

# Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulací

Jana Nechvátalová

Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně



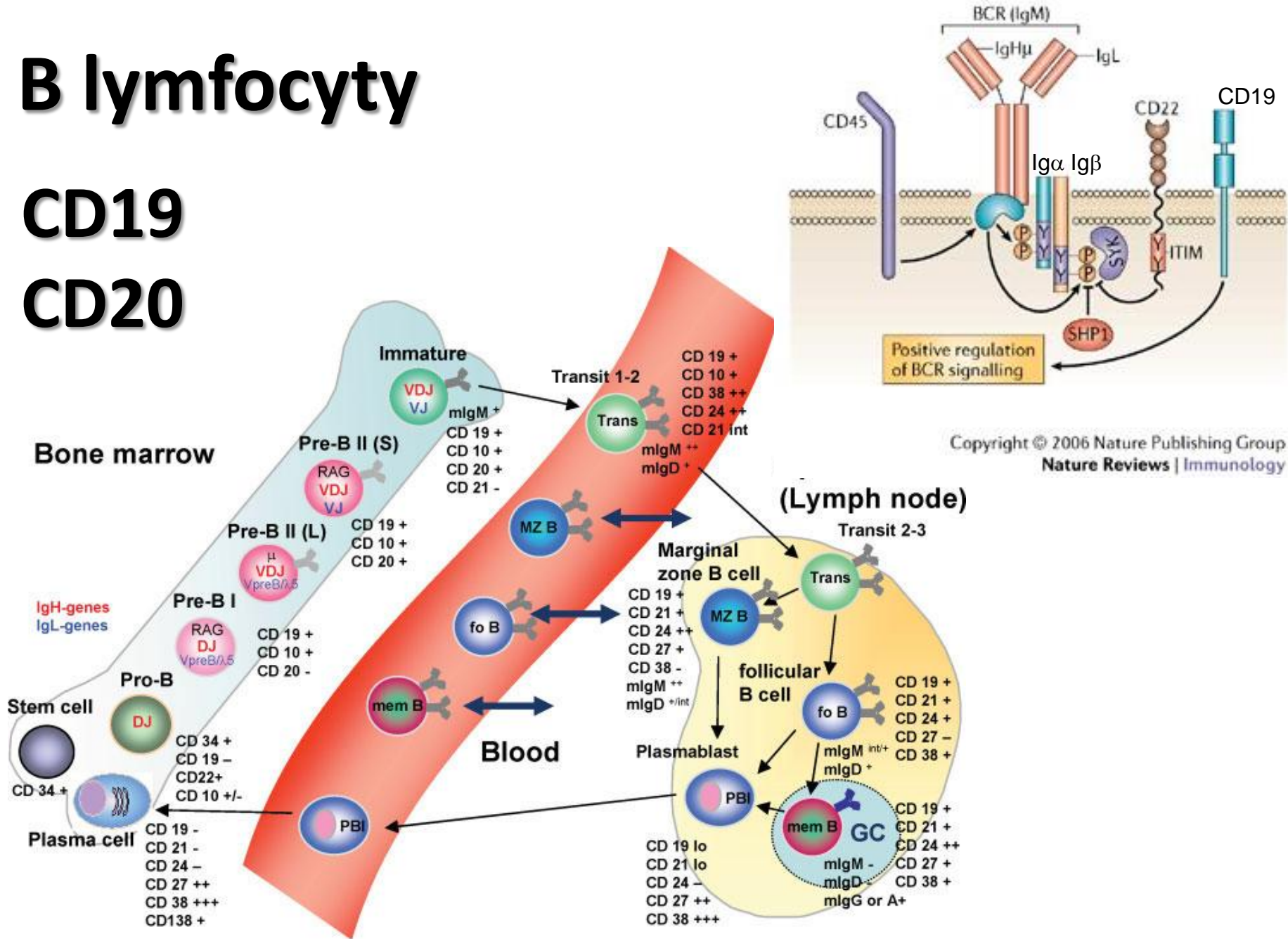
# Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

- **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



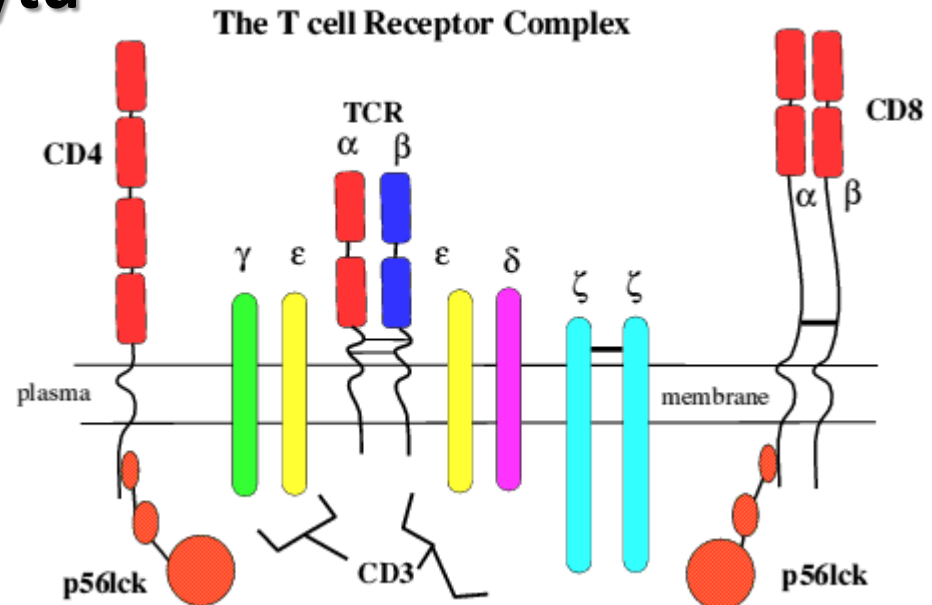
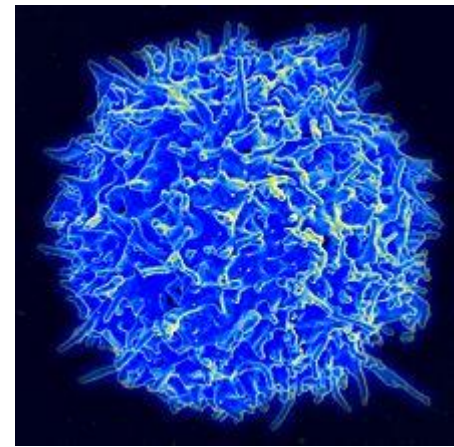
Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

# T lymfocyty

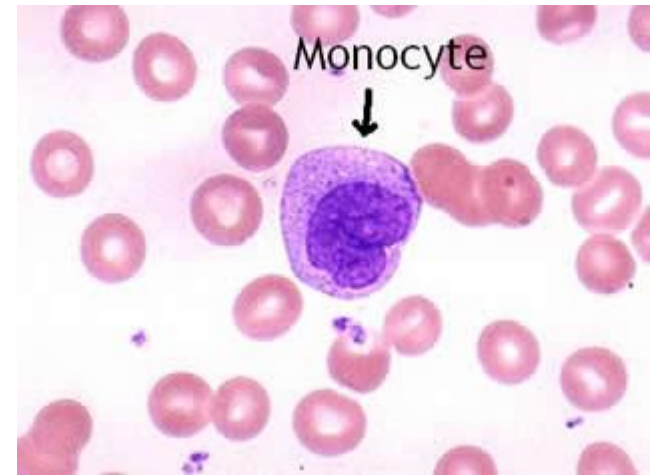
CD3 na povrchu všech T lymfocytů

CD4 na povrchu  $T_H$  lymfocytů ( $T_H1$ ,  $T_H2$ )

CD8 na povrchu  $T_C$  lymfocytů



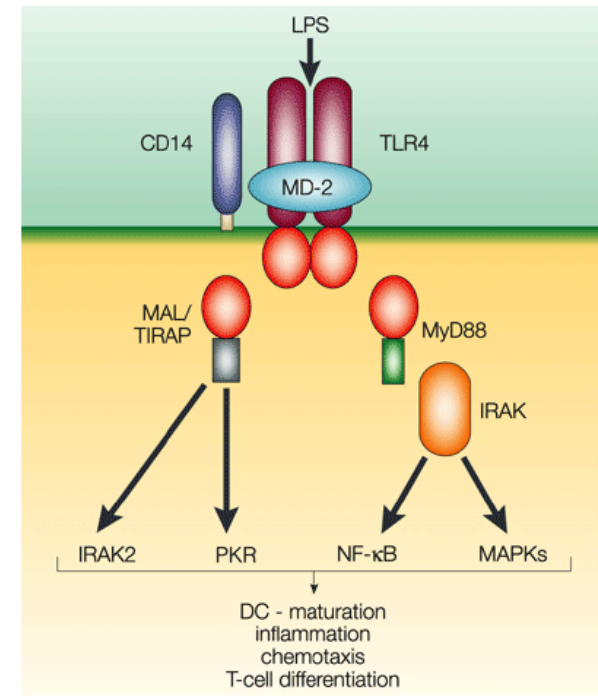
# Monocyty



**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)



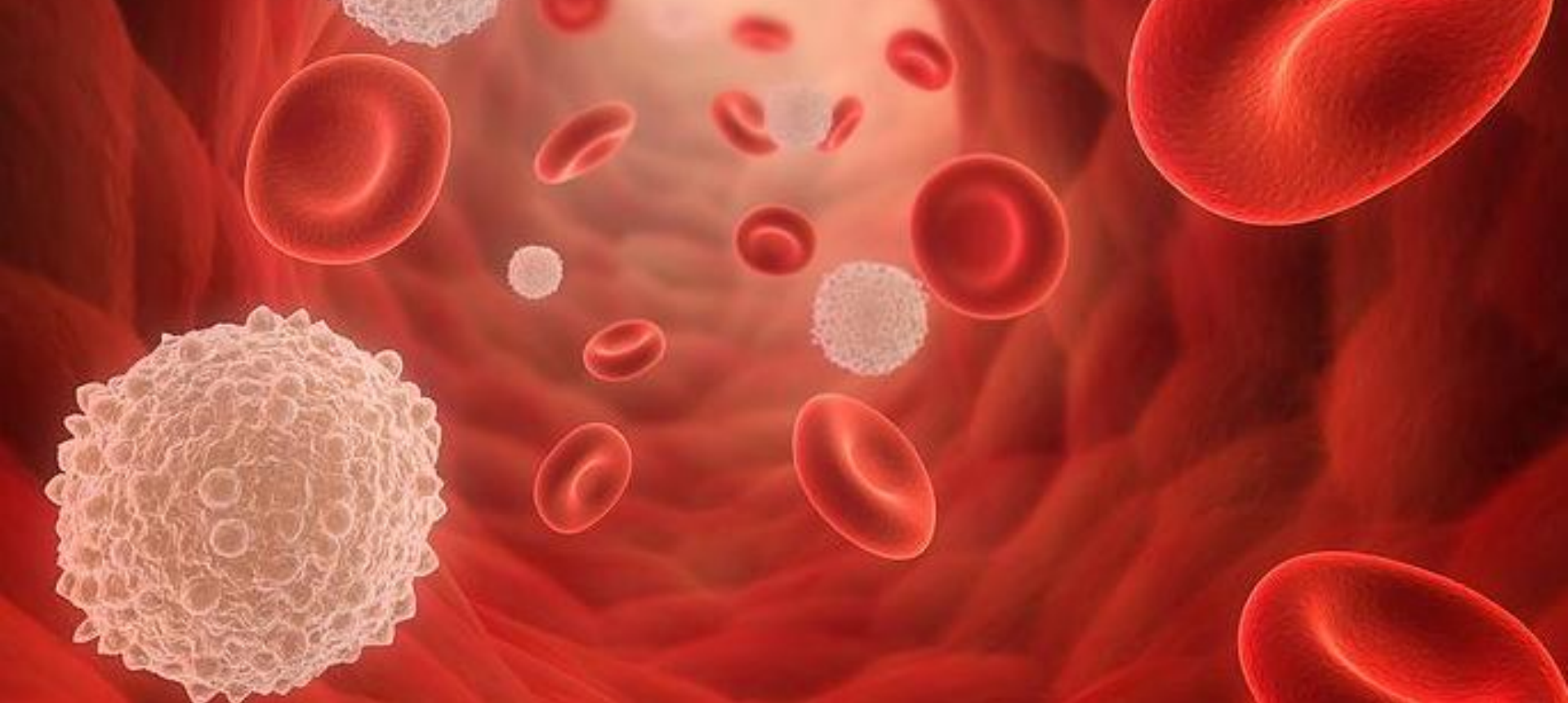
© Eye of Science/Photo Researchers, Inc.

Pozn. **NKT** buňky

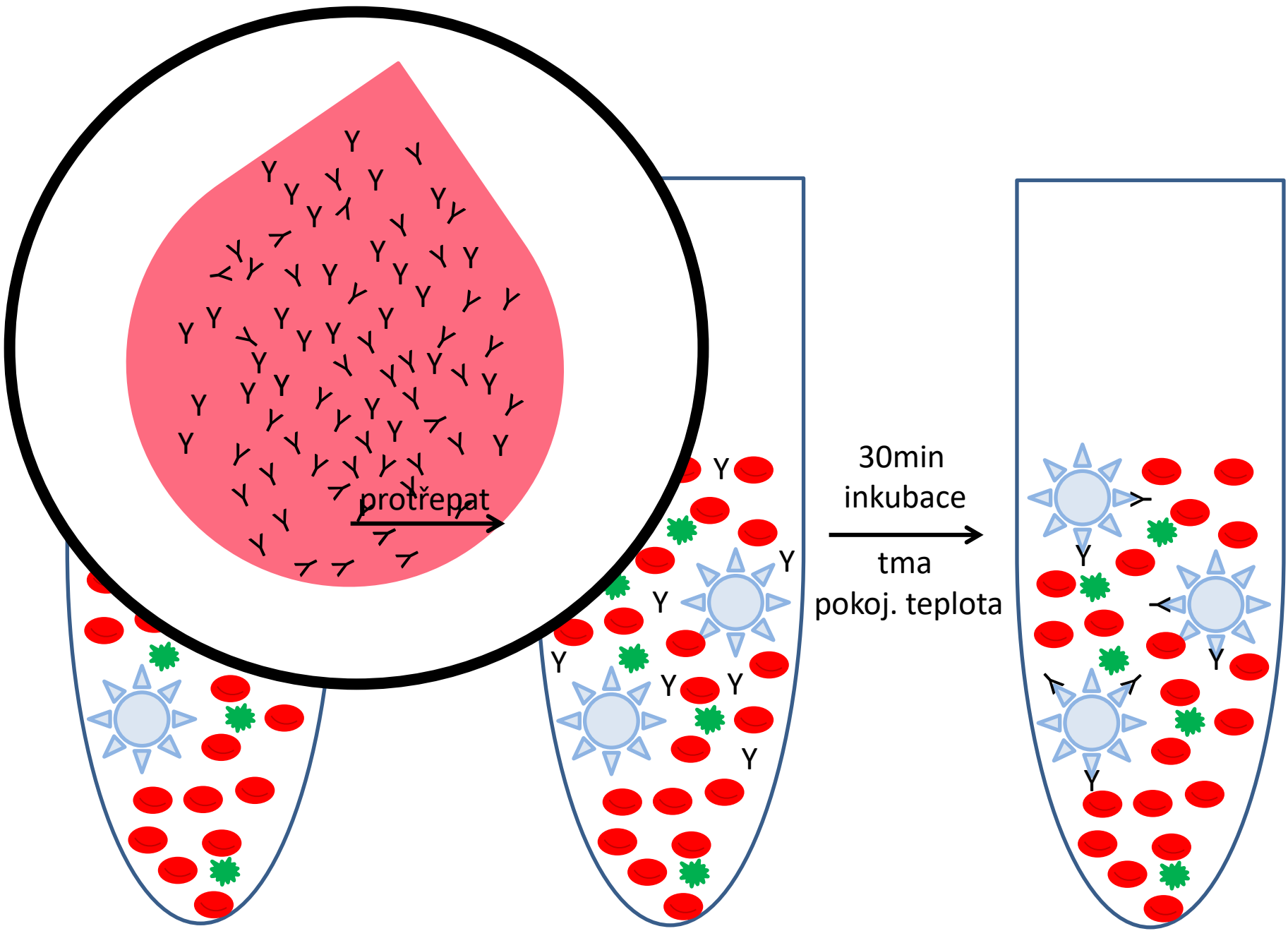
**CD16+**

**CD56+**

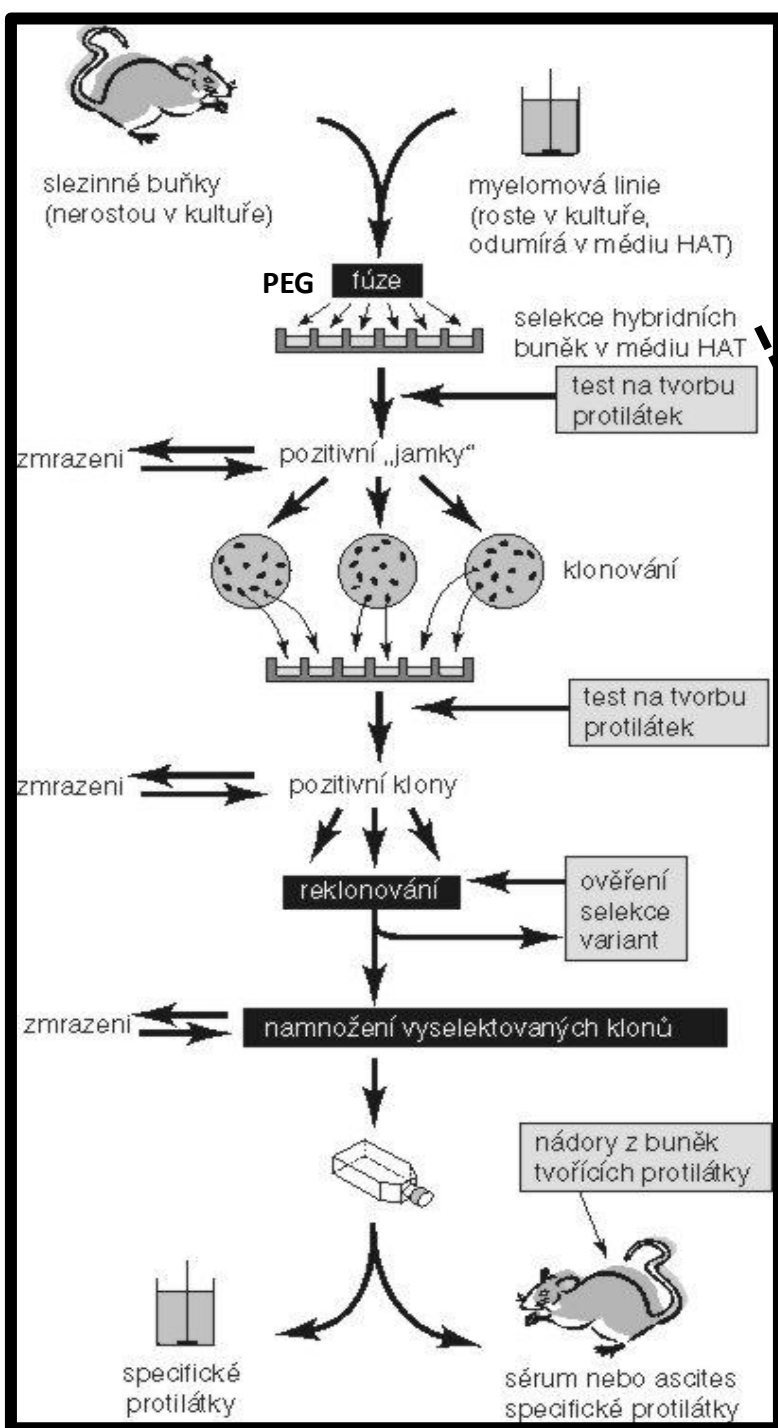
**CD3+**



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





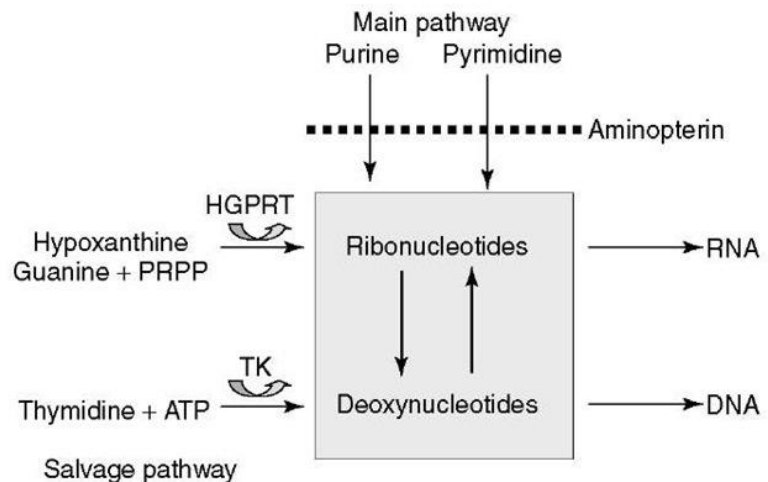


# Mnoklonální protilátky

- 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

## SELEKCE HYBRIDNÍCH BUNĚK V MÉDIU HAT

hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium



HGPRT= hypoxantin(guanin)-fosforibozyltransferasa; TK=thymidinkinasa



# 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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 21,75 g NaCl,  
46,95 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

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

# Průtoková cytometrie

## FLOW CYTOMETRY

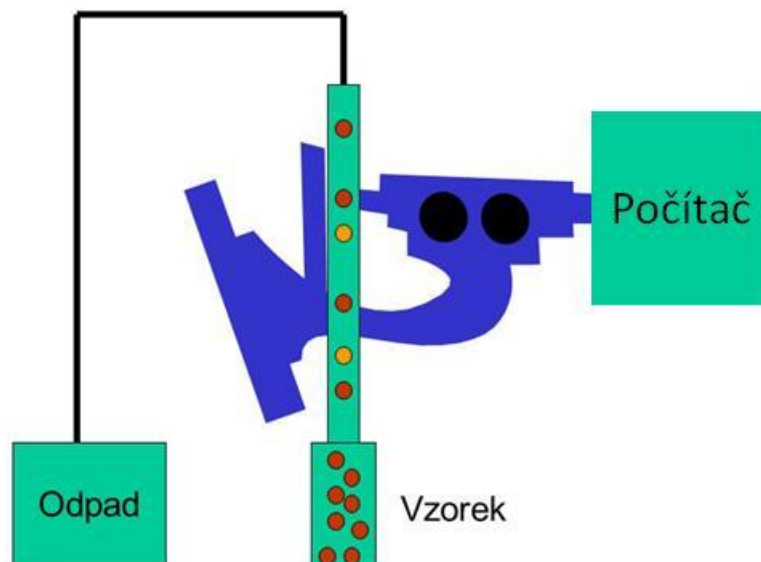


# Průtoková cytometrie

flow+cyto+metrie - „měření buněk v pohybu“

- možnosti analýzy mnoha vlastností a charakteristik na úrovni jedné buňky během krátkého časového úseku
- měření současně více než 20 markerů na jedné buňce
- určování fenotypu buněk, monitorování odpovědi na léčbu, výzkum signalizačních drah
- klíčovým nástrojem pro výzkum poruch krvetvorby

**Průtoková cytometrie** je technologie umožňující současně měření a analýzu několika fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých částic, které jsou unášeny v proudu kapaliny a prochází paprskem světla.



# Využití

- Klinické využití (imunofenotypizace)
- Buněčná biologie (DNA, RNA analýza)
- Mikrobiologie (rezistence na antibiotika, kintetika)

# Co měříme?

- Odražené světlo a emitovanou fluorescenci
- Částice o velikosti 0,2-150 $\mu\text{m}$
  
- Prokaryotické a eukaryotické buňky
- Virové částice, bakterie, houby
- Komplexy antigen-protilátky

# Princip průtokové cytometrie

Při průchodu částic laserovým paprskem dochází k rozptylu světla a k fluorescenci navázaných fluorochromů

Světelné signály jsou převedeny na elektrické pomocí detektorů (fotonásobiče)

Na každé buňce je možné změřit několik parametrů zároveň

Naměřená data se ukládají a dále analyzují



# Tři hlavní systémy průtokového cytometru

## Fluidní systém

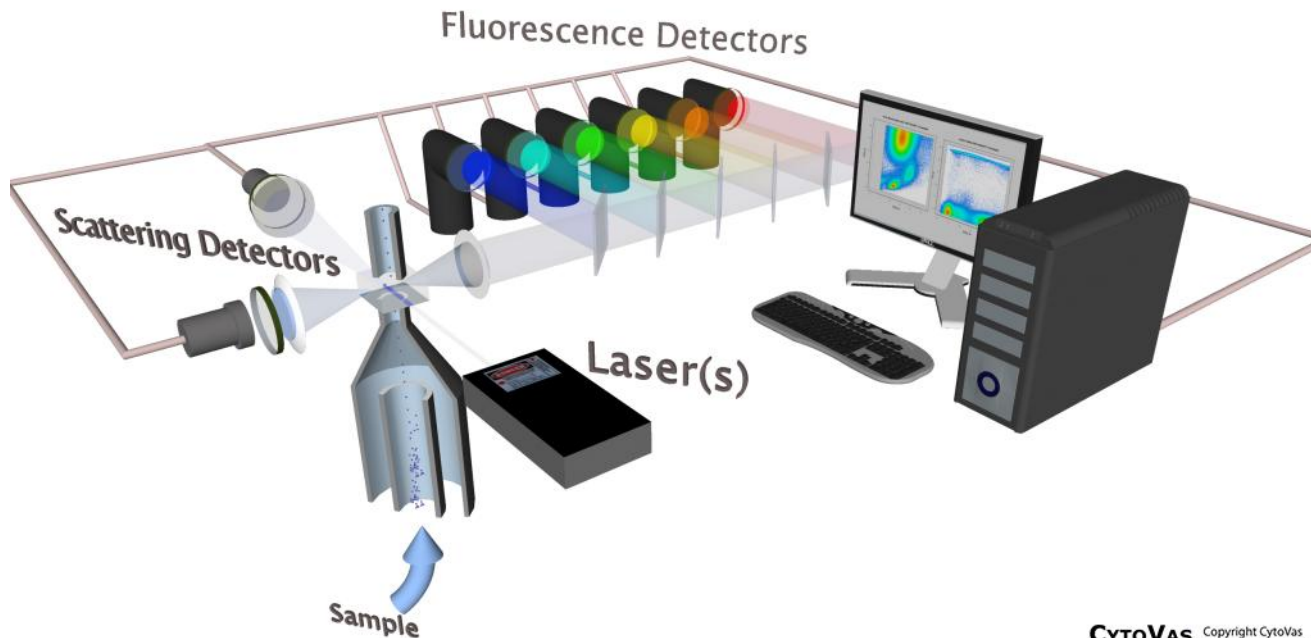
transport částic k laserovému paprsku

## Optický systém

laser, zrcadla a optické filtry

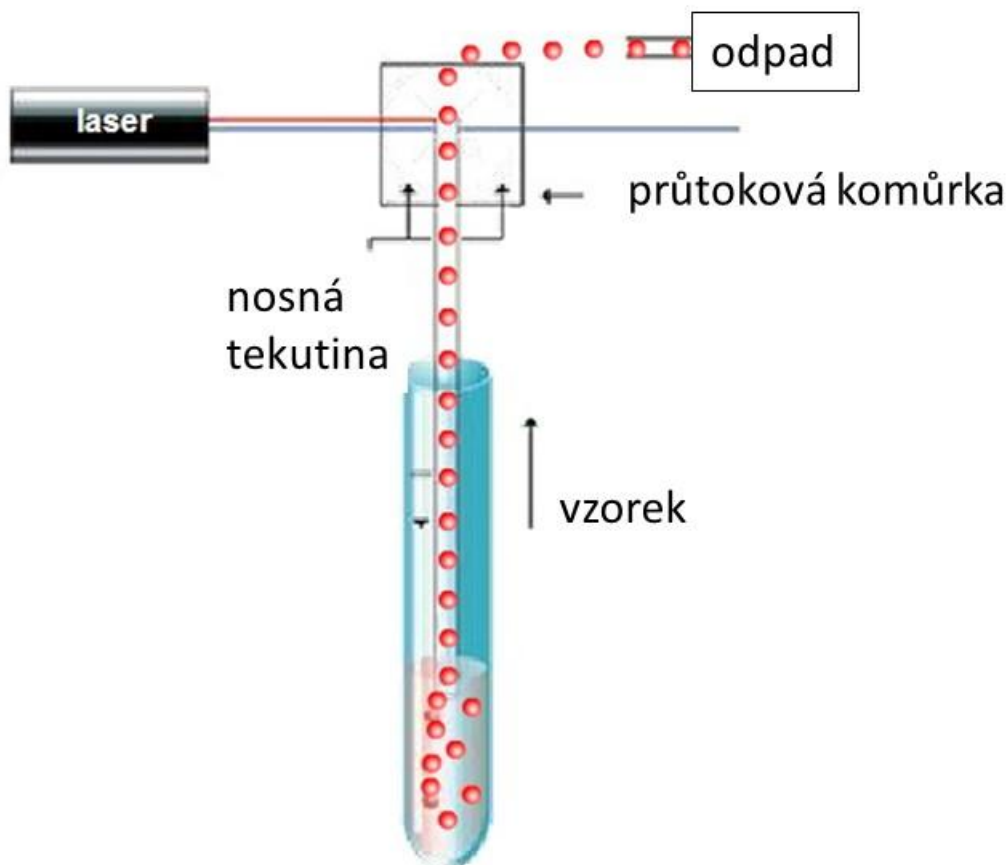
## Elektronický systém

převod detekovaných světelných signálů na signály elektronické, které mohou být vyhodnoceny počítačem



# Fluidika

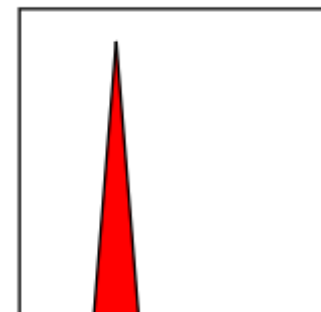
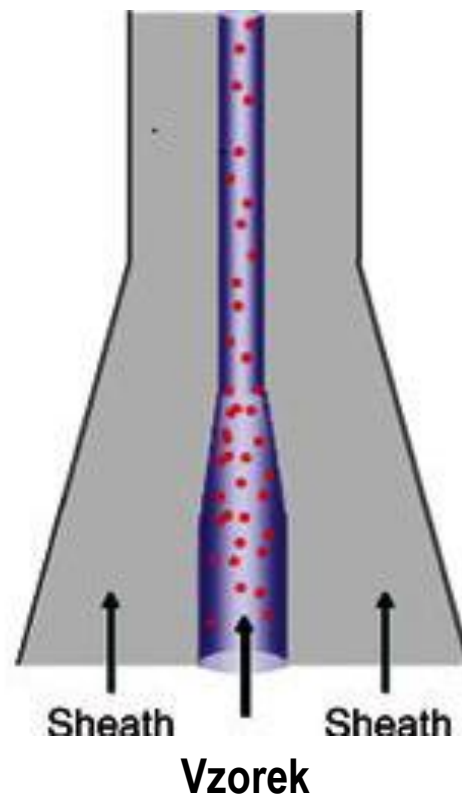
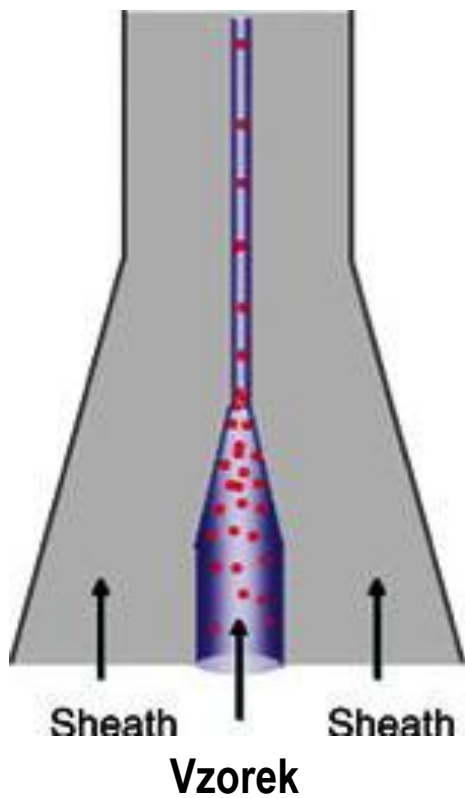
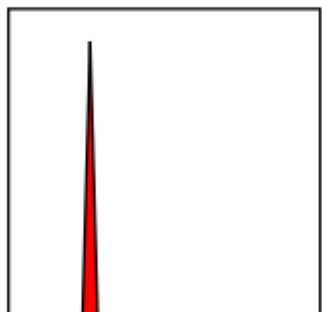
- transport částic v proudu nosné tekutiny k laserovému paprsku



HYDRODYNAMICKÁ FOKUSACE - vzorek je vstříkovan do proudu nosné tekutiny, která proudí rychleji. Buňky vzorku jsou strhávány jedna za druhou. Proudění nosné tekutiny je laminární - pohyb tekutiny v jednom směru.

Nízký tlak vzorku  
Úzký proud vzorku  
Vhodné pro DNA analýzu

Vysoký tlak vzorku  
Široký proud vzorku  
Nevhodné pro DNA analýzu



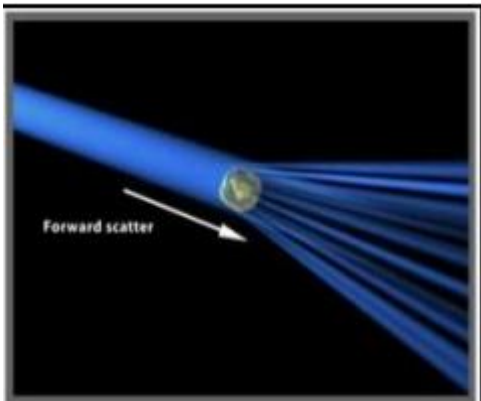
# Velikost vs. granularita

Light Scatter: procházející částice vychýlí dopadající světlo

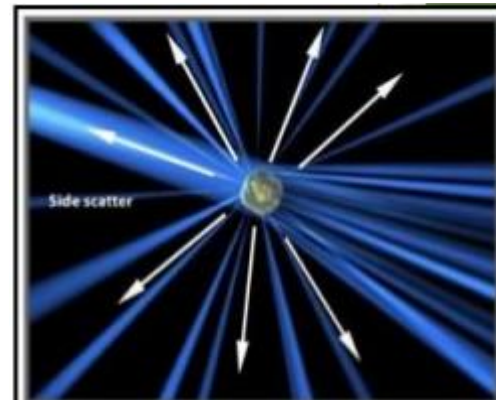
Forward Scatter (velikost)

Side Scatter (granularita)

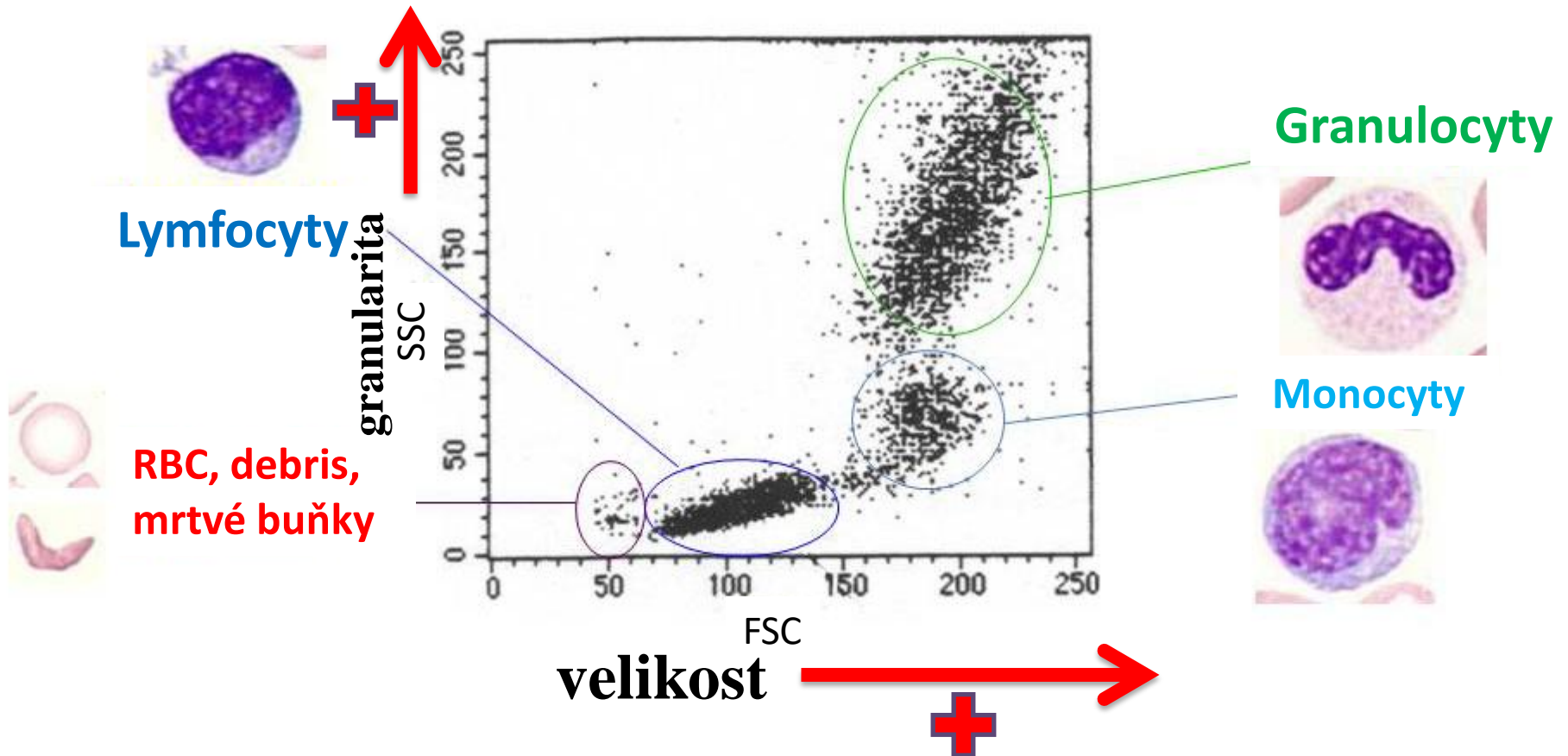
Přímý rozptyl - velikost buněk



Boční rozptyl - granularita buněk



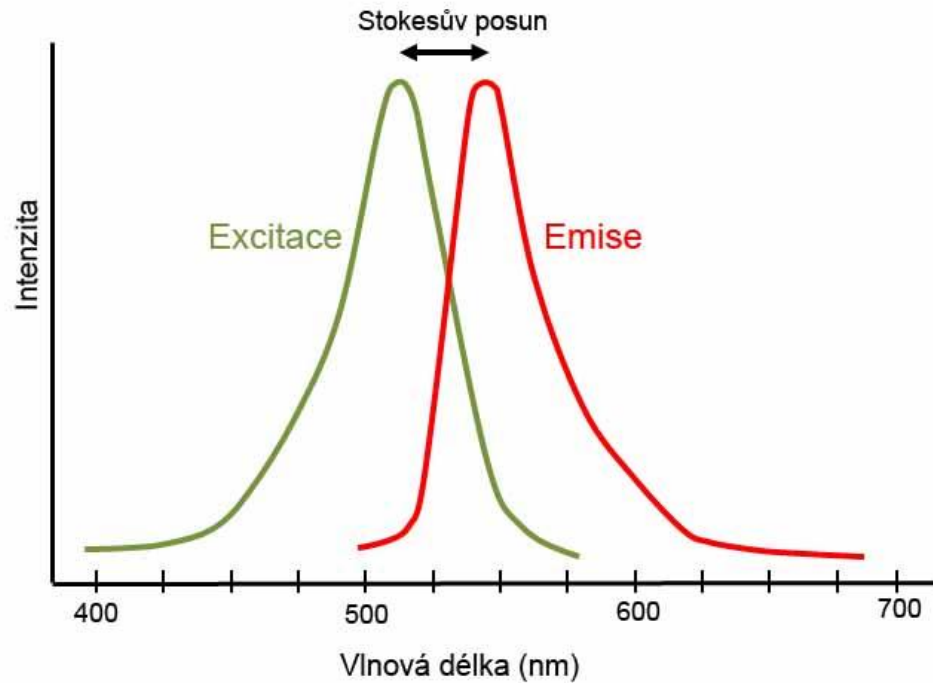
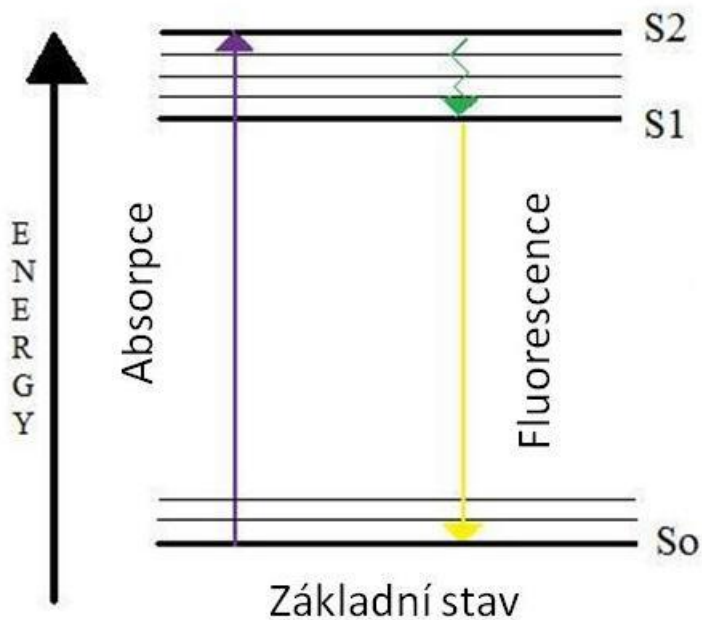
# FSC vs. SSC



# Fluorescence

Mnoho buněk má stejnou či podobnou morfologii

- fluorochromy značené monoklonální protilátky specifické k určitému epitopu



# Fluorochromy

- Jsou excitovány vhodnou vlnovou délkou
- Emitují světlo o specifické delší vlnové délce
- I neznačené buňky mohou být fluorescentní díky slabé autofluorescenci

# Fluorescence

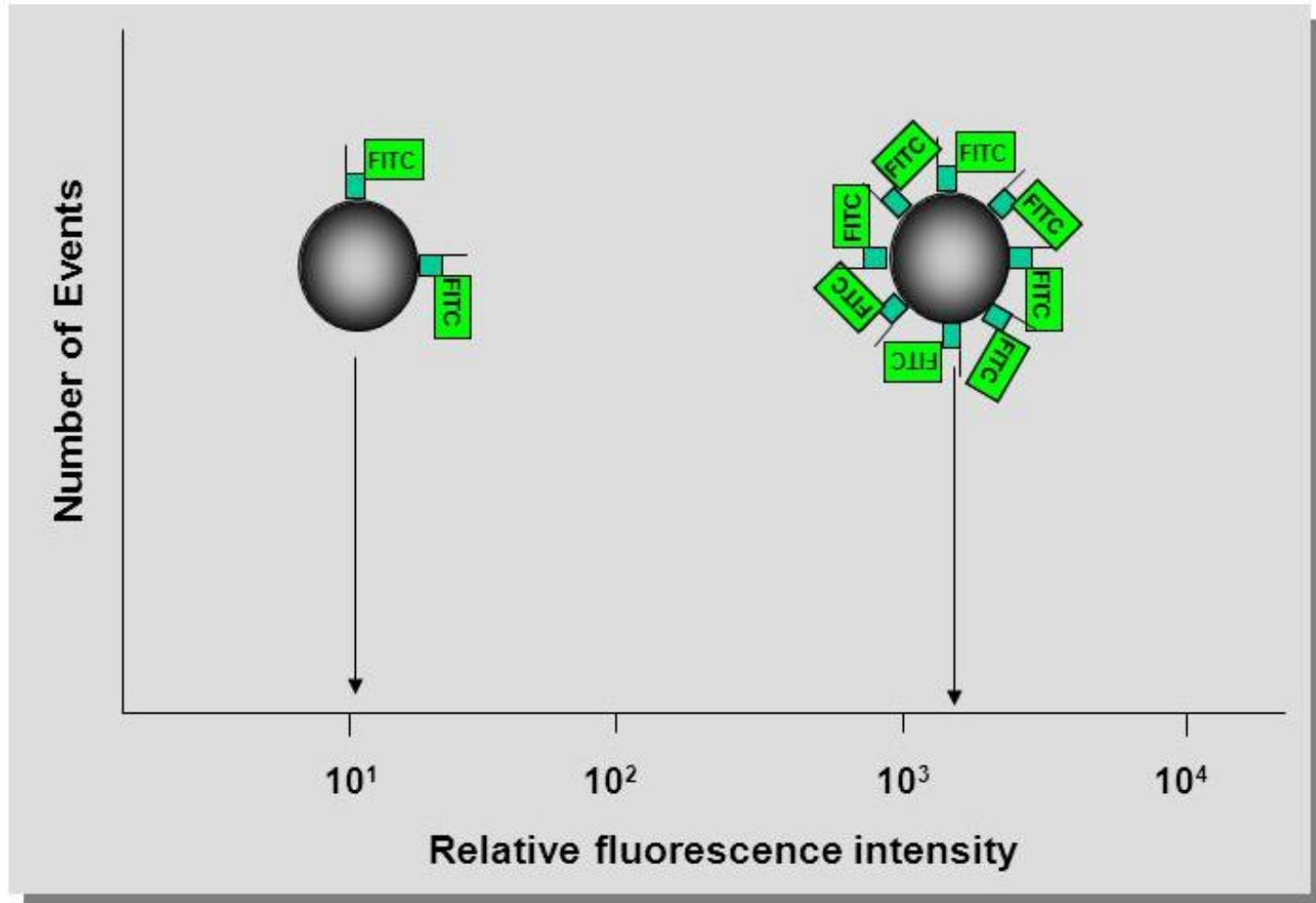
## Fluorochromy:

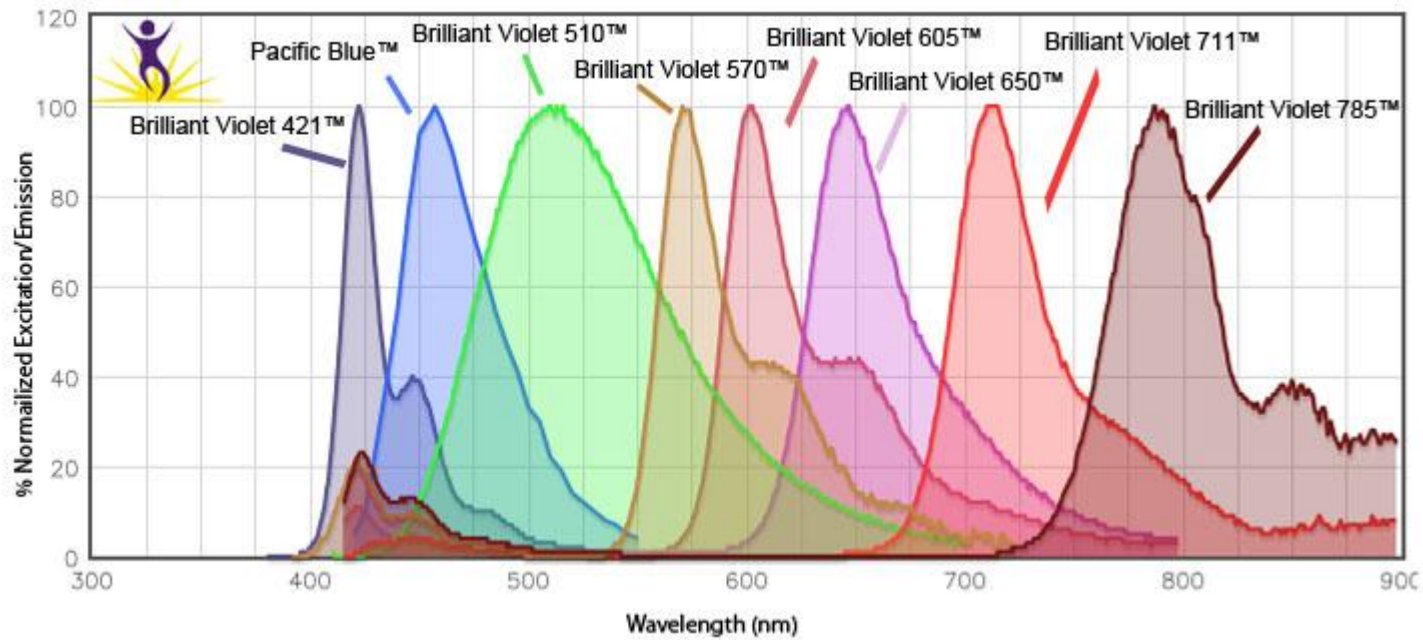
- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
  - Fluorescein isothiokyanát (FITC)**, Cyaniny, Texas Red, řada Alexa, řada Pacific and Cascade,  
AmCyan, *Propidium iodide*, 7-AAD, CFSE,
- Fluorescenční proteiny
  - Phycoerythrins (PE)**, Allophycocyanin, PerCP, GFP a jiné fluorescenční proteiny

***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***



# Intenzita fluorescencija

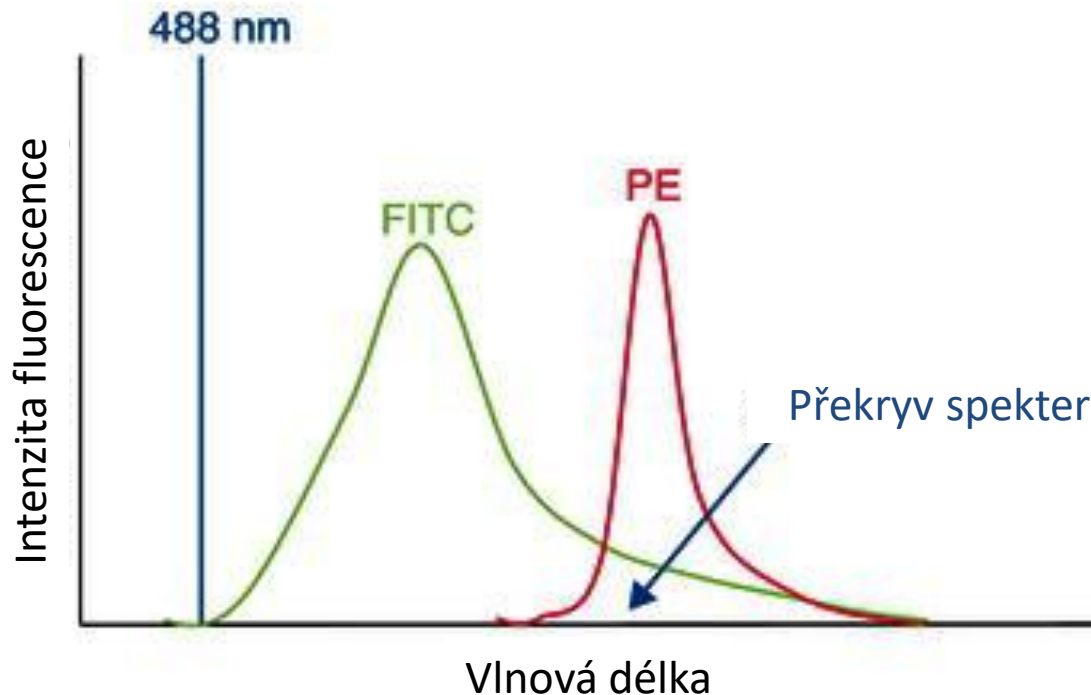




# Překryv spekter

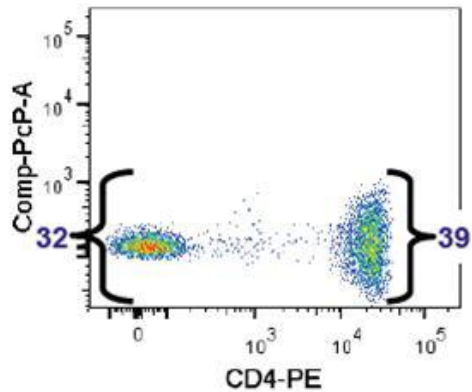
Fluorochromy typicky emitují světlo v širokém spektru vlnových délek

V závislosti na uspořádání filtrů, detektory mohou zachytit fluorescenci od jiných fluorochromů, které jsou detekovány v jiných kanálech (tzv. přesvit, překryv spekter)

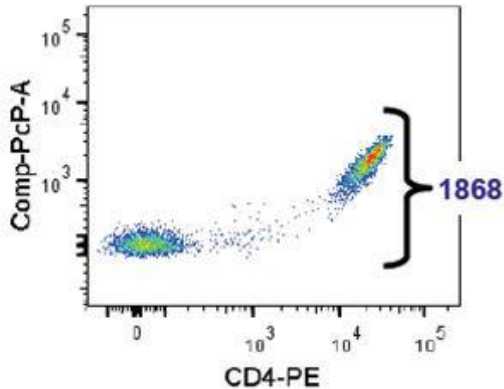


# Kompenzace

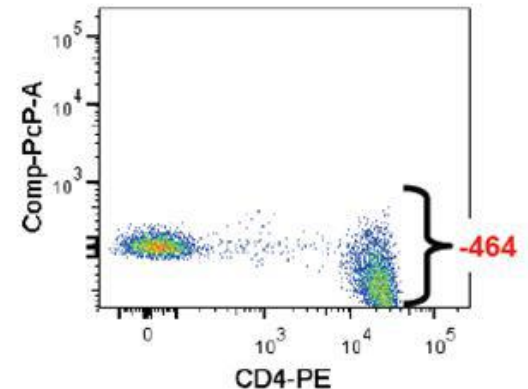
Přesvit je třeba „kompenzovat“, tak aby detektor zaznamenal signál pouze 1 fluorochromu



Properly compensated



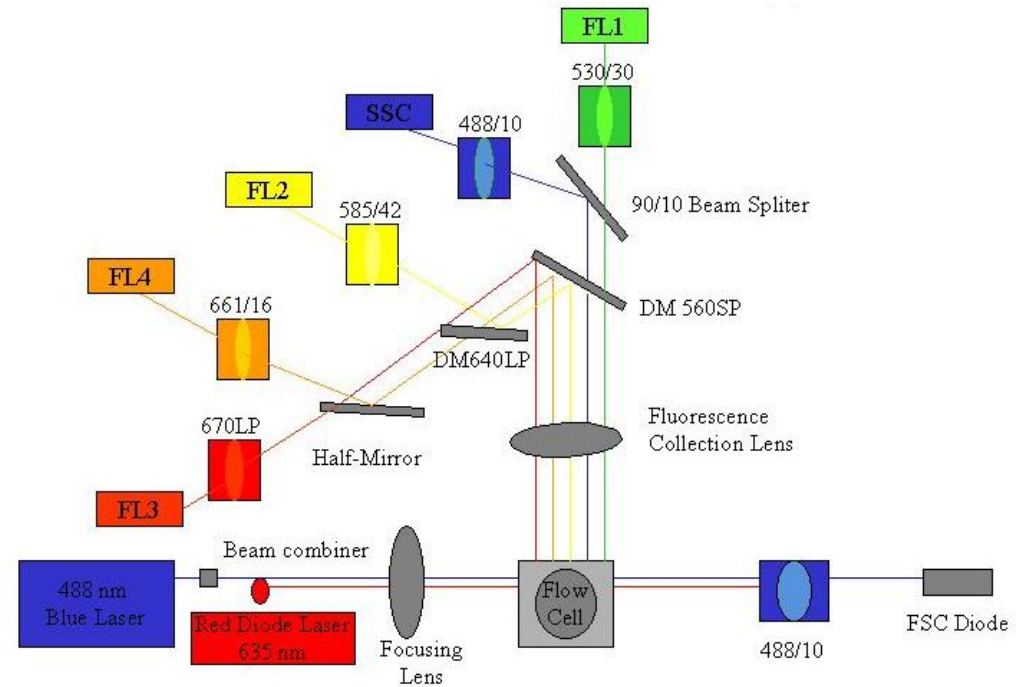
Under compensated

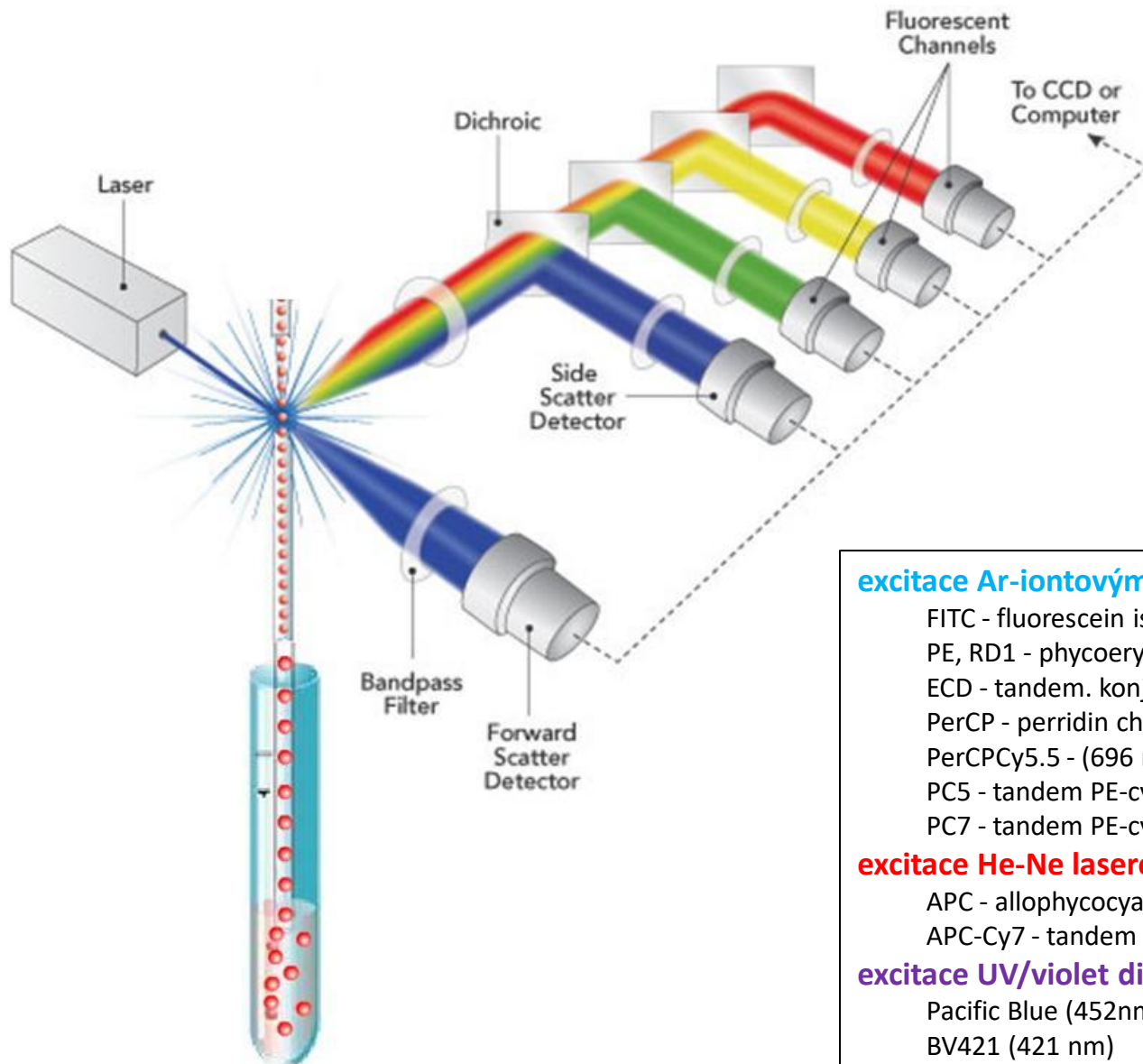


Over compensated

# Optika

- Excitační optika  
laser a systém čoček,  
které zaostřují a směřují  
laserový paprsek
- Sběrná optika  
soustava čoček, zrcadel  
a filtrů, které vedou  
a rozdělují světlo různých  
vlnových délek na  
příslušné detektory





**excitace Ar-ionovým laserem (modrý) - 488 nm**

- FITC - fluorescein isothiokyanát (530 nm)
- PE, RD1 - phycoerythrin (580 nm)
- ECD - tandem. konjugát PE-texaská červeň (620 nm)
- PerCP - perridin chlorophyl (678 nm)
- PerCPCy5.5 - (696 nm)
- PC5 - tandem PE-cyanine 5 (620 nm)
- PC7 - tandem PE-cyanine 7 (778 nm)

**excitace He-Ne laserem/red diode (červený) - 633 nm**

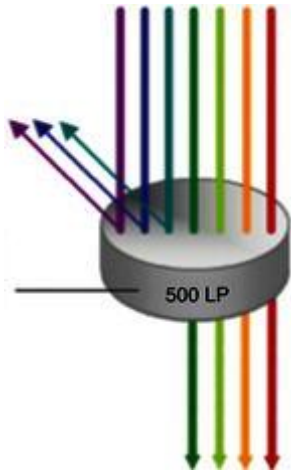
- APC - allophycocyanin (670 nm)
- APC-Cy7 - tandem APC-cyanine 7 (778 nm)

**excitace UV/violet diode (fialový laser) - 405 nm**

- Pacific Blue (452nm),
- BV421 (421 nm)
- BV510 (510nm)

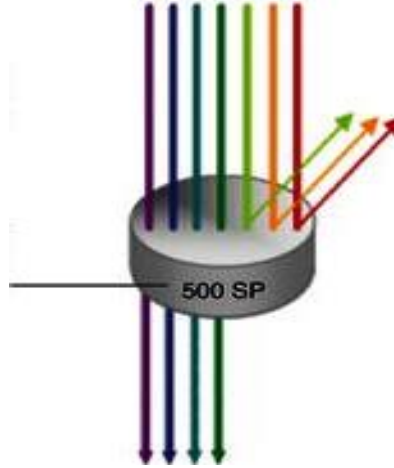
# Optické filtry

**Long Pass filtry (LP)**  
propouští všechny délky  
vyšší než specifikovaná  
vlnová délky



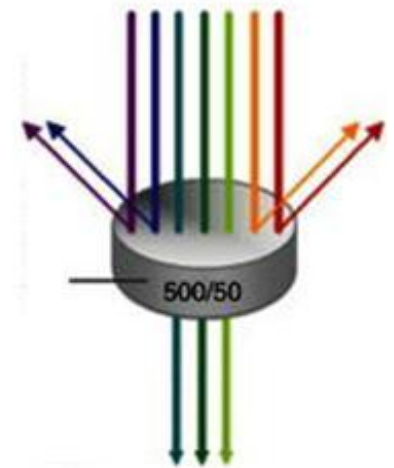
500LP

**Short Pass filtry (SP)**  
propouští všechny délky  
kratší než specifikovaná  
vlnová délka



500SP

**Band Pass filtry (BP)**  
propouští specifické  
rozmezí vlnových délek

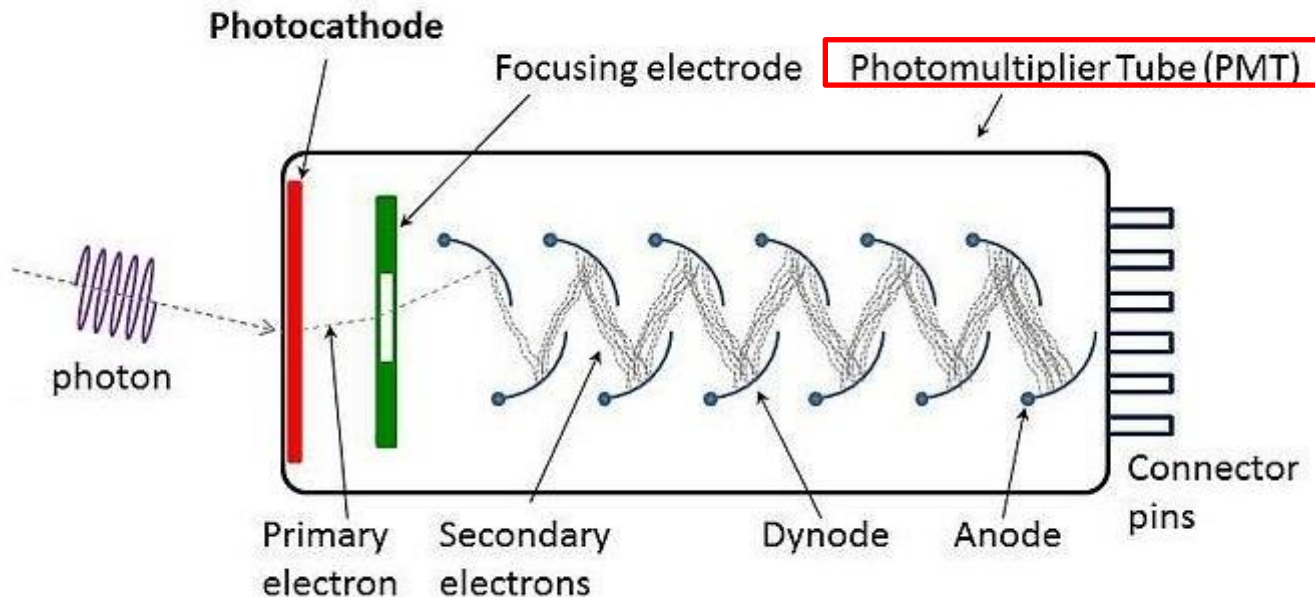


500/50  
500±25

Dichroické filtry - umístěny pod úhlem 45°  
část světla odráží pod úhlem 90°, část propouští

# Elektronika

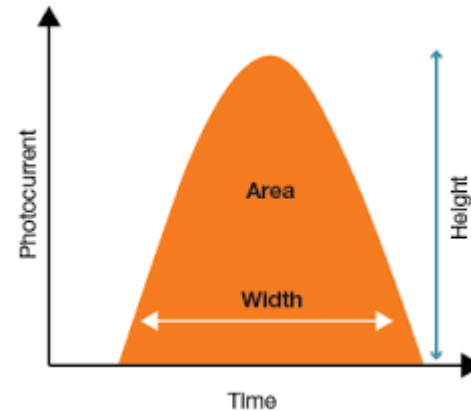
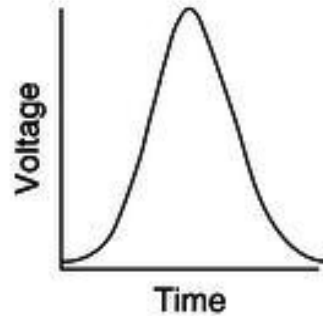
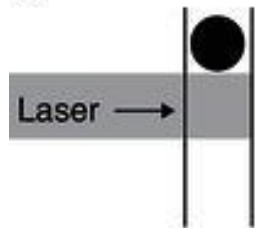
- Světelné signály jsou převáděny na elektrické
- Detektory:
  - diody a fotonásobiče (PMT, photomultiplier tube)
  - (FSC) (SSC a fluorescncce)



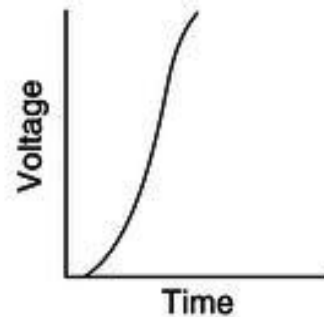
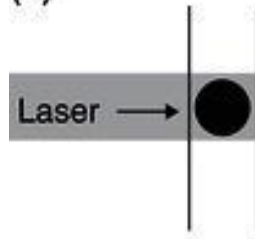


# Vznik napět'ového pulzu

(c)



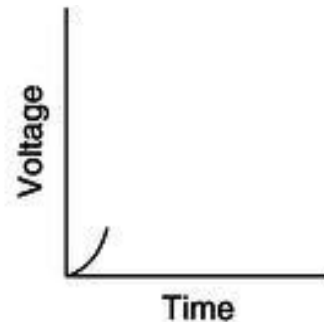
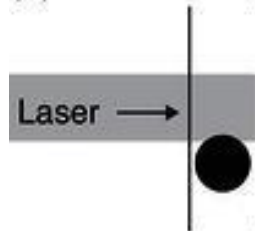
(b)



Výška:  
maximální hodnota fluorescence či scatteru

Plocha:  
Integral pulzu

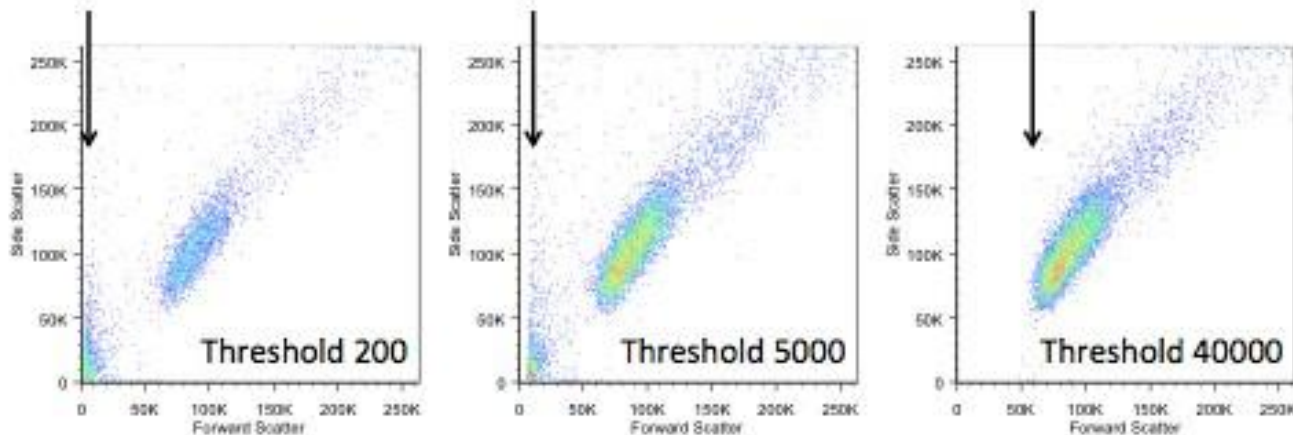
(a)



Šířka:  
Čas trvání pulzu

# Threshold (práh)

- Detektory jsou extrémě citlivé a detekují signály z různých zdrojů - prach, malé částice, debris
- K jejich eliminaci je třeba nastavit treshold
- Nastavuje se na jednom parametru
- Při imunofenotypizaci většinou FSC

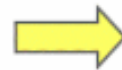


# Amplifikace a digitalizace signálu (Analogue to digital convertor, ADC převodník)

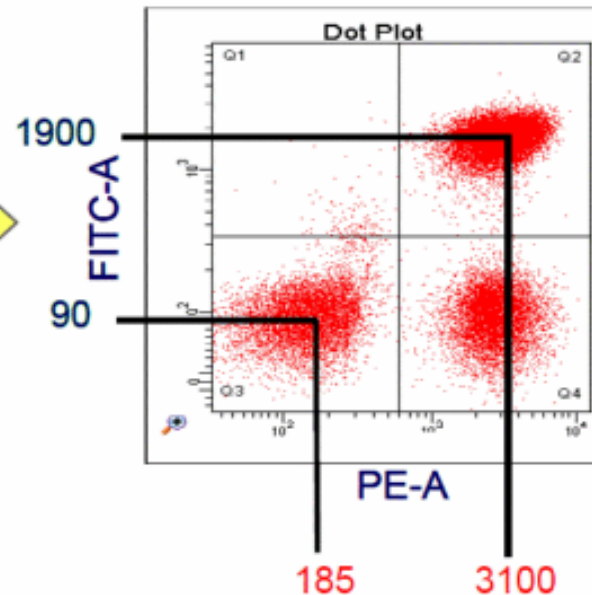
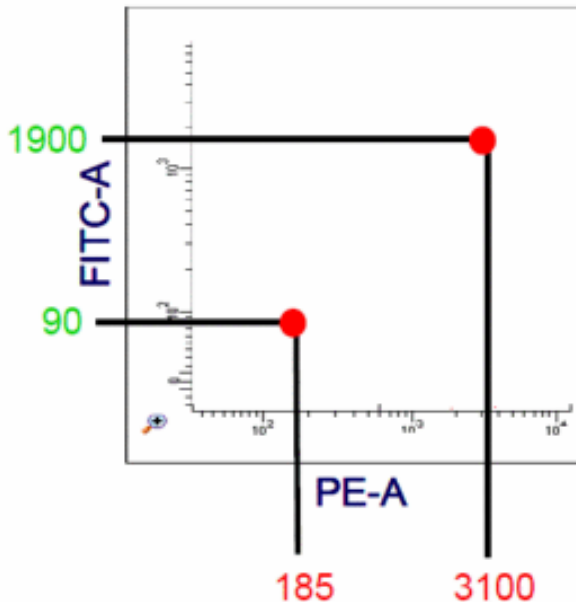
Analýza - pro každou buňku hodnoty všech parametrů

FCS-Data

	Time	FSC	SSC	FITC	PE
Event 1	0	60	120	90	185
Event 2	10	160	65	1900	3100
Event 3	30	650	160	2,688	3,189



Exportable as FCS File



# Analýza naměřených dat

Data v LIST MODE FILE

Analyzační software

Kaluza

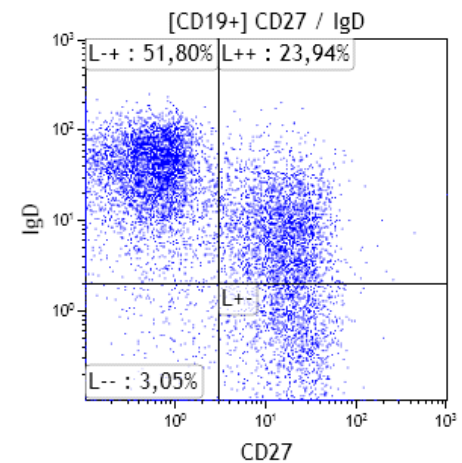
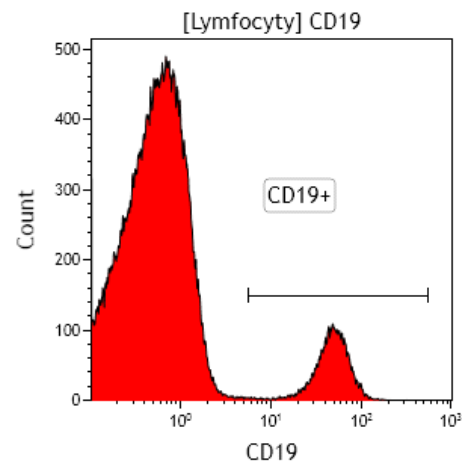
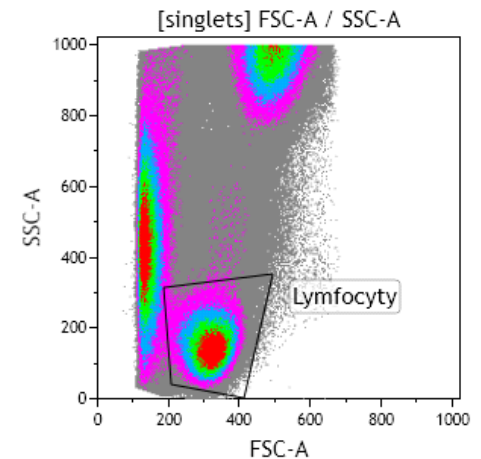
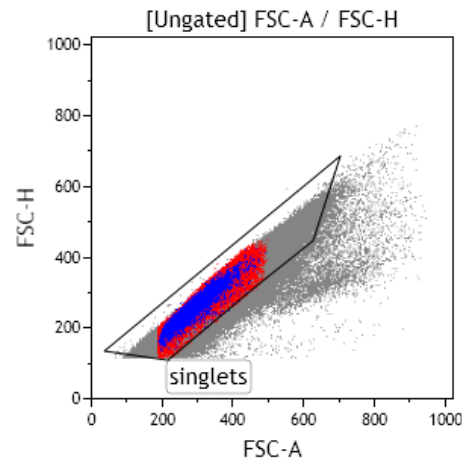
Infinicyt

DiVa

FlowJo

Summit

Vytvoření statistik



# Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

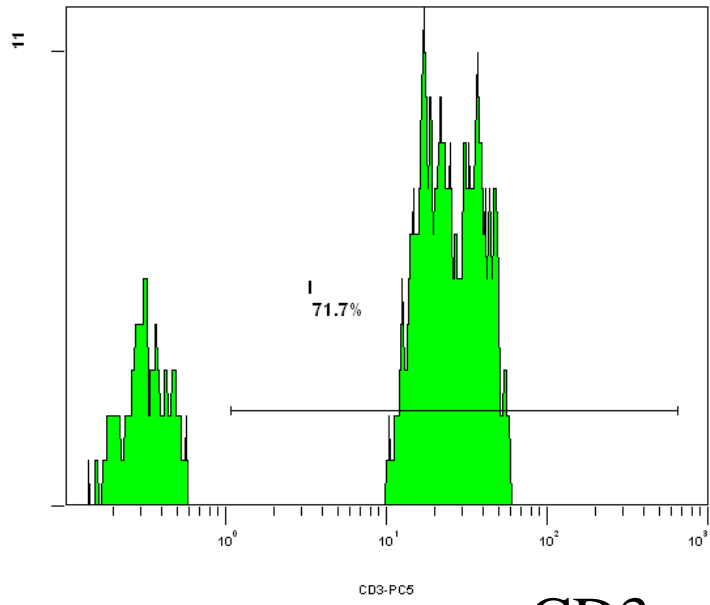
## výhody

- Velké množství analyzovaného materiálu - velké množství dat
- Analýza trvá pouze několik minut a poskytuje velké množství informací.
- Lze provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu.
- Jsou zde možné manipulační operace - např. třídít buňky s vybranými vlastnostmi (cell sorting)

## nevýhody

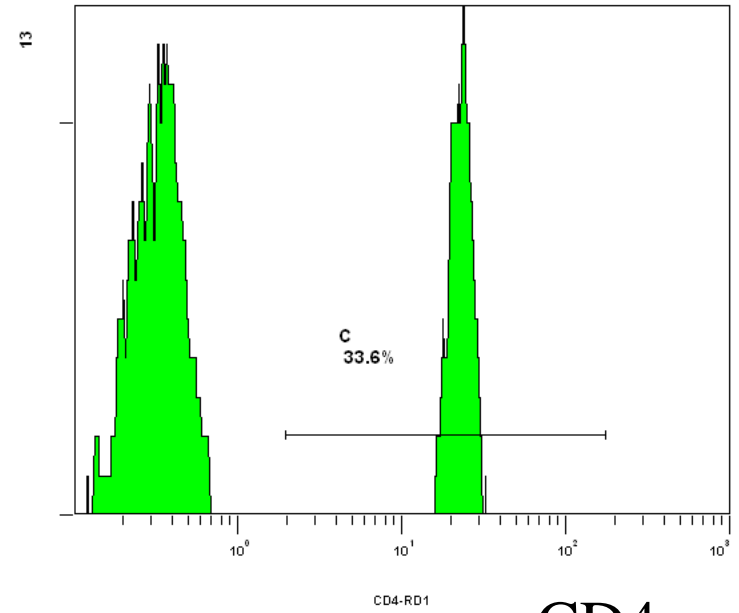
- Vysoká finanční náročnost
- Sestavení experimentu, analýza a vyhodnocování dat závisí na zkušenostech obsluhy
- Analýza vzorků co nejdříve po odběru
- Nevidíme, kde v/na buňce je signál lokalizován

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

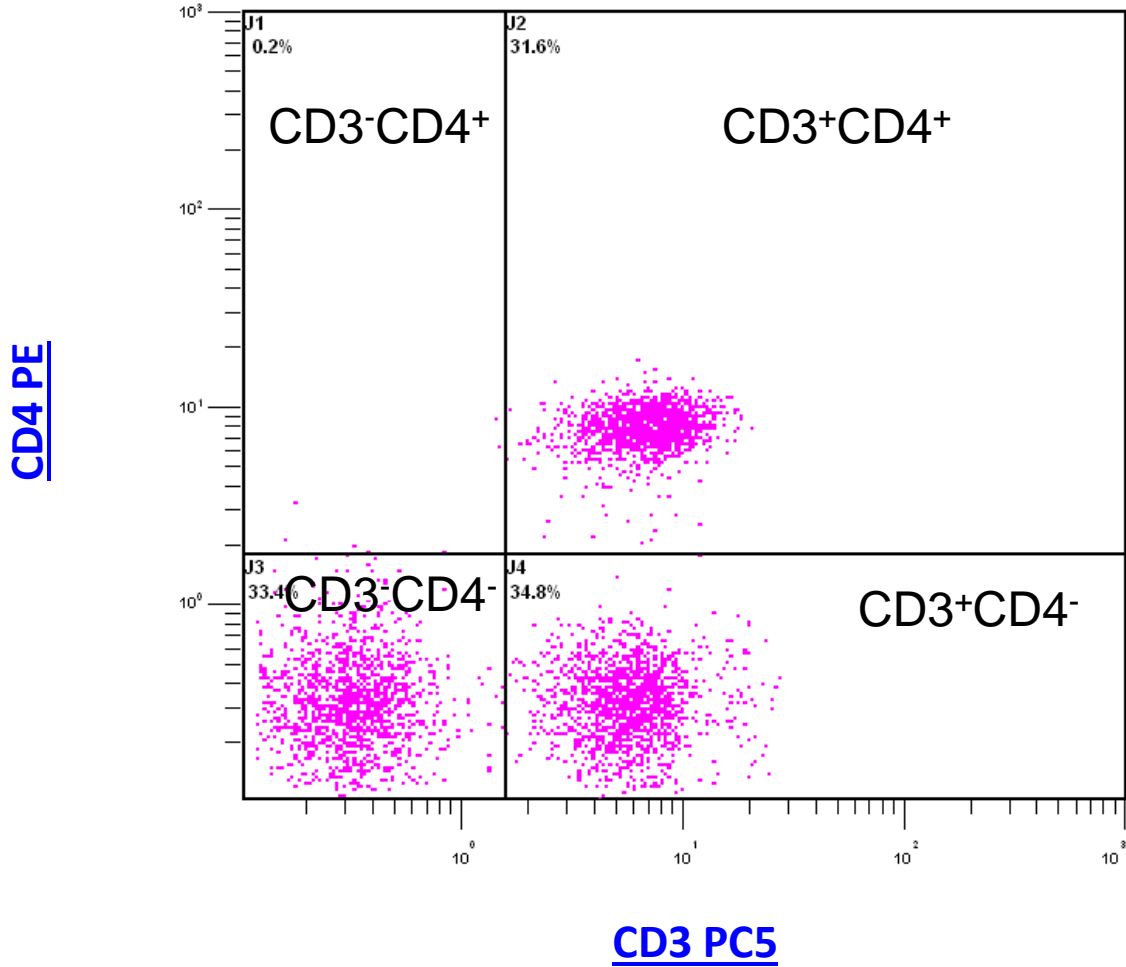


CD3

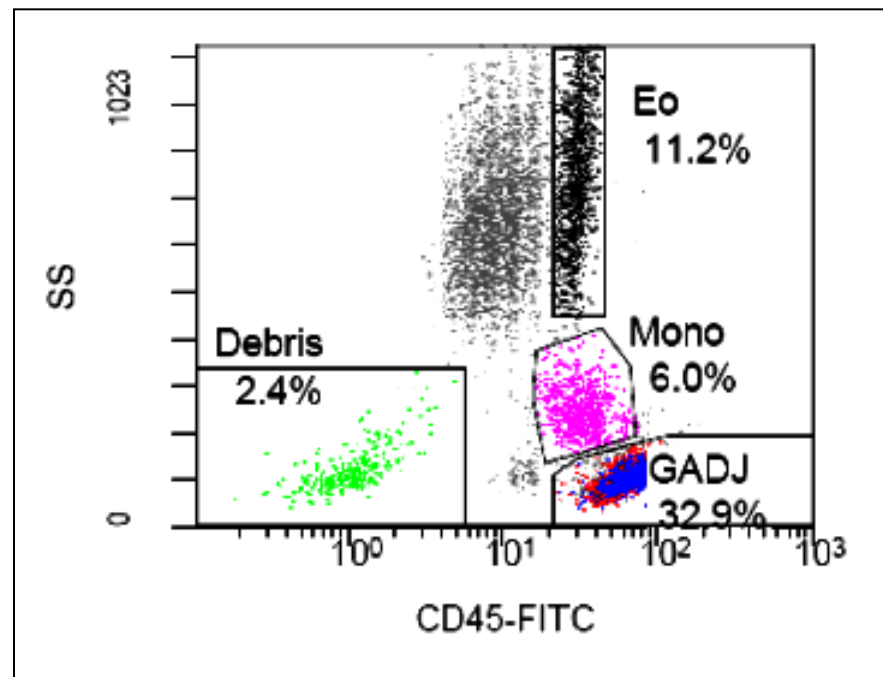
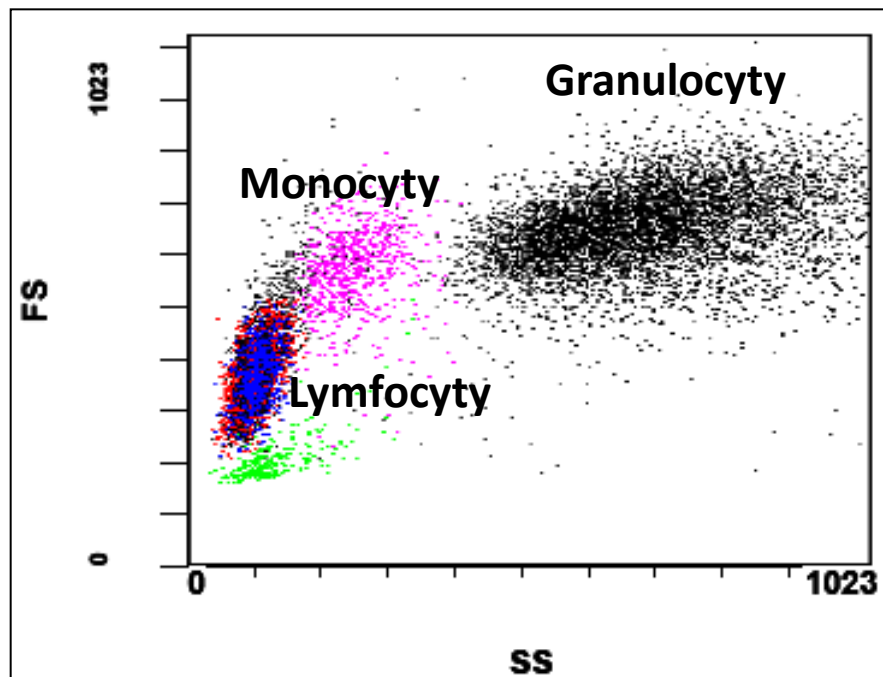
[F1][A] 20051674.LMD : FL2 LOG



CD4

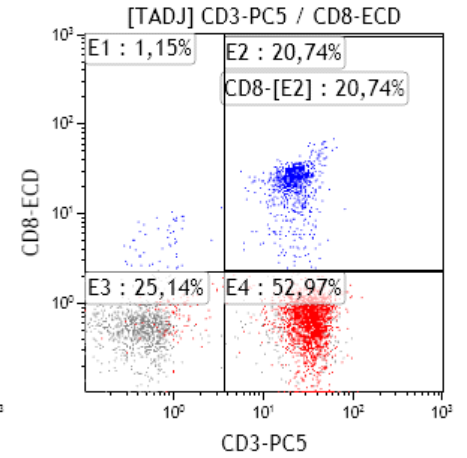
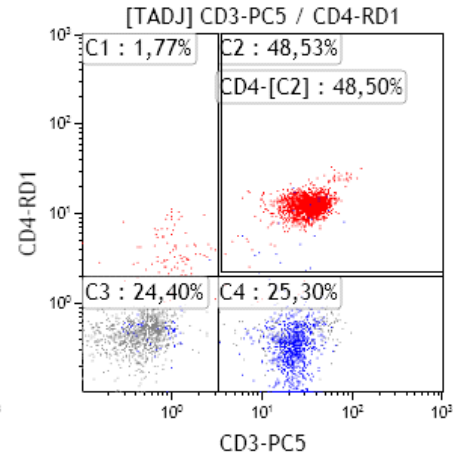
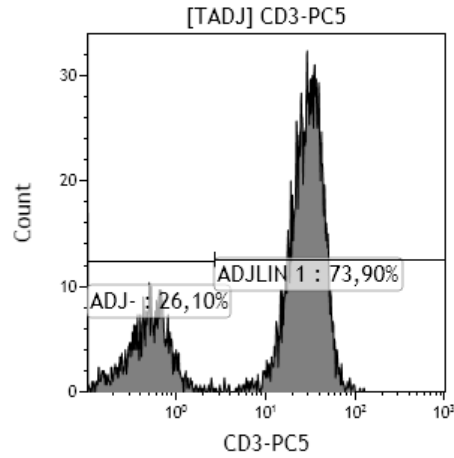
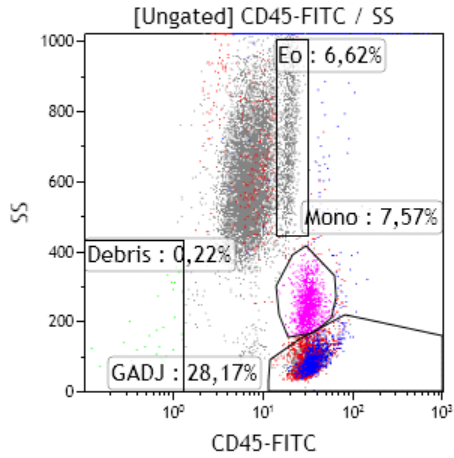


# Krevní diferenciál

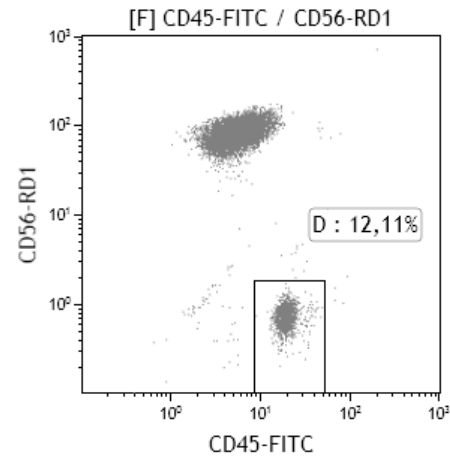
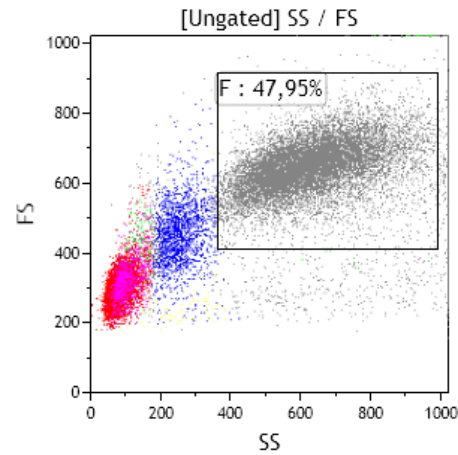
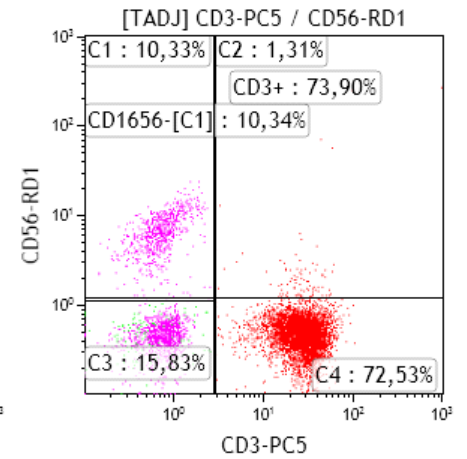
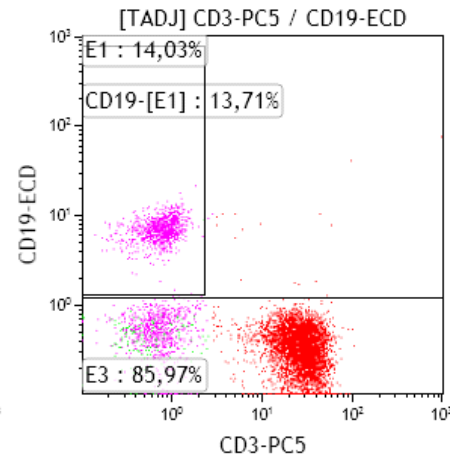
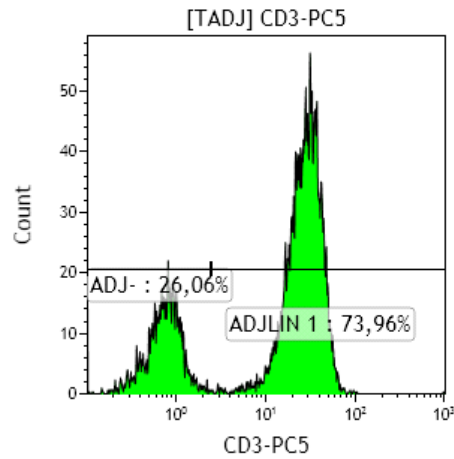
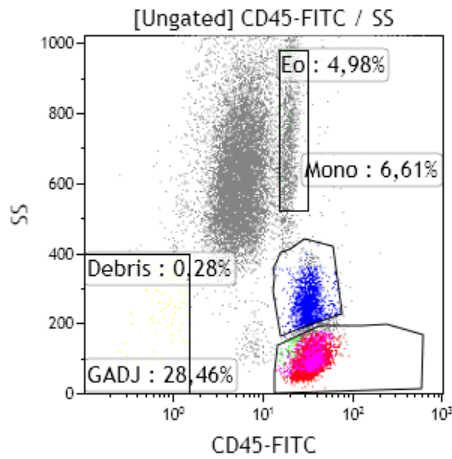




# Zkumavka A



# 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)

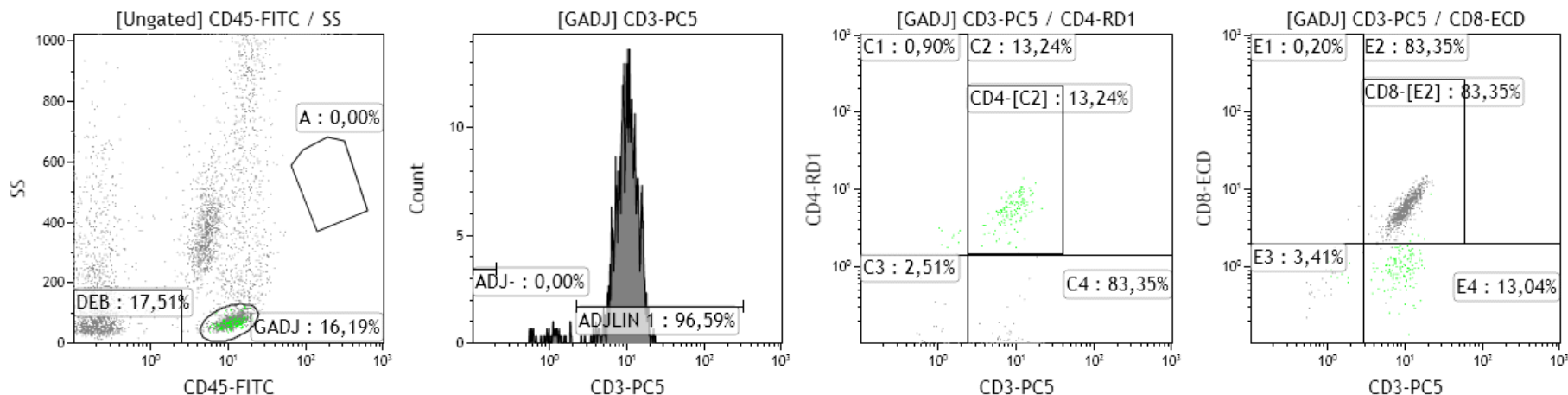
# Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

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**

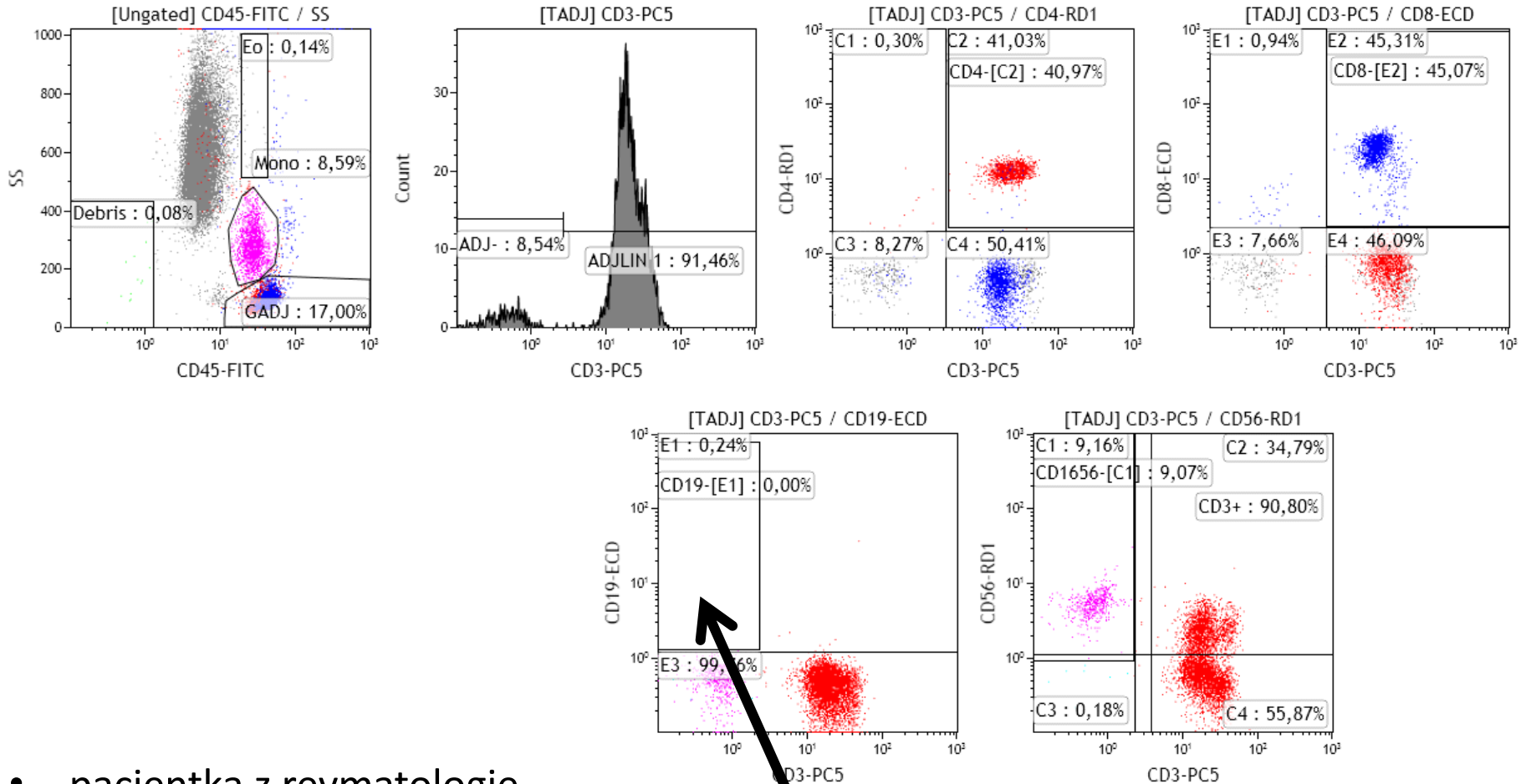
# Bronchoalveolární laváž (BAL)

- imunofenotypizace



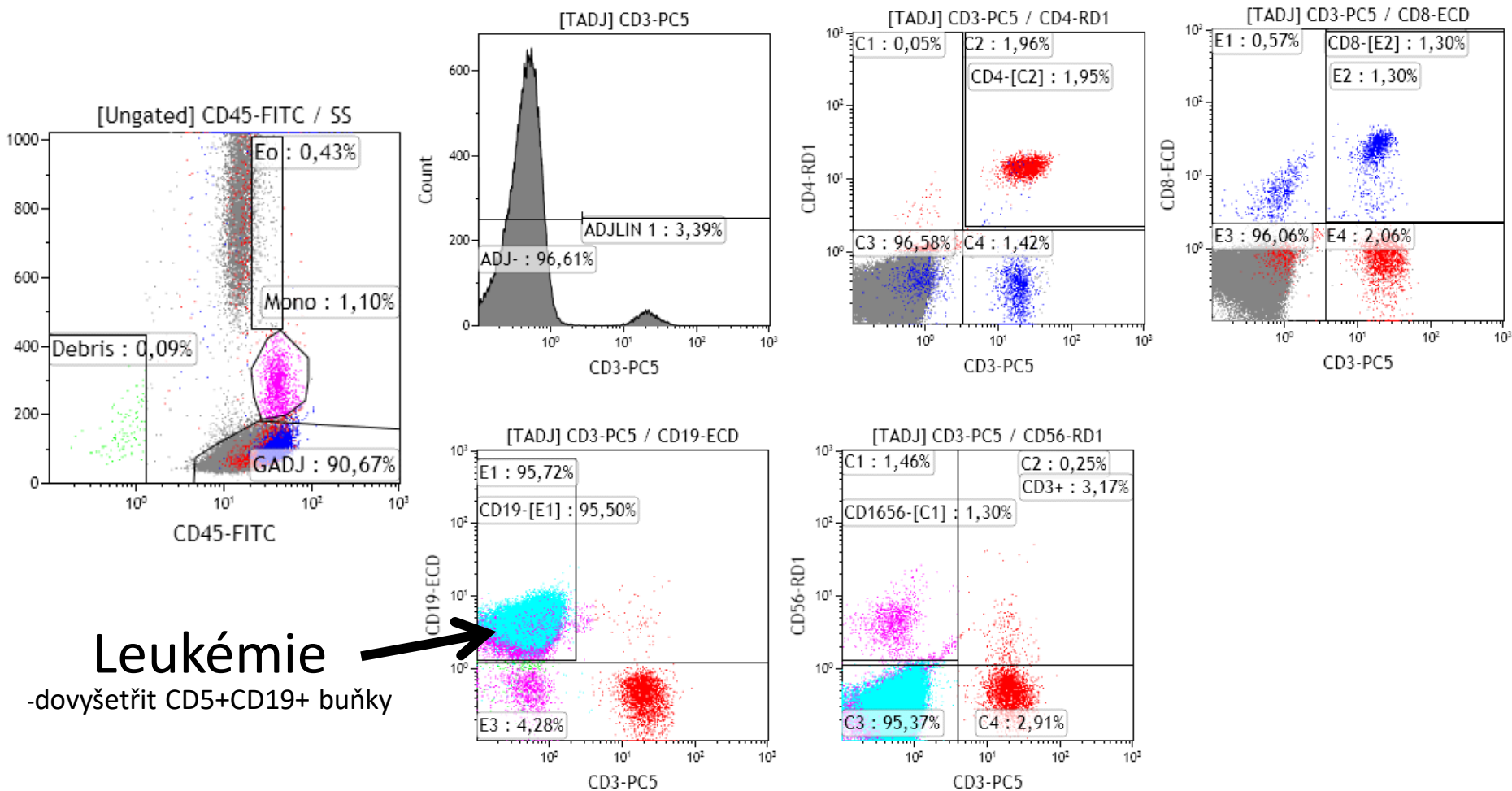
při převráceném poměru CD4+/CD8+  
- podezření na sarkoidózu

# Pacientka: Ž, \*1957



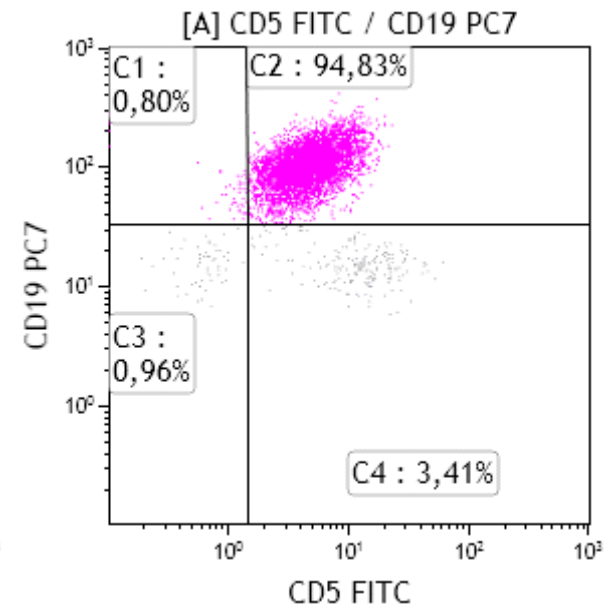
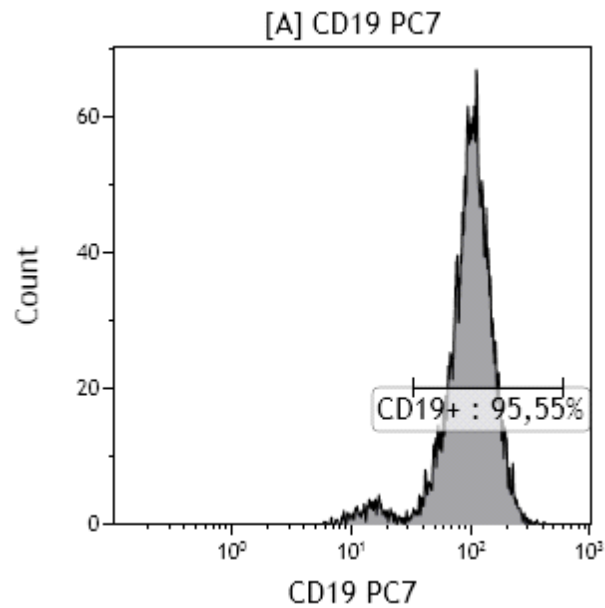
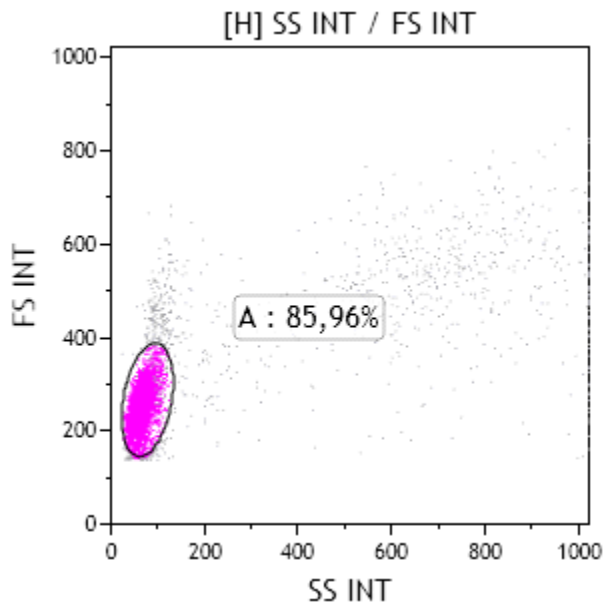
- pacientka z revmatologie
- léčba např. rituximabem způsobuje depleci B-lymfocytů (po 4-6 měsících návrat k normálním hladinám)

# Pacient: muž, \* 1966



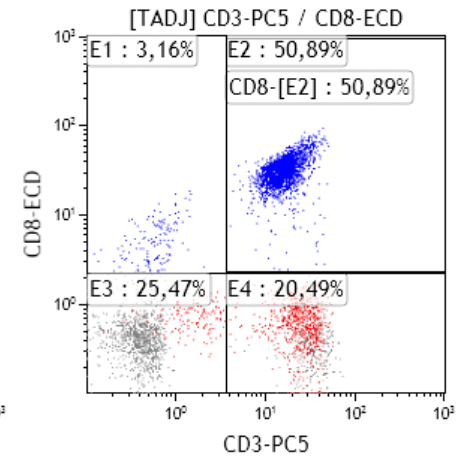
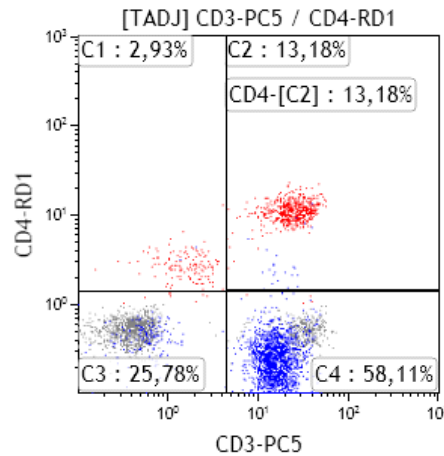
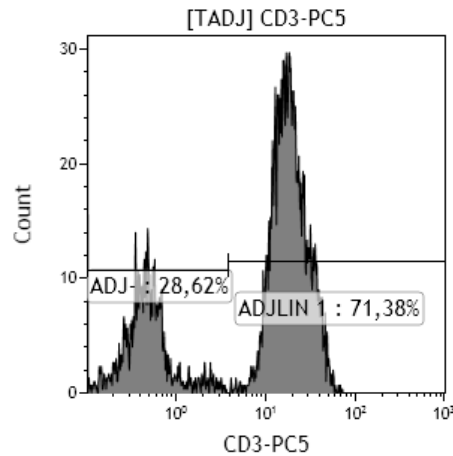
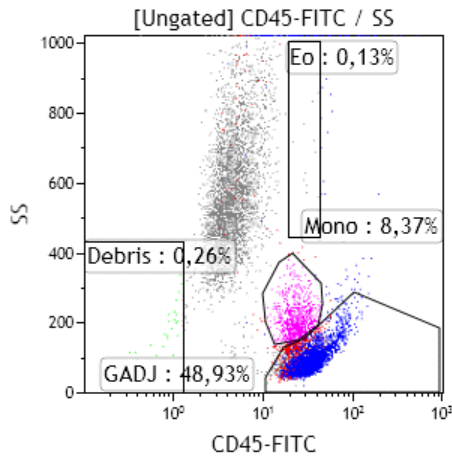


# CD5+CD19+



**CD5+CD19+ : 94.8%**

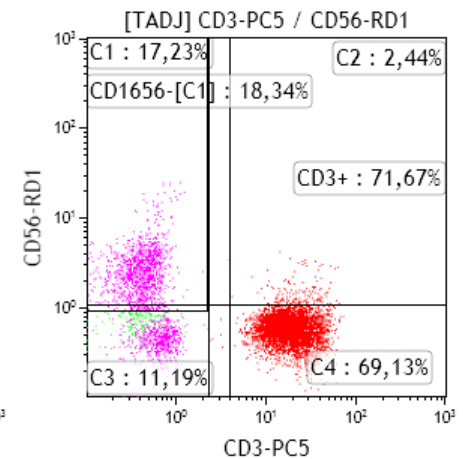
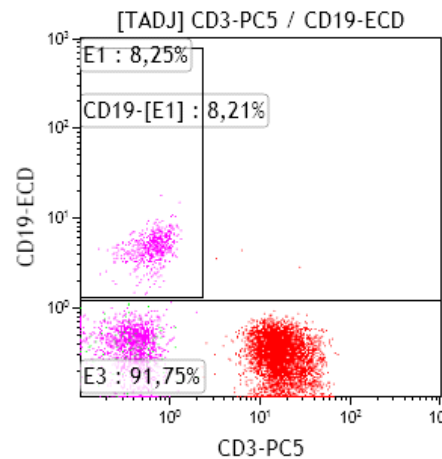
# Pacient: M, \*1999



**převrácený poměr  
CD4/CD8!**

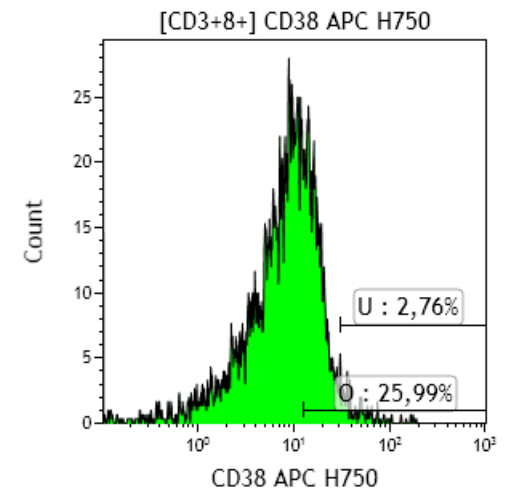
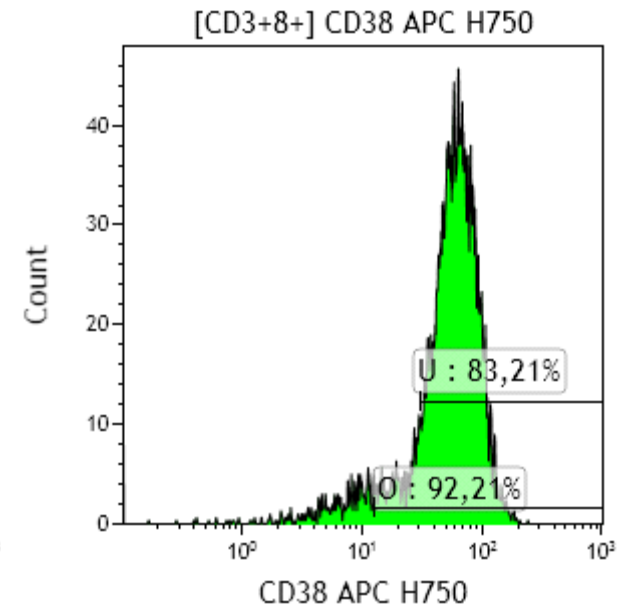
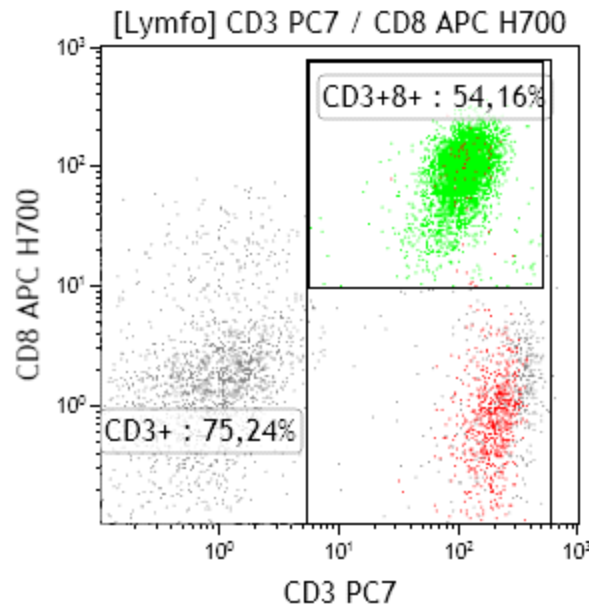
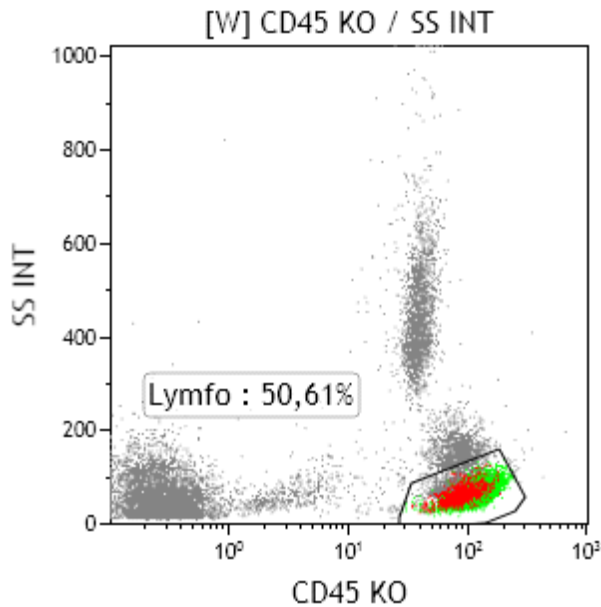
CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

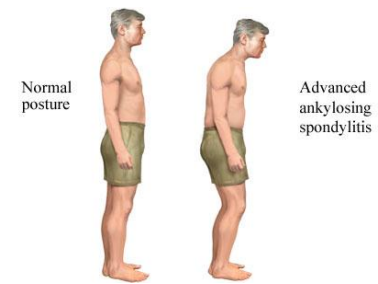


**virová infekce???**

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

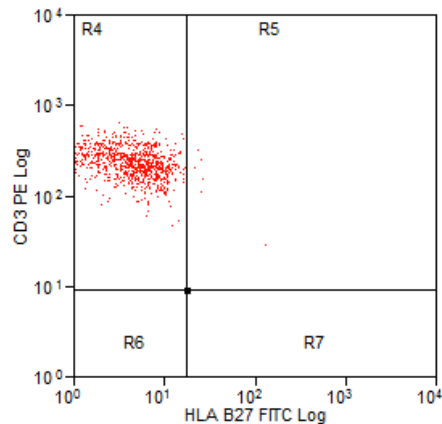


# HLA-B27

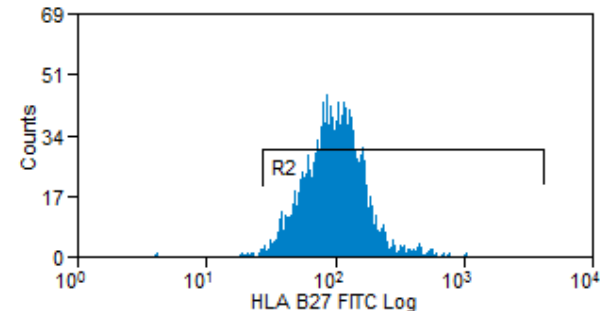
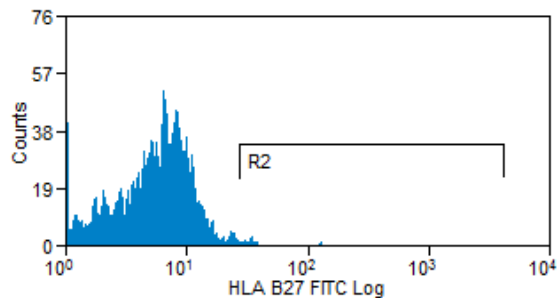
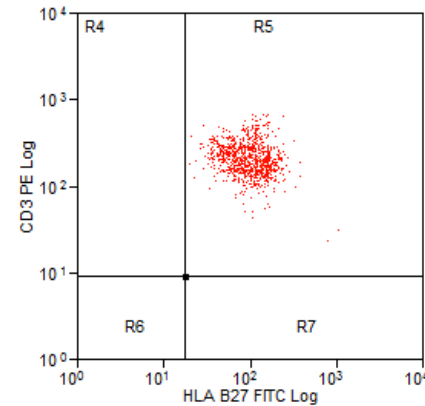


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida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

negativní



pozitivní





**DĚKUJI ZA POZORNOST!**

# Co určitě vědět

- CD znaky charakterizující jednotlivé základní lymfocytární subpopulace
- příprava vzorku k imunofenotypizaci
- monoklonální protilátky a jejich příprava
- průtoková cytometrie – princip metody, příklad fluorochromů
- průtokový cytometr – 3 části a jejich funkce
- histogram, dot plot, krevní diferenciál
- HLA-B27

# !!!K protokolu ze cvičení!!!

- vedle procentuálního zastoupení jednotlivých lymfocytárních subpopulací (najdete v protokolu z cytometru), uveďte také jejich absolutní počty (vypočítejte)

**abs. počet leukocytů je  $5,7 \times 10^9/l$**

leukocyty jsou tvořeny – lymfocyty, monocyty a granulocyty

lymfocyty jsou tvořeny –  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T lymfocyty, B lymfocyty a NK buňkami