



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Κυτταρομετρία ροής - Εφαρμογές

Καλλιόπη Λιαδάκη

Πρόγραμμα Δια Βίου Μάθησης ΑΕΙ για την Επικαιροποίηση Γνώσεων Αποφοίτων ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, το περιβάλλον και τη διατροφή

Ορολογία

- **Flow Cytometry**

cyto=κύτταρο και metry=μέτρηση

- μέτρηση χαρακτηριστικών του κυττάρου υπό ροή

- **Flow/Cell Sorting**

- Απομόνωση (ταξινόμηση) κυττάρων βάση χαρακτηριστικών που μετρώνται όταν βρίσκονται σε κατάσταση ροής

- **Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)**

απομόνωση κυττάρων που βασίζεται σε κυτταρομετρία ροής ενεργοποιούμενης από φθορισμό

- εταιρεία BD (Becton Dickinson)

Κυτταρομετρία ροής

- επιτρέπει την **ταυτόχρονη** μέτρηση **πολλαπλών** χαρακτηριστικών (φυσικών ή χημικών) σε **ένα μόνο** κύτταρο
- οι μετρήσεις γίνονται **ανά κύτταρο** καθώς αυτό βρίσκεται σε διάλυμα και κινείται σε ένα ρεύμα με σταθερή ταχύτητα

Χαρακτηριστικά κυττάρων και κυτταρικά συστατικά που μπορούν να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής

Χαρακτηριστικά

κυτταρική διάμετρος
πυρηνική διάμετρος
όγκος
κατανομή χρωστικών
εσωτερική δομή
επιφάνεια
δυναμικό μεμβράνης

Κυτταρικά συστατικά

DNA
RNA
πρωτεΐνες
επιφανειακά αντιγόνα
πυρηνικά αντιγόνα
ένζυμα
ορμόνες

Κυτταρομετρία ροής- ιστορική αναδρομή

- 1934, Moldavan: μέτρηση ερυθροκυττάρων σε μικροσκόπιο
- 1945, Reynolds: σύστημα στρωτής ροής (laminar flow)
- 1947, Coulter: πατέντα για μέτρηση κυττάρων (αιμοκυτόμετρο)
- 1964, Kamensky: μέτρηση 500 κυττάρων/δευτερόλεπτο ως προς την σκέδαση φωτός και την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας
- 1965, Fulwyler: ηλεκτροστατικός διαχωρισμός κυττάρων (sorting)
- 1966, Van Dilla: διαχωρισμός (sorting) κυττάρων με βάση την περιεκτικότητα σε DNA
- 1969, Hulett: διαχωρισμός (sorting) κυττάρων με βάση τον φθορισμό
- 1972, BDIS: πρώτος εμπορικός κυτταρομετρητής ροής

Βασικά συστατικά κυτταρομετρίας ροής

Σύστημα ρευστών

Fluidics

- κύτταρα σε αιώρημα
- περνούν ένα κάθε φορά μέσω

Οπτικό σύστημα

Optics

- μιας περιοχής με εστιασμένο φωτισμό όπου
- σκεδάζουν φως και εκπέμπουν φθορισμό
- που συλλέγονται, φιλτράρονται και

Ηλεκτρονικό σύστημα

Electronics

- μετατρέπονται σε ψηφιακές μονάδες

Ανάλυση δεδομένων

Data analysis

- που αποθηκεύονται σε υπολογιστή → ανάλυση και παράσταση δεδομένων με ποικίλους τρόπους

Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση με ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

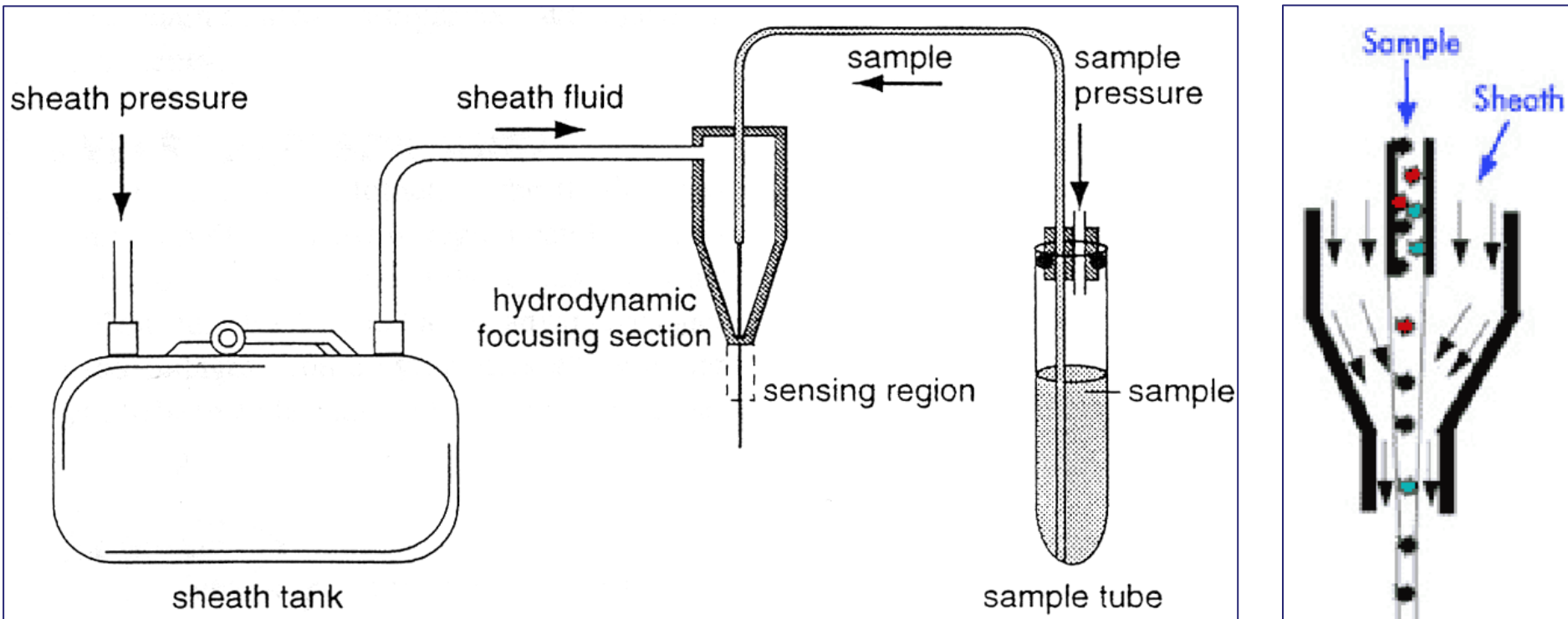
ο κυτταρομετρητής ροής εξετάζει μεμονωμένα κύτταρα

σημαντικό να επιτύχουμε εναιώρημα μονοκυττάρων
(single cell suspension)

απαραίτητο να αποφύγουμε την παρουσία κυτταρικών
συσσωματωμάτων

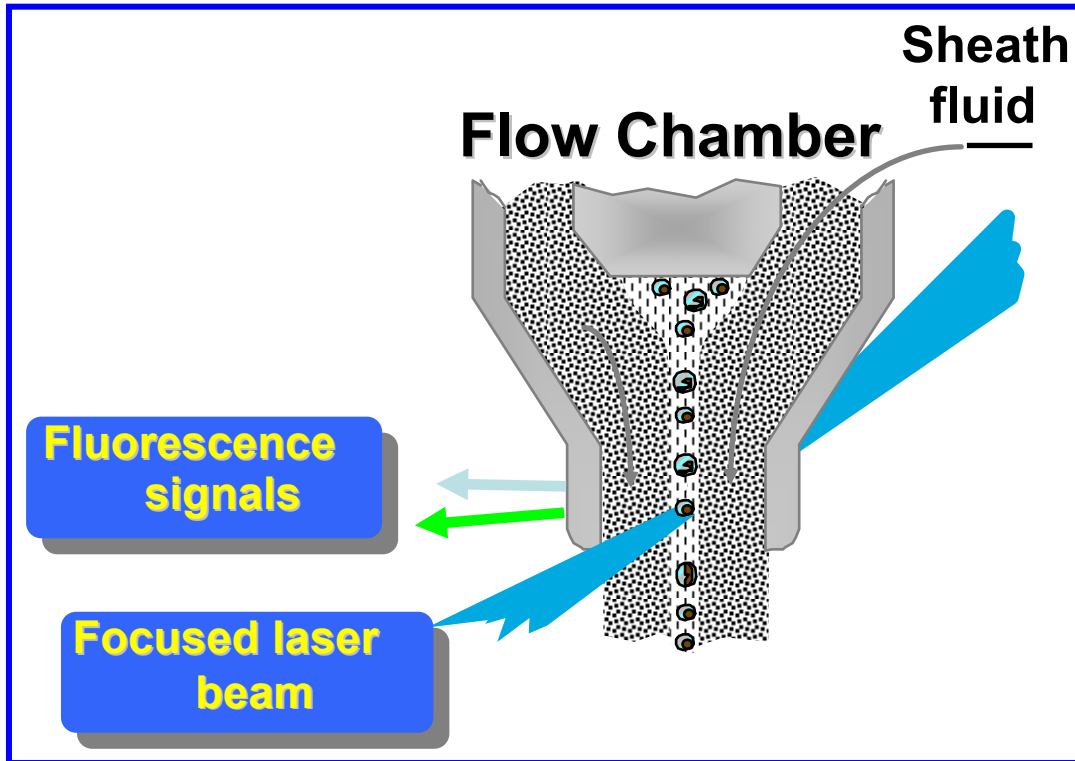
π.χ. ενζυμική πέψη ιστών (κολλαγενάση, δισπάση, τρυψίνη)
και εκτεταμένο φιλτράρισμα και ανακάτεμα του δείγματος

Σχηματική παράσταση συστήματος ρευστών (fluidics)



Sheath fluid (PBS, νερό): υγρό περίβλημα (5 ml/min)
Δείγμα (100 μ l/min)

Υδροδυναμική εστίαση (hydrodynamic focusing)



τα κύτταρα κινούνται το ένα μετά το άλλο διαμέσου του θαλάμου ροής (flow chamber) και καταλήγουν στην περιοχή ανίχνευσης, όπου συναντούν μια εστιαζόμενη πηγή φωτός (laser beam), προκαλώντας σκέδαση φωτός και φθορίζοντα σήματα

Πηγές φωτός σε κυτταρομετρία ροής

- Λυχνίες βολταϊκού τόξου (π.χ. λυχνία ατμών υδραργύρου)
- Laser: εκπέμπουν φως σε καθορισμένη συχνότητα (μήκος κύματος)

Lasers for flow cytometry^a

Laser type	Line (nm)	Approx. cost	Fluorochromes
Argon Ion	488	\$10K	FITC, PE, TRPE, PerCP, Cy5PE, Cy5.5PE, Cy5.5PerCP, Cy7PE, A488
Krypton	568	\$30K	PE, TRPE, PerCP, Cy5PE, Cy5.5PE, Cy5.5PerCP, Cy7PE, A568, TR, A595
	647		APC, Cy5APC, Cy5.5APC, Cy7APC (Cy5PE, Cy5.5PE, Cy7PE) ^e
Violet-enhanced Krypton ion ^b	407+413	\$50K	CasB, CasY, A430
Dye ^c	595	\$15K ^d	TR, A595, APC, Cy5, Cy5.5APC, Cy7APC (TRPE, Cy5PE, Cy5.5PE) ^e
Doubled Nd-YAG	532	\$12K	PE, TRPE, PerCP, Cy5PE, Cy5.5PE, Cy5.5PerCP, Cy7PE
HeNe	632	\$6K (50 mW)	APC, Cy5, Cy5.5APC,
Diode	635	\$1K (10 mW)	Cy7APC (Cy5PE, Cy5.5PE) ^e

Εξέταση κυττάρων από μια ακτίνα φωτός λέιζερ

Μετρήσεις διαφορετικών κυτταρικών παραμέτρων, οι οποίες βασίζονται σε

- ❖ Σκέδαση του φωτός
- ❖ Ικανότητα διέγερσης και εκπομπής ειδικών μορίων, των φθοριοχρωμάτων (fluorochrome molecules)

1. Σκέδαση του φωτός

Φως = ένα κύμα με ταλαντευόμενο ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο
χαρακτηρίζεται από το μήκος κύματος

Όταν ένα κύμα φωτός πέσει πάνω σε ένα μόριο (άτομο, κύτταρο),
δημιουργεί ένα ηλεκτρικό δίπολο: δύο ισοδύναμα αλλά αντίθετα φορτία που
διαχωρίζονται από κάποια απόσταση.

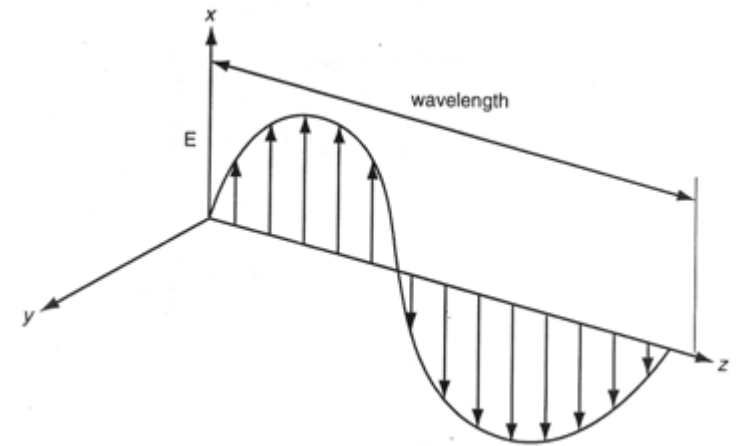
Το δίπολο εκπέμπει ένα νέο κύμα φωτός με την ίδια συχνότητα με το
προσπίπτον κύμα φωτός: σκεδασμένο φως (scattered light)

Π.χ. Μεγαλύτερο κύτταρο

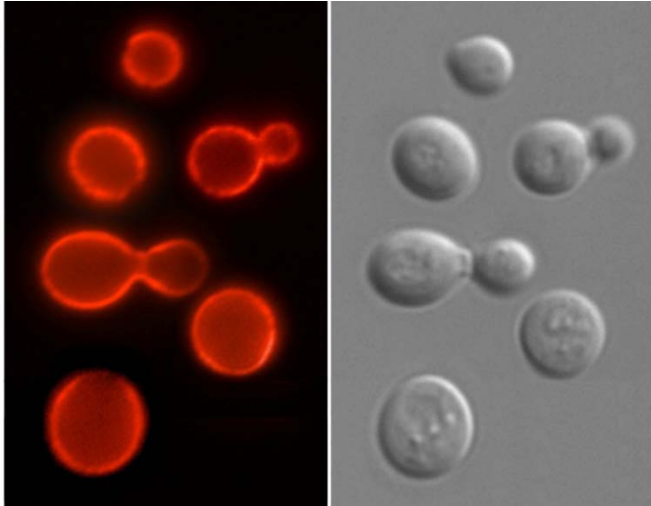
→ μεγαλύτερος ο χρόνος φωτισμού από
την πηγή φωτός

→ μεγαλύτερο εύρος του παραγόμενου
ηλεκτρικού παλμού

**σκέδαση φωτός ↔ μέγεθος(όγκος)
κυττάρων**

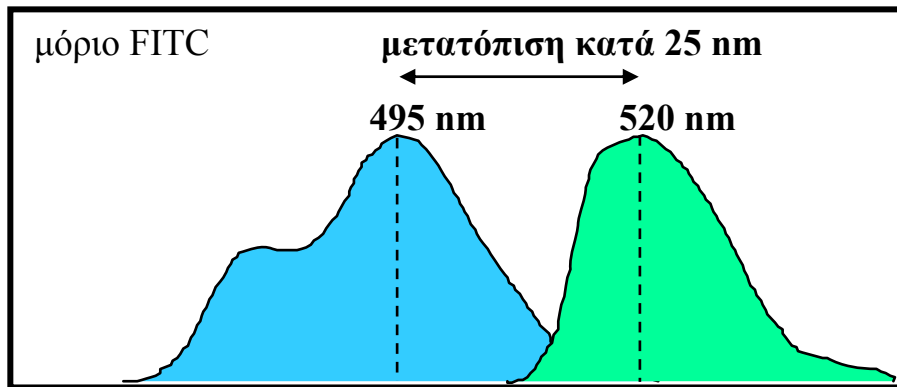


2. Χαρακτηριστικά φθοριζόντων κυττάρων



Φθορισμός: εκπομπή φωτός μετά από διέγερση σωματιδίων από κάποια ακτινοβολία

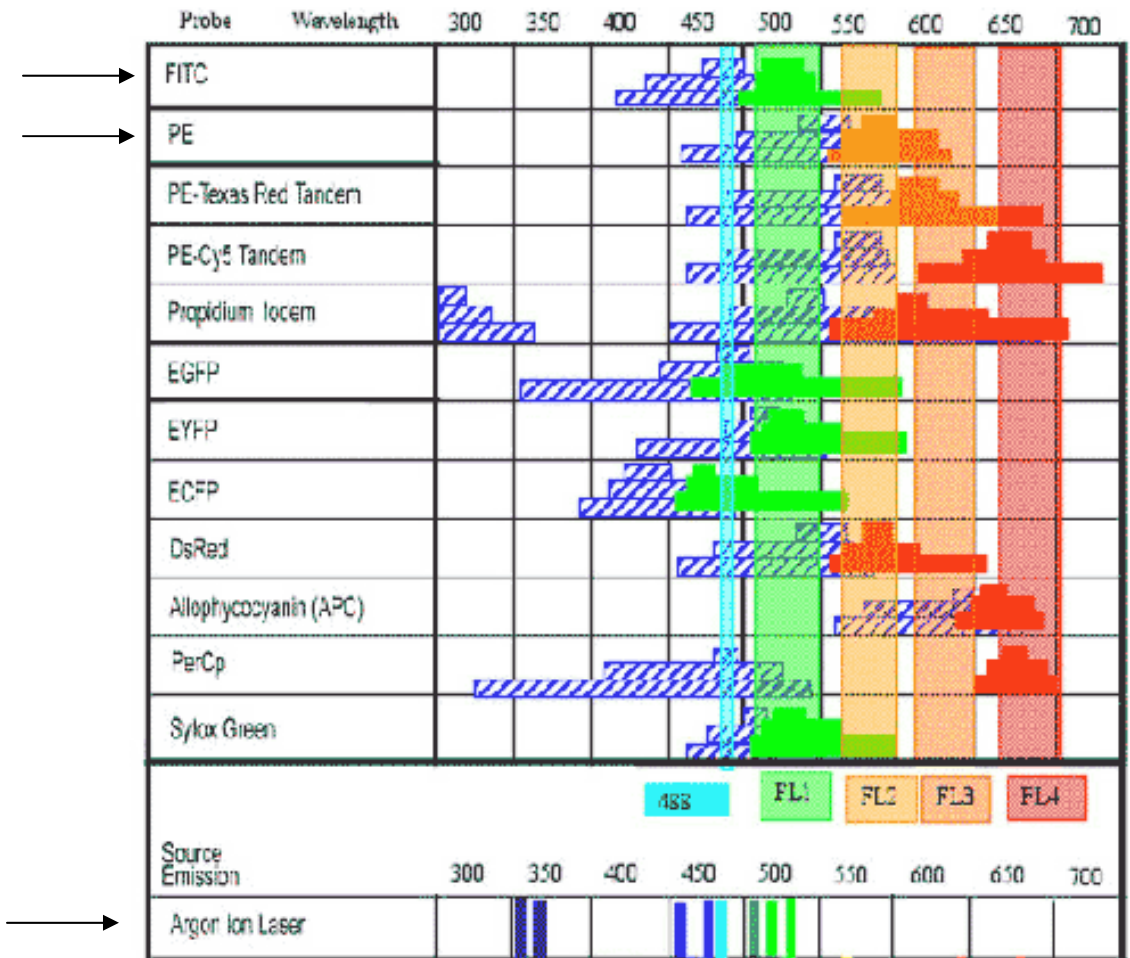
Ένταση φθορισμού



μήκος κύματος

Νόμος του Stokes
διαφορά ενέργειας
μεταξύ της χαμηλότερης
ενέργειας διέγερσης και
της υψηλότερης
ενέργειας εκπομπής

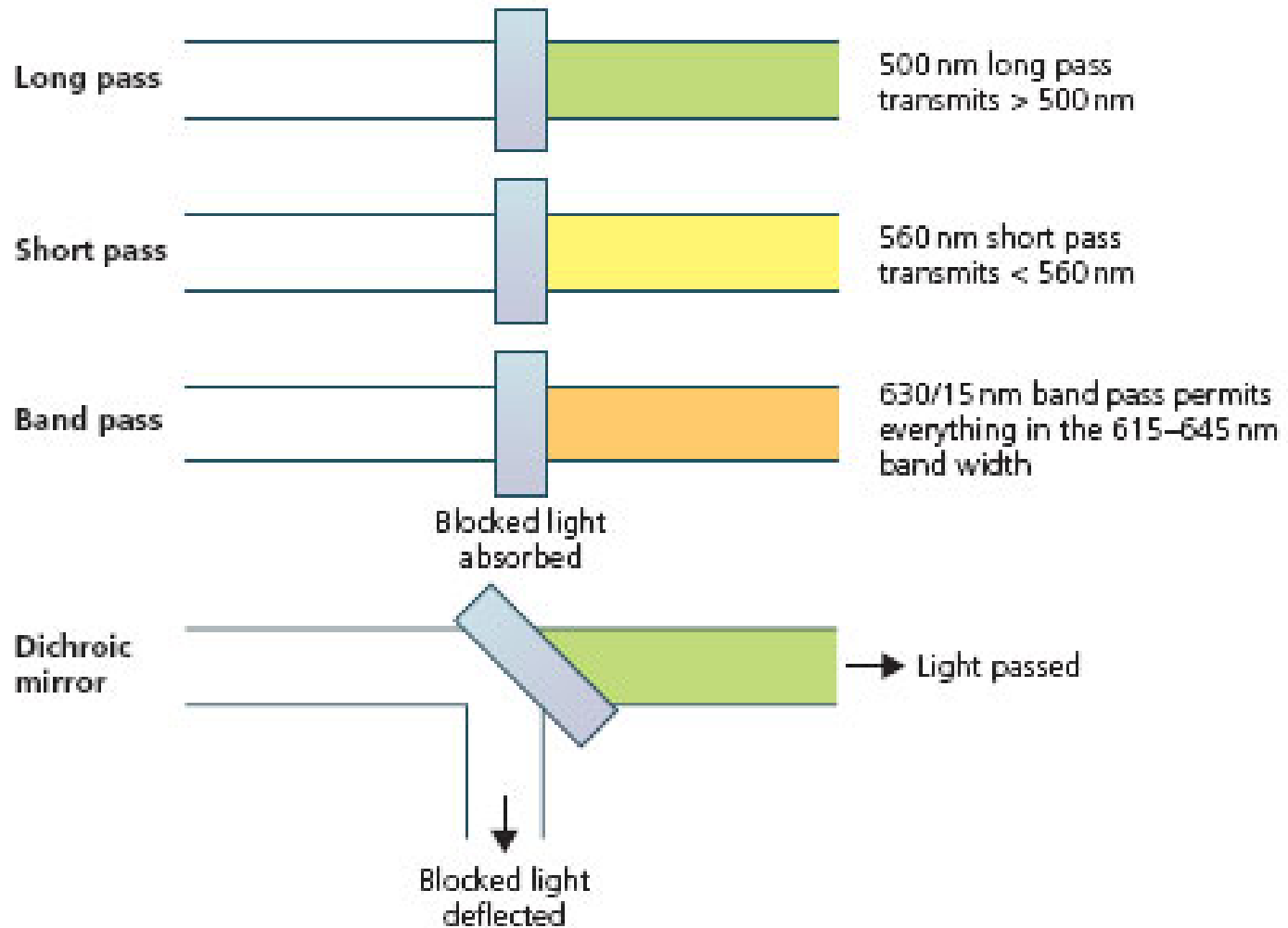
Ευρέως χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες χρωστικές



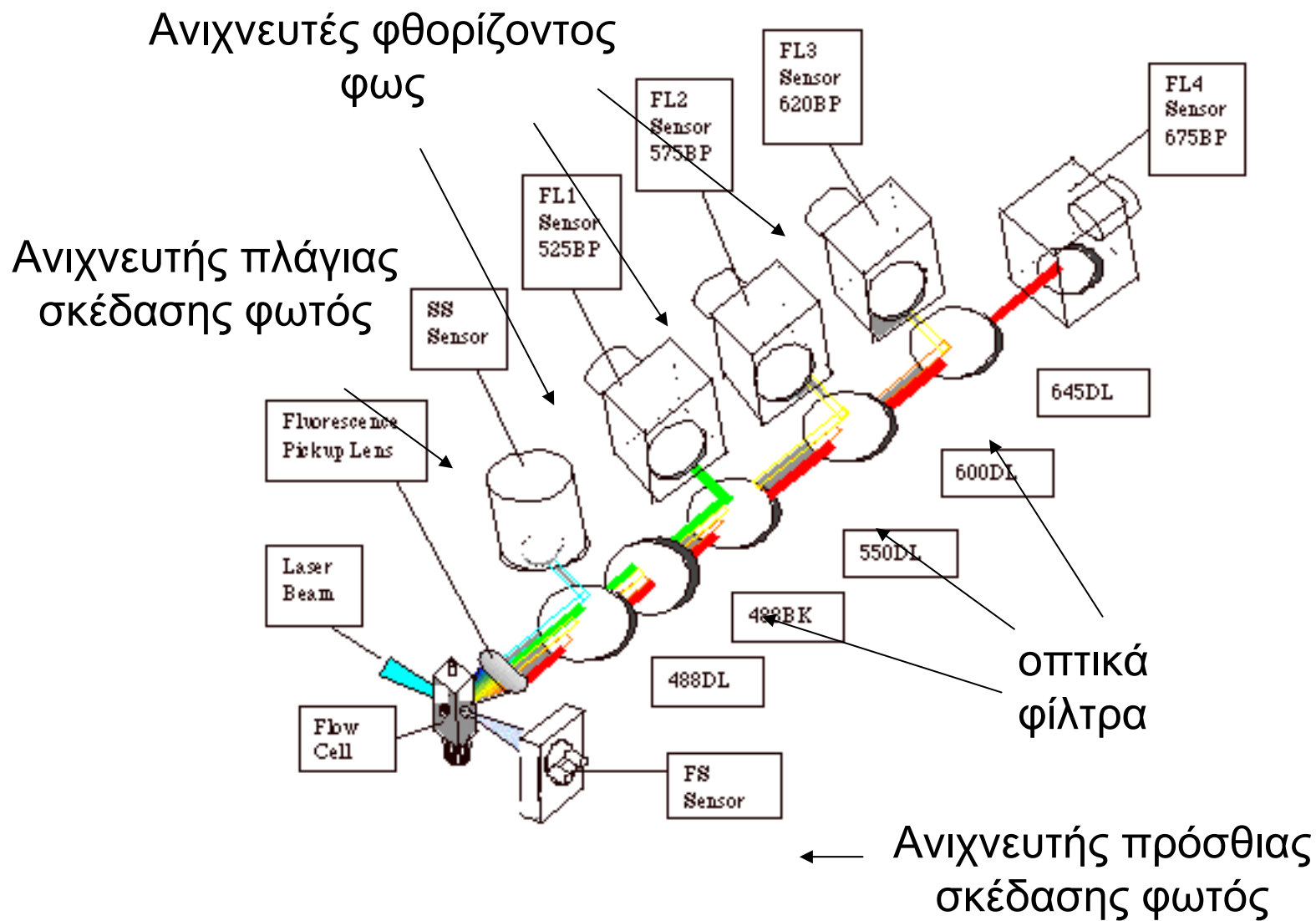
Π.χ. σε μελέτες DNA μέτρηση φθορίζουσας χρωστικής που συνδέεται στο DNA
 → η ποσότητα του φθορίζοντος φωτός που εκπέμπει το κύτταρο παράγει σήμα ανάλογο του περιεχομένου DNA του κυττάρου

FL1, FL2, FL3, FL4 : ανιχνευτές φθορισμού (fluorescence sensors)

Τύποι οπτικών φίλτρων



Σχηματική παράσταση οπτικού συστήματος

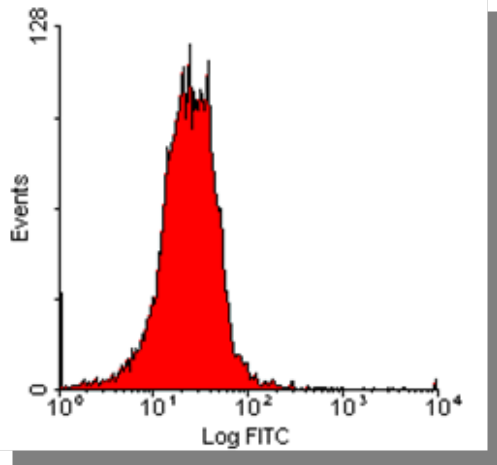


Ηλεκτρονικό σύστημα

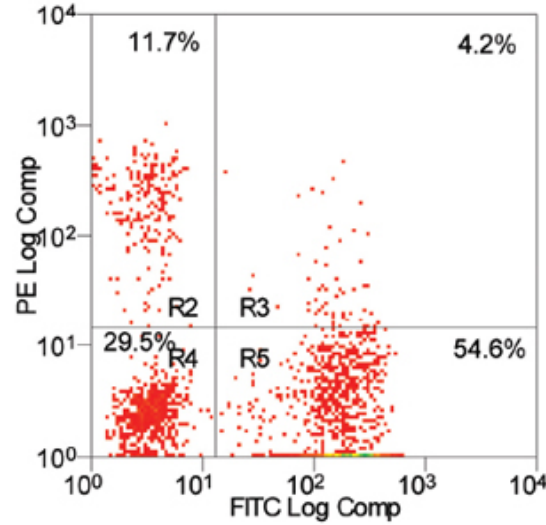
- Το σήμα του φωτός (σκέδασης, φθορισμού) μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα από τους ανιχνευτές
- Οι τιμές του ηλεκτρικού ρεύματος αποθηκεύονται σε αρχείο ψηφιακών δεδομένων (αρχείο list-mode)
- Το αρχείο list-mode είναι μια μεγάλη λίστα όλων των παραμέτρων που συλλέχθηκαν για κάθε κύτταρο με την ακριβή σειρά (χρόνο) συλλογής και χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τη γραφική παράσταση των δεδομένων

Γραφικές παραστάσεις

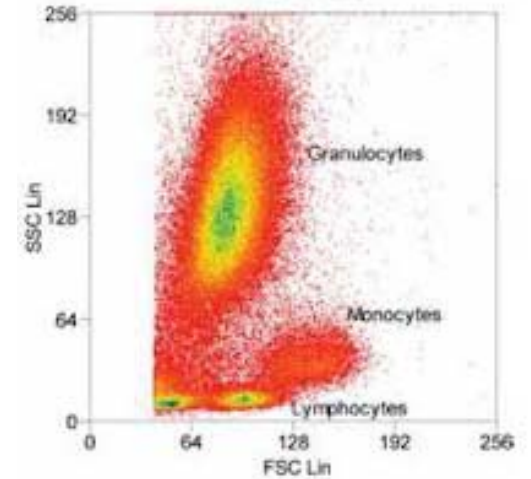
A. One parameter histogram



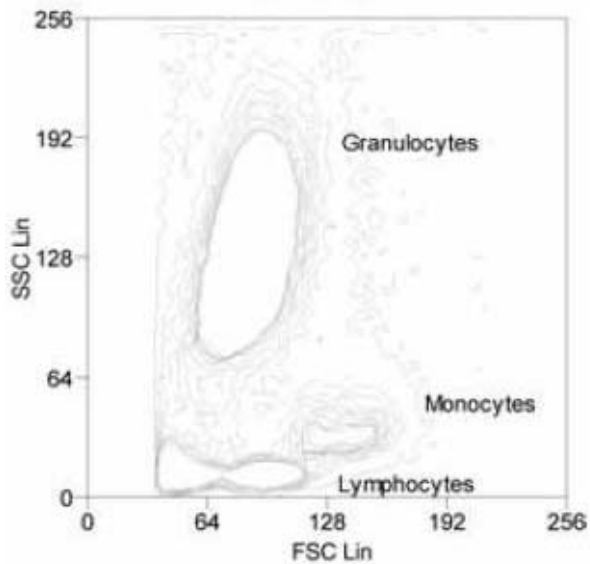
B. Two parameter histogram



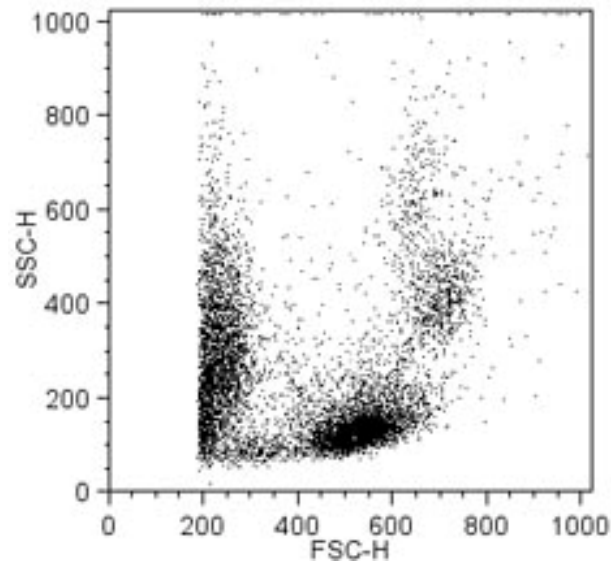
C. Density plot



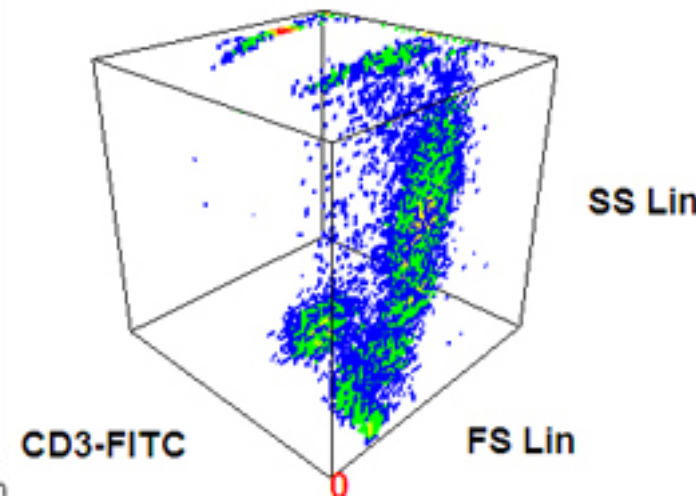
D. Contour diagram



E. Dot plot



F. 3-dimensional plot

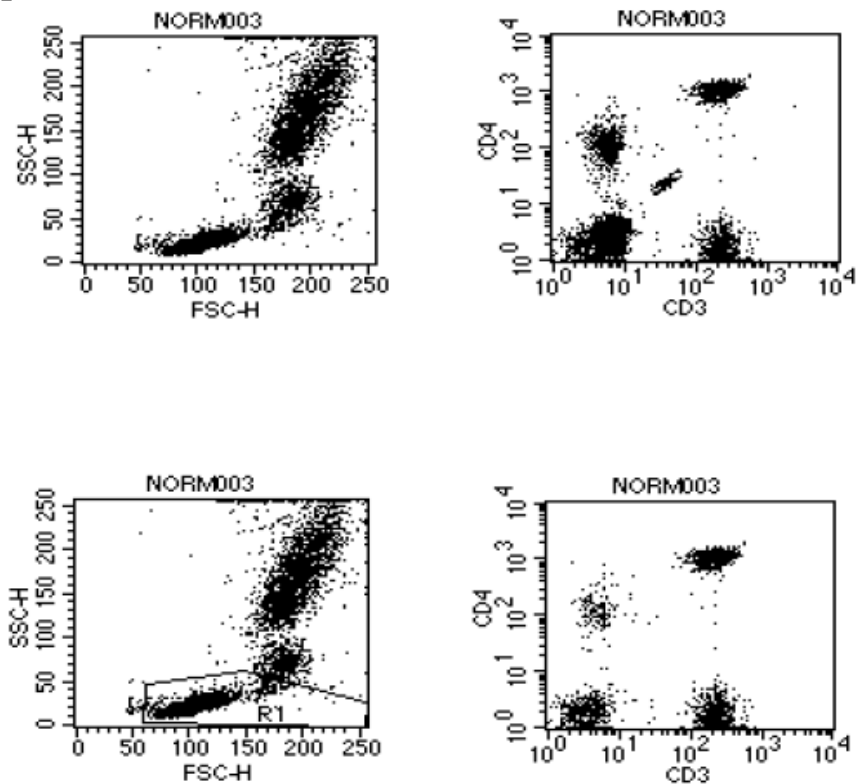


Αρχή ανάλυσης δεδομένων

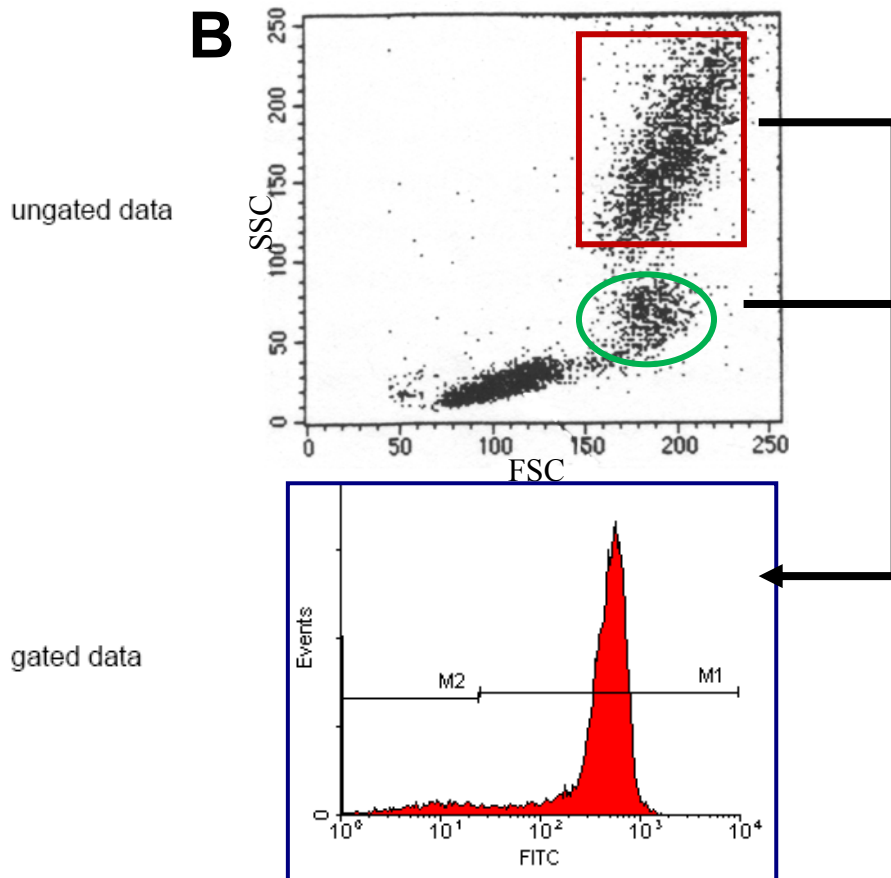
Gating

- μία παράμετρος
- δύο παράμετροι
- πολλαπλές παράμετροι

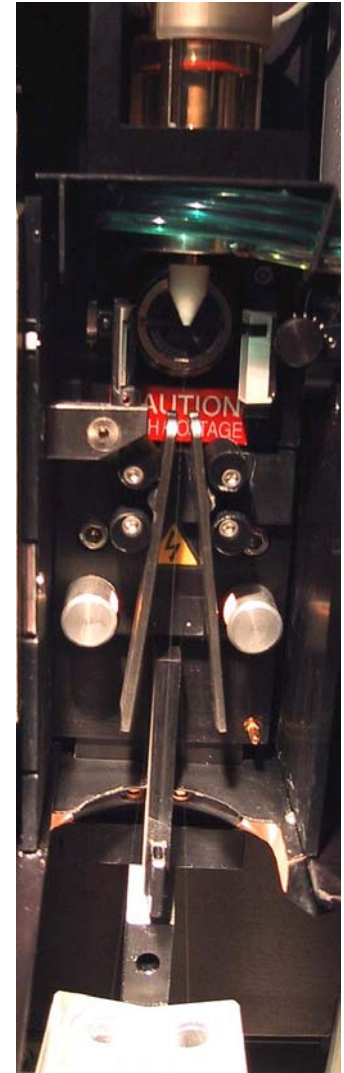
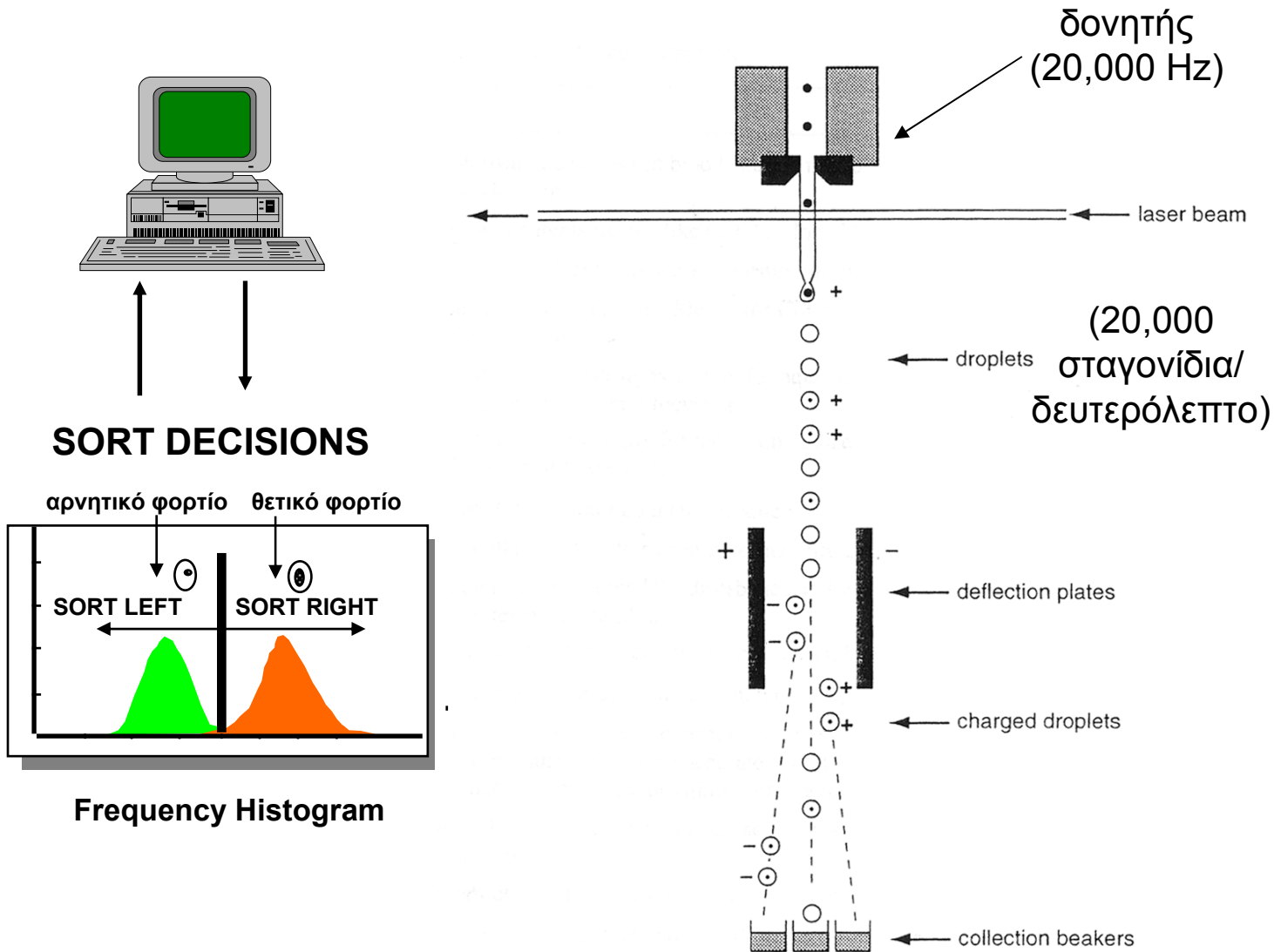
A



B



Απομόνωση (sorting) κυττάρων



Εφαρμογές κυτταρομετρίας ροής

Ανάλυση και απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών με βάση φυσικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, εσωτερική δομή) και τον φθορισμό τους (έκφραση επιφανειακών ή ενδοκυτταρικών ουσιών)

βασική κυτταρική βιολογία

ανάλυση κυτταρικών λειτουργιών

μελέτες καρυότυπου

ταυτοποίηση - απομόνωση βλαστικών κυττάρων

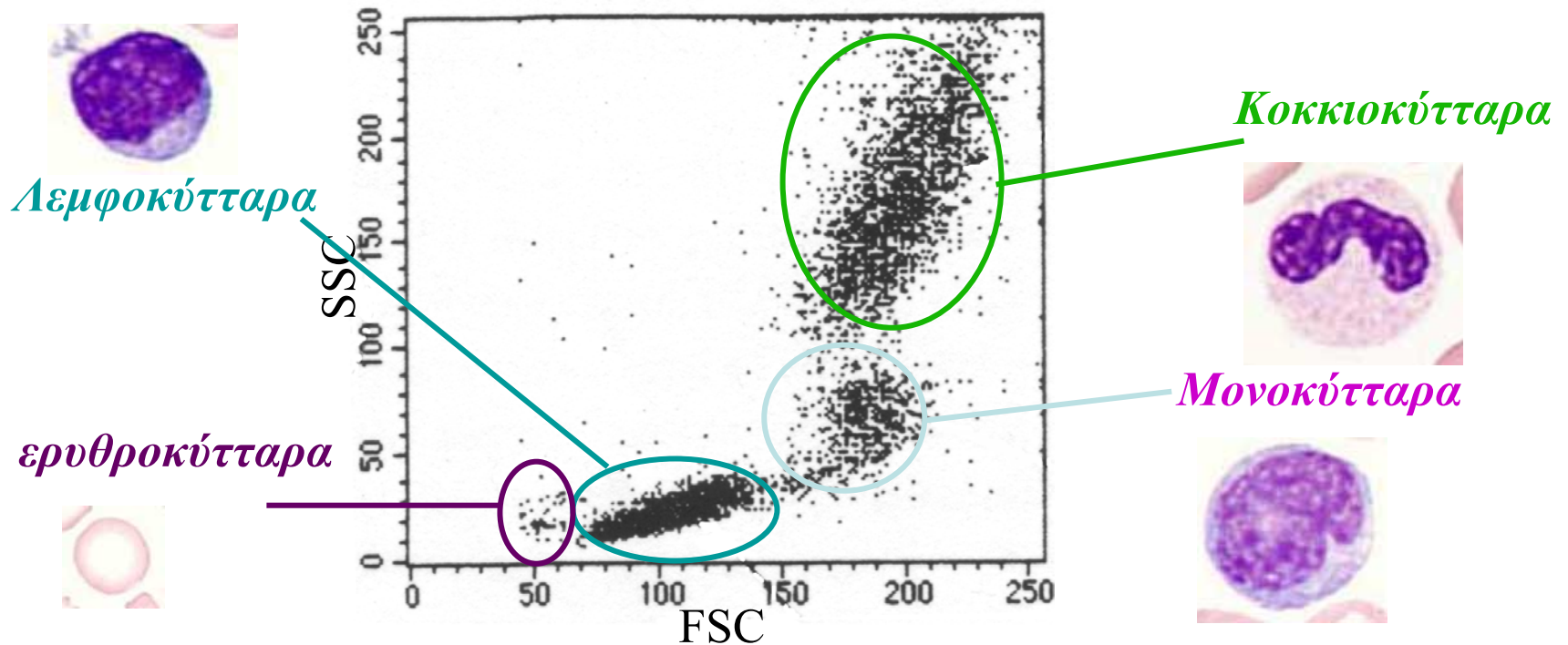
διάγνωση ασθενειών

ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων

Κατηγοριοποίηση των κυτταρικών τύπων του αίματος

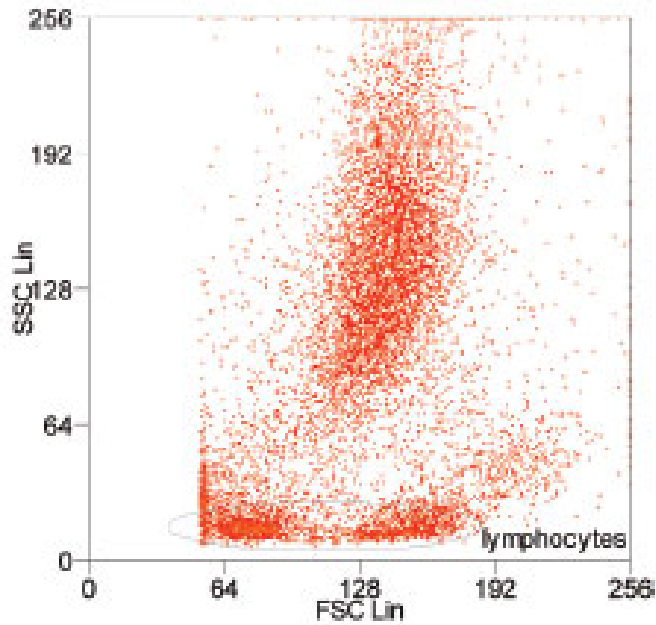
FSC(forward scatter): ανάλογο του μεγέθους

SSC (side scatter, 90° scatter): ανάλογο της εσωτερικής δομής

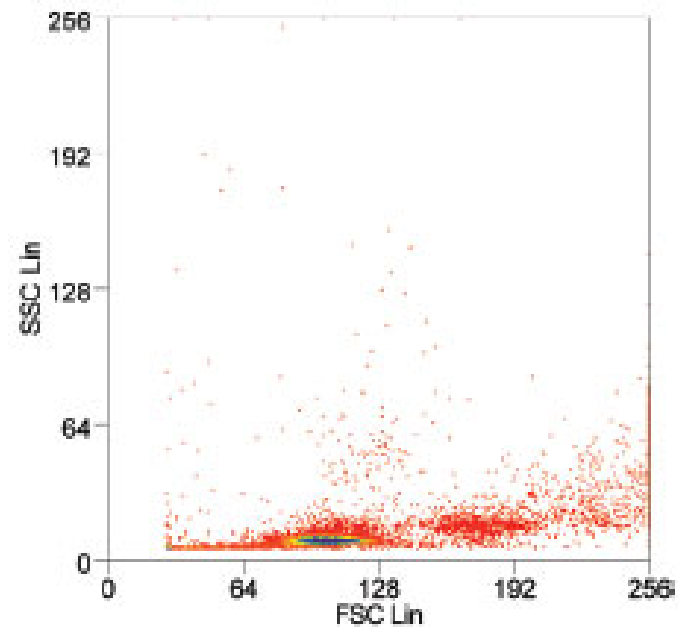


Ανοσοφαινότυπος

υγιές άτομο

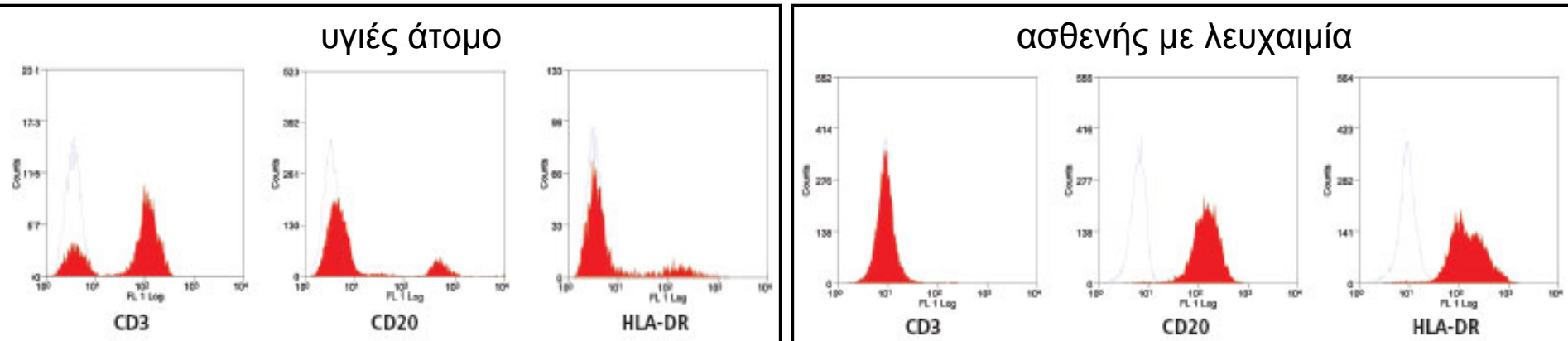


ασθενής με λευχαιμία



χρήση στη διάγνωση λεμφώματος, μυελώματος και λευχαιμιών

Διάγνωση λευχαιμίας



CD3: Ένα φυσιολογικό άτομο εκφράζει ένα σημαντικό ποσοστό από CD3+ λεμφοκύτταρα. Στον ασθενή με λευχαιμία, απουσιάζει.

CD20: Στον ασθενή με λευχαιμία υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων με θετική χρώση για το CD20. Στο υγιές άτομο μόνο μερικά είναι θετικά.

HLA-DR: Ο ασθενής με λευχαιμία είναι HLA-DR+. Στο φυσιολογικό άτομο μόνο ένας μικρός αριθμός των κυττάρων χρωματίζονται θετικά.

Έλεγχος και παρακολούθηση ατόμων με λοίμωξη από ιό HIV

Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των λεμφοκυττάρων (T, B, NK)

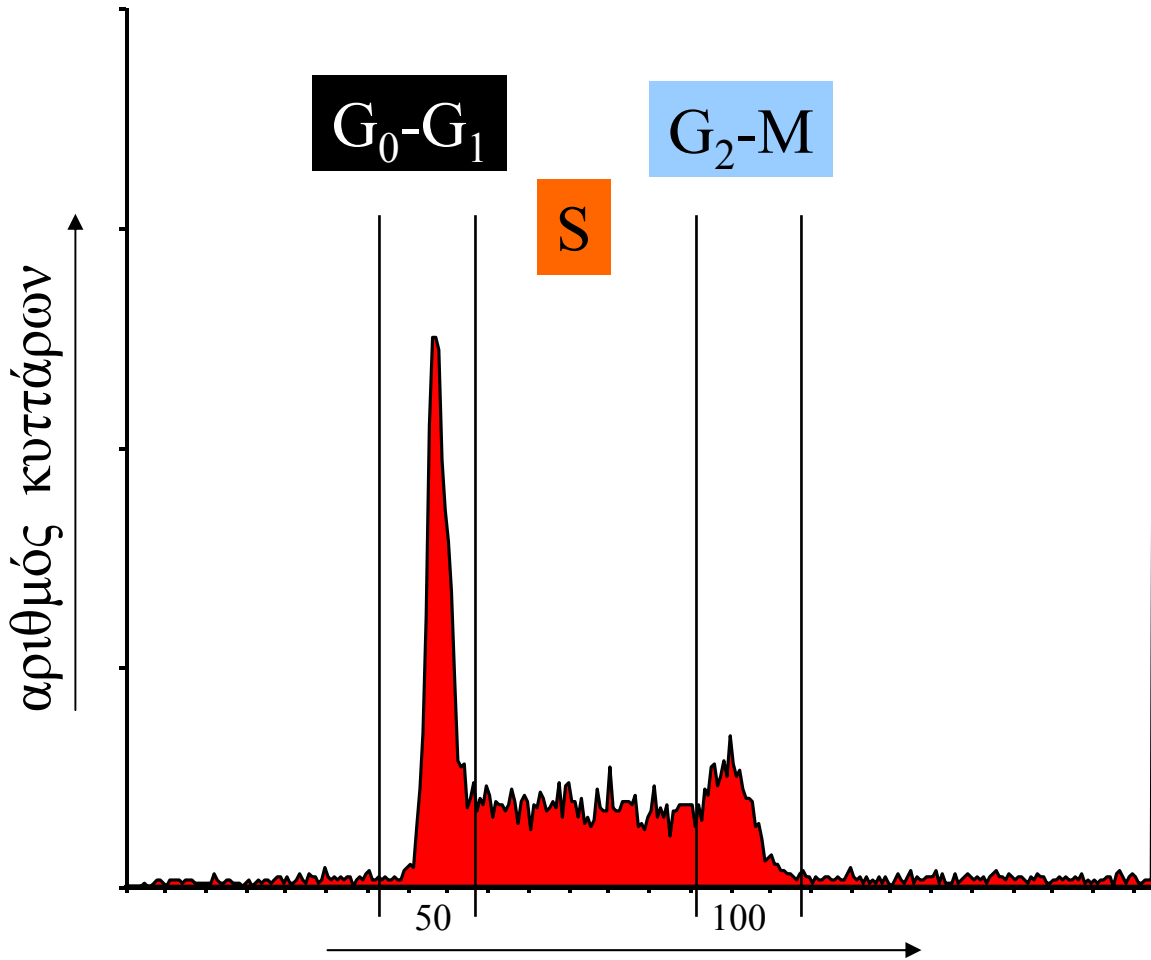
μέτρηση της εκατοστιαίας αναλογίας των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων
μέτρηση του απόλυτου αριθμού των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων
μέτρηση του λόγου CD4/CD8

Η μέτρηση του απόλυτου αριθμού των CD4-θετικών (CD4+) T λεμφοκυττάρων χρησιμεύει στη λήψη αποφάσεων για την έναρξη προφυλακτικής θεραπείας, καθώς και για την έναρξη και παρακολούθηση της αντιρετροϊκής αγωγής

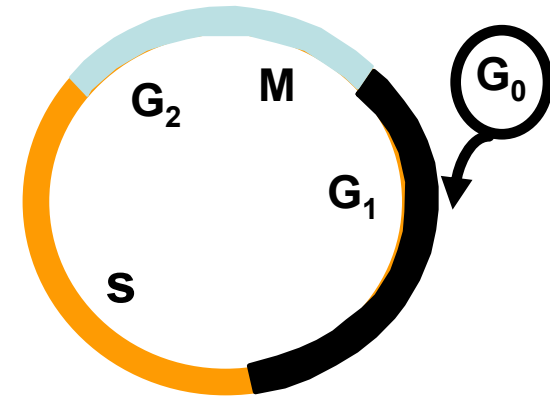
Μέτρηση παραμέτρων που βασίζονται σε DNA και RNA

- Ολικό περιεχόμενο DNA και RNA
- Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου
- Ανάλυση χρωμοσωμάτων
- Ανάλυση ζωντανών/νεκρών κυττάρων

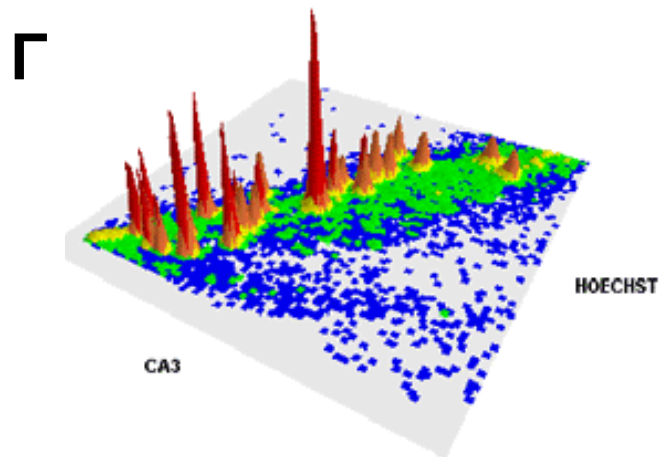
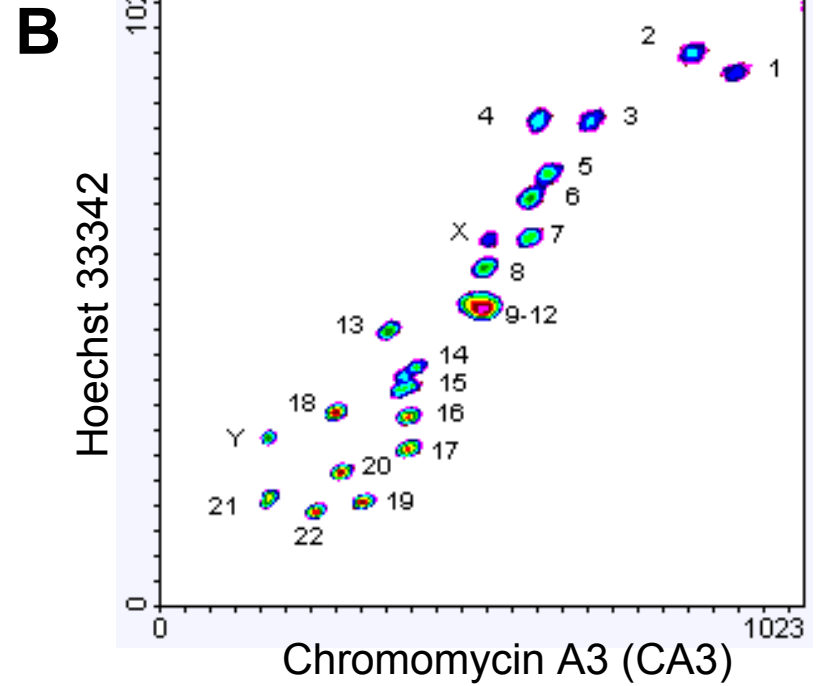
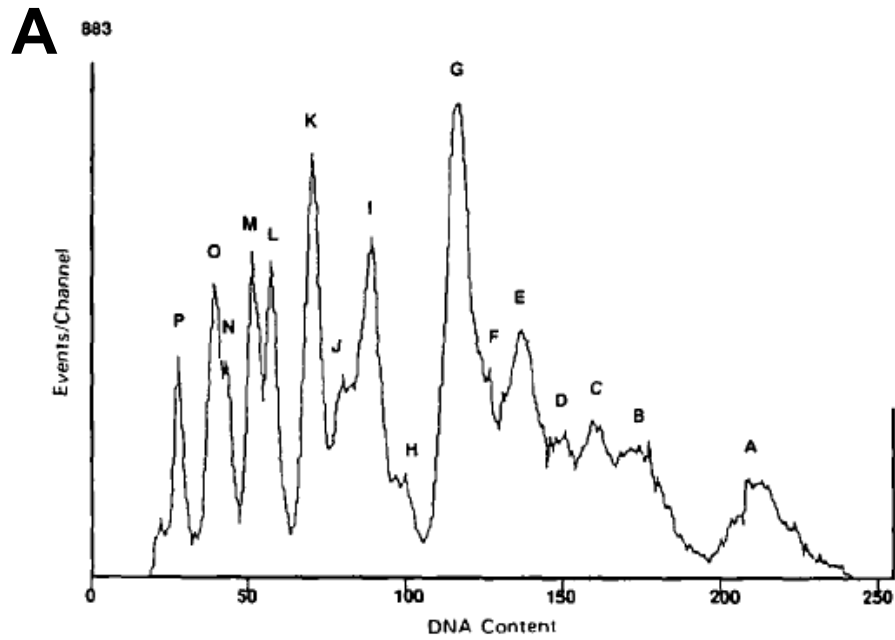
Μελέτες κυτταρικού κύκλου: τυπικό ιστόγραμμα DNA



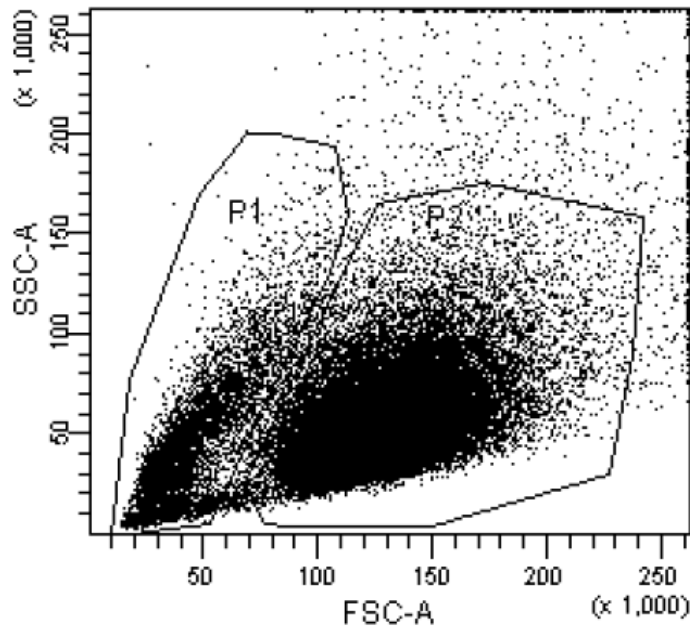
ένταση φθορίζουσας ουσίας που
συνδέεται στο DNA



Ανάλυση χρωμοσωμάτων



Διαχωρισμός νεκρών/ζωντανών κυττάρων



τα νεκρά κύτταρα έχουν
συνήθως μικρότερη
εμπρόσθια σκέδαση
από τα ζωντανά και
παρόμοια ή υψηλότερη
πλάγια σκέδαση

Η επιλογή της περιοχής P2
μπορεί να εμπλουτίσει τον
πληθυσμό των ζωντανών
κυττάρων, αλλά δεν αρκεί για να
διαχωρίσει πλήρως τα νεκρά
από τα ζωντανά κύτταρα

Διαχωρισμός νεκρών/ζωντανών κυττάρων

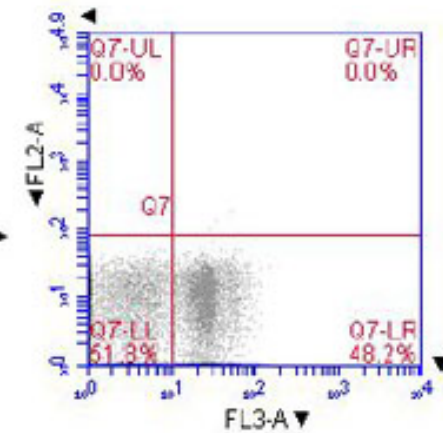
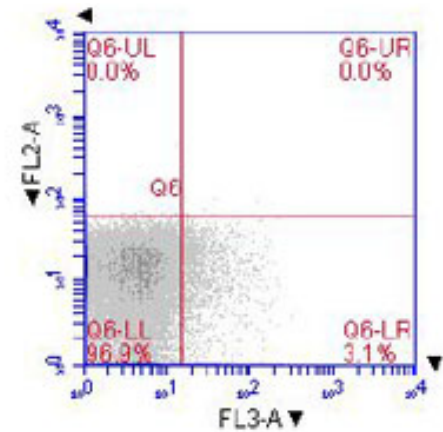
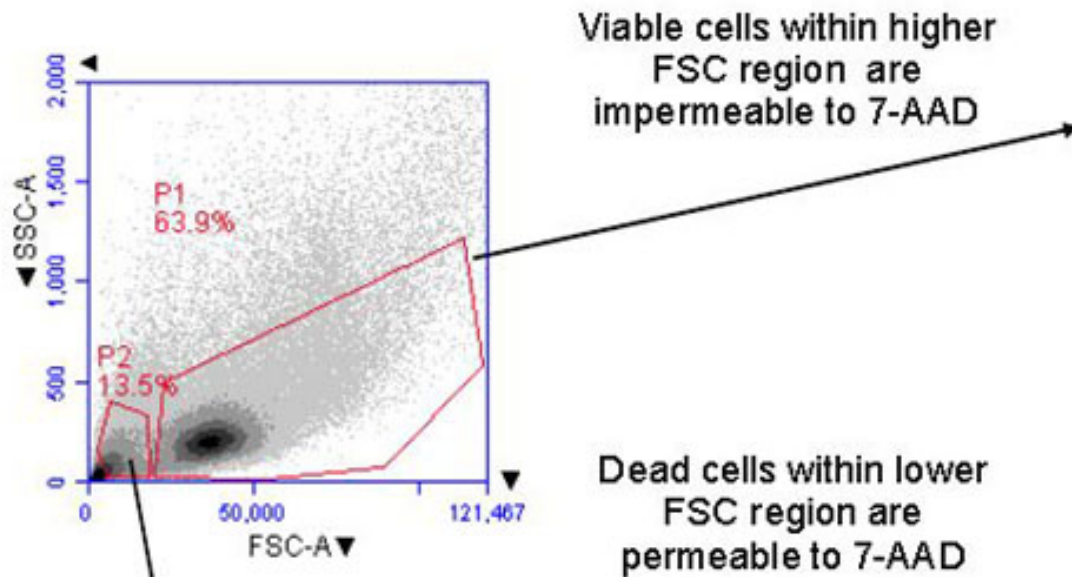
Σήμανση νεκρών κυττάρων

Propidium Iodide (PI)

7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

Σήμανση ζωντανών κυττάρων

calcein dyes



7-AAD