

ПОДХОДЫ К СТАНДАРТИЗАЦИИ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ. НАСТРОЙКА ЦИТОМЕТРОВ И ПОДГОТОВКА ПРОТОКОЛОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Хайдуков С.В.

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
лаборатория иммунохимии, Москва*

Резюме. Иммунофенотипирование методом проточной цитометрии позволяет охарактеризовать клетки при помощи моноклональных антител или каких-либо других зондов и дает возможность судить об их типе и функциональном состоянии по наличию того или иного набора клеточных маркеров и происходящих в них процессах.

Однако в результате проведения цитометрического анализа может быть допущен ряд ошибок на разных этапах подготовки цитометра к работе, что приводит к некорректному результату. Чтобы избежать этого, предложен алгоритм подготовки протоколов для анализа клеток периферической крови. Этот алгоритм настройки рабочего протокола выглядит следующим образом: проверка работы цитометра; настройка дискриминатора; настройка чувствительности каналов светорассеяния; настройка чувствительности каналов флуоресценции; введение коэффициентов компенсации.

Стандартные настройки проточных цитометров и протоколов позволяют более корректно проводить анализ как в клинико-диагностических, так и научно-исследовательских целях.

Ключевые слова: проточная цитометрия, дискриминатор, компенсация, светорассеяние, многопараметрический анализ.

Khaidukov S.V.

APPROACHES TO STANDARDIZATION OF THE FLOW CYTOMETRY METHOD FOR CELLS IMMUNOPHENOTYPING. CYTOMETRS ADJUSTMENT AND PREPARATION OF PROTOCOLS FOR ANALYSIS

Abstract. Immunophenotyping by using a flow cytometry method allows characterizing cells with the help monoclonal antibodies or any other probes and enables to judge their type and a functional condition on presence of this or that set of cellular markers and processes occurring in them.

However as a result of carrying out cytometry analysis could be a number of mistakes at different stages of preparation cytometer to work and that leads to not correct result. To avoid it, the algorithm of preparation of reports for the analysis of cells of peripheral blood is offered. This algorithm of adjustment of the working report looks as follows: check of cytometers work; adjustment of the discriminator; adjustment of sensitivity of channels of light scatters; sensitivity adjustment of channels of fluorescence; introduction of factors of indemnification.

Адрес для переписки:

Хайдуков Сергей Валерьевич
Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: (495) 336-02-55.
E.mail: khsv@mail.ibch.ru

Standard adjustments flow cytometers and reports will allow carrying out more correctly the analysis as in clinical diagnostic, and the research purposes. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 6, pp 569-574)

Введение

Проточная цитометрия — это современная технология быстрого измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов. Две существенные особенности проточной цитометрии делают этот метод особенно ценным для клиники. Во-первых, этот метод позволяет охарактеризовать гетерогенные клеточные популяции по фенотипу входящих в них клеток [3]. Такие исследования позволяют выявлять отклонения, происходящие в процессе онкогенеза и, таким образом, большинство современных применений проточной цитометрии связаны именно с такого рода исследованиями. Во-вторых, они позволяют обнаружить и охарактеризовать редкие события, т.е. события, встречающиеся с частотой 10^{-5} – 10^{-7} . Это возможно благодаря огромной производительности проточной цитометрии, поскольку современные цитометры могут регистрировать несколько параметров для каждой отдельной клетки со скоростью до 10 000 клеток в секунду [2].

В свою очередь, иммунофенотипирование позволяет охарактеризовать клетки при помощи моноклональных антител или каких-либо других зондов и дает возможность судить об их типе и функциональном состоянии по наличию того или иного набора клеточных маркеров и происходящих в них процессах [4]. Однако следует учитывать, что многие маркеры могут экспрессироваться на различных типах клеток, и определять их наличие следует в режиме не менее чем двухцветного анализа [8], а типирование лейкозов желательно проводить в четырех- и более цветном анализе [9, 10].

В настоящее время все больше и больше клиничко-диагностических лабораторий используют метод проточной цитометрии для определения иммунного статуса пациентов [5, 6], диагностики лейкозов [9] и лимфопролиферативных заболеваний [1] и многих других важных параметров иммунной системы. Однако отсутствие стандартных подходов к настройке цитометров, созданию протоколов исследования и подготовке образцов для анализа по-прежнему делает метод проточной цитометрии достаточно субъективным и зависимым от опыта оператора.

В процессе проведения цитометрического анализа могут быть допущены ошибки на разных этапах. Во-первых, необходимо убедиться, что ваш цитометр находится в рабочем состоянии и проходит все тесты проверки его работоспособности, рекомендуемые фирмой производителем. Во-вторых, цитометр может быть неправильно настроен для протокола конкретного анализа. Данная процедура не зависит от типа прибора, поскольку процедуры подготовки инструментов для

соответствующего анализа осуществляются практически по одному и тому же алгоритму. В-третьих, на конечный результат значительное влияние оказывает использование некачественных реагентов или реагентов с истекшим сроком годности. И, наконец, в-четвертых, ошибки, допущенные в ходе подготовки образца для анализа. Попытка стандартизировать данный метод и достаточно частые ошибки, допускаемые врачами-лаборантами, при цитометрическом анализе в клинических лабораториях на всех этих этапах послужили основанием к написанию данной статьи.

Материалы и методы

В данной работе для анализа и настройки цитометров была использована цельная периферическая кровь, полученная от здоровых доноров. Для окрашивания клеток использовали следующую панель моноклональных антител меченных FITC и PE (фикоэритрин): CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD25, CD38, CD45, CD56 и HLA-DR (все Beckman Coulter, США). Для удаления эритроцитов пробоподготовку проводили по безотмывочной технологии с использованием следующих лизирующих растворов: OptiLyse C, OptiLyse B, ImmunoPrep и Whole Blood Lysing Reagents (все Beckman Coulter, США).

Для анализа окрашенных клеток и настройки были использованы следующие проточные цитометры: EPICS XL, EPICS XL-MCL, EPICS «Elite», EPICS «Altra», Cytomics FC500, Cytomics FC500 MPL (все Beckman Coulter, США), FACSCalibur (Becton Dickinson, США) и PAS-III (Partec GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее важных этапов при проведении стандартной процедуры многопараметрического анализа фенотипа клеток периферической крови, прежде всего, является правильность настройки протоколов цитометра для конкретных типов анализа. Например, протоколы для фенотипирования иммунного статуса [5, 6], острых лейкозов [9], лимфопролиферативных заболеваний [1], для измерения внутриклеточных цитокинов [7] и т.д.

Данный этап состоит в следующем: настройка дискриминатора, настройка параметров светорассеяния, настройка параметров чувствительности фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) для флуоресценции, введение коэффициентов компенсации. Без этого практически невозможно получить корректные результаты.

Настройка дискриминатора. Современные цитометры обладают высокой чувствительностью по малоугловому светорассеянию, т.е. по размерам исследуемых частиц (чувствительность достигает

0,2 мкм), поэтому они регистрируют множество объектов, которые не являются клетками. Особенно это проявляется на образцах, приготовленных по так называемой безотмывочной технологии. Наличие в образце «теней» от эритроцитов, тромбоцитов и множества других объектов приводит к тому, что цитометр «захлебывается» от обилия данных, и это приводит к получению недостоверных результатов. Не говоря уж о том, что сохраняемые на жестком диске данные имеют огромный размер. Чтобы избежать этого эффекта, необходимо ввести ограничения по отображаемым на гистограмме событиям, т.е. задать границы чувствительности цитометра. Для этих целей служит дискриминатор. Оператор должен ввести такие значения, чтобы были видны все основные популяции клеток анализируемого образца, а дебрис не попадал в зону анализа. Как правило, это ограничение ставится на канал малоуглового рассеяния света (рис. 1). Следует отметить, что слишком завышенные значения дискриминатора могут убрать из анализа часть интересующей исследователя популяции клеток, поэтому к этому этапу настройки цитометра необходимо подходить со всей ответственностью.

Настройка параметров светорассеяния. Как правило, современные цитометры используют два канала светорассеяния: регистрируются сигналы от малоуглового светорассеяния и рассеяния света под углом 90°. Малоугловое светорассеяние (forward scatter, FS) представляет собой рассеяние света от поверхности клеток под малыми углами (1-19°) и пропорционально диаметру исследуемого объекта. В свою очередь, канал бокового светорассеяния или рассеяния света под углом 90° (side scatter, SS) регистрирует весь свет, рассеянный как самой клеткой, так и ее органеллами, т.е. характеризует структуру и гранулярность объекта. Таким образом, два вида светорассеяния позволяют регистрировать два морфологических параметра клеток.

Использование двух этих параметров позволяет локализовать в гетерогенной популяции клеток все входящие в нее компоненты. Примером

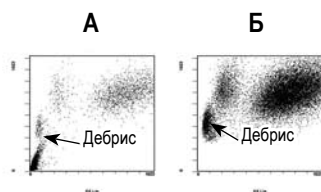


Рисунок 1. Использование дискриминатора для удаления из зоны анализа частиц не соответствующих клеткам по параметрам светорассеяния

А – анализ образца в отсутствии дискриминатора; Б – анализ образца при включенном дискриминаторе.

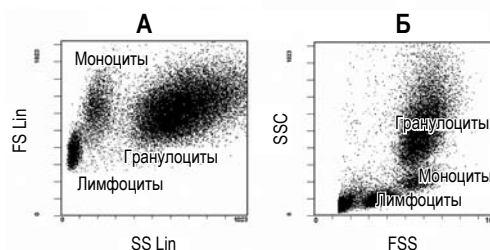


Рисунок 2. Распределение клеток периферической крови при нормальной настройке каналов светорассеяния.

FS Lin (FSS) – малоугловое светорассеяние; SS Lin (SSC) – светорассеяние под углом 90°.

Гистограммы получены на приборах фирмы Beckman Coulter (А) и фирмы Becton Dickinson (Б).

могут служить лейкоциты периферической крови, состоящие из лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов (рис. 2). При ее анализе необходимо соблюдать следующие правила. Как показано на рисунке 2 все основные популяции клеток периферической крови должны быть отображены на гистограмме распределения клеток по двум светорассеяниям, что в последующем значительно облегчит работу.

Традиционно сложилось, что основные фирмы производители проточных цитометров (Beckman Coulter и Becton Dickinson) в процессе обучения специалистов по-разному отображают распределение клеток периферической крови (рис. 2А и 2Б). Это несколько затрудняет взаимопонимание операторов, работающих на разных приборах, но основной смысл отображения остается единым.

На рисунке 3 приведены случаи неправильной установки чувствительности по двум каналам светорассеяния (малоуглового – А, В и под углом 90° – Б, Г). Подобная настройка каналов светорассеяния, как правило, вызывает затруднения при выделении зоны анализа лимфоцитов и, как следствие этого, бывает трудно отделить дебрис от лимфоцитов, что также приводит к последующим недостоверным результатам. Хотя в последнее время все чаще используется метод локализации лимфоцитов по наличию CD45 (панлейкоцитарный маркер, экспрессируется всеми лейкоцитами, но с различной плотностью) [5, 8], использование морфологических параметров по-прежнему актуально.

Настройка параметров фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) для флуоресценции. После настройки каналов светорассеяния можно приступить к настройке чувствительности каналов флуоресценции. Как правило, этот процесс начинают с анализа негативного контроля, который представляет собой клетки образца, окрашенные неспецифическими антителами мечеными теми же флуорохромами, с которыми предстоит ра-

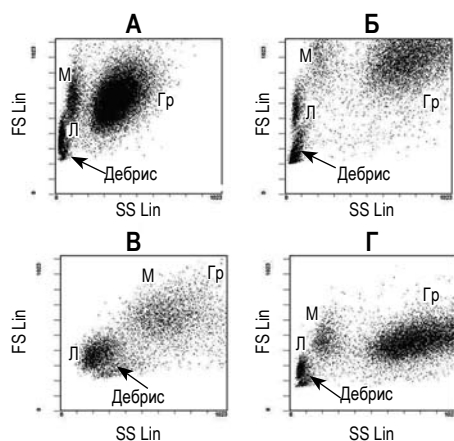


Рисунок 3. Наиболее часто встречающиеся ошибки при настройке каналов светорассеяния

А – слишком низкое напряжение по каналу SS Lin; Б – слишком высокое напряжение по каналу FS Lin; В – слишком высокое напряжение по каналу SS Lin; Г – слишком низкое напряжение по каналу FS Lin. Л – лимфоциты, М – моноциты, Гр – гранулоциты. ботать в дальнейшем (изотипический контроль). В настоящее время принято, что негативные клетки должны попадать в первую декаду на логарифмической шкале интенсивности флуоресценции по всем задействованным каналам (рис. 4А). Следовательно, необходимо добиться того, чтобы клетки контроля легли, по возможности, в центре первой декады. Следует сразу отметить, что неспецифическое взаимодействие антител различных классов с поверхностью клеток мишеней не одинаково. Исходя из этого, антитела для контрольного образца должны быть того же изотипа, что и специфические антитела, используемые для анализа.

На рисунках 4Б и 4В приведены гистограммы, полученные на цитометрах, настроенных не-

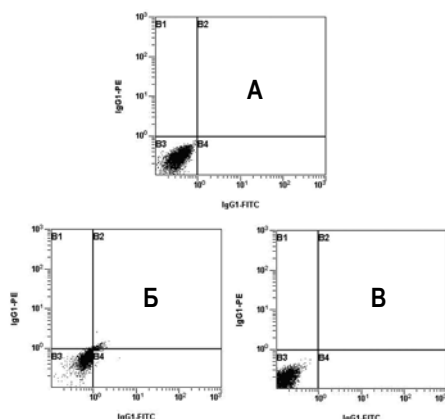


Рисунок 4. Настройка каналов флуоресценции

Негативные клетки должны находиться в середине первой декады логарифмической шкалы интенсивности флуоресценции (А). Б и В – примеры неправильной настройки цитометра. Б – слишком высокое напряжение на ФЭУ. В – слишком низкое напряжение на ФЭУ.

корректно. Если контрольные клетки попадают во вторую декаду, это, в конечном счете, может привести к ложно-положительным результатам (рис. 4Б), а низкая чувствительность приводит к занижению реальных значений (рис. 4В). И то и другое при клинико-диагностических исследованиях недопустимо.

Введение коэффициентов компенсации. После настройки чувствительности прибора в случае многоцветного анализа специалист может столкнуться с неприятным сюрпризом. Даже в случаях использования для анализа панклеточных маркеров, таких как CD19 и CD3, можно увидеть дубль позитивные клетки, хотя они в природе не встречаются. Данный парадокс связан с тем, что спектры, испускаемые флуорохромами, не бывают точечными, а имеют свое распределение в определенном диапазоне. Практически невозможно избежать дополнительной «засветки» всех ФЭУ, не предназначенных для регистрации данного флуорохрома, даже если использовать различные наборы барьерных светофильтров.

Таким образом, специалист сталкивается с необходимостью провести вычитание из интенсивности флуоресценции каждого ФЭУ дополнительного сигнала генерируемого другими флуорохромами. Данное вычитание называется введением в программу анализа коэффициентов компенсации. Пожалуй, это самый сложный и трудоемкий этап работы в процессе подготовки протоколов исследования и настройки цитометра.

Самым простым решением этого вопроса является использование специальных реагентов и протоколов для автоматической настройки цитометров, которые предлагаются фирмами-производителями этих инструментов. Эти реагенты достаточно дороги, и постоянное их использование связано с финансовыми затратами, которые значительно удорожают стоимость исследования.

Однако существуют правила введения коэффициентов компенсации, следование которым позволяет провести данную процедуру каждому оператору, работающему с цитометром.

В процессе анализа оператор получает ряд статистических параметров, среди которых есть такое значение как MEAN (рис. 5). Этот параметр отражает среднестатистическое положение максимума пика распределения частиц на гистограммах в выбранном канале флуоресценции или светорассеяния. Для процедуры введения коэффициентов компенсации необходимо использовать клетки, окрашенные антителами, связанными с разными флуорохромами, (например, CD3-FITC и CD19-PE) и проанализировать их в двухпараметрическом режиме. Антитела для этой процедуры подбирают таким образом, чтобы они

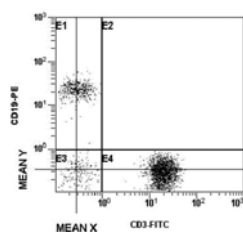


Рисунок 5. Первое правило введения коэффициентов компенсации: коэффициенты компенсации введены правильно, если MEAN квадранта 1 равен MEAN квадранта 3 по оси X, а MEAN квадранта 4 равен MEAN квадранта 3 по оси Y

относились к двум непересекающимся кластерам дифференцировки. Затем необходимо разбить гистограмму на четыре квадранта, где мы можем определить значение MEAN для каждого типа флуоресценции. Первое правило введения коэффициентов компенсации гласит: коэффициенты компенсации введены правильно, если MEAN квадранта 1 равен MEAN квадранта 3 по оси X, а MEAN квадранта 4 равен MEAN квадранта 3 по оси Y (рис. 5).

Существует и второе правило. Оно гласит: если мысленно нарисовать линии из центров областей позитивных клеток, то они должны быть приблизительно параллельны осям X и Y, или должен образоваться прямоугольник (рис. 6) [6].

Однако всегда существует вероятность переили недокомпенсации. На рисунке 7 представлены оба этих случая. При недокомпенсации врач-лаборант может получить завышенный результат и ложно позитивные клетки (рис. 7А). При перекомпенсации можно пропустить часть позитивных клеток и, как следствие этого, заниженный результат (рис. 7Б).

В заключении хотелось бы обратить внимание на следующий факт, что между напряжением на ФЭУ и коэффициентами компенсации существует взаимосвязь. В некоторых случаях, когда специалисты переходят на реагенты других фирм-производителей, но продолжают использовать

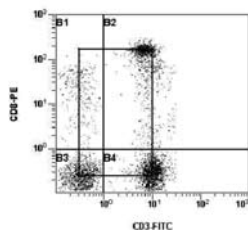


Рисунок 6. Второе правило: если мысленно нарисовать линии из центров областей позитивных клеток, то они должны быть приблизительно параллельны осям X и Y или должен образоваться прямоугольник

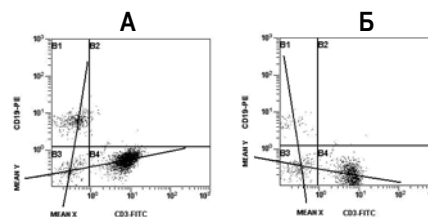


Рисунок 7. При недокомпенсации (А): MEAN квадранта 4 больше, чем MEAN квадранта 3 по оси Y, а MEAN квадранта 1 больше, чем MEAN квадранта 3 по оси X. При перекомпенсации (Б): MEAN квадранта 3 больше, чем MEAN квадранта 4 по оси Y, а MEAN квадранта 3 больше, чем MEAN квадранта 1 по оси X

старый протокол для анализа, возникает необходимость изменить чувствительность по одному из каналов флуоресценции. Эта процедура приводит к тому, что изменяется и отображение флуоресценции на двухпараметрических гистограммах. Повышая чувствительность по одному из каналов, необходимо изменить и соответствующий этому каналу коэффициент компенсации. Например, в двухпараметрическом анализе FITC против PE, задействованы два канала флуоресценции (FL1 и FL2). Для повышения чувствительности по каналу флуоресценции FL2 поднимают напряжение на ФЭУ. При этом наблюдается дополнительный вклад интенсивности флуоресценции FITC в канал FL2, который необходимо вычесть за счет увеличения коэффициента компенсации (рис. 8).

Исходя из всего изложенного выше, алгоритм настройки рабочего протокола выглядит следующим образом: проверка работы цитометра; настройка дискриминатора; настройка каналов светорассеяния; настройка каналов флуоресценции; введение коэффициентов компенсации.

Таким образом, стандартные настройки и создание протоколов для проточных цитометров

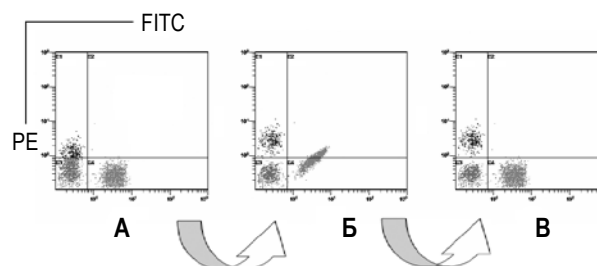


Рисунок 8. Оптимизация двухпараметрического анализа FITC (FL1) против PE (FL2) при изменении чувствительности одного из каналов флуоресценции

А – низкая чувствительность по FL2;
Б – повышение чувствительности по каналу флуоресценции FL2 за счет увеличения напряжения на ФЭУ;
В – вычитание дополнительного вклада интенсивности флуоресценции FITC за счет увеличения коэффициента компенсации.

позволят более корректно проводить анализ как в клинко-диагностических, так и научно-исследовательских целях.

Список литературы

1. Лутовская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов // М.-Тверь: ООО «Издательство Триада», 2005. — 168 с.
2. Полетаев А.И. Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине / ИНТ серия «Общие проблемы физико-химической биологии». — М., 1989. — Т. 12. — 88 с.
3. Claude L., Lobagiu C., Genin C. Enumeration of peripheral lymphocyte subsets using 6 vs. 4 color staining: a clinical evaluation of new flowcytometer // Cytometry B Clin. Cytom. — 2005. — 70B. — P. 29-38.
4. Gallego A., Vargas J.A., Castejon R., Citores M.J., Romero Y., Millan I., Durantez A. Production of intracellular IL-2, TNF-alpha, and IFN-gamma by T cells in B-CLL // Cytometry B Clin. Cytom. — 2003. — Vol. 56, N 1. — P. 23-29.
5. Leucocyte typing VI / Ed. Kishimoto K. et al. — Garland Publishing, Inc. New York & London. 1997. — P. 1342.
6. Luidier J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow Cytometry clinical laboratory servise // Lab. Hematol. — 2004. — Vol. 10. — P. 102-108.
7. Mandy F.F., Bergeron M., Minkus T. Evolution of leukocyte immunophenotyping as influenced by the HIV/AIDS pandemic: a short history of the development of gating strategies for CD4⁺T-cell enumeration. // Cytometry. — 1997. — Vol. 30, N 4. — P. 157-165.
8. Mandy F.F., Nicholson J.K., McDougal J.S. Guidelines for performing single-platform absolute CD4⁺T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus // Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. — 2003. — 52 (RR-2). — P. 1-13.
9. Nagata H., Konno A., Kimura N., Zhang Y., Kimura M., Demachi A., Sekine T., Yamamoto K., Shimizu N. Characterization of novel natural killer (NK)-cell and gammadelta T-cell lines established from primary lesions of nasal T/NK-cell lymphomas associated with the Epstein-Barr virus. // Blood. — 2001. — Vol. 97, N 3. — P. 708-713.
10. Shapiro H.M. Practical flow cytometry. — WILEY-LISS, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto & Singapore, 1995. — P. 542.

поступила в редакцию 30.05.2007

принята к печати 28.06.2007