Geschiedenis van flowcytometrie

Anneke Barends, Result Laboratorium, Dordrecht en redactielid en Jos Wielders, Klinisch chemicus en voorzitter Historisch Cie NVKC

Microscopen zijn vanaf de ontdekking door van Leeuwenhoek gebruikt voor onderzoek van cellen en weefsels. Aan het eind van de 19e eeuw ontwikkelde Paul Ehrlich als eerste een kleurmethode om cellen en hun inwendige structuren te kunnen tellen en te kleuren in een bloeduitstrijkje.

In de jaren '30 lukte het de geneticus Caspersson met een ultravioletmicroscoop en fluorescerende kleurstoffen voor het eerst nucleïnezuren in cellen te bestuderen door gebruik te maken van de Feulgen kleurreactie.

In 1934 beschreef Andrew Moldaven een eerste aanzet tot flowcytometrie, dat wil zeggen het meten en karakteriseren van een stroom individuele cellen in een dun kanaal. Hij beschreef een apparaat waarbij erytrocyten door een capillair onder een microscoop stroomden. Een fotodetector registreerde elke cel, niet alleen het aantal maar ook andere kenmerken zoals grootte.

In 1940 ontwikkelde Albert Coons fluorescerende antistoffen om eiwitten op cellen in bijvoorbeeld celsuspensies of weefselcoupes specifiek en heel gevoelig te detecteren. Deze kunnen dan op een uitstrijkje bekeken worden onder een fluorescentie microscoop en kwantitatief beoordeeld worden d.m.v. een camera of fotodetector.

Fluorochromen zijn stoffen die licht van een specifieke golflengte absorberen en dan in een hogere energietoestand raken (excitatie), bij terugval in het lagere energieniveau wordt licht uitgezonden (emissie) van een andere specifieke golflengte. Lasers van verschillende golflengte worden gebruikt om met verschillende fluorochromen gelabelde cellen aan te stralen waardoor deze licht uitstralen wat gemeten wordt. De eerste fluorochromen waren FITC (groen), TRITC (rood) gelabeld. Door fluorochromen te koppelen aan specifieke monoklonale antistoffen, kunnen antigenen als membraandeterminanten heel specifiek en gevoelig gemeten worden.

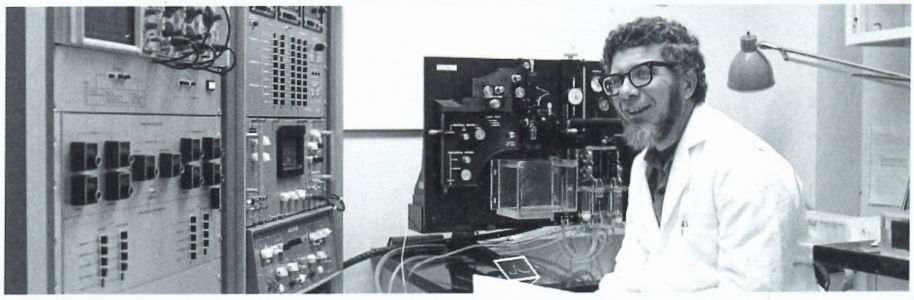
Wallace Coulter ontwikkelde (1949) het naar hem genoemde 'Coulter' principe, waarmee cellen individueel geteld en naar grootte geclassificeerd kunnen worden. Een met een buffer verdund bloedmonster wordt door een zeer kleine opening (apertuur) gezogen waarover een elektrische spanning staat. Elke keer wanneer een deeltje door de opening gaat verandert pulsgewijze de weerstand, de hoogte van de puls is een maat voor het deeltjes volume. Mack Fulwyler ontwikkelde dit principe verder door cellen met een bepaalde grootte d.m.v. een elektrostatisch veld te scheiden en apart te verzamelen.

Om de cellen mooi achtereenvolgens in een vloeistofstroom te krijgen werd hydrodynamic focusing ontwikkeld door Crossland-Taylor in 1953. Kamentsy en collega's combineerden deze focussering met het gebruiken van een laser van 254 nm bij de ontwikkeling van een eerste flow cytometer in 1965. Met een verbeterde kleuring met fluoresceïne kon de nucleïnezuur inhoud in 500 cellen/s gemeten kon worden. Soortgelijk onderzoek werden gedaan door Van Dilla en Fulwuyler, die over de door hun ontwikkelden FCM (FlowCytoMeter) in 1969 publiceerden.

Onafhankelijk van de Amerikanen werd in Duitsland door Göhde en Dittrich in 1968 een flowcytometer ontwikkeld, de ICP11, die ook via de firma Partec vanaf 1969 commercieel verkrijgbaar was. Zij ontwikkelde een systeem dat cellen sorteerde d.m.v. intracellulaire fluorescentie. Ook werd hierbij de flow kamer geïntroduceerd die ook nu nog gebruikt wordt in analyzers. Göhde ontwikkelde een detectie methode gebaseerd op de emissie van fluorescerende moleculen i.p.v. de tot dan toe gebruikte absorptie.

Herzenberg en collega's verbeterden in 1972 de cel scheider waardoor zwak fluorescerende cellen met fluoresceïne gelabelde antistoffen gedetecteerd konden worden en gescheiden op basis van hun fluorescentie. Hij introduceerde de term FACS Fluorescence -activated cell sorting, in plaats van het voorheen gebruikte 'puls cytofotometrie'.

Herzenberg stimuleerde ook de ontwikkeling en productie van gelabelde monoclonale antistoffen (Mabs, zonder welke



dr. Lennart Herzenberg met zijn FACS-II cell sorter

de huidige flowcytometrie niet zo'n belangrijke nieuwe toepassingen had kunnen vinden. De ontdekking door Kohler en Milstein in 1975 van de mogelijkheid om grote hoeveelheden monoclonale antistoffen d.m.v. hybridoma techniek te maken, betekende een doorbaak voor zeer specifiek gebruik van deze immunologische reagentia. Door antistof producerende B-cellen te fuseren met myeloma cellen kon een oneindige productie van monoclonale antistoffen met bekende specificiteit gecreëerd worden. Door deze monoklonale antistoffen te labelen met fluorochromen kunnen deze vervolgens gemeten worden met een flowcytometer, zoals hierboven beschreven.

Toepassingen van flowcytometrie:
Vanaf de jaren '70 werden steeds meer monoklonale antistoffen tegen immunologische markers (eiwitten al dan niet met suikergroepen) ontdekt die op de celmembraan tot expressie gebracht worden of intracellulair voorkomen bij leukocyten. Elke cel heeft min of meer specifieke markers op de celmembraan die d.m.v. flowcytometrie bepaald kunnen worden. Vooral binnen de groep leukocyten kunnen diverse typen blasten en subpopulaties van lymfocyten goed van elkaar onderscheiden worden. Er worden nog steeds nieuwe markers ontwikkeld voor steeds verdergaande medische diagnostiek.

Op de markt kwamen echter verschillende antistoffen tegen eenzelfde immunologische marker, bijv. CD9 kent 5 antistoffen tegen hetzelfde antigeen op de T-cel. Deze verschillen ontstonden door verschillen in techniek, antistof affiniteit en interpretatie. Standaardisatie en een eenduidige naamgeving beek noodzakelijk. Een kleine groep immunologen onderkenden dit probleem en kwamen met de oplossing om verschillende laboratoria blind antistoffen te laten testen en deze statistisch te analyseren. Dit leidde tot de First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) in Parijs in 1982, georganiseerd door Laurence Boumsell en Alain Bernard. Tijdens deze Leucocyte Typing conferenties georganiseerd door de HLDA, worden clusters van deze monoklonale antistoffen voor dezelfde leukocytenantigenen ingedeeld. Elk cluster heeft een eigen CD (Cluster of Differentiation) code. Een CD code wordt pas toegekend als tenminste 3 monoklonale antistoffen van verschillende laboratoria een leukocyten antigeen herkennen. De meest recente HLDA workshop werd in 2014 in Australië gehouden, waarbij CD371 als laatste beschreven werd.

Hoewel de microscoop onontbeerlijk is bij bloed en beenmergmorfologie heeft immunofenotypering van bloedcellen een grote meerwaarde. Er worden meer en sneller cellen geteld en dus ook bij Minimale Rest ziekte (MRD) kan een laag aantal maligne cellen toch teruggevonden worden. Ook een zwakke expressie van antigenen kan beter gemeten worden met gevoeliger flowcytometers. Er zijn op dit moment flowcytometers die tot 50 parameters met 9 lasers tegelijkertijd met een snelheid van 40.000 events per seconde kunnen meten. Met geautomatiseerde verwerkingsmethodes kan snel een uitslag geproduceerd worden.

FACSymphony,foto met toestemming van BD

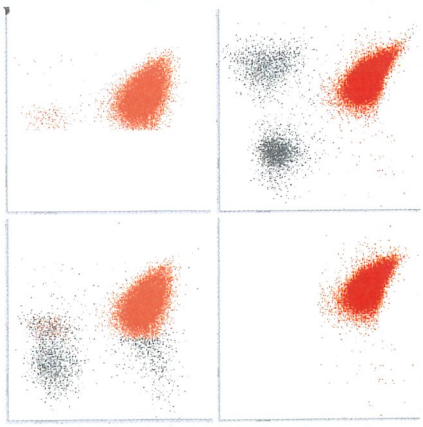
CD markers zijn belangrijk in het onderscheiden van celsoorten: zo is CD45 een pan leuco marker, CD138 specifiek voor myeloma cellen en CD34 voor stamcellen. Vooral voor het onderscheiden van verschillende lymfomen zijn CD markers belangrijk. Een klassieke CLL heeft naast de B-celmarker CD19 ook een T-cel marker CD5, deze marker noemen we aberrant.

Een acute leukemie is myeloïd als CD13 en CD33 aanwezig zijn en MPO (Myeloperoxidase) positief is en B-cel lymfatisch als CD10 aanwezig is. CD4 is voor T helper cellen en CD8 voor cytotoxische T cellen, belangrijk bij HIV patiënten voor vervolgen van hun medicatie. Niet alleen de aanwezigheid van CD markers is belangrijk voor een diagnose maar soms ook de afwezigheid ervan zoals de afwezigheid van CD23 bij CD19 en CD5 positieve cellen van een CLL. Afwezigheid van CD23 wijst eerder naar een mantelcellymfoom dan een CLL.

Naast het onderscheiden van cellen worden de CD markers ook gebruikt voor immuuntherapie. Rituximab bijv. is gericht tegen CD20 cellen zoals bij lymfomen, door binding van Rituximab aan CD20 cellen worden deze vernietigd.

Een laatste nieuwe ontwikkeling binnen de flowcytometrie is de CyTOF (Cytometrie by Time Of Flight) of Mass Cytometry. Hierbij wordt geen gebruik gemaakt van fluorescentie, maar massaspectrometrie. Voordeel hiervan is dat geen spectrale overlap door het gebruik van meerdere fluorochromen plaatsvindt, bovendien zijn deze metaallabels stabieler.

In de CyTOF worden cellen gemengd met 30-100 verschillende monoclonale antistoffen, gelabeld met isotopen uit de lanthanide groep. Per antigeen worden meerdere metaalhoudende polymeren gekoppeld. De gelabelde cellen verdampen bij de een zeer hoge temperatuur van een plasma (ICP-MS) waardoor metaalionen ontstaan, die versneld worden in een elektrisch veld en gescheiden in een magnetisch veld. De detector meet de ionen aan de hand van hun massa/lading verhouding en daarmee dus de antistoffen op de cel. De massaspectrofotometer kan isotopen onderscheiden die slechts 1 atomaire massa eenheid verschillen en kan in 1 experiment tot 100 verschillende parameters meten.



Figuur 3. *B-CLL Foto met toestemming van BD*