

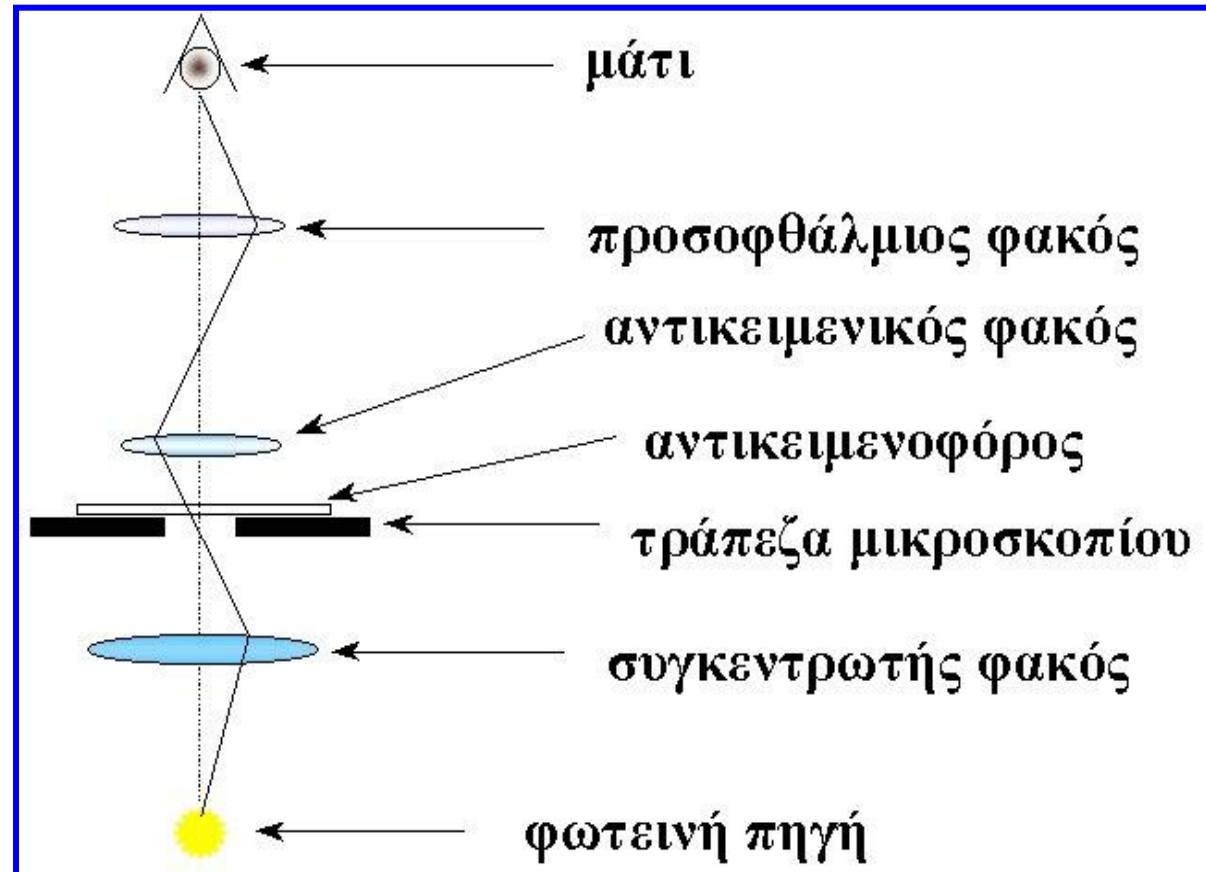
Μικροσκοπία

Κυτταρομετρία ροής

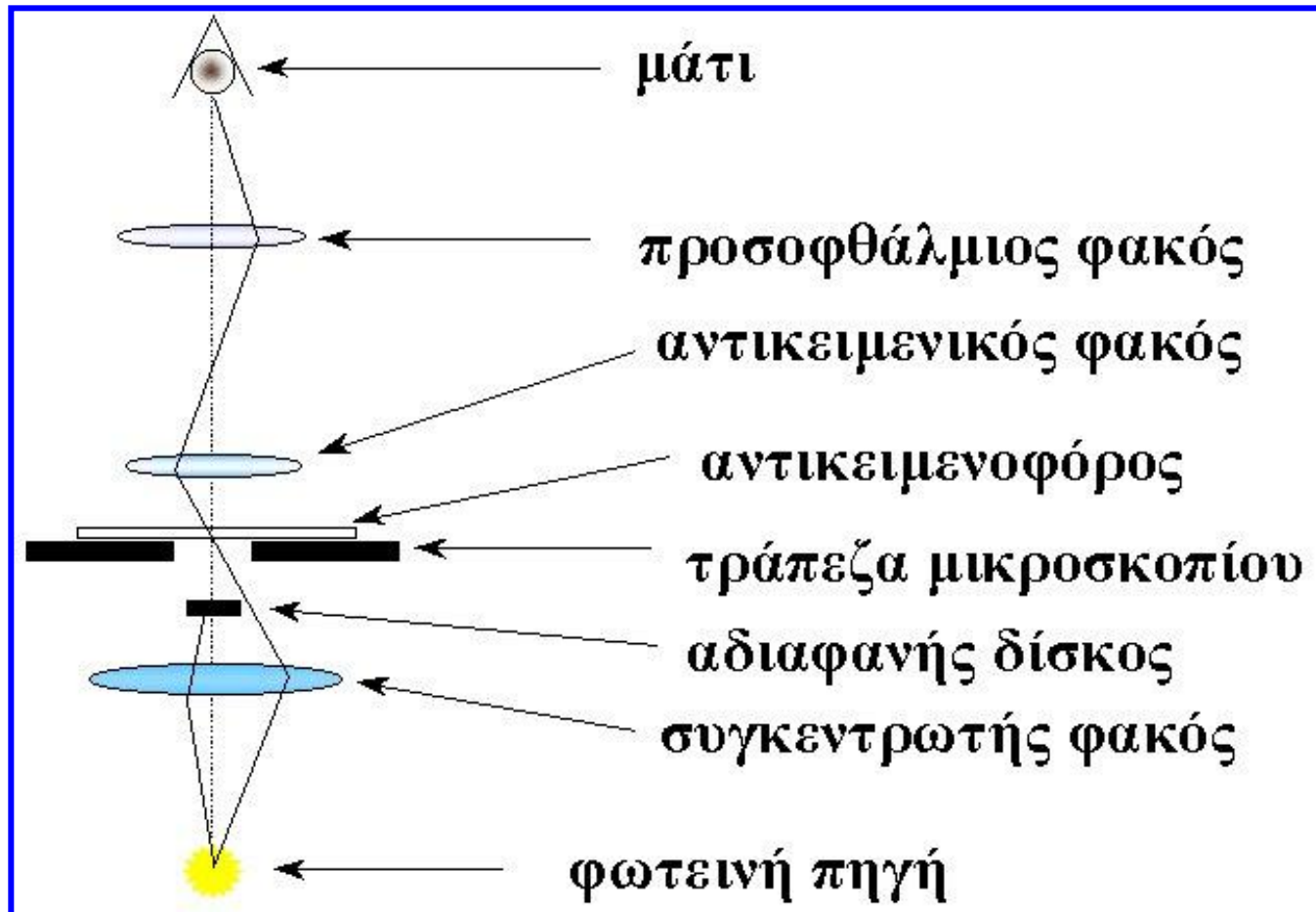
# Μικροσκοπία

- Μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου
- Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου
- Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (phase contrast)
- Ανεστραμμένο μικροσκόπιο (inverted)
- Μικροσκόπιο φθορισμού
- Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal laser scanning)

# Μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου

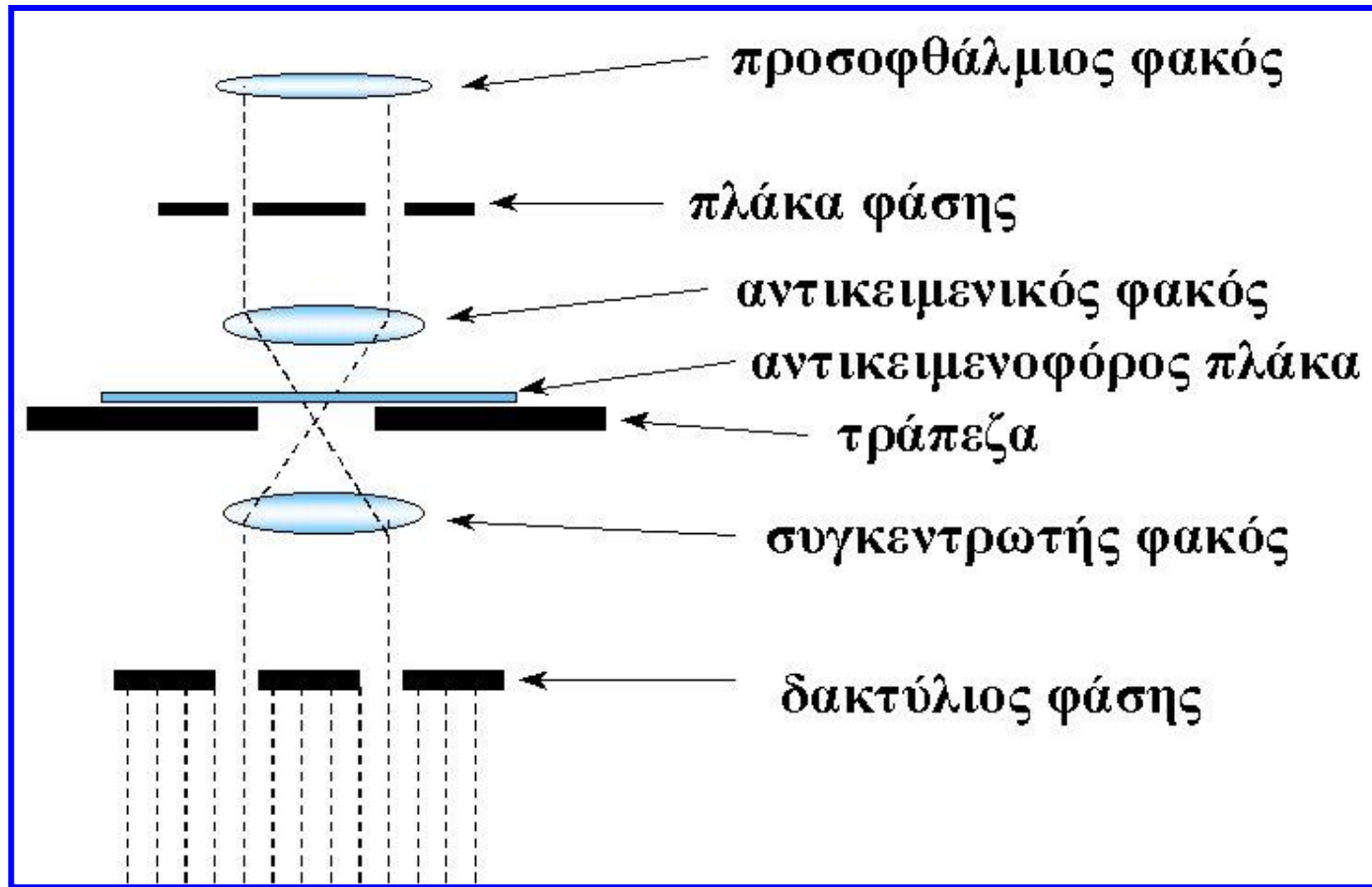


# Μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου



παρατήρηση ζωντανών ή/και αχρωμάτιστων μονοκύτταρων οργανισμών  
π.χ. φωτεινό αντικείμενο σε σκοτεινό πεδίο

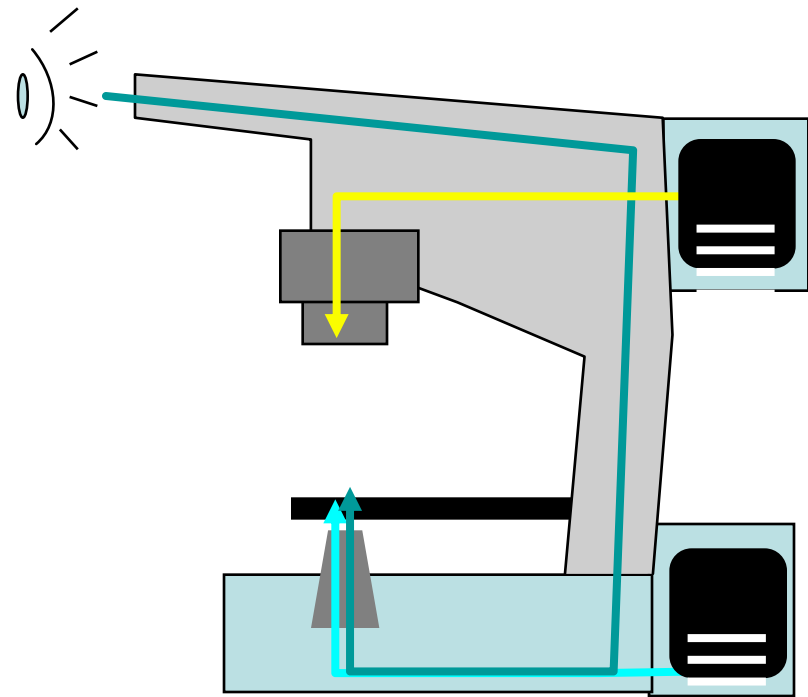
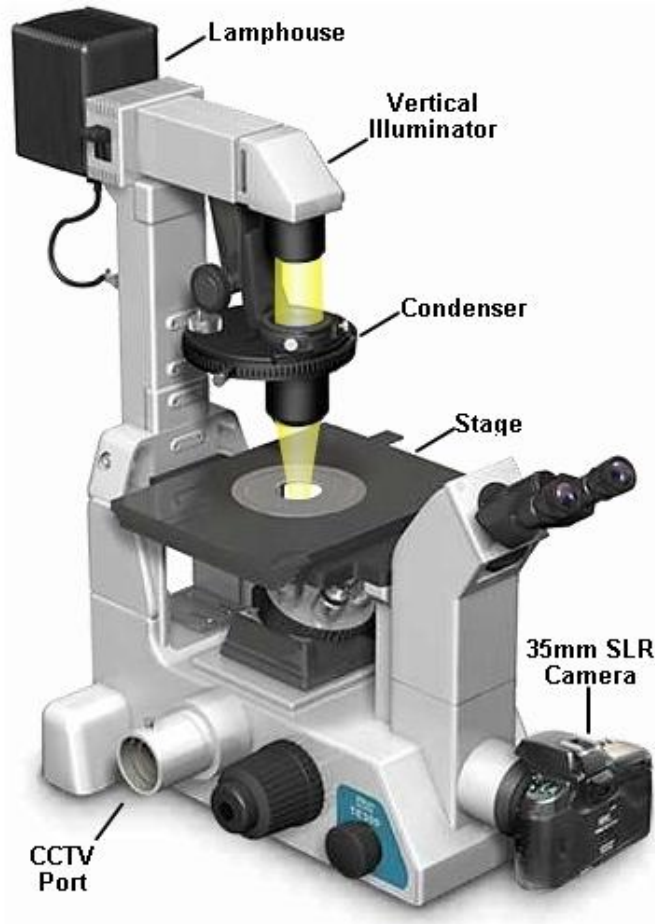
# Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (phase contrast)



παρατήρηση ζωντανών ή/και αχρωμάτιστων μονοκύτταρων οργανισμών και κυτταροκαλλιιεργειών

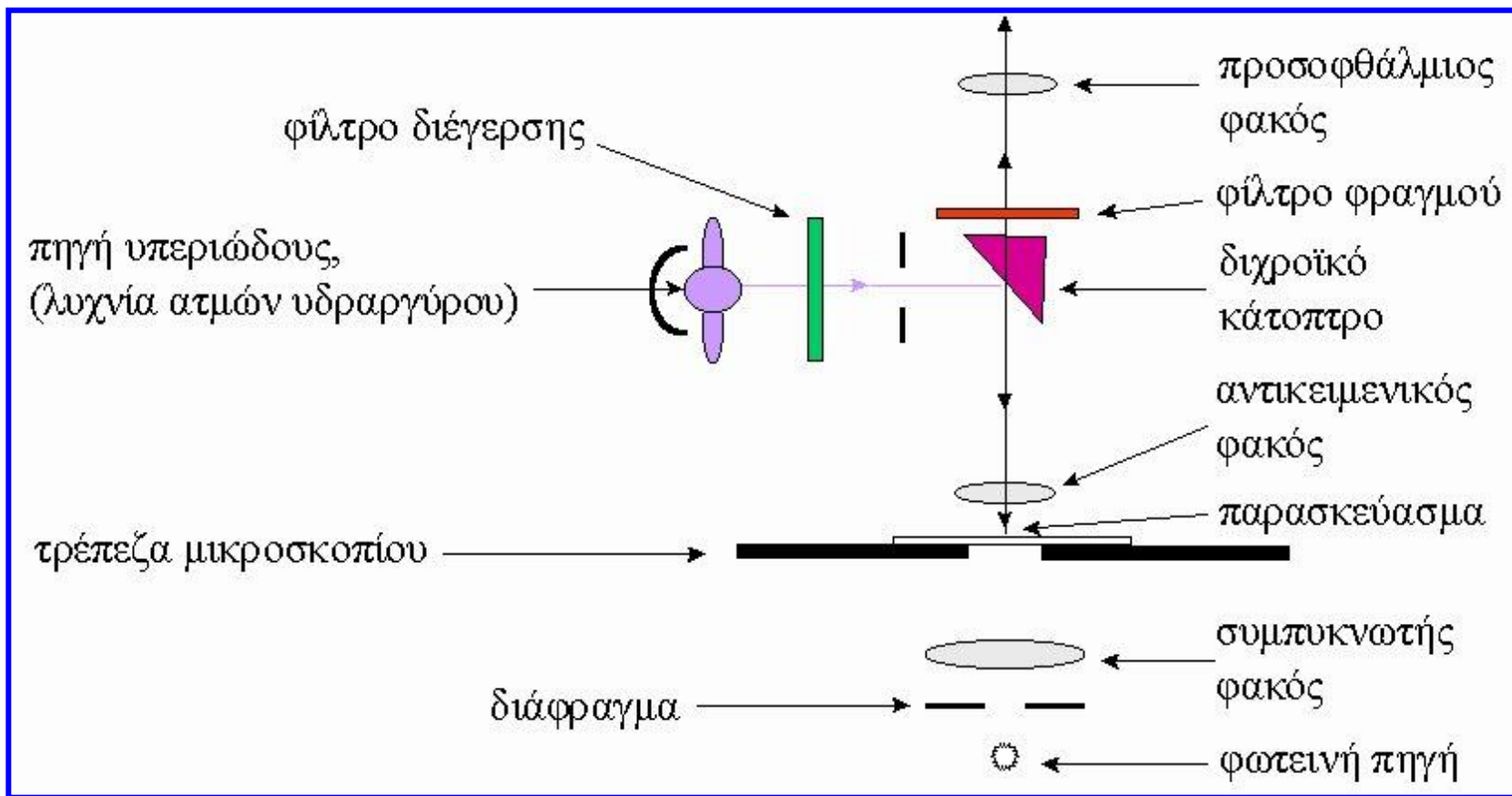
- αρνητική αντίθεση (σκοτεινό αντικείμενο σε φωτεινό πεδίο)
- θετική αντίθεση (φωτεινό αντικείμενο σε σκοτεινό πεδίο)

# Ανεστραμμένο μικροσκόπιο (inverted)



παρατήρηση κυττάρων μέσα σε καλλιέργειες  
(π.χ. μέσα σε τρυβλία petri, φιάλες καλλιέργειας)

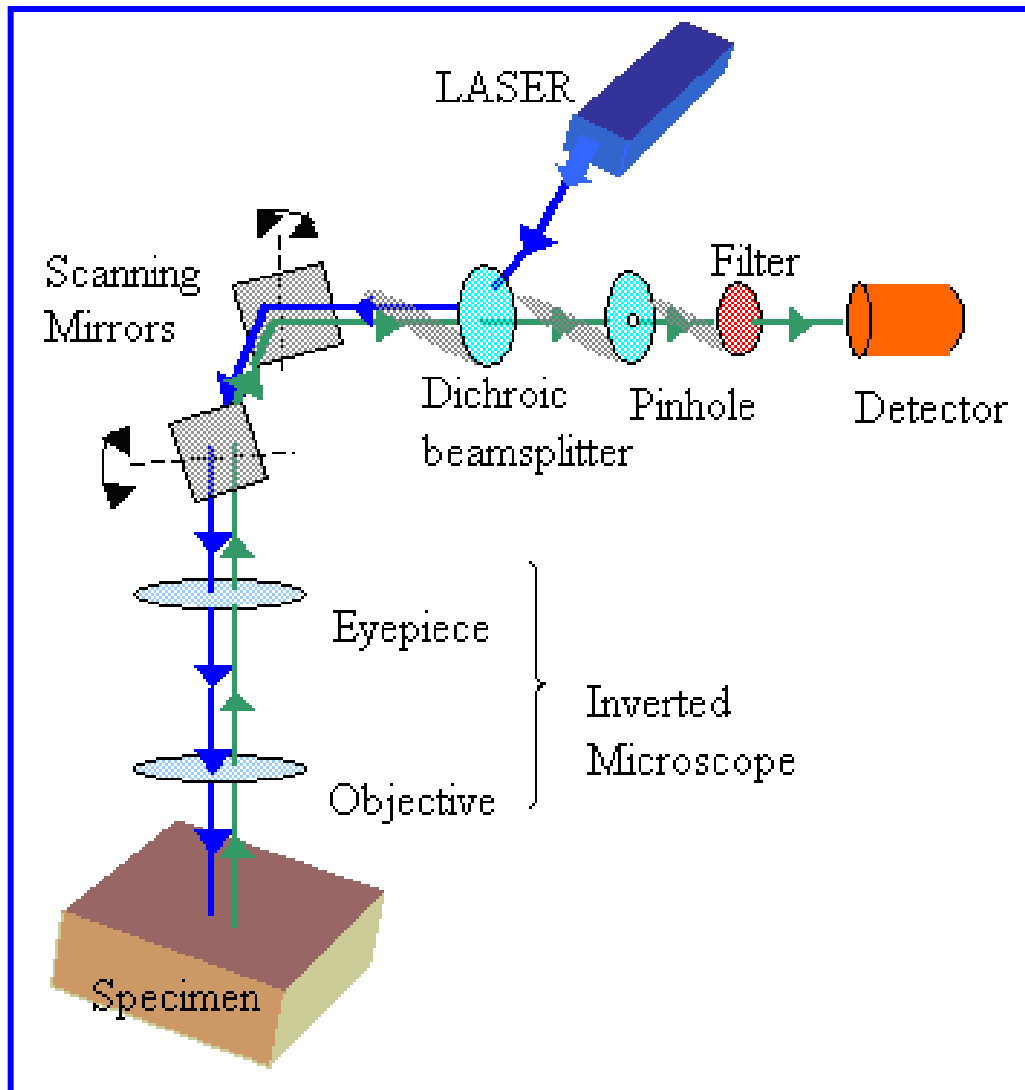
# Μικροσκόπιο φθορισμού



παρατήρηση κυτταρικών δομών που

- φθορίζουν από την φύση τους (πρωτογενής φθορισμός, αυτοφθορισμός)
- γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών, 'χρωστικών', που φθορίζουν (δευτερογενής φθορισμός)

# Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal laser scanning)



φωτισμός και λήψη εικόνας ενός σημείου του δείγματος κάθε φορά

οπή-διάφραγμα ( $<10 \mu\text{m}$ ): επιτρέπει την διέλευση μόνο του εστιασμένου φωτός, ενίσχυση της αντίθεσης  $\rightarrow$  πολύ καθαρές εικόνες

εικόνα σάρωσης: δισδιάστατη εικόνα «τομής» διαμέσου του δείγματος

χρήση ομάδων «τομών» σε διαφορετικά βάθη  $\rightarrow$  τρισδιάστατη σάρωση (άξονας  $x, y$  αλλά και  $z$ ) μέσω Η.Υ. και χρήση ειδικών προγραμμάτων

**παρατήρηση δείγματος σε βάθος**

LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)



# Χαρακτηρισμός και απομόνωση κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Flow Cytometry, Cell Sorting, Fluorescence-  
Activated Cell Sorting (FACS)

# Ορολογία

- **Flow Cytometry**

cyto=κύτταρο και metry=μέτρηση

- μέτρηση χαρακτηριστικών του κυττάρου υπό ροή

- **Flow/Cell Sorting**

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

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

απομόνωση κυττάρων που βασίζεται σε κυτταρομετρία ροής ενεργοποιημένης από φθορισμό

- εταιρεία BD (Becton Dickinson)

# Κυτταρομετρία ροής

- οι μετρήσεις γίνονται **ανά κύτταρο** που βρίσκεται σε διάλυμα και κινείται σε ένα ρεύμα με σταθερή ταχύτητα
- επιτρέπει την **ταυτόχρονη** μέτρηση **πολλαπλών** χαρακτηριστικών σε **ένα μόνο** κύτταρο

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

## Χαρακτηριστικά

κυτταρική διάμετρος  
πυρηνική διάμετρος  
όγκος  
κατανομή χρωστικών  
εσωτερική δομή  
δυναμικό μεμβράνης

## Κυτταρικά συστατικά

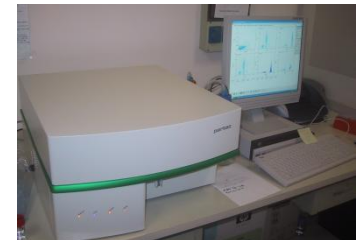
DNA  
RNA

μεμβρανικές πρωτεΐνες  
πυρηνικές πρωτεΐνες  
υποδοχείς  
ένζυμα  
ορμόνες

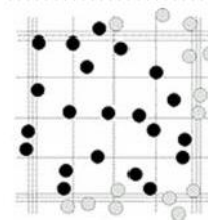
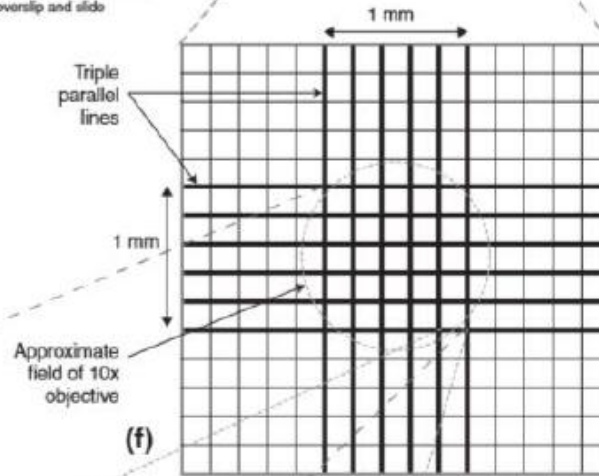
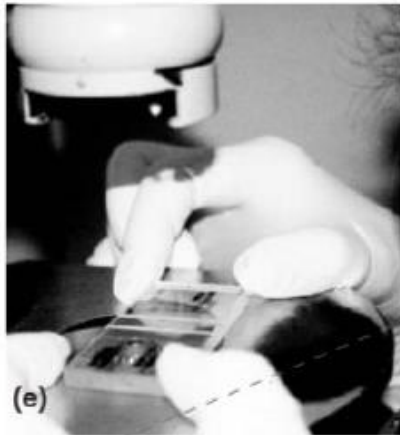
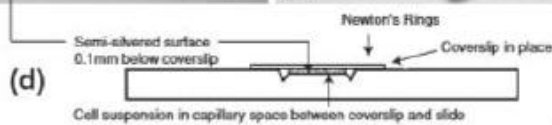
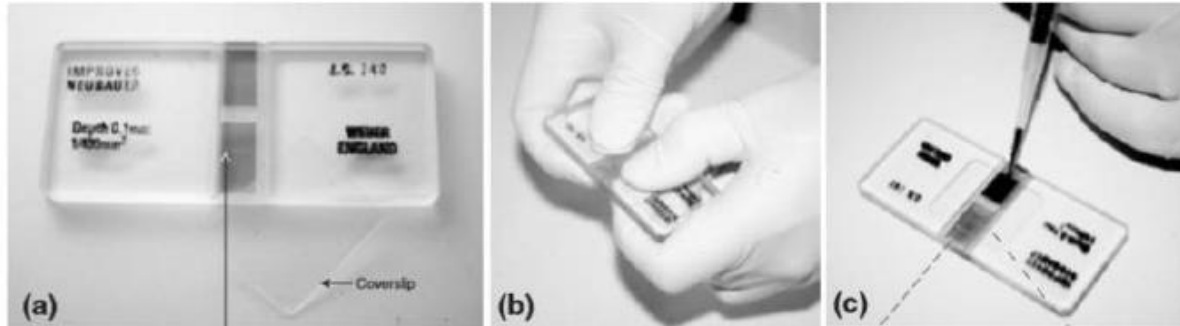
# Κυτταρομετρία ροής - ιστορική αναδρομή

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

# Όργανα κυτταρομετρίας ροής



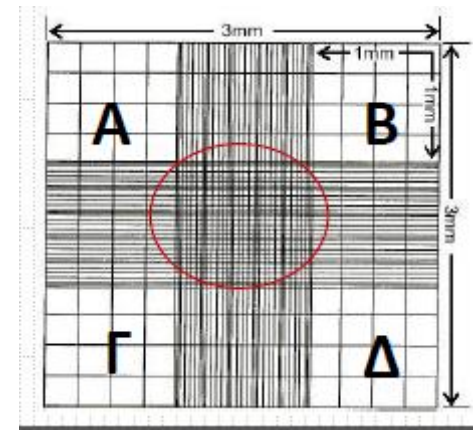
# Ποσοτικοποίηση συγκέντρωσης κυττάρων



## Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)

Διαστάσεις που δημιουργούν συγκεκριμένο χώρο-όγκο για την κυτταροκαλλιέργεια (~ 10 μl δείγμα)

Μέτρηση του αριθμού κυττάρων σε κάθε πεδίο ανάγεται σε συγκέντρωση της κυτταροκαλλιέργειας (μέσος όρος μετρήσεων  $\times 10^4$  κύτταρα/ml)



# Βασικά συστατικά κυτταρομετρίας ροής

## Σύστημα ροής

### Fluidics

- κύτταρα σε αιώρημα
- ρέουν/κινούνται ένα κάθε φορά μέσω

## Οπτικό σύστημα

### Optics

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

## Ηλεκτρονικό σύστημα

### Electronics

- μετατρέπονται σε ψηφιακές μονάδες

## Ανάλυση δεδομένων

### Data analysis

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



# Παρασκευή δειγμάτων για ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής

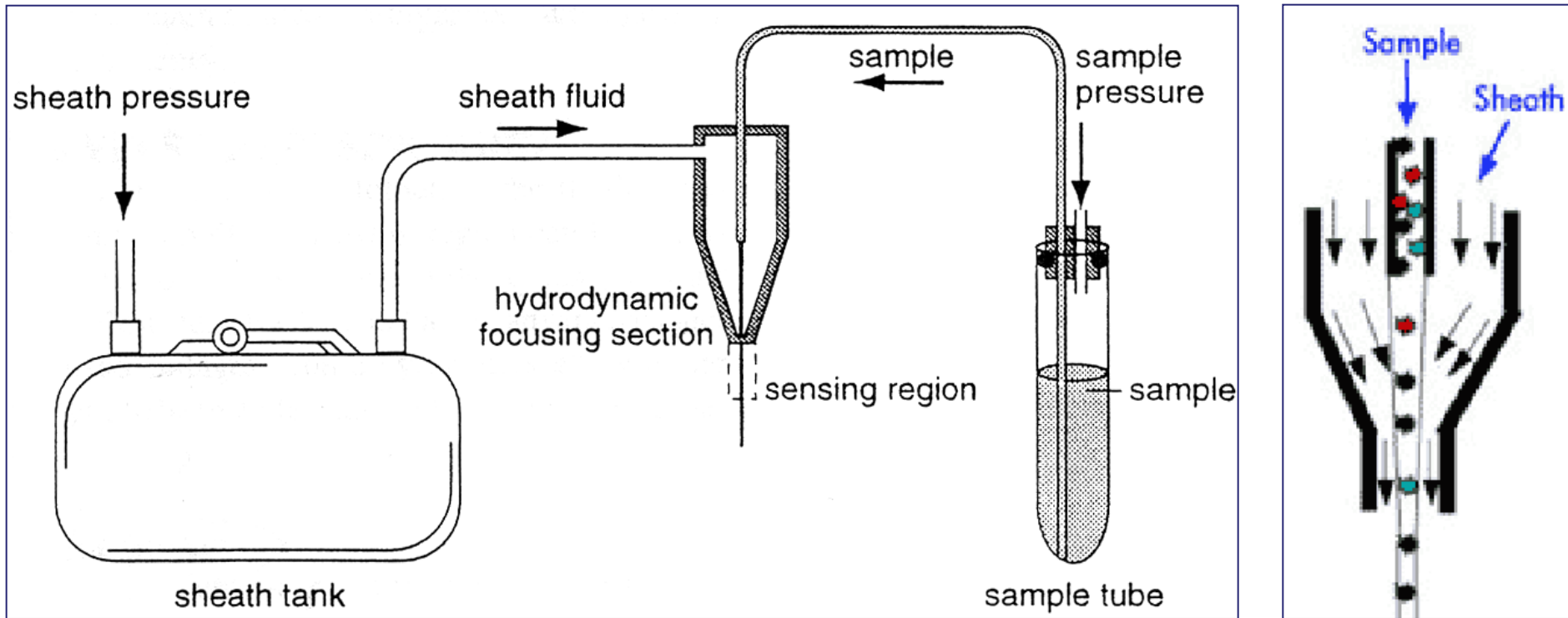
ο κυτταρομετρητής ροής εξετάζει ένα κύτταρο κάθε φορά

σημαντικό να επιτύχουμε εναιώρημα μονοκυττάρων  
(single cell suspension)

Απαραίτητη η αποφυγή κυτταρικών συσσωματωμάτων  
κύτταρα σε καλλιέργεια

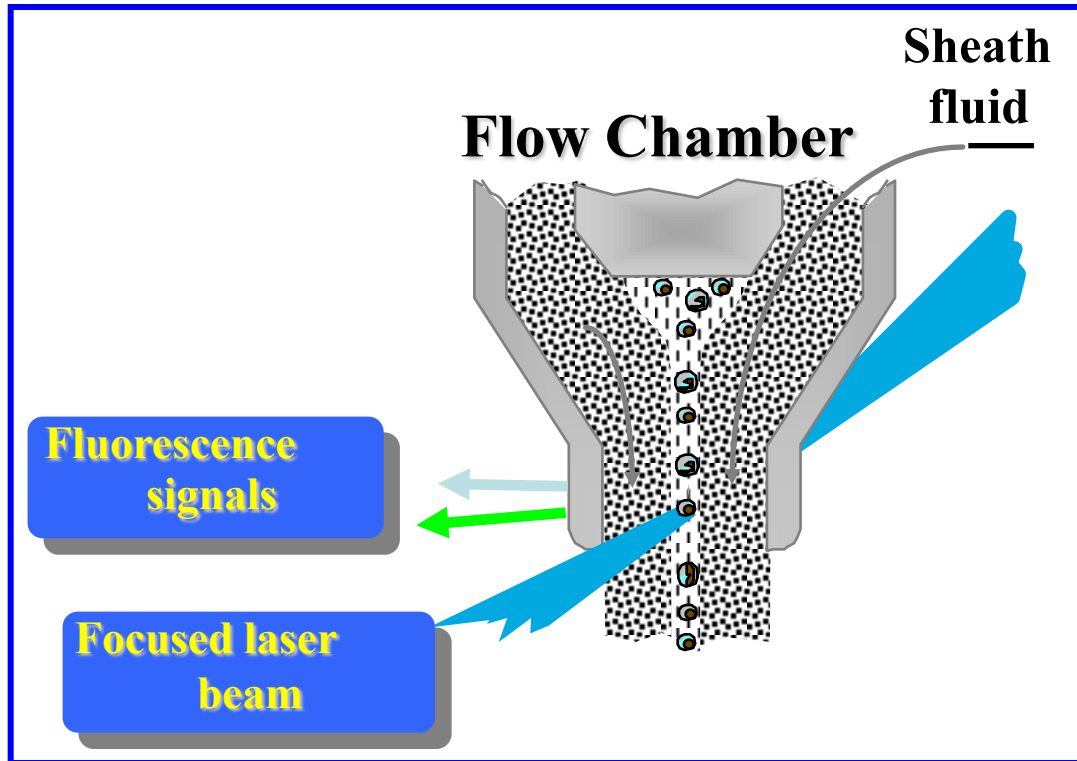
ενζυμική πέψη ιστών (κολλαγενάση, τρυψίνη) και  
εκτεταμένο φιλτράρισμα και ανακάτεμα (πιπετάρισμα) του  
δείγματος

# Σχηματική παράσταση συστήματος ροής (fluidics)



Sheath fluid (νερό, PBS) : περιβάλλον υγρό (υγρό θήκης): 5 ml/min  
Δείγμα: 100  $\mu$ l/min

# Υδροδυναμική εστίαση (hydrodynamic focusing)



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

# Πηγές φωτός σε κυτταρομετρία ροής

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

Lasers for flow cytometry<sup>a</sup>

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

# Εξέταση κυττάρων από μια ακτίνα φωτός laser

Μετρήσεις διαφορετικών κυτταρικών παραμέτρων, οι οποίες βασίζονται σε

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

# 1. Σκέδαση του φωτός

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

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

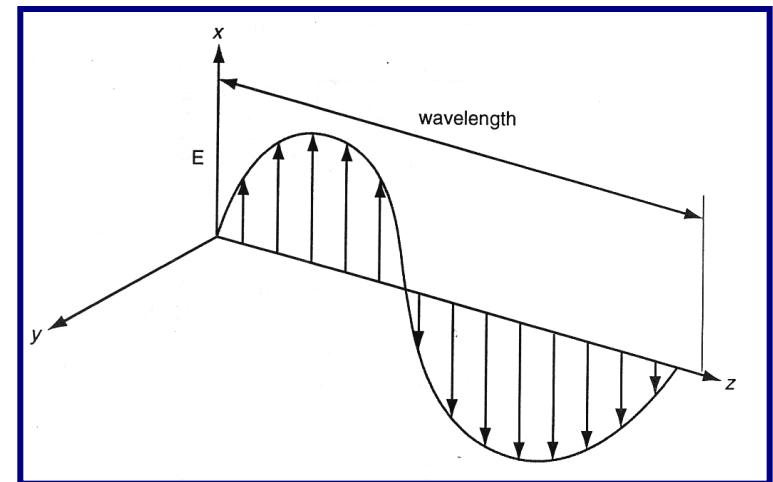
Το δίπολο εκπέμπει ένα νέο κύμα φωτός με την ίδια συχνότητα με το  
προσπίπτον κύμα φωτός: σκεδασμένο φως (scattered light)

Π.χ. μεγάλο κύτταρο

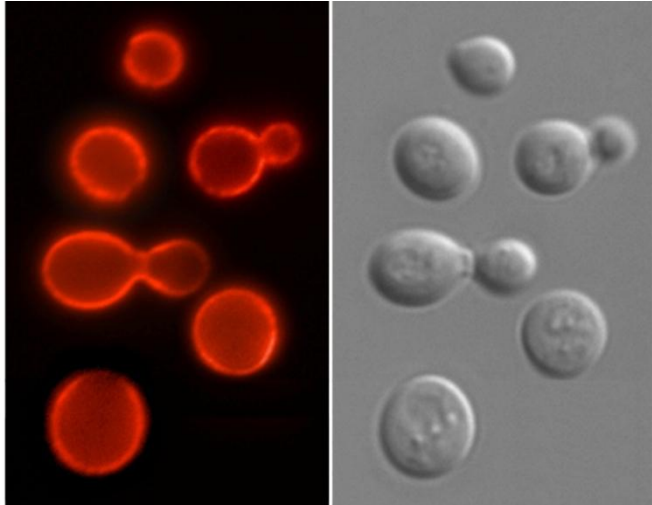
→ μεγάλος ο χρόνος φωτισμού από την  
πηγή φωτός

→ μεγάλο εύρος του παραγόμενου  
ηλεκτρικού παλμού

**σκέδαση φωτός ↔ εύρος (μεγέθος)  
κυττάρων**

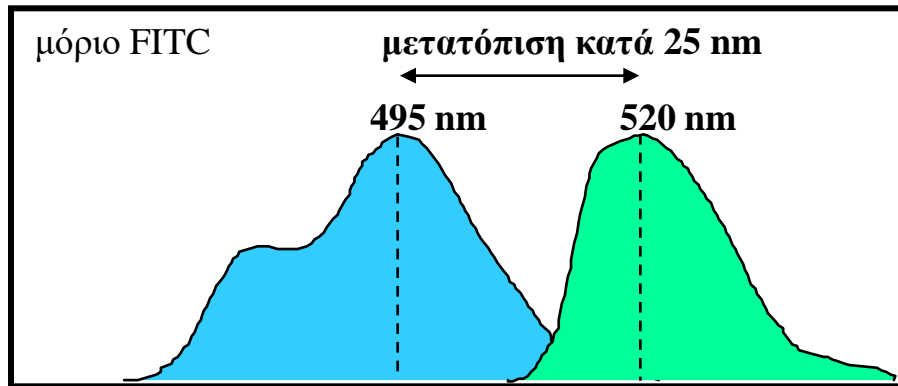


## 2. Χαρακτηριστικά φθοριζόντων κυττάρων



Φθορισμός: εκπομπή φωτός μετά από διέγερση σωματιδίων από κάποια ακτινοβολία

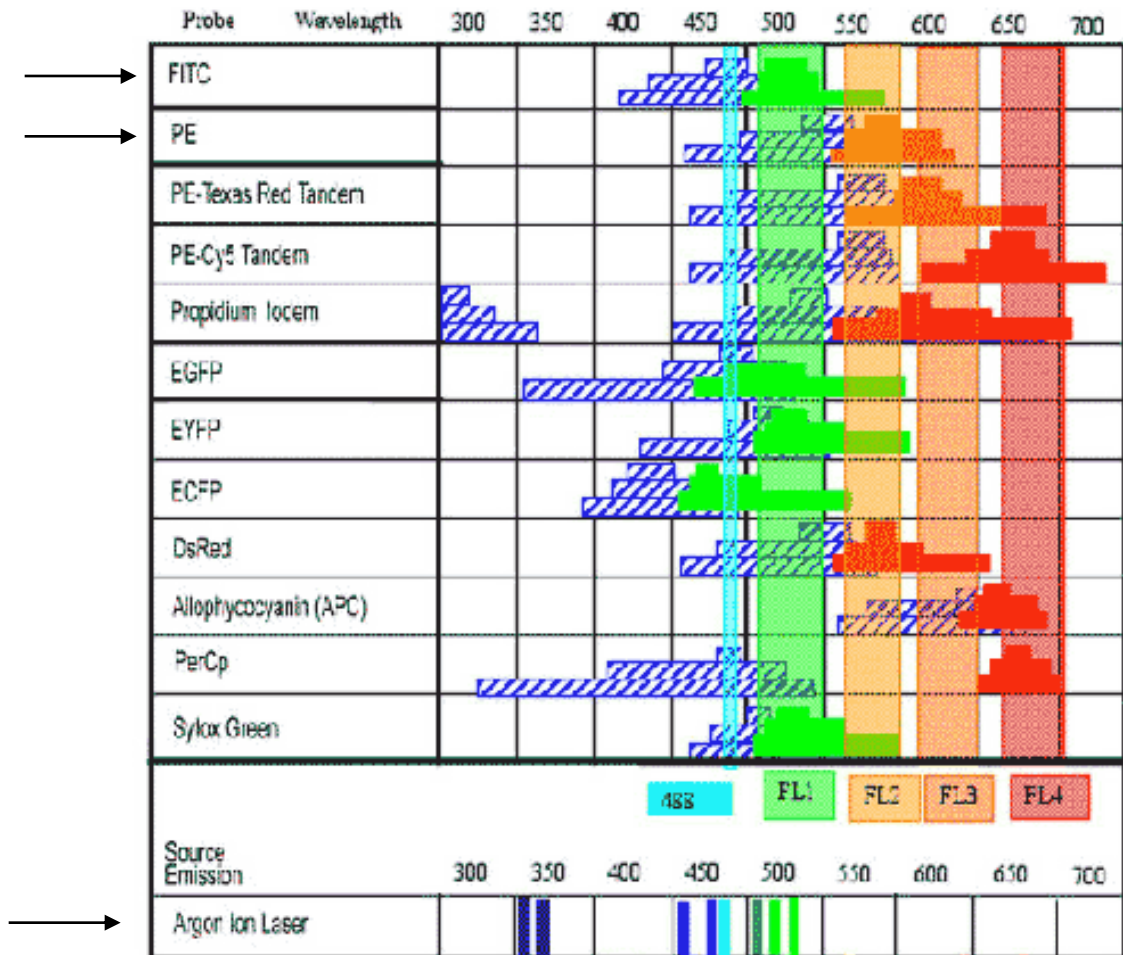
Ένταση φθορισμού



μήκος κύματος

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

# Ευρέως χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες χρωστικές

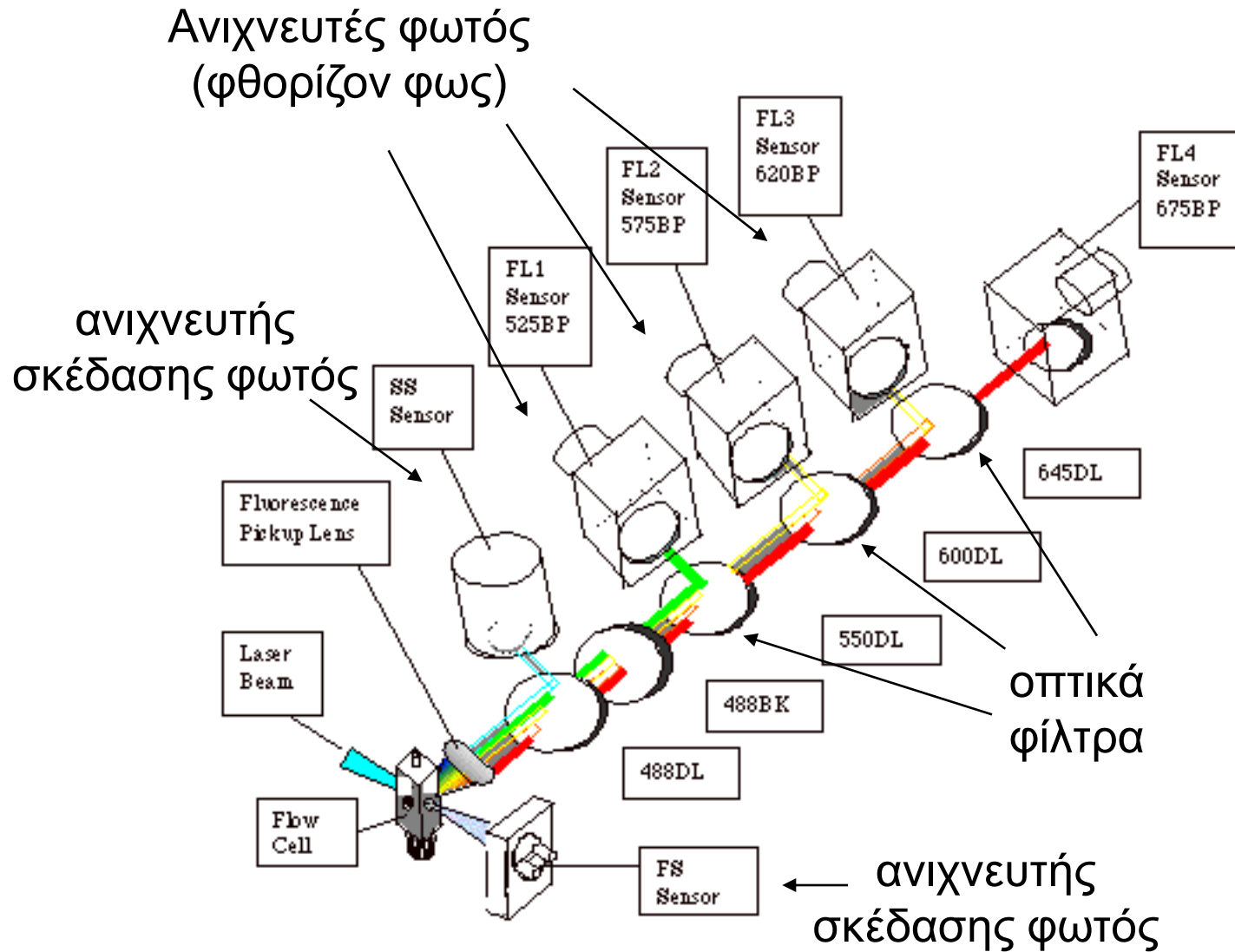


π.χ. σε μελέτες DNA  
 μέτρηση φθορίζουσας  
 χρωστικής που συνδέεται  
 στο DNA  
 → η ποσότητα του  
 φθορίζοντος φωτός που  
 εκπέμπει το κύτταρο  
 παράγει σήμα ανάλογο του  
 περιεχομένου DNA του  
 κυττάρου

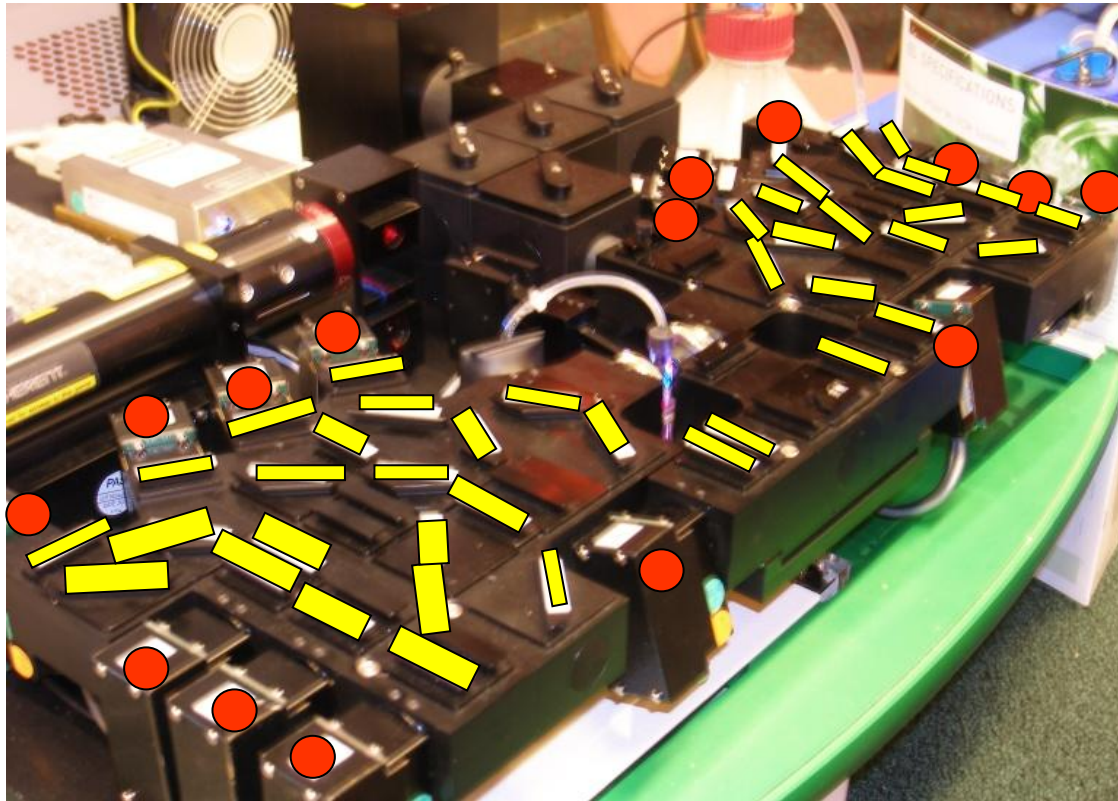
FL1, FL2, FL3, FL4 : ανιχνευτές φθορισμού (fluorescence sensors)



# Σχηματική παράσταση οπτικού συστήματος



# Οπτικό σύστημα πολλαπλών ανιχνευτών

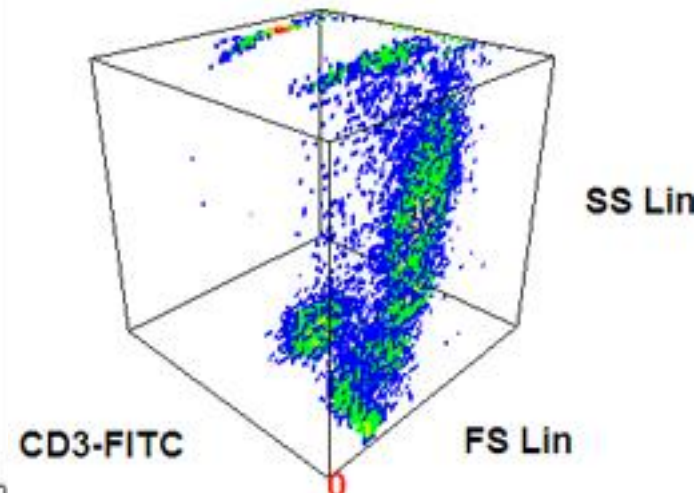
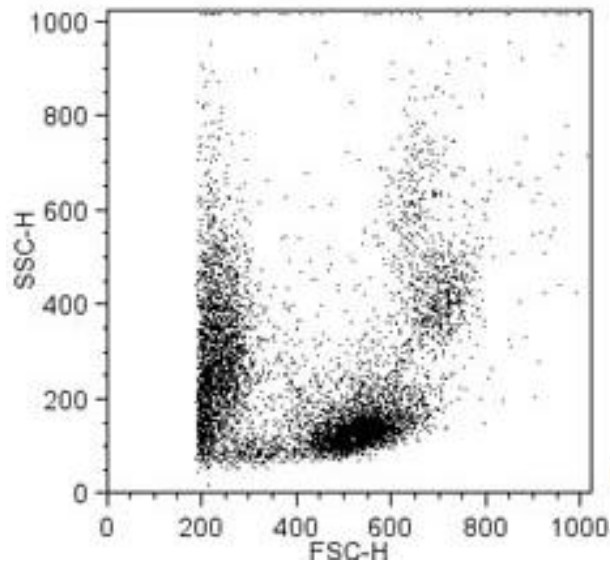
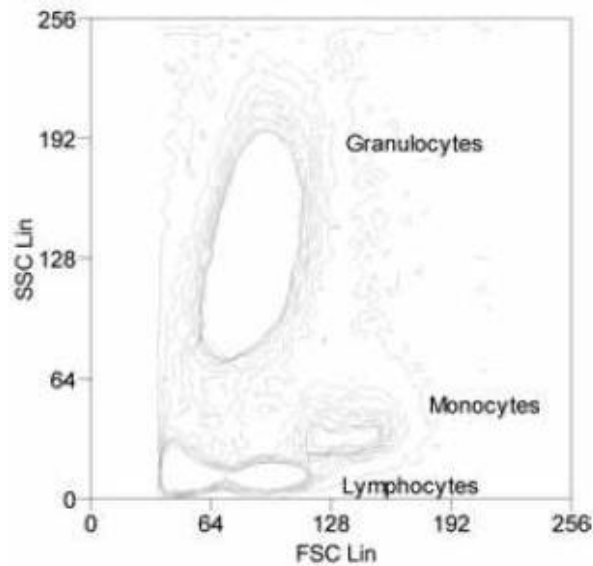
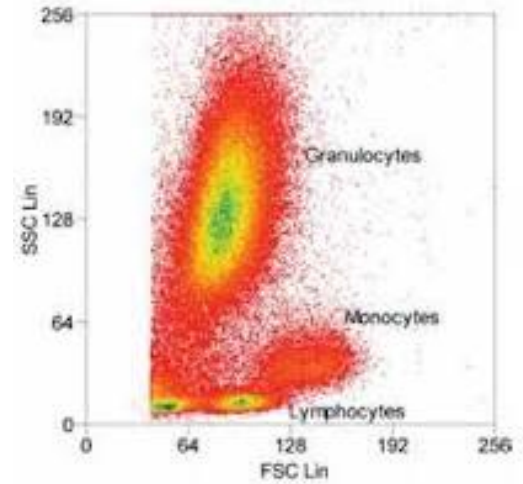
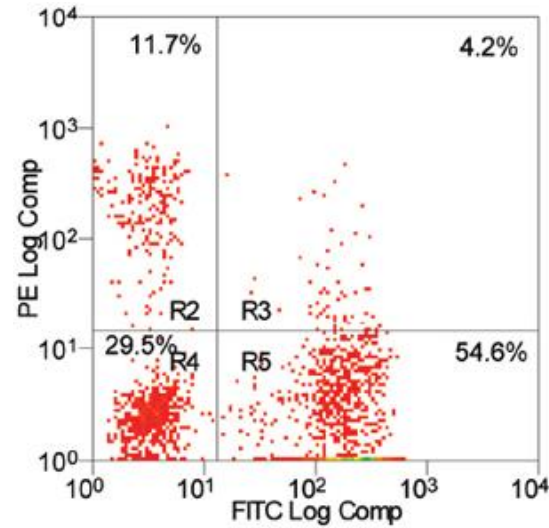
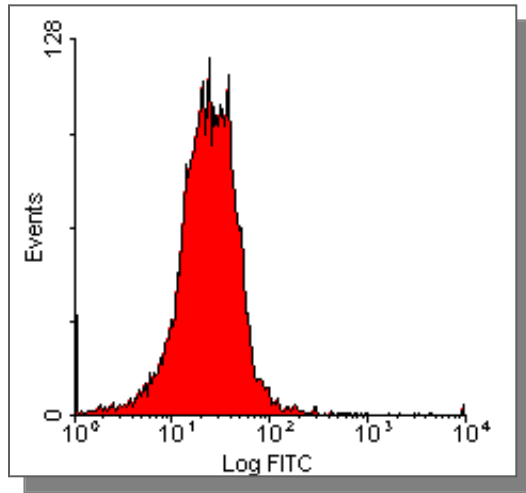


● 14 FLs      ■ 41 φίλτρα

# Δεδομένα ανάλυσης

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

# Γραφικές παραστάσεις δεδομένων

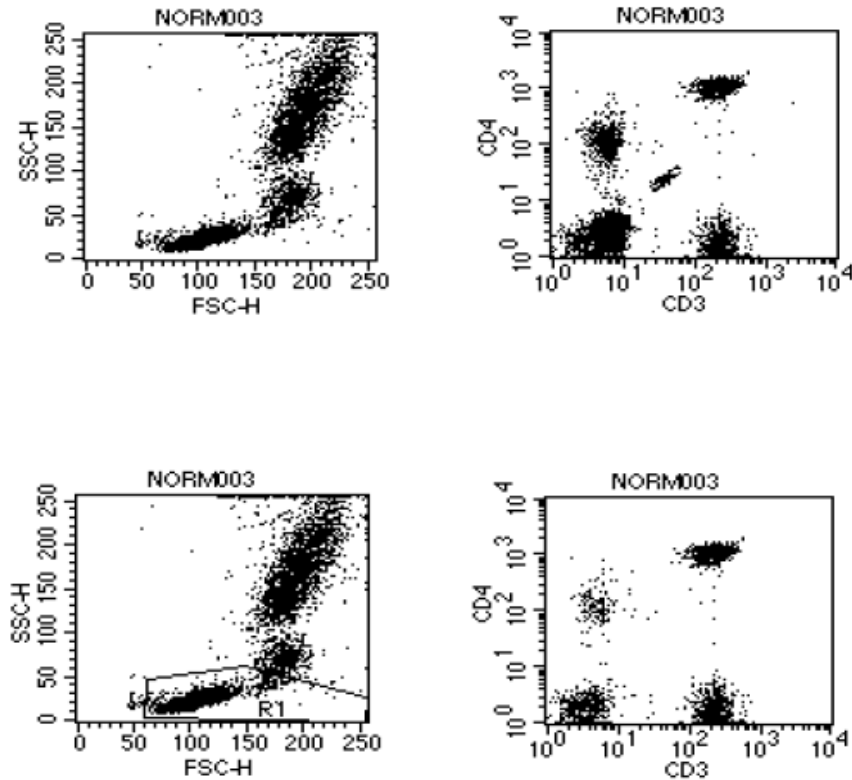


# Αρχή ανάλυσης δεδομένων

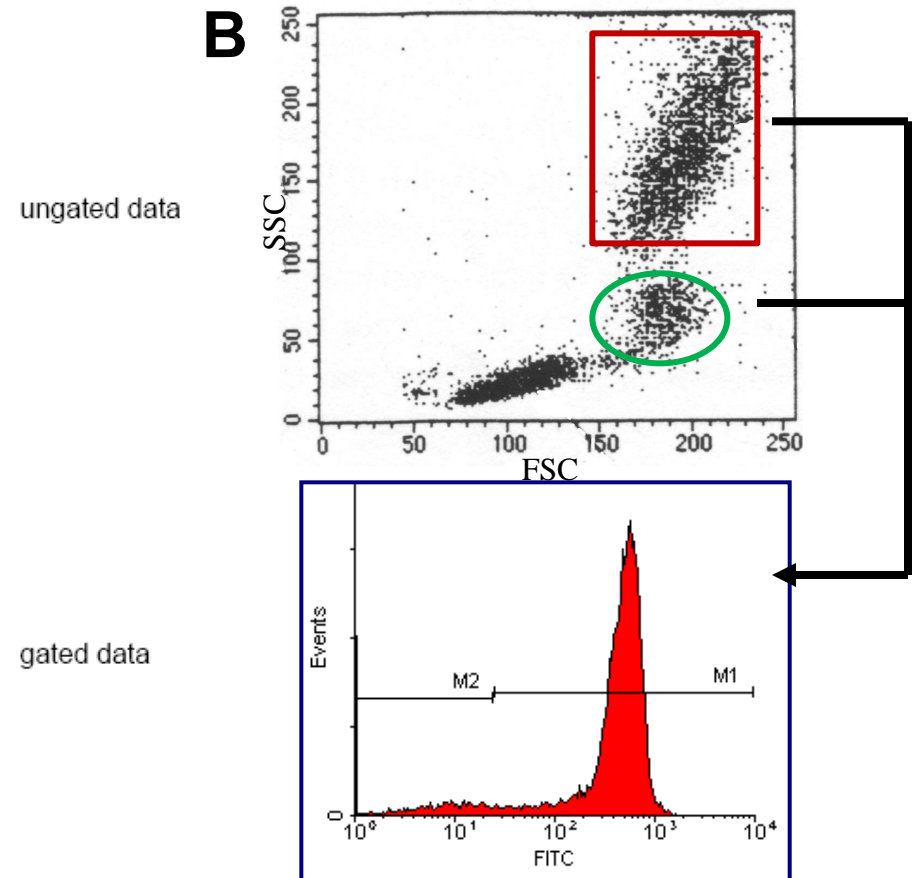
## Gating

- μία παράμετρος
- δύο παράμετροι
- πολλαπλές παράμετροι

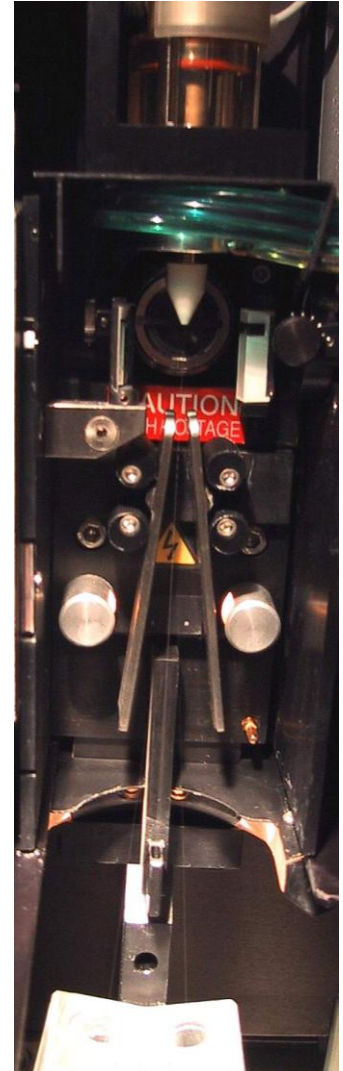
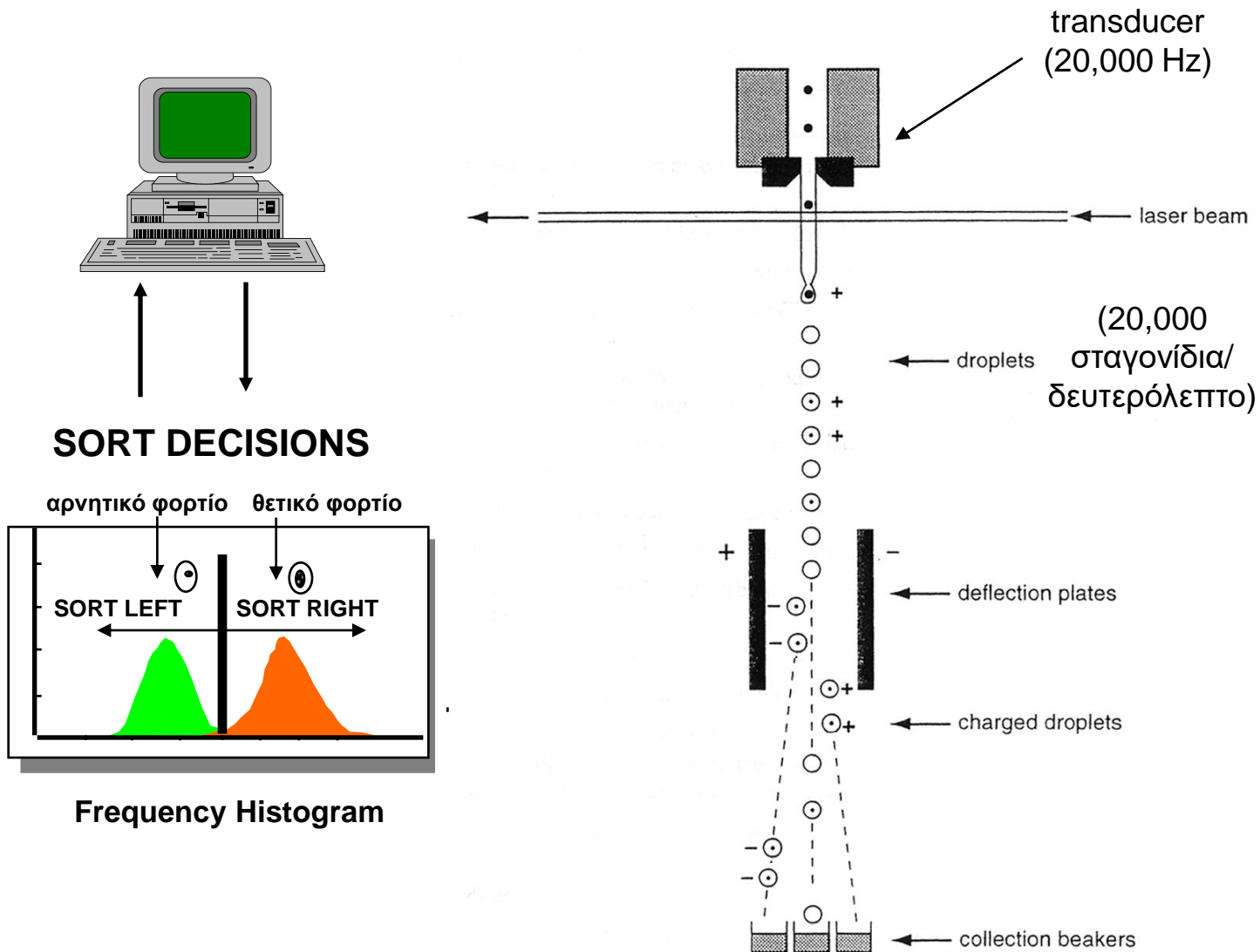
**A**



**B**



# Απομόνωση (sorting) κυττάρων



# Εφαρμογές κυτταρομετρίας ροής

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

βασική κυτταρική βιολογία

ανάλυση κυτταρικών λειτουργιών

μελέτες καρυότυπου

διάγνωση ασθενειών

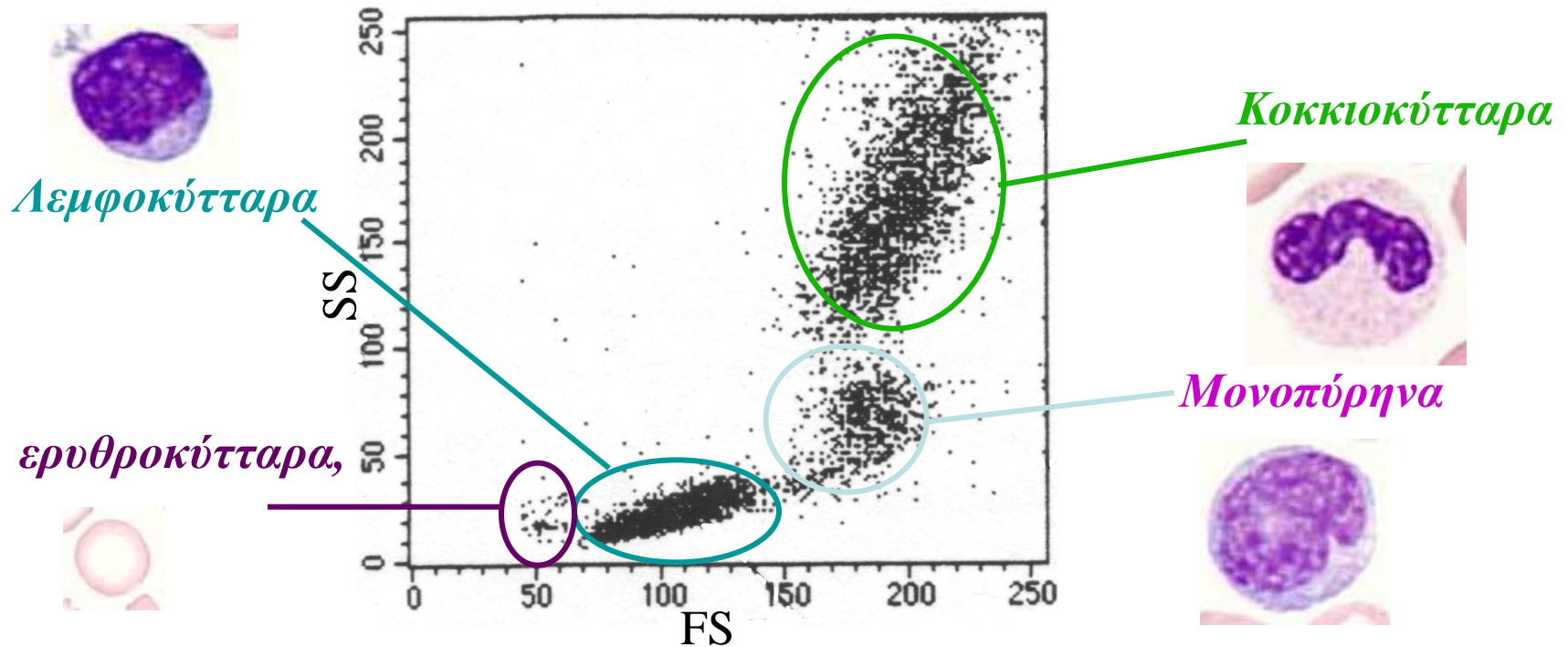
ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων

ταυτοποίηση - απομόνωση βλαστικών κυττάρων

# Διαχωρισμός κυττάρων αίματος

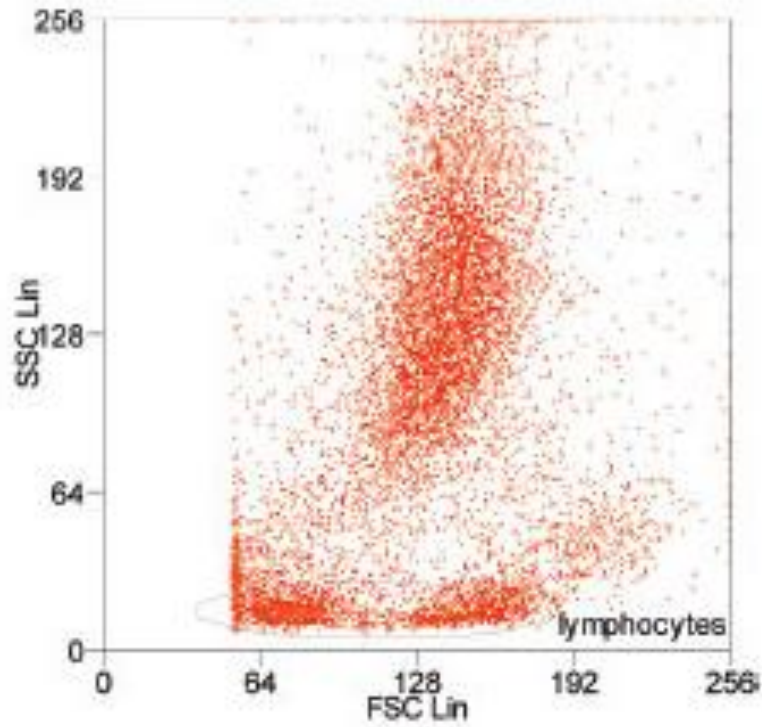
FS (forward scatter): ανάλογο του μεγέθους

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

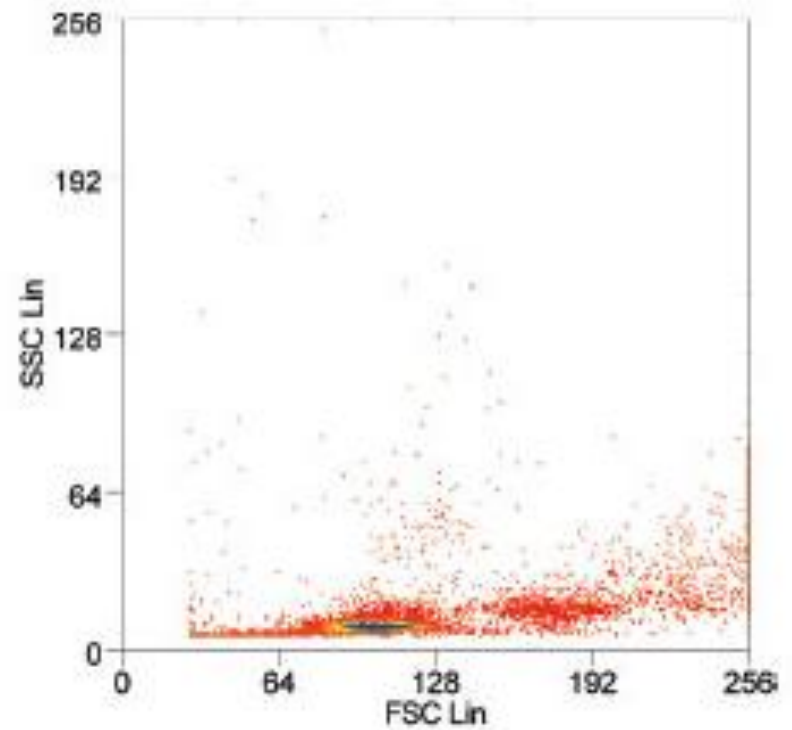
























υγιές άτομο














ασθενής με λευχαιμία



# Φθορίζουσες χρωστικές για σήμανση πρωτεϊνών

Χρωστική	Διέγερση	Εκπομπή
FITC	488 	525 
PE	488 	575 
APC	630 	650 
PerCP™	488 	680 
Cascade Blue	360 	450 
Coumerin-phalloidin	350 	450 
Texas Red™	610 	630 
Tetramethylrhodamine-amines	550 	575 
CY3 (indotrimethinecyanines)	540 	575 
CY5 (indopentamethinecyanines)	640 	670 

# Φθορίζουσες χρωστικές για σήμανση νουκλεϊκών οξέων

Χρωστική	Διέγερση	Εκπομπή
• Hoechst 33342	346	 460
• DAPI	359	 461
• POPO-1	434	 456
• YOYO-1	491	 509
• Acridine Orange (RNA)	460	 650
• Acridine Orange (DNA)	502	 536
• Thiazole Orange	509	 525
• TOTO-1	514	 533
• Ethidium Bromide	526	 604
• PI	536	 620
• 7-Aminoactinomycin D (7AAD)	555	 655

# Ειδικές φθορίζουσες χρωστικές

Χρωστική	Θέση	Διέγερση	Εκπομπή
BODIPY	Golgi	505	511
NBD	Golgi	488	525
DPH	Λιπίδια	350	420
TMA-DPH	Λιπίδια	350	420
Rhodamine 123	Μιτοχόνδρια	488	525
DiO	Λιπίδια	488	500
diI-Cn-(5)	Λιπίδια	550	565
diO-Cn-(3)	Λιπίδια	488	500

# Μέτρηση παραμέτρων που βασίζονται σε DNA και RNA

- Ολικό περιεχόμενο DNA και RNA
- Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου
- Ανάλυση χρωμοσωμάτων
- Ανάλυση προδρόμων ερυθροκυττάρων
- Ανάλυση ζωντανών/νεκρών κυττάρων (δυναμικό μεμβράνης)

# Μελέτες κυτταρικού κύκλου: τυπικό ιστόγραμμα DNA

