

# Laboratorní diagnostika hematoonkologických malignit – průtoková cytometrie

Marek Borský

Laboratoř průtokové cytometrie, CMBG, IHOK

Část I

- Úvod do průtokové cytometrie
  - CD nomenklatura
- Úloha FCM v diagnostice

# Průtoková cytometrie (flow cytometry - FCM)

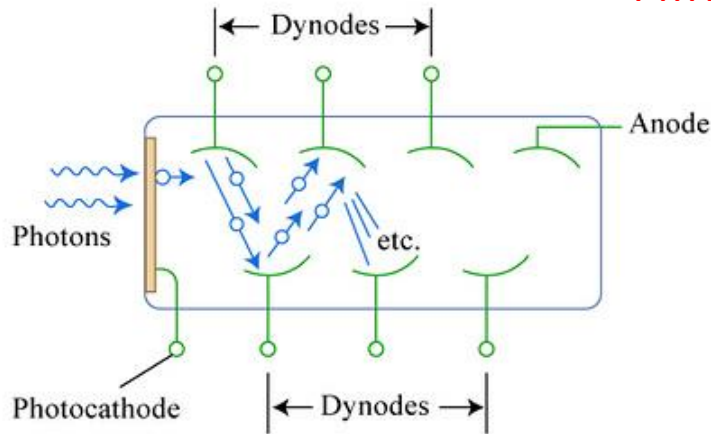
## Metoda na pomezí

- buněčná biologie – analyzuje jednotlivé buňky, jejich imunofenotyp a vlastnosti (velikost, tvar jádra, propustnost membrány atd.)
- imunologie – využívá protilátky jako detekční nástroj
- molekulární biologie – měří expresi povrchových a intracelulárních molekul

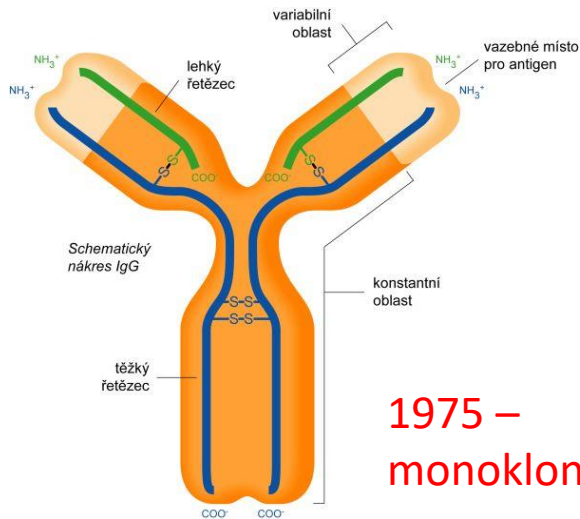
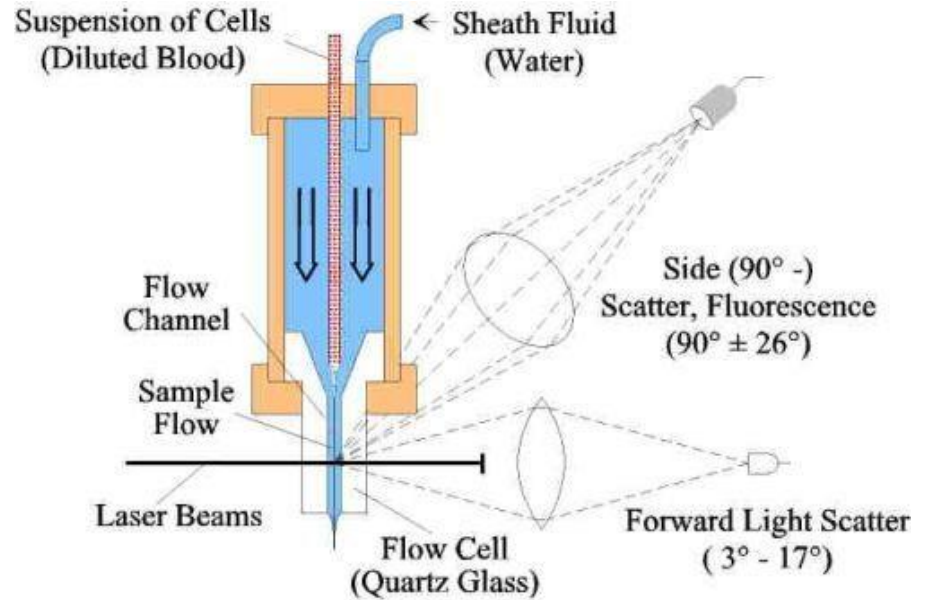
# Zásadní objevy, které umožnily vznik cytometrie

1934 - fotonásobič

PMT



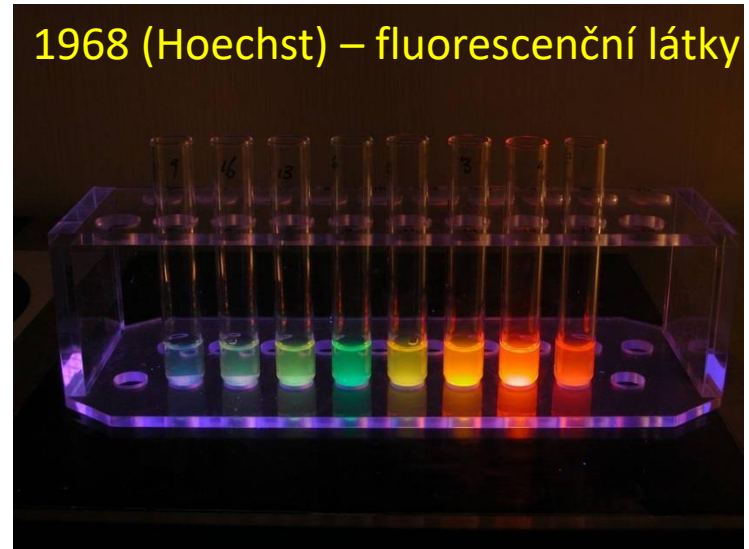
1953 – hydrodynamická fokusace



1975 –  
monoklonální mAb

Köhler, G. & Milstein, C. 'Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.' *Nature* **256**, 495-497 (1975)

1968 (Hoechst) – fluorescenční látky



**ICP 11 – 1968**

**Partec, Germany**

První komerční cytometr

3 parametry



**Sony ID7000 – 2020**

44 parametrů

# Princip průtokové cytometrie - video



Star CellBio

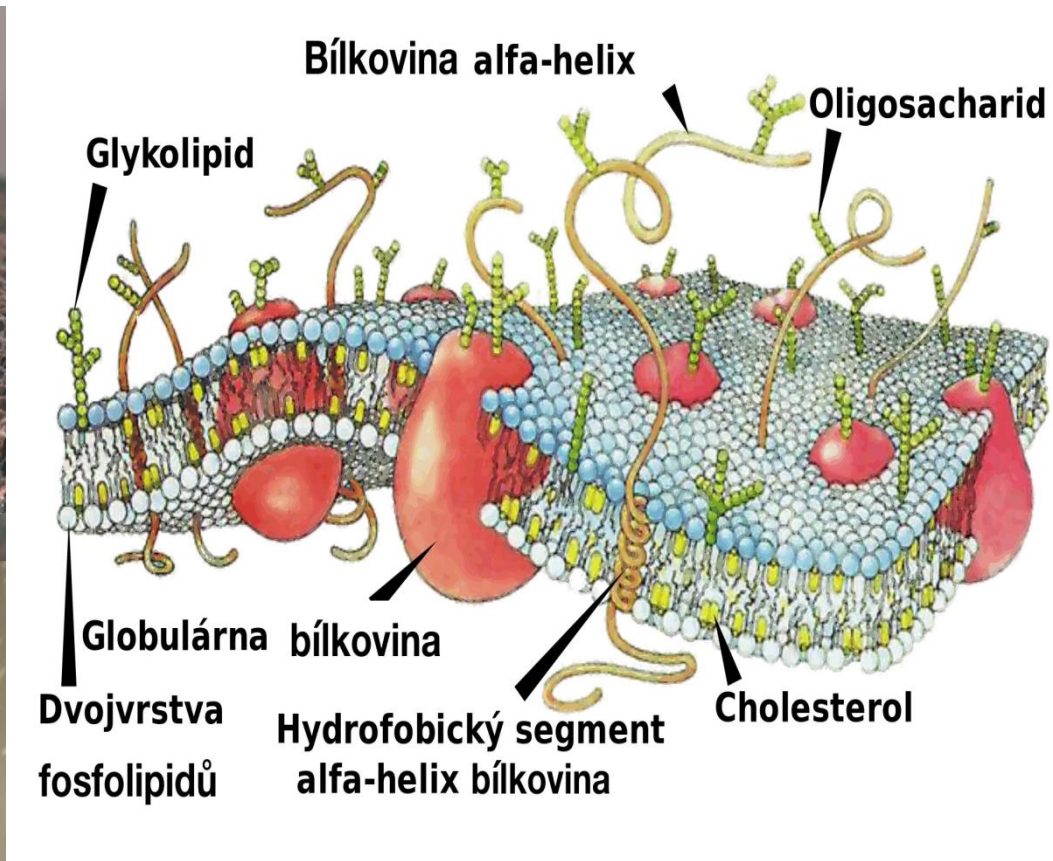
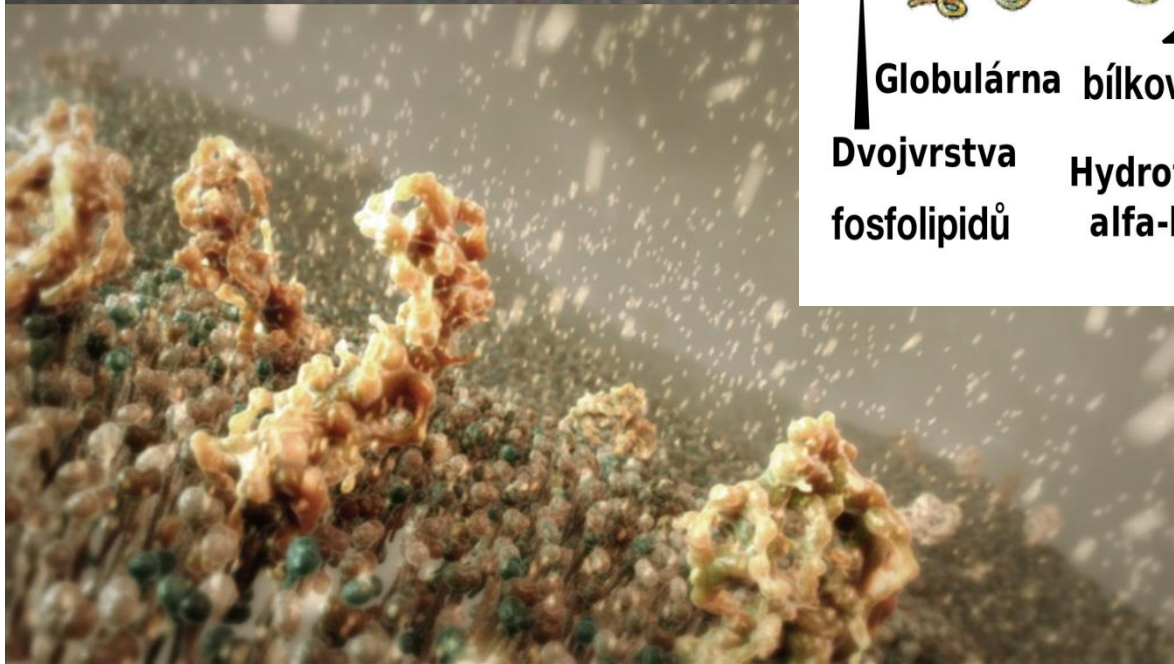
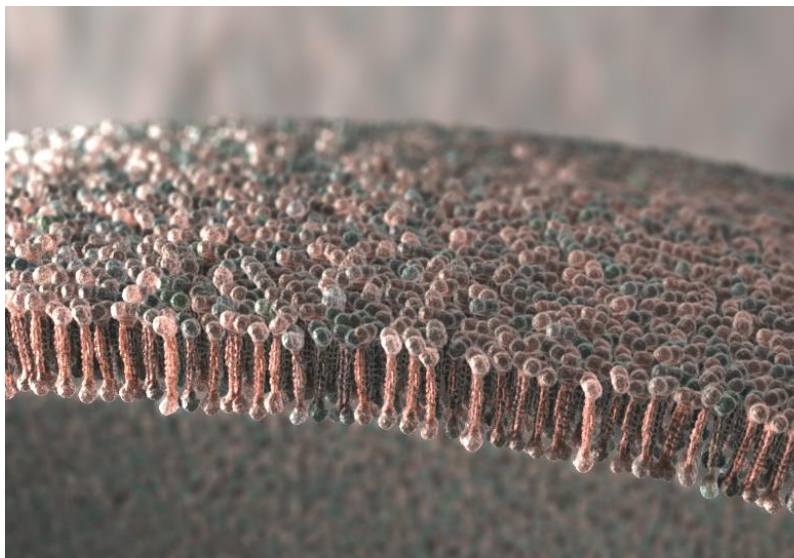
presents

FLOW CYTOMETRY

<https://www.youtube.com/watch?v=2P7YsJ0Zkio>

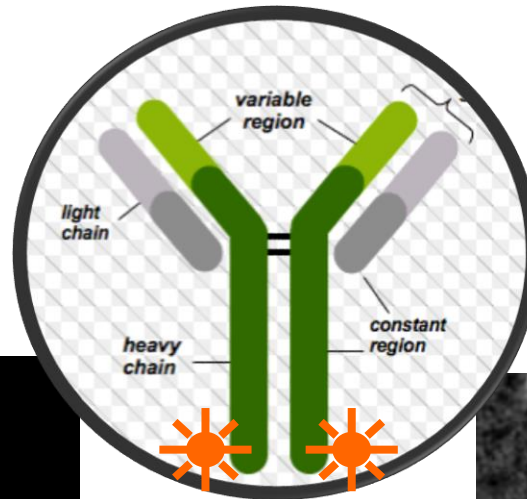


# Buněčný povrch = široké spektrum specifických Ag

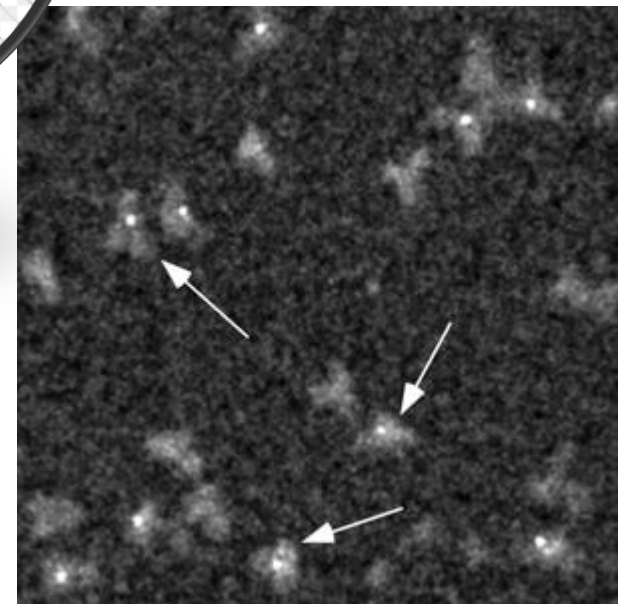
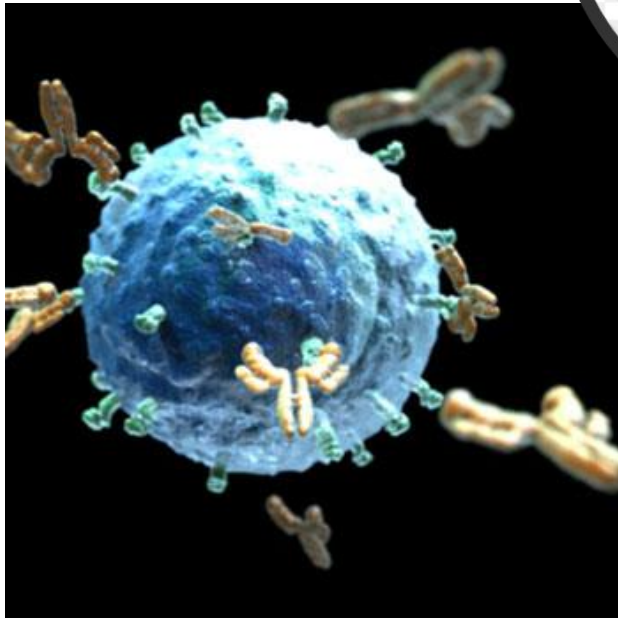


# Imunoglobuliny jako nástroj

Monoklonální protilátky konjugované s fluochromy = vysoce specifické sondy pro FCM



Snímek imunoglobulinu v elektronovém mikroskopu



# CD nomenklatura – klasifikace Ag lidských leukocytů

- 1<sup>st</sup> International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) (Paris, 1982)

CD Marker Handbook Human CD Markers

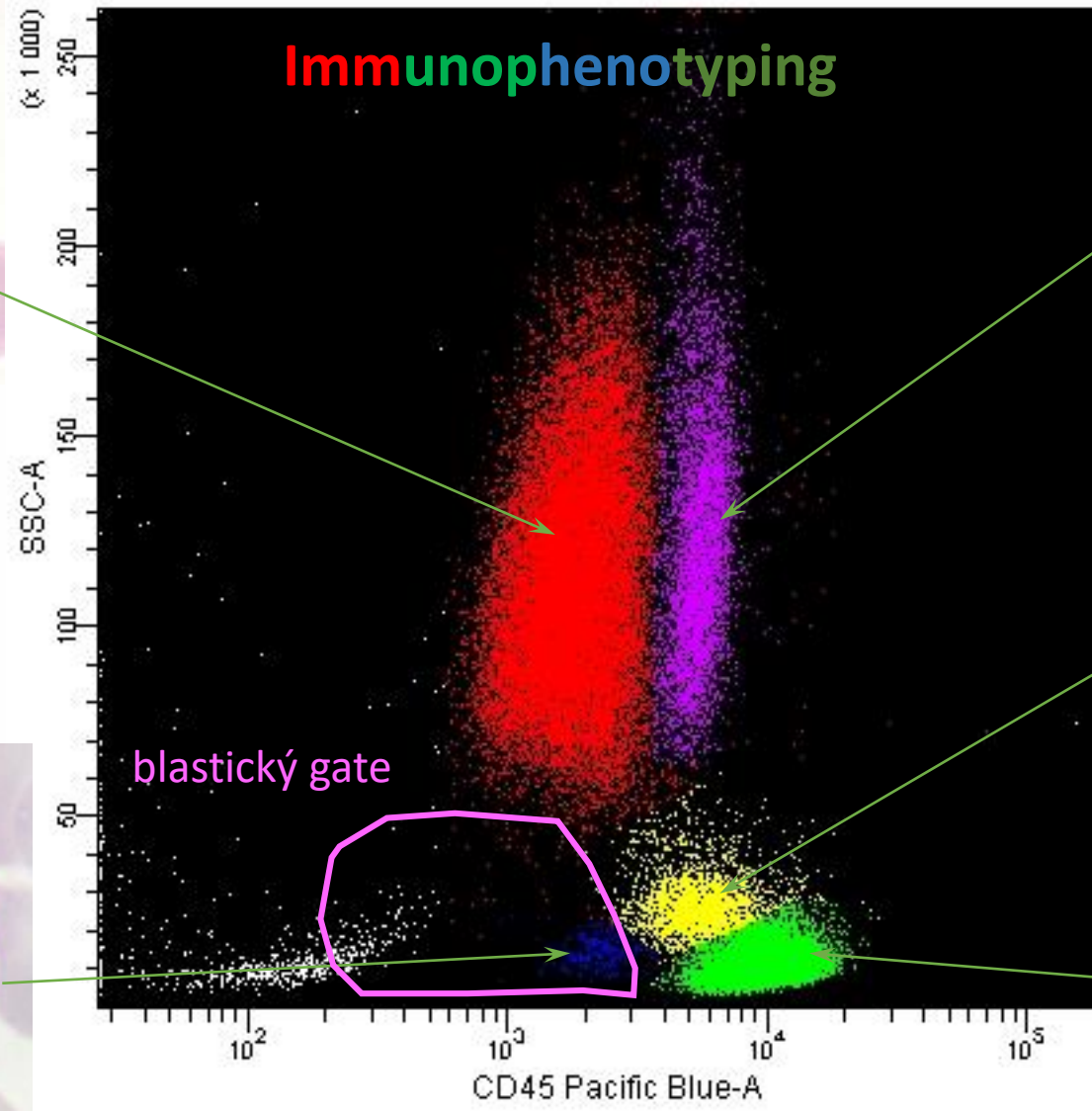
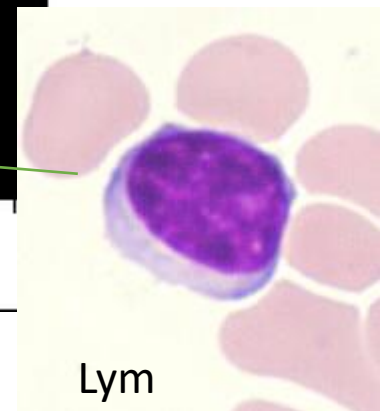
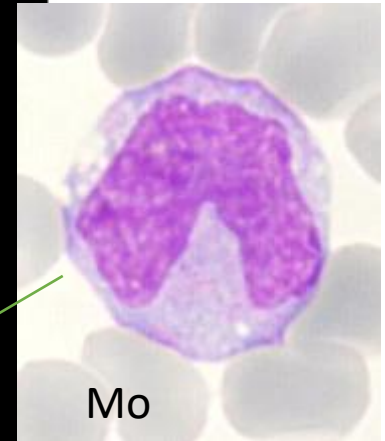
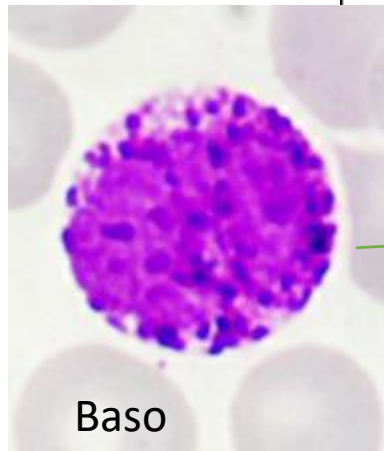
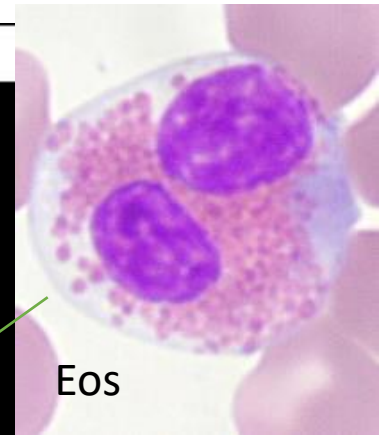
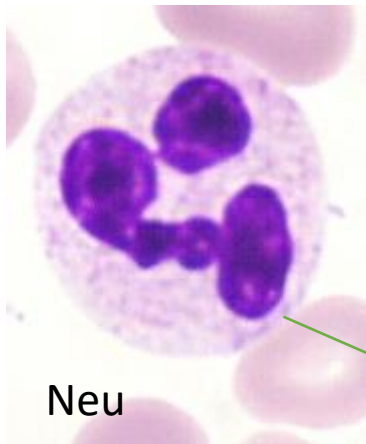
CD = cluster of differentiation

CD	Alternative Name	Ligands & Associated Molecules	T Cell	B Cell	Dendritic Cell	NK Cell	Stem Cell/Precursor	Macrophage/Monocyte	Granulocyte	Platelet	Erythrocyte	Endothelial Cell	Epithelial Cell	Function
CD1a	R4, T6	β-2-Microglobulin, CD74	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Antigen presenting protein
CD1b	R1, T6	β-2-Microglobulin	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Antigen presenting protein
CD1c	M241, R7, T6	β-2-Microglobulin	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Antigen presenting protein
CD1d	R3G1	β-2-Microglobulin, MHC II	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Antigen presenting protein
CD1e	cR2	β-2-Microglobulin	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Antigen presentation of glycolipids
CD2	E-rosette R, Erythrocyte R, T11, LFA-2	CD58, CD48, CD59, CD15, LFA-3	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Cell adhesion between T cells and other cell types
CD3	T3	TCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A complex of subunits that mediates T cell signal transduction
CD3d	δ Polypeptide (TlT3 complex)	TCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Part of the CD3/TCR complex that mediates T-cell receptor signal transduction
CD3e	T3e	TCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Part of the CD3/TCR complex that mediates T-cell receptor signal transduction
CD3g	T3g	TCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Part of the CD3/TCR complex that mediates T-cell receptor signal transduction
CD4	L3T4, W3/25, T4	MHC Class II, gp120, IL-16, Lck	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Initiates or augments the early phase of T-cell activation.
CD5	T1, Tp67, Leu-1, Ly-1	CD72, BCR, gp35-37, ZAP-70, TCR, CD21	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Acts as a negative regulator of T-cell receptor signaling
CD6	T12, TP120	gp40, gp90, CD166 (ALCAM)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Involved in T-cell activation and cell adhesion
CD7	gp40, TP41	PI3-Kinase	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Important for T-cell interactions
CD8a	Leu2, T8, Lyt2,3	MHCL, Lck	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	May play an important role in T-cell mediated killing
CD8b	CD8, Leu2, Lyt3	MHCL, Lck	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	May play an important role in T-cell mediated killing
CD9	p24, DRAP-1, MRP-1	CD63, CD81, CD82, CD41/CD61, HLA-DR, Integrin β1, PI4-Kinase	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Involved in platelet activation and aggregation, cell adhesion and cell motility
CD10	CALLA, NEP, gp100, EC 3.4.24.11, MME		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	Neutral endopeptidase that cleaves peptides and inactivates several peptide hormones.
CD11a	LFA-1α, Integrin αL	ICAM-1, 2, 3, 4, CD18	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Involved in leukocyte-endothelial cell interactions and T-cell mediated killing.
CD11b	Integrin αM, CR3, Mo1, C3iR, Mac-1	iC3b, Fibrinogen, ICAM-1, 2, Factor X	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Implicated in the various adhesive interactions of monocytes, macrophages, and granulocytes.
CD11c	Integrin αX, p150,95, AXb2, CR4	iC3b, Fibrinogen, ICAM-1, 4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Important for cell-cell interaction during inflammatory responses.

... CD371

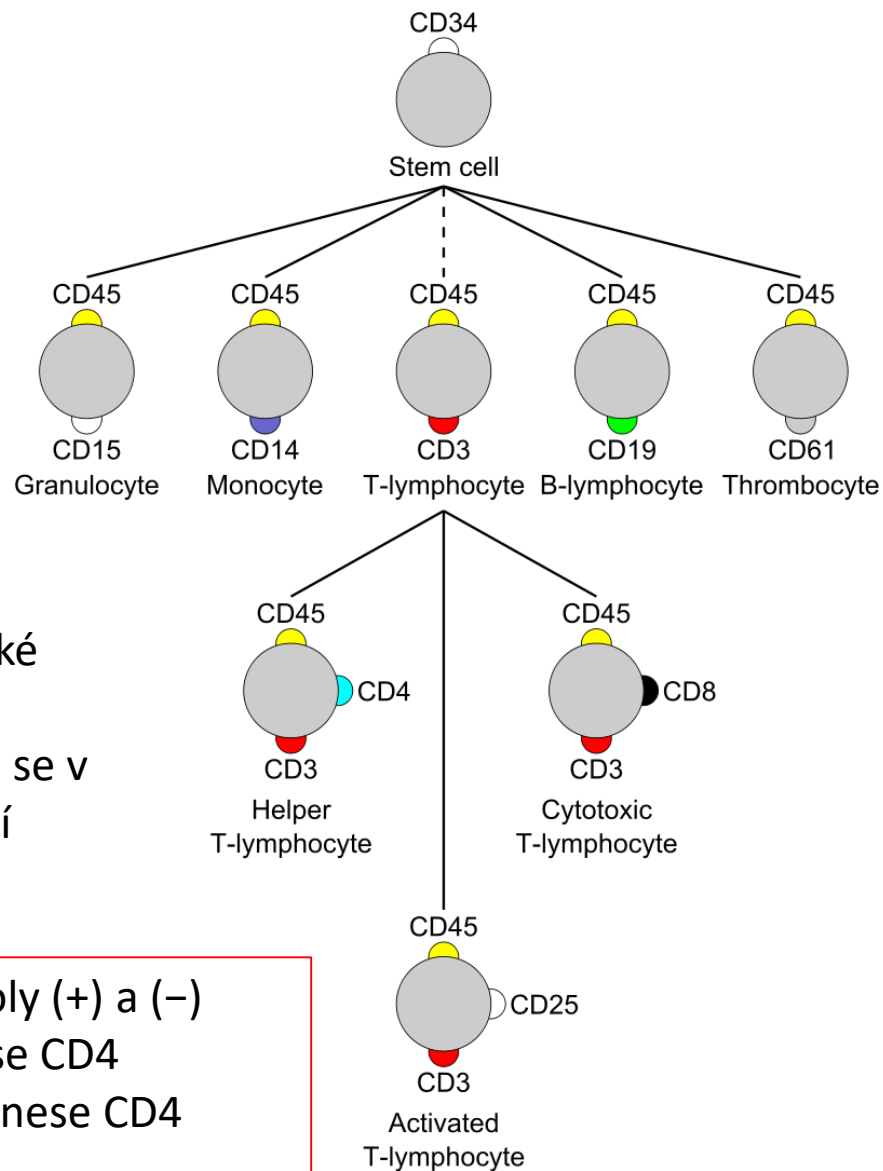


# CD45 – panleukocytární znak



**FCM hodnotí populace, ne jednotlivé buňky!**

# Kombinací CD45 s dalšími znaky lze krevní buňky rozdělit na další podtypy



## Atypické znaky:

Aberantní znaky – takové, které se na fyziologické subpopulaci nevyskytují

Asynchronní exprese – znaky, jejichž kombinace se v daném stádiu vývoje u zdravé buňky nevyskytují

Populace se označují kombinací znaků se symboly (+) a (-)

CD4<sup>+</sup> = CD4 pozitivní popul. = většina buněk nese CD4

CD4<sup>-</sup> = CD4 negativní popul. = většina buněk nenese CD4

sCD3<sup>+</sup> = Ag je pozitivní na povrchu buňky

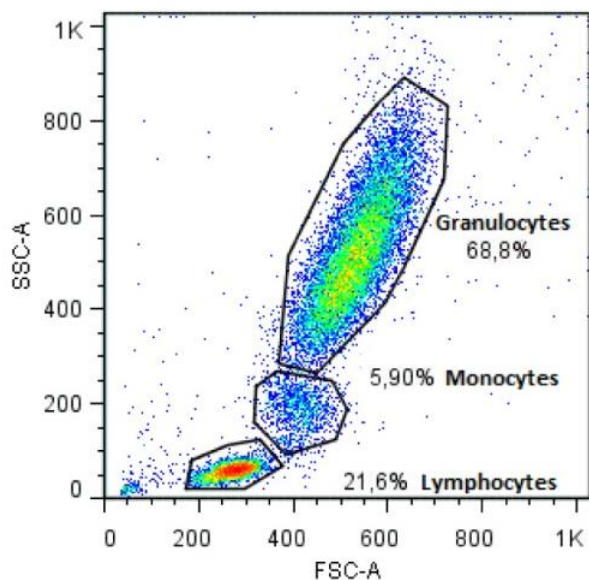
cCD3<sup>+</sup> = Ag je pozitivní v cytoplasmě buňky

# Parametry FSC a SSC

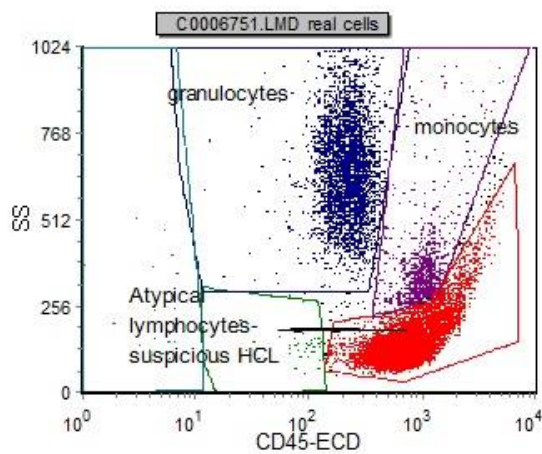
FSC – forward scatter = velikost buňky

SSC – side scatter = tvar jádra (segmentace)

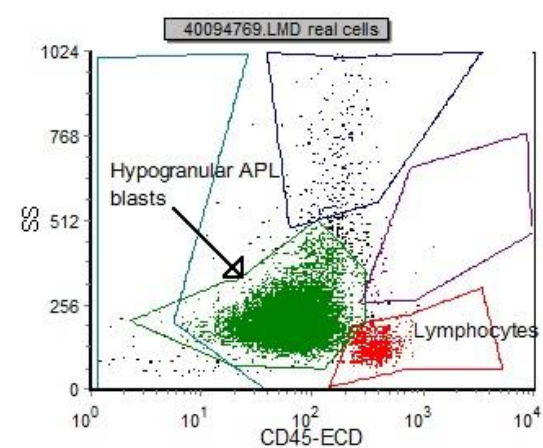
Atypické hodnoty FSC a SSC  
naznačují patologii buněk.



Lym SSC<sup>hi</sup> u HCL



Gr SSC<sup>low</sup> u APL



## Preanalytická fáze












- Likvidní vzorek bez slepených buněk + sonda
- Inkubace v temnu 15 – 30 min.
- Odstranění balastních buněk (lýza Ery)
- Promytí (centrifugace, filtrace, fixace)

## Analýza a hodnocení

- Akvizice dostatečného množství buněk (citlivost metody, LOD)
- „gating“ a výpočty (IRI)
- Fenotyp subpopulací a jejich rozpočet

# Příklady využití FCM v klinické diagnostice

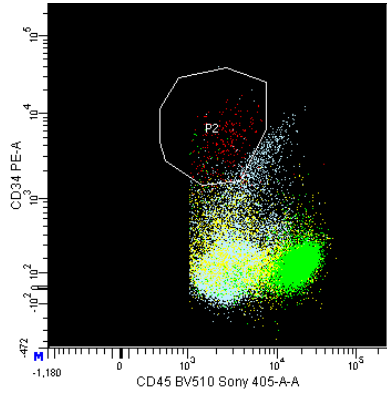
- Diagnostika leukémií a lymfomů (diagnóza, staging, MRD)
- Stanovení počtu kmenových buněk v transplantátu (CD34+)
- Průkaz infiltrace nádorových buněk (likvor, BAL, výpotek)
- Monitoring biologické léčby (RTX, CAR-T)
- HIV infekce (CD45/CD3/CD4 – obrácený IRI)
- Imunodeficience (FN USA)
- Funkční testy (fagotest, oxidativní vzplanutí)
- NK buňky (intracelulární stanovení Perforinu)
- Paroxysmální noční hemoglobinurie (deficit GPI – PNH klony)
- Funkčnost krevních destiček (poruchy srážení krve)
- Fetomaternální hemoglobin – detekce Ery plodu v matčině krvi

		Key Markers - Human
T Cell		CD3 CD4 CD8
B Cell		CD19 CD20
Dendritic Cell		CD11c CD123
NK Cell		CD56
Stem Cell/ Precursor		CD34 <i>hematopoietic stem cell only</i>
Macrophage/ Monocyte		CD14 CD33
Granulocyte		CD66b
Platelet		CD41 CD61 CD62
Erythrocyte		CD235a
Endothelial Cell		CD146
Epithelial Cell		CD326

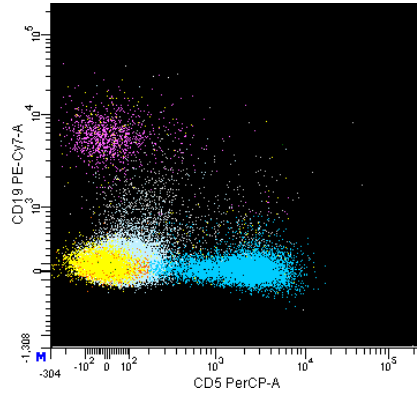


# Cíl: Odhalit patologii

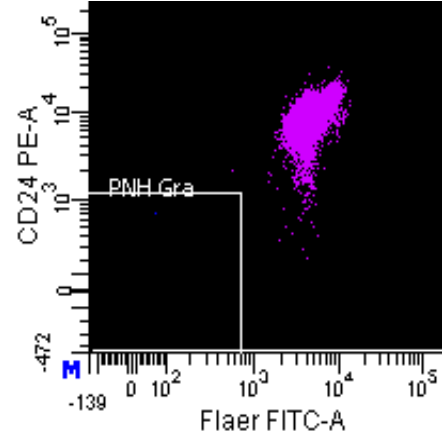
Zmnožení populace - Aberantní znaky - Ztráta exprese znaků - Hyperexprese



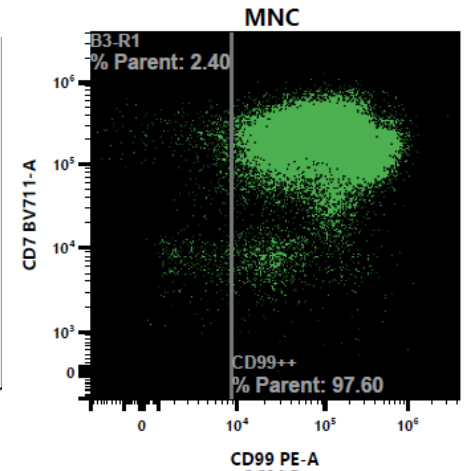
CD34+ v KD



CD5 na B lym

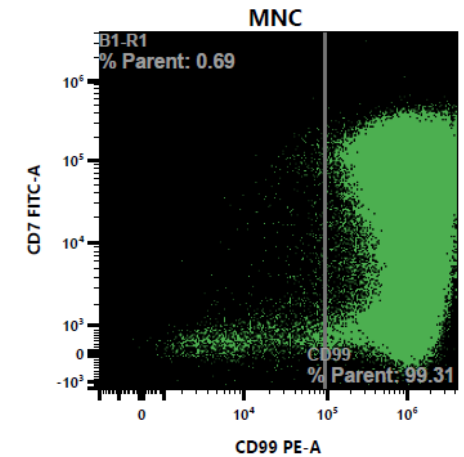
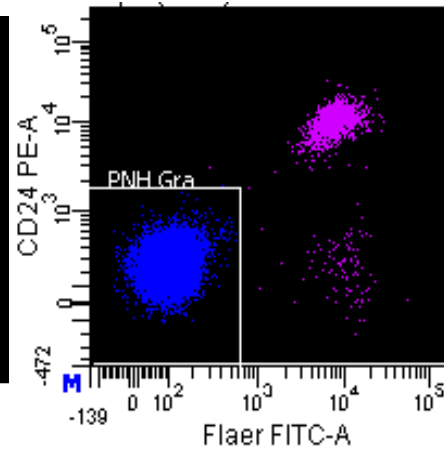
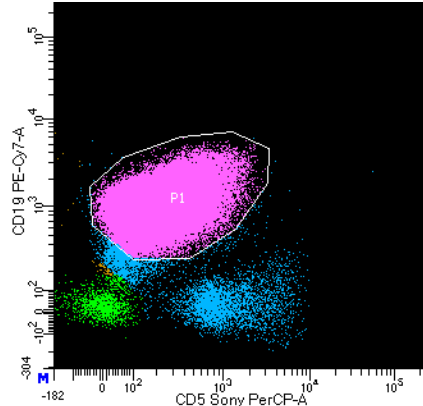
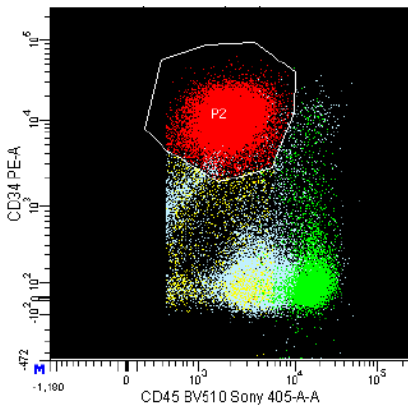


CD24neg Gr



CD99++ T lym

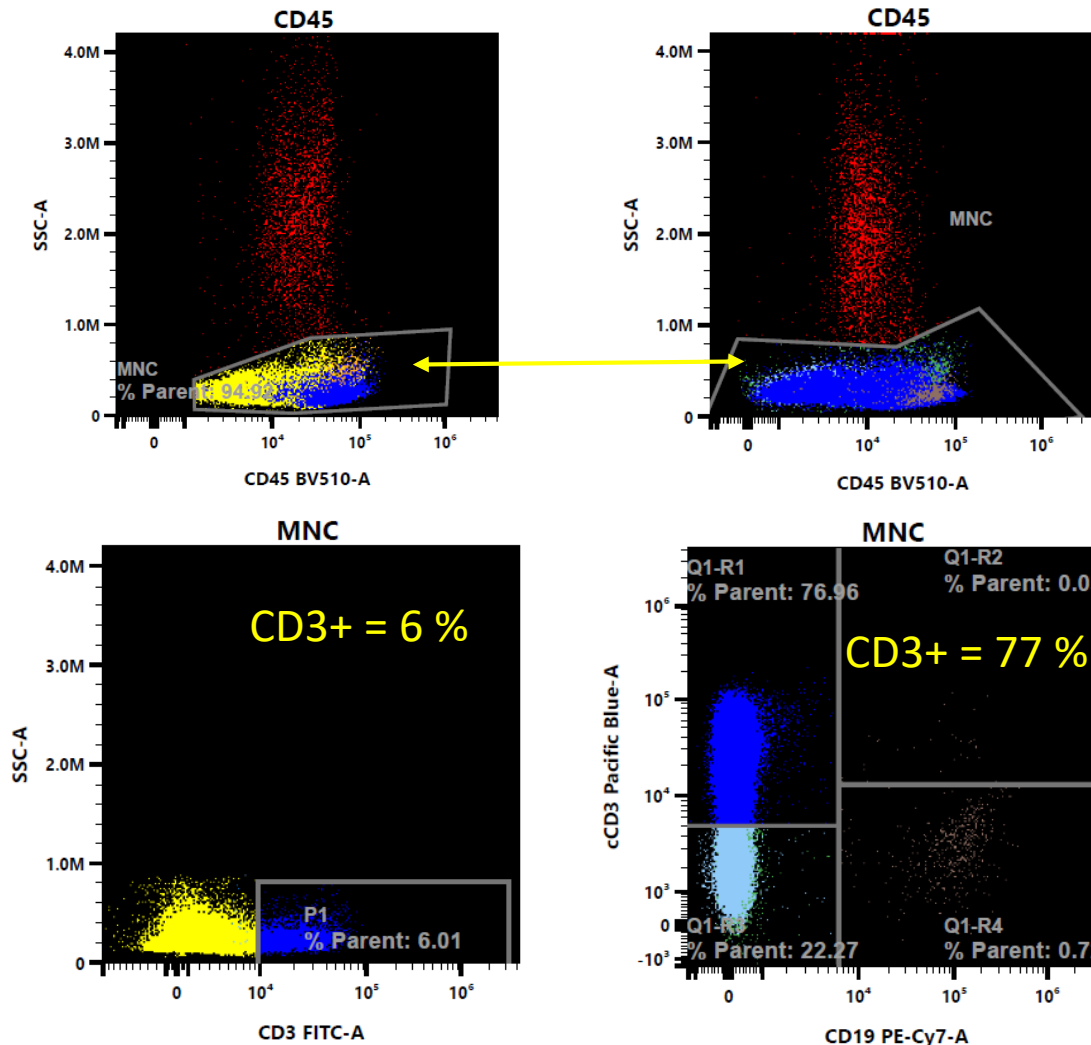
Normální nálezy



Abnormální nálezy

# Cíl: Odhalit původ patologických buněk

T lym povrchové barvení x cytoplazmatické barvení anti-CD3



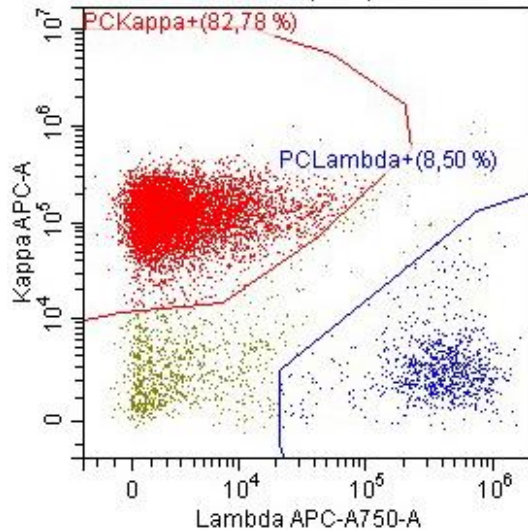
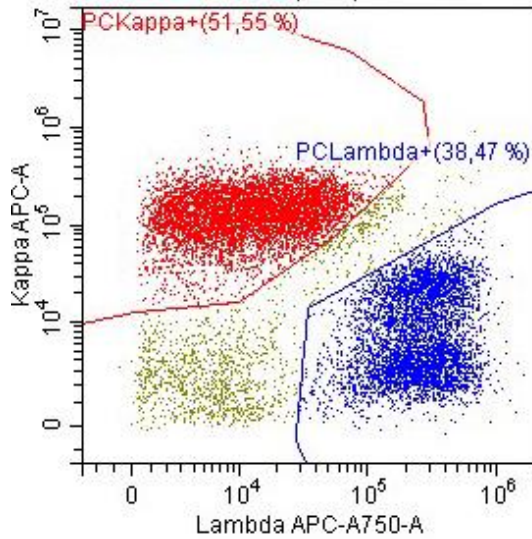
Chybějící povrchové znaky charakteristické pro danou buněčnou linii bývají typickým znakem patologie (viz. Obr.).

naopak

Aberantně vyjádřené znaky na povrchu buněk zastírají jejich původ.  
Příklad: CD19+ na AML  
Cytoplazmaticky prokážeme cCD79a-MPO+

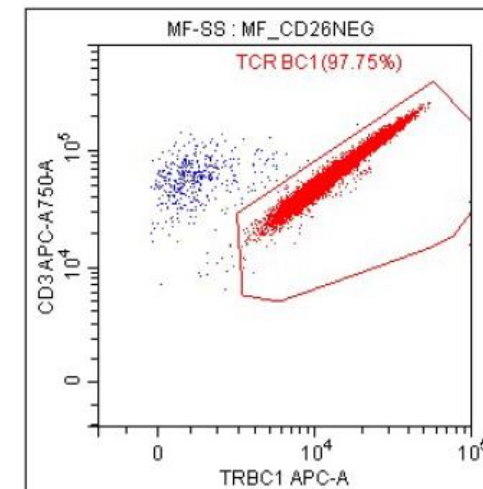
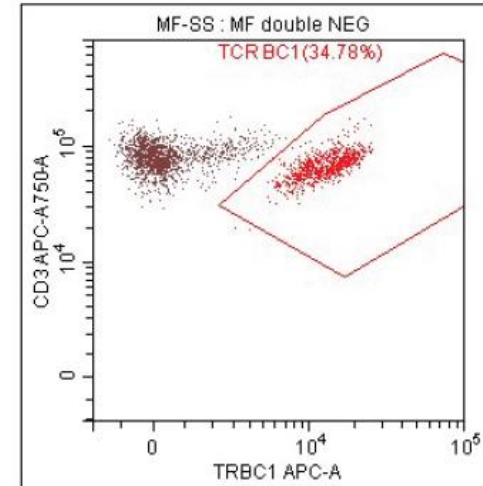
# Cíl: Odhalit klonalitu

## B lym populace (BCR)



-

## T lym populace (TCR)



**Normální nález**  
Normální poměr  
buněk s jedním a  
druhým typem  
BCR či TCR

**Abnormální nález**  
Vychýlený poměr  
buněk s jedním a  
druhým typem BCR  
či TCR

# Cíl: stanovit imunofenotyp patologické populace

**FCM hodnotí populace, ne jednotlivé buňky!**

**Specifický fenotyp** – kombinace znaků, která je typická pro určitou patologickou populaci (dg.)

Příklad: CLL – CD5+19+20<sup>dim</sup>23+43+79b<sup>low</sup>81-FMC7-

**LAIP** – leukemia associated immunophenotype, lze stanovit pacient specificky (AML –MRD)

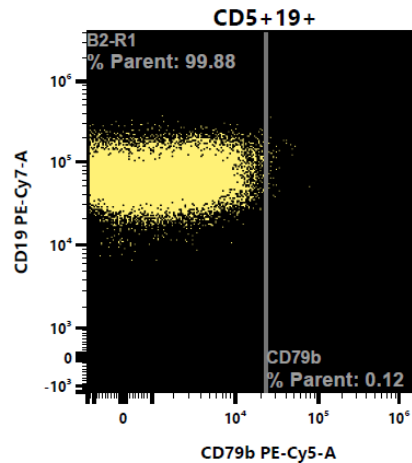
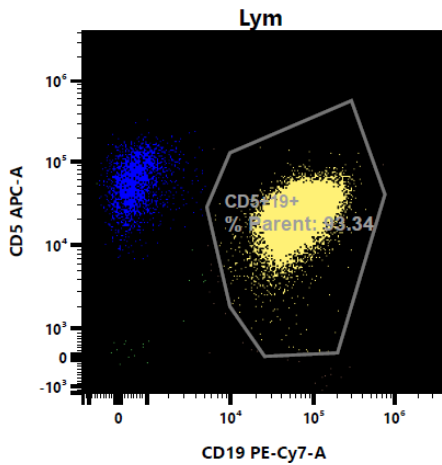
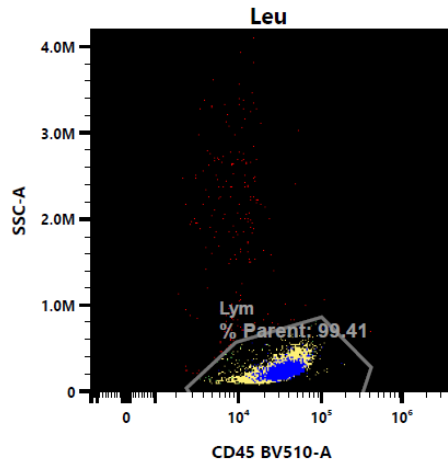
**Nespecifický fenotyp** - kombinace znaků, která není typická (nelze stanovit přesnou dg.)

Příklad: B-NHL

# Cíl: Odhalit infiltraci

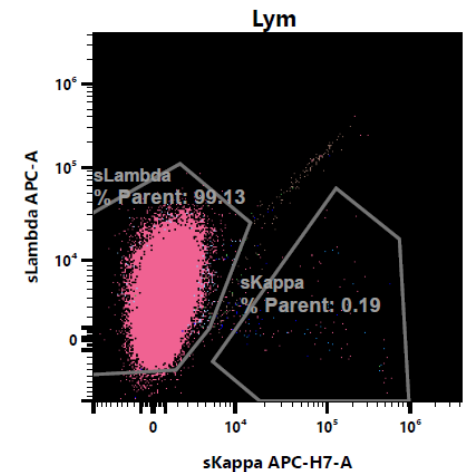
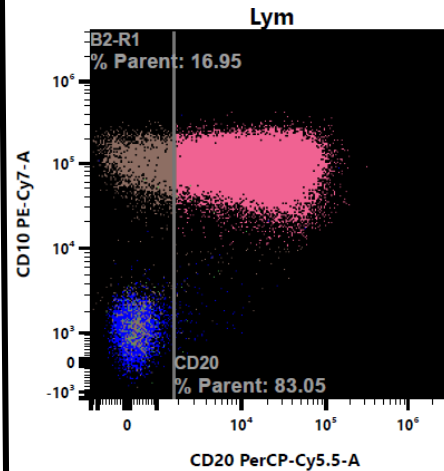
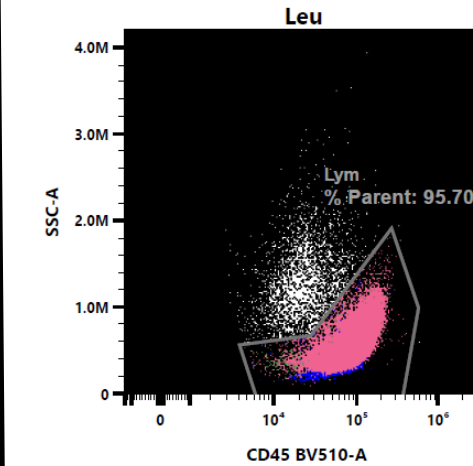
## CLL v pleurálním výpotku

Žlutá populace  
CD5+19+79bdim



## DLBCL v likvoru

Růžová populace  
CD10+20+sLambda+



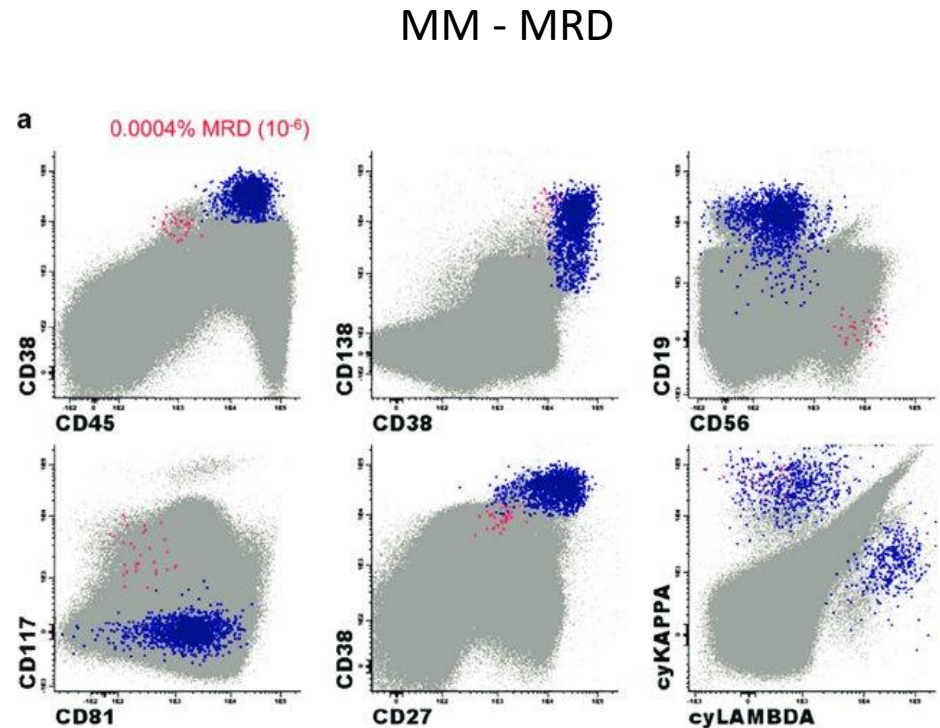
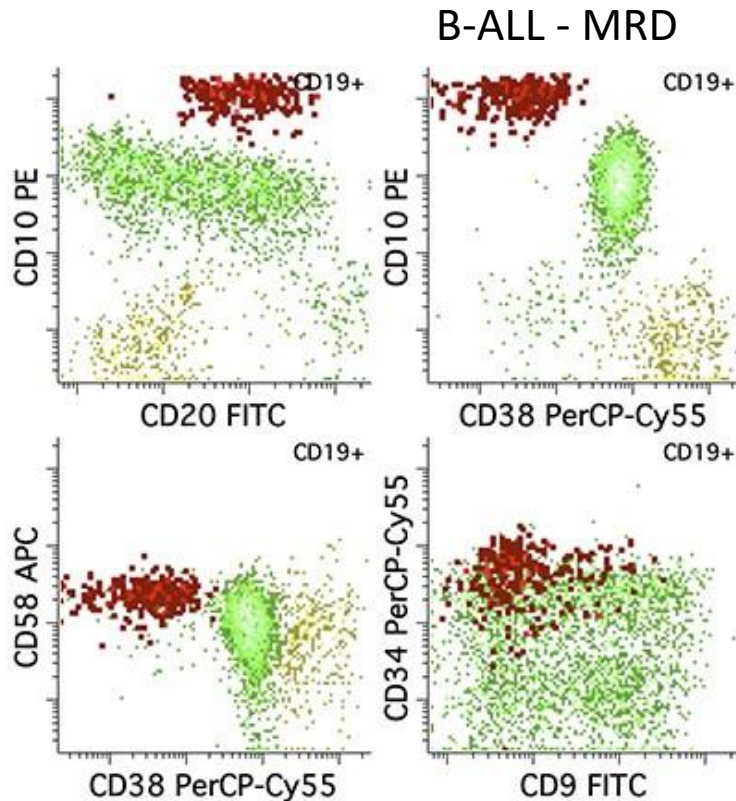


# Cíl: Minimální zbytková nemoc (MRD)

V závislosti na dg. hledáme:

buňky původního fenotypu (nutnost vstupního vyšetření) nebo  
buňky typického fenotypu (dg. se specifickým fenotypem) nebo  
klonální populaci v buněčné linii

Citlivost až  $10^{-6}$  = 20 bb/20 000 000



# Další možnosti stanovení vlastností buněk

Aktivace - T lym (HLA-DR)

Diferenciace (CD38 u kmenové buňky)

Proliferace (Ki-67)

Ztráta funkčnosti – NK buňky (perforin)

Migrace

Viabilita (7-AAD)

Přítomnost jádra (Syto)

# Fetální erytrocyty

2 protilátky: Anti-HgF (fetální hemoglobin), anti-CA (karbonická anhydráza)

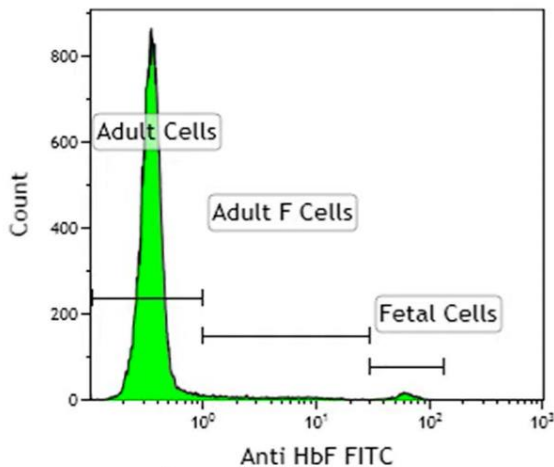
HgF+ jsou fetální Ery a F-buňky

CA+ jsou pouze adultní Ery

Vyšetření umožňuje spolehlivé kvantitativní stanovení množství fetálních erytrocytů proniklých do mateřské cirkulace bez ohledu na RhD

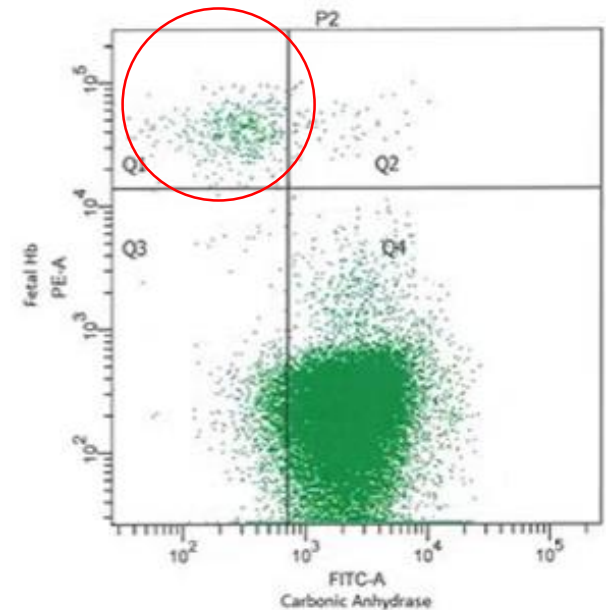


## Flow cytometry



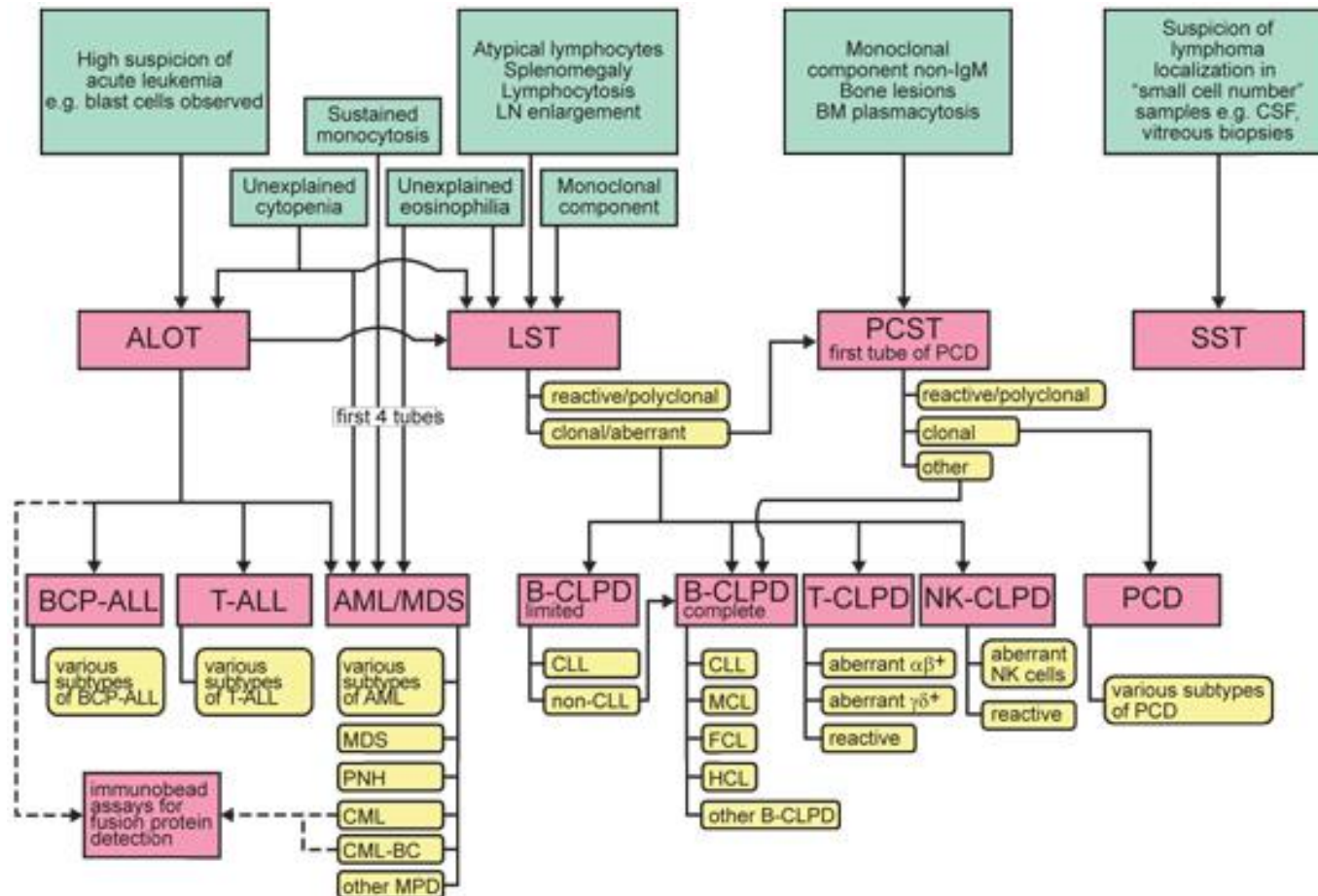
- Distinguish adult vs fetal
  - Intracellular Hgb
    - Fetal Hgb
    - Adult Hgb
      - Fetal
  - Intensity correlated to control cells

AACC Better health through laboratory medicine.

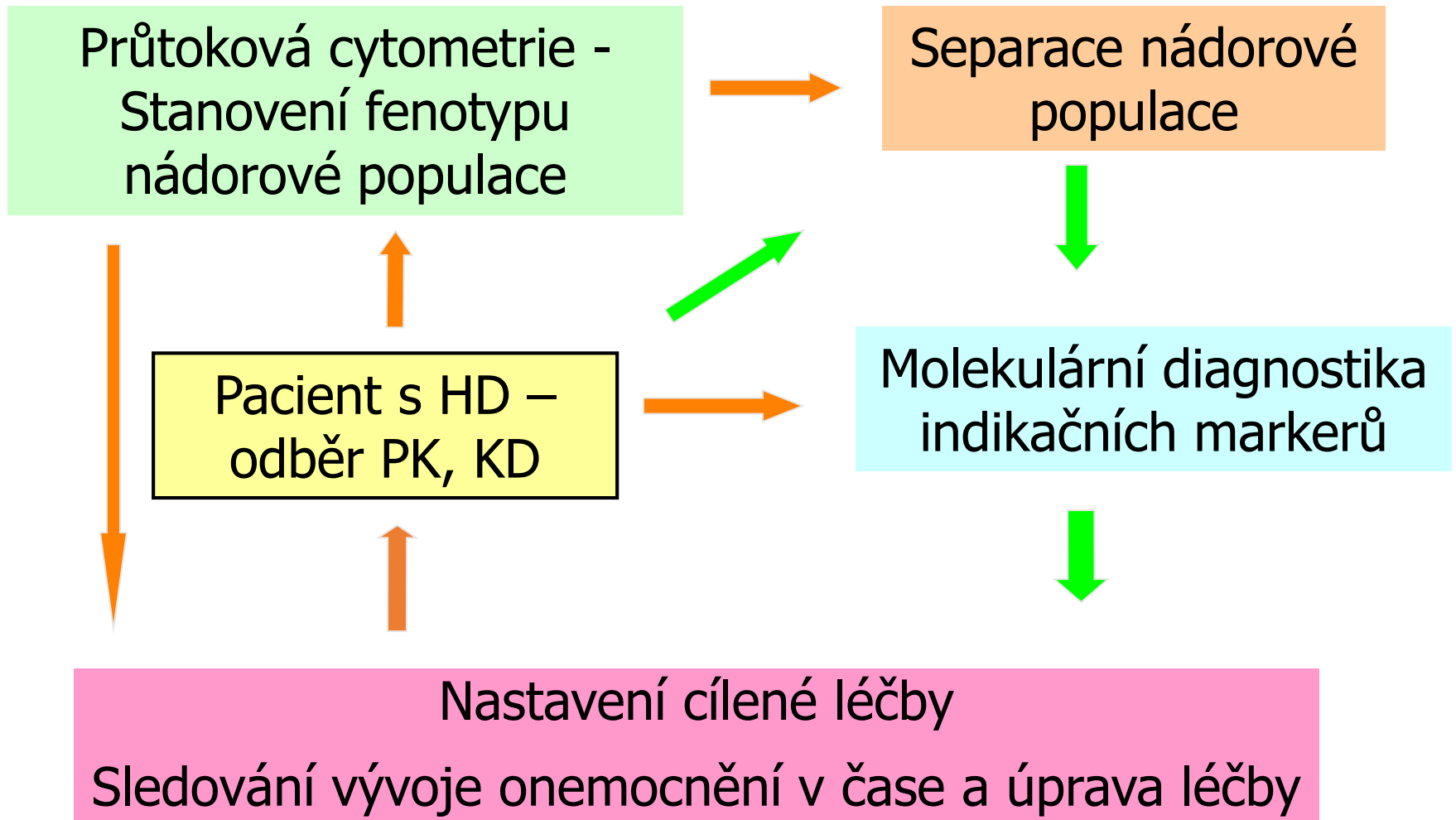


# EuroFlow – standardizovaný přístup k diagnostice

- zavedení 6 – 8 barevného vyšetřovacího protokolu (kombinování povrchových a cytoplazmatických markerů v jedné zkumavce)

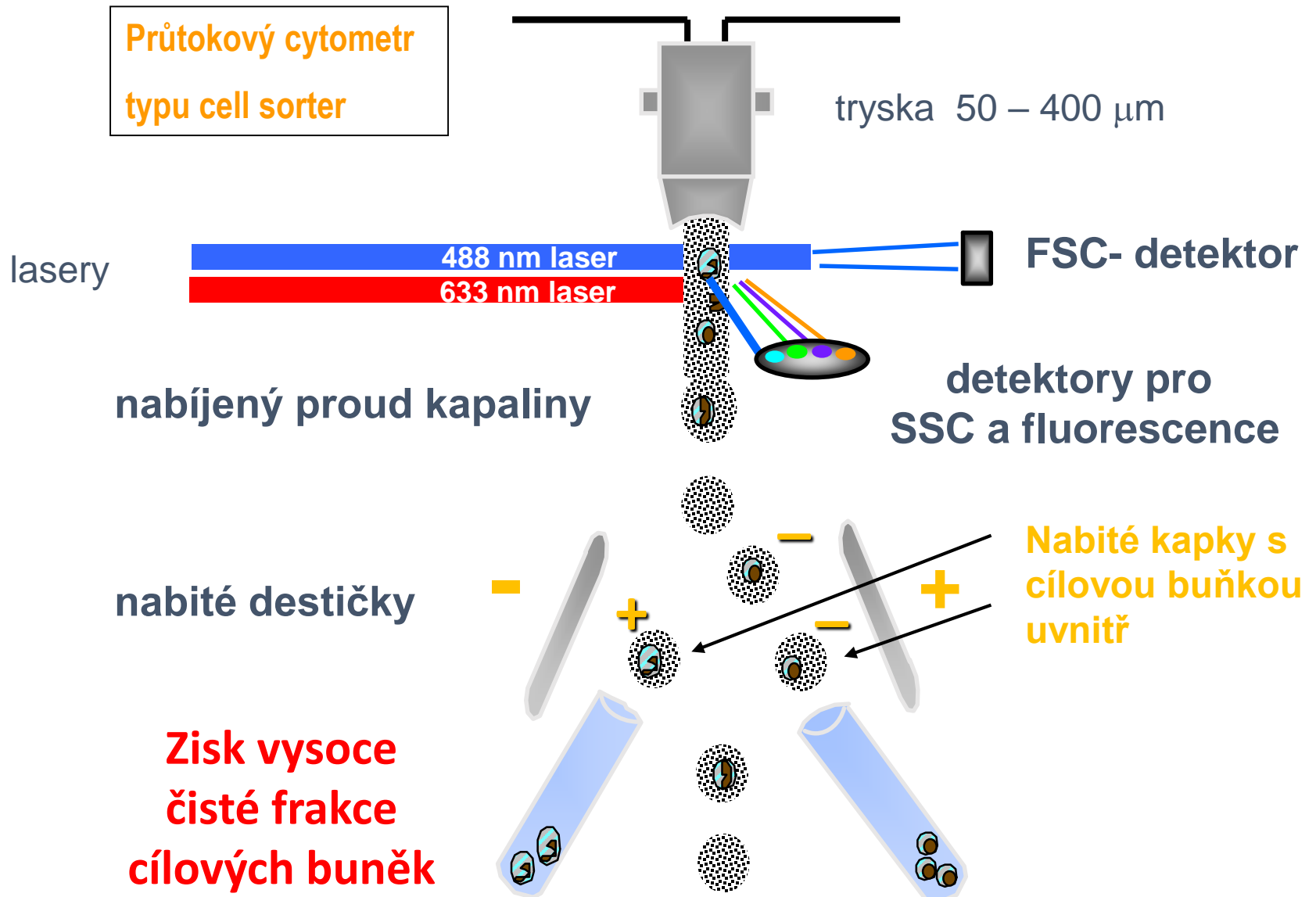


# Cell sorting – vysoce specializované vyšetření v hematatoonkologické diagnostice





# Princip cell sortingu – vybraná buňka v kapce dostává selektivní náboj



# Průtoková cytometrie – výhody a nevýhody

- Rychlá, specifická, citlivá, vysoce informativní
- Nenahraditelná v diagnostice i výzkumu
- Dostupná (ve všech onkologických centrech a velkých nemocnicích)
- Rozvíjející se (spektrální cytometrie)
- Subjektivní (operátor dependentní), nákladná



Let's flow together

