

Průtoková cytometrie

Princip a využití ve zdravotnictví



Lucie Říhová

Oddělení klinické hematologie, FN Brno - NBP

Průtokový cytometr

- poprvé použit v 60. letech k měření objemu buněk
- specializovanější varianta fluorescenčního mikroskopu v kombinaci s krevním analyzátozem, nyní až 30 fluorescencí
- analýza fyzikálních, chemických a biologických vlastností až 20×10^6 buněk v suspenzi
- možnost sortování - separace raritních populací buněk

Klinické průtokové cytometry



Cytomics FC500 (Beckman Coulter)



BD FACSCantoII (BD Biosciences)



Omnicyt (Cytognos)



DxFLEX (Beckman Coulter)



BD FACSLyric (BD Biosciences)



Bricyte (Mindray)



Průtoková cytometrie

- umožňuje simultánní analýzu mnoha tisíců buněk za sekundu
- buňky (částice) procházejí přes paprsek laseru
 - mění jeho kvalitativní i kvantitativní vlastnosti
- rozptýlené či druhotně emitované světlo (fluorescence) pak dopadá na detektory, kde je konvertováno na elektronický signál
- získá mnoha parametrů - velikost, granularita, fluorescence...

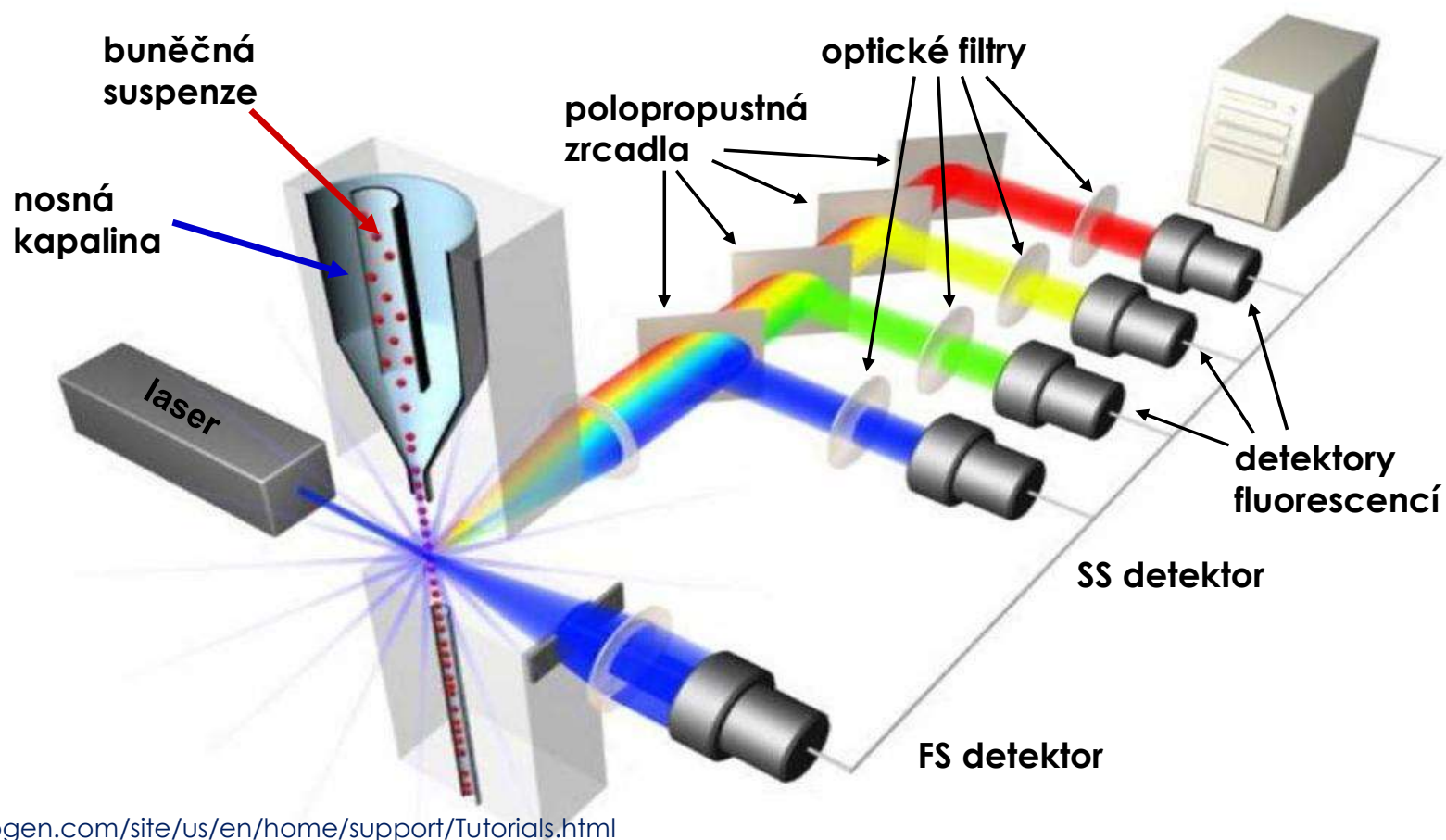
Měřitelné buněčné parametry

- **Expres proteinů - povrch, cytoplazma, jádro (imunofenotypizace)**
- **Posttranslačně modifikované proteiny - vč. fosforylovaných proteinů**
- **RNA - lncRNA, miRNA a mRNA transkripty**
- **Buněčný status - živé bb, pozdně apoptotické a neviabilní**
- **Buněčný cyklus - analýza buněk v G0/G1 fázi vs. S fázi, G2, případně stanovení ploidie, včetně detekce proliferace a aktivace**
- **Identifikace a charakterizace různých buněčných subsetů v rámci heterogenního vzorku pomocí imunofenotypizace**

Složení průtokového cytometru

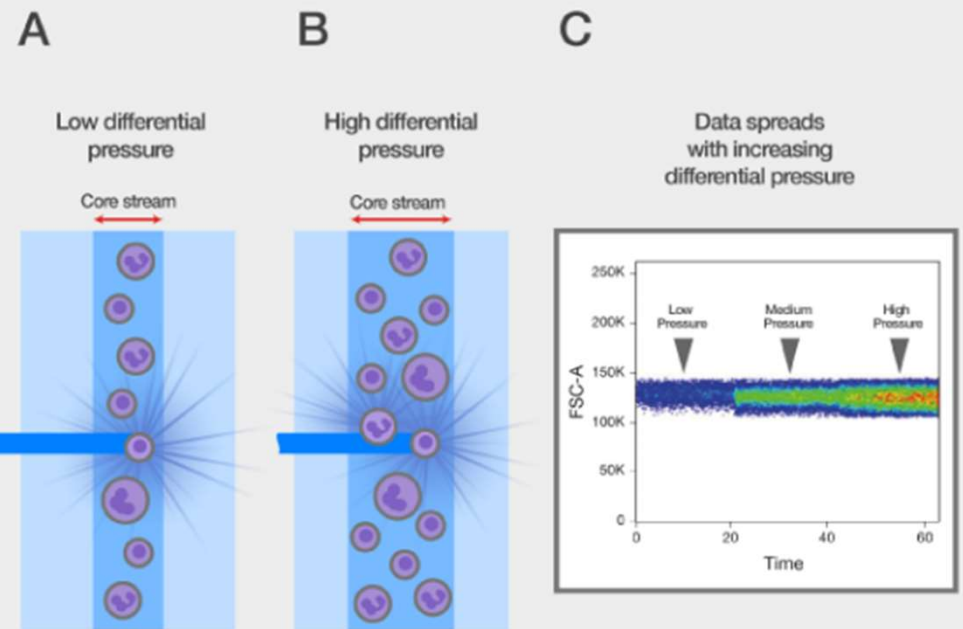
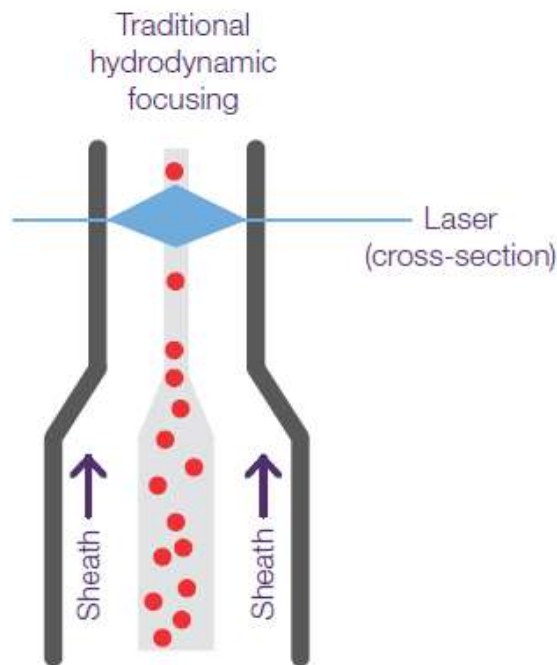
1. Fluidika - směřování vzorku do laserového paprsku a usměrňování jeho toku
2. Zdroj světla - signál z rozptylu na buňkách a aktivace fluorescence navázaných barev
3. Optika - sdružení a rozdělení rozptýlených paprsků dle vln. délky pomocí filtrů a zrcadel na příslušné detektory
4. Elektronika a počítačový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

Složení průtokového cytometru



Fluidika - usměrňování vzorku

Hydrodynamická fokusace



invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

Molecular Probes School of Fluorescence

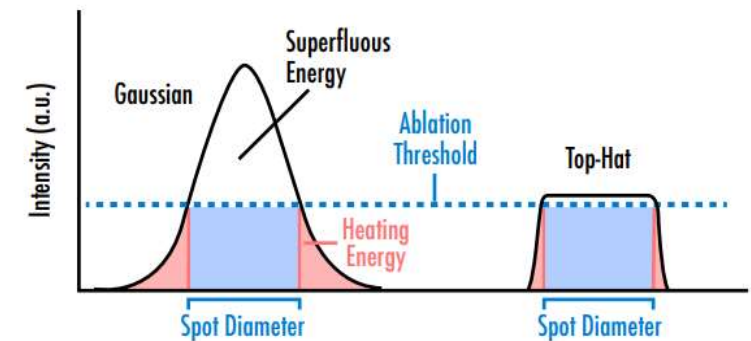
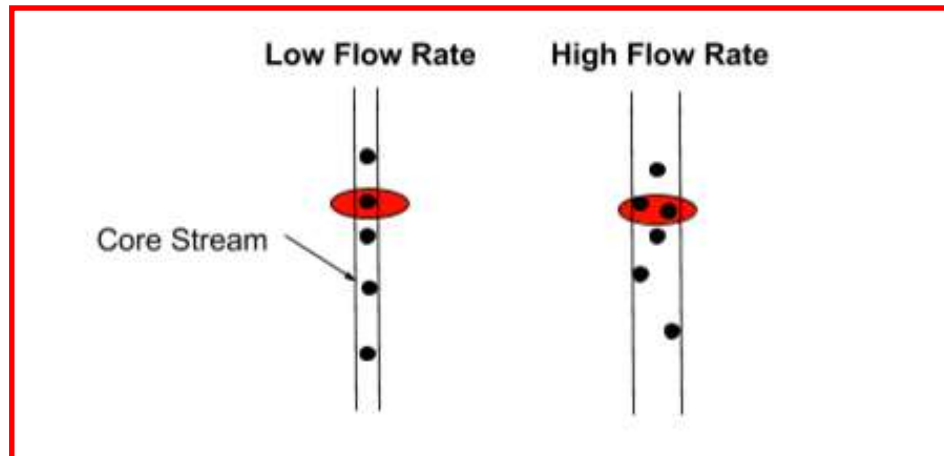
Zdroj světla

LASER = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

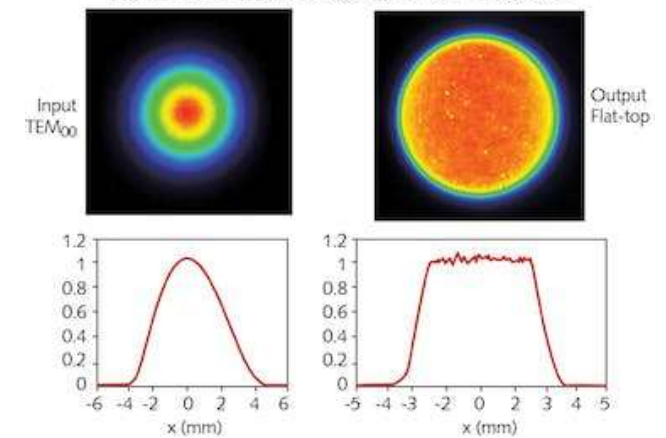
- stálý koherentní zdroj paprsků světla o určité vlnové délce λ
- přesné zacílení co největšího počtu fotonů do co nejmenšího bodu
- dle aktivního média (k pumpování energie)
 - plynové, kapalinové
 - pevnolátkové (polovodičové/diodové) → malé, opt. poměr příkon/výkon, nepotřebují dlouhý zahřívací čas (s)

Paprsek laseru

- většina laserových paprsků má profil Gaussovy křivky
- snížení symetrie ozáření se vzdáleností od centra paprsku
- vysoká rychlost průtoku vzorku = nerovnoměrné ozáření
- využití tzv. flat top laserů

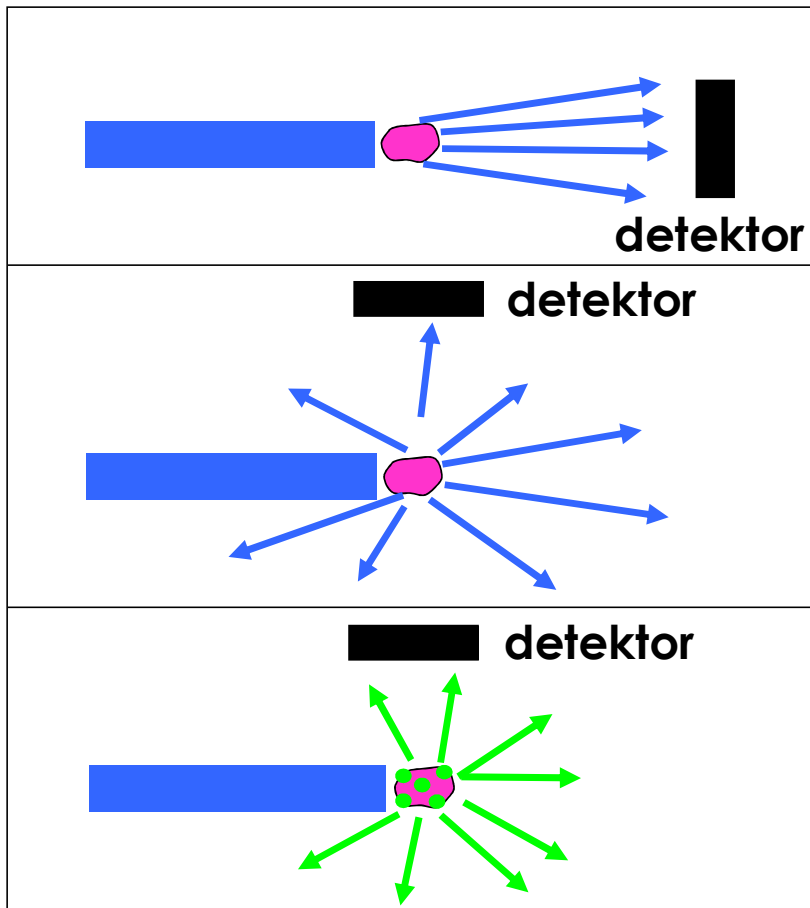


Example of beam shaping for a TEM₀₀ laser



<https://www.edmundoptics.de/knowledge-center/application-notes/optics/why-use-a-flat-top-laser-beam/>
<https://www.laserfocusworld.com/optics/article/14197298/flattop-laser-beams-their-uses-and-benefits>
<https://expert.cheekyscientist.com/what-is-a-flow-cytometry-laser-how-flow-cytometry-optics-function/>

Světlo vs. buňka



Forward Scatter

- rozptyl světla v malém úhlu
- velikost buňky

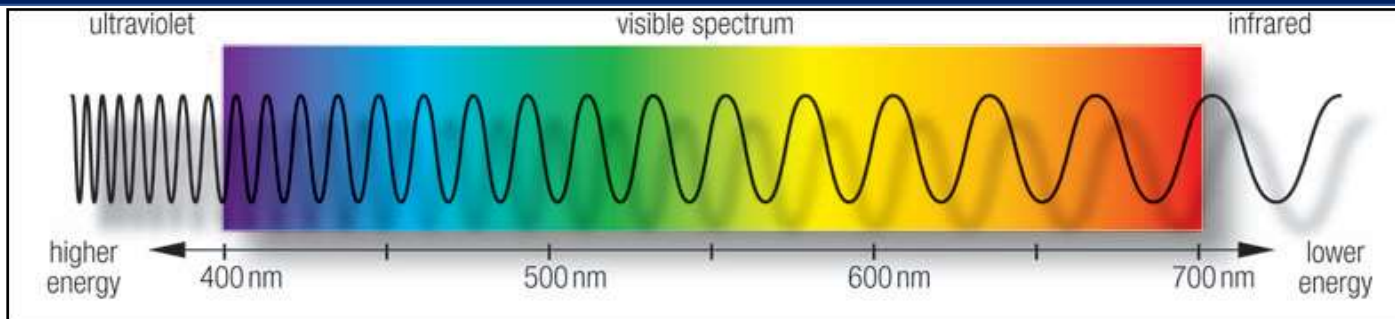
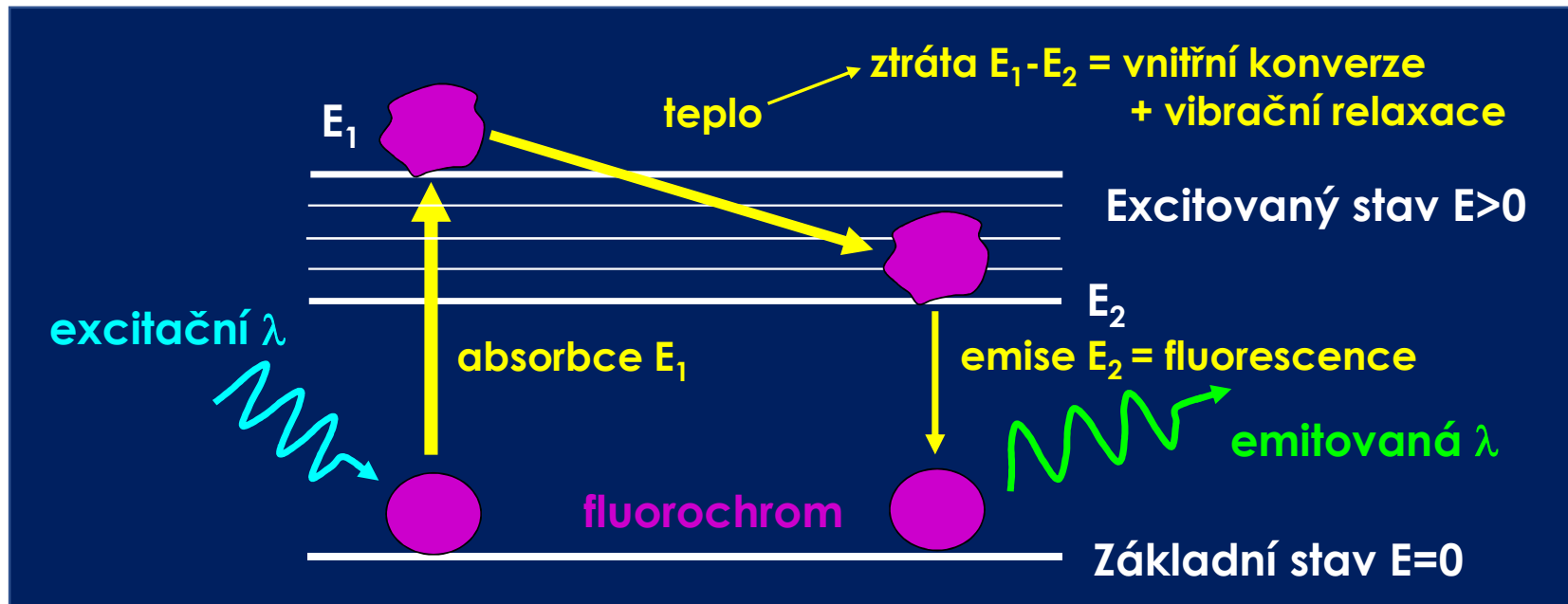
Side Scatter

- rozptyl světla pod úhlem 90°
- komplexita buňky

Fluorescence

- snímána pod úhlem 90°
- přítomnost fluorochromu

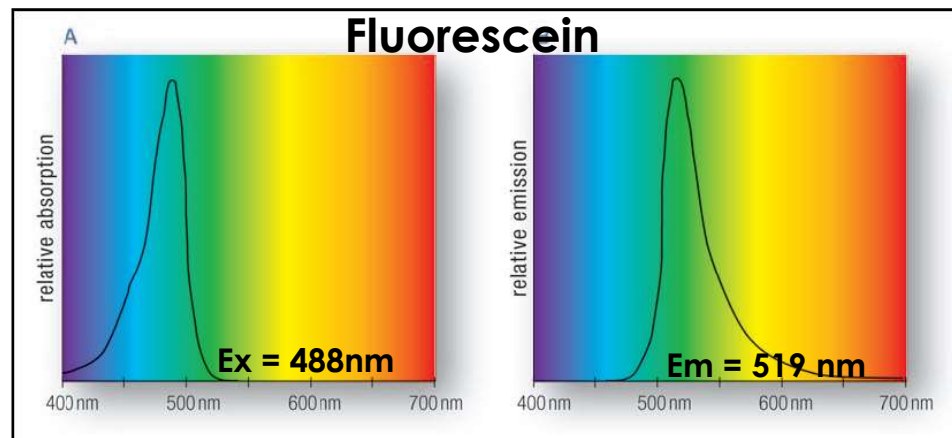
Fluorescence I.



Fluorescence II.

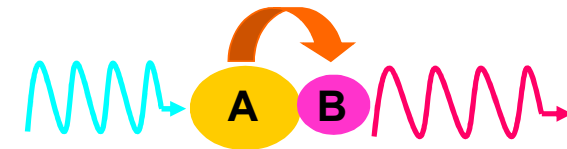
- Stokesův posun

- λ excitace \neq λ emise



- Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET

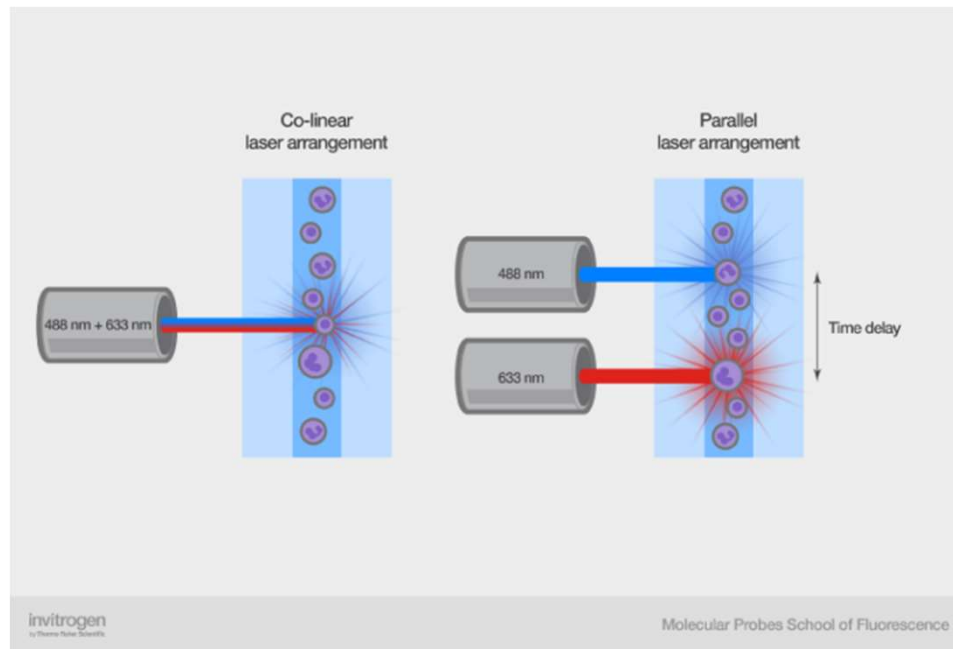
- excitovaný donor A předá energii a fluoreskuje B
- tandemové konjugáty - citlivé na světlo (PC5, PC7, APC-Cy7...)



Uspořádání laserů

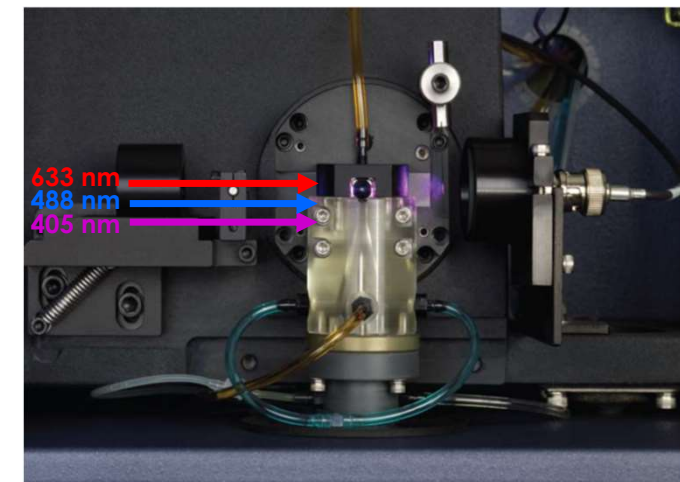
Flow cell = průtoková komůrka

- Interakce laserů s buňkami



Paralelní uspořádání laserů

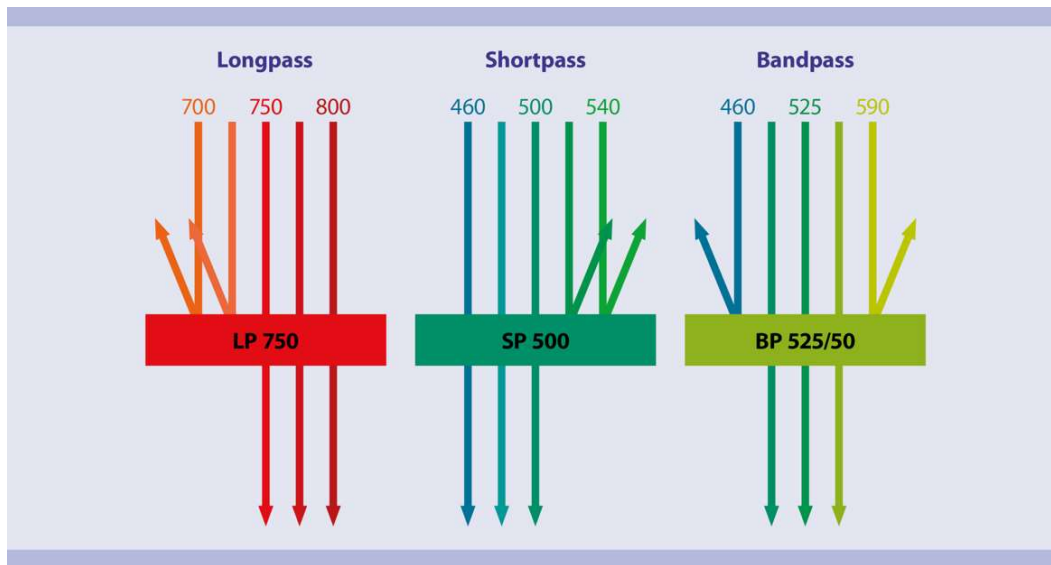
- časové zpoždění
- vyšší počet fluorochromů



Optika I.

Optické filtry a dichroická zrcadla

- propustnost pro dané λ a blokace/odraz jiných
- znalost vlastního cytometru nezbytná



575 nm Short Pass Filter

FACSria Detector Configuration

Laser	Detector Name	Band Pass Filter	Dichoric Filter	Fluorochrome Detected
Blue laser (488nm)	A	780/60	755LP	PE-Cy7
	B	710/50	685LP	PerCP-Cy5.5
	C	660/20	635LP	PE-Cy5
	D	610/20	600LP	PE-Texas Red
	E	585/15	570LP	PE
	F	530/30	505LP	FITC
	G	488/10	Blank	SSC
	H	Blank		FSC PMT
Yellow laser (561nm)	A	610/20	600LP	PE-Texas Red
	B	590/40	570LP	RFP
	C	Blank		n/a
Red laser (635nm)	A	780/60	755LP	APC-Cy7
	B	660/20	Blank	APC
	C	Blank		n/a
Violet laser (407nm)	A	585/42	570LP	QDot 585
	B	525/50	505LP	Am Cyan
	C	450/50		Pacific Blue

Light source

>540 nm light reflected

Optika II.

Detekční systém/optická lavice

Odraz světla = nižší ztráty E

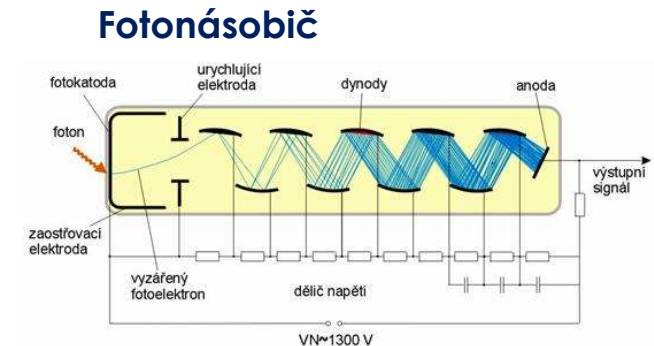
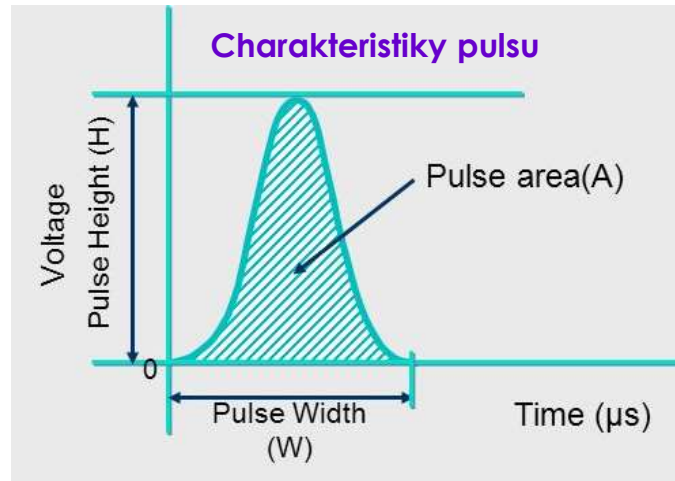
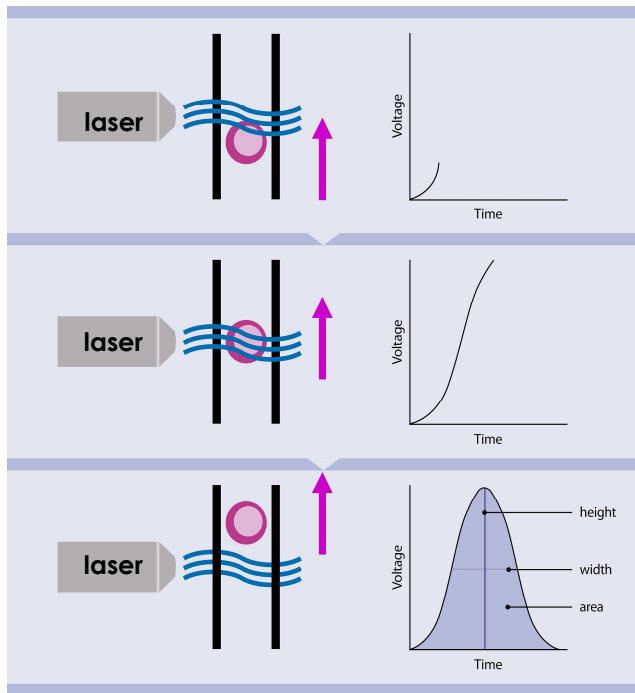


Průchod světla = vyšší ztráty E



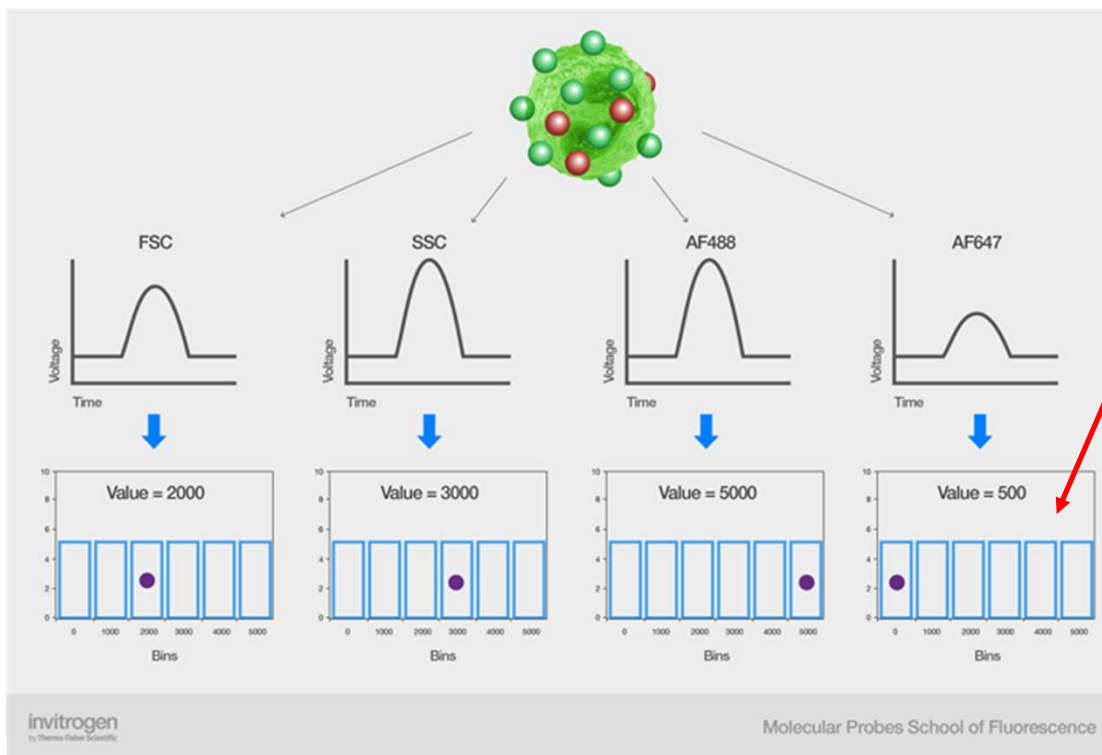
Vznik signálu I.

Převod světelného (generovaného vstupem buňky do paprsku laseru) na elektrický signál prostřednictvím fotonásobiče/fotodiody → slabý fotoproud



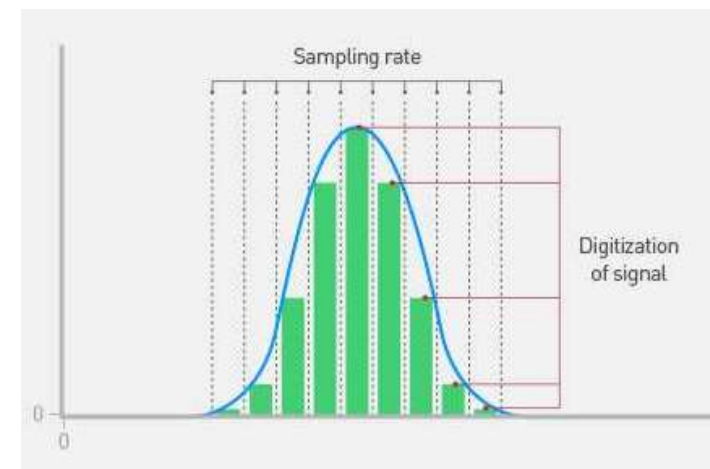
Vznik signálu II.

Fotoproud - zesílení, digitalizace (analog-digital převodník - ADC) a třídění signálu (binning)



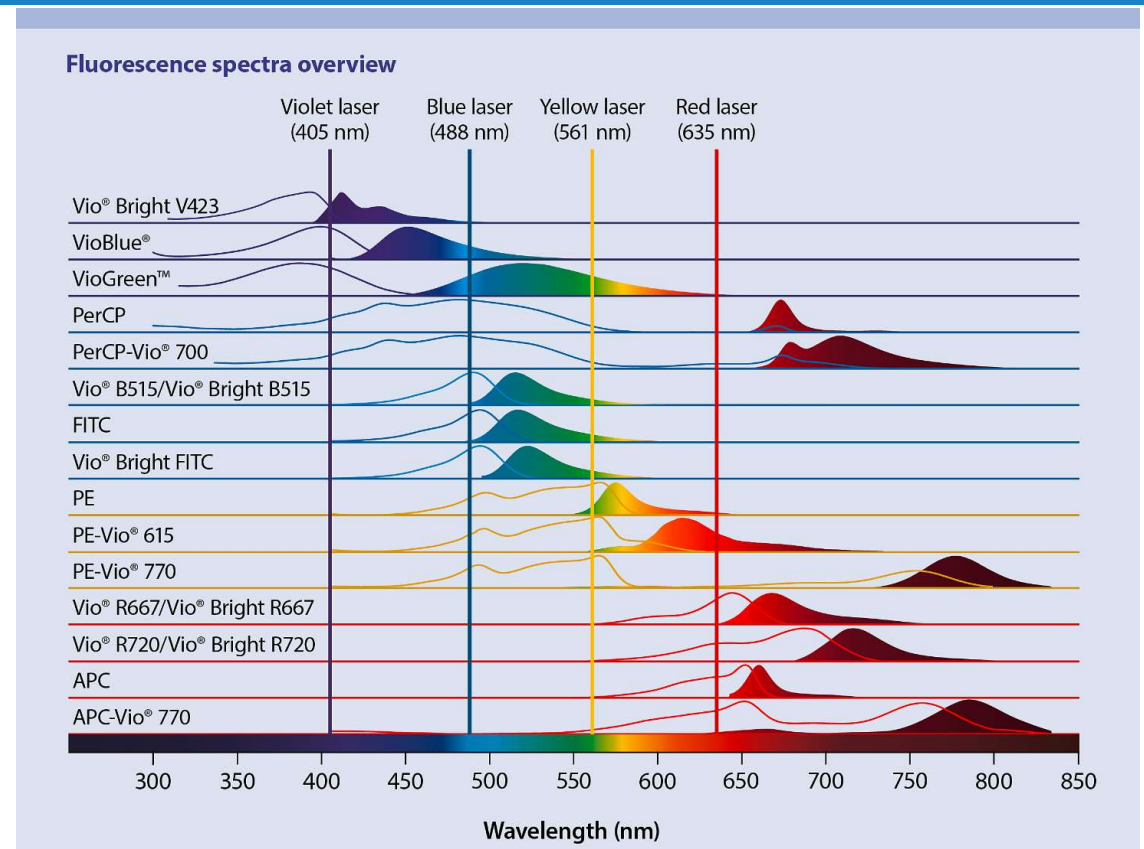
Rozlišení ADC

- dáno počtem „tříd“
- 18-bitový ADC = 2^{18} tříd = 262.144 tříd



Fluorochromy I.

- **Organická barviva**
 - malé stabilní molekuly
 - původní = FITC
 - Pacific dyes
 - Alexa Fluor Dyes
 - eFluor
- **Velké proteiny**
 - původní = PE, APC, PerCP
- **Polymery**
 - Super Brights
 - Brilliant violet/ultraviolet
- **Speciální barviva**
 - NovaFluor



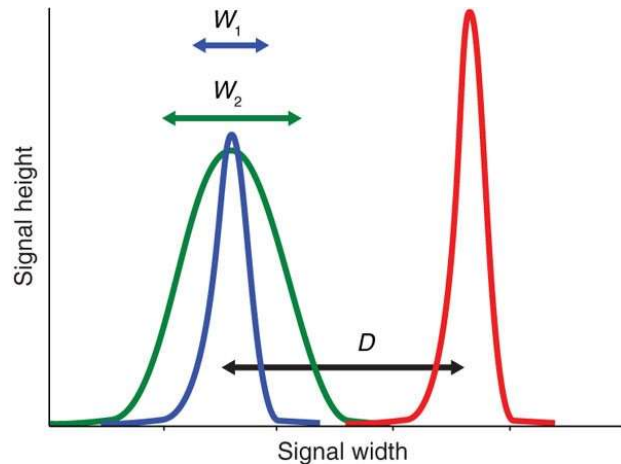
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/antibodies-for-flow-cytometry/flow-cytometry-panel-builder.html.html>

<https://www.miltenyibiotec.com/UN-en/products/mac-s-antibodies/vio-dye-fluorophores.html>

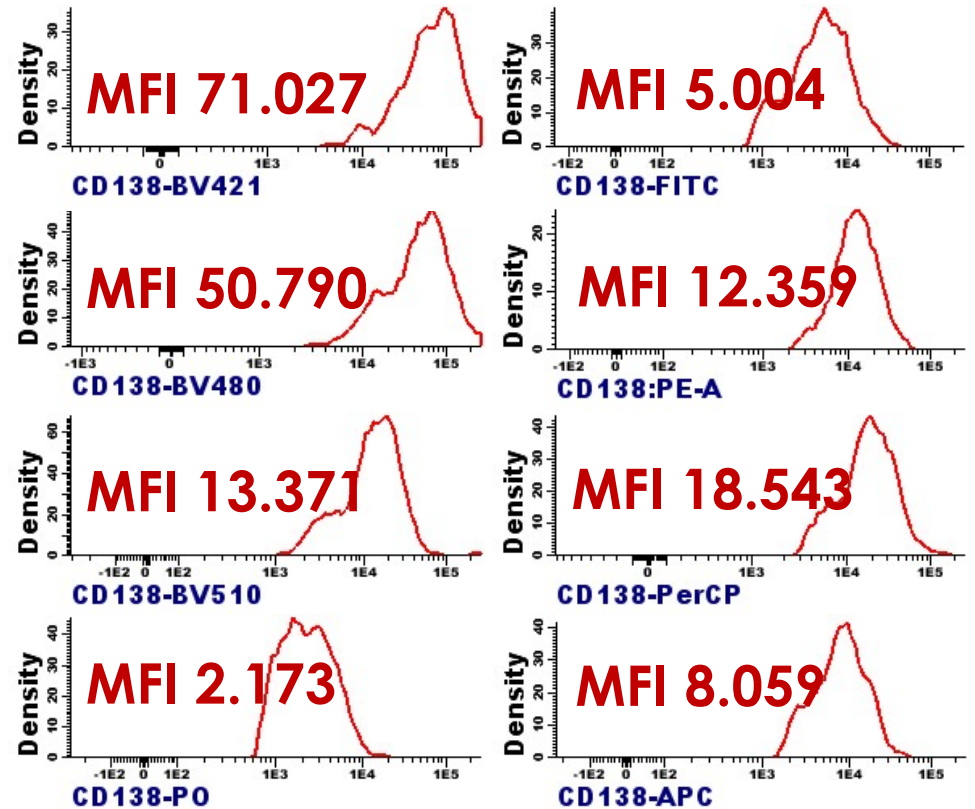
Fluorochromy II.

Stain index

- svítivost jednotlivých fluorochromů
- $SI = D/W$

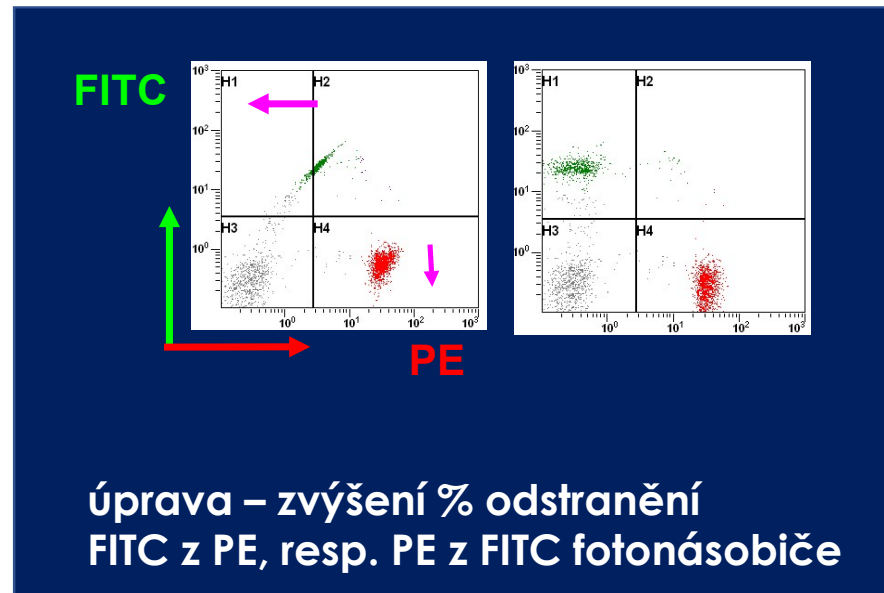
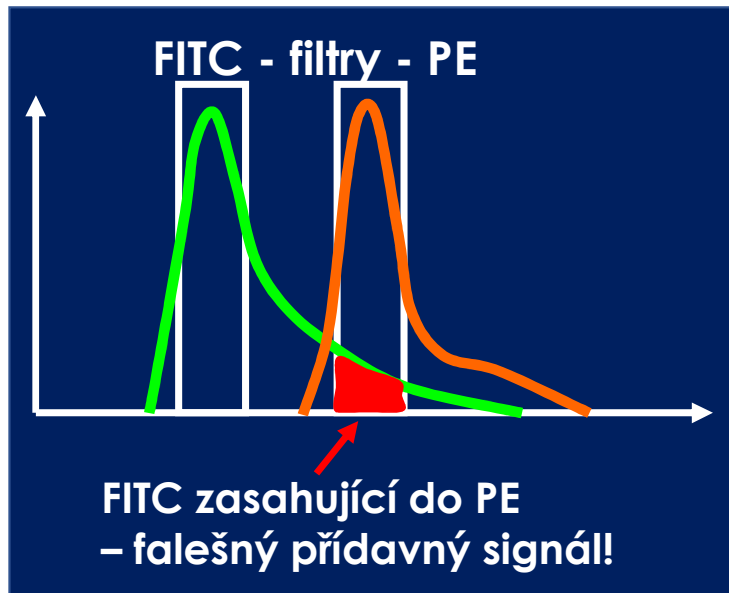


D = difference between positive and negative peak medians
 W = the spread of the background peak (= $2 \times rSD_{negative}$)

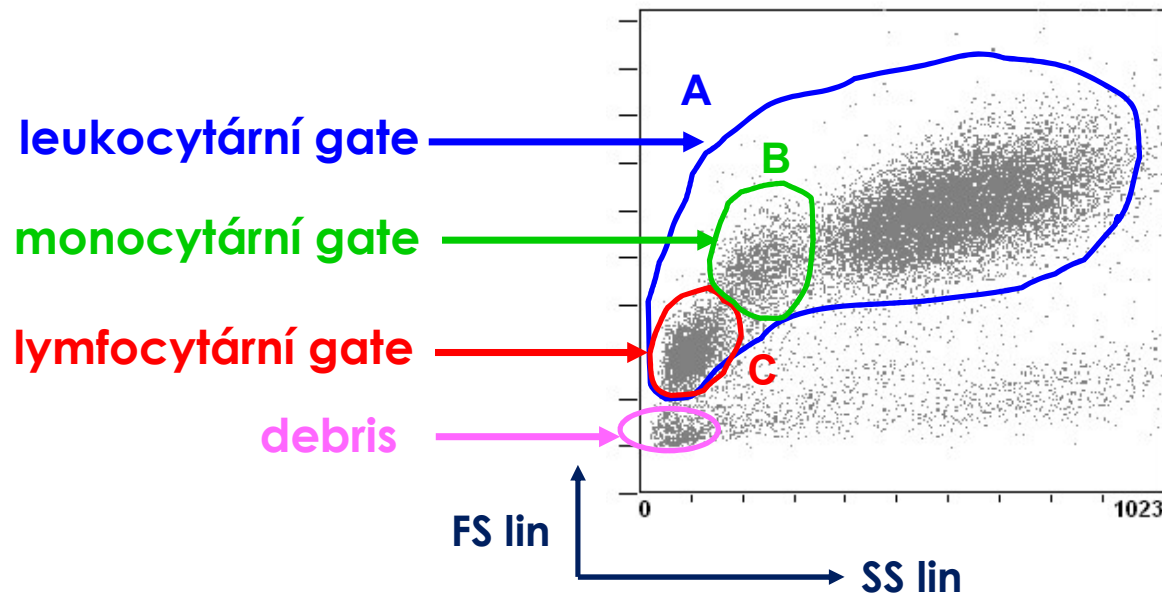


Kompenzace

V důsledku spektrálního překryvu emisních spekter dochází k tomu, že signál jedné fluorescence je zachycen i na fotonásobiči následující fluorescence → falešná fluorescence



Analýza a zobrazení

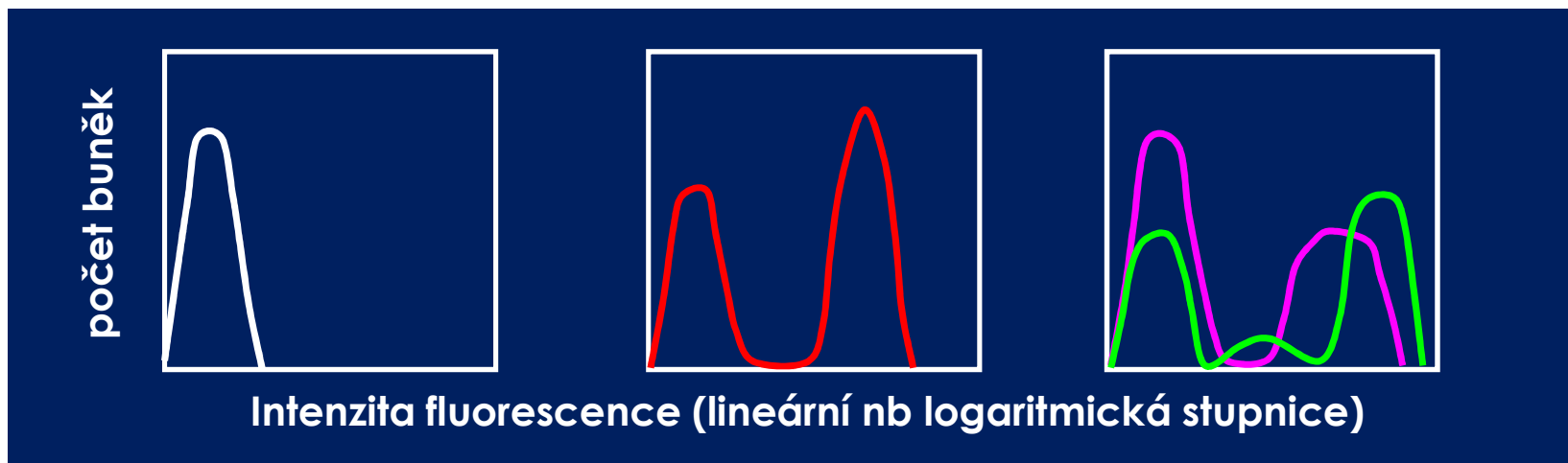


FS - forward scatter - velikost buněk
SS - side scatter - granularita/komplexita

1-parametrová analýza

Histogram

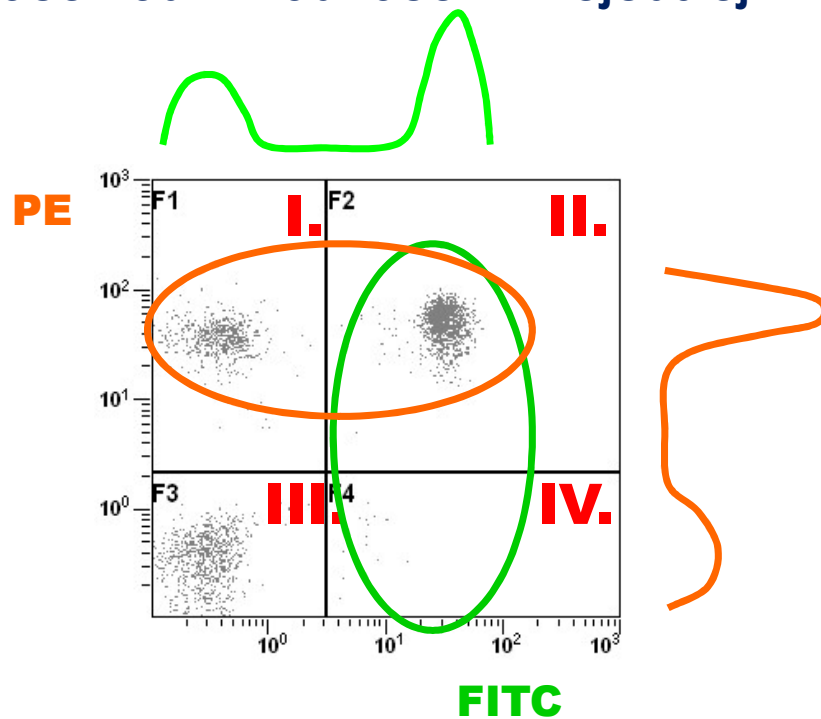
- osa x - intenzita fluorescence, osa y – počet buněk
- hodnocení - odečet % pozitivních buněk
 - neg. peak = autofluorescence, izotypová kontrola
 - poz. peak - low (+/-) < dim (+) < high, bright (++) < very high (+++)
 - porovnávání intenzity exprese - medián intenzity fluorescence (MFI)



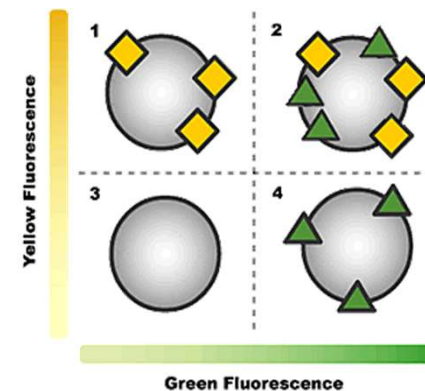
2-parametrová analýza

Dot plot

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



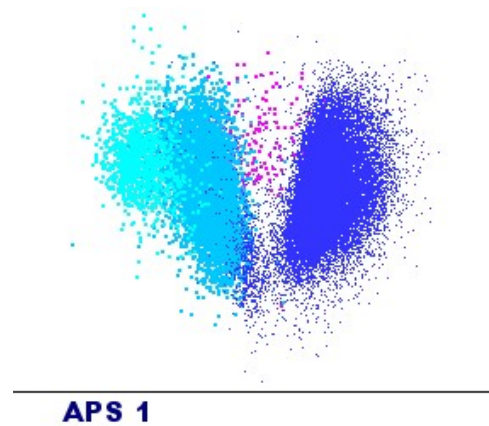
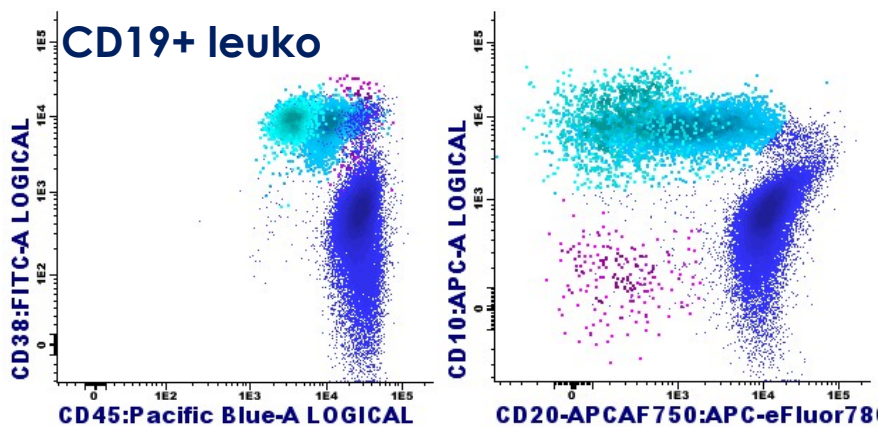
- I. kvadrant – FITC⁻PE⁺
- II. kvadrant – FITC⁺PE⁺
- III. kvadrant – FITC⁻PE⁻
- IV. kvadrant – FITC⁺PE⁻



Multiparametrová analýza

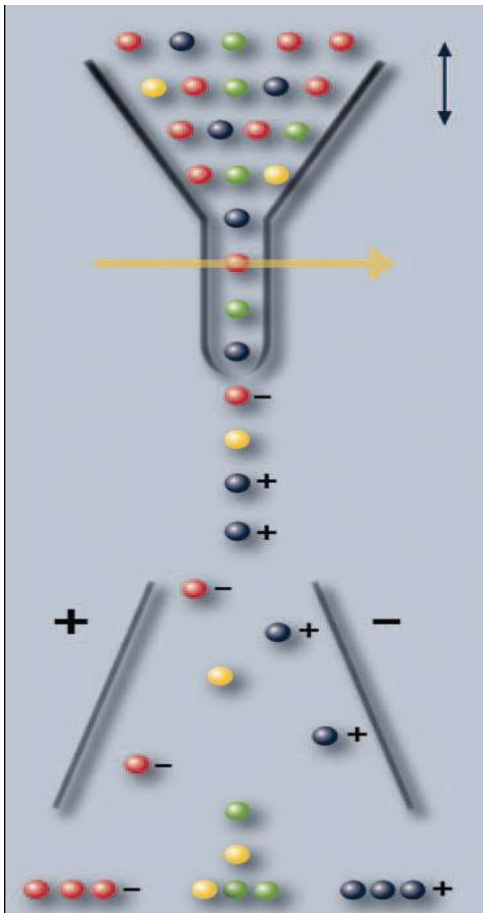
- využívá Principal Component Analysis (PCA)
 - transformace sloužící k dekorelaci dat
 - snížení dimenze dat s co nejmenší ztrátou infomace

APS - automatic population separator (Infinicyt)



CD38:FITC-A LOGICAL	26,83
CD10:APC-A LOGICAL	21,29
CD20-APCAF750:APC-eFluor780-A LOGICAL	20,29
CD34:PE-A LOGICAL	10,83
CD45:Pacific Blue-A LOGICAL	8,17
CD5-PerCPCy5-5:PerCP-A LOGICAL	4,18
CD19:PE-Cy7-A LOGICAL	3,50
FSC-A LINEAR	1,63
CD138-BV510:Pacific Orange-A LOGICAL	1,56
FSC-H LINEAR	1,56
SSC-A Exp-SSC Low	0,11
SSC-H Exp-SSC Low	0,05

Sortování subpopulací



- Přesné časování buněk - znalost jednoznačné polohy buněk od průchodu laserem
- bezprostředně po analýze dochází piezoelektricky k „trhání“ proudu vzorku na kapky - obsahující jednu buňku
- požadovaným buňkám = kapkám je udílen el. náboj
- vychylování nabitých kapek v el. poli a separace
- vhodné pro raritní populace buněk (alternativa imunomagnetické separace)
- časově náročné
- možný aseptický sort

Kontroly kvality (QC) I.

Interní (IKK) - závislé na přístroji

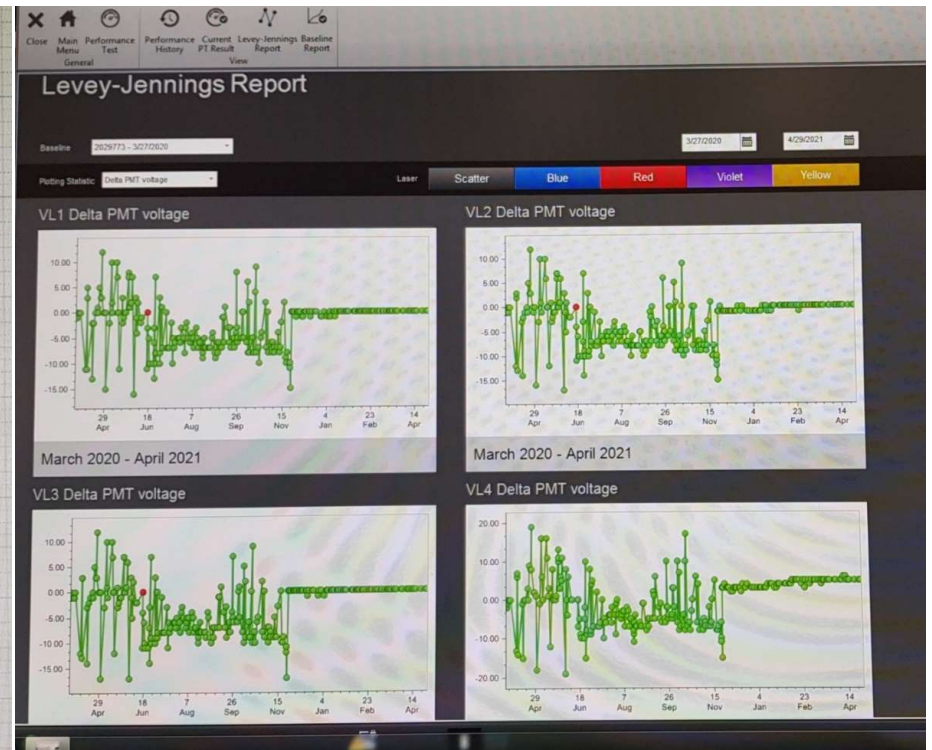
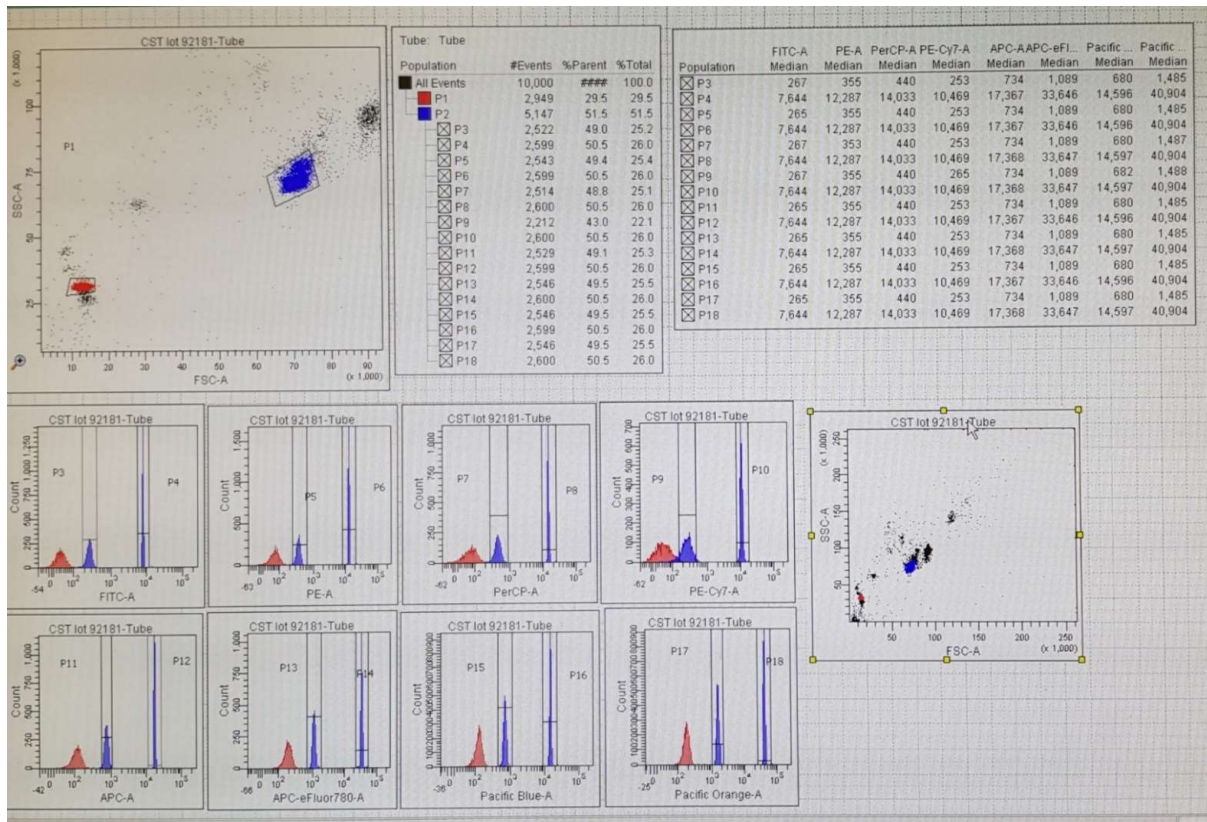
- **Kontrola optického nastavení a fluidiky přístroje I**
 - firemní fluoreskující částice pro kalibraci přístroje tak, aby byl každodenně stejně nastaven (cílové hodnoty MFI)
- **Kontrola optického nastavení II**
 - komerční fluorescenční částice pro mezipřístrojové nastavení
- **Vnitřní kontrola správnosti (buněčná)**
 - stabilizovaná krev s přesným počtem (relativním i absolutním) základních subpopulací lymfocytů → nástroj pro verifikaci metody → akreditace

Externí (EKK) - nezávislé na přístroji a reagensích

- MLP, SEKK - buněčné

Kontroly kvality (QC) II.

Kontrola optického nastavení přístroje - CST, PTB...



Absolutní počty buněk

- využití firemního roztoku s přesně definovaným počtem fluoreskujících částic na ul (2 chyby pipetování)
- využití speciálních zkumavek s definovaným počtem fluorescenčních partikulí (1 chyba pipetování)
- peristaltická pumpa přístroje přesně odměřuje objem analyzovaného vzorku (nutno dopočítat ředění)

Princip imunofenotypizace (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

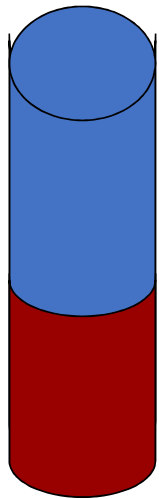
plná krev
kostní dřeň
bb suspenze

+

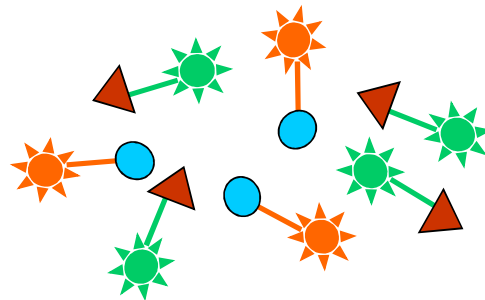
vybrané protilátky
konjugované
s fluorochromem

=

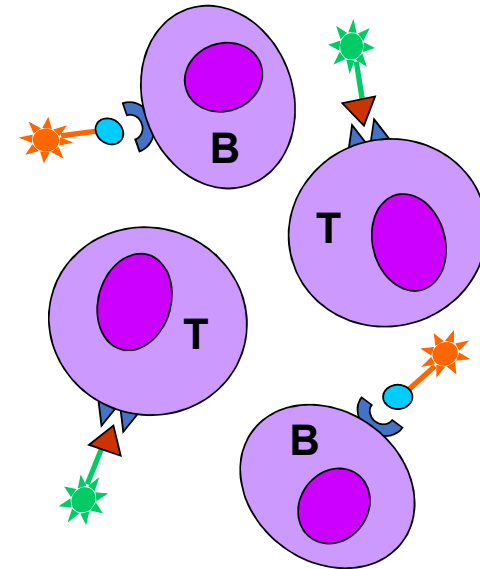
označení buněk
vazbou protilátek
na odpovídající Ag



+



=



Anti CD3-FITC

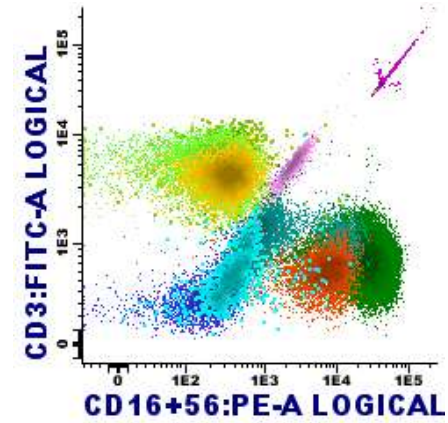
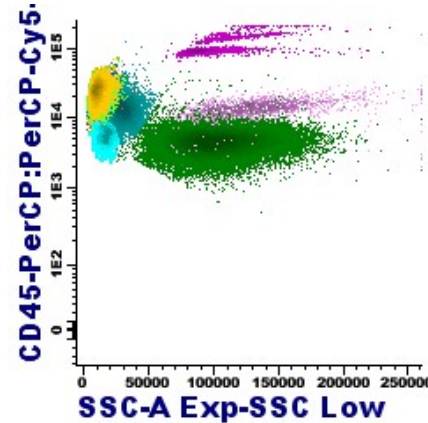
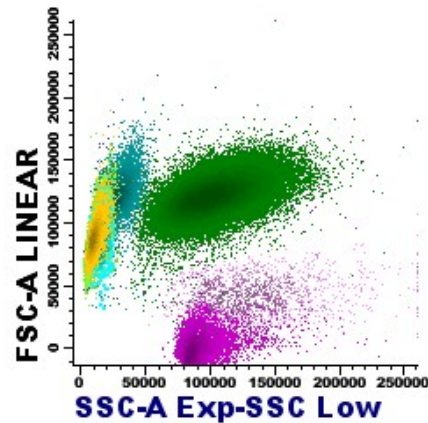


Anti CD19-PE

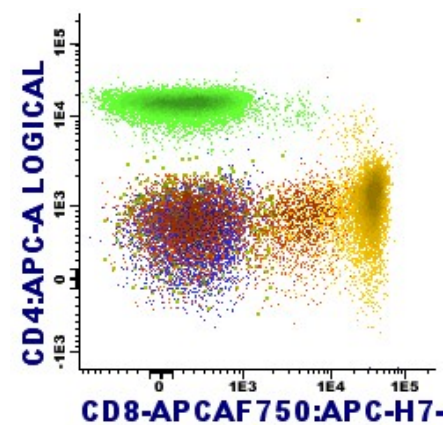
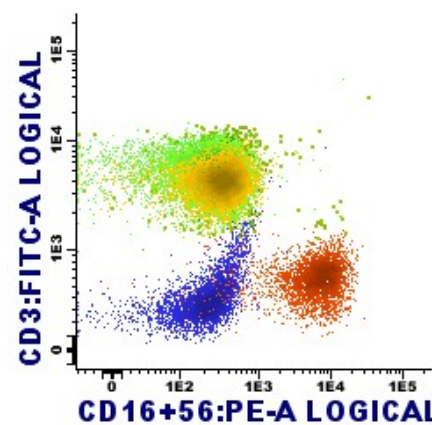
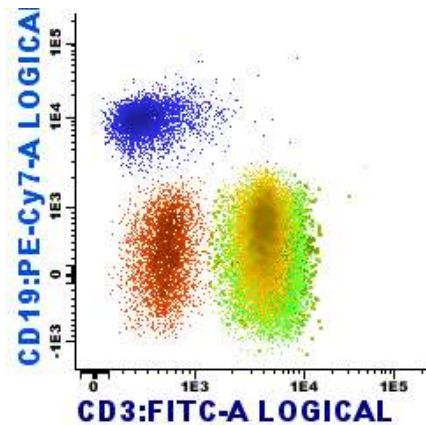
Základní populace lymfocytů

Kontrolní materiál + TC + CD3/CD16+56/CD45/CD19/CD4/CD8

33 % Ly
 8 % Mo
 56 % Neu
 1,0 % Ba
 1,4 % Eos
 TC



74 % Tly
 50 % Th
 21 % Tc
 13 % NK
 13 % Bly



Klinické využití FC

Rutinní vyšetření a výzkumné analýzy

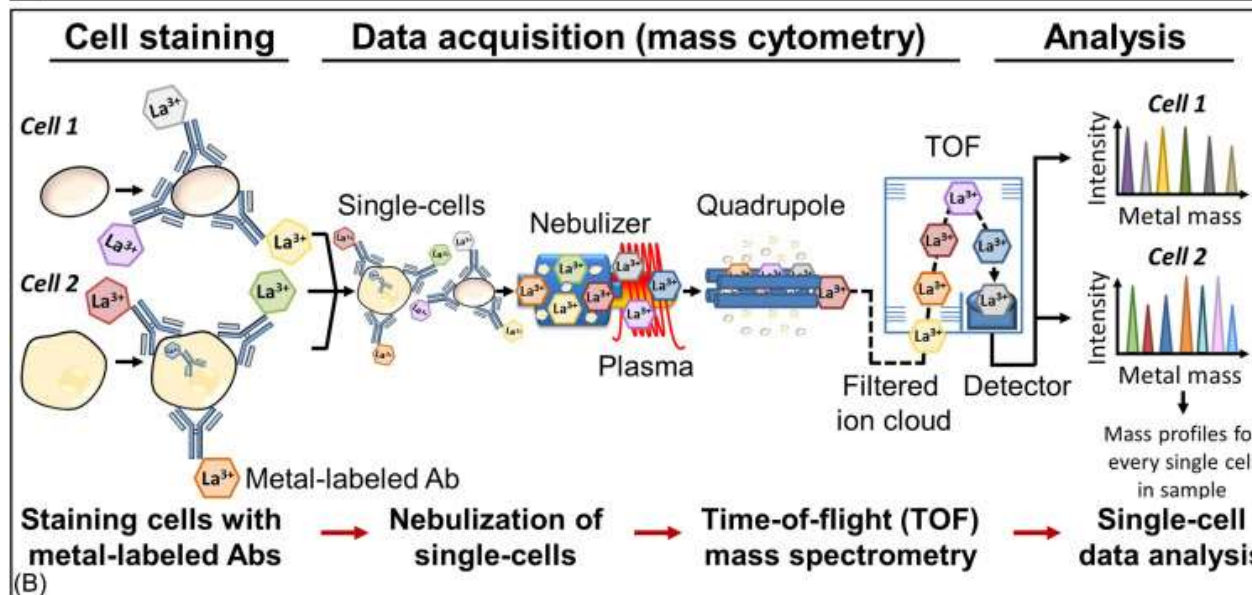
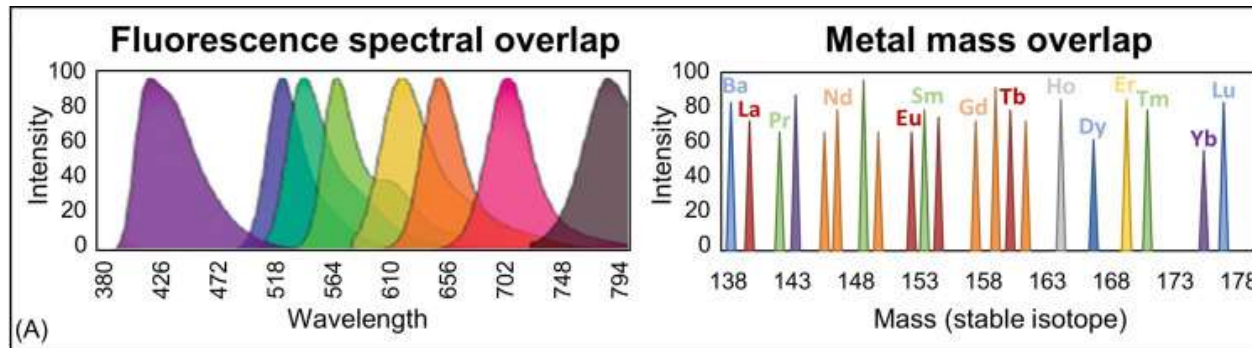
- imunologie
- alergologie
- hemato-onkologie
- transplantologie
- transfuziologie
- neonkologická hematologie

Hmotnostní Cytometrie I.

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**

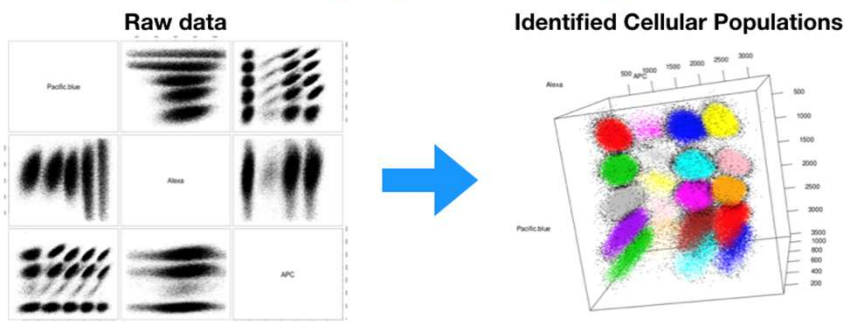
Hmotnostní Cytometrie II.



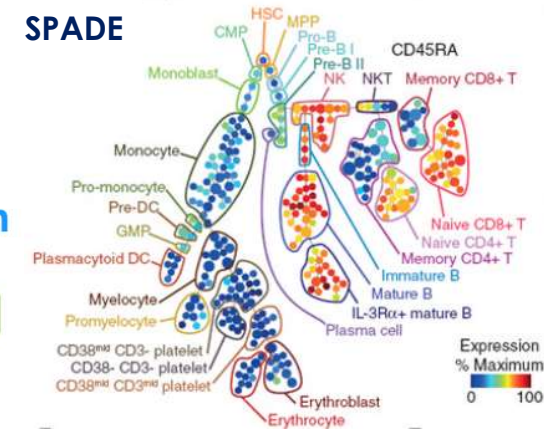
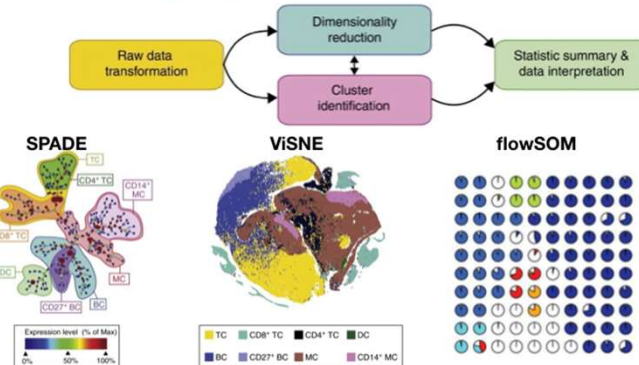
Hmotnostní Cytometrie III.

- nevhodná pro minoritní populace
- existence komerčních panelů protilátek pro vyšetření zejm. imunitního systému
- vizualizace dat ve speciálních SW

Gating by Clustering



Gating by dimension reduction



flowPeaks: a fast unsupervised clustering for flow cytometry data via K-means and density peak finding. Ge Y, Sealfon SC. *Bioinformatics*. (2012)

Unraveling cell populations in tumors by single-cell mass cytometry. Serena Di Palma, Bernd Bodenmiller. *Curr Opin Biotechnol* (2015)

Zobrazovací cytometrie

Flow cytometr se zobrazovacími a funkčními vlastnostmi mikroskopu

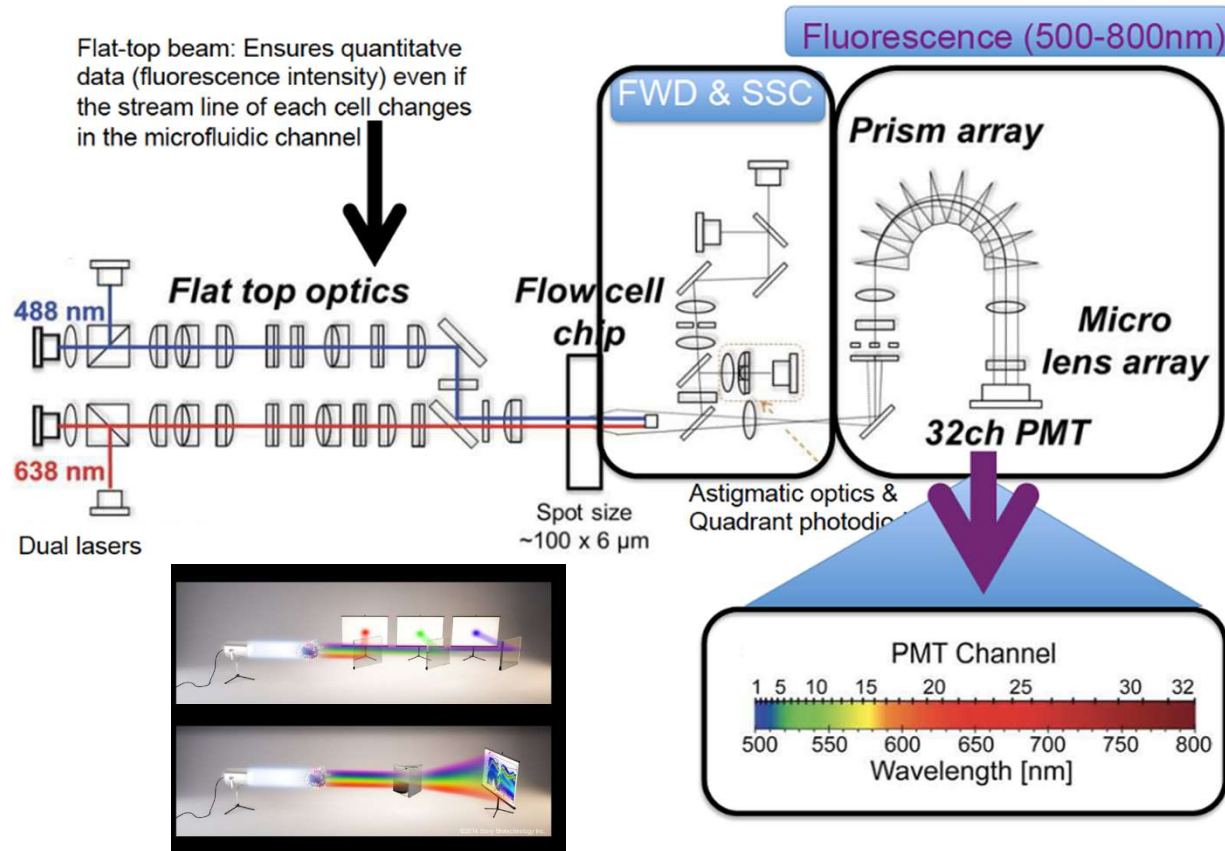
- přímé zobrazení buněk s 60 násobným rozlišením
- simultánní fenotypové a funkční analýzy s využitím 5 laserů a 12 zobrazení na buňku



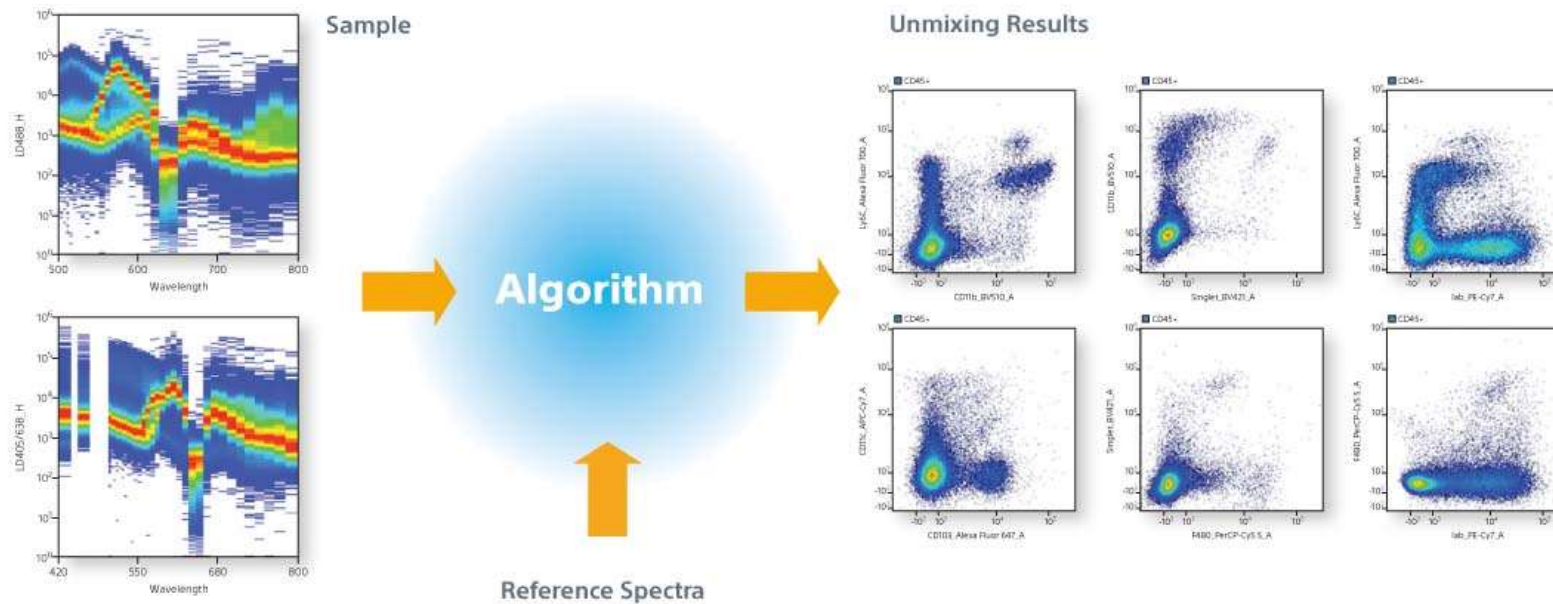
Spektrální cytometrie I.

- progresivní technologie pronikající do rutinní diagnostiky
- znalost spekter negativní/nebarvené kontroly a jednotlivých pozitivních kontrol dle použitých konjugátů
- definice spektrálního „fingerprintu“ referenčních fluorescencí i auto-fluorescence
- mnohobarevný vzorek je porovnáván s jednotlivými kontrolami → matematické rozložení na jednotlivé spektrální komponenty → grafické znázornění ve formě dot plotu
- není potřeba kompenzace!

Spektrální cytometrie II.

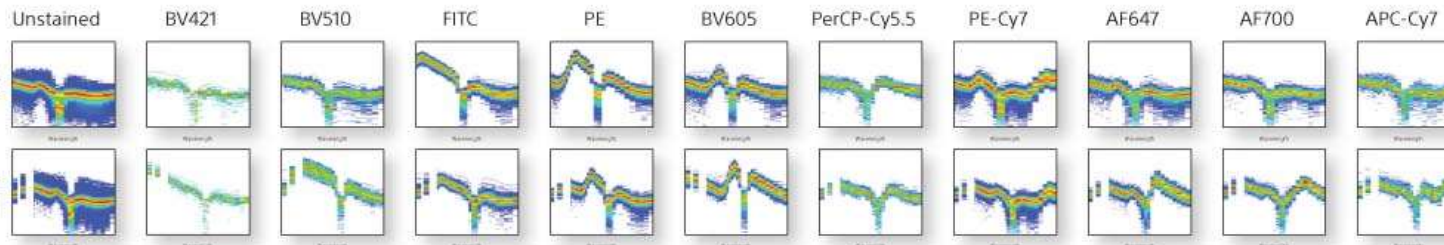


Spektrální cytometrie II.



488nm Laser

405nm/638nm Lasers



Výhody a nevýhody FC

parametr	průtoková cytometrie	konvenční mikroskopie
stupeň jednoduchosti	vysoký	střední
rychlost	vysoká	nízká
počet analyzovaných buněk	vysoký	nízký
absolutní počet buněk	přesná	nepřesná
senzitivita	vysoká	střední/nízká
specifita	vysoká	vysoká
počet parametrů	>10	<3
antigenní exprese	kvantitativní	kvalitativní
antigenní lokalizace	omezená	detailní
morfologické parametry	2	>10