

Cytometria przepływowa jako nowoczesna metoda w diagnostyce i prognozowaniu chorób

URSZULA LISIECKA, KRZYSZTOF KOSTRO, ŁUKASZ JAROSZ

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Lisiecka U., Kostro K., Jarosz Ł.

Flow cytometry as a novel method for diagnosis and prognosis of diseases

Summary

The article presents basic principles of flow cytometry (FCM), which is a highly advanced technology based on measuring physical and chemical parameters such as: light scatter at different angles and fluorescence. The essential principle of flow cytometry is identifying cell surfaces and intracellular antigens using specific monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes. Cells labeled with fluorochromes pass through the flow chamber and, when exposed to the laser beam, they emit and scatter light, causing alterations in the intensity of the light. Light scatter and fluorescence is measured at the same moment. Light signals are converted into digital signals by a photomultiplier system and analyzed by computer. Flow cytometer and computer software provide multiparameter qualitative and quantitative analysis of single cells in a quick, precise and repeatable manner.

Keywords: flow cytometry, disease diagnosis

Cytometria przepływowa (FCM-flow cytometry) jako metoda badawcza znana jest od ponad 30 lat, jednak dopiero w ostatnich 10 latach jest powszechnie stosowana nie tylko w laboratoriach naukowych, ale również stała się niezbędna w rutynowej diagnostyce klinicznej. Metoda ta jest wysoce zaawansowaną technologią opartą na pomiarze parametrów fizycznych i chemicznych, takich jak: ugięcie i rozproszenie światła oraz fluorescencja. Cytometr przepływowy wraz z oprogramowaniem komputerowym zapewnia wieloparametrową ocenę ilościową oraz jakościową pojedynczych komórek w sposób szybki, precyzyjny i powtarzalny. Ogólna zasada cytometrii przepływowej polega na identyfikowaniu antygenów powierzchniowych lub wewnątrzkomórkowych przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z fluorochromami. Znakowane fluorochromami komórki przepływając przez komorę pomiarową, są naświetlane wiązką laserową, a następnie rozpraszają i emitują światło, powodując zmiany jego natężenia. Mierzone jest jednocześnie rozproszenie światła oraz wzbudzone światło emitowane przez fluorochromy. Impulsy świetlne przetwarzane są na impulsy elektryczne w systemie fotonowielaczy, a następnie analizowane za pomocą komputera (1, 4, 10, 12).

Cytometria przepływowa jest metodą badawczą umożliwiającą dokonanie charakterystyki populacji pojedynczych komórek w zawieszynie. Mogą to być komórki krwi, komórki niezwiązane z podłożem w płynach tkankowych lub komórki tkanek i narządów celowo uwolnione z otaczającej je substancji międzykomórkowej. Główną za-

letą cytometrii przepływowej jest prowadzenie badań z wykorzystaniem niewielkich próbek materiału i dość często bez ich wstępnej obróbki, a także możliwość jednoczesnego identyfikowania cytoplazmatycznych i powierzchniowych markerów komórkowych. Podstawowe właściwości komórek, które mogą być określone przy użyciu cytometrii przepływowej to m.in.: ich wielkość, molekularna złożoność budowy, zawartość DNA i RNA, ekspresja określonych białek powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych (1, 5, 8, 11).

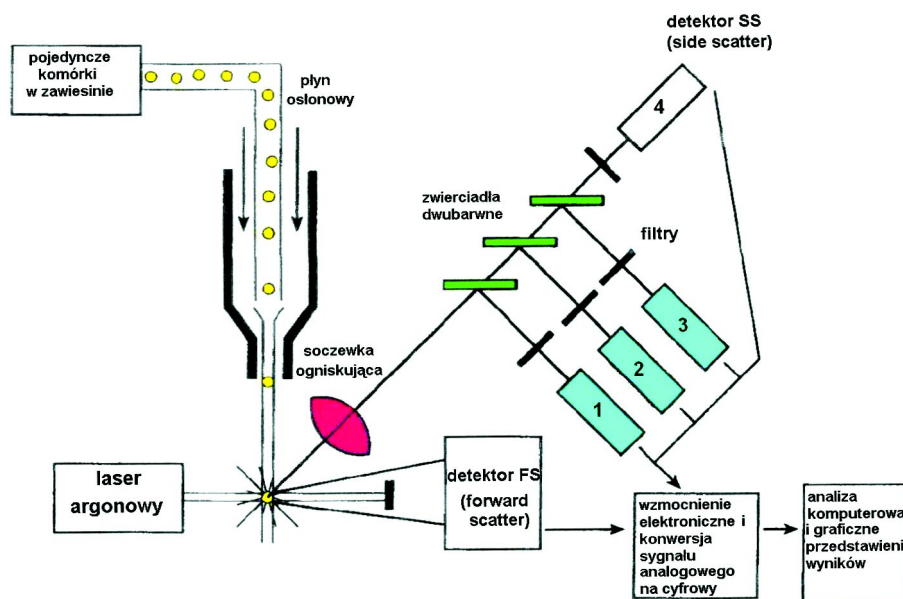
Budowa i zasady działania cytometru

Cytometr przepływowy jest złożonym aparatem pomiarowym, w którym można wyróżnić trzy główne układy, takie jak: hydrauliczny, optyczny i elektroniczny. Układ hydrauliczny dostarcza zawieszinę badanych komórek do komory pomiarowej. W czasie przechodzenia przez komorę zawieszina komórek otoczona jest izotonicznym płynem osłonowym (sheath fluid) i przepływa równomiernie, co zapobiega zlepianiu się komórek (1, 8). Konstrukcja cytometru zapewnia laminarny przepływ komórek i ich dostatecznie niskie stężenie, tak, aby przepływały one pojedynczo, dokładnie w środku kanału. Na komórki przepływające przez komorę pada prostopadle do kierunku ich przepływu wiązka światła (ryc. 1). Najczęściej stosowane źródło światła to lasery emitujące fale świetlne o określonej długości, np. argonowy (488 nm), kryptonowy lub helowo-neonowy (4, 8, 10). W pierwszych cytometrach (np. ICP, Phywe) wiązkę światła produkowały lampy rtęciowe, które obecnie są rzadko

stosowane. Używa się także cytometrów posiadających więcej niż jedno źródło światła. Podczas przepływu przez komorę pomiarową pojedyncze komórki przecinają wiązkę lasera, a emitowane przez nie sygnały fluorescencyjne są odbierane przez detektory FS, SS oraz detektory fluorescencji (ryc. 1). Sygnały te są wzmacniane i przekształcane na cyfrowe, a następnie przedstawiane na ekranie komputera. Komórki przecinając wiązkę lasera, powodują ugięcie i rozproszenie jego promieni w różnych kierunkach (6, 10).

Emitowane światło ugina się na brzegach badanej komórki w kierunku biegu promieni (FS-forward angle light scatter), dzięki czemu można oznaczyć jej wielkość (ryc. 2). Ugięcie światła lasera pod kątem prostym na błonie komórkowej i strukturach wewnątrzkomórkowych (SS-side scatter, RS-right-angle scatter) umożliwia wykrycie ziarnistości komórki (ryc. 3) (7).

Jeżeli komórki zostały wcześniej wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi, mierzona jest także intensywność fluorescencji związanej z komórką (6, 8). Światło lasera powoduje przesunięcie elektronów na bardziej zewnętrznej orbicie atomu, o mniejszej energii (większej długości fali w porównaniu z długością fali źródła światła). Fluorescencja o określonej długości fali pojawia się na skutek powrotu elektronów na pierwotną orbitę. Je-



Ryc. 1. Schemat budowy cytometru przepływowego (wg Brown i Wittwer)

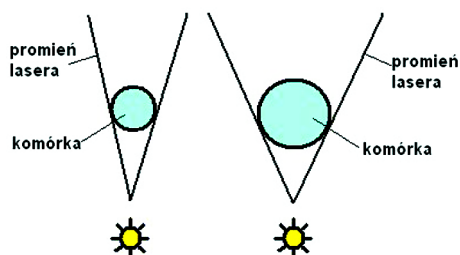
Objaśnienia: 1 – detektor światła rozproszonego pod kątem 90° (SS), 2-4 – detektory fluorescencji

żeli źródłem światła jest laser argonowy, tak jak w większości cytometrów, wiązki używane do znakowania fluorescencyjnego (fluorochromy) powinny posiadać maksima absorpcji w tym zakresie fali (7, 10).

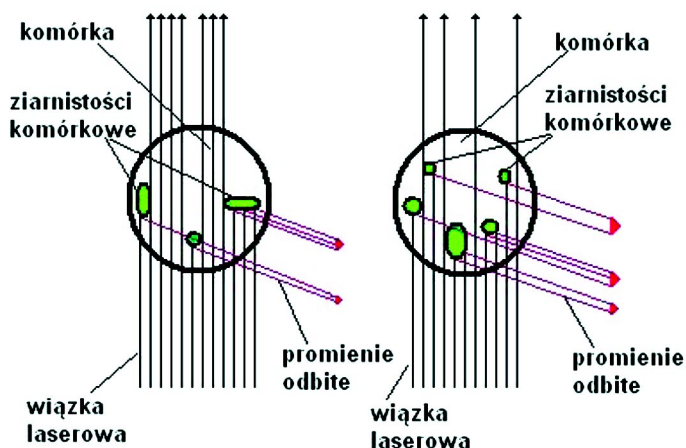
Światło o różnych długościach fali zostaje rozdzielone za pomocą specjalnych filtrów, a następnie skierowane do czujników (detektorów), które są częścią układu elektronicznego. Te czujniki to w większości fotopowielacze (PMTs-photomultiplier tubes). Fotopowielacz przekształca falę świetlną w impuls elektryczny. Impuls ten jest wzmacniany na różne sposoby w celu uzyskania bardziej czytelnych wyników. Zastosowanie wzmacnienia często jest powodem powstawania dodatkowych impulsów, które pochodzą zwykle z zanieczyszczeń. Celem wyeliminowania tych sygnałów można ustawić minimalną wysokość impulsu dla jednego z sygnałów, tak zwany dyskryminator. Ustawianie wartości progowej (dyskryminatora) pozwala operatorowi ustawić numer (poziom) kanału, poniżej którego informacje nie będą przetwarzane. Dyskryminator dla FS może być użyty do wyeliminowania zanieczyszczeń z analizy. Użycie dyskryminatora na wykresie intensywności fluorescencji eliminuje słabą, niespecyficzną fluorescencję. Zastosowanie dyskryminatora często znacznie poprawia otrzymane rezultaty (8). Impulsy emitowane przez cząsteczki, które znajdują się powyżej poziomu dyskryminatora zostają skonwertowane w wartości numeryczne zwane kanałami, których liczba określa rozdzielczość cytometru. Dzięki temu wszystkie zmierzone parametry komórki (FS, SS, intensywność fluorescencji w każdym zakresie widma) mogą zostać zarejestrowane w pamięci komputera.

Przygotowanie próbek do analizy cytometrycznej

Techniką cytometrii przepływowej bada się jedynie komórki, które znajdują się w zawieszynie. Dlatego też najdogodniejszym materiałem do badań są komórki krwi,



Ryc. 2. Schemat rozpraszania światła do przodu (FS) przez badane komórki



Ryc. 3. Schemat rozpraszania światła w bok (SS) przez badane komórki

płynów ustrojowych oraz niektórych linii komórkowych stosowanych w badaniach *in vitro*. W przypadku konieczności analizy komórek zawartych w tkankach litych pobrany materiał biologiczny należy dokładnie rozdrobnić, tak żeby uzyskać pojedyncze i nieuszkodzone komórki (2, 3). Kolejnym ważnym etapem jest właściwe przygotowanie próby do analizy cytometrycznej, szczególnie gdy oceniane są funkcje komórkowe. Procedura pobrania i przygotowania próby jest zależna od typu komórek i sposobu ich analizy. Krew do analizy cytometrycznej należy pobrać do probówek zawierających antykoagulanty, takie jak: EDTA, cytrynian sodowy lub sole heparyny. W cytometrii przepływowej najbardziej miarodajne wyniki uzyskuje się, badając materiał biologiczny bezpośrednio po pobraniu. Niekiedy istnieje konieczność przechowania pobranych próbek przez krótki czas. Wówczas w celu otrzymania obiektywnych wyników badaną próbę należy przechowywać tak, aby komórki nie uległy degeneracji, ponieważ komórki martwe lub uszkodzone mają zmienione właściwości i inaczej rozpraszają światło, czego efektem jest zmiana parametrów FS i SS. Ponadto takie komórki mogą niespecyficznie wiązać przeciwciała monoklonalne i być przyczyną otrzymania fałszywych wyników. Celem uniknięcia takich problemów, krew należy przechowywać w temperaturze 4°C i badać w ciągu 4 godzin po pobraniu lub po odpowiednim jej utrwaleniu dokonać analizy w ciągu kilku dni (1, 3).

Wymagana do analizy objętość krwi wynosi zazwyczaj 100 µl, a sposób jej przygotowania do oznaczenia antygenów powierzchniowych lub wewnątrzkomórkowych dla określonych populacji leukocytów jest podobny. W tym celu komórki inkubuje się przez 30-60 minut ze znakowanym fluorochromem przeciwciałem monoklonalnym w ilości 10-20 µl, skierowanym przeciwko interesującemu nas antygenowi komórkowemu. Niekiedy komórki po inkubacji płucze się, w celu pozbycia się nadmiaru niezwiązanego z komórkami przeciwciała. Z reguły odplukiwanie nadmiaru przeciwciała jest zbędne, gdyż cytometr rejestruje jedynie fluorescencję związaną z komórką. Skraca to czas przygotowania próbki do analizy cytometrycznej.

W celu zidentyfikowania badanych komórek stosuje się odpowiednie związki znakowane fluorochromami, albo same barwniki fluorescencyjne. Przy oznaczaniu antygenów powierzchniowych lub badaniu metabolizmu komórek, można używać materiału nie utrwalonego. Natomiast, aby oznaczyć zawartość DNA lub białek cytoplazmatycznych w komórce wówczas należy ją utwalić przy użyciu m.in. paraformaldehydu, prostaglandyny E₁ lub obniżenia pH do 6,5 (1, 8). Jednakże utrwalenie komórek może wpływać w sposób zasadniczy na wiązanie się ich antygenów z określonym przeciwciałem, a tym samym prowadzić do uzyskania niemiarodajnych wyników.

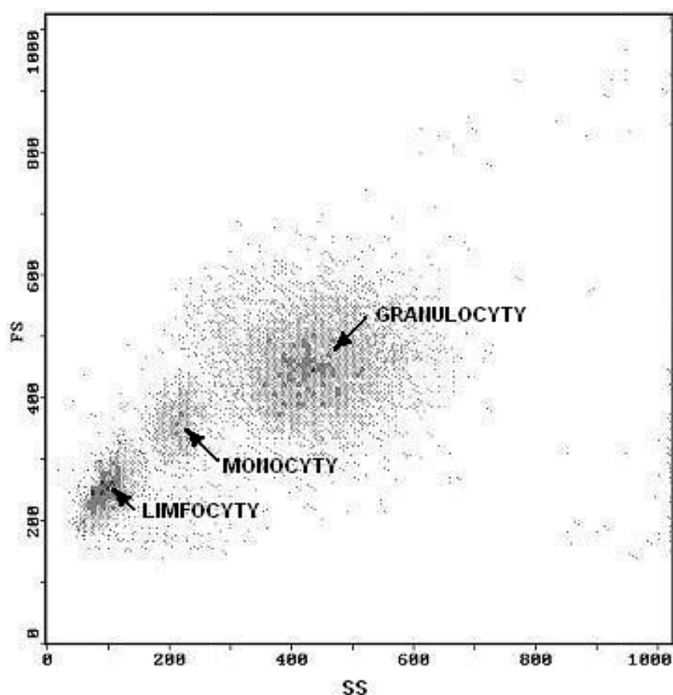
W cytometrii przepływowej ważne jest właściwe dobranie przeciwciał, odpowiednich warunków inkubacji oraz rodzaju stosowanego barwnika fluorescencyjnego. Warunki inkubacji mają wpływ na żywotność komórek, zapoczątkowanie reakcji antygen–przeciwciało oraz in-

tensywność fluorescencji związanej z komórką. Na przykład, izotiocyanian fluoresceiny osiąga najwyższą fluorescencję w pH obojętnym, natomiast minimalną w pH kwaśnym. Ustawienia fluorescencji są zwykle przystosowywane do każdej grupy próbek dzięki zastosowaniu kontroli negatywnej – komórek inkubowanych z kontrolnym przeciwciałem monoklonalnym. Intensywność fluorescencji komórek kontroli negatywnej nie jest równa zeru z powodu niespecyficznego wiązania przeciwciał przez te komórki oraz występowania zjawiska autofluorescencji.

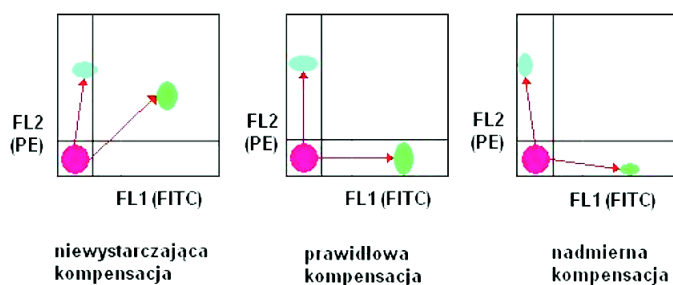
Dobór odpowiedniego barwnika zależy od tego, jakie składniki komórki są poddane analizie cytometrycznej (4). Powszechnie stosowanym barwnikiem jest izotiocyanian fluoresceiny wykazujący bardzo dużą stabilność przy przechowywaniu w 4°C. Często stosuje się także jodek propidyny lub fikoerytrynę (1). Obecnie na rynku dostępnych jest wiele innych barwników fluorescencyjnych. Dzięki wprowadzeniu przeciwciał monoklonalnych do diagnostyki można wyodrębnić szereg subpopulacji komórkowych poprzez uwidocznienie pojedynczych epitopów antygenowych. Sygnały fluorescencji są proporcjonalne do ilości barwnika fluorescencyjnego, a ich cecha charakterystyczna to wysoka czułość i niskie tło. Dzięki zarejestrowaniu ilości światła emitowanego przez wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym komórki możemy ocenić ilość poszczególnych typów białek (receptorów) na powierzchni komórki. Do znakowania komórek można zastosować metodę bezpośrednią lub pośrednią. Metoda bezpośrednia polega na znakowaniu komórek przeciwciałem sprzężonym z fluorochromem. Pozwala ona na zastosowanie jednocześnie dwu lub więcej przeciwciał znakowanych różnymi barwnikami. W metodzie pośredniej, którą stosuje się w przypadku niskiego stężenia antygeny na powierzchni komórek, inkubuje się komórki początkowo z przeciwciałem nie sprzężonym z fluorochromem, a następnie ze znacznikiem lub innym przeciwciałem skierowanym przeciw pierwszemu. Reakcja pierwszego przeciwciała, związanego wcześniej z komórką z przeciwciałem dodanym później pozwala na wykrycie badanego białka na powierzchni komórki. Metodę fluorescencji pośredniej stosuje się, gdy ilość epitopów na powierzchni komórek jest mała. Wysoką czułość można również osiągnąć, stosując pierwsze przeciwciało znakowane biotyliną, a następnie dodając streptawidyny lub awidyny sprzężonej z fluorochromem (8, 13).

Przedstawienie uzyskanych wyników

Wyniki pomiarów uzyskane w cytometrze przepływowym można przedstawić w postaci dokładnych danych liczbowych o każdej z mierzonych populacji komórek, jak również w formie wykresów dwu- lub trójwymiarowych (1, 9). Najczęściej wyniki są prezentowane na monitorze w postaci cytogramów lub histogramów. Cytogramem nazywany jest wykres, na którym badane komórki są odzwierciedlone w postaci kropek, których położenie w układzie współrzędnych jest proporcjonalne do wielkości mierzonego parametru (8). Wszystkie komórki, które mają taki sam model rozpraszania światła



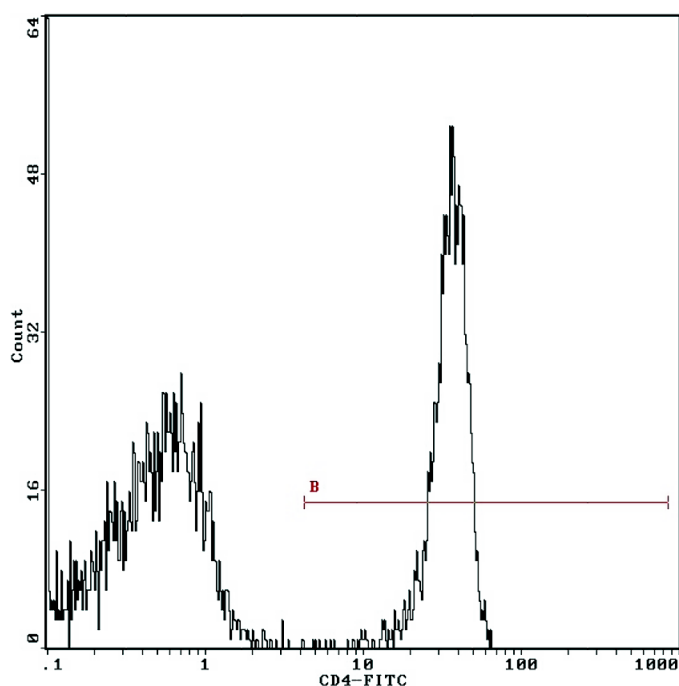
Ryc. 4. Przykładowy cytogram leukocytów krwi obwodowej człowieka



Ryc. 6. Schemat przedstawiający nieprawidłowe i prawidłowe zastosowanie kompensacji w analizie cytometrycznej (wg Owens i Loken)

ła, ukazują się na cytogramie jako pojedyncza kropka. Jedna kropka może zatem reprezentować pojedynczą komórkę lub kilka tysięcy komórek (ryc. 4).

Jeżeli komórki są wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym, intensywność ich fluorescencji jest ukazywana na oddzielnym wykresie. Do wizualizacji danych związanych z fluorescencją komórek zazwyczaj używane są wykresy zwane histogramami (1, 9). Umożliwiają one przedstawienie wybranych wyników w formie dwu- lub trójwymiarowej (ryc. 5). Jeśli w badanej próbie oznacza się więcej niż jeden antygen, wówczas używa się dwu lub więcej przeciwciał monoklonalnych wyznakowanych różnymi barwnikami. Sygnały emitowane przez te barwniki mogą zachodzić na siebie, dlatego też należy stosować kompensację przy użyciu cytogramu, na którego pierwszej osi znajduje się intensywność fluorescencji fluorochromu 1 (FL1), a na drugiej osi intensywność fluorescencji fluorochromu 2 (FL2). Na przykład, po wyznakowaniu komórek równocześnie fluoresceiną (FITC) (maksimum emisji 530 nm) i fikoerytryną (PE) (maksimum emisji 575 nm), komórki znakowane fluoresceiną są dostosowywane pod względem fluorescencji FL2 do komórek kontroli negatywnej



Ryc. 5. Histogram przedstawiający intensywność fluorescencji limfocytów znakowanych przeciwciałem przeciwko antygenowi CD4. Na osi Y znajduje się liczba komórek, które przełyknęły przez układ pomiarowy, a na osi X intensywność fluorescencji. Komórki posiadające antygen CD4 zostały ujęte w bramce B

(ryc. 6). Z kolei komórki znakowane fikoerytryną dostosowuje się pod względem fluorescencji FL1. Zastosowanie zbyt niskiej kompensacji prowadzi do przyporządkowania części sygnału jednego z barwników drugiemu barwnikowi. Zbyt wysoka kompensacja sprawia, że wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi komórki znajdują się poza skalą cytometru.

Piśmiennictwo

- Brown M., Wittwer C.: Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin. Chem. 2000, 46, 1221-1229.
- Iwaskiewicz-Pawłowska A., Hołownia A.: Cytometria przepływowa – przydatność diagnostyczna, lecznicza i rokownicza w litych guzach. Pol. Mer. Lek. 1999, 6, 104-106.
- Judson P. L., Van Lee L.: Flow cytometry. Oncol. Update 1997, 4, 87-91.
- Kawiak J., Skierski J. S.: Cytometria przepływowa w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie. Post. Biol. Kom. 1992, 3, 239-254.
- Leary J. F., Todd P., Wood J. C. S., Jett J. H.: Laser flow cytometric light scatter and fluorescence pulse width and pulse rise – time sizing of mammalian cells. J. Histochem. Cytochem. 1979, 27, 315-320.
- Mandy F. F., Bergeron M., Minkus T.: Principles of flow cytometry. Transfus. Sci. 1995, 16, 303-314.
- Nunez R.: Flow cytometry: principles and instrumentation. Curr. Issues Mol. Biol. 2001, 3, 39-45.
- Owens M. A., Loken M. R.: Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Quality assurance for quantitative immunophenotyping. Wiley-Liss, Inc. 1995.
- Radcliff G., Jaroszewski M. J.: Basics of flow cytometry. Methods Mol. Biol. 1998, 91, 1-24.
- Rytwiński K., Wnuk A.: Cytometria przepływowa, zasady działania, zastosowanie – ze szczególnym uwzględnieniem pediatrii. Medycyna Wieku Rozwojowego 1999, 2, 281-290.
- Trzcinka M.: Apoptoza – mechanizmy molekularne procesu i wybrane metody wykrywania w aspekcie biologii rozrodu. Biotechnol. 2003, 1, 93-105.
- Weiss D. J.: Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. Vet. Clin. Pathol. 2002, 31, 72-74.
- Zeman K.: Wykorzystanie cytometrii przepływowej do badań granulocytów obojętnochnłonnych. Mat. I Konf. szkoleniowej: Przeciwciała monoklonalne w immunologii i diagnostyce. Puławy 1995, s. 99-117.

Adres autora: mgr Urszula Lisiecka, ul. Krasińskiego 12/100, 20-709 Lublin; e-mail: ula.lisiecka@op.pl