

# Identifikácia jadrových erytrocytových prekurzorov pomocou prietokovej obrazovej cytometrie – ImageStream<sup>x</sup>

Mgr. Michaela Fajtová, RNDr. Alena Gábelová, CSc., Mgr. Miroslav Chovanec, PhD., RNDr. Ján Sedlák, DrSc.

Laboratórium imunológie národov, Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

Fenotypová analýza krvných malignít pomocou prietokovej cytometrie sa v onkohematológii na Slovensku používa od 90. rokov minulého storočia. Technika prietokovej cytometrie je stále významný nástroj základného výskumu v odhaľovaní fenotypovej heterogenity bunkových populácií kostnej drene s cieľom skvalitnenia diagnostiky a monitorovania stavu hematologických malignít. Súčasným štandardom v klinických laboratóriách sú prietokové cytometre s tromi lasermi, ktoré umožňujú analýzu 8 fluorescenčných a 2 fyzikálnych parametrov na úrovni jednej bunky. Zásadný prielom v prietokovej cytometrii predstavuje kombinácia s technikou fluorescenčnej mikroskopie – obrazový prietokový cytometer ImageStream<sup>x</sup>. Táto technická novinka umožňuje analýzu fluorescenčných parametrov a zároveň analýzu morfológie buniek, bunkovej signalizácie pomocou lokalizácie vybraných molekúl v bunke či medzibunkových interakcií. Predkladaný príspevok informuje o využití prietokovej cytometrie a ImageStream<sup>x</sup> obrazovej technológie pri štúdiu erytrocytových prekurzorov z regenerujúcej kostnej drene.

**Kľúčové slová:** prietoková cytometria, obrazový ImageStream<sup>x</sup> cytometer, erytrocytové prekurzory.

## Identification of nuclear erythroid precursors by flow cytometry – ImageStream<sup>x</sup> imaging

Phenotypic analysis of blood malignancies by flow cytometry is applied in onco-hematology in Slovakia since the 90's last century. Flow cytometry technique is still an important basic research tool used for the detection of phenotypic cell population heterogeneity of bone marrow in order to improve diagnosis and monitoring of hematological malignancies. Nowadays the flow cytometers equipped with three lasers represent standard accessories in clinical laboratories, providing analysis of 8 fluorescent and 2 physical parameters at a single cell level. Major breakthrough in cytometry represents the combination of flow and fluorescence microscopy methods unified in ImageStream<sup>x</sup> flow cytometer. This technical innovation allows analysis of the fluorescence parameters as well as analysis of cell morphology, cell signaling by the location of molecules of interest within the cell or cell-cell interactions. This article presents the analysis of erythroid precursors in regenerating bone marrow using flow and ImageStream<sup>x</sup> cytometry techniques.

**Key words:** flow cytometry, ImageStream<sup>x</sup> flow cytometer, erythroid precursors.

Onkológia (Bratisl.), 2013; roč. 8(1): 48–49

## Úvod

Kostná dreň je hematopoetický orgán dospelého človeka. Ako tkanivo komplexnej štruktúry pozostáva z pluripotentných hematopoetických kmeňových, prekurzorových a zreých buniek a rôznych typov podporných buniek, ktoré vytvárajú mikroprostredie udržiavajúce a podporujúce zrenie hematopoetických buniek. Hematopoetické prekurzorové bunky sú značne heterogénna skupina buniek rôznych bunkových tried na rôznom stupni diferenciácie. Ich normálny proces zrenia a diferenciácie je sprevádzaný zmenami v cytomorfológii a expresii povrchových molekúl či cytoplazmových signálnych molekúl. Prietokovou cytometriou je možné monitorovať tieto zmeny, priradiť ich k bunkovej triede určitého typu a stupňu diferenciácie.

Laboratórium imunológie nádorov ÚEO SAV sa od začiatku 90. rokov špecializuje na štúdium imunofenotypu hematologických malignít pomocou prietokovej cytometrie a imunofenotypovej diferenciácie vývojových štádií normálnych bunkových populácií kostnej drene pacientov v komplexnej remisii. Pomocou prietokového cytometra EPICS ALTRA (Beckman Coulter), na ktorom je možné analyzovať naraz

4 fluorescenčné a 2 fyzikálne parametre (veľkosť buniek – FSC a granularitu buniek – SSC), sme v predchádzajúcich rokoch opísali špecifický fenotyp troch vývojových štádií B-lymfocytových prekurzorov a CD34+ prekurzorov s ich diferenciáciou do vývojových štádií neutrofilných granulocytov a monocytov (1, 2, 3). Fenotyp normálnych CD34+ a B-lymfocytových prekurzorov je veľmi podobný fenotypu leukemických buniek akútneho leukémie, a preto sa získané poznatky využívajú pri identifikácii leukemických CD34+ blastov v prípade AML a blastov B-ALL, najmä ak sa v kostnej dreni nachádzajú v koncentráciách podobných normálnym prekurzorom (minimálna zvyšková choroba – MRD).

Rovnako ako myelopoéza a B-lymfopoéza, aj erytropoéza prebieha v kostnej dreni dospelého človeka. Morfológicky bolo identifikovaných 6 vývojových erytrocytových štádií – skoré nukleárne erytrocytové prekurzory (pro-erytroblasty, bazofilné erytroblasty, polychromatofilné erytroblasty, ortochromatofilné erytroblasty) a neskorý erytrocytový prekurzor bez jadra (retikulocyt), ktorý diferencuje do zreleho erytrocytu. Identifikácia jadrových erytrocytových prekurzorov prietokovou cytometriou bola zatiaľ opísaná len pre prekurzory myšej kostnej drene (4).

## Analýza erytrocytových prekurzorov prietokovou cytometriou

Fenotyp erytrocytovej bunkovej línie je všeobecne charakterizovaný expresiou CD36 (trombospondínový receptor), CD71 (receptor pre transferín) a CD235a (glykoforín A). Na povrchu erytrocytových prekurzorov bola opísaná aj expresia antigénov CD117 (c-Kit) a CD105 (endoglin), avšak chýbajú informácie o expresii týchto antigénov na povrchu konkrétnych diferenciačných štádií erytrocytových prekurzorov (5, 6).

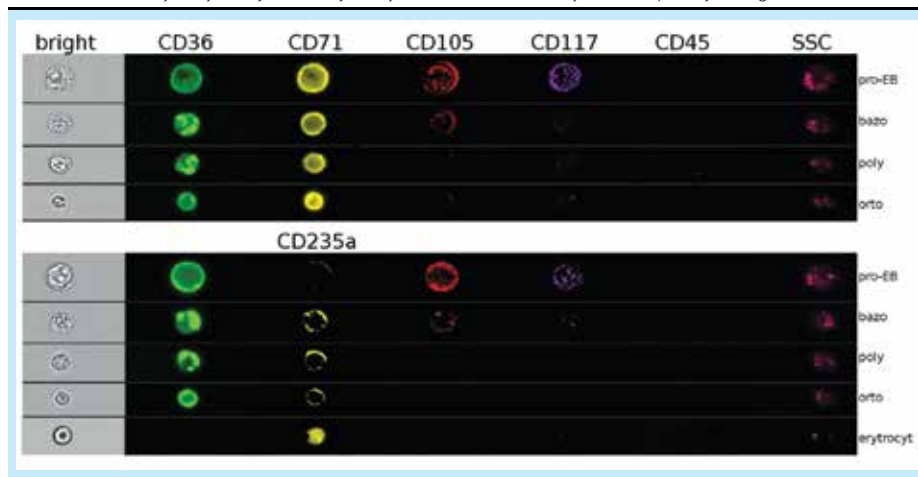
Pomocou analýzy expresie erytrocytových antigénov na bunkových populáciách v kostnej dreni s použitím minimálne 5 fluorescenčných a 2 fyzikálnych parametrov sme opísali špecifický fenotyp jadrových erytrocytových prekurzorov. Významným prínosom pre daný typ analýz bolo získanie novšieho typu prietokového cytometra – FACS Cantoll (Becton-Dickinson), pomocou ktorého je možné analyzovať naraz 8 fluorescenčných a 2 fyzikálne parametre. Všetky 4 štádiá jadrových erytrocytových prekurzorov boli farbiteľné DNA sondou SYTO16 a ich fenotyp je zhrnutý v tabuľke 1.

**Tabuľka 1.** Expresia antigénov na povrchu jednotlivých vývojových štádií jadrových erytrocytových prekurzorov

pro-erytroblasty	bazofilné erytroblasty	polychromatofilné erytroblasty	ortochromatofilné erytroblasty
CD117 <sup>++</sup>			
CD105 <sup>++</sup>	CD105 <sup>+</sup>		
CD36 <sup>+++</sup>	CD36 <sup>++++</sup>	CD36 <sup>+++</sup>	CD36 <sup>++</sup>
CD71 <sup>++++</sup>	CD71 <sup>++++</sup>	CD71 <sup>++++</sup>	CD71 <sup>+++</sup>
CD235 <sup>+</sup>	CD235a <sup>++</sup>	CD235a <sup>++</sup>	CD235a <sup>+</sup>
CD38 <sup>++</sup>	CD38 <sup>+</sup>		
CD45 <sup>++</sup>	CD45 <sup>+</sup>		
FSC <sup>+++</sup>	FSC <sup>+++</sup>	FSC <sup>++</sup>	FSC <sup>+</sup>
SSC <sup>++</sup>	SSC <sup>+</sup>	SSC <sup>+</sup>	SSC <sup>+</sup>

+ nízka intenzita expresie, ++ stredná intenzita expresie, +++ vysoká intenzita expresie, ++++ veľmi vysoká intenzita expresie

**Obrázok 1.** Technika ImageStreamX využitá pri analýze diferenciačných štádií jadrových erytrocytových prekurzorov (pro – pro-erytroblasty, bazo – bazofilné erytroblasty, poly – polychromatofilné erytroblasty, orto – ortochromatofilné erytroblasty, erytrocyty). Zväčšenie 40-x umožnilo v jasnom poli (bright) zobrazenie morfológie buniek a v tmavom poli (SSC, ružová farba) granularitu buniek. Fluorescencia sa analyzovala v kanáloch FITC – zelená farba, PE – žltá farba, PerCP-Cy5.5 – červená farba, APC – fialová farba, CD45-VioGreen – modrá farba. Analýzou bolo možné sledovať expresiu antigénov na povrchu buniek – expresiu CD36 a CD71 na všetkých štádiách erytrocytových prekurzorov, stratu expresie CD105 a CD117 spojenú so zrením prekurzorov a, naopak, zvyšujúcu sa expresiu CD235a (glykoforín A), ktorého najvyššiu hladinu exprimujú zrelé erytrocyty. Všetky diferenciačné štádiá erytrocytarnej bunkovej triedy, na rozdiel od leukocytov, neexprimujú antigén CD45.



### Analýza erytrocytových prekurzorov metódou ImageStream<sup>x</sup> Imaging

Limitáciou fenotypových analýz prietokovou cytometriou je absencia informácií o morfológických charakteristikách a subcelulárnych štruktúrach analyzovaných buniek. Na odstránenie tejto limitácie bol skonštruovaný nový typ obrazového prietokového cytometra. Prístroj kombinuje využitie techník prietokovej cytometrie a fluorescenčnej mikroskopie s možnosťou značenia buniek fluorescenciami používanými v prietokovej cytometrii aj fluorescenčnej mikroskopii. Na pracovisko sme získali ImageStream<sup>x</sup> Flow Cytometer so štyrmi excitačnými laserami (405 nm, 488 nm, 658 nm, 785 nm) a dvoma vysokorozlišovacími kamerami so zväčšením 60-x, 40-x alebo 20-x. Emitovaná fluorescencia, obraz v jasnom poli a tmavom poli (SSC parameter) sú detekované v 12 kanáloch a dáta sú získavané vo forme 12 obrázkov pre každú bunku. Technika ImageStream<sup>x</sup> Imaging je špeciálne vhodná na sledovanie morfológie buniek, lokalizácie internalizovaných značených ligandov v bunke, bunkovej signalizácie (napr. translokácia transkripčných faktorov z cytoplazmy do jadra

alebo medzibunkových interakcií s možnosťou jednoduchšieho a presnejšieho štatistického hodnotenia v porovnaní s fluorescenčnou mikroskopiou.

Jadrové erytrocytové prekurzory fluorescenčne značené pre klasickú prietokovú cytometriu sme analyzovali aj pomocou ImageStream<sup>x</sup> Flow Cytometer. Pomocou tejto analýzy bolo možné sledovať vnútornú štruktúru buniek – jadro vyplňajúce ¾ cytoplazmy pro-erytroblastov a jeho postupné zmenšovanie spolu so zmenšovaním bunky v prípade zrejších štádií erytrocytových prekurzorov. Taktiež bolo možné analyzovať rozmiestnenie antigénov na povrchu buniek, kedy napríklad antigén CD71 bol homogénne exprimovaný na celom povrchu erytrocytových prekurzorov a, naopak, antigén CD235a bol exprimovaný na prekurzoroch veľmi slabo (obrázok 1).

### Záver

Poznatky o fenotype jadrových erytrocytových prekurzorov majú význam pre presnejšiu fenotypovú analýzu erytrocytových neoplázií (čistej erytrocytovej leukémie a erytroleukémie) – ide však o veľmi vzácny typ leukémie (menej

než 5 % všetkých prípadov AML). Častejšie môžu byť využité pri fenotypovej analýze myelodysplastického syndrómu, pre ktorý je typická prítomnosť heterogénneho spektra imunofenotypových abnormalít aj na povrchu erytrocytových prekurzorov, napríklad asynchrónna expresia CD71 a CD235a (7,8) alebo zmenený pomer jadrových erytrocytových prekurzorov (9). Ďalší významný prínos poznania fenotypu, hlavne pro-erytroblastov, je pri určovaní MRD, kedy pro-erytroblasty vďaka svojmu CD34-CD117+CD45+ fenotypu a nízkym počtom v kostnej dreni môžu byť nesprávne interpretované ako patologické bunky AML-M0-2 alebo AML-M7 s fenotypom CD34-CD117+CD45+(HLA-DR-).

Táto štúdia bola financovaná grantom VEGA 2/0041/10 a vznikla aj vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: TRANSMED 2, ITMS: 26240120030, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### Literatúra

1. Babušiková O, Železníková T. Normal maturation sequence of immunoglobulin light and heavy chains in hematogenous stages 1, 2 and 3 in acute leukemia after treatment. *Neoplasma* 2008; 55: 501–506.
2. Babušiková O, Železníková T, Mičáková A, et al. The knowledge on the 3rd type hematogones could contribute to more precise detection of small numbers of precursor B-acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasma* 2005; 52: 502–509.
3. Železníková T, Števelová L, Kovariková A, et al. Increased myeloid precursors in regenerating bone marrow; implications for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Neoplasma* 2007; 54: 471–477.
4. McGrath KE, Bushnell TP, Palis J. Multispectral imaging of hematopoietic cells: where flow meets morphology. *J Immunol Methods* 2008; 336(2): 91–97.
5. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 2000; 96: 2022–2036.
6. Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, et al. Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC Physiology* 2008; 8: 13–23.
7. Della Porta MG, Malcovati L, Invernizzi R, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2006; 20: 549–555.
8. Malcovati L, Della Porta MG, Lunghi M, et al. Flow cytometry evaluation of erythroid and myeloid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 2005; 19: 776–783.
9. Matarraz S, López A, Barrena S, et al. Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on a series of 56 patients. *Cytometry Part B* 2010; 78B: 154–168.

### Mgr. Michaela Fajtová

Laboratórium imunológie národov  
Ústav experimentálnej onkológie SAV  
Vlárska 7, 833 91 Bratislava  
michaela.fajtova@savba.sk