

Laboratorní diagnostika hematoonkologických malignit – průtoková cytometrie

Část I

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

Průtoková cytometrie (flow cytometry - FCM)

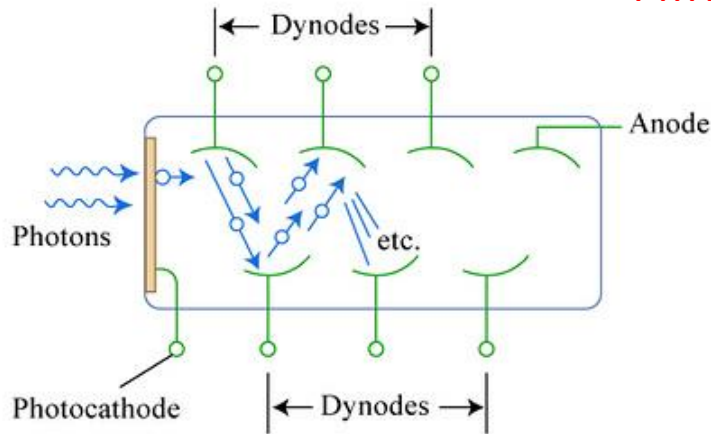
Metoda na pomezí

- 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

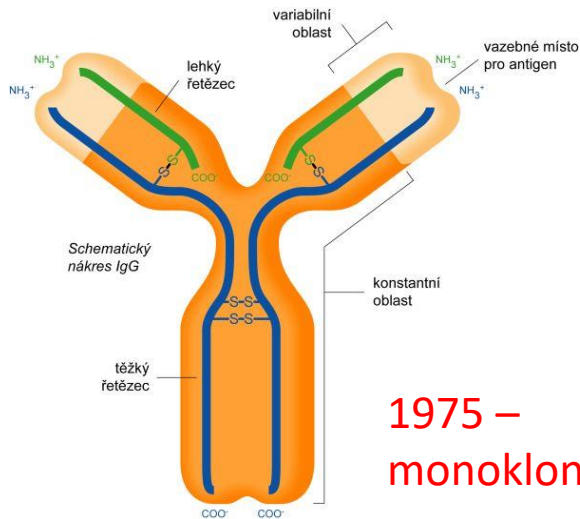
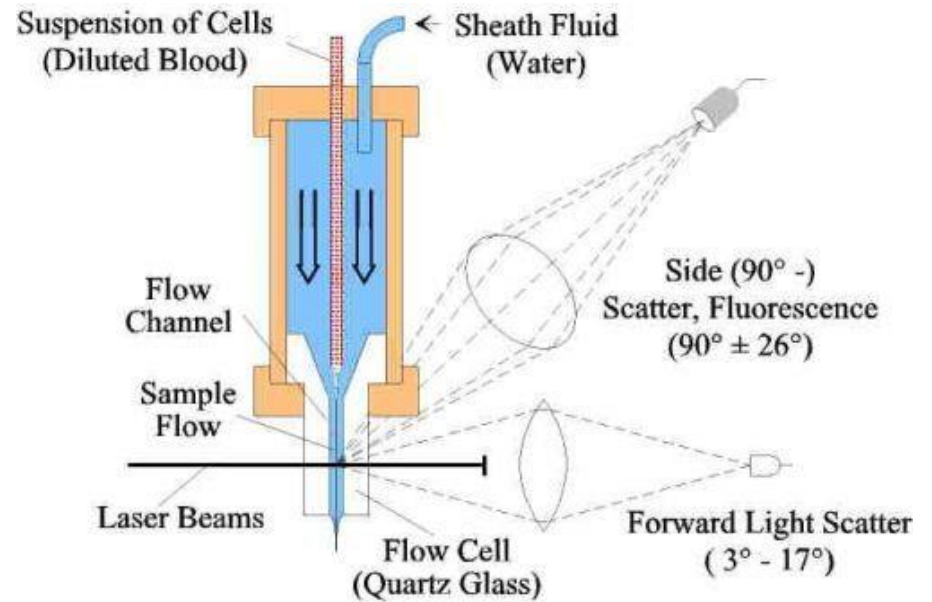
Zásadní objevy, které umožnily vznik cytometrie

1934 - fotonásobič

PMT



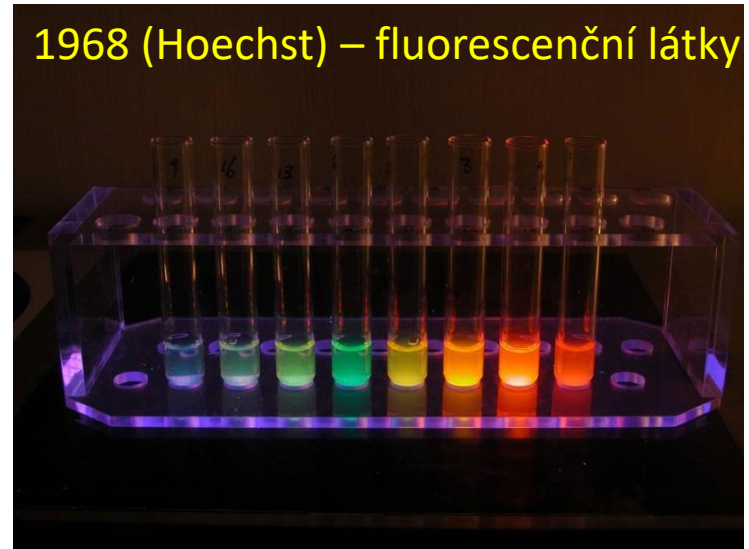
1953 – hydrodynamická fokusace



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



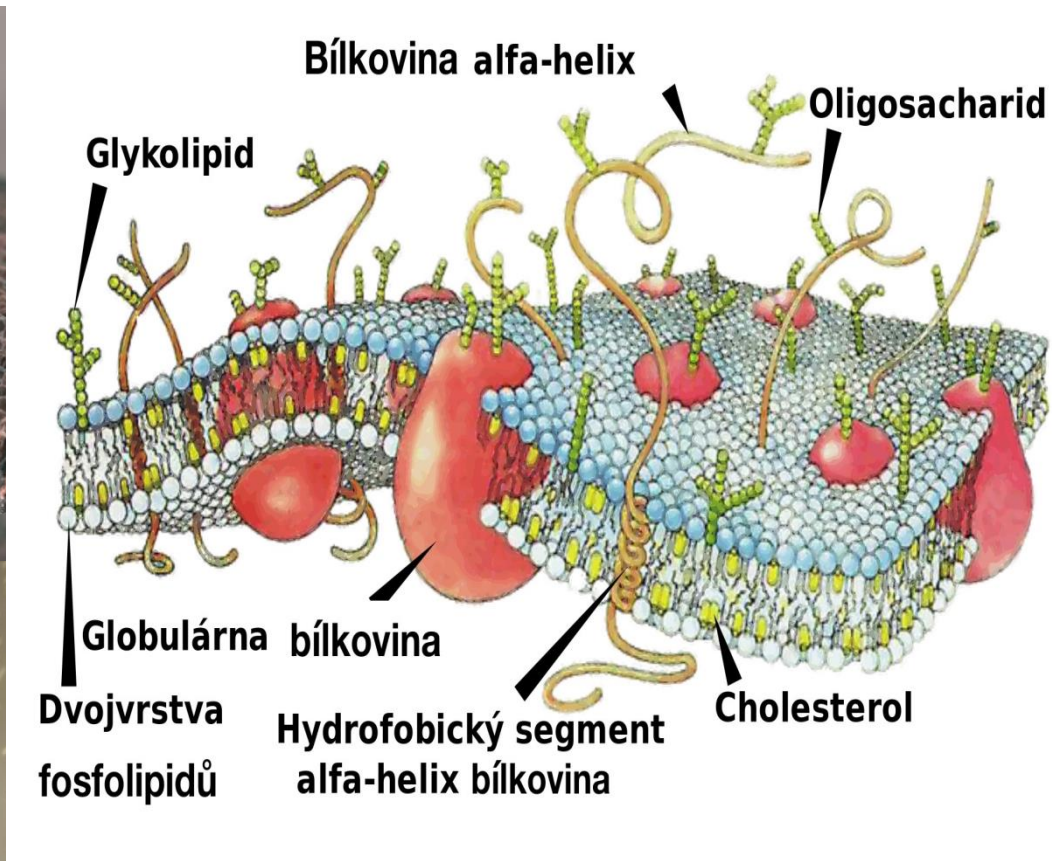
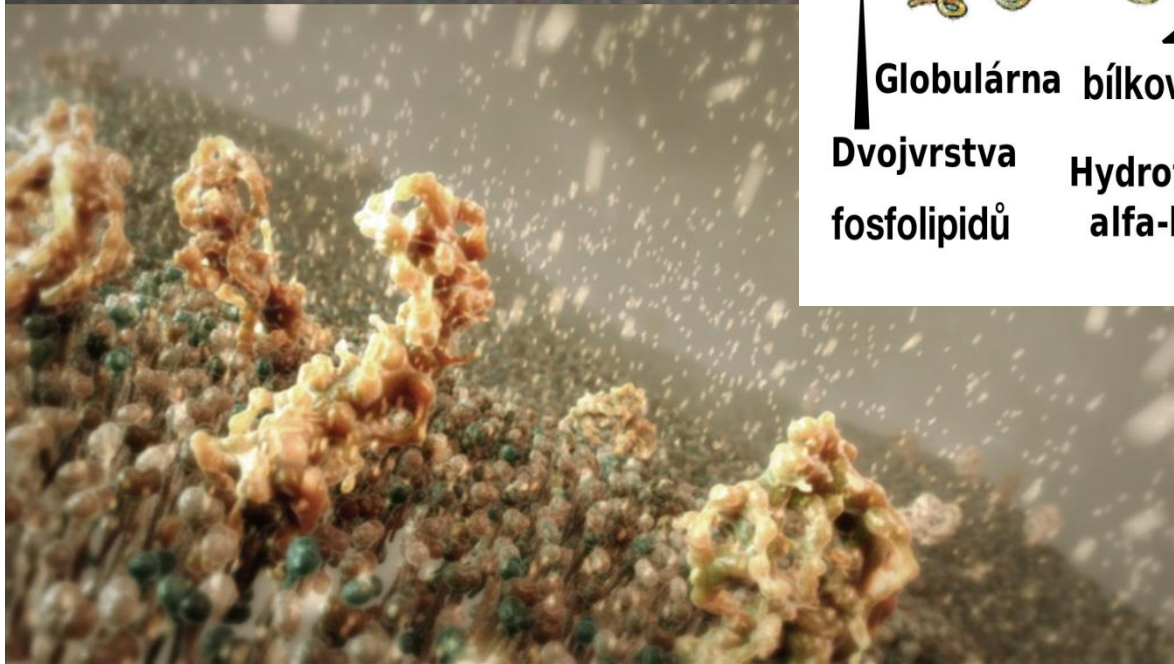
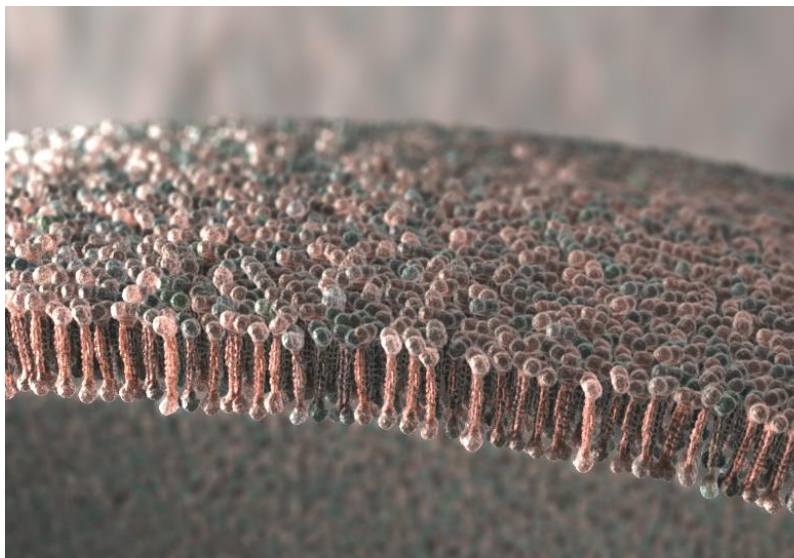
Star CellBio

presents

FLOW CYTOMETRY

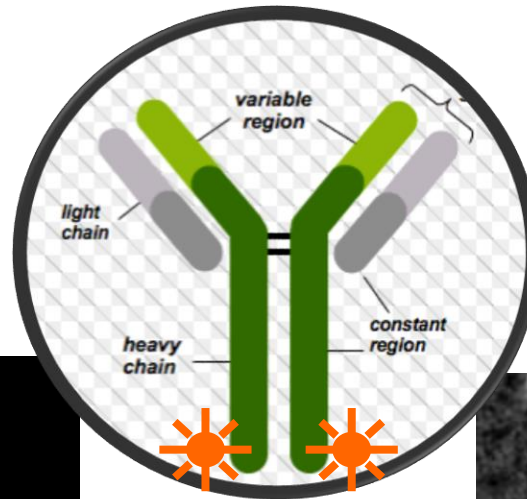
<https://www.youtube.com/watch?v=2P7YsJ0Zkio>

Buněčný povrch = široké spektrum specifických Ag

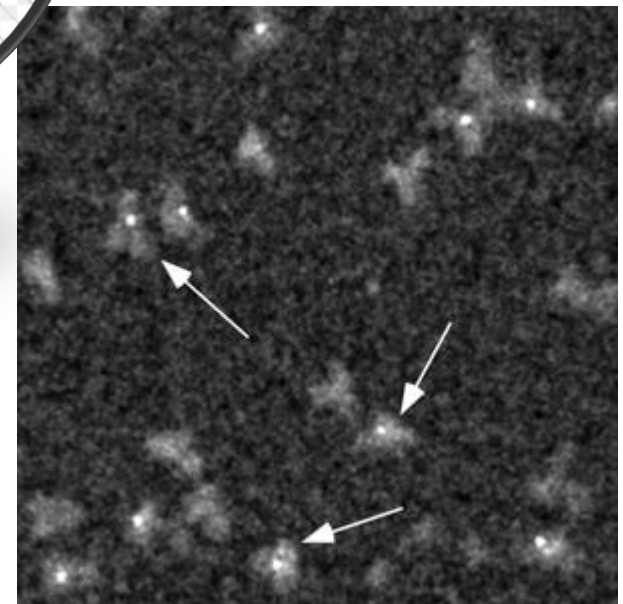
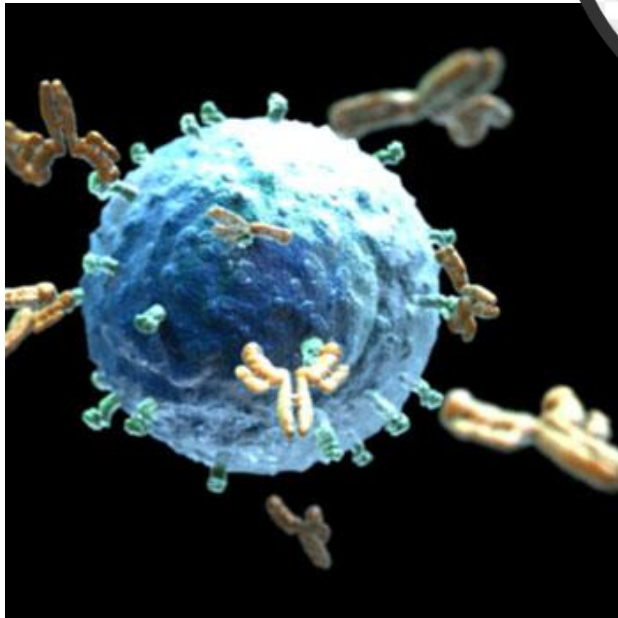


Imunoglobuliny jako nástroj

Monoklonální protilátky konjugované s fluochromy = vysoce specifické sondy pro FCM



Snímek imunoglobulinu v elektronovém mikroskopu



CD nomenklatura – klasifikace Ag lidských leukocytů

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

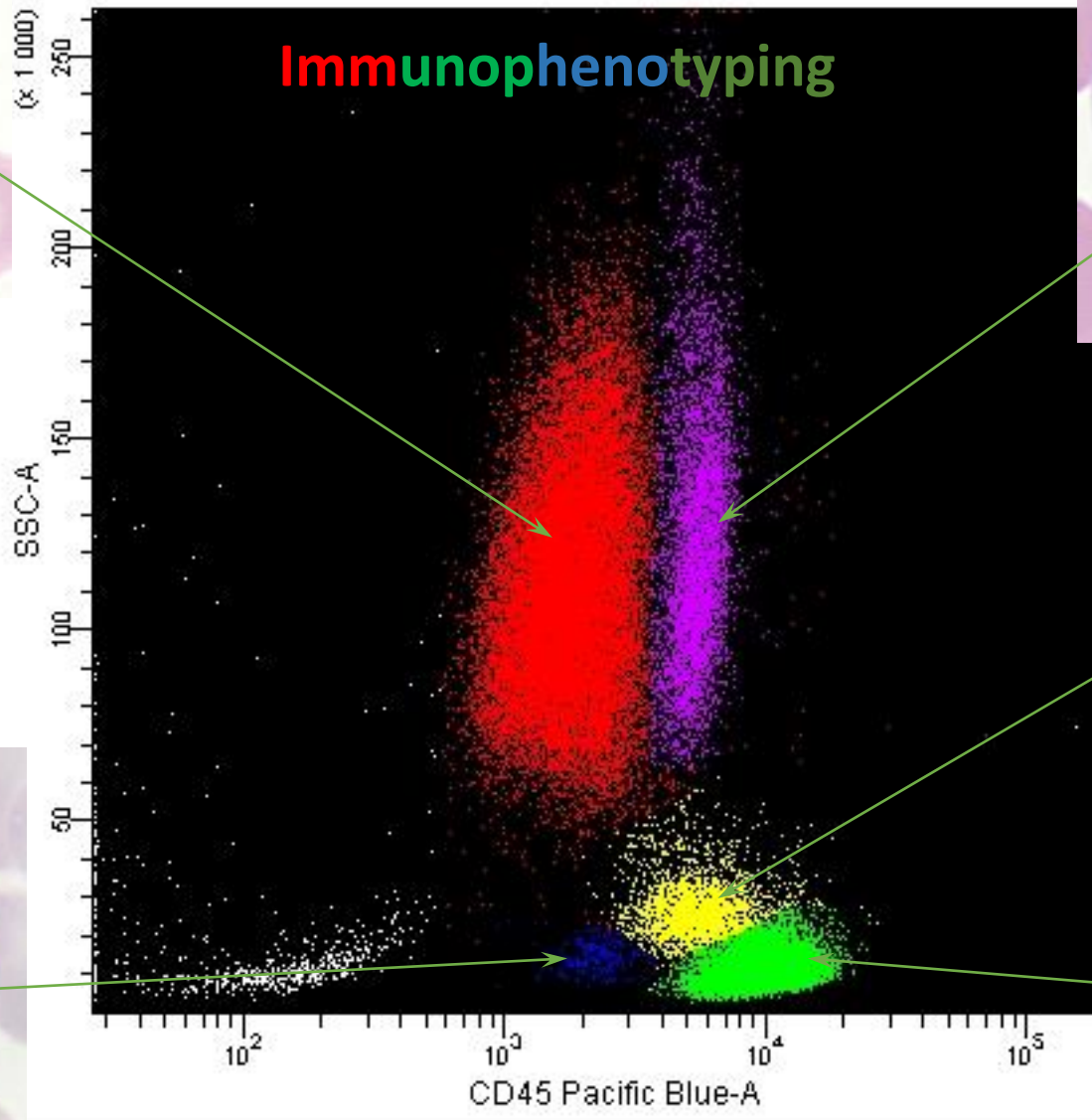
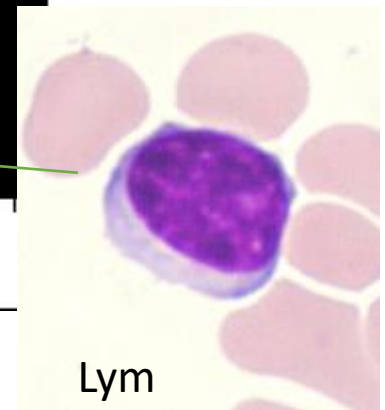
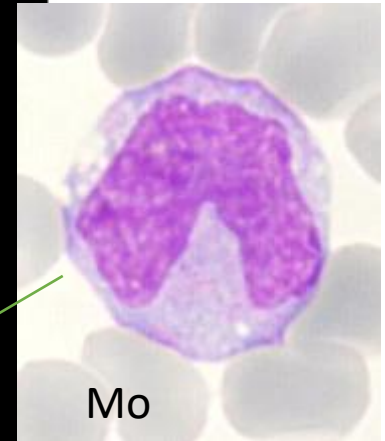
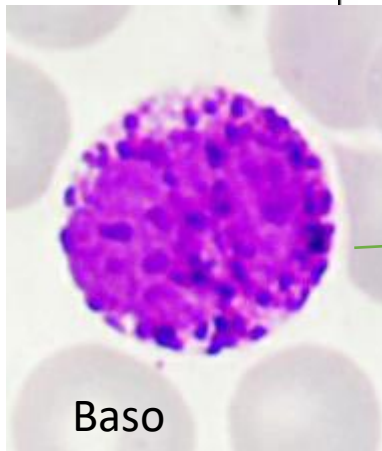
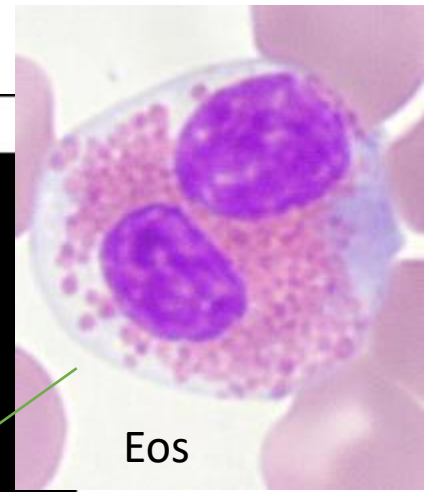
CD Marker Handbook Human CD Markers

CD = cluster of differentiation

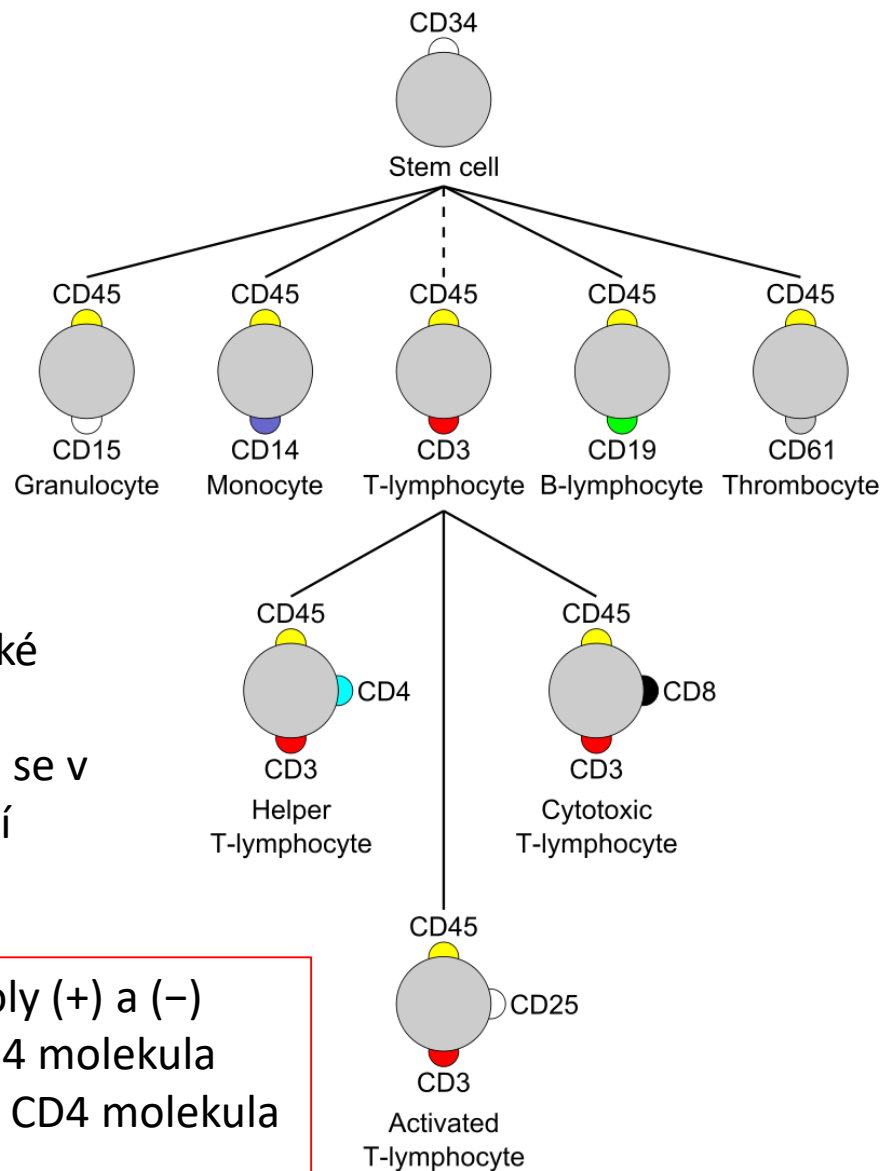
CD	Alternative Name	Ligands & Associated Molecules	T Cell	B Cell	Dendritic Cell	NK Cell	Stem Cell/Precursor	Macrophage/Monocyte	Granulocyte	Platelet	Erythrocyte	Endothelial Cell	Epithelial Cell	Function
CD1a	R4, T6	β-2-Microglobulin, CD74	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Antigen presenting protein
CD1b	R1, T6	β-2-Microglobulin	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	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, C3niR, 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



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⁺ = CD4 pozitivní buňka, tzn. na buňce je CD4 molekula
CD4⁻ = CD4 negativní buňka, tzn. na buňce není CD4 molekula
sCD3⁺ = Ag je pozitivní na povrchu buňky
cCD3⁺ = Ag je pozitivní v cytoplazmě buňky

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)
- „gating“ a výpočty
- Fenotyp subpopulací a jejich rozpočet

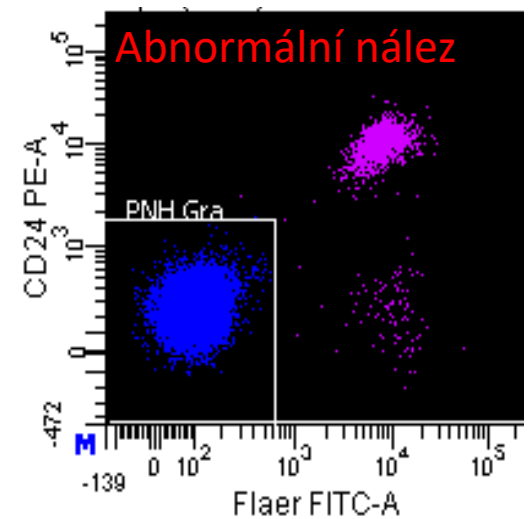
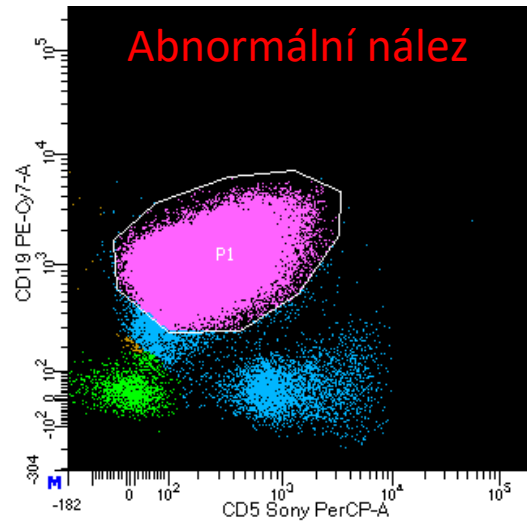
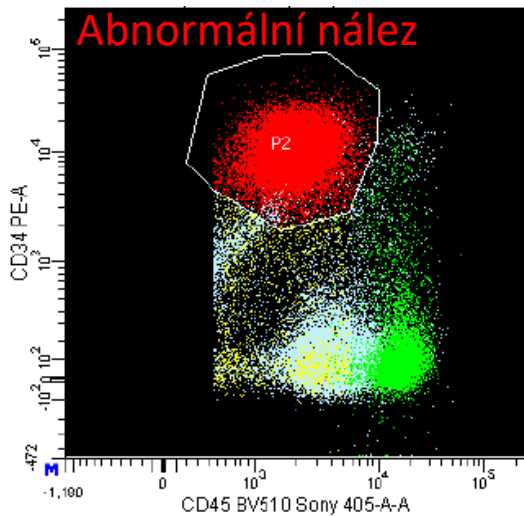
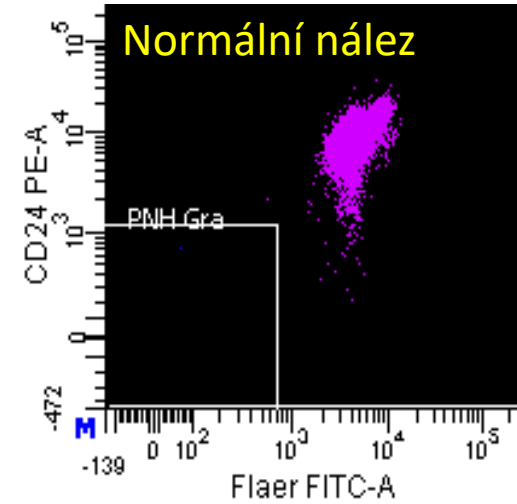
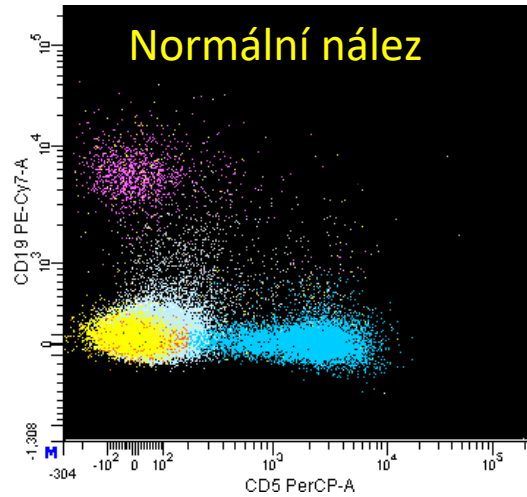
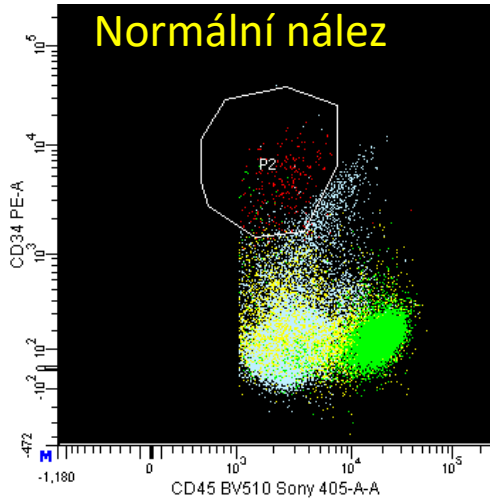
Specifický fenotyp – kombinace znaků, která je typická pro určitou patologickou populaci
Nespecifický fenotyp - kombinace znaků, která není typická pro danou patologickou populaci

Cíl: Odhalit patologii

Zmnožení populace












- Aberantní znaky

- Ztráta exprese znaků



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

Přínos FCM pro hematologii

ZÁSADNÍ VÝZNAM

stanovení diagnózy, „staging“ , MRD

ALL, CLL, AML, MM, HCL, PLL, MCL

OMEZENÝ VÝZNAM

přispívá ke stanovení diagnózy

další NHL, LGL, MF/SS

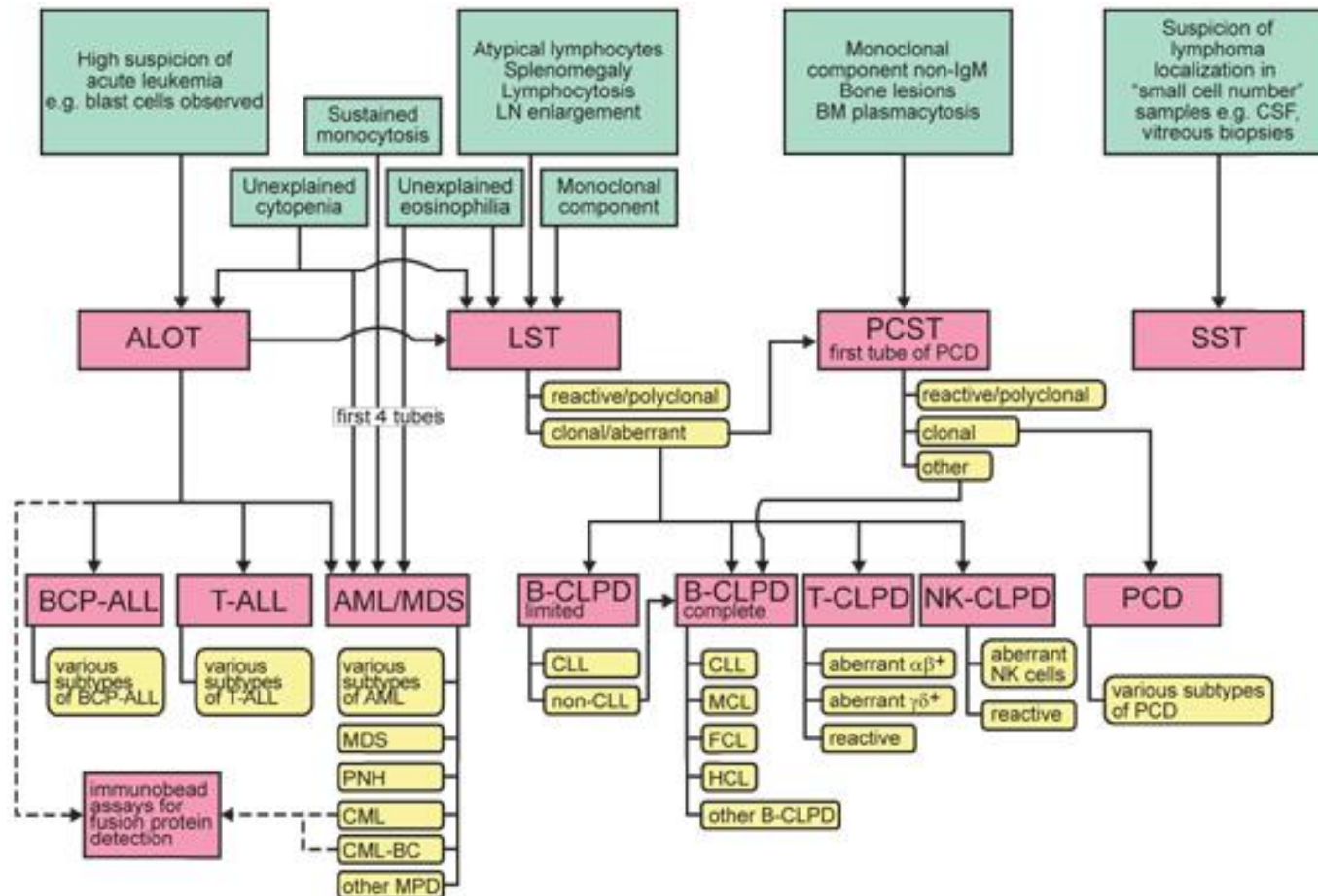
BEZ VÝZNAMU

nelze stanovit diagnózu – není specifický fenotyp

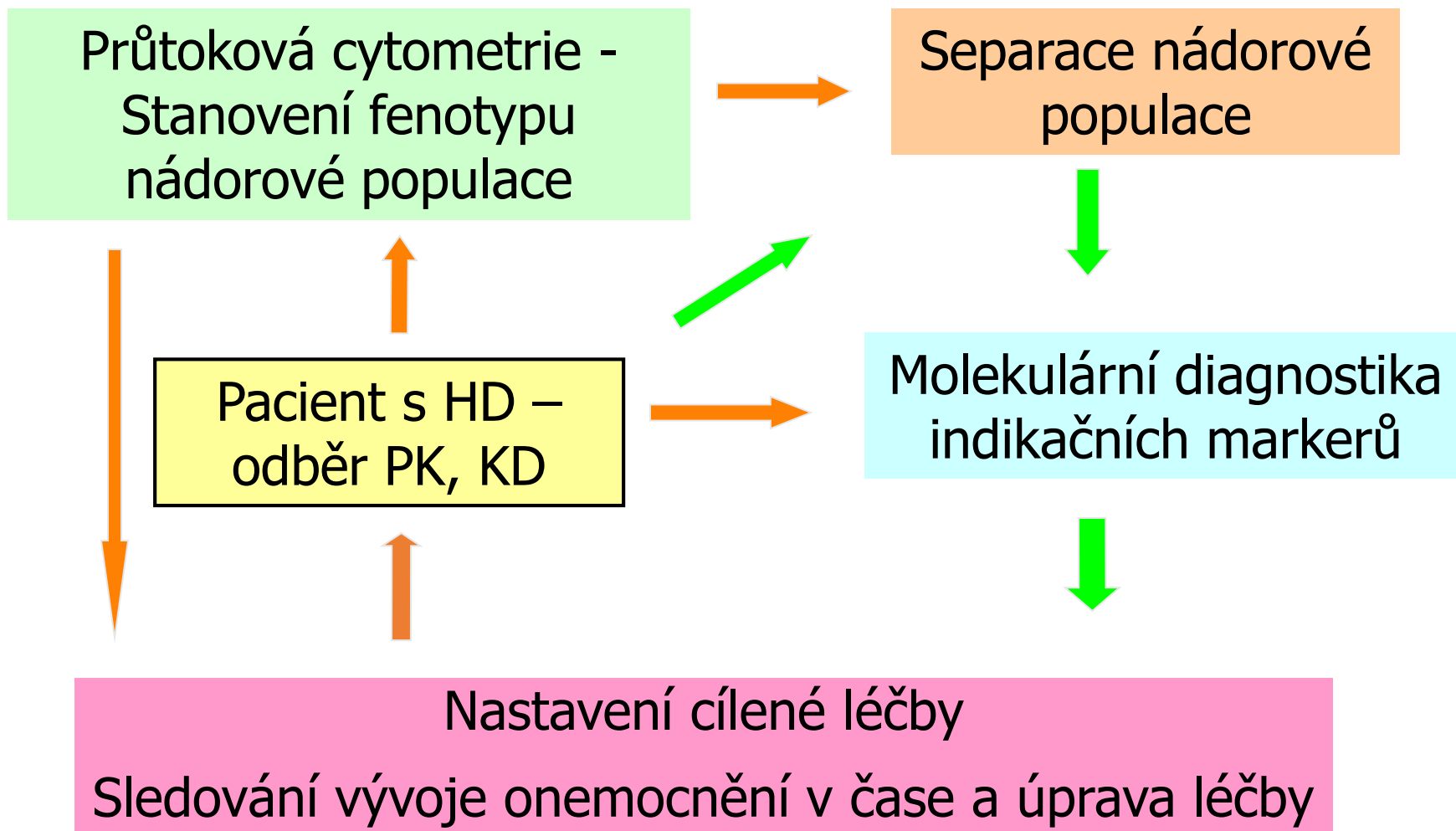
HL, CML

EuroFlow – standardizovaný přístup k diagnostice

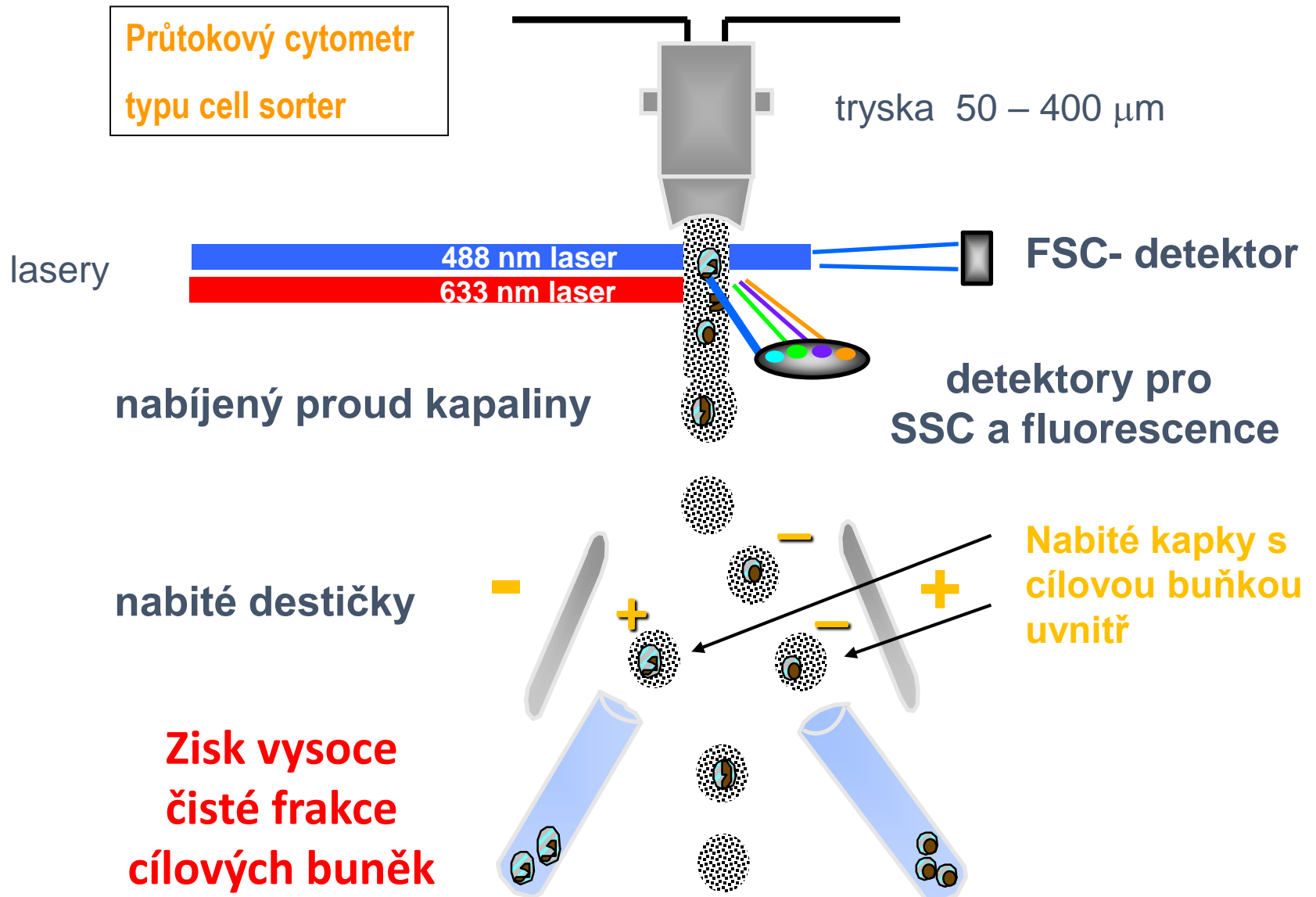
- zavedení 6 – 8 barevného vyšetřovacího protokolu (kombinování povrchových a cytoplazmatických markerů v jedné zkumavce)



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