

Role průtokové cytometrie při vyšetřování vzorků lymfatických uzlin a extranodálních tkání

Tomáš Zajíc¹, Jana Včeláková², Vít Campr², Tomáš Jirásek³

¹Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie, Centrum laboratorní medicíny, Krajská nemocnice Liberec a.s.

²Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

³Oddělení patologie, Centrum PATOS, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

SOUHRN

Vyšetření lymfoproliferací v lymfatických uzlinách průtokovou cytometrií poskytuje pouze minimální informace o morfologii (orientační stanovení velikosti a granularity buněk), a zcela postrádá informace topografické. Nicméně velkou výhodou této metody je především rychlost stanovení a hodnocení kombinace vyšetřovaných antigenů, kde neméně důležité jsou i intenzity exprese jednotlivých znaků. Toto je zcela zásadní pro hematologické malignity, kdy se různá onemocnění mohou na morfologické úrovni velmi podobat a odchylky vzhledu buněk mohou být minimální. Při diagnostice lymfomů korelace histologie a imunohistochemie s průtokovou cytometrií poskytuje komplexnější pohled pro interpretaci jednotlivých nálezů. Cílem tohoto článku je poskytnout základní informace o vyšetření lymfatických uzlin a biopsií extranodálních tkání průtokovou cytometrií se zaměřením na lymfoproliferativní onemocnění a vytvořit odrazový můstek pro spolupráci mezi patologem a cytometristou.

Klíčová slova: Průtoková cytometrie – Lymfoproliferace – Lymfatická uzlina

The role of flow cytometry in the investigation of lymph node and extranodal lymphatic tissue specimen

SUMMARY

Although flow cytometry examination of lymphoproliferation in lymph nodes provides minimal morphological information, apart from indicative determination of cell size and granularity, and completely loses topographical information. However, the great advantage of this method is the speed of determining and combination of investigated antigens, where the expression intensities of individual markers are no less important. This is absolutely crucial for hematological malignancies, where different diseases can look very similar at the morphological level and variations in the appearance of tumour cells can be minimal. When diagnosing lymphomas, the combination of histology and immunohistochemistry with flow cytometry provides a more comprehensive view for the interpretation of individual findings. The aim of this article is to provide basic information about the examination of lymph nodes and extranodal tissue by flow cytometry as a starting point for the collaboration of the pathologist and the cytometrist.

Keywords: Flow cytometry – Lymphoproliferative disorder – Lymph node

Cesk Patol 2023; 59(4): 168–176

Metoda průtokové cytometrie je velice jednoduchá a efektivní. Její princip je založen na průchodu částic suspenze přes laserový paprsek. Přístroj detekuje světlo rozptýlené od těchto částic, kde snímá rozptyl světla v malém úhlu (tzv. forward scatter – FSC), tato hodnota je úměrná velikosti buněk a dále zaznamenává boční rozptyl světla (tzv. „side scatter“ – SSC), který je ovlivněn hlavně granularitou částic a členitostí jádra. Dále je vybaven fotodetektory, které zachycují vybrané části světelného spektra emitovaných fluorescenčními molekulami. Díky tomu je možné použít vícenásobné značení analyzovaných částic pomocí fluorochromů odlišných ve svých emisních spektrech. Nejčastěji se používá navázání fluorescenční značky na monoklonální protilátku. Základní a stručný postup cytometrického vyšetření spočívá v přidání monoklonálních protilátek značených fluorochromem k suspenzi částic našeho zájmu. Protilátka se během krátké inkubace naváže na antigen. Ve většině případů je třeba optimalizovat postup značení, ať již promytím vzorku před přidáním protilátek (pro odstra-

nění volných imunoglobulinů), použitím přísady pro snížení nespecifické vazby protilátek, promytí vzorku po barvení pro snížení pozadí, či cytolyza erytrocytů. Můžeme detekovat jak povrchové, tak intracelulární antigeny. Na trhu je již k dispozici celá řada komerčních souprav, které i tyto postupy významně zjednodušují.

Od publikace článku „Imunofenotypizace průtokovou cytometrií v patologii“ v Česko-slovenské patologii z roku 2013 ke skokovému pokroku na poli průtokové cytometrie nedošlo. Nové slibné metody se zatím příliš nerozšířily do rutinní diagnostiky, ačkoli na některých pracovištích věnujících se souběžně i výzkumné činnosti se pomalu zabydlují. Jedná se v prvé řadě o spektrální průtokovou cytometrii (s rozšířením počtu detekčních kanálů), hmotnostní cytometrii (se značením protilátek konjugovaných s multiatomovými značkami izotopů kovů místo fluorescenčního) a zobrazovací cytometrii (ta kombinuje cytologický obraz s fluorescenčním značením). Výraznějších pokroků však bylo dosaženo v oblasti dostupnosti průtokových cytometrů, dále pak zejména v nabídce značených monoklonálních protilátek, eventuálně i hotových protilátkových koktejlů. Tím pádem je možné metodiky zavést i v laboratořích, které je dosud nevyužívaly (1-6).

Standardizace v průtokové cytometrii je samostatná a náročná kapitola. Je k dispozici velké množství protilátek, celá řada fluorochromů a v současnosti je na trhu také široké spektrum přístrojů. Díky pokrokům v použití výpočetní techniky je stále

✉ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Tomáš Zajíc

Krajská nemocnice Liberec, Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie

Husova 357/10, 460 63, Liberec

e-mail: tomas.zajic@nemlib.cz