



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

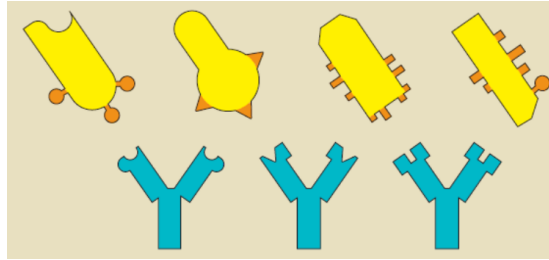


Eosinophil



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



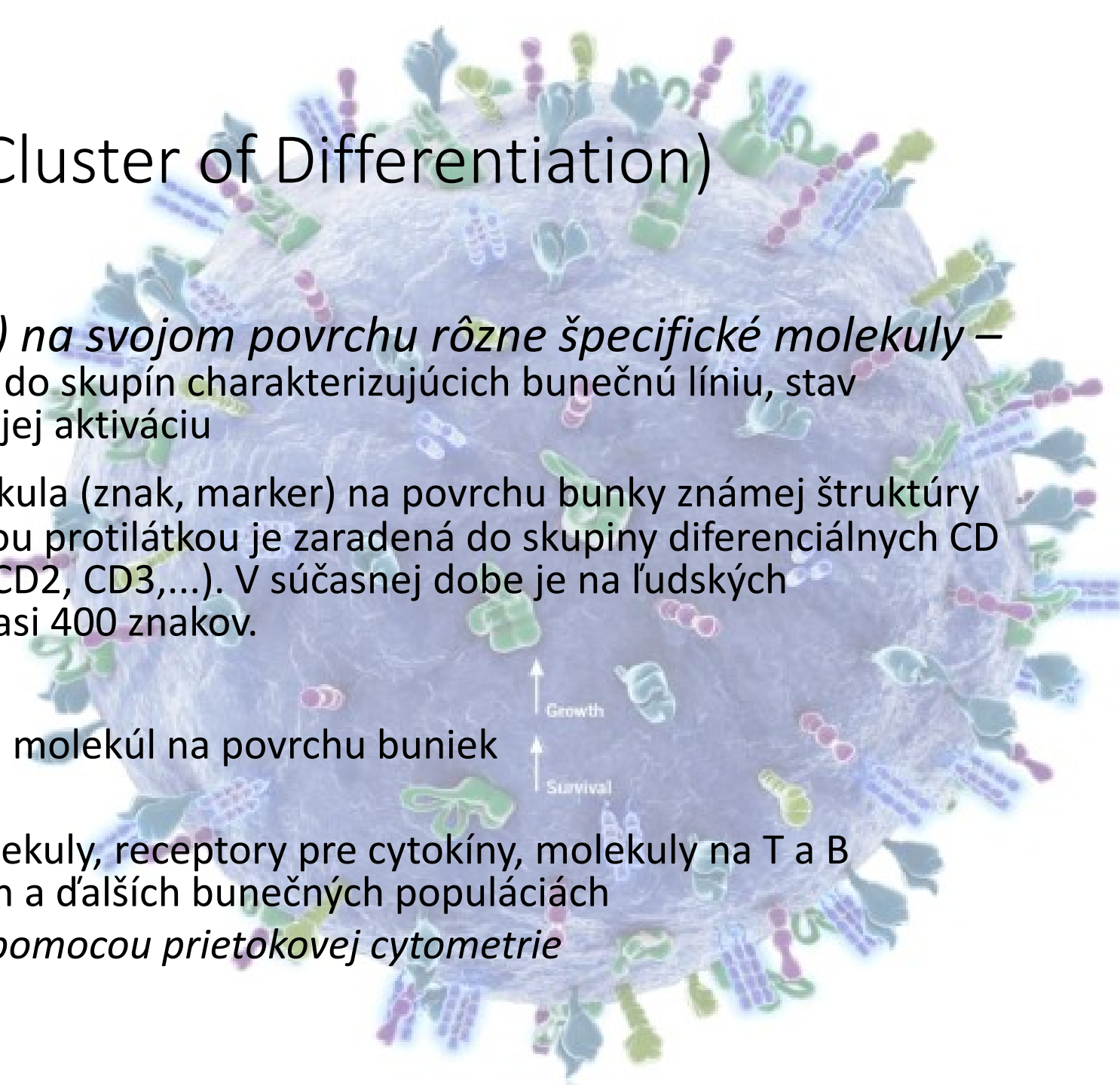
Eosinophil

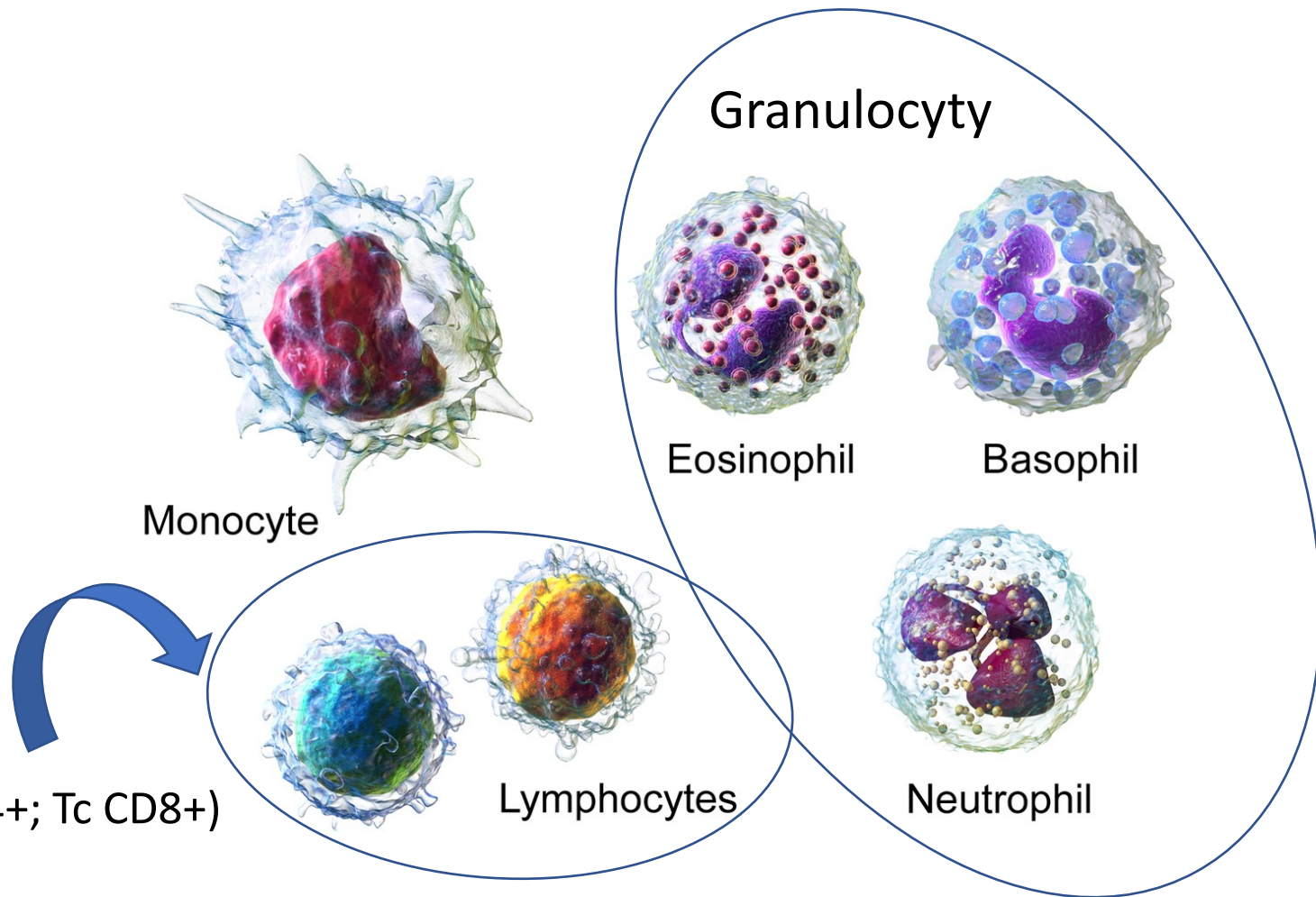


Basophil

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**

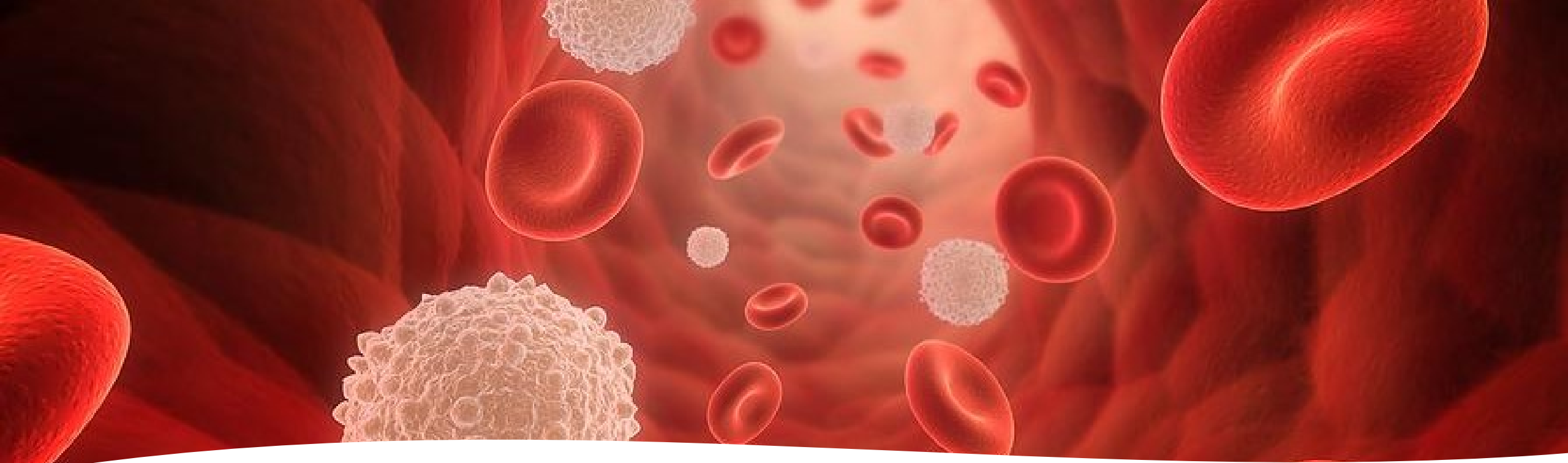




T-lymfocyty (Th CD4+; Tc CD8+)
 B-Lymfocyty
 NK bunky

White Blood Cells

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



Imunofenotypizácia buniek

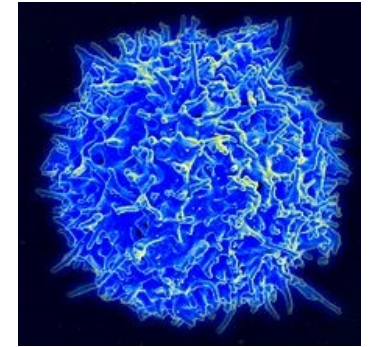
- stanovenie **leukocytárnych subpopulácií** pomocou prietokovej cytometrie (FACS- fluorescent-activated cell sorting)
- odber krvi do skúmavky s **EDTA**



T lymfocyty

CD3 - povrchová molekula prítomná na všetkých T-lymfocytoch

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



T- lymfocyty sa delia na:

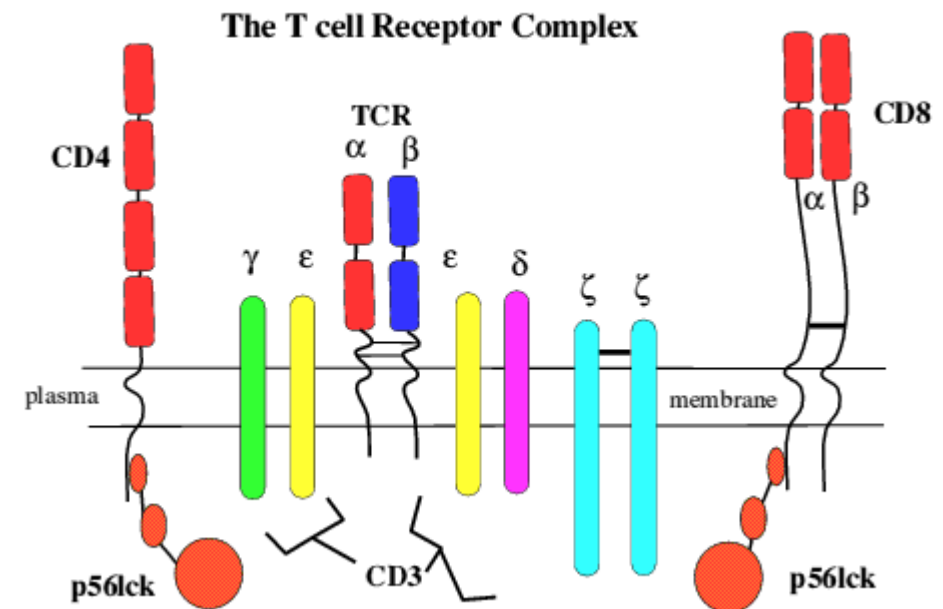


CD4+
 T_H (T_{H1} , T_{H2})
pomocné T-lymfocyty
(T helper cells)

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

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

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

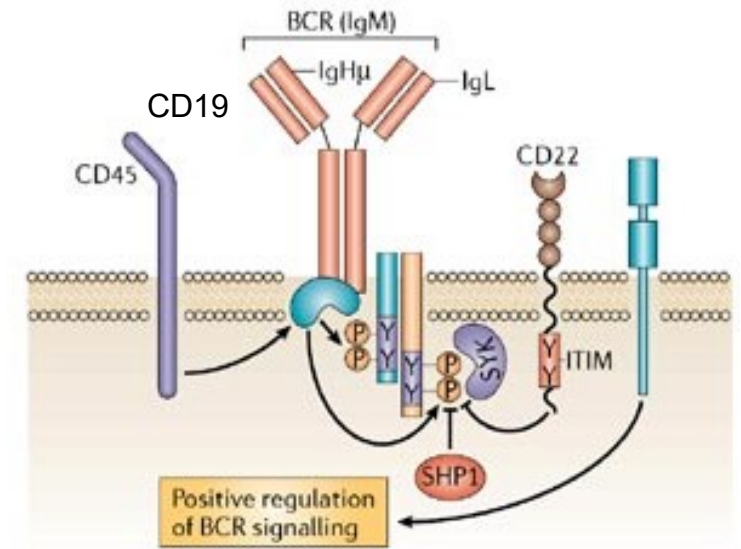


B lymfocyty

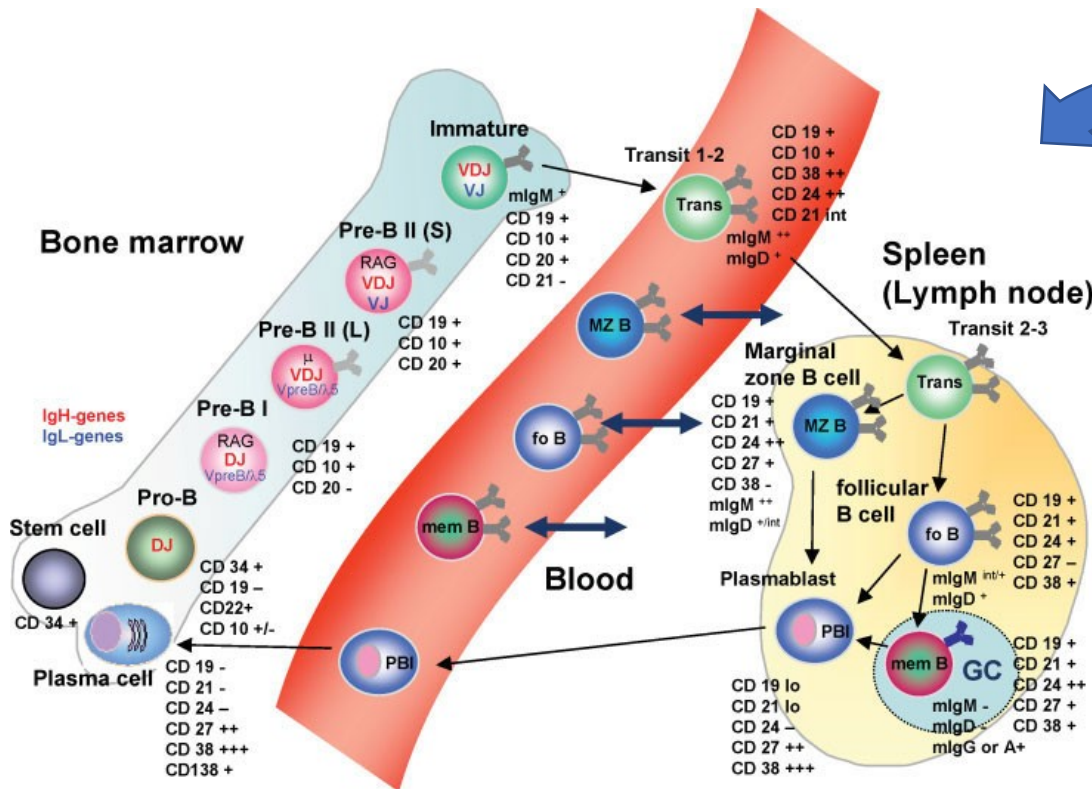
CD19, CD20 - povrchové molekuly najčastejšie využívané k rozlíšeniu B lymfocytov v prietokovej cytometrii

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

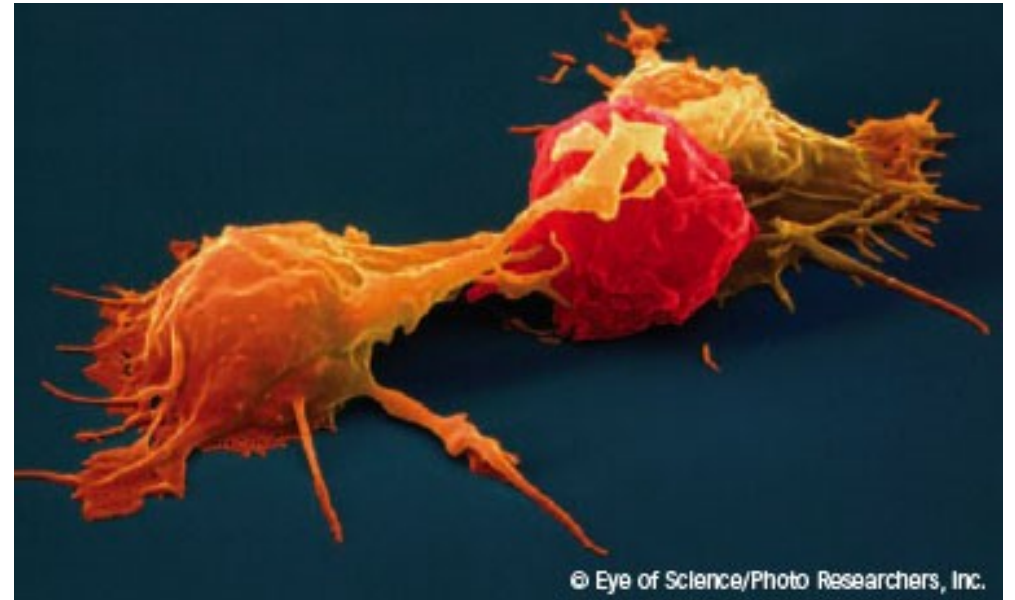
CD16⁺CD56⁺CD3⁻ - charakteristické povrchové markery

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⁺CD56⁺ **CD3⁺**



Monocyty

CD14 - povrchová molekula charakteristická pre monocyty

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

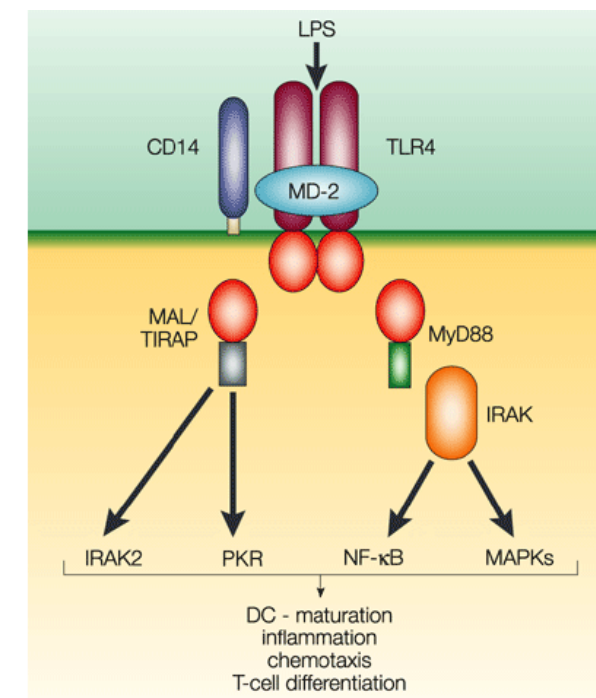
- súčasť nešpecifickej imunity
- schopnosť fagocytózy
- tkanivová forma = makrofág
- APC = antigén prezentujúca bunka

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

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

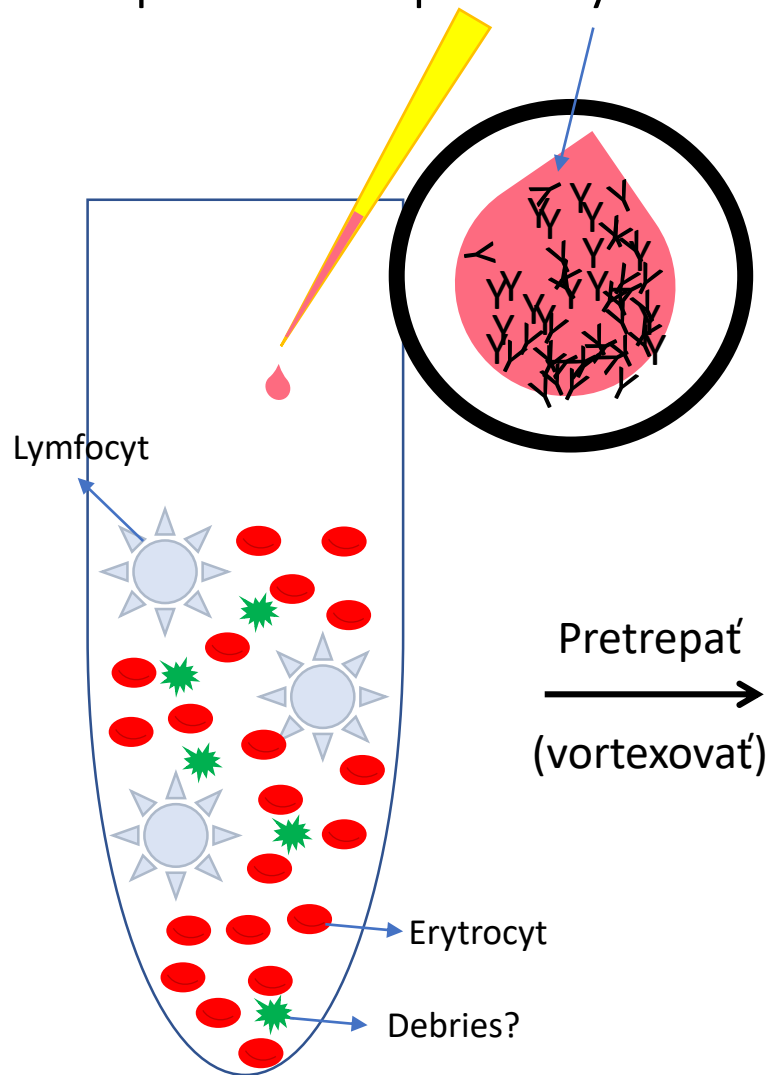


CD14 ako koreceptor TLR4 zapojený do detekcie bakteriálnych lipopolysacharidov (LPS)



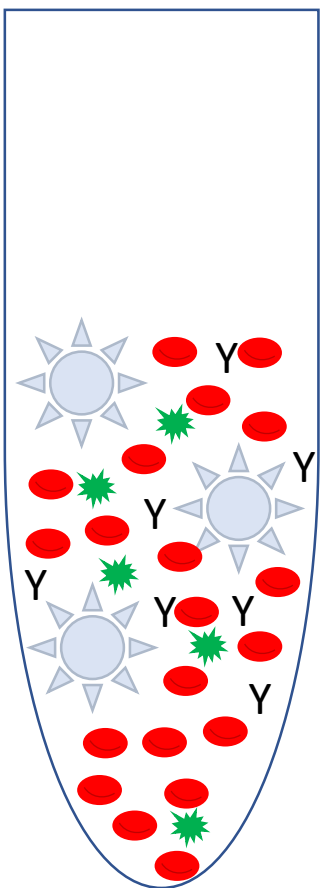
Príprava vzorky na FACS

Pipetovať MIX potrebných MPL



Vzorka krvi 45µl

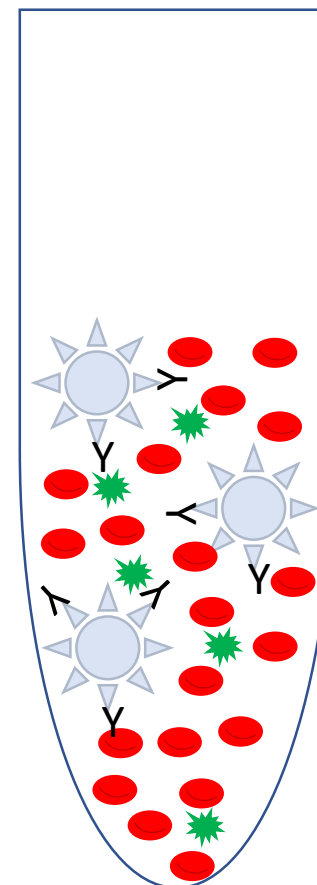
Voľné MPL - väzba na receptory



Vzorka krvi 45µl + MPL

30min.
inkubácia
→
tma
lab. teplota

Plná krv značená 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 Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl, 46,95 g bezvodého Na_2SO_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

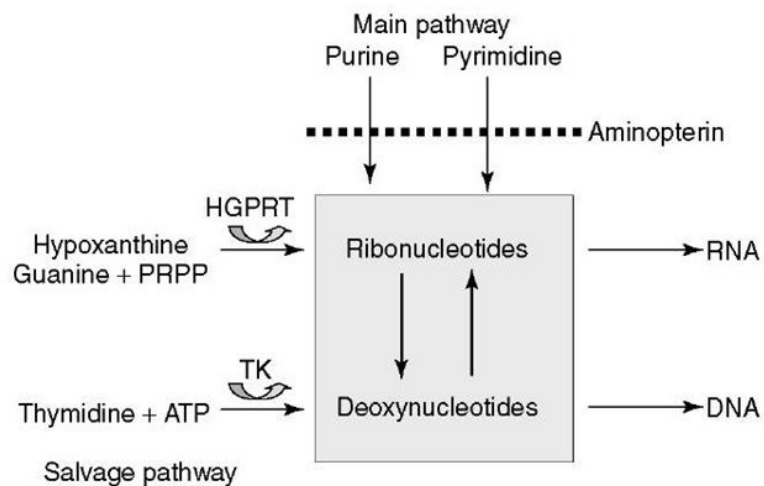
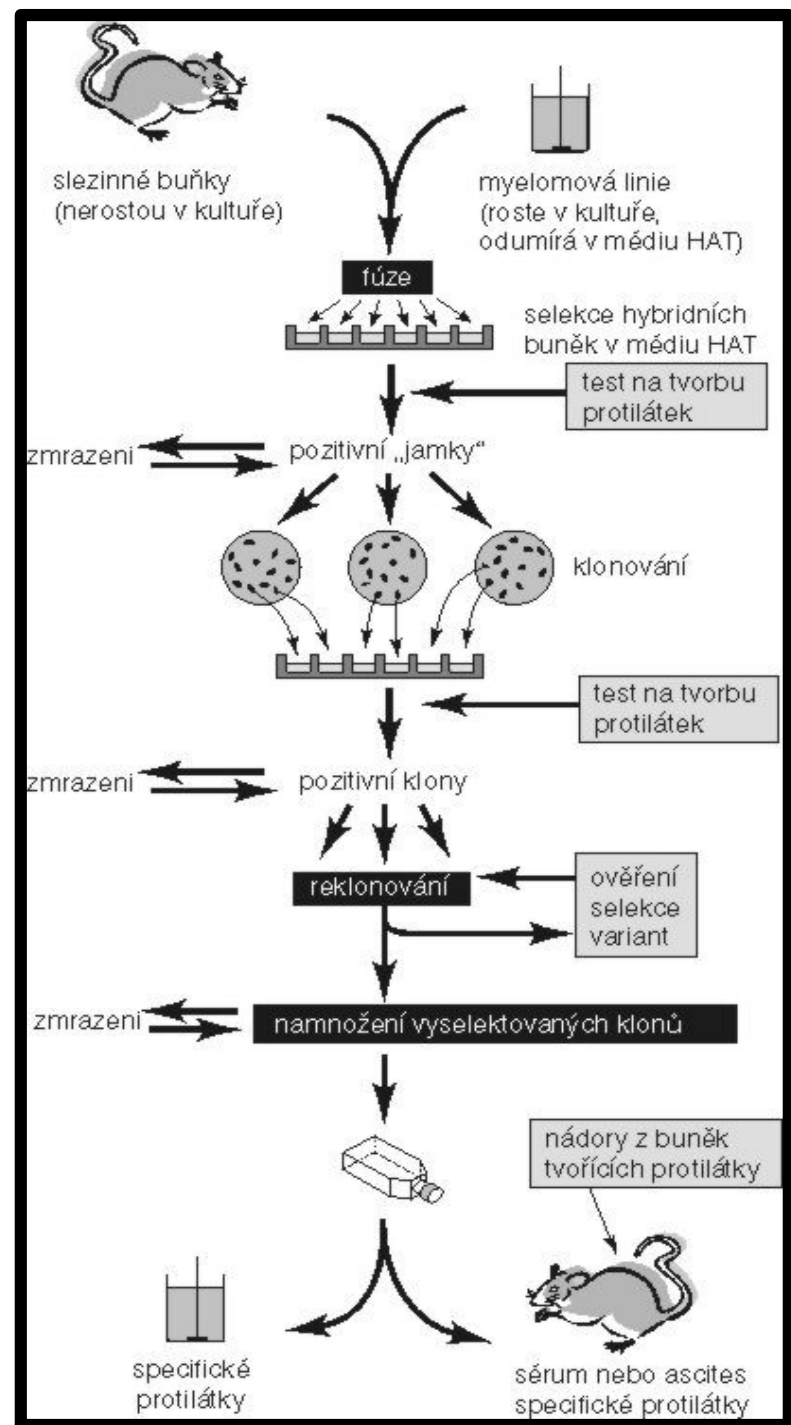
Automatický lyzátor TQ-prep od Firmy Beckman Coulter používaný na lýzu erytrocytov v rutinných vzorkách



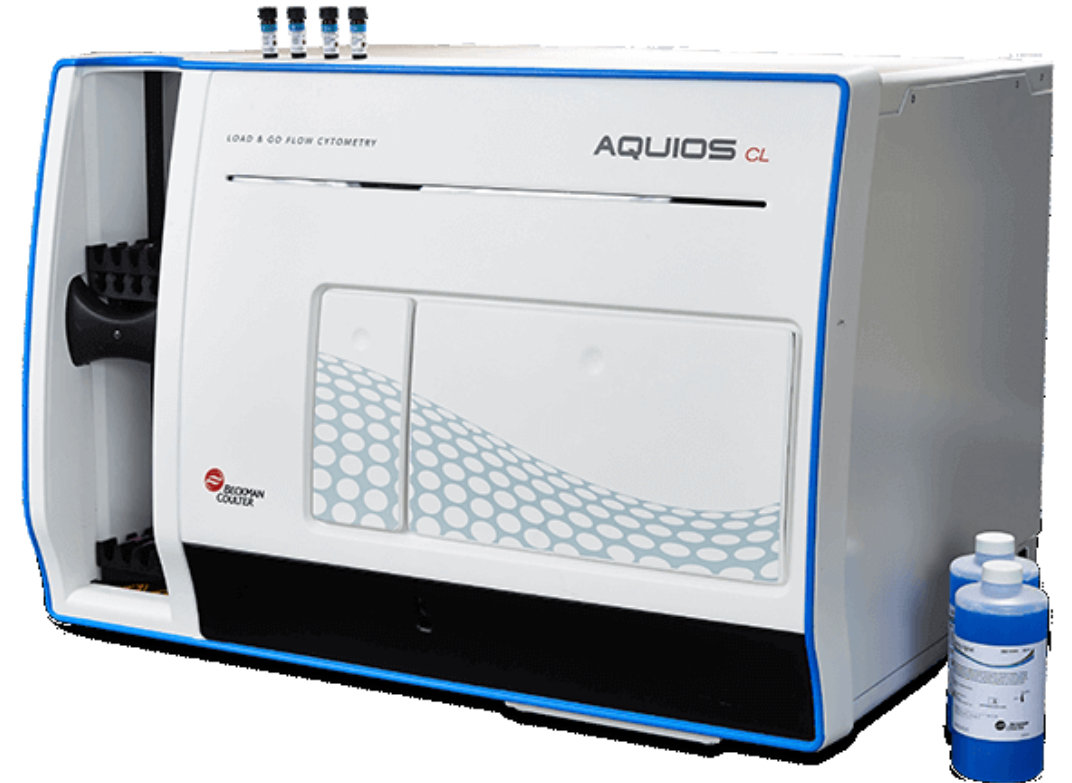
← Proces výroby MPL

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



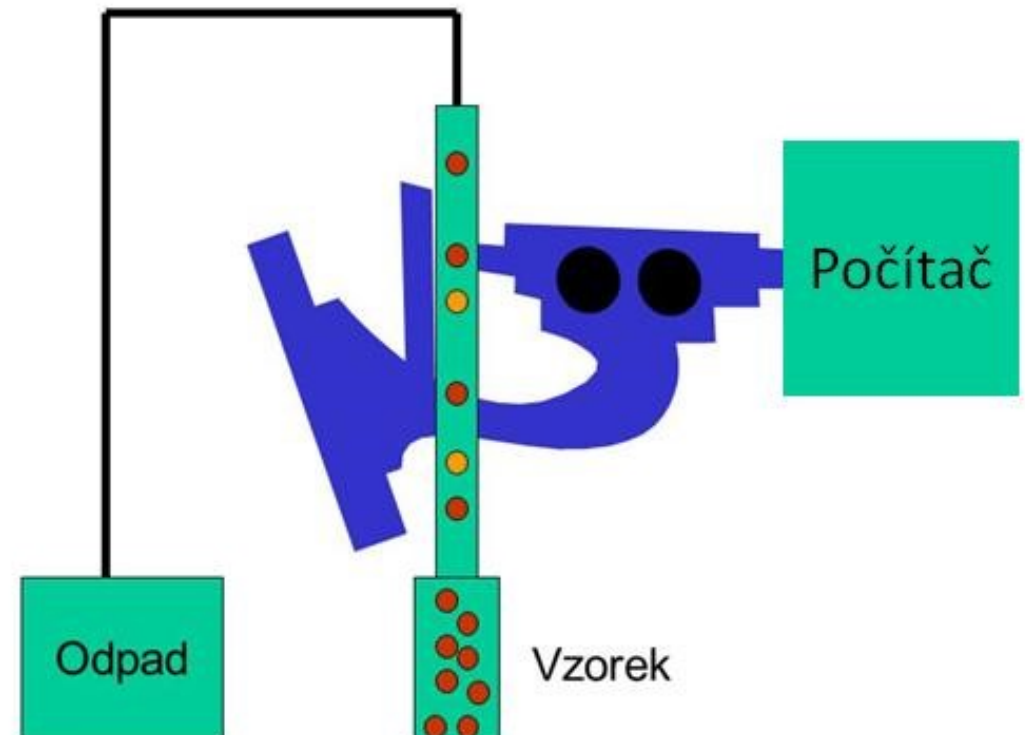
Prietoková cytometria (Flow Cytometry, FACS)



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*

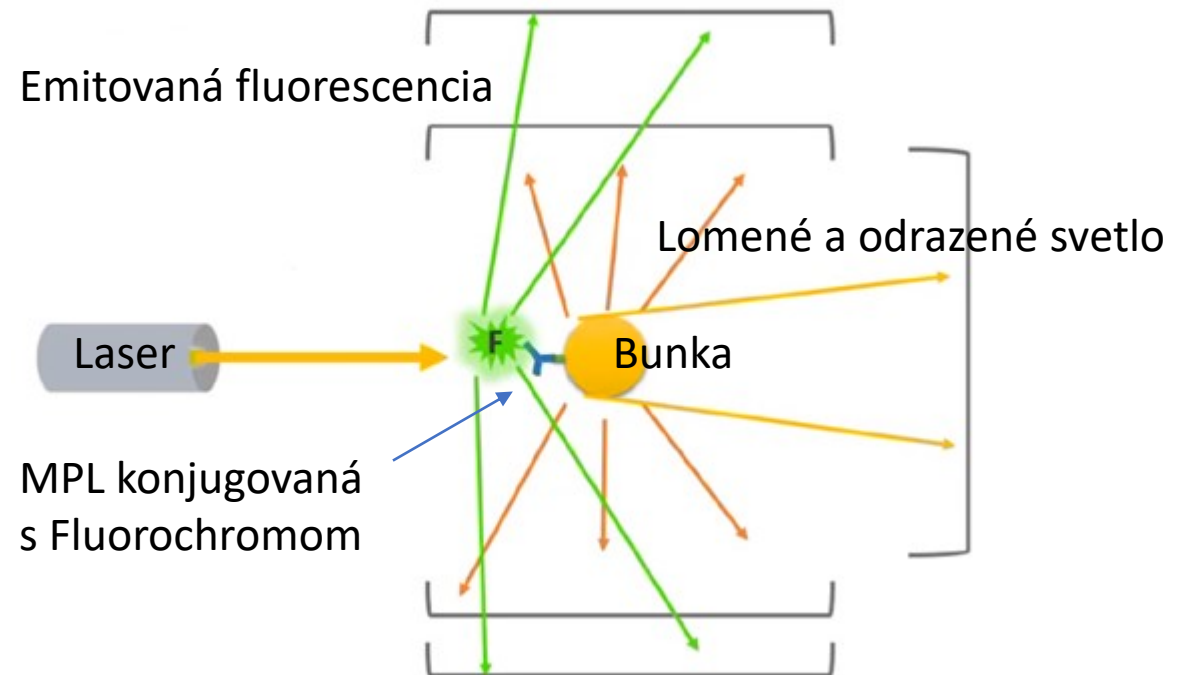


Oblasti uplatnenia FACS

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

Čo meriame???

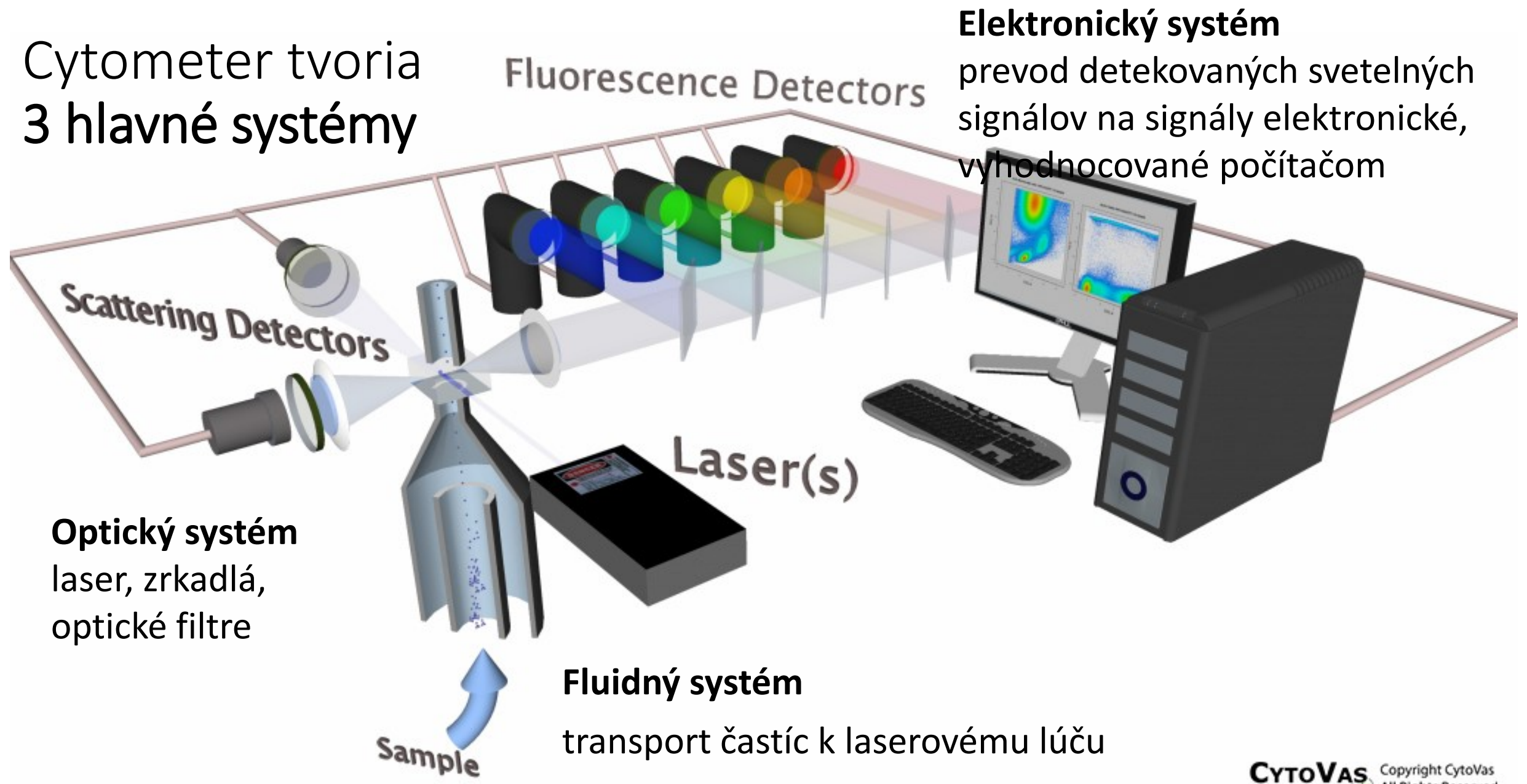
- **Lomené a odrazené svetlo** - pri prechode buniek laserovým lúčom (paprskom) dochádza k jeho lomu a odrazu na bunečnom povrchu a bunkových organelách
- **Emitovanú fluorescenciu** – pokiaľ použijeme MPL konjugované s fluorochromom
- Častice veľkosti 0,2-150 μm
 - prokaryotické a eukaryotické bunky
 - 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



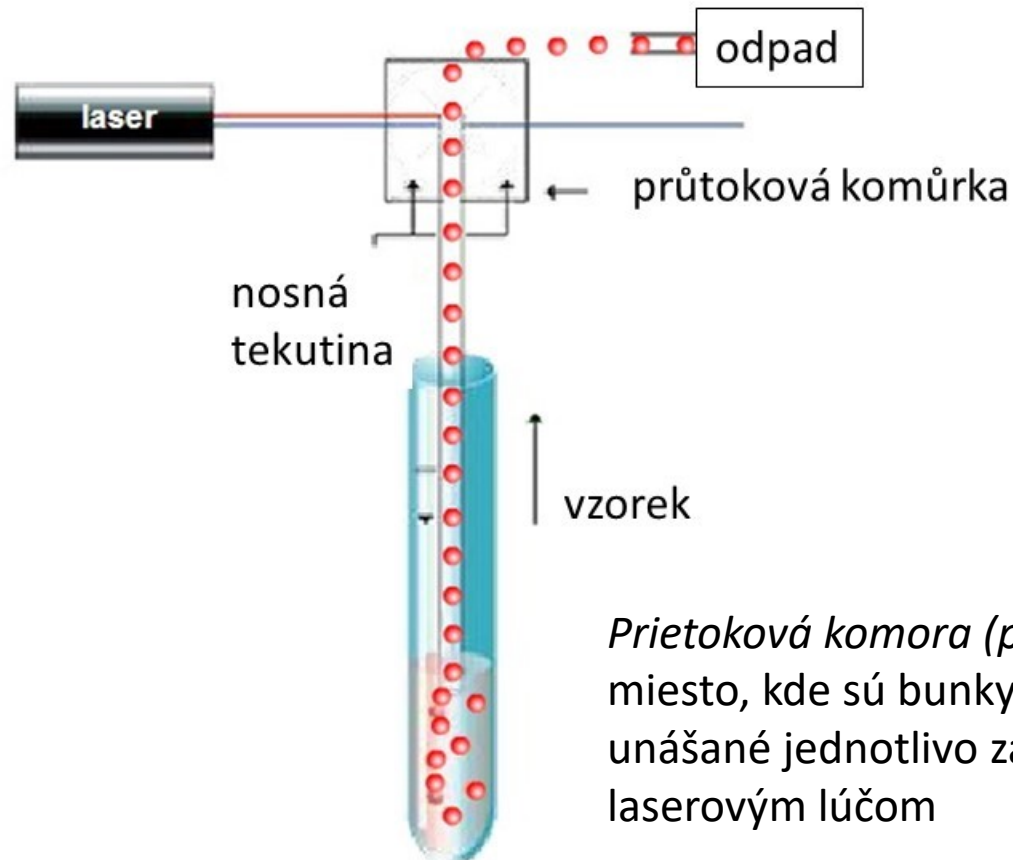
Elektronický systém
prevod detekovaných svetelných signálov na signály elektronické, vyhodnocované počítačom

Optický systém
laser, zrkadlá, optické filtre

Fluidný systém
transport častíc k laserovému lúču

Fluidika

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



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

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



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)

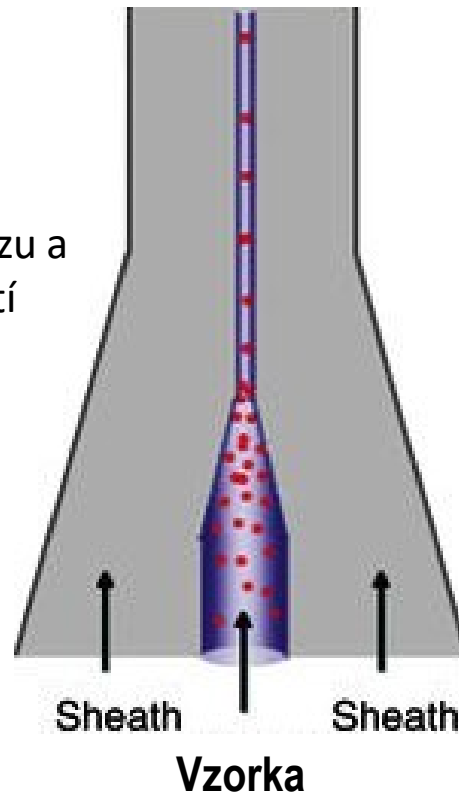
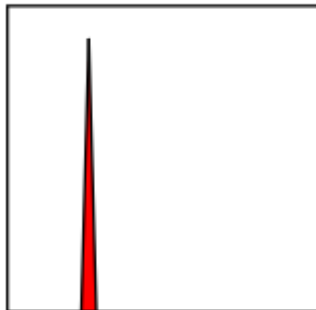
Nízky tlak vzorky

Úzky prúd vzorky

Menší prítok buniek

Presnejšie meranie

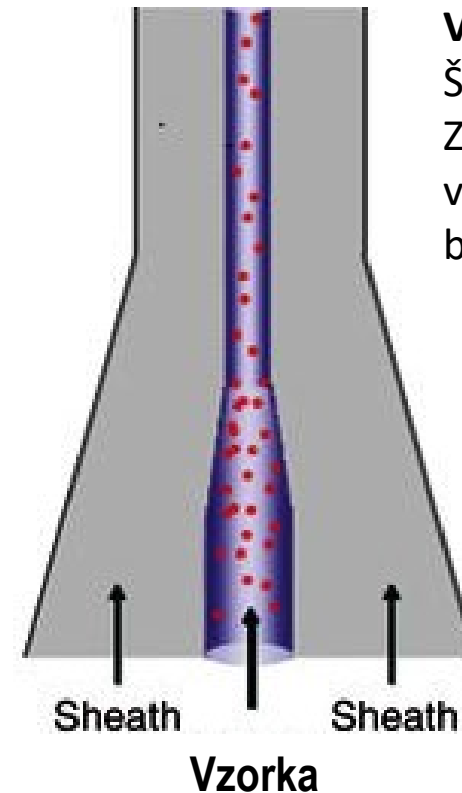
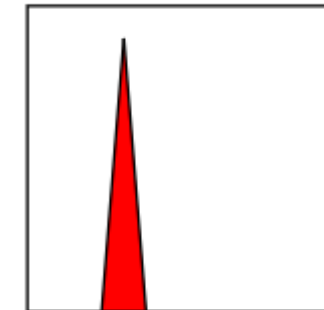
vhodné napr. pre DNA analýzu a meranie funkčných vlastností



Vysoký tlak vzorky

Široký prúd vzorky

Zbieranie veľkého počtu častíc
vhodné napr. na imunofenotypizáciu buniek



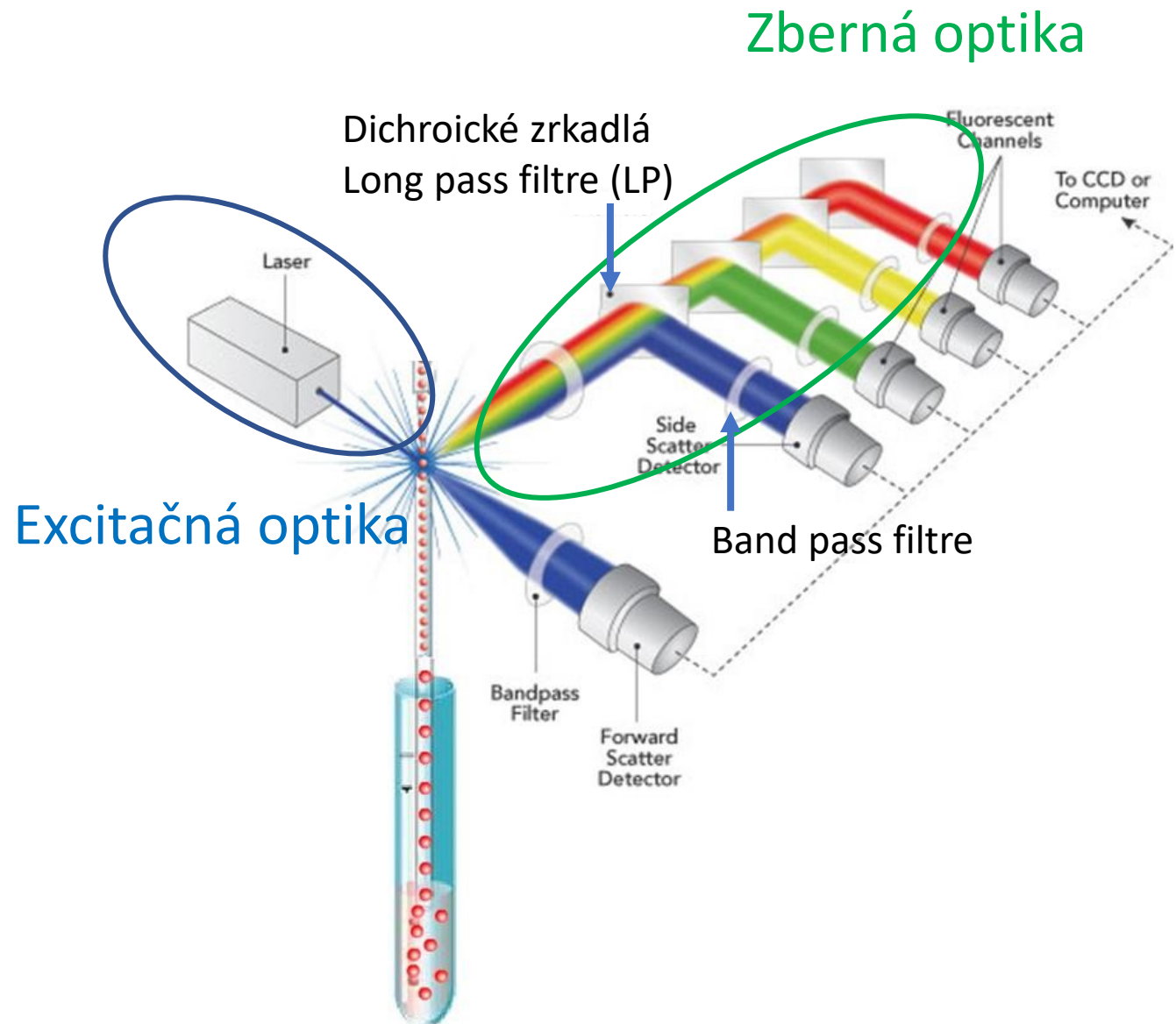
Optika

- **Excitačná optika**

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

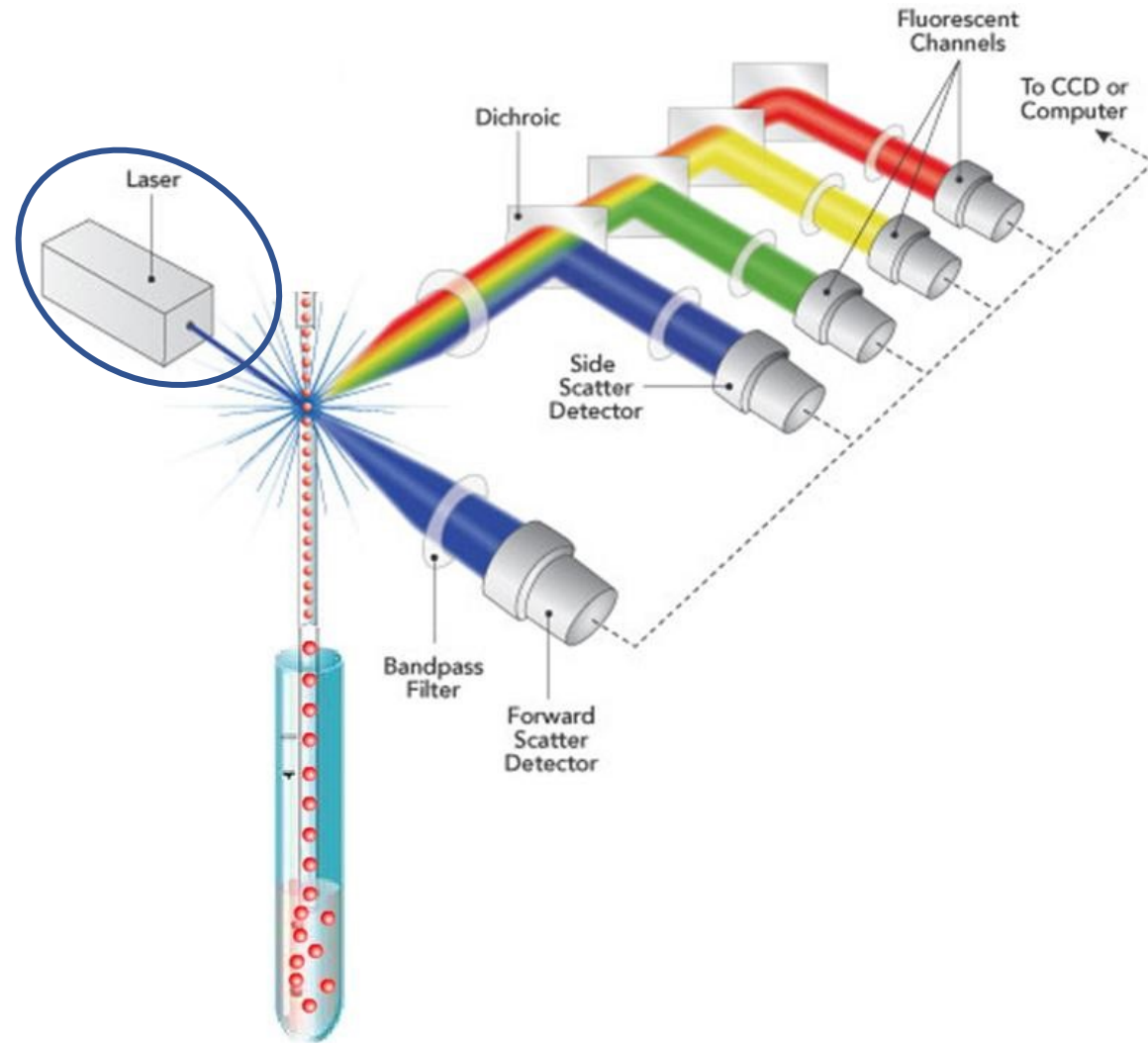
- **Zberná optika**

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)

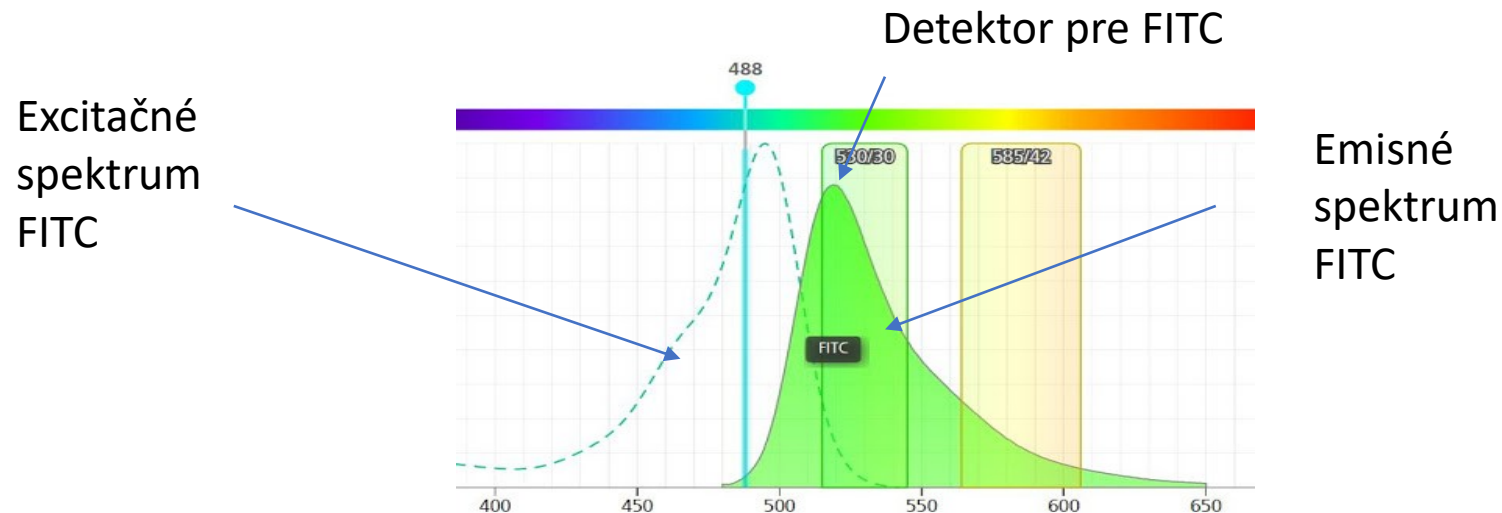
excitácia UV/violet diode (fialový laser) - 405 nm

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

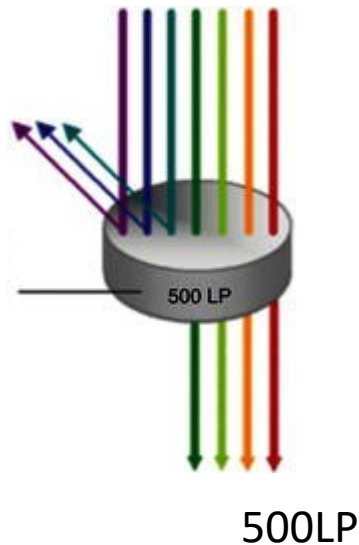
- Vo viacfarebnej prietokovej cytometrii dochádza k emisii niekoľkých fluorochromov naraz – tj. je emitované žiarenie rôznych vlnových dĺžok a je nutné takto vzniknuté žiarenie rozdeliť tak, aby bolo jasné, čo vyžarujú jednotlivé fluorochromy.
- Pri výbere fluorochromov sa v prietokovej cytometrii postupuje 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

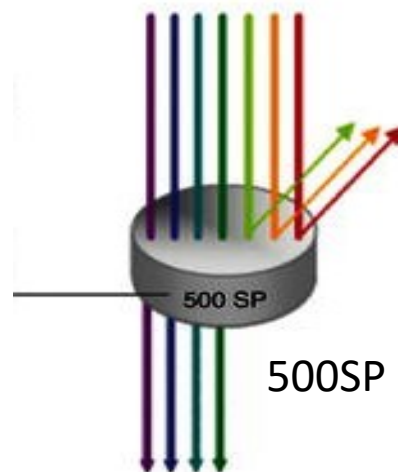
Pre usmernenie žiarenia na detektory pre jednotlivé fluorochromy potrebujeme rozdeliť emitované žiarenie tak, aby na určitý detektor dopadalo žiarenie v danom rozsahu vlnových dĺžok. K tomu potrebujeme short pass filtre a band pass filtre.

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.

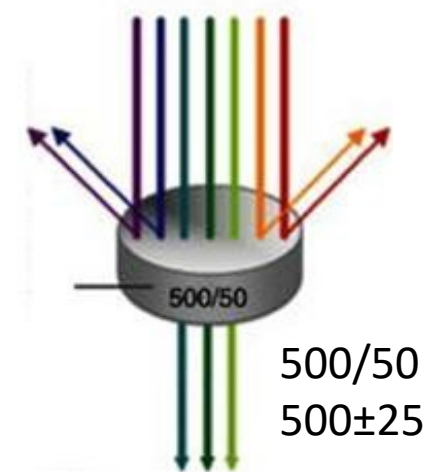
Short Pass (SP)

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° , v tom prípade časť svetla odrážajú pod uhlom 90° , časť prepúšťajú
- sú používané ako **long pass** a **short pass** filtre

Elektronika

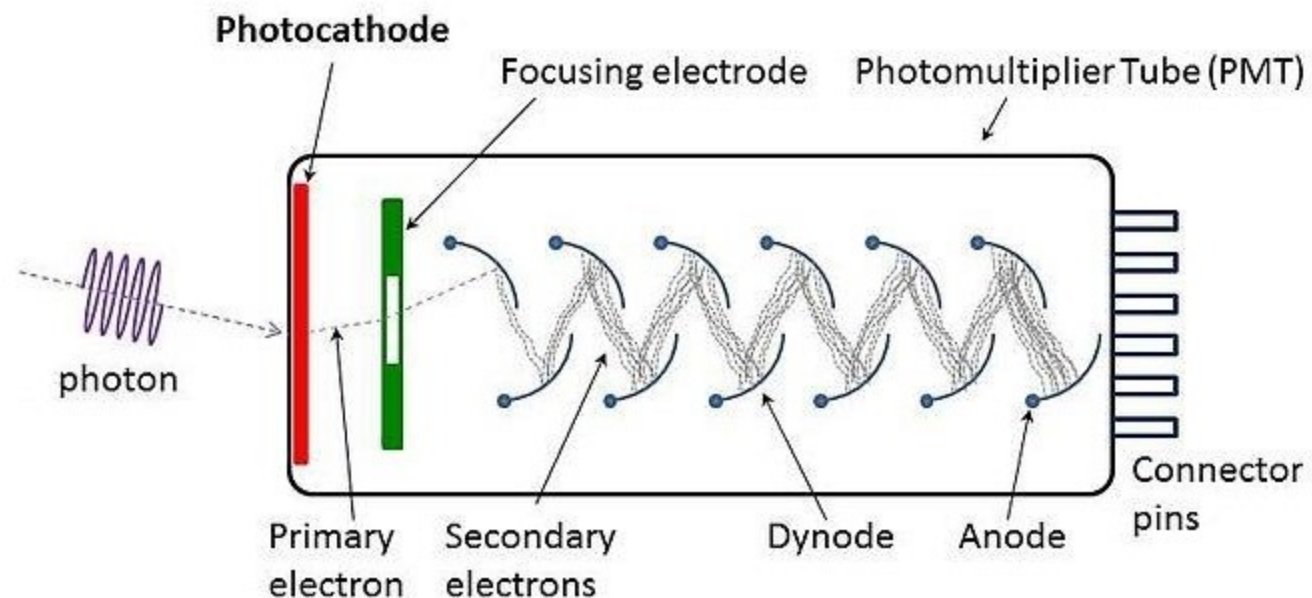
- Svetelné signály sú prevádzané na elektrické
- Typy detektorov:
 - lavinové fotodiódy: detekcia FSC
 - fotonásobiče PMT (PhotoMultiplierTube): detekcia SSC a fluorescencie

PMT

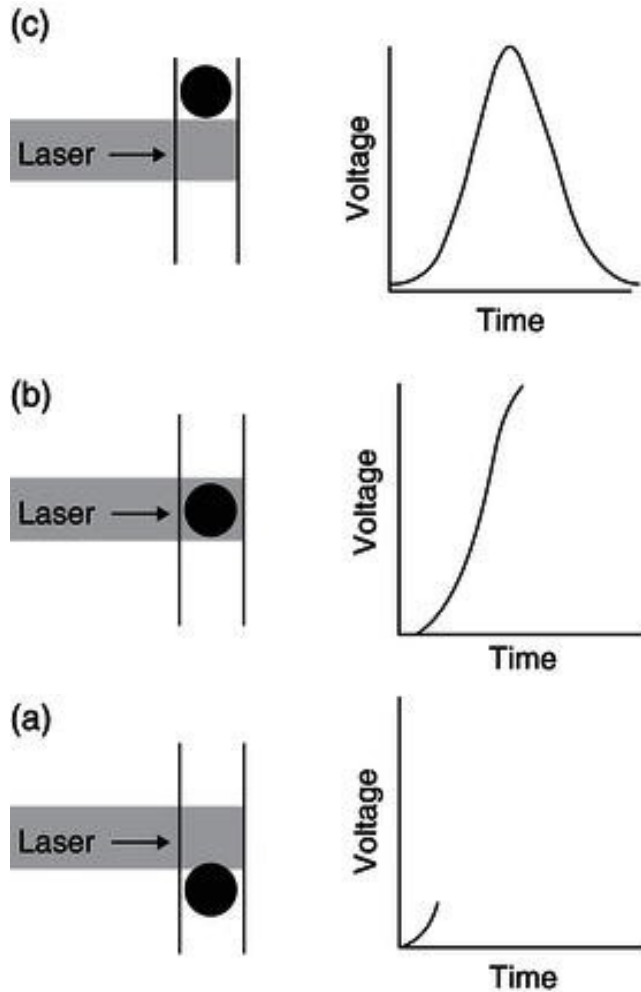
- veľmi citlivé, sú schopné zachytiť i slabé signály
- zvyšujú signál primárneho dopadajúceho žiarenia

Princíp PMT

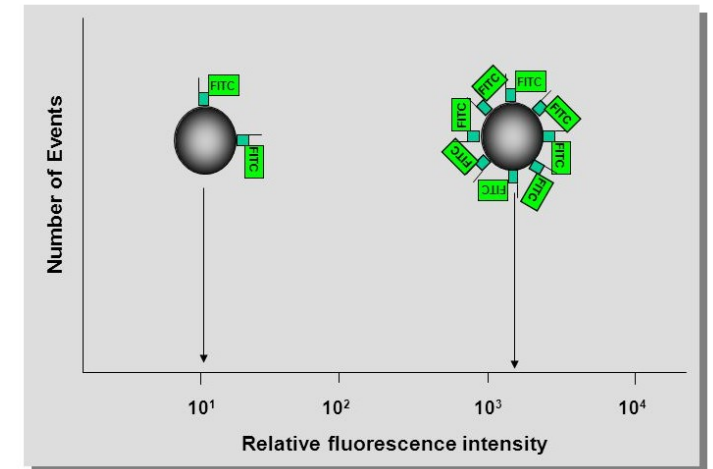
Žiarenie vo forme fotónov dopadá na fotokatódu. Z nej sú na základe fotoelektrického javu vyrazené elektróny, ktoré sú ďalej usmernené na tzv. dynódy (katódy z pozitívnym napätím). Na jednotlivé dynódy je privádzané stále vyššie napätie, čo umožňuje urýchlenie elektrónov a zvýšenie ich energie. Urýchlené 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



- 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



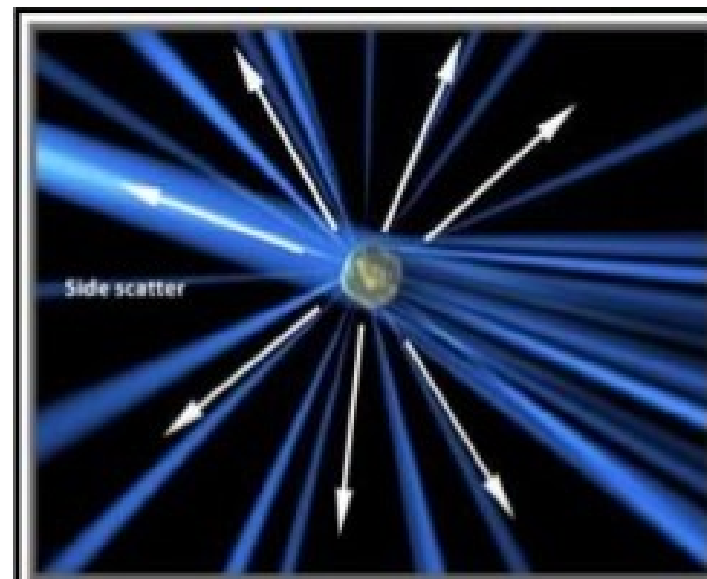
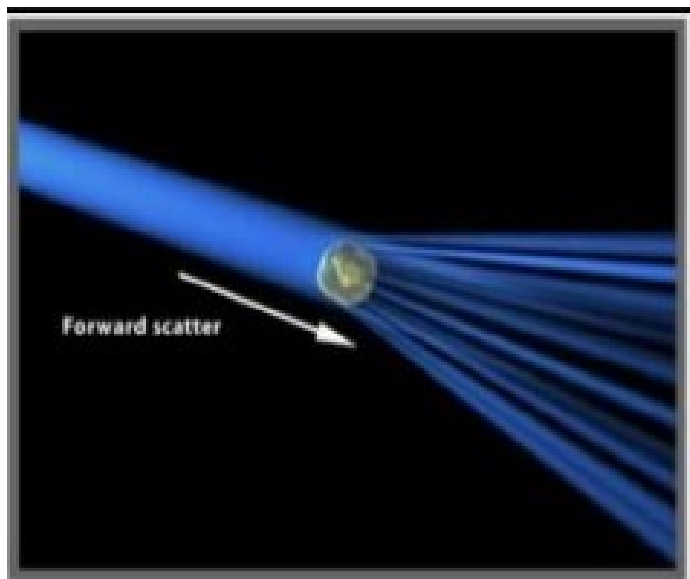
Veľkosť vs. granularita

- 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)

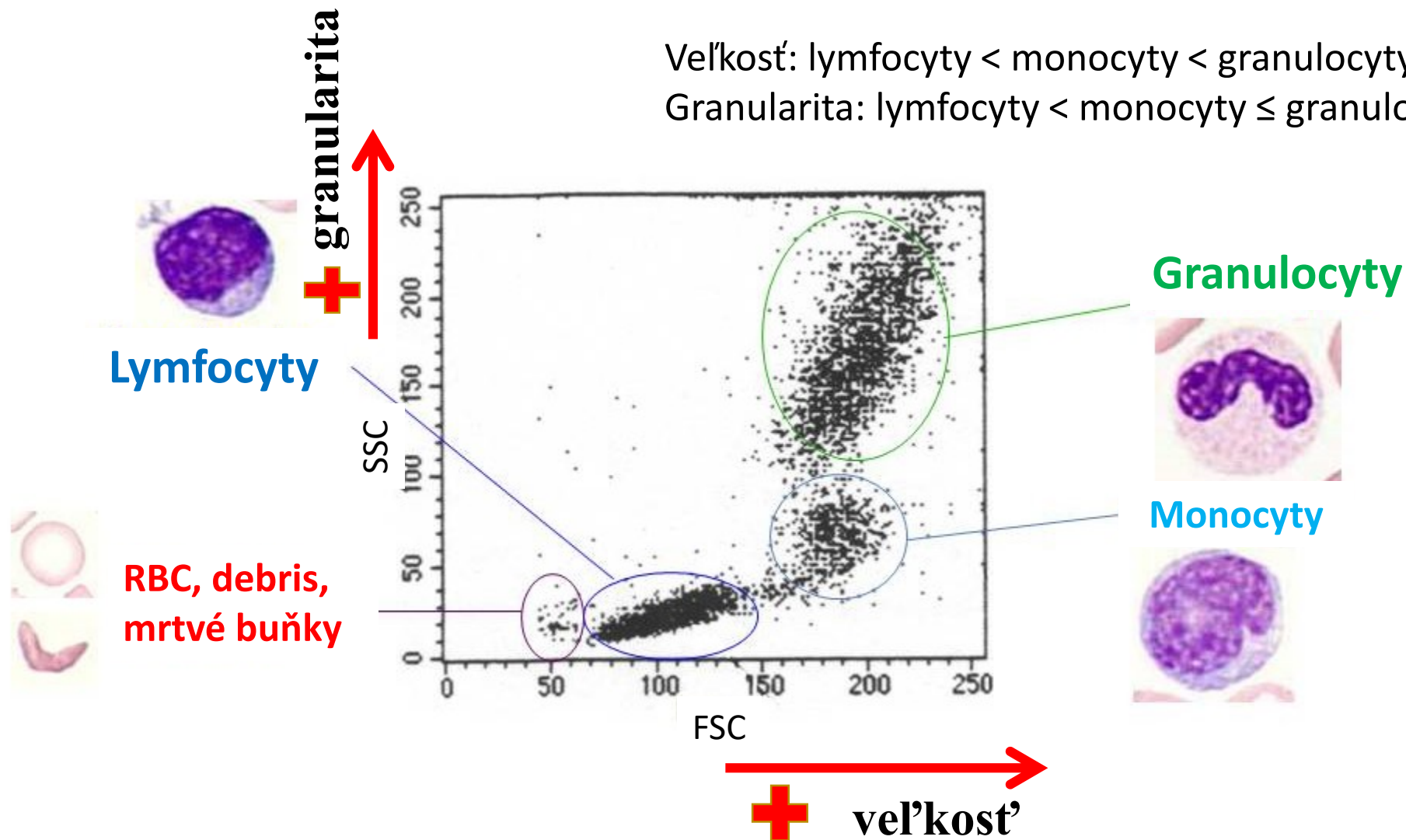


FSC vs. SSC

Kombináciou FSC a SSC získavame rozlíšenie základných subpopulácií Leukocytov

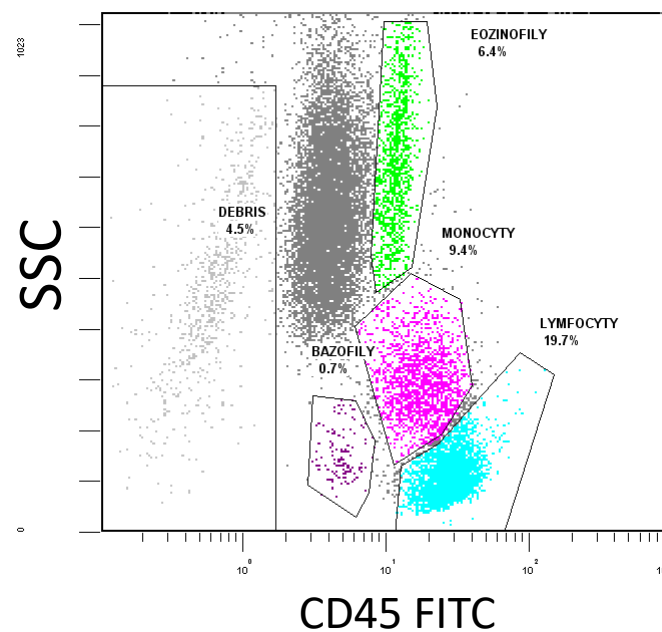
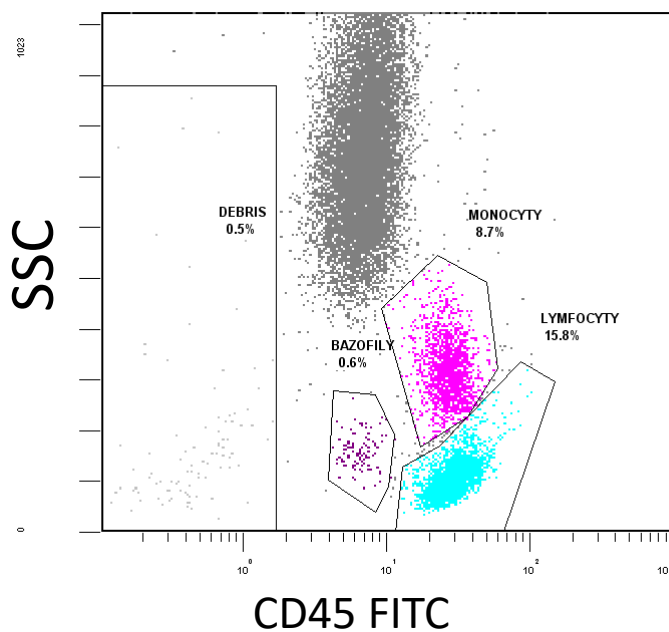
Veľkosť: lymfocyty < monocyty < granulocyty

Granularita: lymfocyty < monocyty ≤ granulocyty



Diferenciálny rozpočet

Stanovenie relatívneho počtu leukocytárnych a lymfocytárnych subpopulácií pomocou prietokovej cytometrie



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

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

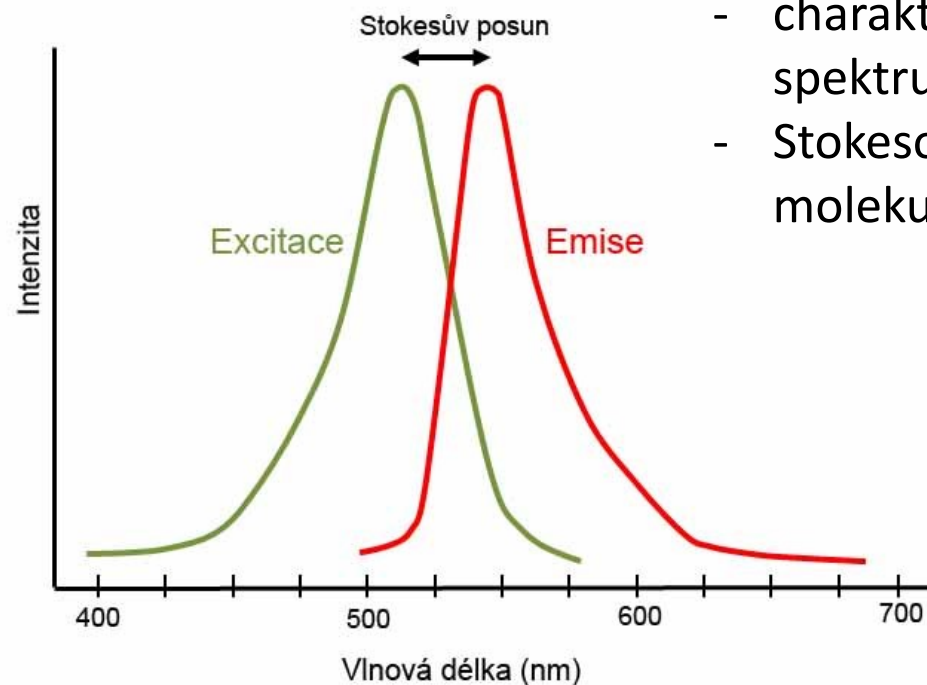
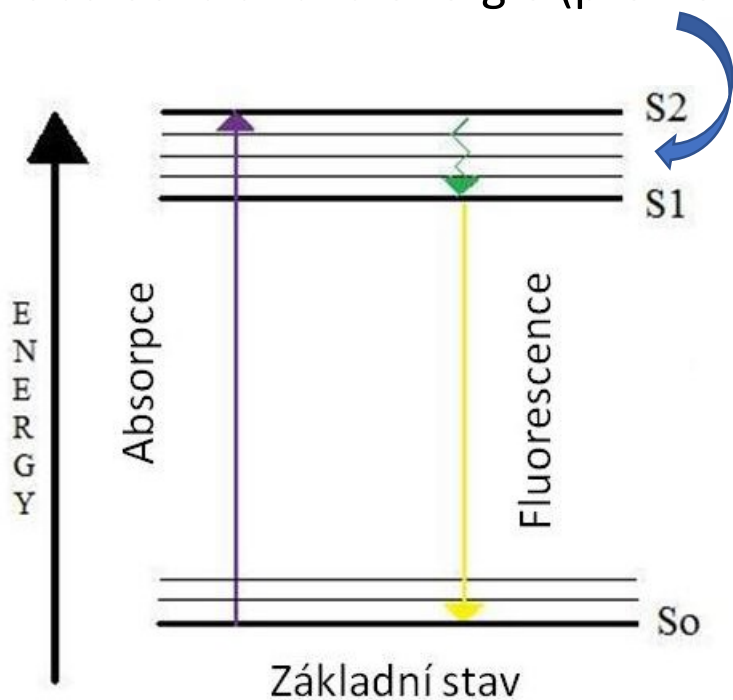
$$x_{11} \% \text{ CD4 Th} + x_{12} \% \text{ CD8 Tc}$$
$$x_{11} + x_{12} = 100 \% = \text{T-lymfocyty}$$

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

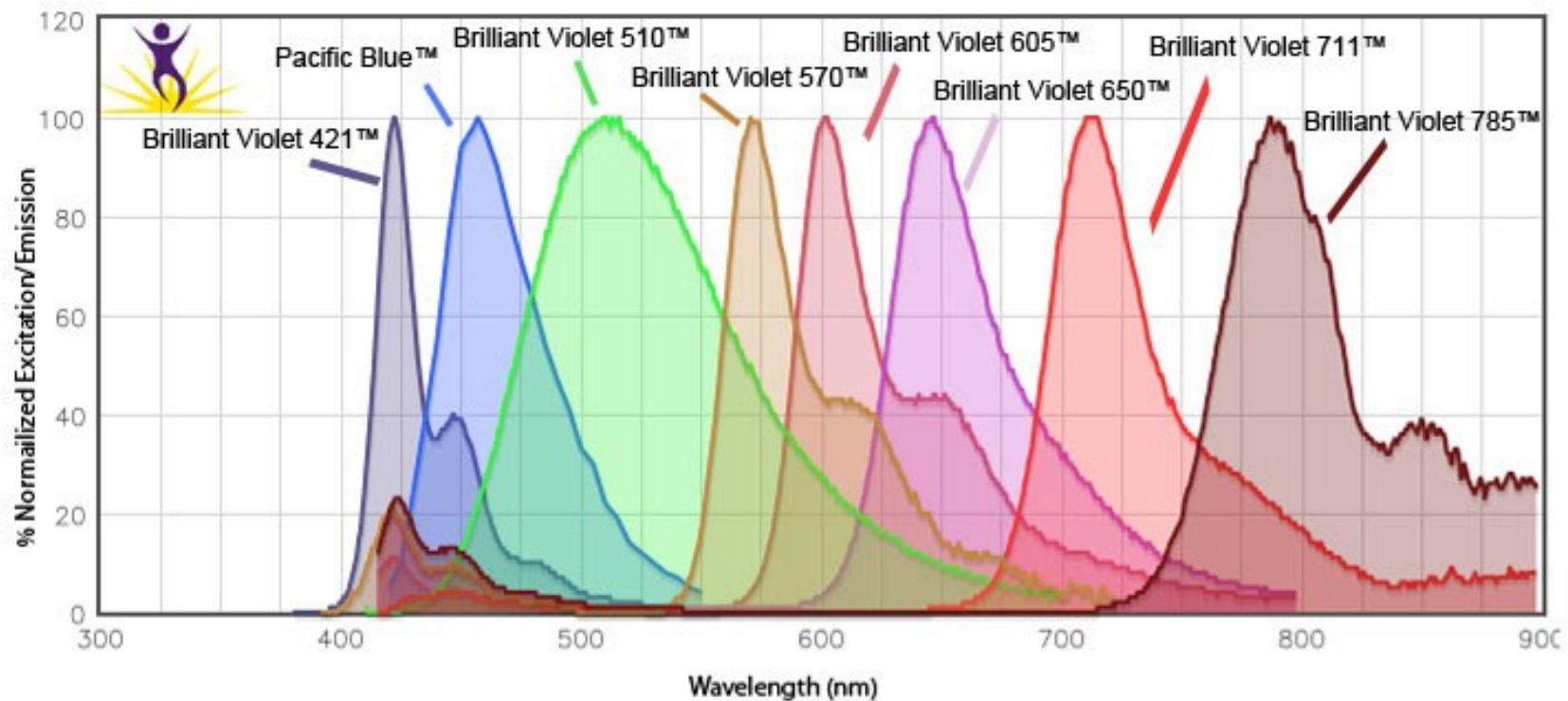
- Sú excitované vhodnou vlnovou dĺžkou (nutné zvoliť správny laser)
- Emitujú svetlo špecifickej vlnovej dĺžky (nutné zvoliť detektor v správnom pásme vlnových dĺžok)
- I neznačené bunky môžu byť fluorescenčné vďaka slabej autofluorescencii

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

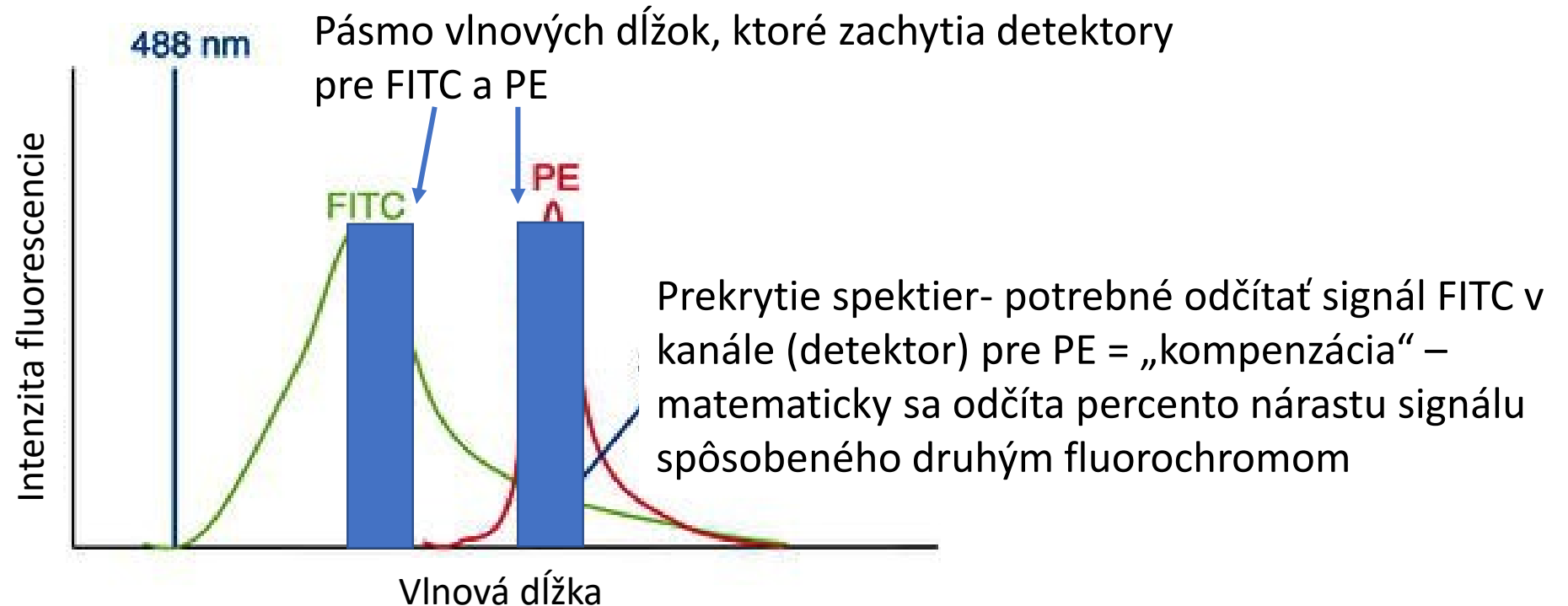
Schopné absorbovať fotóny budiaceho žiarenia (napr. 488 nm) a následne (10^{-8} s) emitovať fotóny s dlhšou vlnovou dĺžkou (nap. 500 – 800 nm). Fluorescenčné žiarenie má teda inú „farbu“.

Ukážka prekrytia emisných spektier niektorých fluorochromov



Prekrytie spektier

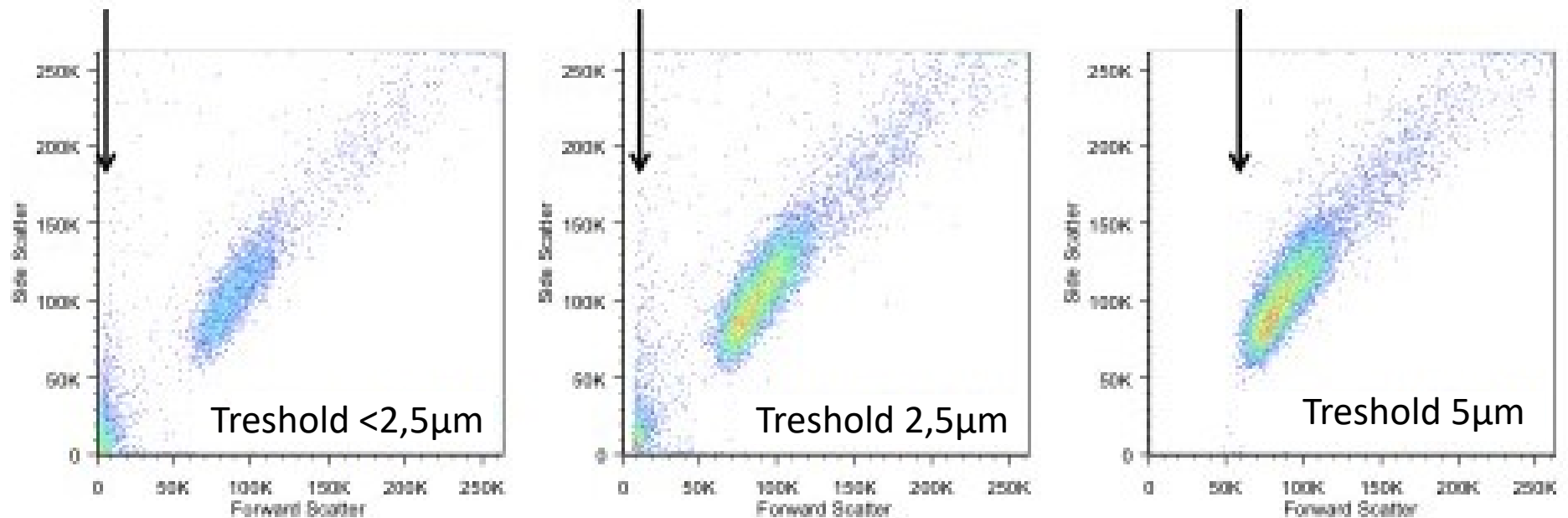
- Fluorochromy typicky emitujú svetlo v širokom spektre vlnových dĺžok
- V závislosti na usporiadaní filtrov, detektory môžu zachytiť fluorescenciu od iných fluorochromov, ktoré sú detekované v iných kanáloch (priesvit, prekrytie)



Threshold (prah)

- Detektory sú extrémne citlivé = detekujú signály z rôznych zdrojov – prach, malé častice, debris
- Na elimináciu slúži nastavenie tzv. **Thresholdu**
- Nastavenie na jednom parametre (najčastejšie FSC) = v tomto prípade eliminujeme signál malých častíc na základe rozptylu svetla

napr. zadefinujeme Threshold odpovedajúci intenzite žiarenia u častíc veľkosti 5 μm = zaznamenané udalosti (eventy) menšie ako nastavený Threshold cytometer nebude zaznamenávať

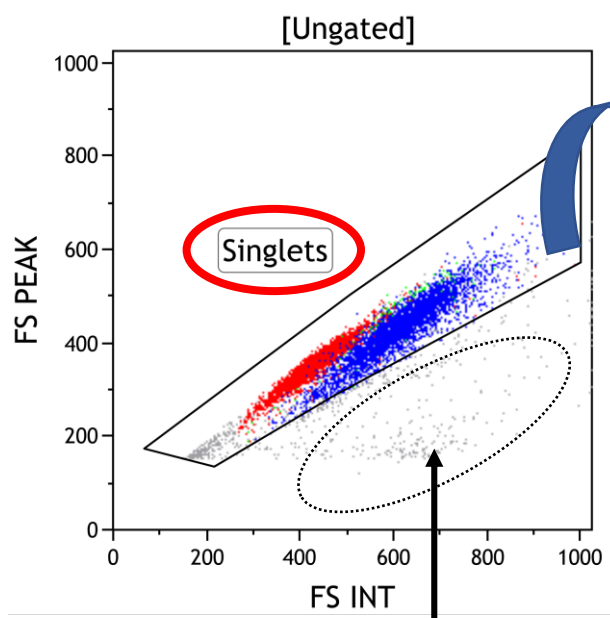


Analýza nameraných dát – Gating Strategy

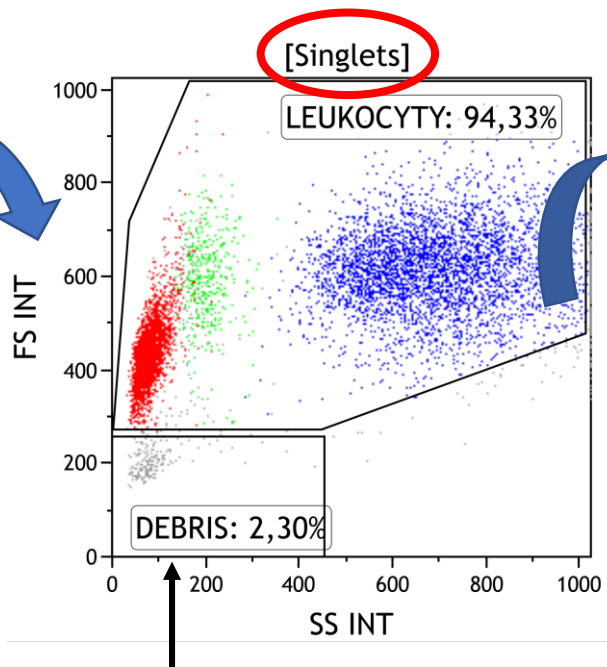
Gatovacia stratégia: postupný výber buniek záujmu.

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.

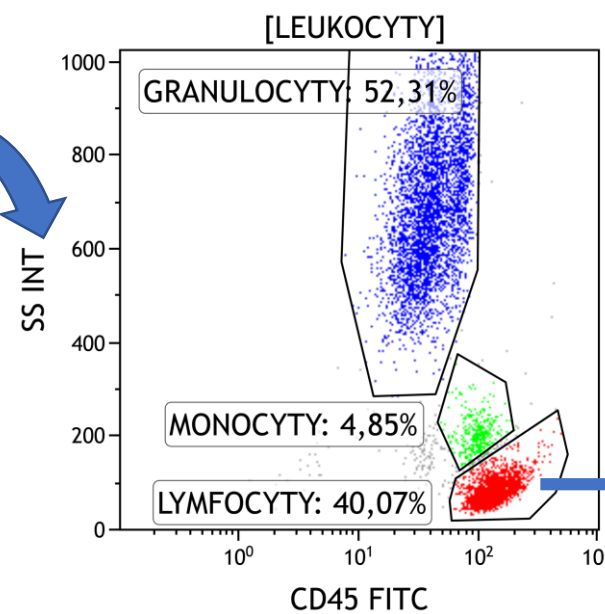
Názov gate, z ktorého sa zobrazujú bunky



Oddelenie doubletov- zlepených buniek



Mŕtve bunky a prachové častice

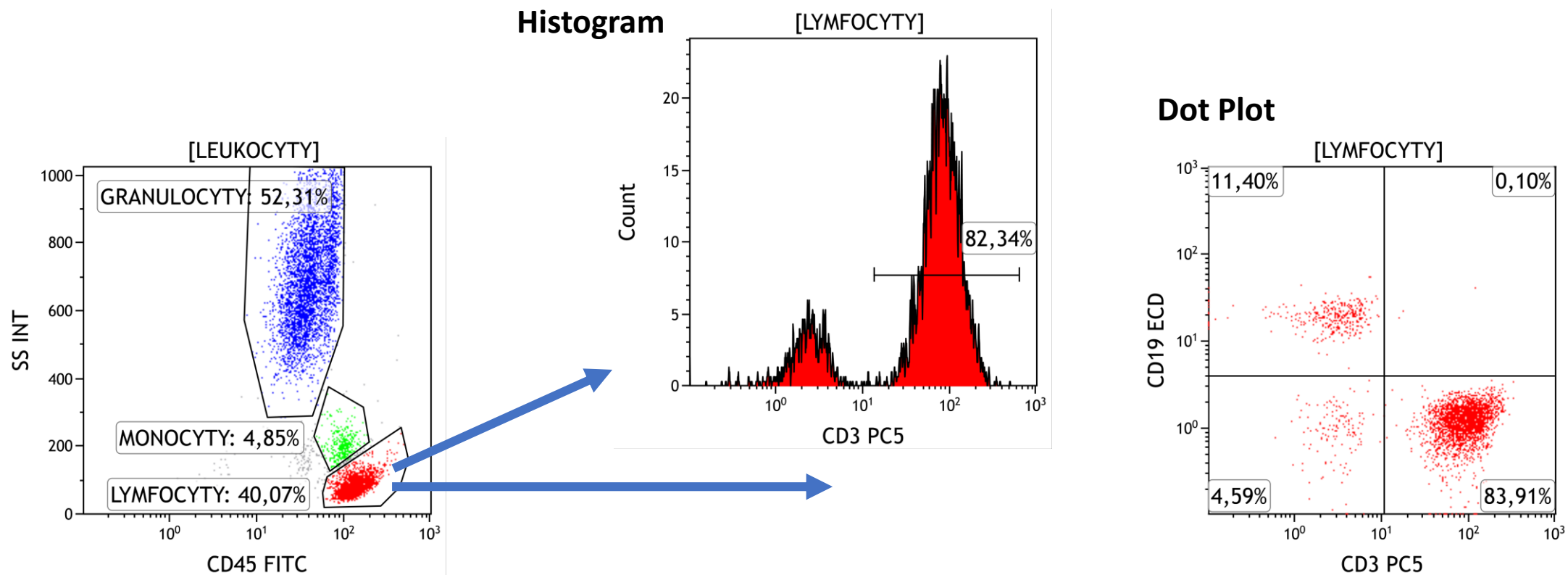


Pokračovanie na nasledujúcom slide (už len gate Lymfocyty)

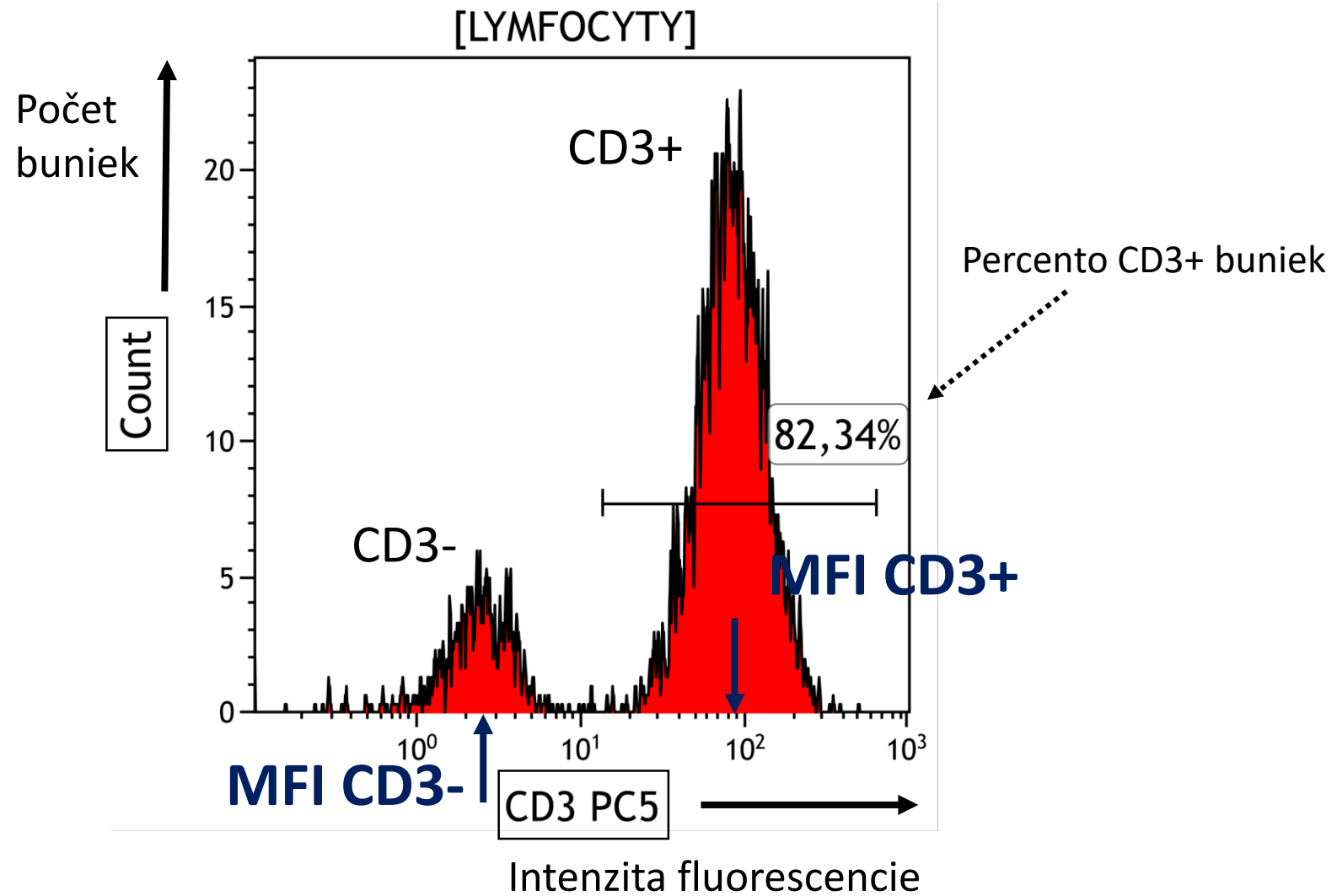
Analýza nameraných dát – Štatistika

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

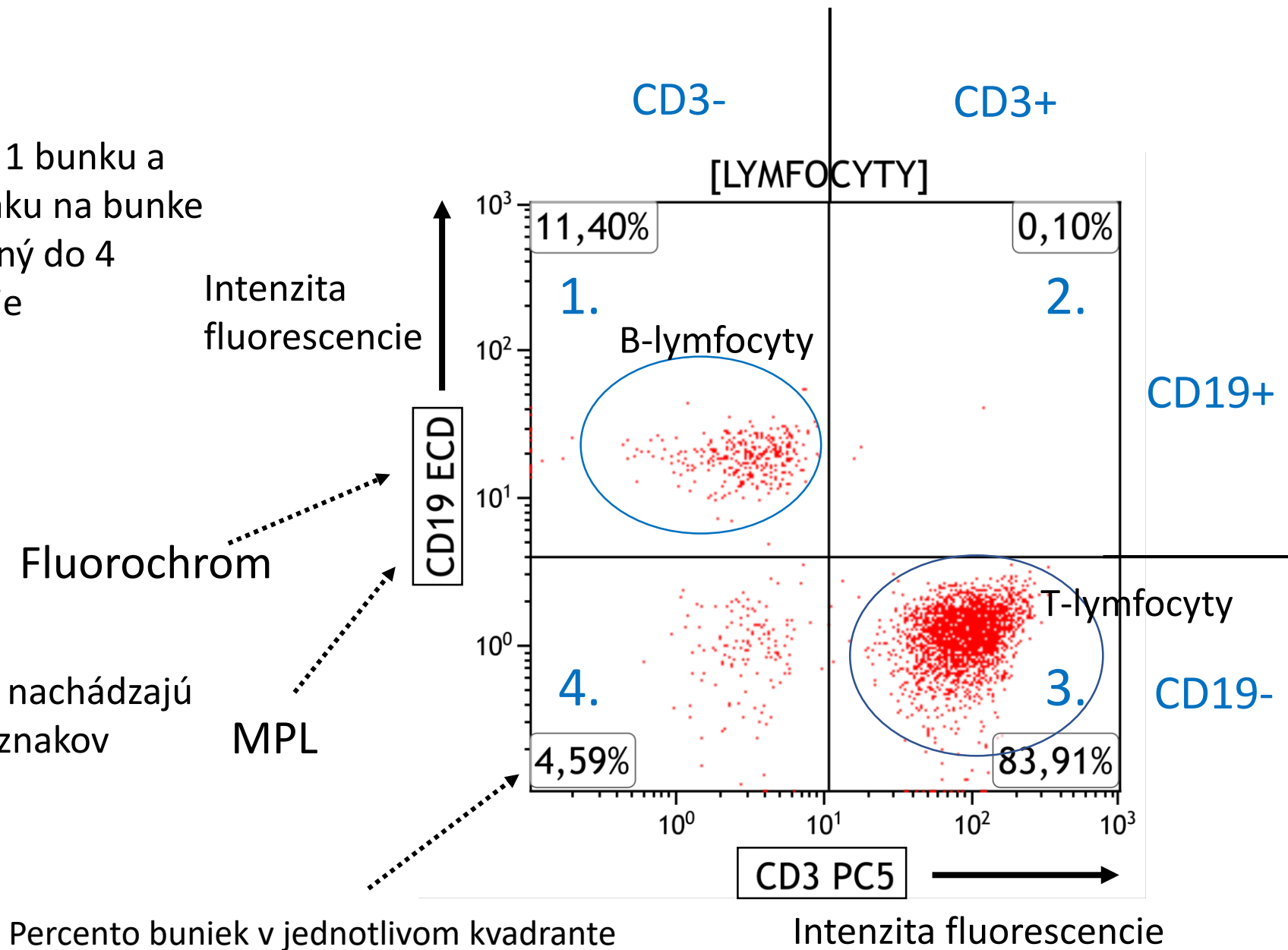


DOT PLOT

- 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

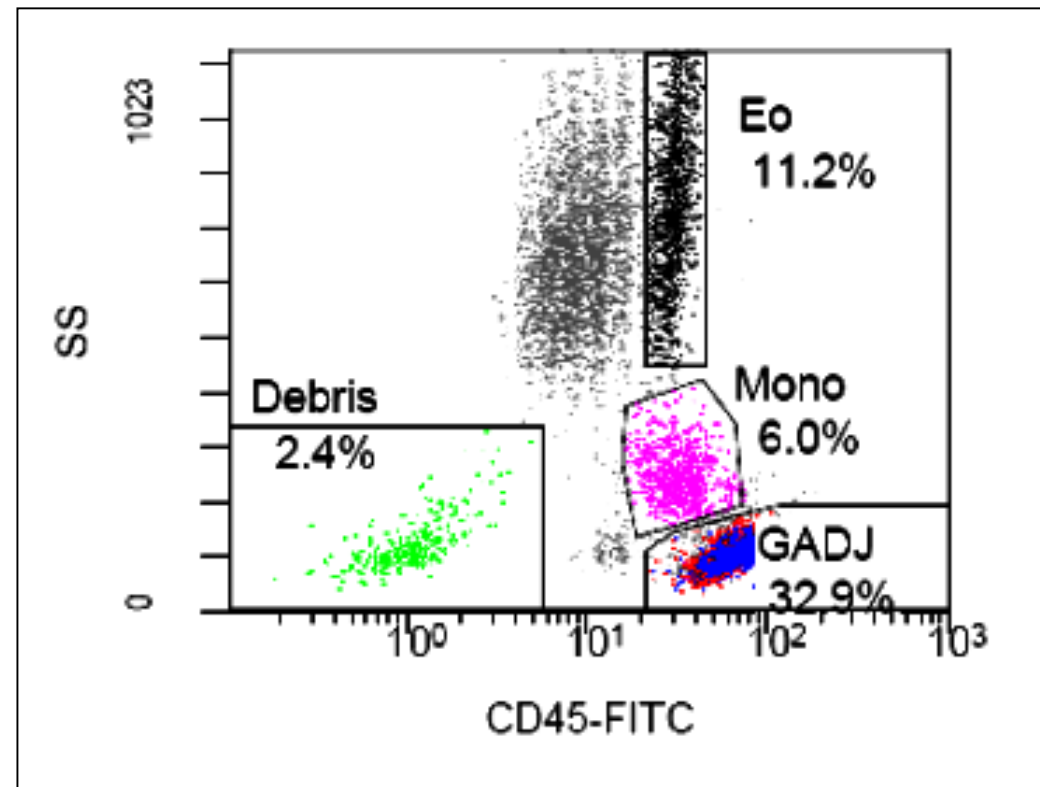
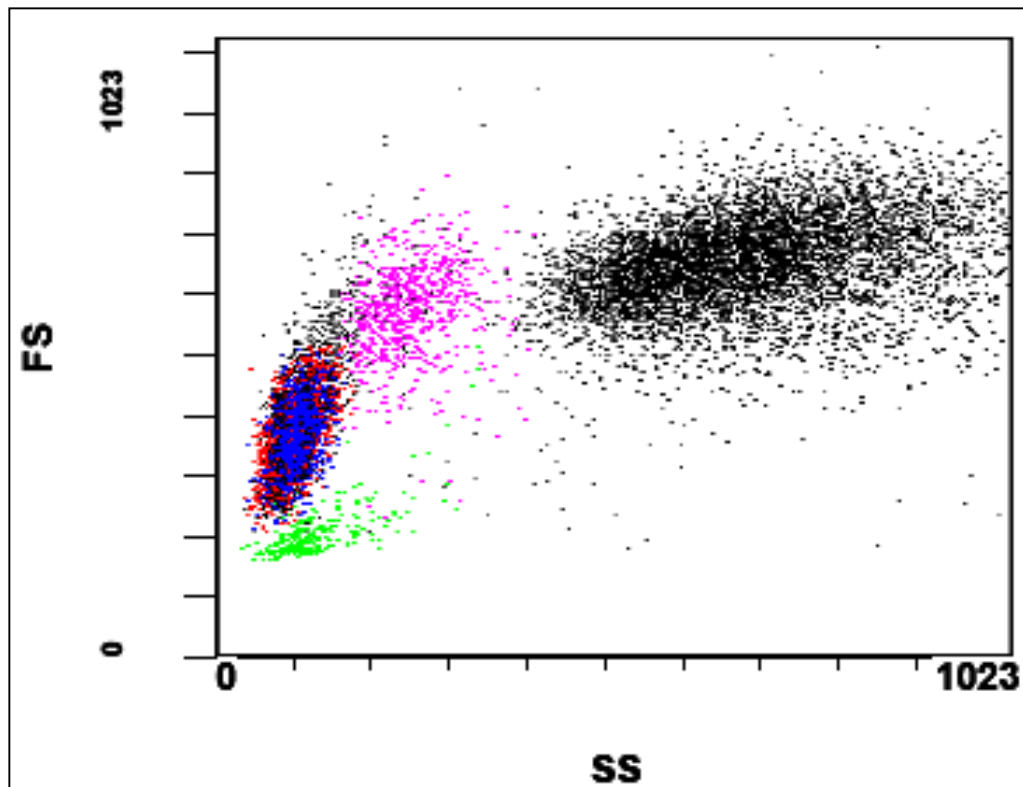
- Veľké množstvo analyzovaného materiálu – veľké množstvo dát
- Analýza trvá niekoľko minút
- Kvalitatívna + kvantitatívna analýza
- Možné manipulačné operácie- napr. triedenie buniek s vybranými vlastnosťami (cell sorting)

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:

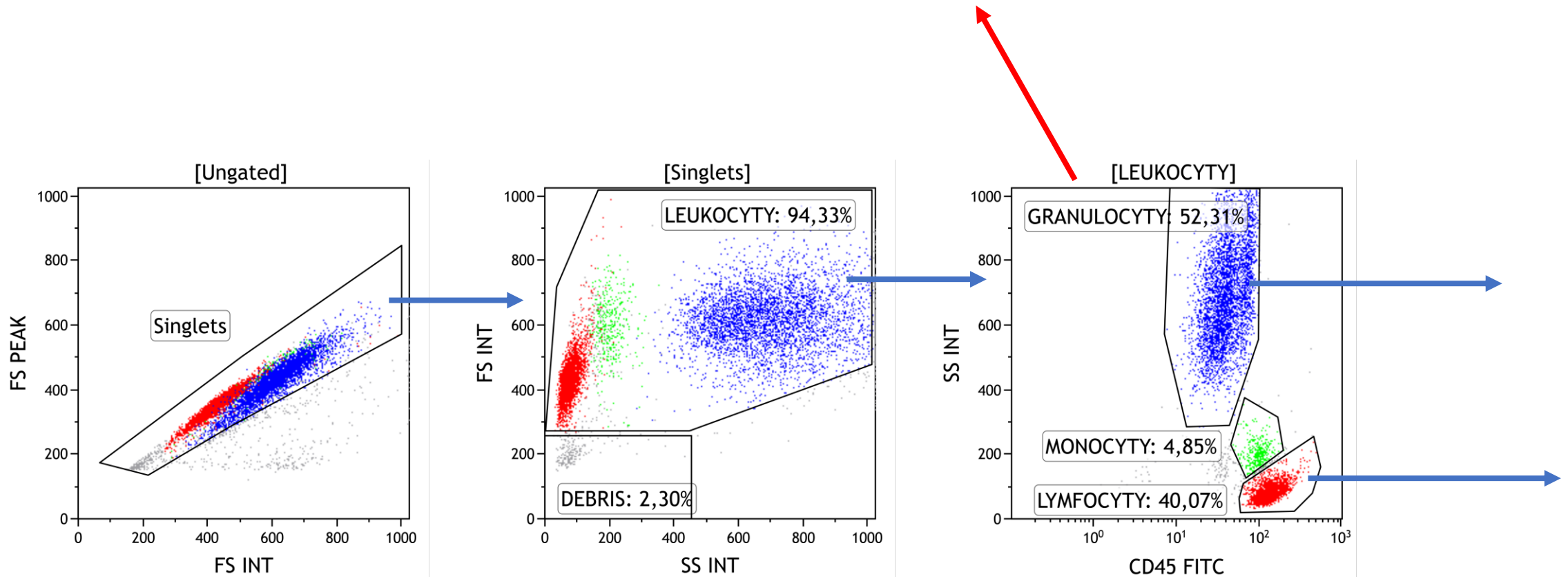
		MPL + Fluorochrom	
Skúmavka A:	45µl krvi + x µl MPL	CD45	FITC
		CD3	PC5
		CD4	RD-1
		CD8	ECD
Skúmavka B:	45µl krvi + x µl MPL	CD45	FITC
		CD3	PC5
		CD19	ECD
		CD16/56	RD-1

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

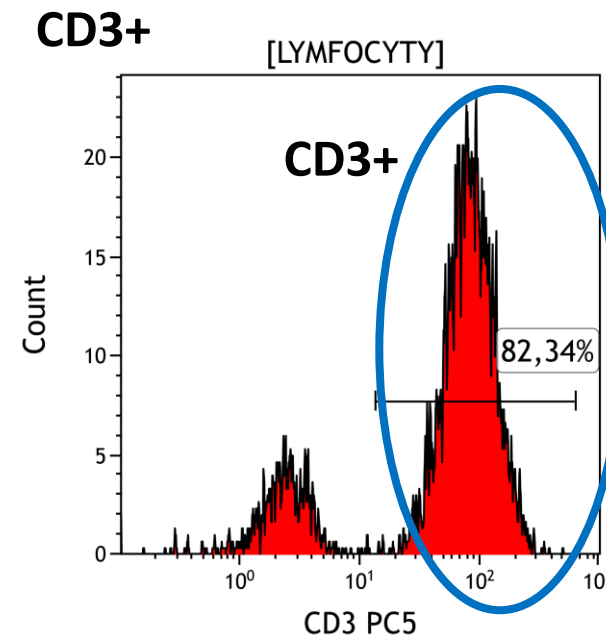
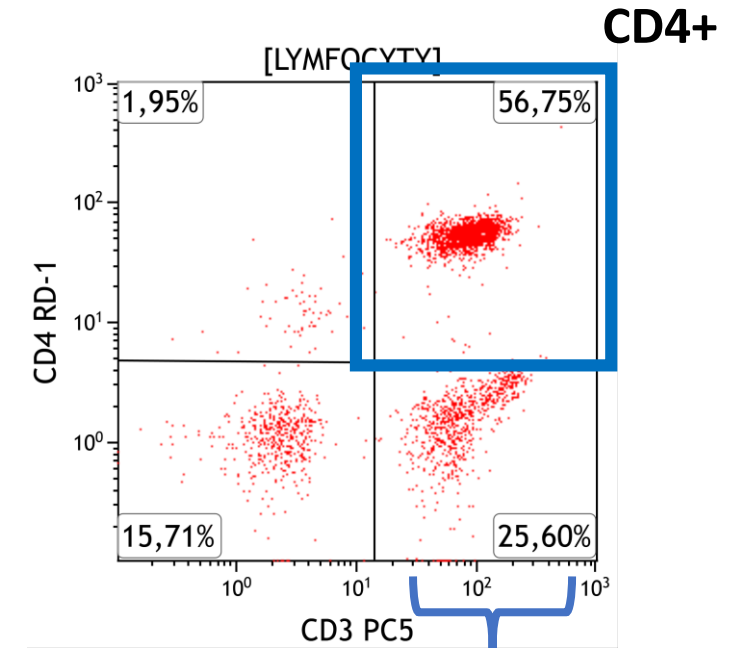
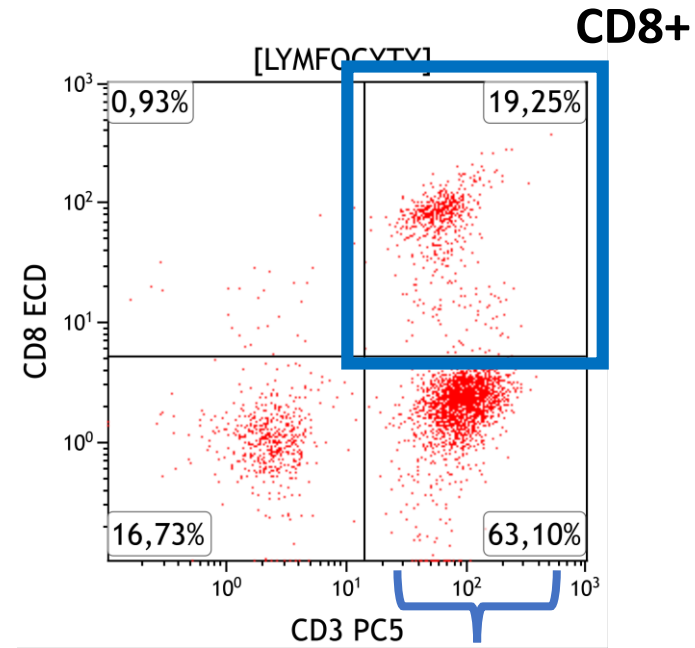
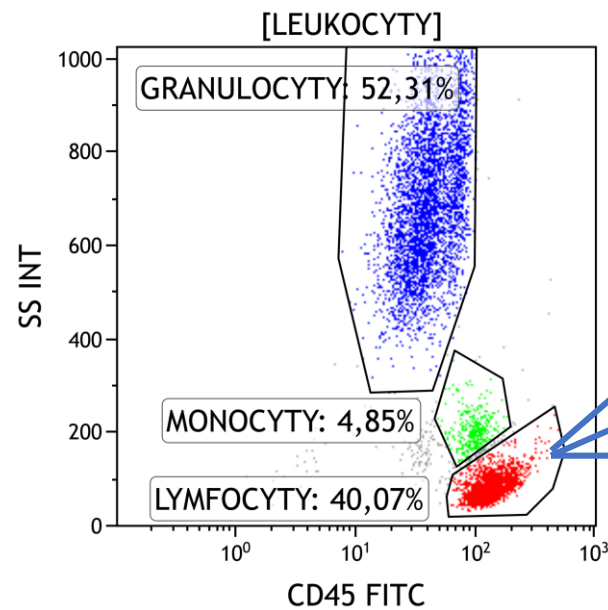
Krvný diferenciál – gatovacia stratégia + výsledky

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



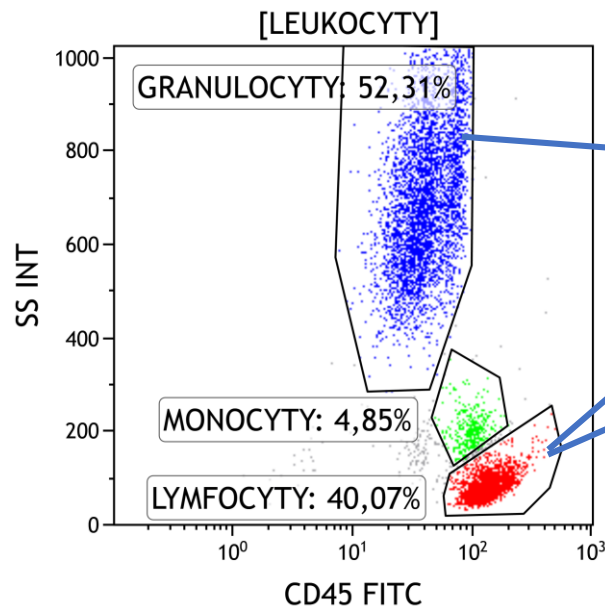
Krvný diferenciál – gatovacia stratégia

Skúmavka A:

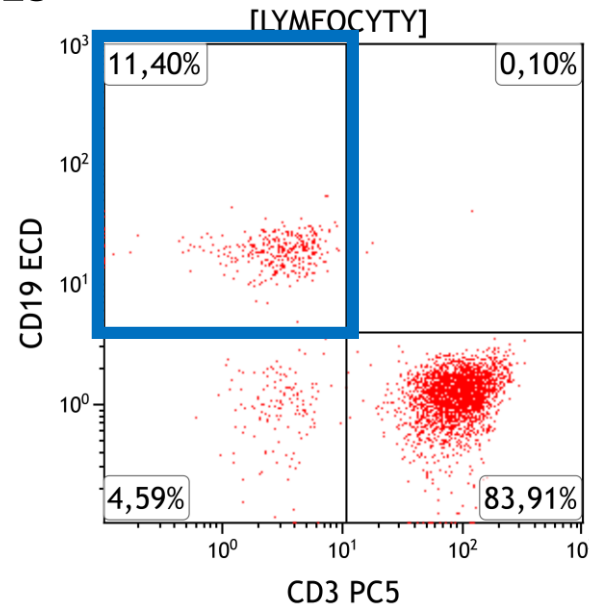


Krvný diferenciál – gatovacia stratégia

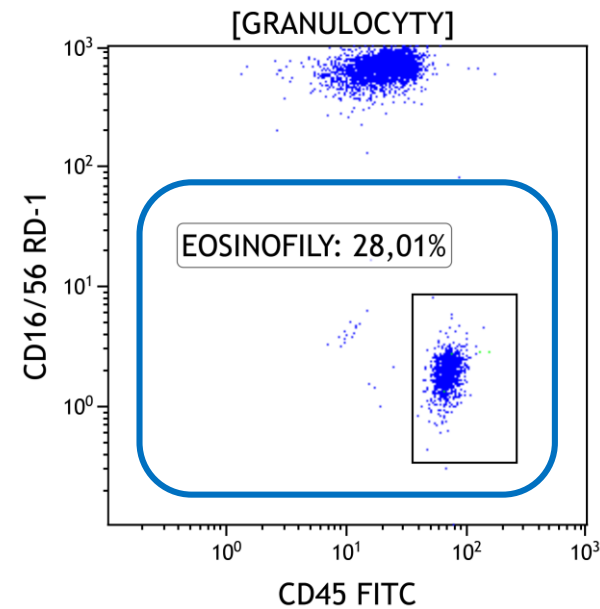
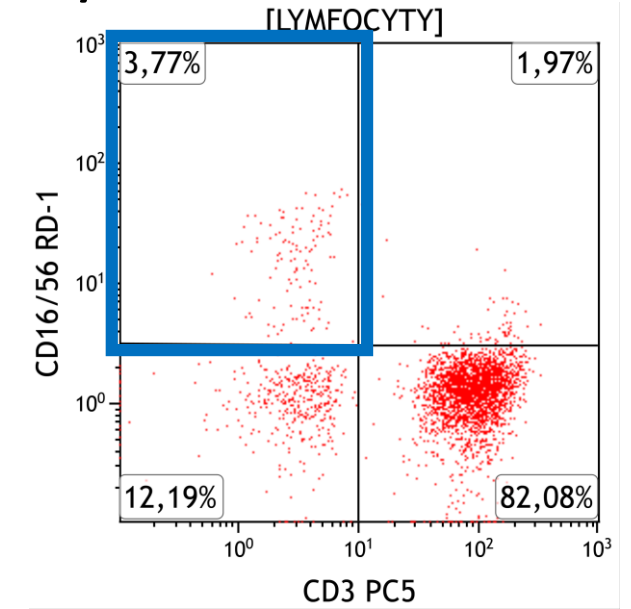
Skúmavka B:



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 ⁹ l
Lymfocyty	20-55 %
Monocyty	0-10 %
Granulocyty – neutrofily, eosinofily, bazofily	37-75 %

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

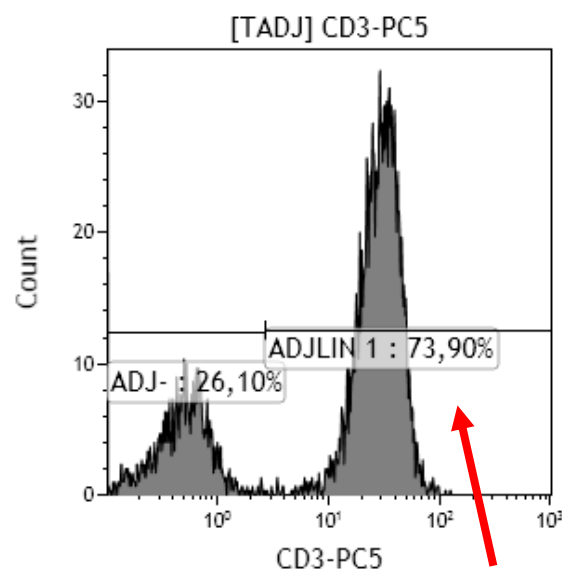
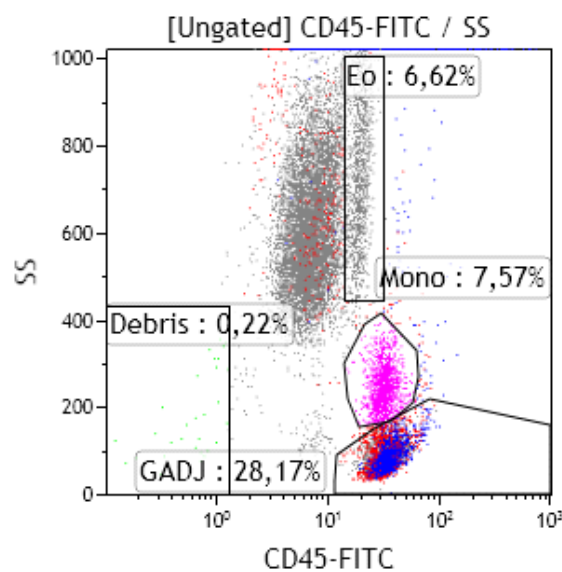
Hodnotenie nálezu jednotlivých subpopulácií

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)

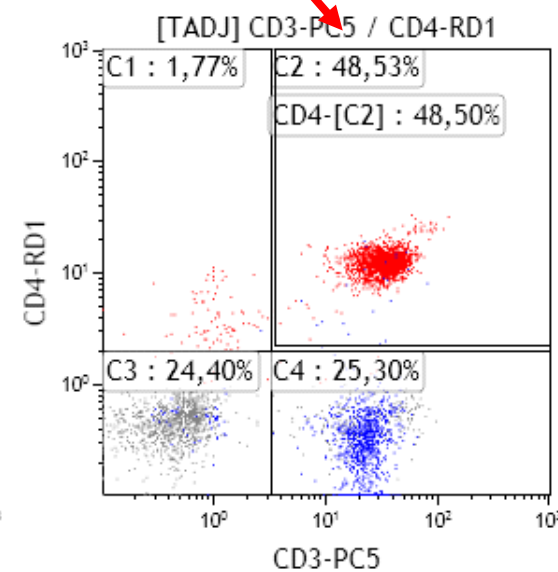
Skúmavka A

Získame relatívny počet:

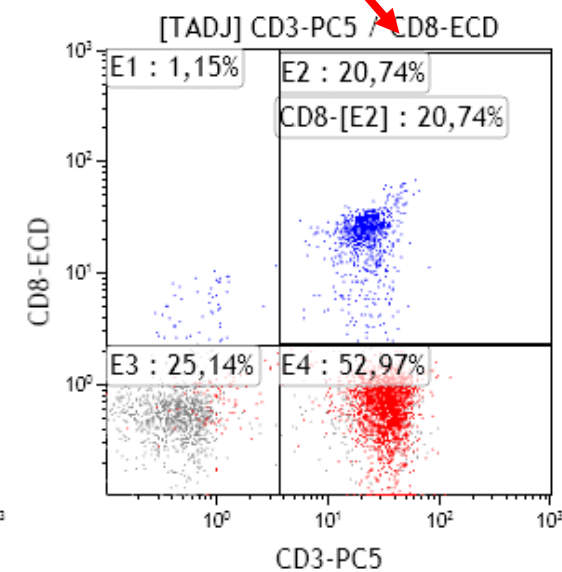


T-lymfocytov CD3+

Pomocných Th-lymfocytov
CD3+ CD4+



Cytotoxických Tc-lymfocytov
CD3+ CD8+

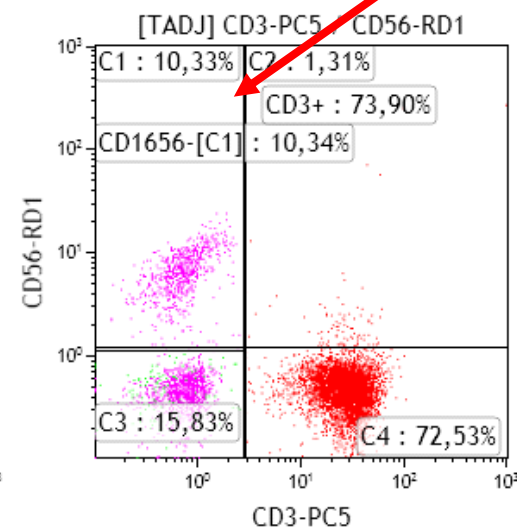
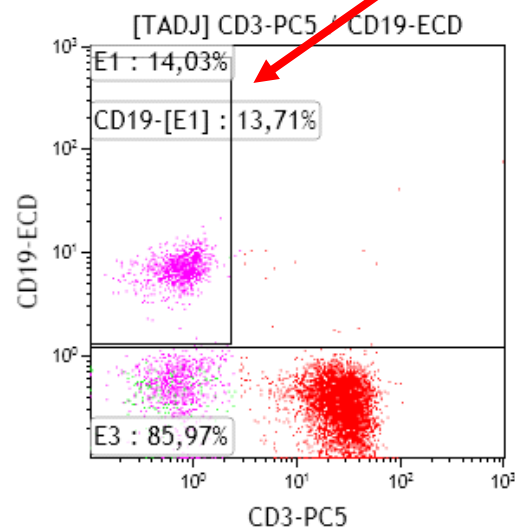
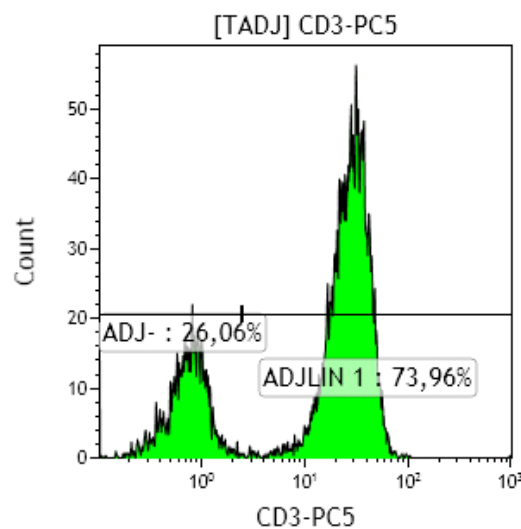
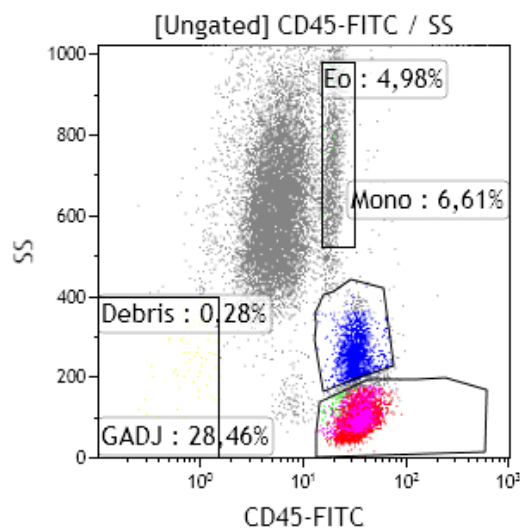


Obsahuje: vzorka krvi + MPL (aCD45; aCD3; aCD19; aCD56)

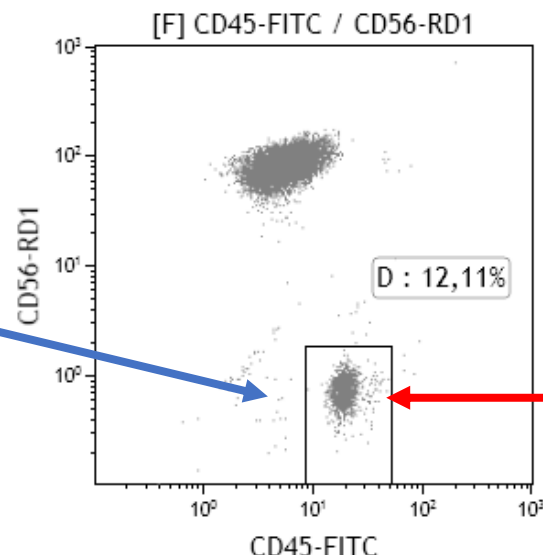
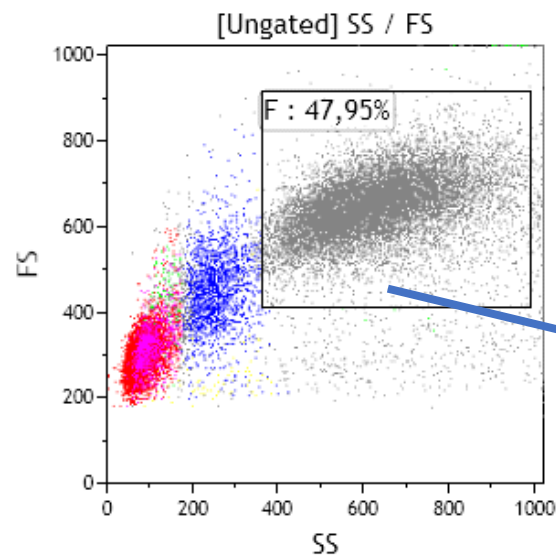
Skúmavka B

B-lymfocytov CD19+

NK buniek CD56+CD3-



Získame relatívny počet:

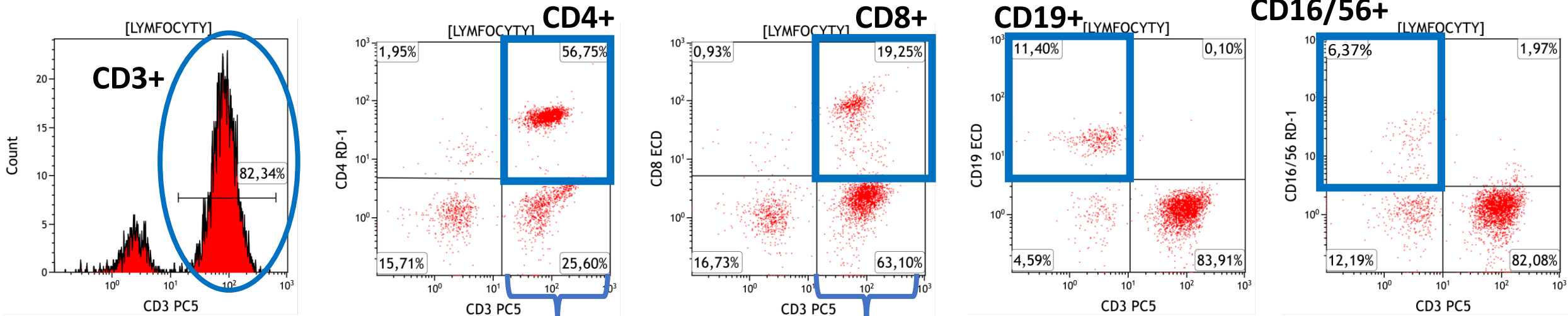


Eosinofilov

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

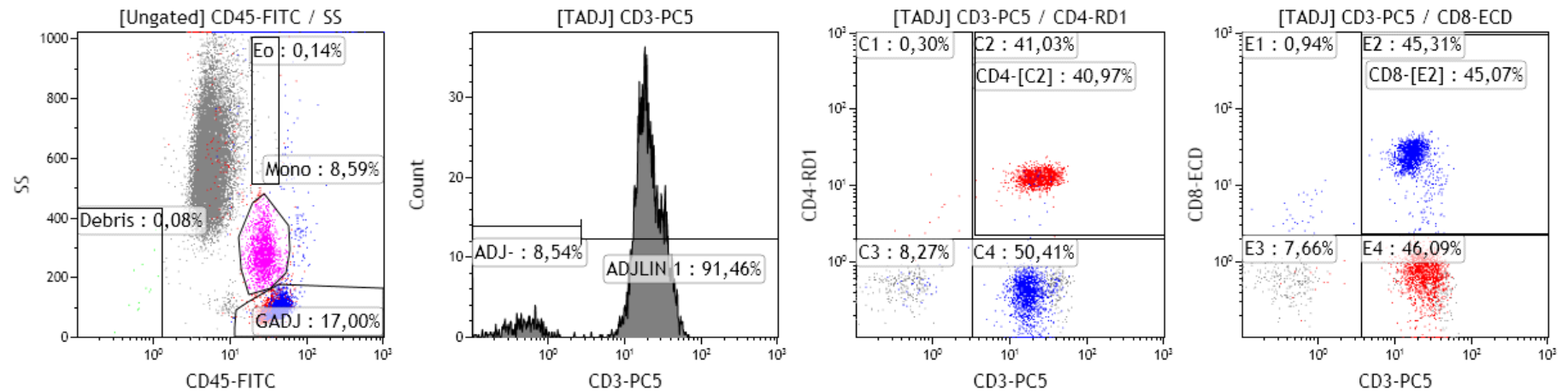
Bakteriální infekce

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

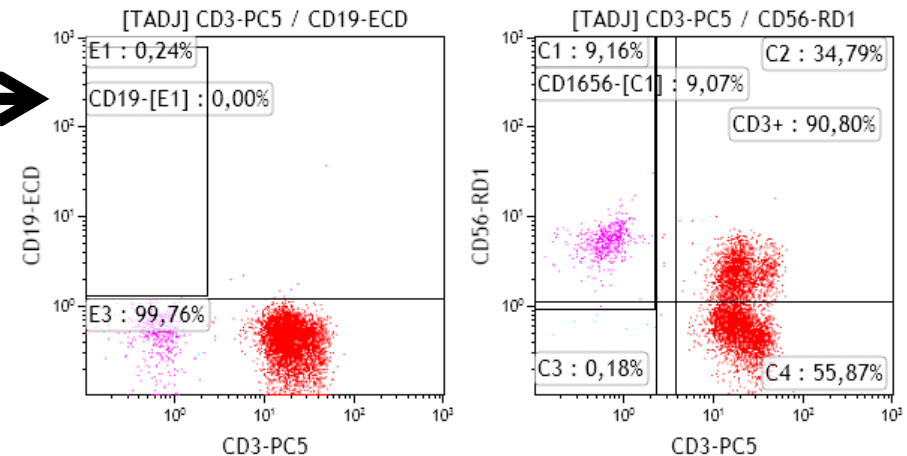
Virová infekce

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

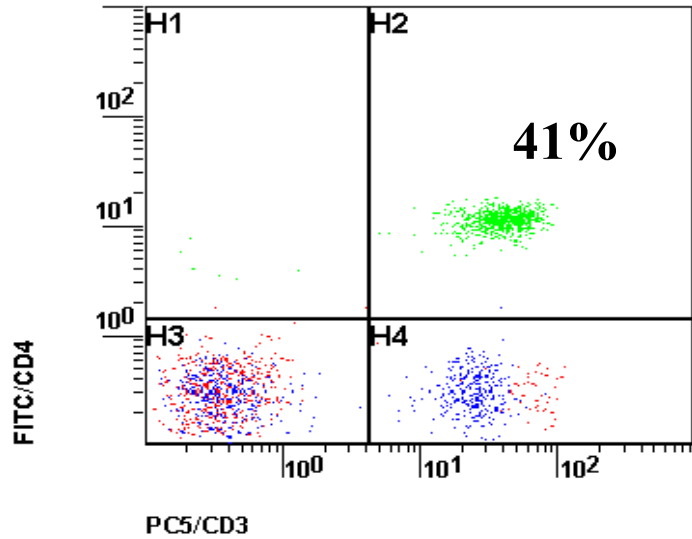
Pacientka: Ž, *1957



- 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

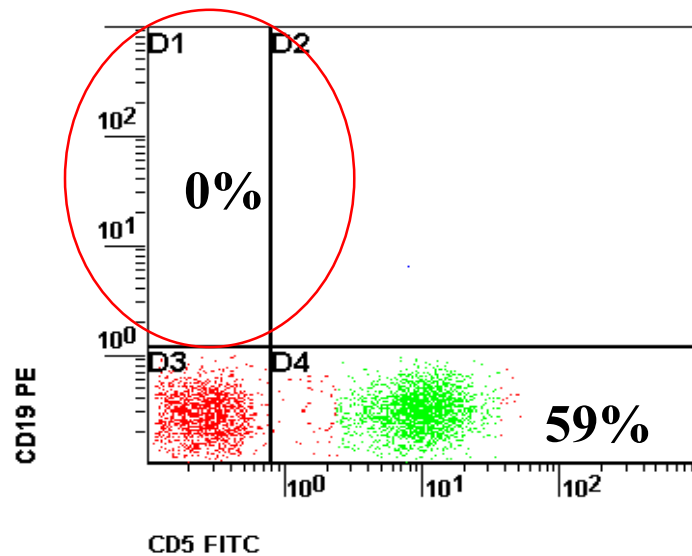
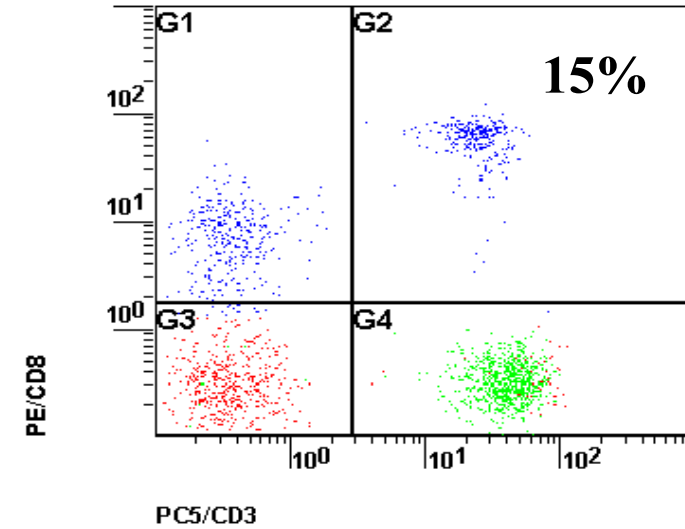


Krvný diferenciál: X-viazaná agamaglobulinémia



T LYMFOCYTY

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

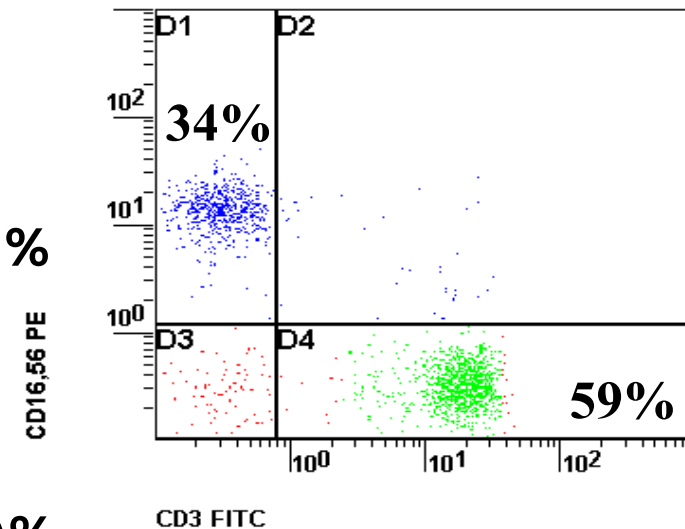


B LYMFOCYTY

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

NK LYMFOCYTY

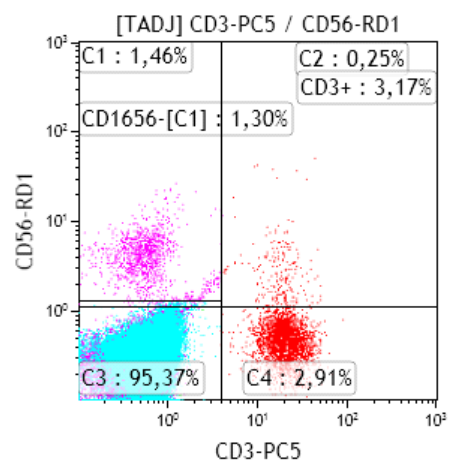
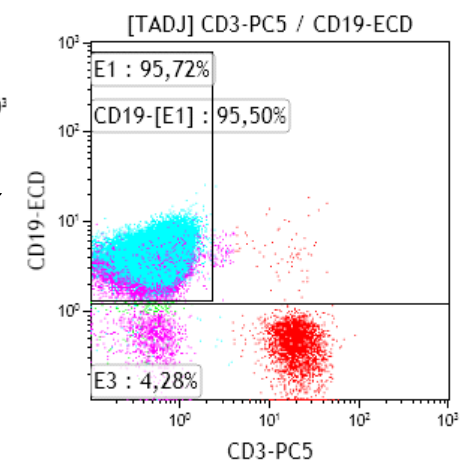
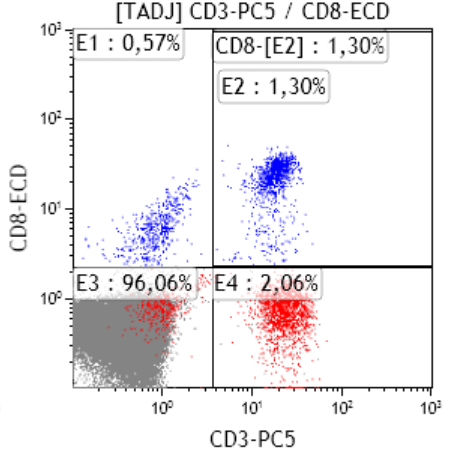
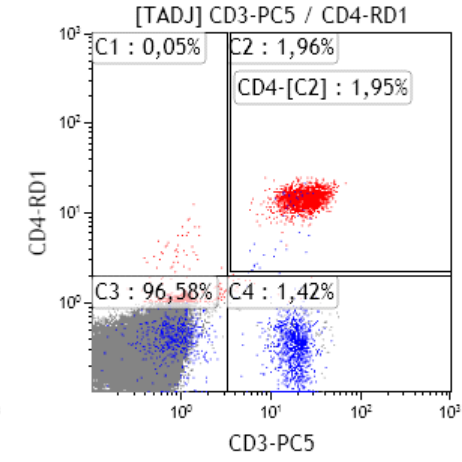
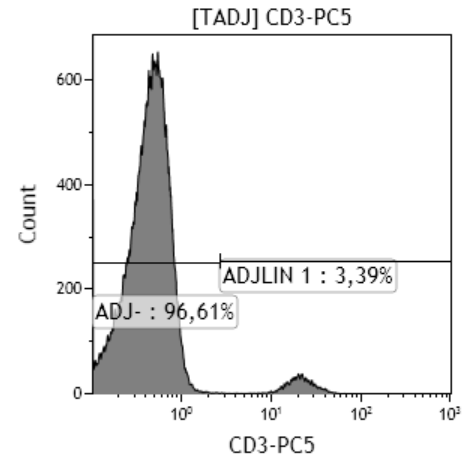
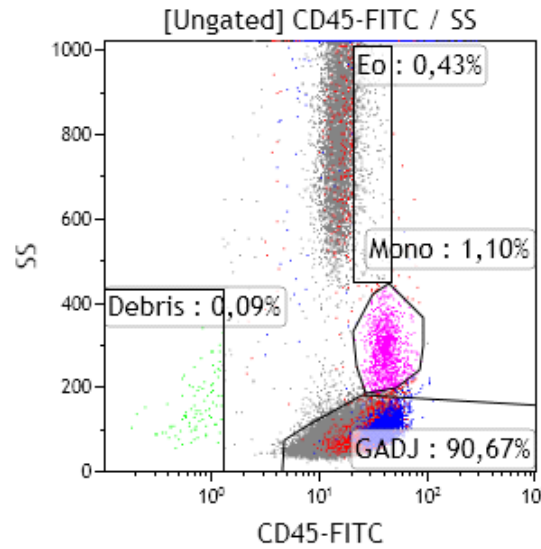
- **CD16,56+ : 34 (6-20)%**



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

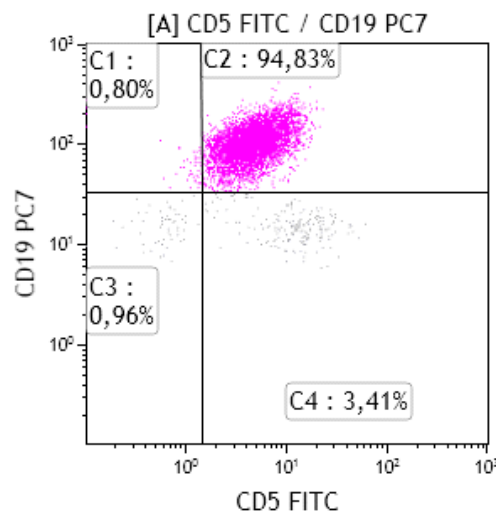
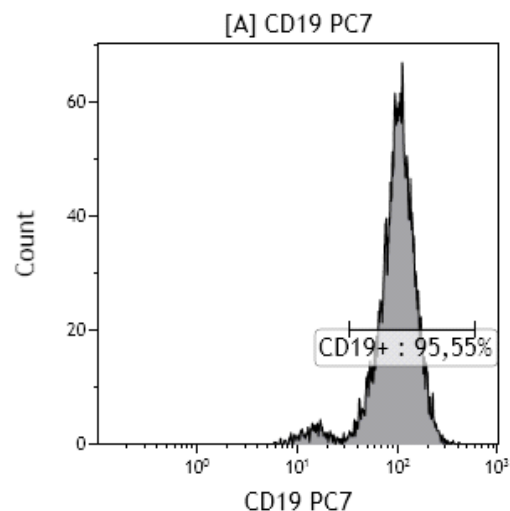
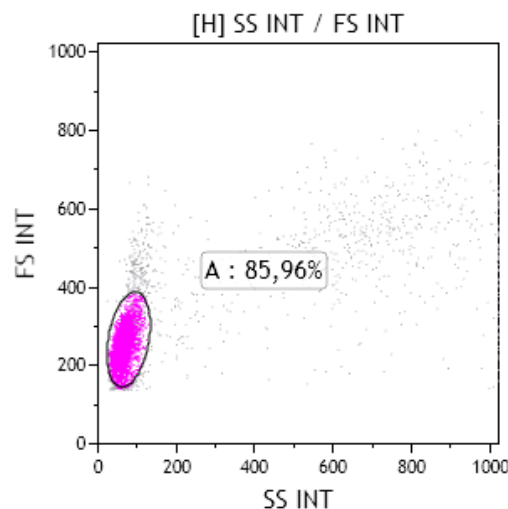


Pokračovanie nasledujúci slide

Pacient: M, *1966

Doplnenie vyšetrenia na zistenie prítomnosti
CD5+CD19+ buniek

- CD5+CD19+ bunky = marker chronickej lymfoproliferatívnej choroby
- u zdravej osoby sa znak CD5 vyskytuje na T-lymfocytoch, normálne hodnoty CD5+ na B-lymfocytoch u zdravého dospelého človeka: do 10% zo všetkých B-lymfocytov



CD5+CD19+ : 94.8%

Vzorka: periférna krv odobraná do EDTA

Značenie MPL:

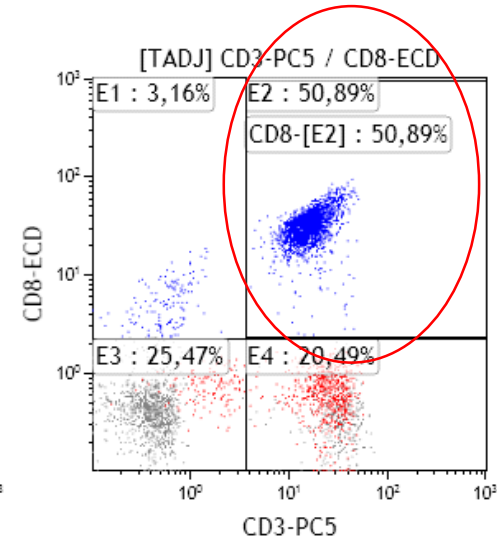
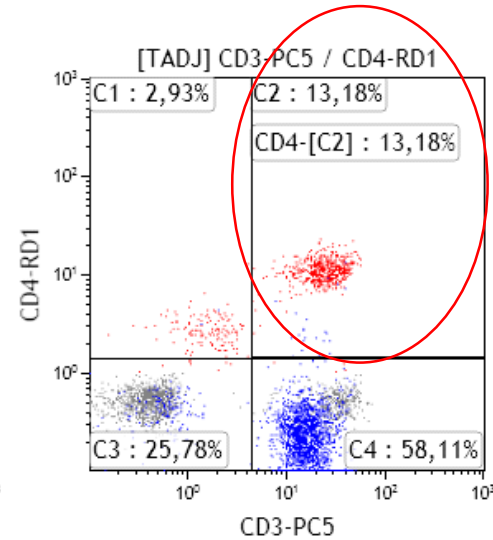
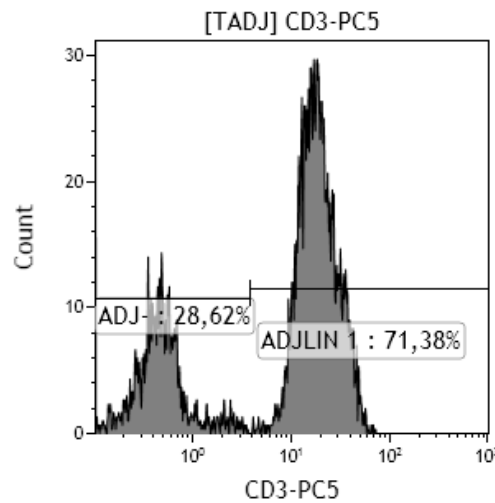
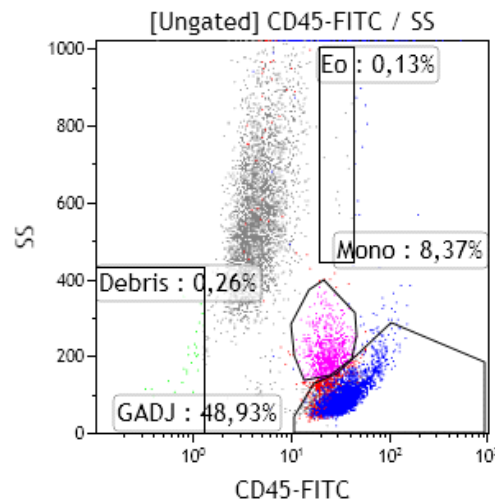
CD45 KO- panleukocytárny znak

CD19 PC7- B-lymfocyty

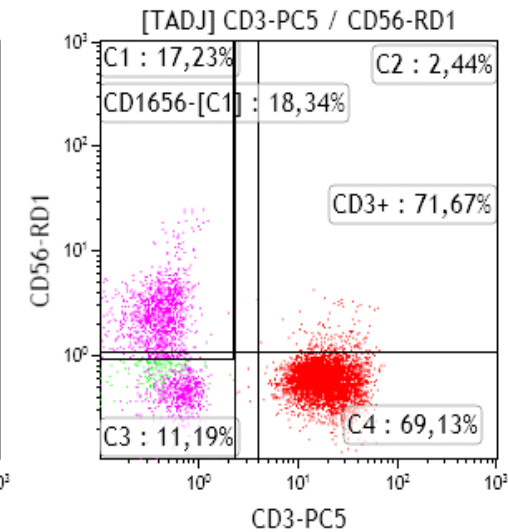
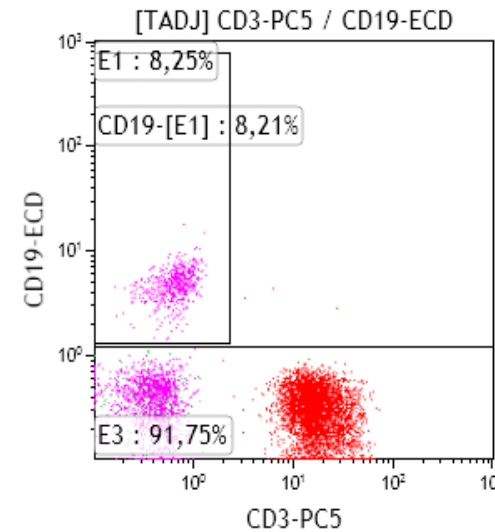
CD5 FITC

Výsledok: vysoký počet CD5+CD19+ = odporúčanie na
hematoonkologické vyšetrenie

Pacient: M, *1999



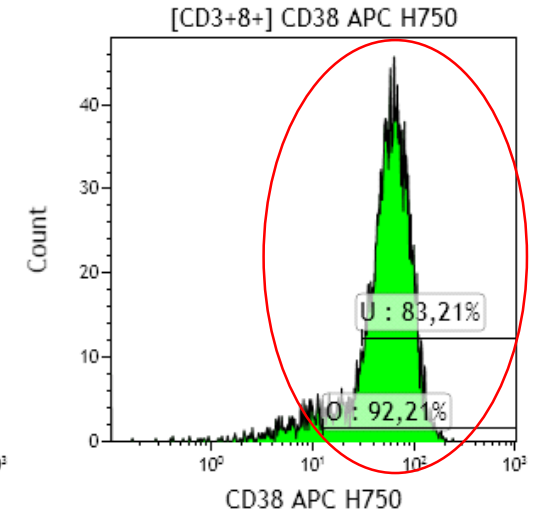
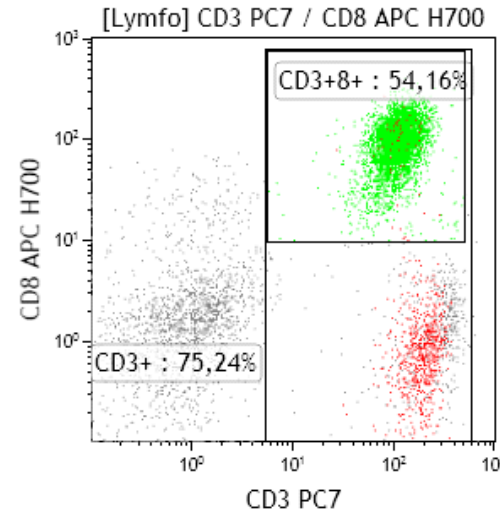
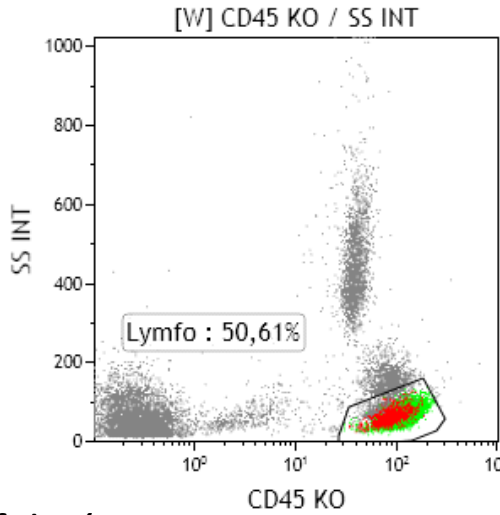
- v krvnom diferenciáli zistený obrátený pomer
CD3+**CD4+** k CD3+**CD8+** (**13,2 : 50,9**)
- Fyziologické hodnoty: pomer CD3+CD4+ > CD3+CD8+
- Prvo-záchyt: bez histórie v nemocničnom systéme
- výsledok: podozrenie na vírovú infekciu
- nutné doplniť vyšetrenie CD8+CD38+ buniek



Pokračovanie nasledujúci slide

Pacient: M, *1999

Doplnenie vyšetrenia na zistenie zvýšenej expresie znaku CD38 na CD3+CD8+ T-lymfocytoch



- CD8+CD38+ bunky = marker vírusových infekcií
- u zdravej osoby je zastúpenie CD8+CD38+ T- buniek nízke, u vírusových infekcií sa zvyšuje, patologické hodnoty = ???
- hodnoty vyššie ako 50% CD8+CD38+ T-buniek z celkových CD3+CD8+ T-buniek nutné výsledok hlásiť doktorovi

Vzorka: periférna krv odobraná do EDTA

Značenie MPL:

CD45 KO- panleukocytárny znak

CD3 PC7- T-lymfocyty

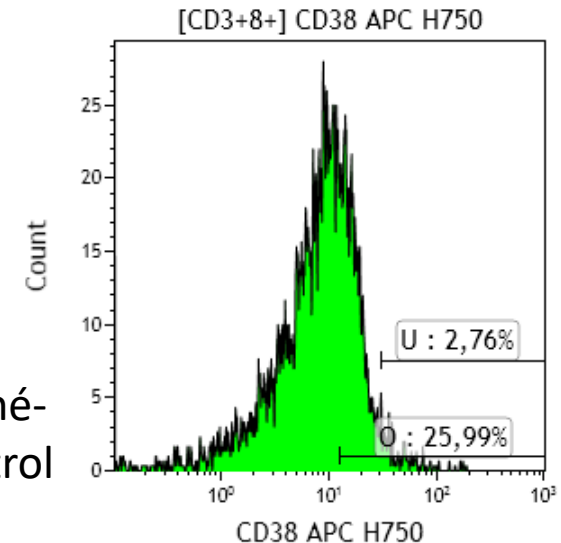
CD8 APC H700 – cytotoxické T-lymfocyty

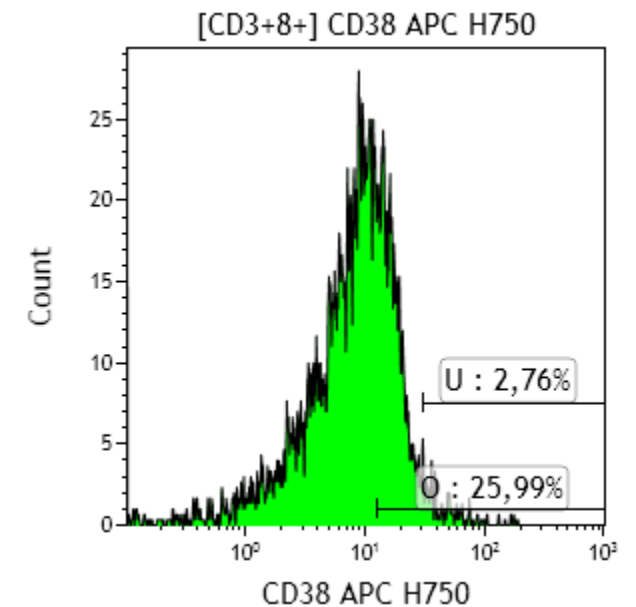
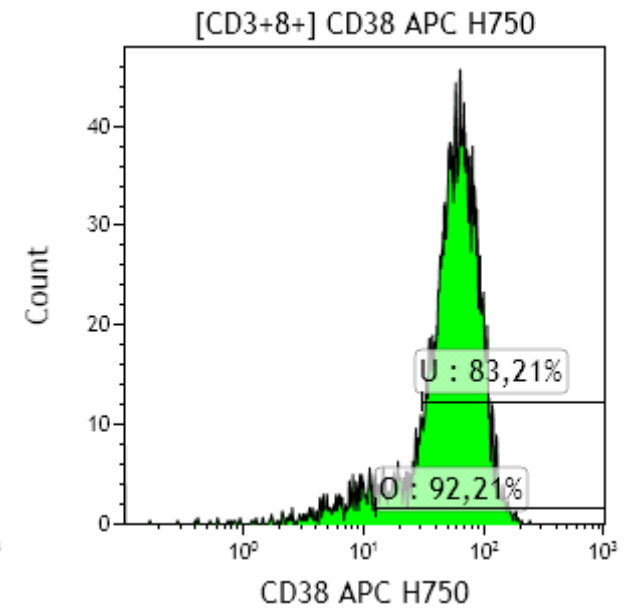
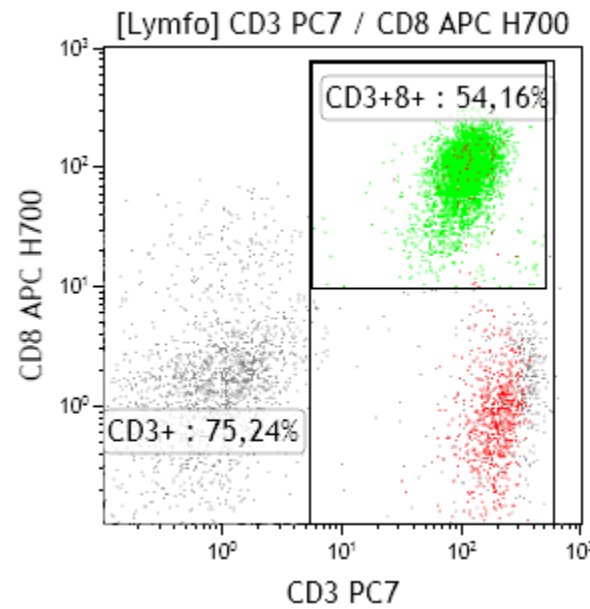
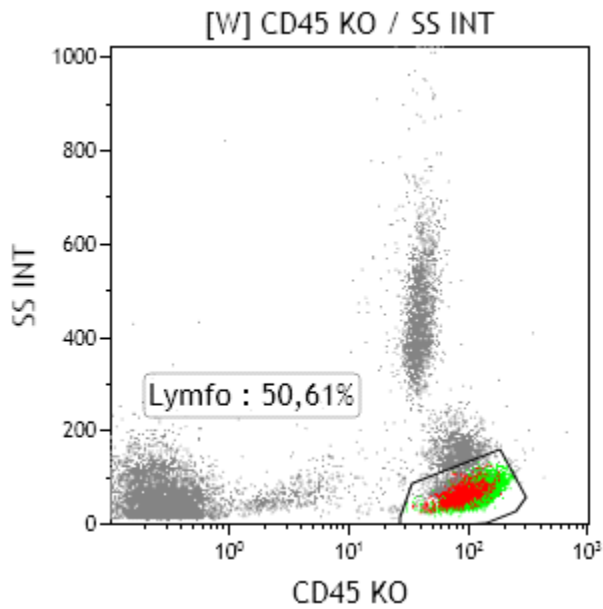
CD38 APC H750 – aktivačný znak T-lymfocytov

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

Výsledok: vysoký počet CD8+CD38+ T-lymfocytov = možná napr. EBV infekcia; odporúčanie na mikrobiologické vyšetrenie

Fyziologický obraz
Nastavenie polohy gatov je fixné-
nastavené podľa zdravých kontrol





CD8+CD38+ 83,2%

CD8++CD38++ 92,2%

EBV infekcia – nutno dovyšetriť v
mikrobiologické laboratoři

SCID - Severe Combined Immunodeficiency

Ťažké kombinované imunodeficiencie



- Primární imunodeficiencie (vrozená), postižena je buněčná složka imunity
- Jedná o nejzávažnější vrozenou imunodeficienci (záhy po narození těžké infekce)
- Bez léčby (transplantace kostní dřeně) úmrtí v prvním roce života (vyvíjí se také genová terapie)
- Klinické projevy:
 - Infekce způsobené atypickými patogeny (pneumocysty, kandidózy, atypické mykobakteriízy, cytomegalová pneumotitida)
 - Chronické průjmy (bez průkazu etiologického agens), neprospívání, kožní infekce, komplikace po vakcinaci BCG
- Molekulární podstata je heterogenní, rozlišuje se několik skupin SCID:
 1. **Porucha ADA (adenosindeaminázy):** Dysfunkce nebo absence tohoto enzymu způsobuje akumulaci produktů metabolismu purinů, které jsou pro časně thymocyty toxické → rozvíjí se těžká T lymfopenie
 2. **SCID T-B-:** Absence T i B lymfocytů, NK buňky zachovány. Molekulární podstata heterogenní (některé případy deficit rekombinázy RAG-2, porucha exprese receptoru pro IL-7)
 3. **SCID T-B+:** Chybí T lymfocyty a NK buňky, B lymfocyty zachovány. **Nejčastější forma SCID** (60% všech případů). 70% případů vázáno na chromosom X – mutace genu pro gama řetězec receptoru pro IL-2. Tento gama řetězec je ale společný i receptorům pro IL-4, IL-7, IL-9 a IL-15 → funkční porucha mnoha cytokinů.
 4. **Retikulární dysgeneze:** Postižení kmenové buňky, blokován vývoj myeloidní i lymfoidní linie.

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

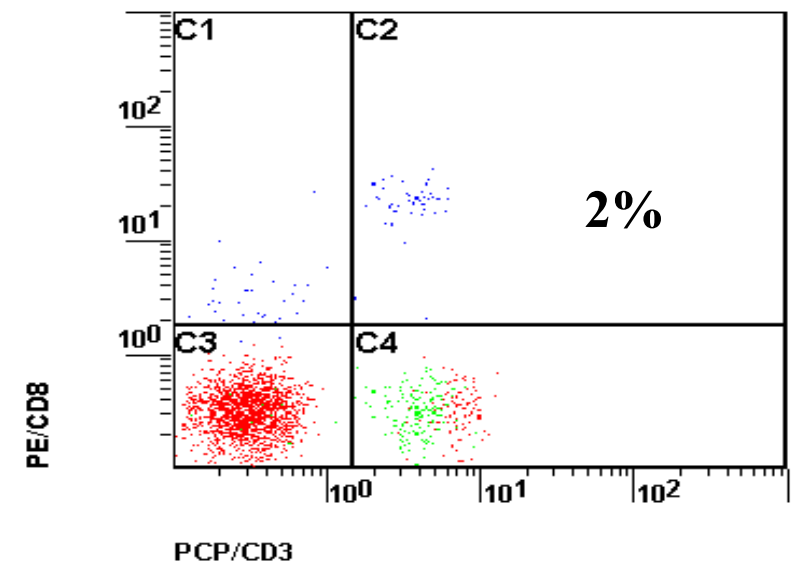
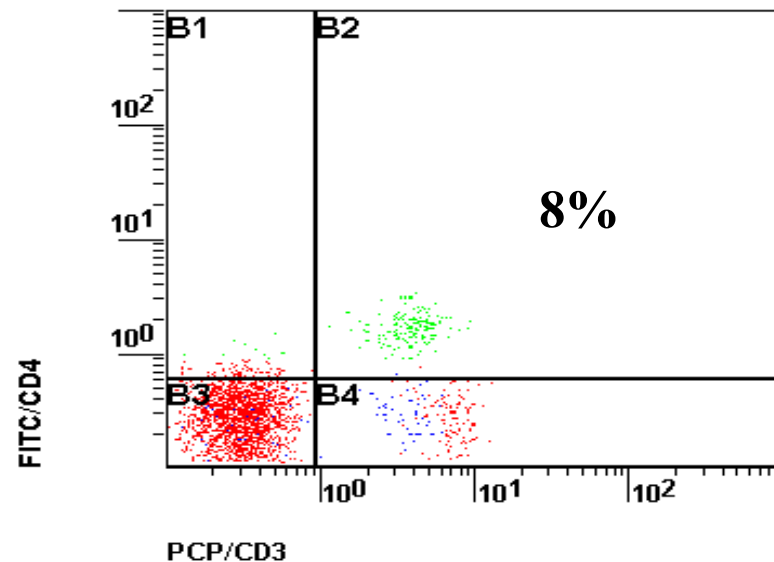
Leukocyty: $5,0 \times 10^9/l$
Lymfocyty: $4,0 \times 10^9/l$

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

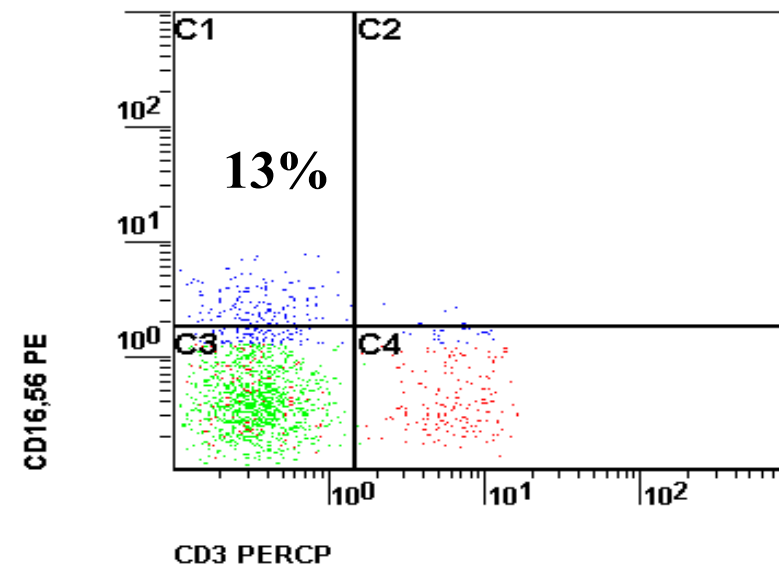
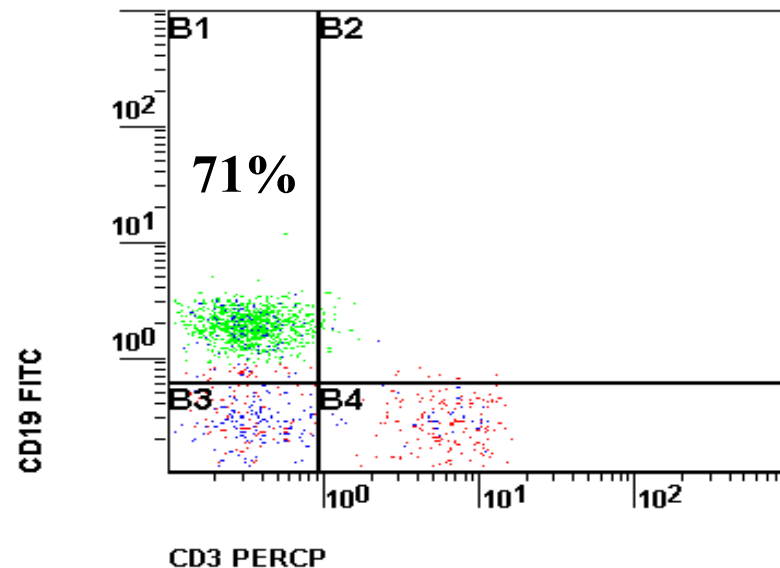
Severe Combined Immunodeficiency – Ťažké kombinované imunodeficiencie

B LYMFOCYTY

- CD19+ : 71 (7-23) %

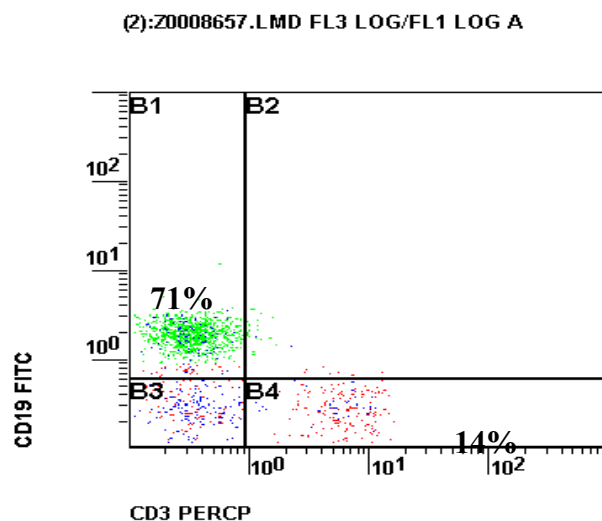
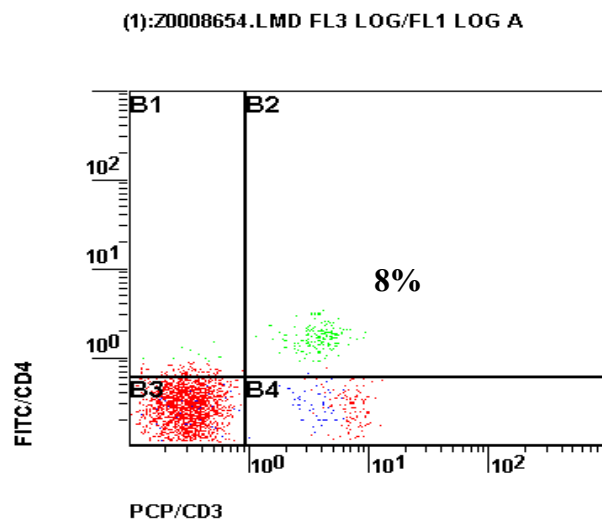
NK LYMFOCYTY

- 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)%

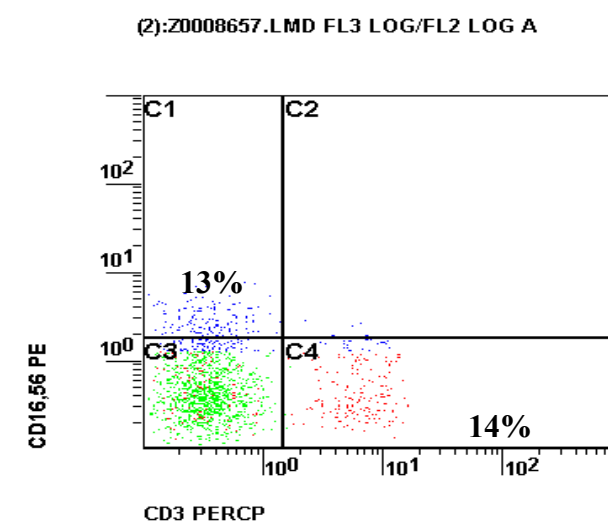
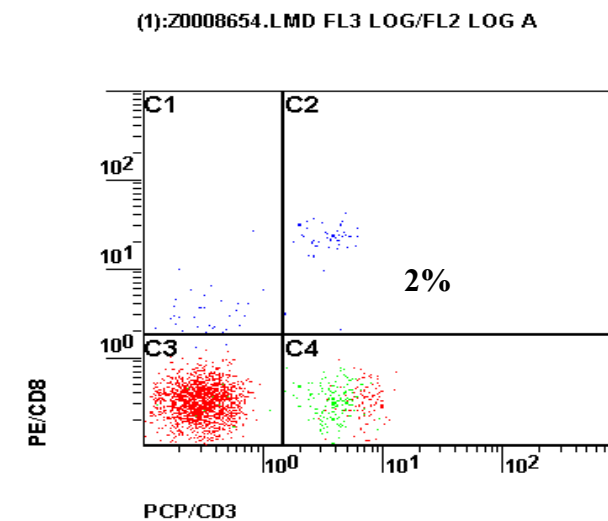
• CD3+ 8+: 2 (15-35)%

B LYMFOCYTY

• CD19+ : 71 (7-23) %

NK LYMFOCYTY

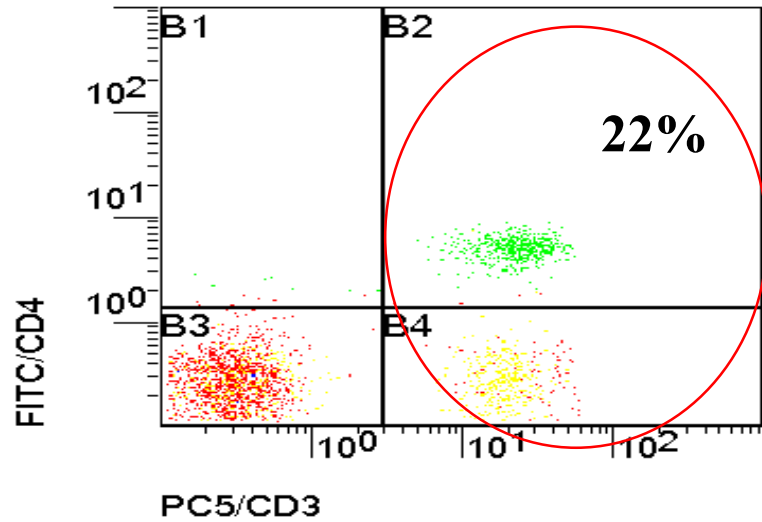
• CD16,56+: 13 (6-20)%



Výsledok: T-B+NK+ SCID

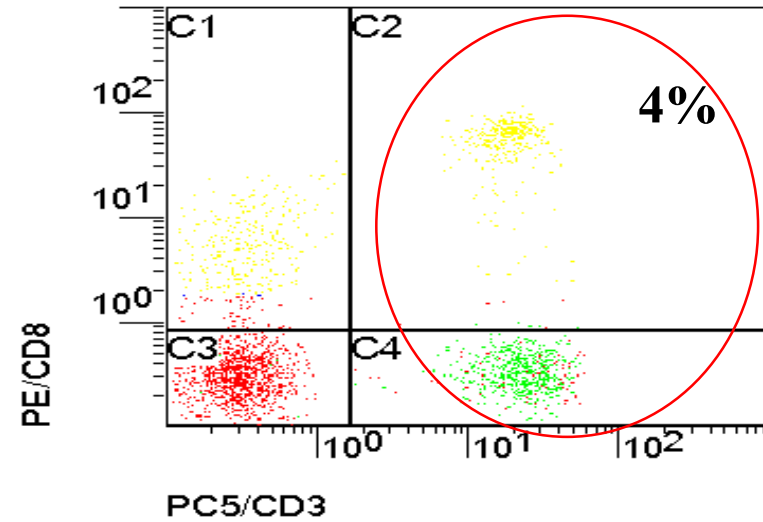
Poznámka: všetky jaderné T-lymfocyty boli materské, aktivované, vyvolávajúce reakciu štěpu proti hostiteľovi.

Krvný diferenciál: DiGeorgův syndrom



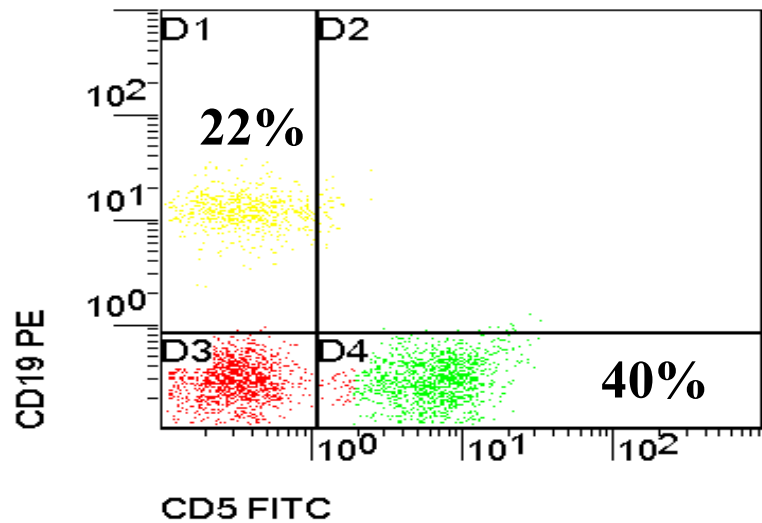
T LYMFOCYTY

- CD3+ : 40 (58-85)%
- CD3+ 4+ : 22 (30-60)%
- CD3+ 8+ : 4 (15-35)%



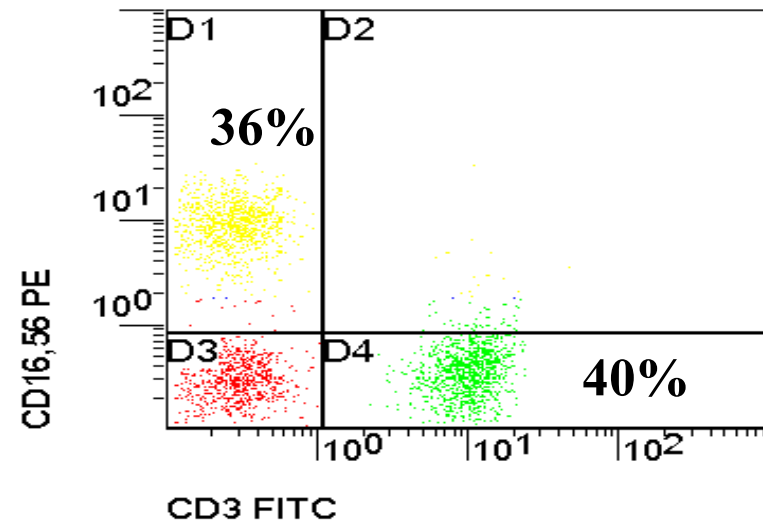
B LYMFOCYTY

- CD19+ : 22 (7-23) %



NK LYMFOCYTY

- CD16,56+ : 36 (6-20)%

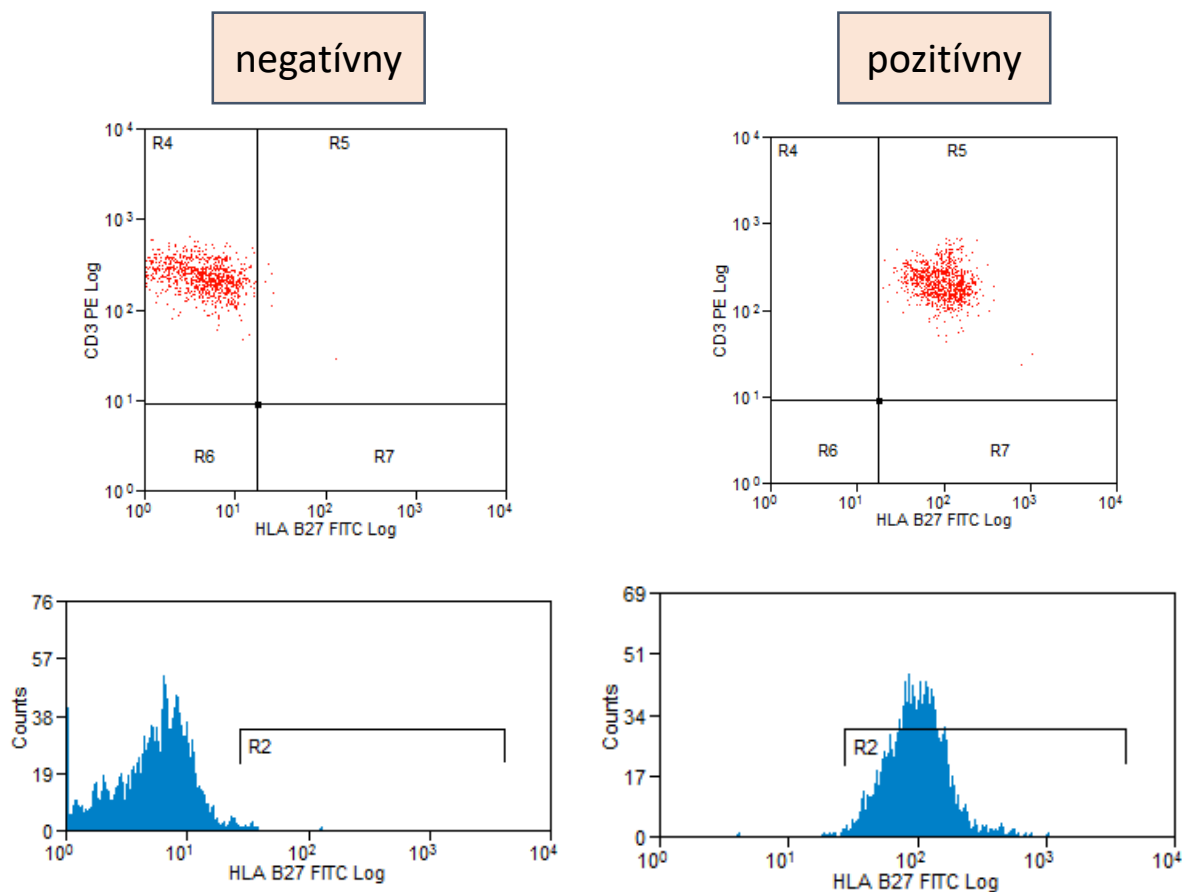


DiGeorgův syndrom

- Embryonálna porucha – narušenie vývoja v oblasti 3. a 4. embryonálneho oblúka
 - Abnormality v arteriálnom obehu, srdci, jícne a čeľustiach
 - Porucha vo vývoji thymu – znížené zastúpenie T lymfocytov
-
- v krvnom diferenciáli výrazne znížené T-lymfocyty (pomocné CD4+ aj cytotoxické CD8+)
 - zastúpenie ostatných lymfocytárnych subpopulácií v norme
 - výsledok:

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

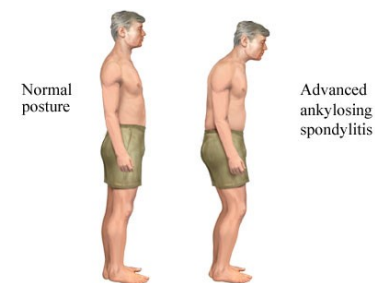
Vzorka: periférna krv odobraná do EDTA

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

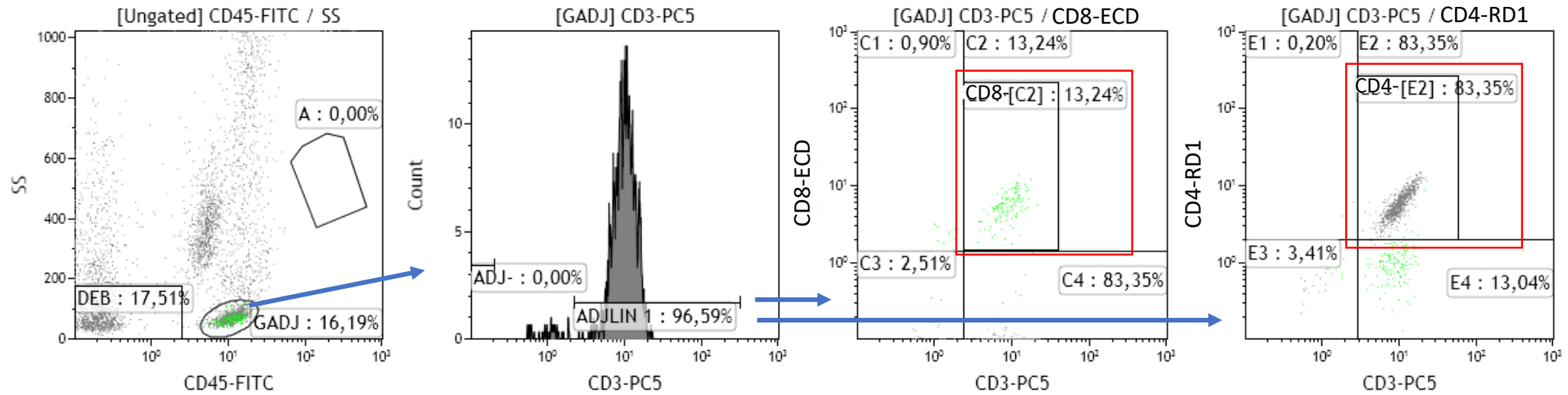
Vyšetrenie HLA-B27 nie je doplňujúcim meraním ku krvnému diferenciólu, je to samostatné meranie

- 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.

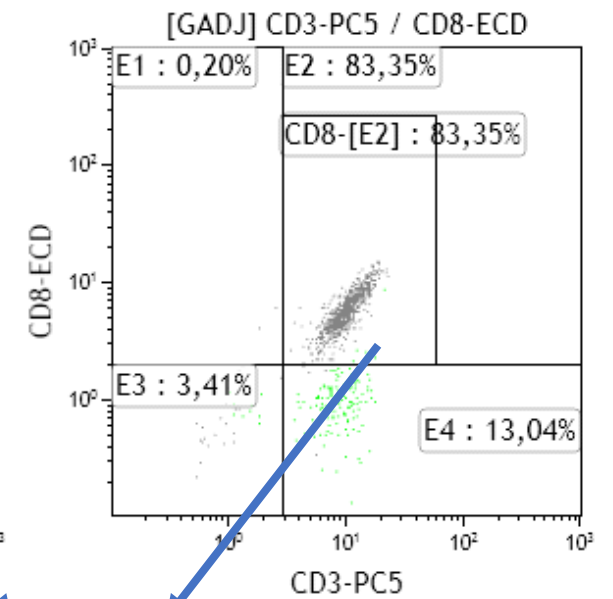
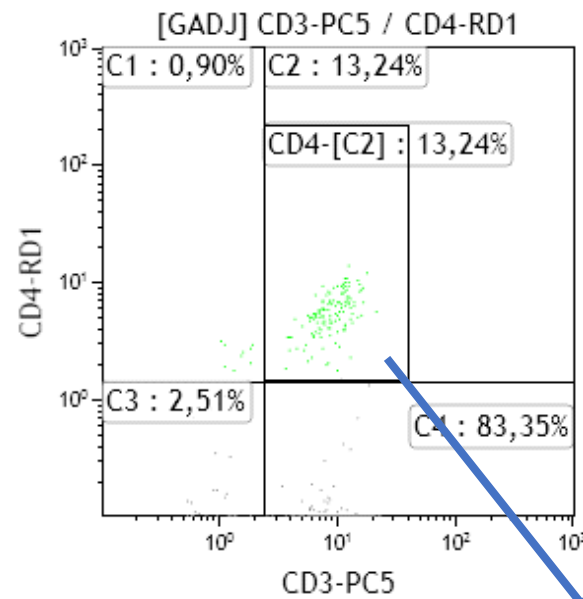
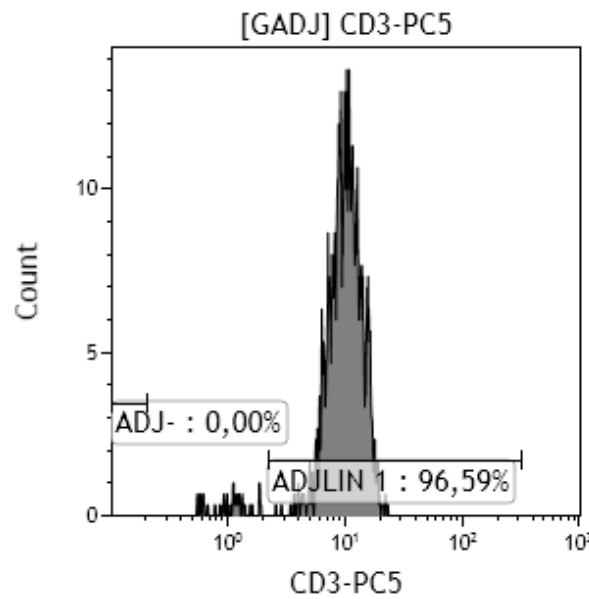
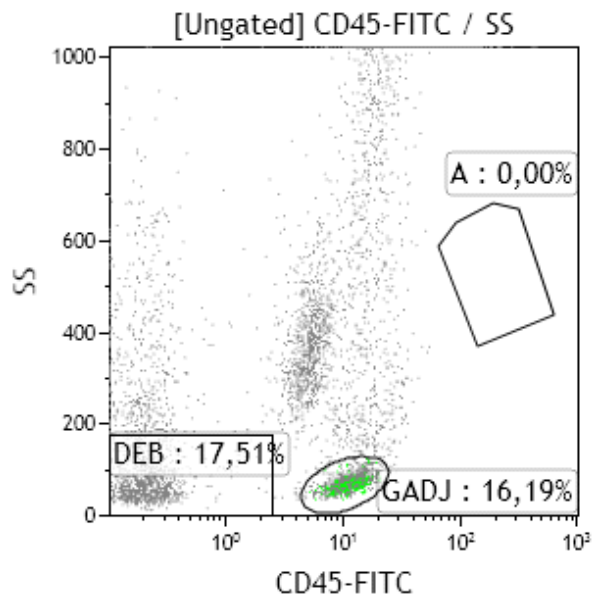
Bronchoalveolárna laváž - BAL



- 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?

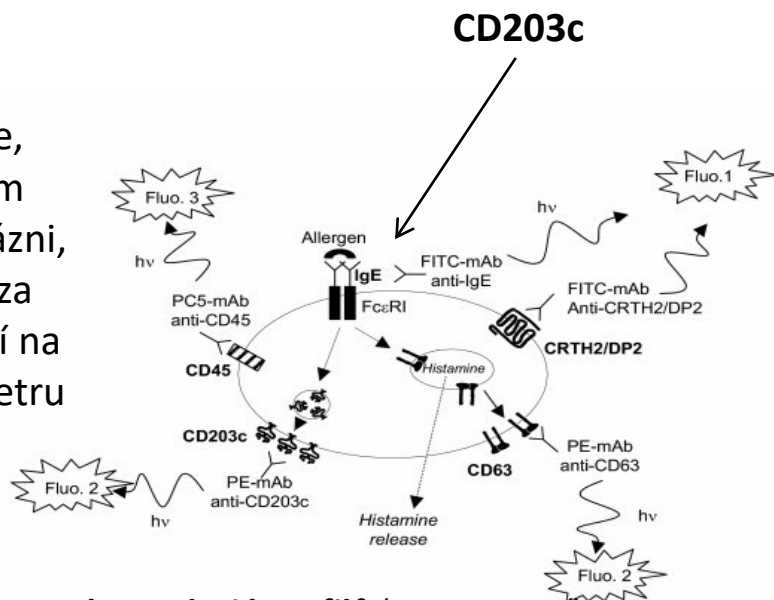
Využití průtokové cytometrie v alergologii

Test aktivace bazofilů (bazotest - BAT)

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

Na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)

Vyšetření periferní heparinizované krve, stimulace alergenem při 37 °C ve vodní lázni, zastavení reakce, lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

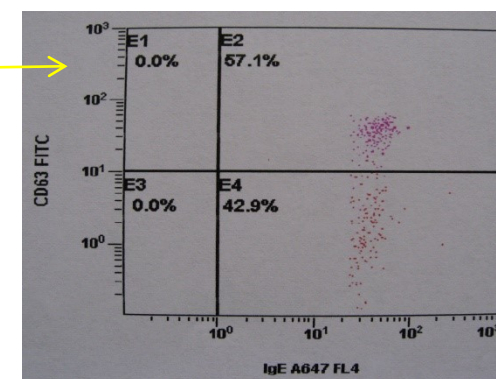
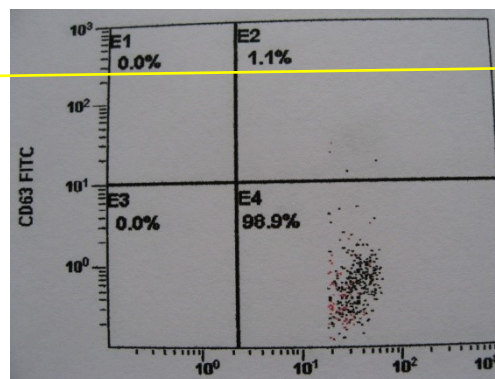
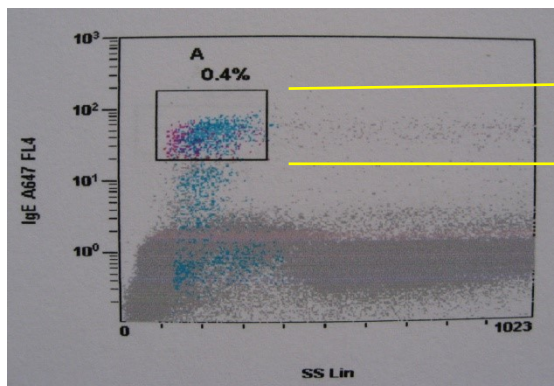


Založen na expresi aktivačního znaku (**CD63**) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem *in vitro*

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.

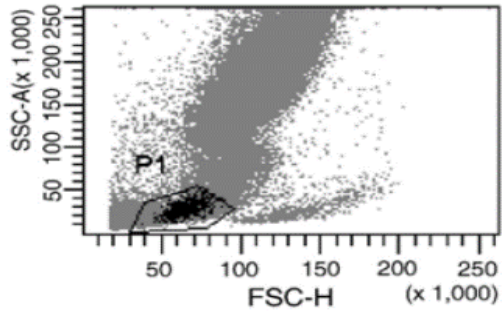
ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)

Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů

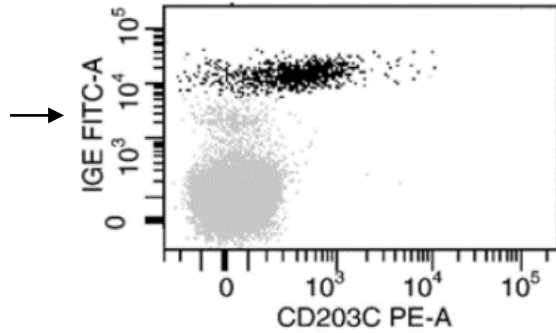


Test aktivace bazofilů – gatovací strategie

(Pacient alergický na kočku – alergen *Fel*)



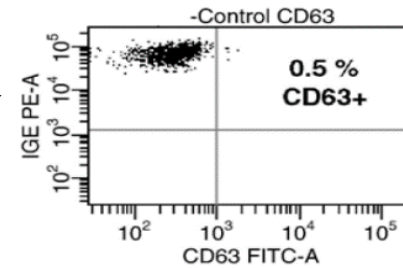
1. Na Forward scatteru a Side scatteru gatovány lymfocyty



2. Z lymfocytů gatovány pouze IgE pozitivní buňky - bazofily

3. Bazofily – sledujeme CD63 a CD203c

Negativní kontrola
Bazofily jsou CD63 neg.



Pozitivní pacient – vidíme populaci CD63 pozitivních bazofilů

