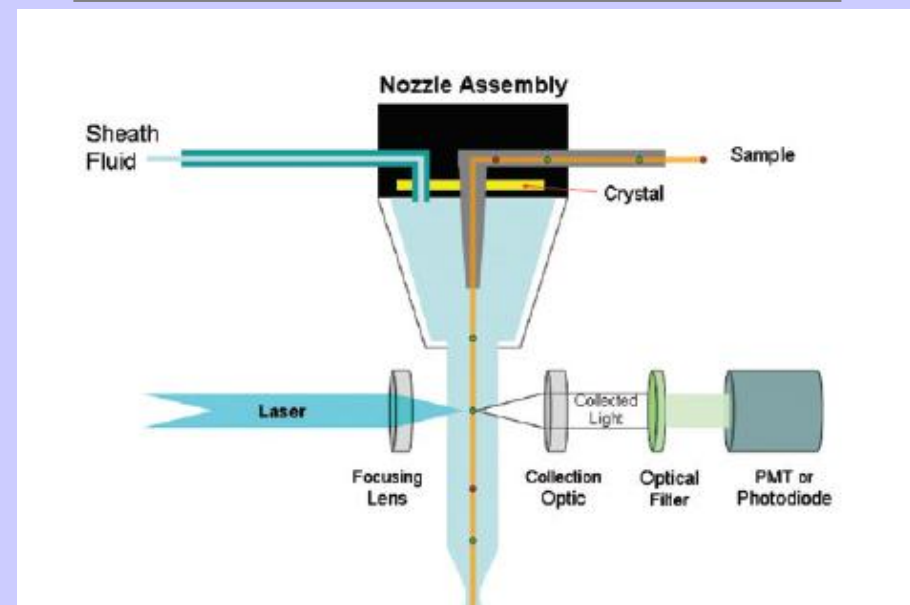
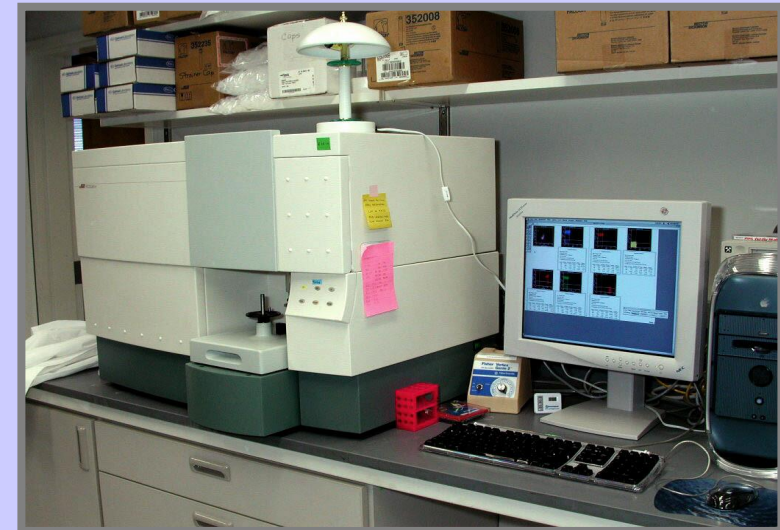


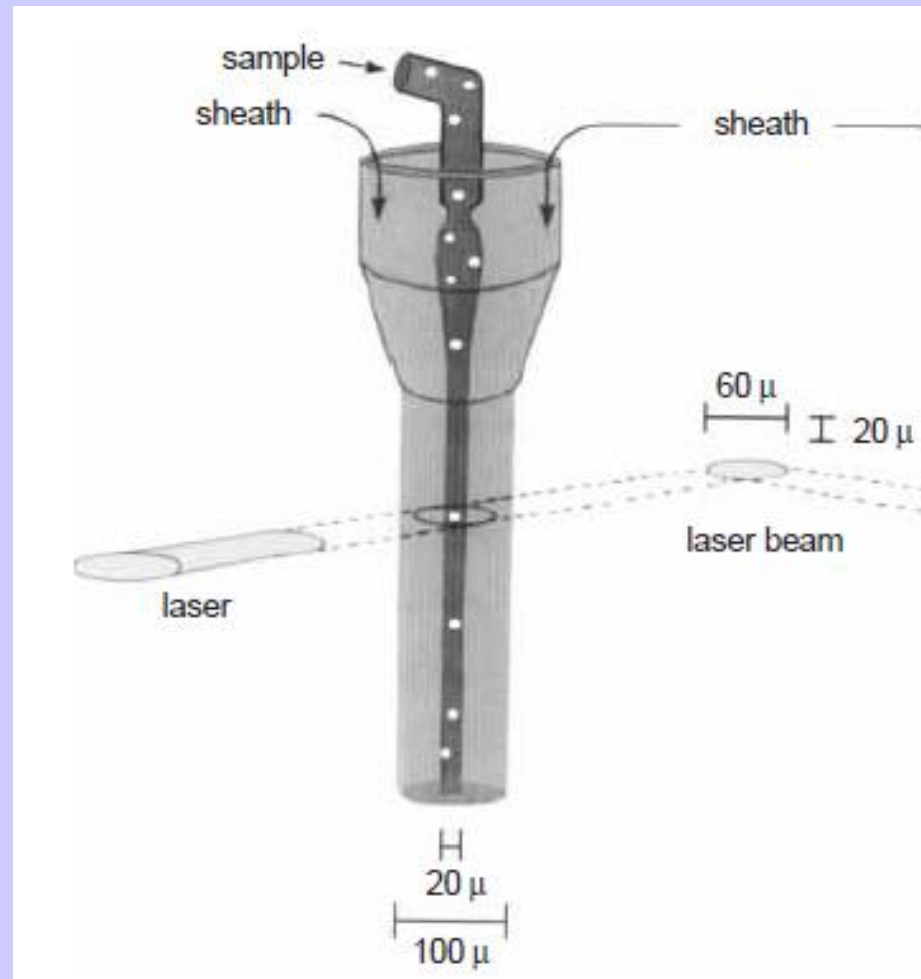
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών μέσω ανάλυσης της **σκέδασης** του φωτός από τα κύτταρα καθώς και της εκπομπής **φθορισμού** από αυτά.
- Τα κύτταρα περνάνε ένα-ένα μπροστά από μια δέσμη laser. Το σκεδασμένο φως και ο φθορισμός καταγράφονται και αναλύονται κατάλληλα.
- Η ανάλυση παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος και το είδος των κυττάρων με ταχύτητα μέχρι δεκάδες χιλιάδες κύτταρα το δευτερόλεπτο.



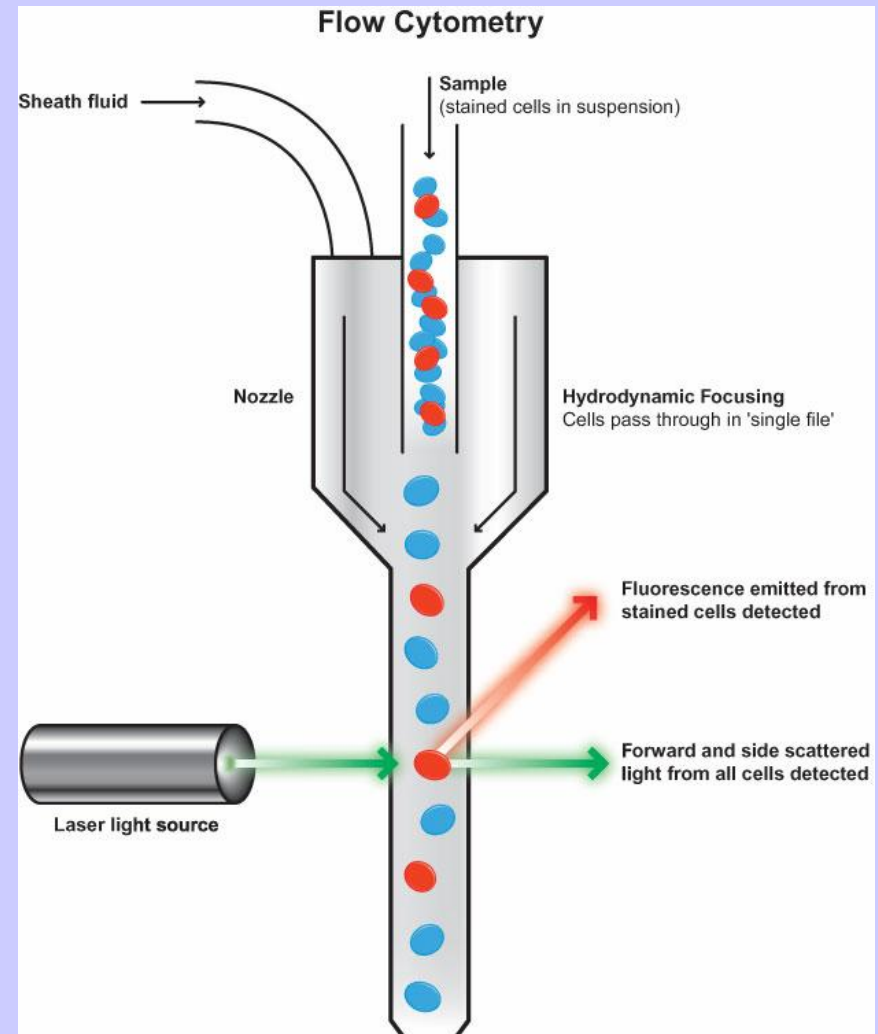
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Η δέσμη laser εστιάζεται έτσι ώστε να ακτινοβολεί ένα κύτταρο κάθε φορά.
- Η ταχύτητα ροής των κυττάρων μπορεί να ρυθμιστεί ελέγχοντας την πίεση του ρευστού που περιέχει τα κύτταρα (sample) καθώς και του περιβάλλοντος ρευστού (sheath).



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Η σκέδαση ανιχνεύεται παράλληλα και κάθετα στη δέσμη laser.
- Ο φθορισμός ανιχνεύεται κάθετα στη δέσμη laser.
- Ο φθορισμός μπορεί να είναι ενδογενής (αυτό-φθορισμός) ή (πιο συχνά) να προέρχεται από εξωγενείς ενώσεις με τις οποίες μαρκάρονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί προς ανάλυση.



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι
ανάλυσης των δεδομένων στην
κυτταρομετρία ροής:

(α) ιστόγραμμα (πάνω γραφικές
παραστάσεις)

(β) δισδιάστατο γράφημα
(dot plot, μεσαίο αριστερά)

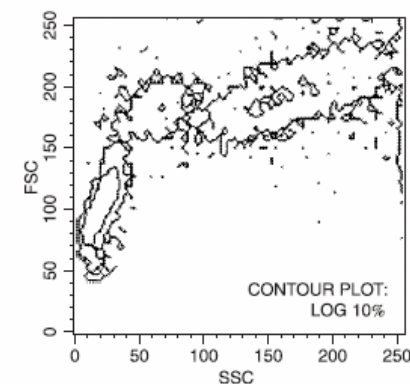
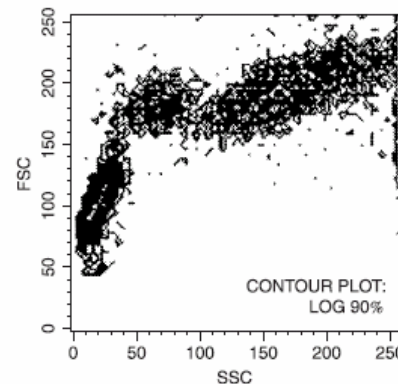
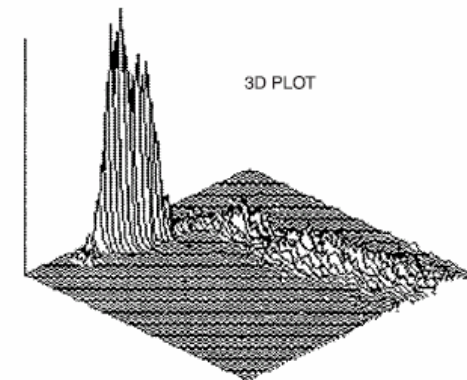
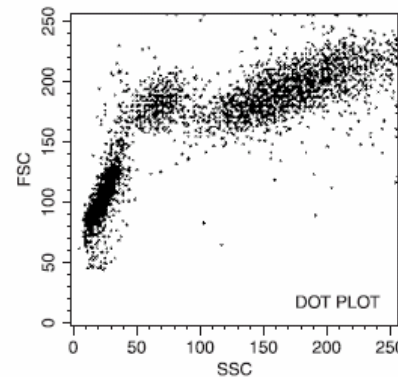
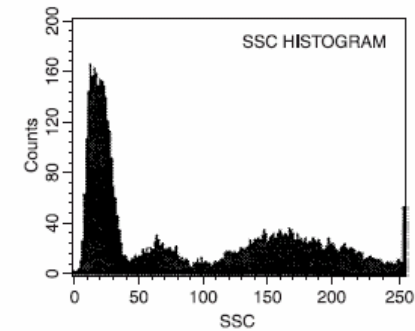
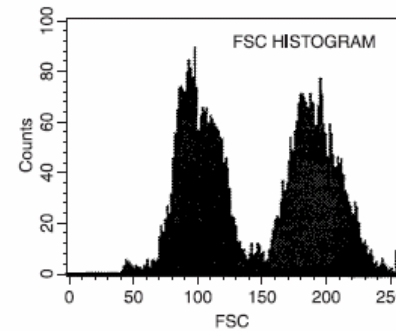
(γ) τρισδιάστατη γραφική
παράσταση (3D plot μεσαίο
δεξιά)

(δ) contour plot (δύο κάτω)

FSC = Forward Scattering

(σκέδαση παράλληλα με τη
δέσμη laser)

SSC = Side Scattering (σκέδαση
κάθετα στη δέσμη laser)



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

■ Εφαρμογή: Διάφορα κύτταρα του αίματος (φωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο)

■ **Ερυθρά αιμοσφαίρια** (αμφίκοιλο σχήμα).

■ **Λευκά αιμοσφαίρια** (σφαιρικό σχήμα). Τα λευκά αιμοσφαίρια μπορούν να διακριθούν σε διάφορες υποκατηγορίες (π.χ. λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα κ.α.)

Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να διακρίνει και να μετρήσει διάφορα κύτταρα του αίματος.

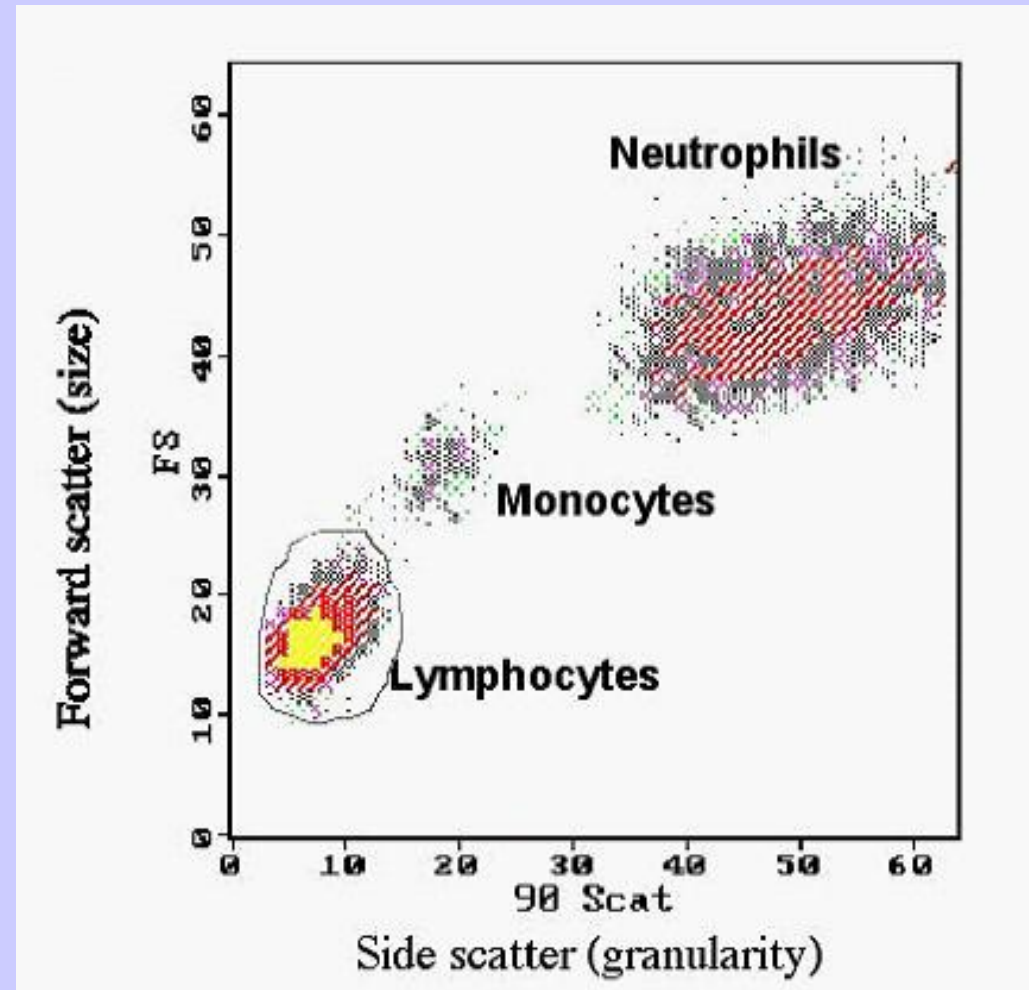


ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

● **κυτταρικοί πληθυσμοί** λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος διαχωρισμένοι μέσω της σκέδασης του φωτός στην κυτταρομετρία ροής (λεμφοκύτταρα, μονοπύρηνα, ουδετερόφιλα).

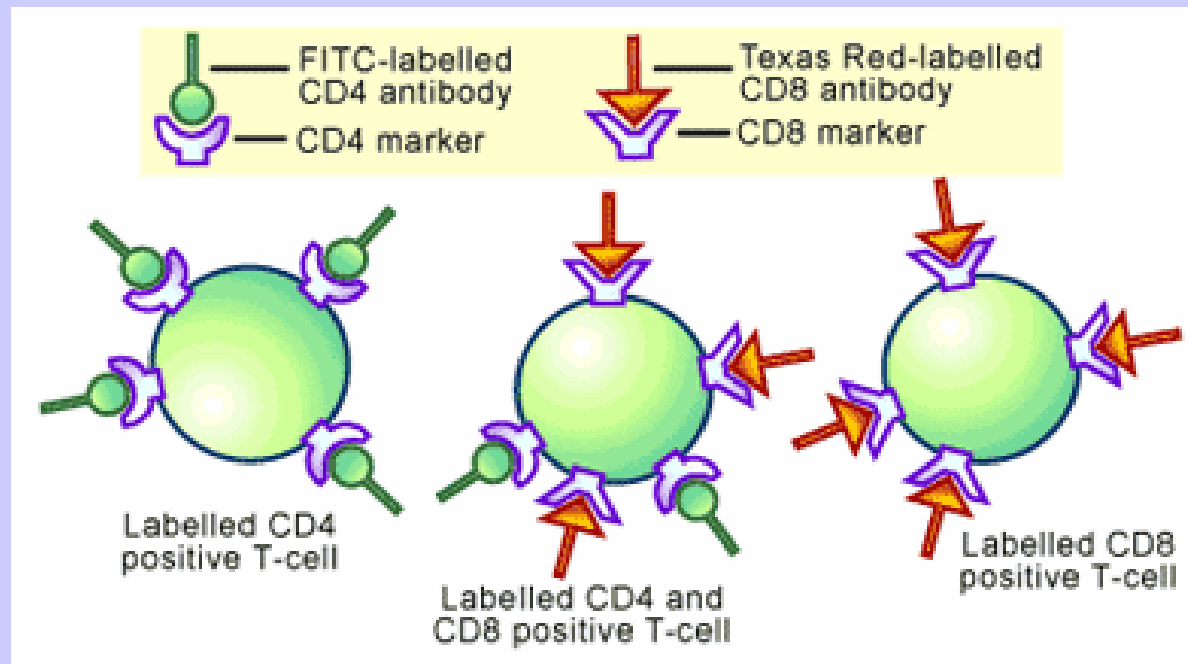
● **χ-άξονας:** σκέδαση υπό γωνία 90 μοιρών (ευαίσθητη στα οργάνidia του κυτταροπλάσματος).

● **γ-άξονας:** σκέδαση υπό μικρές γωνίες (ευαίσθητη στο συνολικό μέγεθος του κυττάρου).



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Διάφορα κύτταρα μπορούν να μαρκαριστούν με κατάλληλα αντισώματα τα οποία προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων.
- Τα αντισώματα έχουν μαρκαριστεί και αυτά με τη σειρά τους με κατάλληλες φθορίζουσες ενώσεις. Ο χαρακτηριστικός φθορισμός επιτρέπει την ανίχνευση των κυττάρων με οπτικό τρόπο.
- Στο συγκεκριμένο παράδειγμα ο ιός HIV προκαλεί σταδιακή μείωση των CD4 και ταυτόχρονη αύξηση των CD8 αντιγόνων των λεμφοκυττάρων.



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

■ κυτταρικοί πληθυσμοί λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος διαχωρισμένοι μέσω του φθορισμού τους στην κυτταρομετρία ροής.

■ ο φθορισμός προέρχεται από κατάλληλα φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα που συνδέονται στην επιφάνεια των κυττάρων.

■ **χ-άξονας:** πράσινος φθορισμός.

■ **γ-άξονας:** κόκκινος φθορισμός.

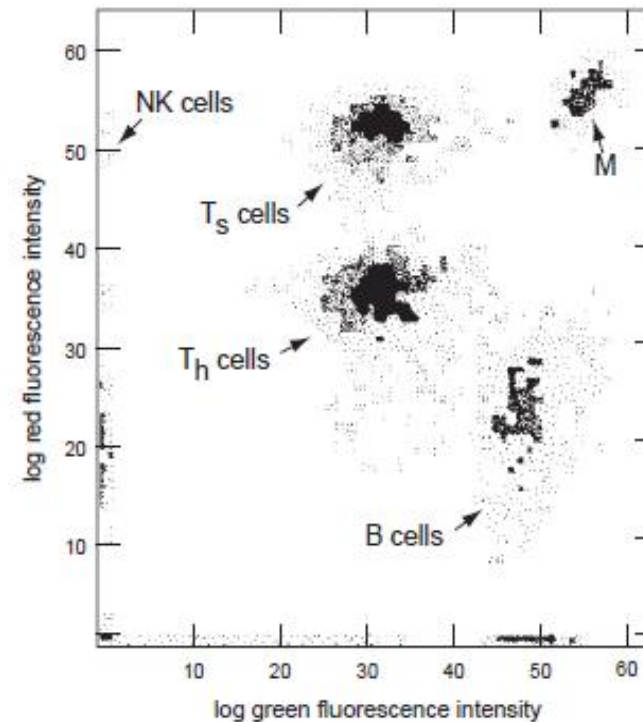
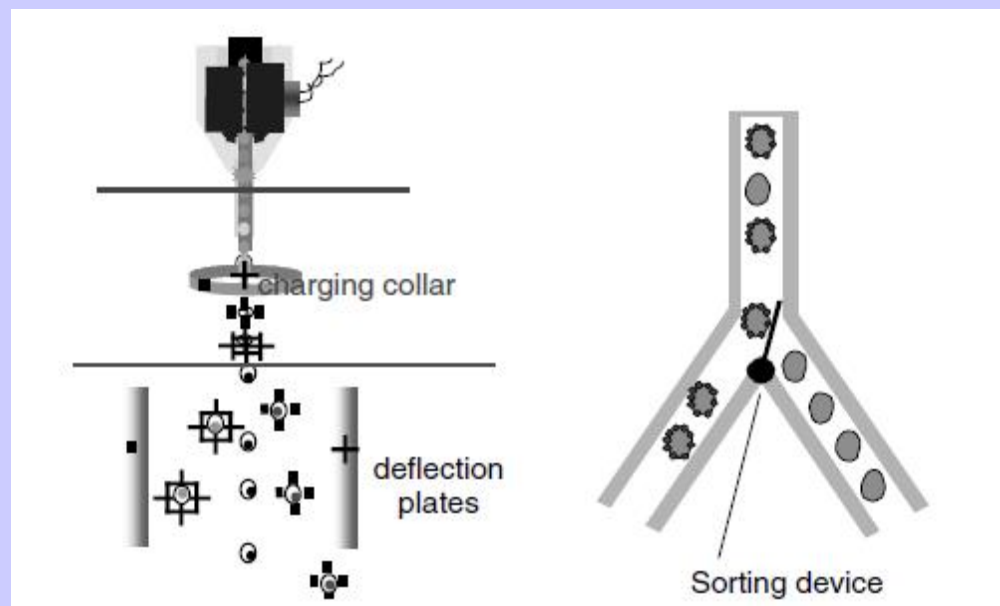


Fig. 6.17. The two-color fluorescence profile of peripheral blood mononuclear cells stained simultaneously with six different monoclonal antibodies to delineate five different populations of cells. From Horan et al. (1986).

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Η κυτταρομετρία ροής έχει πολλές εφαρμογές τόσο στην καθημερινή κλινική πρακτική όσο και σε ερευνητικό επίπεδο.
- Πολλά όργανα κυτταρομετρίας ροής παρέχουν και τη δυνατότητα διαχωρισμού κυτταρικών πληθυσμών (FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter).
- Αυτό μπορεί να γίνει είτε με φόρτιση των κυττάρων και κατόπιν διαχωρισμό τους σε ηλεκτρικό πεδίο (αριστερά) ή με μηχανισμό που ελέγχεται από το αποτέλεσμα την οπτικής αναγνώρισης.



ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Μελλοντική εξέλιξη της τεχνικής μπορεί να επιτρέψει την ανάλυση βιοχημικών μορίων (πρωτεΐνες, DNA).
- Συλλογή δεδομένων σε περισσότερες γωνίες σε σχέση με την δέσμη laser καθώς και σε πολλά μήκη κύματος ταυτόχρονα μπορεί να δώσει πολύ περισσότερες πληροφορίες για το διαχωρισμό και κατηγοριοποίηση των προς ανάλυση κυττάρων, μορίων κ.α.
- Ταχύτερη και πιο αποτελεσματική ανάλυση δεδομένων.
- Πιο εξελιγμένα οπτικά συστήματα και laser καθώς και τεχνικές ανάλυσης.
- Εφαρμογή σε νέα επιστημονικά πεδία και παθολογικές καταστάσεις (ανίχνευση βακτηρίων, διάφορων κυτταρικών οργανιδίων κ.α.)
- Εφαρμογές στον έλεγχο ποιότητας τροφίμων και νερού.