

Průtoková cytometrie

L. Roubalová

Metoda průtokové cytometrie je v současné době považována za standardní metodu analýzy částic v suspenzi. Umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu fyzikálních (optických) a chemických (fluorescenčních) vlastností částic.

První pokusy o studium buněk (částic) datujeme do 17. století, kdy byl sestrojen mikroskop a byla objevena první buňka. Dalšíh 200 let spočívala analýza buněk pouze v jejich morfologii. První prototyp průtokového cytometru byl sestrojen v roce 1934 Andrew Moldavanem [2]. Analyzátor, který umožňoval kvantifikovat fyzikální a chemické vlastnosti buněk a rovněž obsahoval první sorter pro výběr jednotlivých typů částic, byl sestrojen až v šedesátých letech. V sedmdesátých letech se objevily první komerčně vyráběné průtokové cytometry, ale byly příliš drahé a příliš náročné na obsluhu, takže byly určeny pouze pro vědecké účely. Díky elektronové mikroskopii, používání fluorescenčních barviv a především díky objevu monoklonálních protilátek, zažila průtoková cytometrie v následujících letech prudký rozvoj. Dnes můžeme říci, že ve velké většině klinických laboratoří je průtokový cytometr běžnou součástí vybavení. Díky počítačům a velmi sofistikovaným programům jsou tyto cytometry jednoduché na obsluhu a poskytují stále více informací [4].

BUŇKY, ČÁSTICE

Průtokový cytometr byl primárně sestrojen k analýze buněk. V současnosti je možné analyzovat jakoukoli suspenzi částic i daleko menších než buňky. Například viry, chromozómy, fragmenty DNA a mnohé jiné. V klinické praxi je nejčastějším materiálem k analýze krev, kostní dřeň, buněčné kultury a suspenze buněk připravené z tkání (např. lymfatické uzliny). Vzácněji se analyzují materiály jako mozkomíšní mok, bronchoalveolární laváže a punktáty. U těchto a jiných netradičních materiálů mnohdy selhává analýza z důvodů nedostatečného počtu buněk. Abychom dostali při analýze relevantní výsledky, měla by vyšetřovaná suspenze obsahovat nejlépe $10^5 - 10^6$ částic v jednom mililitru a jejich optimální průměr by měl být 1 - 30 μm [4]. Optimální průměr částic se může měnit v závislosti na použitém přístroji.

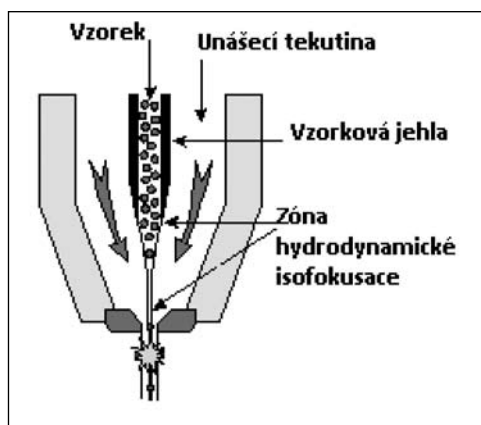
ZÁKLADNÍ KOMPONENTY PRŮTOKOVÉHO CYTOMETRU

Průtokový cytometr se skládá ze tří vzájemně propojených systémů. Fluidika, optika a elektronika.

1. Fluidika

Aby mohla být provedena analýza, je nutné, aby částice procházely systémem jedna za druhou. Fluidika zajišťuje transport částic, které jsou vstříkovány do unášecí tekutiny malým otvorem.

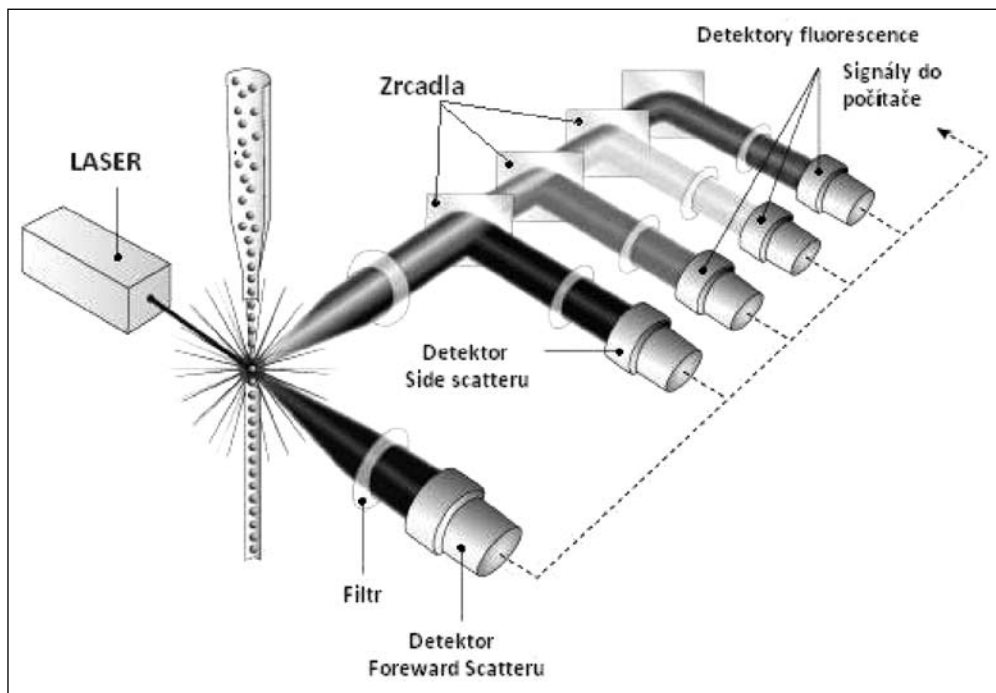
Ideální pozice jednotlivých částic vzhledem k sensorům je nastavena pomocí hydrodynamické isofokuse unášecí tekutiny (izotonický roztok). Vzorek je vstříkovaný tak, aby nedošlo k jeho smísení s tekutinou, ale aby byl vytvořen koaxiální proud (viz Obr. 1). Tím, že dochází k zúžení kapiláry, je zajištěno, že měřicím bodem projde právě jedna částice. Parametry fokuse lze uživatelsky upravovat. Např. nastavení malého rozdílu tlaku vzorku a unášecí tekutiny je vhodné pro analýzu DNA [2].



Obrázek 1: Fluidika

2. Optika

Částice, která se nachází v měřicím bodě je ozářena monochromatickým zářením. Optika zajišťuje interakci analyzovaných částic s excitovaným fluorochromem a elektromagnetickým vlněním emitovaným zdrojem monochromatického záření. Optický systém se skládá ze excitační optiky a sběrných optických cest. Zdrojem monochromatického, koherentního záření jsou nejčastěji lasery. Nejběžnějším laserem používaným v komerčních analyzátoch je vzduchem chlazený argonový laser emitující záření při 488 nm. Jeho výhodou je, že umožňuje excitaci několika fluorochromů současně. Sběrnou optiku tvoří soustava čoček, zrcadel a filtrů. Čočky usměrňují fotony emitovaného záření, zrcadla a filtry rozdělují světelné paprsky na příslušné detektory (viz Obr. 2)



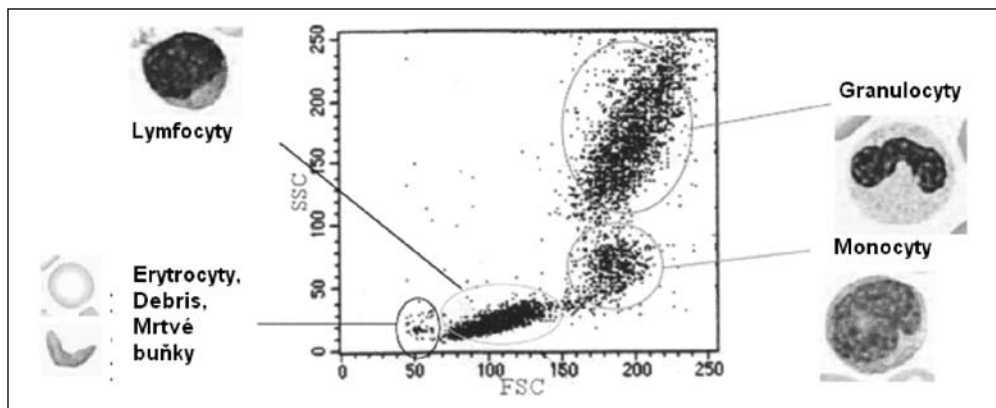
Obrázek 2: Schéma optiky průtokového cytometru

Detekce a zpracování signálu

Výsledkem interakce částice se zářením je signál, který je detekován v závislosti na jeho intenzitě.

Lineárně rozptýlené záření, které dopadá na detektor (fotodiody) umístěný v ose dopadajícího paprsku se nazývá Forward scatter (FS). Jeho intenzita je vysoká a není potřeba ji dále zesilovat. Tento parametr určuje velikost částice. Čím větší je rozptyl světla, tím větší je částice.

Bočně rozptýlené záření, které dopadá na detektor umístěný kolmo na osu dopadajícího paprsku, se nazývá Side scatter (SS). Intenzita tohoto záření je nižší, a proto je zesilována fotonásobičem. Je to parametr, který odráží granularitu částice. Vynesením signálu SS a FS do dvouřozměrného grafu, získáme záznam rozdělení částic dle jejich velikosti a granularity. Modelovým příkladem je rozdělení buněk periferní krve na základě parametrů SS a FS, čímž získáme třípopulační diferenciál (viz Obr. 3)



Obrázek 3: Dot-plot histogram suspenze buněk periferní krve

Fluorescence

Třetím typem signálu, který získáme po ozáření částice je fluorescenční záření. Intenzita fluorescence je nízká a stejně jako u signálu SS je potřeba ji zesilovat fotonásobičem. Fluorescence je jev, při kterém dochází po excitaci zářením o určité vlnové délce k uvolnění energie ve formě fotonů s jinou (delší) vlnovou délkou. Rozdíl mezi vlnovou délkou excitujícího a emitovaného záření se nazývá Stokesův posun.

Látky, které jsou schopny fluorescence, se nazývají fluorochromy. Pro každý fluorochrom je definován Stokesův posun. V průtokové cytometrii se používají takové fluorochromy, které dosahují absorpčního maxima při vlnových délkách poskytovaných komerčně dostupnými lasery. Nejpoužívanější fluorochromy jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled nejběžnějších fluorochromů v průtokové cytometrii

Zkratka	Název	Excitační vlnová délka (nm)	Emisní vlnová délka (nm)
Samostatné fluorochromy			
FITC	Fluoresceinisothiocyanate	488	530
APC	Allophycocyanin	630	661
PE	Phycoerythrin	488	580
PerCP	Peridinin-chlorophyl-protein complex	488	675
Tandemové fluorochromy			
PE – Cy5	Phycoerythrin- Cyanin 5	488	670
PE – Cy7	Phycoerythrin- Cyanin 7	488	780
APC – Cy5.5	Allophycocyanin – Cyanin 5.5	633	695
APC – Cy7	Allophycocyanin – Cyanin 7	633	785
PE – Texas Red	Phycoerythrin – Texas Red	488	615

Průtokové cytometry jsou běžně vybaveny více detektory. V jednom experimentu tedy můžeme použít více fluorochromů, což nám umožňuje označit na částici více epitopů a získat během jedné analýzy více informací. Toto je základní princip sestavení vícebarevného experimentu. Při jeho sestavování musíme dbát na to, aby se použitým fluorochromům nepřekrývala emisní spektra. V praxi se jednotlivá spektra překrývají velmi často, a proto je nutné před vlastním experimentem provést kompenzaci fluorescenčního překryvu. Pro každý parametr je také nutné před začátkem analýzy stanovit prahovou hodnotu neboli treshold.

Nejběžnější cytometry mají nejméně čtyři, častěji už šest nebo osm detektorů. To nám umožňuje stanovit až osm parametrů současně v jedné „zkumavce“.

Fluorochromy jsou většinou konjugovány s monoklonálními protilátkami. Jedná se o nejpoužívanější techniku identifikace částic v průtokové cytometrii. Monoklonální protilátky mají schopnost vázat se na přesně dané struktury na povrchu

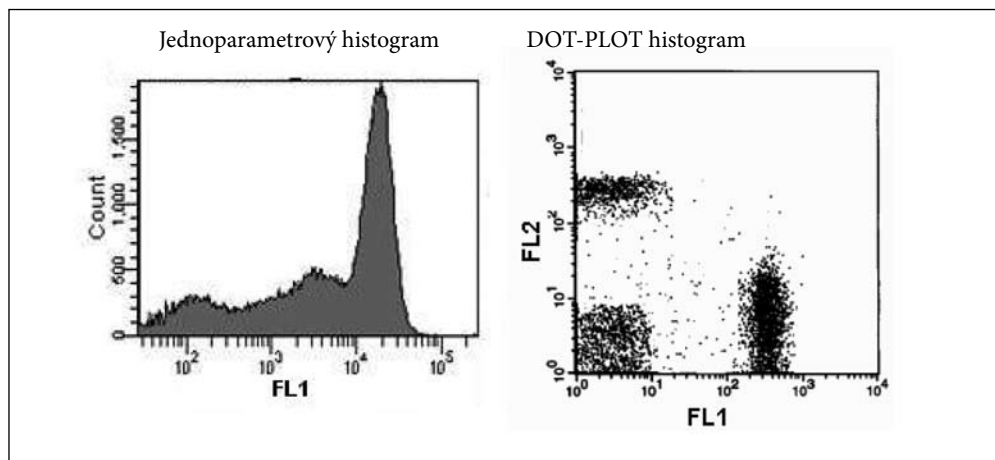
částic, čímž tyto molekulární struktury (antigeny) identifikují [5]. V současné době je popsána celá řada buněčných epitopů, které jsou charakteristické pro jednotlivé buněčné populace a pro jednotlivá stádia jejich vývoje. Všechny epitopy jsou nazývány CD znaky (cluster of differentiation). Jsou rozděleny do desítek skupin a podskupin a jsou označeny číslem, které je jim přiřazeno během celosvětových workshopů. Podle posledního IX. Workshopu, který se konal v Barceloně v roce 2010, je takto klasifikováno 363 lidských CD znaků. Jejich aktuální přehled je k dispozici na webových stránkách www.hcdm.org.

Mimo tuto techniku se využívá schopnosti některých fluorochromů navázat se na struktury buněk (částic) samostatně nebo se inkorporovat do buněk. Typickým příkladem je kvantitativní analýza DNA detekcí fluorescence propidium jodidu, který se interkaluje mezi baze DNA nebo inkorporace methotrexátu do buněk. Při detekci apoptózy se zase využívá vazby fluorochromu na Annexin V [4]. Také se dají využít fluorochromy, které vznikají přímo v buňkách např. při oxidativním vzplanutí.

3. Analýza a interpretace dat pomocí počítačového systému (elektronika)

Signály získané z optiky jsou převáděny na elektrické impulzy a pomocí počítačového softwaru jsou zobrazeny uživateli. Každý impulz se nazývá event = událost a ukládá se jako datový soubor v LIST MODE FILE, kde jsou data připravena k další analýze. K zobrazení událostí se používají různé grafické záznamy. Pokud na osu x vynese me intenzitu signálu a na osu y množství buněk, získáme

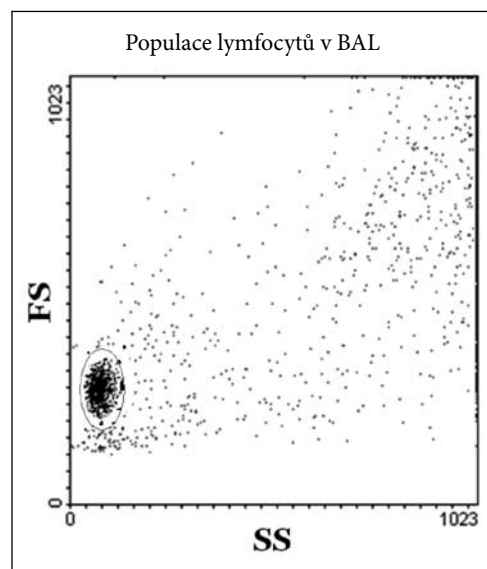
jednparametrový histogram. Mnohem častěji se používají dvouparametrové histogramy, kde je na ose x zobrazena intenzita jednoho signálu a na ose y intenzita druhého signálu. V tomto grafickém zobrazení je každá událost zobrazena jako tečka. Množství částic je dáno hustotou bodů (tzv. dot-plot histogram) nebo hustotou čar (tzv. contour – plot histogram). Většina softwarů komerčních přístrojů umožňuje i zobrazení v trojrozměrném izometrickém grafu.



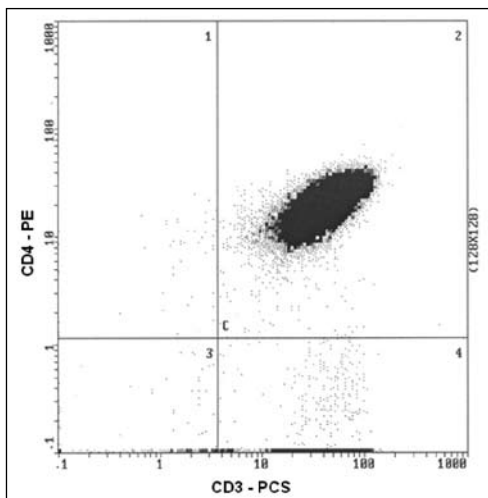
Obrázek 4: Příklady grafického zobrazení

V jednom experimentu získáme množství informací o všech částicích, které se nacházejí v analyzované suspenzi. Každá částice nám poskytuje signál rozptylu Forward scatteru a Side scatteru. Částice, které mají navázanou protilátku s fluorochromem nám navíc poskytují signál fluorescenční. Často nás zajímá pouze určitá populace buněk, kterou chceme dále analyzovat. Např. při typizaci subpopulací lymfocytů periferní krve si musíme nejprve označit populaci lymfocytů mezi ostatními krevními buňkami. K tomu v cytometrii slouží proces gatování. Gate představuje graficky nebo matematicky ohraničenou oblast částic vybraných k další analýze (viz Obr. 5).

Pro označený gate vytvoříme dot-plot histogram z vybraných protilátek konjugovaných s fluorochromy. Tento dot-plot se dále rozděluje na kvadranty. Rozdělením získáme čtyři oblasti – negativní pro oba parametry, pozitivní pro jeden a pozitivní pro oba parametry. V jednotlivých kvadrantech pak můžeme kvantifikovat množství částic (%) (viz Obr. 6).



Obrázek 5: Příklad gatování populace lymfocytů v bronchoalveolární laváži



Obrázek 6: Příklad vyhodnocení dot-plot histogramu pro CD3 – PCS a CD4 – PE

Na ose x je záznam fluorescence fluorochromu Fluoresceinisothiokyanat, který byl navázán na monoklonální protilátku proti CD3 epitopu na lymfocytech. Na ose y je záznam fluorescence fluorochromu Phycoerythrin, který byl navázán na monoklonální protilátku proti CD4 epitopu na lymfocytech. V kvadrantu 1 jsou buňky pozitivní pouze pro znak CD4, v kvadrantu 2 jsou buňky pozitivní na oba znaky, v kvadrantu 3 jsou buňky negativní pro oba znaky + konfliktní případy (debris) a v kvadrantu 4 se nachází buňky pozitivní pouze pro znak CD3. Z dot-plot histogramu vyplynulo, že v námi vybraném gatru (označené populaci buněk) jsme našli 86 % buněk pozitivních pro znak CD3 a zároveň CD4, 12 % buněk pozitivních pouze pro znak CD3 a 1 % pozitivních pouze pro znak CD4.

Způsobů vyhodnocování dat je mnoho. Záleží na typu analýzy a zkoumaném parametru, použitém materiálu, analyzátoru a na zkušenostech pracovníka, který experiment sestavuje a vyhodnocuje.

VÝHODY A NEVÝHODY PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Přednost této techniky spočívá především ve vysoké frekvenci analýzy jednotlivých částic. Nejmodernější cytometry umí zpracovat až 100 000 částic/s. Analýza trvá pouze několik minut a poskytuje velké množství informací. Výhodou je i jednoduchá příprava vzorku k analýze. Celá příprava většinou nezabere více než 1 hodinu. Můžeme provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Celá řada experimentů by bez průtokové cytometrie vůbec nebyla možná. Například analýza malých populací s unikátním fenotypem při sledování minimální reziduální nemoci [5].

Tato technika umožňuje třídít buňky s vybranými vlastnostmi (cell sorting). Sortování je určeno pro vědecké účely, v rutinní klinické praxi se příliš nevyužívá.

Mezi nevýhody se stále řadí relativně vysoká finanční náročnost. Sestavení experimentu, analýza a vyhodnocování dat závisí na zkušenostech obsluhy.

Analýza se nejčastěji provádí na živých buňkách. Z tohoto důvodu je potřeba, aby vzorky byly do laboratoře dopraveny co nejdříve po odběru a ihned analyzovány. Nelze je uchovávat pro další analýzu.

Při analýze pevných tkání je nezbytné jednotlivé buňky separovat od sebe. Během separace však může dojít ke ztrátě nebo ke změně vlastností buněk.

VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI

Aplikace průtokové cytometrie zasahují do všech odvětví klinické praxe. Největší uplatnění mají v klinické imunologii, hematonekologii, nádorové biologii a v oblasti molekulární biologie. Zde je uveden přehled nejčastějších aplikací v jednotlivých oborech:

Klinická imunologie: Imunofenotypizace lymfocytů, aktivace jednotlivých subpopulací T lymfocytů, funkční testy buněk imunitního systému (např. oxidativní vzplanutí fagocytů), detekce autoprotištětek, testování alergií, stanovení produkce intracelulárních cytokinů, HLA typizace, viabilita spermatu.

Hematoonkologie: Imunofenotypizace leukémií, stanovení minimální reziduální nemoci

Nádorová a molekulární biologie: analýza buněčného cyklu, buněčné proliferace a kinetiky, detekce apoptózy, sledování vzniku lékových rezistencí, sledování průniku léčiv do buněk, analýza lékových rezistencí, stanovení nukleových kyselin, stanovení ploidie.

LITERATURA

1. Eckschlager, T. a kol.: Průtoková cytometrie v klinické praxi, Praha, Grada Publishing, 1999
2. Hawley, T. S., Hawley, R.G.: Flow cytometry protocols 2nd ed., New Jersey, Humana press 2004
3. Marinov, I.: Průtoková cytometrie v klinické hematologii, Praha, TRITON, 2008
4. Shapiro, H. M.: Practical flow cytometry 4th ed., John Wiley and sons, 2003
5. Šinkorová, Z., Zárybnická, L.: Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část, Voj. zdr. listy, 2008, 3, p. 98 – 103
6. www.hcdm.org