

**Β' ΒΑΣΙΚΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ
2 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 2013
ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΚΡΑΤΙΚΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «Γ. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ»**

IV Σχεδιασμός Πειραμάτων και Ανάπτυξη Δοκιμασιών

ΚΙΝΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Βικεντίου Μυροφόρα, Χημικός, PhD,

MSc “Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική”

**Επιστημονικός Συνεργάτης, Β' Παθολογική Προπαιδευτική Κλινική,
Αιματολογική Μονάδα, Π.Γ.Ν “Αττικόν**

ΚΙΝΗΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

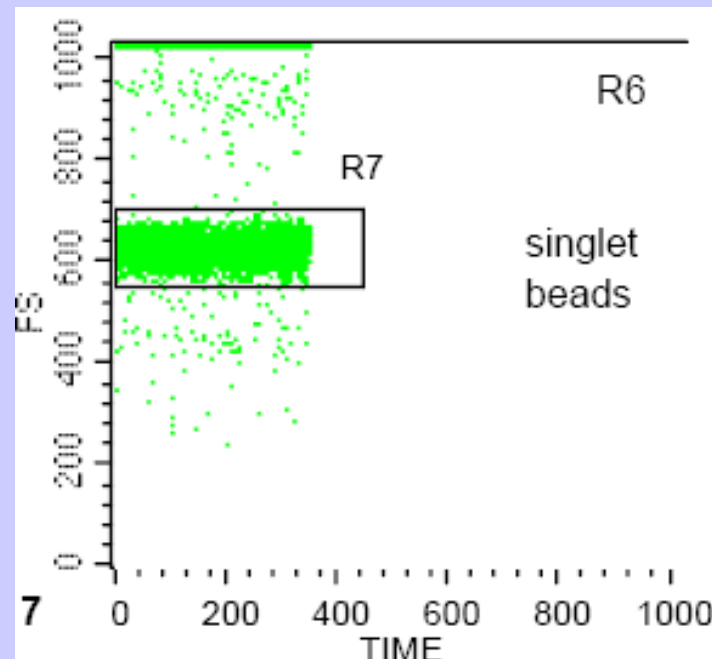
□ *Κινητική Ανάλυση προσδιορίζει την αλλαγή μιας συγκεκριμένης παραμέτρου κατά τη διάρκεια του χρόνου*



Η Κινητική της κυτταρικής απόκρισης αναφέρεται στα γεγονότα μετάδοσης σήματος που έχουν παροδικότητα εντός μερικών λεπτών ή και μικρότερου χρονικού διαστήματος. Τυπικά, μόλις ξεκινήσει η διαδικασία η απόκριση φθάνει εντός δευτερολέπτων σε ένα ανώτερο επίπεδο. Το επίπεδο αυτό είτε μπορεί να παραταθεί είτε μπορεί να ξεκινήσει η φθίνουσα πορεία του μόλις επιτευχθεί η κορύφωση εντός σχετικά σύντομου χρονικού διαστήματος.

ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ (BEADS)

- Έλεγχος σωστής λειτουργίας συστήματος κυτταρομετρίας ροής μέσω σφαιριδίων στο αυτόματο λογισμικό Προσδιορισμού CD34+ Βλαστικών Κυττάρων (Stem Cells)



ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

❑ Αλλαγή στη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου ανιχνεύεται με τη χρήση φθορίζουσών ουσιών που δεσμεύουν τα ιόντα ασβεστίου

Π.χ. indo-1, fluo-4 και fura-2, έχουν σχεδιαστεί για τη μέτρηση επιπέδων ενδοκυττάρου ασβεστίου (Ca^{2+}) σε ζώντα κύτταρα

Οι φθορίζοντες ανιχνευτές έχουν συγγένεια για τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του Ca^{2+} σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας.

Οι ανιχνευτές θα υποδείξουν τόσο την αύξηση και μείωση της συγκέντρωσης ελεύθερου κυτοσολικού Ca^{2+} εντός του βιώσιμου κυττάρου με ελάχιστο σφάλμα.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ (2)

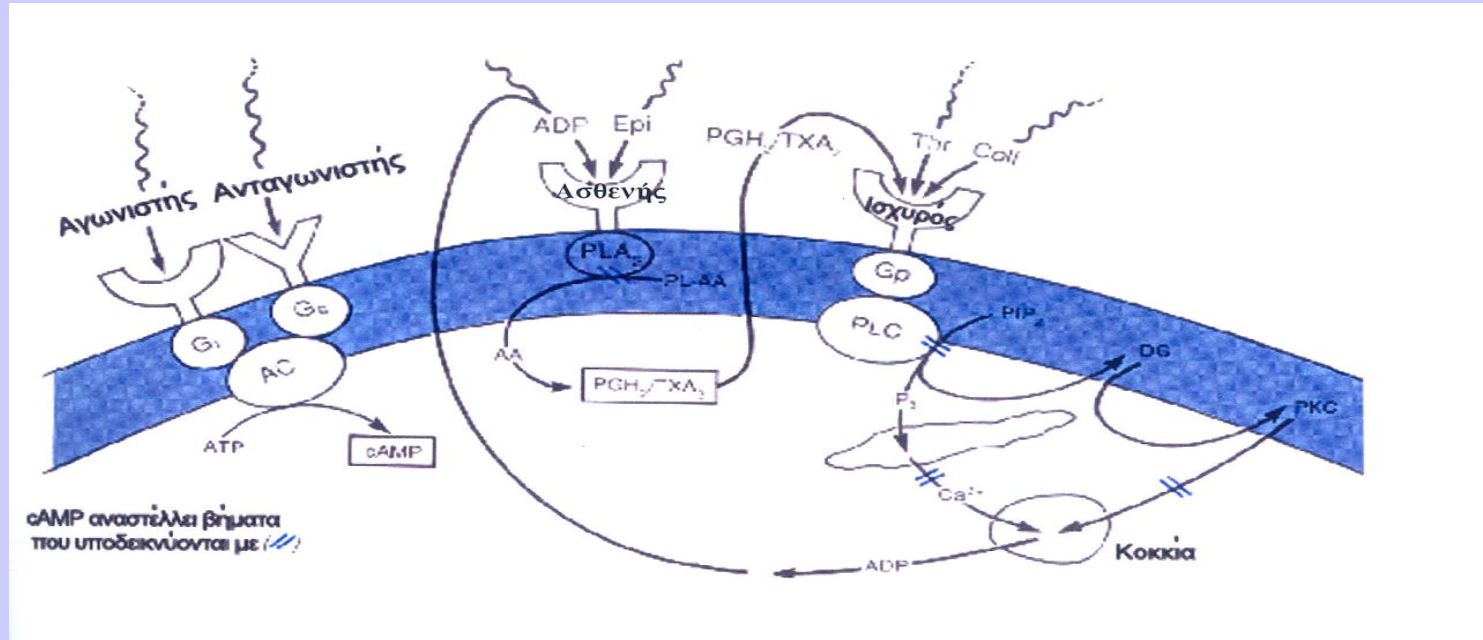
Στην κυτταρομετρία ροής, οι μελέτες κινητικής περισσότερο συχνά τυποποιούνται από την κινητοποίηση Ca^{2+} από πολλούς υποδοχείς που συζεύγνυνται με Ca^{2+} που υπάρχουν στο κύτταρο, ή σε οδούς εισροής που επιτρέπουν στα ιόντα Ca^{2+} να διαχέονται εντός του κυττάρου, υπό συνθήκες πολύ μεγάλης και προς τα έξω κατευθυνόμενης βαθμιδωτής συγκέντρωσης Ca^{2+}

Η κινητοποίηση κυτοσολικού ασβεστίου μπορεί να μελετηθεί από τα περισσότερα κυτταρόμετρα ροής, εφ' όσον το λογισμικό απόκτησης δεδομένων επιτρέπει τη συνεχή απόκτηση και απεικόνιση των γεγονότων με την πάροδο του χρόνου έτσι ώστε μία συνεχής κατανομή της κατάστασης των κυττάρων να μπορεί να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια του χρόνου ως κινητική μέτρηση.

Οι ευρέως διαθέσιμοι φθορίζοντες ανιχνευτές αναφοράς διεγείρονται είτε στο ορατό είτε στο υπεριώδες.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ (3)

Μελέτη κινητοποίησης του ασβεστίου σε αιμοπετάλια κουνελιού με KP

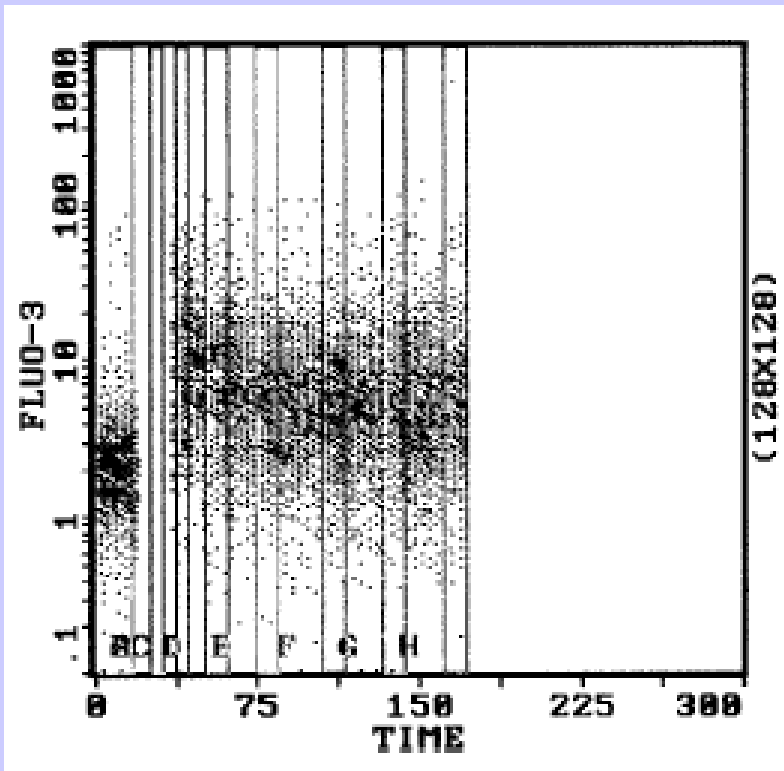


- Χρήση ακετοξικού μεθυλεστέρα του Fluo-3 ο οποίος διαπερνά εύκολα την λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης και υδρολύεται από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες στο κυτοσόλιο των αιμοπεταλίων
- Το ιόν που παράγεται δεσμεύει χηλικά τα ιόντα ασβεστίου
- Ο ακετοξικός μεθυλεστέρας και το ελεύθερο ιόν του Fluo-3 δεν φθορίζουν ενώ το χηλικό σύμπλοκο του Fluo-3 με τα ιόντα Ca^{2+} εκπέμπει φθορισμό στα 530 nm

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ (4)

Μελέτη κινητοποίησης του ασβεστίου σε αιμοπετάλια κουνελιού με KP (II)

Ιστόγραμμα κινητοποίησης του ασβεστίου



- Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από κάποιον διεγέρτη (θρομβίνη, PAF, Ιονοφόρο A23187) παρατηρείται αύξηση του κυτοσολικού ασβεστίου και επομένως αύξηση της εντάσεως του φθορισμού

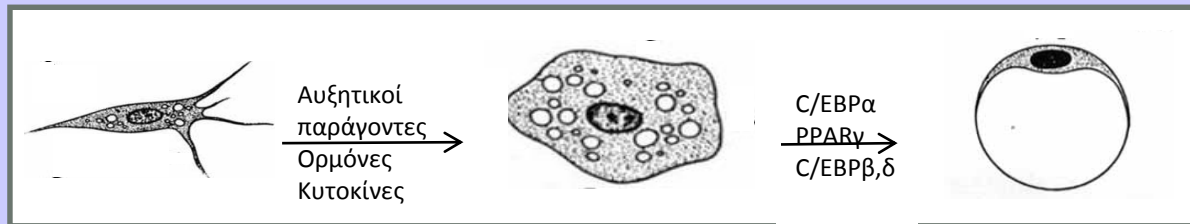
Για να παρακολουθήσουμε τη μεταβολή φτιάχνουμε διαδοχικά παράθυρα κατά μήκος της παραμέτρου «time»

ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΟΠΟΥ ΔΕΝ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Η ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ TIME ΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΗΤΗ

❑ **Μακρύ χρονικό διάστημα που δεν μπορεί να παρακολουθηθεί μέσα στον κυτταρομετρητή**

- **Μελέτη Διαφοροποίησης Προλιποκυττάρων σε Λιποκύτταρα**
- **Μελέτη Απόπτωσης**
- **Ενεργοποίηση κυτταροκινών**
- **Εκτίμηση Οξειδωτικής έκκρισης**

ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΟΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ



Σχήμα 4: Διαφοροποίηση προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για την επίδραση των λιπαρών οξέων αλλά και άλλων παραγόντων στην πορεία της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα. Μέχρι στιγμής στην βιβλιογραφία, ο προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής, γίνεται κυρίως με δύο τρόπους: α) μέσω της χρώσης των λιποσταγόνων με φθορίζουσα χρωστική και μέτρηση του φθορισμού, και β) με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες ουσίες, που προσδένονται σε υποδοχείς που υπερεκφράζονται κατά την διαφοροποίηση.

Πρόσφατα στην βιβλιογραφία αναφέρθηκε μια απλή, ευαίσθητη και χαμηλού κόστους μέθοδος διαχωρισμού προλιποκυττάρων και λιποκυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Με την μέθοδο αυτή μπορούμε να παρακολουθήσουμε την μεταβολή τόσο του μεγέθους όσο και της εσωτερικής πολυπλοκότητας καθενός κυττάρου ξεχωριστά. Κατά την πορεία της διαφοροποίησης και οι δυο αυτοί παράγοντες μεταβάλλονται, τα προλιποκύτταρα (με σχήμα ινοβλάστη) χάνουν το αρχικό τους σχήμα και μετατρέπονται σε σφαιρικά κύτταρα με την συσσώρευση λίπους στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος τους (Σχήμα 4).

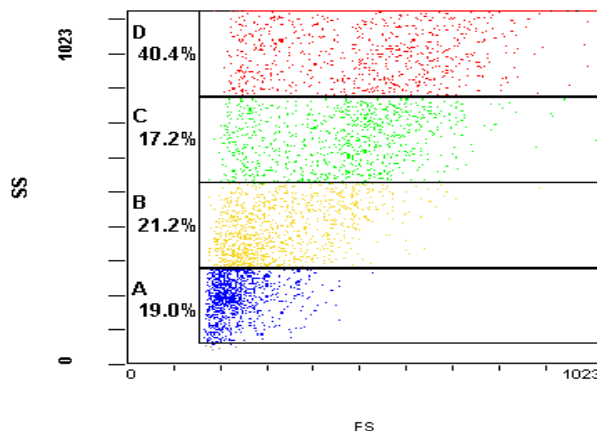
Η αύξηση του μεγέθους και της εσωτερικής πολυπλοκότητας που παρατηρείται κατά την μέτρηση στον κυτταρομετρητή, συσχετίζεται με την συσσώρευση λιποσταγόνων στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα κύτταρα διαφοροποιούνται με ένα ετεροχρονισμένο τρόπο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα ευρύ πεδίο φαινοτύπων κυττάρων. Η σύγκριση των διαφοροποιημένων κυττάρων με τα αδιαφοροποίητα μπορεί να παρέχει ποσοτική εκτίμηση του βαθμού διαφοροποίησης.

ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΟΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ (2)

Με την κυτταρομετρία ροής παρακολουθείται:

- α) Η μεταβολή του μεγέθους (πρόσθιος σκεδασμός-FS) και
- β) Η μεταβολή της εσωτερικής πολυπλοκότητας (πλάγιος σκεδασμός-SS) καθενός κυττάρου ξεχωριστά

Τα κύτταρα κάθε περιοχής διαφέρουν ως προς την εσωτερική πολυπλοκότητα η οποία αντανακλά την διαφορετική συσσώρευση τριγλυκεριδίων στο εσωτερικό των κυττάρων κατά την πορεία της διαφοροποίησης



- Στην περιοχή A περιέχονται τα αδιαφοροποίητα κύτταρα
- Παρατηρείται προοδευτική αύξηση της συσσώρευσης τριγλυκεριδίων από την περιοχή B στην D

Σχήμα 5: Στικτογράμματα που λαμβάνονται από την μέτρηση λιποκυττάρων με κυτταρομετρία ροής

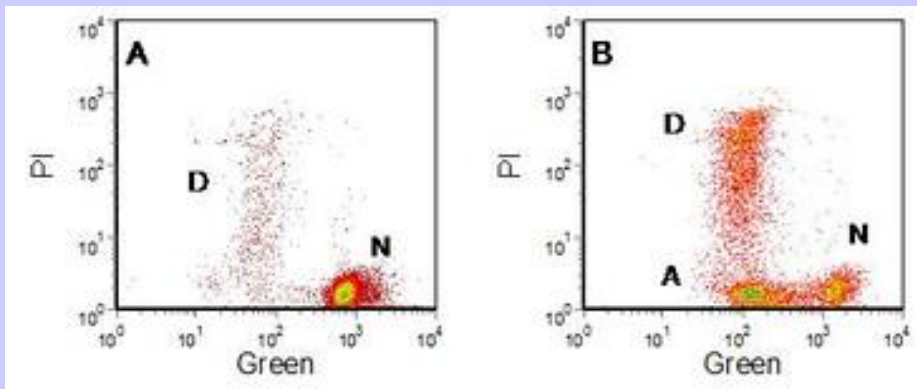
ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

- Έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης (π.χ. Bcl-2)
- Ενεργοποίηση κασπασών (π.χ. caspases -8, -9, and -3)
- Αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης του μιτοχονδρίου
- Αλλαγές στην κυτταροπλασματική μεμβράνη
- Συρρίκνωση του κυττάρου
- Αλλαγές χρωματίνης
- Αποδιάταξη DNA

ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (2)

Αλλαγές στη μιτοχονδριακή μεμβράνη

- Αλλαγές στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Changes in the mitochondrial membrane potential, (MMP))
- ✓ Όταν η μιτοχονδριακή μεμβράνη καταστραφεί η χρώση κατανέμεται στο κυτταρόπλασμα και δημιουργεί νέο ισοζύγιο με τον εξωτερικό χώρο, καταλήγοντας στην απώλεια της χρώσης από το κύτταρο.
- ✓ π.χ. χλωρο-μέθυλ-ροδαμίνη (chloro-methyl-X rhosamine), ροδαμίνη 123 (rhodamine 123) και 3,3'-dihexyloxacarbocyanine - DiOC₆(3).



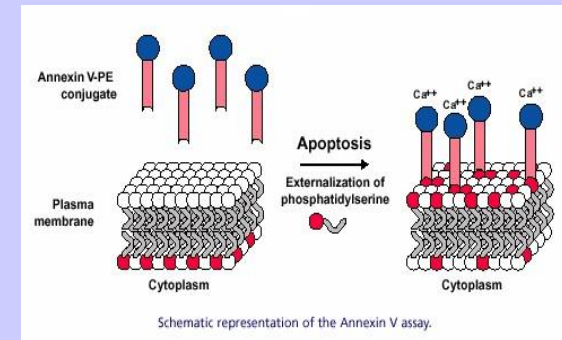
Σχήμα 6: Κυτταρική σειρά λεμφοβλαστών ανθρώπου, W1L2, με χρώση DiOC₆(3) στην οποία προστέθηκε και PI. **A.** Control. **B.** Κυτταρική σειρά μετά από επώαση 16hr με KCN. Η σήμανση υποδεικνύει τα ζώντα (normal, N), τα αποπτωτικά (apoptotic, A) και τα νεκρά (necrotic, D) κύτταρα.

Πειράματα όπου δεν φαίνεται η παράμετρος time μέσα στον κυτταρομετρητή

ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (3)

Αλλαγές στην κυτταροπλασματική μεμβράνη

Αρχική διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης αποτελεί η μετατόπιση της φωσφολιπιδικής μεμβράνης φωσφατιλ-σερίνης (phosphatidylserine, PS) από το εσωτερικό στο εξωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Υπό αυτές τις συνθήκες η PS μπορεί να δεσμεύσει την πρωτεΐνη Annexin V. Η μετατόπιση της μεμβράνης μπορεί να παρατηρηθεί μετά από επώαση των κυττάρων με Annexin V. Η μετατόπιση της PS επάγει και άλλες διαδικασίες της απόπτωσης όπως είναι η απώλεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, η αποδιάταξη του DNA και η συρρίκνωση χρωματίνης.



Η Annexin V μπορεί να συνδεθεί με τη βιοτίνη ή άλλες φθορίζουσες ουσίες όπως FITC, PE, APC, Cy5, ή Cy5.5, και να χρησιμοποιηθεί στην ΚΡ για την ταυτοποίηση κυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο πρώιμης απόπτωσης.

Η μετατόπιση της PS συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της νέκρωσης. Λόγω αυτού η Annexin V δεν αποτελεί απόλυτο δείκτη απόπτωσης.

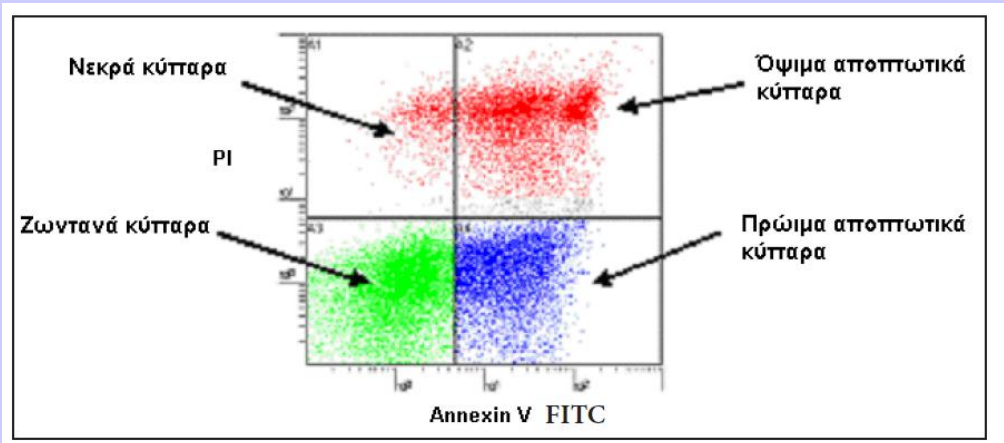
Συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες χρωστικές όπως 7-ακτινομυκίνη (7-amino-actinomycin, 7-AAD) ή το ιωδιούχο προπίδιο (propidium iodide, PI), οι οποίες συνδέονται στα νουκλεϊνικά οξέα και μπορούν να διεισδύσουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη μόνο όταν η μεμβράνη καταστραφεί, γεγονός που εμφανίζεται-προκύπτει στα τελευταία στάδια της απόπτωσης ή στη νέκρωση.

Σημειώνεται ότι στα νεκρά και αποπτωτικά κύτταρα μειώνονται ο πρόσθιος και πλάγιος σκεδασμός του φωτός.

Πειράματα όπου δεν φαίνεται η παράμετρος time μέσα στον κυτταρομετρητή

ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (4)

Αλλαγές στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (II)



Σχήμα 8: Προσδιορισμός πρώιμων αποπτωτικών, όψιμων αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων με τον συνδυασμό Annexin V και PI, με κυτταρομετρία ροής.

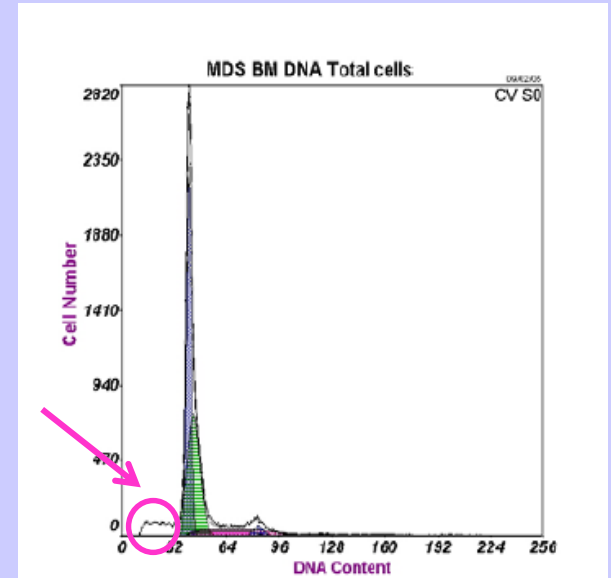
- ✓ **Όχι Απόπτωση = Κυτταρική Βιωσιμότητα:** Κύτταρα αρνητικά στην Annexin V και στις άλλες χρωστικές βιωσιμότητας δεν έχουν ένδειξη ότι το κύτταρο βρίσκεται σε διαδικασία απόπτωσης
- ✓ **Πρώιμη απόπτωση:** Κύτταρα θετικά στην Annexin V και αρνητικά στις χρωστικές βιωσιμότητας έχουν ένδειξη πρώιμης απόπτωσης (έχει γίνει η μετατόπιση της PS αλλά η κυτταροπλασματική μεμβράνη παραμένει άθικτη)
- ✓ **Όψιμη Απόπτωση ή Κυτταρικός Θάνατος:** Κύτταρα που είναι θετικά στην Annexin V και στην χρωστική βιωσιμότητας βρίσκονται είτε στο στάδιο όψιμης απόπτωσης είτε είναι νεκρά.

Πειράματα όπου δεν φαίνεται η παράμετρος time μέσα στον κυτταρομετρητή

ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (5)

Αλλαγές στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (III)

Το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI) λόγω καλών φασματικών χαρακτηριστικών καθίσταται κατάλληλο για πολυπαραμετρικές μετρήσεις. Με τη μέθοδο PI μπορούν να αναλυθούν οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου καθώς και η απόπτωση των υπό μελέτη κυττάρων. Επιτυγχάνεται στοιχειομετρική σύνδεση DNA-χρωστικής (το ποσό δηλ. της χρωστικής που συνδέεται είναι ανάλογο του ποσού του DNA στο κύτταρο). Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι ανάλογη του ποσού της χρωστικής που έχει δεσμευθεί από το DNA.



Η αντίδραση DNA-χρωστικής ουσίας είναι αμφίδρομη, γι' αυτό η μέτρηση πρέπει να γίνεται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας του κυτταρομετρητή. Μετά τη χρώση τα δείγματα μετρώνται στον κυτταρομετρητή, στις κατάλληλες ρυθμίσεις και πρωτόκολλα, όπου προκύπτει το DNA ιστόγραμμα. Το ποσοστό απόπτωσης των υπό μελέτη κυττάρων λαμβάνεται απ' ευθείας κατά τη μέτρηση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής.

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ

Οι κυτταροκίνες έχουν αποκτήσει κεντρική θέση σε πολλές μελέτες είτε κλινικής είτε βασικής έρευνας, διότι παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη μετάδοση ρυθμιστικών μηνυμάτων μεταξύ διαφόρων κυτταρικών τύπων.

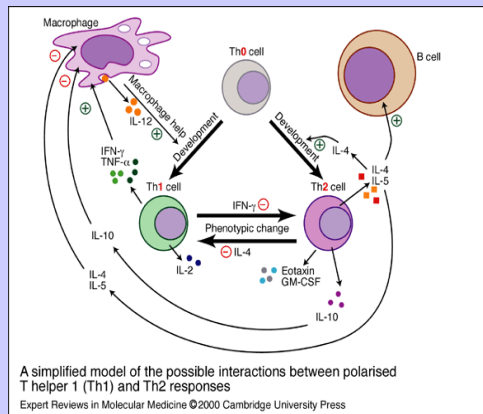
Τα τελευταία χρόνια τα φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι κυτταροκινών και χημειοκινών φάνηκαν ιδιαίτερα χρήσιμα για την ενδοκυττάρια χρώση και την πολυπαραμετρική κυτταρομετρική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων, που παράγουν κυτταροκίνες, μέσα σε μεικτούς πληθυσμούς κυττάρων.

Η χρώση πολλαπλού ανοσοφθορισμού με αντισώματα έναντι ενδοκυτταρίων κυτταροκινών και δεικτών επιφανείας παρέχει μια τεχνική υψηλής διακριτικής ικανότητας για την ταυτοποίηση του είδους και της συχνότητας (ποσοστού) των κυττάρων, που εκφράζουν μια συγκεκριμένη κυτταροκίνη(ες).

Την πιο σημαντική εφαρμογή αυτής της τεχνικής αποτελεί η δυνατότητα χαρακτηρισμού μιας κυτταρικής απάντησης ως Τύπου 1 (παραγωγή IFN- γ , IL-2 κ.λ.π.) ή Τύπου 2 (παραγωγή IL-4, IL-10 κ.λ.π.).

Επιπρόσθετα η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ταχεία ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων, που είναι απαραίτητος για την εκτέλεση στατιστικά σημαντικών μετρήσεων.

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ (2)



Τα κύτταρα σε εναιώρημα παράγουν μόνο πολύ μικρές ποσότητες κυτταροκινών. Επομένως η παραγωγή τους πρέπει να προκληθεί *ex vivo*. Για κάθε τύπο κυττάρων μπορεί να διαφέρει ο κατάλληλος παράγοντας διέγερσης για την επαγωγή κυτταροκινών.

- ✓ Το πρώτο στάδιο της μεθόδου είναι η κατάλληλη **διέγερση** των κυττάρων π.χ. κατάλληλος διεγέρτης των T κυττάρων είναι ο συνδυασμός φορβολικών εστέρων - ιονομυκίνης ενώ των μονοκυττάρων το LPS. Σημειώνεται ότι ποικίλλει επίσης ο απαιτούμενος χρόνος ενεργοποίησης των κυττάρων για την παραγωγή κάθε ξεχωριστής κυτταροκίνης.
- ✓ Σήμερα, χρησιμοποιείται κατ' εξοχήν η διέγερση των κυττάρων με ειδικά πεπτιδία ιών (CMV, HIV) ή μίγματος πεπτιδίων και προσδιορίζεται το ποσοστό των κυττάρων που εκκρίνουν IFN-γ και IL-2. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται η ειδική έναντι των ιών ανοσιακή απάντηση.
- ✓ Αμέσως μετά την παραγωγή τους οι κυτταροκίνες εκκρίνονται από τα κύτταρα. Για να μπορέσουν να ανιχνευθούν μέσα στο κύτταρο πρέπει κατά την ενεργοποίηση να συμπεριληφθεί ένας **αναστολέας της μεταφοράς των προκυτταρινών** από τη συσκευή Golgi, όπως η brefeldin A (BFA)- αντιβιοτικό της ομάδας των μακρολιδών ή η monensin- πολυαιθέρας, Έτσι συσσωρεύεται η προκυτταροκίνη στο κυτταρόπλασμα και ανιχνεύεται με μονοκλωνικά αντισώματα.

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ (3)

Πολύ σημαντική είναι η επιλογή του **κατάλληλου μονοκλωνικού αντισώματος** με τη μεγαλύτερη δυνατή ικανότητα σύνδεσης με ενδοκυττάριας κυτταροκίνες, διότι οι θέσεις σύνδεσης των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι εξωκυτταρίων κυτταροκινών πολλές φορές δεν έχουν εκφρασθεί ή καλύπτονται στις μη εκκρινόμενες κυτταροκίνες. Επειδή αναμένεται ασθενές σήμα φθορισμού συστήνεται η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φυκοερυθρίνη.

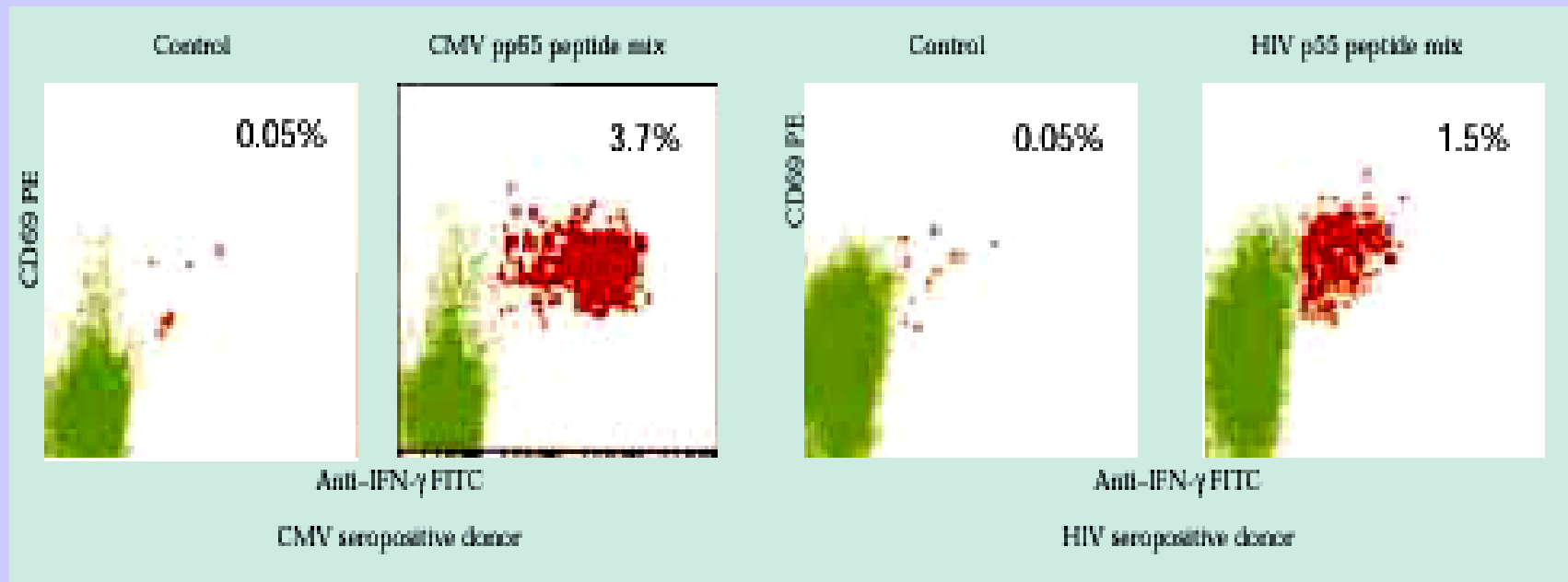
Ενώ κατά κανόνα δεν υπάρχει πρόβλημα με την ανίχνευση των κυτταροκινών Τύπου 1 (IL-2 και IFN-γ) παρουσιάζονται δυσκολίες στην ανίχνευση των κυτταροκινών Τύπου 2 (IL-4, IL-5 και IL-10). Έχουν αναπτυχθεί λίγα μονοκλωνικά ικανοποιητικής αντίδρασης με τις κυτταροκίνες Τύπου 2 μέχρι σήμερα και λείπουν τα θετικά δείγματα - μάρτυρες. Έτσι ανιχνεύονται πολύ χαμηλά ποσοστά κυττάρων Τύπου 2.

Γενικά απαιτούνται πολλά δείγματα ελέγχου της μεθόδου των ενδοκυτταρίων κυτταροκινών, δείγματα που αποδεικνύουν την επαρκή ενεργοποίηση του δείγματος, τη δράση του αναστολέα της μεταφοράς, την αυθόρμητη παραγωγή κυτταροκίνης χωρίς διέγερση, την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης, την ικανότητα αντίδρασης του μονοκλωνικού αντισώματος.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται πλέον ευρέως σε πολλές μελέτες βασικής ανοσολογίας αλλά και συμβάλλει στην παρακολούθηση κλινικών καταστάσεων, όπως σταδίων της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου πριν και μετά την αντιρετροϊκή θεραπεία, Τ δερματικών λεμφωμάτων, αλλεργικών καταστάσεων, μεταμοσχεύσεων μυελού των οστών και συμπαγών οργάνων κ.ά.

Πειράματα όπου δεν φαίνεται η παράμετρος time μέσα στον κυτταρομετρητή

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ (4)



Σχήμα 11 : Πειραματική πορεία και κυτταρομετρική ανάλυση απάντησης σε πεπτίδια του CMV και HIV με παραγωγή IFN-γ.

Πειράματα όπου δεν φαίνεται η παράμετρος time μέσα στον κυτταρομετρητή

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΚΡΗΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ

- **Οξειδωτική ή αναπνευστική έκρηξη (burst):** αιφνίδια μεταβολή του οξειδωτικού μεταβολισμού (κατά τη διέγερση των φαγοκυττάρων)
- Η οξειδωτική έκρηξη των πολυμορφοπύρηνων και των μονοπύρηνων προσδιορίζεται σε:
 - πρωτοπαθείς διαταραχές των φαγοκυττάρων που αφορούν συγγενείς διαταραχές της λειτουργίας τους (π.χ. χρόνια κοκκιωματώδης νόσος)*
 - δευτεροπαθείς διαταραχές των φαγοκυττάρων (π.χ. λοιμώξεις)*
- Μέθοδοι εκτίμησης οξειδωτικής έκρηξης φαγοκυττάρων:
 - δοκιμασία αναγωγής του κυανού του τετραζολίου (NBT test),*
 - μέθοδος της χημειοφωταύγειας,*
 - μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής*

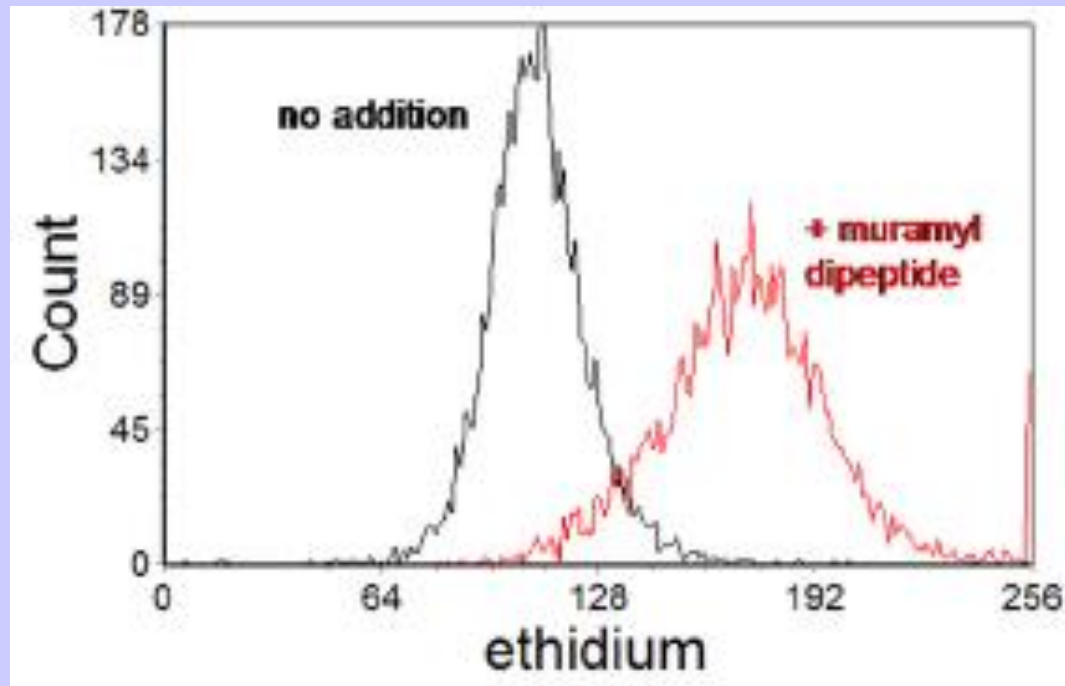
Πειράματα όπου δεν φαίνεται η παράμετρος time μέσα στον κυτταρομετρητή

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΚΡΗΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ (2)

- Κύρια εφαρμογή αποτελεί η ποσοτική μέτρηση των ενδοκυττάριων οξειδωτικών ουσιών (H_2O_2 , O_2^-) με την μετατροπή μη φθορίζουσών ουσιών μέσω αυτών σε φθορίζουσες ουσίες, η ένταση φθορισμού των οποίων αντιστοιχεί στην ποσότητα παραγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή της ρίζας σουπεροξειδίου
- Τέτοιες ουσίες είναι:
 - η διϋδροροδαμίνη-123 (DHR),
 - η υδροεθιδίνη (HE),
 - η 2',7' –διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF)
- Καταλληλότερη για την μέτρηση του οξειδωτικού “burst” είναι η διϋδροροδαμίνη-123, λόγω του ότι προσφέρει υψηλότερη ένταση φθορισμού.

Πειράματα όπου δεν φαίνεται η παράμετρος *time* μέσα στον κυτταρομετρητή

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΕΚΡΗΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ (3)



Σχήμα 12: Η μέτρηση της οξειδωτικής έκρηξης στα κοκκιοκύτταρα περιφερικού αίματος με χρήση διϋδροαιθιδίου. Κατά την οξείδωση παράγεται αιθίδιο το οποίο συνδέεται με το DNA και εκπέμπει στο ερυθρό (fluoresces red). Το ιστόγραμμα δείχνει την εκπομπή φθορισμού στο ερυθρό πριν και μετά την επώαση 15min με 10 mM muramyl dipeptide. Η οριοθέτηση των κοκκιοκυττάρων έγινε μέσω του πλάγιου σκεδασμού του φωτός.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΠΗΓΕΣ

- J. Ransom, DAKO, Guide to flow cytometry, ed: S. Wulff, 2006, 2nd Edition, Kinetics, 93-97.
- Α. Θεοδωρίδου, Δ. Αναγνωστόπουλος, Σ. Σπυριδάκης, Ε. Κώνστα, Κ. Ψαρρά, Α. Σιαφάκα-Καπάδαη, Μελέτη της κινητοποίησης του ασβεστίου στα αιμοπετάλια κουνελιού με κυτταρομετρία ροής, 2006, Βιβλίο Κλινικού Φροντιστηρίου «Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές»: 89-91.
- Χ. Γκοντίνου, Κ. Ψαρρά, Μ. Μαυρή-Βαβαγιάννη, Μελέτη της επίδρασης του αραχιδονικού οξέος στην πορεία της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων με κυτταρομετρία ροής, 2006, Βιβλίο Κλινικού Φροντιστηρίου «Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές»: 85-88
- M. Ormerod, Flow Cytometry- A basic introduction, 2008, (<http://flowbook.denovosoftware.com>)
- Μ. Βικεντίου, Ανάλυση DNA και απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής, 2006, Βιβλίο Κλινικού Φροντιστηρίου «Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές»: 68-72
- Ε. Κώνστα, Λειτουργικές δοκιμασίες φαγοκυττάρων, 2006, Βιβλίο Κλινικού Φροντιστηρίου «Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές»: 76-78
- Κ. Ψαρρά, Οι κυτταροκίνες και ο προσδιορισμός τους, 2006, Βιβλίο Κλινικού Φροντιστηρίου «Κυτταρομετρία Ροής: Κλινικές και Ερευνητικές Εφαρμογές»: 73-75