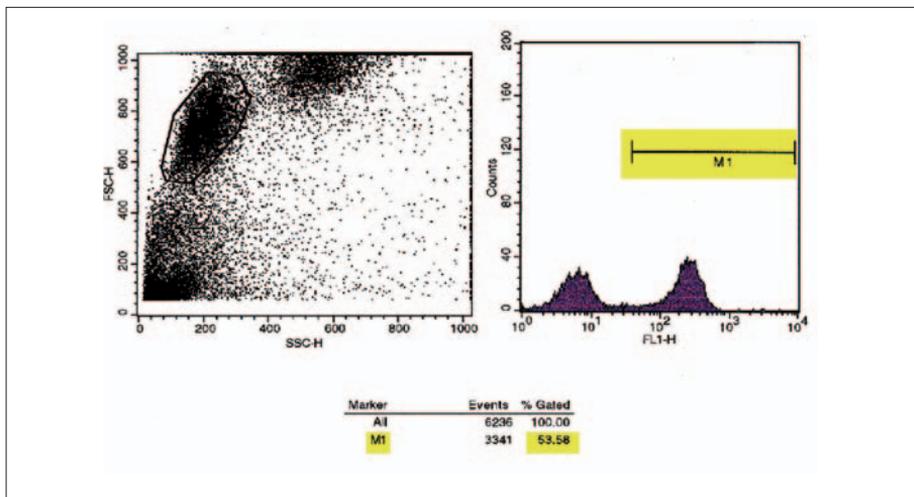


Fig. 2. Esempio di lettura citofluorimetrica di un campione di liquido sinoviale marcato con l'anticorpo primario anti CD4⁺. A sinistra della figura vediamo rappresentato il citogramma, sul quale è evidenziata la nuvola corrispondente ai linfociti (Gate) e a destra l'istogramma con i valori di fluorescenza. Al di sotto dei due grafici è riportato il valore percentuale delle cellule CD4⁺ rispetto alla totalità dei linfociti. *Example of flow cytometric analysis performed on a sample of synovial fluid marked with the primary antibody anti CD4⁺. On the left we can see the cytogram with the evidention of the lymphocyte's gate and, on the right, the histogram with the fluorescence's values read from the instrument. In the bottom there is shown the percentage of lymphocytes CD4⁺ in the sample examined.*

lo strumento è in grado di leggere la fluorescenza emessa dalla sottopopolazione cellulare marcata, in questo caso i linfociti T CD4⁺, rappresentata dall'istogramma presente nella porzione destra della medesima figura. Su questo istogramma sono presenti due picchi: uno a bassa intensità che rappresenta il segnale aspecifico ed uno ad intensità maggiore, che è il segnale realmente emesso dalle cellule marcate, che viene compreso nell'intervallo di lettura M1. Al di sotto dei grafici sono riportati infine i valori numerici letti dallo strumento. In Tab. I. sono riportati a titolo di esempio i dati ottenuti dalla lettura citofluorimetrica di campioni di sangue e liquido sinoviale provenienti da un soggetto affetto da osteoartrosi e da un soggetto con artrite.

	Case of Inflammatory Disease	Case of DJD
CD3⁺ %	S.F. 75,40	S.F. 87,65
	Blood: 70,12	Blood: 82,25
CD4⁺ %	S.F. 59,32	S.F. 47,11
	Blood: 27,32	Blood: 32,50
CD8⁺ %	S.F. 24,69	S.F. 32,30
	Blood: 6,53	Blood: 19,29
CD4⁺/CD8⁺	S.F. 2,40	S.F. 1,12
	Blood: 4,18	Blood: 1,63
CD21⁺ %	S.F. 16,55	S.F. 4,00
	Blood: 17,58	Blood: 18,14

DISCUSSIONE

Le numerose prove che sono state necessarie per la messa a punto del protocollo precedentemente descritto, trovano la loro giustificazione, come abbiamo accennato, nelle particolari caratteristiche del liquido sinoviale, nonché nelle evidenti incongruenze

fra quanto riportato in medicina veterinaria ed in medicina umana sull'argomento.

Per quel che riguarda il pretrattamento con ialuronidasi, gli autori ritengono che rappresenti uno step essenziale per eliminare la viscosità del campione, che risulta pressoché normale in corso di patologie articolari di tipo prevalentemente degenerativo. Numerosi tentativi di diluizioni con soluzioni diverse (soluzione fisiologica, tampone PBS) infatti non hanno consentito di eliminare tale viscosità; solo utilizzando l'enzima specifico il liquido sinoviale assume le caratteristiche di un fluido acquoso rendendo possibile l'estrazione delle cellule nucleate dai campioni.

Un altro problema che ci siamo trovati ad affrontare è stato quello della scarsità di materiale a nostra disposizione, sia in termini di volume che di numero di cellule, soprattutto in caso di osteoartrosi. Siamo giunti quindi alla determinazione di una quantità (1 ml) ed una concentrazione cellulare (1000 cellule/ μ l) minime che i campioni devono avere per fornire una lettura citofluorimetrica attendibile. A tal proposito risulta utile eseguire la conta cellulare con un contaglobuli elettronico e comunque, indipendentemente dal numero di cellule, utilizzare una metodica di concentrazione cellulare tramite centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll.

Queste problematiche non sono riportate nei lavori di medicina umana dal momento che le articolazioni dell'uomo contengono fisiologicamente una quantità di liquido decisamente superiore a quelle del cane di taglia media.

Faldyna e coll. invece, nel lavoro sul liquido sinoviale non patologico, hanno effettuato i prelievi da cani sottoposti ad eutanasia e questo ha consentito loro di prelevare quantità molto maggiori di quelle ottenibili nella pratica clinica. Mentre nel lavoro sui soggetti patologici, hanno incluso solo cani di taglia grande o gigante.

In linea con quanto riportata in medicina umana, abbiamo ritenuto indispensabile la valutazione contestuale del liquido sinoviale e del sangue periferico in modo da avere un parametro di riferimento che consentisse di interpretare le alterazioni rilevate come espressione esclusivamente di una patologia articolare o di un'alterazione sistemica. Nella tabella riportata a titolo d'esempio nei Risultati è possibile vedere che in corso di patologia infiammatoria che si ripercuote a livello sistemico, il valore del rapporto $CD4^+/CD8^+$, sia nel caso del sangue che del liquido sinoviale, è molto più elevato rispetto a quello che si ha in corso di patologia articolare degenerativa, per la quale tale valore resta intorno a 1.

CONCLUSIONI

La messa a punto di una metodica sperimentale che consenta di effettuare l'esame citofluorimetrico del liquido sinoviale di cane fornisce uno strumento di indagine estremamente utile in corso di patologia articolare. Come abbiamo visto dagli studi effettuati in medicina umana, un certo grado di infiammazione è presente in tutte le patologie articolari. Dato che con l'immunofenotipizzazione linfocitaria è possibile andare ad indagare le alterazioni, locali o sistemiche, tra le varie sottopopolazioni linfocitarie, questa tecnica consente di riconoscere il grado e l'importanza del fenomeno infiammatorio nei vari casi, e quindi risulta estremamente utile per l'indagine dei

meccanismi eziopatogenetici che stanno alla base dell'instaurarsi e del perpetuarsi del fenomeno patologico in corso delle diverse artropatie. Inoltre, la conoscenza sempre più approfondita di tali meccanismi può consentire di avere a disposizione elementi utili alla formulazione di una prognosi più precisa e di una terapia più mirata di tali patologie.

BIBLIOGRAFIA

- BEACOCK-SHARP, YOUNG J.L., GASTON J.S. (1998). Analysis of T cell subsets present in the peripheral blood and synovial fluid of reactive arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.*, 57(2): 100-106.
- BERKOVITZ et alii. (1996). *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. Ed. italiana a cura di Giorgio Poli e Alessandra Cocilovo.
- BOJRAB M.J. (2001). *Le basi patogenetiche delle malattie chirurgiche dei piccoli animali*, Giraldi Editore, Bologna.
- BOON G.D. (2000). Synovial fluid analysis: a guide for small animal practitioners. *J. Rheum.*, 27:5.
- FALDYNA M., ZATLOUKAL J., LEVA L., KOHPUT P., NECAS A., TOMAN M. (2004a). Lymphocyte Subset in Synovial Fluid from Clinically Healthy Joints of Dogs. *Acta Vet. Brno*, 73: 73-78.
- FALDYNA M., ZATLOUKAL J., LEVA L., NECAS A., TOMAN M. (2004b). Lymphocyte Subset in Stifle Joint Synovial Fluid of Dogs with Spontaneous Rupture of the Cranial Cruciate Ligament. *Acta Vet. Brno*, 73: 79-84.
- KURYLISZYN-MOSKAL A. (1995). Comparison of blood and synovial fluid lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Rheum. Jan*, 14(1):43-50.
- MORENO M.J., CLAYBURNE G., SCHUMACHER H.R.jr. (2000). Processing of noninflammatory synovial fluid with hyaluronidase for cyto-spin preparation improves the accuracy of differential counts. *Diagn. Cytopathol.*, 22 (4): 256-258.
- TANEYA V., TANEYA N., PAISANSINSUP T., BEHRENS M., GRIFFITHS M., LUTHRA H., DAVID C.S. (2002). CD4 and CD8 T cells in susceptibility/protection to collagen-induced arthritis in HLA-DQ8-transgenic mice: implications for rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, Jun 1, 168(11): 5867-5875.
- TAYLOR J.M., FAHEY J.L., DETELS R., GIORGI J.V. (1989). CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. *J. Acquir. Imm. Defic. Syndr.*, 2(2): 114-124.
- VALTRIANO C., HURLE C. (1997). *Citometria a flusso: Aspetti generali con riferimento particolare allo studio di alcune malattie ematologiche*. *Caleidoscopio Italiano*, n. 113.