

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ



ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ
ΜΑΡΙΑ ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΣΚΩΝ
ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΜΗΤΡΑΚΑΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ & ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ
ΔΙΔΑΚΤΩΡ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Οι μοριακές τεχνικές στο εργαστήριο ιστοπαθολογίας

- Καταλυτική επίδραση σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο
- Συνεισφορά στη διάγνωση, πρόγνωση & θεραπεία
- Σημαντική συμμετοχή στην ανάπτυξη της έρευνας

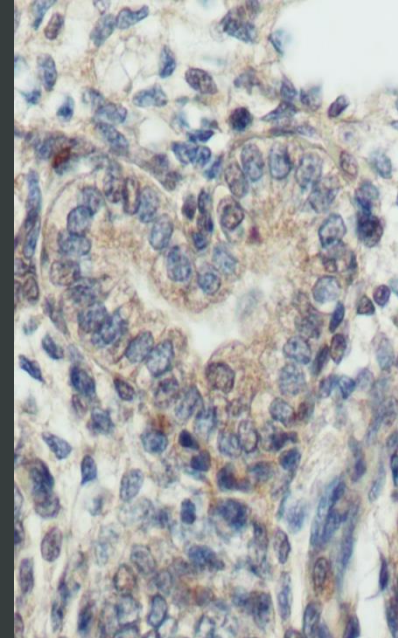
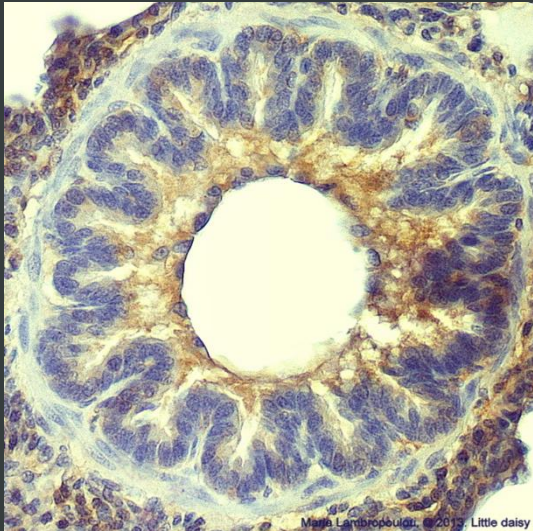
ΜΕΡΟΣ 1^ο
Ανοσοϊστοχημεία

Ανοσοϊστοχημεία

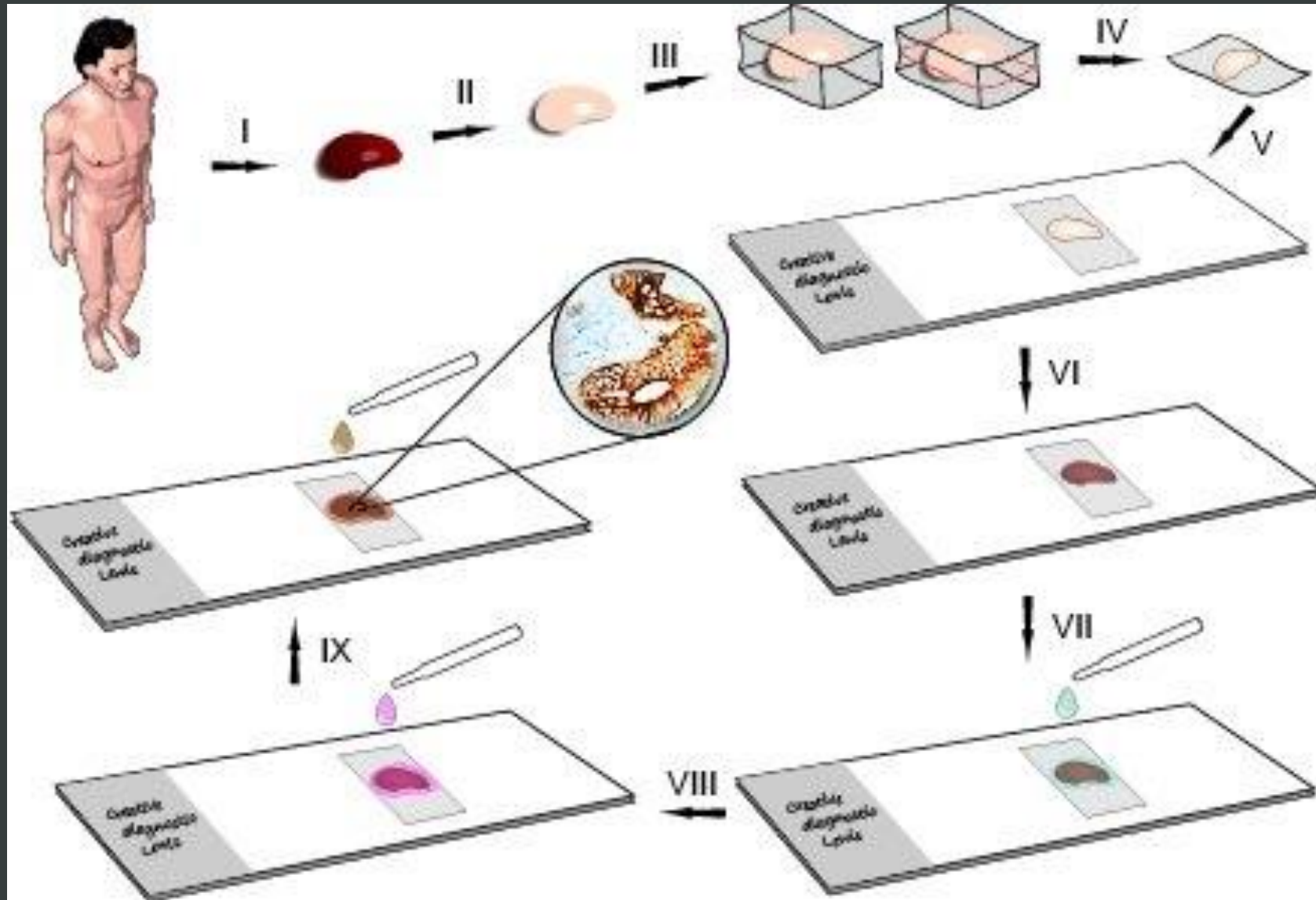
- Αρχικά χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα
- Καθιερώθηκε στη στοχευμένη θεραπεία
- Συνεισφορά στην ανάπτυξη της εξατομικευμένης θεραπείας

Ανοσοϊστοχημεία- Αρχή της μεθόδου

Η διαδικασία και τεχνική της επιλεκτικής απεικόνισης αντιγόνων (π. χ. πρωτεϊνών) στα κύτταρα τμήματος ενός ιστού, η οποία εκμεταλλεύεται την αρχή της ειδικής συνδέσεως των αντισωμάτων σε αντιγόνα σε βιολογικούς ιστούς.

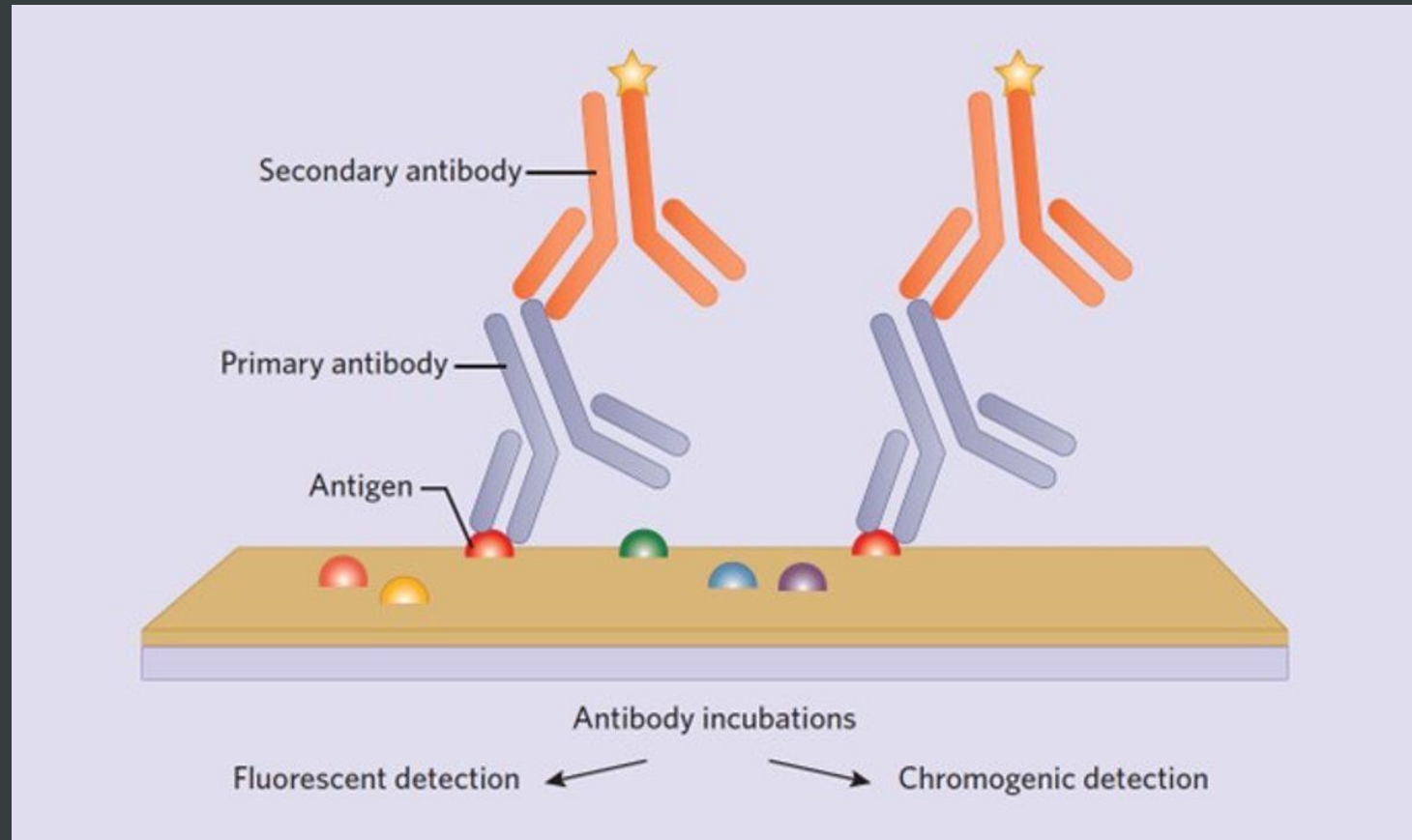


Ανοσοϊστοχημεία- Αρχή της μεθόδου



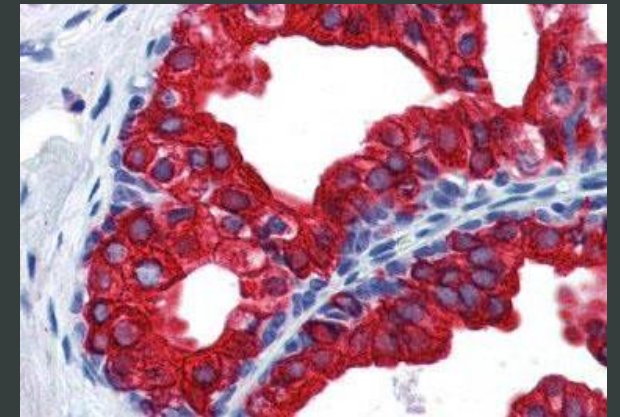
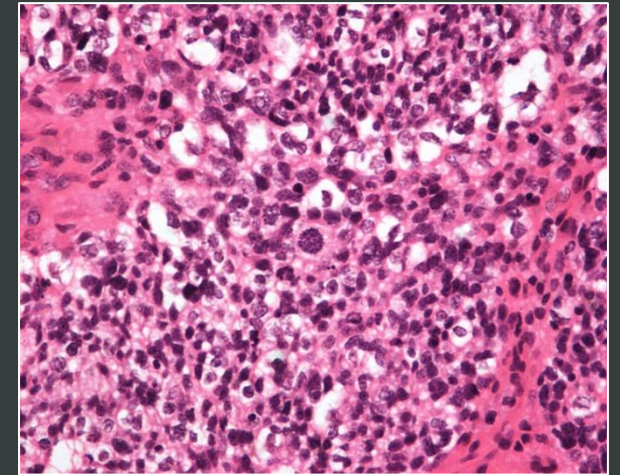
Ανοσοϊστοχημεία- Αρχή της μεθόδου

Άκρως ειδική αντίδραση (δέσμευση) αντιγόνου-αντισώματος κάνοντας το σύμπλοκό τους ορατό στο μικροσκόπιο, εφόσον είναι παρόν.



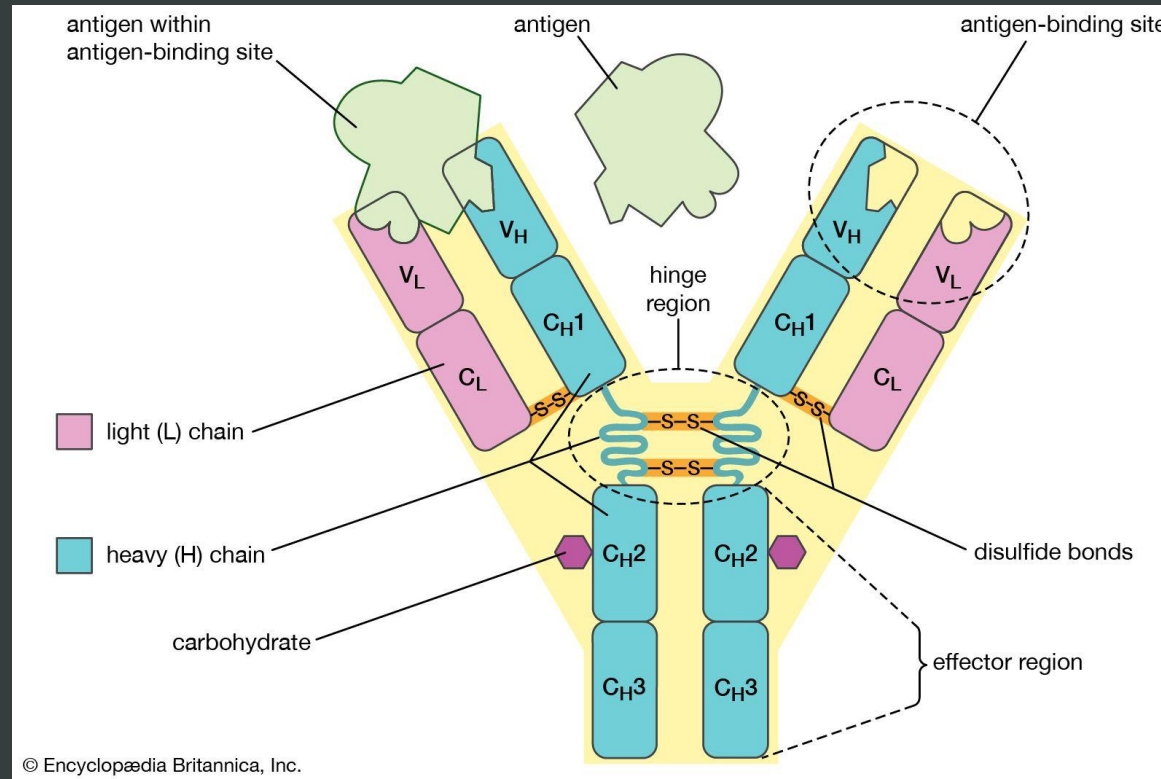
Ανοσοϊστοχημεία- Εφαρμογές

1. Ανίχνευση πρωτεϊνών των νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων, εκκριτικών κυττάρων
2. Μεμβρανικών αντιγόνων
3. Δομικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα
4. Πυρηνικών πρωτεϊνών



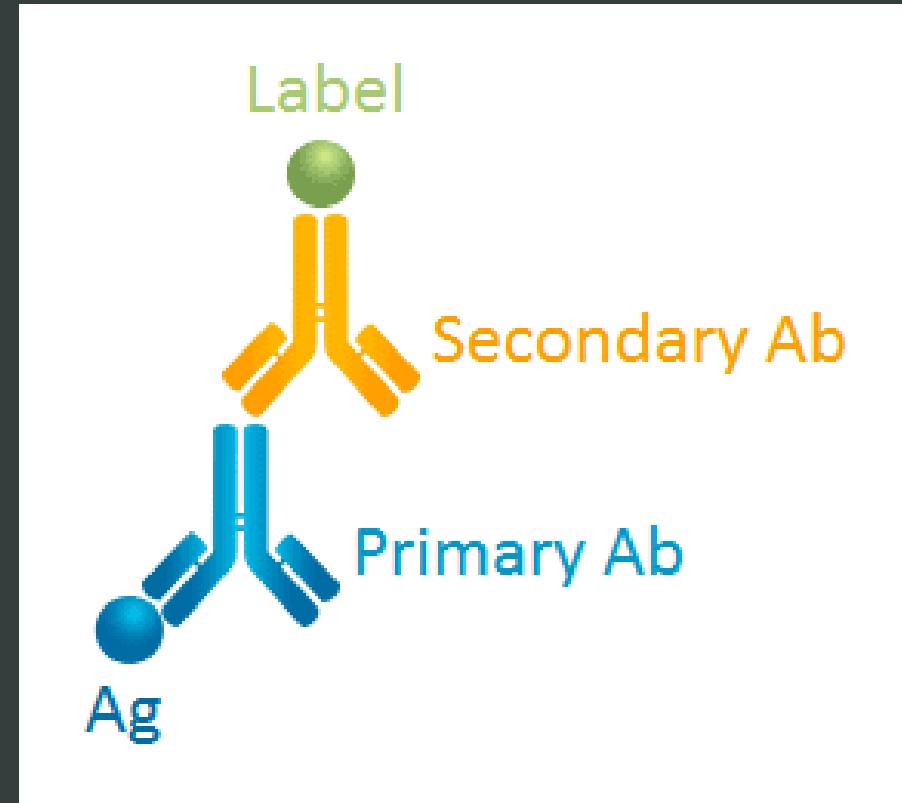
Ανοσοϊστοχημεία- Αρχή της μεθόδου

Αντίσωμα: Μία πρωτεΐνη που παράγεται από το ανοσοποιητικό σύστημα και αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο



Ανοσοϊστοχημεία- Αντισώματα

- Πρωτογενές αντίσωμα:
 - Ειδικό για το αντιγόνο-στόχο
 - Προέρχεται από έναν συγκεκριμένο οργανισμό (π.χ. Rabbit, Mouse, Donkey etc)
- Δευτερογενές αντίσωμα:
 - Ειδικό για το πρωτογενές (π.χ. Anti-rabbit)



Ανοσοϊστοχημεία- Αντισώματα

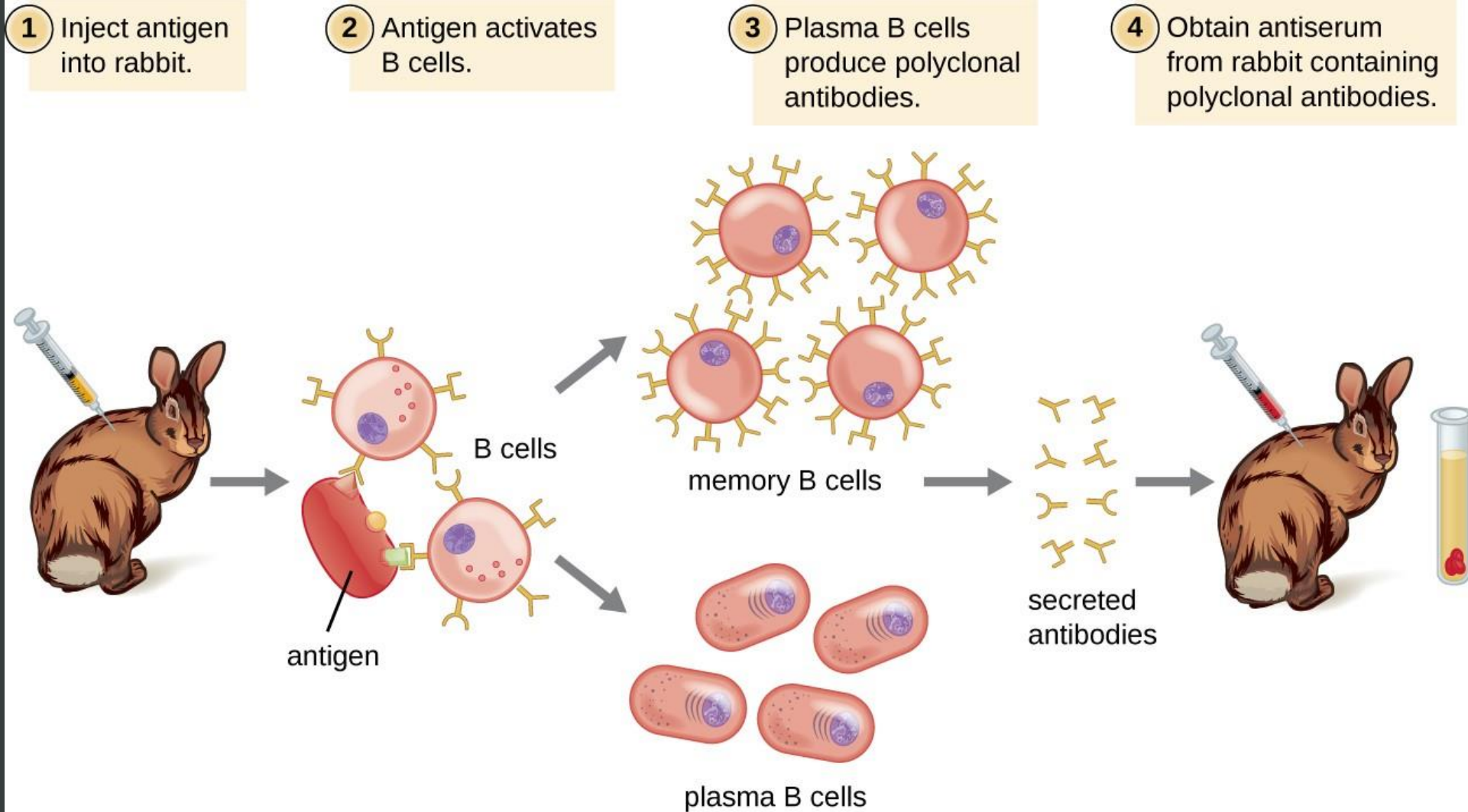
- Πολυκλωνικά:

μείγμα αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια για ένα αντιγόνο

- Πλεονέκτημα: Χαμηλή εξειδίκευση
- Μειονέκτημα: Μικρό Κόστος

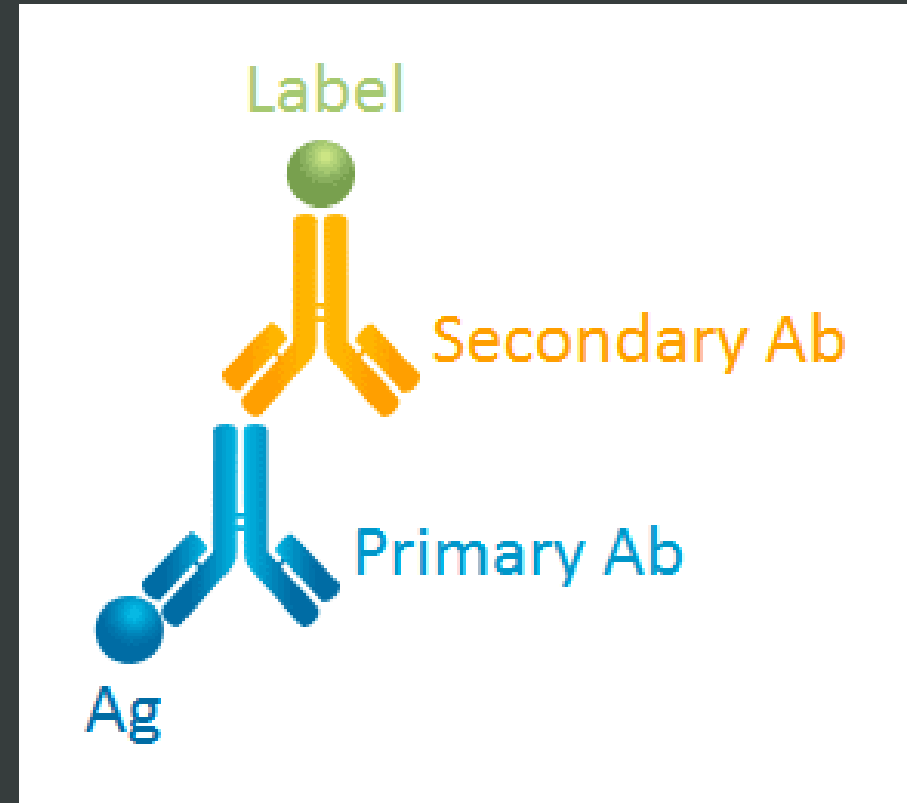
Ανοσοϊστοχημεία- Αντισώματα

- Παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων



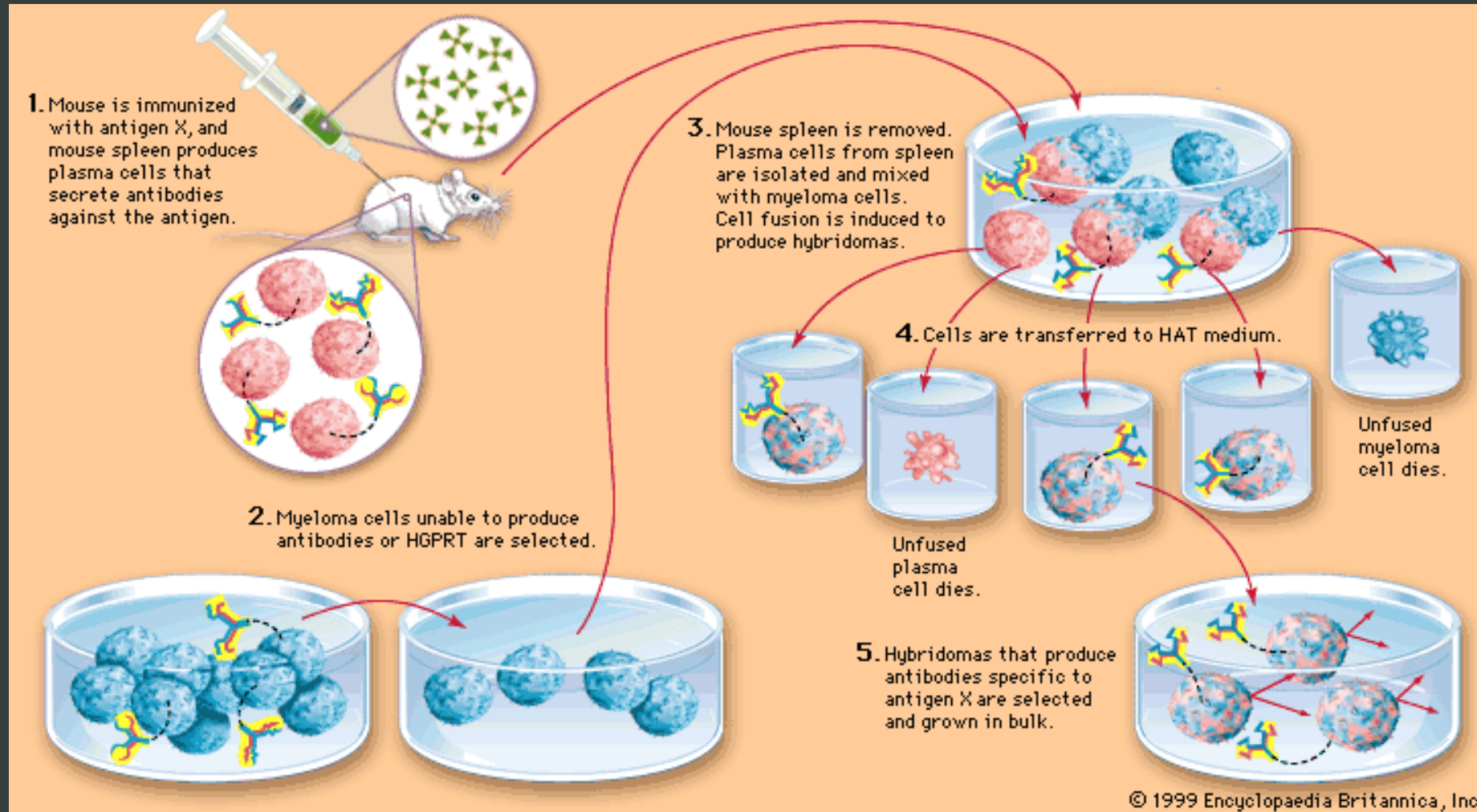
Ανοσοϊστοχημεία- Αντισώματα

- **Μονοκλωνικά: αντισώματα που προέρχονται από έναν κλώνο Β-λεμφοκυττάρων και αναγνωρίζουν έναν ειδικό επίτοπο**
- **Πλεονέκτημα: Εξαιρετική εξειδίκευση**
- **Μειονέκτημα: Κόστος**



Ανοσοϊστοχημεία- Αντισώματα

• Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων

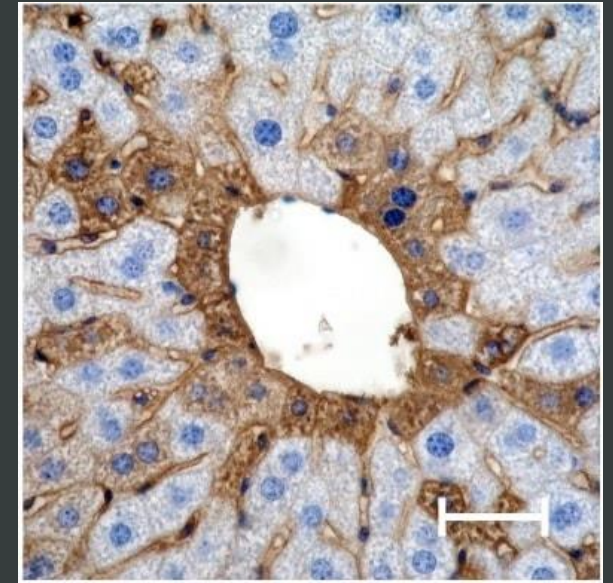


Ανοσοϊστοχημεία- Χρωμογόνα

- Οπτικοποιούμε (στο απλό οπτικό μικροσκόπιο) το αποτέλεσμα
- Κάνουμε χρήση ειδικών χρωστικών ουσιών με τις οποίες είναι σημασμένο το σύμπλοκο.

Αυτές συνήθως είναι:

- Υπεροξειδάση- υπεροξειδίο του υδρογόνου
Diaminobenzidine (DAB) [ΚΑΦΕ ΧΡΩΜΑ]
- 3-αμινο-9-ethylcarbazole (AEC) [ΚΟΚΚΙΝΟ ΧΡΩΜΑ]

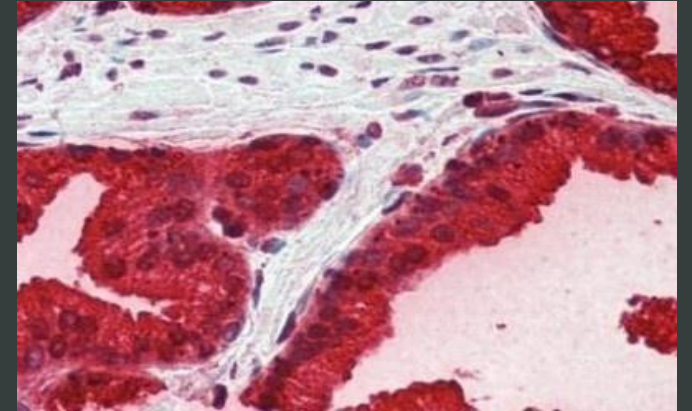


Ανοσοϊστοχημεία- Χρωμογόνα

- Οπτικοποιούμε (στο απλό οπτικό μικροσκόπιο) το αποτέλεσμα
- Κάνουμε χρήση ειδικών χρωστικών ουσιών με τις οποίες είναι σημασμένο το σύμπλοκο.

Αυτές συνήθως είναι:

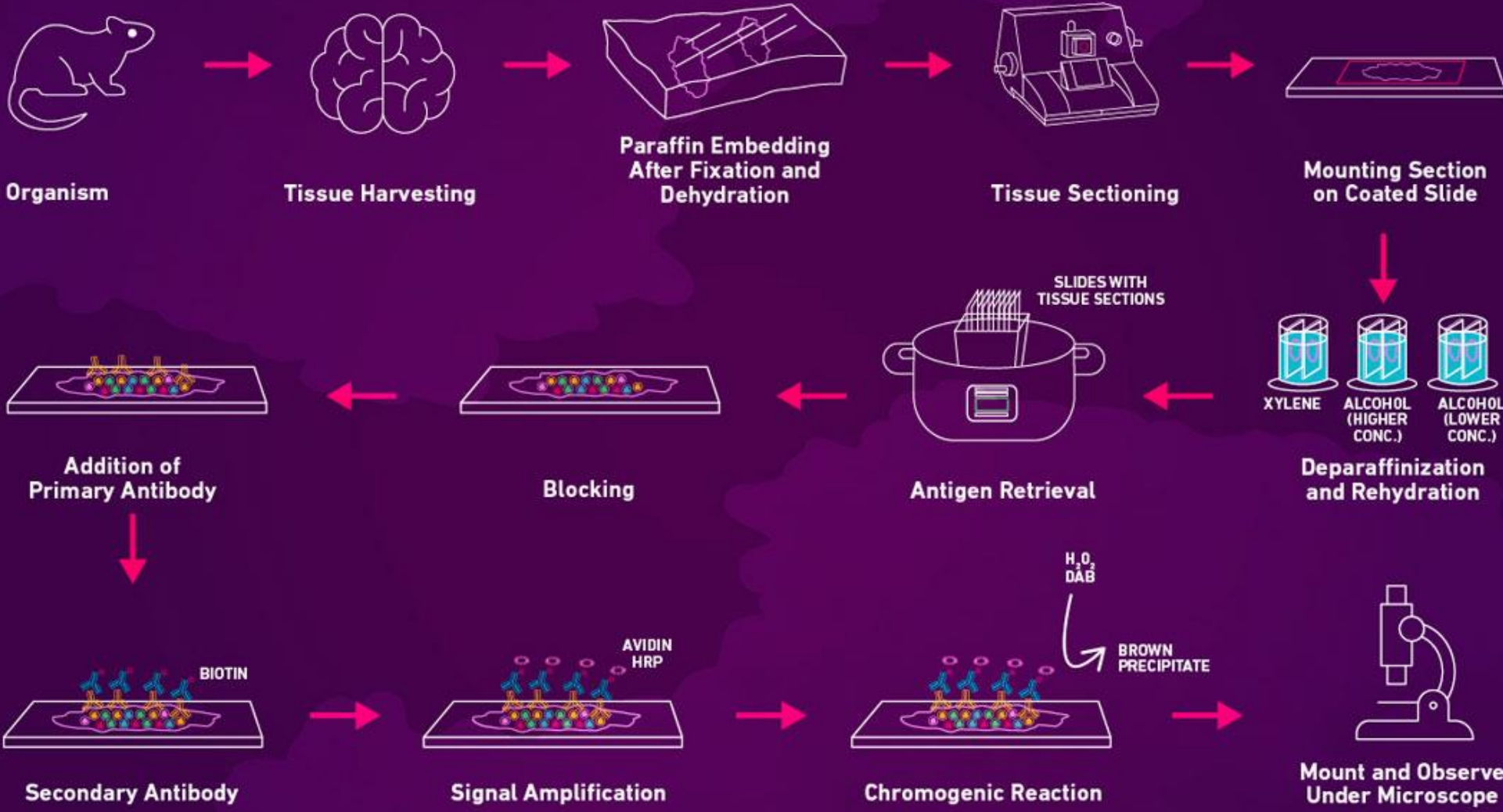
- Υπεροξειδάση- υπεροξειδίο του υδρογόνου
Diaminobenzidine (DAB) [ΚΑΦΕ ΧΡΩΜΑ]
- 3-αμινο-9-ethylcarbazole (AEC) [ΚΟΚΚΙΝΟ ΧΡΩΜΑ]





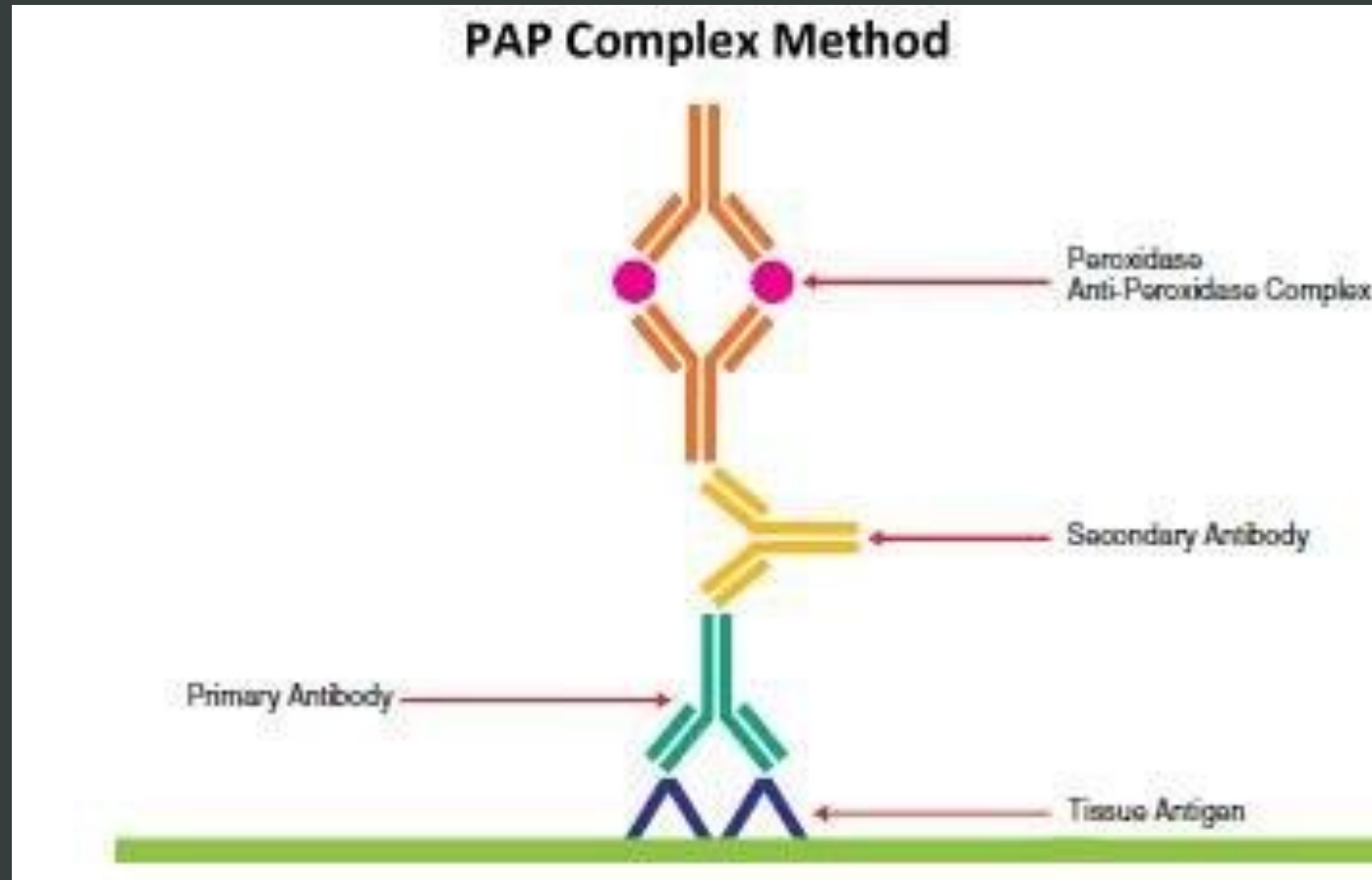
SPECIMEN

Ανοσοϊστοχημεία- Στάδια της μεθόδου



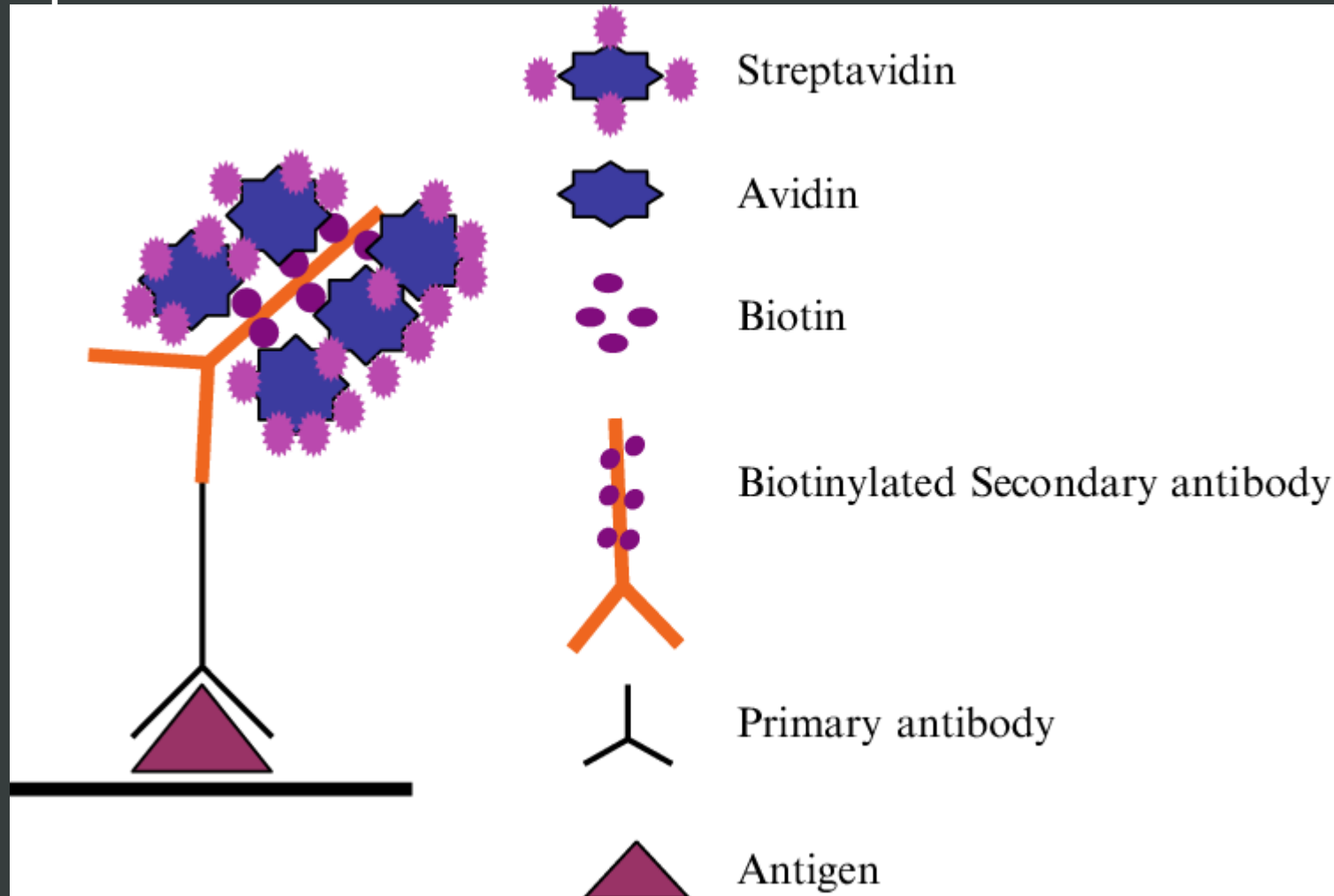
Ανοσοϊστοχημεία

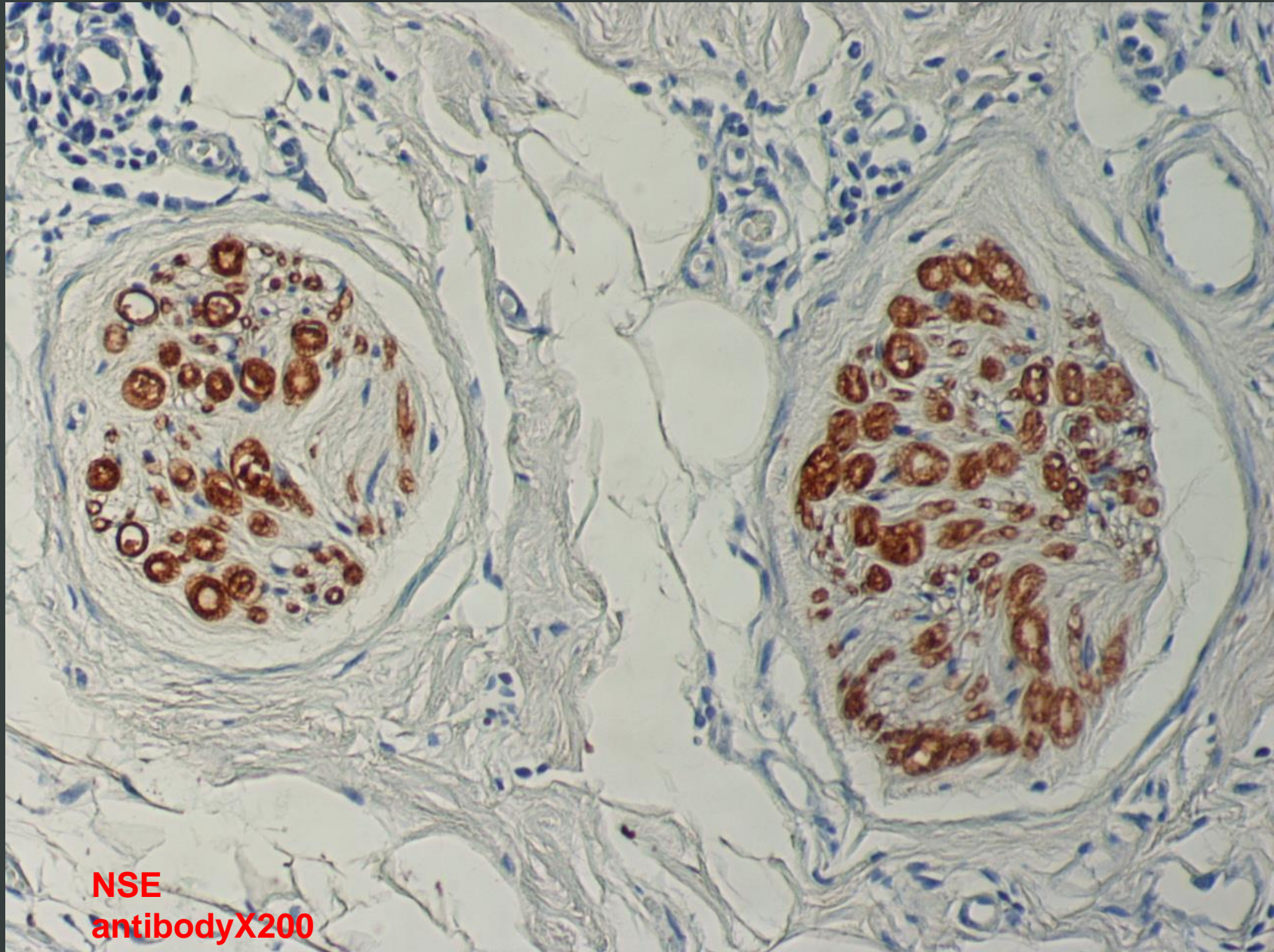
- Τεχνικές ανίχνευσης αντιγόνων σε ιστούς
 - Υπεροξειδάση-Αντι-υπεροξειδάση



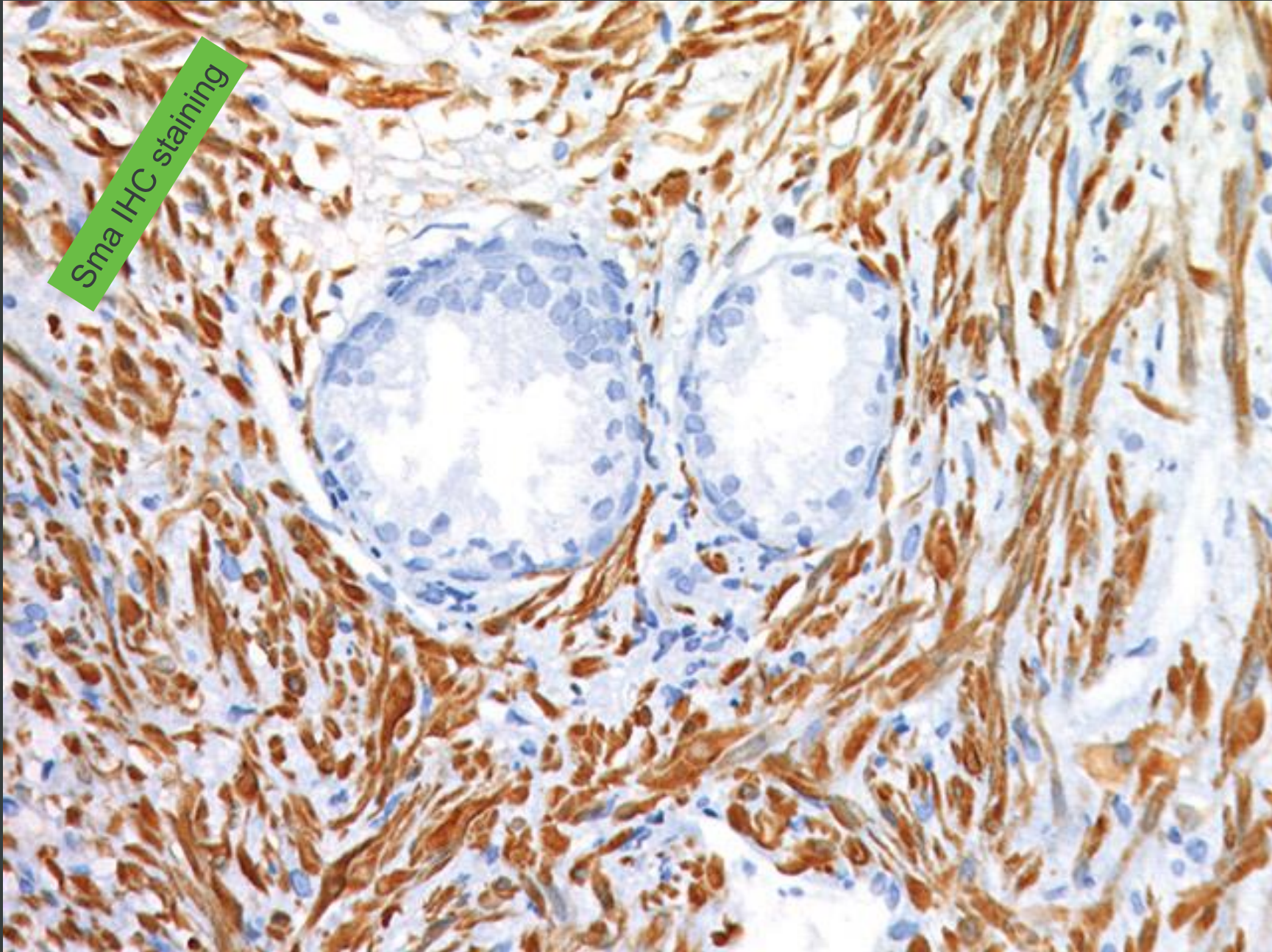
Ανοσοϊστοχημεία

- Τεχνικές ανίχνευσης αντιγόνων σε ιστούς
 - Βιοτίνη-αβιδίνη

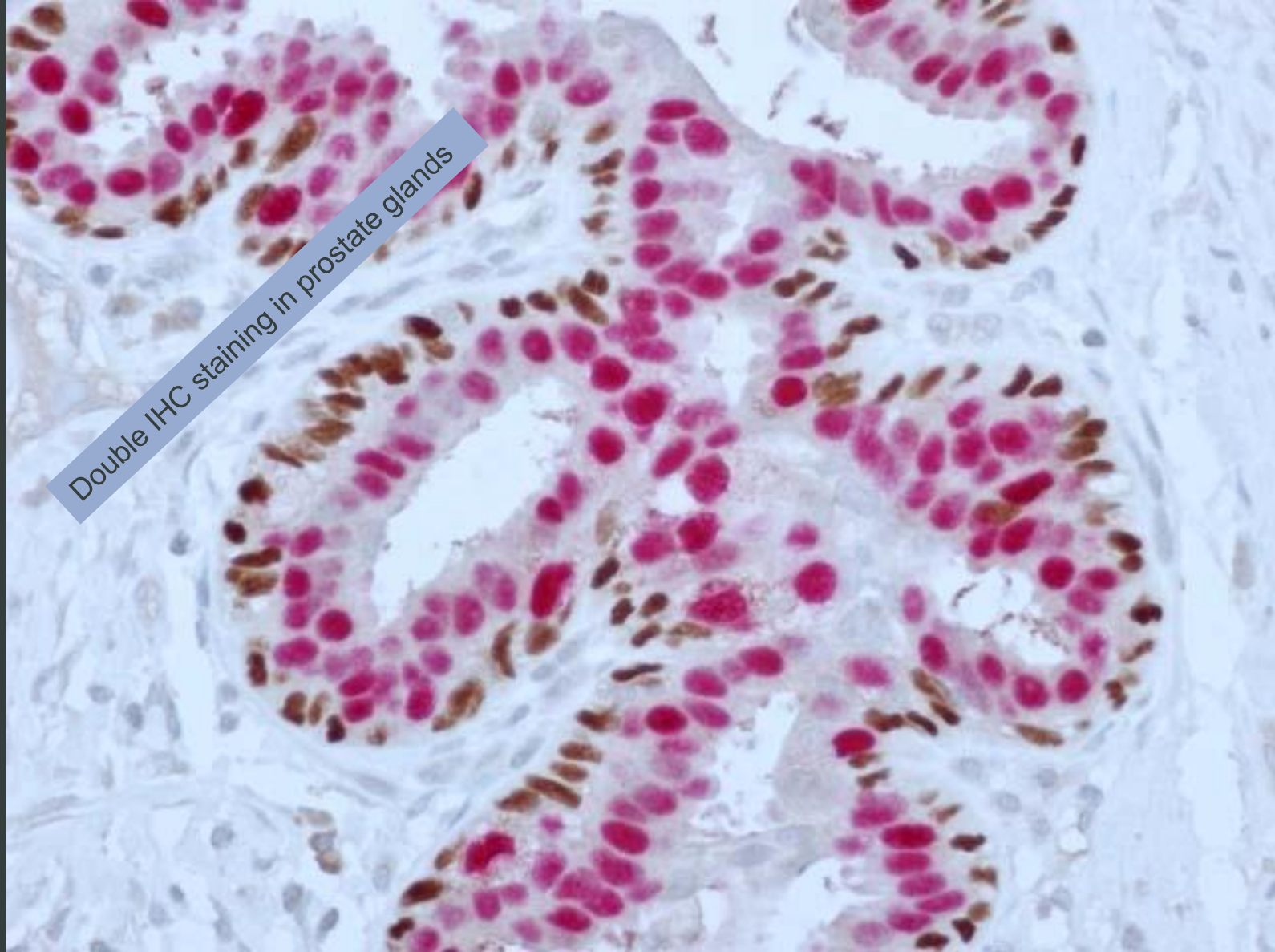




NSE
antibodyX200

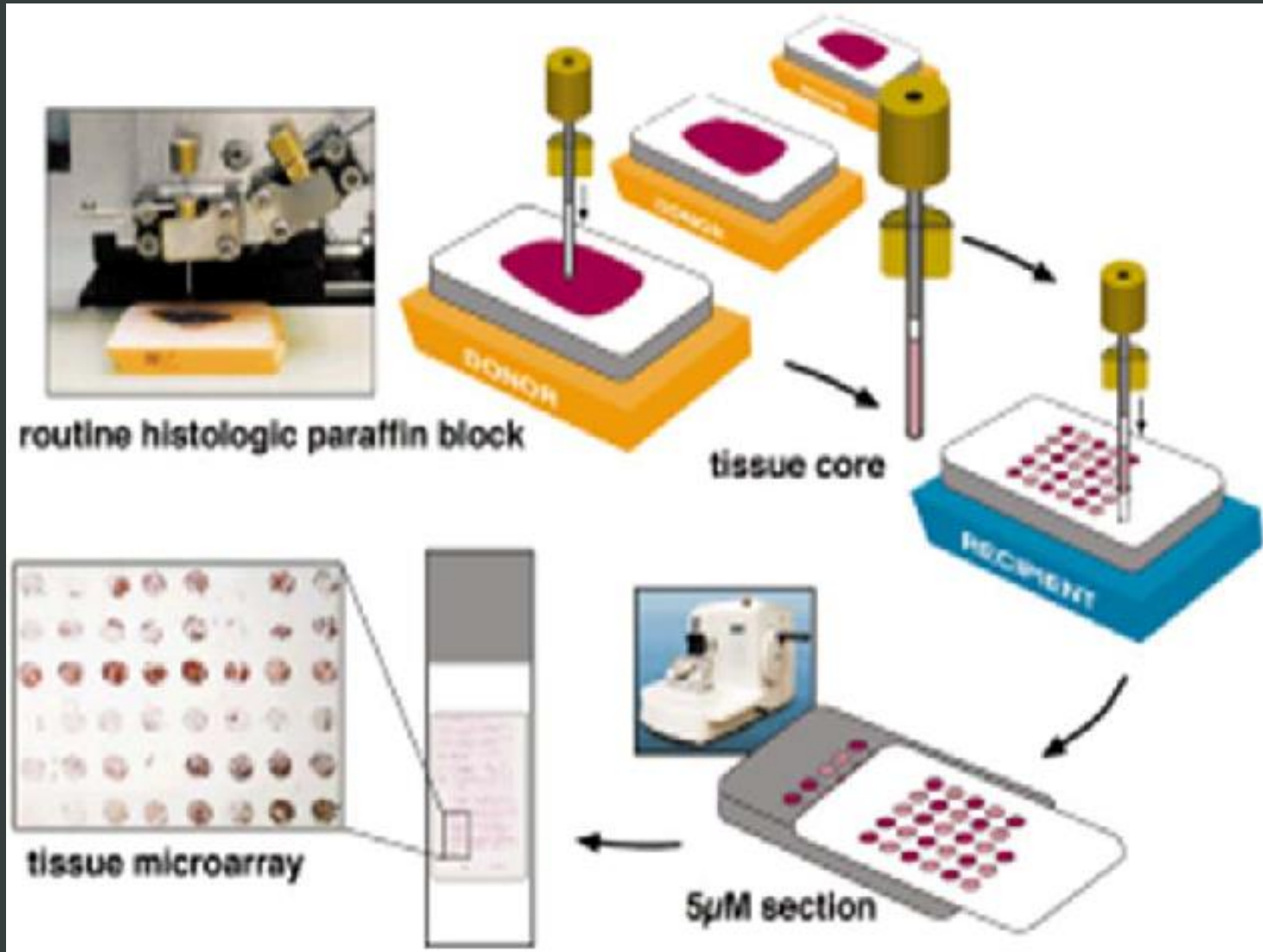


Sma IHC staining

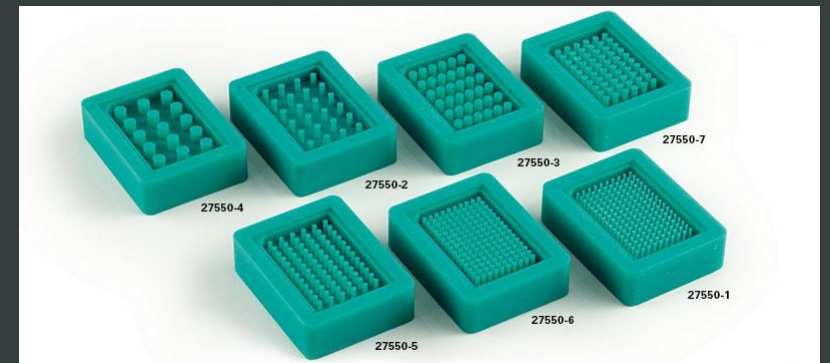
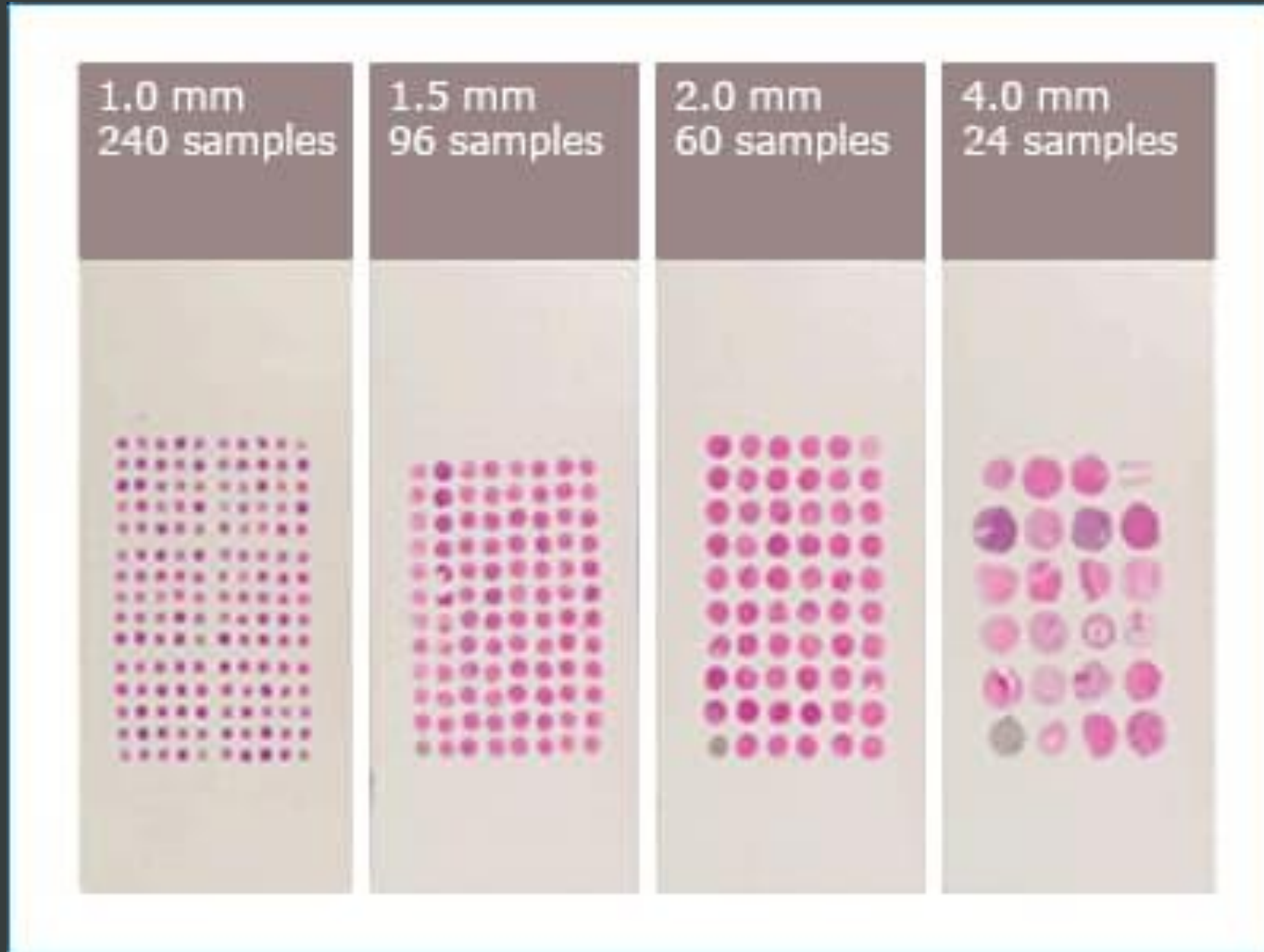


Double IHC staining in prostate glands

Tissue micro-arrays

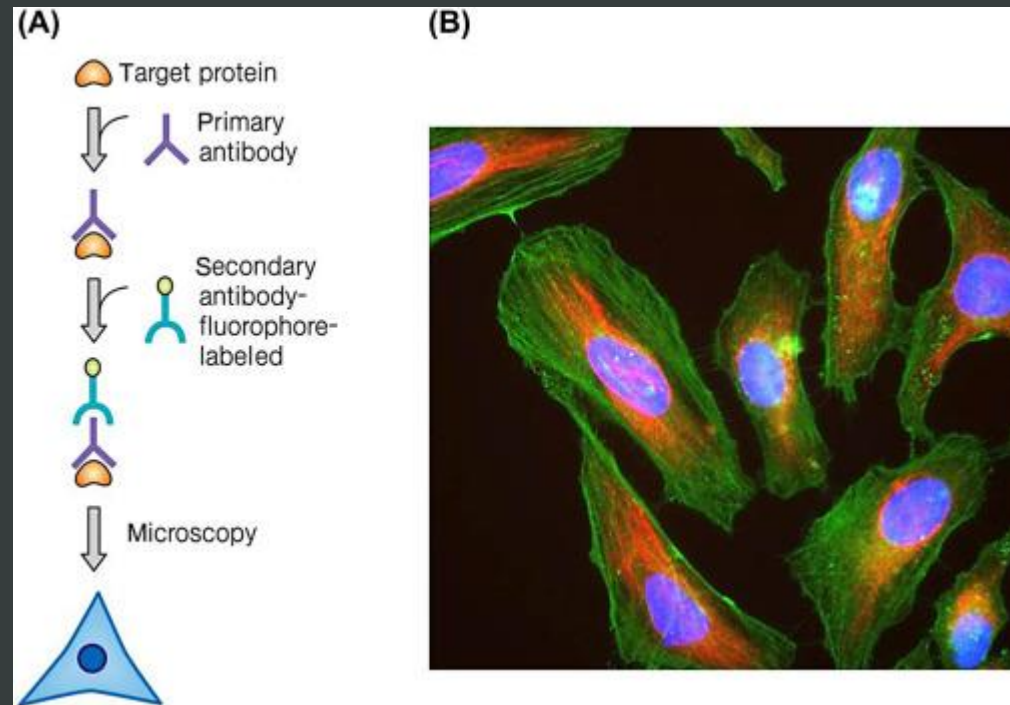


Tissue micro-arrays



Ανοσοφθορισμός

- Χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα.
- Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων στα ανοσολογικά εργαστήρια.

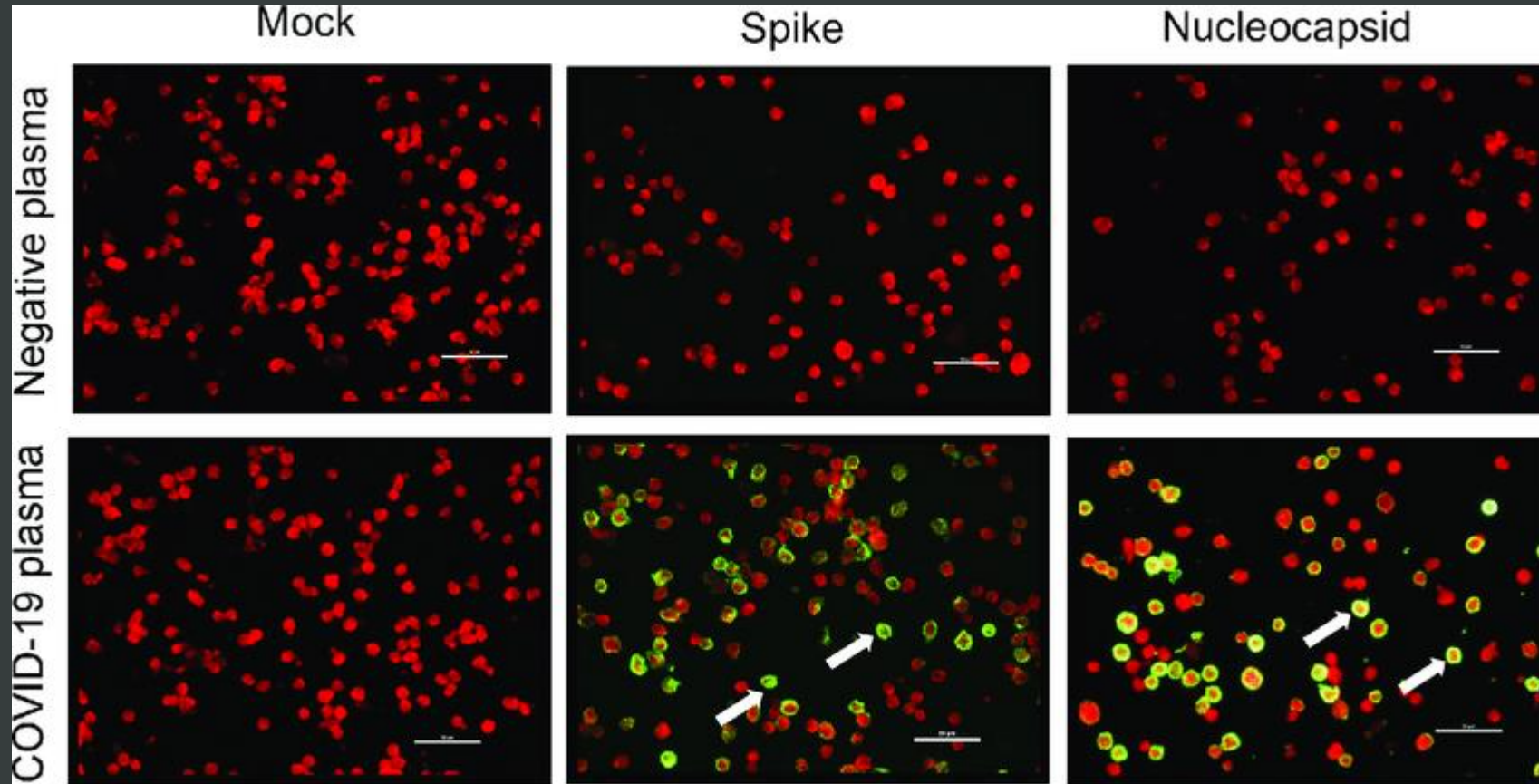


Είδη ανοσοφθορισμού

- Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA),
- Άμεσος ανοσοφθορισμός (DFA),
- Ανοσοφθορισμός με διπλή φθορίζουσα χρώση,

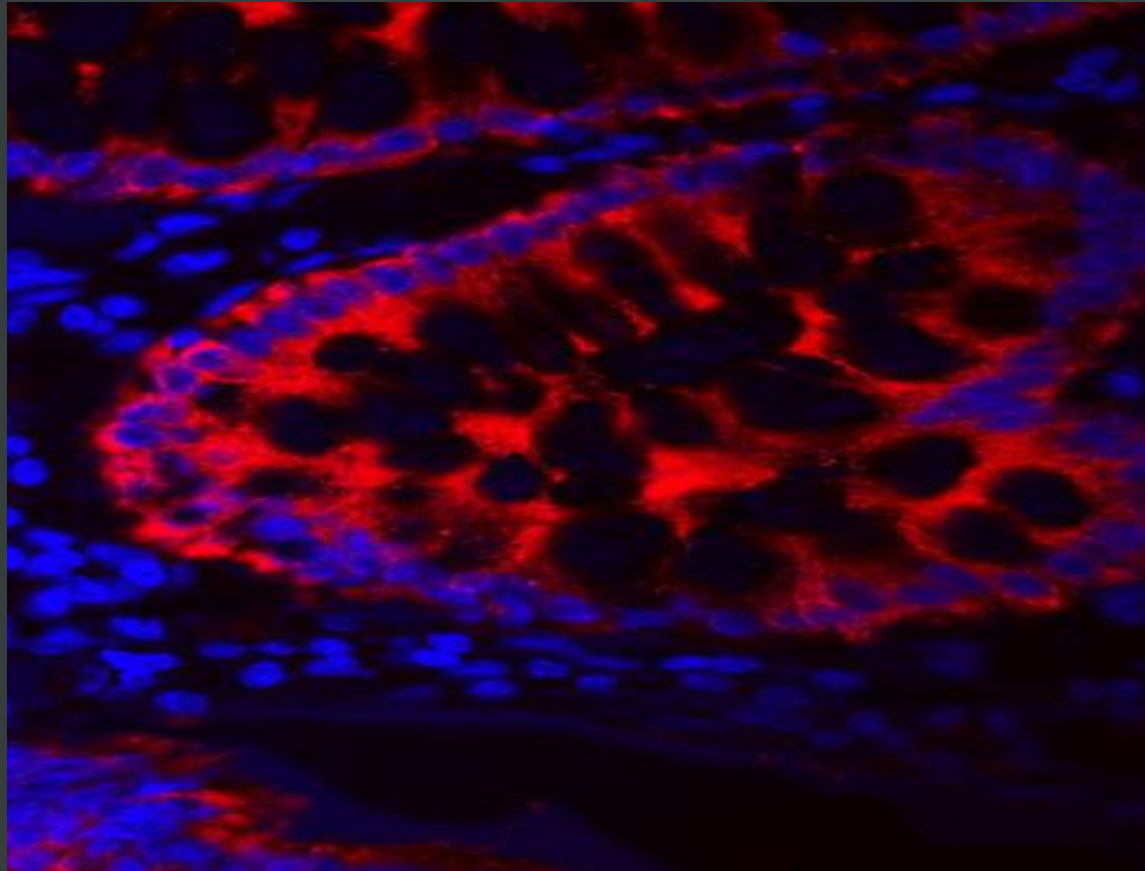
Είδη ανοσοφθορισμού

- Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA), χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό των ασθενών



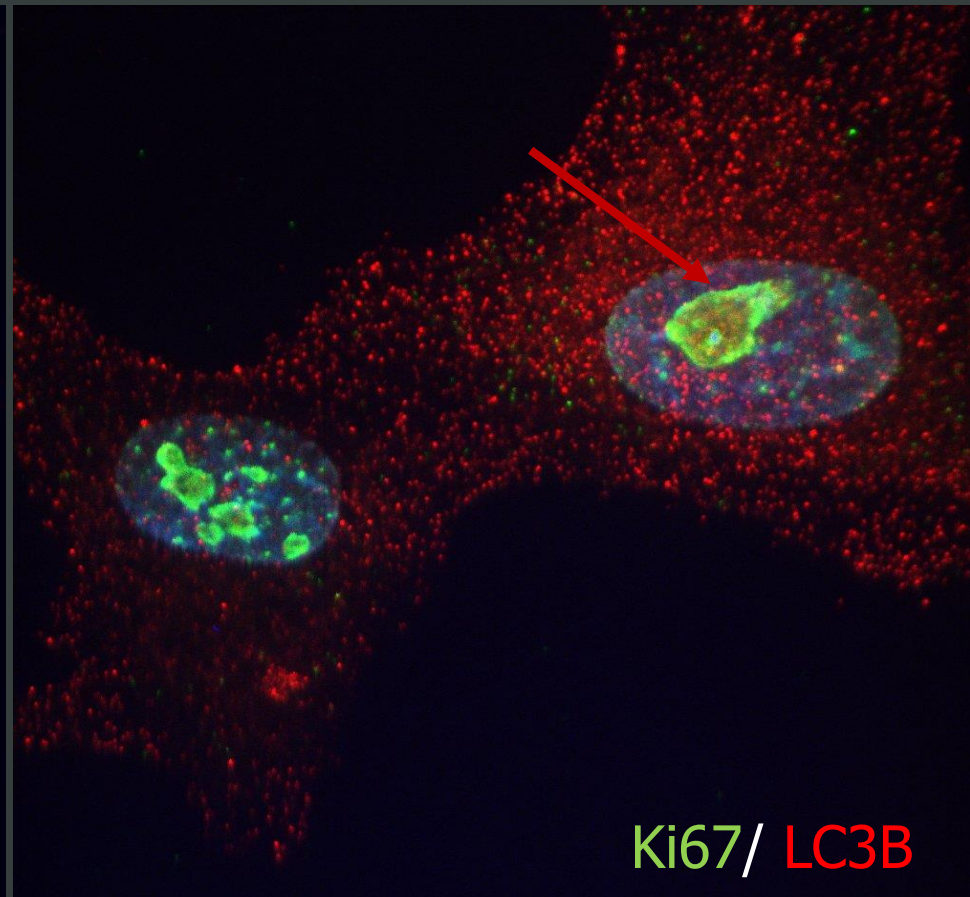
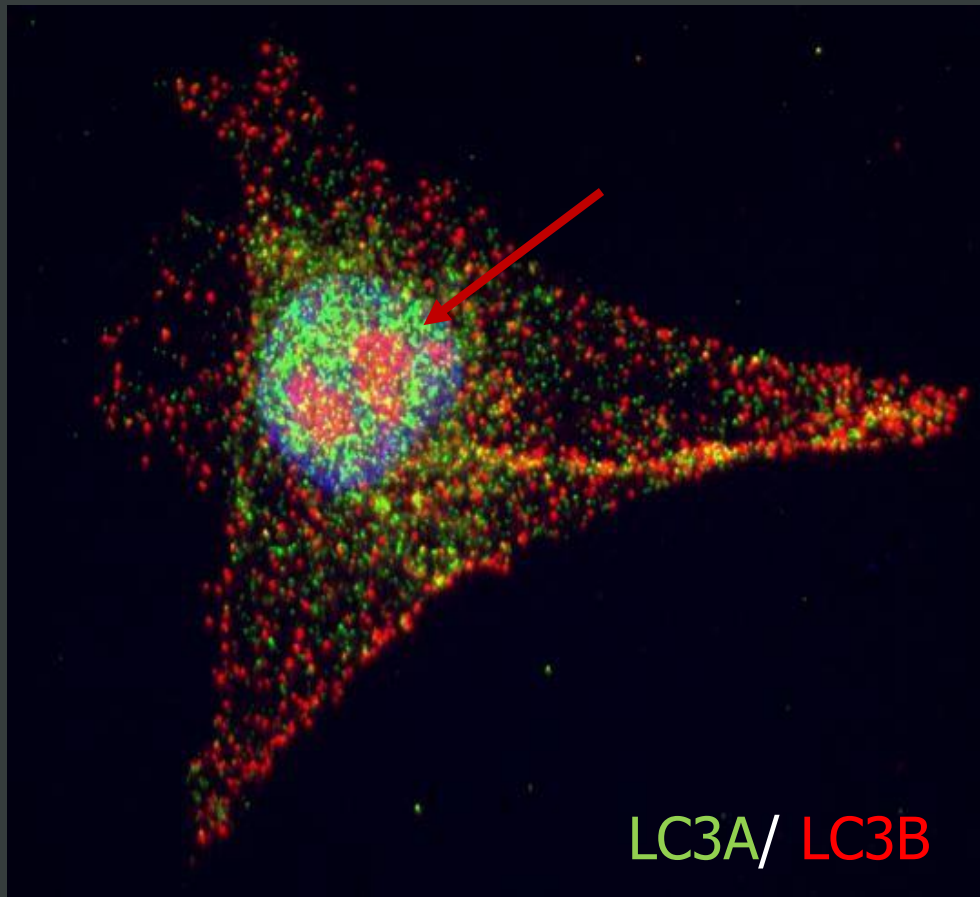
Είδη ανοσοφθορισμού

- Άμεσος ανοσοφθορισμός (DFA), για την ανίχνευση αντιγόνων του ασθενή πάνω σε υλικό βιοψίας.



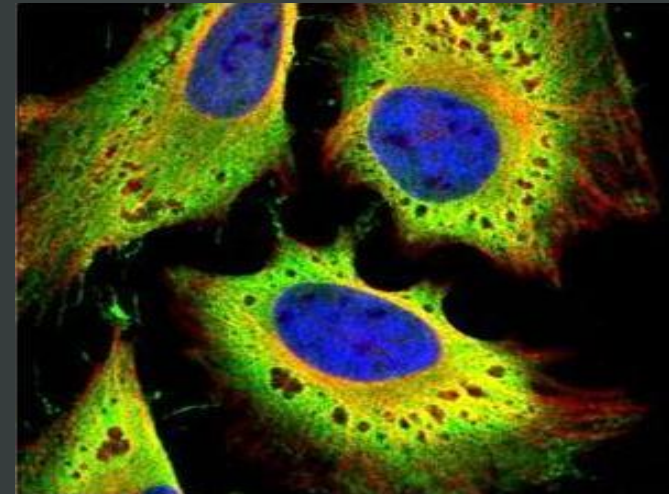
Είδη ανοσοφθορισμού

- **Ανοσοφθορισμός με διπλή φθορίζουσα χρώση**, ταυτόχρονη χρήση δύο αντισωμάτων σημασμένων με διαφορετικά φθοριοχρώματα για την ανίχνευση δύο διαφορετικών αντιγόνων στο ίδιο υπόστρωμα



Είδη ανοσοφθορισμού- Φθοριοχρώματα

- 1. Ισοθιοκυανική φλουορεσκεΐνη (**FITC**), εκπέμπει πράσινο χρώμα.
- 2. Ισοθιοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (**TMRITC**), εκπέμπει κόκκινο χρώμα.
- 3. Φυκοερυθρίνη (**RE**), εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα.
- 4. Ανασυνδυαζόμενες πρωτεΐνες: πράσινη φθορισμού πρωτεΐνη (**GFP**). Η χρήση αυτών των πρωτεϊνών επιτρέπει πολύ καλύτερο εντοπισμό

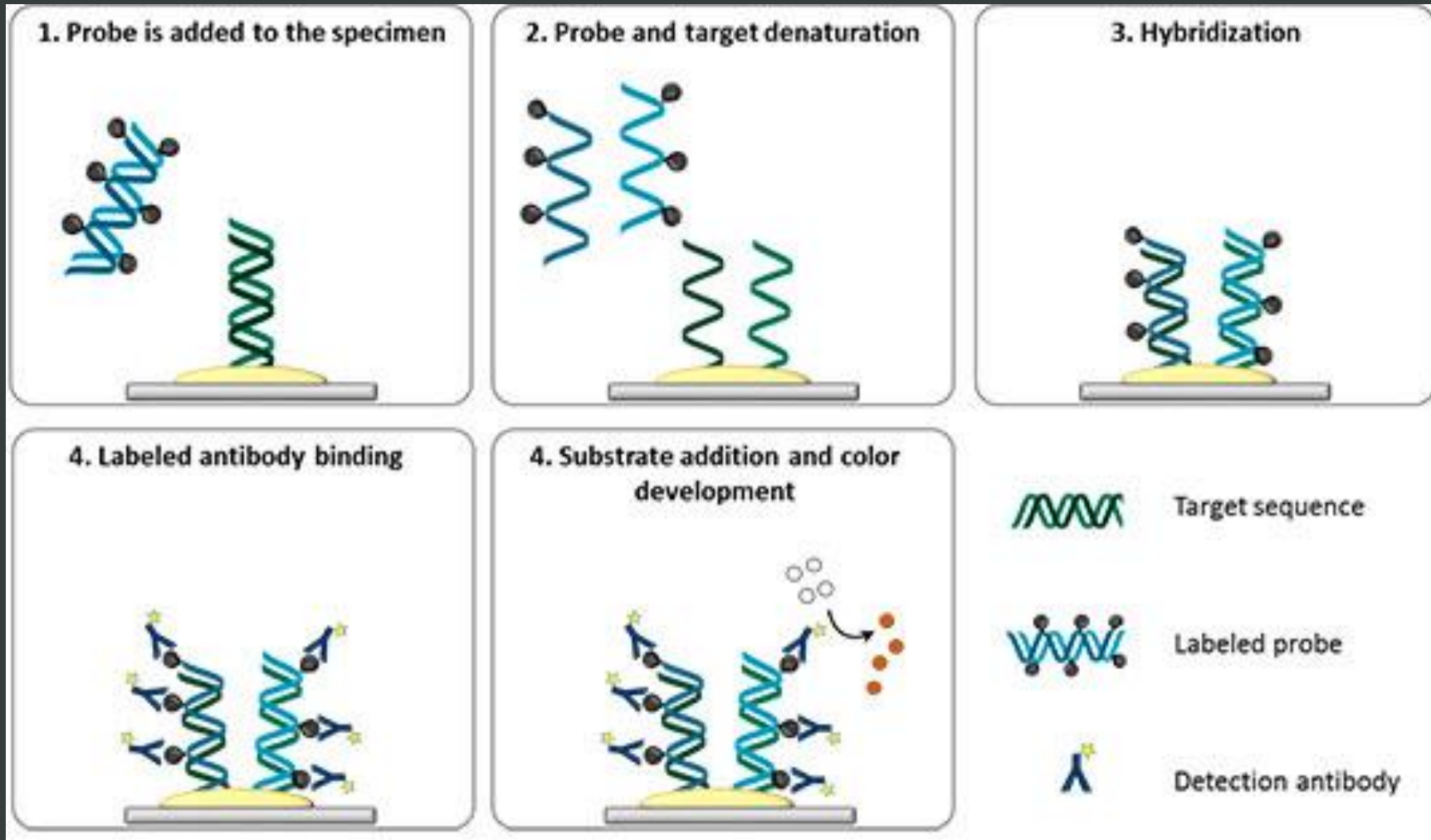


ΜΕΡΟΣ 2^ο
***In situ* υβριδισμός**

***In situ* υβριδισμός- Αρχή μεθόδου**

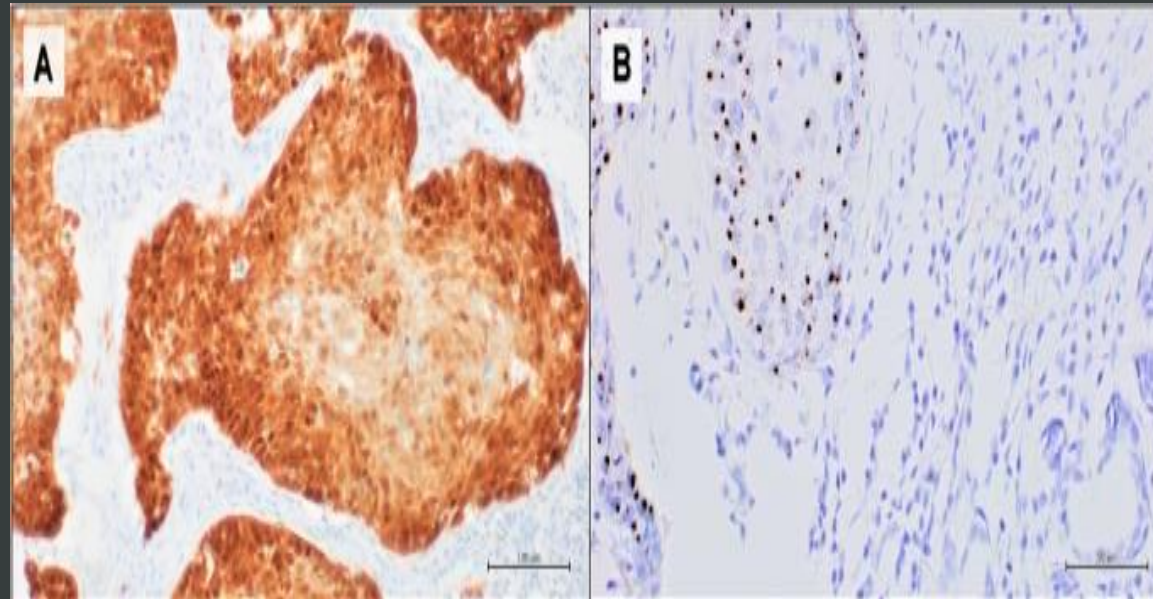
Η μέθοδος στηρίζεται στην θεμελιώδη ιδιότητα των νουκλειικών οξέων να σχηματίζουν σταθερά υβριδικά διμερή μόρια (Συμπληρωματικότητα βάσεων: A-T, G-C)

In situ υβριδισμός- Αρχή της μεθόδου



In situ υβριδισμός- Εφαρμογές

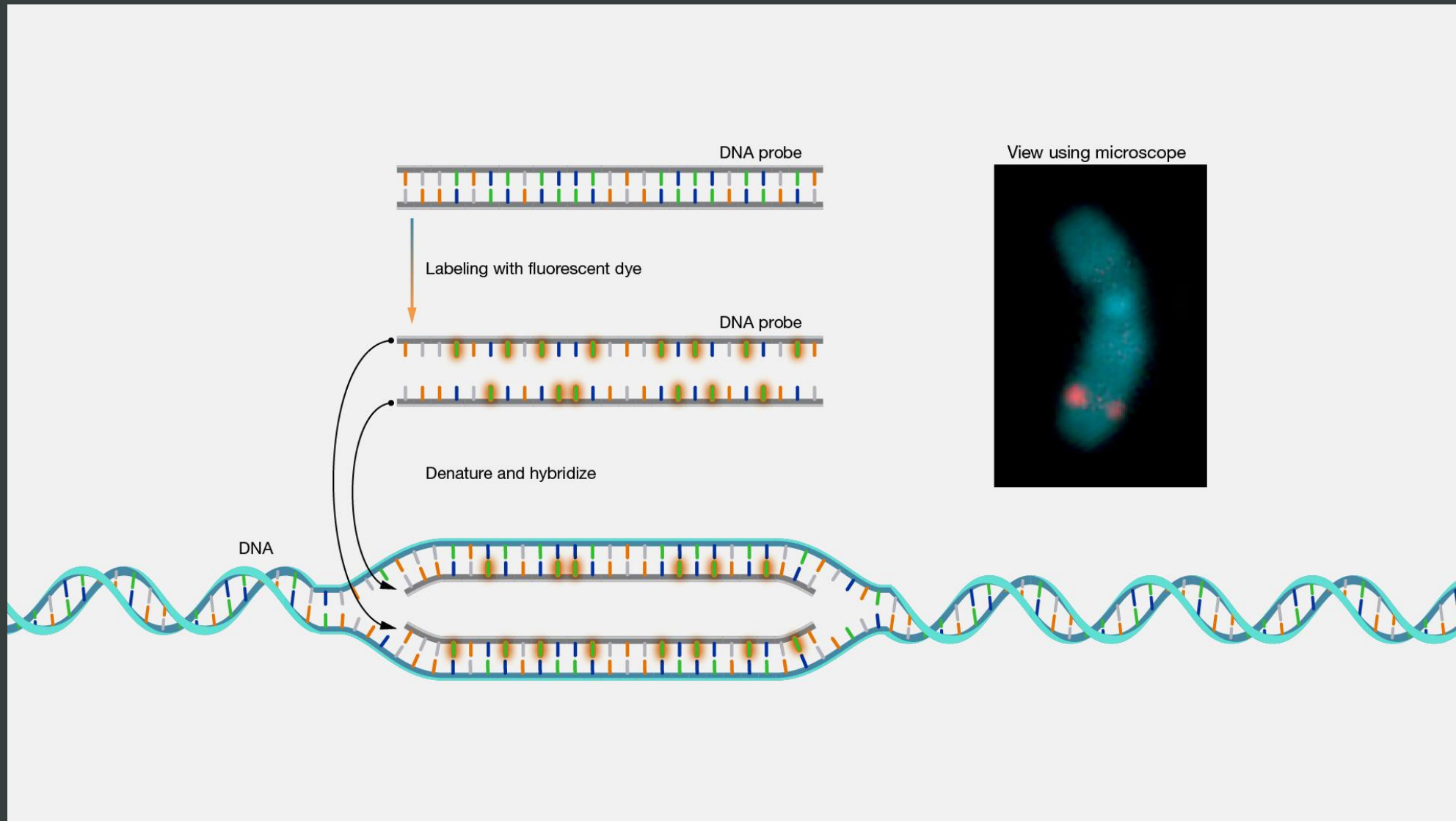
- Ανίχνευση ιών (HPV, HSV)
- Μεταβολές γονιδίων
- Προσδιορισμό δομικών και αριθμητικών χρωσωμικών ανωμαλιών



***Fluorescent In situ* υβριδισμός (FISH)- Αρχή της μεθόδου**

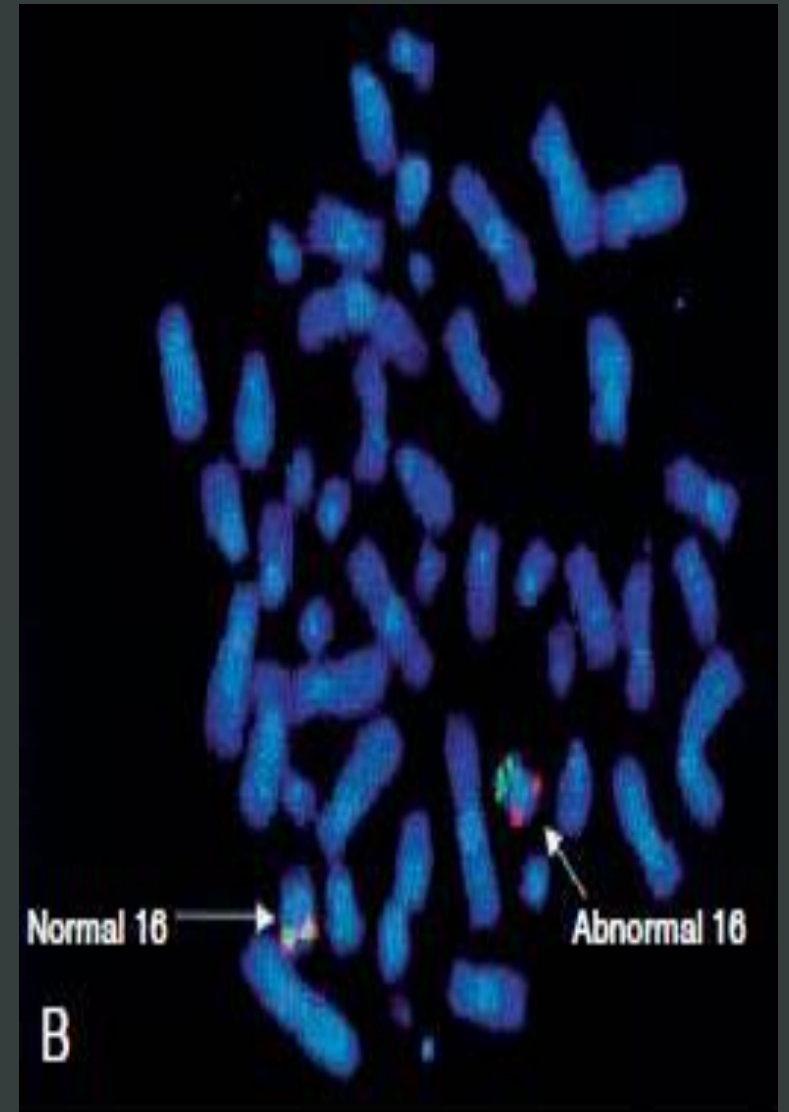
Κυτταρογενετική τεχνική για τον εντοπισμό ή την απουσία συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA /RNA στα χρωμοσώματα σε κύτταρα/ιστούς, χρησιμοποιώντας σημασμένους με φθορίζοντα μόρια ανιχνευτές.

Fluorescent In situ υβριδισμός (FISH)- Αρχή της μεθόδου



***Fluorescent In situ* υβριδισμός (FISH)-Εφαρμογές**

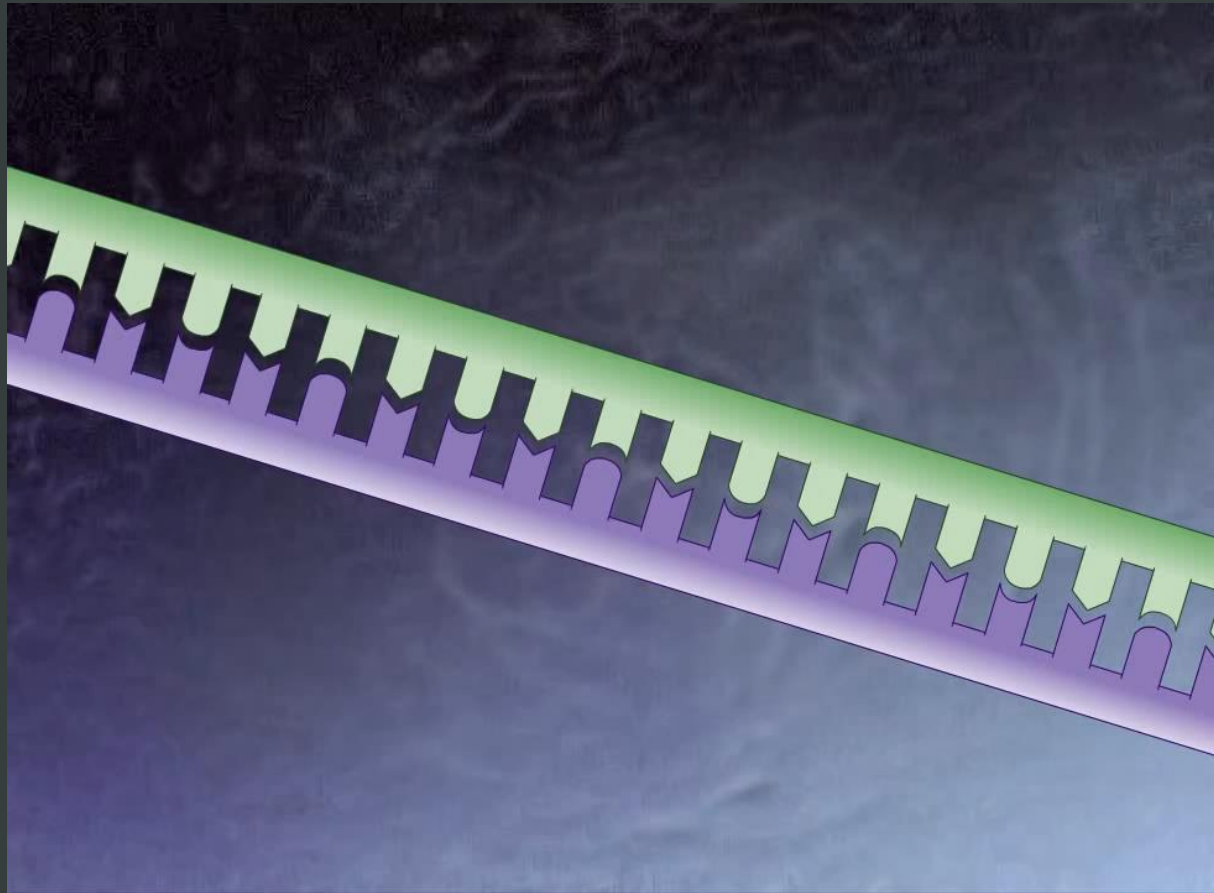
- Ανίχνευση χρωμοσωμικών μετατοπίσεων
- Ανίχνευση CMV, HSV, VZV (varicella-zoster virus)
- Υπότυποι του papilloma
- Ανίχνευση παθογόνων
- Ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο



ΜΕΡΟΣ 3^ο PCR

PCR- Αρχή της μεθόδου

- Με την PCR μπορούμε να πολλαπλασιάσουμε ένα ειδικό κομμάτι DNA εκατομμύρια φορές



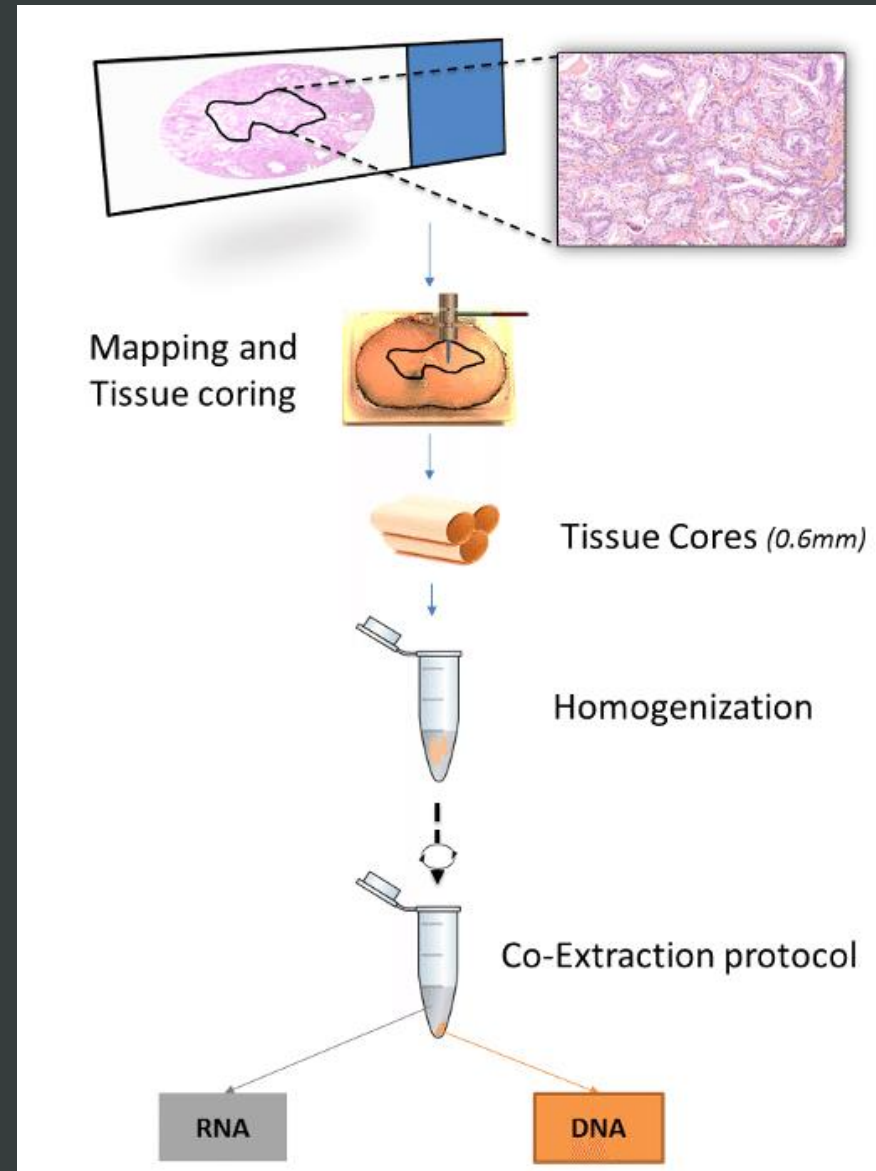
PCR- Αρχή της μεθόδου

- Με την PCR μπορούμε να πολλαπλασιάσουμε ένα ειδικό κομμάτι DNA εκατομμύρια φορές
- Σε κάποια είδη PCR, Real- Time PCR, μπορούμε να παρατηρούμε τον πολλαπλασιασμό σε πραγματικό χρόνο
- Επίσης η ευαισθησία της μας επιτρέπει να ανιχνεύουμε πολύ μικρές ποσότητες DNA

PCR- Εφαρμογές

1. **Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων**
2. **Διάγνωση ασθενειών**
3. **Έλεγχος τροφίμων**
4. **Έλεγχος των ζωικών και των φυτικών αναπαραγωγών**

PCR από δείγματα ιστών σε παραφίνη



PCR από δείγματα ιστών σε παραφίνη

The components of PCR reaction



thermocycler

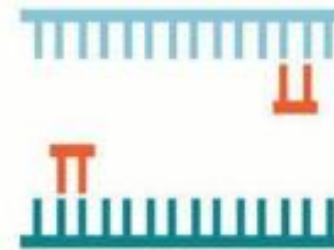


Steps of PCR reaction



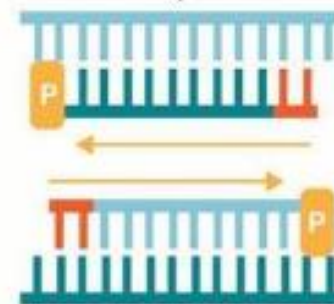
1 Denaturation

The heat breaks the hydrogen bonds of DNA template and separates into single strands



2 Annealing

DNA primers bind to the individual single strands



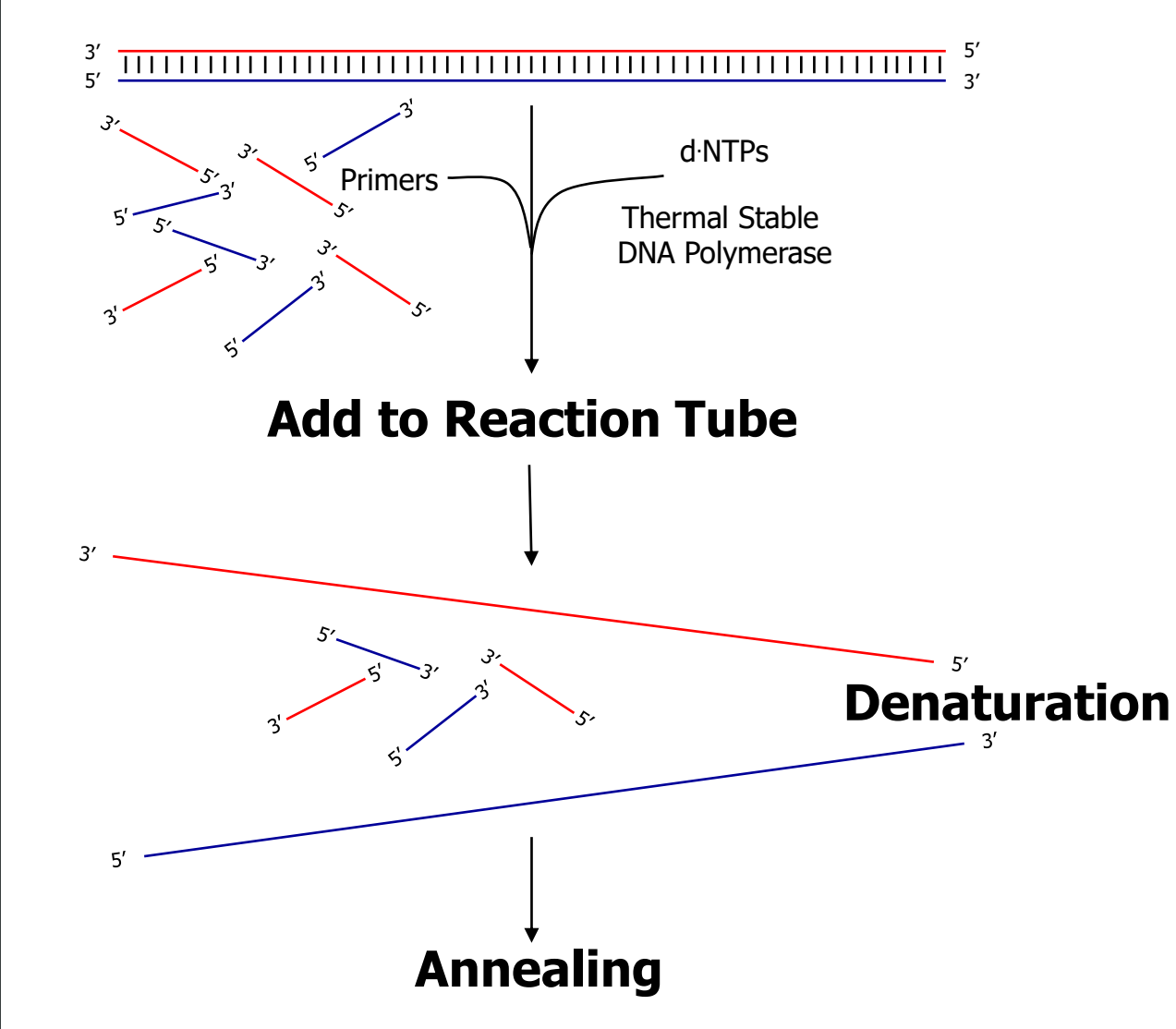
3 Extension

Taq polymerase insert nucleotides and extend the newly strand

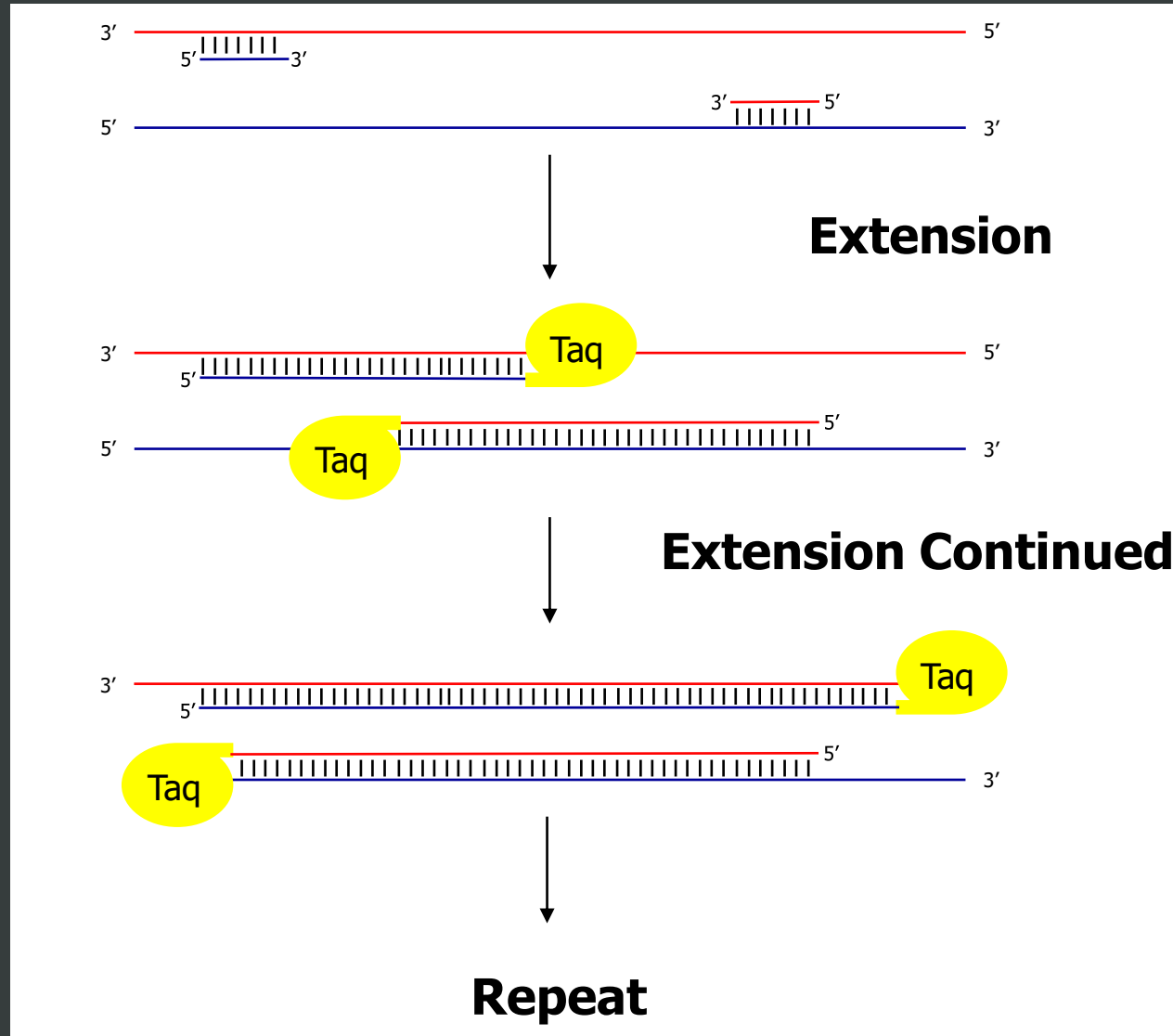
Παραλλαγές PCR

1. **RT- PCR (reverse transcription PCR): για ενίσχυση RNA**
2. **Multiplex PCR**
3. **Nested PCR**
4. **Rep-PCR**
5. **AFPL assay**
6. **RAPD**
7. **Real Time PCR**

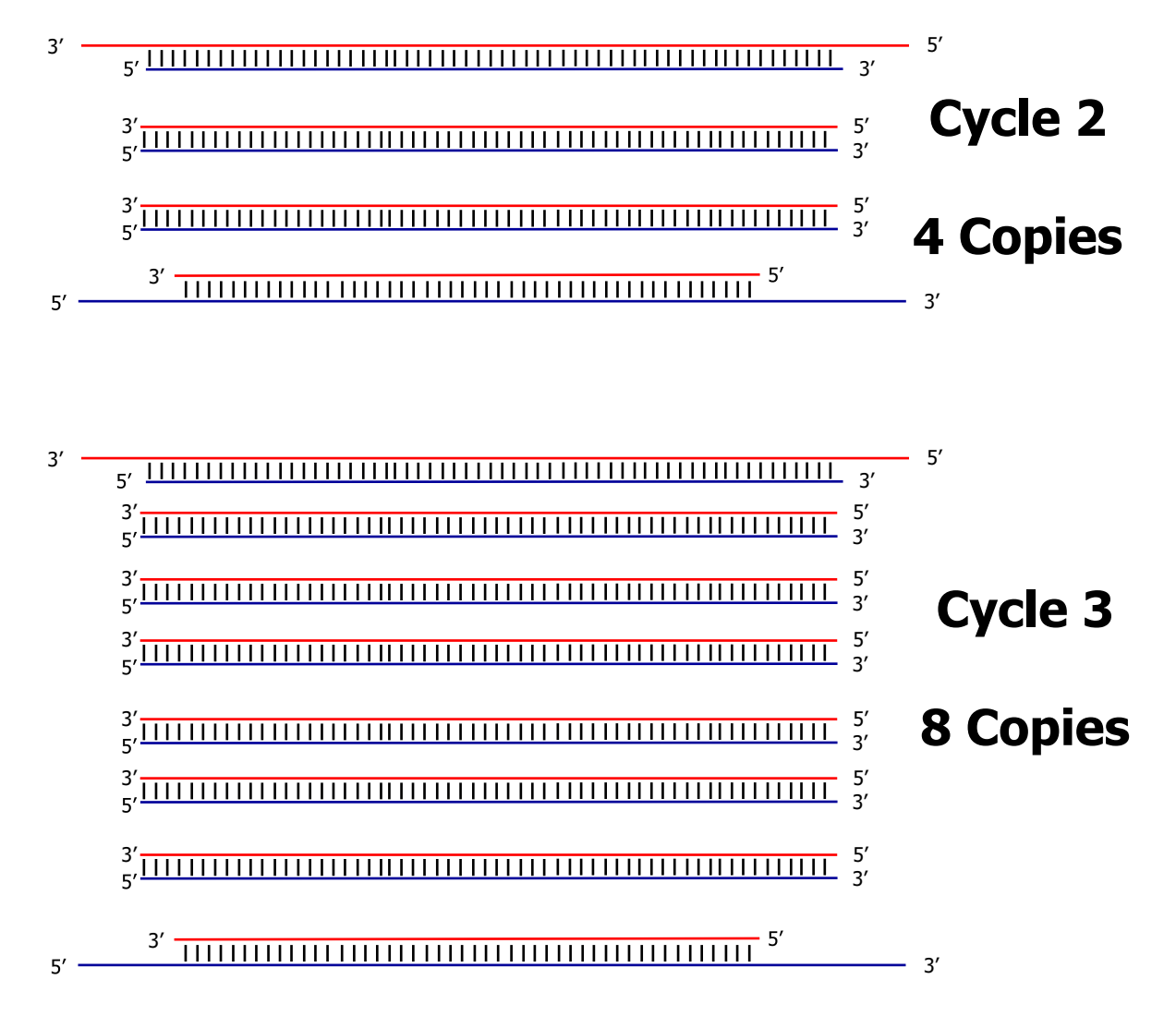
Real-time PCR



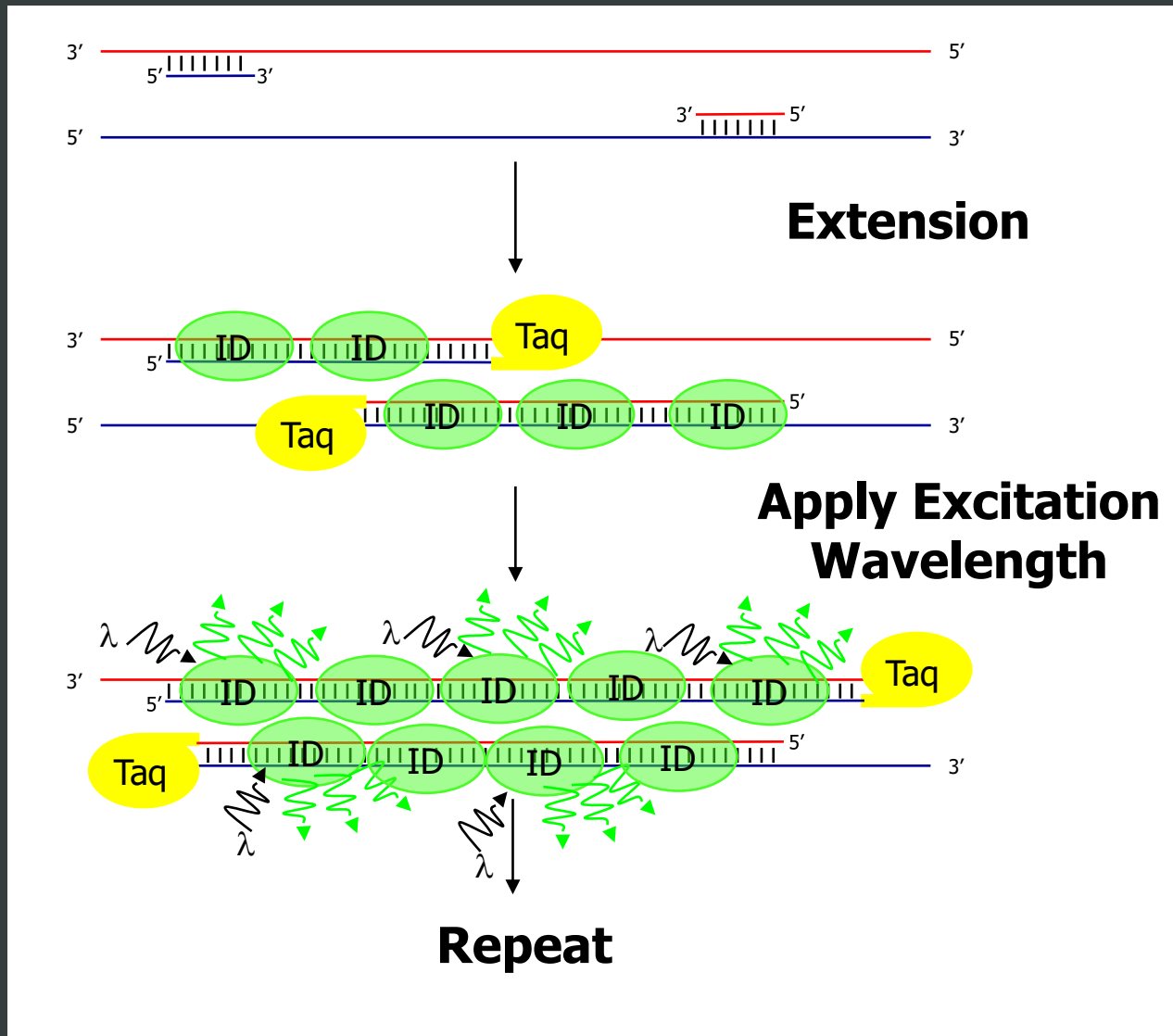
Real-time PCR



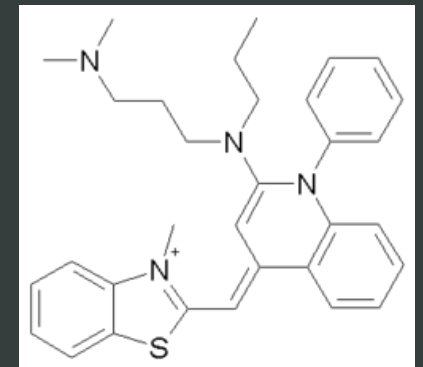
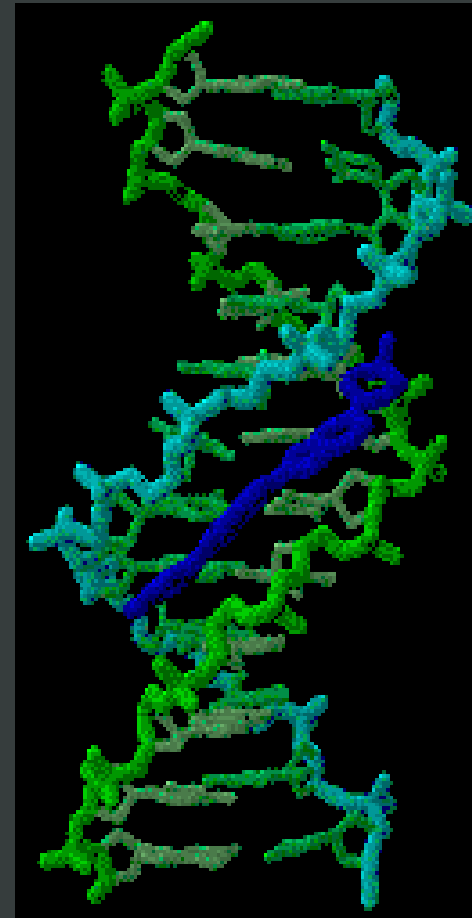
Real-time PCR



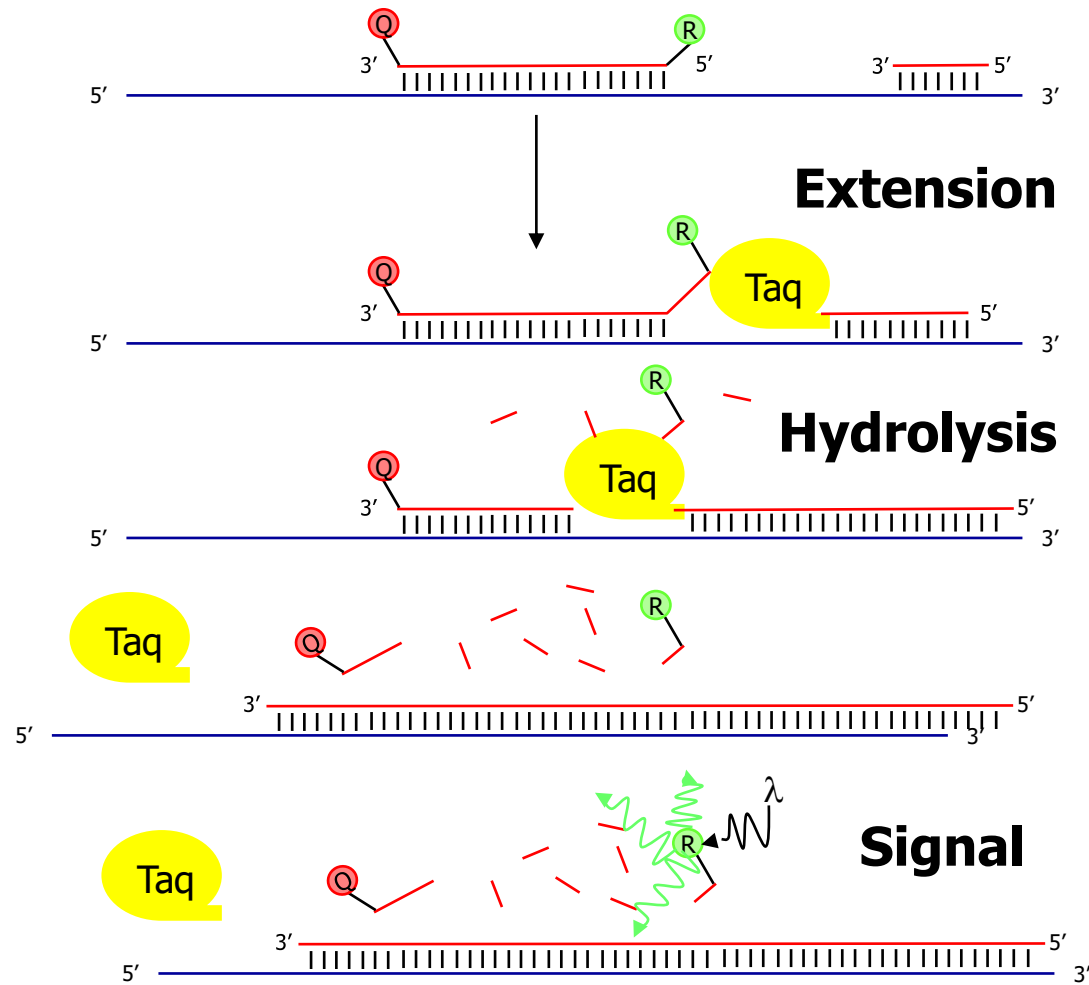
Real-time PCR



SYBR Green I



Real-time PCR



Ειδικό ανιχνευτές
(Probes)



ΜΕΡΟΣ 4^ο
Flow cytometry

Κυτταρομετρία ροής

Η Κυτταρομετρία ροής είναι

μία τεχνική για τη μέτρηση και

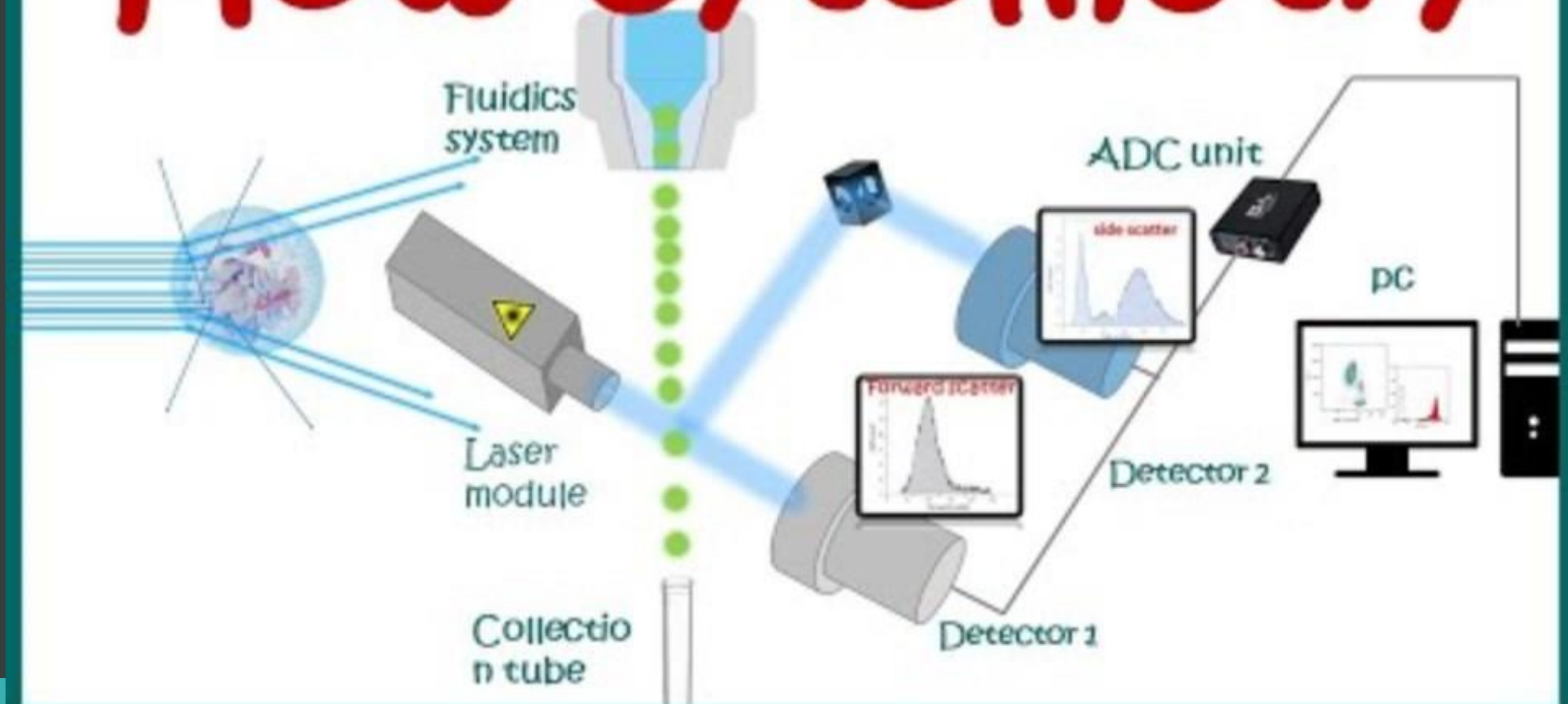
τον χαρακτηρισμό

μικροσκοπικών σωματιδίων σε

ρέον υγρό.

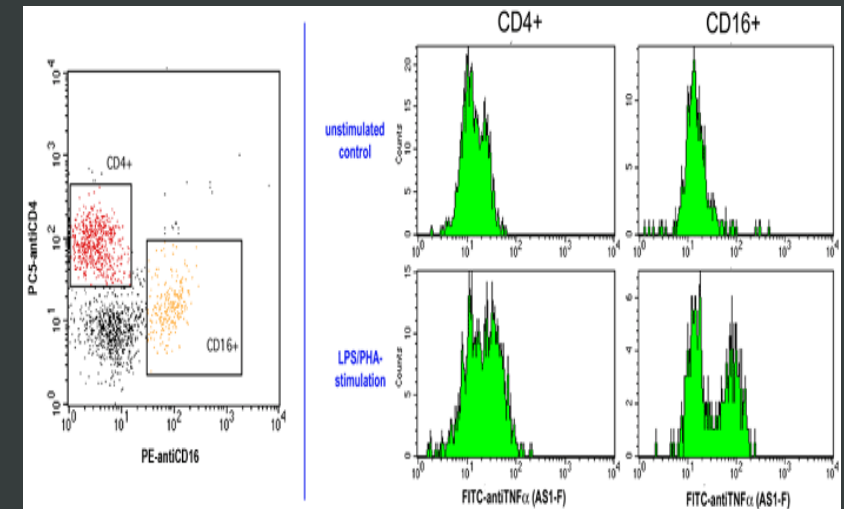
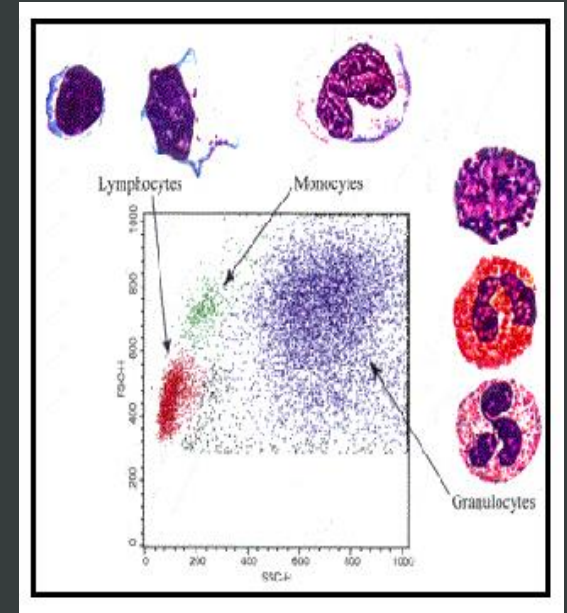


Flow Cytometry



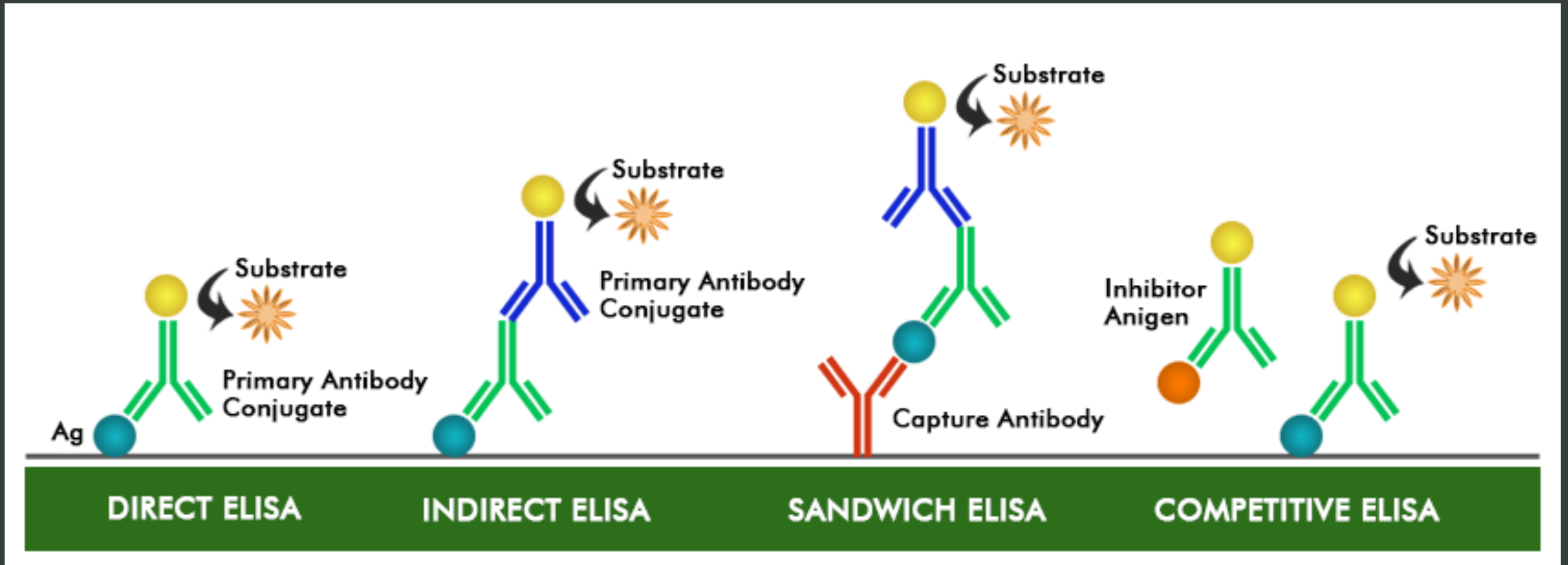
Κυτταρομετρία ροής

- Διερεύνηση χρόνιας λεμφοκυττάρωσης
- Διερεύνηση αναστροφής λευκοκυτταρικού τύπου
- Διερεύνηση εμμένουσας εωσινοφιλίας,
- Διερεύνηση πρωτοπαθών και δευτεροπαθών ανοσοανεπαρκειών
- Διερεύνηση καθ'έξιν αποβολών, πολλαπλών αυτόματων αποβολών

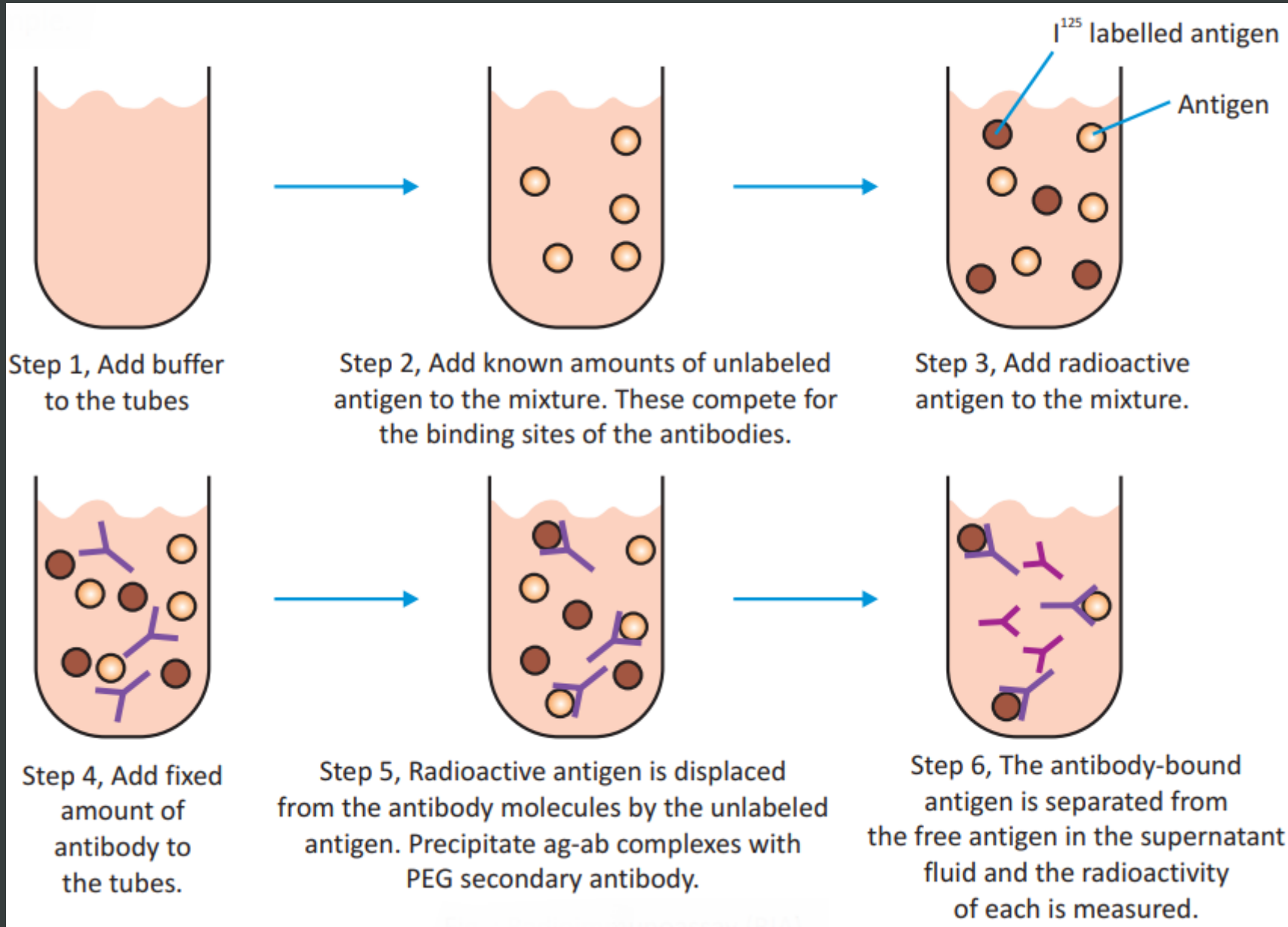


ΜΕΡΟΣ 4^ο
Άλλες πειραματικές τεχνικές

ELISA



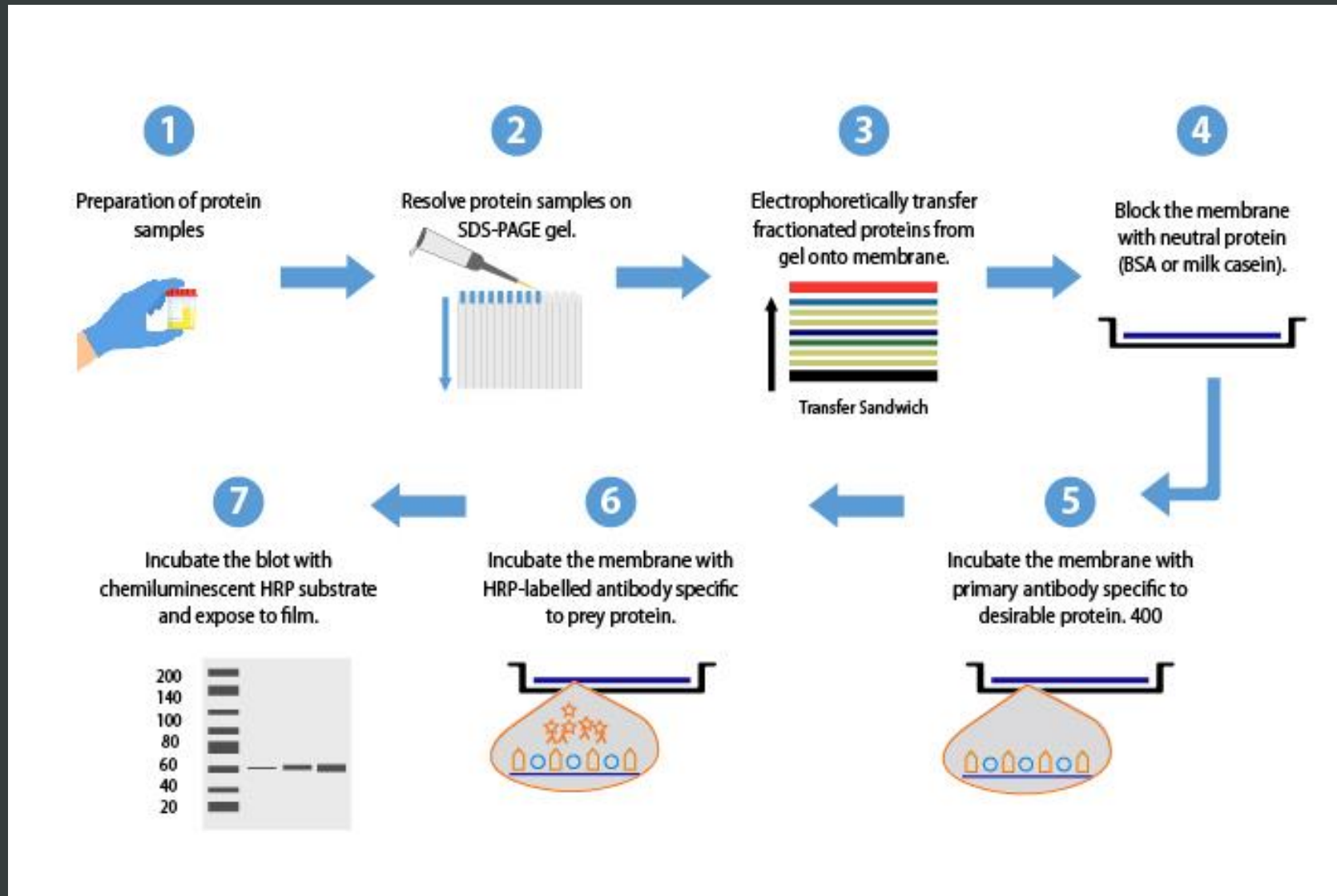
RIA



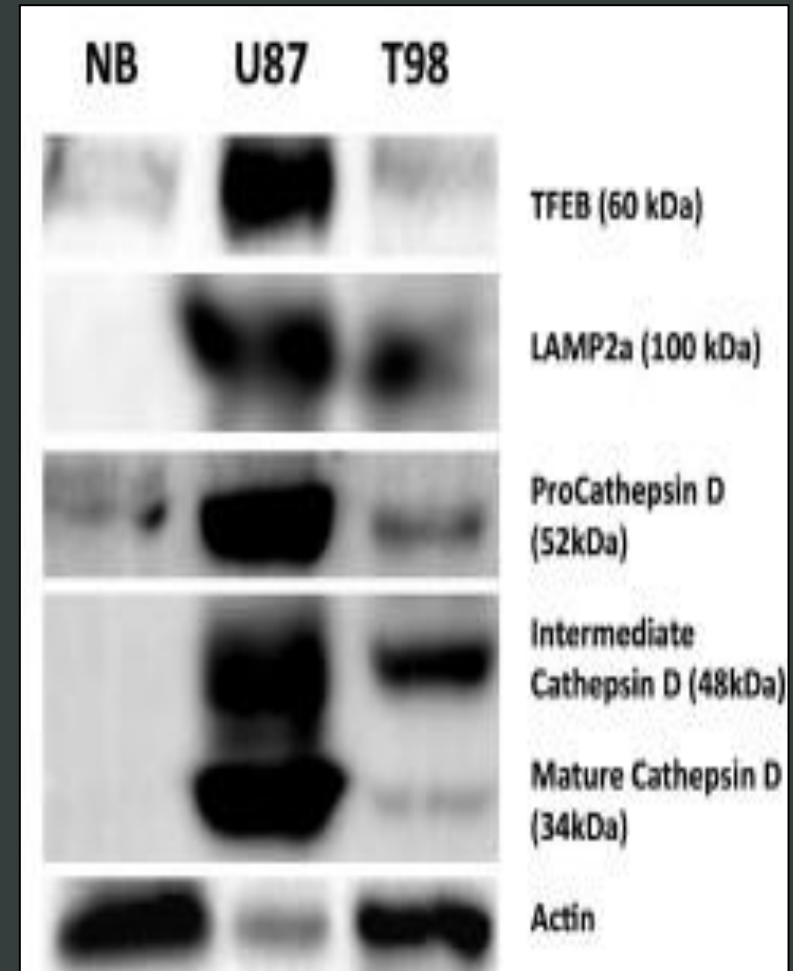
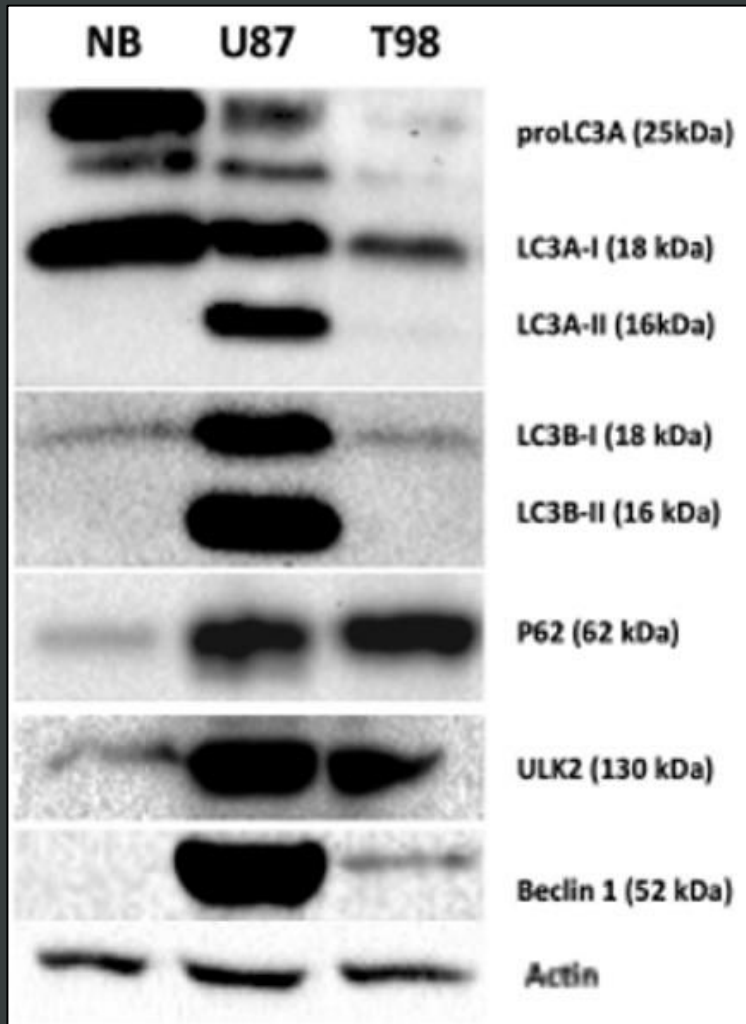
Western Blot analysis

- Ευρέως αποδεκτή αναλυτική μέθοδος για την ανίχνευση ειδικών πρωτεϊνών στο εξεταζόμενο ιστικό παρασκεύασμα, είτε ομογενοποιημένο, είτε εκχύλισμα.
- Χρησιμοποιείται gel ηλεκτροφόρησης για να διαχωρίσει τις φυσικές πρωτεΐνες από τις παθολογικές ανάλογα με το μήκος των πολυπεπτιδίων.
- Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη όπου βάφονται με αντισώματα ειδικά για τον πρωτεϊνικό στόχο

Αρχή της μεθόδου



Παραδείγματα Western Blot



Συμπεράσματα

- Μία τεράστια ποικιλία τεχνικών είναι διαθέσιμη
- Πρέπει να γίνεται σωστή επιλογή της τεχνικής με βάση το ερευνητικό/
διαγνωστικό ερώτημα
- Η απαίτηση κατάλληλου εξοπλισμού και προσωπικού κάνει αδύνατη την εφαρμογή όλων σε ένα μόνο εργαστήριο

Ευχαριστώ για την προσοχή σας !!!!

