

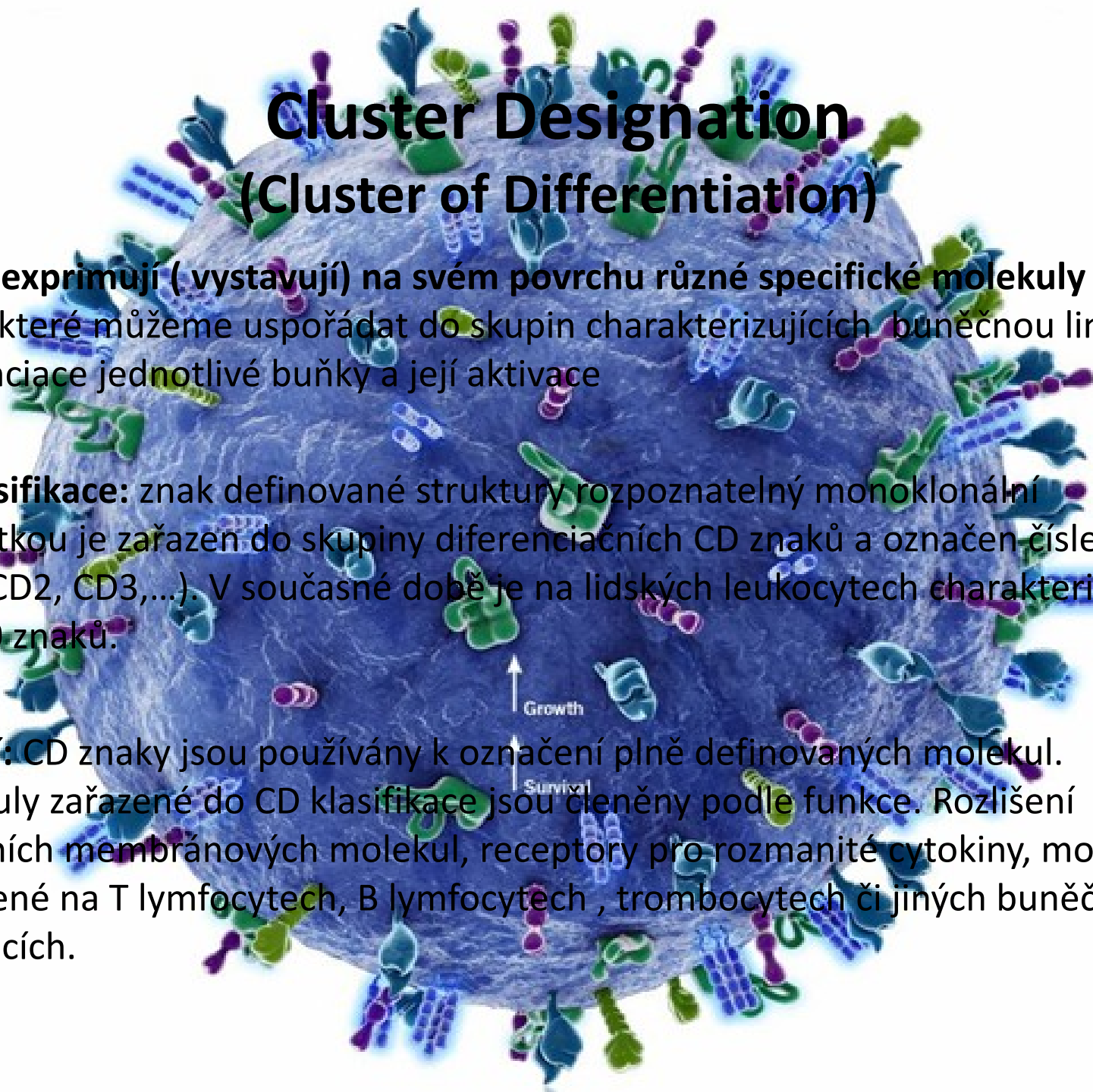
Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulací

Jana Nechvátalová

Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

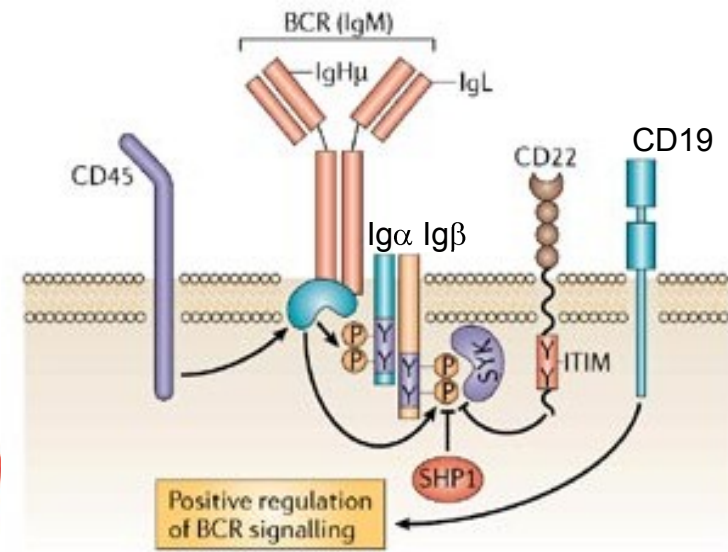
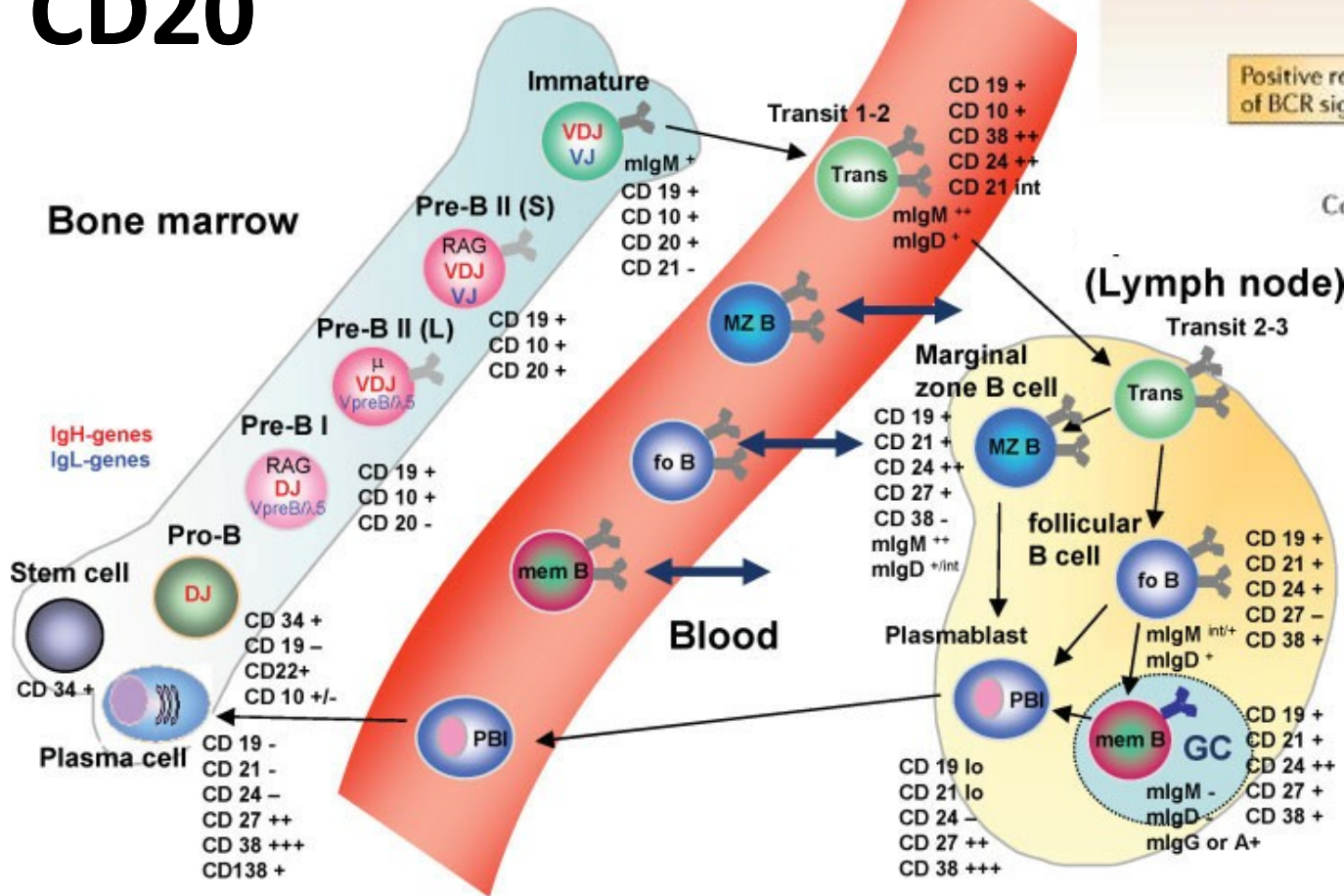
- **buňky exprimují (vystavují) na svém povrchu různé specifické molekuly** – znaky, které můžeme uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav diferenciaci jednotlivé buňky a její aktivace
- **CD klasifikace:** znak definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou je zařazen do skupiny diferenciačních CD znaků a označen číslem (CD1, CD2, CD3,...). V současné době je na lidských leukocytech charakterizováno asi 400 znaků.
- **Využití:** CD znaky jsou používány k označení plně definovaných molekul. Molekuly zařazené do CD klasifikace jsou členěny podle funkce. Rozlišení adhezních membránových molekul, receptory pro rozmanité cytokiny, molekuly vyjádřené na T lymfocytech, B lymfocytech, trombocytech či jiných buněčných populacích.



B lymphocyty

CD19

CD20



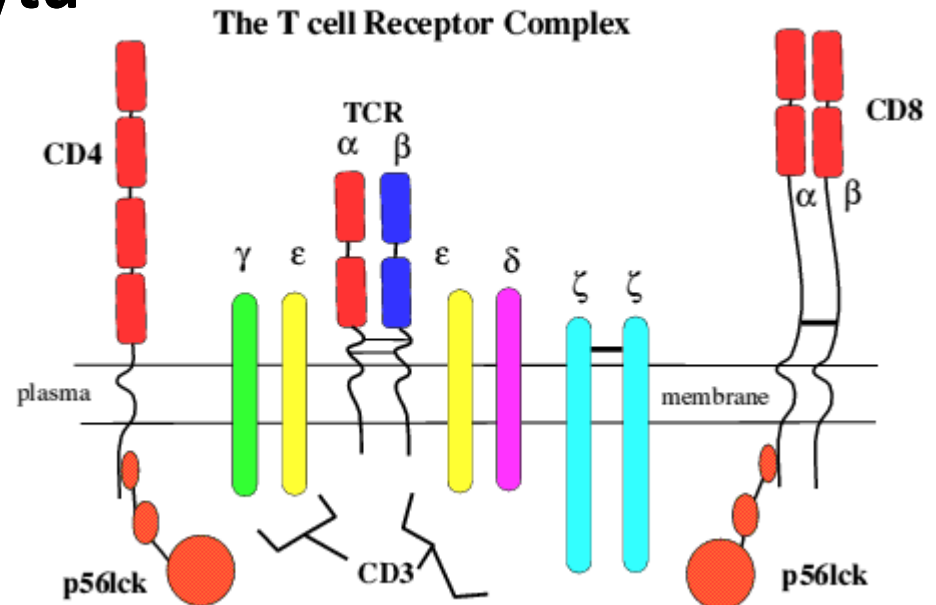
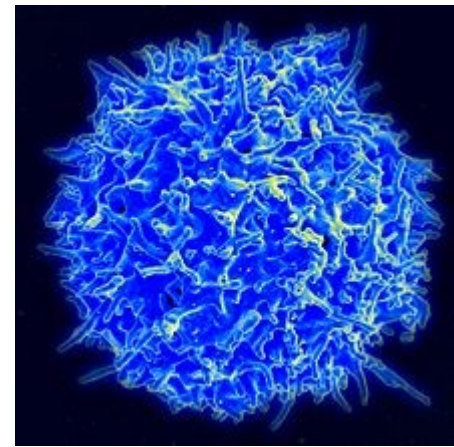
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

T lymfocyty

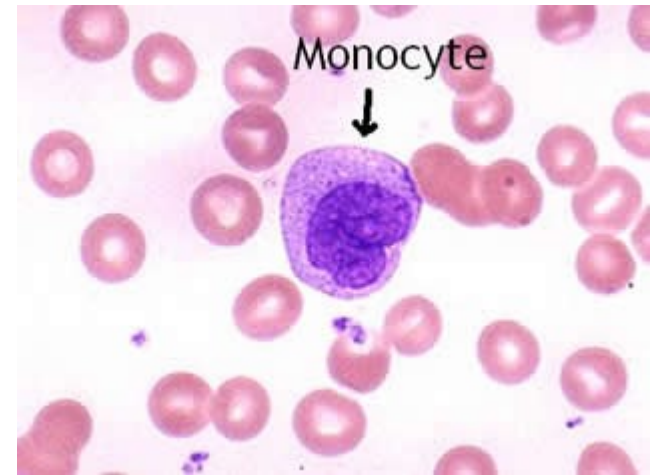
CD3 na povrchu všech T lymfocytů

CD4 na povrchu T_H lymfocytů (T_H1 , T_H2)

CD8 na povrchu T_C lymfocytů



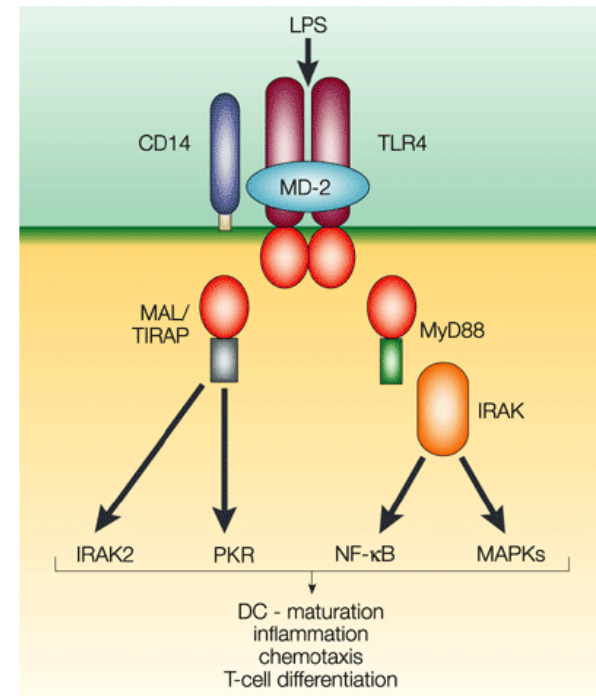
Monocyty



CD14

HLA DR

- součástí nespecifické imunity
- schopnost fagocytózy
- tkáňová forma = makrofág



NK buňky

CD16+

CD56+

CD3-

- rozeznávají buňky, které mají na povrchu abnormálně málo MHC I (= nádorové a virově infikované buňky)
- používají cytotoxické mechanismy (perforin, granzymy)

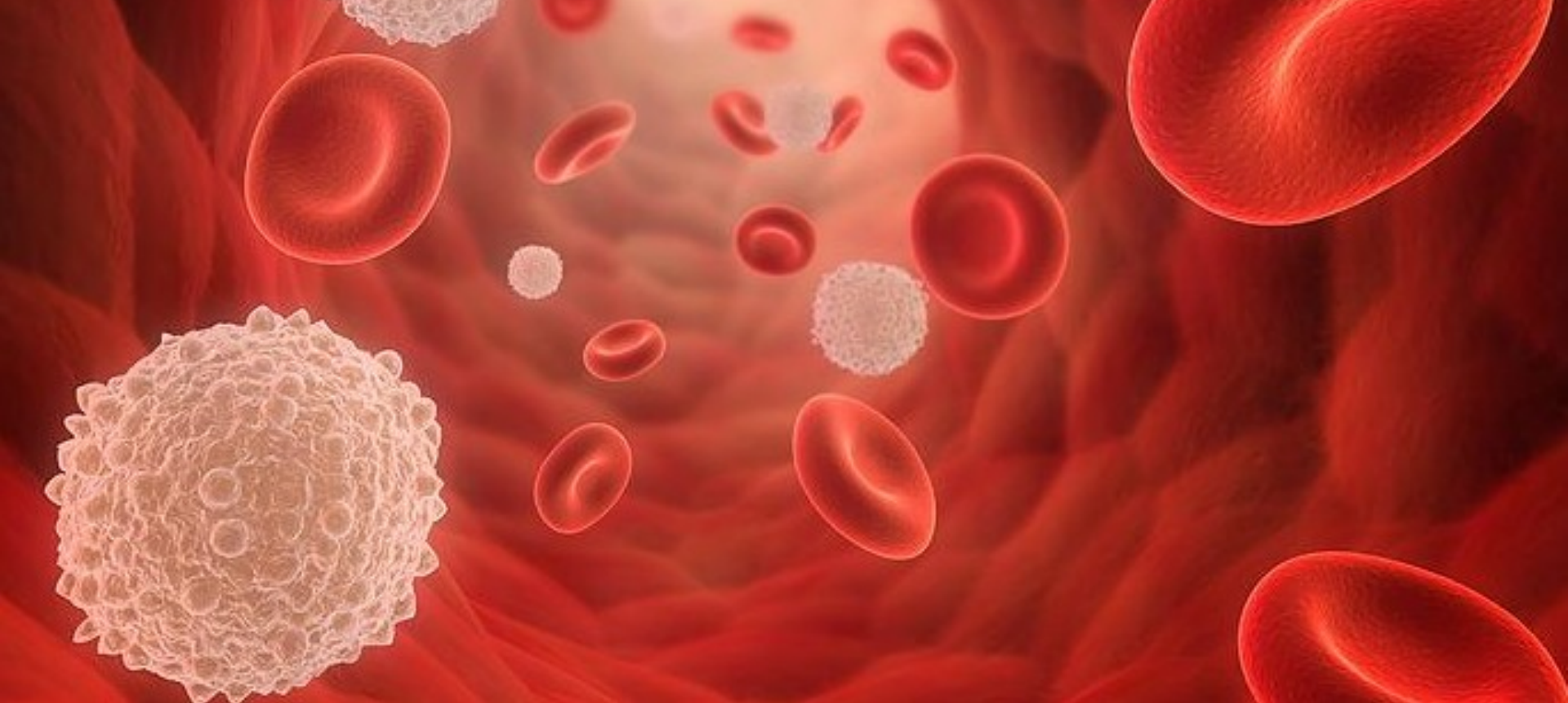


Pozn. **NKT** buňky

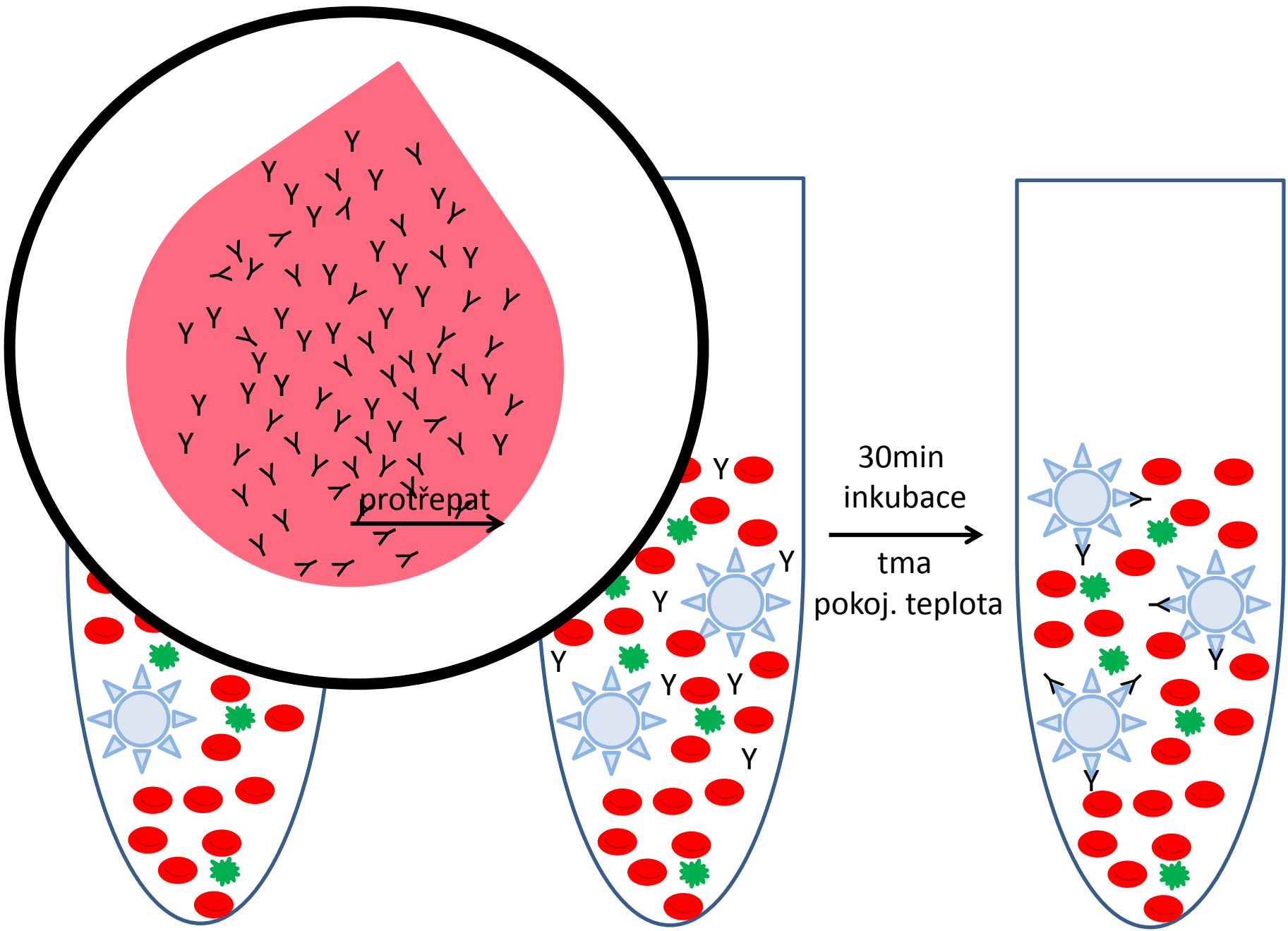
CD16+

CD56+

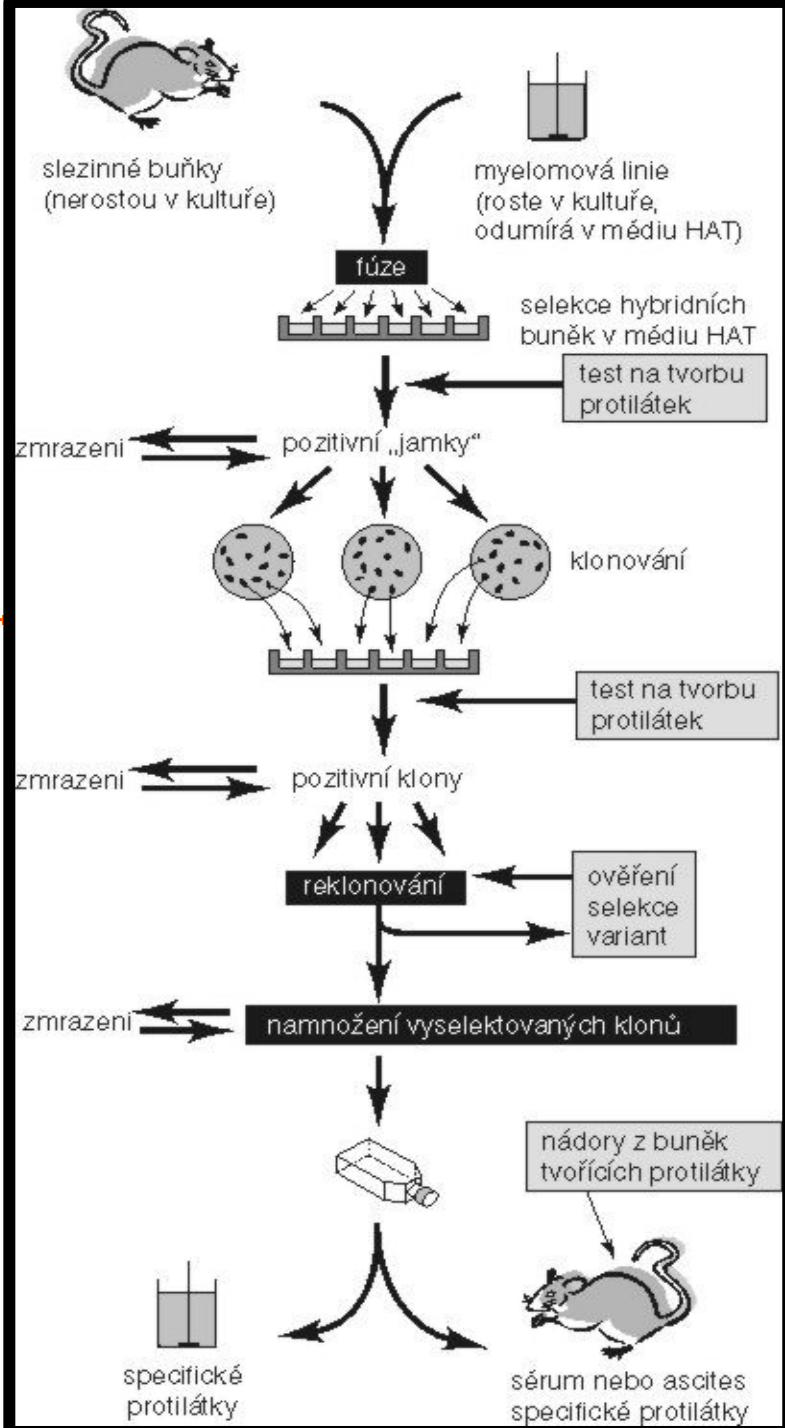
CD3+



Pro stanovování
lymfocytárních subpopulací
odebírat krev do zkumavky s **EDTA**



Mnoklonální protilátky



- protilátky jsou produktem jediného klonu B lymfocytů (klony vzniklé fúzí buněk produkujících protilátky a myelomových buněk, jež schopnost produkce svého vlastního imunoglobulinu ztratily)
- jsou naprosto totožné a jsou přísně specifické proti jedinému epitopu





LYZOVÁNÍ ERYTROCYTŮ

Roztok A: na 1,5 l destilované vody – 1,8 ml 99% kyseliny mravenčí

Roztok B: na 1,5 l destilované vody 9,0 g bezvodého Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl,
46,95 g bezvodého Na_2SO_4

Roztok C: na 1,5 l PBS (pH 7-7,4) - 15 g paraformaldehydu

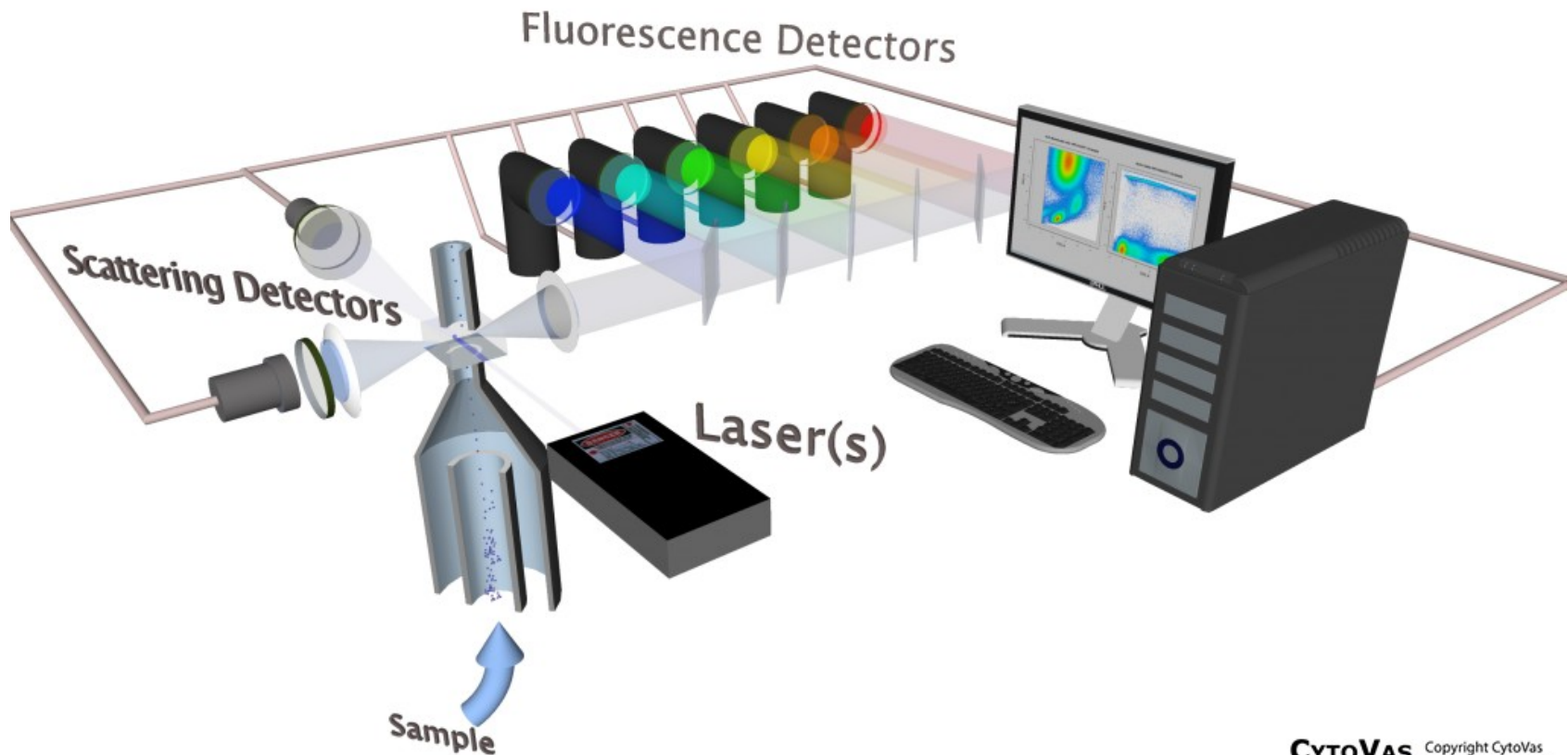
Průtoková cytometrie

FLOW CYTOMETRY



Průtokový cytometr

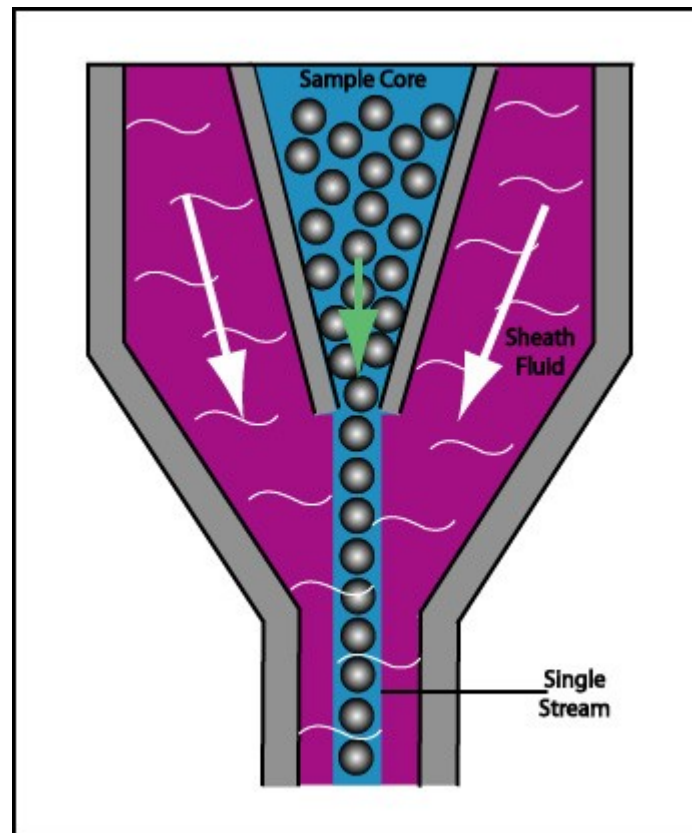
1. FLUIDNÍ SYSTÉM
2. OPTIKA
3. ELEKTRONIKA



1. FLUIDNÍ SYSTÉM

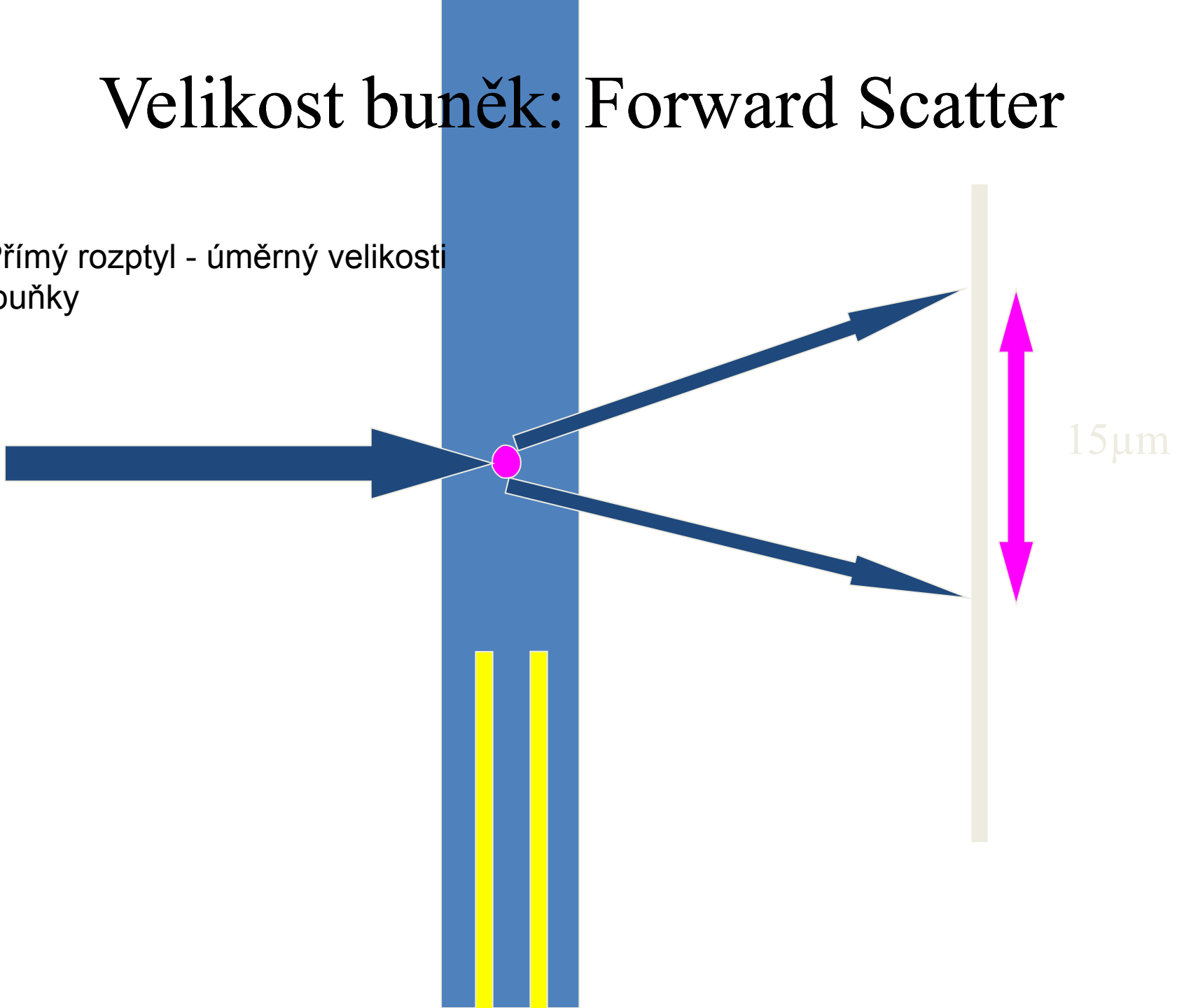
Zajišťuje transport bb. v nosné tekutině (pod tlakem) do průtokové komory. Buňky se pohybují jedna za druhou

na základě hydrodynamické fokusace - nosná tekutina (destil. voda, komerční tekutiny) bývá do komory přinášena tenkou kapilárou pod větším tlakem než suspenze částic, které jsou tak udržovány jen v úzké centrální části proudu. Zrychlení vznikající při výstupu vodního paprsku z komůrky nutí částice pohybovat se jedna za druhou.



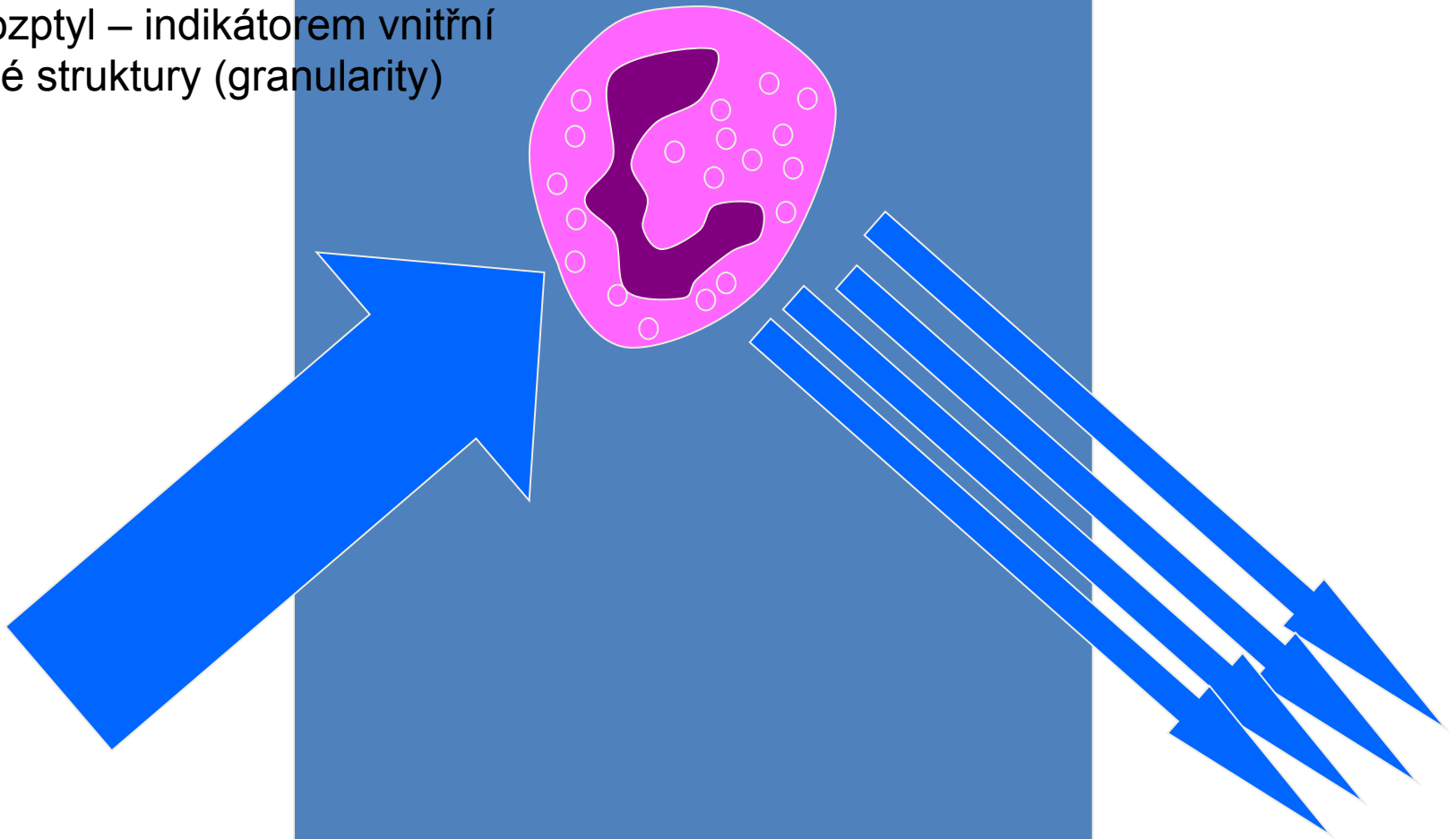
Velikost buněk: Forward Scatter

Přímý rozptyl - úměrný velikosti
buňky



Granularita buněk: Side Scatter

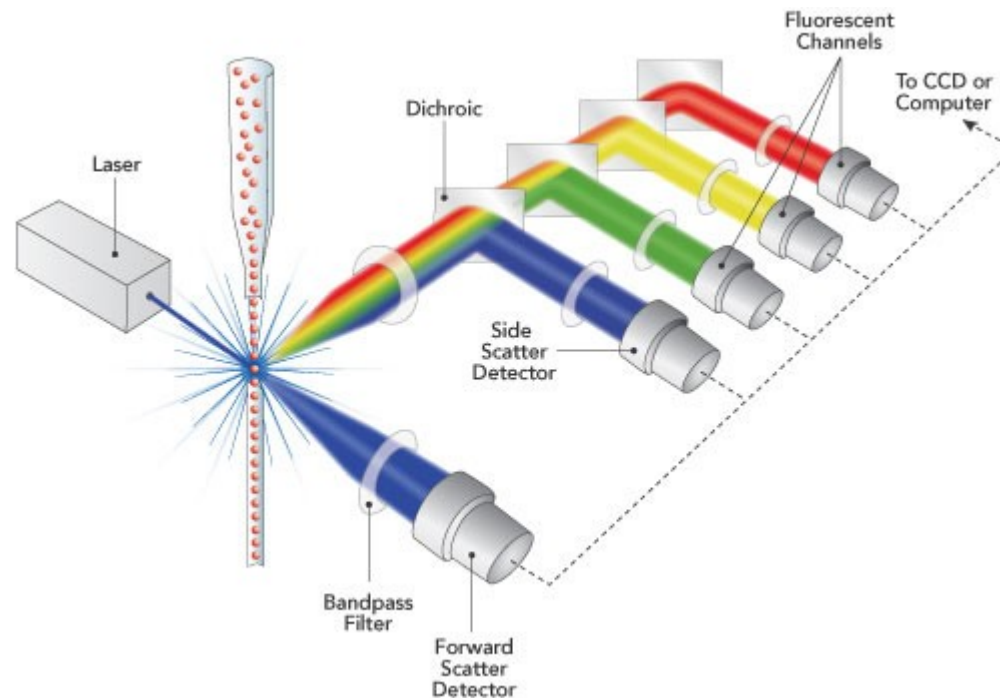
Boční rozptyl – indikátorem vnitřní buněčné struktury (granularity)



2. OPTIKA

Excitační část – laser

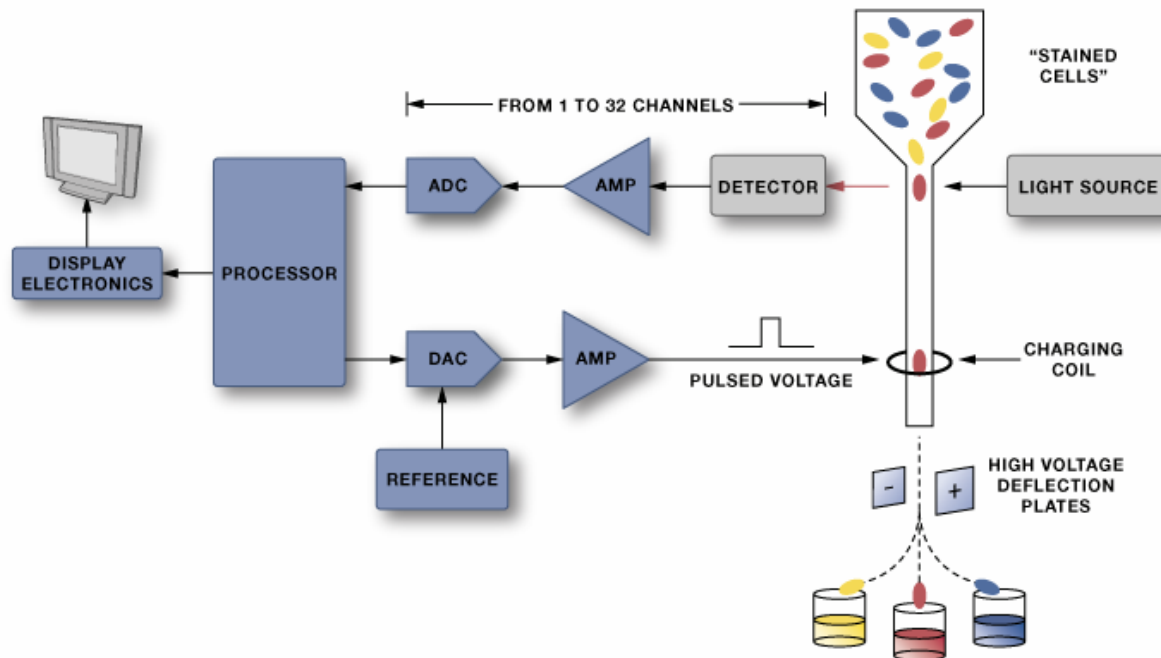
Sběrná část – systém čoček, zrcadel a optických filtrů zachycující fluorescenci částic vyzářenou po jejich projití světelným paprskem



3. ELEKTRONIKA

Převádí optické signály (fluorescenci) na signály elektronické (fotonásobiče, fotodiody).

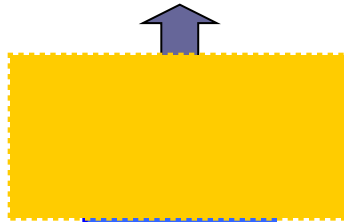
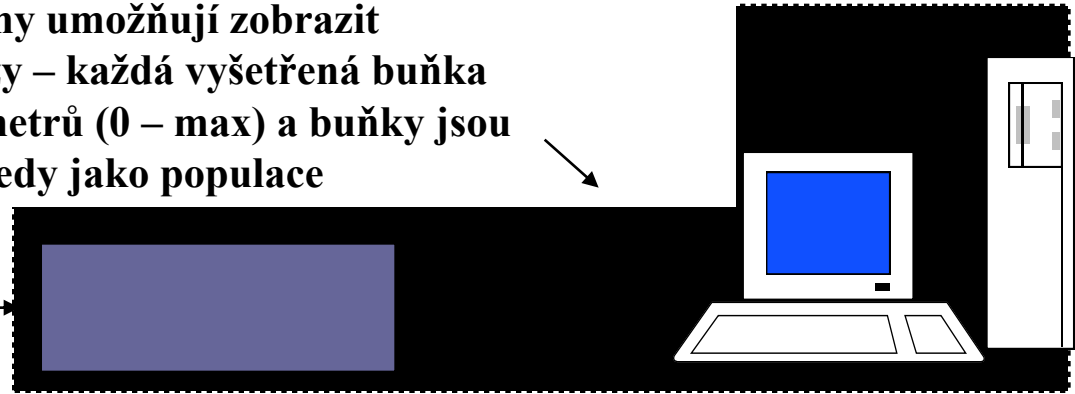
Po zesílení signálu a dalším zpracování dojde k jeho digitalizaci pro počítačovou analýzu



Průtokový cytometr

Speciální počítačové programy umožňují zobrazit a vyhodnotit výsledky analýzy – každá vyšetřená buňka má přiřazené hodnoty parametrů (0 – max) a buňky jsou vyhodnocovány kolektivně, tedy jako populace

(Opto)elektronika převádí optický signál na elektrický, ten zpracovává a údaje jsou posílány do počítače

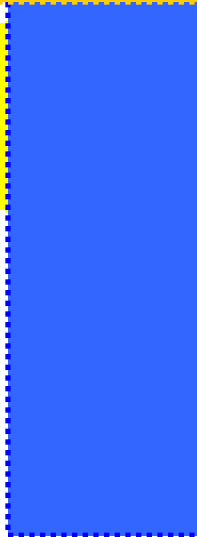


Sběrná optika (čočky, zrcadla, filtry, světlovodná vlákna) třídí světelný signál Podle barvy se světlo a přivádí ho na jednotlivé detektory

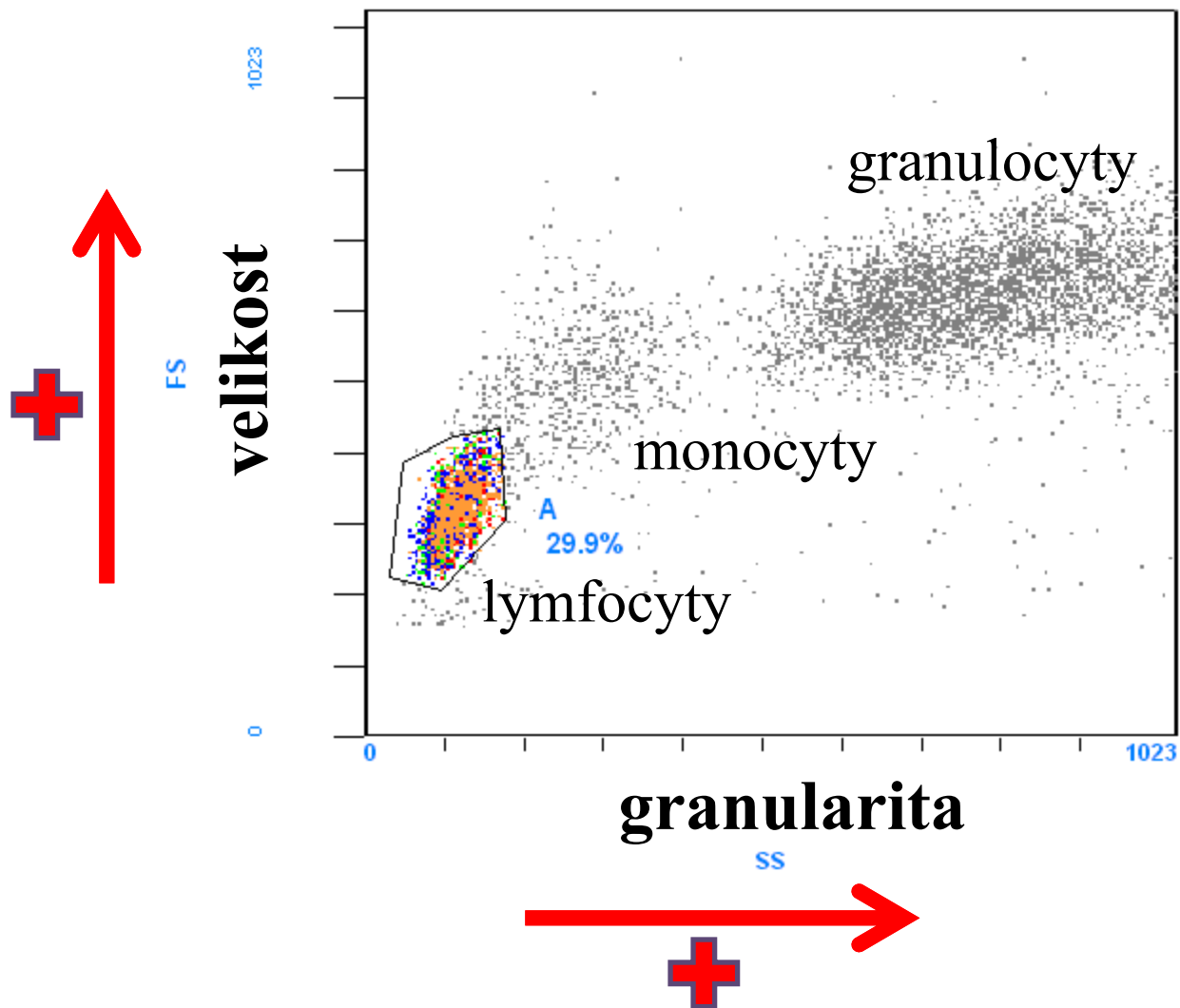
Excitační optika (lasery, světlovodná vlákna, zaostřovací a tvarovací prvky) přivádí budící záření do komory

System hnací tekutiny přináší vzorek do komory kde jsou buňky jedna po druhé vyšetřovány laserovým paprskem

Zkumavka se suspenzí buněk



(F1)[Ungated] Z0051674.LMD : SS/FS



Fluorescence

Fluorochromy:

- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
 - Fluorescein isothiokyanát (FITC)**, Cyaniny, Texas Red, řada Alexa, řada Pacific and Cascade,
AmCyan, *Propidium iodide*, 7-AAD, CFSE,
- Fluorescenční proteiny
 - Phycoerythrins (PE)**, Allophycocyanin, PerCP, GFP a jiné fluorescenční proteiny

Schopné absorbovat fotony budícího záření (např. 488 nm)

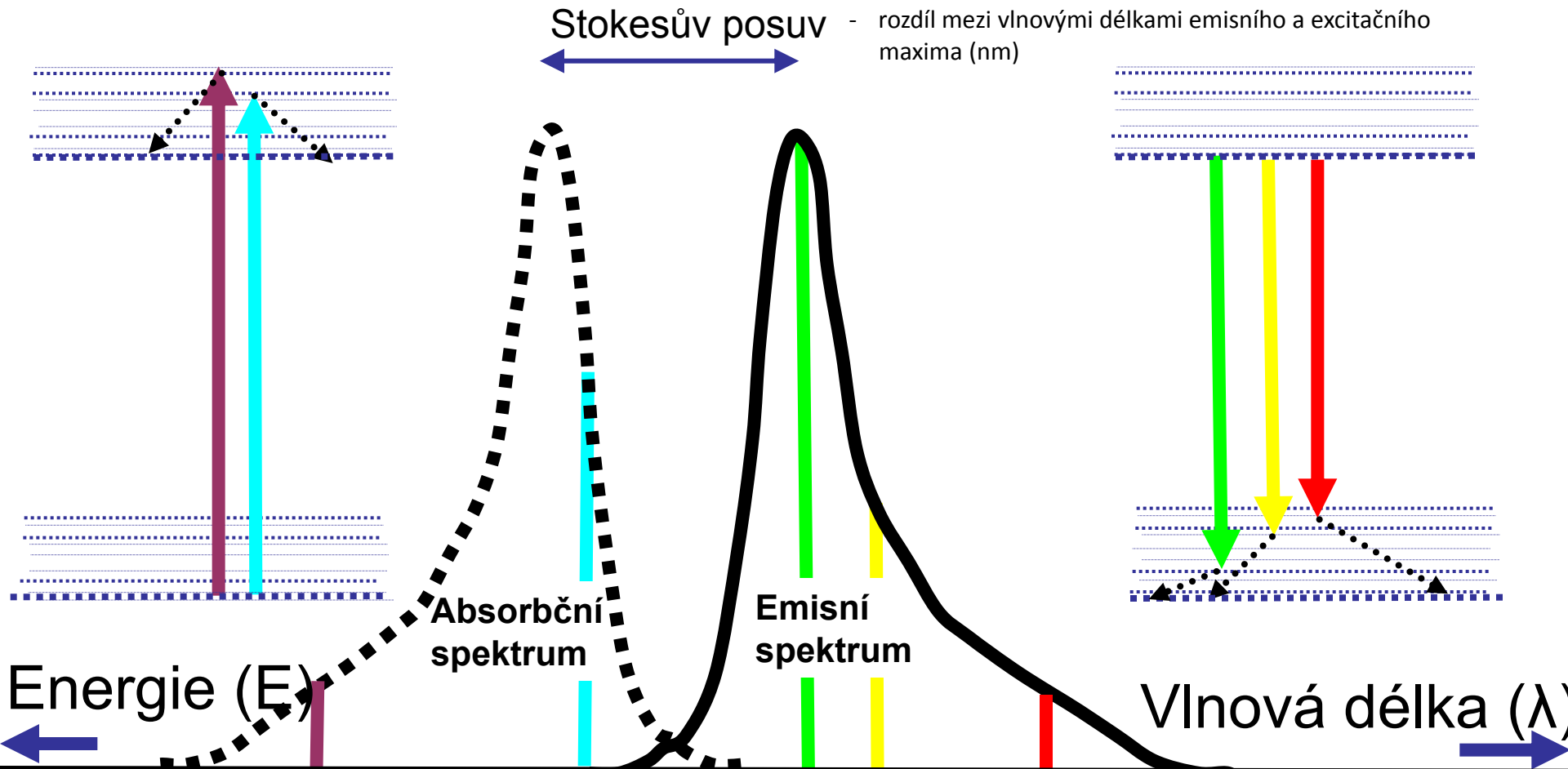
a následně (10^{-8} s) emitovat fotony s

delší vlnovou délkou (v tomto případě 500 – 800 nm).

Fluorescenční světlo má tedy jinou barvu

Fluorescence

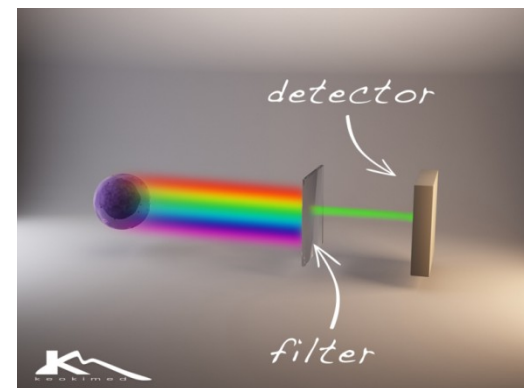
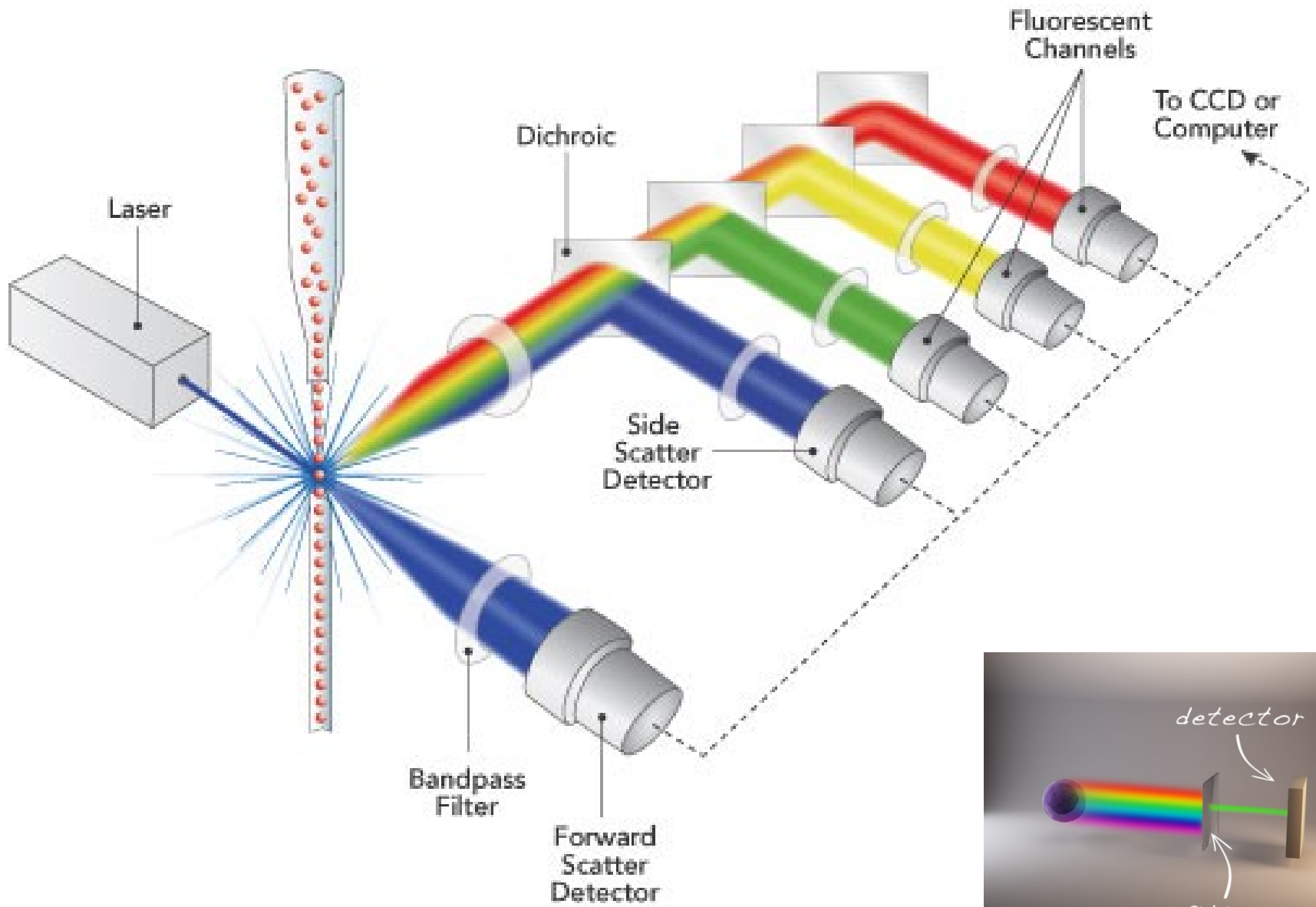
Barva pohlceného a vyzářeného světla se liší



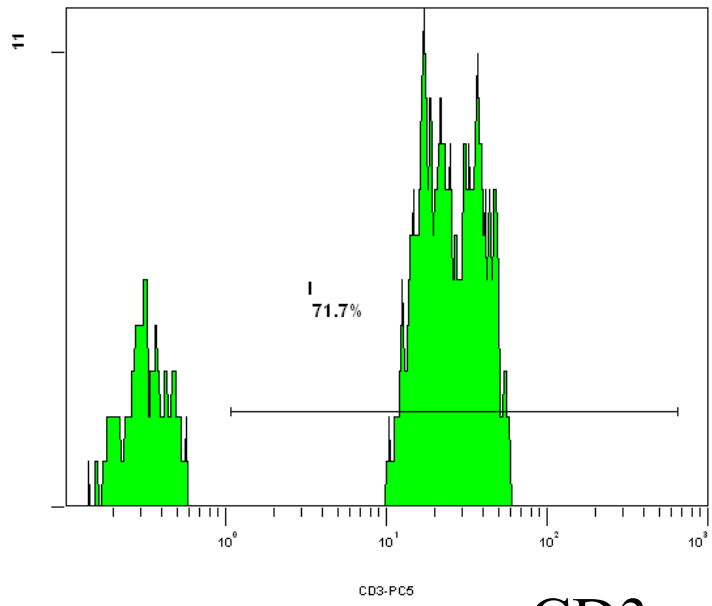
Část energie se přemění na energii vibrační

Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

$$E = h \cdot c / \lambda$$

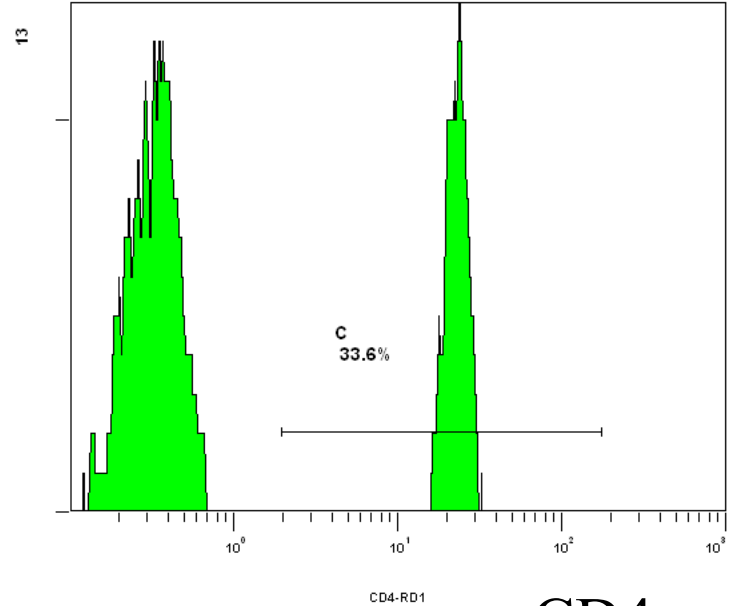


[F1][A] 20051674.LMD : FL4 LOG



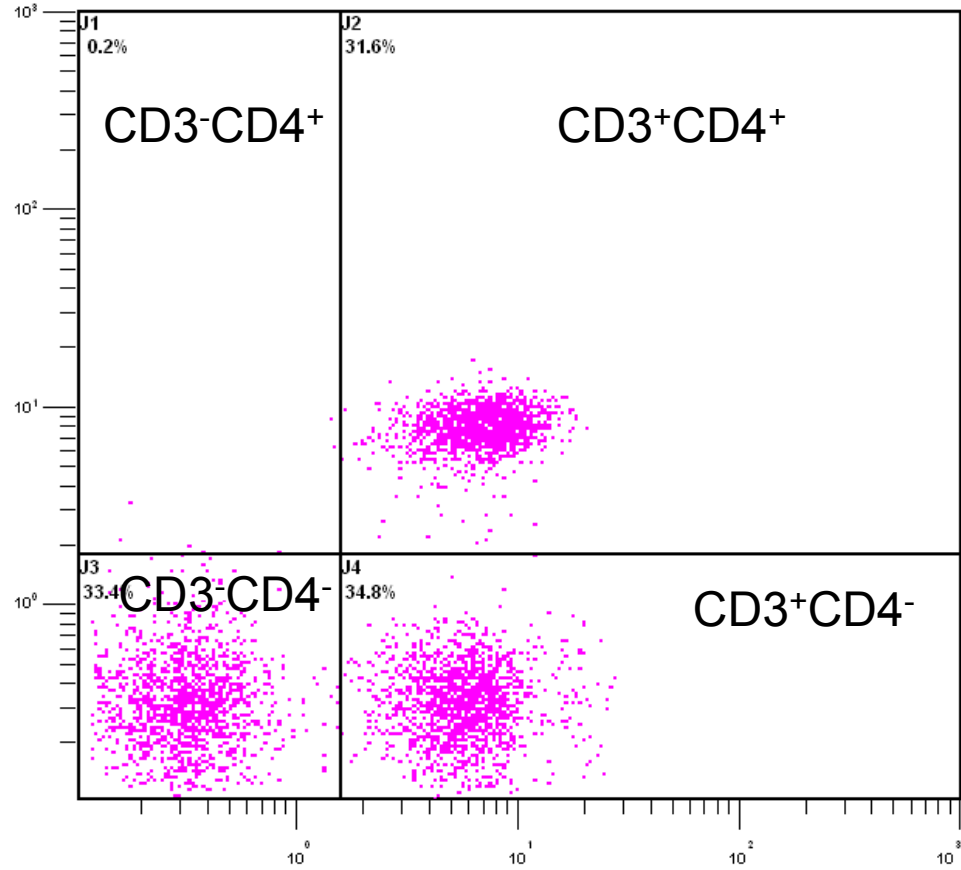
CD3

[F1][A] 20051674.LMD : FL2 LOG



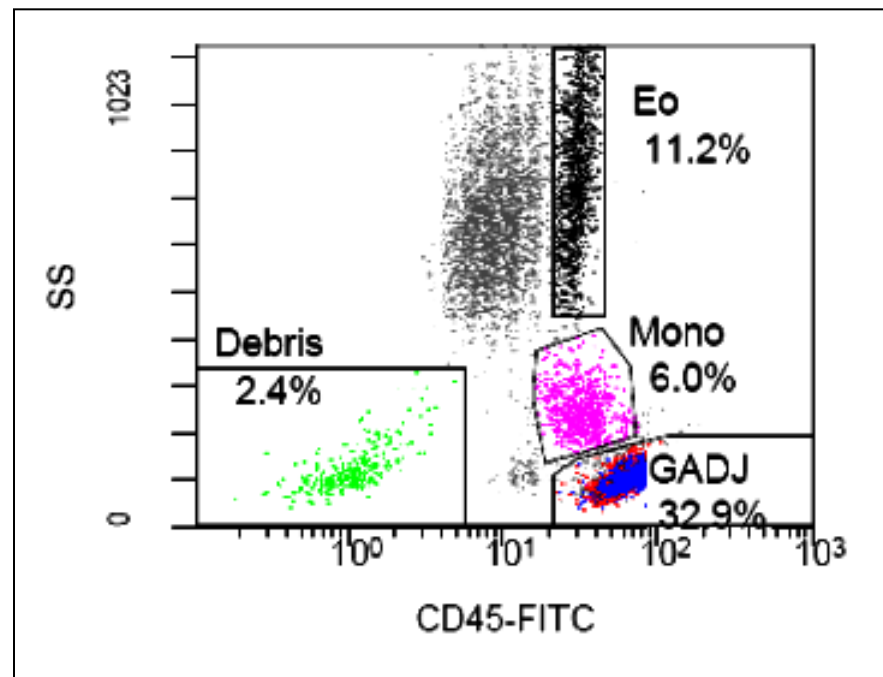
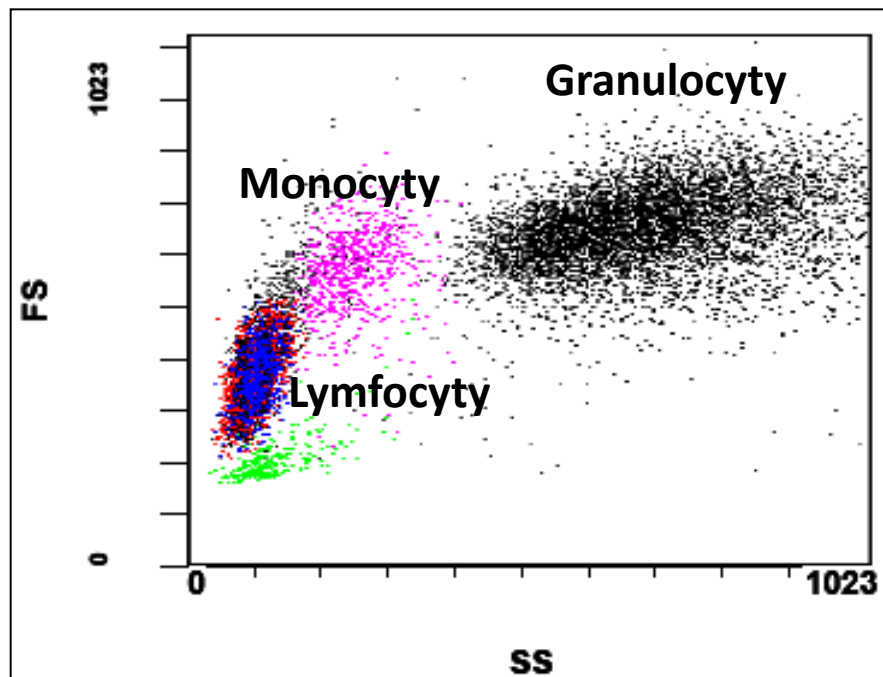
CD4

CD4 PE

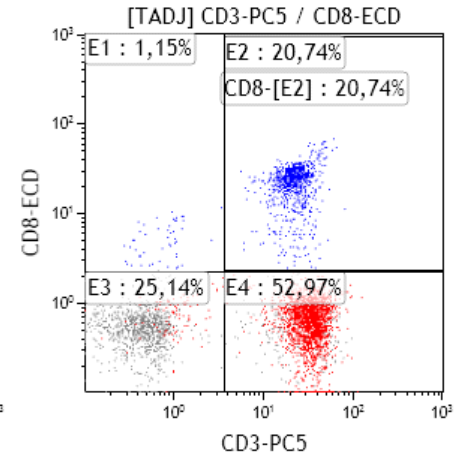
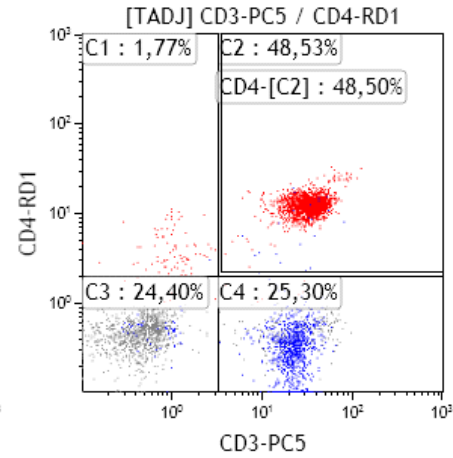
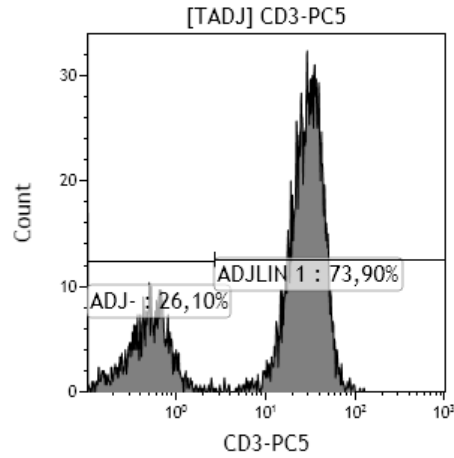
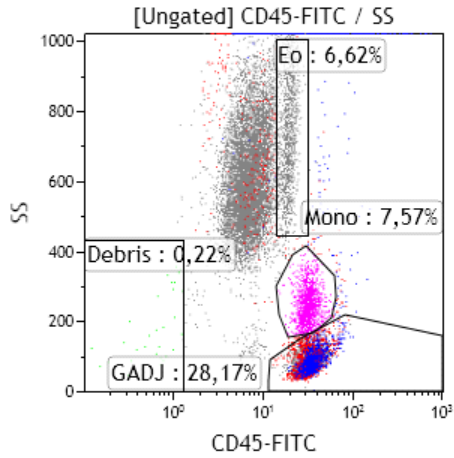


CD3 PC5

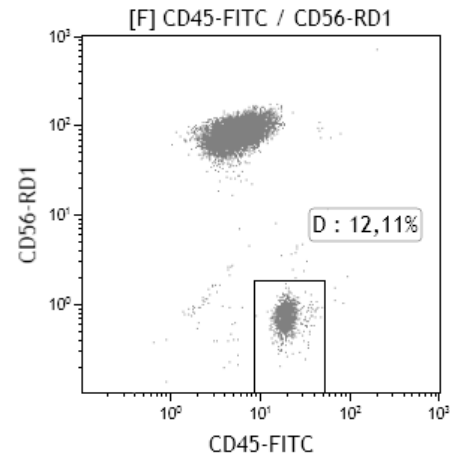
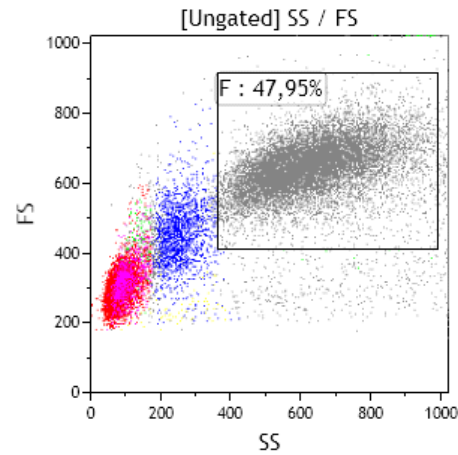
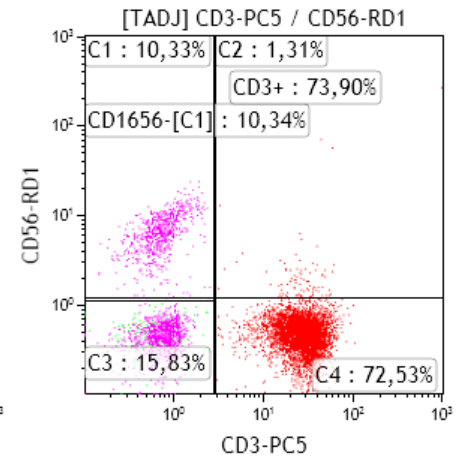
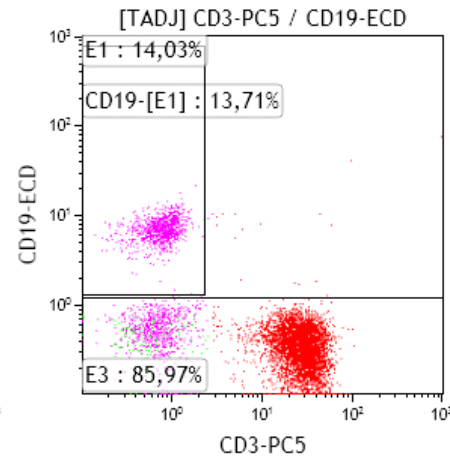
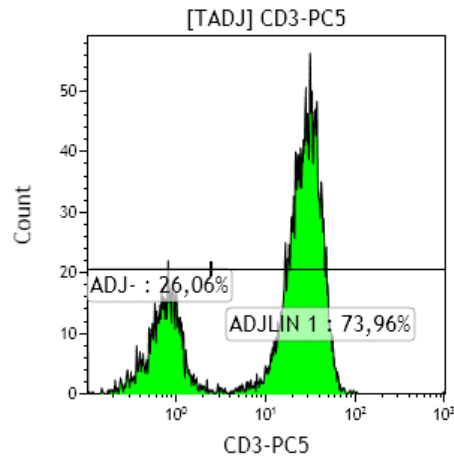
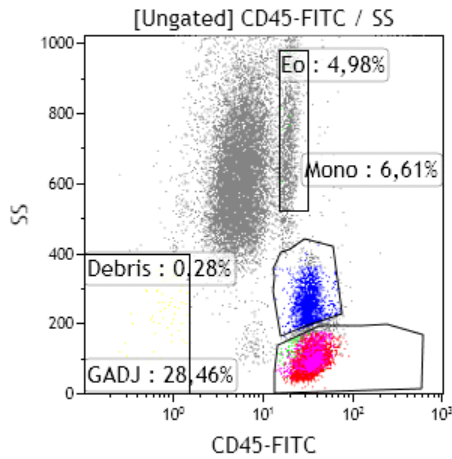
Krevní diferenciál



Zkumavka A



Zkumavka B



Vyšetření lymfocytů periferní krve

ZNAK	EXPRESE	FUNKCE	ZASTOUPENÍ NA LYMFOCYTECH PERIFERNÍ KRVE (%)
CD3	všechny T-lymfocyty	asociován s TCR, přenos signálu	58-85
CD4	pomocné T-lymfocyty	receptor pro MHC II, aktivace	30-60
CD8	cytotoxické T-lymfocyty	receptor pro MHC I, aktivace	15-35
CD19	B-lymfocyty	regulátor aktivace	7-23
CD16/CD56	NK-buňky	FcR pro IgG/mediátor adheze	6-20
HLA-DR	B-lymfocyty, monocyty, aktivované T-lymfocyty	MHC II, prezentace Ag	B-lymfocyty konstitutivně (na všech B-lymfocytech), T-lymfocyty 3-7 (na aktivovaných T-lymfocytech)

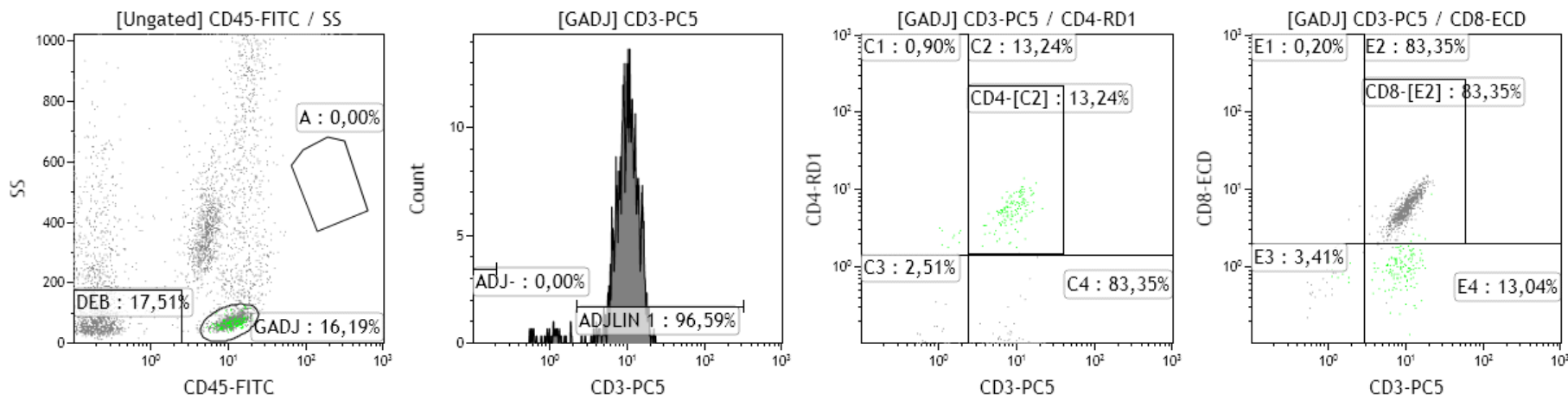
Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

Snížení/ zvýšení	subpopulace	onemocnění
↓	CD19+, CD3+, CD4+, CD8+	při imunosupresi – např. cyklosporin (způsobuje lymfopenii)
↓	CD19+	u některých pacientů s CVID
↑	CD19+	B – buněčná leukémie
↓	CD3+	při expozici člověka toxickými chemikáliemi
↑	CD3+	T – buněčná leukémie
↓	CD4+	u některých pacientů s CVID (běžný variabilní imunodeficit – <u>c</u> ommon <u>v</u> ariable <u>i</u> mmunodeficiency) - virové infekce (EBV, CMV, HIV)
↑	CD4+	autoimunity, alergie
↓	CD8+	autoimunity (roztroušená skleróza, <u>s</u> ystematický <u>l</u> upus <u>e</u> rythematodes-SLE)
↑	CD8+	u některých pacientů s CVID - virové infekce (EBV, CMV, HIV)

Příklady využití průtokové cytometrie v praxi

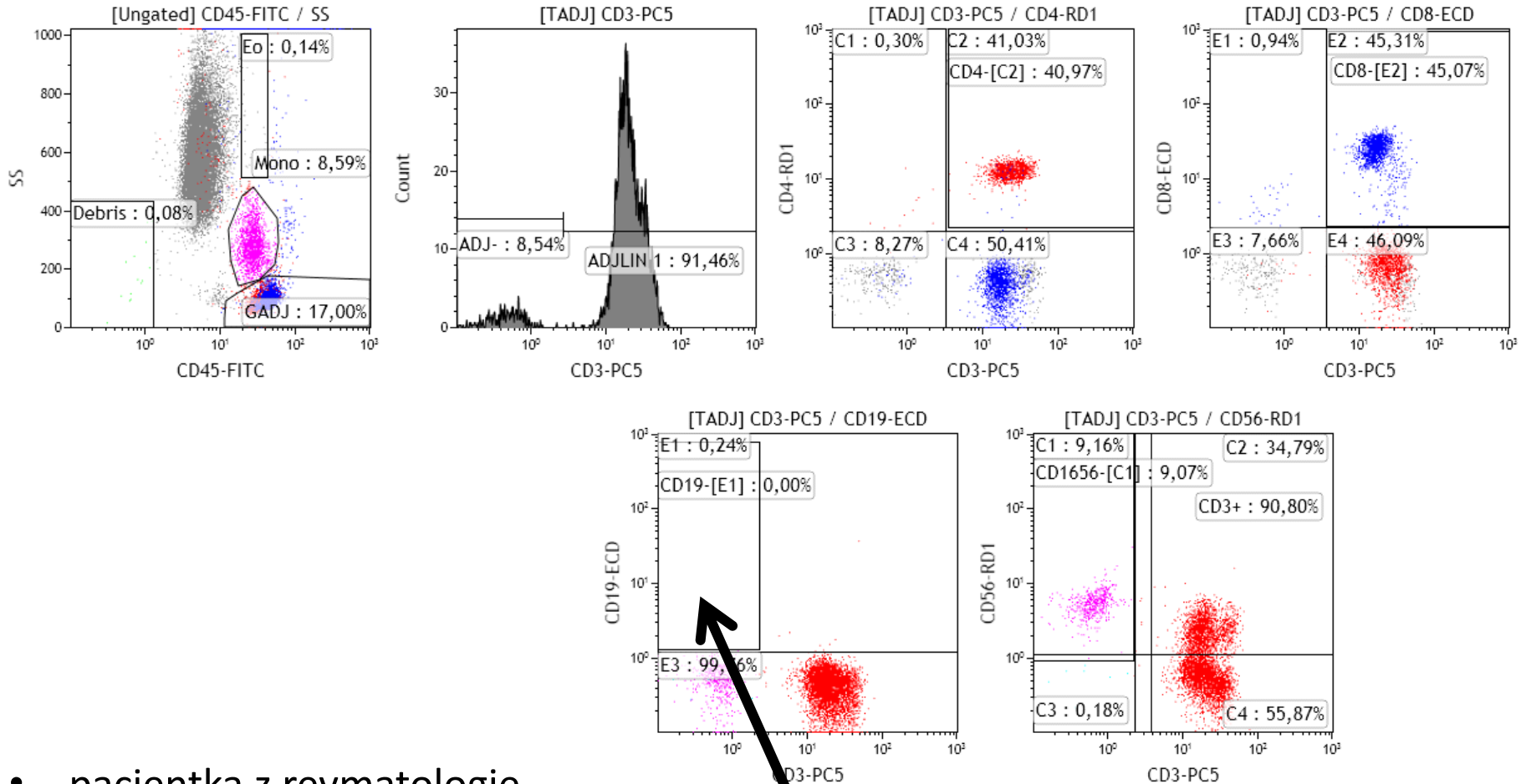
Bronchoalveolární laváž (BAL)

- imunofenotypizace



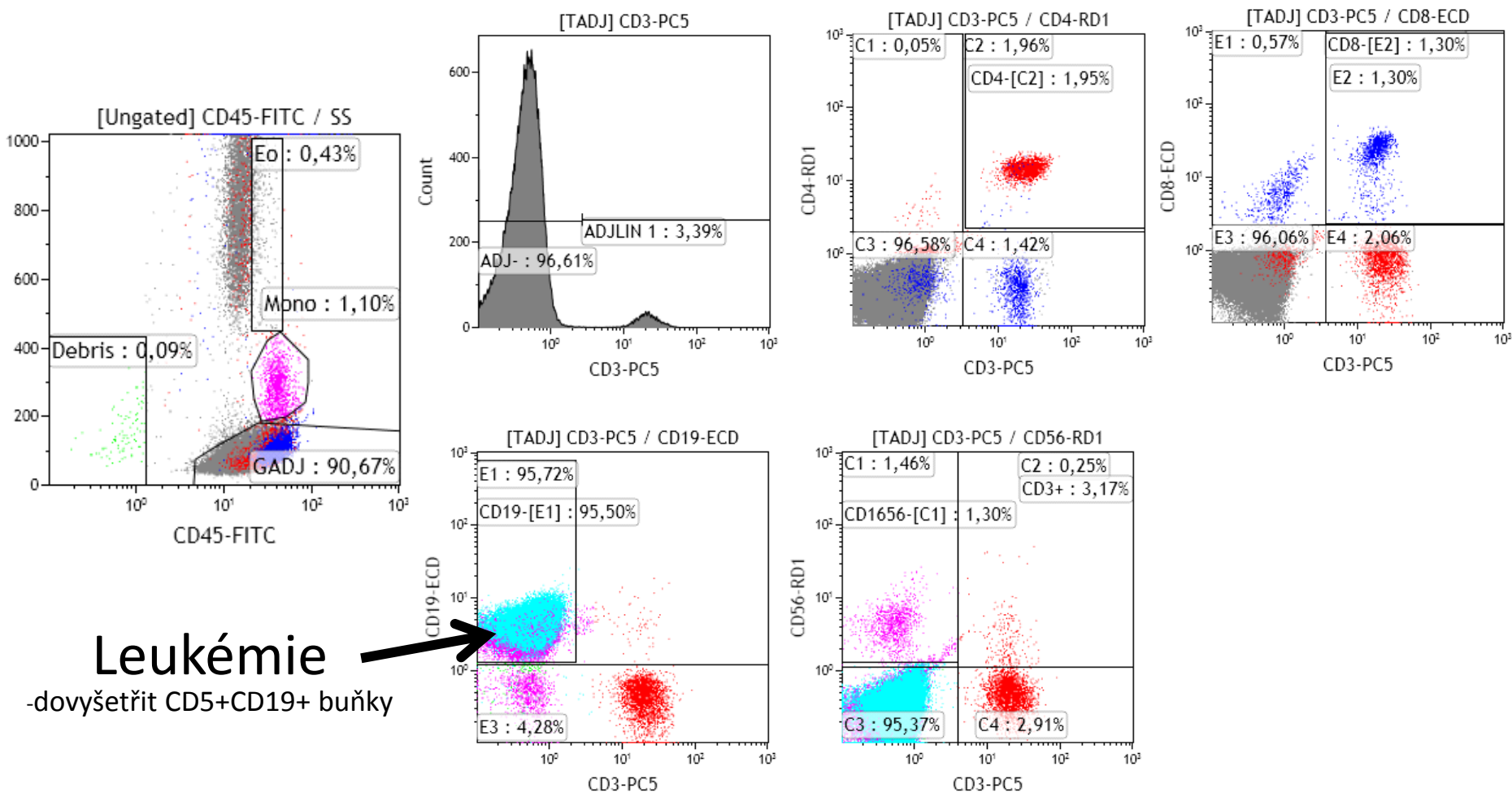
při převráceném poměru CD4+/CD8+
- podezření na sarkoidózu

Pacientka: Ž, *1957

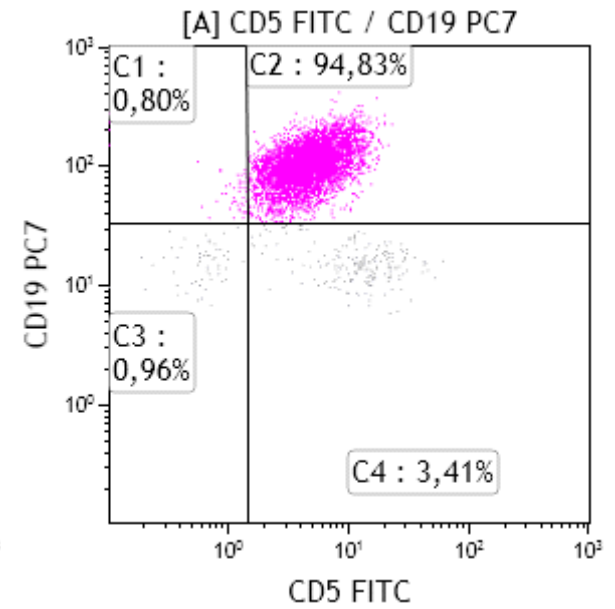
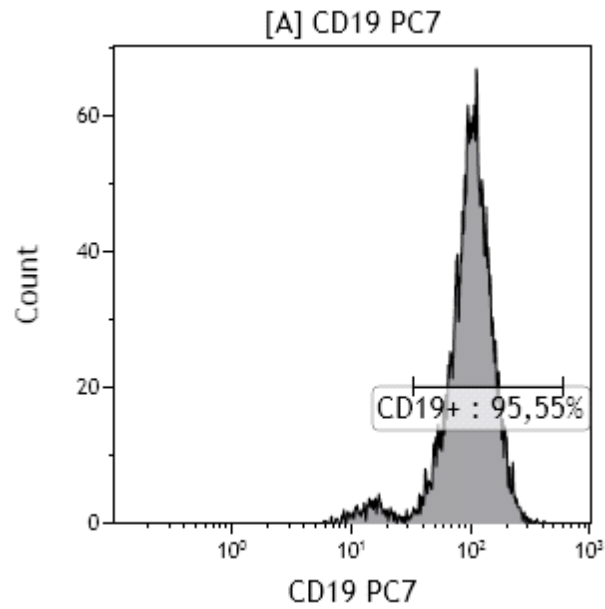
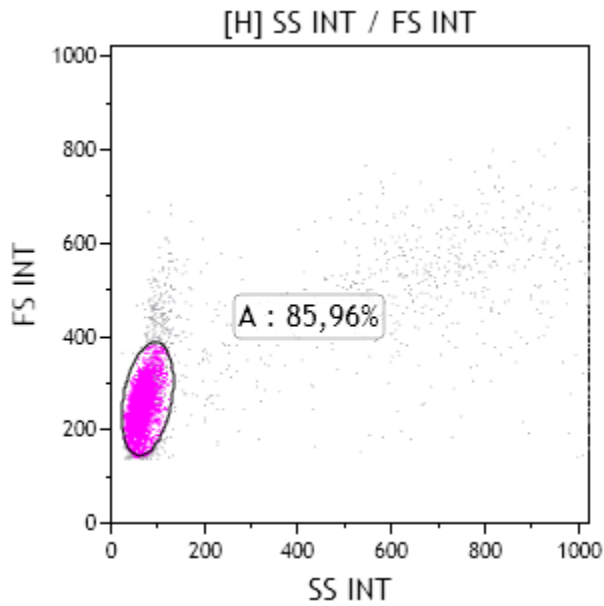


- pacientka z revmatologie
- léčba např. rituximabem způsobuje depleci B-lymfocytů (po 4-6 měsících návrat k normálním hladinám)

Pacient: muž, * 1966

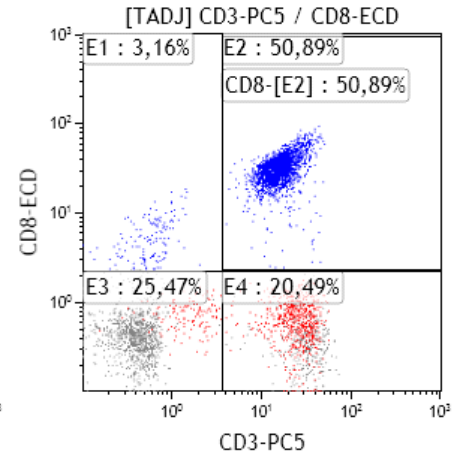
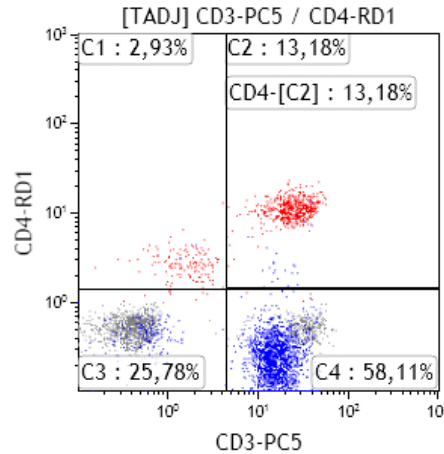
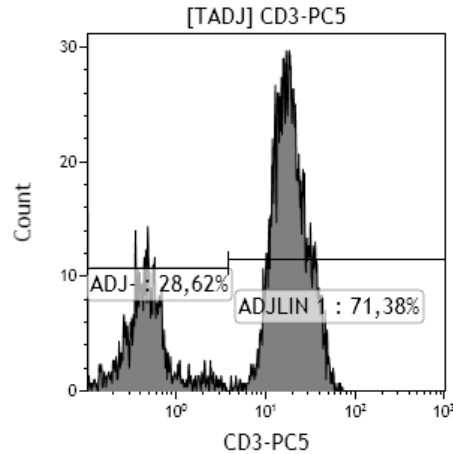
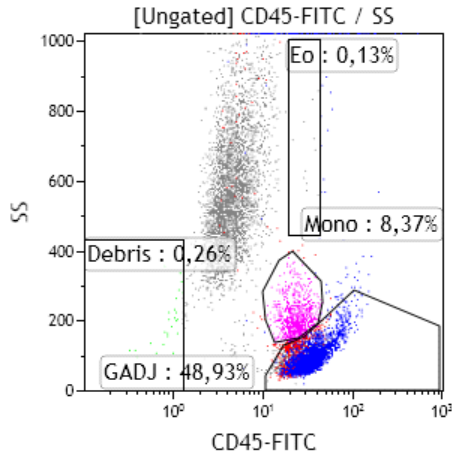


CD5+CD19+



CD5+CD19+ : 94.8%

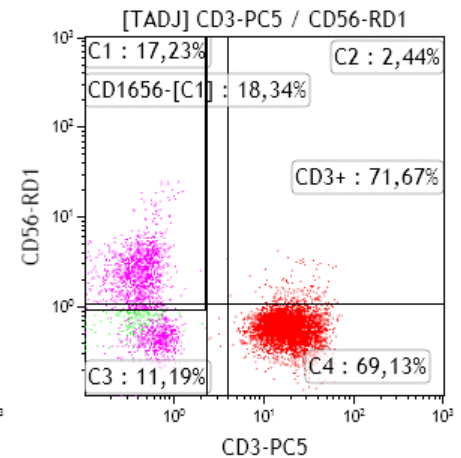
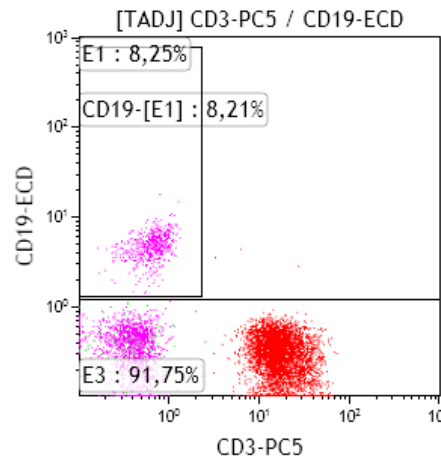
Pacient: M, *1999



**převrácený poměr
CD4/CD8!**

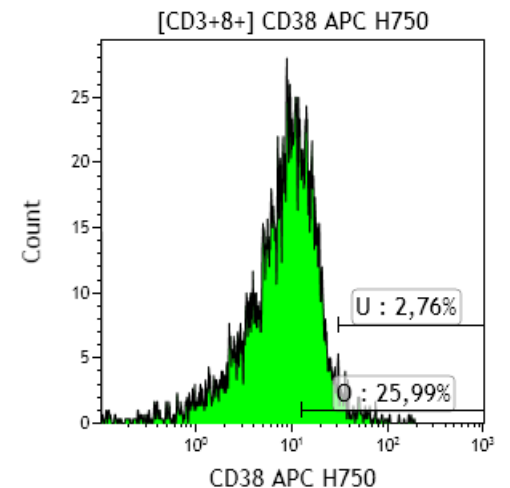
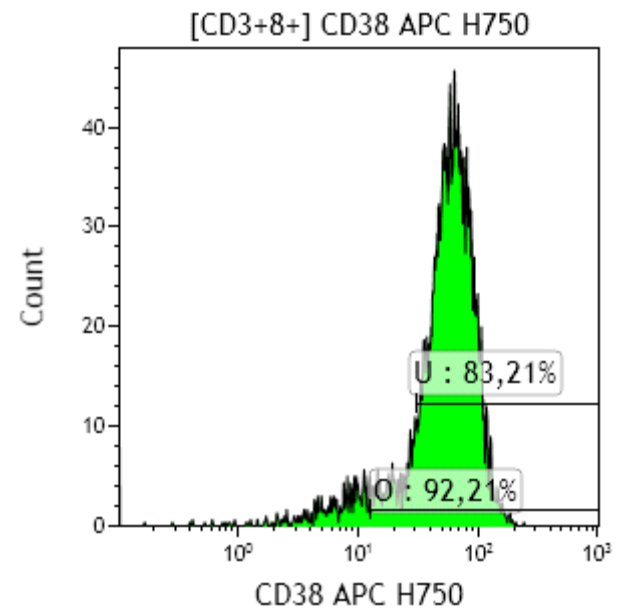
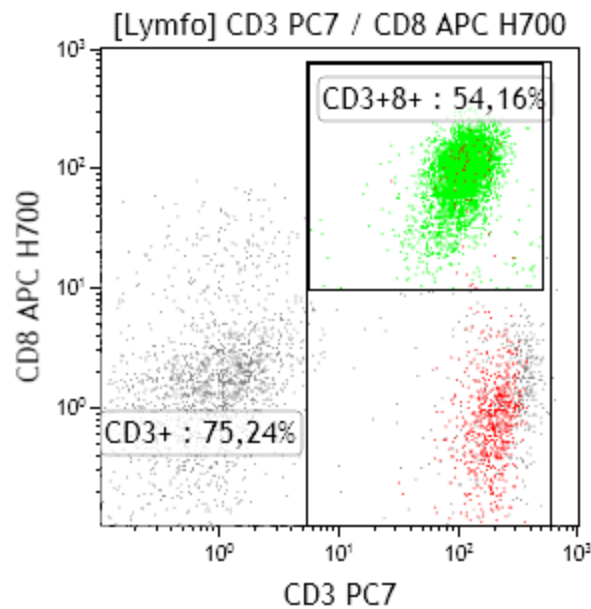
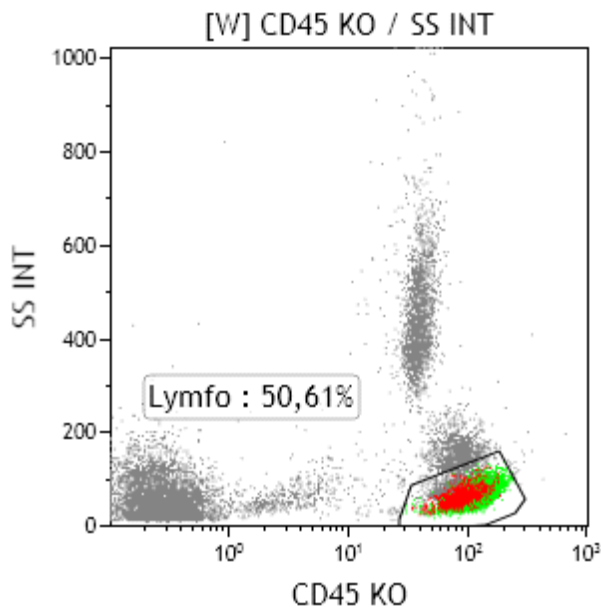
CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

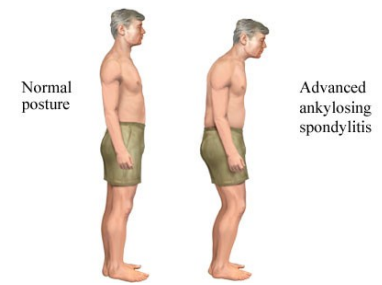


virová infekce???

CD8+CD38+ 83,2%
CD8++CD38++ 92,2%

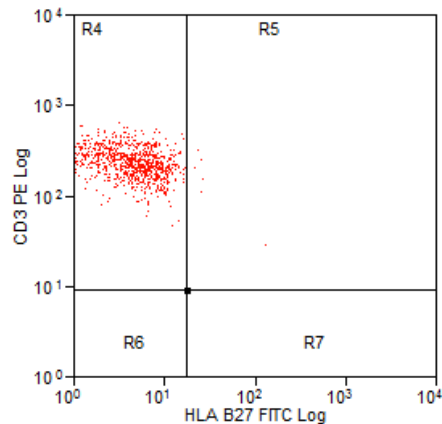


HLA-B27

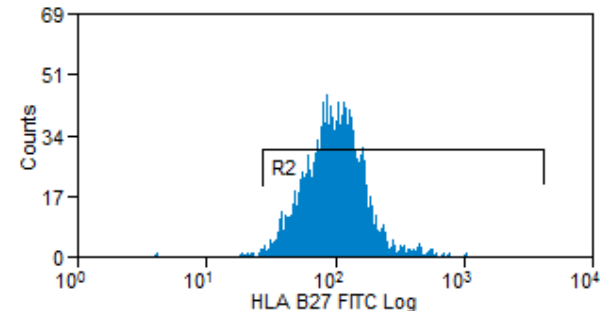
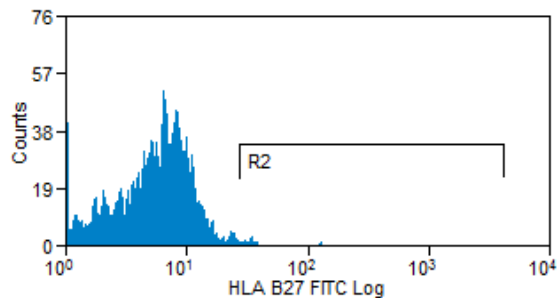
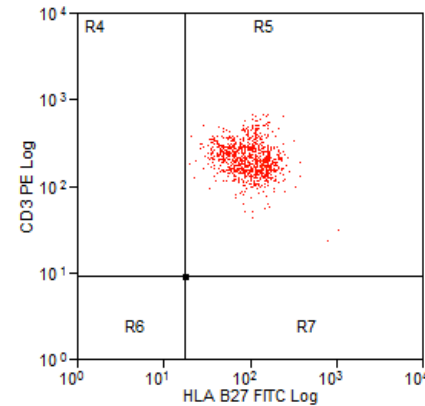


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida (zánětlivé systémové onemocnění osového skeletu a kloubů - **Bechtěrevova nemoc**).

negativní



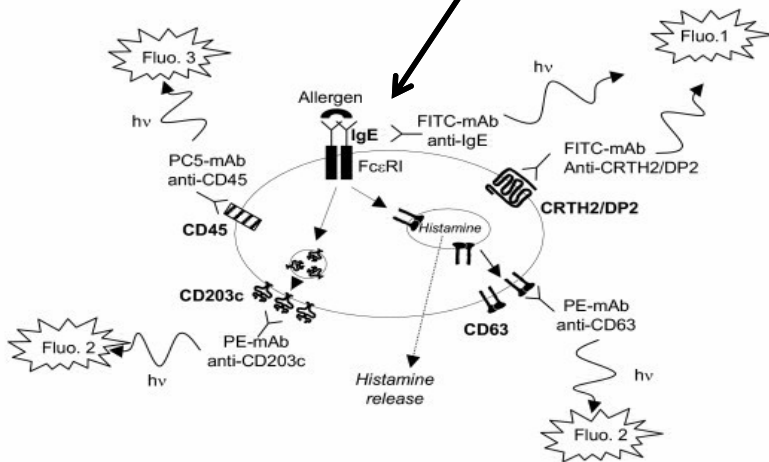
pozitivní



Test aktivace bazofilů (bazotest)

funkční test umožňující vyšetření aktivace basofilů po setkání se s určitým alergenem in vitro

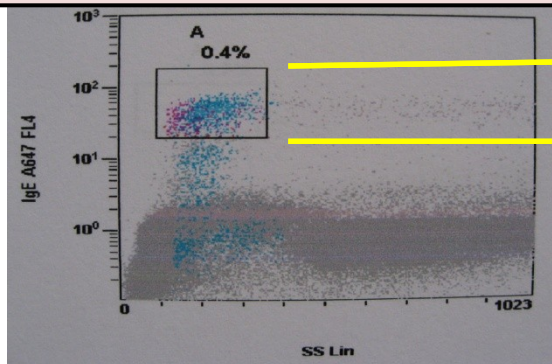
na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)
- CD203c



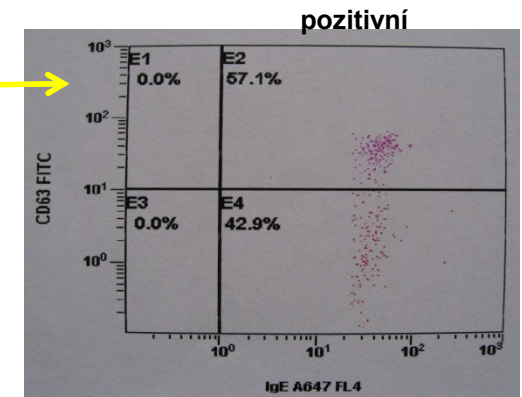
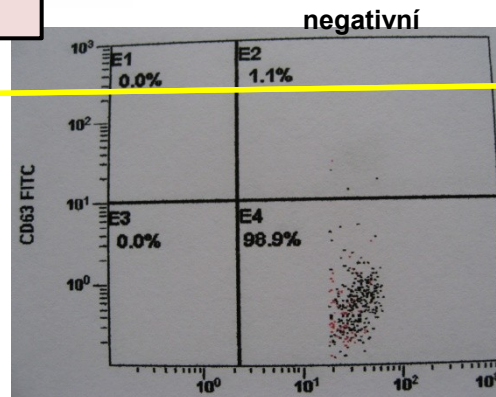
založen na expresi aktivačního znaku (CD63) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem in vitro

Reakce přecitlivělosti jsou podstatou alergických onemocnění. Reakce přecitlivělosti I. typu neboli **IgE** **mediovaná alergie** - je zprostředkována protilátkami IgE. IgE se naváže na bazofily ve fázi senzibilizace. Při dalším setkání s alergenem – alergen přemostí IgE, to vede k aktivaci bazofilů - masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů → **zvýšená exprese CD63 a CD203c** na aktivovaných bazofilech.

ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)



Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů





DĚKUJI ZA POZORNOST!