



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Sviluppo H/S della stazione di lavoro per l'analisi della chemiotassi

Antonio Azzarà, Luciano Azzarelli, Massimo Chimenti, Enrico Fantini

B4-08
lug-1997

S.T.A.R.
Servizio Tecnografico Area di Ricerca del CNR - Pisa
responsabile della stampa Ermanno Scotti
luglio'97 181 , 81

Sviluppo H/S della stazione di lavoro per l'analisi della chemiotassi

Antonio Azzarà¹, Luciano Azzarelli², Massimo Chimenti², Enrico Fantini²

1) Dipartimento di Oncologia, Div. di Ematologia, Università di Pisa

2) Istituto di Elaborazione della Informazione, CNR Pisa

Sommario

Il lavoro descrive i progressi dell'attività svolta nell'ambito della collaborazione scientifica tra l'IEI e la Divisione di Ematologia riguardante lo sviluppo di tecniche e metodi per lo studio della motilità di cellule in filtri microporosi.

La stazione di lavoro per la ripresa di immagini mediante microscopio, sviluppata nelle fasi precedenti della collaborazione, è stata modificata per quanto concerne sia l'hardware che il software. La precedente scheda di acquisizione del segnale video è stata sostituita con una scheda avente prestazioni superiori e in grado di funzionare in ambiente Windows; sono stati di conseguenza realizzati nuovi moduli software per il controllo dell'acquisizione e dell'analisi del segnale, controllati tramite un'apposita interfaccia grafica.

La nuova versione della stazione è stata sperimentata nella fase iniziale di una ricerca per lo studio delle capacità motorie dei granulociti neutrofilici in pazienti affetti da sindromi mielodisplastiche.

Modifiche della stazione di lavoro

La stazione di lavoro per lo studio della motilità di cellule in filtri microporosi, realizzata nell'ambito di una precedente collaborazione, è costituita da:

- un microscopio ottico, con movimento elettromeccanico del tavolino portaoggetti;
- una telecamera B/W per la ripresa delle immagini del vetrino portaoggetti;
- un calcolatore personal, con scheda di acquisizione video e interfaccia per il controllo del motore sul microscopio.

Mediante un software appositamente realizzato, la motilità delle cellule contenute nei vetrini analizzati viene determinata nelle seguente maniera:

- viene focalizzata la superficie superiore del vetrino; viene elaborata l'immagine digitale acquisita per determinare il numero di cellule contenute nello spessore del vetrino messo a fuoco;
- viene spostata l'altezza del piano portaoggetti, in modo da focalizzare uno spessore immediatamente sottostante al precedente e viene determinato il numero di cellule presenti a questa profondità.

La sequenza di operazioni viene ripetuta, finché il numero di cellule riscontrato diventa inferiore ad un valore minimo prefissato: viene quindi determinata la tabella di conteggi di cellule in funzione della profondità all'interno del vetrino, $c(z)$ e viene ricavato il grafico ad essa corrispondente; applicando due modelli di distribuzione rispettivamente nei casi di motilità random e stimolata, vengono determinate i piani finali di migrazione e viene confrontato l'andamento delle curve di distribuzione con i valori ricavati da un'apposita campionatura di casi normali.

Al fine di ampliare le prestazioni dello strumento, in particolare riguardo alle esigenze definite nel contratto, e allo scopo di aumentarne l'efficienza e la versatilità, si è ritenuto necessario apportare delle modifiche all'hardware del sistema, modifiche e ampliamenti del sistema software e modifiche delle procedure di analisi delle immagini.

Per quanto concerne il primo punto, la scheda di acquisizione video usata in precedenza (Matrox PIP-1024) è stata sostituita con la scheda Matrox Meteor.

La scheda PIP-1024 è in grado di acquisire immagini singole B/W, con una risoluzione spaziale di 512 x 512 pixel, e opera in ambiente operativo MS DOS. La scheda Meteor è in grado di acquisire immagini singole o sequenze temporali di immagini definite da segnali video monocromatici o RGB, con una risoluzione spaziale di 768 x 575 pixel, rappresenta le immagini acquisite sul monitor VGA, senza la necessità di un monitor RGB separato, e può operare in ambienti operativi Windows '95 e NT.

Per quanto concerne il secondo punto, è stato realizzato l'applicativo MAC4WIN, che costituisce la logica evoluzione dell'applicativo MAC (Misurazione Automatica della Chemiotassi), realizzato in precedenza: mentre quest'ultimo utilizzava MS-DOS come sistema operativo, MAC4WIN, come si può dedurre dal nome stesso, è stato implementato per girare in un ambiente Windows, per la precisione Windows '95.

Per la stesura del nuovo applicativo sono stati utilizzati sistemi di sviluppo a 32 bit e più precisamente per l'implementazione dell'interfaccia utente è stato utilizzato il Microsoft Visual Basic nella versione 5.0, mentre tutte le routine per la movimentazione dei motori, e per l'acquisizione di immagini, il calcolo e la visualizzazione dei dati sono state inglobate in librerie DLL o controlli OCX, ottenuti utilizzando il Microsoft Visual C++ nella versione 4.0. In particolare, per l'acquisizione delle immagini da microscopio vengono utilizzati dei moduli presenti nelle librerie Matrox Imaging Library (MIL) che gestiscono la scheda Meteor della Matrox alla quale è collegata la telecamera di ripresa.

L'applicativo si presenta all'utente come un contenitore in cui è possibile, tramite finestre in esso aperte, colloquiare con il sistema software. E' così possibile impostare i dati del paziente, effettuare una taratura del sistema HW/SW, impostare i dati del sistema ottico, effettuare delle letture di simulazione o di test, effettuare un retrace di dati già archiviati e naturalmente effettuare delle nuove acquisizioni dati.

A differenza del vecchio applicativo, per effettuare una nuova acquisizione di dati l'utente di MAC4WIN non deve impostare nessuna procedura sequenziale, ad eccezione della taratura del sistema: questa operazione dev'essere eseguita allo start-up del sistema, generalmente una sola volta per seduta di lavoro; l'operazione può comunque essere ripetuta tutte le volte che l'operatore lo ritiene opportuno.

I dati dei pazienti e le letture effettuate dal sistema vengono archiviate in una base di dati con formato Microsoft Access utilizzando un unico archivio con due tabelle, una per i dati anagrafici dei pazienti ed una con i dati degli esami effettuati; le tabelle sono legate tra di loro con una relazione uno a molti, dato che per ogni paziente possono essere effettuati più esami.

Per quanto concerne il terzo punto, si è provveduto a fornire mediante l'interfaccia utente una nuova rappresentazione dei dati di acquisizione e dei grafici da essi ricavati: a questo scopo si è eseguita anche una nuova determinazione delle curve di normalità della cinetica dei granulociti neutrofili in filtri microporosi, nel modo riportato di seguito.

Migrazione random

Si assume che all'interno del filtro microporoso la distribuzione delle cellule in funzione della profondità z sia descritta dal modello:

$$c(z) = \frac{A}{\sigma} \exp(-z^2/2\sigma^2) \tag{1}$$

dove A è una costante di normalizzazione. Posto $x = z^2$, prendendo il logaritmo della eq. 1 si ottiene :

$$\log c(z) = \log A - \log \sigma - (\log e/2 \sigma^2)x \tag{2}$$

vale a dire una relazione lineare del tipo:

$$y = a - bx.$$

I parametri a e b possono essere determinati mediante una regressione lineare sui logaritmi dei valori di misura della distribuzione delle cellule, in funzione del quadrato della profondità; da questi parametri si possono poi ricavare i parametri A e σ della funzione gaussiana

A questo scopo sono state nuovamente considerate le 21 misure ricavate dai casi di controllo. La tabella 1 riporta i valori percentuali di misura $c(z)$ sui piani da 0 a 100 μm (sono state trascurate le misure a profondità maggiore, riscontrate solo nel caso 15); sono stati quindi calcolati i logaritmi decimali dei valori di tabella 1: i risultati sono riportati in tabella 2.

Sugli insiemi di valori in corrispondenza di ciascun piano di misura sono state calcolate le statistiche e sono stati eliminati i valori al di fuori degli intervalli ($m-2s$, $m+2s$), dove m e s sono rispettivamente il valore medio e la deviazione standard; si è così ottenuto l'insieme ridotto riportato in tabella 3.

Sono stati quindi ricavati i valori medi e le deviazioni standard delle colonne di tabella 3: la tabella 4 riporta i valori centrali e gli estremi $m \pm 2s$ relativi ai piani da 0 a 80 μm : si è trascurato il piano a 100 μm , che contiene pochi valori.

Eseguendo la regressione lineare sui dati di tabella 4 in funzione di $x = z^2$ si sono ottenuti i seguenti risultati.

Equation: $m-2s = 1.5548 - 0.0003*x$

Variable	N	Mean	Variance
x	5	2400	6960000
m-2s	5	0.7431	0.8001

Regression Coefficient	-0.000338
Standard Error of B	0.000014
Y-Intercept	1.554826
R-Squared	0.995210
Adjusted R-Squared	0.993613
Standard Error of Estimate	0.071484

The 95.0% confidence limits for the slope are: [-0.000381351, -0.00029512]

Equation: $m = 1.5939 - 0.0002 * x$

Variable	N	Mean	Variance
x	5	2400	6960000
m	5	1.0082	0.4194

Regression Coefficient	-0.000244
Standard Error of B	0.000015
Y-Intercept	1.593859
R-Squared	0.988393
Adjusted R-Squared	0.984523
Standard Error of Estimate	0.080561

The 95.0% confidence limits for the slope are: [-0.000292624, -0.000195442]

Equation: $m+2s = 1.6329 - 0.0001 * x$

Variable	N	Mean	Variance
x	5	2400	6960000
m+2s	5	1.2733	0.1657

Regression Coefficient	0.000150
Standard Error of B	0.000021
Y-Intercept	1.632934
R-Squared	0.943435
Adjusted R-Squared	0.924579
Standard Error of Estimate	0.111775

The 95.0% confidence limits for the slope are: [-0.000217265, -8.24306e-005]

La tabella 5 riporta i valori della suddetta rete di interpolazione in corrispondenza dei piani da 0 a 80 μm ; nel seguente riquadro sono riportati:

- i coefficienti a e b delle rette r_1 , r_m e r_2 . definite rispettivamente dai punti $m - 2s$, m e $m + 2s$ di tabella 5;
- i parametri $\sigma = \sqrt{\frac{\log e}{2b}}$ e $\frac{A}{\sigma}$ delle corrispondenti gaussiane,
- la profondità finale $z_f = 2\sigma \sqrt{\log e} = \sqrt{\frac{2}{b}}$

	a	b	A/ σ	σ	z_f
r_1	1.554826	-0.000338	35.88	25.3	76.8
r_m	1.593859	-0.000244	39.25	29.8	90.4
r_2	1.632934	-0.000150	42.95	38.0	115.3

0 μm	20 μm	40 μm	60 μm	80 μm	100 μm
46.50	35.66	13.02	3.73	0.99	0.1
53.69	32.71	11.47	2.09	0.04	
60.84	31.42	6.26	0.92	0.53	
41.00	36.86	16.32	4.43	1.39	
48.64	40.39	8.75	1.83	0.38	
45.46	41.73	10.64	2.00	0.18	
44.94	35.73	13.48	4.49	1.21	0.13
37.06	29.95	16.90	9.04	4.63	1.93
45.70	34.50	13.98	4.48	1.1	0.23
49.74	31.78	13.13	4.66	0.68	
43.96	34.64	15.43	4.85	1.11	
46.44	35.91	13.31	3.54	0.77	0.03
49.16	34.41	11.11	4.27	1.04	
42.59	30.22	13.68	7.84	4.17	1.21
37.05	30.43	15.64	9.03	5.33	2.067
44.98	33.34	14.00	5.94	1.65	0.08
37.63	34.28	17.17	7.52	2.91	0.47
48.32	35.94	12.08	3.06	0.56	0.03
51.99	32.94	10.81	3.37	0.8	0.08
46.41	32.53	14.72	5.49	0.85	
44.81	37.89	11.57	4.30	1.31	0.11

Tabella 1 - Valori originali di misura $c(z)$.

0 μm	20 μm	40 μm	60 μm	80 μm	100 μm
1.66745	1.55218	1.11461	0.571709	-0.00436481	-1
1.72989	1.51468	1.05956	0.320146	-1.39794	
1.78419	1.49721	0.796574	-0.0362122	-0.275724	
1.61278	1.56656	1.21272	0.646404	0.143015	
1.68699	1.60627	0.942008	0.262451	-0.420216	
1.65763	1.62045	1.02694	0.30103	-0.744727	
1.65263	1.55303	1.12969	0.652246	0.0827854	-0.886057
1.56891	1.4764	1.22789	0.956168	0.665581	0.285557
1.65992	1.53782	1.14551	0.651278	0.0413927	-0.638272
1.69671	1.50215	1.11826	0.668386	-0.167491	
1.64306	1.53958	1.18837	0.685742	0.045323	
1.66689	1.55522	1.12418	0.549003	-0.113509	-1.52288
1.69161	1.53668	1.04571	0.630428	0.0170333	
1.62931	1.48029	1.13609	0.894316	0.620136	0.0827854
1.56879	1.4833	1.19424	0.955688	0.726727	0.31534
1.65302	1.52297	1.14613	0.773786	0.217484	-1.09691
1.57553	1.53504	1.23477	0.876218	0.463893	-0.327902
1.68413	1.55558	1.08207	0.485721	-0.251812	-1.52288
1.71592	1.51772	1.03383	0.52763	-0.09691	-1.09691
1.66661	1.51228	1.16791	0.739572	-0.0705811	
1.65137	1.57852	1.06333	0.633468	0.117271	-0.958607

Tabella 2 - Valori log c(z)

0 μm	20 μm	40 μm	60 μm	80 μm	100 μm
1.66745	1.55218	1.11461	0.571709	-0.00436481	-1
1.72989	1.51468	1.05956	0.320146		
	1.49721			-0.275724	
1.61278	1.56656	1.21272	0.646404	0.143015	
1.68699			0.262451	-0.420216	
1.65763		1.02694	0.30103		
1.65263	1.55303	1.12969	0.652246	0.0827854	-0.886057
1.56891	1.4764	1.22789	0.956168	0.665581	0.285557
1.65992	1.53782	1.14551	0.651278	0.0413927	-0.638272
1.69671	1.50215	1.11826	0.668386	-0.167491	
1.64306	1.53958	1.18837	0.685742	0.045323	
1.66689	1.55522	1.12418	0.549003	-0.113509	-1.52288
1.69161	1.53668	1.04571	0.630428	0.0170333	
1.62931	1.48029	1.13609	0.894316	0.620136	0.0827854
1.56879	1.4833	1.19424	0.955688	0.726727	0.31534
1.65302	1.52297	1.14613	0.773786	0.217484	-1.09691
1.57553	1.53504	1.23477	0.876218	0.463893	-0.327902
1.68413	1.55558	1.08207	0.485721	-0.251812	-1.52288
1.71592	1.51772	1.03383	0.52763	-0.09691	-1.09691
1.66661	1.51228	1.16791	0.739572	-0.0705811	
1.65137	1.57852	1.06333	0.633468	0.117271	-0.958607

Tabella 3 - Insieme ridotto dei valori $\log c(z)$.

$z \mu\text{m}$	$m - 2s$	m	$m + 2s$
0	1.5640	1.6540	1.7440
20	1.4672	1.5272	1.5872
40	0.9991	1.1290	1.2590
60	0.2390	0.6391	1.0392
80	-0.5540	0.0916	0.7371

Tabella 4 - Valori medi ed estremi di $\log c(z)$.

$z \mu\text{m}$	$m - 2s$	m	$m + 2s$
0	1.55483	1.59386	1.63293
20	1.41953	1.49625	1.57300
40	1.01365	1.20341	1.39318
60	0.33718	0.71534	1.09348
80	-0.60988	0.03205	0.67391

Tabella 5 - Valori medi ed estremi sulle rette di interpolazione di $\log c(z)$.

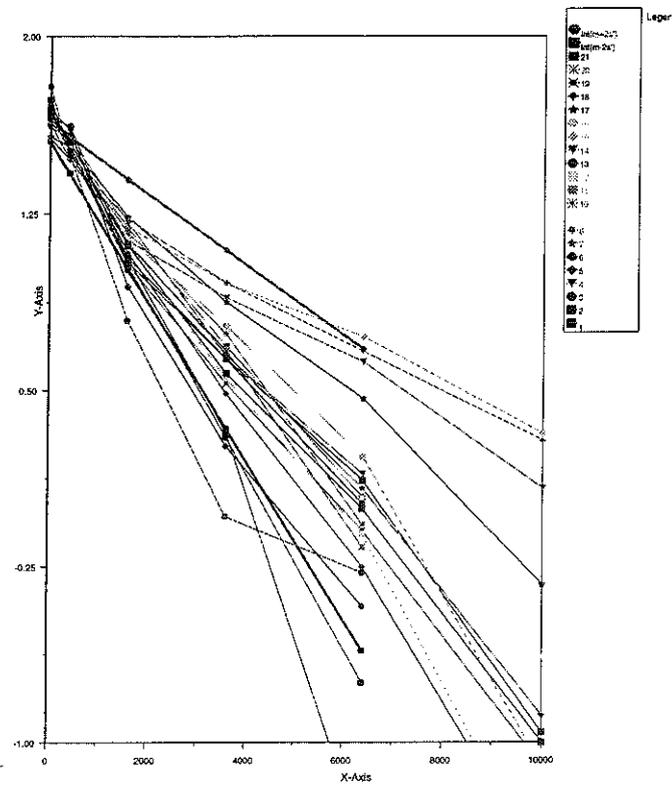


Fig. 1 - Grafico dei valori di $\log c(z)$ dei 21 casi di riferimento e delle rette di normalità ricavate nel caso di migrazione random.

Migrazione stimolata

In questo caso si assume che all'interno del filtro microporoso la distribuzione delle cellule in funzione della profondità z sia descritta dal modello definito dall'eq. 1 per profondità $z > 20 \mu\text{m}$: per la determinazione dei parametri di normalità si segue quindi il procedimento descritto in precedenza per l'analisi dei dati relativi alla migrazione random.

Dato l'insieme dei valori percentuali di misura $c(z)$ ricavato da 21 elementi di controllo, in corrispondenza di ciascun piano di misura sono state calcolate le statistiche e sono stati eliminati i valori al di fuori degli intervalli $(m-2s, m+2s)$, dove m e s sono rispettivamente il valore medio e la deviazione standard: si è così ottenuto l'insieme ridotto riportato in tabella 6. In questo insieme non sono state inserite le misure a $180 \mu\text{m}$, riscontrate solo nei casi 9 e 15, i valori relativi al caso 21 sono stati eliminati per tutti i valori di z .

La tabella 7 riporta i valori centrali m e gli estremi $m \pm 2s$ dei logaritmi decimali dei conteggi $c(z)$ dell'insieme ridotto; eseguendo la regressione lineare in funzione di $x = z^2$, con $z > 20 \mu\text{m}$, si sono ottenuti i seguenti risultati.

Equation: $m = 1.3151 - 0.0001 * x$

Variable	N	Mean	Variance
x	8	10200	81600000
m-2s	8	0.1157	1.1994

Regression Coefficient	-0.000118
Standard Error of B	0.000012
Y-Intercept	1.315148
R-Squared	0.940702
Adjusted R-Squared	0.930819
Standard Error of Estimate	0.288060

The 95.0% confidence limits for the slope are: [-0.000147082, -8.80978e-005]

Equation: $m = 1.4742 - 0.0001 * x$

Variable	N	Mean	Variance
x	8	10200	81600000
m	8	0.6026	0.5988

Regression Coefficient	-0.000059
Standard Error of B	0.000002
Y-Intercept	1.474189
R-Squared	0.994953
Adjusted R-Squared	0.994112
Standard Error of Estimate	0.059380

The 95.0% confidence limits for the slope are: [-9.15263e-005, -7.93674e-005]

Equation: $m+2S = 1.5304 - 0.0001 \cdot x$

Variable	N	Mean	Variance
x	8	10200	81600000
m+2S	8	0.9302	0.2903

Regression Coefficient	-0.000059
Standard Error of B	0.000004
Y-Intercept	1.530403
R-Squared	0.973004
Adjusted R-Squared	0.968505
Standard Error of Estimate	0.095626

The 95.0% confidence limits for the slope are: $[-6.86299e-005, -4.90491e-005]$

La tabella 8 riporta i valori di interpolazione sui piani da 20 μm a 160 μm ; nel seguente riquadro sono riportati:

- i coefficienti a e b delle rette r_1 , r_m e r_2 , definite rispettivamente dai punti $m - 2s$, m e $m + 2s$ di tabella 5;

- la profondità finale $z_f = \sqrt{\frac{2}{b}}$.

	a	b	z_f
r_1	1.315148	-0.000118	130.2
r_m	1.474189	-0.000059	153.4
r_2	1.530403	-0.000059	184.1

N	0 μm	20 μm	40 μm	60 μm	80 μm	100 μm	120 μm	140 μm	160 μm
1	17.81	26.03	23.87	16.44	10.65	3.85	1.06	0.28	
2	15.21	24.20	19.95	16.02	13.26	7.36	2.73	1.12	0.15
3	21.71	25.69	17.32	12.31	9.46	6.33	4.35	2.71	0.11
4	21.99	30.90	24.42	13.50	6.40	2.14	0.42	0.23	
5	24.14	29.15	19.12	12.89	8.64	4.39	1.41	0.20	0.05
6	30.10	33.29	19.44	10.34	5.03	1.58	0.13	0.09	
7	25.61	34.97	20.24	10.47	5.89	2.10	0.46	0.15	0.09
8	21.48	22.94	17.41	12.71	10.41	6.94	4.35	2.96	0.80
9	15.84	20.03	15.59	13.01	11.58	9.26	6.23		
10	14.06	22.16	16.37	13.39	12.24	9.54	6.30		
11	30.33	37.27	19.43	8.71			0.33	0.15	0.05
12	22.23	27.67	20.38	14.98	9.34	3.66	1.05	0.58	0.07
13									
14									
15									
16									
17	21.51	29.43	19.57	13.86	9.35	4.60	1.39	0.21	0.09
18	30.55	34.44	16.60	9.88	5.87	1.93	0.28	0.45	
19	24.46	31.83	20.44	13.20	7.75	2.09	0.18	0.06	
20	26.12	29.13	17.02	12.30	8.89	4.50	1.59	0.40	0.05
21									

Tabella 6 - Insieme ridotto dei valori $c(z)$.

z	$m - 2s$	m	$m + 2s$
0	1.14799	1.35597	1.48501
20	1.30168	1.45783	1.57136
40	1.19285	1.28326	1.38775
60	0.940018	1.10553	1.2159
80	0.701568	0.95347	1.12254
100	0.198657	0.670682	0.979548
120	-0.886057	0.304534	0.799341
140	-1.22185	-0.164309	0.462398
160	-1.30103	-0.789949	-0.09691

Tabella 7 - Valori medi ed estremi di $\log c(z)$.

z	$m - 2s$	m	$m + 2s$
0			
20	1.26811	1.44001	1.50687
40	1.127	1.33747	1.43626
60	0.891824	1.16658	1.31858
80	0.562572	0.927329	1.15383
100	0.139247	0.61972	0.942009
120	-0.378149	0.243754	0.683115
140	-0.989617	-0.20057	0.37715
160	-1.69516	-0.713251	0.0241131

Tabella 8 - Valori medi ed estremi sulle rette di interpolazione di $\log c(z)$.

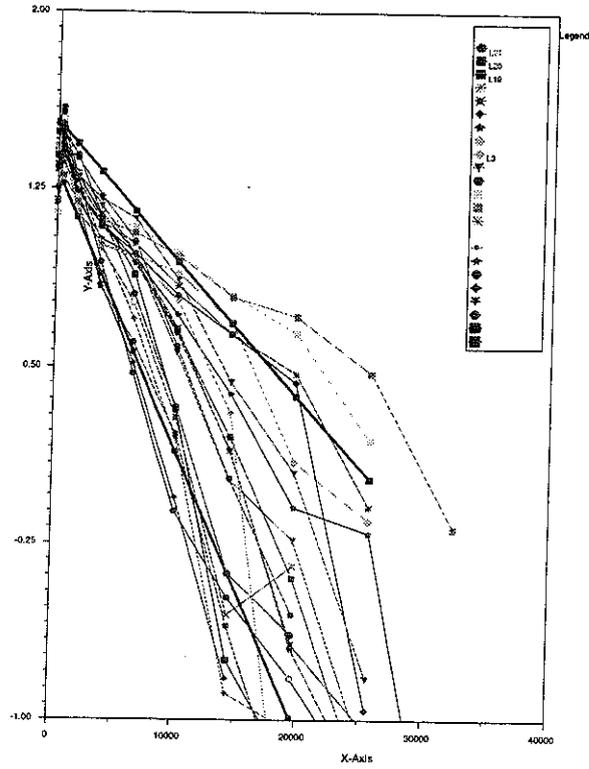


Fig. 2 - Grafico dei valori di $\log c(z)$ dei 21 casi di riferimento e delle rette di normalità ricavate nel caso di migrazione stimolata.

Applicazione clinica

Premessa

Le sindromi mielodisplastiche (SMD) sono un gruppo eterogeneo di disordini ematologici clonali, a diverso grado di malignità, caratterizzati da anomalie quantitative e qualitative a carico dei granulociti neutrofili (GN). In particolare la motilità spontanea (motilità random, MR) e quella orientata sotto stimolo di derivati batterici (chemiotassi, CH) sono spesso deficitarie in queste patologie (così come sono deficitarie generazione di anione superossido, "killing" batterico, chemiluminescenza e aggregazione). Alcune di queste funzioni, in particolare MR e CH (oltretutto la fagocitosi e la mobilizzazione dei granuli intracellulari) sono strettamente dipendenti dall'integrità del citoscheletro cellulare e dalla riorganizzazione del citoscheletro sotto stimolo (assemblaggio e disassemblaggio dei filamenti di actina).

Pazienti

Sulla base di quanto premesso, abbiamo valutato le capacità motorie e la cinetica di migrazione spontanea e sotto stimolo di GN in 11 pazienti affetti da SMD, al fine di identificare specifici patterns di motilità eventualmente correlabili sia con il grado di malignità, sia con eventuali difetti di polimerizzazione dell'actina, valutata con metodiche citometriche mediante anticorpi monoclonali fluoresceinati. Secondo la classificazione FAB (French-American-British cooperative group) erano classificabili come: anemia refrattaria (AR) 4 casi; anemia refrattaria con sideroblasti ad anello (ARS) 1; anemia refrattaria con eccesso di blasti (AREB) 2; anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione leucemica (AREB-t) 2; leucemia mielo-monocitica cronica (LMMC) 2. Tutti i pazienti sono stati valutati alla diagnosi, in assenza di evidenti quadri infettivi, al di fuori di terapie citostatiche o di altre terapie capaci di influenzare la morfologia o le funzioni neutrofiliche.

Metodiche

Le capacità motorie sono state valutate utilizzando la metodica tradizionale della camera di Boyden con filtri microporosi. In breve, GN isolati da sangue periferico, sono stati posti a migrare attraverso filtri microporosi in condizioni e per tempi standardizzati; i filtri, opportunamente diafanizzati, sono stati esaminati tramite la stazione di lavoro appositamente progettata e precedentemente descritta, capace di individuare il piano finale di migrazione raggiunto dalle cellule (FP) e di mostrare la curva di migrazione.

Le funzioni motorie sono state confrontate con quelle di GN di donatore, ma con un approccio sperimentale del tutto peculiare per quanto attiene al tempo di incubazione. Infatti, in condizioni standard, il tempo di migrazione corrisponde a 60 minuti. In tali condizioni la MR è caratterizzata da una curva di tipo gaussiano; la CH è invece caratterizzata da un tipico picco di distribuzione cellulare attraverso lo spessore del filtro. Al fine di meglio definire la cinetica di migrazione, sono stati eseguiti due esperimenti in doppio lasciando migrare le cellule sotto stimolo batterico ($fMLP 10^{-7} M$) per 20, 30, 40, 50, 60 minuti. Ogni set di filtri, appena rimosso, veniva fissato e diafanizzato al fine di essere sottoposto ad analisi di immagine.

Risultati relativi ai donatori

I piani di migrazione finali raggiunti sono stati rispettivamente 54, 75, 85, 107, 138 μm . Il tipico picco di migrazione (corrispondente alla più alta concentrazione cellulare nel filtro) è risultato apparire molto precocemente (tra 20 e 30 minuti), e si è mantenuto in una ristretta banda del filtro ad una profondità compresa tra 10 e 30 μm , in modo dinamico. Infatti, dopo 20 minuti, soltanto circa il 50% delle cellule rimangono sulla faccia superiore del filtro. Un'alta percentuale (44.29 %) si muove rapidamente verso un piano sottostante relativamente vicino, ed è continuamente sostituita (con una lieve ma progressiva riduzione del picco : 44.2; 40.5; 39.8; 33.1; 30.8% rispettivamente) da cellule che provengono dal livello superiore, la cui percentuale decresce progressivamente: 51.3; 34.1; 31.8; 26.8; 17.5 % rispettivamente, mentre, al contrario, soltanto poche cellule più veloci (il cosiddetto "leading front") si muove verso la faccia inferiore del filtro .

Risultati relativi ai pazienti affetti da SMD

La MR media dei GN dei pazienti, valutata relativamente al tempo standard di 60 minuti, è risultata fortemente inibita, mostrando valori di $62.82 \pm 2.75 \mu\text{m}$ (range di normalità: 77-115 μm). I GN di 10 degli 11 soggetti studiati hanno mostrato ridotti valori di FP, ma considerando l'altro importante dato fornito dalla nostra stazione di lavoro (curva di migrazione), appare particolarmente interessante il dato che i GN di 7 di questi 10 pazienti continuavano a mostrare un normale pattern di migrazione di aspetto gaussiano. Solo in un caso i GN hanno esibito un comportamento normale sia per quanto riguarda il valore di FP sia per l'aspetto della curva di migrazione.

Anche i valori di CH sono risultati fortemente inibiti, mostrando valori medi di $104.36 \pm 9.48 \mu\text{m}$ (range di normalità: 130-184 μm). I GN di 6 pazienti hanno mostrato ridotti valori di FP, ma va sottolineato che 4 di questi 6 pazienti continuano a mostrare il picco di migrazione tipico della motilità stimolata, mentre soltanto 2 degli 11 pazienti studiati hanno esibito un comportamento normale sia per quanto riguarda il valore di FP sia per l'aspetto della curva di migrazione. Se i pazienti sono suddivisi in due gruppi (basso grado di malignità: AR, ARS, n = 5 vs. alto grado di malignità: AREB, AREB-t, LMMC, n = 6), si può notare un trend inatteso: nonostante una lieve differenza nei valori di (rispettivamente 61.6 μm vs. 63.8 μm per la MR e 100.8 μm vs. 107.3 μm per la CH) una curva anomala di MR è evidenziabile nel 40% delle sindromi a basso grado di malignità e solo nel 17% di quelle ad alto grado; allo stesso modo, una curva anomala di CH è evidenziabile nel 60% delle sindromi a basso grado di malignità e solo nel 33% di quelle ad alto grado.

Conclusioni

Soltanto alcune conclusioni preliminari possono essere tratte da questo studio condotto su pazienti affetti da SMD, a parte il dato statisticamente confermato di un chiaro difetto delle capacità motorie dei GN di questi soggetti. Appare confermata l'importanza della valutazione non sono delle distanze di migrazione, ma soprattutto delle curve di migrazione. La stazione di lavoro si è dimostrata in grado di fornire informazioni altrimenti non ottenibili con metodiche tradizionali di lettura. In particolare, appare interessante la possibilità di identificare i tempi e le modalità secondo cui si organizza l'onda di migrazione in filtri microporosi di GN di donatori sani, così da poter confrontare con questi inediti parametri i dati relativi ad importanti patologie ematologiche. Al momento, a causa del ridotto numero dei pazienti, non è ancora possibile alcuna correlazione tra questi dati e il grado di malignità di ogni singola patologia, ma appare interessante l'inatteso trend secondo il quale i modelli di migrazione più atipici sembrerebbero riscontrarsi nel gruppo patologico a basso grado di malignità piuttosto che in quello ad alto grado.

Questi dati necessitano di essere confermati su casistiche più ampie (lo studio è ancora in corso) e trarranno ulteriori spunti di interpretazione dal confronto con quelli relativi alla valutazione citometrica, mediante anticorpi monoclonali fluoresceinati, della polimerizzazione dell'actina.