

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ
ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ**

ΟΝΟΜΑΤΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ

Κώνσταντίνος Μάντζαρης

A.M. 10025


Μιχάλης Λιόγρης

A.M. 10123

ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ

Ευγενία Κώνστα

ΑΘΗΝΑ 2019



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARING SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
MEDICAL LABORATORIES SECTION**

THESIS

**CONTRIBUTION OF FLOW CYTOMETRY TO HEMATOLOGICAL
AND IMMUNOLOGICAL HOSPITAL LABORATORIES**

NAMES OF STUDENTS

Konstantine Mantzaris
R.N. 10025

Mihalis Liogris
R.N. 10123

NAME OF SUPERVISOR

Evgenia Konsta

ATHENS 2019

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	viii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	3
1.1. Ιστορική αναδρομή	3
1.2 Αρχή μεθόδου κυτταρομετρίας ροής	5
1.3 Οργανολογία κυτταρομετρητή ροής.....	6
1.3.1 Υδραυλικό σύστημα	6
1.3.2 Οπτικό σύστημα	8
1.3.3 Ηλεκτρονικό σύστημα	11
1.4 Φθορισμός	12
1.4.1 Κριτήρια επιλογής φθοριοχρώματος.....	13
1.4.2 Επιλογή φθοριοχρώματος	16
1.5 Μονοκλωνικά αντισώματα	19
1.6 Βιολογικά δείγματα.....	20
1.7 Κυτταροδιαχωριστές	22
1.8 Σφαιριδομετρία.....	24
1.9 Είδη ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής.....	24
1.9.1 Ποσοτική και ποιοτική κυτταρομετρία ροής ανοσοφθορισμού	24
1.9.2 Κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού.....	25
1.9.3 Κυτταρομετρία ανάλυσης DNA.....	27
1.10 Αναλυτικές δυνατότητες και επεξεργασία δεδομένων κυτταρομετρητή	28
1.10.1 Γραμμική και λογαριθμική ανάλυση	28
1.10.2 Τρόποι παρουσίασης δεδομένων	29
1.10.3 Περιοχές και Τεταρτημόρια	29
1.10.4 Περίφραξη / Οριοθέτηση (gating)	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ	31
2.1 Διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες με την χρήση κυτταρομετρίας ροής.....	31
2.1.1 Αιματολογικές κακοήθειες και νεοπλάσματα η φύση της ασθένειας	31
2.1.2 Η εξέλιξη και η σημασία της κυτταρομετρίας ροής στην κατανόηση και παρακολούθηση των αιματολογικών κακοηθειών	33
2.1.3 Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση, κατάταξη και αντιμετώπιση αιματολογικών νεοπλασμάτων.....	36

2.1.3.1 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση, μελέτη και κατάταξη των χρόνιων λεμφουπερπλαστικών συνδρόμων (ΧΛΣ)	36
2.1.3.2 Χρόνια Β-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα	38
2.1.3.3 Χρόνια Τ και ΝΚ λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα	38
2.1.3.4 ΝΚ λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα	39
2.1.3.5 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση και κατάταξη των οξειών λευχαιμιών	40
2.1.3.6 Ανίχνευση ελαχίστης υπολειμματικής νόσου στις ΟΛ με χρήση κυτταρομετρίας ροής	43
2.1.3.7 Κυτταρομετρία ροής και ΧΜΛ	44
2.1.3.8 Κυτταρομετρία ροής και ΧΛΛ	44
2.1.3.9 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην μελέτη και παρακολούθηση των Μυελοδυσπλαστικών - Μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων	45
2.1.3.10 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην μελέτη και παρακολούθηση των πλάσματοκυτταρικών δυσκρασιών	45
2.1.3.11 Πολλαπλούν μύελωμα και κυτταρομετρία ροής	46
2.2 Κυτταρομετρία ροής και μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	47
2.2.1 Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα	47
2.2.2 Ταυτοποίηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με χρήση κυτταρικών δεικτών και κυτταρομετρία ροής	48
2.2.3 Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT)	51
2.2.4 Ρόλος και συμβολή κυτταρομετρίας ροής στην μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	53
2.3 Κυτταρομετρία ροής αιμοπεταλίων	56
2.3.1 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων	56
2.3.2 Η δομή των αιμοπεταλίων	57
2.3.3 Ο σχηματισμός του θρόμβου	59
2.3.4 Αιμοπεταλιακές διαταραχές	60
2.3.5 Η κυτταρομετρία ροής αιμοπεταλίων ως εργαλείο στην διαγνωστική και θεραπευτική αιματολογία	62
2.3.6 Πλεονεκτήματα της χρήσης κυτταρομετρίας ροής στην αξιολόγηση των αιμοπεταλίων	62
2.3.7 Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής αιμοπεταλίων	63

2.4 Καθ' ἑξιν αποβολές	65
2.4.1 Αιτιολογίες	65
2.4.1.1 Κυττογενετικές μεταλλάξεις.....	65
2.4.1.2 Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο	66
2.4.1.3 Ανατομικές ανωμαλίες.....	67
2.4.1.4 Περιβαλλοντικά και ψυχολογικά αίτια.....	68
2.4.2 Ο ρόλος της κυτταρομετρίας ροής.....	68
2.5 Η σημασία της κυτταρομετρίας ροής στην παρακολούθηση της HIV λοίμωξης	69
2.5.1 Ο ιός HIV (Human Immunodeficiency Virus, Ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου)	69
2.5.1.1 Ανακάλυψη και ιστορική αναδρομή της μελέτης του ιού HIV και του συνδρόμου AIDS (Acquired Immuno Deficiency Syndrome, Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας) 69	
2.5.1.2 Η φύση του ιού HIV.....	70
2.5.1.3 Δομή του ιού HIV	71
2.5.1.4 Κύκλος ζωής του ιού HIV.....	72
2.5.1.5 Στάδια της λοίμωξης με HIV	74
2.5.1.6 Σχετικά με την αντιμετώπιση του ιού HIV	76
2.5.2 Παρακολούθηση του ιού HIV.....	76
2.5.2.1 Σημασία των CD4+ T λεμφοκυττάρων στην παρακολούθηση της ασθένειας	76
2.5.2.2 Μέτρηση των CD4+ T κυττάρων	77
2.5.2.3 Ιικό φορτίο	79
2.5.2.4 Επιπλέον εξετάσεις	80
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	81
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	83
ABSTRACT	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

AIDS (Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας/ Acquired Immuno Deficiency Syndrome)

ART (Αντι-ρετροϊοική Θεραπεία/ Anti Retroviral Therapy)

BP (Φίλτρα Ορισμένου Περάσματος/ Band Pass)

CD (Σύμπλοκο Διαφοροποίησης/ Cluster of Differentiation)

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Array/ Δοκιμασία Ενζυμοσυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης)

FSC (Πρόσθιος Σκεδασμός/Forward scatter)

GVHD (Ασθένεια Μοσχεύματος Εναντίον Λήπτη/ Graft Versus Host Disease)

HIV (Ιός της Ανοσοανεπάρκειας του Ανθρώπου/ Human Immunodeficiency Virus)

HSC (Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα/ Hematopoietic Stem Cells)

HSCT (Μεταμόσχευση Αρχέγονων Αιμοποιητικών Κυττάρων/ Hematopoietic Stem Cell Transplantation)

IBMTR (Διεθνές Κέντρο Ερευνών Μεταμόσχευσης Αίματος και Μυελού/ Center for International Bone Marrow Transplantation Research)

LP (Ευρέως Περάσματος/ Long Pass)

LT-HSC (Μακροπρόθεσμα Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα/ Long Term-HSC)

NK (Κύτταρα Φυσικοί Φονείς/Natural Killer Cells)

PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης/ Polymerase Chain Reaction)

PMT (Φωτοπολλαπλασιαστές/ Photomultiplier Tubes)

PVL (Ιικό Φορτίο Πλάσματος/ Plasma Viral Load)

RPL (Καθ' ἑξίν Αποβολές/ Recurrent Pregnancy Loss)

SP (Σύντομου Περάσματος/ Short Pass)

SSC (Πλάγιος Σκεδασμός/ Side Scatter)

ST-HSC (Βραχυπρόθεσμα Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα/ Short Term-HSC)

ΑΦΑ (Αντιφωσφολιπιδικό Αντίσωμα/ Phospholipid Specific Antibody, aPL)

ΑΦΣ (Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο/ Antiphospholipid Syndrome, APS)

ΕΥΝ (Ελάχιστη Υπολειμματική Νόσος)

ΜΔΣ (Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα)

ΟΛ (Οξεία Λευχαιμία)

ΟΛΛ (Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία)

ΟΜΛ (Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία)

ΠΟΥ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)

ΧΛΛ (Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία)

ΧΛΣ (Χρόνιων Λεμφοϋπερπλαστικών Συνδρόμων)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια μεθοδολογία η εφαρμογή της οποίας αποτέλεσε μια από τις σημαντικότερες καινοτομίες που εντοπίζονται σε ένα ερευνητικό, όσο και σε ένα νοσοκομειακό εργαστήριο. Η βασική τεχνολογία για τους σημερινούς κυτταρομετρητές αναπτύχθηκε κυρίως τις δεκαετίες '50 και '60, σε πολλά μέτωπα ταυτοχρόνως. Καινοτομίες στο χώρο της διάταξης φωτεινών πηγών, των laser και των υδραυλικών συστημάτων συντέλεσαν στην κατασκευή του πρώτου μοντέρνου κυτταρομετρητή ροής από τον van Dilla το 1969.

Βασικός σκοπός του μετρητή είναι η καταμέτρηση και αναγνώριση κυττάρων ή σωματιδίων σε ένα εναιώρημα. Ο σκοπός αυτός επιτυγχάνεται οδηγώντας τα κύτταρα σε μονήρη διάταξη στη πορεία ακτινοβολιών laser, εκμεταλλευόμενος το φαινόμενο της νοηματικής ροής. Η αλληλεπίδραση των ακτινοβολιών laser με την επιφάνεια των κυττάρων μετριέται μέσω φωτοανιχνευτών και αναλύεται από το ηλεκτρονικό σύστημα ώστε να παραχθούν δεδομένα που απεικονίζουν χαρακτηριστικά των κυττάρων, όπως είναι το μέγεθος και η κοκκίωση αυτών. Επιπλέον δεδομένα μπορούν να ληφθούν με την χρήση φθοριοχρωμάτων, σφαιριδίων latex, καθώς και μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Η μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιείται για διάφορους τύπους αναλύσεων, όπως ποσοτική και ποιοτική ανάλυση ανοσοφθορισμού, όπου αξιολογείται η ύπαρξη και η ποσότητα αντιγόνου ή/και DNA ανάλυση που αξιολογεί το γενετικό περιεχόμενο κυττάρων. Η ευελιξία της μεθοδολογίας και η ικανότητα της στοχευόμενης κυτταρικής αξιολόγησης πολλαπλών παραμέτρων που προσφέρει στο ερευνητικό προσωπικό, τοποθετεί τον κυτταρομετρητή ροής ανάμεσα στα πιο χρήσιμα εργαλεία ενός αιματολογικού ή/και ανοσολογικού κλινικού εργαστηρίου.

Ο κυτταρομετρητής ροής συμβάλει στην μελέτη και διάγνωση πληθώρας ιατρικών ζητημάτων, όπως στην περίπτωση των νεοπλασιών. Η σύγχρονη διάγνωση και η κατάταξη των διαφορετικών περιπτώσεων αιματολογικής νεοπλασίας ανά περίπτωση, βάση των εργαστηριακών ευρημάτων στηρίζεται στα δεδομένα του κυτταρομετρητή ροής ώστε να παρέχει ολοκληρωμένες διαγνωστικές εικόνες σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες μεθόδους. Η μελέτη, η απομόνωση και η μεταμόσχευση αρχέγονων

αιμοποιητικών κυττάρων, καθώς και η παρακολούθηση της μετα-μεταμοσχευτικής περιόδου καθιστάται δυνατή μέσω της χρήσης της μεθοδολογίας, επιτρέποντας ακριβέστερες ιατρικές προβλέψεις για την πορεία αντίστοιχων περιπτώσεων. Η μεθοδολογία βρίσκει εφαρμογή και στην παρακολούθηση διαταραχών μεμονωμένων αιματολογικών κυτταρικών σειρών, όπως στην περίπτωση των αιμοπεταλίων.

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται και στη διερεύνηση αιτιών καθ' έξιν αποβολών, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει διπλοειδίες και γενετικές μεταλλαγές στα προϊόντα της σύλληψης, που μπορεί να οδήγησαν στην αποβολή του εμβρύου. Επίσης, χρησιμοποιείται και στην παρακολούθηση ασθενών που πάσχουν από AIDS. Σύνδρομο που προκαλείται από μόλυνση με τον ιό HIV, το AIDS οδηγεί σε ανοσοανεπάρκεια, με αποτέλεσμα ο ασθενής να προσβάλλεται και να υποκύπτει σε ευκαιριακές λοιμώξεις. Ο ιός δεν εξαλείφεται από τον οργανισμό, αλλά παραμένει έστω και σε μικρή συγκέντρωση καθ' όλη την διάρκεια της ζωής του ασθενή. Υπάρχουν θεραπείες στη μορφή αντί-RNA φαρμάκων, των οποίων η αποτελεσματικότητα πρέπει να μετριέται και η πορεία της ασθένειας να παρακολουθείται. Ο κυτταρομετρητής ροής επιτρέπει την καταμέτρηση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων, γνωστά και ως βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά είναι αυτά που προσβάλλονται και καταστρέφονται από τον ιό HIV, άρα και η παρακολούθηση της συγκέντρωσής των κυττάρων αυτών δίνει μια πολύ καλή εικόνα της δραστηριότητας του ιού, αλλά και την πιθανότητα ευκαιριακής λοίμωξης, καθιστώντας την μέτρησή τους τεράστιας σημασίας για την παρακολούθηση της ασθένειας σε συνδυασμό με το ιικό φορτίο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

1.1. Ιστορική αναδρομή

Από τον 17^ο αιώνα γίνεται μελέτη και μέτρηση κυττάρων με την χρήση των πρώιμων μοντέλων του οπτικού μικροσκοπίου. Η επιστήμη της μικροσκόπησης και το μικροσκόπιο αναπτύσσονται μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα με αργούς ρυθμούς, όπου γίνεται η πρώτη χρήση χρώσεων για την καλύτερη μελέτη συγκεκριμένων κυτταρικών συνόλων. Ως φυσική εξέλιξη αυτού, στα μέσα του ίδιου αιώνα εμφανίζεται και η χρήση φθορισμού σε συνδυασμό με την νέα τεχνολογία μονοκλωνικών αντισωμάτων. [1]

Παράλληλα, από το 1930, οι πρώτες ιδέες για ένα σύστημα καταμέτρησης βασισμένο πάνω σε μια συνεχή ροή διατυπώνονται από τον Andrew Moldavan, ο οποίος πρότεινε ένα σύστημα που περιλάμβανε την συνεχή ροή εναιωρήματος κυττάρων υπό πίεση, με παρουσία ενός φωτοηλεκτρικού συστήματος καταμέτρησης προσαρτημένο σε ένα μικροσκόπιο. [2]

Μέσα στη δεκαετία του '60, ο Kamentsky με τον Melamed ανέπτυξαν μια συσκευή η οποία μετράει την απορρόφηση και τον σκεδασμό φωτός από κύτταρα ενός εναιωρήματος, την οποία βελτιστοποιούν με την προσθήκη της ικανότητας μονιμοποίησης και συλλογής συγκεκριμένων κυττάρων προς μελέτη. [3] Το '69, οι Ditrach και Goehde αναπτύσσουν μια διάταξη που επιτρέπει τη δημιουργία ιστογραμμάτων έντασης φθορισμού. [4]

Παράλληλα με τις προαναφερθείσες εξελίξεις, ο Coulter εισάγει το '50 τον μετρητή Coulter, ένα μηχάνημα υψηλής τεχνολογικής σημασίας για κάθε αιματολογικό εργαστήριο. Το μηχάνημα αυτό επιτρέπει την ακριβή μέτρηση κυττάρων του αίματος με βάση το πόσο αλλάζει κάθε κύτταρο την ηλεκτρική αντίσταση ενός ισοτονικού διαλύματος, καθώς περνάει από αυτό σε γραμμική διάταξη με τη χρήση ροής. [5]

Την ίδια περίοδο, ο Fulwyler, έψαχνε μια μέθοδο διαχωρισμού συγκεκριμένων κυττάρων, τα οποία έδιναν ύποπτες μετρήσεις σε μετρητή Coulter. Για να το πετύχει, χρησιμοποίησε τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν από τον R.G. Sweet για εκτυπωτές ink jet. Συγκεκριμένα, η τεχνολογία επέτρεπε την ελεγχόμενη διακοπή μιας συνεχούς ροής

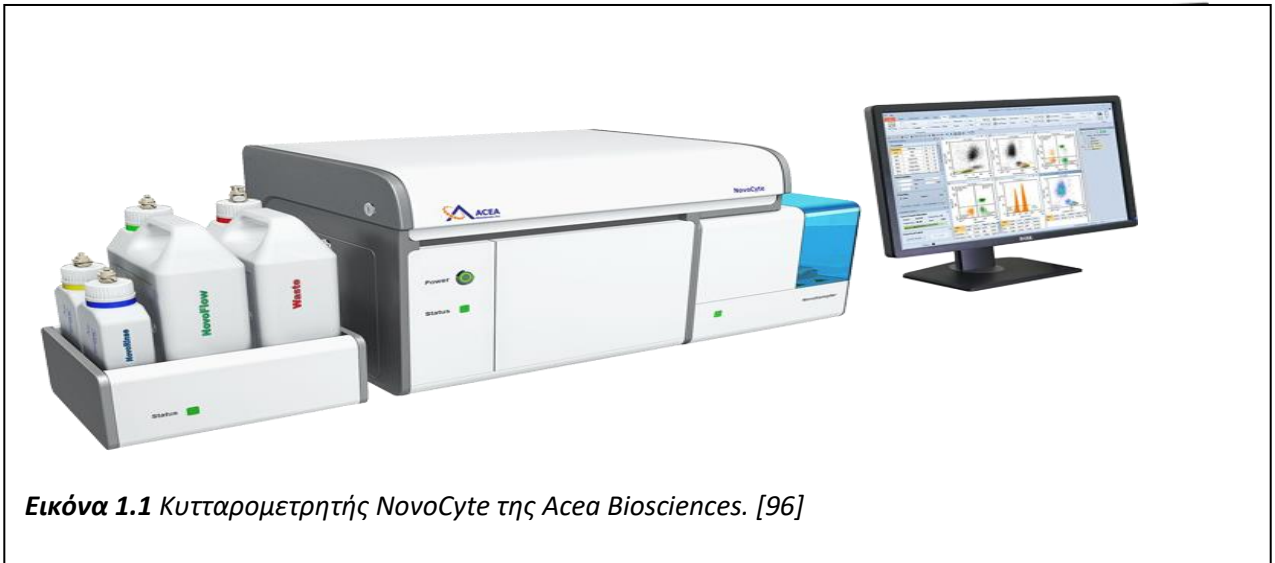
υγρού σε σταγόνες επιθυμητού μεγέθους. Συνδυάζοντας την τεχνολογία αυτή με τους μετρητές Coulter, δημιούργησε τον πρώτο κυτταροδιαχωριστή. [6]

Το 1953 οι Crosland και Taylor εισάγουν την αρχή της νηματικής ροής στο προσκήνιο των συστημάτων ροής, λύνοντας το πρόβλημα πολλών ερευνητών στην επιλογή σωληναρίου σωστής διαμέτρου και σωστού δείκτη διάθλασης. [7]

Το 1969, ο Marvin van Dilla κατασκευάζει τον πρώτο μοντέρνο κυτταρομετρητή, ο οποίος εκμεταλλεύεται τις αρχές της υδροδυναμικής εστίασης, είχε ως πηγή φωτός λέιζερ αργού και την διάταξη που χρησιμοποιείται έως σήμερα. Η επαναστατική για την εποχή διάταξη υποστήριζε όλες τις τεχνολογικές εξελίξεις των Kamensky και Fulwyler. Στη διάταξη προστέθηκε αργότερα και η τεχνολογία πολυπαραμετρικής ανάλυσης φθορισμού. [8]

Στα επόμενα χρόνια, το σύστημα συνέχισε να εξελίσσεται ως προς την ευαισθησία και την ευχρηστία του, οδηγώντας στα σημερινά εμπορικά μοντέλα, τα οποία συναντώνται όλο και περισσότερο σε αιματολογικά και ανοσολογικά εργαστήρια νοσοκομείων. [1]

1.2 Αρχή μεθόδου κυτταρομετρίας ροής



Εικόνα 1.1 Κυτταρομετρητής NovoCyte της Acea Biosciences. [96]

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια ποσοτική διαδικασία μέτρησης των χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Η βασική αρχή λειτουργίας των κυτταρομετρητών περιλαμβάνει μία σταθερή ροή εναιωρήματος κυττάρων σε γραμμική διάταξη, τα οποία περνώντας από μια φωτεινή δέσμη υφίστανται ανάλυση των χαρακτηριστικών τους, μελετώντας την αλληλεπίδραση του φωτός και του κυττάρου. Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί βασικό εργαλείο στο ερευνητικό και ιατρικό εργαστήριο. [9]

Οι βασικές αρχές του κυτταρομετρητή ροής έχουν αλλάξει ελάχιστα τα τελευταία χρόνια. Σκοπός του είναι η ανάλυση και καταμέτρηση σωματιδίων και κυττάρων σε μορφή εναιωρήματος, καθώς ρέουν μπροστά από σταθερές πηγές λέιζερ. [10] Τα σωματίδια αυτά μπορεί να είναι χρωμοσώματα ή μόρια ή πρωτεΐνες ή σφαιρίδια latex. [1] Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά μετρώντας την σκέδαση του φωτός αφού προσπέσει στο σωματίδιο, με σκοπό την μέτρηση του μεγέθους και κοκκίωσης του, και στη συνέχεια μετρώντας κάποιο σήμα φθορισμού, εάν έχει προηγηθεί επώαση με φθορίζουσες ουσίες. [11]

1.3 Οργανολογία κυτταρομετρητή ροής

Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία βασικά συστήματα. Αρχικά, το υδραυλικό σύστημα μεταφέρει το δείγμα ενώπιον του οπτικού συστήματος, όπου μία φωτεινή ακτίνα λέιζερ προσπίπτει στα κύτταρα. Ο τρόπος διάθλασης, απορρόφησης και αλλοίωσης από κάθε κύτταρο του δείγματος, αναλύεται και μετράται από το ηλεκτρονικό σύστημα. [11]

1.3.1 Υδραυλικό σύστημα

Ο ρόλος του υδραυλικού συστήματος στον κυτταρομετρητή ροής είναι να μεταφέρει το δείγμα μέσα στο σύστημα, από το δοχείο του μπροστά από το λέιζερ και τους φωτοανιχνευτές, με ακρίβεια και σταθερή ροή. Αυτό το επιτυγχάνει εκμεταλευόμενο τις αρχές της υδροδυναμικής εστίασης. Το υδραυλικό σύστημα εισάγει τη ροή του δείγματος στο κέντρο ενός γρηγορότερου ρεύματος υγρού, που κινείται με ίδια κατεύθυνση και ονομάζεται περιρρέον υγρό. Το υγρό αυτό είναι ένα ισότονο διάλυμα, το οποίο έχει ίδιο δείκτη διάθλασης με το δείγμα και το σωληνάριο. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η σταθερή και με μικρή διάμετρο ροή του δείγματος, στον πυρήνα της ροής του περιρρέοντος υγρού, αναγκάζοντας έτσι τα κύτταρα και τα σωματίδια του δείγματος να περνάνε σε γραμμική διάταξη (ένα-ένα) και με σταθερή ταχύτητα μπροστά από το λέιζερ και τους φωτοανιχνευτές. [1]

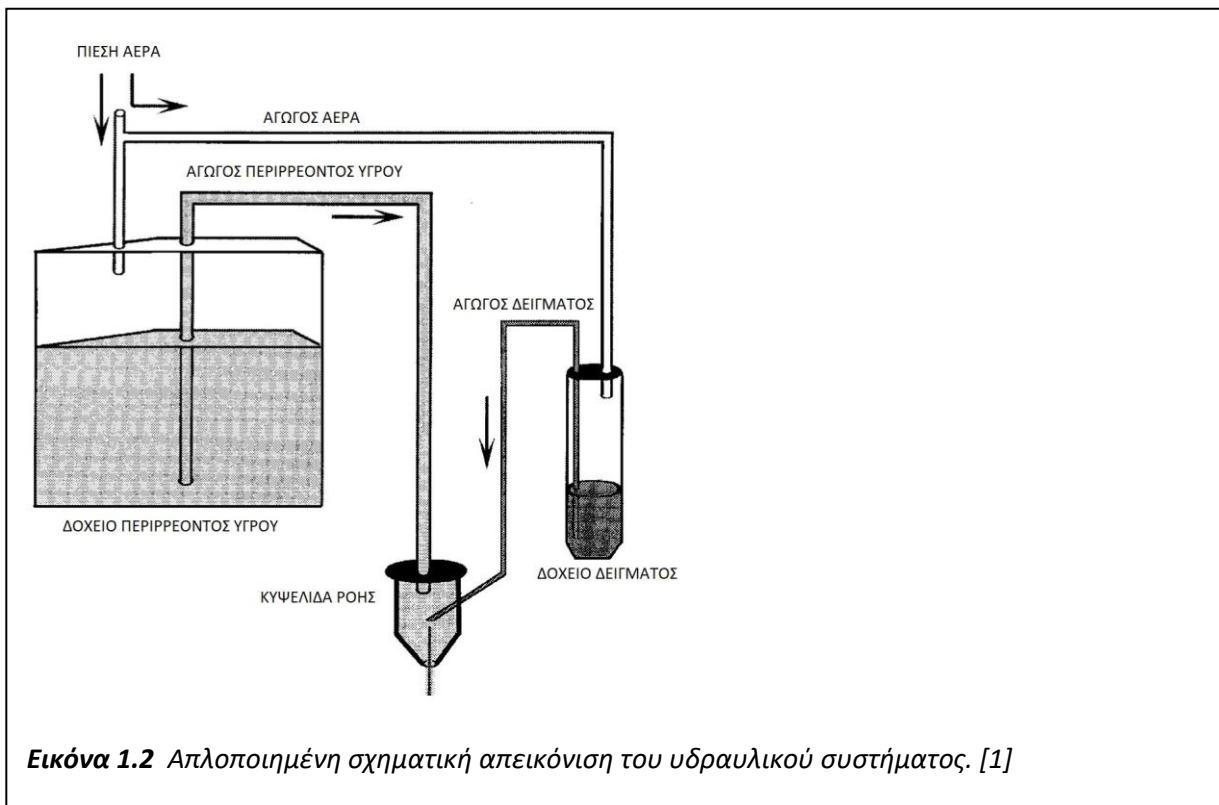
Τα υδραυλικά συστήματα στους κυτταρομετρητές ροής λειτουργούν με τρεις κύριους μηχανισμούς. Οι περισσότεροι έως σήμερα κυτταρομετρητές χρησιμοποιούν αντλίες αέρα για να δημιουργήσουν διαφορά πίεσης ανάμεσα στο εσωτερικό των δοχείων του δείγματος και περιρρέοντος υγρού, και του υπόλοιπου συστήματος. Αυτό αναγκάζει τα υγρά να προχωρήσουν στα σωληνάκια του συστήματος με έναν σταθερό ρυθμό. Κύριο μειονέκτημα του μηχανισμού αυτού είναι ότι δεν υπάρχει σταθερότητα και ακριβής έλεγχος της πίεσης που δημιουργεί το σύστημα αυτό, με αποτέλεσμα να μην γνωρίζει ο χειριστής την ακριβή ποσότητα δείγματος που μετράει το μηχάνημα. [12]

Οι άλλοι δύο μηχανισμοί λειτουργούν με περισταλτικές ή/και συριγγοειδείς αντλίες, ωθώντας τα υγρά (δείγμα και περιρρέον υγρό) άμεσα, χωρίς να δημιουργούν κάποια διαφορά πίεσης με τον αέρα μέσα στο σύστημα. Αυτό επιτρέπει καλύτερο έλεγχο του

όγκου του δείγματος που θα μετρηθεί, με το μειονέκτημα ότι ενδεχομένως η ροή που δημιουργούν, να προκαλέσει φθορά στους αγωγούς και πιθανές ανακρίβειες στις μετρήσεις, εφιστώντας μεγαλύτερη προσοχή από τον χειριστή. [12]

Η όλη διαδικασία ξεκινάει στα δοχεία του περιρρέοντος υγρού και του δείγματος, όπου ο κυτταρομετρητής, χρησιμοποιώντας μία από τις προαναφερόμενες μεθόδους ώθησης, αναρροφεί μια ποσότητα δείγματος και περιρρέοντος υγρού, προωθώντας την σε φίλτρα, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπάρχει κάποια επιμόλυνση, ή κάποιο σωματίδιο μεγάλου μεγέθους, που μπορεί να φράξει τους αγωγούς, ή να παρεμποδίσει την δημιουργία σωστής νηματικής ροής. [1]

Στη συνέχεια, εισάγεται στην κυψελίδα ροής το ρεύμα του δείγματος στο ρεύμα του περιρρέοντος υγρού, όπου δημιουργείται η νηματική ροή. Ακολούθως, το ρεύμα περνάει μπροστά από τη διάταξη λέιζερ και ανιχνευτών του οπτικού συστήματος. [9] Η μέθοδος με την οποία πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση του λέιζερ με το δείγμα διαφέρει από κυτταρομετρητή σε κυτταρομετρητή. Σε κάποια μηχανήματα, ένα ακροφύσιο εκπέμπει το ρεύμα στον αέρα μπροστά από το λέιζερ, ενώ σε άλλα περνάει από ένα διαφανές τμήμα της κυψελίδας ροής. Υπάρχουν και μηχανήματα στα οποία το ρεύμα εκπέμπεται με κλίση πάνω σε μια γυάλινη επιφάνεια, κάτω από την οποία βρίσκεται η πηγή λέιζερ. Τέλος, το μείγμα δείγματος και περιρρέοντος υγρού καταλήγει στο δοχείο λυμάτων, όπου μπορεί με ασφάλεια να απορριφθεί από τον χειριστή. [10],[1]



1.3.2 Οπτικό σύστημα

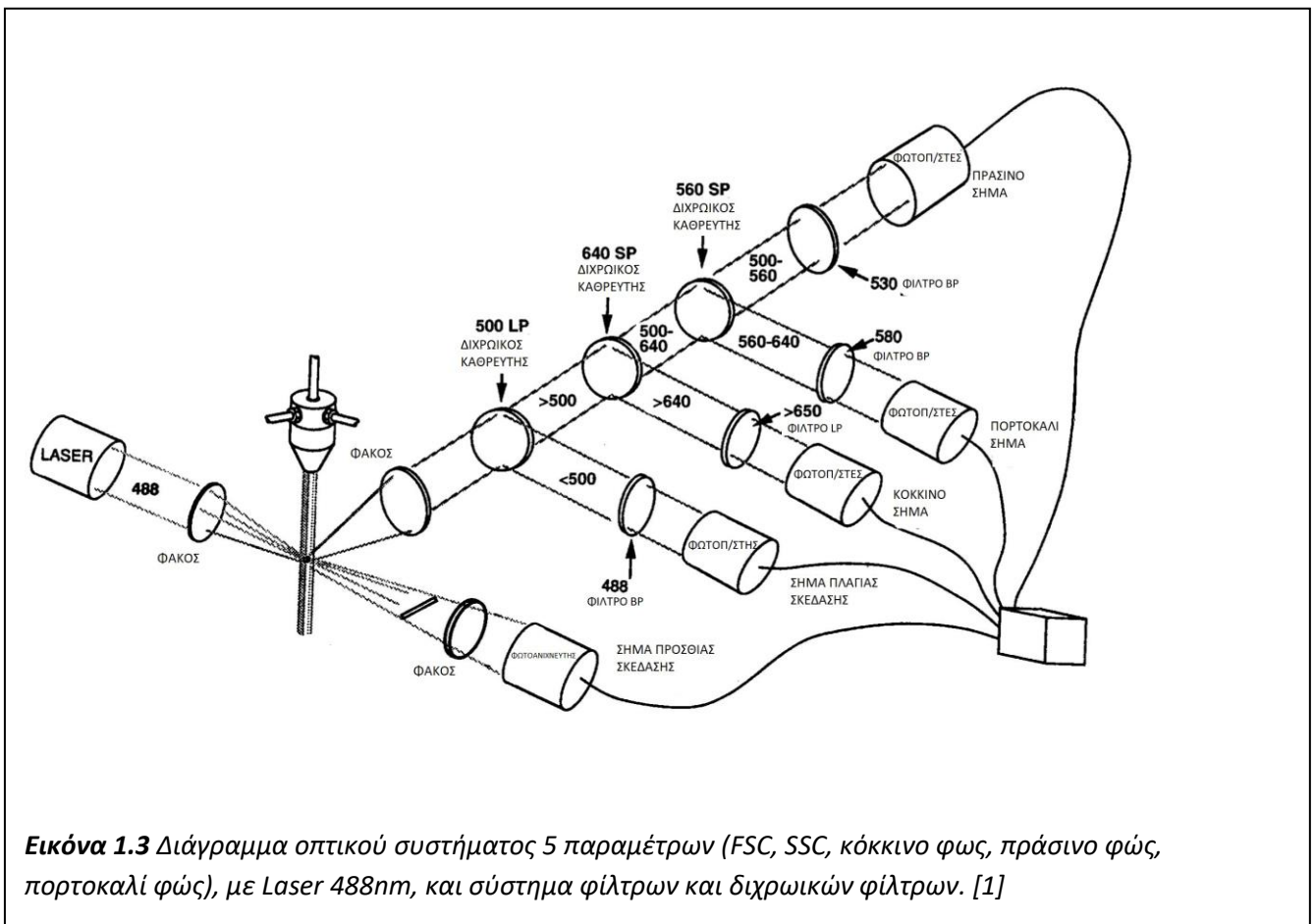
Το οπτικό σύστημα αποτελείται από το σύνολο των συστημάτων παραγωγής, ανίχνευσης και μέτρησης φωτός. Βασικό χαρακτηριστικό της διάταξης των οπτικών συστημάτων πρέπει να αποτελεί η σταθερότητα ως προς τα κύτταρα-στόχους, καθώς έστω και μικροσκοπικές αλλαγές σε αυτήν την δομή μπορούν να αλλοιώσουν τις μετρήσεις. [1]

Τα μέρη που αποτελούν μια τυπική διάταξη οπτικού συστήματος ενός κυτταρομετρητή ροής περιλαμβάνουν βασικά μια φωτεινή πηγή (λέιζερ). Οι πρώτες γενιές κυτταρομετρητών, δεν προσέφεραν πολλές επιλογές όσον αφορά τις πηγές φωτός, καθώς τα μοντέλα που υπήρχαν στην αγορά ήταν εξοπλισμένα με λέιζερ αργού, το οποίο εκπέμπει 10-25 mwatt στα 488 nm. Διάφορες άλλες συσκευές χρησιμοποιούσαν λέιζερ ηλίου-νέον (he-ne), λέιζερ ηλίου-κάδμιου (he-cd), λέιζερ χρώσης (dye lasers), καθώς και λέιζερ στερεάς κατάστασης (solid state), με τα δύο τελευταία είδη να είναι ιδιαίτερα δημοφιλή στα σύγχρονα μοντέλα αναλυτών, λόγω των διαφορών τους και της ευχρηστίας τους. [13]

Τα μέρη του οπτικού συστήματος που ενισχύουν ή απορροφούν μια φωτεινή ακτίνα ονομάζονται φωτοπολλαπλασιαστές (Photomultiplier Tubes, PMT) και φωτοανιχνευτές, ενώ έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το φωτεινό σήμα που δέχονται σε ηλεκτρικό. Συγκεκριμένα, οι φωτοπολλαπλασιαστές διαθέτουν την δυνατότητα να συλλαμβάνουν πολύ ασθενείς ακτινοβολίες και να τις ενισχύουν, έτσι ώστε να παρέχουν στο ηλεκτρονικό σύστημα του κυτταρομετρητή ένα μετρήσιμο και αξιοποιήσιμο πακέτο δεδομένων. Με την χρήση φίλτρων (υάλινοι φακοί συγκεκριμένου χρώματος που επιτρέπουν την έλευση μόνο ακτινοβολιών ίδιου χρώματος) καταγράφεται ηλεκτρικό σήμα μόνο όταν παραχθεί φως ίδιου φάσματος. Όσο περισσότεροι φωτοπολλαπλασιαστές χρησιμοποιούνται σε μια διάταξη, τόσες περισσότερες παραμέτρους μπορούν να συμπεριληφθούν στην ανάλυση δεδομένων (πολυπαραμετρική ανάλυση). [14]

Το σημείο στο οποίο η ακτίνα της φωτεινής πηγής τέμνεται με την νηματική ροή, ονομάζεται σημείο ανάλυσης. Σε αυτό το σημείο, η τοποθέτηση της φωτεινής πηγής πρέπει να προσπίπτει έτσι ώστε ο πυρήνας της ροής (μεμονωμένα κύτταρα) να φωτίζεται ομοιόμορφα. Η ακτίνα λέιζερ προσπίπτει στο μεμονωμένο κύτταρο και υφίσταται σκεδασμό ανάλογα με κάποια χαρακτηριστικά του κυττάρου. Ακριβώς αντιδιαμετρικά της πηγής λέιζερ βρίσκεται φωτοανιχνευτής που ανιχνεύει της ακτίνες που έχουν υποστεί σκεδασμό λόγω του εμβαδού της τομής του κυττάρου και του δείκτη διάθλασης. Η διάθλαση αυτή λέγεται πρόσθιος σκεδασμός (forward scatter, FSC). Σε γωνία 90 μοιρών από το σημείο ανάλυσης, βρίσκονται ανιχνευτές και φωτοπολλαπλασιαστές που ο ρόλος τους είναι να ανιχνεύσουν ακτινοβολίες που έχουν υποστεί σκέδαση λόγω της κοκκίωσης και της επιφάνειας του κυττάρου, οι οποίες αποτελούν τον πλάγιο σκεδασμό (side scatter, SSC). Σε περίπτωση που έχει προηγηθεί επώαση των κυττάρων με φθορίζουσες ουσίες ή/και φθορίζοντα αντισώματα, η ακτινοβολία λέιζερ προκαλεί διέγερση της φθορίζουσας ουσίας και εκπομπή σημάτων. Οι διαφορετικές χρωστικές που χρησιμοποιούνται, έχουν κοινό φάσμα διέγερσης (διεγείρονται από μία μόνο ακτίνα λέιζερ), αλλά εκπέμπουν σε διαφορετικά μήκη κύματος (διαφορετικό φάσμα εκπομπής). Οι ακτινοβολίες αυτές πρέπει να ανιχνεύονται από συγκεκριμένους για κάθε φθορίζον χρώση φωτοπολλαπλασιαστές, ώστε να γίνεται πιο ακριβή μέτρηση, οι οποίοι και βρίσκονται σε γωνία σε σχέση με τη πορεία της ακτίνας. Χρησιμοποιούνται ειδικά φίλτρα

για να κατευθυνθεί η επιθημητή ακτινοβολία σε κάθε PMT. Αρχικά, χρησιμοποιούνται διχρωικά φίλτρα (dichroic mirrors) σε 45 μοίρες κλίση προς την ακτίνα του φωτός, καθρέπτες επικαλυμμένοι με λεπτά στρώματα μετάλλων, με αποτέλεσμα να αφήνουν μόνο ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο ή μικρότερο από μία συγκεκριμένη τιμή. Η υπόλοιπη ακτινοβολία αντανακλάται με 90 μοίρες γωνία, προς τον κάθε PMT. Τα διχρωικά φίλτρα ονομάζονται ευρέως περάσματος (Long Pass, LP) όταν επιτρέπουν φως πάνω από μια τιμή μήκους κύματος να περάσει, και σύντομου περάσματος (Short Pass, SP) όταν αφήνει φως με μικρότερο μήκος κύματος από την τιμή του να περάσει. Για παράδειγμα, ένα διχρωικό φίλτρο 500 LP, αντανακλάει όλο το φως με μήκος κύματος κάτω από 500nm, και αφήνει να περάσει το υπόλοιπο φως. Στη συνέχεια, υπάρχουν κανονικά φίλτρα ακριβώς πριν από κάθε PMT, που φιλτράρουν μια τελευταία φορά το φως. Αυτά βρίσκονται κάθετα στην ακτίνα, και είναι όμοια με τα διχρωικά, στο ότι υπάρχουν LP και SP αντίστοιχα, με ίδια ακριβώς λειτουργία το καθένα. Εδώ όμως υπάρχουν και τα φίλτρα ορισμένου περάσματος (Band Pass, BP), τα οποία επιτρέπουν φως σε ένα περιορισμένο εύρος μήκους κύματος να διέλθει. Για παράδειγμα, ένα φίλτρο 500/30nm, επιτρέπει φως με μήκος κύματος από 485nm με 515nm να περάσει, δηλαδή το εύρος έχει πλάτος 30nm. Με τη χρήση των δύο αυτών φίλτρων, επιτυγχάνεται ακριβή μέτρηση συγκεκριμένων ακτινοβολιών από συγκεκριμένους PMT. [1]



Εικόνα 1.3 Διάγραμμα οπτικού συστήματος 5 παραμέτρων (FSC, SSC, κόκκινο φως, πράσινο φως, πορτοκαλί φως), με Laser 488nm, και σύστημα φίλτρων και διχρωικών φίλτρων. [1]

1.3.3 Ηλεκτρονικό σύστημα

Το ηλεκτρονικό σύστημα αποτελείται από τους φωτοανιχνευτές, τους φωτοπολλαπλασιαστές, τους ενισχυτές, τους επεξεργαστές (μετατροπείς) σήματος και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αρχικά, οι φωτοανιχνευτές και οι φωτοπολλαπλασιαστές μετατρέπουν το φωτεινό σήμα που δέχονται σε ηλεκτρονικό σήμα (ηλεκτρικό ρεύμα), το οποίο στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται από τους ενισχυτές. Οι επεξεργαστές σήματος μεταφράζουν ενισχυμένο το ηλεκτρονικό σήμα σε ψηφιακά δεδομένα που αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη αριθμητική τιμή και το στέλνουν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. [10]

Έτσι, στον ηλεκτρονικό υπολογιστή δημιουργείται μια βάση δεδομένων που περιλαμβάνει πληροφορίες για κάθε ένα κύτταρο ξεχωριστά δίνοντας στον χειριστή την δυνατότητα να επιλέξει το είδος της ανάλυσης που επιθυμεί και τον τρόπο απεικόνισης των δεδομένων που προκύπτουν. Συγκεκριμένα, ο ηλεκτρονικός υπολογιστής ενός κυτταρομετρητή ροής δίνει μια πληθώρα επιλογών στον χειριστή, ως προς την ανάλυση και την απεικόνιση των αποτελεσμάτων που λαμβάνει. Το είδος της ανάλυσης αυτής μπορεί να είναι σειριακή ή λογαριθμική, κάτι το οποίο εξαρτάται από τις δυνατότητες και το είδος των ενισχυτών. [1]

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι φωτοπολλαπλασιαστές δέχονται φωτεινά σήματα και τα μετατρέπουν σε ηλεκτρικά, με ισχύ ανάλογη της έντασης του αρχικού. Όμως, έχουν και αρκετές επιλογές ενίσχυσης του σήματος αυτού σύμφωνα με την κατασκευή του κάθε πολλαπλασιαστή. Αρχικά, η τάση που χορηγείται σε έναν φωτοπολλαπλασιαστή μπορεί να καθοριστεί από τον χειριστή δίνοντας του έλεγχο ως προς την ευαισθησία των φωτοπολλαπλασιαστών. Με αυτόν τον τρόπο, όσο πιο μεγάλη τάση δίνεται τόσο μεγαλύτερος και ο αριθμός των ηλεκτρονίων που παράγονται ανά φωτόνιο. Επιπλέον, το σύστημα μπορεί μόνο του να ενισχύσει το ηλεκτρικό σήμα, κατόπιν της μετατροπής από τον ανιχνευτή. [1]

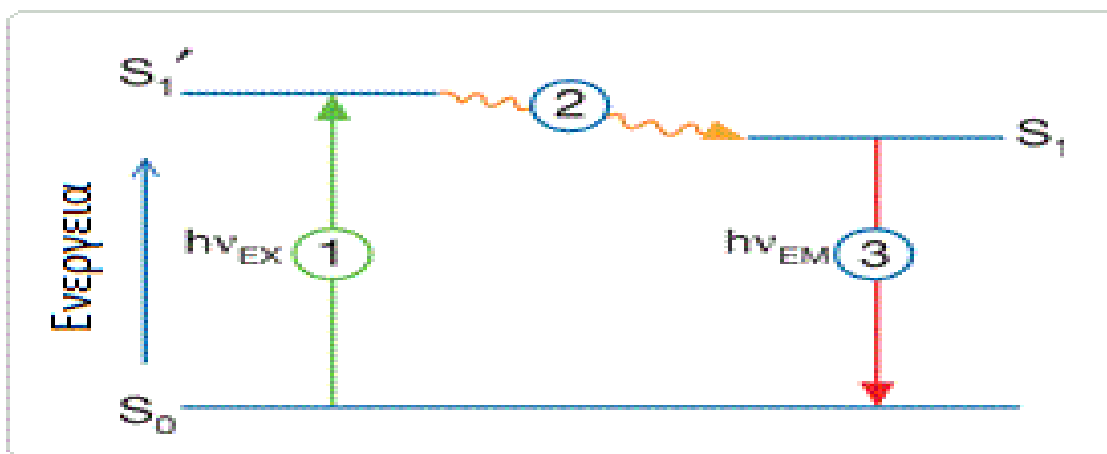
Δίνεται επιπλέον στον χρήστη η δυνατότητα να δώσει εντολή στο σύστημα να αγνοήσει κάποια φωτεινά σήματα που μπορεί να είναι πολύ χαμηλά και να οφείλονται σε σκόνη ή άλλα σωματίδια. Αυτή η εντολή ονομάζεται κατώφλι (threshold). Κατώφλι μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σε οποιονδήποτε φωτοανιχνευτή, αλλά όσον αφορά στα νοσοκομειακά εργαστήρια θα εφαρμοσθεί κυρίως στον ανιχνευτή πρόσθιου σκεδασμού. [10]

1.4 Φθορισμός

Τα μόρια συγκεκριμένων ουσιών, που ονομάζονται φθοριοχρώματα, έχουν την ικανότητα να απορροφήσουν την ενέργεια ακτινοβολίας που προσκρούει πάνω τους και να διεγείρονται. Στη διεγερμένη αυτή κατάσταση τα ηλεκτρόνια του μορίου βρίσκονται σε μια ανωτέρα ενεργειακή κατάσταση. Όταν τα ηλεκτρόνια επιστρέψουν στη θεμελιώδη τους ενεργειακή κατάσταση, εκπέμπουν την ενέργεια που απορρόφησαν ως φωτόνια, προκαλώντας το γνωστό φαινόμενο ως φθορισμό.

Παρατηρούνται τρεις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο φαινόμενο: η διέγερση (excitation), η δονητική επαναφορά (vibrational relaxation), και η εκπομπή (emission). Σε ένα μόριο, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται στην θεμελιώδη ενεργειακή τους κατάσταση (ground state) S_0 . Όταν προσκρούσει πάνω ακτινοβολία, τα μόρια απορροφούν τα φωτόνια και τα ηλεκτρόνια μεταπηδούν σε μια ανώτερη ενεργειακή κατάσταση, την διεγερμένη (excited state) S_1 , στην οποία έχουν και μεγαλύτερη απόσταση από τον πυρήνα του μορίου. Στην διεγερμένη κατάσταση το μόριο θα παραμείνει περίπου 10^{-8} δευτερόλεπτα. Στην διάρκεια αυτή τα ηλεκτρόνια χάνουν ενέργεια μέσω δονητικής επαναφοράς. Η ενέργεια χάνεται σε μορφή θερμότητας, μέσω σύγκρουσης του μορίου με άλλα μόρια στο περιβάλλον του. Η ενέργεια που χάνεται δεν επαρκεί να πέσει το ηλεκτρόνιο στην θεμελιώδη του κατάσταση, απλά πλησιάζει στον πυρήνα, στην απλή, χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Τελικά, το ηλεκτρόνιο εκπέμπει το υπόλοιπο της ενέργειας που έχει απορροφήσει ως φωτόνια, επιστρέφοντας στην θεμελιώδη ενεργειακή του κατάσταση. Λόγω της ενέργειας που χάθηκε στην διεγερμένη κατάσταση του μορίου, η ακτινοβολία που εκπέμπεται είναι χαμηλότερης ενέργειας και μεγαλύτερου μήκους κύματος από την απορροφούμενη, άρα και άλλου χρώματος. Η εκπομπή αυτή κρατάει 10^{-9} με 10^{-7} δευτερόλεπτα. [15]



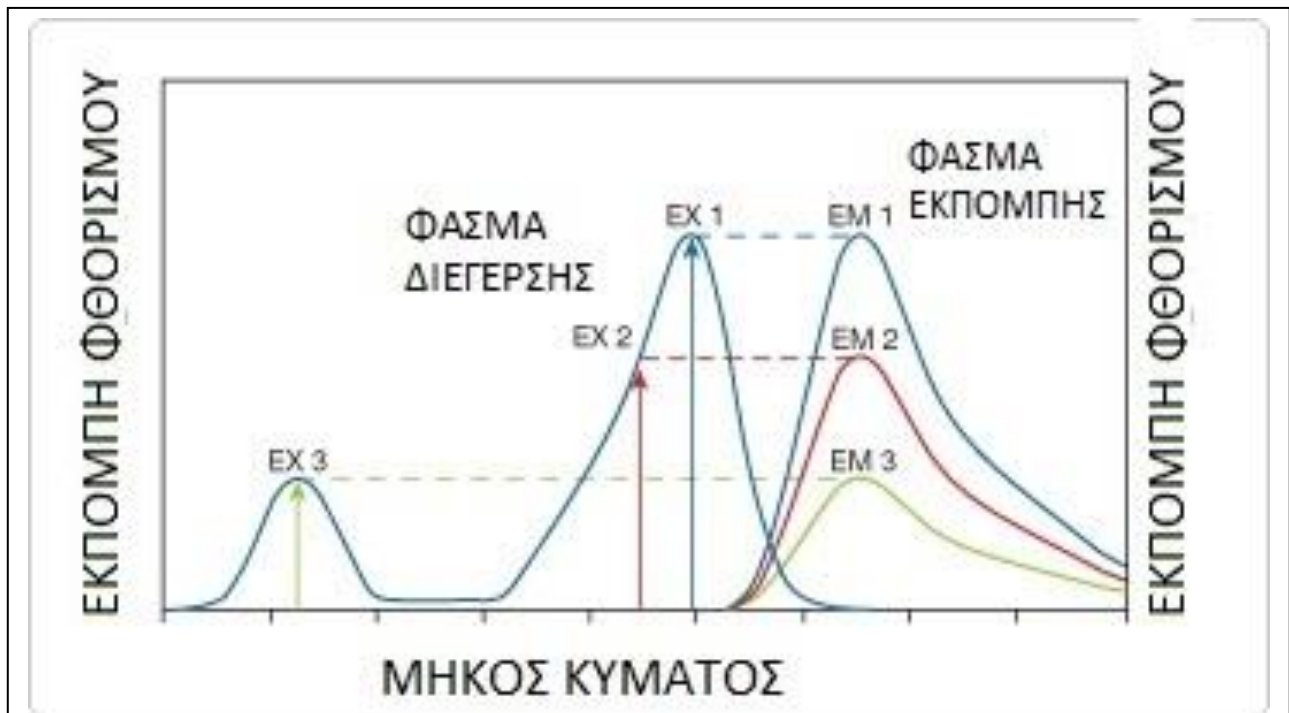
Εικόνα 1.4 Οι τρεις διαδικασίες του φθορισμού: 1. Απορρόφηση ενέργειας και διέγερση, 2. Δονητική επαναφορά, 3. Επιστροφή στη θεμελιώδη κατάσταση μέσω εκπομπής ενέργειας. [16]

1.4.1 Κριτήρια επιλογής φθοριοχρώματος

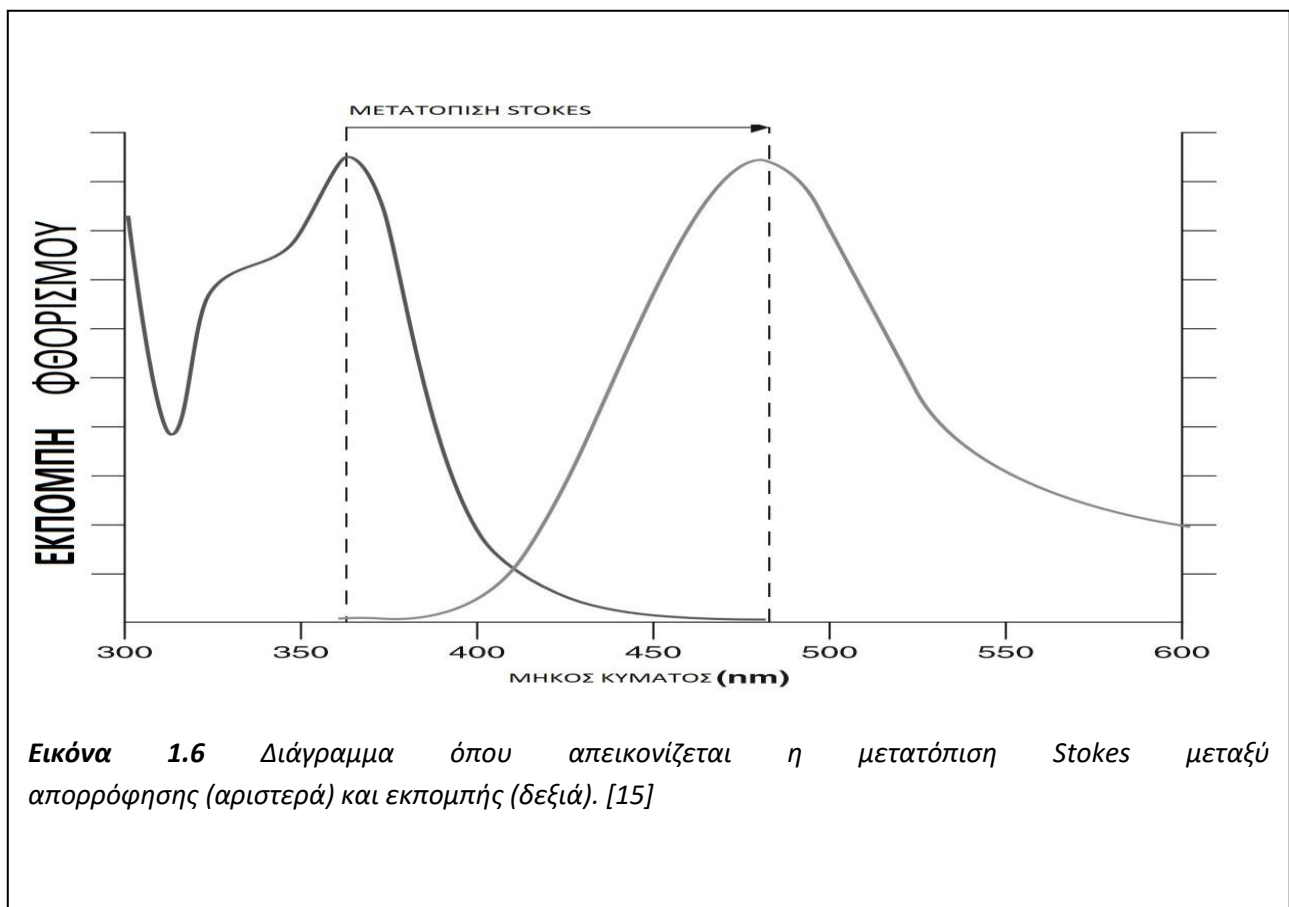
Κάθε φθοριόχρωμα έχει πολλά χαρακτηριστικά που διαφέρουν. Στην κυτταρομετρία, ο χειριστής θα κοιτάξει τρία από αυτά τα χαρακτηριστικά αυτά για την επιλογή του κατάλληλου φθοριοχρώματος: το φάσμα απορρόφησης, την μετατόπιση Stokes, και το φάσμα εκπομπής.

Τα φθοριοχρώματα δεν μπορούν να απορροφήσουν οποιαδήποτε ακτινοβολία. Κάθε ένα απορροφά ακτινοβολίες με συγκεκριμένα μήκη κύματος. Τα μήκη αυτά ανήκουν στο φάσμα απορρόφησης του φθοριοχρώματος. Κατα την επιλογή φθοριοχρωμάτων για μια εξέταση, η γνώση του φάσματος απορρόφησης είναι σημαντική, λόγω του ότι οι κυτταρομετρικές χρησιμοποιούν πηγές λέιζερ ως πηγή ακτινοβολίας. Άρα οποιαδήποτε φθοριοχρώματα επιλεγθούν, θα πρέπει να έχουν φάσμα απορρόφησης στο οποίο περιλαμβάνεται το μήκος κύματος που εκπέμπει το λέιζερ. Κάθε φάσμα απορρόφησης έχει τιμές ανώτερης απορρόφησης (absorption maximum), δηλαδή μήκη κύματος όπου το μόριο θα απορροφήσει περισσότερη ενέργεια. Για παράδειγμα, η φυκοερυθρίνη (Phycoerythrin, PE), ένα από τα πιο συχνά και πολυχρησιμοποιούμενα φθοριοχρώματα, έχει φάσμα απορρόφησης 480-565nm, με ανώτατες τιμές απορρόφησης στα 496, 546 και 565nm. Παρόμοιο φάσμα παρατηρείται και στο φάσμα εκπομπής. Η ακτινοβολία που εκπέμπει το μόριο, δεν είναι ενός μήκους κύματος, αλλά καλύπτει ένα φάσμα, όπως

προαναφέρθηκε, με μεγαλύτερες τιμές από αυτές του φάσματος απορρόφησης, λόγω της ενέργειας που χάνεται στην διεγερμένη κατάσταση. Τα φθοριοχρώματα θα εκπέμψουν και σε ένα μήκος κύματος με μεγαλύτερη ένταση, η κορυφή εκπομπής (emission peak). Η φυκοερυθρίνη π.χ. έχει φάσμα εκπομπής στα 575-585 nm, και κορυφή εκπομπής στα 578 nm. Να σημειωθεί ότι το τι μήκος κύματος απορροφήσει το μόριο δεν επηρεάζει το μήκος κύματος στο οποίο θα εκπέμψει. Το φθοριόχρωμα εκπέμπει πάντα ακτινοβολία σε όλο το φάσμα εκπομπής του, οι τιμές ανώτερης απορρόφησης επηρεάζουν μόνο την ένταση του φωτός που εκπέμπεται, δηλαδή την ποσότητα των φωτονίων. Όσο πιο κοντά στην ανώτατη απορρόφηση τόσο μεγαλύτερη η ένταση του φωτός που εκπέμπεται. Μετατόπιση Stokes, ονομάζεται η διαφορά μεταξύ της ανώτερης απορρόφησης και της κορυφαίας εκπομπής. Σε μια εξέταση, τα φθοριοχρώματα που θα πρέπει να επιλεγθούν, εκτός του να έχουν όσο το δυνατόν ίδιο φάσμα απορρόφησης, θα πρέπει να έχουν διαφορετικές μετατοπίσεις Stokes, άρα και διαφορετικά φάσματα εκπομπής. Αυτό έχει σημασία ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί ο φθορισμός κάθε μορίου καθαρά και χωρίς αλληλεπικαλύψεις. Διαφορετικά δεν μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια η ένταση του φθορισμού κάθε μορίου. [16]



Εικόνα 1.5 Διάγραμμα όπου απεικονίζεται ότι στην περίπτωση διαφορετικών μηκών κύματος απορρόφησης ακτινοβολίας (EX 1, EX 2, EX 3), οι εκπεμπόμενες ακτινοβολίες (EM 1, EM 2, EM 3) έχουν όλες το ίδιο μήκος κύματος, αλλά διαφορετική ένταση της ακτινοβολίας. [16]



Εικόνα 1.6 Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η μετατόπιση Stokes μεταξύ απορρόφησης (αριστερά) και εκπομπής (δεξιά). [15]

Κατά την επιλογή φθοριοχρώματος θα πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένα στοιχεία. Αρχικά, τι θα μετρηθεί, π.χ. υπάρχουν χρώσεις που δεσμεύονται στοιχειομετρικά σε νουκλεϊκά οξέα, για ποσοτική μέτρηση και καθορισμός του κυτταρικού κύκλου. Θα επιλεχθούν τα φωτεινότερα φθοριοχρώματα που είναι κατάλληλα για τον κυτταρομετρητή (π.χ. η φυκοερυθρίνη). Σε πολυπαραμετρικές μετρήσεις, χρησιμοποιούνται τα φωτεινότερα φθοριοχρώματα για τις λιγότερο αναμενόμενες πρωτεΐνες και τα πιο αμυδρά φθοριοχρώματα για τις περισσότερο αναμενόμενες πρωτεΐνες. Επίσης, πρέπει οι χρησιμοποιούμενες χρώσεις να έχουν όσο το δυνατόν διαφορετικότερα φάσματα εκπομπής, ώστε να αποφευχθεί η αλληλοεπικάλυψη. Ο φθορισμός ορισμένων φθοριοχρωμάτων, όπως η φλουορεσκεΐνη (fluorescein, FITC), εξαρτάται από το pH, άρα θα πρέπει να αποφεύγονται όταν χρησιμοποιούνται διαλύματα με όξινο pH. [16, 20]

Διαθέσιμα υπάρχουν και τα συζευγμένα (tandem) φθοριοχρώματα. Αυτά είναι ζεύγη φθοριοχρωμάτων, όπου το ένα εκπέμπει ακτινοβολία που το άλλο μπορεί να απορροφήσει. Πιο συγκεκριμένα, το σύζευγμα ακτινοβολείται από φως με μήκος κύματος που ανήκει στο φάσμα απορρόφησης του ενός φθοριοχρώματος, άρα απορροφάται και το φθοριόχρωμα διεγείρεται. Αντί όμως να εκπέμπει την ενέργεια ως φως, την δίνει στο άλλο φθοριόχρωμα του συζεύγματος, εφόσον η ενέργεια έχει μειωθεί και μπορεί να την απορροφήσει με το μεγαλύτερο φάσμα απορρόφησης του (αφού μικρότερη ενέργεια σημαίνει μεγαλύτερο μήκος κύματος). Τελικά το δεύτερο φθοριόχρωμα εκπέμπει την ενέργεια ως φως στο δικό του φάσμα εκπομπής. Επομένως, είναι φανερό γιατί τα συζευγμένα φθοριοχρώματα έχουν μεγάλη και σημαντική χρήση σε πολυπαραμετρικές μετρήσεις, αφού έχουν πολύ μεγαλύτερες μετατοπίσεις Stokes. Όμως, απαιτείται προσοχή κατά την χρήση τους, διότι κατά την χρώση, επώαση και πλύση, υπάρχει κίνδυνος να αποδεσμευθεί το σύζευγμα. Γι' αυτό το λόγο, μια μέτρηση δείγματος ελέγχου χρειάζεται για να ανιχνευθεί αυτή η πιθανότητα. Για παράδειγμα, δείγμα στο οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σύζευγμα φυκοερυθρίνης- Texas Red (PE-Texas Red tandem), όπου απορροφά η φυκοερυθρίνη και εκπέμπει η Texas Red, θα αναλυθεί και ως προς το φάσμα εκπομπής της φυκοερυθρίνης, ώστε να ανιχνευθεί η πιθανότητα αποδέσμευσης του συζεύγματος. [1, 20]

Ως τελευταίο είδος φθοριοχρώματος θα πρέπει να αναφερθούν τα κβαντικά στίγματα (Quantum Dots, QD's). Τα QD's είναι μικροί ημιαγωγοί, συνήθως ανάμεσα σε 2nm με 20nm. Ως φθοριοχρώματα απορροφούν και εκπέμπουν ακτινοβολία, αλλά ο φθορισμός τους οφείλεται στη δημιουργία εξιτονίων (excitons), ζευγάρια ηλεκτρονίων που έχουν απορροφήσει ενέργεια και κυκλοφορούν ελεύθερα στη κρυσταλική δομή του QD, και ηλεκτρονιακών κενών (electron holes) [σημεία στις ηλεκτρονιακές τροχιές των ατόμων όπου πιθανολογικά θα έπρεπε να βρεθεί ηλεκτρόνιο αλλά είναι κενά] οδηγώντας σε θετικά φορτισμένο άτομο. Όταν ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο περάσει σε ένα ηλεκτρονιακό κενό, δεσμεύεται από το άτομο και εκπέμπει την παραπλήσια ενέργειά του ως φωτεινή ακτινοβολία. Τα QD's έχουν αρκετά θετικά στοιχεία. Έχουν όλα το ίδιο φάσμα απορρόφησης, άρα μπορούν πολλά QD's να διεγερθούν από την ίδια φωτεινή πηγή. Το φάσμα εκπομπής τους επηρεάζεται μόνο από το μέγεθος και το σχήμα τους, όχι από την χημική τους διάταξη ή από το pH τους όπως άλλα φθοριοχρώματα. Επίσης, τα φάσματα εκπομπής τους είναι πολύ στενά, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο αλληλοεπικάλυψης. Έχουν πολύ μεγάλη σταθερότητα, άρα φθορίζουν για πολύ μεγαλύτερη διάρκεια από άλλα φθοριοχρώματα, και διατηρούνται περισσότερο στην αποθήκευση. Φθορίζουν σε μεγαλύτερη ένταση από τα συνηθισμένα φθοριοχρώματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με αυτά χωρίς κάποιο πρόβλημα. Το μέγεθος τους όμως είναι πολύ μεγάλο για να διαπεράσουν την μεμβράνη των περισσότερων κυττάρων χωρίς να τους προκαλέσουν ζημία, γεγονός που τα αποκλείει ως ενδοκυττάρια φθοριοχρώματα. Άλλα μειονεκτήματα αυτών περιλαμβάνουν την υποψία μεταξύ επιστημόνων ότι μπορεί να είναι τοξικά ως προς τα υπό μελέτη κύτταρα, και το ότι ο μεγαλύτερος χρόνος εκπομπής τους μπορεί να μην είναι επιθυμητός σε κάποια πειράματα. Επιπλέον, τα διαθέσιμα στην αγορά QD's, έχουν δείξει αναξιοπιστία στο φάσμα εκπομπής και στην σταθερότητα του φθορισμού, λόγω μη σταθερού μεγέθους και σχήματος. Τα QD's βρίσκουν χρήση κυρίως σε έρευνες και όχι σε νοσοκομειακές εξετάσεις ρουτίνας. [18, 19]

1.5 Μονοκλωνικά αντισώματα

Η τεχνολογία μονοκλωνικών αντισωμάτων προσφέρει ένα ευρύ φάσμα συγκεκριμένων αντισωμάτων που το καθένα έχει ως στόχο ένα χαρακτηριστικό σύμπλοκο διαφοροποίησης (cluster of differentiation ή CD) στην επιφάνεια των κυττάρων προς μελέτη. Τα σύμπλοκα διαφοροποίησης αποτελούν χαρακτηριστικές διατάξεις πρωτεϊνών, διαφορετικές ανάλογα με το είδος και το στάδιο ανάπτυξης του κυττάρου. Οι οποίες έχουν καταγραφεί και αριθμηθεί ως διαφορετικά CD προκειμένου να είναι δυνατή η εύρεση και διαφοροποίηση των κυττάρων που τα φέρουν. [1, 14]

Στην κυτταρομετρία ροής, τα αντισώματα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τα φθοριοχρώματα, ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί η ειδική ένωση του αντισώματος με το κάθε κύτταρο. Ο φθορισμός ανιχνεύεται με ειδικά φίλτρα, επιτρέποντας στο μηχάνημα να μετρήσει μόνο τα κύτταρα με τα οποία δεσμεύθηκαν τα αντισώματα. Έτσι είναι δυνατή η μελέτη συγκεκριμένων υποπληθυσμών κυττάρων με τη χρήση περισσότερων τύπων αντισωμάτων. [9]

Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η προσθήκη φθοριοχρώματος μπορεί να γίνει με δύο τρόπους ανάλογα με το πόσα αντισώματα μπορούν να παρεμβληθούν ανάμεσα στο φθοριόχρωμα και στο κύτταρο. Αν το φθοριόχρωμα είναι δεσμευμένο στο χορηγούμενο αντίσωμα που έχει προσδεθεί στο κύτταρο, η μέθοδος λέγεται άμεση. Διαφορετικά, μπορεί να χρησιμοποιηθούν πολλά διαφορετικά αντισώματα ως εξής: στο κύτταρο δεσμεύεται ένα ειδικό προς το κύτταρο αντίσωμα χωρίς φθοριόχρωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται αντίσωμα ειδικό προς το πρώτο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε και ακολούθως τρίτο αντίσωμα ειδικό προς το δεύτερο. Αυτό μπορεί να συνεχιστεί όσο απαιτεί το πείραμα ή η εξέταση, έως ότου επιλεγεί κάποιο αντίσωμα που να έχει προσδεμένο φθοριόχρωμα. Αυτή η μέθοδος ονομάζεται έμμεση, και κύριο προτέρημα της, είναι ότι σε κάθε αντίσωμα μπορούν να προσδεθούν πολλά αντισώματα. Αυτό συνεπάγεται ότι ένα CD που μπορεί να εμφανίζεται σε πολύ μικρή ποσότητα στην επιφάνεια ενός κυττάρου θα δώσει μεγαλύτερης έντασης σήμα, καθώς έχει πολλά μόρια φθοριοχρώματος έμμεσα προσδεμένα. Η άμεση μέθοδος είναι όμως πιο γρήγορη, καθώς κάθε αντίσωμα που προστίθεται στο δείγμα απαιτεί επώαση και πλύση μισής ώρας. [1, 21]

Λόγω της δομής του ίδιου του αντισώματος υπάρχει αρκετά μεγάλη πιθανότητα να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, γεγονός που οφείλεται στο ότι τα αντισώματα μπορεί να έχουν προσκολληθεί σε μη ειδικές περιοχές. Προκειμένου να αποφευχθούν αυτά τα σφάλματα είναι σοφό να χρησιμοποιούνται δείγματα ελέγχου. Τα δείγματα ελέγχου που χρησιμοποιούνται περιέχουν μονοκλωνικά αντισώματα ίδιου υπότυπου με μοριακή δομή παρόμοια με αυτών που θα χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση, αλλά με ειδίκευση για διαφορετικό αντιγόνο, το οποίο είναι γνωστό ότι δεν θα υπάρχει στο δείγμα [11]

Εάν υπάρχει ανάγκη να μετρηθούν ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, τότε υπάρχουν ειδικές μέθοδοι που κάνουν την κυτταρική μεμβράνη διαπερατή από τα μονοκλωνικά αντισώματα. Στη περίπτωση αυτή χρειάζονται ειδικά δείγματα ελέγχου και ιδιαίτερη προσοχή, γιατί η διαδικασία διαπερατότητας μπορεί να αλλάξει τις τιμές FSC και SCC των κυττάρων. [21]

1.6 Βιολογικά δείγματα

Οποιοδήποτε εναιώρημα κυττάρων ή μικροσωματιδίων μεταξύ 0,2-150 nm, κατόπιν κατάλληλης προετοιμασίας είναι δυνατόν να εκτιμηθεί από τον κυτταρομετρητή. Τα κύτταρα του εναιωρήματος θα πρέπει να βρίσκονται σε περιεκτικότητα 10^5 – 10^7 cells/ml προκειμένου να μην δημιουργούνται πηγμένα στο εσωτερικό των σωληνώσεων του κυτταρομετρητή, καθώς και για να διατηρείται ένας σταθερός ρυθμός ροής 2,000–20,000 cells/sec. Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο διάλυμα εναιωρήματος είναι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline ή PBS). Τα είδη δείγματος μπορεί να προέρχονται από δύο διαφορετικές βασικές πηγές.

Πρώτη αποτελούν τα μεμονωμένα κύτταρα, τα οποία αναλόγως της προέλευσής τους ενδέχεται να χρειαστούν φιλτράρισμα και ρύθμιση της συγκέντρωσης των κυττάρων προς μέτρηση. Τα ιδανικότερα δείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν τα απομονωμένα κύτταρα από καλλιέργειες, υδάτινοι μικροοργανισμοί, βακτήρια, καθώς και ζύμες, αφού δεν χρειάζεται κάποια προετοιμασία για να μπορούν να κινηθούν στο εσωτερικό του ρυθμιστικού διαλύματος και να εκτιμηθούν από τους αισθητήρες του

αναλυτή. Ακόμα και το ολικό αίμα μπορεί να αναλυθεί εφόσον έχει πραγματοποιηθεί διαδικασία λύσης των ερυθροκυττάρων επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την άμεση παρατήρηση του λευκοκυτταρικού τύπου.

Το δεύτερο είδος δείγματος που συναντάται αποτελούν τα κύτταρα στερεών ιστών, όπως για παράδειγμα ηπατικά κύτταρα ή κύτταρα προερχόμενα από όγκους. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μέτρηση στα κύτταρα ενός στερεού ιστού πρέπει αυτά να έρθουν σε μορφή μεμονωμένων κυττάρων. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μεθόδους, μηχανικά ή ενζυματικά. Η μηχανική απομόνωση χρησιμοποιείται περισσότερο σε δείγματα στερεών ιστών με πιο αραιές δομές, όπως κυτταροκαλλιέργιες ιστών, μυελού των οστών, καθώς και σε λεμφικό ιστό. Ένας από τους τρόπους με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί μηχανική αποκόλληση είναι η ανασύσταση του προς μελέτη, ήδη εν μέρη κατακρημισμένου ιστού, με την χρήση βελόνας κατάλληλου διαμετρήματος και εφαρμογής κατάλληλων μηχανικών πιέσεων.

Στην ενζυματική απομόνωση γίνεται χρήση ενζύμων που στοχεύουν τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και τις εξωκυτταρικές δομές που συγκρατούν τα κύτταρα μεταξύ τους. Λόγω της ευαισθησίας των ενζύμων στις περιβαλλοντικές συνθήκες πρέπει να γίνει κατάλληλη επιλογή του ενζυματικού παράγοντα, καθώς το αντίθετο μπορεί να καταστρέψει τις δομές που μπορεί να εκτιμήσει ο αναλυτής. Για παράδειγμα η πεψίνη λειτουργεί ιδανικά σε όξινο περιβάλλον σε τιμές pH 1.5-2.5, αλλά εάν δεν εξουδετερωθεί σύντομα μπορεί να καταστρέψει σημαντικά αντιγόνα στην επιφάνεια των προς μελέτη κυττάρων. [22]

Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα βιολογικών υλικών που μετρούνται συχνά σε έναν κυτταρομετρητή αποτελούν το αίμα, ο μυελός των οστών, το πλευριτικό υγρό, το ασκτικό υγρό, το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), το υαλοειδές και το υδατοειδές οφθαλμικό υγρό, καθώς και το εναιώρημα κυττάρων μετά από παρακέντηση. [1][9]

Κάθε διαφορετικό είδος δείγματος, αναλόγως της φύσεως και της σύστασής του, απαιτεί διαφορετικό πρωτόκολλο προετοιμασίας, όπως ήδη προαναφέρθηκε, προκειμένου να πραγματοποιηθούν αποτελεσματικά οι μετρήσεις του αναλυτή. Στα περισσότερα είδη

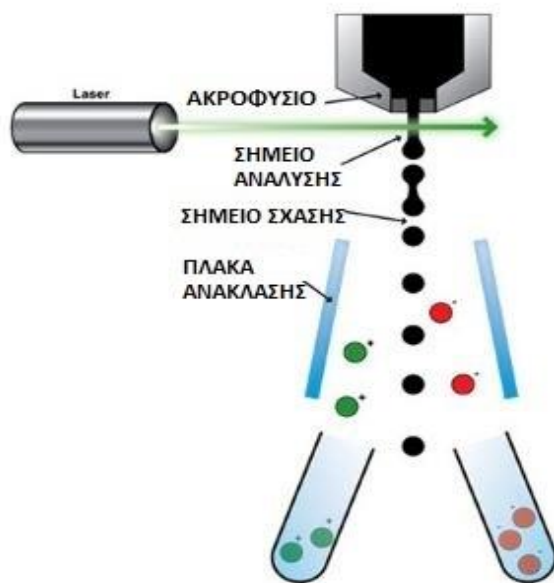
δειγμάτων υπάρχουν κάποιοι γενικοί κανόνες που επιτρέπουν στον αναλυτή να επεξεργαστεί το δείγμα με μεγαλύτερη ακρίβεια.

- Η μηχανική αποκόλληση απαιτεί μεγάλη προσοχή και λεπτές κινήσεις, καθώς σε αντίθετη περίπτωση θα καταστραφούν τα κύτταρα ενδιαφέροντος.
- Είναι συνετό να απομακρυνθούν τα επιμέρους στοιχεία των ιστών που δεν μετρώνται από τον κυτταρομετρητή προκειμένου να γίνουν ακριβείς μετρήσεις. Π.χ. στην προετοιμασία δείγματος από μυελό των οστών, κομμάτια από οστό και μύες πρέπει να απομακρύνονται όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματικά είτε μηχανικά είτε μέσω χρήσης φίλτρων.
- Η σωστή επιλογή ενζύμων στην ενζυματική μέθοδο αποκόλλησης βοηθάει στην αποφυγή καταστροφής των κυττάρων. Π.χ. η τρυψίνη συνήθως μπορεί να καταστρέψει τα κύτταρα, καθώς και επιτόπους αυτών.
- Πρέπει να αποφεύγεται η υπέρμετρη χρήση μηχανικής ανάδευσης και φυγοκέντρησης, ώστε να αποφεύγεται η συσσωμάτωση των κυττάρων.
- Η ψύξη των δειγμάτων επιτρέπει την επιβράδυνση της νέκρωσης των κυττάρων, καθώς και του μεταβολισμού τους.
- Η προετοιμασία των δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται όσον το δυνατόν πιο σύντομα, καθώς το πέρασμα του χρόνου έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ζωτικότητα των κυττάρων.
- Χρήση κατάλληλου αντιπηκτικού για το περιφερικό αίμα. Το EDTA δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό διαμεμβρανικών κυτοκινών ή επιφανειακών δεικτών που χρειάζονται ιόντα Ca^{2+} . [22]

1.7 Κυτταροδιαχωριστές

Εκτός από την απλή μέτρηση κυττάρων, πολλοί κυτταρομετρητές μπορούν να λειτουργήσουν και ως κυτταροδιαχωριστές, διαχωρίζοντας κύτταρα επιθυμητών χαρακτηριστικών από το υπόλοιπο δείγμα, με σκοπό να εξεταστούν με άλλη μέθοδο ή άλλες παραμέτρους. Αυτό επιτυγχάνεται φορτίζοντας ηλεκτρικά τα κύτταρα αφού περάσουν από το σημείο ανάλυσης, και στην συνέχεια με τη χρήση ηλεκτρομαγνητισμού συλλέγονται τα κύτταρα σε ξεχωριστό σωληνάριο ή άλλο δοχείο δείγματος. [23]

Συγκεκριμένα, στους κυτταροδιαχωριστές το στόμιο από το οποίο εξέρχεται το δείγμα μετά την κυψελίδα ροής έχει την ικανότητα να δονείται με τρόπο ώστε η ροή κυττάρων να διασπάται σε σταγονίδια, που το καθένα περιέχει ένα κύτταρο. Μόλις μετρηθεί κύτταρο που επιθυμεί ο χειριστής να απομονώσει, το σταγονίδιο που το εμπεριέχει φορτίζεται με ηλεκτρικό φορτίο. Στη συνέχεια, πλάκες ανάκλασης που παράγουν ηλεκτρικό πεδίο, απωθούν τα φορτισμένα σταγονίδια αρκετά ώστε να συλλεχθούν σε ξεχωριστό σωληνάριο, ενώ τα μη φορτισμένα συνεχίζουν ανέπαφα τη ροή τους. Σύμφωνα με το εάν φορτιστούν αρνητικά ή θετικά, αλλά και το πόσο φορτιστούν τα σταγονίδια, μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός περισσότερων κυτταρικών πληθυσμών σε διαφορετικά σωληνάρια. Οι κυτταροδιαχωριστές χρησιμοποιούνται κυρίως σε ερευνητικούς χώρους, διότι για διαγνωστικούς και κλινικούς λόγους, η μέτρηση και η ταυτοποίηση κυττάρων είναι επαρκής. [24]



Εικόνα 1.7 Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας κυτταροδιαχωριστή.[21]

1.8 Σφαιριδομετρία

Πέραν της ποσοτικής ανάλυσης κυττάρων, αναφέρθηκε ότι ο κυτταρομετρητής μπορεί να αναλύσει και κυτταρικές δομές ή πρωτεΐνες. Αυτό το επιτυγχάνει με τη μέθοδο της σφαιριδομετρίας. Στην μέθοδο αυτή, προστίθενται στο δείγμα γνωστή συγκέντρωση σφαιριδίων latex, επικαλυμμένα με αντισώματα αντί του μορίου προς μέτρηση. Αφού πλυθούν τα μόρια που δεν δεσμεύθηκαν στα σφαιρίδια, προστίθενται μονοκλωνικά αντισώματα δεσμευμένα με φθορίζουσες ουσίες, τα οποία προσδένονται στα μόρια που έχουν προσκολληθεί στα σφαιρίδια. Αυτά τα σφαιρίδια μετρώνται από τον κυτταρομετρητή σαν να ήταν κύτταρα, μετρώντας την ένταση του φθορισμού καθενός. Γνωρίζοντας εμπειρικά τον φθορισμό του κάθε φθορίζοντος μορίου και τη συγκέντρωση των σφαιριδίων στο δείγμα, ο αναλυτής υπολογίζει με ακρίβεια την συγκέντρωση του μορίου στο δείγμα. Με αυτήν την μέθοδο πραγματοποιείται η μέτρηση των κυτοκινών, ενδοκυτταρικών μορίων, δεικτών όπως οι κινάσες, καθώς και η μέτρηση παραγωγής αντισωμάτων ή η απόπτωση. [25]

1.9 Είδη ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής

1.9.1 Ποσοτική και ποιοτική κυτταρομετρία ροής ανοσοφθορισμού

Η κυτταρομετρία ροής ανοσοφθορισμού αποτελεί το πιο διαδεδομένο είδος ανάλυσης στην έρευνα, καθώς και στο κλινικό περιβάλλον. Έχοντας το κατάλληλο αντίσωμα είναι δυνατόν να μετρηθεί ποιοτικά και ποσοτικά οποιοδήποτε αντίσωμα βρίσκεται σε ανιχνεύσιμη ποσότητα στην επιφάνεια ή και εντός των κυττάρων. Μέσω της χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων στα κύτταρα τους προς εξέταση δείγματος μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την προέλευση, το στάδιο διαφοροποίησης, καθώς και την λειτουργία αυτών. Είναι εφικτή η μέτρηση και πολλαπλών αντιγόνων παράλληλα αναλόγως το μοντέλο του κυτταρομετρητή. Στα περισσότερα εργαστήρια μετρώνται 3 με 5 αντιγόνα ταυτόχρονα, αλλά μέσω της χρήσης εξειδικευμένων κυτταρομετρητών μπορεί να γίνει ταυτόχρονη μέτρηση μέχρι και 17 αντιγόνων. [26]

Το σημαντικότερο στάδιο από το οποίο εξαρτάται και η ακρίβεια των μετρήσεων είναι η κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος. Η επιθυμητή σύσταση του δείγματος είναι

μεμονωμένα κύτταρα σε εναιώρημα με ελάχιστα συσσωματώματα και πολύ λίγα κυτταρικά θραύσματα. Αν πρόκειται να υποστούν σήμανση με επιφανειακά αντιγόνα, τα σεσημασμένα αντισώματα χορηγούνται σε δείγμα μη σταθεροποιημένων κυττάρων, ενώ σε περίπτωση που πρέπει να γίνει ενδοκυττάρια χρώση, τα κύτταρα πρέπει να σταθεροποιηθούν και να μονιμοποιηθούν έτσι ώστε το σεσημασμένο αντίσωμα να έχει πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου όπου και θα συνδεθεί με το αντιγόνο-στόχο. [16]

Καθώς το δείγμα κατόπιν επεξεργασίας περιέχει σωματίδια, όπως κυτταρικά θραύσματα, νεκρά κύτταρα, καθώς και κάποια αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα, η ποσοτική μέτρηση των επιθυμητών κυτταρικών πληθυσμών πραγματοποιείται με την χρήση οριοθετήσεων (gates). Πραγματοποιείται αρχική ανάλυση με βάση τον πρόσθιο και τον πλάγιο σκεδασμό και στην συνέχεια επιλέγεται ο πληθυσμός που θα μελετηθεί οριοθετώντας τον σε σχέση με τους υπολοίπους. Πλέον όλες οι παράμετροι φθορισμού θα υπολογιστούν για τον οριοθετημένο πληθυσμό και μόνο. Μέσω της χρήσης των οριοθετήσεων προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που αναλύεται, όπως την λειτουργία, την προέλευση και το στάδιο του κυτταρικού κύκλου (ποιοτική ανάλυση), καθώς και ο ακριβής αριθμός των κυττάρων που ανήκουν στην συγκεκριμένη ομάδα (ποσοτική ανάλυση). [9]

1.9.2 Κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού

Οι φαινότυποι χρησιμεύουν ιδιαίτερα στην διαφοροποίηση μεταξύ φυσιολογικών και νεοπλασματικών λευκοκυττάρων. Αυτή η διάκριση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας φθοριοχρώματα τα οποία εντοπίζει ο κυτταρομετρητής. Αρχικά, αυτές οι διαφορές στον φθορισμό παρατηρούνταν κατά την μικροσκόπηση και χαρακτηρίζονταν ως θετικές ή αρνητικές μόνο, με τα θετικά κύτταρα να αξιολογούνται βάσει του κατά πόσο ο φθορισμός είναι ασθενής ή ισχυρός. Πλέον η πληρέστερη κατανόηση των σημάτων φθορισμού επιτρέπει την μετάφραση των όρων ασθενής ή ισχυρός φθορισμός σε πραγματικά μεγέθη που εκφράζουν ποσότητα φθορισμού και κατά συνέπεια ποσότητα του αντιγόνου που αναζητάται μέσω της δοκιμασίας φθορισμού. Η μέθοδος μέσω της οποίας πραγματοποιείται η παραπάνω ανάλυση, ονομάζεται κυτταρομετρία ποσοτικού

φθορισμού [Quantitative Fluorescence Cytometry (QFCM)]. Η μέθοδος χρησιμοποιεί διάλυμα αναφοράς που συνήθως αποτελείται από μικροσφαιρίδια σσημασμένα με την κατάλληλη φθορίζουσα ουσία. Αναλόγως του διαλύματος αναφοράς κατασκευάζεται ένα διάγραμμα βαθμονόμησης, βάση του οποίου πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση της φθορίζουσας ουσίας.

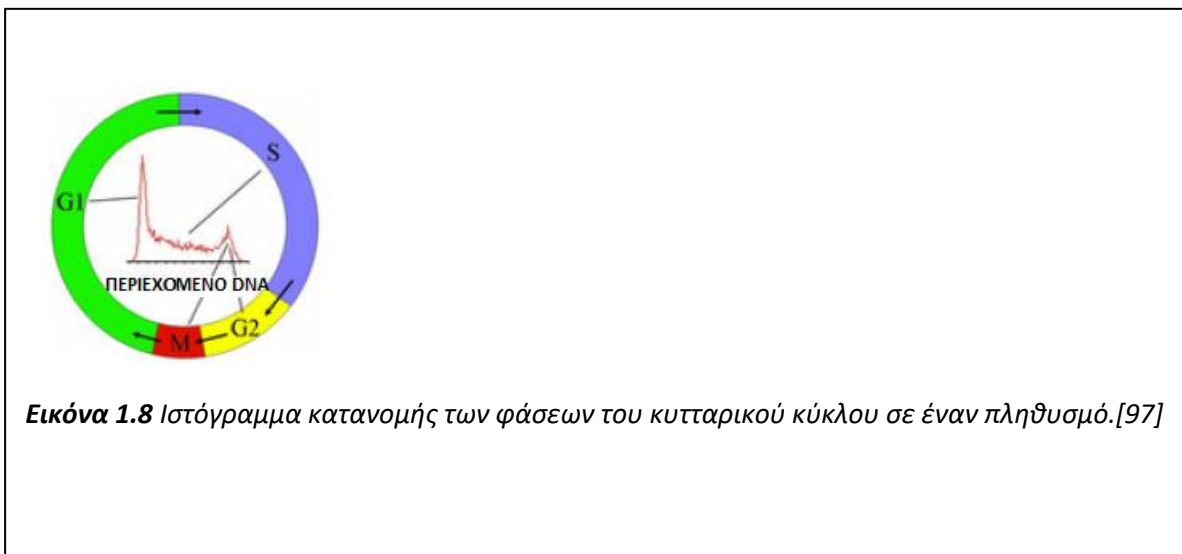
Η ποσότητα του φθοριοχρώματος στα κύτταρα που έχουν υποστεί χρώση είναι σχετικά μικρή και κυμαίνεται από μερικές χιλιάδες μέχρι μερικά εκατομμύρια μόρια, επομένως είναι πρακτικό να εκφράζεται η ένταση του φθορισμού [Fluorescence Intensity (FI)] σε μόρια. Τα σωστά βαθμονομημένα πρότυπα μικροσωματίδια για κυτταρομετρία ροής το επιτυγχάνουν εκφράζοντας την ένταση φθορισμού σε μονάδες ονομαζόμενες μόρια ισοδύναμου διαλυτού φθοριοχρώματος [Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF)]. Τα ιστογράμματα φθορισμού βαθμονομούνται σε τιμές MESF αναλύοντας τα κατάλληλα πρότυπα μικροσφαιρίδια. Επειδή στο εμπόριο υπάρχει πληθώρα επιλογών πρότυπων μικροσφαιριδίων, είναι συνετό να γίνει επιλογή αυτών βάση της φύσης του δείγματος και των αναγκών της ανάλυσης που θα πραγματοποιηθεί.

Η τιμή του MESF εκφράζει την ποσότητα των συμπλόκων φθορισμού που έχουν συνδεθεί στο κύτταρο που έχει υποστεί χρώση, επειδή όμως αυτά τα σύμπλοκα αποτελούν αντισώματα εναντίων κυτταρικών αντιγόνων, ο όρος ικανότητα δέσμευσης αντισώματος [Antibody Binding Capacity (ABC)] χρησιμοποιείται συχνά υποδηλώνοντας τον αριθμό των συμπλόκων μορίων που έχουν συνδεθεί με ένα κύτταρο όταν όλοι οι υποδοχείς έχουν πληρωθεί. Επομένως, το ABC αποτελεί έναν έμμεσο δείκτη έκφρασης δέσμευσης του υποδοχέα.

Τα μεγέθη που αναφέρθηκαν παραπάνω, εκφράζουν αναλόγως του είδους του προτύπου δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την βαθμονόμηση, ποσοτική ένταση φθορισμού. Τα εργαστηριακά ευρήματα πάντα αξιολογούνται σε συνάρτηση με την καμπύλη βαθμονόμησης του εκάστοτε προτύπου διαλύματος φθορίζουσας ουσίας, καθώς διαφορετικά είδη τεχνικών και προτύπων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για διαφορετικά αναλυτικά ζητήματα. [27]

1.9.3 Κυτταρομετρία ανάλυσης DNA

Η ανάλυση του DNA αποτελεί μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής. Αξιολογώντας το γενετικό υλικό μεμονωμένων κυττάρων, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για τον αριθμό των χρωμοσωμάτων (πλοειδία) αυτών, ενώ αξιολογώντας τα κύτταρα ενός ευρύτερου πληθυσμού είναι εφικτή η αξιολόγηση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου που διακρίνονται, καθώς και την συχνότητα με την οποία εμφανίζονται αποπτωτικά κύτταρα.



Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός DNA φθοριοχρωμάτων και τεχνικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτό το είδος ανάλυσης. Οι τεχνικές διαφέρουν κυρίως ως προς την μονιμοποίηση των κυττάρων, την σύνθεση του διαλύματος χρώσης, καθώς και την εφαρμογή αυτών σε διαφορετικές κυτταρικές ομάδες. Προκειμένου να μετρηθεί το περιεχόμενο DNA, τα κύτταρα πρέπει να υποστούν χρώση με φθορίζουσα χρωστική η οποία να προσδέεται στο DNA με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται αντιπροσωπευτική εικόνα για την ποσότητα του περιεχόμενου γενετικού υλικού. Οι περισσότερες χρώσεις που χρησιμοποιούνται σε αυτό το είδος ανάλυσης φθορίζουν ασθενώς σε υδατικά διαλύματα, ενώ φθορίζουν με αυξημένη ένταση όταν προσδεθούν στο DNA λόγω της υδρόφοβης φύσης τους.

Η πιο διαδεδομένη χρώση στην ανάλυση DNA είναι το ιωδιούχο προπίδιο, το οποίο φθορίζει ερυθρά και ενεργοποιείται στα 488 nm. Το ιωδιούχο προπίδιο έχει δύο κύρια μειονεκτήματα, συνδέεται με όλα τα δίκλινα μόρια νουκλεϊκού οξέος επομένως τα

κύτταρα πρέπει να επωαστούν με Rnaση, προκειμένου να αφαιρεθούν τα δίκλινα μόρια RNA. Επίσης, η χρώση δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, επομένως θα πρέπει να υποστούν μονιμοποίηση ή να αυξηθεί η διαπερατότητα των κυττάρων πριν τη χρήση αυτής. Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ακτινοβολία UV ή ιώδες λέιζερ συνήθως χρησιμοποιείται η χρώση DAPI, η οποία επίσης απαιτεί αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης και είναι ειδική ως προς το DNA. [16, 28]

1.10 Αναλυτικές δυνατότητες και επεξεργασία δεδομένων κυτταρομετρητή

Από την στιγμή που το ηλεκτρικό σήμα μετατρέπεται σε ψηφιακό και αποθηκεύεται στην βάση δεδομένων του Η/Υ ξεκινά η διαδικασία επεξεργασίας, κατάταξης και αξιοποίησης των πληροφοριών που καταγράφηκαν. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την ανάλυση δεδομένων. Τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής αποθηκεύονται σε ένα συνηθισμένο τύπο αρχείου που ονομάζεται FCS (Flow Cytometry Standard), το οποίο περιέχει πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά του κυττάρου, το μοντέλο και τα χαρακτηριστικά του κυτταρομετρητή, καθώς και την ημερομηνία και τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Η ανάλυση των δεδομένων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές μεθόδους, με βάση τα ζητούμενα που απαιτεί ο χειριστής, το μοντέλο του αναλυτή και την κλίμακα της χρήσης του (νοσοκομείο ή προσωπικό ιατρείο). [10]

1.10.1 Γραμμική και λογαριθμική ανάλυση

Οι τιμές που μετράνε οι φωτοανιχνευτές του κυτταρομετρητή, λαμβάνοντας υπόψη τα μεγέθη, μπορούν να εκτείνονται σε μία ιδιαίτερα μεγάλη κλίμακα με μικρές διαφορές ανάμεσά τους ώστε να αλληλοεπικαλύπτονται με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατή η αναπαράστασή τους σε μια γραμμική κλίμακα μέτρησης. Σε αυτό το πρόβλημα την λύση δίνει η αναπαράσταση των μετρούμενων τιμών σε λογαριθμική κλίμακα, καθώς η απόσταση μεταξύ των τιμών έντασης μπορεί να αναπαρασταθεί χρησιμοποιώντας δυνάμεις του 10. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται εφικτή η διάκριση των καναλιών καταγραφής του κυτταρομετρητή, συμπεριλαμβανοντας και φάσματα τα οποία μπορεί διαφορετικά να αλληλεπικαλύπτονταν. [29]

1.10.2 Τρόποι παρουσίασης δεδομένων

Οι τιμές των χαρακτηριστικών των κυττάρων αποθηκεύονται στον Η/Υ, όπου τα δεδομένα για έναν κυτταρικό υποπληθισμό μπορούν να παρουσιαστούν με την μορφή διαφόρων διαγραμμάτων. Οι τιμές μπορεί να παρουσιαστούν σε διάγραμμα λογαριθμικής ή και εκθετικής κλίμακας για να αυξηθεί το εύρος των μετρούμενων τιμών των χαρακτηριστικών.

Οι διάφοροι τύποι διαγραμμάτων εξυπηρετούν και διαφορετικές ανάγκες. Συγκεκριμένα, όταν πρέπει να παρουσιαστεί η σχέση ενός χαρακτηριστικού των κυττάρων σε σχέση με τον αριθμό τους θα χρησιμοποιηθεί ιστόγραμμα. Σε περίπτωση που χρειάζεται να αξιολογηθούν δύο ή περισσότερες παράμετροι θα χρησιμοποιηθεί στικτόγραμμα, στο οποίο σε κάθε άξονα αντιστοιχούν δυο διαφορετικές παράμετροι και τα σήματα απεικονίζονται ως σημεία πάνω στην επιφάνεια.

Σε περίπτωση μεγάλης ποσότητας σημείων με παραπλήσιες τιμές, ένα στικτόγραμμα πιθανώς δεν είναι κατάλληλο, αφού θα απεικονιζόταν μία μεγάλη μάζα από σημεία. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιούνται διαγράμματα εμβαδού ή πυκνότητας. Σαν το στικτόγραμμα, δείχνουν μετρήσεις σχετικά με δύο παραμέτρους, αλλά επιπλέον απεικονίζουν την συχνότητα τιμών με παραπλήσιες τιμές και για τις δυο παραμέτρους. Το διάγραμμα πυκνότητας το απεικονίζει αυτό, χρωματίζοντας με χρώμα τις περιοχές της επιφάνειας του στικτογράμματος όπου τα σημεία είναι πιο πυκνά, ανάλογα με την πυκνότητα αυτή. Το διάγραμμα εμβαδού δεν δείχνει καθόλου στίξεις, αλλά περιβάλλει με γραμμές εμβαδά της επιφάνειας, με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε τμήμα να περιέχει ίσο ποσοστό των συνολικών σημείων. [30]

1.10.3 Περιοχές και Τεταρτημόρια

Παρέχεται η δυνατότητα ορισμού περιοχών επάνω στην επιφάνεια κάθε διαγράμματος. Με αυτό τον τρόπο ορίζεται το υποσύνολο σημείων ως προς τα χαρακτηριστικά του, ενώ σε περίπτωση που τα σημεία είναι πολύ πυκνά στην περιοχή αυτή, ο κυτταρομετρητής μπορεί να δώσει τον ακριβή αριθμό τους.

Επίσης, επάνω σε κάθε διάγραμμα δύο παραμέτρων φθορισμού, ο χρήστης έχει την δυνατότητα να χωρίσει τα σημεία της επιφάνειας σε τεταρτημόρια. Με αυτά τα

τεταρτημόρια ορίζει ποια σημεία φθορίζουν αρνητικά για τις μεταβλητές, θετικά για μία εκ των δύο μεταβλητών και θετικά και για τις δύο μεταβλητές. Ο αρνητικός φθορισμός οφείλεται σε αυτοφθορισμό των κυττάρων και ορίζεται με την χρήση αρνητικών δειγμάτων ελέγχων (control), που αποτελούνται από ποσότητα δείγματος χωρίς χρώση. [31]

1.10.4 Περίφραξη / Οριοθέτηση (gating)

Οριοθέτηση ονομάζεται η δυνατότητα επιλογής κυττάρων ή μορίων. Σε ένα στικτόγραμμα, ο χειριστής μπορεί να επιλέξει έναν υποπληθυσμό κυττάρων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ως προς δυο παραμέτρους (π.χ. FSC και SSC) και ακολούθως να απεικονιστούν μόνο τα κύτταρα αυτού του πληθυσμού σε ένα στικτόγραμμα ως προς δύο άλλες παραμέτρους.

Ο ορισμός των κυττάρων όπου γίνεται η οριοθέτηση μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν (live gating) ή μετά (analysis gating) την ανάλυση του δείγματος. Το πρόβλημα με την οριοθέτηση πριν την ανάλυση του δείγματος είναι ότι δεν αποθηκεύονται δεδομένα για κύτταρα που δεν έχουν τα χαρακτηριστικά που έχουν οριστεί για την οριοθέτηση. Γι'αυτόν τον λόγο, τέτοιου είδους οριοθέτηση γίνεται μόνο όταν υπάρχει περιορισμένη χωρητικότητα δεδομένων. [9]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ ΡΟΗΣ

2.1 Διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες με την χρήση κυτταρομετρίας ροής

2.1.1 Αιματολογικές κακοήθειες και νεοπλάσματα η φύση της ασθένειας

Οι περισσότεροι καρκίνοι κατηγοριοποιούνται βάση του οργάνου/ιστού στον οποίο εντοπίζονται, καθώς και από τον τύπο του κυττάρου που προσβάλλεται. Οι αιματολογικές κακοήθειες ξεκινούν από κύτταρα τα οποία προέρχονται από τον μυελό των οστών, επειδή όμως αυτοί οι κυτταρικοί τύποι συναντώνται διασκορπισμένοι σε όλον τον οργανισμό, καθώς πρόκειται για κυτταρικές σειρές του αίματος, η σύνδεση με την πηγή προέλευσης των κυτταρικών μορφών που νοσούν πραγματοποιήθηκε σχετικά πρόσφατα. Ιστορικά, οι αιματολογικές κακοήθειες κατηγοριοποιούνταν αναλόγως το όργανο που φαινομενικά έπασχε αντί του είδους του κυτταρικού πληθυσμού που νοσεί. [33]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αιματολογικές κακοήθειες αποτελούν μορφές καρκίνου οι οποίες εμφανίζονται στους αιμοποιητικούς ιστούς όπως στον μυελό των οστών ή στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τύπων καρκίνου του αίματος αποτελούν η οξεία και χρόνια λευχαιμία, τα λεμφώματα, το πολλαπλό μύελωμα, καθώς και τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. [9] Η κατηγοριοποίηση αυτής της ομάδας καρκινικών ασθενειών πραγματοποιείται βάση του αιματικού ιστού (περιφερικό αίμα, μυελός, λεμφικό σύστημα) που προσβάλλεται σε:

- **Λευχαιμία**, η οποία χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη υπερπαραγωγή ανώμαλων μορφών λευκών αιμοσφαιρίων στον μυελό των οστών και κατηγοριοποιείται βάση του λευκοκυτταρικού τύπου που νοσεί σε μυελογενής και λεμφοβλαστική
- **Λέμφωμα**, καρκίνος του λεμφικού συστήματος χαρακτηριζόμενος από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη κακοηθών λευκοκυττάρων με σχηματισμό όγκων στους λεμφαδένες. Το λέμφωμα κατηγοριοποιείται σε δύο κύριους τύπους: λέμφωμα Hodgkin και μη-Hodgkin λέμφωμα.

- **Μυέλωμα**, το οποίο χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση ανώμαλων μορφών πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών.[34]

Το 2001, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) κατέληξε σε έναν τρόπο κατηγοριοποίησης ο οποίος ορίζει τις αιματολογικές κακοήθειες με βάση την κυτταρική σειρά, το είδος γενετικής βλάβης και των κλινικών χαρακτηριστικών που φέρει η κάθε περίπτωση. Αυτός ο τρόπος κατηγοριοποίησης, ο οποίος ορίζει πάνω από 60 διαφορετικούς υπότυπους αιματολογικών κακοηθειών, υιοθετήθηκε ενιαία στην κλινική πράξη και συμπεριλαμβάνεται στην διεθνή ταξινόμηση ογκολογικών ασθενειών. [35, 36]

Το 2008 η κατηγοριοποίηση των αιματολογικών κακοηθειών ανανεώθηκε από τον ΠΟΥ, καθώς οι ραγδαίες εξελίξεις στους τομείς των μοριακών και κυτταρικών δεικτών, με αρκετούς από αυτούς ιδιαίτερης προγνωστικής σημασίας, οδήγησαν στην λεπτομερέστερη περιγραφή των διαγνωστικών υπότυπων και διευκόλυναν την χρήση και εφαρμογή μοριακών θεραπευτικών αγωγών. [35, 36]

Η διάκριση μεταξύ **λεμφικών** και **μυελικών** κυτταρικών τύπων είναι δομικής σημασίας στην σύγχρονη κατηγοριοποίηση της ασθένειας. Όπως και άλλα όργανα, ο μυελός των οστών διαθέτει έναν μικρό πληθυσμό αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων ο οποίος παραμένει καθ' όλη την διάρκεια της ζωής. Όταν τα κύτταρα αυτού του πληθυσμού διαιρούνται, τα θυγατρικά κύτταρα είτε παραμένουν στις βλαστοκυτταρικές μορφές τους είτε ξεκινούν μια διαδικασία διαφοροποίησης, η οποία καταλήγει στην παραγωγή λειτουργικά εξειδικευμένων κυττάρων. Το πρώτο βήμα κατά την εκκίνηση της δεύτερης περίπτωσης είναι το μονοπάτι διαφοροποίησης που θα ακολουθήσει το κύτταρο, δηλαδή εάν θα διαφοροποιηθεί σε κύτταρο της λεμφικής σειράς ή της μυελικής σειράς. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο μυελικό μονοπάτι διαφοροποιούνται σε ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια και σε κάποιες από τις λευκοκυτταρικές μορφές, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται στο λεμφικό μονοπάτι διαφοροποιούνται σε T και B λεμφοκύτταρα. [34]

Όλα αυτά τα είδη κυττάρων κυκλοφορούν ανάμεσα στους λεμφαδένες και τα υπόλοιπα όργανα μέσω του κυκλοφορικού και του λεμφικού συστήματος. Κάποια από αυτά

διαφοροποιούνται επιπλέον κατά την ανοσολογική απόκριση, όπως π.χ. τα εξειδικευμένα πλασματοκύτταρα που παράγουν συγκεκριμένα αντισώματα έναντι ενός αντιγόνου. Οι διαδικασίες της κυτταρικής διαφοροποίησης είναι εξαιρετικά πολύπλοκες και υπάρχουν αρκετά σημεία σε αυτές κατά τα οποία τα κύτταρα μπορεί να αναπτύξουν γενετικές ανωμαλίες, οι οποίες μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνους. Οι καρκίνοι, που προέρχονται από αυτές τις κυτταρικές σειρές, φέρουν γνωρίσματα και ιδιαιτερότητες χαρακτηριστικές αυτών, πράγμα που αξιολογείται για να σχηματιστεί ακριβής εικόνα μέσω της κατηγοριοποίησης που έχει θεσπίσει ο ΠΟΥ. [34]

Βάση του παραπάνω συστήματος διάκρισης παρατηρείται ότι οι αιματολογικές κακοήθειες της λεμφικής σειράς καταλαμβάνουν τα $\frac{3}{4}$ όλων των περιπτώσεων, ενώ αυτές της μυελικής σειράς το υπόλοιπο των περιπτώσεων. Εντός των περιπτώσεων της λεμφικής σειράς, σημειώνεται ότι οι κακοήθειες των ώριμων Β λεμφοκυττάρων καταλαμβάνουν το 90% των περιπτώσεων. [34]

Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της κυτταρικής φύσης της αιτίας εμφάνισης των αιματολογικών κακοηθειών, η σωστή εκτίμηση και κατανόηση του προβλήματος χωρίς την ικανότητα αξιολόγησης της ποιότητας και ποσότητας των έμμορφων κυτταρικών συστατικών του αίματος αποτελεί πολύ δύσκολη διαδικασία, καθώς οι πληροφορίες που μπορούν να συλλεχθούν είναι πολύ περιορισμένες. Σε αυτό το πρόβλημα έδωσε λύση η χρήση της τεχνολογίας της κυτταρομετρίας ροής.

2.1.2 Η εξέλιξη και η σημασία της κυτταρομετρίας ροής στην κατανόηση και παρακολούθηση των αιματολογικών κακοηθειών

Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες η κυτταρομετρία ροής, από ερευνητικό εργαλείο που χρειαζόταν μια ομάδα εξειδικευμένων μηχανικών και εξειδικευμένο χώρο και εξοπλισμό, έφτασε να αποτελεί τακτικό εξοπλισμό ενός κλινικού εργαστηρίου υψίστης σημασίας στην παρακολούθηση και διάγνωση ασθενειών. Η κλινική εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής ξεκίνησε με την ανοσοφαινοτυποποίηση των λεμφοκυττάρων σε περιπτώσεις λευχαιμίας και λεμφωμάτων. [32]

Η χρήση της κυτταρομετρίας στην ταυτοποίηση του ανοσοφαινότυπου των λεμφοκυττάρων ήταν κυρίως αποτέλεσμα των τεχνολογικών και μεθοδολογικών εξελίξεων σε μία ευρεία γκάμα πεδίων όπως:

- Η ανάπτυξη της τεχνολογίας υβριδιώματος παρήγαγε πληθώρα μονοκλωνικών αντισωμάτων αντί κυτταρικών αντιγόνων
- Η ανακάλυψη της δράσης των κυτοκινών και των υποδοχέων τους βοήθησε στην πληρέστερη κατανόηση της κυτταρικής ανάπτυξης και των διαφόρων σταδίων της
- Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση και διαχωρισμό των διαφορετικών σειρών διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων
- Οι εξελίξεις στον τομέα της χημείας των φθοριοχρωμάτων, με την χρήση συμπλοκών φθοριοχρωμάτων τα οποία ενεργοποιούνται με ένα μόνο συγκεκριμένο μήκος κύματος
- Η βελτιστοποίηση της οργανολογίας και του λογισμικού που χρησιμοποιείται στην κυτταρομετρία. [32]

Αρχικά, η μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε κυρίως στον χαρακτηρισμό των λευχαιμικών κυττάρων και την ταξινόμηση της ασθένειας, αφού είχε προηγηθεί διάγνωση λευχαιμίας/λεμφώματος, όπως π.χ. στον διαχωρισμό των νοσούντων κυτταρικών σειρών σε λεμφικής και μυελικής βλαστικής προέλευσης σε οξεία λευχαιμία ή τον χαρακτηρισμό των υπότυπων πρόδρομων T και B κυττάρων στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Πλέον, η ανοσοφαινοτυποποίηση των λευχαιμιών, λεμφωμάτων και λοιπών αιματολογικών κακοηθειών αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες κλινικές εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής. [37]

Η εμφάνιση της πολυπαραμετρικής κυτταρομετρίας ροής επέτρεψε την ταχεία διάγνωση αιματολογικών νεοπλασμάτων σε τακτική βάση. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της χρήσης της κυτταρομετρίας στην διαγνωστική αιματολογία αποτελούν:

- ο μικρός χρόνος ολοκλήρωσης της εξέτασης
- ο μικρός όγκος απαιτούμενου δείγματος
- η δυνατότητα μέτρησης πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα
- η ταυτόχρονη αναγνώριση πολλαπλών αντιγόνων
- η ικανότητα απόδειξης μονοκλωνικότητας

- ο εντοπισμός ασθενών αντιγόνων.

Η παρακολούθηση και ο χαρακτηρισμός των αιματολογικών νεοπλασμάτων δεν μπορεί να αξιολογηθεί πλήρως μόνο με την χρήση συμβατικών μορφολογικών μέσων, καθώς ακόμη ανακαλύπτονται νέες βιολογικές ανωμαλίες στα κακοήθη κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και την πορεία του καρκίνου. Αυτές οι ανωμαλίες εμφανίζονται συνήθως ως παρεκλείωντες φαινότυποι.

Οι κυτταρικές αλλοιώσεις μπορούν να αναγνωρισθούν με γενετικές μεθόδους (κυτταρομετρία DNA), αλλά και μέσω της χρήσης αντισωμάτων που προσκολλώνται στην κυτταρική επιφάνεια, όπως και σε διαμεμβρανικούς στόχους (κυτταρομετρία ανοσοφθορισμού). Η χρήση των αντισωμάτων άλλαξε δραστικά τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η αξιολόγηση των αιματολογικών κακοηθειών. Πλέον, αποτελεί σπάνια περίπτωση η διάγνωση ή ο χαρακτηρισμός λευχαιμίας, λεμφώματος ή μυελώματος χωρίς να προηγηθεί κατάλληλη ανοσοφαινοτυπική αξιολόγηση. [32, 37]

Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής για ανοσοφαινοτυπική ανάλυση, ολοκληρώνει το προφίλ της αιματολογικής κακοήθειας σε συνάρτηση με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και τις διαγνωστικές μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και μοριακής βιολογίας, με σκοπό την διάγνωση, κατάταξη και προγνωστική αξιολόγηση της πορείας της ασθένειας. [32]

Σε συνέδριο που πραγματοποιήθηκε το 2006 στην Bethesda εκδόθηκαν οι διεθνείς συστάσεις για την χρήση της κυτταρομετρίας ροής στα αιματολογικά νοσήματα από μία ομάδα ειδικών. Σύμφωνα με τις συστάσεις, οι κλινικές ενδείξεις που καθιστούν τον ανοσοφαινότυπο απαραίτητο είναι:

- οι κυτταροπενίες
- οι λευκοκυτταρώσεις
- η παρουσία άτυπων κυττάρων ή βλαστών στο περιφερικό αίμα, στον μυελό ή σε άλλα υγρά
- η πλασματοκυττάρωση
- η μονοκλωνική γαμμαπάθεια
- η οργανομεγαλία

- η ανεύρεση μαζών σε ιστούς.

Στις παραπάνω περιπτώσεις με την πραγματοποίηση ανοσοφαινότυπου μπορεί να γίνει ανίχνευση για ύπαρξη αιματολογικής κακοήθειας ή τον αποκλεισμό ύπαρξης αυτής. [38]

Η συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στο αιματολογικό εργαστήριο του νοσοκομείου όσον αφορά την διαφοροδιάγνωση των αιματολογικών νεοπλασμάτων και κακοηθειών είναι ζωτικής σημασίας, τόσο για τις πληθυσμιακές ομάδες που νοσούν, όσο και για τις ομάδες ειδικών που καλούνται να αντιμετωπίσουν την συγκεκριμένη ομάδα καρκινικών ασθενειών. Η φύση της ασθένειας κάνει την σωστή παρακολούθηση και αξιολόγηση της κλινικής εικόνας δυσχερή.

Η κυτταρομετρία ροής όντας μια τεχνική που επιτρέπει στο ερευνητικό προσωπικό την δυνατότητα αξιολόγησης των κυτταρικών μορφών του αίματος σε πολλαπλά στάδια διαφοροποίησης συμβάλλει στην:

- διάγνωση αλλά και την σταδιοποίηση μίας αιματολογικής κακοήθειας
- παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία
- ανίχνευση υπολειπόμενης νόσου
- πιστοποίηση τυχόν επιδείνωσης ή υποτροπής
- εκτίμηση επιτάχυνσης της νόσου
- πρόγνωση και ανίχνευση πιθανών θεραπευτικών στόχων. [39, 40, 42]

2.1.3 Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση, κατάταξη και αντιμετώπιση αιματολογικών νεοπλασμάτων

2.1.3.1 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση, μελέτη και κατάταξη των χρόνιων λεμφουπερπλαστικών συνδρόμων (ΧΛΣ)

Στα νεοπλάσματα, που οφείλονται σε ώριμα λεμφοκύτταρα, περιλαμβάνονται οι Χρόνιες Λεμφοκυτταρικές Λευχαιμίες (ΧΛΛ) και τα non-Hodgkin λεμφώματα. Η συγκεκριμένη ομάδα νοσημάτων χαρακτηρίζεται από ανοσοφαινότυπο παρόμοιο με αυτόν του αντίστοιχου ώριμου φυσιολογικού λεμφοκυττάρου (έκφραση ανοσοσφαιρίνης επιφανείας σε ώριμο Β λεμφοκύτταρο) και έλλειψη δεικτών αωρότητας (π.χ. CD34, TdT, ασθενή έκφραση CD45).

Στην ανοσοφαινοτυπική μελέτη των ΧΛΣ χρησιμοποιούνται panel με συνδυασμούς μονοκλωνικών αντισωμάτων που βοηθούν στην ταυτοποίηση:

- της κυτταρικής σειράς που ανήκουν τα παθολογικά κύτταρα (B, T ή NK)
- του σταδίου διαφοροποίησης των παθολογικών κυττάρων
- της παρουσίας κλωνικού πληθυσμού
- της ασύγχρονης έκφρασης δεικτών που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα νοσήματα
- της απώλειας έκφρασης, υποέκφρασης ή υπερέκφρασης ενός ή περισσοτέρων δεικτών που εκφράζονται στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα
- της έκφρασης δεικτών που έχουν προγνωστική αξία
- της έκφρασης δεικτών που αποτελούν θεραπευτικούς στόχους.

Η κατάταξη των ΧΛΣ που προτείνεται από το σύστημα ταξινόμησης του ΠΟΥ επικεντρώνεται, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε ταυτόχρονη αξιολόγηση πολλών παραμέτρων και στην αξιολόγηση των ευρημάτων που προκύπτουν από μορφολογικές, ανοσοφαινοτυπικές και γενετικές αναλύσεις.

Η κύρια συμβολή της τεχνολογίας εντοπίζεται στην ακριβή ταυτοποίηση των κυττάρων (B ή T λεμφικής σειράς), στην απόδειξη μονοκλωνικότητας του παθολογικού πληθυσμού, καθώς και στην κατηγοριοποίηση της νόσου. Το προτεινόμενο διαγνωστικό panel των ΧΛΣ χρησιμοποιεί τους δείκτες CD19, CD3, CD56 ως δείκτες οριοθέτησης των λεμφοκυττάρων, τα CD19, CD5, CD20, CD22, CD103, CD10, κ, λ, sIg, CD25, CD79b, CD38 ως δείκτες οριοθέτησης των B λεμφοκυττάρων και τα CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD7 ως δείκτες οριοθέτησης των T λεμφοκυττάρων ή άλλων T λεμφοκυτταρικών κυτταρικών σειρών.

Η μελέτη δεικτών με προγνωστική αξία (όπως τα CD38 και ZAP-70 στην B-ΧΛΛ), καθώς και η ποσοτική μέτρηση της έντασης κάποιων αντιγόνων επιφάνειας (CD5, CD20, CD38, CD79b) μπορεί να βοηθήσει στην διαφορική διάγνωση και στην πρόγνωση των ΧΛΣ, καθώς και στην λήψη θεραπευτικών αποφάσεων. [9, 37, 39]

2.1.3.2 Χρόνια Β-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα

Ο ανοσοφαινότυπος καθίσταται απαραίτητος στην διάγνωση και ταξινόμηση των χρονίων Β-λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων. Καθώς η κυτταρική σειρά των Β λεμφοκυττάρων νοσεί, οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό των Β λεμφοκυττάρων είναι τα CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b, FMC-7. Ο πιο ειδικός από αυτούς τους δείκτες θεωρείται ο CD19 καθώς εκφράζεται σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων, από τους άωρους λεμφοβλάστες έως και τα πλασματοκύτταρα. Για αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιείται για την απομόνωση του παθολογικού πληθυσμού. Ο διαχωρισμός μεταξύ των φυσιολογικών και των νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται με την ανάδειξη κλωνικότητας, καθώς και από την ασύγχρονη έκφραση δεικτών (π.χ CD5, CD10, CD103).

Κάποια Β-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα έχουν χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο, όπως η Β-ΧΛΛ, η λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων, το λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα, το οζώδες λέμφωμα, ενώ άλλα παρουσιάζουν ανοσοφαινοτυπική ετερογένεια. Βάση της έκφρασης του δείκτη CD5 (δείκτης που χαρακτηρίζει τα Τ λεμφοκύτταρα και εκφράζεται πάντα έκτοπα στα παθολογικά κύτταρα της Β-ΧΛΛ και του λεμφώματος από κύτταρα του μανδύα), του δείκτη CD23, την ένταση της έκφρασης του CD79b, του FMC-7 και της ελαφράς αλύσου επιφανείας (κ ή λ), εφαρμόζεται αξιολόγηση βάση του συστήματος αξιολόγησης Β-χρόνιων λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων. [9, 38, 39]

2.1.3.3 Χρόνια Τ και NK λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα

Η συγκεκριμένη ομάδα νοσημάτων, αν και σπανιότερη από τα Β νεοπλάσματα, παρουσιάζεται κυρίως σε νεαρά άτομα και η διάγνωση τους με συμβατικά μορφολογικά και μοριακά μέσα αποδεικνύεται δύσκολη. Πραγματοποιείται ανοσοφαινοτυπική μελέτη μέσω κυτταρομετρίας ροής, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση των Β-λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων, με panel εστιασμένο σε δείκτες της Τ ή NK λεμφικής σειράς.

Ο πιο χαρακτηριστικός δείκτης της Τ-λεμφικής σειράς αποτελεί το CD3 του οποίου η έκφραση σημειώνεται σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων από το

στάδιο του λεμφοβλάστη μέχρι και τα ώριμα T-λεμφοκύτταρα. Άλλοι δείκτες που χρήζουν αναφοράς είναι το CD2 και το CD7, οι οποίοι δεν αποτελούν ειδικοί δείκτες καθώς εκφράζονται και στα NK, καθώς και το CD5 το οποίο μπορεί να εκφράζεται ασύγχρονα και σε νεοπλασματικά B-λεμφοκύτταρα. Στους μη ειδικούς δείκτες των συγκεκριμένων νοσημάτων, επίσης ανήκουν τα CD4 και τα CD8 που χαρακτηρίζουν τους δύο υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων, τα CD4+ T-βοηθητικά και CD8+ T-κυτταροτοξικά αντίστοιχα. Τα CD4 εμφανίζονται ασθενώς και στα μονοκύτταρα, ενώ τα CD8 εμφανίζονται ασθενώς και στα NK κύτταρα.

Όπως και στα B-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα και στα T κάποια από αυτά έχουν χαρακτηριστικό φαινότυπο ή εκφράζουν έκτοπους δείκτες ειδικούς για το συγκεκριμένο νόσημα. Ανεύρεση ενός CD4+ T κλωνικού πληθυσμού με απώλεια δεικτών CD7 και CD26 χαρακτηρίζει συνήθως το σύνδρομο Sezary που αποτελεί συχνό δερματικό T-λέμφωμα. Όταν παρατηρείται συνέκφραση του δείκτη CD10 σε έναν CD4+ T κλωνικό πληθυσμό με υπάρχουσα απώλεια του δείκτη sCD3, η διαγνωστική μελέτη στρέφεται προς T αγγειοανοσοβλαστικό λέμφωμα. Δύο ακόμη χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το ALK+ αναπλαστικό λέμφωμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από συνέκφραση του CD30 σε έναν CD4+ T κλωνικό πληθυσμό και η T-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, που χαρακτηρίζεται από την κυτταροπλασματική ανίχνευση της πρωτεΐνης του ογκογονιδίου TCL-1. Η κατάταξη των T-λεμφωμάτων δεν είναι ακόμα τόσο σαφής όσο των B-λεμφωμάτων, και λόγω αυτού αρκετά από τα είδη της νόσου δεν κατατάσσονται στις παραπάνω κατηγορίες, αλλά σε συγκεκριμένη κατηγορία που ονομάζεται PLT-NOS (Peripheral T-Lymphomas - Not Otherwise Specified). [38, 39]

2.1.3.4 NK λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί την κύρια διαγνωστική μέθοδο για την αναγνώριση παθολογικών NK κυττάρων, τα οποία δεν είναι εύκολα αναγνωρίσιμα από τα T-λεμφοκύτταρα με χρήση συμβατικών οπτικών μέσων. Μία ακόμη δυσκολία στην μελέτη τους αποτελεί η απουσία μοριακών μεθόδων εξειδικευμένων στον εντοπισμό τους. Εξαιτίας των παραπάνω, η ανοσοφαινοτυπική μελέτη τους παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερες δυσκολίες.

Ο φυσιολογικός ανοσοφαινότυπος των NK κυττάρων χαρακτηρίζεται ως CD3-CD16+CD56+ και χαρακτηρίζεται από έκφραση CD57 και κυτταροτοξικών μορίων. Ο δείκτης CD56+ δεν αποτελεί ειδικό δείκτη, καθώς εντοπίζεται και σε άλλα φυσιολογικά ή παθολογικά κύτταρα, και η διαγνωστική του αξία περιορίζεται σε περιπτώσεις που τα NK κύτταρα έχουν χάσει την δυνατότητα έκφρασης του συγκεκριμένου δείκτη. Άλλοι μη ειδικοί δείκτες που εκφράζονται στα NK κύτταρα είναι τα CD2, CD7, CD8 καθώς και οι υποδοχείς KIR και το σύμπλοκο CD94/NG2A που έχουν σχέση με την λειτουργία των NK, αλλά εκφράζονται και σε μικρούς υποπληθυσμούς κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων. [38, 39]

2.1.3.5 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην διάγνωση και κατάταξη των οξείων λευχαιμιών

Οι **Οξείες Λευχαιμίες (ΟΛ)** αποτελούν κλωνικές διαταραχές των προδρόμων αιμοποιητικών κυττάρων χαρακτηριζόμενες από την ύπαρξη μεγάλων πληθυσμών άωρων κυττάρων με ελάχιστη ή καμία ικανότητα ωρίμανσης. Η κυτταρομετρία ροής παραμένει εδώ και χρόνια το πολυτιμότερο διαγνωστικό μέσο στην διάγνωση, ταξινόμηση και παρακολούθηση των ΟΛ, προσφέροντας υψηλή ταχύτητα και ακρίβεια αναγνώρισης του υπό μελέτη βλαστικού πληθυσμού, καθώς και χαρακτηρισμό της κυτταρικής σειράς (λεμφική η μυελική) στην οποία ανήκει.

Στους ασθενείς με ΟΛ, το πρώτο και σημαντικότερο βήμα είναι η ακριβής διάγνωση που να περιγράφει τις ιδιαιτερότητες της περίπτωσης. Πριν την καθολική χρήση της κυτταρομετρίας, τα διαγνωστικά κριτήρια της ΟΛ αποτελούσαν η μορφολογία και η κυτταροχημεία.

Σήμερα, η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των λευχαιμικών κυττάρων με την χρήση κυτταρομετρίας παράγει αντικειμενικά και αναπαραξίμα ευρήματα, τα οποία εκτιμώνται μαζί με το υπόλοιπο εύρος εξετάσεων. Συγκεκριμένα, επιτυγχάνονται τα εξής με την χρήση αυτής:

- Αναγνώριση του παθολογικού πληθυσμού και προσδιορισμός της κυτταρικής σειράς στην οποία ανήκει ο λευχαιμικός πληθυσμός [**Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ)** ή

Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)] και σε συνέχεια κατηγοριοποίηση σε υποκατηγορίες αναλόγως των αντιγονικών δεικτών που εντοπίζονται

- Αναγνώριση των άτυπων άωρων κυττάρων από τα φυσιολογικά άωρα κύτταρα
- Εκτίμηση του ποσοστού διήθησης, η οποία είναι απαραίτητη για την ένταξη του νοσήματος στις ΟΛ (σε συνδυασμό με οπτική εκτίμηση)
- Εύρεση παθολογικής έκφρασης αντιγόνων και ανίχνευση έκτοπης έκφρασης κάποιων δεικτών ή συγκεκριμένων ανοσοφαινοτυπικών προφίλ που συσχετίζονται με ορισμένες γενετικές διαταραχές
- Αξιολόγηση της κυτταρικής ωριμότητας και της ετερογένειας του παθολογικού πληθυσμού
- Διάγνωση λευχαιμιών με μη σαφής κυτταρικές μορφές όπως η αδιαφοροποίητη λευχαιμία, οι λευχαιμίες μεικτού φαινότυπου, καθώς και η μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία.
- Ποσοτική μέτρηση της έκφρασης αντιγόνων στα λευχαιμικά κύτταρα
- Ταυτοποίηση σύνθετων αντιγονικών συνδυασμών, που σχετίζονται με συγκεκριμένες μοριακές βλάβες και συγκεκριμένη κυτταρική βιολογία
- Εφαρμογή αυτών των ευρημάτων στην παρακολούθηση του αποτελέσματος της θεραπείας, την αναγνώριση του ανοσολογικού αποτυπώματος της συγκεκριμένης λευχαιμίας που στην συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην αναζήτηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου.

Η πορεία του διαγνωστικού panel αρχικά περιλαμβάνει την αναγνώριση του βλαστικού πληθυσμού, μέσω του στικτογράμματος CD45/SSC, όπου τα άωρα κύτταρα αναγνωρίζονται από την χαμηλή θέση που καταλαμβάνουν στο SSC και την ασθενή ή αρνητική έκφραση του CD45 σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα του δείγματος. Οριοθετούνται σε περιοχή του στικτογράμματος που ονομάζεται βλαστικό παράθυρο.

Στην συνέχεια ξεκινά η διερεύνηση έκφρασης δεικτών χαρακτηριστικών στα άωρα κύτταρα. Τα άωρα μυελικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από έκφραση δεικτών CD34 και CD117, ενώ παρατηρείται η απουσία έκφρασης δεικτών ωρίμανσης, όπως το CD11b, το CD15 και το CD16. Στα άωρα κύτταρα της Β-λεμφικής σειράς εκφράζονται οι δείκτες CD34 και TdT, ενώ δεν παρατηρείται έκφραση των δεικτών CD20 και ανοσοσφαιρίνης

επιφάνειας. Στην περίπτωση που οι βλάστες προέρχονται από την κυτταρική σειρά των Τ-λεμφοκυττάρων, ο διαχωρισμός των άωρων από τα ώριμα Τ κύτταρα πραγματοποιείται με την έκφραση των CD34, TdT και CD1a.

Στα εργαστήρια του εξωτερικού χρησιμοποιούνται συνήθως panel ρουτίνας που αξιολογούν 8-10 δείκτες και αυτοματοποιημένα συστήματα επεξεργασίας των δεδομένων που προκύπτουν με σκοπό την ταξινόμηση της νόσου βάση του ανοσοφαινοτυπικού της προφίλ στην αντίστοιχη κατηγορία. Τα panel προσανατολισμού ρουτίνας περιλαμβάνουν ειδικούς δείκτες για κάθε σειρά όπως:

- CytMPO (μυελική σειρά)
- CytCD79a (B-λεμφική σειρά)
- CytCD3 (T-λεμφική σειρά)
- cytTdt (βλάστες της B και T λεμφικής σειράς)
- CD34 (δείκτης αωρότητας)
- CD45 (πανλευκοκυτταρικός δείκτης).

Η εισαγωγή νέων δεικτών με ειδικότητα για τις παθολογικές πρωτεΐνες που προκύπτουν από τις αναδιατάξεις των γονιδίων, καθώς και η ποσοτική έκφραση των αντιγόνων δίνουν την δυνατότητα στην κυτταρομετρία ροής να συμβάλλει ακόμη περισσότερο στην μελέτη και αντιμετώπιση περιπτώσεων ΟΛ.

Κατόπιν του προσανατολισμού, πραγματοποιείται ένα ευρύτερο panel δεικτών που επιβεβαιώνει τα ευρήματα της πρώτης διερεύνησης και συγκεκριμενοποιεί τον υπότυπο της νόσου.

Ένα ιδιαίτερο παράδειγμα της αξίας του φαινότυπου στα αιματολογικά νεοπλάσματα αποτελεί το ότι η χρήση του είναι απαραίτητη στην διάγνωση της **ΟΜΛ με ελάχιστη διαφοροποίηση** (δεν παρατηρούνται μορφολογικές και κυτταροχημικές αποδείξεις μυελικής διαφοροποίησης), της **οξείας μεγακαρυοβλαστικής λευχαιμίας** (οι μεγακαρυοβλάστες εκφράζουν γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων, που έχουν την τάση να προσκολλώνται στα μονοκύτταρα δίνοντας ψευδή αποτελέσματα), της **οξείας λευχαιμίας αδιευκρίνιστης σειράς** (περιέχει δύο ή και περισσότερους διαφορετικούς

βλαστικούς πληθυσμούς που εκφράζουν δείκτες για διαφορετικές σειρές στο ίδιο κύτταρο), καθώς και του **νεοπλάσματος από βλαστικά πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα** (ο βλαστικός πληθυσμός του συγκεκριμένου νοσήματος δεν εκφράζει ειδικούς δείκτες κάποιας σειράς).

Οι οξείες λευχαιμίες χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό ετερογένειας. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αληθή αναγνώριση των άτυπων ανοσοφαινότυπων αποτελεί η γνώση του φυσιολογικού προφίλ έκφρασης των δεικτών στα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης στον μυελό. Δεδομένης αυτής της γνώσης, η διερεύνηση της άτυπης νόσου περιλαμβάνει τον εντοπισμό των ατυπιών στα διάφορα στάδια ωρίμανσης όπως:

- Την ασύγχρονη έκφραση δεικτών (ταυτόχρονη έκφραση δεικτών ωριμότητας και αωρότητας)
- Έκφραση δεικτών διαφορετικών κυτταρικών σειρών σε ένα κύτταρο
- Υπερέκφραση δεικτών
- Απουσία έκφρασης δεικτών που φυσιολογικά πρέπει να εκφράζονται
- Μη αναμενόμενα δεδομένα σκέδασης, τα οποία δείχνουν προς ανώμαλη μορφολογία. [9, 32, 39]

2.1.3.6 Ανίχνευση ελαχίστης υπολειμματικής νόσου στις ΟΛ με χρήση κυτταρομετρίας ροής

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα που προσφέρει η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής στην ανίχνευση της **ελαχίστης υπολειμματικής νόσου (EYN)** είναι η καθολικότητα της εφαρμογής σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με ΟΛ, ανεξαρτήτως της ύπαρξης ή όχι γενετικών διαταραχών. Η ασύγχρονη έκφραση δεικτών εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς και μπορεί να αξιολογηθεί αναλόγως του είδους της νόσου μέσω της τακτικής παρακολούθησης συστημάτων δεικτών που δεν πρέπει να εκφράζονται ταυτόχρονα. Προκειμένου να υπάρχει αντικειμενικότερη εικόνα είναι σοφό να επιλέγεται ένα ή/και περισσότερα συστήματα ασύγχρονης έκφρασης των οποίων η πορεία θα αξιολογούνται ως δείκτες ύπαρξης άτυπων μορφών.

Στην Β-ΟΛΛ η εκτίμηση της EYN κρίνεται απαραίτητη, καθώς δείγμα παρουσίας της νόσου στον μυελό δείχνει υποτροπή αυτής, παρομοίως και στην Τ-ΟΛΛ. Η εκτίμηση της

ΕΥΝ στην ΟΜΛ παρουσιάζει μεγαλύτερη δυσκολία, λόγω της ετερογένειας της συγκεκριμένης ομάδας νόσων και της ελλιπματικής περιγραφής της νόσου.[32, 39]

2.1.3.7 Κυτταρομετρία ροής και ΧΜΛ

Η χρόνια φάση της συγκεκριμένης μυελοϋπερπλαστικής νόσου δεν μπορεί να μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Η μεγάλη αξία της τεχνολογίας εμφανίζεται στην οξεία μορφή της νόσου ή στο στάδιο της διαφοροποίησης των βλαστών. Ενώ αρχικά η μελέτη της νόσου στα πρώιμα στάδια αποτελούσε αντικείμενο μεγάλου ενδιαφέροντος, μελέτες έδειξαν ότι τα δεδομένα που μπορούν να συλλεχθούν σε αυτό το στάδιο δεν διαθέτουν ιδιαίτερη κλινική χρήση, πάραυτα η τεχνολογία δίνει την δυνατότητα της παρακολούθησης της γενικής εικόνας με σκοπό την εμβάθυνση σε περίπτωση επιτάχυνσης της εξέλιξης της ασθένειας.[39]

2.1.3.8 Κυτταρομετρία ροής και ΧΛΛ

Η Β-ΧΛΛ συνδέεται στενά με άλλες μορφές λεμφοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων, όπως προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, λευχαιμία των τριχωτών κυττάρων, νόσος του Waldenstrom, καθώς και με την λευχαιμική φάση του μικρολεμφοκυτταρικού λεμφώματος.

Μέσω της χρήσης της τεχνολογίας είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί διαφοροδιάγνωση μεταξύ της Β- ΧΛΛ από τις υπόλοιπες περιπτώσεις που περιγράφονται. Συγκεκριμένα, ο τυπικός ανοσοφαινότυπος της Β-ΧΛΛ χαρακτηρίζεται ως: CD5+CD19+dimCD20+dimCD22+dimCD23+CD79aslgdim. Από την στιγμή που ο φαινότυπος είναι γνωστός μέσω ανοσοφαινοτυποποίησης της υπό μελέτη νόσου, είναι δυνατή η σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις και συνεπώς η διάγνωση της ασθένειας. [32, 39]

2.1.3.9 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην μελέτη και παρακολούθηση των Μυελοδυσπλαστικών - Μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων

Τα **μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ)** χαρακτηρίζονται από διαφόρων βαθμών αναστολή της ωρίμανσης και διαφοροποίησης των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Χαρακτηριστικό σημείο που προδίδει την παρουσία της νόσου αποτελεί ο αυξημένος ρυθμός απόπτωσης σε όλες τις κυτταρικές βαθμίδες με αποτέλεσμα την ελλιπή αιμοποίηση. Καθώς τα ΜΔΣ ως νόσος χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό κλινικής και αιματολογικής ετερογένειας, η εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής σε αυτά παραμένει διερευνητική. Τα ευρήματα του ανοσοφαινότυπου εστιάζονται περισσότερο σε εντοπισμό ασύγχρονης έκφρασης δεικτών στα κύτταρα της μυελικής και της ερυθράς σειράς, σε άτυπες εκφράσεις αντιγόνων άλλων κυτταρικών σειρών, καθώς και υπερέκφραση ή υποέκφραση δεικτών. Προς το παρόν, η πιο ουσιαστική εφαρμογή της μεθοδολογίας εντοπίζεται στον υπολογισμό ποσοστού των βλαστών και στην επιβεβαίωση των μορφολογικών ευρημάτων μέσω των δεδομένων σκέδασης. [32, 39]

2.1.3.10 Συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στην μελέτη και παρακολούθηση των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών

Ως πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες ορίζονται τα νοσήματα τα οποία οφείλονται σε κλωνικές διαταραχές των πλασματοκυττάρων ή των πρόδρομων μορφών αυτών. Διακρίνονται σε πολυκλωνικές αντιδραστικές και μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Οι μονοκλωνικές γαμμαπάθειες στην συνέχεια χωρίζονται σε μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης αιτιολογίας και στις πλασματοκυτταρικές νεοπλασίες που περιλαμβάνουν το **πλασματοκύττωμα**, το **πολλαπλουν μύελωμα**, την **πλασματοκυτταρική λευχαιμία**, την **αμυλοείδωση**, καθώς και τις **νόσους των ελαφρών και βαρέων αλυσίδων**.

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμεύει στον αναγνώριση των παθολογικών πλασματοκυττάρων, καθώς και στον διαχωρισμό μεταξύ Β-λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων και πλασματοκυτταρικών νεοπλασιών. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των πλασματοκυττάρων είναι το CD38, του οποίου η έκφραση

παρατηρείται αυξημένη στα πλασματοκύτταρα, και το CD138 που αποτελεί ειδικό δείκτη των πλασματοκυττάρων. Ο φυσιολογικός φαινότυπος των πλασματοκυττάρων είναι: CD38brightCD138+CD45-/CD19+CD20-. Στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα παρατηρείται ασθενής έκφραση των CD38 και CD138, ενώ χαρακτηρίζονται συνήθως ως: CD45-CD19-CD20-. [39, 41]

2.1.3.11 Πολλαπλούν μυέλωμα και κυτταρομετρία ροής

Το πολλαπλούν μυέλωμα αποτελεί μία από τις κυριότερες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες χαρακτηριζόμενη από αναίτιο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των πλασματοκυττάρων του μυελού. Η παρουσία των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων μπορεί να κυμαίνεται από περισσότερο από το 5% των κυττάρων του μυελού μέχρι και την πλήρη κατάληψη και διήθηση του μυελού από τις νεοπλασματικές μορφές.

Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε τμήμα του μυελού, το οποίο κατόπιν κατάλληλης επεξεργασίας, εισάγεται υπό την μορφή εναιωρήματος κυττάρων στον κυτταρομετρητή ροής για αξιολόγηση. Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται οι σημαντικότεροι διαγνωστικοί δείκτες που αξιολογούνται στο πολλαπλούν μυέλωμα.

Πίνακας 2.1 Οι σημαντικότεροι διαγνωστικοί δείκτες που αξιολογούνται στο πολλαπλούν μυέλωμα. [39, 41]

Δείκτες	Φυσιολογικός φαινότυπος πλασματοκυττάρων	Διαταραγμένος φαινότυπος πλασματοκυττάρων
CD19	+	-
CD20	-	Dim+
CD27	++	- or dim-
CD28	-/weak	+
CD33	-	+
CD38	++	Dim+
CD45	+	-
CD54	+	Dim+
CD56	-	++
CD81	+	- or dim+
CD117	-	+
CD200	weak	+ / ++
Smlg	-	+
CD319	+	+
BCMA	+	+

2.2 Κυτταρομετρία ροής και μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

2.2.1 Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

Οι κυτταρικοί τύποι που συναντώνται στο αίμα προέρχονται από τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα HSC (Hematopoietic stem cells). Εντοπίζονται σε μικρούς πληθυσμούς στα σημεία παραγωγής των κυττάρων του αίματος και σε ακόμη μικρότερους στο περιφερικό αίμα. Αποτελούν το 0,05% του συνόλου των αιμοποιητικών κυττάρων και κύριο χαρακτηριστικό τους αποτελεί η δυνατότητα της αυτοανανέωσης. Μέσω αυτής της ικανότητας είναι δυνατό να παραμένει ένα σταθερό απόθεμα αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στον οργανισμό. Τα θυγατρικά κύτταρα των αρχέγονων αιμοποιητικών μπορούν είτε να παραμείνουν στην φάση G0 του κυτταρικού τους κύκλου είτε να διαφοροποιηθούν σε δεσμευμένα προγονικά κύτταρα, τα οποία στην συνέχεια θα σχηματίσουν τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του αίματος. [43]

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε δύο διαφορετικούς τύπους:

- Πολυδύναμα μυελογενή αρχέγονα κύτταρα: Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν την δυνατότητα να σχηματίζουν αποικίες σε κυτταροκαλλιέργειες και λόγω αυτής ονομάζονται μονάδες σχηματισμού αποικιών (Colony Forming Units, CFU). Από τα πολυδύναμα μυελογενή κύτταρα προέρχονται πέντε διαφορετικές κυτταρικές ομάδες του αίματος, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, τα βασεόφιλα, τα ηωσινοφιλα, καθώς και τα ουδετερόφιλα-μονοκύτταρα.
- Πολυδύναμα λεμφικά αρχέγονα κύτταρα: Από αυτήν την κυτταρική σειρά σχηματίζονται τα T και B λεμφοκύτταρα. [43]

Πίνακας 2.2 Πίνακας διαφοροποίησης πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές του αίματος.[9]

Φάση	Αρχέγονα κύτταρα	Προγονικά κύτταρα	Πρόδρομα κύτταρα (βλάστες)	Πριμα κύτταρα
Πρώιμη μορφολογική	Μορφολογικά μη αναγνωρίσιμα: παρόμοια με τα λεμφοκύτταρα		Αρχόμενη μορφολογική διαφοροποίηση	Ευδιάκριτη μορφολογική διαφοροποίηση
Μιτωτική δραστηριότητα	Χαμηλή μιτωτική δραστηριότητα, αυτοανανέωση, σπάνια στο μυελό των οστών	Υψηλή μιτωτική δραστηριότητα, αυτοανανέωση, εντόπιση στο μυελό των οστών και στα λεμφικά όργανα, μονο- ή διδύναμα κύτταρα	Υψηλή μιτωτική δραστηριότητα, απουσία αυτοανανέωσης, εντόπιση στο μυελό των οστών και στα λεμφικά όργανα, μονοδύναμα (δεσμευμένα)	Απουσία μιτωτικής δραστηριότητας, άφθονα στο αίμα και στα αιμοποιητικά κύτταρα

2.2.2 Ταυτοποίηση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με χρήση κυτταρικών δεικτών και κυτταρομετρία ροής

Όπως αναφέρθηκε, τα δύο κύρια χαρακτηριστικά ενός αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου αποτελούν η δυνατότητα της αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης στις διάφορες κυτταρικές σειρές του αίματος. Ο μικρός αριθμός τους μέσα στους κυτταρικούς πληθυσμούς του αίματος (1 στα 10.000 κύτταρα στον μυελό και 1 στα 100.000 κύτταρα στο περιφερικό αίμα) προκαλεί σημαντικό πρόβλημα στον εντοπισμό τους και κατά συνέπεια στην χρήση τους. Η μορφολογική ανάλυση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων δείχνει τις ομοιότητες τους με τα λευκά αιμοσφαίρια. Λόγω αυτής τους της ομοιότητας χρησιμοποιούνται σύμπλοκα διαφοροποίησης, καθώς και κυτταρικοί δείκτες που συναντώνται στα λευκοκύτταρα.

Στο παρελθόν έχουν υπάρξει αρκετές απόπειρες για τον εμπλουτισμό και κατά συνέπεια εντοπισμό των βλαστοκυττάρων χρησιμοποιώντας ποικίλες τεχνικές καταλήγοντας στην χρήση της κυτταρομετρίας ροής από μεγάλη μερίδα του ερευνητικού κλάδου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο εμπλουτισμός των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων βασισμένος στην απουσία έκφρασης ενός συνόλου δεικτών διαφοροποίησης κυτταρικής σειράς (lineage-negative cocktail), καθώς και την έκφραση γνωστών βλαστοκυτταρικών δεικτών ποντικού (Sca-1, Thy1.1) που χρησιμοποιήθηκε από τον Weissman και τους συνεργάτες του.

Οι δύο κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην αναγνώριση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων με χρήση κυτταρομετρίας ροής βασίζονται πάνω στα βασικά χαρακτηριστικά των HSC:

- Χρήση συμπλοκών αντισώματος-φθοριοχρώματος έναντι κυτταρικών δεικτών στην επιφάνεια των HSC. Οι κυτταρικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο είναι οι c-Kit, Sca-1 και δείκτες κυτταρικής σειράς. Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που φέρουν αυτούς τους δείκτες ονομάζονται πληθυσμοί KSL (c-Kit+, Sca-1+, Lineage). Η χρήση επιπλέον κυτταρικών δεικτών όπως το CD34 και EPCR επιτρέπει τον διαχωρισμό των HSC από προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα που βρίσκονται στην διαδικασία της διαφοροποίησης εντός των πληθυσμών KSL. Η πρόσφατη ανακάλυψη μίας οικογένειας πρωτεϊνών (CD150, CD48, CD244) που φέρουν την ονομασία SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule ή μόριο ενεργοποίησης λεμφοκυτταρικής σηματοδότησης) επιτρέπει τον εμπλουτισμό της τεχνικής KSL και προσφέρει ακόμη μεγαλύτερο βαθμό ακρίβειας στον διαχωρισμό των HSC από τις υπόλοιπες προγονικές μορφές.
- Αξιοποίηση των φυσιολογικών ικανοτήτων των HSC, όπως η αυξημένη δραστηριότητα εκροής ορισμένων φθοριοχρωμάτων, π.χ. η Hoechst 33342 που δεσμεύεται στο DNA και η Rhodamine123 που δεσμεύεται στα μιτοχόνδρια. Η δυνατότητα αυξημένης εκροής που διαθέτουν τα HSC οφείλεται στην αυξημένη έκφραση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών μεταφοράς, όπως το ATP-Binding Cassette (ABC), οι οποίες αποβάλλουν τα φθοριοχρώματα στο κυτταρικό περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η απορροφητικότητα των φθοριοχρωμάτων στα HSC να είναι χαμηλή. Για παράδειγμα, εάν

χρησιμοποιηθεί χρώση Hoechst 33342 σε κύτταρα του μυελού των οστών και στην συνέχεια πραγματοποιηθεί ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής με διέγερση υπό ακτινοβολία UV, στην περίπτωση που εντοπισθεί εκπομπή σε ερυθρά και κυανά μήκη κύματος, η χαμηλή απορροφητικότητα της χρώσης Hoechst 33342 δημιουργεί έναν υποπληθυσμό ο οποίος αποτελείται από εμπλουτισμένα HSC και είναι διακριτός από τα υπόλοιπα διαφοροποιημένα κύτταρα. [44, 45]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η λειτουργική ικανότητα των HSC να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αίματος τα καθιστά ιδανικά μοσχεύματα σε περιπτώσεις που ο οργανισμός αντιμετωπίζει δομικά ή παθολογικά προβλήματα στην διαδικασία της αιμοποίησης. Συγκεκριμένα, ο τύπος των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων που μπορεί να μεταμοσχευθεί εφ' όρου ζωής ονομάζεται **Long Term-HSC (LT-HSC, μακροπρόθεσμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα)** και διαθέτει και τις δύο βασικές ιδιότητες των βλαστοκυττάρων. Τα LT-HSC διαφέρουν από τα **Short Term-HSC (ST-HSC, βραχυπρόθεσμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα)** ως προς την δυνατότητα διαφοροποίησης, η οποία είναι μικρότερη από αυτήν των LT-HSC.

Σε μοντέλα που χρησιμοποιούν δείγμα μυελού από ποντίκι, χρησιμοποιείται μια ποικιλία μεθόδων απομόνωσης LT-HSC. Παρόλο που οι συνδυασμοί κυτταρικών δεικτών δεν δείχνουν κάποια εικόνα συνοχής, έχει παρατηρηθεί ότι οι μέθοδοι συχνά αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους φανερώνοντας κάλυψη κοινών κυτταρικών δεικτών μεταξύ των τεχνικών. [45]

Πίνακας 2.3 Κυτταρικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σε τεχνικές απομόνωσης LT-HSC.[45]

Συνηθισμένες τακτικές απομόνωσης καθαρών HSC	
Φαινότυπος κυτταρικών δεικτών	Κυτταρικός τύπος
SP ^{KLS}	Μακροπρόθεσμα HSCs
Flk2 ⁻ CD34 ⁻ KLS	Μακροπρόθεσμα HSCs
CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD244 ⁻	Μακροπρόθεσμα HSCs
CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD34 ⁻ KLS	Μακροπρόθεσμα HSCs
CD45 ^{mid} Lin ⁻ Rhodamine ^{lo} SP	Μακροπρόθεσμα HSCs
CD150 ⁺ Thy1.1 ^{lo} Flk2 ⁻ KLS	Μακροπρόθεσμα HSCs
Lower SP ^{KLS}	Μακροπρόθεσμα HSCs μυελοειδούς τάσης
Upper SP ^{KLS}	Μακροπρόθεσμα HSCs λεμφοειδούς τάσης
CD150 ^{hi} CD34 ⁻ KLS	Μακροπρόθεσμα HSCs μυελοειδούς τάσης
CD150 ⁻ CD34 ⁻ KLS	Μακροπρόθεσμα HSCs λεμφοειδούς τάσης

2.2.3 Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cell Transplantation, HSCT)

Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων έχει ως σκοπό την αντικατάσταση των BSC των οποίων η λειτουργία έχει διαταραχθεί με νέα υγιή αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα. Εφαρμόζεται όταν τα BSC ή ο μυελός των οστών έχουν φθαρεί ή καταστραφεί από καρκινικές ασθένειες, όπως λεμφοαιματοποιητικά νεοπλάσματα, στερεούς όγκους, αντικαρκινικές θεραπείες, όπως χημειοθεραπεία ή υψηλές δόσεις ακτινοβολίας, όπως και από ορισμένες γενετικές ασθένειες. Οι ενδείξεις για HSCT βασίζονται στο είδος της ασθένειας, τους θεραπευτικούς στόχους, καθώς και την διαθεσιμότητα και την πηγή από την οποία θα προέλθουν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Το 2006, το διεθνές κέντρο ερευνών μεταμόσχευσης αίματος και μυελού (IBMTR, διεθνές κέντρο ερευνών μεταμόσχευσης αίματος και μυελού), έχοντας συλλέξει δεδομένα από περισσότερα από 400 κέντρα μεταμόσχευσης κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι αιματολογικές κακοήθειες (και οι προκαρκινικές καταστάσεις) αποτελούν τα πιο συνήθη αίτια για αλλογενείς HSCT. Η οξεία μυελογενής λευχαιμία καταλαμβάνει το 33% του συνόλου των HSCT, η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία το 16%, η χρόνια μυελογενής λευχαιμία το 6%, άλλες λευχαιμίες και προ-λευχαιμίες το 18%, το λέμφωμα του Hodgkin και το μη-Hodgkin λέμφωμα το 12% και τέλος το πολλαπλό μύελωμα το 3%.

Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων διακρίνεται κυρίως σε αυτόλογου μοσχεύματος και αλλογενούς μοσχεύματος:

- Στην **μεταμόσχευση αυτόλογου μοσχεύματος** πραγματοποιείται συλλογή αιμοποιητικών κυττάρων από τον ίδιο τον ασθενή, τα οποία αποθηκεύονται σε ψυγείο και στην συνέχεια επαναχρησιμοποιούνται στον ίδιο κατόπιν χορήγησης υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας ή ακτινοβολίας. Η αυτόλογη μεταμόσχευση έχει μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας, καθώς τα κύτταρα προέρχονται από τον ίδιο οργανισμό και επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος απόρριψης του μοσχεύματος.
- Στην **μεταμόσχευση αλλογενούς μοσχεύματος** χορηγούνται κύτταρα από άλλον κατάλληλο υγιή δότη, ιδανικά από αδέρφια παρόμοιου γενετικού προφίλ, αλλά ακόμα κατάλληλοι δότες αποτελούν: συμβατός συγγενής δότης, συμβατός μη συγγενής δότης

(VUD, volunteer unrelated donor), μη συμβατός δότης με διαφορά κάποιων αντιγόνων, απλός ταυτόσημος δότης.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι αναλόγως των περιστάσεων ως προς την διαθεσιμότητα κατάλληλου δότη, την ηλικία, αλλά και ως προς την ένταση της χημειοθεραπείας που προηγήθηκε της μεταμόσχευσης, τα είδη του μοσχεύματος μπορούν να χαρακτηριστούν και ως:

- *Μυελοαφανιστικό μόσχευμα* (αυτόλογο ή αλλογενές) πριν την χορήγηση του οποίου πραγματοποιείται χημειοθεραπεία σε πολύ υψηλές δόσεις με σκοπό την πλήρη καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος του λήπτη.
- *Μη-μυελοαφανιστικό μόσχευμα*, ονομαζόμενο και μόσχευμα ελαττωμένης έντασης, όπου το ζητούμενο είναι να αποφευχθεί η εκτεταμένη χημειοθεραπεία ή η έκθεση σε ακτινοβολία. Συνήθως αυτού του είδους μοσχεύματα απευθύνονται σε άτομα τρίτης ηλικίας που δεν ενδέχεται να αντέξουν πλήρη μυελοαφανιστική θεραπεία.
- *Συνεργατικά μοσχεύματα*, τα οποία προέρχονται από μονοζυγωτικά δίδυμα αδέρφια.

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα στις ΗΒSC μπορούν να απομονωθούν από τρεις κύριες πηγές: το **περιφερικό αίμα**, τον **μυελό των οστών**, καθώς και το **ομφαλοπλακουντιακό αίμα**. Επομένως, αναλόγως του σημείου συλλογής των αρχέγονων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων ο τύπος του μοσχεύματος αποκαλείται:

- *Μόσχευμα μυελού των οστών (Bone Marrow Transplant ή BMT)*: ο μυελός συλλέγεται με την χρήση συρίγγων που στο εσωτερικό τους φέρουν ηπαρίνη και βελόνες μεγάλου διαμετρήματος. Αποθηκεύεται σε ειδικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας και μπορεί να διατηρηθεί στους 4 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες χωρίς να επηρεαστεί η ζωτικότητα των βλαστοκυττάρων.
- *Μόσχευμα αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Stem Cell ή PBSC)*: τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα περιφερικού αίματος χρησιμοποιούνται ευρέως σε αλλογενείς HSCT και έχουν αντικαταστήσει τον μυελό σαν μόσχευμα για αυτόλογες HSCT. Τα PBSC εγκαθίστανται με μεγαλύτερη ταχύτητα από ότι τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα του μυελού. Ο χρόνος που απαιτείται για την εμφάνιση

των επιθυμητών επιπέδων των έμμορφων συστατικών του αίματος στον οργανισμό του λήπτη είναι συνήθως 11-14 ημέρες.

- *Μόσχευμα αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων ομφάλιου λώρου (Cord Blood Stem Cell transplant):* στις αλλογενείς HSCT η απουσία κατάλληλου HLA δότη, περιορίζει αρκετά την πιθανότητα να βρεθεί κατάλληλο μόσχευμα. Μία λύση που δόθηκε σε αυτό το πρόβλημα ήταν η δημιουργία των τραπεζών ομφαλοπλακουντιακού αίματος. Η χρήση του συγκεκριμένου μοσχεύματος διαθέτει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως είναι η εύκολη και ασφαλής προμήθεια, η άμεση διαθεσιμότητα, η μειωμένη πιθανότητα διάδοσης ιών, όπως και η πληθώρα μη-ώριμων λευκοκυττάρων. Παρόλα τα πλεονεκτήματα, το ομφαλοπλακουντιακό αίμα περιέχει λιγότερα κύτταρα στο σύνολο από ότι οι υπόλοιπες πηγές συλλογής και επομένως η ανοσοαιματολογική φυσιολογική εικόνα αργεί περισσότερο να επανέλθει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερες πιθανότητες μόλυνσης και θανάτου κατά την μεταμόσχευματική περίοδο. [46-48]

2.2.4 Ρόλος και συμβολή κυτταρομετρίας ροής στην μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων βασίζεται ιδιαίτερα στην τεχνολογία της κυτταρομετρίας από την αρχική διάγνωση και πρόγνωση της αιμοποιητικής ασθένειας, την εκτίμηση και παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, την ανάλυση αυτόλογων ή αλλογενών CD34+ κυττάρων (δείκτης που φέρουν οι βλαστοκυτταρικοί τύποι με δυνατότητα δημιουργίας αιμοποιητικών αποικιών στον μυελό) και τέλος στον εντοπισμό εναπομείνουσας ασθένειας στον οργανισμό. Όλα τα παραπάνω σημεία παρακολούθησης στην εκκίνηση, πορεία και θεραπεία μίας αιμοποιητικής ασθένειας απαιτούν την αυστηρή διαγνωστική χρήση της κυτταρομετρίας ροής σε συνεργασία με τα μορφολογικά δεδομένα που παρέχουν τα κυτταρολογικά / κυτταρογενετικά και μοριακά εργαστήρια. Είναι σημαντικό να αναφερθεί και η προκλινική συμβολή της κυτταρομετρίας μέσω της τεχνολογίας κυτταροδιαχωρισμού βασισμένου στον φθορισμό, καθώς η δυνατότητα συλλογής συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων βοηθά στην εφαρμογή αυτών των θεραπειών σε κλινικό περιβάλλον.

Συγκεκριμένα, οι κλινικές χρήσεις και εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στην μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων περιγράφονται ακολούθως:

- Διάγνωση και κατάταξη αιματολογικών διαταραχών:

Ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός του αιματοποιητικού νεοπλάσματος αποτέλεσε μία από τις πρώτες χρήσεις της κυτταρομετρίας ροής στην κλινική ιατρική βελτιώνοντας έτσι την ακριβή διάγνωση και πορεία αυτών των ασθενειών, όπως και την παρακολούθηση υποτροπής αυτών κατόπιν μεταμόσχευσης BSC. Η ταυτόχρονη ανάλυση τριών ή τεσσάρων αντιγόνων στην επιφάνεια των κυττάρων, χρησιμοποιώντας δύο ή και περισσότερα λέιζερ, καθώς και η ποσοτική εκτίμηση της πυκνότητας των αντιγόνων αποτέλεσαν πολύτιμα εργαλεία στην διάγνωση των αιματολογικών κακοηθειών. Έτσι, η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται με επιτυχία στον εντοπισμό κακοηθειών σε κυτταροπενικούς ασθενείς, στην ταυτοποίηση οξείας μυελογενής λευχαιμίας με ελάχιστη διαφοροποίηση, στην διαφοροποίηση φυσιολογικών και λευχαιμικών κυττάρων κατόπιν μεταμόσχευσης μυελού των οστών.

- Ποσοτικοποίηση αρχέγονων αιμοποιητικών στο μόσχευμα:

Μία από τις σημαντικότερες συμβολές της κυτταρομετρίας ροής στη BSCT, αποτέλεσε ο φαινοτυπικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων υπεύθυνων για την ανοσοαιμοποιητική ανασύσταση στους ασθενείς που έχουν υποστεί μεταμόσχευση. Η ανακάλυψη του CD34 (μείζον κυτταρικός δείκτης ανθρωπίνων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και προγονικών κυτταρικών σειρών του αίματος), που υπάρχει στην επιφάνεια των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με δυνατότητα σχηματισμού αποικιών κατόπιν HSCT και επομένως υψηλού δυναμικού αποκατάστασης, παρείχε νέα δεδομένα πάνω στους μηχανισμούς παθολογικής, μεταμοσχευτικής, καθώς και φυσιολογικής αιμοποίησης και αποτέλεσε πολύτιμο εργαλείο στην εκτίμηση των αναγκών του μοσχεύματος και του δυναμικού αποκατάστασης που διαθέτει αυτό. Η κλινική χρήση κυτταροδιαχωρισμού φθοριοχρώματος που βασίζεται στην κυτταρομετρία ροής για την απομόνωση των αυτόλογων CD34+ κυττάρων, επέτρεψε την δυνατότητα καθαρής απομόνωσης των επιθυμητών αρχέγονων κυτταρικών σειρών χωρίς τον φόβο επιμόλυνσης από παθολογικά καρκινικά κύτταρα του μυελού/αίματος του δότη, όπως και την διαδικασία ακριβούς ποσοτικοποίησης αυτών.

- Παρακολούθηση αιματοποιητικής ανασύστασης και εκτίμηση κινδύνου εμφάνισης ασθένειας μοσχεύματος εναντίον λήπτη (Graft Versus Host Disease, GVHD) κατόπιν HSCT:

Η ανοσολογική ανασύσταση μετά από μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αποτελεί μια ακολουθία ιδιαίτερα περίπλοκων μηχανισμών των οποίων η παρακολούθηση πριν την εμφάνιση της κυτταρομετρίας ροής ήταν δύσκολη και ανακριβής. Ο μικρός αριθμός κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος με ιδιάζοντες φαινοτύπους και πολλαπλές λειτουργικές ανωμαλίες που παρατηρείται στην μεταμοσχευτική εικόνα του αίματος του λήπτη καθιστά τον χαρακτηρισμό της αιματοποιητικής λειτουργίας δύσκολο με την χρήση συμβατικών μεθόδων μικροσκόπησης φθορισμού και κυτταροκαλλιεργείων. Παρόλο που η εκτίμηση της ανοσολογικής ανασύστασης κατόπιν HSCT δεν εντάσσεται στις εξετάσεις ρουτίνας, οι πληροφορίες που παρέχει η παρακολούθηση της έχουν ιδιαίτερη αξία στην πρόβλεψη και τον εντοπισμό μολύνσεων, GVHD, υποτροπή, καθώς και για την εκτίμηση λειτουργίας της ανοσοπροφύλαξης. Η μεταμόσχευση αιματοποιητικού μοσχεύματος παρακολουθείται κατόπιν της επέμβασης και εκτιμάται συγκρίνοντας τα επίπεδα των έμμορφων συστατικών του αίματος με την πανκυτταροπενική εικόνα που παρατηρείται κατά την προετοιμασία της θεραπείας. Οι γενικές αιματολογικές εξετάσεις μπορούν να παρέχουν πιο ολοκληρωμένη εικόνα όταν συνδυάζονται και συνεκτιμώνται με κυτταρομετρικές τεχνικές φθορισμού, οι οποίες μπορούν να εντοπίσουν πιο δυσδιάκριτα σημάδια της προσαρμογής των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και να βοηθήσουν στο διαχωρισμό των διαφόρων κυττάρων και της χίμαιρας που προκύπτουν στην περίπτωση υποτροπής και απόρριψης του μοσχεύματος.

Στο μέλλον οι ποικίλες μεθοδολογίες της κυτταρομετρίας ροής θα αντικαταστήσουν την πλειονότητα των μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα στην HSCT. Οι νέοι τομείς ανάπτυξης θα συμπεριλαμβάνουν τον ακριβή εντοπισμό μόλυνσης από κυτταρομεγαλοϊούς, τον εντοπισμό αλλο-ανοσοποίησης των αιμοπεταλίων και των ουδετερόφιλων, την καταγραφή χίμαιρας μέσω φθορισμού σε in situ υβριδισμό και την επιλογή HSC ή ανοσοσυμβατών αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων για μεταμόσχευση. Η πλήρης καταγραφή, κατανόηση και παρακολούθηση του κυτταρικού

κύκλου των φυσιολογικών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, όπως και των νεοπλαστικών ιστών, μέσω χρώσης DNA θα αποτελέσει ανεκτίμητο εργαλείο σε μελέτες με αντικείμενο την πρόγνωση της HSCT. Η δυνατότητα της κυτταρομετρίας ροής να παράγει μεγάλο όγκο πολυπαραμετρικών, υψηλής πολυπλοκότητας, δεδομένων τα οποία υπάγονται αυτόματα ανάλυση τοποθετεί την συγκεκριμένη τεχνολογία σε θέση κλειδί για την χρήση και εφαρμογή μεθόδων βασισμένων σε αυτή σε κλινικό περιβάλλον.

Συμπερασματικά, ο ρόλος της τεχνολογίας της κυτταρομετρίας ροής είναι αδιαμφισβήτητος διάχυτος σε όλα τα στάδια της μεταμόσχευσης από την ταυτοποίηση, αξιολόγηση και συλλογή των βλαστοκυττάρων, την αξιολόγηση της νόσου και των επιπλοκών που προκύπτουν από αυτήν, μέχρι και την εκτίμηση, παρακολούθηση, αξιολόγηση του μοσχεύματος και γενικά της διαδικασίας της μεταμόσχευσης. [47-50]

2.3 Κυτταρομετρία ροής αιμοπεταλίων

2.3.1 Ο ρόλος των αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια χρήζουν εξαιρετικής σημασίας στην φυσιολογική διαδικασία της αιμόστασης, καθώς και στην παθολογική θρόμβωση. Τα αιμοπετάλια συγκεντρώνονται στα σημεία όπου υπάρχουν βλάβες στο αγγειακό τοίχωμα ή σε σημεία όπου έχει υπάρξει ρήξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας μέσω αλληλεπιδράσεων συγκόλλησης μεταξύ των αιμοπεταλίων και του υποενδοθηλιακού πλέγματος.

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά απύρρηνα κύτταρα του αίματος με εκτιμώμενες διαστάσεις 2-5μm διάμετρο και 0,5μm πάχος, προερχόμενα από το κυτταρόπλασμα των μεγακαρυωτικών. Ενώ σε κατάσταση ηρεμίας το σχήμα των αιμοπεταλίων είναι δισκοειδές, κατόπιν ενεργοποίησης γίνεται πιο σφαιρικό εμφανίζοντας προεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης. Ο χρόνος ζωής τους είναι περίπου 10 ημέρες με ρυθμό ανανέωσης περίπου το 10% του φυσιολογικού αριθμού τους και κατόπιν λήξης αυτού αποδομούνται από τα μακροφάγα στον σπλήνα και στο ήπαρ.

Τα αιμοπετάλια όντας τα μικρότερα από τα κύτταρα του αίματος, εντοπίζονται κατά την ροή του αίματος κοντά στα αγγειακά τοιχώματα, όπου και κινούνται εφαιπτόμενα στο ενδοθηλιακό αγγειακό τοίχωμα. Το ενδοθήλιο έχει την ικανότητα να αποτρέπει την συγκόλληση των συστατικών του αίματος στην επιφάνειά του, όταν όμως σε κάποιο σημείο του τοιχώματος υπάρχει ρήξη, τα νημάτια και μία πληθώρα ουσιών (κολλαγόνο, παράγοντας von Willebrand κτλ.) που πλέον είναι εκτεθειμένα στην ροή του αίματος, προσελκύνουν τα αιμοπετάλια τα οποία προσκολλώνται στο κολλαγόνο του υποενδοθήλιου (μέσω υποδοχέα ειδικού για το κολλαγόνο) με συμμετοχή του παράγοντα von Willebrand και αλλοιώνουν το σχήμα και το ηλεκτροχημικό τους προφίλ προκειμένου να σχηματίσουν συσσωματώματα. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν ουσίες από τα κοκκία τους (ADP, σεροτονίνη, θρομβοξάνη A₂). Τα συσσωρευμένα αιμοπεταλιακά συσσωματώματα σε συνδυασμό με τα ελεύθερα νημάτια σχηματίζουν την πρωτοπαθής αιμοστατική πλάκα.

Στις λειτουργικές δυνατότητες των αιμοπεταλίων συμπεριλαμβάνονται:

- Η ικανότητα πρόκλησης αγγειοσυσπασξης μέσω της δράσης σεροτονίνης και TXA₂
- Η συστολή του σχηματιζόμενου θρόμβου μέσω της ακτομυοσίνης
- Η σταθεροποίηση του ινώδους μέσω της δράσης του παράγοντα πήξης f XIII [9, 51, 52]

2.3.2 Η δομή των αιμοπεταλίων

Δομικά τα αιμοπετάλια αποτελούνται από τυπική φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα με ενσωματωμένες γλυκοπρωτεΐνες και χοληστερόλη. Σε κατάσταση ηρεμίας τα λιγότερο φορτισμένα φωσφολιπίδια εντοπίζονται στην εξωτερική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ τα πιο αρνητικά φορτισμένα στο εσωτερικό, κατόπιν όμως της ενεργοποίησης του αιμοπεταλίου παρατηρείται μετακίνηση των πιο αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων προς την εξωτερική στοιβάδα καθώς αυτά συμμετέχουν στην διαδικασία της πήξης. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων παρατηρούνται παρατεταμένες προεκβολές, δημιουργώντας μία δομική οντότητα ονόματι επιφανειακό ανοικτό σύστημα διαύλων, του οποίου η παρουσία αυξάνει την λειτουργική επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Το συγκεκριμένο σύστημα

βρίσκεται σε επικοινωνία με ένα άλλο δίκτυο, το πυκνό σωληνοειδές το οποίο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

Η κυτταρική μεμβράνη περιβάλλεται από τον γλυκοκάλυκα, ένα στρώμα πάχους 10-50 nm αποτελούμενο από πρωτεΐνες, βλεννοπολυσακχαρίδες και σιαλικό οξύ, το οποίο περιέχει τις εξωκυττάρειες περιοχές των μεμβρανικών υποδοχέων. Το φορτίο του συγκεκριμένου σχηματισμού είναι αρνητικό, πράγμα που συμβάλλει στην απώθηση μεταξύ των αιμοπεταλίων και των αγγειακών τοιχωμάτων. Στο κυτταρόπλασμα του αιμοπεταλίου εντοπίζονται μιτοχόνδρια, υπεροξειδισώματα, ελεύθερα κοκκία γλυκογόνου, καθώς και διαφόρων ειδών ινίδια που συνθέτουν τον κυτταροσκελετό.

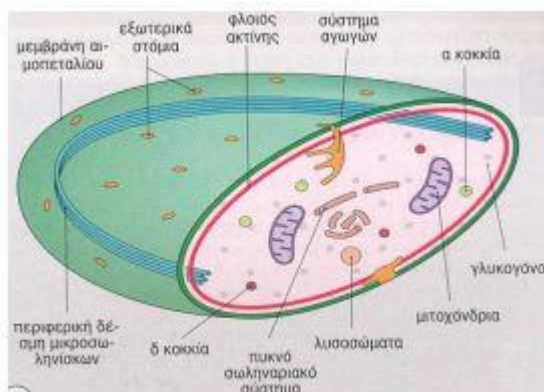
Ο κυτταροσκελετός των αιμοπεταλίων είναι υπεύθυνος για το δισκοειδές σχήμα τους και συμμετέχει στην αλλαγή του σχήματος τους κατά την ενεργοποίηση σχηματίζοντας ψευδοπόδια, καθώς και για την μεταφορά και έκκριση κυστιδίων επιτρέποντας στο αιμοπετάλιο την ανταλλαγή βιολογικών προϊόντων με το περιβάλλον του. Ο κυτταροσκελετός διακρίνεται στα εξής μέρη:

- Ο σκελετός της κυτταρικής μεμβράνης αποτελούμενος από ινίδια και τοποθετημένος στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης
- Ο δακτύλιος μικροσωληνίσκων, ο οποίος εντοπίζεται περιμετρικά του αιμοπεταλίου και είναι υπεύθυνος για το δισκοειδές σχήμα.
- Τα ινίδια ακτίνης καθώς και τα ινίδια που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα

Ένα από τα σημαντικότερα δομικά στοιχεία, τα οποία πρέπει να αναφερθούν περιγράφοντας την αιμοπεταλιακή δομή είναι τα κοκκία. Τα αιμοπετάλια διαθέτουν τρία διαφορετικά είδη εκκριτικών κοκκίων:

- **Κοκκία δ** (πυκνά), τα οποία περιέχουν ADP,ATP, ασβέστιο, σεροτονίνη, ισταμίνη, πυροφωσφατάση, κατεχολαμίνες, ουσίες οι οποίες αποτελούν ισχυρούς επαγωγείς συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.
- **Κοκκία λ**, τα οποία έχουν ως λειτουργία την απορρόφηση του θρόμβου, καθώς αποτελούν λυσοσωμάτια

- **Κοκκία α**, τα οποία εντοπίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και χαρακτηρίζονται ως τα κύρια αποθηκευτικά κοκκία των αιμοπεταλίων. Οι ουσίες που περιέχονται παίζουν λειτουργικό ρόλο στην λειτουργία της πήξης. Οι ουσίες αυτές είναι: η θρομβοσπονδίνη, ο γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας GP IIb/IIIa, η φιμπρενεκτίνη, το ινωδογόνο (παράγοντας πήξης), ο παράγοντας von Willebrand (γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης) , ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (εξουδετερώνει την αντιπηκτική δράση της ηπαρίνης, ρυθμίζει την αγγειακή διαπερατότητα, την κινητοποίηση του ασβεστίου), οι παράγοντες πήξης V και VIII (συμμετοχή στην πήξη), το πλασμινογόνο, ο αναστολέας 1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1, Plasminogen activator inhibitor-1), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) (συμμετέχει στην εκκίνηση της επιδιόρθωσης των κατεστραμμένων αγγείων) [52],[53]



Εικόνα 2.1 Η δομή του αιμοπεταλίου. [9]

2.3.3 Ο σχηματισμός του θρόμβου

Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από το απελευθερωμένο κολλαγόνο και διαλυτών ανταγωνιστών, όπως η θρομβίνη και η διφωσφορική αδενοσίνη. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων οδηγεί στον σχηματισμό ενός σταθερού θρόμβου μέσω δύο ταυτόχρονων διαδικασιών:

- Ενεργοποίηση της ιντεκγρίνης αIIbβ3, η οποία επιτρέπει τον σχηματισμό αιμοπεταλιακών ομοτυπικών συσσωματωμάτων μέσω μοριακών στελεχών ινωδογόνου, σχηματίζοντας ένα φυσικό φραγμό στο σημείο του τραύματος

- Η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{++} (ως απόκριση στην απελευθέρωση κολλαγόνου και θρομβίνης) ενεργοποιεί την διαδικασία μιτοχονδριακής κατακρήμνισης και την πρωτεΐνη scramblase (διαμεμβρανική πρωτεΐνη) στην μεμβράνη των προ-θρομβωτικών αιμοπεταλίων. Η εκτεθειμένη φωσφατιδυλοσερίνη (PS) στην επιφάνεια των προ-θρομβωτικών αιμοπεταλίων υποστηρίζει τον σχηματισμό του συμπλόκου προθρομβινάσης και την παραγωγή θρομβίνης. Η θρομβίνη περιορίζει τον σχηματισμό ινωδογόνου στην περιοχή του θρόμβου επιτυγχάνοντας την σταθεροποίησή του.

Τα αιμοπεταλιακά συσσωματώματα και η προ-πηκτική δραστηριότητα συμβάλλουν στον σχηματισμό του θρόμβου. [54]

2.3.4 Αιμοπεταλιακές διαταραχές

Οι νόσοι των αιμοπεταλίων προκαλούν διαταραχές στην διαδικασία της αιμόστασης και τα συμπτώματα που προκαλούνται διαφέρουν από αυτά της διαταραχής αιματικής πήξης (διαταραχές των παραγόντων πήξης). Ο αρχικός αιμοστατικός φραγμός αποτελείται από αιμοπεταλιακά συσσωματώματα τα οποία σταθεροποιούνται από το ινώδες πλέγμα κατά την δευτερεύουσα αιμόσταση, επομένως η διακοπή της αιμορραγίας εξαρτάται από την λειτουργία των αιμοπεταλίων. Ως αποτέλεσμα αυτού οι διαταραχές της αιμόστασης πρώτης φάσης (αιμοπεταλιακή αιμόσταση) χαρακτηρίζονται από αυξημένο χρόνο αιμορραγίας δεδομένης της διαταραχής σχηματισμού της πρωτοπαθούς αιμοστατικής πλάκας.

Οι διαταραχές των αιμοπεταλίων μπορούν να προκληθούν από μη φυσιολογικούς αριθμούς πληθυσμών, όπως ανεπαρκή αριθμό αιμοπεταλίων (θρομβοπενία), και από διαταραχές στην λειτουργία αυτών. Φαινόμενα θρομβοπενίας παρατηρούνται σε διαταραχές στις οποίες ο μυελός δεν δύναται να παράγει επαρκή αριθμό αιμοπεταλίων, καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις στις οποίες ο ρυθμός καταστροφής των αιμοπεταλίων είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό παραγωγής αυτών. Ορισμένα παραδείγματα τέτοιων παθολογικών καταστάσεων αποτελούν:

- Η **ιδιοπαθής (άνοση) θρομβοπενία ή ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα** που οφείλεται στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά των αιμοπεταλίων

- **Η θρομβοπενία οφειλόμενη στην ηπαρίνη** κατά την οποία η έκθεση του ασθενή σε ηπαρίνη λόγω θεραπείας προκαλεί τον σχηματισμό αντισώματος
- **Η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα** κατά την οποία τα αιμοπετάλια χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό πολλαπλών παθολογικών θρόμβων στα αγγεία του σώματος με αποτέλεσμα την εξάντληση των αιμοπεταλιακών αποθεμάτων.

Γενικά κατανάλωση των αιμοπεταλίων μπορεί να παρατηρηθεί και σε διαφορετικές νόσους, όπως στην διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη ή το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, καθώς τα αιμοπετάλια καταναλώνονται ως συνέπεια δυσλειτουργίας των αιμοστατικών μηχανισμών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η αυξημένη καταστροφή αιμοπεταλίων παρουσιάζει εικόνες σπληνομεγαλίας.

Όταν τα αιμοπετάλια δυσλειτουργούν σε κάποιο κομμάτι του συνόλου των λειτουργιών τους, αυτό αντικατοπτρίζεται από την εμφάνιση εκχυμώσεων και αιμορραγιών. Παραδείγματα τέτοιας δυσλειτουργίας αποτελούν η **θρομβασθένεια Glanzmann**, καθώς και το σύνδρομο **Bernard-Soulier**.

Στο σύνδρομο Bernard-Soulier τα αιμοπετάλια αδυνατούν να προσκολληθούν στο σημείο της βλάβης, καθώς τα γονίδια που κωδικοποιούν την γλυκοπρωτεΐνη Ib/IX/V δυσλειτουργούν με αποτέλεσμα οι υποδοχείς του vWF να σχηματίζονται μερικώς ή και καθόλου.

Στην θρομβασθένεια Glanzmann εντοπίζεται διαταραχή στα γονίδια που κωδικοποιούν τις γλυκοπρωτεΐνες IIb/IIIa, οι οποίες αποτελούν δομικά συστατικά των υποδοχέων ινωδογόνου που εντοπίζονται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Αυτή η διαταραχή έχει ως αποτέλεσμα την μερική έκφραση ή και ανυπαρξία των υποδοχέων ινωδογόνου αποτρέποντας το αιμοπετάλιο από το να προσκολληθεί στο σημείο της βλάβης. [9, 55, 56]

2.3.5 Η κυτταρομετρία ροής αιμοπεταλίων ως εργαλείο στην διαγνωστική και θεραπευτική αιματολογία

Η κυτταρομετρία ροής αιμοπεταλίων αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο που επιτρέπει την ταχύτατη αξιολόγηση πολλαπλών λειτουργικών παραγόντων σε έναν μεγάλο πληθυσμό αιμοπεταλίων ολικού αίματος. Αποτελεί την πλέον κατάλληλη μέθοδο για την μελέτη της έκφρασης των επιφανειακών υποδοχέων των αιμοπεταλίων ποσοτικά και ποιοτικά.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με την χρήση της μεθοδολογίας αποτελούν δείκτη μεγάλης διαγνωστικής αξίας, καθώς παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την λειτουργία και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στον οργανισμό, δίνοντας την δυνατότητα να προληφθούν επεισόδια θρομβοεμβολισμού, στεφανιαία σύνδρομα περιφερικών αγγειακών νόσων, καθώς και προ-εκλαμψίας.

Η μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιείται επίσης και στην μελέτη και σύγκριση της δράσης διαφόρων αντι-αιμοπεταλιακών φαρμάκων στο επίπεδο των αιμοπεταλίων στο αίμα, καθώς και για την βελτιστοποίηση της επιθυμητής δόσης. Η τοπογραφική μελέτη των κοκκίων των αιμοπεταλίων, καθώς και η μελέτη της αλληλεπίδρασης αιμοπεταλίου-αιμοπεταλίου, αλλά και αιμοπεταλίου-λευκοκυττάρου, είναι επίσης εφικτή μέσω της χρήσης κυτταρομετρίας ροής. Όλοι αυτοί οι δείκτες σχηματίζουν ακριβή εικόνα της παρουσίας ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία, καθώς και τις θρομβοεμβολικές επιπτώσεις αυτών στον οργανισμό. [57]

2.3.6 Πλεονεκτήματα της χρήσης κυτταρομετρίας ροής στην αξιολόγηση των αιμοπεταλίων

Η μεθοδολογία προσφέρει αρκετές ευκολίες αντικαθιστώντας χρονοβόρες συμβατικές μεθόδους αξιολόγησης και καταμέτρησης προσθέτοντας ακόμη μεγαλύτερη ακρίβεια εντοπισμού και στόχευσης των επιθυμητών πληθυσμών. Συγκεκριμένα πλεονεκτήματα άξια αναφοράς αποτελούν:

- Το γεγονός ότι η ανάλυση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται στην φυσιολογική τους κατάσταση χωρίς ανάγκη ουσιαστικής τροποποίησης της φυσιολογίας τους.

- Η ενεργοποίηση αμελητέας ποσότητας αιμοπεταλίων του δείγματος *in vitro*, καθώς το δείγμα δεν χρειάζεται να υποστεί ιδιαίτερη μεταχείριση πριν την αξιολόγησή του από τον κυτταρομετρητή
- Απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος προκειμένου να προκύψουν αξιολογήσιμα αποτελέσματα
- Η στόχευση ορισμένων δεικτών στην επιφάνεια των προς μελέτη κυττάρων επιτρέπει τον εντοπισμό νεοεπιτόπιων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων
- Ταυτόχρονη αξιολόγηση ενεργοποιημένων και μη αιμοπεταλιακών πληθυσμών
- Υψηλή ευαισθησία εντοπισμού ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, καθώς και μικρομορίων ουσιών φερόμενες από αιμοπετάλια
- Ανάλυση ακρίβειας σε περιπτώσεις ακραίας θρομβοκυτταροπενίας λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μεθοδολογίας
- Η μεθοδολογία προσφέρει μεγαλύτερη ασφάλεια σε σχέση με την χρήση ραδιενεργών ουσιών για σήμανση. [57, 58]

2.3.7 Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής αιμοπεταλίων

Η κυτταρομετρία ροής αιμοπεταλίων αξιολογεί την έκφραση επιφανειακών υποδοχέων, την σύσταση των κοκκίων, τους δεσμευμένους συνδέτες καθώς και την αλληλεπίδραση μεταξύ των αιμοπεταλίων, των ουδετερόφιλων και των μονοκύτταρων, εφόσον μέσω της χρήσης μονοκλωνικών φθορίζοντων αντισωμάτων είναι εφικτό να υπολογιστεί ο απόλυτος αριθμός των τιτλοποιημένων κυττάρων-στόχων με κυτταρομετρία ροής.

Η διάγνωση κληρονομικών θρομβοκυτταροπαθειών (σύνδρομο Bernard-Soulier, θρομβασθένεια του Glanzmann) πλέον πραγματοποιείται εύκολα μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Η αξιολόγηση της παθολογίας και εξέλιξης των οξείων στεφανιαίων συνδρόμων, οξείων εγκεφαλοαγγειακών ισχαιμιών περιφερικών αγγειοπαθειών σακχαρώδους διαβήτη, καθώς και προεκλαμψίας, μπορεί να πραγματοποιηθεί με ακρίβεια μέσω του εντοπισμού ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, μικρομοριακών αιμοπεταλιακών ουσιών και συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων.

Η κυτταρομετρία ροής μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης πριν και μετά από την διενέργεια αγγειοπλαστικής και καρδιοπνευμονικού bypass. Η ταυτοποίηση συσσωματωμάτων λευκοκυττάρων-αιμοπεταλίων στην κυκλοφορία του αίματος μέσω χρήσης κυτταρομετρίας αποτελεί διαγνωστικό δείκτη για αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση *in vivo*. Ακόμη, μέσω της μεθοδολογίας, είναι εφικτή η διάγνωση θρομβοκυτταροπενίας λόγω ηπαρίνης πράγμα που την καθιστά ανεκτίμητο εργαλείο στην παρακολούθηση ασθενών που λαμβάνουν αντι-αιμοπεταλιακές αγωγές.

Μερικές ακόμα χαρακτηριστικές κλινικές και ερευνητικές εφαρμογές της μεθοδολογίας στην παρακολούθηση των αιμοπεταλίων αποτελούν:

- Η ταυτοποίηση αντισωμάτων κατά των αιμοπεταλίων
- Η διευκρίνιση του ρυθμού καταστροφής των αιμοπεταλίων
- Η καταμέτρηση αιμοπεταλίων μέσω κυτταρομετρητή και μέσω ανοσοφθορισμού
- Η διενέργεια ποιοτικού ελέγχου των αιμοπεταλιακών συγκεντρώσεων, η ταυτοποίηση λευκοκυτταρικής επιμόλυνσης, καθώς και η ανοσοφαινοτυποποίηση του ανθρώπινου αιμοπεταλιακού αντιγόνου 1a (HPA-1a) κατά την κατάθεση ασκών σε τράπεζες αίματος και σε μεταμοσχεύσεις.

Η λειτουργία των παραπάνω μεθόδων αποδίδεται στην γνώση των χαρακτηριστικών αλλοιώσεων των αιμοπεταλιακών CD. Η γλυκοπρωτεΐνη αIIbβ3 εντοπίζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στην επιφάνεια των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων και κατόπιν της ενεργοποίησης τους εμφανίζονται δομικές αλλοιώσεις σε αυτήν. Με την χρήση του PAC-1, το οποίο αποτελεί μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του ενεργοποιημένου αIIbβ3, είναι δυνατός ο εντοπισμός των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Ένας άλλος δείκτης το CD62p εντοπίζεται στα κοκκία α των αιμοπεταλίων όταν αυτά βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, ενώ εντοπίζεται στην επιφάνεια αυτών όταν αυτά βρίσκονται σε κατάσταση ενεργοποίησης.

Ο ρυθμός παραγωγής και ο αριθμός νέων αιμοπεταλίων μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της κυτταρομετρίας ροής με την χρήση του φθοριοχρώματος πορτοκαλί της θιαζόλης, το οποίο προσκολλάται στο RNA των αιμοπεταλίων. Δύο ακόμη σημαντικά φθοριοχρώματα

αποτελούν τα Indo-1 και Fluo-3 με την χρήση των οποίων μπορεί να μετρηθεί η ενδοκυτταρική ποσότητα ασβεστίου κατόπιν της ενεργοποίησης. [57-59]

2.4 Καθ' έξιν αποβολές

Ως αποβολή ορίζεται η διακοπή κύησης πριν την 20^η εβδομάδα κύησης, και αποτελεί σχετικά συχνό φαινόμενο, καθώς συμβαίνει σε περίπου 15 με 20% των εγκυμοσύνων. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ποσοστό αυτό αυξάνεται με την ηλικία της μητέρας. **Καθ'έξιν αποβολές (Recurrent Pregnancy Loss, RPL)** ονομάζονται οι συνεχόμενες αποβολές. Ο ακριβής ορισμός διαφέρει από οργάνωση σε οργάνωση, με άλλες να ορίζουν τις καθ' έξιν αποβολές στις 2 μη συνεχόμενες, ενώ οι περισσότερες οργανώσεις τις ορίζουν ως 3 συνεχόμενες αποβολές. Η RPL επηρεάζει το 2-5% των ζευγαριών. Πρωτεύων ονομάζεται η RPL όταν η μητέρα έχει πολλαπλές αποβολές, χωρίς να έχει γεννήσει προηγουμένως υγιές βρέφος, ενώ δευτερεύων ονομάζεται όταν έχει προηγηθεί κύηση μεγαλύτερη των 20 μηνών. [60]

2.4.1 Αιτιολογίες

2.4.1.1 Κυττογενετικές μεταλλάξεις

Κυτογενετικές μεταλλάξεις έχουν βρεθεί να παίζουν ρόλο σε μεγάλο ποσοστό καθ' έξιν αποβολών, και αποβολών γενικά, ειδικά σε συνδυασμό με την ηλικία της μητέρας, και μάλιστα η εύρεση μιας έχει δειχθεί να είναι χρήσιμος προγνωστικός παράγοντας για μελλοντικές εγκυμοσύνες. [60, 61]

Από τις μεταλλάξεις που μπορεί να έχει γονέας, οι αμοιβαίες μετατοπίσεις είναι οι πιο κοινές και αφορούν τις μεταλλάξεις όπου γίνεται ανταλλαγή γονιδιακού υλικού μεταξύ χρωμοσωμάτων, χωρίς να υπάρχει έλλειψη υλικού. Επίσης συχνές και παρόμοιες είναι και οι Ρομπερτσονιανές (Robertsonian) μετατοπίσεις με την σύντηξη των μακρών άκρων δύο ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων με κοινό κεντρομερίδιο. Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, ο γονέας είναι συνήθως ασυμπτωματικός, και συχνά δεν γνωρίζει ότι έχει κάποια τέτοια μετάλλαξη. Όμως, μία εγκυμοσύνη θα έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να διακοπεί. [60]

Όταν ο γονέας έχει μια από τις παραπάνω μεταλλάξεις υπάρχουν οι τρεις ακόλουθες πιθανότητες. Η πρώτη είναι να μην κληρονομηθεί από το έμβρυο η μετάλλαξη και να γεννηθεί με φυσιολογικό καρυότυπο. Δεύτερη πιθανότητα, το έμβρυο γεννιέται με την ίδια αμοιβαία μετάλλαξη που έχει ο γονέας. Σημειώνεται ότι και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, η κύηση διεξάγεται φυσιολογικά. Η τρίτη πιθανότητα αφορά στο γεγονός το έμβρυο να έχει μία μη αμοιβαία μετατόπιση, όπου η κύηση συνήθως τερματίζεται νωρίς (90% των περιπτώσεων). Συχνά το βρέφος μπορεί και να γεννηθεί νεκρό ή με κάποια νοητική ή και αναπτυξιακή στέρηση. Είναι δύσκολο να προβλεφθεί ποια περίπτωση θα είναι το αποτέλεσμα, μια και εξαρτάται από την ακριβή φύση της μετάλλαξης του γονέα, αλλά και από τις πιθανότητες. [60, 62, 63]

Οι κυτογενετικές μεταλλάξεις συνήθως αποτελούν αιτία μία μεμονωμένης αποβολής εξαιτίας του μεγάλου ρόλου που παίζουν οι προαναφερθείσες πιθανότητες. Η πιθανότητα να οφείλεται μια περίπτωση καθ' έξιν αποβολών σε μεταλλάξεις (ειδικά de novo) μειώνεται με κάθε επιπλέον αποτυχημένη κύηση. [61]

2.4.1.2 Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (ΑΦΣ) [Antiphospholipid Syndrome, APS] είναι σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντισωμάτων έναντι των φωσφολιπιδίων και των συμπαραγόντων τους. Κλινικές και εργαστηριακές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν αρτηριακές και φλεβικές θρομβώσεις, υποτροπιάζουσες αποβολές, θρομβοπενία, αιμολυτική αναιμία και νευρολογικές εκδηλώσεις. Όταν το σύνδρομο δεν συνυπάρχει με άλλη νόσο χαρακτηρίζεται ως πρωτοπαθές, διαφορετικά εάν βρεθεί να συνυπάρχει με αυτοάνοσα ή άλλα νοσήματα, χαρακτηρίζεται ως δευτεροπαθές. Τα αντισώματα που ανιχνεύονται και ευθύνονται για το σύνδρομο λέγονται αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα (ΑΦΑ) [Antiphospholipid Antibodies, APL]. Τα πιο συνηθισμένα ΑΦΑ που συναντώνται, είναι τα αντικαριολιπιδικά, τα αντι-β2 γλυκοπρωτεϊνικά αντισώματα (β_2 -glycoprotein I antibodies, anti- β_2 -GPI), και το αντιπηκτικό του λύκου. Τα κριτήρια για την διάγνωση του ΑΦΣ φαίνονται παρακάτω. [64]

Κλινικά, το ΑΦΣ εκδηλώνεται με μια ποικιλία συμπτωμάτων, ήπια, όπως θρομβοπενίες και ημικρανίες, έως σοβαρά, όπως αποβολές, ισχαιμικά έμφρακτα και ανεπάρκεια οργάνων. Συγκεκριμένα, οι αποβολές που οφείλονται στο ΑΦΣ πιστεύεται ότι έχουν σχέση με θρομβώσεις στην εμβρυομητρική επικοινωνία, με αποτέλεσμα την μη επαρκή κυκλοφορία μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Σχετικά με τις RPL, έρευνες έχουν δείξει ότι το 5-20% των διαγνωσμένων RPL παρουσιάζουν ΑΦΣ, που εκδηλώνει αντιπηκτικά του λύκου σε μεγαλύτερο ποσοστό από οποιοδήποτε άλλο ΑΦΑ, άρα πιθανότατα η γνώση του είδους του ΑΦΑ που παρουσιάζεται να αποτελεί μέθοδο πρόβλεψης της πορείας μια εγκυμοσύνης μητέρας με ΑΦΣ. [9, 65]

Η θεραπεία του ΑΦΣ εξαρτάται κυρίως από την εκδήλωσή του. Σε ασυμπτωματικές περιπτώσεις, μπορεί να μην χορηγείται καθόλου θεραπεία, αλλά να προτείνεται να αποφεύγουν άλλους προδιαθεσικούς παράγοντες της οξείας θρομβοπενίας με παράλληλη ισόβια παρακολούθηση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αγωγή περιλαμβάνει ισόβια καθημερινή λήψη αντιπηκτικών φαρμάκων και χαμηλής δοσολογίας ασπιρίνη. Στις εγκύους, παραλλαγή στην θεραπεία πρέπει να γίνει όσο το δυνατόν νωρίτερα ώστε να βελτιωθεί το αποτέλεσμα της εγκυμοσύνης, διότι κάποια αντιπηκτικά φάρμακα σχετίζονται με επιπλοκές στη γέννηση. Για αυτόν τον λόγο, γυναίκες διαγνωσμένες με ΑΦΣ πρέπει να προγραμματίζουν και να προετοιμάζουν την εγκυμοσύνη, ώστε να την ανιχνεύσουν και να αλλάξουν την θεραπεία τους αμέσως, εάν υπάρχει τέτοια ανάγκη. Κατά την κύηση, η θεραπεία αποτελείται από καθημερινή λήψη ασπιρίνης ή κλασσικής ηπαρίνης, ή και των δύο υποδορίως, έως και κάποιες βδομάδες μετά την γέννα. [9, 66]

2.4.1.3 Ανατομικές ανωμαλίες

Οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας χωρίζονται σε συγγενείς και αποκτούμενες. Οι αποκτούμενες περιλαμβάνουν τις ενδομήτριες συμφύσεις, τα μυώματα και τους πολύποδες ενδομητρίου. Οι συμφύσεις εμφανίζονται μετά από τραύματα στον τοίχο της μήτρας, και έχει παρατηρηθεί ότι η αφαίρεση τους μειώνει τις αποβολές. Τα μυώματα ευθύνονται για καθ' ἑξιν αποβολές μέσω δομικών και μοριακών μεθόδων, ενώ ο πολύποδας βρίσκεται σε 2-4% γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές.

Οι συγγενείς ανωμαλίες περιλαμβάνουν παθήσεις, όπως η μονόκερως μήτρα, η δίκερως μήτρα, η καρδιόσχημη μήτρα ή τοξοειδής μήτρα, η μήτρα με διάφραγμα και η διδελφύς μήτρα, και απαντώνται σε περίπου 8-12% των περιπτώσεων καθ' έξιν αποβολών. Δεν υπάρχει συμφωνία στο πόσο αποτελεσματική είναι η μητροπλαστία στην αύξηση του αριθμού των πετυχημένων κυήσεων. [60, 67]

2.4.1.4 Περιβαλλοντικά και ψυχολογικά αίτια

Έρευνες έχουν δείξει την επήρεια που έχουν περιβαλλοντικά αίτια και τρόποι ζωής στην ομαλή εγκυμοσύνη. Κάπνισμα, αλκοόλ, καφεΐνη και ναρκωτικά, έχουν δείξει διάφορα επίπεδα επίδρασης, σύμφωνα με τις έρευνες και τις ομάδες ελέγχου. Είναι σημαντικό ότι οι παραπάνω παράγοντες έχουν δράση και προ της σύλληψης, και πρέπει να ελεγχθούν πριν αποφασίσει το ζευγάρι να συλλάβει. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι παράγοντες επηρεάζουν και τον ανδρολογικό τομέα. Ο συνδυασμός του καπνίσματος, καφεΐνης και αλκοόλ δρα σημαντικά στην ζωτικότητα και μορφολογία των σπερματοζωαρίων, αλλά και στην ζημία στο σπερματικό DNA. [68][69]

Η κακή ψυχολογία έχει δειχθεί να επηρεάζει αρνητικά την εγκυμοσύνη και τα ποσοστά επιτυχούς κυήσεως. Παράγοντες, όπως στρες και άγχος, επηρεάζουν τα επίπεδα κυτοκινών και ανοσολογικών κυττάρων στο αίμα, που μπορούν να οδηγήσουν σε επιπλοκές. Σε συνδυασμό με το ότι κάθε αποβολή βλάπτει σοβαρά την ψυχολογική υγεία, προκαλώντας αισθήματα όπως ενοχή, κατάθλιψη, τύψεις και άγχος, φαίνεται η σημασία ψυχολογικής υποστήριξης στο ζευγάρι προτού ξεκινήσει νέα εγκυμοσύνη, γι' αυτό και πολλές οργανώσεις το συνιστούν. [63, 70]

2.4.2 Ο ρόλος της κυτταρομετρίας ροής

Όσον αφορά τη διαχείριση των καθ' έξιν αποβολών, προτείνεται αρχικά η εξέταση καρυοτύπου του προϊόντος της αποβολής για την εύρεση πιθανής γενετικής ανωμαλίας. Μέχρι πρότινος, αυτό συχνά δεν γινόταν λόγω κόστους. Όμως, πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνολογίες επιτρέπουν την εύρεση κυτογενετικών ανωμαλιών στα κύτταρα της αποβολής με μεγάλη ακρίβεια.

Μια προτεινόμενη μέθοδος είναι ο συνδυασμός συγκριτικής γονιδιωματικής υβριδοποίησης με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος έχει δειχθεί να έχει μεγάλη επιτυχία στην εύρεση γενετικών ανωμαλιών, καθώς η συγκριτική γονιδιωματική υβριδοποίηση (μια πρόσφατη μέθοδος εξέτασης καρυοτύπου) έχει μεγάλη επιτυχία εύρεσης μετατοπίσεων, ενώ η κυτταρομετρία ροής ανιχνεύει τις διπλοειδίες ή τριπλοειδίες. Η ανίχνευση ή μη τέτοιων ανωμαλιών στο γονιδίωμα του εμβρύου είναι πολύ καλή ένδειξη ως προς την πορεία της διαχείρισης.

Ειδικότερα, εάν με την παραπάνω μέθοδο ανευρεθεί ανευπλοϊδία δεν πραγματοποιείται παραπάνω διάγνωση. Διαφορετικά, εάν ανευρεθεί μη αμοιβαία μετατόπιση, τότε θα πραγματοποιηθεί εξέταση καρυοτύπου και των γονέων για την εύρεση μετατοπίσεων, και στη συνέχεια θα προταθεί εξωσωματική γονιμοποίηση με προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο και έλεγχο βιωσιμότητας του εμβρύου για μετέπειτα προσπάθειες κυήσεως. Στην περίπτωση που δεν βρεθεί κάποια γενετική αλλοίωση, συνιστάται έλεγχος για ΑΦΣ και ανατομικές αιτίες. [60, 63, 71, 72]

2.5 Η σημασία της κυτταρομετρίας ροής στην παρακολούθηση της HIV λοίμωξης

2.5.1 Ο ιός HIV (Human Immunodeficiency Virus, Ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου)

2.5.1.1 Ανακάλυψη και ιστορική αναδρομή της μελέτης του ιού HIV και του συνδρόμου AIDS (Acquired Immuno Deficiency Syndrome, Σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας)

Το AIDS παρατηρήθηκε πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 80, όταν οι γιατροί παρατήρησαν περιπτώσεις προηγουμένως υγιέστατων ομοφυλοφιλικών να παρουσιάζουν βαριές περιπτώσεις πνευμονίας, κυττομεγαλοϊού, καντιντίασης και πολλαπλών ιώσεων. Παράλληλα, παρατήρησαν ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος και λεμφοπενία. [73, 74] Σύντομα, ταυτοποιήθηκε και απομονώθηκε ο ιός που ευθυνόταν και ονομάστηκε τότε HTLV-III (Human T-Lymphotropic Virus III), ο γνωστός σήμερα HIV. Ακολούθως, παρατηρήθηκαν οι λειτουργίες του ιού και οι κυτταρικές δομές που δημιουργούσε στα κύτταρα που προσέλαβε, και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για υπολογισμό του ιικού φορτίου. [75, 76] Η χρήση της νέας για την

εποχή τεχνολογίας μονοκλωνικών αντισωμάτων, οδήγησε τους επιστήμονες στην ανακάλυψη ότι ο ιός προσβάλλει τα CD4+ T λεμφοκύτταρα. [77]

2.5.1.2 Η φύση του ιού HIV

Τα αρχικά HIV που σχηματίζουν το όνομα του ιού αναφέρονται στο μείζον πρόβλημα που αντιμετωπίζει το ανοσοποιητικό σύστημα κατόπιν λοίμωξης με τον ιό HIV. Ο HIV είναι RNA ιός, κατατάσσεται στο γένος των Lentivirus και περιλαμβάνεται στην οικογένεια των ρετροϊών. Αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά των ιών του γένους Lentivirus αποτελούν η μεγάλη περίοδος επώασης, καθώς και το γεγονός ότι προκαλούν μακροχρόνιες ασθένειες στα θηλαστικά.

Ο HIV μολύνει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου και συγκεκριμένα η κυτταρική σειρά που πλήττεται είναι τα κύτταρα που φέρουν στην επιφάνεια τους τον αντιγονικό υποδοχέα CD4 (T λεμφοκύτταρα CD4+, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση του πληθυσμού των CD4 στον οργανισμό και καθώς τα CD4 κύτταρα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην συστηματική ανοσολογική απόκριση, ο οργανισμός καθίσταται ευάλωτος σε ευκαιριακές λοιμώξεις, καθώς και σε καρκινώματα που προκαλούνται από λοιμώδη αίτια. Αν η δράση του ιού στο σώμα δεν περιοριστεί μέσω θεραπευτικής αγωγής στο κατάλληλο χρονικό πλαίσιο, τότε ο πληθυσμός των CD4 μειώνεται δραματικά και ο οργανισμός οδηγείται στην εμφάνιση του συνδρόμου AIDS.

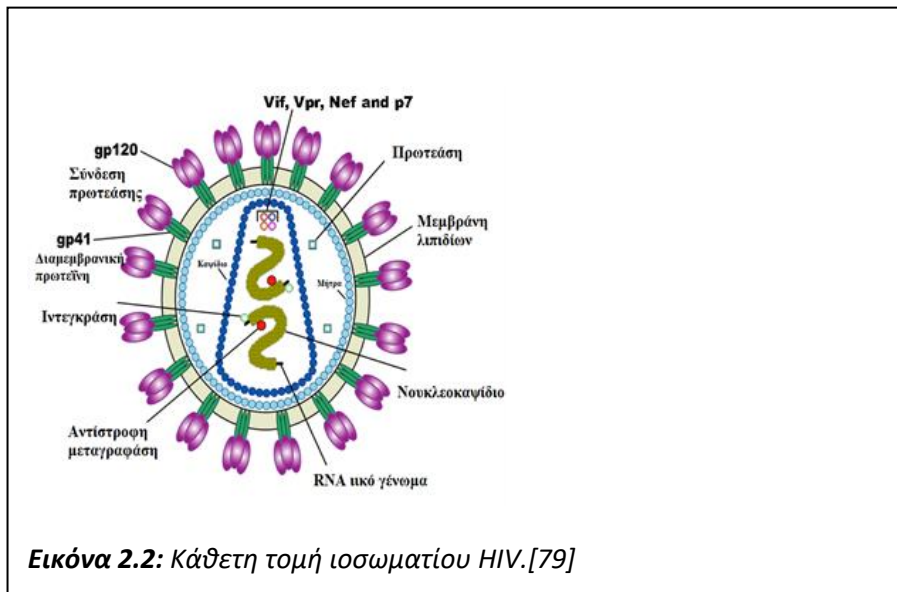
Βάση των γενετικών χαρακτηριστικών του και διαφορών στα ιϊκά αντιγόνα, ο HIV κατατάσσεται σε τύπου-1 (HIV-1) και τυπου-2 (HIV-2). Επιδημιολογικές και φυλογενετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ο HIV έφτασε στον ανθρώπινο πληθυσμό στο χρονικό πλαίσιο 1920 με 1940. Ο HIV-1 εξελίχθηκε από μη-ανθρώπινους ιούς ανοσοανεπάρκειας των πρωτεύοντων που παρατηρήθηκαν στους χιμπατζήδες της κεντρικής Αφρικής, ενώ ο HIV-2 από πρωτεύοντα της δυτικής Αφρικής. [78, 79]

2.5.1.3 Δομή του ιού HIV

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται κάθετη τομή του ιού HIV, όπου παρατηρούνται τα εξής δομικά στοιχεία:

- Η λιπιδική μεμβράνη, η οποία είναι μια λιπιδική διπλοστοιβάδα που δομείται από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή κατά την εκβλάστηση ενός νέου ιού από αυτό. Αποτελεί το 30% του συνολικού βάρους του ιού και περιβάλλει τα υπόλοιπα μέρη του ιού εκτός από τις γλυκοπρωτεϊνικές άκανθες (ονομαζόμενες gp160), οι οποίες δομούν τον πρωτεϊνικό φάκελο. Κάθε άκανθα gp160 χωρίζεται σχηματίζοντας δύο γλυκοπρωτεΐνες, την πρωτεΐνη πρόσδεσης gp120 στο εξωτερικό περίβλημα του ιού και την διαμεμβρανική πρωτεΐνη gp41. Η gp160 αποτελεί το κομμάτι του ιού HIV το οποίο προσκολλάται στο κύτταρο στόχο (κύτταρα CD4+). Τα μέρη της γλυκοπρωτεΐνης gp160, τα gp120 και gp41 είναι τριμερή δηλαδή αποτελούνται από τρεις κόπιες του εαυτού τους το καθένα. Όταν ο HIV συνδέεται με ένα CD4+ T κύτταρο, τα τριμερή σε συνδυασμό με τους υποδοχείς του κυττάρου και έναν από τους υποδοχείς CCR5 ή CXCR4 επιτυγχάνουν πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή.
- Στο εσωτερικό της μεμβράνης υπάρχει ένα πρωτεϊνικό στρώμα, η μήτρα (matrix) η οποία είναι δομημένη από μητρικές πρωτεΐνες (matrix proteins), εντός του οποίου περικλείεται το γενετικό υλικό του ιού και σημαντικές πρωτεΐνες για τον πολλαπλασιασμό του.
- Η πρωτεάση, η οποία αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο αλληλοεπιδρά (κόβει) τις νεοσύστατες πολύ πρωτεΐνες HIV κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού.
- Το καψίδιο περικλείει το γενετικό υλικό του ιού και αποτελείται από μόρια πρωτεΐνης p24 εντός του οποίου περιέχονται: 1) Το γονιδίωμα, το οποίο αποτελείται από δύο μονόκλιωνα RNA μερικώς περιεχόμενο σε νουκλεοκαψίδια, 2) ορισμένες πρωτεΐνες, όπως η αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία είναι το ένζυμο υπεύθυνο για την αντίστροφη μεταγραφή του HIV RNA σε DNA, η ιντεργκράση, η οποία αποτελεί το ένζυμο υπεύθυνο για την ενσωμάτωση του αντίστροφα μεταγραμμένου DNA στο DNA του κυττάρου ξενιστή, η Vif είναι μικρή πρωτεΐνη που συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του ιού, η Vpr η οποία συμμετέχει στην διαδικασία πολλαπλασιασμού του ιού σε κύτταρα που δεν διαιρούνται, η Nef μια μικρή πρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για την αλλαγή

του εσωτερικού περιβάλλοντος του κυττάρου-ξενιστή , έτσι ώστε να είναι έτοιμο να υποστηρίξει τις αναπαραγωγικές διαδικασίες του ιού και το πεπτιδίο p7 το οποίο παίζει καταλυτικό ρόλο στην αντίστροφη μεταγραφή. [80, 81]

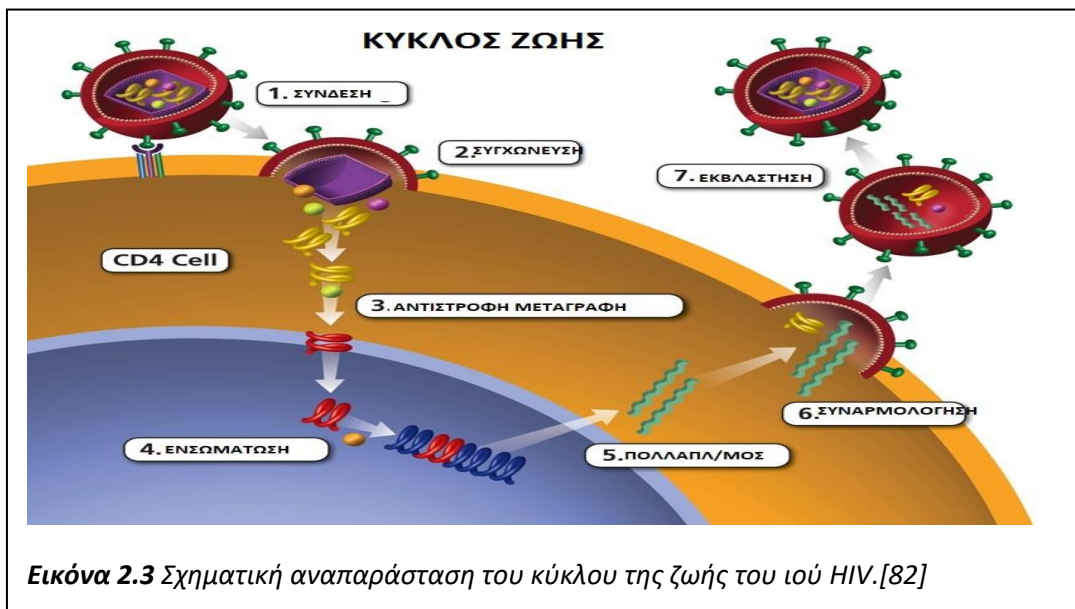


2.5.1.4 Κύκλος ζωής του ιού HIV

Ο HIV επιτίθεται στα CD4+ T κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και αφού εισχωρήσει στο εσωτερικό τους, χρησιμοποιεί τους κυτταρικούς γενετικούς μηχανισμούς προκειμένου να πολλαπλασιαστεί. Ο κύκλος της ζωής του HIV ξεκινά κατά την επαφή του με ένα κύτταρο στόχο και διακρίνεται στα 7 συγκεκριμένα βήματα:

- **Σύνδεση:** Όταν ο HIV επιτίθεται σε ένα κύτταρο, ο ιός συνδέεται στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου. Πρώτα πραγματοποιείται σύνδεση με τον CD4 υποδοχέα, και στην συνέχεια με τους υποδοχείς CCR5 ή CXCR4.
- **Συγχώνευση:** Αφού ο HIV συνδεθεί στο κύτταρο ξενιστή, το εξωτερικό περίβλημα του HIV και η κυτταρική μεμβράνη συγχωνεύονται, επιτρέποντας στον HIV να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου CD4, όπου και ο ιός ξεκινά να απελευθερώνει HIV-RNA και ένζυμα HIV.

- **Αντίστροφη μεταγραφή:** Στο εσωτερικό του κυττάρου, ο HIV απελευθερώνει και χρησιμοποιεί το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφής, με σκοπό την μετατροπή του γενετικού του υλικού από HIV-RNA σε HIV-DNA. Η μετατροπή του γενετικού υλικού του HIV επιτρέπει στον ιό να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου και να συνδυάσει το γενετικό του υλικό με αυτό του κυττάρου.
- **Ενσωμάτωση:** Στο εσωτερικό του πυρήνα του κυττάρου, ο HIV απελευθερώνει το ένζυμο ιντεργκράση το οποίο χρησιμοποιεί για να ενσωματώσει το ιικό DNA στο DNA του κυττάρου.
- **Πολλαπλασιασμός:** Αφού το γενετικό υλικό του ιού ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό του κυττάρου, ο HIV χρησιμοποιεί τους γενετικούς μηχανισμούς αυτού, προκειμένου να παράξει μεγάλες αλυσίδες με πρωτεΐνες του ιού HIV.
- **Συναρμολόγηση:** Οι νέες ιικές πρωτεΐνες και το HIV-RNA οδηγούνται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, όπου και συναρμολογούνται σε ανώριμες μη-λοιμώδεις μορφές του HIV.
- **Εκβλάστηση:** Οι νεοσύστατες ανώριμες μορφές του HIV εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή. Οι νέοι HIV απελευθερώνουν πρωτεάση, η οποία σπάει τις μακριές πρωτεϊνικές αλυσίδες που σχηματίζουν την ανώριμη μορφή του ιού. Οι μικρότερες πλέον αλυσίδες πρωτεϊνών HIV συνδυάζονται σχηματίζοντας την ώριμη μορφή του ιού. [82]



2.5.1.5 Στάδια της λοίμωξης με HIV

Όταν ένας ασθενής που έχει μολυνθεί από τον ιό HIV δεν λάβει αντιρετροϊκή θεραπεία, η πορεία της ασθένειας θα εξελιχθεί σε 3 στάδια. Η αντιρετροϊκή θεραπεία μπορεί να καθυστερήσει ή να εμποδίσει την μετάβαση από το ένα στάδιο της ασθένειας στο επόμενο, δρώντας σε πολλαπλά σημεία κατά τον κύκλο της ζωής του ιού.

Στάδιο 1: Οξεία HIV λοίμωξη

Εντός 2 με 4 εβδομάδων κατόπιν της λοίμωξης με τον HIV, ο ασθενής μπορεί να εμφανίσει συμπτώματα που μοιάζουν με αυτά της γρίπης, όπως πυρετό, πονοκέφαλο, πονόλαιμο, διογκωμένους λεμφαδένες, πόνο στις αρθρώσεις ή και εξανθήματα, τα οποία μπορεί να κρατήσουν για μερικές εβδομάδες και οφείλονται στην φυσική ανοσολογική απόκριση του οργανισμού ενάντια στην λοίμωξη από τον HIV. Αυτή η εικόνα ονομάζεται οξύ ρετροϊκό σύνδρομο ή πρωταρχική λοίμωξη HIV.

Στο στάδιο της οξείας HIV λοίμωξης, ο ασθενής φέρει μεγάλο ιικό φορτίο στο αίμα του και η μολυσματικότητα της ασθένειας είναι ιδιαίτερα υψηλή. Ο ιός χρησιμοποιεί τα CD4+ T κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό του και στην πορεία τα καταστρέφει, λόγω αυτού ο αριθμός των CD4+ T κυττάρων μειώνεται ραγδαία. Σταδιακά, η ανοσολογική απόκριση θα ρίξει τα επίπεδα του ιού στο αίμα σε ένα φυσιολογικό επίπεδο που ονομάζεται ιικό σημείο αναφοράς (ή τίτλος) με τους πληθυσμούς των CD4+ T κυττάρων να επανέρχονται κοντά στον αρχικό τους αριθμό ή/και όχι. Συνήθως ο ασθενής δεν γνωρίζει ότι φέρει τον ιό, καθώς τα συμπτώματα της ασθένειας είναι λίγα ή δεν εμφανίζονται και καθόλου αρχικά. Άτομα που πιστεύουν ότι έχουν έρθει σε επαφή με τον ιό, πρέπει να αναζητήσουν βοήθεια οπωσδήποτε σε αυτό το στάδιο, καθώς μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά η μελλοντική εικόνα της ασθένειας.

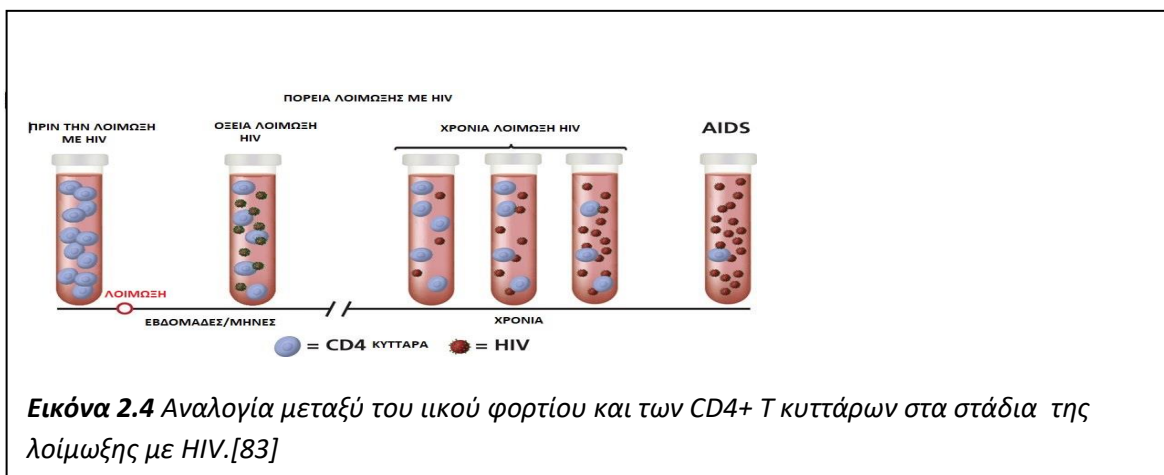
Στάδιο 2: Κλινική αφάνεια

Η συγκεκριμένη περίοδος συχνά αποκαλείται και ασυμπτωματική λοίμωξη HIV ή/και χρόνια λοίμωξη HIV. Κατά την διάρκεια αυτής της φάσης, ο HIV παραμένει ενεργός αλλά αναπαράγεται σε χαμηλά επίπεδα. Ο ασθενής μπορεί να μην εμφανίσει καθόλου

συμπτώματα ή μπορεί και να εμφανίσει συμπτώματα της ασθένειας. Για τους ασθενείς που δεν λαμβάνουν θεραπεία για τον HIV, αυτή η περίοδος μπορεί να κρατήσει μία δεκαετία ή/και περισσότερο. Ο ασθενής μπορεί να μεταδώσει ακόμη τον ιό σε αυτήν την φάση, εκτός και αν λαμβάνει θεραπευτική αγωγή η οποία μειώνει το ιικό φορτίο στο αίμα του. Στο τέλος αυτού του σταδίου, το ιικό φορτίο στο αίμα του ασθενούς αυξάνεται και ο πληθυσμός των CD4+ T κυττάρων μειώνεται, με αποτέλεσμα ο ασθενής θα εμφανίσει συμπτώματα και η ασθένεια θα περάσει στο επόμενο στάδιο.

Στάδιο 3: Σύνδρομο AIDS

Το σύνδρομο AIDS αποτελεί την πιο επικίνδυνη φάση της λοίμωξης με HIV. Ο ασθενής με AIDS πλέον δεν είναι προστατευμένος εναντίον των ευκαιριακών λοιμώξεων, καθώς το ανοσοποιητικό του σύστημα έχει πληχθεί ανεπανόρθωτα. Χωρίς θεραπεία το εκτιμώμενο υπολειπόμενο όριο ζωής κυμαίνεται περίπου στα 3 χρόνια. Κοινά συμπτώματα του AIDS αποτελούν ρίγη, υψηλός πυρετός, έντονη εφίδρωση, διογκωμένοι λεμφαδένες, αδυναμία και χάσιμο βάρους. Η κατάσταση της ασθένειας θεωρείται ότι έχει οδηγηθεί στο στάδιο του AIDS όταν ο πληθυσμός των CD4+ T κυττάρων εκτιμάται μικρότερος των 200 κυττάρων/mm ή όταν αρχίσουν να αναπτύσσονται ευκαιριακές λοιμώξεις. Σε αυτό το στάδιο το ιικό φορτίο στο αίμα είναι ιδιαίτερα αυξημένο και η ασθένεια θεωρείται πολύ μολυσματική. [79, 80, 83]



2.5.1.6 Σχετικά με την αντιμετώπιση του ιού HIV

Προς το παρόν δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία που να δύναται να αφαιρέσει εντελώς την παρουσία του ιού από το ανθρώπινο σώμα, παρόλα αυτά με σωστή θεραπευτική αγωγή η εξέλιξη της νόσου μπορεί να ελεγχθεί. Η θεραπευτική αγωγή κατά HIV ονομάζεται **αντιρετροϊική θεραπεία** (Anti Retroviral Therapy, ART). Η ART μπορεί να αυξήσει δραματικά το προσδόκιμο όριο ζωής των μολυσμένων ασθενών, κρατώντας τους υγιείς και μειώνοντας τις πιθανότητες μετάδοσης του ιού. Πριν την εμφάνιση της ART ένας οροθετικός ασθενής περνούσε στο στάδιο του AIDS μέσα σε μερικά χρόνια, πλέον όμως ο χρόνος ζωής ενός οροθετικού είναι σχεδόν ίδιος με αυτόν ενός υγιούς ανθρώπου. [79]

2.5.2 Παρακολούθηση του ιού HIV

2.5.2.1 Σημασία των CD4+ T λεμφοκυττάρων στην παρακολούθηση της ασθένειας

Η πιο κοινή ασθένεια που συνδέεται με την επίκτητη ανοσοανεπάρκεια είναι η πνευμονία από *Pneumocystis carinii* και παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζεται, μαζί με άλλες ιολογικές μολύνσεις, όταν ο απόλυτος αριθμός των CD4+ T κυττάρων πέσει κάτω από 200 κύτταρα/μl [84]. Αυτός ο απόλυτος αριθμός είναι που χρησιμοποιείται σήμερα για την διάγνωση του AIDS, αλλά και ως δείκτης εκκίνησης των αντι-ρετροϊικών θεραπειών και προφυλακτικών φαρμάκων για ευκαιριακές λοιμώξεις, σε συνδυασμό με την μέτρηση του ιοϊκού φορτίου στο πλάσμα [85] [86]. Η μέτρηση των CD4+ T κυττάρων χρησιμοποιείται επίσης στην παρακολούθηση της ασθένειας και στην αντίδραση του ασθενή στην λήψη φαρμάκων. Άλλοι ασθενείς που προσβάλλονται από HIV παρουσιάζουν πιο ταχεία πτώση των CD4+ T κυττάρων από άλλους, ενώ μετά από θεραπεία άλλοι παρουσιάζουν άλλη αύξηση των CD4+ T κυττάρων [87].

Πιο συγκεκριμένα, η πορεία της θεραπείας αντι-HIV αλλά και η επικινδυνότητα μόλυνσης από ευκαιριακές λοιμώξεις μπορεί να προβλεφθεί με παρακολούθηση των CD4+ T κυττάρων. Έχει διαπιστωθεί ότι με απόλυτο αριθμό CD4+ T κυττάρων πάνω από 500 κύτταρα/μl οι ασθενείς έχουν φυσιολογική λειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος και μικρή πιθανότητα ευκαιριακών λοιμώξεων. Σήμερα, αντί-HIV θεραπείες ξεκινούν όταν τα CD4+ T κύτταρα μετρηθούν κάτω από 350 κύτταρα/μl. Αυτά τα νούμερα βρέθηκαν μετά από έρευνες πάνω στην αποτελεσματικότητα θεραπείας σε διάφορα

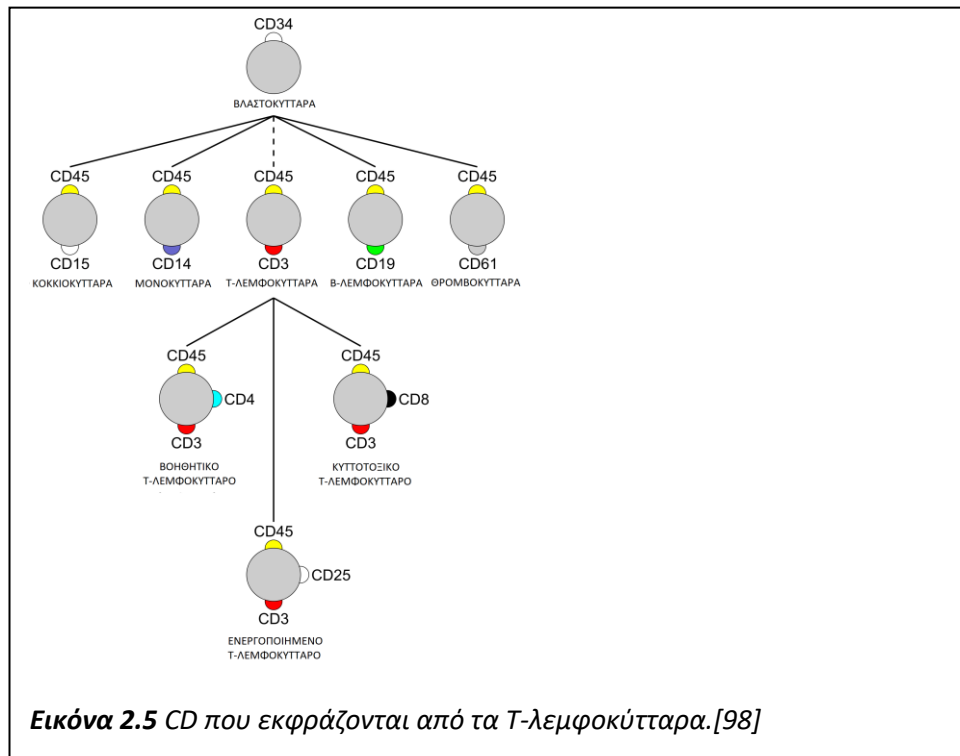
στάδια εξέλιξης της ασθένειας. Συνιστάται η μέτρηση CD4+ T κυττάρων με την διάγνωση του ιού HIV, και ακολούθως κάθε 3-6 μήνες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα κάθε φορά, δηλαδή μετά από 6 μήνες εάν ο αριθμός είναι μεγάλος ενώ μετά από 3 μήνες εάν βρεθεί μικρός.

Είναι πιο χρήσιμη η μέτρηση της ανοδικής ή καθοδικής πορείας του απόλυτου αριθμού των CD4+ T κυττάρων από μία μεμονωμένη μέτρηση. Μετριέται η αποτελεσματικότητα της θεραπείας έτσι, καθώς με θεραπεία μπορούν να αυξηθούν πάλι τα CD4+ T κύτταρα. Έλεγχοι PCR (polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) μπορούν να μετρήσουν ιικό φορτίο στο πλάσμα (PVL, plasma viral load) και αποτελούν έναν άλλο σημαντικό παράγοντα παρακολούθησης. Έχει βρεθεί ανάστροφη σχέση αριθμού CD4+ T κυττάρων με PVL, αλλά αυξητική σχέση των CD8+ T κυττάρων με PVL [85].

Εξαιτίας της σημασίας αυτής των CD4+ T κυττάρων, είναι σημαντική η κατανόηση άλλων παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τον απόλυτο αριθμό τους. Συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει ότι οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερα ποσοστά CD4+ T κυττάρων από τους άντρες, οι οποίοι αντιστρόφως, έχουν μεγαλύτερο ποσοστό CD8+ T κυττάρων. Σε ηλικιωμένα άτομα, έχει παρατηρηθεί ότι τα T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν λιγότερο CD3, ενώ έχουν χαμηλότερη αναλογία CD4:CD8. Τέλος, η πλειονότητα ερευνών δεν έχουν δείξει στατιστικά σημαντικές αλλαγές στους υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων εξαιτίας του καπνίσματος και του αλκοόλ. [85, 88, 90]

2.5.2.2 Μέτρηση των CD4+ T κυττάρων

Όλες οι μέθοδοι της κυτταρομετρίας ροής για την μέτρηση των CD4+ T κυττάρων βασίζονται σήμερα σε κάποια γνωστά χαρακτηριστικά. Όπως είναι γνωστό, τα T-λεμφοκύτταρα εκφράζουν όλα CD45 και CD3. Συνήθως, χρησιμοποιείται CD45 και πλευρική σκέδαση για να αναγνωριστούν τα T-λεμφοκύτταρα. Λόγω του ότι ο HIV επιτίθεται στα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, παρατηρείται αύξηση συνήθως των κυτταροτοξικών κυττάρων, τα οποία εκφράζουν CD8. Για τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιείται τριπλή χρώση CD3/CD4/CD45 ή τετραπλή CD3/CD4/CD8/CD45. [91][85] Οι μέθοδοι μέτρησης με κυτταρομετρητή ροής χωρίζονται σε μονής πλατφόρμας και διπλής.



-Διπλής πλατφόρμας

Ο κυτταρομετρητής ροής χρησιμοποιεί περίφραξη στα CD45+ κύτταρα με τριπλή ή τετραπλή χρώση για να προσδιοριστεί ακολούθως το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που είναι CD4+. Η μέθοδος λέγεται διπλής πλατφόρμας διότι χρειάζεται και εξέταση από αιματολογικό αναλυτή. Συγκεκριμένα, μετριέται ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων, ο οποίος με το ποσοστό των CD4+ κυττάρων πολλαπλασιάζεται για να προκύψει ο απόλυτος των CD4+. Η παραπάνω μέθοδος έχει το μειονέκτημα ότι χρησιμοποιεί ξεχωριστές εξετάσεις (απόλυτο αριθμό λευκοκυττάρων και ποσοστό λεμφοκυττάρων) από τον αιματολογικό αναλυτή, από όπου υπολογίζεται ο απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων και CD4+ κυττάρων. Αυτό οδηγεί σε αποκλείσεις. Συχνά, ο πληθυσμός λεμφοκυττάρων που χρησιμοποιεί ο κυτταρομετρητής για να βγάλει το ποσοστό CD4 δεν είναι ακριβώς ίδιος με αυτών που μέτρησε ο αιματολογικός αναλυτής. Επίσης, πολλοί αιματολογικοί αναλυτές δεν μετράνε με ακρίβεια τους μικρούς αριθμούς κυττάρων που ανευρίσκονται σε ασθενείς με AIDS. [85]

-Μονής πλατφόρμας

Τα συστήματα μονής πλατφόρμας είναι εξειδικευμένοι κυτταρομετρητές, οι οποίοι μπορούν να μετρήσουν απόλυτο αριθμό CD4+ T κυττάρων χωρίς την ανάγκη αιματολογικού αναλυτή, παρόλο που χρειάζονται και ειδικευμένο προσωπικό για τον χειρισμό τους. Υπάρχουν δύο κατηγορίες, αυτοί που χρησιμοποιούν σφαιριδομετρικές μεθόδους και αυτοί που χρησιμοποιούν ογκομετρικές τεχνικές. Από τις δύο, η σφαιριδομετρική μεθοδολογία έχει την μεγαλύτερη αναγνώριση από παγκόσμιους οργανισμούς. [85, 92, 93]

-Μη κυτταρομετρικές τεχνικές

Πρέπει να αναφερθεί ότι χρησιμοποιούνται τεχνικές για την μέτρηση των CD4+ κυττάρων χωρίς κυτταρομετρητή ροής σε χώρες όπου το κόστος του κυτταρομετρητή ροής είναι απαγορευτικό. Τέτοιες τεχνικές περιλαμβάνουν:

1. *Τεχνική Coulter*: τεχνική που χρησιμοποιεί σφαιρίδια Latex επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα για την απομόνωση των CD4+ κυττάρων. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται χειροκίνητα από τον τεχνολόγο με μικροσκόπηση.
2. *Τεχνική Dynal T4-T8*: χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια με αντι-CD4 μονοκλωνικά για την απομόνωση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία χρωματίζονται και μετρούνται με μικροσκόπηση φθορισμού.
3. *Τεχνικές Elisa (Enzyme Linked ImmunoSorbent Array/ Δοκιμασία ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης)*: μετρώνται οι πρωτεΐνες CD4 σε αίμα μετά από λύση, ενώ δίνουν πολύ καλή προσέγγιση. Επειδή οι τεχνικές συχνά έχουν 96 πηγάδια, μπορούν εύκολα να αυτοματοποιηθούν και να μετρήσουν πολλά δείγματα ταυτοχρόνως. [85][94]

2.5.2.3 Ιικό φορτίο

Το ιικό φορτίο του HIV είναι ο αριθμός αντίγραφων του RNA του ιού στο αίμα και μετριέται σε αντίγραφα/ml. Γενικότερα, αποτελέσματα με 100000 αντίγραφα/ml θεωρούνται υψηλά, ενώ μικρότερα από 10000 αντίγραφα/ml θεωρούνται χαμηλά. Αν τα αντίγραφα δεν μπορούν να μετρηθούν, το ιικό φορτίο θεωρείται μη ανιχνεύσιμο στο

αίμα. Όπως και τα CD4+ T κύτταρα, το ιικό φορτίο δείχνει μια πολύ καλή ένδειξη της πορείας του ιού και επιτρέπει στον γιατρό να δει εάν η θεραπεία είναι αποτελεσματική ή όχι στον κάθε ασθενή. Σε ασθενείς που το ιικό φορτίο δεν πέφτει σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, συνήθως θεωρείται μη αποτελεσματική η θεραπεία και προστίθενται ή αλλάζονται τα φάρμακα. Υπάρχει μεγάλη επιλογή στις τεχνικές μέτρησης του ιικού φορτίου, αλλά οι περισσότερες είναι κάποια μορφή ELISA ή PCR. [85, 95]

2.5.2.4 Επιπλέον εξετάσεις

Πέρα των ανωτέρω, υπάρχουν και άλλες εξετάσεις που είναι πολύ μεγάλης σημασίας στην παρακολούθηση της ασθένειας. Συντόμως, είναι οι ακόλουθες:

- **B2-μικροσφαιρίνη:** πρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια εμπύρηνων κυττάρων. Η ελεύθερη β2-μικροσφαιρίνη μπορεί να μετρηθεί στο αίμα ή στα ούρα και η συγκέντρωσή της στα ούρα σχετίζεται με την πρόοδο του HIV. Η μέτρηση της είναι εύκολη χρησιμοποιώντας ELISA ή ραδιοανοσολογικές τεχνικές.
- **Νεοπτερίνη:** μόριο παράγωγο βιοσύνθεσης τετραϋδροβιοπτερίνης. Αποτελεί δείκτη μόλυνσης από HIV, ενώ έρευνες έχουν δείξει καλή σχετικότητα με την πρόοδο της ασθένειας.
- **Τεστ Παπανικολάου:** έρευνες έχουν δείξει πως άτομα με HIV έχουν αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του πρωκτού ή των γεννητικών οργάνων. Γι' αυτό τον λόγο συστήνεται τεστ Παπανικολάου για έλεγχο μόλυνσης από HPV σε άτομα με υψηλό ρίσκο. [85]

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής επεκτάθηκε ιδιαίτερως τις τελευταίες δεκαετίες χάρη στην ανάπτυξη μικρότερων, φιλικών προς τον χρήστη, αλλά και λιγότερο κοστοβόρων κυτταρομετρητών με αποτέλεσμα η εφαρμογή της τεχνολογίας να εντοπίζεται πλέον ευρέως διαδεδομένη σε πολυάριθμες κλινικές και ιατρικά κέντρα, συμπληρώνοντας στην διαγνωστική αλλά και ερευνητική διαδικασία. Η αξιολόγηση της σκέδασης του φωτός αποκαλύπτει πληροφορίες για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, ενώ η εκτίμηση των εκπεμπόμενων χρωματικών συχνοτήτων από τιτλοδοτημένα φθορίζοντα αντισώματα μπορεί να συνθέσει το αντιγονικό προφίλ αυτού. Λόγω των παραπάνω δυνατοτήτων, η κυτταρομετρία ροής αποδεικνύεται ισχυρότατο εργαλείο στην λεπτομερή ανάλυση σύνθετων κυτταρικών πληθυσμών σε μικρό χρονικό διάστημα.

Η κυτταρομετρία ροής πλέον χρησιμοποιείται στην ανοσοφαινοτυποποίηση μίας ευρείας ποικιλίας δειγμάτων, όπως ολικού αίματος, μυελού των οστών, εγκεφαλονωτιαίου υγρού, ούρων καθώς και στερεών δειγμάτων αξιολογώντας χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος των κυττάρων, την σύνθεση του κυτταροπλάσματος, το περιεχόμενο DNA και RNA και ένα εύρος διαμεμβρανικών και εσωκυττάρων πρωτεϊνών. Η δυνατότητα της λεπτομερέστερης απόδοσης της πληθώρας παραμέτρων που συνθέτουν το βιολογικό προφίλ μίας κυτταρικής ομάδας, σε συνεργασία με τις μοριακές, χημικές και μικροσκοπικές μεθοδολογίες που εντοπίζονται στα σύγχρονα αιματολογικά και ανοσολογικά εργαστήρια προσφέρει στο ιατρικό προσωπικό την ικανότητα να αποδίδει ακόμη πιο ολοκληρωμένες διαγνωστικές εικόνες και συνεπώς πιο ολοκληρωμένες θεραπευτικές αγωγές.

Η χρήση της μεθοδολογίας στην διάγνωση των αιματολογικών κακοηθειών, στην παρακολούθηση και διάγνωση της πορείας λοίμωξης από τον ιό HIV, κλπ. αναμφίβολα επέτρεψε την ακριβή αξιολόγηση των παθολογικών αυτών καταστάσεων, αλλά και την παρακολούθηση και αντιμετώπιση αυτών μέσω νέων θεραπευτικών αγωγών όπως ο εντοπισμός, η καταμέτρηση και η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, αξιοποιώντας τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας, δηλαδή την στόχευση

μέσω χρήσης των κυτταρικών δεικτών, καθώς και την ικανότητα καταμέτρησης, αλλά και διάκρισης κυτταρικών πληθυσμών βάση των φυσικών τους χαρακτηριστικών.

Η ικανότητα ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών αναλόγως των παραμέτρων που ορίζει η εκάστοτε εξέταση με μεγαλύτερη ταχύτητα αλλά και ακρίβεια από οποιαδήποτε άλλη συμβατική μέθοδο, εμπλουτίζει την διαγνωστική αλλά και ερευνητική διαδικασία επιτρέποντας την παρακολούθηση των φυσιολογικών, αλλά και παθολογικών κυτταρικών μορφών σε όλα τα στάδια των κυτταρικών κύκλων και διαφοροποιήσεων. Οι πληροφορίες αυτές όχι μόνο αποκαλύπτουν την ταυτότητα των νοσούντων κυτταρικών σειρών, αλλά και προειδοποιούν για την πορεία της νόσου επιτρέποντας έγκυρες διαγνωστικές προβλέψεις, οι οποίες μπορούν να έχουν τεράστιο αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής ενός ασθενή.

Η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής αναπτύσσεται συνεχώς και με αλματώδης ρυθμούς οδηγώντας στην εμφάνιση φθοριοχρωμάτων μεγαλύτερης ευαισθησίας, μικρότερων κυτταρομετρητών μεγαλύτερης ακρίβειας, καθώς και δοκιμασίες με ανανεωμένες κλινικές εφαρμογές. Τα μειονεκτήματα χρήσης της τεχνολογίας μειώνονται με την αντιμετώπιση προβλημάτων, όπως την ανάλυση μεγάλων σωματιδίων, την δημιουργία πηγμάτων και την πολυπλοκότητα της χρήσης μέσω πιο εξειδικευμένου τεχνολογικού εξοπλισμού και της ανάπτυξης πιο φιλικών προς τον χρήστη συσκευών, ενώ παράλληλα εισάγεται περαιτέρω αυτοματοποίηση στην ροή εργασίας και στην καταγραφή των αποτελεσμάτων αυξάνοντας την ταχύτητα της ανάλυσης και μειώνοντας τον παράγοντα ανθρώπινου λάθους μέσω εξειδικευμένων δικλείδων ασφαλείας.

Όσο τα αναλυτικά εργαλεία του πεδίου των ιατρικών επιστημών αυξάνουν την σφαίρα της αντίληψης της λειτουργίας του ανθρώπινου οργανισμού στο κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, τόσο πιο ολοκληρωμένη μπορεί να είναι η μελέτη της παθολογίας αυτού και συνεπώς η θεραπεία και η πρόληψη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία που εντοπίζονται στα κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια, προσφέροντας την δυνατότητα αναλύσεων υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας. Αρχικά, η μεθοδολογία χρησιμοποιούταν κυρίως στον τομέα της έρευνας, όμως η εξέλιξη της τεχνολογίας των λειτουργικών μέσων καθώς και η ανάπτυξη αποτελεσματικότερων αντιδραστηρίων οδήγησε στην υιοθέτηση της μεθοδολογίας στα κλινικά αιματολογικά και ανοσολογικά εργαστήρια και συνεπώς στην χρήση της ως διαγνωστικής μεθόδου.

Οι κυτταρομετρητές ροής αξιολογούν τα δεδομένα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας laser με την επιφάνεια των κύτταρων προσφέροντας πληροφορίες σχετικά με τα φυσικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, καθώς και την δυνατότητα αποκόμισης περισσότερων δεδομένων με την χρήση φθοριοχρωμάτων, σφαιριδίων latex, και μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η φύση της μεθόδου δίνει την δυνατότητα διενέργειας διαφόρων τύπων ανάλυσης όπου αξιολογούνται ταυτόχρονα πολλές παράμετροι, όπως για παράδειγμα η ύπαρξη αντιγόνου, η ποσότητα έκφρασης αντιγόνων, καθώς και η αξιολόγηση του γενετικού υλικού των κυττάρων.

Οι κυτταρομετρητές ροής εντοπίζονται πλέον στην ρουτίνα των αιματολογικών και ανοσολογικών κλινικών εργαστηρίων, βρίσκοντας εφαρμογή στην μελέτη, διάγνωση και παρακολούθηση μίας ευρείας γκάμας ιατρικών ζητημάτων, όπως την διάγνωση και κατάταξη των αιματολογικών νεοπλασιών, την απομόνωση και μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, την διάγνωση διαταραχών μεμονωμένων κυτταρικών σειρών όπως των αιμοπεταλίων, την μελέτη και παρακολούθηση των καθ' έξιν αποβολών, καθώς και την διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με AIDS.

ABSTRACT

Flow cytometry is one of the most important tools found in clinical and research laboratories, offering the possibility of high sensitivity and high precision analysis. Initially, this methodology was mainly used in the field of research, whereas advances in the development of cytometer mechanical components and the development of more effective reagents led to the gradual adoption of the methodology in clinical hematological and immunological laboratories as a diagnostic method.

Flow cytometers measure the data resulting from the interaction of laser radiation with the cell surface, providing information on the physical characteristics of the cell as well as the ability to extract more data using fluorochromes, latex beads, and monoclonal antibodies. The nature of the method makes it possible to perform different types of assays where multiple parameters are assessed simultaneously, such as, the existence of a certain antigen, the amount of antigen expression as well as evaluation of cell genetic material.

Nowadays, flow cytometers can be found as part of the diagnostic routine of hematological and immunological clinical laboratories, finding application in the study, diagnosis and monitoring of a wide range of medical issues such as the diagnosis and classification of hematological neoplasms, the isolation and transplantation of stem cells, the diagnosis of individual cellular series disorders such as platelets, the study and follow-up of recurrent miscarriages, and the diagnosis and follow-up of AIDS patients.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Givan A.L. (2001).** flow cytometry first principles. *new york: john wiley and sons. Second ed.*
2. **Moldovan A. (1934).** Photoelectric Technique For The Counting of Microscopical Cells. *Science, Vol. 80, Issue 2069; 188-189.*
3. **Kamentsky L A, Melamed MR. (1967).** Spectrophotometric cell sorter. *Science 156: 1364-1365.*
4. **Dittrich W, Goehde W. (1969).** Impulsfluorometrie dei Einzelzellen in Suspensionen. *Z. Naturforsch. 24b: 360-361.*
5. **Coulter W H. (1956).** High speed automatic blood cell counter and size analyzer. *Proc. Natl. Electronics Conf. 12: 1034-1040.*
6. **Fulwyler M J. (1965).** Electronic Separation of Biological Cells by Volume. *Science 150: 910-911.*
7. **Crossland-Taylor P J.(1953).** A Device for Counting Small Particles suspended in a Fluid through a Tube. *Nature volume 171: 37–38.*
8. **Van Dilla M A, Trujillo T T, Mullaney P F, Coulter JR. (1969).** Cell microfluorimetry: A method for rapid fluorescence measurement. *Science 163:1213-1214.*
9. **Πάγκαλης Γ Α. (2008).** Αιματολογία στην Κλινική Πράξη. *Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης: 149-150.*
10. **McCoy J P Jr. (2002).** Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am. 16(2):229-243.*
11. **Χατζοπούλου Δ. (2012).** Αρχές λειτουργίας κυτταρομετρητή. *Κλινικό φροντιστήριο 7ου Πανελληνίου συνέδριου ιατρικής βιοπαθολογίας: 1-7.*
12. **Suthanthiraraj Pearlson P Austin, Steven W Graves.(2013).** “Fluidics.” *Current protocols in cytometry . PMC: Unit 1-2.*
13. **Shapiro H M, Telford W G. (2009).** Lasers for Flow Cytometry. *Curr. Protoc. Cytom. 49:1.9.1-1.9.17.*
14. **Becton, Dickinson and Company. (2002).** Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. *11-11032-03: rev. A.*

15. **Reynolds D M. (2014).** The Principles of Fluorescence. Aquatic Organic Matter Fluorescence. *Cambridge University Press: 3-34.*
16. **Michael G Ormerod. (2009).** Flow Cytometry: A Basic Introduction. Privately Published . (<http://flowbook.denovosoftware.com/>).
17. **Live Technologies Corporation. (2010).** The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 11th Edition. (<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>).
18. **Abrams B, Dubrovsky T. (2007).** Quantum Dots in Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology, vol. 374: 185-203.*
19. **Wirrig C. (2018).** Are Quantum Dots Any Good for Flow Cytometry?.(<https://bitesizebio.com/33830/quantum-dots-good-flow-cytometry/>).
20. **Biolegend. (2018).** “Guide to Choosing and Using Fluorochromes in Multicolor FlowCytometry”(http://www.biolegend.com/media_assets/support_resource/Guide_to_Fluorochromes.pdf).
21. **Abcam plc. (1998-2018).** Introduction to flow cytometry: Antibody staining. .(<http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry#Antibody%20staining>).
22. **BIO RAD. (2018).** “Sample preparation protocol”. (<https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-sample-prep.html>).
23. **Herzenberg L A , Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Leonore A H. (2002).**The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clinical Chemistry. 48(10):1819-1827.*
24. **Ibrahim S F , Engh G V D. (2007).** Flow Cytometry and Cell Sorting. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: 19–39.*
25. **Morgan E, et al. (2004).** Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin. Immunol. 110:252–266.*
26. **Baumgarth N, Roederer M. (2000).** A practical approach to multicolour flow cytometry for immunophenotyping. *J. Immunol. Meth. 243(1-2): 77-97.*

27. **Vogt R F, Schwartz A, Marti G E, Whitfield W E, Henderson, L O. (2001).** Quantitative Fluorescence Cytometry. In: Hematologic Malignancies. Methods in Molecular Medicine. *Humana Press, vol 55.*
28. **Darzynkiewicz Z, Huang X. (2004).** Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Current Protocols in Immunology: 5.7.1-5.7.18.*
29. **Bushnell T. (2017).** The Difference Between Linear And Log Displays In Flow Cytometry. (<https://expertcytometry.com/the-difference-between-linear-and-log-displays-in-flow-cytometry/>)
30. **Herzenberg L A, et al. (2006).** Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nature Immunology 7 (7): 681-685.*
31. **Biolegend. (2017).** Flow Cytometry Data Analysis I: What Different Plots Can Tell You. (<https://www.biolegend.com/newsdetail/flow-cytometry-plots/1180/>)
32. **Marti G E, Stetler-Stevenson M, Fleisher T. (2001).** Diagnostic Flow Cytometry in Hematologic Malignancies. *Methods Mol Med. 55: 179–215.*
33. **Haematological Malignancy Research Network. (2019).** Classification. (<https://www.hmrn.org/about/classification>).
34. **American Society of Hematology. (2019).** Blood Cancers. (<http://www.hematology.org/Patients/Cancers/>).
35. **Swerdlow S H, Campo E, Pileri S A, Lee Harris N, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles G A, Zelenetz A D, Jaffe E S. (2016).** The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood 127 (20): 2375-2390.*
36. **Harris N L, Campo E, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Swerdlow S H, Thiele J, Vardiman J W. (2008).** WHO Classification of Tumours, of Haemopoietic and Lymphoid Tissues. *Fourth Edition. IARC, Lyon, France.*
37. **Orfao A, Lopez A, Flores J, Vidriales B, Perez J, Kneba M, Macintyre E, Parreira A, Richards S, Szczepanski T, Trka J, Van der Velden V H J, Van Dongen J J M. (2006).** Diagnosis of haematological malignancies: new applications for flow cytometry. *Hematology- The European hematology association program 2(1): 6-13.* (<http://cnc.cj.uc.pt/BEB/private/pdfs/Oncobiology0607/Hematology,%202006%5B1%5D.%20Orfao.pdf> 23/02/2019)

38. **Fiona E Craig, Kenneth A Foon (2008).** Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111:3941-3967.
39. **Χατζοπούλου Δ, Δημητρακοπούλου Α, Τζανουδάκη Μ, Καφάση Ν. (2012).** Ανοσοφαινότυπος-αξιολόγηση και διαγνωστική σημασία σε νοσήματα. 7ο πανελλήνιο συνέδριο ιατρικής βιοπαθολογίας, πανελλήνια ένωση ιατρικής βιοπαθολογίας.
40. **Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R, Rothe G, Lacombe F, Lanza F, Papa S, Lucio P, San Miguel J F. (1999).** Clinically Useful Information Provided by the Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematological Malignancies: Current Status and Future Directions. *Clinical Chemistry* Oct 45 (10): 1708-1717.
41. **Kumar S, Kimlinger T, Morice W. (2010).** Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 23(3): 433–451.
42. **Jennings C D, Kenneth A Foon. (1997).** Recent Advances in Flow Cytometry: Application to the Diagnosis of Hematologic Malignancy. *Blood*, 90 (8): 2863-2892.
43. **Κουλούκουσα Κ Μ. (2018).** Ιστολογία-εμβρυολογία 1. (http://emed.med.uoa.gr/application/syllabus_i/aimopiisi/info.htm)
44. **Senthil Pazhanisamy. (2013).** Adult Stem Cell and Embryonic Stem Cell Markers. *MATER METHODS* ;3:200. (<http://www.labome.com/method/Adult-Stem-Cell-and-Embryonic-Stem-Cell-Markers.html>).
45. **Lin K K, Goodell M A. (2011).** Detection of Hematopoietic Stem Cells by Flow Cytometry. *Recent Advances in Cytometry, Part B - Advances in Applications: 21–30.*
46. **Negrin R S MD. (2017).** Patient education: Hematopoietic cell transplantation (bone marrow transplantation) (Beyond the Basics), (<https://www.uptodate.com/contents/hematopoietic-cell-transplantation-bone-marrow-transplantation-beyond-the-basics>)
47. **Tuthill M, Hatzimichael E. (2010).** Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications. Dovepress.* 105-117.

48. **Voltarelli J C. (2000).** Applications of flow cytometry to hematopoietic stem cell transplantation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. vol.95(3):403-414.*
49. **Chin-Yee I, Anderson L, Keeney M, Sutherland D Robert. (1997).**Quality assurance of stem cell enumeration by flow cytometry. *Cytometry. 30:296 – 303.*
50. **Jaime-Pérez J C, Villarreal-Villarreal C D, Méndez-Ramírez N, Vázquez-Garza E, Salazar-Riojas R, Gómez-Almaguer D. (2016).** Assessment of immune reconstitution status in recipients of a successful hematopoietic stem cell transplant from peripheral blood after reduced intensity conditioning. *Blood Cells, Molecules, and Diseases. 58:52–56, 2016.*
51. **ΜΑΓΔΑ Ι. ΤΣΕΚΟΥΡΑ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ. (2015).** ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ. ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ. (<https://docplayer.gr/3139579-Aimopetalia-magda-i-tsekouyra-viopathologos-ippokrateio-nosokomeio-athinon.html>)
52. **George J N. (2000).** Platelets. *Lancet 335:1531-1543,*
53. **Holinstat M. (2017).** Normal platelet function. *Cancer Metastasis. 36(2):195-198.*
54. **Pasalic L, Pennings G J, Connor D, Campbell H, Kritharides L, Chen V M. (2017).** Flow Cytometry Protocols for Assessment of Platelet Function in Whole Blood. *Hemostasis and Thrombosis. 369–389.*
55. **Perumal Thiagarajan. (2017).** Platelet Disorders, Overview of Platelet Disorders, 2017. (<https://emedicine.medscape.com/article/201722-overview>).
56. **Giannini S, Cecchetti L, Mezzasoma A M, Gresele P. (2009).** Diagnosis of platelet-type von Willebrand disease by flow cytometry. *Haematologica. 95(6):1021-4.*
57. **Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. (2013).** New horizons in platelets flow cytometry. *Malays J Med Sci. 20(2):62-6*
58. **Dr. Joseph E J. (2017).** The use of flow cytometry to assess platelet function and activation – is it time to throw out the platelet aggregometer??. DEPARTMENT OF HAEMATOLOGY and HAEMATOLOGY RESEARCH LABORATORY ST VINCENT'S HOSPITAL AND UNIVERSITY OF NSW, SYDNEY. (http://www.practical-haemostasis.com/References/Joanne_Joseph.pdf)
59. **Ramström S, Södergren A, Nahreen Tynngård, Lindahl T. (2016).** Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives?. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis. (42), 3: 268-281.*

60. **El Hachem H et al. (2017).** “Recurrent Pregnancy Loss: Current Perspectives.” *International Journal of Women’s Health* 9:331–345.
61. **Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. (2012).** Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Human Reproduction.* 27(8):2297–2303.
62. **Stephenson M D, Sierra S. (2006).** Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Human Reproduction.* 21(4):1076–1082.
63. **Fertility and Sterility. (2012).** Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. 98(5):1103–1111, ([https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(12\)00701-7/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(12)00701-7/fulltext))
64. **Opartrny L, David M, Kahn S R, Shrier I, Rey E. (2006).** Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis. *J Rheumatol.* 33: 2214–2221.
65. **Di Prima FAF, Valenti O, Hyseni E, et al. (2011).** Antiphospholipid Syndrome during pregnancy: the state of the art. *Journal of Prenatal Medicine.* 5(2):41-53.
66. **NHS. (2018).** Antiphospholipid syndrome treatment. (<https://www.nhs.uk/conditions/antiphospholipid-syndrome/treatment/>)
67. **Deans R, Abbott J. (2010).** Review of Intrauterine Adhesions. *Journal of Minimally Invasive Gynecology.* 17(5):555–569.
68. **Lassi Z S et al. (2014).** “Preconception care: caffeine, smoking, alcohol, drugs and other environmental chemical/radiation exposure”. *Reproductive health vol. 11 Suppl 3:S6.*
69. **Ruixue Wang et al. (2011).** “The impact of semen quality, occupational exposure to environmental factors and lifestyle on recurrent pregnancy loss”. *Journal of assisted reproduction and genetics vol. 30,(11): 1513-8.*
70. **Mehta S , Anjum D. (2017).** Psychological Factors and Stress in RPL. *Recurrent Pregnancy Loss.* 157–167.
71. **Kutteh W. (2015).** Novel Strategies for the Management of Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine,* 33(03):161–168.

72. **Menten B, Swerts K, Chiaie B D, Janssens S, Buysse K, Philippé J, Speleman F. (2009).** Array comparative genomic hybridization and flow cytometry analysis of spontaneous abortions and mors in utero samples. *BMC Medical Genetics*. 10(1).
73. **Gottlieb M S, et al. (1981).** *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 305:1425–1431.
74. **Siegal F P, et al. (1981).** Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med*. 305:1439–1444.
75. **Barré-Sinoussi F, et al. (1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220:868–871.
76. **Popovic M, Sarngadharan M G, Read E, Gallo R C. (1984).** Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*. 224:497–500.
77. **McDougal J S, et al. (1986).** Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*. 231:382–385.
78. **Centers for disease control and prevention. (2018).** HIV/AIDS, (<https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html> 2018)
79. **PROJECT INFORM. (2018).** Information and advocacy for people with HIV/AIDS Hepatitis C, HIV Structure & Function, (<https://www.projectinform.org/glossary/hiv-structure-function> ην 05/03/2019)
80. **Rainer S. (2016).** Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother*. 43(3):203-22. (<https://www.karger.com/Article/Fulltext/445852>)
81. **Engelman A, Cherepanov P. (2012).** The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 10(4):279-90.
82. **AIDS info. (2018).** , The HIV Life Cycle, (<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/73/the-hiv-life-cycle> ην 05/03/2019)
83. **AIDS info. (2018).** The stages of HIV infection, (<https://aidsinfo.nih.gov/understanding-hiv-aids/fact-sheets/19/46/the-stages-of-hiv-infection> ην 05/03/2019)

84. **Margolick J B, et al. (1998).** Decline in total T cell count is associated with onset of AIDS, independent of CD4(+) lymphocyte count: implications for AIDS pathogenesis. *Clin Immunol Immunopathol.* 88:256–263.
85. **Vajpayee M, Mohan T. (2011).** Current practices in laboratory monitoring of HIV infection. *Indian J Med Res.* 134(6):801-22.
86. **Kaplan J E, et al. (2002).** Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Preventing Opportunistic Infections Among HIV-Infected Persons — 2002 Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. (No. RR-8), *MMWR* 51.
87. **Barnett D et al. (2008).** “CD4 Immunophenotyping in HIV Infection.” *Nature reviews. Microbiology* 6.11 Suppl (2008): S7–15.
88. **Uppal SS, Verma S, Dhot PS. (2003).** Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry).* 52B:32–6.
89. **Ginaldi L, De Martinis M, D’Ostilio A, Marini L, Loreto F, Modesti M, et al. (2001).** Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *Am J Hematol.* 67:63–72.
90. **Marshall, Mariah M et al. (2009).** “Effect of cigarette smoking on HIV acquisition, progression, and mortality” *AIDS education and prevention : official publication of the International Society for AIDS Education* vol. 21(3):28-39.
91. **World Health Organization. (2009).** Laboratory Guidelines for enumerating CD4 T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS. (revised version 2009). *WHO Regional Office for South-East Asia.*
92. **Morbidity and Mortality Weekly Report. (2003).** Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4+ T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. Centers for Disease Control and Prevention. *52(RR02):1-13.*
93. **Hultin Lance E et al. (2010).** “Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods” *Cytometry. Part B, Clinical cytometry. Vol 78(3):194-200.*

94. **Nam. (2018).** Immune system monitoring methods. (<http://www.aidsmap.com/Immune-system-monitoring-methods/page/1729270/>)
95. **Peter J B, Sevall J S. (2004).** Molecular-based methods for quantifying HIV viral load. *AIDS Patient Care STDS*. 18(2):75-9.
96. **Ryan Duggan. (2019).** The NovoCyte Analyzer Review - Acea Biosciences. (<http://ucflow.blogspot.com/>)
97. **Flow cytometry: a basic introduction. (2018).** chapter 6: DNA analysis, (<http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-6-dna-analysis>)
98. **Fawzia Abo-Ali. (2019).** Clusters of differentiation (<https://www.slideshare.net/drafawzia/clusters-of-differentiation-cds>)

