

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE I POLIKLONALNE I ICH ZASTOSOWANIE W CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ

THE APPLICATION OF MONOCLONAL AND POLICLONAL ANTIBODIES IN FLOW CYTOMETRY

Łukasz SĘDEK¹, Bogdan MAZUR²

¹Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej oraz

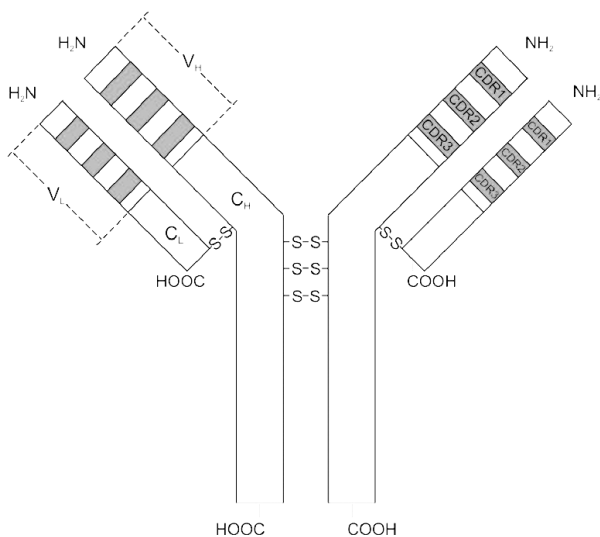
²Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie: Przeciwciała to substancje białkowe zdolne do swoistego wiązania się z antygenem. Przeciwciała poliklonalne to grupa przeciwciał, które rozpoznają różne epitopy tego samego antygeny. Przeciwciała monoklonalne to przeciwciała rozpoznające wyłącznie jeden epitop. Obydwa typy przeciwciał mają zastosowanie diagnostyczne jednak tylko przeciwciała monoklonalne mają zastosowanie w cytometrii przepływowej. Dzięki sprzężaniu przeciwciał z barwnikami fluorescencyjnymi możliwe jest wykrywanie antygenów różnych typów komórek. Rozwiązania techniczne współczesnych cytometrów przepływowych dają możliwość odczytu do kilkunastu różnych fluorescencji jednocześnie, co w praktyce oznacza możliwość jednoczesnej oceny ekspresji do kilkunastu różnych antygenów jednej komórki.

Summary: Antibodies are protein particles capable of specific antigen binding. Polyclonal antibodies comprise of a group of antibodies that recognize different epitopes of the same antigen. Monoclonal antibodies recognize and bind to only one specific epitope. Both types of antibodies have their applications in diagnostic techniques, however only monoclonal antibodies are used in flow cytometry. Conjugation of monoclonal antibodies with fluorescent dyes enables the detection of antigens of different cell types. Contemporary flow cytometers can simultaneously detect more than ten different fluorescences, which gives the possibility of simultaneous assessment of many different antigens of the same cell.

I. PRZECIWCIAŁA

Przeciwciała, czyli immunoglobuliny, to substancje białkowe wytwarzane przez w pełni zróżnicowane limfocyty B – plazmocyty, zdolne do swoistego łączenia się z antygenem. Cząsteczka przeciwciała składa się z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch lekkich i dwóch ciężkich połączonych ze sobą mostkami disiarczkowymi (ryc. 1). Wyróżnia się 5 typów łańcuchów ciężkich: α , δ , ϵ , γ , μ



RYCINA 1. Schemat budowy przeciwciała: V_H – część zmienna łańcucha ciężkiego, V_L – część zmienna łańcucha lekkiego, C_H – część stała łańcucha ciężkiego, C_L – część stała łańcucha lekkiego, CDR1-3 – regiony determinujące dopasowanie (ang. *complementarity determining regions*) (na podst. [1] zmodyfikowane)

oraz 2 typy łańcuchów lekkich: κ i λ . W zależności od typu łańcucha ciężkiego wyróżnia się 5 klas immunoglobulin, odpowiednio: IgA, IgD, IgE, IgG oraz IgM. Zarówno łańcuchy lekkie, jak i ciężkie zawierają części stałe (C) znajdujące się w ich odcinkach C-końcowych (z wolnymi grupami karboksylowymi łańcuchów polipeptydowych) oraz części zmienne obejmujące odcinki N-końcowe (z wolnymi grupami aminowymi). Części stałe łańcuchów ciężkich i lekkich są identyczne dla wszystkich przeciwciał danej klasy. Natomiast części zmienne, kodowane przez wiele genów o skomplikowanych mechanizmach regulacji ekspresji, mogą różnić się znacznie nawet w obrębie jednej klasy. Część zmienna każdego łańcucha składa się z 3 regionów hiperzmiennych, zwanych też regionami determinującymi dopasowanie – CDR (ang. *complementarity determining regions*) i 4 przylegających do nich regionów zrębowych – FR (ang. *frame regions*). Części zmienne łańcuchów ciężkich i lekkich tworzą miejsce wiążące antygen, a przestrzenna konfiguracja tych części, a zwłaszcza leżących w ich obrębie regionów CDR determinuje swoistość przeciwciała, czyli jego selektywne łączenie się z określonym antygenem [1, 2]. Miejsce wiążące antygen zwane jest paratopem i jest przestrzennie dopasowane do determinanty antygenowej (epitopu), czyli określonego fragmentu przestrzennej struktury antygeny.

Według obowiązującej nomenklatury przeciwciałom nadaje się nazwę wskazującą na antygen, jaki rozpoznają, jednakże określenie „przeciwciało przeciwko danemu antygenowi” nie jest do końca jednoznaczne. I chociaż do niektórych celów dalsze precyzowanie tego pojęcia nie jest konieczne, istnieją takie zastosowania, dla których ścisłe określenie swoistości przeciwciała jest kluczowe. Jednym z takich zastosowań jest cytometria przepływowa. Dlatego należy wprowadzić i zdefiniować pojęcia przeciwciała poliklonalnego i monoklonalnego.

I.1. Przeciwciała poliklonalne

Podczas produkcji przeciwciał poprzez immunizację zwierzęcia określonym antygenem, nawet o bardzo wysokiej czystości, każdy klon limfocytów B, który bierze udział w odpowiedzi immunologicznej wytwarza immunoglobuliny swoście rozpo-

nające określony epitop tego antygeny [3, 4]. Biorąc pod uwagę fakt, że w odpowiedzi immunologicznej bierze udział wiele klonów limfocytów B oraz że na jednym antygenie może być obecnych co najmniej kilka różnych epitopów, można się spodziewać powstania mieszaniny przeciwciał rozpoznających różne determinanty, różniących się również powinowactwem, czyli stopniem dopasowania i siłą wiązania z antygenem. Taka grupa przeciwciał, rozpoznająca zasadniczo jeden antygen, ale reagująca z różnymi jego epitopami to przeciwciała poliklonalne (pochodzące od wielu klonów limfocytów B).

I.1.1. Zalety i wady stosowania przeciwciał poliklonalnych

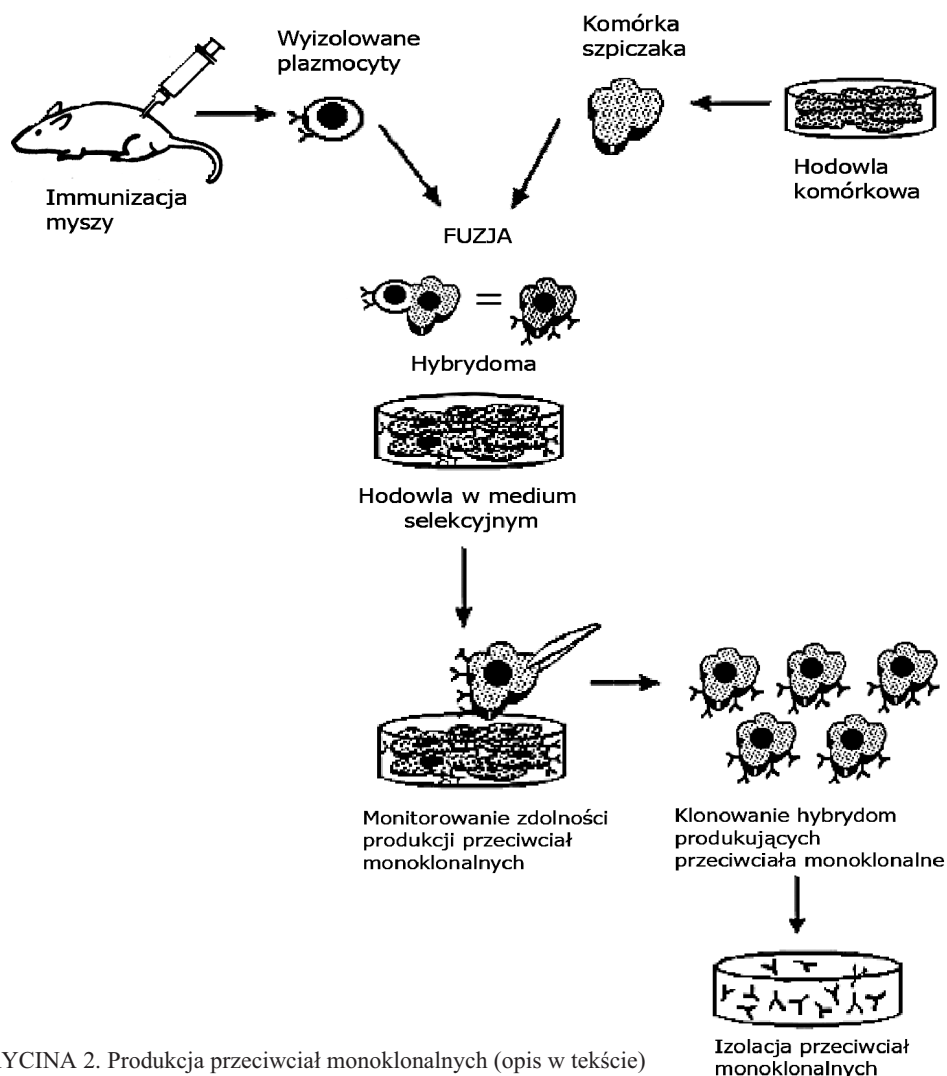
Jak już wspomniano, wybór rodzaju przeciwciał zależy od specyfiki celu, do jakiego mają być użyte. Do wielu badań, obejmujących również niektóre zastosowania w diagnostyce i terapii, przeciwciała poliklonalne są w zupełności wystarczające. Ich niewątpliwym atutem jest stosunkowo niski w porównaniu z przeciwciałami monoklonalnych koszt uzyskiwania. Zdolność do rozpoznawania różnych determinant antygeny sprawia, że przeciwciała poliklonalne mają bardzo wysoką zachłanność (awidność), która wynika z faktu, że całkowita siła oddziaływania przeciwciał poliklonalnych z wieloma różnymi epitopami antygeny jest znacznie większa niż prosta suma pojedynczych oddziaływań, ponieważ związanie jednego przeciwciała zwiększa prawdopodobieństwo przyłączenia kolejnego przeciwciała przez sąsiedni epitop [1–4].

Dzięki tej właściwości, za pomocą przeciwciał poliklonalnych łatwo i z wysoką czułością można stwierdzić obecność lub brak danego antygeny oraz określić jego stężenie. Ponadto, przeciwciała poliklonalne bardzo dobrze sprawdzają się w badaniu złożonych antygenów, w reakcjach immunoprecypitacji lub aglutynacji. Szczególnym zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych są różne surowice odpornościowe, gdyż dzięki wysokiej zachłanności przeciwciała te mają wysoką zdolność neutralizacji toksyn [3, 5]. Ważną zaletą przeciwciał poliklonalnych jest też fakt, że trwałość powstałych z antygenem kompleksów w mniejszym stopniu niż w przypadku przeciwciał monoklonalnych zależy od właściwości roztworu (np. pH) [6].

Przeciwciała poliklonalne nie sprawdzają się jednak w wykrywaniu subtelnych różnic w budowie antygenów. Jeżeli dwa antygeny różnią się tylko jednym epitopem, to przeciwciała poliklonalne w reakcji krzyżowej rozpoznają obydwa antygeny. Ponadto próba wykrycia konkretnego antygeny o wielu epitopach w mieszaninie antygenów za pomocą przeciwciał poliklonalnych będzie nieść ze sobą wysokie ryzyko zajścia reakcji krzyżowych i uzyskania fałszywie pozytywnych wyników. Problemem jest też zróżnicowane powinowactwo przeciwciał poliklonalnych do antygeny, rzutujące na wiarygodność, spójność i powtarzalność wyników. Z wymienionych powodów przeciwciała poliklonalne nie mają zastosowania w czułych i precyzyjnych technikach, takich jak cytometria przepływowa [1, 3].

I.2. Przeciwciała monoklonalne

Przeciwciała monoklonalne są to przeciwciała produkowane przez nieróżnicujące się, stanowiące jeden klon limfocyty B, rozpoznają tylko jedną, ściśle określoną determinantę antygenową [1, 2, 4]. Produkcja przeciwciał monoklonalnych jest



RYCINA 2. Produkcja przeciwciał monoklonalnych (opis w tekście)

bardziej skomplikowana niż przeciwciał poliklonalnych (ryc. 2). Jedną z metod jest metoda opracowana w 1975 r. przez Köhlera i Milsteina polegająca na fuzji komórki plazmatycznej produkującej przeciwciała z komórką szpiczaka (Nagroda Nobla w dziedzinie medycyny w 1984 r.) [7]. Do fuzji używane są komórki plazmatyczne wyizolowane z immunizowanej określonym antygenem myszy oraz komórki szpiczaka z defektem metabolicznym (np. nieprodukujące enzymu fosforybozylotransferazy hipoksantyno-guaninowej – HGPRT). Hodowla mieszaniny komórek poddanych fuzji na specjalnym medium selekcyjnym pozwala pozbyć się niesfuzjowanych plazmacytów oraz komórek szpiczaka, a pozwala jedynie na przeżycie produktów fuzji komórek szpiczaka i plazmacytów (hybrydom). Spośród otrzymanych hybrydom izoluje się i klonuje te, które najbardziej wydajnie produkują przeciwciała. W ten sposób otrzymane hybrydy produkujące przeciwciała o określonej swoistości można dowolnie długo hodować *in vitro* [1–3].

I.2.1. Zalety i wady stosowania przeciwciał monoklonalnych

Przeciwciała monoklonalne używane są wszędzie tam, gdzie przede wszystkim wymagana jest wysoka specyficzność i powtarzalność reakcji z antygenem w ogóle. W szczególności właśnie ten typ przeciwciał znalazł zastosowanie w cytometrii przepływowej. Za takim wyborem przemówiły również inne unikalne własności przeciwciał monoklonalnych. Bardzo ważną zaletą przeciwciał monoklonalnych jest fakt, że dzięki wysokiej specyficzności można używać ich w bardzo małych stężeniach eliminując przy tym skłonność do krzyżowych reakcji z innymi białkami oraz wiązanie niespecyficzne (tło). Poza tym, przeciwciała monoklonalne umożliwiają odróżnienie od siebie minimalnie różniących się antygenów, np. punktową zmianą jednego aminokwasu w obrębie epitopu. Przeciwciała monoklonalne pozwalają też na wykrywanie innych modyfikacji antygeny, takich jak: utlenienie, fosforylacja, czy proteoliza. Przy pomocy przeciwciał monoklonalnych jest ponadto możliwe odróżnienie od siebie izoenzymów, proenzymów od enzymów właściwych, białek prawidłowych od nowotworowych, szczepów bakterii lub mutantów wirusów.

Oprócz swoich niewątpliwych zalet, przeciwciała monoklonalne mają także pewne ograniczenia. Paradoksalnie, niektóre z nich wynikają również z ich wysokiej specyficzności. Na przykład badanie wieloepitopowego antygeny przy pomocy jednego rodzaju przeciwciał monoklonalnych mogącego wiązać się tylko do jednego epitopu może dać wynik nieadekwatny do rzeczywistości. W przypadku skrajnie rzadko występujących lub niedostatecznie wyeksponowanych epitopów uzyskany wynik będzie mocno zaniżony. Ta niska w porównaniu z przeciwciałami poliklonalnymi zachłanność, powoduje, że przeciwciała monoklonalne mają także ograniczone zastosowanie w testach opartych na reakcjach immuno-precypitacji i aglutynacji. Inna wada przeciwciał monoklonalnych wynika z faktu, że wiążą się specyficznie z określonym epitopem, czyli pewnym tylko fragmentem przestrzennej struktury białka, a nie z antygenem jako całością. Z tego powodu dane przeciwciało monoklonalne może rozpoznawać dwa różne antygeny, na których obecny jest ten sam epitop. Prawdopodobieństwo takiej krzyżowej reakcji jest tym większe, im mniejszy jest epitop rozpoznawany przez dane przeciwciało monoklonalne. Stosowanie przeciwciał monoklonalnych w diagnostyce niektórych rodzajów nowotworów również może napotkać pewne ograniczenia. Znane są przypadki, gdy u chorych na szpiczaka mnogiego dochodzi do delecji pewnych fragmentów produkowanych w ich organizmach immunoglobulin. Jeżeli stosowane do wykrycia tych patologicznych immunoglobulin przeciwciało monoklonalne jest skierowane akurat przeciwko temu fragmentowi, który uległ delecji, to uzyskany wynik jest fałszywie negatywny. Dlatego, aby zapobiec takim sytuacjom, prawdopodobne jest, że w przyszłości, przynajmniej do niektórych rodzajów badań z użyciem przeciwciał, będą stosowane mieszaniny przeciwciał monoklonalnych lub przeciwciała poliklonalne [1–5].

I.3. Nazewnictwo przeciwciał

Praca z przeciwciałami może w niektórych przypadkach nastrożyć pewnych problemów. Dotyczy to obydwu typów przeciwciał, jednak nie jest związane z ich

funkcjonalnością, lecz z ugruntowanym historycznie zamieszczeniem w ich nazewnictwie. Początkowo, w momencie pierwszego otrzymania, przeciwciałom nadawano nazwy bezpośrednio kojarzące się z ich funkcjami, jak np. przeciwciało CALLA przeciwko antygenowi powszechnej ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *common acute lymphoblastic leukemia antigen*). Ponieważ różne firmy zajmujące się produkcją przeciwciał nie mogły używać tych samych nazw, przeciwciała rozpoznające ten sam antygen (zgodnie z obowiązującą nomenklaturą: CD4) otrzymały różne nazwy, jak np. Leu3, L3T4, OKT4, W3/25, T4 [3, 8].

W 1982 r. w Paryżu odbyła się pierwsza międzynarodowa Konferencja poświęcona antygenom różnicowania ludzkich leukocytów – HLDA (ang. *Human Leucocyte Differentiation*), której celem było ujednoczenie nazewnictwa tych antygenów [9]. Konsekwencją było wprowadzenie jednolitego systemu nomenklatury przeciwciał zgodnego z nazewnictwem przedziałów antygenów różnicowania CD (ang. *cluster of differentiation* lub *cluster designation*) – struktur występujących na powierzchni komórek, głównie leukocytów. Klasyfikacja antygenów oparta była na badaniu ich rozmieszczenia na różnych typach komórek technikami cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjnej oraz immunohistologii. Określone zostały też masy cząsteczkowe antygenów metodą radioimmunoprecypitacji. Na 1. Konferencji HLDA wyodrębniono 15 przedziałów CD, w których sklasyfikowano około 150 przeciwciał. Do 6. Konferencji HLDA, która odbyła się w 1996 r. w Kobe w Japonii, sklasyfikowano ponad 1000 przeciwciał w 166 przedziałach CD obejmujących limfocyty T i B, komórki NK, komórki mieloidalne, monocyty, płytki krwi [9–14]. Dla porównania, na ostatniej, 8. Konferencji HLDA, która odbyła się w 2004 r. w Adelaide w Australii, wyszczególniono 339 przedziałów CD, a w niektórych z nich dodatkowo subprzedziały. Przy okazji ostatniej Konferencji HLDA zmieniono jej nazwę na HCDM (ang. *Human Cell Differentiation Molecules*), jednocześnie rozszerzając pole badań na komórki inne niż leukocyty, takie jak np. komórki śródbłonna [8, 15–19].

II. ZASADY BARWIENIA KOMÓREK

Rezultaty eksperymentów na komórkach często nie są mierzalne poprzez zwykłą obserwację preparatu pod mikroskopem. Aby naprawdę przekonać się o wyniku eksperymentu, należy najpierw w jakiś sposób uwidocznić jego przedmiot – komórki. Istnieje kilka sposobów uwidaczniania, czyli barwienia komórek:

A. barwienie pośrednie z użyciem przeciwciał:

- ♦ sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi,
- ♦ sprzężonych z enzymami,
- ♦ sprzężonych z biotyną,
- ♦ wyznakowanych radioizotopami;

B. barwienie pośrednie z użyciem cząsteczek innych niż przeciwciała, sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi,

C. barwienie wolnymi barwnikami fluorescencyjnymi,

D. barwienie wolnymi barwnikami niefluorescencyjnymi.

Trzy pierwsze główne typy barwień mają zastosowanie w cytometrii przepływowej i zostaną omówione szerzej w kolejnych podrozdziałach. Wybór określonego sposobu barwienia komórek zależy od celu, w jakim barwienie się przeprowadza. Warto dodać, że wymienione rodzaje barwień mogą uwidocznić struktury powierzchniowe, wewnątrzkomórkowe lub jedno i drugie jednocześnie (por. ryc. 4 i 5).

II.1. Barwienie pośrednie z użyciem przeciwciał

Przeciwciała są bardzo precyzyjnym narzędziem, dzięki któremu można selektywnie wybarwić pożądaną strukturę komórkową – antygen. W wiązaniu przeciwciała z antygenem uczestniczą 4 typy oddziaływań: siły elektrostatyczne (pomiędzy grupami $R-NH_3^+$ i $R-COO^-$), wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe oraz siły van der Waalsa [1, 3, 4]. Na skutek tych oddziaływań dochodzi do trwałego i swoistego związania się przeciwciała z antygenem i utworzenia kompleksu immunologicznego. Trwałość kompleksu zależy od siły oddziaływania przeciwciała z antygenem (powinowactwa), od ilości determinant antygeny i od tego czy przeciwciało jest poliklonalne czy monoklonalne. Te dwa ostatnie warunki określają zachłanność wiązania antygen-przeciwciało. Stabilność kompleksu immunologicznego zależy też od proporcji pomiędzy przeciwciałem a antygenem, temperatury oraz pH i siły jonowej roztworu, w którym zachodzi reakcja. Przy równowadze lub nadmiarze przeciwciał w stosunku do antygeny tworzą się duże kompleksy, które mają skłonność do precipitacji [3, 4].

Samo związanie przeciwciała z antygenem nie wystarczy do uwidocznienia kompleksu. Wiodące zastosowanie w cytometrii przepływowej ma barwienie z użyciem przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi.

II.1.1. Barwienie pośrednie z użyciem przeciwciał sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi

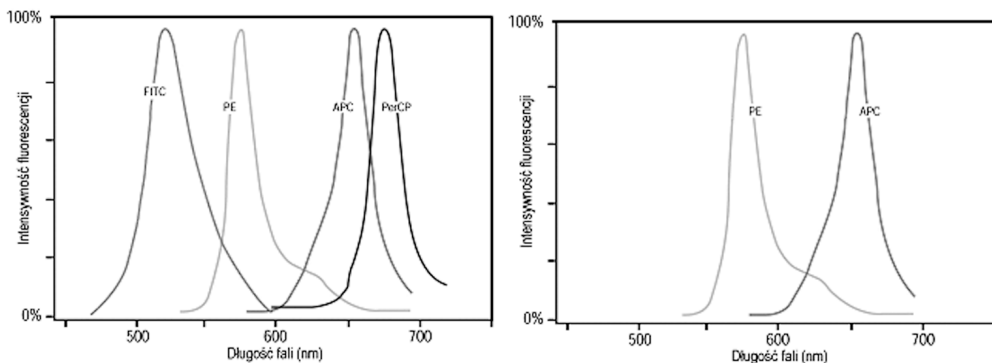
Najszerzej stosowanym w cytometrii przepływowej sposobem wykrywania kompleksów antygen-przeciwciało jest użycie przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym, tzw. fluorochromem lub fluoroforem, czyli cząsteczką mającą zdolność emisji światła poprzez fluorescencję po wzbudzeniu światłem o określonej długości fali. Źródłem światła są lasery gazowe lub oparte na ciałach stałych (kryształach). W cytometrii przepływowej znalazło zastosowanie wiele różnych fluorochromów (tab. I). Każdy fluorochrom ma charakterystyczne dla siebie widmo absorpcji i emisji, dlatego nie każdy fluorochrom może być wzbudzany przez każdy laser. Dobór barwników fluorescencyjnych zależy od tego, w jakie lasery wyposażony jest cytometr, od liczby detektorów fluorescencji, a także od tego, jakie przeciwciała, przeciwko jakim antygenom mają być używane w danym badaniu. Warto zwrócić uwagę, że niektóre fluorochromy nie mogą być stosowane jednocześnie, ze względu na zbyt podobne widmo emisji, wymagające zastosowania tego samego filtra optycznego (np. PE-Cy5, PerCP, PerCp-Cy5.5).

TABELA I. Przykłady fluorochromów, z którymi sprzęgane są przeciwciała stosowane w cytometrii przepływowej. FITC – izotiocyjanian fluoresceiny, PE – fikoerytryna, PE – Cy5 (-Cy7)-fikoerytryna-cyjanina 5 (7), PerCP(-Cy5.5) – peridininochlorofil (-cyjanina 5.5), APC(-Cy7) – allofiko-cyjanina (-cyjanina 7) [52, 53]

Laser (dł. fali)	Fluorochrom	Charakterystyka filtra optycznego
Fioletowy (407 nm)	Pacific Blue	450/50
	Am-Cyan	525/50
	Cascade Yellow	550/30
Niebieski (488 nm)	FITC	530/30
	PE	575/26
	Texas Red	630/30
	PE-Cy5	695/40
	PerCP	
	PerCP-Cy5.5	780/60
	PE-Cy7	
Żółty (594 nm)	Alexa 594	618/25
Czerwony (635 nm)	APC	670/30
	Alexa 680	712/20
	Alexa 700	730/40
	APC-Cy7	780/60

Stosowanie wielu fluorochromów jednocześnie w wielokolorowej cytometrii przepływowej, oprócz oczywistej dużej możliwości analizy i precyzji w określeniu immunofenotypu populacji komórek, niesie ze sobą pewne problemy. Mianowicie stosując jedynie filtry optyczne nie da się uniknąć konsekwencji faktu, że widma emisji poszczególnych fluorochromów zachodzą na siebie (ryc. 3). Zachodzenie widm emisji powoduje, że dany detektor mierzy nie tylko światło wyemitowane przez przypisany do niego fluorochrom, lecz także tę część światła wyemitowaną przez inny fluorochrom, która mieści się w „oknie” przepuszczalności spektralnej filtra optycznego umieszczonego przed danym detektorem. Efekt ten przynajmniej częściowo jest niwelowany poprzez odejmowanie od sygnału

mierzonego w danym kanale części sygnału pochodzącego od innych fluorochromów. Operacja ta zwana jest kompensacją i jest przeprowadzana przez komputer sterujący cytometrem dla każdej pary fluorochromów z



RYCINA 3. Widma emisji różnych fluorochromów zachodzą na siebie. Stosowanie filtrów umożliwia rozdzielanie od siebie sygnałów pochodzących od różnych fluorochromów i wydzielenie interesującego wycinka spektrum [64]

osobna. Podstawą obliczenia optymalnej kompensacji jest jednak odpowiednie ustawienie napięć na fotopowielaczach sygnału mierzonej fluorescencji (PMT), gwarantujące umiejscowienie wszystkich komórek, w zakresie mierzalności, w sposób taki, aby możliwe było rozróżnienie pomiędzy komórkami negatywnymi, słabo pozytywnymi lub silnie pozytywnymi na dany antygen. Zadanie to nie jest łatwe biorąc pod uwagę różne charakterystyki spektralne stosowanych fluorochromów oraz odmienne zachowania różnych przeciwciał sprzężonych z tym samym barwnikiem [20–24].

Mając do dyspozycji odpowiednie przeciwciała sprzęgnięte z barwnikami fluorescencyjnymi można określić skład antygenowy komórek w próbce. Określanie składu antygenowego z użyciem przeciwciał nazywa się immunofenotypowaniem, a same przeciwciała stosowane w cytometrii przepływowej powinny być przeciwciałami monoklonalnymi. Warunkiem przeprowadzenia pomiaru cytometrycznego jest uzyskanie zawiesiny komórek (lub ich fragmentów) w odpowiednim buforze. O ile tkanki płynne (krew, szpik kostny, płyn mózgowo-rdzeniowy) przeważnie nie wymagają żadnego wstępnego przygotowania przed barwieniem, o tyle w przypadku tkanek stałych (węzłów chłonnych, bioptatów) konieczna jest homogenizacja i filtracja. Niektóre rodzaje materiału, jak krew i szpik kostny wymagają zastosowania antykoagulantów (takich jak EDTA, heparyna) oraz lizy erytrocytów [20, 25]. Dla niektórych zastosowań, takich jak immunofenotypizacja szpiku kostnego w diagnostyce białaczek lub ocena liczebności CD34-pozytywnych komórek macierzystych, kluczowym jest, by badane komórki były żywe przed barwieniem [20]. Podstawowym warunkiem zapewnienia maksymalnej żywotności komórek i integralności ich błony komórkowej jest badanie przeprowadzone na świeżo pobranym materiale. Komórki martwe bowiem często niespecyficznie wiążą przeciwciała, co powoduje zafałszowanie wyników i znacznie utrudnia późniejszą analizę [26–27]. W szczególności do analizy cytometrycznej nie nadaje się więc materiał rozmrażany. Cytometria przepływowa pozwala na jednoczesną ocenę żywotności badanych komórek. Osiągnąć to można stosując równolegle do barwienia przeciwciałami, barwienie np. jodkiem propidyny (PI), który wnika do martwych komórek i wiąże się z ich DNA (por. niżej).

Przygotowanie próbki do pomiaru cytometrycznego zależy od tego, czy badany antygen znajduje się na powierzchni komórki, czy wewnątrz niej (cytoplazma, jądro komórkowe).

II.1.1.1. *Barwienie powierzchniowe z użyciem przeciwciał sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi*

Barwienie powierzchniowe przeprowadza się bezpośrednio po uzyskaniu zawiesiny materiału, poprzez inkubację z przeciwciałem monoklonalnym lub częściej z wieloma przeciwciałami sprzężonymi z różnymi fluorochromami. Barwienie powinno odbywać się w ciemności, w temperaturze pokojowej. Następnie, komórki muszą zostać poddane działaniu buforu utrwalającego barwienie, który dodatkowo powoduje lizę erytrocytów niezbędną do analizy próbek z krwi i szpiku kostnego. W jednym z wariantów protokołu barwienia, po etapie lizy, komórki wymagają przepłukania buforem, najczęściej specjalnie wzbogaconym roztworem PBS w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał oraz resztek roztworu lizującego. Wiązanie przeciwciała-antygen jest na ogół silne i kompleksy takie są trwałe

przez dłuższy czas. Przechowywanie wybarwionych próbek nie jest jednak wskazane ze względu na fakt, że zdolność emisji fluorescencji przez fluorochromy może znacząco obniżyć się [28].

Techniką cytometrii przepływowej można badać rozmaite antygeny powierzchniowe. Najczęściej są to różne antygeny różnicowania – cząsteczki CD, występujące głównie na leukocytach, antygeny płytkowe, erytrocytarne, antygeny komórek macierzystych i wiele innych (ryc. 4).

II.1.1.2. Barwienie wewnątrzkomórkowe z użyciem przeciwciał

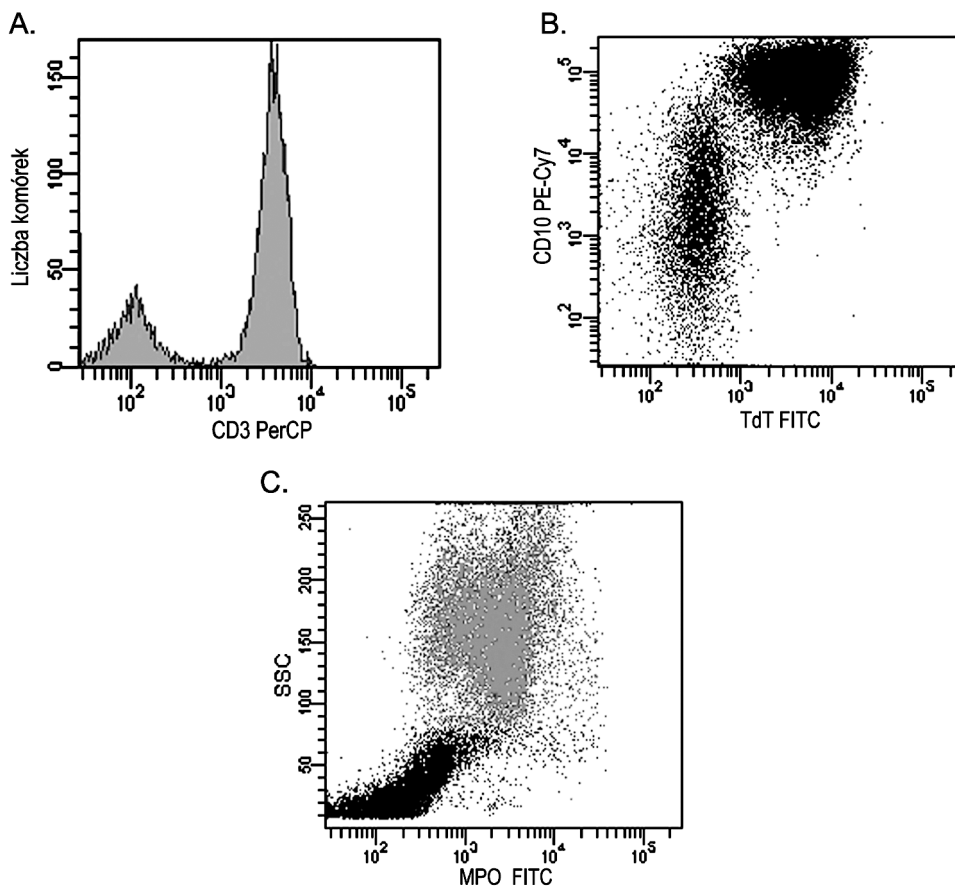
Barwienie antygenów wewnątrzkomórkowych, zarówno cytoplazmatycznych, jak i jądrowych, wymaga wcześniejszego utrwalenia komórek, najczęściej poprzez inkubację w roztworze zawierającym formaldehyd. Po utrwaleniu, komórki muszą zostać poddane permeabilizacji łagodnym detergentem. Jest to proces, w którym błona komórkowa jest częściowo dezintegrowana i staje się przepuszczalna dla cząstek określonych rozmiarów, przy czym komórka jako całość nie traci swej integralności. Równocześnie z działaniem środka permeabilizującego, komórki inkubuje się z przeciwciałem monoklonalnym przeciwko wewnątrzkomórkowemu antygenowi. Odpowiedni dobór roztworu permeabilizującego pozwala na przejście do wnętrza komórki nawet tak dużych cząsteczek jak pentameryczne przeciwciało klasy IgM. Podobnie jak przy barwieniu powierzchniowym konieczne jest odplukanie roztworu utrwalającego i permeabilizującego oraz niezwiązanych przeciwciał roztworem PBS [28]. Najczęściej oznaczanymi za pomocą przeciwciał monoklonalnych antygenami cytoplazmatycznymi są cytoplazmatyczne immunoglobuliny (np. cI μ [29]), enzymy (np. mieloperoksydaza – MPO [30]), cytokiny wewnątrzkomórkowe (np. TNF α [31]) oraz cząsteczki przekaźników sygnału (np. ZAP-70 [32]). Z antygenów jądrowych należy wymienić ważny w diagnostyce ostrych białaczek limfoblastycznych enzym transferazę nukleotydów terminalnych (TdT [33]) (ryc. 4).

Utrwalanie komórek przed barwieniem wewnątrzkomórkowym niesie jednak ze sobą pewien efekt uboczny, polegający na zmianie charakterystyki rozproszenia światła przez komórki. Nie stanowi to jednak większego problemu przy analizie takich próbek. Można natomiast wykorzystać obraz rozproszenia komórek utrwalonych i nieutrwalonych do porównania zmian spowodowanych użyciem środka utrwalającego [20].

II.1.2. Barwienie pośrednie z użyciem przeciwciał sprzężonych z biotyną lub enzymami

Alternatywą dla przeciwciał sprzężonych z fluorochromami jest ich sprzężanie z biotyną. Do wykrywania kompleksów z antygenem stosuje się w takich układach awidynę lub streptawidynę – białka o wysokim powinowactwie do biotyny, które sprzężane są z barwnikiem fluorescencyjnym. Jedna cząsteczka awidyny lub streptawidyny może związać 4 cząsteczki biotyny, co zwiększa czułość testu [34].

Przeciwciała mogą być również sprzężane z enzymami. Takie układy nie mają jednak zastosowania w cytometrii przepływowej, lecz w innej grupie technik, zwanych immunoenzymatycznymi. Do najważniejszych z nich należy technika ELISA (ang. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), *Western Blot* oraz techniki PAP i APAAP.



RYCINA 4. Różne rodzaje barwień i różne typy prezentacji wyników pomiaru cytometrycznego: A – barwienie powierzchniowe antygeny CD3 (histogram), B – barwienie wewnątrzkomórkowe enzymu jądrowego transferazy nukleotydów terminalnych TdT połączone z barwieniem powierzchniowym antygeny CD10 (wykres kropkowy, prezentacja fluorescencji pochodzącej od dwóch różnych fluorochromów), C – barwienie wewnątrzkomórkowe enzymu cytoplazmatycznego mieloperoksydazy MPO (wykres kropkowy, połączenie obrazu fluorescencji i rozproszenia bocznego SSC)

W najczęściej stosowanych odmianach testu ELISA przeciwciało jest związane ze stałym podłożem. Następnie dodawana jest próbka zawierająca oznaczany antygen. Kompleks antygeny z przeciwciałem wykrywany jest przeciwciałami sprzężonymi z enzymem, np. peroksydazą chrzanową (HRP) lub alkaliczną fosfatazą (AP). W ostatnim etapie testu dodawany jest substrat dla enzymu sprzężonego z przeciwciałem (np. dichlorowodorek p-fenylendiaminy dla peroksydazy chrzanowej lub np. fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indoksyłowy (BCIP) lub błękit nitrotetrazolowy (NBT) dla alkalicznej fosfatazy) [35]. Produkt reakcji jest barwny i oznacza się go metodą spektrofotometryczną. Natężenie barwy produktu jest proporcjonalne do ilości enzymu, która z kolei jest proporcjonalna do ilości oznaczanego antygeny [36, 37].

Inna z metod – *Western Blot* opiera się o wykrywanie białek przeniesionych po elektroforezie z żelu na specjalną membranę nitrocelulozową lub nylonową.

Przeniesione na zasadzie elektrotransferu białka wykrywane są na membranie przeciwciałami rozpoznającymi badany antygen. Kompleksy antygen-przeciwciało wykrywane są metodą immunoenzymatyczną, po inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z enzymem, podobnie jak w teście ELISA [38].

Techniki PAP (peroksydaza-antyperoksydaza) i APAAP (alkaliczna fosfataza-antyalkaliczna fosfataza) są również przykładami barwień komórek z użyciem przeciwciał sprzężonych z enzymami. Ich głównym zastosowaniem jest barwienie rozmazów krwi lub szpiku kostnego. [35]. Metody te polegają na trzyetapowym barwieniu antygenu przeciwciałami pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowymi. Przeciwciało trzeciorzędowe jest przeciwciałem rozpoznającym właściwy dla siebie enzym (peroksydazę lub alkaliczną fosfatazę). Wykrywanie kompleksu odbywa się po dodaniu roztworów odpowiedniego enzymu, a następnie substratu. Takie wieloetapowe barwienie zapewnia wysoką czułość i stabilność powstałych kompleksów. Jednak ze względu na pracochłonność tych technik zostały one prawie całkowicie zastąpione prostszymi, lecz równie czułymi metodami [34].

II.1.3. Inne barwienia z użyciem przeciwciał

Do barwienia komórek i uwidaczania kompleksów antygen-przeciwciało mogą służyć też przeciwciała znakowane radioizotopami. Takie przeciwciała nie mają jednak zastosowania w cytometrii przepływowej. Technikami alternatywnymi do cytometrii przepływowej opartymi na wykrywaniu radioizotopów są metody emisyjnej tomografii pozytonowej – PET (ang. *Positron Emission Tomography*) i emisyjnej tomografii pojedynczego fotonu – SPECT (ang. *Single Photon Emission Computed Tomography*) [39, 40].

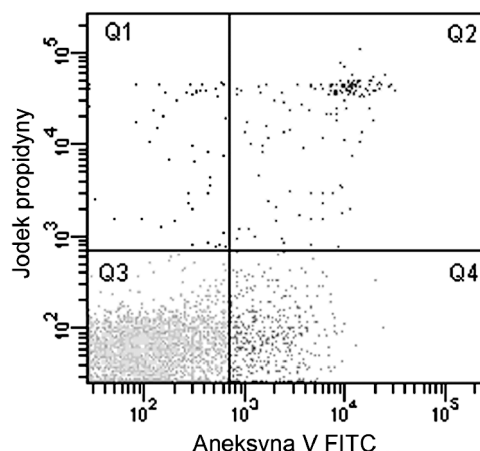
II.2. Barwienie pośrednie z użyciem cząsteczek innych niż przeciwciała, sprzężonych z barwnikami fluorescencyjnymi

Z barwnikami fluorescencyjnymi mogą być również sprzęgane inne niż przeciwciała cząsteczki. Przykładami mogą być lektyny wiążące węglowodany [41] oraz tzw. przeciwciała antyfosfolipidowe, których przedstawicielem jest np. aneksyna V. Ten ostatni związek ma zdolność wiązania się z fosfatydyloseryną – fosfolipidem błonowym. W warunkach fizjologicznych fosfolipid ten znajduje się po wewnętrznej (cytoplazmatycznej) stronie błony komórkowej. Kiedy jednak komórka wchodzi na drogę apoptozy, fosfatydyloseryna zostaje przemieszczona na zewnętrzną stronę błony. Fakt ten został wykorzystany w jednej z metod wykrywania apoptozy, w której aneksyna V jest stosowana w parze z jodkiem propidyny (ryc. 5). Test z użyciem aneksyny V i jodku propidyny jest przykładem jednoczesnego barwienia powierzchniowego i wewnątrzkomórkowego [42–44].

II.3. Barwienie wolnymi barwnikami fluorescencyjnymi

W przypadku barwienia z użyciem przeciwciał sprzężonych z fluorochromami, każdy ze składników odgrywa swoją rolę: przeciwciało wiąże się swoiście z odpowiednim antygenem, natomiast fluorochrom pozwala wykryć utworzony

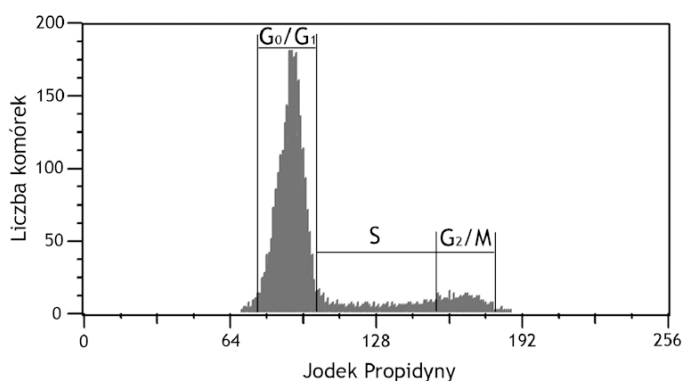
kompleks. Barwniki fluorescencyjne stosowane samodzielnie mogą spełniać obydwie te funkcje jednocześnie: wiążą się z odpowiednią dla siebie strukturą docelową i dają wykrywalny sygnał utworzenia kompleksu. Spektrum barwników fluorescencyjnych, które można stosować w stanie wolnym, niesprzężonym z przeciwciałami jest szerokie, podobnie jak spektrum zastosowań takich barwień. Barwniki fluorescencyjne w stanie wolnym, w większości mają zdolność wiązania się z DNA, co znalazło zastosowanie m.in. w testach określających zawartość DNA w komórce. Za pomocą innych wolnych barwników możliwe jest badanie procesów oksydacyjnych (wybuch tlenowy), badanie zmian potencjału błonowego, zdolności fagocytarnej komórek, wewnątrzkomórkowego pH, czy aktywności enzymatycznej. Najważniejsze barwniki wraz z zastosowaniami zostały zebrane w tabeli II.



RYCINA 5. Wykrywanie apoptozy: ćwiartka Q1 – komórki nekrotyczne (wybarwione jedynie jodkiem propidyny), ćwiartka Q2 – komórki w późnej fazie apoptozy (wybarwione zarówno aneksyną V, jak i jodkiem propidyny), ćwiartka Q3 – komórki żywe, ćwiartka Q4 – komórki we wczesnej fazie apoptozy (wybarwione tylko aneksyną V)

II.3.1. Barwniki wiążące się z DNA

Barwniki fluorescencyjne (jak np. bromek etydyny czy jodek propidyny) wiążą się z DNA poprzez interkalację pomiędzy komplementarnymi zasadami obydwu jego nici. Jest to wiązanie stechiometryczne, dzięki czemu możliwa jest nie tylko jakościowa ocena reakcji tych barwników z DNA, ale również i ilościowa. Barwienie DNA danej próbki może dać dwa rodzaje informacji: na temat ploidi DNA oraz proporcji pomiędzy komórkami znajdującymi się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (ryc. 6). Ta grupa barwników znalazła więc szczególne zastosowanie w diagnostyce różnych chorób przebiegających z zaburzeniem ploidi DNA, bądź cyklu komórkowego [20, 45]. Poprzez porównanie położenia pików odpowia-



RYCINA 6. Profil DNA. Najwyższy pik to komórki nie dzielące się, będące w fazie G_0 lub G_1 cyklu komórkowego (komórki diploidalne). Drugi mniejszy pik to komórki w fazie G_2 i M (mitozy), o podwojonej ilości DNA (komórki tetraploidalne). Pomiedzy pikami znajdują się komórki w fazie S (syntezy DNA)

TABELA II. Barwniki fluorescencyjne stosowane w stanie wolnym do barwienia komórek i ich zastosowanie

Barwnik	Możliwe zastosowanie	Literatura
PI* (jodek propidyny)	badanie żywotności komórek, wykrywanie apoptozy, ocena fazy cyklu komórkowego, ocena ploiddii DNA, wykrywanie aneuploidii	[20], [28], [44], [54], [55]
EtBr* (bromek etydyny)		
DAPI* (4',6-diamidino-2-fenylindol)		
Hoechst 33258*, 33342*		
FDA** (dwooctan fluoresceiny)	pomiar wybuchu tlenowego, badanie żywotności komórek	[55], [56]
HE** (hydroetydyna)	pomiar wybuchu tlenowego	[57, 58]
DCFH-DA** (dwooctan dichlorofluoresceiny)		[57, 59, 60]
DHR** (dihydrorodamina 123)	pomiar wybuchu tlenowego, badanie aktywności enzymów	[57, 59]
różne estry fluoresceiny**	badanie aktywności enzymów, ocena zdolności fagocytarnej komórek	[58, 60, 61]
diacetoksy-2,3-dicyjanobenzen	badanie wewnątrzkomórkowego pH	[62]
CFSE**	badanie odpowiedzi limfocytów T na różne antygeny	[63]

* barwniki wiążące się z DNA; ** barwniki nabywające właściwości fluorescencyjne po przekształceniu przez enzym

dającego fazy G_0/G_1 (faza spoczynku) pomiędzy próbką badaną a diploidalną próbką kontrolną, można określić jej ploidię. Natomiast określenie proporcji komórek w poszczególnych fazach cyklu wymaga podzielenia histogramu na trzy regiony odpowiadające fazom G_0/G_1 , S (faza syntezy DNA) i G_2/M (faza po zakończeniu replikacji i mitozą) oraz obliczenia powierzchni pod pikami (fazy G_0/G_1 i G_2/M) i pomiędzy nimi (faza S).

II.3.2. Barwniki nabywające właściwości fluorescencyjnych po przekształceniu przez enzym

Istnieją też barwniki, które dopiero po przekształceniu przez enzym nabywają zdolności do emisji fluorescencji (tab. II). Stosuje się je do pomiarów aktywności enzymów, które tę konwersję przeprowadzają. Najszersze zastosowanie mają związki, które nabywają właściwości fluorescencyjnych po utlenieniu przez reaktywne formy tlenu, takie jak: nadtlenek wodoru (H_2O_2) – produkt aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), a także rodnik hydroksylowy ($^{\circ}OH$) oraz tlen singletowy (1O_2). Reaktywne formy tlenu są wytwarzane przez aktywowane inicjacją fagocytozy granulocyty w procesie zwanym wybuchem tlenowym, najczęściej jako odpowiedź na infekcje bakteryjne. W wybuchu tlenowym granulocyty, a także

monocyty, przy udziale enzymu mieloperoksydazy (MPO) mogą produkować kwas podchlorawy (HClO) [46–48].

II.4. Barwienie wolnymi barwnikami niefluorescencyjnymi

Istnieje jeszcze duża grupa barwników, które nie wykazują właściwości fluorescencyjnych, jednak są szeroko stosowane do barwienia komórek. Barwienie komórek z użyciem tego typu barwników nie ma jednak zastosowania w cytometrii przepływowej. Barwniki te stosuje się np. do barwienia rozmazów krwi lub szpiku kostnego (barwienie metodami May-Grünwald-Giemsa, Wrighta, Romanovsky'ego, Pappenheima), a także w testach żywotności (błękit trypanu) [49].

Do tej grupy barwników należą też związki, które dają barwny produkt w wyniku reakcji enzymatycznej. Przykładem może być błękit nitrotetrazolowy (NBT), który w formie zredukowanej tworzy niebieskie kryształy. Wykorzystuje się go do oceny aktywności enzymów oksydoredukcyjnych (głównie alkalicznej fosfatazy) i zdolności fagocytarnej komórek [35, 50]. Innym związkiem służącym do badania aktywności enzymów oksydoredukcyjnych (głównie peroksydazy) jest diaminobenzodyna (DAB), dająca po utlenieniu barwny produkt [35, 51].

Inne barwniki z tej grupy mają zastosowanie w diagnostyce białaczek i zespołów limfoproliferacyjnych. Należą tu np. Sudan czarny B barwiący lipidy obojętne, fosfolipidy i cerebrozydy, PAS (*periodic-acid-Schiff*) wiążący się z glikogenem, a także estry fosforanów – substraty enzymu lizosomalnego kwaśnej fosfatazy oraz wspomniane wcześniej fosforany związków aromatycznych, będące substratem dla alkalicznej fosfatazy granulocytów (FAG) [35, 51].

LITERATURA

- [1] GOŁĄB J, JAKÓBISIAK M, LASEK W. Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [2] ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. tłum. pod red. J. Żeromskiego. Immunologia. Wydawnictwo Medyczne Słotwiński Verlag, Brema 1996.
- [3] KEREN DF. Background on surface marker assays and immunologic reagents. W: Keren DF, McCoy Jr. JP, Carey JL. [red.] Flow cytometry in clinical diagnosis. ASCP Press, American Society for Clinical Pathology, Chicago 2001: 1–26.
- [4] BOENISCH T. Antibodies. W: Boenisch T. [red.] Immunochemical Staining Methods Handbook. Dako Corporation, Carpinteria, California, 3rd Edition, 2001: 5–11.
- [5] PETERS JH, BAUMGARTEN H. [red.] Monoclonal antibodies. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 1992.
- [6] BOENISCH T. Diluent buffer ions and pH: their influence on the performance of monoclonal antibodies in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1999; 7(4): 300–306.
- [7] KOHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 445–497.
- [8] ZOLA H, SWART B, NICHOLSON I, AASTED B, BENSUSSAN A, BOUMSELL L, BUCKLEY C, CLARK G, DRBAL K, ENGEL P, HART D, HOREJSI V, ISACKE C, MACARDLE P, MALAVASI F, MASON D, OLIVE D, SAALMUELLER A, SCHLOSSMAN SF, SCHWARTZ-ALBEIZ R, SIMMONS P, TEDDER TF, UGUCCIONI M, WARREN H. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 2005; 106(9): 3123–3126.
- [9] BERNARD A, BOUMSELL L, DAUSSET J et al. [red.] Leucocyte typing. Springer-Verlag, Berlin: 1984.
- [10] RENHERZ EL, HAYNES BF, NADLER LM et al. [red.] Leukocyte typing II. Springer-Verlag, New York, NY: 1986.

- [11] MCMICHAEL AJ. [red.] Leukocyte typing III. Oxford University Press, Oxford: 1987.
- [12] KNAPP W, DORKEN B, GILKS WR et al. [red.] Leucocyte typing IV. Oxford University Press, Oxford: 1990.
- [13] SCHLOSSMANN SF, BOUMSELL L, GILKS W et al. [red.] Leukocyte typing V. Oxford University Press, New York, NY: 1995.
- [14] KISHIMOTO T, KIKUTANI H, VON DEM BORNE A et al. [red.] Leukocyte typing VI. Garland Publishing Inc, New York, NY: 1997.
- [15] ABDO M, IRVING B, HUDSON P, ZOLA H. Development of a cluster of differentiation antibody-based protein microarray. *J Immunol Methods* 2005; **305**(1): 3–9.
- [16] ALGANIK MP, HARDIE DL, SWART B, DANDIE GW, ZOLA H, SHAW S, SHAPIRO H, TINCKAM K, MILFORD EL, WAND MP. Detecting antibodies with similar reactivity patterns in the HLDA8 blind panel of flow cytometry data. *J Immunol Methods* 2005; **305**(1): 67–74.
- [17] VIDAL-LALIENA M, ROMERO X, MARCH S, REQUENA V, PETRIZ J, ENGEL P. Characterization of antibodies submitted to the B cell section of the 8th Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop by flow cytometry and immunohistochemistry. *Cell Immunol* 2005 Sep 10 [w druku].
- [18] REDDY M, WONG J, DAVIS C, PRABHAKAR U. Co-expression of IL-12 receptors along with CXCR3 and CD25 on activated peripheral blood T lymphocytes. *Cell Immunol* 2005 Sep 12 [w druku].
- [19] HALDER S, HARDIE DL, SCHEEL-TOELLNER D, SALMON M, BUCKLEY CD. Generation and characterization of novel stromal specific antibodies. *Cell Res* 2005; **15**(9): 739–744.
- [20] MCCOY JR. JP. Basic principles in clinical flow cytometry. W: Keren DF, McCoy Jr. JP, Carey JL. [red.] Flow cytometry in clinical diagnosis. ASCP Press, American Society for Clinical Pathology, Chicago 2001: 45–57.
- [21] KANTORSKI J. Podstawy cytometrii przepływowej. *Centr Eur J Immunol* 1996; **21**: 87–93.
- [22] RADCLIFF G, JAROSZEWSKI MJ. Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1998; **91**: 1–24.
- [23] GIVAN AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 2004; **263**: 1–32.
- [24] MAECKER HT, TROTTER J. Flow Cytometry Controls, Instrument Setup, and the Determination of Positivity. *Cytometry Part A* 2006; **69A**: 1037–1042.
- [25] ŻEROMSKI J, DWORACKI G. Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cytometrii przepływowej – uwagi praktyczne i zastosowanie kliniczne. *Centr Eur J Immunol* 1996; **21**: 99–106.
- [26] ORFAO A, SCHMITZ G, BRANDO B, RUIZ ARGUELLES A, BASSO G, BRAYLAN R et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem* 1999; **45**: 1708–1717.
- [27] PITUCH-NOWOROLSKA A. Zastosowanie cytometrii przepływowej do diagnostyki białaczek i chłoniaków niezłośliwych. *Centr Eur J Immunol* 1996; **21**: 138–146.
- [28] SĘDEK Ł, MAZUR B. Wieloparametryczna cytometria przepływowa jako nowa technika w ręku diagnosty laboratoryjnego – cz. II. Laboratorium. *Przegląd Ogólnopolski* 2007; **4**: 42–46.
- [29] KÖNIKOVA E, BABUSIKOVA O, MESAROSOVA A, KUSENDA J, GLASOVA M. Cytoplasmic and surface membrane phenotypic markers in cells of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasma* 1994; **41**(2): 69–74.
- [30] PEFFAULT DE LATOUR R, LEGRAND O, MOREAU D, PERROT JY, BLANC CM, CHAOUI D, CASADEVALL N, MARIE JP. Comparison of flow cytometry and enzyme cytochemistry for the detection of myeloperoxidase in acute myeloid leukaemia: interests of a new positivity threshold. *Br J Haematol* 2003; **122**(2): 211–216.
- [31] ROSTAING L, PERES C, TKACZUK J, CHARLET JP, BORIES P, DURAND D, OHAYON E, DE PREVAL C, ABBAL M. *Ex vivo* flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN-gamma, and TNF-alpha in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2000; **20**(1): 18–26.
- [32] WIESTNER A. Flow cytometry for ZAP-70: New colors for chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; **70**(4): 201–203.
- [33] FARAHAT N, LENS D, MORILLA R, MATUTES E, CATOVSKY D. Differential TdT expression in acute leukemia by flow cytometry: a quantitative study. *Leukemia* 1995; **9**(4): 583–587.
- [34] BOENISCH T. Staining methods. W: Boenisch T. [red.] Immunochemical Staining Methods Handbook. Dako Corporation, Carpinteria, California, 3rd Edition, 2001: 26–31.
- [35] BOENISCH T. Basic Enzymology. W: Boenisch T. [red.] Immunochemical Staining Methods Handbook. Dako Corporation, Carpinteria, California, 3rd Edition, 2001: 14–16.
- [36] MADERSBACHER S, WOLF H, GERTH R, BERGER P. Increased ELISA sensitivity using a modified method for conjugating horseradish peroxidase to monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1992; **152**(1): 9–13.

- [37] MARKHAM R, YOUNG L, FRASER IS. An amplified ELISA for human tumour necrosis factor alpha. *Eur Cytokine Netw* 1995; **6**(1): 49–54.
- [38] LAZZAROTTO T, MAINE GT, DAL MONTE P, RIPALTI A, LANDINI MP. A novel Western blot test containing both viral and recombinant proteins for anticytomegalovirus immunoglobulin M detection. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(2): 393–397.
- [39] VEREL I, VISSER GW, VOSJAN MJ, FINN R, BOELLAARD R, VAN DONGEN GA. High-quality 124I-labelled monoclonal antibodies for use as PET scouting agents prior to 131I-radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; **31**(12):1645–1652.
- [40] BOUCEK JA, TURNER JH. Validation of prospective whole-body bone marrow dosimetry by SPECT/CT multimodality imaging in 131I-anti-CD20 rituximab radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; **32**(4): 458–469.
- [41] GUASCH RM, GUERRI C, O'CONNOR JE. Study of surface carbohydrates on isolated Golgi subfractions by fluorescent-lectin binding and flow cytometry. *Cytometry* 1995; **19**(2): 112–118.
- [42] WILKINS RC, KUTZNER BC, TRUONG M, SANCHEZ-DARDON J, MCLEAN JR. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. *Cytometry* 2002; **48**(1): 14–19.
- [43] DARZYNKIEWICZ Z, HUANG X, OKAFUJI M, KING MA. Cytometric methods to detect apoptosis. W: Darzynkiewicz Z, Roederer M, Tanke HJ [red.] *Cytometry*, 4th Edition: New Developments. Methods in Cell Biology. Elsevier Academic Press 2004; **75**: 325–327.
- [44] HERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 1995; **184**: 39.
- [45] TRAGANOS F. Mechanism of antitumor drug action assessed by cytometry. W: Darzynkiewicz Z, Roederer M, Tanke HJ [red.] *Cytometry*, 4th Edition: New Developments. Methods in Cell Biology. Elsevier Academic Press 2004; **75**: 265–273.
- [46] ZIELIŃSKA M, FENRYCH W, KOSTRZEWA A, WIKTOROWICZ K. Cytometryczny pomiar wybuchu oddechowego. *Diagn Lab* 1997; **33**: 47–57.
- [47] ALVAREZ-LARRAN A, TOLL T, RIVES S, ESTELLA J. Assessment of neutrophil activation in whole blood by flow cytometry. *Clin Lab Hematol* 2005; **27**(1): 41–46.
- [48] MIĘDZOBRODZKI J, ZEMANEK G, BARAN J. Chemiluminescencja – opis zjawiska, możliwości jego detekcji i wykorzystania. *Mikrobiologia Medycyna* 1999; **1**(18).
- [49] PAWELSKI S. [red.] Wyposażenie i organizacja pracowni hematologicznej – Mariańska B. PZWL, Wyd. III, Warszawa 1990: 22–24.
- [50] PAWELSKI S. [red.] Badania krwinek białych – Mariańska B. PZWL, Wyd. III, Warszawa 1990: 139.
- [51] PAWELSKI S. [red.] Diagnostyczne badania cytochemiczne i cytoenzymatyczne – Litwin J. PZWL, Wyd. III, Warszawa 1990: 148–161.
- [52] WOOD B. 9 and 10 color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2006; **130**: 680–690.
- [53] www.bdbiosciences.com/spectra
- [54] MAZZINI G, FERRARI C, ERBA E. Dual excitation multi-fluorescence flow cytometry for detailed analyses of viability and apoptotic cell transition. *Eur J Histochem* 2003; **47**(4): 289–298.
- [55] JAYPAL V, SHARMILA KM, SELVIBAI G, THYAGARAJAN SP, SHANMUGASUNDRAM N, SUBRAMANIAN S. Fluorescein diacetate and ethidium bromide staining to determine the viability of *Mycobacterium smegmatis* and *Escherichia coli*. *Lepr Rev* 1991; **62**(3): 310–314.
- [56] CLARKE JM, GILLINGS MR, ALTAVILLA N, BEATTIE AJ. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *J Microbiol Methods* 2001; **46**(3): 261–267.
- [57] WALRAND S, VALEIX S, RODRIGUEZ C, LIGOT P, CHASSAGNE J, VASSON MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta* 2003; **331**(1–2): 103–110.
- [58] PERTICARARI S, PRESANI G, MANGIAROTTI MA, BANFI E. Simultaneous flow cytometric method to measure phagocytosis and oxidative products by neutrophils. *Cytometry* 1991; **12**(7): 687–693.
- [59] SMITH JA, WEIDEMANN MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; **162**(2): 261–268.
- [60] CASADO JA, MERINO J, CID J, SUBIRA ML, SANCHEZ-IBARROLA A. Simultaneous evaluation of phagocytosis and Fc R-mediated oxidative burst in human monocytes by a simple flow cytometry method. *J Immunol Methods* 1993; **159**(1–2): 173–176.

- [61] CONRADS G, HERRLER A, MOONEN I, LAMPERT F, SCHNITZLER N. Flow cytometry to monitor phagocytosis and oxidative burst of anaerobic periodontopathogenic bacteria by human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* 1999; **34**(3): 136–144.
- [62] COOK JA, FOX MH. Intracellular pH measurements using flow cytometry with 1,4-diacetoxy-2,3-dicyanobenzene. *Cytometry* 1988; **1**: 143–151.
- [63] LYONS AB, HASBOLD J, HODGKIN PD. Flow cytometric analysis of cell division history using dilution of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, a stably integrated fluorescent probe. *Methods Cell Biol* 2001; **63**: 375–398.
- [64] BD FACSDiva Software Reference Manual.

Bogdan Mazur

ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

e-mail: bmazur@slam.katowice.pl