

Κυτταρομετρία Ροής και Λοιμώξεις

Δρ. Άρης Σπάθης

Βιολόγος, ESCCA certified Cytometrist, SCYM (ASCP)

Β' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας

Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ»,

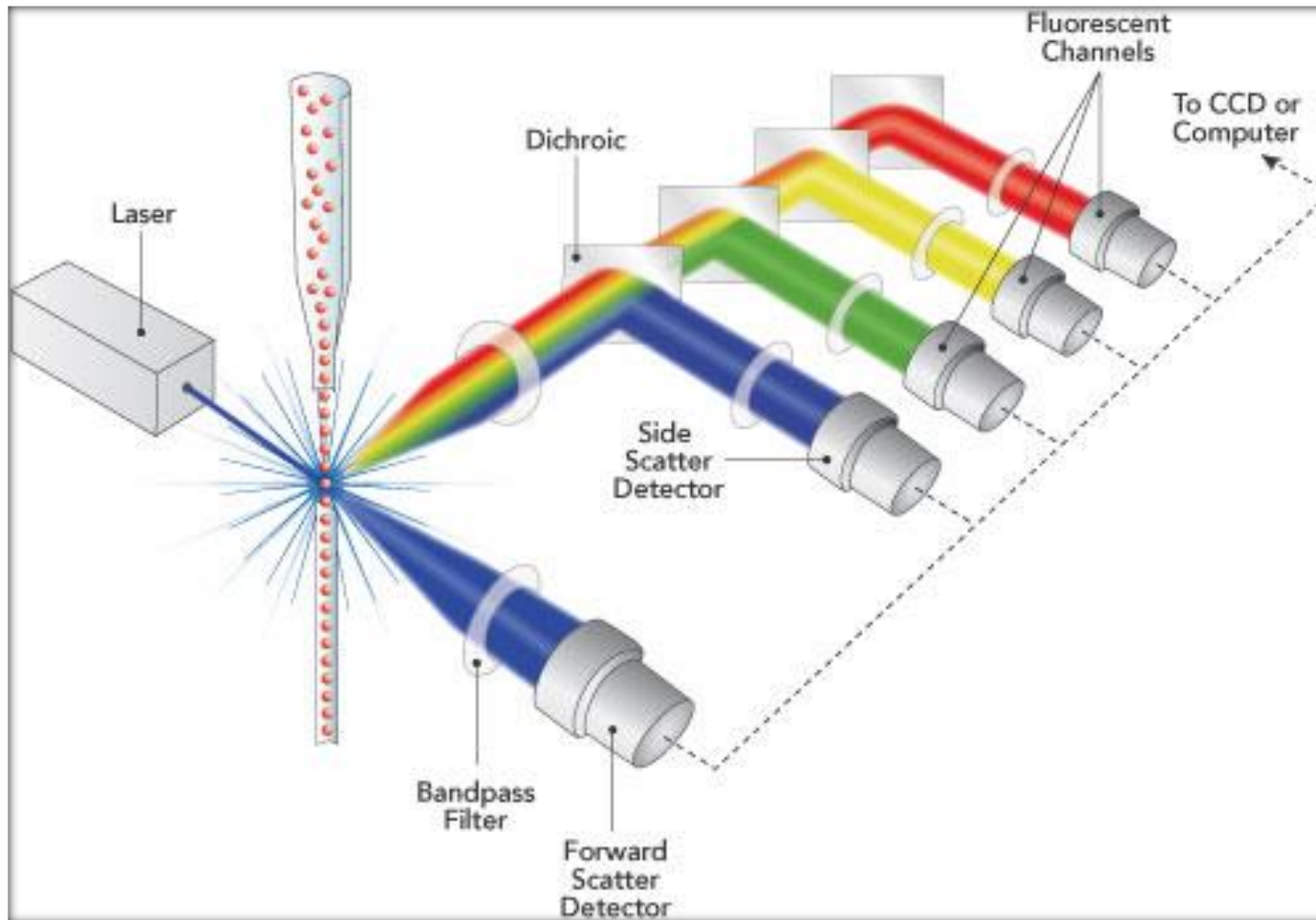
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Κυτταρομετρία Ροής

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

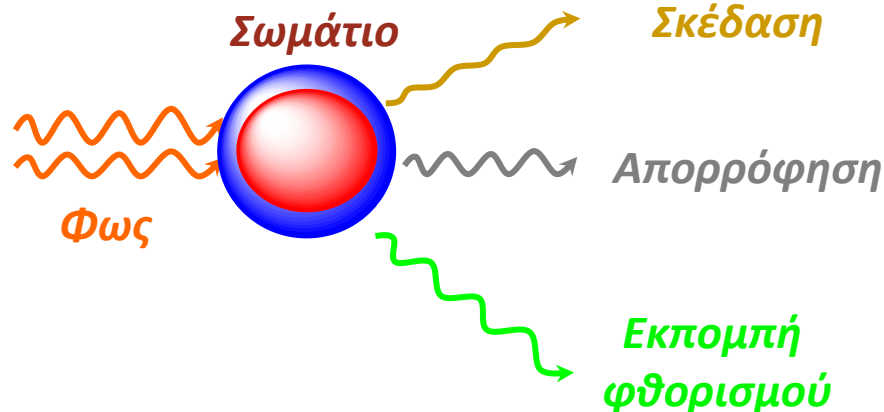
1. Τα κύτταρα σημαίνονται με φθορίζοντα αντισώματα, χρωστικές (pH, DNA, RNA) ή ιχνηθέτες
2. Τα κύτταρα υποχρεούνται να περάσουν από δίοδο τουλάχιστον μίας φωτεινής πηγής (Laser) σε νηματική ροή
3. Το προσπίπτων φως σκεδάζεται (διάθλαση, ανάθλαση, περίθλαση) σε διαφορετικές γωνίες
4. Φθορισμός ορισμένου 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



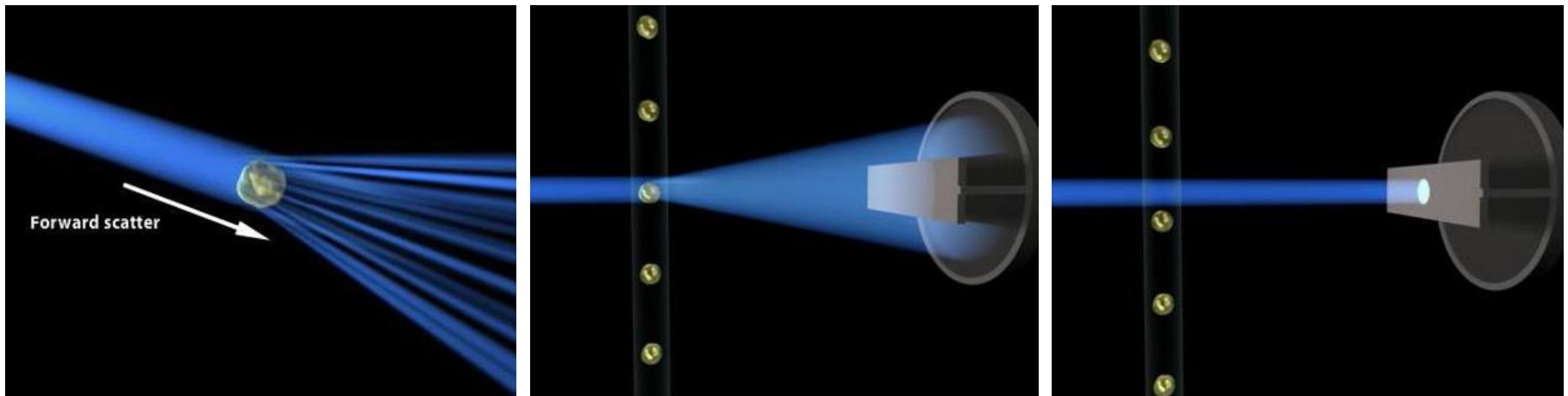
Φως

- 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

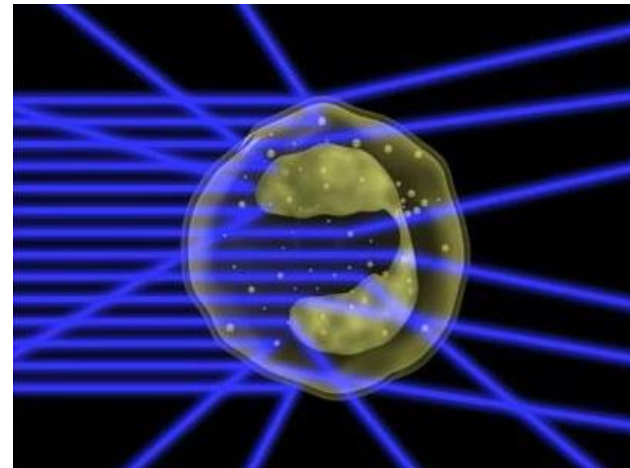
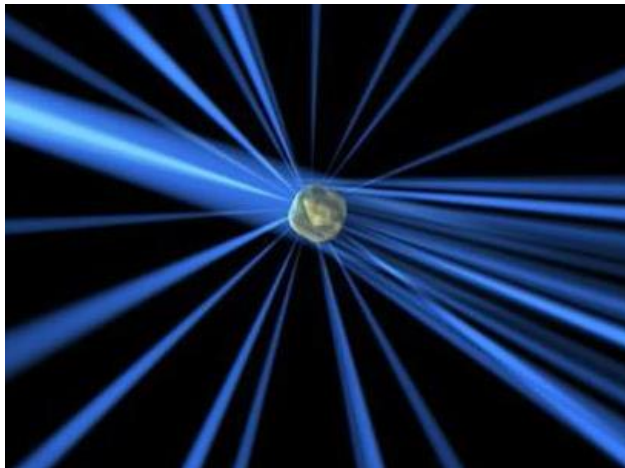
- Forward Scatter, FSC
 - Οφείλεται στην περίθλαση του φωτός. Σε μικρές γωνίες είναι σχετιζόμενη με την έκταση της επιφάνειας (μέγεθος των κυττάρων)
 - Ανιχνεύεται παράλληλα με τον άξονα του προσπίπτοντος φωτός
 - Υπάρχει blocker ώστε να μην προσπίπτει η αρχική ακτίνα



Πλάγια σκέδαση

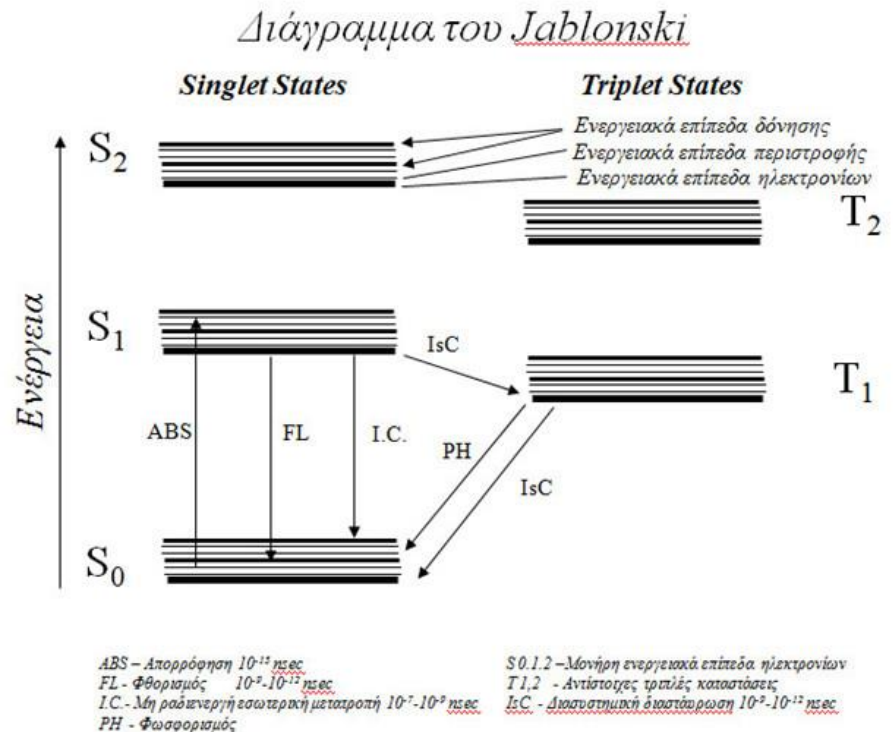
- Side Scatter, SSC

- 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



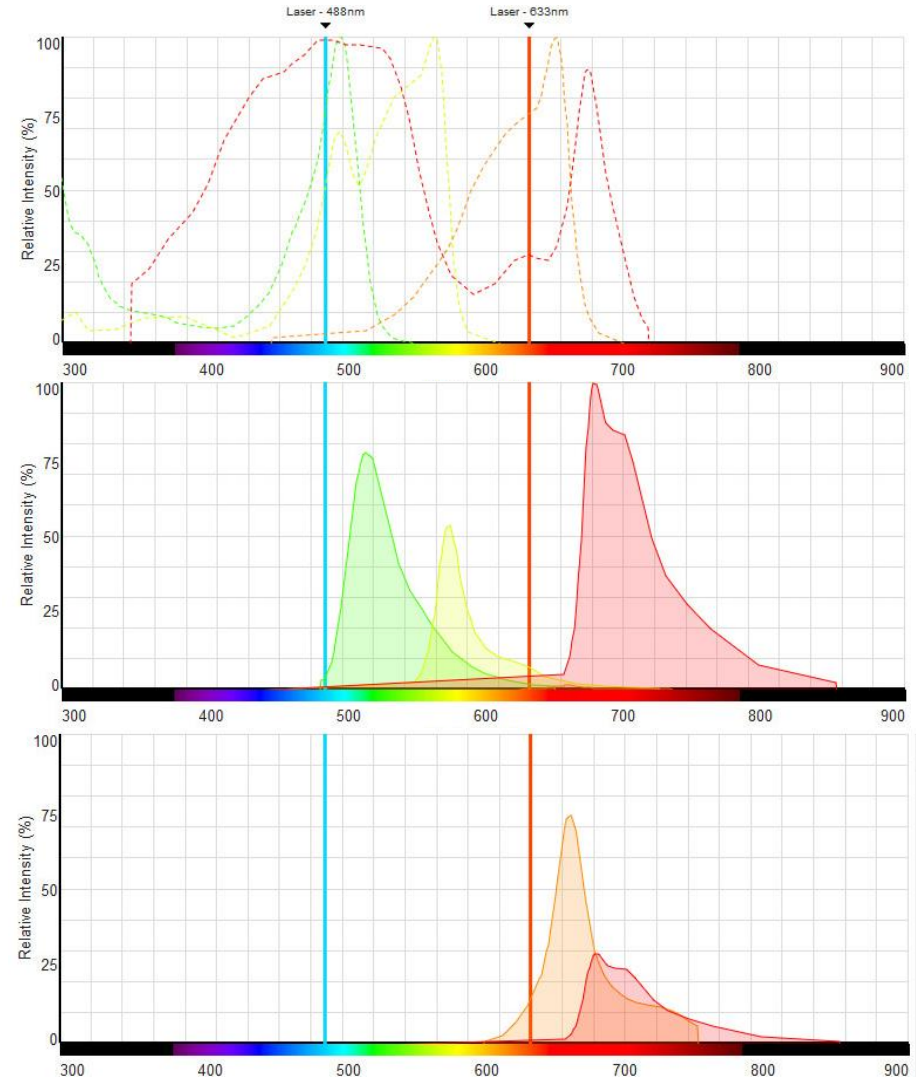
Φθορισμός

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



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. μιτοχόνδρια)

Αντισώματα

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

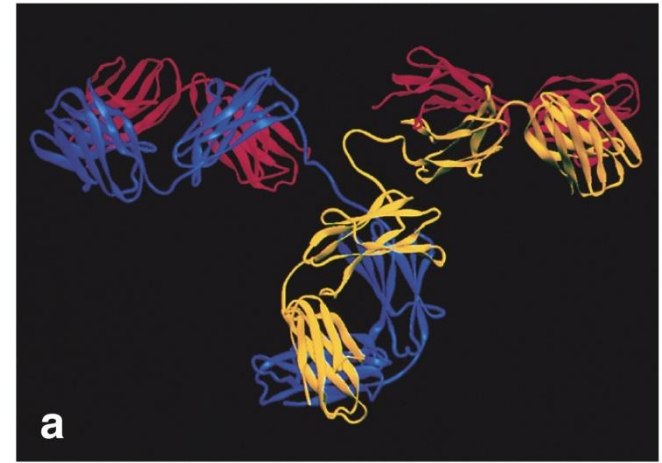


Figure 3-1 part 1 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

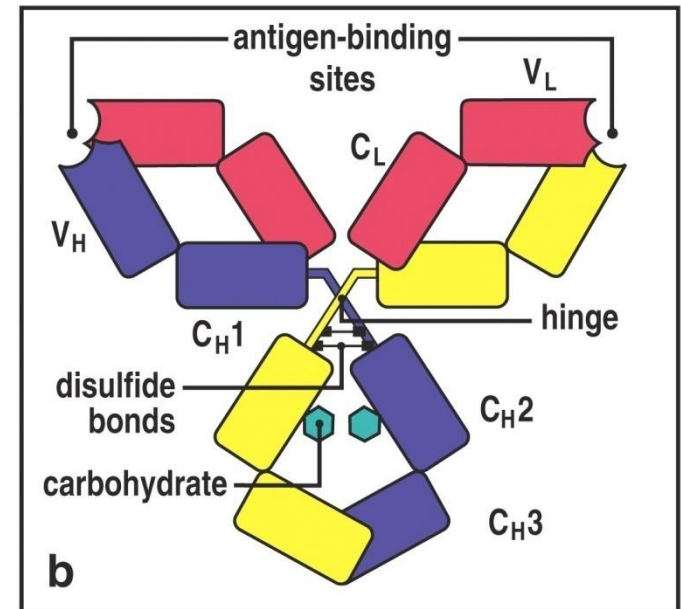
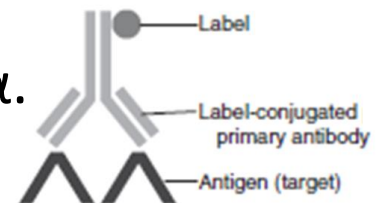


Figure 3-1 part 2 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

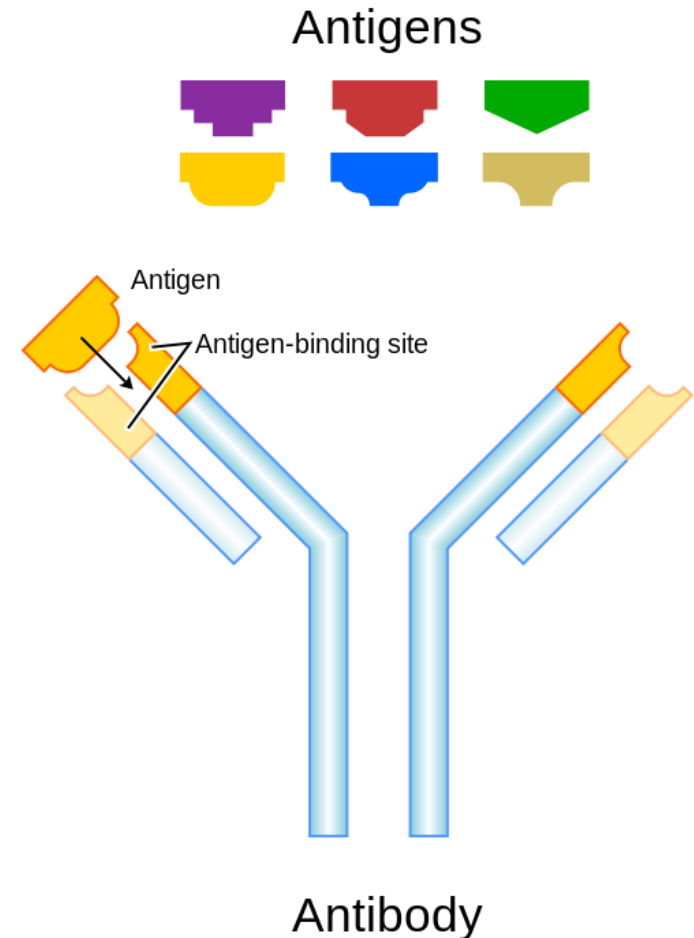
Πρωτογενές αντίσωμα

- 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 θερμοκρασία επώασης (4° C 12-18h, RT 15-60min)
- Υπάρχει η προτεινόμενη αραίωση από τον κατασκευαστή
 - για εύρος κυττάρων (0,5-2 10⁶ συνήθως σε 100μL). Συχνά απαραίτητος ο καθορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης (titration)
- Label στην κυτταρομετρία συνήθως φθοριόχρωμα.



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 περιορισμένου τμήματος του αντιγόνου 7-20 αμινοξέων (επίτοπος).

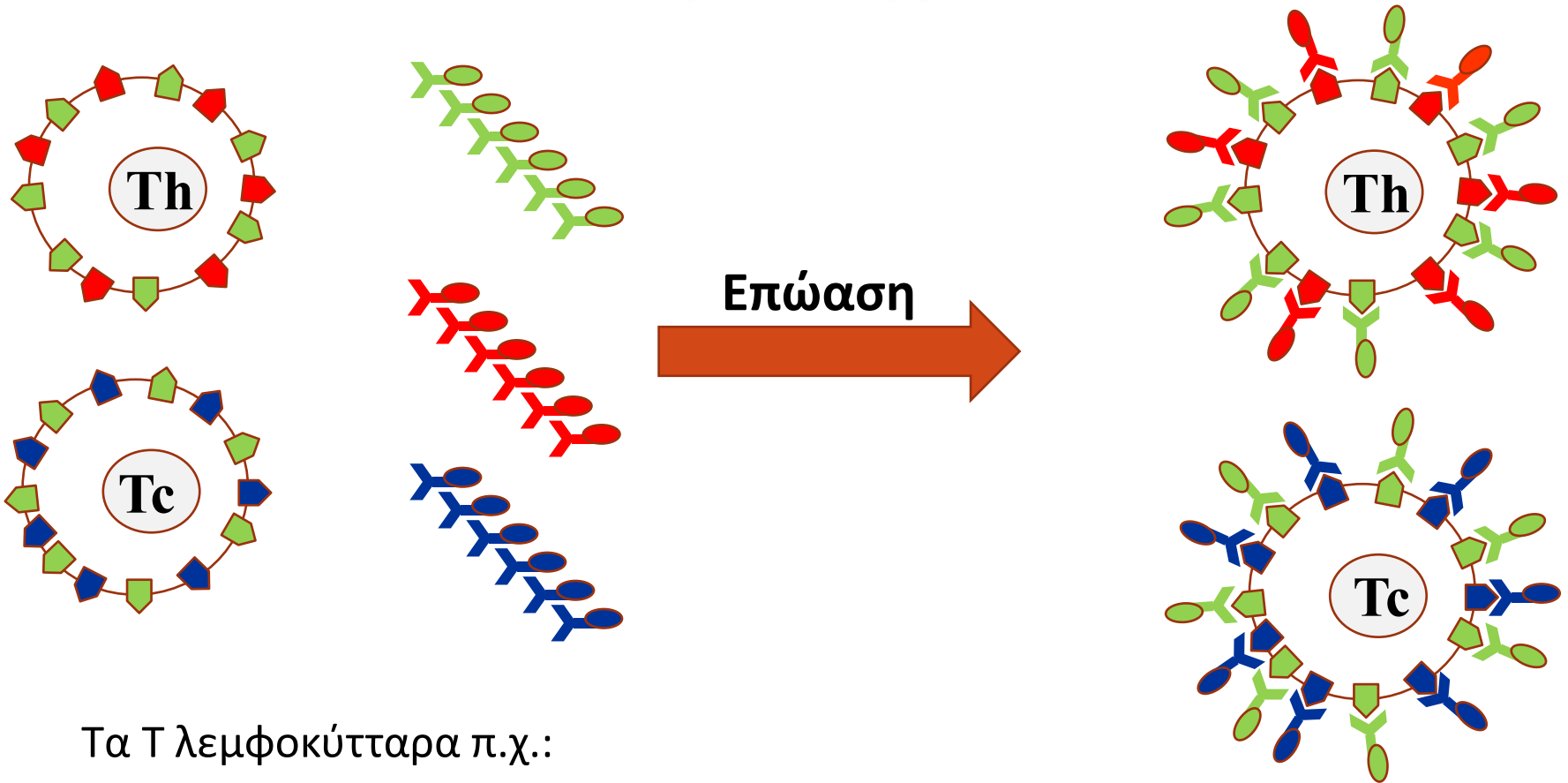


Cluster of Differentiation (CDs)

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 αλυσούς (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d που όλα περιέχουν b2mg)
 - Μόρια της ίδιας οικογένειας (CD66a, ... , CD66f)
 - Μόρια με τροποποιήσεις (CD15s, sialyated)

Παράδειγμα



Τα Τ λεμφοκύτταρα π.χ.:

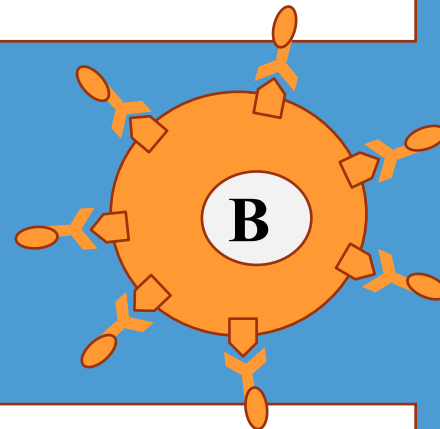
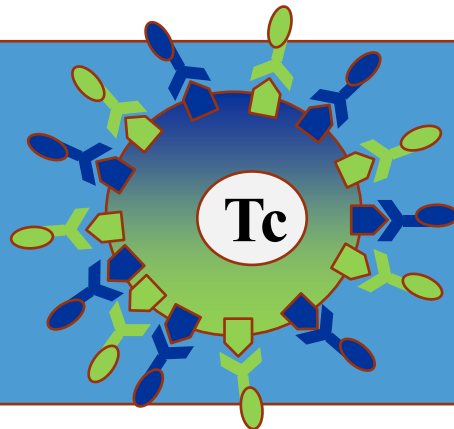
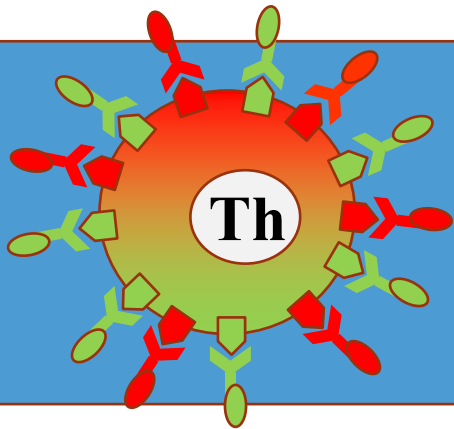
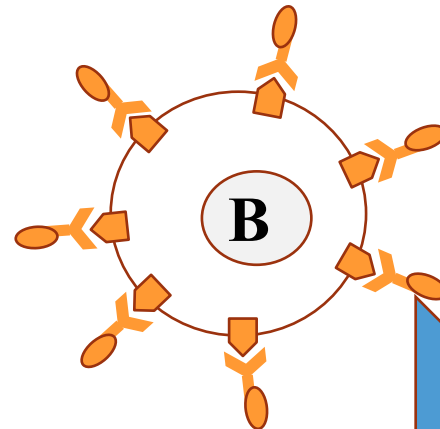
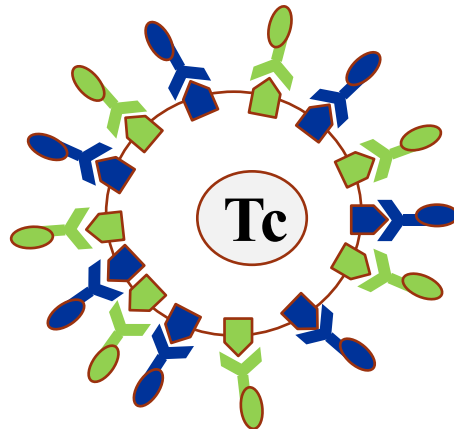
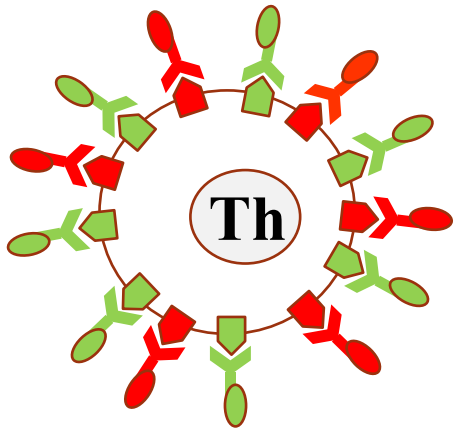
- Εκφράζουν ειδικά το **CD3** (≈ 120.000 αντίγραφα/κύτταρο)
- Τα βοηθητικά (T helpers) εκφράζουν **CD4** (≈ 100.000 αντίγραφα/κύτταρο)
- Τα κυτταροτοξικά (T cytotoxic) εκφράζουν **CD8** (≈ 90.000 αντίγραφα/κύτταρο)

■ Αντιγόνο

Y Αντίσωμα

● Φθοριόχρωμα

Παράδειγμα



 Αντιγόνο

 Αντίσωμα

 Φθοριόχρωμα

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

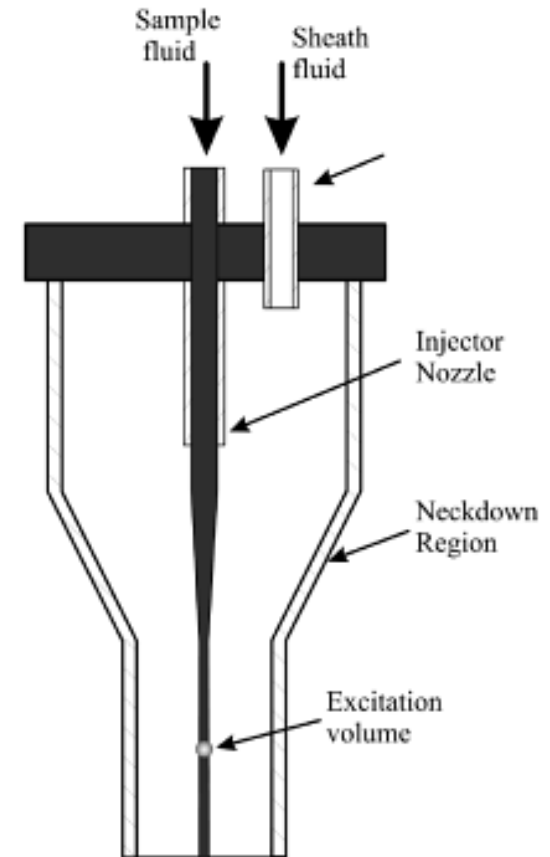
Το εναιώρημα των κυττάρων:

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 ddH₂O). 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 (νηματική ροή) χωρίς να αναμειγνύονται μεταξύ τους (υδροδυναμική εστίαση)
4. Το αναλυμένο μείγμα είτε καταλήγει στα απόβλητα είτε διαχωρίζεται (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Θάλαμος ροής (Flow Chamber)

Αποτελεί την καρδιά του κυτταρομέτρου

- Υδροδυναμική εστίαση των κυττάρων
- Συνήθως σημείο προσπίπτουσας φωτεινής πηγής και σκέδασης
- Ανάλογα με την εφαρμογή περνούν 100-10.000 κύτταρα / **sec**
- Κόστος > 1.000 €
- 1^{ος} νόμος της Κυτταρομετρίας (Shapiro) :
“A 51 μm particle **CLOGS** a 51 μm orifice!”



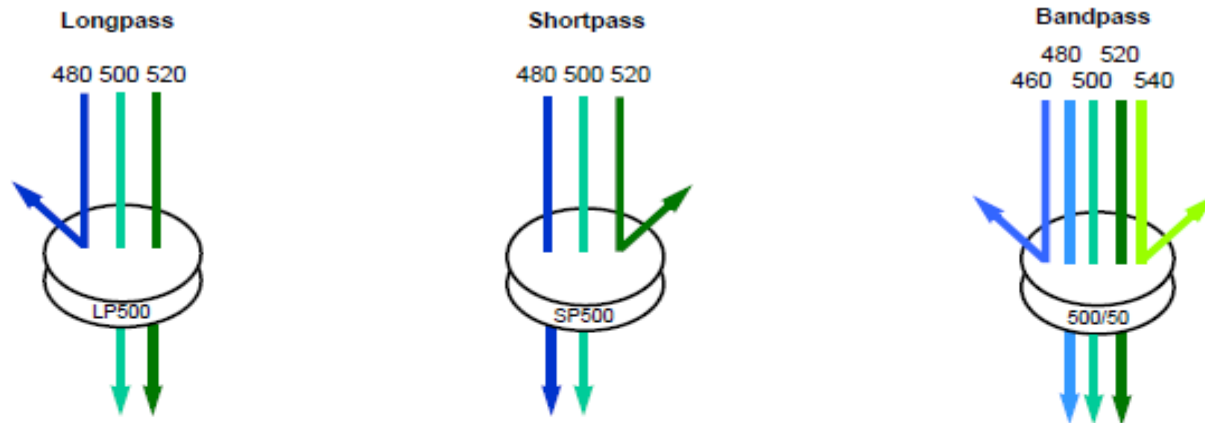
Optics

- 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° λειτουργούν ως φίλτρα. Σε γωνία 45° ως διχρωικοί καθρέπτες
- Περιορισμός στον αριθμό τους καθώς υπάρχουν απώλειες σε κάθε φίλτρο

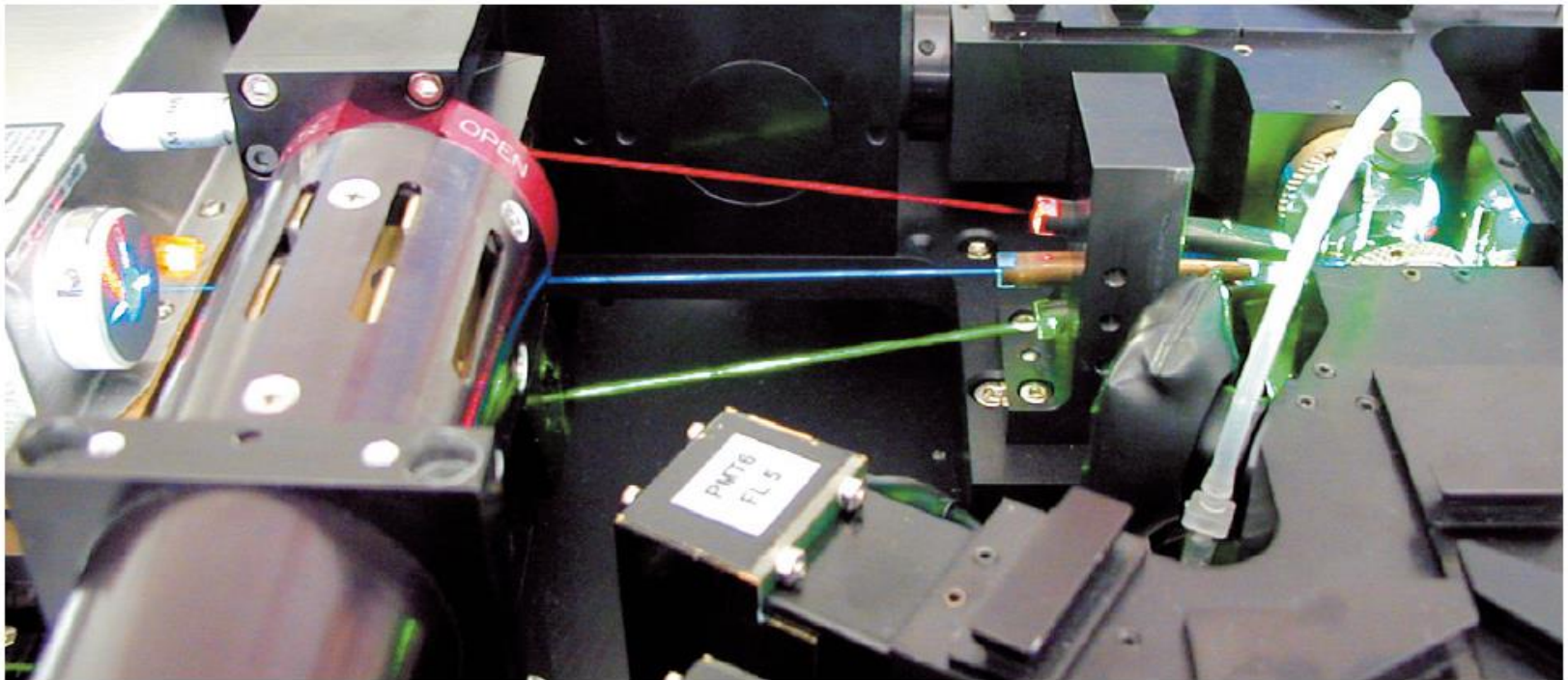


Εστίαση των Laser

Lasers

Laser focus point

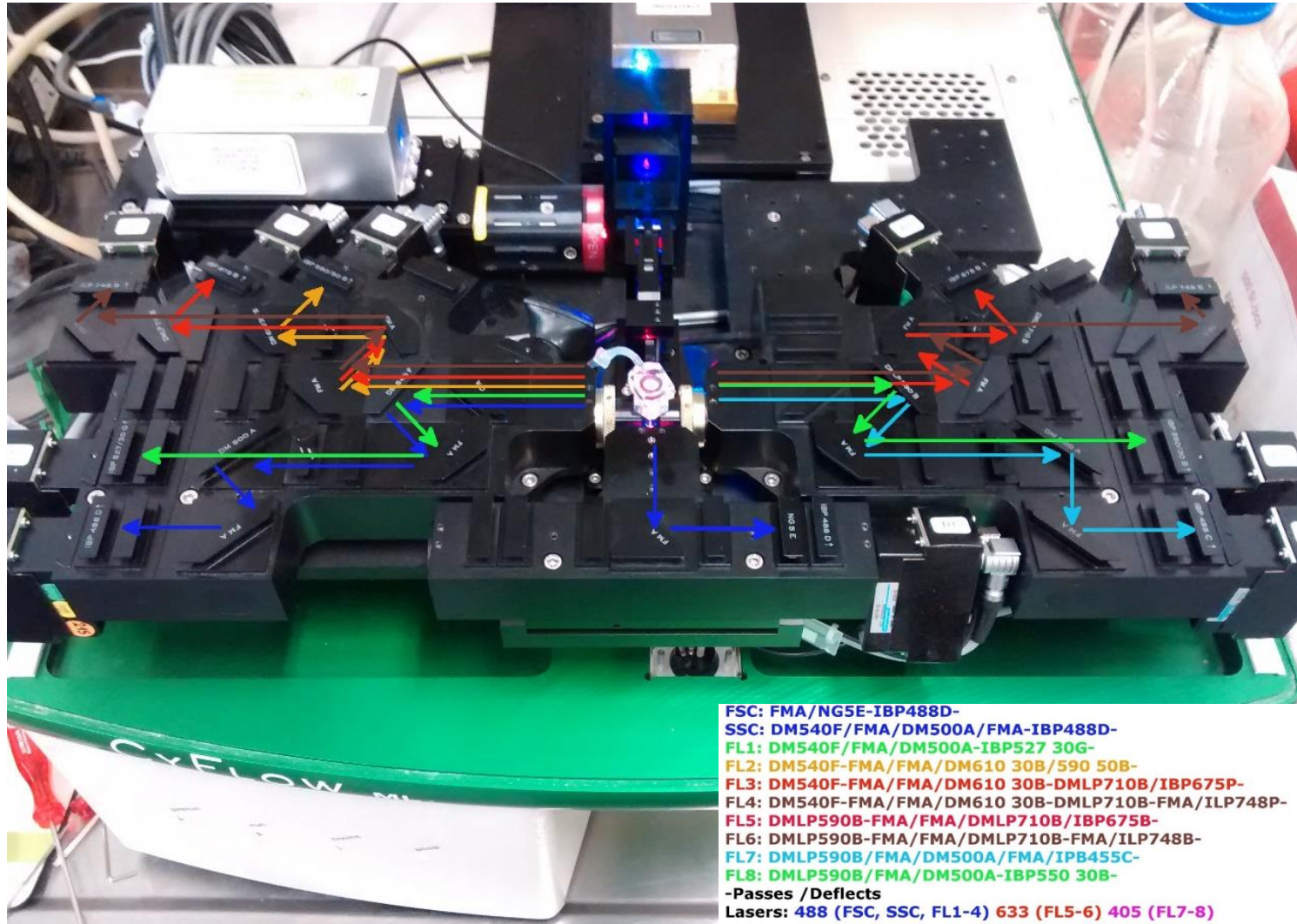
Interrogation point



Τα laser εστιάζονται σε συγκεκριμένο σημείο της ροής ώστε:

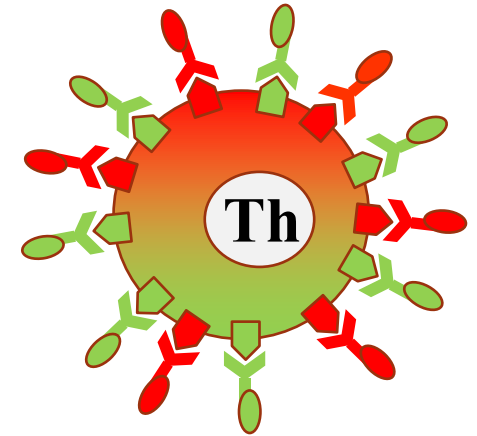
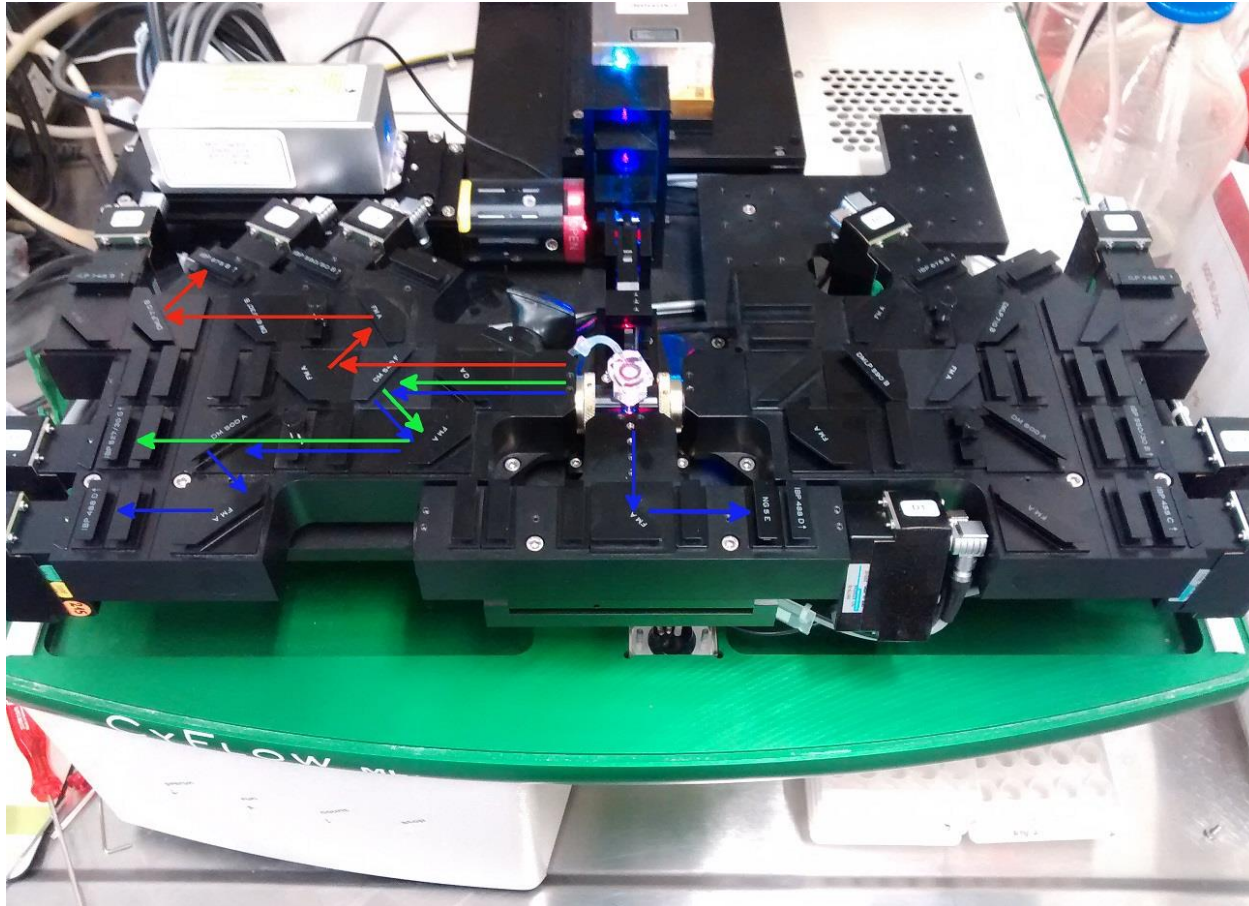
- να είναι ορισμένος ο χρόνος που διανύει μεταξύ κάθε laser το κύτταρο και να μπορούν να μετρηθούν οι παράμετροι φθορισμού

3 Laser – 10 Παράμετροι

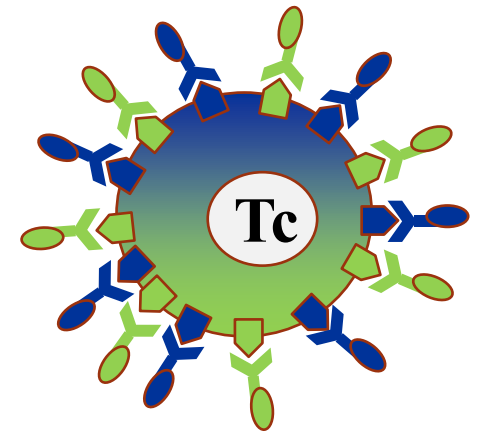
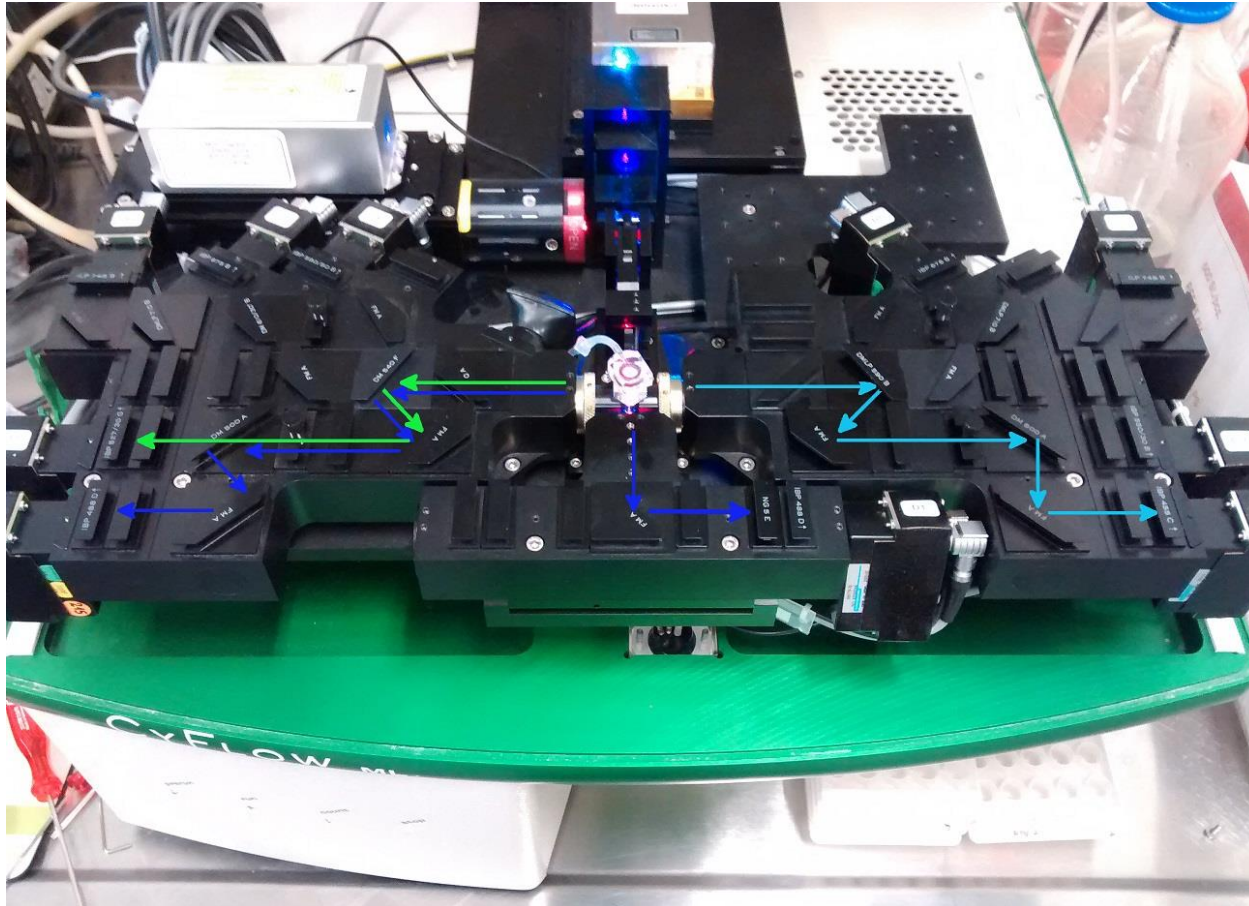


FSC: FMA/NG5E-IBP488D-
SSC: DM540F/FMA/DM500A/FMA-IBP488D-
FL1: DM540F/FMA/DM500A-IBP527 30G-
FL2: DM540F-FMA/FMA/DM610 30B/590 50B-
FL3: DM540F-FMA/FMA/DM610 30B-DMLP710B/IBP675P-
FL4: DM540F-FMA/FMA/DM610 30B-DMLP710B-FMA/ILP748P-
FL5: DMLP590B-FMA/FMA/DMLP710B/IBP675B-
FL6: DMLP590B-FMA/FMA/DMLP710B-FMA/ILP748B-
FL7: DMLP590B/FMA/DM500A/FMA/IPB455C-
FL8: DMLP590B/FMA/DM500A-IBP550 30B-
-Passes / Deflects
Lasers: 488 (FSC, SSC, FL1-4) 633 (FL5-6) 405 (FL7-8)

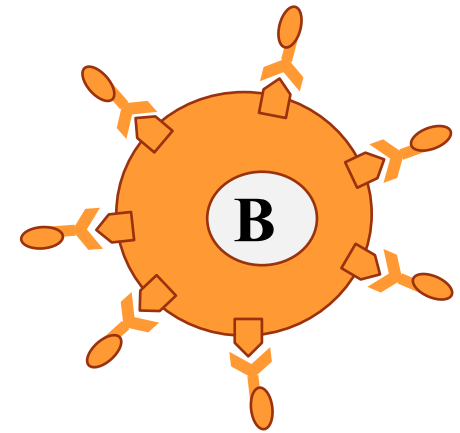
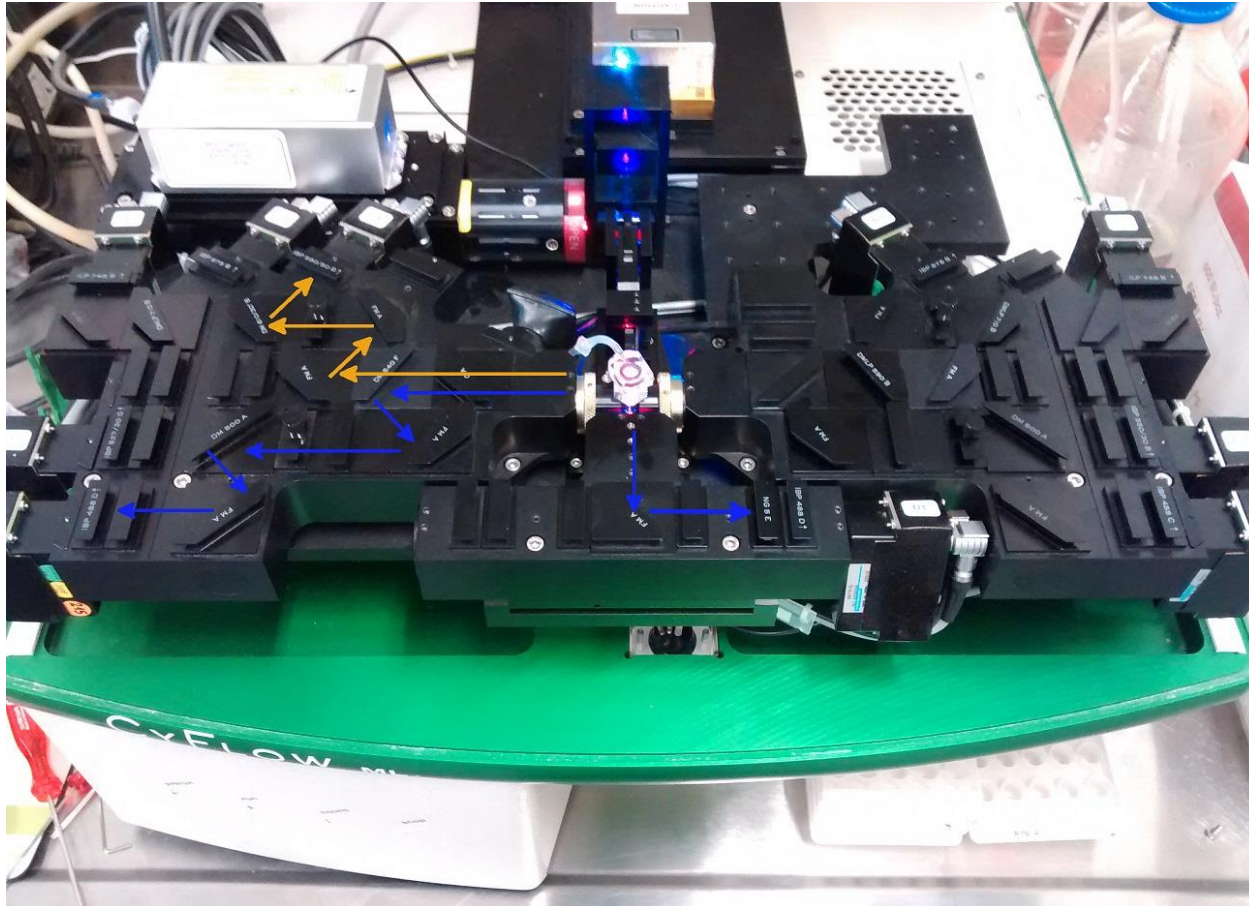
Παράδειγμα



Παράδειγμα



Παράδειγμα



Electronics

Φωτοδίοιοι (silica):

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

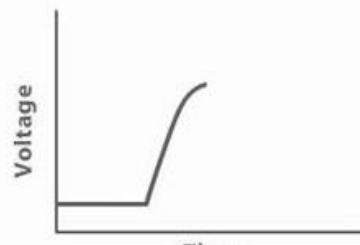
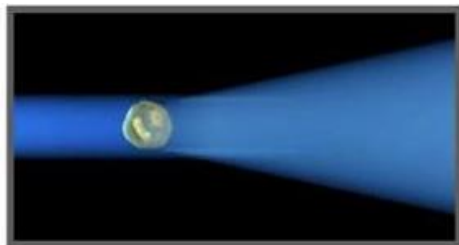
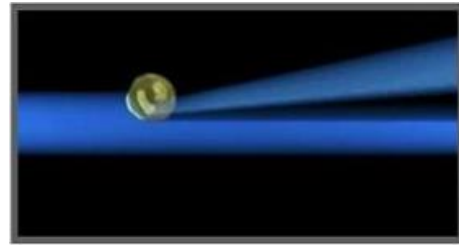
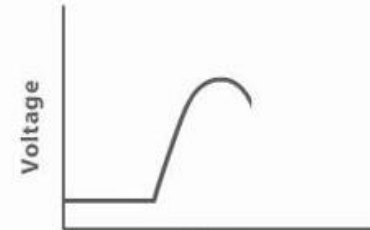
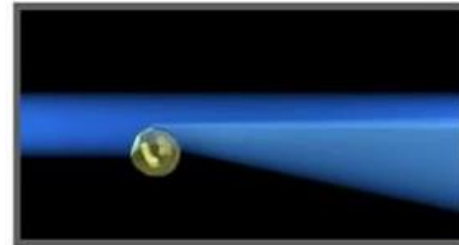
Φωτοπολλαπλασιαστές (PMTs):

- 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



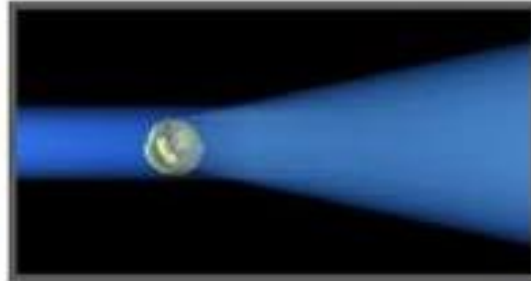
- Σωματίδιο που προσπίπτει στο laser προκαλεί σκέδαση φωτός
- Το φως συλλέγεται στον κατάλληλο PMT και μετατρέπεται σε διαφορά δυναμικού

Electronics

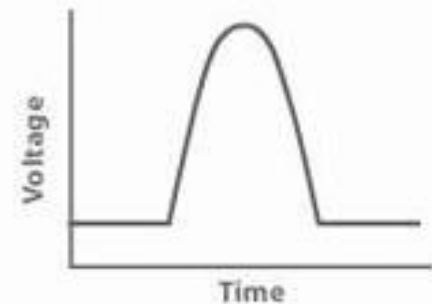
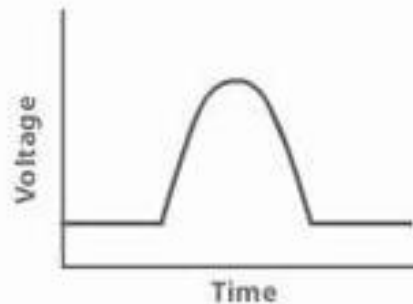
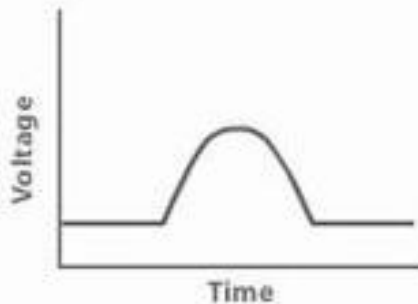
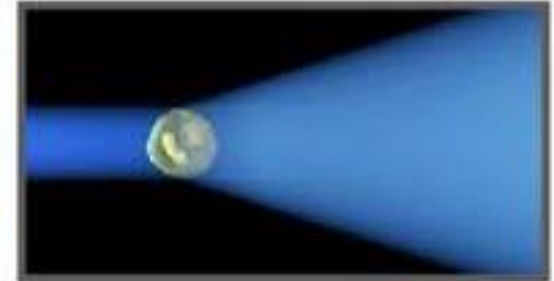
Small



Medium



Large



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

FCS Data

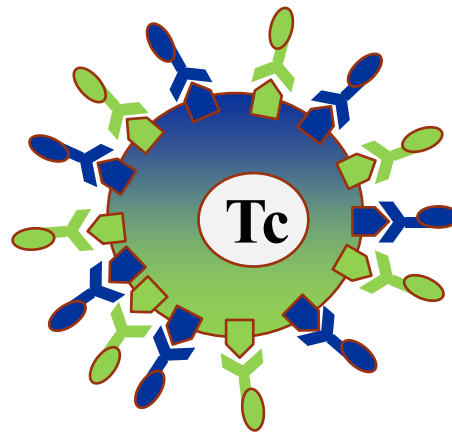
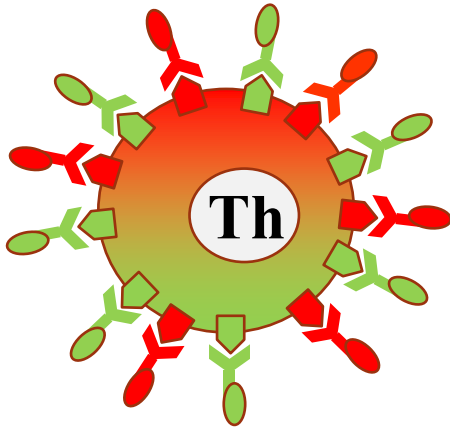
Το λογισμικό καταγράφει τις τιμές παραμέτρων για κάθε γεγονός που περνάει από το laser

- 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

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

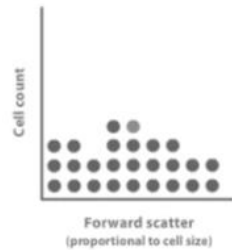
Software

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)

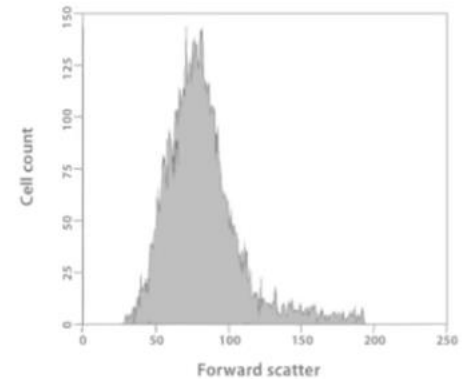
Από τα γεγονότα στο ιστόγραμμα

Histograms: Pulse Height/Width/Area



molecular
probes®

Histograms: Pulse Height/Width/Area



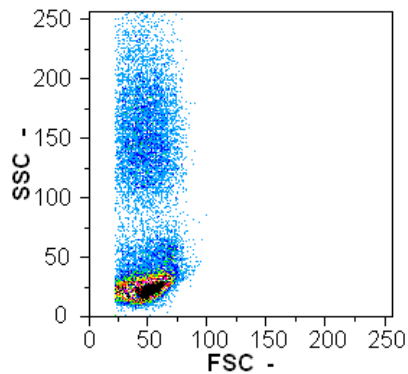
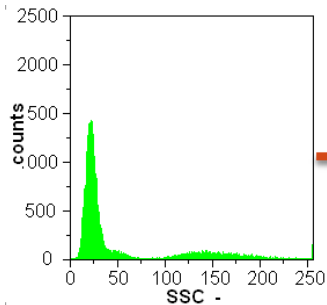
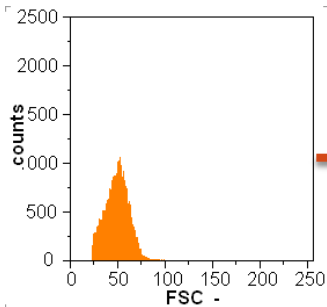
molecular
probes®

Τα γεγονότα αναπαρίστανται σε ιστογράμματα

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

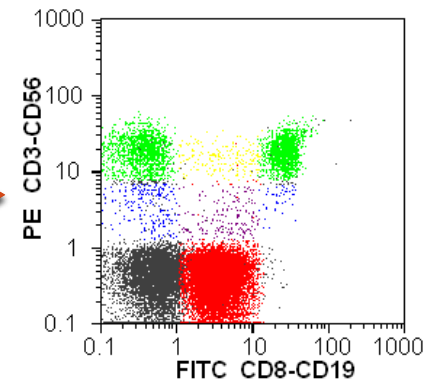
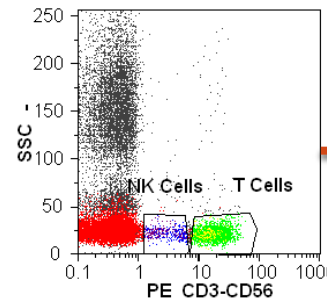
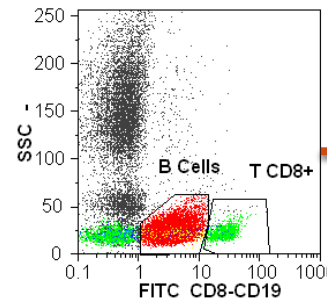
Ιστόγραμμα

Ιστόγραμμα μίας
παραμέτρου



2 παραμέτρων
(contour plots)

Ιστόγραμμα δύο
παραμέτρων

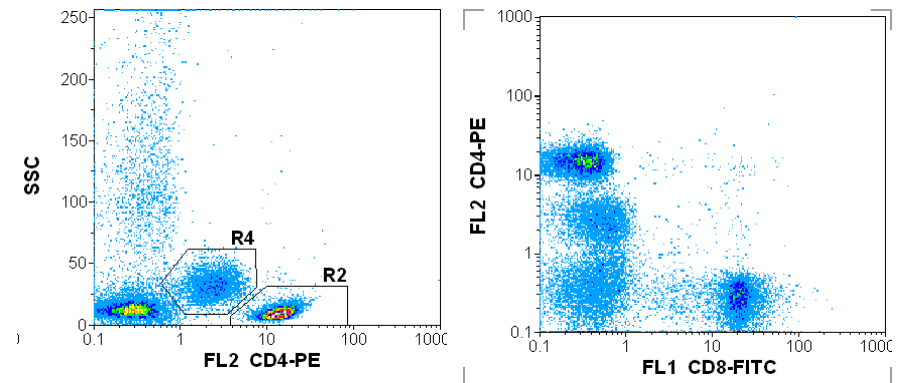
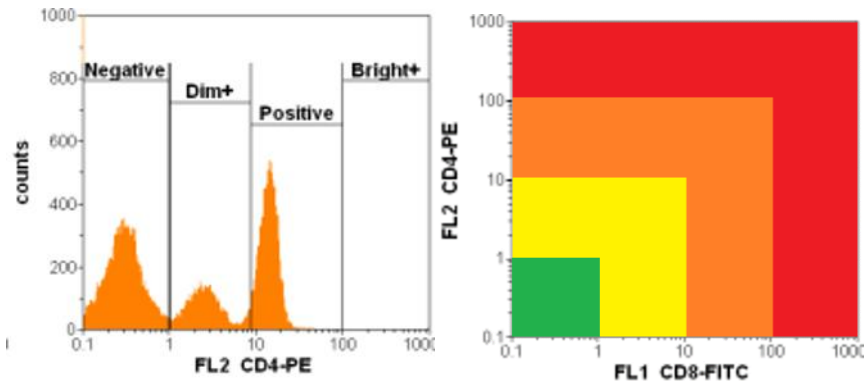


2 παραμέτρων
(dot plots)

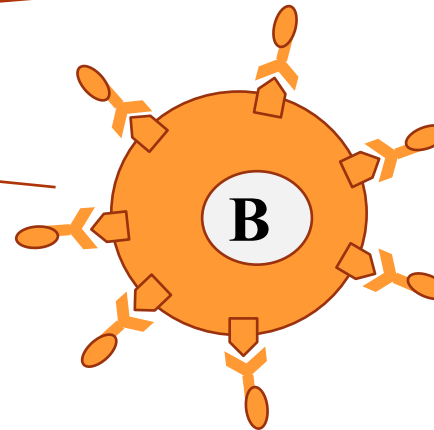
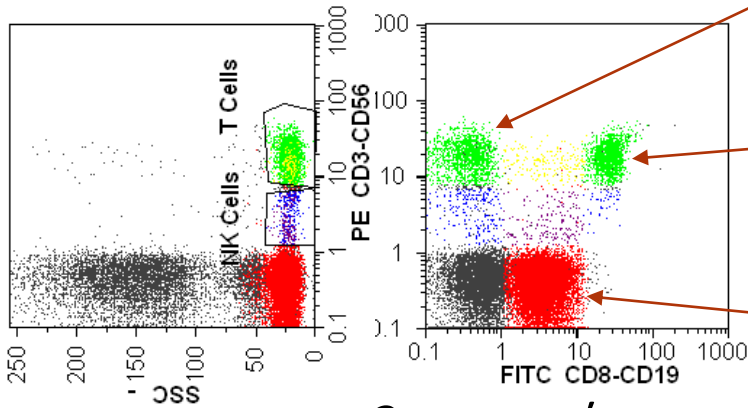
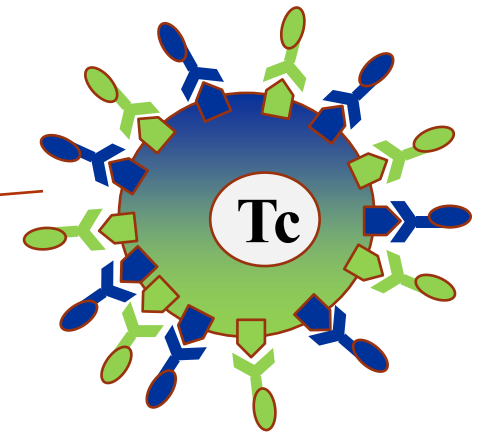
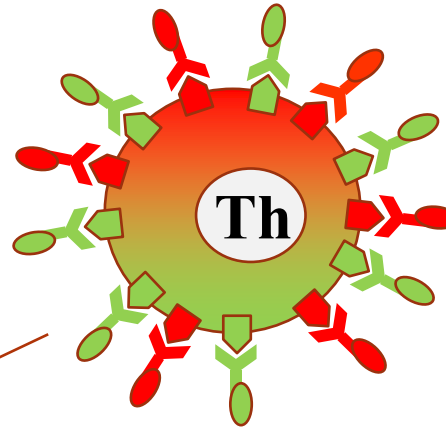
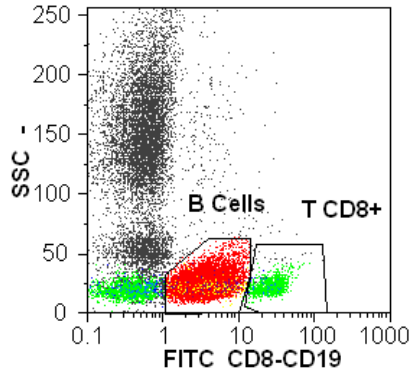
Ιστόγραμμα

Ρυθμίζουμε το όργανο κατάλληλα ώστε:

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

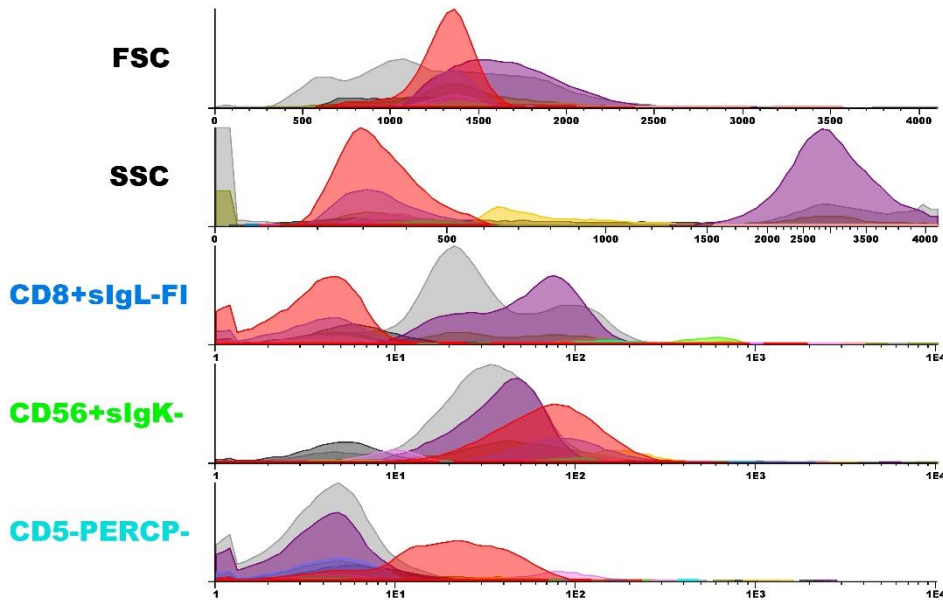


Ιστόγραμμα



2 παραμέτρων
(dot plots)

Ιστόγραμμα



APS 1

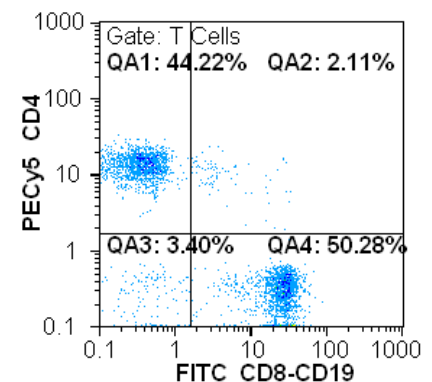
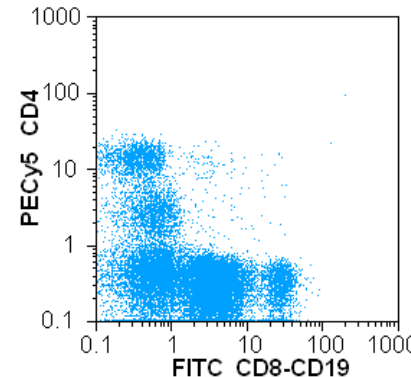
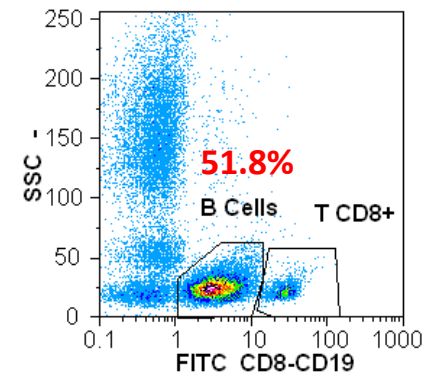
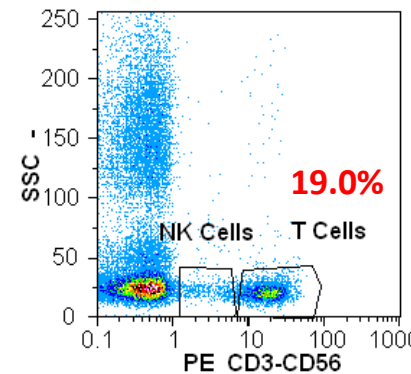
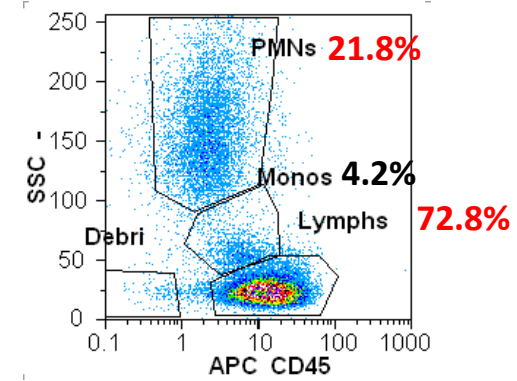
Πολλαπλών παραμέτρων
(Band)

Πολλαπλών παραμέτρων
(APS)

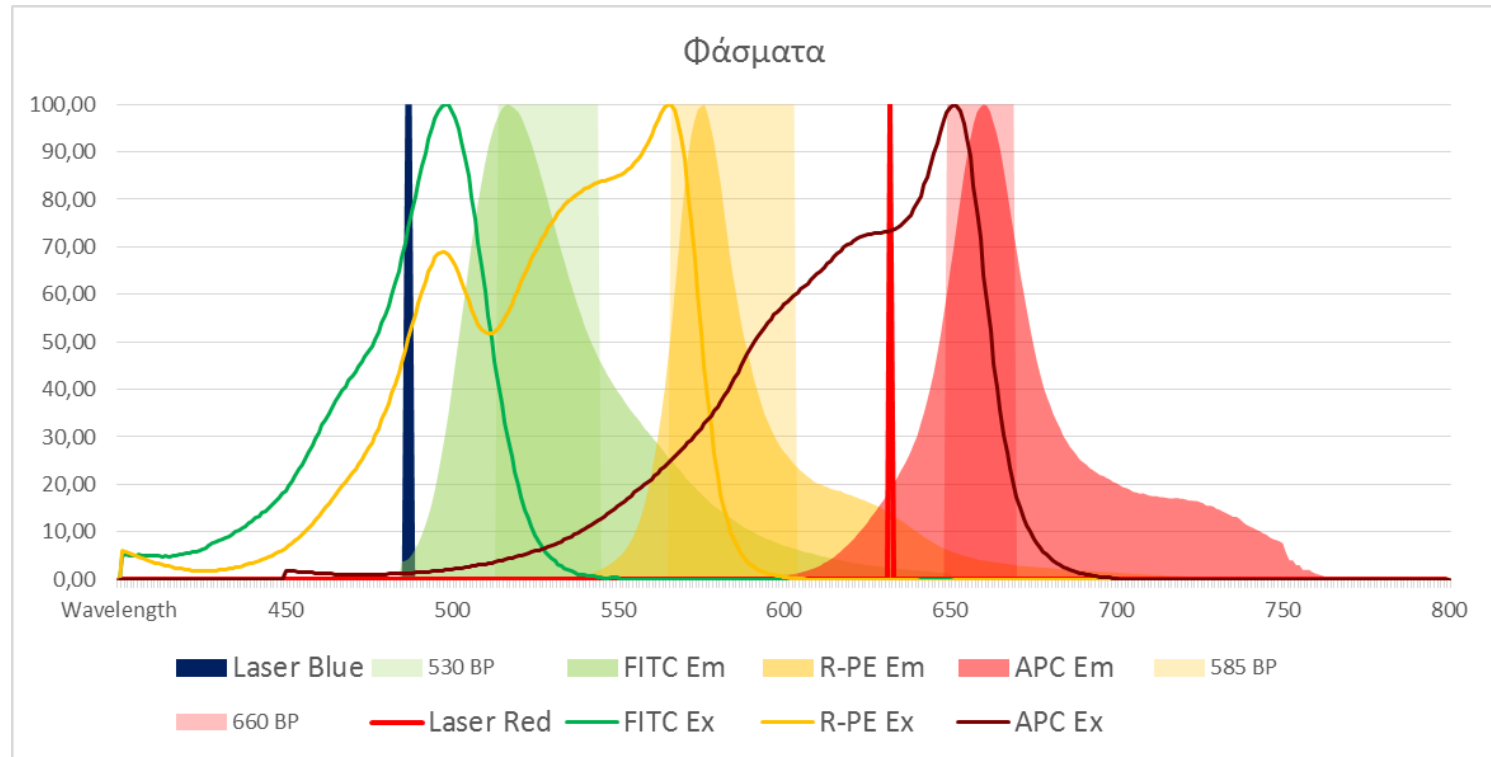
Gates

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)



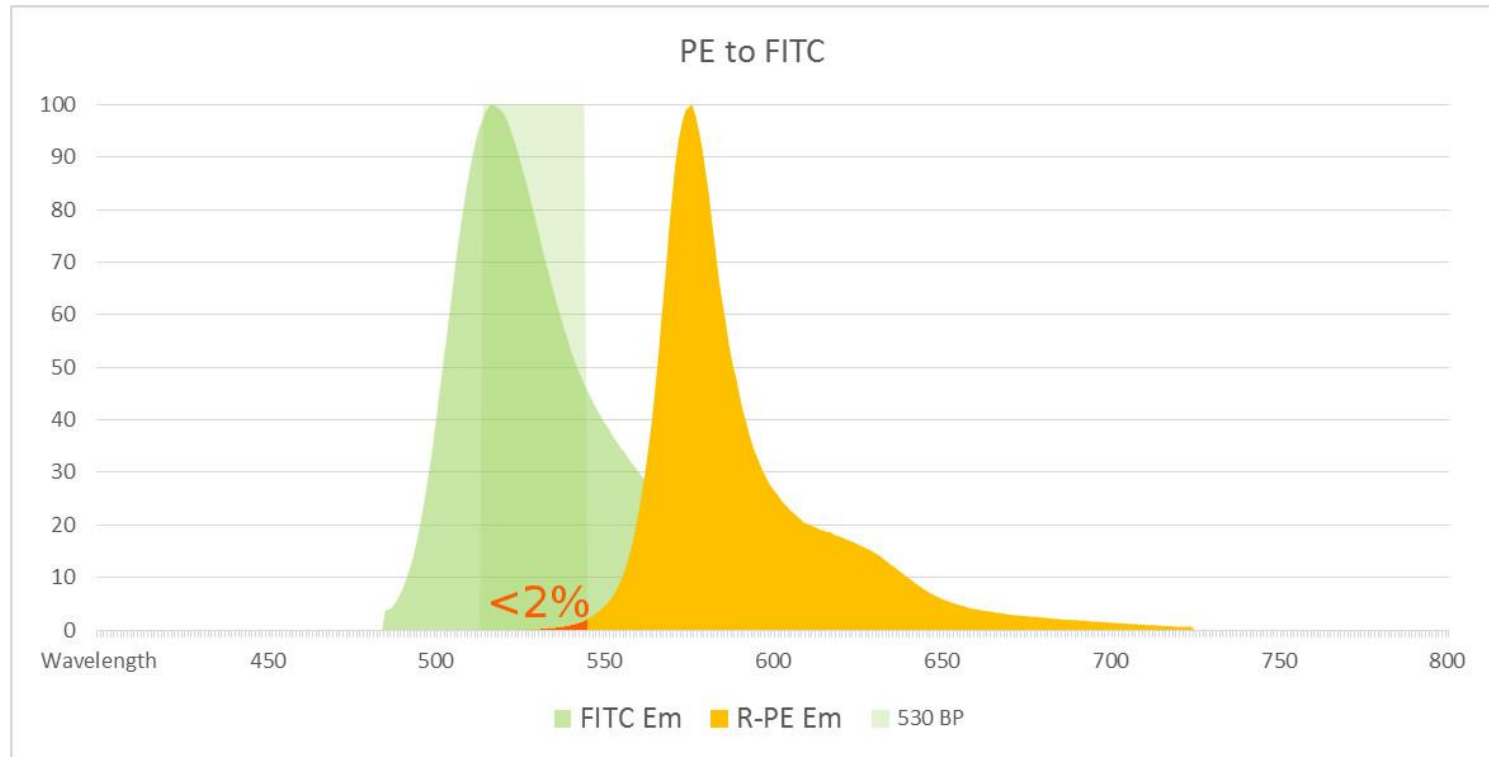
Compensation



Η χρωματική αντιστάθμιση είναι **απαραίτητη**:

- Όταν υπάρχουν παραπάνω από ένα φθοριοχρώματα (πάντα σχεδόν)

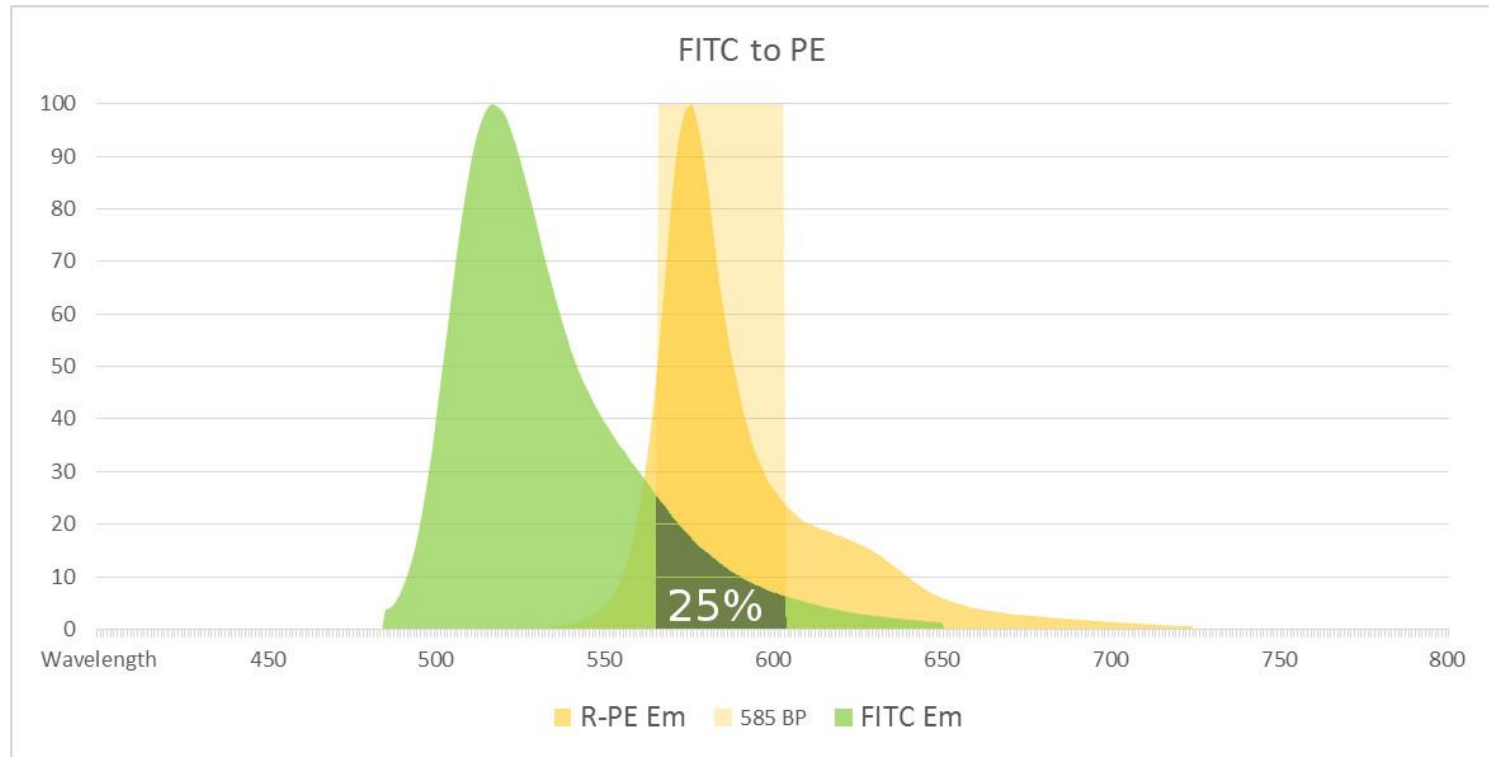
Compensation



Με το **συγκεκριμένο** φίλτρο και το συνδυασμό των FI:

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

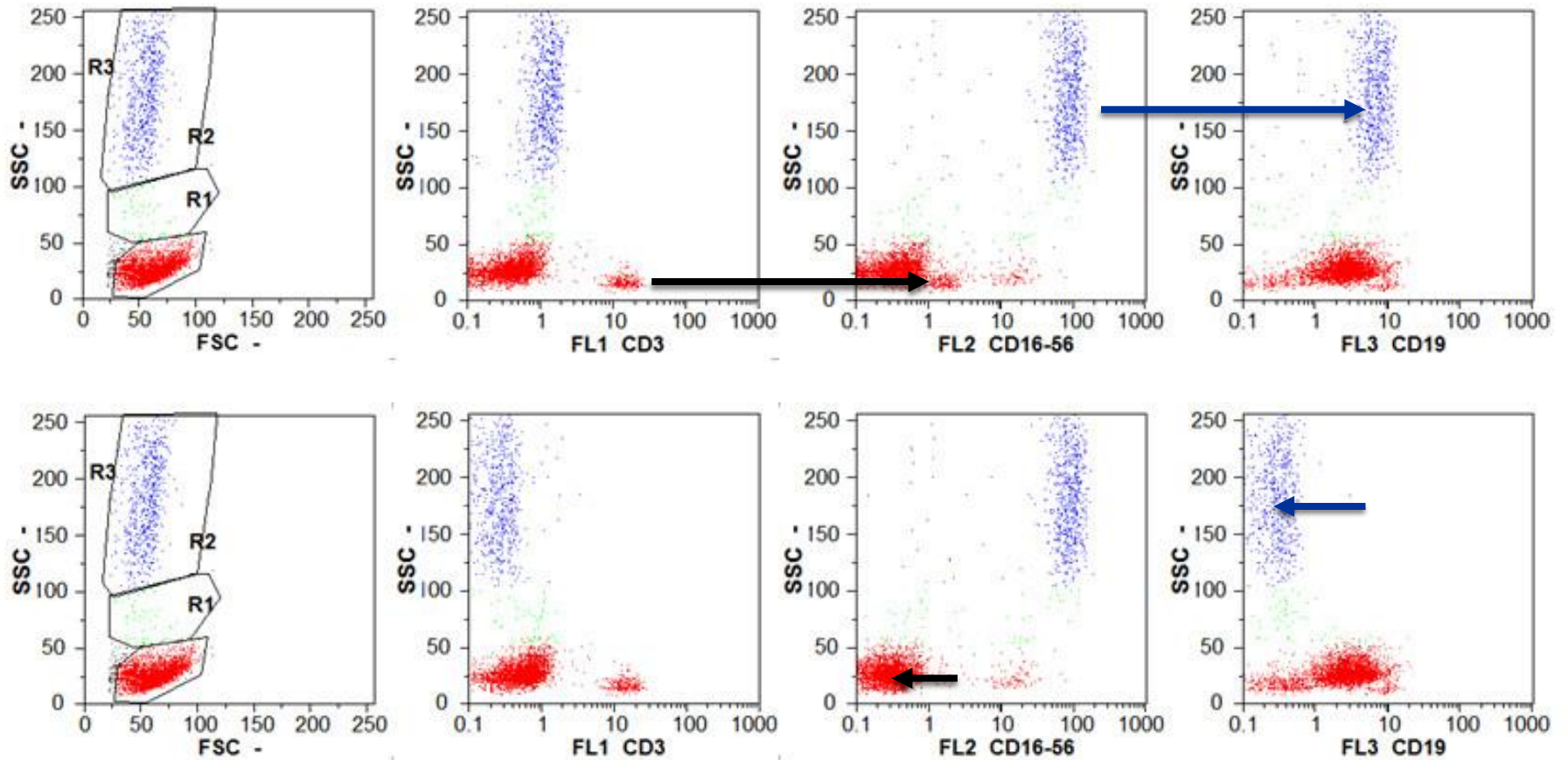
Compensation



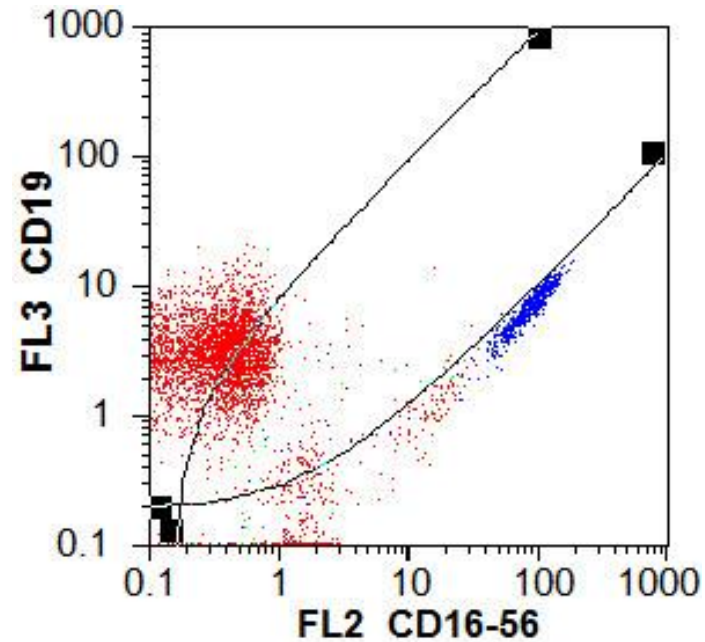
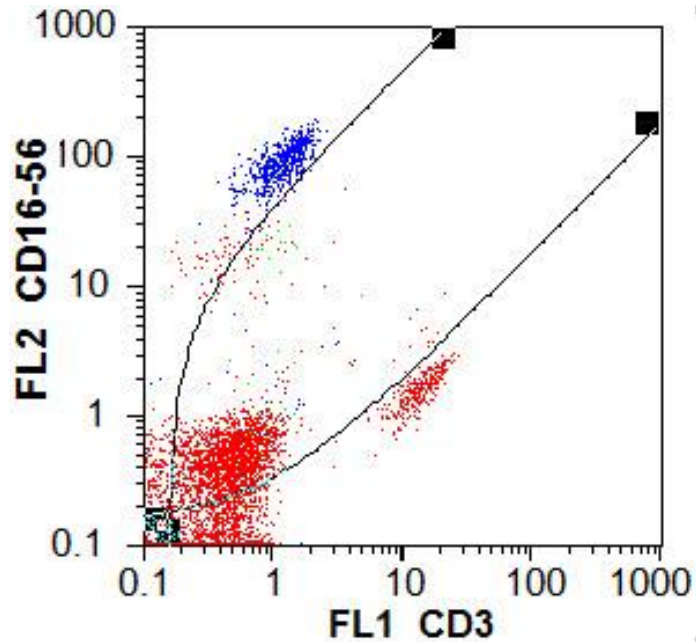
Με το **συγκεκριμένο** φίλτρο και το συνδυασμό των FI:

- 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. ENY - Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα – Υγρά σωματικών κοιλότητων
3. Ανίχνευση με χρήση χρωστικών (Καρκινικά κύτταρα, Μικροοργανισμοί)
4. Ανίχνευση ιχνηθετών μετά από υβριδισμό (Μικροοργανισμοί , αναδιατάξεις γονιδίων, κ.α.)
5.

2. Προσδιορισμός λευκοκυτταρικού πληθυσμού επιλογής

2.1 CD4+ T λεμφοκυττάρων σε HIV+ ασθενείς:

- Αριθμός καθόριζε:
 1. Συμπληρωματικά το στάδιο της νόσου (Στάδιο <200, 201-499, >500 κύτταρα/μL)
 2. Την έναρξη αντιρετροϊκής αγωγής (ART)
- Νεότερες μελέτες έδειξαν:
 1. Σαφές όφελος της έναρξης ART ακόμα και με υψηλό αριθμό CD4
 2. Έλλειψη οφέλους μέτρησης όταν υπάρχει διαθέσιμο ικό φορτίο
 3. Όφελος μέτρησης ως δείκτη της ανοσιακής και κλινική κατάσταση του ασθενούς, ειδικά σε περιπτώσεις προχωρημένου σταδίου νόσο
- Οδηγίες ΚΕΛΠΝΟ για τη μέτρηση των CD4:
 1. Απόλυτος αριθμός και % των CD4, λόγος CD4/CD8 (ισχυρότερος προγνωστικός δείκτης σοβαρών εκβάσεων) (προαιρετικά απόλυτος αριθμός και % των CD8)
 2. Ετήσια παρακολούθηση για ασθενείς υπό αντιρετροϊκή αγωγή σε σταθερή κατάσταση (μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο), με αριθμό CD4>350 κυτ./mm³

HIV Laboratory Guide Enumerating CD4 T Lymphocytes, WHO, 2007

Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection START study group (NEJM, 2015)

The evolving role of CD4 cell counts in HIV care (Current Opinion in HIV and AIDS, 2017)

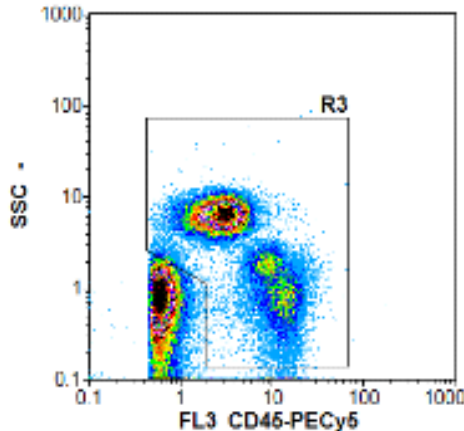
Κατευθυντήριες οδηγίες χορήγησης αντιρετροϊκής αγωγής και θεραπείας καιροσκοπικών λοιμώξεων σε ενήλικες και εφήβους με HIV λοίμωξη, 2017, ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.

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 σωληνάριων 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



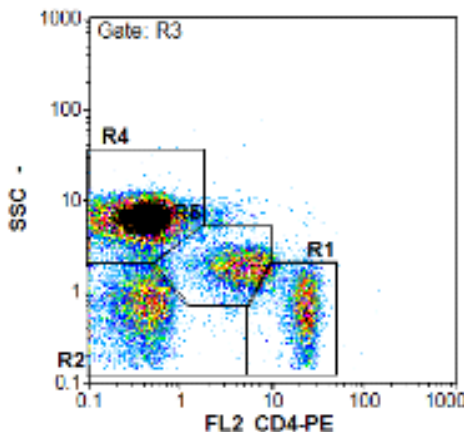
- Ταχεία μέτρηση με χρήση δύο αντισωμάτων (CD45 PEcy5, CD4-PE)
- Μέτρηση χωρίς λύση κυττάρων (threshold στο CD45 για αποφυγή debris)
- Οριοθέτηση λευκοκυττάρων (R3) (CD45+, SSC low/med/high)

- Καθορισμός βασικών υποπληθυσμών

- Πολυμορφοπύρηννα R4(SSChigh, CD4-)
- Μονοκύτταρα R5(SSC med, CD4+dim)
- Λεμφοκύτταρα R2 (SSC low, CD4-), T CD4+ λεμφοκύτταρα R1 (SSC low, CD4bright+)

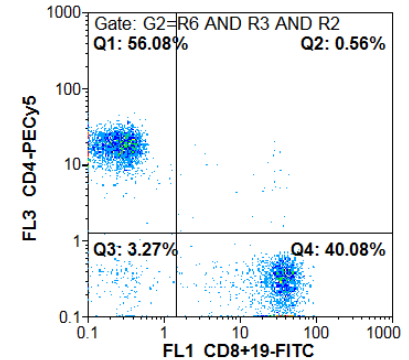
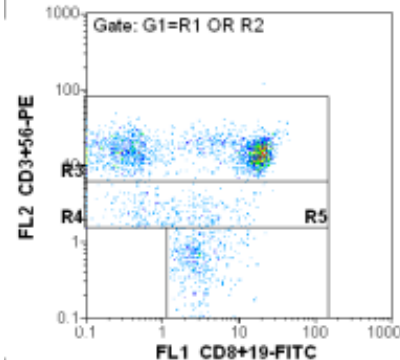
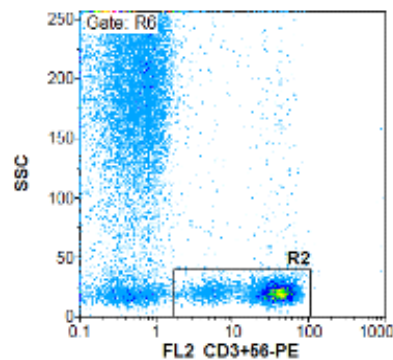
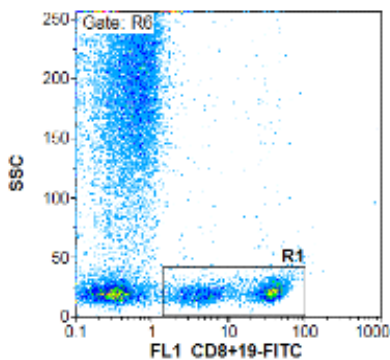
- Υπολογισμός αριθμού T CD4+ από την ογκομετρική ανάλυση

- Υπολογισμός ποσοστού T CD4+ από την αναλογία R1/R3

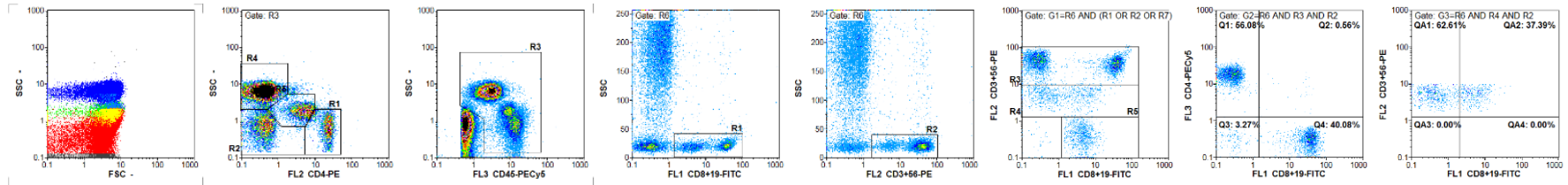


2.1 CD4+ T λεμφοκύτταρα

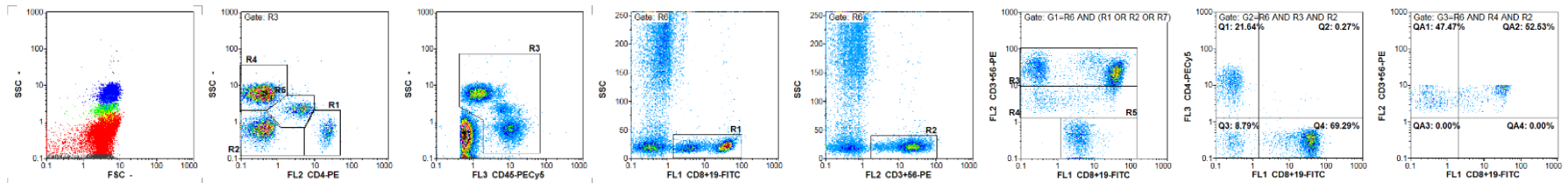
- Καθορισμός λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών με χρήση τριχρωμίας με 5 αντισώματα
- Οριοθέτηση λεμφοκυττάρων με χρήση της κοκκίωσης και της θετικότητας σε δείκτες λεμφοκυττάρων (R1 or R2)
 - T (R3) CD3bright+, CD8bright+ μόνο τα Tc
 - NK (R4) CD56+dim (διαχωρισμός από τα T λόγω χαμηλότερης έντασης)
 - B (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+ T λεμφοκύτταρα



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

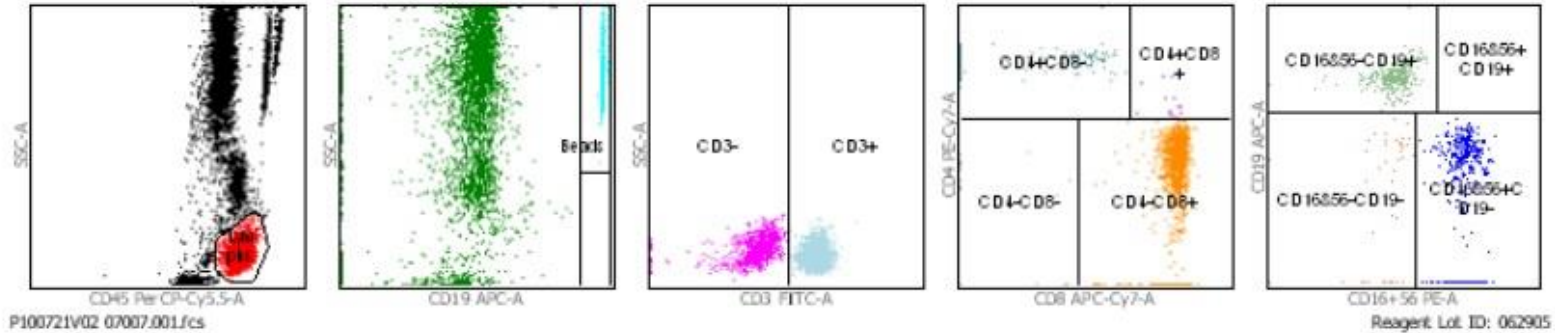


- CD4+ 128 cells/uL CD4/CD8 ratio 0,3

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

2.1 CD4+ T λεμφοκύτταρα

CD3/CD16+56/CD45/CD4/CD19/CD8 TruC



| 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-)

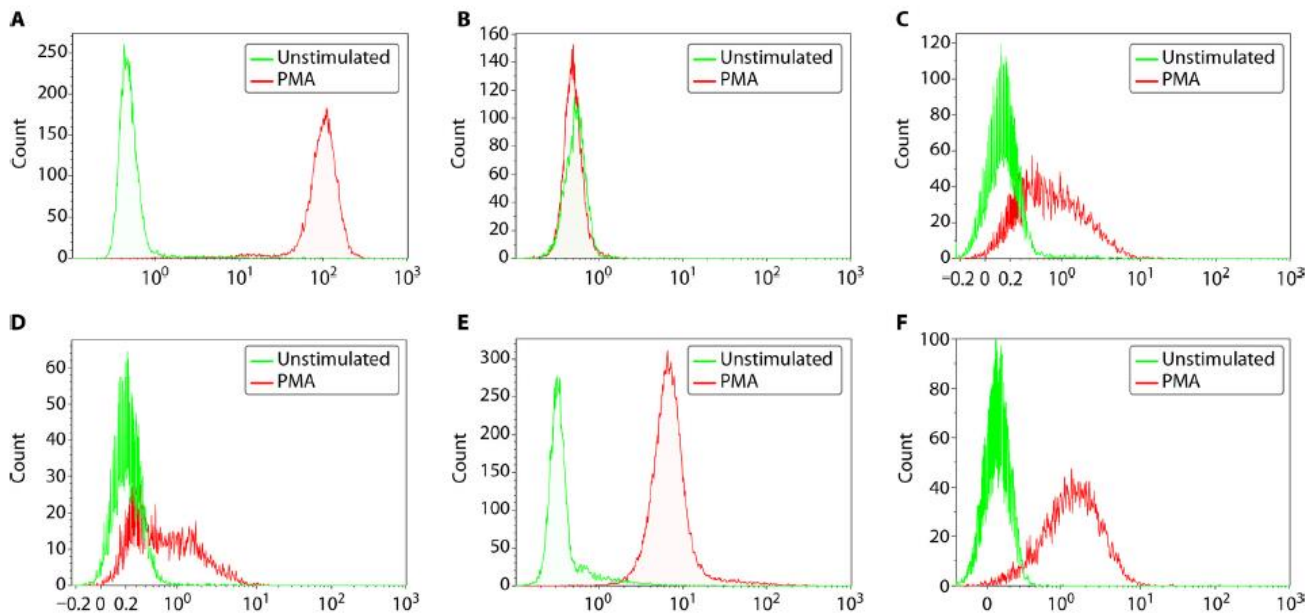
2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας

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)

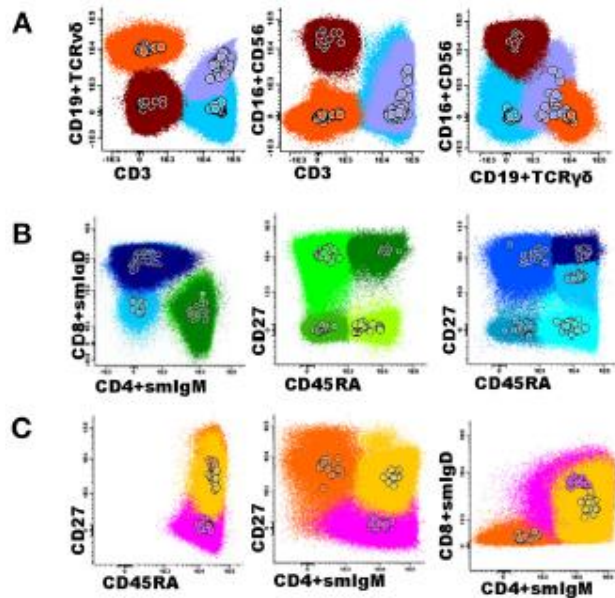
2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας

- 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



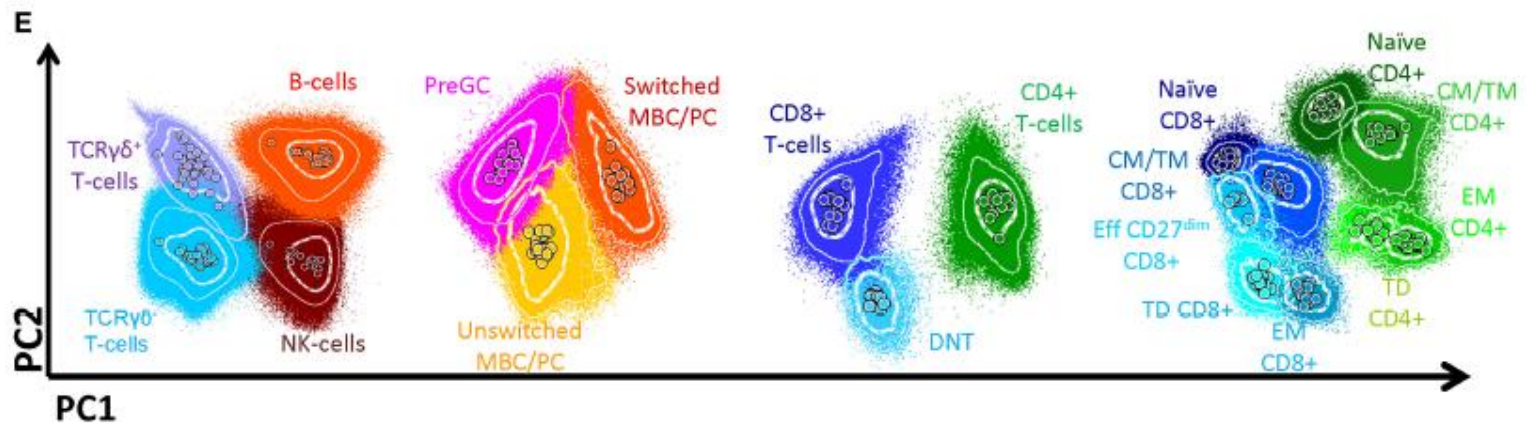
- A. Normal
- B. X linked CGD
- C. Autosomal CGD
- D. Autosomal CGD
- E. cMPO deficiency
- F. Atypical CGD

2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας

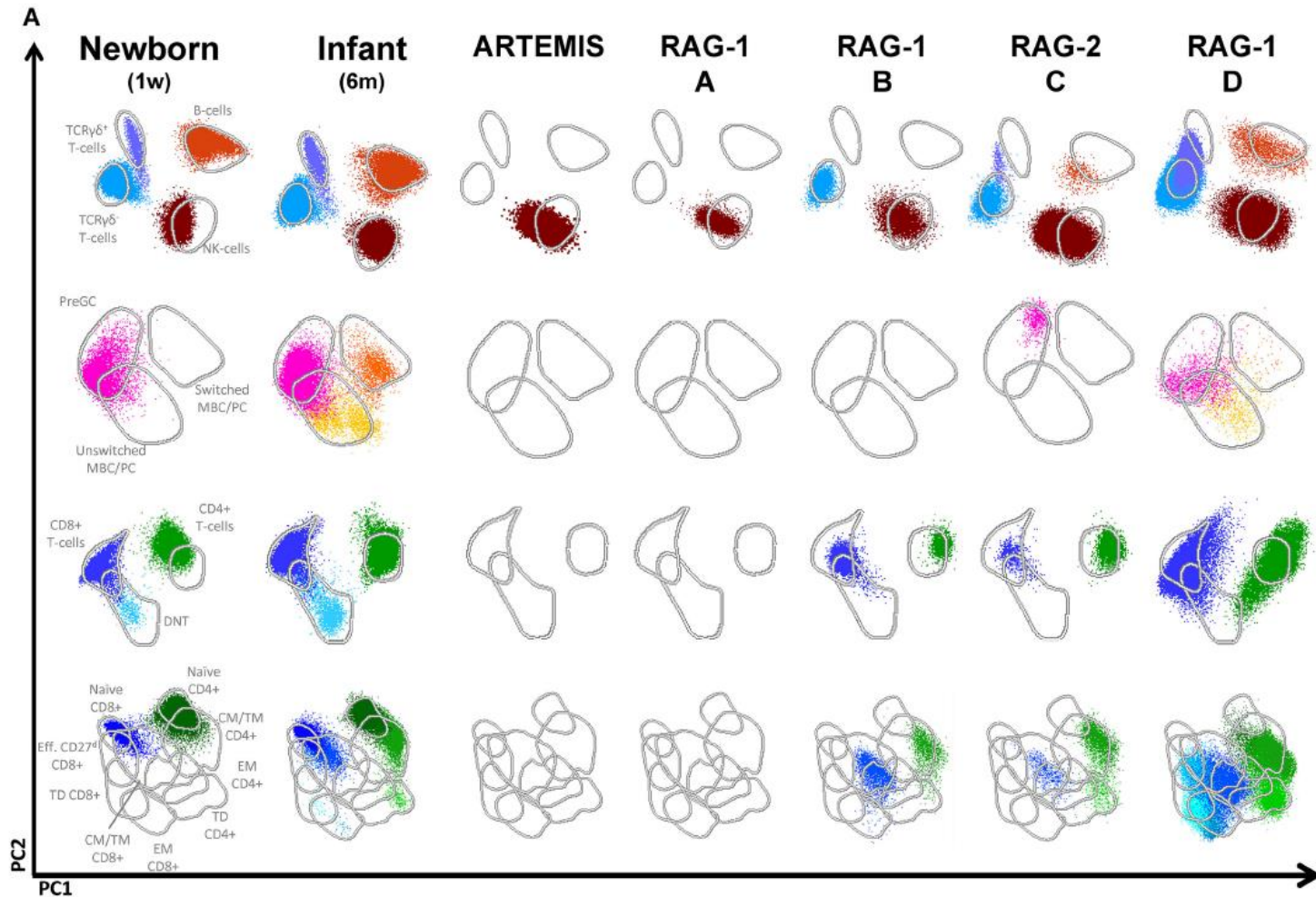


D

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



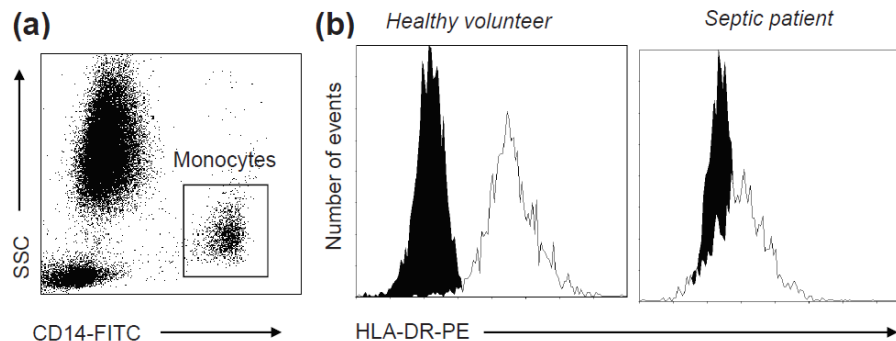
2.2 Ανίχνευση ανοσοανεπάρκειας



2.3 Δείκτες σηψαιμίας

2.3 Σε ερευνητική χρήση:

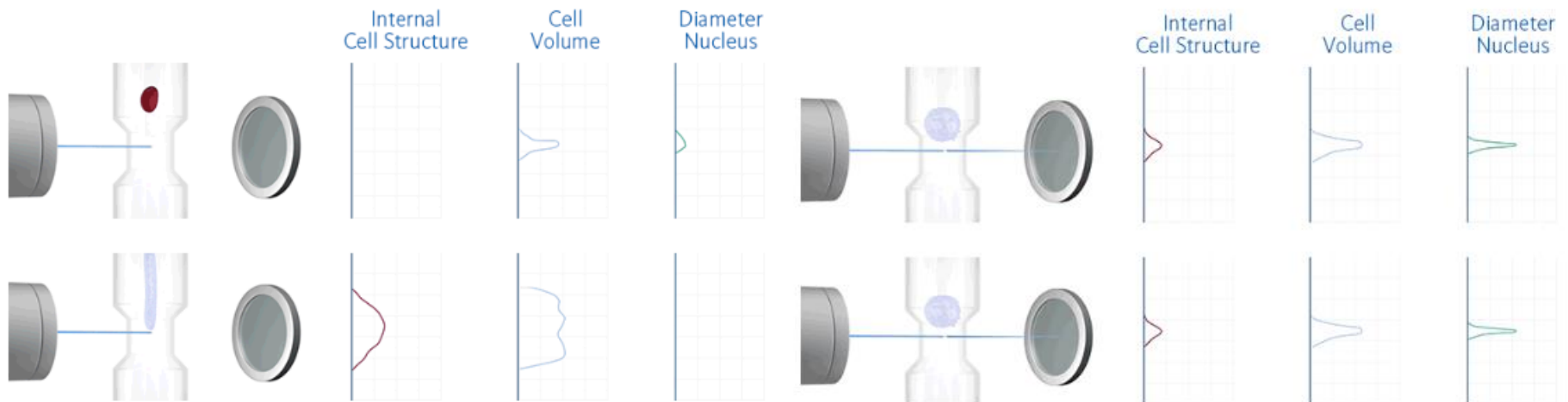
- Τμήματα επειγόντων περιστατικών:
 1. Μέτρηση αυξημένης έκφρασης CD64 στα Ουδετερόφιλα(n), απώλεια του HLADR στα μονοκύτταρα (m) ή αύξηση των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs, CD4+CD25++CD127-).
 2. Δείκτες οξείας αντίδρασης σε φλεγμονή.
- Πιθανή διάκριση του είδος του παθογόνου:
 1. nCD64+ σημαντικά αυξημένα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



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).



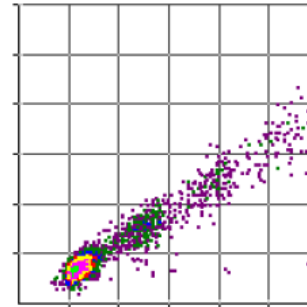
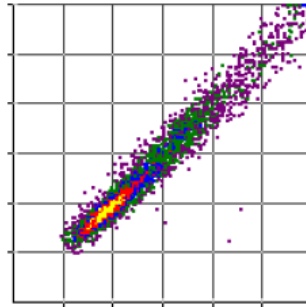
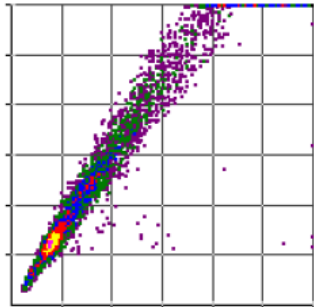
3. Ανίχνευση με χρήση χρωστικών

3.2 Χρήση χρωστικών που προσδέονται στο DNA:

Staphylococcus aureus
(2.8 Mb, ~67% A+T)

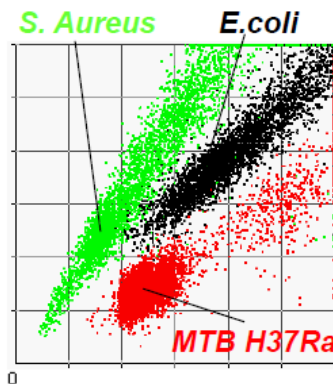
Escherichia coli
(4.6 Mb, ~50% A+T)

M. tuberculosis H37Ra
(4.4 Mb, ~35% A+T)



PICO FLUO BLUE → YELLOW

HOECHST FLUO UV → YELLOW



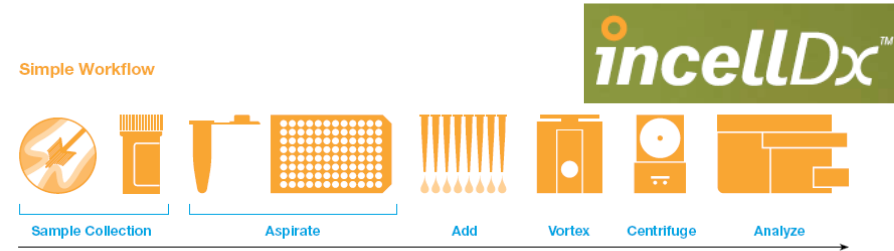
Data from bottom quadrants of plots in top row show clear separation of single cells of different species by base composition

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

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 ιού
- Αποτελέσματα εντός 4 ωρών



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

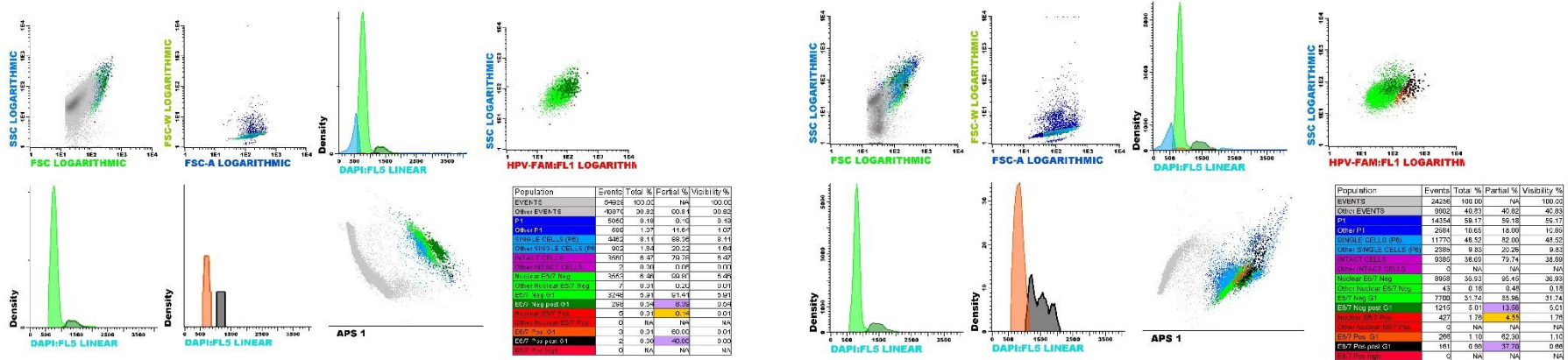
● Action ○ No Action Required

The sample is ready for analysis on the flow cytometer.

4. Ανίχνευση μετά από υβριδισμό

Συνδυασμός με χρωστική DNA (DAPI) για:

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



Αρνητικό HPV L1 DNA-

Post G1 8%. E6/E7+ 1.09%

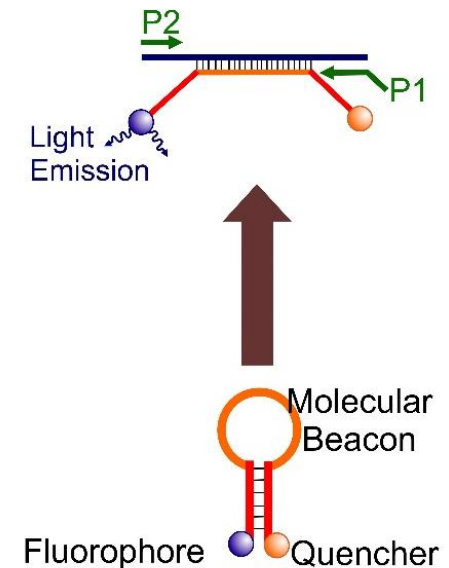
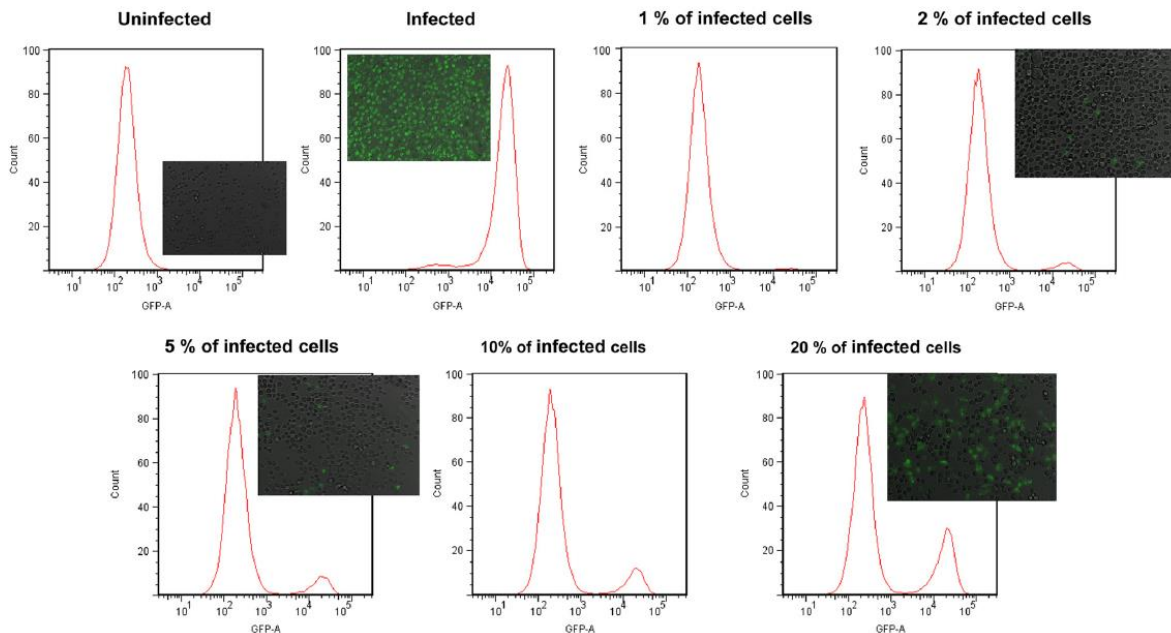
HSIL HPV L1 DNA-

Post G1 13%. E6/E7+ 4.55%

4. Ανίχνευση μετά από υβριδισμό

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

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



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)

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 (50-100 μ m, 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 δχρωμία 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
Καθηγητής Π. Φούκας

Ε. Αγγελοπούλου, Βιολόγος εφαρμογών

