



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΔΕΙ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**“ΙΑΤΡΙΚΗ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ: ΟΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ, ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΤΗ
ΔΙΑΤΡΟΦΗ”.**

ΕΝΟΤΗΤΑ 4. ΟΙ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΙΟ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Δ. ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Καλλιόπη Λιαδάκη

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας

Εισαγωγικά

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία μέθοδος μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η παρατήρηση, η ποσοτικοποίηση και ο διαχωρισμός μικροσκοπικών σωματιδίων (π.χ. κυττάρων) τα οποία αιωρούνται σε μία ροή υγρού. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών χαρακτηριστικών (φυσικών και χημικών) σε ένα μόνο κύτταρο. Στην κυτταρομετρία ροής οι μετρήσεις γίνονται σε μεμονωμένα κύτταρα, καθώς αυτά βρίσκονται σε διάλυμα, κινούνται σε ένα ρεύμα με σταθερή ταχύτητα και ρέουν μέσα σε μία συσκευή ανίχνευσης οπτικών και ηλεκτρονικών σημάτων.

Η λέξη κυτταρομετρία (flow cytometry) προέρχεται από τις λέξεις cyto=κύτταρο και metry=μέτρηση και περιγράφει τη μέτρηση χαρακτηριστικών του κυττάρου, όταν αυτό βρίσκεται σε κατάσταση ροής. Η τεχνική αυτή συναντάται στη βιβλιογραφία με διάφορους όρους, όπως Flow Cytometry, Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) και Flow/Cell Sorting. Ο όρος Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) αφορά στην απομόνωση κυττάρων, η οποία βασίζεται σε κυτταρομετρία ροής ενεργοποιούμενης από φθορισμό και έχει καθιερωθεί από την εταιρεία Becton Dickinson (BD) που διαθέτει στο εμπόριο τις πιο ευρείας χρήσης συσκευές κυτταρομετρίας ροής. Ο όρος Flow/Cell Sorting αφορά στην απομόνωση-διαλογή κυττάρων βάσει συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που μετρώνται όταν βρίσκονται σε κατάσταση ροής.

Χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής μπορούν να αναλυθούν διαφορετικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, όπως κυτταρική διάμετρος, πυρηνική διάμετρος, όγκος, κατανομή χρωστικών, εσωτερική δομή (π.χ. παρουσία κοκκίων), η επιφάνεια και το δυναμικό μεμβράνης του κυττάρου. Επίσης, τα κυτταρικά συστατικά που μπορούν να αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής περιλαμβάνουν τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA και RNA) και τις πρωτεΐνες, όπως επιφανειακά αντιγόνα, πυρηνικά αντιγόνα, ένζυμα και ορμόνες. Οι εφαρμογές αυτές θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Στην διαφάνεια 5 του αρχείου powerpoint παρουσιάζεται μια ιστορική αναδρομή των σημαντικότερων γεγονότων που οδήγησαν στην ανάπτυξη της κυτταρομετρίας ροής.

Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση σε κυτταρομετρία ροής

Όπως αναφέρθηκε, μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής εξετάζει μεμονωμένα κύτταρα. Συνεπώς, πριν την ανάλυση απαιτείται ειδική προετοιμασία του δείγματος ώστε να επιτευχθεί ένα εναιώρημα μονοκυττάρων (single cell suspension) και να αποφευχθεί η παρουσία κυτταρικών συσσωματωμάτων. Είναι ευνόητο ότι το πρωτόκολλο που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή των δειγμάτων θα διαφέρει ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο προέρχεται το δείγμα. Κάποια παραδείγματα δίνονται στη συνέχεια. Για την ανάλυση δειγμάτων που προέρχονται από μυελό των οστών ή αίμα (π.χ. σε διάφορες μορφές λευχαιμίας) αρκεί ισχυρή μηχανική (μέσω σύριγγας) ανάδευση και ένα φιλτράρισμα του δείγματος και δεν απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία. Για την ανάλυση

κυττάρων που καλλιεργούνται και είναι προσκολλημένα σε ειδικά πιάτα (τρυβλία) καλλιέργειας συνήθως πραγματοποιείται η ενζυμική αποκόλλησή τους από το τρυβλίο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η τρυψίνη, που είναι μια πρωτεάση σερίνης παρούσα στο πεπτικό σύστημα αλλά παρέχεται και στο εμπόριο και διασπά πρωτεΐνες. Μετά από σύντομη επώαση των κυττάρων με τρυψίνη, διασπώνται οι δεσμοί των κυττάρων μεταξύ τους (κυτταρικές επαφές) και μεταξύ των κυττάρων και του τρυβλίου καλλιέργειας και επιτυγχάνεται η επαναφορά των κυττάρων σε διάλυμα. Στο στάδιο αυτό επίσης πραγματοποιείται καλή ανάδευση του δείγματος (με χρήση αποστειρωμένης πιπέτας) και ακολούθως φιλτράρισμα από ειδικά φίλτρα που επιτρέπουν τη διόδο σωματιδίων συγκεκριμένου μεγέθους με αποτέλεσμα να περνάνε μόνο τα κύτταρα και όχι μεγαλύτερα σωματίδια ή κυτταρικά συσσωματώματα. Τέλος, για την ανάλυση δειγμάτων που προέρχονται από ένα πιο πολύπλοκο ιστό, όπως ο σκελετικός μυς, είναι απαραίτητη η ενζυμική αποικοδόμηση του ιστού. Αυτό μπορεί να γίνει με επώαση (πέψη) του ιστού με ένζυμα όπως κολλαγενάσες, δισπάσες ή και τρυψίνη. Η κολλαγενάση είναι ένζυμο που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς του κολλαγόνου, επομένως καταστρέφει την εξωκυττάρια ουσία. Η δισπάση είναι μια ουδέτερη μεταλλοπρωτεάση, που διασπά ινωδεκτίνη και κάποιους τύπους κολλαγόνου. Χρησιμοποιείται για τη δημιουργία μονοκυττάρων πιο συχνά, γιατί είναι πιο ήπια από την τρυψίνη, την κολλαγενάση ή άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα. Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι η διάσπαση των δεσμών των κυττάρων μεταξύ τους αλλά και της εξωκυττάριας ουσίας. Η ενζυμική πέψη του ιστού ακολουθείται και από εκτεταμένο φιλτράρισμα του δείγματος για να επιτευχθεί ένα αιώρημα μονοκυττάρων. Συνεπώς, ανάλογα με τον ιστό από τον οποίο προέρχεται το δείγμα που θα αναλυθεί με κυτταρομετρία ροής απαιτείται διαφορετική προετοιμασία του.

Συστατικά του συστήματος κυτταρομετρίας ροής

Τα βασικά συστατικά ενός συστήματος κυτταρομετρίας ροής είναι το σύστημα ρευστών (fluidics), το οπτικό σύστημα (optics), το ηλεκτρονικό σύστημα (electronics) και το σύστημα ανάλυσης δεδομένων (data analysis). Συγκεκριμένα, το σύστημα ροής είναι απαραίτητο γιατί μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα, που βρίσκονται σε αιώρημα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα (ένα κάθε φορά) μέσω μιας περιοχής, που έχει εστιασμένο φωτισμό. Καθώς τα κύτταρα συναντούν την εστιασμένη πηγή φωτός, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, σκεδάζουν φως και εκπέμπουν φθορισμό. Το οπτικό σύστημα επίσης περιλαμβάνει οπτικά φίλτρα και ανιχνευτές με στόχο τη συλλογή και το φιλτράρισμα των δεδομένων. Στη συνέχεια τα δεδομένα αυτά μετατρέπονται σε ψηφιακές μονάδες μέσω του ηλεκτρονικού συστήματος και τέλος αποθηκεύονται σε υπολογιστή ώστε να μπορεί να γίνει η ανάλυση και η παράσταση των δεδομένων με ποικίλους τρόπους.

Στη συνέχεια αναλύονται με λεπτομέρεια τα συστήματα μιας συσκευής κυτταρομετρίας ροής. Γενικά με τον όρο fluidics (σύστημα ρευστών) μπορεί να περιγραφεί η τεχνολογία που χρησιμοποιεί υγρά για να πραγματοποιήσει ποικίλες λειτουργίες. Όπως αναφέρθηκε ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της κυτταρομετρίας ροής είναι η ικανότητα να μετράει χαρακτηριστικά σε μεμονωμένα σωματίδια/κύτταρα. Όταν ένα διάλυμα κυττάρων εισέρχεται στον κυτταρομετρητή, τα κύτταρα κατανέμονται τυχαία στον τρισδιάστατο χώρο. Το κύτταρο συνεπώς πρέπει να οδηγηθεί σε ένα ρεύμα από μεμονωμένα κύτταρα, που θα περάσουν από το σύστημα ανίχνευσης του κυτταρόμετρου (δηλαδή την δέσμη φωτός). Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται με το σύστημα ροής και την καλούμενη υδροδυναμική εστίαση (hydrodynamic focusing).

Αναλυτικά, το σύστημα ρευστών, που απεικονίζεται στην διαφάνεια 8 αποτελείται από το υπό μελέτη δείγμα (sample) και από ένα άλλο βασικό συστατικό, το υγρό περίβλημα (sheath fluid). Το υγρό περίβλημα βρίσκεται σε ένα δοχείο (sheath tank) και συνήθως είναι φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος (PBS: Phosphate Buffered Saline) ή και νερό. Συνήθως, το δείγμα των κυττάρων που μελετάται διαλύεται στο ίδιο υγρό με το υγρό περίβλημα. Εφαρμόζοντας διαφορετική πίεση στο δείγμα (sample pressure) και στο υγρό περίβλημα (sheath pressure) επιτυγχάνεται διαφορετική ταχύτητα κίνησης των δύο υγρών. Καθώς κινούνται τα δύο υγρά καταλήγουν σε μια περιοχή που καλείται θάλαμος ροής (flow chamber) ή περιοχή υδροδυναμικής εστίασης (hydrodynamic focusing section), η οποία καταλήγει σε ένα πολύ μικρό στόμιο (ανοίγματος 50-300 μm). Όταν οι συνθήκες είναι σωστές το υγρό που περιέχει τα κύτταρα ρέει σε ένα κεντρικό πυρήνα που δεν αναμιγνύεται με το υγρό που το περιβάλλει. Γενικά, η εισαγωγή ενός μεγάλου όγκου σε ένα μικρό όγκο με τέτοιο τρόπο ώστε να επικεντρωθεί κατά μήκος ενός άξονα καλείται υδροδυναμική εστίαση. Με την υδροδυναμική εστίαση τα κύτταρα να κινούνται το ένα μετά το άλλο διαμέσου του θαλάμου ροής (flow chamber) και να καταλήγουν στην περιοχή ανίχνευσης, όπου συναντούν μια εστιαζόμενη πηγή φωτός προκαλώντας, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, σκέδαση φωτός και φθορίζοντα σήματα.

Ως πηγές φωτός στην κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιούνται λαμπτήρες (υδραργύρου, ξένου) και ακτίνες λέιζερ (laser), όπως υγρόψυκτα λέιζερ υψηλής ισχύος (αργού, κρυπτού, χρωστικό λέιζερ), αερόψυκτα λέιζερ χαμηλής ισχύος (αργού (488 nm), ερυθρού ηλίου-νέον (633 nm), πράσινο ηλίου-νέον, υπεριώδες ηλίου-καδμίου) και λέιζερ διόδου (κυανό, πράσινο, ερυθρό και ιώδες). Ο όρος λέιζερ (Laser: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) αποδίδεται στα ελληνικά ως *‘ενίσχυση φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας’*. Τα λέιζερ παράγουν μονοχρωματικό φως, δηλαδή φως με συγκεκριμένο μήκος κύματος-χρώμα, το οποίο διαδίδεται σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση σχηματίζοντας στενές δέσμες. Επειδή τα λέιζερ υπερθερμαίνονται καθώς εκπέμπουν φως χρειάζονται ένα σύστημα, είτε με νερό (υγρόψυκτα), είτε με αέρα (αερόψυκτα) για να κρυώσουν.

Το οπτικό σύστημα, εκτός από λέιζερ, περιλαμβάνει και έναν αριθμό ανιχνευτών που περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας ανιχνευτής σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο-κύτταρο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η λήψη πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου-κυττάρου.

Αναλυτικά, όταν ένα κύτταρο συναντήσει μια δέσμη φωτός λέιζερ μπορούν να μετρηθούν διαφορετικές κυτταρικές παράμετροι, οι οποίες βασίζονται τόσο στη σκέδαση του φωτός όσο και στην ικανότητα διέγερσης και εκπομπής ειδικών μορίων, των φθοριοχρωμάτων (fluorochrome molecules).

α) Σκέδαση του φωτός: Το φως είναι μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας που ταξιδεύει σε μορφή κυμάτων. Τα κύματα αυτά έχουν συχνότητα και μήκος, το τελευταίο των οποίων καθορίζει το χρώμα του φωτός. Όταν ένα κύμα φωτός πέσει πάνω σε ένα μόριο (άτομο, κύτταρο), δημιουργεί ένα ηλεκτρικό δίπολο, δηλαδή δύο ισοδύναμα αλλά αντίθετα φορτία, που διαχωρίζονται από κάποια απόσταση μεταξύ τους. Στη συνέχεια, το δίπολο θα εκπέμψει ένα νέο κύμα φωτός με την ίδια συχνότητα με το προσπίπτον κύμα φωτός. Αυτό είναι το σκεδασμένο φως (scattered light). Για παράδειγμα, όσο μεγαλύτερο είναι ένα κύτταρο τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος φωτισμού από την πηγή φωτός και συνεπώς τόσο μεγαλύτερο το εύρος του παραγόμενου ηλεκτρικού παλμού. Επομένως, η πρόσθια σκέδαση του φωτός ('FSC', Forward Scattering) δίνει πληροφορίες (και συγκεκριμένα είναι ανάλογη) με το μέγεθος ή τον όγκο του κυττάρου. Η ένταση της πρόσθιας σκέδασης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να διαχωρίσει μεταξύ κυτταρικών υπολλειμάτων και ζωντανών κυττάρων. Επιπλέον, η πλάγια σκέδαση ή σκέδαση σε γωνία 90 μοιρών (SSC, 'Side Scattering') εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων, αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Η πρόσθια και η πλάγια σκέδαση είναι μοναδικές για κάθε κύτταρο και ο συνδυασμός τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαχωριστούν διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί σε ένα ετερογενές δείγμα (μια τέτοια εφαρμογή θα αναφερθεί στη συνέχεια για τα κύτταρα του αίματος). Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή της πρόσθιας σκέδασης του φωτός είναι συνήθως φωτοδιόδοι σιλικόνης διότι το σήμα του φωτός είναι αρκετά ισχυρό.

β) Φθορίζον φως: Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως μετά από διέγερση από κάποια ακτινοβολία. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως μετά την παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Κατά το φαινόμενο

του φθορισμού ισχύει ο νόμος του Stokes, σύμφωνα με τον οποίο το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που παράγεται (εκπομπής) είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για το φθοριόχρωμα FITC (fluorescein isothiocyanate) υπάρχει μετατόπιση του μήκους κύματος κατά 25 nm (powerpoint, διαφάνεια 13). Κάθε φθορίζουσα χρωστική (φθοριόχρωμα) διεγείρεται από διαφορετικά μήκη κύματος και εκπέμπει σε διαφορετικά μήκη κύματος. Στη διαφάνεια 14 εμφανίζονται 14 ευρέως χρησιμοποιούμενες χρωστικές, όπως FITC, EGFP (enhanced Green fluorescent protein), PE (phycoerythrin), EYFP (enhanced Yellow fluorescent protein), PE-Texas Red, APC (allophycocyanin) και PE-Cy5. Με μπλε ριγέ χρώμα απεικονίζονται τα φάσματα διέγερσης της κάθε χρωστικής ενώ με τα χρώματα (πράσινο, πορτοκαλί και κόκκινο) απεικονίζονται τα φάσματα εκπομπής. Ενδεικτικά, αν χρησιμοποιηθεί ως πηγή φωτός ένα λέιζερ αργού που εκπέμπει σε μήκος κύματος 488 nm μπορεί να διεγείρει σχεδόν όλες τις φθορίζουσες χρωστικές που φαίνονται στη διαφάνεια 14. Το φως που εκπέμπουν οι φθορίζουσες χρωστικές ανιχνεύεται από τους ανιχνευτές φθορισμού (fluorescence sensors) και στη συγκεκριμένη εικόνα της διαφάνειας 14 υπάρχουν 4 ανιχνευτές φθορισμού, οι FL1, FL2, FL3, και FL4. Ο FL1 θα συλλέξει φως που αντιστοιχεί στη χρώση με FITC, ο FL2 θα συλλέξει το φως που αντιστοιχεί στη χρώση με PE, ο FL3 θα συλλέξει το φως που αντιστοιχεί στη χρώση με PE-Texas Red και ο FL4 θα συλλέξει το φως που αντιστοιχεί στη χρώση με PE-Cy5. Ο αριθμός των ανιχνευτών ποικίλλει ανάλογα με το μηχάνημα και τον κατασκευαστή. Οι ανιχνευτές φθορισμού καλούνται και φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes, PMTs) γιατί είναι πιο ευαίσθητοι στη συλλογή και ενίσχυση του φωτός και, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, μετατρέπουν το σήμα του φωτός σε ηλεκτρικό σήμα. Η μέτρηση του φθορισμού σε διαφορετικά μήκη κύματος μπορεί να δώσει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για κυτταρικούς υποδοχείς ή ενδοκυτταρικά μόρια που μπορούν να σηματοδοτούν με φθορίζουσες χρωστικές (φθοριοχρώματα), όπως τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) και πρωτεΐνες (κυτταροπλασματικές ή ενδοκυττάρια). Για παράδειγμα, σε ένα συνδεδεμένο κύτταρο με μια φθορίζουσα χρωστική που αναγνωρίζει ένα μεμβρανικό υποδοχέα, η παρουσία του φθορίζοντος φωτός αντικατοπτρίζει την παρουσία του υποδοχέα και η ποσότητα του φθορίζοντος φωτός που εκπέμπει το κύτταρο παράγει ένα σήμα ανάλογο της ποσότητας του υποδοχέα. Επίσης, σε ένα συνδεδεμένο κύτταρο με μια φθορίζουσα χρωστική που ενσωματώνεται στο DNA, η ποσότητα του φθορίζοντος φωτός που εκπέμπει το κύτταρο παράγει ένα σήμα ανάλογο του περιεχομένου του DNA του κυττάρου (η ανάλυση του περιεχομένου DNA και του κυτταρικού κύκλου περιγράφονται στη συνέχεια).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ειδικότητα της ανίχνευσης του φωτός ελέγχεται από οπτικά φίλτρα, τα οποία μπλοκάρουν ορισμένα μήκη κύματος αλλά επιτρέπουν τη διόδου σε άλλα μήκη κύματος. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι φίλτρων: τα φίλτρα 'long pass', που αφήνουν να περάσει φως πάνω από ένα μήκος κύματος, τα 'short pass', που

αφήνουν να περάσει φως κάτω από ένα μήκος κύματος και τα 'band pass', που αφήνουν να περάσει φως μεταξύ ενός συγκεκριμένου εύρους μηκών κύματος (Διαφάνεια 15). Όταν ένα φίλτρο τοποθετείται σε γωνία 45 μοιρών στο φως που έρχεται γίνεται ένας διχροϊκός καθρέπτης (dichroic filter/mirror). Αυτός ο τύπος φίλτρου επιτελεί δύο ρόλους και πιο συγκεκριμένα αφήνει συγκεκριμένα μήκη κύματος να περάσουν στην οριζόντια κατεύθυνση και εκτρέπει το φως που μπλοκάρεται σε γωνία 90 μοιρών. Για να επιτευχθεί η ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών σημάτων είναι σημαντική η ακριβής επιλογή και η σειρά τοποθέτησης των οπτικών φίλτρων. Μια σχηματική παράσταση παρουσιάζεται στη διαφάνεια 16. Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες συσκευές παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.

Το ηλεκτρονικό σύστημα περιλαμβάνει τους φωτοανιχνευτές και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό (Analogue-to-Digital Conversion, ADC), το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως σε ηλεκτρικά σήματα-ηλεκτρικές ώσεις. Η ένταση των ώσεων αυτών είναι ανάλογη της έντασης των φωτεινών σημάτων που προσπίπτουν στους φωτοανιχνευτές. Στη συνέχεια είναι απαραίτητη η χρήση ενός ενισχυτή σήματος. Η απόκριση του φωτοανιχνευτή στο φως μπορεί να ρυθμιστεί από το χρήστη με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι η αυξομείωση της διαφοράς δυναμικού που εφαρμόζεται στον φωτοπολλαπλασιαστή και ο δεύτερος τρόπος είναι η αυξομείωση της ενίσχυσης του ρεύματος αφού αφήσει τον φωτοπολλαπλασιαστή. Οι ενισχυτές μπορεί να είναι είτε γραμμικοί είτε λογαριθμικοί. Για σήματα μεγάλου εύρους έντασης χρησιμοποιείται συνήθως λογαριθμική ενίσχυση ενώ για σήματα μικρού εύρους έντασης χρησιμοποιείται γραμμική ενίσχυση. Η λογαριθμική ενίσχυση χρησιμοποιείται για ανάλυση επιφανειακών και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών ενώ η γραμμική ενίσχυση χρησιμοποιείται για ανάλυση DNA και κυτταρικού κύκλου.

Τέλος, οι τιμές του ηλεκτρικού ρεύματος αποθηκεύονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή σε ένα αρχείο ψηφιακών δεδομένων που καλείται αρχείο list-mode. Το αρχείο list-mode είναι μια μεγάλη λίστα όλων των παραμέτρων που συλλέχθηκαν για κάθε κύτταρο με την ακριβή χρονική σειρά συλλογής και χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τη γραφική παράσταση των δεδομένων. Οι υπολογιστές διαθέτουν το αντίστοιχο λογισμικό πρόγραμμα για συλλογή και περαιτέρω επεξεργασία των σημάτων. Τα πιο διαδεδομένα λογισμικά προγράμματα είναι το winMDI και το FlowJo.

Όπως φαίνεται στη διαφάνεια 18 τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης μπορούν να παρασταθούν γραφικά με πολλούς τρόπους. Μια παράμετρος μπορεί να παρασταθεί σε ένα ιστόγραμμα μίας παραμέτρου (A) (one parameter histogram) όπου ο οριζόντιος άξονας αντιπροσωπεύει τις τιμές της παραμέτρου (π.χ. FITC στο γράφημα A) και ο κατακόρυφος άξονας αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυττάρων-γεγονότων (events) που

αναλύθηκαν. Επίσης, μπορούν να παρασταθούν ταυτόχρονα και δύο παράμετροι, όπου η μία παράμετρος δίνεται στον άξονα x και η άλλη παράμετρος στον άξονα y. Ενδεικτικά γραφήματα είναι το ιστόγραμμα δύο παραμέτρων (B), το γράφημα πυκνότητας (density plot) (C), το διάγραμμα κλειστής καμπύλης (contour diagram) (D). Στο σημειακό γράφημα κυτταροδιαγράμματος (dot plot, E) κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα κύτταρο με συγκεκριμένες τιμές πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης. Επίσης, μπορούν να γίνουν και τρισδιάστατες γραφικές παραστάσεις, στις οποίες οι άξονες x, y και z αντιπροσωπεύουν παραμέτρους (F).

Μια σημαντική αρχή των δεδομένων ανάλυσης της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι μας παρέχουν την δυνατότητα να επικεντρώσουμε τη μελέτη μας σε συγκεκριμένα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν, ενώ ταυτόχρονα δε λαμβάνουμε υπόψη μη επιθυμητά σωματίδια, όπως νεκρά κύτταρα ή κυτταρικά κατάλοιπα. Αυτή η διαδικασία καλείται gating. Σχεδιάζεται γραφικά (μέσω του υπολογιστή) ένα διαχωριστικό σχήμα-όριο, που καλείται gate και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστούν τα χαρακτηριστικά συγκεκριμένων κυττάρων που επιλέγονται για περαιτέρω ανάλυση. Η διαδικασία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για μία, δύο ή πολλαπλές παραμέτρους. Για παράδειγμα, αν σε ένα μείγμα κυττάρων αίματος θέλουμε να μελετήσουμε μόνο τα λεμφοκύτταρα (A), μπορούμε να τα επιλέξουμε με βάση το μέγεθός τους (από τις τιμές της πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης) και στη συνέχεια να αναλύσουμε την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών των λεμφοκυττάρων με βάση τον φθορισμό τους. Παρομοίως, μπορούμε να εστιαστούμε σε άλλους τύπους κυττάρων αίματος, όπως κοκκιοκύτταρα ή μονοκύτταρα (B) και να μελετήσουμε τον φθορισμό τους (Διαφάνεια 19).

Απομόνωση (sorting) κυττάρων

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που δε διαθέτουν όλες οι κυτταρομετρητές ροής, αλλά οι πιο εξειδικευμένες συσκευές, είναι η απομόνωση (sorting) ή ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός συγκεκριμένων κυττάρων από ένα μείγμα με βάση τα κριτήρια που επιλέγονται με τη διαδικασία του gating. Τα κύτταρα μετά τη συλλογή τους μπορεί να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω μικροσκοπικές, βιοχημικές ή λειτουργικές αναλύσεις.

Για την απομόνωση κυττάρων, το μηχάνημα είναι απαραίτητο να διαθέτει μια ειδική μορφή θαλάμου ροής, ο οποίος καταλήγει σε ένα πολύ λεπτό στόμιο (narrow orifice). Ο θάλαμος ροής συνδέεται με ένα δονητή-μετατροπέα (transducer), ο οποίος μπορεί να είναι ενεργός ή απενεργοποιημένος (on ή off). Όταν ο μετατροπέας είναι ενεργός ο θάλαμος δονείται σε πολύ υψηλές συχνότητες (της τάξης των 20,000 Hz). Η δόνηση προκαλεί διαταραχή στο ρεύμα με τα κύτταρα και καταλήγει τελικά το ρεύμα να κόβεται σε σταγόνες (π.χ. με δόνηση των 20,000 Hz τελικά δημιουργούνται 20.000 σταγόνες/δευτερόλεπτο). Η σταθερή δόνηση έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται σταγόνες που είναι ομοιόμορφες σε μέγεθος και απόσταση και συνεπώς κάθε κύτταρο υπό ροή τελικά θα περιέχεται σε μία σταγόνα.

Πριν ξεκινήσει η απομόνωση των κυττάρων πρέπει ο κυτταρομετρητής ροής να ταυτοποιήσει τα επιθυμητά κύτταρα και στη συνέχεια να τα διαχωρίσει από τα υπόλοιπα κύτταρα του δείγματος. Αρχικά, έχοντας τον δονητή απενεργοποιημένο αναλύεται μια μικρή ποσότητα του δείγματος και λαμβάνεται μια εικόνα των δεδομένων σε ένα γράφημα (data acquisition plot). Τότε μπορεί να επιλεγεί ο επιθυμητός κυτταρικός πληθυσμός σχεδιάζοντας μια περιοχή (gate) που περιλαμβάνει τον πληθυσμό αυτό. Το μηχάνημα διαθέτει ειδικά προγράμματα (software), που αποθηκεύουν αυτή την περιοχή ως την περιοχή διαλογής-απομόνωσης (sort gate). Αυτό σημαίνει ότι η περιοχή διαλογής (sort gate) ταυτοποιεί τα επιθυμητά κύτταρα που θέλουμε να απομονώσουμε από το δείγμα.

Κατά την απομόνωση των κυττάρων ο δονητής ενεργοποιείται και οι μετρήσεις γίνονται στα κύτταρα καθώς ρέουν λίγο πριν το στόμιο, όπου πέφτει η ακτίνα φωτός και πριν η διατάραξη στο ρεύμα αυξηθεί και σχηματιστούν οι σταγόνες. Καθώς αναλύονται τα χαρακτηριστικά του κάθε κυττάρου καθορίζεται αν το κύτταρο πρέπει να απομονωθεί (με βάση το αν βρίσκεται στην περιοχή διαλογής, συνεπώς διαθέτει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά). Τότε μια τιμή τάσης (μια διαφορά δυναμικού) εφαρμόζεται στο ρεύμα ακριβώς όταν το κύτταρο που επιλέγεται φτάσει στο τέλος του ρεύματος και σχηματιστεί η σταγόνα, οπότε όταν η σταγόνα διαχωριστεί από το ρεύμα θα φέρει ένα ηλεκτρικό φορτίο. Η τιμή της τάσης στο ρεύμα θα επανέλθει απευθείας στο μηδέν, ώστε να μην φορτιστούν άλλες σταγόνες πριν την επόμενη μέτρηση. Τα φορτία μπορεί να είναι αρνητικά ή θετικά και με τον τρόπο αυτό μπορούν να διαχωριστούν και να απομονωθούν δύο διαφορετικές κατηγορίες κυττάρων ταυτόχρονα. Όσο οι σταγόνες πέφτουν προς τα κάτω διέρχονται μεταξύ δύο μεταλλικών πλακών που είναι φορτισμένες με υψηλό φορτίο (η μία φέρει θετικό φορτίο και η άλλη αρνητικό). Λόγω του ότι και οι σταγόνες φέρουν φορτίο, θα αποκλίνουν από το κύριο ρεύμα σταγόνων και θα συγκεντρωθούν σε ειδικά σωληνάκια συλλογής. Οι σταγόνες που περιέχουν κύτταρα, τα οποία δεν έχουν επιλεγεί με βάση την περιοχή διαλογής (sort gate) δεν θα αποκτήσουν φορτίο και θα κινηθούν απευθείας στο σωληνάριο απόχυσης (waste tube).

Για να επιτευχθεί αποτελεσματικός και ακριβής διαχωρισμός των κυττάρων, πρέπει το φορτίο να εφαρμόζεται ακριβώς όταν το κύτταρο πλησιάζει στο τέλος του ρεύματος και πριν διαχωριστεί ως σταγόνα. Για να αντισταθμιστούν οι διακυμάνσεις στην ταχύτητα του ρεύματος και να υπάρχει σιγουριά ότι απομονώνεται το επιθυμητό κύτταρο, συνήθως για το κάθε κύτταρο απομονώνονται δύο με τρεις σταγόνες (στην εικόνα της διαφάνειας 20 φαίνονται μόνο 2 σταγόνες ανά κύτταρο). Το ηλεκτρονικό σύστημα είναι ικανό να ανιχνεύσει άλλα κύτταρα, που είναι κοντά στο επιθυμητό κύτταρο. Αν ένα ανεπιθύμητο κύτταρο απομονωθεί μαζί με το επιθυμητό κύτταρο, η απομόνωση απορρίπτεται και οι σταγόνες αποχύνονται.

Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει την ανάλυση και απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών με βάση φυσικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, εσωτερική δομή) και τον φθορισμό τους (έκφραση επιφανειακών ή ενδοκυτταρικών ουσιών). Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής έχει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών όπως στη μοριακή βιολογία, στην ανοσολογία, στη φυτολογία, στη θαλάσσια βιολογία. Στην ιατρική οι εφαρμογές της τεχνολογίας είναι πολλές τόσο στο πεδίο της κλινικής πράξης όσο και στη βασική έρευνα. Έτσι, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη βασικής βιολογίας κυττάρων, την ανάλυση κυτταρικών λειτουργιών, την κινητική κυττάρων, τη μελέτη του καρυότυπου, την ταυτοποίηση και απομόνωση βλαστικών κυττάρων, τη διάγνωση ασθενειών και την ταυτοποίηση καρκινικών κυττάρων. Κάποιες από τις εφαρμογές αναλύονται στη συνέχεια.

Κατηγοριοποίηση των κυτταρικών τύπων του αίματος

Η κυτταρομετρία ροής βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ιατρική κατά την κατηγοριοποίηση των κυτταρικών τύπων σε ένα ετερογενές δείγμα, όπως το αίμα και χρησιμοποιείται στη διάγνωση ασθενειών. Συγκεκριμένα, η διάκριση των κυττάρων του αίματος (μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και ερυθροκύτταρα) μπορεί να γίνει με βάση τις τιμές της σκέδασης του φωτός. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρόσθια σκέδαση (FSC, forward scatter) είναι ανάλογη του μεγέθους του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση (SSC, side scatter, ή 90^0 scatter) είναι ανάλογη της εσωτερικής δομής, που επηρεάζεται από την παρουσία κοκκίων, δηλαδή δομών που σκεδάζουν το φως με γωνία 90^0 . Σε ένα γράφημα που έχει στον άξονα x τις τιμές της πρόσθιας σκέδασης και στον άξονα y τις τιμές της πλάγιας σκέδασης διακρίνονται οι ακόλουθοι κυτταρικοί πληθυσμοί:

- Τα κοκκιοκύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα με αυξημένη κοκκίωση. Συνεπώς χαρακτηρίζονται από υψηλή πρόσθια και υψηλή πλάγια σκέδαση, καθώς η παρουσία των κοκκίων παράγει την υψηλότερη σκέδαση φωτός σε 90^0 .
- Τα μονοκύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα με μέτρια κοκκίωση και εμφανίζουν υψηλή πρόσθια και χαμηλότερη πλάγια σκέδαση.
- Τα λεμφοκύτταρα είναι μικρά κύτταρα χωρίς κοκκίωση (ομοιόμορφη εσωτερική δομή) και άρα έχουν χαμηλή πρόσθια και πλάγια σκέδαση.
- Τα ερυθροκύτταρα είναι κύτταρα με το μικρότερο μέγεθος και χαρακτηρίζονται από την έλλειψη εσωτερικών δομών, συνεπώς έχουν τις μικρότερες τιμές πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης.

Επομένως, η σχετική μέτρηση μεταξύ της πρόσθιας και της πλάγιας σκέδασης μπορεί να επιτρέψει την ταυτοποίηση των κυτταρικών τύπων στον ετερογενή πληθυσμό κυττάρων του αίματος.

Ανοσοφαινότυπος

Όλα τα φυσιολογικά κύτταρα εκφράζουν μια ποικιλία δεικτών στην επιφάνειά τους. Οι δείκτες αυτοί εξαρτώνται από το συγκεκριμένο τύπο κυττάρων και το βαθμό ωρίμανσής τους. Ωστόσο, η μη φυσιολογική ανάπτυξη μπορεί να επηρεάσει την έκφραση των δεικτών με αποτέλεσμα την υπερέκφραση ή τη μείωση της έκφρασης ορισμένων από αυτούς. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων και με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ υγιών και παθολογικών κυττάρων. Ο ανοσοφαινότυπος σήμερα είναι μία από τις μεγαλύτερες κλινικές εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής και χρησιμοποιείται στη διάγνωση του λεμφώματος, του μυελώματος και των διαφόρων τύπων λευχαιμίας. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της κλινικής θεραπείας.

Οι διαφορές μεταξύ των προφίλ στο αίμα ενός υγιούς ατόμου και ενός ατόμου που πάσχει από λευχαιμία είναι πολύ έντονες. Αυτό μπορεί να φανεί από τα γραφήματα της πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης (FSC και SSC) στη διαφάνεια 23. Στο υγιές άτομο οι τύποι κυττάρων είναι σαφώς καθορισμένοι ενώ το αίμα ενός ασθενή με λευχαιμία δεν είναι φυσιολογικό και δεν ακολουθεί το κλασικό προφίλ. Περισσότερα στοιχεία για την κατάσταση του ασθενούς μπορούν να προκύψουν μετά από χρώση των λεμφοκυττάρων με φθορίζουσες χρωστικές, που συνδέονται σε ειδικούς δείκτες στην επιφάνειά τους, όπως οι CD3, CD20 και HLA-DR. Στη διαφάνεια 24 συγκρίνεται η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών σε υγιή άτομο και σε ασθενή με λευχαιμία.

- Έκφραση του CD3: Ένα φυσιολογικό άτομο εκφράζει ένα σημαντικό ποσοστό από CD3+ λεμφοκύτταρα. Στον ασθενή με λευχαιμία, τα κύτταρα αυτά απουσιάζουν.
- Έκφραση του CD20: Στον ασθενή με λευχαιμία υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων με θετική χρώση για το CD20. Στο υγιές άτομο μόνο μερικά κύτταρα είναι θετικά.
- Έκφραση του HLA-DR: Ο ασθενής με λευχαιμία είναι HLA-DR+. Στο φυσιολογικό άτομο μόνο ένας μικρός αριθμός των κυττάρων χρωματίζονται θετικά.

Ο γιατρός μπορεί να διαγνώσει με βεβαιότητα ότι ένας ασθενής πάσχει από λευχαιμία ή λέμφωμα αν ο ασθενής είναι CD3-αρνητικός, CD20-θετικός και HLA-DR-θετικός. Η ακριβής ταξινόμηση της νόσου μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας περαιτέρω αντισώματα.

Έλεγχος και παρακολούθηση ατόμων με λοίμωξη από ιό HIV. Ο βασικός έλεγχος των ασθενών που είναι θετικοί για τον ιό HIV περιλαμβάνει την ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των βασικών λεμφοκυτταρικών πληθυσμών (T, B, φυσικά κυτταροκτόνα NK λεμφοκύτταρα). Συγκεκριμένα, εκτιμάται η εκατοστιαία αναλογία και ο απόλυτος αριθμός των T λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τα CD4 (CD4+) και CD8 (CD8+) καθώς και ο λόγος CD4/CD8. Τα επίπεδα των CD4+ T λεμφοκυττάρων μαζί με το ιϊκό φορτίο παραμένουν ισχυροί δείκτες του βαθμού ανοσοκαταστολής και της εξέλιξης της νόσου.

Η μέτρηση του απόλυτου αριθμού των CD4+ T λεμφοκυττάρων χρησιμεύει στη λήψη αποφάσεων για την έναρξη προφυλακτικής θεραπείας έναντι ευκαιριακών λοιμώξεων, καθώς και για την έναρξη αλλά και παρακολούθηση της αντιρετροϊκής αγωγής.

Ανάλυση του περιεχομένου DNA και του κυτταρικού κύκλου.

Η ανάλυση του DNA σε ιστούς ή βιολογικά υγρά είναι μία από τις πρώτες και πλέον διαδεδομένες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής και παρουσιάζει κλινικό ενδιαφέρον. Καθώς οι μεταβολές του DNA συνοδεύουν συχνά πολλές κακοήθειες νόσους ερευνάται η πιθανή προγνωστική αξία της πλοειδίας στους ανθρώπινους όγκους. Με την κυτταρομετρία ροής μετράται το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κύκλου (ανάλυση του κυτταρικού κύκλου) καθώς και το ολικό περιεχόμενο σε DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού (DNA πλοειδία). Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του ποσοστού των κυττάρων στη φάση ηρεμίας (G_0/G_1), στη φάση σύνθεσης DNA (S) και στη φάση μίτωσης (G_2/M). Τα κύτταρα επωάζονται με μια φθορίζουσα χρωστική, που συνδέεται στο DNA και μετά από ανάλυση μετριέται η ένταση του φθορισμού, η οποία αντανακλά το περιεχόμενο DNA. Ένα τυπικό ιστόγραμμα (διαφάνεια 27) περιέχει κύτταρα σε φάση G_0/G_1 , με το χαμηλότερο ποσό DNA, στη φάση S με την αύξηση της ποσότητας DNA και στη φάση G_2/M , με τη διπλάσια ποσότητα DNA από τη φάση G_0/G_1 . Η S φάση έχει ιδιαίτερη σημασία διότι αντανακλά την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα της νεοπλασίας. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εκφράζονται ως δείκτης SPF:S phase fraction (ποσοστό των κυττάρων της S φάσης επί του συνόλου των κυττάρων) καθώς και ως δείκτης πολλαπλασιασμού (Proliferative Index, PI), που υποδηλώνει το ποσοστό των κυττάρων στις φάσεις S και G_2/M . Το περιεχόμενο DNA μιας νεοπλασίας εκφράζεται με τον δείκτη DNA (DNA index, DI), που ορίζεται ως ο λόγος της μέσης τιμής της έντασης φθορισμού του παθολογικού προς το φυσιολογικό πληθυσμό κυττάρων, που βρίσκονται στη φάση G_0/G_1 .

Ανάλυση χρωμοσωμάτων

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια νέα τεχνική προσδιορισμού των χρωμοσωμάτων. Ανάλογα με τα φθοριοχρώματα, που συνδέονται στο DNA μπορούν να σχεδιαστούν ιστογράμματα (μίας ή δύο παραμέτρων) κατανομής του μεγέθους των χρωμοσωμάτων. Στο ιστόγραμμα μίας παραμέτρου (monovariate histogram), χρησιμοποιείται μία χρωστική (ιωδιούχο προπίδιο και βρωμιούχο αιθίδιο), που συνδέεται στο DNA χωρίς κάποια προτίμηση σε ζεύγη βάσεων (A-T και G-C). (Διαφάνεια 28A) με αποτέλεσμα τα χρωμοσώματα να ταξινομούνται ανάλογα με την ποσότητα DNA που περιέχουν. Στο ιστόγραμμα δύο παραμέτρων (bivariate histogram) χρησιμοποιούνται ως χρωστικές η χρωμομυσίνη A3 (chromomycin A3), που δεσμεύεται ειδικά σε ζεύγη G-C και η Hoechst

33258, που δεσμεύεται ειδικά σε ζεύγη A-T κι έτσι τα χρωμοσώματα ταξινομούνται ανάλογα με το περιεχόμενο τους σε A-T and G-C (Διαφάνεια 28B, Γ).

Διαχωρισμός νεκρών/ζωντανών κυττάρων

Τα νεκρά κύτταρα έχουν συνήθως μικρότερη πρόσθια σκέδαση από τα ζωντανά και παρόμοια ή υψηλότερη πλάγια σκέδαση. Η χρήση της πρόσθιας και της πλάγιας σκέδασης μπορεί να εμπλουτίσει τον πληθυσμό των ζωντανών κυττάρων αλλά δεν αρκεί για να διαχωρίσει πλήρως τα νεκρά από τα ζωντανά κύτταρα. Χρειάζονται φθορίζουσες χρωστικές, όπως το Propidium Iodide (PI) και η 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), που χρησιμοποιούνται για τη χρώση των νεκρών κυττάρων ώστε αυτά να μη συμπεριλαμβάνονται στην ανάλυση των δεδομένων. Αυτές οι χρωστικές δεν μπορούν να διαπεράσουν ακέραιες κυτταρικές μεμβράνες αλλά μπορούν ελεύθερα να εισέρθουν σε κύτταρα με διαπερατή μεμβράνη. Οι χρωστικές αυτές μετά την είσοδό τους στα νεκρά κύτταρα θα ενσωματωθούν στο δίκλωνο DNA και θα δώσουν φθορισμό.

Υπάρχουν και άλλες χρωστικές (calcein dyes), οι οποίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση των ζωντανών κυττάρων μέσω εκπομπής φθορισμού. Οι χρωστικές αυτές (Calcein, Calcein Violet, και Calcein Blue) δεν είναι φθορίζουσες αλλά μπορούν να διαπεράσουν ανέπαφες κυτταρικές μεμβράνες και να εισέρθουν σε ζωντανά κύτταρα. Οι χρωστικές αυτές μετά την είσοδό τους στα κύτταρα μετατρέπονται από ενδοκυτταρικά ένζυμα σε σύμπλοκα, που πλέον δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και εκπέμπουν φθορισμό. Τα νεκρά κύτταρα δεν έχουν ενεργά ένζυμα και δεν μπορούν να κατακρατήσουν τις φθορίζουσες χρωστικές σε αντίθεση με τα ζωντανά κύτταρα που φθορίζουν και μπορούν εύκολα να ταυτοποιηθούν.