

BIOMEDICINSKA ANALITIKA: UPORABA PRETOČNE CITOMETRIJE ZA PREUČEVANJE MEHANIZMOV CITOTOKSIČNOSTI

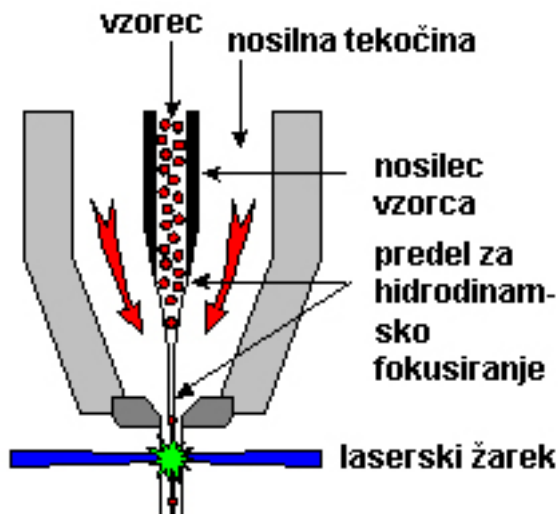
1. OSNOVE PRETOČNE CITOMETRIJE

(angl. *flow cytometry*), tudi: FACS (angl. *fluorescence-activated cell sorting*)

Pretok – gibanje v toku.

Citometrija – metoda za karakterizacijo in merjenje lastnosti celic in celičnih komponent.

Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice v suspenziji. Pri prehodu skozi izvor svetlobe odda posamezna celica svetlobne signale, ki so odvisne od njenih lastnosti. Vir svetlobe je laserski žarek (najpogosteje argonski), usmerjen v tok celic, ki skozi mesto interakcije z laserskim žarkom prehajajo posamično (*hidrodinamsko fokusiranje*).



Slika 1: V pretočni celici pride do injektiranja vzorca, ki ima počasen tok, v hitrejšo nosilno tekočino (angl. *sheath fluid*). Zaradi površinske napetosti in laminarnega toka pride do prehajanja kapljic vzorca iz injektorja v ozek, hiter tok nosilne tekočine. Natančen nadzor hitrosti obeh pretokov omogoča kontrolo širine sredinskega toka in posledično poravnave celic v njem.

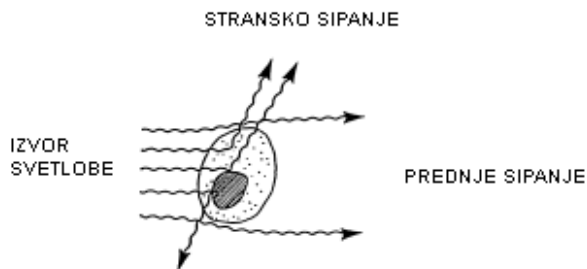
1. 1. Razpršena svetloba

(angl. *light scatter*)

Pri interakciji laserskega žarka z vzorcem večina fotonov neovirano prispe skozi tok. Nekateri pa zaradi ovirane poti skozi vzorec spremenijo svoje lastnosti, kar opazimo kot odboj oz. razprševanje svetlobe. Dva fotodetektorja merita količino razpršene svetlobe, ki jo oddaja obsevana celica (oddana svetloba je enake valovne dolžine kot obsevalna svetloba). Prvi detektor je FALS (angl. *forward angle light scatter*) in se nahaja v ravnini poti laserskega žarka (tj. na nasprotni strani toka) in omogoča zaznavo odbite svetlobe. Parameter, ki ga najpogosteje imenujemo »prednje sipanje« (angl. *forward scatter*, FSC), nastane zaradi kontakta s celičnimi membranami in je sorazmeren velikosti celice; čim večja je celica, tem

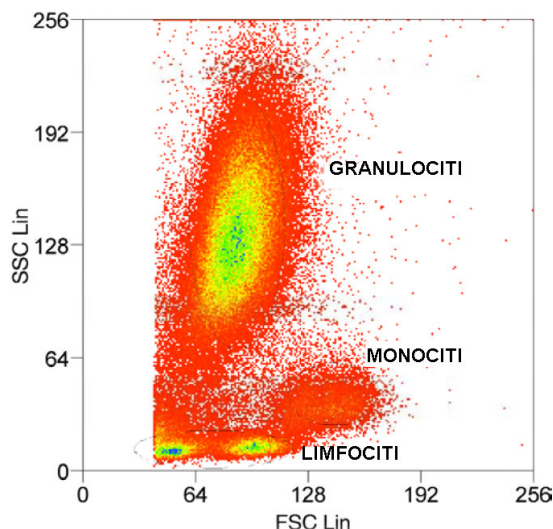
večje je sipanje svetlobe in posledično signal, ki ga zaznamo na detektorju, ki sprejema razpršeno svetlobo iz smeri laserskega žarka (odbojni kot žarka je majhen).

Ker so celice prosojne, prehaja veliko fotonov tudi skozi citoplazmo. Če pride do interakcije z organeli (endoplazemski retikulum, jedro,...) bo prišlo do odboja fotona pravokotno od smeri laserskega žarka. Fotodetektor RALS (angl. *right angle light scatter*) se nahaja pravokotno od poti laserskega žarka in omogoča zapis drugega parametra - »stransko sipanje« (angl. *side scatter*), ki je premerosložen kompleksnosti (zrnatosti oz. granuliranosti) posamezne celice; več, kot je organelov oz. membranskih struktur, večje bo stransko sipanje in višji bo signal.



Slika 2: Pri interakciji s celico se svetloba razprši v dve smeri; prednje in stransko sipanje.

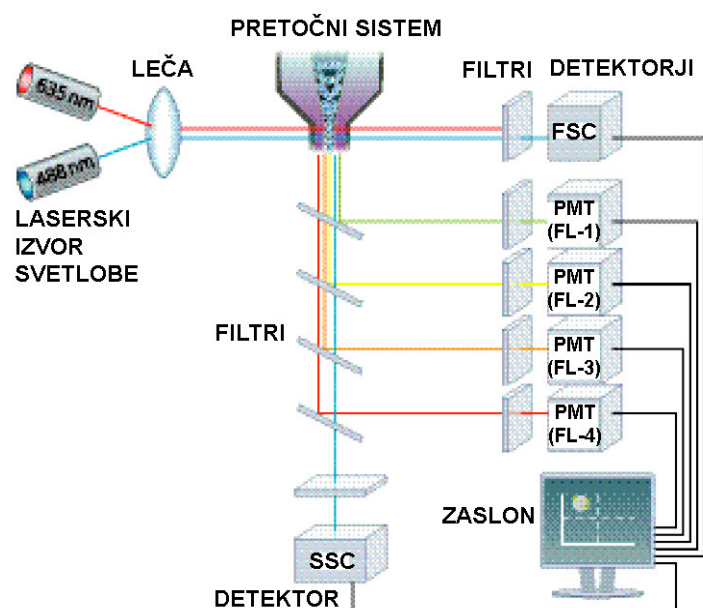
V praksi je torej možno izolirati posamezne populacije celic dokaj enostavno preko zgoraj omenjenih parametrov sipanja. Kot primer si oglejmo tipičen pripravek polne krvi, v katerem smo predhodno odstranili rdeče krvničke. Na x osi prikažemo parameter prednjega sipanja (FSC), na y osi pa stransko sipanje. Vsaka pika na grafu predstavlja celico, ki jo detektor zazna kot »dogodek«. Relativna skala (0-256) predstavlja rastočo intenziteto signala. Kot vidimo na sliki, sipanje svetlobe omogoča enostavno identifikacijo posameznih celičnih populacij: limfociti so po velikosti manjši od ostalih celic in se nahajajo spodaj levo, proti sredini se nahajajo večji monociti, nad le-temi pa opazimo podobno velike, vendar strukturno veliko kompleksnejše granulocite. Če aparatura omogoča celično sortiranje, lahko katerokoli od teh populacij ločimo od ostalih in jo uporabimo za nadaljnje študije.



Slika 3: Dvoparametrski histogram, ki podaja granuliranost v odvisnosti od velikosti krvnih celic po predhodni odstranitvi eritrocitov.

1. 2. Imunofluorescenca

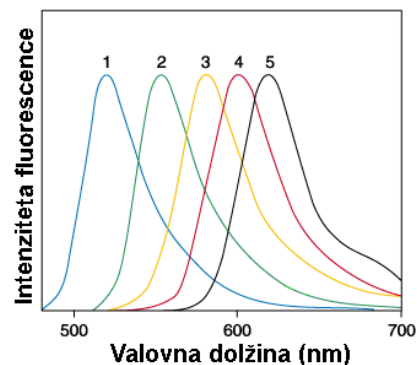
Poleg morfoloških karakteristik lahko s pretočnim citometrom analiziramo funkcionalne lastnosti celic. Pretočni citometer ima tudi dva do štiri fluorescenčne detektorje (PMT), ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. Vsak detektor prejema emitirano fluorescenčno svetlobo določene valovne dolžine in na ta način meri signal, ki ga oddaja določeno fluorescenčno barvilo. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne. Izmerjene vrednosti električnih signalov po računalniški obdelavi prikažemo matematično in grafično. O vsaki celici na ta način poleg podatkov o njeni relativni velikosti in zrnatosti (FSC in SSC) dobimo še informacijo o vrsti in jakosti oddanih fluorescenčnih signalov. Razvrščanje celic glede na velikost in zrnatost omogoči razločitev belih krvnih celic na posamezne populacije, če pa želimo razločevati med podvrstami limfocitov, jih je potrebno razvrstiti glede na prisotnost posameznih označevalskih molekul (ponavadi na površini celice), katerih navzočnost ugotavljamo s specifičnimi protitelesi.



Slika 4: Sistem detektorjev pretočnega citometra: PMT – fotopomnoževalke fluorescenčnih detektorjev različnih valovnih dolžin (FL1-4).

Prisotnost specifičnih antigenov na površini celic ali v njihovi notranjosti lahko določimo z imunofluorescenčnimi tehnikami, pri katerih uporabljamo za želeni antigen specifična protitelesa, ki so konjugirana s fluorokromi. Fluorokromi so barvila, ki absorbirajo svetlobo določene valovne dolžine, oddajajo pa svetlobo večje valovne dolžine; pri imunofluorescenčnih tehnikah vzorec obsevamo z vzbujevalno (ekscitacijsko) svetlobo, ki jo fluorokromi absorbirajo, merimo pa relativno intenziteto oddane (emitirane) svetlobe, ki odraža količino imunskih kompleksov. V isti preiskavi lahko kombiniramo več fluorokromnih barvil hkrati, ki jih vzbujamo z eno vrsto svetlobe (npr. Ar laser, 488nm), pri tem pa moramo zagotoviti oddajanje svetlobe različnih valovnih dolžin, ki jo razlikujemo s pomočjo fotodetektorjev. Zaželeno je čim manjše prekrivanje emisijskih spektrov, kljub temu da je lažno pozitivne rezultate pri večini citometrov možno odstraniti s t.i. metodo kompenzacije.

Fluorokrom	Ekscitacija (nm)	Opt. ekscitacija (nm)	Opt. emisija (nm)	Barva
Alexa Fluor 405	405, 407	401	421	
Alexa Fluor 430	405, 407	433	541	
Alexa Fluor 488	488	495	519	
Alexa Fluor 633	633, 635, 647	632	647	
Alexa Fluor 647	633, 635, 647	650	665	
Alexa Fluor 660	633, 635, 647	663	690	
Alexa Fluor 680	633, 635, 647	679	702	
APC	633, 635, 647	650	661	
FITC	488	490	525	
PerCP	488	490	675	
Phycoerythrin	488	490, 565	578	



Slika 5: (Levo) Lastnosti najpogosteje uporabljenih fluorokromov. (Desno) Prekrivanje emisijskih spektrov nekaterih fluorokromov.

Metoda pretočne citometrije je v osnovi enaka metodi fluorescenčne mikroskopije, s to razliko, da je odčitavanje odstotka obarvanih celice avtomatizirano, hitrejše in objektivnejše. Odstotek pozitivnih celic (celice, ki po reakciji s fluorescenčno označenimi protitelesi fluorescirajo) lahko zanesljivo izračunamo v primeru, da lahko jasno ločimo med pozitivnimi in negativnimi celicami.

2. UPORABNOST PRETOČNE CITOMETRIJE V KLINIKI

Poleg omenjenih analiz celičnega fenotipa, ki jo opravljamo z ugotavljanjem navzočnosti posameznih vrst molekul na celici in v njej (kvalitativno in kvantitativno), lahko pretočno citometrijo uporabimo še za druge analize (hematološke, onkološke, mikrobiološke itd.). Detekcija fluorescence seveda ni omejena samo na vezavo protiteles, ki so konjugirana s fluorokromi. Lahko uporabimo katerikoli izvor fluorescence, ki je povezan s funkcionalno karakteristiko celice; npr. znotrajcelična barvila (Hoechst ali propidijev iodid) lahko uporabimo za kvantifikacijo DNA ali RNA. Število parametrov, ki jih lahko izmerimo, je omejeno le z dostopnostjo fluorescenčnih označevalcev in specifikko aparature (valovna dolžina laserja, število detektorjev itd.).

VZOREC	KLINIČNO VPRAŠANJE	MERJENI PARAMETER
Hematologija in transfuziologija		
retikulociti	število, velikost	RNA
trombociti	aktivacija zrelost avtoprotelesa	aktivacijski markerji RNA vezava Ig
levkociti	število, velikost avtoprotelesa	sipana svetloba vezava Ig
matične celice levkemične in limfomske celice	število diagnoza in klasifikacija	markerji levkocitni markerji (CD)
Imunologija		
limfociti	podvrste in število aktivacija citokinski profil (Th1/Th2) proliferacija apoptoza	levkocitni markerji (CD) levkocitni markerji (CD) znotrajcelični citokini DNA, aktivacijski markerji DNA, različni markerji
NK aktivnost	NK aktivnost	mrtve tarčne celice

Transplantacija		
limfociti	aloprotitelesa aktivacija	vezani Ig levkocitni markerji (CD)
Pulmologija		
limfociti (BAL)	podvrste in število aktivacija citokinski profil (Th1/Th2) proliferacija	levkocitni markerji (CD) levkocitni markerji (CD) znotrajcelični citokini aktivacijski markerji
Onkologija		
aspirat, biopsija	diagnoza limfoma vrsta tumorja prognoza tumorja kemorezistenca	antigeni (CD) tumorski antigeni DNA markerji, apoptoza
Mikrobiologija		
bakterije	diagnoza občutljivost	velikost, zrnatost, DNA, FISH, markerji, encimi

2. 1. Priprava vzorcev za analizo s pretočnim citometrom

Za analizo s pretočnim citometrom potrebujemo celice v suspenziji, ki morajo biti ločene oz. neagregirane (angl. *single cells*). Ponavadi jih suspendiramo v območju 10^5 - 10^7 celic/ml, da preprečimo zamašitev ozkih cevčic v aparaturi. Koncentracija celic prav tako vpliva na hitrost sortiranja celic, ki je pri večini citometrov v območju 2-000-20.000 celic/sekundo.

Najbolj razširjen pufer za pripravo suspenzije celic je izotonični fosfatni pufer PBS (angl. phosphate buffered saline), medtem ko so najbolj razširjeni vzorci suspenzijske celične kulture, vodni mikroorganizmi, bakterije in kvasovke. Priprava polne krvi je prav tako enostavna za uporabo, saj je po lizi eritrocitov mogoče zelo dobro razločiti med limfociti, granulociti in monociti, glede na parametra FSC in SSC (glej zgoraj).

Analiza celic iz trdnih tkiv (npr. jetra, tumorska tkiva) je bolj zahtevna, saj je za pripravo suspenzije celic potrebna razgradnja trdnega materiala in celičnih agregatov oz. skupkov, kar lahko dosežemo z mehanskimi ali encimskimi postopki. Mehanska razgradnja je primerna za šibko vezane strukture (npr. adhezijske celice, punktati kostnega mozga, limfa), in sicer suspenzijo razrežanega tkiva nekajkrat potisnemo skozi injekcijsko iglo, če je potrebno pa vzorec še stremo v tarilnici ali razgradimo s pomočjo ultrazvoka. Z encimskimi tehnikami prekinjamo interakcije protein-protein in razgrajujemo ekstracelularni matriks, ki povezuje celice. Delovanje encimov je odvisno od številnih faktorjev (pH, temperatura, kofaktorji), zato je potrebno premišljeno izbrati encim. Primer: optimalen pH, pri katerem deluje pepsin je 1,5-2,5, vendar pod temi pogoji poškodujemo celice, če jih v določenem času ne netraliziramo, prav tako lahko pride do poškodbe celičnih antigenov. Prisotnost kelatorjev (EDTA, EGTA) lahko odstrani dvovalentne katione, ki so odgovorni za nadzor celičnih funkcij in integriteta, pa tudi za aktivnost določenih encimov, ki so potrebni za razgradnjo matriksa (npr. kolagenaza). Pri teh postopkih izolacije celic je iz zgornjih razlogov potrebna empirična rešitev in optimizacija postopka, ki jih je potrebno prilajati potrebam posamezne analize.

Pri analizi znotrajceličnih komponent (npr. citokinov), je potrebna permeabilizacija celične membrane, da omogočimo prehod barvil ali protiteles v notranjost celice, hkrati pa ohranimo

integriteto in strukturo celice. V ta namen uporabljamo nizke koncentracije ne-ionskih detergentov (saponin, Triton X-100, Tween 20). Izbira metode za pripravo vzorca je odvisna od vrste vzorca in narave epitopa oz. celične strukture, ki jo želimo analizirati.

3. TESTI CITOTOKSIČNOSTI/PROLIFERACIJE

Toksičnost je kompleksen *in vivo* dogodek, ki lahko povzroči poškodbo celic, fiziološki učinek (membranski transport v ledvicah ali nevrotoksičnost v možganih), vnetni odziv ali kakršnkoli drug sistemski učinek. Na *in vitro* nivoju je težko opazovati sistemske in fiziološke učinke, zato večina testov temelji na določanju učinkov na celičnem nivoju oz. citotoksičnosti. Definicija citotoksičnosti se razlikuje glede na naravo samega testa, in sicer ali pride do smrti celice ali pride do spremembe metabolizma celice.

Glede na naravo testa ločimo test viabilnosti, test preživetja, metabolni test, transformacijo ali inflamatorni test. Viabilnost je takojšnji ali kratkotrajni odziv, kot je sprememba v permeabilnosti membrane. Preživetje pa je dolgotrajna ohranitev obnovitvene kapacitete (5-10 generacij ali več). Metabolni test določa spremembe v metabolizmu (npr. aktivnost dehidrogenaze, sinteza DNA, RNA ali proteinov) po tretiranju celic ali v kratkem času po tretiranju ali po posameznih celičnih delitvah.

Ločimo dva osnovna tipa celične smrti, in sicer programirano celično smrt in nekrozo. Vrste programirane celične smrti so: apoptoza (tip I) ter avtofagija (tip II), ne-apoptozna programirana celična smrt, anoikis, ekscitotoksičnost...

Obstajajo številni različni testi, ki omogočajo določanje citotoksičnosti/proliferacije celic:

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Caspase-Glo® 3/7 Assay

Caspase-Glo® 8 Assay

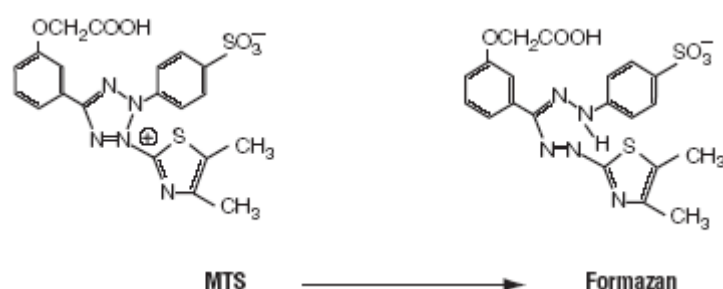
Caspase-Glo® 9 Assay

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

Testi viabilnosti temeljijo na izgubi membranske integritete, ki se določi z privzemom barvila, za katerega je celica običajno neprepustna (npr. tripan modro, eritrozín, nigrozín, naftalen črno) ali na privzemu in sprostitvi barvila, ki se običajno zadrži znotraj celic (npr. diacetil fluorescein, neutralno rdeče).

Merjenje citotoksičnosti lahko temelji na osnovi metabolne aktivnosti celic (merjenje ključnega metabolita- ATP; nastanek formazanskega produkta) ali aktivnosti posameznih znotrajceličnih proteaz (fluorogen, celično-permeabilen, peptidni substrat (Gly-Phe-AFC)).

Slika 2: Struktura MTS tetrazolijeve soli ter formazanskega produkta



MTS je tetrazolijeva sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol; MTS), ki se v prisotnosti mitohondrijske reduktaze (NADH, NADPH) reducira v formazan, ki je topen v gojišču in absorbira pri 492 nm.

Merjenje citotoksičnosti/proliferacije s pretočno citometrijo

Proliferacijo lahko zelo enostavno določamo z uporabo reagenta CFSE (ang. *carboxyl-fluorescein diacetate, succinimidyl ester*). CFSE prosto prehaja v celice, kjer znotrajcelične esteraze cepijo acetatno skupino in nastane fluorescentno barvilo, ki nato ne prehaja več skozi membrane. Torej se barvilo ne prenaša med celicami. Pri vsaki delitvi se barvilo razporedi med dve hčerinski celici, ki imata dvakrat nižjo fluorescenco.

Propidijev jodid ter 7AAD omogočata določanje deleža mrtvih celic, saj se vgradita le v DNA mrtvih celic. V kombinaciji z Aneksinom V lahko določimo delež apoptotičnih celic.

4. LITERATURA

Ihan, A. Klinična uporaba analize limfocitnih populacij s pretočnim citometrom. Kemomed, 1999.

Rahman, M. Introduction to flow cytometry. WWW: www.ab-direct.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf (21.2.2008)

Adams, D. University of Michigan Flow Core. Introductory Core Operation Course. WWW: <http://www.med.umich.edu/flowcytometry/training/> (21.2.2008)

BD Biosciences. MultiTEST CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC Reagent. WWW: http://www.bdbiosciences.com/external_files/is/doc/tds/Package_Inserts_IVD/live/web_enabled/23-3600-02_3_8_45_4_IVD.pdf (21.2.2008)