

Væskestrømscytometri – anvendelse i cellebiologi og nytte i klinisk medisin

TEMA

OLE PETTER F. CLAUSEN

GØRIL OLSEN

Institutt for patologi
Instituttgruppe for laboratoriemedisin
Universitetet i Oslo

GEIR E. TJØNNFJORD

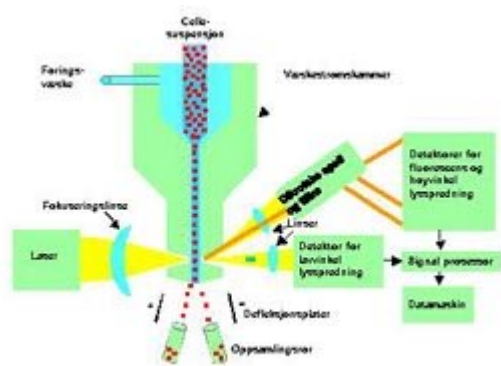
Hematologisk seksjon
Medisinsk avdeling
Rikshospitalet
0027 Oslo

Væskestrømscytometri er en automatisk metode for måling av egenskaper til enkeltceller i suspensjon, og flere parametere kan måles samtidig, objektivt og raskt med god statistikk. Metoden er tatt i bruk i medisinsk diagnostikk og i prognostisk sammenheng i økende grad i løpet av det siste tiåret. De klinisk-kjemiske avdelinger er de største brukerne med automatiserte differensialtelling av leukocytter ved måling av lysspredning. Ved immunfenotyping av akutte leukemier brukes væskestrømscytometri rutinemessig ved samtlige regionsykehus. Metoden er også et hjelpemiddel ved kroniske lymfoproliferative sykdommer og brukes til kvantitering av CD34-positive stamceller ved høydosebehandling med autolog stamcellestøtte. Også ved utredning av ikke-maligne hematologiske sykdommer, som ulike former for immunsvikt, brukes væskestrømscytometri rutinemessig. I diagnostisk patologi brukes DNA-analyser med påvisning av aneuploidi og måling av vekstfraksjon som prognostiske markører først og fremst ved enkelte maligne svulster i barnealder og ved gynekologiske maligne neoplasier. Væskestrømscytometri brukes i betydelig grad i tumorbiologisk forskning for analyse av cellevekst og celledød. I tillegg er metoden et viktig verktøy i biomedisinsk forskning, hvor så vel strukturelle som funksjonelle egenskaper kan påvises og kvantiteres.

I midten av 1960-årene ble en helt ny metodologi for kvantitative cellemålinger utviklet samtidig og uavhengig i USA og Tyskland, nemlig væskestrømscytometri (1, 2). Denne metoden baserer seg på

målinger på enkeltceller i en væskestrøm mens de passerer en lyskilde med en hastighet av mange tusen celler per sekund. Dette innebærer at enkeltcellers egenskaper kan måles raskt og nøyaktig med stor statistisk sikkerhet sammenliknet med tidligere anvendte metoder. En forutsetning for å kunne anvende metoden er at man har enkeltceller i suspensjon, noe som er lett å få fra blod, beinmarg og væskeansamlinger i serøse hulrom. Det er også utviklet metoder for å isolerer enkeltceller fra så å si alle typer vev, inklusive solide tumorer, slik at alle celler og vev kan analyseres med væskestrømscytometri.

Prinsippet for væskestrømscytometri inklusive cellesortering er illustrert i figur 1. Cellesuspensjonen strømmer igjennom en dyse sammen med en saltholdig føringsvæske som leder cellene enkeltvis gjennom fokus til en laserstråle eller til en lysstråle fra en kvikksølvlampe. Det vanligste er å merke de cellekomponenter man ønsker å analysere med et fluorescerende fargestoff som binder seg kvantitativt til makromolekyler som DNA, RNA og protein, eller er bundet til et spesifikt antistoff rettet mot molekyler i kjernen, cytoplasma eller på celleoverflaten. Når eksitasjonslyset treffer den fluorescensmerkede cellen, vil fluorokromet emittere en lypuls med en bølgelengde noe lengre enn eksitasjonsbølgelengden. Styrken på denne lypulsen vil være proporsjonal med mengden bundne fluorescerende molekyler, og dermed gi et mål for mengden av cellekomponenter man ønsker å måle. Lypulsen som fluorokromene sender ut, oppfanges av et linse- og filtersystem som leder til detektorer som overfører dataene til en lagrings- og prosessorenhet. Man kan enten lagre alle data for senere bearbeiding uten å risikere å miste informasjon, eller lagre kun selekterte data og spare lagringsplass.



Figur 1 Oppbygning av væskestrømscytometer med cellesorteringsenhet. Enkeltceller føres i væskestrøm gjennom et kammer hvor de treffes av en laserstråle. De vil da sende ut en lypuls som registreres og lagres i en dataenhet. Tre fluorescenssignaler og lysspredning kan samtidig måles fra en celle med en laser, og opptil 10 000 celler kan analyseres i sekundet. Ved at væskestrømmen lades og splittes i dråper kan celler av spesiell interesse sorteres ut av totalpopulasjonen for nærmere analyse

I tillegg til fluorescerende lys kan også lysspredning måles. Spredning i forlengelsesretningen til eksitasjonslyset (lavvinkel lysspredning), reflekterer størrelsen til pattedyrceller, mens spredning til siden (høyvinkel lysspredning) reflekterer cellenes indre struktur inklusive granularitet. Det er dog ingen strikt sammenheng mellom lavvinkel lysspredning og cellestørrelse, hhv. mellom høyvinkel lysspredning og indre struktur, verken i mammalske celler eller i virus, bakterier og gjær. Spesielt er dette tilfellet for små partikler som virus, hvor lysspredning i begge vinkler gir samme resultat. I moderne væskestrømscytometre med én laser kan lysspredning måles i to vinkelområder i tillegg til 3–4 separate fluorescenssignaler. De fleste instrumenter har muligheter til installasjon av to eller flere lasere. Dette øker fleksibiliteten for flerparameter-fluorescensundersøkelser

betraktelig og dermed muligheten til å detektere og kvantifisere subpopulasjoner av interesse. Det må her tillegges at bruk og innstilling av slike instrumenter krever betydelig spesialkunnskap og erfaring.

Nedre del av figur 1 illustrerer hvordan væskestrømscytometri kan kombineres med cellesortering. Dette innebærer at celler med spesielle egenskaper kan atskilles fysisk fra de øvrige celler i suspensjonen. Dette skjer ved at væskestrømmen brytes opp i dråper etter å ha passert målefokus. En dråpe inneholder vanligvis én eller ikke noen celle, og kan bli elektrisk ladet hvis den er av interesse og ønskes sortert. Ved hjelp av positivt og negativt ladede defleksjonsplater kan de ladede dråper avbøyes enten til høyre eller venstre. På denne måten kan to separate cellepopulasjoner samtidig atskilles fra de øvrige cellene. Cellene kan så samles opp på objektsglass for morfologiske undersøkelser og fluorescens in situ-hybridisering (FISH), eller samles i rør for biokjemiske eller genetiske undersøkelser. Cellene kan også sorteres levende for videre dyrking og funksjonelle studier, for eksempel som enkeltceller i såkalt «clonogenic assay».

Hva kan måles ved væskestrømscytometri?

Påvisning av svulstcellers avvikende kromosomantall og totale DNA-mengde sammen med ønsket om å automatisere DNA-målinger, var noe av drivkraften bak utviklingen av væskestrømscytometri i Europa i 1970-årene. Samtidig ønsket forskere i USA å forbedre deteksjonen av overflateegenskaper på leukocytter for å kunne sortere subpopulasjoner ved hjelp av overflatemarkører for nærmere funksjonelle studier. I starten ble derfor majoriteten av de væskestrømscytometriske undersøkelsene gjort på tumorceller og leukocytter. Det ble utviklet metoder for analyse av cellenes totale DNA-mengde ved farging med stoffer som binder seg kvantitativt til DNA. På denne måten kan man studere svulstcellers DNA-fordeling med påvisning av aneuploide populasjoner og kvantifisering av S-fasefraksjonen, dvs. av antallet celler i DNA-syntese.

Det andre hovedanvendelsesområdet for væskestrømscytometri har vært karakterisering av hematopoetiske celler, normale som neoplastiske, ved deres antigene egenskaper basert på hvilke kombinasjoner av disse de uttrykker. Funksjonelle analyser etter sortering av levende leukocytter har bidratt til forståelse av modningsutvikling og funksjon av hematopoetiske celler og celler knyttet til immunforsvaret, samt til forståelse av neoplasiautvikling og til bedre diagnostikk innen dette feltet. Også erytrocytter og blodplater kan analyseres og skilles fra de øvrige blodcellene, bl.a. ved lysspredning.

Væskestrømscytometri er også velegnet til å detektere enkeltceller av spesiell interesse (rare events) blant ca. 10 000 – 100 000 andre celler. Et anvendelsesområde er å isolere føtale celler fra morens blod for prenatal diagnostikk, samt å påvise celler i beinmarg ved minimal restsykdom hos pasienter med leukemi (3).

I tillegg til analyser av somatiske celler fra mennesker og dyr, anvendes også væskestrømscytometri på kjønnsceller inkludert spermier. DNA-væskestrømscytometri på materiale fra lite traumatiserende finnålsaspirasjonsbiopsier fra testikler hos menn under utredning for infertilitet gir viktig informasjon om forstyrrelser i spermatogenesisen (4), mens analyser av spermier kan gi informasjon om deres befruktningsevne ved å måle akrosomintegritet (5) eller DNA-denaturerbarhet (6, 7).

Ved utvikling av væskestrømscytometre med bedre oppløslighet og bedre DNA-basespesifikke fluorokromer (chromomycin A₃, Hoechst 33258) er det mulig å analysere kromosomer ved væskestrømskaryotyping og å sortere enkeltkromosomer for å lage DNA-bibliotek (8), samt å utføre såkalt «reversert kromosomfarging» som ledd i genetisk pasientutredning. Ved hjelp av spesielle væskestrømscytometre kan man både detektere og identifisere bakterier og sopp og måle deres vekstkinetikk og følsomhet overfor antibiotika (9, 10). Dette er foreløpig ingen rutinemetode i klinisk medisin, men instrumenter er kommersielt tilgjengelige for bl.a. å påvise og karakterisere bakterier i drikkevannskilder.

Hvilke celleegenskaper kan analyseres?

I tillegg til DNA-målinger er analyse av cellers antigene egenskaper ved hjelp av immunfluorescens et viktig bruksområde for væskestrømscytometri. Ulike typer celler uttrykker karakteristiske antigener i kjerner, i cytoplasma, og på celleroverflaten. Dette betegnes som cellens immunfenotype som bestemmes ved hjelp av kombinasjoner av antistoffer. De mest brukte antistoffene er monoklonale, men polyklonale antistoffer benyttes også. Et stort antall antistoffer er karakterisert ved internasjonalt samarbeid, og de antistoffene som identifiserer samme antigen er gitt det samme CD-nummer (CD = cluster of differentiation), som er den vanligst brukte betegnelsen på det aktuelle antigenet. Polyklonale eller monoklonale antistoffer merkes med fluorokromer med forskjellige emisjonsbølgelengder, og kan dermed detekteres samtidig fra de samme celler sammen med lysspredningsmålinger. Opptil fire, men vanligvis to eller tre fluorescensmålinger fra ulike epitoper måles samtidig fra samme celle i instrumenter med en laser, og sammen med lysspredning kan man således skille mellom en rekke subpopulasjoner av f.eks. leukocytter. Ved å øke antall lasere i et væskestrømscytometer kan antallet uavhengige fluorescensparametere økes, og ved hjelp av celloppsortering kan spesifikke populasjoners egenskaper testes i forskjellige funksjonelle analyser.

Leukocytters funksjonelle egenskaper, slik som fagocytterende evne kan også undersøkes ved hjelp av væskestrømscytometri, men dette er foreløpig ikke rutinemessig i bruk. Det finnes prober for måling av intracellulært Ca^{++} så vel som for cellenes pH. I tillegg kan cellenes reduserende, hhv. oksyderende evne (redox-status) og deres enzymaktiviteter måles. Man kan også måle opptaks- og akkumuleringskinetikken til kjemikalier med egenfluorescens, slik som antracykliner, og dermed få informasjon om det foreligger medikamentresistens eller ikke i tumoceller. Dette kan også måles direkte med antistoffer mot hovedproteinet i efflukspumpen, nemlig glykoprotein 170 (14). Funksjonelle undersøkelser i videste forstand kan man vel også kalle målinger av egenskaper knyttet til cellevekst og programmert celledød (apoptose). En meget elegant metode for celleproliferasjonsundersøkelse er basert på opptak av tymidinanalogen bromdeoksiuridin (BrdUrd) som bare opptas i celler i DNA-syntese (S-fasen). Disse cellene kan detekteres med monoklonale antistoffer mot BrdUrd, og ved sekvensundersøkelser etter merking kan cellene følges gjennom cellyklus med bivariat DNA/BrdUrd væskestrømscytometri. Slike undersøkelser gir god informasjon om vekstegenskaper i celler og svulstvev hos dyr og mennesker.

Det finnes også flere måter å studere apoptose på med væskestrømscytometri. En mye brukt metode er den såkalte TUNEL-metoden. Senstadiet med DNA-degradering visualiseres med binding av fluorescerende d-UTP til DNA-endifragmenter ved hjelp av et transferaseenzym (TdT). Apoptose kan også studeres med merkede antistoffer mot proteiner involvert i apoptosen, slik som FAS, Annexin V og kaspaser. I tillegg finnes flere måter å kvantitere apoptose på etter farging med DNA-bindende fargestoffer som visualiserer graden av DNA-fragmentering.

En ny og elegant metode velegnet for væskestrømscytometri er knyttet til bruken av det egenfluorescerende reporterproteinet «green fluorescent protein» (GFP). Genet for dette proteinet kan transfekteres sammen med andre gener, og ekspresjonen av genene kan deretter analyseres med væskestrømscytometri uten ytterligere fluorescensmerking. For ytterligere detaljer om nevnte metoder, og for oversikt over andre spesielle anvendelsesområder for væskestrømscytometri, kan noen bøker anbefales (15 – 17).

Som nevnt i innledningen kan estimerer for pattedyrcellers størrelse og indre struktur, inklusive granularitet, analyseres ved lysspredning alene selv om slike målinger vanligvis kombineres med fluorescensmålinger. Målinger av kjernens totale DNA-innhold er en undersøkelse som er viktig i tumorbiologi. Her brukes fluorescerende fargestoffer som etidumbromid (EB), propidiumjodid (PI), DAPI og ulike Hoechst-fargestoffer som binder seg kvantitativt til dobbelttrådet DNA. Slike målinger gir informasjon om S-fasens størrelse og dermed et vevs eller en tumors proliferasjonsaktivitet, samt om DNA-instabilitet ved

tilstedeværelse av aneuploide tumorpopulasjoner. Den beste oppløseligheten får man ved å måle DNA-mengde på isolerte kjerner (11), men ved å foreta DNA-målinger på hele celler kan analysene kombineres med målinger av kjerneproteiner som p53, proliferasjonsmarkørene PCNA og Ki-67 samt ulike cytoplasmatiske proteiner og overflateproteiner. Å kombinere måling av cytokeratin og DNA gjør at man kan skille epiteliale og inflammatoriske celler i en svulst. Dermed kan svulstegenskaper undersøkes uten tilblending av betennelsesceller. I begynnelsen av 1980-årene utviklet Hedley og medarbeidere (12) en metode for DNA-væskestrømscytometriske analyser av cellekjerner isolert fra svulstvev innstøpt i parafinblokker for rutinemessig histopatologisk undersøkelse i patologilaboratorier. Undersøkelser av slikt arkivmateriale fra pasienter med kjent prognose, kunne retrospektivt vise korrelasjoner mellom DNA-fordelinger og prognose, som tidligere vist til i Tidsskriftet (13). Måling av cellenes totale proteininnhold kan gi ytterligere prognostisk informasjon. Cellenes totale RNA-mengde kan ogs&

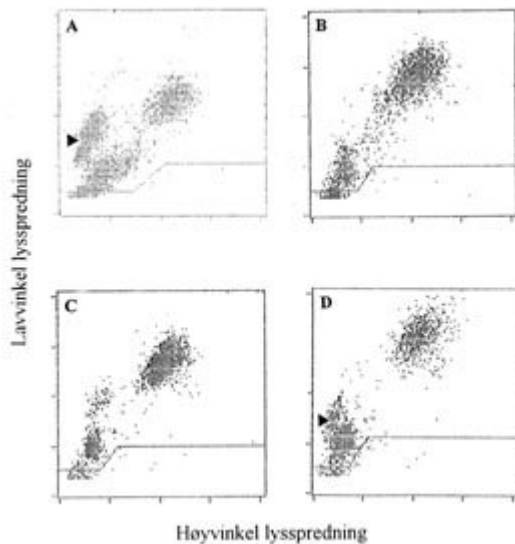
aring; måles, og med det metakromatiske fargestoffet akridinoransje (AO) kan man måle cellenes totale DNA- og RNA-innhold samtidig. Ved hjelp av AO kan også celler med økt DNA-denaturerbarhet identifiseres og skilles fra andre celler. Denaturering av DNA betyr at dobbeltrådet DNA blir enkelttrådet og endrer AO-fluorescens fra grønn til rød. Dette gjøres etter RNase-behandling, og skiftet kan registreres raskt og nøyaktig med væskestrømscytometri. Dette prinsippet er grunnlaget for en metode som kan skille spermier med høy og lav fertiliseringsevne i ejakulat hos så vel dyr som mennesker. Totalt proteininnhold kan måles med en spesiell FITC (fluorescintiocyanat)-protokoll og kombineres med DNA-målinger. Man kan sortere levende celler basert på DNA-farging med Hoechst-fargestoffet 33342 og dyrke dem videre for ytterligere studier. Det finnes også protokoller for å skille levende og døde celler i en blandet populasjon, og disse baserer seg på cellenes membranintegritet. Fluorescein diacetat (FDA) er mye brukt til slike målinger, hvor det fluorescerende frie anion retineres intracellulært i levende celler. Membranpotensialet kan også måles selektivt i mitokondrier med fargestoffet rhodamin 123, mens det cytoplasmatiske membranpotensialet måles med cyaninfargestoffer.

Nytten av væskestrømscytometri i klinisk medisin

Inkluderer vi klinisk forskning, er nytten av væskestrømscytometriske undersøkelser betydelig innenfor en rekke felter i klinisk medisin. Her må nevnes undersøkelser knyttet til tumorbiologi og onkologi, hvor studier av cellevekst og programmert celledød står sentralt. Ulike metoder brukes for karakterisering av svulstvekst med henblikk på prognose og behandlingsrespons, inkludert undersøkelser av medikamentresistens og minimal restsykdom. Et stort behov for væskestrømscytometriske analyser er det også innenfor hematologi, onkologi og infeksjonsmedisin, hvor karakterisering av leukocyt-subpopulasjoner ved infeksjoner, immundefekter og neoplasier står sentralt. I klinisk forskning er også muligheten for celledatering av stor betydning, idet man kan sortere ut celler med spesielle fenotypiske karakteristika og gjøre funksjonelle og genetiske undersøkelser for nærmere klassifisering.

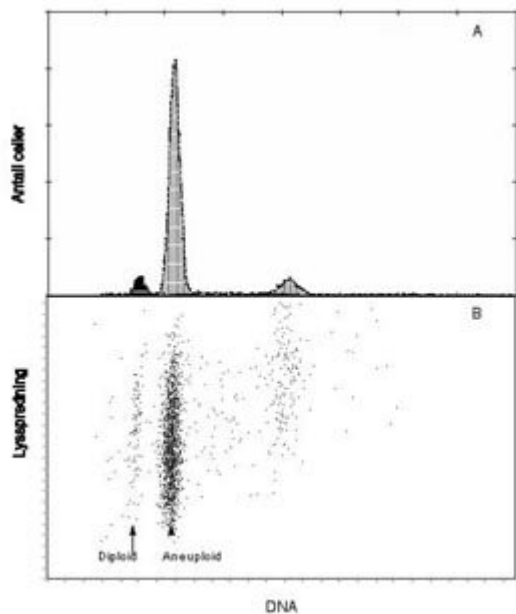
Definerer vi klinisk medisin kun til å omfatte de rutinemessige diagnostiske og behandlingsmessige prosedyrer knyttet til pasientbehandling, er bruken av væskestrømscytometri noe mer begrenset hva gjelder anvendelsesområder. De klinisk-kjemiske avdelingene er helt klart de største brukerne av denne teknologien, da differensialtelling av leukocyter i de moderne helautomatiske celledetektorne skjer ved hjelp av væskestrømscytometri. Leukocyttenes lysspredningsegenskaper er alene grunnlaget for identifikasjon i noen instrumenter, mens andre kombinerer lysspredningsegenskaper med cytokjemiske egenskaper (peroksidase). Utskriftene fra disse moderne instrumentene inneholder store mengder informasjon som kan nyttiggjøres i den kliniske hverdagen, men som nok dessverre i liten grad benyttes av klinikerne. Lysspredningsplottene, spesielt når de er kombinert med cytokjemisk påvisning av peroksidase, kan bidra med verdifull informasjon ved akutte leukemier og gi antydning om riktig subtype (FAB-klasse). Vi har

særlig hatt nytte av lysspredningsplottene i oppfølging av pasienter med kronisk lymfoproliferativ sykdom (fig 2).



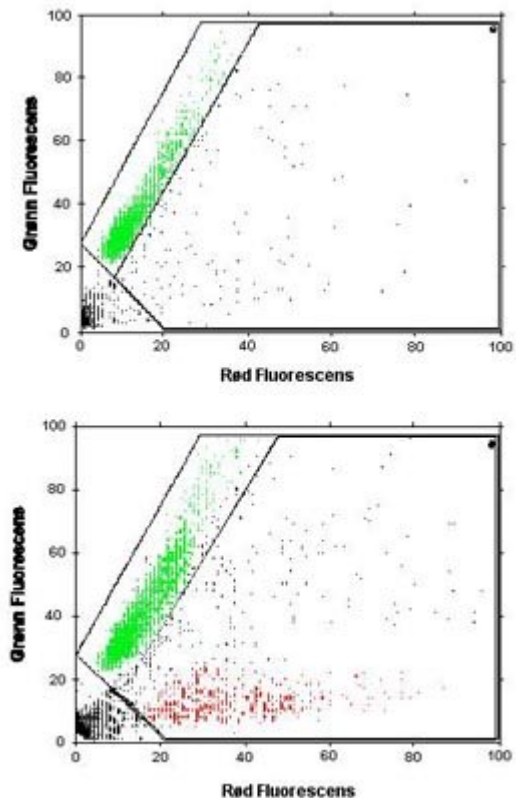
Figur 2 Serie med lysspredningsdiagrammer fra en helautomatisk blodcelleteller (CellDyn 3500) av prøve fra en pasient med hårcelleleukemi. Ved diagnose/behandlingstidspunkt (A) sees en lymfocyttopulasjon (nedad til venstre), ingen monocyttopulasjon, en granulocyttopulasjon (oppad til høyre) og en stor hårcellepopulasjon (pilhodet; øvre del av hårcellepopulasjonen overlapper med forventet spredningsprofil for monocytter (2C), men når populasjonen undersøkes for overflatemarkører (fig 5) fremkommer at cellene utelukkende er B-lymfocytter). Tre måneder etter behandling (B) er hårcellepopulasjonen ikke lenger til stede, og fortsatt mangler en monocyttopulasjon. Fem måneder etter behandling (C) kan en monocyttopulasjon lett identifiseres. Ytterligere 13 måneder senere er monocyttopulasjon igjen forsvunnet og en liten hårcellepopulasjon (pilhodet) sees tydelig som uttrykk for residiv

DNA-væskestrømscytometri av svulster for prognostisk vurdering er en metode som nyttes ved regionssykehusene i Norge og i utlandet. Det beste er å bruke ferskt tumormateriale som utgangspunkt, men celler kan også som tidligere nevnt isoleres fra parafinblokker slik at cellekjerner kan analyseres med svært godt resultat. Dette gjør det også lett å sende materiale for konsultasjonsanalyse til annet laboratorium. Figur 3 viser eksempel på DNA-fordeling fra et nevroblastom hos et barn hvor vi ser en dominerende aneuploid populasjon med kun få diploide celler, som sannsynligvis er betennelsesceller. I nevroblastomer og rhabdomyosarkomer er DNA-aneuploidi en viktig prognostisk markør knyttet til god prognose. I de fleste andre tumortyper hvor aneuploidi er en prognostisk faktor, er den knyttet til dårlig prognose. De fleste sentre som behandler gynekologiske neoplasier bruker DNA-analyser som viktige prognostiske og behandlingsveiledende faktorer ved endometrie- og ovarialkarsinomer. Selv om DNA-aneuploidi er knyttet til dårlig prognose også ved brystkreft, urologiske neoplasier og kolorektal cancer, er rutinebruk av DNA-analyse ved disse kreftformer foreløpig begrenset.



Figur 3 DNA-fordelingshistogram fra nevroblastom hos barn. A viser en dominerende aneuploid cellepopulasjon som er knyttet til god prognose. I B indikerer lysspredning med lav vinkel i tillegg forskjeller i celledørrelse, og hvert punkt indikerer én celle

Etter farging med AO kan man med væskestrømscytometri skille mellom denaturert og ikke-denaturert DNA i spermier. Metoden kalles SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), og gir en uavhengig parameter for å forutsi infertilitet hos menn (7). Denne metoden etableres nå som rutineundersøkelse ved utredning av mannlig infertilitet ved flere større sentre i USA, og brukes også ved Rikshospitalet (fig 4). Ved genetiske laboratorier anvendes sortering av humane kromosomer som utgangspunkt for DNA-bibliotek og for å lage spesielle prober som anvendes i deres rutinemessige utredning av kromosomavvik.



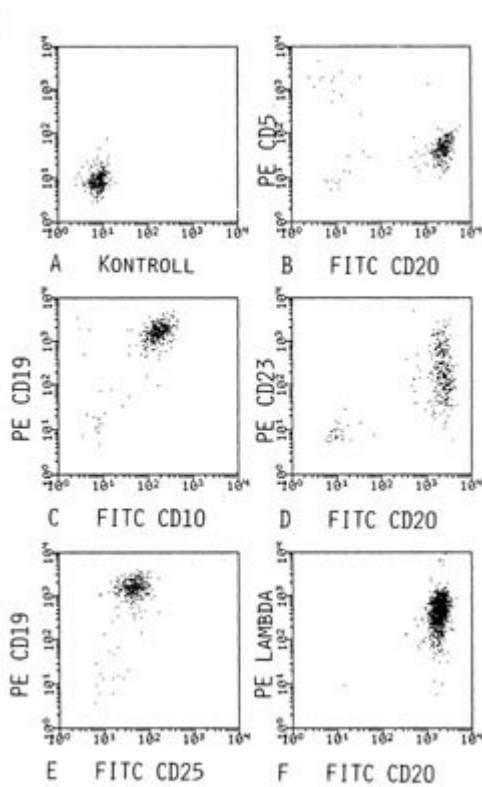
Figur 4 Analyse av sædceller etter denatureringsprotokoll (SCSA) og farging med akridinoransje. A. Normale sædceller med resistens mot denaturering (dominerende grønn populasjon). B. Sædceller fra mann med nedsatt fertilitet. I tillegg til resistente og ikke-denaturerbare normale spermier (grønn populasjon) sees denaturerte spermier (rød fluorescens)

Immunfenotyping er indisert ved de tilfeller av akutt leukemi hvor behandlingen har remisjon som målsetting for dermed å gi mulighet for helbredelse. For å kunne identifisere alle tilfeller av udifferensiert akutt myelogen leukemi (Mo AML) og megakarioblastleukemi (M7 AML) kreves immunfenotyping ved akutt myelogen leukemi (AML). For med sikkerhet å kunne stille diagnosen akutt lymfatisk leukemi (ALL) er immunfenotyping nødvendig. Ved samtlige regionsykehus i Norge benyttes væskestrømscytometri rutinemessig ved immunfenotyping av akutte leukemier. Dette bidrar først og fremst til en mer presis diagnose og har dermed betydning for den initiale behandlingen. Undersøkelsene har imidlertid også prognostisk betydning og er viktig for valg av konsolideringsbehandling, f.eks. ved identifikasjon av pasienter som er kandidater for allogen stamcelletransplantasjon i første remisjon. Det er først og fremst ved akutt lymfatisk leukemi (ALL) at dette har gyldighet. Tabell 1 viser et eksempel på immunfenotypisk klassifikasjon av akutte leukemier; den såkalte EGIL-klassifikasjonen (18).

Tabell 1 Immunfenotypisk klassifikasjon av akutte leukemier

<i>Akutt lymfatisk leukemi (ALL)</i>	
B-celle ALL (alle kategorier er positive for CD19 og/eller CD79 α og/eller CD22)	
B-I (pro-B) ALL	CD10 – , Cy IgM –
B-II (vanlig) ALL	CD10+, Cy IgM –
B-III (pre-B) ALL	Cy IgM+
B-IV (moden B) ALL	κ eller λ i cytoplasma eller på overflaten
T-celle ALL (alle kategorier uttrykker CD3 i cytoplasma eller på overflaten)	
T-I (pro-T) ALL	CD7+, CD2 – , CD5 – CD8 – , CD1a –
T-II (pre-T) ALL	CD2+ og/eller CD5+ og/eller CD8+, CD1a –
T-III (kortikal T) ALL	CD1a+
T-IV (moden T) ALL	overflate CD3+, CD1a –
ALL med ekspresjon av en eller to myeloide markører (My+ALL)	
<i>Akutt myelogen leukemi (AML)</i>	
Myelomonocytteleukemi	
Erytroleukemi	
Megakaryocytteleukemi (M7 AML)	
Udifferensiert myeloid leukemi (M0 AML)	
TdT+ AML	
AML med ekspresjon av en eller to lymfoide markører (Ly+AML)	
<i>Bifenotypisk akutt leukemi</i>	
<i>Udifferensiert akutt leukemi</i>	

Ved kroniske myeloproliferative sykdommer har immunfenotyping foreløpig ikke funnet noen plass. Derimot er immunfenotyping et meget nyttig hjelpemiddel i diagnostikken ved kroniske lymfoproliferative sykdommer hvor en presis diagnose både kan ha terapeutisk og prognostisk betydning. Når det foreligger blod- og/eller beinmargsaffeksjon er væskestrømscytometri særlig egnet for immunfenotypisk diagnostikk (fig 5). Tabell 2 viser hvordan den immunfenotypiske profilen kan bidra til en presis diagnose ved ulike kroniske lymfoproliferative sykdommer hvor blod- og/eller beinmargsaffeksjon er vanlig.



Figur 5 Tofarge fluorescenscytogrammer (FITC; fluorescein isotiocyanat, PE; fykoerytrin) fra samme pasient som i figur 2, og det er bare cellene i hårcelevinduet som omfattes av analysen. A viser en negativ kontroll, og ved analyse deles cytogrammet i fire felter ved at > 99 % av cellene i prøven med negativ kontroll faller i nedre venstre kvadrant. Dette innebærer at hårcellene i dette tilfellet har følgende immunfenotype:

CD5+CD10+CD19+CD20+CD23+CD25+ λ +

Tabell 2 Immunfenotype ved kronisk lymfoproliferative sykdommer av B-celletype (CD19+CD20+)

Sykdom	slg	CD5	CD43	CD22	CD23	CD25	FMC7	CD103	CD11c	CD10
Kronisk lymfatisk leukemi (KLL)	- /+	+	+	-/+	+	+/-	-/+	-	-/+	-
Immunocytom	++	-/+	+/-	+	-	-/+	+	-	-/+	-
Prolymfocytteleukemi	++	-/+	+	+	-/+	-	+	-	-	-/+
Hårceleleukemi	++	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Miltlymfom	++	-/+	+	+	+/-	-/+	+	-/+	+/-	-/+
Mantelcellelymfom	++	+	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-/+
Follikulært lyfom	++	-/+	-	+/-	-/+	-	+	-	-	+/-

Ved leukemier og lymfomer er det ikke sjelden å finne at pasientene har pleuravæske eller ascites eller at det er mistanke om affeksjon av sentralnervesystemet.

Væskestrømscytometri er velegnet for immunfenotypisk diagnostikk av celler fra pleuravæske, ascites og spinalvæske, men vår erfaring er at det i slike tilfeller er svært viktig at prøvematerialet blir preparert omgående for at resultatet av undersøkelsen ikke skal forringes betydelig. Dette er i kontrast til blod- og beinmargsprøver som iallfall kan ligge i romtemperatur i 24 timer før preparering uten at prøveresultatene endres.

Høydosebehandling med autolog stamcellestøtte er etablert behandling ved alle landets regionsykehus, og i dag er det nesten utelukkende stamceller fra blod som anvendes. Væskestrømscytometri benyttes for å kvantifisere CD34-positive celler i leukafereseproduktet. CD34 er et overflatemolekyl som uttrykkes på hematopoetiske progenitorceller inklusive celler med stamcelleegenskaper. Det må være et visst minimum av CD34-positive celler (vanligvis 2×10^6 /kg kroppsvekt) i leukafereseproduktet for at det skal være egnet til stamcellestøtte etter høydosebehandling.

Væskestrømscytometri er også velegnet i diagnostikken av ikke-maligne hematologiske sykdommer. Metoden er av stor verdi ved mistanke om paroksysmal nokturnal hemoglobinuri (PNH), og synes å kunne erstatte Hams test slik som omtalt i Tidsskriftet (19). Ved paroksysmal nokturnal hemoglobinuri (PNH) resulterer en somatisk mutasjon i *PIG-A* genet på X-kromosomet i en global defekt i syntesen av GPI-ankre. Dette resulterer i utvikling av kloner av blodceller som mangler flere viktige overflatemolekyler, og det kan raskt og presist vises ved væskestrømscytometri.

I utredningen av pasienter hvor det er mistanke om medfødt eller ervervet immunsvikt, er også væskestrømscytometri en viktig del av det diagnostiske armamentarium. På en rask og presis måte kan antall B- og T-lymfocytter i blod bestemmes i likhet med subpopulasjoner av B- og T-lymfocytter så som CD4-positive T-lymfocytter ved HIV-infeksjon. Metoden kan også brukes til å evaluere effekt av behandling f.eks. økning av CD4-positive T-lymfocytter som følge av moderne retroviral behandling ved AIDS.

Trombocytt sykdommene Bernard-Souliers sykdom og Glanzmans trombasteni er karakterisert ved at blodplatene mangler henholdsvis membranmolekylet CD42 (glykoproteinkomplekset Ib-IX) og CD61 (glykoprotein IIIa). Væskestrømscytometri brukes rutinemessig i diagnostikken ved mistanke om disse sykdommene.

Væskestrømscytometri eller statisk cytometri

Der man har tilstrekkelig med celler i naturlig suspensjon, slik som i prøver fra blod, beinmarg og effusjoner, er væskestrømscytometri klart å foretrekke. Dette fordi målingenes oppløsningsevne er den beste, og analysene kan foregå raskt og med uovertruffen statistikk fordi man kan måle et høyt antall celler på kort tid (opptil 10 000 celler/sekund). Ideelt sett trengs rundt 100 000 celler eller mer for en sikker analyse, men målinger kan gjøres med tilfredsstillende resultat ned til 5 000 celler. En stor fordel ved væskestrømscytometri er at man i en prøve med en enkelt analyse samtidig kan måle mange parametere på enkeltceller. Kommersielle væskestrømscytometre med én laser gjør rutinemessig 2 – 3 fluorescens- og to lysspredningsmålinger samtidig. Ved å bruke tre lasere samtidig kan man måle ni fluorescens- og to lysspredningsparametere på samme tid (20). Det er åpenbart at man med en slik strategi oppnår maksimal informasjon fra en enkelt analyse som ingen annen metode i dag kan gi. Problemet her er delvis hvordan man skal håndtere så mye informasjon som slike analyser gir, samt at slike målinger krever helt spesiell teknisk ekspertise. Når det gjelder sortering og videre funksjonell analyse av små subpopulasjoner av celler, er væskestrømscytometri kombinert med cellesortering den beste løsning.

Der man har et begrenset celled materiale, for eksempel fra punksjoner, er statisk cytometri et godt alternativ. Metoden gir god informasjon fra ned til noen hundretalls celler, og kan kombinere fluorescensmålinger med cellulær og nukleær morfologi. Med moderne fluorescensbaserte laserskancytometre kan fluorescensmålinger med tilnærmet samme oppløsningsevne som i væskestrømscytometre utføres på celleutstryk. Instrumentet kan automatisk undersøke tusenvis av celler og lagre bildeinformasjonen fra hver enkelt celle mht. morfologi og flere fluorescensparametere i egne arkiv som man interaktivt kan hente opp. Denne type teknologi vil være et godt supplerende alternativ til væskestrømscytometri heller enn en konkurrerende metode. Metodene kan også kombineres ved nærmere bildeanalytiske undersøkelser av subpopulasjoner etter cellesortering ved væskestrømscytometri.

LITTERATUR:

1. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1969; 163: 1213 – 4.
2. Dittrich W, Göhde W. Impulsfluorometri, bei Einzelzellen in Suspension. *Z Naturforsch B* 1969; 24: 360 – 1.

3. Ryan DH, Mitchell SJ, Hennessy LA, Bauer KD, Horan PK, Cohen HJ. Improved detection of rare CALLA-positive cells in peripheral blood using multiparameter flow cytometry. *J Immunol Methods* 1984; 74: 115 – 28.
4. Clausen OPF, Åbyholm T. Deoxyribonucleic acid flow cytometry of germ cells in the investigation of male infertility. *Fertil Steril* 1980; 34: 369 – 74.
5. Engh E, Clausen OP, Purvis K. Acrosomal integrity assessed by flow cytometry in men with variable sperm quality. *Hum Reprod* 1991; 6: 1129 – 34.
6. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131 – 3.
7. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039 – 49.
8. Cram LS. Flow cytogenetics and chromosome sorting. *Hum Cell* 1990; 3: 99 – 106.
9. Steen HB, Boye E, Skarstad K, Bloom B, Godal T, Mustafa S. Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry* 1982; 2: 249 – 57.
10. Walberg M. Flow cytometry in medical microbiology: rapid staining protocols and measurement of drug susceptibility. Doktoravhandling. Oslo. Universitetet i Oslo, 1999.
11. Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983; 3: 323 – 7.
12. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333 – 5.
13. Clausen OPF. Bør DNA-fordelingsanalyser bli rutine ved alle patologilaboratorier? *Tidsskr Nor Lægeforen* 1991; 111: 1609 – 10.
14. Lehne G, De Angelis P, Clausen OP, Egeland T, Tsuruo T, Rugstad HE. Binding diversity of antibodies against external and internal epitopes of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Cytometry* 1995; 20: 228 – 37.
15. Shapiro HM. Practical flow cytometry. 3 utg. New York: Wiley-Liss, 1995.
16. Robinson JP. Handbook of flow cytometry methods. New York: Wiley-Liss, 1993.
17. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. Clinical flow cytometry. Principles and application. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1993.
18. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; 9: 1783 – 6.
19. Vetlesen A, Kjeldsen-Kragh J, Tjønnfjord GE. Paroksyttisk nattlig hemoglobinuri – diagnostikk ved hjelp av væskestrømscytometri. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1999; 119: 3909 – 13.
20. Bigos M, Baumgarth N, Jager GC, Herman OC, Nozaki T, Stovel RT et al. Nine color eleven parameter immunophenotyping using three laser flow cytometry. *Cytometry* 1999; 36: 36 – 45.

Publisert: 20. februar 2000. *Tidsskr Nor Lægeforen*. DOI:

© Tidsskrift for Den norske legeforening 2020. Lastet ned fra tidsskriftet.no