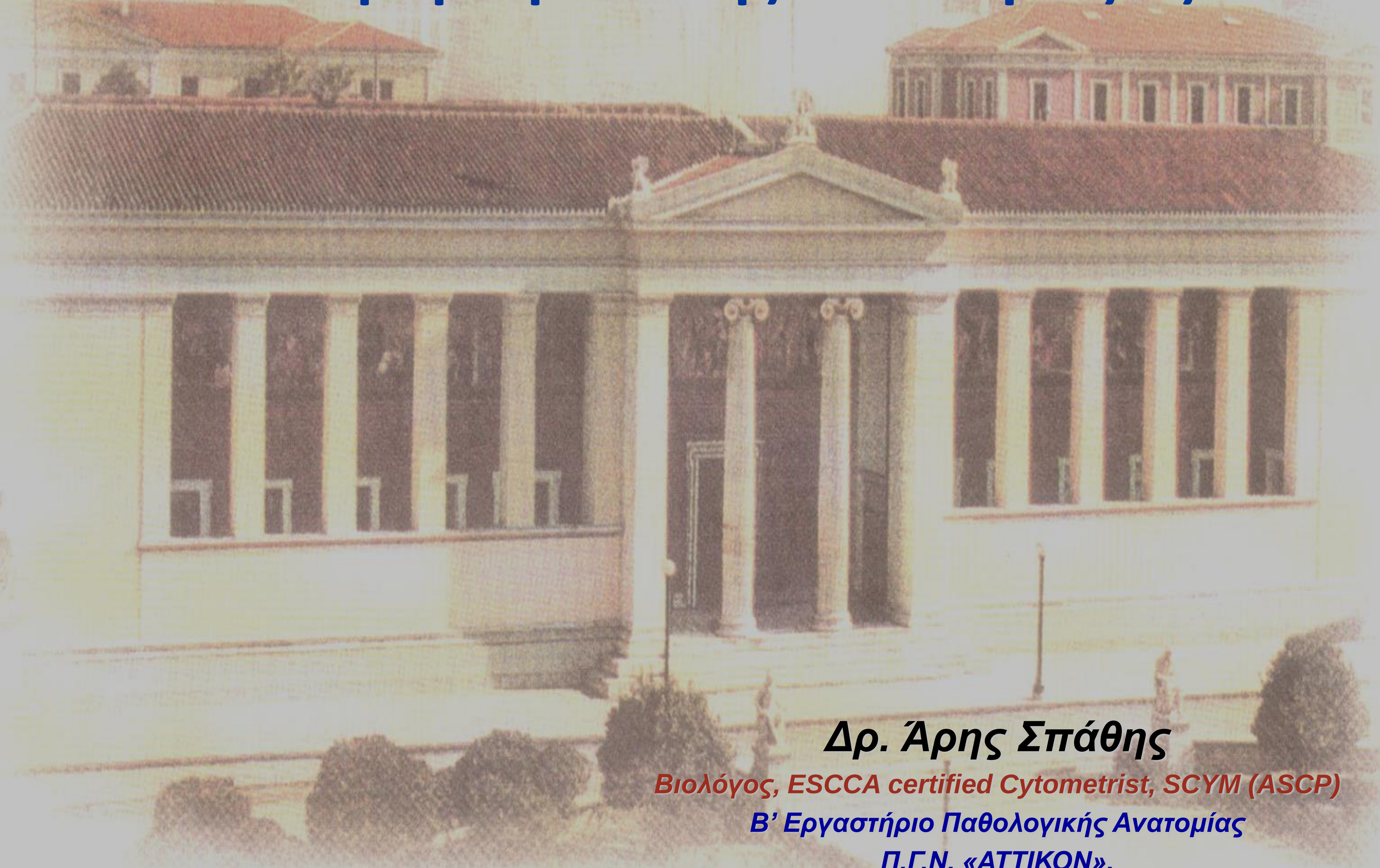
Κυτταρομετρία Ροής και Λοιμώξεις



Δρ. Άρης Σπάθης

Βιολόγος, ESCCA certified Cytometrist, SCYM (ASCP)

Β’ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας

Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ»,

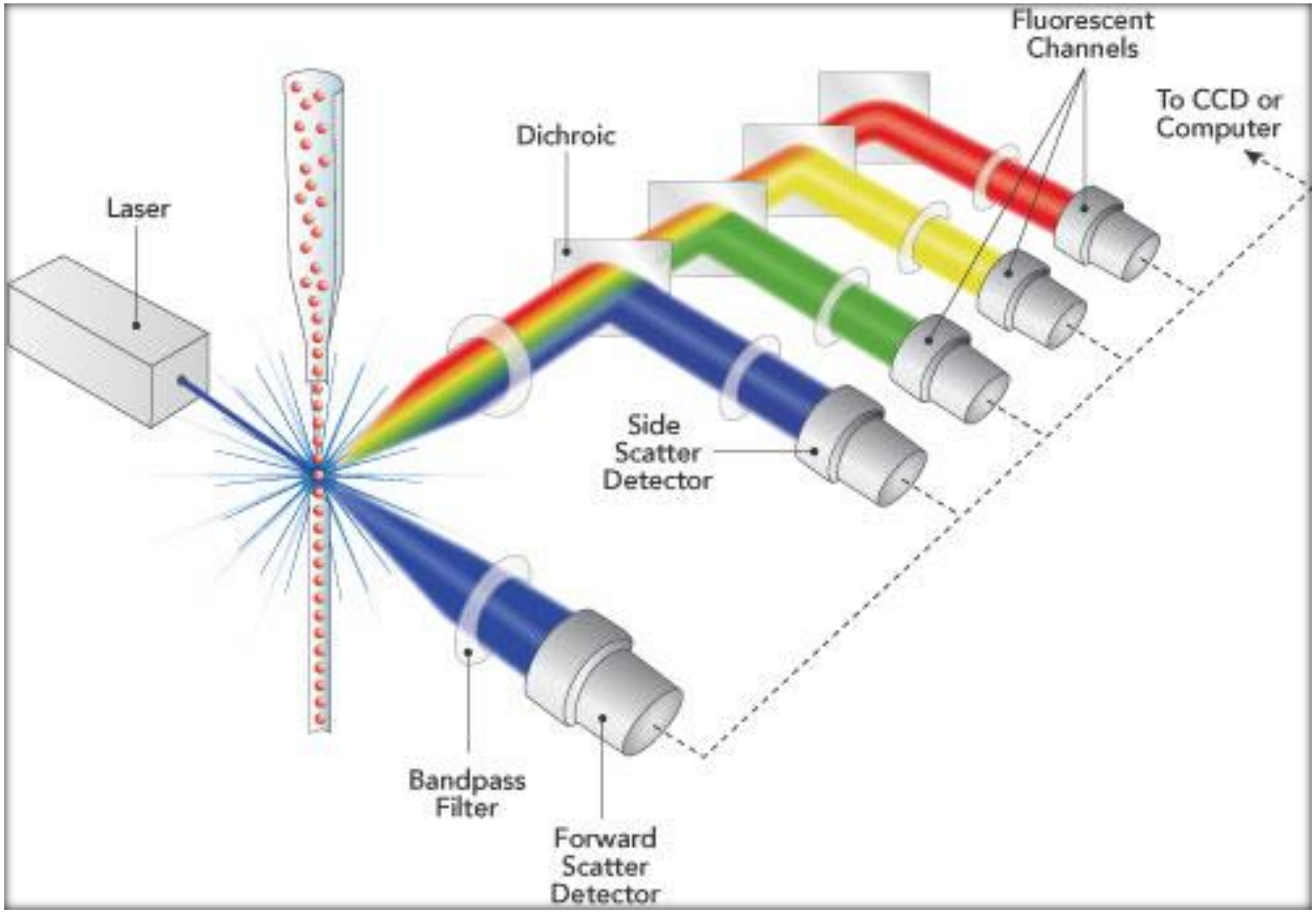
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κυτταρομετρία Ροής

Μια πολυπαραμετρική μέθοδος ανίχνευσης 2-20 διαφορετικών παραμέτρων σε εναιώρημα κυττάρων.

1. Τα κύτταρα σημαίνονται με φθορίζοντα αντισώματα, χρωστικές (pH, DNA, RNA) ή ιχνηθέτες
2. Τα κύτταρα υποχρεούνται να περάσουν από δίοδο τουλάχιστον μίας φωτεινής πηγής (Laser) σε νηματική ροή
3. Το προσπίπτων φως σκεδάζεται (διάθλαση, ανάθλαση, περίθλαση) σε διαφορετικές γωνίες
4. Φθορισμός ορισμένου μήκους κύματος εκπέμπεται από τα φθοριοχρώματα και τις χρωστικές
5. Πολύπλοκο σύστημα οπτικών καθοδηγεί το φως στον κατάλληλο ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστής, PMT)
6. Το φως μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα και μεταφράζεται σε παράμετρο μέσω λογισμικού

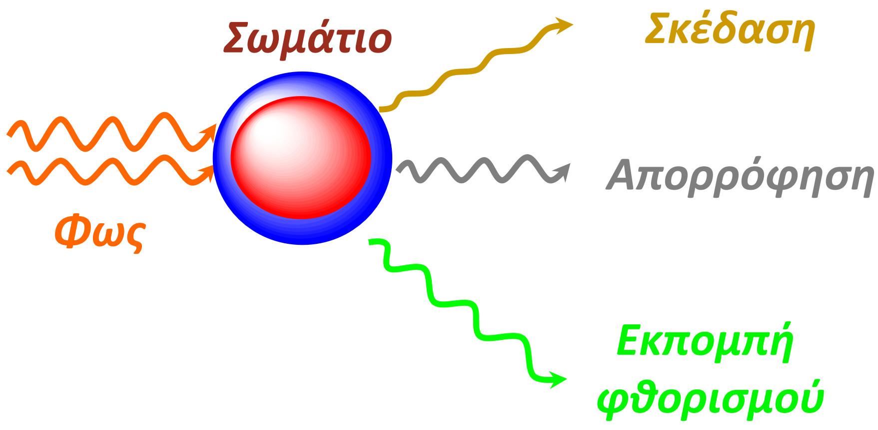
Σχηματικά



Fluorescent Channels
To CCD or Computer
Dichroic
Laser
Side Scatter Detector
Bandpass Filter
Forward Scatter Detector

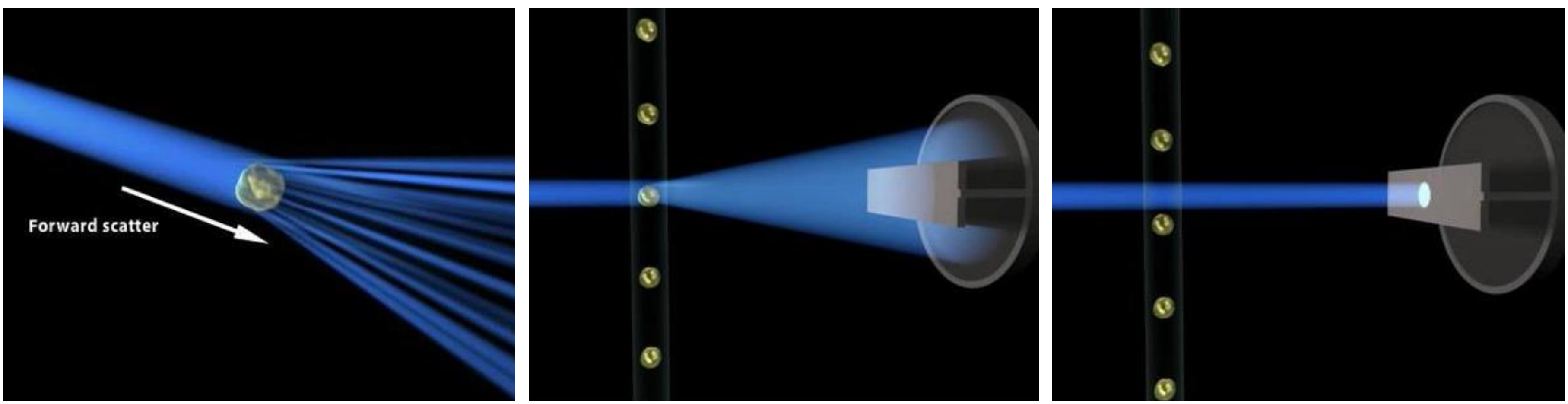
Φως

- Φωτόνιο
  - Σωματίδιο ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας χωρίς μάζα ηρεμίας
  - Ορατό φως 400-750nm
- Όταν το φως προσπίπτει σε άλλο σωματίδιο
  - Έχουμε απορρόφηση, σκέδαση και εκπομπή ακτινοβολίας
  - Σκέδαση περιλαμβάνει περίθλαση, διάθλαση και ανάκλαση



Πρόσθια σκέδαση

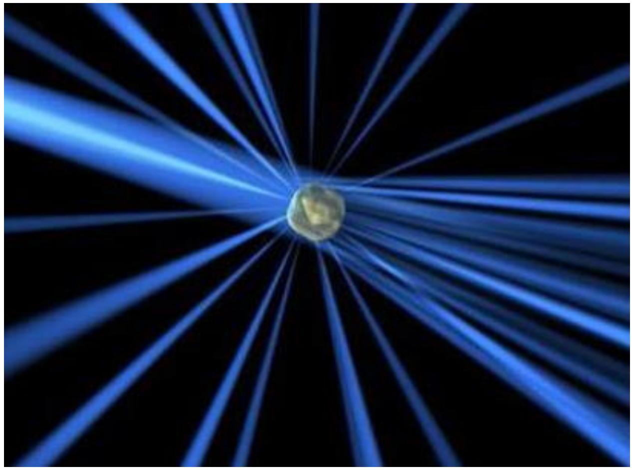
- Forward Scatter, FSC
  - Οφείλεται στην περίθλαση του φωτός. Σε μικρές γωνίες είναι σχετιζόμενη με την έκταση της επιφάνειας (μέγεθος των κυττάρων)
  - Ανιχνεύεται παράλληλα με τον άξονα του προσπίπτοντος φωτός
  - Υπάρχει blocker ώστε να μην προσπίπτει η αρχική ακτίνα

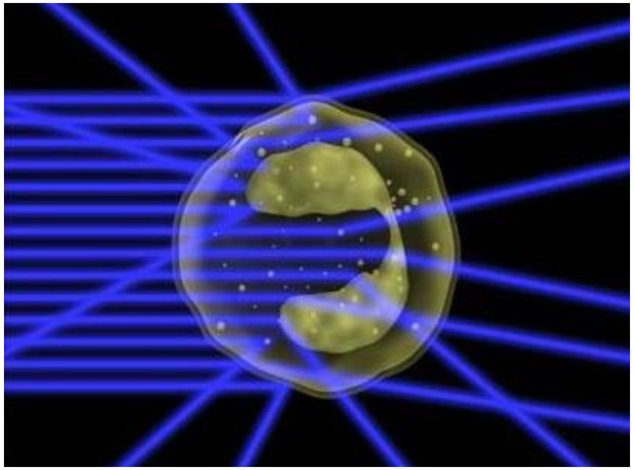


“Intro to flow cytometry”, Video tutorial, © 2010 Life Technologies Corporation. (www.invitrogen.com)

Πλάγια σκέδαση

- Side Scatter, SSC
  - Οφείλεται στην ανάκλαση και διάθλαση του φωτός. Μετριέται, συνήθως, σε ορθή γωνία από τον άξονα του προσπίπτοντος φωτός
  - Σχετίζεται με την πολυπλοκότητα της δομής στην οποία προσπίπτει το φως. Στα κύτταρα σχετίζεται με τη δομή, την κοκκίωση και τη πολυπλοκότητα

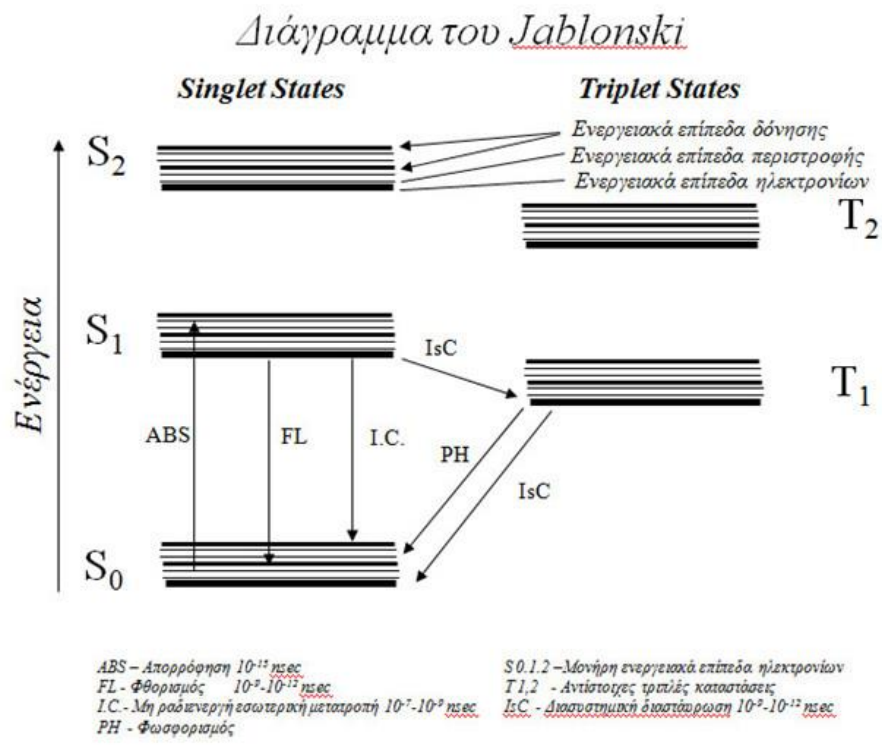




“Intro to flow cytometry”, Video tutorial, © 2010 Life Technologies Corporation. (www.invitrogen.com)

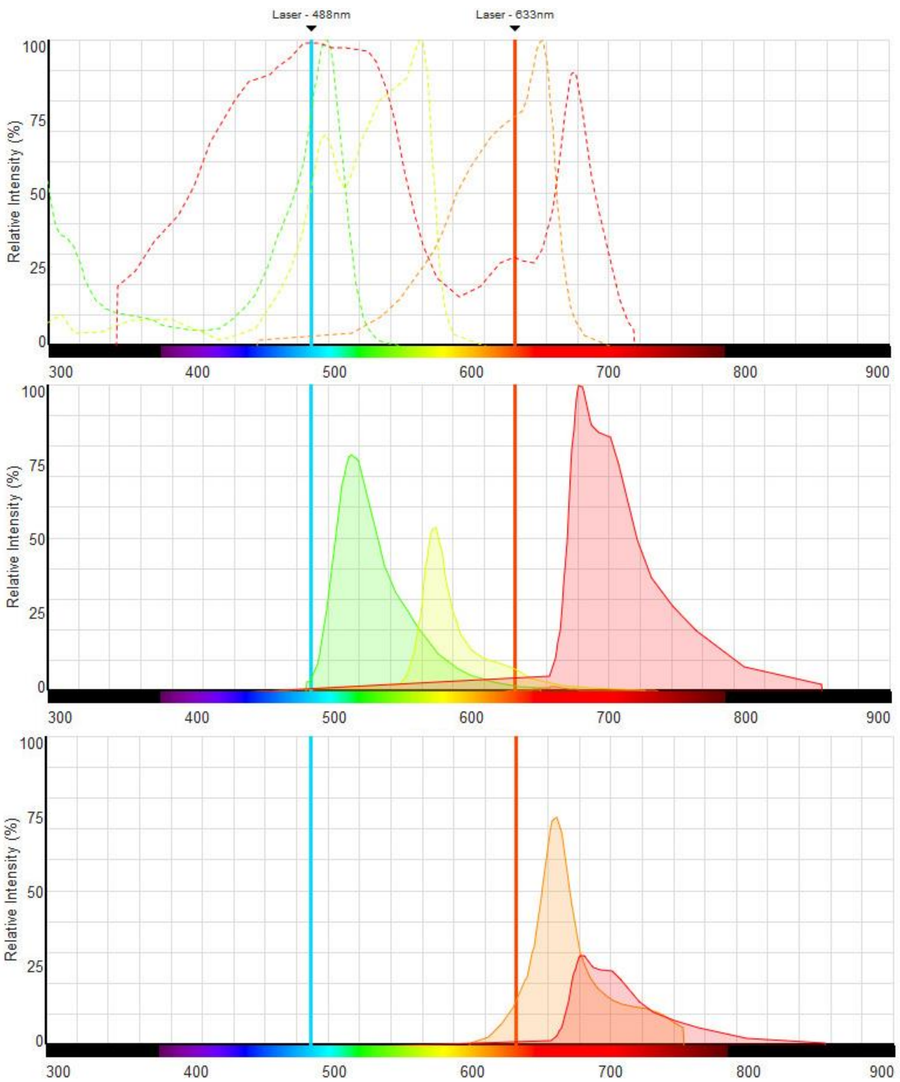
Φθορισμός

- Φυσικό φαινόμενο
  - Παραγωγή φωτονίου κατά την επιστροφή ενός ηλεκτρονίου από διεγερμένη κατάσταση
  - Πάντα μικρότερης ενέργειας = μεγαλύτερου μήκους κύματος (Stroke shift)
  - Ενδογενής (πουρίνες, κ.α.)
  - Εξωγενής (φθοριοχρώματα, φθορίζουσες χρωστικές)
  - Εξασθενεί με το χρόνο (photo-bleaching)



Φθοριοχρώματα

- Ενώσεις με αρωματικούς δακτύλιούς και περίπλοκες δομές
  - Έχουν επιλεχθεί ή κατασκευαστεί με στενά φάσματα απορρόφησης και εκπομπής
  - Δυστυχώς υπάρχει αλληλο-επικάλυψη (spillover)
  - Αύξηση χρωμάτων κάνει την ανάλυση πολύπλοκη
  - Αναγκαία η αντιστάθμιση φθορισμών (compensation)



http://www.lifetechnologies.com/gr/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html

Φθοριοχρώματα

Excitation (nm)	Detector	Exemplary Dyes	Exemplary Dyes	Exemplary Dyes	Exemplary Dyes
Blue 488	Green	FITC	GFP	Alexa Fluor® 488	Syto 9-24
	Orange	PE	YFP	Hydroethidine	
	Orange Red	PE-Texas Red	PI	ECD	EB
	Red I	PE-Cy5	PerCP	PE-Dy647	Acridine Orange
	Red II	PE-Cy5.5	PerCP-Cy5.5		
	Far Red	PE-Cy7			
Red 638	Red I	APC	APC-Cy5	Syto 59-63	Dy647
	Red II	APC-Cy5.5	Cy5.5		
	Far Red	APC-Cy7	APC-H7	Alexa Fluor® 750	Cy7
Violet 407	Blue	Pacific Blue	Alexa Fluor® 405	Monobromobimane	Hoechst 33342
	Green	AmCyan	CFP	Qdot 525	Lucifer Yellow
	Orange	Cascade Yellow	Pacific Orange	Qdot 585	
UV LED 365 / UV Laser 355 375	Blue	DAPI	Hoechst 33342	Alexa Fluor® 350	Cascade Blue
	Green	Qdot 525			
	Orange	Qdot 585	Indo-1 (no Ca++)		
Green 532	Orange	mStrawberry	DsRed	DY590	mOrange
	Red	mCherry	LDS 751	PE-Cy5	
Yellow 561	Orange	PE	Dy590	Philippin	Cy3
	Red	PE-Cy5	PI	LDS 751	
Orange 594	Orange Red	Texas Red	Alexa Fluor® 594		
	Red	APC	mCherry	Cell Tracker Red	
	Far Red	APC-Cy7	mPlum	mRaspberry	mKate

- Ενώσεις:
  - Συζευγμένες με αντισώματα
  - Στοιχειομετρική σύνδεση σε νουκλεϊκά οξέα (DAPI, PI)
  - Υδρόφιλες (μη διαπερατά σε ζώντα κύτταρα) ή υδρόφοβες (διαπερατά)
  - Έναντι ιόντων ή δομών (π.χ. μιτο-χόνδρια)

Αντισώματα

- Τετραμερής πολυπεπτιδική αλυσίδα (ανοσοσφαιρίνη):
  - 2 βαριές (450-550 αμινοξέα)
  - 2 ελαφριές (211-230 αμινοξέα)
- Τάξη αντισώματος καθορίζεται από τις IgH αλύσους (Ισότυπος)
- Ειδικότητα αντισώματος από το συνδυασμό των βαρέων με τις ελαφρές αλύσους (κ, λ)

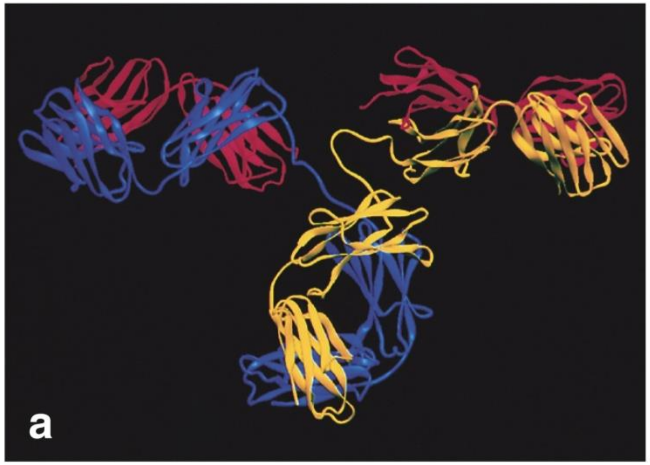


Figure 3-1 part 1 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

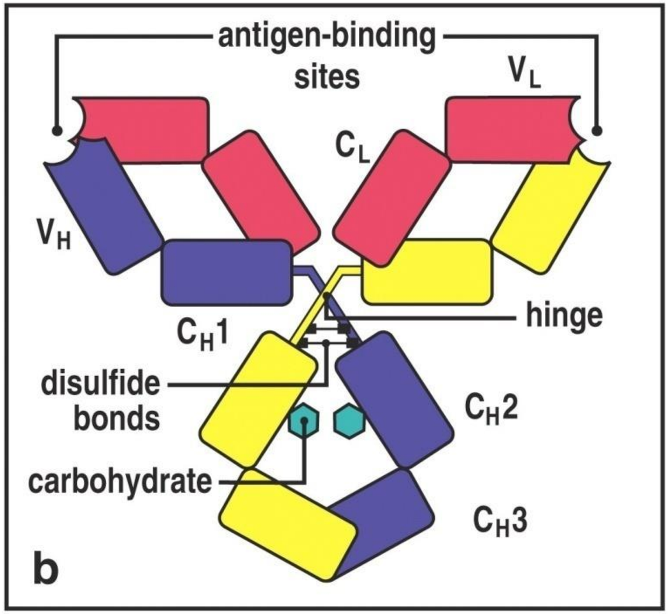
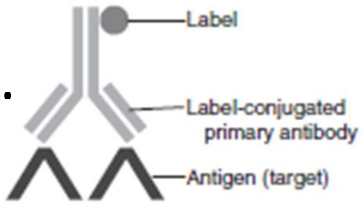


Figure 3-1 part 2 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Janeway C., "Immunobiology", 4th ed., Garland Science, 2011
Dabbs D.J., "Diagnostic Immunohistochemistry" 3rd Ed., Elsevier 2010

Πρωτογενές αντίσωμα

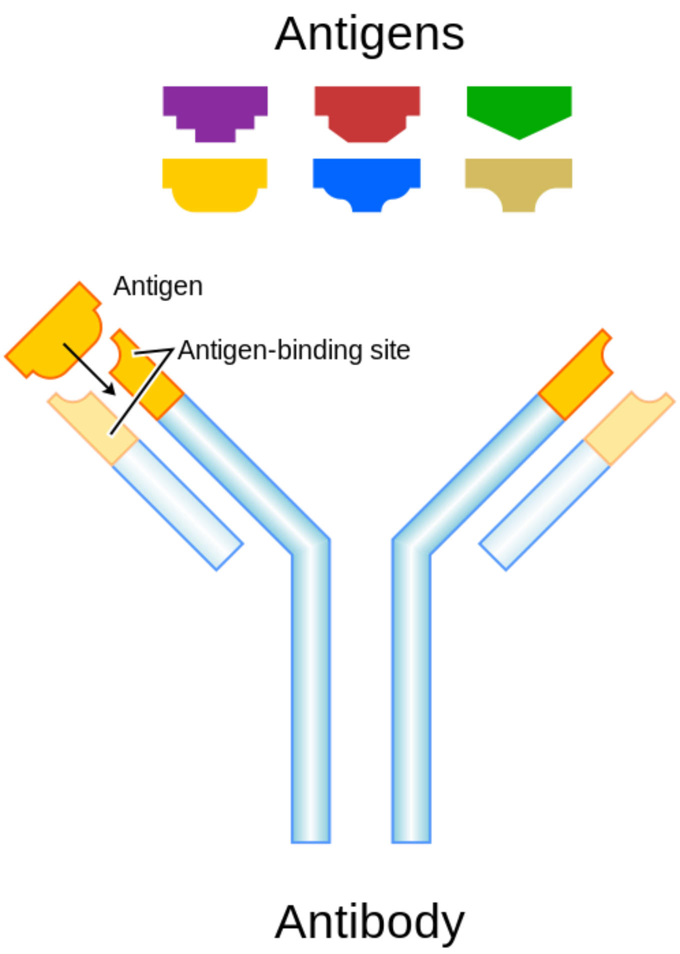
- Το δείγμα επωάζεται με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος. Το διάλυμα περιέχει:
  - Κατάλληλη ποσότητα αντισώματος (τάξη μεγέθους 0.5-500μg)
  - Ρυθμιστικό διάλυμα (ισότονο, ουδέτερο)
  - Ήπιο απορρυπαντικό και πρωτεΐνες (μείωση μη-ειδικής δέσμευσης)
  - Αντιμικροβιακούς παράγοντες (Sodium azide, Proclin)
- Ο χρόνος επώασης εξαρτάται κυρίως από:
  - Τον τίτλο του αντισώματος
  - Τη θερμοκρασίας επώασης (4^o C 12-18h, RT 15-60min)
- Υπάρχει η προτεινόμενη αραίωση από τον κατασκευαστή
  - για εύρος κυττάρων (0,5-2 10^6 συνήθως σε 100μL). Συχνά απαραίτητος ο καθορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης (titration)
- Label στην κυτταρομετρία συνήθως φθοριόχρωμα.



Renshaw S, "Immunohistochemistry: Methods Express", Scion Publishing Ltd, Bloxham, UK, 2010

Αντιγόνο

- Αντιγόνο είναι οποιαδήποτε ένωση μπορεί να αναγνωριστεί ειδικά από τα Β ή Τ λεμφοκύτταρα.
- Προκαλεί παραγωγή αντισώματος από τα Β λεμφοκύτταρα.
- Το αντίσωμα είναι ειδικό έναντι <u>περιορισμένου</u> τμήματος του αντιγόνου 7-20 αμινοξέων (επίτοπος) .



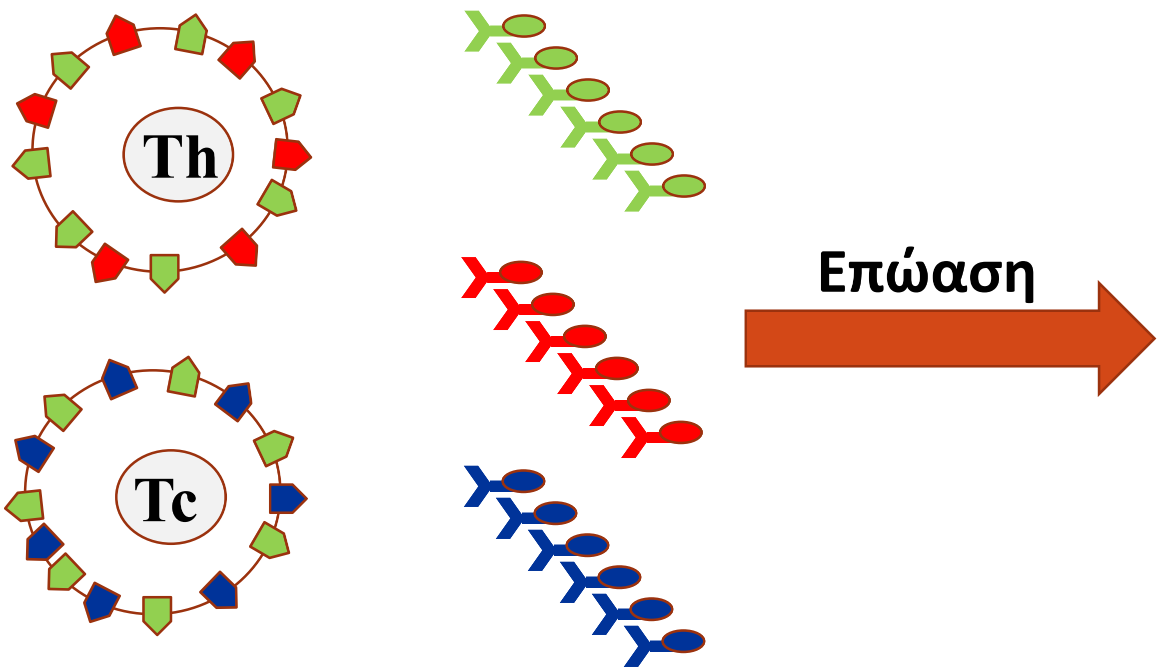
Cluster of Differentiation (CDs)

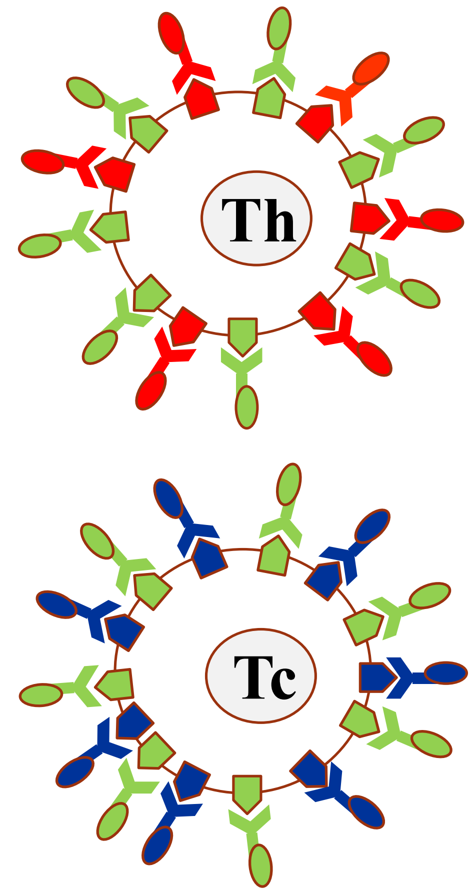
Είναι επιφανειακά μόρια που εκφράζονται από λευκοκύτταρα (και άλλα κύτταρα) που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα

- Μέχρι σήμερα έχουν αντιστοιχηθεί 371 CDs
- Η ανάθεση ενός CD αφορά τόσο τα σύνολο των αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το μόρια διαφοροποίησης όσο και το ίδιο το μόριο
- Το “w” (workshop, π.χ. CDw12) αφορά προσωρινές αναθέσεις
- Κεφαλαία μετά τον αριθμό (π.χ. CD45RA, CD45RO) αφορούν splice variants
- Μικρά γράμματα υποδηλώνουν:
  - Μόρια με κοινές αλύσους (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d που όλα περιέχουν b2mg)
  - Μόρια της ίδιας οικογένειας (CD66a, … , CD66f)
  - Μόρια με τροποποιήσεις (CD15s, sialytated)

Engel et al, (2015), “CD Nomenclature 2015 Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology”, J Immunol, doi: 10.4049/jimmunol.1502033

Παράδειγμα



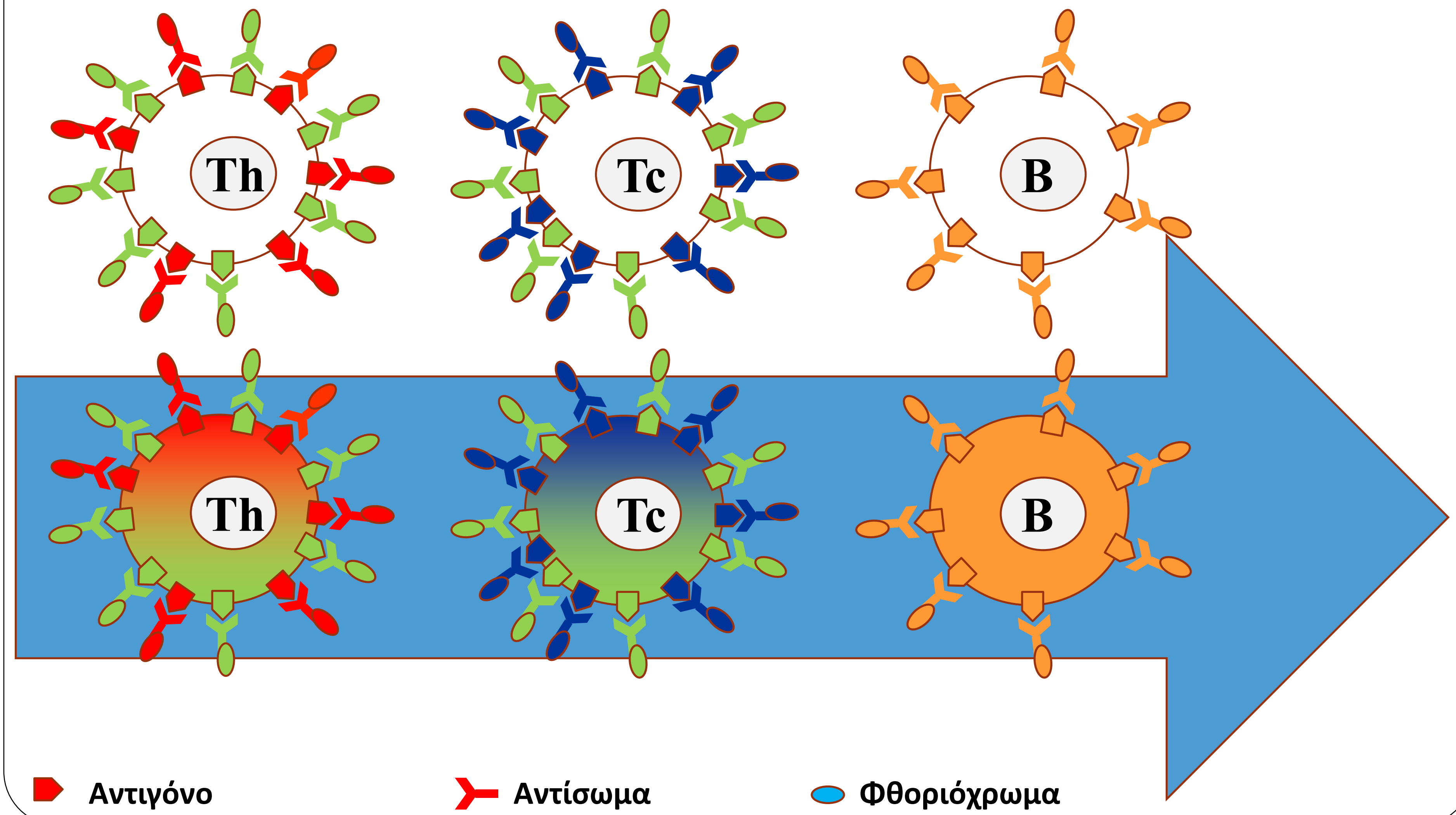


Τα Τ λεμφοκύτταρα π.χ.:

- Εκφράζουν ειδικά το CD3 (≈120.000 αντίγραφα/κύτταρο)
- Τα βοηθητικά (T helpers) εκφράζουν CD4 (≈100.000 αντίγραφα/κύτταρο)
- Τα κυτταροτοξικά (T cytotoxic) εκφράζουν CD8 (≈90.000 αντίγραφα/κύτταρο)

Αντιγόνο **Αντίσωμα** **Φθοριόχρωμα**

Παράδειγμα



Κύρια μέρη Κυτταρομέτρου

Πολλά εμπορικά διαθέσιμα συστήματα. Βασικά κοινά μέρη:

1. Fluidics: Τα μέρη που αφορούν την είσοδο, μεταφορά του δείγματος στο σημείο ανάλυσης (interrogation site) και έξοδο του δείγματος από το όργανο. Περιλαμβάνουν τις αντλίες πίεσης, σωληνάρια μεταφοράς του δείγματος, το υγρό περιρροής
2. Optics: Τα μέρη που αφορούν την φωτεινή πηγή, τη μεταφορά στο σημείο ανάλυσης και την μεταφορά του φωτός στους φωτοπολλαπλασιαστές
3. Electronics: Τα μέρη που μετατρέπουν το μετρούμενο φως σε ηλεκτρικό παλμό συγκεκριμένης έντασης (καναλιού)
4. Interpretation: Αναγνώριση παραμέτρων, σύνθεση δεδομένων και οπτική παρουσίαση μέσω λογισμικού

Fluidics

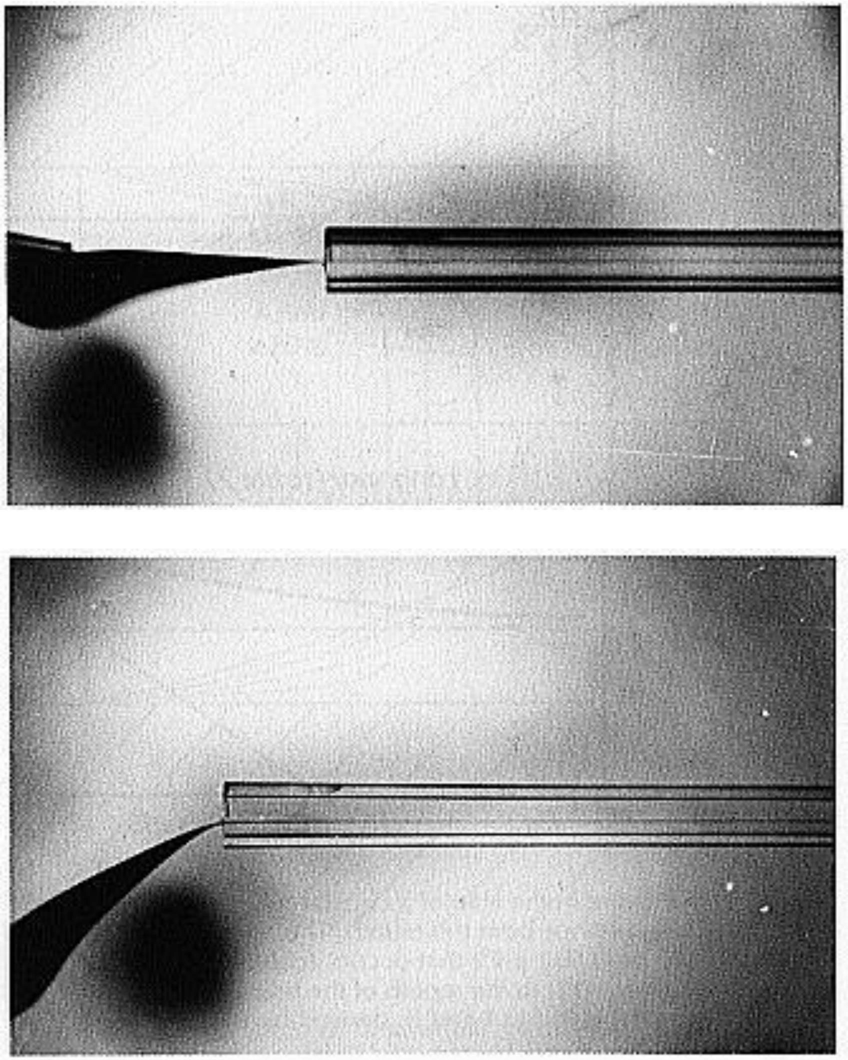
Το εναιώρημα των κυττάρων:

1. Βρίσκεται συνήθως υπό πίεση. Μια αντλία ή σύριγγα λαμβάνει καθορισμένη ποσότητα από το εναιώρημα και τη διοχετεύει με καθορισμένο ρυθμό ροής και πίεσης. Ο ρυθμός καθορίζεται από το χρήστη ανάλογα με την εφαρμογή
2. Δεύτερη αντλία διοχετεύει με καθορισμένο ρυθμό ροής και πίεσης το υγρό περιρροής (PBS ή ddH_2O). Ο όγκος του υγρού περιρροής είναι 10-10.000 φορές μεγαλύτερος, ανάλογα με την εφαρμογή
3. Τα δύο υγρά ενώνονται στον θάλαμο ροής με το δείγμα να βρίσκεται στο κέντρο της ροής <u>χωρίς να αναμειγνύονται μεταξύ τους </u>(νηματική ροή)
4. Το αναλυμένο μείγμα είτε καταλήγει στα απόβλητα είτε διαχωρίζεται (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Υδροδυναμική εστίαση

Η μείωση του όγκου ενός υγρού με εστίαση του κατά μήκος ενός άξονα

- Επιτυγχάνεται από τη διαφορά πίεσης μεταξύ δείγματος – υγρού περιρροής
- Επιτρέπει τη νηματική ροή του δείγματος
- Εξαρτάται από το σημείο εισόδου

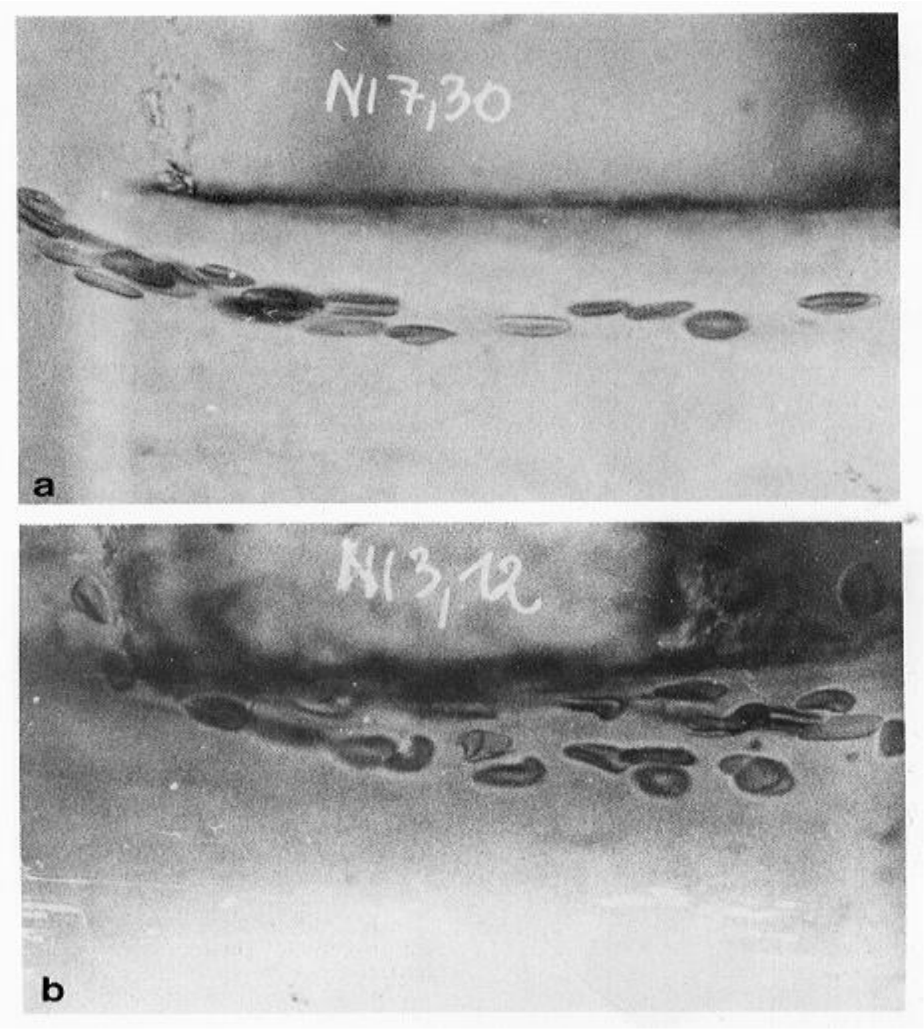


V. Kachel, et al “Properties of Flow Cytometry Instruments”, in Melamed, et al, “Flow Cytometry & Sorting”, 1990, Wiley-Liss, 2nd Ed.

Νηματική ροή κυττάρων

Όταν υπάρχει νηματική ροή

- Τα κύτταρα κινούνται κατά μήκος του μεγαλύτερου άξονα τους
- Προκαλείται μικρή παραμόρφωση τους με επιμήκυνση τους
- Αύξηση της ταχύτητας ή άλλοι λόγοι που διαταράσσουν τη νηματική ροή προκαλούν στροβιλισμό στην κίνηση των κυττάρων



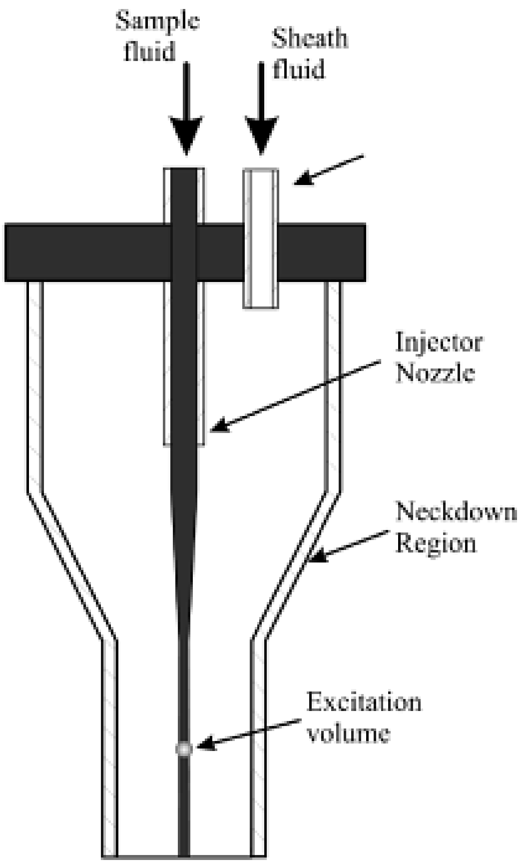
V. Kachel, et al “Properties of Flow Cytometry Instruments”, in Melamed, et al, “Flow Cytometry & Sorting”, 1990, Wiley-Liss, 2nd Ed.

Θάλαμος ροής (Flow Chamber)

Αποτελεί την καρδία του κυτταρο-μέτρου

- Υδροδυναμική εστίαση των κυττάρων
- Συνήθως σημείο προσπίπτουσας φωτεινής πηγής και σκέδασης
- Ανάλογα με την εφαρμογή περνούν 100-10.000 κύτταρα / sec
- Κόστος > 1.000 €
- 1ος νόμος της Κυτταρομετρίας (Shapiro) :

"A 51 μm particle CLOGS a 51 μm orifice!"



D. Kin et al. , "Progress in Capillary Flow Cytometry", in Linger et al., "The Microflow Cytometer", 2010 Pan Stanford Publishing

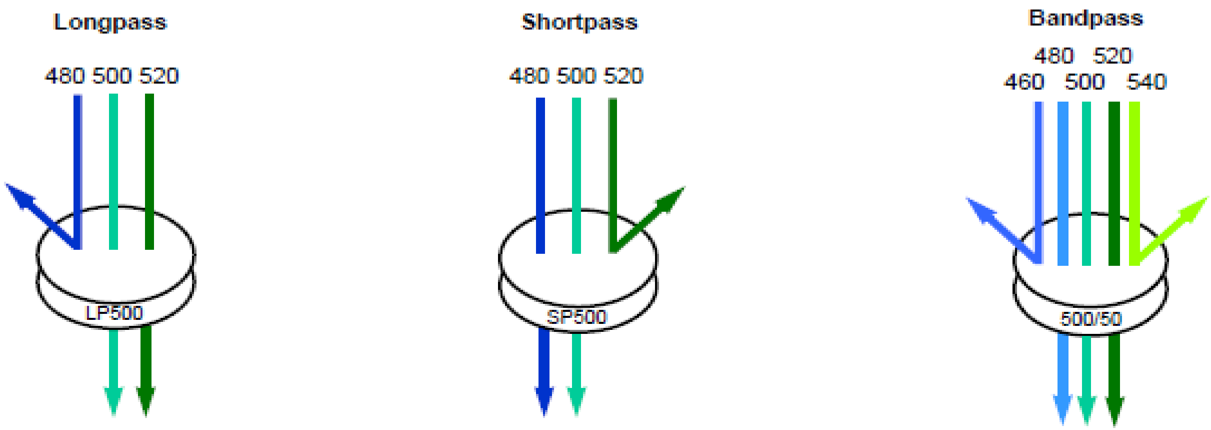
Optics

- Φωτεινές πηγές πολωμένου φωτός
  - Συνηθέστερα Laser αερίων (Arg / 488nm, He-Ne / 633nm, Kr / 407nm). Σπανιότερα λάμπες υδραργύρου (Hg) ή LED
- Φακούς συλλογής φωτός
  - Απλοί ή καταδυτικοί που συλλέγουν το φως μετά το σημείο ανάκρισης
- Φίλτρα, διχρωικοί καθρέπτες
  - Φίλτρα από γυαλί, χαλαζία (quartz) ή πυρίτιο (silica). Κατευθύνουν το συλλεγμένο φως στον κατάλληλο ανιχνευτή
- Φωτοανιχνευτές
  - Μετατρέπουν προσπίπτοντα φωτόνια σε ηλεκτρικό ρεύμα (παλμός)
  - Φωτοδιόδοι (Photodiode), φωτοπολλαπλασιαστές (PMT) και CCD κάμερες

Φίλτρα

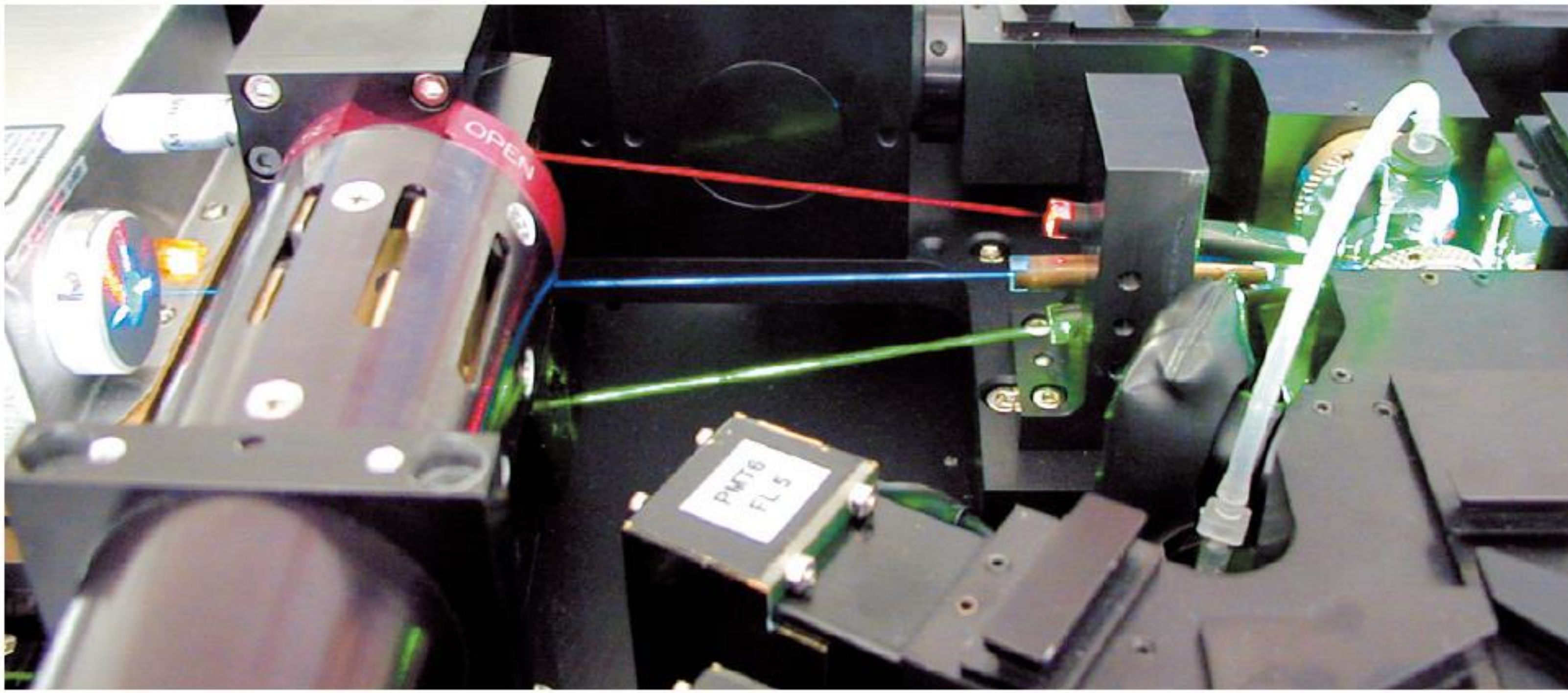
Απορρόφησης, ουδέτερα και παρεμβολής (κυρίως)

- Επιτρέπουν να περάσει φως με μήκος κύματος μεγαλύτερου (LP), μικρότερου (SP) ή ορισμένου (BP)
- Σε γωνία 90^o λειτουργούν ως φίλτρα. Σε γωνία 45^o ως διχρωικοί καθρέπτες
- Περιορισμός στον αριθμό τους καθώς υπάρχουν απώλειες σε κάθε φίλτρο



Εστίαση των Laser

Lasers **Laser focus point** **Interrogation point**

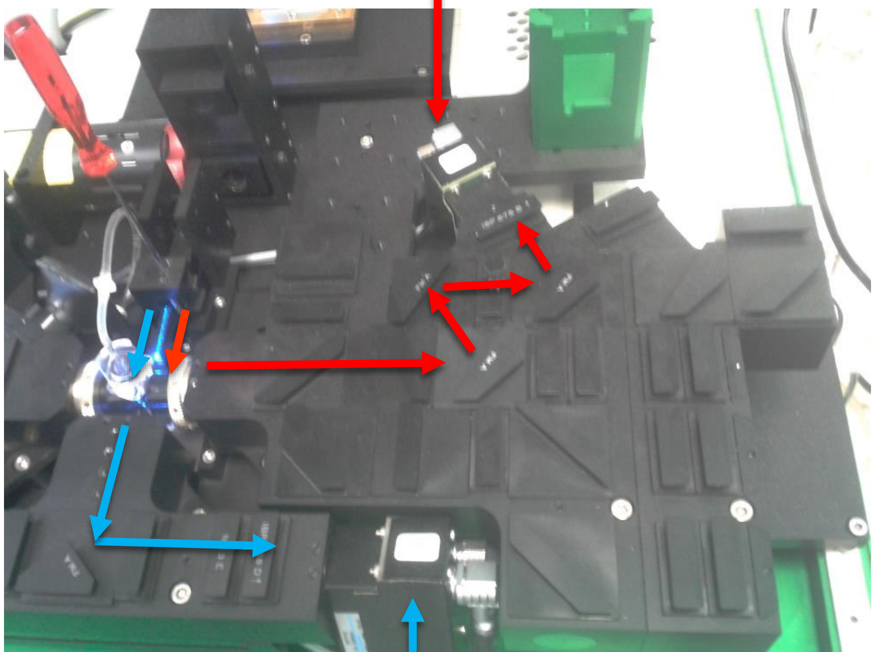


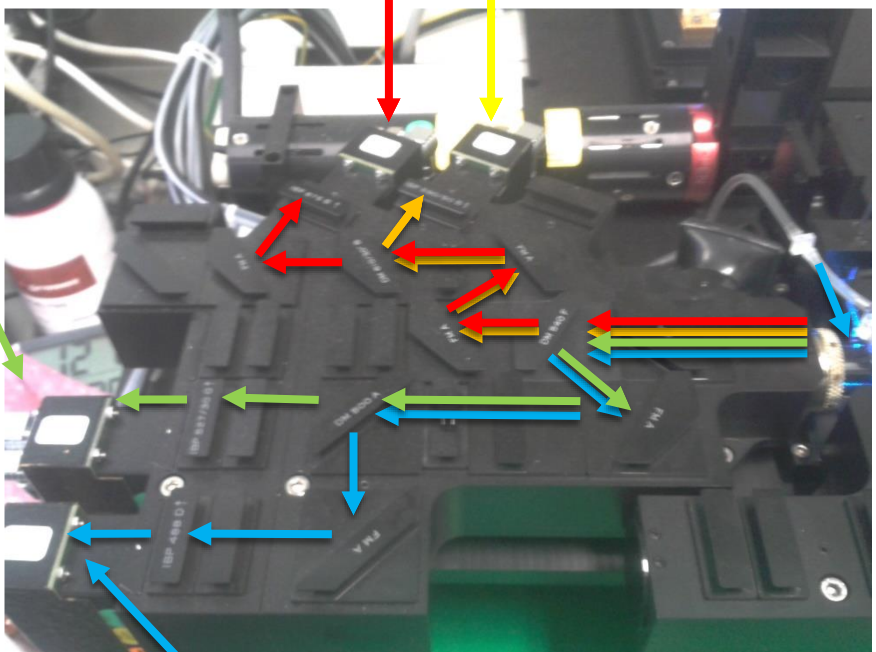
Τα laser εστιάζονται σε συγκεκριμένο σημείο της ροής ώστε:

- να είναι ορισμένος ο χρόνος που διανύει μεταξύ κάθε laser το κύτταρο και να μπορούν να μετρηθούν οι παράμετροι φθορισμού

2 Laser – 6 παράμετροι

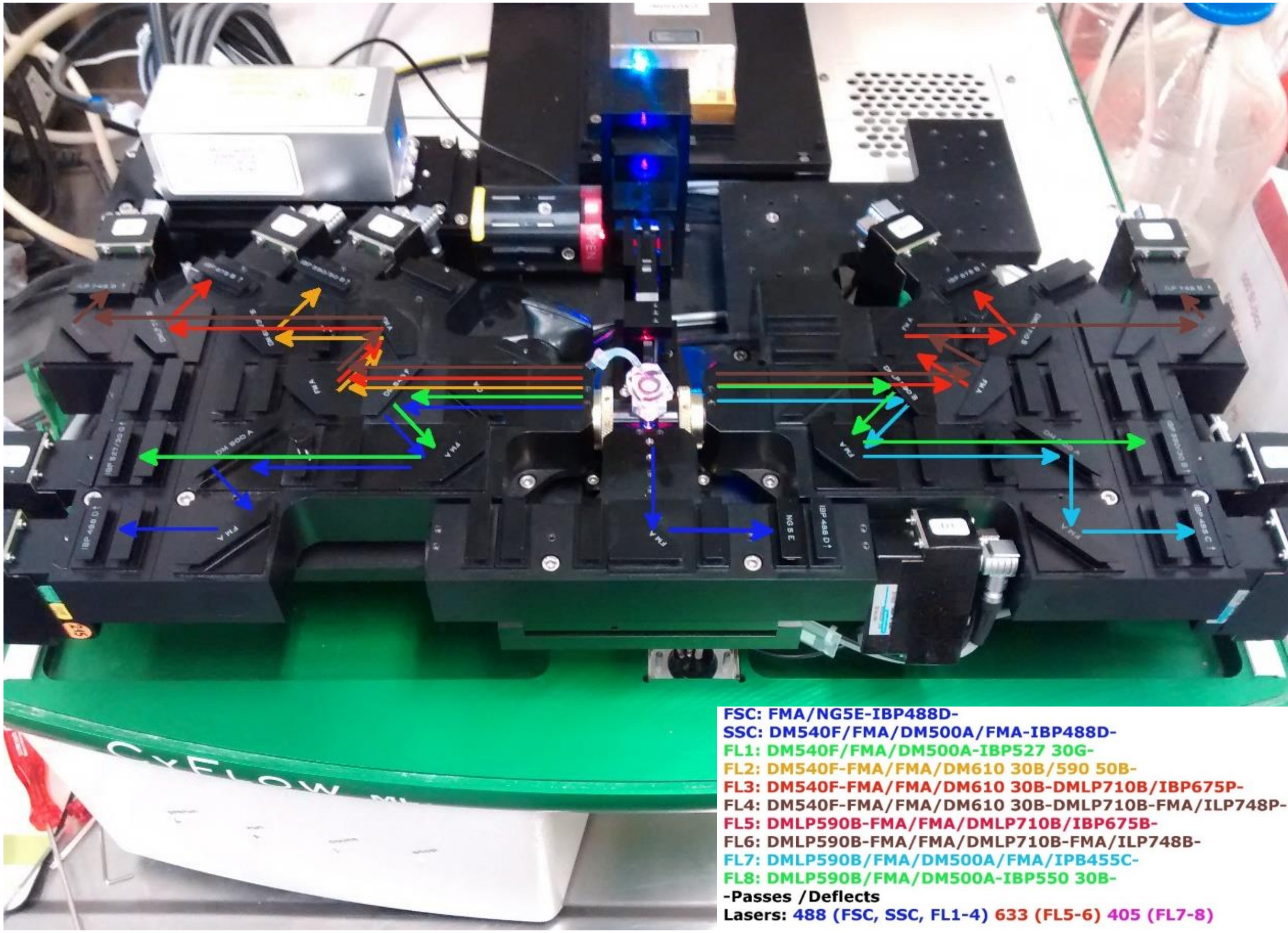
Red laser FL detector **Blue Laser FL detectors**



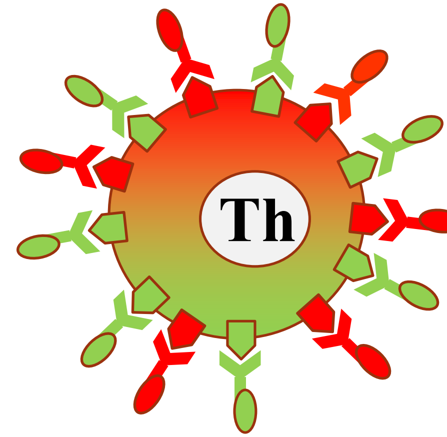


FSC detector **SSC detector**

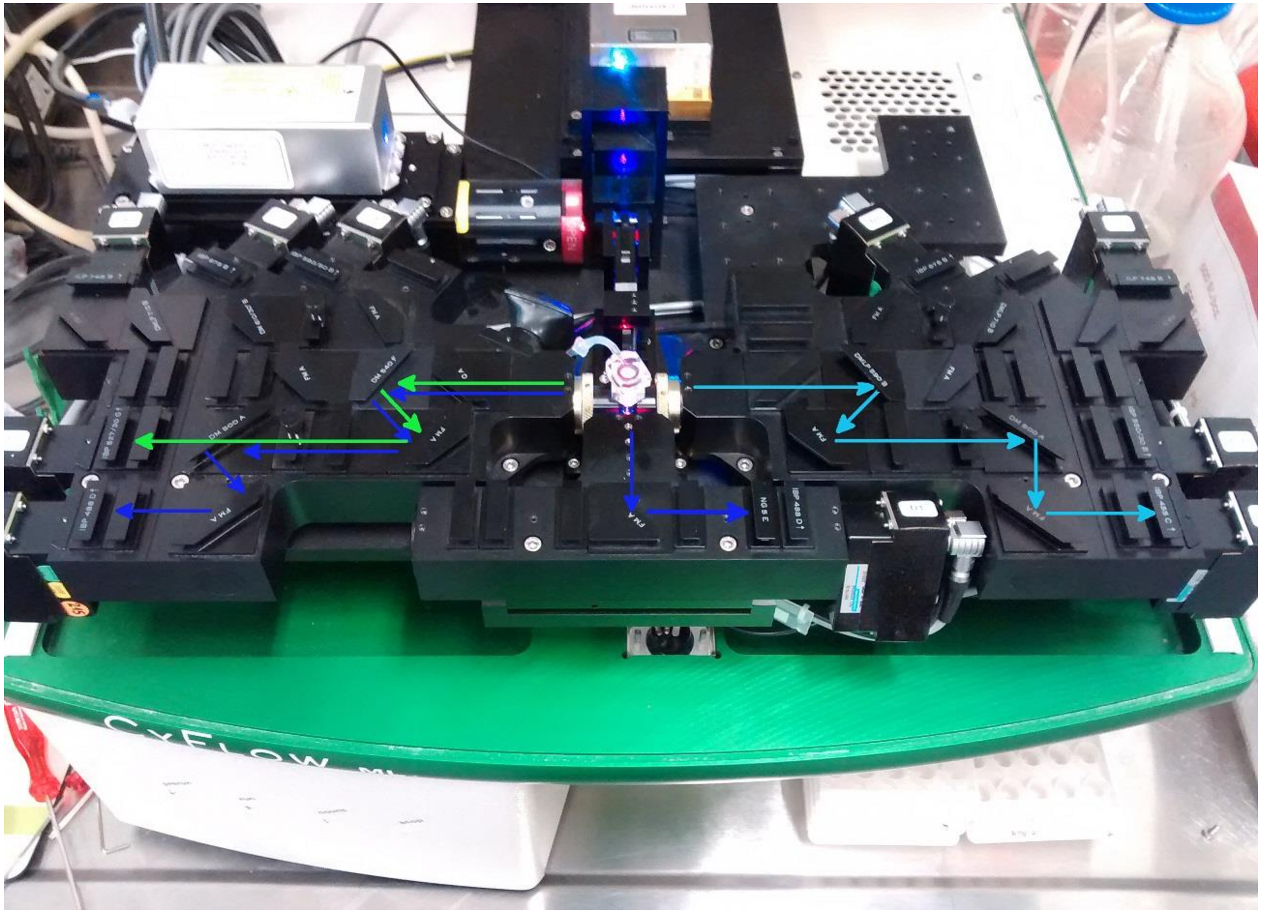
3 Laser – 10 Παράμετροι

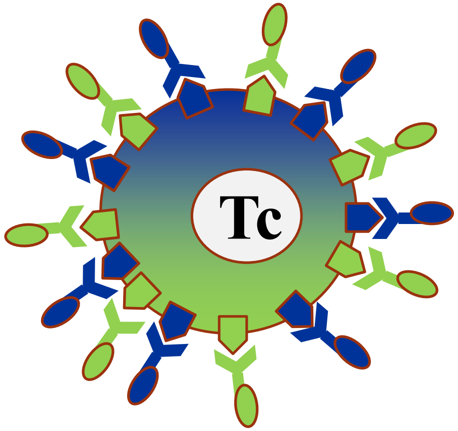


Παράδειγμα

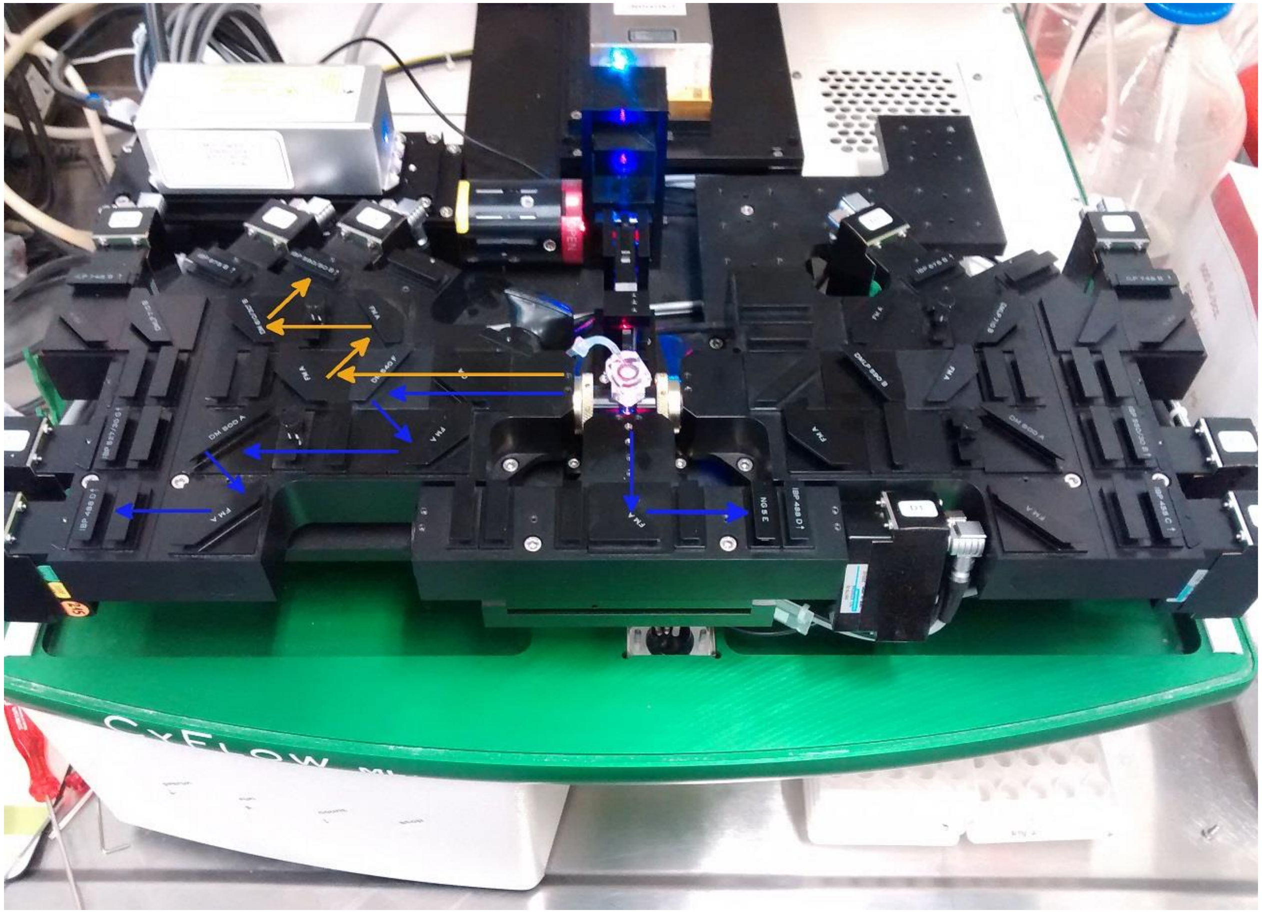


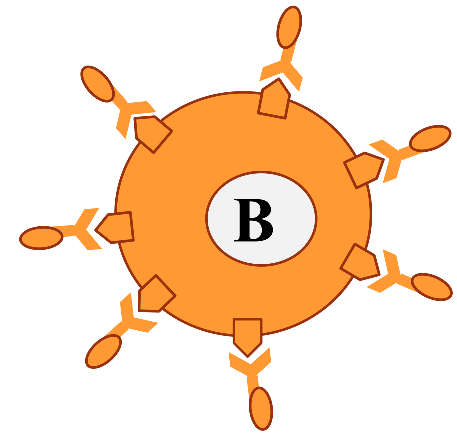
Παράδειγμα





Παράδειγμα





Electronics

Φωτοδίοιδοι (silica):

- Εξωτερικοί ενισχυτές. Κατάλληλοι για μεγάλης έντασης σήμα (FSC,SSC)

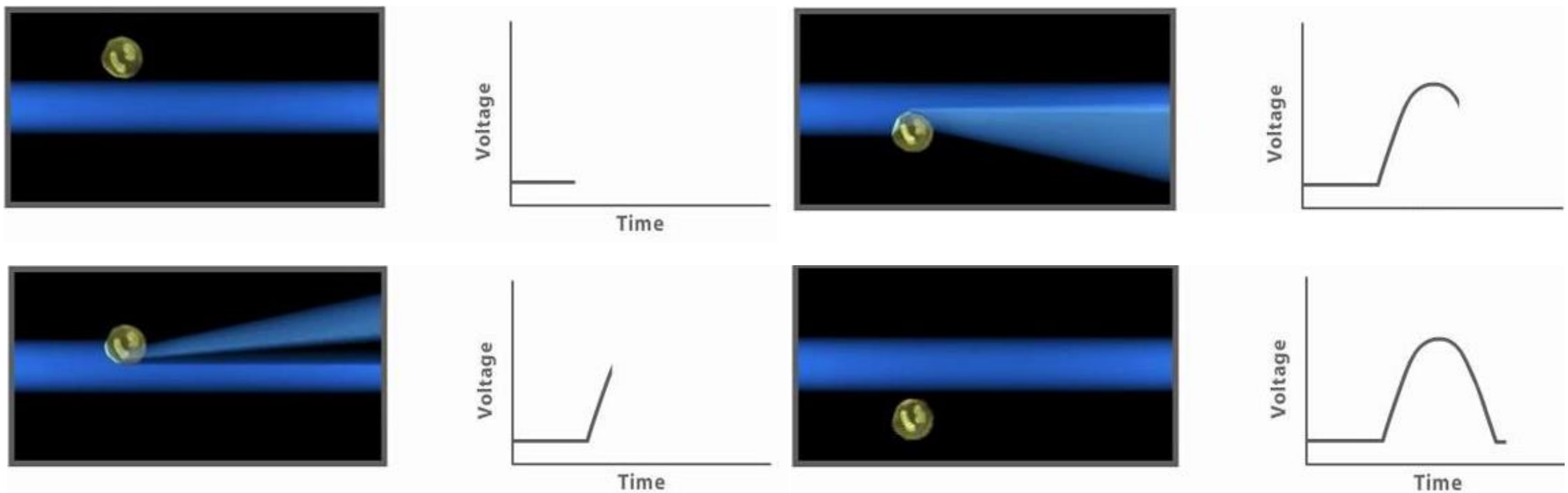
Φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs):

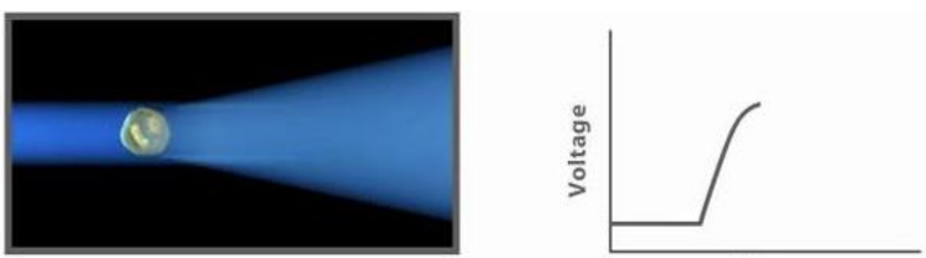
- Ενισχύουν το σήμα (έως 10^7 e^- / φωτόνιο) ανάλογα με την τάση που λαμβάνουν (gain) με σχεδόν λογαριθμική αναλογία
- Χρησιμοποιούνται κυρίως για φθορισμό όπου η ενίσχυση του σήματος είναι απαραίτητη

CCD (Charged coupled devices):

- Μεγάλο χρόνο απόκρισης

Electronics

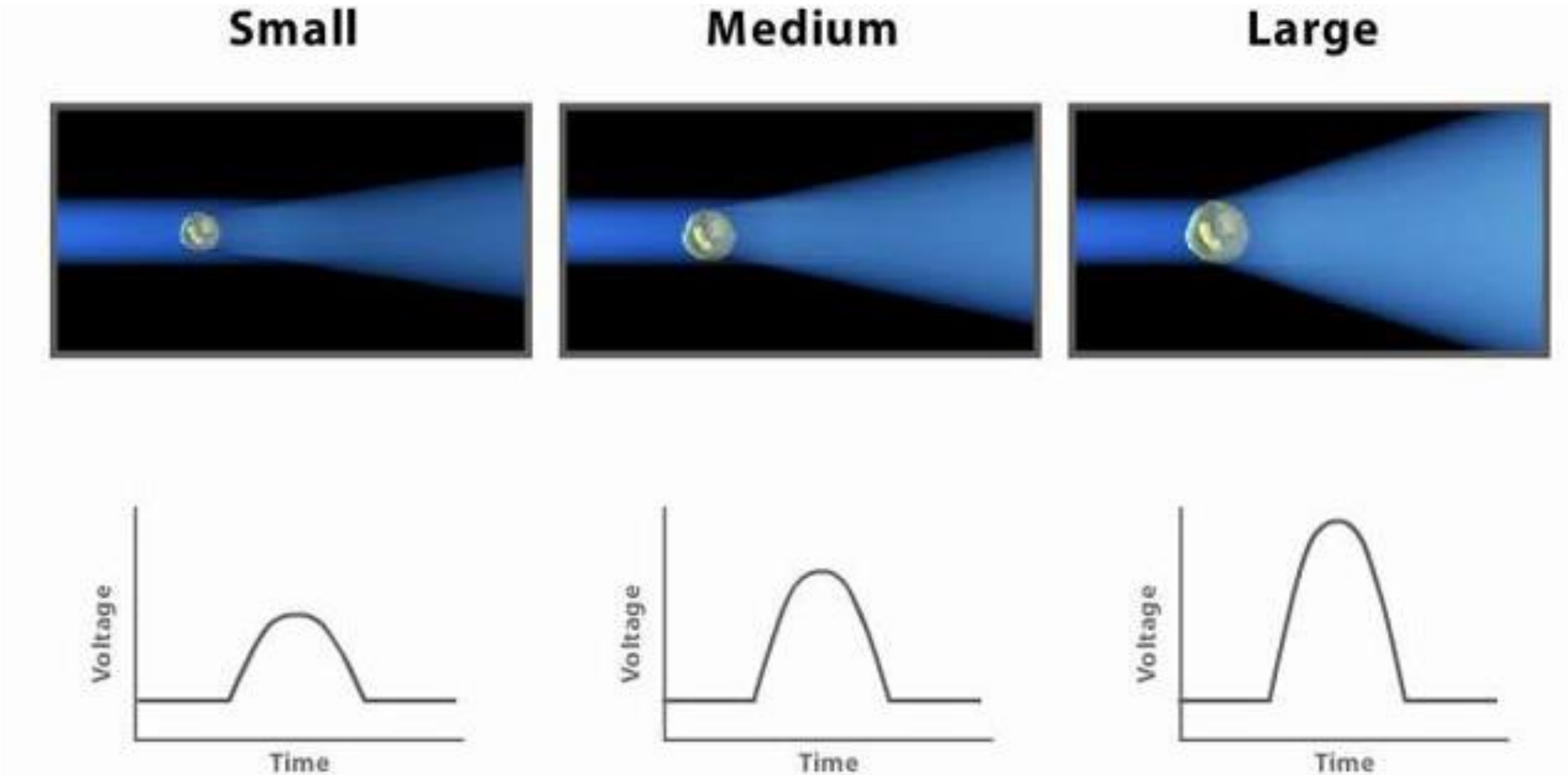




- Σωματίδιο που προσπίπτει στο laser προκαλεί σκέδαση φωτός
- Το φως συλλέγεται στον κατάλληλο PMT και μετατρέπεται σε διαφορά δυναμικού

“Intro to flow cytometry”, Video tutorial, © 2010 Life Technologies Corporation. (www.invitrogen.com)

Electronics



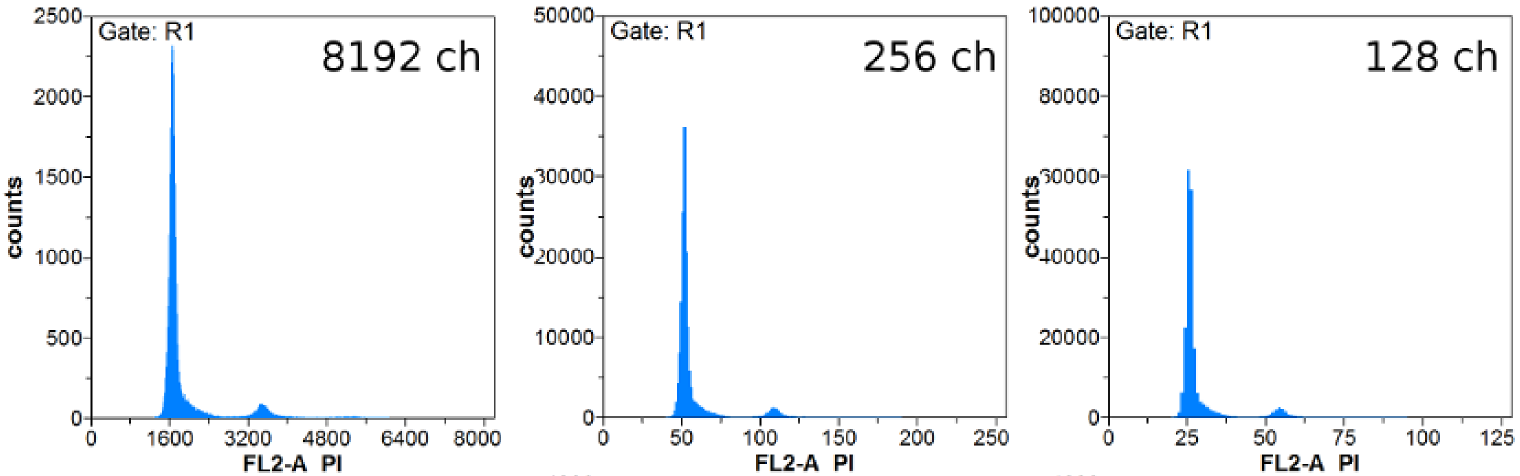
- Η τάση είναι εξαρτώμενη από την ποσότητα (ένταση) του φωτός
- Στο άνω παράδειγμα το ύψος του παλμού ανάλογο με ….?

“Intro to flow cytometry”, Video tutorial, © 2010 Life Technologies Corporation. (www.invitrogen.com)

Electronics

ADC (Analog to Digital Convertors):

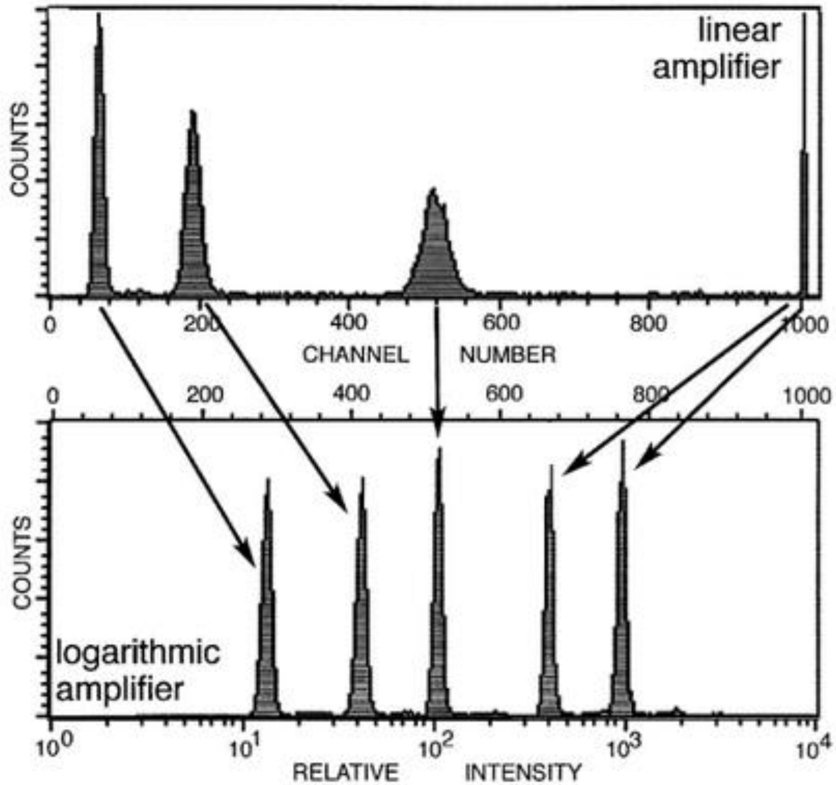
- Ηλεκτρικός παλμός από τους ανιχνευτές μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα. Ανάλογα με το είδος του ADC έχει συγκεκριμένο αριθμό bit ο οποίος κατατάσσει το σήμα σε συγκεκριμένο κανάλι
- 8 bit=2^8=256 κανάλια. 24bit=16.777.216
- Αυξάνει τη διακριτική ικανότητα και το εύρος τιμών



Κλίμακες

Ανάλογα τον τύπο ενίσχυσης ή των ρυθμίσεων του ADC τα δεδομένα μπορούν να συλ-λεχθούν σε:

- Λογαριθμική κλίμακα: Μεγαλύτερο εύρος τιμών. Χρήσιμο για φθορισμό μονοκλωνικών και FSC/SSC σε μερικές εφαρμογές
- Γραμμική κλίμακα: Μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού. Κυτταρικός κύκλος, FSC/SSC συνήθως



A. Given "Principles of Flow Cytometry. An overview", in Darzynkewicz, et al, "Flow Cytometry", Elsevier, 3rd Ed

FCS Data

Το λογισμικό καταγράφει τις τιμές παραμέτρων για κάθε γεγονός που περνάει από το laser

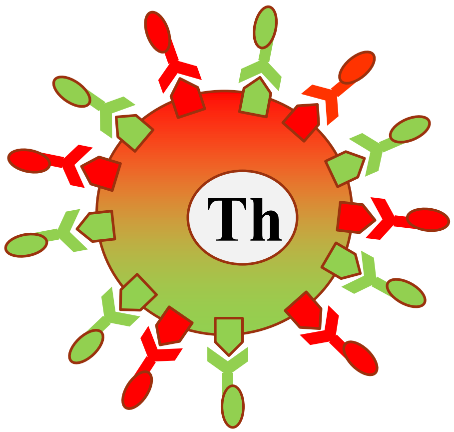
- Οι τιμές αυτές αποθηκεύονται σε κατάλληλο αρχείο (FCS)
- Τροποποιώντας τα gain (voltage) αλλάζει η τάση του PMT και αλλάζει το κανάλι στο οποίο αντιστοιχεί
- Μένει στο χρήστη πως θα παρουσιάσει τα δεδομένα ώστε να μπορεί να γίνουν αντιληπτές οι μεταβολές που θέλει να διακρίνει

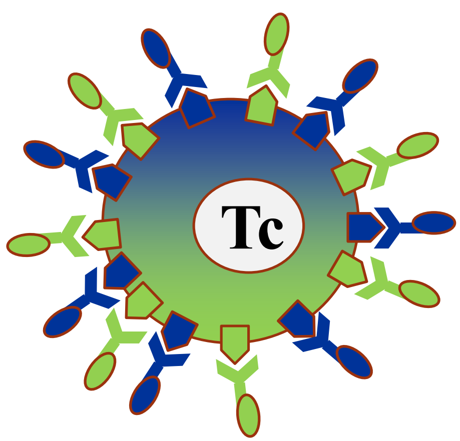
CELL #	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
1	264	65	49	749	0
2	192	86	152	769	0
3	214	252	25	803	0
4	266	71	555	552	0
5	306	87	94	681	272
6	293	59	431	585	0
7	268	63	187	740	156
8	57	195	0	713	0
9	241	52	64	713	147
10	304	53	87	668	223
11	1002	1023	291	861	155
12	211	59	108	673	239
13	93	8	123	691	0
14	327	103	106	617	197
15	262	120	6	721	0
16	232	108	47	758	146
17	282	108	158	776	0
18	267	67	131	748	255
19	201	161	99	746	0
20	289	97	141	642	307
21	255	97	134	824	0
22	260	34	82	427	0
23	302	112	0	606	301
24	274	91	4	698	293
25	275	84	521	708	0
26	246	33	69	717	0

etc

A. Given "Principles of Flow Cytometry. An overview", in Darzynkewicz, et al, "Flow Cytometry", Elsevier, 3rd Ed

Παράδειγμα





CELL #	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
1	264	65	49	749	0
2	192	86	152	769	0
3	214	252	25	803	0
4	266	71	555	552	0
5	306	87	94	681	272
6	293	59	431	585	0
7	268	63	187	740	156
8	57	195	0	713	0
9	241	52	64	713	147
10	304	53	87	668	223
11	1002	1023	291	861	155
12	211	59	108	673	239
13	93	8	123	691	0
14	327	103	106	617	197
15	262	120	6	721	0
16	232	108	47	758	146
17	282	108	158	776	0
18	267	67	131	748	255
19	201	161	99	746	0
20	289	97	141	642	307
21	255	97	134	824	0
22	260	34	82	427	0
23	302	112	0	606	301
24	274	91	4	698	293
25	275	84	521	708	0
26	246	33	69	717	0

etc

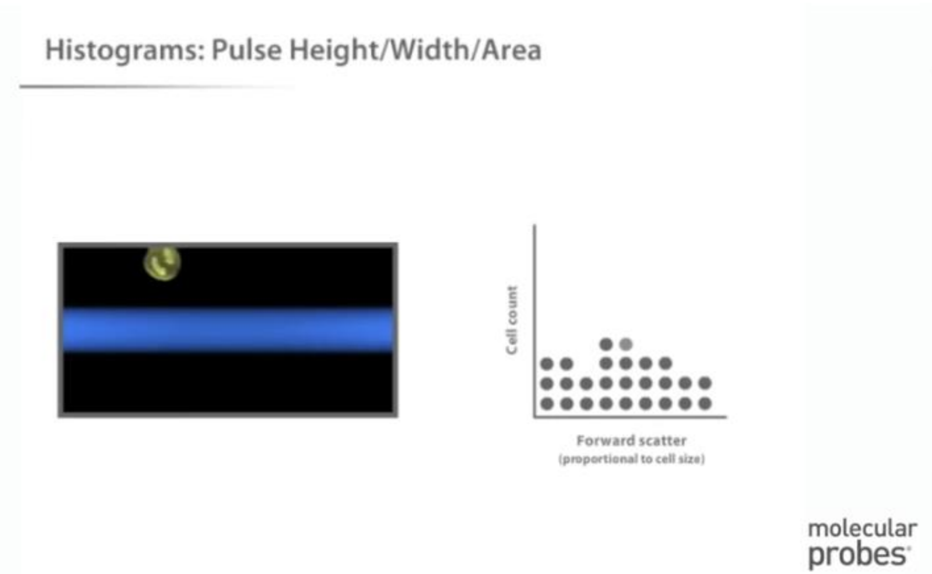
A. Given “Principles of Flow Cytometry. An overview”, in Darzynkewicz, et al, “Flow Cytometry”, Elsevier, 3rd Ed

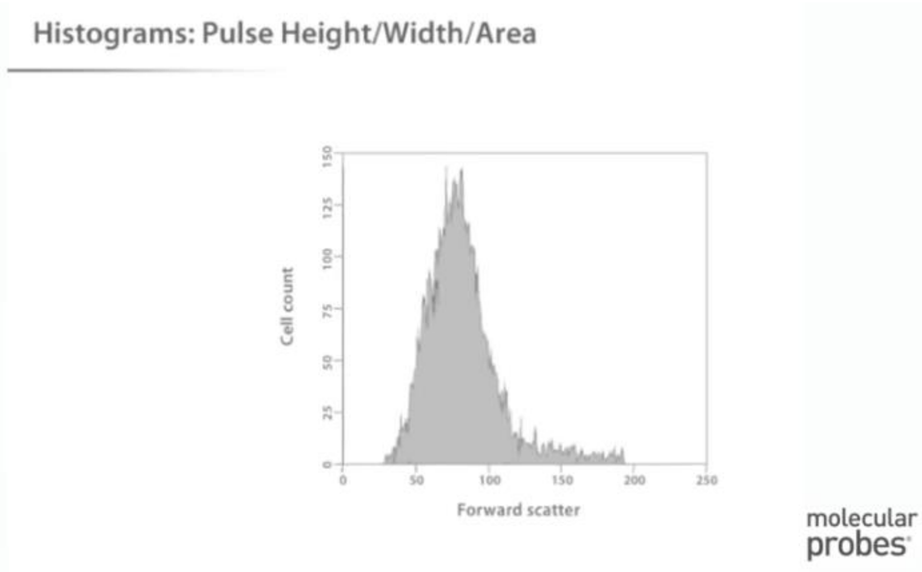
Software

Τιμές παραμέτρων κάθε κυττάρου υπολογίζονται από το λογισμικό και αντιστοιχίζονται σε συγκεκριμένη τιμή (κανάλι τιμής, αυθαίρετες μονάδες). Παράμετροι που μετρούνται είναι:

- Πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC), αντιστοιχεί στο μέγεθος του κυττάρου
- Πλάγια σκέδαση (Side Scatter, SSC), αντιστοιχεί στην πολυπλοκότητα ή κοκκίωση του κυττάρου
- Φθορισμός που παράγεται σε κάθε κανάλι από το κάθε φθοριόχρωμα (εδώ η έννοια κανάλι αφορά τον κάθε φωτοπολλαπλασιαστή, διαφορετικό μήκος κύματος φθορισμού)
- «Ηλεκτρονικός όγκος» (παράμετρος μεγέθους, σπάνια)
- Χρόνος (χρήσιμος για την απόλυτη μέτρηση, έλεγχος ομαλής ροής)

Από τα γεγονότα στο ιστόγραμμα





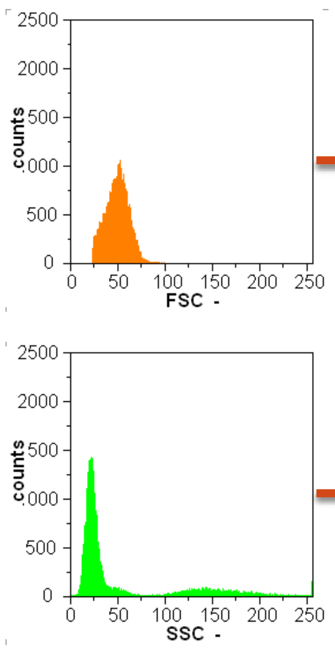
Τα γεγονότα αναπαρίστανται σε ιστογράμματα

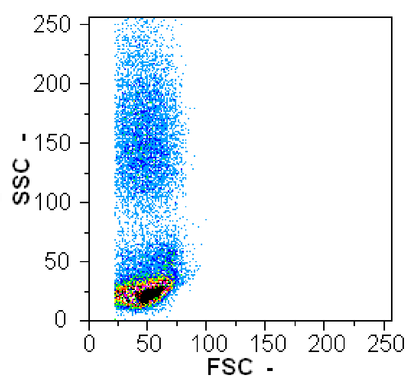
- Ιστογράμματα μιας παραμέτρου είναι ουσιαστικά ένα ραβδόγραμμα με χιλιάδες όμως γεγονότα

“Analyzing flow cytometry data”, Video tutorial, © 2017 http://www.thermofisher.com/gr/en/home/support/tutorials.html

Ιστόγραμμα

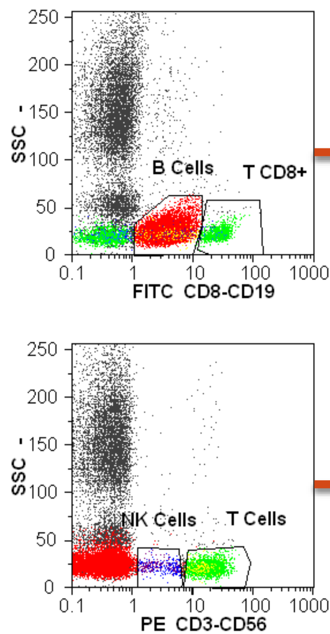
Ιστόγραμμα μίας παραμέτρου

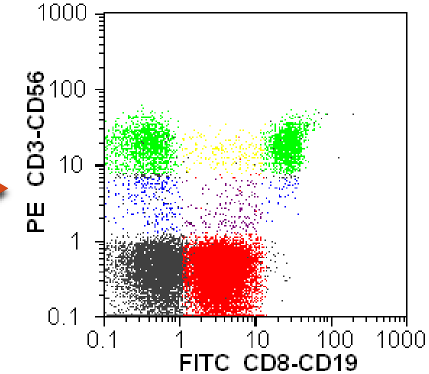




2 παραμέτρων (contour plots)

Ιστόγραμμα δύο παραμέτρων



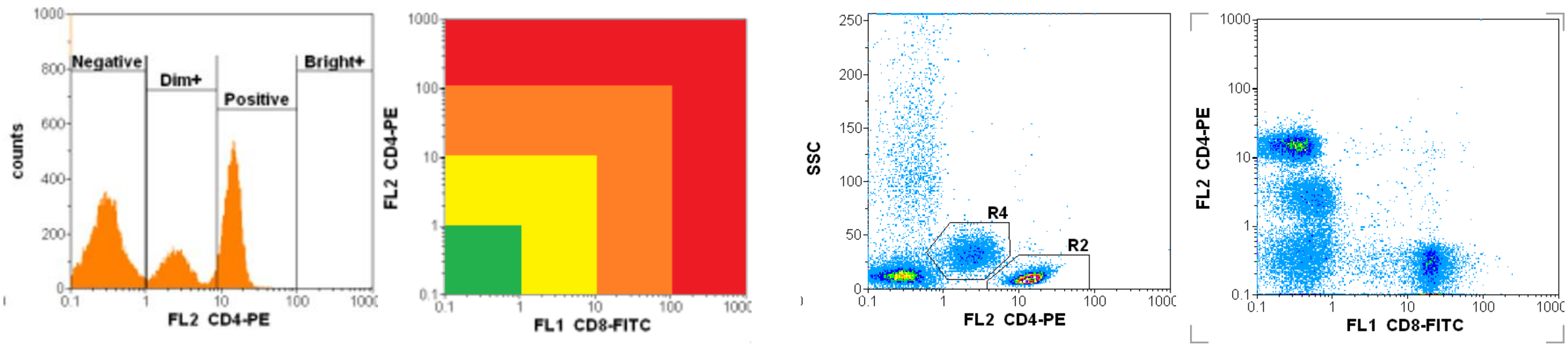


2 παραμέτρων (dot plots)

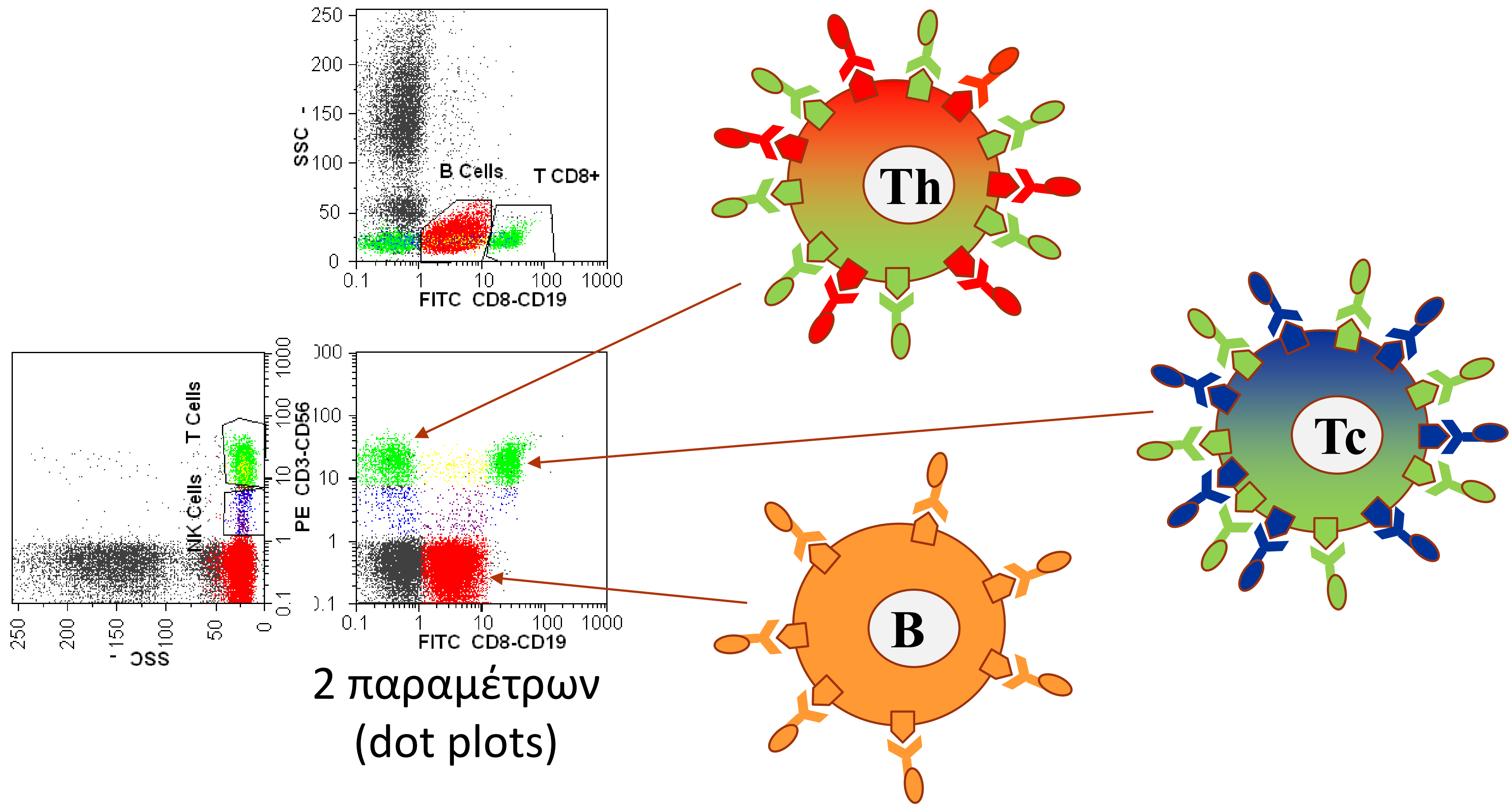
Ιστόγραμμα

Ρυθμίζουμε το όργανο κατάλληλα ώστε:

- Τα αρνητικά γεγονότα να είναι στο πρώτο τεταρτημόριο ή τάξη
- Τα ασθενώς θετικά στο 2ο
- Τα θετικά στο 3ο
- Τα ισχυρά θετικά (bright) στο 4ο
- Για τον x άξονα θετικότητα αυξάνει προς τα αριστερά, για τον y προς τα πάνω

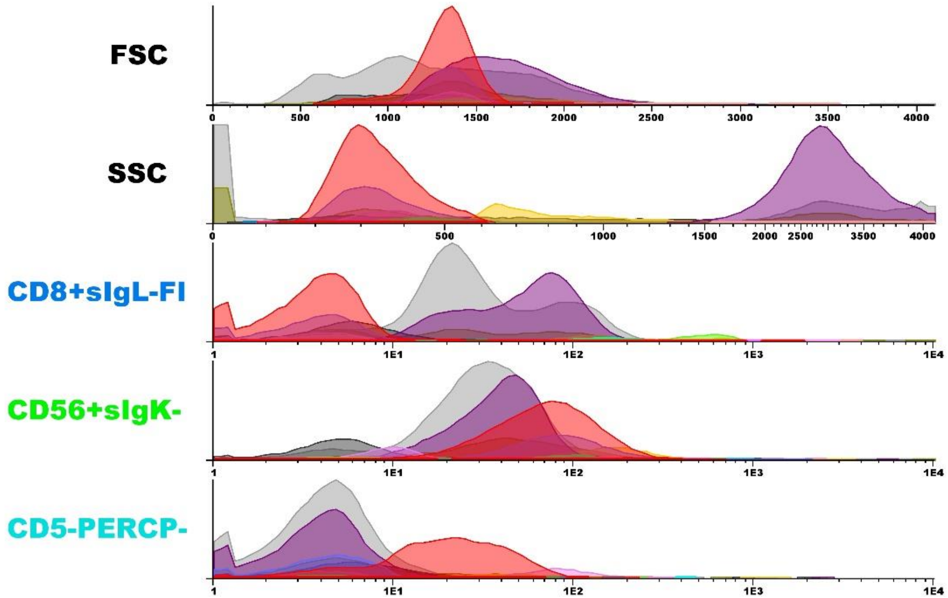


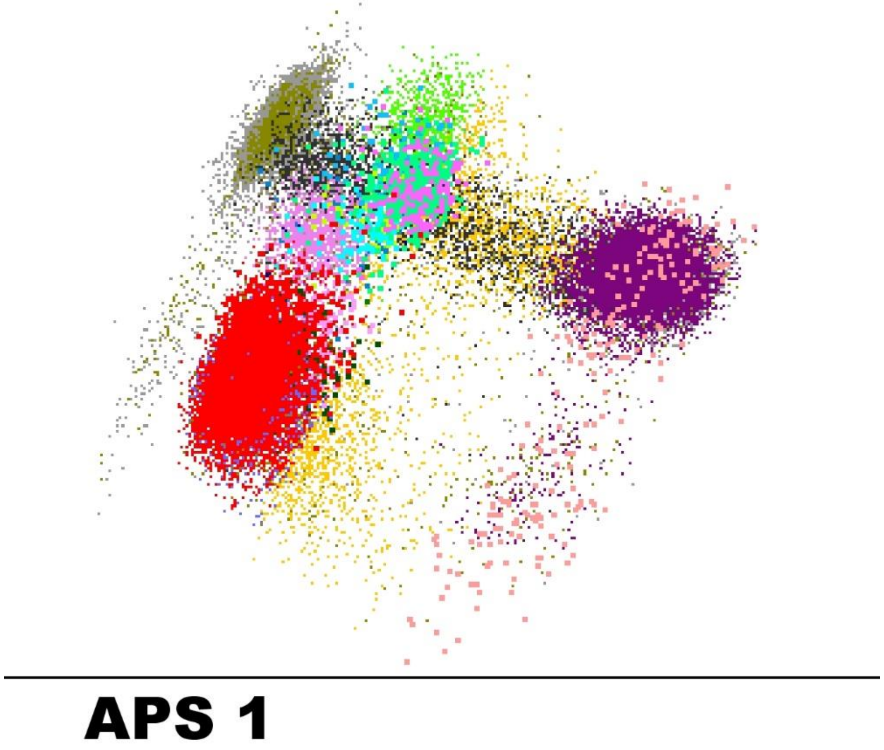
Ιστόγραμμα



2 παραμέτρων
(dot plots)

Ιστόγραμμα





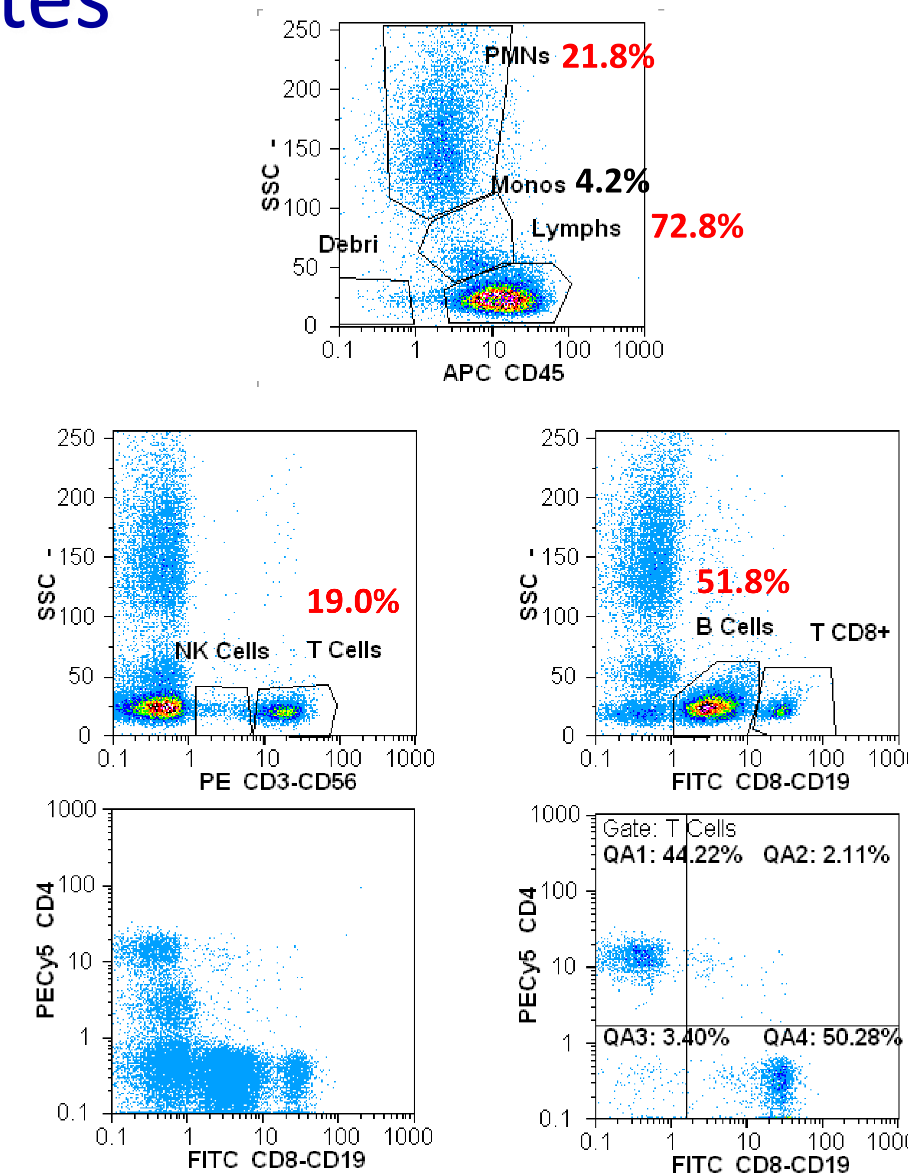
Πολλαπλών παραμέτρων
(Band)

Πολλαπλών παραμέτρων
(APS)

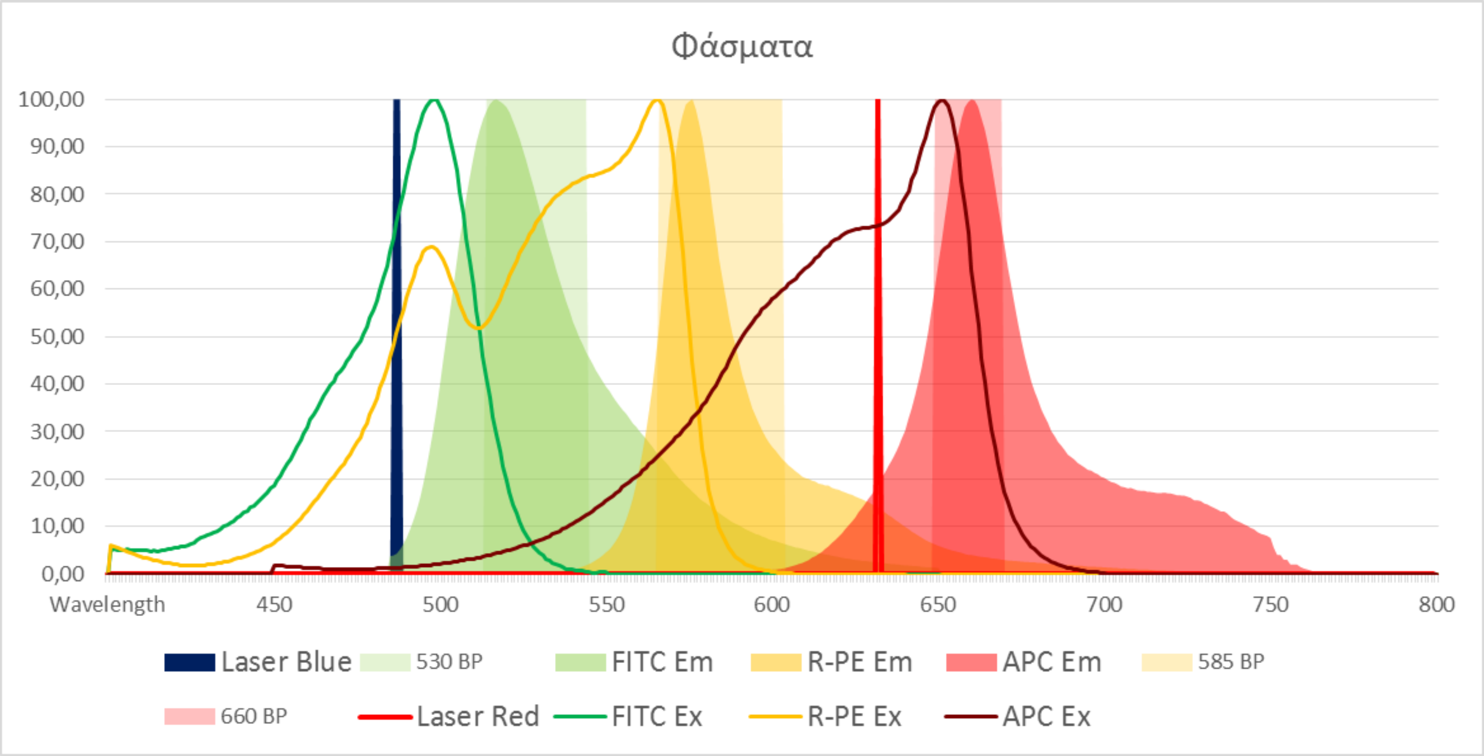
Gates

Δεν έχουν αξία όλοι οι πληθυσμοί σε κάθε σωληνάριο:

- Περιοχές (Regions) ορίζονται για να μελετηθούν οι παράμετροι του πληθυσμού ενδιαφέροντος
- Με την οριοθέτηση (gating) μπορούμε να εξετάσουμε τα γεγονότα της επιλεγμένης περιοχής
- Ιεραρχικό (κληρονομούμενο) ή Boolean (πολύπλοκη επιλογή)



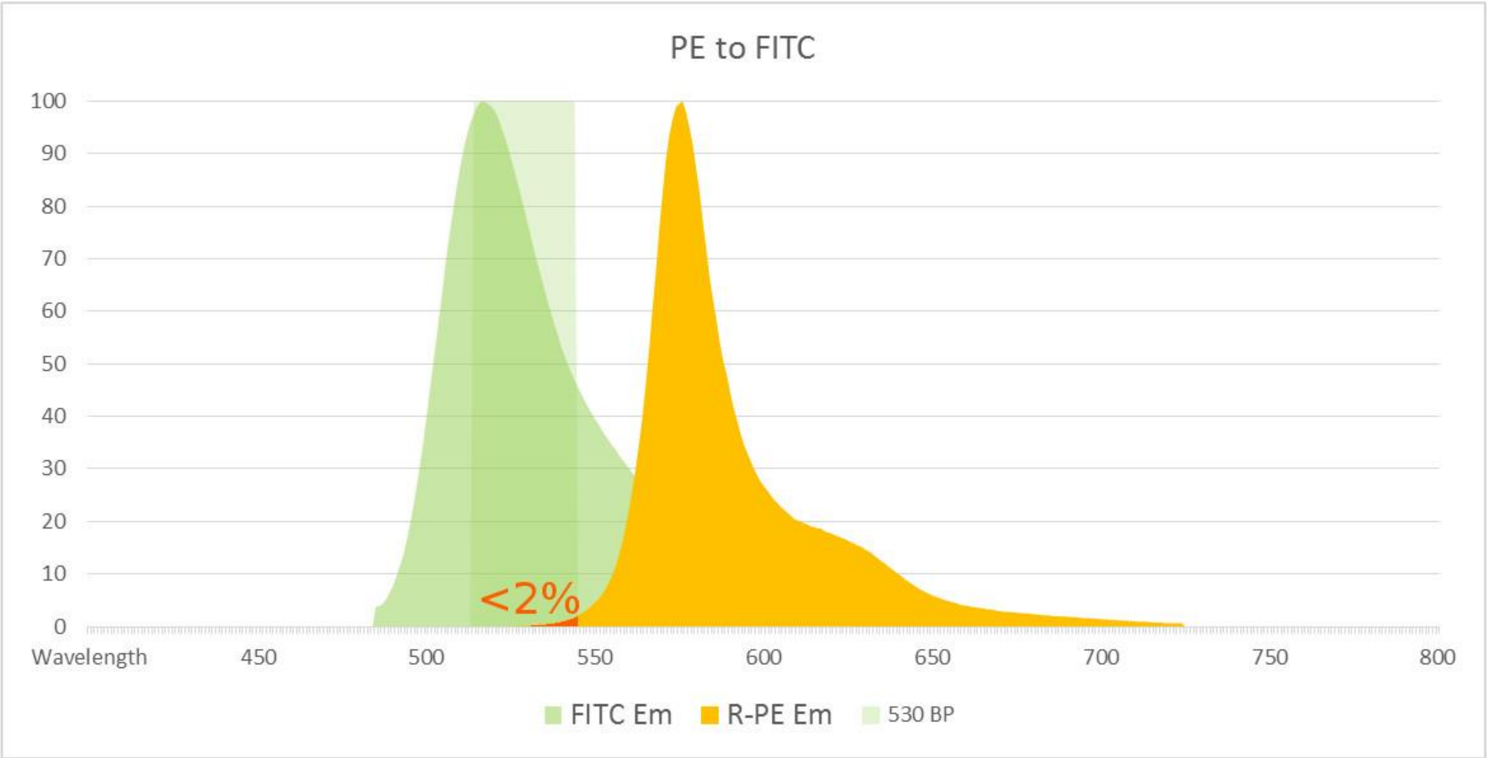
Compensation



Η χρωματική αντιστάθμιση είναι απαραίτητη:

- Όταν υπάρχουν παραπάνω από ένα φθοριοχρώματα (πάντα σχεδόν)

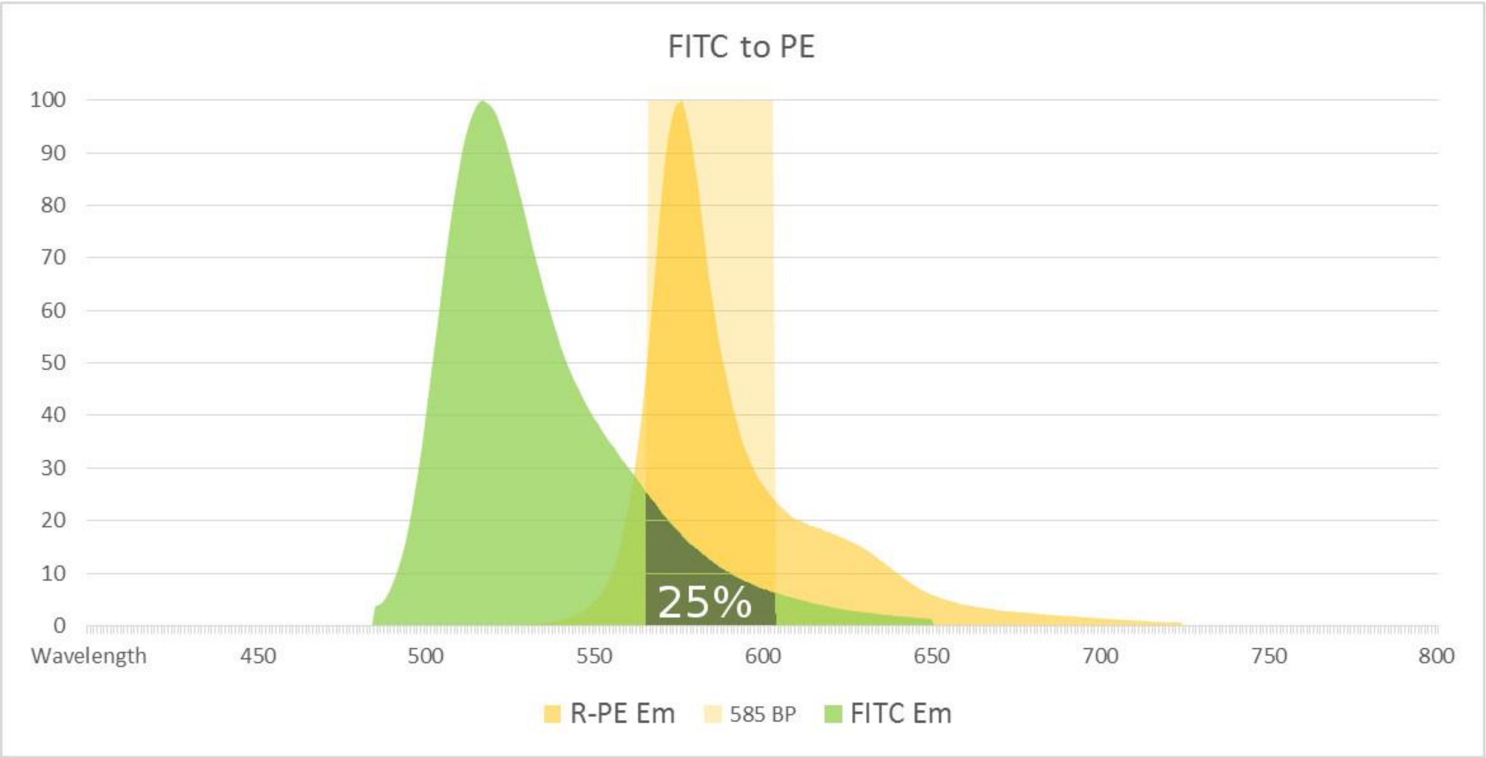
Compensation



Με το συγκεκριμένο φίλτρο και το συνδυασμό των Fl:

- 2% του μέγιστου φθορισμού του PE συνυπολογίζεται στο κανάλι του FITC

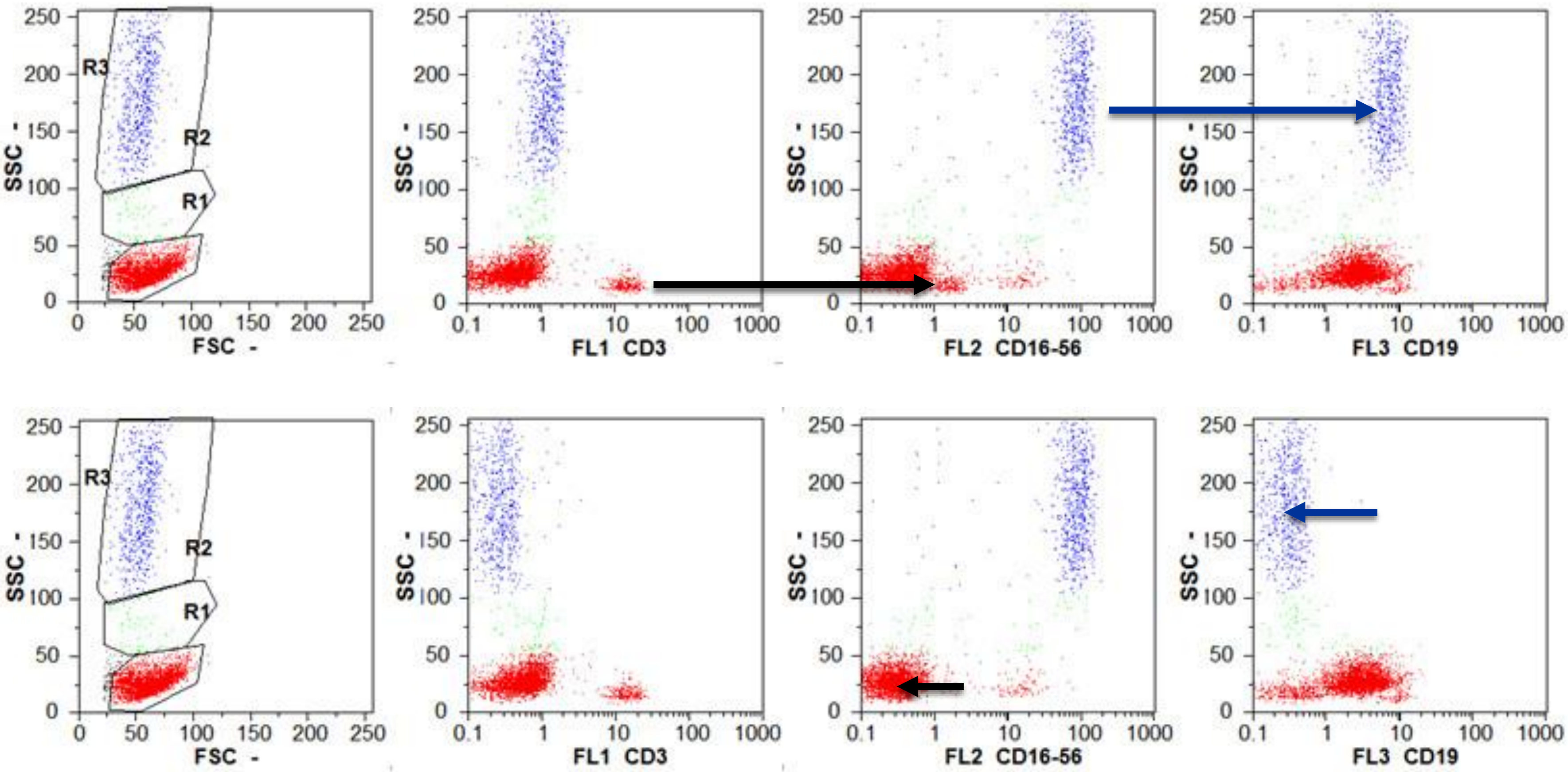
Compensation



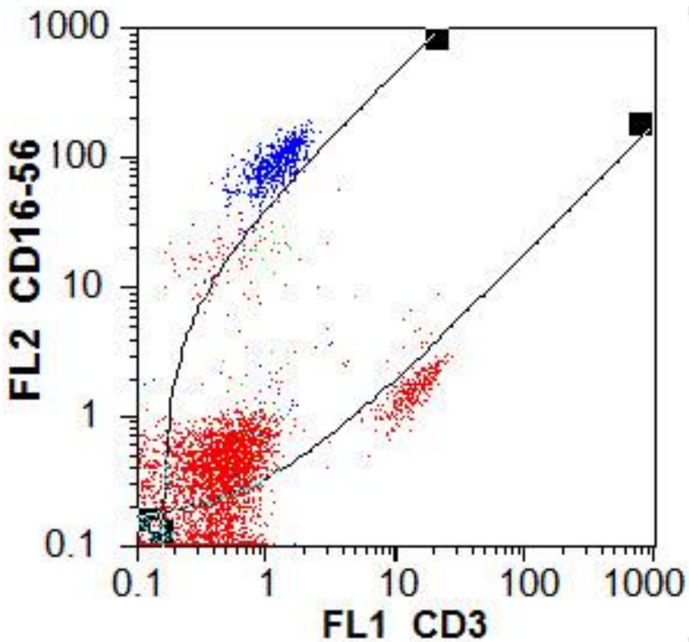
Με το συγκεκριμένο φίλτρο και το συνδυασμό των Fl:

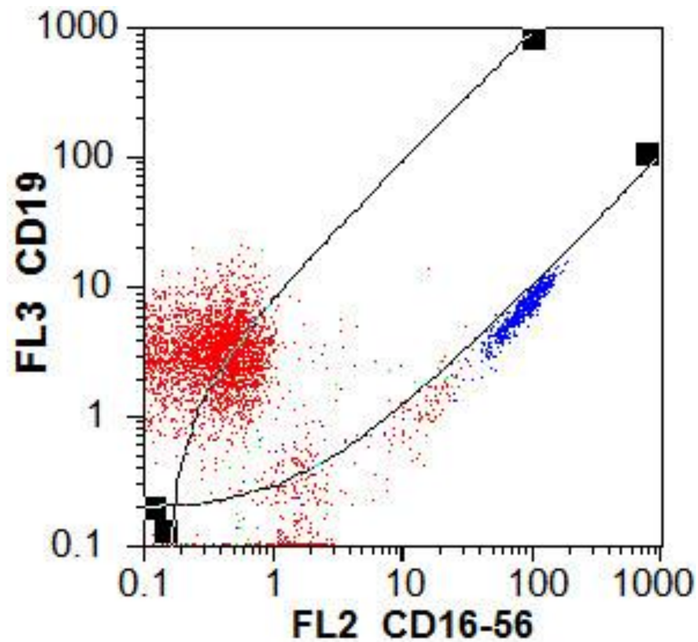
- 25% του μέγιστου φθορισμού του FITC συνυπολογίζεται στο κανάλι του PE

Compensation



Compensation





Speed: 1.0 µl/s

Enable	Parameter		Gain	Log	L-L	U-L	Comp.	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3	FL4	IC
	FSC	-	208.0	lin	100.0	999.9		--	-	-	-	-	-	-
	SSC	-	253.0	lin	10.0	999.9		-	--	-	-	-	-	-
	FL1	CD3	480.0	log4	10.0	999.9		-	-	--	1.7	-	-	0.2
	FL2	CD16-56	450.0	log4	10.0	999.9		-	-	17.8	--	8.6	-	0.2
	FL3	CD19	520.0	log4	10.0	999.9		-	-	-	8.3	--	-	0.2
	FL4	635-25	467.0	log4	10.0	999.9		-	-	-	-	-	--	-

Εφαρμογές Κυτταρομετρίας Ροής

Πολυπαραμετρική μέθοδος ανίχνευσης διαφορετικών παραμέτρων σε εναιώρημα κυττάρων

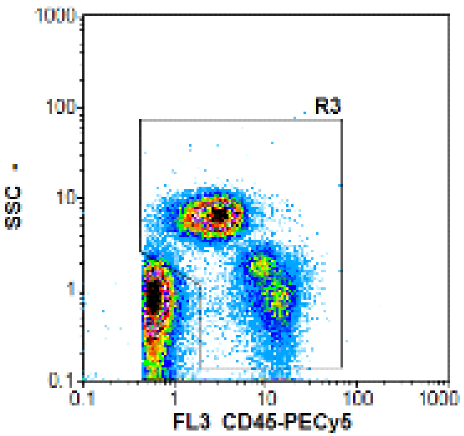
1. Ανοσοφαινότυπος:
   1. Οξείας λευχαιμίας (Λεμφοβλαστική, Μυελοβλαστική)
   2. Μυελοϋπερπλαστικά /μυελοδυσπλαστικά νοσήματα
   3. Πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών (PCD)
   4. Λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών (LPDs)
2. Προσδιορισμός λευκοκυτταρικού πληθυσμού επιλογής
   1. CD4+ T λεμφοκυττάρων σε HIV+ ασθενείς
   2. Μέτρηση CD34+ αρχέγονων κυττάρων
   3. Υπολειπόμενα λευκά σε παράγωγα αίματος
   4. ΕΝΥ - Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα – Υγρά σωματικών κοιλοτήτων
3. Ανίχνευση με χρήση χρωστικών (Καρκινικά κύτταρα, Μικροοργανισμοί)
4. Ανίχνευση ιχνηθετών μετά από υβριδισμό (Μικροοργανισμοί , αναδιατάξεις γονιδίων, κ.α.)
5. ……

2.1 CD4+ T λεμφοκύτταρα

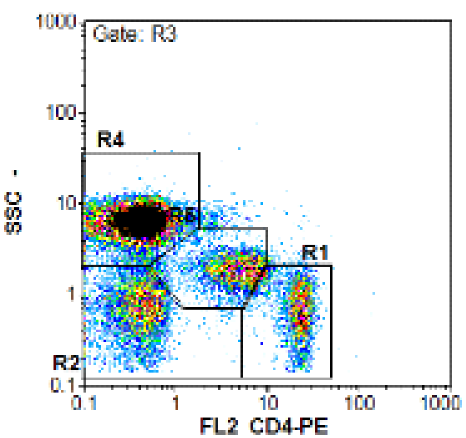
2.1 CD4+ T λεμφοκυττάρων σε HIV+ ασθενείς:

- Απόλυτη μέτρηση:
  1. Μέτρηση σε αιματολογικό αναλυτή του αριθμού και προσδιορισμός πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής
  2. Μέτρηση αριθμού και πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής
- Για την απόλυτη μέτρηση με κυτταρομετρία ροής:
  1. Χρήση σωληνάριών με γνωστή συγκέντρωση σφαιριδίων (π.χ. TrueCount, BD, BC). Λύση δείγματος σε ήπιες συνθήκες. Trigger/Threshold σε φθορισμό για την μέτρηση των σφαιριδίων που έχουν μικρότερο μέγεθος από κύτταρα
  2. Χρήση ογκομετρικού συστήματος (Sysmex, Thermo). Χρώση και μέτρηση χωρίς λύση των κυττάρων. Trigger/Threshold σε φθορισμό για την αποφυγή μέτρησης ερυθρών που είναι >1.000 φορές σε αριθμό από τα λευκά

2.1 CD4+ T λεμφοκύτταρα

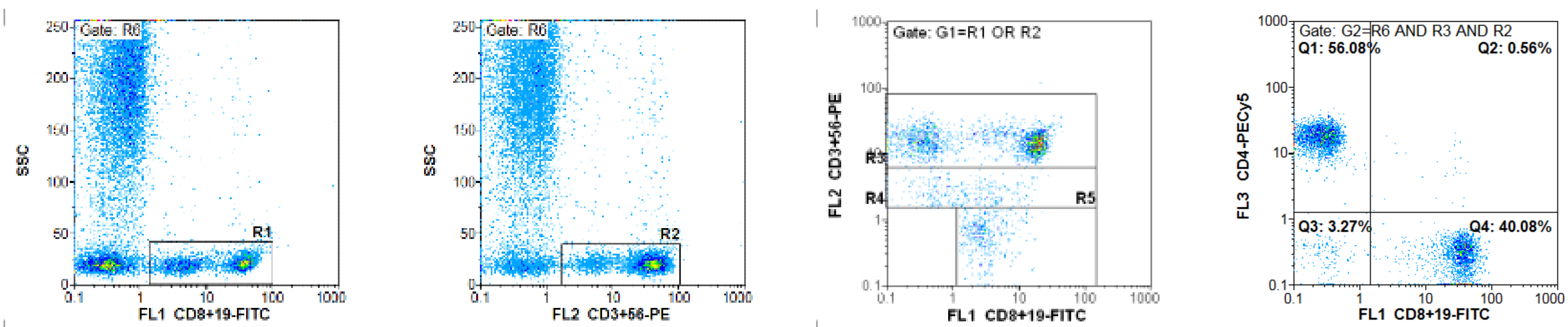


- Ταχεία μέτρηση με χρήση δύο αντισωμάτων (CD45 PECy5, CD4-PE)
- Μέτρηση χωρίς λύση κυττάρων (threshold στο CD45 για αποφυγή debri)
- Οριοθέτηση λευκοκυττάρων (R3) (CD45+, SSC low/med/high)
- Καθορισμός βασικών υποπληθυσμών
  - Πολυμορφοπύρηνα R4(SSChigh, CD4-)
  - Μονοκύτταρα R5(SSC med, CD4+dim)
  - Λεμφοκύτταρα R2 (SSC low, CD4-) , T CD4+ λεμφοκύτταρα R1 (SSC low, CD4bright+)
- Υπολογισμός αριθμού T CD4+ από την ογκομετρική ανάλυση
- Υπολογισμός ποσοστού T CD4+ από την αναλογία R1/R3

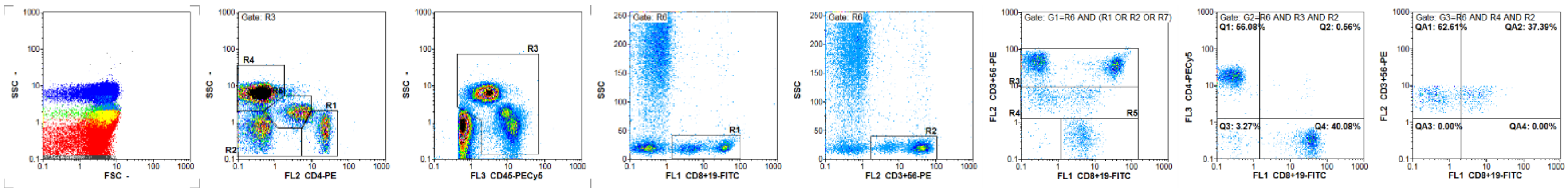


2.1 CD4+ T λεμφοκύτταρα

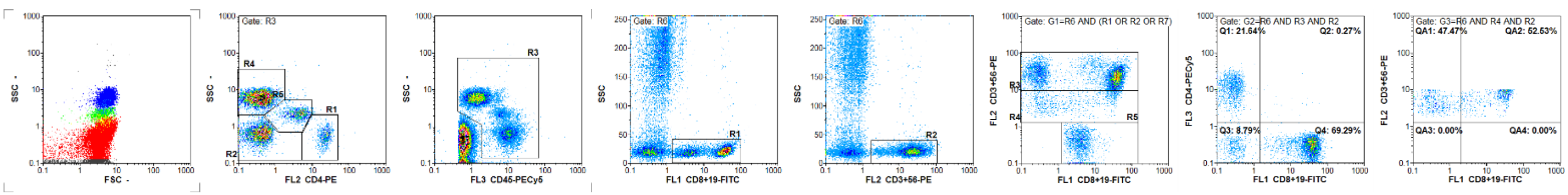
- Καθορισμός λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με χρήση τριχρωμίας με 5 αντισώματα
- Οριοθέτηση λεμφοκυττάρων με χρήση της κοκκίωσης και της θετικότητας σε δείκτες λεμφοκυττάρων (R1 or R2)
  - T (R3) CD3bright+, CD8bright+ μόνο τα Tc
  - NK (R4) CD56+dim (διαχωρισμός από τα T λόγω χαμηλότερης έντασης)
  - B (R5) CD19+dim (διαχωρισμός από τα Tc λόγω χαμηλότερης έντασης και απουσίας CD3)
- Gating μόνο των T σε νέο ιστόγραμμα CD4/CD8 και καθορισμός αναλογίας CD4/CD8 (Q1/Q4)



2.1 CD4+ Τ λεμφοκύτταρα



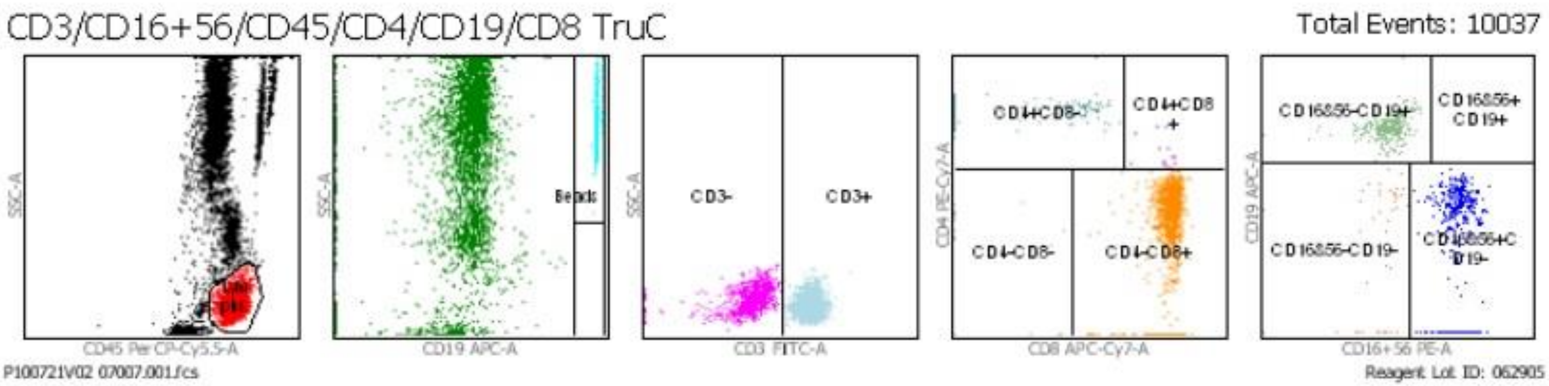
- CD4+ 785 cells/uL CD4/CD8 ratio 1,4



- CD4+ 128 cells/uL CD4/CD8 ratio 0,3

- Μέτρηση χωρίς λύση κυττάρων (threshold στο CD45 για αποφυγή debri)
- Ογκομετρικός προσδιορισμός Τ CD4+ λεμφοκυττάρων και των άλλων υποπληθυσμών βάσει αναγωγής στα ολικά λεμφοκύτταρα

2.1 CD4+ T λεμφοκύτταρα



Parameter	Percent	Value/AbsCnt
Lymph Events		3300
Bead Events		2144
CD3+	76.79	1180.60
CD3+CD8+	61.39	943.92
CD3+CD4+	14.58	224.10
CD3+CD4+CD8+	0.42	6.52
CD16+CD56+	12.30	189.16
CD19+	9.67	148.62
CD45+		1537.49
4/8 Ratio		0.24

- Σφαιρίδια ταυτοποιούνται από μέγεθος κοκκίωση και τον έντονο φθορισμό τους (threshold στο CD45, λόγω μικρού μεγέθους των beads)
- Λεμφοκύτταρα από CD45/SSC, διαχωρισμός T(CD3+), B (CD19+), NK (CD16/56+CD3-)

2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας

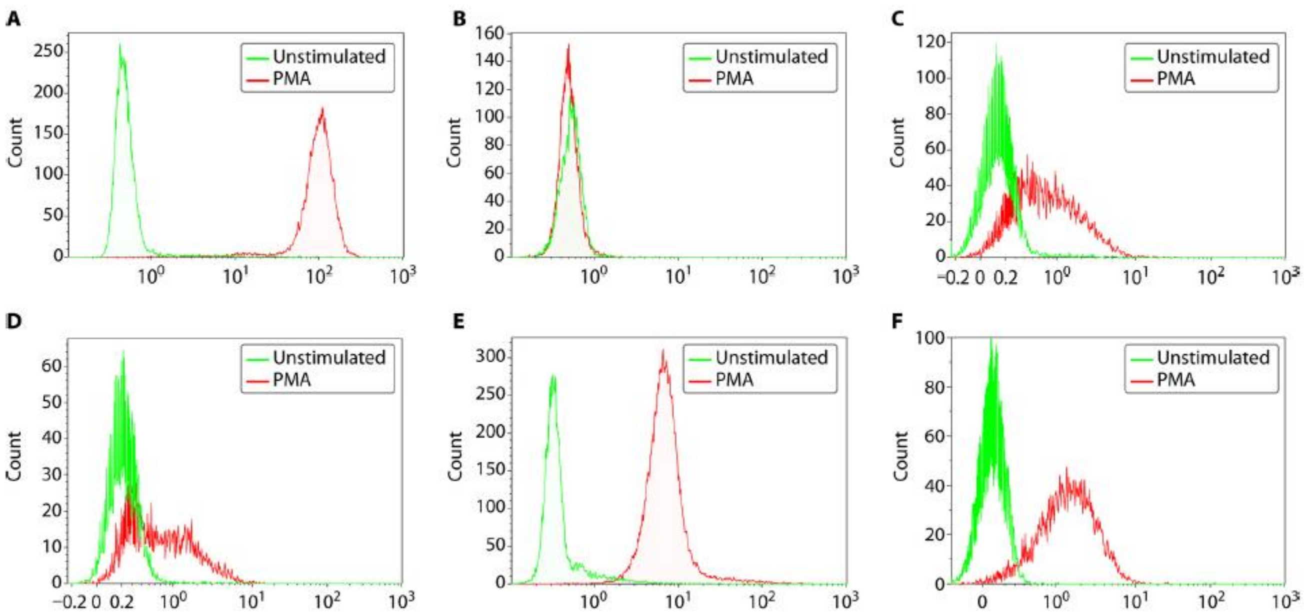
Ετερογενείς ομάδα διαταραχών που έχουν αποτέλεσμα την εξασθένιση του ανοσοποιητικού και συχνές λοιμώξεις:

- Αφορούν την χημική ή/και κυτταρική ανοσία, ανεπάρκειες στον αριθμό, κατανομή ή λειτουργικότητα των υποπληθυσμών του ανοσοποιητικού, των παραγόμενων αντισωμάτων ή του συμπληρώματος
- Συχνά εκτός από βιοχημικά και γενετικά αποτελέσματα είναι απαραίτητη και η κυτταρομετρία ροής. Π.χ.:
  1. Oxidative burst using DHR (λειτουργικότητα ουδετερόφιλων)
  2. Μέτρηση των υποπληθυσμών των Β λεμφοκυττάρων στην CVID
  3. Κατανομή των naive / memory T cells στην SCID
- Εμπορικά διαθέσιμα κιτ για ταχεία αναγνώριση απώλειας λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών, π.χ. CD16, CD19, CD3, CD4, CD45, CD56, CD8, IgD, IgM, TCRgd (PIDOT, Cytognos)

Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies (Clinical and Vaccine Immunology, 2016)

2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας

- Ανίχνευση οξειδωτικής ικανότητας – αναπνευστικής έκρηξης ουδετερόφιλων:
  1. Μη ειδική ενεργοποίηση από PMA (Phorbol myristate acetate)
  2. Τα φυσιολογικά παραγόμενα ROS προκαλούν την μετατροπή της DHR (dihydroxyrhodamine) σε φθορίζουσα ροδαμίνη.
  3. Ανίχνευση με κυτταρομετρία ροής



A. Normal

B. X linked CGD

C. Autosomal CGD

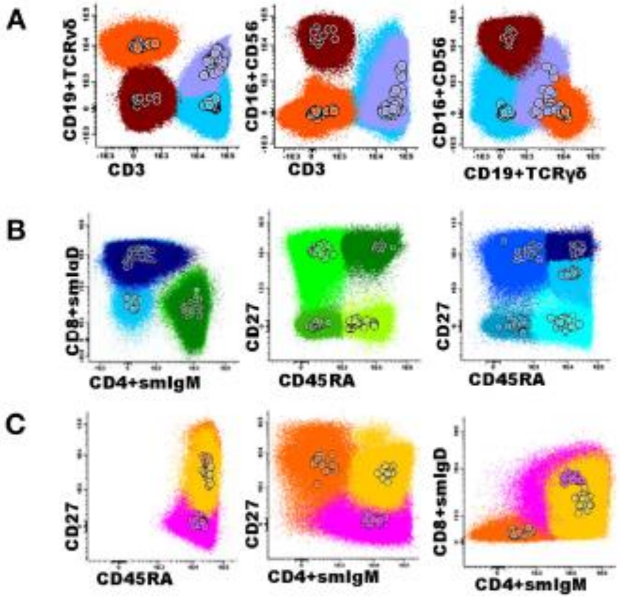
D. Autosomal CGD

E. cMPO deficiency

F. Atypical CGD

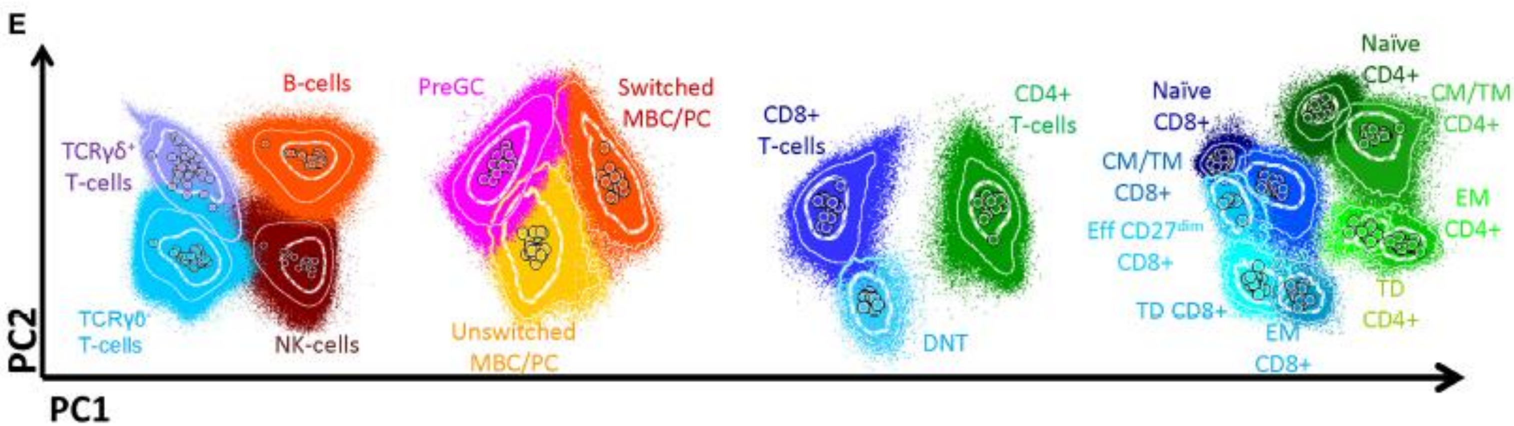
Flow Cytometry, a Versatile Tool for Diagnosis and Monitoring of Primary Immunodeficiencies (Clinical and Vaccine Immunology, 2016)

2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας



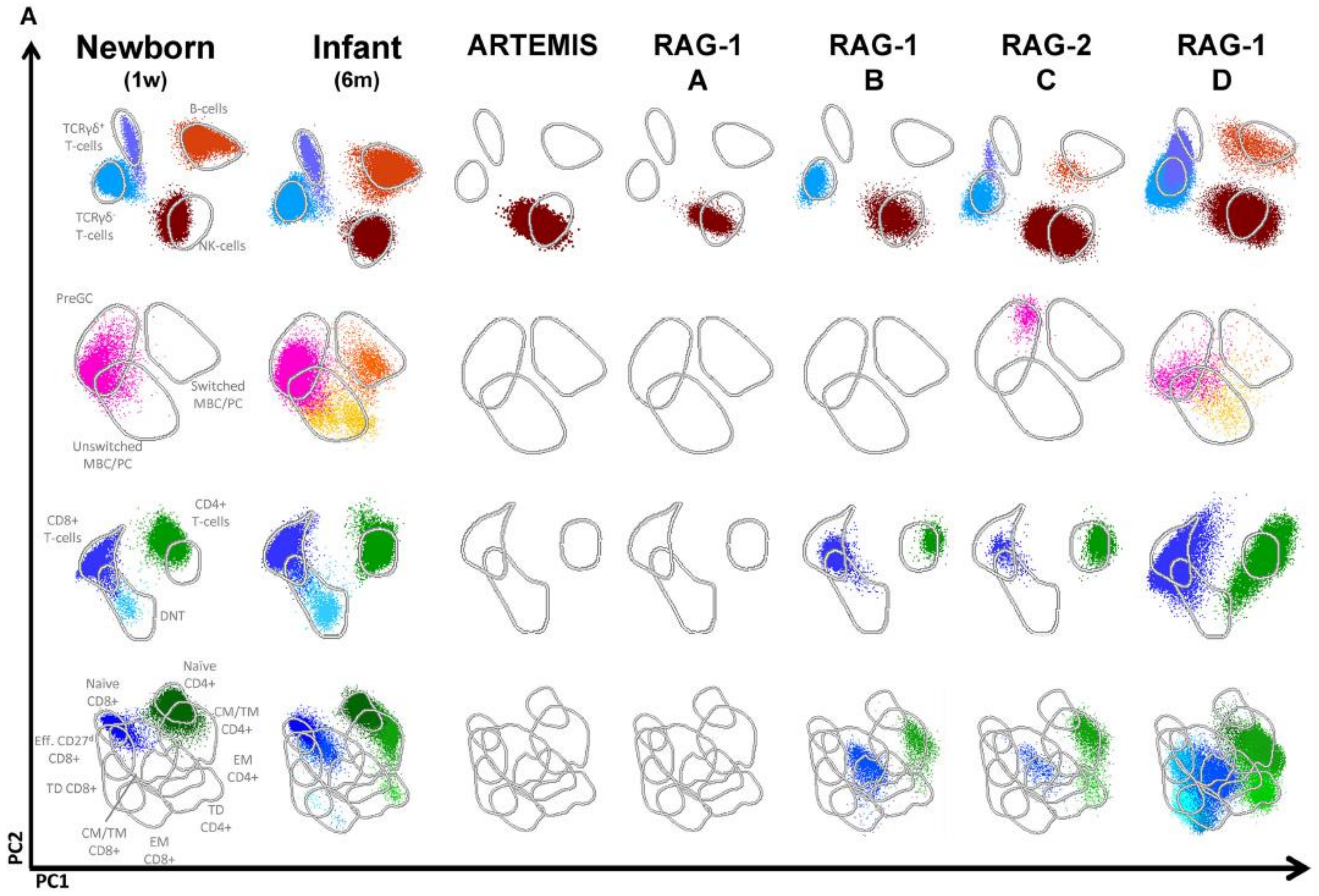
D

Subset	Phenotype
NK cells	$FSC^{int}/SSC^{int}/CD45^{hi}/CD16{+}CD56^{+}/CD3^{-}/CD19^{-}$
T cells	$FSC^{int}/SSC^{int}/CD45^{hi}/CD16{+}CD56^{-}/CD3^{+}/CD19^{-}$
CD4+ T-cells	$CD4^{+}/CD8^{-}/TCRgd^{-}$
Naïve CD4+	$CD27^{+}/CD45RA^{+}$
CM/TM CD4+	$CD27^{+}/CD45RA^{-}$
EM CD4+	$CD27^{-}/CD45RA^{-}$
TD CD4+	$CD27^{-}/CD45RA^{+}$
CD8+ T-cells	$CD4^{-}/CD8^{+}/TCRgd^{-}$
Naïve CD8+	$CD27^{+}/CD45RA^{+}$
CM/TM CD8+	$CD27^{+}/CD45RA^{-}$
Eff $CD27^{dim}$ CD8+	$CD27^{int}/CD45RA^{+}$
EM CD8+	$CD27^{-}/CD45RA^{-}$
TD CD8+	$CD27^{-}/CD45RA^{+}$
B cells	$FSC^{int}/SSC^{int}/CD45^{hi}/CD16{+}CD56^{-}/CD3^{-}/CD19^{+}$
PreGC	$CD27^{-}/smIgM^{+}/smIgD^{++}$
Unswitched MBC/PC	$CD27^{+}/smIgM^{++}/smIgD^{+}$
Switched MBC/PC	$CD27^{+}/smIgM^{-}/smIgD^{-}$



The EuroFlow PID Orientation Tube for Flow Cytometric Diagnostic Screening of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System, (Front Immunol. 2019)

2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας

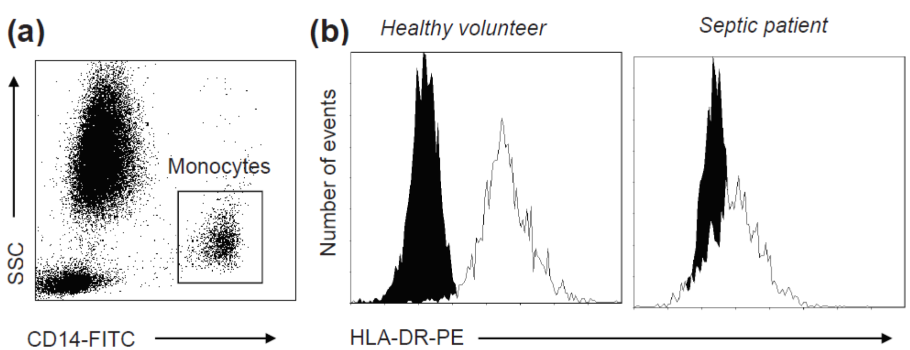


The EuroFlow PID Orientation Tube for Flow Cytometric Diagnostic Screening of Primary Immunodeficiencies of the Lymphoid System, (Front Immunol. 2019)

2.3 Δείκτες σηψαιμίας

2.3 Σε ερευνητική χρήση:

- Τμήματα επειγόντων περιστατικών:
    1. Μέτρηση αυξημένης έκφρασης CD64 στα Ουδετερόφιλα(n), απώλεια του HLADR στα μονοκύτταρα (m) ή αύξηση των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs, CD4+CD25++CD127-).
    2. Δείκτες οξείας αντίδρασης σε φλεγμονή.
- Πιθανή διάκριση του είδος του παθογόνου:
    1. nCD64+ σημαντικά αυξημένα σε βακτηριακές λοιμώξεις, mCD169+ σε ιογενείς (86% ευαισθησία 90% ειδικότητα).
    2. Μέτρηση με χρήση πρωτοκόλλου ενός σταδίου σε 15 λεπτά.

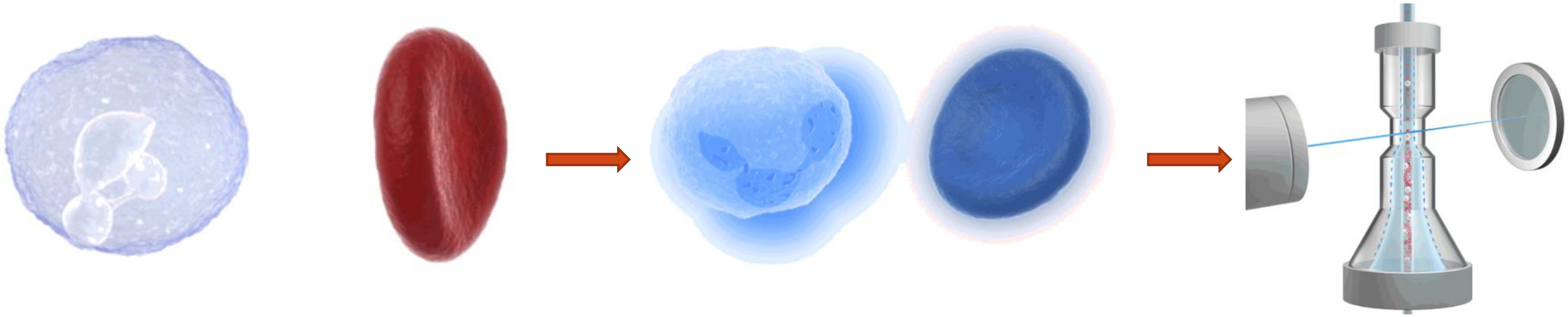


Clinical review flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions (Clin Care, 2011)
Clinical research assessment by flow cytometry of biomarkers for infectious stratification in an ER Department (Biom Medic, 2019)
A novel one-step extracellular staining for flow cytometry Proof-of-concept on sepsis-related biomarkers. (J Immunol Meth, 2019)

3. Ανίχνευση με χρήση χρωστικών

3.1 Αυτοματοποιημένη ανάλυση ούρων και υγρών σωματικών κοιλοτήτων:

- Χρήση χρωστικών που προσδένονται στοιχειομετρικά στο DNA/RNA μικροοργανισμών και δομών της μεμβράνης
- Ανάλυση ούρων για ύπαρξη μυκήτων, βακτηρίων (gram+ ή -), επιθηλιακών κυττάρων, λευκοκυττάρων (ουρολοιμώξεις) και ερυθρών (αιματουρία)
- Περίπου 120 δείγματα/ώρα αντί των ημερών που χρειάζεται μια καλλιέργεια αλλά που ακόμα αποτελεί το gold standard

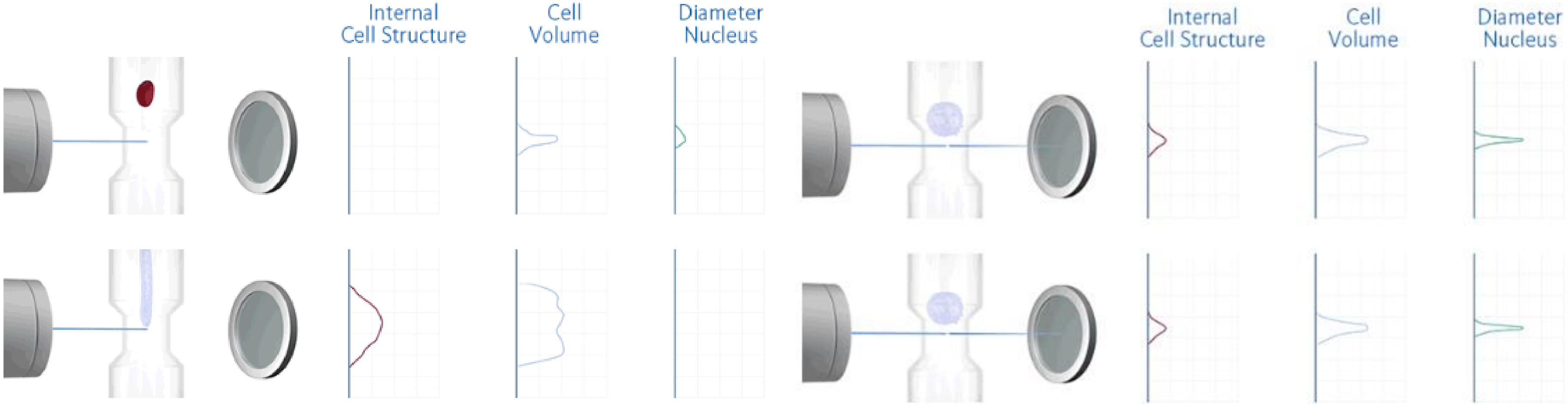


Systematic review and meta-analysis of flow cytometry in urinary tract infection screening (Clinica Chimica Acta, 2013)
Diagnosis of Urinary Tract Infections by Urine Flow Cytometry (Disease markers, 2019)
Evaluation of flow cytometry for the detection of bacteria in biological fluids (PLoS One, 2019)
https://www.sysmex-europe.com/n/products/diagnostics/fluorescence-flow-cytometry.html

3. Ανίχνευση με χρήση χρωστικών

3.1 Αυτοματοποιημένη ανάλυση ούρων και υγρών σωματικών κοιλοτήτων:

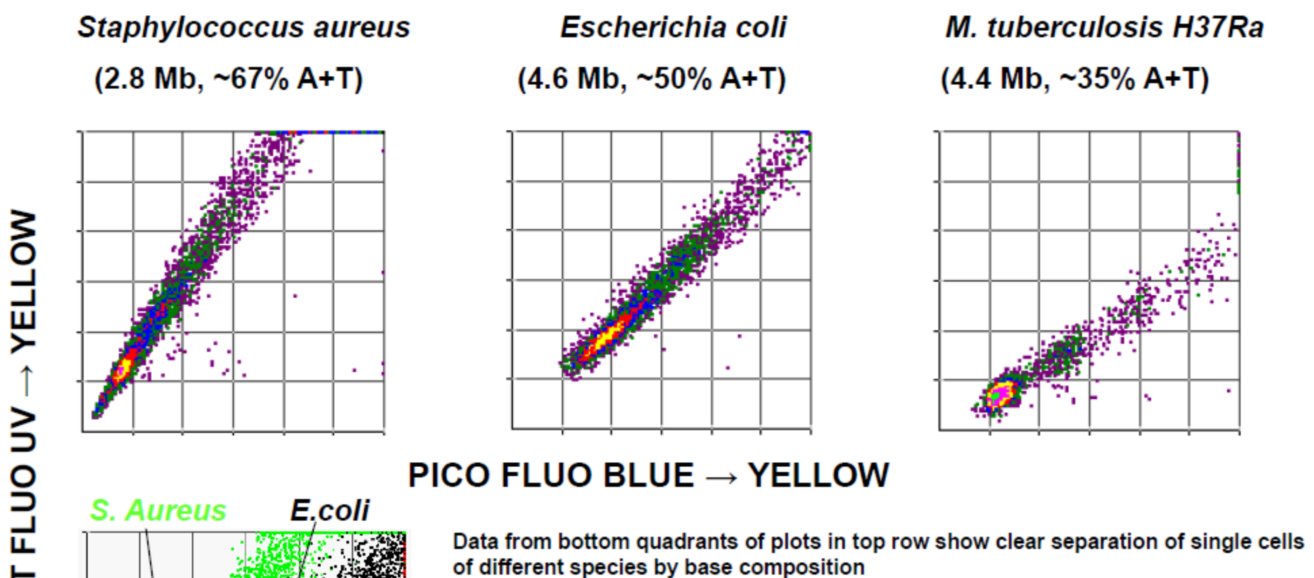
- 17 διαφορετικοί παράμετροι στα ούρα 7 σε άλλα σωματικά υγρά
- Ένα μπλε laser (488 nm), δύο σημεία ανάλυσης (επιφάνειας, SFch και πυρήνα, CRch). Μέτρηση FSC (μέγεθος), SSC (κοκκίωση, κρυσταλλικές δομές), φθορισμού χρωστικών (SFL) και depolarized side scattered light (DSS).

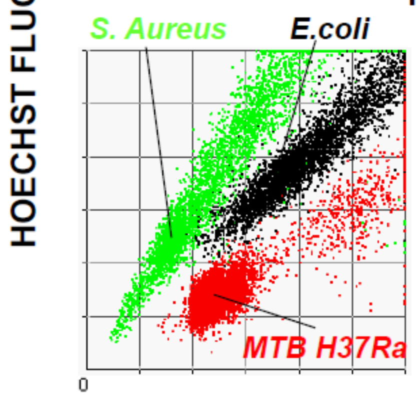


https://www.sysmex-europe.com/n/products/diagnostics/fluorescence-flow-cytometry.html

3. Ανίχνευση με χρήση χρωστικών

3.2 Χρήση χρωστικών που προσδένονται στο DNA:





- Διαφορετική ένταση χρώσης ανάλογα το μέγεθος του γονιδιώματος (Picogreen)
- Διαφορετική ένταση χρώσης ανάλογα με την αναλογία A:T (Hoechst 33342)

Martin G. Wilkinson - Flow Cytometry in Microbiology: Technology and Applications - Caister Academic Press (2015)

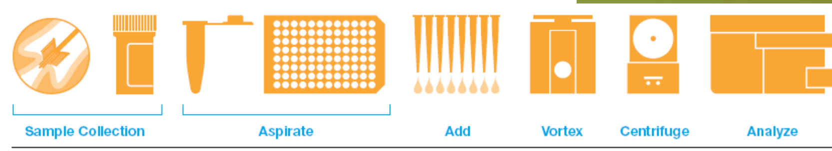
4. Ανίχνευση μετά από υβριδισμό

4.1 Ανίχνευση υπερέκφρασης mRNA του HPV:

- Σε κολποτραχηλικά επιθηλιακά κύτταρα από κυτταρολογία υγρής φάσης
- Χρήση πολλαπλών ιχνηθετών που αναγνωρίζουν το mRNA των E6/E7 ογκογονιδίων του ιου
- Αποτελέσματα εντός 4 ωρών

incellDx™

Simple Workflow



24 & 96 Test Procedure	Aspirate	Add	Vortex	Centrifuge	Waterbath
1	●	1 mL PBS	●	●	○
2	●	300 uL R1	○	○	○
	○	1 mL R2	●	●	○ (1 hr. wait)
3	●	1 mL R3	●	●	○
	Make the master mix by combining 100 uL R4 and 3 uL R5 per sample, vortex.				
4	○	100 uL R4/R5 mix	●	○	● 30 min
	○	1 mL R6	●	●	○
5	●	1 mL R7	○	○	● 15 min
	○	○	●	●	○
6	●	400 uL PBS	●	○	○

Start To Finish: Approx. 3 Hours

● Action ○ No Action Required

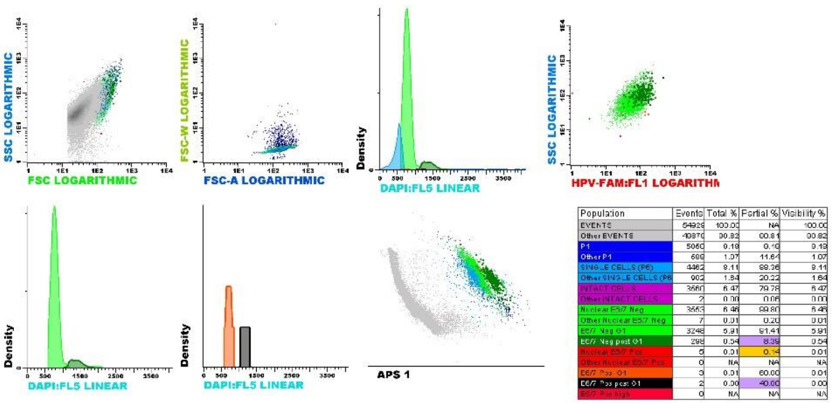
The sample is ready for analysis on the flow cytometer.

High-Throughput Cervical Cancer Screening Using Intracellular Human Papillomavirus E6 and E7 mRNA Quantification by Flow Cytometry. (American Journal of Clinical Pathology, 2005)

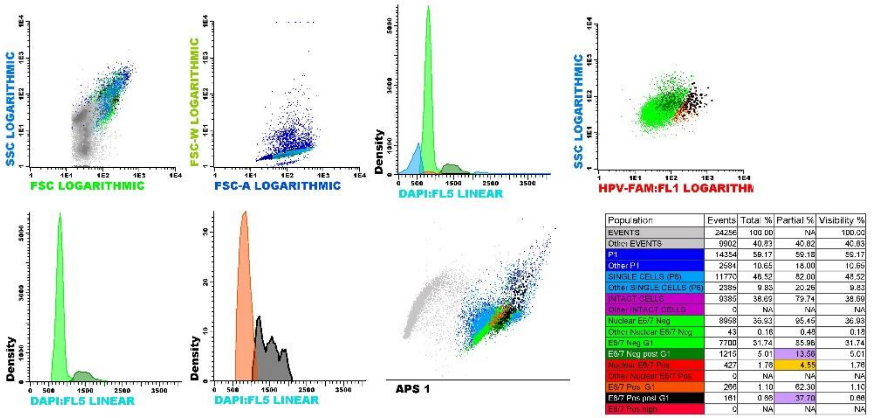
4. Ανίχνευση μετά από υβριδισμό

Συνδυασμός με χρωστική DNA (DAPI) για:

- την αναγνώριση των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται
- την αναγνώριση κυττάρων με ανευπλοειδία (καρκινικά)



Population	Events	Total %	Partial %	Visibility %
EVENTS	54929	100.00	NA	100.00
Other EVENTS	49879	90.82	90.81	90.82
P1	5050	9.19	9.19	9.19
Other P1	588	1.07	11.64	1.07
SINGLE CELLS (P6)	4462	8.11	88.36	8.11
Other SINGLE CELLS (P6	902	1.64	20.22	1.64
INTACT CELLS	3560	6.47	79.78	6.47
Other INTACT CELLS	2	0.00	0.06	0.00
Nuclear E6/7 Neg	3553	6.46	99.80	6.46
Other Nuclear E6/7 Neg	7	0.01	0.20	0.01
E6/7 Neg G1	3248	5.91	91.41	5.91
E6/7 Neg post G1	298	0.54	8.39	0.54
Nuclear E6/7 Pos	5	0.01	0.14	0.01
Other Nuclear E6/7 Pos	0	NA	NA	NA
E6/7 Pos G1	3	0.01	60.00	0.01
E6/7 Pos post G1	2	0.00	40.00	0.00
E6/7 Pos high	0	NA	NA	NA



Population	Events	Total %	Partial %	Visibility %
EVENTS	24256	100.00	NA	100.00
Other EVENTS	9902	40.83	40.82	40.83
P1	14354	59.17	59.18	59.17
Other P1	2584	10.65	18.00	10.65
SINGLE CELLS (P6)	11770	48.52	82.00	48.52
Other SINGLE CELLS (P6)	2385	9.83	20.26	9.83
INTACT CELLS	9385	38.69	79.74	38.69
Other INTACT CELLS	0	NA	NA	NA
Nuclear E6/7 Neg	8958	36.93	95.45	36.93
Other Nuclear E6/7 Neg	43	0.18	0.48	0.18
E6/7 Neg G1	7700	31.74	85.96	31.74
E6/7 Neg post G1	1215	5.01	13.56	5.01
Nuclear E6/7 Pos	427	1.76	4.55	1.76
Other Nuclear E6/7 Pos	0	NA	NA	NA
E6/7 Pos G1	266	1.10	62.30	1.10
E6/7 Pos post G1	161	0.66	37.70	0.66
E6/7 Pos high	0	NA	NA	NA

Αρνητικό HPV L1 DNA-.

Post G1 8%. E6/E7+ 1.09%

HSIL HPV L1 DNA-

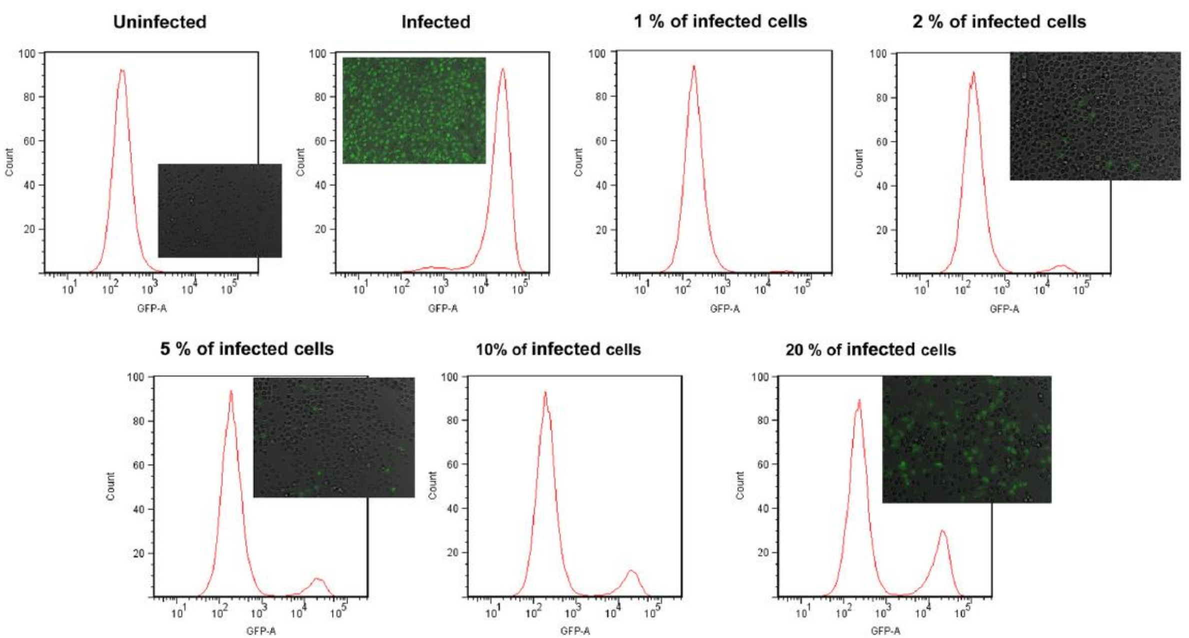
Post G1 13%. E6/E7+ 4.55%

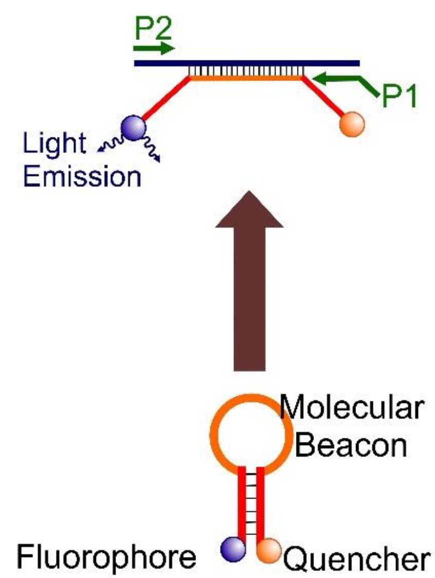
Staging pre-cervical cancer using combined E6, E7 mRNA quantification and cell cycle analysis (OncoTect 3Dx), EuroGin, 2016

4. Ανίχνευση μετά από υβριδισμό

4.2 Χρήση μοριακών ιχνηθετών (beacons) για in-vivo ανίχνευση παθογόνων :

- Πρωτόκολλο υβριδισμού 30 λεπτών. Ανίχνευση μολυσμένων (φθοριζόντων) κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.





Use of Flow Cytometry for Rapid, Quantitative Detection of Poliovirus-Infected Cells via TAT Peptide-Delivered Molecular Beacons (Applied and Environmental Microbiology, 2012)

5. Συνδυασμός χρωστικών ιχνηθετών, αντισωμάτων

Πολλαπλές εφαρμογές χωρίς ευρεία κλινική χρήση που αφορούν:

- Άμεση ταυτοποίηση βακτηρίων, μυκήτων, παρασίτων και ιών (αντιγόνων ή νουκλεϊκών οξέων)
- Χρήση φθοριζόντων σφαιριδίων (πολυπαραμετρική ELISA) για ορολογική αναγνώριση των παθογόνων
- Χρήση της κυτταρομετρίας για την ταυτοποίηση ενώσεων με αντιμικροβιακή δράση (μέτρηση νεκρών κυττάρων ή αλλαγές στην μεμβράνη)
- Παρακολούθηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας
- Φορτίο μικροοργανισμών στο νερό (πόσιμο, εμφιαλωμένο)

Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology (Clinical Microbiology Reviews, 2000)
Martin G. Wilkinson - Flow Cytometry in Microbiology_- Technology and Applications. (Caister Academic Press, 2015)

Χρήστης

Ένας χρήστης κυτταρομετρίας δυνητικά μπορεί να:

- Παραλαμβάνει και ελέγχει τα δείγματα και το ιστορικό τους
- Εκτελεί τα πρωτόκολλα προετοιμασίας και χρώσης
- Εκτελεί τον έλεγχο λειτουργίας του κυτταρομέτρου
- Αναλύει τα δείγματα, το οποίο περιλαμβάνει:
    - Επιλογή των κατάλληλων ρυθμίσεων και πρότυπων αρχείων
    - Ρύθμιση των PMTs, ταχύτητας, καθαρισμού ανεπιθύμητων γεγονότων

Ως αποτέλεσμα είναι απαραίτητες:

- Εμπειρία στη λειτουργία του κυτταρομέτρου και γνώση κυτταρικής βιολογίας και ανοσολογίας
- Ικανότητα εκτίμησης των αποτελεσμάτων τη στιγμή που αναλύεται το δείγμα και διόρθωση ή επανάληψη μετρήσεων

Κοινά λάθη (και πώς να τα αποφύγεις)

Προετοιμασία δείγματος:

- Δείγματα με πήγμα, μυελός των οστών και όλα τα δείγματα που πιθανώς να έχουν ομάδες κυττάρων, τεμάχια ιστού ή εξωγενή σωμάτια (τροφή, βλέννα κ.α.) χρειάζονται διήθηση με φίλτρο (50-100μm, First Law)
- Σχεδιασμός panel, επιλογή κλώνων και τιτλοποίηση τους
- Τα πρωτόκολλα έχουν φτιαχτεί για να τηρούνται (Αυτός που το έφτιαξε συνήθως ξέρει καλύτερα)

Μέτρηση και ανάλυση:

- Απουσία ενός αντισώματος σε μια 8χρωμία συνήθως καθιστά το αποτέλεσμα μη ερμηνεύσιμο
- Επιλογή σωστής ταχύτητας ανάλυσης ανά εφαρμογή (π.χ. για τον κυτταρικό κύκλο είναι απαραίτητο <200 cells/sec)
- Περιοχές και οριοθετήσεις έχουν τεθεί με βάση συγκεκριμένα αντισώματα, συνδυασμούς και ρυθμίσεις

Shapiro's 3rd Law: "What's in the bottle isn't necessarily what's in the label"
Shapiro's 6th law: "There are some cell identification problems which even monoclonal antibodies can't solve"

Β΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας ΠΓΝ «ΑΤΤΙΚΟΝ», Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

1. Βίντεο: http://www.lifetechnologies.com/gr/en/home/support/tutorials.html
2. Βιβλία: "Practical Flow Cytometry", H. Shapiro, 2003, 4th ed Willy
3. Παρουσιάσεις: http://www.cyto.purdue.edu/class/bms602a/index.htm
4. Ελληνικά: http://www.kyttarometria.gr/library.html

Καθηγητής Ι.Γ. Παναγιωτίδης
Αν. Καθηγητής Π. Φούκας

Α. Σπάθης, Βιολόγος
Χ. Κοτταρίδη, Βιολόγος