

# WSPÓŁCZESNA CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA

## MODERN FLOW CYTOMETRY

Anna Skotny<sup>1\*</sup>, Joanna Pucińska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, 50-367 Wrocław, Wybrzeże L. Pasteura 4

<sup>2</sup> Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Politechnika Wrocławska, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

\* e-mail: annaskotny@gmail.com

### STRESZCZENIE

Cytometria przepływowa jest bardzo obiecującą techniką badawczą i diagnostyczną, znajdującą zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, medycyny i biotechnologii. Umożliwia ona zarówno charakterystykę jakościową, jak i ilościową badanych komórek. Cytometria przepływowa pozwala na opisanie populacji komórek, która może stanowić nawet mniej niż 1% badanej próbki. Dzięki rozwojowi techniki i biotechnologii współczesne cytometry pozwalają na jednoczesną analizę wielu parametrów badanych próbek. Pomiar jest szybki, a pozyskiwane dane można analizować wykorzystując ogólnie dostępne narzędzia i metody statystyczne. W niniejszym artykule omówiono zasadę działania oraz wybrane zastosowania współczesnej cytometrii przepływowej.

### ABSTRACT

Flow cytometry is a very promising diagnostic and research technique. It already has been employed in medicine, biotechnology and other industry branches. The method enables both qualitative and quantitative characterization of examined material. Flow cytometry allows to detect and describe cell subpopulations that may be even less than 1% of sample content. With the development of engineering and biotechnology modern flow cytometers enable simultaneous analysis of multiple parameters. The measurement is fast and the data collected can be analyzed using common tools and statistical methods. This article discusses the working principles and selected applications of modern flow cytometry.

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, analiza wieloparametrowa, diagnostyka, immunologia, alergologia

Keywords: flow cytometry, multi-parametric analysis, diagnosis, immunology, allergology

### 1. Wstęp

W 1934 roku A. Maldaven opisał urządzenie umożliwiające automatyczne liczenie krwinek czerwonych w przepływie. Wykorzystywało ono detektor fotoelektryczny przyłączony do okularu mikroskopu oraz kapilarę, przez którą przepływała badana zawiesina komórek. Nie udało się jednak uzyskać stabilnego przepływu, a badane komórki agregowały w wąskim kanale kapilary. Problemy te w 1953 roku rozwiązał P.J. Crosland-Taylor. Zaproponował on wykorzystanie szybkiego strumienia cieczy płynącego w poszerzonej komorze przepływowej. Zawiesinę badanych komórek wstrzykiwano

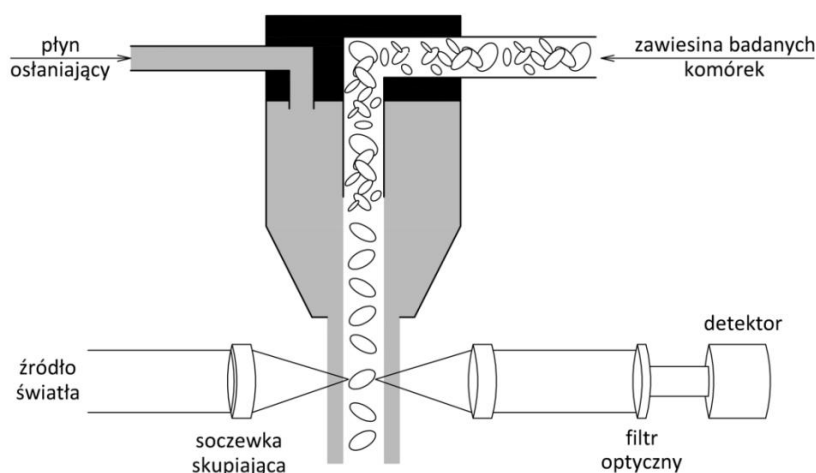
ze znacznie mniejszą prędkością, co zmuszało je do formowania się w cylindryczny strumień o szerokości jednej komórki (ogniskowanie hydrodynamiczne) przepływający przez środek komory przepływowej. Poszerzenie komory zapobiegało agregacji, a rozwiązanie to leży u podstaw obecnej cytometrii przepływowej.

Dzisiejsza cytometria przepływowa nie tylko umożliwia liczenie komórek, ale pozwala na wieloaspektową i wieloparametrową analizę ich biochemicznych i fizycznych właściwości [1].

## 2. Budowa i zasada działania cytometru przepływowego

Cytometr przepływowy składa się z trzech głównych układów: hydrodynamicznego, optycznego i elektronicznego. Podstawowym nośnikiem informacji w cytometrii przepływowej jest światło rozproszone na analizowanej komórce oraz światło pochodzące od wzbudzonego barwnika, który występuje w komórce naturalnie lub jest do niej wprowadzany. Z badanej populacji komórek przygotowuje się zawiesinę, która następnie jest zasysana do zbiornika otoczonego przez zwężający się kanał. Na skutek ogniskowania hydrodynamicznego przez komorę pomiarową ze stałą prędkością rzędu  $10^3$  cząstek/s przepływa strumień pojedynczych komórek [2]. Wielkość badanych cząstek zwykle waha się w granicach od 0,2 do 150 mikronów [3]. Komórki w komorze pomiarowej oświetla się wiązką promieniowania laserowego, które rozprasza się na kolejnych przepływających komórkach. Po interakcji z pojedynczą komórką natężenie rozproszonego promieniowania rejestrowane jest przez odpowiednio dobrane i ustawione fotodetektory.

W przypadku rozproszenia do przodu (ang. *Forward Scattering*, FS) detektor umieszczony jest za komorą. Światło laserowe rozproszone do przodu, czyli pod kątem nie przekraczającym  $10^\circ$ , niesie ze sobą informacje o rozmiarach komórki. Zakłada się, że jego natężenie jest proporcjonalne do rozmiaru cząstki rozpraszającej. Sygnał ten nie niesie ze sobą informacji na temat współczynnika załamania światła czy samego kształtu analizowanej komórki. By ochronić detektor FS przed bezpośrednią ekspozycją na wiązkę laserową, umieszcza się przed nim specjalną przysłonę (ang. *obscuration bar*). Detektor ustawiony pod kątem  $90^\circ$  zbiera sygnały pochodzące z rozproszenia prostopadłego do padającej wiązki laserowej (ang. *Side Scattering*, SS). Natężenie tego promieniowania jest funkcją ziarnistości oświetlanej komórki – im więcej wyraźnych struktur wewnętrznych rozpraszających światło, tym większy jest kąt rozproszenia promieniowania padającego, co prowadzi do zwiększenia natężenia promieniowania rejestrowanego pod kątem  $90^\circ$ . Dodatkowo zależy ono od kształtu komórki oraz jej współczynnika załamania i odbicia światła. Detektory FS i SS rejestrują sygnały dla każdego pojedynczego obiektu, dzięki czemu można wnioskować o poszczególnych cechach analizowanych komórek czy rozróżniać ich populacje [4, 5]. Schemat budowy cytometru przepływowego przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Schemat budowy cytometru przepływowego

Oprócz pomiarów promieniowania rozproszonego, duże znaczenie ma pomiar natężenia fluorescencji wzbudzonych fluorochromów (barwników). W komórkach danego typu fluorochromy mogą występować naturalnie. Jednak najczęściej są do nich wprowadzane poprzez poprzedzający pomiary proces barwienia. By zapewnić selektywność barwienia, czyli oznakować wybraną grupę komórek, fluorochromy łączy się z odpowiednimi przeciwciałami dopasowanymi do antygenów występujących na powierzchni tych komórek, a następnie kompleksy barwnik-przeciwciało wprowadza się do zawiesiny. Podczas pomiaru promieniowanie padające, które nie uległo rozproszeniu, może zostać pochłonięte przez barwnik fluorescencyjny. Wzbudzony fluorochrom, powracając do stanu podstawowego, oddaje energię, czemu towarzyszy krótkotrwała emisja fotonów – fluorescencja. Typowo czas życia fluorescencji jest rzędu kilku nanosekund, podczas gdy czas obserwacji pojedynczej cząstki w cytometrze to rząd mikrosekund. Umożliwia to rejestrację setek fotonów pochodzących z barwników zawartych w pojedynczej komórce [2]. Do pomiaru natężenia fluorescencji wykorzystuje się dodatkowo fotodetektory umieszczone pod pewnym kątem (np.  $90^\circ$ ) do wzbudzającej wiązki laserowej.

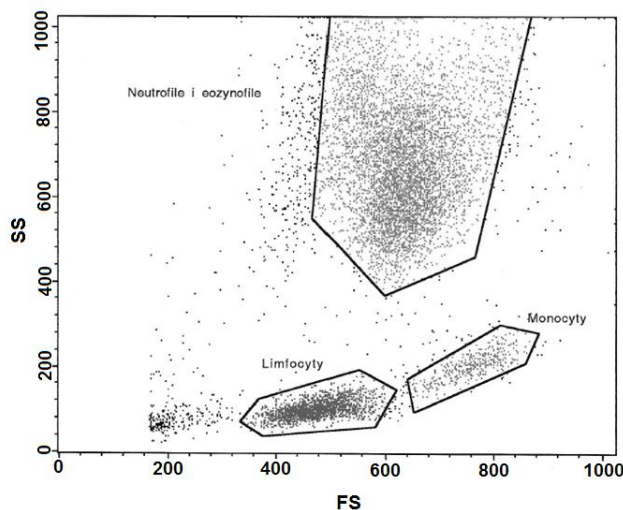
By zwiększyć liczbę parametrów określanych za pomocą pojedynczego eksperymentu, zwykle stosuje się kilka różnych barwników połączonych z różnymi przeciwciałami. Ponieważ widma absorpcji i emisji wykorzystanych fluorochromów są znane, oświetlając wybarwione komórki daną wiązką laserową, odpowiedzi barwnika można spodziewać się w konkretnym zakresie spektralnym. Ów wąski zakres długości fal (zwykle zawierający także maksimum fluorescencji), w którym spodziewamy się odpowiedzi barwnika, nazywamy kanałem. Aby detektory fluorescencji rejestrowały wyłącznie promieniowanie mieszczące się w zakresie danego kanału, umieszcza się przed nimi odpowiednie filtry. Obecnie najczęściej stosuje się cytometry trójkanałowe, wykrywające fluorescencję w zakresie zielonym (FL1), pomarańczowym (FL2) i czerwonym (FL3). Rzadkością przestają być również cytometry sześciokanałowe, a na rynku pojawiły się już urządzenia pozwalające na przeprowadzanie pomiarów z jednoczesnym wykorzystaniem osiemnastu barwników (BD LSRFortessa™, BD Biosciences) [6]. Należy jednak pamiętać, iż taka liczba rejestrowanych sygnałów wymaga bardzo dokładnej i skomplikowanej analizy często niejednoznacznych danych.

Jako źródło promieniowania w cytometrii przepływowej najczęściej wykorzystuje się niebieską linię lasera argonowego (488 nm). Laser ten jest w stanie jednocześnie wzbudzić kilka barwników, np. fluoresceinę i jej pochodne (FITC), oranż akrydyny (AO), fikoerytrynę (PE). Popularne jest także wykorzystywanie dwuwiązkowego wzbudzenia – w tym celu jako drugą linię stosuje się laser helowo-neonowy (długość fali 633 nm), coraz częściej zastępowany czerwoną diodą laserową. Większa liczba rejestrowanych kanałów wymusza wykorzystanie większej liczby źródeł promieniowania. Planując eksperyment, barwniki należy dobrać tak, by ich maksima fluorescencyjne, a więc i kanały, nie pokrywały się. Jednak pokrywanie się widm absorpcyjnych wykorzystanych barwników jest korzystne, ponieważ pozwala to ograniczyć liczbę niezbędnych źródeł promieniowania. Dzięki dynamicznemu rozwojowi biochemii i biotechnologii, wybór barwników fluorescencyjnych jest ogromny [1, 7].

### 3. Budowa i zasada działania cytometru przepływowego

Po oświetleniu wiązką laserową dla każdej komórki określane jest natężenie światła rozproszonego wprzód (detektor FS), rozproszonego prostopadle (detektor SS) oraz natężenia fluorescencji (detektory FL). Sygnały zarejestrowane przez fotodetektory są przetwarzane na wartości liczbowe i wprowadzane do komputera, gdzie podlegają analizie. Do obrazowania otrzymanych wyników wykorzystuje się różne narzędzia. Najprostszym z nich jest histogram, który jest jednowymiarowym przedstawieniem częstości występowania danej cechy w badanej populacji. Na przykład, rysując histogram natężenia promieniowania rozproszonego wprzód, możemy w badanej populacji wyróżnić trzy grupy komórek: o małej, średniej i dużej średnicy. Podobnie rysując histogram natężenia promieniowania rozproszonego prostopadle, możemy stwierdzić występowanie grup o różnej ziarnistości. Jednak na wykresie jednowymiarowym poszczególne grupy komórek mogą się na siebie nakładać i w efekcie pozostawać nierozróżnialne. By uzyskać pełniejszą informację o badanej populacji, wyniki pomiarów ilustruje się za pomocą wykresów kropkowych, które na osiach przedstawiają wartości natężenia promieniowania rozproszonego FS i SS, a każda kropka na tych

wykresach reprezentuje pojedynczą komórkę. Takie dwuwymiarowe przedstawienie wyników znacznie ułatwia ich interpretację, ponieważ pozwala na szybkie rozróżnienie poszczególnych grup w obrębie badanej populacji. Wspomniane wcześniej jednowymiarowe histogramy mogą być traktowane jako swego rodzaju rzuty wykresu kropkowego na daną oś (FS lub SS). Przykładowy wykres przedstawia rysunek 2.



Rys. 2. Przykładowy wykres dwuwymiarowy pełnej krwi hemolizowanej (z wyznaczonymi bramkami)

Użytkownik analizujący wykres kropkowy samodzielnie wyznacza te obszary na wykresie, które według niego reprezentują różne grupy w danej populacji. Wyznaczanie takich obszarów reprezentujących poszczególne grupy komórek poprzez przypisanie im zakresów na osiach nazywamy bramkowaniem. Komórki reprezentowane przez dany obszar, a zatem spełniające dany warunek, można dalej obrazować na bardziej szczegółowych wykresach oraz obliczać ich parametry statystyczne za pomocą wbudowanych w oprogramowanie narzędzi.

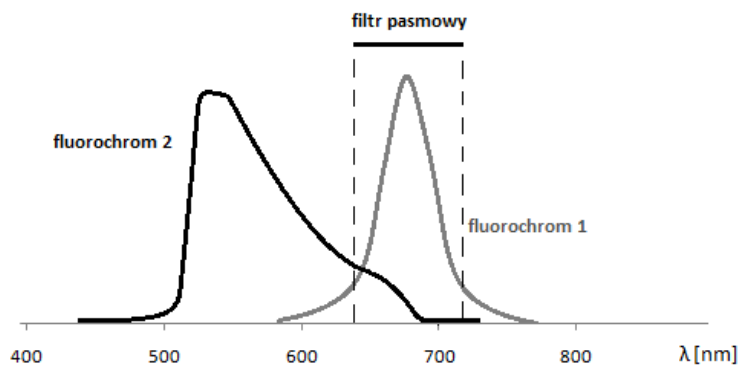
Bardzo ważną jest również analiza wyników natężenia fluorescencji wybarwionych komórek. Możliwość wykorzystania kompleksów barwnik-przeciwciała, które selektywnie wiążą się z odpowiednimi antygenami na powierzchni komórki sprawiła, że cytometr przepływowo stał się bardzo ważnym narzędziem poznawczym. Ponadto dostępne są barwniki zmieniające widmo emisyjne w zależności od rozmaitych czynników fizjologicznych, takich jak pH wewnątrzkomórkowe, potencjał mitochondrialny czy zawartość poszczególnych jonów [8]. Wykorzystując zjawisko rezonansowego transferu energii FRET, można badać wzajemne położenie struktur komórkowych, zachodzące zmiany konformacyjne białek, formowanie się kompleksów oraz ich rozpad [9]. Transfer energii zachodzi tu między cząstkami dwóch fluorochromów, którymi wyznakowano odpowiednie obszary komórki lub białka. Wzbudzona cząstka fluorochromu, zwanego donorem (D), bezpromieniście przekazuje energię cząstce drugiego fluorochromu, zwanego akceptorem (A). Zjawisko to zachodzi tylko wówczas, gdy widmo emisyjne donora przynajmniej częściowo pokrywa się z widmem absorpcyjnym akceptora. Natomiast wydajność FRET w dużym stopniu zależy od odległości dzielącej oba fluorochromy. Jeśli wzajemna odległość donora i akceptora nie przekracza 10 nm, to oświetlając układ wiązką mającą wzbudzić donor, obserwujemy fluorescencję cząstek akceptora.

Ogromną zaletą cytometrii przepływowej jest możliwość wykorzystania kilku, a nawet kilkunastu barwników w pojedynczym eksperymencie. Wiąże się ona jednak z pewnymi problemami. Największym z nich jest problem nakładania się widm emisji poszczególnych barwników. W sytuacji idealnej widma emisji barwników byłyby rozseparowanymi pojedynczymi wąskimi i intensywnymi maksimami. Jednak obwiednie emisyjne barwników organicznych są dosyć szerokie i nawet jeśli maksima barwników są dobrze rozseparowane, nadal występuje zjawisko przenikania się kanałów.

Na przykład w danym eksperymencie detektor, przed którym ustawiono filtr pasmowy FP1, miał za zadanie rejestrować sygnał pochodzący od wzbudzonych cząstek fluorochromu 1, którymi

wybarwiono komórki A. Jednak może on również rejestrować emisję pochodzącą z tzw. „ogona” emisji fluorochromu 2, którym wybarwiono komórki B, co będzie prowadziło do błędnej interpretacji wyników. Sytuację taką zilustrowano na rysunku 3.

Istnieje zatem konieczność kompensacji sygnałów fluorescencji. Znając stopień przenikania się kanałów (w przypadku standardowych kombinacji barwników i filtrów, są to znane wartości), wykrywaną w danym paśmie emisję pochodzącą od innego barwnika można po prostu odjąć na poziomie oprogramowania. Jeżeli jednak dysponujemy wystarczającą ilością badanego materiału, przed odjęciem najlepiej byłoby zbadać rzeczywistą wykrywalność emisji danego barwnika w pozostałych kanałach. Badanie takie polega na przeprowadzeniu wstępnych pomiarów z wykorzystaniem każdego z barwników osobno.



Rys. 3. Schematyczne przedstawienie zjawiska przenikania się kanałów fluorescencyjnych

Innym sposobem na ograniczenie przenikania się kanałów jest zastąpienie barwników organicznych kropkami kwantowymi (QD) [10, 11]. Te półprzewodnikowe struktury o wymiarach rzędu nanometrów charakteryzują się dużą wydajnością fluorescencji, wąskimi pasmami emisji (bez tzw. „ogonów”) oraz długim czasem zaniku świecenia. Duża wydajność fluorescencji kropek kwantowych przekłada się na zwiększenie czułości metody. Dzięki wydłużonemu czasowi zaniku fluorescencji QD możliwie jest odcięcie sygnału autofluorescencji komórek. Ponadto fotodegradacja kropek kwantowych jest znikoma. Daje im to znaczną przewagę nad organicznymi barwnikami, które w wyniku przemian chemicznych stosunkowo łatwo mogą utracić zdolność do fluorescencji. Jednak kropki kwantowe mogą uszkadzać struktury biologiczne, w związku z czym istnieje konieczność opłaszczania ich materiałami biozgodnymi (np. krzemionką) [12].

Podobnie, jak natężenie promieniowania rozproszonego, wyniki pomiarów natężenia fluorescencji poszczególnych barwników ilustruje się na histogramach i wykresach kropkowych.

Poza badaną populacją komórek, w zawiesinie znajdują się różnego rodzaju zanieczyszczenia. Mogą to być na przykład szczątki uszkodzonych komórek, niezwiązane przeciwciała czy swobodne cząstki barwników. Zwykle obiekty te są mniejsze od badanych komórek. Aby ograniczyć wpływ zanieczyszczeń na wyniki pomiarów, podczas analizy wyników ustala się wartość progową intensywności FS, poniżej której dane nie podlegają dalszej obróbce. Niewielkie obiekty nadal przepływają przez komorę pomiarową, jednak zaniechuje się je na poziomie oprogramowania.

By uzyskać dokładniejsze wyniki, ograniczyć można również wpływ niezwiązanych z komórką cząstek barwników na pomiary natężenia fluorescencji. Osiąga się to, uwzględniając zmiany polaryzacji światła. Promieniowanie laserowe jest liniowo spolaryzowane. Jeżeli podczas pomiarów komórki byłyby nieruchome, a więc cząstki fluorochromów związane z komórką również, to emitowane przez barwniki promieniowanie byłoby spolaryzowane w ten sam sposób. Jeżeli natomiast badana cząstka z barwnikami w stanie wzbudzonego zmieniłaby swoją orientację, to emitowane przez barwniki promieniowanie mają inną płaszczyznę polaryzacji. Zmiany płaszczyzny polaryzacji można monitorować, wykorzystując polaryzatory i odpowiedni układ optyczny przed fotodetekтором. Ponieważ małe obiekty mają większą swobodę poruszania się w komorze niż makromolekuły, wykorzystując polaryzację światła można określić stosunek liczby swobodnych cząstek barwnika do liczby cząstek barwnika związanych z komórkami [2].

Monitorowanie polaryzacji sygnałów emitowanych przez fluorochromy może również dostarczyć informacji. np. o występujących w danej populacji odchyleniach od sferycznej symetrii komórek [13] czy o lepkości cytoplazmy [14].

Cytometr przepływowy składa się z trzech głównych układów: hydrodynamicznego, optycznego i elektronicznego. Podstawowym nośnikiem informacji w cytometrii przepływowej jest światło rozproszone na analizowanej komórce oraz światło pochodzące od wzbudzonego barwnika, który występuje w komórce naturalnie lub jest do niej wprowadzany. Z badanej populacji komórek przygotowuje się zawiesinę, która następnie jest zasysana do zbiornika otoczonego przez zwężający się kanał. Na skutek ogniskowania hydrodynamicznego przez komorę pomiarową ze stałą prędkością rzędu  $10^3$  cząstek/s przepływa strumień pojedynczych komórek [2]. Wielkość badanych cząstek zwykle waha się w granicach od 0,2 do 150 mikronów [15]. Drogę komórek w komorze pomiarowej przecina się wiązka promieniowania laserowego, które rozprasza się na kolejnych przepływających komórkach. Po interakcji z pojedynczą komórką natężenie rozproszonego promieniowania rejestrowane jest przez odpowiednio dobrane i ustawione fotodetektory.

#### 4. Mierzone parametry i przykłady zastosowań

Nie sposób wymienić wszystkich możliwych zastosowań cytometrii przepływowej. Technika ta nie tylko umożliwia ocenę cech morfologicznych (wielkość, ziarnistość) komórek. Pozwala ona także wnioskować o ich cechach fenotypowych (różne białka błonowe czy cytoplazmatyczne) i funkcjonalności (między innymi aktywność enzymatycznej). Wykorzystuje się ją w badaniu pojedynczych komórek, jąder komórkowych i chromosomów. Stosowane metody barwienia pozwalają na zachowanie żywotności komórek i spójności błony komórkowej. Możliwe jest monitorowanie rozpadu i zużycia komórek, procesów apoptotycznych (różnych ich stadiów), nekrozy, procesów mikrocykulacji, fagocytozy, pinocytozy, sekrecji komórkowej, chemotaksji, adhezji i agregacji komórek. Określa się także asymetrię i płynność błon komórkowych. Metoda pozwala na ocenę bezwzględnej liczby komórek wybranych subpopulacji i umożliwia określenie odsetka komórek, w których ekspresja markerów wzrasta pod wpływem badanego czynnika. Możliwa jest także analiza mediatorów metabolizmu tlenowego (generowanie wolnych rodników), mobilizacji i transportu jonów ( $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ). Cytometria jest pomocna w badaniu zmian potencjału błonowego komórek i organelli. Dzięki tej technice udaje się analizować zawartość kwasów nukleinowych (replikację), bada się ploidię komórek, monitoruje polimeryzację białek cytoszkieletu i wiele innych [16, 17].

Wykorzystanie cytometrii umożliwia ocenę fenotypową krwi obwodowej, płynu mózgowo-rdzeniowego, szpiku kostnego czy węzłów chłonnych. Ocena fenotypowa wykonywana jest w zawiesinie komórek żywych. Nie jest zatem możliwe badanie preparatów archiwalnych. Preparat musi być świeży i badany niezwłocznie po pobraniu. Nie należy preparatu zamrażać ani stosować środków konserwujących. Liczba wykrywanych kanałów, która najczęściej nie przekracza ośmiu, jest parametrem ograniczającym możliwość oceniania antygenów danej populacji [17]. Grupowanie poszczególnych subpopulacji komórek nie jest proste i bywa niejednoznaczne. Różnicuje się je w dwuwymiarowym układzie FS vs SS (p. rys. 2).

Ważnym zastosowaniem cytometrii przepływowej jest jej wykorzystanie w diagnostyce chorób rozrostu układu krwionośnego. Technika ta pozwala nie tylko na ocenę morfologicznych cech badanych komórek, ale również na badania cytochemiczne, cytogenne i określanie immunofenotypu komórek. Ocena immunofenotypu komórek ma znaczenie w przypadku ostrych i przewlekłych białaczek, chłoniaków, zespołów mielodysplastycznych i mieloproliferacyjnych [16, 19]. Klasyfikacja immunofenotypowych białaczek polega na oznaczaniu (barwnikami fluorescencyjnymi) markerów powierzchniowych i cytoplazmatycznych. Dzięki analizie odpowiednio wyznakowanej zawiesiny komórek udaje się określić ich pochodzenie, dojrzałość, różnicowanie zawartości DNA. Można również wykrywać koekspreję dwóch fenotypów klonów białaczkowych. Na podstawie wyników rokowań immunofenotypowych można postawić szybką i obiektywną diagnozę. Udaje się wyodrębnić grupę chorych, u których należy zdecydować się na bardziej agresywne leczenie. Zatem wykorzystanie cytometrii przepływowej jest niezwykle pomocne przy wprowadzaniu leczenia, określeniu stopnia reemisji i wykrycia występowania choroby resztkowej [17].

Pojawienie się cytometrii przepływowej umożliwiło znaczący rozwój diagnostyki klinicznej, monitorowania i przebiegu leczenia oraz ocenę morfologiczną i czynnościową komórek, które biorą udział w mechanizmach obronnych. Dzięki cytometrii, standardowa diagnostyka uzupełniana jest o wykazanie mutacji genowej, która jest typowa dla poszczególnych rodzajów niedoborów odporności. Aby rozpoznać pierwotny niedobór odporności, należy opierać się na obrazie klinicznym i badaniach laboratoryjnych. W najcięższych przypadkach znaczenie ma obecność komórek układu odpornościowego, ich wzajemnych proporcji, jak również ocena immunofenotypu [18]. Cytometrię przepływową wykorzystuje się w diagnostyce między innymi zespołu nabytego niedoboru immunologicznego AIDS, przewlekłej chorobie ziarniniakowej, zespole Di George'a czy Wiskotta-Aldricha. W przypadku AIDS ocenia się ilościowo populacje CD4+ i CD8+ [19], oraz przepływ jonów metabolitów i leków przez błonę komórkową i błony organelli [20]. W przypadku podejrzenia AIDS bądź innych niedoborów odporności cytometria przepływowa pozwala na wykonanie specjalistycznych badań immunologicznych, określających parametry takie jak: fagocytoza, rozkład antygenów, różnicowanie i liczbę poszczególnych subpopulacji, stężenie cytokin, które pozwalają wnioskować między innymi o dojrzałości komórek układu odpornościowego [17, 21].

W przypadku komórek nowotworowych ważne jest określenie ich potencjału proliferacyjnego. Istnieje możliwość przewidzenia zagrożenia wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych w guzach litych. Pozwala na to cytometryczne badanie cyklu proliferacyjnego komórek nowotworowych z oceną ploidi DNA, jak również fazy cykli komórkowych białek jak np. cykliny [16, 22]. Metody cytometrii przepływowej doskonale sprawdzają się w przypadku chemioterapii wykorzystującej m.in. metotrexatem czy doksorubicynę, w której zachodzi konieczność określenia odporności wielolekowej (ang. *MultiDrug Resistance*, MDR) [16]. Ocena immunofenotypu pozwala na zaobserwowanie zmian jakościowych, jak również ilościowych w subpopulacjach komórkowych, zmiany ekspresji markerów aktywacji komórkowych i ich zróżnicowanie morfologiczne. Genotypowa ocena pozwala wnioskować o antygenach powierzchniowych jądrowych i cytoplazmatycznych [17].

Wciąż aktualnym problemem badawczym jest poznanie czynników wpływających na apoptozę. Proces ten, fizjologicznie towarzyszący rozwojowi embrionalnemu (np. organów płciowych, siatkówki oka, itp.), występuje również u dorosłych osobników – zbędne komórki są w ten sposób eliminowane. Ogromne znaczenie dla zdrowia ma tu równowaga. Zaburzenia w procesie apoptozy, jej nasilenie lub ograniczenie, prowadzi do wielu groźnych powikłań. Nieregularności w apoptozie skutkują między innymi: nowotworami, chorobami neurodegeneracyjnymi czy autoimmunizacyjnymi. Możliwości oceny cech morfologicznych, fenotypowych, jakości i funkcjonalnych komórek, które daje cytometria przepływowa, sprawiły, że stała się ona główną metodą badawczą wykorzystywaną w eksperymentach służących lepszemu poznaniu apoptozy. Cytometria przepływowa umożliwia oznaczanie zmian morfologicznych, charakterystycznych markerów fenotypowych, zaburzeń w funkcji mitochondriów czy ocenę aktywności kaspaz [23].

Cytometria stopniowo obejmuje kolejne gałęzie medycyny. Wciąż chyba niesłusznie uznaje się ją za niezbyt przydatną w diagnostyce chorób alergicznych. Dzieje się tak głównie ze względu na konieczność wykorzystania zaawansowanych technologii i brak standaryzacji istniejących testów. Podstawowymi narzędziami w diagnostyce alergii wciąż pozostają testy skórne i wywiad kliniczny. Z roku na rok rośnie jednak zainteresowanie testami aktywacji bazofilów (BAT), które poprzez wykorzystanie cytometrii, pozwalają na diagnostykę *in vitro*. Największą zaletą tego typu testów jest eliminacja możliwości wywołania wstrząsu anafilaktycznego, będącego częstym i zagrażającym życiu powikłaniem, szczególnie u pacjentów z alergią pokarmową, lekową czy na jady owadów błonkoskrzydłych. W 2007 roku w Hiszpanii odbyły się pierwsze warsztaty dotyczące zastosowania cytometrii przepływowej w alergologii, na których specjaliści podkreślali konieczność stworzenia nowych standardów tej metody, jak również to, że nie istnieją powody, dla których testy BAT nie miałyby się znaleźć wśród metod diagnostyki chorób alergicznych wykorzystywanych klinicznie.

Prace nad udoskonaleniem i uzupełnieniem dotychczasowych metod diagnostycznych wykorzystujących cytometr przepływowy wciąż trwają. Dlatego też nie sposób w krótkim przeglądzie wyczerpująco przedstawić możliwości wszystkich zastosowań. Podkreślić należy ogromne znaczenie metody i jej potencjał, który pozwala na coraz to szersze wykorzystanie. Pomijając opisane w artykule zastosowania, nawet pobieżne zapoznanie się z tematem pozwala wymienić drogi praktycznego wykorzystania cytometrii np. w diagnostyce chorób autoimmunizacyjnych (np. reumatoidalne

zapalenie stawów, cukrzyca typu I czy zespół Sjögrena) [24, 25], w chorobach płuc i układu oddechowego (nowotwory np. krtani, płuc, histiocytoza, sarkoidoza) [16, 26, 27], przy monitorowaniu stanu pacjentów po tonisilektomii [16, 28], przy badaniach kłykcin kończystych [29, 30] czy diagnostyce przewodu pokarmowego (np. wrzodziejące zapalenie jelit, choroby trzustki) [31].

## 5. Podsumowanie

Cytometria przepływowa jest uniwersalną techniką badawczą. Pierwsze wzmianki o tej metodzie pochodzą sprzed 50 lat, jednak jej intensywny rozwój przypada na ostatnie dwie dekady. Rozwój techniki pozwolił na budowę czułych, szybkich i wydajnych instrumentów. W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu barwników nowej generacji (w szczególności dotyczy to kropek kwantowych), cytometria ma znacznie większą czułość i swoistość oraz pozwala na jednoczesną rejestrację większej liczby parametrów. Cytometria przepływowa pozwala na uzyskanie ogromnej ilości informacji z pojedynczego eksperymentu. Jest dzięki temu docenianą metodą badawczą, eksperymentalną i naukową. Ponadto jednocześnie dostarcza także dane ilościowe, co czyni ją niezastąpionym narzędziem diagnostycznym. Możliwość szybkiej i wieloparametrowej analizy właściwości populacji żywych komórek, jak również łączenie tej techniki z innymi metodami badawczymi sprawia, że cytometria przepływowa znajduje się obecnie w stanie dynamicznego rozwoju.

Rejestracja coraz większej liczby parametrów skutkuje skomplikowaną i żmudną analizą danych. Dlatego obsługa aparatu wymaga wysoko wykwalifikowanych specjalistów. Prawidłowe obchodzenie się z danymi eksperymentalnymi, jak i poprawna analiza wyników, wymagają wiedzy i doświadczenia. Ponadto w wielu przypadkach testy diagnostyczne należy standaryzować. Na szczęście trudności te da się pokonać, a ogromne korzyści płynące z zastosowania cytometrii przepływowej sprawiają, że metoda ta jest systematycznie adaptowana przez kolejne gałęzie medycyny.

## LITERATURA

- [1] J. Skierski: *Cytometria wczoraj i dziś - podróż przez dziesięciolecia*, Cytometria Polska, vol. 1, 2012, s. 4–10.
- [2] H. Shapiro: *Practical flow cytometry*, Wiley-Liss (4th ed.), New York 2003.
- [3] [http://www.appliedcytometry.com/flow\\_cytometry.php](http://www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php)
- [4] J. Kantorski: *Podstawy cytometrii przepływowej*, Central-European Journal of Immunology, vol. 21, 1996, s. 87–93.
- [5] M. Rahman: *Introduction to Flow Cytometry*, AbD Serotec, <http://static.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>
- [6] BD LSRFortessa Specification, [http://www.bdbiosciences.com/documents/bd\\_lsrfortessa\\_brochure.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/bd_lsrfortessa_brochure.pdf)
- [7] Fluorescent Dyes for Flow Cytometric Analysis, <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/application/flow-cytometry/flow-cytometry-fluorophores.htm>
- [8] J. Skierski: *Cytometria przepływowa*, [w:] *Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami*, Z. Józwiak, G. Batrosz, (red.), PWN, Warszawa 2008, s. 494–501.
- [9] M. Kopaczyńska, J. Pucińska, A. Ulatowska-Jarża, H. Podbielska: *Badania mikroskopowe w biomedycynie*, [w:] *Optyka biomedyczna – wybrane zagadnienia*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2011, s. 215–241.
- [10] M. Walling, J. Novak, J.R. Shepard: *Quantum dots for live cell and in vivo imaging*, International Journal of Molecular Sciences, vol. 10(2), 2009, s. 441–491.
- [11] Qdot Probes, <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Qdot.html>
- [12] R. Bakalova, Z. Zhelev, D. Kokuryo, L. Spasov, I. Aoki, T. Saga: *Chemical nature and structure of organic coating of quantum dots is crucial for their application in imaging diagnostics*, International Journal of Nanomedicine, vol. 6, 2011, s. 1719–1732.
- [13] D. Strokotov, A. Moskalensky, V. Nekrasov, V. Maltsev: *Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry*, Cytometry A, vol. 79(7), 2011, s. 570–579.
- [14] T. Lindmo, H. Steen: *Flow cytometric measurement of the polarization of fluorescence from intracellular fluorescein in mammalian cells*, Biophysica Journal, vol. 18(2), 1977, s. 173–187.
- [15] Flow Cytometry Overview, [http://www.appliedcytometry.com/flow\\_cytometry.php](http://www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php)
- [16] D. Burchardt, L. Machowska, K. Derwich, H. Samara, G. Dworacki: *Cytometria przepływowa – możliwości zastosowania w diagnostyce klinicznej zmian w obrębie jamy ustnej*, Nowiny Lekarskie, vol. 77(4), 2008, s. 324–329.



- [17] A. Kaczmarek, A. Mackiewicz, E. Leporowska, T. Osawa: *Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce klinicznej*, Współczesna Onkologia, vol.6, 2002, s. 366–373.
- [18] A. Pituch-Noworolska, K. Bukowska-Strakova, M. Wójcikowska, K. Zwonarz, A. Błaut-Szlósarczyk, A. Szaflarska, *Analiza cytometryczna w trudnych przypadkach pierwotnych niedoborów odporności*, Cytometria Polska, vol. 1, 2012, s. 115–126.
- [19] J.M. Taylor, J.L. Fahey, R. Detels, J.V. Giorgi: *CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection*, Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes, vol. 2(2), 1989, s.114–124.
- [20] J.M. Witkowski: *Udział kationów w transdukcji sygnału w stymulowanych limfocytach T.II.H+ i zmiany pH cytoplazmy*, Postępy Biologii Komórki, vol. 19, 1992, s. 139–145.
- [21] A. Szczawińska-Popłonyk, A. Bręborowicz: *Niedobory odporności*, [w:] *Immunologia kliniczna*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego, Poznań 2008, s. 137–157.
- [22] J. Baran: *Nowa epoka cytometrii przepływowej – przewodnik po współczesnych cytometriach i ich zastosowanie*, Postępy Biologii Komórki, vol. 35(24), 2008, s. 3–15.
- [23] J. Baran: *Współczesne metody oceny apoptozy – wiele dróg do celu*, Cytometria Polska, vol. 1, 2012, s. 11–19.
- [24] B. György, T.G. Szabó, L. Turiák, M. Wright, P. Herczeg, Z. Lédeczi, Á. Kittel, A. Polgár, K. Tóth, B. Dérfalvi, G. Zelenák, I. Böröcz, B. Carr, G. Nagy, K. Vékey, S. Gay, A. Falus: *Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases*, PLoS One, vol. 7 (11), 2012.
- [25] Z. Smoleńska, J. Pawłowska, A. Daca, M. Soroczyńska-Cybula, J. Witkowski, E.M. Bryl: *Disease activity in patients with long-lasting rheumatoid arthritis is associated with changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations*, Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej, vol. 122(12), 2012, s. 591–598.
- [26] T. Urbankowski, G. Hoser, J. Domagała-Kulawik: *Th1/Th2/Th17-related cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis: association with smoking*, Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej, vol. 122(7–8), 2012, s. 320–325.
- [27] A. Szepechiński, P. Kopiński, D. Giedronowicz, A. Rozy, P. Jaguś, M. Szolkowska, J. Chorostowska-Wynimko: *Simple flow cytometric protocol of CD4+/CD8+ lymphocyte ratio assessment in bronchoalveolar lavage fluids from patients with interstitial lung diseases*, Analytical and Quantitative Cytology and Histology, vol. 33(5), 2011, s. 289–296.
- [28] I. Steiner, A. Kostrzewa, M. Grzegorowski, K. Wiktorowicz: *Wpływ tonsilektomii na skład subpopulacji limfocytów krwi obwodowej dziecka*, Nowiny Lekarskie, vol. 67(4), 1998, s. 540–546.
- [29] Z. Karaś, R. Rutkowski: *Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach kłykcin kończystych*, Nowiny Lekarskie, vol. 67(4), 1998, s. 408–411.
- [30] Y. Xu, K.J. Zhu, N. Zhu, D.H. Jiang, X.Z. Chen, H. Cheng: *Expression of Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells and Th1/Th2, Tc1/Tc2 profiles in the peripheral blood of patients with condyloma acuminatum*, Clinical and Experimental Dermatology, vol. 34(2), 2009, s. 229–235.
- [31] Y.Y. Li, H.H. Liu, H.L. Chen, Y.P. Li: *Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate STZ-induced pancreas damage in type 1 diabetes*, Biomedical Materials and Engineering, vol. 22(1–3), 2012, s. 97–103.

otrzymano / submitted: 11.01.2013r.

wersja poprawiona / revised version: 26.02.2013r.

zaakceptowano / accepted: 25.03.2013r.