

КОНСПЕКТ

Проточная цитофлуориметрия как новый метод исследования клеток возникла и стала развиваться во второй половине XX века. Основная идея, послужившая толчком для создания этого метода – ускорение и автоматизация рутинного микроскопического исследования в лабораторной диагностике. Почти одновременно с появлением первого “проточного микроскопа” в 60-х гг были реализованы и подходы, которые позволяли анализировать клетки без получения их микроскопических изображений, а также проводить некоторые манипуляции с анализируемыми клетками.

К началу XXI века коммерческие проточные цитофлуориметры заняли прочное место в исследовательских лабораториях и медицинских учреждениях. Спектр областей их применения охватывает клеточную и молекулярную биологию, микробиологию, ботанику, иммунологию, эмбриологию, генетику и т.д. В практической медицине проточная цитофлуориметрия используется в гематологии, бактериологии, вирусологии, онкологии, медицинской иммунологии, причем данный список постоянно расширяется.

Современные проточные цитофлуориметры представляют собой довольно сложные устройства, требующие от оператора хорошего знания как биологии, так и ряда физических дисциплин, в первую очередь оптики и гидродинамики. Цитофлуориметры позволяют исследовать морфофункциональное состояние индивидуальных клеток в потоке на основе измерения оптических, а в некоторых случаях и электрических свойств. Исключительно высокая производительность этих приборов позволяет собирать и анализировать большие массивы данных, объединяющие информацию о десятках и сотнях тысяч клеток.

В настоящее время существует также целый ряд приборов, позволяющих не только анализировать оптические свойства клеток, но и сортировать клетки с учетом этих свойств (так называемые “клеточные сортеры”). После сортировки собранные популяции клеток или выделенные индивидуальные клетки могут быть использованы исследователем для своих задач –

последующего культивирования, введения экспериментальным животным, других методов анализа и т.п. Клеточные сортеры не являются предметом данного пособия и в дальнейшем не рассматриваются.

ПРИНЦИП РАБОТЫ ПРОТОЧНОГО ЦИТОФЛУОРИМЕТРА

Назначение проточного цитофлуориметра

Проточный цитофлуориметр – это прибор, позволяющий измерять оптические свойства индивидуальных клеток в суспензии.

Использование суспензии клеток является необходимым условием, поскольку измерение производится в токе жидкости. Большинство существующих в настоящее время приборов измеряют такие параметры клеток, как светорассеяние под разными углами и флуоресценция в различных диапазонах спектра.

В отличие от оптического микроскопа, проточная цитофлуориметрия не является методом визуализации, изображения клетки в процессе работы прибор не получает. Однако, необходимо отметить, что в последнее время на рынке появляются приборы, совмещающие функции цитофлуориметра и микроскопа.

Высокая производительность проточных цитофлуориметров обеспечивает измерение до нескольких десятков тысяч клеток в секунду, при этом для каждой клетки, в зависимости от конструкции прибора, может измеряться от 5 до 14 и более параметров. Анализ собранных данных позволяет выделить популяции клеток, обладающие теми или иными свойствами, определить их относительное и абсолютное содержание в образце.

Проточная цитофлуориметрия позволяет анализировать клетки (бактерии, одноклеточные водоросли, дрожжи, клетки животных и растений), а также другие частицы, такие как изолированные ядра, хромосомы и т.п.

Кроме этого, развиваются специализированные методы анализа растворимых молекул с применением полимерных микросфер с конъюгированными антителами.

Принципиальная схема устройства

В упрощенном виде работу проточной системы прибора можно представить следующим образом (рис. 1):

- суспензия клеток из пробирки с образцом забирается специальной иглой (1);
- клетки узкой струей впрыскиваются в центр ламинарного потока проточной жидкости, представляющей собой буферный раствор, изотоничный по отношению к клеткам (2).

Забор образца из пробирки и проточной жидкости из соответствующего резервуара осуществляется за счет подачи избыточного давления (3);

- поток жидкости с клетками протекает через проточную ячейку (4), где происходит измерение оптических свойств клеток;
- после прохождения проточной ячейки поток жидкости собирается в слив (5).

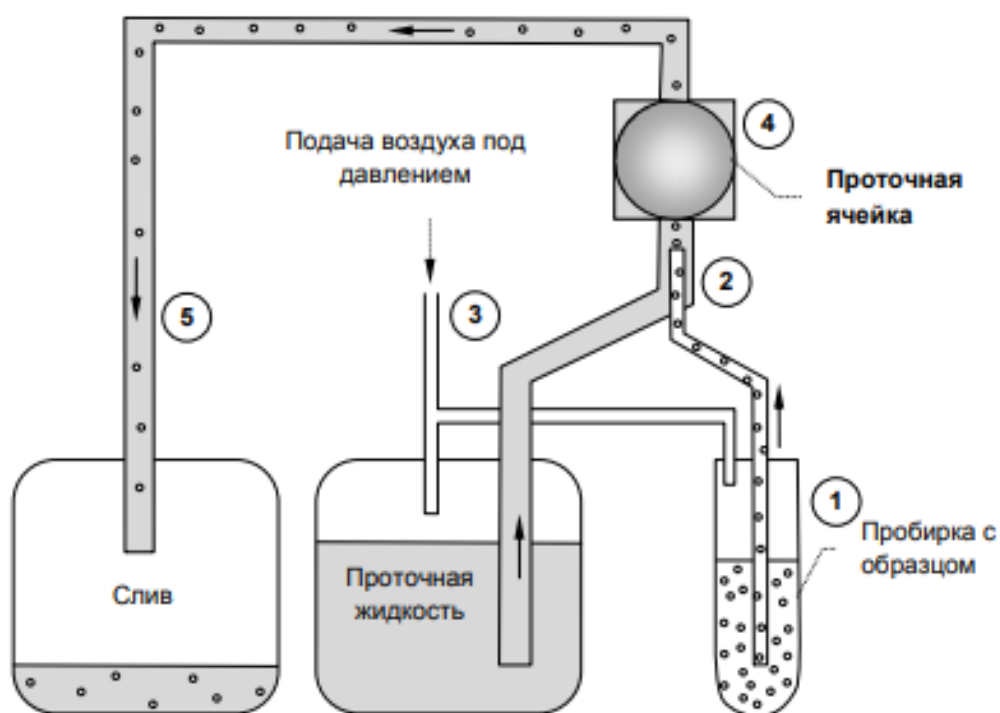


Рис. 1. Принципиальная схема проточной системы цитофлуориметра.

Измерение оптических свойств клетки осуществляется в *проточной ячейке* – ключевом элементе цитофлуориметра.

Цитофлуориметры различных моделей могут существенно отличаться по конструкции проточной ячейки, однако в целом её принципиальная схема может быть представлена, как показано на рисунке 2. Ламинарный поток жидкости протекает по тонкому каналу в кювете из оптически прозрачного материала (кварц). В одном из участков канала в его центре сфокусирован лазерный луч, и клетки в потоке последовательно пересекают эту точку (рис. 2 Б). В момент пересечения клеткой этого участка рассеянный ею свет лазера, а также флуоресценция регистрируются оптической системой прибора.

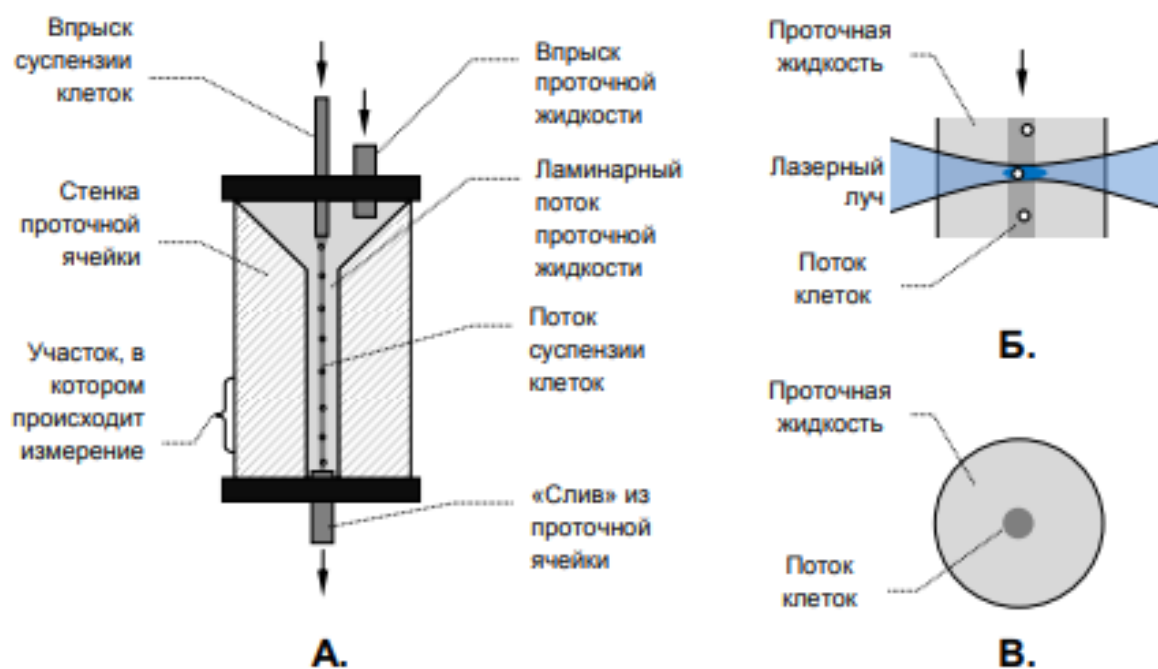


Рис. 2. Схема устройства типичной проточной ячейки (А); отдельно показаны участок, в котором клетка в потоке пересекает сфокусированный лазерный луч, (Б) и поперечный разрез ламинарного потока (В)

Диаметр лазерного луча в точке фокуса составляет около 20 мкм вдоль проточного канала и 60 мкм поперек него. Эти размеры обеспечивают быстрое пересечение клеткой пучка (при этом избегается ситуация, когда в пучке одновременно находятся несколько клеток) и достаточно равномерное освещение по всей ширине потока клеток. Однако, интенсивность света в луче неодинакова – в центре она выше, а к краям существенно уменьшается. Поперечный профиль интенсивности лазерного луча соответствует распределению Гаусса. Для примера, клетка, отклонившаяся от центра такого луча на 30 мкм, получит только 13,5% интенсивности света по сравнению с той, что окажется строго в центре. В связи с этим, для стабильности результатов очень важно, чтобы клетки пересекали лазерный луч строго определенным образом, одна за другой, без отклонения от потока.

Центрирование клеток в проточной ячейке осуществляется за счет строго организованного потока жидкости (гидродинамическое фокусирование). Именно для этой цели необходимо поддержание ламинарности потока, т.е. перемещение жидкости слоями/струями без их перемешивания (рис. 2 В). Поток клеток в центре не смешивается с окружающей его проточной жидкостью. Диаметр потока клеток регулируется за счет давления проточной жидкости – чем меньше это давление, тем шире поток клеток, и наоборот.

Ламинарность потока является важнейшим условием корректности измерения. Увеличение точности измерения можно достичь увеличением давления проточной жидкости. При этом сужается поток клеток; количество клеток, пересекающих лазерный луч в единицу времени, также снижается; фокусировка клеток относительно центра ламинарного потока улучшается; инструментальная погрешность измерения снижается. Напротив, уменьшение давления проточной жидкости и увеличение диаметра потока клеток приводит к увеличению количества клеток, пересекающих лазерный луч в единицу времени, это позволяет значительно ускорить анализ, однако точность измерения становится существенно ниже.

Оптическая система и анализируемые параметры

Оптическая система проточного цитофлуориметра включает один или несколько монохроматических лазерных источника света и систему детектирования сигнала.

При прохождении клеткой лазерного луча происходят следующие события:

- 1) часть света рассеивается клеткой;
- 2) часть энергии света поглощается и расходуется в тепло, на протекание фотохимических процессов, либо вновь высвечивается в виде света (флуоресценция), как правило, с меньшей энергией кванта;
- 3) часть света проходит без изменения, не взаимодействуя с клеткой.

Для анализа свойств клеток используются процессы 1) и 2), при этом в последнем случае анализируется флуоресценция.

Анализ прямого светорассеяния

Детектор прямого светорассеяния (FSC, от англ. “forward scatter”) располагается по ходу лазерного луча и собирает излучение, рассеянное в пределах малых углов (2-16°, значения зависят от модели прибора). Центральная часть FSC-детектора экранирована, поэтому нерассеянное лазерное излучение им не регистрируется.

В отсутствие клеток или других частиц лазерный луч попадает на экранированную часть детектора. При прохождении клетки через лазерный луч часть излучения рассеивается и попадает на боковые части детектора. Зарегистрированный сигнал преобразуется детектором в электрический импульс, величина которого пропорциональна количеству попавшего на детектор света. Появление сигнала FSC свидетельствует о прохождении какого-либо объекта через лазерный луч и используется для подсчета количества объектов.

Объекты бóльшего размера, как правило, приводят к бóльшей величине малоуглового светорассеяния. В связи с этим, величина FSC-сигнала позволяет косвенно судить о величине объекта (рис. 3 А).

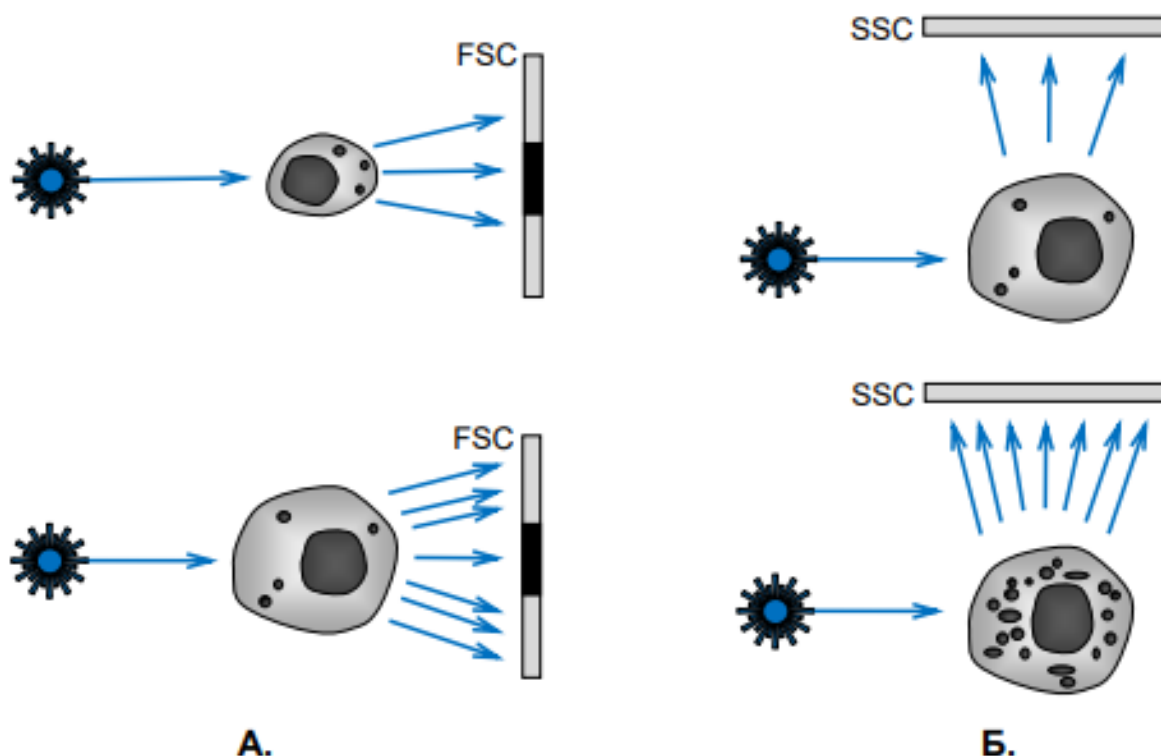


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая принцип интерпретации данных о светорассеянии объектов:

А – сигнал прямого светорассеяния (FSC) выше от более крупных объектов;

Б – сигнал бокового светорассеяния (SSC) выше от объектов бóльшей гранулярности

Анализ бокового светорассеяния

Детектор бокового светорассеяния (SSC, от англ. “side scatter”) располагается под углом в 90° относительно направления лазерного луча и собирает излучение, рассеянное в пределах больших углов ($75-105^\circ$, значения зависят от модели прибора).

Рассеяние света под большими углами является следствием многократного преломления и рассеяния луча лазера при прохождении через клетку. Регистрация этого излучения позволяет судить о сложности внутреннего строения клетки (наличие гранул, везикул, других внутриклеточных включений, соотношение ядро-цитоплазма и т.п.).

Объекты более сложной внутренней структуры, как правило, приводят к бóльшей величине светорассеяния на больших углах. В связи с этим, величина SSC-сигнала позволяет косвенно судить о гранулярности объекта (рис. 3 Б).

Комбинация FSC и SSC позволяет судить о морфологии клетки в целом и даже без анализа флуоресценции является довольно информативной при анализе популяций клеток в образце.

Анализ флуоресценции

Система для регистрации флуоресценции состоит из комплекса дихроичных зеркал, светофильтров и детекторы флуоресценции (FL, от англ. “fluorescence”), каждый из которых регистрирует излучение в строго определенном диапазоне длин волн.

Анализ флуоресценции клеток позволяет получить наибольшее количество информации об исследуемом образце, поскольку даже клетки с идентичной морфологией могут отличаться по составу белков и других макромолекул в зависимости от выполняемой функции, стадии клеточного цикла и т.д. Флуоресценция клетки может возникать как за счет собственных химических соединений (автофлуоресценция), так и за счет применения специальных красителей. Применяются красители, специфически связывающиеся с теми или иными структурами и компонентами клеток (например, пропидиум йодид, связывающийся с ДНК) или конъюгаты красителей с моноклональными антителами, специфичными к определенным мембранным и цитоплазматическим антигенам клетки. Подход с использованием антител к мембранным антигенам является наиболее распространенным в проточной цитофлуориметрии.

В простейшем случае, при использовании только одного красителя, интенсивность флуоресценции свидетельствует о количестве сайтов связывания красителя с клеткой: в случае ДНК-специфичного красителя – о количестве ДНК в клетке, в случае антител – об экспрессии соответствующих антигенов на поверхности клетки и т.п. (рис. 4).

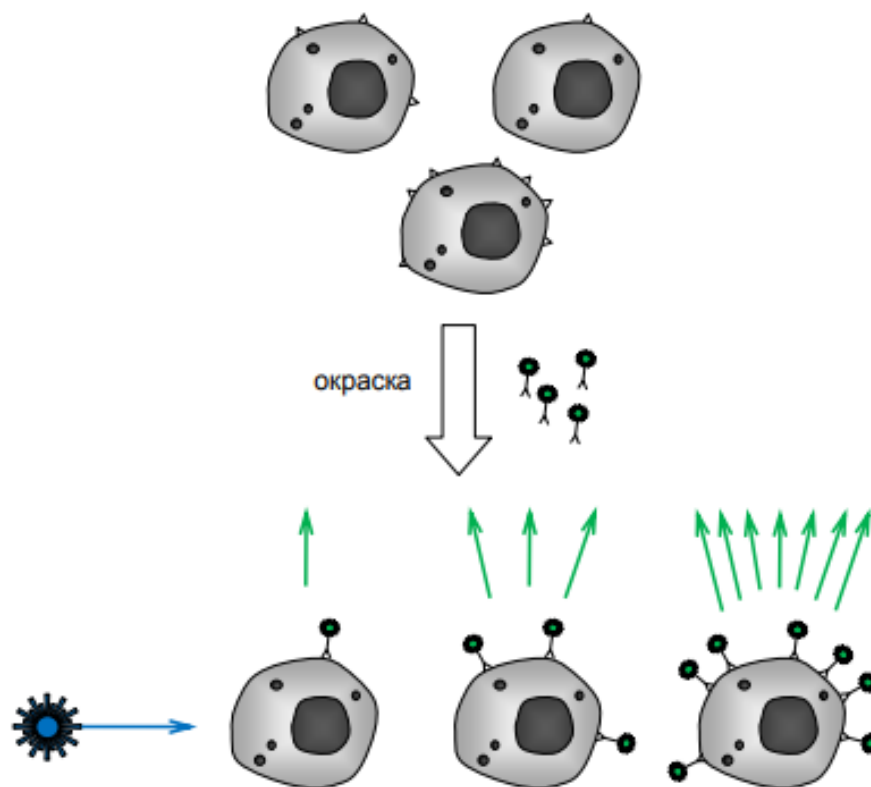


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая принцип интерпретации данных о флуоресценции объектов при использовании одного красителя: интенсивность флуоресценции свидетельствует о количестве сайтов связывания красителя с клеткой.

Одновременное использование нескольких красителей позволяет выделить популяции клеток с различным сочетанием исследуемых признаков (рис. 5). В частности, такой подход является очень важным при анализе содержания в крови различных фракций лейкоцитов, каждая из которых отличается уникальным сочетанием поверхностных белков – кластеров дифференциации. Все антитела с красителями при этом вносятся в суспензию клеток одновременно, но каждая клетка связывается только с антителами, специфичными к экспрессируемым ею антигенам.

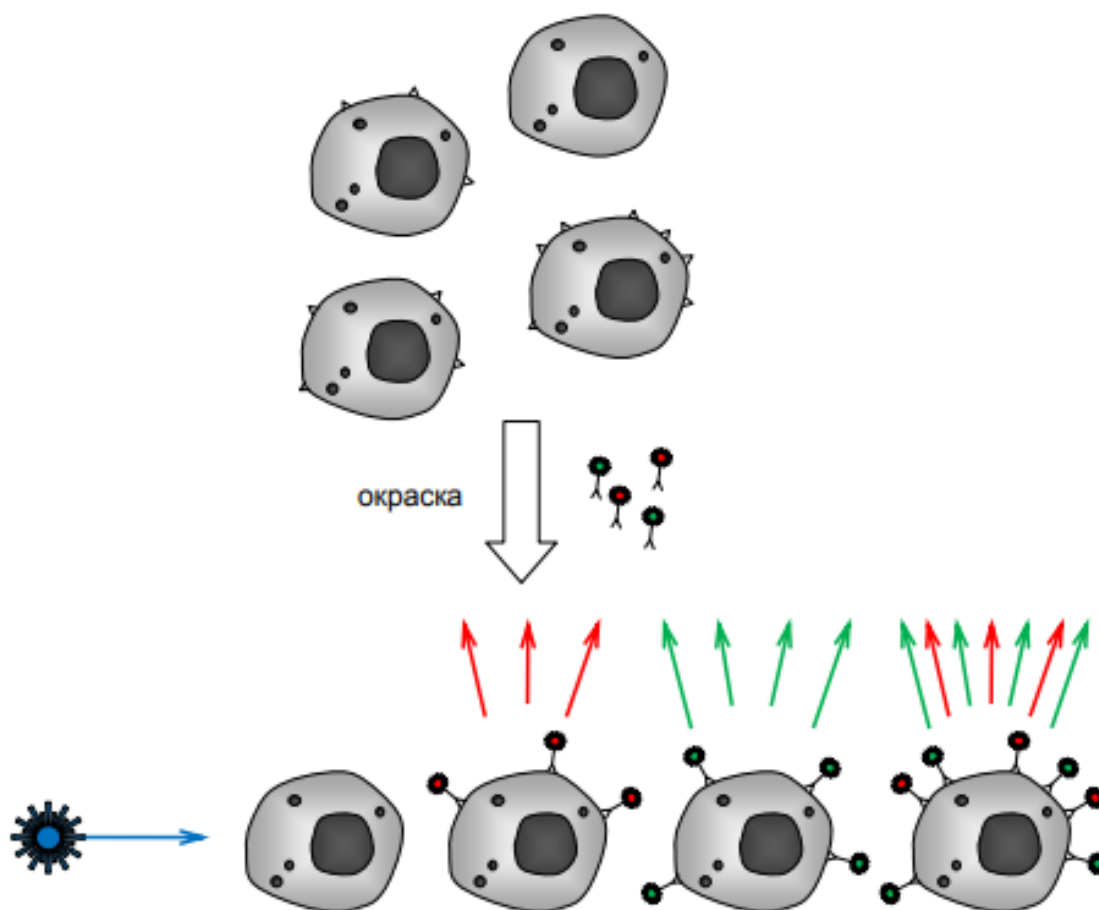


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая принцип интерпретации данных о флуоресценции объектов при использовании нескольких красителей: сопоставление интенсивности сигнала на разных детекторах позволяет выделить в образце популяции клеток с различным сочетанием исследуемых признаков.

При выборе красителя для проведения анализа необходимо учитывать, что его оптические свойства должны соответствовать возможностям прибора:

- ♣ длина волны хотя бы одного из лазерных источников должна попадать в спектр возбуждения красителя;

- ♣ в системе детектирования сигнала должен быть хотя бы один канал FL, позволяющий принять сигнал флуоресценции красителя.

Работа с двумя и более красителями требует учитывать, насколько широки и насколько перекрываются между собой их спектры флуоресценции. Широкий спектр флуоресценции красителя приводит к тому, что при его возбуждении сигнал регистрируется не только в основном FL-канале, но и в соседних (рис. 6). Это может привести к неправильной интерпретации результатов. В частности, в приведенном на рисунке 6 примере сигнал от зелёного красителя флуоресцеина изотиоцианата (FITC) регистрируется как в канале FL1 (530/30), так и в каналах FL2 (585/42) и FL3 (650 LP).

Для всех существующих в настоящее время проточных цитофлуориметров существуют алгоритмы компенсации перекрытия спектров флуорофоров.

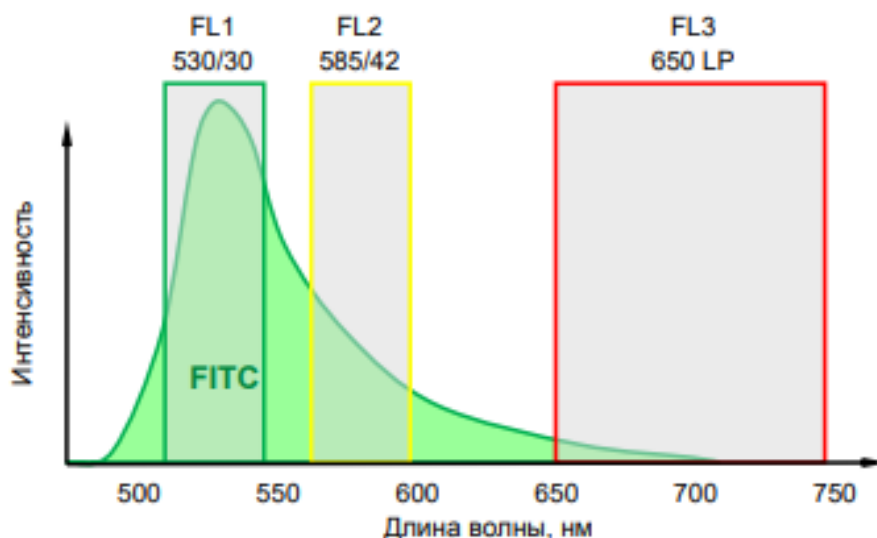


Рис. 6. Спектр флуоресценции красителя FITC и его сопоставление с каналами регистрации флуоресцентного сигнала

Общие принципы анализа данных

При попадании света на детектор светорассеяния или флуоресценции генерируется электрический ток, который в дальнейшем усиливается системой обработки сигнала, преобразуется в значения напряжения и оцифровывается для дальнейшего анализа.

Схема формирования сигнала при прохождении клеткой лазерного луча показана на рисунке 7: сигнал постепенно нарастает при вхождении клетки в луч (1), достигает максимума, когда клетка достигает центра луча с максимальной интенсивностью излучения (2) и затем спадает (3). После оцифровки для электрического импульса рассчитывается его высота (H, от англ. “height”), ширина (W, от англ. “weight”) и площадь (A, от англ. “area”).

Незначительные колебания тока детектора в отсутствие образца, а также присутствие “мусора” в токе жидкости приводят к появлению небольших изменений напряжения. Для того чтобы прибор не учитывал их при подсчете и анализе событий, устанавливается некое пороговое значение напряжения, ниже которого изменения не учитываются.

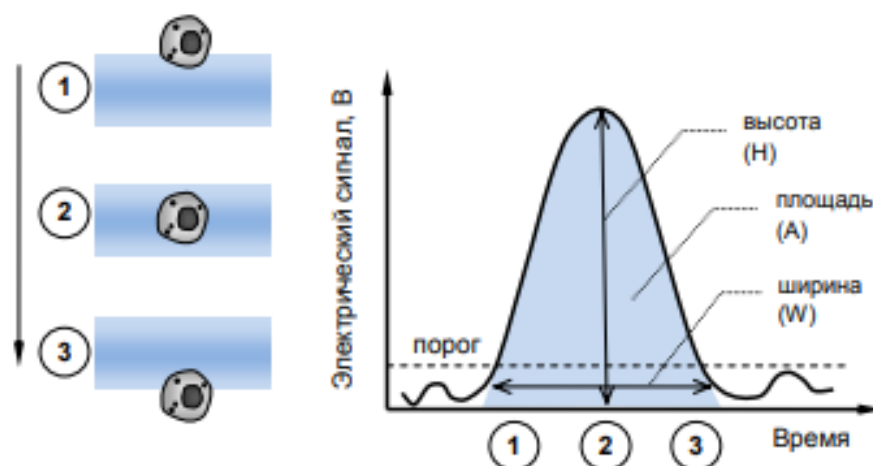


Рис. 7. Схема, формирования электрического сигнала при прохождении клеткой лазерного луча и основные параметры его анализа.

Если прибор оснащен двумя и более лазерными источниками, то в нем предусмотрено совмещение данных, полученных при последовательном прохождении одной клеткой разных лазерных лучей. Это осуществляется за счет точного измерения времени, затрачиваемого клеткой на путь от одного лазера до другого и автоматического учета этого времени программой сбора данных.

Результатом измерения образца является сформированный файл, в котором в виде таблицы записаны данные со всех рабочих детекторов для каждого из зарегистрированных событий (объектов). Для облегчения обработки полученных данных они могут быть представлены в графическом виде (рис. 8).

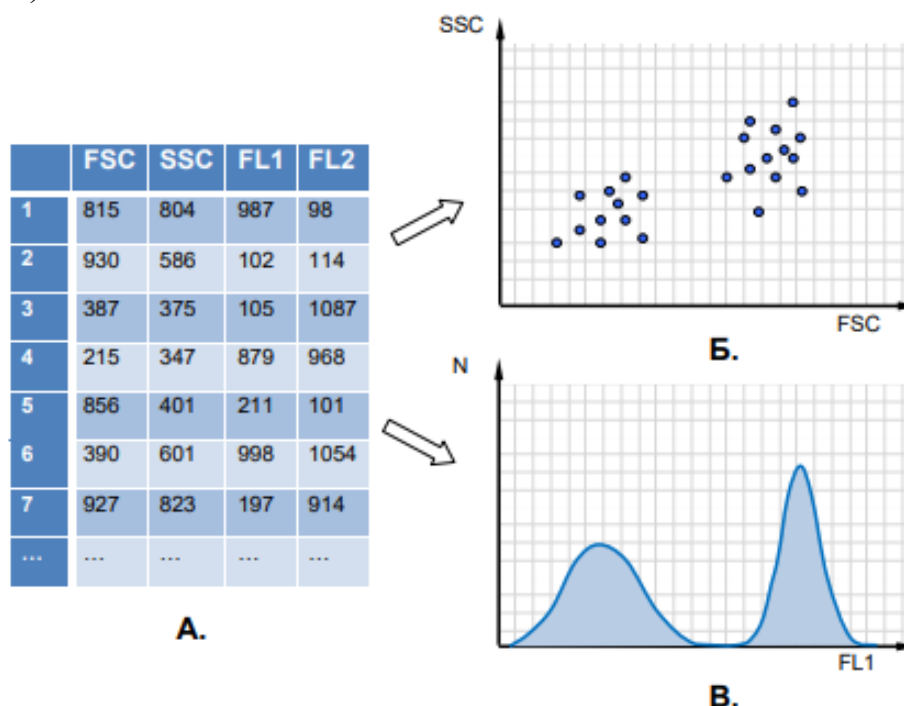


Рис. 8. Основные формы представления результатов проточной цитофлуориметрии: таблица данных (А), точечная диаграмма, на осях X и Y которой отложены любые два выбранных параметра (Б), гистограмма, на оси X которой отложен один из параметров, а на оси Y – количество событий, зарегистрированных для каждого из значений выбранного параметра (В)

Наиболее распространенными формами графического представления данных являются точечная диаграмма (рис. 8 Б) и гистограмма (рис. 8 В). В первом случае на осях диаграммы откладываются любые два из измеренных параметров. Каждое из событий отображается точкой, координаты X и Y которой соответствуют значениям сигнала для выбранных параметров. Во втором случае для отображения на гистограмме выбирается только один параметр, значения которого откладываются по оси X. По оси Y откладывается количество событий для каждого из значений X.

Программное обеспечение, используемое для получения и анализа данных проточной цитофлуориметрии, позволяет с помощью различных инструментов выделять на полученных графиках произвольные группы событий (клеток), определять их процентное соотношение, сравнивать степень выраженности исследуемого признака у разных популяций, проводить статистический анализ и т.д.