

# PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

## Princip a využití

Lucie Kovářová  
OKH, FN Brno



Babak Research Institute  
Masaryk University



# Průtokový cytometr

- ✓ **flow cytometrie (flow+cyto+metrie)**
- ✓ **specializovanější varianta fluorescenčního mikroskopu v kombinaci s krevním analyzátozem**
- ✓ **měření fyzikálních, chemických a biologických vlastností až  $10^6$  buněk v suspenzi**

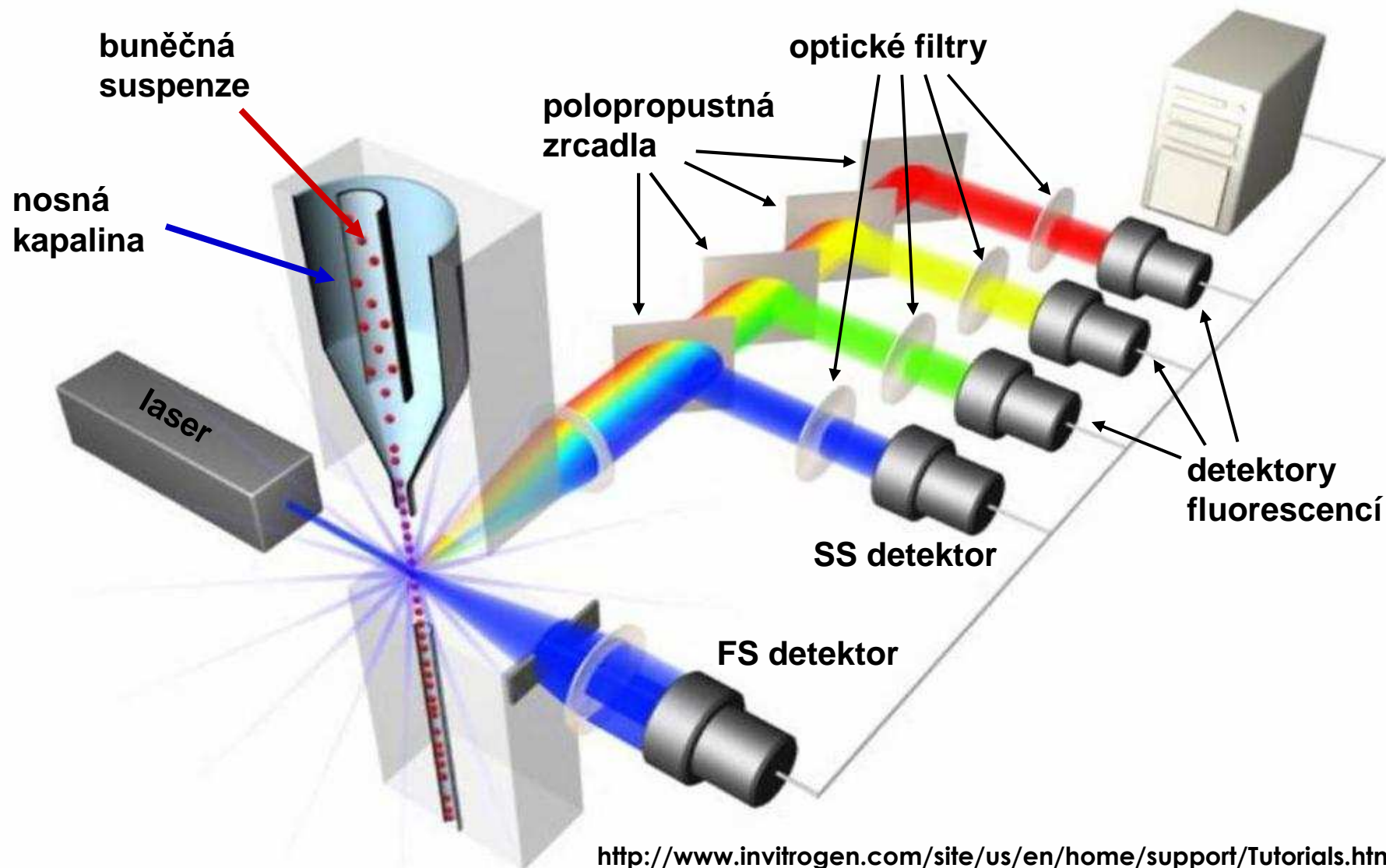


**FACSCantoll (Becton-Dickinson)**

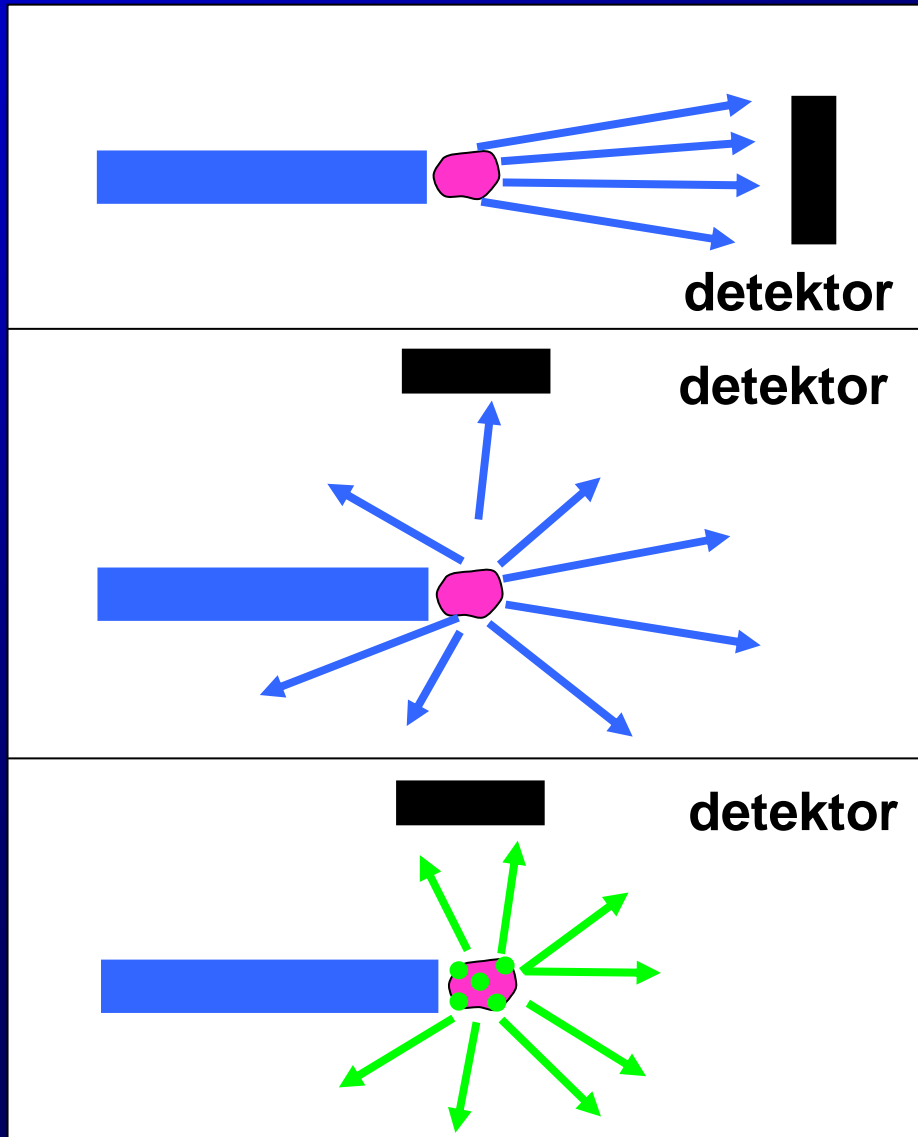


**Cytomics FC500 (Beckman Coulter)**

# Složení průtokového cytometru



# Světlo vs. buňka



## Forward Scatter

- rozptyl světla v malém úhlu
- velikost buňky

## Side Scatter

- rozptyl světla pod úhlem  $90^\circ$
- komplexita buňky

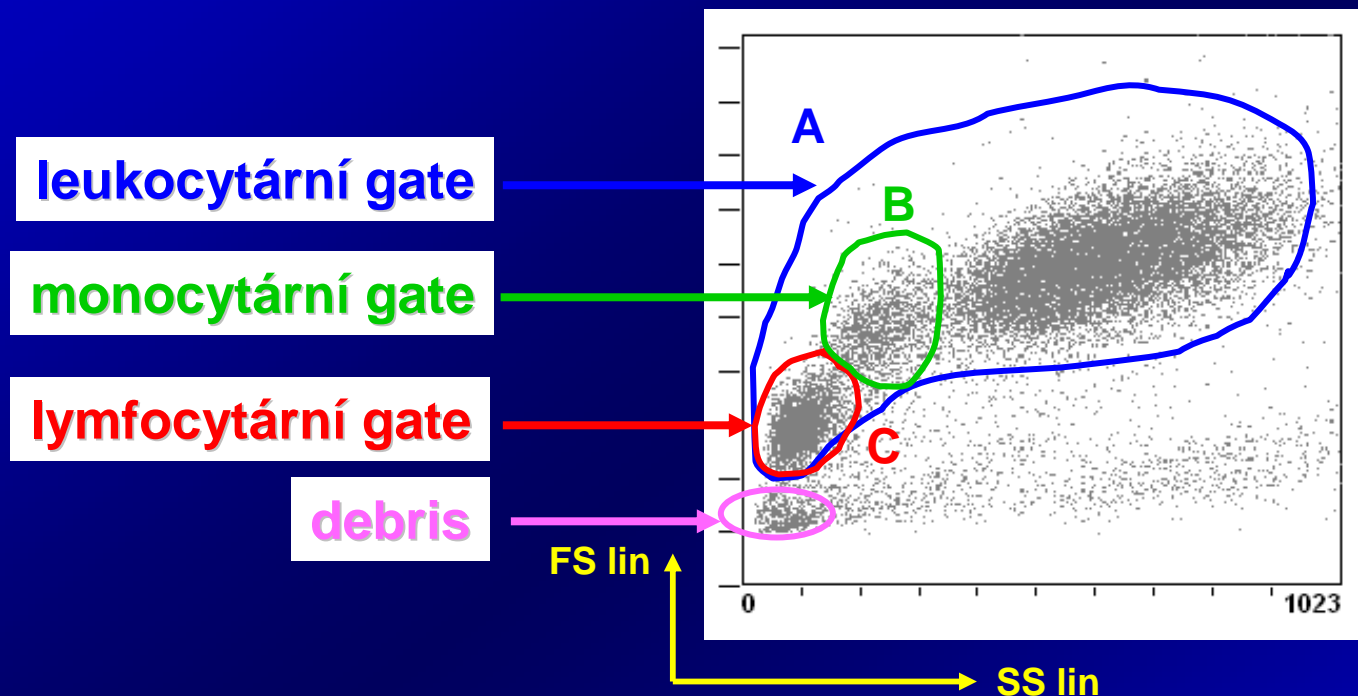
## Fluorescence

- přítomnost fluorochromu

# Fluorochromy

- **excitace UV/violet diode (fialový laser) - 405 nm**
  - DAPI, Hoechst/Pacific Blue (452), AmCyan (491), BD Horizon 450 a 500
- **excitace Ar-iontovým laserem (modrý) - 488 nm**
  - FITC** - fluorescein isothiokyanát (530 nm)
  - Alexa Fluor 488** (519 nm)
  - PE, RD1** - phycoerythrin (580 nm)
  - ECD** - tandem. konjugát PE-texaská červeň (620 nm)
  - PerCP** - perridin chlorophyl (678 nm)
  - PerCPCy5.5** - tandem. konjugát PerCP-Cy5.5 (696 nm)
  - PC5** - tandem PE-cyanine 5 (620 nm)
  - PC7** - tandem PE-cyanine 7 (778 nm)
  - PI** - propidium jodid, široký peak okolo 620 nm
- **excitace He-Ne laserem/red diode (červený) - 633 nm**
  - APC** - allophycocyanin (670 nm)
  - APC-Cy7** - tandem APC-cyanine 7 (778 nm)

# Analýza a zobrazení



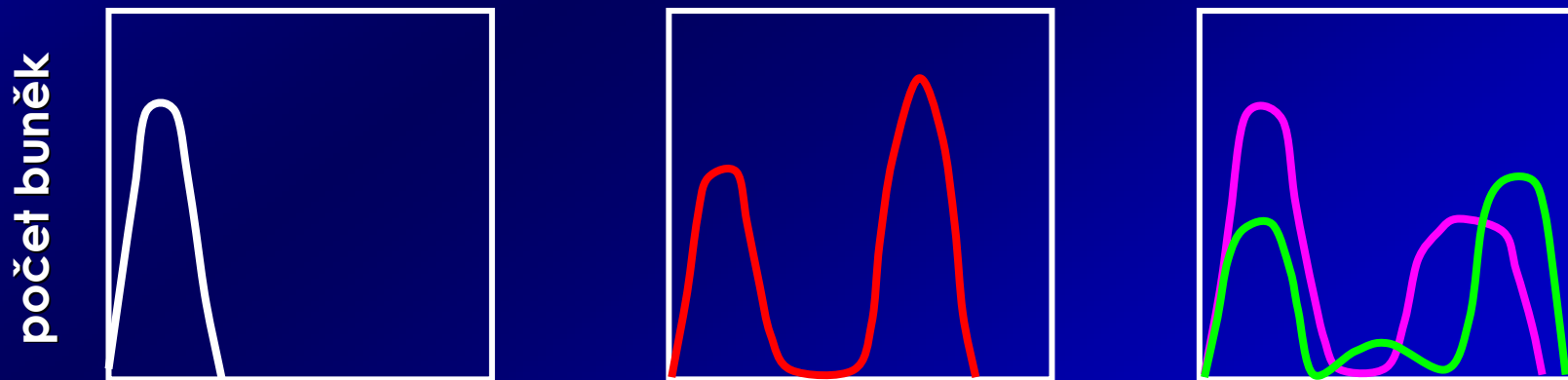
**FS - forward scatter - velikost buněk**

**SS - side scatter – granularita/komplexita**

# 1-parametrová analýza

## ➤ Histogram

- ✓ osa x - intenzita fluorescence, osa y – počet buněk
  - ✓ hodnocení - odečet % pozitivních buněk
    - neg. peak = autofluorescence, izotypová kontrola
    - poz. peak - různá intenzita exprese
- ⇒ low (+/-) < dim (+) < high, bright (++) < very high (+++)
- porovnávání intenzity exprese

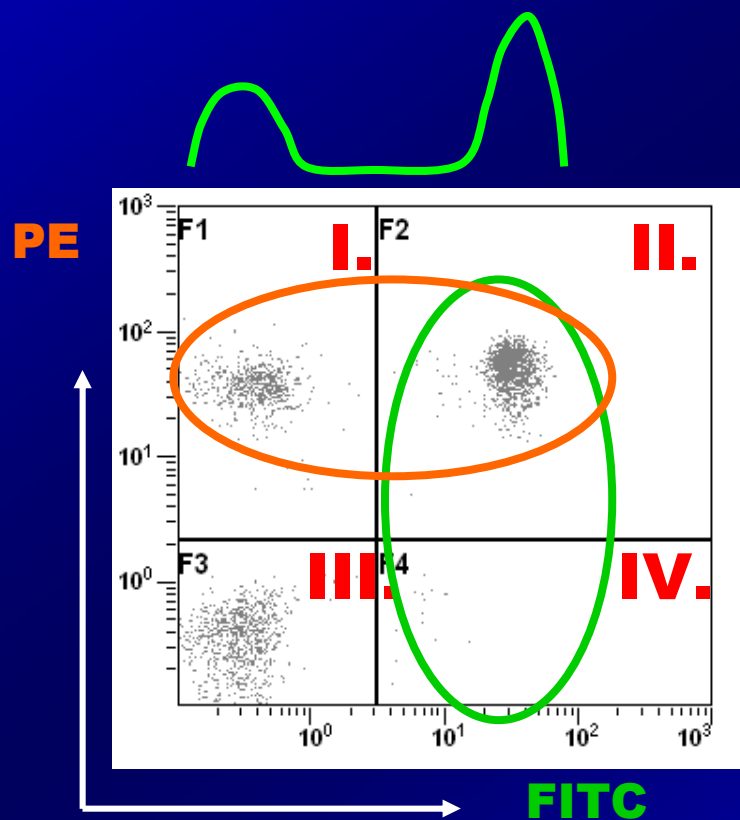


Intenzita fluorescence (lineární nb logaritmická stupnice)

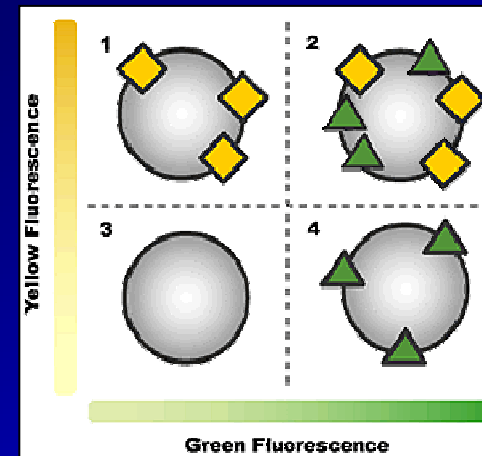
# 2-parametrová analýza

## ➤ Dot plot

- ✓ dva parametry proti sobě - FLx vs. FLy, FLx vs. FS či SS
- ✓ procentuální hodnocení – nejčastěji kvadrantová analýza

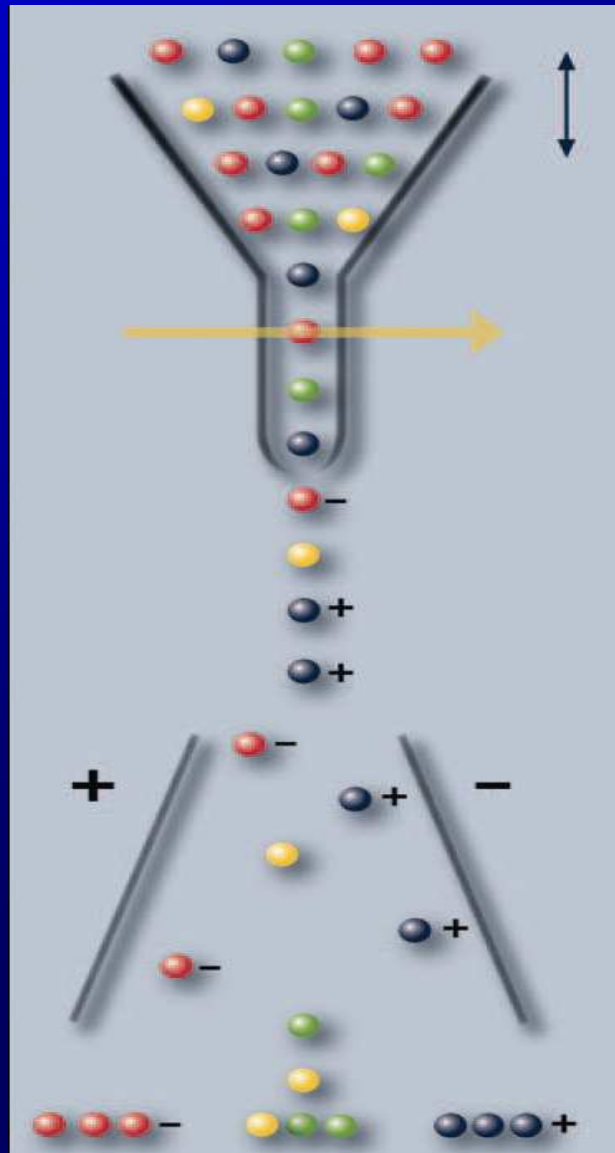


- I. kvadrant – FITC<sup>-</sup>PE<sup>+</sup>
- II. kvadrant – FITC<sup>+</sup>PE<sup>+</sup>
- III. kvadrant – FITC<sup>-</sup>PE<sup>-</sup>
- IV. kvadrant – FITC<sup>+</sup>PE<sup>-</sup>



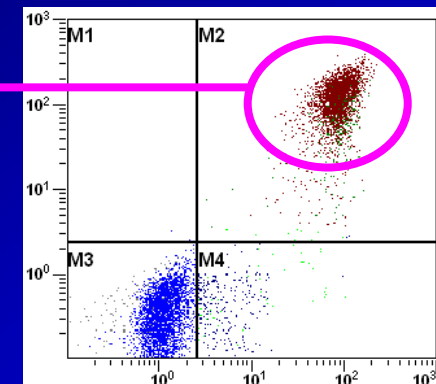


# Sortování subpopulací



Bezprostředně po analýze dochází piezoelektricky k „trhání“ proudu vzorku na kapky - obsahující jednu buňku - přičemž požadovaným buňkám = kapkám je udílen el. náboj. Tyto jsou pak v el. poli vychylovány a odseparovány.

udělení náboje a separace gateovaných bb



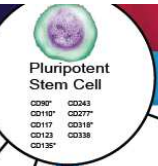
# Imunofenotypizace - CD znaky

Stanovení povrchových a intracelulárních markerů exprimovaných jednotlivými hodnocenými buňkami

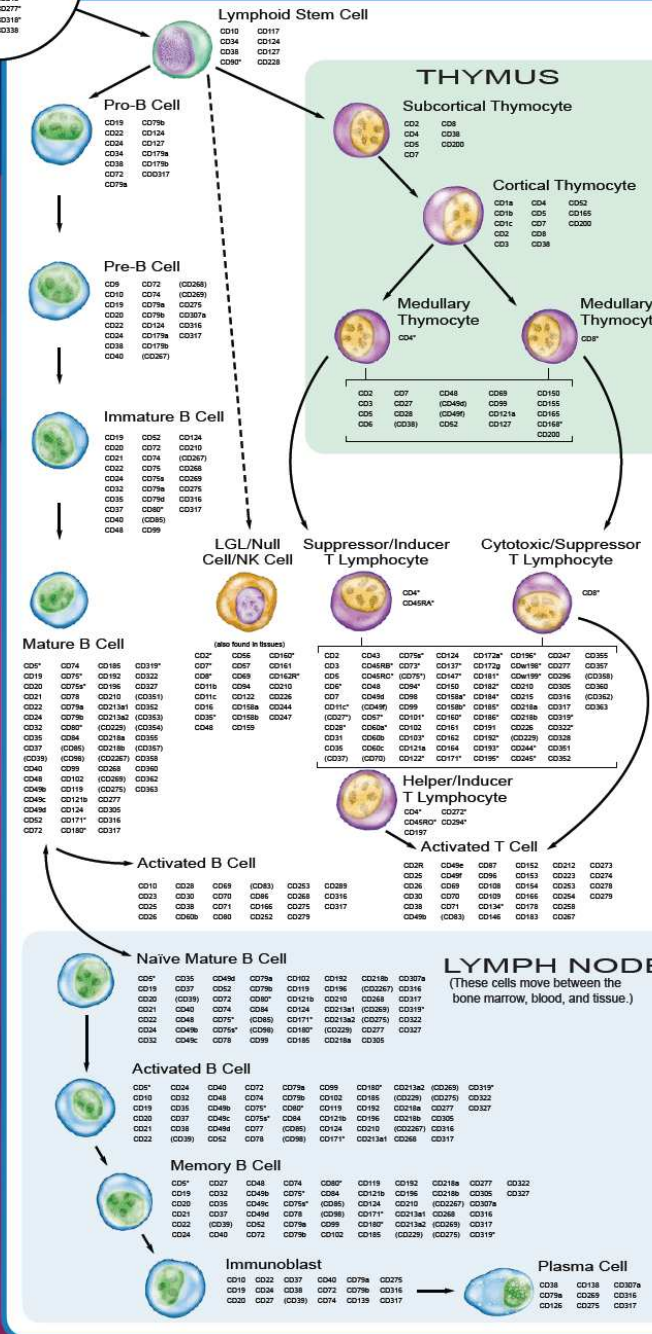
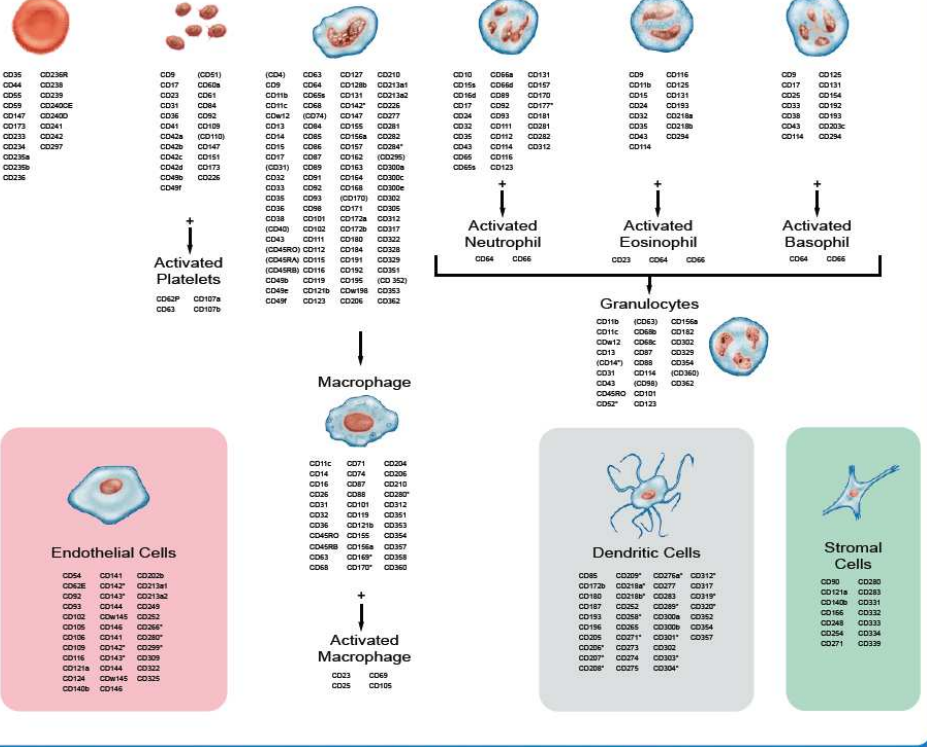
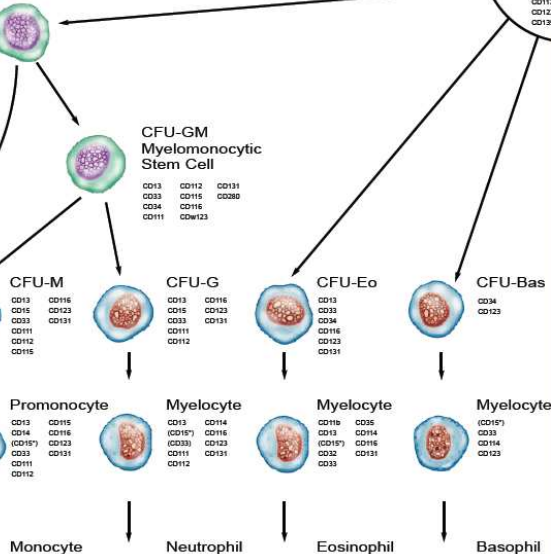
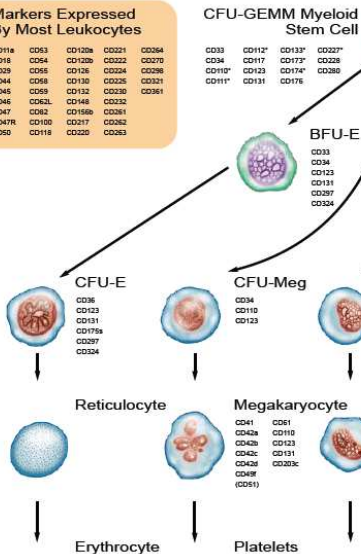
- ✓ vznik CD klasifikace v r. 1982, využívá k identifikaci buněk tzv. CD markerů - Cluster of Differentiation, def. cca 300 znaků (antigenů Ag) a není uzavřeno
- ✓ historicky označeny nejprve leukocytární markery, později zahrnutí dalších znaků (megakaryocyty, trombocyty, erytrocyty...)
- ✓ různá fce - buněčné enzymy, receptory mikrobiálních Ag, transportní proteiny, prezentace Ag, Fc receptory, komplementové receptory, regulační signalizační receptory a jejich ligandy, adhezivní proteiny...

# MYELOID

# LYMPHOID



- Markers Expressed By Most Leukocytes**
- CD19
  - CD18
  - CD29
  - CD44
  - CD45
  - CD46
  - CD47
  - CD74
  - CD95
  - CD126
  - CD128
  - CD132
  - CD134
  - CD135
  - CD151
  - CD152
  - CD153
  - CD154
  - CD165
  - CD170
  - CD181
  - CD182
  - CD183
  - CD184
  - CD185
  - CD186
  - CD187
  - CD188
  - CD189
  - CD190
  - CD191
  - CD192
  - CD193
  - CD194
  - CD195
  - CD196
  - CD197
  - CD198
  - CD199
  - CD200
  - CD201
  - CD202
  - CD203
  - CD204
  - CD205
  - CD206
  - CD207
  - CD208
  - CD209
  - CD210
  - CD211
  - CD212
  - CD213
  - CD214
  - CD215
  - CD216
  - CD217
  - CD218
  - CD219
  - CD220
  - CD221
  - CD222
  - CD223
  - CD224
  - CD225
  - CD226
  - CD227
  - CD228
  - CD229
  - CD230
  - CD231
  - CD232
  - CD233
  - CD234
  - CD235
  - CD236
  - CD237
  - CD238
  - CD239
  - CD240
  - CD241
  - CD242
  - CD243
  - CD244
  - CD245
  - CD246
  - CD247
  - CD248
  - CD249
  - CD250
  - CD251
  - CD252
  - CD253
  - CD254
  - CD255
  - CD256
  - CD257
  - CD258
  - CD259
  - CD260
  - CD261
  - CD262
  - CD263
  - CD264
  - CD265
  - CD266
  - CD267
  - CD268
  - CD269
  - CD270
  - CD271
  - CD272
  - CD273
  - CD274
  - CD275
  - CD276
  - CD277
  - CD278
  - CD279
  - CD280
  - CD281
  - CD282
  - CD283
  - CD284
  - CD285
  - CD286
  - CD287
  - CD288
  - CD289
  - CD290
  - CD291
  - CD292
  - CD293
  - CD294
  - CD295
  - CD296
  - CD297
  - CD298
  - CD299
  - CD300
  - CD301
  - CD302
  - CD303
  - CD304
  - CD305
  - CD306
  - CD307
  - CD308
  - CD309
  - CD310
  - CD311
  - CD312
  - CD313
  - CD314
  - CD315
  - CD316
  - CD317
  - CD318
  - CD319
  - CD320
  - CD321
  - CD322
  - CD323
  - CD324
  - CD325
  - CD326
  - CD327
  - CD328
  - CD329
  - CD330
  - CD331
  - CD332
  - CD333
  - CD334
  - CD335
  - CD336
  - CD337
  - CD338
  - CD339
  - CD340
  - CD341
  - CD342
  - CD343
  - CD344
  - CD345
  - CD346
  - CD347
  - CD348
  - CD349
  - CD350
  - CD351
  - CD352
  - CD353
  - CD354
  - CD355
  - CD356
  - CD357
  - CD358
  - CD359
  - CD360
  - CD361
  - CD362
  - CD363
  - CD364
  - CD365
  - CD366
  - CD367
  - CD368
  - CD369
  - CD370
  - CD371
  - CD372
  - CD373
  - CD374
  - CD375
  - CD376
  - CD377
  - CD378
  - CD379
  - CD380
  - CD381
  - CD382
  - CD383
  - CD384
  - CD385
  - CD386
  - CD387
  - CD388
  - CD389
  - CD390
  - CD391
  - CD392
  - CD393
  - CD394
  - CD395
  - CD396
  - CD397
  - CD398
  - CD399
  - CD400
  - CD401
  - CD402
  - CD403
  - CD404
  - CD405
  - CD406
  - CD407
  - CD408
  - CD409
  - CD410
  - CD411
  - CD412
  - CD413
  - CD414
  - CD415
  - CD416
  - CD417
  - CD418
  - CD419
  - CD420
  - CD421
  - CD422
  - CD423
  - CD424
  - CD425
  - CD426
  - CD427
  - CD428
  - CD429
  - CD430
  - CD431
  - CD432
  - CD433
  - CD434
  - CD435
  - CD436
  - CD437
  - CD438
  - CD439
  - CD440
  - CD441
  - CD442
  - CD443
  - CD444
  - CD445
  - CD446
  - CD447
  - CD448
  - CD449
  - CD450
  - CD451
  - CD452
  - CD453
  - CD454
  - CD455
  - CD456
  - CD457
  - CD458
  - CD459
  - CD460
  - CD461
  - CD462
  - CD463
  - CD464
  - CD465
  - CD466
  - CD467
  - CD468
  - CD469
  - CD470
  - CD471
  - CD472
  - CD473
  - CD474
  - CD475
  - CD476
  - CD477
  - CD478
  - CD479
  - CD480
  - CD481
  - CD482
  - CD483
  - CD484
  - CD485
  - CD486
  - CD487
  - CD488
  - CD489
  - CD490
  - CD491
  - CD492
  - CD493
  - CD494
  - CD495
  - CD496
  - CD497
  - CD498
  - CD499
  - CD500
  - CD501
  - CD502
  - CD503
  - CD504
  - CD505
  - CD506
  - CD507
  - CD508
  - CD509
  - CD510
  - CD511
  - CD512
  - CD513
  - CD514
  - CD515
  - CD516
  - CD517
  - CD518
  - CD519
  - CD520
  - CD521
  - CD522
  - CD523
  - CD524
  - CD525
  - CD526
  - CD527
  - CD528
  - CD529
  - CD530
  - CD531
  - CD532
  - CD533
  - CD534
  - CD535
  - CD536
  - CD537
  - CD538
  - CD539
  - CD540
  - CD541
  - CD542
  - CD543
  - CD544
  - CD545
  - CD546
  - CD547
  - CD548
  - CD549
  - CD550
  - CD551
  - CD552
  - CD553
  - CD554
  - CD555
  - CD556
  - CD557
  - CD558
  - CD559
  - CD560
  - CD561
  - CD562
  - CD563
  - CD564
  - CD565
  - CD566
  - CD567
  - CD568
  - CD569
  - CD570
  - CD571
  - CD572
  - CD573
  - CD574
  - CD575
  - CD576
  - CD577
  - CD578
  - CD579
  - CD580
  - CD581
  - CD582
  - CD583
  - CD584
  - CD585
  - CD586
  - CD587
  - CD588
  - CD589
  - CD590
  - CD591
  - CD592
  - CD593
  - CD594
  - CD595
  - CD596
  - CD597
  - CD598
  - CD599
  - CD600
  - CD601
  - CD602
  - CD603
  - CD604
  - CD605
  - CD606
  - CD607
  - CD608
  - CD609
  - CD610
  - CD611
  - CD612
  - CD613
  - CD614
  - CD615
  - CD616
  - CD617
  - CD618
  - CD619
  - CD620
  - CD621
  - CD622
  - CD623
  - CD624
  - CD625
  - CD626
  - CD627
  - CD628
  - CD629
  - CD630
  - CD631
  - CD632
  - CD633
  - CD634
  - CD635
  - CD636
  - CD637
  - CD638
  - CD639
  - CD640
  - CD641
  - CD642
  - CD643
  - CD644
  - CD645
  - CD646
  - CD647
  - CD648
  - CD649
  - CD650
  - CD651
  - CD652
  - CD653
  - CD654
  - CD655
  - CD656
  - CD657
  - CD658
  - CD659
  - CD660
  - CD661
  - CD662
  - CD663
  - CD664
  - CD665
  - CD666
  - CD667
  - CD668
  - CD669
  - CD670
  - CD671
  - CD672
  - CD673
  - CD674
  - CD675
  - CD676
  - CD677
  - CD678
  - CD679
  - CD680
  - CD681
  - CD682
  - CD683
  - CD684
  - CD685
  - CD686
  - CD687
  - CD688
  - CD689
  - CD690
  - CD691
  - CD692
  - CD693
  - CD694
  - CD695
  - CD696
  - CD697
  - CD698
  - CD699
  - CD700
  - CD701
  - CD702
  - CD703
  - CD704
  - CD705
  - CD706
  - CD707
  - CD708
  - CD709
  - CD710
  - CD711
  - CD712
  - CD713
  - CD714
  - CD715
  - CD716
  - CD717
  - CD718
  - CD719
  - CD720
  - CD721
  - CD722
  - CD723
  - CD724
  - CD725
  - CD726
  - CD727
  - CD728
  - CD729
  - CD730
  - CD731
  - CD732
  - CD733
  - CD734
  - CD735
  - CD736
  - CD737
  - CD738
  - CD739
  - CD740
  - CD741
  - CD742
  - CD743
  - CD744
  - CD745
  - CD746
  - CD747
  - CD748
  - CD749
  - CD750



# Identifikace subpopulací

- ✓ pomocí MoAb proti znakům přítomným na povrchu nebo v cytoplazmě buňky
- ✓ na základě exprese CD markerů rozlišení subpopulací buněk, jejich stádia vývoje a zralosti, patologie...

T lymfocyty

CD1a - CD3, CD4, CD5 - CD8...

B lymfocyty

CD19, CD20 - CD24, CD79 - CD84...

NK buňky

CD16, CD55, CD56, CD57, CD244...

kmenové buňky

CD34, CD117...

trombocyty

CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61...

erytrocyty

Gly-A (CD235a)...

leukocyty

CD45...

monocyty

CD14...

dendritické bb

CD83, HLA-DR, ILT3...

# Princip IFT

**monoklonální protilátka (MoAb) konjugovaná s fluorochromem (fluorescenční molekulou)**

**suspenze buněk s určitými povrchovými či intracelulárními antigeny (Ag)**

**vizualizace specifické vazby MoAb-Ag**

**možnost kombinace několika MoAb  
⇒ vizualizace mnoha znaků najednou**



# Zpracování a analýza vzorku

## Imunofenotypizace

- ✓ typ vzorku - buněčná suspenze - nesrážlivá periferní krev či kostní dřeň (EDTA, Heparin), BAL, kultivované buňky, desintegrovaná lymfatická uzlina...
- ✓ Inkubace - se specifickou monoklonální protilátkou proti požadovaným znakům (T, B, NK buňky...)
- ✓ lyzace erytrocytů - pokud jsou obsaženy v suspenzi  
⇒ osmoticky, enzymaticky či chemicky
- ✓ fixace - 0,5% paraformaldehydem
- ✓ proplach - vymytí nadbytečné protilátky pomocí PBS
- ✓ analýza - získání listmode a vyhodnocení histogramů

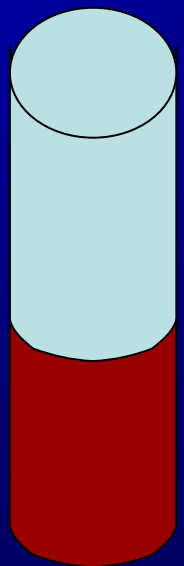
# Vazba MoAb - Ag

plná krev  
kostní dřeň +  
bb suspenze

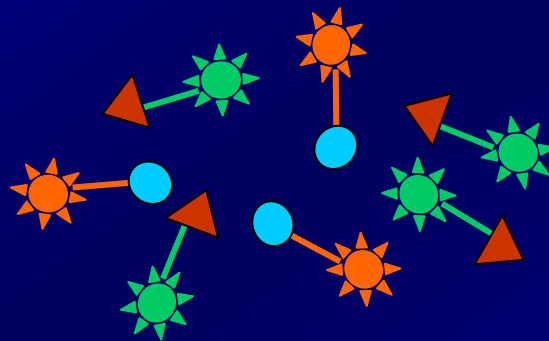
vybrané protilátky  
konjugované  
s fluorescenční  
barvou

=

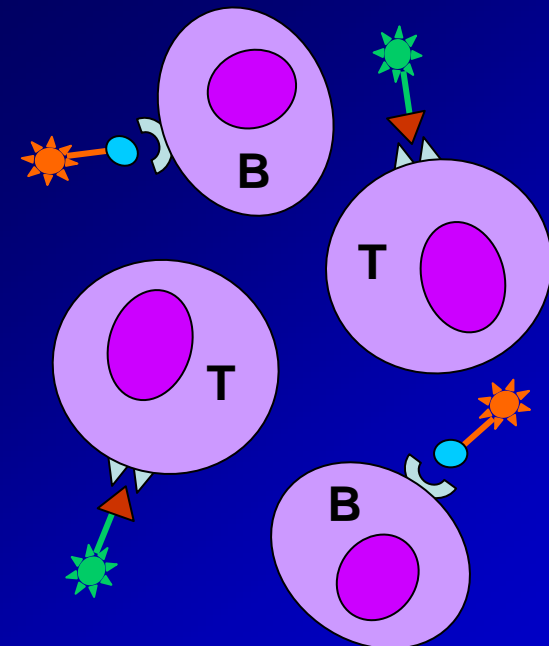
označení buněk  
vazbou protilátek  
na odpovídající Ag



+



=



Anti CD3-FITC

Anti CD19-PE

# Klinické využití FC

- **Rutinní vyšetření a výzkumné analýzy**
  - ✓ **imunologie**
  - ✓ **hemato-onkologie**
  - ✓ **transplantologie**
  - ✓ **transfuziologie**
  - ✓ **hematologie**



# Imunologie

- ✓ **Analýza imunokompetentních buněk (IFT)**
  - subpopulace T, B, NK buněk
  - dif. dg. imunodeficiencí apod.
- ✓ **Analýza autoprotilátek**
  - proti leukocytům, erytrocytům či trombocytům
- ✓ **Analýza funkce neutrofilů**
  - oxidativní vzplanutí
  - fagocytóza

# Základní populace lymfocytů

## T lymfocyty

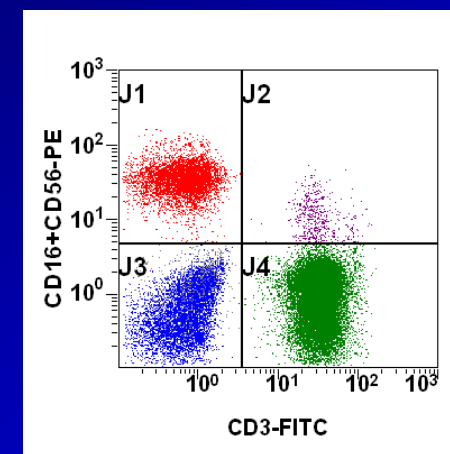
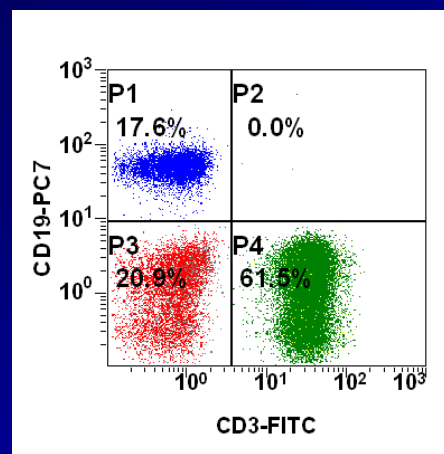
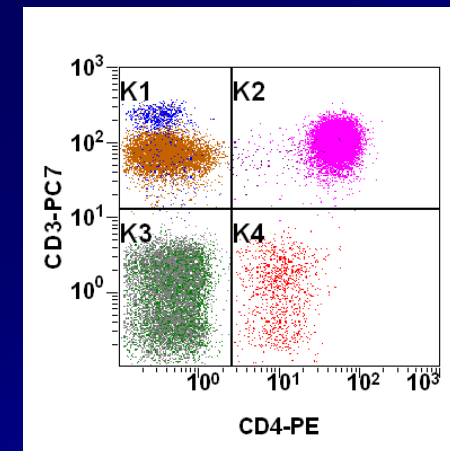
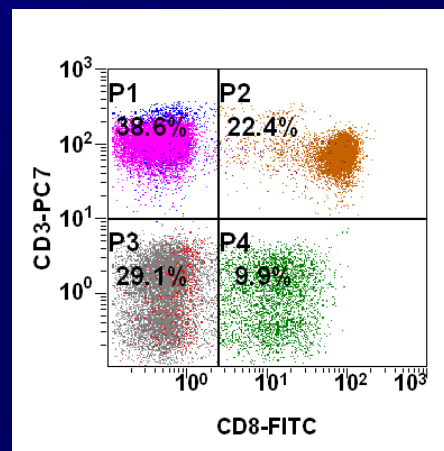
- cytotoxické:  $CD3^+CD8^+$
- pomocné:  $CD3^+CD4^+$

## B lymfocyty

- B2:  $CD19^+CD20^+$
- B1:  $CD5^+CD19^+CD20^{dim+}$

## NK buňky

- $CD3^-CD16^+CD56^+$
- NK-T:  $CD3^+CD56^+$

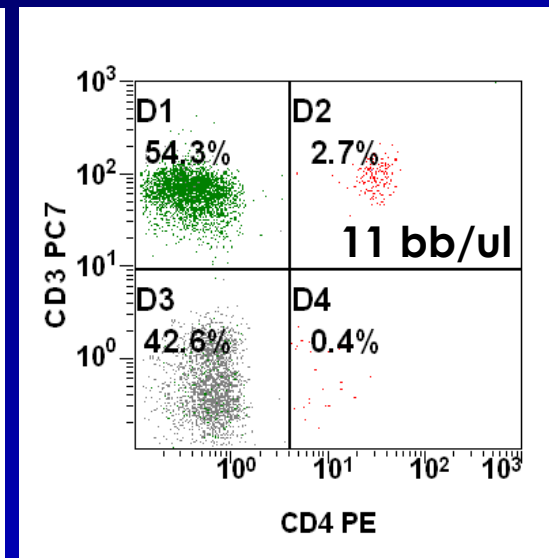
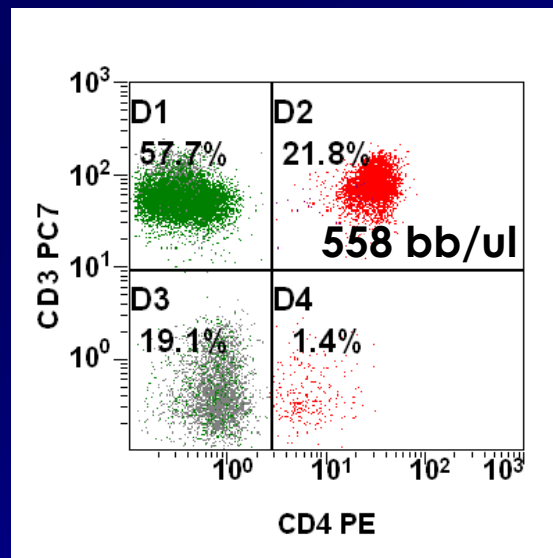
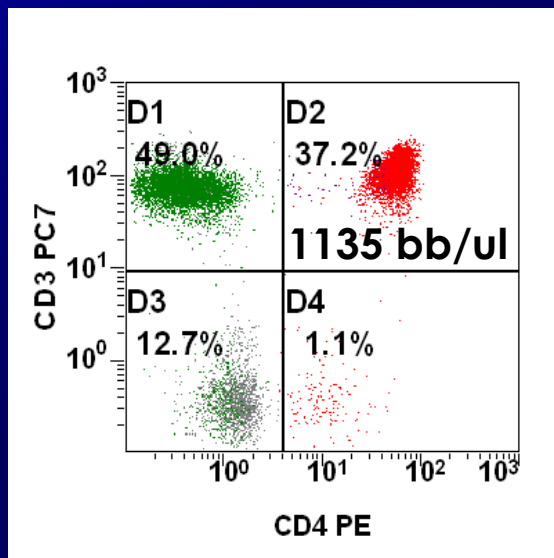


# Absolutní počty buněk

Využití firemního roztoku s přesně definovaným počtem částic na  $\mu\text{l}$  a fluorescencí ve všech kanálech

- ✓ zadáván jako kalibrátor
- ✓ shodný objem vzorku a kalibrátoru

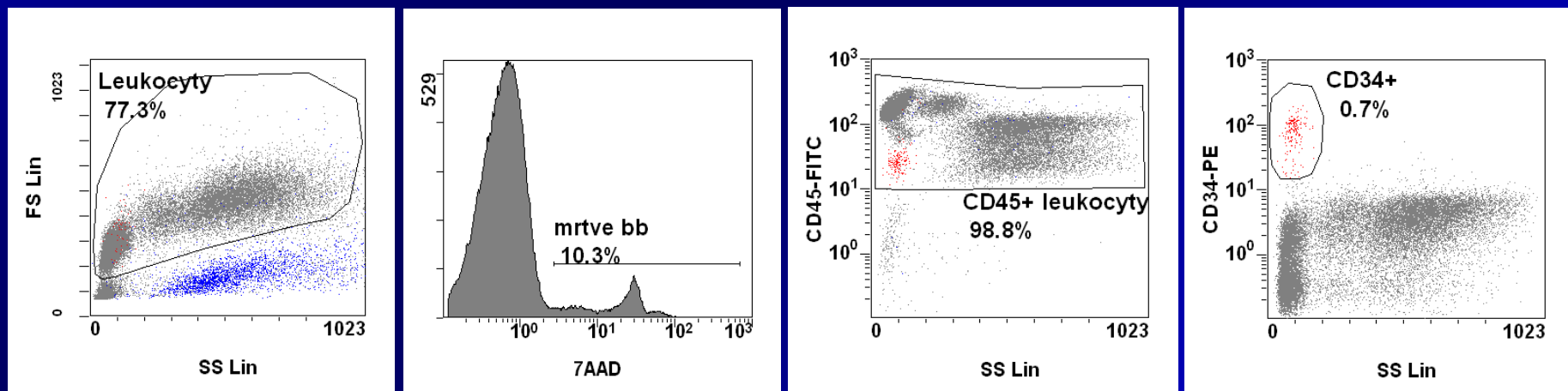
HIV<sup>+</sup> pacienti - stanovení abs, počtu CD4<sup>+</sup> helper T lymfocytů



# Transplantologie

## Zjištění zastoupení hematopoetických kmenových buněk

- CD34+ leukocyty
- v rámci transplantace kmenových buněk
  - ✓ monitorování PK po stimulaci G-CSF, v transplantátu...
- analýza pupečnickové krve...



# Hemato-(onkologie)

- ✓ **Analýza povrchových a intracelulárních markerů - imunofenotypizace**
  - dif. dg. leukémií, lymfomů apod.
  - analýza stavu onemocnění (remise, relaps...)
  - stanovení minimální reziduální nemoci
- ✓ **DNA analýza**
  - ploidita a proliferace buněk
- ✓ **Analýza apoptózy a nekrózy...**

# Diferenciální diagnostika hematologických malignit

Vychází ze znalostí exprese povrchových a intracelulárních molekul v průběhu diferenciace krevních bb

- přítomnost patologických buněk s odlišným fenotypem
- liniová příslušnost (lymfoidní, myeloidní, monocytární aj.)
- diferenciační stupeň hematologických malignit
- analýza smíšeného fenotypu u leukémií
- detekce aberantně exprimovaných markerů

# Kdy provádět IFT?

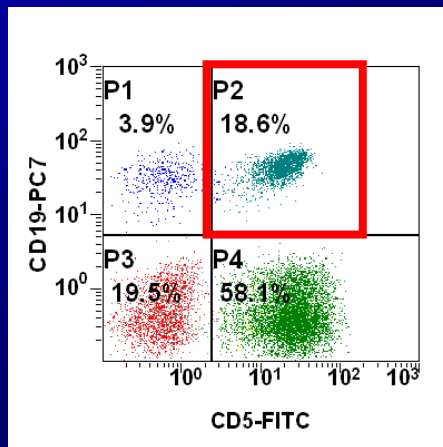
- ✓ cytopenie (zejména bicytopenie a pancytopenie)
- ✓ leukocytózy (lymfocytózy, monocytózy a eozinofilie)
- ✓ nálezy atypických buněk či blastů v PK, KD či jiných TT
- ✓ zvýšený počet plazmocytů, monoklonální gamapatie
- ✓ organomegalie či nálezy tkáňové masy
- ✗ neutrofilie ze zralých buněk
- ✗ polyklonální hypergamaglobulinémie
- ✗ polycytémie, trombózy a bazofilie

# B -CLL

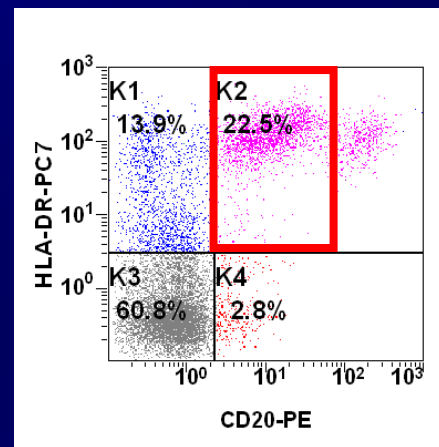
Patologické B1 (CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) lymfocyty přítomny v PK

- vesměs charakteristický fenotyp CD20<sup>dim</sup>+CD23<sup>+</sup>

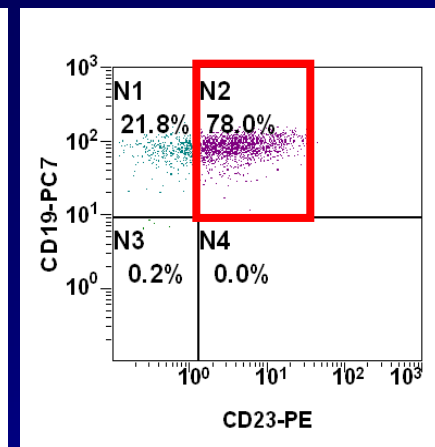
- bez exprese povrchových kappa/lambda lehkých řetězců Ig



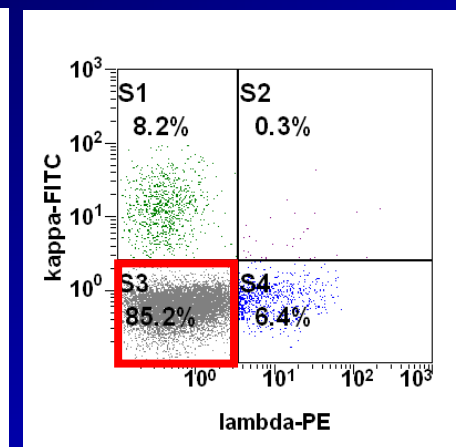
CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>



CD20<sup>dim</sup><sup>+</sup>



CD23<sup>dim</sup><sup>+</sup>



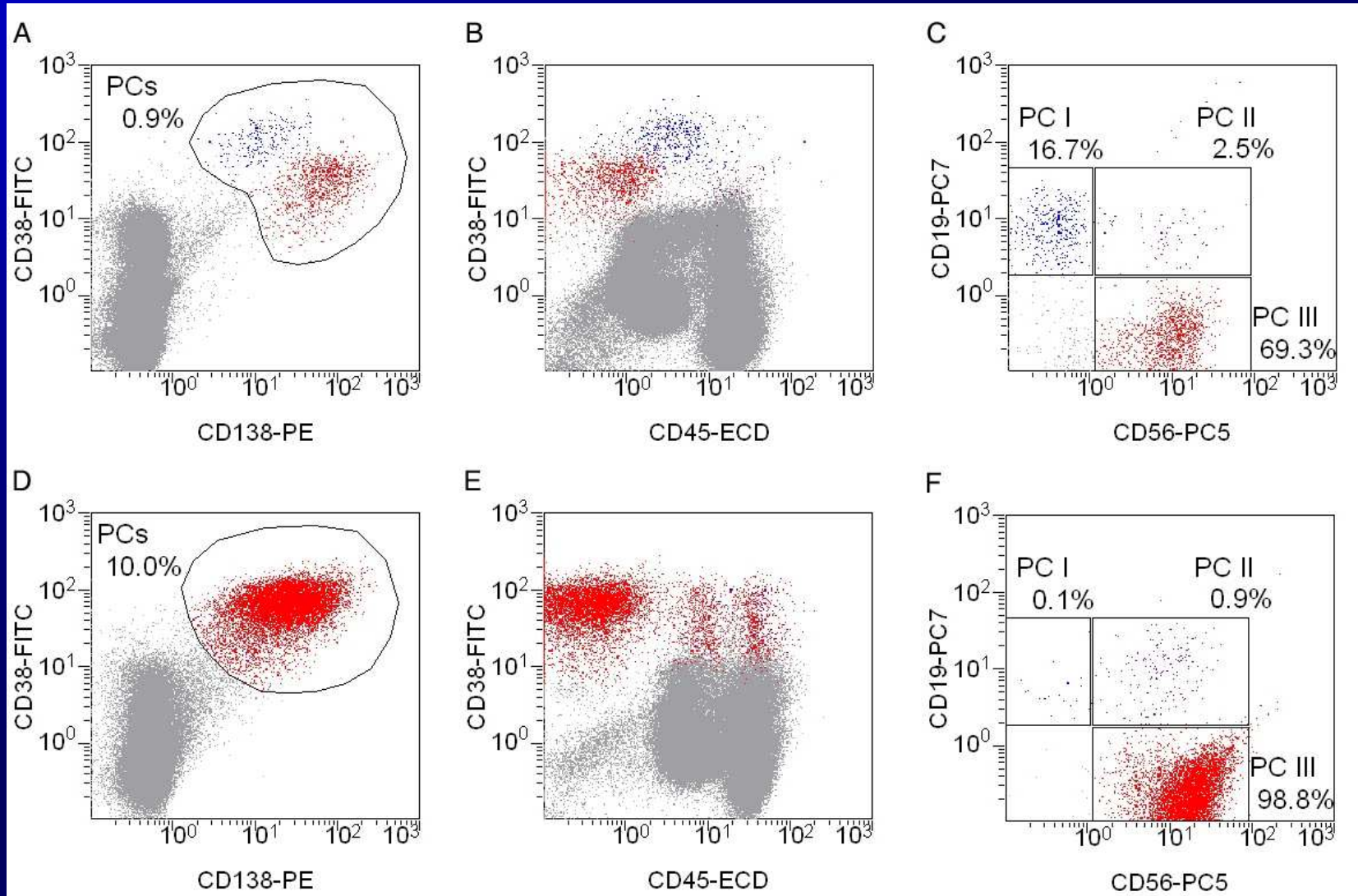
sκ<sup>-</sup>/sλ<sup>-</sup>



# Malignity z PC

- ✓ plazmocyty (PC) fyziologicky přítomny v nízkém zastoupení - produkce vlastních MoAb
- ✓ zvratem v diferenciaci vznikají maligní PC
  - prekanceróza - MGUS (nízký počet maligních PC)
  - kumulace maligních PC v KD - mnohočetný myelom
- ✓ charakteristický fenotyp
  - rozlišení fyziologických CD19<sup>+</sup> a patologických CD56<sup>+</sup> PC
- ✓ myeloma stem cells - CD138<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>
  - vysoký stupeň proliferace
  - schopné diferenciacie do maligních CD138<sup>+</sup>bb

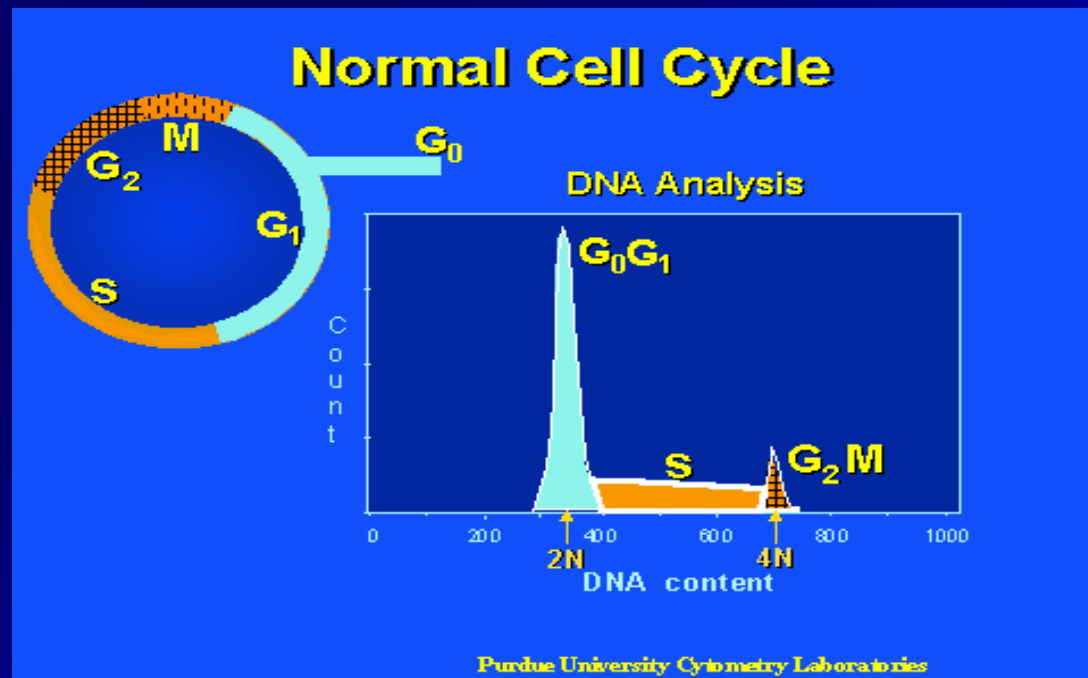
# Analýza PC u MG



# DNA analýza

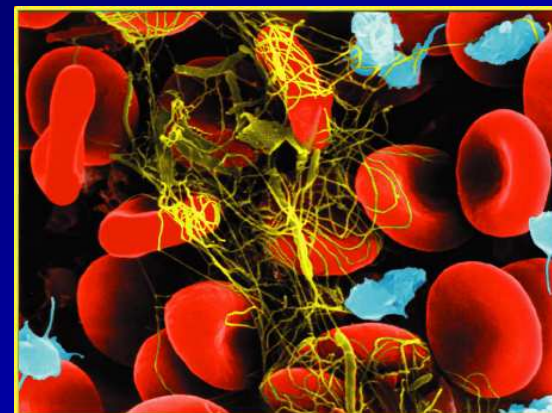
- ✓ senescentní buňky nevstupující do BC -  $G_0$  fáze
- ✓ většina buněk se nedělí -  $G_1$  fáze (možná syntéza RNA a proteinů)
- ✓ buňky syntetizující a duplikující DNA – S fáze
- ✓ buňky před rozdělením – opravy a reorganizace DNA -  $G_2$  fáze
- ✓ buňky mitotické tvořící dceřinné bb – M fáze

dle obsahu DNA  
v dané fázi:  
 $G_0/G_1 < S < G_2/M$



# Analýza trombocytů

- FC umožňuje simultánní analýzu mnoha biologických vlastností na vysokém počtu destiček (PLT) v poměrně krátké době
- analýza všech dostupných subpopulací
  - „giant“ PLT
  - mikropartikule odvozené z PLT
  - agregáty s leukocyty
- možnost analýzy dle potřeby
  - plná krev
  - plazma bohatá na PLT
  - izolované PLT v arteficiálním médiu



# Trombocytární glykoproteiny

- přítomny na povrchu trombocytů či v membráně granulí
- zprostředkovávají adhezi a agregaci destiček
  - ✓ CD31 - GPIIa (PECAM) - adheze k endotelím
  - ✓ CD36 - GPIV - adherence ke trombospondinu
  - ✓ CD41/CD61 - GPIIb/GPIIIa - ligandy jsou fibrinogen a vWF, komplex zprostředkovává agregaci
  - ✓ CD42a/CD42b - GPIX/GPIb - tvoří receptor pro vWF, komplex zprostředkovává adhezi k subendoteliu
  - ✓ CD62P - GMP-140 (P-selektin) - přítomen na  $\alpha$ -granulích
  - ✓ CD63 - GP53 - přítomen na lyzozomálních/denzních granulích

# Nejčastější aplikace u PLT I.

## ✓ Diagnostika dědičných či získaných defektů

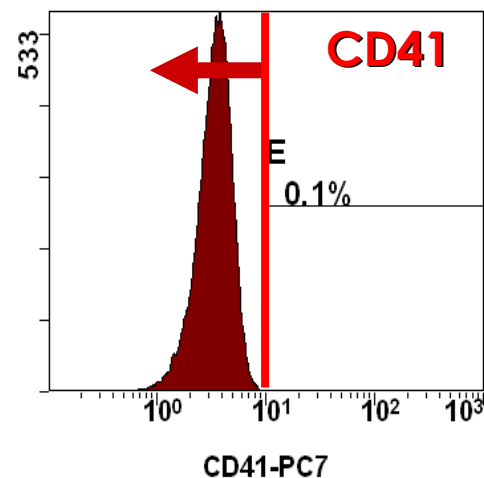
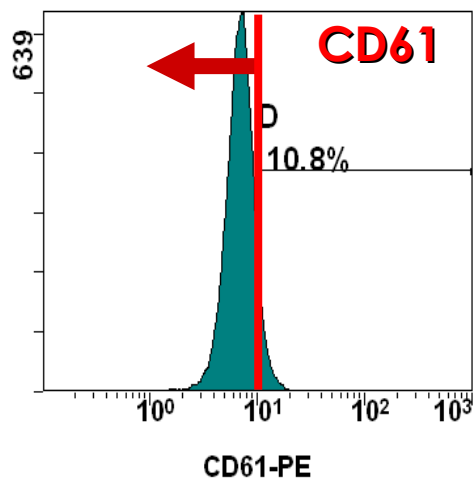
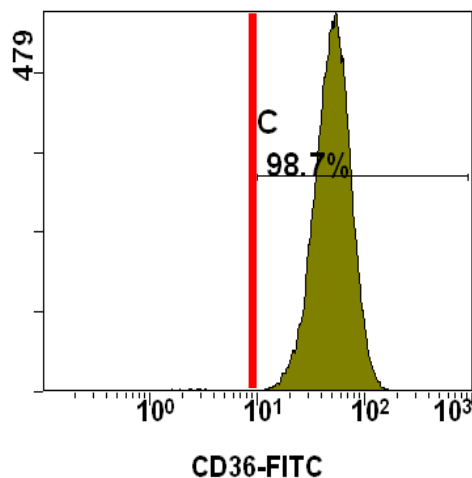
- Glanzmanova trombocytopenie (GPIIb/IIIa - CD41/CD61)
- Syndrom Bernard Soulier (GPIb/IX - CD42b/CD42a)
- Syndrom šedých destiček (P-selektin - CD62P)....

## ✓ Aktivace PLT in vivo

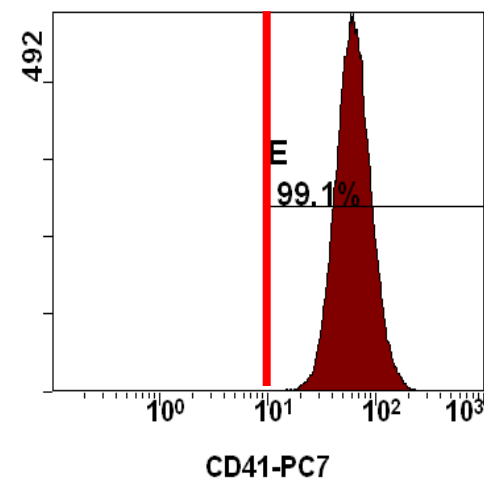
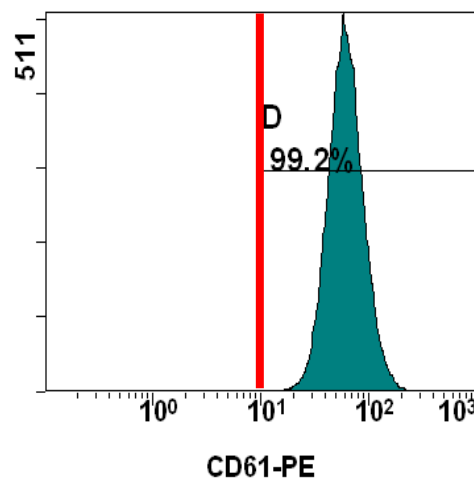
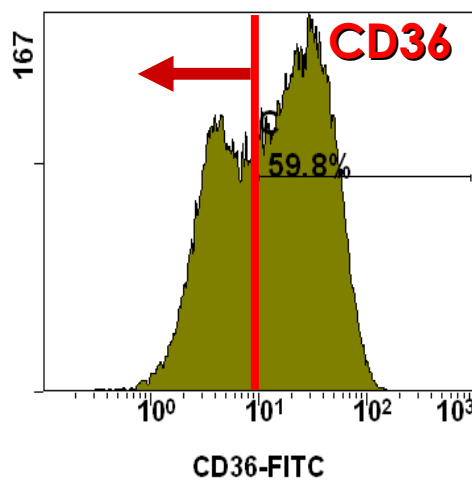
- analýza na aktivaci závislých Ag (CD62P)
- analýza PLT-PLT agregátů, případně agregátů s Leu (CD62P iniciuje interakci s PSGL-1 na leukocytech)
- destičkové mikropartikule

# Defekty PLT GP

## Glanzmanova trombastenie



## Krvácivý stav



# Nejčastější aplikace u PLT II.

## ✓ Transfuziologie

- **monitorování koncentrátů PLT**  
(zbytkové WBC, aktivace PLT - ↑ CD62P, ↓ CD42b)
- **detekce s PLT asociovaných Ig**  
(potransfuzní reakce, ITP)

## ✓ Analýza PLT obratu

- **detekce retikulovaných PLT**  
(kvantifikace nezralých destiček - stupeň trombopoézy)
- **počty PLT**



# Výhody a nevýhody FC

- ✓ FC analýza povrchových i intracelulárních markerů je citlivá a kvalitativní metoda (lze i kvantitativně)
- ✓ simultánní analýza několika markerů na vysokém počtu buněk
- ✓ paralela k morfologickému vyšetření - upřesnění dg.
- ✗ chybí informace morfologická
- ✗ občas nejednoduchá interpretace
- ✗ flowcytometr a fluorescenčně značené protilátky jsou poměrně drahé