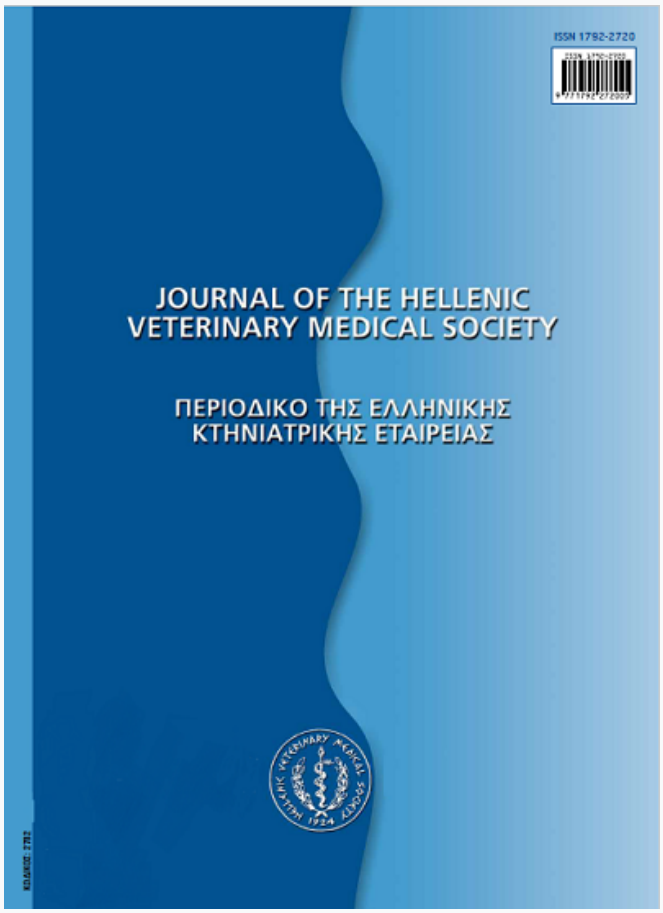
ePublishing
ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας

Τόμ. 56, Αρ. 1 (2005)



Η κυτταρομετρία ροής και οι εφαρμογές της

E. I. PAPADOGIANNAKIS (Ε. Ι. ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΑΚΗΣ), V. I. KONTOS (Β. Ι. ΚΟΝΤΟΣ), M. TAMAMIDOU (Μ. ΤΑΜΑΜΙΔΟΥ), A. ROUMELIOTOU (Α. ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΟΥ)

doi: 10.12681/jhvms.15073

Βιβλιογραφική αναφορά:

PAPADOGIANNAKIS (Ε. Ι. ΠΑΠΑΔΟΓΙΑΝΝΑΚΗΣ) E. I., KONTOS (Β. Ι. ΚΟΝΤΟΣ) V. I., TAMAMIDOU (Μ. ΤΑΜΑΜΙΔΟΥ) M., & ROUMELIOTOU (Α. ΡΟΥΜΕΛΙΩΤΟΥ) A. (2017). Η κυτταρομετρία ροής και οι εφαρμογές της. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, *56*(1), 71–77. https://doi.org/10.12681/jhvms.15073

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2005, 56(1): 71-77
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2005, 56(1): 71-77

Ανασκόπηση
Review article

Η κυτταρομετρία ροής και οι εφαρμογές της

Ε.Ι. Παπαδογιαννάκης[1], Β.Ι. Κοντός[1], Μ. Ταμαμίδου[2], Α. Ρουμελιώτου[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αυτοματοποιημένη, πολυπαραμετρική και ποσοτική μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων σκεδασμού και φθορισμού που παράγονται, καθώς μία μονήρης κυτταρική διάταξη διέρχεται μπροστά από μία φωτεινή δέσμη LASER. Με την εργασία αυτή δίνονται λεπτομέρειες πάνω στην περιγραφή της μεθόδου, τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται και τους τρόπους σήμανσης των κυττάρων. Παράλληλα, γίνεται αναφορά στις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής οι οποίες, αν και είναι ακόμη περιορισμένες στην κτηνιατρική, είναι βέβαιο ότι θα τύχουν ευρείας αποδοχής στο προσεχές μέλλον.

Λέξεις ευρετηρίασης: κυτταρομετρία ροής, μέθοδος, εφαρμογές

Flow cytometry and its applications

Papadogiannakis E.I.[1], Kontos V.I.[1], Tamamidou M.[2], Roumeliotou A.[2]

ABSTRACT. Flow cytometry is an automated, multiparametric and quantitative method that counts and analyses the scattering and fluorescence signals produced as a single cell stream passes through a laser beam. This article describes the method along with fluorochromes used and cell labeling techniques. Additionally, details regarding the applications of flow cytometry are also given. Although flow cytometry is not widely used in veterinary science so far, its application in the near future will rise, since more necessary reagents for veterinary use will be in the market.

Key words: flow cytometry, method, applications

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry - FC) είναι μια αυτοματοποιημένη, πολυπαραμετρική και ποσοτική μέθοδος μέτρησης και ανάλυσης των σημάτων σκεδασμού και φθορισμού που παράγονται, καθώς μία μονήρης κυτταρική διάταξη διέρχεται μπροστά από μία φωτεινή δέσμη, κατά κύριο λόγο LASER (Shapiro 1988, Parks and Herzenberg 1989, Marti et al. 2001, Γερμενής 2002).

Τα μηχανήματα στα οποία πραγματοποιείται η FC ονομάζονται κυτταρόμετρα ροής (ή FACS, από το fluorescence-activated cell sorter) και θεωρούνται αυτοματοποιημένα μικροσκόπια ανοσοφθορισμού, τα οποία πλεονεκτούν, σε σχέση με τα τελευταία, στο ότι μπορούν να εξετάζουν τα κύτταρα με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη πολύ μικρών κυτταρικών πληθυσμών (π.χ. ένα κύτταρο σε εναιώρημα 10^5 κυττάρων). Επιπλέον, οι υπό μελέτη κυτταρικές παράμετροι (μέχρι και 12) μετρούνται ταυτόχρονα και επί ενός εκάστου των κυττάρων, ενώ είναι δυνατή η απομόνωση και ο διαχωρισμός ομάδων κυττάρων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (cell sorting) (Shapiro 1988, Darzynkiewicz and Crissman 1990, Affolter 2000).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το κυτταρόμετρο ροής διαθέτει ως βασικό στοιχείο του ένα υδροδυναμικό σύστημα με το οποίο επιτυγχάνεται μία μονήρης κυτταρική διάταξη, η οποία επιτρέπει την επί ενός εκάστου των κυττάρων πρόσπτωση της δέσμης LASER και μέτρηση των υπό μελέτη παραμέτρων (Carter and Ormerod 2000, Rose et al. 1992, McCoy 2002).

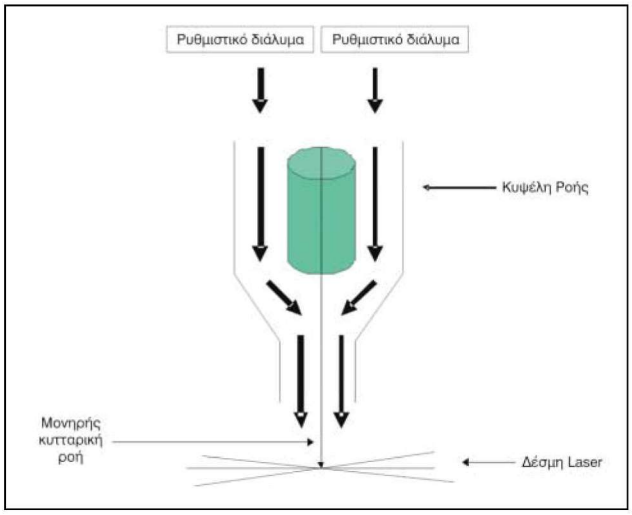
Το υδροδυναμικό σύστημα αποτελείται από μια χοανοειδή κατασκευή (κυψέλη ροής), μέσα στην οποία διοχετεύεται ένα υγρό υπό πίεση (ρυθμιστικό διάλυμα, sheath fluid), το οποίο έχει μεγάλη ταχύτητα, ενώ το προς εξέταση κυτταρικό εναιώρημα διοχετεύεται κατά μήκος του κεντρικού άξονα της ροής του ρυθμιστικού διαλύματος, έτσι ώστε η διάμετρος ροής του κυτταρικού εναιωρήματος να αντιστοιχεί στη διάμετρο των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αναγκάζει τα κύτταρα να διατάσσονται το ένα κατόπιν του άλλου και τελικά να διέρ-

[1] Τομέας Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας
[2] Τομέας Επιδημιολογίας και Βιοστατιστικής
Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα

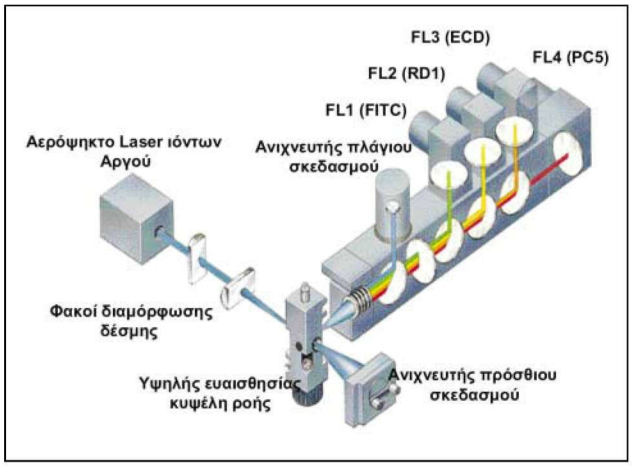
Ημερομηνία υποβολής: 03.12.2004
Ημερομηνία εγκρίσεως: 16.02.2005

[1] Dept. of Veterinary Public Health
[2] Dept. of Epidemiology and Biostatistics
National School of Public Health, Athens, Greece

Submission date: 03.12.2004
Approval date: 16.02.2005



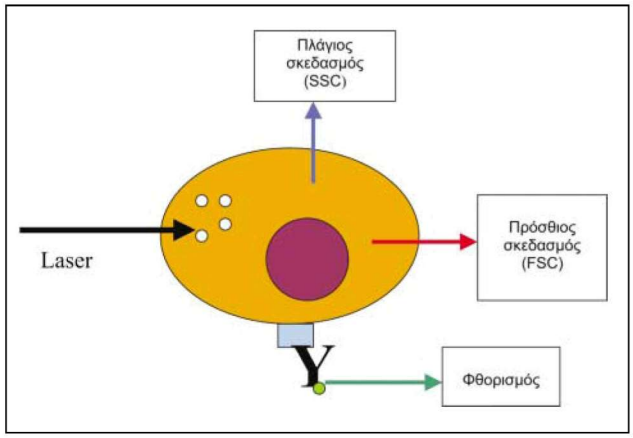
Εικόνα 1. *Σχηματική παράσταση της κυψέλης ροής των κυτταρομέτρων.*
Figure 1. *A scheme illustrating the coaxial stream in the flow cell of a flow cytometer.*



Εικόνα 3. *Σχηματική παράσταση του κυτταρόμετρου ροής.*
Figure 3. *A scheme illustrating the parts of a flow cytometer.*

χονται από το ρύγχος του υδροδυναμικού συστήματος με ταχύτητα 3.000 – 10.000 κυττάρων/sec (Darzynkiewicz and Crissman 1990, Ashcroft and Lopez 2000) (Εικόνα 1). Καθώς τα κύτταρα διέρχονται από το ρύγχος της κυψέλης ροής, μία δέσμη φωτός LASER προσπίπτει κάθετα πάνω σε αυτά. Εάν προηγηθεί σύνδεση ορισμένων μεμβρανικών ή ενδοκυτταρικών συστατικών των κυττάρων με φθοριοσημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα, η πρόσπτωση της φωτεινής δέσμης προκαλεί διέγερση των φθοριοχρωμάτων και εκπομπή αντίστοιχων σημάτων φθορισμού (Shapiro 1988, Lakowicz 1999, Affolter 2000) (Εικόνα 2).

Από την πρόσπτωση της δέσμης LASER πάνω στα κύτταρα προκαλείται σκεδασμός του φωτός, αφενός ευθύγραμμος (FSC) και αφετέρου πλάγιος (SSC). Ο πρώτος δίνει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος των κυττάρων, ενώ ο δεύτερος για την περιεκτικότητά τους σε κοκκία (Parks



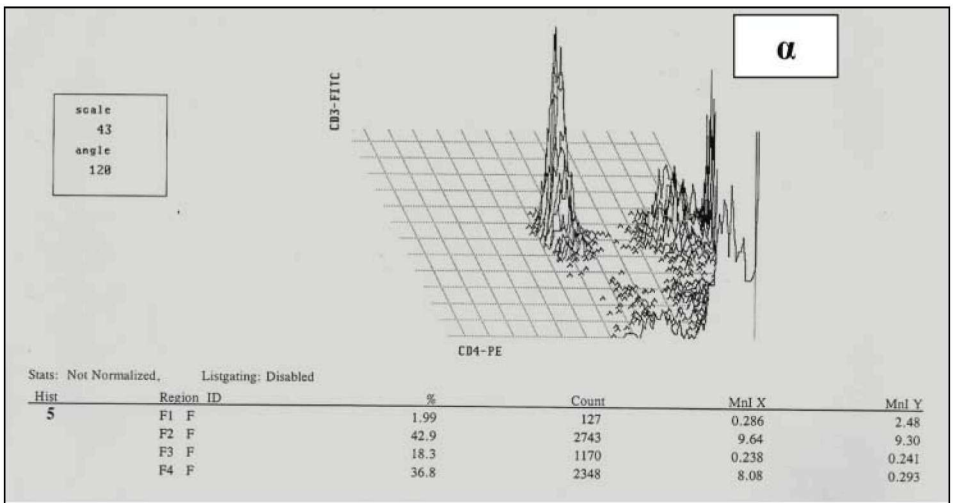
Εικόνα2. *Τα αποτελέσματα της πρόσπτωσης της δέσμης laser πάνω στο κύτταρο.*
Figure 2. *Forward scatter (FSC), side scatter (SSC) and fluoresence as a laser beam strikes the cell.*

and Herzenberg 1989, Scheffold and Kern 2000) (Εικόνα 2).

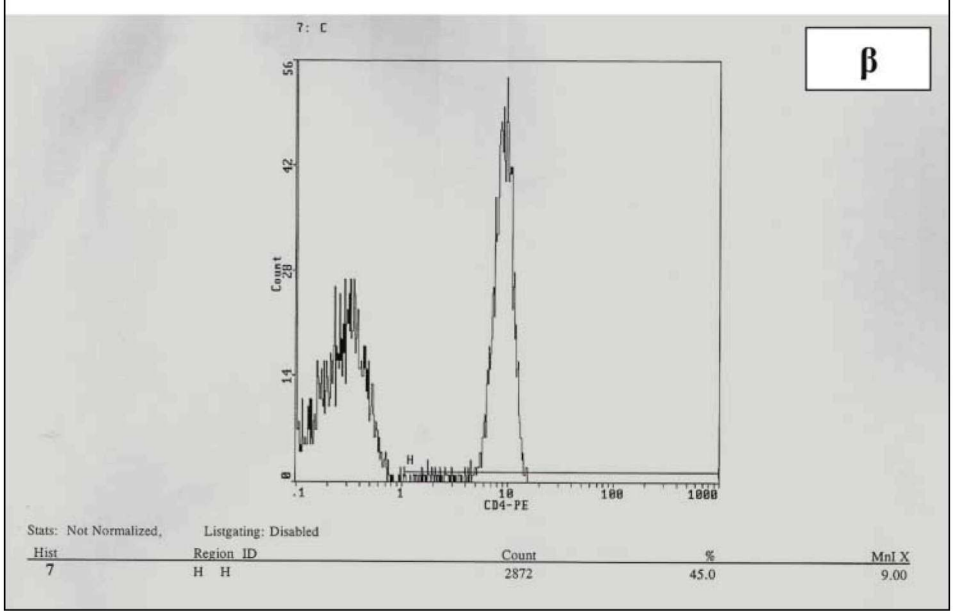
Με ένα πολύπλοκο σύστημα φακών, κατόπτρων και φίλτρων, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και η εκτροπή των παραπάνω φωτεινών σημάτων σε θέσεις όπου βρίσκονται φωτοανιχνευτές (Εικόνα 3). Οι τελευταίοι είναι φωτοδίοδοι για τα σήματα του ευθύγραμμου σκεδασμού και φωτοπολλαπλασιαστές (Photomultipliers, PHTs) για τα υπόλοιπα σήματα. Οι φωτοανιχνευτές μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρικούς παλμούς, η ένταση των οποίων είναι ανάλογη εκείνης του φωτεινού σήματος που δέχονται. Στη συνέχεια, οι ηλεκτρικοί παλμοί υποβάλλονται σε ενίσχυση (γραμμική ή λογαριθμική) από κατάλληλους ενισχυτές, ενώ με τη βοήθεια ειδικών μετατροπέων τα ενισχυμένα αυτά σήματα μετατρέπονται σε ψηφιοποιημένα και με τη μορφή αυτή πλέον μπορούν να προβληθούν στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή του κυτταρόμετρου ή να αποθηκευτούν για μετέπειτα ανάκληση και μελέτη (Coligan et al. 1995, McCoy 2002, Πατεράκης 2003, Γερμενής 2002).

Η παρουσίαση και η ανάλυση των σημάτων μπορεί να γίνει υπό μορφή ιστογράμματος (Εικόνα 4), στικτογράμματος (dot plot) (Εικόνα 5) ή περιμετρικού διαγράμματος (contour plot) (Εικόνα 6). Δεδομένα που προέρχονται από απλές σημάνσεις συνήθως απεικονίζονται με τις δύο πρώτες μορφές, ενώ πολλαπλές κυτταρικές σημάνσεις μπορούν να απεικονιστούν καλύτερα με τις δύο τελευταίες μορφές (Shapiro 1988, Affolter 2000).

Το λογισμικό των FACS επιτρέπει τη χάραξη περιοχής (gate) γύρω από τον κυτταρικό υποπληθυσμό που ενδιαφέρει, για περαιτέρω ανάλυση και μελέτη, με βάση τα μονοκλωνικά αντισώματα και τα φθοριοχρώματα με τα οποία έχει σημανθεί (Εικόνα 7). Επίσης, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των στικτογραμμάτων σε τεταρτημόρια που περιλαμβάνουν τα θετικά και τα αρνητικά για καθεμιά από δύο σημάνσεις, καθώς και τα θετικά και τα αρνητικά και για τις δύο σημάνσεις που συνεξετάζονται (Loken et



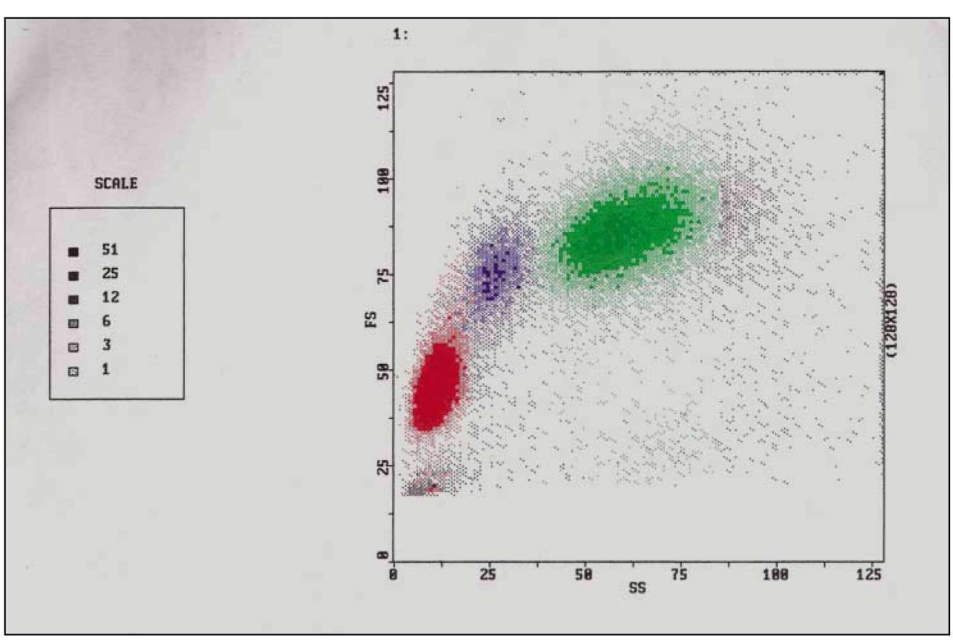
Hist	Region	ID	%	Count	MnI X	MnI Y
5	F1	F	1.99	127	0.286	2.48
	F2	F	42.9	2743	9.64	9.30
	F3	F	18.3	1170	0.238	0.241
	F4	F	36.8	2348	8.08	0.293



Hist	Region	ID	Count	%	MnI X
7	H	H	2872	45.0	9.00

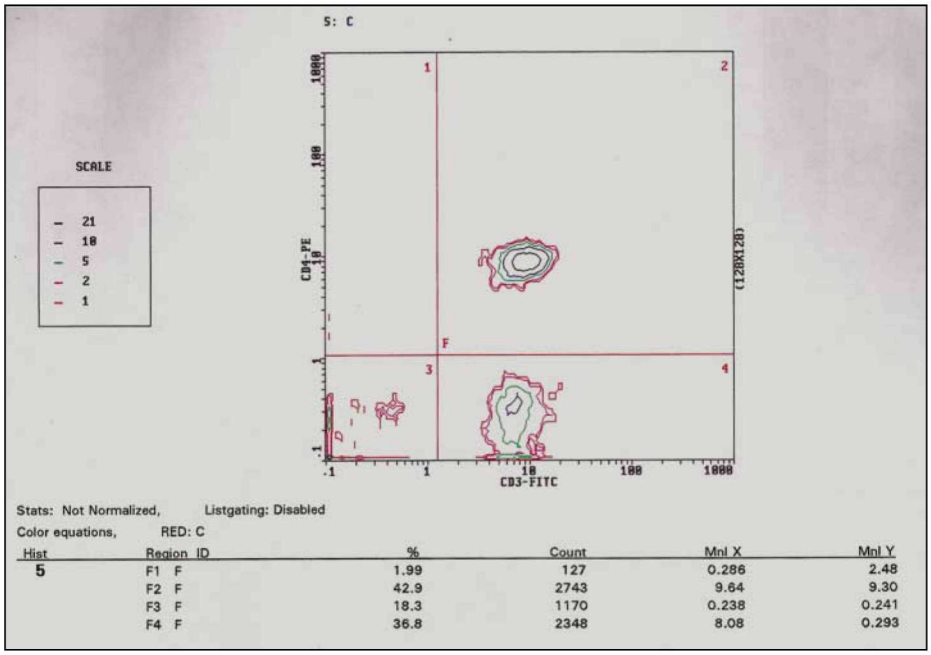
Εικόνα 4. *Ιστογράμματα.* **α)** *Στον άξονα χ απεικονίζεται ο λεμφοκυτταρικός υποπληθυσμός CD4 με χρώση PE (Phycoerythrin). Στον άξονα ψ απεικονίζεται το σύνολο των Τ-λεμφοκυττάρων (CD3).* **β)** *Στον άξονα χ απεικονίζεται ο λογάριθμος των CD4 κυττάρων, ενώ στον άξονα ψ ο απόλυτος αριθμός τους.*

Figure 4. *Histograms.* **α)** *CD4 lymphocytes labelled with PE (Phycoerythrin) and CD3 lymphocytes labelled with FITC are illustrated.* **β)** *Linear and Logarithmic displays of CD4 lymphocytes labelled with PE.*



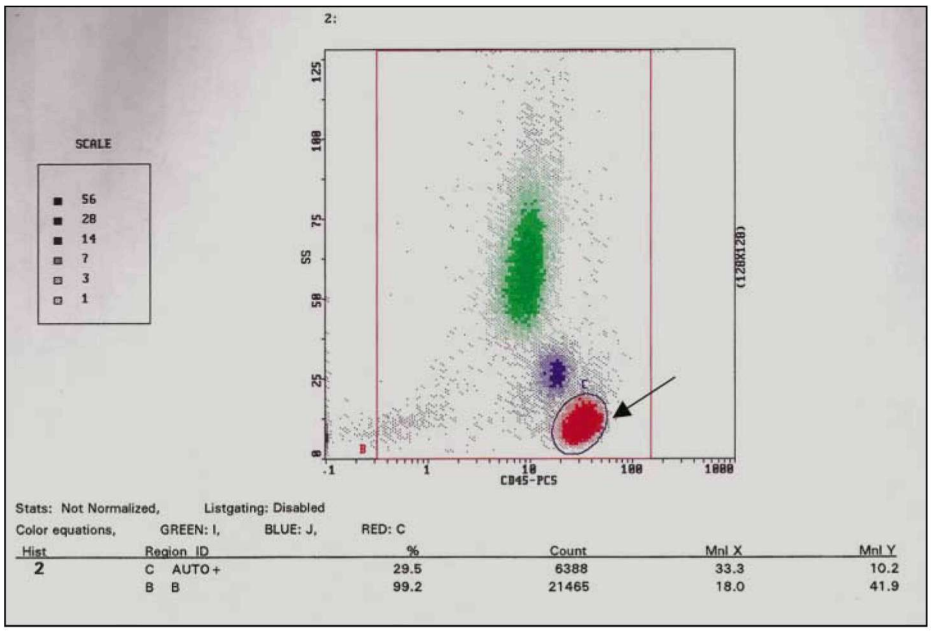
Εικόνα 5. *Στικτόγραμμα (dot plot). Στον άξονα χ απεικονίζονται τα αποτελέσματα του πλάγιου σκεδασμού, ενώ στον ψ του πρόσθιου σκεδασμού.*

Figure 5. *A dot plot of blood leucocytes. SS:side scatter, FS:forward scatter.*



Εικόνα 6. *Περιμετρικό διάγραμμα (contour plot) διπλού ανοσοφθορισμού (PE και FITC) χωρισμένο σε τεταρτημόρια (το 1 απεικονίζει τα CD3- CD4+ κύτταρα, το 2 τα CD3+CD4-, το 3 τα κυτταρικά συντρίμματα και το 4 τα CD3+CD4- κύτταρα).*

Figure 6. *Contour plot double immunofluoresence (PE and FITC) divided into quarters (1 illustrates CD3-CD4+ cells, 2 the CD3+CD4+, 3 the cellular debris and 4 the CD3+CD4- cells).*



Εικόνα 7. *Χάραξη (gating) της υπό εξέταση περιοχής του στικτογράμματος (βέλος). Στον άξονα χ απεικονίζεται ο λογάριθμος των CD45 (με χρώση PC5) κυττάρων.*

Figure 7. *Gating the area to be examined (arrow) of a dot plot. Logarithmic display of CD45 cells labelled with PC5.*

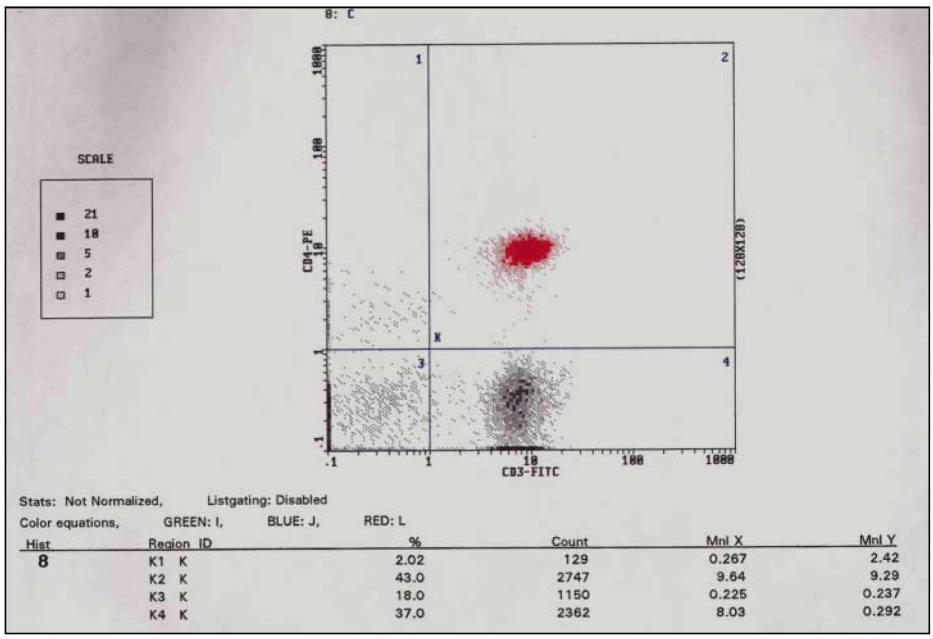
al. 1990, Byrne et al. 2000) (Εικόνα 8).

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων εκτελείται βασιζόμενη είτε στο ιστόγραμμα (μετά το δέσιμο των δεικτών) είτε στο στικτόγραμμα ή στο περιμετρικό διάγραμμα (μετά τον ορισμό των τεταρτημορίων) (McCoy 2002, Πατεράκης 2003).

ΦΘΟΡΙΟΧΡΩΜΑΤΑ

Τα φθοριοχρώματα είναι ουσίες που διεγείρονται από φως ορισμένου μήκους κύματος (λ), με αποτέλεσμα να εκπέμπουν φως συγκεκριμένου λ. Στην FC, τα σημασμένα κύτταρα διεγείρονται από δέσμη φωτός LASER. Το γεγονός ότι ορισμένα φθοριοχρώματα μπορούν να διεγερθούν από ένα συγκεκριμένο λ και να εκπέμψουν στη συνέχεια φως διαφορετικού λ, έχει βρει εφαρμογή για πολλαπλές σημάνσεις του ίδιου κυττάρου. Σε περίπτωση, όμως, πολλαπλών σημάνσεων του κυττάρου με χρήση φθοριοχρωμάτων, τα οποία χρειάζονται διαφορετικό λ για τη διέγερσή τους, τότε απαιτούνται κυτταρόμετρα που να διαθέτουν περισσότερες της μίας πηγές LASER με ρυθμιζόμενη εκπομπή φωτός (Watson 1991, Riley 2002).

Τα συνηθέστερα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής φαίνονται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 8. *Διαχωρισμός στικτογράμματος σε τεταρτημόρια (το 1 απεικονίζει τα CD3- CD4+ κύτταρα, το 2 τα CD3+CD4+, το 3 τα κυτταρικά συντρίμματα και το 4 τα CD3+CD4- κύτταρα).*
Figure 8. *Dot plot double immunofluoresence (FITC and PE) divided into quarters.*

ΣΗΜΑΝΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται, κατά κύριο λόγο, για τον προσδιορισμό του κυτταρικού ανοσοφαινότυπου με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία είναι σημασμένα με ένα φθοριόχρωμα. Τα σημασμένα αυτά μονοκλωνικά αντισώματα συνδέονται με το αντίστοιχο κυτταρικό αντιγόνο (συνήθως αντιγόνο διαφοροποίησης), ενώ η φωτεινή ακτίνα LASER του κυτταρόμετρου, που προσπίπτει πάνω στο φθοριόχρωμα, το αναγκάζει να εκπέμψει φως συγκεκριμένου λ, το οποίο ανιχνεύεται από τους φωτοανιχνευτές του κυτταρόμετρου, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Parks and Herzenberg 1989, Coligan et al. 1995, Bernander et al. 1998).

Για τη σήμανση των κυττάρων εφαρμόζονται οι παρακάτω μέθοδοι (Affolter 2000) :

α) **Άμεσος ανοσοφθορισμός.** Εκτελείται με φθοριοσημασμένα αντισώματα (π.χ. FITC- σημασμένη IgG ποντικού κατά του CD3 μορίου του σκύλου).

β) **Έμμεσος ανοσοφθορισμός.** Αρχικά γίνεται η προσθήκη του πρωτογενούς μη σημασμένου αντισώματος (π.χ. IgG ποντικού κατά του CD3 μορίου του σκύλου). Στη συνέχεια προστίθεται ένα σημασμένο με φθοριόχρωμα αντίσωμα κατά του Fc τμήματος του πρωτογενούς αντισώματος (π.χ. FITC-σημασμένη IgG αίγας κατά της IgG του ποντικού).

γ) **Μονή σήμανση.** Αυτή μπορεί να γίνει με άμεση μέθοδο που απαιτεί παραγωγή καθαρής IgG και δέσμευση των πρωτογενών αντισωμάτων ή με έμμεση μέθοδο με χρήση φθοριοσημασμένων δευτερογενών αντισωμάτων.

δ) **Διπλή ή πολλαπλή σήμανση.** Σε αυτού του τύπου τις σημάνσεις κάθε πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύεται συνήθως με ένα διαφορετικό φθοριόχρωμα.

Χρώμα	Διέγερση	Εκπομπή	Μοριακό βάρος
FITC	488 nm	520 nm	389 Da
PE	488 nm	578 nm	240 000 Da
ECD	488 nm	613 nm	250 000 Da
PC5	488 nm	668 nm	105 000 da
PerCP	488 nm	688 nm	35 000 Da
APC	613 nm	665 nm	105 000 Da

Εικόνα 9. *Τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιούνται συνήθως στην κυτταρομετρία ροής και τα χαρακτηριστικά τους.*
Figure 9. *Commonly used fluoresence dyes in flow cytometry along with their characteristics.*

ε) **Μάρτυρες.** Ένα δείγμα με μη σημασμένα κύτταρα χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του FACS σε σχέση με τον ευθύγραμμο, αλλά και τον πλάγιο σκεδασμό. Ταυτόχρονα πρέπει να χρησιμοποιούνται ισοτυπικά δείγματα ελέγχου (isotype controls). Πρόκειται για αντισώματα ίδιου ισότυπου, συγκέντρωσης και αναλογίας πρωτεΐνης-φθοριοχρώματος με το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη μέτρηση, αλλά με άσχετη ειδικότητα. Αφαιρώντας την κατανομή των σημάτων του ισοτυπικού δείγματος, προσδιορίζεται το τμήμα της κατανομής που αντιστοιχεί στην ειδική δέσμευση του μονοκλωνικού αντισώματος, το οποίο αντιστοιχεί στα αληθώς θετικά κύτταρα.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

Με την κυτταρομετρία ροής μπορεί να γίνει υπολογι-

σμός διαφόρων ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών, όπως των λευκοκυττάρων του περιφερικού αίματος, κυτταρική ανάλυση ασκιτικού, θωρακικού και περικαρδιακού υγρού συλλογής, ενώ συμπαγείς ιστοί μπορούν να τεμαχιστούν σε μικρά τεμάχια, να φιλτραριστούν, να γίνει εναιώρημά τους σε ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια να εξεταστούν στο κυτταρόμετρο (Ibrahim and Van den Engh 2003).

Τα πλεονεκτήματα της FC, σε σχέση με την ανοσοϊστοχημεία και τη μικροσκόπηση με φθορισμό, είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής ανάλυσης και στατιστικής επεξεργασίας πολλαπλών κυτταρικών παραμέτρων επί ενός εκάστου των κυττάρων.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί αναλύονται αποσπασματικά και όχι στο εγγύς βιολογικό τους περιβάλλον, ενώ απαιτείται και ένας μάλλον μεγάλος αριθμός κυττάρων (περίπου 10^5 κύτταρα/δείγμα).

Οι κυριότερες εφαρμογές της FC είναι (Affolter 2000, Γεωργίου 2003):

α) **Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των κυττάρων.** Βασίζεται σε μόρια που εκφράζονται στην κυτταρική μεμβράνη, τα οποία σχετίζονται με το είδος και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Για παράδειγμα, τα Τ-λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωριστούν από το μόριο CD3 και τον υποδοχέα τους (TCR), τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα από το μόριο CD4, τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα από το μόριο CD8 κ.ά.

β) **Η εξέταση και ταυτοποίηση αντισωμάτων άγνωστης ειδικότητας.** Αυτή επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση πολύ καλά φαινοτυπικώς χαρακτηρισμένων κυτταρικών πληθυσμών. Για παράδειγμα, ορισμένες λευκοκυτταρικές νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό.

γ) **Προσδιορισμός κυτταροπλασματικών συστατικών ενός κυτταρικού πληθυσμού.** Για παράδειγμα η ε αλυσίδα του συμπλέγματος CD3 ή η παραγωγή της ιντερλευκίνης 4 (IL-4).

δ) **Εκτίμηση της διαφοροποίησης και της ενεργοποίησης ενός κυτταρικού πληθυσμού.** Αυτό επιτυγχάνεται με ειδικά αντιδραστήρια που αναγνωρίζουν μόρια στην κυτταρική μεμβράνη, η έκφραση των οποίων σχετίζεται με τη διαφοροποίηση ή την ενεργοποίηση του κυττάρου. Για παράδειγμα, τα μόρια CD54 και CD86 πιστοποιούν αντίστοιχα την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων.

ε) **Υπολογισμός του DNA που περιέχει το κύτταρο.** Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση του σταδίου του κυτταρικού κύκλου. Π.χ. κύτταρα ευρισκόμενα στη φάση G2 έχουν διπλή ποσότητα DNA.

στ) **Διαχωρισμός ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών**, οι οποίοι μπορούν να καλλιεργηθούν ή να χρησιμεύσουν για μελέτες λειτουργικές ή ενεργοποίησης (in vitro).

ζ) **Διαφοροποίηση μεταξύ ζώντων και νεκρών κυττάρων**, ανάλογα με την ικανότητα πρόσληψης της 7-amino-actinomycin D και

η) **Μέτρηση του κυτταρικού Ca^{2+}.**

Η FC βρίσκει, επίσης, εφαρμογή στον έλεγχο των ανοσοεπαρκειών, την παρακολούθηση μεταμόσχευσης ή θεραπείας, τα αυτοάνοσα νοσήματα, τον προσδιορισμό των αλληλόμορφων γονιδίων του DLA ή CLA (Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας του σκύλου ή της γάτας), τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων αίματος, τον προσδιορισμό ενζύμων, καθώς και την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ

Μέχρι σήμερα, η κυτταρομετρία ροής έχει περιορισμένη εφαρμογή στην Κτηνιατρική διαγνωστική λόγω της έλλειψης κατάλληλων αντιδραστηρίων και τιμών αναφοράς.

Παρ' όλα αυτά η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της εξέλιξης των λοιμώξεων από τον ιό της ανοσοανεπάρκειας (FIV) ή εκείνον της λευχαιμίας (FeLV) της γάτας, τη μέτρηση αποπτωτικών κυττάρων, την εκτίμηση της ανοσολογικής αντίδρασης σε μεταμοσχευμένα όργανα σε σκύλους και για το χαρακτηρισμό της ανοσολογικής αντίδρασης κατά την πορεία διαφόρων λοιμώξεων (Ackley et al. 1990, Holznagel et al. 1996, Hofmann-Lehmann et al. 1997, Bourdoiseau et al. 1997). Πρόσφατα, το εργαστήριο κυτταρομετρίας ροής του Τομέα Επιδημιολογίας και Βιοστατιστικής της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας, σε συνεργασία με τον Τομέα Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας, ολοκλήρωσε την εφαρμογή της μεθόδου για τον προσδιορισμό του ανοσοφαινότυπου των λεμφοκυττάρων του αίματος στο σκύλο, ενώ παράλληλα είναι σε εξέλιξη έρευνα για την επίπτωση της θεραπευτικής αγωγής της λεϊσμανίωσης του σκύλου στον εν λόγω ανοσοφαινότυπο.

Είναι βέβαιο ότι στο προσεχές μέλλον θα υπάρξει παραγωγή και επομένως διάθεση στην αγορά των μονοκλωνικών αντισωμάτων, αλλά και άλλων απαραίτητων αντιδραστηρίων, έτσι ώστε η κυτταρομετρία ροής να βρει ευρεία εφαρμογή και στην κτηνιατρική τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς. ❑

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

Ackley C.D., Yamamoto J.K., Levy N., Pedersen N.C. and Cooper M.D. (1990). Immunologic abnormalities in pathogen free cats experimentally infected with FIV, J Virology, 64:5652-5655.

Affolter V.K. (2000). Flow cytometry. In: Proceedings of the Workshop on skin immunology organized by ESVD, Saint Paul de Vence, France.

Ashcroft R.G. and Lopez P.A. (2000). Commercial high speed machines open new opportunities in high throughput flow cytometry, J Immunological Methods, 243: 13-24.

Bernander R., Stokke T. and Boye E. (1998). Flow cytometry of bacterial cells: comparison between different flow cytometers and different DNA strains, Cytometry, 31:29-36.

Bourdoiseau G., Bonnefont C., Magnol J.P., Saint-Andre I. and Chabanne L. (1997). Lymphocyte subset abnormalities in canine leshmaniasis, Vet Immunol Immunopathol, 56:345-351.

Byrne K.M., Kim H.W., Chew B.P., Reinhart G.A. and Hayek M.G. (2000). A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes, Veterinary Immunology and Immunopathology, 73:167-182.

Carter N.P. and Ormerod M.G. (2000). Introduction to the principles of flow cytometry. In: Flow cytometry practical approach, third edition, Oxford University Press, pp:1-22.

Coligan J.E, Kruisbeck A.M., Margulies D.H et al. (1995): Current protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc.

Darzynkiewicz Z. and Crissman H.A (1990): Flow cytometry. In: Methods in cell biology, volume 33, San Diego: Academic Press, Inc. USA.

Georgiou M. (2003): Introduction to flow cytometry. Proceedings of Seminar on lymphomas and leukemias, University of Ioannina.

Germenis A. (2002): Flow cytometry. Diagnostic Immunology. Academic lectures, University of Thessaly, Larissa.

Hofmann-Lehmann R., Holznagel E., Ossent P. and Lutz H. (1997). Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (FIV and FeLV) infections: hematology, clinical chemistry and lymphocyte subsets, Clin Diagn Lab Immunol, 4:33-42.

Holznagel E., Hofmann-Lehmann R., Allenspach K., Huttner S., Willett B., Groscurth P., Niederer E. and Lutz H. (1996). Flow cytometric detection of activation induced cell death (apoptosis) in peripheral blood lymphocyte subpopulations from healthy cats, Vet Immunol Immunopathol, 52:1-14.

Ibrahim S.F. and van den Engh G. (2003). High speed cell sorting: fundamentals and recent advances, Current Opinion in Biotechnology, 14:5-12.

Lakowicz J.R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd edition, New York: Kluwer Academic Plenum Publishers.

Loken M.R., Brosnan J.M., Bach B.A. and Ault K.A. (1990). Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry, Cytometry, 11:453-459.

Marti G.E., Stetler-Stevenson M., Bleesing J.J. and Fleisher T.A. (2001). Introduction to flow cytometry, Seminars in Hematology, volume 38 (2).

Mc Coy J.P. (2002). Basic principles of flow cytometry, Hematol Oncol Clin N Am, 16:229-243.

Parks D. R. and Herzenberg L. A (1989): Flow Cytometry and Fluorescence Activated Cell Sorting. In: Paul W. (ed.): Fundamental Immunology, 2nd edition, Raven Press, New York, USA.

Peterakis G. (2003): Flow cytometry. A technology with everyday clinical applications. Proceedings of 29th Hellenic Medical Congress, Athens, pp:33-48.

Riley R.S. (2002). Flow Cytometry and its Applications in Hematology and Oncology, Hematology/Oncology Clinics of North America, vol 16 (2).

Rose N.R., Conway de Macario E., Fahey J.L., Friedman H. and Renn G.M (1992): Manual of Laboratory Immunology, 4th edition, American Society of Microbiology, Washington DC, USA.

Scheffold A. and Kern F. (2000). Recent developments in flow cytometry, J Clin Immunol, 20: 400-407.

Shapiro H.M (1988): Practical Flow Cytometry, 2nd edition, Alan R. Liss Inc., New York, USA.

Watson J.V. (1991). Introduction to flow cytometry, Cambridge University Press, Cambridge.