



# Prietoková cytometria a stanovenie lymfocytárných subpopulácií

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil

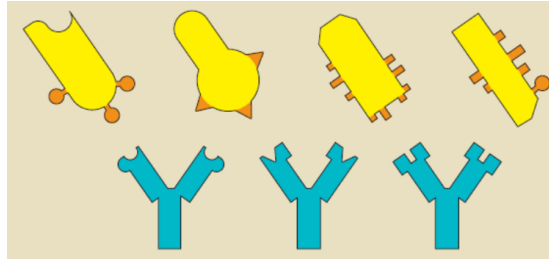


Eosinophil



Basophil

# Rozdelenie imunologických laboratórnych metód



Metódy  $\left\{ \begin{array}{l} \text{serologické (humorálne)- detekcia antigénov a protilátok,} \\ \text{preukázanie tvorby protilátok proti infekčnému agens} \\ \text{bunečné- stanovenie počtu (relatívneho; absolútneho) a} \\ \text{funkčnosti jednotlivých typov leukocytov (nutný odber} \\ \text{nezrážlivej krvi do EDTA, heparínu, citrátu sodného)} \end{array} \right.$



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



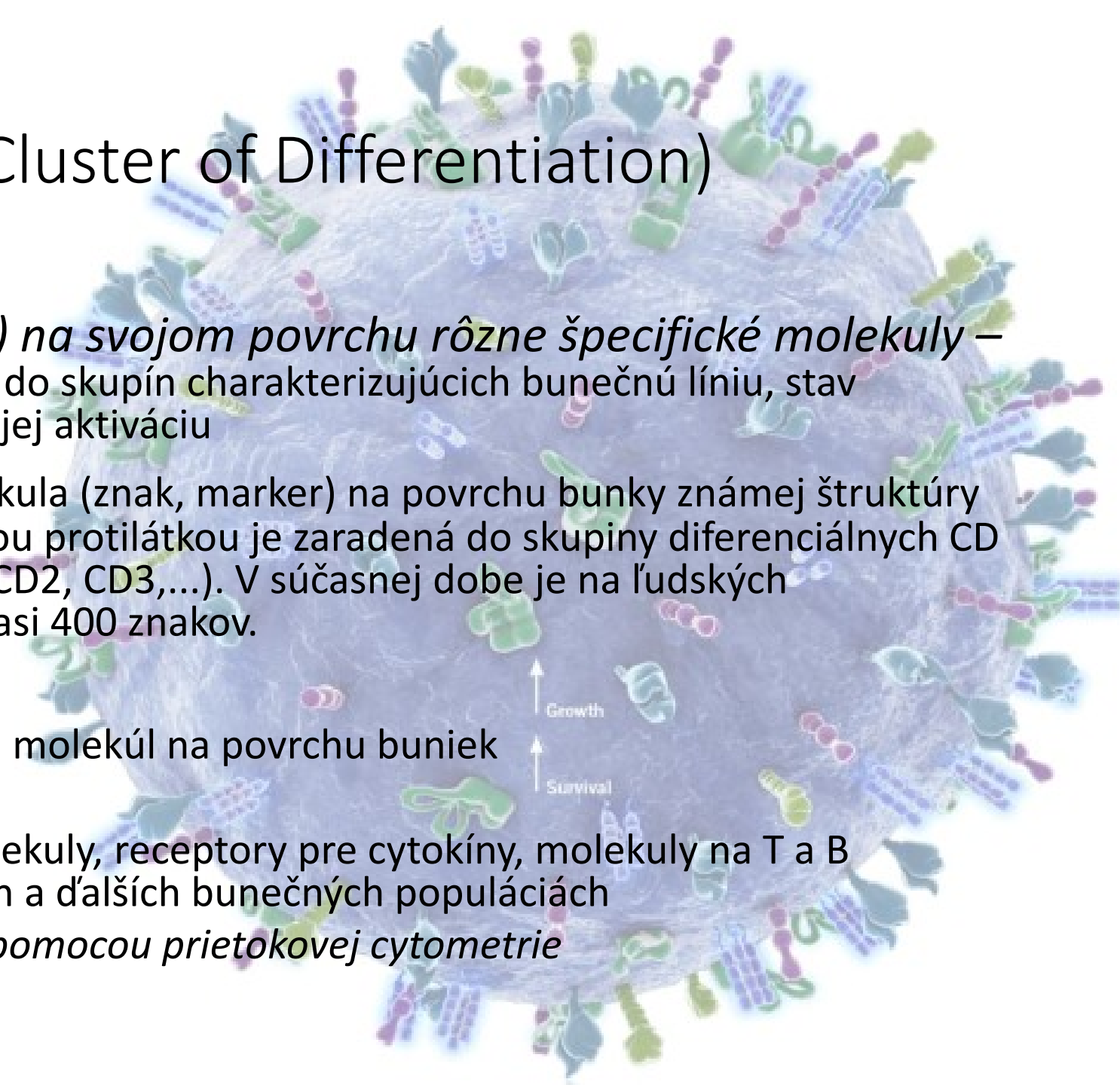
Eosinophil

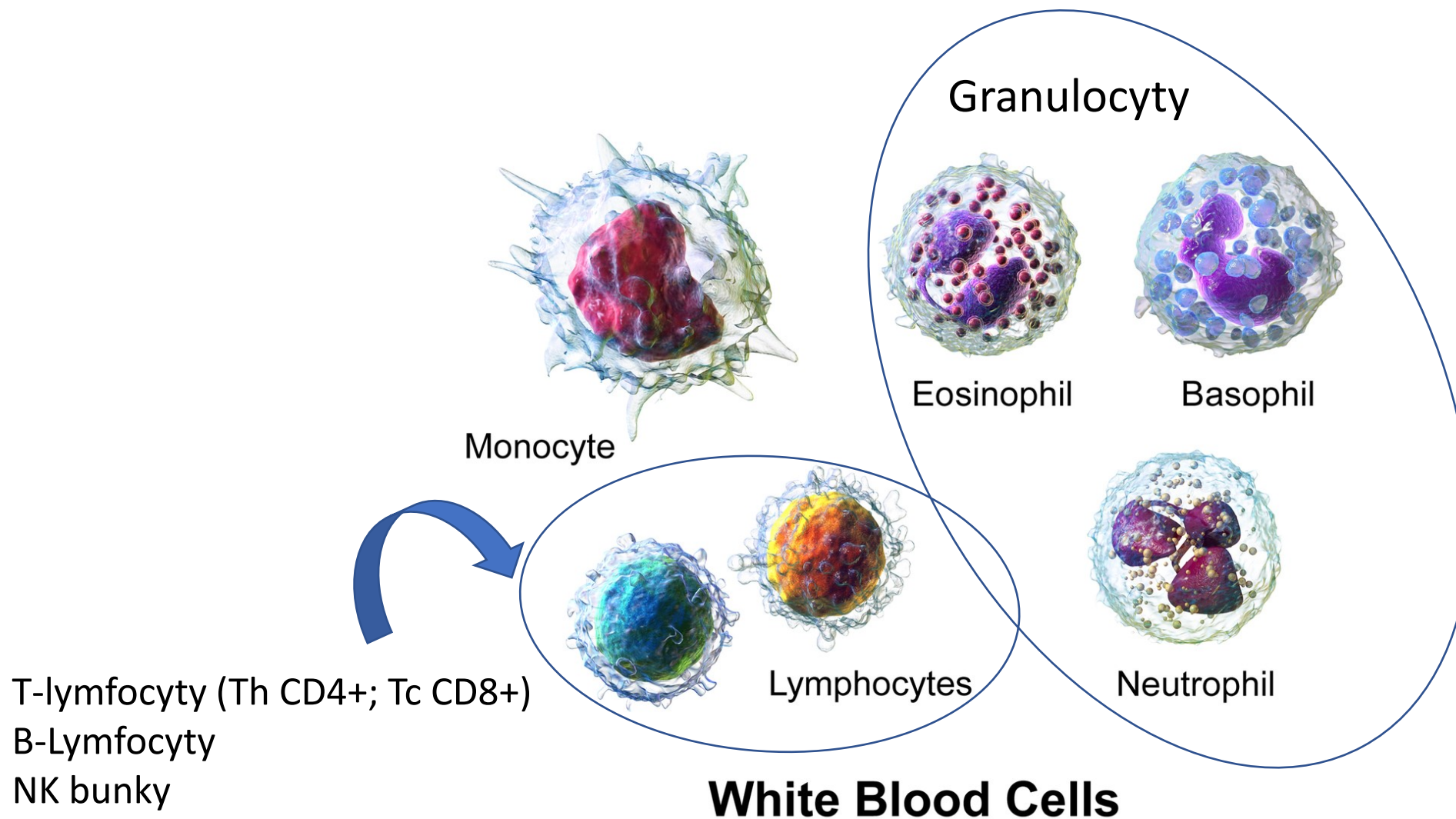


Basophil

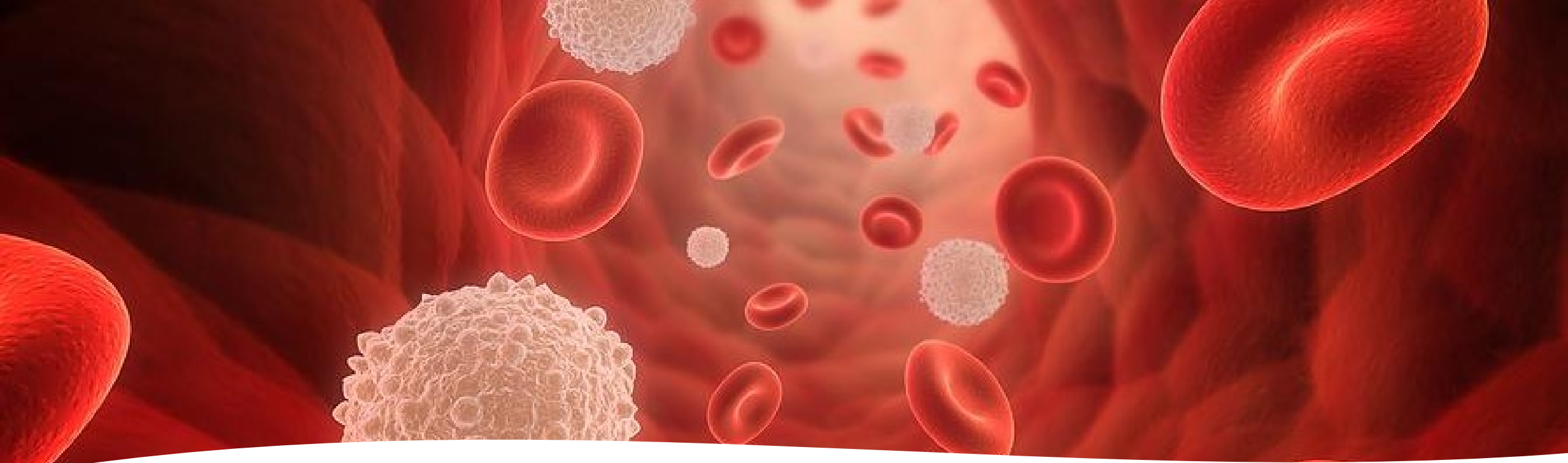
# Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

- *Bunky exprimujú (vystavujú) na svojom povrchu rôzne špecifické molekuly* – znaky, ktoré môžeme usporiadať do skupín charakterizujúcich bunečnú líniu, stav diferenciácie jednotlivkej bunky a jej aktiváciu
- *CD klasifikácia:* pokiaľ je molekula (znak, marker) na povrchu bunky známej štruktúry a je rozpoznateľná monoklonálnou protilátkou je zaradená do skupiny diferenciálnych CD znakov a označená číslom (CD1, CD2, CD3,...). V súčasnej dobe je na ľudských leukocytoch charakterizovaných asi 400 znakov.
- **Využitie:**
  - označenie plne definovaných molekúl na povrchu buniek
  - rozdelenie podľa funkcie:
    - adhézne membránové molekuly, receptory pre cytokíny, molekuly na T a B lymfocytoch, trombocytoch a ďalších bunečných populáciách
  - **Imunofenotypizácia buniek pomocou prietokovej cytometrie**





Leukocyty: počet leukocytov v krvi –  $4-9 \times 10^9/l$



## Imunofenotypizácia buniek

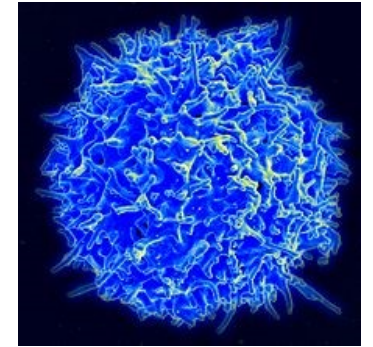
- stanovenie **leukocytárných subpopulácií** pomocou prietokovej cytometrie (FACS- fluorescent-activated cell sorting)
- odber krvi do skúmavky s **EDTA**



# T lymfocyty

**CD3** - povrchová molekula prítomná na všetkých T-lymfocytoch

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **58-85 % z Lymfocytov**



T- lymfocyty sa delia na:

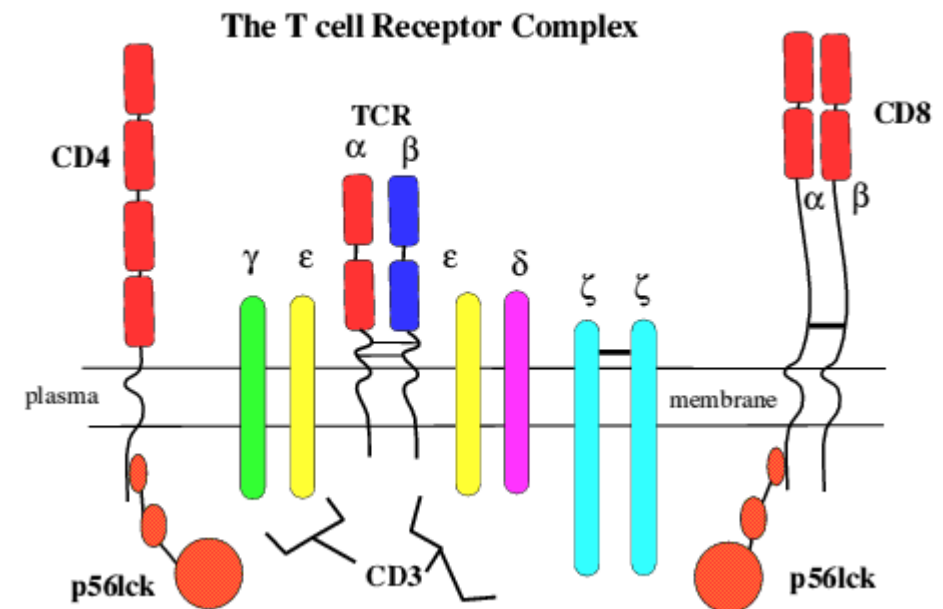


**CD4+**  
 $T_H$  ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ )  
pomocné T-lymfocyty  
(T helper cells)

**CD8+**  
 $T_C$   
cytotoxické T-lymfocyty  
(cytotoxic T-cells)

Fyziologické zastúpenie z celkových CD3+ T-lymfocytov  
**30-60 %**                      **15-35 %**

Stavba T- bunečného receptoru TCR a umiestnenie koreceptorových molekúl CD3, CD4, CD8 zapojených do signalizácie cez T-bunečný receptor TCR

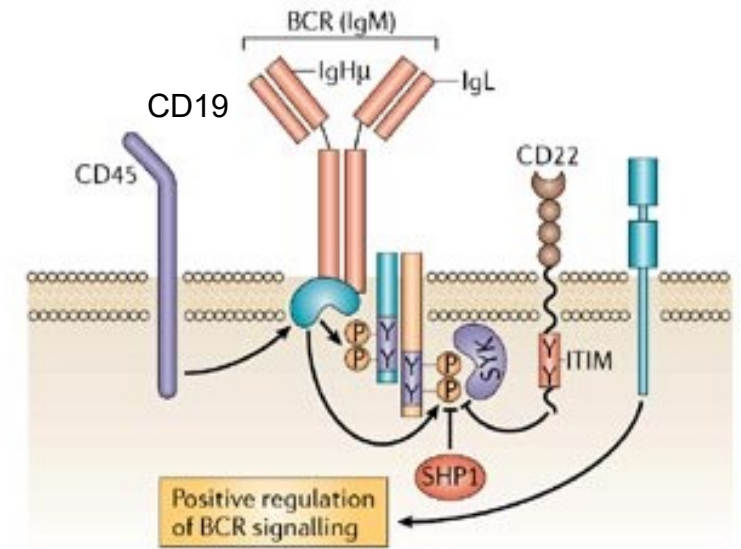


# B lymfocyty

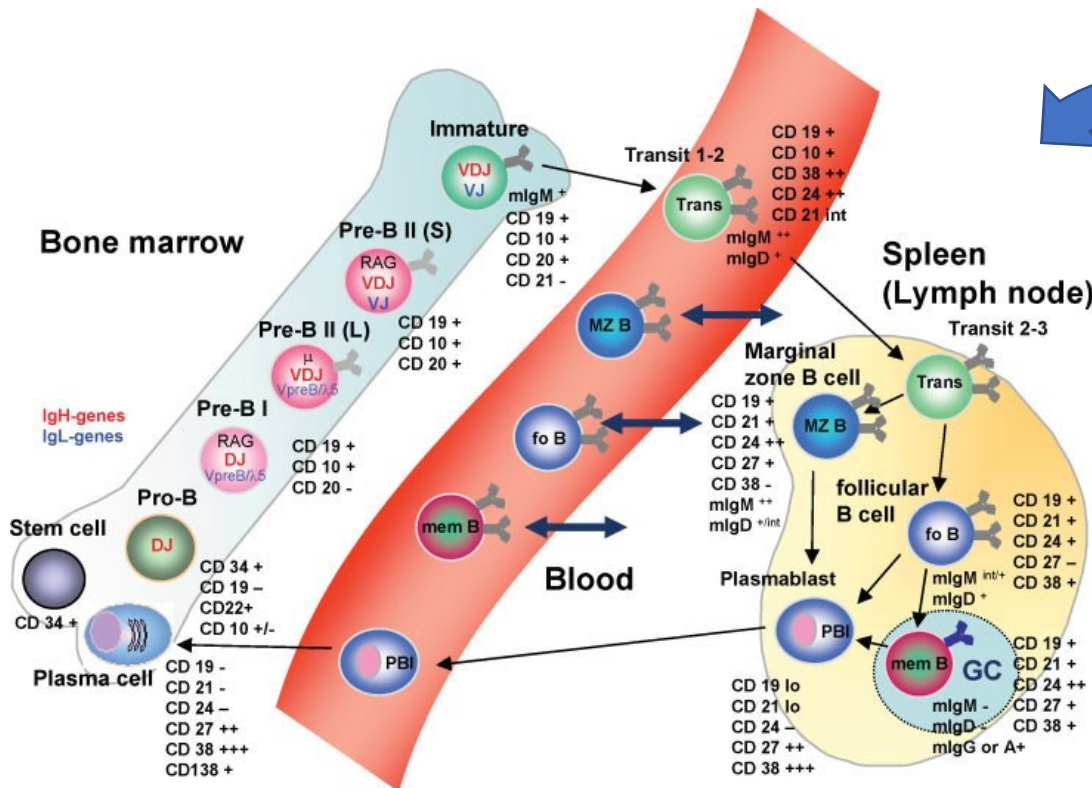
**CD19, CD20** - povrchové molekuly najčastejšie využívané k rozlíšeniu B lymfocytov v prietokovej cytometrii

Vhodne zvolená kombinácia iných CD znakov slúži k presnejšej charakterizácii jednotlivých vývojových štádií a funkčných subpopulácií

CD19 súčasťou B-bunečného receptora BCR



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology



Expresia CD znakov na povrchu B lymfocytov počas ich vývoja.  
Zastúpenie subpopulácií v kostnej dreni, sekundárnych lymfatických orgánoch a periférnej krvi

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **7-23 % z Lymfocytov**

# NK (Natural Killer) bunky

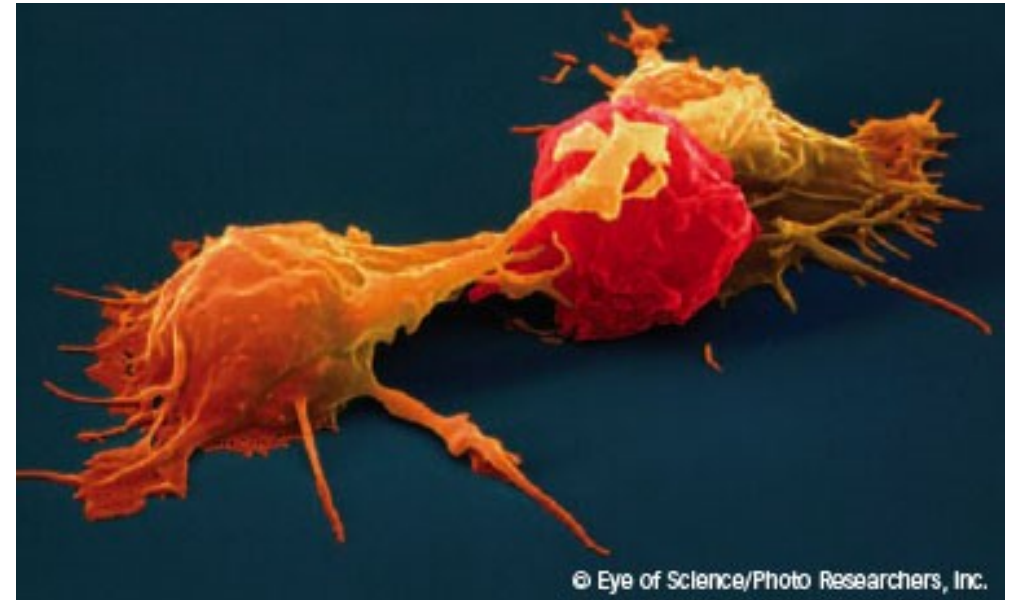
**CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>** - charakteristické povrchové markery

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **6-20 % z Lymfocytov**

- rozpoznávajú bunky, ktoré majú na povrchu abnormálne málo MHC I (= nádorové a vírom infikované bunky)
- Na zničenie bunky používajú cytotoxické mechanizmy (perforin, granzymy)

Pozor!!! Okrem klasických NK ešte existujú

NKT bunky: CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> **CD3<sup>+</sup>**



© Eye of Science/Photo Researchers, Inc.



# Monocyty

**CD14** - povrchová molekula charakteristická pre monocyty

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **0-10 % z Leukocytov**

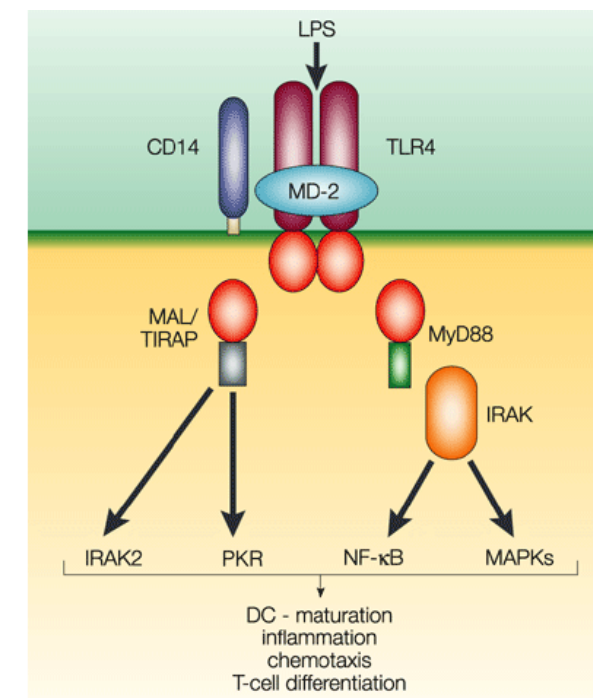
- súčasť nešpecifickej imunity
- schopnosť fagocytózy
- tkanivová forma = makrofág
- APC = antigén prezentujúca bunka

**Na svojom povrchu exprimujú HLA DR – Human Leukocyte Antigen DR isotype**

- naviazanie peptidov z pohltených patogénov →
- rozoznanie pomocnými T-lymfocytmi
- cytometrický marker pre imunitnú odpoveď

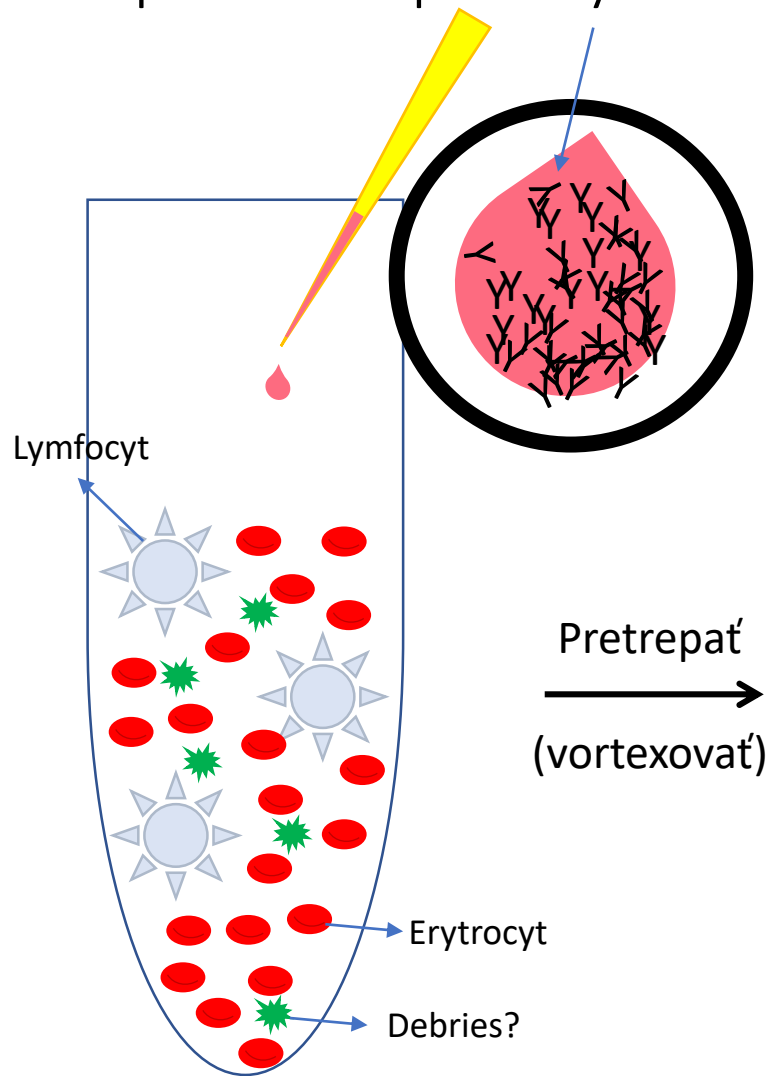


CD14 ako koreceptor TLR4 zapojený do detekcie bakteriálnych lipopolysacharidov (LPS)



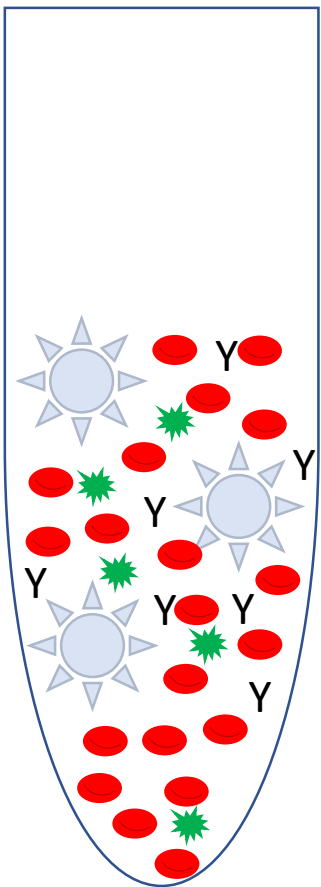
# Príprava vzorky na FACS

Pipetovať MIX potrebných MPL



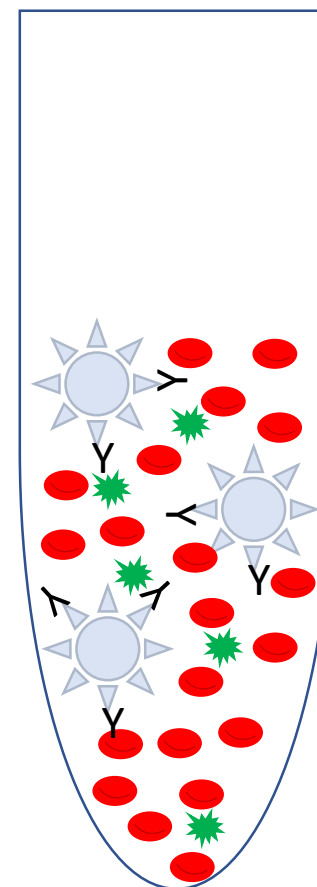
Pretrepať  
→  
(vortexovať)

Voľné MPL - väzba na receptory



30min.  
inkubácia  
→  
tma  
lab. teplota

Plná krv značená MPL



Vzorka krvi 45μl

Vzorka krvi 45μl + MPL

# Príprava vzorky na FACS

## Lýza erytrocytov

- Erytrocyty prítomné vo vzorke zahlcujú meranie (obraz je ťažko odčítateľný), preto po značení plnej krvi MPL je nutné previesť lýzu erytrocytov
- K vzorke sa postupne pridáva:
  - **Roztok A: 600ul**
    - **Príprava roztoku A:** 1,5 l destilovanej vody + 1,8 ml 99% kyselina mravenčia – spôsobuje lýzu erytrocytov v kyslom prostredí
  - **Roztok B: 300ul**
    - **Príprava roztoku B:** 1,5 l destilovanej vody + 9,0 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 21,75 g NaCl, 46,95 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – alkalický roztok = zastavenie lýzy a úprava pH
  - **Roztok C: 100ul**
    - **Príprava roztoku C.:** 1,5 l PBS (pH 7-7,4) + 15 g paraformaldehydu – fixácia buniek

Vzorky sa do začiatku merania uchovávajú v tme pri 4°C

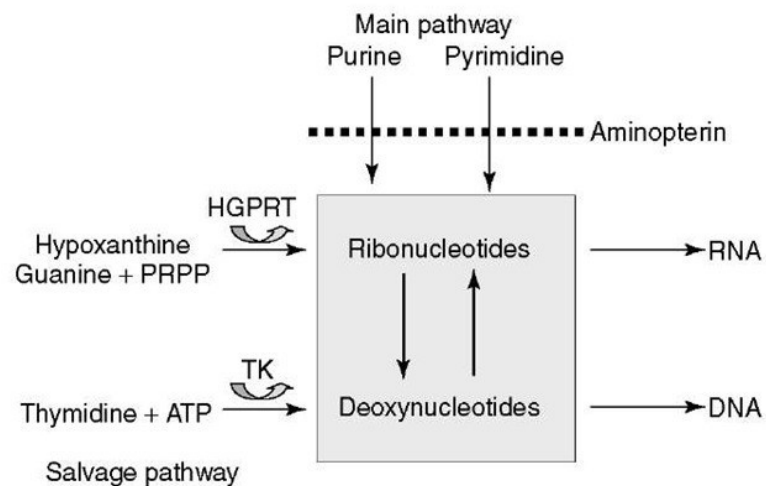
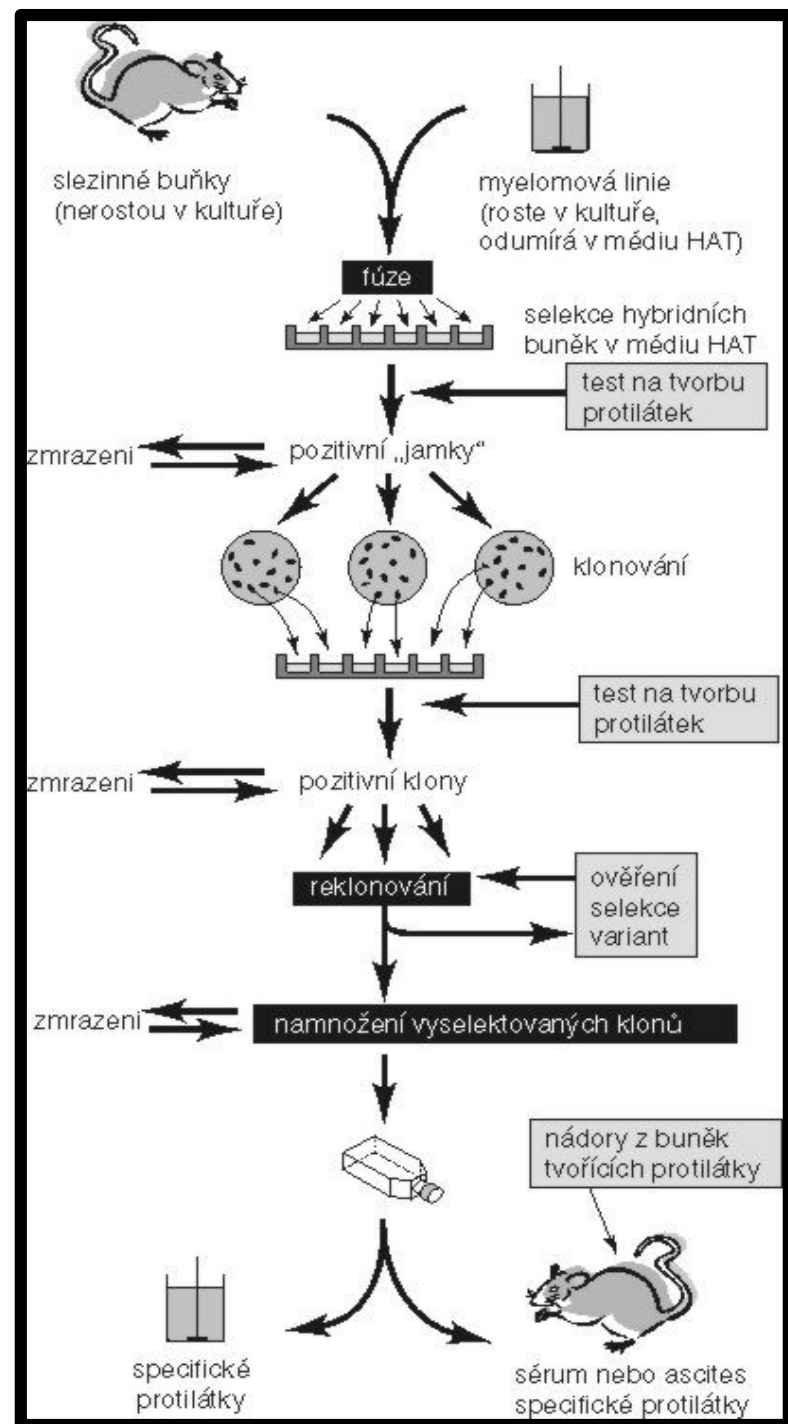
Automatický lyzátor TQ-prep od Firmy Beckman Coulter používaný na lýzu erytrocytov v rutinných vzorkách



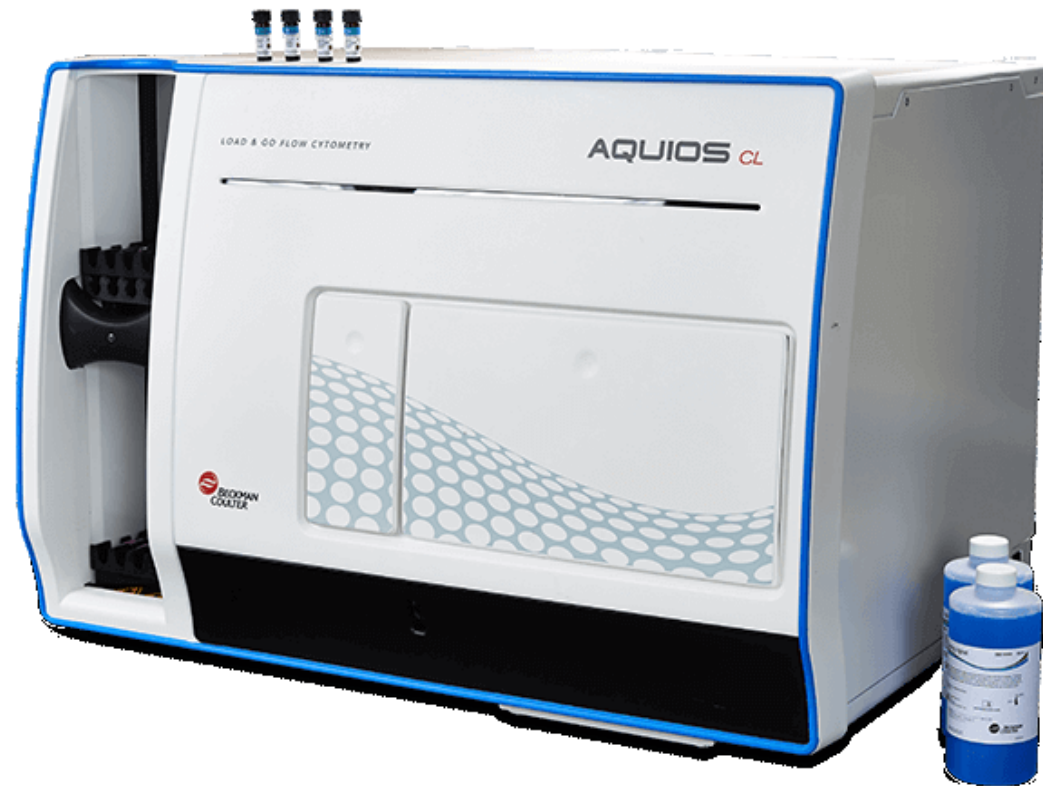
## ← Proces výroby MPL

# Monoklonálne protilátky (MPL)

- produkt jediného klonu B lymfocytov (klony vzniknuté fúziou buniek produkujúcich Ab a myelomových buniek, ktoré schopnosť produkcie vlastného Ig ztratil) nastimulovaných príslušným antigénom
- totožné a prísne špecifické proti jednému epitopu na povrchu použitého antigénu



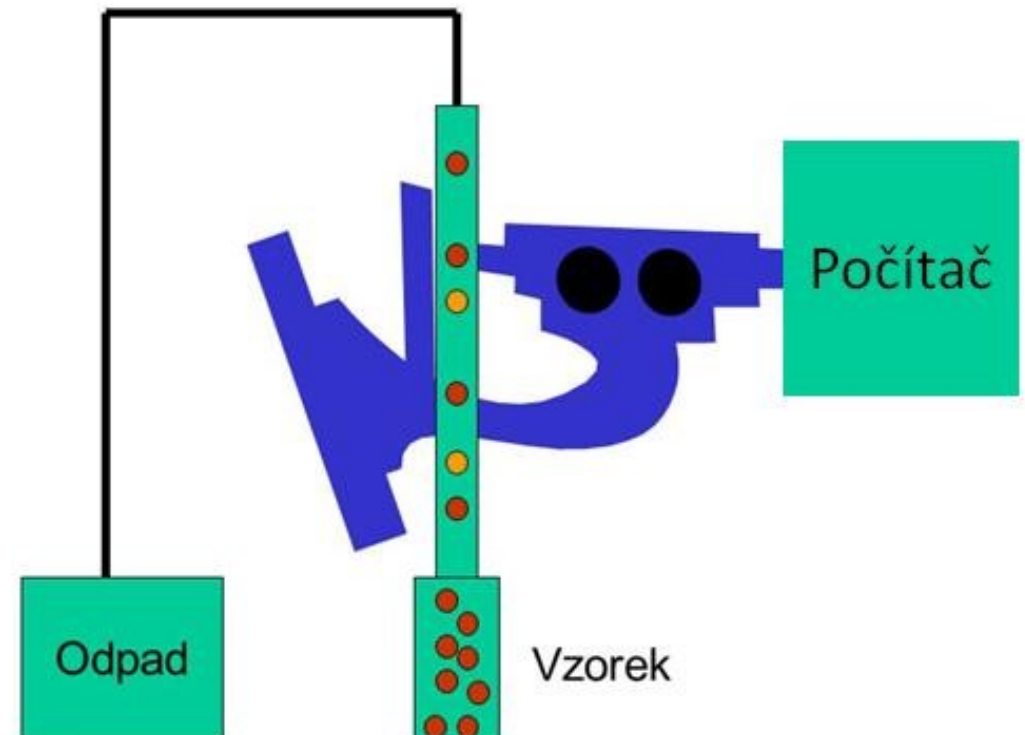
# Prietoková cytometria (Flow Cytometry, FACS)



# Flow+cyto+metria = „meranie buniek v pohybe“

- Možnosť analýzy mnohých vlastností a charakteristík na úrovni jednej bunky počas krátkeho časového úseku
  - Dnešné stroje umožňujú meranie súčasne viac než 25 markerov na jednej bunke
- 
- Určovanie fenotypu buniek
  - Monitorovanie odpovede na liečbu
  - Výskum signalizačných dráh
- 
- Kľúčový nástroj pre výskum porúch krvotvorby

**Prietoková cytometria** je technológia umožňujúca súčasné meranie a analýzu niekoľkých fyzikálnych a chemických *vlastností jednotlivých častíc*, ktoré sú *unášané v prúde kvapaliny a prechádzajú lúčom svetla*



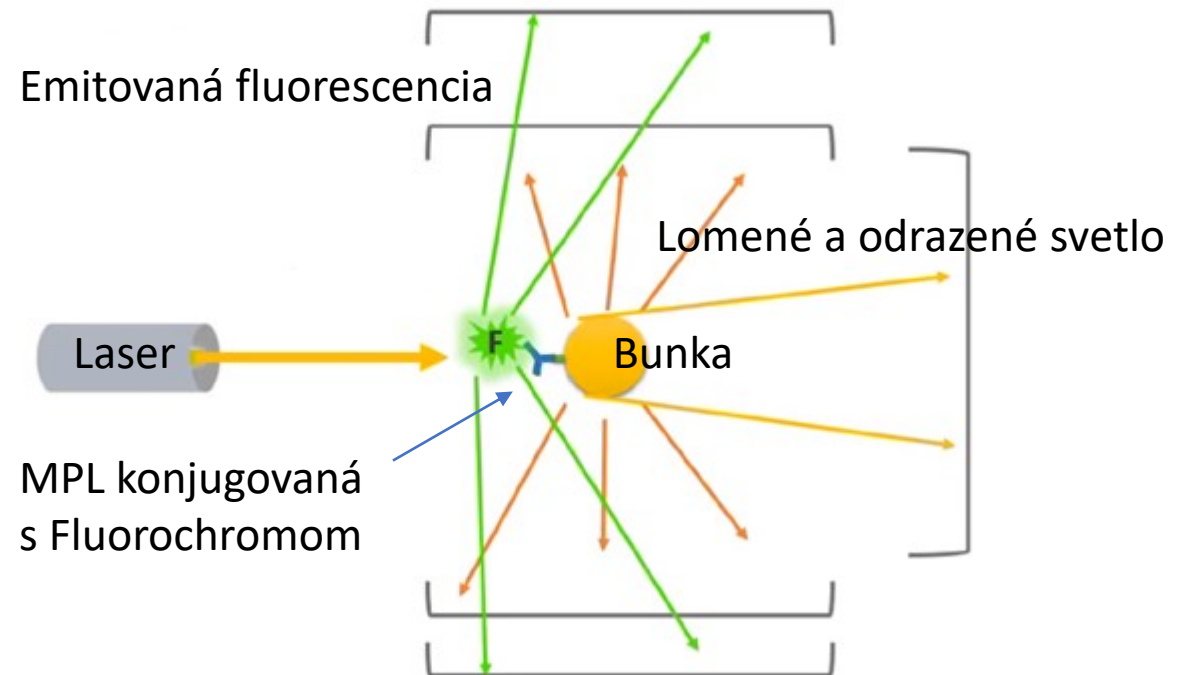
# Oblasti uplatnenia FACS

- **Klinické využitie** – imunofenotypizácia buniek a meranie ich funkčných vlastností
- **Bunečná biológia** – DNA, RNA analýza
- **Mikrobiológia** – rezistencia na ATB, kinetika



# Čo meriame???

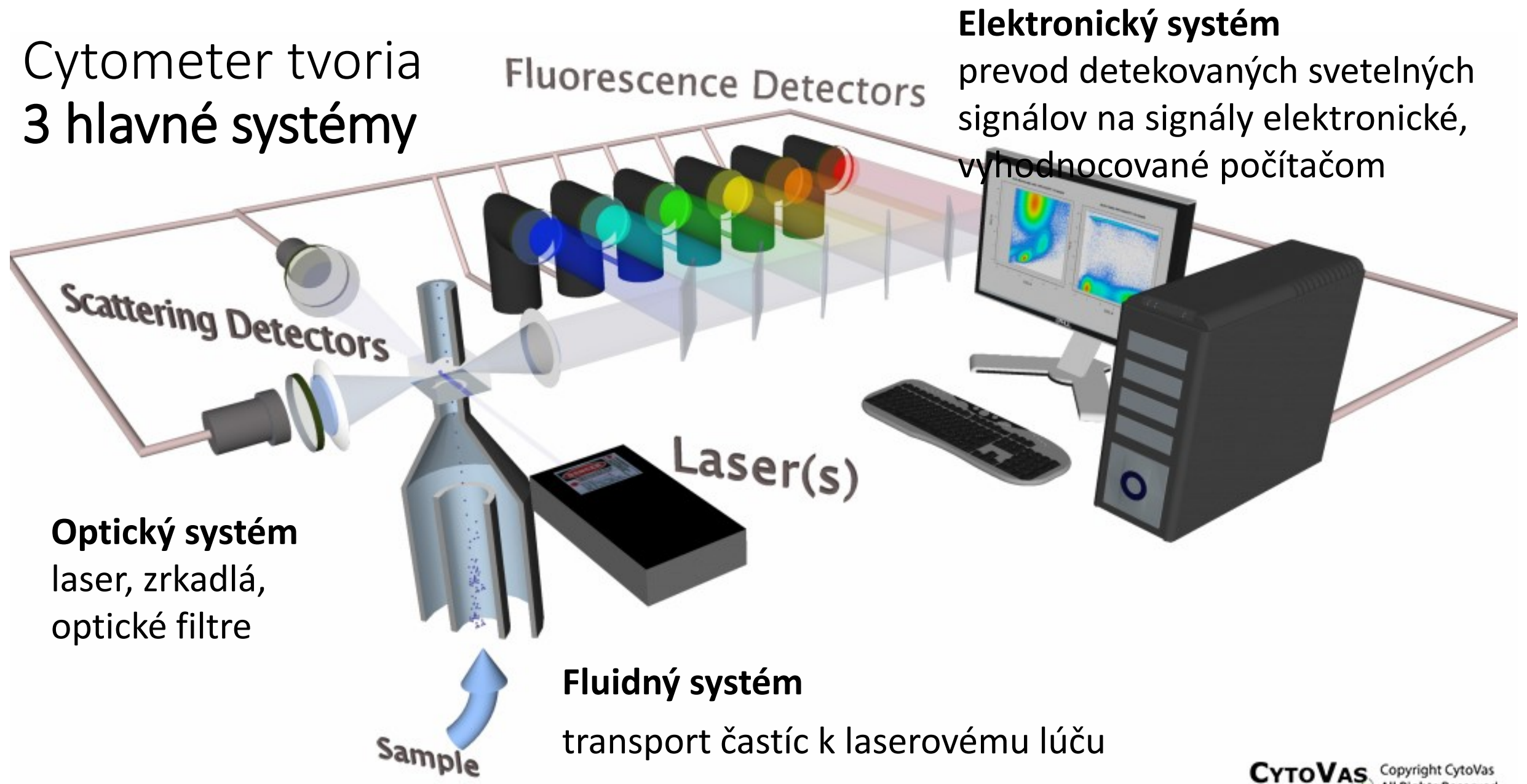
- **Lomené a odrazené svetlo** - pri prechode buniek laserovým lúčom (paprskom) dochádza k jeho lomu a odrazu na bunečnom povrchu a bunkových organelách
- **Emitovanú fluorescenciu** – pokiaľ použijeme MPL konjugované s fluorochromom
- Častice veľkosti 0,2-150  $\mu\text{m}$ 
  - prokaryotické a eukaryotické bunky
  - vírové častice, baktérie, huby
  - komplexy Ag-Ab



# Princíp FACS

- Pri prechode častíc laserovým lúčom dochádza k rozptylu svetla a k fluorescencii naviazaných fluorochrómov
- Svetelné signály sú prevedené na elektrické pomocou detektorov (PMT)
- Na každej bunke je možné zmerať niekoľko parametrov zároveň (rozptýlené svetlo + fluorescencia)
- Namerané dáta sa ukladajú a ďalej analyzujú

# Cytometer tvoria 3 hlavné systémy



**Optický systém**  
laser, zrkadlá,  
optické filtre

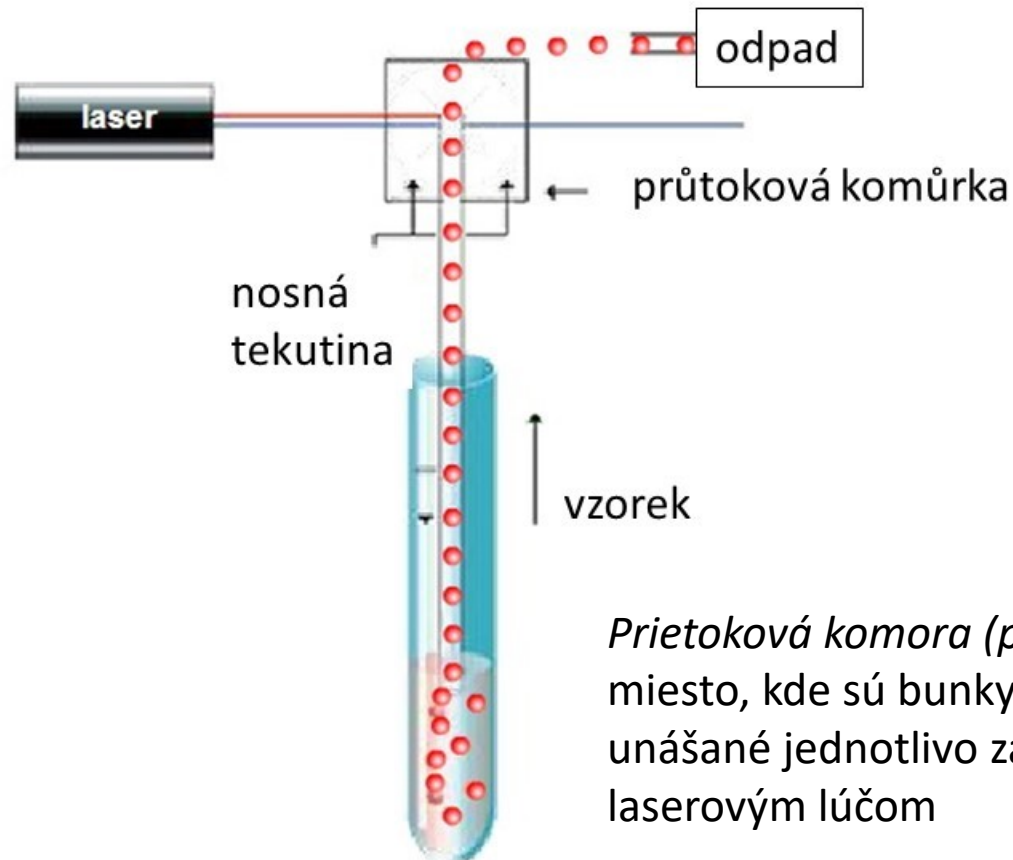
**Fluidný systém**  
transport častíc k laserovému lúču

**Elektronický systém**  
prevod detekovaných svetelných  
signálov na signály elektronické,  
vyhodnocované počítačom

# Fluidika

Zabezpečuje transport častíc (buniek) v prúde nosnej kvapaliny k laserovému lúču a ich odvod do odpadu – princíp hydrodynamické fokusace

Rez prietokovou celou: uprostred vzorka (bunečná suspenzia) unášaná nosnou kvapalinou (sheath fluid)



*Prietoková komora (prietoková cela)-*  
miesto, kde sú bunky v ideálnom prípade  
unášané jednotlivo za sebou a ožiarené  
laserovým lúčom



# Hydrodynamická fokusácia

- jav, ktorý zabezpečuje usporiadanie buniek jednotlivo za sebou
- vzorka, napr. bunečná suspenzia je vyvedená do prostredia tzv. Sheath fluid (nosná kvapalina)
- nosná kvapalina postupne strhá jednotlivé bunky a usporadúva ich do radu za sebou
- tlak nosnej kvapaliny je nastavený výrobcom, meniť môžeme tlak vzorky (nastavenie rýchlosti prietoku buniek)

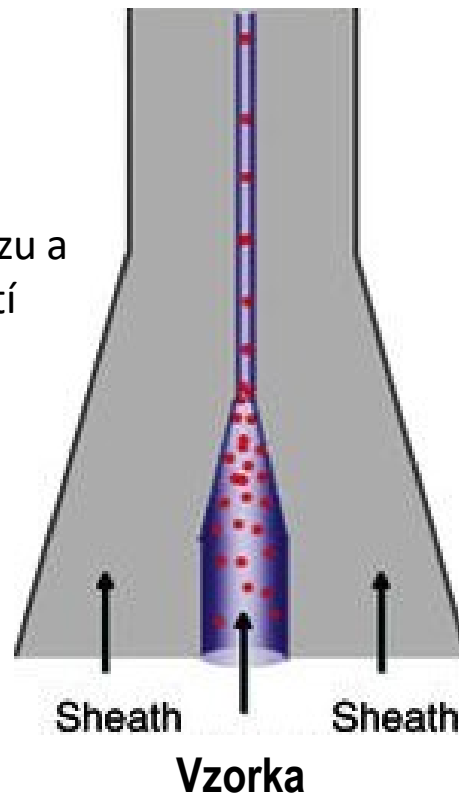
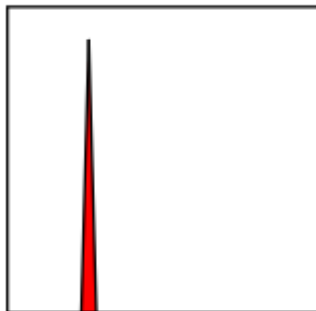
## Nízky tlak vzorky

Úzky prúd vzorky

Menší prúd buniek

*Presnejšie meranie*

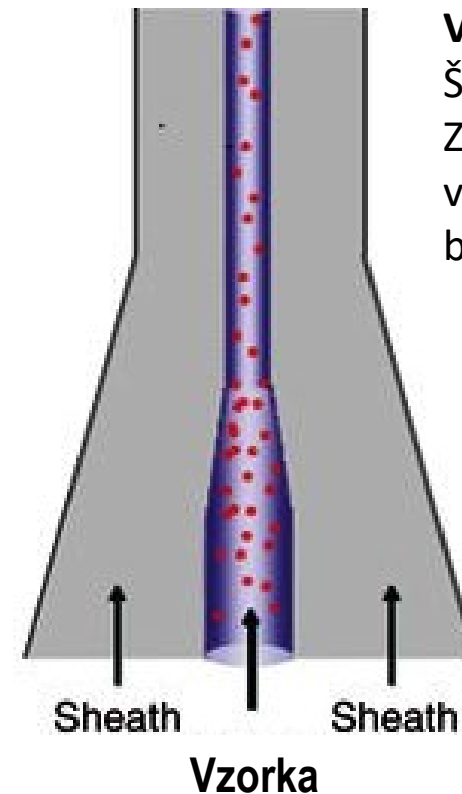
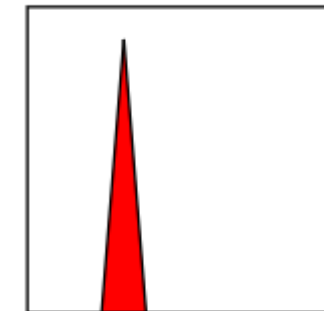
vhodné napr. pre DNA analýzu a  
meranie funkčných vlastností



## Vysoký tlak vzorky

Široký prúd vzorky

Zbieranie veľkého počtu častíc  
vhodné napr. na Imunofenotypizáciu  
buniek



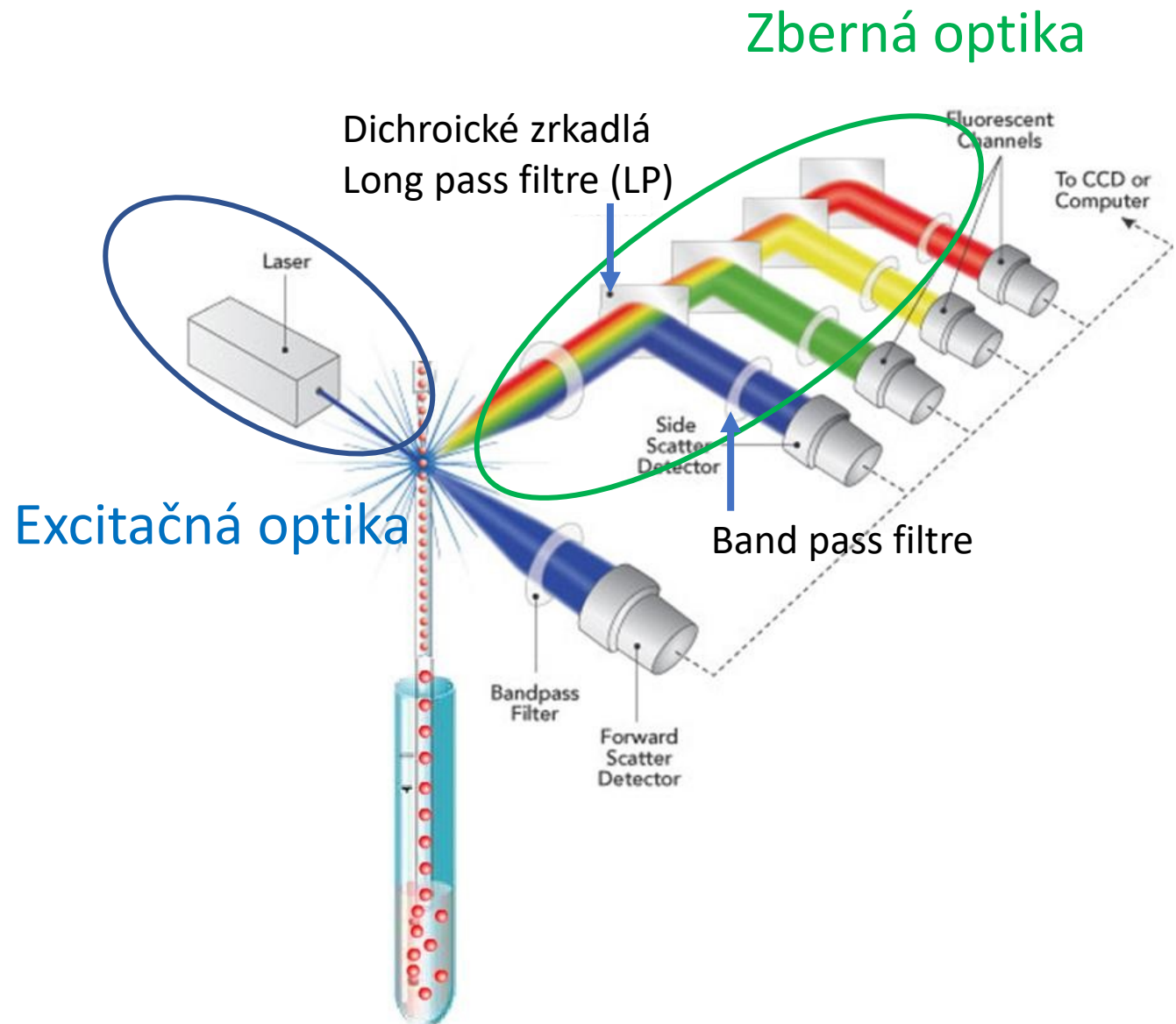
# Optika

- **Excitačná optika**

laser a systém šošoviek (čoček), ktoré zaostrujú a smerujú laserový lúč – pred ožiarením častíc

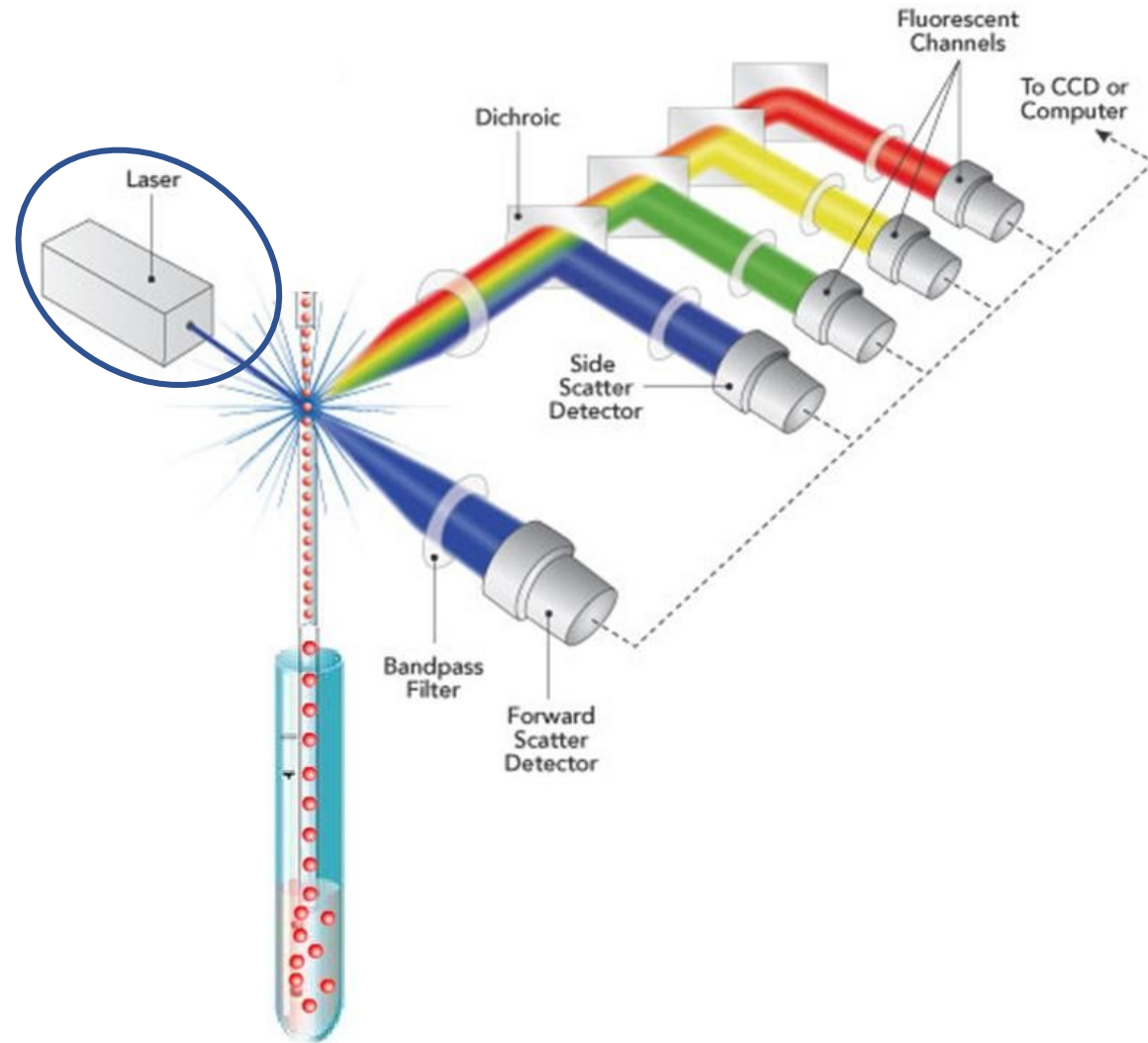
- **Zberná optika**

sústava šošoviek, ktorá vedie a rozdeľuje svetlo do rôznych vlnových dĺžok na príslušné detektory – odrazené a fluorescenčné žiarenie po ožiarení častíc



# Lasery – zdroj žiarenia

- Každý cytometer obsahuje ako zdroj žiarenia laser
- Dnes: najčastejšie využívané 3 až 4 lasery súčasne v jednom stroji
- Každý laser má charakteristickú vlnovú dĺžku žiarenia → excitácia rôznych fluorochromov



Emisný peak: Pri ožiarení fluorochromu lúčom lasera je emitované žiarenie určitej vlnovej dĺžky. Podľa najvyššej intenzity vlnovej dĺžky emitovaného žiarenia sa volí vhodný detektor pre daný fluorochrom.

Fluorochromy excitovateľné jednotlivými lasermi

## excitácia Ar-iontovým laserom (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)

## excitácia He-Ne laserom/red diode (červený) - 633 nm

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

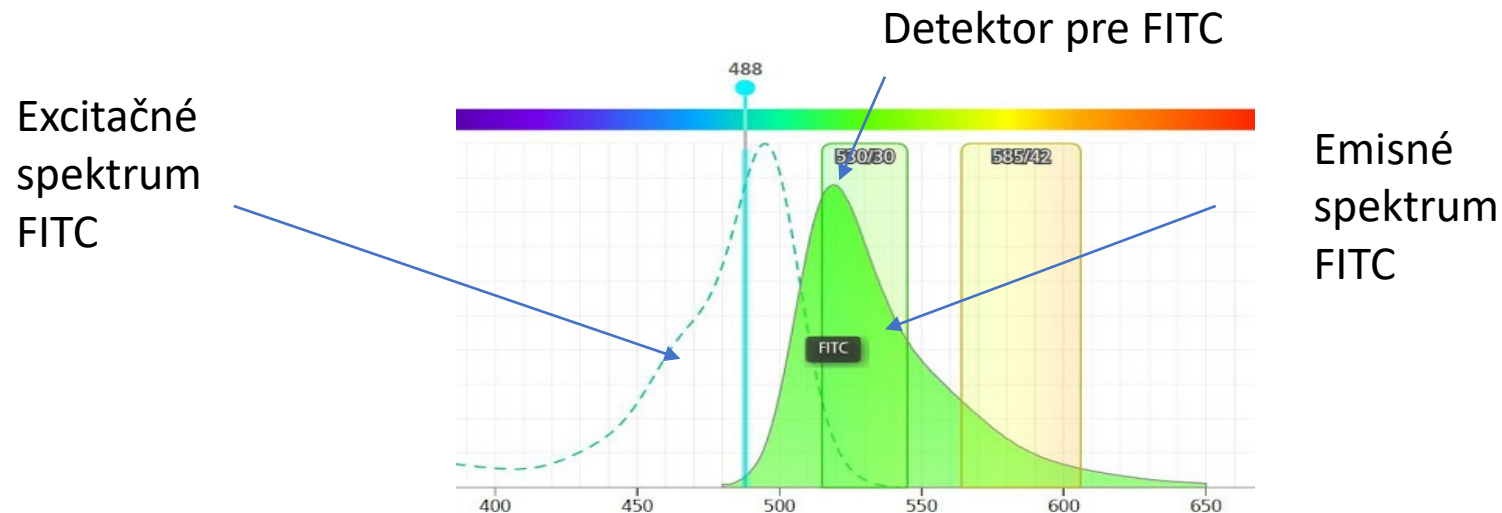
## excitácia UV/violet diode (fialový laser) - 405 nm

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

Emisný peak

# Zber optického signálu v prietokovej cytometrii

- Fluorochrom – po ožiarení lúčom lasera dochádza k emisii svetla v rozsahu určitých vlnových dĺžok – napríklad FITC po ožiarení argonovým laserom s vlnovou dĺžkou 488 nm emituje svetlo v rozsahu 480 – 674 nm, pričom emisné maximum = emisný pík má v 521 nm.
- Detektor pre meranie fluorescencie emitovanej FITC by mal mať rozsah detegovaných vlnových dĺžok medzi 500 – 560 nm – v závislosti na výrobcovi cytometra.





# Zber optického signálu v prietokovej cytometrii

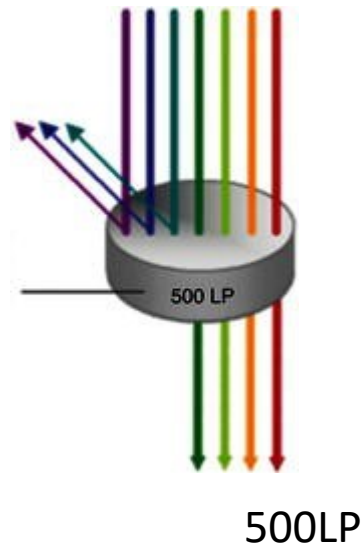
- Vo viacfarebnej prietokovej cytometrii dochádza k emisii niekoľkých fluorochromov naraz – tj. je emitované žiarenie rôznych vlnových dĺžok a je nutné takto vzniknuté žiarenie rozdeliť tak, aby bolo jasné, čo vyžarujú jednotlivé fluorochromy.
- Pri výbere fluorochromov sa v prietokovej cytometrii postupuje tak, aby sa emisné spektra vo svojich píkoch neprekrývali.
- K rozdeleniu emitovaného žiarenia slúžia filtre uvedené na ďalšej snímke:

# Optické filtre

- súčasť zbernej optiky
- odfiltrovanie vhodnej vlnovej dĺžky emitovaného svetla pred dopadom na detektor

## Long Pass (LP)

Prepúšťa všetky dĺžky vyššie ako špec. vlnová dĺžka



Slúži k rozdeleniu emitovaného svetla napríklad tak, že prepúšťa žiarenie vyššie ako 500 nm – tým dôjde k oddeleniu napr. odrazeného svetla lasera, ktorý má vlnovú dĺžku 488 nm. Takto upravené prepustené žiarenie je rozdelené ďalšími filtermi.

# Optické filtre

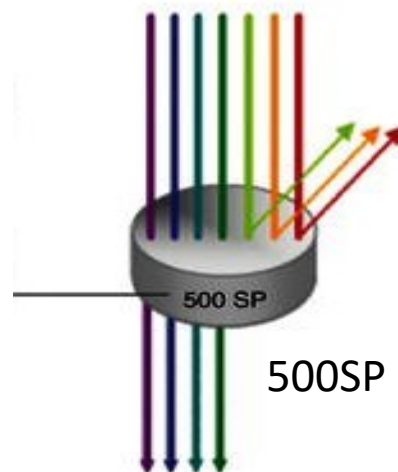
Pre usmernenie žiarenia na detektory pre jednotlivé fluorochromy potrebujeme rozdeliť emitované žiarenie tak, aby na určitý detektor dopadalo žiarenie v danom rozsahu vlnových dĺžok. K tomu potrebujeme short pass filtre a band pass filtre.

Short pass filter prepúšťa žiarenie kratšej vlnovej dĺžky a žiarenie s vyššou vlnovou dĺžkou odrazí. Prepustené žiarenie putuje smerom k detektoru, kde je jeho rozsah upravený pomocou band pass filtrov – je teda prepustené žiarenie vlnovej dĺžky typickej pre emisný pík jedného fluorochromu.

Odrazené žiarenie putuje k ďalším short pass filtrom, ktoré následne prepustia žiarenie vyššej vlnovej dĺžky ako v predchádzajúcich short pass filtroch.

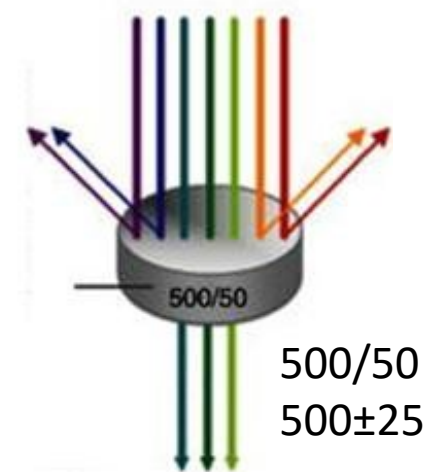
## Short Pass (SP)

Prepúšťa všetky dĺžky kratšie ako špec. vlnová dĺžka



## Band Pass (BP)

Prepúšťa špecifické rozmedzie vlnových dĺžok



# Optické filtre

## Dichroické filtre (zrkadlá)

- usmerňujú odrazené a emitované žiarenie do detekčnej dráhy smerujúcej k detektorom
- rozdeľujú odrazené a fluorescenčné žiarenie tak, aby dopadalo na vhodný detektor
- najčastejšie umiestnené pod uhlom  $45^\circ$ , v tom prípade časť svetla odrážajú pod uhlom  $90^\circ$ , časť prepúšťajú
- sú používané ako **long pass** a **short pass** filtre

# Elektronika

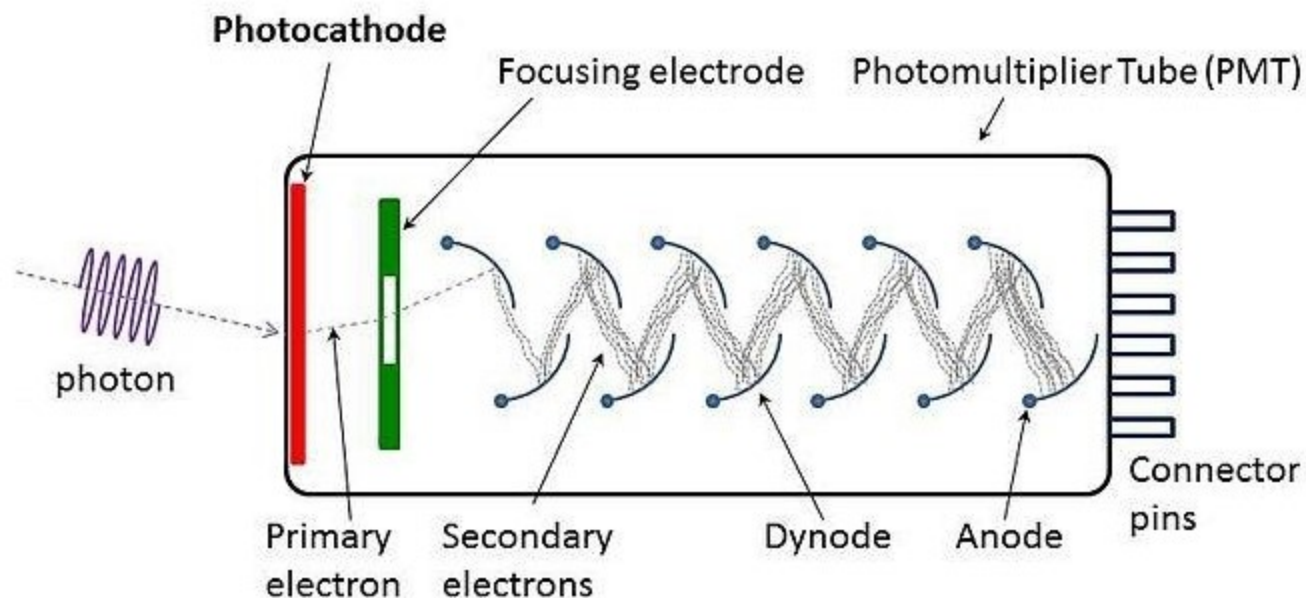
- Svetelné signály sú prevádzané na elektrické
- Typy detektorov:
  - lavinové fotodiódy: detekcia FSC
  - fotonásobiče PMT (PhotoMultiplierTube): detekcia SSC a fluorescencie

## PMT

- veľmi citlivé, sú schopné zachytiť i slabé signály
- zvyšujú signál primárneho dopadajúceho žiarenia

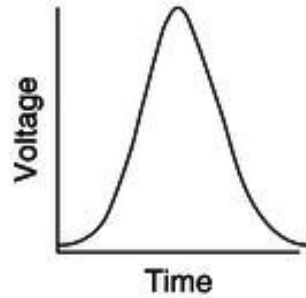
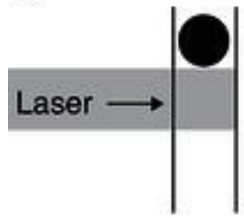
## Princíp PMT

Žiarenie vo forme fotónov dopadá na fotokatódu. Z nej sú na základe fotoelektrického javu vyrazené elektróny, ktoré sú ďalej usmernené na tzv. dynódy (katódy z pozitívnym napätím). Na jednotlivé dynódy je privádzané stále vyššie napätie, čo umožňuje urýchlenie elektrónov a zvýšenie ich energie. Urýchlené elektróny majú dostatok energie na vyrazenie ďalších elektrónov z povrchu dynód. Počet elektrónov exponenciálne rastie. Vzniknuté elektróny dopadajú na koniec na anódu, na ktorej dochádza k vzniku napäťového pulzu. PMT umožňuje premeniť slabý počiatočný signál na silný napäťový pulz.

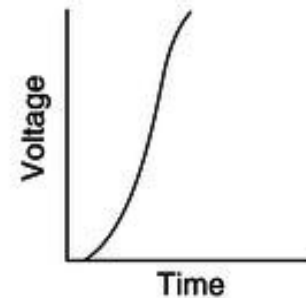
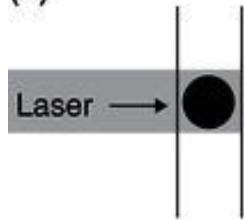


# Vznik napätového pulzu / Intenzita fluorescence

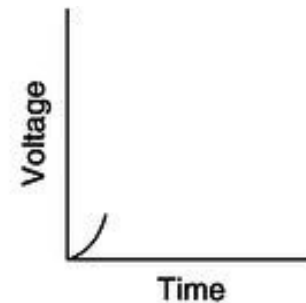
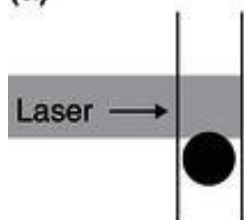
(c)



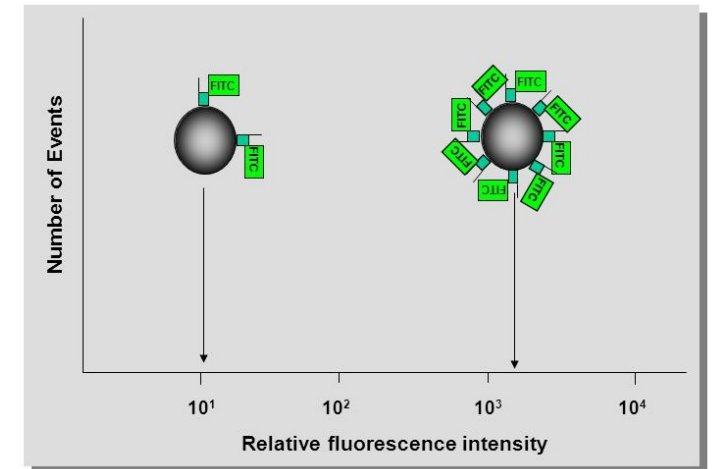
(b)



(a)



- prechod bunky laserovým lúčom generuje vznik napätového pulzu na detektore
- veľkosť napätového pulzu je daná intenzitou žiarenia (intenzitou fluorescence), ktoré dopadlo na PMT
- intenzita fluorescence závisí na:
  - expresii jednotlivých povrchových znakov
  - počte naviazaných fluorochromov
  - na sile fluorochromu (fluorochromy nevykazujú rovnakú intenzitu fluorescence)
- napätovým pulzom sú pomocou prevodníkov pridelené digitálne hodnoty rozdelené do 0-1024 kanálov na základe veľkosti pulzu
- každý z týchto kanálov odpovedá určitej intenzite fluorescence



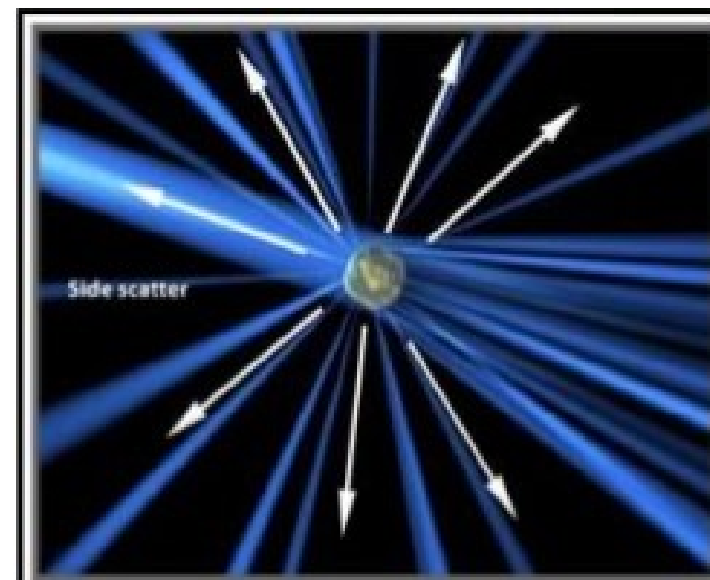
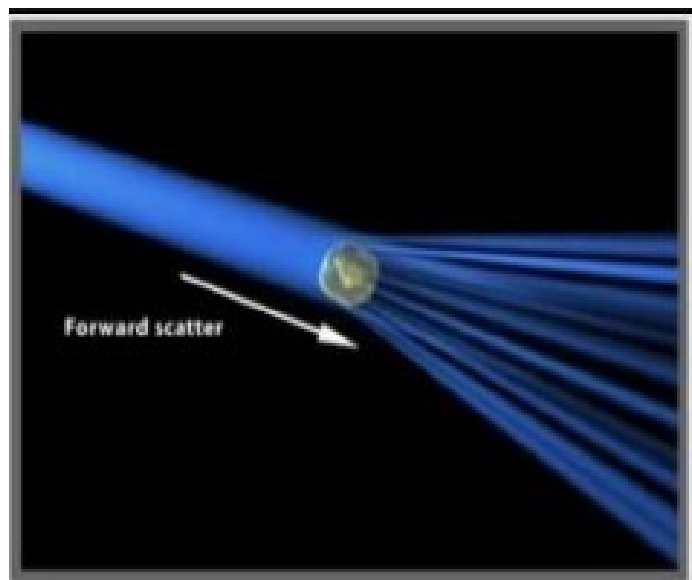
# Veľkosť vs. granularita

- Veľkosť a členitosť bunky určujeme na základe rozptylu žiarenia (light scatter): prechádzajúca častica vychýli dopadajúce žiarenie

Forward Scatter (FSC) – rozptyl žiarenia v priamom smere → závisí na veľkosti buniek = určuje veľkosť

Side Scatter (SSC) – rozptyl žiarenia do strán → závisí na členitosti buniek = určuje granularitu

- Stačí jeden laser
- Nie je to fluorescenčné žiarenie (nepotrebujeme MPL s fluorochrómami)

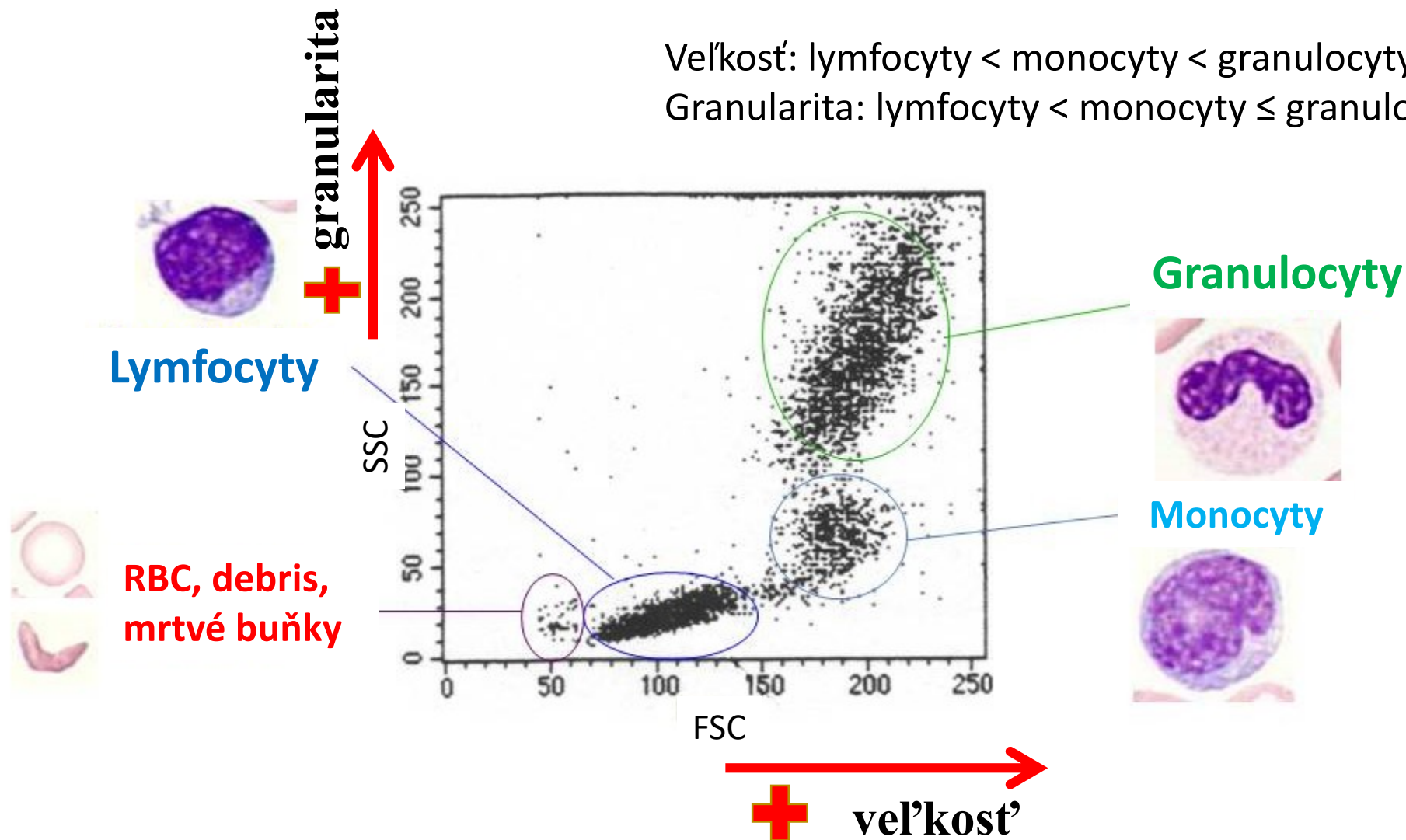


# FSC vs. SSC

Kombináciou FSC a SSC získavame rozlíšenie základných subpopulácií Leukocytov

Veľkosť: lymfocyty < monocyty < granulocyty

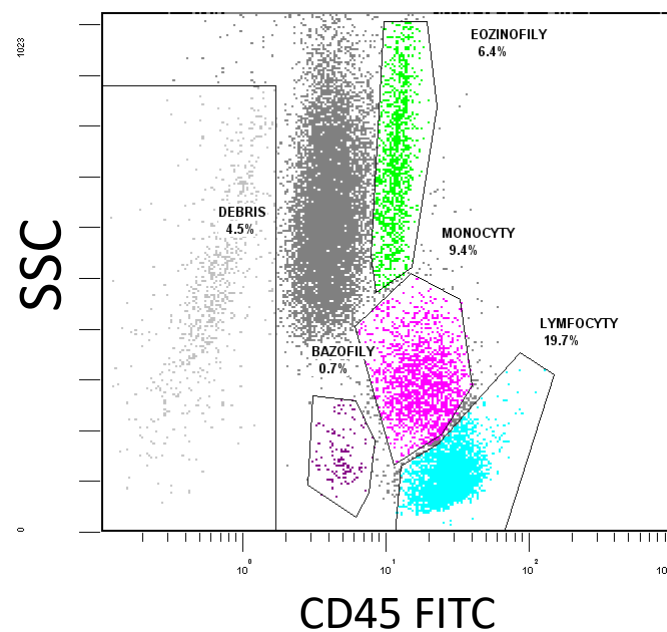
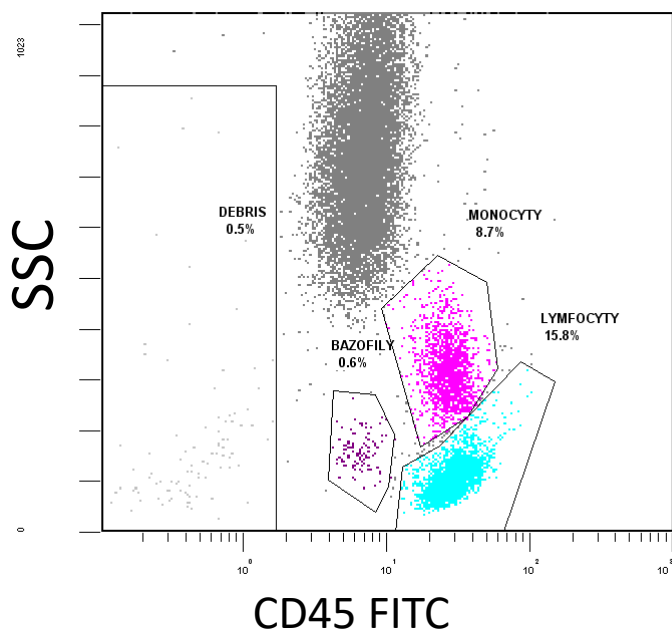
Granularita: lymfocyty < monocyty ≤ granulocyty





# Diferenciálny rozpočet

Stanovenie relatívneho počtu leukocytárných a lymfocytárných subpopulácií pomocou prietokovej cytometrie



$$x \% \text{ Lymfocyty} + y \% \text{ Monocyty} + z \% \text{ Granulocyty}$$
$$x+y+z = 100 \% = \text{Leukocyty}$$

$$x_1 \% \text{ T-lym.} + x_2 \% \text{ B-lym} + x_3 \% \text{ NK bunky}$$
$$x_1+x_2+x_3 = 100 \% = \text{Lymfocyty}$$

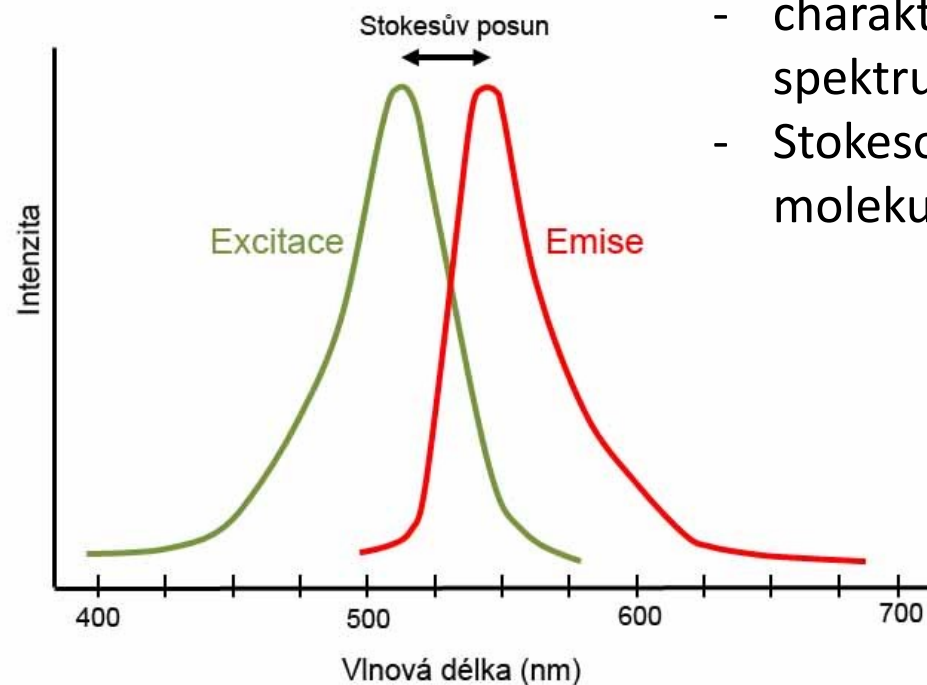
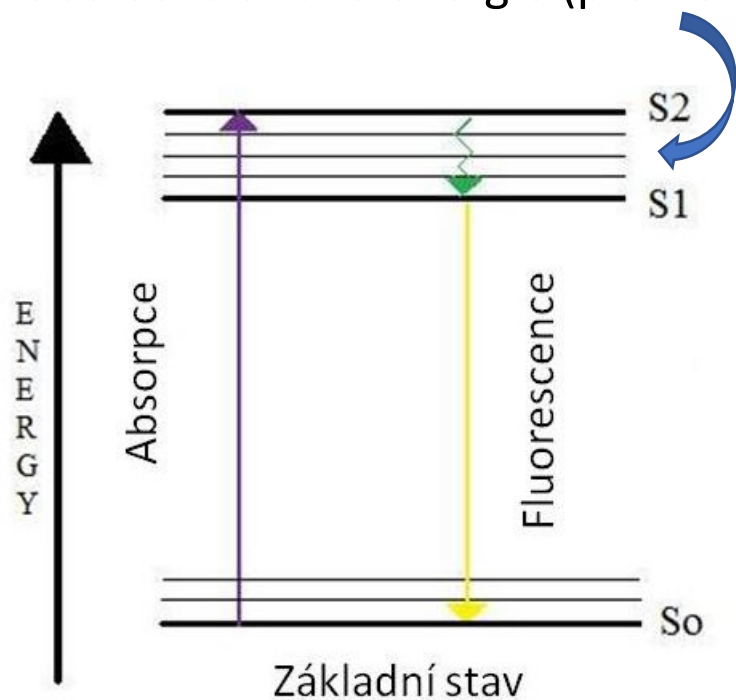
$$x_{11} \% \text{ CD4 Th} + x_{12} \% \text{ CD8 Tc}$$
$$x_{11} + x_{12} = 100 \% = \text{T-lymfocyty}$$

CD45- panleukocytárny znak, prítomný na všetkých leukocytoch

# Fluorescencia

Veľa buniek má rovnakú alebo podobnú morfológiu- na základe exprese povrchových znakov ich vieme roztriediť do skupín

- využívajú sa k tomu monoklonálne Ab značené **fluorochromom** špecifické k určitému epitopu
- fluorochrom je molekula schopná absorbovať žiarenie špecifickej vlnovej dĺžky (excitácia) a následne vyžiariť kvantum energie (emisie) vo forme fluorescenčného žiarenia
- čiastočná strana energie (premena na teplo) = Stokesov posun



## Fluorochrom

- charakteristické excitačné a emisné spektrum
- Stokesov posun je daný štruktúrou molekuly

# Fluorochromy

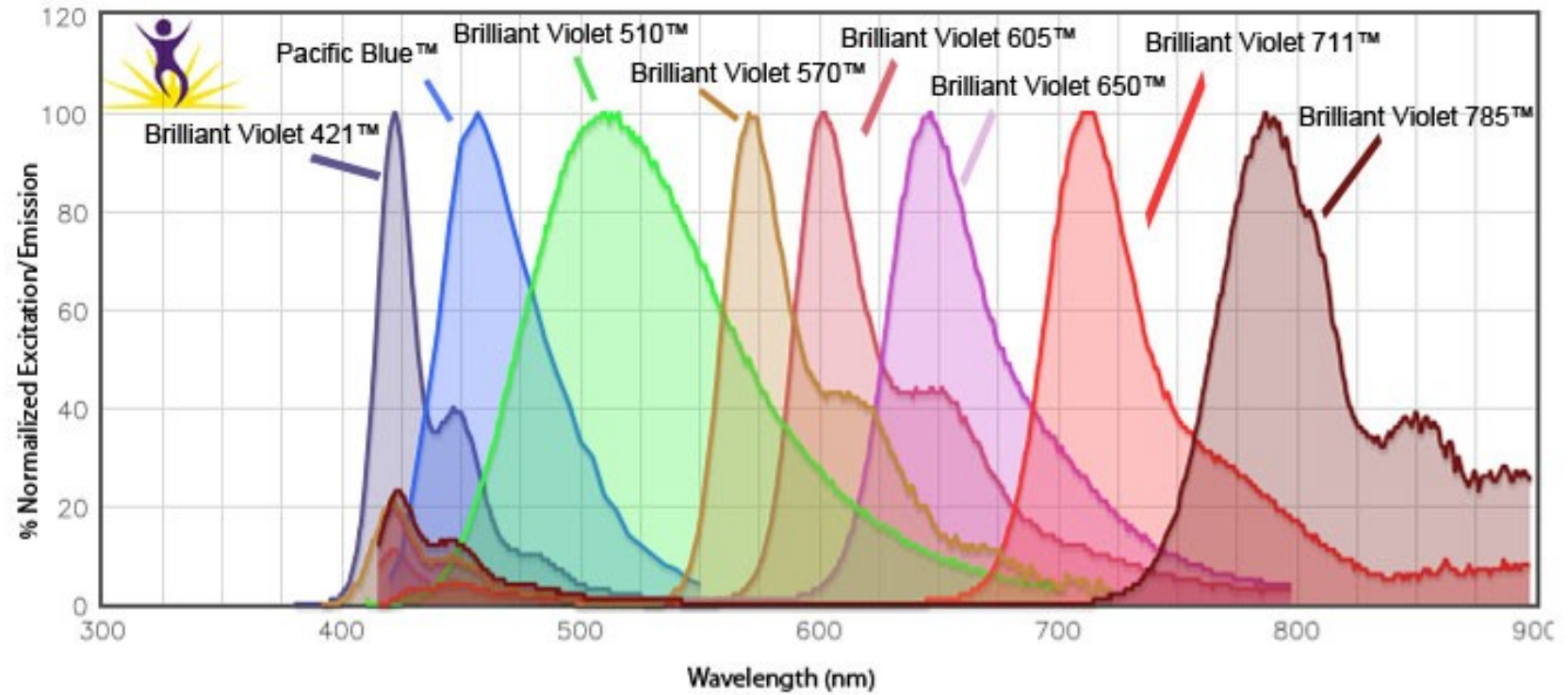
- Sú excitované vhodnou vlnovou dĺžkou (nutné zvoliť správny laser)
- Emitujú svetlo špecifickej vlnovej dĺžky (nutné zvoliť detektor v správnom pásme vlnových dĺžok)
- I neznačené bunky môžu byť fluorescenčné vďaka slabej autofluorescencii

# Fluorochromy

- Polycyklické organické molekuly a ich deriváty
  - Fluorescein isothiokyanát (FITC), Cyaniny, Texas Red, rada Alexa, Pacific a Cascade
  - AmCyan, Propidium Iodide, 7-AAD, CFSE
- Fluorescenčné proteíny
  - Phycoerythríny (PE), Allophycocyaniny, PerCP, GFP,...
- Quantum Dots

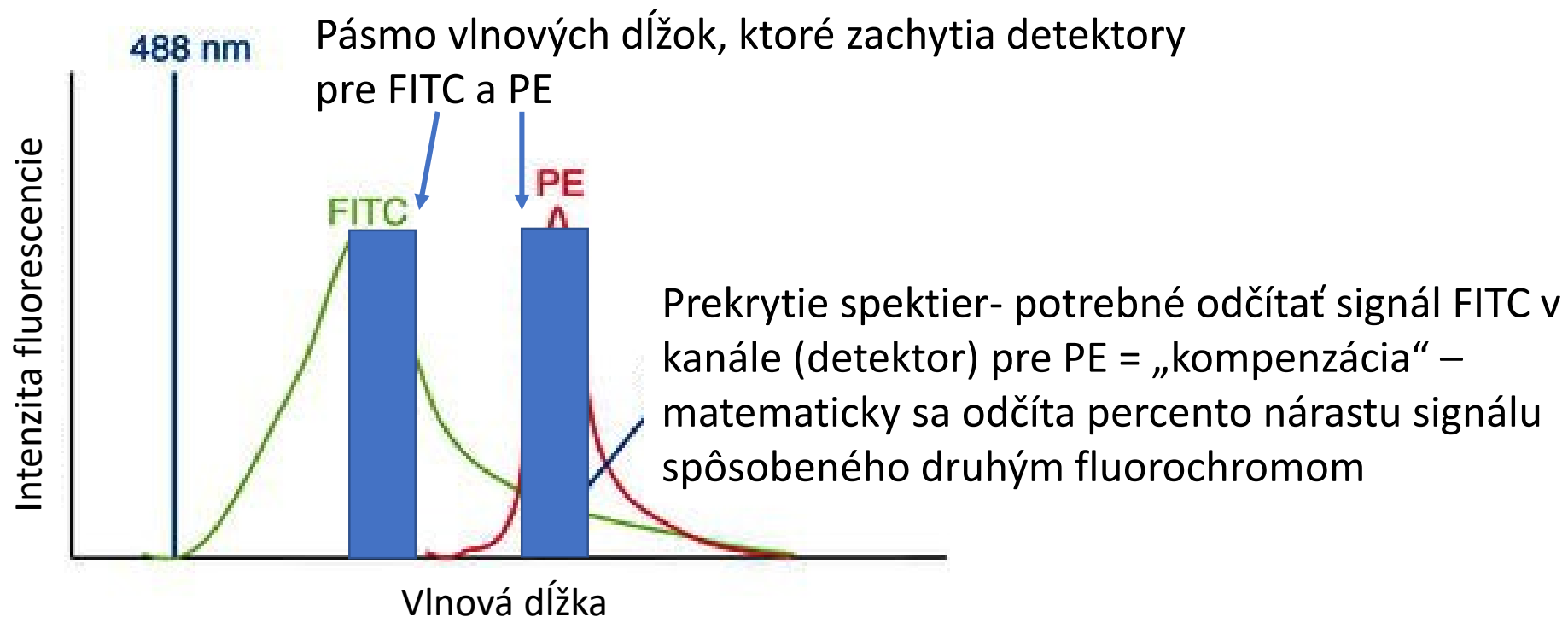
Schopné absorbovať fotóny budiaceho žiarenia (napr. 488 nm) a následne ( $10^{-8}$  s) emitovať fotóny s dlhšou vlnovou dĺžkou (nap. 500 – 800 nm). Fluorescenčné žiarenie má teda inú „farbu“.

# Ukážka prekrytia emisných spektier niektorých fluorochromov



# Prekrytie spektier

- Fluorochromy typicky emitujú svetlo v širokom spektre vlnových dĺžok
- V závislosti na usporiadaní filtrov, detektory môžu zachytiť fluorescenciu od iných fluorochromov, ktoré sú detekované v iných kanáloch (priesvit, prekrytie)

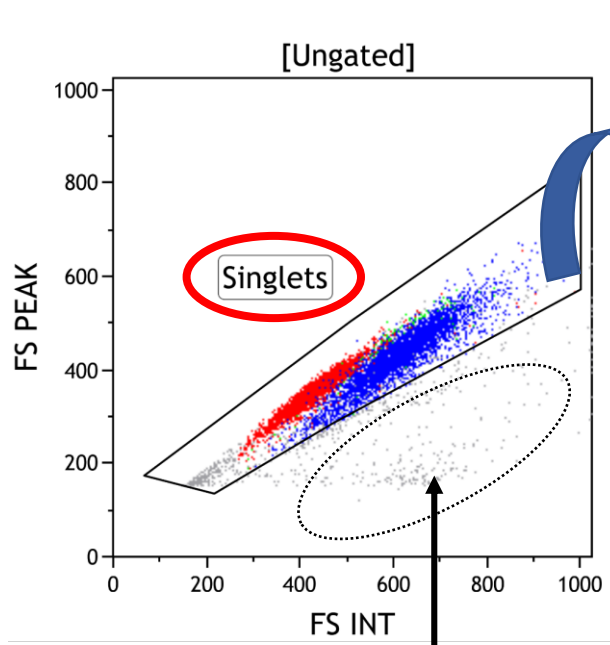


# Analýza nameraných dát – Gating Strategy

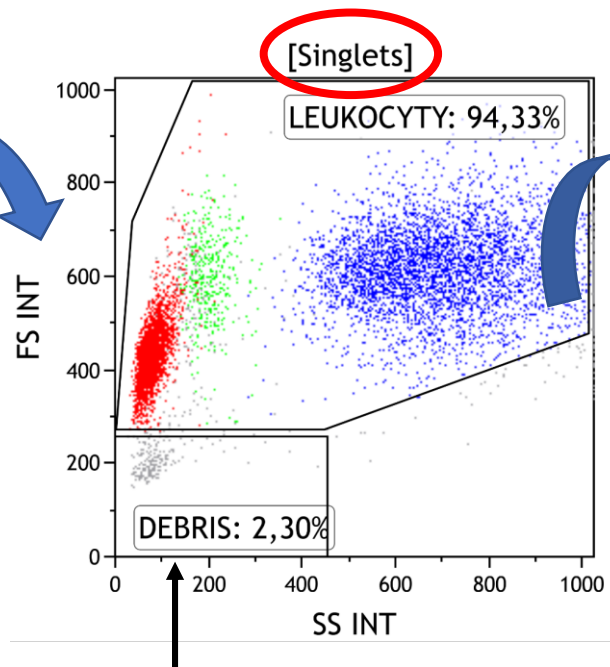
*Gatovacia stratégia:* postupný výber buniek záujmu.

Namerané vzorky obsahujú okrem rôznych typov buniek, taktiež zlepené bunky, mŕtve bunky alebo prachové častice. Gatovacia stratégia slúži v odfiltrovaní nechcených častíc z analýzy a k výberu cieľovej populácie buniek, na základe rôznej kombinácie pozitívnych znakov. V grafe sa následne ohraničia len bunky, ktoré nás zaujímajú (vytvorí sa tzv. gate). Ďalší graf už zobrazuje len bunky výberu (ohraničené) z predchádzajúceho grafu.

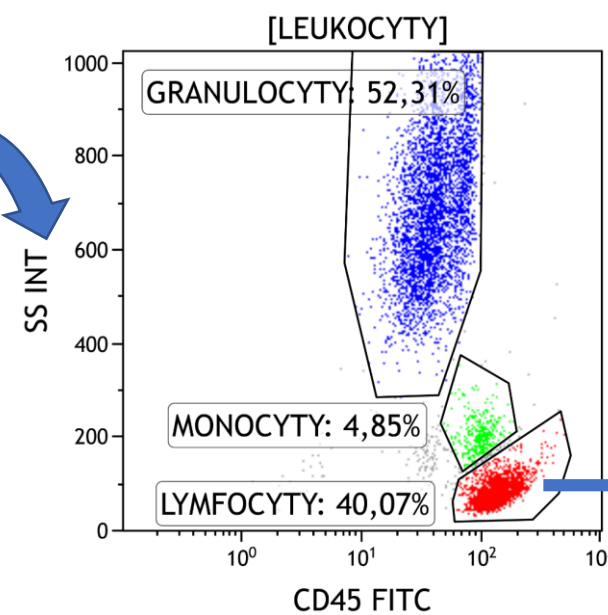
Názov gate, z ktorého sa zobrazujú bunky



Oddelenie doubletov- zlepených buniek



Mŕtve bunky a prachové častice

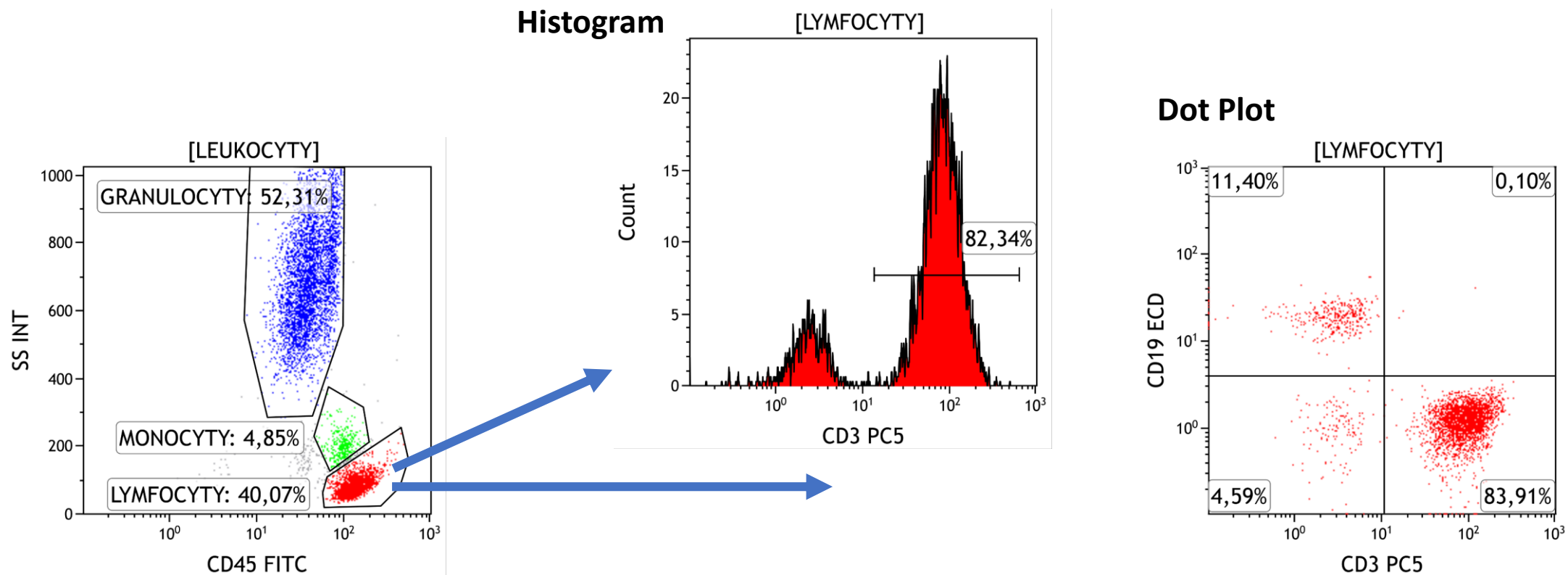


Pokračovanie na nasledujúcom slide (už len gate Lymfocyty)

# Analýza nameraných dát – Štatistika

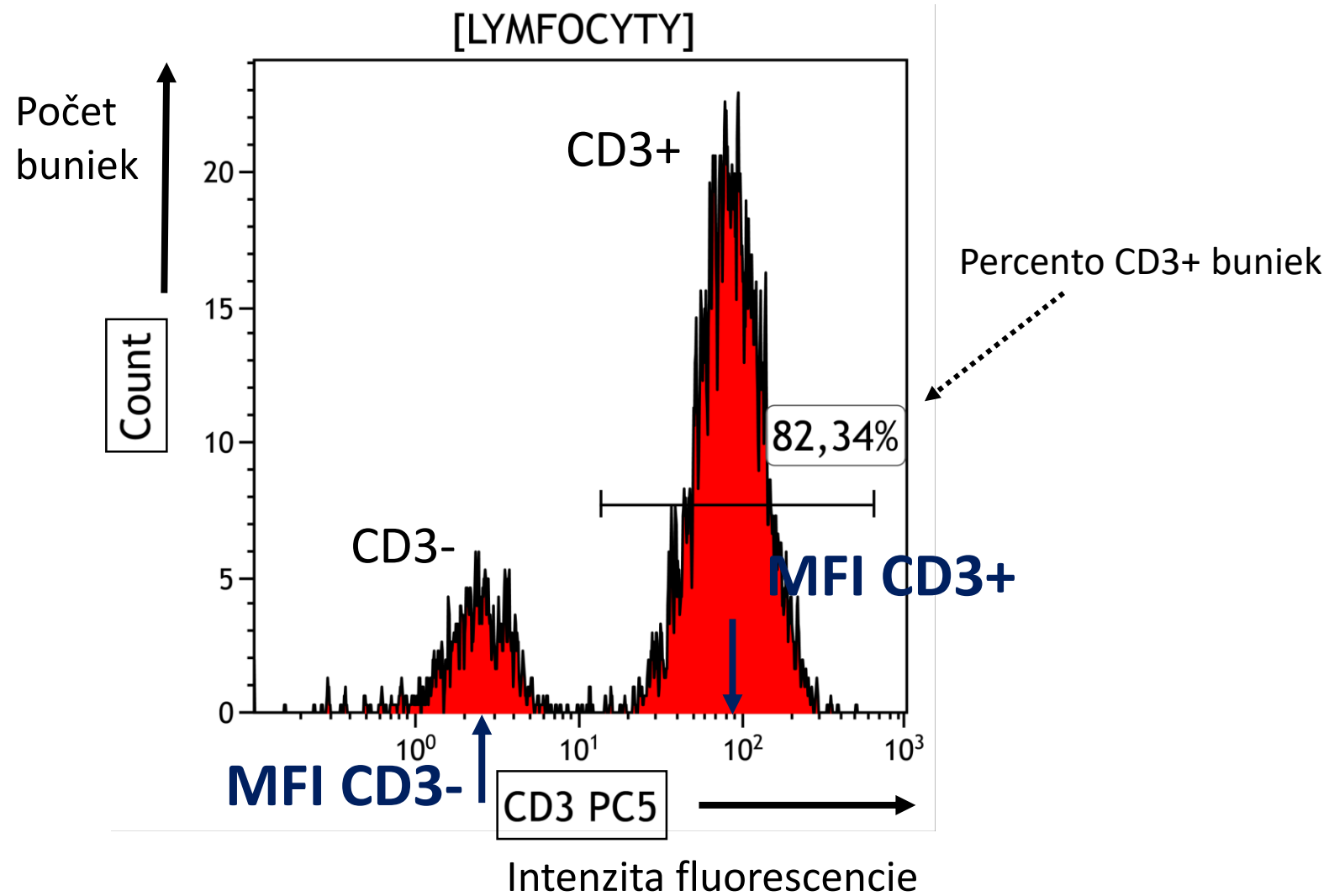
K zobrazeniu dát sa používajú viaceré typy grafov: Histogram, Dot Plot  
Z gatovaných buniek vytvárame štatistiku:

- údaje o počte buniek
- relatívnom zastúpení (percento buniek; %) bunkových subpopulácií
- porovnanie mediánu intenzity fluorescencie **MFI** = miery expresie sledovaných znakov





# HISTOGRAM

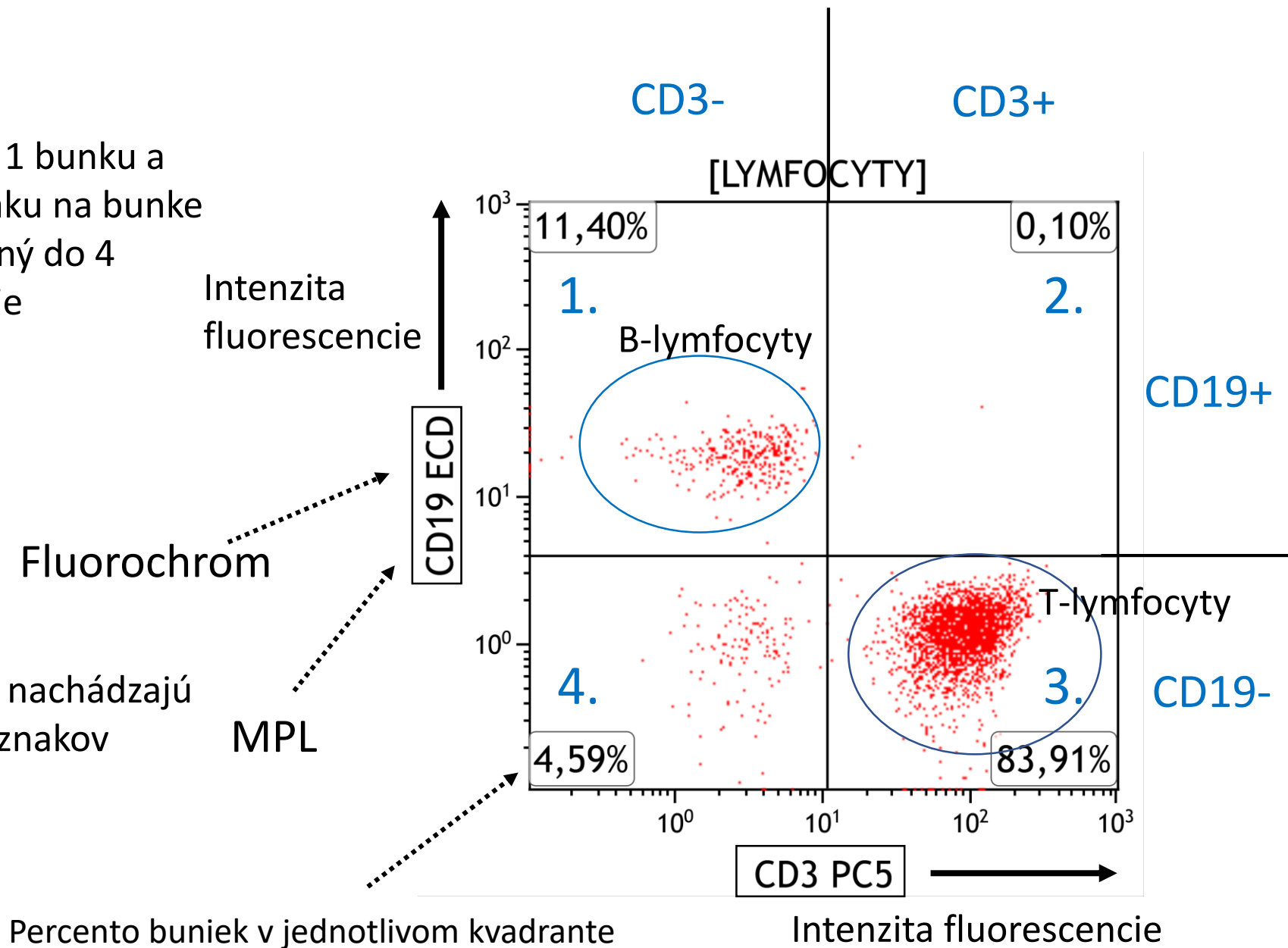


# DOT PLOT

- každá bodka (tečka) zobrazuje 1 bunku a vyjadruje expresiu daného znaku na bunke
- príklad grafu: Dot Plot rozdelený do 4 kvadrantov, na základe expresie sledovaných znakov:

1. CD19+ CD3- = B-lymfocyty (11,40% z Lymfocytov)
2. CD19+ CD3+
3. CD19- CD3+ = T-lymfocyty (83,91% z Lymfocytov)
4. CD19- CD3-

- v jednotlivých kvadrantoch sa nachádzajú bunky s podobnou expresiou znakov



# Výhody a nevýhody prietokovej cytometrie

## Výhody

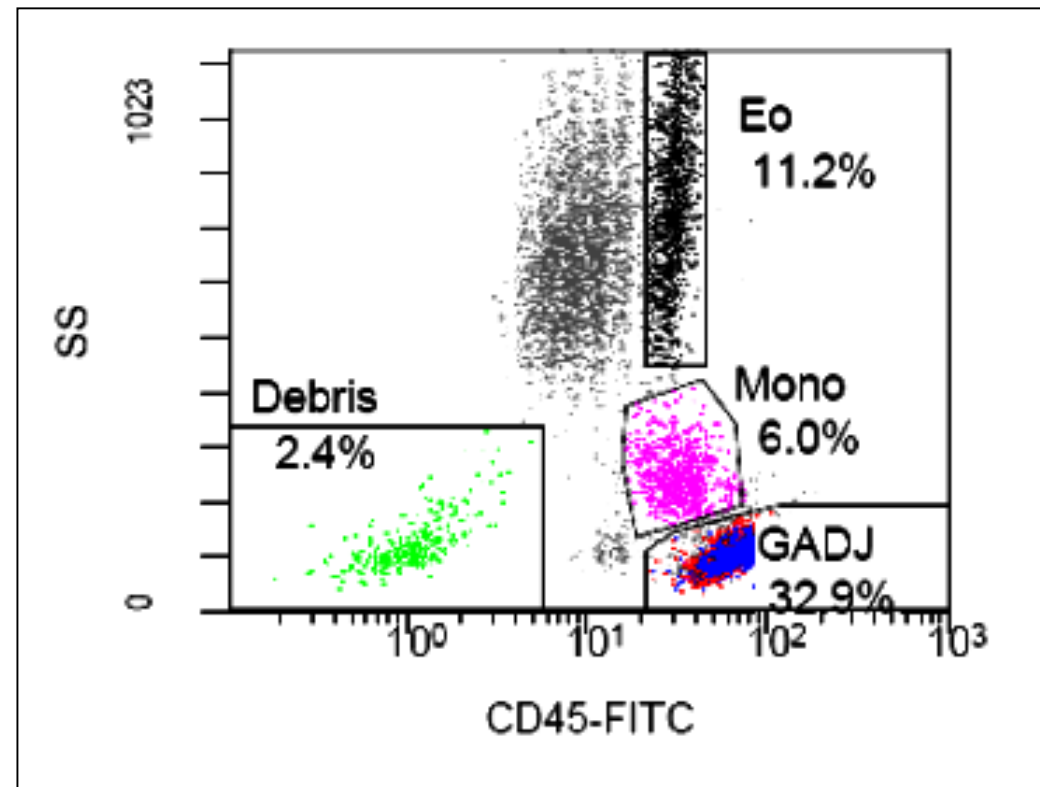
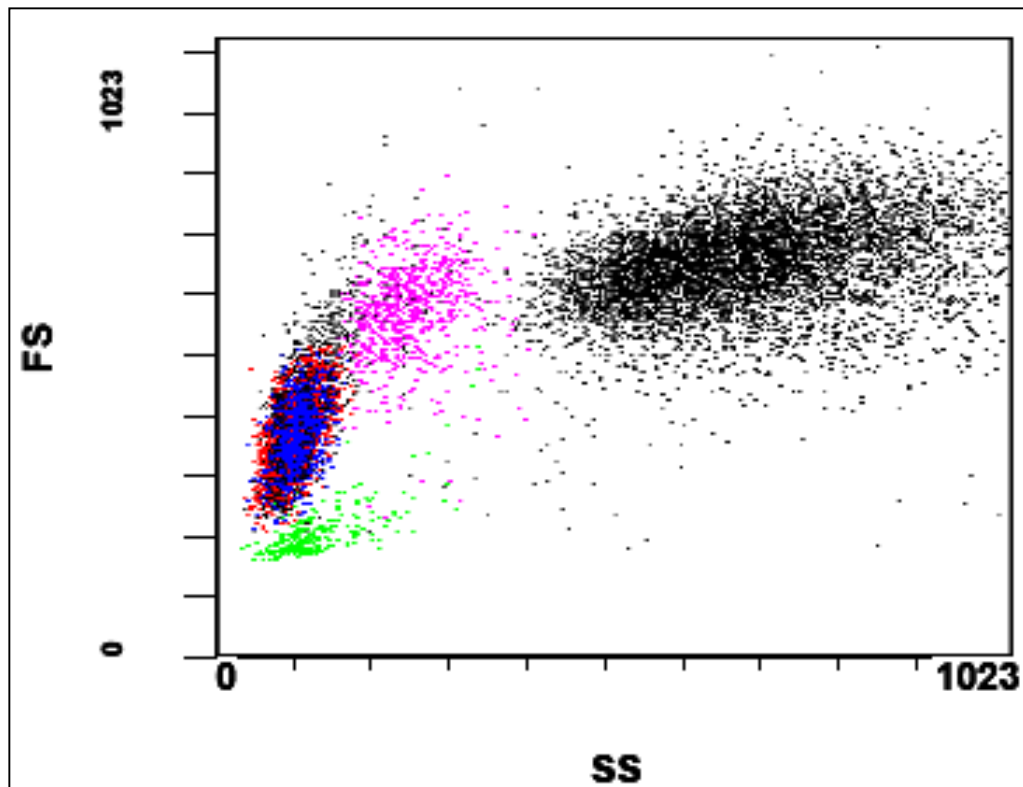
- Veľké množstvo analyzovaného materiálu – veľké množstvo dát
- Analýza trvá niekoľko minút
- Kvalitatívna + kvantitatívna analýza
- Možné manipulačné operácie- napr. triedenie buniek s vybranými vlastnosťami (cell sorting)

## Nevýhody

- Vysoká finančná náročnosť
- Zostavenie experimentu, analýza a vyhodnotenie dát závislé na skúsenostiach obsluhy
- Analýza vzoriek čo najskôr po odbere
- Nevidíme lokalizáciu signálu na bunke

# Krvný diferenciál

Základné vyšetrenie v imunologickom laboratóriu: stanovenie lymfocytárnych subpopulácií  
Pripravujú sa **dve skúmavky**:



Sledujeme počet: Lymfocytov (GADJ); Monocytov (Mono); Eosinofilov (Eo); množstvo Debris (spád = mŕtve bunky)

# Krvný diferenciál

Základné vyšetrenie v imunologickom laboratóriu: *stanovenie zastúpenia lymfocytárnych subpopulácií v plnej krvi*

Prietokovou cytometriou sa stanovuje počet buniek v jednotlivých subpopuláciách leukocytov a porovnáva sa s tabuľkovými hodnotami.

Pripravujú sa **dve skúmavky** s nasledujúcou kombináciou monoklonálnych protilátok MPL:

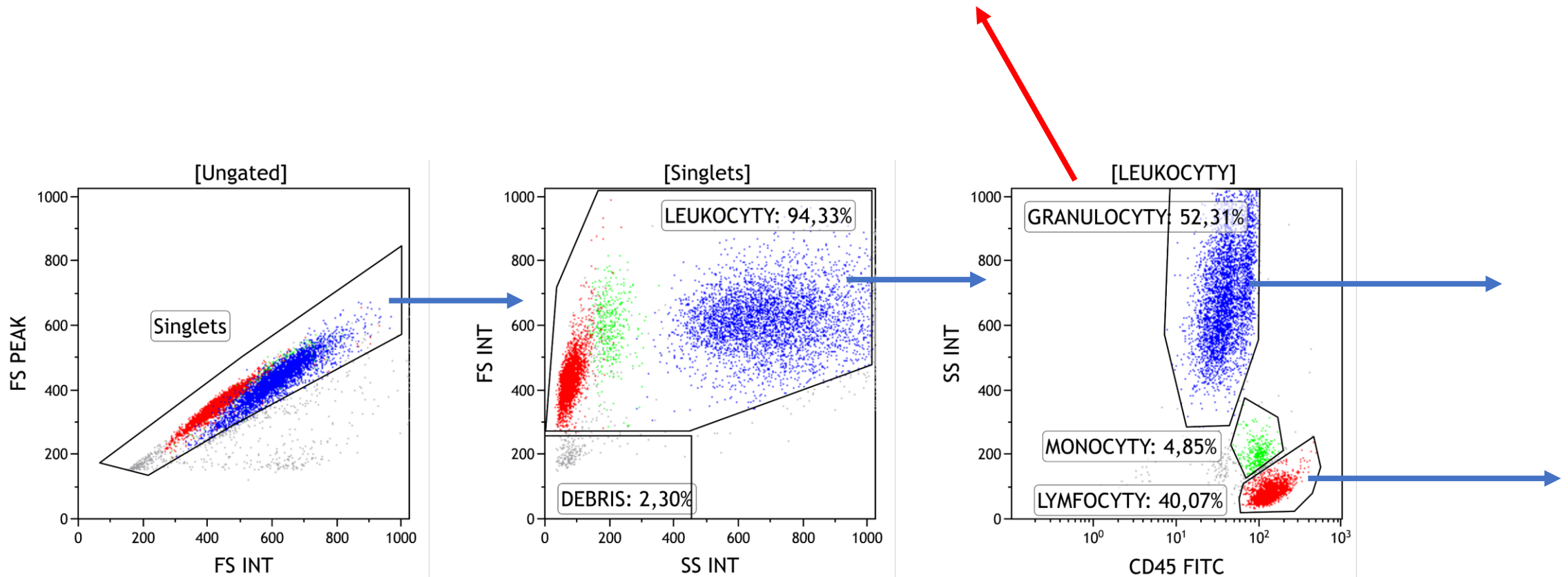
		MPL + Fluorochrom	
<b>Skúmavka A:</b>	<b>45µl krvi + x µl MPL</b>	<b>CD45</b>	<b>FITC</b>
		<b>CD3</b>	<b>PC5</b>
		<b>CD4</b>	<b>RD-1</b>
		<b>CD8</b>	<b>ECD</b>
<b>Skúmavka B:</b>	<b>45µl krvi + x µl MPL</b>	<b>CD45</b>	<b>FITC</b>
		<b>CD3</b>	<b>PC5</b>
		<b>CD19</b>	<b>ECD</b>
		<b>CD16/56</b>	<b>RD-1</b>

Rovnaké fluorochromy ale konjugované s inou MPL = musia byť rozdelené do dvoch skúmaviek

*Vzorky krvi s MPL sa inkubujú 25 min, nasleduje lýza erytrocytov a meranie na prietokovom cytometry*

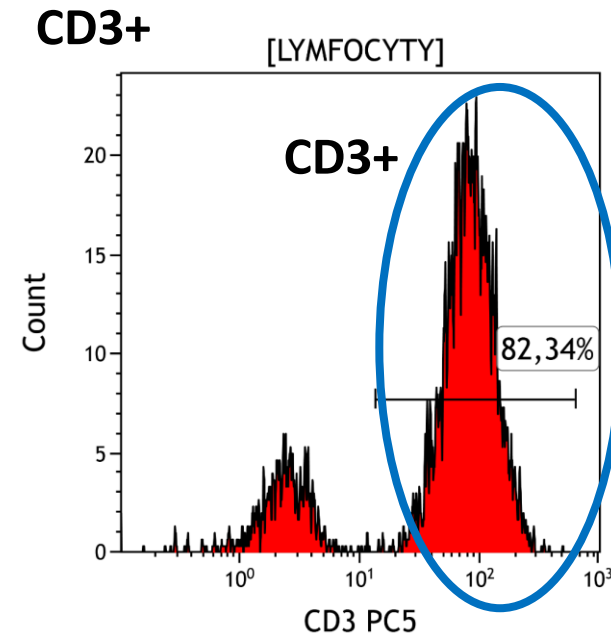
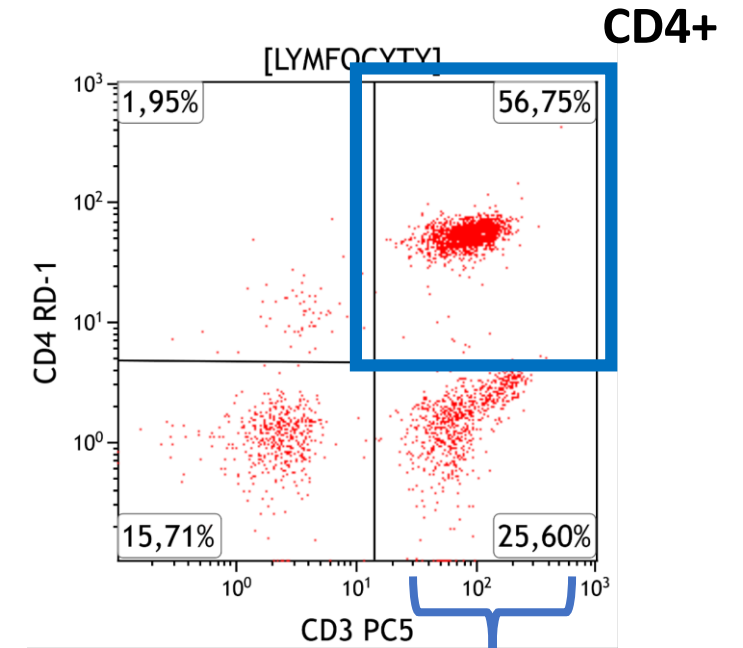
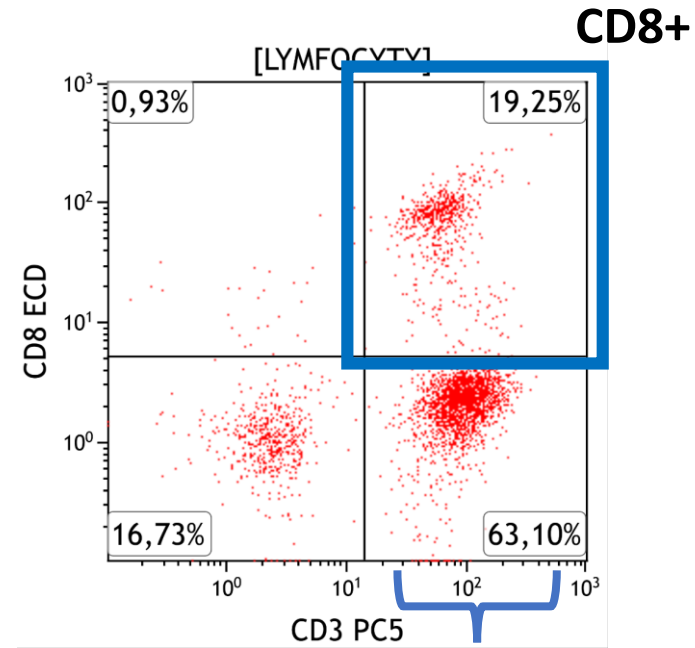
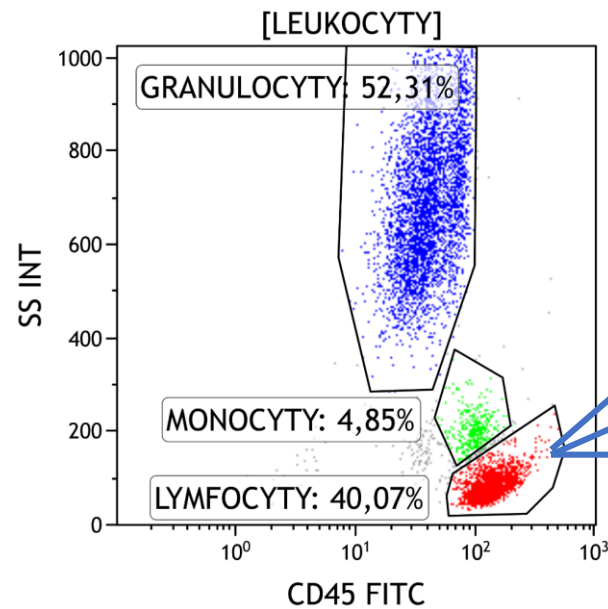
# Krvný diferenciál – gatovacia stratégia + výsledky

Z oboch skúmaviek získame relatívny počet (%): Lymfocytov + Monocytov + Granulocytov  
Do výsledku sa zapisuje priemerná hodnota z oboch skúmaviek



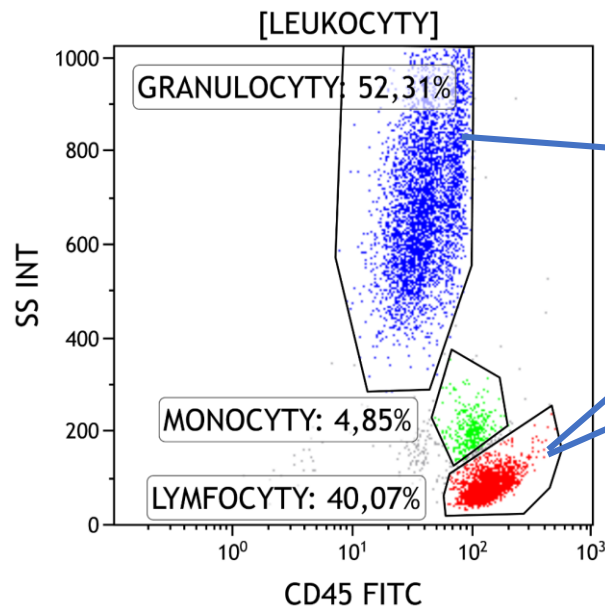
# Krvný diferenciál – gatovacia stratégia

## Skúmavka A:

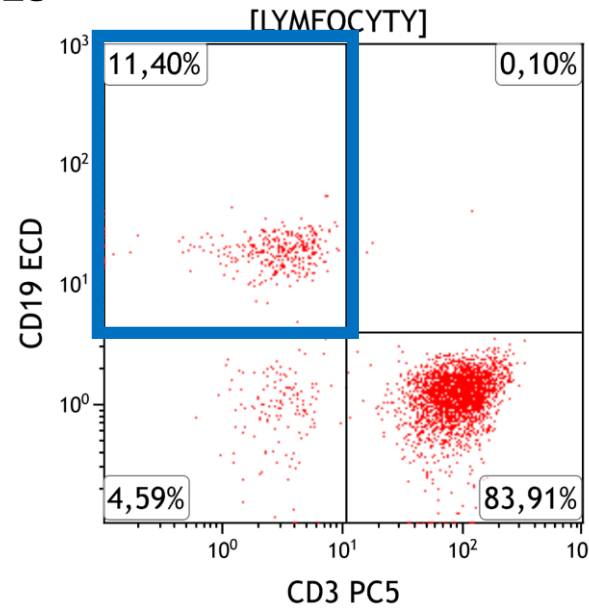


# Krvný diferenciál – gatovacia stratégia

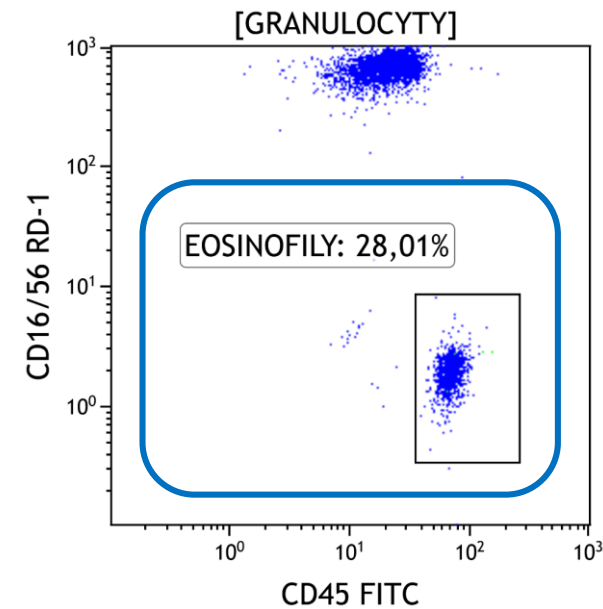
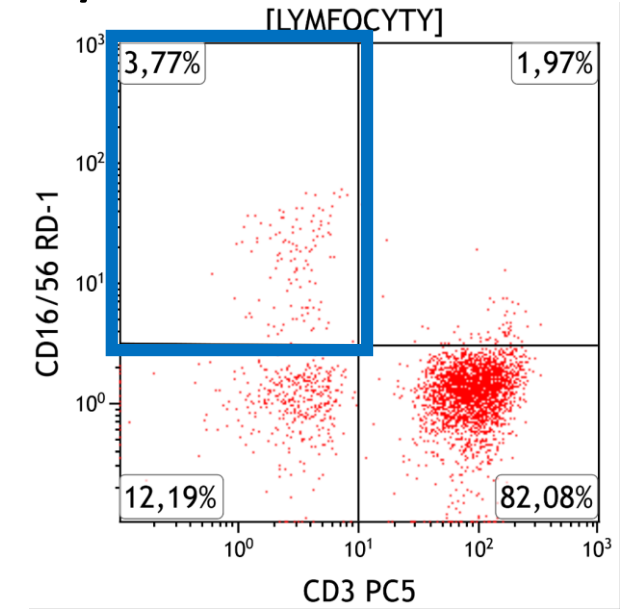
## Skúmavka B:



## CD19+



## CD16/56+





# Krvný diferenciál – výsledky

Cytometrické meranie:

Zo **skúmavky A** získame relatívny počet:

**CD3+** T-lymfocytov

**CD3+CD4+** pomocných Th-lymfocytov

**CD3+CD8+** cytotoxických Tc-lymfocytov

Zo **skúmavky B** získame relatívny počet:

**CD3+** T-lymfocytov

**CD19+** B-lymfocytov

**CD16/56+** NK buniek

**eosinofilov**

Zo **skúmavky A+B** získame relatívny počet:

**Monocytov**

**Lymfocytov**

**Granulocytov**

*Relatívny počet:* percentuálne zastúpenie danej populácie buniek

*Absolútny počet:* počet buniek na 1l krvi

- Pomocou počítacia leukocytov stanovíme počet leukocytov na 1l krvi
- Z relatívneho počtu danej subpopulácie a absolútneho počtu leukocytov dorátame absolútny počet danej subpopulácie buniek

Vo výsledkovom liste sa udáva relatívny a taktiež absolútny počet buniek jednotlivých subpopulácií a porovnáva sa s fyziologickými/tabuľkovými hodnotami

# Stanovenie absolútneho počtu lymfocytárnych subpopulácií

Počet Leukocytov	3,6-10 x10 <sup>9</sup> l
Lymfocyty	20-55 %
Monocyty	0-10 %
Granulocyty – neutrofily, eosinofily, bazofily	37-75 %

Príklad:		relatívny počet	abs. počet
Leukocyty	5 x10 <sup>9</sup> l	Lymfocyty: 20%	1,0 x10 <sup>9</sup> l
		CD3: 75%	0,75 x10 <sup>9</sup> l
		CD19: 10%	0,1 x10 <sup>9</sup> l
		CD15,56: 15%	0,15 x10 <sup>9</sup> l

# Hodnotenie výsledkov

- Bola dostatočná **lýza** erytrocytov? (Ak nie, erytrocyty prekryjú všetky leukocyty a nie je možné odčítať jednotlivé subpopulácie leukocytov, výsledky sú skreslené)
- Sú prítomné všetky MPL → Ak nie → boli pridané? ; je to pacientom? ; liečbou?
- Sú dáta správne skompenzované?
- Bola dodržaná **gatovacia stratégia**?
- Výsledné hodnoty: fyziologický rozsah hodnôt zastúpenia leukocytárnych subpopulácií závisí na veku, k hodnoteniu sú dostupné tabuľky uvádzajúce fyziologické hodnoty pre rôzne vekové skupiny)



v norme – výsledky sa môžu uvoľniť

zvýšené/znížené oproti norme? → je nutné opakovať meranie, prípadne dovyšetriť s použitím iných MPL, u patologických hodnôt je nutné opakovať odber v iný deň

# Vyšetrenie lymfocytov periférnej krvi

ZNAK	EXPRESE	FUNKCE	ZASTOUPENÍ NA LYMFOCYTECH PERIFERNÍ KRVE (%)
CD3	všetchny 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)

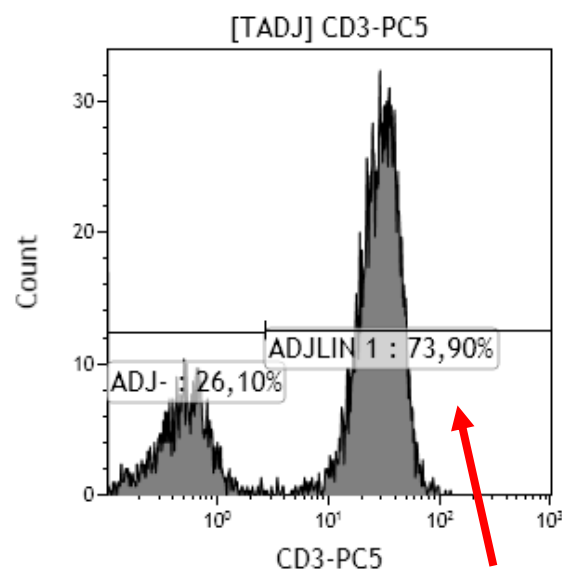
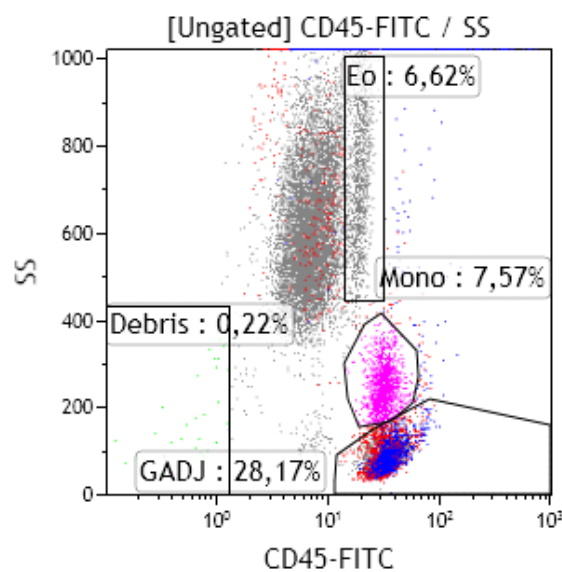
# Hodnotenie nálezu jednotlivých subpopulácií

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> ystémový <u>l</u> upus <u>e</u> rythematodes-SLE)
↑	CD8+	u některých pacientů s CVID - virové infekce (EBV, CMV, HIV)

Obsahuje: vzorka krvi + MPL (aCD45; aCD3; aCD4; aCD8)

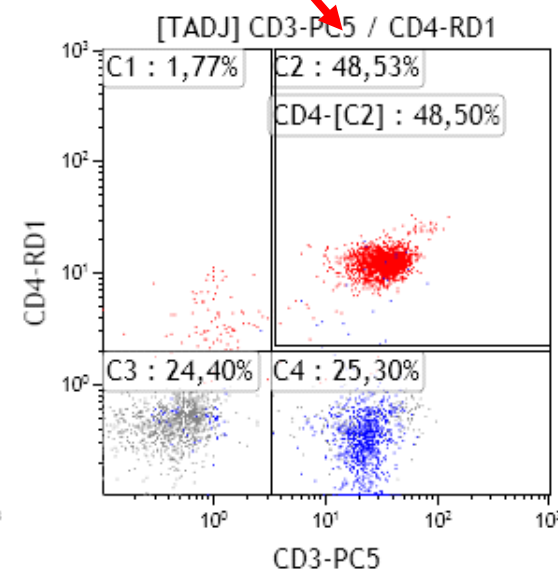
# Skúmavka A

Získame relatívny počet:

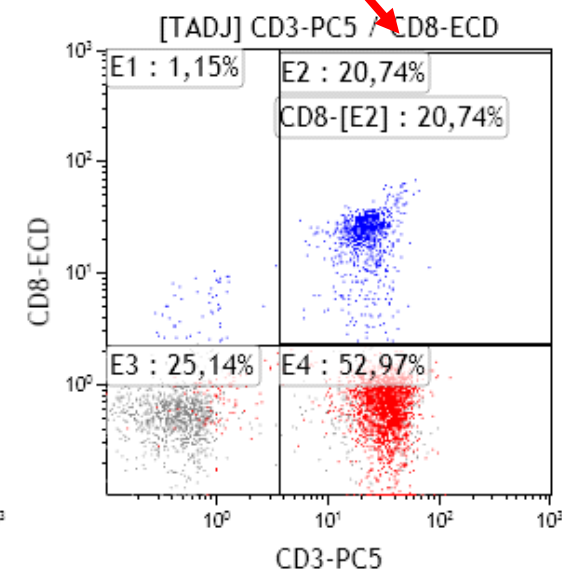


T-lymfocytov CD3+

Pomocných Th-lymfocytov  
CD3+ CD4+



Cytotoxických Tc-lymfocytov  
CD3+ CD8+

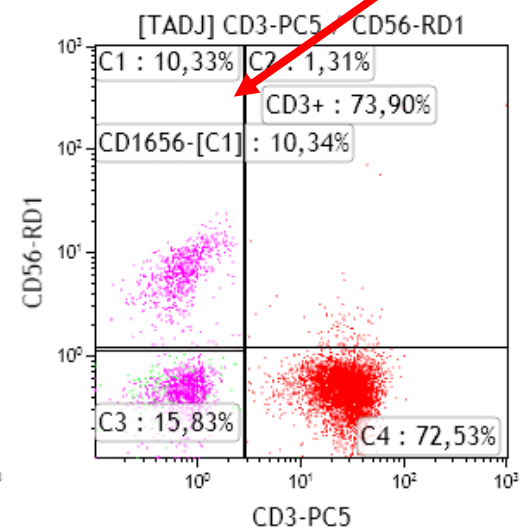
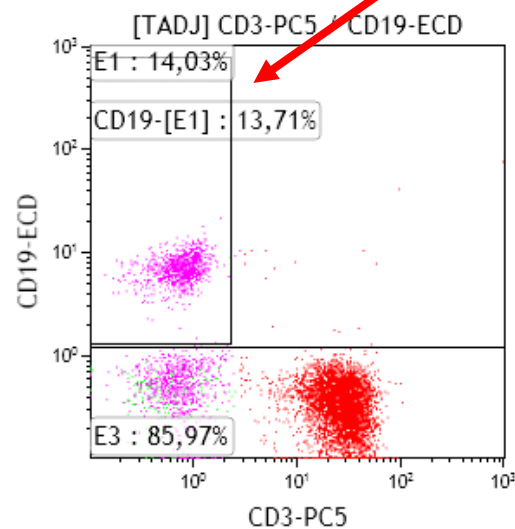
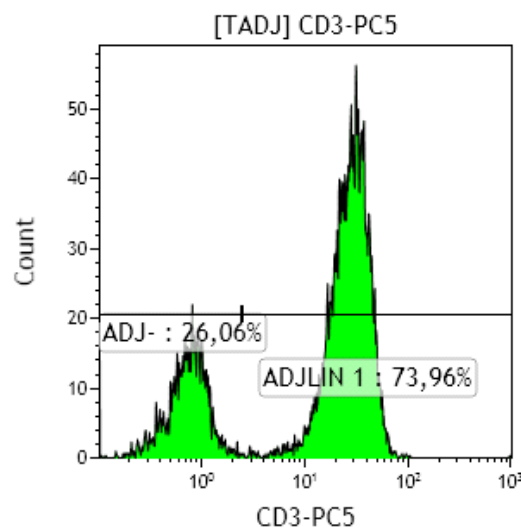
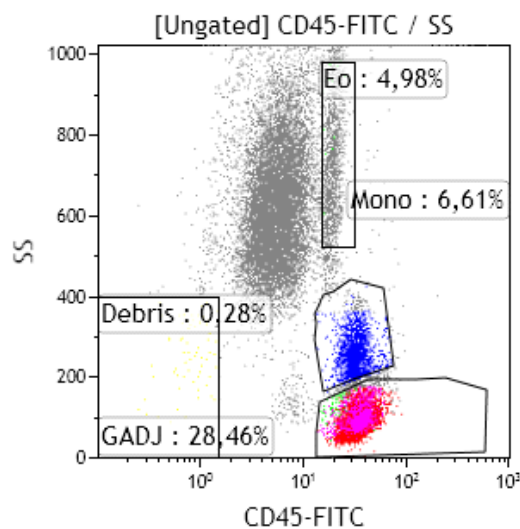


Obsahuje: vzorka krvi + MPL (aCD45; aCD3; aCD19; aCD56)

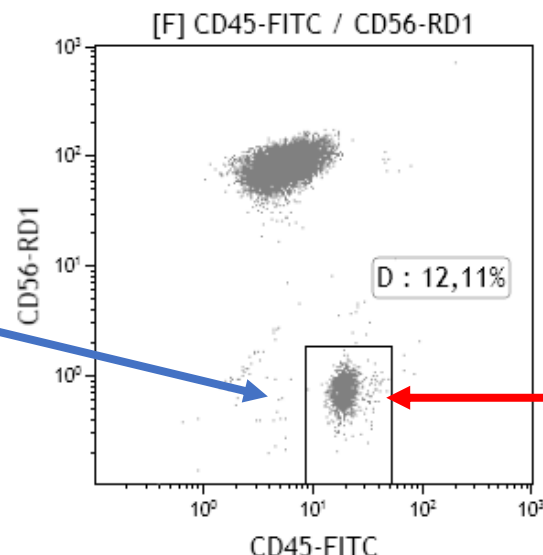
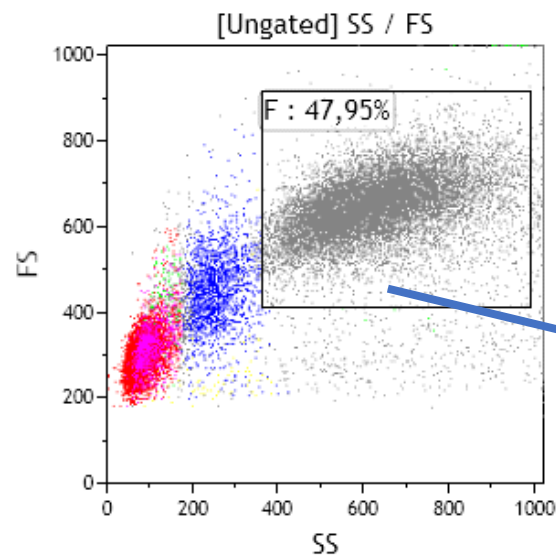
# Skúmavka B

B-lymfocytov CD19+

NK buniek CD56+CD3-



Získame relatívny počet:



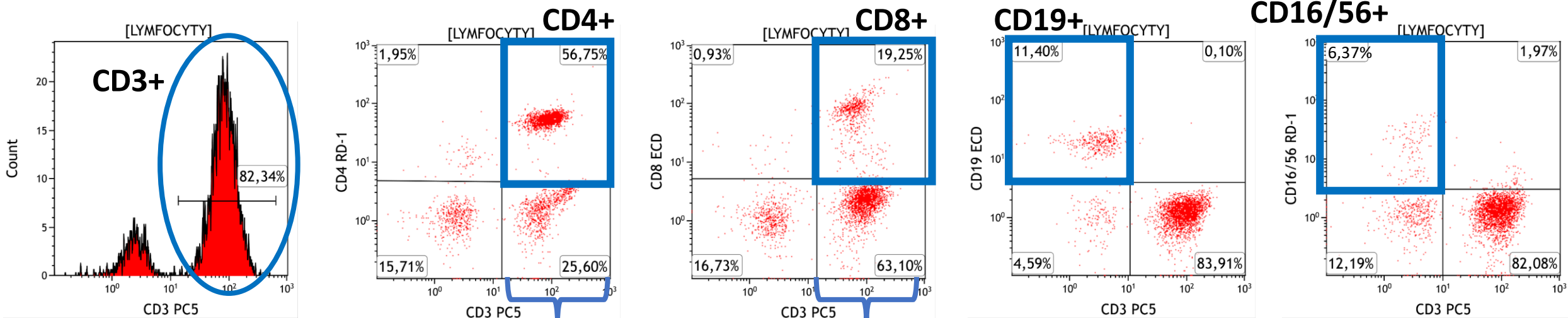
Eosinofilov

# Príklady využitia FACS v praxi



Základom imunologického vyšetrenia je krvný diferenciál, určenie základných leukocytárnych subpopulácií. V prípade patologických hodnôt je nutné merania doplniť s využitím iných MPL a bližšie charakterizovať možný patologický stav.

## Zdravá osoba



## Fyziologické hodnoty:

### T LYMFOCYTY

- CD3+ : 82 (58-85)%
- CD3+ 4+ : 57 (30-60)%
- CD3+ 8+ : 19 (15-35)%

### B LYMFOCYTY

- CD19+ : 11 (7-23) %

### NK LYMFOCYTY

- CD16,56+ : 6 (6-20)%

# Vplyv infekcie

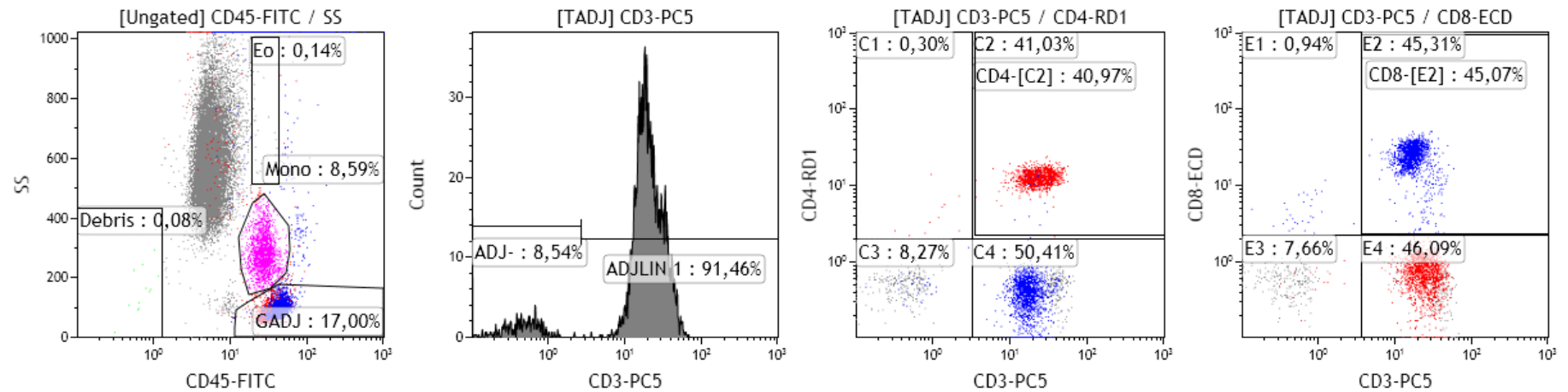
## Bakteriální infekce

• Počet leukocytů:	↑	Th:	CD3+ 4+:	↑
• Lymfocyty:	↓	Monocyty:	CD14+HLA DR+ :	↓
• Granulocyty:	↑			

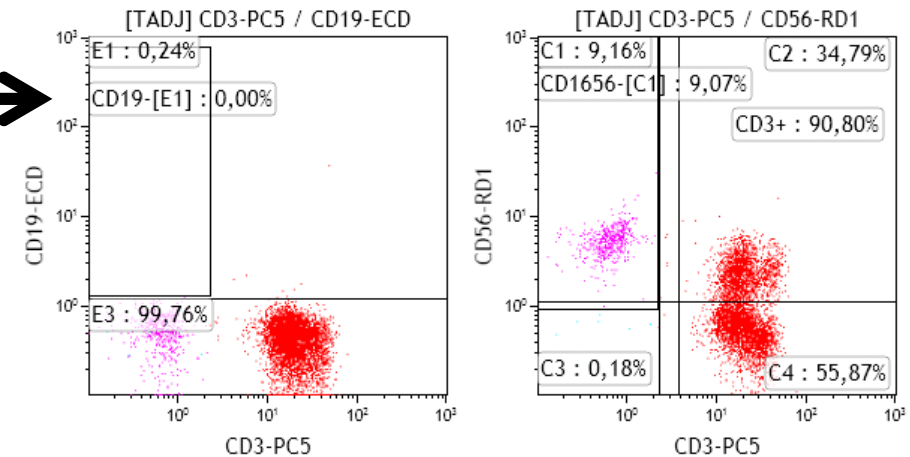
## Virová infekce

• Počet leukocytů:	↓	Tc:	CD3+ 8+:	↑
• Lymfocyty:	↑		CD3+8+HLA DR+ :	↑
• Granulocyty:	↓		CD3+8+38+ :	↑

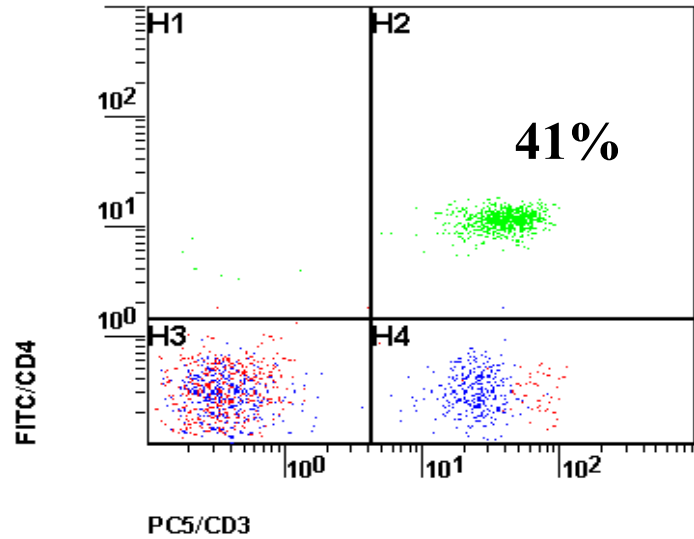
# Pacientka: Ž, \*1957



- v krvnom diferenciáli chýbajú B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytov)
- v nemocničnom systéme zistená liečba rituximabom – pacientka reumatológie
- výsledok: deplécia B lymfocytov vplyvom liečby (po 4-6 mesiacoch návrat k normálnym hladinám)
- odber a meranie nutné opakovať po niekoľkých mesiacoch

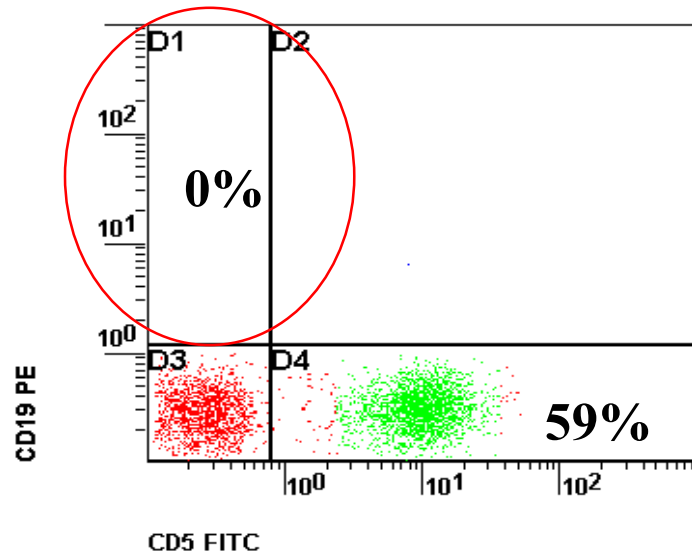
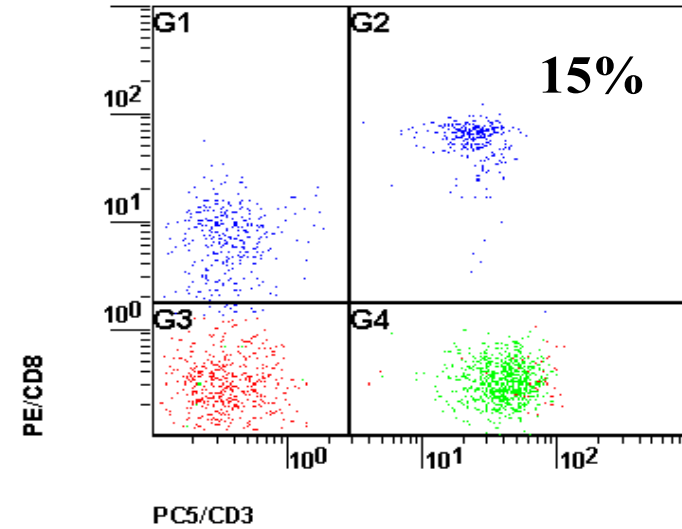


# Krvný diferenciál: X-viazaná agamaglobulinémia



## T LYMFOCYTY

- **CD3+ : 59 (58-85)%**
- **CD3+ 4+ : 41 (30-60)%**
- **CD3+ 8+ : 15 (15-35)%**

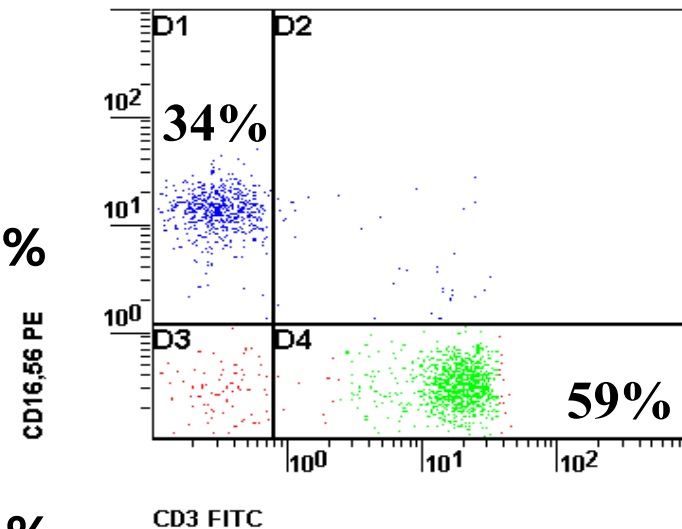


## B LYMFOCYTY

- **CD19+ : 0 (7-23) %**

## NK LYMFOCYTY

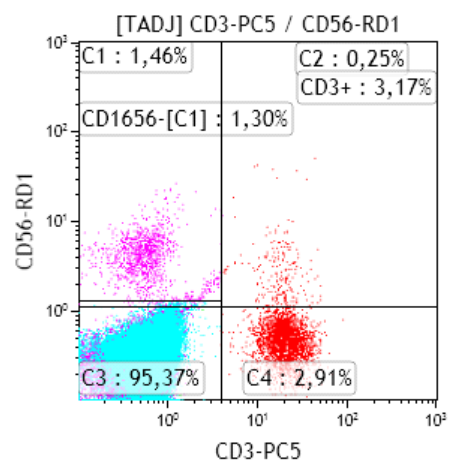
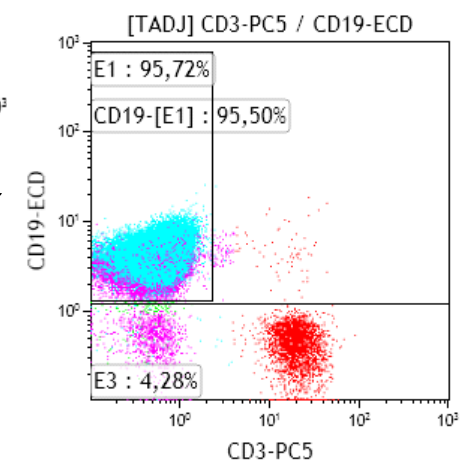
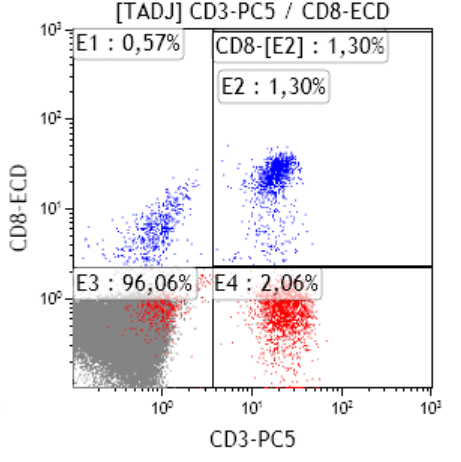
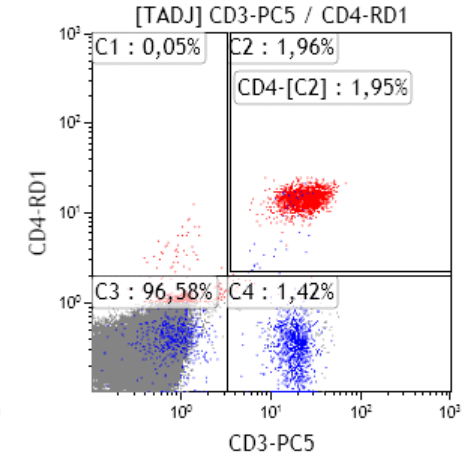
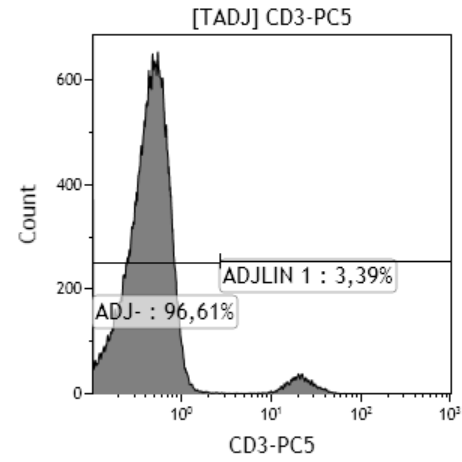
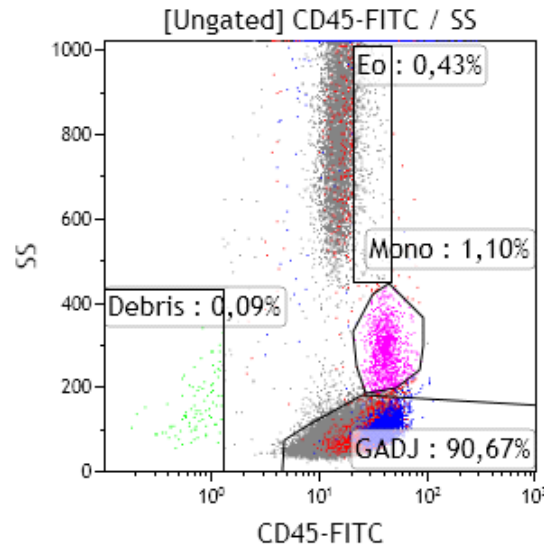
- **CD16,56+ : 34 (6-20)%**



# X-viazaná agamaglobulinémia

- mutácia v géne kódujúcom Brutonovu tyrosinkinázu – dôležitá pre diferenciáciu B lymfocytov
  - ženy prenášačky, manifestácia u mužov
  - dochádza k zastaveniu vývoja B lymfocytov
  - neprítomnosť B lymfocytov v krvnom obehu
- 
- v krvnom diferenciáli chýbajú B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytov)
  - zastúpenie ostatných lymfocytárnych subpopulácií v norme
  - výsledok:

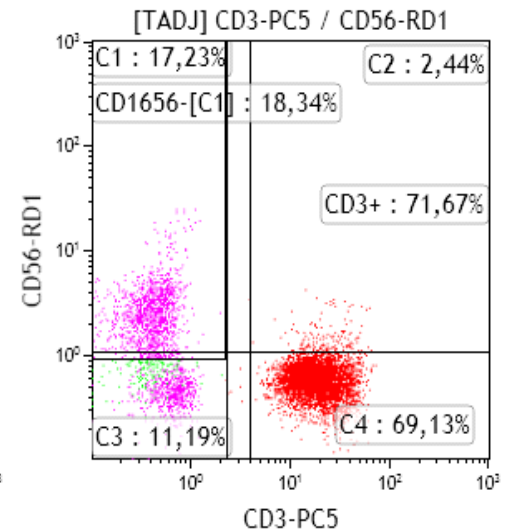
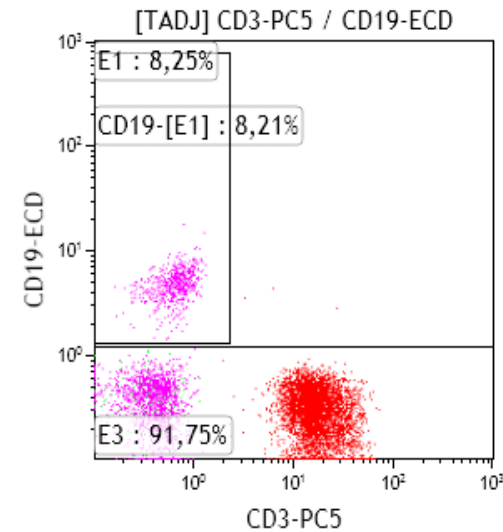
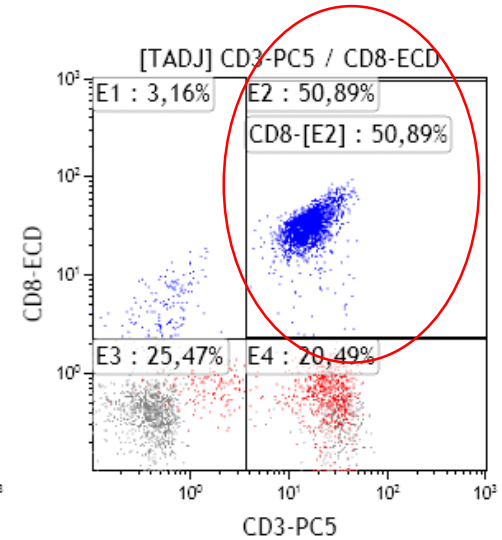
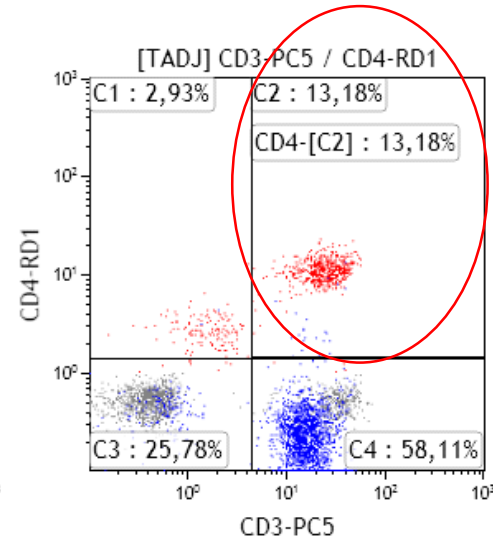
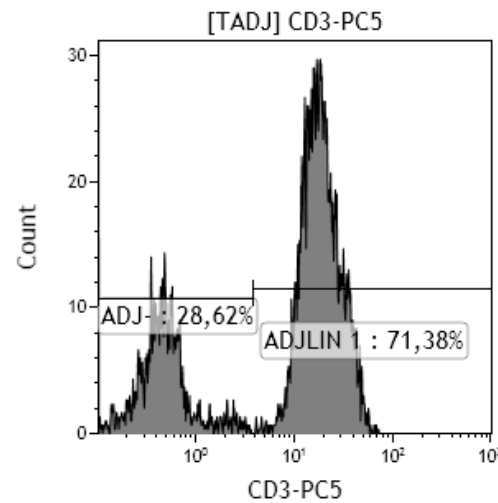
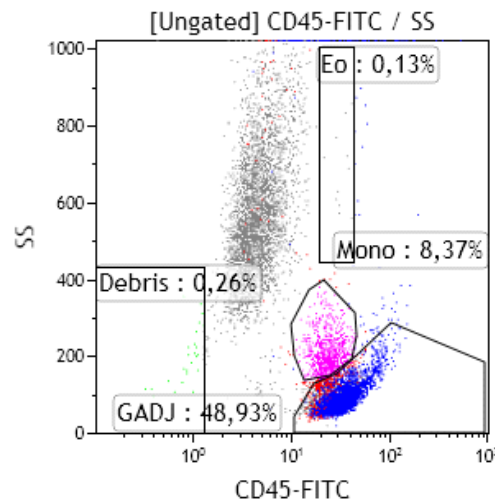
# Pacient: M, \*1966



- v krvnom diferenciáli vysoké B-lymfocyty (95,50 % z celkových lymfocytov)
- Prvo-záchyt: bez histórie v nemocničnom systéme
- výsledok: podozrenie na leukémiu
- nutné doplniť vyšetrenie CD5+CD19+ buniek

→ Pokračovanie nasledujúci slide

# Pacient: M, \*1999



- v krvnom diferenciáli zistený obrátený pomer  
CD3+**CD4+** k CD3+**CD8+** (**13,2 : 50,9**)
- Fyziologické hodnoty: pomer CD3+CD4+ > CD3+CD8+
- Prvo-záchyt: bez histórie v nemocničnom systéme
- výsledok: podozrenie na vírovú infekciu

# SCID

## Severe Combined Immunodeficiency – Ťažké kombinované imunodeficiencie

Príklad pacienta s SCID

- záchyt u novorodencov a detí
- nízky absolútny počet Leukocytov a Lymfocytov, v podstate chýbajú CD3+ T-lymfocyty, počet B-lymfocytov a NK buniek môže byť taktiež znížený

Leukocyty:  $5,0 \times 10^9/l$

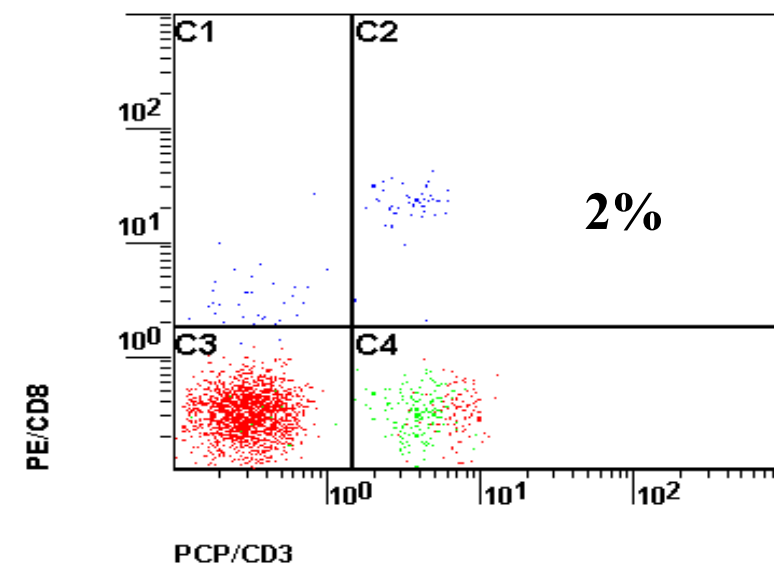
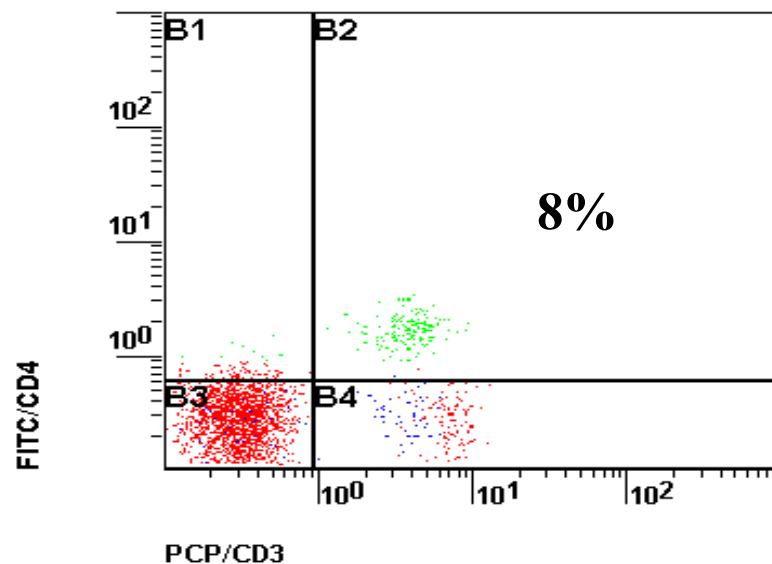
Lymfocyty:  $4,0 \times 10^9/l$

Nízky počet leukocytů i lymfocytů vzhledem k věku pacienta

### T LYMFOCYTY

- CD3+ : 14 (58-85)%
- CD3+ 4+ : 8 (30-60)%
- CD3+ 8+ : 2 (15-35)%

Velice nízký počet T-lymfocytů!!





# SCID

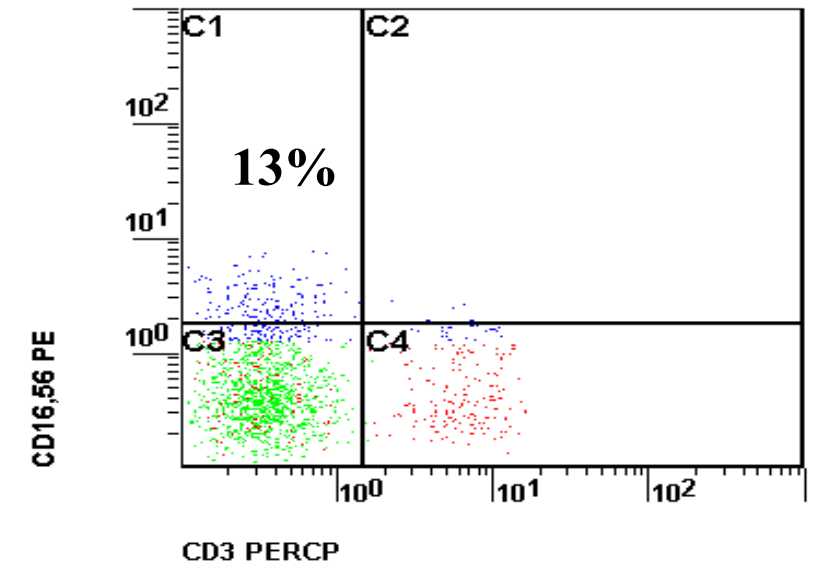
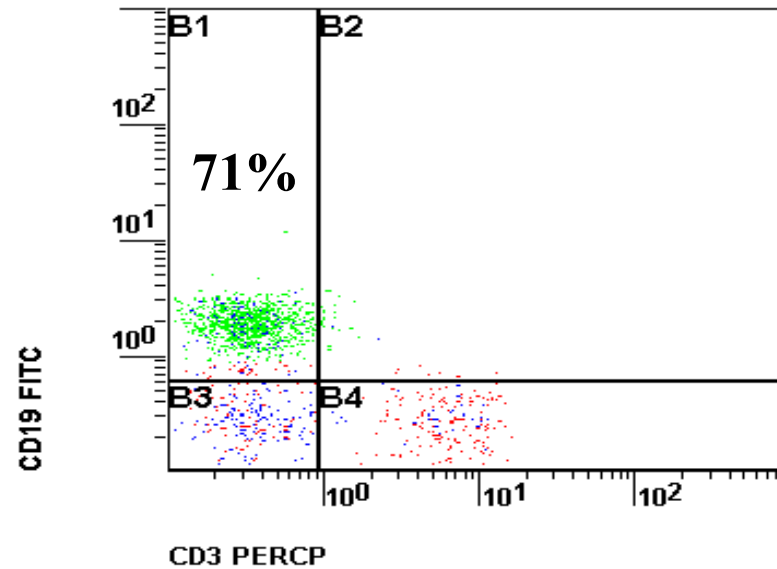
Severe Combined Immunodeficiency – Ťažké kombinované imunodeficiencie

## B LYMFOCYTY

- CD19+ : 71 (7-23) %

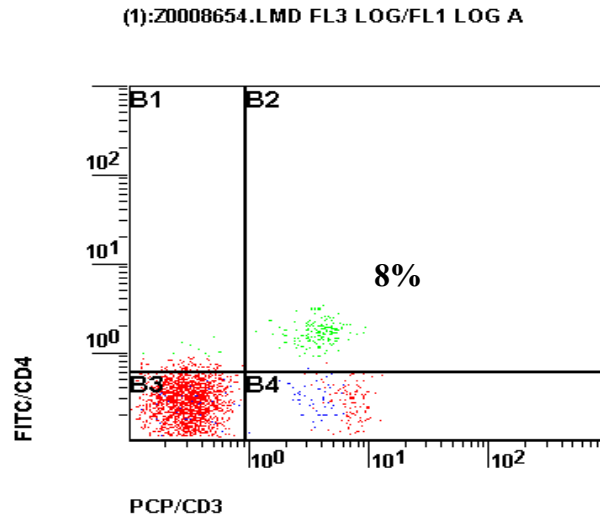
## NK LYMFOCYTY

- CD16,56+: 13 (6-20)%



Výsledok: možné doplniť funkčný test proliferácie T-lymfocytov; dieťa je smerované k transplantácii kostnej drene

# SCID



Leu :  $5,0 \times 10^9/l$

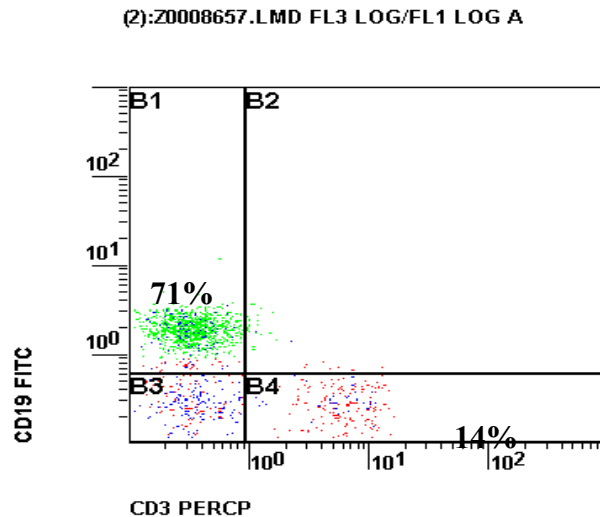
Ly: :  $4,0 \times 10^9/l$

## T LYMFOCYTY

• CD3+ : 14 (58-85)%

• CD3+ 4+: 8 (30-60)%

• CD3+ 8+: 2 (15-35)%

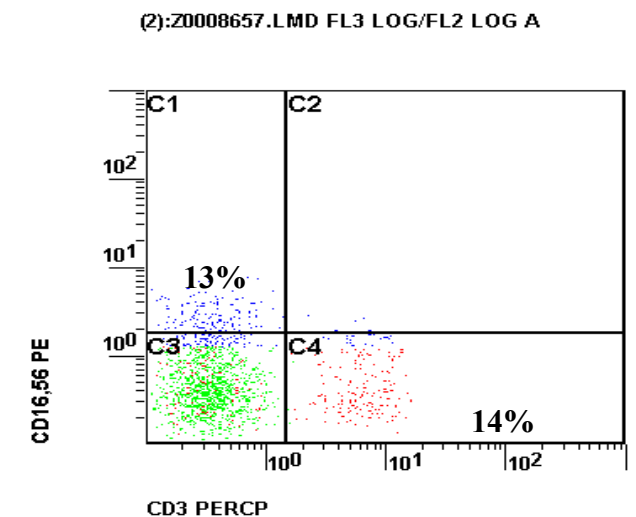
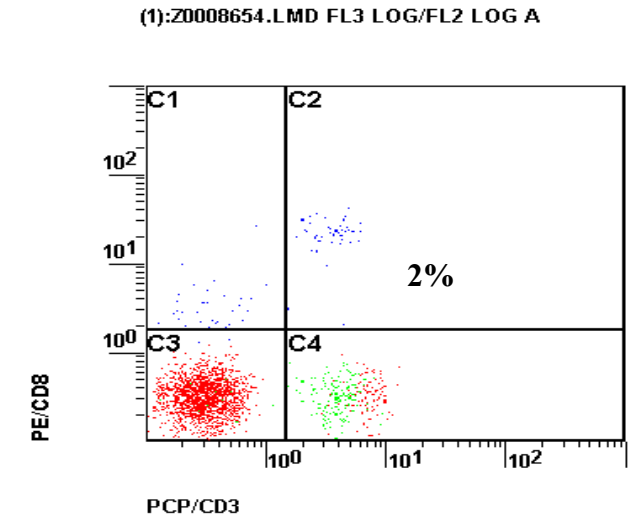


## B LYMFOCYTY

• CD19+ : 71 (7-23) %

## NK LYMFOCYTY

• CD16,56+: 13 (6-20)%

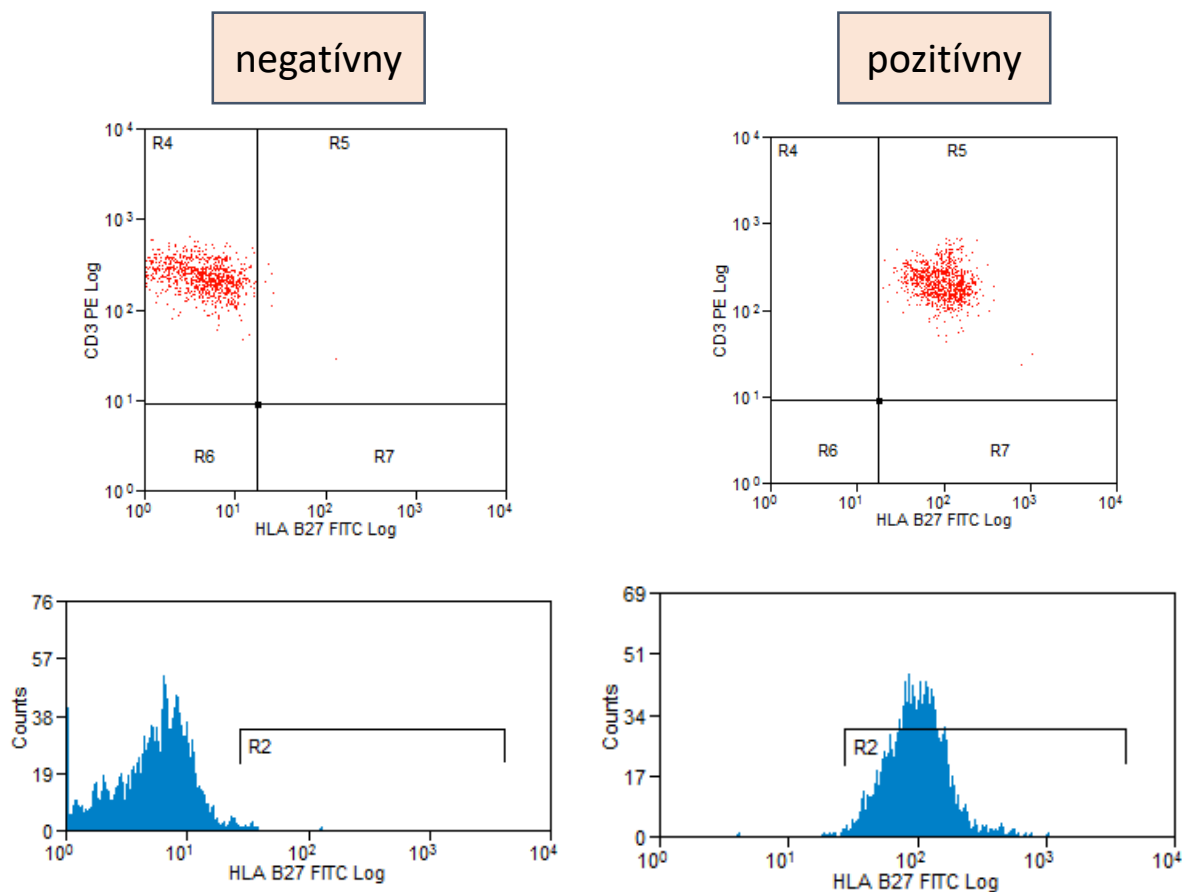


Výsledok: T-B+NK+ SCID

Poznámka: všetky jaderné T-lymfocyty boli materské, aktivované, vyvolávajúce reakciu štěpu proti hostiteľovi.

# HLA-B27

Znak HLA-B27 je asociovaný s radou nešpecificky zápalových ochorení, akými sú zápaly kĺbov, vnútorných štruktúr oka (uveitída), krátkych kostí rúk, nôh a šliach, ďalej psoriázou, chronickými bolesťami spodnej časti chrbta (zad) a spondyloarthropatiou, z ktorej najznámejšou je ankylózujúca spondylitída (zápalové systémové ochorenie osového skeletu a kĺbov – **Bechtěrevova choroba**)



Vyšetrenie HLA-B27 nie je doplňujúcim meraním ku krvnému diferencíálu, je to samostatné meranie

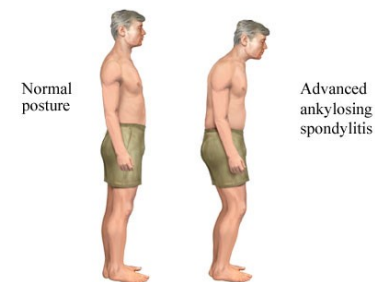
Vzorka: periférna krv odobraná do EDTA

Značenie MPL:

CD3 PE- T-lymfocyty

HLA-B27 FITC

**Výsledok:** cytometrické vyšetrenie HLA-B27 je len screeningová metóda, pozitívny výsledok sa vydáva s odporúčaním na genetické vyšetrenie



# Bronchoalveolárna laváž - BAL

- diagnostické bronchoskopické vyšetrenie
- pacientovi sa do bronchu (vetvy bronchu) pomocou fibrobronchoskopu aplikuje a následne späť aspiruje 150-200 ml fyziologického roztoku
- sleduje sa zastúpenie množstva a percentuálneho podielu jednotlivých typov leukocytov
- indikuje sa u zápalových pľúcnych ochorení, nádorových ochorení, intersticiálnych pľúcnych procesoch, pneumokoniózach

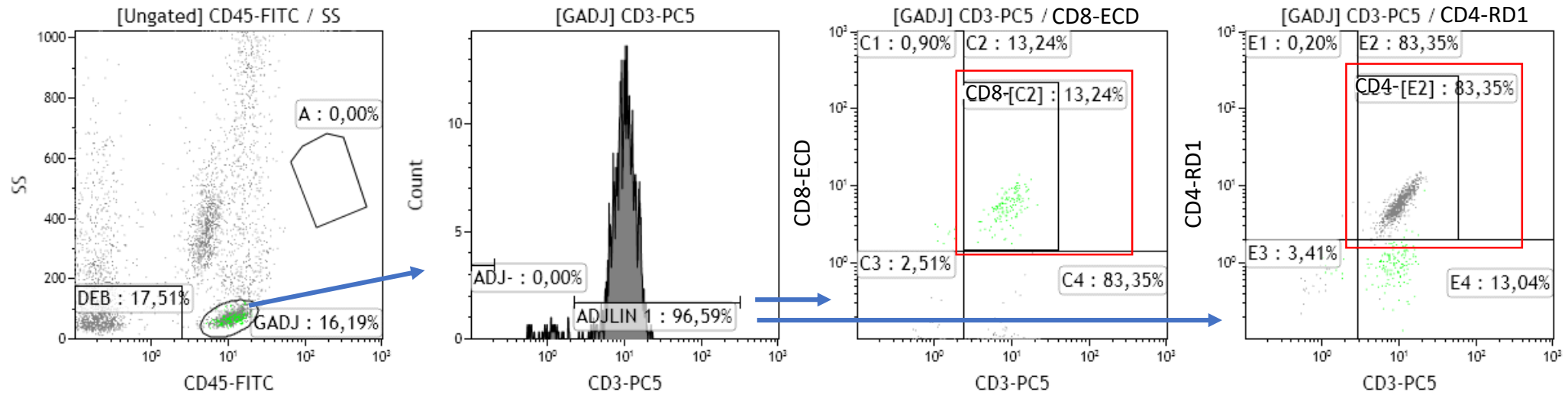
Vyšetrenie HLA-B27 nie je doplňujúcim meraním ku krvnému diferenciólu, je to samostatné meranie

- vzorka: bronchoalveolárna tekutina
- Spracovanie:
  - filtrácia vzorky kvôli prípadnému obsahu nečistôt, tkanív, premytie, značenie MPL:
    - CD45 FITC – panleukocytárny znak
    - CD3 PC5 – T-lymfocyty
    - CD4 RD1 – Th- lymfocyty
    - CD8 ECD – Tc-lymfocyty

**Pozn. Vzorka BAL nesmie obsahovať krv.**

V krvi je iné zastúpenie lymfocytárných subpopulácií ako v BAL, v prípade „znečistenia“ BAL krvou nie je možné rozpoznať, ktoré lymfocyty pochádzajú z krvi a ktoré z BAL, čo vedie k znehodnoteniu vyšetrenie.

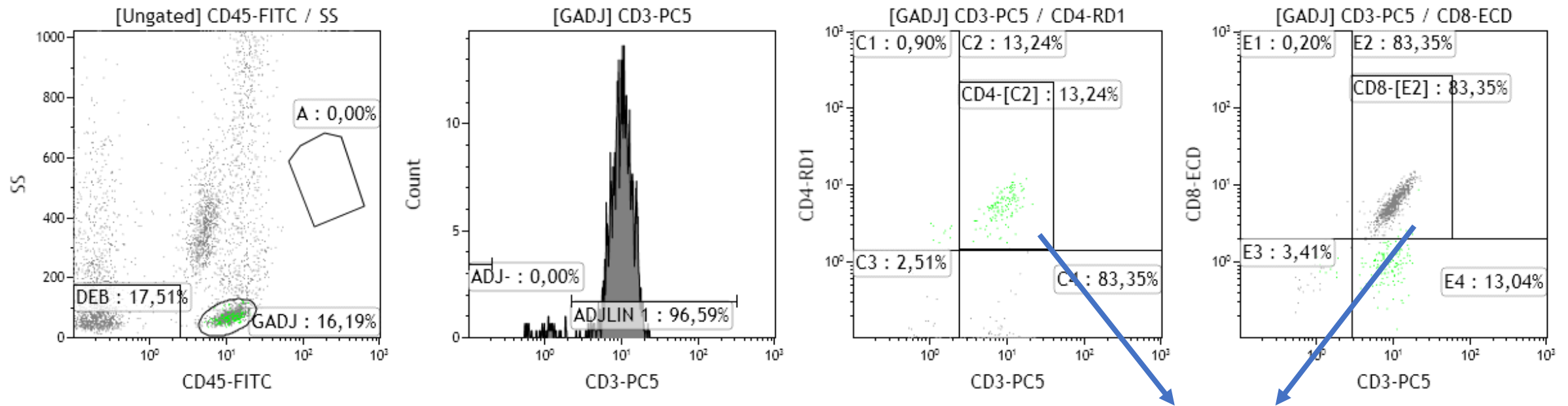
# Bronchoalveolárna laváž - BAL



- Diagnosticky dôležitý je pomer CD3+**CD4+** k CD3+**CD8+** T-lymfocytov (= imunoregulačný index)
- Fyziologické hodnoty: pomer CD3+CD4+/CD3+CD8+ = 1,1 až 3,5
- Patologické hodnoty:
  - výrazná prevaha pomocných CD4+ T-lymfocytov = podozrenie napr. na **sarkoidózu**, pneumóniu, nádory dýchacích ciest,...
  - prevaha cytotoxických CD8+ T-lymfocytov = podozrenie na hypersenzitívnu pneumonitídu,...

# Bronchoalveolárna laváž (BAL)

Prevrátený pomer CD4+/CD8+ = podozrenie na sarkoidózu



Idiopatická intersitciálna pnemuonie?