

Praca poglądowa • Review Article

Techniczne aspekty cytometrii przepływowej

Technical aspects of flow cytometry

Łukasz Sędek¹, Alicja Sonsala¹, Tomasz Szczepański¹, Bogdan Mazur²

¹Śląski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii Dziecięcej, Zabrze

²Śląski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Zabrze

Streszczenie

Cytometria przepływowa to technika umożliwiająca analizę komórek w płynnej próbce materiału biologicznego. Analiza cytometryczna umożliwia rozróżnienie populacji komórek pod względem cech morfologicznych oraz badanie fenotypu przy wykorzystaniu zjawiska fluorescencji. Stosowanie zaawansowanej techniki, jaką jest wieloparametryczna cytometria przepływowa wymaga wysokiego stopnia standaryzacji. Wielokrotne znakowanie komórek przeciwciałami monoklonalnymi może nastręczać pewnych problemów przy właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Jedną z przyczyn jest nakładanie się widm emisji fluorochromów, z którymi sprzężone są przeciwciała monoklonalne. Zjawisko to wymaga matematycznej korekty zmierzonego sygnału w procesie zwanym kompensacją. Wiedza na temat zjawisk, jakie zachodzą w próbce podczas jej przygotowania do analizy cytometrycznej (zarówno tych pożądanых jak i niepożądanych) może być wykorzystana do odpowiedniego zaprojektowania eksperymentu. W zależności od celu wymienione efekty niepożądane mogą być częściowo wyeliminowane lub skorygowane poprzez odpowiedni dobór przeciwciał, fluorochromów, protokołu znakowania lub konfiguracji optycznej cytometru. Ponadto istnieje szereg różnych rodzajów kontroli, dzięki którym można określić poziom fluorescencji tła i tym samym ułatwić lub umożliwić właściwą interpretację. Do takich kontroli należą kontrola izotypowa, kontrola izokloniczna, negatywna kontrola wewnętrzna oraz tzw. kontrola FMO (fluorescence-minus-one).

Summary

Flow cytometry is a technique that enables the analysis of cells in a liquid sample of biological material. The cytometric analysis allows to distinguish cell populations in terms of morphological characteristics and to perform a phenotypic study based on fluorescence phenomenon. The use of the advanced technique, such as multiparameter flow cytometry, requires a high degree of standardization. Multiple labeling of cells with monoclonal antibodies can pose some problems in correct interpretation of the data. One of the reasons is the overlap between the emission spectra of fluorochromes with which monoclonal antibodies are conjugated. This phenomenon requires a mathematical correction of the measured signal in a process called compensation. The insight into the processes occurring in the sample during the preparation for the flow cytometry analysis (both desirable and undesirable) can be used to design an appropriate experiment. Depending on the purpose, some of the adverse effects may be partially eliminated or corrected by a proper choice of antibodies or fluorochromes, by a cell labeling protocol, or by an optical configuration of the flow cytometer. In addition, there are number of different types of controls enabling to determine the level of background fluorescence and thus to facilitate or make the correct interpretation possible. Such controls are isotype control, isoclonic control, internal negative control and so-called FMO control (fluorescence-minus-one).

Słowa kluczowe: fluorescencja, cytometr przepływowy, kompensacja, widmo emisji, kontrola izotypowa.

Keywords: fluorescence, flow cytometer, compensation, emission spectrum, isotype control.

Wstęp

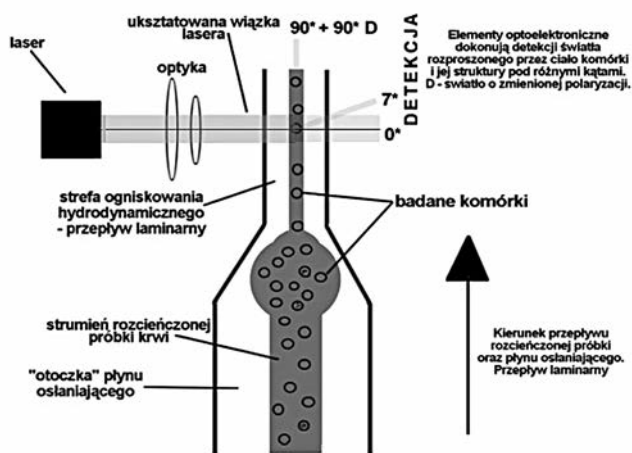
Wieloparametryczna cytometria przepływowa wykorzystuje zarówno zjawiska fizyczne jak i procesy chemiczne, dzięki którym możliwa jest szybka ocena nawet do kilkudziesięciu parametrów pojedynczej komórki. Analizowana jest morfologia oraz fenotyp komórek, czyli jakościowa i ilościowa ocena ekspresji antygenów różnicowania na komórkach w przepły-

wającej cieczy [1, 7, 14]. Do identyfikacji antygenów powierzchniowych (lub wewnątrzcytoplazmatycznych) charakterystycznych dla danego rodzaju komórek stosowane są przeciwciała monoklonalne sprzężone z fluorochromem, które swoiście reagują z określonymi antygenami. Kompleks antygen–przeciwciało emituje fluorescencję, której pomiar pozwala względnie ocenić ekspresję antygenów.

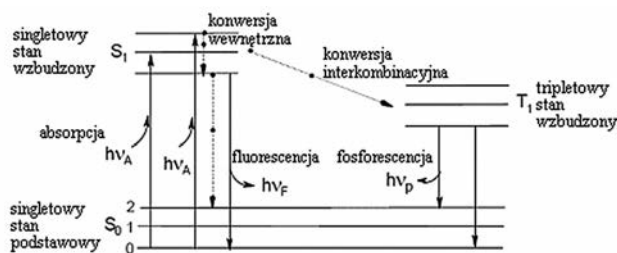
Cytometria przepływowa jest techniką obecną w ręku diagnosty od 30 lat i należy do technik, które najprężniej się rozwijają. Nowe rozwiązania technologiczne pozwalają na zastosowanie wielu źródeł wzbudzenia barwników fluorescencyjnych i badanie ekspresji wielu antygenów jednocześnie. Ponadto projektowane są nowe przeciwciała monoklonalne przeciwko nowopoznanym antygenom o potencjalnym znaczeniu klinicznym. Powyższe rozwiązania stawiają cytometrię na szczycie technik o największym znaczeniu diagnostycznym charakteryzujących się wysoką czułością i powtarzalnością oraz krótkim czasem wymaganym do postawienia właściwej diagnozy [3, 7].

Zasada pomiaru cytometrycznego

Płynna próbka materiału badanego wprowadzana jest do aparatu, a następnie układ hydrauliczny przemieszcza zawieszoną komórek do komory przepływowej i układu pomiarowego. Przepływające komórki są otoczone przez izotoniczny płyn, który zapewnia przepływ laminarny próbki i zapobiega sklejaniu się komórek. Profil szybkości w przepływie laminarnym jest paraboliczny, czyli komórki będące w centralnej części strumienia płyną szybciej niż komórki znajdujące się przy ścianach kanału. Konstrukcja komory przepływowej powoduje, że zawieszona w płynie cząstki wpływając z bardzo dużej powierzchni w wąski kanał ulegają tzw. ogniskowaniu hydrodynamicznemu (rycina 1). Prędkość przepływu jest proporcjonalna do kwadratu stosunku powierzchni większej do powierzchni mniejszej, czyli jest ona znacząco większa w wąskim kanale [2, 7, 14, 16]. W tak uformowanym strumieniu komórki przepływają linowo przez układ pomiarowy przecinając promień światła monochromatycznego emitowanego przez laser(y). W cytometrii przepływowej najczęściej stosowane są lasery gazowe takie jak laser kryptonowy, argonowy, kryptonowo-argonowy, helowo-neonowy lub lasery oparte na kryształach ciał stałych. Od liczby laserów zależy liczba mierzonych jednocześnie rodzajów fluorescencji, co przekłada się na liczbę jednocześnie oznaczanych antygenów [1, 2, 16]. Komórki przepływające przez promień lasera powodują jego rozproszenie (bez zmiany długości fali) mierzone przez dwa



Rycina 1. Komora przepływowa

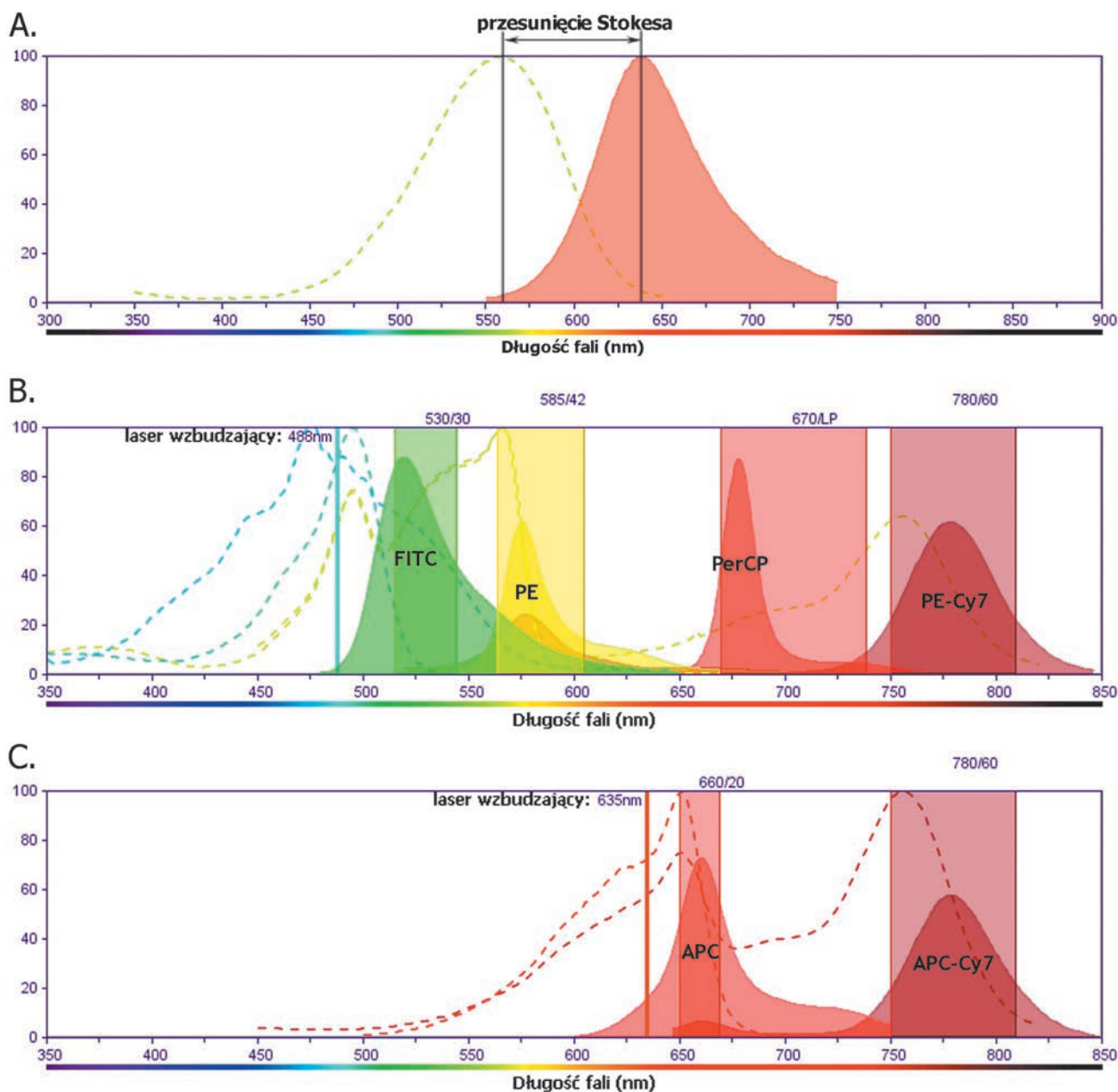


Rycina 2. Diagram poziomów energetycznych cząsteczki – diagram Jabłońskiego. Na skutek absorpcji energii elektron zostaje przeniesiony na jeden z wyższych stanów oscylacyjnych wyższego poziomu elektronowego S_1 . Elektrony ze stanu wzbudzonego mogą powracać do singletowego stanu podstawowego S_0 kilkoma drogami: na drodze przemian promienistych (fluorescencja, fosfofluorescencja) lub przemian bezpromienistych (konwersja wewnętrzna – z wyższego stanu oscylacyjnego na podstawowy stan oscylacyjny w obrębie tego samego wzbudzonego stanu elektronowego lub konwersja interkombinacyjna – z singletowego stanu wzbudzonego S_1 na niższy energetycznie trypletowy stan wzbudzony T_1).

detektory. Pierwszy z nich, FSC (Forward Scatter) odbiera wiązkę lasera, która przeszła przez strumień płynących komórek nierozproszona lub rozproszona pod niewielkim kątem, rzędu kilku stopni. FSC jest proporcjonalne do wielkości komórki. Drugi z detektorów rozproszenia – SSC (Side Scatter) jest umieszczony pod kątem prostym i odbiera informacje o wewnętrznej złożoności komórki. Na wielkość SSC mają wpływ ziarnistość i budowa jądra komórkowego [1, 2, 16]. Oprócz rozproszenia mierzona jest również fluorescencja pochodząca od wzbudzonych kompleksów antygen–wyznawek fluorescencyjnie przeciwciała. Emitowane światło jest zbierane przez filtry, system soczewek i lusterek dichroicznych układu optycznego, które izolują poszczególne długości fal światła fluorescencyjnego. Sygnały światła monochromatycznego są odbierane przez odpowiednie detektory. Następnie fotopowielacze wzmacniają sygnał analogowy, który ostatecznie zostaje przetworzony na sygnał cyfrowy i w tej postaci informacja dociera do komputera [2, 15, 16].

Co to jest fluorescencja?

Cząsteczki związków chemicznych posiadają charakterystyczny dla siebie układ elektronowych poziomów energetycznych, w obrębie, których wyróżnia się stany oscylacyjne. W stanie spoczynku elektrony zajmują podstawowy stan elektronowy S_0 . Absorpcja energii powoduje przeniesienie elektronów do określonego poziomu oscylacyjnego wysookoenergetycznych stanów elektronowych S_1 lub S_2 – mówi się wtedy o przejściu w stan wzbudzony (rycina 2). Każde dwa elektrony zajmujące ten sam orbital w cząsteczce w stanie podstawowym mają przeciwne zwroty spinów (momentu pędu), ich wypadkowa wynosi więc zero, co zapewnia minimum energii wewnętrznej i stabilność stanu, który określa się jako podstawowy stan singletowy. Wzbudzenie elektronu może nastąpić na drodze absorpcji promieniowania świetlnego, energii chemicznej lub termicznej. Absorpcja energii może spowodować przeniesienie elektronów na wyższe stany energetyczne bez zmiany zwrotu spinu (singletowy stan wzbudzony) lub też zwrot spinu może ulec zmianie na przeciwny (trypletowy stan wzbudzony).



Rycina 3.

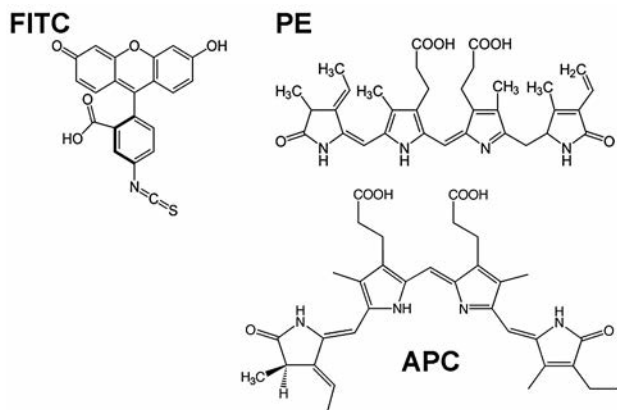
A. Przesunięcie Stokesa (przesunięcie w kierunku fal dłuższych). Długość fali światła emitowanego (linia ciągła) przez wzbudzony fluorochrom jest dłuższa niż długość fali światła wzbudzającego (linia przerywana).

B. Widma wzbudzenia i emisji fluorochromów wzbudzanych przez światło lasera o długości 488nm (FITC – izotiocyjanian fluoresceiny, PE- fikoerytryna, PerCP – peridininochlorofil, PE-Cy7 – fikoerytryna-cyjanina 7).

C. Widma wzbudzenia i emisji fluorochromów wzbudzanych przez światło lasera o długości 635nm (APC – allofikocyjanina oraz APC-Cy7 – allofikocyjanina-cyjanina 7). Na rycinie zaznaczone są filtry optyczne służące do odcinania określonego zakresu długości fal światła pochodzącego od danego fluorochromu. Zachodzenie na siebie widm emisji poszczególnych fluorochromów wymaga korekcji (kompensacji). Rycina utworzona za pomocą aplikacji dostępnej na stronie: http://wwwbdbiosciences.com/external_files/media/spectrumviewer/index.jsp.

Cząsteczka w stanie wzbudzonym dąży do osiągnięcia stanu równowagi, w którym energia całkowita przyjmuje wartość minimalną, a „nadmiar” energii zostaje wypromieniowany. Jeżeli wzbudzenie nastąpiło na drodze absorpcji promieniowania świetlnego, to powrót do stanu podstawowego z towarzyszącą mu emisją światła nosi nazwę fotoluminescencji, a w zależności od tego, czy stan wzbudzony był singletowy czy trypletowy, fotoluminescencję dzieli się odpowiednio na fluorescencję i fosforescencję. Ponieważ zgodnie z multipletową regułą wyboru przejścia elektronowe pomiędzy stanami o tej samej multipletowości są dozwolone, fluorescencja zachodzi w bardzo krótkim czasie, rzędu 10^{-8} s.

Dla odróżnienia, fosforescencja czyli przejście energetyczne między stanami o różnej multipletowości jest w myśl tej samej reguły wzbronione – cząsteczka przebywa przez długi czas w elektronowym stanie wzbudzonym zanim przejdzie do stanu podstawowego S_0 (czasy rzędu $10^0 - 10^3$ s) [12]. Oprócz opisanych powyżej przejść tzw. promienistych, po absorpcji energii mogą zachodzić również inne procesy – procesy bezpromieniste, które obrazuje diagram Jabłońskiego (rycina 2). W związku z istnieniem alternatywnych dróg oddawania zaabsorbowanej energii, światło emitowane na drodze fluorescencji ma mniejszą energię niż światło wzbudzające, czego wyrażeniem jest przesunięcie



Rycina 4. Wzory strukturalne fluorochromów stosowanych w cytometrii przepływowej. FITC – izotiocyanian fluoresceiny, PE- fikoerytryna, APC – allofikocyjanina.

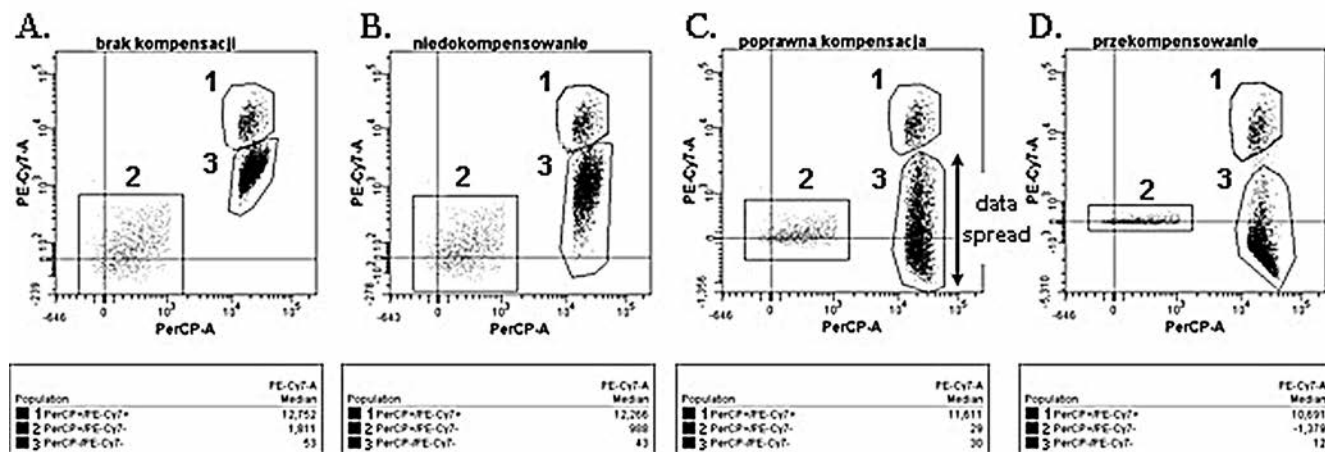
widma światła emitowanego (widma emisji) w kierunku fal dłuższych względem widma światła wzbudającego (widma absorpcji). Jest to tzw. reguła Stokesa (rycina 3) [12]. Substancje wykazujące właściwości fluorescencyjne nazywane są fluorochromami. Do tej grupy należy wiele związków organicznych posiadających w cząsteczce sprzężone wiązania podwójne (elektrony zdelokalizowane), czyli przede wszystkim są to wielopierścieniowe związki aromatyczne i heterocykliczne. Przykładami mogą być aminokwasy aromatyczne (np. tryptofan, tyrozyna), zasady nukleinowe DNA, RNA (adenina, guanina, cytozyna, tymina, uracyl), niektóre witaminy, barwniki (karotenoidy, fluoresceina, eozyna, fikoerytryna, rodamina). Niektóre z nich przedstawiono na rycinie 4 [12].

Właściwości spektralne fluorochromów stosowanych w cytometrii przepływowej

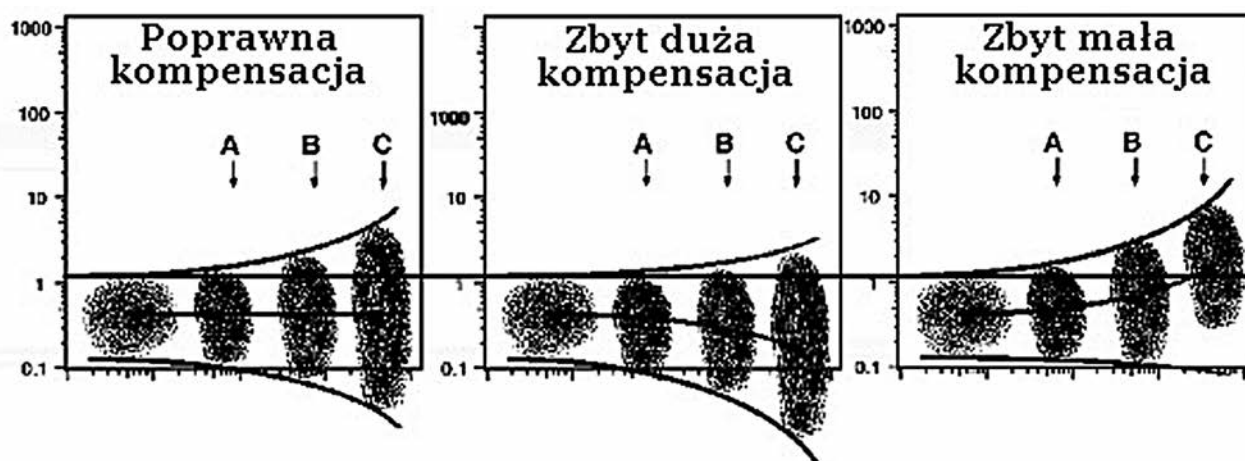
Istnieje obecnie przynajmniej kilkadziesiąt barwników fluorescencyjnych, które mogą mieć potencjalne zastosowanie w cytometrii [8, 9]. Dzięki postępowi, jaki dokonał się w ostat-

nich latach dzisiejsze cytometry przepływowe posiadają zdolność pomiaru nawet 20 widm emisji fluorescencji w zakresie światła widzialnego. Widma emisji fluorescencji fluorochromów w mniejszym lub większym stopniu nakładają się na siebie, a jednoczesna rejestracja widm pochodzących od wielu fluorochromów nieuchronnie prowadzi do zwielokrotnienia tego problemu. Nakładanie się widm może prowadzić do uzyskiwania wyników zarówno fałszywie pozytywnych, jak i fałszywie negatywnych. Aby temu zapobiec konieczne jest zastosowanie kompensacji, czyli matematycznej korekty zmierzonych sygnałów fluorescencji [8, 14]. Każdy fluorochrom ma charakterystyczne dla siebie widmo emisji i również charakterystyczny jest stopień nakładania się tego widma na widma emisji innych fluorochromów. Kompensacja zapewnia, że zmierzony w danym kanale sygnał, np. w kanale APC (allofikocyjanina) pochodzi rzeczywiście od APC, a nie od innych interferujących fluorochromów użytych w danym badaniu jednocześnie, takich jak np. PerCP (peridininio-chlorofil) czy APC-Cy7 (allofikocyjanina-cyjanina-7). Stopień nakładania się widm poszczególnych fluorochromów jest ustalany podczas kalibracji cytometru polegającym na pomiarze fluorescencji pochodzącej od komórek wybarwionych każdym fluorochromem osobno. Dzięki temu możliwe jest oszacowanie wielkości kompensacji i zdefiniowanie rzeczywistego sygnału w danym kanale fluorescencji.

Jeżeli dana populacja komórek jest prawdziwie pozytywna w jednym kanale fluorescencji (np. PerCP, peridininio-chlorofil) i jednocześnie na skutek nakładania się widm fałszywie pozytywna w innym kanale (np. PE-Cy7, fikoerytryna-cyjanina-7), kompensacja doprowadzi do eliminacji fałszywie pozytywnego sygnału z kanału PE-Cy7 (rycina 5). Polega to w tym przypadku na zrównaniu mediany w kanale PE-Cy7 populacji komórek pozytywnych w kanale PerCP z medianą populacji komórek negatywnych w kanale PE-Cy7. Kompensacja polega na zrównaniu mediany dla populacji całościowo,



Rycina 5. Kompensacja pomiędzy fluorochromami PerCP i PE-Cy7. Populacja 1 jest prawdziwie pozytywna zarówno w kanale PerCP, jak i PE-Cy7 (A–D). Populacja 2 (populacja odniesienia, wewnętrzna kontrola negatywna) jest negatywna zarówno w kanale PerCP, jak i PE-Cy7 (A–D). Populacja 3 jest prawdziwie pozytywna w kanale PerCP oraz na skutek nakładania widm fałszywie pozytywna w kanale PE-Cy7 (A – brak kompensacji i B – niedokompensowanie) – mediana fluorescencji populacji 3 w kanale PE-Cy7 jest znacznie wyższa niż mediana populacji 2 w kanale PE-Cy7. Po właściwej kompensacji (C) mediana fluorescencji populacji 3 jest prawie równa medianie fluorescencji populacji 2 w kanale PE-Cy7. Na skutek efektu rozproszenia danych (data spread) część populacji 3 jest wciąż pozornie pozytywna w kanale PE-Cy7. Przekompensowanie (D) powoduje niewłaściwe obniżenie mediany fluorescencji populacji 3 w kanale PE-Cy7.



Rycina 6. Kompensacja pomiędzy dwoma fluorochromami. Kompensacja nie zależy od intensywności fluorescencji. Jednak im większa intensywność fluorescencji danej populacji komórek ($A < B < C$) tym większe znaczenie ma poprawne ustalenie kompensacji, ze względu na fakt, że efekt rozproszenia danych (*data spread*) jest większy dla populacji o wyższej intensywności fluorescencji.

jednak pojedyncze komórki będą umiejscowione poniżej lub powyżej mediany, doprowadzając do tzw. rozproszenia danych (*data spread*), który jest efektem ubocznym kompensacji [4, 5, 9, 10, 11]. Rozproszenie danych jest tym większe im bardziej widma kompensowanych fluorochromów nakładają się [5, 8, 9]. Kompensacja nie usuwa fizycznie efektu nakładania się widm, stąd też pomimo właściwej korekcji mediany, pozostaje rozproszenie danych (*data spread*, wariancja) wynikające z rozkładu statystycznego zarejestrowanych fotelektronów odzwierciedlających populację komórek [8, 10]. Na koniec warto nadmienić, że w wyniku kompensacji, można otrzymać pozornie ujemne wartości fluorescencji. Jak wiadomo zmierzony sygnał fluorescencji będzie miał zawsze wartość dodatnią, ale kompensacja to działanie matematyczne (postanalizyczne) dodatkowo obciążone rozproszeniem danych, zarówno w stronę wartości dodatnich jak i ujemnych. Trudności techniczne napotykane przy określaniu kompensacji zostały zobrazowane na rycinach 5 i 6.

Jak wspomniano wcześniej wartości kompensacji są wyznaczone w czasie okresowej kalibracji cytometru przepływowego z użyciem komórek (lub mikrosfer) pojedynczo wybarwionych fluorescencyjnie. Poprawna kompensacja jest obliczana przez oprogramowanie obsługujące cytometr. Wyznaczona kompensacja jest właściwa dla konkretnych napięć ustawionych na fotopowielaczach sygnału dla poszczególnych detektorów fluorescencji, przy założeniu, że stałe napięcie wyzwala odtwarzalną intensywność fluorescencji wzbudzanego fluorochromu. Dlatego też konieczne jest monitorowanie pracy cytometru poprzez codzienne kontrole, przy użyciu zestawu mikrosfer wybarwionych fluorescencyjnie. Nowsze cytometry są wyposażone w oprogramowanie, które może automatycznie dostosowywać napięcia na fotopowielaczach zapewniając w ten sposób poprawność kompensacji [4, 5, 8, 10, 11, 13]. Właściwa kompensacja zapewnia poprawną analizę danych i zarówno niedokompensowanie jak i przekompensowanie mogą być istotnymi źródłami błędów (rycina 5 i 6).

Sposoby określenia pozytywności i tła: kontrola izotypowa, kontrola izokloniczna, kontrola wewnętrzna i FMO

Jednym z najważniejszych aspektów cytometrii przepływowej jest wiarygodne rozróżnienie komórek pozytywnych i negatywnych na dany antygen. Aby dokonać wiarygodnej oceny należy stosować próbki kontrolne, które umożliwią ocenę tła. Pomijając tło pochodzące od samego analizatora, przyczyny fluorescencji tła można podzielić na spowodowane: autofluorescencją, zachodzeniem widm emisji fluorescencji (opisane powyżej) oraz niespecyficznym wiązaniem się przeciwciał. Eliminacja zakłóceń analizy jest możliwa dzięki stosowaniu różnego typu kontroli. Najpowszechniej stosowane rodzaje kontroli to: kontrola izotypowa, kontrola izokloniczna, kontrola wewnętrzna i kontrola FMO (*full-* lub *fluorescence-minus-one*) [5, 11].

Kontrola izotypowa jest jedną z najstarszych stosowanych typów kontroli w dziejach cytometrii do oceny niespecyficznej fluorescencji tła. Kontrolę izotypową wykonuje się wybierając dodatkową próbkę badanych komórek mysimi immunoglobulinami tej samej klasy, podklasą i sprzężonymi z tym samym fluorochromem co przeciwciała diagnostyczne. Kontrolne mysie immunoglobuliny muszą być tak zaprojektowane, aby nie reagowały specyficznie z żadnym badanym antygenem. Poziom ich niespecyficznego wiązania może być pomocny w określeniu fluorescencji tła [4, 5, 10]. Należy zwrócić uwagę na istnienie pewnych ograniczeń, co do stosowania tego rodzaju kontroli. O ile immunoglobuliny kontrolne nie różnią się od immunoglobulin diagnostycznych izotypem, podklasą, fluorochromem, stosunkiem liczby jego cząsteczek przypadających na jedną immunoglobulinę, o tyle różnią się budową domen zmiennych łańcucha lekkiego (V_L) i ciężkiego (V_H), które uczestniczą w swoistym wiązaniu się przeciwciała z danym epitopem, i które są specyficzne dla każdego przeciwciała [15]. Przeciwciała różniące się budową części zmiennych mogą więc wykazywać różnice w awidności i poziomie niespecyficznego oddziaływania. Kontrola izotypowa może być przeznaczona do jakościowej orientacji

w poziomie niespecyficznego oddziaływania oraz może być stosowana w barwieniu komórek z hodowli [4, 5, 6, 11]. Kontrola izokloniczna składa się z mieszaniny przeciwciał sprzężonych z fluorochromem oraz większej ilości tych samych przeciwciał, ale niesprzężonych. Ten typ kontroli jest użyteczny przy określaniu niespecyficznego wiązania, w których bierze udział cząsteczka fluorochromu. W tej kontroli wykorzystuje się fakt, że nadmiar niesprzężonego z fluorochromem przeciwciała wysycza wszystkie epitopy blokując je dla przeciwciał sprzężonych z fluorochromem. W ten sposób jakkolwiek wzrost fluorescencji tła jest wynikiem niespecyficznego wiązania się cząsteczek fluorochromu do różnych antygenów [5]. Ten rodzaj kontroli nie jest powszechnie stosowany, brak jest również opublikowanych danych na temat istotności tego typu oddziaływań [5]. Zastosowanie tego typu kontroli może wpłynąć na decyzję o zmianie stosowanych kombinacji przeciwciała-fluorochrom w przypadku podejrzenia niespecyficznego wiązania się przeciwciała poprzez fluorochrom [5].

Negatywną kontrolę wewnętrzną stanowi populacja komórek, która nie wykazuje ekspresji interesującego nas antygenu i pozostaje niewybarwiona w próbce, która zawiera populację komórek wykazujących ekspresję poszukiwanego antygenu. Główną zaletą wewnętrznej kontroli negatywnej jest to, że wszystkie populacje komórek są narażone na identyczne czynniki i poddawane są tej samej procedurze analitycznej jak populacja komórek oznaczanych. Teoretycznie intensywność fluorescencji kontroli wewnętrznej powinna odpowiadać autofluorescencji komórek niezwiązanych z przeciwciałem [4, 5, 10, 11]. Niestety w rzeczywistości nie zawsze tak jest z powodu niespecyficznego wiązania się nadmiaru przeciwciała. Istnieją sposoby minimalizacji ilości wiązań niespecyficzych poprzez zmianę stężenia oraz ilości dodawanego do oznaczenia przeciwciała. O ile to możliwe, najwłaściwsza wydaje się ocena pozytywnej populacji komórek w stosunku do negatywnej populacji tego samego typu komórek, ze względu na podobny poziom autofluorescencji i niespecyficznego wiązania przeciwciał [5, 10]. Np. przy oznaczaniu antygenów limfocytów T, kontrolą negatywną powinny być pozostałe limfocyty obecne w tej samej próbce.

Kontrola FMO (*fluorescence- lub full-minus-one*) to dodatkowe próbki znakowane wszystkimi przeciwciałami obecnymi w panelu oprócz jednego. Tak więc, np. dla jednego badania ośmiokolorowego (z użyciem 8 przeciwciał sprzężonych z 8 różnymi fluorochromami) można wykonać 8 kontroli FMO – w każdej z nich będzie brakować jednego przeciwciała (jeden kanał fluorescencji będzie pusty). Pusty kanał jest kanałem, który będzie stanowił kontrolę bramkowania dla tej samej próbki znakowanej wszystkimi przeciwciałami, sprzężonymi ze wszystkimi fluorochromami [4, 5, 11]. Ten typ kontroli umożliwia ocenę niespecyficznego wiązania określonego przeciwciała (sprzężonego z określonym fluorochromem). Przede wszystkim jednak kontrole FMO pozwalają ocenić efekt skompensowania nakładających się widm emisji fluorescencji poszczególnych fluorochromów, czyli ocenić wielkość efektu rozproszenia danych (*data spread*) i wyznaczyć

granice pomiędzy komórkami pozytywnymi i negatywnymi na dany antygen. Kontrole typu FMO są więc najużyteczniejsze w eksperymentach wielokolorowych, w których głównym źródłem szumów uniemożliwiających jednoznaczne określenie granicy pomiędzy komórkami (populacjami) negatywnymi i pozytywnymi na dany antygen jest zjawisko nakładania się widm [5, 10].

Piśmiennictwo

1. Baran J. Nowa epoka cytometrii przepływowej – przewodnik po współczesnych cytometrach i ich zastosowanie. *Post Biol Kom* 2008; 35: 3-15.
2. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: Principles and Clinical Applications In Hematology. *Clin Chem* 2000; 46: 1221-1229.
3. Frelinger J, Ottinger J, Gouttefangeas C i wsp. Modeling flow cytometry data for cancer vaccine immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59:1435-1441.
4. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA i wsp. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol*. 2006 Jul; 7: 681-5.
5. Hulspas R, O’Gorman MR, Wood BL i wsp. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009; 76: 355-64.
6. Karczmarek A, Osawa T, Leporowska E i wsp. Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce klinicznej. *Współcz Okol*. 2002; 6: 366-373.
7. Lisiecka U, Kostro K, Jarosz Ł. Cytometria przepływowa jako nowoczesna metoda w diagnostyce i prognozowaniu chorób. *Medycyna Wet*. 2006; 62.
8. Maecker H, Trotter J. Wybór odczynników do wielokolorowej cytometrii przepływowej. *Post Bioch* 2009; 55: 461-467.
9. Maecker HT, Frey T, Nomura LE i wsp. Selecting Fluorochrome Conjugates for Maximum Sensitivity. *Cytometry Part A*. 2004; 62A :169-173.
10. Maecker HT, Trotter J. Flow cytometry controls, instrument setup, and the determination of positivity. *Cytometry A*. 2006; 69: 1037-42.
11. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin Lab Med*. 2007; 27: 469-485.
12. Morrison LE. Basic principles of fluorescence and energy transfer. *Methods Mol Biol* 2008; 429: 3-19.
13. Owens MA, Vall HG, Hurley AA i wsp. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2000; 21; 243: 33-50.
14. Robinson JP. Flow Cytometry. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Bowlin GL, Wnek G. Indiana. Marcel Dekker, 2004; 630-639.
15. Sędek Ł, Mazur B. Przeciwciała monoklonalne i poliklonalne i ich zastosowanie w cytometrii przepływowej. *Post Biol Kom* 2008; 35: 17-34.
16. Sędek Ł, Mazur B. Wieloparametryczna cytometria przepływowa jako nowa technika w ręku diagnosty laboratoryjnego – cz. I. Laboratorium. *Przegląd Ogólnopolski* 2007; 3: 45-49.
17. Szabo AG. Fluorescence principles and measurement. Gore MG, ed. Spectrophotometry and spectrofluorimetry, practical approach. New York. Oxford University Press; 2000: 33-67.

Adres do korespondencji:

Bogdan Mazur
 Śląski Uniwersytet Medyczny
 Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii
 ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze
 e-mail: bmazur@sum.edu.pl

(Praca wpłynęła do Redakcji: 2011-01-24)

(Praca przekazana do opublikowania: 2011-02-07)