

PROTOČNA CITOMETRIJA U HEMATOLOGIJI

DRAGO BATINIĆ, LANA RNJAK, KLARA DUBRAVČIĆ*

Tehnike protočne citometrije postaju sve važnije u suvremenoj kliničkoj medicini ponajviše zahvaljujući činjenici da ona omogućuje objektivnu, osjetljivu, brzu i točnu analizu relativno velikog broja staničnih svojstava. Iako je svoju primjenu našla i u drugim granama medicine, kao što su patologija, biokemija, mikrobiologija i interna medicina, ona se ipak najčešće koristi u hematologiji i imunologiji. U ovom se kratkom pregledu iznose glavna područja primjene protočne citometrije u suvremenoj hematologiji koja uključuju fenotipske i funkcijske analize krvotvornih stanica. Od fenotipskih analiza posebno se izdvajaju: imunofenotipizacija leukocita periferne krvi u cilju ocjene imunološkog statusa, imunofenotipizacija leukemija i limfoma i praćenje ostatnih malignih stanica (minimalne rezidualne bolesti), mjerenje broja CD34+ krvotvornih matičnih stanica u perifernoj krvi i leukocitnom koncentratu za potrebe transplantacije krvotvornih matičnih stanica, dijagnostika paroksizmalne noćne hemoglobinurije (PNH) i mjerenje sadržaja stanične DNA. Funkcijski testovi leukocita najčešće se rabe za mjerenje aktivacije i proliferacije limfocita, kao i za analizu funkcije granulocita (fagocitoze i respiracijskog praska). Kliničar bi trebao okvirno poznavati opseg i domet navedenih pretraga kako bi ih mogao ciljano i uspješno primijeniti u rutinskoj dijagnostici i praćenju učinka liječenja.

Deskriptori: PROTOČNA CITOMETRIJA, HEMATOLOGIJA, IMUNOLOGIJA, DIJAGNOSTIKA

Protočna citometrija je u današnjem obliku poznata 30-ak godina, iako su se slični oblici mjerenja protočnim sustavom s pomoću rasapa svjetla pojavili puno ranije. Protočni citometar se sastoji od 3 međusobno povezana sustava: protočnog, optičkog i elektronskog (1). Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Protočni sustav omogućuje da stanice iz stanične suspenzije pojedinačno laminarnom protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i osjetnicima čine optički sustav. Stanice se obasjavaju laserskim svjetlom, a stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih

osobina stanica - veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom od 0,5-10°, FSC - prema engl. *forward scatter*) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, prema engl. *side scatter*).

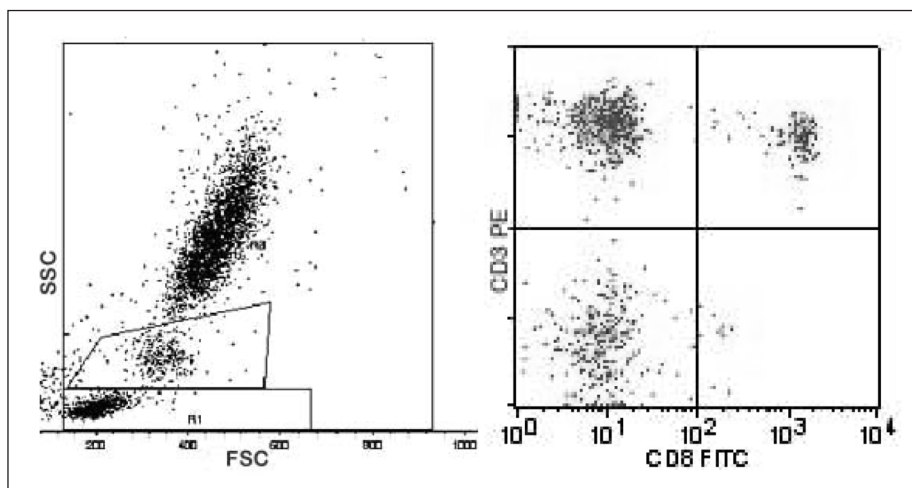
Dodatno obilježavanje stanica slobočnim ili (ponajčešće) za monoklonska protutijela vezanim fluorescentnim bojama (*fluorokromima*) rabi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični osjetnici (detektori) protočnog citometra. Sve svjetlosne signale elektronski sustav pretvara u digitalne signale koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu. Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi citogram veličine i zrnatosti stanica (FSC×SSC) (Slika 1) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Upravo je to jedna od najvećih prednosti moderne protočne citometrije, budući da stanice prije analize nije potrebno prethodno fizički razdvojiti. Od ostalih prednosti valja izdvojiti veliku brzinu

mjerenja signala (>10³ stanica u sekundi) te istodobno mjerenje više parametara (fizičkih parametara i fluorescentnih signala), pa se na modernim citometrima istodobno može analizirati i do desetak parametara (1).

Premda je do danas razvijen velik broj protočnocitometrijskih testova za analizu različitih staničnih obilježja i/ili funkcija, ona se još uvijek ponajviše rabi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanje specifičnih staničnih biljega. Od imunofenotipskih analiza posebno se izdvaja analiza limfocita periferne krvi u cilju ocjene imunološkog statusa, imunofenotipizacija leukemija i limfoma i praćenje ostatnih malignih stanica (minimalne rezidualne bolesti), mjerenje broja CD34+ krvotvornih matičnih stanica u perifernoj krvi i leukocitnom koncentratu za potrebe transplantacije krvotvornih matičnih stanica, dijagnostika paroksizmalne noćne hemoglobinurije (PNH) i mjerenje sadržaja stanične DNA u cilju otkrivanja aneuploidija (najčešće u leukemijama) i proliferacijske aktivnosti stanica (za funkcijske testove limfocita ili procjenu proliferacije tumorskih

*KBC Zagreb - Rebro
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Zavod za imunologiju

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. Drago Batinić
KBC Zagreb - Rebro
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Zavod za imunologiju
10000 Zagreb, Kišpatićeva 12
E-mail: drago.batinic@zg.t-com.hr



Slika 1.
Imunofenotipizacija limfocita T periferne krvi. A. Osnovni prikaz raspodjele subpopulacija prema fizičkim karakteristikama leukocita u suspenziji - veličine/FSC i zrnatosti/SSC; B. Primjer citotoksičnih limfocita T karakteriziranih biljezima CD3 i CD8

Figure 1
Immunophenotyping of peripheral blood T-lymphocytes. A. Basic dot plot showing subpopulations according to physical characteristics of leukocytes in cell suspension - size/FSC and granularity/SSC; B. Example of cytotoxic T-lymphocytes characterized by CD3 and CD8 expression

stanica). Funkcijski testovi leukocita najčešće se rabe za mjerenje aktivacije i proliferacije limfocita, kao i za analizu funkcije granulocita (fagocitoze i respiracijskog praska).

Dijagnostika imunodeficijencija

Protočna citometrija omogućuje uvid u stanje imunskog sustava, što je posebice važno za dijagnostiku i praćenje imunodeficijencija (2, 3). U odnosu na uzrok, imunodeficijencije se dijele se na primarne (urođene) i sekundarne (stečene), a obje dovode do sličnih kliničkih stanja koja se manifestiraju tvrdokornim rekurentnim ili kroničnim infekcijama (4, 5). Imunodeficijencije nastaju zbog manjka

ili oštećenja mehanizama nespecifične ili specifične imunosti, a u odnosu na izvršni krak imunskog odgovora poremećaj može nastati na razini stanične imunosti, humoralne imunosti ili zahvaća oba kraka imunskog odgovora (mješovite imunodeficijencije). Na razini nespecifične imunosti oštećenje zahvaća fagocite, NK-stanice ili sustav komplementa, dok na razini specifične imunosti poremećaj dovodi do smanjenog broja ili funkcije T i B-limfocita, odnosno do smanjenog ili potpunog izostanka izlučivanja protutijela (5-9). Jedna od posebnih indikacija za praćenje imunološkog statusa u djece jest i period nakon alogenične transplantacije krvotvornih stanica, kada se serijskim praćenjem limfocita periferne krvi ocjenjuje imunološki oporavak i imunokompetencija djeteta (10).

Osnovna metoda za određivanje relativnog i apsolutnog broja pojedinih razreda i podrazreda limfocita u perifernoj krvi je imunološka fenotipizacija limfocita. (3, 6, 8, 9, 11). Za tu se svrhu rabe monoklonska protutijela koja se vežu (tj. obilježavaju) specifične stanične molekule (=leukocitne antigene ili tzv. CD-biljege) izražene na membrani ili u citoplazmi stanica. Osnovni panel za fenotipizaciju limfocita uključuje biljege T-limfocita (CD3, CD4 i CD8), B-limfo-

cita (CD19) i NK-stanica (CD16, CD56). Biljezi T-(CD3) i B-(CD19) limfocita ne nalaze se na drugim populacijama stanicama, pa stoga dobro karakteriziraju dvije glavne populacije limfocita. Subpopulacije T-limfocita detektiramo kao dvostruko pozitivne stanice - CD3+CD4+ pomagački limfociti i CD3+CD8+ citotoksični limfociti (Tablica 1). Specijalni biljezi limfocita i granulocita rabe se za dijagnostiku relativno rijetkih primarnih imunodeficijencija, kao što su sindrom golih limfocita ili sindrom "lijenih leukocita" (3).

Pri tumačenju i prikazivanju rezultata limfocitnih subpopulacija periferne krvi treba se obvezatno služiti referentnim vrijednostima. Udio i apsolutni broj limfocitnih subpopulacija u krvi ovisi o dobi i spolu, pa za djecu i starije osobe uvijek treba tražiti primjerene referentne raspone, uključujući one iz velikih serija ispitanika iz literature. Pri tome treba imati na umu da je apsolutni broj stanica važniji podatak nego njihov udio u zajedničkoj lozi. Praćenje limfocitnih subpopulacija pokazalo se vrijednim i za dijagnostiku specifičnih imunodeficita (npr. parcijalnog Di Georgeovog sindroma) i praćenje bolesnika s imunodeficitom, posebice u kontekstu specifične terapije (4, 12).

Imunofenotipizacija leukemija i limfoma

Pored analize limfocita, imunofenotipizacija leukemija i limfoma jest najčešća protočnociometrijska pretraga u hematologiji. U dijagnostici leukemija i limfoma protočna citometrija se koristi za:

- određivanje loze;
- određivanje diferencijacijskog stupnja malignih stanica;
- određivanje aberantnih osobina malignih populacija stanica;
- detekciju klonalnosti;
- odrađivanje minimalne ostatne bolesti (13-17).

Za to se rabe monoklonska protutijela koja se vežu (tj. obilježavaju) spe-

Tablica 1.
Imunofenotip osnovnih limfocitnih subpopulacija periferne krvi

Table 1
Immunophenotype of major lymphocyte subsets in peripheral blood

T-limfociti	CD3+
Citotoksični T-limfociti	CD3+ CD8+
Pomagački T-limfociti	CD3+ CD4+
B-limfociti	CD3- CD19+
NK-stanice	CD3- CD16+/ CD56+

Tablica 2.
Kriteriji za klasifikaciju bifenotipskih ili mješovitih akutnih leukemija
(panel usvojen od strane Nacionalne skupine za hematologiju Republike Hrvatske)

Table 2
Classification criteria for biphenotypic acute leukemia

Broj bodova*	B-loza	T-loza	Mijeloidna loza
2	cCD79a c/mIgM cCD22	cCD3 TSR- $\alpha\beta$ TSR- $\gamma\delta$	MPO Lizozim
1	CD19 CD20 CD10	CD2 CD5 CD8 CD10	CD117 c/mCD13 c/mCD33 CD65
0,5	TdT CD24	TdT CD7 CD1a	CD14 CD15 CD64

*zbroj bodova unutar loze mora biti >2, odnosno ukupno >4 da bi se dijagnosticirala mješovita AL

cifične stanične molekule (=leukocitne antigene ili tzv. CD-biljege) izražene na membrani ili u citoplazmi stanica. Pripadnost malignih stanica lozi najčešće se može precizno odrediti detekcijom citoplazmatskih biljega, kao što su mijeloperoksidaza (MPO) u mijeloidnoj lozi, CD79 i CD22 u B-stanicama i CD3 u T-stanicama. Membranski biljezi, kao što su CD13 i CD33 u mijeloidnoj lozi, CD19 u B-lozi i CD7 u T-lozi, također su korisni u određivanju pripadnosti stanica određenoj lozi, iako nisu preci-

zni u mjeri u kojoj su to citoplazmatski biljezi. Detekcija mijeloperoksidaze s CD13/CD33 (mijeloidne stanice), CD79 s CD19 (B-stanice) i CD3 s CD7 (T-stanice) danas otkriva pripadnost leukemija mijeloidnoj, T ili B-lozi u više od 96% slučajeva, dok se preostale razvrstavaju u mješovite akutne leukemije (oko 3%), odnosno nediferencirane leukemije (1,5-2%) (Tablica 2) (17, 18). Osobina leukemijskih stanica da odražavaju redosljed i uzorak izražaja biljega viđen u normalnoj hematopoetskoj diferencijaciji omo-

gućava razvrstavanje leukemijskih oblika unutar loze (Tablica 3) (13, 19).

Leukemijske stanice također izražavaju leukemiji pridružen fenotip (engl. *leukemia associated phenotype* - LAP) koji može uključivati:

- istodobni izražaj (koekspresiju) biljega dviju loza - stanice limfatične leukemije izražavaju mijeloidni biljeg ili obrnuto;
- asinkronu ekspresiju biljega - istovremena ekspresija biljega rane i kasne diferencijacije;
- prekomjerni izražaj biljega - biljeg je izražen u tom stadiju diferencijacije normalnih stanica, ali u manjem obimu;
- neizražaj biljega koji bi se normalno nalazio na tom stupnju diferencijacije stanica;
- ektopični izražaj biljega - na primjer, imunofenotip timocita u koštanoj srži (15, 16, 20).

Sve ove aberacije izražaja leukocitnih biljega omogućuju otkrivanje leukemijske populacije, kao i praćenje učinka terapije, odnosno praćenje minimalne ostatne bolesti (Slike 2 i 3) (14, 15).

Mjerenje CD34+ krvotvornih matičnih stanica

Biljeg CD34 izražen je na 2-4% mononuklearnih stanica koštane srži i te stanice pokazuju sposobnost obnove više krvnih loza *in vitro* i *in vivo* (10). Također je dokazano da se unutar odjeljka CD34+ stanica u ljudi nalaze primitivne krvotvorne matične stanice. CD34+ stanice se mogu iz koštane srži "mobilizirati" u perifernu krv primjenom kemoterapije ili rekombinantnih čimbenika rasta (npr. G-CSF), pa su stoga matične stanice periferne krvi danas najčešći izvor krvotvornih matičnih stanica za transplantaciju (21).

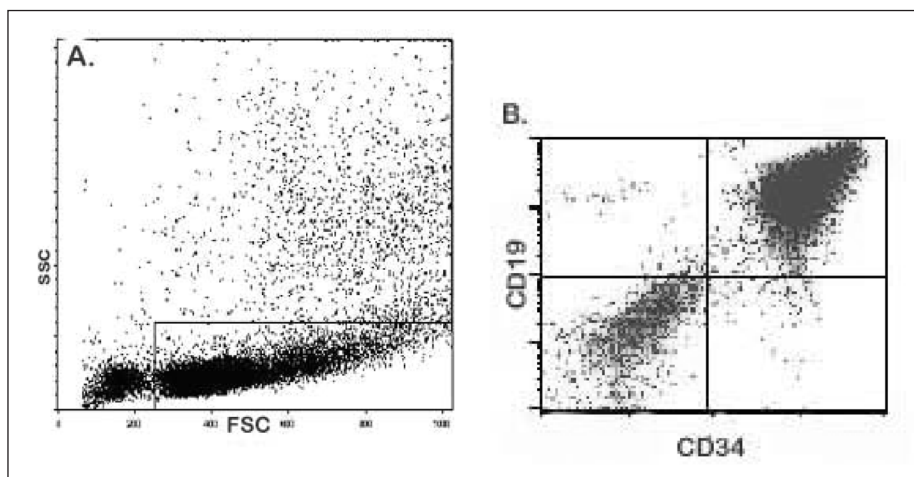
Prednosti određivanja broja CD34+ stanica u krvi protočnom citometrijom su brzina (mjerenje se može izvršiti unutar 1 sata), osjetljivost (analiza do 500000 stanica u nekoliko minuta) i re-

Tablica 3.
Imunološka klasifikacija ALL

Table 3
Immunologic classification of ALL (acute lymphatic leukemia)

ALL B-loze (ekspresija CD79a i/ili CD22 i/ili CD19)		
B I	pro-B (nulla) ALL	cCD79a i/ili cCD22 i/ili CD19
B II	common ALL	gornji biljezi + CD10
B III	pre-B ALL	gornji biljezi + cit. μ
*	tranzicijska pre-B ALL	gornji biljezi + cit. μ i parcijalni memb. μ
B IV	zrela B ALL	gornji biljezi + mIgM
ALL T-loze (ekspresija citoplazmatskog ili membranskog CD3)		
T I	pro-T ALL	cCD3 + CD7+
T II	pre-T ALL	gornji biljezi + CD2 i/ili CD5 i/ili CD8
T III	kortikalna T ALL	gornji biljezi + CD1a
T IV	zrela T ALL	gornji biljezi (izuzev CD1) CD4+ ili CD8+ mCD3+

c citoplazmatski; m membranski; μ teški lanac IgM

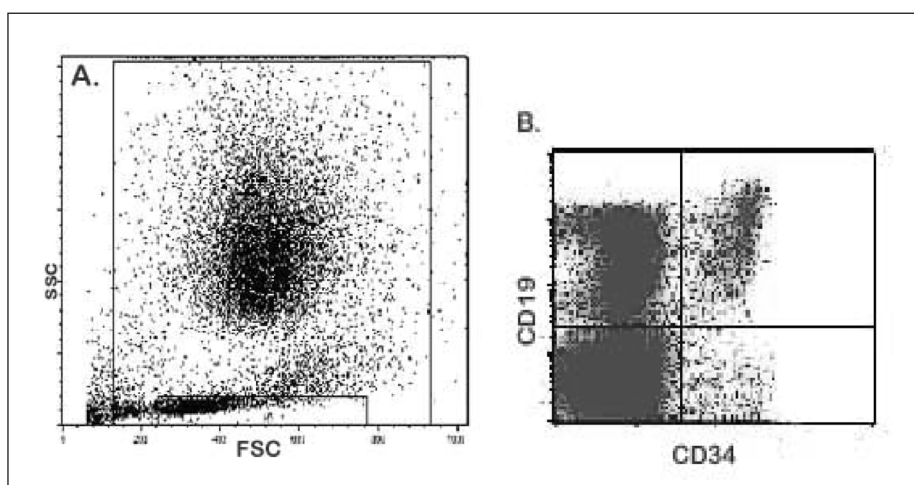


Slika 2.
Protočnociometrijska analiza neseparirane koštane srži djeteta s novootkrivenom leukemijom. A. Prikaz subpopulacija prema fizičkim karakteristikama (veličine/FSC i zrnatosti/SSC) leukemijskih stanica B. Prikaz pozitivnog nalaza biljega CD34 i CD19 na populaciji leukemijskih stanica

Figure 2
Flow cytometric analysis of unseparated bone marrow in a child with de novo leukemia. A. Subpopulations of leukemic cells according to physical characteristics (size/FSC and granularity/SSC), B. Positive finding of CD34 and CD19 on leukemic cell population

producibilnost. Rezultat se izražava kao postotak CD34+ stanica u određenim leukocitnim odjeljcima periferne krvi ili koncentrata leukocita (produkta leukofereze), no najvažniji podatak jest udio tih stanica na ukupan broj leukocita (Slika 4). U perifernoj krvi taj se podatak izražava brojem CD34+ stanica u mikrolitru

krvi (kada se odlučuje da li treba započeti postupak njihovog prikupljanja leukaferezom!), odnosno broj CD34+ stanica u prikupljenom koncentratu leukocita. Danas se za takve izračune primjenjuju dvije metode: jedna se oslanja na udio CD34+ stanica među leukocitima i podatke o broju leukocita s hematološkog



Slika 3.
Prikaz protočnociometrijske analize neseparirane koštane srži u djeteta s leukemijom, u remisiji 3 godine od dijagnoze A. Prikaz subpopulacija prema fizičkim karakteristikama (veličine/FSC i zrnatosti/SSC) B. Prikaz pozitivnih biljega CD34 i CD19 regeneracijskih B-limfocita unutar ograde limfocita

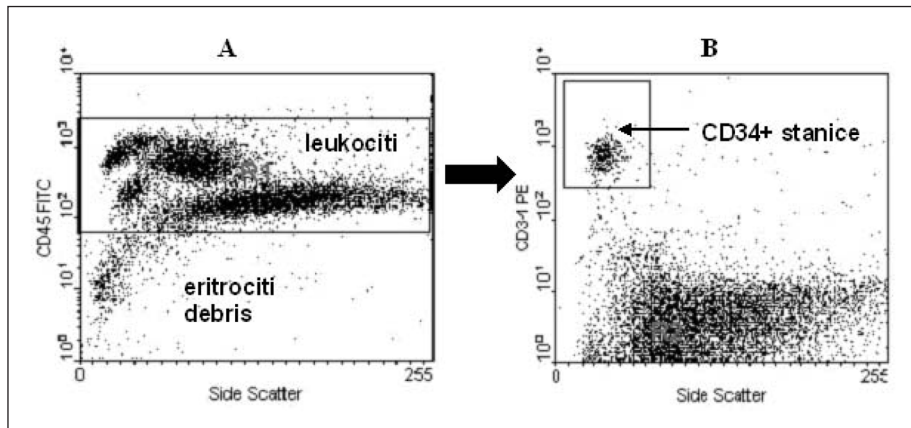
Figure 3
Flow cytometric analysis of unseparated bone marrow in a child with leukemia in remission, 3 years after diagnosis. A. Subpopulations of leukemic cells according to physical characteristics (size/FSC and granularity/SSC), B. Positive finding of CD34 and CD19 on regenerative B-cell subpopulation inside lymphocyte gate

brojača (*double-platform*), dok najnovija metodologija zahtijeva izračun svih vrijednosti na samom protočnom citometru, za što se koriste posebne baždarne kuglice (*single-platform*). Općenito, prikupljanje matičnih stanica periferne krvi započinje kada broj CD34+ stanica u mikrolitru krvi iznosi 10-20, a sve u cilju da bi se povećala vjerojatnost prikupljanja dovoljnog broja CD34+ stanica čak i samo jednim postupkom leukafereze, tj. da se dobije željeni broj od 2-4×10⁶ CD34+ stanica po kilogramu tjelesne težine primatelja (22).

Test na paroksizmalnu noćnu hemoglobinuriju (PNH)

Paroksizmalna noćna hemoglobinurija (PNH) je stečena hemolitička anemija obilježena osjetljivošću eritrocita na lizu (razaranje) posredovanu komplemenom. Ta se osjetljivost eritrocita pripisuje nedostatku membranskih proteina CD55 (engl. *decay accelerating factor*, DAF) i CD59 (engl. *membrane inhibitor of reactive lysis*, MIRL) koji spadaju u skupinu proteina koji se za membranu sidre svojim glikozilfosfatidil-inozitolskim (GPI) dijelom. Ti membranski proteini imaju funkciju regulacije aktivacije sustava komplementa, pa njihov manjak i smanjenja funkcija dovode do prekomjerne i nefiziološke aktivacije komplementa na stanicama. Osim na eritrocitima, nedostatak i drugih GPI-usidrenih proteina nađen je i na limfocitima, monocitima, granulocitima i trombocitima bolesnika s PNH, što samo potvrđuje da se radi o klonskoj bolesti (23).

Osim što protočnom citometrijom mjerimo udio stanica kojima nedostaju biljezi CD55 i CD59, tom se metodom mogu i razvrstati subpopulacije PNH stanica u odnosu na izražaj tih biljega (Slika 5). Stanice PNH I izražavaju CD55 i CD59 slično kao i normalne stanice, na stanicama PNH III antigeni su potpuno odsutni, dok stanice PNH II pokazuju djelomičan izražaj ovih biljega. Različiti PNH klonovi često koegzistiraju u istom bolesnika. Dijagnostika i praćenje veličine PNH klona provodi se obilježavanjem najmanje dviju populacija stanica iz periferne krvi (eritrocita i granulocita) monoklonskim protutijelima konjugira-



Slika 4. Određivanje CD34+ krvotvornih matičnih stanica periferne krvi. A. U prvom koraku se razdvoje CD45+ stanice (leukociti) od debrisa i rezidualnih eritrocita. B. Udio CD34+ stanica potom se mjeri iz ograde čistih CD45+ leukocita

Figure 4 Determination of CD34+ hematopoietic stem cells in peripheral blood. A. First, CD45+ cells (leukocytes) are separated from debris and residual erythrocytes. B. Second, proportion of CD34+ cells is measured in pure CD45+ leukocyte gate

nim s fluorokromom na CD55 i CD59 te detekcijom PNH I, II i III stanica na protočnom citometru (24).

Analiza sadržaja stanične DNA

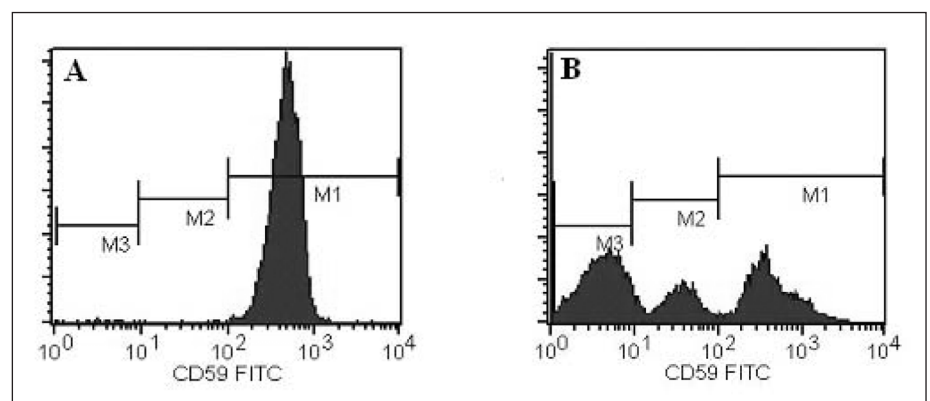
Protočnom citometrijom može se izravno mjeriti sadržaj jezgrine DNA, a to se postiže primjenom specifičnih fluorescentnih boja koje se izravno i u stehiometrijskom odnosu vežu za DNA. Ta nam metoda pruža dvije biološki važne informacije o stanicama - sadržaju DNA (tj. ploidijski) i proliferacijskoj aktivnosti stanica (22-26). Ploidija je važna u prognostičkoj stratifikaciji nekih vrsta leukemija (posebice dječjih akutnih limfatičnih leukemija), dok se proliferacijski status rabi za procjenu malignosti tumora, za ispitivanje proliferacijske sposobnosti normalnih stanica (npr. limfocita pri sumnji na imunodeficit), procjenu stupnja apoptoze stanica i sl.

Protočnocitometrijska analiza DNA-ploidije manje je osjetljiva od citogenetskih metoda. Razlog tomu je činjenica da protočna citometrija, čak ni pod savršenim tehničkim uvjetima, nije u mogućnosti otkriti kompenzirane kariotipske promjene kao što su monosomije i trisomije niti kvalitativne promjene poput adicija, delecija i recipročnih translokacija. Međutim, velika prednost citometrije u mjerenju DNA-ploidije leži u

činjenici da se analiza može izvoditi na interfaznim jezgrama bez potrebe da se stanice potaknu na diobu. Rezultat se izražava u obliku DNA-indeksa (DI), koji predstavlja omjer između fluorescencije vrška kontrolnih (standardnih) stanica u mirovanju (G0/G1-fazi) i ispitivanih stanica. Normalan raspon za DI iznosi 0,9-1,1 (dakle, idealno bi trebao iznositi 1,0), dok se aneuploidija definira nalazom DI izvan raspona od 0,9-1,1. (Slika 6). DNA aneuploidija je rijetka u

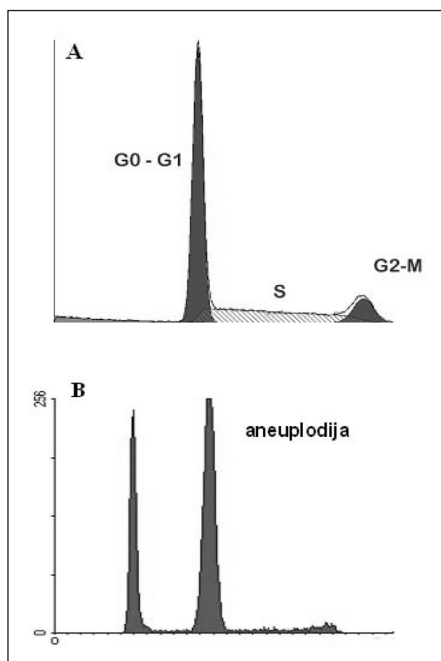
nekim oblicima hematoloških zloćudnosti (npr. u kroničnoj limfocitnoj leukemiji i Hodgkinovoj bolesti), a relativno čest nalaz u multiplom mijelomu (40-80%). U *de novo* akutnim leukemijama, učestalost aneuploidije se kreće od 5%-20% u AML i 25%-35% u ALL. U aneuploidnih slučajeva hiperploidija je puno češća od hipoploidije, a u djece s ALL ona čak predstavlja dobar nezavisni prognostički pokazatelj (27).

Proliferacijska aktivnost stanica određuje se analizom stanica koje se nalaze u određenoj fazi staničnog ciklusa, posebice S-fazi (25). Kinetika staničnog ciklusa važna je u prognostičkom stupnjevanju nekih hematoloških bolesti (25). Uočena je i povezanost određenih citomorfoloških oblika leukemija i udjela stanica u proliferaciji: ALL-L2 povezana je s višim postotkom stanica u proliferaciji u usporedbi s ALL-L1. Visok broj stanica u S-fazi pokazuju i monocitni oblici AML, dok refrakterna anemija (RA) i RA sa prstenastim sideroplastima pokazuju vrlo nisku proliferacijsku aktivnost. Visoka proliferacijska aktivnost povezuje se s manjom stopom preživljenja, posebice u slučaju ne-Hodgkinovog limfoma B-stanica (B-NHL), multiplom mijeloma (MM) i mijelodisplastične sindrome (MDS) (25, 27).



Slika 5. Prikaz protočnocitometrijske analize eritrocita testom za PNH. A. u zdravog čovjeka sve stanice izražavaju biljeg CD59; B. U bolesnika s PNH nalaze se tri subpopulacije stanica, tipa PNH I (normalan izražaj CD59), tipa PNH II (djelomičan izražaj CD59) i tipa PNH III (manjak CD59 na stanicama)

Figure 5 Flow cytometric analysis of erythrocytes with PNH (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) test A. In healthy donor all cells express CD59 marker; B. In patient with PNH three cell subpopulations are present, PNH I type (normal CD59 expression), PNH II type (partial CD59 expression) and PNH III type (loss of CD59 expression)



Slika 6.
Prikaz protočnicometrijske analize stanične DNA. A. Histogram fluorescencije normalne distribucije sadržaja DNA ovisno o fazama staničnog ciklusa. B. Histogram fluorescencije stanične DNA u bolesnika s akutnom leukemijom s nalazom tetraploidnih stanica

Figure 6
Flow cytometric analysis of cellular DNA content. A. Fluorescence histogram showing normal distribution of DNA content in cell cycle phases. B. Fluorescence histogram of DNA content in patient with acute leukemia - finding of tetraploid cells

Funkcijski testovi leukocita

Postoje brojni testovi leukocitnih funkcija koji su se u zadnjih nekoliko godina prilagodili uvjetima protočnicometrijske analize. Među njima se ističe proliferacija limfocita, određivanje unutar staničnih citokina podraženih limfocita, mjerenje aktivnosti NK-stanica, kao i brojni testovi funkcije fagocita (2, 3). Na ovom će se mjestu ukratko opisati testovi fagocitne funkcije. Antimikrobna aktivnost fagocita može se podijeliti u četiri međusobno povezana mehanizma:

- migraciju stanica u smjeru kemijsko-biološkog podražaja (kemotaksija);
- adherenciju;
- fagocitozu;
- unutarstaničnu razgradnju mikroorganizama (6, 11, 28).

Danas se fagocitoza najčešće ispituje protočnicometrijskom analizom fluorescentnih signala neutrofila i monocita nakon njihove inkubacije s fluorescentno obilježenim i opsoniziranim bakterijama (obično *E. coli*). I sposobnost oksidativnog metabolizma (tzv. respiracijskog praska, prema engl. *respiratory burst*) granulocita mjeri se protočnicometrijski, a temelji se na pretvorbi nefluorescentnog spoja u intenzivno fluorescentni spoj unutar neutrofila nakon njihove aktivacije (obično jonomycinom i forbolesterom). Nesposobnost razvoja respiracijskog praska u granulocitima karakterističan je nalaz u bolesnika s kroničnom granulomatoznom bolesti. Prema intenzitetu fluorescencije granulocita ne otkrivaju se samo bolesne osobe, već i prenositeljice ove X-vezane bolesti, kao i dvije inačice (genotipa) ove bolesti - spolno (X)-vezane i autosomno-recesivne.

Ostale protočnicometrijske analize u hematologiji

Protočna citometrija se više se rabi i u drugim područjima hematologije i onkologije, posebice za analizu trombocita, retikulocita i praćenje kemorezistencije malignih stanica, a otvara se i posve novo područje kliničke hematologije onkologije - specifična stanična terapija (26). Glede trombocita, treba istaći da šira klinička primjena analize funkcije trombocita još nije zaživjela, posebice zbog poteškoća u standardizaciji metode i biološke varijabilnosti prilikom usporedbe normalnih i abnormalnih trombocita (26). Drugo područje kliničke primjene citometrije jest analiza retikulocita, posebice zahvaljujući otkriću velikog broja RNA-specifičnih boja koje se vežu za RNA u retikulocitima. Metoda se može rabiti i na hematološkim analizatorima opskrbljenim specifičnim optičkim sustavom. Kao i u slučaju trombocita, klinička primjena ove metode još uvijek je u razvoju, ali sve je više podataka da bi ona mogla biti korisna za točniju klasifikaciju anemija, praćenje bolesnika liječenih pripravcima eritropoetina te bolesnika koji se oporavljaju nakon kemoterapije ili transplantacije krvotvornih stanica (26).

Protočna citometrija se sve više rabi i u analizi proteina i njihove aktivnosti

odgovornih za otpornost lijekova na kemoterapiju. Među njima se ističe p-glikoprotein (P-gp/MDR1), koji se pojačano izražava u leukemijskim stanicama i ima funkciju crpke za citostatike. Pored izražaja P-gp, u klinici se sve više rabi i funkcijski test za procjenu aktivnosti mehanizma kemorezistencije koji se temelji se na izbacivanju (engl. *efflux*) fluorescentnih boja iz stanice posredovanom čimbenicima kemorezistencije, primarno P-gp (26). To ujedno omogućuje dodatnu prognostičku stratifikaciju bolesnika s leukemijom pri dijagnozi, kao i potencijalnu primjenu inhibitora čimbenika kemorezistencije.

LITERATURA

1. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 2nd ed. New York: Alan R. Liss, Inc., 1988.
2. Batinić D. Laboratorijski testovi u kliničkoj imunologiji. Paediatr Croat 1997; 41 (Supl 1): 43-8.
3. Batinić D. Laboratorijska dijagnostika imunodeficiencijskih sindroma. Paediatr Croat 2005; 49 (Supl1): 39-47.
4. Chinen J, Shearer WT. Advances in asthma, allergy and immunology series 2004: basic and clinical immunology. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 398-405.
5. Cooper MD, Lanier LL, Conley ME, Puck JM. Immunodeficiency disorders. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2003; 314-30.
6. Conley ME, Stiehm ER. Immunodeficiency disorders: General considerations. U: Stiehm ER (ur). Immunologic Disorders in Infants and Children, 4th edition. Philadelphia: WB Saunders, 1996; 201.
7. Bonilla FA, Rosen FS, Geha RS. Primary Immunodeficiency Diseases. U: Nathan DG, Orkin SH (ur). Hematology of Infancy and Childhood. 5th Edition. Philadelphia: WB. Saunders Company, 1998.
8. Fleisher TA, Oliveira JB. Functional and molecular evaluation of lymphocytes. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 227-34.
9. Folds JD, Schmitz JL. Clinical and laboratory assessment of immunity. J Allergy Clin Immunol 2003; 111 (Supl 2): 702-11.
10. Batinić D. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica - suvremeni laboratorijski pristup. Paediatr Croat 1999; 43 (Supl 1): 119-26.
11. Rose NR, Hamilton RG, Detrick B. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington (DC): American Society for Microbiology, 2002.

12. Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM. Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 573-9.
13. Batinić D. Imunološka fenotipizacija akutnih leukemija dječje dobi. *Paediatr Croat* 1997; 41 (Supl 1): 83-8.
14. Batinić D. Biološko i kliničko značenje detekcije minimalne ostatne bolesti. *Liječ vjesn* 1999; 121 (Supl 3): 62-3.
15. Ćurić J, Dubravčić K, Užarević B, Batinić D. Imunološke metode određivanja minimalne ostatne bolesti u akutnim leukemijama. *Bioc-hem Medica* 2002; 12 (3-4): 97-104.
16. Batinić D, Labar B. Akutne leukemije i minimalna ostatna bolest. *Liječ vjesn* 2003; 125 (Supl 3): 7-11.
17. Golemović M, Sucić M, Zadro R, Mrcić S, Mikulić M, Labar B, Rajić Lj, Batinić D. IgH and TCRgamma gene rearrangements, cyclin A1 and HOXA9 gene expression in biphenotypic acute leukemias. *Leuk Res* 2006; 30 (2): 211-21.
18. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia* 1996; 10: 877-95.
19. Weir EG, Borowitz MJ. Flow Cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *Semin Hematol* 2001; 38 (2): 124-38.
20. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittger S, Schoch C, Kolb HJ, Ludwig WD, Hiddemann W, Haferlach T. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica* 2003; 88 (6): 646-53.
21. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayyar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. Cytometry. April*, 1998; 34 (2): 61-70.
22. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, Devine S. Stem cell mobilization. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2003; 419-37.
23. Piedras J, Lopez-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size. *Cytometry* 2000; 15: 42 (4): 234-8.
24. Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, Sainty D, Nowak R, Naumann R, Bux Y, Ehninger G. A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol* 2001; 23 (2): 81-90.
25. Vucković J, Forenpoher G, Marusic M, Užarević B, Zemunik T. Prognostic relevance of non-Hodgkin's lymphomas cell cycle data. *Neoplasma* 1998; 45 (5): 332-5.
26. Riley RS (ur). Flow cytometry and its applications in hematology and oncology. *Hematol Oncol Clin N Am* 2002; 16 (2): 421-54.
27. Rosenzweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113 (4): 620-6.
28. Orfao A, Ruiz-Arguelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*. 1995; 80 (1): 69-81.

Summary

FLOW CYTOMETRY IN HEMATOLOGY

D. Batinić, L. Rnjak, K. Dubravčić

The techniques of flow cytometry are becoming more important in modern clinical medicine due to the fact that this technology enables objective, sensitive, rapid and accurate analysis of relatively large number of cell characteristics. Although flow cytometry found its role in other areas of medicine, including pathology, biochemistry, microbiology and internal medicine, still it most often used in hematology and immunology. This brief review reports on the main areas of flow cytometry application in modern hematology which include phenotypic and functional analysis of hematopoietic cells. Among phenotypic analyses, the most important are: immunophenotyping of peripheral blood leukocytes as a method of immune status determination, immunophenotyping of leukemia/lymphoma as well as minimal residual disease follow-up, enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells in peripheral blood and leukocyte concentrate for the purpose of hematopoietic stem cell transplantation, diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and cellular DNA content measurement. Functional leukocyte tests are most often used for the analysis of lymphocyte activation and proliferation as well as the analysis of granulocyte function (phagocytosis and respiratory burst). Clinician should be aware of the extent and scope of flow cytometric tests in order to apply them in routine diagnostics and disease monitoring.

Descriptors: FLOW CYTOMETRY, HEMATOLOGY, IMMUNOLOGY, DIAGNOSTICS