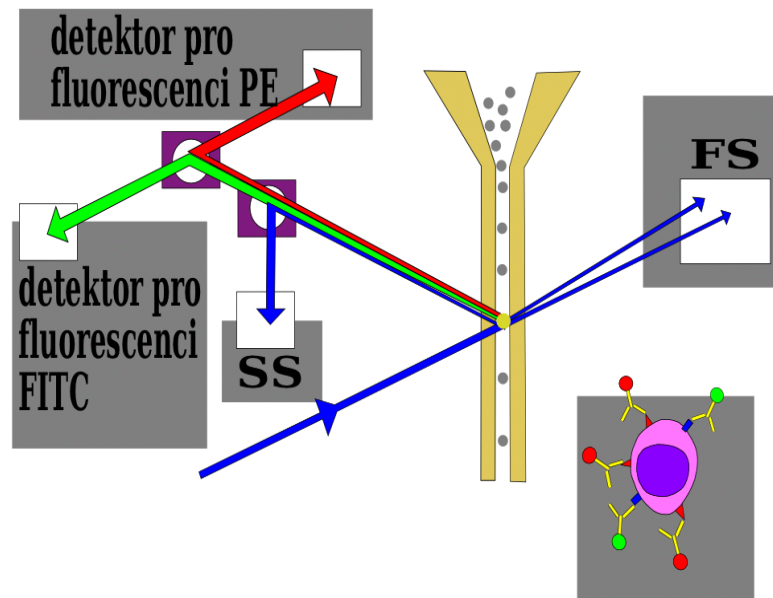


Průtoková cytometrie

Flow Cytometry



PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

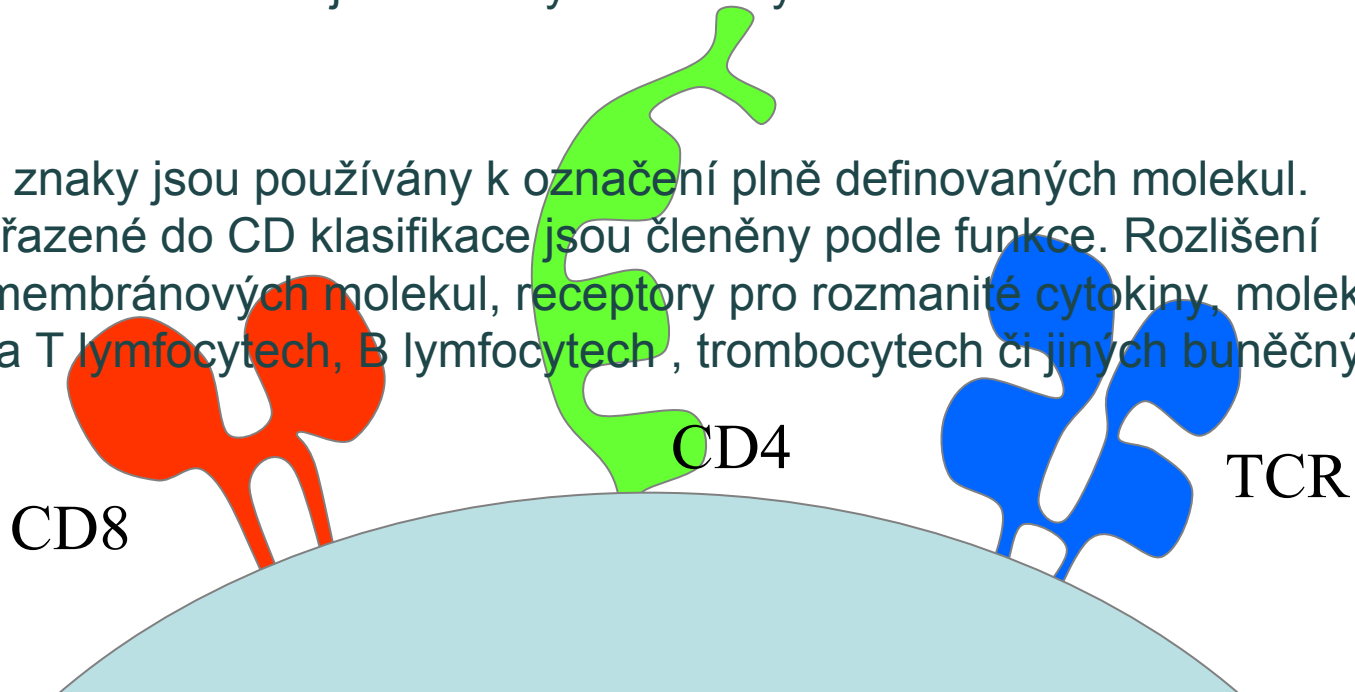
(fluorescenční metoda)

- Měření fyzikálně-chemických vlastností buněk během jejich průchodu laserovým paprskem
- Nejčastěji imunofenotypizace krevních leukocytů a buněk kostní dřeně
(povrchové znaky i intracelulární)
- Standardní metoda analýzy částic (většinou buněk) v suspenzi
- Rychlá, přesná a reprodukovatelná metoda, umožňuje současné měření několika parametrů na velkém množství částic



Cluster of Differentiation

- **buňky exprimují (vystavují) na svém povrchu různé specifické molekuly – znaky, které můžeme uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav diferenciaci jednotlivé buňky a její aktivace**
- **CD klasifikace:** znak definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou je zařazen do skupiny diferenciačních CD znaků a označen číslem (CD1, CD2, CD3,...). V současné době je na lidských leukocytech charakterizováno více než 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.



Znak:

buněčná populace:

CD3

T-lymfocyty

CD4, CD8

CD19, CD20, CD21

B-lymfocyty

CD16/CD56

NK buňky

CD14/DR

Monocyty

HLA-DR; CD25; CD69

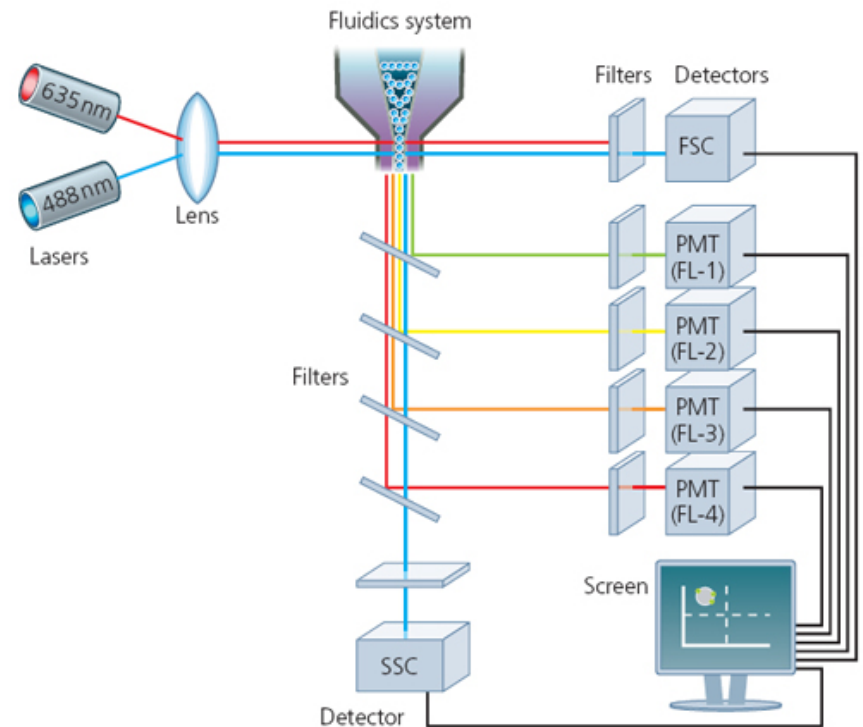
Aktivační znaky

Průtokový cytometr

1. FLUIDNÍ SYSTÉM

2. OPTIKA

3. ELEKTRONIKA

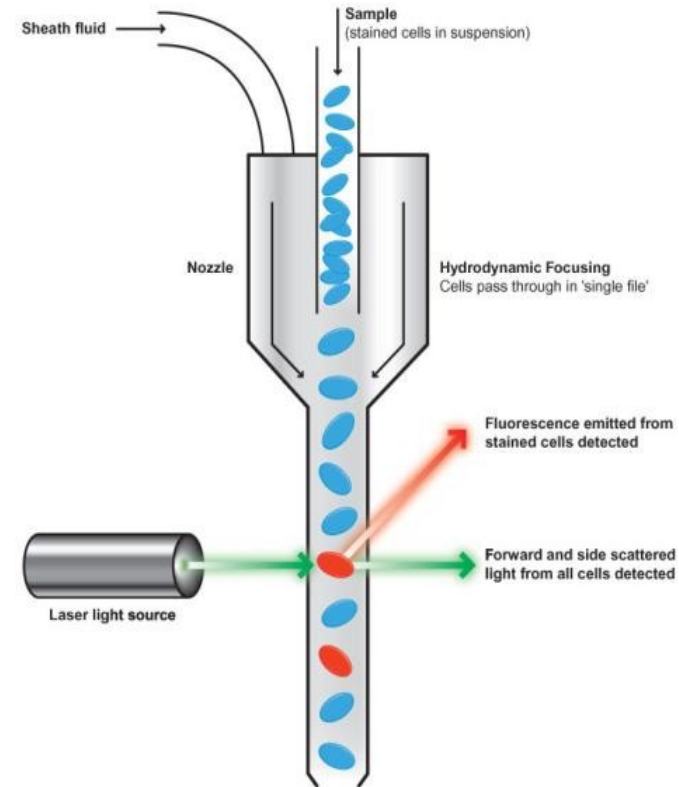


1. FLUIDNÍ SYSTÉM

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

(na základě hydrodynamické fokusace - nosná tekutina

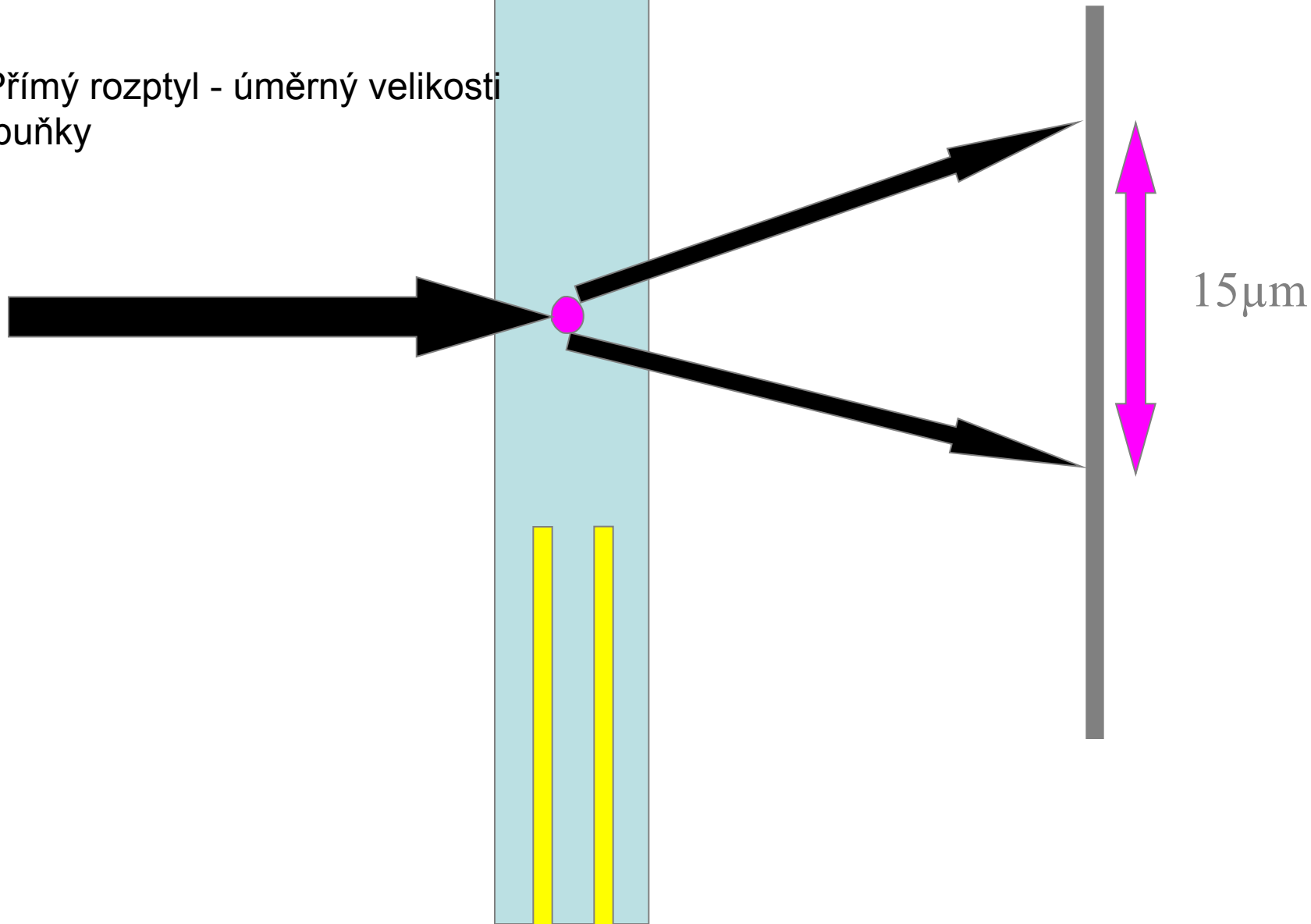
(destil. voda, komerční tekutiny) bývá do komory přinášena tenkou
Kapilárou pod větším tlakem než suspenze částic, které jsou tak
udržovány jen v úzké centrální části proudu. Zrychlení vznikající při
výstupu vodního paprsku z komůrky nutí částice pohybovat se jedna
za druhou.



<http://withfriendship.com/user/mithunss/flow-cytometry.php>

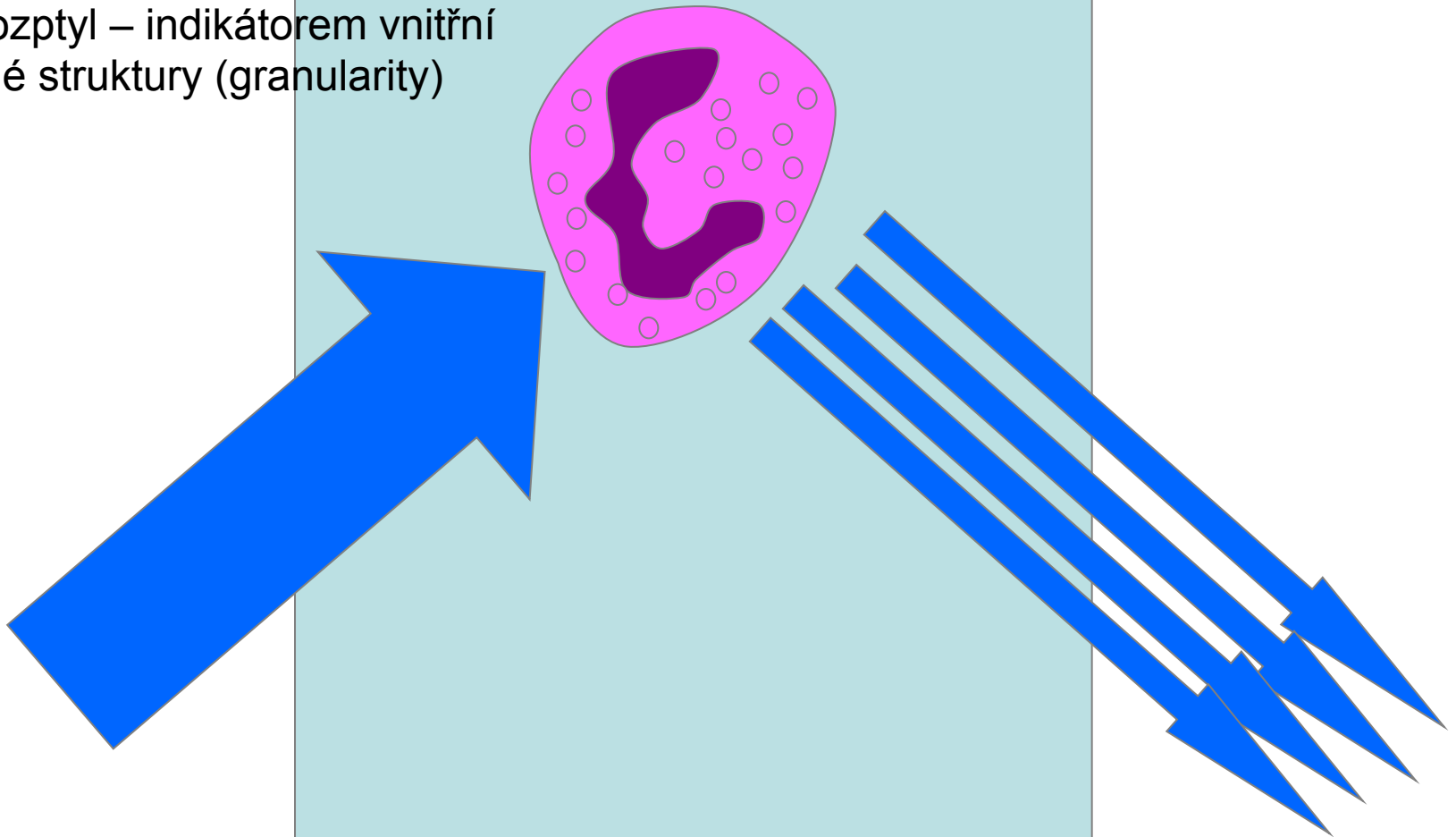
Velikost buněk: Forward Scatter

Přímý rozptyl - úměrný velikosti
buňky



Granularita buněk: Side Scatter

Boční rozptyl – indikátorem vnitřní buněčné struktury (granularity)

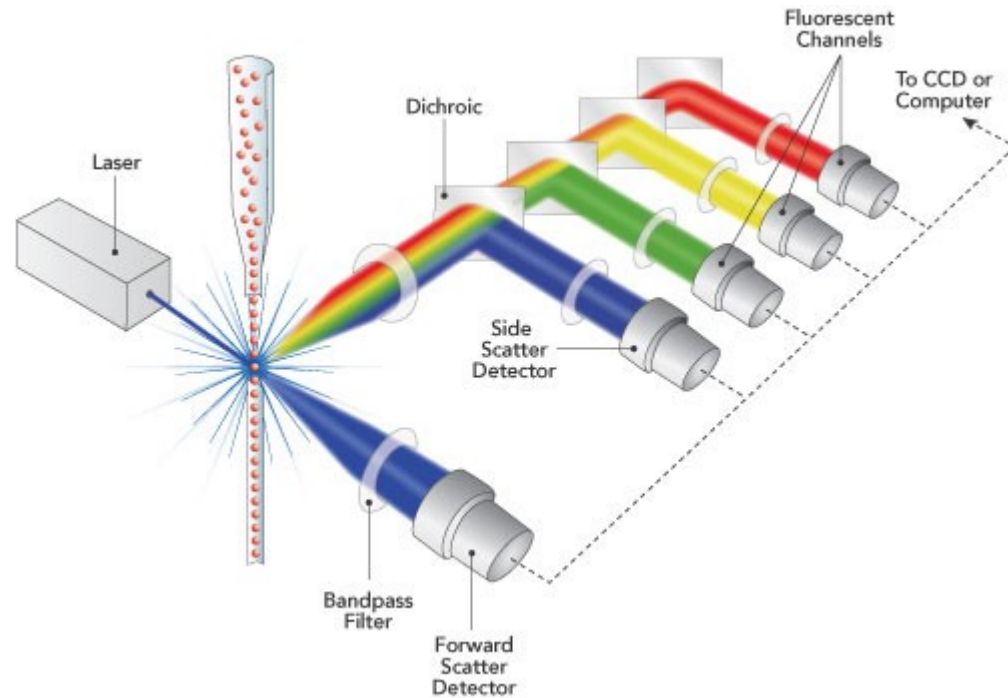


2. OPTIKA

Excitační část – laser

Sběrná část – systém čoček, zrcadel a optických filtrů zachycující fluorescenci částic

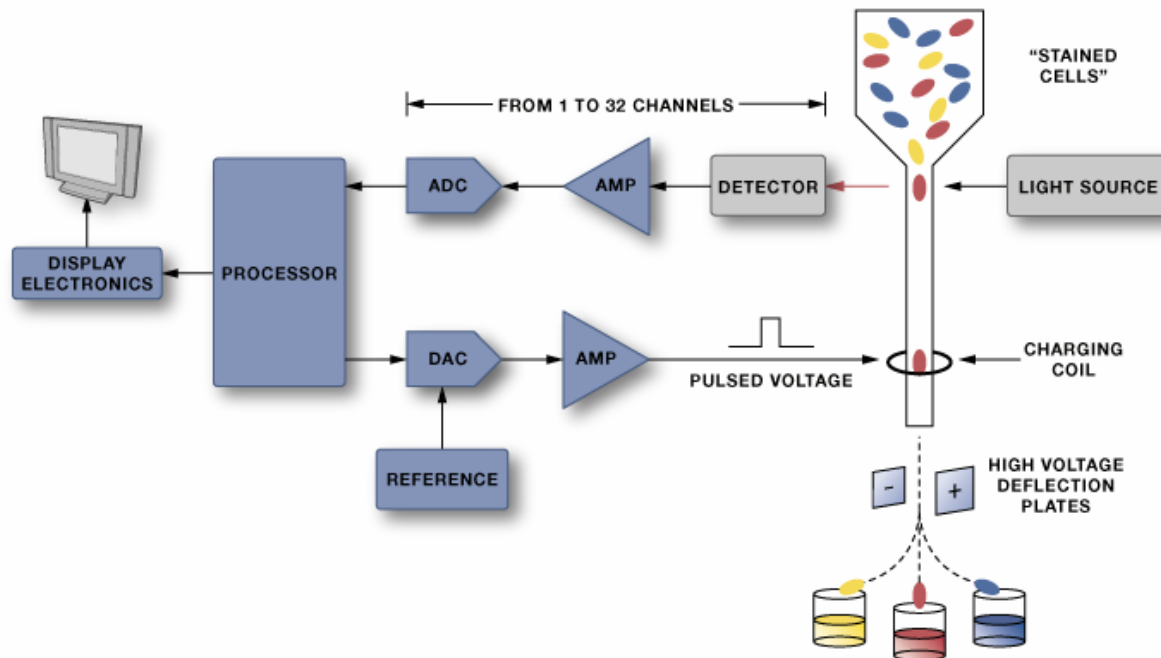
vyzářenou po jejich projití světelným paprskem



3. ELEKTRONIKA

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

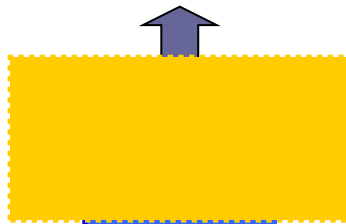
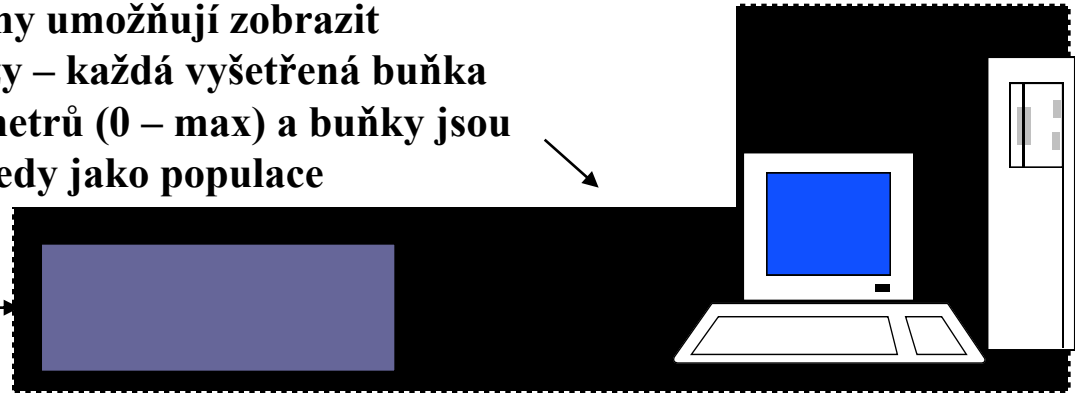
Po zesílení signálu a dalším zpracování dojde k jeho digitalizaci pro počítačovou analýzu



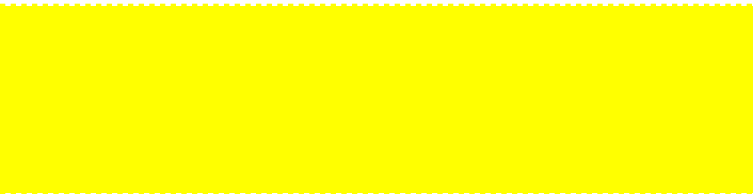
Průtokový cytometr

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

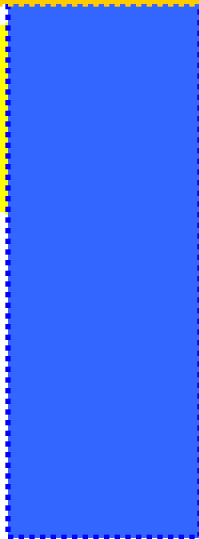
(Opto)elektronika převádí optický signál na elektrický, ten zpracovává a údaje jsou posílány do počítače



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



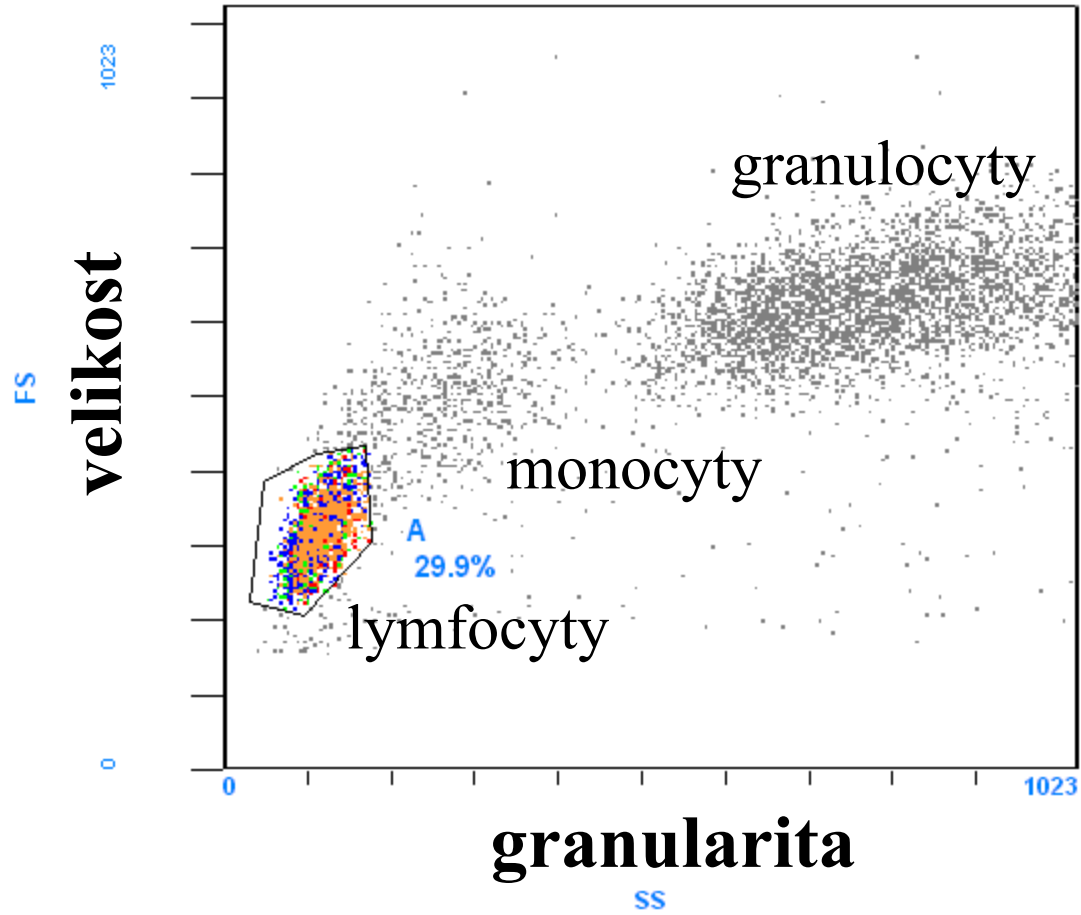
Excitační optika (lasery, světlovodná vlákna, zaostřovací a tvarovací prvky) přivádí budící záření do komory



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

Zkumavka se suspenzí buněk

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



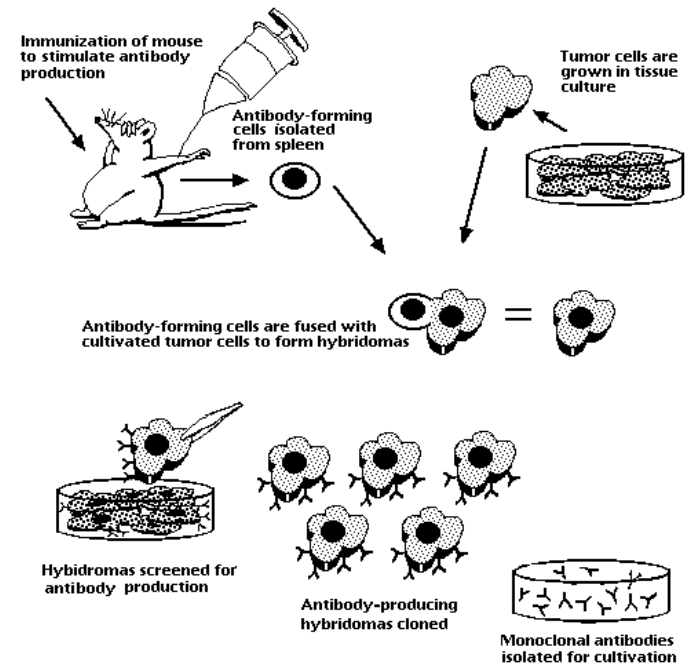
POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

- protilátky vznikající při přirozené odpovědi imunity na antigen jsou polyklonální.
- jsou zaměřené proti různým epitopům antigenu a tvořeny mnoha klony B lymfocytů - na rozdíl od monoklonálních nejsou zcela totožné

MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

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

Monoclonal Antibody Production



Fluorescence

Fluorochromy:

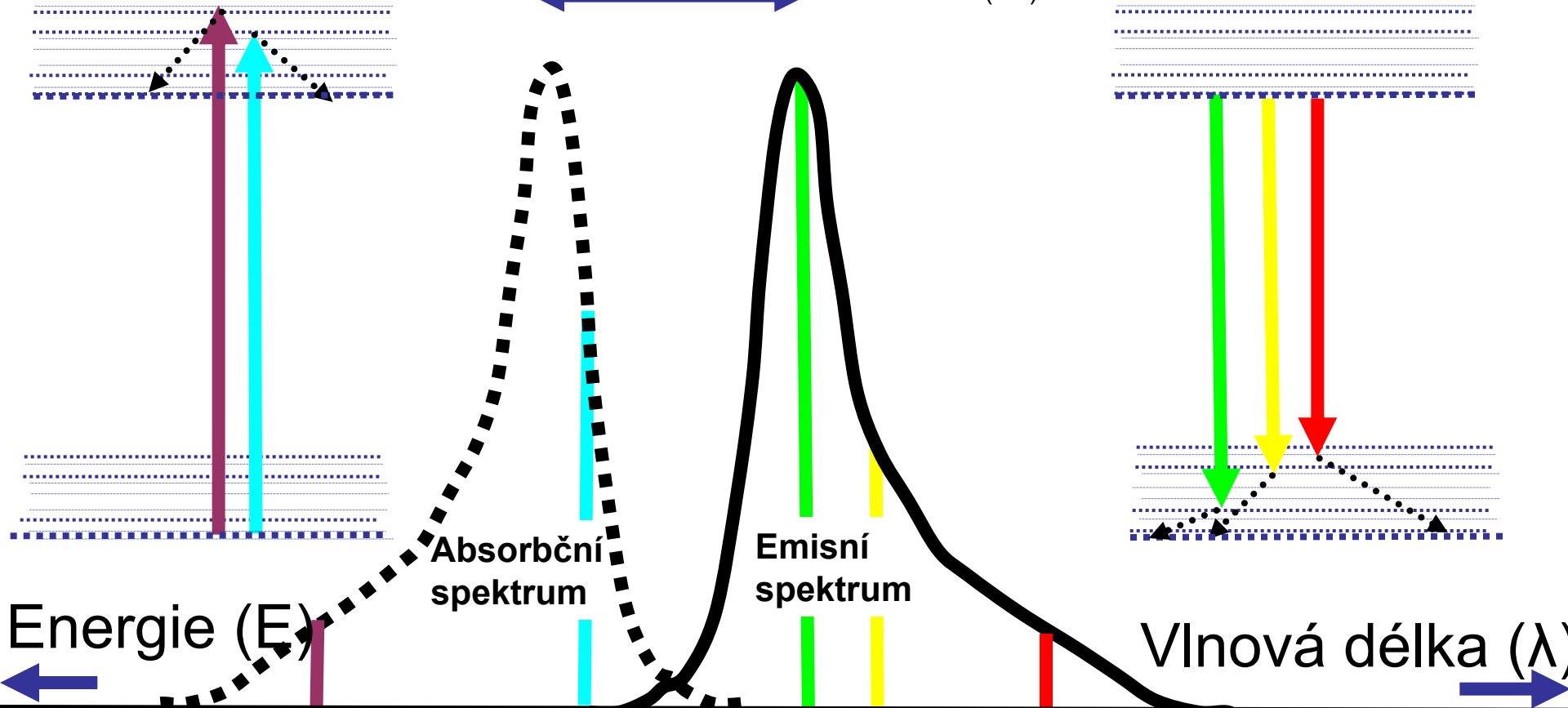
- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
FITC, Cyaniny, Texas Red, řada Alexa, řada Pacific and Cascade,
AmCyan, *Propidium iodide*, 7-AAD, CFSE,
- Fluorescenční proteiny
Phycoerythrins (B, R), Allophycocyanin, PerCP,
GFP a jiné fluorescenční proteiny

***Schopné absorbovat fotony budícího záření (např. 488 nm)
a následně (10^{-8} s) emitovat fotony s
delší vlnovou délkou (v tomto případě 500 – 800 nm).
Fluorescenční světlo má tedy jinou barvu***

Fluorescence

Barva pohlceného a vyzářeného světla se liší

Stokesův posuv - rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima (nm)

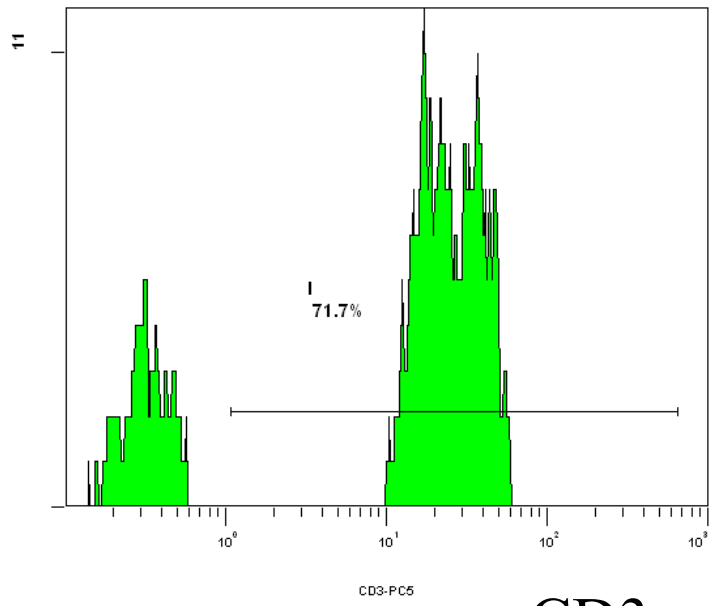


Část energie se přemění na energii vibrační

Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

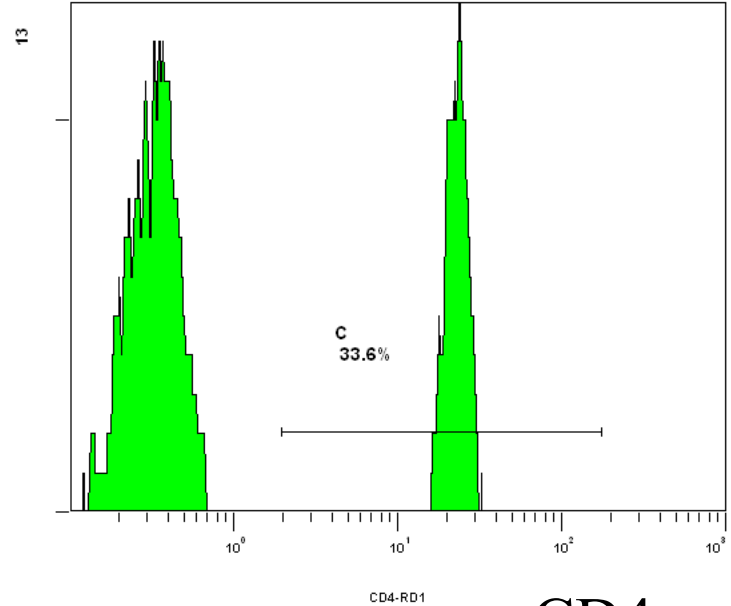
$$E = h \cdot c / \lambda$$

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



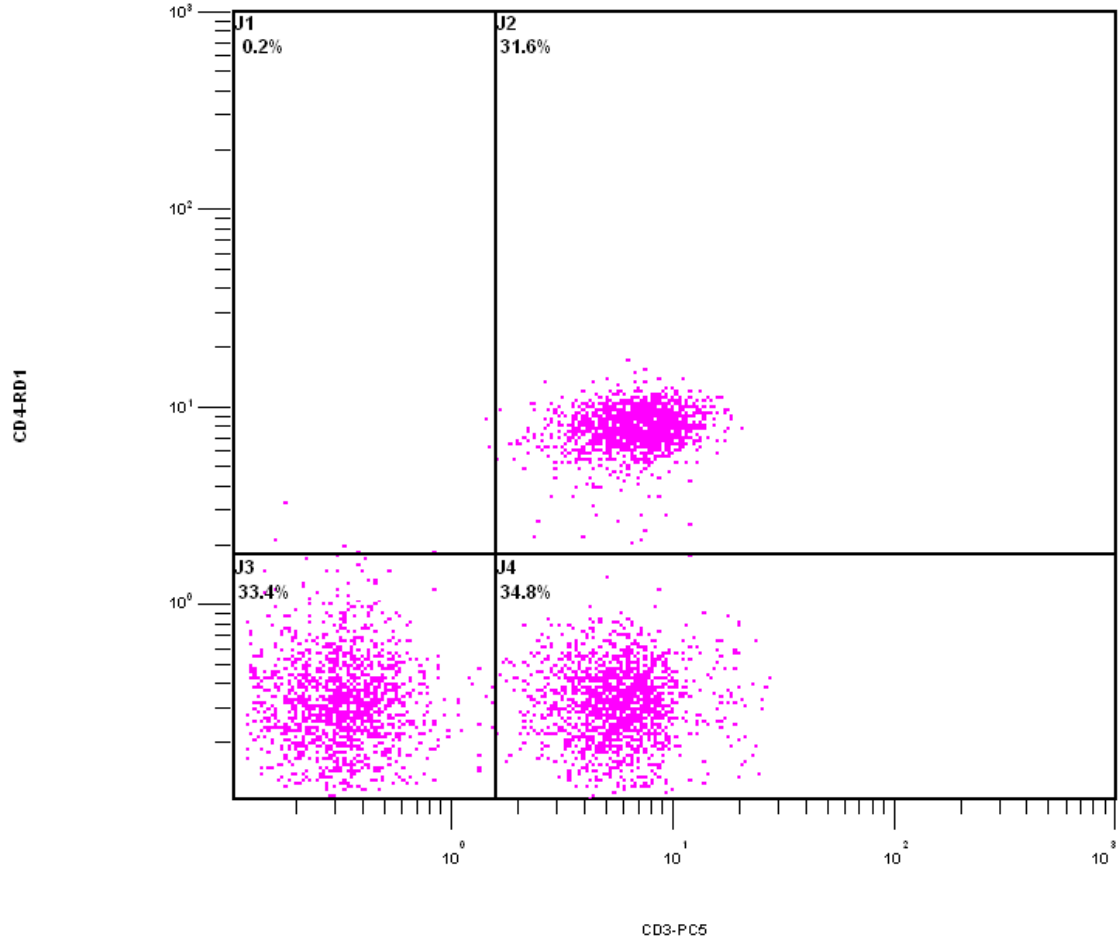
CD3

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

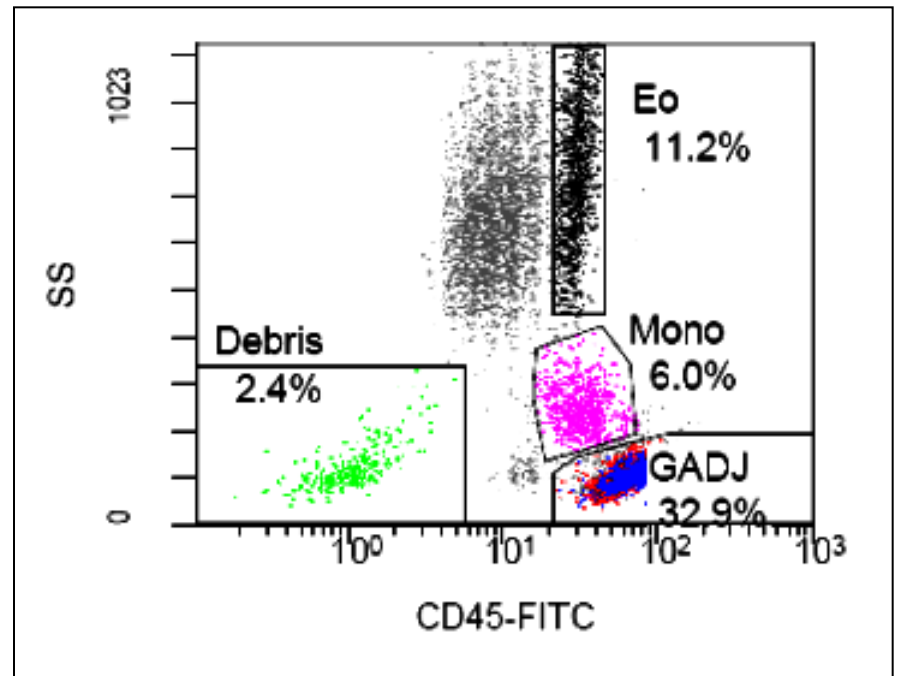
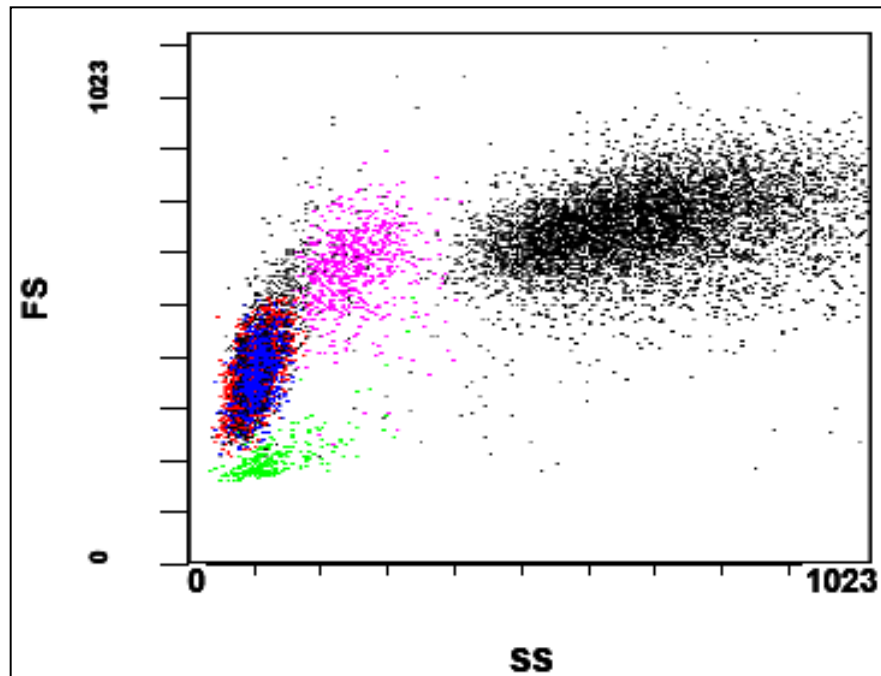


CD4

(F4)[Lymfo] 20089743.LMD : FL4 LOG/FL2 LOG



Krevní diferenciál



Vyšetření lymfocytů periferní krve

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

Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

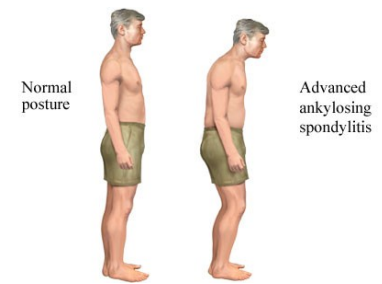
Snížení/ zvýšení	subpopulace	onemocnění
↓	CD19+, CD3+, CD4+, CD8+	při imunosupresi – např. cyklosporin (způsobuje lymfopenii)
↓	CD19+	u některých pacientů s CVID
↑	CD19+	B – buněčná leukémie
↓	CD3+	při expozici člověka toxickými chemikáliemi
↑	CD3+	T – buněčná leukémie
↓	CD4+	u některých pacientů s CVID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

Příklady klinických a experimentálních aplikací průtokové cytometrie

Vyšetření:

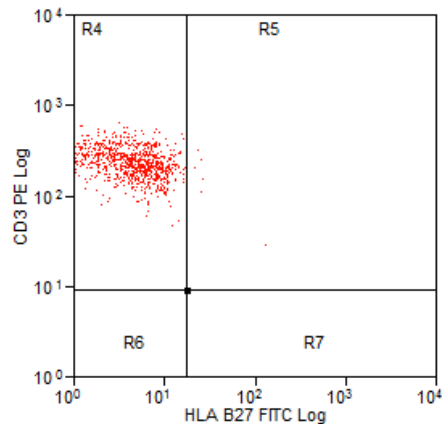
Povrchových antigenů	imunofenotypizace, HLA-B27, receptory pro cytokiny...
Intracelulárních antigenů	myeloperoxidáza
Buněčná DNA	kinetika buněčného cyklu, hodnocení apoptózy nekrózy....
Protilátky	stanovení hladin terapeutických protilátek
Funkcí	test blastické transformace lymfocytů, fagocytóza a oxidační vzplanutí, NK-cytotoxicita
Aktivita enzymů, vnitřní prostředí buněk....	

HLA-B27

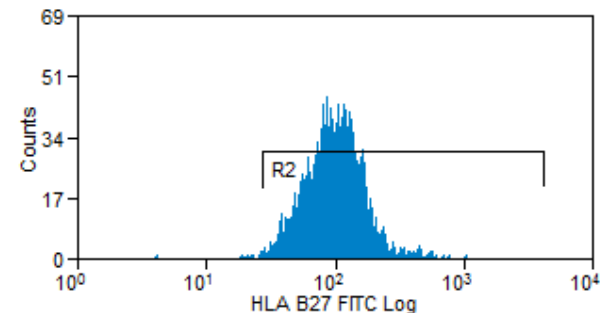
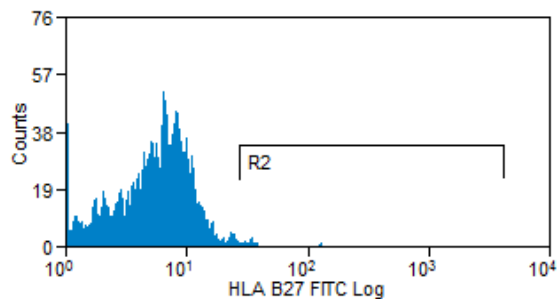
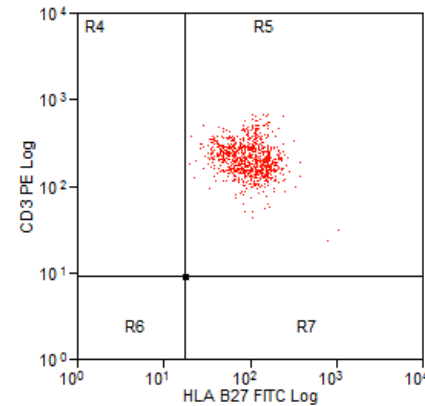


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida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

negativní



pozitivní

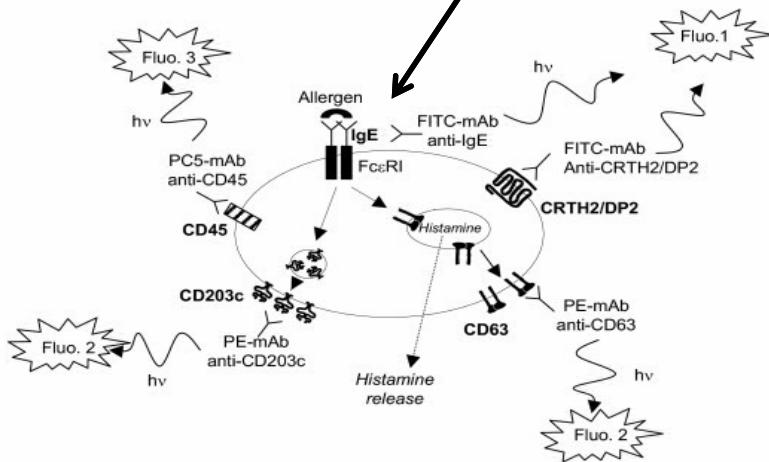


Test aktivace bazofilů (basotest)

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

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

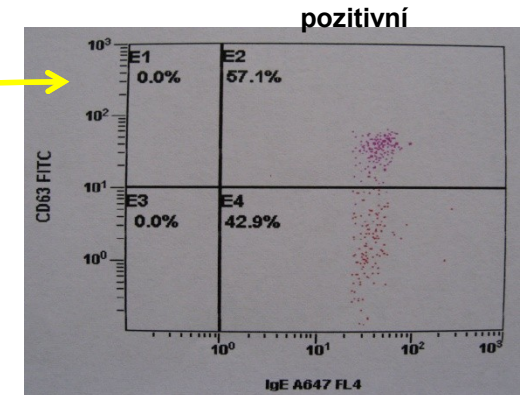
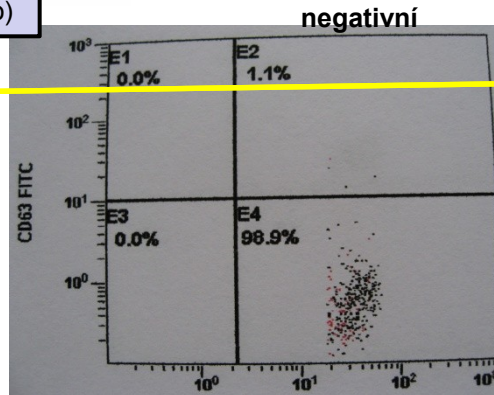
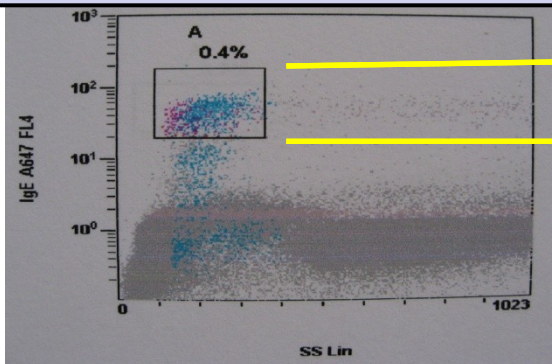
na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)
- CD203c



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.

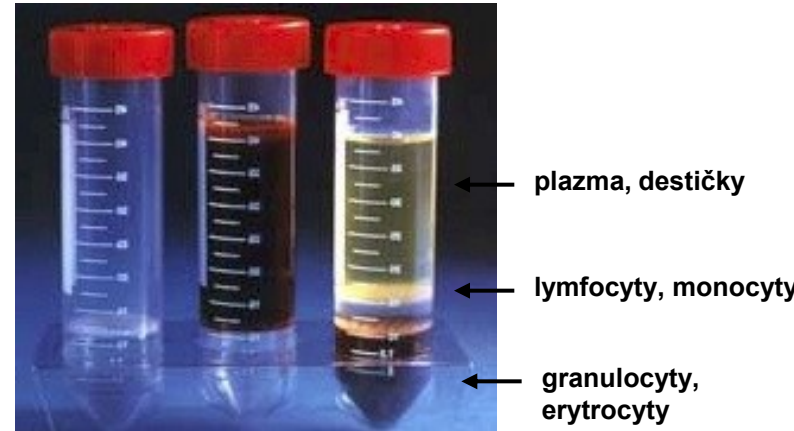
ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)

Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů



IZOLACE LYMFOCYTŮ

- 9ml heparinizované krve
- hustotní gradientová centrifugace (separační medium - lymphoprep)
- rozsuspendováno v RPMI-1640 s přísávkem 10% fetálního séra
- 300 μ l suspenze + monoklonální protilátky – inkubace
- promytí v PBS a naředění
- měření na průtokovém cytometru



Izolace lymfocytů

- 10 ml krve – pro čtyři studenty
- 10ml krve smíchat s 10 ml RPMI v kontejnerku, promíchat
- do prázdné zkumavky napipetovat 3,5 ml Lymphoprepu
- pasterkou nanést **OPATRNĚ** na povrch Lymphoprepu cca 5 ml krve smíchané s RPMI (ve skupině 4 rovnoměrně = stejná hladina), vrstvy se nesmí promíchat

Izolace lymfocytů 2

- **stáčet při 2500 ot. /30 min**
- **po centrifugaci: bílý proužek cca uprostřed je vrstva lymfocytů oddělený na základě odlišné vznášivé hustoty**
- **odstranit do koše vrchní vrstvu krevní plazmy**
- **kroužek lymfocytů přenést do nové zkumavky (vždy 2 studenti do 1 zkumavky)**
- **doplnit do plného objemu PBS a PROMÍCHAT pasterkou**
- **centrifugovat 1800 ot./10 min**

Izolace lymfocytů 3

- **zkontrolovat zda jsou lymfocyty zcentrifugovány na dně zkumavky**
- **slít tekutinu**
- **přidat 1 ml PBS**
- **dobře promíchat**
- **nechat spočítat lymfocyty pomocí přístroje pro počítání leukocytů – naměřená hodnota udává počet lymfocytů $\times 10^6/\text{ml}$**
- **další možný postup – nasazení buněk s monoklonálníma protilátkama**
- **měření na průtokovém cytometru**