

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE JAKO ANALYTICKÁ A SELEKČNÍ METODA I. ČÁST

Zuzana ŠINKOROVÁ, Lenka ZÁRYBNICKÁ

Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

Souhrn

V současné době dochází k rychlému nárůstu nových poznatků v biomedicíně, který je mimo jiné umožněn neustálým vývojem kvantitativních a kvalitativních analytických metod. Tyto nové přístupy umožňují podrobné sledování dějů na buněčné a molekulární úrovni, a tak nacházejí své uplatnění v široké škále vědních oborů i klinické praxi. Závěry jimi získané jsou přínosem pro civilní i vojenskou medicínu. Jednou z progresivních metod, která dosáhla v posledních letech výrazného technologického rozvoje, je metoda průtokové cytometrie (flow cytometry, FCM). Ve své podstatě FCM představuje dnes již standardní přístup pro vysokorychlostní rozměrovou a typovou analýzu suspenzí částic, nejčastěji savčích buněk. Článek se zabývá principem a nejběžnějšími aplikacemi FCM.

Klíčová slova: Průtoková cytometrie; Imunofenotypizace; Lymfocyt; Monoklonální protilátka.

Flow Cytometry As an Analytical and Selective Method Part I

Summary

Permanent development of qualitative and quantitative analytical methods has currently resulted in a fast increase of knowledge in biomedicine. Such new approaches have enabled very detailed observations of processes on the cellular and molecular level and thus become useful in both, research and clinical practice including military medicine. Flow cytometry (FCM) is one of the highly progressive techniques with considerable technological development. Nowadays FCM represents a standard approach for a high speed analysis of particle (mostly mammalian cells) suspensions in terms of size, internal complexity and subset composition. The article deals with principle and the most common FCM applications.

Key words: Flow cytometry; Immunophenotyping; Lymphocyte; Monoclonal antibody.

Imunofenotypizace a monoklonální protilátky

Studium jednotlivých buněk a jejich populací znamená rychlý rozvoj díky neustále se zvyšujícímu spektru analytických metod, jež se touto problematikou zabývají. První pokusy charakterizovat lymfoidní buňky specifickými antiséry namířenými proti povrchovým znakům (imunofenotypizace) a pomocí tvorby rozet s červenými krvinkami ovčí proběhly v 60. a 70. letech minulého století, kdy se podařilo od sebe odlišit a navzájem oddělit (izolovat) jejich dvě hlavní skupiny nazývané podle svého původu u ptáků lymfocyty typu B (Fabriciova bursa) a T (thymus, česky brzlík) (2). I když se později ukázalo, že tehdy dostupná polyklonální antiséra i rozetový test nejsou příliš přesnými nástroji k analýze lymfoidního kompartmentu, ve své době představovaly oba testy průlom v imunologických metodách. Nevýhodou polyklonálních antisér byla

hlavně jejich malá specifita (křížová reaktivita s jinými povrchovými strukturami) a velká variabilita jednotlivých šarží. Jedinými prakticky použitelnými polyklonálními imunoreagenciemi jsou dnes antiséra namířená proti povrchovým imunoglobulinům, která se s úspěchem používají např. při imunofenotypizaci lymfomů řady B či při (sub)izotypově specifické nepřímé vícebarevné imunofluorescenci (5).

Převratný objev nositelů Nobelovy ceny Köhlera a Milsteina z roku 1975 (3) znamenal zásadní obrat v experimentálním použití imunoreagencií (protilátek). Tzv. hybridomy – stále rostoucí a stabilní klony vzniklé fúzí buněk produkujících protilátky a myelomových buněk, jež schopnost produkce svého vlastního imunoglobulinu ztratily – představují unikátní buněčné kultury produkující specifické imunoglobuliny, tzv. monoklonální protilátky (MoAb) coby (bio)chemicky identické makromolekuly, které se po své charakterizaci využívají k jednoznačné

identifikaci molekulárních struktur (antigenů) na povrchu buněk i ve vnitrobuněčném prostoru.

Každá MoAb využívaná k imunofenotypizaci se specificky váže k jednomu molekulárnímu motivu (epitopu), jehož výskyt může být vázán na různé (sub)populace a diferenciací stadia buněk a na různých buněčných typech se může vyskytovat v odlišném počtu kopií. Rozsáhlé studie v rámci mezinárodních pracovních skupin zaměřených na typizaci MoAb se staly základem systému rozdělení buněk krvetvorby podle tzv. CD znaků (cluster of differentiation) (1) do desítek skupin a podskupin odrážejících rozmanitost buněčných elementů krvetvorby včetně leukocytů coby efektorů imunitního systému (4). Dnes je takto klasifikováno již více než tři sta lidských CD znaků rozpoznávaných MoAb (6), z nichž mnohé mají dobře definované protějšky u laboratorních zvířat (myš, potkan) a veterinárně důležitých druhů.

Polychromatická imunofluorescence

Ke zviditelnění vazby MoAb k buňkám se používá několik přístupů. Pro účely FCM se jednotlivé MoAb kovaletně váží (konjugují) s různými fluorescenčními molekulami (fluorofory), které po expozici záření excitačního zdroje emitují fotony s jinou (delší) vlnovou délkou. Komerčně dostupných fluoroforů dnes existuje celá řada od malých polycyklických molekul, jako jsou například fluorescein (FITC) nebo cyaniny či barvičky řady Alexa, přes fluorescenční fykobiliproteiny, jejichž nejznámějšími představiteli jsou phycoerythrin (PE) a allophyco-cyanin (APC) až po nanokrystaly (tzv. quantum dots). Protože FCM dnes využívá téměř ve všech případech monochromatického excitačního záření laserů, existuje ke každému prakticky používanému laseru (nejčastěji 405, 488 a 633 nebo 635 nm) celá skupina fluoroforů s dostatečně silnou absorpcí v dané oblasti spektra a rozdílnou emisní charakteristikou tak, aby byla jejich fluorescence odlišitelná pomocí soustavy optických filtrů uzpůsobených k odrazu a/nebo prostupu fotonů s definovanou vlnovou délkou. Označení suspenze buněk komplexním koktejlem monoklonálních protilátek, každé z nich vázané k jinému fluoroforu (tedy molekule s jinou barvou fluorescence), je základní princip vícebarevné nebo mnohobarevné (polychromatické) imunofenotypizace. Polychromatickou imunofluorescencí pak nazýváme optický signál, který označené buňky po

ozáření excitačním zářením jednoho nebo více laserů vydávají. Intenzita fluorescence jednotlivých buněk je v ideálním případě přímo uměrná množstvím navázané monoklonální protilátky. Ke kvalitativní informaci (svítí–nesvítí), umožňující definovat buňky jako pozitivní nebo negativní s ohledem na přítomnost studovaného epitopu (též nazývaného marker nebo znak), se tak nabízí možnost kvantitativní analýzy, tedy určení množství epitopu na nebo ve studované buňce. Ze zjištěných rozdílů lze buňky rozčlenit do skupin, které označujeme jako populace, subpopulace, typy, subtypy, diferenciací a aktivační stadia nebo malformace (v případě krvetvorby nazývané leukémie a lymfomy). Polychromatická FCM dnes využívá paralelní analýzu čtyř a více (běžně šesti až osmi) znaků na jednotlivých buňkách, což překračuje možnosti jiných experimentálních technik, s výjimkou genetické analýzy jednotlivých buněk technikou polymerázové řetězové reakce (PCR). Na rozdíl od PCR však polychromatická imunofenotypizace ve spojení s FCM umožňuje vysokorychlostní analýzu rozsáhlých populací intaktních buněk s následnou možností jejich separace a další kultivace, eventuálně transplantace. Zvláště výhodná je pak kombinace průtokové cytometrického třídění buněk a PCR umožňující studium genové exprese u dobře definovaného biologického materiálu, včetně jednotlivých buněk.

Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM) je v současné době považována za standardní metodu analýzy částic (většinou buněk) v suspenzi. V rámci klinické praxe je nejčastěji využívána při polychromatické imunofenotypizaci krevních leukocytů a buněk kostní dřeně, ale běžné jsou i další aplikace jako imunofenotypizace buněčných suspenzí izolovaných z jiných tělních tekutin (moč, likvor, výpotky), bronchoalveolárních laváží a také z orgánů a lymfatických tkání (např. při diagnostice lymfomů) či leukocytů infiltrujících solidní nádory. Kromě technik založených na specifickém rozpoznávání antigenů protilátkami se v FCM používají i další přístupy, jako jsou kvantitativní analýza DNA u fixovaných nebo dnes už i intaktních buněk, detekce apoptózy, biofyzikální a biochemická stanovení včetně kinetiky buněčných procesů, asociace a disociace makromolekul a v posledních letech se objevila celá řada dalších stanovení, jako je např. detekce rozpustných

látek pomocí nosičů ve formě fluorescenčních kuliček. Polychromatická imunofluorescence leukocytů však zůstává silně převažující technikou v experimentální biologii, biomedicině i klinické praxi.

Průtokové cytometry jsou na český trh dodávány od několika výrobců v pořizovací ceně od jednoho do více než 12 miliónů korun. Nejdražší průtokové cytometry většinou slouží pro vědecké účely. Jsou to polychromatická zařízení, u nichž počet možných kanálů fluorescence často značně převyšuje deset a jsou také často vybavena třídící (sortovací) jednotkou. Levnější modely jsou dodávány ve formě analyzátoru a slouží pro jednodušší aplikace s využitím menšího počtu barev k analýze, kdy již o polychromatické FCM nehovoříme. Klinické přístroje jsou dnes vybaveny nejméně čtyřmi, častěji však šesti až osmi detektory fluorescence takto umožňujícími současnou detekci až osmi znaků na každé buňce. Dále existuje celá řada jednoduchých FCM analyzátorů určených ke dvou a tříbarevné imunofluorescenci a většinou zaměřených na jednodušší klinické aplikace (například CD4/CD8 imunofenotypizace a monitorování HIV-pozitivních pacientů) (barevná příloha s. III, obr. 3).

Průtokový cytometr sestává ze tří základních, vzájemně propojených systémů. Fluidika zajišťuje transport buněk ze suspenze, které jedna za druhou postupně přicházejí do průtokové komory, když jsou předtím hydrodynamicky fokusovány hnací tekutinou do proudnice a konstantní rychlostí procházejí jednotlivými laserovými paprsky. Během tohoto průchodu paprskem fotonů excitačního záření dochází k detekci fluorescence a u jednoho z laserů i rozptylu záření. Buňky jsou poté unášeny do třídící jednotky nebo do odpadní nádoby. Optika zahrnuje excitační zdroje (lasery) a sběrné optické dráhy, které systémem čoček, zrcadel a optických filtrů zachycují fluorescenční a rozptýlené záření a přivádějí je na opticky aktivní vrstvu optoelektronických detektorů (fotonásobičů a fotodiod) tvořících rozhraní mezi optickým a elektronickým podsystémem průtokového cytometru. Z technického hlediska je nejsložitějším systémem průtokového cytometru elektronika, která převádí optické signály (fluorescenci a rozptyl) na signály elektronické, ty potom zesiluje, digitalizuje a zpracovává do srozumitelné formy, kterou je grafická reprezentace jednotlivých buněk na monitoru řídicího počítače. Účelem tohoto pojednání je podat přehlednou zprávu o technice průtokové cytometrie a ne zabíhat do technických podrobností, které jsou ostatně pro každý typ ana-

lyzátoru specifické. Proto zde uvedeme jen nejdůležitější údaje, které jsou podstatné pro pochopení významu, silných stránek, ale také omezení popísaného zařízení. Hlavní předností FCM je vysoká frekvence analýzy jednotlivých buněk. Moderní analyzátor i sortery dokáží zpracovat za vteřinu desetitisíce buněk (nebo jiných mikroskopických objektů) unášených v okamžiku analýzy rychlostí několika metrů za vteřinu. Kromě poměrně velkého počtu fluorescenčních parametrů obsahují údaje o jednotlivých buňkách tradičně také dva rozptylové parametry – rozptyl v přímém směru (forward scatter, FSC), úměrný velikosti buněk a rozptyl pod úhlem 90° (side scatter, SSC), který odráží vnitřní komplexitu buněk (například granulocyty a apoptotické buňky mají vyšší hodnoty SSC, zřejmě z důvodu granulace a/nebo fragmentace jadra). Při akvizici dat je třeba odstranit debris, tzv. konfliktní případy (například dvě buňky měřené najednou) a také kompenzovat vzájemný přesvit jednotlivých fluorochromů. V neposlední řadě u cytometrů, kde je vyšetřování buňky jednotlivými laserovými paprsky prostorově a časově oddělené (a to platí v případě všech technicky pokročilejších analyzátorů), je nutné poskládat dohromady data, která sice pocházejí z různých časových okamžiků, ale patří k jedné buňce. Je tedy zřejmé, že na elektroniku jsou kladeny ty nejvyšší nároky a nejdražší cytometry jsou vybaveny špičkovou elektronikou, včetně vysokorychlostních převodníků a dnes i vnitřním a vnějším počítačem, spolupracujícími na základě vysokorychlostního spojení typu LAN. Elektronický modul včetně programového vybavení tedy představuje významnou složku ceny přístroje. S přibývajícím počtem parametrů rostou nejen nároky na technické vybavení, ale i na kvalitu obsluhy, protože kromě schopnosti ovládání špičkového technického zařízení a správné interpretace multiparametrické analýzy je nutno zabránit systematické chybě spojené se stále komplexnější maticí kompenzací spektrálních překryvů fluorochromů. Návrh a korektní provedení multiparametrické analýzy je tedy složitá a časově náročná záležitost, při které se doporučuje vycházet z jednodušších kombinací a postupně přidávat parametry během vývoje experimentálního protokolu. Na druhou stranu jsou špičkové multiparametrické FCM analyzátor a třídíče renomovaných výrobců natolik stabilní a testy kvality již pokročily tak daleko, že ve většině případů znamená správné nastavení přístroje bezproblémové a reprodukovatelné akvizice dat stejného typu po dobu mnoha měsíců.

Příklad sedmibarevné multiparanetrické analýzy

Nejběžnější vyšetření imunofenotypu se provádí povrchovým značením leukocytů z nesrážlivé krve (odebrané do heparinu, citrátového pufru či EDTA), ze které se jednou ze standardních technik (diskontinuální hustotní gradient, hypotonická nebo chlořidem amonným zprostředkovaná lýza) odstraní převládající červené krvinky a krevní destičky. Značení leukocytů koktejlem vybraných monoklonálních protilátek označených fluorofory může probíhat před lýzou nebo po lýze bezjaderných krevních elementů. Buňky se s protilátkami inkubují obvykle po dobu 10–30 minut a potom se promývají jednorázovou nebo opakovanou centrifugací a resuspendací v pufrovaném izotonickém roztoku, často obsahujícím ochrannou bílkovinu a azid sodný, bránící buněčným pochodům, a někdy i fixativum ke stabilizaci vazby protilátek a buněčných struktur před měřením. Experimentálních protokolů povrchové imunofenotypizace existuje celá řada, ale v zásadě se dělí na přímé značení protilátkami konjugovanými s fluorochromy a nepřímé značení, při kterém je vazba neznačené či biotinylované primární MoAb zviditelněna fluorinovaným polyklonálním antiserem specifickým pro primární imunoreagencii, resp. komplexem streptavidinu a fluoroforu. Značící techniky se dále dělí na protokoly s promýváním a bez promýváním. Obecně lze říci, že u protokolů bez promýváním, které jsou poměrně populární v klinické praxi a při kterých se imunofluorescenčně označí malé množství nesrážlivé krve a po krátké inkubaci se buňky krátce lyzují a přímo měří, je nižší podíl signálu k pozadí, především z důvodů fluorescence nenavázaných, resp. nespecificky navázaných nadbytečných protilátek. S tímto se však při přípravě komerčně dodávaných koktejlů protilátek počítá a klinické akviziční a analytické programy obsahují parametry, které vyšší pozadí korigují. V případě vlastních návrhů koktejlů protilátek, a to zvláště pro výzkumné účely nebo v případě měření malého počtu cílových molekul na jednu buňku (tzv. nízká exprese), se doporučuje používat techniky s promýváním, především pokud se jedná o mnohobarevnou imunofluorescenci. Z uvedeného je zřejmé, že součástí nezbytného vybavení pro vysokorychlostní mnohobarevnou imunofluorescenci je kromě cytometru také sada laboratorních mikropipet a v případě technik s promýváním i centrifuga.

Na jeden vzorek se běžně používá 50–100 µl

krve a odebrané vzorky se doporučuje zpracovat co nejdříve, nejpozději do 30 hodin po odběru. Uložení biologického materiálu před značením hraje velkou roli a kupříkladu krev je vhodné skladovat při laboratorní teplotě a ne ji chladit nebo umístit do vyhřívaného inkubátoru. U jiných typů vzorků jsou požadavky na dobu zpracování přísnější, např. stanovení funkčního stavu krevních destiček se musí provádět ihned a mozkomíšní mok má být zpracován do čtyř hodin po odběru.

Před měřením vzorků se doporučuje provést kontrolu kvality funkce cytometru, což v podstatě spočívá ve změření referenčních fluoreskujících kuliček a v porovnání kvality detekce s referenčními hodnotami. Dalším krokem je nastavení detektorů tak, aby bylo pro daný biologický materiál (v našem případě lymfocyty) dosaženo dostatečné citlivosti a dobrého rozlišení. Tradiční empirický přístup spoléhající na detekci autofluorescence buněk v neznačeném vzorku je dnes postupně nahrazován plně automatizovanou procedurou využívající speciálního referenčního materiálu (kuliček s nízkou, střední a vysokou fluorescencí ve všech kanálech detekce). Takovéto automatické procedury provedou zároveň kontrolu kvality a optimalizaci nastavení detektorů nezávisle na subjektivním přístupu obsluhy, což vede nejen k lepší reprodukovatelnosti dat z různých měřicích dnů a dobrou korelaci mezi jednotlivými laboratořemi, ale též umožňuje automatickou korekci stárnutí cytometru. V neposlední řadě je nutné nastavit korekci překryvu emisních spekter fluorochromů pomocí jednobarevných kontrolních vzorků, tzv. kompenzací. Dnes je i tato procedura většinou prováděna automaticky pomocí speciálních modulů akvizičních programů dodávaných s průtokovým cytometrem.

Označený vzorek se měří ze standardních zkumavek nebo podavačů (karuselového či destičkového typu) a typická akvizice desítek až stovek tisíc buněk trvá několik desítek vteřin podle hustoty suspenze a je shora limitována maximální rychlostí akvizice (událost za vteřinu, events per second, EPS) cytometru. Moderní cytometry umožňují kompenzaci spektrálního překryvu, resp. její úpravy při i po akvizici. Starší modely plně analogových přístrojů vyžadují nastavení kompenzace před měřením. Obrázek 1 na straně IV barevné přílohy ukazuje příklad analýzy průtokové cytometrického stanovení sedmibarevné povrchové imunofenotypizace leukocytů lidské krve pomocí následujícího koktejlů fluorofory značených monoklonálních protilátek:

- anti-CD3/FITC (fluorescein izothiokyanát),
- anti-CD16+anti-CD56/RPE (dvě monoklonální protilátky navázané na jeden nosič R-phycoerythrin),
- anti-CD4/RPE-Cy7 (tandem R-phycoerythrin-cyanin 7),
- anti-CD8/APC (allophycocyanin),
- anti-CD14/APC-Cy7 (allophycocyanin – Cy7),
- anti-CD19/PB (Pacific blue),
- anti-CD45/AmCyan.

Dvojrozměrný tečkový diagram A (angl. dot plot) na obr. 1 (barevná příl. s. IV) představuje hromadnou reprezentaci všech objektů vzorku s hodnotou parametru FSC vyšší než vybraný práh (angl. threshold) v kanálu 32. Protože FSC je úměrný velikosti analyzovaného objektu, mluvíme o objektech (buněkách) s nadprahovou velikostí. Každá buňka je v takovýchto diagramech reprezentována jednou tečkou, takže dvě buňky s identickou hodnotou znázorňovaných parametrů nelze rozlišit. Přesto tečkové diagramy představují při vhodném nastavení zobrazovaných buněk velmi dobrou reprezentaci umožňující snadné vizuální rozlišení buněčných populací a stále jsou nejpoužívanějším zobrazením dat v průtokové cytometrii. Další možností jsou obrysové neboli hustotní diagramy založené na principu vrstevnic, kdy jsou body dvojrozměrného diagramu se stejnou hustotou buněk spojeny čarami, nebo kombinace tečkového a hustotního diagramu, kdy jsou body tečkového diagramu zobrazeny v pseudobarevné škále podle počtu buněk zobrazovaných v daném bodě diagramu. Z diagramu A je rovněž patrné, že leukocyty periferní krve jsou značně heterogenní z hlediska parametru SSC a rozpadají se do několika zřetelně odlišitelných populací.

Diagram B na obr. 1 (barevná příl. s. IV) znázorňuje typický profil exprese obecného leukocytárního antigenu CD45 na populacích s různou hodnotou SSC. Oblast (region) R1 bude použita při všech dalších analýzách, protože odlišuje populaci leukocytů, které nesou na povrchu glykoprotein CD45 (CD45⁺), od buněk tzv. CD45 negativních (CD45⁻), což jsou především zbytky erytrocytů po lýze.

Další reprezentace FSC versus SSC (FSC/SSC), diagram C na obr. 1 (barevná příl. s. IV), v pseudobarevné škále ukazuje CD45⁺ leukocyty z oblasti R1 (angl. gate) a mezi nimi populace lymfocytů (R2) a monocytů (R3) souhrnně nazývané mononukleární buňky s typicky nízkou (R2) a střední (R3) hodnotou parametru SSC. Neoznačená populace buněk

v černé barvě s vysokou hodnotou SSC jsou granulocyty (neutrofilní a eozinofilní polymorfonukleární leukocyty). Vybraný panel monoklonálních protilátek je používán při imunologickém stanovení zastoupení hlavních leukocytárních populací (diagram B a C) a dále při klasifikaci subpopulací lymfocytů postupem naznačeným na obr. 1 (barevná příl. s. IV) v diagramech D–K. V diagramech D–F je provedena analýza hlavních lymfocytárních populací. CD19⁺ B-buňky představující 16 % lymfocytů (buněk s booleovským kritériem gate = R1 AND R2, nazývaným angl. lymphogate (lymfocytární oblasti) (diagram E), mají povrchový fenotyp CD16⁻CD56⁻ (diagram D), CD3⁻ (diagram E) a jsou také negativní pro povrchové znaky CD4 a CD8 (není přímo ukázáno). Proto je při použitém značení analyzujeme procentuálně jako homogenní populaci. Naopak CD19⁻ populace lymfocytů je z hlediska exprese CD3 (diagram E) a CD16+CD56 (diagram D a F) značně heterogenní, což umožňuje její rozdělení do několika subpopulací. Především se z hlediska exprese CD3 klasicky dělí na CD3⁺ T-buňky (v tomto případě 64 % lymfocytů) a CD3⁻ NK-buňky (20 %) (diagram E), které je nutné analyzovat odděleně. Tečkový diagram F ukazuje heterogenitu současné exprese CD16 a CD56 na T-buňkách a CD3-lymfocytech. Je zřejmé, že většina T-buněk je CD16⁻CD56⁻. Minoritní subpopulace CD3⁺ lymfocytů s nízkou expresí CD16+CD56 (v našem případě 1%, diagram F) se nazývá NKT-buňky a na rozdíl od klasického dělení lymfocytů na základě exprese CD3 a CD19 se dnes považují za speciální subpopulaci NK-buněk s povrchovou expresí CD3. Na rozdíl od NKT-buněk je současná exprese CD16 a CD56 na CD3⁻ NK-buňkách vysoká (diagram F). Za normálních okolností má naprostá většina CD3⁻(CD16+CD56)⁻ buněk povrchový fenotyp CD19⁺ a dvoubarevná CD3 versus CD16+CD56 analýza v „lymphogate“ tedy umožňuje jednoznačnou kvantifikaci hlavních lymfocytárních populací periferní krve včetně NKT-buněk (porovnej diagramy D, E a F).

Současná detekce přítomnosti sedmi povrchových znaků na jednotlivých buňkách poskytuje též možnost detailnější analýzy lymfocytárních subpopulací tak, jak je znázorněno na diagramech G–K. Profily exprese CD8 versus CD4 a CD8 versus CD16+CD56 na NK-buňkách (CD3⁻CD19⁻ lymfocyty, regionu R4 na diagramu E) jsou znázorněny na diagramu G a H, všechny tři kombinace uvedených povrchových antigenů pro CD3⁺ lymfocyty (region R5 v diagramu E) a NK-buňky jsou v dia-

gramech I–K. Z klinického hlediska má největší význam analýza na diagramu I, ze které se poměr zastoupení $CD4^+$ pomocných a regulačních T-lymfocytů vůči relativnímu počtu $CD8^+$ T-buněk, ve velké většině představovaných cytotoxickými T-buňkami a jejich prekurzory, používá k imunomonitorování postupu AIDS a indikaci léčby u HIV pozitivních pacientů. Na diagramu L je ve formě histogramů znázorněna exprese $CD14$ na všech leukocytech (modře), lymfocytech (červeně) a populaci odpovídající FSC a SSC parametry monocytům (červeně, barvy odpovídají regionům na diagramech B a C).

Protože předvedená analýza závisí na postupném vydělování subpopulací pomocí logických bran vytvořených booleovskou algebrou (zde se jedná výlučně o nejčastěji používaný operátor AND), nedá se z hlediska přesného a jednoznačného určení a kvantifikace subpopulací nahradit popsáný polychromatický přístup pomocí více vzorků s menším počtem použitých fluorochromů. Je také zřejmé, že pro účely třídění subpopulací charakterizovaných složitým expresním profilem je polychromatická FCM jediným možným řešením. Proto je multiparametrická analýza stále častěji používána nejen při výzkumu, ale i v klinické praxi, a to především při analýze malých populací s unikátním fenotypem, jako je tomu např. při diagnóze a sledování minimální reziduální nemoci.

Třídíče buněk

Třídíče buněk (cell sorter) využívají dat získaných při průchodu buňky jednotlivými laserovými paprsky k třídění buněk s vybranými vlastnostmi. Poté, co jsou data ze všech excitačních zdrojů k dispozici, rozhodnou elektronické obvody třídíče, zda daná buňka splňuje výběrová kritéria (např. lymfocyt z oblasti R5 na diagramu E). V negativním případě skončí v odpadu, v pozitivním případě se třídíč pokusí uvedenou buňku dopravit do připravené zkumavky nebo jamky v mikrotitrační destičce. Toho se dosahuje pomocí sortovacích modulů různé konstrukce. Nízkorychlostní mechanické nebo piezoelektrické třídíče buňky sbírají či odchylují z proudu hnací tekutiny mířící do odpadní nádoby. Takto lze dosáhnout maximální rychlosti sběru 300 buněk za vteřinu. Mnohem sofistikovanější a dražší vysokorychlostní třídíče vytvářejí chvěním trysky uniformní proud kapek a protože je rychlost proudu hnací tekutiny vysoce stabilní, lze odhadnout, ve které

kapce se s nejvyšší pravděpodobností buňka určená k třídění ocitne. Tato kapka je těsně před oddělením z proudu hnací tekutiny nabita elektrickým pulsem procházejícím proudem hnací tekutiny a následně je v elektrickém poli vychylovacích destiček vychýlena do sběrné nádoby. Všechny ostatní kapičky, ať již prázdné, nebo obsahující nechtěné buňky, končí v odpadu nebo jiné sběrné zkumavce. Podle konstrukce přístroje a zadání operátora je dnes možné provádět až čtyřcestné sortování (jednonásobný a dvojnásobný kladný nebo záporný náboj) do zkumavek nebo destiček, kam lze provádět i třídění jednotlivých buněk (single cell sorting).

Literatura

1. BERNARD, A. – BOUMSELL, L. The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Hum. Immunol.*, 1984, vol. 11, p. 1–10.
2. JONDAL, M. – HOLM, G. – WIGZELL, H. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.*, 1972, vol. 136, no. 2, p. 207.
3. KOHLER, G. – MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *Biotechnology*, 1992, vol. 24, p. 524–526.
4. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee. *Bull. World Health Organ.*, 1984, vol. 62, no. 5, p. 809–815.
5. SINKORA, M. – SINKORA, J. – REHÁKOVÁ, Z. – SPLÍCHAL, I. – YANG, H. – PARKHOUSE, RM. – TREBIČAVSKÝ, I. Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology*, 1998, vol. 95, no. 4, p. 595–603.
6. SCHREUDER, GM., et al. HLA dictionary 2004: summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Hum. Immunol.*, 2005, vol. 66, no. 2, p. 170–210.

Práce byla podpořena projektem POV MO ČR č. OPUOFVZ 200604.

Korespondence: Mjr. MVDr. Zuzana Šinkorová, CSc.

Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra radiobiologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: sinkorova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 26. 2. 2008