

Publicazione mensile della sezione veronese della MATHESIS – Società Italiana di Scienze Matematiche e Fisiche – Fondata nel 1895 – Autorizzazione del Tribunale di Verona n. 1360 del 15 – 03 – 1999 – I diritti d'autore sono riservati. Direttore: Luciano Corso - Redazione: Alberto Burato, Elisabetta Capotosto, Carlo Marchiori, Giovanna Tessari – Via IV Novembre, 11/b – 37126 Verona – tel e fax (045) 8344785 – 338 6416432 – e-mail: lcorso@iol.it – Stampa in proprio - Numero 168 – Pubblicato il 08 – 05 – 2012

La distribuzione di Poisson nel laboratorio biomedico

Roberto Chignola^[1,2]

La moderna ricerca biomedica è prevalentemente concentrata sugli aspetti molecolari che presiedono al funzionamento delle cellule dei nostri tessuti. Questo è dovuto soprattutto all'enorme e rapido - e per certi versi strabiliante - progresso delle biotecnologie e della bioinformatica, che nell'ultimo decennio hanno permesso con relativa facilità di raccogliere ed interpretare moltissime informazioni sulla struttura ed espressione dell'informazione genetica, sugli aspetti metabolici e biochimici e in generale sulle reti molecolari che agiscono per regolare la vita cellulare. Difetti nel funzionamento anche di una sola molecola possono propagarsi all'intero sistema molecolare determinando patologie talvolta molto gravi. Grandi sforzi vengono oggi compiuti in tutto il mondo dai ricercatori biomedici per cercare di definire la carta d'identità molecolare delle malattie e, da un punto di vista tecnologico, per cercare di dominare l'estrema complessità delle reti molecolari delle cellule. Ma nonostante la sua grande potenzialità questo approccio presenta due limiti importanti: è un approccio essenzialmente descrittivo, poiché è estremamente difficile - se non impossibile - determinare la variazione delle quantità di tutte le molecole che partecipano alle numerose reazioni biochimiche in una cellula; l'approccio molecolare non dice nulla sulle interazioni dinamiche tra le diverse popolazioni cellulari in un tessuto, e tuttavia sono proprio queste interazioni a determinare processi fisiologici e patologici importanti come ad esempio la risposta immunitaria e i tumori.

Per quantificare la frequenza delle cellule che presiedono ad una certa funzione, sia da sole sia in interazione con altri tipi cellulari, è possibile ricorrere a metodi statistici che fanno largo uso della distribuzione di Poisson. Questi metodi sono noti fin dalla seconda metà del 1900 [B.1] e, cosa molto importante, rappresentano un esempio di come dovrebbe essere sempre la statistica a *determinare* e a *guidare* la sperimentazione biomedica, anche nei suoi aspetti meramente tecnologici ed operativi. Un fatto spesso trascurato dai moderni ricercatori biomedici.

Gli esperimenti di diluizione limite (LDA)

Un tumore è un tessuto composto da molte cellule di diverso tipo in cui viene perduta - da parte di alcune cellule - la capacità di arrestare la propria proliferazione. Supponiamo allora di voler quantificare con precisione quante cellule in un tumore siano in grado di proliferare in modo autonomo. Eventualmente, potremmo voler quantificare gli effetti di un trattamento antitumorale proprio a carico di queste cellule: non ci interessa cioè sapere che un trattamento elimina le cellule in generale, ma ci interessa sapere se tale trattamento uccida le cellule che proliferano autonomamente, perché sono proprio queste cellule ad essere ovviamente le più pericolose. Supponiamo di sapere come si fa ad isolare le cellule da un tessuto: la nostra sospensione cellulare conterrà ora cellule che proliferano e cellule che non proliferano. Le cellule possono essere coltivate in laboratorio immergendole in un terreno liquido nutritivo all'interno di pozzetti da coltura (si possono immaginare i pozzetti come piccoli bicchieri che contengono al mas-

simo poche centinaia di microlitri di liquido). Il terreno contiene anche un indicatore colorato di pH, e poiché le cellule che proliferano acidificano l'ambiente, è facile vedere anche ad occhio nudo se in un pozzetto sono finite cellule in grado di proliferare.

Se le cellule che vogliamo studiare proliferano autonomamente e dunque non richiedono la cooperazione di altre cellule dello stesso tipo o di altri tipi (in gergo questa viene chiamata ipotesi *single-hit*), allora la probabilità che r cellule proliferanti su c cellule totali finiscano a caso in un pozzetto da coltura w (r , c e w sono numeri interi) è:

$$P_r = \frac{c!}{r!(c-r)!} p^r q^{c-r}$$

con $p = 1/w$ e $q = 1-p$. Nella pratica di laboratorio è relativamente facile contare le cellule totali che desideriamo seminare in un dato pozzetto, e dunque è conveniente considerare la variabile $u = c/w$ che esprime appunto la densità cellulare di semina. Nell'ipotesi che c e w siano molto grandi (e che u sia comunque finito) la distribuzione delle probabilità P_r è approssimativamente Poissoniana, e dunque:

$$P_r = \frac{u^r}{r!} e^{-u}$$

Per quanto detto prima, in laboratorio sappiamo determinare con un colpo d'occhio se in un pozzetto ci sono cellule che proliferano.

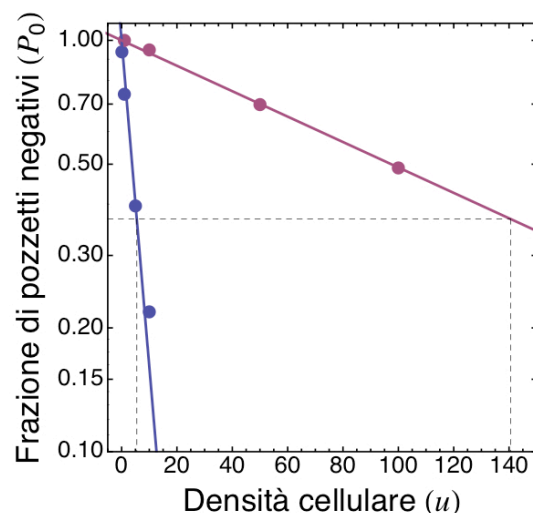


Figura1: Esperimento condotto nel nostro laboratorio con cellule di una leucemia umana. Cerchi blu: cellule non trattate; cerchi rossi: cellule trattate con una molecola tossica. Ogni punto corrisponde alla misura effettuata in 960 pozzetti. Le linee colorate mostrano il *fit* ottenuto mediante regressione nonlineare con l'equazione $P_0 = e^{-u}$. Le linee tratteggiate mostrano la densità cellulare a cui ci si attende che almeno 1 cellula proliferi in modo autonomo nella popolazione. In queste cellule molto aggressive 1 cellula su circa 5 prolifera attivamente. Dopo trattamento solo 1 cellula su circa 140 è ancora in grado di proliferare, e questo dimostra che il trattamento è efficace contro le cellule proliferanti ed è in grado di ridurre questa sottopopolazione al 4% circa del valore iniziale.

Parimenti, sappiamo immediatamente contare i pozzetti in cui non ci sono cellule che proliferano, ovvero i pozzetti per i quali vale la relazione $r = 0$. In questo caso l'equazione prece-

dente si riduce alla $P_0 = e^{-u}$, e si vede pertanto che la probabilità è esponenziale.

Se seminiamo le cellule ad elevata densità la probabilità di trovare pozzetti negativi per la crescita è molto bassa, ma se diluiamo il campione avremo una certa probabilità di trovare pozzetti negativi: al limite, se non seminiamo alcuna cellula, $P_0 = 1$ e in nessun pozzetto osserveremo proliferazione.

Infine, se ad una data densità u la sospensione cellulare contiene in media solo una cellula in grado di proliferare, ci aspetteremo di osservare pozzetti negativi con una probabilità $P_0 = e^{-1} \cong 0.37$ e dunque, al converso, se alla fine del nostro esperimento osserviamo che nel 37% circa dei pozzetti non vi è proliferazione potremo concludere che $1/u$ cellule nella sospensione hanno la capacità di proliferare in modo autonomo. Questa è appunto la misura che cercavamo (la figura n. 1 mostra un esperimento reale).

Ciò che è sorprendente nella teoria fin qui sviluppata è che essa si traduce in esperimenti semplici da effettuare e a basso costo. Inoltre, è importante notare che la teoria si applica se e solo se le cellule non aderiscono le une alle altre nella sospensione di semina (e dunque l'operatore deve aver cura di manipolare le cellule in modo appropriato), ed infine che l'esperimento dà informazioni corrette a patto di pianificare la semina delle cellule in un gran numero di pozzetti per ciascuna diluizione. Ecco perché (anche) in questo caso la teoria determina e guida la sperimentazione.

Popolazioni cellulari interagenti

Il sistema immunitario presiede alla difesa dell'organismo dall'attacco di agenti patogeni. Questo sistema è composto da numerosi tipi cellulari diversi che cooperano tra loro. La teoria di Poisson può essere facilmente estesa anche allo studio di queste popolazioni cellulari. Un tipo cellulare fondamentale è costituito dai linfociti *T helper*. Se un patogeno supera certe barriere di difesa, i linfociti *T helper* proliferano attivamente ed iniziano a stimolare altre componenti cellulari e molecolari del sistema immunitario. Queste ultime sono in grado a loro volta di aggredire e di eliminare il patogeno (non sempre, purtroppo). Tuttavia, questa risposta deve essere finemente regolata, ed esistono ad esempio cellule *T soppressorie* in grado di inibire la proliferazione dei linfociti *T helper*.

Supponiamo allora che esista una popolazione di cellule contenente due sottopopolazioni cellulari T_1 e T_2 presenti alla frequenza, rispettivamente, f_1 e f_2 e con queste proprietà:

- 1) le cellule T_1 proliferano se incontrano il patogeno con un meccanismo *single-hit*;
- 2) le cellule T_2 inibiscono la proliferazione delle cellule T_1 se, e solo se, il numero delle cellule T_2 supera una certa soglia n ;
- 3) le cellule T_2 sono in grado di proliferare, ma la loro efficienza è molto più bassa rispetto a quella delle cellule T_1 , e proliferano in risposta al patogeno se il loro numero è superiore ad una certa soglia m , con $m > n$.

Per le ipotesi 1) e 2) e per quanto detto prima, se seminiamo le cellule alla densità u la probabilità di trovare pozzetti in cui è possibile osservare proliferazione è:

$$P_a = (1 - T_{1,0}) \sum_{i=0}^{n-1} T_{2,i}$$

dove:

$$T_{1,0} = e^{-f_1 u} \quad e \quad T_{2,i} = \frac{(f_2 u)^i}{i!} e^{-f_2 u}$$

Per l'ipotesi 3), la probabilità di seminare pozzetti ed osservare proliferazione è:

$$P_b = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} T_{2,i}$$

Pertanto, complessivamente la probabilità di non osservare proliferazione è:

$$P_0 = 1 - (P_a + P_b)$$

Dal punto di vista metodologico, dunque, dobbiamo condurre

un esperimento identico a quello visto in precedenza: seminiamo opportunamente le cellule e contiamo quanti pozzetti, sul totale di pozzetti seminati, non presentano proliferazione. La figura qui sotto mostra il risultato di un esperimento reale tratto dalla letteratura scientifica [B.2].

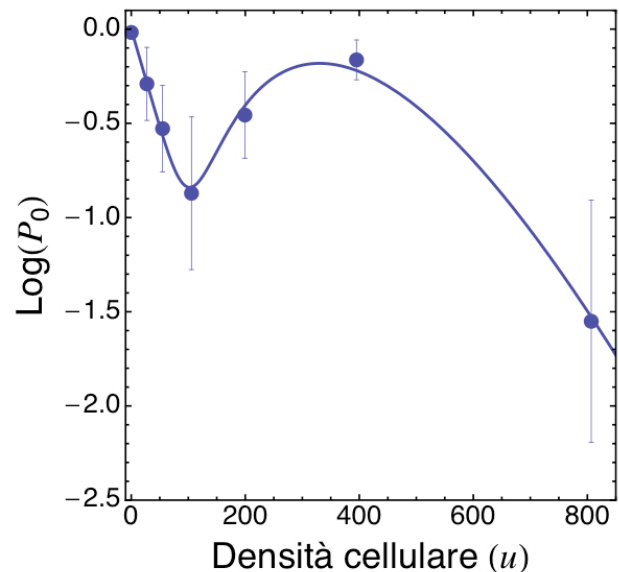


Figura2: Esperimento di cooperazione tra cellule murine del sistema immunitario. L'esperimento è descritto nel dettaglio in [B.2]. La linea rappresenta il fit non lineare dei dati sperimentali con il modello Poissoniano descritto nel testo e studiato dagli stessi autori.

Conclusioni

Certamente non è possibile qui discutere nel dettaglio la ricca varietà di modelli che possono essere costruiti a partire dalla teoria di Poisson, né la comparabile varietà di osservazioni che possono essere interpretate quantitativamente grazie a tali modelli. In questa sede preme far notare ancora una volta come semplici considerazioni matematiche possano tradursi in potenti strumenti d'indagine quando siano applicate alla realtà del laboratorio biomedico.

Gli esperimenti ispirati da questa modellizzazione sono di una semplicità tecnologica disarmante al giorno d'oggi. Va però detto - per amor di verità - che se l'analisi degli esperimenti è davvero semplice, la preparazione degli stessi può essere molto complicata, come nell'esperimento riportato nella Fig.2: una complessità manuale superiore a quella richiesta per l'analisi molecolare.

Quelle che abbiamo visto sono applicazioni semplici, quasi immediate della statistica di Poisson, ma che - nell'ambito dell'insegnamento della statistica - rappresentano degli esempi interessanti e motivanti. Come ha detto una volta un mio brillante studente: "... è di gran lunga più stimolante ed illuminante comprendere il ragionamento e i concetti matematici affrontando problematiche molto serie e concrete piuttosto che giocando concettualmente con dadi non truccati e palline colorate". E' a questo studente e a tutti gli altri come lui che io dedico questo mio breve contributo.

[1] Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona, [2] Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Sezione di Trieste.
E-mail: roberto.chignola@univr.it

Bibliografia: [B.1] I. Lefkovits, H. Waldmann. *Limiting dilution analysis of cells in the immune system*. Cambridge University Press, Cambridge 1979 (ISBN 0521227712). [B.2] I.M.Dozmorov, G.V.Lutsenko, I.A.Sidorov, R.A.Miller. *Analysis of cellular interactions in limiting dilution cultures*. J. Immunol. Methods (1996) 189: 183-196.

Ringraziamenti: ringrazio il Prof. Edoardo Milotti, Dipartimento di Fisica dell'Università di Trieste, e la dott.ssa Michela Segal, Dipartimento di Biotecnologie dell'Università di Verona, per i loro preziosi consigli e la paziente revisione di questo articolo.