

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Princip a využití

Lucie Říhová
OKH, FN Brno



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**



FACSCanto II (Becton-Dickinson)

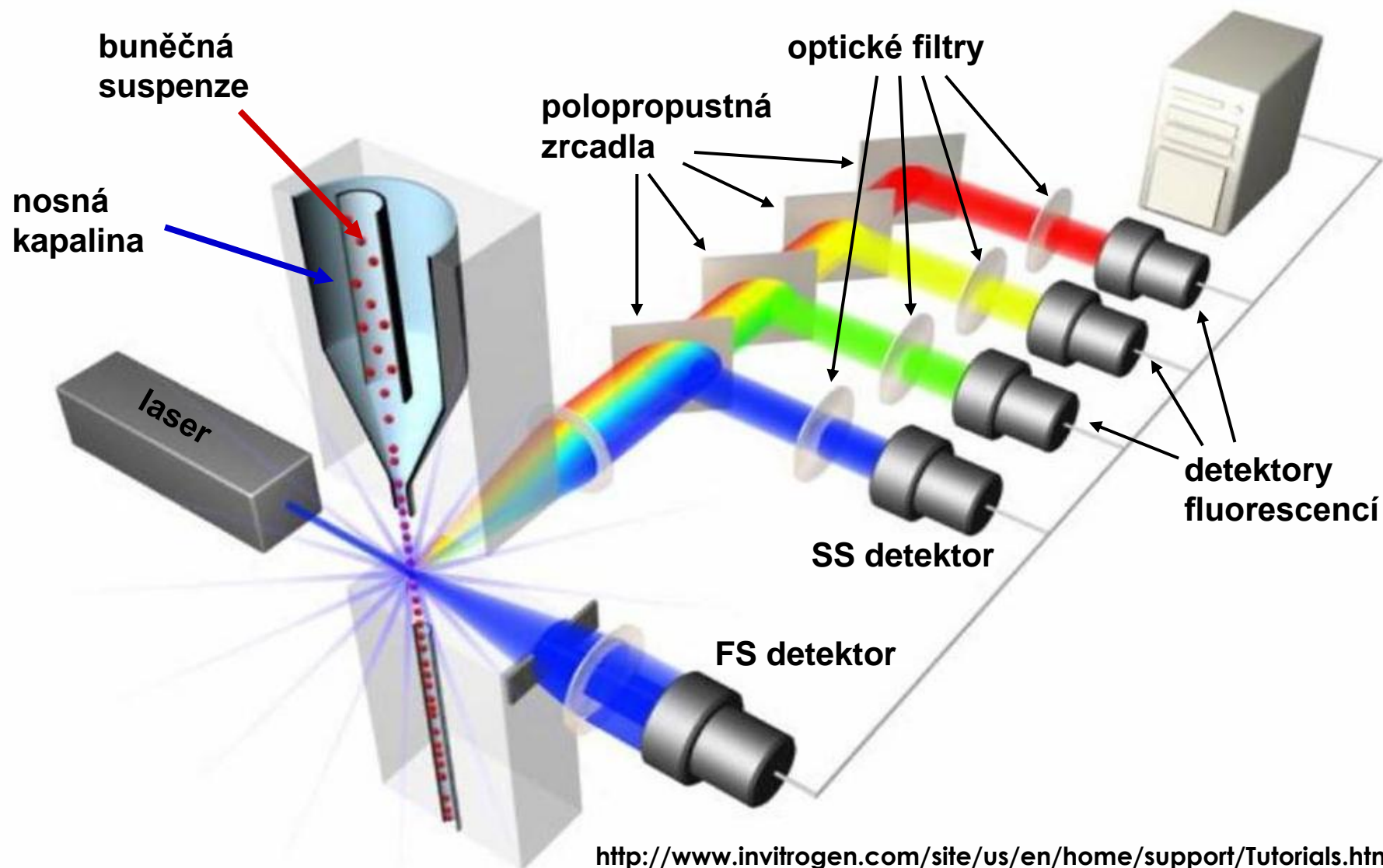


Cytomics FC500 (Beckman Coulter)

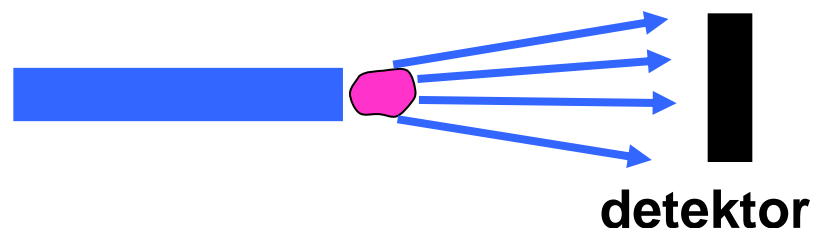
Složení průtokového cytometru

1. Zdroj světla - signál z rozptylu na buňkách a aktivace fluorescence navázaných barev
2. Fluidika - směřování vzorku do laserového paprsku a usměrňování jeho toku
3. Optika - sdružení a rozdělení rozptýlených paprsků dle λ pomocí filtrů a zrcadel na příslušné detektory
4. Elektronika a počítačový systém - převod optického signálu na elektronický a další zpracování

Složení průtokového cytometru

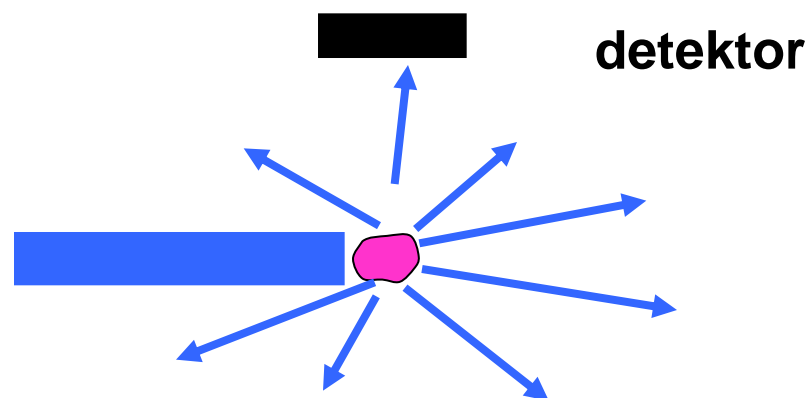


Světlo vs. buňka



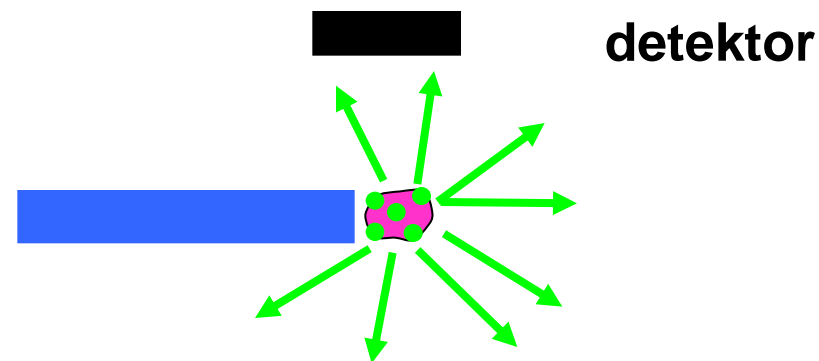
Forward Scatter

- rozptyl světla v malém úhlu
- velikost buňky



Side Scatter

- rozptyl světla pod úhlem 90°
- 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)

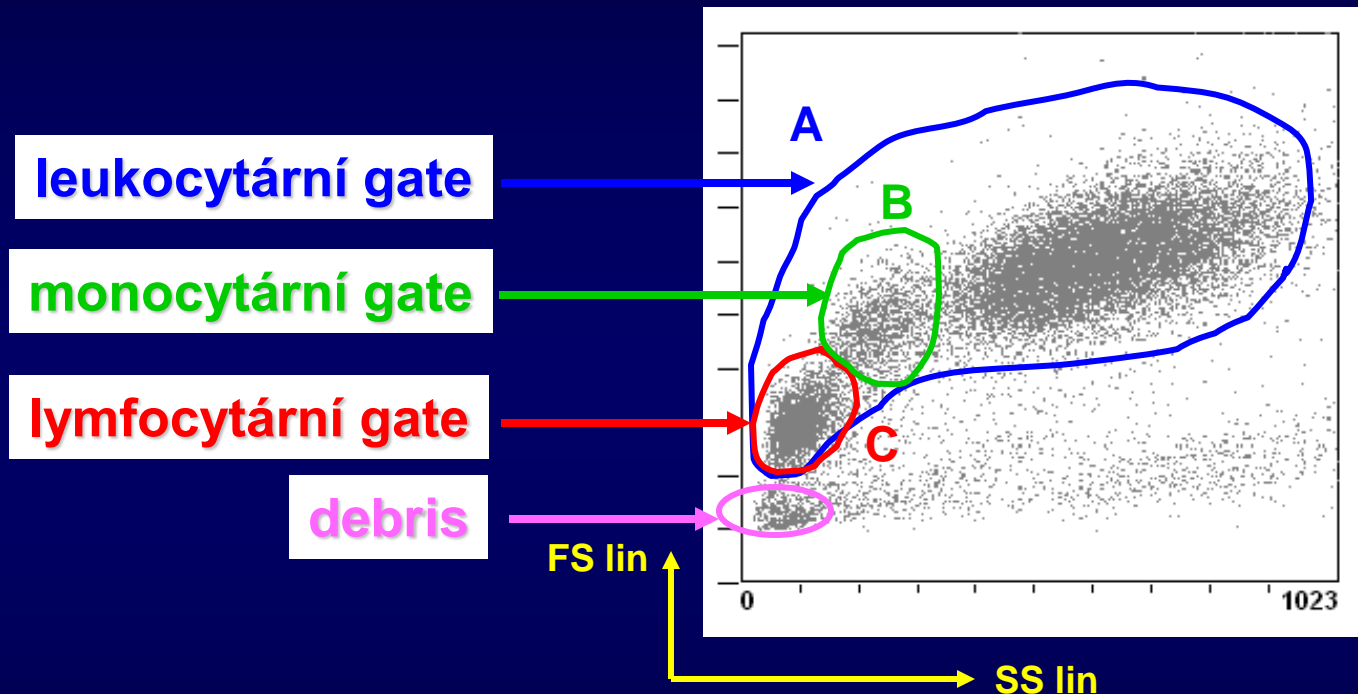
PI - propidium jodid, široký peak okolo 620 nm

➤ **excitace He-Ne laserem/red diode (červený) - 633 nm**

APC - allophycocyanin (670 nm)

APC-Cy7 - tandem APC-cyanine 7 (778 nm)

Analýza a zobrazení



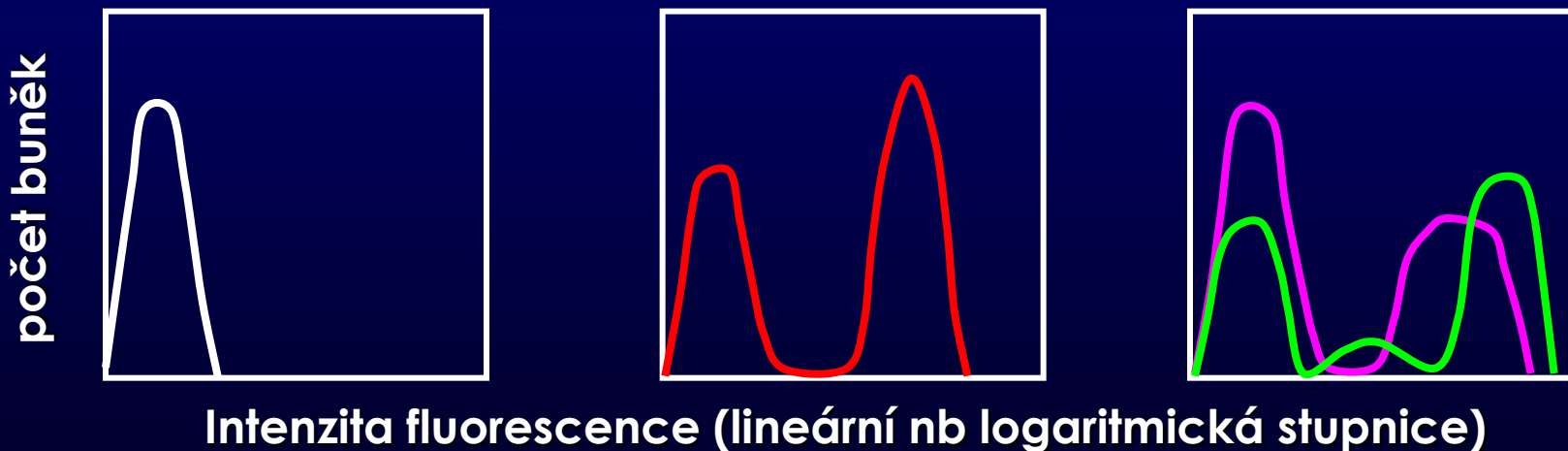
FS - forward scatter - velikost buněk

SS - side scatter - granularita/komplexita

1-parametrová analýza

➤ Histogram

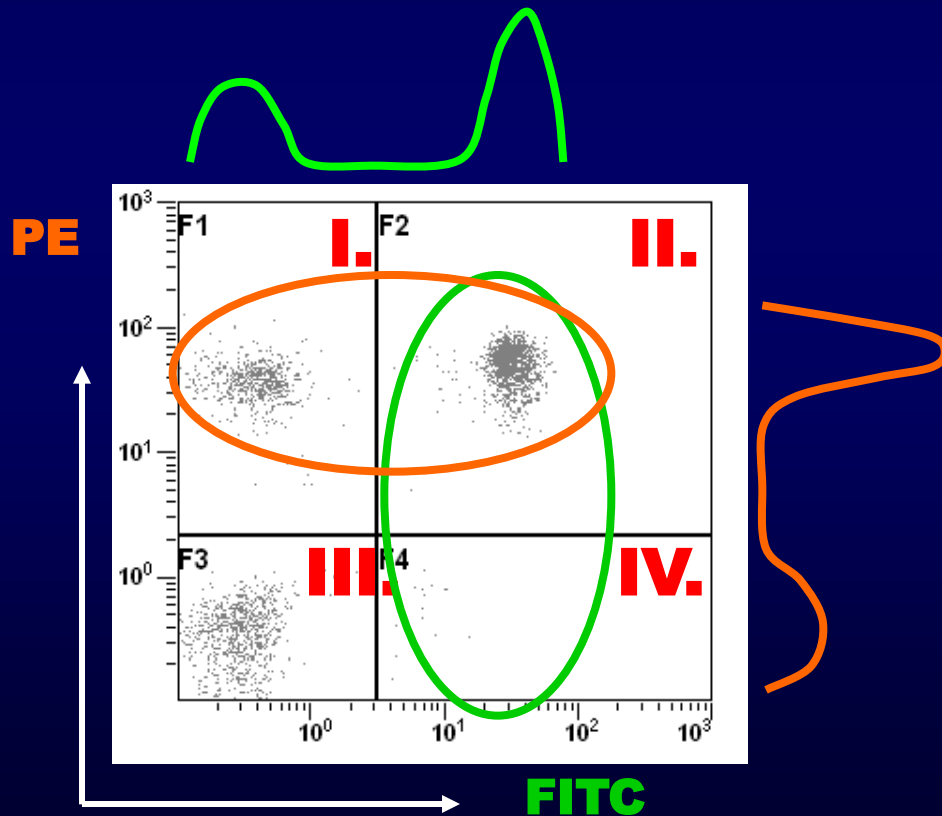
- ✓ osa x - intenzita fluorescence, osa y – počet buněk
- ✓ hodnocení - odečet % pozitivních buněk
 - neg. peak = autofluorescence, izotypová kontrola
 - poz. peak - různá intenzita exprese
 - low (+/-) < dim (+) < high, bright (++) < very high (+++)
 - porovnávání intenzity exprese



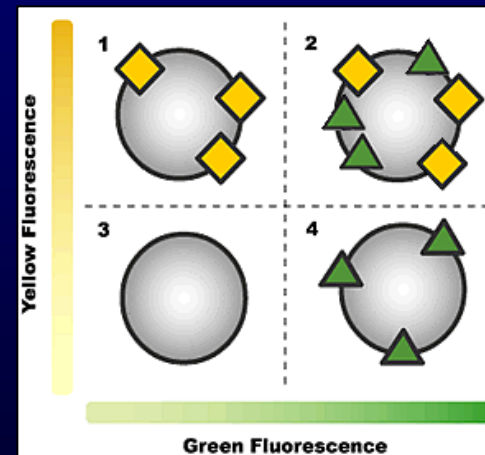
2-parametrová analýza

➤ Dot plot

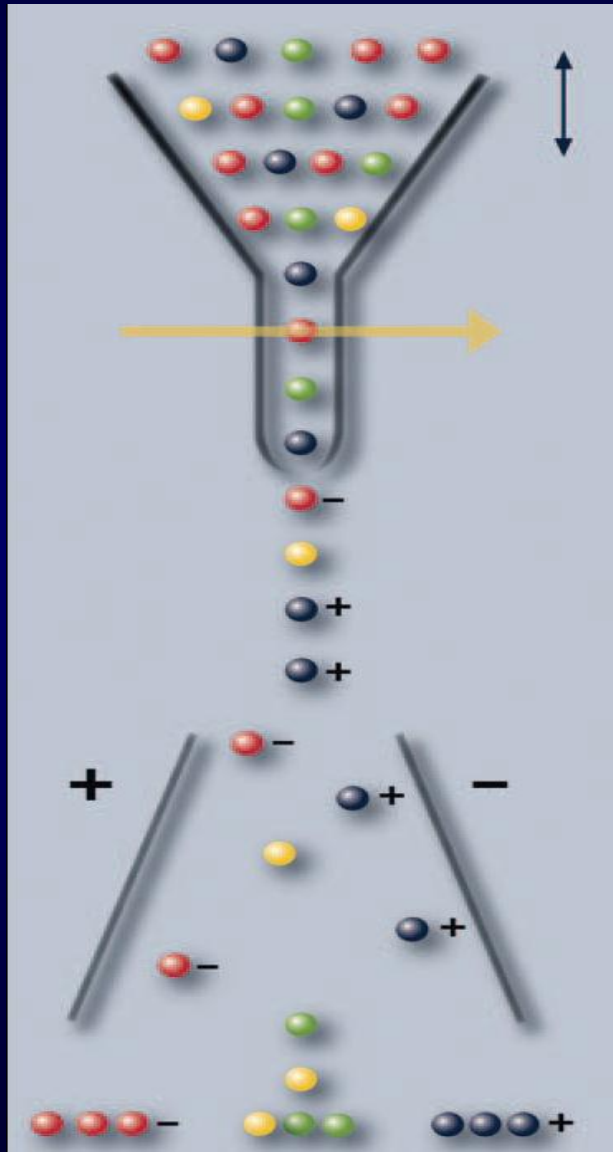
- ✓ dva parametry proti sobě - FLx vs. FLy, FLx vs. FS či SS
- ✓ procentuální hodnocení - nejčastěji kvadrantová analýza



- I. kvadrant – FITC⁻PE⁺
- II. kvadrant – FITC⁺PE⁺
- III. kvadrant – FITC⁻PE⁻
- IV. kvadrant – FITC⁺PE⁻

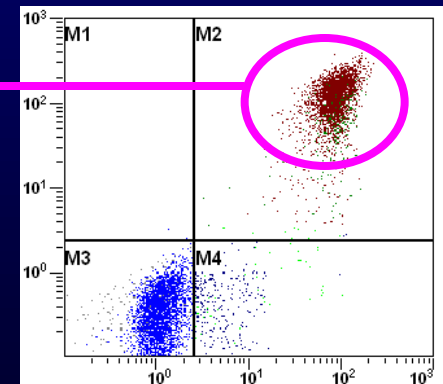


Sortování subpopulací



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

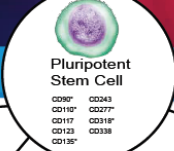
Stanovení povrchových a intracelulárních markerů exprimovaných jednotlivými hodnocenými buňkami

- ✓ 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...

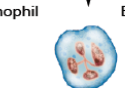
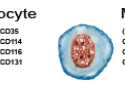
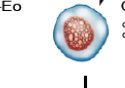
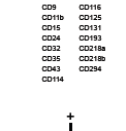
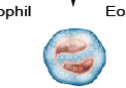
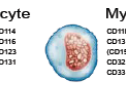
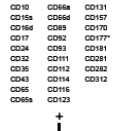
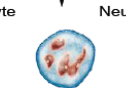
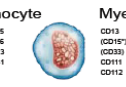
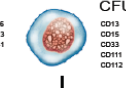
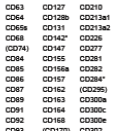
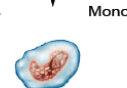
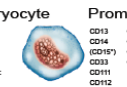
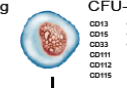
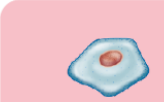
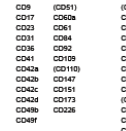
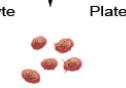
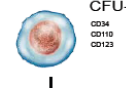
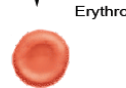
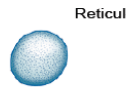
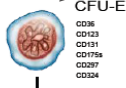
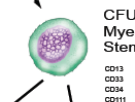
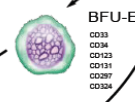
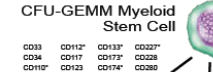
MYELOID

LYMPHOID

A Division of MorphoSys



- Markers Expressed By Most Leukocytes**
- CD11a CD63 CD120b CD221 CD264
 - CD18 CD54 CD120c CD222 CD270
 - CD29 CD56 CD135 CD204 CD298
 - CD44 CD58 CD130 CD225 CD321
 - CD46 CD62L CD146 CD232
 - CD47 CD82 CD156b CD381
 - CD47H CD180 CD217 CD262
 - CD50 CD118 CD220 CD263



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

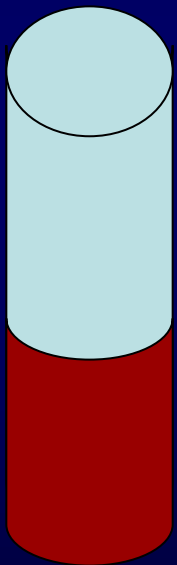
Vazba MoAb - Ag

plná krev
kostní dřeň +
bb suspenze

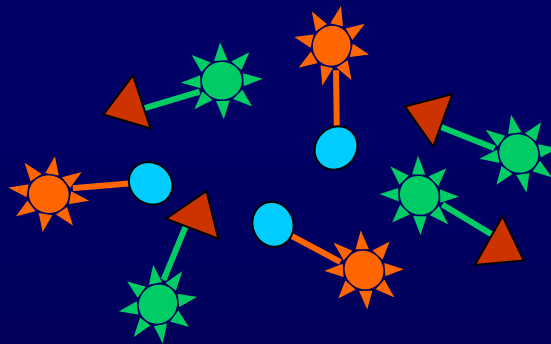
vybrané protilátky
konjugované
s fluorescenční
barvou

=

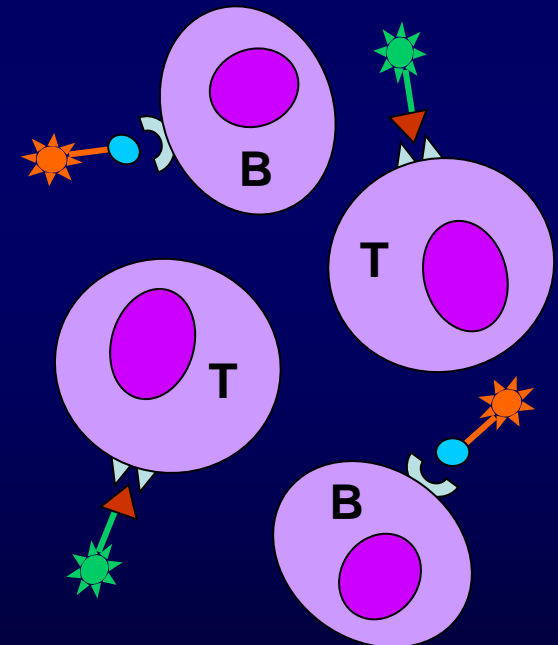
označení buněk
vazbou protilátek
na odpovídající Ag



+



=



Anti CD3-FITC

Anti CD19-PE

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

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: $CD3^+CD4^+$

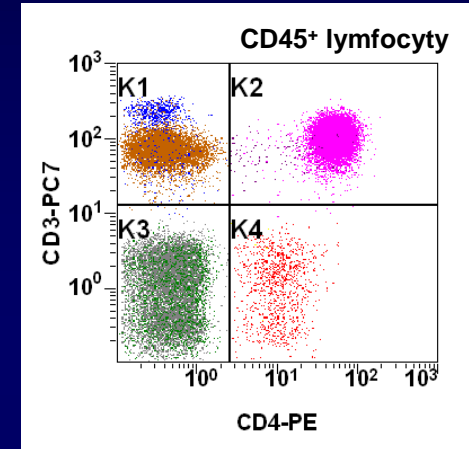
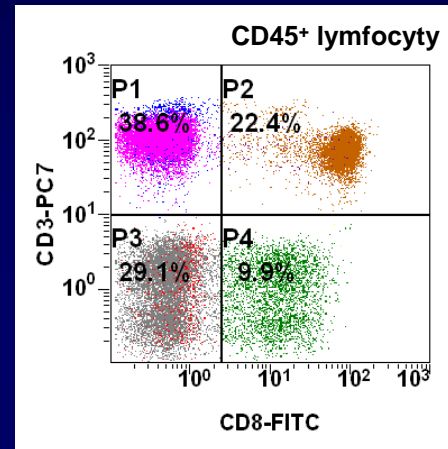
B lymfocyty

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

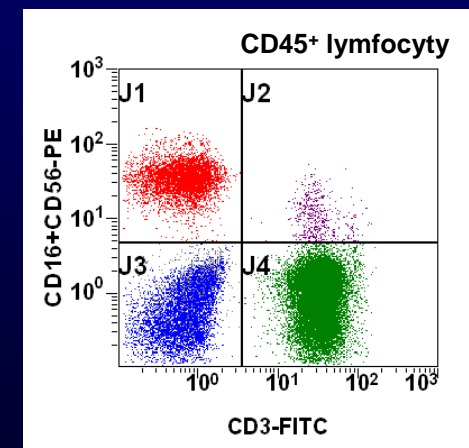
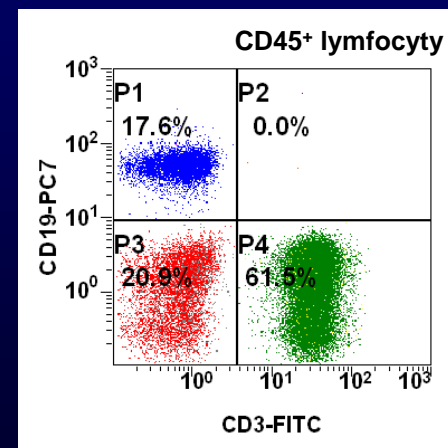
NK buňky

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

CD8-FITC/CD4-PE/CD45-PC5/CD3-PC7



CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-PC5/CD19-PC7

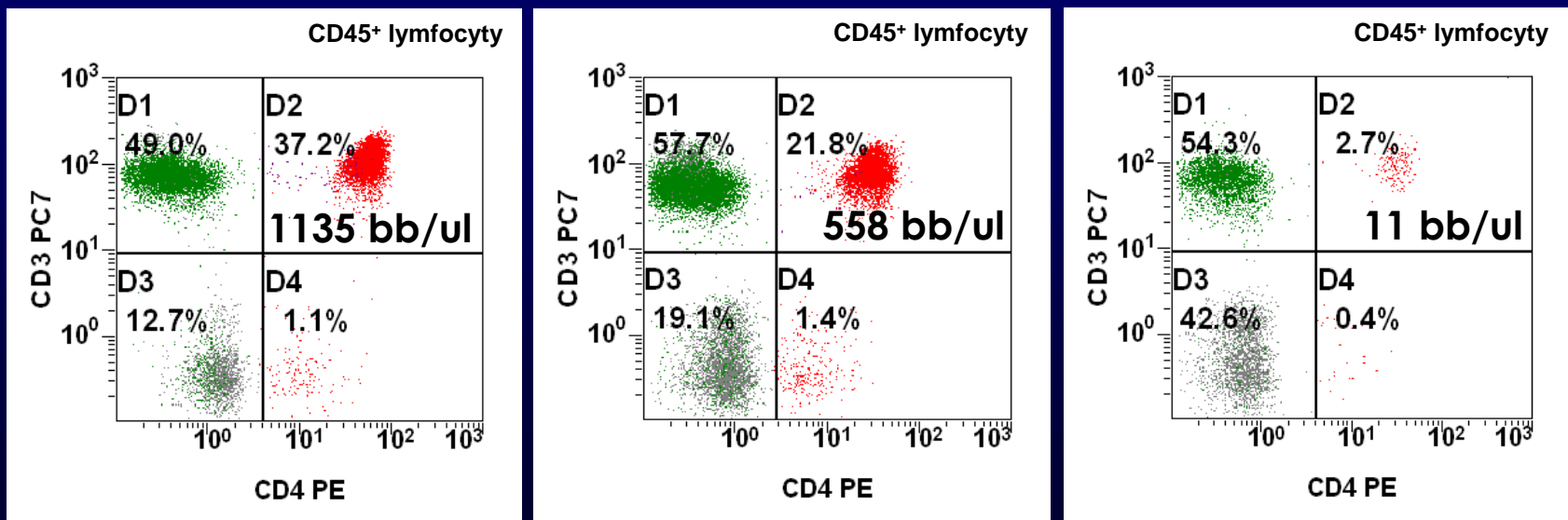


Absolutní počty buněk

Využití firemního roztoku s přesně definovaným počtem částic na μl a fluorescencí ve všech kanálech

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

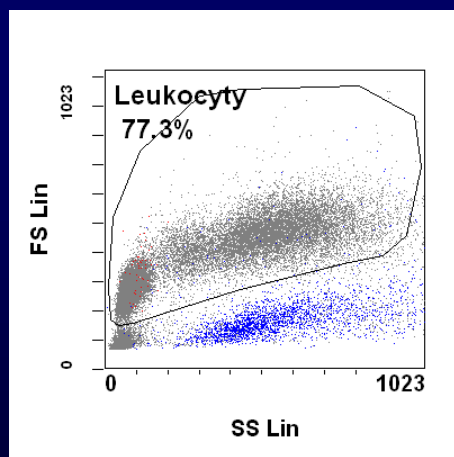
HIV⁺ pacienti - stanovení abs. počtu CD4⁺ helper T lymfocytů



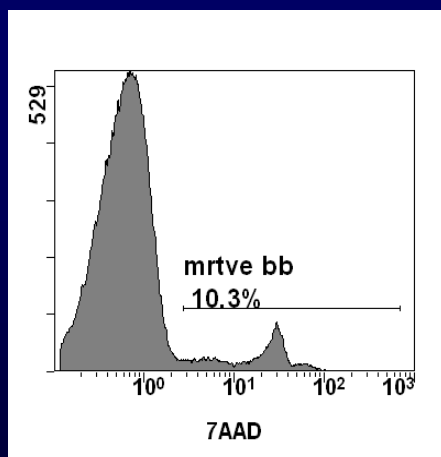
Transplantologie

Zjištění zastoupení hematopoetických kmenových buněk

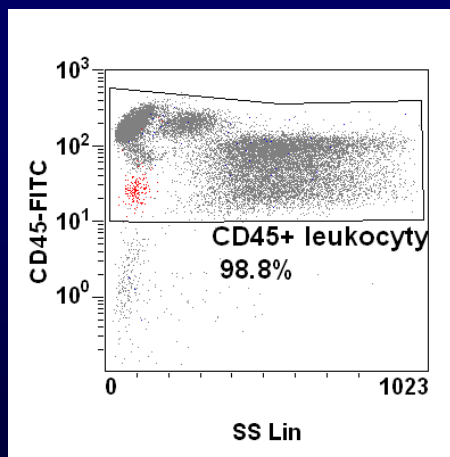
- CD34⁺ leukocyty (hematopoietic stem cell, HSC)
- v rámci transplantace kmenových buněk
 - ✓ monitorování PK po stimulaci G-CSF, v transplantátu...
- analýza pupečnickové krve...



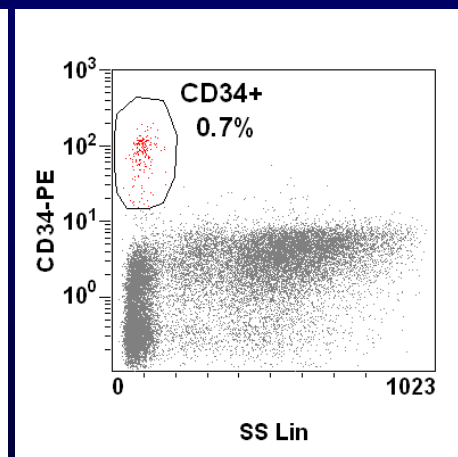
Vymezení leukocytů



Označení mrtvých bb



Vymezení CD45⁺
leukocytů



Označení CD34⁺ HSC

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

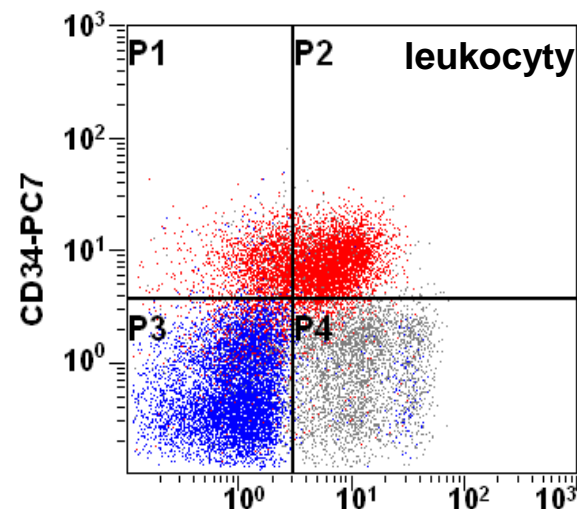
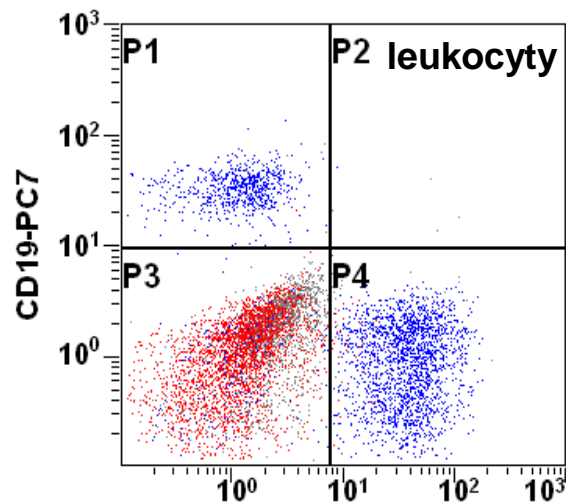
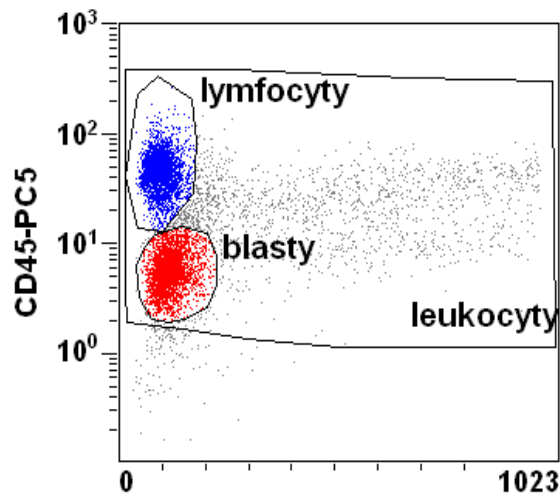
Kdy provádět IFT?

- ✓ 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

Akutní myeloidní leukémie

Klonální neoplastická proliferace myeloidních blastů

- Antigeny prekurzorových buněk: CD34, CD38, CD117, HLA-DR, TdT
- Myeloidní antigeny: CD13, CD15, CD33, CD65, MPO
- Antigeny monocytární diferenciace: CD14, CD4, CD64, CD36, CD11b, CD11c

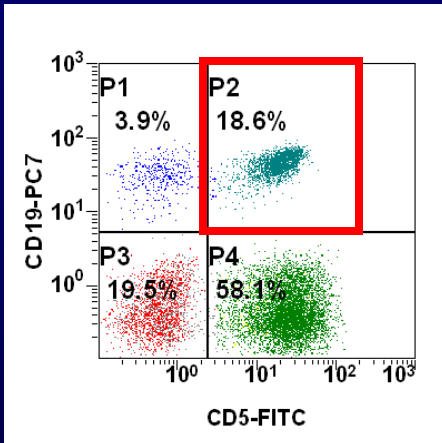


Lymfoproliferace - B-CLL

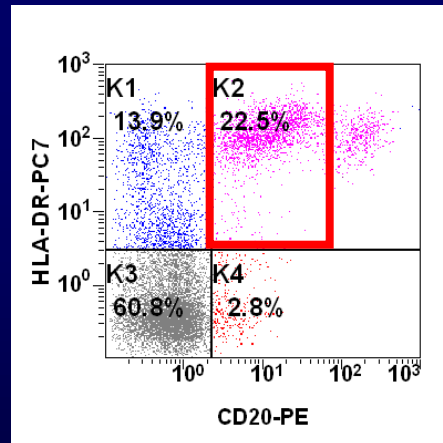
Patologické B1 (CD5⁺CD19⁺) lymfocyty přítomny v PK

- vesměs charakteristický fenotyp CD20^{dim}+CD23⁺

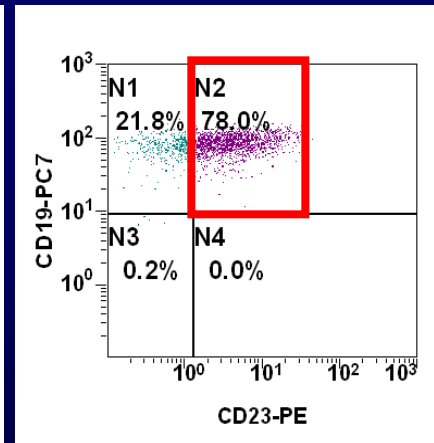
- bez exprese povrchových kappa/lambda lehkých řetězců Ig



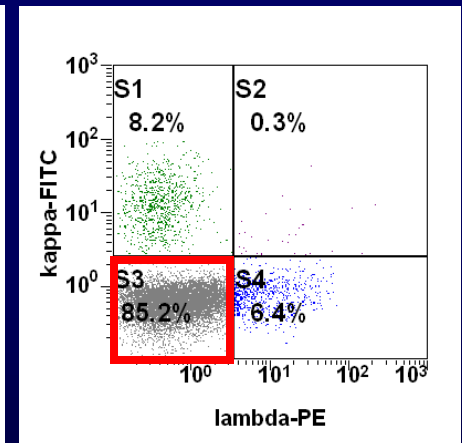
CD5⁺CD19⁺



CD20^{dim}⁺



CD23^{dim}⁺

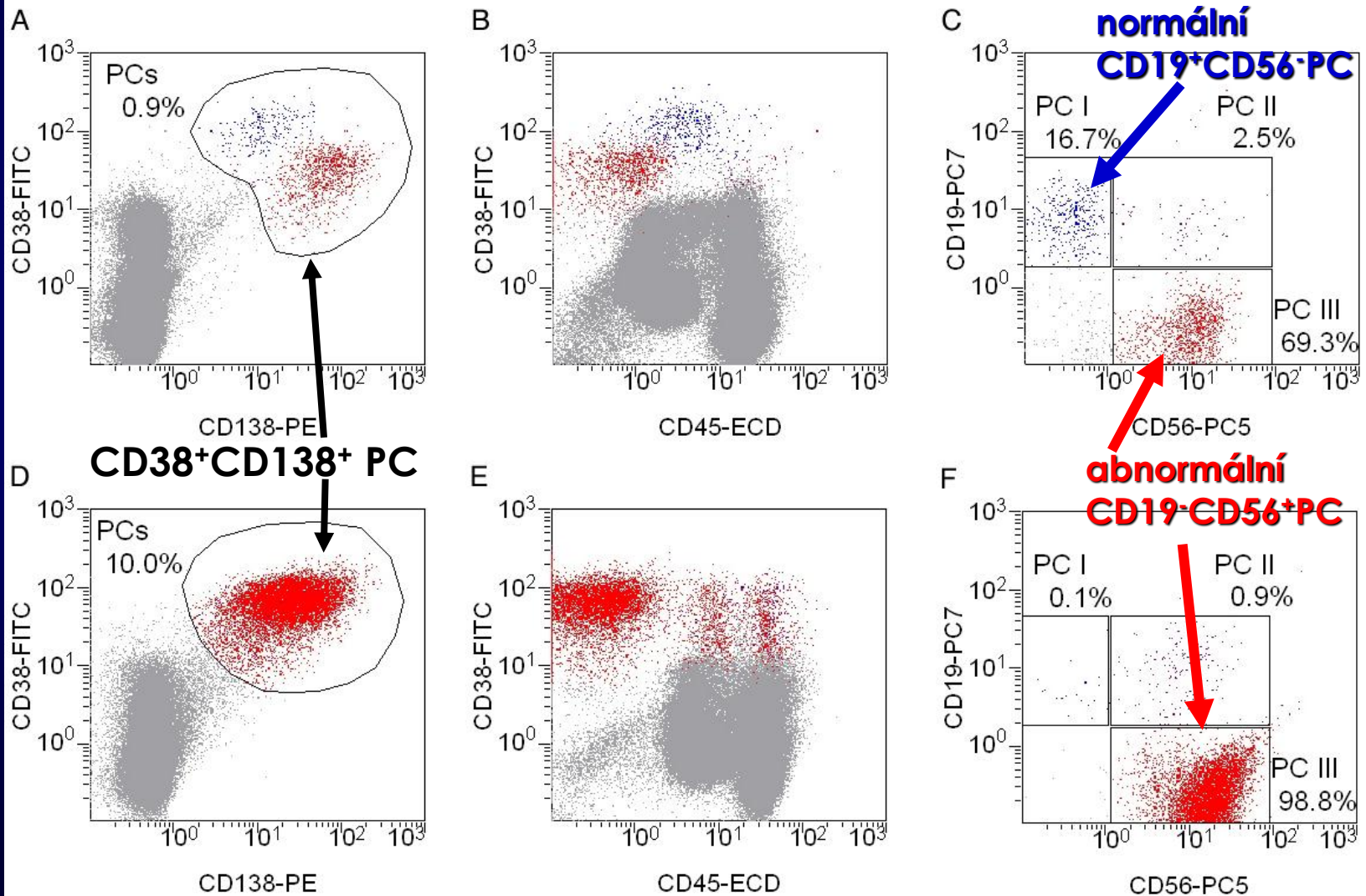


κ⁻/λ⁻

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⁺ a patologických CD56⁺ PC
- ✓ myeloma stem cells - CD138⁺CD34⁻CD27⁺
 - vysoký stupeň proliferace
 - schopné diferenciacie do maligních CD138⁺bb

Analýza PC u MG

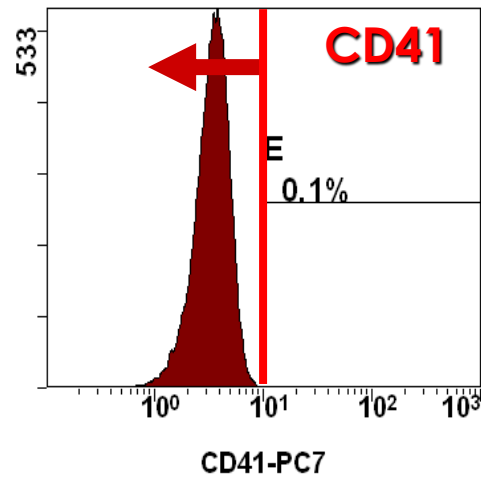
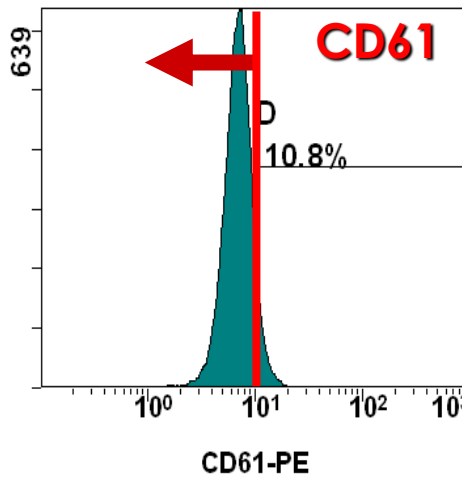
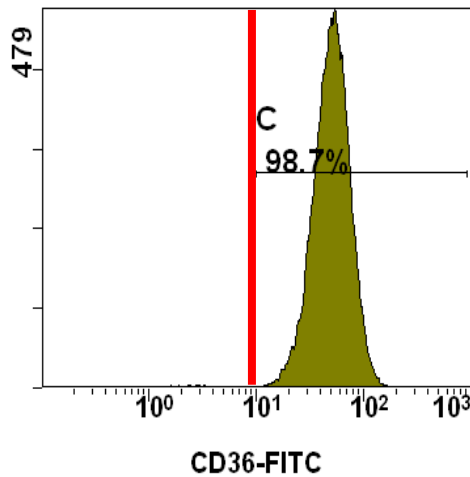


Nejčastější aplikace u PLT I.

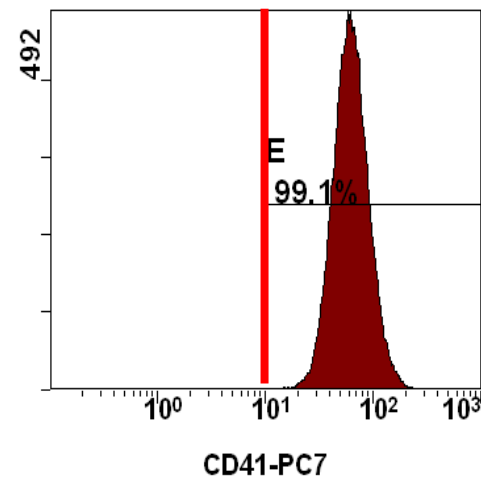
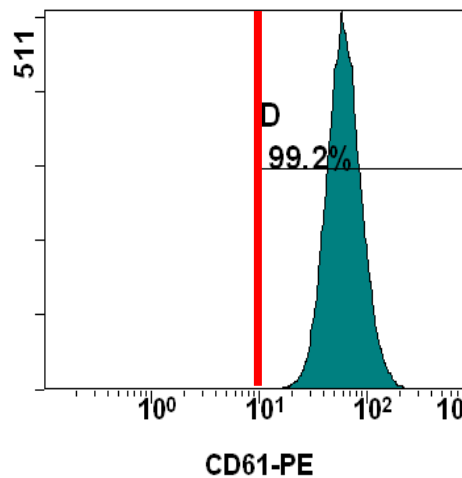
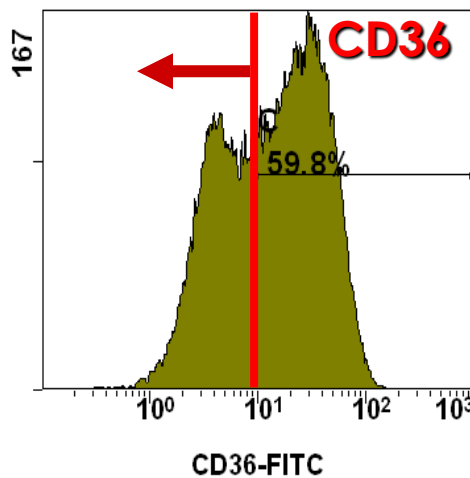
- ✓ Diagnostika dědičných či získaných defektů
 - Glanzmanova trombocytopenie (GPIIb/IIIa - CD41/CD61)
 - Syndrom Bernard Soulier (GPIb/IX - CD42b/CD42a)
 - Syndrom šedých destiček (P-selektin - CD62P)....
- ✓ Aktivace PLT in vivo
 - analýza na aktivaci závislých Ag (CD62P)
 - analýza PLT-PLT agregátů, 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)

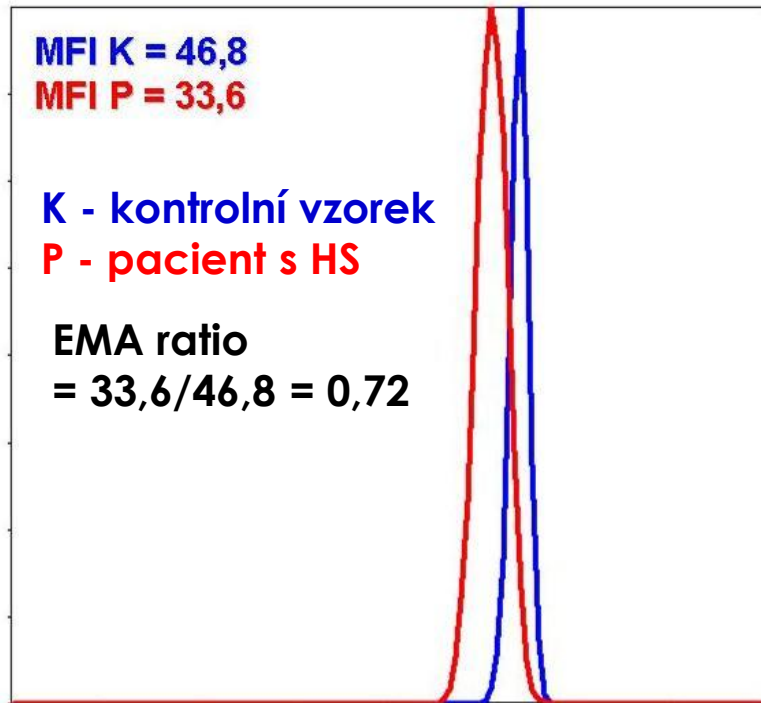
✓ Analýza PLT obrátu

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

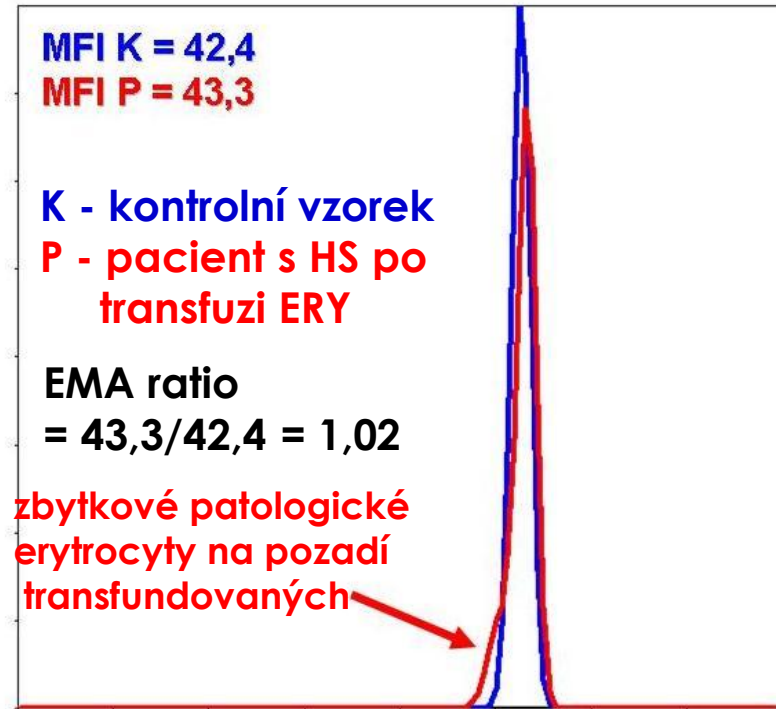
Hereditární sférocytóza

- nejčastější vrozená hemolytická anémie
- molekulární defekty membránových proteinů erytrocytů (spectrin, band 3...)
 - ⇒ narušený bikonkávní tvar
 - ⇒ destrukce ve slezině
- diagnostické testy
 - ⇒ sférocyty, osmotická rezistence, autohemolýza
 - ✓ kryohemolýza
 - ✓ průtoková cytometrie
 - vazba kyseliny eosin maleimidové (EMA) na erytrocyty
 - analýza snížení fluorescence oproti kontrole

Hereditární sférocytóza



Intenzita fluorescence



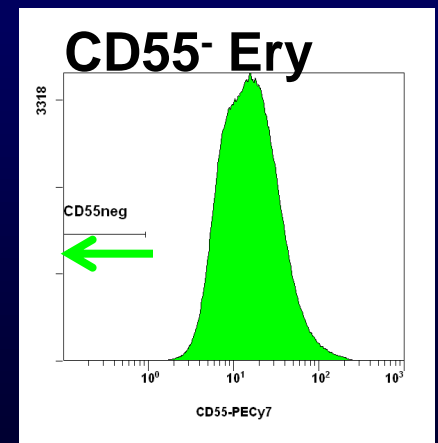
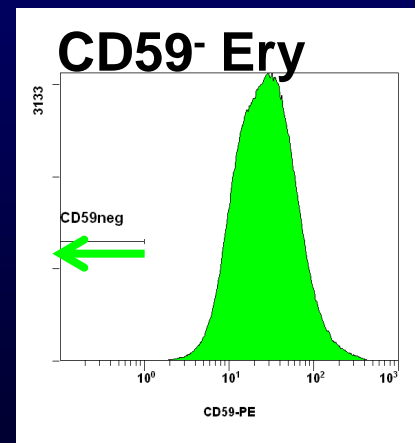
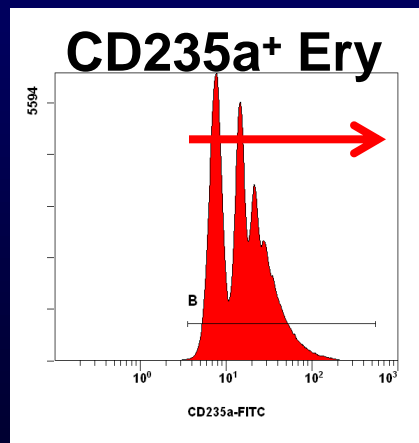
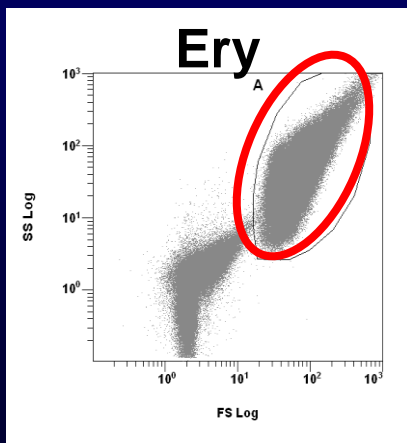
Intenzita fluorescence

MFI - medián intenzity fluorescence EMA = poloha peaku na ose X
MFI P/MFI K = EMA ratio ~ 1 u pacientů bez HS a <0,9 u HS

PNH - Paroxysmální noční hemoglobinurie

Chybění glykofosfatidyl-inositol proteinové kotvy

- Analýza CD235a⁺ erytrocytů
 - dle zastoupení CD55⁻/CD59⁻ buněk různé typy PNH I-III
- Analýza monocytů a neutrofilů - CD45⁺ a CD14⁺/CD33⁺
 - přítomnost proaerolyzinu FLAER - protilátka proti GPI

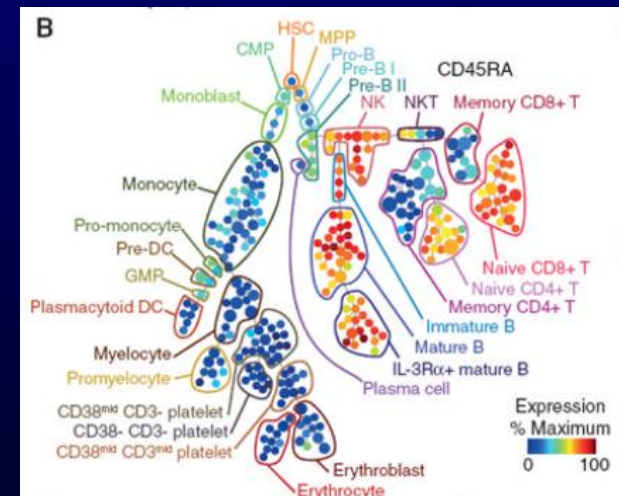


Hmotnostní Cytometrie

Nový přístup využívající stabilní izotopy kovů jako „značky“ spolu s jejich detekcí pomocí atomové hmotnostní spektrometrie

- značky jsou spojeny s MoAb kompatibilními s povrchovými i či intracelulárními znaky
- buňky jsou vaporizovány, atomizovány a ionizovány, poté je měřena základní kompozice
- simultánní detekce až 30 parametrů jedné buňky bez nutnosti kompenzace

SPADE



Zobrazovací cytometrie

Flow cytometr se zobrazovacími a funkčními vlastnostmi mikroskopu

- přímé zobrazení buněk s 60 násobným rozlišením
- simultánní fenotypové a funkční analýzy s využitím 5 laserů a 12 zobrazení na buňku



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