

Průtoková cytometrie

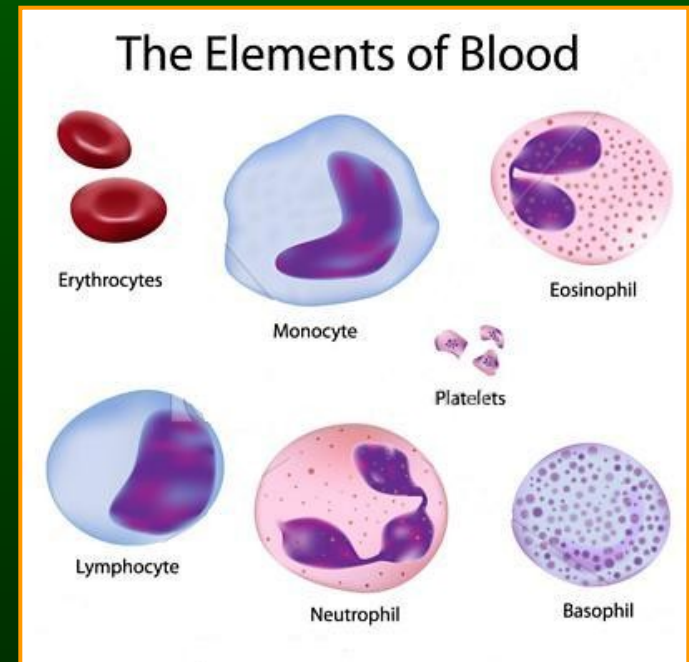
RNDr. Alena Mikušková

FN Brno – Pracoviště dětské medicíny, OKB



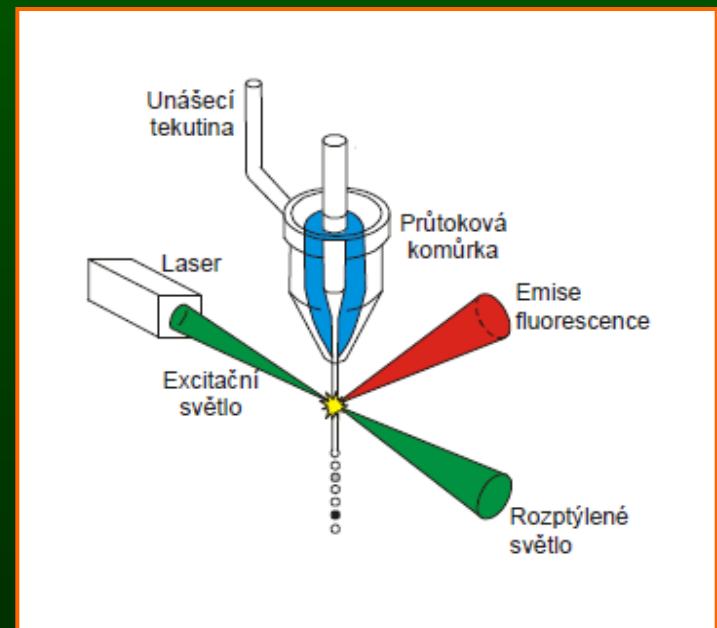
Průtoková cytometrie – Flow Cytometry

- technika pro kvalitativní a kvantitativní analýzu buněk nebo jiných částic (jadérka, mikroorganismy, latexové částice aj.) v suspenzi
- rozlišení buněk pomocí rozptylu světla a fluorescence
- rozlišení na základě fyzikálních a chemických vlastností buněk
 - např. velikost, množství granul, obsah DNA, apod.
- po označení buněk fluorescenčním konjugátem monoklonálních protilátek umožňuje studium
 - povrchových molekul
 - diferenciačních antigenů
 - intracelulárních molekul apod.
- **průtokový cytometr**
 - vyhodnocuje řádově tisíce buněk za sekundu

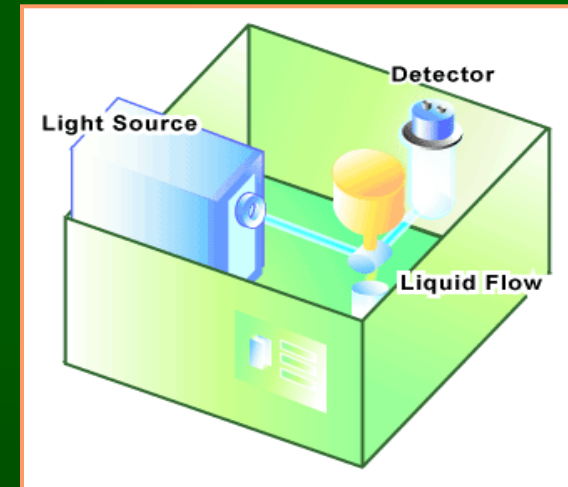
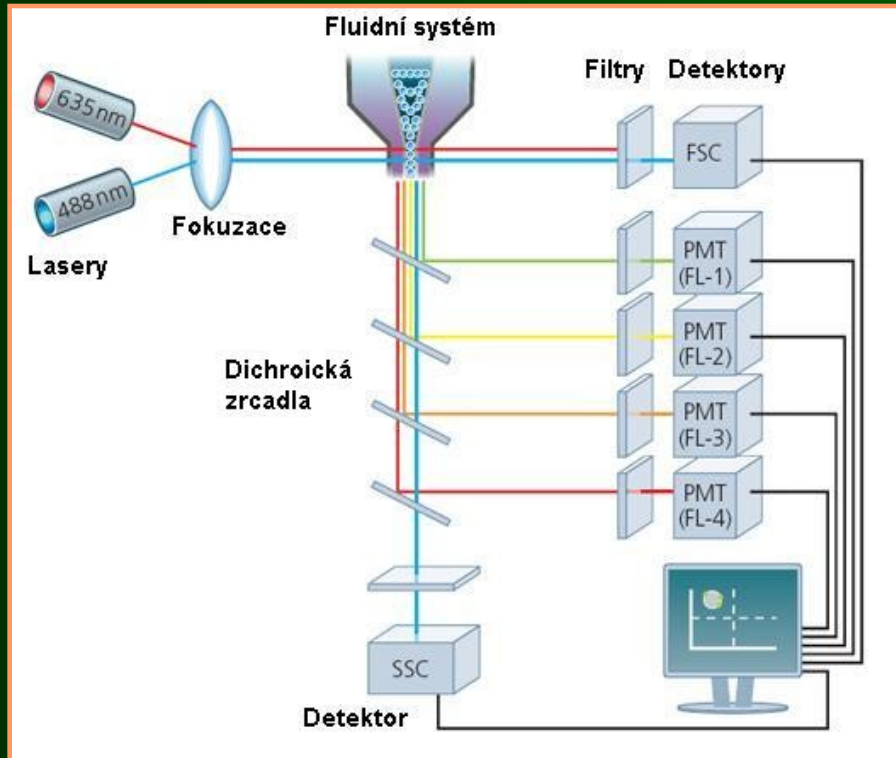


Princip průtokové cytometrie

- buňky v suspenzi protékají kapilárou - usměrněné do velmi tenkého proudu
- buňky protínají dráhu paprsku světla (laseru) kolmé na směr toku
- buňka **rozptyluje** světlo do různých směrů
 - podle své velikosti
 - vnitřní struktury (granulace)
- vyhodnocením **rozptylu** lze buňky roztrždit na jednotlivé buněčné populace
 - př. lymfocyty, monocyty, granulocyty
- **Fluorescence:**
 - buňky před analýzou obarveny fluorescent. barvivem
 - nebo inkubovány s fluorescenčně značenými monoklon. Ab proti určitým Ag
 - excitace fluorochromů laserem
 - následná emise fluorescenčního záření
 - fluorescence odráží
 - vnitřní strukturu buňky
 - specifické molekuly exprimované na povrchu buňky (znaky, receptory)
 - umožňuje třídění buněk do subpopulací



Průtokový cytometr - schema



FACS Calibur (Becton-Dickinson)
(Fluorescence Activated Cell Scanner)

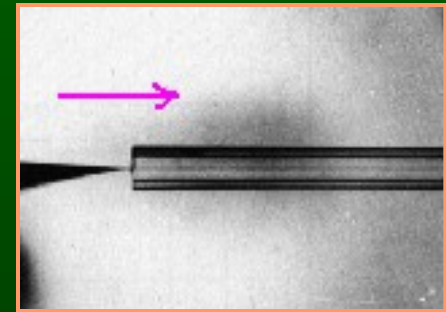
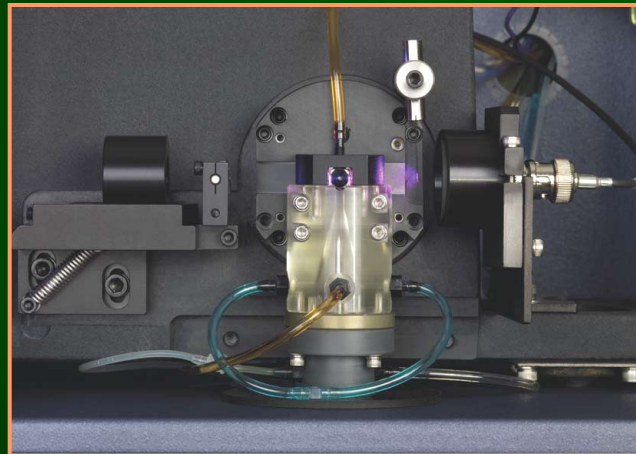
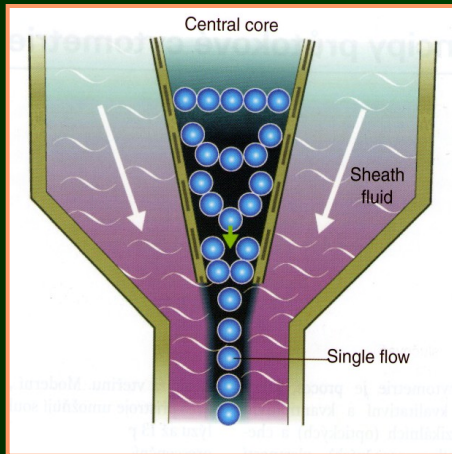


- rozptýlené světlo a emitovaná fluorescence rozděleny optickou soustavou
 - hranoly, filtry, zrcadla
- detekce
 - FSC...detektor rozptylu světla v malém úhlu
 - SSC...detektor bočního rozptylu
 - PMT...fotonásobiče (detektory fluorescence)

Průtokový cytometr - fluidní systém

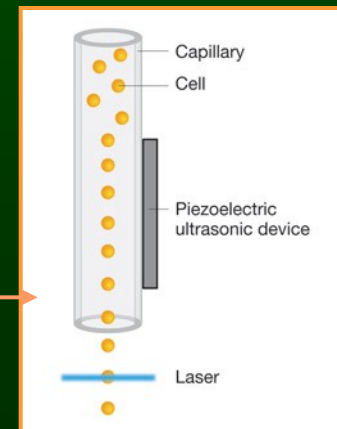
hydrodynamická fokuzace

- vzorek (suspenze) vnášen tenkou tryskou do průtokové kyvety (silnější kapilára)
- kapilárou proudí nosná tekutina (solný roztok, tzv. Sheath fluid)
- laminární průtok nosné tekutiny usměrní buňky do velmi tenkého proudu
 - částice se pohybují v jedné řadě za sebou



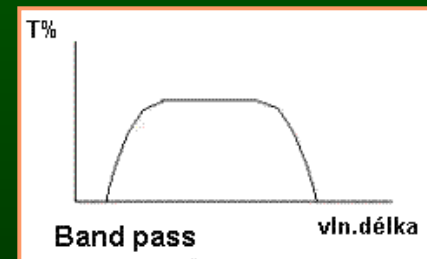
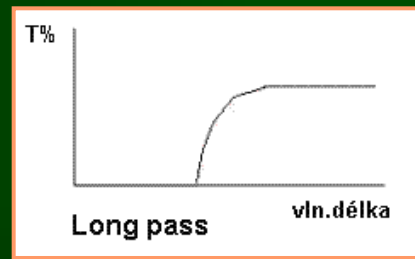
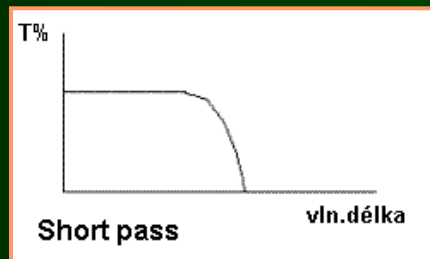
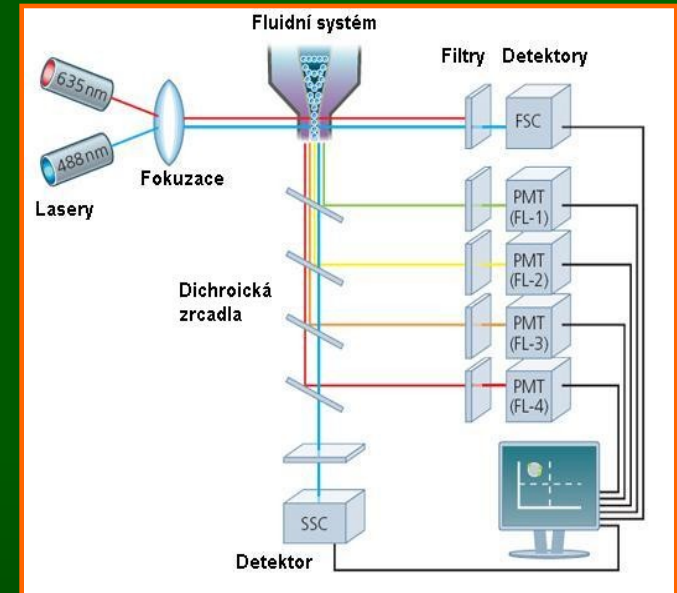
akustická fokuzace

- alternativní způsob usměrnění buněk
- využívá ultrazvukové vlny pro umístění buněk do osy kapiláry



Průtokový cytometr optický systém

- zdroj světla
 - laser, např. Ar (488 nm), He - Ne (635 nm)
 - rtuťová nebo xenonová lampa
- optická soustava pro rozdělení rozptýleného světla resp. fluorescenčního záření podle vln. délky
 - dichroická zrcadla
 - odráží světlo určité vlnové délky, jiné propouští
 - filtry - propouštějí pouze určité vlnové délky

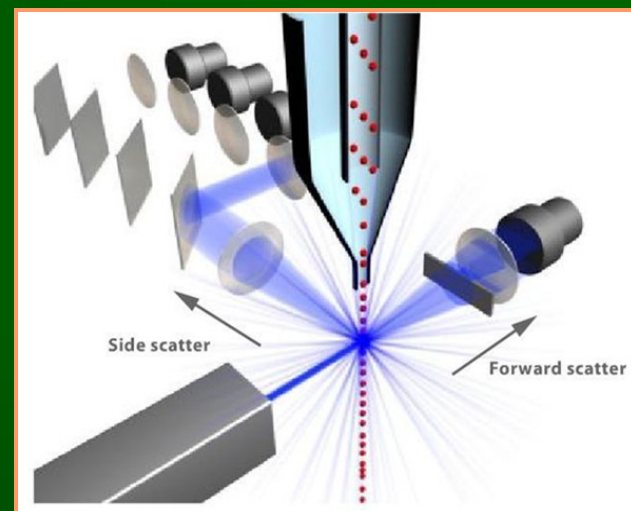


- detektory
 - diody (FSC a SSC)
 - fotonásobiče (PMT – photomultiplier tube)
 - zachycují fluorescenci pro každý fluorofor zvlášť v úhlu 90 st. od osy laserového paprsku

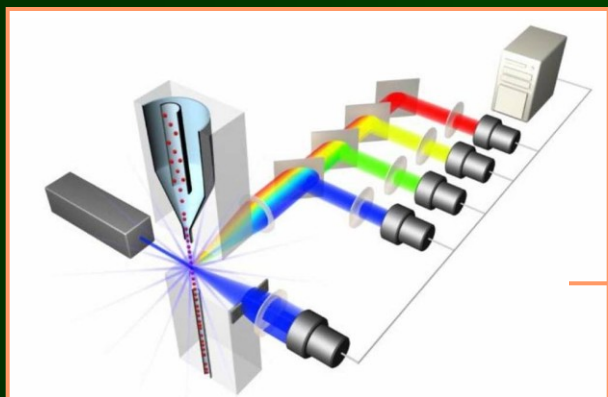
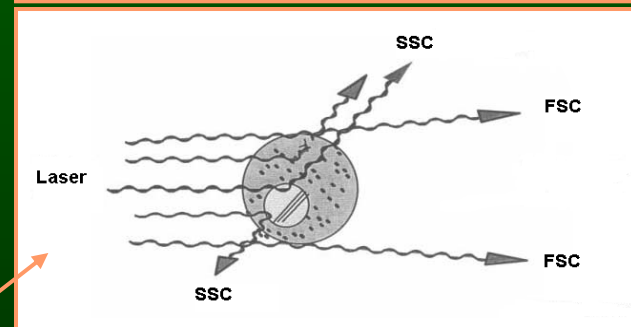


Základní parametry flow cytometrické analýzy

- Forward scatter channel – **FSC** (rozptyl světla v malém úhlu)
 - dioda měří signál v malém úhlu od osy paprsku
 - intenzita signálu přímo úměrná velikosti buněk



- Side scatter channel – **SSC** (boční rozptyl)
 - fotonásobič v úhlu 90 st. od osy laser. paprsku
 - informace o vnitřní struktuře buněk (granulace)

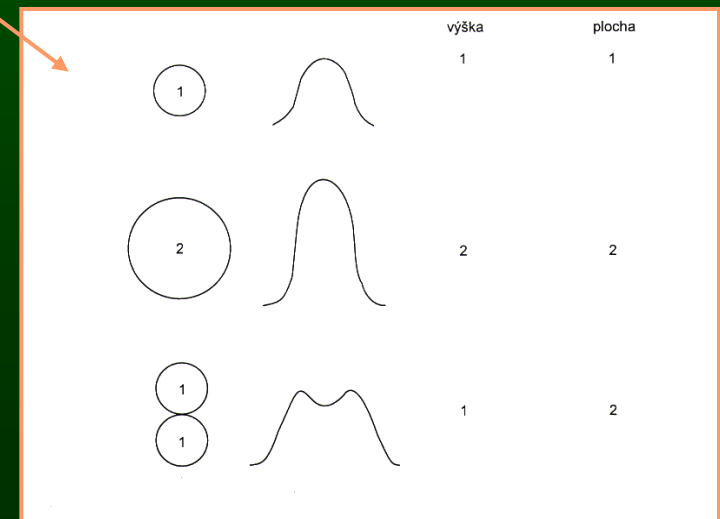
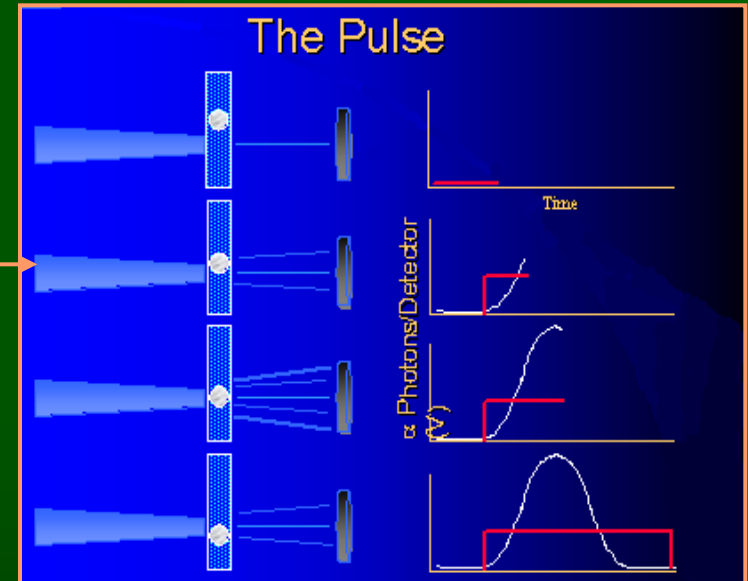


FSC + SSC - identifikace buněk v suspenzi

- Fluorescence - **FL**
 - informace o vnitřních strukturách buňky
 - o specifických membránových resp. cytoplazmatických molekulách

Flow cytometr – vyhodnocovací systém

- Světelné signály převedeny na elektrické impulzy
 - Zpravidla se měří „plocha“ elektrického signálu (integrál)
 - Jiná možnost zpracování signálu - měření výšky a šířky signálu pro odlišení agregátů buněk
- Elektrické signály zpracovávány počítačem
 - digitalizace, grafické znázornění
- Počítačové zpracování dat umožňuje tzv. gatování (elektronická selekce analyzovaných částic)

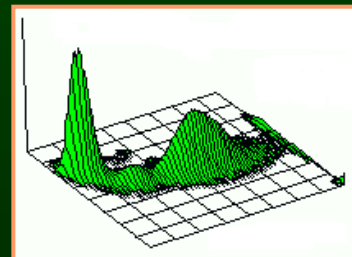
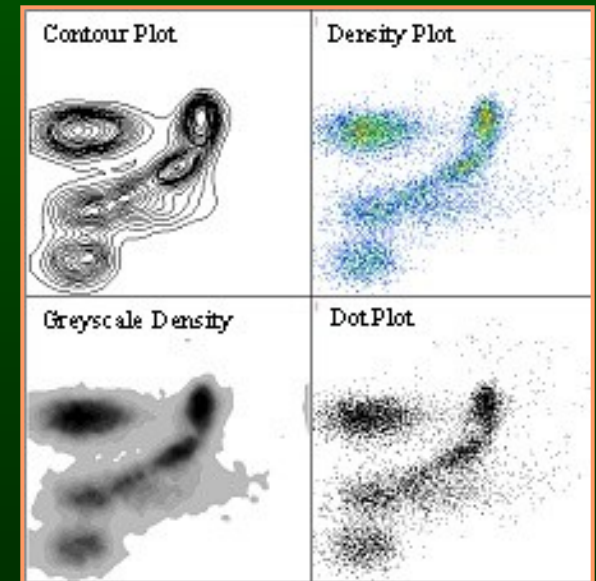
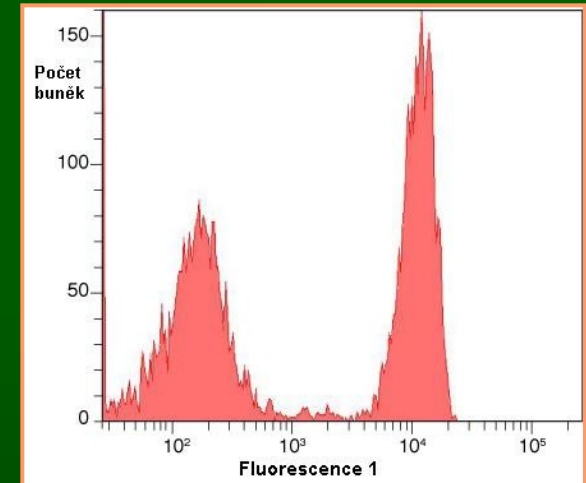


Zobrazování dat z flow cytometrické analýzy

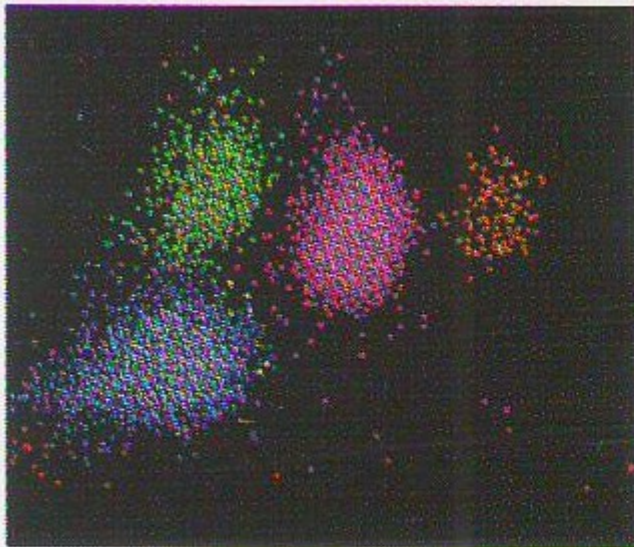
Výstup - výsledky v číselné nebo grafické formě

Grafické zobrazení:

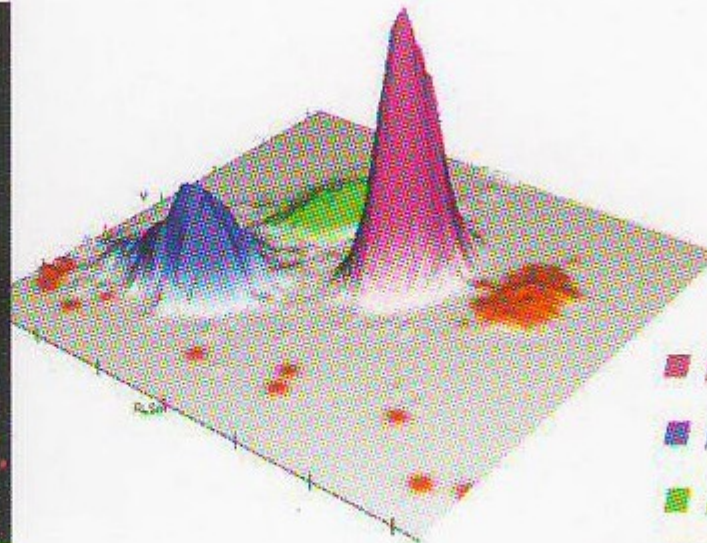
- jednoparametrové histogramy
 - osa x ...intenzita signálu FSC, SSC nebo FL
 - osa y ... četnost buněk
- dvouparametrové grafy
 - osa x ... intenzita jednoho měřeného parametru
 - osa y ... intenzita druhého parametru
 - množství buněk je znázorněno
 - hustotou bodů (tzv. dot-plot histogram)
 - vrstevnicemi (contour-plot histogram)
 - barvami znázorňujícími hustotu (density plot)
- Archivace dat
 - ve formě histogramů
 - ve formě souborů, které uchovávají všechny údaje o každé buňce



Zobrazování dat z flow cytometrické analýzy



Dif 1: Objem vs RMALS

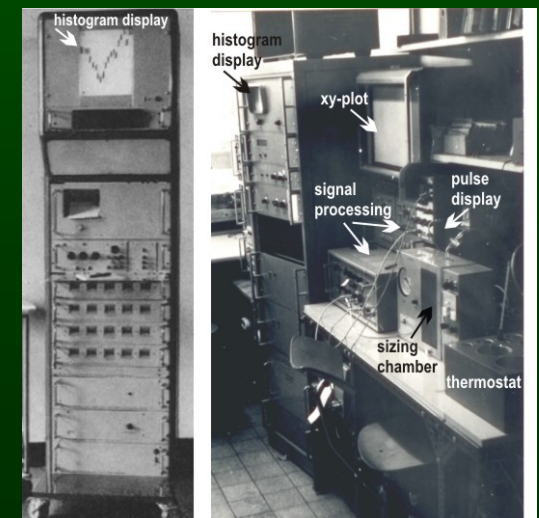
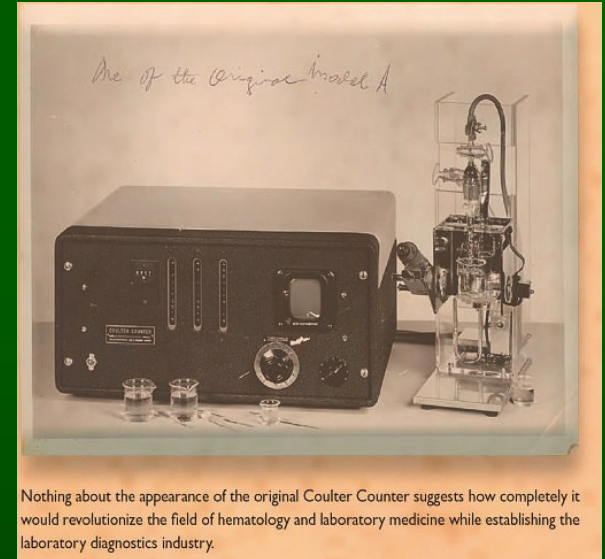


- Neutrofilly
- Lymfocyty
- Monocyty
- Eosinofily
- Drt'

Historie průtokové cytometrie

Counter (počítač buněk)

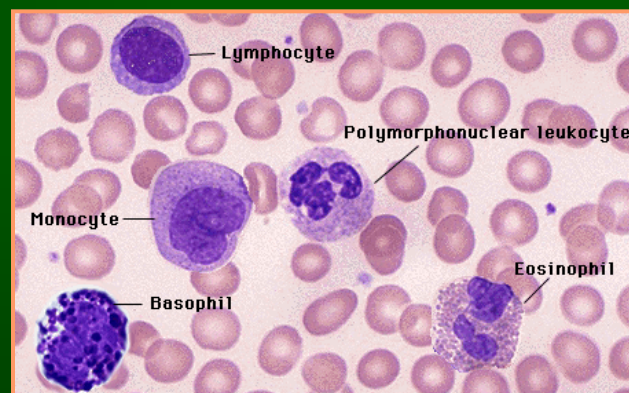
- 1953, USA, bratři Coulterové
- impedanční princip:
 - buňky usměrněné hydrodynamickou fokuzací ve vodivém roztoku
 - prochází mezi elektrodami (stejnoseměrné napětí, proud)
 - při průchodu buňky pulzní zvýšení el. odporu (impedanční pulz)
 - počet impulzů ... počet prošlých buněk
 - velikost impulzu ... objem buňky
- původní Coulter princip - stále používaný v hematologii
 - analyzátoři pro počítání krevních buněk
 - kombinace s dalšími technologiemi - rozptyl, fluorescence
- 1968 - fluorescenční flow cytometr
 - první flow cytometry byly přístroje pouze experimentální
 - původní název metody - „pulzní cytofotometrie“



Hematologické analyzátoři pro počítání krevních buněk

Stanovení počtu jednotlivých typů krvinek na principu průtokové cytometrie

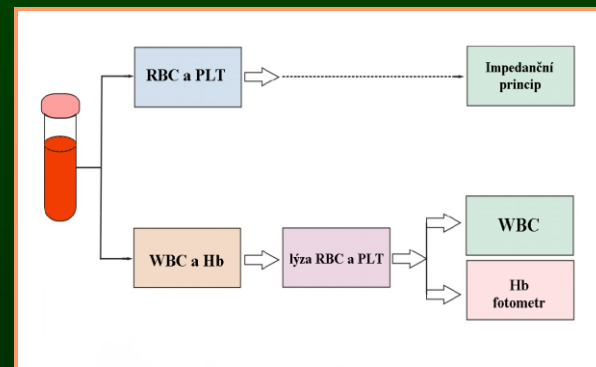
- počet erytrocytů (RBC – red blood cell),
- počet trombocytů (PLT - platelet),
- počet a morfologický typ leukocytů (WBC – white blood cell):
 - polymorfonukleáři (granulocyty)
 - neutrofilní
 - eozinofilní
 - bazofilní
 - mononukleáři
 - lymfocyty
 - monocyty
- a další (retikulocyty, Hb,...)



Princip stanovení na hematologickém analyzátoru

- krev rozvedena do tří cest:

1. erytrocyty a trombocyty - impedanční metoda
2. hemoglobin - spektrofotometrie v průtokové cele
3. neutrofilny, eozinofily, bazofily, lymfocyty, monocyty
- různé principy stanovení – dle výrobce



Příklady technických řešení stanovení leukocytů

Beckman Coulter

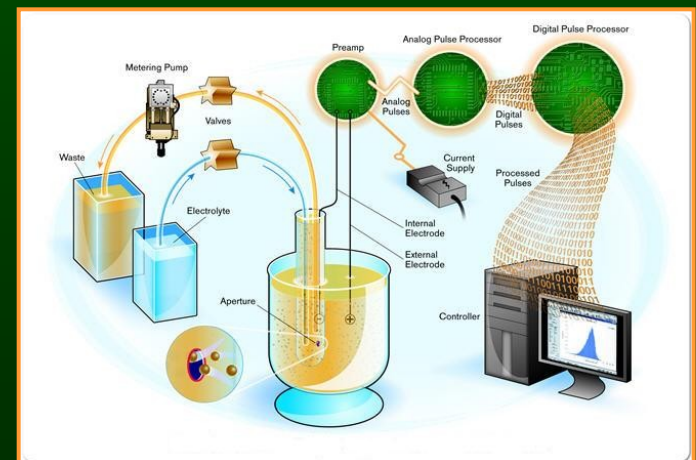
Elektrooptická flow cytometrie VCS (V – volume, C – conductivity, S – scatter)

- destrukce erytrocytů a trombocytů lyzačním činidlem
- leukocyty zůstávají konstitučně neporušeny - detekce
 - impedanční metodou (počet a objem buněk – V)
 - vysokofrekvenčním střídavým el. polem (vnitřní struktury buněk - nevedou el. proud – C)
 - rozptylem laserového paprsku (tvar buňky, povrch – S)
- měření všech tří parametrů simultánně na každém leukocyty
- softwarové zpracování
 - roztřídění buněk do skupin
 - zobrazení – histogram
 - počet buněk

COULTER® Ac-T diff™ Analyzer



Impedanční princip (Coulter)



Příklady technických řešení stanovení leukocytů

Sysmex

- optická metoda – fluorescenční průtoková cytometrie
- pro měření leukocytů - dva měřící systémy (kanály):
 - 1. systém - měření neutrofilů, eozinofilů, monocytů a lymfocytů
 - destrukce erytrocytů a trombocytů lyzačním činidlem
 - perforace membrány leukocytů
 - obarvení DNA a RNA v jádře i cytoplazmě – fluorescenční barvivo
 - navázání organických kyselin z lyzačního činidla na eozinofilní granula
 - zvýšení signálu - odlišení eozinofilů od neutrofilů
 - expozice polovodičovým laserem
 - **SSC** odpovídá lobularitě, tj. členitosti jádra a přítomnosti granulí v cytoplazmě
 - **fluorescence** odpovídá množství nukleových kyselin
 - 2.systém - měření bazofilů
 - destrukce všech buněk kromě bazofilů druhým lyzačním činidlem
 - z ostatních WBC zůstávají jen holá jádra
 - **FSC** - velikost částice
 - **SSC** - vnitřní struktura

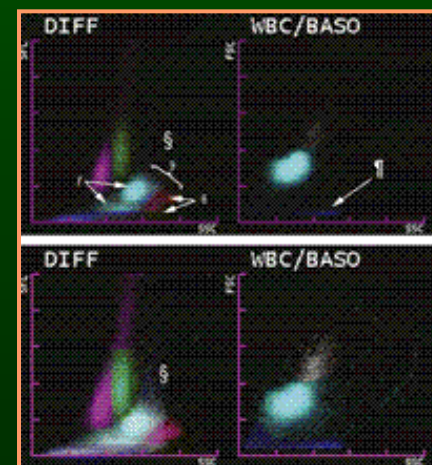
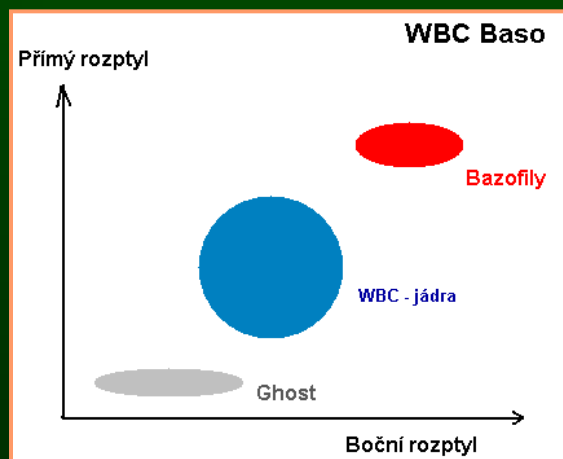
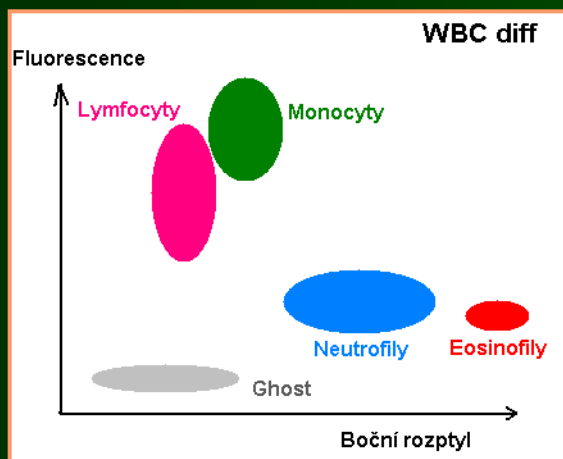
Příklady technických řešení



XE-5000™ Automated Hematology systém



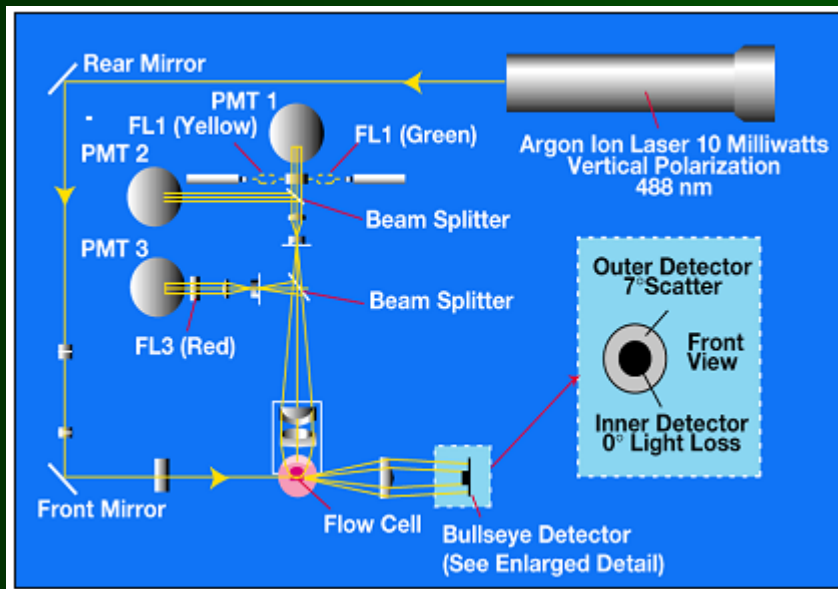
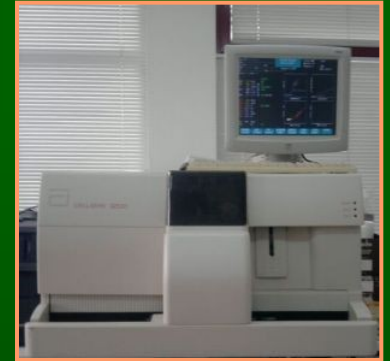
XE-2100™ Automated Hematology System



Příklady technických řešení stanovení leukocytů

Abbott

- **MAPSS** technologie (Multi Angle Polarized Scatter Separation)
- interakce buněk s polarizovaným paprskem argonového laseru
- rozptýlené světlo měřeno v různých úhlech
- v kolmém směru sledována míra depolarizace paprsku buňkou
- buňky rozlišeny na základě rozptylu světla
- odlišení eozinofilů (od neutrofilů) na základě schopnosti depolarizovat světlo



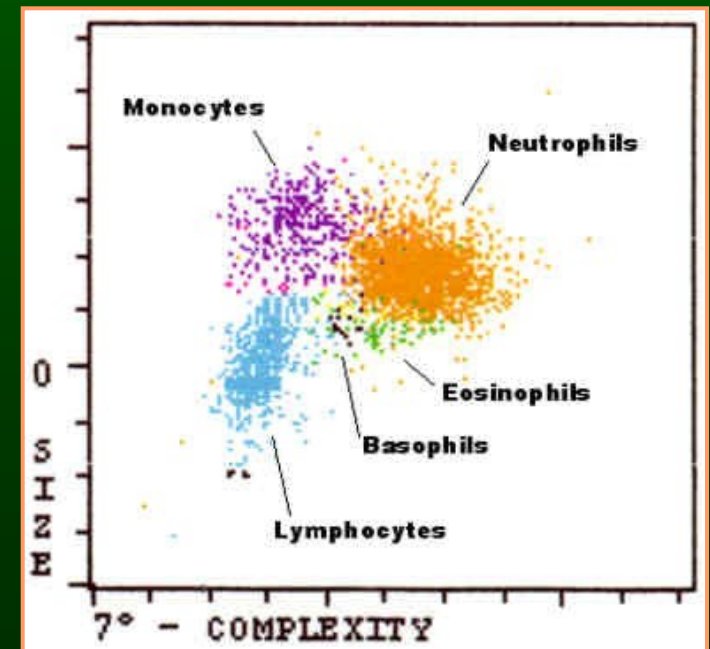
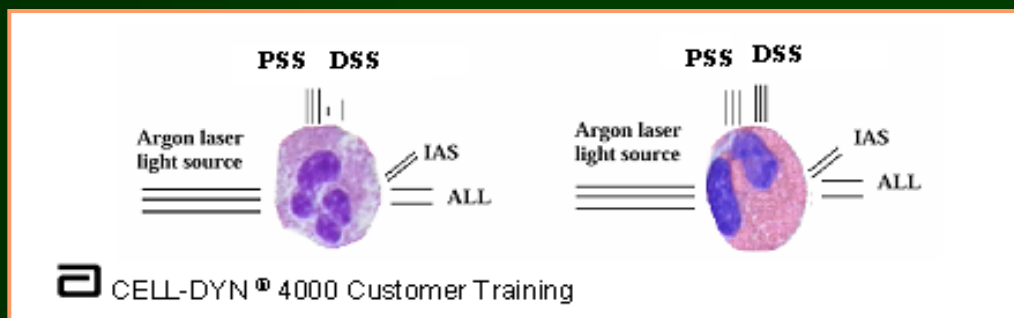
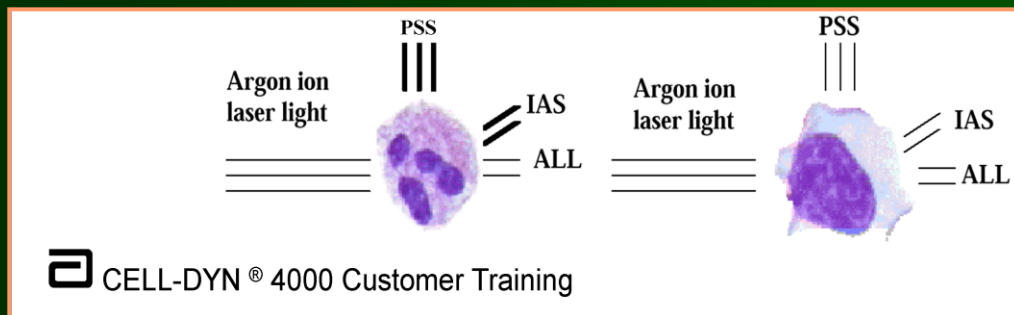
Optický systém analyzátoru CELL-DYN 4000

- Polarizovaný paprsek Ar laseru zrcadly usměrněn do průtokové cely
- Interakce buněk s paprskem
- detektor „buvolí oko“ - detekce rozptylu světla pod úhlem 0 a 7 st.
- 3 fotonásobiče – detekce
 - depolarizované rozptýlené světlo z eozinofilů
 - rozptýlené světlo pod úhlem 90 st.
 - příp. fluorescence

Příklady technických řešení stanovení leukocytů

Abbot

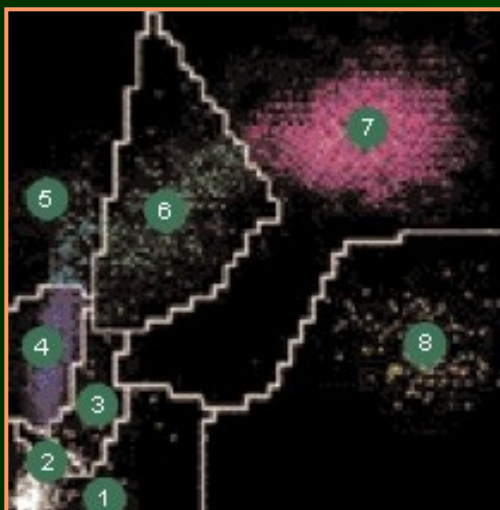
- **ALL** - úbytek světla pod úhlem 0° - velikost buňky (měřeno ve středové části detektoru)
 - srovnání intenzity paprsku při průchodu buněk s plnou intenzitou paprsku za nepřítomnosti buněk
- **IAS** - rozptýlené světlo pod úhlem 7° - komplexita buňky (měřeno ve vnější části detektoru)
- **PPS** - rozptýlené světlo měřené pod úhlem 90° - členitost buněčného jádra (lobularita)
- **DPS** - rozptýlené depolarizované světlo měřené pod úhlem 90° - granularita a odlišení eozinofilů od neutrofilů
 - granula obsažená v eozinofilech světlo při rozptylu depolarizují



Příklady technických řešení stanovení leukocytů

Siemens

- cytochemická tzv. Perox metoda
- buňky cytochemicky obarveny na přítomnost intracelulární myeloperoxidázy
- interakce buněk se světlem wolframové žárovky v průtokové cele
- hodnocení:
 - velikost (objem) buňky - rozptyl světla
 - myeloperoxidázová aktivita buněk – absorpce světla
 - neutrofilů, monocytů a eosinofilů – pozitivní na myeloperoxidázu
 - lymfocytů a bazofilů – negativní na myeloperoxidázu
 - scattergram s vyznačením klastrů (oblastí pro jednotlivé populace)



1,2,3...šum, RBC, PLT
4...lymfocyty a bazofily
5...velké nebarvitelné buňky
6...monocyty
7...neutrofilů
8...eozinofily

Siemens Advia 120



Flow cytometrie v močové analýze

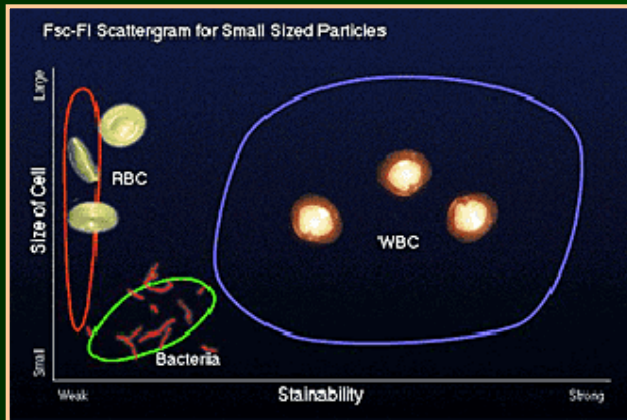
Analyzátoary močového sedimentu UF (Sysmex)

- Principy - impedanční měření, rozptyl světla a fluorescence
- RBC, WBC, epitelie, hyalinní válce, patologické válce, bakterie, kvasinky, spermie, krystaly a „jiné buňky“
- necentrifugovaná moč naředěna dilučním pufrem - stabilizace osmotického tlaku
- obarvení vzorku dvěma fluorescenčními barvivy
 - membrány (karbocyanin)
 - nukleové kyseliny (fenantridin)
- hydrodynamická fokuzace
- impedanční měření (objem buňky)
- průchod částic paprskem Ar laseru (488 nm)
 - intenzita FSC (velikost částice)
 - šířka FSC pulzu (délka částice)
 - SSC (povrch částice)
 - intenzita fluorescence (odráží barvitelnost)
 - šířka pulzu fluorescence (délka obarvené části)
- zobrazení pomocí scattergramů

Sysmex UF-100

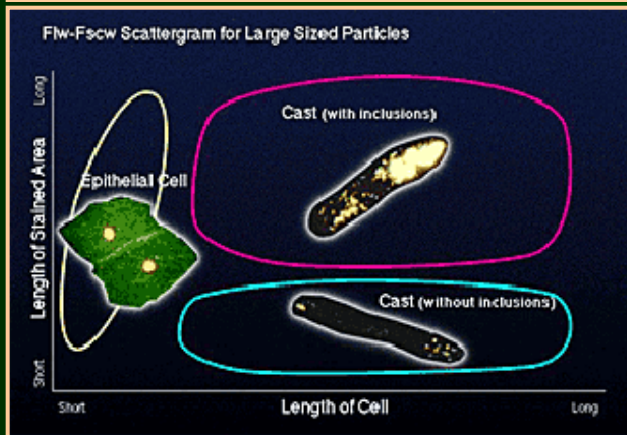


Flow cytometrie v močové analýze



Scattergram malých částic

- Závislost intenzity FSC signálu (velikost částic – Size of Cell) na intenzitě fluorescence (barvitelnost částice - Stainability)



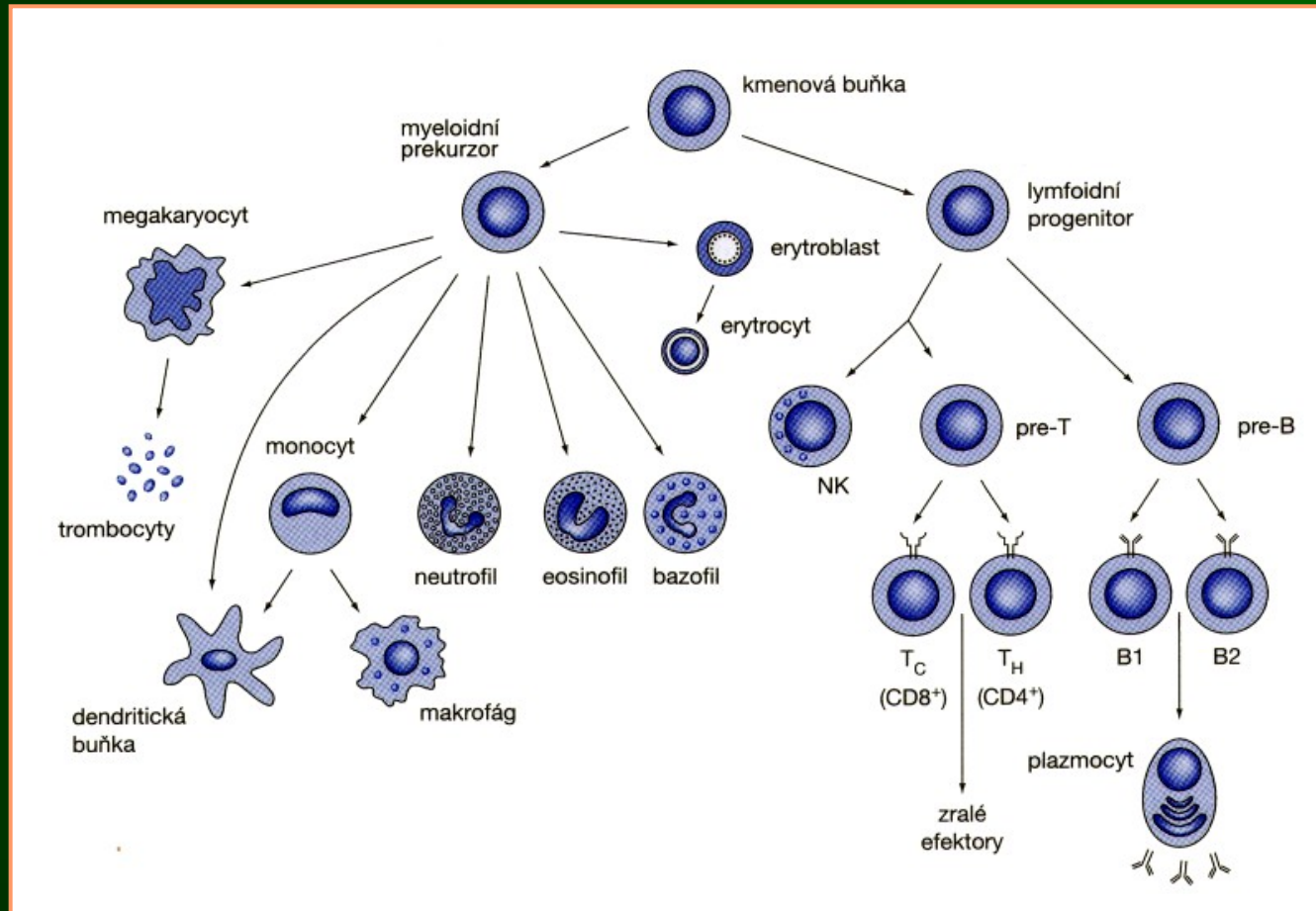
Scattergram velkých částic

- Závislost šířky signálu fluorescence (délka obarvené části – Length of Stained Area) na šířce FSC signálu (délka částice – Length of Cell)
- epitelie
- válce hyalinní (without inclusions)
- válce patologické (with inclusions)

- ▼ nemožnost kvalitativního popisu položek, rozpoznání zřídka se vyskytujících komponent
- ▲ možnost diferenciální diagnostiky hematurií na základě distribuční křivky erytrocytů a jejich morfologie, příp. analýzy jiných tělních tekutin (mozkomíšní mok, ...)

Flow cytometrie - buněčná imunologická vyšetření

- Buňky imunitního systému



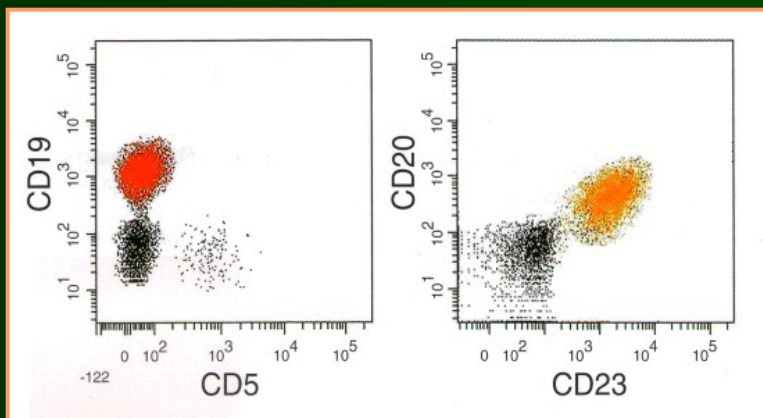
Flow cytometrie - buněčná imunologická vyšetření

Imunofenotypizace leukocytů průtokovou cytometrií

- zjišťování povrchových molekul (CD znaků)
 - některé společné pro více druhů leukocytů - zajišťují společné základní funkce
 - jiné přítomné specificky pouze na určité subpopulaci

Princip:

- Inkubace buněk v plné krvi s monoklonální protilátkou proti vyšetřovanému CD znaku
 - protilátka označena fluorescenčním barvivem (přímá fluorescence)
 - buňky lze označit současně více fluorochromy – detekce více znaků najednou
- vazba protilátky na buněčnou strukturu vyhodnocována průtokovou cytometrií
- počítačové zpracování naměřených dat - tzv „gatování“ (elektronické ohraničení)



- lze získat údaje o subpopulaci buněk charakterizovaných na základě jiného znaku
 - např. zastoupení znaku CD4 na CD3 pozitivních buňkách
 - (CD3 je typický pro T-lymfocyty, kombinace CD3 a CD4 signálu z nich vyselektuje Th lymfocyty)

Imunofenotypizace leukocytů průtokovou cytometrií

Reagencie a postupy

- fluorescenčně značené monoklonální protilátky
 - přímá imunofluorescence
 - protilátka proti zkoumanému antigenu je označena fluoroforem
 - výhodou přímé fluorescence je jednodušší zpracování vzorku
 - nepřímá fluorescence
 - protilátka proti zkoumanému antigenu není značena
 - k její detekci se používá značená protilátka proti této protilátce
 - pokud neexistuje Ab (proti zkoumanému Ag) ve formě konjugátu s fluorochromem
 - sledování slabě exprimovaného antigenu (nepřímá FL - intenzivnější signál)

Tab. 1: Samostatné fluorochromy nejčastěji používané v průtokové cytometrii

Fluorochrom	Vlnová délka excitace (nm)	Vlnová délka maximální absorpce (nm)	Vlnová délka maximální emise (nm)	Fluorescenční barva
Alexa Fluor 405	405, 407	401	421	
Alexa Fluor 430	405, 407	433	541	
Alexa Fluor 488	488	495	519	
Alexa Fluor 633	633, 635, 647	632	647	
Alexa Fluor 647	633, 635, 647	650	665	
Alexa Fluor 660	633, 635, 647	663	690	
Alexa Fluor 680	633, 635, 647	679	702	
Alexa Fluor 700	633, 635, 647	702	723	infračervená
APC	633, 635, 647	650	661	
FITC	488	490	525	
Pacific Blue	405, 407	410	455	
PerCP	488	490	675	
Phycoerythrin	488	490, 565	578	

Tab. 2: Tandemové fluorochromy nejčastěji používané v průtokové cytometrii

Fluorochrom	Vlnová délka excitace (nm)	Vlnová délka maximální absorpce (nm)	Vlnová délka maximální emise (nm)	Fluorescenční barva
APC-Alexa Fluor 750	633, 635, 647	650	779	infračervená
APC-Cy5.5	633, 635, 647	650	695	
APC-Cy7	633, 635, 647	650	785	infračervená
PerCP-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Alexa Fluor 610	488	496, 546	627	
PE-Alexa Fluor 647	488	496, 546	667	
PE-Alexa Fluor 680	488	496, 546	702	
PE-Alexa Fluor 700	488	496, 546	723	infračervená
PE-Alexa Fluor 750	488	496, 546	779	infračervená
PE-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Cy5	488	496, 546	667	
PE-Cy7	488	496, 546	785	infračervená
PE-Texas Red	488	496, 546	615	

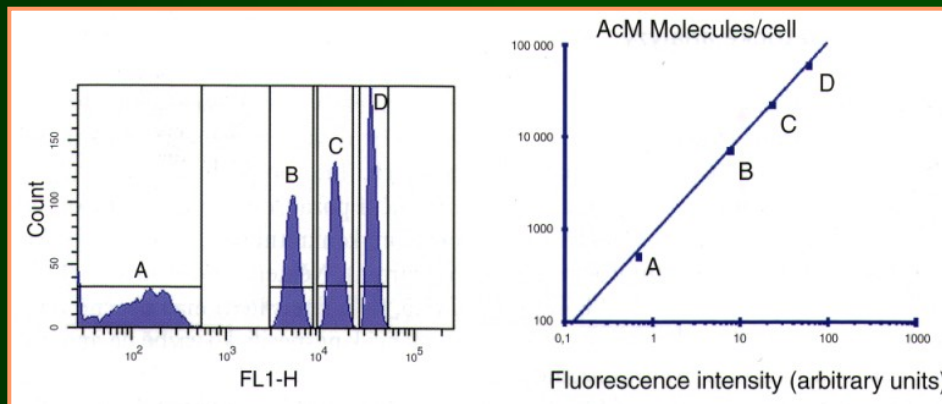
fluorochromy pro značení Ab – samostatné

- tandemové (excitace primárního aktivuje sekundární fluorochrom)

Imunofenotypizace leukocytů průtokovou cytometrií

Reagencie a postupy

- reagencie pro fixaci, lyzaci RBC nebo permeabilizaci membrán leukocytů
 - permeabilizace - šetrné poškození membrány (zprůchodnění pro reagencie)
 - vyšetřování cytoplazmatických nebo jaderných antigenů
 - vyšetřování obsahu buněčné DNA a RNA atd.
- **Kvantimetrie** - určení množství (intenzitu exprese) antigenu na jednotlivých buňkách na základě množství navázané protilátky
 - srovnání signálu buněk s kalibrační křivkou
 - kalibrační částice - kuličky se známým množstvím navázaného fluorochromu

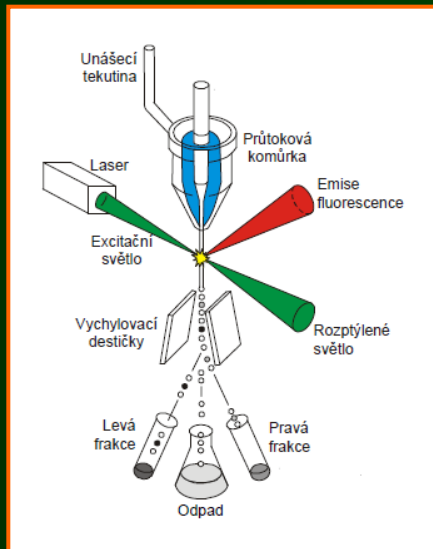
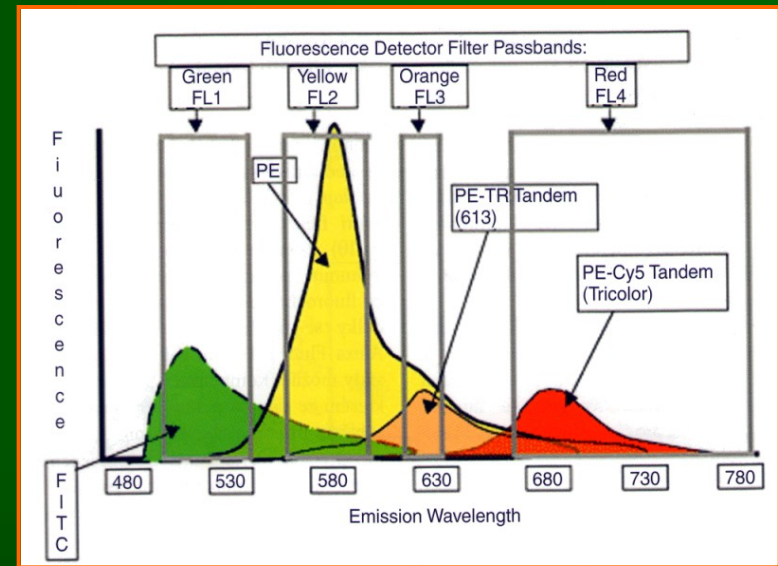


- použití času jako jednoho z parametrů - lze provádět i kinetické studie
 - např. měření změn hladin intracelulárního kalcia, stanovení aktivity intracelulárních enzymů...

Flow cytometrie - buněčná imunologická vyšetření

Přístroje

- flow cytometry se složitým optickým systémem
 - více laserů a detektorů pro fluorescenci různých vlnových délek)
- možnost softwarové kompenzace překryvu emisních spekter fluorochromů
 - při multibarevné analýze



- cytometr se „sorterem“ - zařízení pro třídění buněk do frakcí
 - fokuzovaný proud buněk prochází vibračním mechanismem
 - rozpad proudu na jednotlivé kapičky
 - každá obsahuje pouze jednu buňku
 - po průchodu paprskem buňkám udělován el. náboj (+ nebo -)
 - nabité buňky rozděleny do sběrných zkumavek elektrostaticky
 - pomocí nabitých vychylovacích destiček
 - Calibur Becton–Dickinson, iCyt Eclipse, Partec CyFlow aj.

Flow cytometrie - multiplexové metody

- Flow cytometrie - dokáže detegovat jakékoli částice velikosti řádově v μm
 - např. inertní mikrosféry (kuličky) obarvené různými fluorochromy
 - viz kalibrace flow cytometrů (kvantimetrie)

Multiplexové systémy - stanovení velkého počtu analytů z minimálního objemu vzorku

- planární, které jsou vlastně rozšířením ELISA metody
- „bead-based“ multiplex. analýzy (na mikrosférách) - zpracovávají flow cytometrií
- inertní polystyrenové mikrosféry (kuličky, beads) obarvené různými fluorochromy
 - pevná báze pro multiplexové analýzy



Flow cytometrie - multiplexové metody

- mikrosféry obarveny dvěma fluorescenčními barvivy
 - kombinace - až 500 různých barevných odstínů (typů) mikrosfér
- na každém typu mikrosféry navázaná specifická protilátka nebo proba rozpoznávající a vázající určitou molekulu
 - antigen, protilátka, receptor, substrát enzymu, DNA, RNA atd.
- smísení mikrosfér se vzorkem
- specifické navázání příslušného analytu ze vzorku na povrch mikrosféry
- přidání fluorescenčně značené protilátky proti navázanému analytu
- vyhodnocení suspenze flow cytometrií
 - registrace zbarvení vlastní mikrosféry (identifikace navázaného analytu)
 - kvantifikace analytu na základě intenzity fluorescence značené protilátky



Flow cytometrie - multiplexové metody

- **Luminex xMAP (Multiple Analyte Profiling)**
 - teoreticky umožňuje 50 – 500 simultánních analýz
 - Luminex dodává řada firem, např. Applied Cytometry System, BioRad, Invitrogen, Millipore a další.
 - systém Luminex vyžaduje speciální flow cytometry
- **CBA (Cytometric Bead Array)** firmy BD Bioscience
 - dovoluje simultánní stanovení 30-ti analytů
 - lze provádět na jakémkoli multibarevném flow cytometru
- **Beckman Coulter**
 - místo kombinace dvou barev na mikročástici využívá kombinaci dvou mikrosfér pro každou metodu
- **Aplikace:**
 - cytokiny
 - chemokiny
 - růstové faktory
 - zánětlivé markery
 - kardiální markery
 - tumormarkery
 - hormony
 - specifické IgE
 - izotypy imunoglobulinů
 - protilátky
 - fosfoproteiny
 - intracel. signální molekuly
 - HLA testování
 - genotypizace
 - a další

Děkuji za pozornost...

Flow
Cytometrie...?



???