

Φωτονικό και ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο - Ανοσοϊστοχημεία - Ανοσοφθορισμός

Θέμις Αλισσάφη, PhD

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας

Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Επιστημονική Υπεύθυνη Εργαστηρίου

Ανοσολογικής Ρύθμισης, Ίδρυμα

Ιατρολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

talissafi@med.uoa.gr

www.alissafilab.com

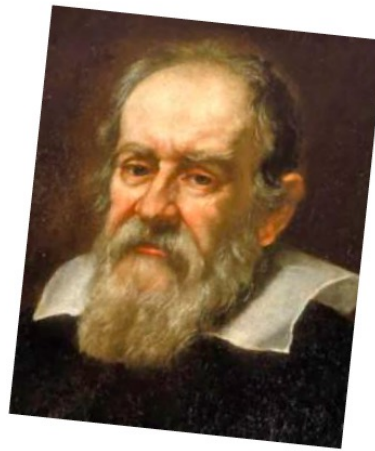
Τι πρέπει να γνωρίζετε:

- ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
- ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΦΩΤΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ
- ΕΜΠΕΔΩΣΗ ΤΗΣ ΦΩΤΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
- ΓΝΩΡΙΜΙΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
- ΠΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
- ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ
- ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Ιστορική αναδρομή οπτικής μικροσκοπίας



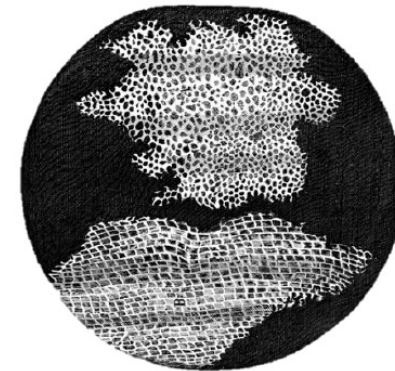
Η χρήση μεγεθυντικών φακών αναφέρεται σε κείμενα Ρωμαίων φιλοσόφων του 1^{ου} αιώνα μ.Χ.



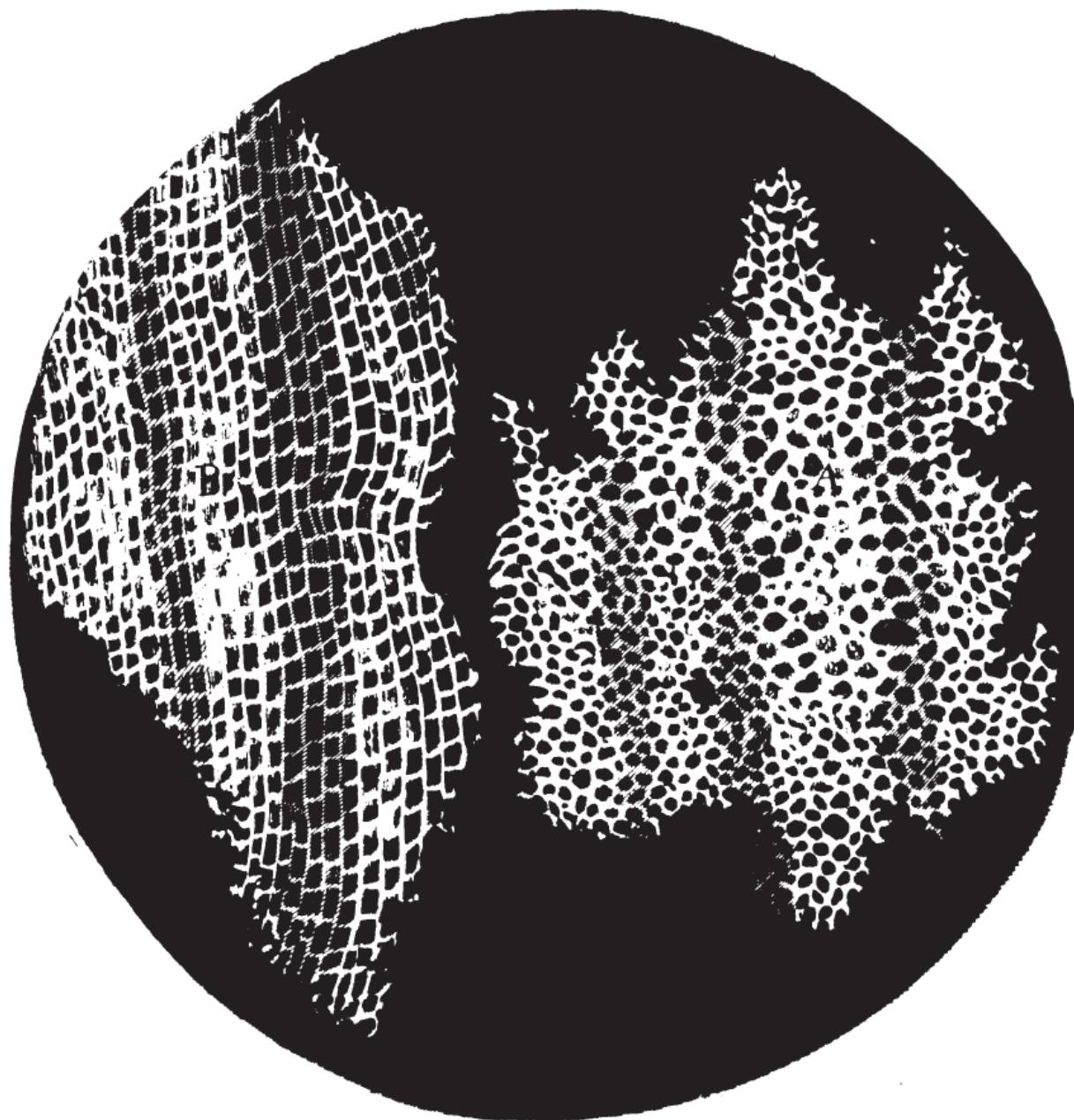
Ο Γαλιλαίος διατυπώνει τις αρχές που διέπουν τη λειτουργία των φακών και την εστίαση του φωτός (αρχές 17^{ου} αιώνα)



Εφεύρεση του **σύνθετου** οπτικού μικροσκοπίου από τον Robert Hooke (1665) με μεγέθυνση 20X.

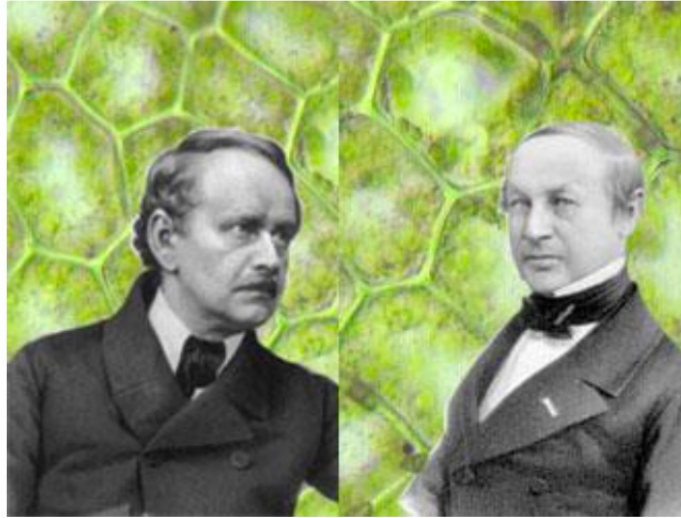


Το πρώτο σχέδιο από παρατήρηση κομματιών φελλού – διάκριση δομών που κατά τον Hooke θυμίζουν κελιά (cells) μοναχών



ΕΙΚΟΝΑ 1.22 Η κυτταρική δομή του φελλού. Αναπαράγωγη από σχέδιο του Robert Hooke στο οποίο απεικονίζεται μια λεπτή τομή φελλού κάτω από το φωτονικό μικροσκόπιο. Τα «κύτταρα» που παρατήρησε ο Hooke ήταν στην πραγματικότητα τα εναπομείναντα κυτταρικά τοιχώματα από κύτταρα που είχαν ήδη πεθάνει.

Η διατύπωση της κυτταρικής θεωρίας

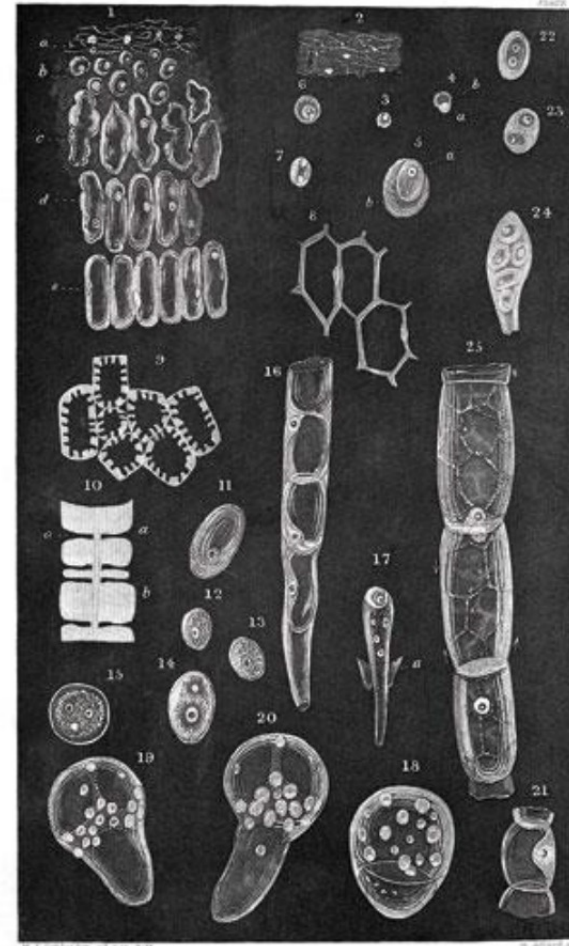


Matthias Schleiden (1804-1881) **Theodor Schwann** (1810-1882)

«Θεμελιώδης δομική και λειτουργική μονάδα όλων των έμβιων οργανισμών είναι το κύτταρο»

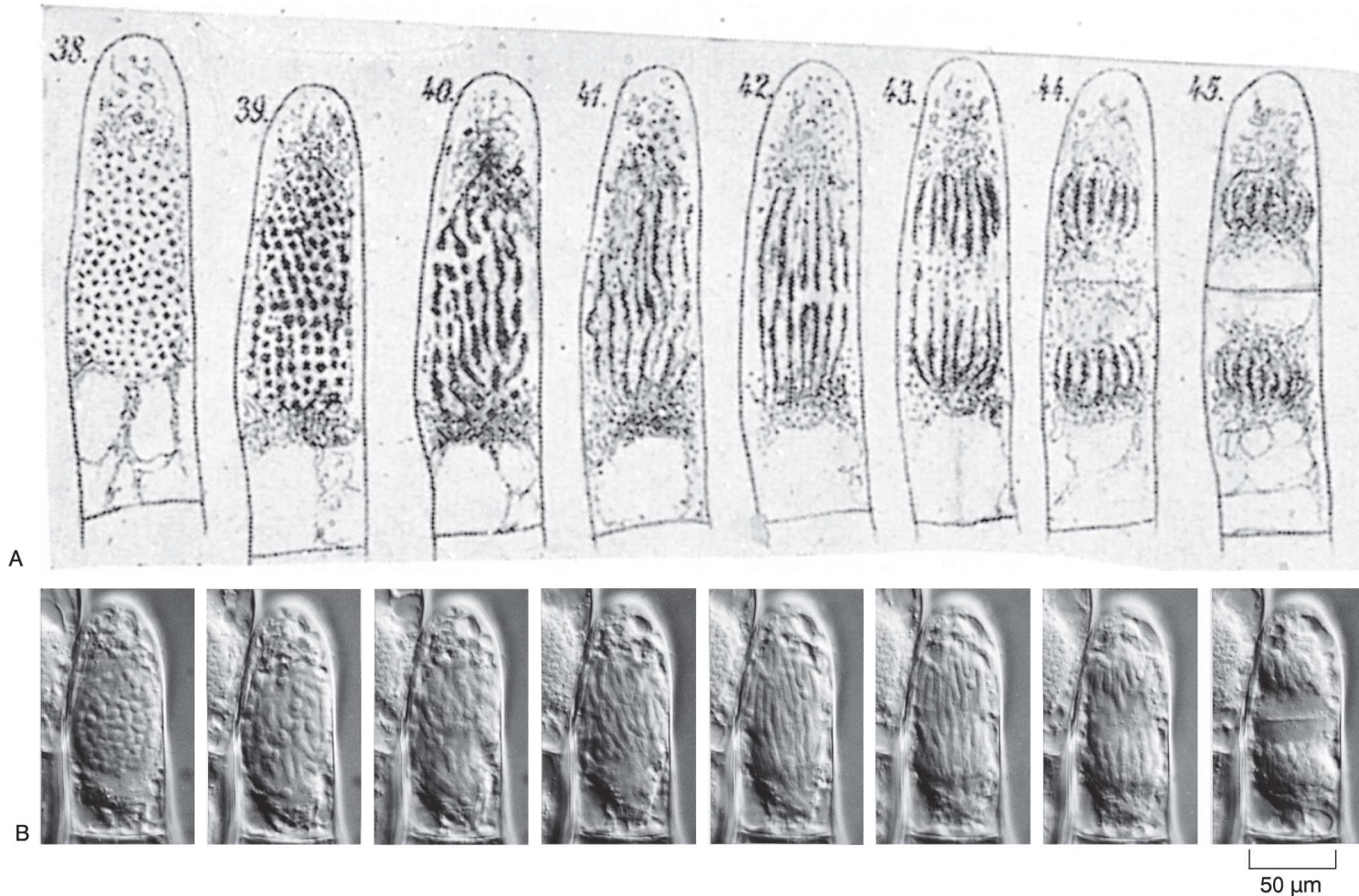


Αν και τα κύτταρα είχαν παρατηρηθεί το 1665 από τον Hooke, μόλις το 1839 ο Schwann και Schleiden διατύπωσαν την ολοκληρωμένη κυτταρική θεωρία



1838: Σχέδια φυτικών κυττάρων από τον Schleiden

Τα κύτταρα και ορισμένα από τα συστατικά τους φαίνονται με το φωτονικό μικροσκόπιο



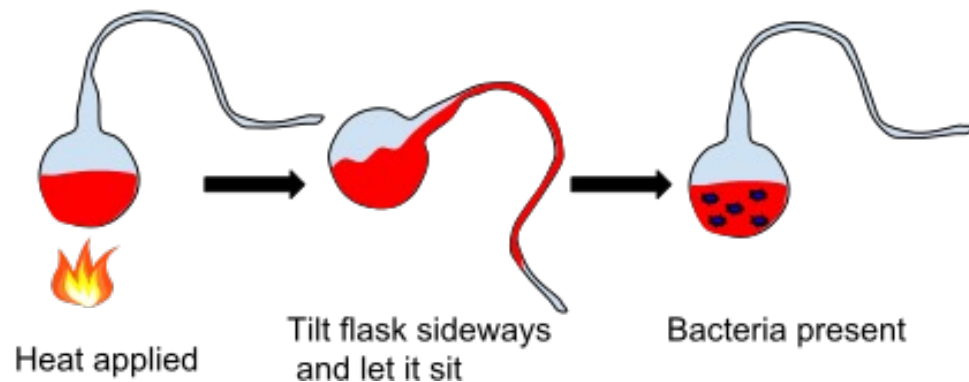
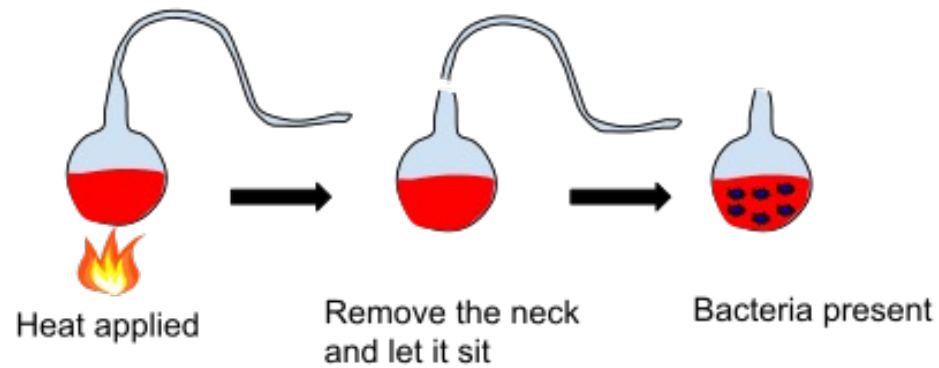
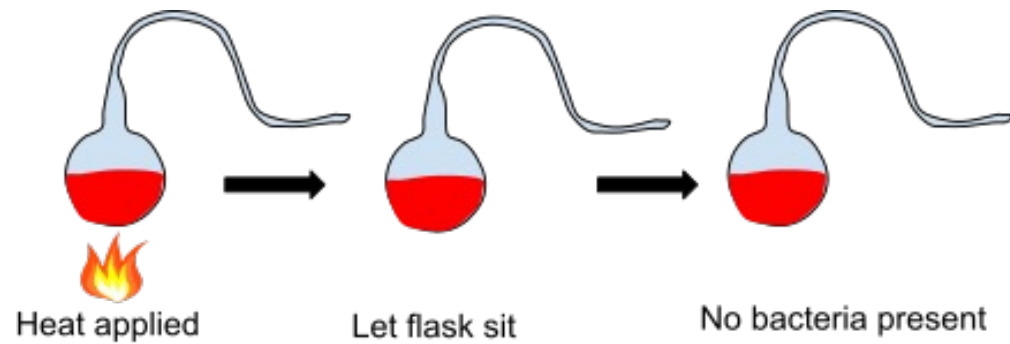
Κυτταρική Θεωρία

Όλα τα ζωντανά κύτταρα σχηματίζονται από την αύξηση και τη διαίρεση κυττάρων που προϋπάρχουν.

Συνεπώς οι ζωντανοί οργανισμοί δεν προκύπτουν αυθόρμητα, **αλλά ΜΟΝΟ** από οργανισμούς που προϋπάρχουν.

Εικόνα 1-4. Τα νεότερα κύτταρα σχηματίζονται από παλαιότερα καθώς αυτά αναπτύσσονται και διαιρούνται. (A) Σχέδιο ενός φυτικού κυττάρου (ένα κύτταρο τριχιδίου από ένα άνθος *Tradescantia*) κατά τη διαδικασία της διαίρεσής του σε δύο θυγατρικά κύτταρα μέσα σε χρονική περίοδο 2,5 ωρών (Eduard Strasburger, 1880). (B) Ένα παρόμοιο ζωντανό κύτταρο, όπως φωτογραφήθηκε με τη βοήθεια φωτονικού μικροσκοπίου. (Με την άδεια του Peter Hepler).

Επιβεβαίωση Κυτταρικής Θεωρίας από τα κλασικά πειράματα του Louis Pasteur



Η κυτταρική θεωρία επιβεβαιώθηκε από ένα σύνολο εξαιρετικών πειραμάτων από τον Louis Pasteur την δεκαετία του 1860.

Αποτελεί την Βάση για την θεωρία της εξέλιξης των ειδών του Δαρβίνου

Κοινό ή Σύνθετο μικροσκόπιο

1. Προσοφθάλμιος

8. Κινητή βάση αντικειμένου

9. Κινητή βάση συμπυκνωτή

10. Κοχλίες



2. Οπτικός σωλήνας

3. Βάση αντικειμενικών

4. Αντικειμενικός

5. Αντικειμενοφόρος τράπεζα

6. Διάφραγμα συμπυκνωτή

7-11. Σύστημα συμπυκνωτή

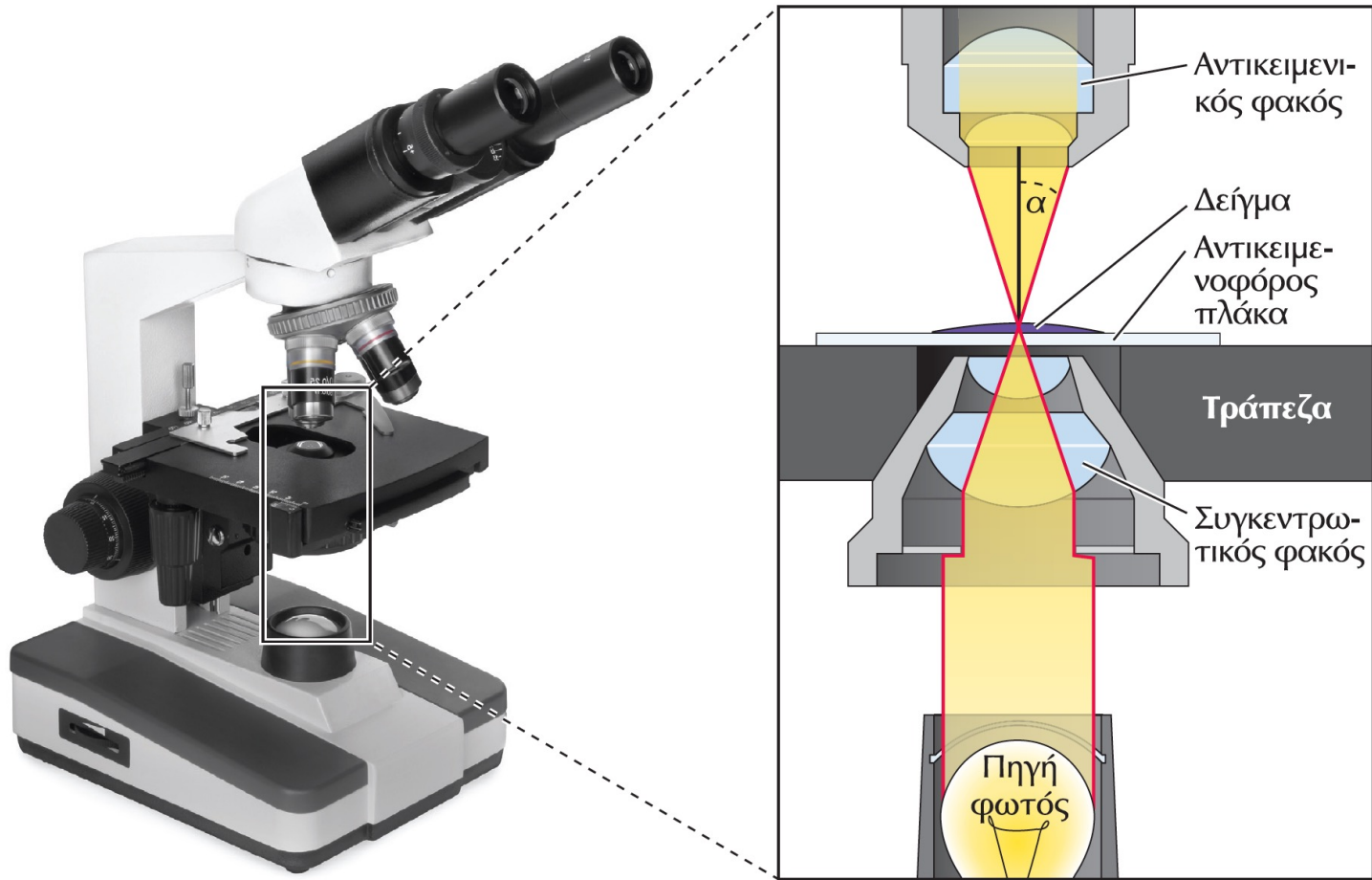
13. Φωτεινή πηγή-Διάφραγμα

14. Βάση

Το φωτονικό μικροσκόπιο δίνει την δυνατότητα να μεγεθύνουμε τα κύτταρα έως και **χίλιες φορές** και να διακρίνουμε **λεπτομέρειες έως 0,2 μm (200nm)**.

Αυτός ο περιορισμός επιβάλλεται από την κυματική φύση του φωτός και όχι από την ποιότητα των φακών

Διακριτική ικανότητα 0.2-0.3 μm

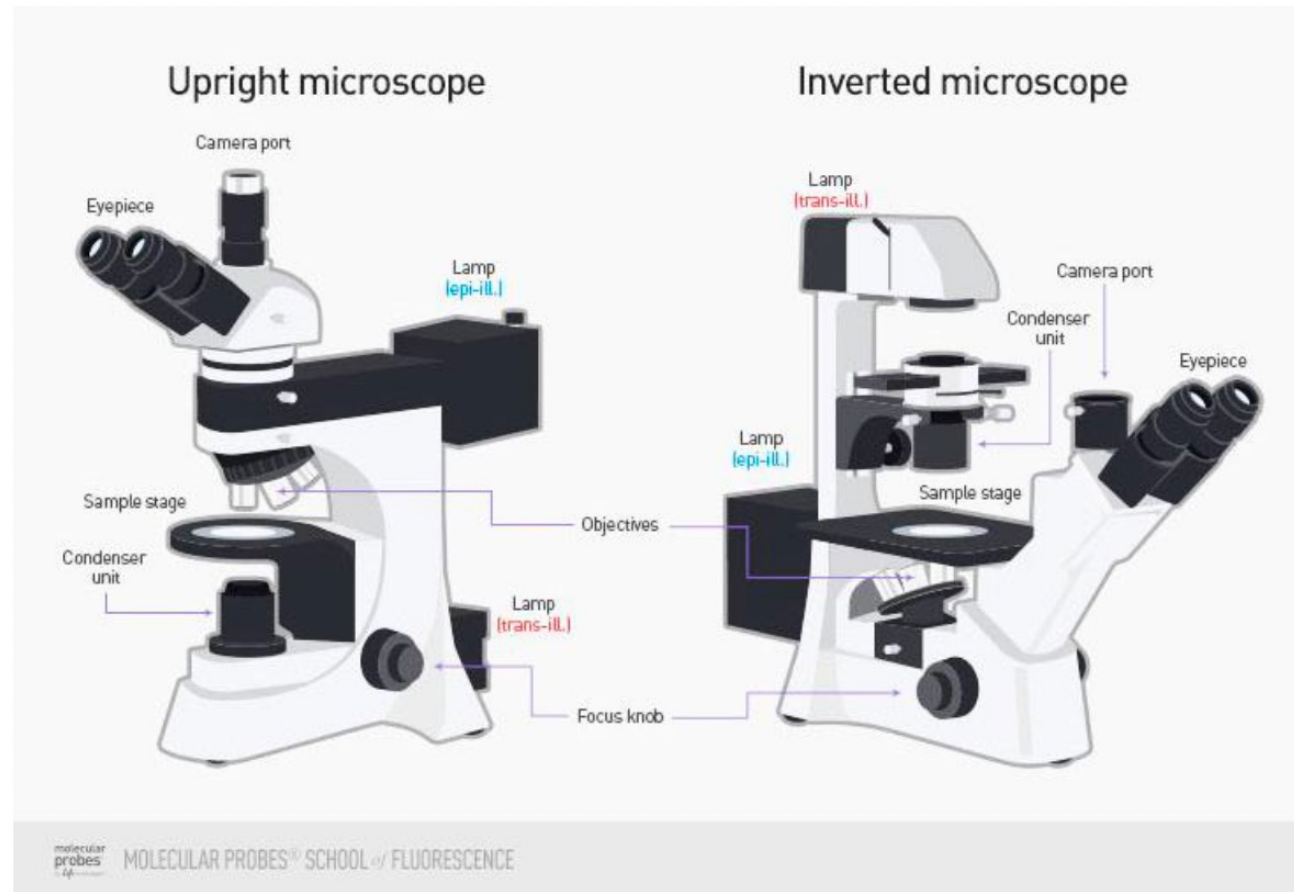


Για την παρατήρηση κυττάρων με το φωτονικό μικροσκόπιο υπάρχουν τρεις προϋποθέσεις :

1. Έντονο φως πρέπει να εστιάζεται πάνω στο δείγμα με την μεσολάβηση φακών στο συγκεντρωτικό φακό
2. Το δείγμα πρέπει να έχει υποβληθεί σε κατάλληλη προετοιμασία, έτσι ώστε το φως να το διαπερνά.
3. Ένα σετ κατάλληλοι φακοί (αντικειμενικός, σωλήνας και προσοφθάλμιος) πρέπει να διατάσσονται σωστά προκειμένου το είδωλο του δείγματος να εστιάσει στον οφθαλμό.

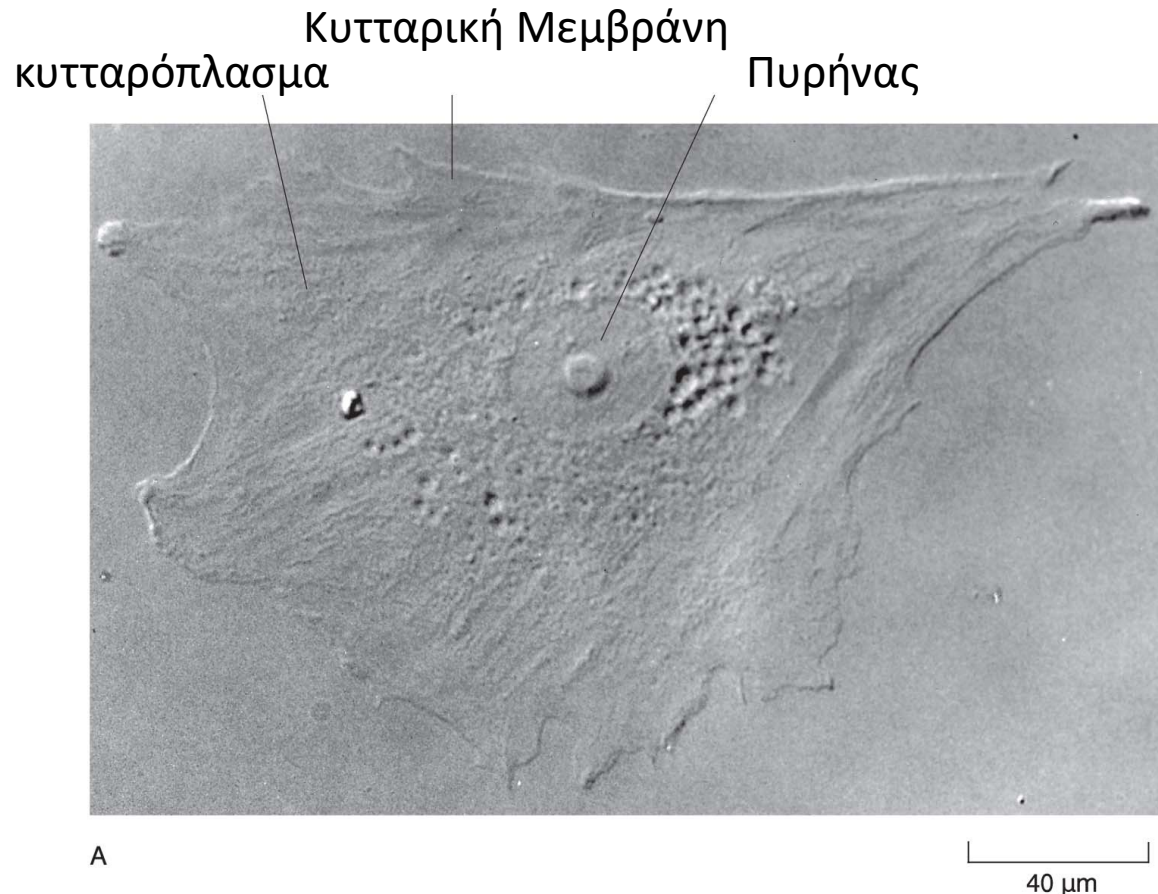
ΕΙΚΟΝΑ 1.23 Αριθμητικό άνοιγμα. Το φως εστιάζεται πάνω στο δείγμα μέσω του συγκεντρωτικού φακού και στη συνέχεια συλλέγεται από τον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου. Το αριθμητικό άνοιγμα ορίζεται από τη γωνία του κώνου του φωτός που εισέρχεται στον αντικειμενικό φακό (α) και από τον συντελεστή διάθλασης του μέσου (που είναι συνήθως αέρας ή λάδι) μεταξύ του φακού και του δείγματος.

Είδη οπτικών μικροσκοπίων (ορθό / ανάστροφο)



Τα ανάστροφα μικροσκόπια εκμεταλλεύονται τη βαρύτητα ώστε να επιτευχθεί απευθείας παρατήρηση ζωντανών κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε petridish μαζί με θρεπτικό μέσο. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές είναι πιο ακριβά και διαθέτουν περιορισμένη μεγέθυνση σε σχέση με τα ορθά μικροσκόπια

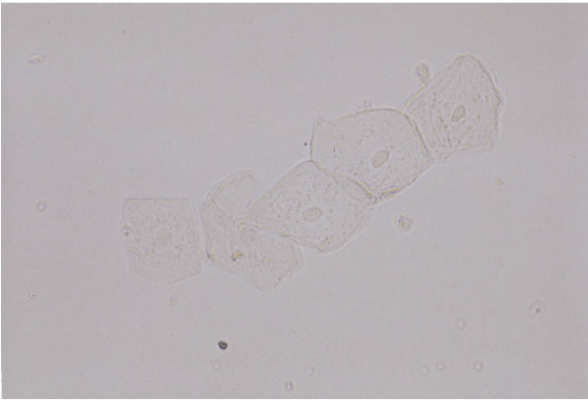
Τα κύτταρα και ορισμένα από τα συστατικά τους φαίνονται με το φωτονικό μικροσκόπιο λόγω διαφορετικής διάθλασης



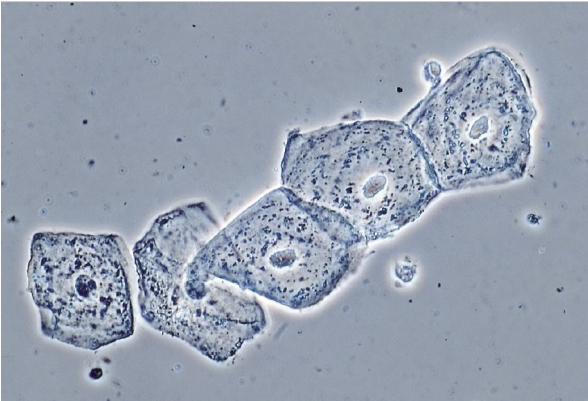
Εικόνα 1-6. Μερικές από τις εσωτερικές δομές ενός ζωντανού κυττάρου όπως φαίνονται με το φωτονικό μικροσκόπιο. (A) Ένα κύτταρο από δέρμα ανθρώπου το οποίο αναπτύχθηκε σε ιστοκαλλιέργεια και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε μέσω ενός φωτονικού μικροσκοπίου αντίθεσης φάσεων (βλέπε Παράρτημα 1-1). Ο πυρήνας είναι εμφανώς διακριτός. (B) Ένα χρωμοφόρο κύτταρο βατράχου

- Τα συστατικά του κυττάρου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον δείκτη διάθλασης με αποτέλεσμα οι ακτίνες του φωτός να εκτρέπονται καθώς περνούν από το ένα μέσα στο άλλο.
- Αυτές οι μικρές διαφορές μπορούν να γίνουν ορατές με οπτικά τεχνάσματα και η εικόνα αυτή μπορεί να βελτιωθεί με περαιτέρω ψηφιακή επεξεργασία.
- Λεπτομέρειες δομών με μέγεθος κάτω από $0,2 \mu\text{m}$ δεν είναι δυνατό να διακριθούν.

(A)



(B)



(Γ)

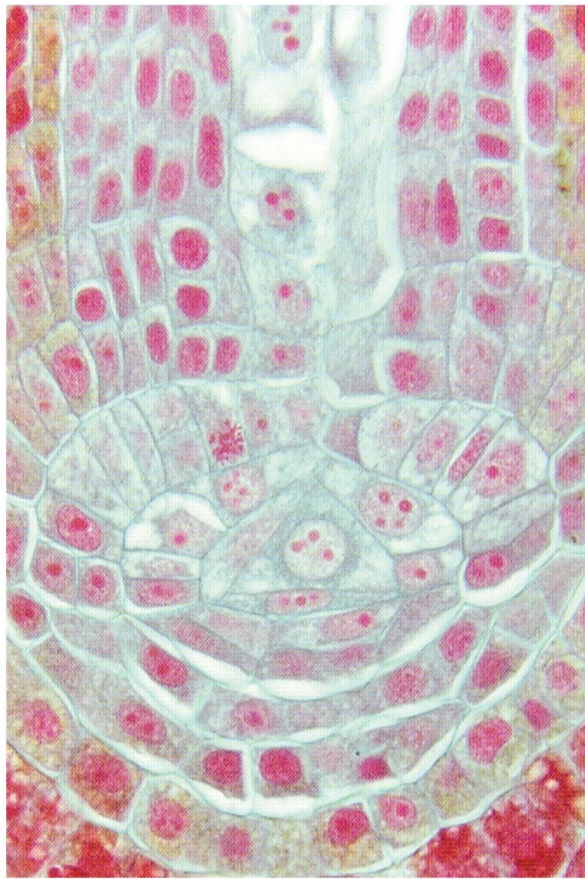


50 μm

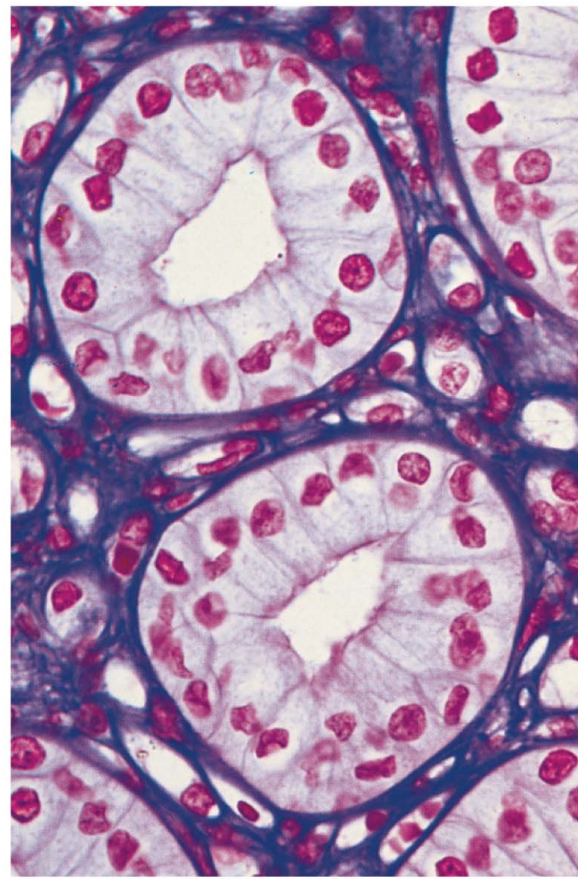
ΕΙΚΟΝΑ 1.25 Μικροσκοπική παρατήρηση ζωντανών κυττάρων. Φωτογραφίες κυττάρων από παρειές ανθρώπου με μικροσκοπία (Α) φωτεινού πεδίου, (Β) αντίθεσης φάσης και (Γ) αντίθεσης-διαφορικής συμβολής. (Ευγενική προσφορά του Mort Abramowitz, Olympus America, Inc.)

Τα δύο τελευταία συστήματα αξιοποιούν διαφορές στον τρόπο με τον οποίο το φως διέρχεται από περιοχές του κυττάρου με διαφορετικό δείκτη διάθλασης. Και οι τρεις εικόνες προκύπτουν απλά αλλά αλλάζοντας τα ξεχωριστά οπτικά συστήματα (φίλτρα), του ίδιου μικροσκοπίου.

Τα κύτταρα και ορισμένα από τα συστατικά τους φαίνονται με το φωτονικό μικροσκόπιο με τη χρήση ειδικών χρωστικών



A
50 μm

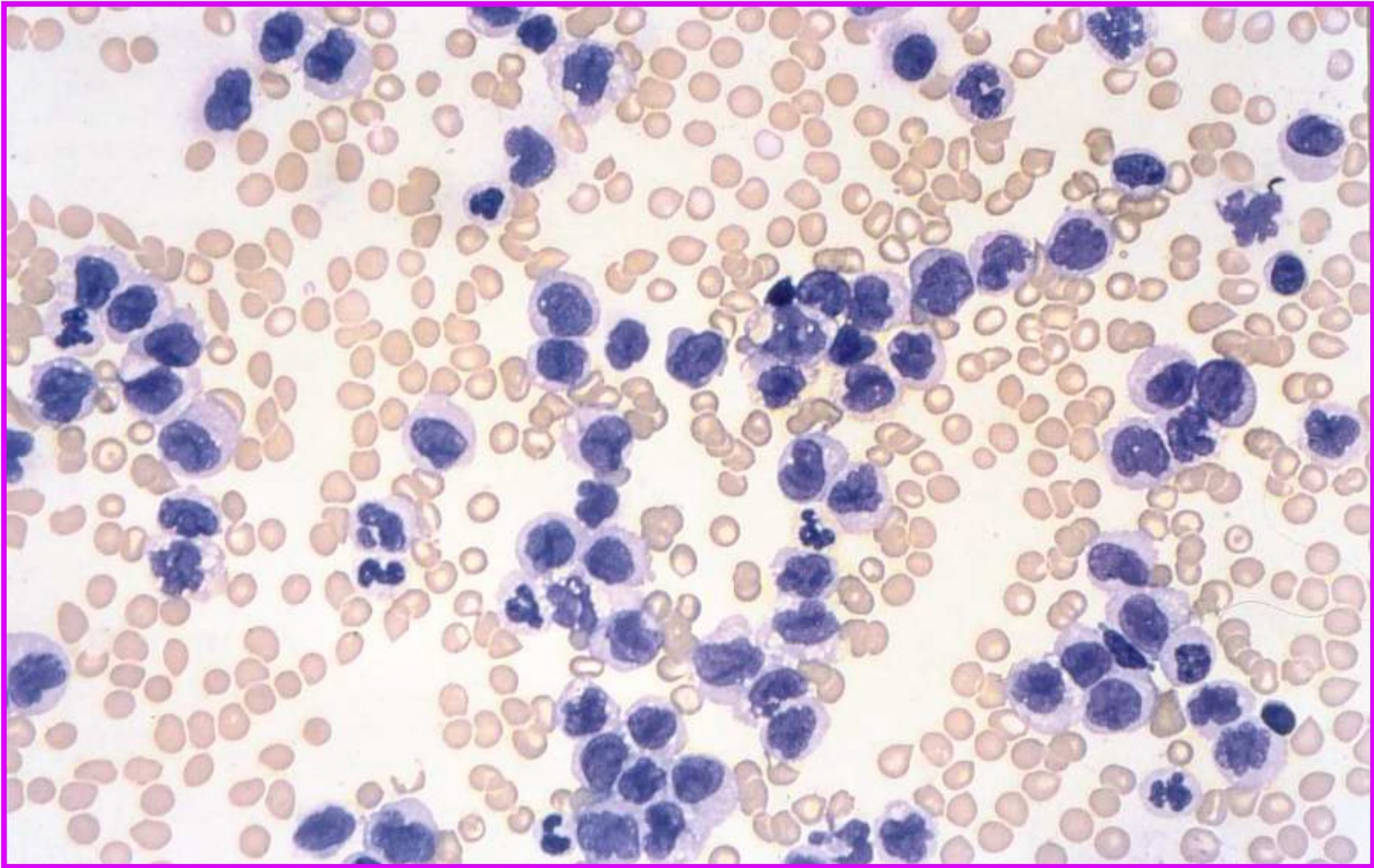


B
50 μm

Η εξέταση της εσωτερικής δομής των κυττάρων είναι πιο δύσκολη, όχι μόνο επειδή τα διάφορα οργανίδια του είναι μικρά, αλλά και επειδή είναι διάφανα ή άχρωμα

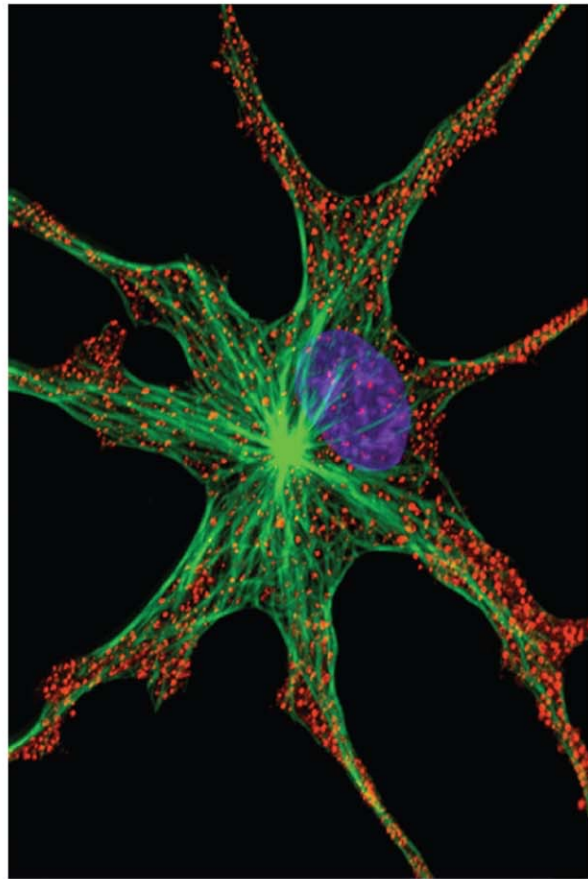
Μια λύση είναι τα δείγματα να υποβληθούν σε ειδική επεξεργασία που περιλαμβάνει **μονιμοποίηση** με χημικά μέσα και διατομή σε λεπτές τομές ή φέτες που επιστρώνονται σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και έπειτα χρωματίζονται.

Εικόνα 1-5. Κύτταρα σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς. (Α) Κύτταρα από το ακρορίζιο μιας φτέρης. Οι πυρήνες των κυττάρων έχουν βαφεί κόκκινοι και κάθε κύτταρο περιβάλλεται από ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα (ανοικτό μπλε). **(Β)** Κύτταρα από τα ουροσυλλεκτικά σωληνάρια του νεφρού. Σε αυτή την εγκάρσια τομή, κάθε σωληνάριο εμφανίζεται ως ένας δακτύλιος κυττάρων που διατάσσονται κοντά το ένα στο άλλο (με τους πυρήνες χρωματισμένους με κόκκινο). Ο δακτύλιος περιβάλλεται από εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (μωβ χρώμα). (Α, με την άδεια του James Mauser. Β, από P.R. Wheeler et al., Functional Histology, 2nd ed., 1987, Churchill Livingstone. Με την άδεια του εκδοτικού οίκου Elsevier).



Εικόνα από σύνθετο μικροσκόπιο

Τα κύτταρα και ορισμένα από τα συστατικά τους φαίνονται με το φωτονικό μικροσκόπιο με τη χρήση φθορισμού



B

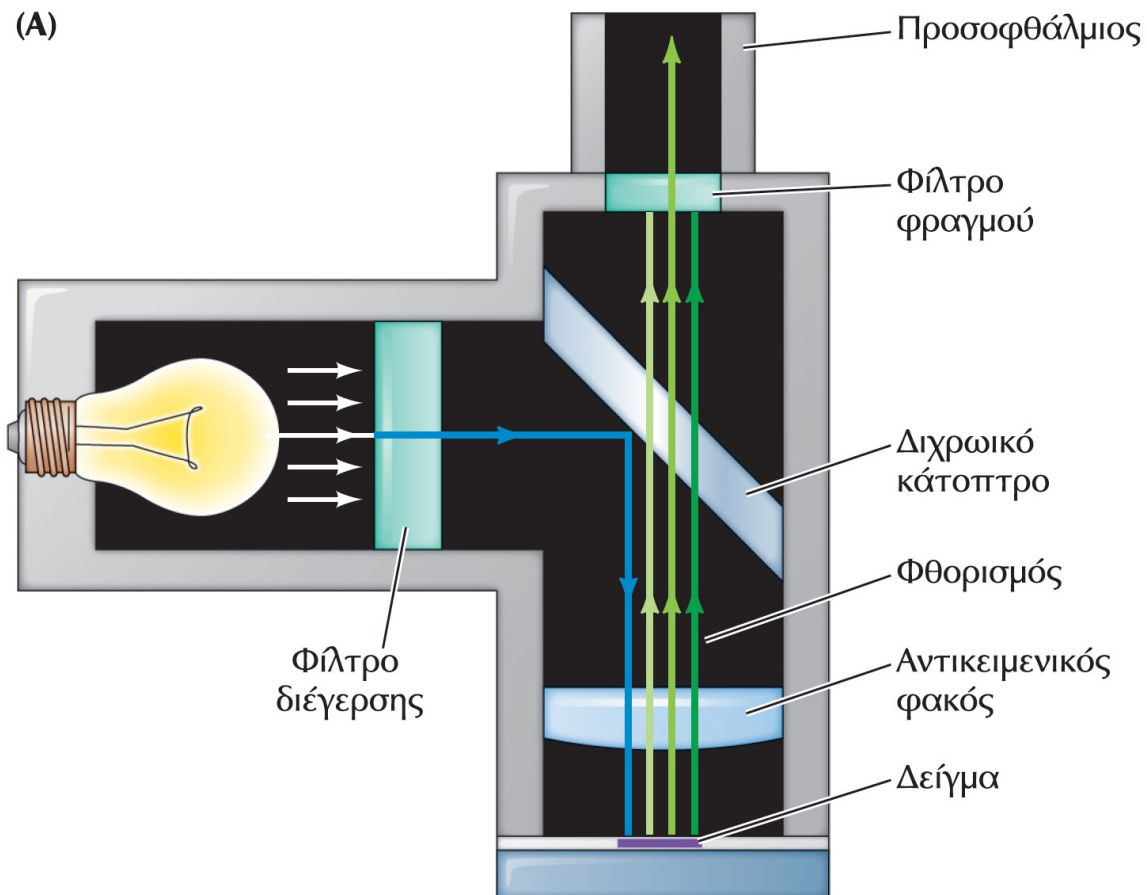
10 μm

Εικόνα 1-6. Μερικές από τις εσωτερικές δομές ενός ζωντανού κυττάρου όπως φαίνονται με το φωτονικό μικροσκόπιο.

(B) Ένα χρωμοφόρο κύτταρο βατράχου που έχει χρωστεί με φθορίζουσες χρώσεις εικονίζεται με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (βλέπε Παράρτημα 1-1). Ο πυρήνας εμφανίζεται με κυανέρυθρο χρώμα, τα χρωστικά κοκκία με κόκκινο και οι μικροσωληνίσκοι (ένα είδος ινιδίων που σχηματίζονται από πρωτεϊνικά μόρια στο κυτταρόπλασμα) με πράσινο. (A, με την άδεια του Casey Cunningham. B, με την άδεια του Steve Rogers και του Imaging Technology group, Beckman Institute, University of Illinois, Urbana).

Νέοι τύποι μικροσκοπίων φθορισμού αξιοποιούν εξελιγμένες μεθόδους φωτισμού (λέιζερ σκέδαση) και ψηφιακής ανάλυσης, με τις οποίες μπορεί να διακριθούν φθορίζοντα κυτταρικά συστατικά με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια και διακριτική ικανότητα έως 20 nm (όσο δηλαδή το μέγεθος ενός ριβοσωματίου).

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΕΥΡΕΩΣ ΠΕΔΙΟΥ



Το **μικροσκόπιο φθορισμού** μοιάζει με ένα συνηθισμένο φωτονικό μικροσκόπιο. Με εξαίρεση ότι το φως διέρχεται από δύο είδη φίλτρων.

Το (1^ο) **φίλτρο διέγερσης**: διηθεί το φως προτού φτάσει στο δείγμα, αφήνοντας μόνο τα μήκη κύματος που **διεγείρουν την συγκεκριμένη φθορίζουσα χρωστική**.

Το (2^ο) **φίλτρο φραγμού**: ανακόπτει αυτό το φως και αφήνει να διέλθουν μόνο τα μήκη κύματος που **εκπέμπονται** από τη φθορίζουσα χρωστική.

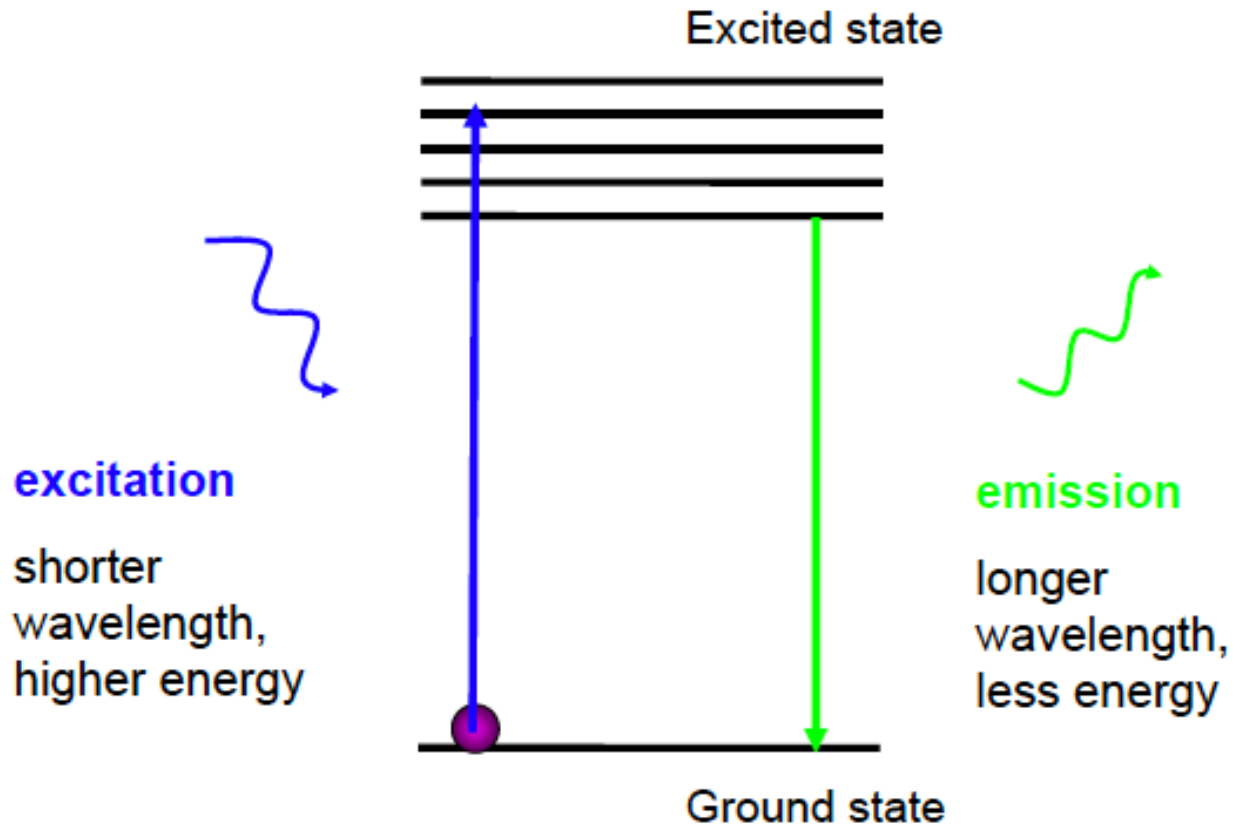
ΕΙΚΟΝΑ 1.27 Μικροσκοπία φθορισμού. (A) Το φως διέρχεται από ένα φίλτρο διέγερσης, μέσω του οποίου επιλέγεται το μήκος κύματος (π.χ. μπλε) της ακτινοβολίας που διεγείρει τη φθορίζουσα χρωστική. Ένα διχρωμικό κάτοπτρο εκτρέπει τη δέσμη φωτός προς το δείγμα. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα (π.χ. με μήκος κύματος στο πράσινο) διέρχεται στη συνέχεια από το διχρωμικό κάτοπτρο και από ένα ακόμη φίλτρο (φίλτρο φραγμού) με το οποίο επιλέγεται το μήκος κύματος της ακτινοβολίας φθορισμού που εκπέμπει η χρωστική.

ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ



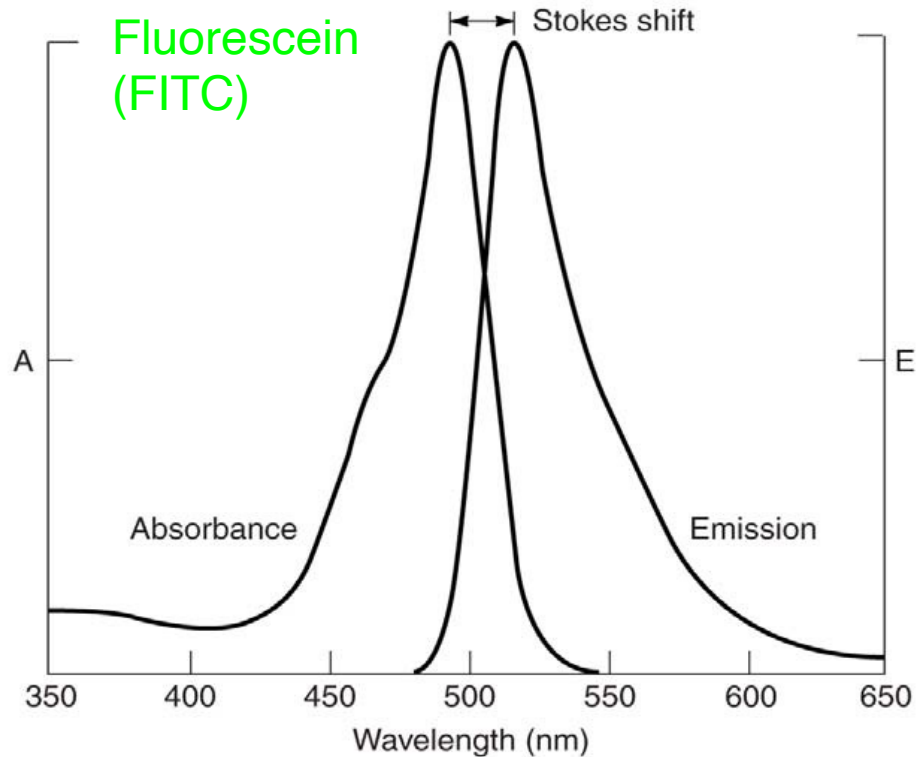
- Φθορίζουσα μόρια απορροφούν φως ορισμένου μήκους κύματος κι εκπέμπουν φως χαμηλότερης έντασης ενός άλλου μεγαλύτερου μήκους κύματος
- Ορισμένες φθορίζουσες χρωστικές προσδένονται ειδικά σε συγκεκριμένα μόρια των κυττάρων και με την βοήθεια του μικροσκοπίου φθορισμού αποκαλύπτουν την τοποθεσία τους στο κύτταρο
- Οι φθορίζοντες ανιχνευτές εκπέμπουν φως και επιτρέπουν την ανίχνευση αντικειμένων ακόμα και μικρότερων από 0.2 μm σε μέγεθος.
- Ανάλογα με το είδος του μικροσκοπίου φθορισμού, μπορούμε να παρατηρήσουμε ταυτόχρονα 1, 2, 3 ή και παραπάνω φθορίζουσες χρωστικές

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



- Άτομα ή μόρια διεγείρονται από ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος
- Απορροφούν ενέργεια με αποτέλεσμα ηλεκτρόνια αυτών να μετακινούνται παροδικά σε υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα.
- Κατά την επαναφορά των ηλεκτρονίων αυτών στη βασική στοιβάδα εκπέμπεται ακτινοβολία (φθορισμού) μεγαλύτερου μήκους κύματος (μικρότερης ενέργειας, $E = hc/\lambda$).
- Αυτό σημαίνει ότι το χρώμα του φωτός που εκπέμπεται είναι διαφορετικό από το χρώμα του φωτός που απορροφήθηκε.
- Ο χρόνος μεταξύ απορρόφησης και εκπομπής κατά το φθορισμό είναι 10^{-9} - 10^{-12} seconds

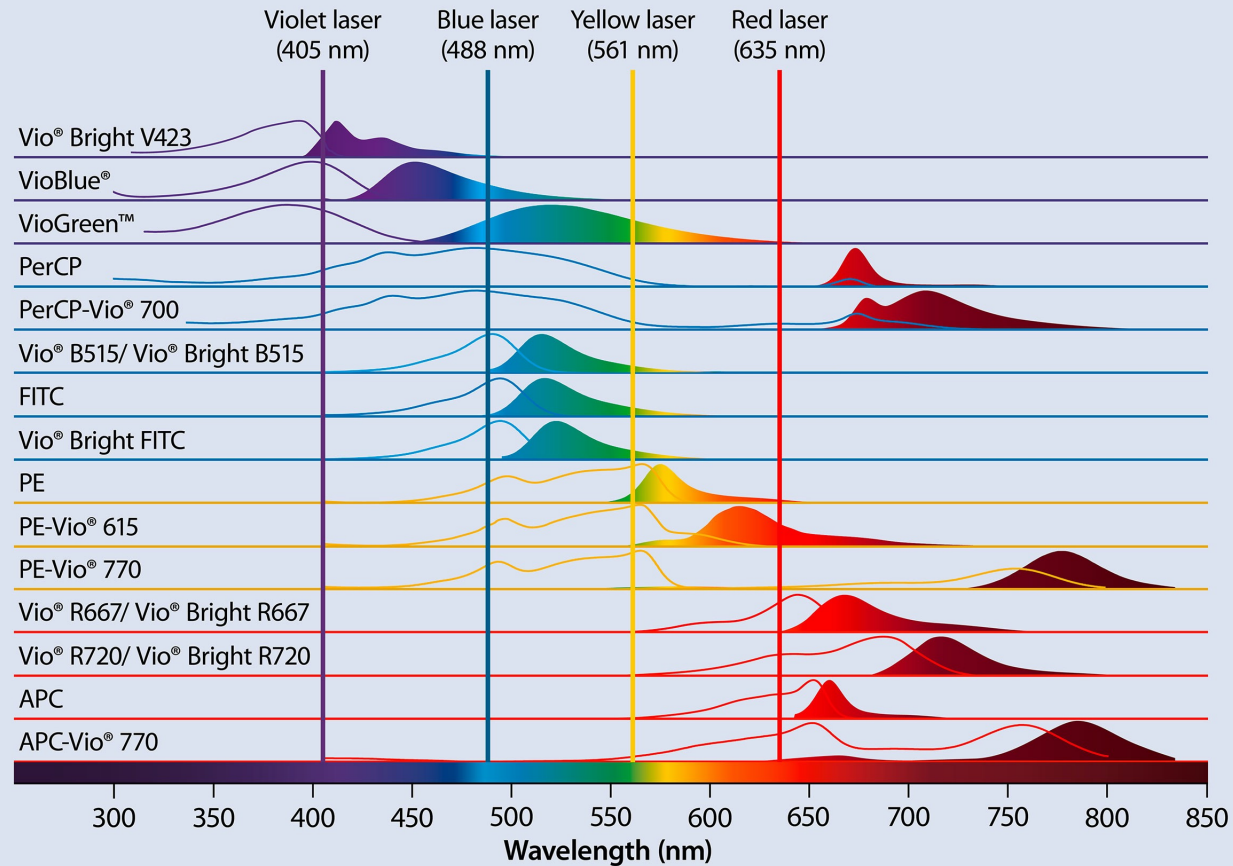
ΦΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟΡΡΦΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ



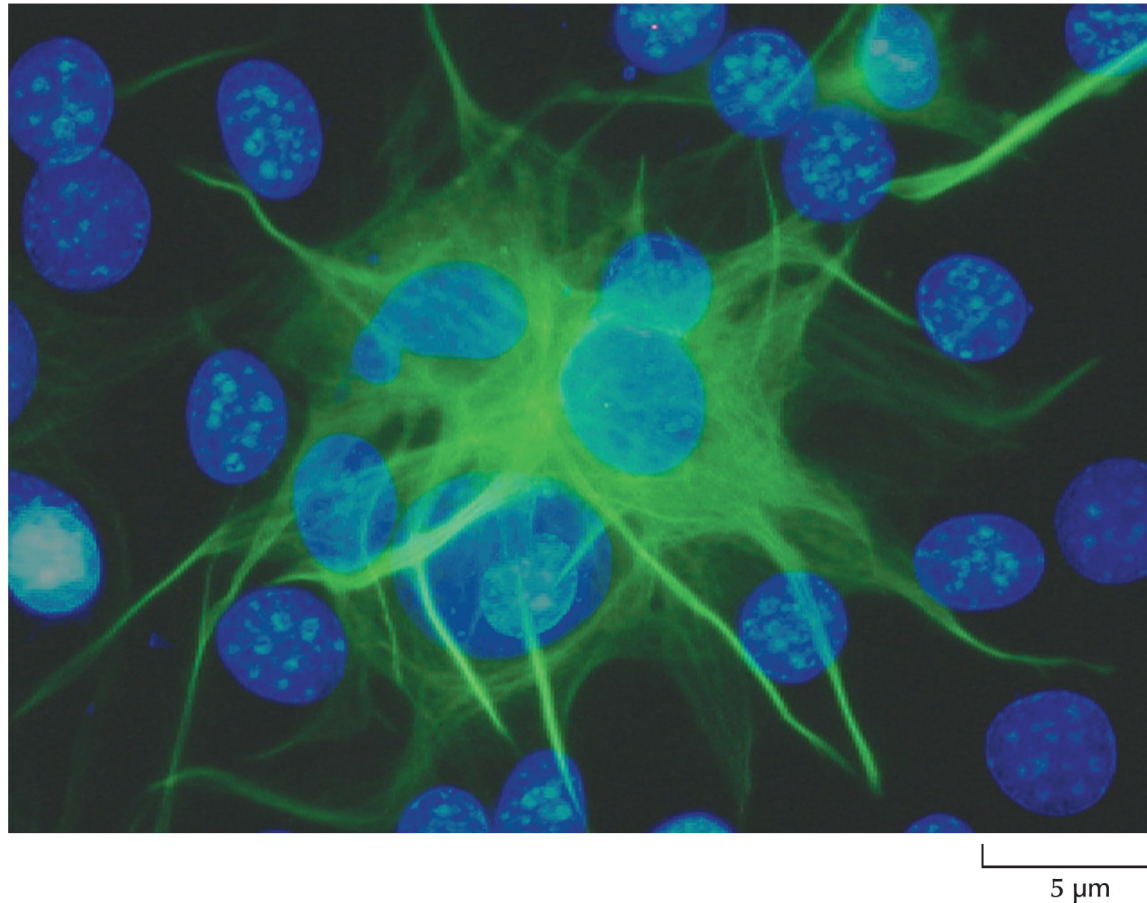
- Μόρια τα οποία μπορούν να φθορίζουν ονομάζονται φθορίζοντα μόρια/ ουσίες/ χρωστικές/ ανιχνευτές (fluorescent molecules, fluorochromes, fluorescent dyes)
- Κάθε φθορίζουσα ουσία έχει χαρακτηριστικά φάσματα **απορρόφησης/ εκπομπής** ακτινοβολίας τα οποία εξαρτώνται από τη δομή των ατόμων και των ηλεκτρονίων αυτής
- Παρατηρείται διαφορά μεταξύ των μέγιστων μηκών κύματος απορρόφησης και εκπομπής (Stokes shift)

ΕΠΙΚΑΛΥΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Fluorescence spectra overview

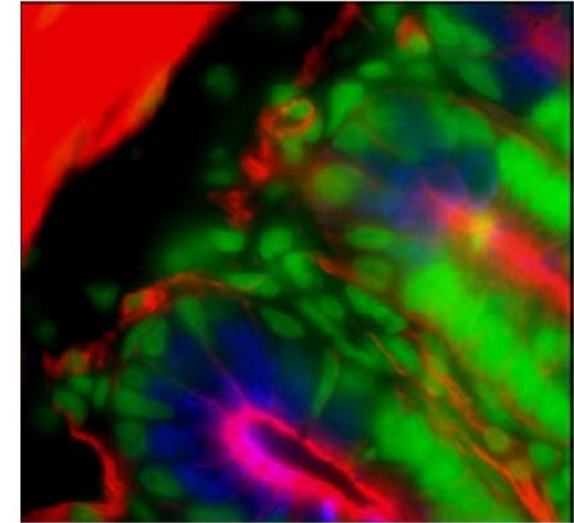
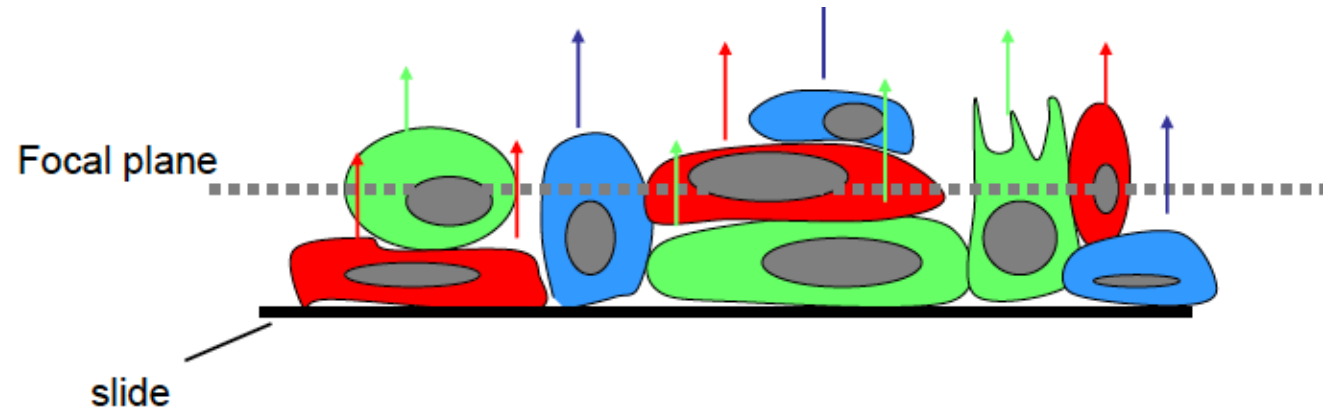


- Ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος δύναται να απορροφηθεί από περισσότερες από μία φθορίζουσες ουσίες και να τις διεγείρει
- Συχνά υπάρχει επικάλυψη μεταξύ φασμάτων εκπομπής διαφορετικών φθορίζόντων ουσιών
- Όταν χρησιμοποιούμε περισσότερες από μία φθορίζουσες χρωστικές για να σημάνουμε μακρομόρια, προσπαθούμε να επιλέξουμε συνδυασμούς χρωστικών που έχουν όσο περισσότερο διακριτά φάσματα εκπομπής/ απορρόφησης γίνεται



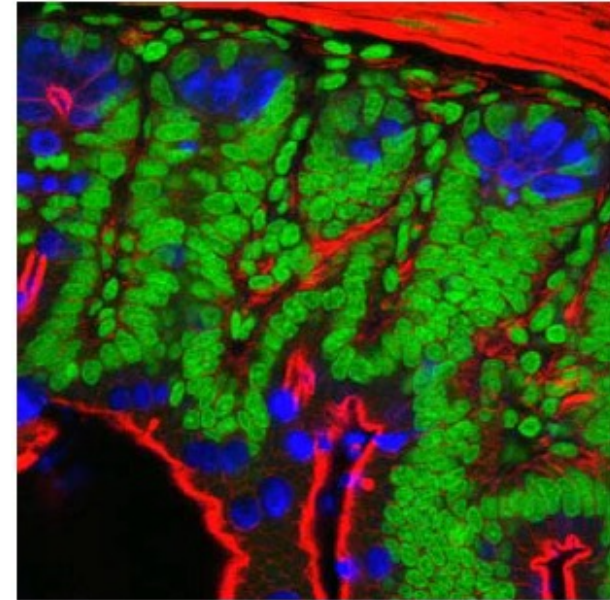
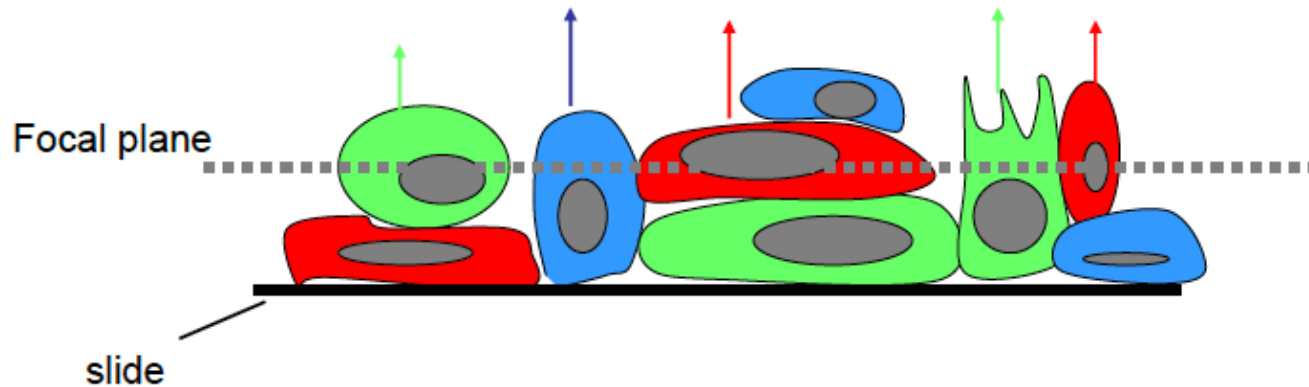
ΕΙΚΟΝΑ 1.28 Μικροσκοπία φθορισμού πρωτεΐνης σημασμένης με GFP. Απεικόνιση με μικροσκοπία φθορισμού νευρώνων ποντικού σε κυτταροκαλλιέργεια, στους οποίους έχει εισαχθεί μια συντηγμένη με GFP πρωτεΐνη που συνδέεται στους μικροσωληνίσκους. Οι πυρήνες εμφανίζονται με μπλε χρώση. (Από τη δημοσίευση του A. Cariboni, 2004. *Nature Cell Biol.* 6: 929.)

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΕΥΡΕΩΣ ΠΕΔΙΟΥ vs ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ



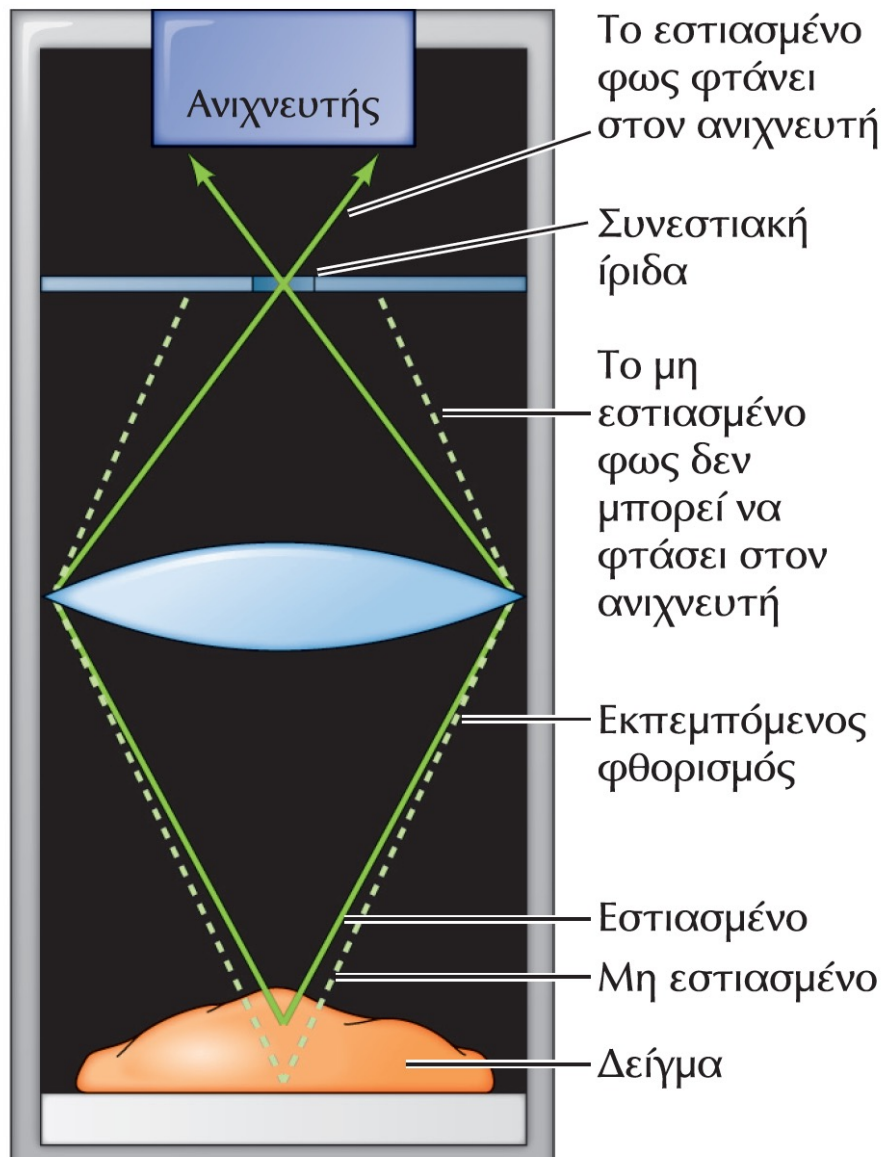
- Φθορίζοντα παρασκευάσματα με σημαντικό πάχος όπως στρογγυλά κύτταρα ή τομές ιστών δεν απεικονίζονται καλά με μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου διότι φθορίζοντα σήματα από μέρη που ευρίσκονται εκτός αλλά κοντά στο επίπεδο εστίασης ανιχνεύονται, αυξάνουν το background και δίνουν εικόνες με χαμηλή αντίθεση (contrast)

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΕΥΡΕΩΣ ΠΕΔΙΟΥ vs ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ



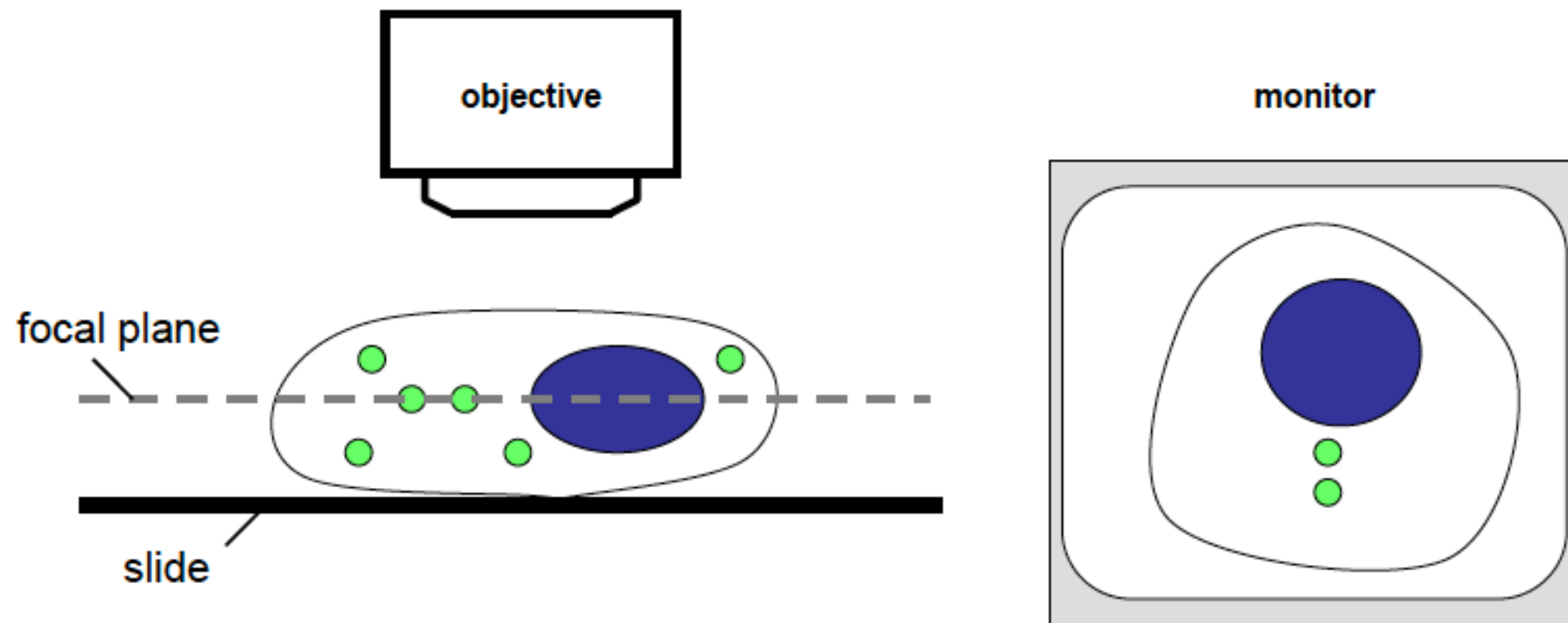
- Η συνεστιακή μικροσκοπία (confocal laser scanning microscopy) επιλύει το πρόβλημα διότι απορρίπτει σήματα από κοντινά αντικείμενα πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης
- Με τη συνεστιακή μικροσκοπία παρατηρούμε **οπτικές «τομές»** του παρασκευάσματος!!

ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ – CONFOCAL MICROSCOPY

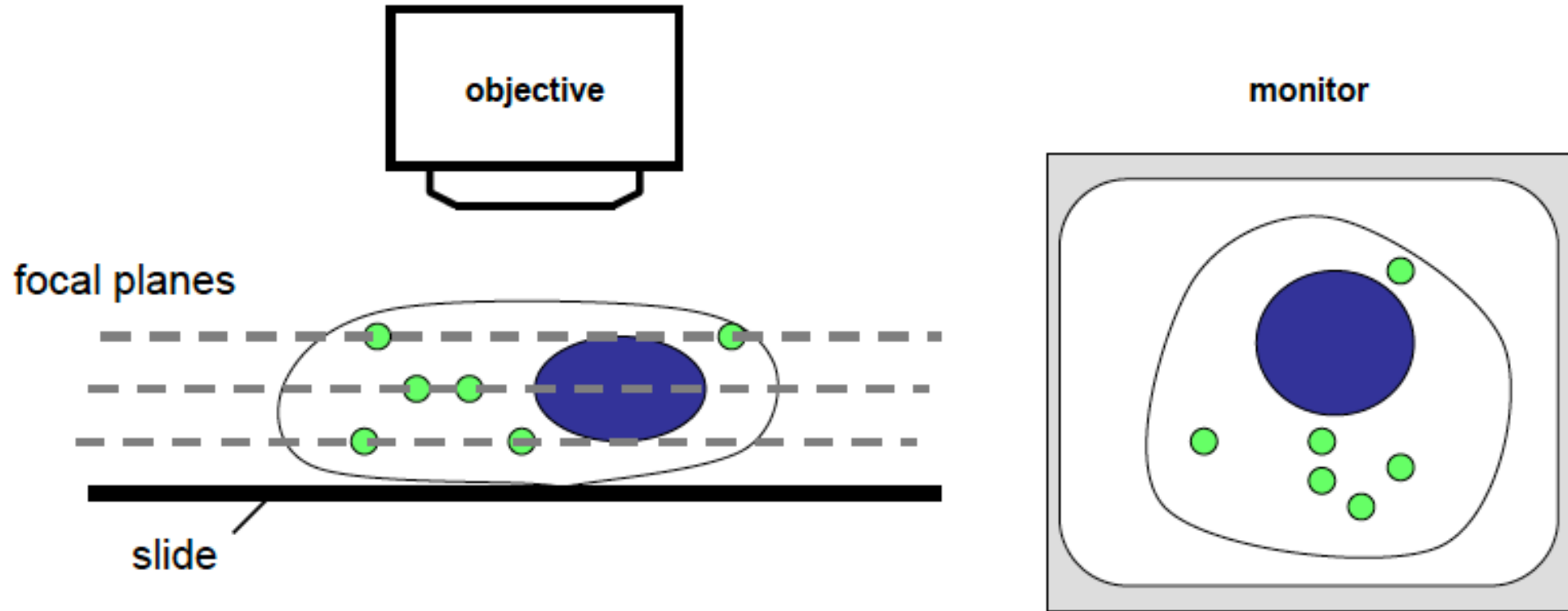


- Μια μικροσκοπική δέσμη φωτός εστιάζεται πάνω στο δείγμα σε ορισμένο βάθος και ο εκπεμπόμενος φθορισμός συλλέγεται από έναν ανιχνευτή.
- Πριν φτάσει στον ανιχνευτή, το φως που εκπέμπεται από το δείγμα διέρχεται από μια συνεστιακή ίριδα που βρίσκεται τοποθετημένη ακριβώς στο σημείο όπου εστιάζεται το φως που εκπέμπεται από το επιλεγμένο βάθος δείγματος.
- Συνεπώς μόνο ο φθορισμός που εκπέμπεται από το ακριβές σημείο εστίασης συμπεριλαμβάνεται στην εικόνα.
- Η σάρωση της δέσμης laser διαμέσου του δείγματος αποδίδει μια ακριβή εικόνα του εστιακού πλάνου – μια **οπτική τομή**
- Μια ακολουθία οπτικών τομών σε διαφορετικά βάθη επιτρέπει την κατασκευή τρισδιάστατων εικόνων

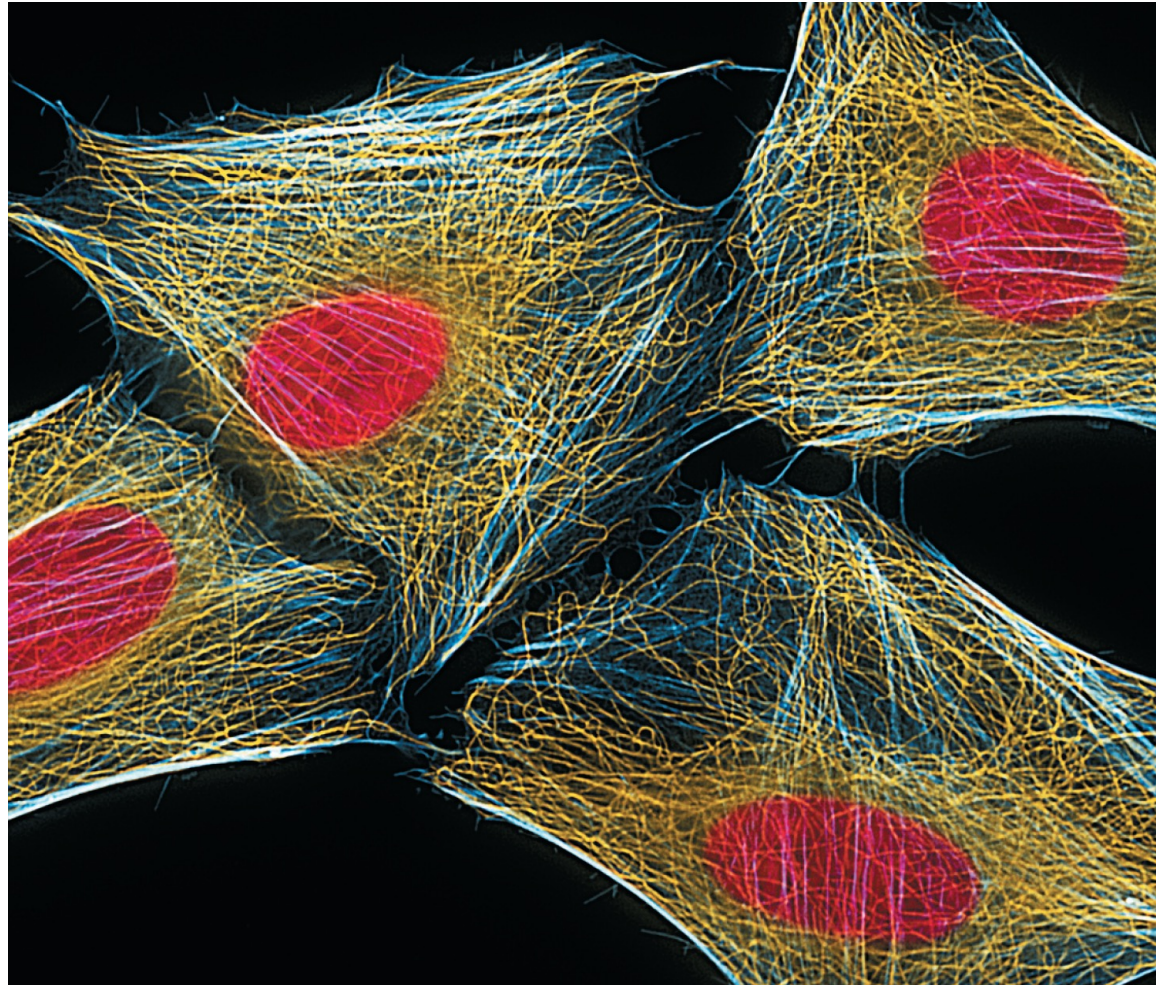
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ



ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

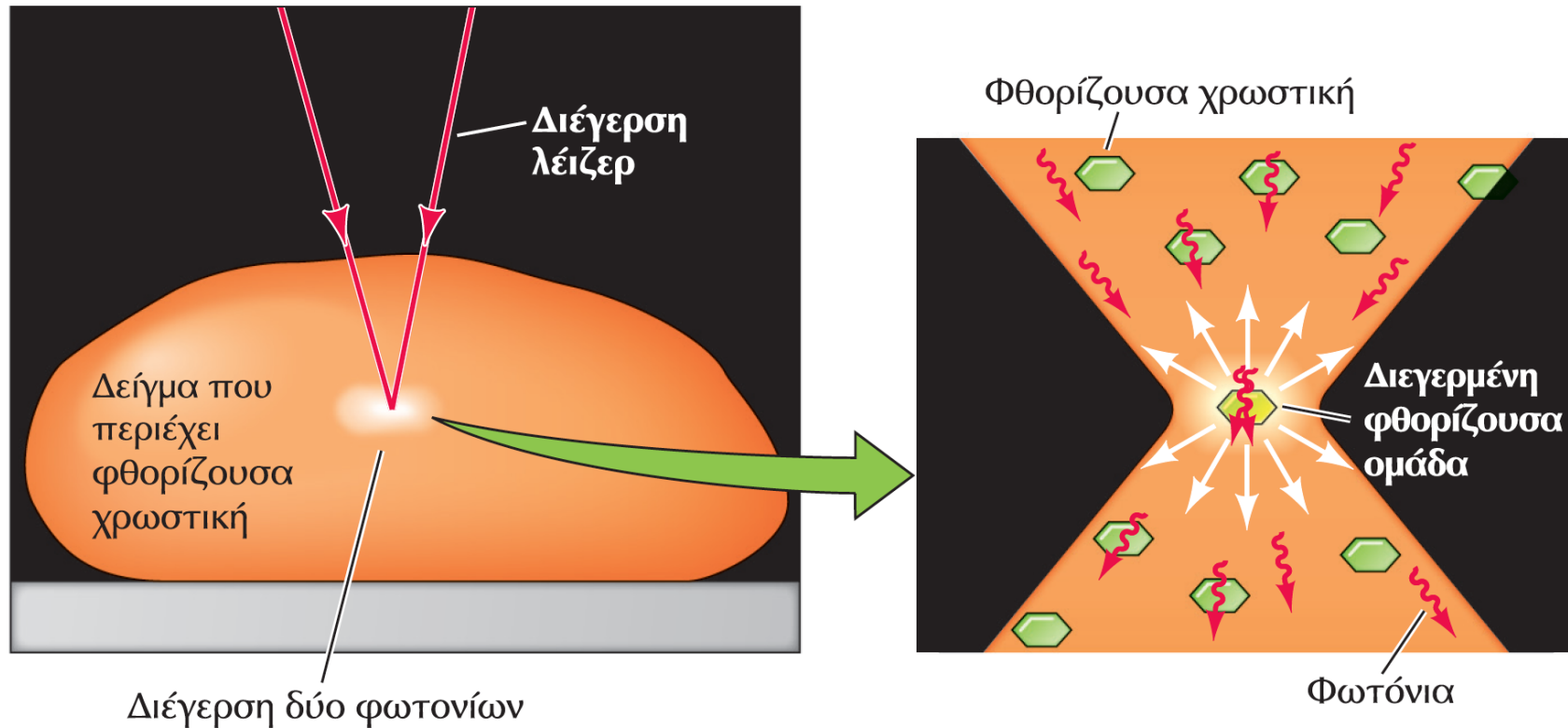


- Διαδοχική σάρωση του παρασκευάσματος σε πολλαπλά επίπεδα (οπτικές τομές) με προκαθορισμένη απόσταση (step) μεταξύ τους κατά τον άξονα z
- Deconvolution software: Προβολή των οπτικών τομών σε ένα επίπεδο ή τρισδιάστατη αναπαράσταση



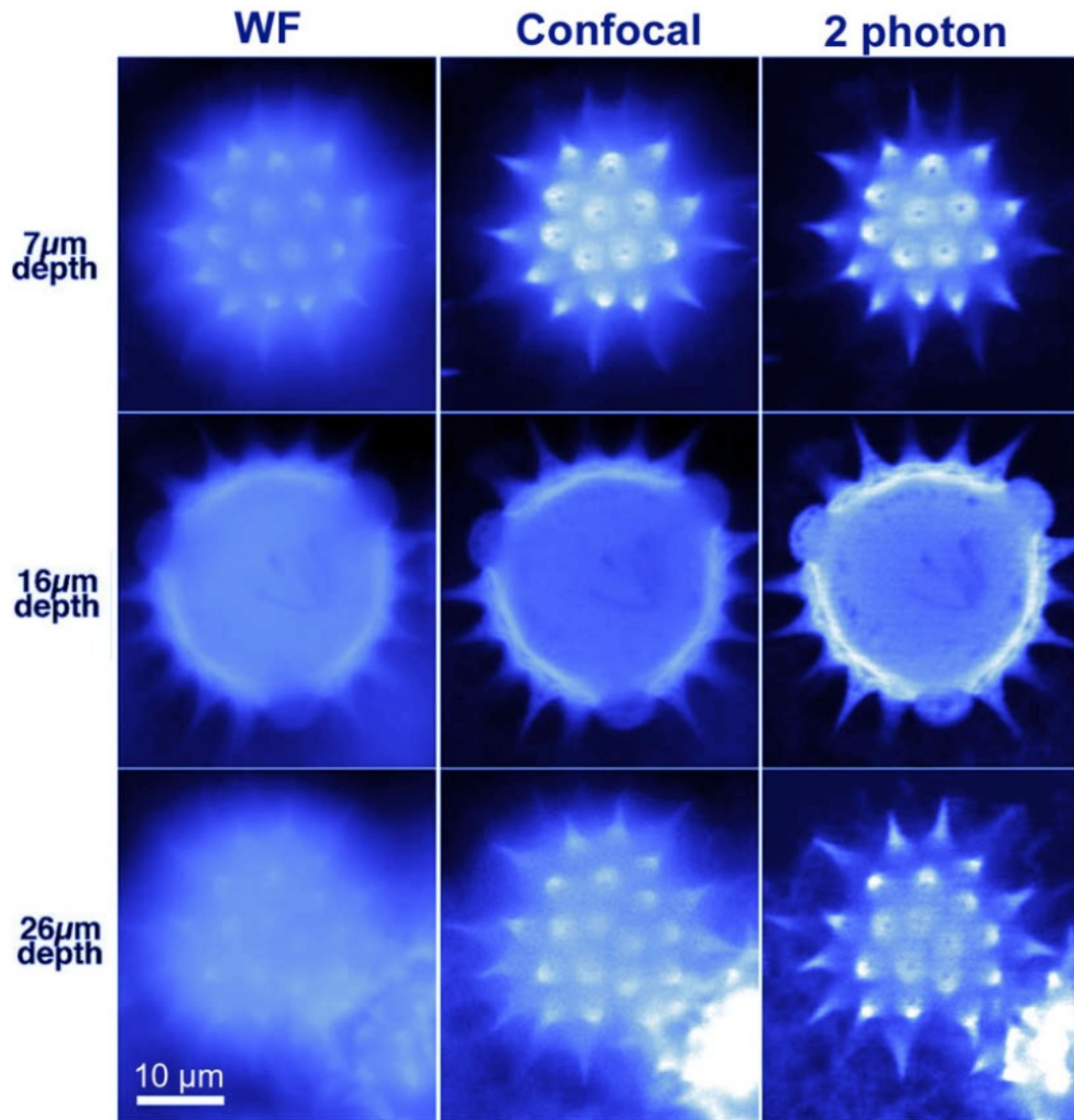
ΕΙΚΟΝΑ 1.32 Φωτογραφία συνεστιακού μικροσκοπίου που δείχνει ανθρώπινα κύτταρα. Οι μικροσωληνίσκοι και τα ινίδια ακτίνης έχουν υποστεί χρώση με κίτρινη και μπλε φθορίζουσα χρωστική αντίστοιχα. Οι πυρήνες έχουν χρωματιστεί με κόκκινη φθορίζουσα χρωστική.

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΔΥΟ ΦΩΤΟΝΙΩΝ



Για τη διέγερση της φθορίζουσας χρωστικής απαιτείται ταυτόχρονη απορρόφηση δύο φωτονίων. Αυτό επιτυγχάνεται μόνο στο σημείο του δείγματος στο οποίο εστιάζεται το εισερχόμενο φως, με αποτέλεσμα να εκπέμπεται φθορισμός μόνο από το επιλεγμένο βάθος.

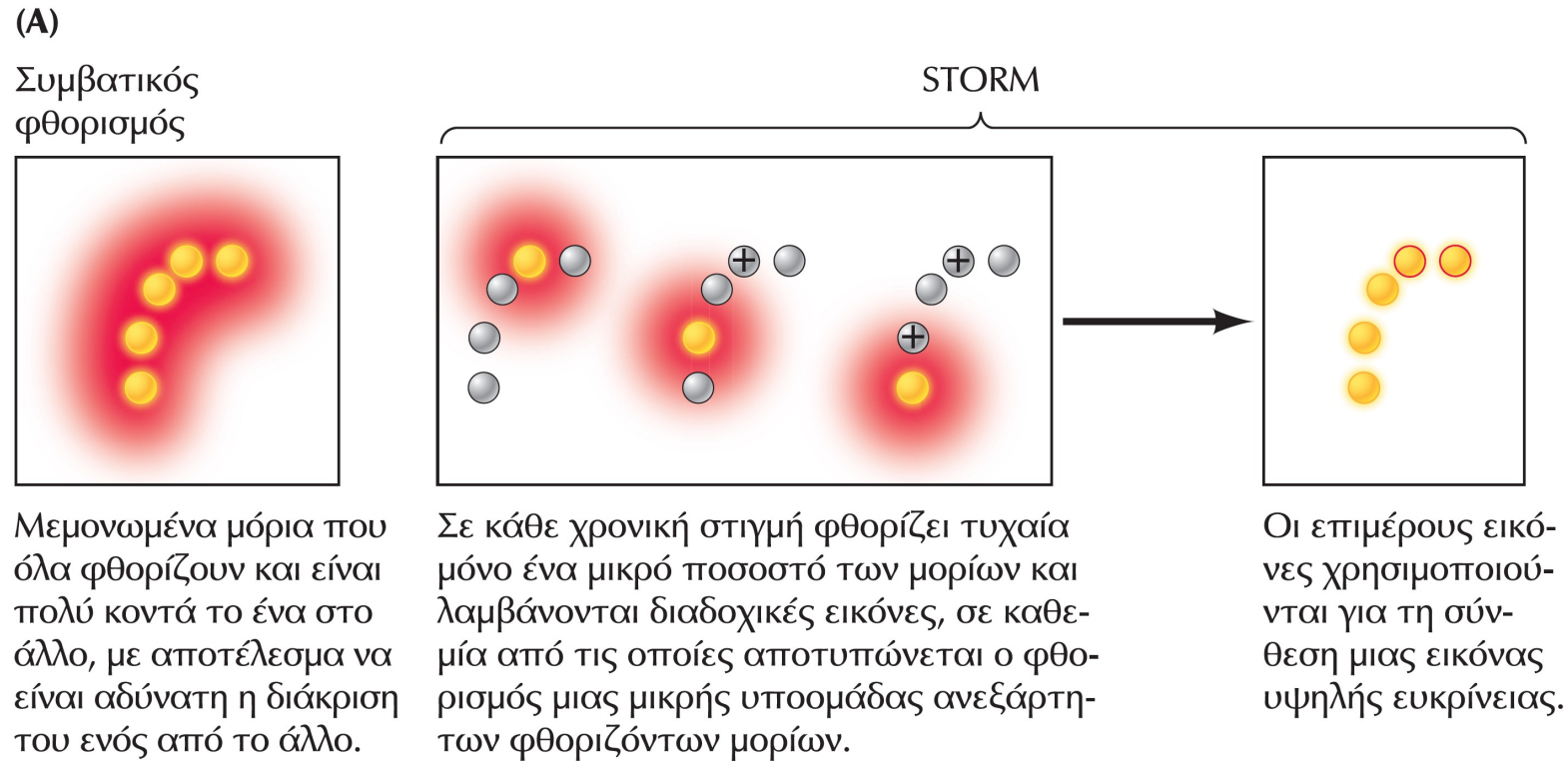
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΔΥΟ ΦΩΤΟΝΙΩΝ



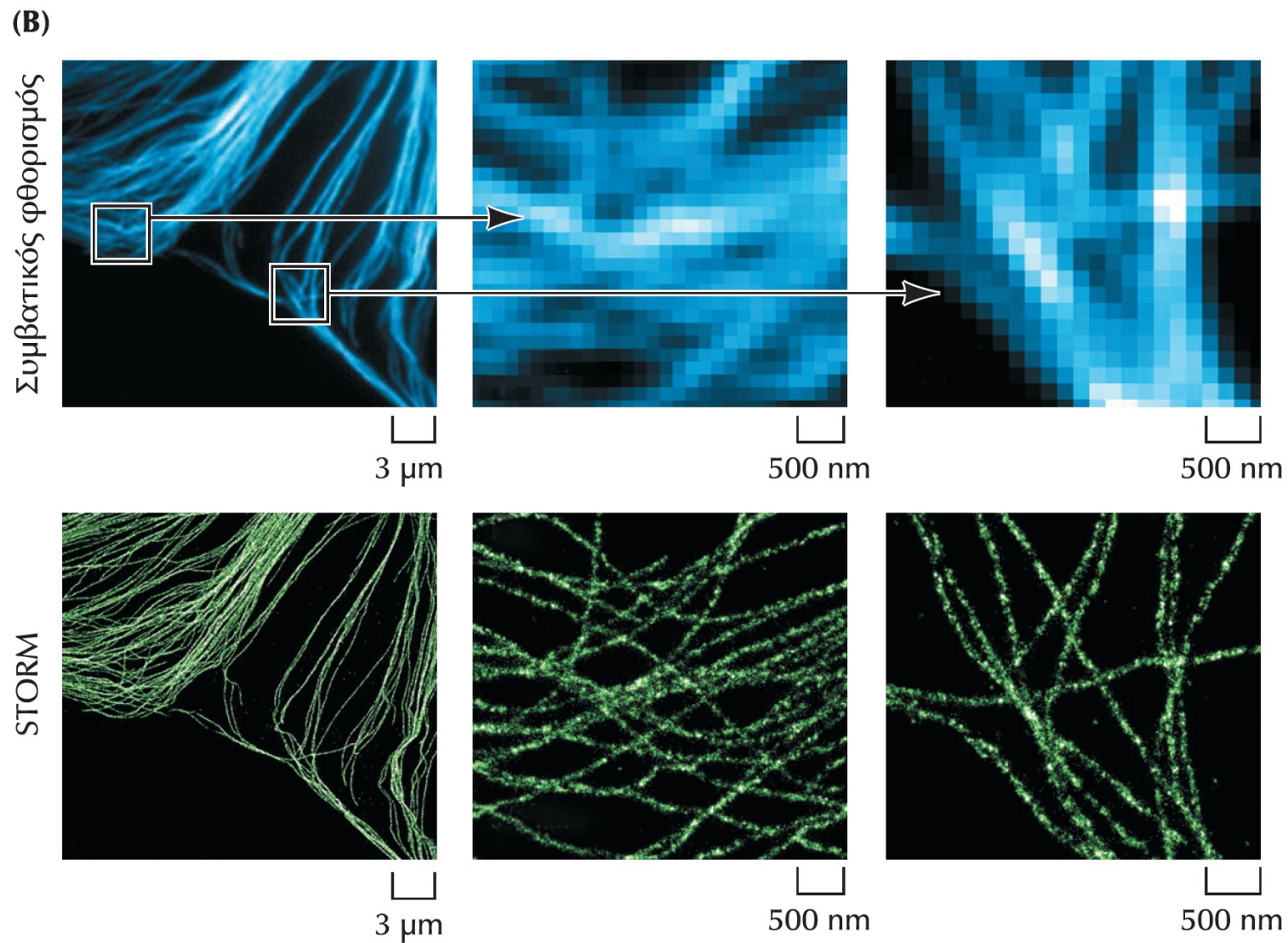
- Σε λεπτά δείγματα (10- 20 μm), η ευκρίνεια και των δύο μεθόδων είναι παρόμοια.
- Όμως το photobleaching φθοριζόντων μορίων πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης είναι πολύ μικρότερο στη 2-photon
- Η υπέρυθη ακτινοβολία διαπερνά μεγαλύτερο πάχος παρασκευάσματος από αυτήν μεγαλύτερης συχνότητας
- Είναι λιγότερο φωτοτοξική λόγω μικρότερης ενέργειας

Η 2-photon χρησιμοποιείται για απεικόνιση παχέων ιστών (deep tissue imaging) βάθους έως 1 mm σε ζωντανούς οργανισμούς (in vivo imaging)

ΦΩΤΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (STORM)

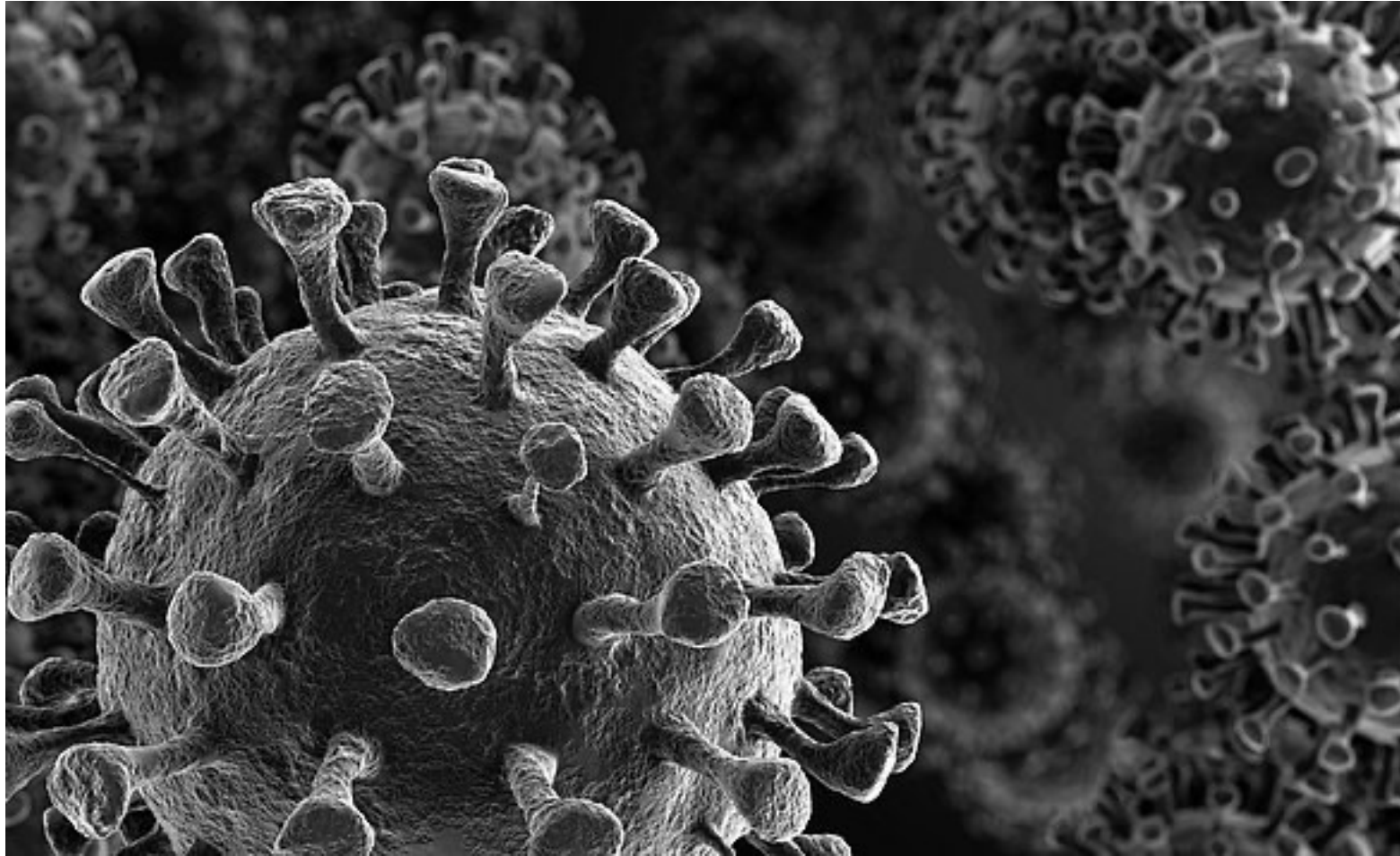


Στη συμβατική μικροσκοπία φθορισμού όλοι οι φθορίζοντες ανιχνευτές σε ένα δείγμα εκπέμπουν φθορισμό την ίδια στιγμή, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια θαμπή εικόνα. Κατά τη STORM, σε κάθε χρονική στιγμή φθορίζει τυχαία μόνο ένα μικρό ποσοστό των ανιχνευτών. Λαμβάνεται μια σειρά διαδοχικών εικόνων στις οποίες διακρίνονται φθορίζοντα μόρια, ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Από τη σύνθεση αυτών εικόνων προκύπτει μια νέα εικόνα υψηλής ευκρίνειας.

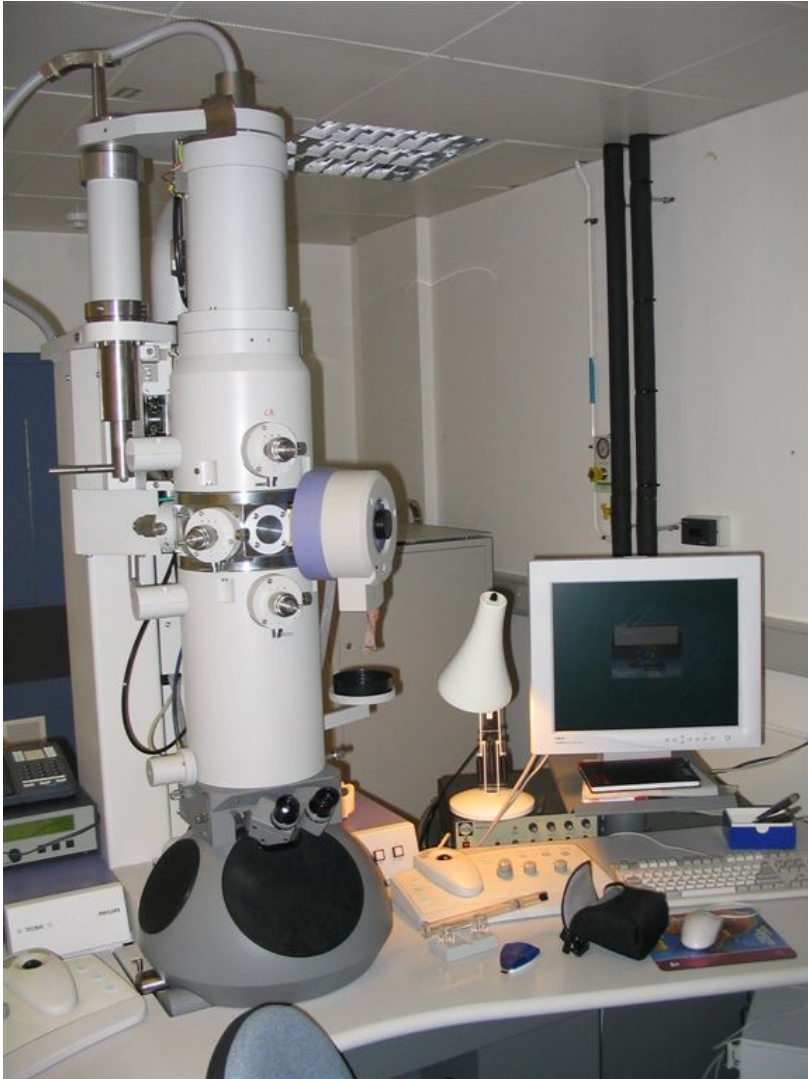


ΕΙΚΟΝΑ 1.39 Φωτονική μικροσκοπία υψηλής διακριτικής ικανότητας. (B) Σύγκριση της συμβατικής μικροσκοπίας και της STORM στην απεικόνιση μικροσωληνίσκων (Από τη δημοσίευση των M. Bates et al., 2007. *Science* 317: 1749. Ευγενική προσφορά του B. Huang, Harvard University.)

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ



Η ΛΕΠΤΗ ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΑΠΟΚΑΛΥΠΤΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

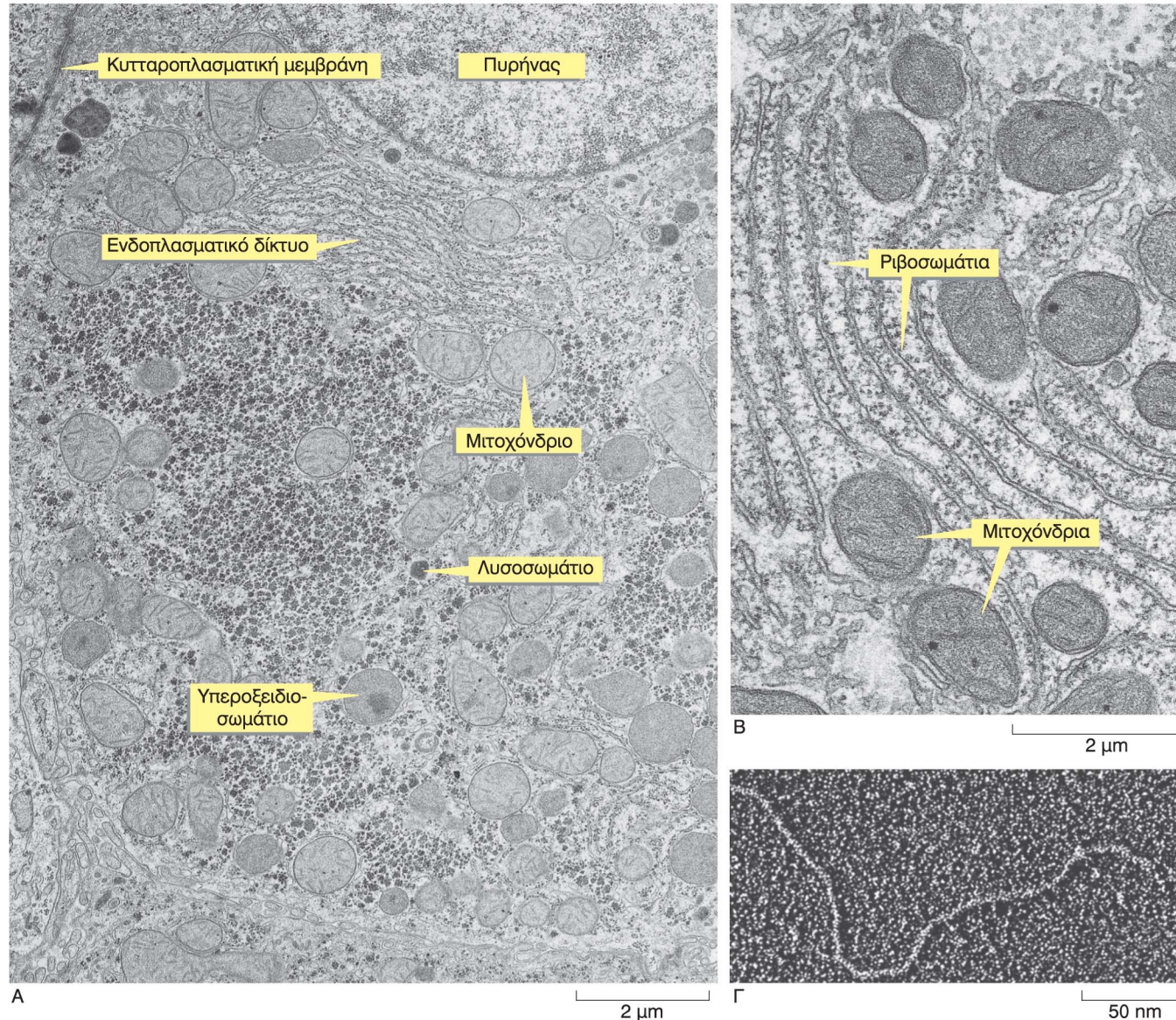


Για την παρατήρηση αντικειμένων σε μεγαλύτερη μεγέθυνση και με καλύτερη διακριτική ικανότητα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε το **ηλεκτρονικό μικροσκόπιο**, το οποίο μπορεί να αποκαλύψει λεπτομέρειες μεγέθους λίγων νανομέτρων.

Η παρατήρηση προϋποθέτει προσεκτική προετοιμασία του δείγματος.

Ο ιστός πρέπει πρώτα να μονιμοποιηθεί και μετά να εμβαπτιστεί μέσα σε μια πηχτή (ζελατίνης ή άγαρ), να τεμαχιστεί σε πολύ λεπτές τομές και να χρωματιστεί. Γι' αυτό το λόγο, τα ζωντανά κύτταρα δεν μπορεί να εξεταστούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

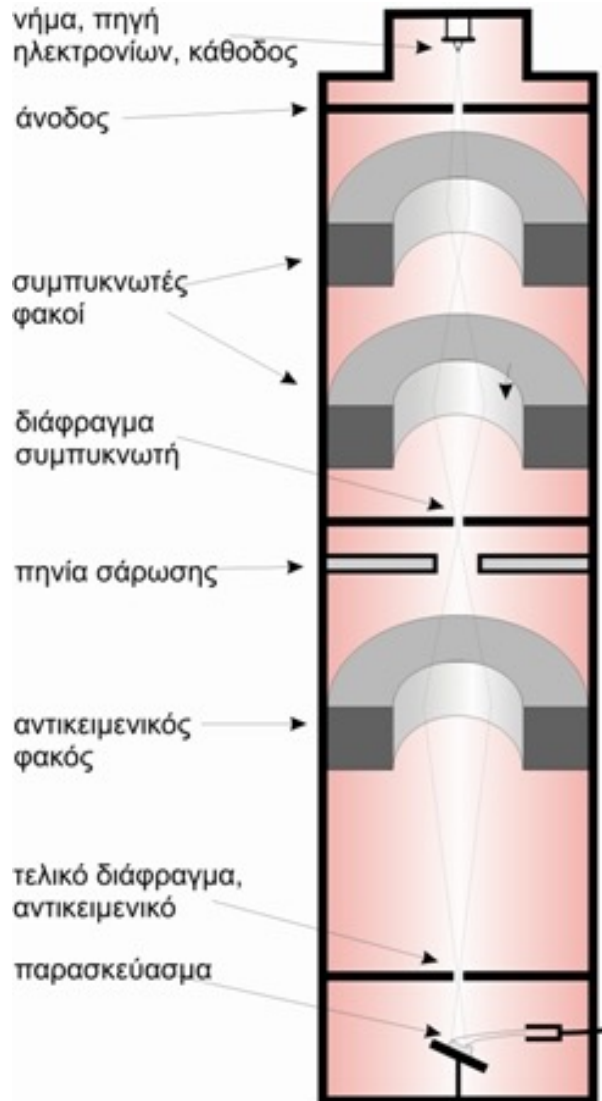
Η ΛΕΠΤΗ ΔΟΜΗ ΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΑΠΟΚΑΛΥΠΤΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ



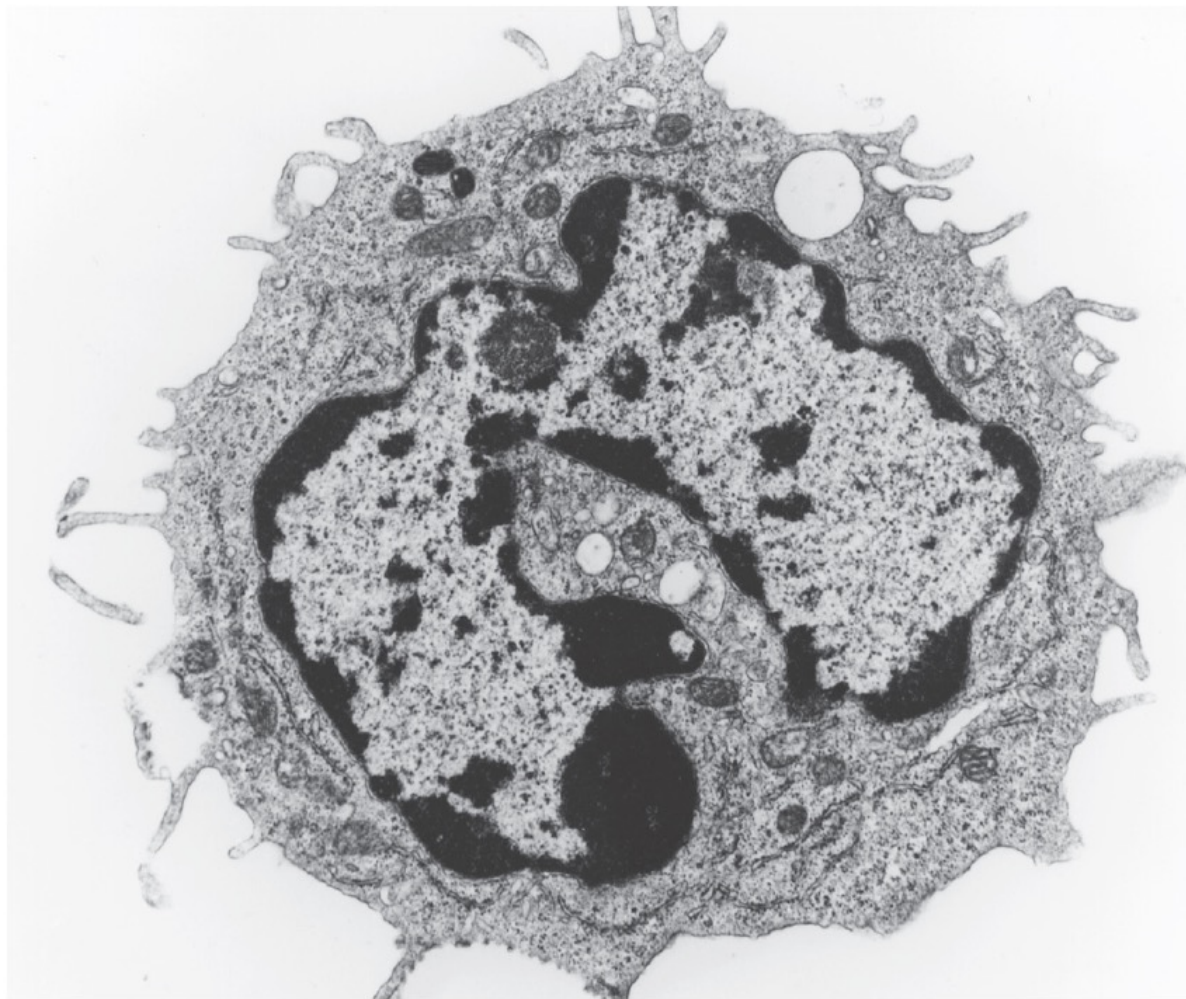
Ένα μεγάλο μέρος από το συνονθύλευμα των συστατικών του κυττάρου διακρίνεται σε χαρακτηριστικά **οργανίδια**: ξεχωριστές ενδοκυττάρια δομές.

- Το κύτταρο περιβάλλεται από μια λεπτή μεμβράνη, πάχους περίπου 5 nm, η οποία ονομάζεται **κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη**.
- Παρόμοιες μεμβράνες περιβάλλουν πολλά ενδοκυττάρια οργανίδια και ονομάζονται **εσωτερικές μεμβράνες**.
- Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορούν να διακριθούν ακόμη και ορισμένα από τα διάφορα μεγάλα μόρια ενός κυττάρου

ΤΥΠΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ: ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ



- Ανάλογες αρχές λειτουργίας με το ανεστραμμένο φωτονικό μικροσκόπιο
- Αντί για δέσμη φως χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων μικρού μήκους κύματος
- Αντί για γυάλινους φακούς χρησιμοποιούνται μαγνητικές σπείρες
- Εξαιτίας του μικρού μήκους κύματος των ηλεκτρονίων, το δείγμα πρέπει να είναι πολύ λεπτό και τοποθετείται σε θάλαμο κενού
- Η αντίθεση εξασφαλίζεται συνήθως από χρωστικές βαρέων αλάτων μετάλλων
- Προσφέρει τη δυνατότητα μεγέθυνσης έως και ένα εκατομμύριο φορές και έχει διακριτικό όριο 1 nm



5 μm

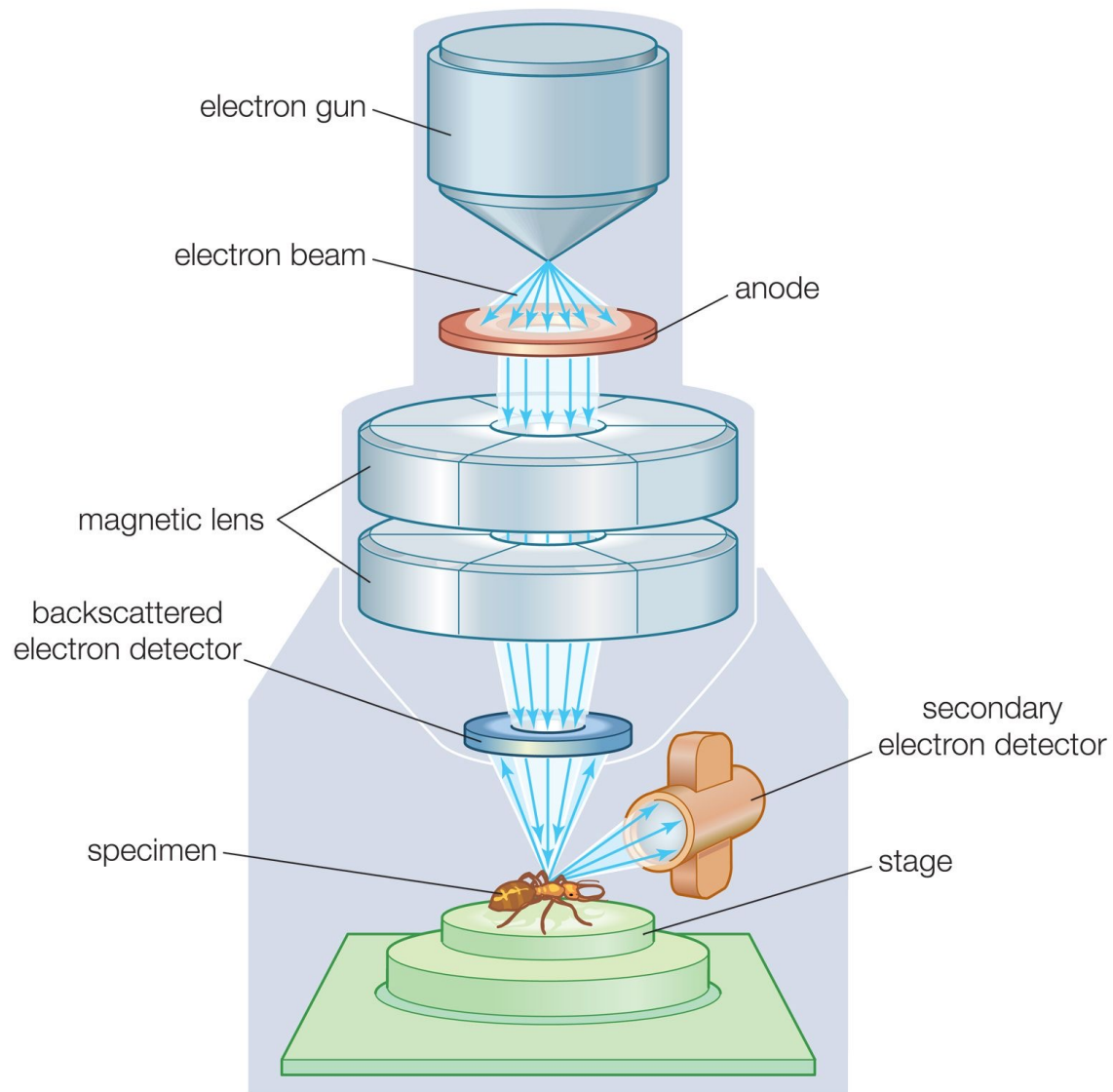
Essential Cell Biology, Fifth Edition
Copyright © 2019 W. W. Norton & Company

ΕΙΚΟΝΑ 1.34 Θετική χρώση. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης που δείχνει ένα λευκό αιμοσφαίριο θετικά «χρωματισμένο» με άλατα βαρέων μετάλλων.

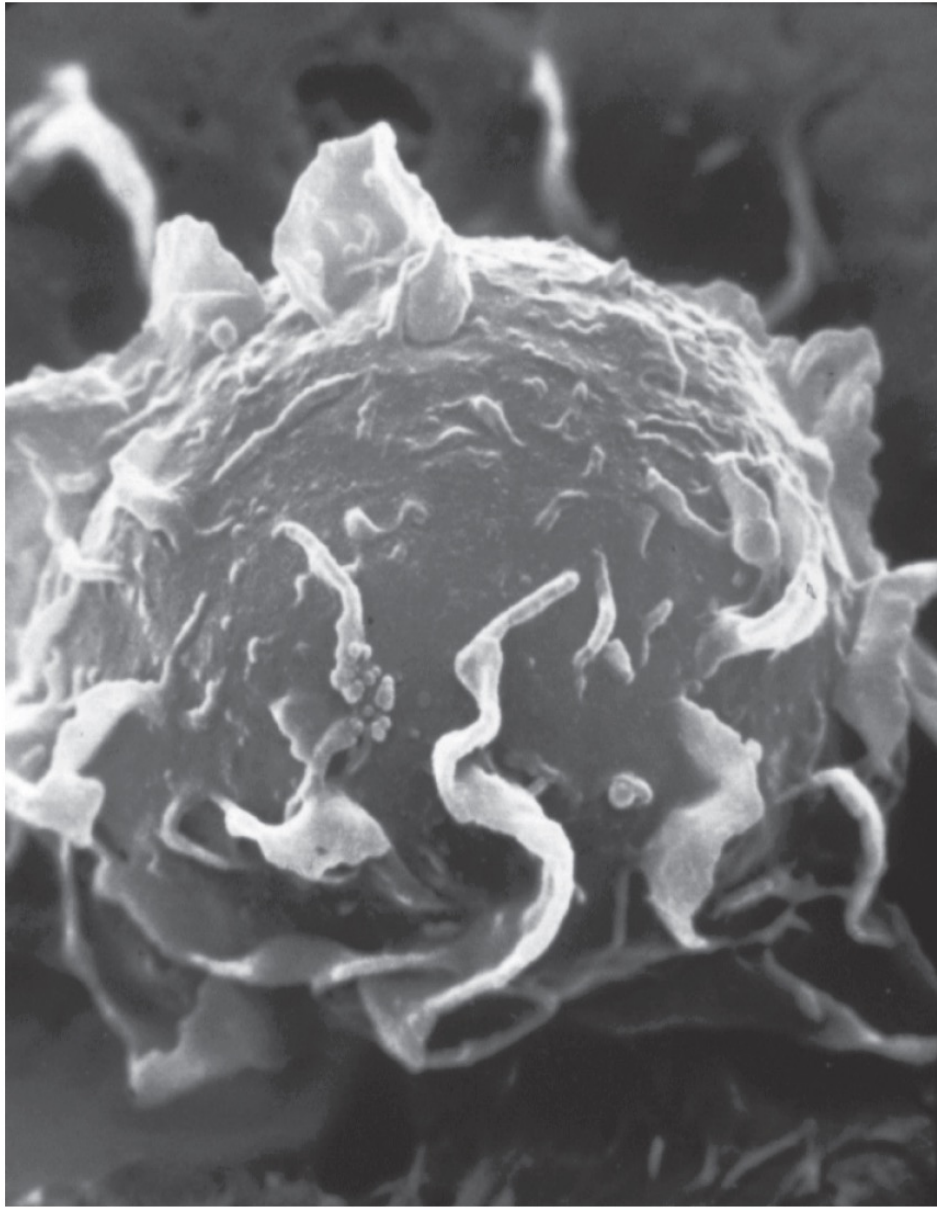


ΕΙΚΟΝΑ 1.35 Αρνητική χρώση. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης που δείχνει αρνητικά «χρωματισμένα» ινίδια ακτίνης. (Ευγενική προσφορά του Roger Craig, University of Massachusetts Medical Center.)

ΤΥΠΟΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ: ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ



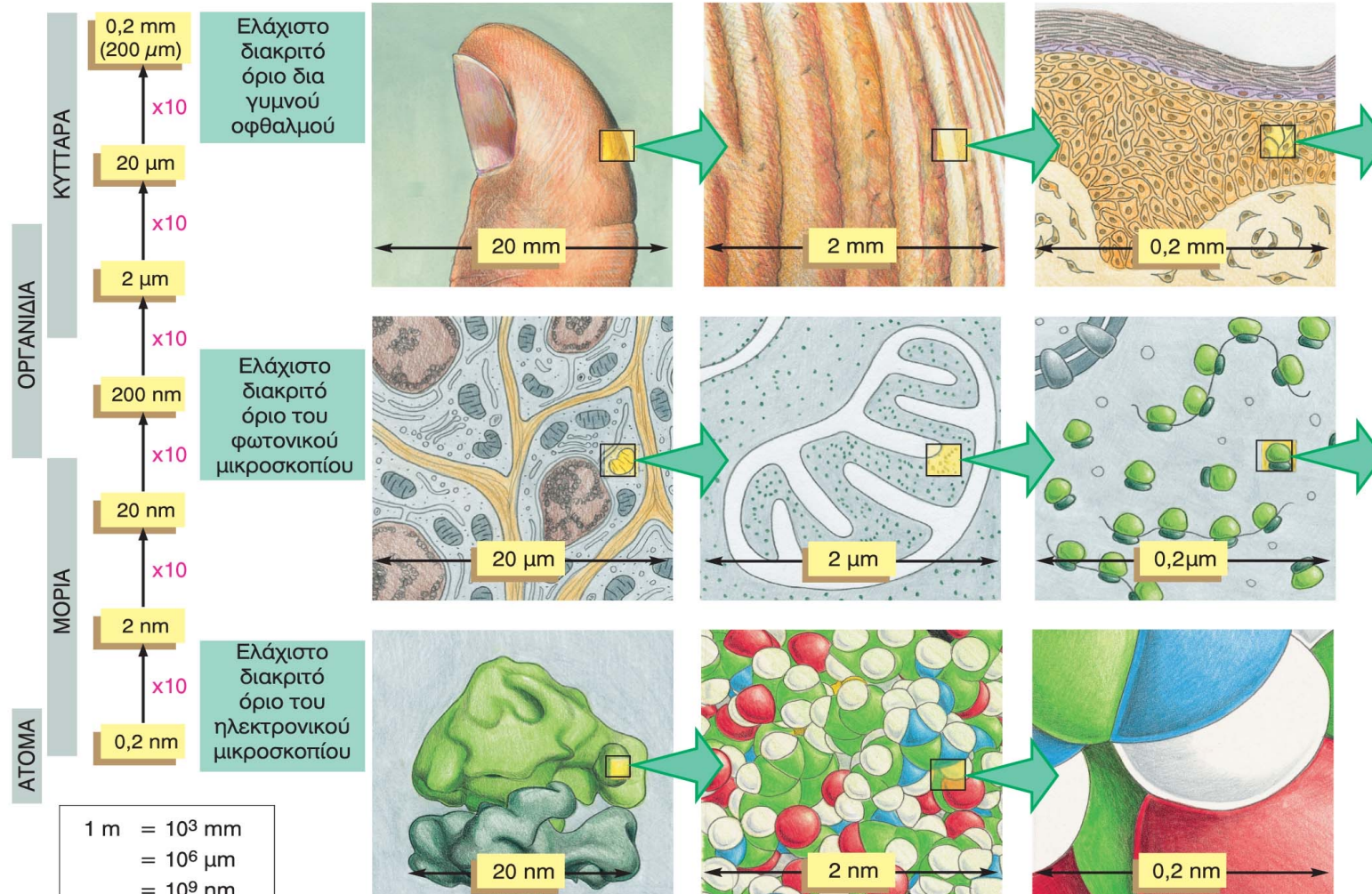
- Το δείγμα σαρώνεται από μια δέσμη ηλεκτρονίων που εστιάζονται πάνω του από ηλεκτρομαγνητικές σπείρες που δρουν σαν φακοί
- Η ποσότητα ηλεκτρονίων που διαχέεται ή εκπέμπεται καθώς η δέσμη βομβαρδίζει κάθε σημείο στην επιφάνεια του δείγματος μετράται από τον ανιχνευτή
- Το μικροσκόπιο δημιουργεί εντυπωσιακές εικόνες τρισδιάστατων αντικειμένων με μεγάλο βάθος εστίασης και διακριτικής ικανότητας μεταξύ 3 και 20 nm



**ΕΙΚΟΝΑ 1.38 Ηλεκτρονική
μικροσκοπία σάρωσης.** Φω-
τογραφία ηλεκτρονικού μι-
κροσκοπίου σάρωσης που
δείχνει ένα μακροφάγο.

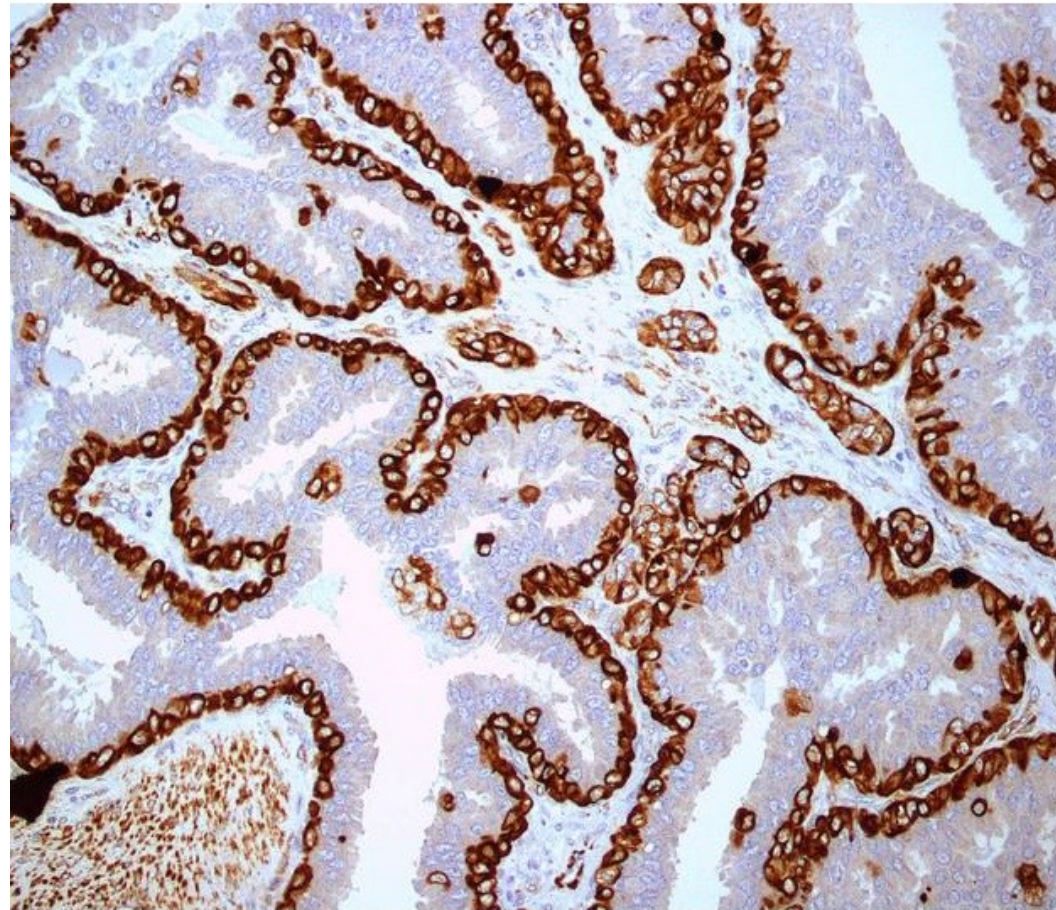
5 μm

ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΕΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ



Εικόνα 1-8. Ποιό είναι το μέγεθος ενός κυττάρου και των συστατικών του. **(Α)** Το μέγεθος των κυττάρων και των συστατικών τους και οι αντίστοιχες μονάδες μέτρησης. **(Β)** Μια συγκριτική κλίμακα μεγεθών μεταξύ ζωντανών κυττάρων (στη μια άκρη) και ατόμων (στην άλλη άκρη). Κάθε διάγραμμα αποδίδει μια εικόνα μεγεθυμένη κατά δέκα φορές, αρχίζοντας από τον αντίχειρα και συνεχίζοντας προοδευτικά στα κύτταρα της επιδερμίδας, στο μιτοχόνδριο, σε ένα ριβοσώματιο και τελικά σε μια ομάδα ατόμων που συνιστούν μέρος ενός από τα μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια του σώματός μας. Παρατηρείστε τα ριβοσώματα που βρίσκονται μέσα στα μιτοχόνδρια όπως και στο κυτταρόπλασμα. Λεπτομέρειες των μοριακών δομών, όπως αποδίδονται στα δύο τελευταία σχήματα, είναι πέραν της διακριτικής ικανότητας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ



ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ



Albert Coons, MD, PhD
Immunologist, Harvard
Medical School

Ανακάλυψη

Ανοσοϊστοχημείας 1941

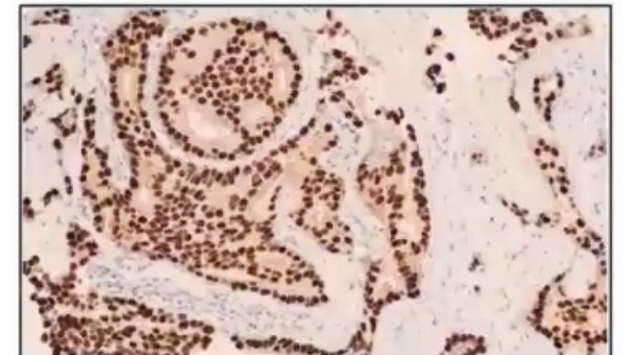
Τι είναι η ανοσοϊστοχημεία?



- Μέθοδος ανίχνευσης **αντιγόνων** στον ιστό
- Συνέργεια τριών επιστημονικών πεδίων (ανοσολογία, ιστολογία και χημεία)
- Χρήση χημικών αντιδράσεων για τον εντοπισμό και την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αντισωμάτων και των αντιγόνων-στόχων τους στον ιστό

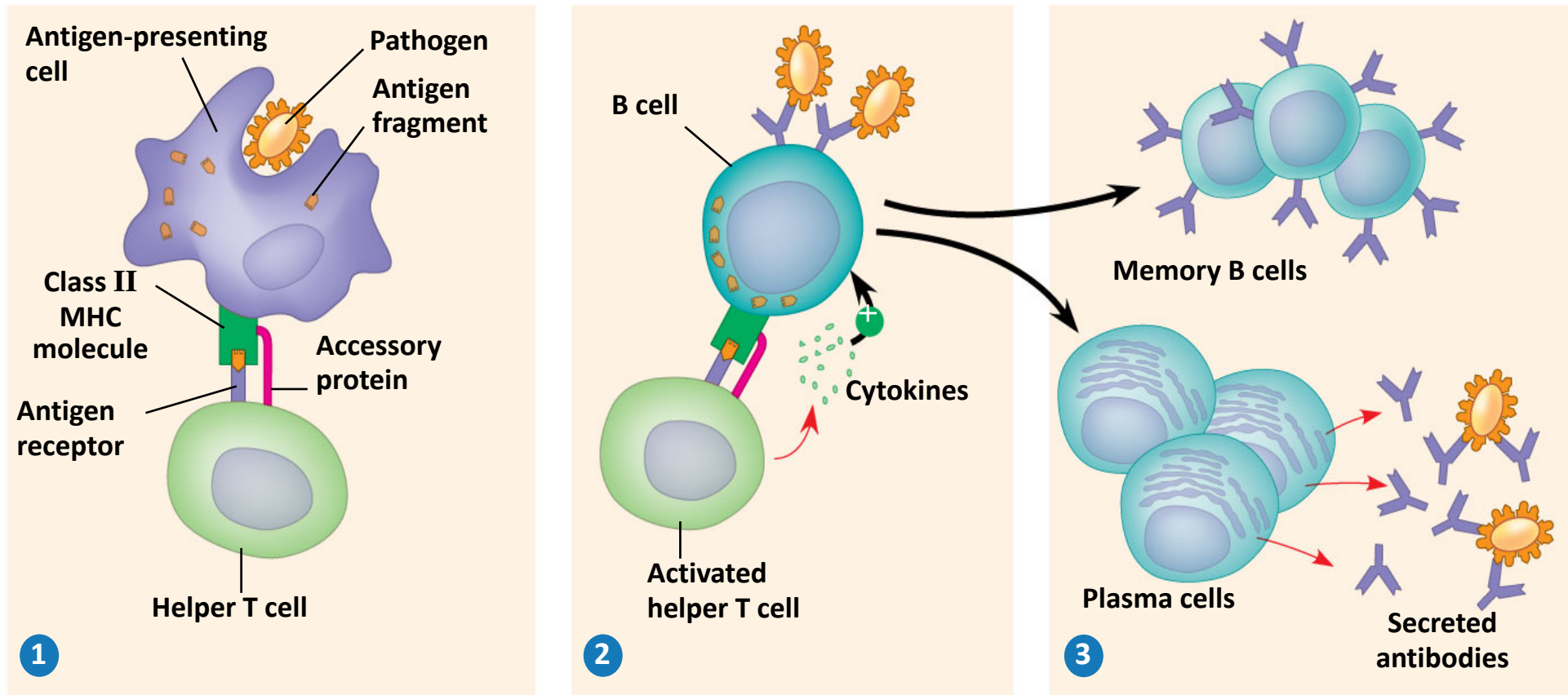
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

- Διάγνωση
 - Χρησιμοποιείται για την διάγνωση ασθενειών, όπως ο καρκίνος, νευροεκφυλιστικές νόσοι, μυασθένειες κ.α.
 - Επίσης χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των διαφορετικών τύπων και σταδίων του καρκίνου και την διαφορετική κυτταρική προέλευση
- Προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο
 - Δυνατότητα πρόγνωσης για την εξέλιξη της νόσου
 - Παραδείγματα: MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6)
- Προγνωστικός δείκτης για την απόκριση στην θεραπεία
 - Τα επίπεδα έκφρασης συσχετίζονται με την απόκριση σε συγκεκριμένες θεραπείες
 - Παραδείγματα: ER, PR, HER2, PDL-1, CD30
- Εφαρμογές στην έρευνα
 - Κυτταρικός πολλαπλασιασμός/Απόπτωση
 - Κυτταρική Σηματοδότηση
 - Εντοπισμός κυτταρικών τύπων/κυτταροσκελετικής δομής



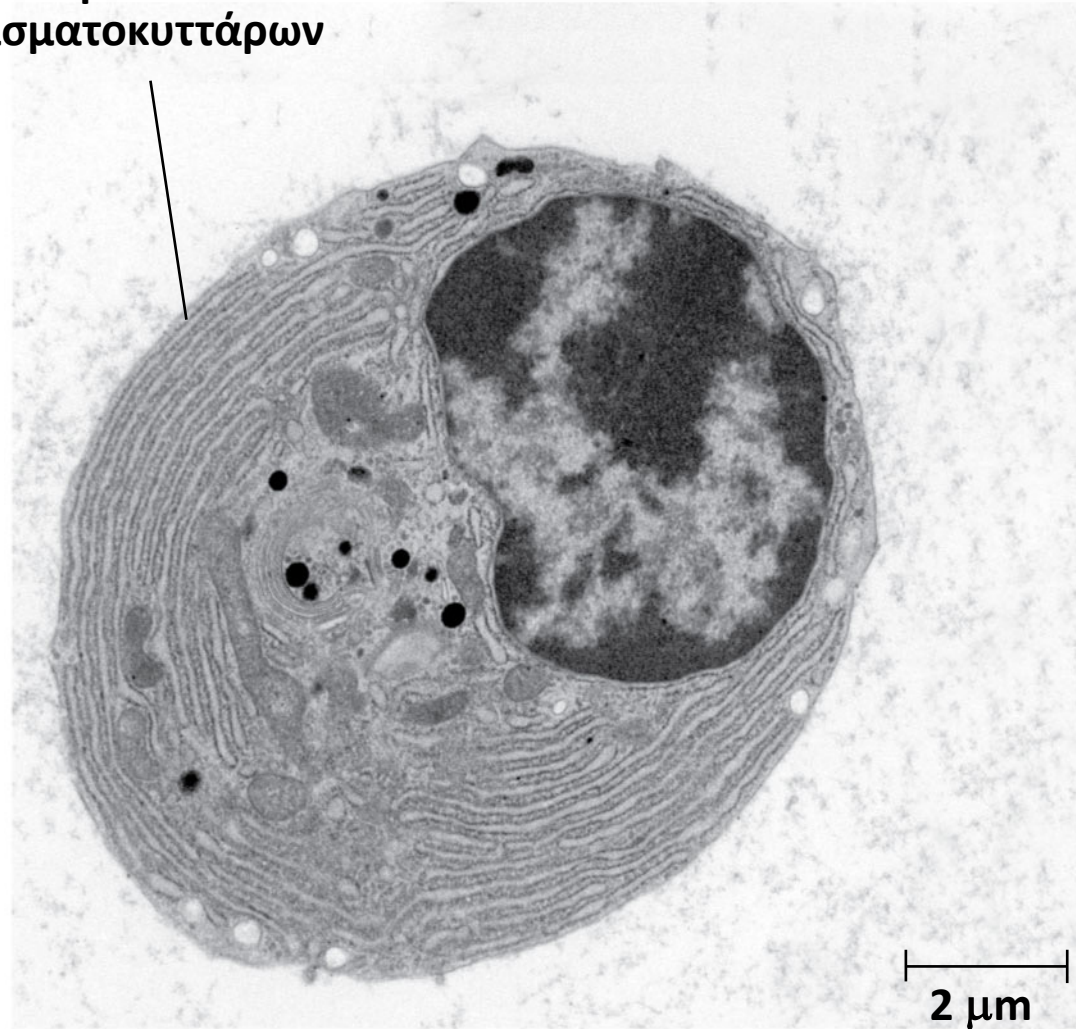
ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΙΝΑΙ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ Β ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Έπειτα από την απόκριση στις κυτταροκίνες που παράγουν τα Τ βοηθητικά κύτταρα και στο αντιγόνο, το Β κύτταρο πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε Β κύτταρα μνήμης και Β **πλασματοκύτταρα**, ικανά να παράγουν αντισώματα

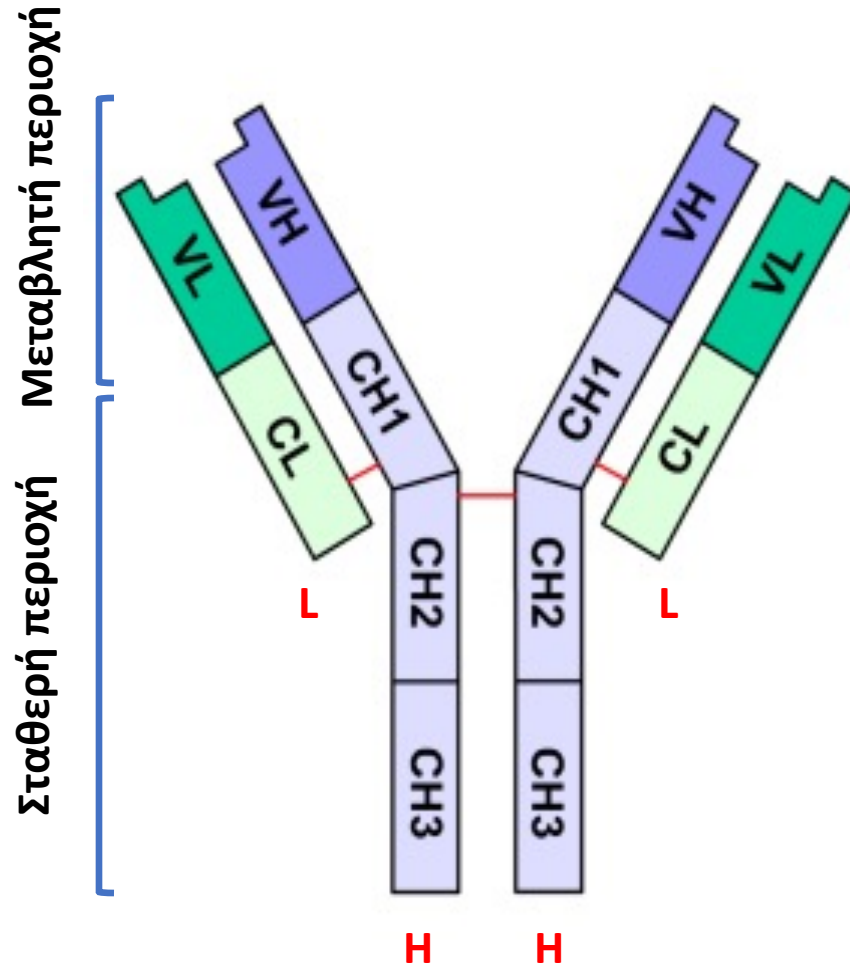


ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ?

Ενδοπλασματικό δίκτυο
πλασματοκυττάρων

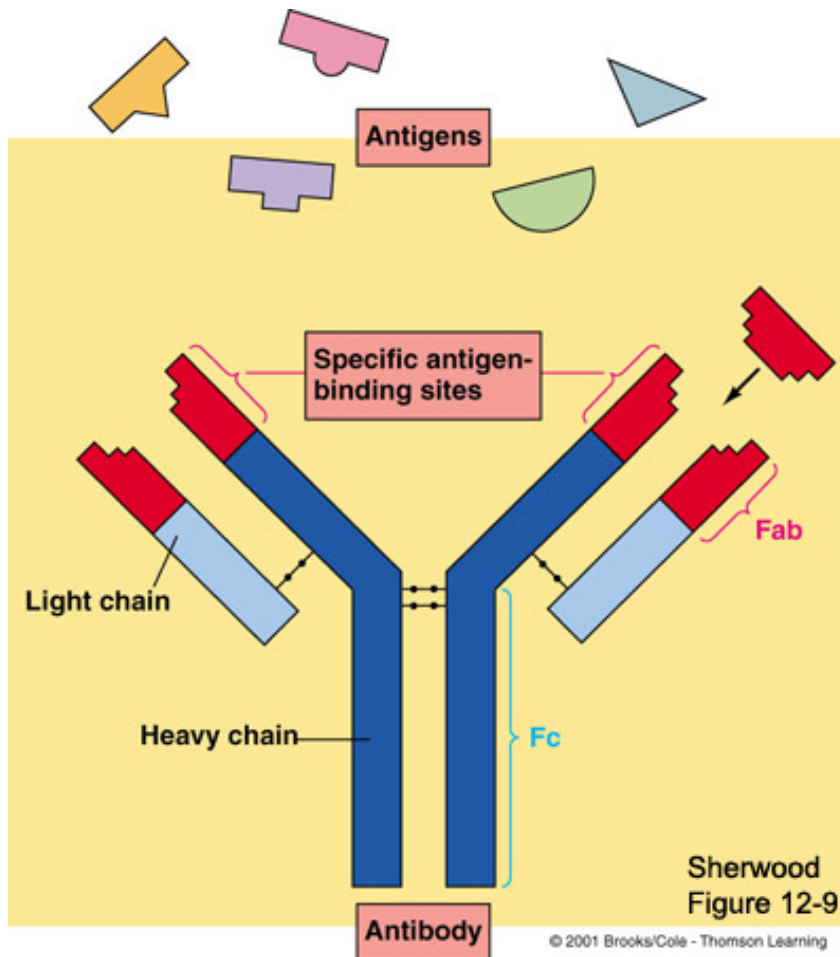


ΠΩΣ ΜΟΙΑΖΕΙ ΕΝΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑ



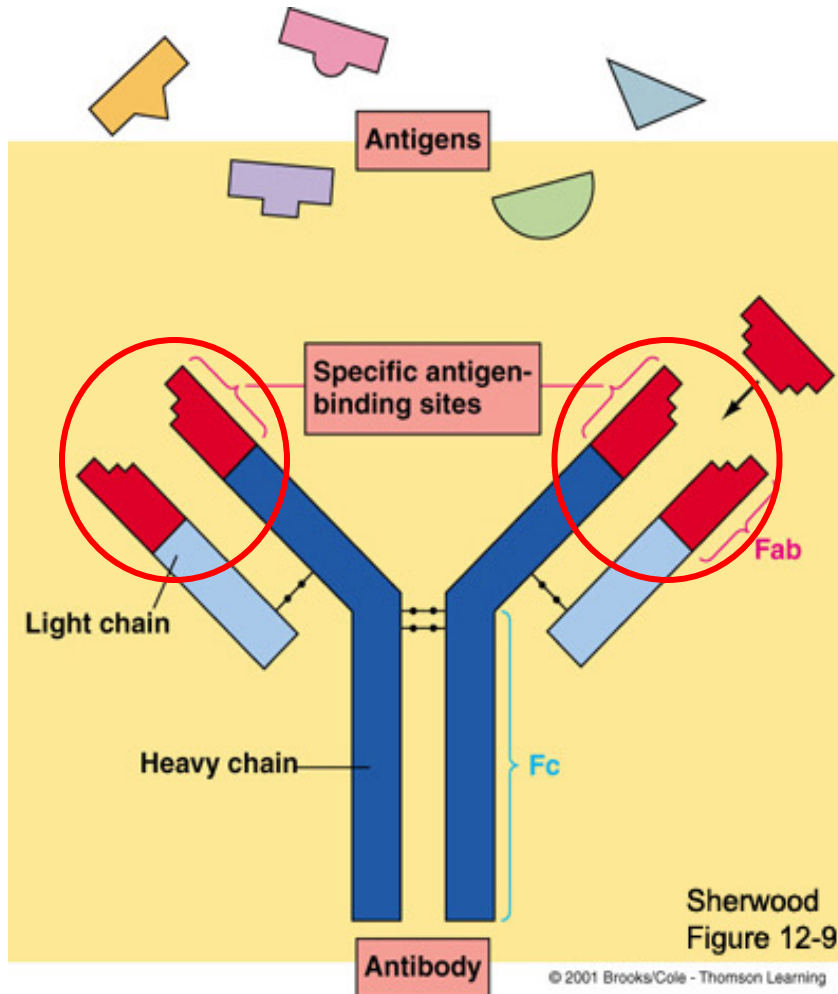
- 2 πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες
- 2 πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες
- Κάθε βαριά αλυσίδα έχει μια σταθερή και μια μεταβλητή περιοχή
- Κάθε ελαφριά αλυσίδα έχει μια σταθερή και μια μεταβλητή περιοχή

Αντίσωμα: δομή και λειτουργία



- Fab – fragment antigen binding. Περιοχή πρόσδεσης αντιγόνου
- Fc- Fragment constant. Σταθερή περιοχή

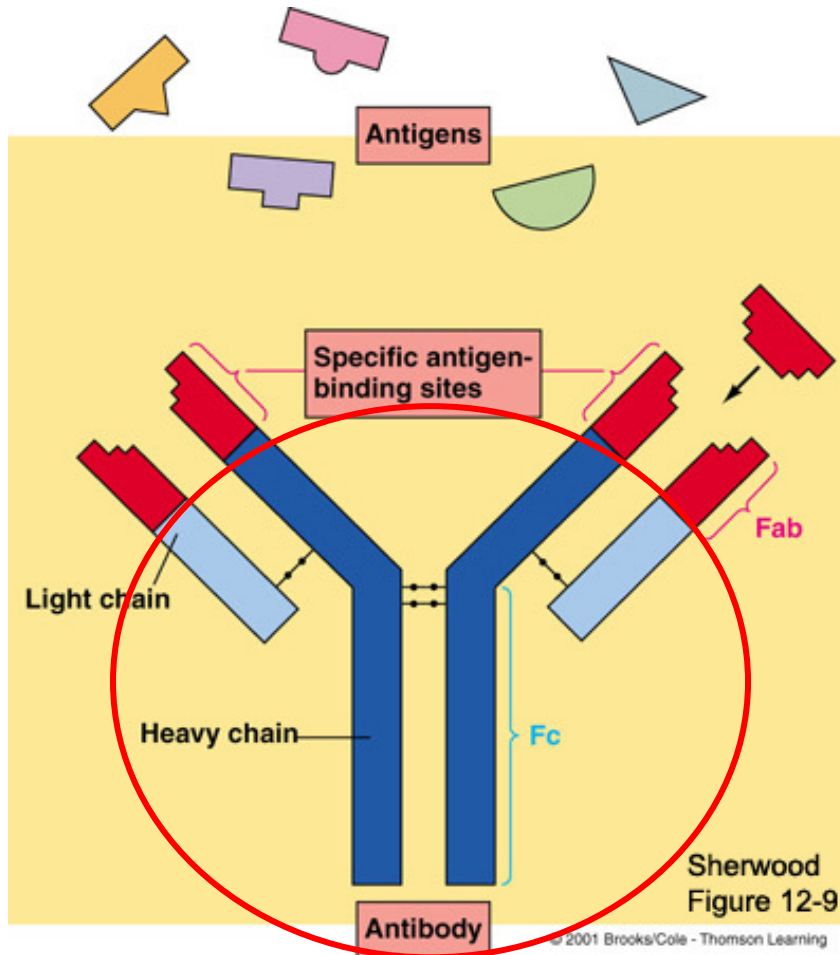
Αντίσωμα: Περιοχή πρόσδεσης Αντιγόνου



Fab

- Αποτελεί την μεταβλητή περιοχή του αντισώματος
- Είναι η άκρη του αντισώματος
- Προσδένει το αντιγόνο
- Η αντιγονοειδικότητα προσδιορίζεται από τις μεταβλητές περιοχές της βαριάς και της στερεάς αλυσίδας
 V_H και V_L

Αντίσωμα: Fc - Σταθερή περιοχή

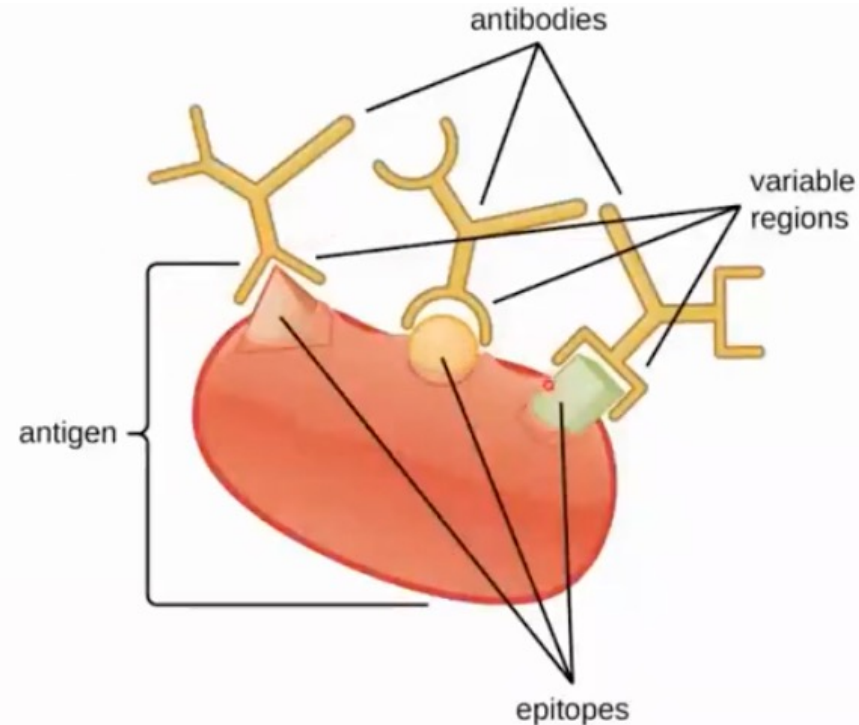
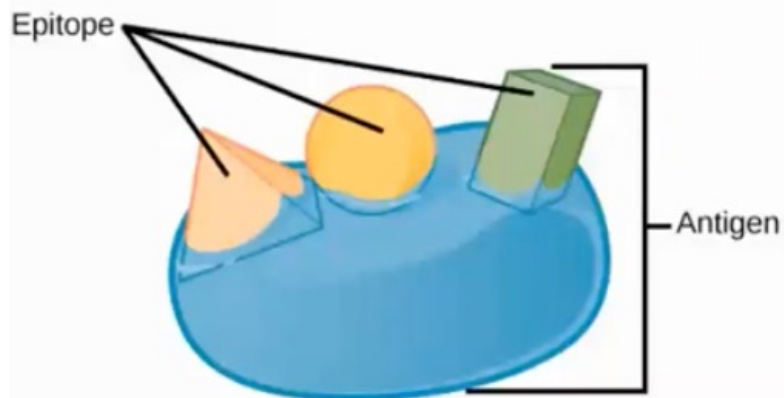


Fc Περιοχή

- Αποτελεί την σταθερή ή μη μεταβλητή περιοχή
- Είναι η βάση του αντισώματος
- Μπορεί να προσδέσει κυτταρικούς υποδοχείς και πρωτεΐνες του συμπληρώματος

Αντιγόνο - Επίτοπος

- **Αντιγόνο**, διεθνές σύμβολο: **Ag** : «γεννήτορας αντισωμάτων»
- Το αντιγόνο είναι μόριο ή μοριακή δομή (π.χ. τμήμα μακρομορίου), που μπορεί να δεσμευτεί από ένα «ειδικό προς το αντιγόνο» αντίσωμα ή υποδοχέα αντιγόνου Β λεμφοκυττάρου και να ενεργοποιήσει Β και Τ κυτταρικές ανοσολογικές απαντήσεις
- **Επίτοπος**: Το τμήμα ενός αντιγόνου (7-20 αμινοξέα) που αναγνωρίζεται και δεσμεύεται από ένα αντίσωμα ή από ένα Τ κύτταρο με σκοπό την πρόκληση απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος



Πολυκλωνικά και Μονοκλωνικά Αντισώματα

Monoclonal Antibodies



Figure 5: A given clone of monoclonal antibodies reacts with a specific epitope on an antigen.

- Ομοιογενής πληθυσμός ανοσοσφαιρινών που αναγνωρίζουν και προσδένονται σε **έναν μόνο** επίτοπο του αντιγόνου
- Συνήθως έχουν υψηλό τίτλο και ειδικότητα
- Έχουν χαμηλή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
- Χαμηλή μη ειδική πρόσδεση

Polyclonal Antibodies

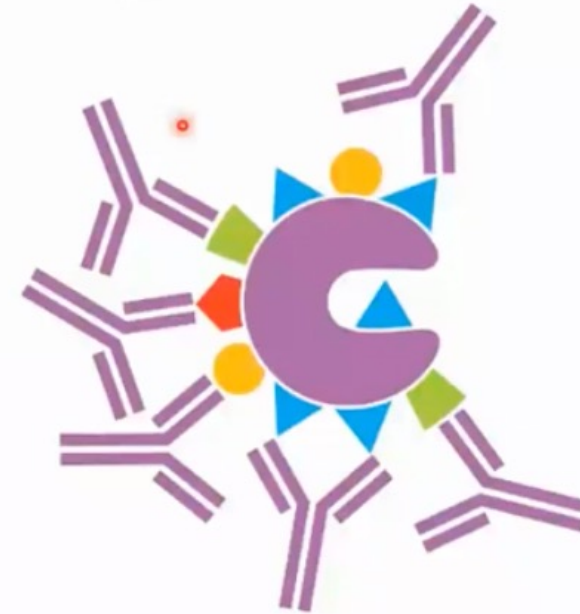
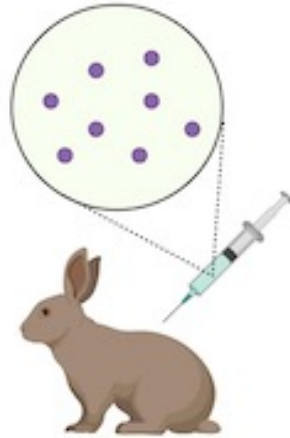


Figure 4: Schematic diagram of polyclonal antibodies binding to various epitopes on an antigen.

- Ετερογενής πληθυσμός ανοσοσφαιρινών εναντίον **πολλαπλών** επιτόπων ενός αντιγόνου
- Έχουν συνήθως χαμηλότερο τίτλο και μικρότερη ειδικότητα
- Μικρότερος χρόνος Παραγωγής
- Η δυνατότητα πρόσδεσης σε πολλαπλούς επιτόπους παράλληλα αυξάνει το σήμα

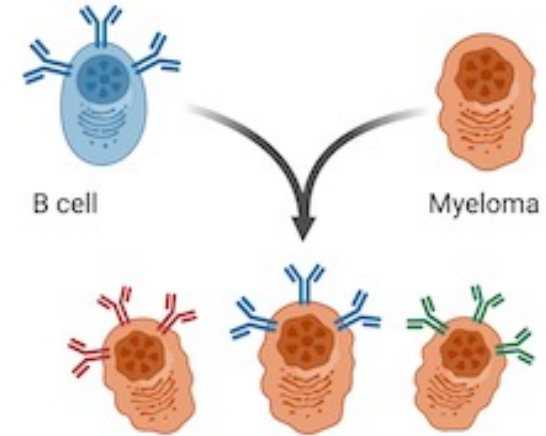
Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων



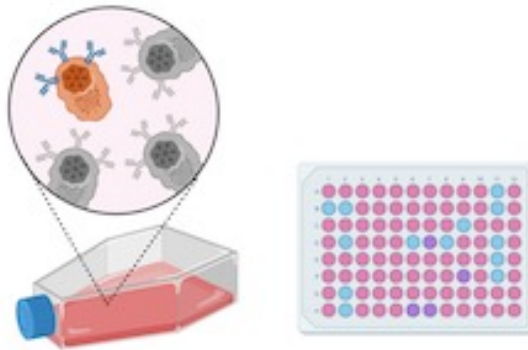
1 Immunization of an animal with protein antigen to stimulate antibody production



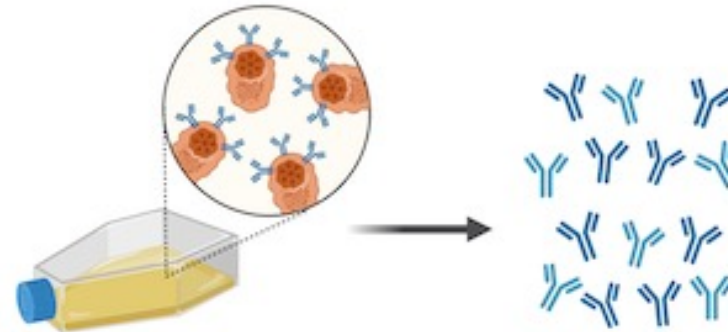
2 Isolation of antibody-secreting B cells



3 Fusion and generation of hybridomas cells

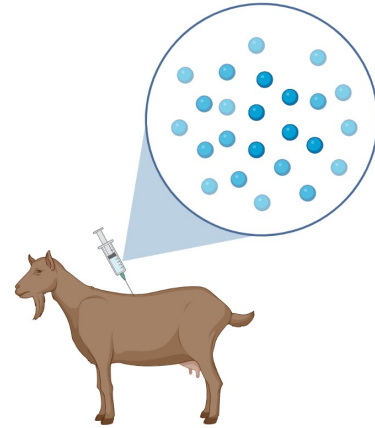


4 Selection for specific hybridomas using HAT media and ELISA

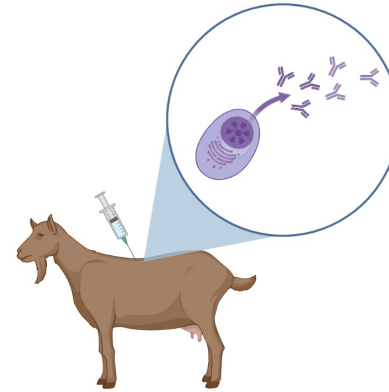


5 Expansion of selected hybridoma to produce monoclonal antibodies

Παραγωγή Πολυκλωνικών αντισωμάτων

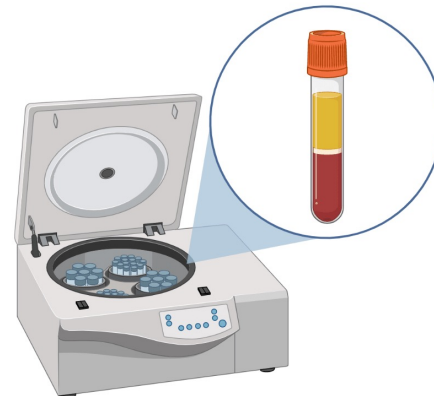


1. An animal, such as a goat or a rabbit, is injected with an immunogen plus adjuvant.



2. Booster injections are given to the animal every 2-3 weeks until the proper titer of antibody is reached.

3. Blood is harvested from the animal and centrifuged to isolate the serum, which contains the antibodies.



4. The serum is further processed to purify the polyclonal antibody population.

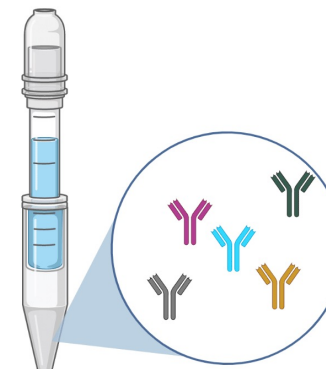
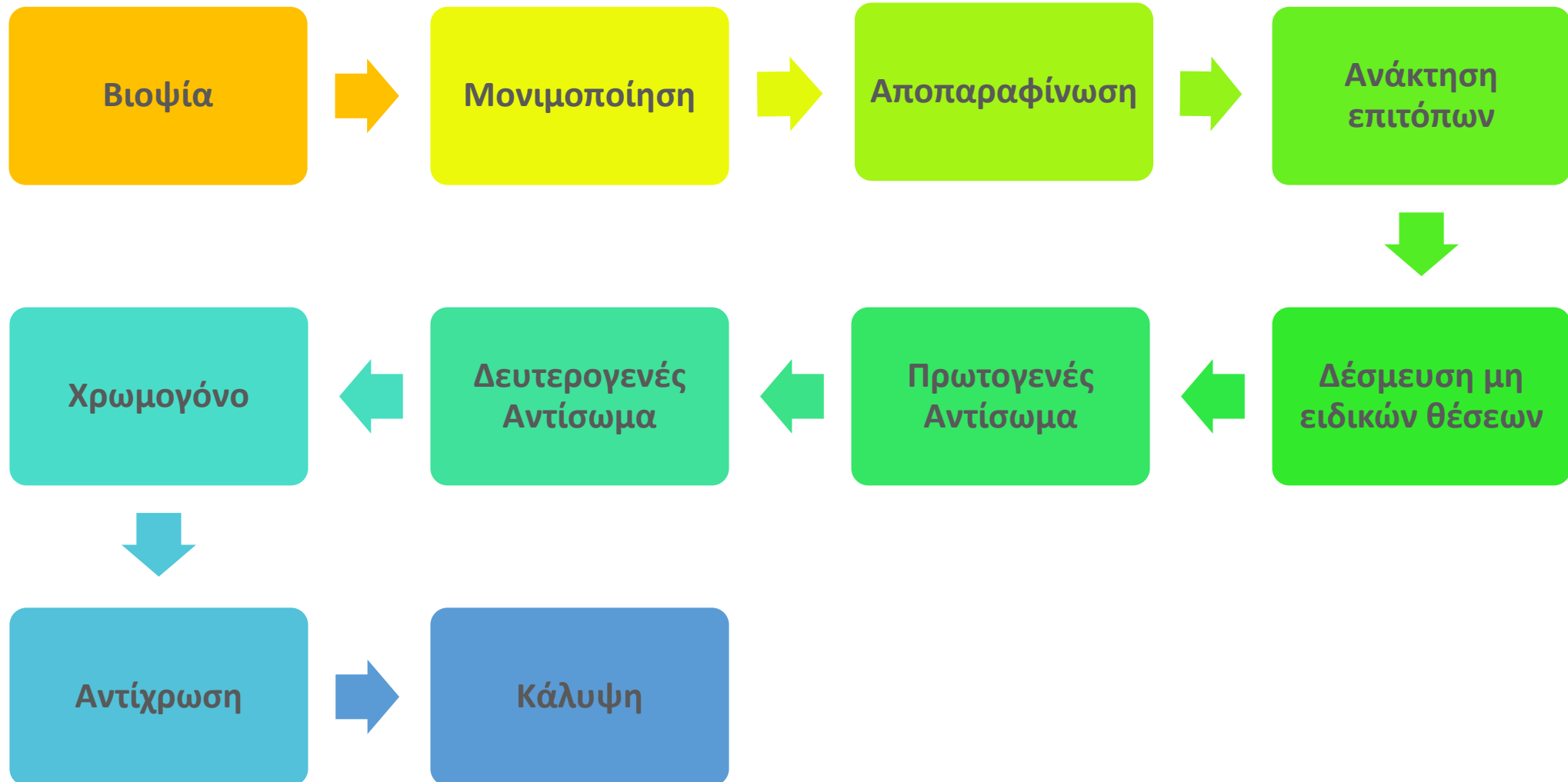
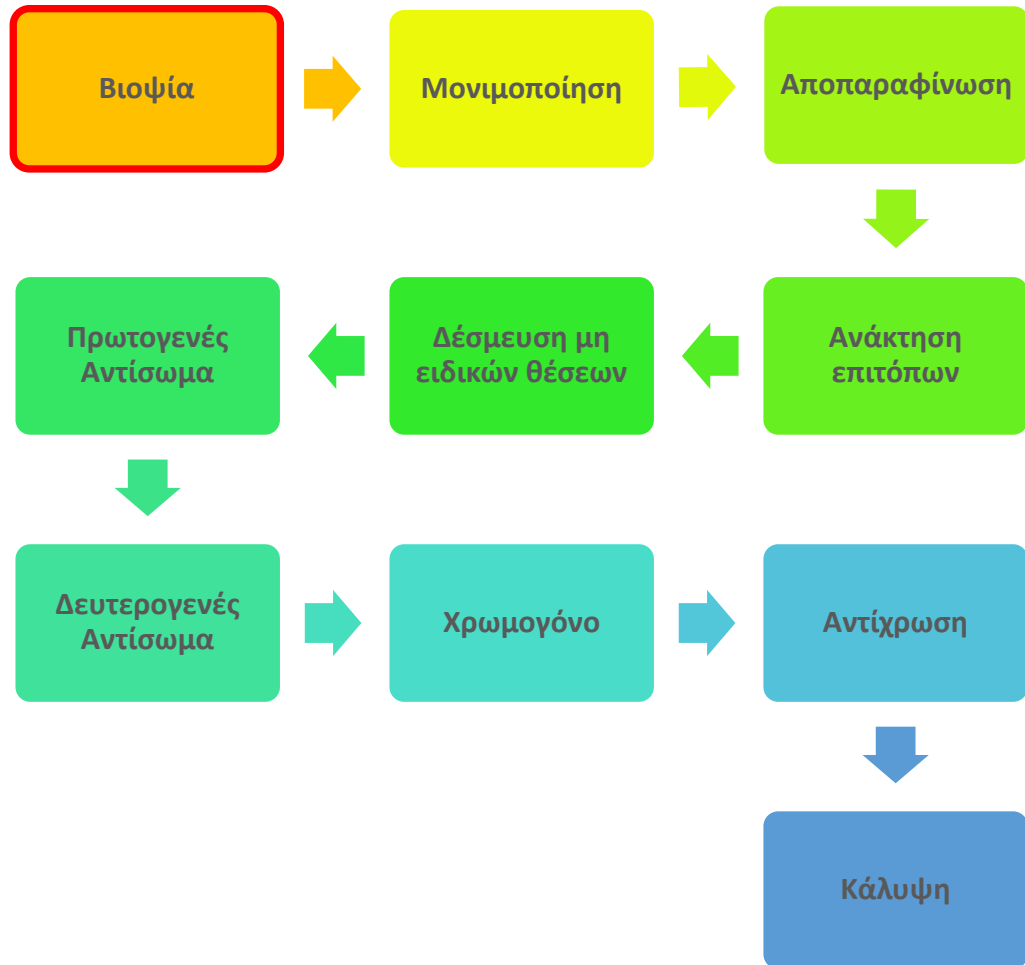


Image created with BioRender.com and adapted from Addgene blog

Βασικά στάδια ανοσοϊστοχημείας



Βασικά στάδια ανοσοϊστοχημείας



- Δείγμα ιστού αφαιρείται από το σώμα, προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη και το στάδιο της ασθένειας
- Ωστόσο, η αποδιάταξη του ιστού ξεκινά αμέσως μετά την αφαίρεσή του από το σώμα
- Έρευνα
 - Απομόνωση ιστών
 - Μπορούν να απομονωθούν και ολόκληρα όργανα

Μονιμοποίηση

Η μονιμοποίηση είναι μία **ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΗ** διαδικασία που γίνεται αμέσως μετά τη συλλογή του δείγματος

Οι περισσότεροι ιστοί είναι αδύνατο να εξεταστούν στο μικροσκόπιο επειδή δεν είναι αρκετά μικροί είτε αρκετά διαφανείς. Για το σκοπό αυτό υποβάλλονται στην **μονιμοποίηση**, δηλαδή στην ειδική επεξεργασία με χημικά μέσα και διατομή σε λεπτές τομές που έπειτα χρωματίζονται

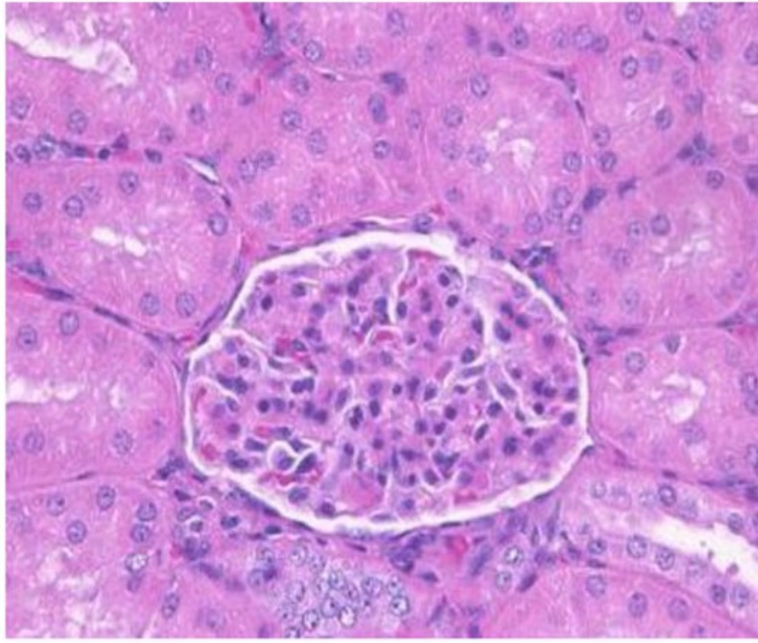
Η μονιμοποίηση είναι μόνιμη και μη αναστρέψιμη κατάσταση

Σκοπός της μονιμοποίησης είναι να διατηρήσει στο ακέραιο τη δομή των ιστών για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Συγκεντρωτικός πίνακας κατηγοριών μονιμοποιητικών υλικών

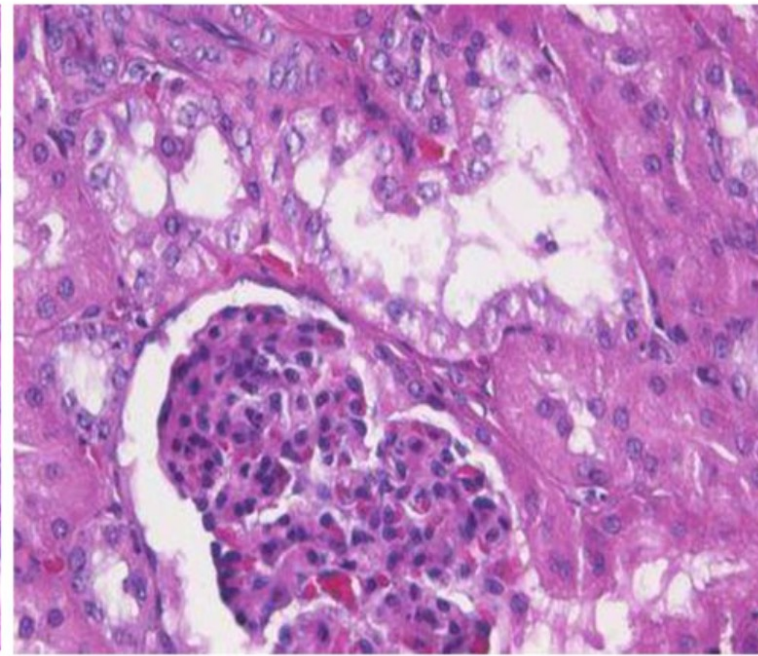
Αλδεΰδες	Φορμαλδεΰδη, Γλουταραλδεΰδη
Άλατα Υδραργύρου	B-5, Zenker's
Αλκοόλες	Μεθανόλη, Αιθανόλη
Οξειδωτικά	Υπερμαγγανικό Κάλιο, Διχρωμικό Κάλιο, Τετροξειδίο του Οσμίου
Πικρικά	Διάλυμα Bouin's

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΣΤΟΥ



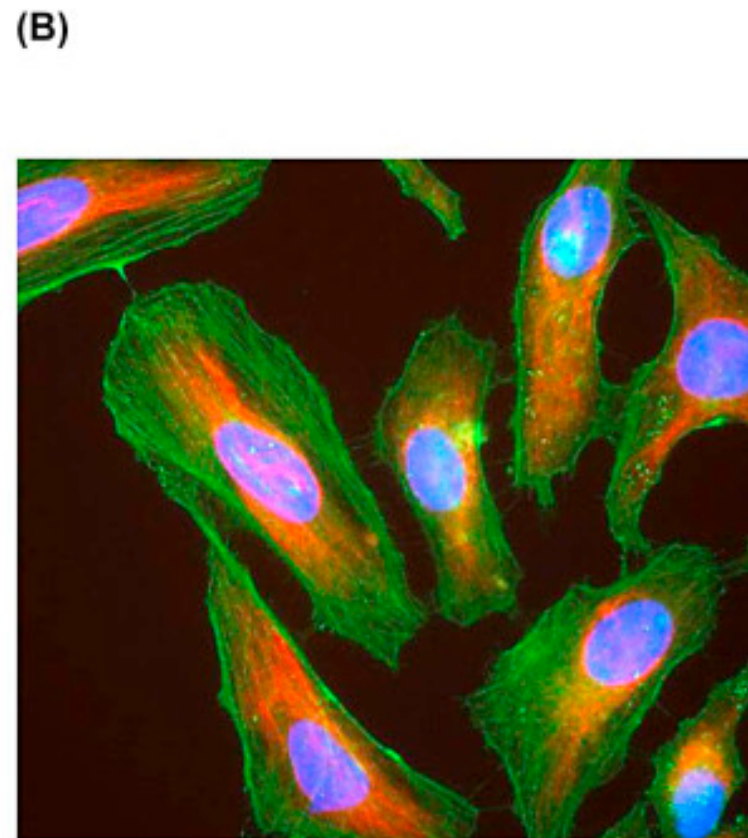
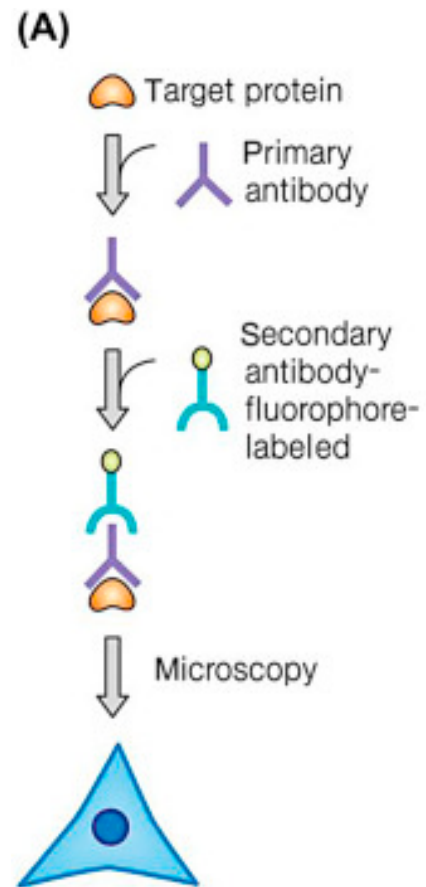
Το μονιμοποιητικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε και στις δυο περιπτώσεις νεφρικών βιοψιών, είναι η ουδέτερη φορμόλη

- Στην πάνω εικόνα, η σωστή μονιμοποίηση διατηρεί τη μορφολογία του πυρήνα, του κυτταροπλάσματος, της βασικής μεμβράνης και των ορίων των κυττάρων.
- Στην κάτω εικόνα, η λάθος μονιμοποίηση δεν διατηρεί την μορφολογία των κυττάρων, παρατηρείται συρρίκνωση αυτών με ασαφή όρια. Στα νεφρικά σωληνάρια παρουσιάζονται κενोटόπια, κατακερματισμός των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος. Το νεφρικό σπείραμα είναι συρρικνωμένο.



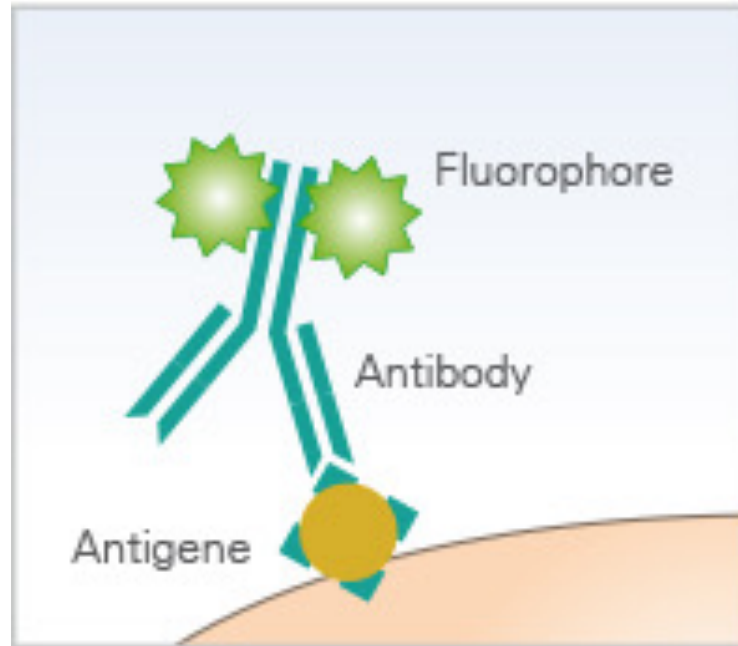
Αρχή Λειτουργίας ανοσοφθορισμού

Ανοσοϊστοχημική τεχνική κατά την οποία το ειδικό σύμπλεγμα Ag-Ab γίνεται ορατό με τη βοήθεια Ab **σημασμένου με φθοριόχρωμα** στο μικροσκόπιο φθορισμού

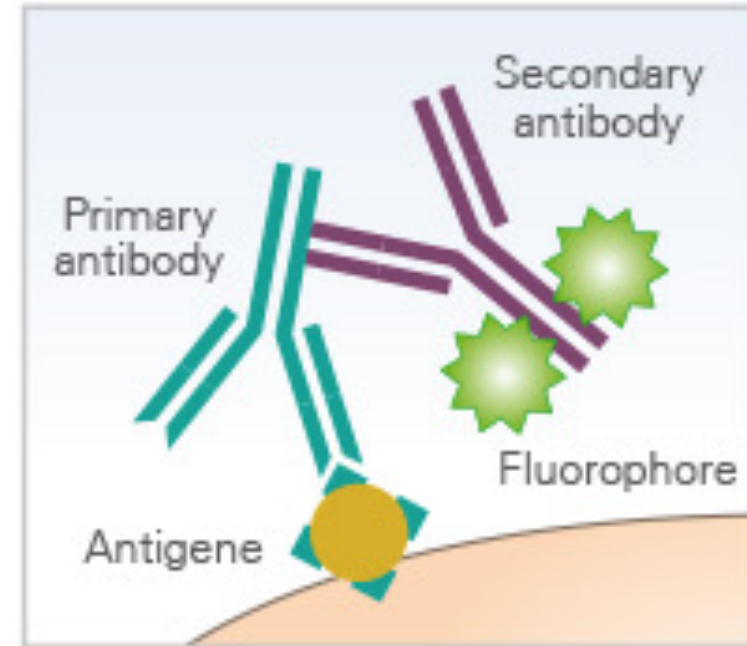


Μέθοδοι ανοσοφθορισμού

Direct Immunofluorescence



Indirect Immunofluorescence



Εκπαιδευτικοί Στόχοι Διάλεξης: Μικροσκοπία

Τι πρέπει να γνωρίζετε:

- ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
- ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΦΩΤΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ
- ΕΜΠΕΔΩΣΗ ΤΗΣ ΦΩΤΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
- ΓΝΩΡΙΜΙΑ ΜΕ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
- ΠΩΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
- ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ
- ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Για μελέτη:

- Alberts: Παράρτημα 1.1
- Alberts: Κεφ. 1, σελ. 31-39
- Διαφάνειες στο e-class MED 1951