

Průtoková cytometrie – 50 let v biologickém výzkumu a klinické praxi

První experimenty, které vedly k etablování metody průtokové cytometrie, se datují do poloviny 20. století – v r. 1974 uvedla na trh americká firma Becton Dickinson Biosciences první komerční fluorescenční buněčný sorter (FACS II). Jedním z nejdůležitějších pionýrů vývoje této techniky byl Louis Kametsky, tehdy inženýr na Columbia University, který hledal způsoby, jak rozlišit rakovinné a normální buňky na základě absorpce a rozptylu světla. Mack Fulwyler, působící v Los Alamos National Laboratory, později vyvinul metody separace buněk na základě jejich náboje a velikosti, čímž položil základ pro moderní průtokové tříděče. V 70. letech se experimentální přístroje výrazně zdokonalily, zejména díky zavedení laserů a citlivých fotonásobičů, které umožnily přesné a citlivé měření fluorescenčních signálů. Přidání dalších laserů a detektorů rozšířilo možnosti analýzy a umožnilo studovat více parametrů současně. Zásadním krokem kupředu bylo zavedení fluorescenčních barviv typicky navázaných na monoklonální protilátky, které se pak specificky vážou na konkrétní molekuly na povrchu či uvnitř buněk. V 70. a 80. letech 20. století se tak sešlo několik technologických pokroků, které způsobily skutečnou revoluci v biologickém výzkumu. Díky celé řadě postupných vylepšení se průtoková cytometrie stala průlomovou technologií a za posledních 50 let zásadním způsobem změnila pohled na buněčné analýzy.

Jak průtoková cytometrie funguje?

Unikátnost této metody spočívá v tom, že umožňuje analyzovat vlastnosti jednotlivých buněk nebo jiných částic suspendovaných v kapalině – a to nesmírně rychle a přesně, v obrovském množství a pro každou buňku poskytnout řadu parametrů (u těch nejpokročilejších aplikací i více než 100). Metoda nachází široké uplatnění v základním výzkumu, dnes je ale i součástí rutinních klinických laboratoří. Základní princip spočívá v průchodu jednotlivých složek suspenze tenkým proudem kapaliny, na nějž v určitém místě svítí paprsky laserů. Buňky přitom rozptylují světlo nebo emitují fluorescenční signály, které lze detekovat a analyzovat.

Metodika analýzy vzorků průtokovou cytometrií se skládá z několika klíčových kroků (obr. 2):

- **Příprava vzorku:** Vzorky jsou upraveny do suspenze (v některých případech je třeba pevné tkáň rozvolnit pomocí enzymů, u krve jde o přímo analyzovatelný vzorek), často označené monoklonálními protilátkami s navázanými fluorescenčními barvivy, která se vážou na specifické molekuly na povrchu buňky nebo uvnitř ní.

- **Hydrodynamické zaostřování:** Vzorek je směřován do úzkého proudu kapaliny, který buňky uspořádá do jedné linie. To je zabezpečeno proudem unášecí kapaliny, do ní je vzorek tlačěn takovým tlakem, aby buňky procházely průtokovou komo-

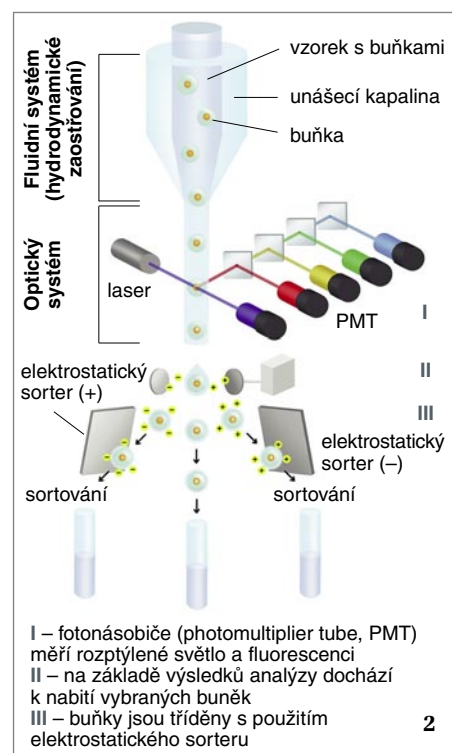
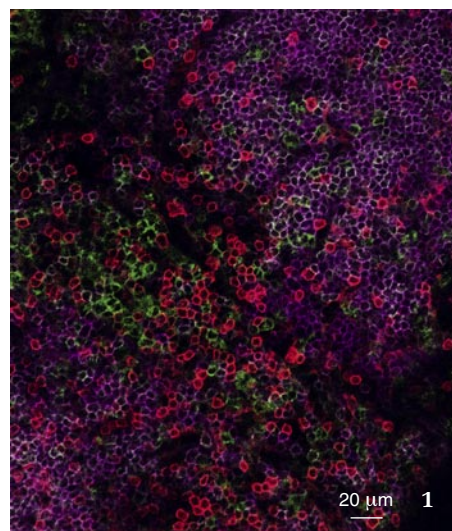
rou a jednotlivými lasery v úzkém proudu postupně jedna po druhé.

- **Osvětlení laserem:** Buňky postupně procházejí laserovými paprsky.

- **Detekce signálů:** Světlo rozptýlené buňkou a emitované fluorescenční signály z navázané monoklonální protilátky jsou zachyceny detektory, které analyzují jejich intenzitu a spektrální vlastnosti.

- **Sortování** (v případech, kdy nám nestačí analýza, ale chceme izolovat jednu nebo více buněčných populací): Proud kapek obsahujících konkrétní buňky s požadovanými vlastnostmi může být vychýlen z původního směru a dále analyzován, či dokonce kultivován odděleně od zbytku suspenze.

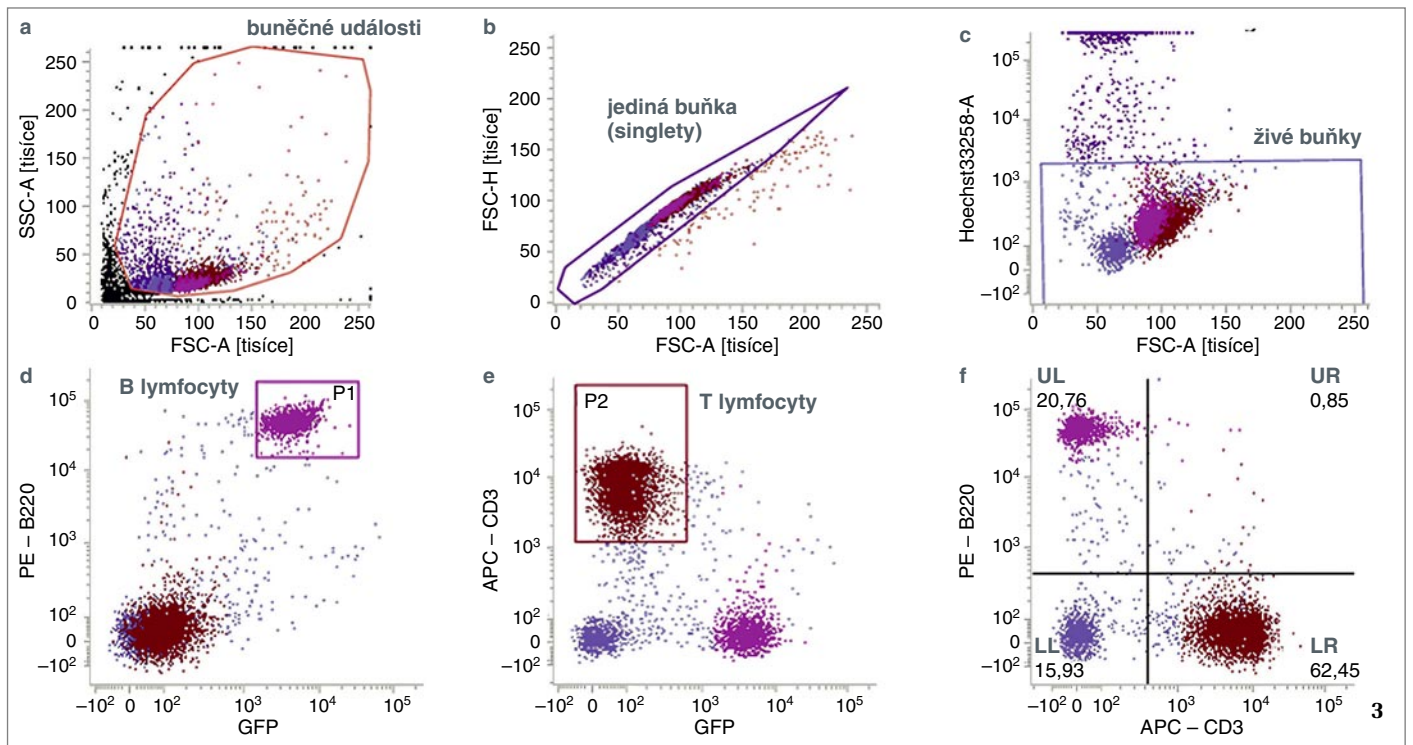
Světlo rozptýlené přímo dopředu (anglicky forward scatter) poskytuje informace o velikosti buňky, zatímco světlo rozptýlené do stran (side scatter) odhaluje její vnitřní strukturu a komplexitu. Fluorescenční signály indikují přítomnost specifických molekul nebo struktur. Fluorofory bývají typicky navázané na protilátky, případně jsou jimi přímo senzory buněčných aktivit – např. kyselosti lyzozomů nebo protonového gradientu v mitochondriích či koncentrace vápenatých iontů uvnitř buněk. Oblíbené jsou i fluorescenční látky vážící se na DNA, pomocí kterých lze kvantifikovat množství genetické informace v buňkách, popřípadě rozlišit, zda je příslušná buňka živá, mrtvá, nebo umírá prostřednictvím programované buněčné smrti.



1 Peyerovy pláty na tenkém střevě 12denního mláděte geneticky modifikovaného myšího kmene B6 s fluorescenčně značenou molekulou MHC II. Preparát v konfokálním mikroskopu v 3D. Zeleně antigen-prezentující buňky, exprimující molekuly MHC II. třídy, typicky dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty. Fixovaný preparát střeva byl dále značen protilátkami s přímo navázanými fluorofory (podobně jako u průtokové cytometrie), rozpoznávajícími CD4+ buňky (červeně, pomocné a regulační lymfocyty) a CD19+ (fialově, B lymfocyty). Jasně jsou vidět folikulární struktury složené převážně z plazmatických buněk – B lymfocytů exprimujících jen velmi malé množství MHC II. Foto N. Malinská

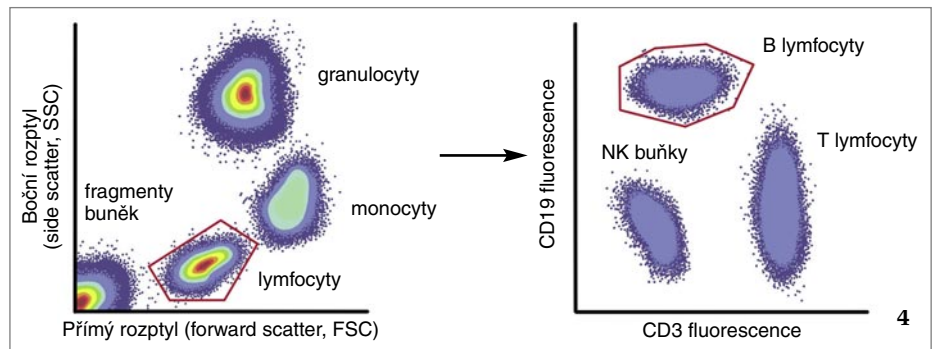
2 Schéma průtokového cytometru. Blíže v textu. Upraveno podle: Matsusada Precision (www.matsusada.com)

Pomocí průtokové cytometrie můžeme získat informace o obrovském množství buněk. Ne všechna naměřená data však splňují všechny kvalitativní ukazatele. Před tím, než jsou data interpretována, je třeba



je očistit od chyb. U buněčných suspenzí se např. omezuje analýza na dostatečně velké objekty (s využitím zmíněných side a forward scatterů – odstraní se tím nebuněčné kontaminace nebo rozpadlé buňky), dále se do analýzy zahrnou jen živé buňky (bez buněčných signálů s narušenou integritou plazmatické membrány, do nichž takto vstoupila fluorescenční sonda). Také se odstraňují dublety – události (záznamy signálů) podezřelé z toho, že by mohly v jedné kapce obsahovat více než jednu buňku.

Zbytek buněk je pak analyzován podle molekulárních nástrojů s rozdílnými fluorofory navzájem odlišitelnými na základě spektrálních vlastností – absorpce a emise. Čím komplexnější kombinaci fluoroforů použijeme, tím větší nároky na průtokový cytometr klademe a tím složitější je analýza našich vzorků. Excitaci zde zajišťují lasery, emise je zachycena a vyhodnocena pomocí citlivých detektorů fotonů. Emitované světlo je vedeno k jednotlivým detektorům soustavou dichroických zrcadel a dalších optických filtrů, které filtrují světlo do požadovaného výseku vlnových délek tak, aby jednotlivé detektory mohly být použity pro detekci konkrétních fluoroforů, kterými byly buňky obarveny. Průtokový cytometr osazený čtyřmi lasery může díky promyšleným kombinacím dichroických zrcadel zajistit specifickou detekci mnohobarevných kombinací fluoroforů – vysoce multiparametrickou analýzu komplexní směsi. Naměřená data jsou srovnána s celým panelem kontrolních vzorků, aby se zajistila analýza jen specifických signálů v příslušných kanálech (v určitých vlnových délkách). Následně probíhá analýza umožňující identifikaci buněčných populací s různými kombinacemi specifických fluorescenčních signálů. Průlomem jsou na tomto poli analýzy, které pomyslně korelují „vše se vším“ a jejichž výsledkem je vynesení buněk do dvourozměrného grafu, v němž jsou jednotlivé typy buněk zobrazeny jako více nebo méně kompaktní „obláčky“ jednotlivých událostí vyznačených



odlišnou barvou (obr. 7). Ty zahrnují buňky s unikátními kombinacemi pozitivit a negativit pro jednotlivé fluorofory v mnohorozměrném analytickém prostoru. Z jednoho vzorku, např. krve, tak získáme charakteristiku desítek více nebo méně vzácných buněčných populací. Pokud se chceme soustředit na menší buněčné populace, ale ve vzorku jeden buněčný typ výsokce převažuje, lze jej v některých případech předem odstranit, abychom se mohli zaměřit na minoritní, ale funkčně potenciálně zásadní buněčné populace. U krve se tak např. standardně lyzují červené krvinky a analýza se soustředí pouze na ty bílé, tvořící jen výrazně méně než 1 % všech událostí.

Metodicky nejjednodušší je analýza povrchových molekul studovaných buněk. Zde typicky využíváme monoklonální protilátky specifické pro konkrétní povrchové molekuly s navázanými navzájem spektrálně odlišitelnými fluorofory (obr. 1 a 5). Pro analýzu T lymfocytů se tak např. využívají protilátky specificky se vážící na molekuly CD4 a CD8, které jsou typické pro různé funkční skupiny těchto buněk (CD4+ jsou pomocné a regulační T lymfocyty, CD8+ pak cytotoxické T lymfocyty). Pro jemnější škálování těchto hlavních kategorií T buněk přidáváme další specifické znaky, které definují jejich vývojové stadium, popřípadě indikují funkční zapojení do imunitních aktivit. Jde např. o receptory pro komunikační molekuly imunitního systému (cyto-

kiny) nebo o molekuly zajišťující zachycení v cílové tkáni (adhezivní molekuly). Ne vždy nám ale povrchové molekuly dají správnou odpověď na výzkumné otázky, ta se může skrývat uvnitř buněk. V tomto případě můžeme použít intracelulární barvení. Buňky musíme nejdříve zafixovat, pak umožnit vstup detekčních reagentů do buňky (permeabilizací cytoplazmatické membrány pomocí detergentů), nakonec standardně „barvit“ a analyzovat. Takové barvení je s oblibou používáno pro zjištění transkripčních faktorů, intracelulárních cytokinů nebo molekulárních nástrojů, kterými imunitní buňky realizují svou funkci – např. složení cytotoxických granulek u cytotoxických T lymfocytů.

Monoklonální protilátky nejsou jedinými vhodnými nástroji pro vazbu fluoroforů na konkrétní molekulární cíle. Těmi mohou být např. lektiny, které se vážou na specifické cukerné varianty. Pro funkční testy se využívá široké spektrum fluorescenčních sond – již byly zmíněny sondy měnící své spektrální vlastnosti v odlišném fyzikálně-chemickém prostředí. Tím může být pH v případě lysotrackerů a lysosomů (identifikujících v buňkách organely s kyselým pH – lysozomy), protonový gradient u mitochondrií nebo vnitrobuněčné koncentrace iontů vápníku u Fura-2 (např. při oplození vajíčka nebo svalovém stahu). V živých buňkách tak můžeme získat komplexní

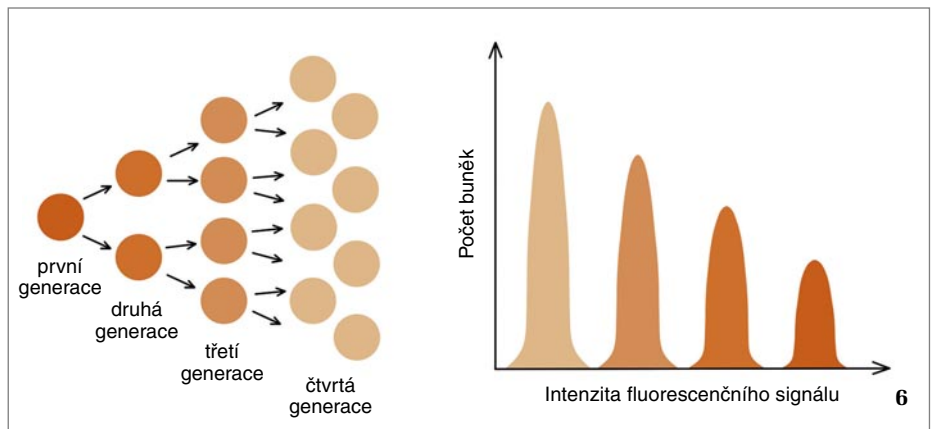
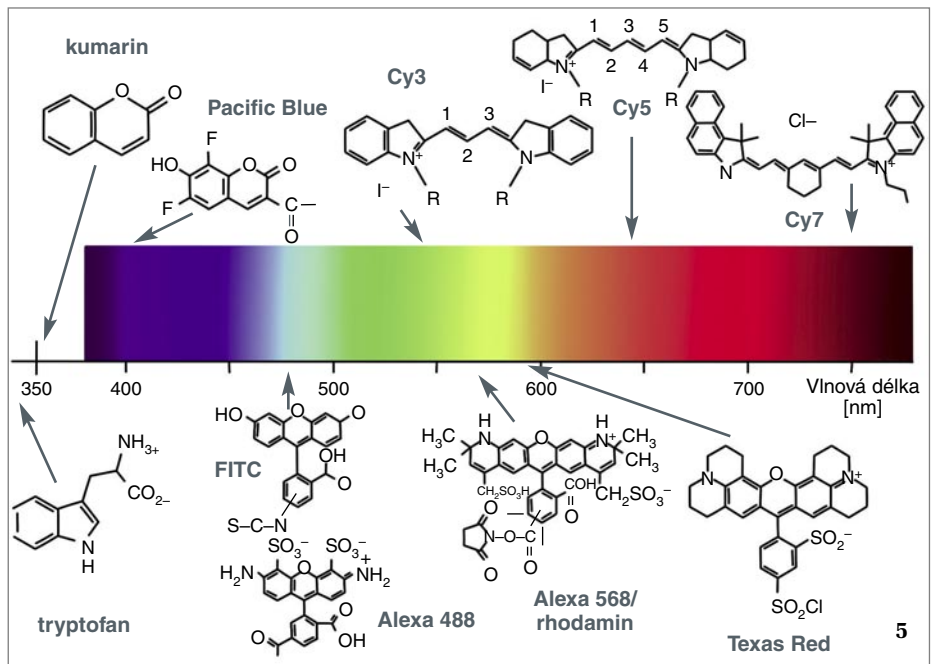
3 Příklad analýzy cytometrického vzorku během Praktického cvičení z imunologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy. Mízní uzlina z genetiky modifikované myši (s molekulou MHC II spojenou se zeleným fluorescenčním proteinem GFP) byla převedena do buněčné suspenze a inkubována fluorescenčním barvivem Hoechst33258, s protilátkami CD3 (typická molekula T lymfocytů) a B220 (varianta molekuly CD45 typická pro B lymfocyty) s kovalentně navázanými fluorofory PE (phycoerythrin) a APC (allophycocyanin), které je spolu s GFP možné od sebe dobře fluorescenčně oddělit. Některé buňky v suspenzi jsou pozitivní pro GFP (ty, které syntetizují MHC II, jde o antigen-prezentující buňky), některé nesou navázanou protilátku rozpoznávající CD3, jiné protilátku rozpoznávající B220. Buněčná suspenze tak obsahuje čtyři fluorescenční látky – protein GFP, Hoechst33258, PE a APC. Celkem byly nasbírány signály z 10 tisíc buněk. A – pomocí bočního a přímého rozptylu (side a forward scatteru, SSC-A a FSC-A) je analyzována velikost a granularita buněk. Je zvolen region (červeně), v kterém se typicky nacházejí buněčné události. B – dále jsou fialovým regionem identifikovány události obsahující jednu jedinou buňku (singlety) z buněčných událostí. C – Hoechst33258 neproniká do živých buněk, pozitivita na ose y identifikuje během experimentu poškozené buňky nebo buňky apoptotické, které jsou z další analýzy odstraněny pomocí modrého regionu (obsahujícího živé buňky). V grafech D, E a F jsou tedy analyzovány pouze živé jednotlivé buňky.

D – vynesení pozitivitu protilátky rozpoznávající B220 (osa y) proti MHC II-GFP. Region P1 označuje populaci B lymfocytů (fialově, B220+, MHC II+). E – vynesení pozitivitu protilátky proti CD3 (osa y) proti MHC II-GFP. Region P2 označuje T lymfocyty (hnědě, CD3+, MHC II-). F – vynesení pozitivitu protilátky rozpoznávající B220 (osa y) proti pozitivitě protilátky proti CD3 (osa x). V jednotlivých kvadrantech jsou identifikovány a kvantifikovány tři hlavní buněčné populace v mízních uzlinách: UL – B lymfocyty (20,76 %), LR – T lymfocyty (62,45 %) a LL – populace dvojité negativních bílých krvinek (např. NK buněk, 15,93 %). Z archivu katedry buněčné biologie PfF UK

4 Příklad analýzy cytometrických dat. Pomocí forward a side scatteru jsou identifikovány lymfocyty (malé leukocyty bez granulí), ty jsou vybrány a dále analyzovány na základě pozitivitu pro znaky CD3 (součást T receptorového signalizačního komplexu) a CD19 (typického znaku B lymfocytů). Upraveno podle: Rapid Novor (www.rapidnovor.com)

5 Příklady fluoroforů, které je možné vázat na monoklonální protilátky a navzájem kombinovat při vícebarevné cytometrické analýze. Upraveno podle: FluoroFinder (<https://fluorofinder.com>)

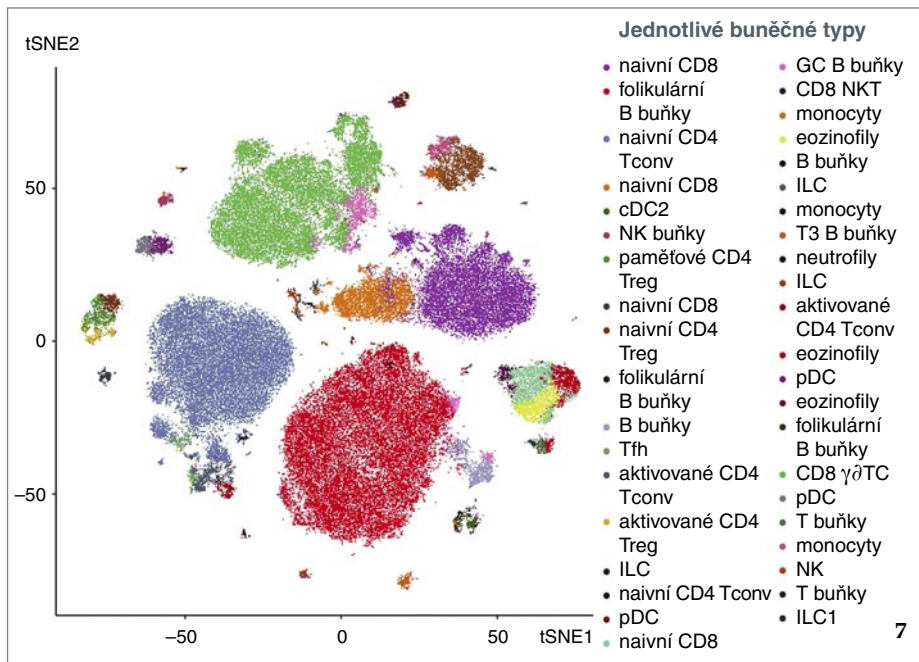
6 Princip studia buněčného dělení (proliferace) průtokovou cytometrií. Upraveno podle: ABP Biosciences (www.abpbio.com). Kreslila R. Bošková (obr. 2, 4, 5 a 6).



informaci o jejich fyziologických funkcích, jež se mohou mezi buněčnými typy lišit. To nám může pomoci pochopit diverzitu buněčných aktivit v mnohobuněčném organismu. Často využívanou skupinou fluorescenčních sond jsou ty, které se vážou na DNA. Některé z nich dokážou proniknout přes neporušenou cytoplazmatickou membránu a my je můžeme použít pro kvantifikaci množství DNA v buňkách konkrétních organismů. Dokážeme tak studovat např. buněčný cyklus – tedy počet buněk v G1 fázi s genomem o velikosti $2n$ (diploidní sada chromozomů), těch, které procházejí replikací (S fáze, množství DNA mezi $2n$ a $2 \times 2n$) a těch v G2 fázi před buněčným dělením s $2 \times 2n$. Další možností je srovnání velikosti genomů mezi organismy. Uvedený přístup je oblíbený zejména mezi botaniky, kde je studium polyploidizace pomocí průtokové cytometrie zavedena a standardní metodikou (více např. v Živě 2005, 1: 46–48; 2021, 3: 110–113; 2024, 4: 163–172, 6: 308–311; a na str. 12–15 tohoto čísla). Buněčný cyklus lze také studovat měřením vyředování fluorescenčního signálu při buněčném dělení (obr. 6). Buňky jsou na začátku experimentu inkubovány s fluoroforem (např. CFSE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), který do nich vstoupí a nastaví hodnotu fluorescence pro stabilní buněčnou populaci na hodnotu 1. Pokud se buňky rozdělí, množství fluorescenčního signálu se sníží na

polovinu, při dalším dělení na čtvrtinu atd. Je jasné, že tato metoda má velké využití např. při studiu látek aktivujících buněčné dělení (umožňujících např. expanzi buněk imunitního systému pro terapii), nebo ho naopak potlačujících (jako u nádorového bujení).

V experimentálních modelech bývají často využívány fluorescenční proteiny, které mohou mít odlišné fluorescenční vlastnosti a jsou typicky kódovány v genomu studované buněčné populace, či celého organismu. V současné době máme k dispozici kompletní paletu fluorescenčních proteinů, pokrývajících viditelné světelné spektrum od modré do červené v mnoha variantách, které můžeme spolu kombinovat a v živých buňkách bez použití dalších externích reagentů studovat nejrůznější fenomény. Konkrétní varianty fluorescenčních proteinů mohou být připojeny k proteinům, jež studujeme tak, že původní gen je nahrazen variantou kódující proteinovou chiméru (obsahující fluorescenční složku). Tento tzv. knock-in přístup zajišťuje, že se studovaný protein s fluorescenční značkou syntetizuje jen ve správném buněčném typu a ve správném množství. Vzhledem k tomu, že se buňky liší spektrem syntetizovaných proteinů, můžeme relativně snadno připravit např. myši model se zeleně fluoreskujícími makrofágy, červenými B lymfocyty nebo modrými cytotoxickými T lymfocyty. Tyto myši lze zkřížit mezi sebou, a získat



7 Ukázka multiparametrické analýzy dat umožňující rozlišení 40 různých buněčných typů. Orig. O. T. Butron (www.colibri-cytometry.com)

8 Příklad jednoho z nejpokročilejších současných cytometrů – BD FACSDiscover™ S8 Cell Sorter – umožňujících sortování buněčných populací založené na spektrální a obrazové analýze jednotlivých buněk. Vrchol 50 let vývoje průtokových cytometrů. Zdroj: BD Biosciences

unikátní nástroj pro testování velkého množství různých hypotéz. Důležité je zdůraznit, že se fluorescenční signály nacházejí v živých buňkách a jsou nezávislé na použití protilátek. Použití fluorescenčních proteinů je skvělým nástrojem zároveň pro mikroskopické i cytometrické aplikace. V obou případech to umožňuje mimo jiné studium intracelulárních molekul bez nutnosti příslušné buňky fixovat a permeabilizovat. Rozšiřuje se tak příležitost studovat buněčnou fyziologii na obrovském vzorku buněk zaživa, bez potenciálních artefaktů spojených s přípravou fixovaných buněk.

Sortování buněčných populací

Fascinující možností, kterou nabízí průtoková cytometrie, je spojení analýzy buněčných suspenzí s izolací unikátní buněčné populace. Buněčné suspenze připravované z pevných tkání, ale i krve jsou typicky velice komplexní. Pro studium jen jednoho jediného konkrétního buněčného typu je třeba jej oddělit od těch ostatních. K tomu existuje několik metodik. Jednu z nich představuje centrifugace v hustotním gradientu, která oddělí např. granulocyty od monocytů a lymfocytů. Jinou možností je použití magnetických kuliček s navázanou protilátkou proti molekule, která definuje konkrétní buněčný typ – např. CD3 pro T lymfocyty nebo CD20 (případně B220) pro B lymfocyty. Nejpreciznější a s velkým množstvím modifikací je ale právě FACS – fluorescenční activated cell sorting – tedy třídění buněk pomocí specifického znaku s navázanou protilátkou s daným fluoroforem, případně pomocí fluorescenčního proteinu exprimovaného pouze v dané buněčné populaci. Jak již bylo zmíněno, buněčnou suspenzi je možné inkubovat s kombinací fluorescenčně značených protilátek, na které se konkrétní buněčné typy naváží v unikátních kombinacích. Získaná buněčná směs je analyzována a buněčná populace, o níž máme zájem, může být zvolena a nadefinována pro izolaci. Buněčný sorter je schopen spojit analýzu konkrétních buněk během průchodu mezi laserovými paprsky a detektory, identifikovat ty, které mají požadované kombinace fluoroforů,

tuto událost (kapku s buňkou) elektrostaticky nabít a následně vychýlit z původního směru pomocí elektromagnetického pole. Úžasné je, že zároveň můžeme izolovat několik odlišných buněčných populací, a to v několika formátech. Pokud chceme buňky dále kultivovat, můžeme sortovat do růstového média v připravené zkumavce, nebo přímo do kultivačních destiček. Přístroj se dá nastavit i tak, že nám kýžené buněčné populace klonuje – do každé kultivační jamky (např. v destičce s 96 jamkami) kápně jednu jedinou buňku! Není překvapivé, že definovaná příprava jednotlivých buněk pro následnou analýzu může být dobře kombinována s další převratnou metodikou – analýzou transkripce na úrovni jednotlivých buněk (single cell transcriptomics).

Přínos pro biomedicínu a rozšíření do klinické praxe

Průtoková cytometrie kromě základního výzkumu významně ovlivnila diagnostiku a výzkum řady nemocí. V éře epidemie HIV např. umožnila rychlé a přesné počítání CD4+ T lymfocytů u pacientů, což bylo klíčové pro monitorování průběhu onemocnění. Ve srovnání s tradičními metodami, např. mikroskopií, byla průtoková cytometrie mnohem rychlejší, přesnější a dovozovala analyzovat tisíce buněk během několika sekund. V imunologii je průtoková cytometrie nenahraditelná při studiu imunitních buněk, třeba při analýze jejich receptorů, metabolismu nebo apoptózy. Schopnost analyzovat více parametrů zároveň umožňuje vědcům odhalit komplexní vzorce chování buněk v různých podmínkách. Kromě základního výzkumu se tak průtoková cytometrie stále častěji uplatňuje v klinické diagnostice. Používá se mimo jiné při diagnostice leukémie, analýze funkčního nastavení imunitního systému nebo při hodnocení účinků léčby konkrétních pacientů. Lze ji použít i při charakterizaci imunodeficitů, kdy může chybět nebo být v anomálním množství konkrétní buněčný typ. Jak již bylo zmíněno, cytometrickými přístupy se dají buněčné vzorky nejen analyzovat, ale také třídit na základě specifických znaků. To může najít terapeutické využití např. při izolaci kmenových buněk.

kých znaků. To může najít terapeutické využití např. při izolaci kmenových buněk.

Pokroky v technologii

Průtoková cytometrie se neustále vyvíjí. Moderní přístroje dokážou pracovat s velkým množstvím parametrů díky pokroku v laserové technologii a využívaných fluorescenčních barvivách. Zavedením spektrální cytometrie se začalo analyzovat celé fluorescenční spektrum, a tím se výrazně rozšířily možnosti měření s využitím mnoha nezávislých parametrů. Dalším významným pokrokem se stala obrazová průtoková cytometrie, která kombinuje schopnosti tradiční průtokové cytometrie s možností pořizovat snímky jednotlivých buněk. To umožňuje nejen analyzovat vlastnosti buněk, ale také lokalizovat specifické molekuly uvnitř buňky nebo využívat různý tvar buněk pro jejich odlišování. Propojení průtokové cytometrie a hmotnostní cytometrie dramaticky rozšiřuje charakterizaci jednotlivých buněk pomocí množství parametrů – využívajících možná překvapivě izotopy vzácných zemin. Rozlišení cytometrů se navíc posunulo od našich tělních buněk k výrazně menším strukturám – organelám, exozomům, bakteriím, dokonce i virům. Opustilo laboratoře biologů a lékařů a stalo se součástí studia environmentálně zaměřených výzkumníků – věnujících se např. mikroplastům kontaminujícím životní prostředí. Výrazným momentem rozvoje průtokové cytometrie je propojení s pokročilými analytickými softwary a umělou inteligencí, které (i díky rozvoji počítačového výkonu) poskytují přehlednost realizovat velice komplexní mnohorozměrné analýzy. Díky průtokové cytometrii řada biologických disciplín dostala možnost pracovat s reálnými čísly a od subjektivity se dostat k exaktním datům a jejich interpretacím.

Práce byla podpořena projektem Grantové agentury Univerzity Karlovy (č. 177124).

O buňkách imunitního systému podrobněji na str. XVII–XXI kulěrové přílohy. K dalšímu čtení např. Živa 2010, 1–6; 2021, 3 a 6; 2022, 1.