

Průtoková cytometrie

Andrea Wagnerová

Průtoková cytometrie

Laboratorní metoda, která umožňuje rychlou multiparametrickou analýzu buněk.

U každé buňky z připravené buněčné suspenze je možné analyzovat:

- velikost buňky
- vnitřní strukturu buňky (granularita)
- detekovat tzv. CD znaky (intracelulární x extracelulární)

Význam průtokové cytometrie spočívá zejména v tzv. imunofenotypizaci buněk, tj. možnosti detekovat antigeny buněk (CD znaky).

Princip průtokové cytometrie

Pomocí průtokového cytometru je možné buňky identifikovat a kvantifikovat.

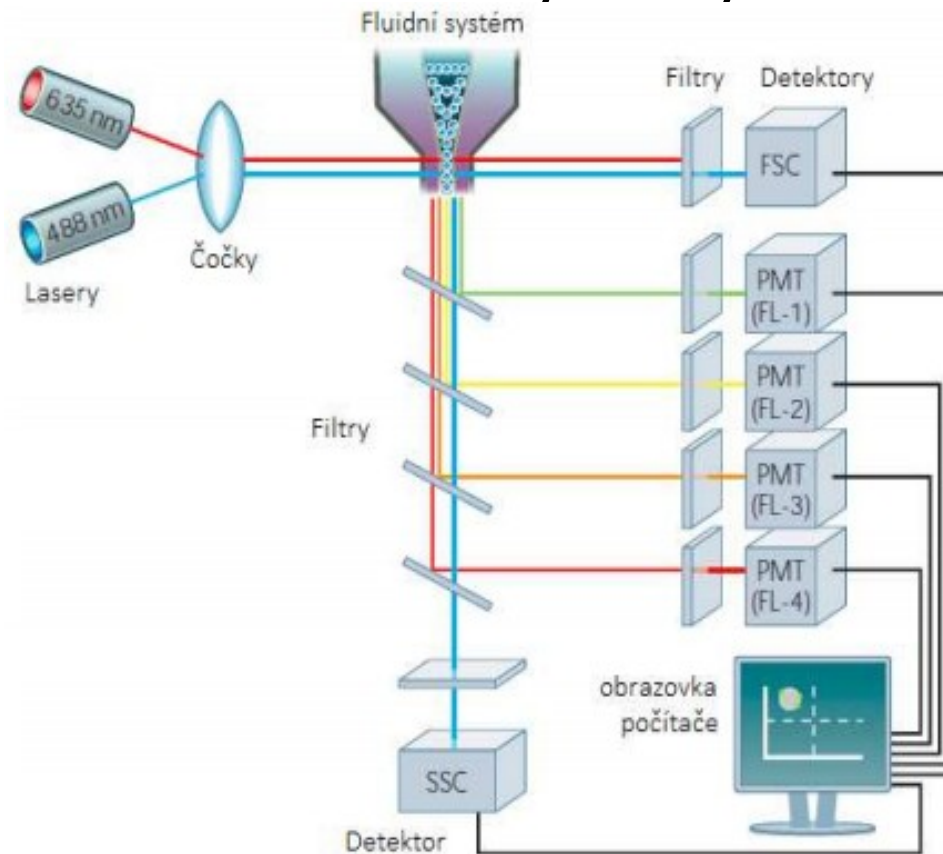
Buněčná suspenze je unášena proudem nosné kapaliny → s paprskem světla dochází na buňkách k rozptylu světla v různých úhlech → rozlišení vlastnosti buněk:

- Forward scatter (přímý rozptyl) – rozptyl laserového paprsku v malém úhlu, informace o velikosti částice,
- Side scatter (boční rozptyl) – rozptyl laserového paprsku pod úhlem 90 °, informace o komplexitě částice.

Součástí buněčné suspenze jsou fluorochromem konjugované monoklonální protilátky, které se vážou na konkrétní struktury částice a po setkání s laserovým paprskem dochází k excitaci fluorochromu a následné emisi záření. Emitované fluorescenční záření je v přístroji detekováno a zpracováno.

Průtokový cytometr

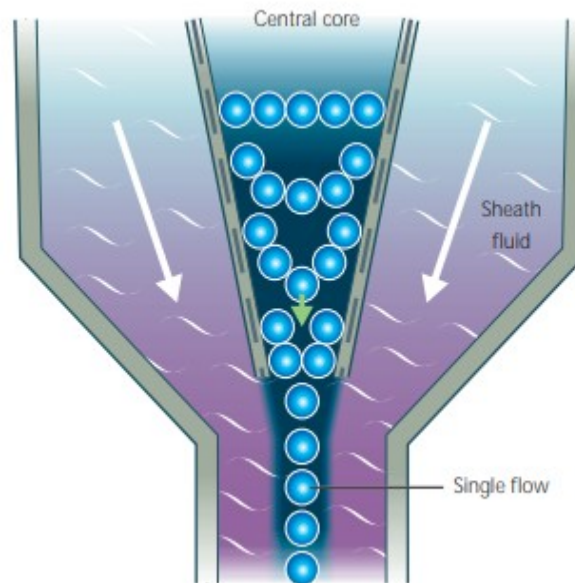
Průtokový cytometr tvoří 3 základní systémy: fluidní, optický a elektronický.



Fluidní systém (Rahman 2016)

Instrumentace

Fluidní systém: je tvořený centrálním kanálem, kterým pod tlakem prochází nosná kapalina → usměrnění částic (hydrodynamická fokusace).



Fluidní systém (Rahman 2016)

Instrumentace

Optický systém:

- lasery (zdroj světla),
- systém čoček – soustřeďují fotony emitovaného záření na sadu zrcadel a filtrů,
- zrcadla a optické filtry – usměrňují a odrážejí světlo různých vlnových délek do konkrétních fluorescenčních kanálů.

Fluorochrom navázaný na monoklonální/polyklonální protilátce → vazba na buňky → projití buňky laserovým paprskem → excitace → emise fotonů → detekce optickým systémem přístroje.

Instrumentace

Detekční systém: je představován detektory, které převádějí světelný signál na elektrický. Počet detektorů se liší v závislosti na typu průtokového cytometru.

2 typy detektorů:

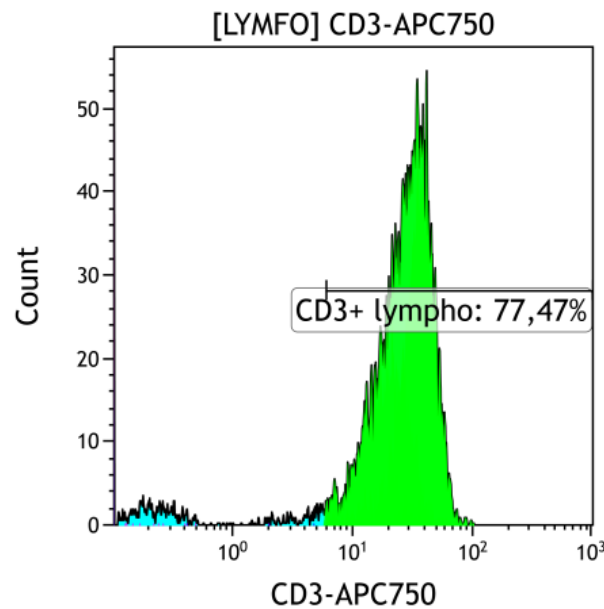
- fotodiody – pro detekci silnějšího signálu,
- fotonásobiče – jsou citlivějšími detektory vhodnými pro detekci emitovaného fluorescenčního záření.

Výsledkem je grafické zobrazení na obrazovce počítače.

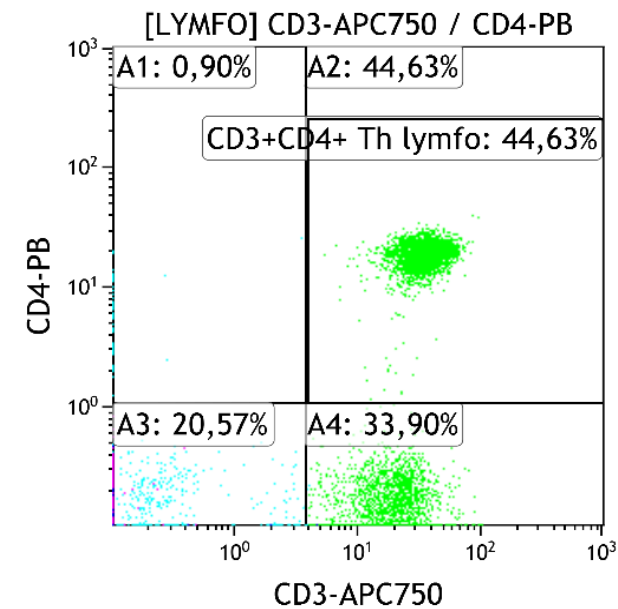
Analýza dat

Analýza dat je prováděna pomocí grafických a číselných údajů. Pomocí tzv. gatování lze oddělit jednotlivé populace buněk.

Grafický výstup:



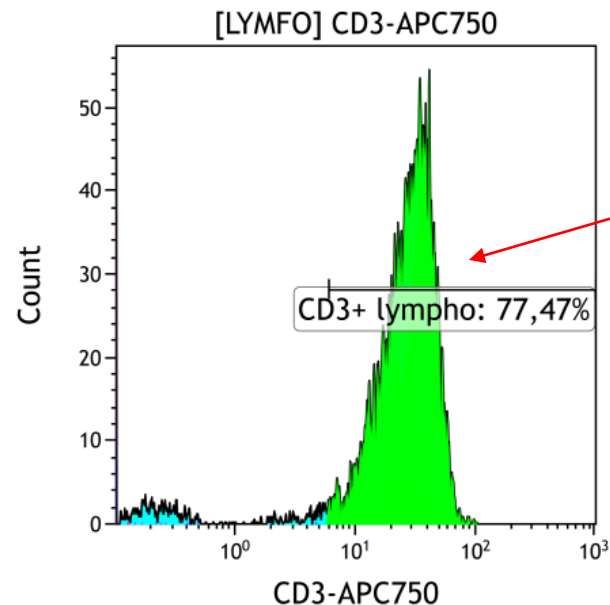
jednparametrový histogram



dvouparametrový scattergram

Přímá imunofluorescence

Antigen (CD znak) → protilátka značená fluorochromem → komplex Ag x Ab → molekula fluorescenčního barviva emituje záření o specifické vlnové délce → detekce detektorem.



Populace CD3+ buněk, tj. T-lymfocyty (osa x znak CD3, použitým fluorochromem je APC750).

CD klasifikace

Tabulka: Přehled nejznámějších povrchových antigenů

CD znak	Výskyt
CD3	T lymfocyt
CD3, CD4	Th lymfocyt
CD3, CD8	Tc lymfocyt
CD19	B lymfocyt
CD14	Monocyt
CD15	Neutrofilní, eozinofilní granulocyt

Fluorochromy

Použitím monoklonálních protilátek značených různými fluorochromy je možné během jedné analýzy detekovat na buňkách více antigenů.

Fluorochrom	Excitace (nm)	Emisní vrchol (nm)
FITC	488	525
KrO	405	528
PB	405	455
PC7	486–580	710–800
APC	633–638	660
PE	488	575

Tabulka: Přehled vybraných fluorochromů (Beckman Coulter)

Aplikace průtokové cytometrie

- Imunofenotypizace lymfocytů
- Funkční testy a testy fagocytózy
- Měření obsahu DNA v buňkách (hodnocení ploidie, buněčného cyklu)
- Stanovení cytokinů
- Imunofenotypizace trombocytů, erytrocytů

Vyšetřovaný materiál

K nejčastěji vyšetřovanému biologickému materiálu patří:

- periferní krev,
- kostní dřeň,
- buněčná suspenze získaná z bioptického vzorku (vzorku tkáně), uzliny,
- jiné tělní tekutiny (likvor, výpotky, BAL...).

Příprava vzorku

Ab + biologický materiál

Inkubace 15 min ve tmě při lab. teplotě

Lyzační roztok (lýza ery)

Inkubace 15 min ve tmě při lab. teplotě

Promytí vzorku (odstranění nenavázaných Ab a odpadu po lýze ery)

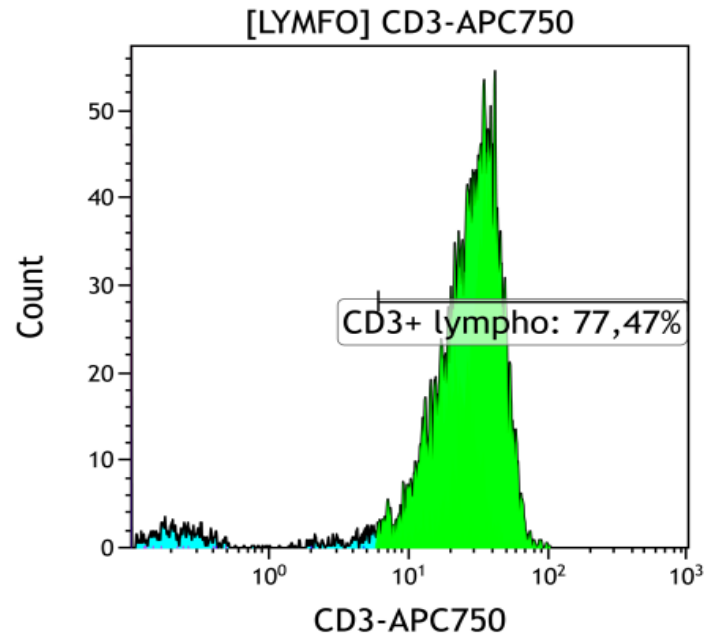
Měření (v řádu sekund/minut)

Cytometrický výstup měření

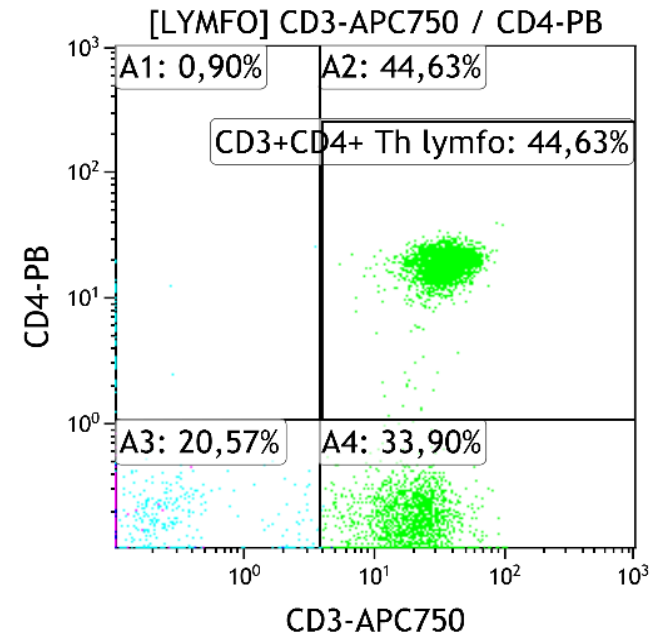
Měření nám umožní vizualizaci různých parametrů, jejich grafické znázornění:

- histogram (1 parametr; počet buněk x analyzovaný parametr)
- dot plot (2 parametry → jeden na ose x, druhý na ose y)

Histogram vs. Dot plot



histogram

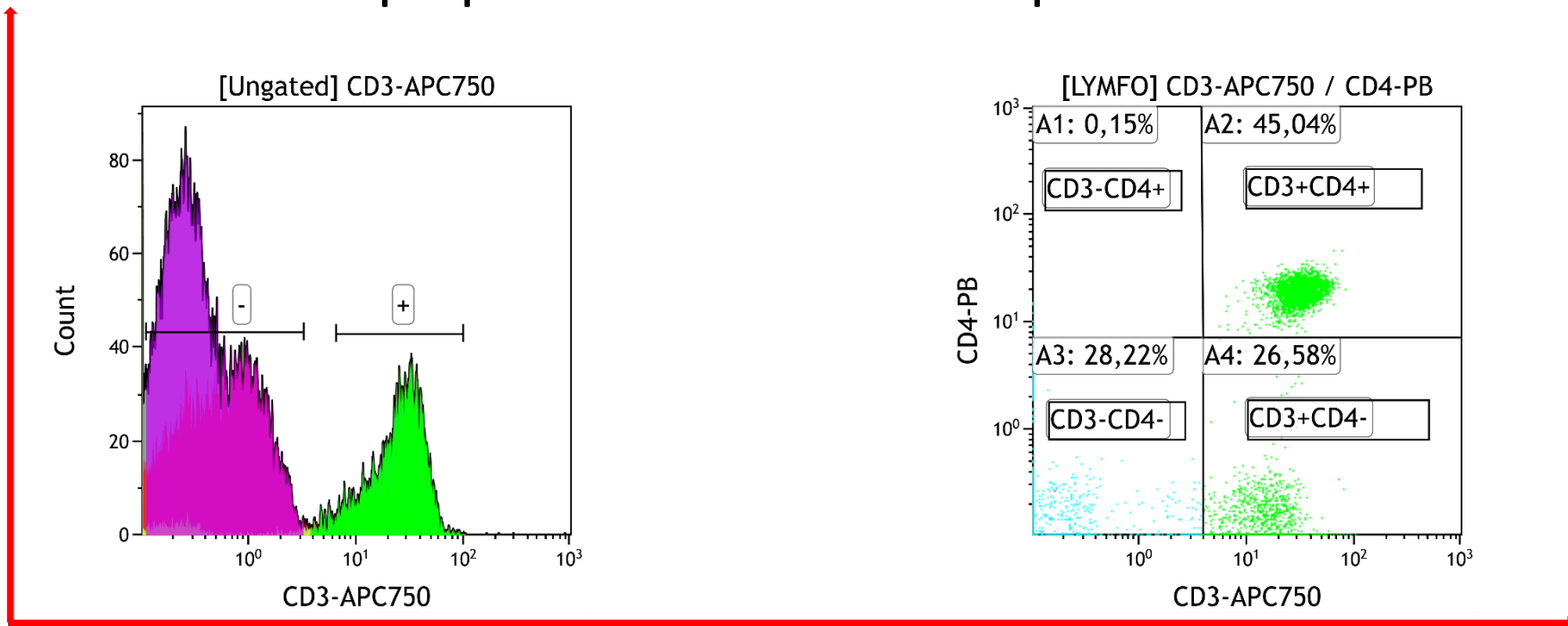


dot plot

Cytometrický výstup měření: čtení grafů

Buňky jsou zobrazeny jako tečky v příslušné oblasti.

- na ose y stoupá pozitivita směrem nahoru,
- na ose x stoupá pozitivita směrem doprava



Imunofenotypizace

Detekce antigenů na povrchu či uvnitř analyzovaných buněk pomocí fluorochromem značených monoklonálních protilátek.

Součást laboratorních diagnostických postupů:

- přítomnosti klonu maligních buněk hematopoetického původu,
- liniová příslušnost buněk,
- stupeň diferenciaci.

Příklady onemocnění, využití pro diagnostiku:

- akutní a chronická leukémie,
- PNH,
- mnohočetný myelom...

Funkční testy

Detekce antigenů na povrchu analyzovaných buněk po jejich aktivaci pomocí fluorochromem značených monoklonálních protilátek.

Cílem provedení funkčních testů je:

- odhalení poruchy ve fungování leukocytů,
- schopnosti jejich aktivace.

Funkční testy: rozdělení

Funkční testy lymfocytů:

- aktivitu T lymfocytů,
- aktivitu B lymfocytů,
- aktivitu NK buněk.

Funkční testy granulocytů:

- aktivita neutrofilních granulocytů (fagocytóza, tzv. burst test),
- aktivita bazofilních granulocytů (alergie, tzv. bazotest).

Funkční testy lymfocytů

Aktivita lymfocytů se stanovuje na základě schopnosti buňky:

- proliferovat,
- exprimovat aktivační molekuly,
- produkovat cytokiny.

Funkční testy: exprese aktivačních molekul

Stanovení exprese antigenů na aktivovaných buňkách po kultivaci s mitogenem.

Konkrétní molekuly se vyskytují jen na aktivovaných buňkách, varianty provedení testu:

- Časná aktivace po 24 hod kultivace s mitogenem
 - T, B lymfocyty exprimují po aktivaci CD69
- Pozdní aktivace po 48 hod kultivace s mitogenem
 - T lymfocyty exprimují po aktivaci CD25
 - B lymfocyty exprimují po aktivaci CD23

Průtoková cytometrie: videoukázka

[Průtoková cytometrie: video](#)

Zdroje

Beckman Coulter – Instruction For Use [online]. Poslední revize 30. 9. 2021 [cit, 2022-03-10]. Dostupné z:

<https://www.mybeckman.cz/search#q=navios&t=coveo-tab-techdocs>

Ormerod MG. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. Third Edition. Oxford; 2000.

Děkuji za pozornost.

Autor: RNDr. Andrea Wagnerová

Kontakt: 532 236 860 (OKMI, FN Brno), wagnerova.andrea@fnbrno.cz