

NOWA EPOKA CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ – PRZEWODNIK PO WSPÓLCZESNYCH CYTOMETRACH I ICH ZASTOSOWANIE

NEW TIME OF FLOW CYTOMETRY –
APPLICATIONS OF CONTEMPORARY CYTOMETERS

Jarosław BARAN

Zakład Immunologii Klinicznej, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Collegium
Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie: Cytometria przepływowa jest techniką powszechnie stosowaną zarówno w diagnostyce klinicznej, jak i różnego typu badaniach podstawowych. Publikacja ta przedstawia krótką charakterystykę techniczną różnego typu cytometrów dostępnych obecnie na rynku oraz podaje w zarysie diagnostyczne i badawcze wykorzystanie metody.

Summary: Flow cytometry is a technique commonly used in the clinic as well as in basic research. This paper gives a technical overview of flow cytometers currently available in the market and provides some application of the method in the clinic and research.

Cytometria jest metodą pomiaru właściwości fizycznych i/lub chemicznych pojedynczych komórek lub innych „cząstek” biologicznych (izolowane jądra komórkowe, kwasy nukleinowe, mitochondria, chloroplasty itp.). W cytometrii przepływowej pomiary te dokonywane są w urządzeniach zwanych cytometrami przepływowymi w trakcie przepływu komórek lub cząstek w strumieniu cieczy. Definicja ta obejmuje więc również liczniki hematologiczne, jednak na potrzeby tego opracowania zostanie ona ograniczona tylko do aparatów zdolnych do pomiaru właściwości fizycznych i fluorescencji komórek/cząstek przepływających w strumieniu cieczy (zwanych również cytofluorymetrami). Dzięki postępowi, jaki się dokonał w ostatnich latach w optyce, elektronice, inżynierii laserów, dzięki rozwojowi informatyki dzisiejsze cytometry przepływowe są urządzeniami o znacznie większych możliwościach pomiarowych i łatwiejszymi w obsłudze. Również postęp w produkcji coraz to nowych barwników fluorescencyjnych sprawił, że współczesne cytometry potrafią analizować jednocześnie nawet do kilkunastu parametrów pochodzących z pojedynczej komórki. Zasadniczo wyróżnia się dwa rodzaje cytometrów przepływowych – analizatory i

sortery komórkowe. Sortery mają zdolność nie tylko zbierania danych o przepływających komórkach (ich analizy), ale również izolacji (sortowania) w wysokim stopniu czystości (>99%) komórek spełniających określone przez operatora kryteria.

Ostatnie lata, dzięki wprowadzeniu technologii cyfrowej, zapoczątkowały nową epokę w rozwoju cytometrii przepływowej jako techniki naukowo-badawczej. Opracowanie to stanowi formę kompendium wiedzy o dostępnych obecnie komercyjnych cytometrach przepływowych i ich zastosowaniu zarówno w diagnostyce medycznej, jak i badaniach podstawowych. Z założenia więc informacje dotyczące opisu cytometrii przepływowej jako metody diagnostyczno-badawczej nie będą przedstawione. Czytelnika zainteresowanego podstawami cytometrii przepływowej odsyłam do artykułu „*Cytometria przepływowa – istota metody i jej wykorzystanie*” [1].

ROZWÓJ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

Początki cytometrii przepływowej sięgają roku 1934, kiedy to Moldavan opublikował na łamach *Science* artykuł o metodzie liczenia komórek płynących w kapilarze za pomocą czujnika fotoelektrycznego [7]. Był to jednak tylko pomysł i sam autor nigdy nie wprowadził go w życie. Pierwsze urządzenia powstały natomiast w połowie lat 40 i analizowały one komórki bakteryjne „płynące” w powietrzu a nie w strumieniu cieczy. W 1947 r. Gucker opublikował pierwsze doniesienie o cytofluorymetrycznej detekcji bakterii w aerozoluach [9]. Badania te rozpoczęte jeszcze w trakcie trwania II Wojny Światowej i sponsorowane przez armię amerykańską miały na celu szybką identyfikację w powietrzu bakterii i/lub ich zarodników na wypadek użycia broni biologicznej. Z oczywistych względów badania te nie mogły być ujawnione przed zakończeniem wojny, stąd opublikowane zostały dopiero w 1947 r. W urządzeniu tym próbki powietrza analizowane były w „komorze przepływu” w ciemnym polu (podobnie jak w mikroskopii ciemnego pola) po oświetleniu światłem widzialnym z najmocniejszej znanej wówczas lampy, jaką był reflektor samochodu marki Ford. Urządzenie to pozwalało na detekcję z 60% prawdopodobieństwem cząstek o średnicy 0,6 μm . Paradoksalnie historia zatoczyła koło, gdyż w ostatnich latach po atakach terrorystycznych armia amerykańska ponownie interesuje się cytofluorymetryczną metodą wykrywania bakterii w powietrzu [8]. Do roku 1970 na rynku cytometrycznym istniały tylko dwie firmy: amerykańska Bio/Physics Systems, założona przez Lou Kamensky'ego, produkująca Cytograf i Cytofluorograf oraz niemiecka Phywe AG dystrybuująca Impulscytographometer (ICP), komercyjną wersję aparatu Dittricha i Göhde firmy Partec. Wkrótce potem Technicon wprowadził na rynek Hemalog D, pierwszy z serii przepływowych liczników hematologicznych różnicujących populacje leukocytów, a w 1974 r. Becton-Dickinson (B-D) wprowadził sorter komórkowy FACS, zapoczątkowujący technologię FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorters*). Rok później Coulter wszedł na rynek z TPS-1, zastępując go następnie serią EPICS. W roku 1976, po połączeniu Johnson

& Johnson z Bio/Physics Systems powstał Ortho Diagnostics Systems, który w 1978 r. nabył prawa również do ICP od Phywe AG, oferując zarówno analizatory (Cytofluorograph), jak i sortery (ICP). Tak więc na początku lat 80 trzy duże firmy Becton-Dickinson, Coulter i Ortho oferowały laserowe cytometry przepływowe z możliwością sortowania. Po roku 1985 zarówno B-D, jak i Coulter wprowadziły niesortujące cytometry przepływowe (FACScan i EPICS Profile) wykorzystujące chłodzone powietrzem lasery argonowe o niskiej mocy. Urządzenia te przeznaczone były zarówno do diagnostyki klinicznej, jak i badań naukowych. W połowie roku 1987 Ortho zaprzestało produkcji cytometrów i sprzedało zobowiązania serwisowe B-D. Powtórnie Ortho pojawiło się na rynku w 1992 r. z modelem Cytoron Absolute budowanym w Japonii przez firmę Omron, by stopniowo znowu wycofać się pod koniec dekady. W 1988 r. na rynku cytometrycznym pojawiła się firma Cytomation, początkowo oferująca tylko systemy CICERO do udoskonalania przetwarzania danych i przyspieszania sortowania dla dostępnych wówczas urządzeń sortujących, aby w 1994 r. rozpocząć sprzedaż modułowych sorterów MoFlo (*modular high speed cell sorter*) stworzonych przez zespół Gera van den Engha w Lawrence Livermore National Laboratory [3]. Od tego czasu datuje się obecność trzech wielkich firm cytometrycznych, które dominują na rynku do chwili obecnej: BD Biosciences, Beckman Coulter (połączone w 1997 r.) i DakoCytomation (połączone w 2001 r.). Oprócz tych trzech wielkich, na rynku są obecne i inne firmy oferujące swoje cytometry.

ANALIZATORY CYTOFLUORYMETRYCZNE

1. BD Biosciences

FACScan firmy Becton Dickinson był pierwszym nowoczesnym analizatorem dostępnym komercyjnie od 1985 r. Początkowo było to urządzenie „trzykolorowe” współpracujące z komputerem Hewlett-Packard serii 300 w programie Consort 30 lub Consort 32. W połowie lat 90 seria systemów analizy Consort została zastąpiona przez FACStation współpracującą z komputerami Apple Mackintosh. Wraz ze zmianą systemu komputerowego na Apple'a i rosnącym zapotrzebowaniem na analizę czterokolorową Becton-Dickinson zmodernizował model do dwulaserowego (laser argonowy 488 nm i diodowy 635 nm) analizatora czterokolorowego nazywając go FACSCalibur. Urządzenie to rejestruje w opcji jednolaserowej 7 parametrów, w tym 3 fluorescencje: zieloną (515–545 nm, „FL1”), żółto-pomarańczową (564–606 nm, „FL2”) i czerwoną (>670 nm, „FL3”); w opcji dwulaserowej – 8 (4 fluorescencja – czerwona 653–669 nm, „FL4” – wzbudzana jest przez laser diodowy 635 nm). Dla wybranego rodzaju fluorescencji możliwa jest analiza szerokości piku sygnału (*pulse width*) wykorzystywana do eliminacji agregatów komórkowych. Dodatkowym parametrem jest czas. System akwizycji danych może rejestrować komórki lub „cząstki biologiczne” przepływające z częstością > 3000/s. Możliwa jest regulacja prędkości przepływu próbki: niska (12 µl/min), średnia (35 µl/min) i wysoka (60 µl/min).

Dodatkowo, FACSCalibur może być wyposażony w opcję sortowania działającą na zasadzie mechanicznego wychwytu wybranej (jednej) populacji przez kapilarę poruszającą się ruchem wahadłowym w strumieniu cieczy (*catcher tube sorting*). Ze względu na małą wydajność tego typu sortowania (ok. 300 komórek/s) i fakt, że sortowana populacja jest bardzo rozcieńczona (kapilara aspiruje relatywnie duże objętości płynu), rozwiązanie to nie cieszy się dużą popularnością. Zbieranie i analiza danych (zapisanych w systemie FCS 2.0) odbywa się w programie CellQuest lub CellQuest Pro na komputerach Apple'a wyposażonych w procesor PowerPC G4.

FACSCount jest małym analizatorem przeznaczonym do przeprowadzania analizy subpopulacji limfocytów CD4 i CD8 u pacjentów zakażonych wirusem HIV. Wyposażony w helowo-neonowy zielony laser (543 nm) rejestruje 2 rodzaje fluorescencji emitowanej przez fikoerytrynę i koniugat fikoerytryny z barwnikiem cyjaninowym. FACSCount przeznaczony jest głównie do laboratoriów klinicznych w krajach o wysokiej zachorowalności na AIDS.

LSR II zapoczątkował nową linię analizatorów BD. Jest to w pełni cyfrowy analizator mogący współpracować z 4 laserami i analizujący do 15 fluorescencji! Zastąpił on analogowy aparat LSR I, który mógł być skonfigurowany jako trójlaserowy, z możliwością analizy 6 fluorescencji. LSR II w optymalnej konfiguracji może posiadać niegazowy (*solid state*) laser Sapphire 488 nm (Coherent), laser YAG 355 nm do emisji UV (Lightwave), 25 mW fioletowy diodowy laser VioFlame 405 nm (Coherent) i czerwony laser diodowy 638 nm. Całkowitą nowością techniczną jest wprowadzenie optyki światłowodowej i rozdział sygnałów biegnących do poszczególnych detektorów rozmieszczonych po okręgu za pomocą zwierciadeł o bardzo wysokiej wydajności. Rozwiązanie to sprawia, że straty światła są zminimalizowane, ponieważ po odbiciu każdy sygnał przechodzi tylko przez jeden filtr optyczny umieszczony bezpośrednio przed detektorem.

LSR II wykorzystuje do zbierania danych w pełni cyfrowy system FACSDiVa i nowy oparty o komputery typu IBM program pracujący w środowisku Windows XP. System cyfrowy umożliwia m.in. zastosowanie dowolnego parametru lub logicznej kombinacji (i/lub) dwu i więcej parametrów do rozpoczęcia rejestracji sygnałów (*triggering*). Wszystkie sygnały podlegają cyfrowej obróbce równocześnie, z częstością 10 milionów razy na sekundę (10 MHz) wykorzystując 14-bitowe przetworniki sygnałów analogowych na cyfrowe (*analog to digital converters*, ADC). Elektroniczny „czas martwy” jest wyeliminowany, co pozwala na zwiększenie liczby analizowanych komórek (ponad 20 000/s). Dzięki wyeliminowaniu wzmacniaczy logarytmicznych możliwy stał się bardziej dokładny pomiar fluorescencji, z poprawioną liniowością pomiaru, kompensacją i oceną ilościową. Kompensacja może być dokonana dla wszystkich par fluorescencji zarówno przed, jak i po zebraniu danych przy użyciu oprogramowania. Sygnały liniowe są zamieniane na skalę logarytmiczną (5 dekad) również programowo przy użyciu 18-bitowej elektroniki. Maksymalnie urządzenie może rejestrować 16, a w analizie można używać 36 parametrów, w tym pole powierzchni (*area*) i standardową wysokość piksu (*height*) dla wszystkich 16 parametrów, plus dodatkowo dwa stosunki parametrów (*ratio*), szerokość piksu (*width*) i czas.

FACSCanto to najnowszy, dwulaserowy, w pełni cyfrowy analizator wprowadzony na rynek w końcu 2003 r. Wyposażony w 20 mW laser 488 nm typu *solid state* i 17 mW He-Ne laser 633 nm, jest 6-kolorowym (FITC, PE, PerCP lub PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 i APC, APC-Cy7) analizatorem. W analizie można używać 27 parametrów, w tym pole powierzchni, wysokość i szerokość piku dla wszystkich 8 parametrów (fluorescencje + *scattery*), 2 *ratio* i czas. Zbieranie i analiza danych odbywa się podobnie jak w przypadku LSR II w systemie FACSDiVa w programie pracującym w środowisku Windows XP. Wszystkie parametry (maksimum 16) są rejestrowane w skali liniowej (262 141 kanałów) i cyfrowo zamieniane na 5-dekadową skalę logarytmiczną przy użyciu 10-bitowej elektroniki, co znacznie poprawia liniowość i precyzję pomiarów.

2. Beckman Coulter

EPICS XL był pierwszym i przez wiele lat jedynym komercyjnym niesortującym cytometrem wykorzystującym cyfrową obróbkę sygnału, co dawało unikalną przewagę nad pozostałymi cytometrami wyposażonymi w elektronikę analogową. W przypadku analizy logarytmicznej eliminuje to konieczność stosowania wzmacniaczy logarytmicznych – wszystkie dane są zbierane w skali linearnej i cyfrowo przekształcane na logarytmiczne. Cyfrowa elektronika umożliwia również kompensację wszystkich par fluorescencji. Dzięki wprowadzeniu nowych barwników fluorescencyjnych EPICS XL był jedynym analizatorem mogącym analizować 4 fluorescencje wzbudzone światłem lasera argonowego o długości fali 488 nm. Analiza danych odbywa się w programie XL SYSTEM II v.3.0 lub EXPO32 ADC. XL SYSTEM II pracuje w środowisku DOS w systemie Windows 98SE i wykorzystuje do zapisu danych format FCS 2.0. System jest w stanie zbierać 12 parametrów – z czasem, stosunkiem fluorescencji (*ratio*) i parametrem PRISM włącznie – identyfikuje populacje komórkowe uwzględniając „pozytywność” lub „negatywność” dla maksimum 6 wybranych markerów. Program EXPO 32 ADC (*Advanced Digital Compensation*) dodatkowo umożliwia automatyczną kompensację do 4 fluorescencji i analizę do 16 parametrów. Model EPICS XL-MCL dodatkowo wyposażony jest w automatyczny podajnik próbek (*multicarousel loader*).

Cytomics FC500 jest najnowszym analizatorem firmy Beckman Coulter, mogącym przeprowadzać analizę 5 fluorescencji (FITC, PE, PE-Texas red, PE-Cy5 lub APC i PE-Cy7) wzbudzanych przez jeden lub dwa lasery (20 mW laser argonowy 488 nm i 20 mW laser He-Ne 633 nm lub 5 mW laser diodowy 635 nm), z cyfrową kompensacją i skalą logarytmiczną po przekształceniu danych zbieranych w 20-bitowej skali linearnej. FC 500 analizuje dane w programie RXP w systemie Windows 2000, używając do zapisu formatu FCS 3.0. Urządzenie zapisuje do 16 parametrów uwzględniając czas, stosunek fluorescencji i PRISM. W analizie możliwe jest użycie 24 parametrów. Możliwa jest również kompensacja programowa, a prezentowane dane w formie wykresów kropkowych (*dot-plot*) lub histogramów mogą być łatwo przenoszone do innych aplikacji Microsoftu lub konwertowane do formatu PDF.

3. DakoCytomation (obecnie Beckman Coulter)

Cytomation wystartowało w końcu lat 80 z systemami CICERO do ówczesnych cytometrów sortujących, poprawiając ich szybkość sortowania i możliwości analizy danych. Po sukcesie odniesionym z sorterami MoFlo, już jako DakoCytomation, w 2001 r. firma wprowadziła na rynek analizator CyAn. Jest to maksymalnie 11-parametrowy (9 fluorescencji), trójlaserowy instrument, który w optymalnej konfiguracji ma 150 mW wiązkę 488 nm i 50 mW wiązkę 351 nm (UV), obie z chłodzonego wodą lasera argonowego Enterprise II (Coherent) i 12,5 mW czerwony laser diodowy 635 nm. Alternatywnie, urządzenie można wyposażyć w 20 mW laser Sapphire 488 nm (Coherent) i 25 mW fioletowy laser diodowy VioFlame 405 nm (Coherent). Akwizycja i analiza danych odbywa się w programie Summit pracującym w środowisku Windows NT, z możliwością kompensacji wszystkich par fluorescencji w czasie rzeczywistym podczas akwizycji, jak i później podczas analizy. Analiza może się odbywać również *off line* na innych komputerach PC. Maksymalna prędkość akwizycji to 50 000/s. Niewątpliwą zaletą tego urządzenia jest łatwość rozbudowy i zmiany konfiguracji w zależności od potrzeb (łatwo wymienne filtry).

4. Partec GmbH

Powstała w 1960 r. firma Partec produkuje cytometry najdłużej spośród wszystkich firm cytometrycznych. Obecnie firma oferuje urządzenia wyposażone zarówno w lampy rtęciowe i/lub lasery jako źródła światła, z możliwością sortowania, jak i elektronicznego pomiaru objętości komórek, umożliwiającego ocenę zróżnicowania morfologicznego leukocytów (podobnie, jak to ma miejsce w licznikach hematologicznych). Dodatkowo, dzięki zastosowaniu precyzyjnych strzykawk dozujących określoną objętość próbki do analizy, możliwe jest uzyskanie bezwzględnej liczby badanych populacji komórkowych. Nowa linia cytometrów obejmuje zarówno proste, jednolaserowe, jednoparametrowe urządzenia, które mogą być zasilane z baterii – **CyFlow**, jak i wielolaserowe instrumenty, z cyfrową obróbką danych, zdolne do pomiaru 14 parametrów fluorescencyjnych – **CyFlow ML**. Seria CyFlow może być wyposażona w następujące źródła światła: 100 W lampę rtęciową (źródło UV), fioletowy laser diodowy 407 nm, niegazowy laser niebieski 488 nm (20 lub 200 mW), zielony Nd-YAG laser 532 nm (do 100 mW) lub czerwony laser diodowy 635 nm (15 lub 25 mW). Szybkość przepływu próbki jest regulowana programowo w przedziale 0–3 ml/min z wykorzystaniem precyzyjnych pompostrzykawk. Model CyFlow ML może być wyposażony w dwa detektory dla parametru FSC (*forward scatter*). Pierwszy, rejestruje natężenie światła ugiętego w osi biegu promienia pod kątem 2–6°, drugi, pod kątem 6–14°. Sygnały dla parametru SSC (*side scatter*) i fluorescencji są zbierane przez obiektywy mikroskopowe o wysokim współczynniku transmitancji dla światła UV (opracowane przez Parteca) i przesyłane do odpowiednich fotopowielaczy. Wysokość piku, szerokość i pole powierzchni piku (*area*) są zamieniane z analogowych na cyfrowe przy użyciu szybkich 16-bitowych konwerterów, a zmiana skali logarytmicznej na liniową i odwrotnie odbywa się przy użyciu programu FloMax, w środowisku Windows. Dane są zapisywane w formacie

FCS 2.0 i możliwy jest zapis danych z 10 000 000 komórek. W sumie możliwa jest akwizycja 16 podstawowych parametrów, w analizie można wykorzystać dalszych 16 pochodnych. Maksymalna prędkość akwizycji wynosi >10 000 komórek/s.

Jak większość z cytometrów firmy Partec, seria CyFlow może być wyposażona w zamknięty system sortowania oparty na przełączaniu przepływu (*fluid switch sorters*). W systemie tym kanał przepływu w punkcie detekcji rozwidła się na kształt litery Y. Jedno ramię jest ramieniem zlewkowym, drugie sortującym. Sterowany piezoelektrycznie tłoczek kieruje wybraną komórkę do ramienia sortującego, a komórki niepożądane do ramienia zlewkowego. Rozwiązanie to umożliwia sortowanie komórek znacznie większych niż przy użyciu standardowych sorterów kroplowych (komórki roślinne, komórki wysp Langerhansa).

Pierwszą linią cytometrów Partec była seria **PAS**, jedyna łącząca w komercyjnych cytometrach jako źródła światła lampę rtęciową i laser. Podobnie jak seria CyFlow, seria PAS obejmuje proste i skomplikowane analizatory mogące mieć opcję sortowania. Generalnie, w porównaniu z serią CyFlow urządzenia tego typu są większe i mogą być wyposażone w większe lasery (np. chłodzony powietrzem laser argonowy 488 nm). Dodatkowo, mogą współdziałać ze stacją przygotowania i podawania próbek – ROBBY. Stacja ta jest w stanie dozować przeciwciała i/lub fluorochromy, dodawać odczynniki lizujące eryocyty i utrwalające próbki, łącznie 16 różnych odczynników z kontrolowanym czasem inkubacji.

5. Guava Technologies, Inc

Guava Personal Cell Analysis (PCA) system jest bardzo małym (niewiele większym od laptopa, z którym współpracuje), przenośnym cytometrem, niewymagającym do analizy próbek buforu! Komora przepływu jest na tyle szeroka, że umożliwia analizę przepływających komórek bez ryzyka częstego zatykania i wymaga zaledwie kilku μ l próbki! Urządzenie wyposażone jest w zielony laser YAG 532 nm i rejestruje 3 parametry: FSC i dwie fluorescencje przy długości fali 575 nm i 675 nm. Program CytoSoft umożliwia akwizycję i analizę danych w systemie Windows. Trzy osobne moduły programu: Guava ViaCount, Guava Express i Guava Nexin umożliwiają odpowiednio podanie bezwzględnej liczby żywych komórek, badanie ekspresji markerów powierzchniowych oraz analizę apoptozy. Ekspresję markerów powierzchniowych ocenia się z użyciem przeciwciał sprzężonych z fikoerytryną (PE) lub barwnikiem cyjaninowym Cy3, żywotność – z użyciem 7-aminoaktynomycyny D, apoptozę – z użyciem aneksyny V sprzężonej z PE. Ze względu na brak płynu okrywowego, gwarantującego przepływ komórek jedna za drugą, a tym samym gwarantującego precyzję pomiaru, urządzenie to nie nadaje się do analizy cyklu komórkowego.

KOMERCYJNE KROPLOWE SORTERY KOMÓRKOWE

Sortery kroplowe wykorzystują drgania kryształu piezoelektrycznego o wysokiej częstotliwości (15–200 kHz) powodujące rozerwanie strumienia cieczy wypływa-

jącego z komory przepływu na pojedyncze krople. Ze względu na dużą efektywność, tego typu sortery są najpopularniejsze i takie zostaną przedstawione w niniejszym opracowaniu. Zasada działania tych urządzeń została szczegółowo opisana w artykule „Cytometria przepływowa – istota metody i jej wykorzystanie” [1].

Wśród sorterów kropłowych wyróżnia się dwa podtypy: sortery o niskiej szybkości sortowania (*low speed sorters*) – do 10 000–15 000 komórek/s oraz sortery o dużej szybkości (*high speed sorters*) – powyżej 20 000 komórek/s. W celu osiągnięcia dużych szybkości sortowania konieczne jest wysokie ciśnienie (20–100 psi (funtów na cal kwadratowy)) płynu, w którym płyną komórki (płyn okrywowy), co dla niektórych typów komórek może być szkodliwe.

1. BD Biosciences

Pierwsze komercyjne sortery komórkowe firmy B-D nie bardzo odbiegały od prototypu zbudowanego przez zespół Leonarda Herzenberga na Uniwersytecie Stanforda [5].

Obecnie sortery kropłowe firmy B-D obejmują zarówno linię urządzeń wyposażonych w elektronikę analogowo-cyfrową, jak i w pełni cyfrową. **FACSVantage SE** jest następcą urządzeń lat 90 typu FACStar, FACStar Plus i FACSVantage. Ten analogowo-cyfrowy instrument typu *stream in air* (analiza odbywa się w powietrzu w strumieniu cieczy wypływającym z dyszy o określonej średnicy), może współdziałać z trzema laserami i rejestrować do 12 fluorescencji. Ciśnienie płynu może być regulowane w zakresie od 2,0 psi (przy dyszy o średnicy 400 μm) do 60 psi z użyciem dyszy 70 μm i opcji TurboSort umożliwiającej sortowanie z prędkością do 25 000 komórek/s. Użycie opcji MacroSort pozwala na sortowanie komórek o wielkości ok. 100 μm , z prędkością do 500 komórek/s. Do zbierania i obróbki danych urządzenie może być wyposażone w dwa zasadniczo różniące się systemy: analogowy lub cyfrowy – FACSDiVa. W wersji analogowej każdy z parametrów wzbudzanych światłem lasera 488 nm może być użyty jako „wyzwalacz pomiaru” (*trigger*), a maksymalnie 8 parametrów może być analizowanych. Sygnały ze skali liniowej są zamieniane na skalę logarytmiczną przy użyciu analogowych wzmacniaczy o zakresie 4 dekad. Kompensacja fluorescencji odbywa się tylko sprzętowo. Parametry wysokości, szerokości i pola powierzchni piksu są zamieniane z analogowych na cyfrowe przy użyciu 10-bitowych konwerterów. W wersji analogowej analiza danych (maksimum 16 parametrów) odbywa się z użyciem programu CellQuest Pro na bazie komputerów Apple Macintosh wyposażonych w procesor G4 Power PC. Opcja cyfrowa obróbki sygnału (FACSDiVa) pozwala na użycie dowolnego parametru lub logicznej kombinacji dowolnych parametrów jako *trigger*. Wszystkie parametry (maksimum 16) są rejestrowane w skali liniowej (262 141 kanałów) i cyfrowo zamieniane na 5-dekadową skalę logarytmiczną przy użyciu 18-bitowej elektroniki. Kompensacja może być dokonywana zarówno sprzętowo, jak i programowo po zebraniu danych. Analiza 36 parametrów odbywa się w programie FACSDiVa na komputerach Hewlett-Packard X 4000 w systemie Windows. Dzięki wyeliminowaniu „czasu martwego” szybkość analizy zwiększyła się do 100 000

komórek/s. Zarówno w wersji analogowej, jak i cyfrowej możliwe jest sortowanie 4 wybranych populacji komórkowych, a ustawianie punktu tworzenia kropli (*drop delay*) odbywa się bardzo szybko i precyzyjnie dzięki opcji AccuDrop. W opcji tej, w trakcie bezpośredniej obserwacji sortowania mikrokuleczek, *drop delay* dostosowuje się tak, aby wszystkie mikrokuleczki fluoryzujące w świetle dodatkowej diody laserowej (umieszczonej powyżej probówek zbierających sortowane populacje) kierowane były do probówki. W przypadku, gdy część mikrokuleczek jest kierowana do probówki, a część do zlewki, *drop delay* należy skorygować tak, aby wszystkie mikrokuleczki były kierowane do probówki. Dodatkowo, system usuwania aerozolu (*Aerosol Management Option*) zabezpiecza operatora przed ewentualną kontaminacją materiałem zakaźnym.

FACSAria, najnowszy cyfrowy cytometr sortujący firmy BD wprowadzony na rynek w grudniu 2002 r. jest dwu- lub trójlaserowym sorterem o dużej szybkości sortowania, mającym unikalne rozwiązania techniczne eliminujące m.in. konieczność adiustacji optyki przez operatora (jak to ma miejsce w innych sorterach kropłowych). Jest to pierwszy i jak na razie jedyny sorter, w którym analiza komórek odbywa się w kuwecie przepływowej (a nie w powietrzu), co zwiększa czułość pomiaru. 20 mW laser Sapphire 488 nm (*solid state*) i 17 mW laser He-Ne 633 nm są na wyposażeniu w wersji podstawowej, a 20 mW diodowy laser fioletowy 407 nm lub 10 mW laser 375 nm „near-UV” są opcjonalne. Mogą one być wykorzystane do wzbudzenia m.in. barwnika DAPI lub Hoechst. Podobnie jak w LSR II, FACSAria wyposażona jest w optykę światłowodową, a sygnały biegną do poszczególnych detektorów rozmieszczonych po okręgu w układzie oktagonalnym, co umożliwia rejestrację 8 parametrów (7 fluorescencji i *side scatter*) z lasera 488 nm i po 3 (*trigon*) parametry z pozostałych dwóch laserów. FACSAria wykorzystuje zmodyfikowany program FACSDiVa współpracujący z komputerami PC w środowisku Windows XP. Wszystkie dane są zbierane w skali linearnej (262 141 kanałów) i cyfrowo zamieniane na 5-dekadową skalę logarymiczną (analogicznie jak w FACSDiVa). Komórki do analizy można podawać w kilku rodzajach probówek, a igła transportująca komórki jest omywana przez płyn zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz, ograniczając ryzyko przeniesienia komórek z poprzedniej próbki. W trakcie zbierania komórki są ciągle mieszane, co zapobiega ich sedymentacji. Całkowitą nowością techniczną jest proces sortowania, który zachodzi po wypłynięciu komórek z kuwety analizującej. Jest to jakby połączenie typowego analizatora o nieadiustowanej optyce z sorterem kropłowym. Również wymiarami FACSAria przypomina bardziej analizatory niż duże urządzenia sortujące. W porównaniu z typowymi sorterami tego typu całkowicie zmieniono ideę tworzenia kropli. W zastosowanym w FACSArii rozwiązaniu krople nie są tworzone przez drgającą z wysoką częstotliwością głowicę, ale przez drgający strumień cieczy. Rzeczywisty punkt tworzenia kropli jest ustawiany przy użyciu systemu AccuDrop (analogicznie jak w FACSDiVa). Proces sortowania (na dwie lub cztery populacje) odbywa się pod ujemnym ciśnieniem, zabezpieczając operatora przed aerozolem i jest nadzorowany (opcja Sort Watch) tak, aby w przypadku np. zatkania dyszy zabezpieczyć probówki z sortowanymi komórkami przez odcięcie płynu i zasłonięcie probówek. Maksymalna

szybkość sortowania to 60 000 komórek/s przy ciśnieniu płynu 75 psi. Ze względu na brak konieczności adiustacji optyki, FACSAria może być obsługiwana przez mało doświadczonych adeptów cytometrii.

2. Beckman Coulter

EPICS ALTRA to dwulaserowy instrument analogowy umożliwiający detekcję do 8 parametrów: FSC, SSC i 6 fluorescencji dla wybranych barwników: FITC, PE, ECD (PE-Texas Red), PC5 (PE-Cy5), PC7 (PE-Cy7), APC i APC-Cy7. Detektor każdej fluorescencji może być użyty do rejestracji sygnałów pochodzących z 2 różnych laserów. Oznacza to, że pojedynczy fotopowielacz może „zbierać” fluorescencje wzbudzone przez różne lasery, a pochodzące z barwników mających bardzo podobne spektra emisyjne (np. PE-Cy5 i APC). Wszystkie filtry są łatwo wymienne, bez konieczności ponownej adiustacji optyki. Dodatkowymi parametrami może być czas, stosunek dwóch fluorescencji (*ratio*) oraz pomiar czasu przepływu (*time of flight*) umożliwiający rozróżnienie pojedynczych komórek od ich agregatów. Do inicjacji zbierania danych (*triggering*) możliwe jest zastosowanie dowolnego parametru lub dwu i więcej parametrów. Ciśnienie płynu okrywowego może być regulowane w zakresie 0–15 psi w standardowym trybie pracy lub do 100 psi w opcji sortowania o dużej szybkości (*high speed sorting*). Częstota generowania kropli w opcji *high speed* wynosi 90–100 kHz. W opcji tej wysoka czystość i duży odzysk sortowanych komórek uzyskuje się przy prędkości sortowania nie przekraczającej 20 000 komórek/s. Opcja SortLOCK monitoruje i utrzymuje *drop delay* na stałym poziomie. Do zbierania i analizy danych zapisanych w formacie FCS 2.0 Altra wykorzystuje pracujący w środowisku Windows program EXPO32 (szczegółowiej opisany przy analizatorze EPICS). Kompensacja fluorescencji w układzie „każda z każdą” odbywa się programowo. Dane liniowe z maks. 1024 kanałów są konwertowane do logarytmicznych przy użyciu analogowych wzmacniaczy. Do pomiarów bezwzględnej liczby receptorów wyrażonych jako „wiązaną przeciwciał przez komórkę” (*Antibody Bound per Cell – ABC*) lub „cząsteczek ekwiwalentów rozpuszczonego fluorochromu” (*Molecules of Equivalent Soluble Fluorophore – MESF*) istnieje możliwość przekonwertowania skali po analizie mikrokuleczek standaryzujących.

3. DakoCytomation (obecnie Beckman Coulter)

MoFlo (Modular Flow Cytometer) był pierwszym komercyjnie dostępnym sorterem typu *high speed* wyposażonym w cyfrowo-analogową elektronikę. Pierwotnie, jeszcze w wersji prototypowej zbudowany w Lawrence Livermore National Laboratory przeznaczony był do szybkiej izolacji chromosomów, po modernizacji stał się urządzeniem o wszechstronnym zastosowaniu. MoFlo to otwarty, maksymalnie trójlaserowy system rozbudowywany w zależności od potrzeb operatora do 14 parametrów. Do wzbudzenia rejestracji sygnałów (*trigger*) możliwe jest użycie logicznej kombinacji (i/lub) do 4 parametrów. Parametry wysokości piku są zamieniane z analogowych na cyfrowe przy użyciu 16-bitowych konwerterów obejmujących 4096 kanałów fluorescencji (typowo w urządzeniach analogowych 1024). Cyfrowe przetworniki sygnału (DSP) pozwalają na programową kompensację każdej

pary z 8 fluorescencji, korygując błąd konwersji sygnału przez analogowe wzmacniacze logarytmiczne o zakresie 4 dekad. Częstość generowania kropli może dochodzić do 200 kHz, co daje możliwość sortowania z maksymalną prędkością 70 000 komórek/s. Proces sortowania na 2 lub 4 populacje jest nadzorowany przez system SortMaster, który dodatkowo automatycznie dostosowuje *drop delay* do optymalnej wartości w trakcie sortowania. W sytuacji, kiedy system nie jest w stanie skorygować zmian, ładowanie kropli zostaje wyłączone, a sygnał dźwiękowy informuje operatora o konieczności interwencji. Podobnie jak w analizatorach CyAn akwizycja i analiza danych odbywa się w programie Summit pracującym w środowisku Windows NT, z możliwością kompensacji wszystkich par fluorescencji w czasie rzeczywistym podczas akwizycji, jak i później podczas analizy. Analiza może się odbywać również *off line* na innych komputerach PC.

4. Cytopeia (obecnie BD Biosciences)

Założona na początku nowego stulecia nowa kompania oferuje modułowe sortery **InFlux** z możliwością rozbudowy do 28 fluorescencji i szybkością sortowania do 100 000 komórek/s na 6 różnych populacji. Pracujący w środowisku Windows NT program przeznaczony jest do kontroli sortowania i ma raczej ograniczone możliwości analizy. Logiczna kombinacja bramek dopuszcza użycie 32 parametrów. Dobór źródeł światła oraz fotopowielaczy odbywa się na życzenie.

WYKORZYSTANIE CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

Komercyjne analizatory służą głównie do celów diagnostyki klinicznej, ze szczególnym uwzględnieniem diagnostyki onkohematologicznej (fenotypowanie komórek białaczkowych i chłoniakowych, analiza profilu DNA komórek nowotworowych w trakcie chemioterapii, wykrywanie choroby resztkowej), oceny subpopulacji limfocytów w różnego typu niedoborach immunologicznych (wrodzonych i nabytych – w tym monitorowania poziomu limfocytów CD4 u pacjentów zakażonych wirusem HIV). Oprócz badań fenotypowych cytometria przepływowa jest wykorzystywana w diagnostyce immunologicznej do oceny funkcji komórek żernych umożliwiając diagnostykę zaburzeń chemotaksji, fagocytozy czy produkcji rodników tlenowych (deficyt mieloperoksydazy, przewlekła choroba ziarniniakowa). Dzięki cytometrii przepływowej możliwa jest również diagnostyka niektórych schorzeń autoimmunizacyjnych, np. badanie obecności autoprzeciwciał przeciwpłytkowych w małopłytkowościach, badanie ekspresji antygenu CD95 i apoptozy komórek w diagnostyce autoimmunologicznego zespołu proliferacji limfocytów (ALPS) [2], a badanie obecności antygenu HLA B27 może ujawnić predyspozycje do określonych schorzeń autoimmunizacyjnych. W transplantologii cytometria przepływowa znalazła zastosowanie do oznaczania antygenów HLA na powierzchni komórek dawcy i biorcy, do oceny obecności w surowicy biorcy przeciwciał cytotoksycznych dla komórek dawcy

(*crossmatch*). Kontrolne badania subpopulacji limfocytów u pacjentów po przeszczepie dają informację o stanie układu immunologicznego i skuteczności terapii immunosupresyjnej. W alergologii cytofluometryczna ocena stopnia degranulacji bazoofilów czy analiza poziomów limfocytów pomocniczych o fenotypie Th1 i Th2 pozwala ocenić skuteczność terapii odczulającej. Również w cytogenetyce dzięki wykorzystaniu cytometrii przepływowej i techniki hybrydyzacji *in situ* (FISH) możliwe się stało identyfikowanie mutacji chromosomalnych, jak np. mikrodelecji 22q11 w zespole DiGeorge'a [6] czy chromosomu Filadelfia, występującego u ok. 95% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową [4].

Coraz większego znaczenia diagnostycznego nabiera informacja nie tylko o obecności lub braku określonego markera komórkowego, ale o jego gęstości na powierzchni komórek. Analiza taka jest możliwa po porównaniu intensywności fluorescencji badanych komórek z intensywnością świecenia mikrokuleczek (*beads*) sprzężonych ze znaną, ale różną ilością fluorochromu. Dzięki wprowadzeniu technologii cyfrowej pomiar gęstości markerów komórkowych stał się o wiele dokładniejszy. Postęp ten bez wątpienia przyczyni się do upowszechnienia badania gęstości antygenów powierzchniowych w diagnostyce klinicznej.

Niektóre z komercyjnych cytometrów zostały zaprojektowane do ściśle określonych zastosowań, jak np. cytometry firm: Optoflow (MICROCYTE) i Fluid Imaging Technologies, Inc. (FlowCAM) służące do detekcji, charakterystyki i zliczania mikroorganizmów w wodzie; cytometry firm: Bentley Instruments (Somacount i Bactocount), Delta Instruments b. v. (SomaScope i BactoScope) i FOSS Electric A/S (Fossomatic i BactoScan) służące do detekcji komórek somatycznych lub bakterii w mleku; czy cytometr firmy Luminex pozwalający na ilościową ocenę do 100 różnych antygenów, przeciwciał lub oligonukleotydów w pojedynczej próbce na podstawie różnic w intensywności fluorescencji polistyrenowych mikrokuleczek (*beads*).

Równie szeroko cytometry analizujące są wykorzystywane w laboratoriach badawczych, gdzie służą głównie do oceny ekspresji antygenów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych (cytokiny, hormony), oceny aktywności wielu enzymów (kinazy, kaspazy), oceny ekspresji genów lub mRNA dla różnych produktów komórkowych (technika FISH).

Sortery, dzięki dużej wydajności są wykorzystywane do izolacji bardzo rzadkich komórek, występujących z częstością 10^{-6} – 10^{-7} , np. erytrocytów płodowych w krążeniu matki, komórek nowotworowych krążących we krwi czy komórek modyfikowanych genetycznie. Cytofluometryczną separację gamet męskich z chromosomem X od gamet z chromosomem Y wykorzystuje się do zapłodnień pozaustrojowych, a sortowane komórki wysp Langerhansa i komórki macierzyste są wykorzystywane do przeszczepów.

PODSUMOWANIE

Współczesna cytometria przepływowa dzięki możliwościom wieloparametrowej analizy i cyfrowej obróbki sygnałów jest w stanie dostarczyć pełniejszą charakterystykę badanych populacji komórkowych. Dzięki wykorzystaniu zjawiska przeniesienia energii rezonansu (FRET – *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) i stworzeniu całej gamy tandemów barwników (głównie koniugatów barwników cyjaninowych (Cy) z fikoerytryną (PE) lub allofukocyjaniną (APC), np. PE-Cy5, APC-Cy7, znacznie powiększyła się lista fluorochromów wzbudzanych światłem lasera niebieskiego (488 nm). Ten ogromny postęp na pewno przyczyni się do jeszcze szerszego wykorzystania cytometrii przepływowej zarówno w badaniach diagnostycznych, jak i naukowych.

PODZIĘKOWANIE

Powstanie tego opracowanie nie byłoby możliwe bez monumentalnej monografii autorstwa dr Howarda Shapiro *Practical Flow Cytometry*, wyd. 4. Wiley-Liss, 2003.

LITERATURA

- [1] BARAN J. Cytometria przepływowa – istota metody i jej wykorzystanie. *Mikrob Med* 1996; **3**: 33.
- [2] BLEESING JH, FLEISHER TA, PUCK JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. W: *Immunologic disorders in infants & children*. STIEHM ER, OCHS HD, WINKELSTEIN JA. [red] 2004. Elsevier Saunders.
- [3] van den ENGH G, STOKDIJK W. Parallel processing data acquisition system for multilaser flow cytometry and cell sorting. *Cytometry* 1989; **10**: 282.
- [4] HANSZ J. Współczesna terapia przewlekłej białaczki szpikowej. *Post Nauk Med* 2000; 4.
- [5] HERZENBERG LA, SWEET RG, HERZENBERG LA. Fluorescence activated cell sorting. *Sci Amer* 1976; **234**: 108.
- [6] KOWALCZYK D, ZEMBALA M. Niedobory odporności. W: *Zarys immunologii klinicznej* ZEMBALA M i GÓRSKI A [red], Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2001.
- [7] MOLDAVAN A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 1934; **88**: 188.
- [8] STOPA PJ. The flow cytometry of *Bacillus anthracis* spores revisited. *Cytometry* 2000; **41**: 237.
- [9] TUCKER FT Jr., O'KONSKY CT, PICKARD HB, PITTS JN Jr. A photoelectronic counter for colloidal particles. *J Am Chem Soc* 1947; **69**: 2422.

Jarosław Baran
 Ul. Wielicka 265, 30-663 Kraków
 e-mail: mibaran@cyf-kr.edu.pl