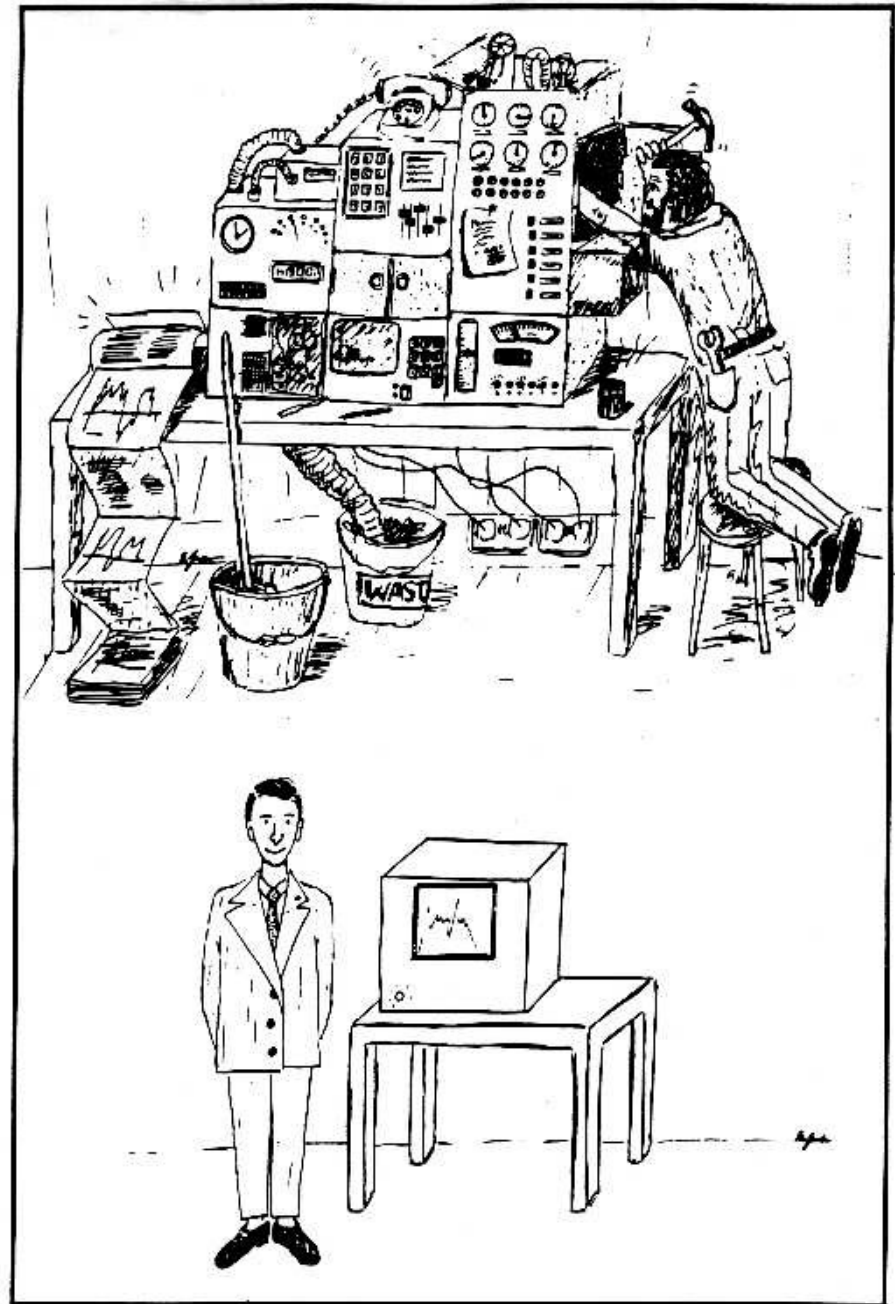




Κυτταρομετρία Ροής [Flow cytometry]

Μέθοδοι Ενόργανης Ανάλυσης Βιομορίων
2024 - 2025

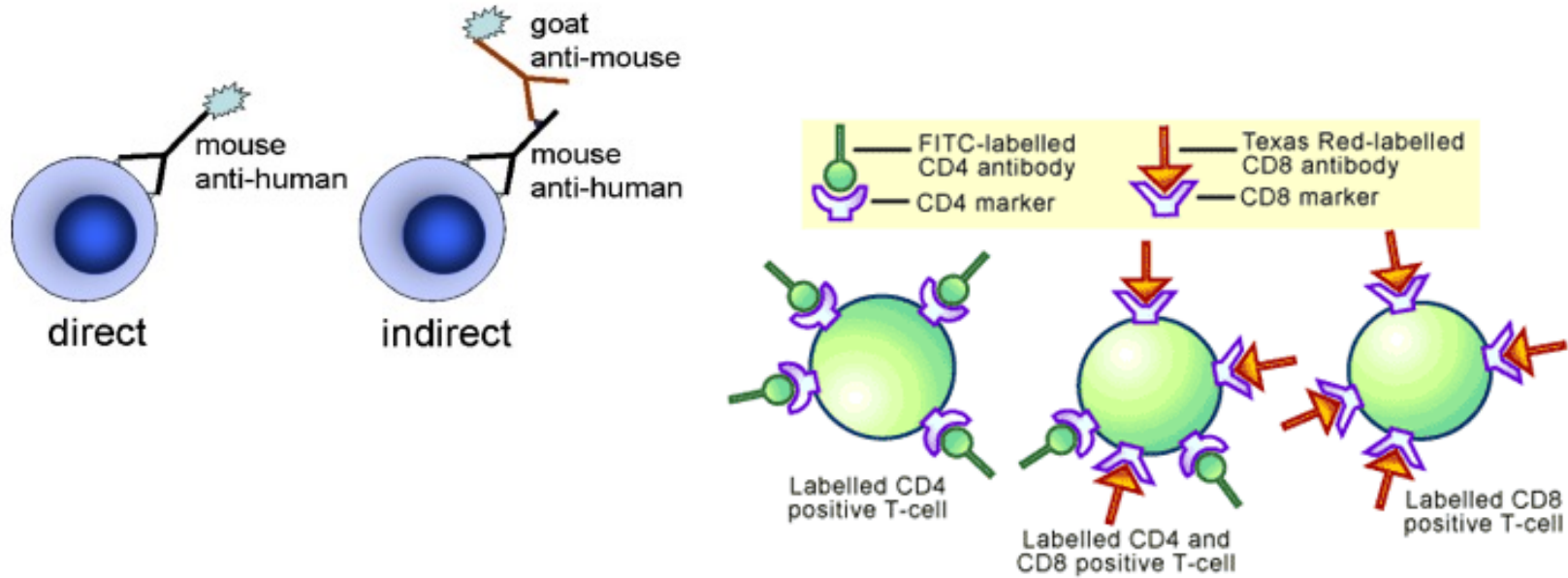


Two opposing fantasies of what flow cytometry is all about. Drawings by Ben Givan

+ Κυτταρομετρία Ροής

- ✓ Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία η οποία ταυτόχρονα μετρά και στη συνέχεια αναλύει πολλαπλά φυσικά χαρακτηριστικά μεμονωμένων σωματιδίων, π.χ. κυττάρων, καθώς αυτά ρέουν σε ένα υγρό ρεύμα μέσα από μια δέσμη φωτός. Οι ιδιότητες οι οποίες μετρώνται περιλαμβάνουν:
 - το σχετικό μέγεθος ενός σωματιδίου,
 - τη σχετική κοκκίωση ή εσωτερική πολυπλοκότητα, και
 - τη σχετική ένταση φθορισμού.
- ✓ Αυτά τα χαρακτηριστικά προσδιορίζονται με τη χρήση ενός συστήματος ζεύξης οπτικής-ηλεκτρονικής, το οποίο καταγράφει πως το κύτταρο ή το σωματίδιο σκεδάζει το προσπίπτον φως λέιζερ.

+ Κυτταρομετρία Ροής



- ✓ Αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες χρωστικές, μπορούν να δένουν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο εσωτερικό των κυττάρων. Όταν σημασμένα κύτταρα περνούν από μία πηγή φωτός, τα φθορίζοντα μόρια διεγείρονται και μεταβαίνουν σε μία υψηλότερη ενεργειακά κατάσταση.
- ✓ Με την επιστροφή τους στις καταστάσεις ηρεμίας τους, τα φθοροχρώματα εκπέμπουν φωτεινή ενέργεια σε υψηλότερα μήκη κύματος. Η χρήση πολλαπλών φθοροχρωμάτων, καθένα με παρόμοια μήκη κύματος διέγερσης και διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής [ή «χρώματα»], επιτρέπει να μετρηθούν ταυτόχρονα αρκετές κυτταρικές ιδιότητες.

+ Κυτταρομετρία Ροής



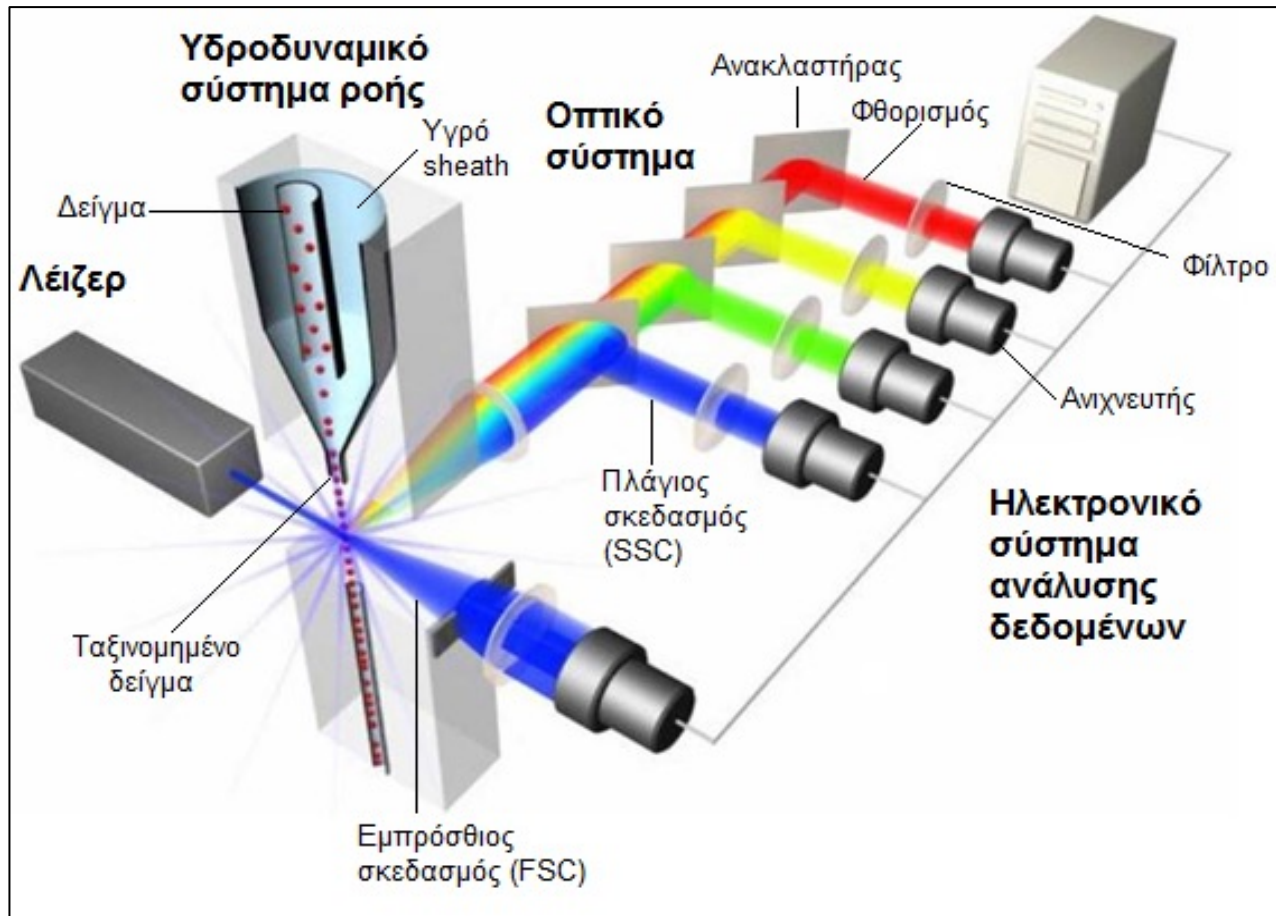
<https://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur/index.jsp>



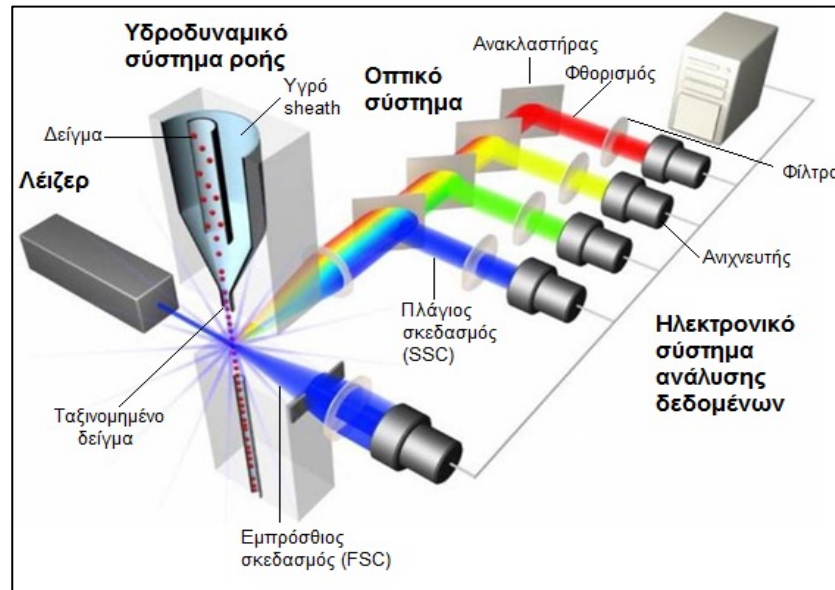
<https://www.bdbiosciences.com/us/instruments/research/cell-sorters/bd-facsaria-fusion/m/1526412/overview>

+ Κυτταρομετρία Ροής

- ✓ Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία κύρια συστήματα, το υδροδυναμικό, το οπτικό και το ηλεκτρονικό.

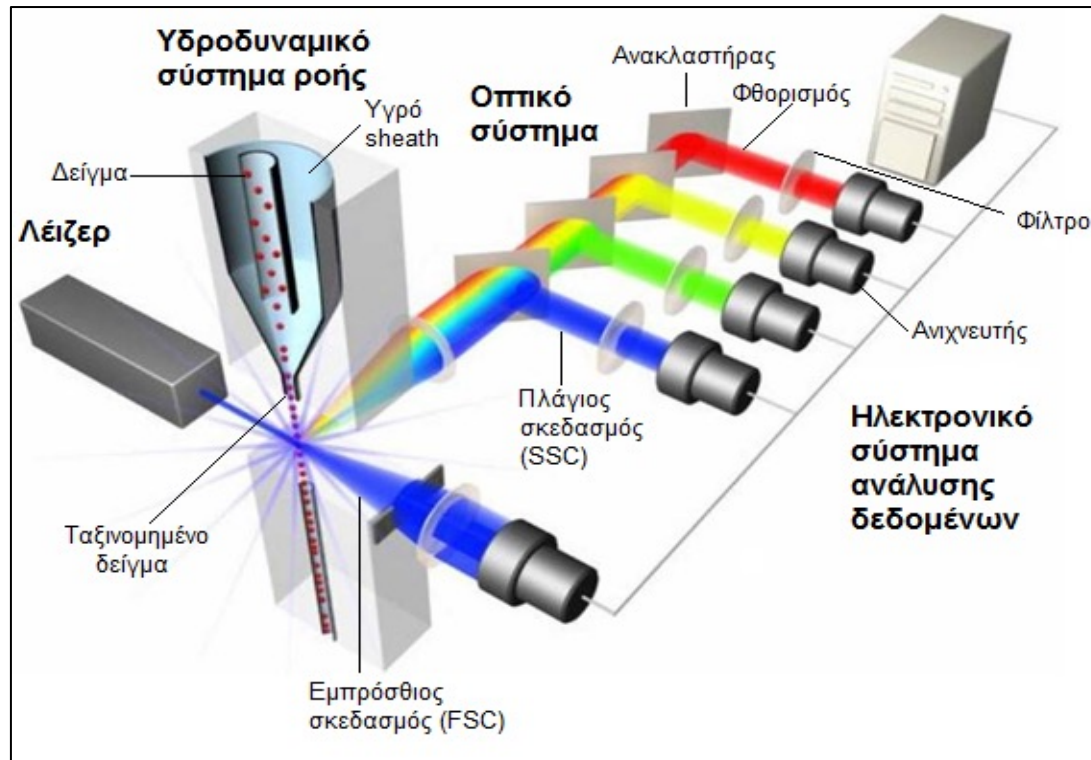


+ Κυτταρομετρία Ροής



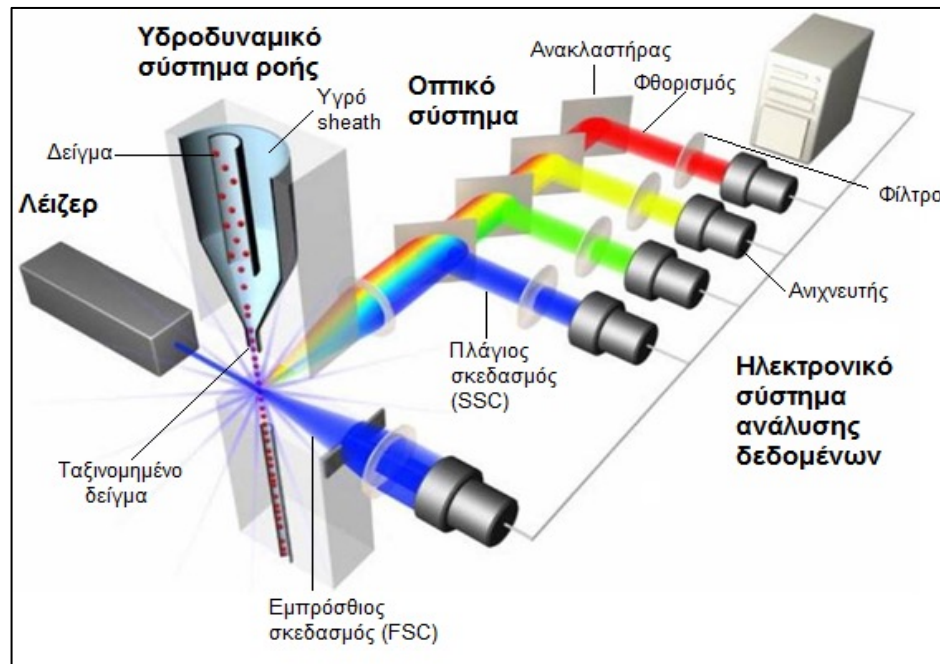
- Το **υδροδυναμικό σύστημα ροής** μεταφέρει τα σωματίδια σε ένα ρεύμα στη δέσμη του laser [interrogation].
- Το **οπτικό σύστημα** αποτελείται από λέιζερ για το φωτισμό των σωματιδίων στο ρεύμα του δείγματος και οπτικά φίλτρα για να κατευθύνουν τα προκύπτοντα φωτεινά σήματα [σκεδαζόμενα] στους κατάλληλους ανιχνευτές.
- Το **ηλεκτρονικό σύστημα** μετατρέπει τα σήματα φωτός που έχουν ανιχνευτεί σε ηλεκτρονικά σήματα και μπορούν να επεξεργαστούν από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

+ Κυτταρομετρία Ροής



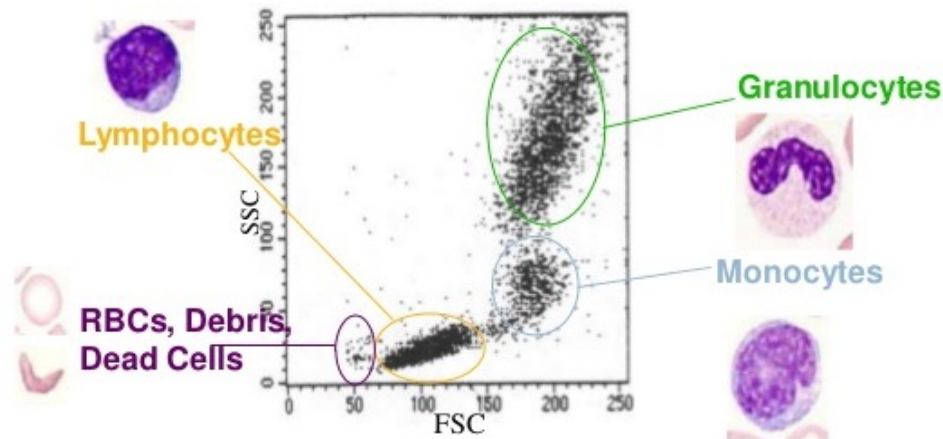
- ✓ Μέσα σε έναν κυτταρομετρητή ροής, τα κύτταρα σε εναιώρημα οδηγούνται μέσα σε ένα ρεύμα, δημιουργούμενο από έναν περιβάλλοντα μανδύα ισοτονικού υγρού [υγρό sheath], το οποίο δημιουργεί γραμμική ροή επιτρέποντας στα κύτταρα να περνούν μεμονωμένα μέσω ενός σημείου [interrogation point]. Σε αυτό το σημείο, μία δέσμη μονοχρωματικού φωτός, συνήθως από ένα λέιζερ, διατέμνει τα κύτταρα.

+ Κυτταρομετρία Ροής



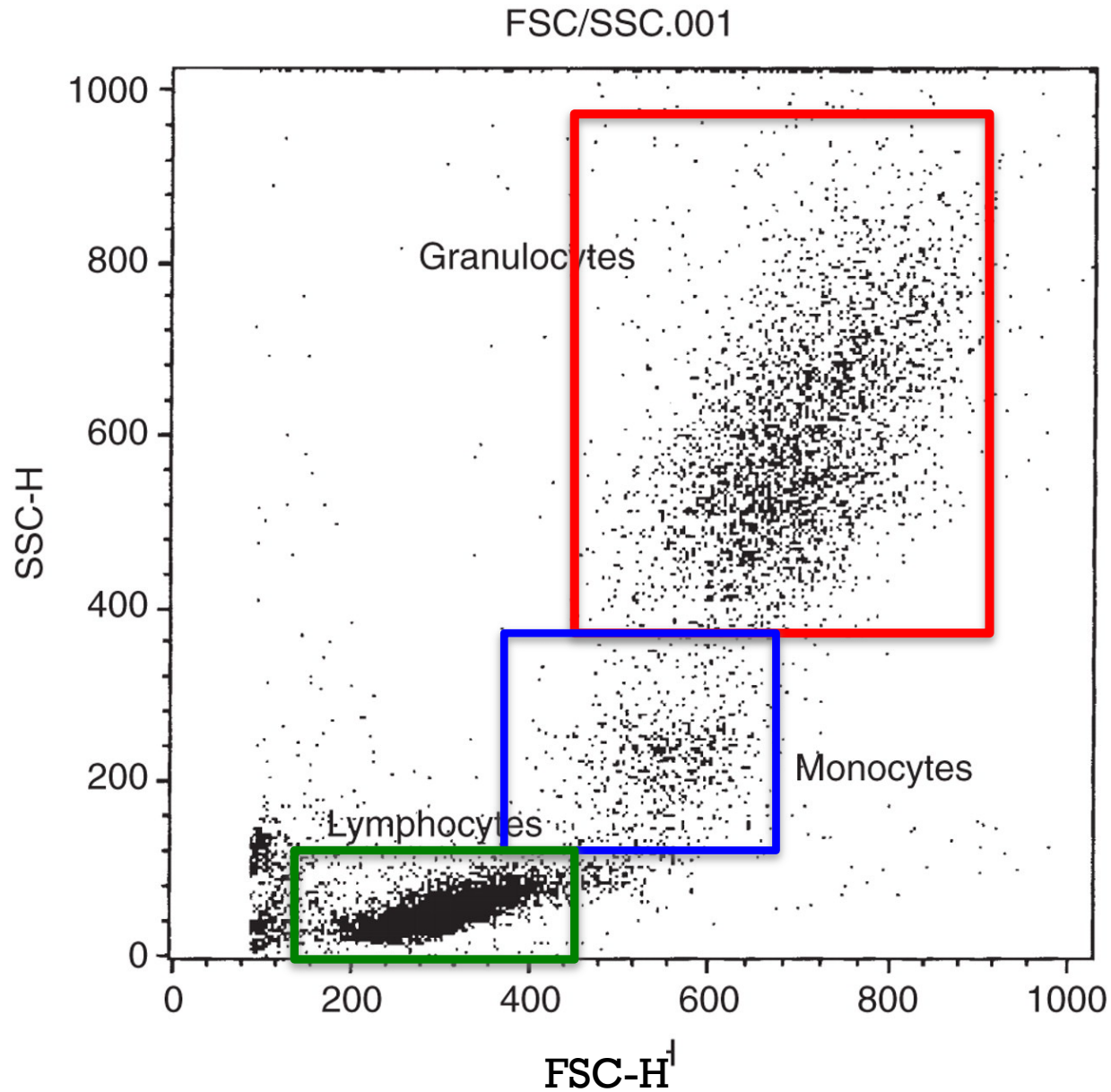
- Το εκπεμπόμενο φως εκπέμπεται προς όλες τις κατευθύνσεις και συλλέγεται μέσω των οπτικών συστημάτων τα οποία κατευθύνουν το φως σε μια σειρά φίλτρων και διχρωικών καθρεπτών, τα οποία απομονώνουν συγκεκριμένου μήκους κύματος μπάντες.
- Τα φωτεινά σήματα ανιχνεύονται από λυχνίες φωτοπολλαπλασιασμού και ψηφιοποιούνται για ανάλυση στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.
- Η προκύπτουσα πληροφορία συνήθως παρουσιάζεται σε ιστόγραμμα ή σε μορφή δισδιάστατου διαγράμματος σημείων [dot-plot].

+ Κυτταρομετρία Ροής



- ✓ Οι φυσικές ιδιότητες όπως είναι το μέγεθος το οποίο αντιπροσωπεύεται από την εμπρόσθια σκέδαση του φωτός [**Forward Scattering, FSC**] και η εσωτερική πολυπλοκότητα [π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης] που αντιπροσωπεύεται από την πλάγια σκέδαση [**Side Scattering, SSC**], μπορούν να καθορίσουν συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς.

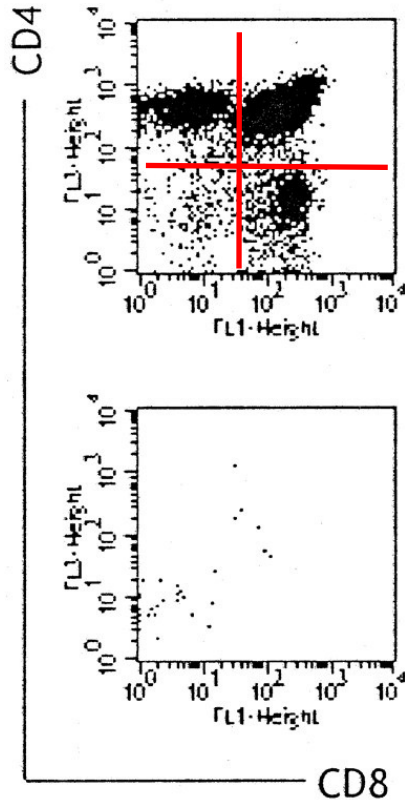
+ Κυτταρομετρία Ροής



+ Κυτταρομετρία Ροής

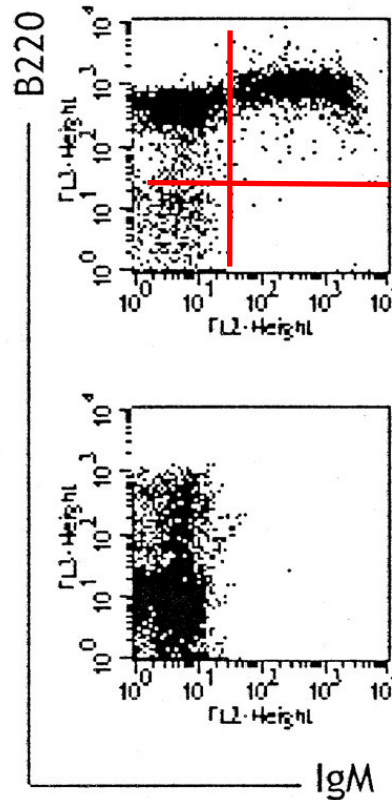
ΘΥΜΟΣ

Thymus



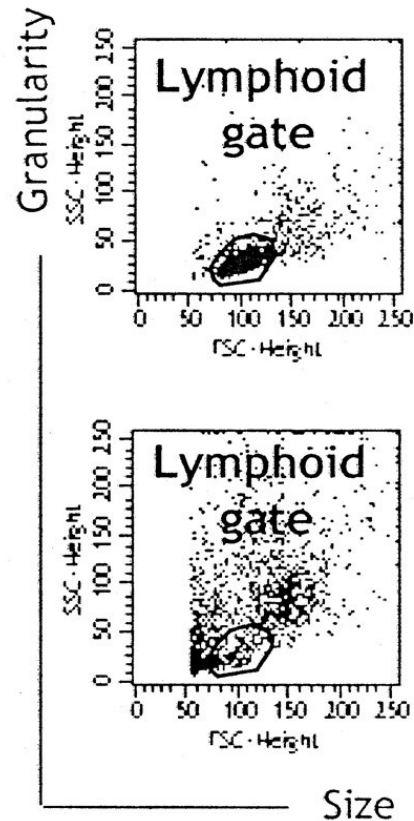
ΜΥΕΛΟΣ ΟΣΤΩΝ

BM



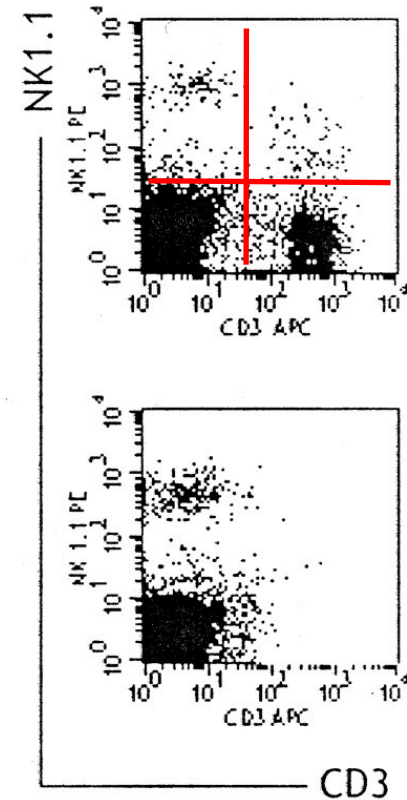
ΣΠΛΗΝΑ

Spleen



ΣΠΛΗΝΑ

Spleen



WT

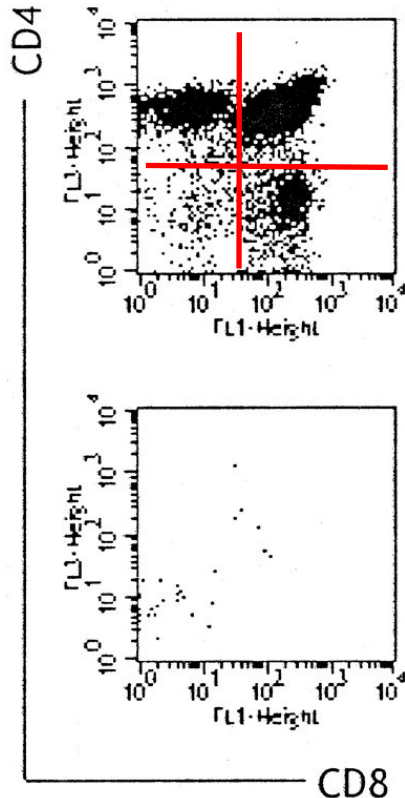
PU.1^{-/-}

- **WT:** Wild type [κανονικό ποντίκι, αγρίου τύπου]
- **PU.1^{-/-}:** Knock-out ποντίκι που δεν εκφράζει το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα PU.1

+ Κυτταρομετρία Ροής

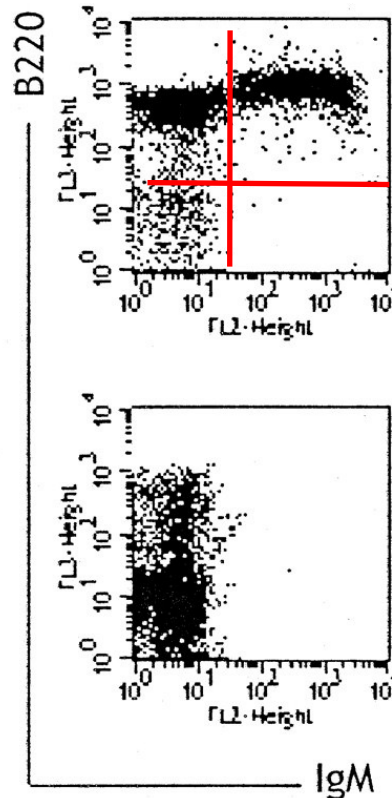
ΘΥΜΟΣ

Thymus



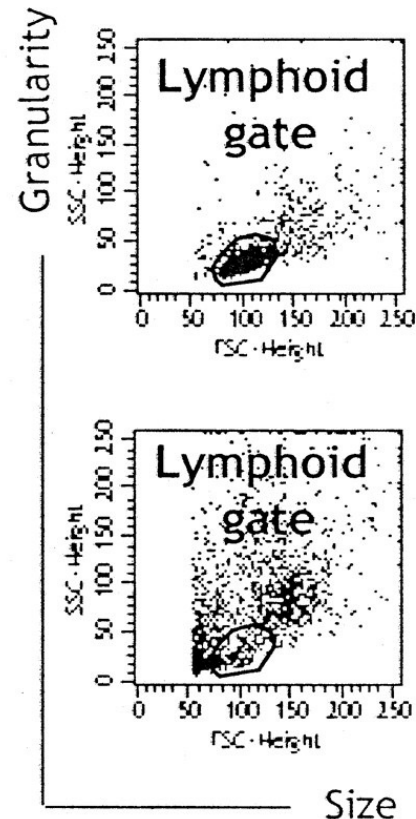
ΜΥΕΛΟΣ ΟΣΤΩΝ

BM



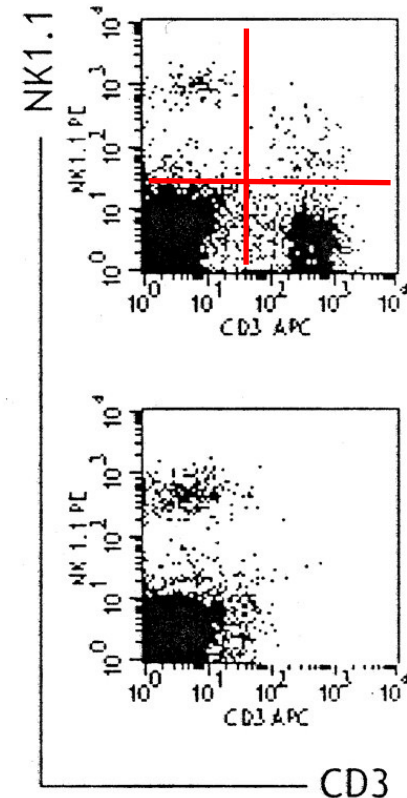
ΣΠΛΗΝΑ

Spleen



ΣΠΛΗΝΑ

Spleen



WT

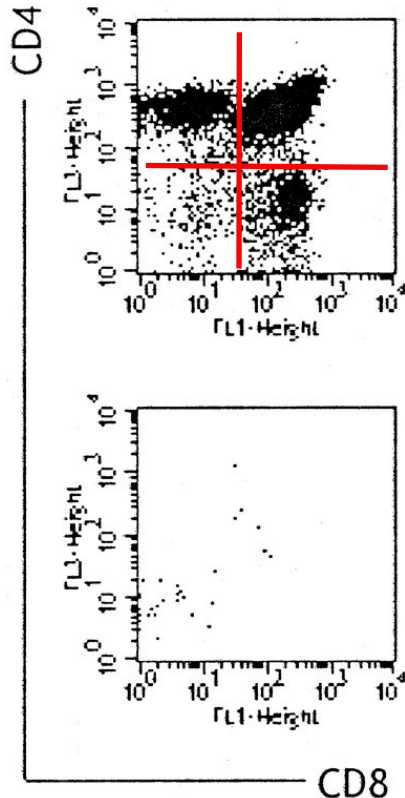
PU.1-/-

- **CD4:** γλυκοπρωτείνη, συνυποδοχέας του TCR, που εκφράζεται κυρίως στα βοηθητικά T κύτταρα, καθώς επίσης και σε μερικά μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα.
- **CD8:** διαμεμβρανική πρωτείνη, συνυποδοχέας του TCR, που εκφράζεται κυρίως στα κυτταροτοξικά T κύτταρα, καθώς επίσης και σε μερικά NK και δενδριτικά κύτταρα.

+ Κυτταρομετρία Ροής

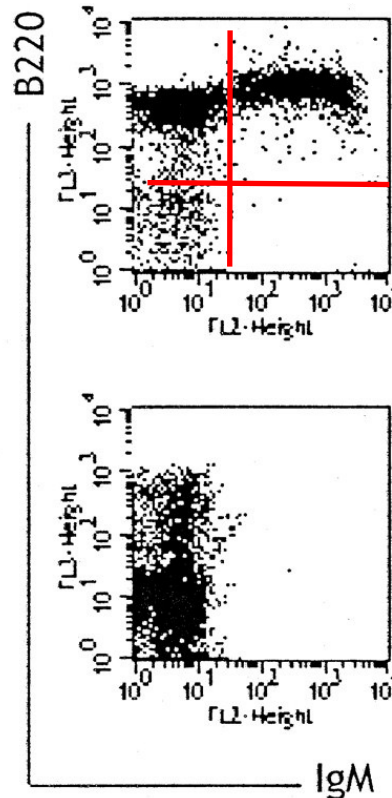
ΘΥΜΟΣ

Thymus



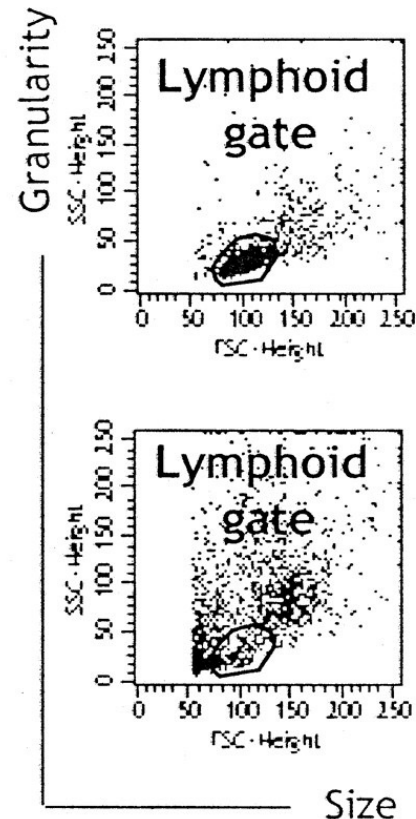
ΜΥΕΛΟΣ ΟΣΤΩΝ

BM



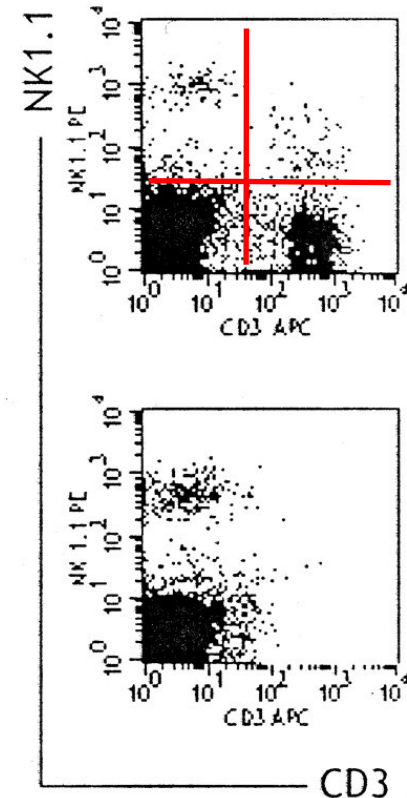
ΣΠΛΗΝΑ

Spleen



ΣΠΛΗΝΑ

Spleen



WT

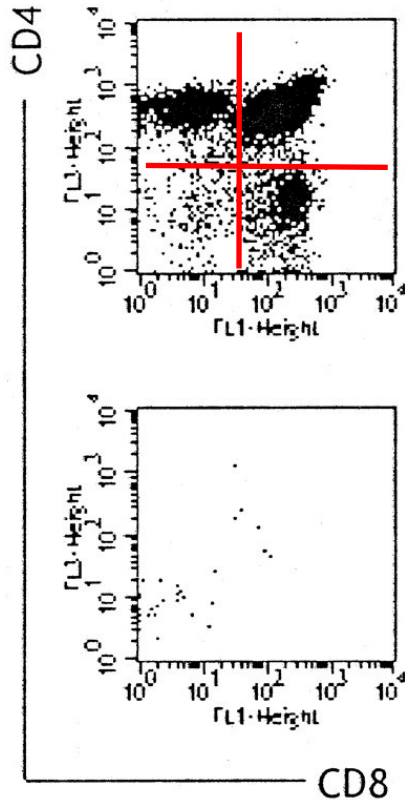
PU.1-/-

- **B220**: πρωτεΐνη που εκφράζεται σε όλα τα B λεμφοκύτταρα στο ποντίκι.
- **IgM**: το μεγαλύτερο φυσικό αντίσωμα που εντοπίζεται στο ανθρώπινο κυκλοφορικό σύστημα. Είναι το πρώτο αντίσωμα που εμφανίζεται ως απάντηση στην αρχική έκθεση στο αντιγόνο. Παράγεται κατά κύριο λόγο στην σπλήνα.

+ Κυτταρομετρία Ροής

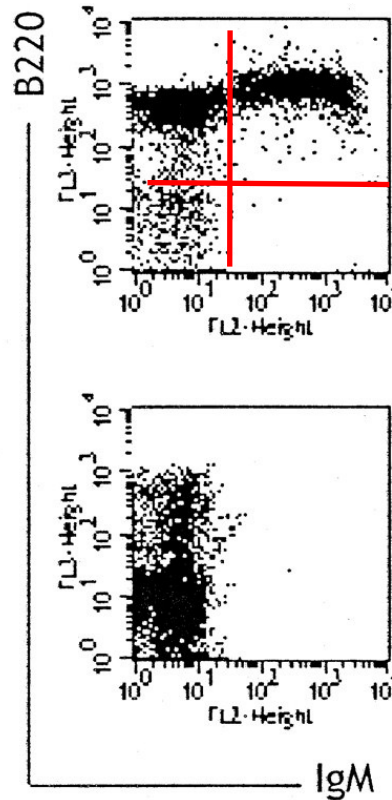
ΘΥΜΟΣ

Thymus



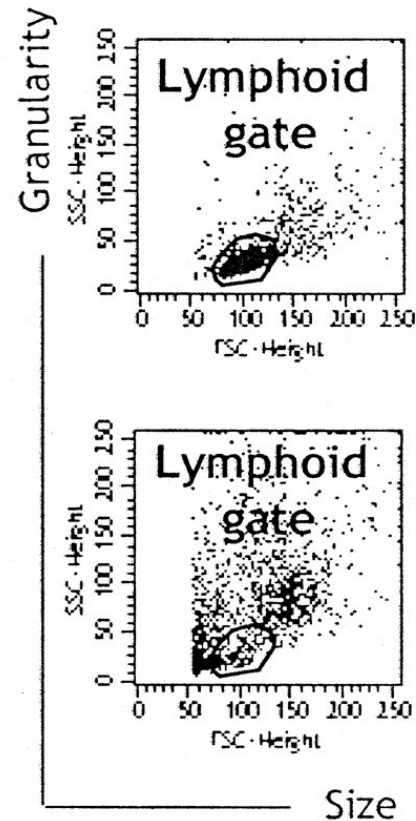
ΜΥΕΛΟΣ ΟΣΤΩΝ

BM



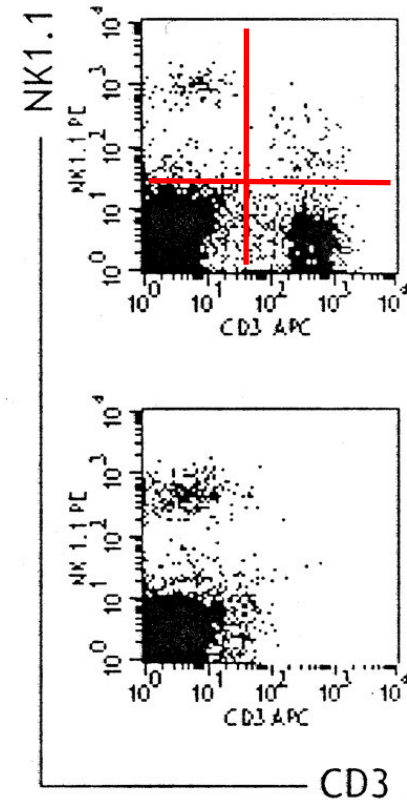
ΣΠΛΗΝΑ

Spleen



ΣΠΛΗΝΑ

Spleen

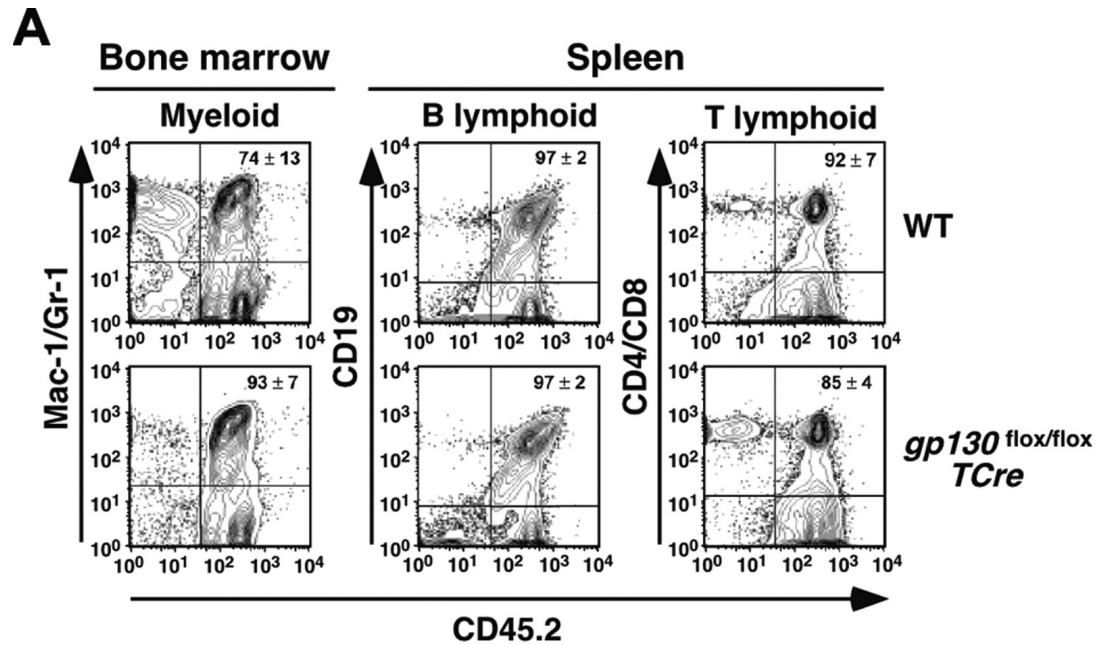


WT

PU.1-/-

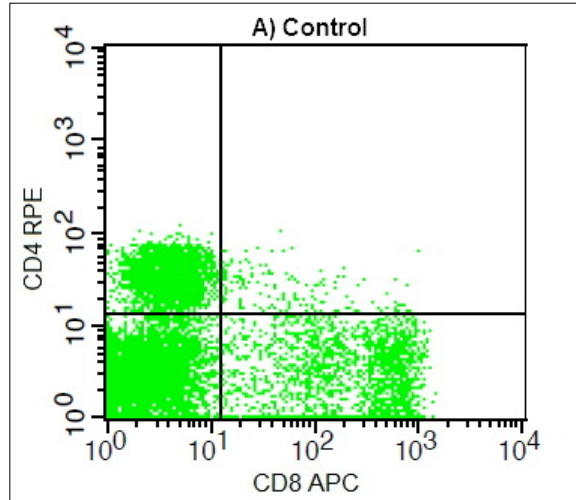
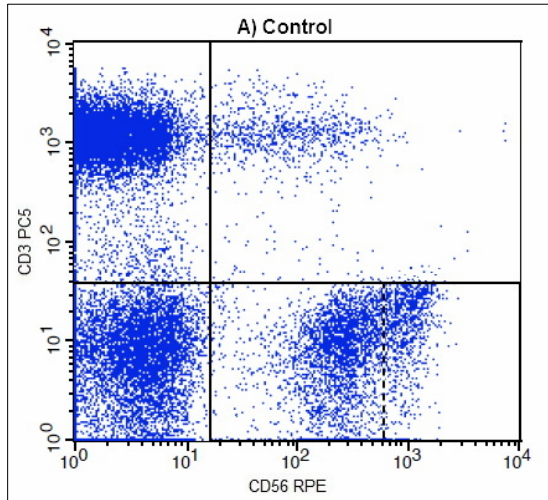
- **NK1.1:** μέλος της NKR-P1 οικογένειας των επιφανειακών υποδοχέων, τύπου II μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται σε NK και NK-T κύτταρα.
- **CD3:** συνυποδοχέας του TCR, εκφράζεται σε T και NK-T κύτταρα.

+ Κυτταρομετρία Ροής



- **Macrophage-1 antigen [Mac-1]:** επιφανειακός υποδοχέας που εκφράζεται σε πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα [κυρίως ουδετερόφιλα], NK κύτταρα και μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα όπως τα μακροφάγα.
- **Gr-1:** εκφράζεται σε κύτταρα της μυελοειδούς σειράς και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση κοκκιοκυττάρων στον ΜΟ και περιφερικών ουδετερόφιλων.
- **CD19:** εκφράζεται στην επιφάνεια Β κυττάρων.
- **CD45.2 [leukocyte common antigen, LCA]:** εκφράζεται σε όλα τα διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα εκτός από τα ερυθροκύτταρα.

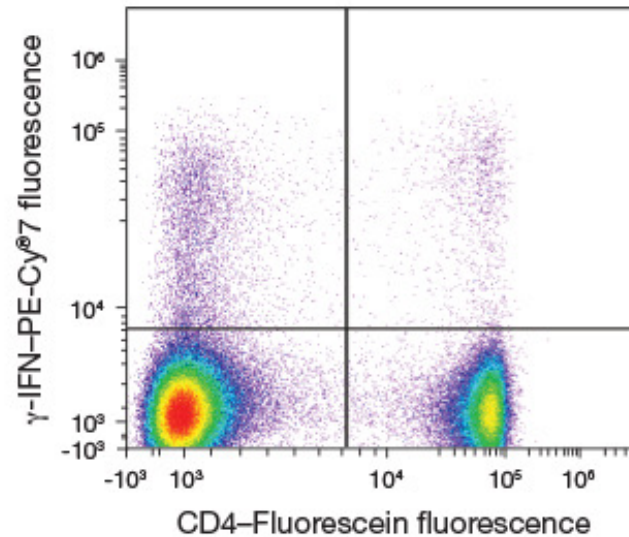
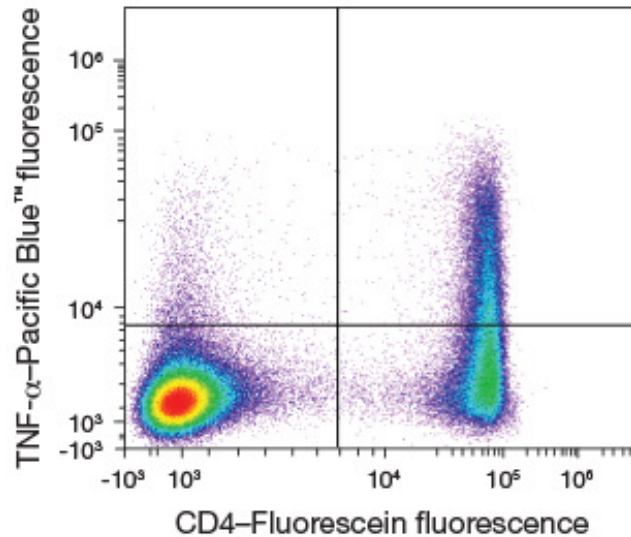
+ Κυτταρομετρία Ροής



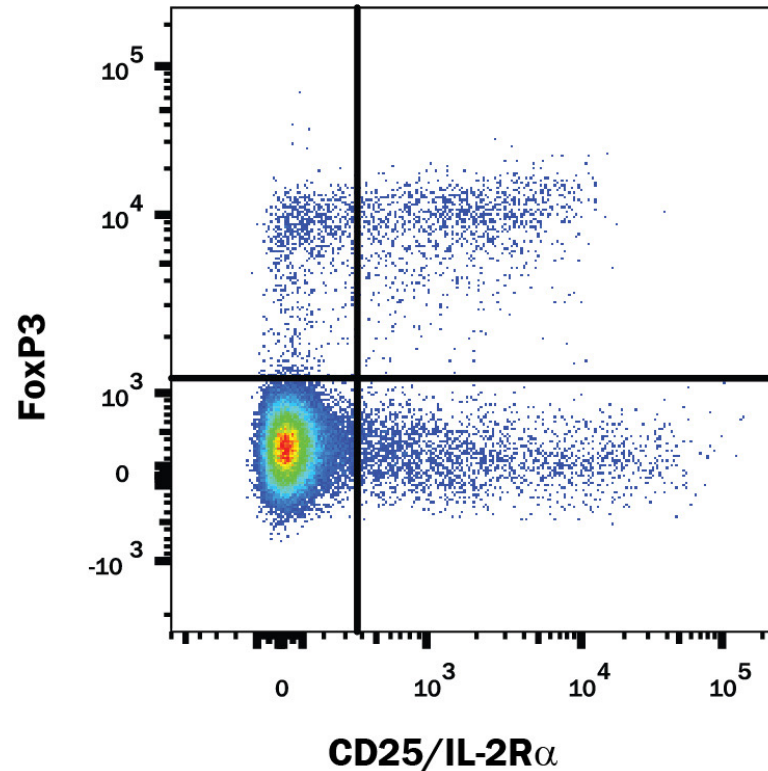
- **CD56 [neural cell adhesion molecule, NCAM]:** γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια νευρώνων, σκελετικών μυών και NK κυττάρων στον άνθρωπο.

+ Κυτταρομετρία Ροής

- ✓ Ενδοκυτταρική χρώση για τις κυτταροκίνες TNF- α και IFN- γ σε CD4⁺ βοηθητικά T λεμφοκύτταρα



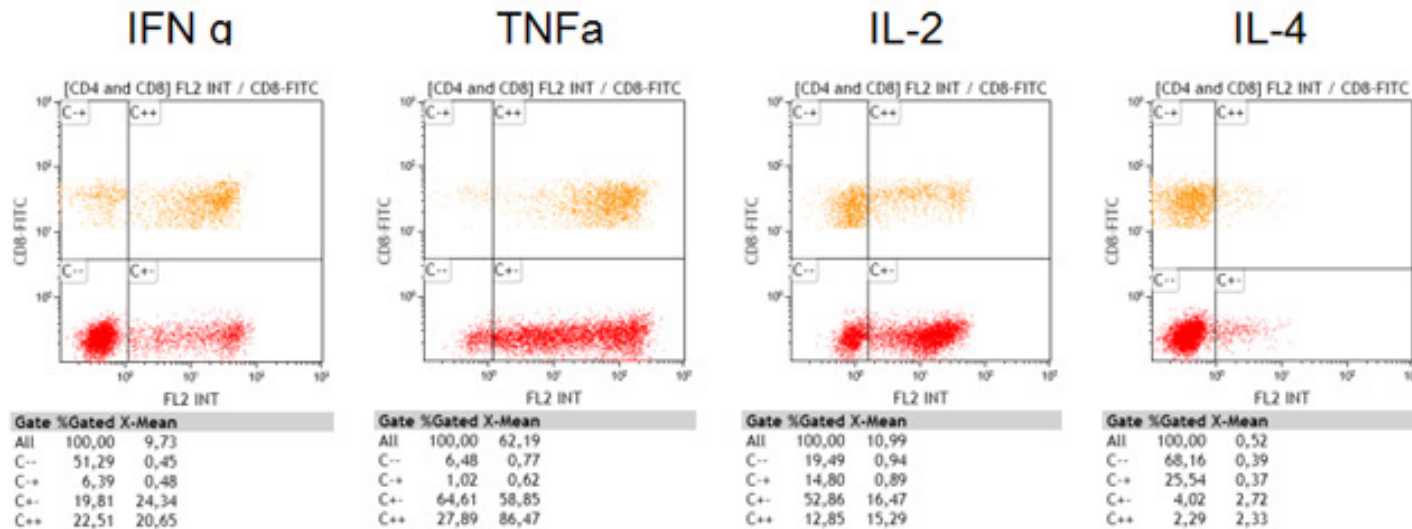
+ Κυτταρομετρία Ροής



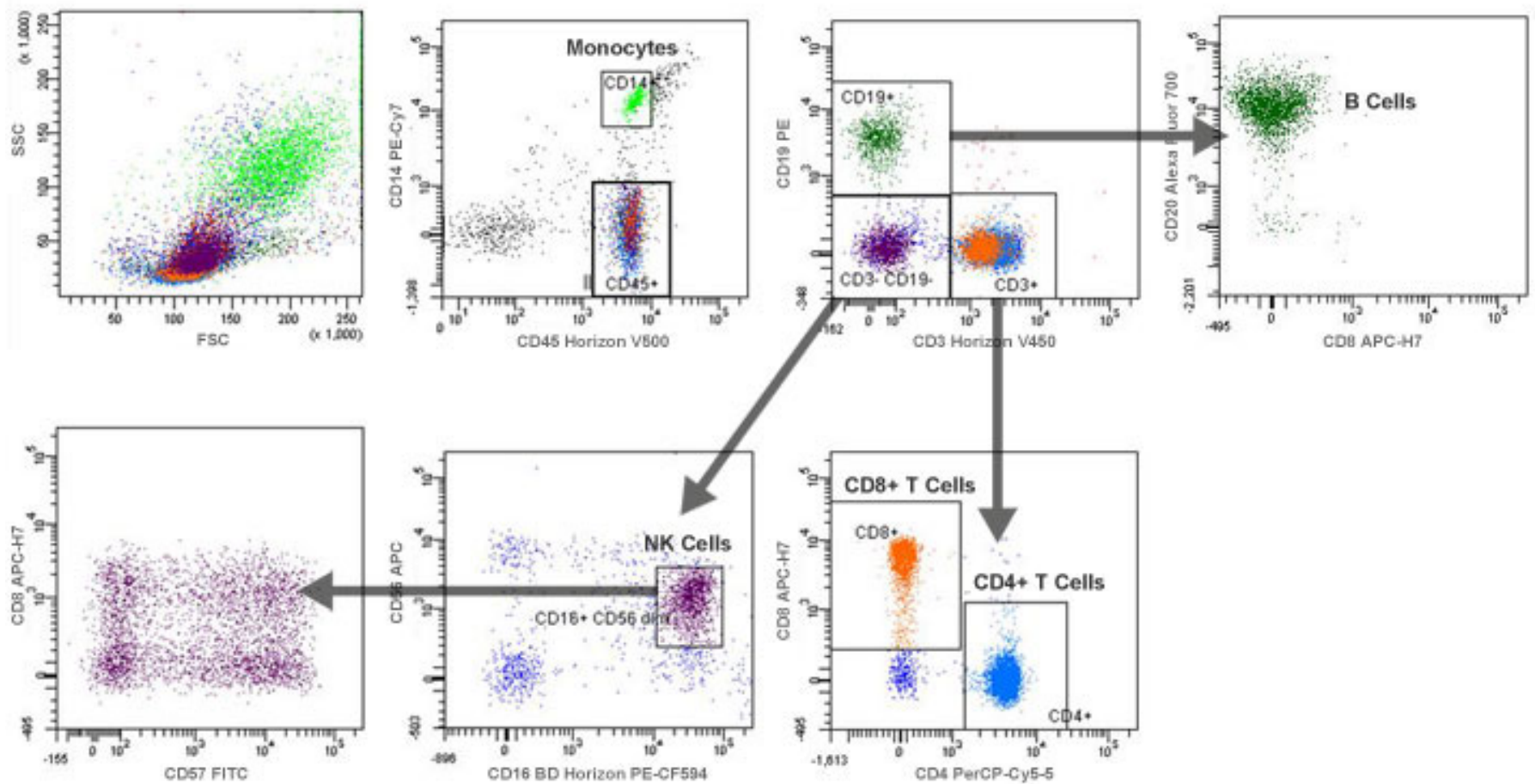
- **FoxP3**: Μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται στα ρυθμιστικά Tregs.
- **CD25/IL2Rα**: Η α αλυσίδα του υποδοχέα της IL-2 που εκφράζεται σε T κύτταρα.

+ Κυτταρομετρία Ροής

- ✓ Ενδοκυτταρική χρώση για τις κυτταροκίνες IFN- α , TNF- α , IL-2 και IL-4 σε CD8⁺ κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα



+ Κυτταρομετρία Ροής



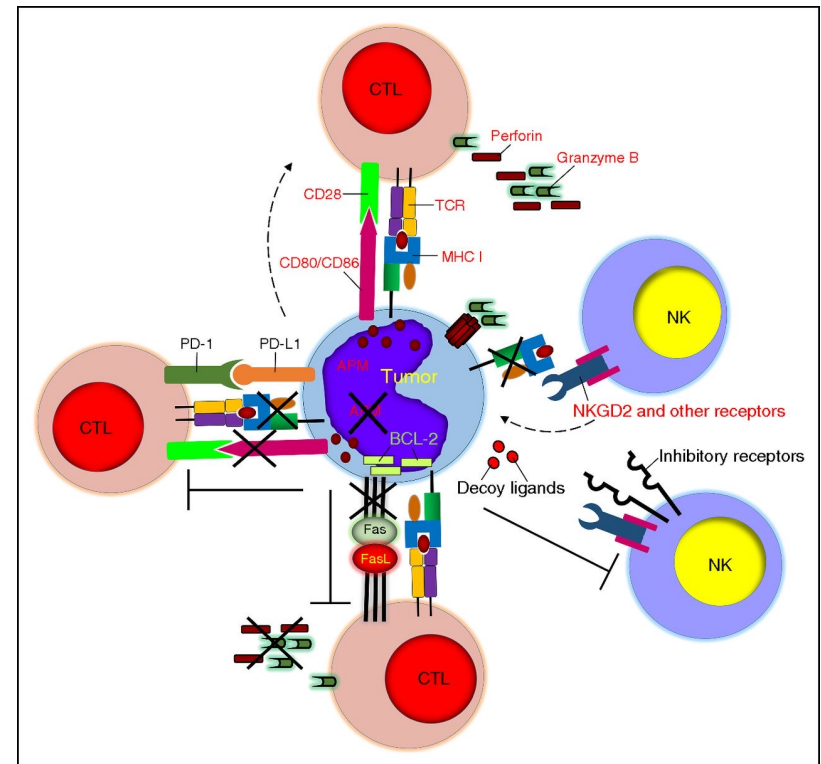
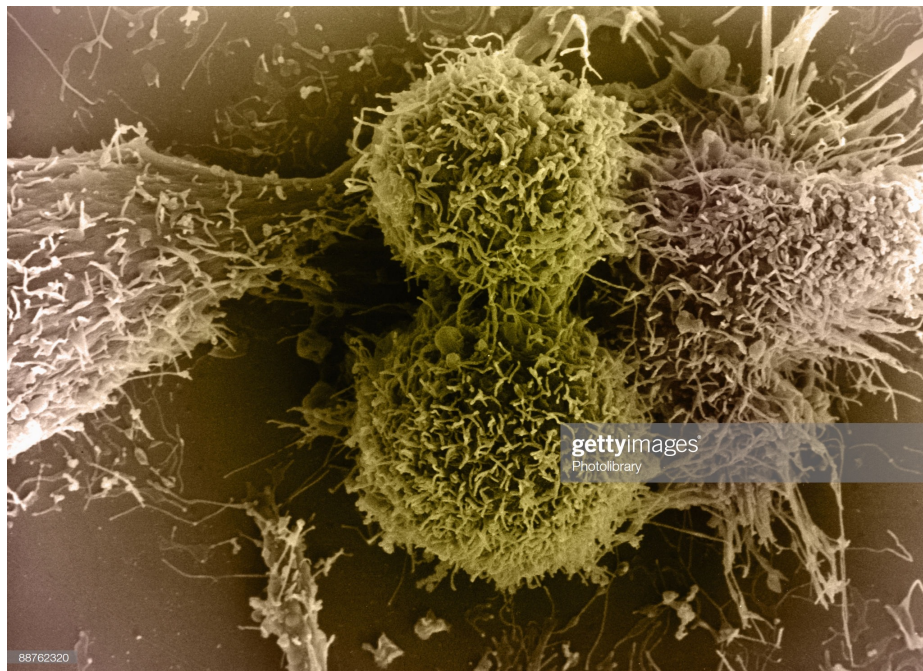


Τέστ κυτταροτοξικότητας

[⁵¹Chromium Release Assay]

+ Τέστ κυτταροτοξικότητας [51 Chromium Release Assay]

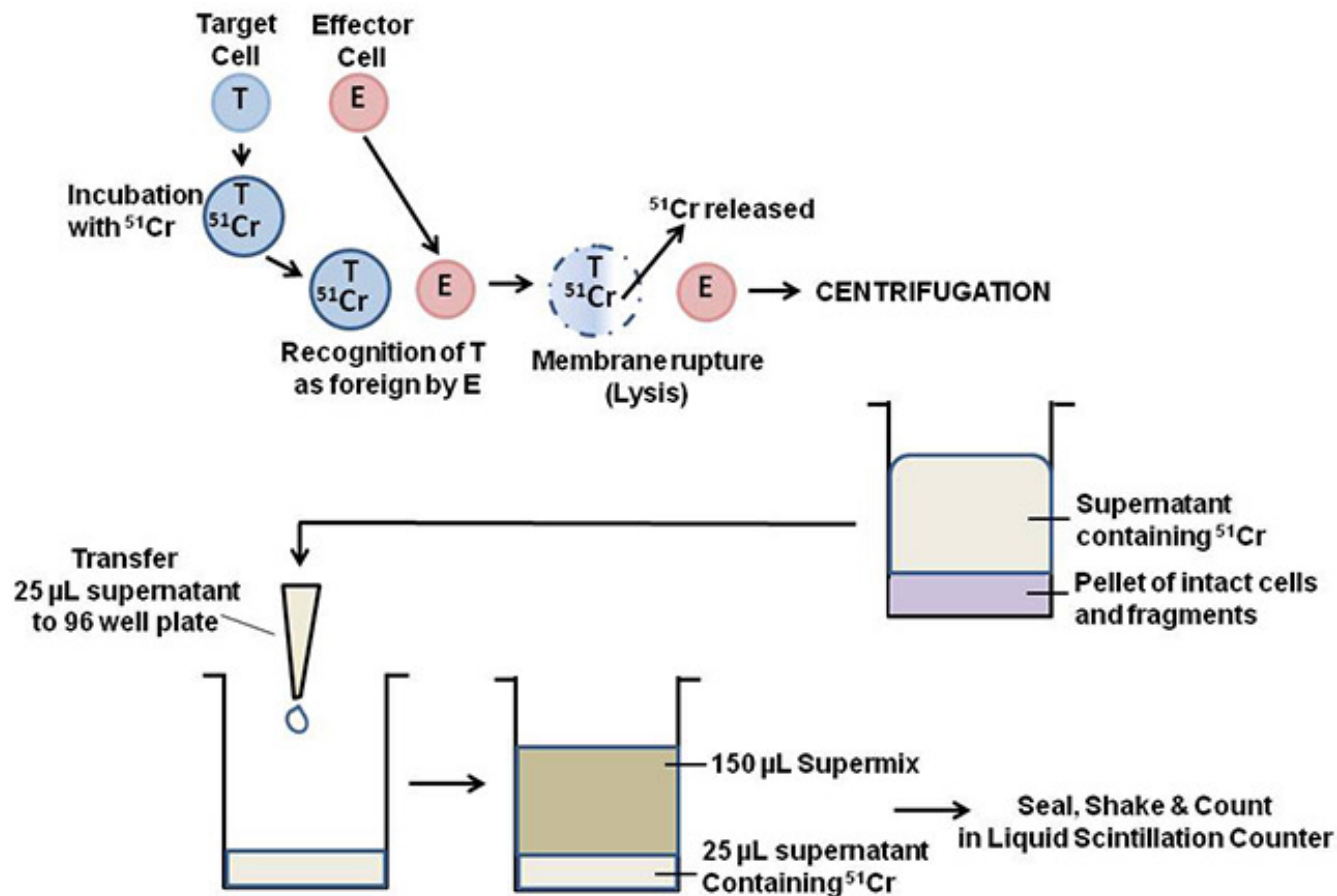
- Με την μέθοδο αυτή μπορεί να μετρηθεί η κυτταροτοξικότητα των CD8⁺ Τ λεμφοκυττάρων [CTLs] και των NK κυττάρων.



+ Τέστ κυτταροτοξικότητας [^{51}Cr Chromium Release Assay]

■ Η διαδικασία χωρίζεται σε 3 κύρια στάδια:

1. Σήμανση των κυττάρων-στόχων με ^{51}Cr και επώαση με τα T ή NK κύτταρα
2. Απελευθέρωση του ^{51}Cr έπειτα από κυτταρόλυση, και
3. Ανίχνευση του ^{51}Cr



+ Τέστ κυτταροτοξικότητας [^{51}Cr Chromium Release Assay]

1. Επώαση των κυττάρων-στόχων [target cells, T] με ^{51}Cr .
2. Επώαση των κυττάρων-στόχων με τα δραστικά κύτταρα [T ή NK κύτταρα, effector cells, E] για 4 ώρες στους 37°C .
3. Εάν τα δραστικά κύτταρα θανατώσουν τα κύτταρα-στόχους, αυτά θα απελευθερώσουν ^{51}Cr στο υπερκείμενο.
4. Το υπερκείμενο συλλέγεται έπειτα από 4 ώρες, και μετράται η απελευθέρωση ^{51}Cr σε gamma counter.



+ Τέστ κυτταροτοξικότητας [$^{51}\text{Chromium}$ Release Assay]

