



# Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulcí

Jana Nechvátalová

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil

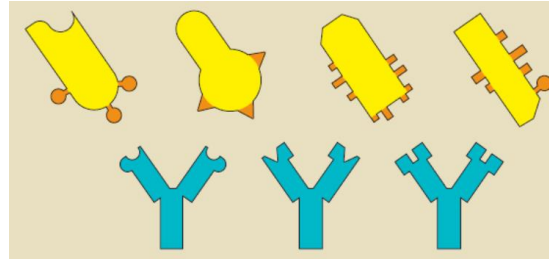


Eosinophil



Basophil

# Rozdělení imunologických laboratorních metod



serologické (humorální)- detekce antigenů a protilátek,  
průkaz tvorby protilátek proti infekčním agens

buněčné- stanovení počtu (relativního, absolutního) a funkčnosti  
jednotlivých typů leukocytů

- odběr nesrážlivé krve do EDTA, heparinu, citrátu sodného



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



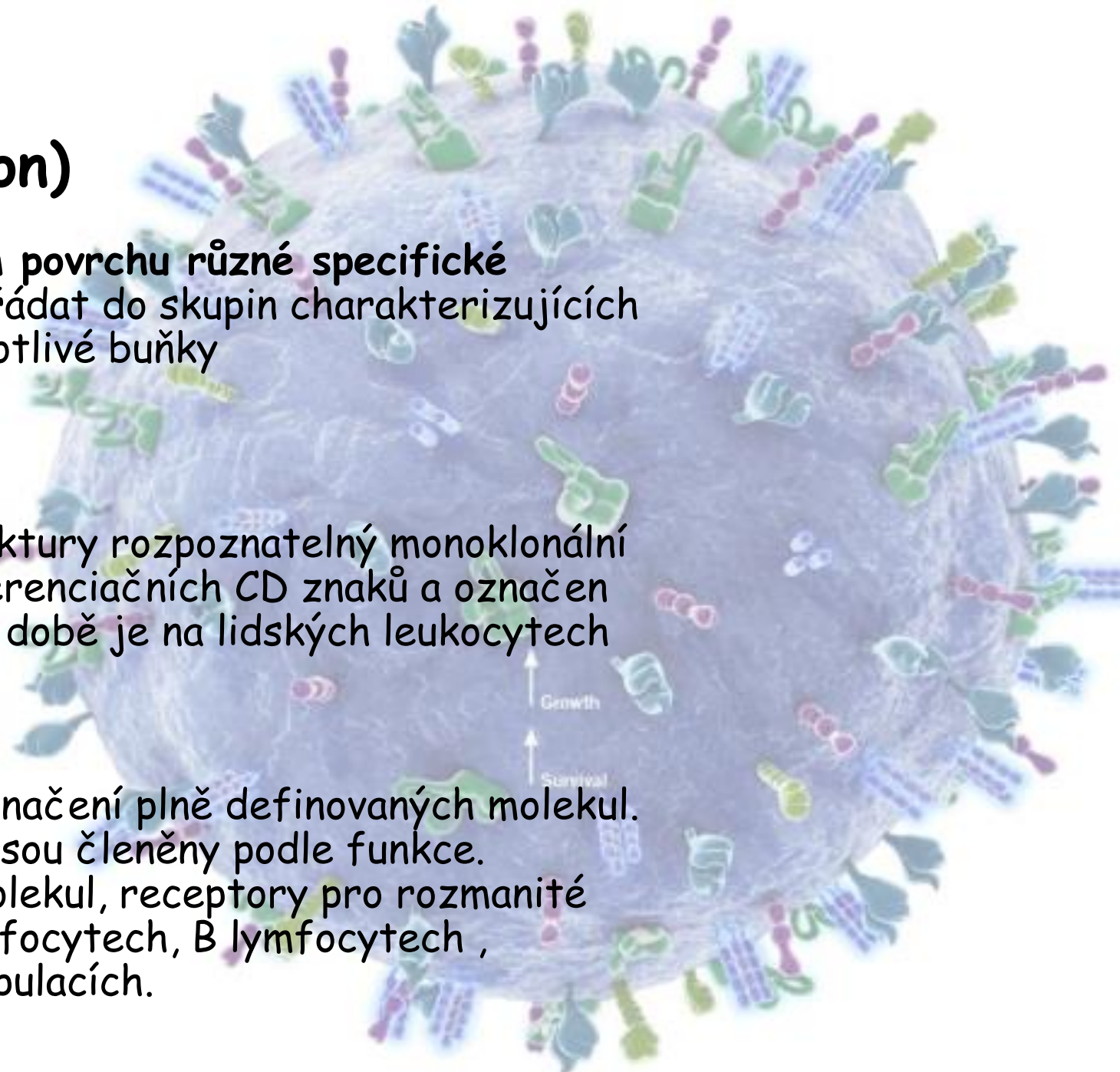
Eosinophil

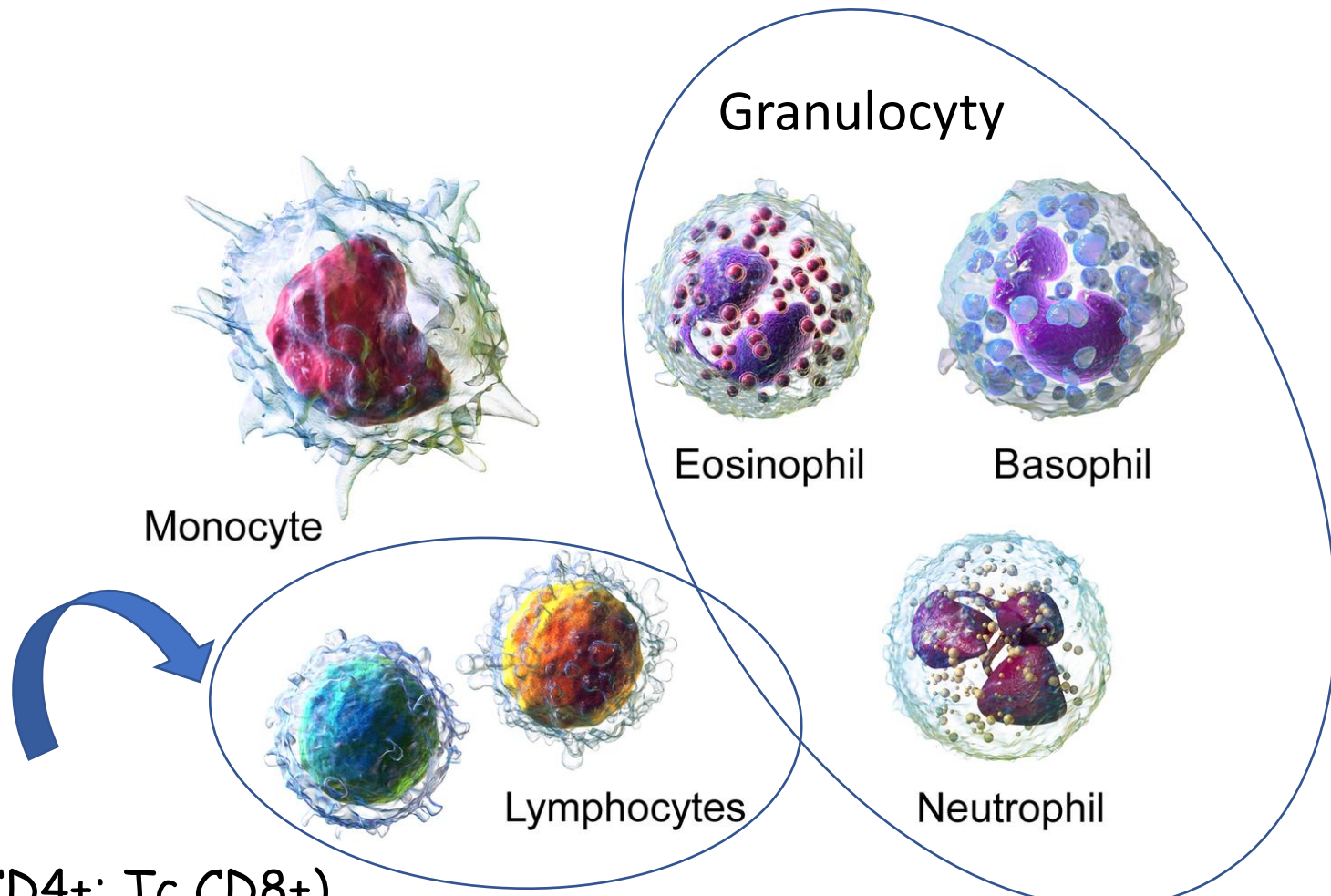


Basophil

# Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

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





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

## White Blood Cells

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

# Imunofenotypizace buněk

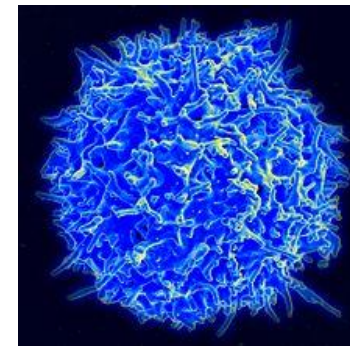
- stanovení leukocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie (FACS- fluorescent-activated cell sorting)
- odběr krve do zkumavky s EDTA



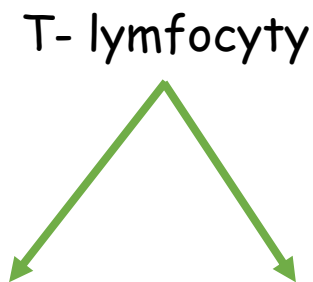
# T lymfocyty

CD3 - povrchová molekula přítomná na všech T-lymfocytech

Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **58-85 % z lymfocytů**



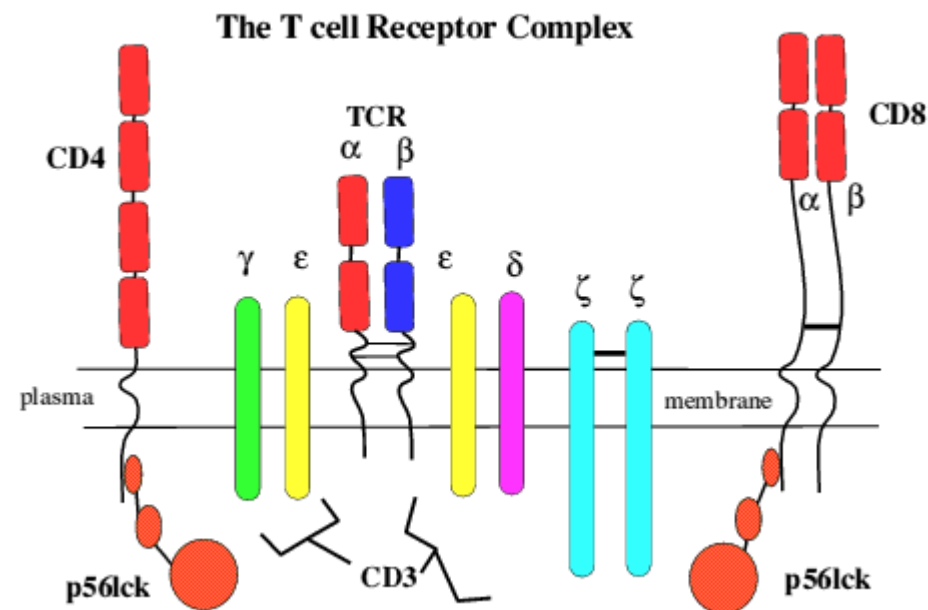
Stavba T- bunečného receptoru TCR a umístění koreceptorových molekul CD3, CD4, CD8 zapojených do signalizace přes T-bunečný receptor TCR.



CD4+  
T<sub>H</sub> (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2)  
pomocné  
T-lymfocyty  
(T helper cells)

CD8+  
T<sub>C</sub>  
cytotoxické  
T-lymfocyty  
(cytotoxic T-cells)

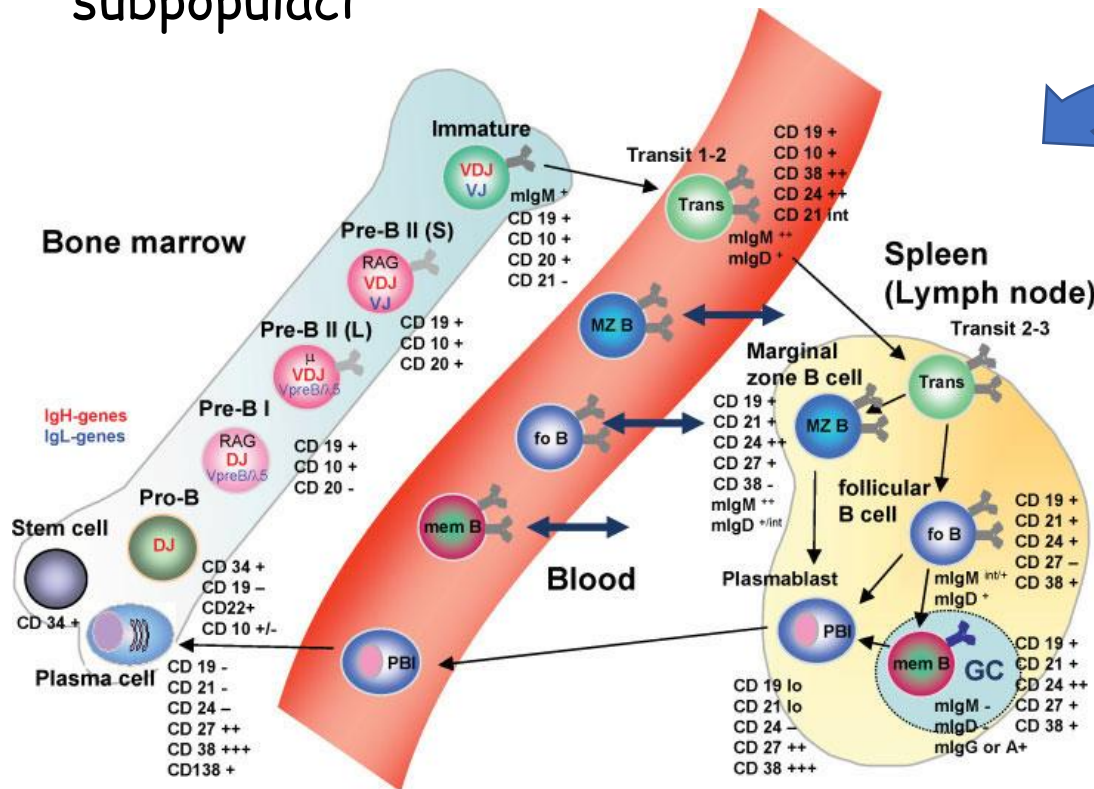
fyziologické zastoupení z celkových lymfocytů  
**30-60 %**                      **15-35 %**



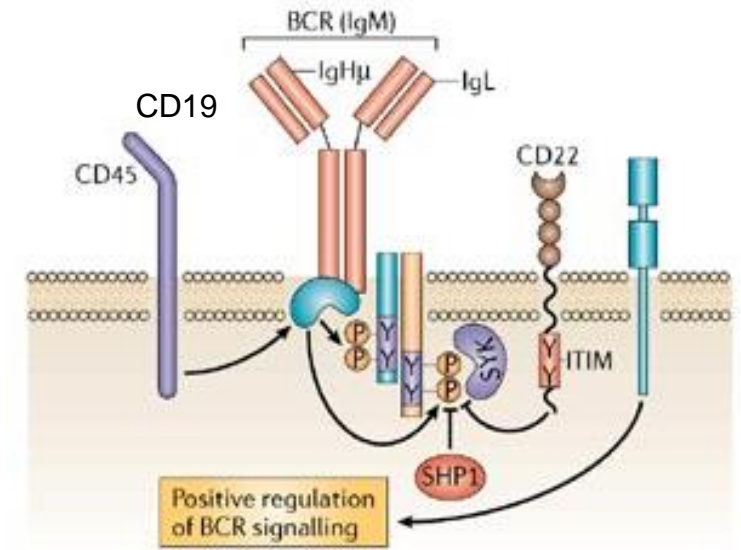
# B lymfocyty

CD19, CD20 - povrchové molekuly využívané k detekci B lymfocytů v průtokové cytometrii

Vhodně zvolená kombinace dalších CD znaků slouží k charakterizaci jednotlivých vývojových stadií a funkčních subpopulací



CD19 součástí B-bunečného receptoru BCR



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

Expresse CD znaků na povrchu B lymfocytů během jejich vývoje v kostní dřeni, sekundárních lymfatických orgánech a periferní krvi

(Warnatz K, Schlesier M 2008)

Fyziologické zastoupení v periferní krvi: 7-23 % z lymfocytov

# NK (Natural Killer) bunky

$CD16^+CD56^+CD3^-$  - charakteristické povrchové markery

Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **6-20 % z lymfocytů**

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

Pozor!!!

NK**T** bunky:  $CD16^+CD56^+ CD3^+$





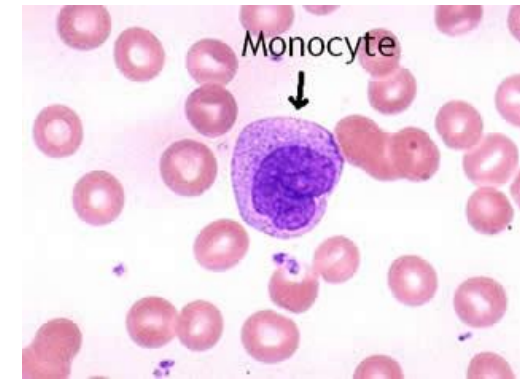
# Monocyty

**CD14** - povrchová molekula charakteristická pro monocyty  
Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **0-10 % z leukocytů**

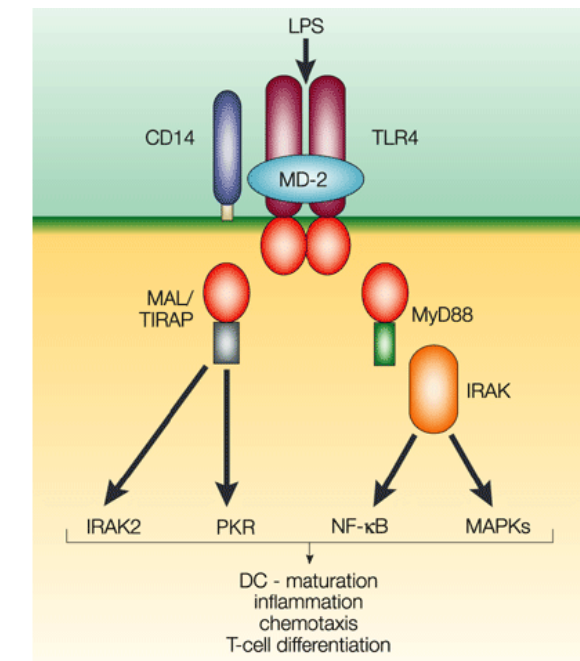
- součást nespecifické imunity
- schopnost fagocytózy
- tkaňová forma = makrofág

**Na svém povrchu exprimují HLA DR**  
(Human Leukocyte Antigen DR isotype)

- navázání peptidů z pohlcených patogenů →  
→ rozpoznání pomocnými T-lymfocyty
- APC = antigen prezentující buňka

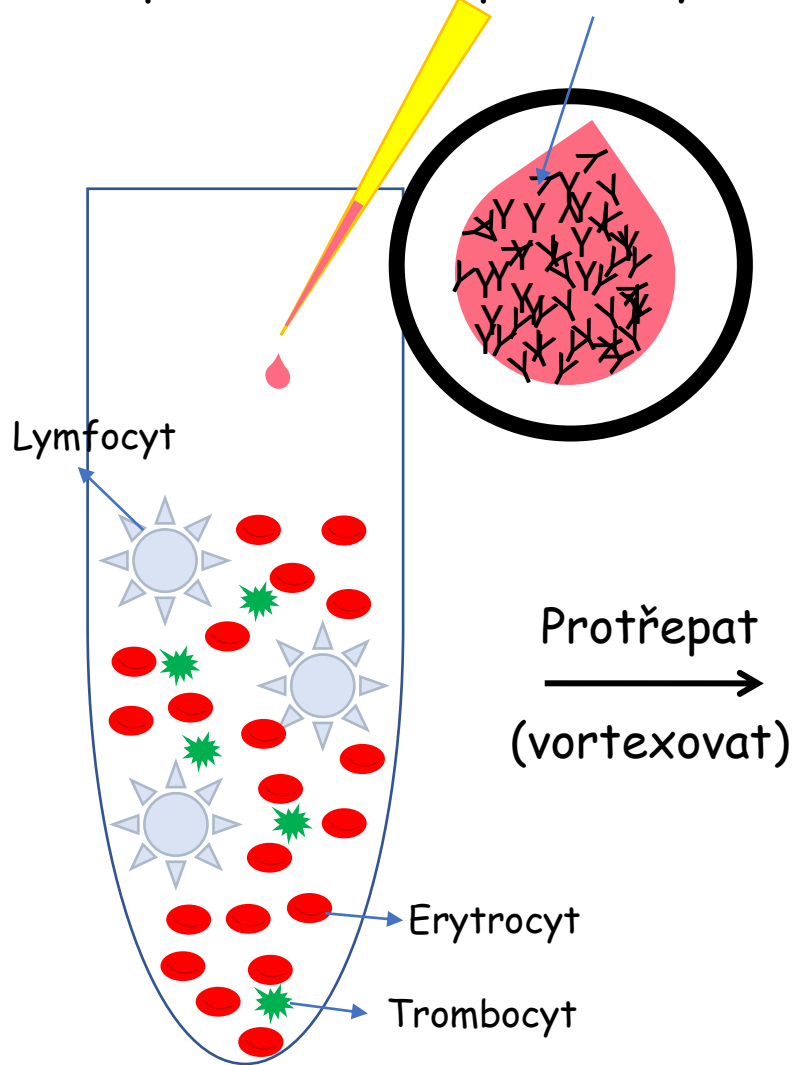


**CD14 jako koreceptor TLR4**  
- rozpoznání bakteriálních lipopolysacharidů (LPS)



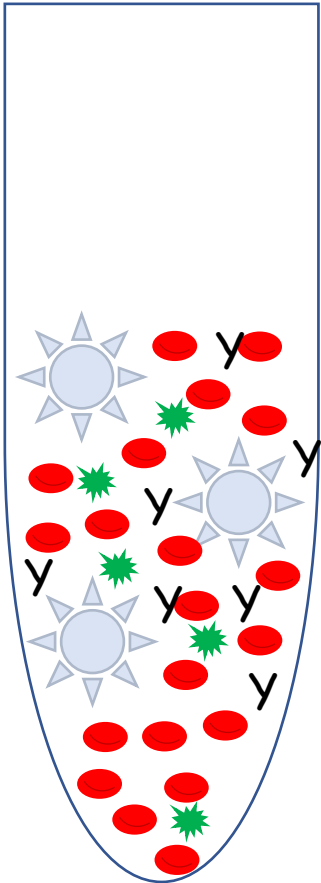
# Příprava vzorku na FACS

Pipetovat MIX potřebných MPL



Vzorek krve 45 $\mu$ l

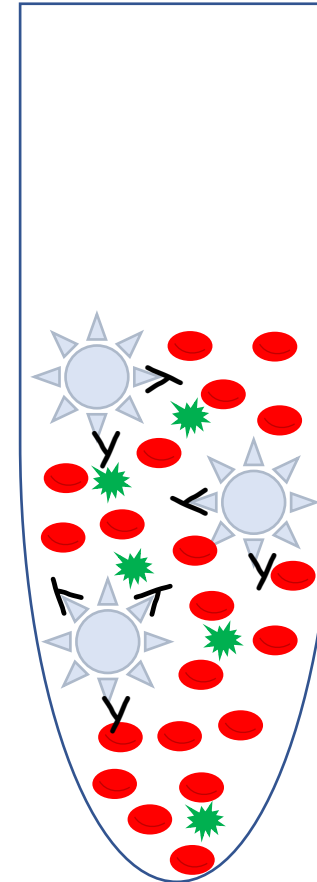
Volné MPL - vazba na receptory



Vzorek krve 45 $\mu$ l + MPL

30min.  
inkubace  
→  
tma  
lab. teplota

Plná krev značená MPL



# Lýza erytrocytů

- Erytrocyty přítomné ve vzorku zahlcují cytometr proto po značení plné krve MPL je nutné erytrocyty lyzovat
- Ke vzorku se postupně přidává:
  - **Roztok A: 600ul**
    - Příprava roztoku A: 1,5 l destilované vody + 1,8 ml 99% kyselina mravenčí - způsobuje lýzu erytrocytů v kyselém prostředí
  - **Roztok B: 300ul**
    - Příprava roztoku B: 1,5 l destilované vody + 9,0 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 21,75 g  $\text{NaCl}$ , 46,95 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  - alkalický roztok = zastavení lýzy a úprava pH
  - **Roztok C: 100ul**
    - Příprava roztoku C.: 1,5 l PBS (pH 7-7,4) + 15 g paraformaldehydu - fixace buněk

Vzorky se do začátku měřání uchovávají ve tmě při 4°C

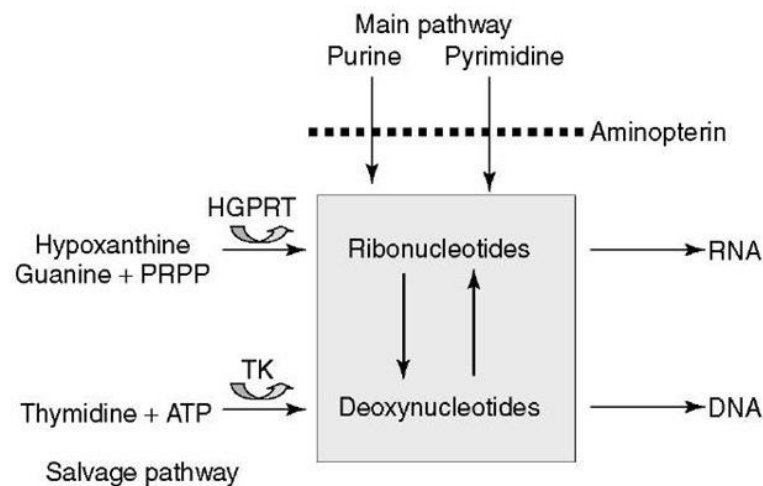
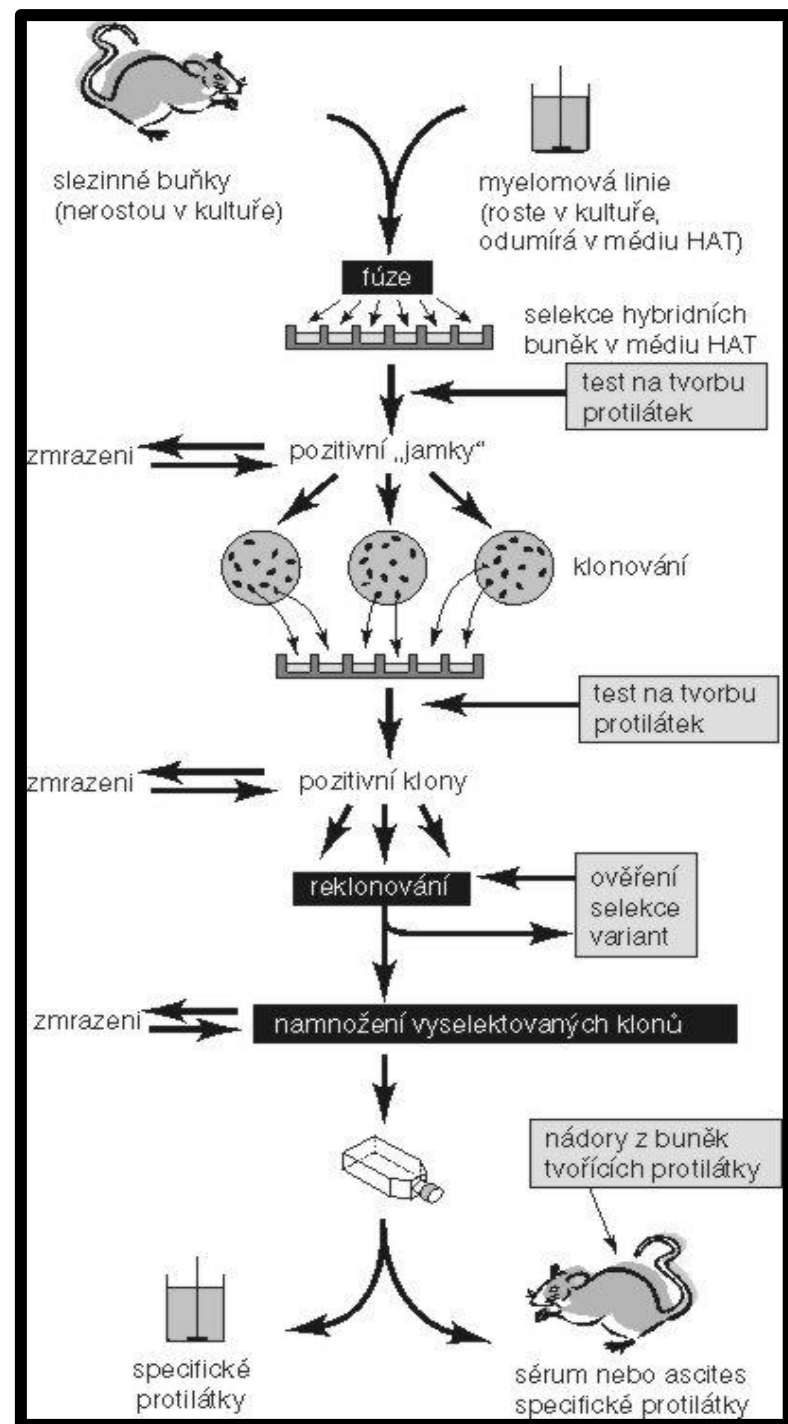
Automatický lyzátor TQ-prep od firmy Beckman Coulter používaný na lýzu erytrocytů



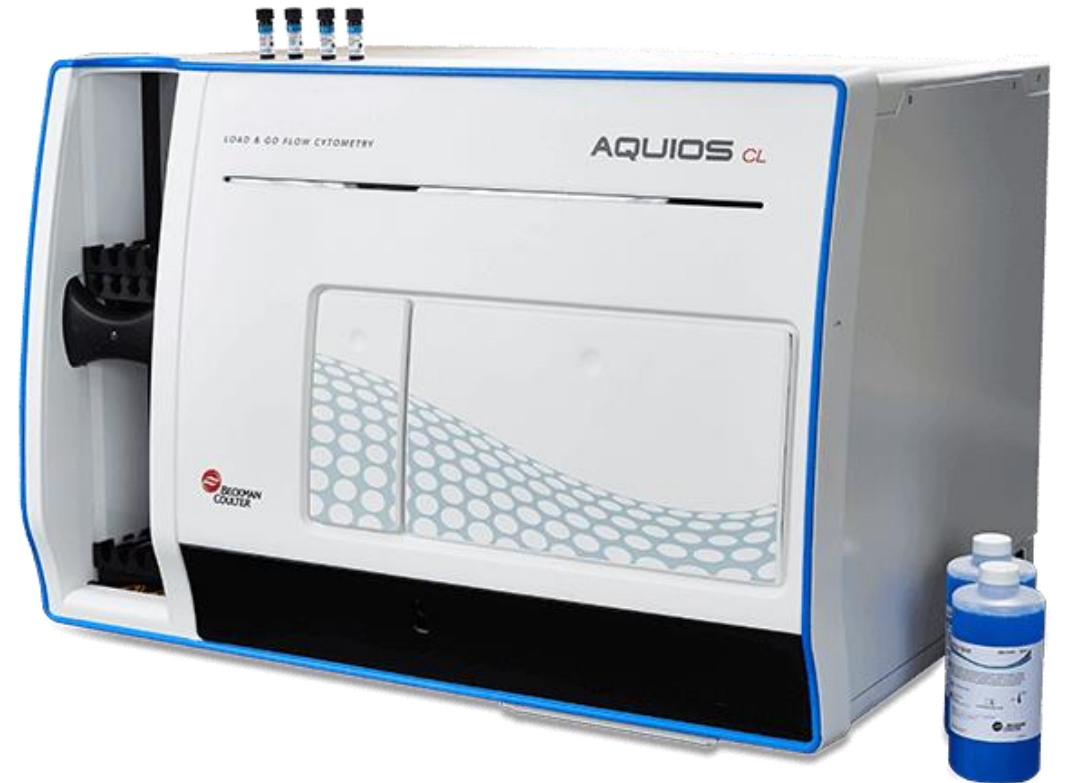
## Proces výroby MPL

# Monoklonální protilátky (MPL)

- produkt jediného klonu B lymfocytů (klonů vzniklých fúzí buněk produkujících Ab a myelomových buněk, které schopnost produkce vlastních Ig ztratili) nastimulovaných příslušným antigenem
- totožné a specifické proti jednomu epitopu na povrchu použitého antigenu



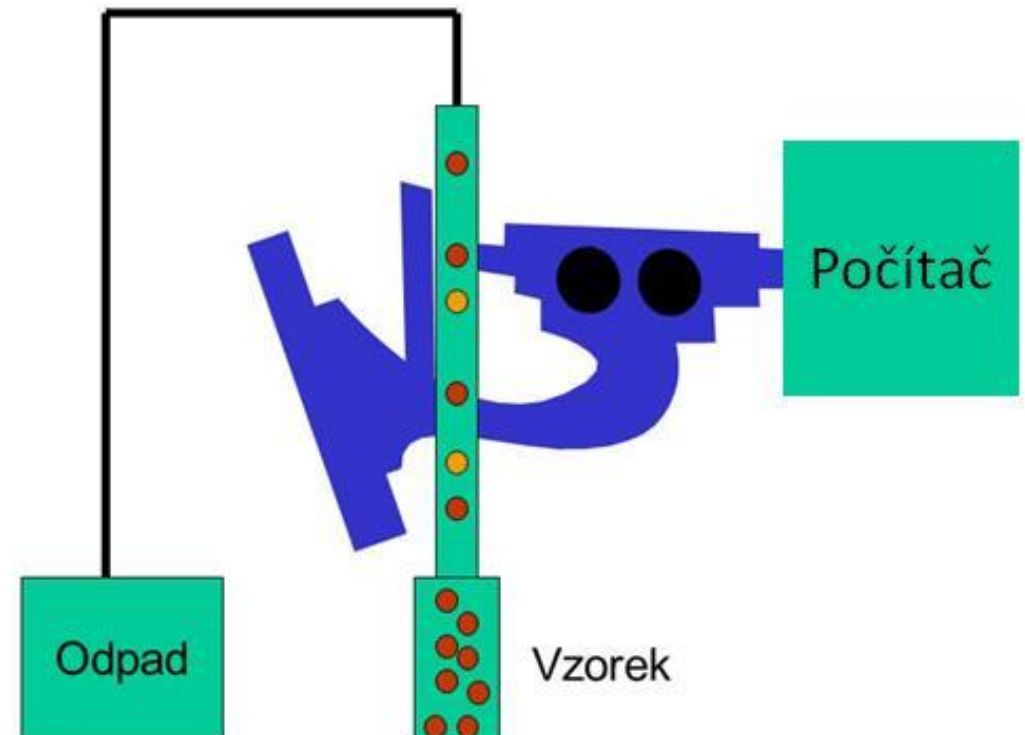
# Průtoková cytometrie (Flow Cytometry, FACS)



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

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

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



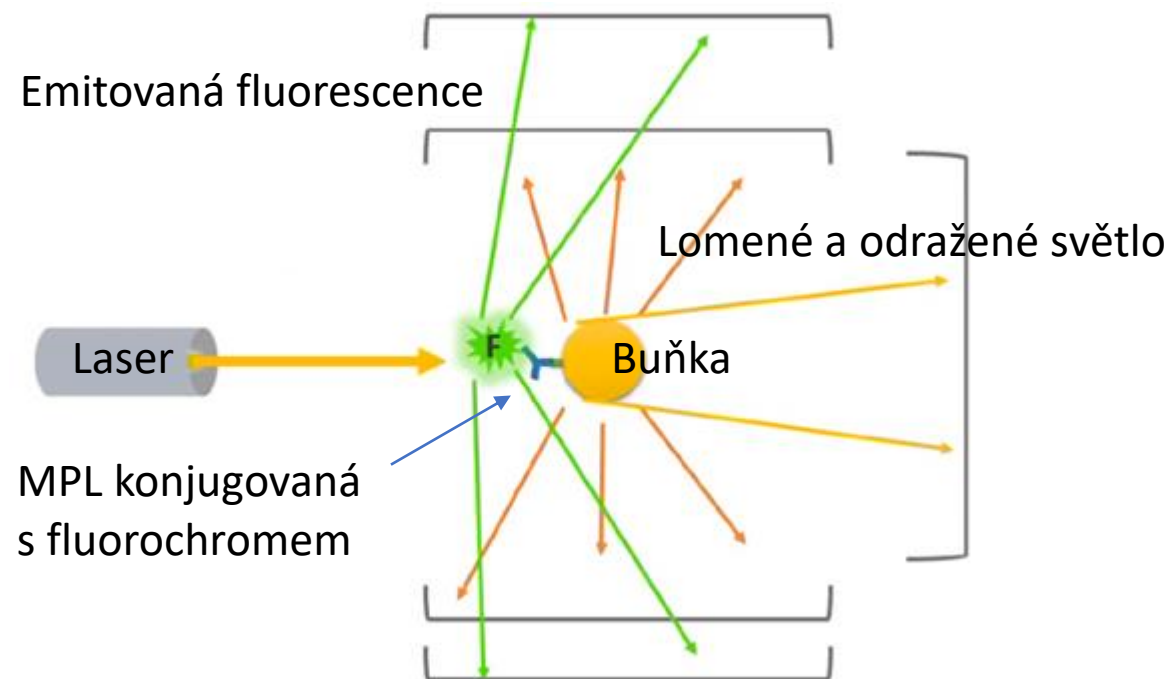
# Využití

- Klinické využití (imunofenotypizace a měření funkčních vlastností buněk)
- Buněčná biologie (DNA, RNA analýza)
- Mikrobiologie (rezistence na antibiotika, kintetika)



# Co měříme:

- **Lomené a odražené světlo** - při průchodu buněk laserovým paprskem dochází k jeho lomu a odrazu na buněčném povrchu a buněčných organelách
- **Emitovanú fluorescenci** - pokud použijeme MPL konjugované s fluorochromem
- částice velikosti 0,2-150  $\mu\text{m}$
- prokaryotické a eukaryotické buňky
- virové částice, bakterie, houby
- komplexy Ag-Ab



# Princip průtokové cytometrie

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

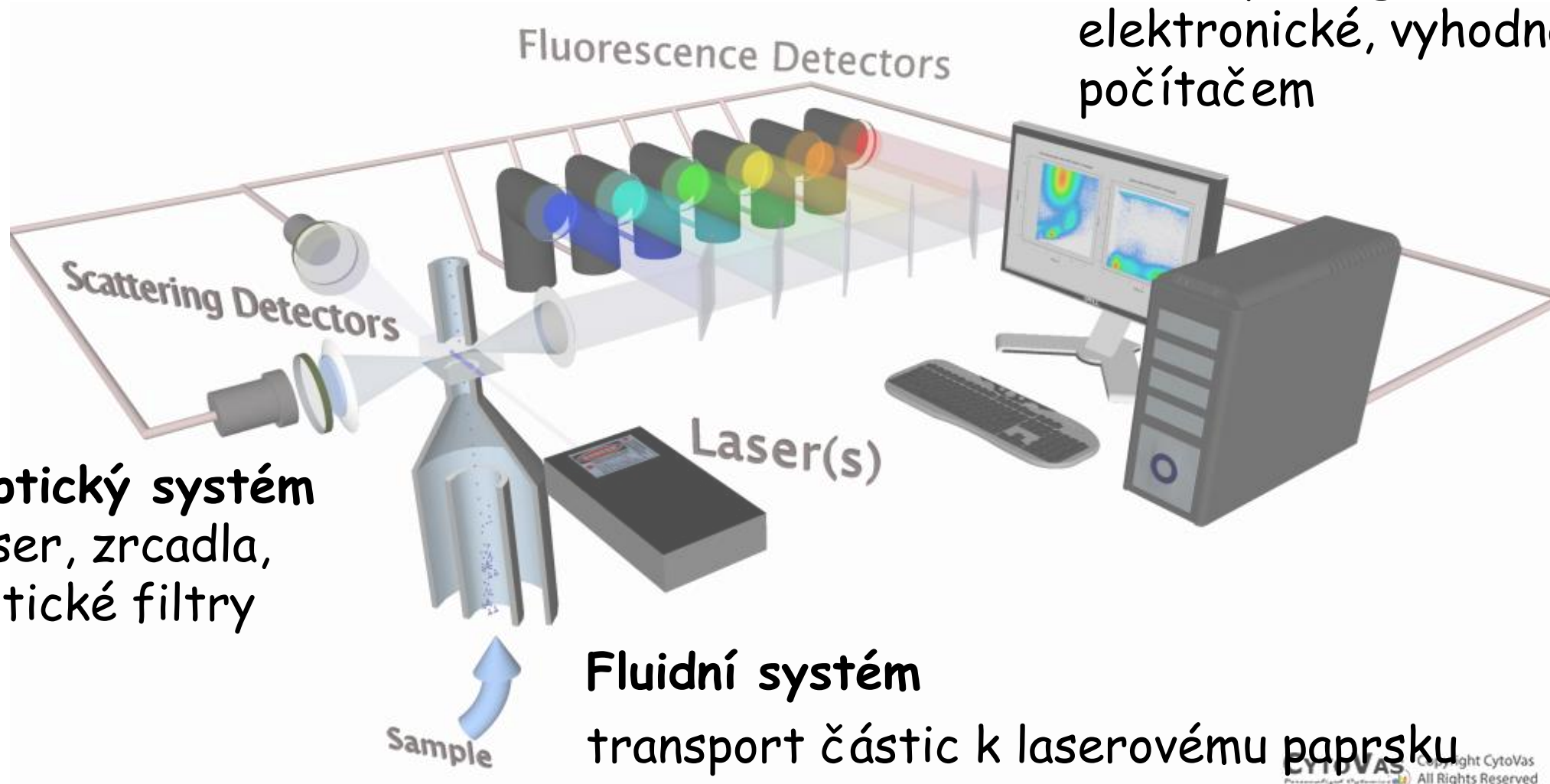
Světelné signály jsou převedeny na elektrické pomocí detektorů (fotonásobiče)

Na každé buňce je možné změřit několik parametrů zároveň

Naměřená data se ukládají a dále analyzují

# Cytometr je tvořen třemi hlavními systémy

Elektronický systém převod detekovaných světelných signálů na signály elektronické, vyhodnocované počítačem

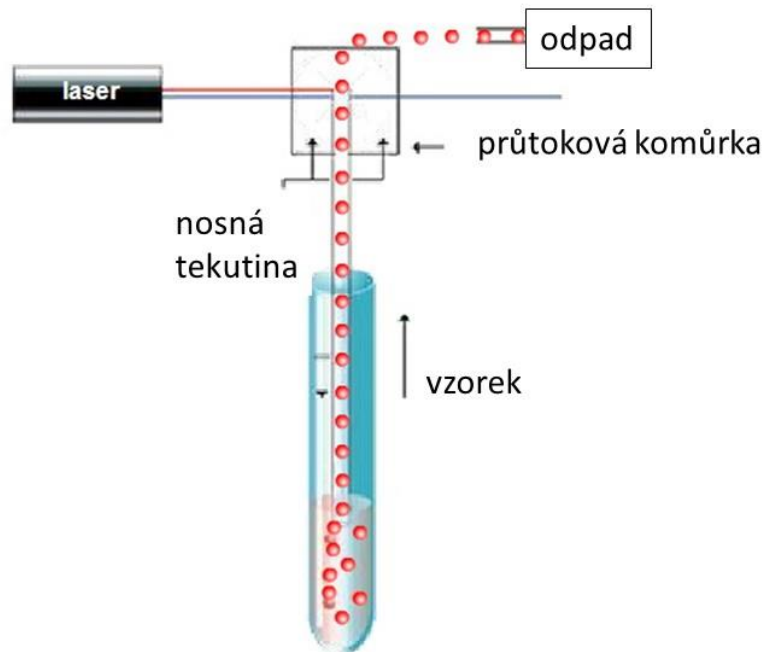


Optický systém  
laser, zrcadla,  
optické filtry

Fluidní systém  
transport částic k laserovému paprsku

# Fluidika

- zajišťuje transport bb. v nosné tekutině (pod tlakem) do průtokové komory
- buňky se pohybují jedna za druhou



Řez průtokovou komorou:  
uprostřed vzorek (bunečná suspenze)  
unášaná nosnou kvapalinou (sheath fluid)

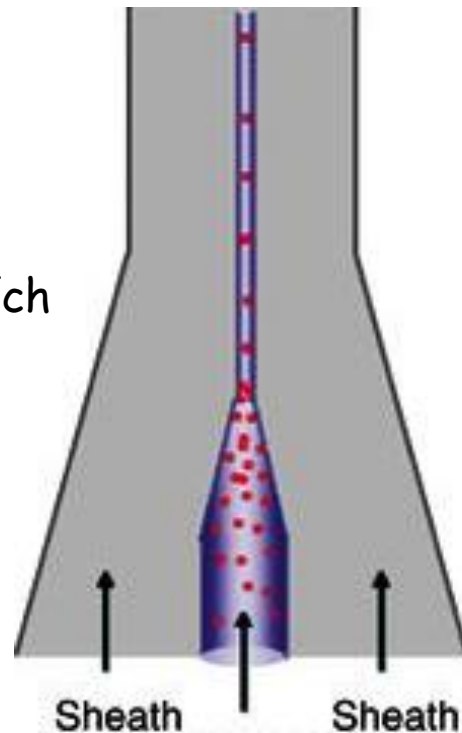
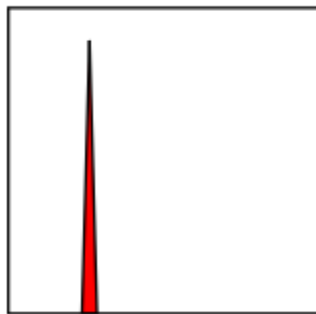


# Hydrodynamická fokusace

- jev, který zabezpečuje uspořádání buněk jednotlivě za sebou
- rozdíl v tlaku a rychlosti nosné tekutiny a suspenze částic
- vzorek, např. buněčná suspenze je vstříknut doprostřed tzv. sheath fluid (nosná kapalina)
- nosná kapalina postupně strhává jednotlivé buňky a uspořádává je do řady za sebou
- tlak nosnej kapaliny je nastavený výrobcem, měnit můžeme tlak vzorku (nastavení rychlosti průtoku buněk)

## Nízky tlak vzorku

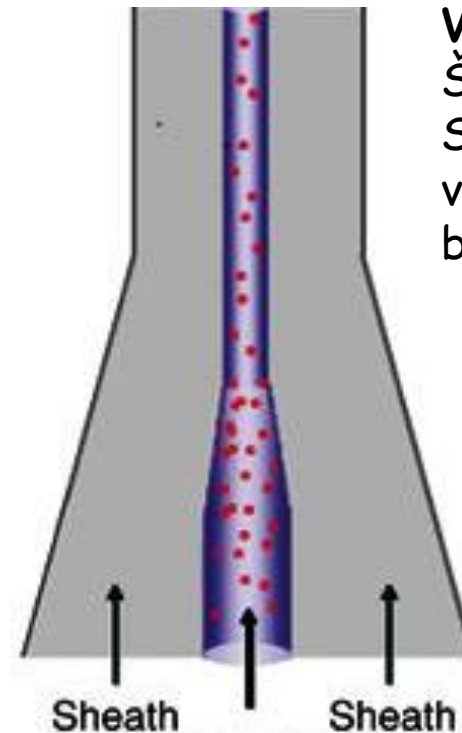
Úzký proud vzorku  
Menší průtok buněk  
Přesnější měření  
vhodné např. pro DNA  
analýzu a měření funkčních  
vlastností



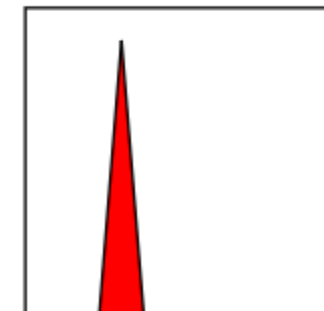
Vzorek

## Vysoký tlak vzorku

Široký proud vzorku  
Sbírání velkého počtu částic  
vhodné např. na imunofenotypizaci  
buněk



Vzorek



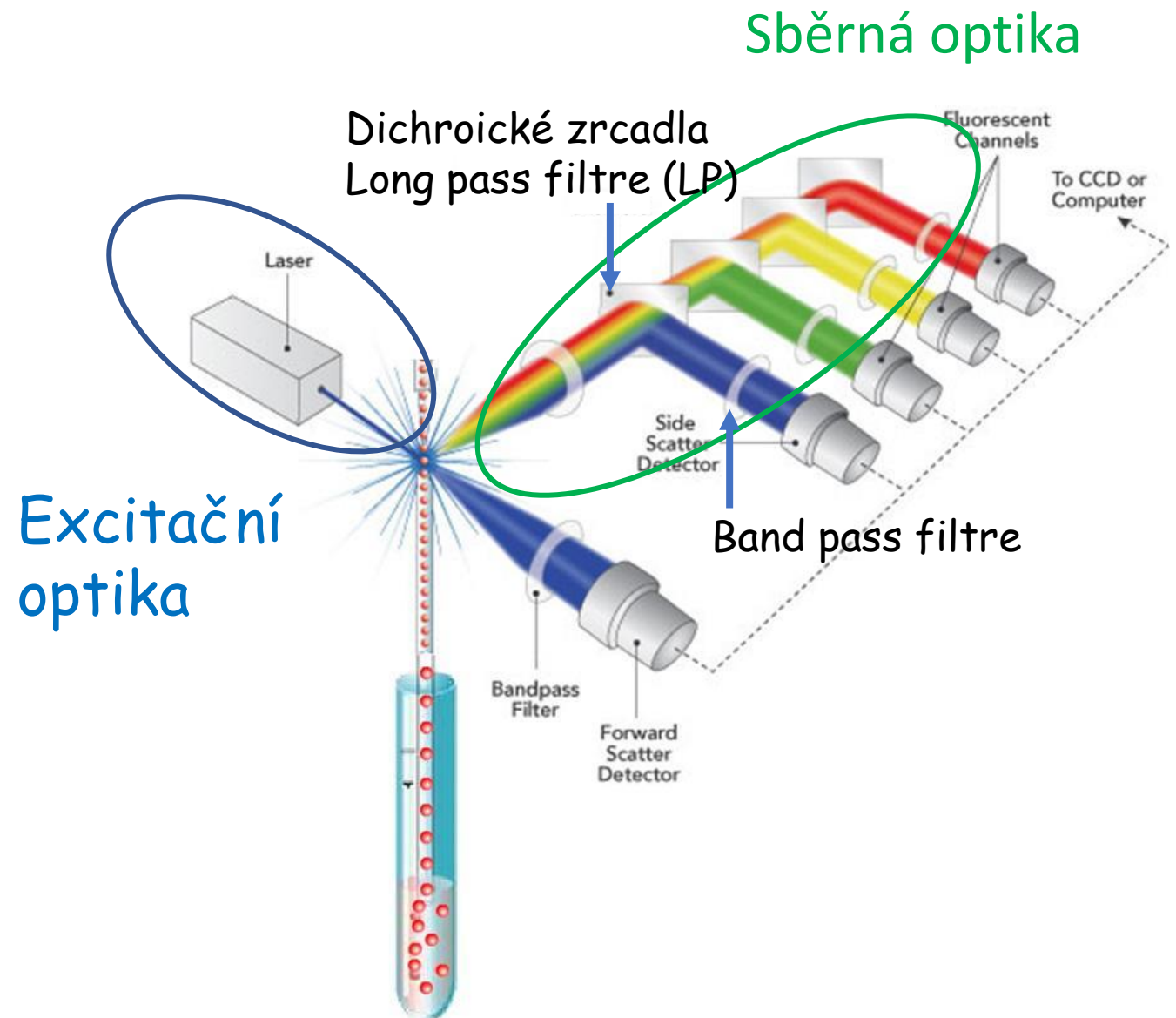
# Optika

- **Excitační optika**

laser a systém čoček, které zaostřují a směřují laserový paprsek - před ozářením částic

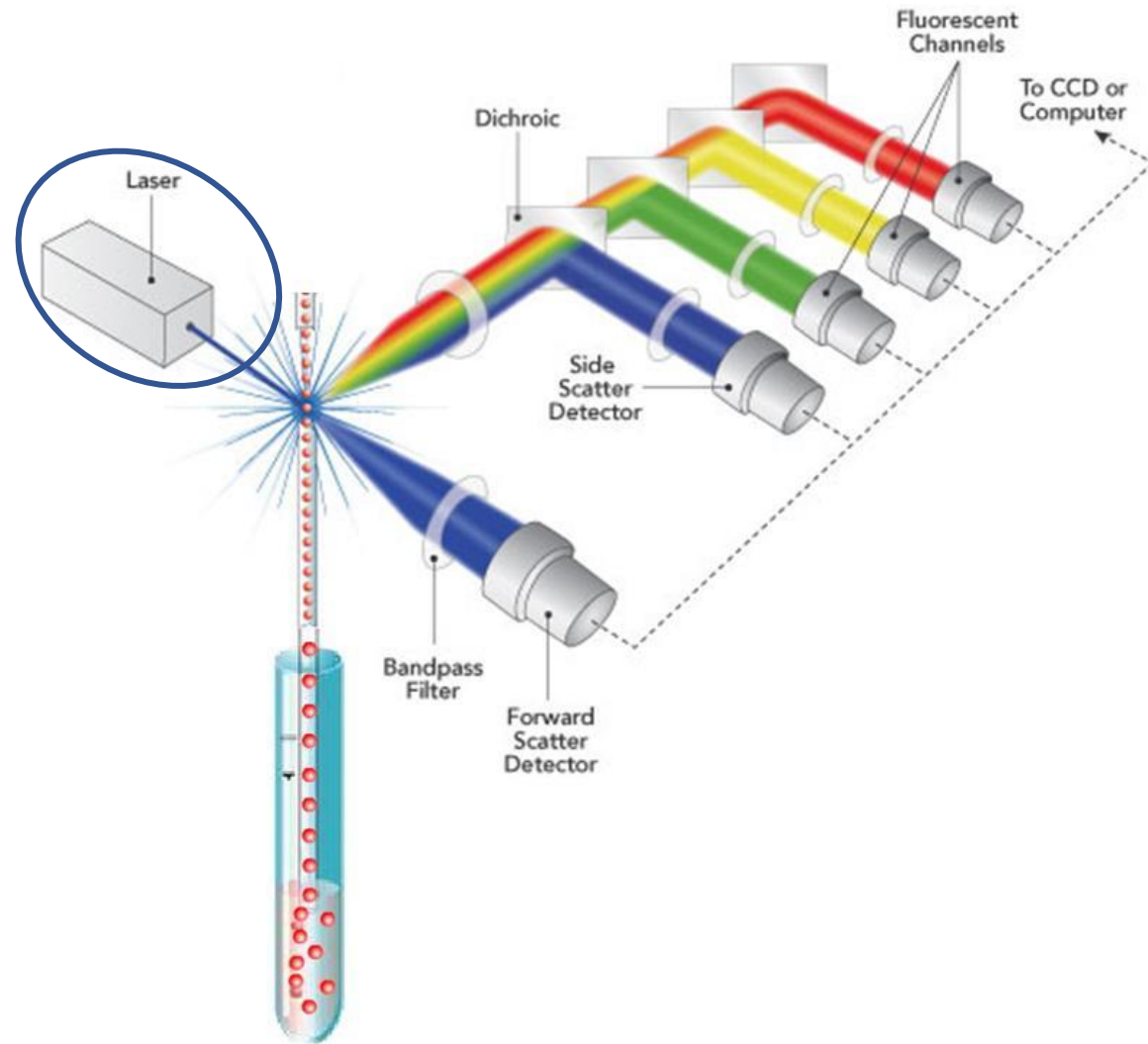
- **Sběrná optika**

soustava čoček, která vede a rozděluje světlo do různých vlnových délek na příslušné detektory - odražené a fluorescenční záření po ozáření částic



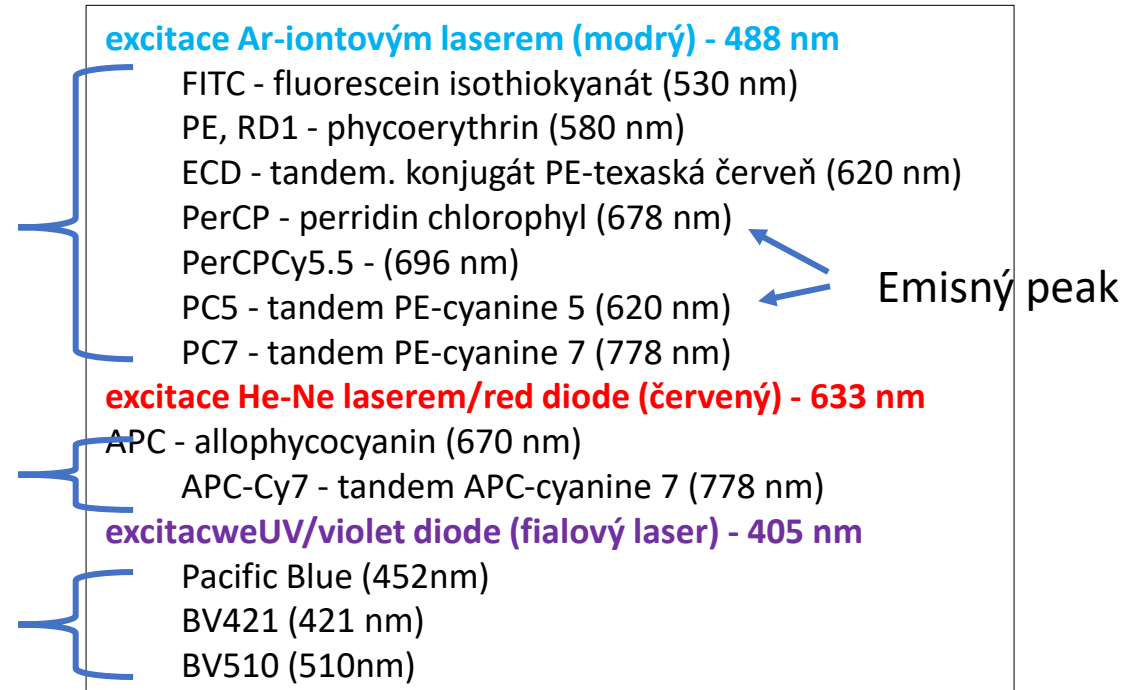
# Lasery - zdroj záření

- každý cytometr obsahuje jako zdroj záření laser
- dnes: nejčasteji využívané 3 až 4 lasery v cytometru
- každý laser má charakteristickou vlnovou délku záření → excitace různých fluorochromů



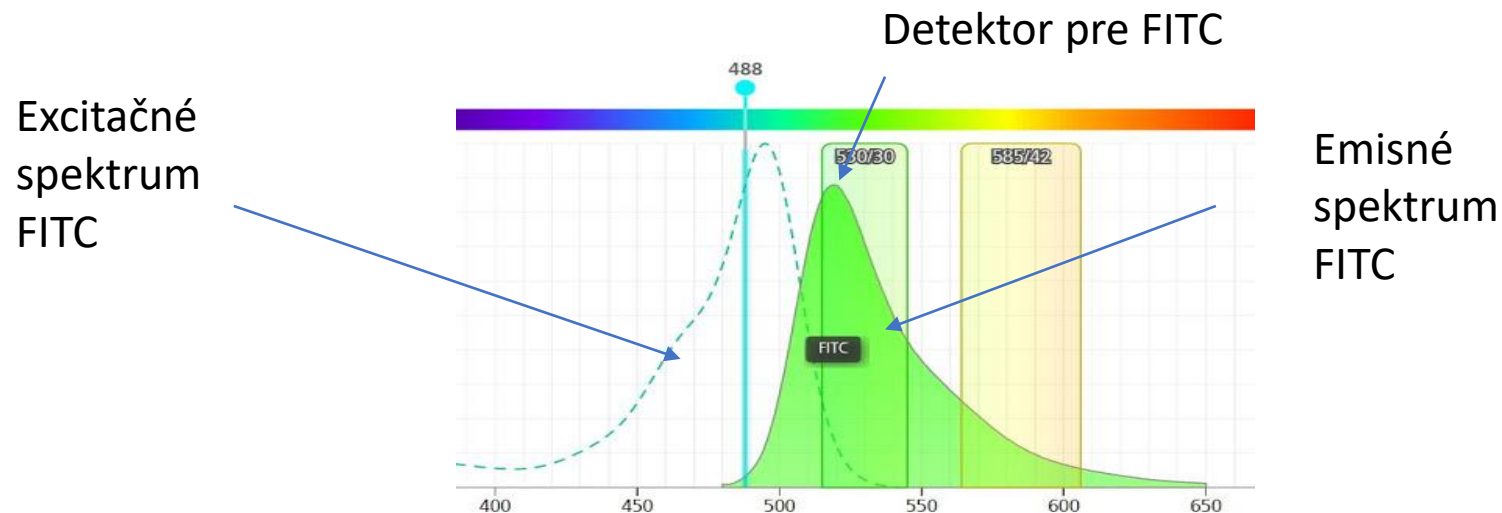
Emisní peak: při ozáření fluorochromu paprskem laseru je emitované záření určité vlnové délky. Podle nejvyšší intenzity vlnové délky emitovaného záření se volí vhodný detektor pro daný fluorochrom.

Fluorochromy excitovatelné jednotlivými lasery



# Sběr optického signálu v průtokové cytometrii

- Fluorochrom - po ozáření paprskem laseru dochází k emisi světla v rozsahu určitých vlnových délek - například FITC po ozáření argonovým laserem s vlnovou délkou 488 nm emituje světlo v rozsahu 480 - 674 nm, emisní maximum = emisní pík má v 521 nm.
- Detektor pro měření fluorescence emitované FITC by měl mít rozsah detekovaných vlnových délek mezi 500 - 560 nm - v závislosti na výrobci cytometru.





# Sběr optického signálu v průtokové cytometrii

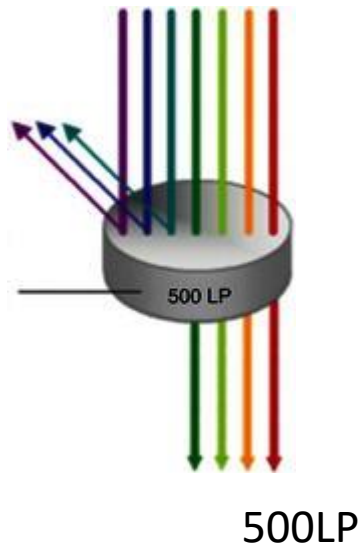
- ve vícebarevné průtokové cytometrii dochází k emisi několika fluorochromů najednou - tj. je emitované záření různých vlnových délek a je nutné takto vzniklé záření rozdělit tak, aby bylo jasné, co vyzařují jednotlivé fluorochromy
- při výběru fluorochromů se v průtokové cytometrii postupuje tak, aby se píky emisních spekter nepřekrývali

# Optické filtry

- součást sběrné optiky
- odfiltrování vhodné vlnové délky emitovaného světla před dopadem na detektor

## Long Pass (LP)

Propoští všechny délky vyšší než uvedená vlnová délka



Slouží k rozdělení emitovaného světla například tak, že propouští záření vyšší než 500 nm – tím dojde k oddělení např. odraženého světla laseru, který má vlnovou délku 488 nm. Takto upravené propuštěné záření je rozdělené dalšími filtry.

# Optické filtry

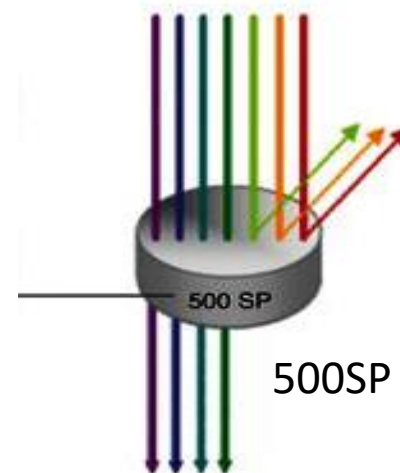
Pro usměrnění záření dopadajícího na detektory pro jednotlivé fluorochromy potřebujeme rozdělit emitované záření tak, aby na určitý detektor dopadalo záření v daném rozsahu vlnových délek. K tomu potřebujeme short pass filtry a band pass filtry.

Short pass filter propouští záření kratší vlnové délky a záření s vyšší vlnovou délkou odrazí. Propuštěné záření putuje směrem k detektoru, kde je jeho rozsah upravený pomocí band pass filtrů - propuštěno je záření vlnové délky typické pro emisní pík jednoho určitého fluorochromu.

Odražené záření putuje k dalším short pass filtrům, které následně propouští záření vyšší vlnové délky než v předešlých short pass filtrech.

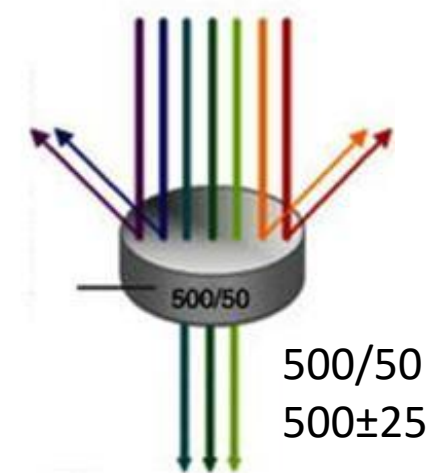
## Short Pass (SP)

Prepoští všechny délky kratší než daná vlnová délka



## Band Pass (BP)

Propuští specifické rozmezí vlnových délek



# Optické filtry

## Dichroické filtry (zrcadla)

- usměrňují odražené a emitované záření do detekční dráhy směřující k detektorům
- rozdělují odražené a fluorescenční záření tak, aby dopadalo na vhodný detektor
- nejčastěji umístěné pod úhlem  $45^\circ$ , v tom případě část světla odráží pod úhlem  $90^\circ$ , část propouští
- jsou používány jako **long pass** a **short pass** filtry

# Elektronika

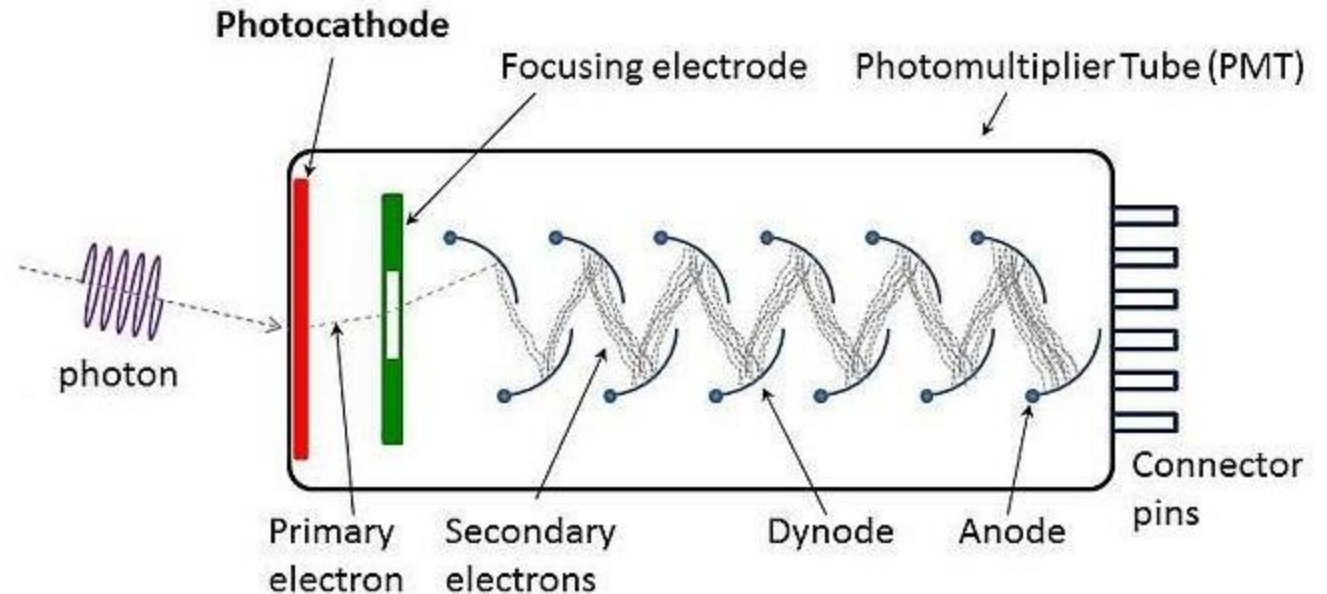
- Světelné signály jsou převáděny na elektrické
- Typy detektorů:
  - lavinové fotodiódy: detekce FSC
  - fotonásobiče PMT (PhotoMultiplierTube): detekce SSC a fluorescence

## PMT

- velmi citlivé, jsou schopné zachytit i slabé signály
- zvyšují signál primárního dopadajícího záření

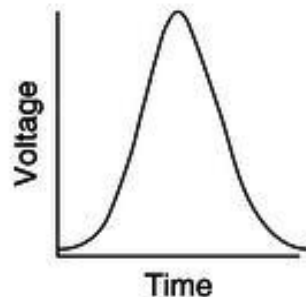
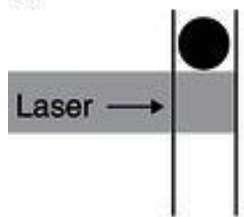
## Princíp PMT

Záření ve formě fotonů dopadá na fotokatodu. Z ní jsou na základě fotoelektrického jevu vyraženy elektrony, které jsou dále usměrněny na tzv. dynody (katody z pozitivním napětím). Na jednotlivé dynody je priváděné stále vyšší napětí, což umožňuje urychlení elektronů a zvýšení jejich energie. Urychlené elektrony mají dostatek energie na vyražení dalších elektronů z povrchu dynod. Počet elektronů exponenciálně roste. Vyražené elektrony dopadají nakonec na anodu, na které dochází ke vzniku napěťového pulzu. PMT umožňuje přeměnit slabý počátečný signál na silný napěťový pulz.

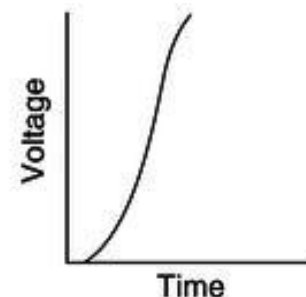
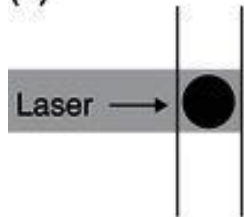


# Vznik napěťového pulzu / Intenzita fluorescence

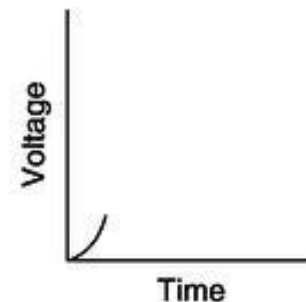
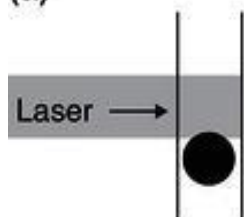
(c)



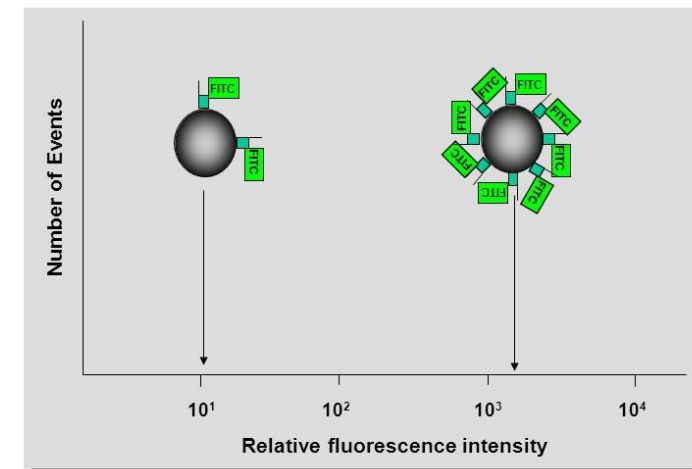
(b)



(a)



- přechod buňky laserovým paprskem generuje vznik napěťového pulzu na detektoru
- velikost napěťového pulzu je daná intenzitou záření (intenzitou fluorescence), které dopadlo na PMT
- intenzita fluorescence závisí na:
  - expresi jednotlivých povrchových znaků
  - počtu navázaných fluorochromů
  - na síle fluorochromu (fluorochromy nevykazují stejnou intenzitu fluorescence)
- napěťovým pulzům jsou pomocí převodníků přidělené digitální hodnoty rozdělené do 0-1024 kanálů na základě velikosti pulzu
- každý z těchto kanálů odpovídá určité intenzitě fluorescence



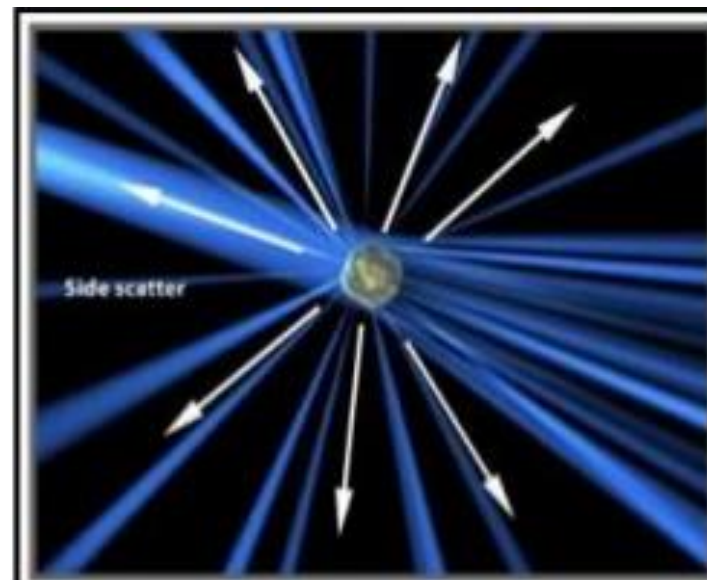
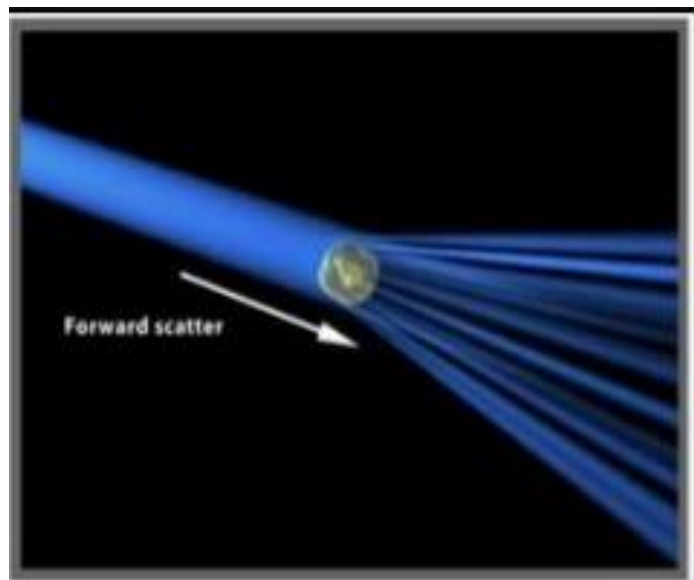
# Velikost vs. granularita

- Velikost a členitost buňky určujeme na základě rozptylu záření (light scatter): procházející částice vychýlí dopadající záření

Forward Scatter (FSC) – rozptyl záření v přímém směru → závisí na velikosti buněk = určuje velikost

Side Scatter (SSC) – rozptyl záření do stran → závisí na členitosti buněk = určuje granularitu

- Stačí jeden laser
- Není to fluorescenční záření (nepotřebujeme MPL s fluorochromi)

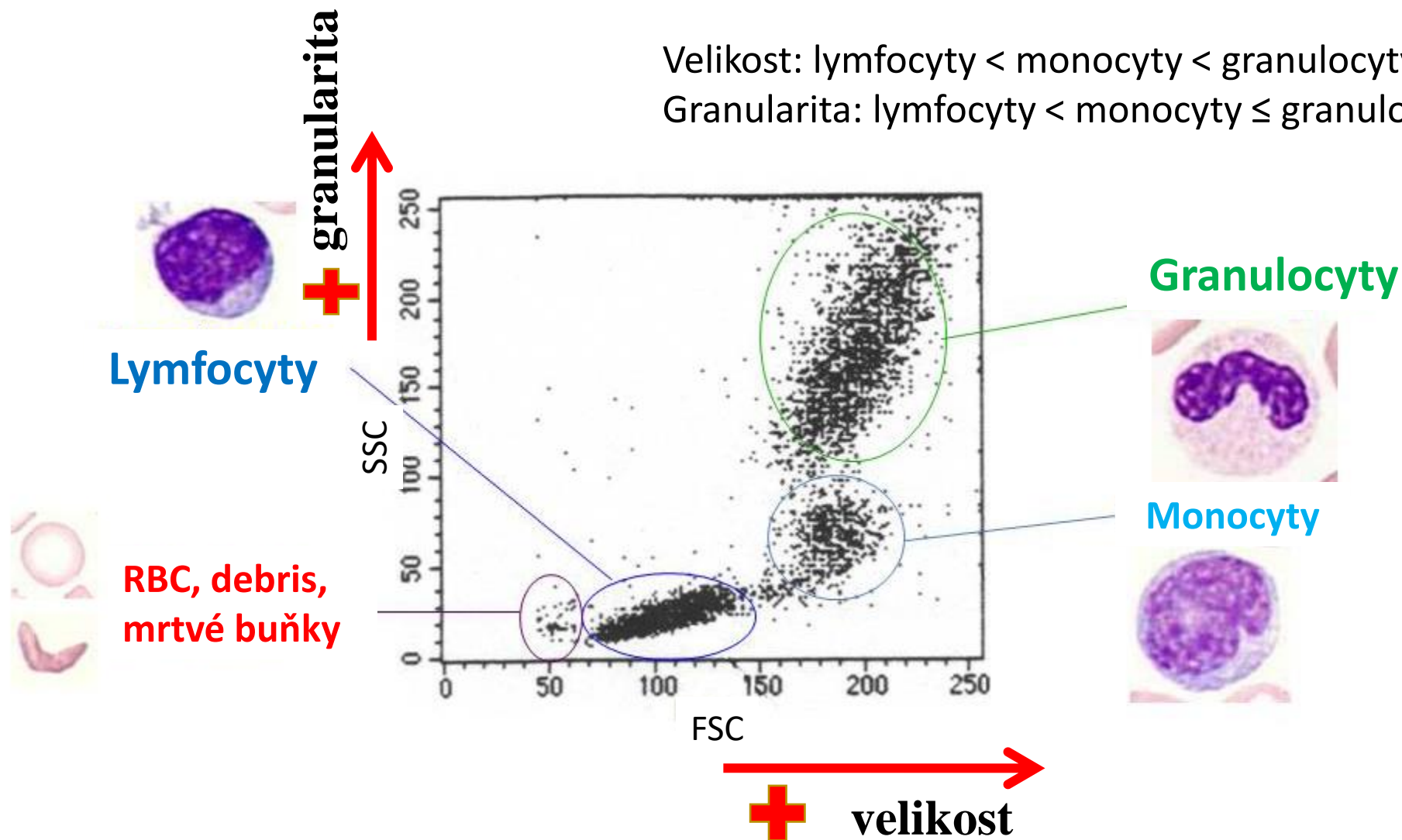


# FSC vs. SSC

Kombinací FSC a SSC získáváme rozlišení základních subpopulací leukocytů

Velikost: lymfocyty < monocyty < granulocyty

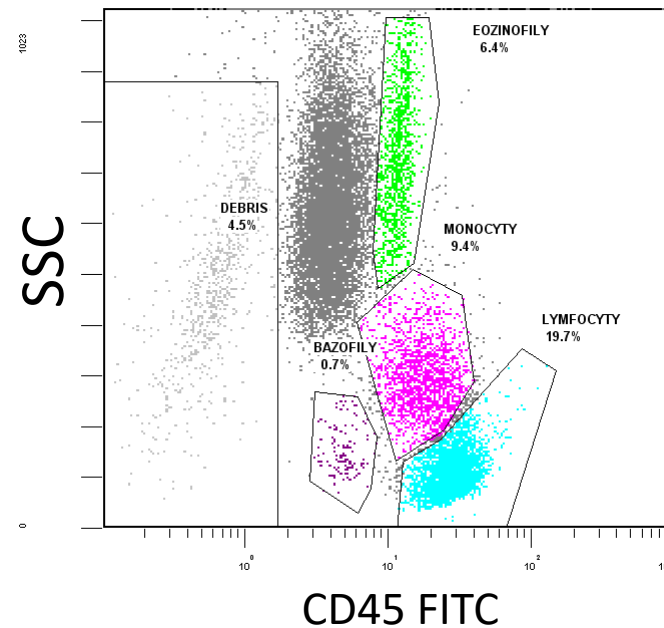
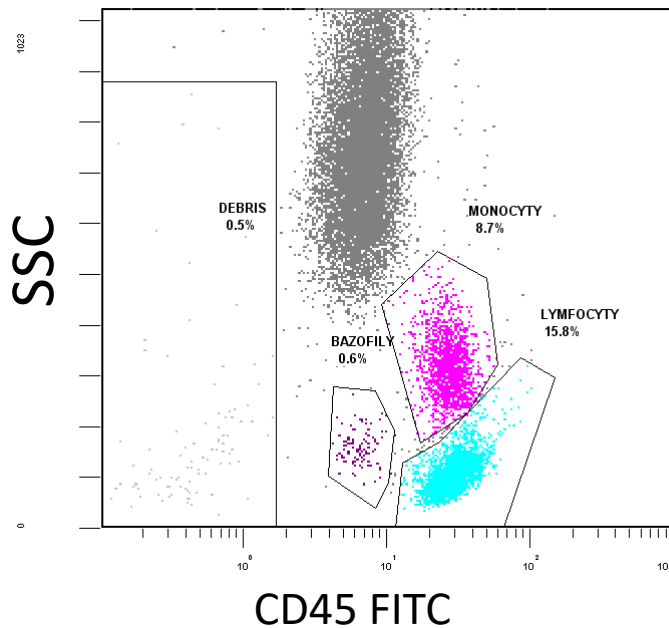
Granularita: lymfocyty < monocyty ≤ granulocyty





# Diferenciální rozpočet

Stanovení relativního počtu leukocytárních a lymfocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie



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

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

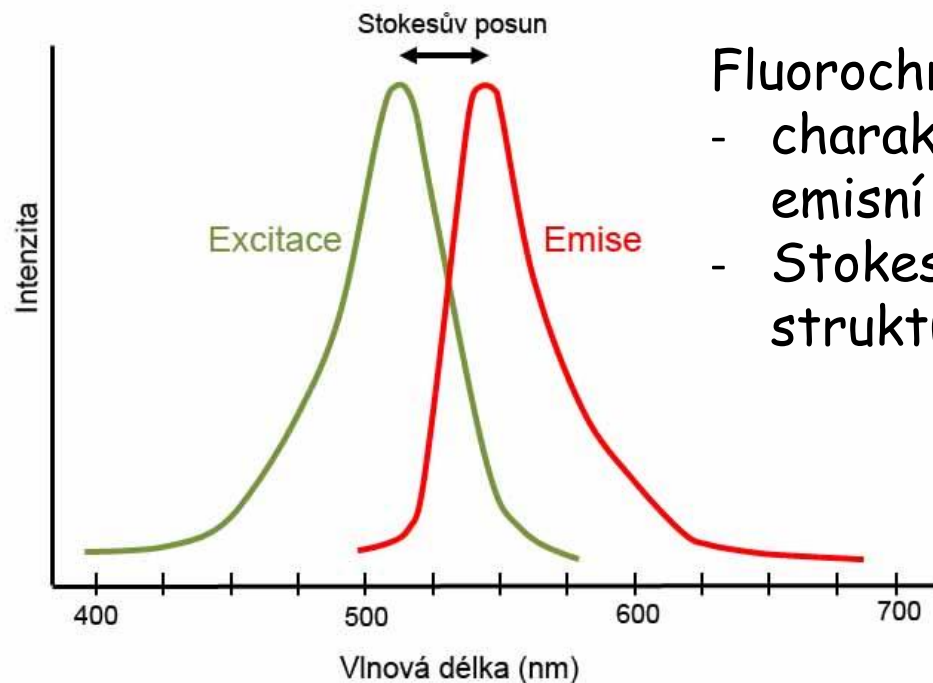
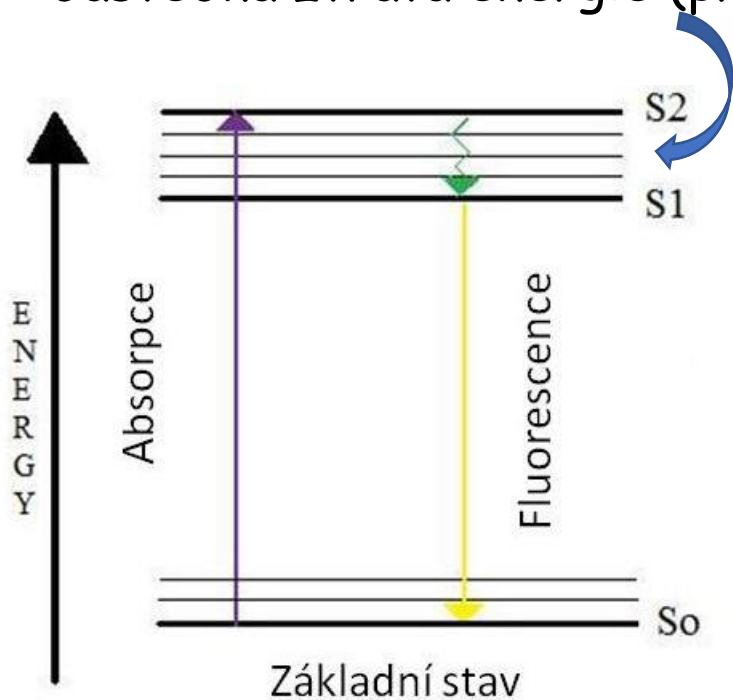
$$x_{11} \% \text{ CD4 Th} + x_{12} \% \text{ CD8 Tc}$$
$$x_{11} + x_{12} = 100 \% = \text{T-lymfocyty}$$

CD45- panleukocytární znak, přítomný na všech leukocytech

# Fluorescence

Mnoho buněk má stejnou anebo podobnou morfologii- na základě exprese povrchových znaků je můžeme rozdělit do skupin:

- využívají se k tomu monoklonální Ab značené **fluorochromy** specifické k určitému epitopu
- fluorochrom je molekula schopná absorbovat záření specifické vlnové délky (excitace) a následně vyzářit kvantum energie (emise) ve formě fluorescenčního záření
- částečná ztráta energie (přeměna na teplo) = Stokesův posun



## Fluorochrom

- charakteristické excitační a emisní spektrum
- Stokesov posun je daný strukturou molekuly

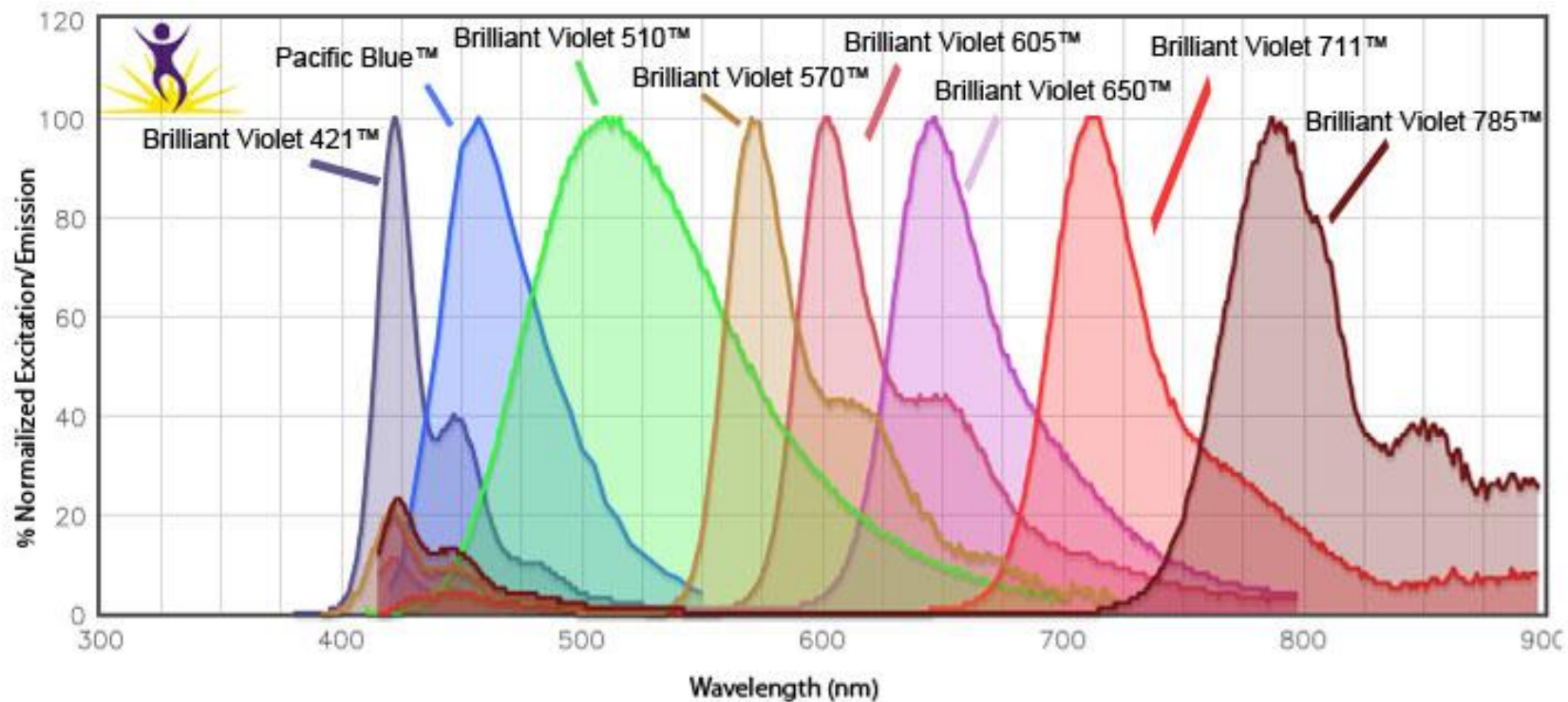
# Fluorochromy

- jsou excitované vhodnou vlnovou délkou (nutné zvolit správný laser)
- emitují světlo specifické vlnové délky (nutné zvolit detektor ve správném pásmu vlnových délek)
- i neznačené bunky mohou být fluorescenční kvůli slabé **autofluorescenci**
  
- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
  - **Fluorescein isothiokyanát (FITC)**, Cyaniny, Texas Red, rada Alexa, Pacific a Cascade
  - AmCyan, Propidium Iodide, 7-AAD, CFSE
- Fluorescenční proteiny
  - **Phycoerythríny (PE)**, Allophycocyaniny, PerCP, GFP,...
- Quantum Dots

Schopné absorbovat fotony budícího záření (napr. 488 nm) a následně ( $10^{-8}$  s) emitovat fotony s delší vlnovou délkou (nap. 500 - 800 nm). Fluorescenční záření má tedy jinou „barvu“.

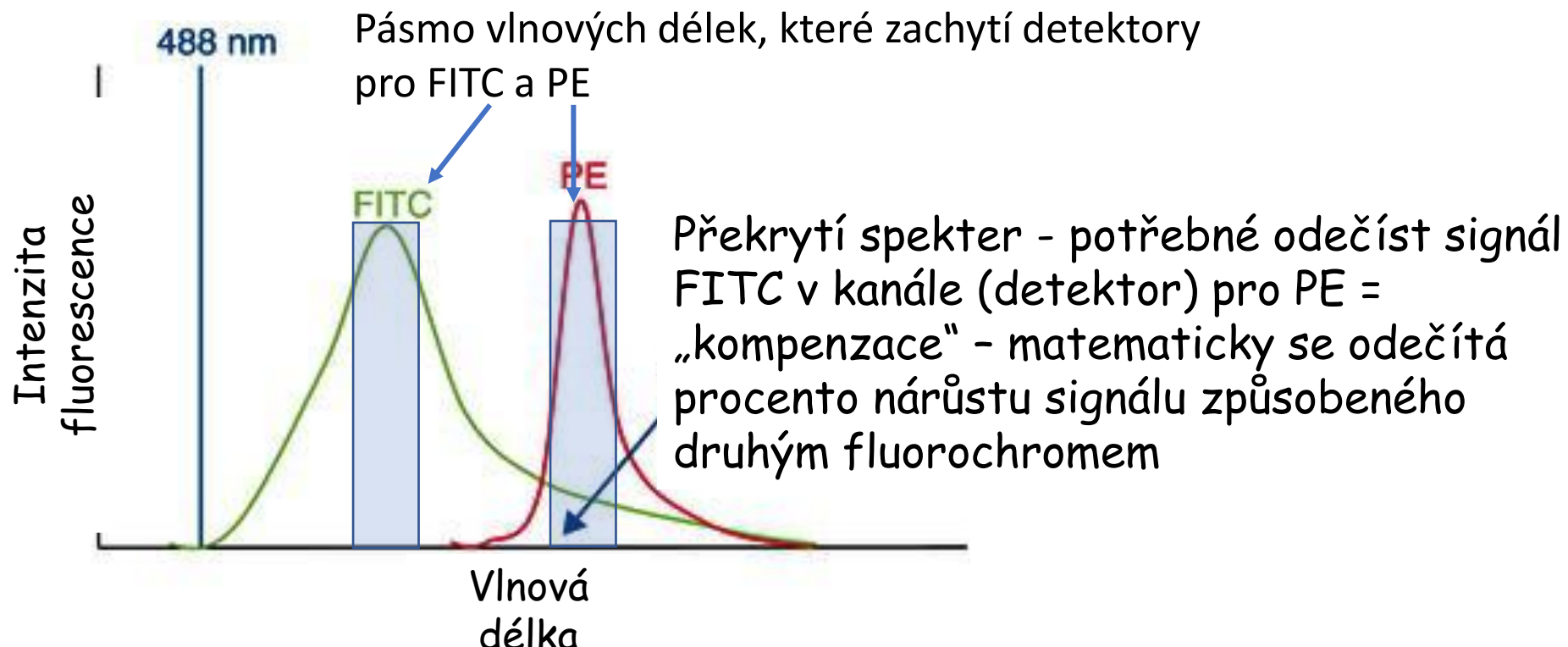
## Ukázka překrytí emisních spekter některých fluorochromů

Emisné  
spektra



# Překrytí spekter

- Fluorochromy typicky emitují světlo v širokém spektru vlnových délek
- V závislosti na uspořádání filtrů, detektory mohou zachytit fluorescenci od jiných fluorochromů, které jsou detekované v jiných kanálech (přesvit, překrytí)

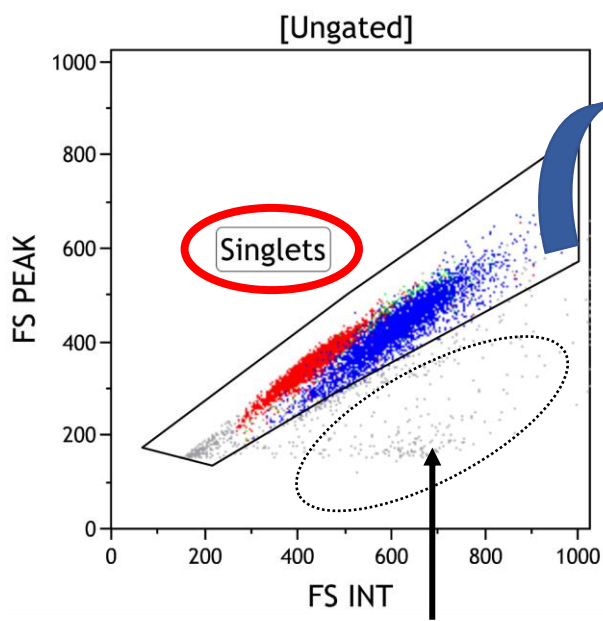


# Analýza naměřených dat – Gating Strategy

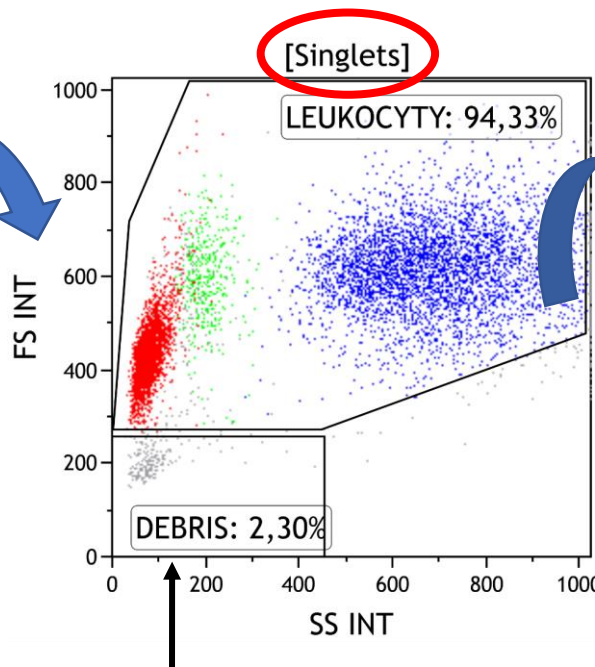
*Gatovací strategie:* postupný výběr buněk

Naměřené vzorky obsahují, kromě různých typů buněk, také spleené buňky, mrtvé buňky anebo prachové částice. Gatovací strategie slouží k odfiltrování nechtěných částic z analýzy a k výběru cílové populace buněk na základě různé kombinace použitých znaků. V grafu se následně ohraničí jen buňky, které nás zajímají (vytvoří se tzv. gate). Další graf už zobrazuje jen buňky výběru (ohraničené) z předcházejícího grafu.

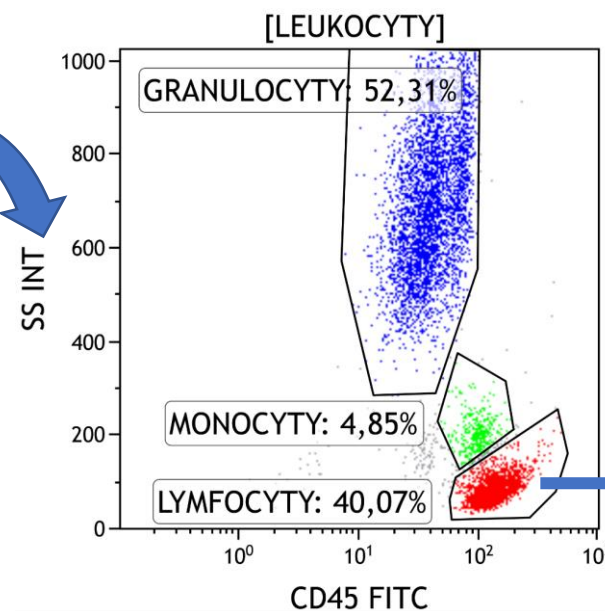
Název gate, z kterého se zobrazují buňky



Oddělení doubletu - spleených buněk



Mrtvé buňky a prachové částice

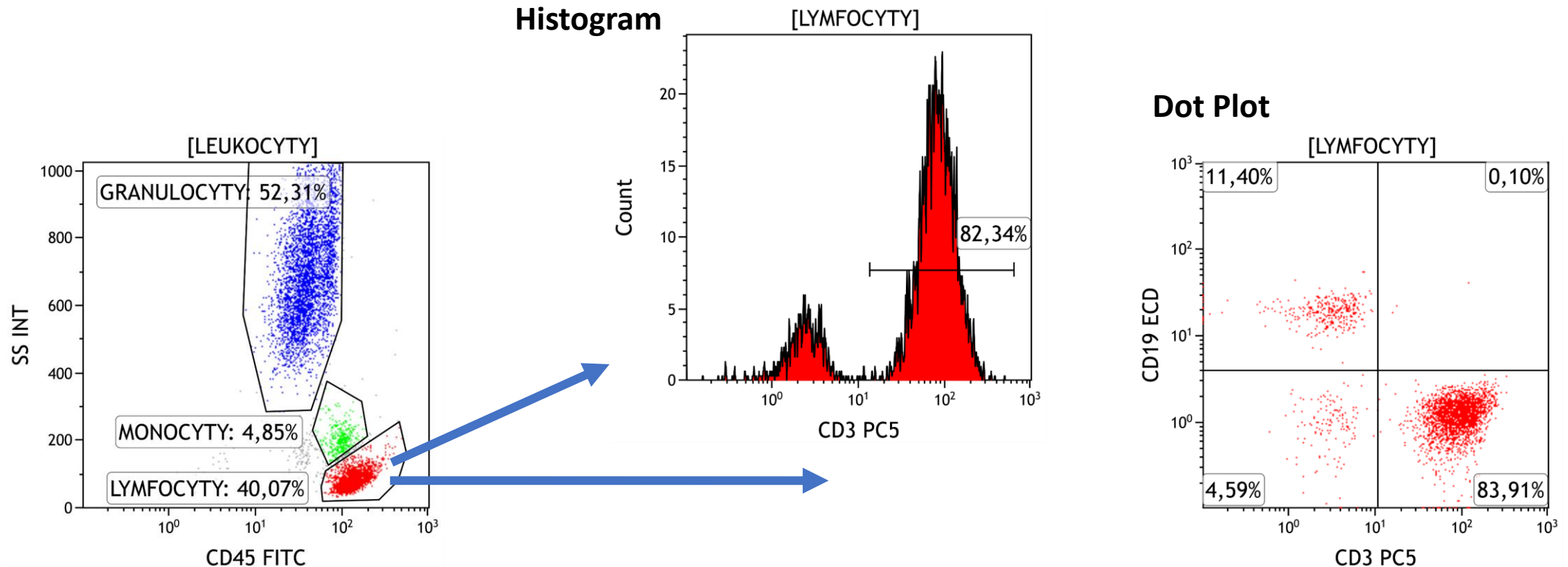


# Analýza naměřených dat – statistika

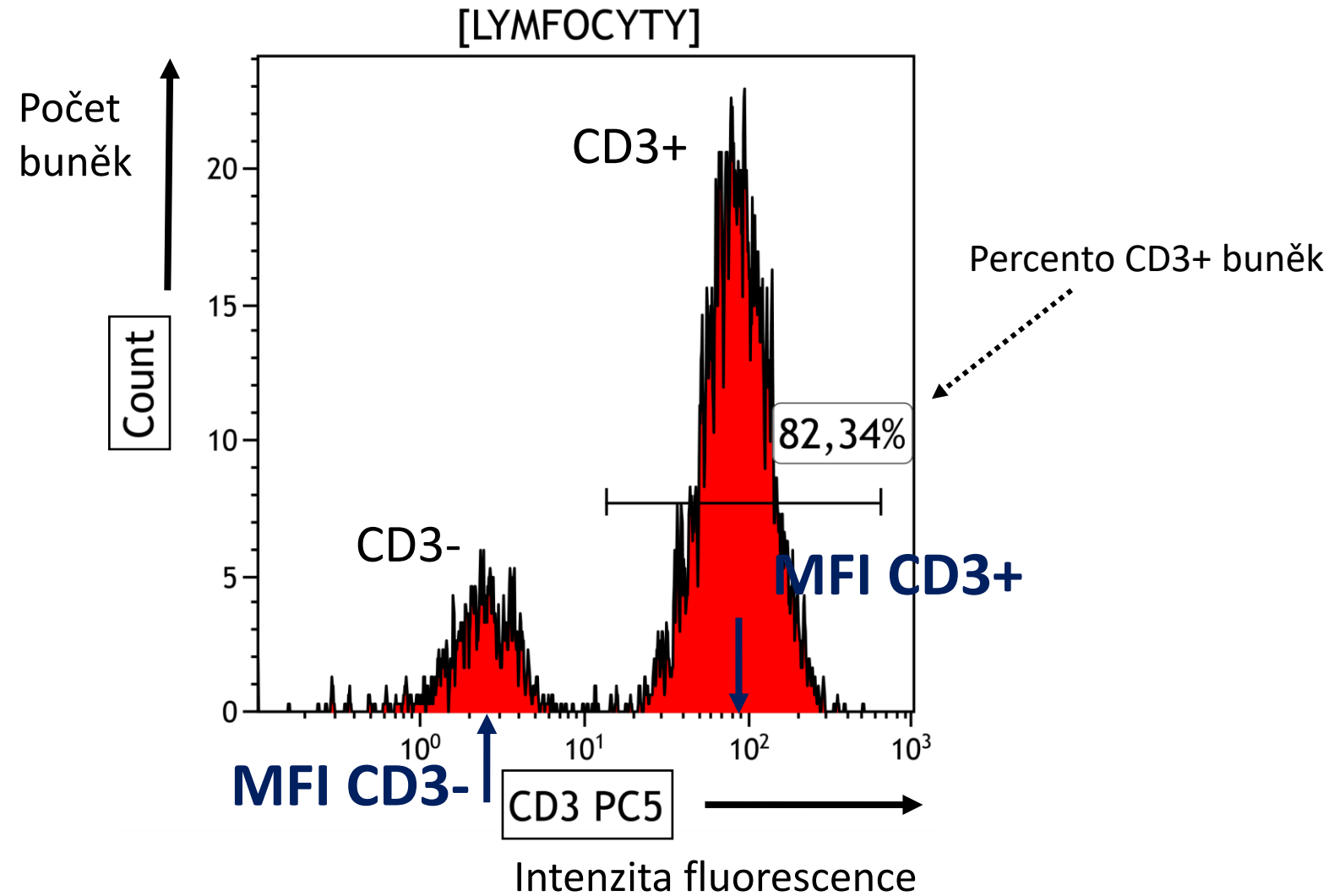
K zobrazení dat se používají různé typy grafů: Histogram, Dot Plot

Z hodnot gatovaných buněk vytvoříme statistiku:

- údaje o počtu buněk
- relativním zastoupení (prcento buněk; %) buněčných subpopulací
- porovnání mediánu intenzity fluorescence **MFI** = míra exprese sledovaných znaků



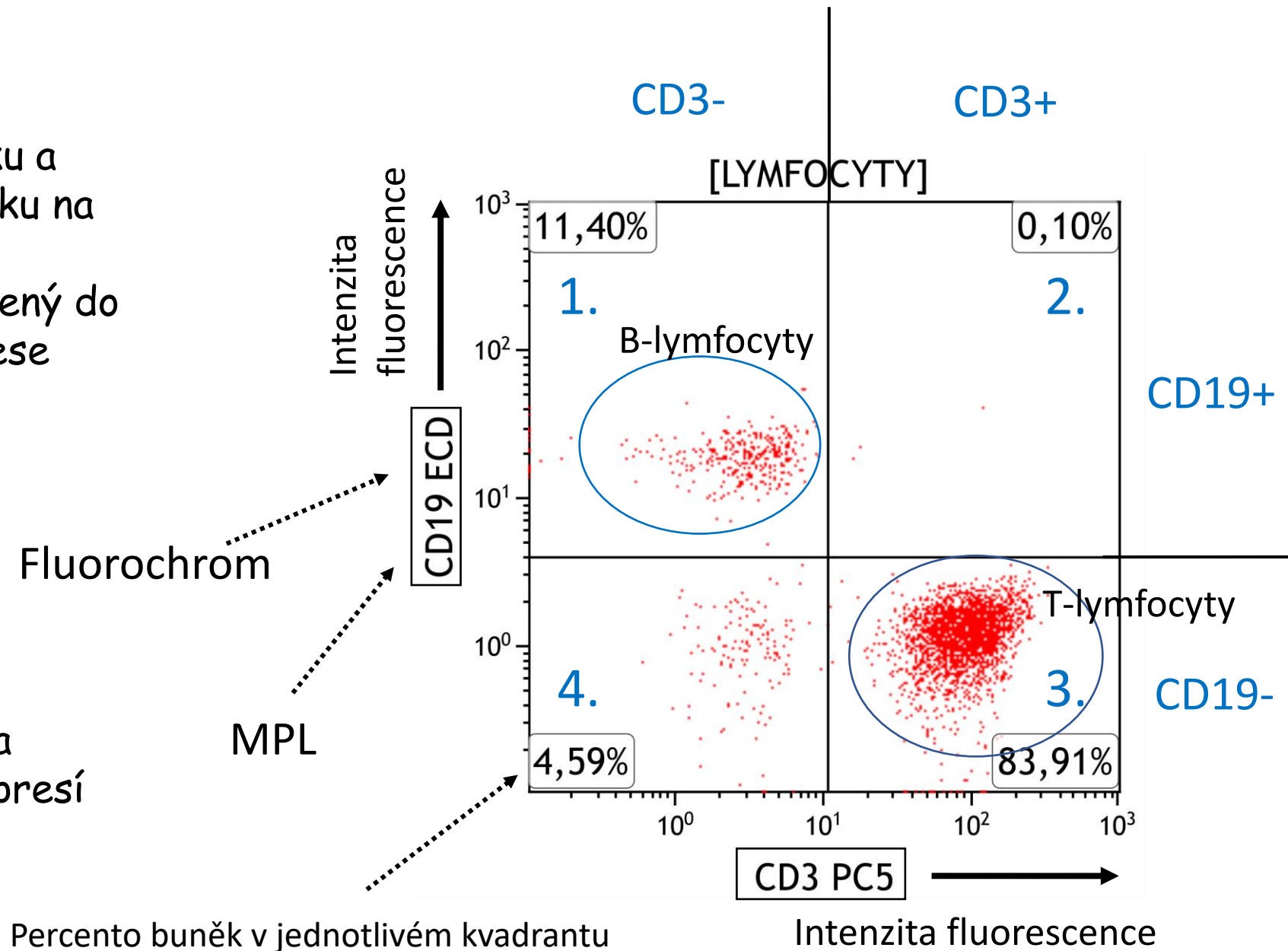
# HISTOGRAM





# DOT PLOT

- každá tečka zobrazuje 1 buňku a vyjadřuje expresi daného znaku na buňce
- příklad grafu: Dot Plot rozdělený do 4 kvadrantů, na základě exprese sledovaných znaků:
  1. CD19+ CD3- = B-lymfocyty (11,40% z Lymfocytů)
  2. CD19+ CD3+
  3. CD19- CD3+ = T-lymfocyty (83,91% z Lymfocytů)
  4. CD19- CD3-
- v jednotlivých kvadrantech se nachází buňky s podobnou expresí znaků



# Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

## Výhody

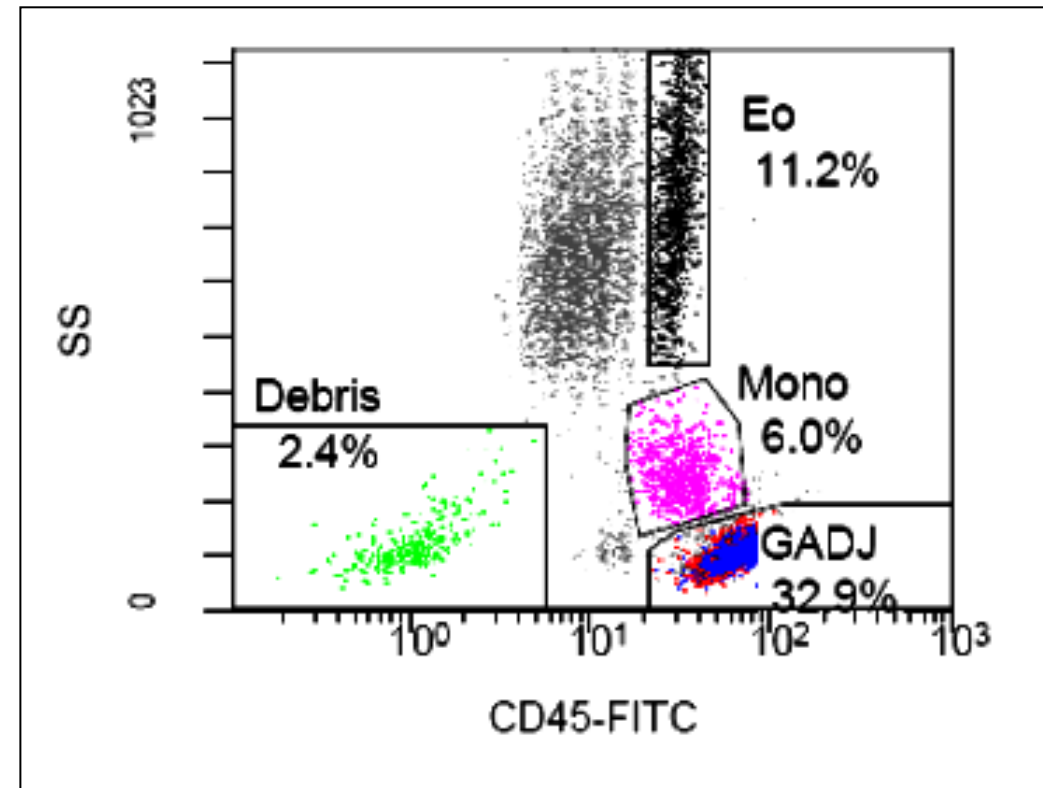
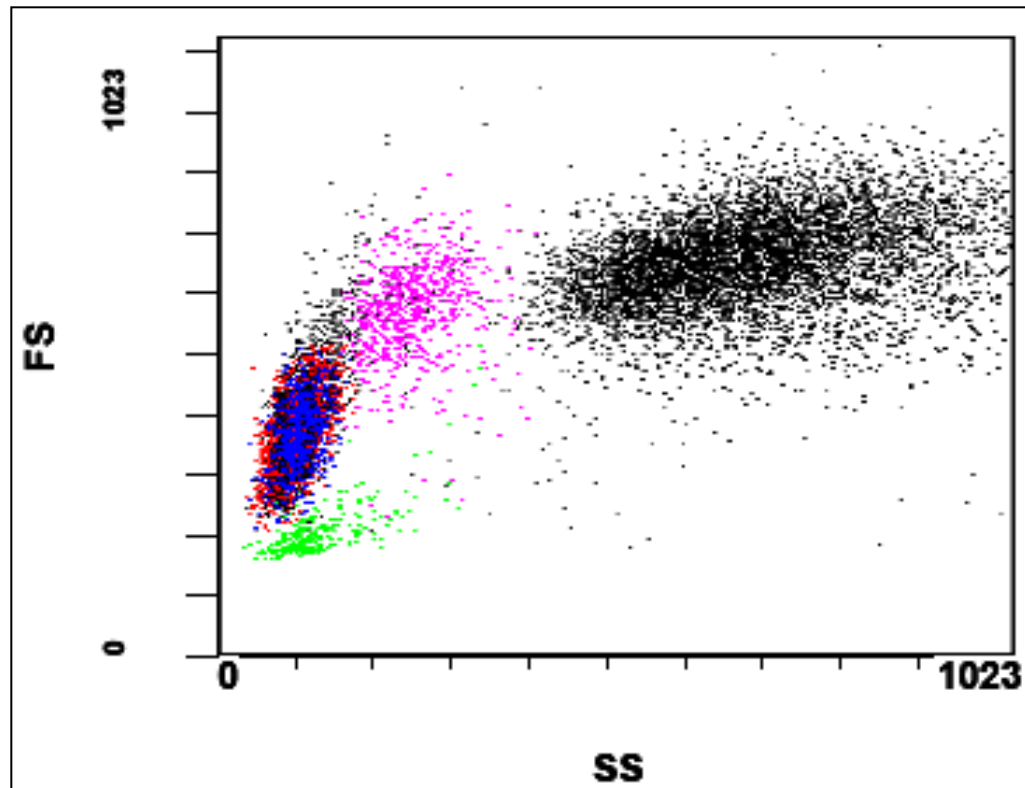
- Velké množství analyzovaného materiálu - velké množství dat
- Analýza trvá několik minut
- Kvalitativní + kvantitativní analýza
- Možné manipulační operace  
např. třídění buněk podle  
vybraných vlastností (cell sorting)

## Nevýhody

- Vysoká finanční náročnost
- Sestavení experimentu, analýza a vyhodnocení dat závislé na zkušenostech obsluhy
- Analýza vzorků co nejdříve po odběru
- Nevidíme lokalizaci signálu na buňce

# Krvení diferenciál

Základní vyšetření v imunologické laboratoři: stanovení lymfocytárních subpopulací  
Připravují se **dvě zkušavky**:



Sledujeme počet: Lymfocytů (GADJ); Monocytů (Mono); Eosinofilů (Eo); množství Debris (spad = mrtvé buňky)

# Krevní diferenciál

- základní vyšetření v imunologické laboratoři: *stanovení zastoupení lymfocytárních subpopulací v plné krvi*

Průtokovou cytometrií se stanovuje počet buněk v jednotlivých subpopulacích leukocytů a porovnává se s referenčními hodnotami.

Připravují se **dvě zkumavky** s následující kombinací monoklonálních protilátek MPL:

MPL + Fluorochrom

Zkumavka A: 45 $\mu$ l krve + x  $\mu$ l MPL

CD45	FITC
CD3	PC5
CD4	RD-1
CD8	ECD

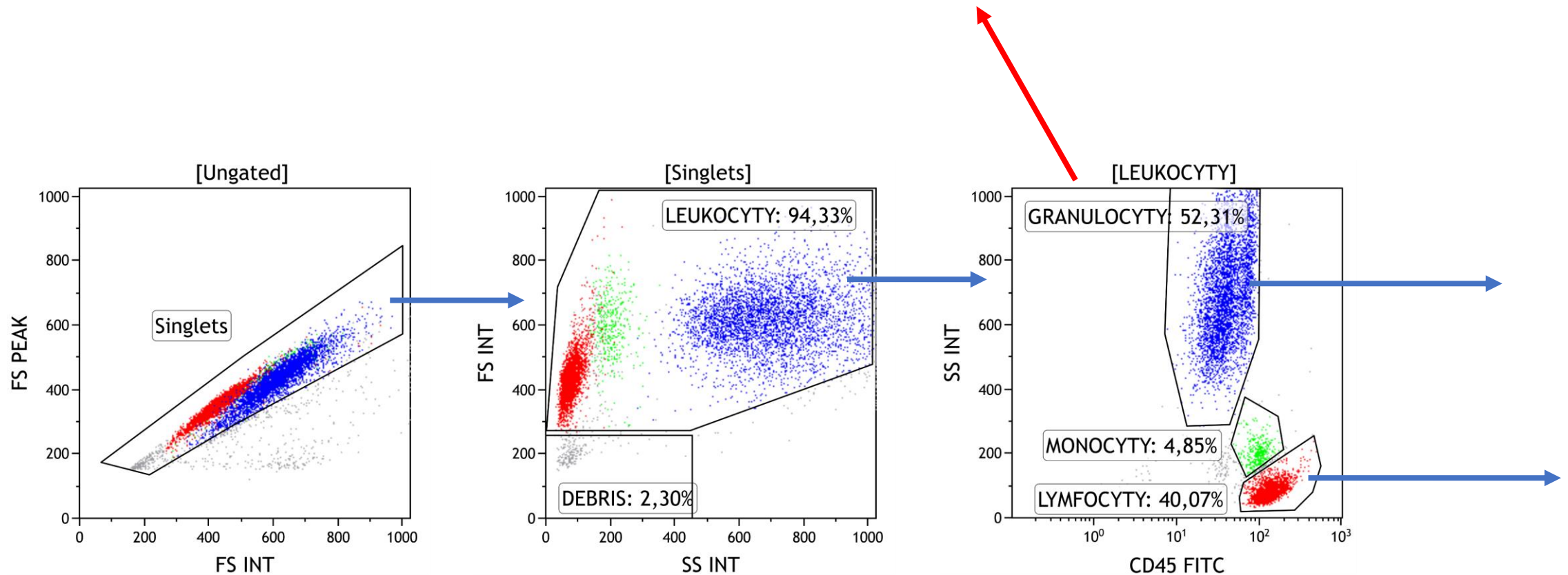
Zkumavka B: 45 $\mu$ l krve + x  $\mu$ l MPL

CD45	FITC
CD3	PC5
CD19	ECD
CD16/56	RD-1

*Vzorky krve s MPL se inkubují 30 min, následuje lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru*

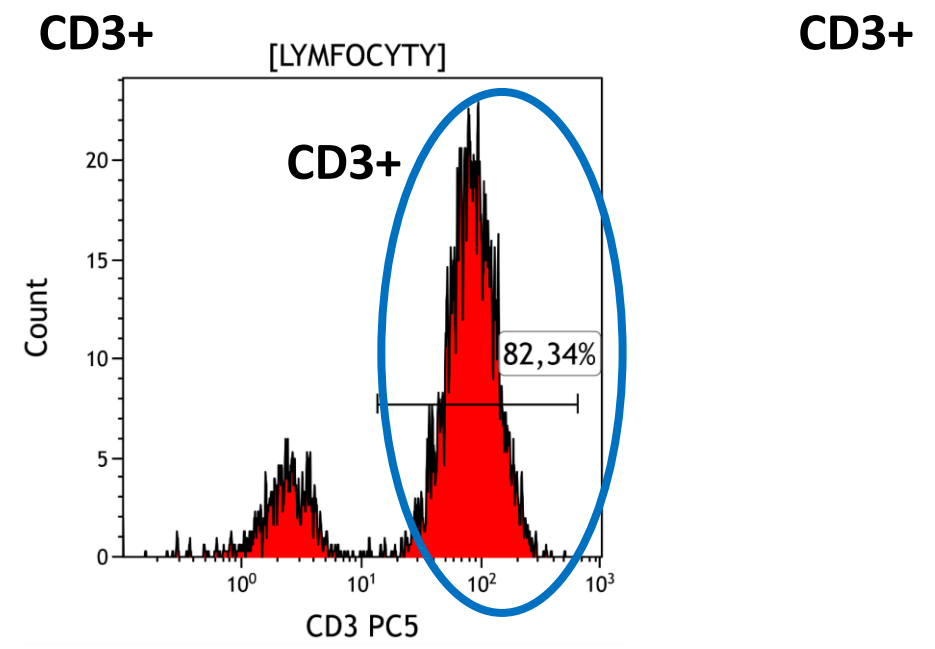
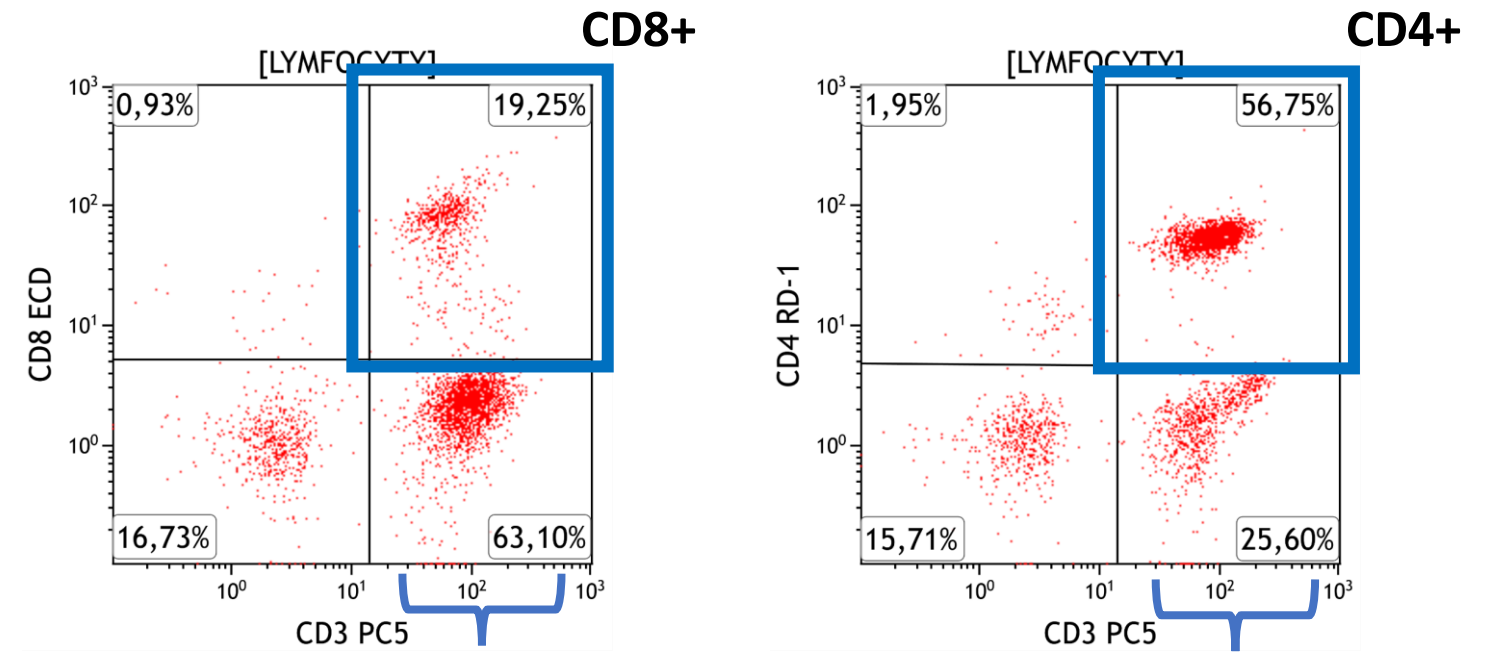
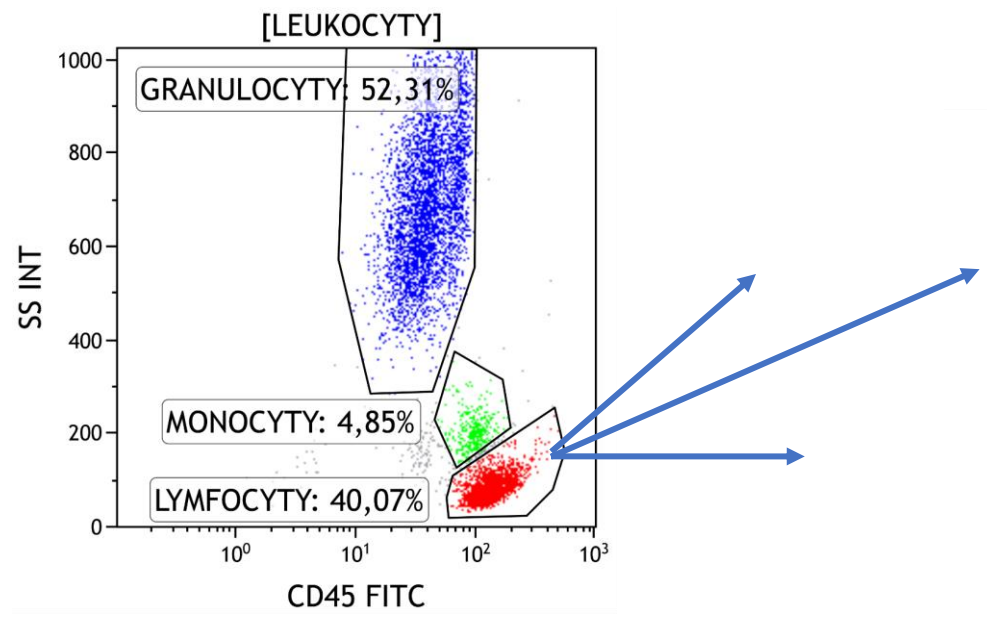
# Krevní diferenciál - gatovací strategie + výsledky

Z obou zkumavek získáme relativní počet (%): Lymfocytů + Monocytů + Granulocytů  
Do výsledku se zapisuje průměrná hodnota z obou zkumavek

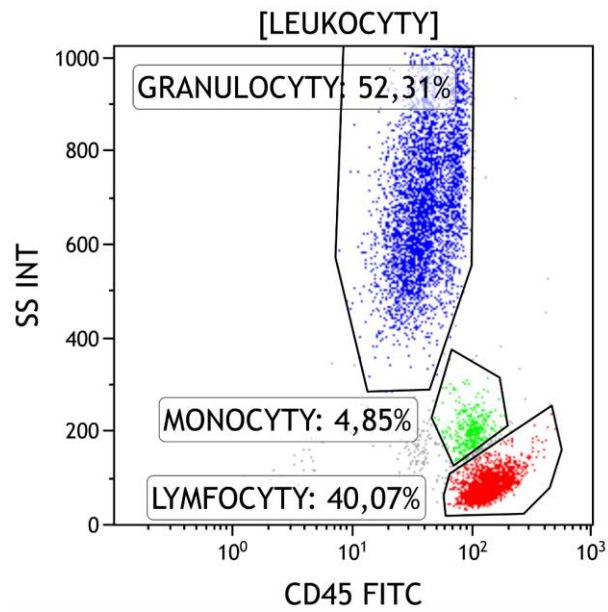


# Krevní diferenciál - gatovací strategie

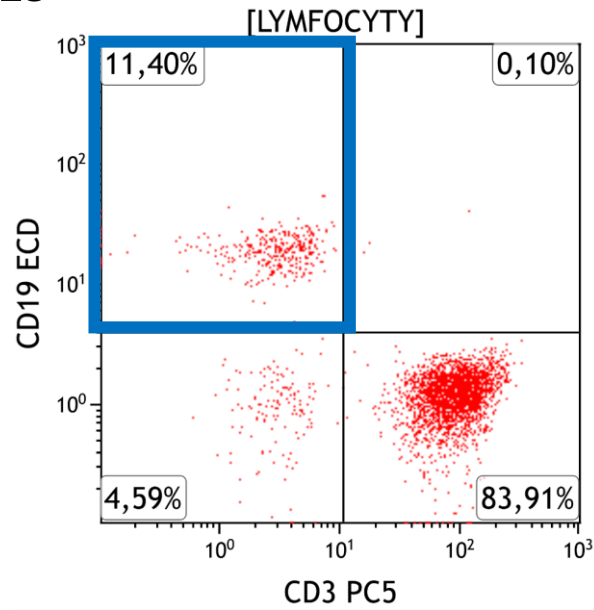
## Zkumavka A:



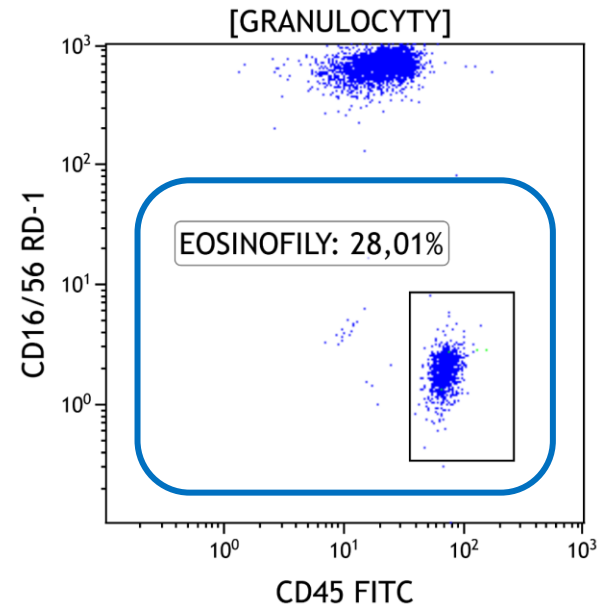
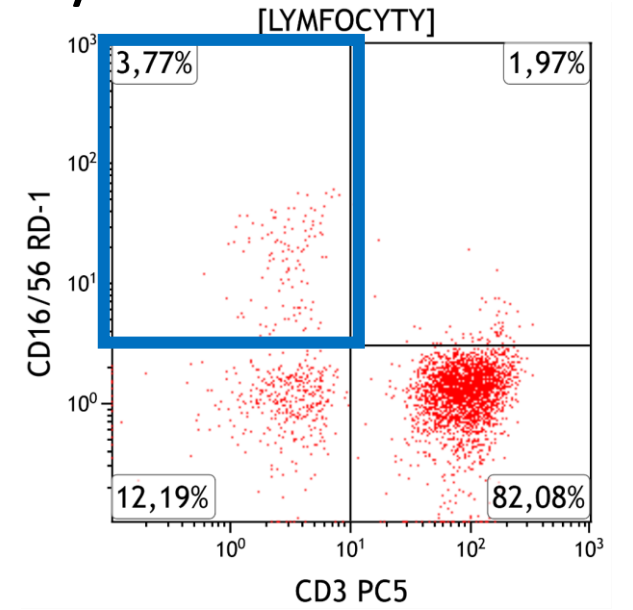
# Zkumavka B:



## CD19+



## CD16/56+



# Krevní diferenciál - výsledky

Cytometrické měření:

Ze zkumavky **A** získáme relativní počet:

**CD3+** T-lymfocytů

**CD3+CD4+** pomocných Th-lymfocytů

**CD3+CD8+** cytotoxických Tc-lymfocytů

Ze zkumavky **B** získáme relativní počet:

**CD3+** T-lymfocytů

**CD19+** B-lymfocytů

**CD16/56+** NK buněk

**Eosinofilů** (z granulocytů)

Ze zkumavky **A+B** získáme relativní počet:

**Monocytů**

**Lymfocytů**

**Granulocytů**

*Relativní počet:* procentuální zastoupení dané populace buněk

*Absolutní počet:* počet buněk na 1l krve

- pomocí počítače leukocytů stanovíme počet leukocytů na 1l krve
- z relativního počtu dané subpopulace a absolutního počtu leukocytů dopočítáme absolutní počet dané subpopulace buněk

Ve výsledkovém listě se udává relativní a takéž absolutní počet buněk jednotlivých subpopulací a porovnává se s fyziologickými/referenčními hodnotami



# Stanovení absolutního počtu lymfocytárních subpopulací

## !Počet leukocytů

lymfocyty

3,6-10  $\times 10^9/l$

monocyty

20-55 %

0-10 %

granulocyty - neutrofily, eosinofily, bazofily

37-75 %

Příklad:

Leukocyty 5  $\times 10^9/l$

relativny počet

Lymfocyty: 20%

abs. počet

1,0  $\times 10^9/l$

CD3: 75%

0,75  $\times 10^9/l$

CD19: 10%

0,1  $\times 10^9/l$

CD15,56: 15%

0,15  $\times 10^9/l$

# Hodnocení výsledků

- Byla dostatečná **lýza** erytrocytů? Pokud ne, výsledky mohou být zkreslené, málo načtených událostí, vysoký spad (debris)
- Jsou zobrazeny všechny MPL → Pokud ne → byly přidáné? ; je to pacientem? ; léčbou?
- Jsou data správně zkompenzované?
- Byla dodržena **gatovací strategie**?
- Výsledné hodnoty: fyziologický rozsah hodnot zastoupení leukocytárních subpopulací závisí na věku, k hodnocení jsou dostupné tabulky uvádějící referenční rozmezí pro dané věkové kategorie)

→ v normě - výsledky sa mohou uvolnit

→ zvýšené/snížené oproti normě? → je nutné dovyšetřit s použitím jiných MPL, případně opakovat měření, u patologických hodnot je nutné opakovat odběr v jiný den

# Vyšetření lymfocytů periferní krve

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

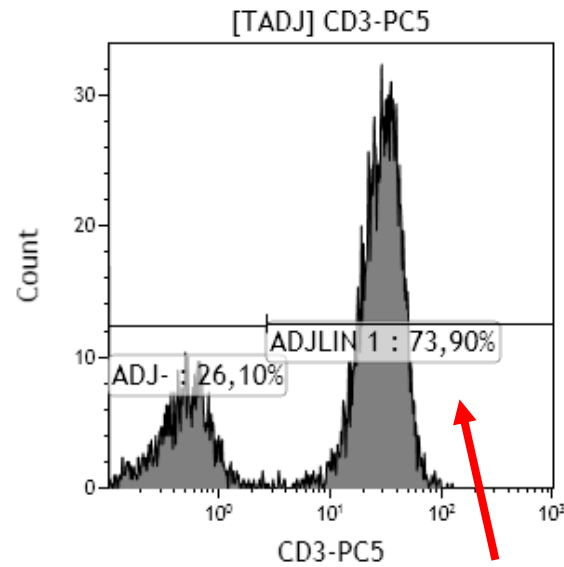
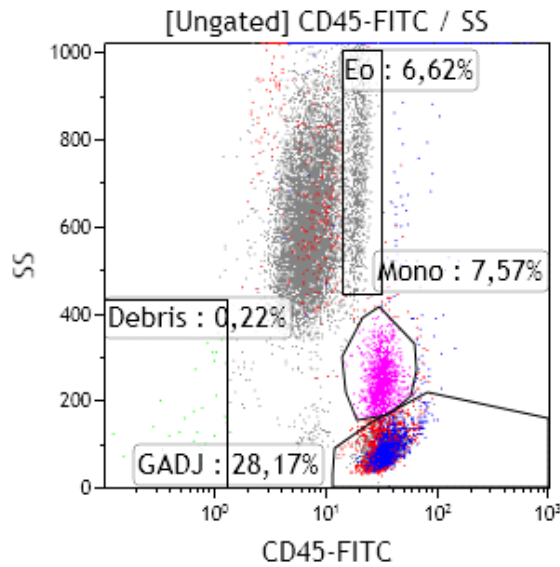
# Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

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

Obsahuje: vzorek krve + MPL (anti-CD45; anti-CD3; anti-CD4; anti-CD8)

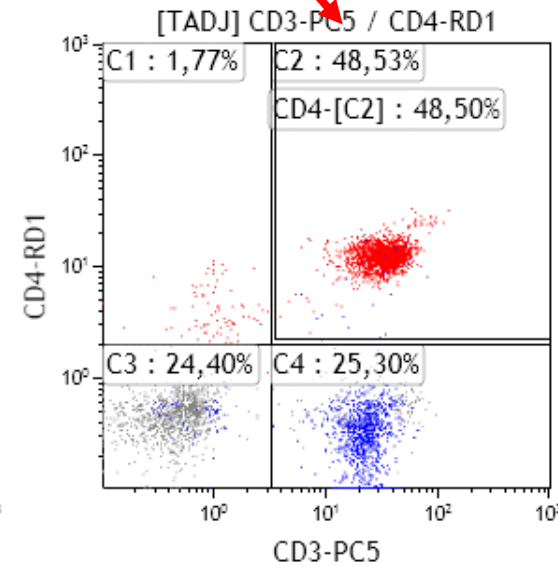
# Zkumavka A

Získáme relativní počet:

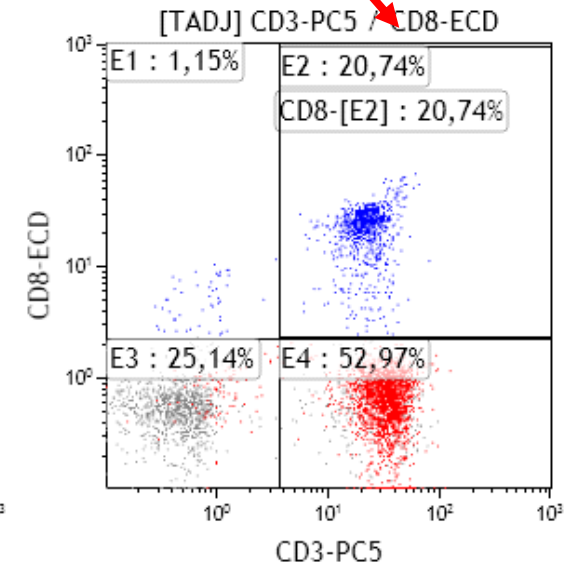


T-lymfocytů CD3+

Pomocných Th-lymfocytů  
CD3+ CD4+



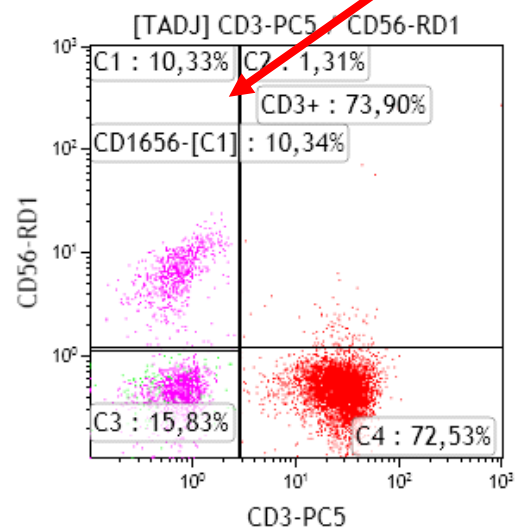
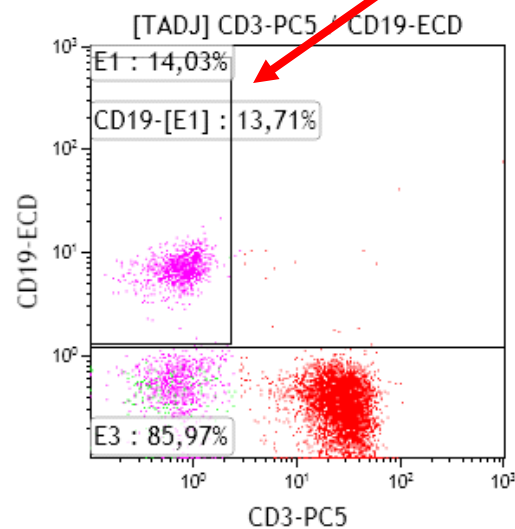
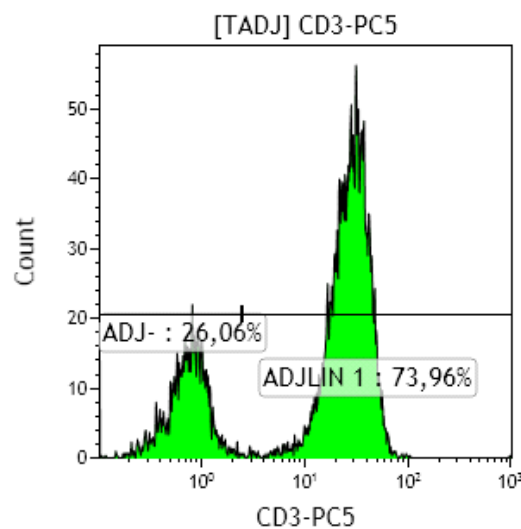
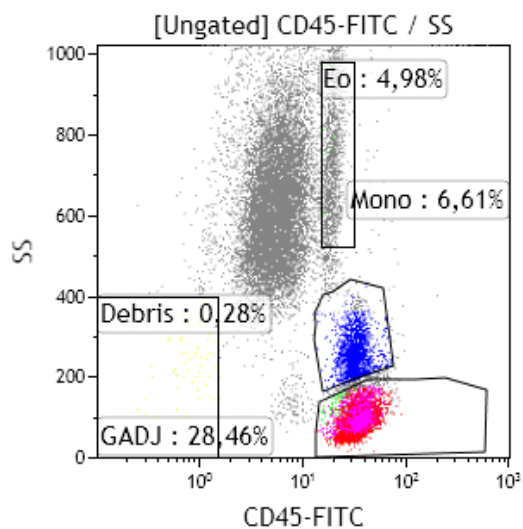
Cytotoxických Tc-lymfocytů  
CD3+ CD8+



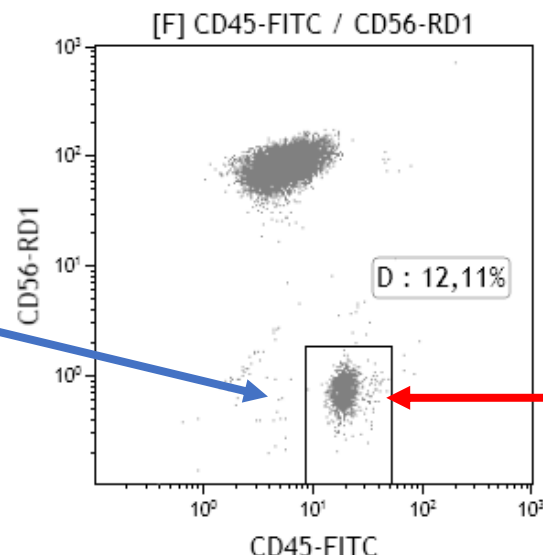
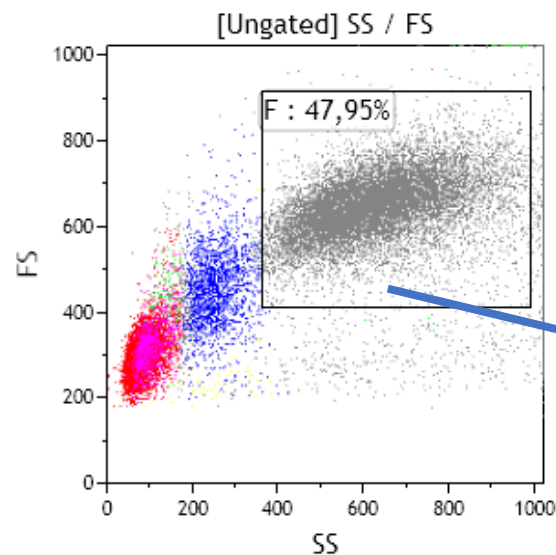
Obsahuje: vzorek krve + MPL (anti-CD45; anti-CD3; anti-CD56, anti-CD19)

# Skúmavka B

B-lymfocytov CD19+    NK buniek CD56+CD3-



Získame relatívny počet:

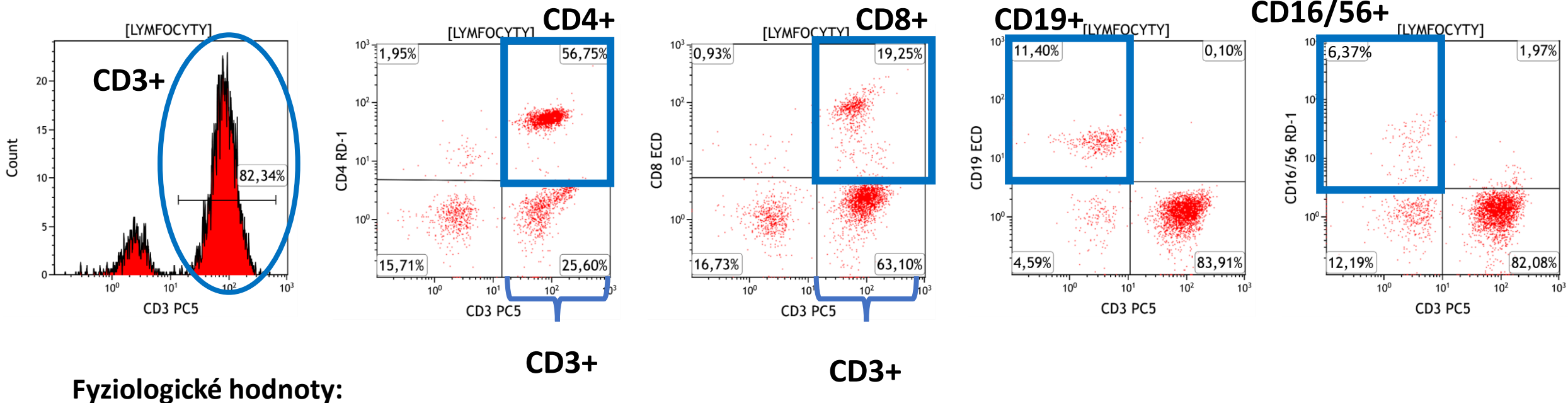


Eosinofilov

Příklady využití FACS v praxi

Základem imunologického vyšetření je krevní diferenciál a určení základních lymfocytárních subpopulací. V případě patologických hodnot je nutné měření doplnit s využitím jiných MPL a blíže charakterizovat možný patologický stav.

## Zdravá osoba



### 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)%



# Vliv infekce

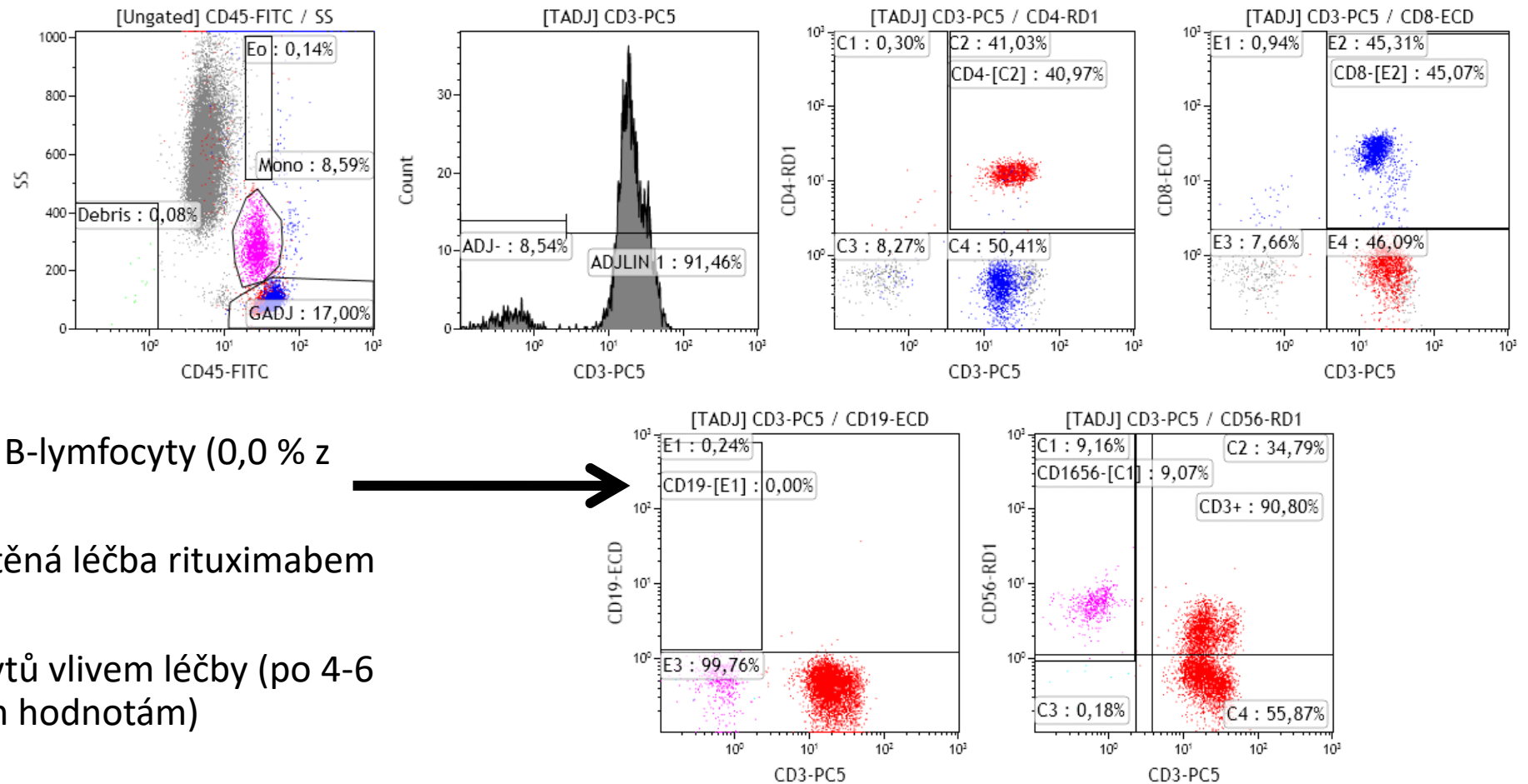
## Bakteriální infekce

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

## Virová infekce

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

# Pacientka: Ž, \*1957

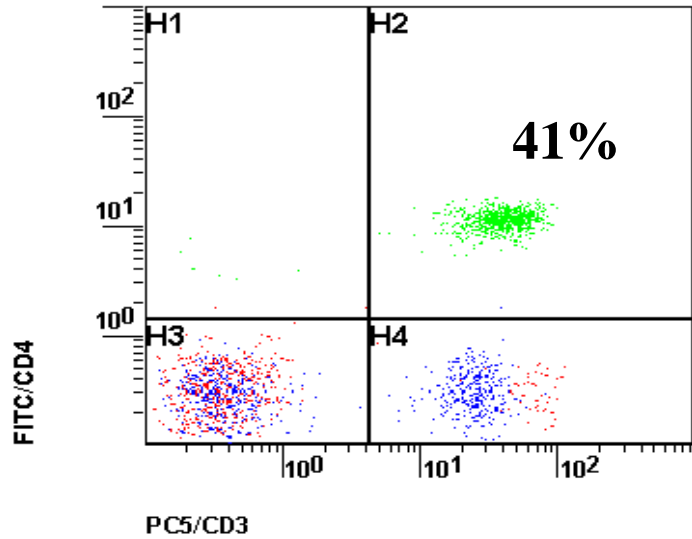


- v krevním diferenciálu chybí B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytov)
- v nemocničním systému zjištěná léčba rituximabem – pacientka revmatologie
- výsledek: deplecia B lymfocytů vlivem léčby (po 4-6 měsících návrat k normálním hodnotám)

# X-vázaná agamaglobulinémie

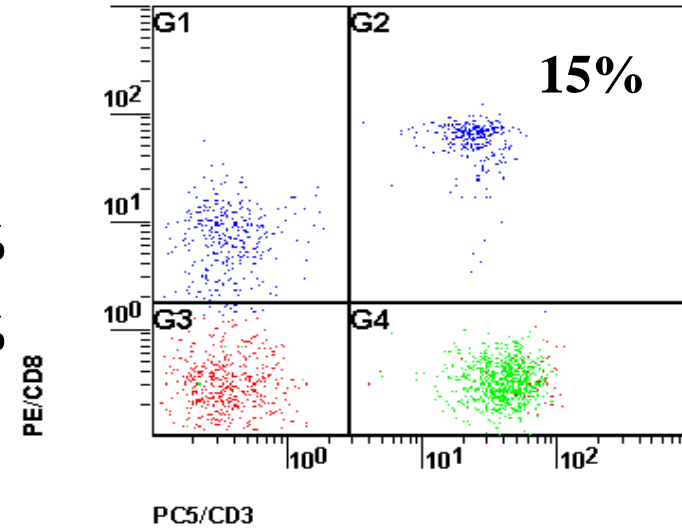
- mutace v genu kódujícím Brutonovu tyrosinkinázu – důležitá pro diferenciaci B lymfocytů
  - ženy prenašečky, manifestace u mužů
  - dochází k zastavení vývoje B lymfocytů
  - nepřítomnost B lymfocytů v krevním oběhu
- 
- v krevním diferenciálu chybí B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytů)
  - zastoupení ostatních lymfocytárních subpopulací v normě
  - výsledek:

# X-vázaná agmaglobulinémie



## T LYMFOCYTY

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

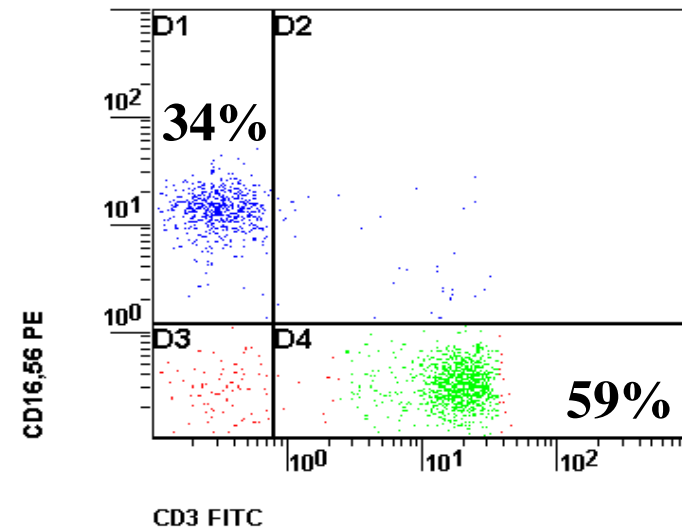
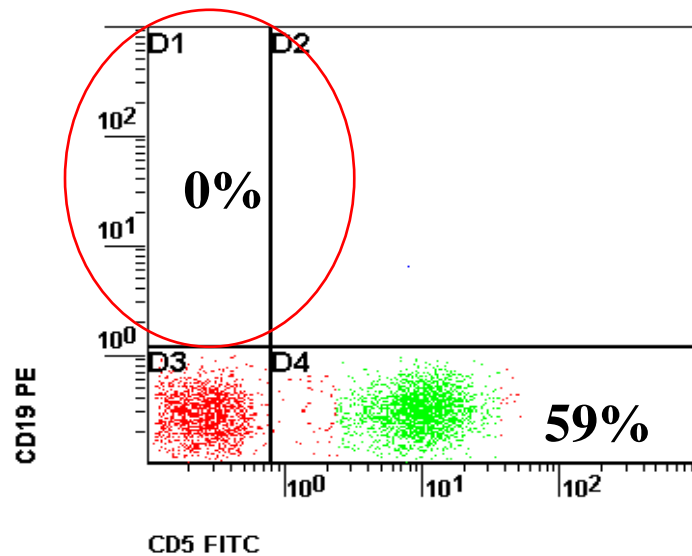


## B LYMFOCYTY

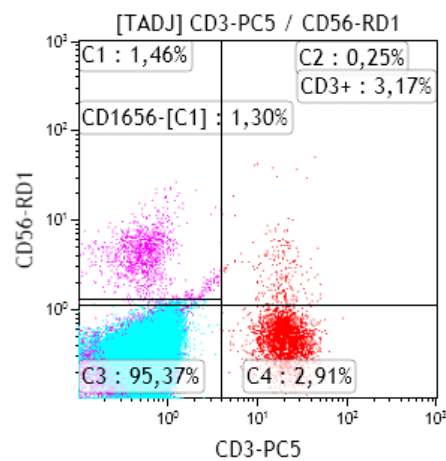
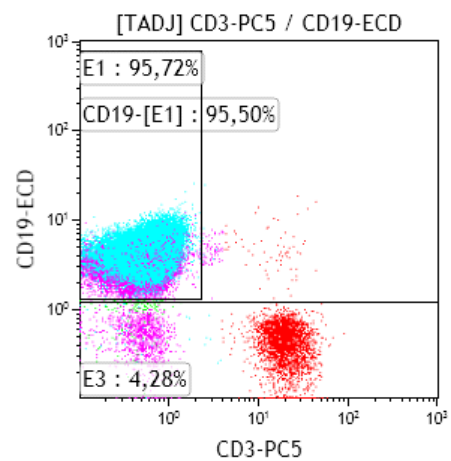
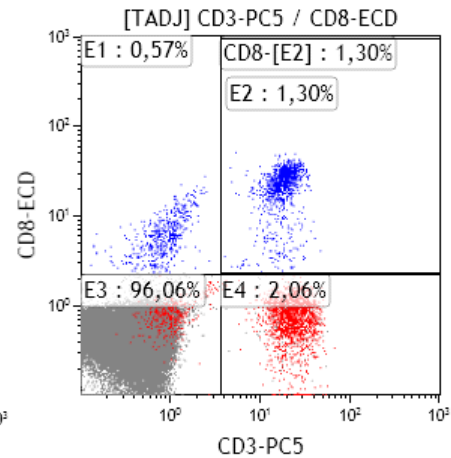
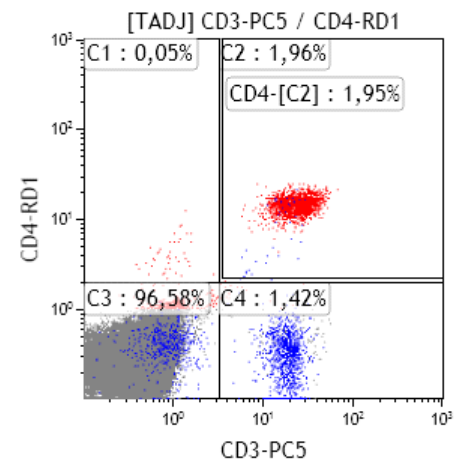
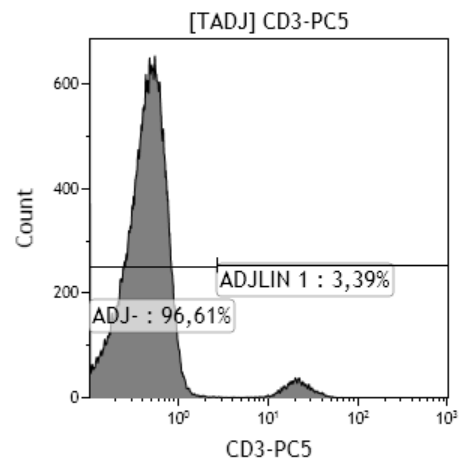
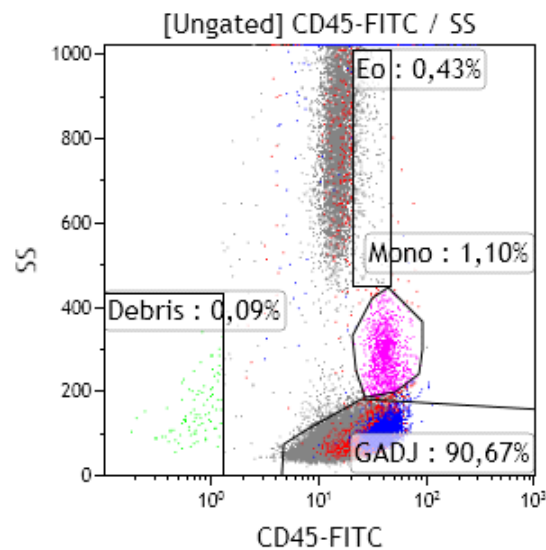
- CD19+ : 0 (7-23) %

## NK LYMFOCYTY

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



# Pacient: M, \*1966

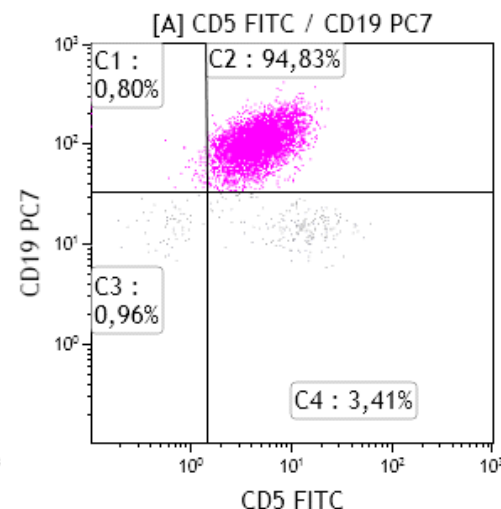
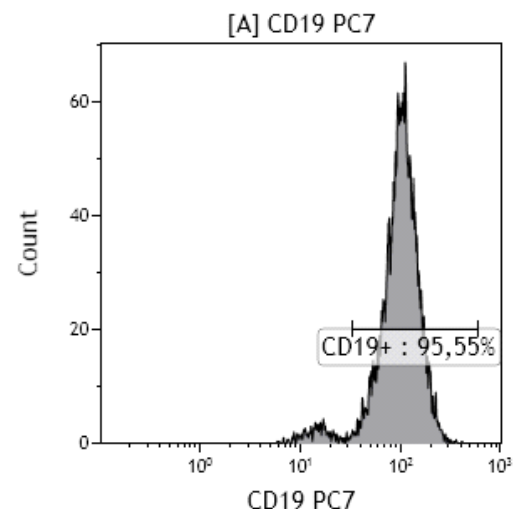
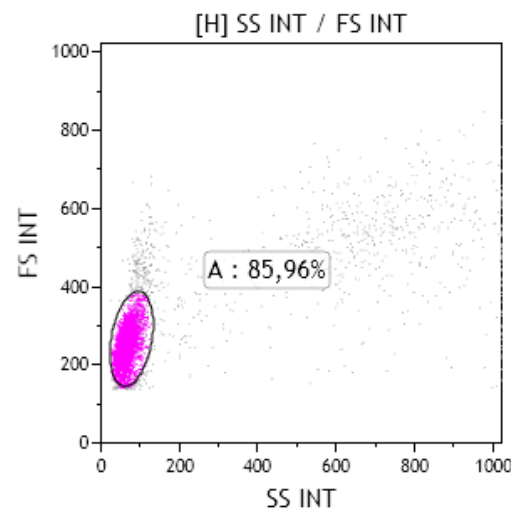


- v krevním diferenciálu vysoké B-lymfocyty (95,50 % z celkových lymfocytů)
- Prvo-záchyt: bez historie v nemocničním systému
- výsledek: podezření na leukémii
- nutné doplnit vyšetření CD5+CD19+ buněk

Pacient: M, \*1966

## Doplnění vyšetření na přítomnost CD5+CD19+ buněk

- CD5+CD19+ buňky = marker chronické lymfoproliferativní choroby
- u zdravé osoby se znak CD5 vyskytuje na T-lymfocytech, normální hodnoty CD5+ na B-lymfocytech u zdravého dospělého člověka: do 10% ze všech B-lymfocytů



**CD5+CD19+ : 94.8%**

Vzorka: periferní krev odebraná do EDTA

Značení MPL:

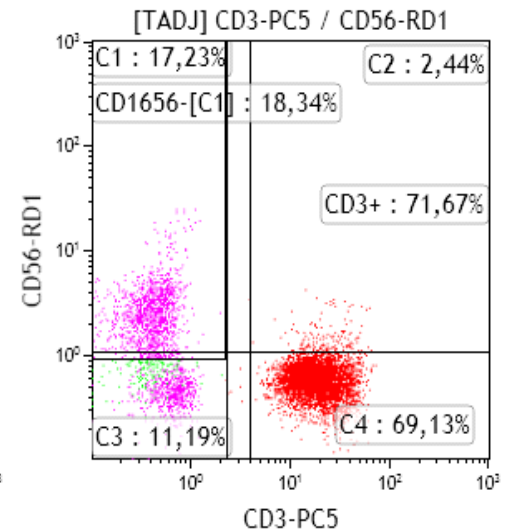
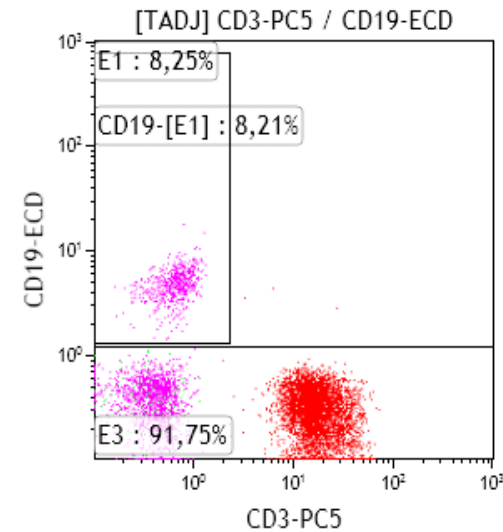
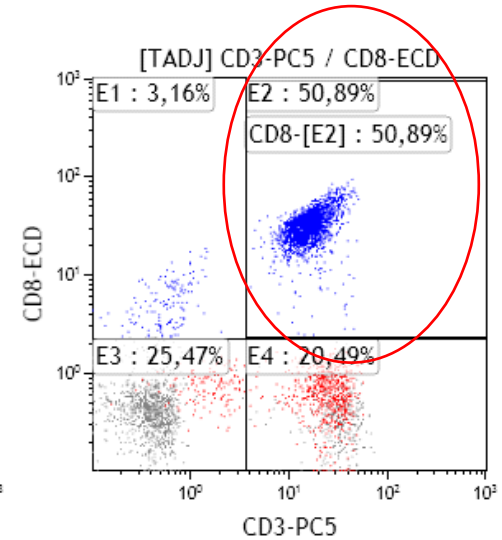
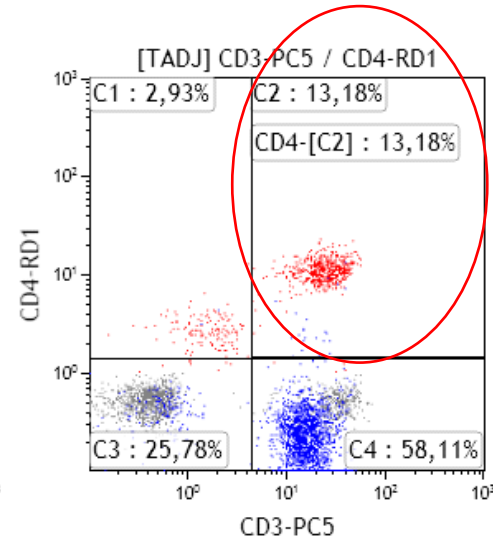
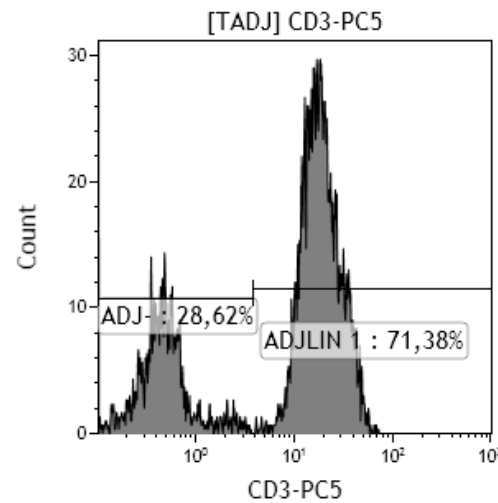
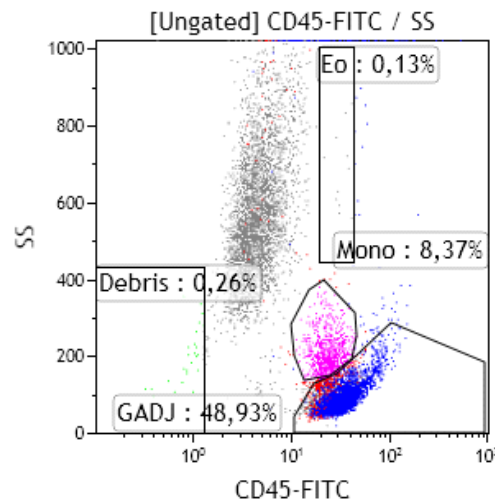
CD45 KO - panleukocytární znak

CD19 PC7- B-lymfocyty

CD5 FITC

Výsledek: vysoký počet CD5+CD19+ = doporučení na hematoonkologické vyšetření

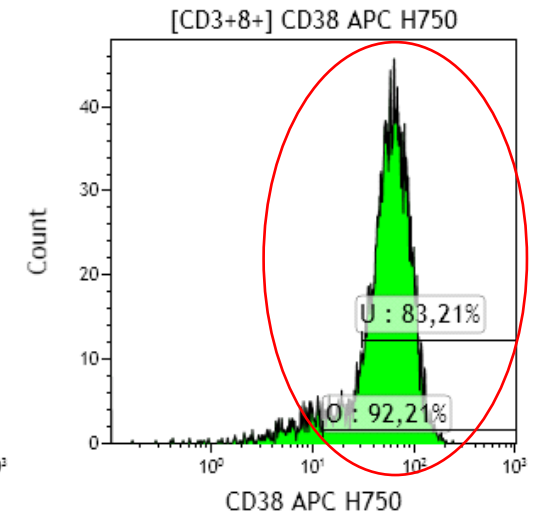
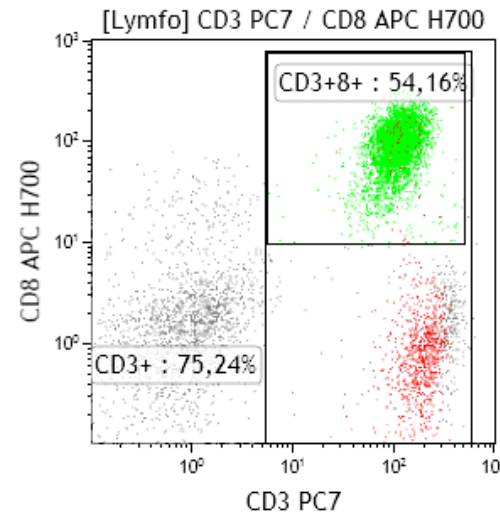
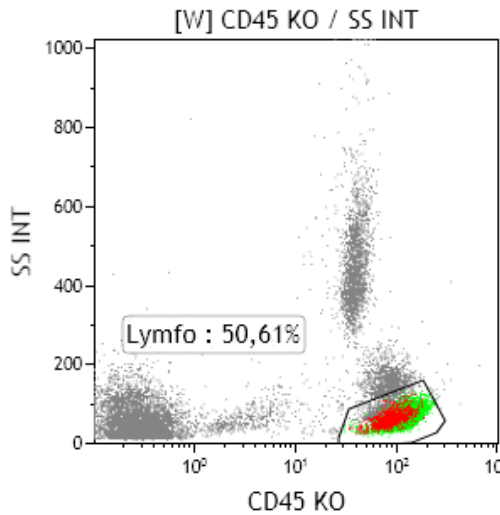
# Pacient: M, \*1999



- v krvním diferenciálu zjištěný obrácený poměr CD3+**CD4+** k CD3+**CD8+** (**13,2 : 50,9**)
- Fyziologické hodnoty: poměr CD3+CD4+ > CD3+CD8+
- Prvo-záchyt: bez historie v nemocničním systému
- výsledek: podezření na virovou infekci (často EBV, CMV)
- nutné doplnit vyšetření CD8+CD38+ buněk

# Pacient: M, \*1999

Doplnění vyšetření na přítomnost zvýšené exprese znaku CD38 na CD3+CD8+ T-lymfocytech



- CD8+CD38+ buňky = marker virových infekcí
- u zdravé osoby je zastoupení CD8+CD38+ T- buněk nízké, u virových infekcí se zvyšuje, patologické hodnoty = ???
- hodnoty vyšší než 50% CD8+CD38+ T-buněk z celkových CD3+CD8+ T-buněk nutně výsledkem hlásit ošetřujícímu lékaři

Vzorek: periferní krev odebraná do EDTA

Značení MPL:

CD45 KO- panleukocytární znak

CD3 PC7- T-lymfocyty

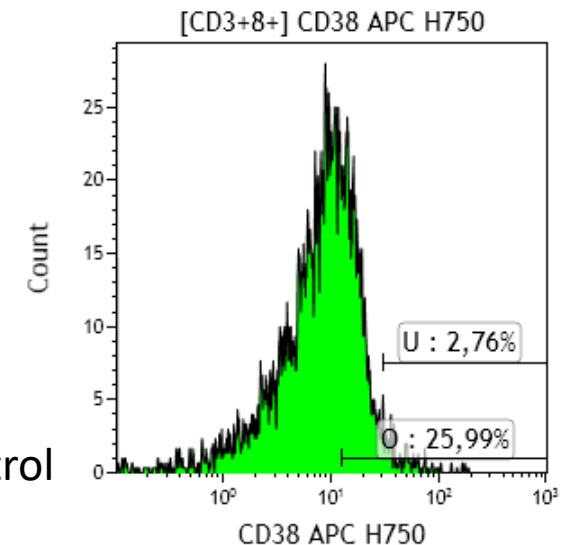
CD8 APC H700 – cytotoxické T-lymfocyty

CD38 APC H750 – aktivační znak T-lymfocytů

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

**Výsledek:** vysoký počet CD8+CD38+ T-lymfocytů = možná např. EBV infekce (mononukleóza), doporučeno mikrobiologické vyšetření

Fyziologický obraz  
Nastavení polohy gatů je fixní-  
nastavené podle zdravých kontrol





# 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 mykobakteriózy, 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-NK+:** 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+NK-:** 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 – Těžký kombinovaný imunodeficit

Příklad pacienta se SCID

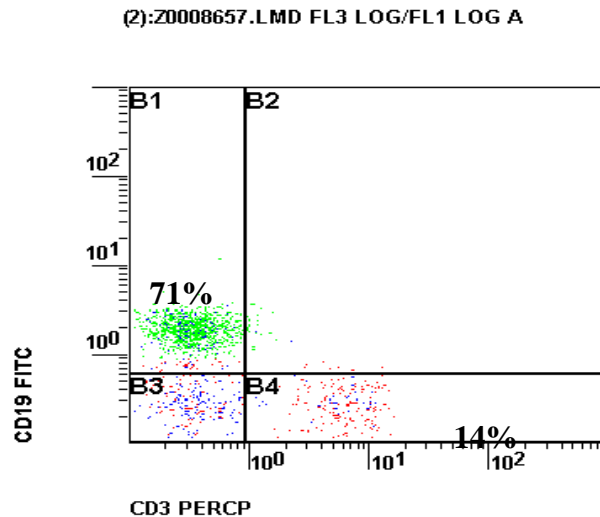
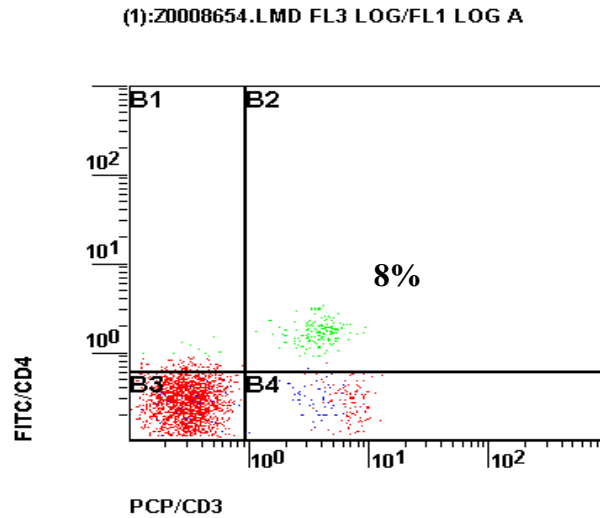
- záchyt u novorozenců a dětí
- nízký absolutní počet leukocytů a lymfocytů, v podstatě chybí CD3+ T-lymfocyty, počet B-lymfocytů a NK buněk může být také snížený

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

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

Nízký počet leukocytů i lymfocytů vzhledem k věku pacienta

# SCID



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

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

## T LYMFOCYTY

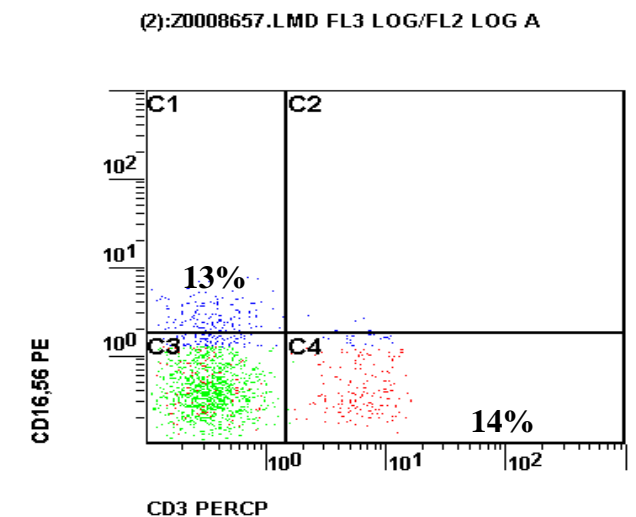
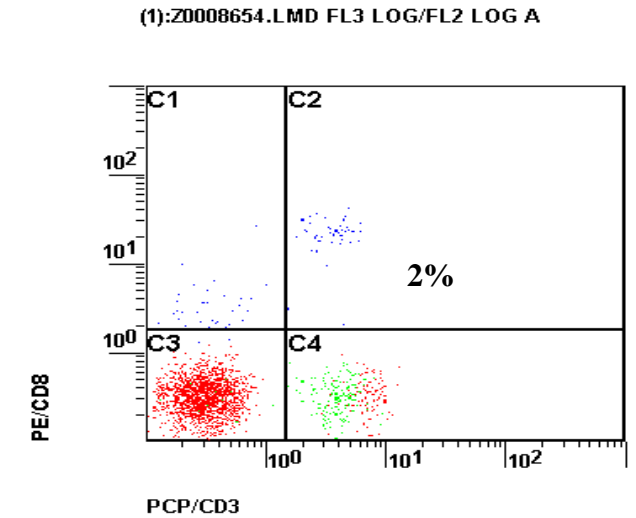
- CD3+ : 14 (58-85)%
- CD3+ 4+: 8 (30-60)%
- CD3+ 8+: 2 (15-35)%

## B LYMFOCYTY

- CD19+ : 71 (7-23) %

## NK LYMFOCYTY

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



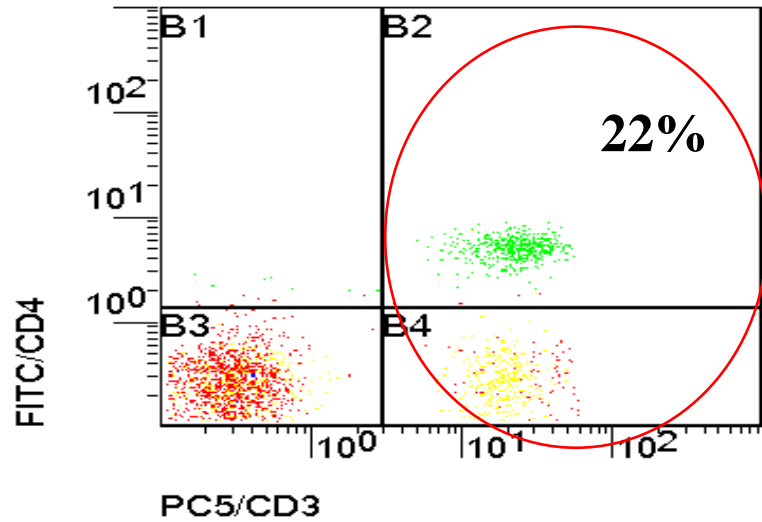
## Výsledek: T-B+NK+ SCID

- všechny T-lymfocyty byly mateřské, aktivované, rozpoznávají HLA antigeny kojence jako „cizí“
- možné doplnit funkční test proliferace T-lymfocytů; dítě je směřované k transplantaci kostní dřeně

# DiGeorgův syndrom

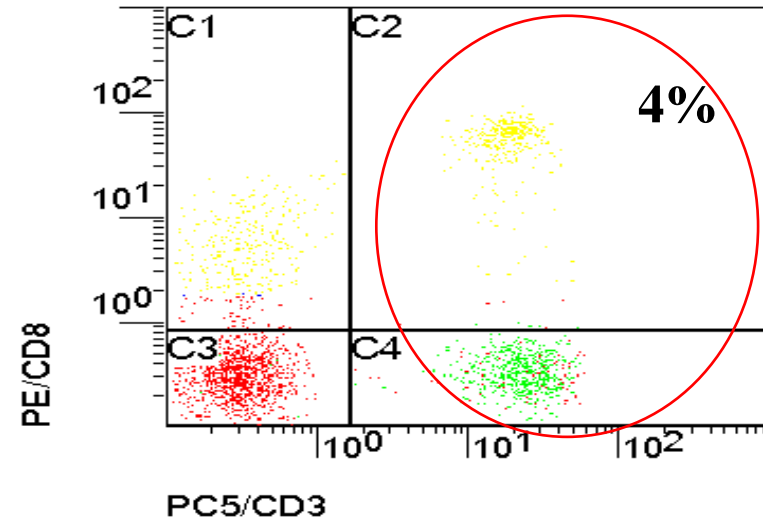
- embryonální porucha – narušení vývoje v oblasti 3. a 4. žaberního oblouku
  - abnormality v arteriálním oběhu, srdci, jícnu a čelistech
  - porucha vo vývoji thymu – snížené zastoupení T lymfocytů
- 
- v krvním diferenciálu výrazně snížené T-lymfocyty (pomocné CD4+ i cytotoxické CD8+)
  - zastoupení ostatních lymfocytárních subpopulací v normě

# Krevní diferenciál: DiGeorgův syndrom



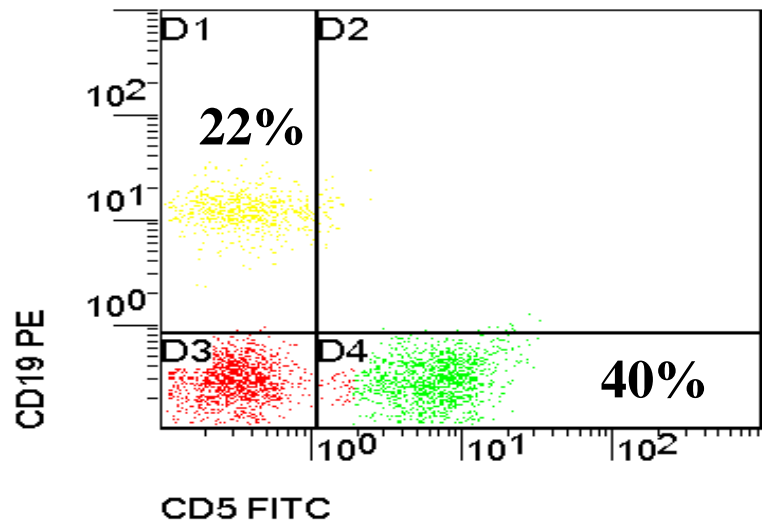
## T LYMFOCYTY

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



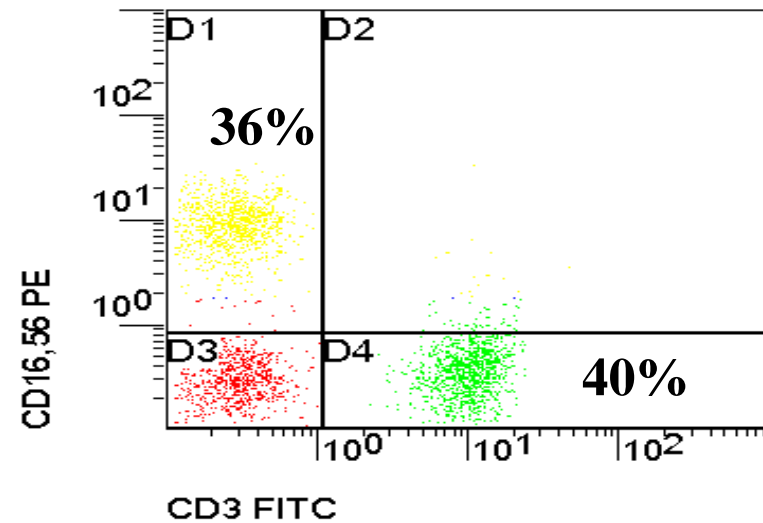
## B LYMFOCYTY

- CD19+ : 22 (7-23) %



## NK LYMFOCYTY

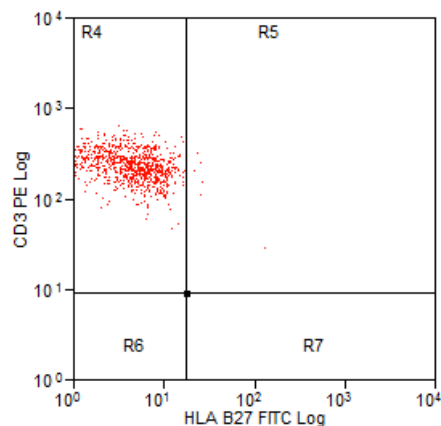
- CD16,56+ : 36 (6-20)%



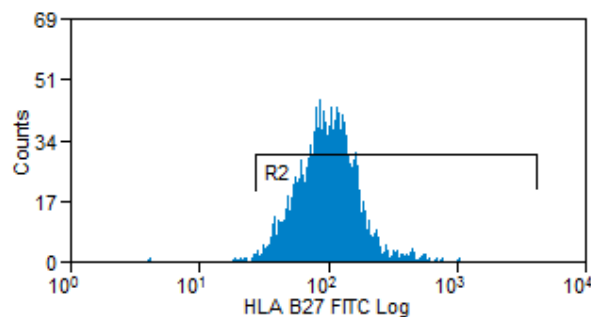
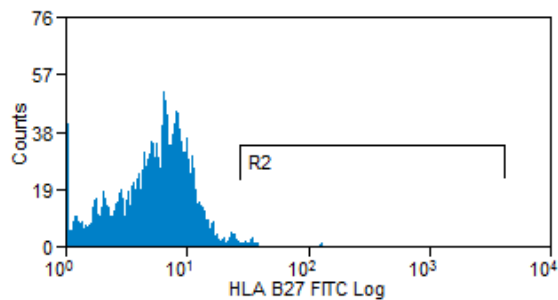
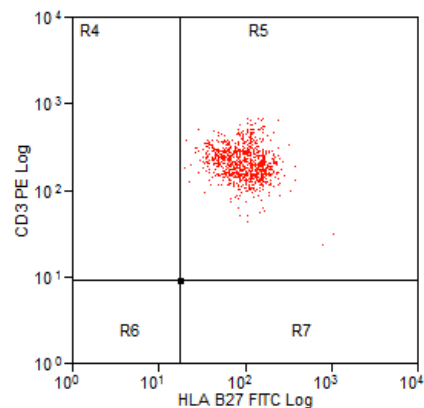
# HLA-B27

Znak HLA-B27 je asociovaný s řadou zánětlivých onemocnění jako zánět kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, noh a šlach, dále psoriázou, chronickými bolestmi spodní částmi zad a spondyloarthropatiou - najznámější je ankylozující spondylitida (zánětlivé systémové onemocnění páteře a kloubů – **Bechtěrevova choroba**)

negativní



pozitivní



Vyšetření HLA-B27 není doplňujícím měřením ke krvnímu diferenciálu, je to samostatné měření

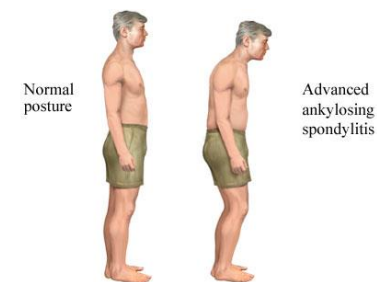
Vzorek: periferní krev odebraná do EDTA

Značení MPL:

CD3 PE- T-lymfocyty

HLA-B27 FITC

**Výsledek:** cytometrické vyšetření HLA-B27 je jen screeningová metoda, pozitivní výsledek je třeba confirmovat metodou PCR



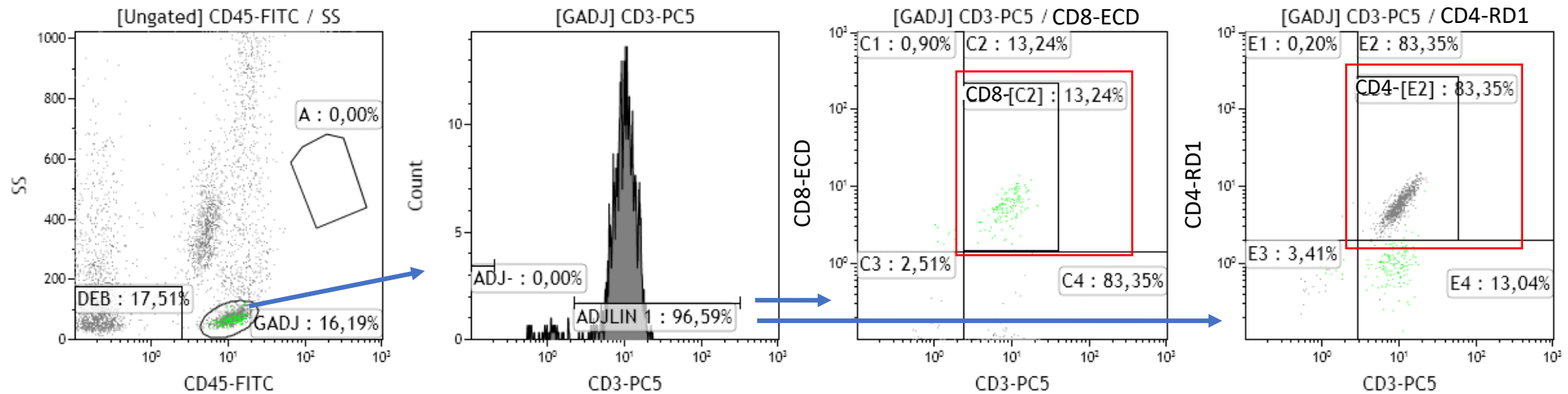
# Bronchoalveolární laváž - BAL

- diagnostické bronchoskopické vyšetření
  - pacientovi se do bronchu (větve bronchu) pomocí fibrobronchoskopu aplikuje a následně zpět aspiruje 150-200 ml fyziologického roztoku
  - sleduje se procentuální zastoupení jednotlivých typů leukocytů
  - indikuje se u zánětlivých plicních onemocnění, nádorových onemocnění, intersticiálních plicních procesech, pneumokoniózách
- 
- vzorek: bronchoalveolární tekutina
  - zpracování:
    - filtrace vzorku kvůli případnému obsahu nečistot, promytí, značení MPL:
      - CD45 FITC – panleukocytární znak
      - CD3 PC5 – T-lymfocyty
      - CD4 RD1 – Th- lymfocyty
      - CD8 ECD – Tc-lymfocyty

**Pozn. Vzorek BAL nesmí obsahovat krev.**

V krvi je jiné zastoupení lymfocytárních subpopulací než v BAL, v případě kontaminace BAL krví není možné rozpoznat, které lymfocyty pocházejí z krve a které z BAL, což vede ke zkresleným výsledkům.

# Bronchoalveolární laváž - BAL



- Diagnosticky důležitý je poměr CD3+**CD4+** k CD3+**CD8+** T-lymfocytů (= imunoregulační index)
- Fyziologické hodnoty: poměr CD3+CD4+/CD3+CD8+ = 1,1 až 3,5
- Patologické hodnoty:
  - výrazná převaha pomocných CD4+ T-lymfocytů = podezření např. na **sarkoidózu**, pneumónii, nádory dýchacích cest,...
  - převaha cytotoxických CD8+ T-lymfocytů = podezření na hypersenzitivnu pneumonitídu,...

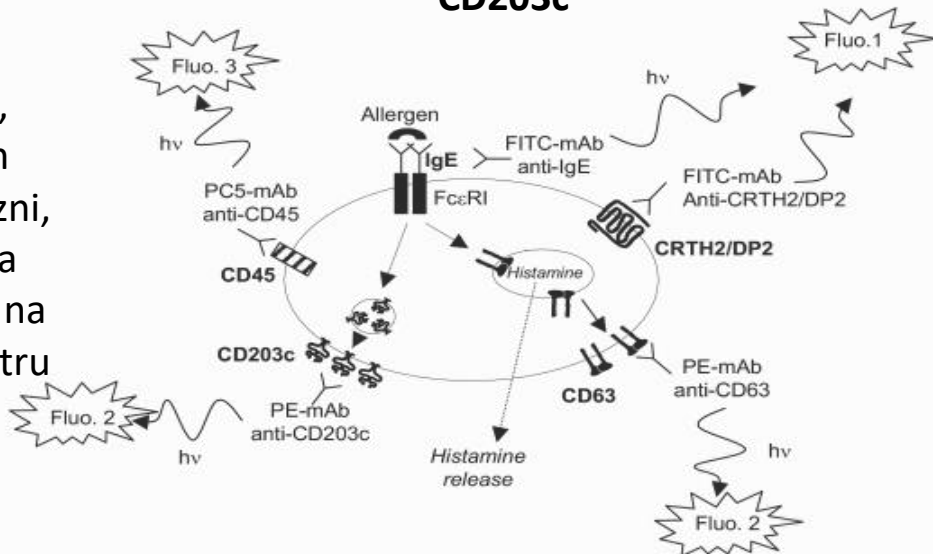


# Využití průtokové cytometrie v alergologii

## 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**)  
**CD203c**



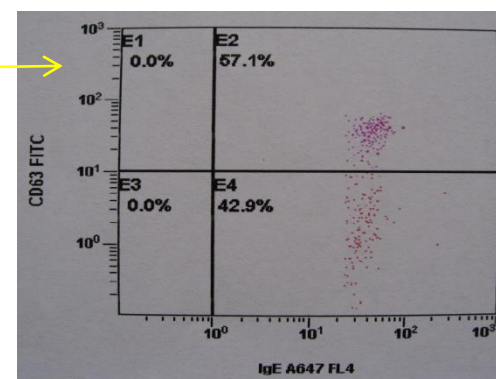
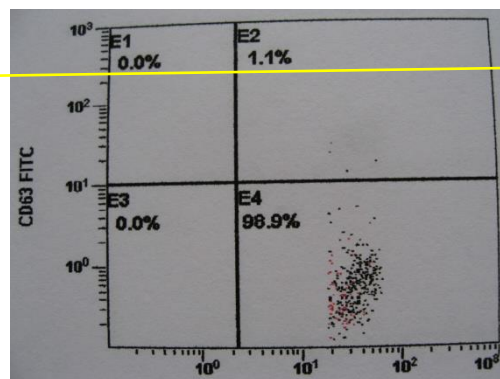
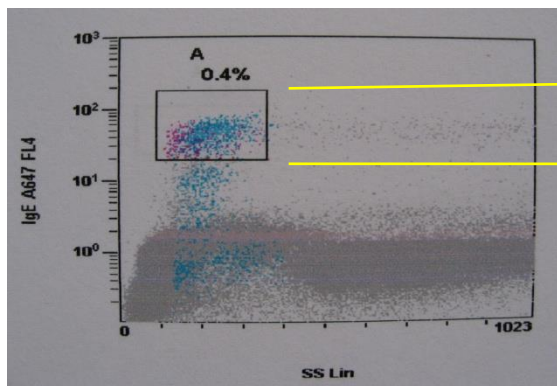
Vyšetření periferní heparinizované krve, stimulace alergenem při 37 °C ve vodní lázni, zastavení reakce, lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

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.

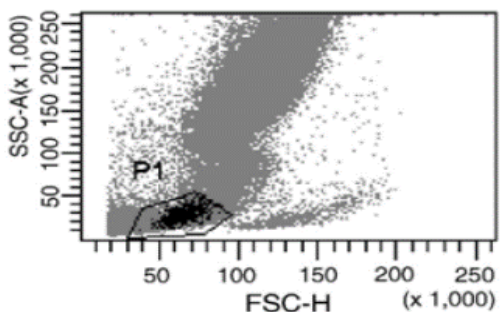
ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)  
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)

Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů

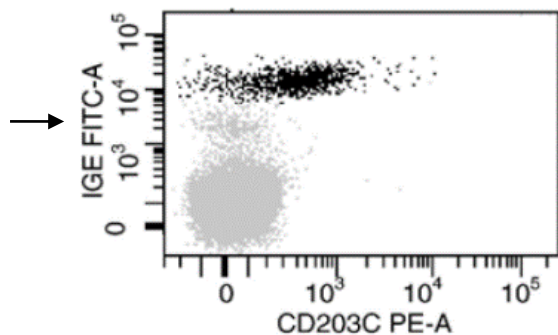


# Test aktivace bazofilů – gatovací strategie

(Pacient alergický na kočku – alergen *Fel*)



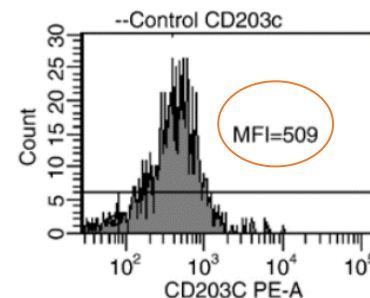
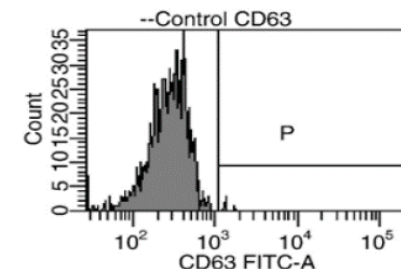
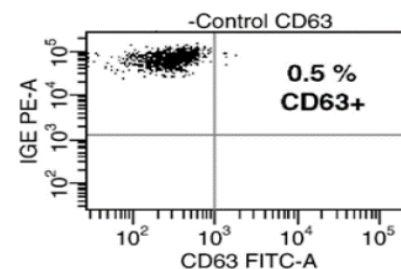
1. Na Forward scatteru a Side scatteru gatovány lymfocyty



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

