

Prietoková cytometriá v diagnostike vybraných onkologických ochorení

Flow Cytometry in the Diagnosis of Selected Oncological Diseases

Klaudia Zelinková¹, Lucián Zastko^{1,2}

¹Katedra laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve, Fakulta zdravotníctva, Katolícka univerzita v Ružomberku, Ružomberok, Slovenská republika

²Oddelenie rádiobiológie, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Bratislava, Slovenská republika

<https://doi.org/10.54937/zs.2023.15.1.3-10>

Abstrakt

Prietoková cytometria predstavuje všestranne využiteľnú a rýchlu metódu detekcie buniek. My sa zameriavame na jej uplatnenie v rámci diagnostiky onkologických ochorení. Stručne popisujeme charakteristiku a princíp fungovania prietokového cytometra a jeho jednotlivých systémov, nevynímajúc fluorescenciu ako dôležitú súčasť tejto metódy. Ďalej definujeme metodiku, princíp imunofenotypizácie a materiál používaný na vyšetrenie v diagnostike onkologických ochorení využitím prietokovej cytometrie. Hlavný dôraz však prikladáme odprezentovaniu prietokovej cytometrie ako diagnostickej metódy vybraných hematooonkologických ochorení, ako aj jej uplatnenie v diagnostike solídnych tumorov, s konkrétnym zameraním na identifikáciu prítomnosti metastatického procesu asociovaného so solídnyimi tumorami detekciou významných markerov metastatickej činnosti.

Kľúčové slová: Prietoková cytometria. Imunofenotypizácia. Diagnostika onkologických ochorení. Hematoonkologické ochorenia. Metastatický proces.

Abstract

Flow cytometry is a versatile and fast method of cell detection. We focus on its application in oncological diseases diagnostics. We briefly describe the characteristics and functional principle of the flow cytometer and its systems, including fluorescence as an important element of this method. Next, we define the methodology, the immunophenotyping principle, and the material used in the diagnostics of oncological diseases by flow cytometry. However, the main emphasis is on presenting flow cytometry as a diagnostic method for selected hemato-oncological diseases, and its application in solid tumors diagnostics, with a specific focus on identifying the metastatic process presence associated with solid tumors by detecting significant markers of metastatic activity.

Key words: Flow cytometry. Immunophenotyping. Diagnostics of oncological diseases. Hemato-oncological diseases. Metastatic process.

Úvod

Neustály vedecko-technický vývoj pozitívne ovplyvňuje aj laboratórnu diagnostiku. Diagnostika onkologických ochorení v dnešnej dobe pracuje s mnohými presnými, rýchlymi a účinnými metódami, ktoré sa snažia odhaliť prítomnosť nádorového procesu čo najefektívnejšie a v čo najskoršom štádiu ochorenia. Jednou z týchto metód je aj prietoková cytometria (PC) - vysoko sofistikovaná laboratórna metóda v súčasnosti rutinne využívaná na vyšetovanie bunkových suspenzií, a to najmä v imunologických alebo hematologických laboratóriách. Ide o metódu, ktorá počas krátkeho časového úseku dokáže kvantitatívne aj kvalitatívne rozanalyzovať tisíce buniek alebo častíc. V onkologickej diagnostike má kľúčové miesto hlavne v oblasti hematooonkológie. Najvyužívanejším princípom je imunofenotypizácia buniek, a teda detekcia rôznych špecifických extracelulárnych a intracelulárnych bunkových markerov.

Prietoková cytometria

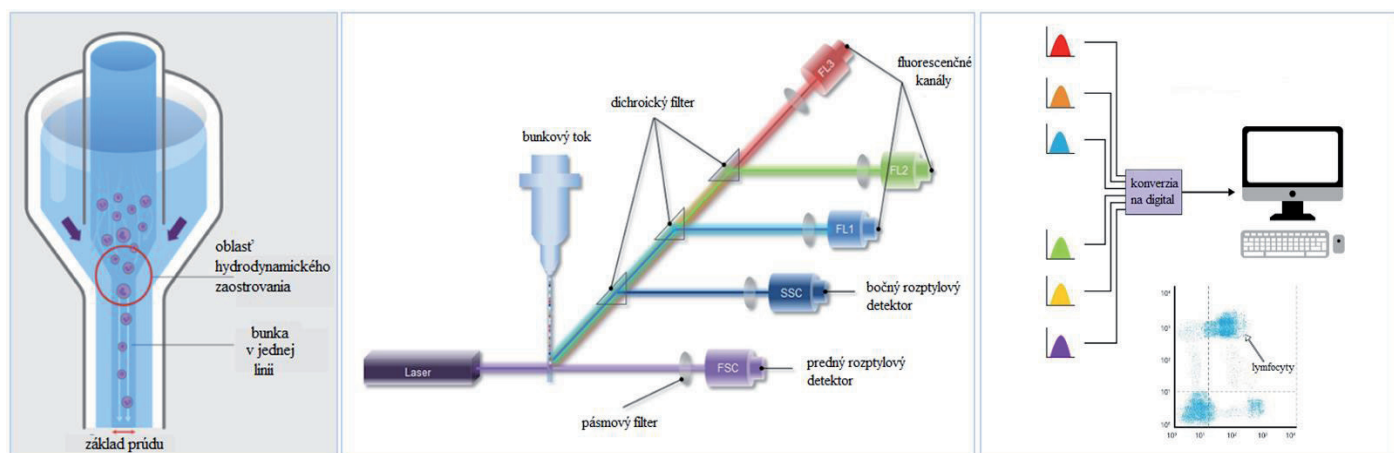
Prietoková cytometria (PC) je výkonný nástroj na analýzu viacerých individuálnych bunkových parametrov z heterogénnych populácií z krvi, kostnej drene, ako aj pevného tkaniva disociovateľného na jednotlivé bunky, príkladom sú lymfatické uzliny, mukózne tkanivá, pevné nádory atď. [1,2]. Táto technológia dokáže zanalyzovať desiatky tisíc častíc za sekundu a definovať prítomné subpopulácie [3]. Analýza prebieha v prietokovom cytometri, prístroji, ktorý meria charakteristiky

buniek, resp. častíc, v prúde tekutiny, prechádzajúcej cez zdroj svetla, laser. Každý bunke alebo inej v roztoku suspendovanej častici je stanovený rozptyl viditeľného svetla a jeden alebo viacero parametrov fluorescencie [4,2]. V súčasnosti má PC rutinné uplatnenie vo viacerých disciplínach, napr. v imunológii, virológii, molekulárnej biológii, onkobiológii a monitorovaní infekčných chorôb [2]. Medzi najbežnejšie aplikácie PC v klinických laboratóriách patrí imunofenotypizácia, identifikácia malígnych buniek z telových tekutín, určenie DNA ploidity, analýza bunkovej proliferácie a bunkového cyklu [5]. PC tiež slúži ako hlavný výskumný nástroj vo farmácii a biotechnológii a je technológiou používanou na takmer každej univerzite alebo výskumnom stredisku vo svete [3].

Analýza bunkových parametrov je realizovaná prietokovým cytometrom, ktorý tvoria tri základné systémy: fluidný, optický - excitačný a zberový, elektronický a počítač - obrázok 1. Fluidika je zodpovedná za smerovanie častíc rozptýlených v kvapaline cez zdroj fokusovaného svetla. Tento proces je zabezpečovaný pôsobením hydrodynamickej fokusácie - techniky, ktorá usporadúva bunky v prietokovej komôrke s presnosťou na jeden mikrometer. Excitačná optika usmerňuje svetelný zdroj, laser, na bunky a častice, pričom sa svetlo vychyluje okolo okrajov bunky a nastáva jav nazývaný rozptyl svetla [6,7]. Rozpoznávame dva typy svetelného rozptylu, predný rozptyl (FSC, forward scatter) v smere dopredu, a bočný rozptyl (SSC, side scatter) otočený o 90° [2]. Predný rozptyl charakterizuje svetlo difraktované

okolo bunky a je úmerné jej veľkosti. Bočný rozptyl je úmerný vnútornej zložitosti, granularite alebo nukleárnej lobularite bunky [4]. Zberná optika transmittuje zaznamenaný signál a rozptyle svetla alebo fluorescencií častice do elektronickej

siete. Elektronický systém rozpozná signál a konvertuje ho na digitálne dáta, ktoré možno zobraziť vo forme histogramov alebo bodových grafov. Takto získané a spracované dáta sú pripravené na vyhodnotenie a validáciu operátorom [6].

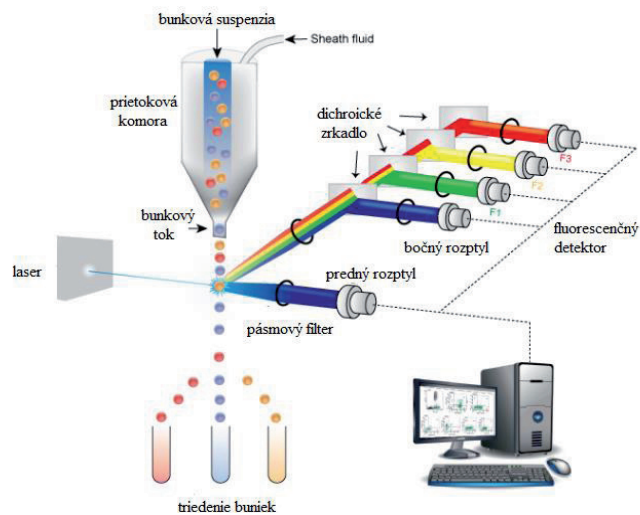


Obrázok 1 Tri základné systémy prietokového cytometra: fluidný (vľavo), optický (v strede) a elektronický (vpravo) (upravené podľa Aysun a kol., 2016 [8]).

Nevyhnutnú súčasť detekcie znakov v rámci PC predstavuje fluorescencia. Fluorescenčné svetlo povrchových Ag značených monoklonálnymi protilátkami alebo DNA a farbivo nukleovej kyseliny sa odráža pod rovnakým uhlom ako rozptyl bočného uhla [4]. Aby došlo k vzniku svetla alebo akéhokoľvek druhu fluorescencie, musí nastať excitácia častice, atómu, iónu alebo inej molekuly absorpciou fotónom - dochádza k prechodu stimulovanej častice z nižšej elektrónovej energetickej úrovne na vyššiu elektrónovú energetickú úroveň a jej excitácii. Po niekoľkých nanosekundách sa molekula zvyčajne vráti do základného energetického stavu, pričom časť z celkovej energie je uvoľnená vo forme fotónov vyššej vlnovej dĺžky - tieto častice nazývame fluorofóry, chromofóry a fluorochrómy, pretože majú jedinečnú schopnosť absorbovať energiu. Dôležitým aspektom pri výbere fluorescenčných markerov je počet parametrov, ktoré chceme stanoviť, a podľa toho je potrebné zvoliť aj vhodné typy fluorochrómov. Z imunologického hľadiska hovoríme o fenotypových markeroch, ktoré dokážu bunky rozdeliť až na 70 rôznych subpopulácií. V súčasnosti možno pomocou polychromatickej PC definovať približne 30 subpopulácií jedným testom, využitím spektrálnej PC možno identifikovať viac ako 40 subpopulácií. [3,9].

Najkritickejší a časovo najnáročnejší krok analýzy v PC predstavuje identifikácia homogénnych bunkových populácií v dátach, proces známy ako „gating“ - vrátkovanie. „Gate“ je numerická alebo grafická hranica, ktorú možno použiť na definovanie charakteristík častíc. Ide o identifikáciu viacerých subpopulácií v rámci jednej vzorky a hľadanie zhody medzi viacerými vzorkami [6,10]. Dva najznámejšie spôsoby zobrazovania analyzovaných dát sú histogram a bodový graf - „dot plot“. Histogram je jednoparametrový graf, kde os x predstavuje číselnú hodnotu signálu parametra a os y predstavuje počet častíc vyskytujúcich sa na danú hodnotu na osi x. Signály s rovnakou intenzitou sa hromadia v tom istom mieste. Dot plot, dvojrozmerný bodový diagram, predstavuje hromadnú reprezentáciu všetkých objektov vo vzorke s hodnotou parametra FSC vyššou než zvolený prah, čiže častice s nadprahovou

veľkosťou. Každá bunka je v diagrame reprezentovaná jedným bodom. Dot plotové dvojparametrové grafy sú rozdelené na štyri kvadranty, ktoré separujú populácie na negatívne - ľavý dolný kvadrant, pozitívne - ľavý horný a pravý dolný kvadrant, alebo dvojito pozitívne - pravý horný kvadrant [6,11]. Celkový pohľad na princíp prietokovej cytometrie sumarizuje obrázok č. 2.



Obrázok 2 Schematické zobrazenie spracovania, merania a vyhodnotenia vzorky prietokovou cytometriou (upravené podľa Aysun a kol., 2016 [8]).

Imunofenotypizácia

Jedným zo spôsobov identifikácie buniek, napr. krvných elementov je morfológické vyšetrenie. Táto metóda je veľmi dobre prepracovaná, avšak v súčasnosti nie je dostatočujúca, preto bola do laboratórnej praxe aplikovaná presnejšia metóda identifikácie buniek prostredníctvom ich povrchových a intracelulárnych znakov, imunofenotypizácia. Znaky predstavujú membránové proteíny, antigény, ktoré majú odlišný a špecifický charakter vzhľadom na tkanivo alebo orgán, v ktorom sú lokalizované. Jeden špecifický Ag môže byť však exprimovaný viacerými

populáciami buniek. Tieto membránové Ag nazývame CD molekuly (clusters of differentiation/designation, diferenciačné/označovacie znaky) [6,12,13]. Buc ich vo svojej knižnej publikácii definuje ako: „...súbor membránových antigénov (znakov), ktoré sa objavujú v bunkovej membráne v určitom štádiu ich vývoja, pretrvávajú v nej v určitom vývojovom období

bunky alebo zostávajú v nej ako charakteristický znak až do jej zániku.“ [12]. CD klasifikácia bola ustanovená v roku 1982 v Paríži a spočiatku zahŕňala len Ag leukocytov. Dnes obsahuje aj znaky ďalších bunkových populácií a tvorí ju približne 400 znakov [14]. Najznámejšie povrchové antigény CD klasifikácie uvádzame v tabuľke č. 1.

Tabuľka 1 Stručný prehľad najznámejších povrchových antigénov. Ide o CD znaky charakterizujúce krvné bunky, keďže leukocyty boli prvým typom buniek, ktorých Ag boli popísané v CD klasifikácii (upravené podľa [14]).

Druh buniek	Povrchové markery
leukocyty	CD45
T lymfocyty	CD3, CD5
pomocné T lymfocyty	CD3+, CD4+
cytotoxické T lymfocyty	CD3+, CD8+
B lymfocyty	CD19, CD20 (mladšie formy CD10)
NK bunky	CD3-, CD16+, CD56+
monocyty	CD14
myeloidné bunky	CD13, CD33
trombocyty	CD41, CD61
erytrocyty	CD235a
kmeňové hematopoetické bunky	CD34
plazmatické bunky	CD138

Imunofenotypizácia využíva poznatky o veľkosti a komplexnosti analyzovaných buniek a taktiež elektronickú vizualizáciu väzby protilátok s Ag, najčastejšie ide o komerčné monoklonálne protilátky značené fluorochrómami [14]. Pre protilátky je najvýhodnejším a požadovaným spôsobom väzby na Ag špecifická väzba protilátky cez väzobné miesto. Protilátky sa však môžu na bunky viazať aj inými spôsobmi, ktorých vylúčenie je kriticky dôležité pre spoľahlivú kvantifikáciu a expresiu Ag imunofluorescenciou [7].

Materiál - suspenzia jednotlivých buniek

Fluidný charakter počítania v PC vyžaduje suspenziu jednotlivých buniek. Pokiaľ bunky pochádzajú z pevného tkaniva alebo z adherentnej bunkovej kultúry, pred analýzou je potrebné zabezpečiť disintegráciu tkaniva alebo bunkovej vrstvy na jednotlivé bunky detekovateľné prietokovým cytometrom. Dvomi hlavnými princípmi disociácie tkanív a adherentných kultúr sú mechanická a enzymatická disociácia. Pri mechanickej disintegrácii je potrebné z tkaniva, napr. solídneho tumoru, vyextrahovať dostatočný počet buniek pôsobením mechanickej sily - tkanivo je rozrušované skalpelom až do uvoľnenia buniek. Na enzymatickú disociáciu sú najčastejšie volenými enzýmami trypsín a kolagenáza typu II - tkanivo je inkubované určitú dobu v enzymatickom roztoku zvyčajne pri 37 °C. Pokiaľ má vyšetrenie určiť stupeň ploidity, v prípade tkaniva zo solídnych nádorov je aplikovaná DNáza I, ktorá odstraňuje DNA z neporušených buniek. Po disociácii je odporúčané určiť počet a viabilitu, životaschopnosť vyextrahovaných buniek. Jednoduchým spôsobom stanovenia viability je použitie testu životaschopnosti buniek - Trypánovou modrou. Adekvátne zastúpenie všetkých bunkových línií vo vzorke po disociácii tkaniva však nemožno brať ako 100 %-nú zhodu s východiskovým materiálom. Môžeme konštatovať, že ide o podiel rôznych typov buniek, podobajúci sa ich proporciám v pôvodnom tkanive, novovytvorená bunková

suspenzia však môže vykazovať odlišné fyziologické funkcie ako východiskový materiál [7].

Diagnostika hematoonkologických ochorení prietokovou cytometriou

Hematologické malignity predstavujú skupinu ochorení vznikajúcich v kostnej dreni a lymfatickom tkanive. Ide o klonálne ochorenia z nezrelých hematopoetických buniek, kde je degenerácia formovaná v totipotentných či pluripotentných kmeňových bunkách alebo v bunkách nachádzajúcich sa v určitom stupni vývoja. Diagnostika hematoonkologických ochorení spočívala dlhé obdobie výlučne vo vyhodnotení náterov periférnej krvi a kostnej drene, cytologickom, prípadne cytochemickom vyšetrení. V posledných desaťročiach dochádza k rozvoju hematológie, v rámci ktorého klasická morfológická diagnostika stále zostáva základnou a bežne dostupnou metódou pri rozlišovaní normálnych, atypických a patologických nálezov, a zároveň sa stala súčasťou komplexného vyšetrovacieho procesu zahŕňajúceho modernejšie a technologicky vyspelejšie diagnostické metódy, medzi ktoré radíme aj PC [14,15]. „Prietoková cytometria (PC) je moderná diagnostická metóda, ktorá dopĺňa štandardné morfológické vyšetrenie o údaje, ktoré sa týkajú informácií o bunkových líniách, o stupni diferenciácie a o klonovom pôvode buniek. Za jej vzostupom stojí pokrok v imunologickej fenotypizácii, molekulárnej biológii a cytogenetike, ktorý umožnil presnejšiu klasifikáciu maligného klonu, má prognostický význam v čase diagnózy a priamy vplyv na stratifikáciu liečby. Imunofenotypovým vyšetrením dokážeme odpovedať na otázky, či je nádor leukocytového pôvodu, či je leukocytová proliferácia maligná, o aký typ leukémie či lymfómu ide, či sú prítomné znaky, ktoré pomôžu vybrať terapiu alebo určiť prognózu a aký efekt má liečba (monitorovanie priebehu terapie a detekcia minimálnej reziduálnej choroby - MRD).“ [16].

Akútne leukémie

Akútna lymfoblastová leukémia a lymfoblastový lymfóm (ALL) - agresívne nádorové ochorenie z lymfocytárných prekursorov charakterizované akumuláciou nezrelých lymfoblastov. ALL s infiltráciou kostnej drene menšou ako 20 % aprevážneextramedulárnym postihnutím sa nazýva lymfoblastový lymfóm. V krvnom obraze (KO) je prítomná leukocytóza, leukopénia, ale aj normálny počet leukocytov. V periférnej krvi

sú preukázateľné leukemické blasty. Imunofenotypizácia blastov využitím PC je nevyhnutná pre stanovenie diagnózy a typu ALL. Znalosť membránových a cytoplazmatických Ag maligných buniek umožňuje rozlíšenie medzi T- a B-lymfocytárnou líniou a roztriedenie leukemických blastov podľa miery zrelosti [15,17]. Rozdelenie T- a B-ALL spolu s charakteristickými diagnostickými markermi uvádzame v Tabuľke č. 2.

Tabuľka 2 Imunofenotypová klasifikácia ALL (upravené podľa [18]).

B-línia	CD19+ a/alebo CD79a+ a/alebo CD22+ (75%)
Pro-B-ALL	CD10-
Common-B-ALL	CD10+ (najčastejšie)
Pre-B-ALL	Cytoplazmatické klonálne imunoglobulíny +, povrchové imunoglobulíny κ- a λ-
T-línia	CD3+ (25%)
Pro-T-ALL	CD7+
Pre-T-ALL	CD2+ a/alebo CD5+ a/alebo CD8+
Thymic-T-ALL	CD1a+
Mature-T-ALL	CD1a-, povrchové CD3+, TCRαβ+ alebo TCRγδ+

Akútna myeloidná leukémia (AML) - heterogénna skupina maligných ochorení krvotvorby, ktoré vznikajú klonálnou transformáciou hematopoetickej kmeňovej bunky, konkrétne nekontrolovateľnej proliferácii na úrovni patologických promyelocytov, čo vedie k akumulácii nezrelých elementov, blastov, myeloidnej línie v kostnej dreni [15,17]. Na vyšetrenie AML prostredníctvom PC sa používajú vzorky periférnej krvi a kostnej drene. Prvotne je vykonané stanovenie myeloidných blastov imunofenotypizáciou CD45 verzus SSC a zaradenie do tzv. „blast gate“. Myeloidné blasty vykazujú pozitívitu znakov CD 34 a CD 117. Kritickým bodom v diagnostike akútnej leukémie je presné priradenie línie. Myeloidná línia je detegovaná expresiou znakov CD13, CD15, CD33 a MPO, zatiaľ čo monocytová línia je naznačená expresiou Ag CD4, CD14, svetlého CD33 a CD64. Lymfoidný panel by mal zahŕňať markery B-lymfocytov, t. j. CD19, CD22 a/alebo CD79a, a markery T-lymfocytov, t. j. CD2, CD3, CD5 a CD7. Akonáhle je línia s istotou priradená, malo by byť vykonané komplexne hodnotenie Ag exprimovaných populáciou blastov - pre určenie odlišnosti aberantného blastového imunofenotypu od imunofenotypu normálnych progenitorov [19,20].

Lymfoproliferatívne ochorenia

Lymfoproliferatívne ochorenia zahŕňajú súbor klonálnych hematonekologických ochorení, ktoré vychádzajú z rôznych vývojových štádií lymfocytov, najčastejšie bunkovej línie B, ale aj línie T, prípadne z NK-buniek (natural killers, prirodzení zabíjači) [18].

Chronická lymfocytárna leukémia (CLL) - nádorové klonálne ochorenie krvotvorby charakterizované akumuláciou morfológicky zreých malých B-lymfocytov s typickým imunofenotypom CD5+/19+/23+ v kostnej dreni, periférnej krvi a lymfatických orgánoch. Pre stanovenie diagnózy CLL je v súčasnosti nutná prítomnosť $\geq 5 \times 10^9/l$ klonálnych B-lymfocytov s typickým fenotypom v periférnej krvi. Rozhodujúcim vyšetrením pre potvrdenie klonality a fenotypu

B-lymfocytov je PC. CLL bunky typicky koexprimujú Ag CD5, CD19, CD23. Slabo exprimujúce sú aj znaky CD20, CD22 a ľahké reťazce κ a λ. Naopak vykazujú nízku expresiu znaku CD79b typického pre B-lymfocyty. K stanoveniu diagnózy i v rámci diferenciálnej diagnostiky sa využíva skórovací systém podľa Matutesovej, zobrazený v Tabuľke č. 3. Systém je založený na expresii piatich povrchových Ag lymfocytov, ktorá sa rôzni podľa typu B-lymfoproliferácie [16,17,18].

Tabuľka 3 Skóre Matutesovej. CLL má typicky skóre 4 – 5 (upravené podľa [17]).

Znak	1 bod	0 bodov
CD5	pozitívne	negatívne
CD23	negatívne	negatívne
sIgM	slabé	silné
CD79b	slabé	silné
FMC7	negatívne	pozitívne

Prolymfocytárna leukémia z B buniek (B-PLL) a prolymfocytárna leukémia z T buniek (T-PLL) - vzácné maligne lymfoproliferatívne ochorenia s veľmi nepriaznivou prognózou, podobné chronickej lymfocytárnej leukémii (CLL). PLL vznikajú malignou transformáciou zreých periférnych lymfocytov. V nátere periférnej krvi dominujú prolymfocyty. Definitívne potvrdenie diagnózy a odlišenie B-PLL od T-PLL je možné len na základe vyšetrenia periférnej krvi metódou PC, ktorá je schopná detegovať špecifické antigénne znaky na povrchu a v cytoplazme buniek a s istotou ich odlišiť. Imunofenotyp B-PLL je variabilný, kľúčová je pozitívita pan-B znakov CD19+, CD20+, CD22, HLA-DR, CD79b a povrchových monoklonálnych imunoglobulínov SmIgM, IgD, ako aj znaku FMC7. T-PLL má postýmický genotyp a je teda TdT a CD1 negatívna. Pozitívitu naopak vykazujú znaky CD2, CD3, CD5 a silnú expresiu CD7. V 65 % prípadov je pozitívna kombinácia CD4+/CD8-, menej časté sú kombinácie CD4+/8+, CD4-/8+ a veľmi vzácné môže byť prítomná negatívita oboch týchto znakov. Pri rozporných výsledkoch sa dodatočne vykoná cytogenetická analýza, prípadne histologické vyšetrenie, trepanobiopsia [15,18].

Leukémia z vlasatých buniek (HCL, hairy cells leukemia) - vzácné indolentné lymfoproliferatívne ochorenie vychádzajúce zo zreých B-lymfocytov, charakterizované prítomnosťou typických „vlasatých“ buniek v periférnej krvi, kostnej dreni a lymfoidných orgánoch s prítomnou pancytopeniou a splenomegáliou. Diagnostika HCL sa opiera o prítomnosť charakteristických leukemických buniek v periférnej krvi a kostnej dreni pacienta. HCL má typický imunofenotyp. Pri vyšetrení metódou PC je prítomná silná expresia znakov

CD20, CD22 a CD11c, tiež sú prítomné CD103, CD25, CD123, AnnexinA1, DBA.44, FMC-7 a cyklín D1. Expresia CD25 odráža aktuálnu masu nádorových buniek HCL. Vhodné je sledovanie tohto znaku počas doby diagnózy pred zahájením liečby i po liečbe. AnnexinA1 sa používa na odlišenie cHCL od vHCL a splenického lymfómu marginálnej zóny (SLMZ), príbuzných ochorení, ktoré tento Ag nenesú. Diferenciálna diagnostika HCL a príbuzných ochorení sa nachádza v tabuľke č. 4 [17,18].

Tabuľka 4 Diferenciálna diagnostika vlasatobunkovej leukémie (HCL), variantnej vlasatobunkovej leukémie (vHCL) splenického lymfómu marginálnej zóny (SMZL) (upravené podľa [18]).

Nález	HCL	vHCL	SMZL
periférna lymfadenopatia	cca 5 %	cca 80 %	cca 25 %
monocytopenia	áno	nie	nie
cytoplazmatické výbežky buniek	áno	áno	áno na póloch
štruktúra chromatinu	jemná jadierko nie	hrubá jadierko nie	hrubá jadierko +/-
infiltrácia sleziny	červená pulpa	červená pulpa	biela pulpa
CD5	-/*	+	-/*
CD11c	++	+/-	+/-
CD20	++	++	++
CD25	++	-	-/*
CD103	++	+/-	-/*
TRAP	++	-/*	-/*
mutácia BRAF V-600-E	71 – 100 %	nie	nie

Hodgkinov lymfóm (HL) - v minulosti nazývaný malígnym lymfogranulóm, malígne ochorenie vychádzajúce z B-lymfocytárnej rady. Typické nádorové bunky tohto lymfómu sú jednojadrové Hodgkinove bunky a Reedove-Sternbergove bunky (H/RS), obrovské bunky s viacpočetnými jadrami a výraznými eozinofilnými jadričkami. PC v diagnostike HL nebola v minulosti užitočná z dôvodu problematickej izolácie H/RS buniek, pretože sú v heterogénnej zmesi zápalového

pozadia zahŕňajúcej iné leukocyty. V súčasnosti však viaceré štúdie prezentujú vhodný imunofenotypový profil na identifikáciu H/RS buniek, vykazujúci pozitívitu markerov CD30, CD40 a CD95. Variabilná môže byť pozitívita znakov CD3, CD5 a CD45 v dôsledku možného vzniku T-lymfocytových roziet po interakcii H/RS buniek s T-lymfocytmi, pričom dôjde k zmene negatívneho znaku CD3 alebo CD5 na pozitívny a zvýši sa intenzita farbenia markera CD45 [18,21].

Tabuľka 5 Zoznam antigénnej detekcie aberantných plazmatických buniek MM (upravené podľa [22]).

Antigén	Normálna expresia plazmatických buniek kostnej drene	Abnormálna expresia plazmatických buniek kostnej drene	Podiel abnormálnych buniek pri MM
CD38	vysoká hustota expresie	pozitívna	80 %
CD45	variabilná	negatívna	80 %
CD19	pozitívna	negatívna	96 %
CD56	negatívna	vysoká hustota expresie	60 – 75 %
CD117	negatívna	pozitívna	30 %
CD20	negatívna	pozitívna	17 – 30 %
CD28	negatívna	vysoká hustota expresie	15 – 45 %
CD27	jasná/pozitívna	slabá/ negatívna	40 – 68 %
CD81	pozitívna	slabá/ negatívna	55 %
CD200	slabo pozitívna	vysoká hustota expresie	≥ 70 %
CD33	negatívna	slabá/ pozitívna	18 %

Mnohopočetný myelóm (MM) - zhubné ochorenie charakterizované klonálnou proliferáciou terminálne diferencovaných B-lymfocytov, plazmatických buniek (PB) v kostnej dreni a menej často v extramedulárnych léziách, ktoré produkujú monoklonálne imunoglobulíny IgG, IgA, IgD, IgE a voľné ľahké reťazce κ , λ , pričom v kostnej dreni musí

byť prítomných aspoň 10 % klonálnych PB. V diagnostike slúži imunofenotypizácia plazmatických buniek metódou PC najmä pri zriedkavých prípadoch IgM MM, nesekrečnej forme MM a primárnej amyloidóze. Prvým krokom je detekcia neoplastických PB stanovením znakov CD138, CD38 a CD45. Existujú zriedkavé prípady MM, v ktorých majú PB „omladený“

imunofenotyp CD138dim/CD45+ alebo plazmoblastový CD138-/CD45+. Bunkovú klonalitu je možné potvrdiť aj na základe imunoglobulínových ľahkých reťazcov. Univerzálny povrchový marker jednoznačnej diferenciácie abnormálnych anormálnych PB v šak neexistuje [21]. Znakys najinformatívnejším významom pre diagnostiku MM uvádzame v tabuľke č. 5.

Myeloproliferatívne neoplázie

Myeloproliferatívne neoplázie (MPN) sú klonálne hematologické ochorenia kmeňových krvotvorných buniek charakterizované proliferáciou jednej alebo viacerých myeloidných línii. Typická je hypercelularita kostnej drene s efektívnym zrením krvotvorby a zvýšený počet granulocytov, erytrocytov alebo trombocytov v periférnej krvi [14].

Chronická myeloidná leukémia (CML) - je klonálne myeloproliferatívne ochorenie, charakterizované prítomnosťou špecifickej získanej genetickej abnormality t(9;22) nazvanej Filadelfský chromozóm (Ph chromozóm). V dôsledku tejto mutácie vzniká patologický fúzny gén BCR-ABL1 kódujúci vznik patologickej tyrozínkinázy Bcl-Abl zodpovednej za nekontrolovateľné množenie krvotvorných buniek [17,23]. V diagnostike CML je zlatým štandardom stanovenie fúzneho génu BCR-ABL1 pomocou RT-PCR. Štúdia švédskych vedcov Löf a kol. (2017) však preukazuje vhodnosť spojenia PC s in situ PLA (proximity ligation assay, test proximitej ligácie) do tzv. PLA-flow aplikovateľného v diagnostike CML detekciou buniek exprimujúcich BCR-ABL1. Experimentálne bola vykonaná detekcia fúzneho proteínu BCR-ABL1 prostredníctvom PLA-flow na bunkách K-562 - bunková línia ľudskej imortalizovanej chronickej myeloidnej leukémie. Ako negatívna kontrola bola použitá bunková línia U-937 - promonocytová bunková línia ľudskej myeloidnej leukémie izolovaná z histiocytového lymfómu. Bunková línia K-562 vykazovala v teste BCR-ABL1 jasne pozitívne farbenie, zatiaľ čo bunky U-937 boli negatívne, čo potvrdzuje selektivitu testu. Podobne boli bunky pacientov s CML detegované ako pozitívne na fúzny proteín BCR-ABL1, zatiaľ čo zdravým kontrolným vzorkám chýbalo špecifické označenie. V konečnom dôsledku PLA-flow poskytlo výsledky podobné tým z RT-PCR, len s malými rozdielmi pozorovanými u niektorých pacientov [24].

Diagnostika metastatických procesov

Metastatické procesy sú jednou z hlavných problematik rakoviny. Viac ako 90 % úmrtí súvisiacich s nádorovými ochoreniami je spôsobených práve metastatickým procesom. V diagnostike a monitorovaní rozvoja metastázovania solidných tumorov je možné uplatniť aj metódu PC, konkrétne detekciu významných markerov metastatickej činnosti ako napr.: cirkulujúce tumorové bunky, epitelovo-mezenchymálnu tranzíciu a kmeňové nádorové bunky [25].

Cirkulujúce nádorové bunky (circulating tumor cells, CTC) - zriedkavo sa vyskytujú bunky, tzv. „rare cells“, vylučované solidnými nádormi, ktoré sa v extrémne nízkych počtoch nachádzajú v periférnej krvi pacientov s väčšinou typov nádorových ochorení. Subtyp CTC sa môže diseminovať do vzdialených orgánov v tele a iniciovať proces tvorby metastáz. CTC predstavujú vhodný biomarker pre diagnostiku, „staging“ a prognózu nádorových ochorení [25,26]. Štandardom v diagnostike CTC je metóda kvapalnej biopsie. Novodobé štúdie prezentujú, že spojenie metódy PC s kvapalnou biopsiou môže

podstatne zlepšiť charakterizáciu CTC a taktiež preukazujú, že citlivosť PC v rámci tohto vyšetrenia je podobná alebo vyššia ako real-time PCR. Reprezentatívnou vzorkou pre PC vyšetrenie CTC je vzorka krvi z kolorekta, v ktorej sú prítomne štandardné epiteliálne markery, ako je EpCAM, K20 (cytokeratín 20), K5/6/8/17 a EpCAM/pan-K. Analýza bola nedávno skvalitnená začlenením znakov CD133, CD54 a CD44, vimentínu, PTEN a AR-V7, ktoré sú preukázateľné pri karcinóme hrubého čreva, prsníka, kolorektálnom karcinóme a karcinóme prostaty. Napriek mnohým výhodám použitia PC je pri detekcii CTC potrebné brať do úvahy, že PC nezaručuje vizuálne potvrdenie identity buniek, čo zvyšuje riziko výskytu falošne pozitívnych udalostí z dôvodu technickej náročnosti rozlišovania skutočných CTC [27].

Epitelovo-mezenchymálny prechod (epithelial-mesenchymal transition, EMT) - molekulárny mechanizmus zapojených do vzniku metastáz tumorových buniek, charakterizovaný stratou adhézie a polarity medzi bunkami epitelu a cytoskeletálnou reorganizáciou membrány, čo vo výsledku umožňuje oddelenie buniek od primárneho nádoru, ich transport do okolitých tkanív a vzdialených orgánov a možný rozvoj metastatického procesu. Metódu PC môžeme aplikovať na stanovenie kvantitatívneho indexu úrovne EMT, a teda rizika či percenta metastázovosti solidných tumorov - pričom na tento účel možno použiť proteín Vimentín (Vim) ako marker fenotypu EMT. De novo expresiu markera Vim môžeme detegovať len v prípade vstupu epitelovej bunky do EMT vzhľadom na to, že tento marker nie je bežne exprimovaný v epitelových bunkách - preto sú výsledky vyšetrení s použitím proteínu Vim považované za vysoko presné klinické hodnoty kvantitatívneho stanovenia expresie nádorovej EMT u pacientov s onkologickým ochorením, ako napr. karcinóm prsníka, nemalobunkový karcinóm pľúc a karcinóm ovárií [28,29].

Kmeňové nádorové bunky (cancer stem cells, CSC) - sú známe ako bunky vykazujúce schopnosť samoobnovy a asymetrického delenia, ktorých existencia má dôležitú úlohu v raste, progresii a prežívaní nádorových buniek. Existujú podstatné dôkazy naznačujúce, že metastázy nádorových buniek začínajú v bunkách veľmi charakterovo podobných normálnym kmeňovým bunkám, a teda práve CSC. CSC sú identifikovateľné vo väčšine bežných nádorov, ako sú karcinóm pečene, prsníka, prostaty, hlavy a krku, pankreasu, ale aj leukémia a melanóm. Na ich stanovenie sa používajú rôzne metódy, často založené na identifikácii markerov bunkového povrchu, medzi ktoré radíme aj PC. Najčastejšie študovanými povrchovými markermi CSC sú CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, ESA, ale aj ALDH1 - využívaná na identifikáciu a izoláciu týchto buniek [28].

Záver

Prietoková cytometria vďaka svojej principiálnej technológii umožňuje simultánne meranie a analýzu niekoľkých fyzikálnych a chemických atribútov, čím predstavuje mimoriadne všestranný a užitočný nástroj v diagnostike onkologických ochorení. Pochopenie princípu imunofenotypizácie je kritickým prvým krokom k úspešnej diagnostike onkologických ochorení. Vďaka znalosti fyziologických, zdravých imunofenotypových bunkových vzorcov sme následne schopní identifikovať abnormálne bunkové populácie identifikujúce hematopoetické neoplázie.

Nami prezentované onkologické ochorenia sa vyznačujú charakteristickým imunofenotypovým profilom - potvrdenie diagnózy pomocou metódy PC je pre nich kľúčové. Unikátnym

a veľmi zaujímavým exemplárom je spojenie PC a in situ PLA do tzv. PLA-flow v diagnostike chronickej myeloidnej leukémie, kde namiesto typických imunofenotypických CD markerov stanovujeme prítomnosť fúzneho proteínu BCR-ABL1 leukemických buniek. Existujú však mnohé iné hematologické ochorenia, v diagnostike ktorých sa metóda PC uplatňuje ako doplnkové vyšetrenie na potvrdenie diagnózy v prípade nejednoznačných alebo rozporných výsledkov iných klinických testov. Ide napríklad o celú skupinu Non-Hodgkinových lymfómov zahŕňajúcu folikulárny lymfóm, lymfóm z buniek plášťovej zóny, difúzny veľkobunkový lymfóm a i., tiež ide o myelodysplastický syndróm alebo mnohopočetný myelóm. Významným novodobým diagnostickým uplatnením PC je identifikácia prítomnosti metastatického procesu asociovaného s onkologickými ochoreniami, najmä so solídnymi tumormi detekciou markerov metastatickej činnosti. My uvádzame tri, a to cirkulujúce tumorové bunky, epitelovo-mezenchymálnu tranzíciu a kmeňové nádorové bunky.

Významné pokroky v oblasti elektroniky, softvéru či reagencií v posledných rokoch zjednodušili niektoré aspekty PC, napriek tomu ide o metódu, ktorej plný potenciál je stále predmetom výskumu. Podobne je to aj s jej aplikáciou v diagnostike onkologických ochorení. PC sa rutinne používa na diagnostiku a sledovanie hematolymfoidných ochorení a neoplázií, ale identifikácia nehematologických solídnych malígnych nádorov je obmedzená a predstavuje neustály predmet výskumu.

Financovanie

Táto prehľadová štúdia bola podporená projektom VEGA grant č. 2/0140/23.

Zoznam bibliografických odkazov

- Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012;64(2):109–130. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>
- McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1 – 5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Robinson JP. Flow cytometry: past and future [online]. *Biotechniques*. 2022;72(4):159 – 169. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0005>
- Wilkerson MJ. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012;42(1):53 – 71. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.012>
- Dey P. Flow Cytometry: Basic Principles, Procedure and Applications in Pathology. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore. 2018;171 – 183. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_17
- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163 – 176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition) *Eur J Immunol*. 2019;49(10):1457 – 1973. <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>
- Aysun Adan, et al.; Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 37(2): 163-176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
- Shapiro HM, Telford WG. Lasers for Flow Cytometry: Current and Future Trends. *Curr Protoc Cytom*. 2018;83:1.9.1 – 1.9.21. <https://doi.org/10.1002/cpcy.30>
- Montante S, Brinkman RR. Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(1):56 – 62. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13016>
- Šinkorová Z, Zárbynická L. Prútoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část *Vojenské zdravotnické listy*. 2008;77(3):98 – 103. <https://adoc.pub/zuzana-inkorova-lenka-zarybnicka-univerzita-obrany-katedra-rbde3ba9d49-b53b-fe51f2556910d0593310352.html>
- Jílek P, *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada Publishing, a.s.; 2019.
- Buc M, *Základná a klinická imunológia*. Bratislava: VEDA; 2012.
- Penka M, Tesařová E, Blatný J et al. *Hematologie a transfúzní lékařství I*. Praha: Grada Publishing, a.s.; 2011
- Indrák K, Adam Z, Bláha M. *Hematologie a transfúzní lékařství*. Praha: TRITON; 2014.
- Tupý J, Turzová I, Ďurišová Z et al. Prietoková cytometria v diagnostike lymfoproliferatívnych ochorení - prípadová štúdia. *Zdravotnické štúdie*. 2017;9(2):15 – 24 <https://www.ku.sk/app/cmsSiteBoxAttachment.php?ID=6730&cmsDataID=0>
- Výdra J, Novák J, Lauermannová M et al. *Hematologie v kostce*. 2nd ed. Praha: Mladá fronta a.s.; 2019.
- Büchler T et al. *Specialní onkologie*. 2nd ed. Praha: Maxdorf s. r. o.; 2020.
- Chen X, Cherian S. Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2017;37(4):753 – 769. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.07.003>
- Grewal RK, Chetty M, Abayomi EA, Tomuleasa C, Fromm JR. Use of Flow Cytometry in the Phenotypic Diagnosis of Hodgkin's Lymphoma. *Cytometry Part B*. 2019;96:116 – 127. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21724>.
- Tupý J, Lorenčíková M, Horváthová M, Popelková L. Akútna erytroblastová leukémia - Historické aspekty a prvky patogenézy. Ružomerské zdravotnícké dni 2022 - XVI. ročník. Zborník z medzinárodnej konferencie. Katolícka univerzita v Ružomberku. VERBUM - vydavateľstvo KU, 2022.
- Galtseva IV, Davydova YO, Kapranov NM, Julhakyán HL, Mendeleeva LP. Minimal residual disease in multiple myeloma: Benefits of flow cytometry. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(1):12 – 20. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12757>

23. Tupý J, Liová S, Ondrášik I. Chronická myeloidná leukémia. *Zdravotnícke štúdie*. 2022;14(1):3-11 <https://doi.org/10.54937/zs.2022.14.1.3-11>
24. Löf L, Arngården L, Olsson-Strömberg U et al. Flow Cytometric Measurement of Blood Cells with BCR-ABL1 Fusion Protein in Chronic Myeloid Leukemia. *Sci Rep*. 2017;7(1):623. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00755-y>
25. Suo Y, Gu Z, Wei X. Advances of In Vivo Flow Cytometry on Cancer Studies. *Cytometry A*. 2020;97(1):15 – 23. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23851>
26. Bhagwat N, Dulmage K, Pletcher CH et al. An integrated flow cytometry-based platform for isolation and molecular characterization of circulating tumor single cells and clusters. *Sci Rep*. 2018;8(1):5035. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23217-5>
27. Muchlinska A, Smentoch J, Zaczek AJ, Bednarz-Knoll N. Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells Using Imaging Flow Cytometry - A Perspective Study. *Cancers*. 2022;14:4178. <https://doi.org/10.3390/cancers14174178>
28. Babaei G, Aziz SGG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;133:110909. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333222031101X> <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110909>
29. Bogush TA, Basharina AA, Eliseeva BK et al. A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. *Biotechniques*. 2020;69(4):257 – 263. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0024>

Kontakt:

Klaudia ZELINKOVÁ
Fakulta zdravotníctva
Katolícka univerzita v Ružomberku
Námestie A, Hlinku 28
03401, Ružomberok
e-mail: klaudiazelinkova@gmail.com