

# PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

## Princip a využití

Lucie Říhová  
OKH, FN Brno



Babak Research Institute  
Masaryk University



# Průtokový cytometr

- ✓ **flow cytometrie (flow+cyto+metrie)**
- ✓ **specializovanější varianta fluorescenčního mikroskopu v kombinaci s krevním analyzátozem**
- ✓ **měření fyzikálních, chemických a biologických vlastností až  $10^6$  buněk v suspenzi**



**FACSCantoll (Becton-Dickinson)**

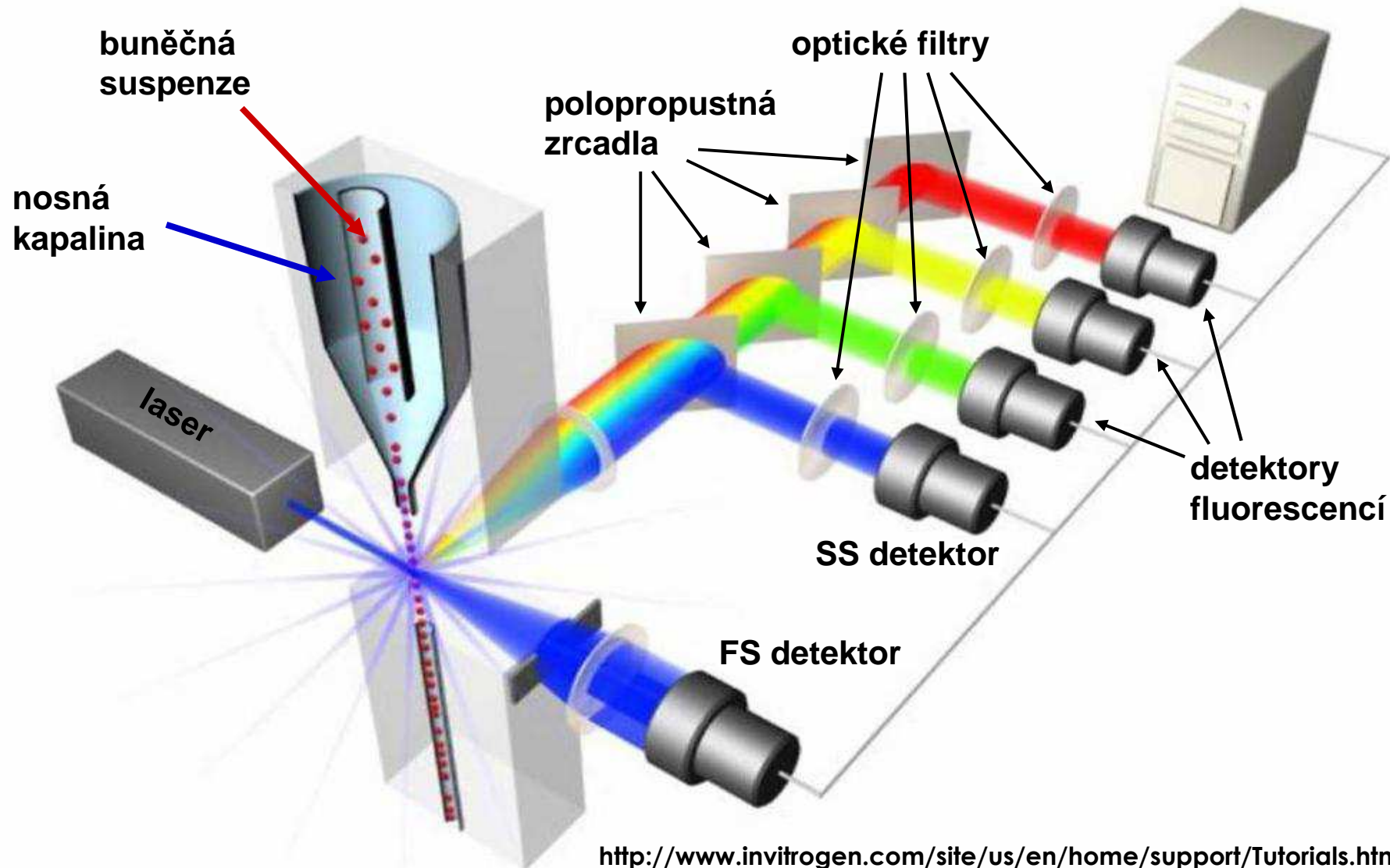


**Cytomics FC500 (Beckman Coulter)**

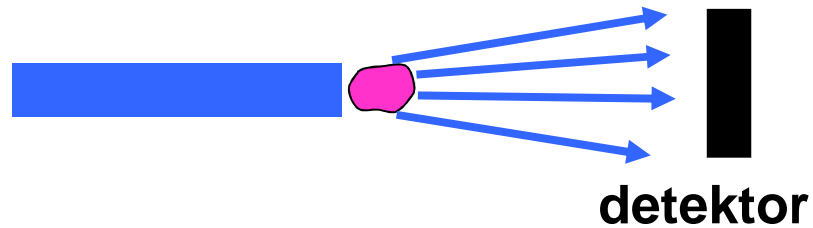
# Složení průtokového cytometru

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

# Složení průtokového cytometru

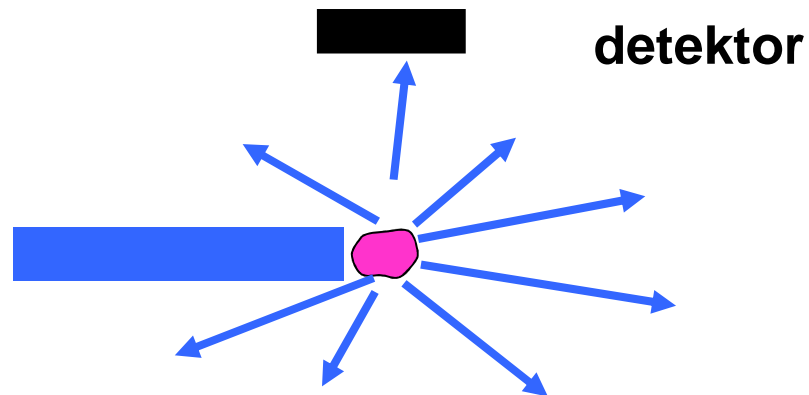


# Světlo vs. buňka



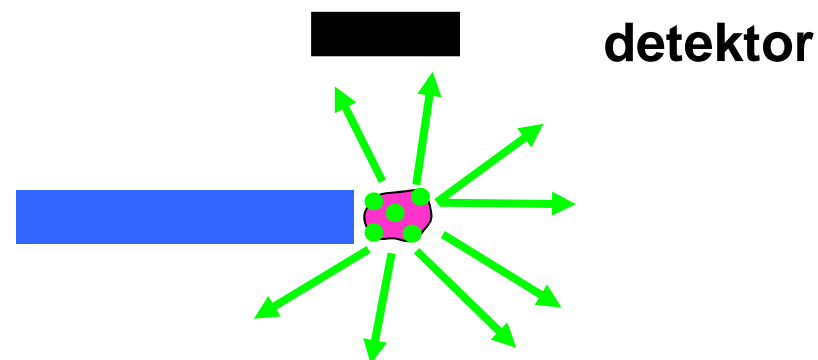
## Forward Scatter

- rozptyl světla v malém úhlu
- velikost buňky



## Side Scatter

- rozptyl světla pod úhlem  $90^\circ$
- komplexita buňky



## Fluorescence

- přítomnost fluorochromu

# Fluorochromy

## ➤ *excitace UV/violet diode (fialový laser) - 405 nm*

- DAPI, Hoechst/Pacific Blue (452), AmCyan (491), BD Horizon 450 a 500

## ➤ *excitace Ar-iontovým laserem (modrý) - 488 nm*

**FITC** - fluorescein isothiokyanát (530 nm)

**Alexa Fluor 488** (519 nm)

**PE, RD1** - phycoerythrin (580 nm)

**ECD** - tandem. konjugát PE-texaská červeň (620 nm)

**PerCP** - perridin chlorophyl (678 nm)

**PerCPCy5.5** - tandem. konjugát PerCP-Cy5.5 (696 nm)

**PC5** - tandem PE-cyanine 5 (620 nm)

**PC7** - tandem PE-cyanine 7 (778 nm)

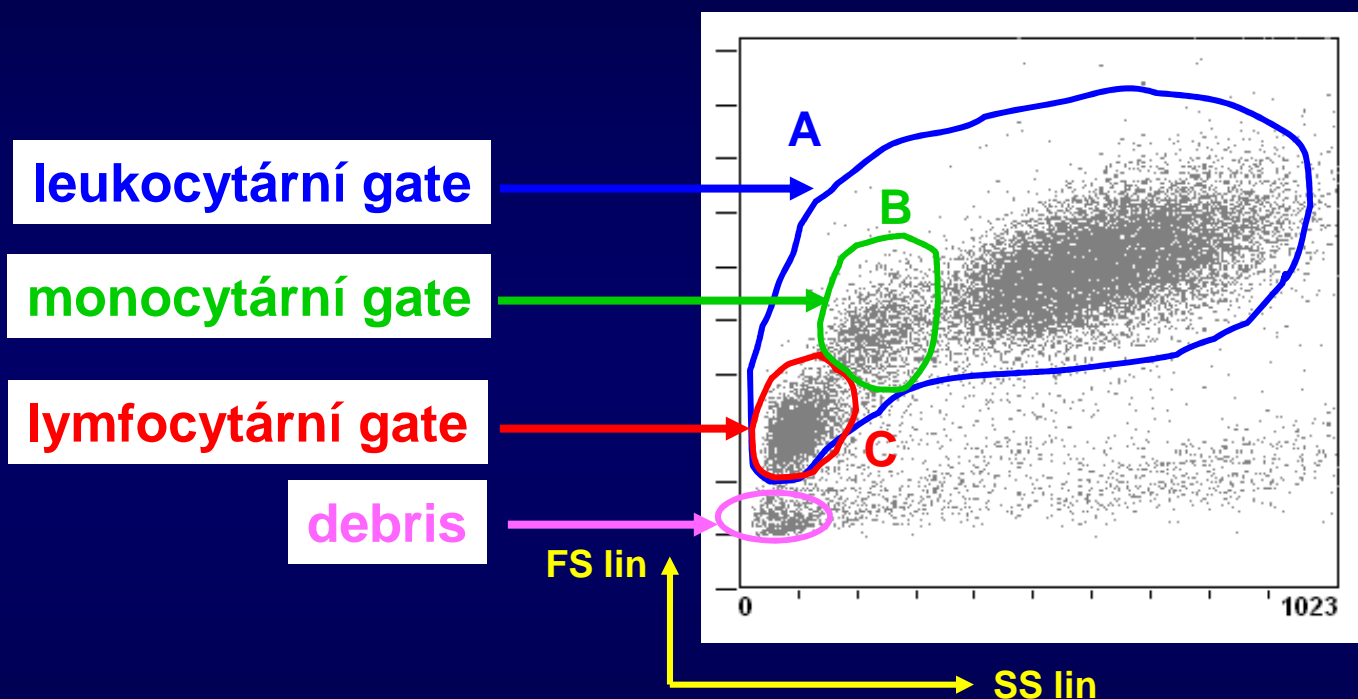
**PI** - propidium jodid, široký peak okolo 620 nm

## ➤ *excitace He-Ne laserem/red diode (červený) - 633 nm*

**APC** - allophycocyanin (670 nm)

**APC-Cy7** - tandem APC-cyanine 7 (778 nm)

# Analýza a zobrazení



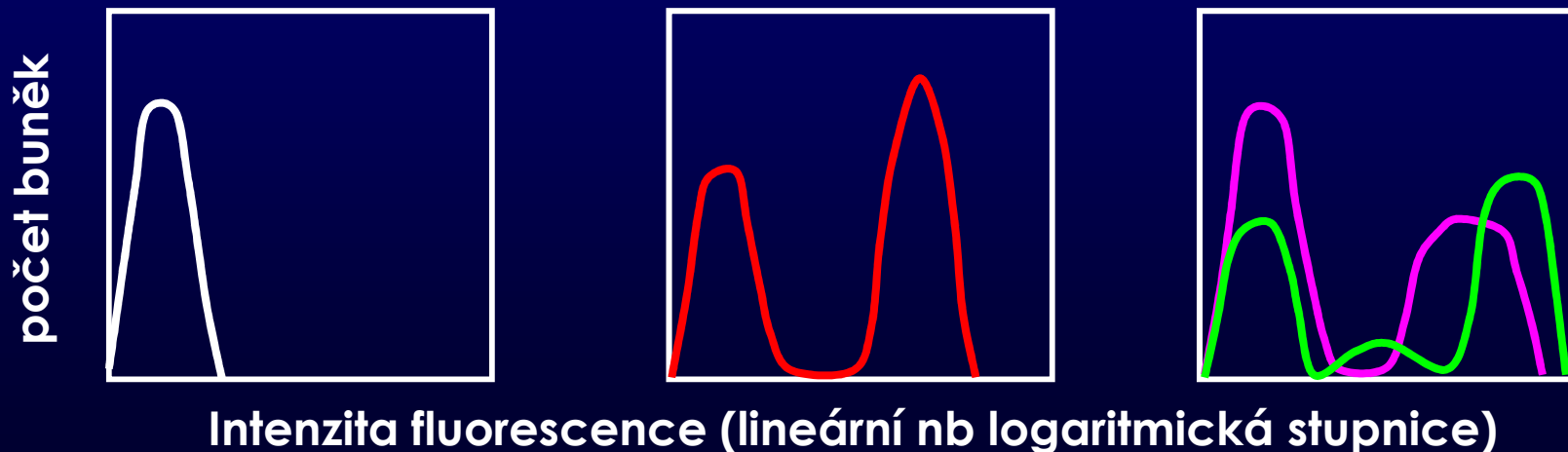
**FS - forward scatter - velikost buněk**

**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 - různá intenzita exprese  
low (+/-) < dim (+) < high, bright (++) < very high (+++)
  - porovnávání intenzity exprese

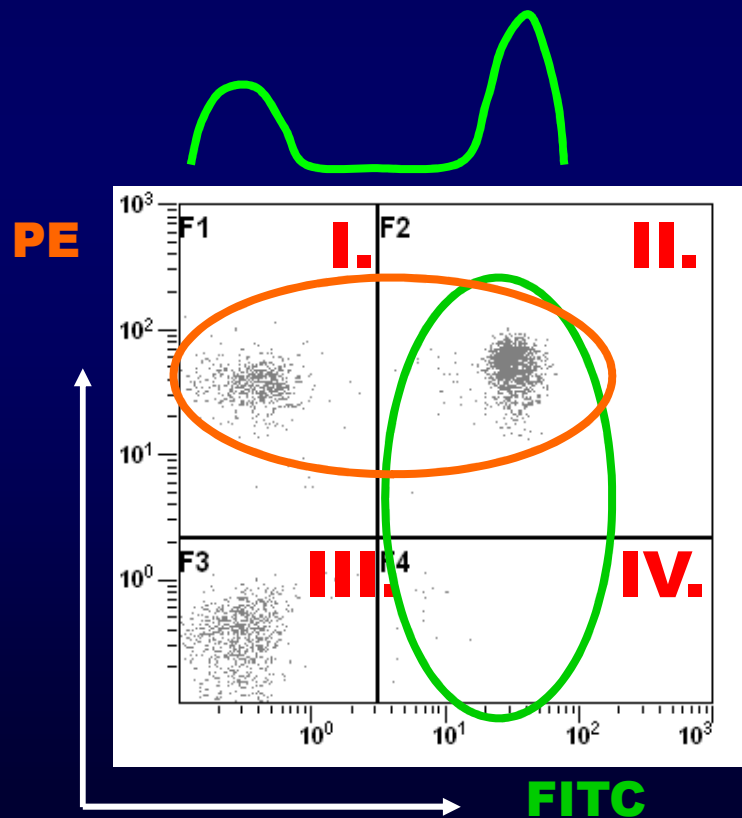




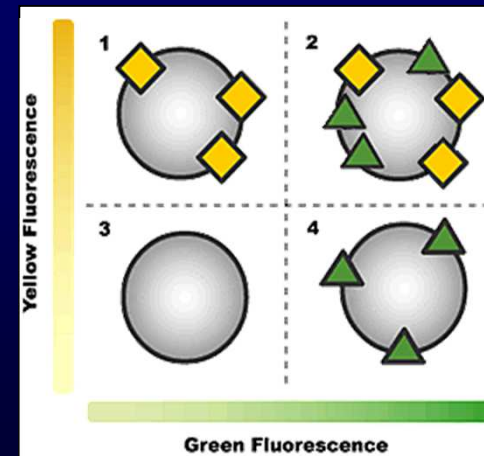
# 2-parametrová analýza

## ➤ Dot plot

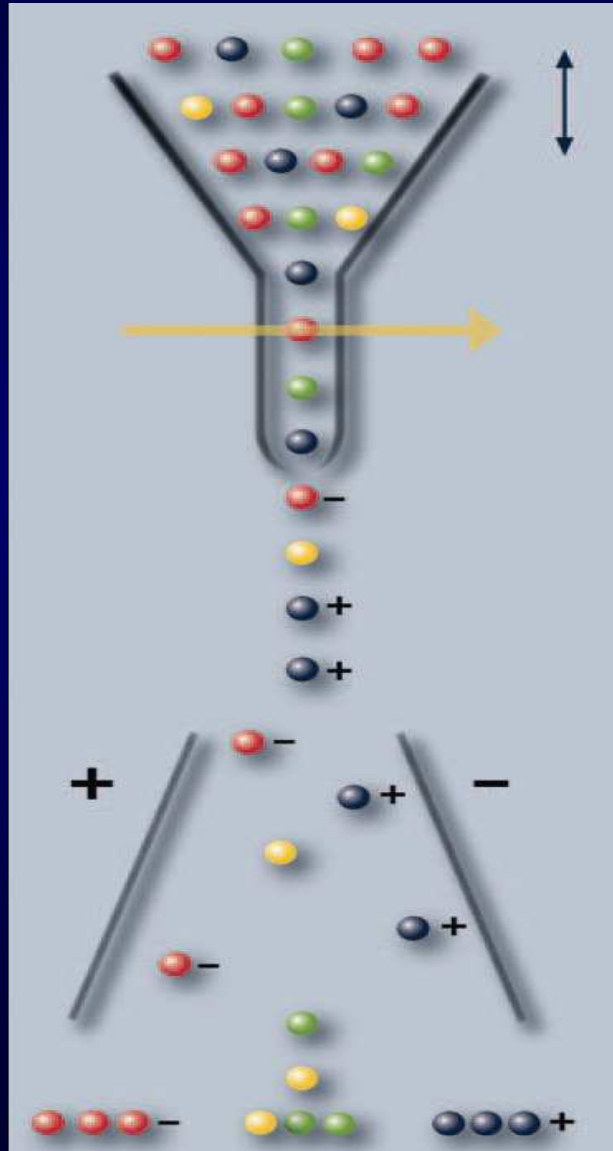
- ✓ dva parametry proti sobě - FLx vs. FLy, FLx vs. FS či SS
- ✓ procentuální hodnocení - nejčastěji kvadrantová analýza



- I. kvadrant – FITC<sup>-</sup>PE<sup>+</sup>
- II. kvadrant – FITC<sup>+</sup>PE<sup>+</sup>
- III. kvadrant – FITC<sup>-</sup>PE<sup>-</sup>
- IV. kvadrant – FITC<sup>+</sup>PE<sup>-</sup>

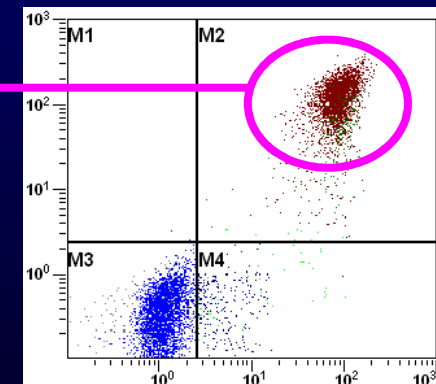


# Sortování subpopulací



Bezprostředně po analýze dochází piezoelektricky k „trhání“ proudu vzorku na kapky - obsahující jednu buňku - přičemž požadovaným buňkám = kapkám je udílen el. náboj. Tyto jsou pak v el. poli vychylovány a odseparovány.

udělení náboje a separace gateovaných bb



# Imunofenotypizace - CD znaky

Stanovení povrchových a intracelulárních markerů exprimovaných jednotlivými hodnocenými buňkami

- ✓ vznik CD klasifikace v r. 1982, využívá k identifikaci buněk tzv. CD markerů - Cluster of Differentiation, def. cca 300 znaků (antigenů Ag) a není uzavřeno
- ✓ historicky označeny nejprve leukocytární markery, později zahrnutí dalších znaků (megakaryocyty, trombocyty, erytrocyty...)
- ✓ různá fce - buněčné enzymy, receptory mikrobiálních Ag, transportní proteiny, prezentace Ag, Fc receptory, komplementové receptory, regulační signalizační receptory a jejich ligandy, adhezivní proteiny...



# Identifikace subpopulací

- ✓ pomocí MoAb proti znakům přítomným na povrchu nebo v cytoplazmě buňky
- ✓ na základě exprese CD markerů rozlišení subpopulací buněk, jejich stadia vývoje a zralosti, patologie...

T lymfocyty

CD1a - CD3, CD4, CD5 - CD8...

B lymfocyty

CD19, CD20 - CD24, CD79 - CD84...

NK buňky

CD16, CD55, CD56, CD57, CD244...

kmenové buňky

CD34, CD117...

trombocyty

CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61...

erytrocyty

Gly-A (CD235a)...

leukocyty

CD45...

monocyty

CD14...

dendritické bb

CD83, HLA-DR, ILT3...

# Princip 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**

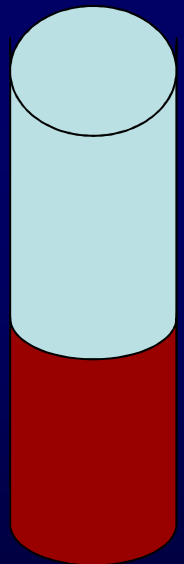
# Vazba MoAb - Ag

plná krev  
kostní dřeň +  
bb suspenze

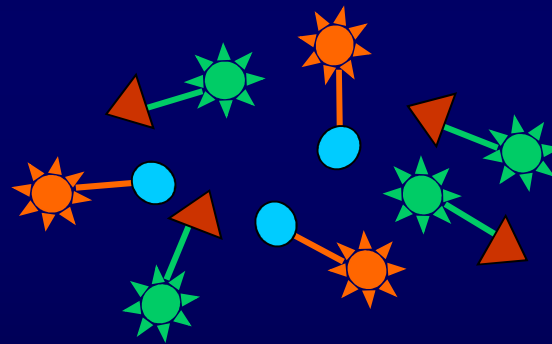
vybrané protilátky  
konjugované  
s fluorescenční  
barvou

=

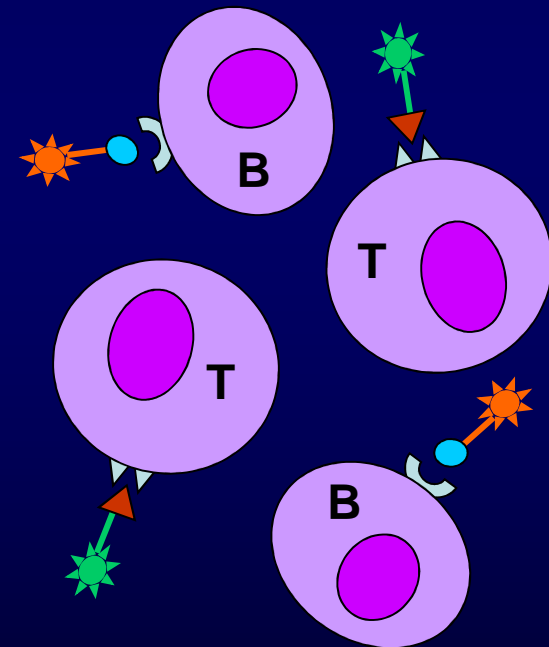
označení buněk  
vazbou protilátek  
na odpovídající Ag



+



=



Anti CD3-FITC

Anti CD19-PE

# Zpracování a analýza vzorku

## Imunofenotypizace

- ✓ typ vzorku - buněčná suspenze - nesrážlivá periferní krev či kostní dřeň (EDTA, Heparin), BAL, kultivované buňky, desintegrovaná lymfatická uzlina...
- ✓ Inkubace - se specifickou monoklonální protilátkou proti požadovaným znakům (T, B, NK buňky...)
- ✓ lyzace erytrocytů - pokud jsou obsaženy v suspenzi  
⇒ osmoticky, enzymaticky či chemicky
- ✓ fixace - 0,5% paraformaldehydem
- ✓ proplach - vymytí nadbytečné protilátky pomocí PBS
- ✓ analýza - získání listmode a vyhodnocení histogramů



# Klinické využití FC

- **Rutinní vyšetření a výzkumné analýzy**
  - ✓ **imunologie**
  - ✓ **hemato-onkologie**
  - ✓ **transplantologie**
  - ✓ **transfuziologie**
  - ✓ **hematologie**

# Imunologie

## ✓ Analýza imunokompetentních buněk (IFT)

- subpopulace T, B, NK buněk
- dif. dg. imunodeficiencí apod.

## ✓ Analýza autoprotilátek

- proti leukocytům, erytrocytům či trombocytům

## ✓ Analýza funkce neutrofilů

- oxidativní vzplanutí
- fagocytóza

# Základní populace lymfocytů

## T lymfocyty

- cytotoxické:  $CD3^+CD8^+$
- pomocné:  $CD3^+CD4^+$

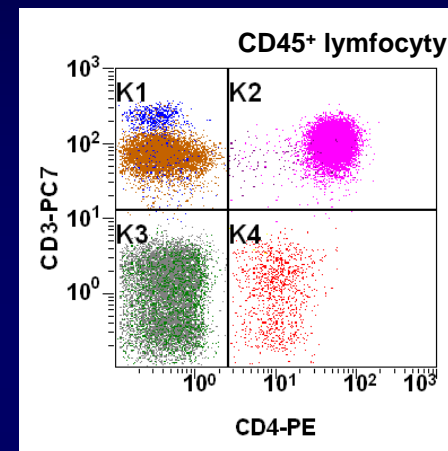
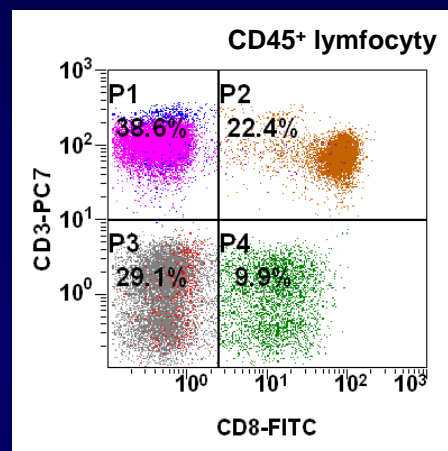
## B lymfocyty

- B2:  $CD19^+CD20^+$
- B1:  $CD5^+CD19^+CD20^{dim+}$

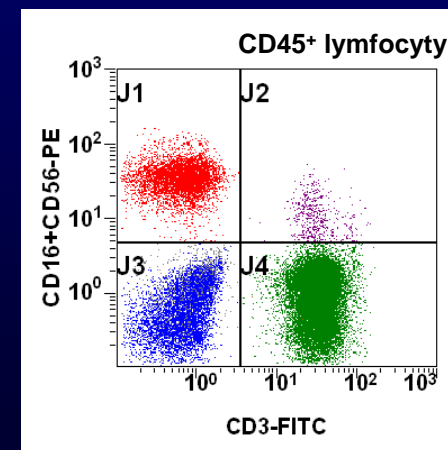
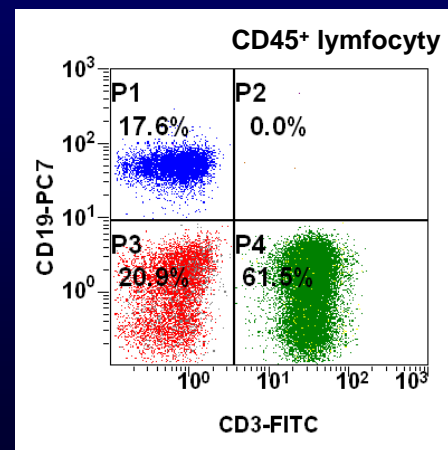
## NK buňky

- $CD3^-CD16^+CD56^+$
- NK-T:  $CD3^+CD56^+$

CD8-FITC/CD4-PE/CD45-PC5/CD3-PC7



CD3-FITC/CD16+56-PE/CD45-PC5/CD19-PC7

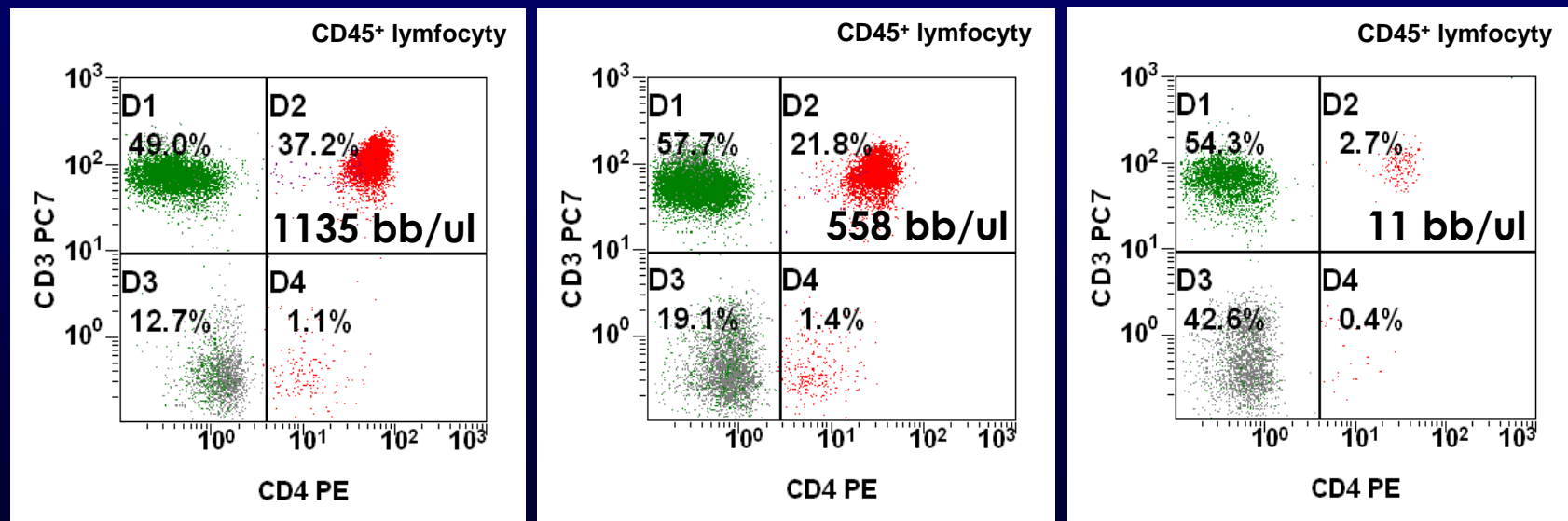


# Absolutní počty buněk

Využití firemního roztoku s přesně definovaným počtem částic na  $\mu\text{l}$  a fluorescencí ve všech kanálech

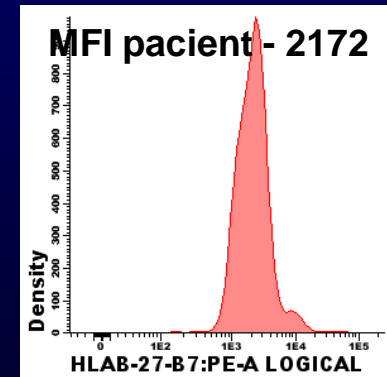
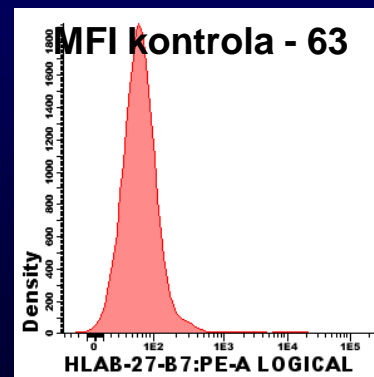
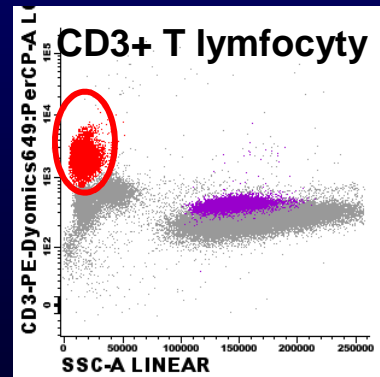
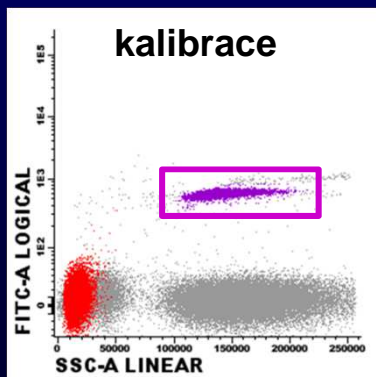
- ✓ zadáván jako kalibrátor
- ✓ shodný objem vzorku a kalibrátoru

HIV<sup>+</sup> pacienti - stanovení abs. počtu CD4<sup>+</sup> helper T lymfocytů



# Stanovení HLA-B27

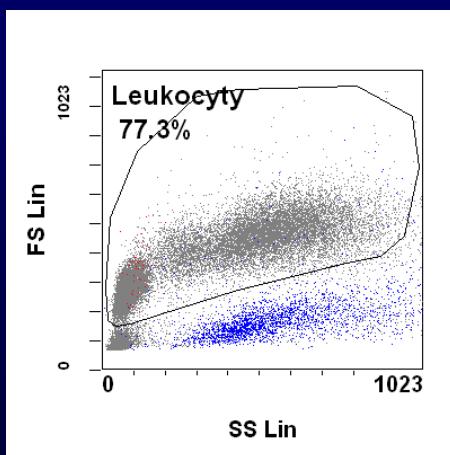
- přítomnost alely HLA-B27 je asociována s řadou nespecifických zánětlivých onemocnění.
- exprimována u 90% pacientů postižených ankylózní spondylózou (AS)
- screeningové vyšetření u pacientů trpících záněty sakroiliálních meziobratlových plotének → indikace AS



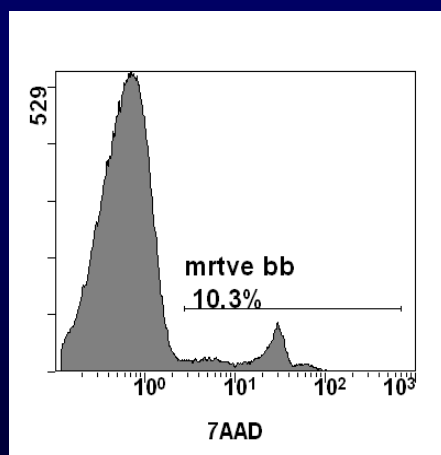
# Transplantologie

## Zjištění zastoupení hematopoetických kmenových buněk

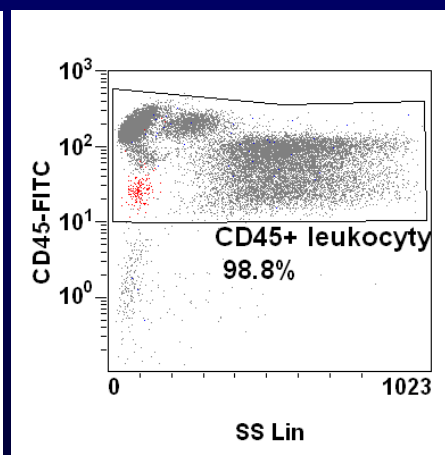
- **CD34<sup>+</sup> leukocyty (hematopoietic stem cell, HSC)**
- **v rámci transplantace kmenových buněk**
  - ✓ monitorování PK po stimulaci G-CSF, v transplantátu...
- **analýza pupečnickové krve...**



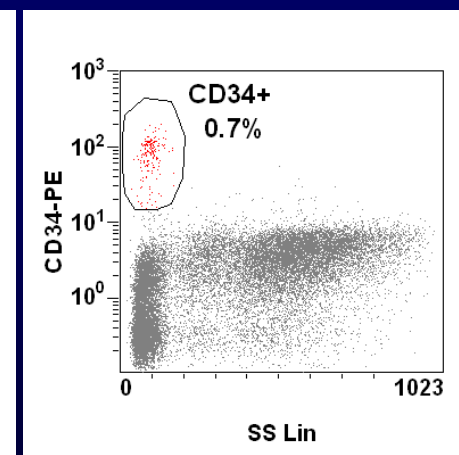
Vymezení leukocytů



Označení mrtvých bb



Vymezení CD45<sup>+</sup>  
leukocytů



Označení CD34<sup>+</sup> HSC

# Hemato-(onkologie)

- ✓ **Analýza povrchových a intracelulárních markerů - imunofenotypizace**
  - dif. dg. leukémií, lymfomů apod.
  - analýza stavu onemocnění (remise, relaps...)
  - stanovení minimální reziduální nemoci
- ✓ **DNA analýza**
  - ploidita a proliferace buněk
- ✓ **Analýza apoptózy a nekrózy...**

# Kdy provádět IFT?

- ✓ cytopenie (zejména bicytopenie a pancytopenie)
- ✓ leukocytózy (lymfocytózy, monocytózy a eozinofilie)
- ✓ nález atypických buněk či blastů v PK, KD či jiných TT
- ✓ zvýšený počet plazmocytů, monoklonální gamapatie
- ✓ organomegalie či nález tkáňové masy
- ✗ neutrofilie ze zralých buněk
- ✗ polyklonální hypergamaglobulinémie
- ✗ polycytémie, trombózy a bazofilie



# Diferenciální diagnostika hematologických malignit

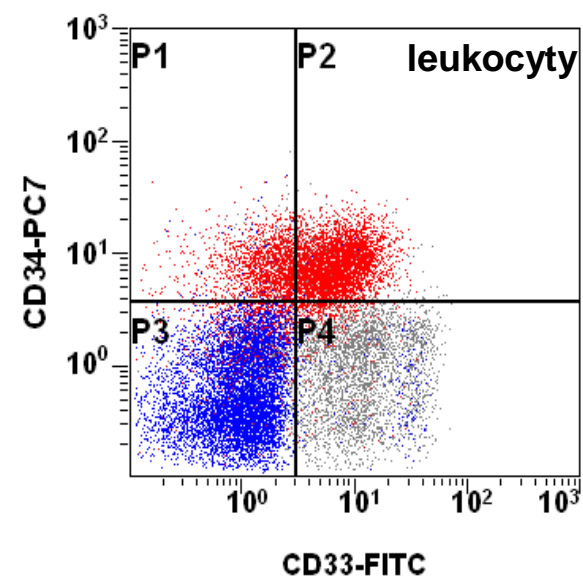
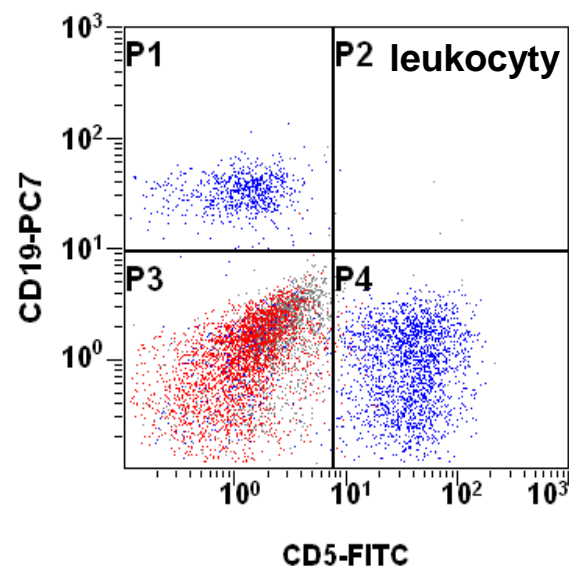
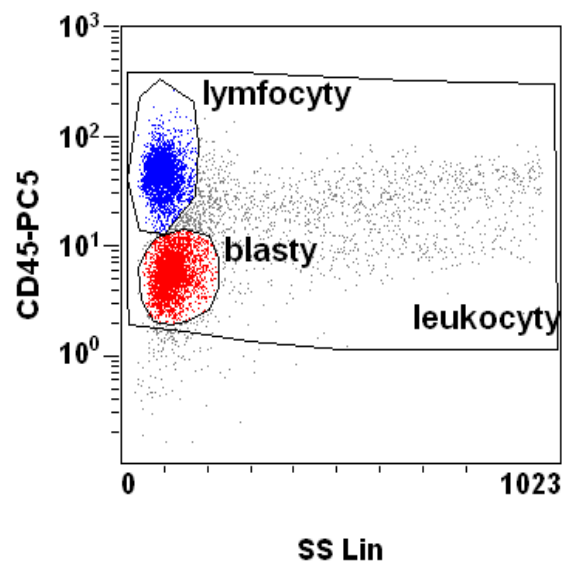
Vychází ze znalostí exprese povrchových a intracelulárních molekul v průběhu diferenciace krevních bb

- přítomnost patologických buněk s odlišným fenotypem
- liniová příslušnost (lymfoidní, myeloidní, monocytární aj.)
- diferenciační stupeň hematologických malignit
- analýza smíšeného fenotypu u leukémií
- detekce aberantně exprimovaných markerů

# Akutní myeloidní leukémie

## Klonální neoplastická proliferace myeloidních blastů

- Antigeny prekurzorových buněk: CD34, CD38, CD117, HLA-DR, TdT
- Myeloidní antigeny: CD13, CD15, CD33, CD65, MPO
- Antigeny monocytární diferenciace: CD14, CD4, CD64, CD36, CD11b, CD11c

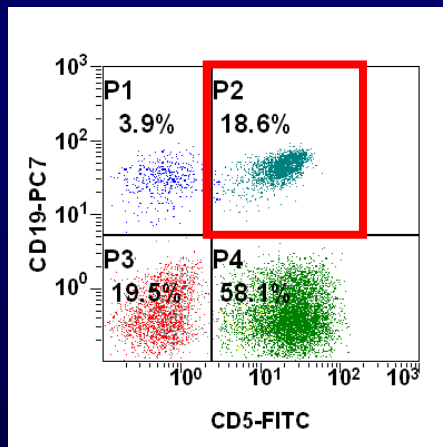


# Lymfoproliferace - B-CLL

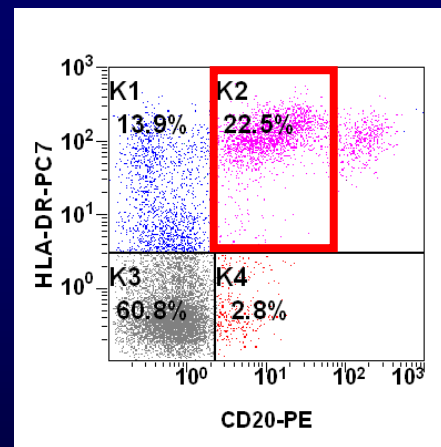
Patologické B1 (CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) lymfocyty přítomny v PK

- vesměs charakteristický fenotyp CD20<sup>dim</sup>CD23<sup>+</sup>

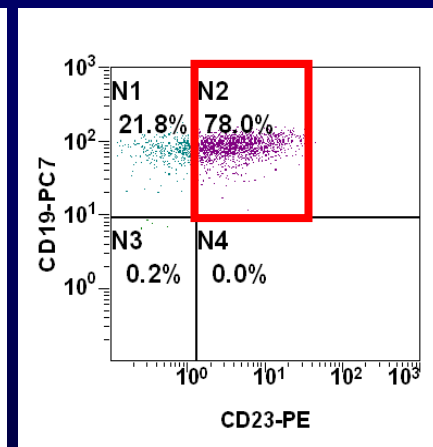
- bez exprese povrchových kappa/lambda lehkých řetězců Ig



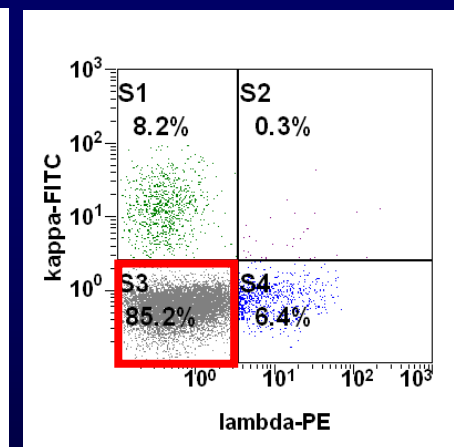
CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>



CD20<sup>dim</sup><sup>+</sup>



CD23<sup>dim</sup><sup>+</sup>

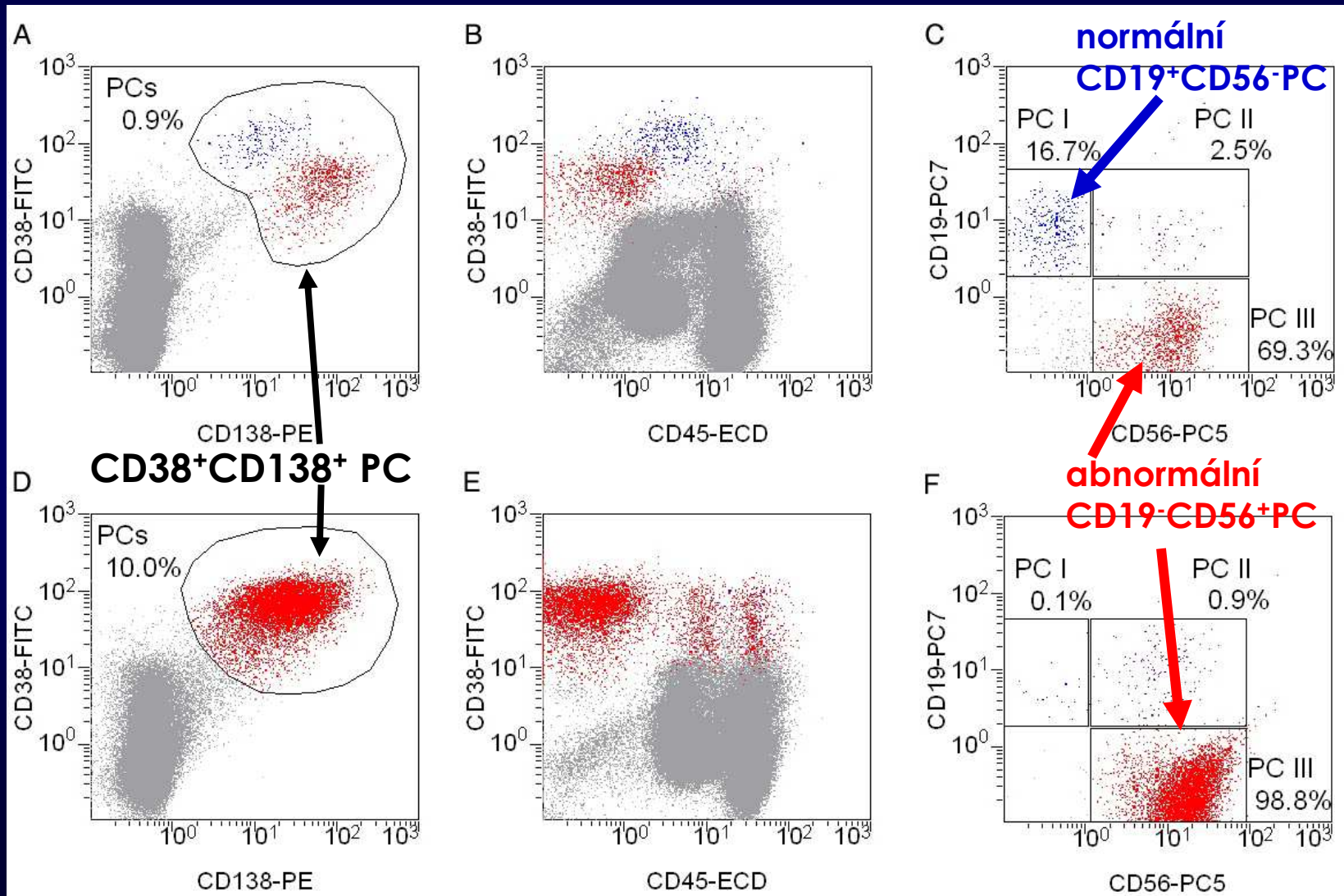


sκ<sup>-</sup>/sλ<sup>-</sup>

# Malignity z PC

- ✓ plazmocyty (PC) fyziologicky přítomny v nízkém zastoupení - produkce vlastních MoAb
- ✓ zvratem v diferenciaci vznikají maligní PC
  - prekanceróza - MGUS (nízký počet maligních PC)
  - kumulace maligních PC v KD - mnohočetný myelom
- ✓ charakteristický fenotyp
  - rozlišení fyziologických CD19<sup>+</sup> a patologických CD56<sup>+</sup> PC
- ✓ myeloma stem cells - CD138<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>
  - vysoký stupeň proliferace
  - schopné diferenciacie do maligních CD138<sup>+</sup>bb

# Analýza PC u MG



# Nejčastější aplikace u PLT I.

## ✓ Diagnostika dědičných či získaných defektů

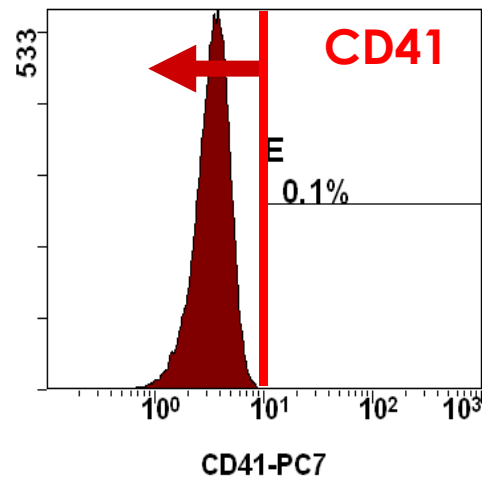
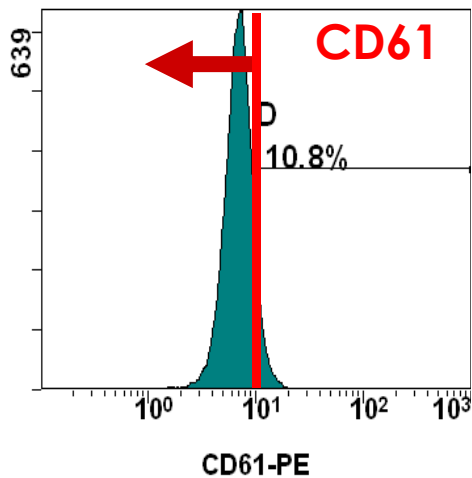
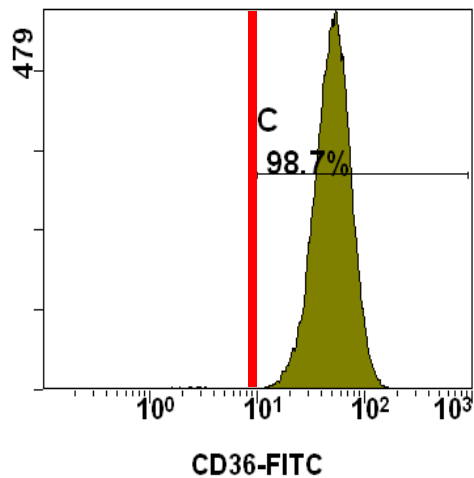
- Glanzmanova trombocytopenie (GPIIb/IIIa - CD41/CD61)
- Syndrom Bernard Soulier (GPIb/IX - CD42b/CD42a)
- Syndrom šedých destiček (P-selektin - CD62P)....

## ✓ Aktivace PLT in vivo

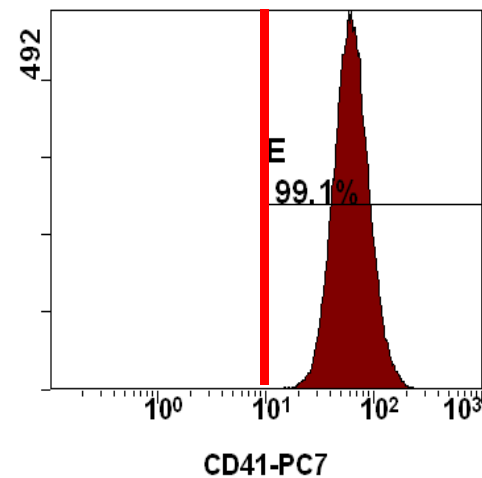
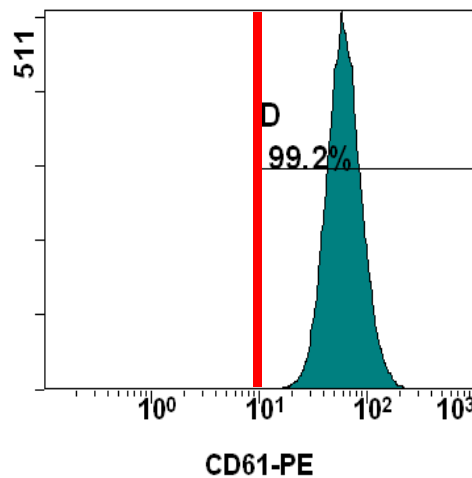
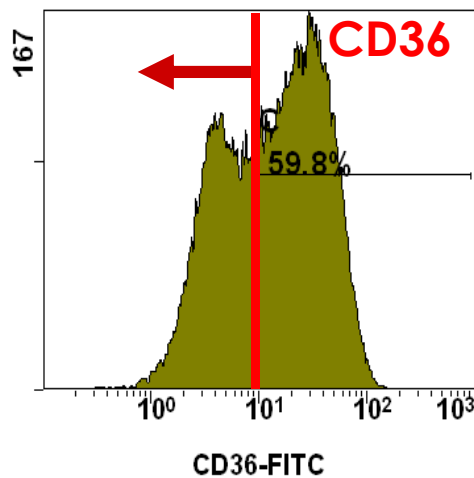
- analýza na aktivaci závislých Ag (CD62P)
- analýza PLT-PLT agregátů, případně agregátů s Leu (CD62P iniciuje interakci s PSGL-1 na leukocytech)
- destičkové mikropartikule

# Defekty PLT GP

## Glanzmanova trombastenie



## Krvácivý stav



# Nejčastější aplikace u PLT II.

## ✓ Transfuziologie

- **monitorování koncentrátů PLT**  
(zbytkové WBC, aktivace PLT - ↑ CD62P, ↓ CD42b)
- **detekce s PLT asociovaných Ig**  
(potransfuzní reakce, ITP)

## ✓ Analýza PLT obratu

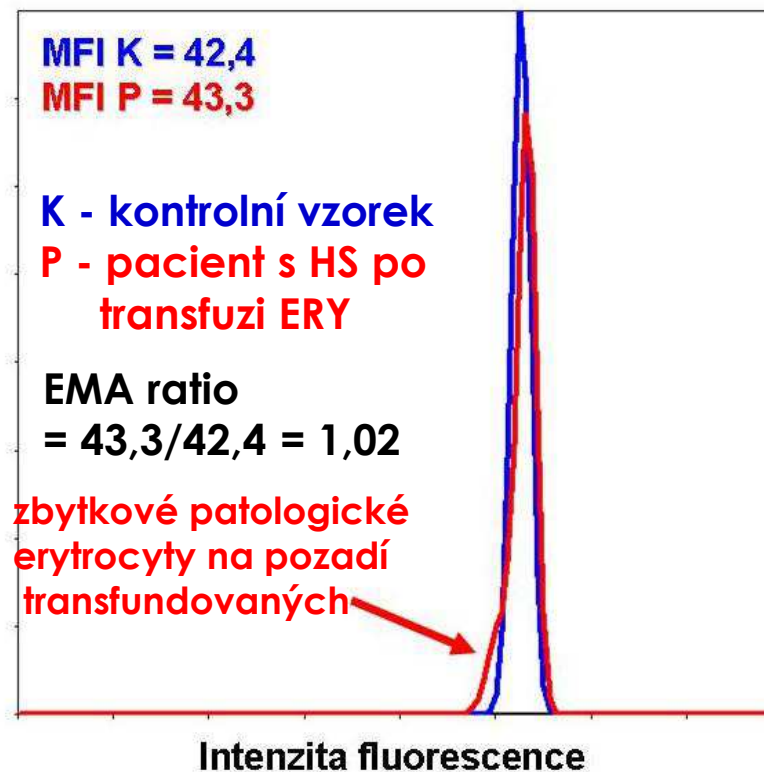
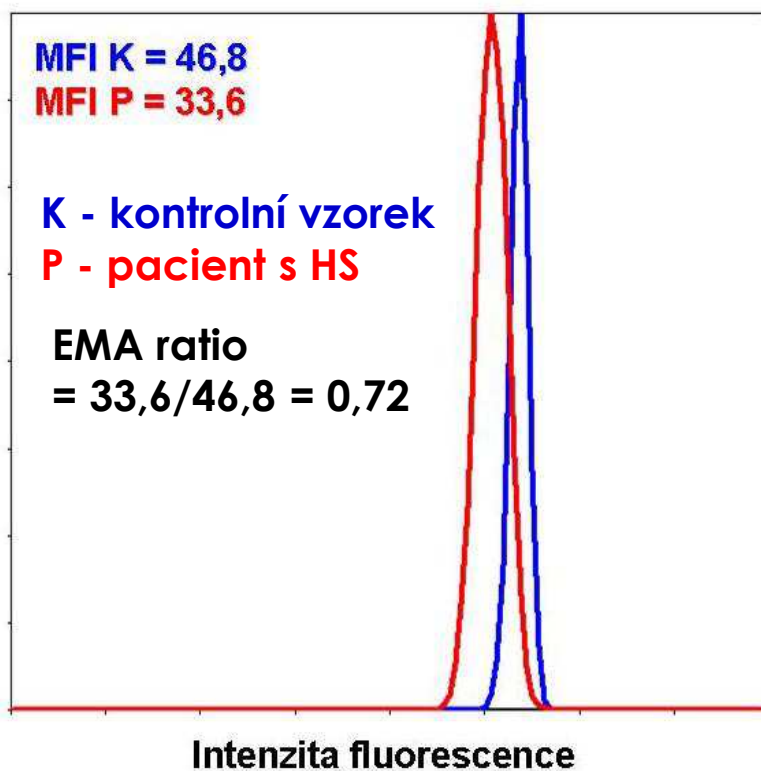
- **detekce retikulovaných PLT**  
(kvantifikace nezralých destiček - stupeň trombopoézy)
- **počty PLT**



# Hereditární sférocytóza

- nejčastější vrozená hemolytická anémie
- molekulární defekty membránových proteinů erytrocytů (spectrin, band 3...)
  - ⇒ narušený bikonkávní tvar
  - ⇒ destrukce ve slezině
- diagnostické testy
  - ⇒ sférocyty, osmotická rezistence, autohemolýza
  - ✓ kryohemolýza
  - ✓ průtoková cytometrie
    - vazba kyseliny eosin maleimidové (EMA) na erytrocyty
    - analýza snížení fluorescence oproti kontrole

# Hereditární sférocytóza



MFI - medián intenzity fluorescence EMA = poloha peaku na ose X  
MFI P/MFI K = EMA ratio ~ 1 u pacientů bez HS a <0,9 u HS

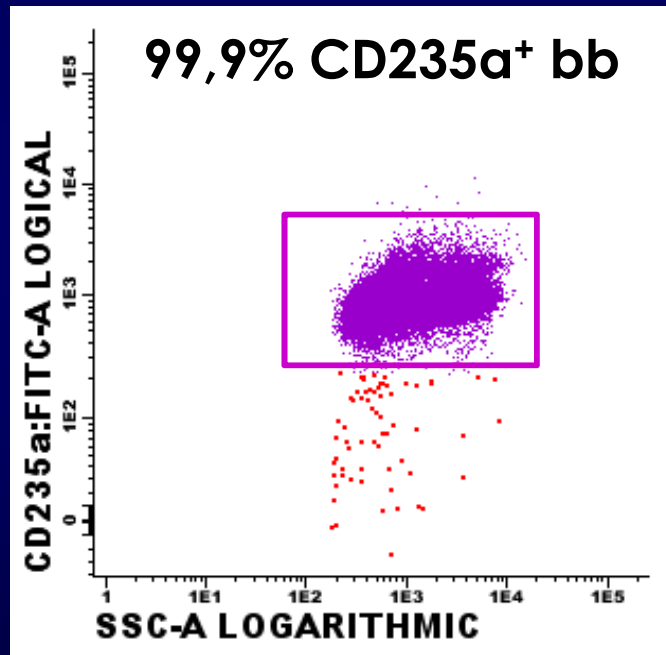
# PNH

## Paroxysmální noční hemoglobinurie

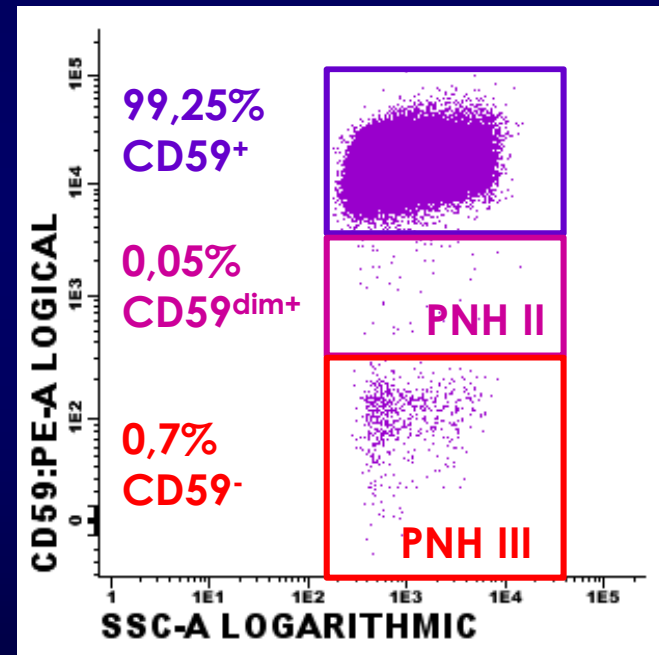
- získaná mutace → membránový defekt kmenových buněk a jejich diferencovaných forem (WBC, RBC, PLT)
- chybějící glykosyl-fosfatidyl-inositolová (GPI) kotva  
→ klon s chybějícím membránovým proteinem
- diagnostika průtokovou cytometrií
  - erytrocyty - chybění CD59 (CD55 nespecifické)
  - leukocyty - chybění FLAER (MoAb proti GPI)

# PNH - erythrocyty

## 1. identifikace erytrocytů

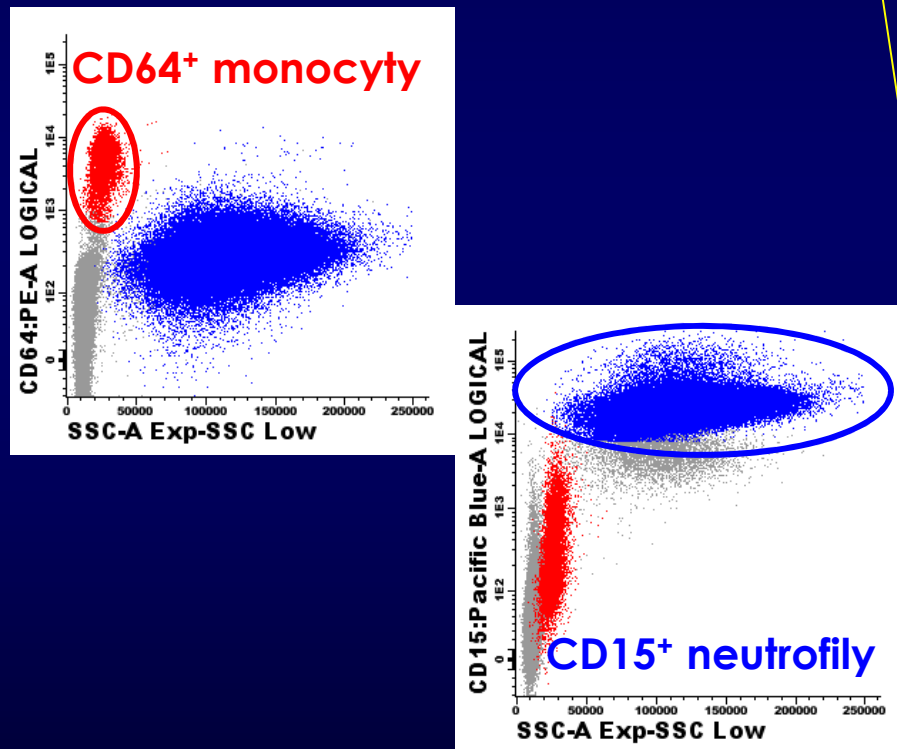


## 2. Analýza přítomnosti CD59

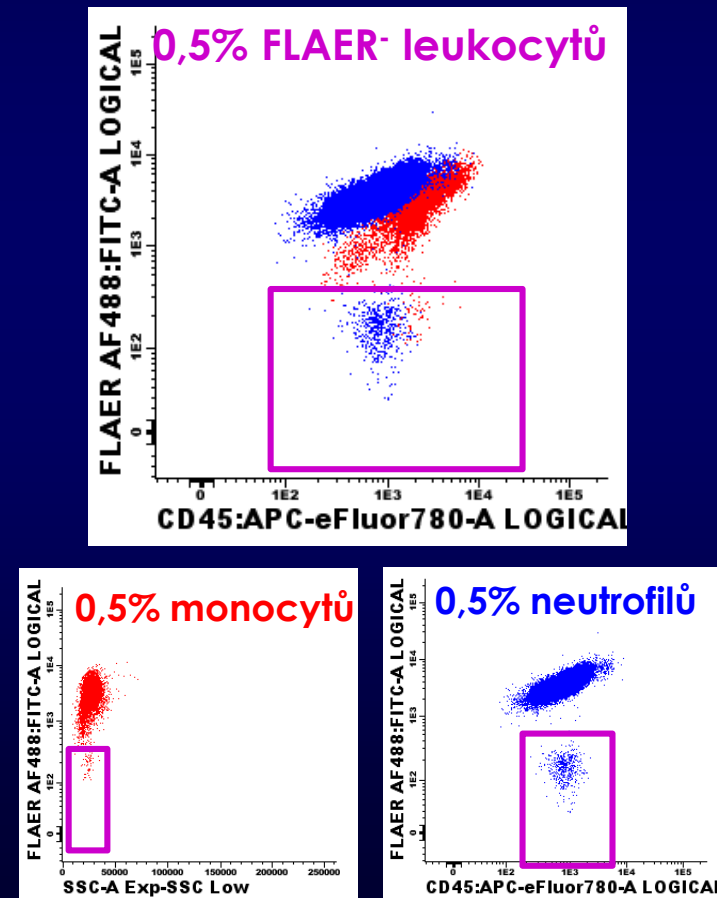


# PNH - leukocyty

## 1. identifikace monocytů a neutrofilů



## 2. Analýza přítomnosti FLAER

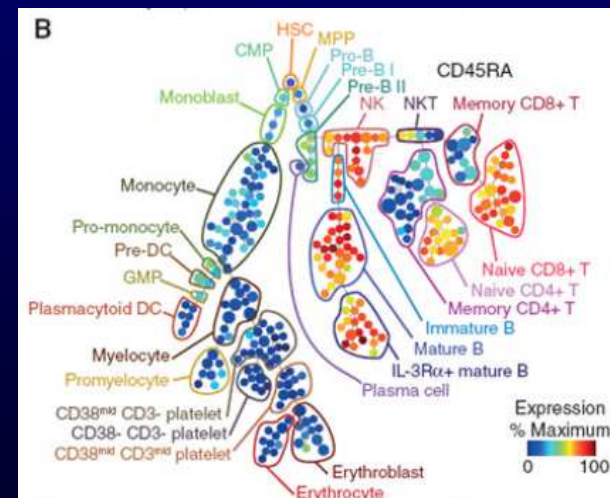


# Hmotnostní Cytometrie

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

SPADE



# 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**



# Výhody a nevýhody FC

- ✓ FC analýza povrchových i intracelulárních markerů je citlivá a kvalitativní metoda (lze i kvantitativně)
- ✓ simultánní analýza několika markerů na vysokém počtu buněk
- ✓ paralela k morfologickému vyšetření - upřesnění dg.
- ✗ chybí informace morfologická
- ✗ občas nejednoduchá interpretace
- ✗ flowcytometr a fluorescenčně značené protilátky jsou poměrně drahé