

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Σπυριδούλα Βασιλείου
Βιολόγος, PhD

*Αιματολογική Κλινική-Μονάδα Μεταμόσχευσης
Μυελού Οστών, Γ.Ν.Α. <<Ο Ευαγγελισμός>>*

- **Κυτταρομετρία Ροής (ΚΡ):** απαραίτητο εργαλείο για την κλινική διάγνωση από το 1969 (πρώτος εμπορικά διαθέσιμος κυτταρομετρητής ροής)
- Πλεονεκτήματα της ΚΡ (ταχύτητα, ακρίβεια, ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων → στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, δυνατότητα πολυπαραμετρικής ανάλυσης)
↓
- Διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών της ΚΡ σε πολλούς τομείς (έρευνα, περιβαλλοντικές μελέτες, βιομηχανία)

Ερευνητικές εφαρμογές ΚΡ:

I. Δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών

II. Μικροοργανισμοί (πληθυσμοί βακτηρίων)

III. Φυτικά κύτταρα

IV. Μικροσωματίδια (microparticles)

Ι. Κυτταροκαλλιέργειες

- ΚΡ: δυνατότητα μελέτης διαφόρων κυτταρικών παραμέτρων (δείκτες επιφανείας, ενδοκυττάριοι δείκτες, περιεχόμενο DNA – ανάλυση κυτταρικού κύκλου, βιωσιμότητα, ανάλυση πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων κ.λ.π.)
- Δυνατότητα ανάλυσης του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού για την παρουσία διαλυτών παραγόντων (κυτταροκίνες)
- Δειγματοληψίες σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα → επιλογή της κατάλληλης χρονικής στιγμής για συλλογή των κυττάρων

Προετοιμασία κυττάρων

- Κύτταρα που **προσκολλώνται** στον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας: αποκόλληση κατόπιν επώασης με **Θρυψίνη** στους 37°C.
Εναλλακτικά : χρήση **cell scraper**/αποκόλληση των κυττάρων με έντονο πιπετάρισμα
- Κύτταρα που **αιωρούνται**: απευθείας συλλογή των κυττάρων στο θρεπτικό τους υλικό
Και στις 2 περιπτώσεις : προσεκτικό **ξέπλυμα** του δοχείου καλλιέργειας με **Phosphate Buffered Saline (PBS)** 2-3 φορές, ώστε να συλλεχθεί το σύνολο των κυττάρων
- Πλύσιμο των κυττάρων 2X σε **PBS** για απομάκρυνση Θρυψίνης/θρεπτικού υλικού με φυγοκέντρηση (**200-400xg** για **5-10 λεπτά**)
Προαιρετικά : Συλλογή του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού της φυγοκέντρησης, φύλαξη στους **-80°C** (**προσοχή**: αποφυγή συχνών κύκλων ψύξης - απόψυξης)

Προετοιμασία κυττάρων

- Αναδιάλυση σε επιθυμητό όγκο **PBS**, μέτρηση του **αριθμού** και της **βιωσιμότητας** των κυττάρων σε πλάκα **Neubauer** με χρωστική **Trypan blue 0,04%**
- **Χρώση** : τυπικά, προσθήκη **20μl** μονοκλωνικού αντισώματος (moAb) σε **1×10^5 - 1×10^6** κύτταρα σε όγκο **100μl** → **τιτλοδότηση/προσαρμογή** στις ανάγκες του πειράματος
- Επώαση στους **4°C**
- Πλύσιμο 2x σε **PBS** με φυγοκέντρηση
- Αναδιάλυση των κυττάρων σε **500μl PBS** ή **παραφορμαλδεϋδης**, ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος
- Μέτρηση στον κυτταρομετρητή

Παράδειγμα 1 : καλλιέργεια δενδριτικών κυττάρων (ΔΚ) απο διαφοροποίηση μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος υγιών δοτών

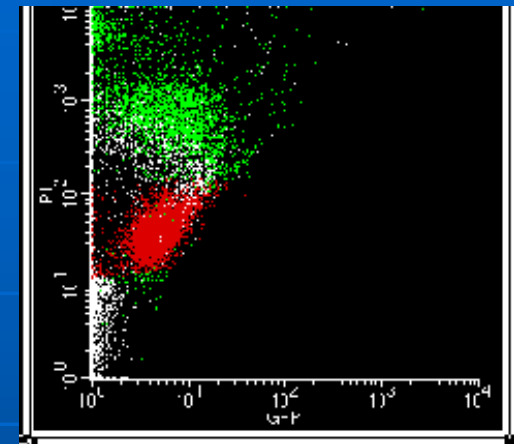
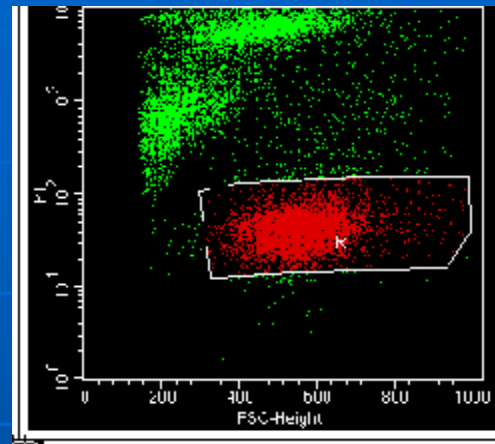
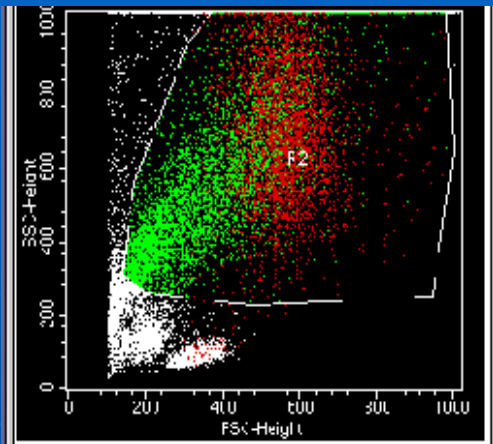
➤ συλλογή των ΔΚ την 5^η ημέρα της καλλιέργειας

➤ Διαμόλυνση αυτών με mRNA της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Green Fluorescent Protein, GFP) με την τεχνική του electroporation (ηλεκτρική διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών)

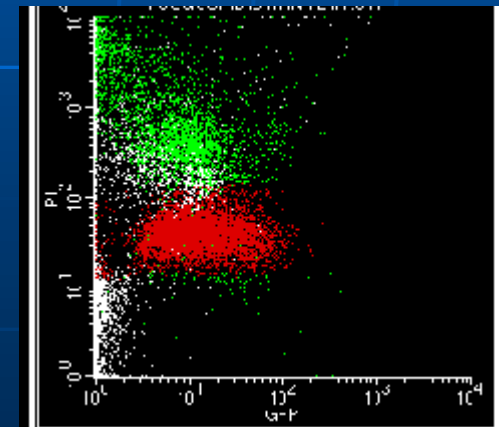
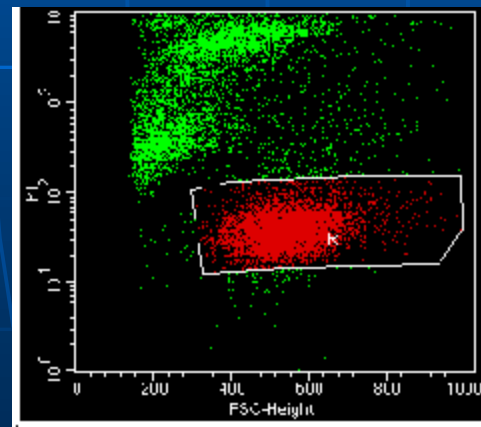
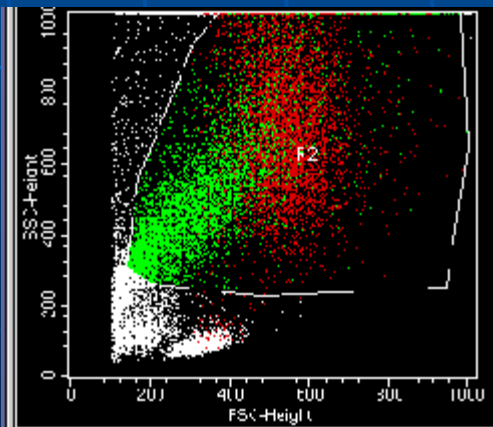
✳️ KP: Έλεγχος της απόδοσης του electroporation (ανίχνευση έκφρασης GFP) και της βιωσιμότητας των κυττάρων με προσθήκη κατάλληλης DNA χρωστικής (Propidium Iodide, PI)

24 ώρες μετά το *electroporation*

Control (ΔΚ μη διαμολυσμένα με GFP mRNA)



ΔΚ διαμολυσμένα με GFP mRNA



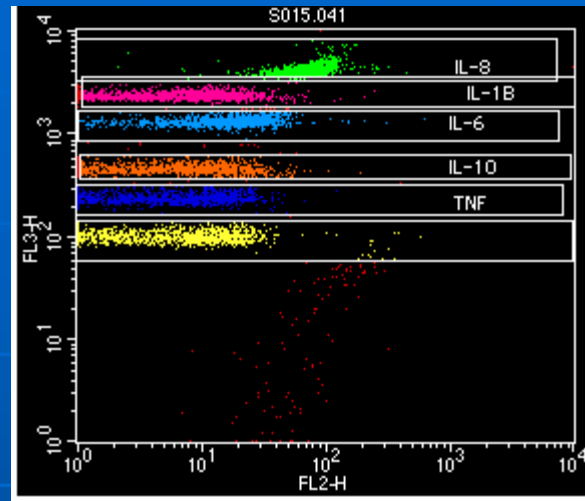
Παράδειγμα 2 : μέτρηση κυτταροκινών σε υπερκείμενο θρεπτικό υλικό από καλλιέργειες ΔΚ υγιών δοτών με ΚΡ

➤ Χρήση τεχνολογίας των σφαιριδίων (Cytometric Bead Array, CBA): ανάλυση **πολλαπλών παραγόντων** σε μικρό όγκο δείγματος (**≤50μl**)

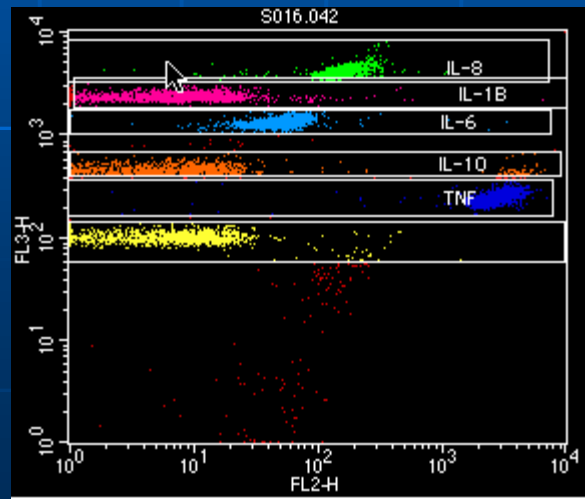


➤ Πλεονεκτικότερη έναντι παραδοσιακών τεχνικών (Elisa), επιτρέπει ανάλυση συμβατικών (ορός, πλάσμα, κυτταρικά υπερκείμενα) και πιο σπάνιων δειγμάτων, στα οποία ο διαθέσιμος όγκος αποτελεί περιοριστικό παράγοντα (ομογενοποιημένοι ιστοί, πλευριτικό υγρό από πειραματόζωα, μεσοκυττάριο υγρό εγκεφάλου κ.α.)

Υπερκείμενο
απο άωρα ΔΚ,
5^η ημέρα
καλλιέργειας



Υπερκείμενο
από ώριμα ΔΚ,
24 ώρες μετά
την προσθήκη
TNFα



II. Βακτήρια

- Μικρό μέγεθος του βακτηριακού κυττάρου: αρχικά περιοριστικός παράγοντας για τη χρήση της ΚΡ στη μελέτη βακτηριακών πληθυσμών
- Βελτίωση της ευαισθησίας των οργάνων, αυξανόμενη εμπειρία γύρω από τις εφαρμογές της ΚΡ → συνεχώς αυξανόμενη χρήση της τεχνικής αυτής στη μικροβιολογία, ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία
- **Βασικό πλεονέκτημα της ΚΡ:** δυνατότητα μέτρησης βακτηριακών κυττάρων που εμφανίζουν **αδυναμία ανάπτυξης σε στερεά θρεπτικά υλικά** (ιδιαίτερα σημαντικό για περιβαλλοντικά δείγματα μικροοργανισμών)
 - ↓
- Αυξανόμενες εφαρμογές της ΚΡ:
 - **Βασική μικροβιολογική έρευνα**
 - **Βιομηχανία τροφίμων/φαρμακευτική βιομηχανία**
 - **Περιβαλλοντικές μελέτες (έλεγχος υδάτων, εδάφους)**

Γενικές αρχές προετοιμασίας βακτηριακών κυττάρων

- Η διαπερατότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες (θερμοκρασία, φάση ανάπτυξης του βακτηρίου κ.α.) → πιθανές επιπτώσεις στην ποσότητα της χρωστικής-δείκτη που εισέρχεται στο κύτταρο
- Διαφορές ανάμεσα σε gram+/gram- βακτήρια: υδρόφοβες χρωστικές ουσίες διαπερνούν ευκολότερα τα gram+, υδρόφιλες τα gram-.
- Για τα gram- βακτήρια: προσθήκη EDTA μπορεί να βελτιώσει τη διαπερατότητα

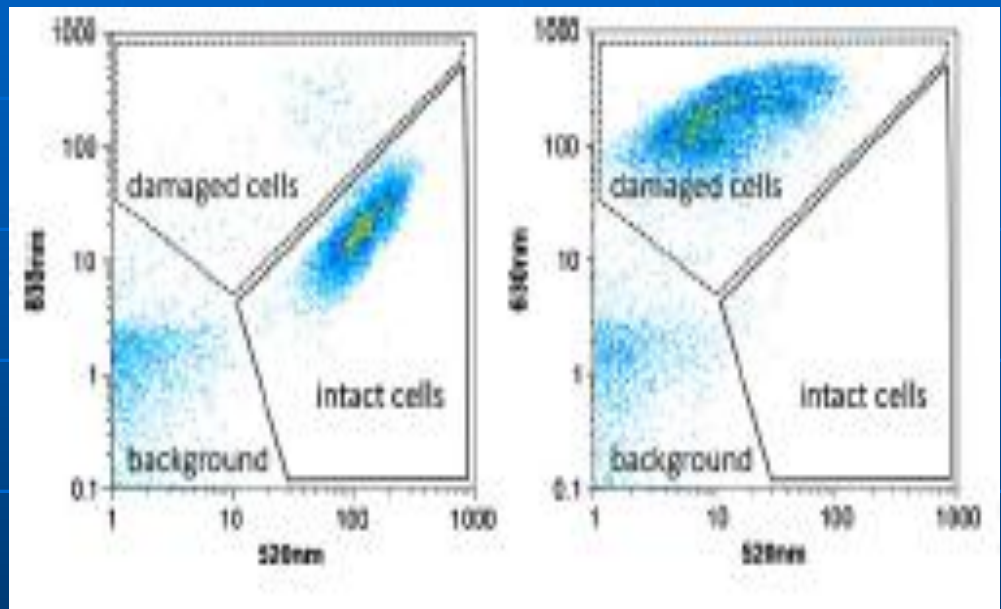
Γενικές αρχές προετοιμασίας βακτηριακών κυττάρων

- Ανάλογα με την προέλευση των βακτηρίων, διαφορετικές παρασκευαστικές διαδικασίες:
 - i. Περιφερικό αίμα: επιλεκτική **λύση** των **ευκαρυωτικών** κυττάρων ώστε να γίνει ανίχνευση των βακτηρίων
 - ii. Γάλα: προσθήκη **πρωτεασών** για απομάκρυνση πρωτεϊνών, φυγοκέντρηση για απομάκρυνση λιπιδίων
 - iii. Δείγματα νερού: **συμπύκνωση** ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση ≥ 100 βακτηριακά κύτταρα/ml → **μαγνητικός διαχωρισμός** με χρήση σφαιριδίων επικαλυμμένων με αντίσωμα ειδικό για επιφανειακά αντιγόνα (π.χ. *Legionella pneumophila*)

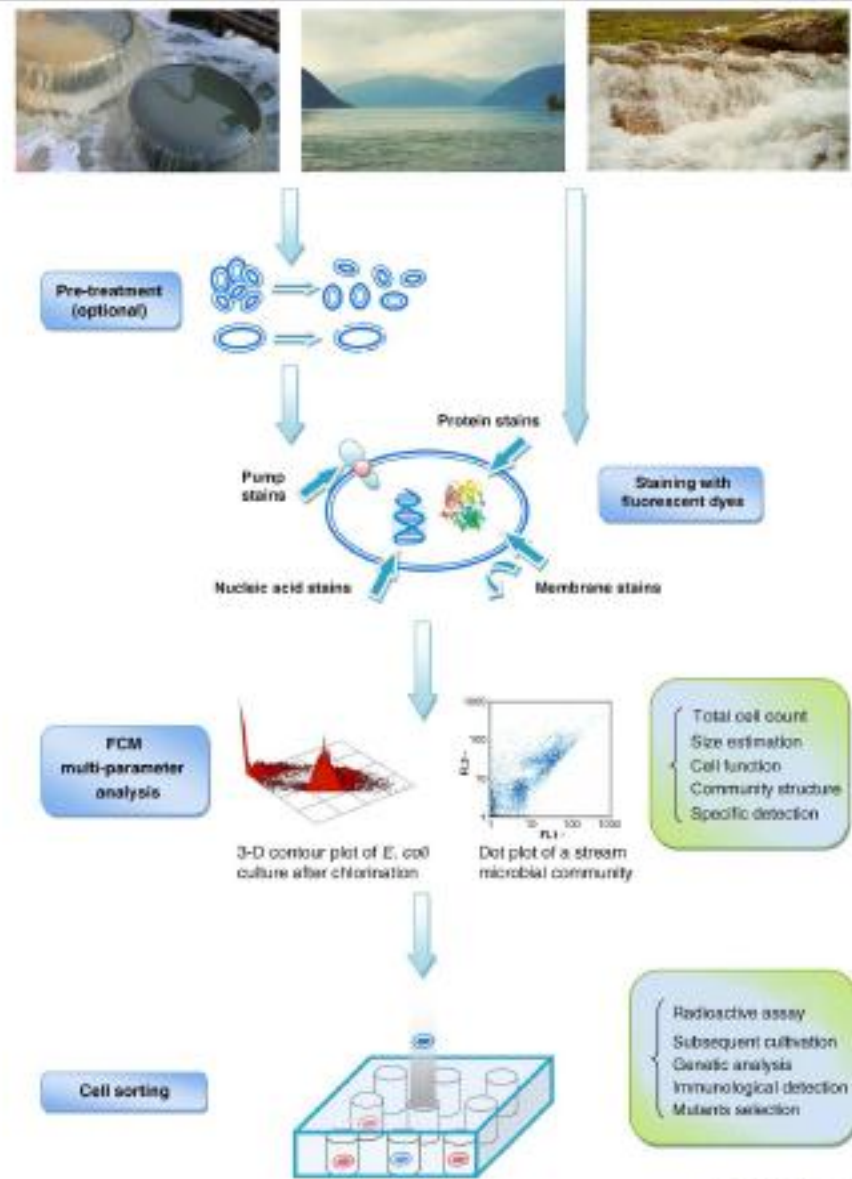
Εφαρμογές της ΚΡ στη μελέτη των βακτηριακών κυττάρων

- **Μέτρηση του απόλυτου αριθμού:** απο τις βασικότερες εφαρμογές, με μεγάλη χρησιμότητα σε έρευνα/βιομηχανία. **Χρώση του βακτηριακού DNA** με φθορίζουσες χρωστικές που εισέρχονται σε **όλα** αδιακρίτως τα κύτταρα (SYBR Green I, SYTO 9 κ.α.)
- **Μέτρηση της συνολικής περιεκτικότητας σε DNA/RNA:** διάκριση διαφορετικών πληθυσμών σε φυσικά περιβάλλοντα ή υποπληθυσμών σε καθарές βακτηριακές καλλιέργειες. **Χρώση του βακτηριακού DNA/RNA** (Hoechst 33342 για DNA, Pyronin Y, Ribogreen για RNA κ.α.)
- **Μέτρηση της βιωσιμότητας:**
 - **Εξέταση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης** (φθορίζουσες DNA χρωστικές που διαπερνούν μόνο νεκρά κύτταρα, π.χ. Propidium Iodide, Ethidium Bromide)
 - **Μέτρηση μεμβρανικού δυναμικού**
 - **Ενδοκυτταρικό pH**
 - **Ενεργότητα ενδοκυτταρικών ενζύμων (εστεράσες)**
- **Ειδική ανίχνευση βακτηριακών ειδών:** προϋποθέτει την ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων (*Salmonella*, *Legionella*, *Pseudomonas*)

Κλασική τεχνική μέτρησης βιωσιμότητας. Οι βλάβες της μεμβράνης σε κύτταρα *E.coli* πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) από έκθεση σε οξειδίο του χλωρίου ανιχνεύονται με χρώση με SYBR Green I (520nm) και Propidium Iodide (630nm). (από Anal Bioanal Chem 2010)



Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης υδάτινων δειγμάτων. Η προετοιμασία των κυττάρων μπορεί να περιλαμβάνει αύξηση της διαπερατότητας και εφαρμογή υπερήχων. Τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να σημανθούν με χρώσεις ειδικές για ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, μεμβρανικές πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Εάν ακολουθήσει διαχωρισμός των κυττάρων με ΚΡ, τα απομονωμένα βακτήρια μπορούν να καλλιεργηθούν και να υποβληθούν σε περαιτέρω δοκιμασίες. (από Trends in Biotechnology 2010)



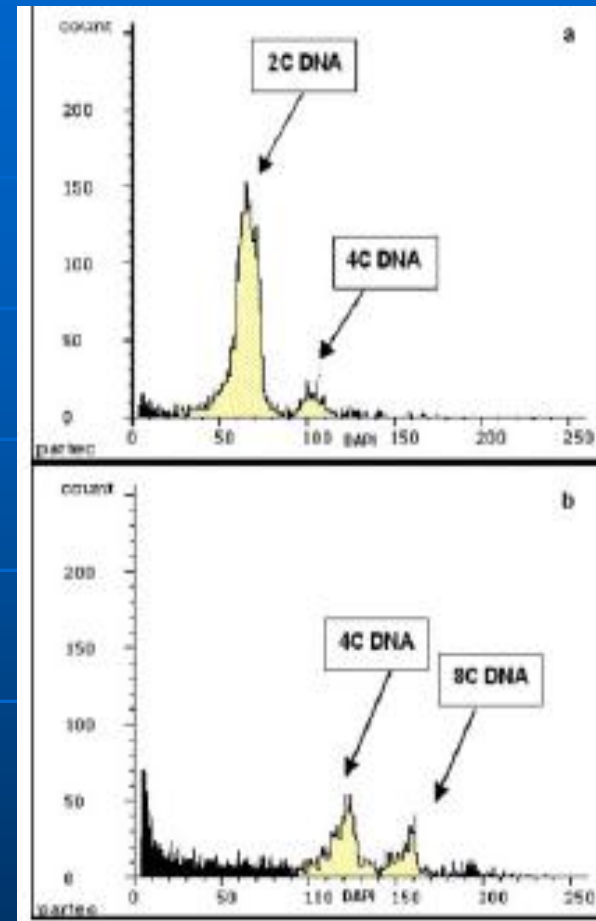
III. Φυτικά κύτταρα

- **1973:** πρώτη αναφορά εφαρμογής τεχνικών ΚΡ σε φυτικό υλικό (ανάλυση πυρηνικού DNA)
- Μέχρι σήμερα: συνεχώς αυξανόμενες εφαρμογές της ΚΡ στη βοτανική επιστήμη και τη βιομηχανία φυτικής παραγωγής
- **Βασική χρήση της ΚΡ:** μελέτη του επιπέδου πλοειδικότητας του DNA των φυτικών κυττάρων με χρήση **DNA χρωστικών** (DAPI κ.α.) – πλεονεκτεί η ΚΡ σε σχέση με τις κλασικές χρονοβόρες τεχνικές ανάλυσης του μιτωτικού κύκλου
- **Ανευπλοειδίες/Πολυπλοειδίες:** σχετίζονται με εμφάνιση υπογόνιμων/στείρων απογόνων και μειωμένη φυτική παραγωγή → ΚΡ χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση φυτικών ποικιλιών/υβριδίων και τον μαζικό ποιοτικό έλεγχο φυτικών εμβρύων/σπόρων

Προετοιμασία φυτικών κυττάρων

- Προβληματική η ανάλυση άθικτων φυτικών κυττάρων εξαιτίας του ακανόνιστου σχήματός τους και του άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος
- ↓
- Παραγωγή σφαιρικών **πρωτοπλαστών** (φυτικά κύτταρα κατόπιν απομάκρυνσης του κυτταρικού τοιχώματος μέσω ενζυμικής πέψης) → δύσκολη και δαπανηρή διαδικασία, αυξημένη ευαισθησία των πρωτοπλαστών στους χειρισμούς
- *Εναλλακτικά:* **απομόνωση πυρήνων** (γενικά σφαιρικού σχήματος και μικρότερου μεγέθους)
- τεμαχισμός του φυτικού ιστού σε κατάλληλο διάλυμα και απελευθέρωση των πυρήνων
- διήθηση του υλικού σε φίλτρο με πόρους διαμέτρου 20-100μm για απομάκρυνση περιττού κυτταρικού υλικού
- φυγοκέντρωση/πλύσιμο των πυρήνων για απομάκρυνση χλωροπλαστών, μιτοχονδρίων και άλλων οργανιδίων
- προσθήκη διαλύματος χρώσης πυρηνικού DNA

Πάνω: διπλοειδικό μητρικό
φυτό.
Κάτω: τετραπλοειδικός
απόγονος.
Η χρώση των πυρήνων
έγινε με DAPI.
(από *Cytometry A*, 2008)



IV. Μικροσωματίδια

■ **Μικροσωματίδια (Microparticles, MPs):** μικρά μεμβρανικά κυστίδια διαμέτρου 0.05-3μm που μπορεί να περιέχουν DNA, RNA, miRNA, ενδοκυττάρια πρωτεΐνες και εκφράζουν επιφανειακούς δείκτες των κυττάρων από τα οποία προέρχονται. Περιλαμβάνουν υποκατηγορίες:

• **Εξωσώματα (Exosomes):** MPs ενδοκυτταρικής προέλευσης που εκκρίνονται κατόπιν σύντηξης με την κυτταρική μεμβράνη. Διάμετρος 50-100nm, περιέχουν λιπίδια, RNA, miRNA (όχι DNA). Εκκρίνονται από επιθηλιακά κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα, B και T λεμφοκύτταρα, αιμοπετάλια. Ανιχνεύονται σε πλάσμα, ούρα, μητρικό γάλα, σίελο.

• **Μικροκυστίδια/Αποπτωτικά κυστίδια:** MPs από την επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης ενεργοποιημένων/αποπτωτικών κυττάρων, διαμέτρου >100nm.

■ Εμπλοκή των MPs στην πήξη, φλεγμονή, κυτταρική ομοιόσταση και επιβίωση, επικοινωνία μεταξύ κυττάρων → αυξανόμενο ερευνητικό και κλινικό ενδιαφέρον

Απομόνωση των MPs από βιολογικά υγρά - Ανάλυση με KP

➤ Δεν υπάρχει τυποποιημένη διαδικασία απομόνωσης. **Διαδοχικές φυγοκεντρήσεις**: η πρώτη σε χαμηλότερη ταχύτητα (απομάκρυνση κυττάρων και κυτταρικών θραυσμάτων), οι 2 τελευταίες σε υψηλότερες ταχύτητες, ανάλογα με τον τύπο MPs που απομονώνεται

➤ Τα MPs εκφράζουν επιφανειακά αντιγόνα των κυττάρων από τα οποία προήλθαν



➤ Σήμανση των MPs με δείκτες επιφανείας → **ανίχνευση και ποσοτικοποίηση υποπληθυσμών MPs διαφορετικής κυτταρικής προέλευσης με KP**

ΚΡ σε αποπτωτικά ΜΡs από
κυτταρική σειρά
ανθρώπινης τροφοβλάστης.

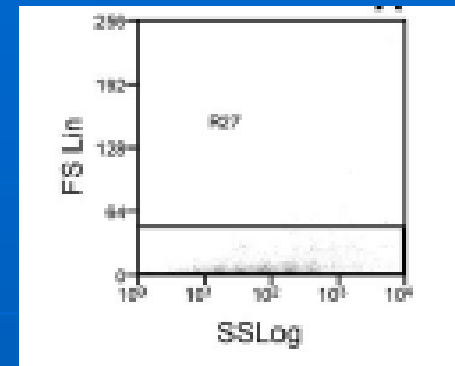
A. σκεδαστικά

χαρακτηριστικά των ΜΡs

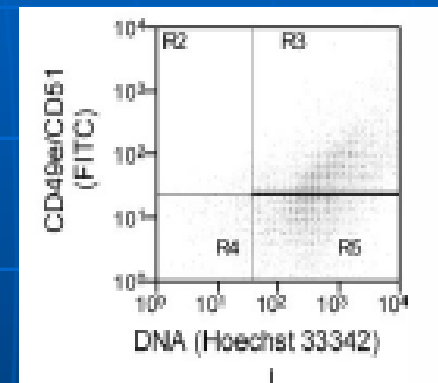
B. Τα ΜΡs περιέχουν DNA
και εκφράζουν τυπικούς
δείκτες των τροφοβλαστών
(CD49e/CD51).

C. Τα ΜΡs δεν εκφράζουν
τον τυπικούς δείκτες των
μονοκυττάρων (CD14).
(από Cytometry A, 2010)

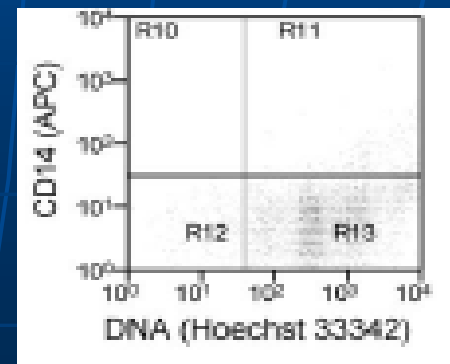
A



B



C



Συμπερασματικά

- Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία από τις πλέον ευέλικτες και αξιόπιστες τεχνικές, απαραίτητο εργαλείο σε συνεχώς διευρυνόμενες εφαρμογές σε κλινικό, ερευνητικό και βιομηχανικό επίπεδο.
- Οι συνεχείς βελτιώσεις στην ευαισθησία και τη διακριτική ικανότητα των κυτταρομετρητών ροής και η συνδυαστική χρήση των σύγχρονων αναλυτικών και απεικονιστικών μεθόδων κατατάσσουν την κυτταρομετρία ροής στις μελλοντικές τεχνολογίες αιχμής.