

Imunofenotypizace průtokovou cytometrií v patologii

Petra Mandáková, Jarmila Čandová

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole, Praha

SOUHRN

Průtoková cytometrie je moderní analytická metoda používaná v klinických i výzkumných laboratořích k imunofenotypizaci vybraných buněčných subpopulací v suspenzi (periferní krve, aspirátu kostní dřeně, mozkomíšního moku atd., ale i buněčné suspenzi získané z nefixovaného solidního tumoru). Poskytuje současně informace o četných povrchových nebo intracelulárních znacích analyzovaných elementů. V klinické praxi k tomu využívá fluorescenčních monoklonálních protilátek proti povrchovým nebo intracelulárním antigenům, které jsou asociovány s určitým typem buněk (T-lymfocyty, B-lymfocyty, apod.), jejím vývojovým stádiem nebo monoklonalitou (např. lehké řetězce povrchových imunoglobulinů).

Pravděpodobně nejširšího využití dosáhla metoda v diagnostice hematologických malignit, kde právě rychlá a přesná diagnostika dává lékaři stěžejní informace ke správnému stanovení diagnózy a k výběru optimální léčby, následně lze takřka v reálném čase sledovat efekt léčby.

Klíčová slova: průtoková cytometrie – imunofenotypizace – non-Hodgkinské lymfomy

Immunophenotypization by means of flow cytometry in pathology

SUMMARY

Flow cytometry represents a modern analytical method useful for an assessment of selected cellular subpopulations in suspension (peripheral blood, aspirate of bone marrow, liquid fluid etc. and also in suspensions prepared from non-fixed solid tumors) in clinical and research laboratories. The method provides information on numerous surface or intracellular markers of the analyzed elements at the same time. The usage of fluorescent monoclonal antibodies against surface or intracellular antigens associated with specific type of cells (T-lymphocytes, B-lymphocytes etc.), with their developmental stage, or with monoclonality (for example antibodies against light chains of immunoglobulins), are the most valuable for the clinical practice.

The most important application of flow cytometry in pathology has remained in hematologic malignancies, where this fast and exact method provides, practically in a real time, crucial information for correct diagnosis as well as for the choice of optimal therapy, and subsequently for assessing the effect of the therapy.

Keywords: flow cytometry – immunophenotypization – non-Hodgkin lymphomas

Cesk Patol 2013; 49(4): 126–130

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda používaná pro měření různých parametrů buněk. Jedná se o bioanalytickou metodu, která spojuje principy fluorescenční mikroskopie a hematologického analyzátoru. Je využitelná v mnoha vědeckých disciplínách. Největší uplatnění však našla v medicíně a biologii.

S myšlenkou průtokové cytometrie nás seznamuje v roce 1934 Andrew Moldavan, ovšem jeho prototyp zařízení nebyl nikdy sestaven. Průtoková cytometrie se zrodila v roce 1949 díky Wallace H. Coulteru, který zkonstruoval přístroj schopný počítat krevní buňky v proudícím roztoku. Na principu Coulterova counteru vyvinul Mack Fulwyler a Marvin Van Dilla z Los Alamos National Laboratory první průtokový cytometr, který separoval částice podle jejich velikosti (1-4). Tento přístroj byl posléze zdokonalen doplněním detektorů fluorescence a byl představen Leonardem Herzenbergem a jeho pracovní skupinou ze Stanfordské Univerzity jako první funkční **FACS (fluorescence-activated cell sorter)** (3,5).

✉ Adresa pro korespondenci:

RNDr. Petra Mandáková, Ph.D.

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN v Motole

V Úvalu 84, Praha 5, 150 06

tel.: 2 2443 5658, 5644; fax: 2 2443 5620

e-mail: p.mandak@email.cz

PRINCIP METODY

Termín „průtoková cytometrie“ je používán od roku 1976. Cytometrie umožňuje analyzovat v krátkém čase velký počet částic a cytometrická data dovolují statistické zhodnocení jednotlivých buněčných subpopulací zejména podle relativní buněčné velikosti, granularity a intenzity fluorescenčního signálu pro různé testované vlastnosti díky použití vybraných specifických fluorescenčně značených protilátek (6-13).

Průtoková cytometrie funguje na principu **hydrodynamické fokusace**. Jednotlivé buňky v izotonickém roztoku (nosná tekutina, tzv. sheat fluid) protékají velmi tenkou tryskou do silnější kapiláry, kterou nosná tekutina proudí. Buňky usměrněné do tenkého proudu postupují jedna za druhou průtokovou komůrkou, kde protínají nejčastěji laserový monochromatický světelný paprsek. Částice fyzikálně lomí, odrážejí a rozptylují laserové světlo procházející optickou soustavou, jejímiž základními prvky jsou filtry propouštějící světlo o definovaných vlnových délkách (band pass, short pass a long pass filtry). Jednotlivé signály jsou převedeny na elektrické impulzy a zesíleny fotonásobičem (obr. 1) (7).

Měřeními parametry jsou zejména rozptyl světla v malém úhlu, tzv. „forward scatter“ (FSC – je přímo úměrný velikosti buněk) a rozptyl světla v úhlu 90°, tzv. „side scatter“ (SSC – je ovlivněn hlavně granularitou částic a členitostí buněčného jádra). Kromě těchto zá-