

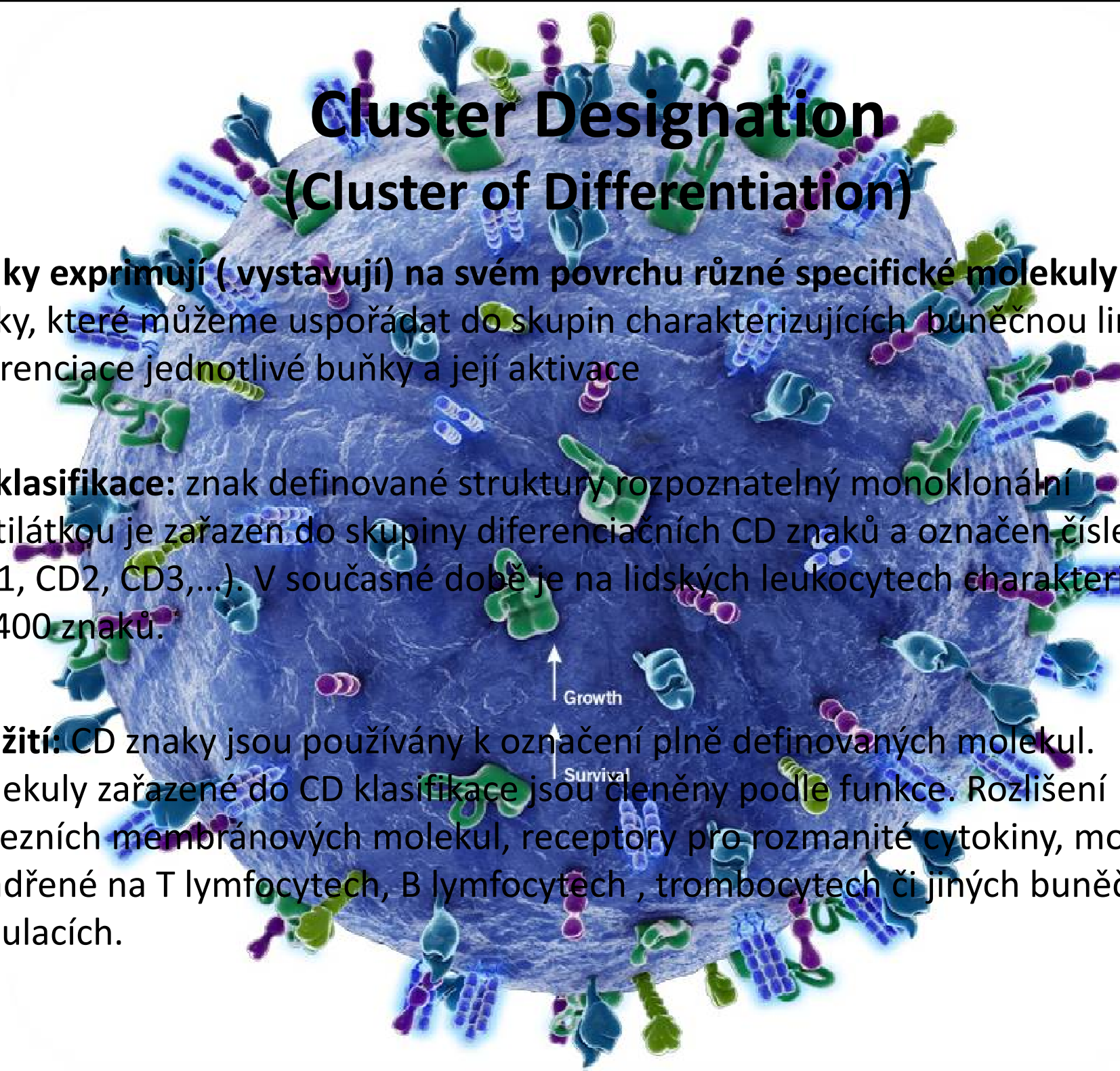
# Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulací

Jana Nechvátalová

Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

# Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

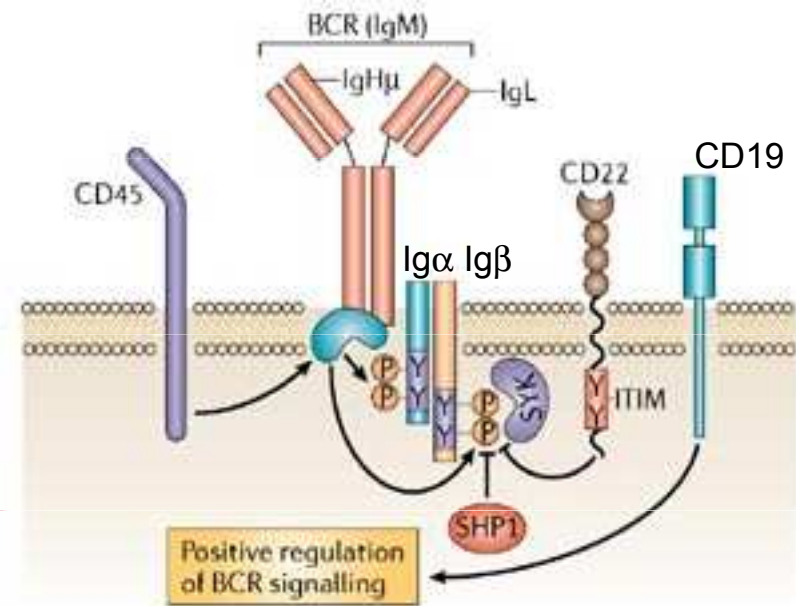
- **buňky exprimují (vystavují) na svém povrchu různé specifické molekuly – znaky, které můžeme uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav diferenciaci jednotlivé buňky a její aktivace**
- **CD klasifikace:** znak definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou je zařazen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



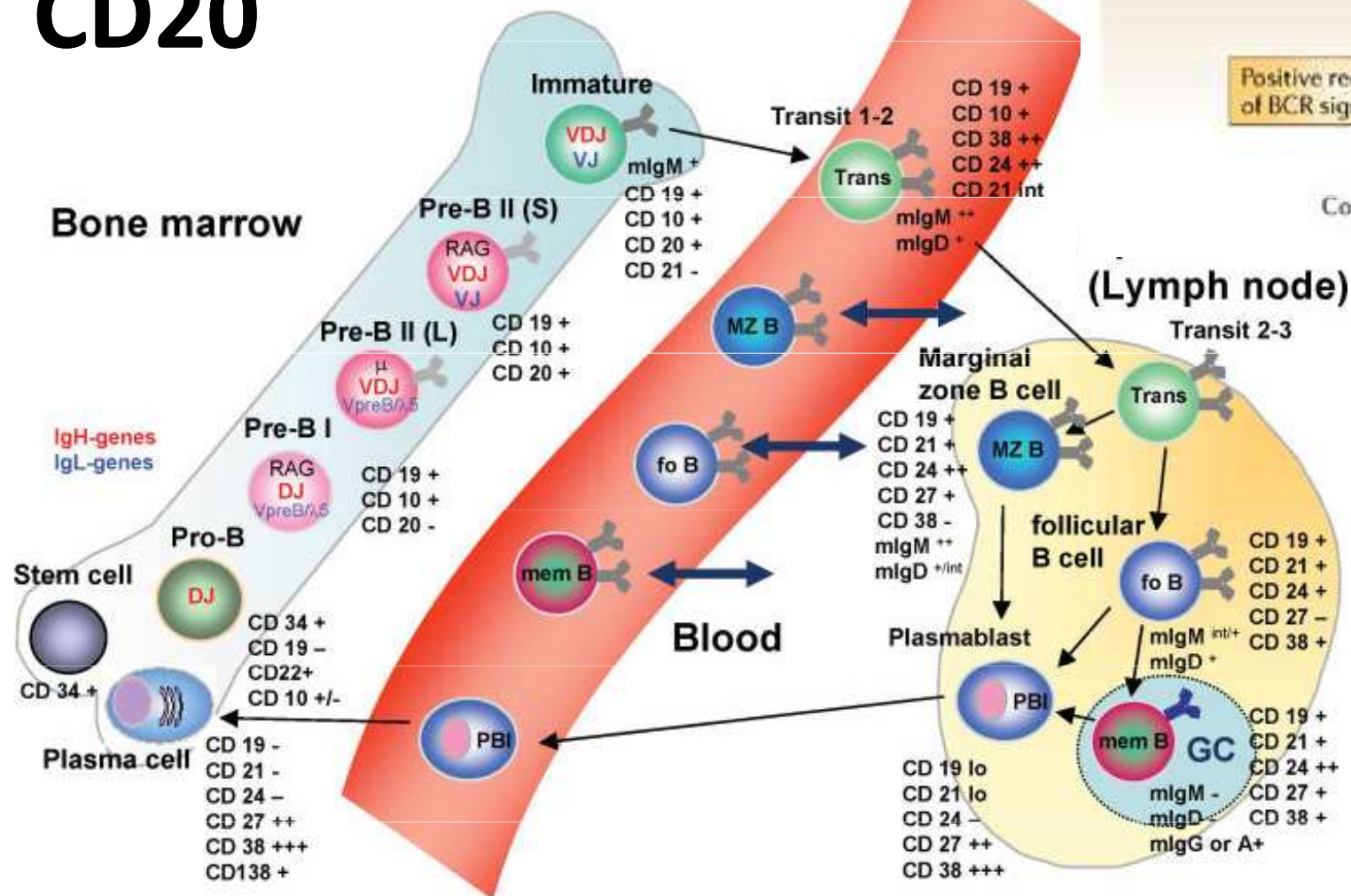
# B lymphocyty

CD19

CD20



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

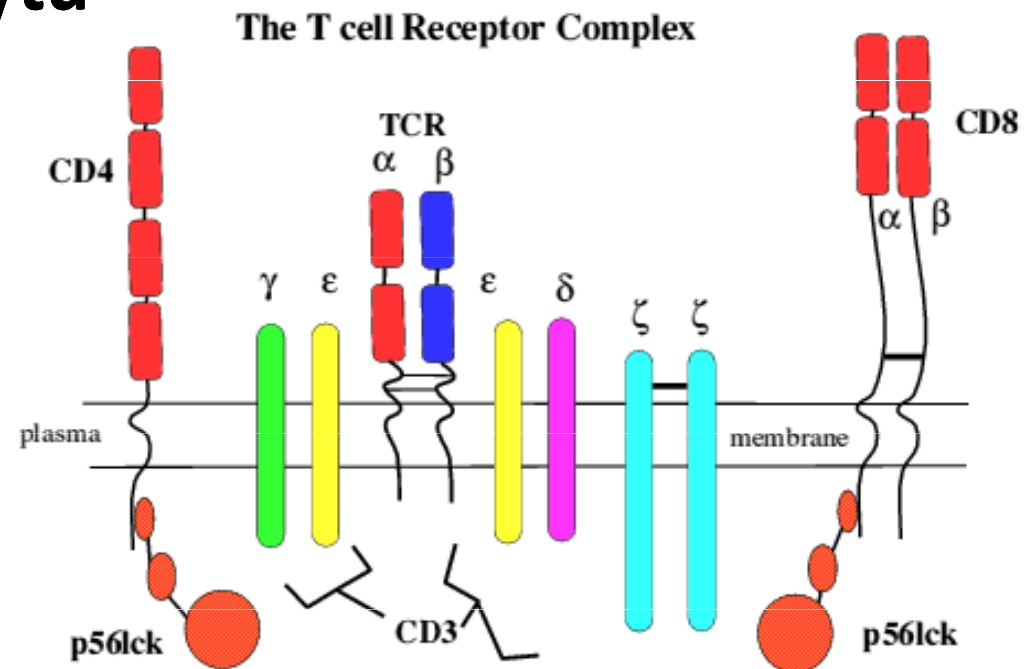
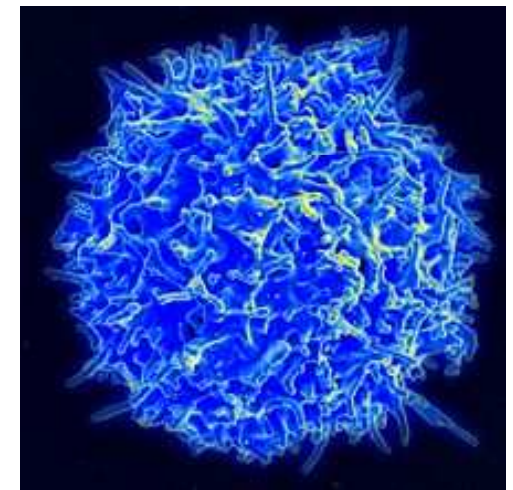


# T lymfocyty

CD3 na povrchu všech T lymfocytů

CD4 na povrchu  $T_H$  lymfocytů ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ )

CD8 na povrchu  $T_C$  lymfocytů

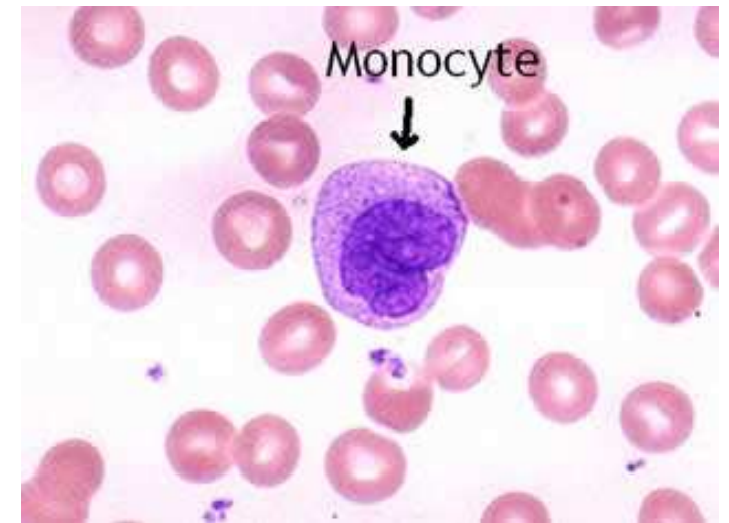


# Monocyty

**CD14**

**HLA DR**

- součástí nespecifické imunity
- schopnost fagocytózy
- tkáňová forma = makrofág

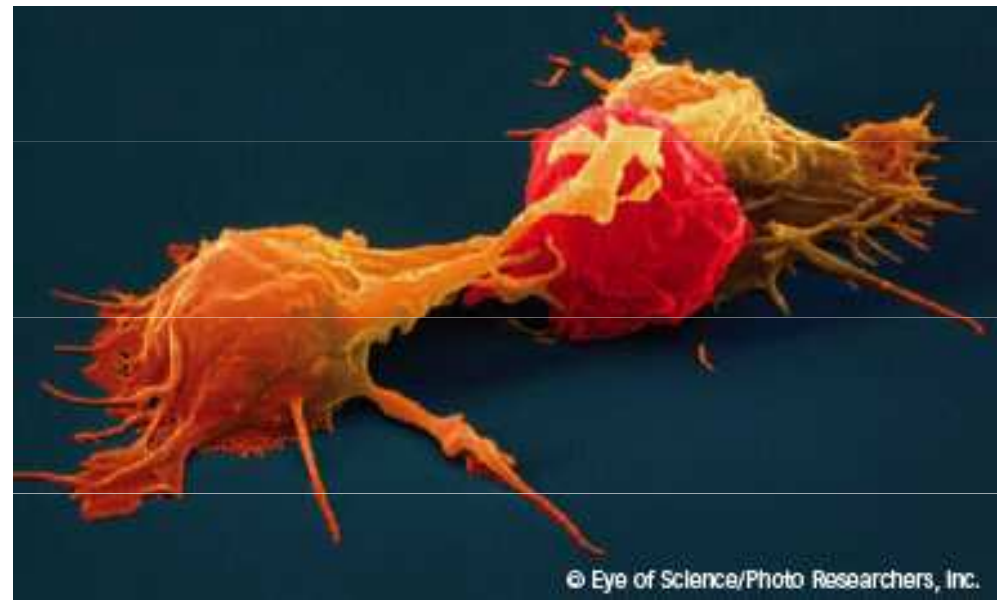


# NK buňky

**CD16+**

**CD56+**

**CD3-**



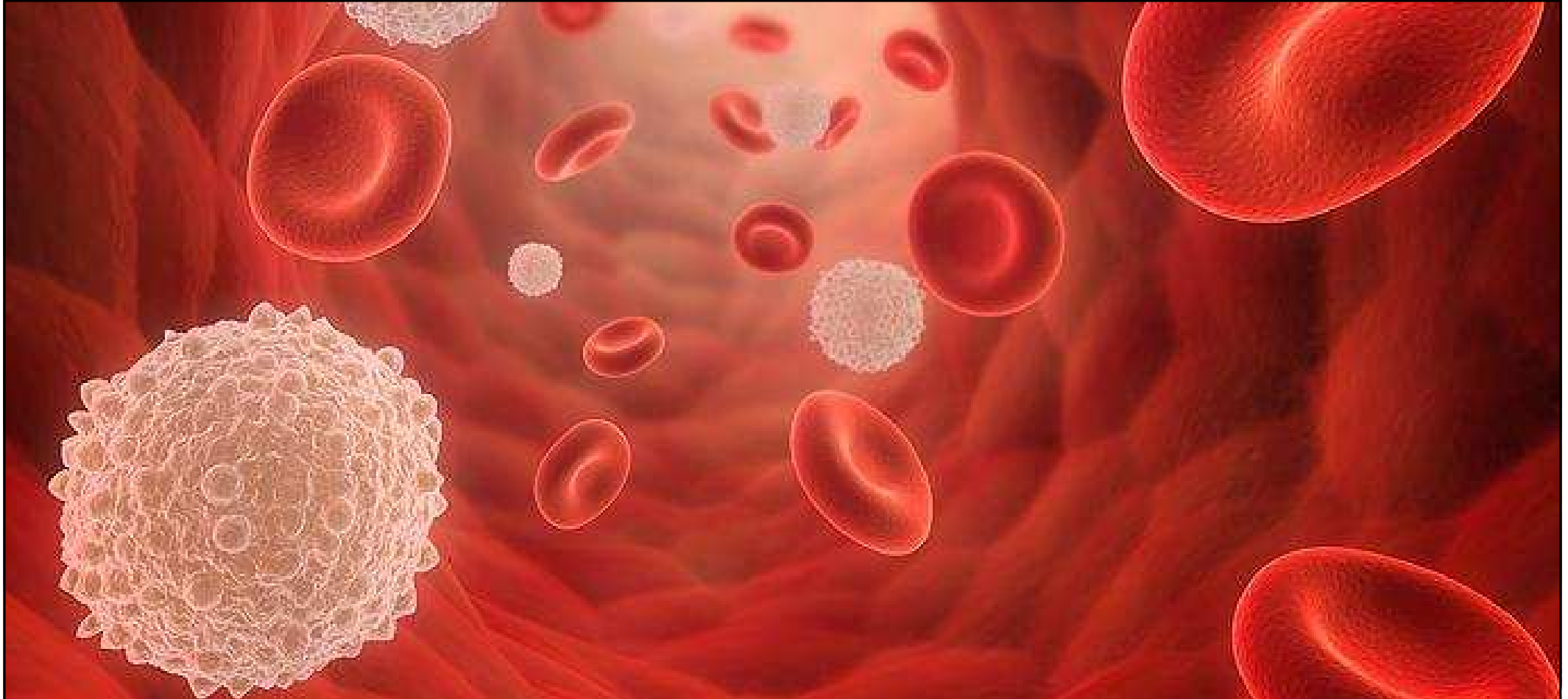
- rozeznávají buňky, které mají na povrchu abnormálně málo MHC I (= nádorové a virově infikované buňky)
- používají cytotoxické mechanismy (perforin, granzymy)

Pozn. **NKT** buňky

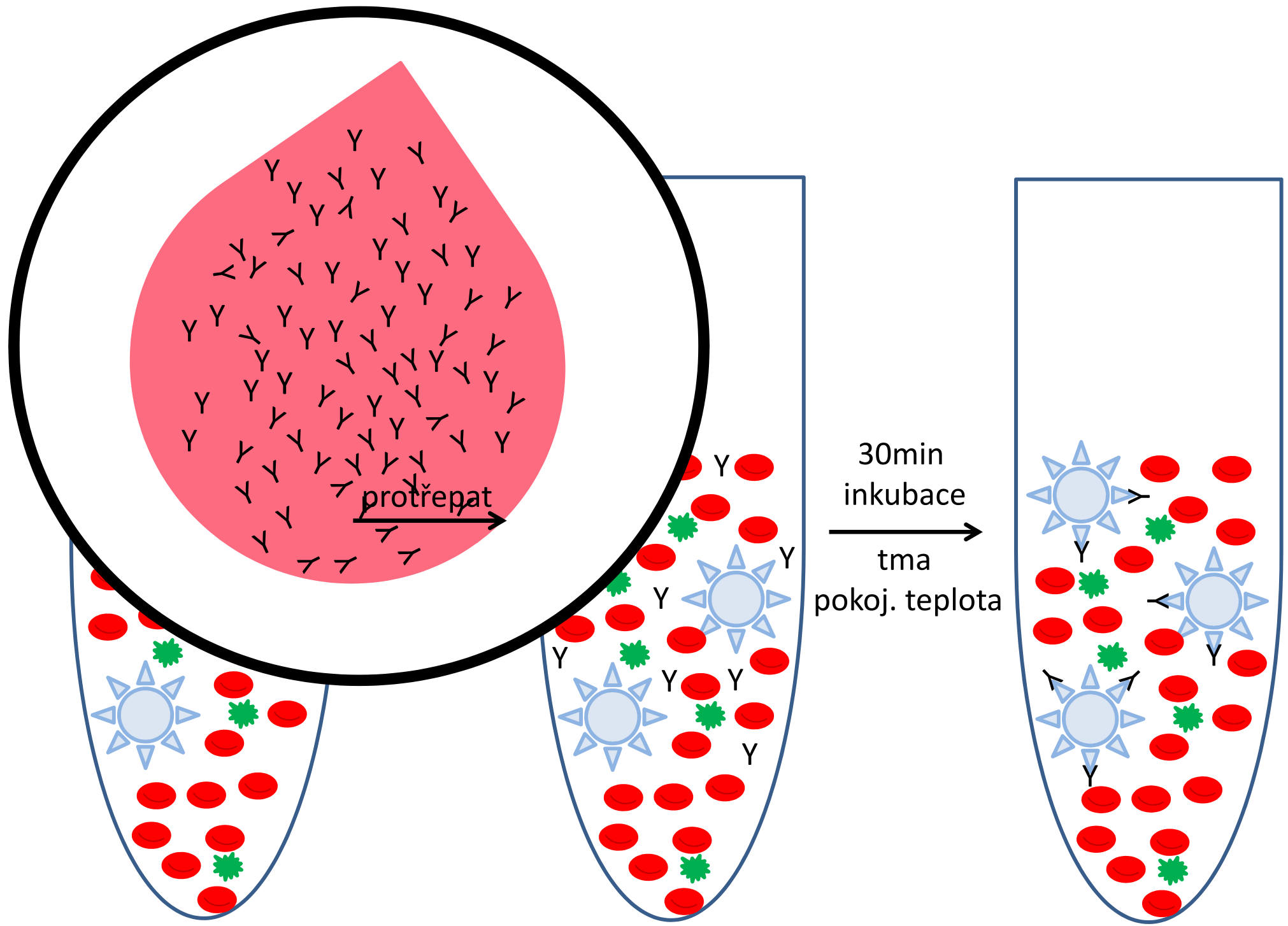
**CD16+**

**CD56+**

**CD3+**

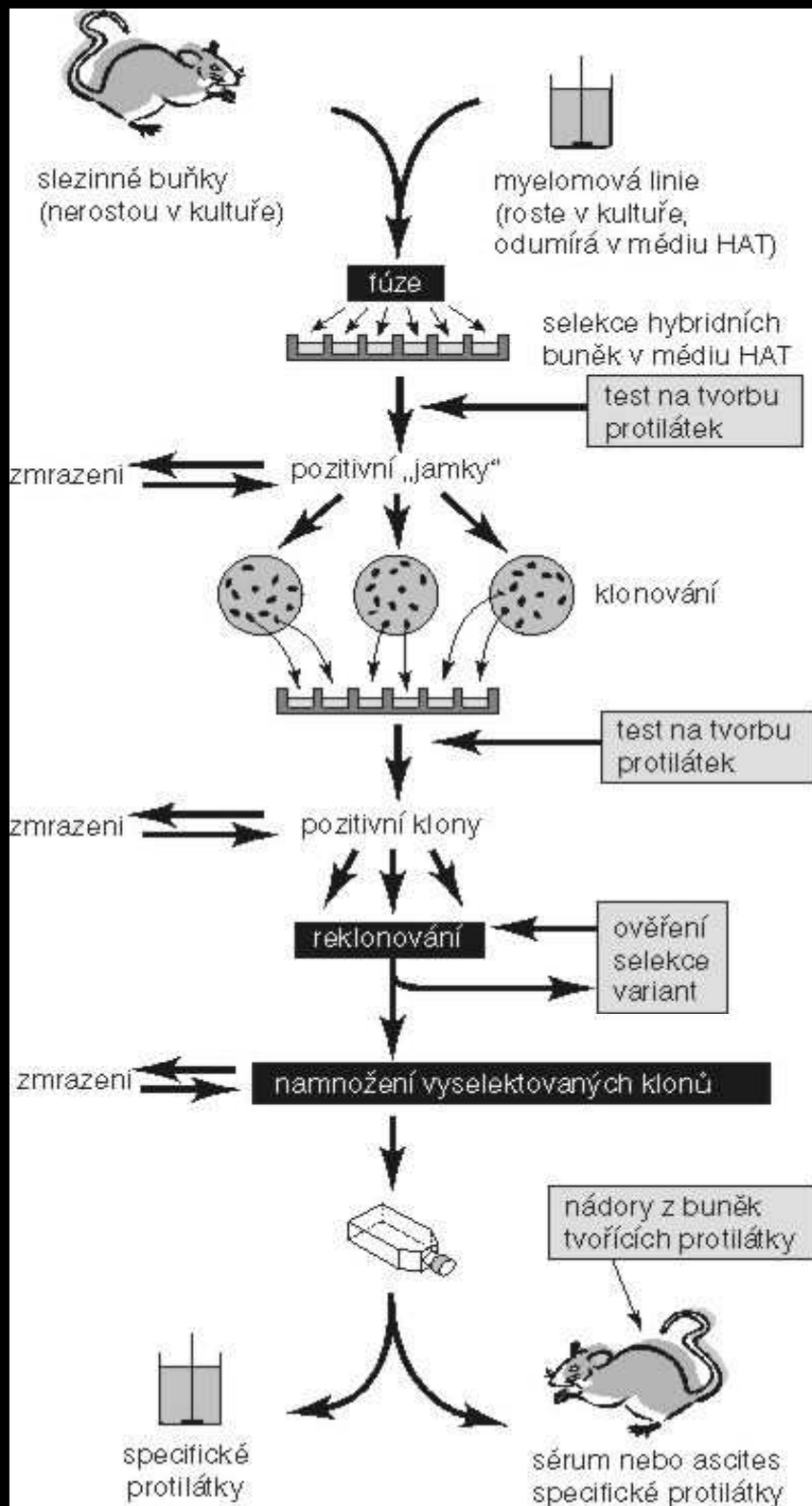


Pro stanovování  
**lymfocytárních subpopulací**  
odebírat krev do zkumavky s **EDTA**





# Mnoklonální protilátky



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





# LYZOVÁNÍ ERYTROCYTŮ

**Roztok A:** na 1,5 l destilované vody – 1,8 ml 99% kyseliny mravenčí

**Roztok B:** na 1,5 l destilované vody 9,0 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 21,75 g NaCl,  
46,95 g bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$

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

# Průtoková cytometrie

## FLOW CYTOMETRY

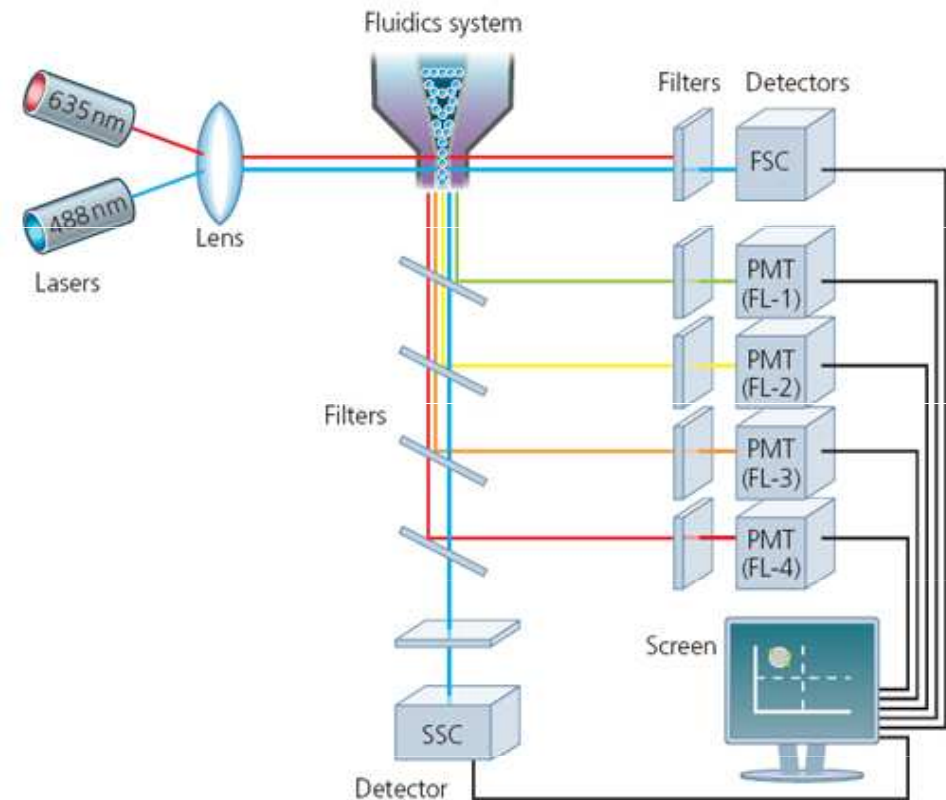


# Průtokový cytometr

1. FLUIDNÍ SYSTÉM

2. OPTIKA

3. ELEKTRONIKA

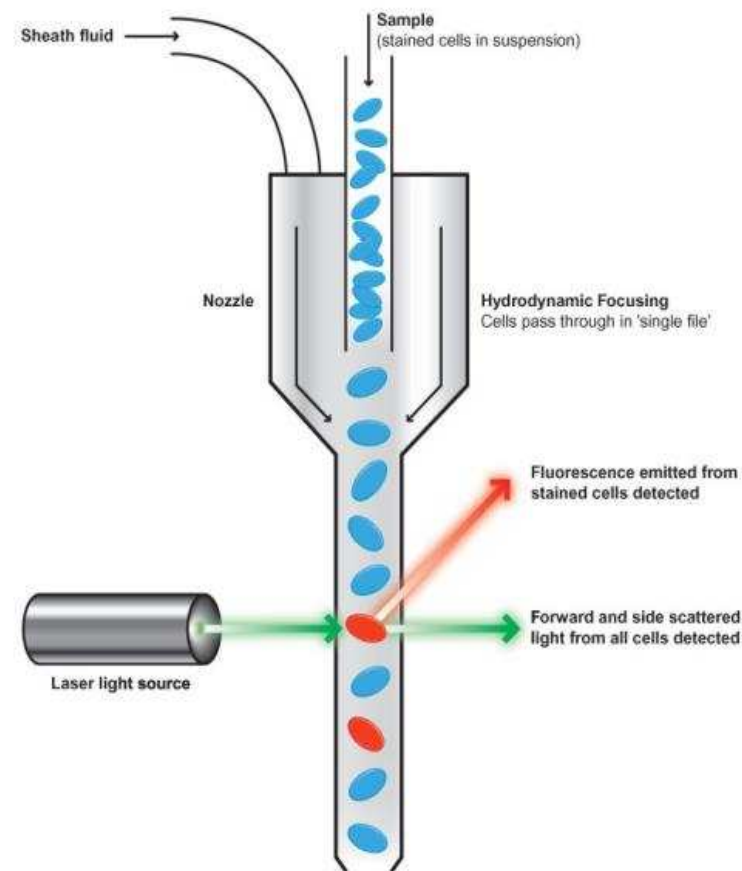


# 1. FLUIDNÍ SYSTÉM

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

na základě hydrodynamické fokusace - nosná tekutina

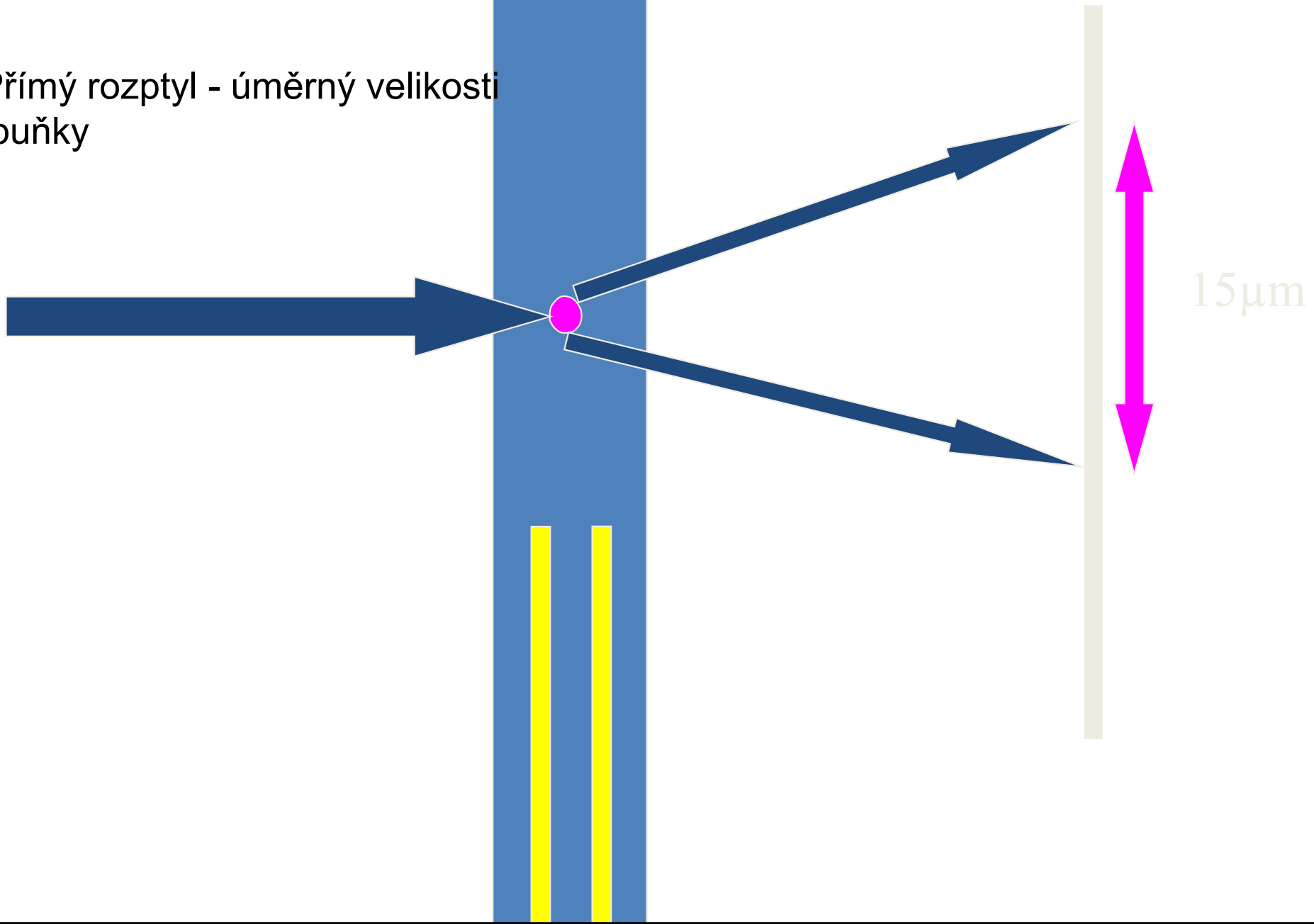
(destil. voda, komerční tekutiny) bývá do komory přinášena tenkou kapilárou pod větším tlakem než suspenze částic, které jsou tak udržovány jen v úzké centrální části proudu. Zrychlení vznikající při výstupu vodního paprsku z komůrky nutí částice pohybovat se jedna za druhou.



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

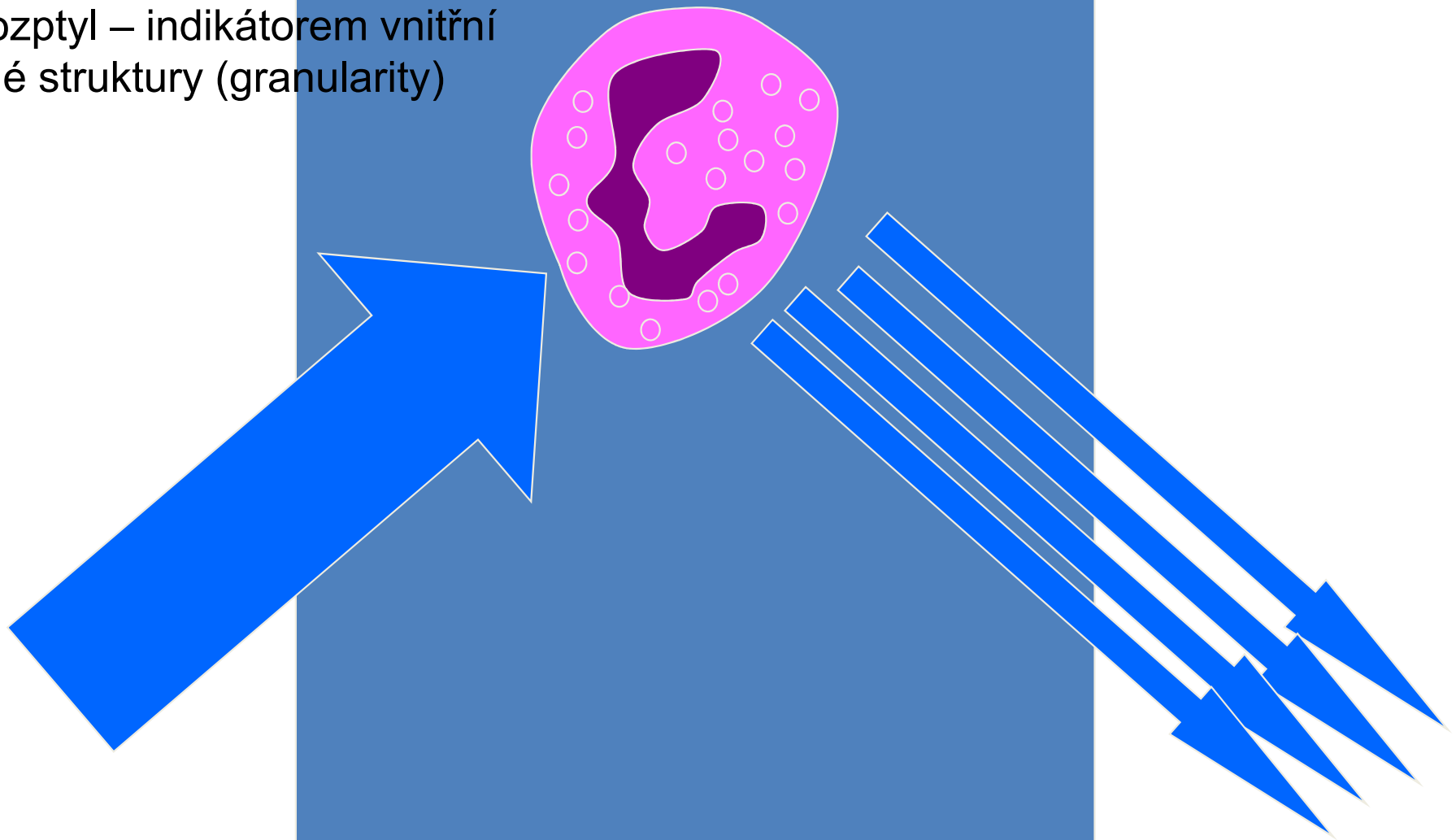
# Velikost buněk: Forward Scatter

Přímý rozptyl - úměrný velikosti  
buňky



# Granularita buněk: Side Scatter

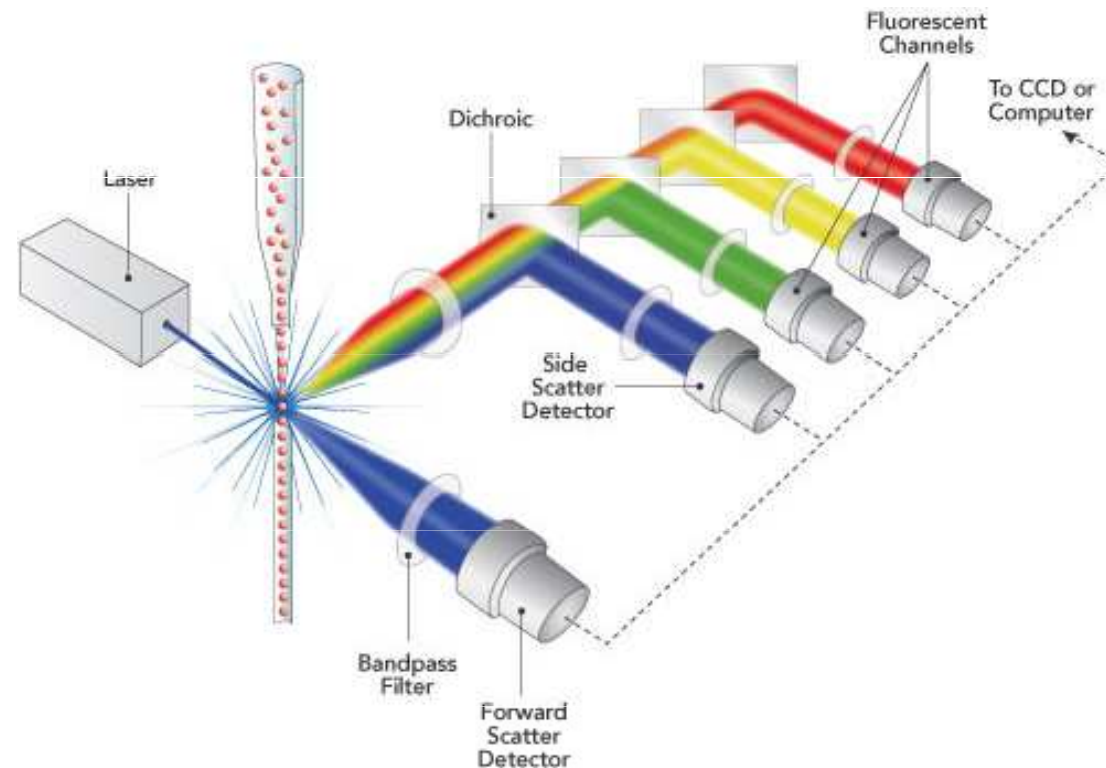
Boční rozptyl – indikátorem vnitřní buněčné struktury (granularity)



## 2. OPTIKA

Excitační část – laser

Sběrná část – systém čoček, zrcadel a optických filtrů zachycující fluorescenci částic vyzářenou po jejich projití světelným paprskem

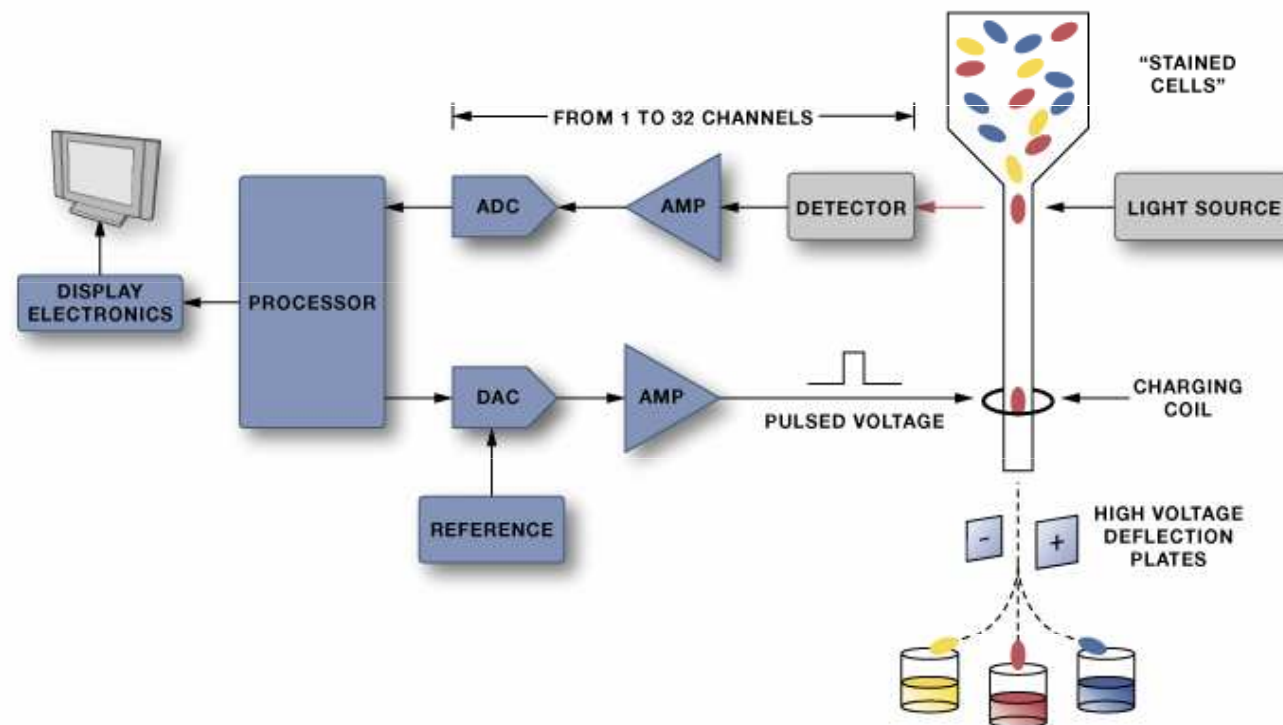




### 3. ELEKTRONIKA

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

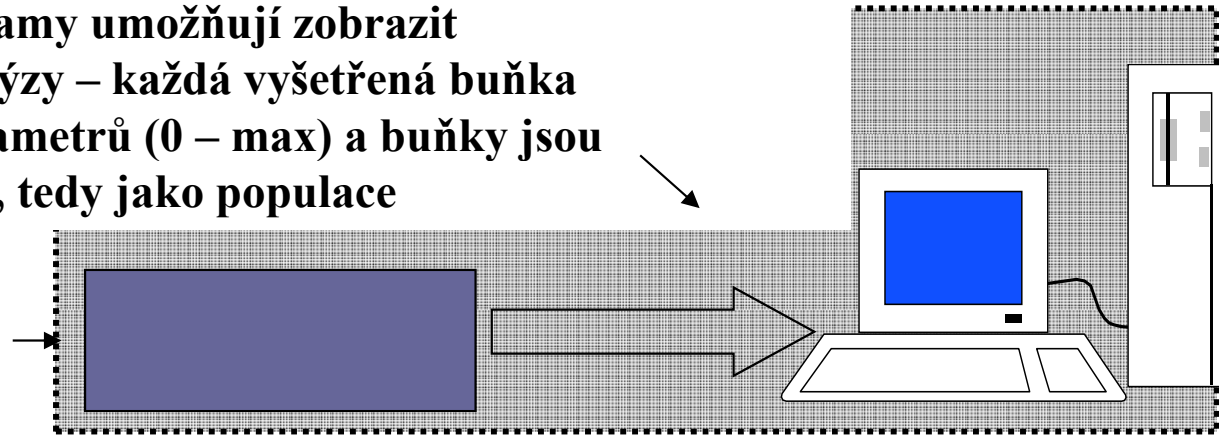
Po zesílení signálu a dalším zpracování dojde k jeho digitalizaci pro počítačovou analýzu



# 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



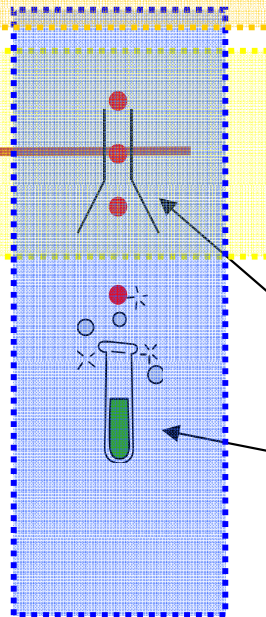
Sběrná optika (čočky, zrcadla, filtry, světlovodná vlákna) třídí světelný signál. Podle barvy se světlo a přivádí ho na jednotlivé detektory

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

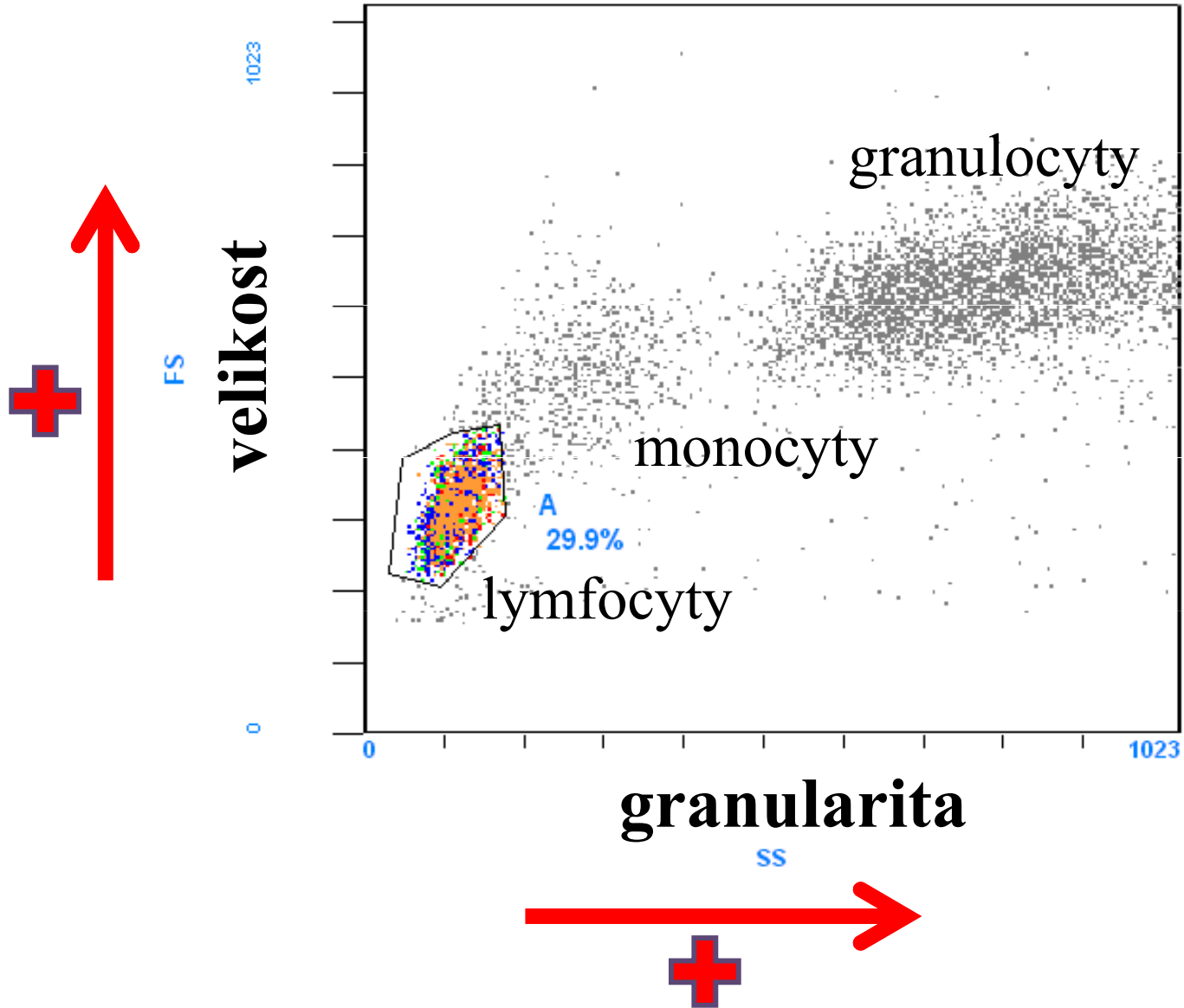
Zkumavka se suspenzí buněk

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

Laser



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



# Fluorescence

## Fluorochromy:

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

***Schopné absorbovat fotony budícího záření (např. 488 nm)***

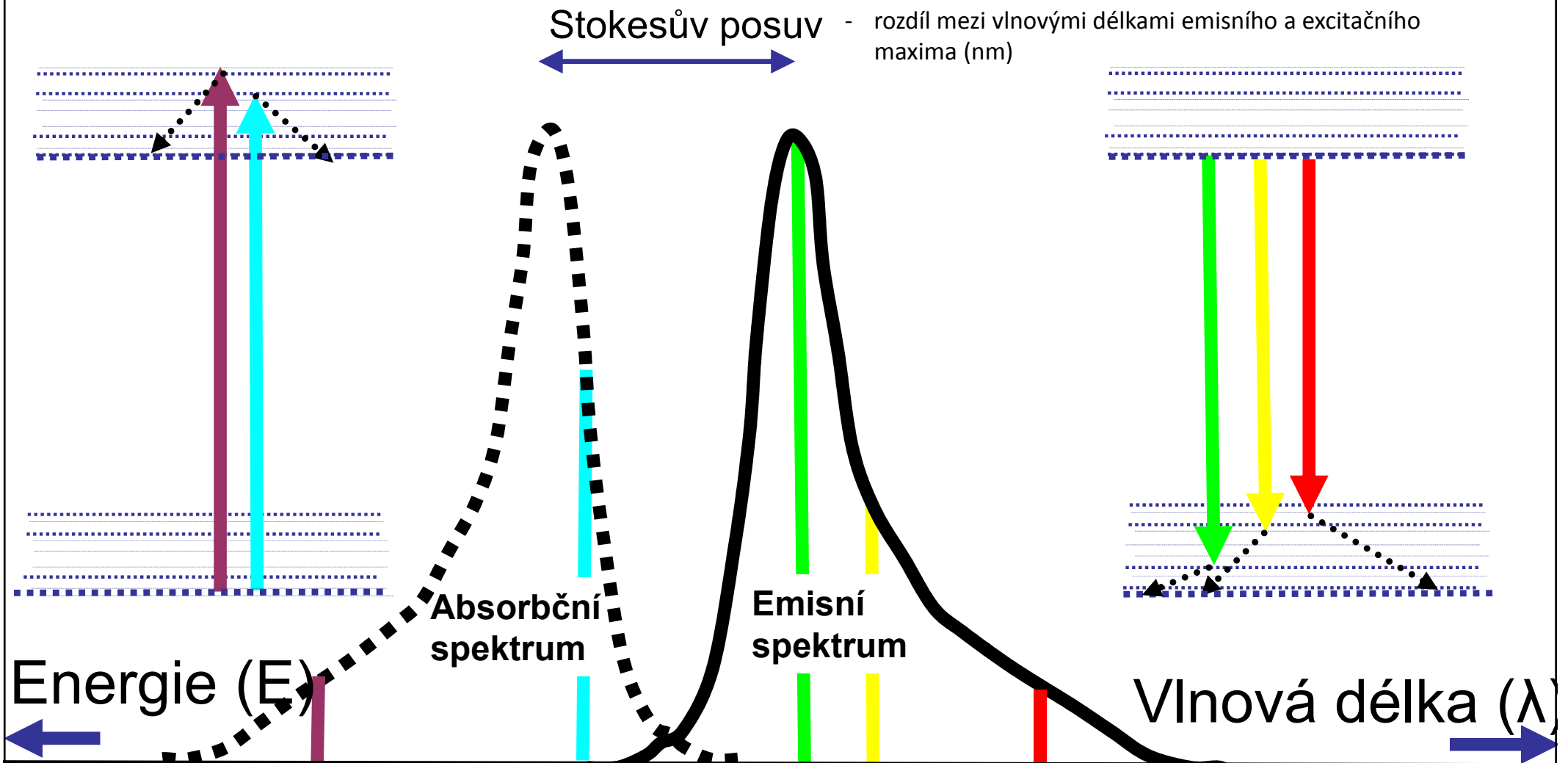
***a následně ( $10^{-8}$  s) emitovat fotony s***

***delší vlnovou délkou (v tomto případě 500 – 800 nm).***

***Fluorescenční světlo má tedy jinou barvu***

# Fluorescence

Barva pohlceného a vyzářeného světla se liší

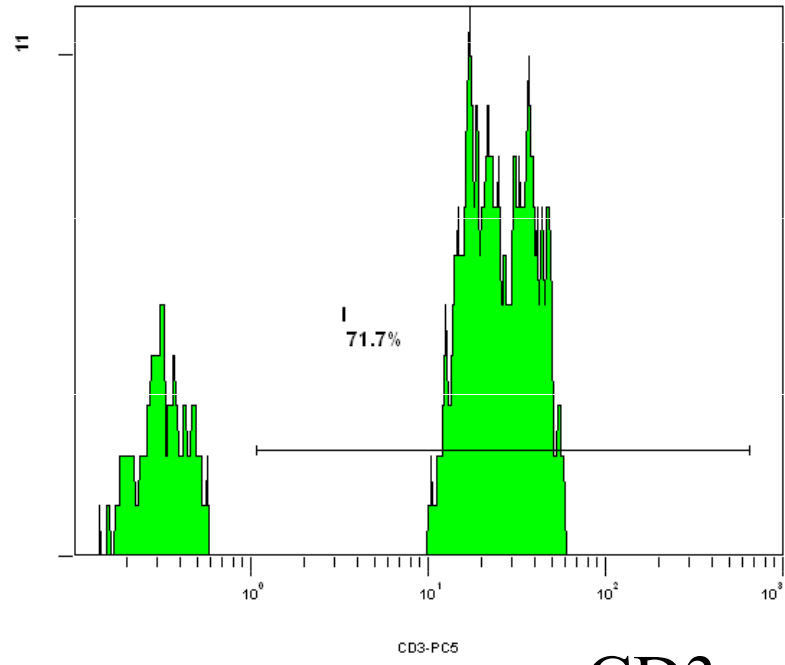


Část energie se přemění na energii vibrační

Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

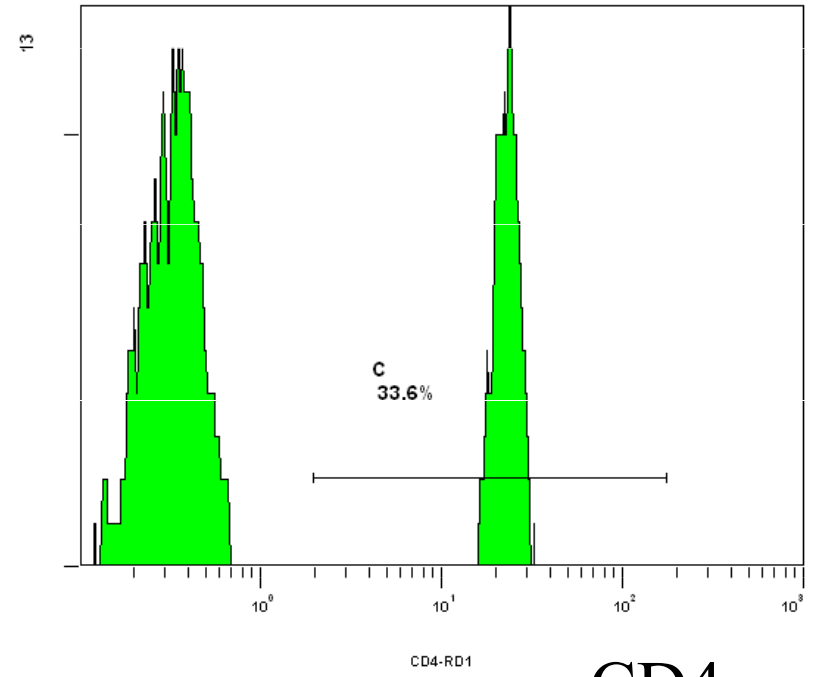
$$E = h \cdot c / \lambda$$

(F1)[A] Z0051674.LMD : FL4 LOG



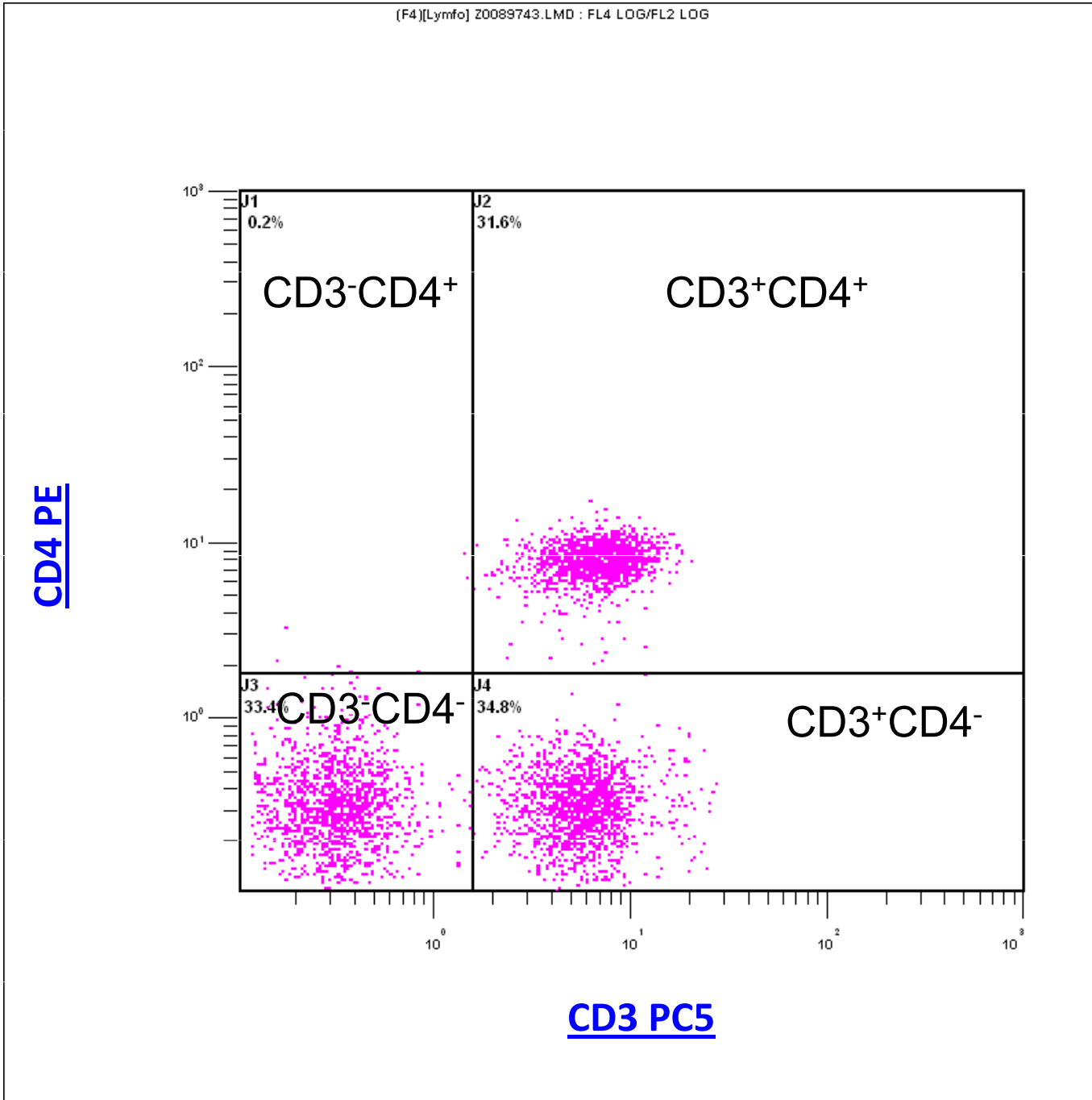
CD3

(F1)[A] Z0051674.LMD : FL2 LOG



CD4

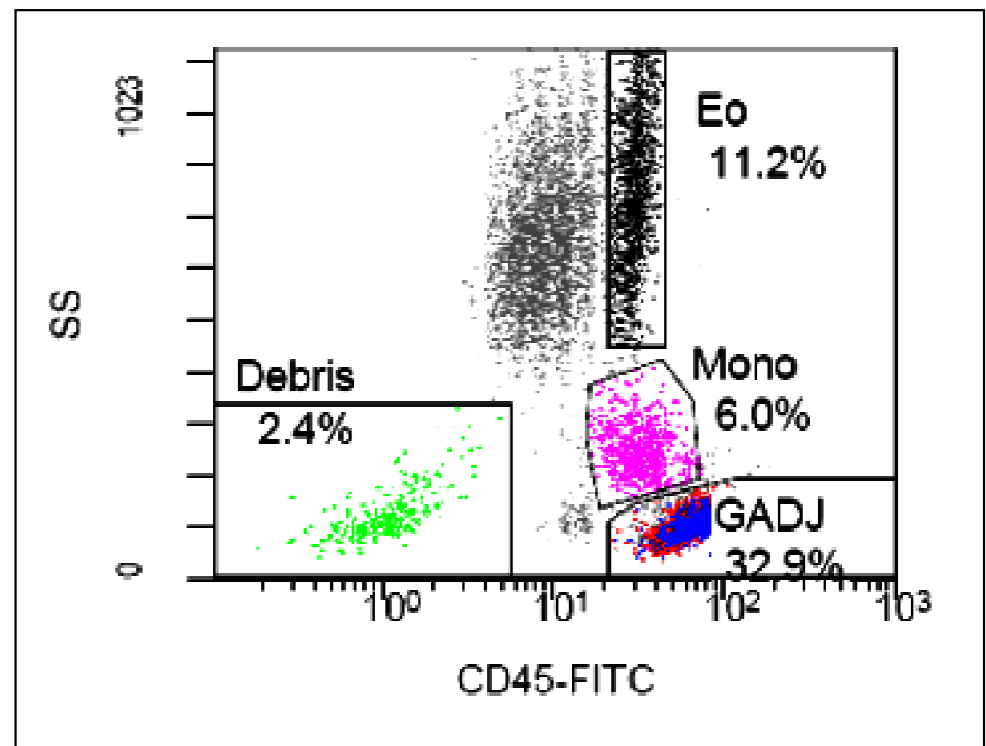
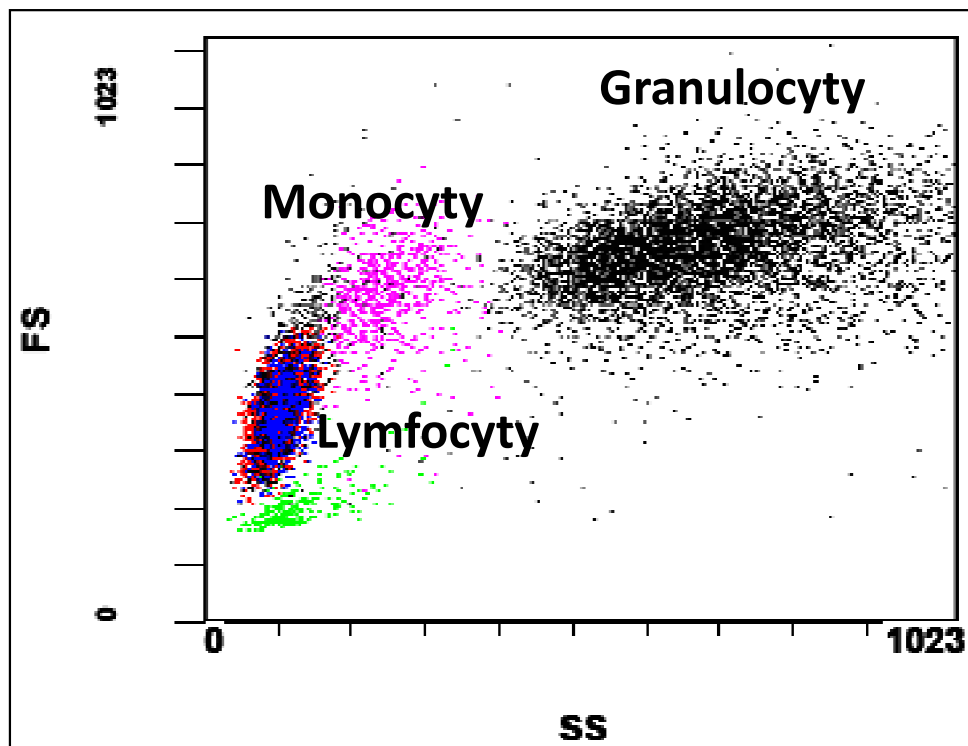
(F4)[Lymfo] 20089743.LMD : FL4 LOG/FL2 LOG



CD4 PE

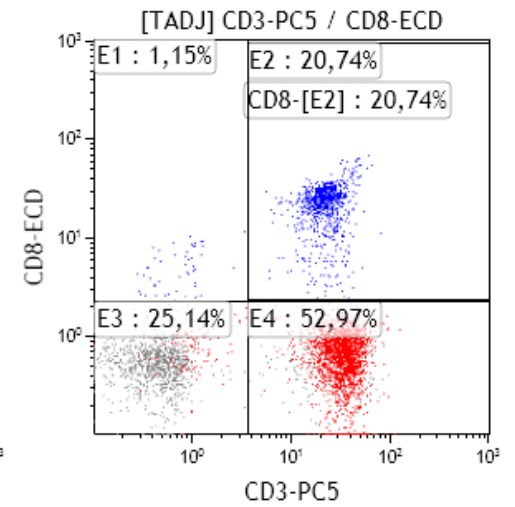
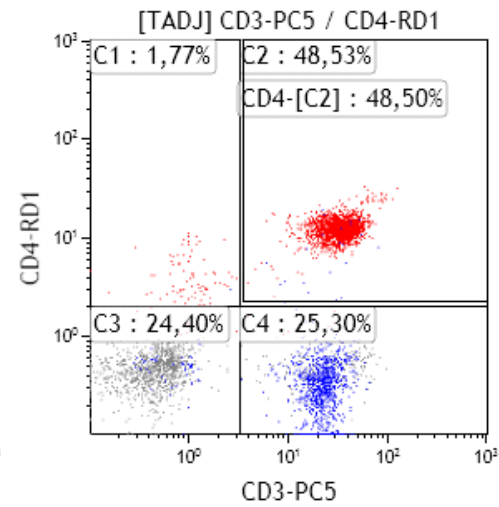
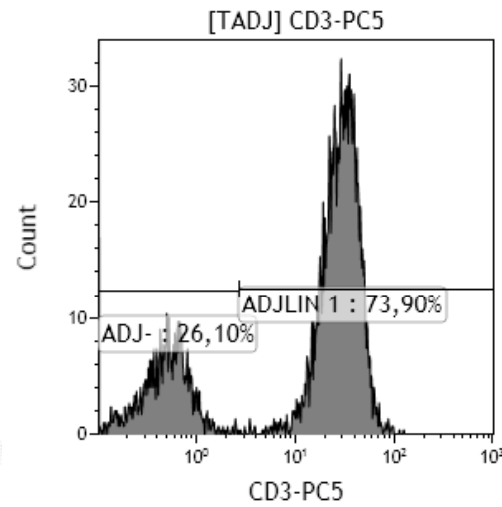
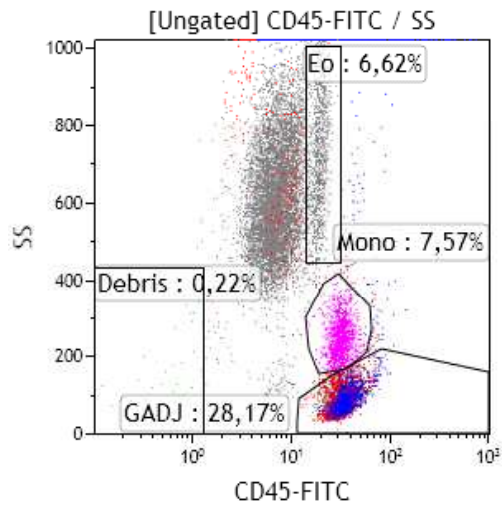
CD3 PC5

# Krevní diferenciál

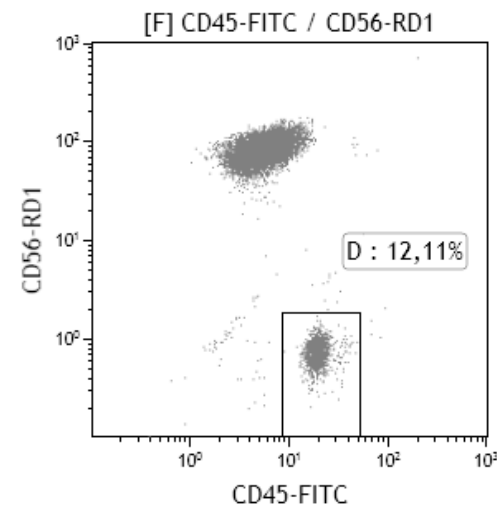
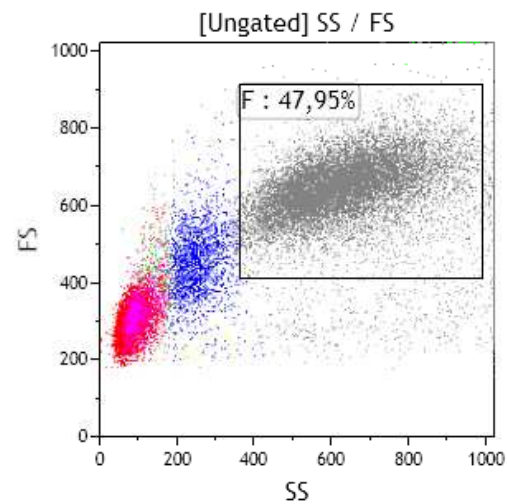
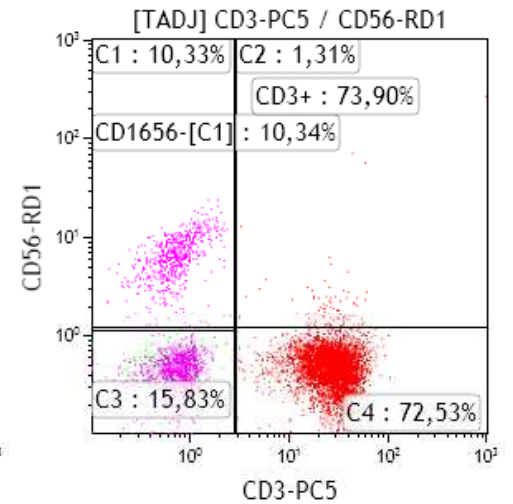
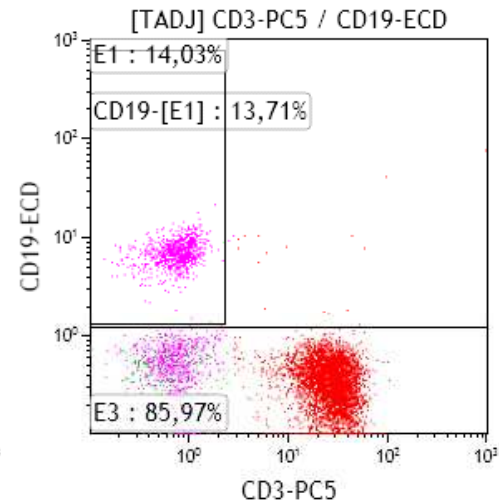
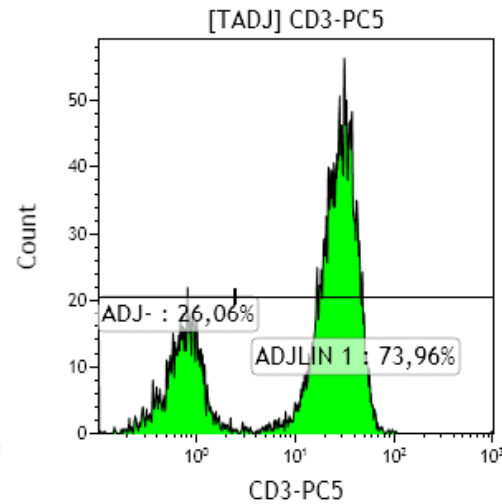
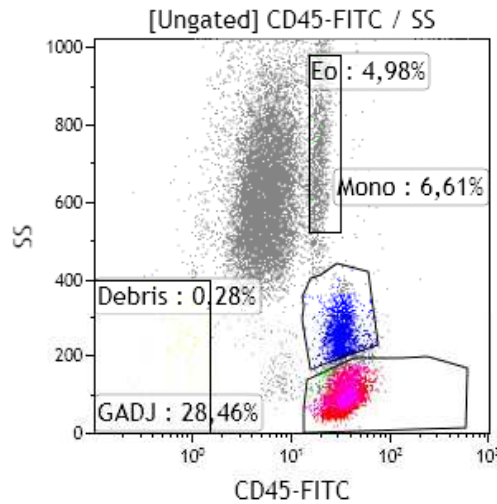




# Zkumavka A



# Zkumavka B



# Vyšetření lymfocytů periferní krve

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

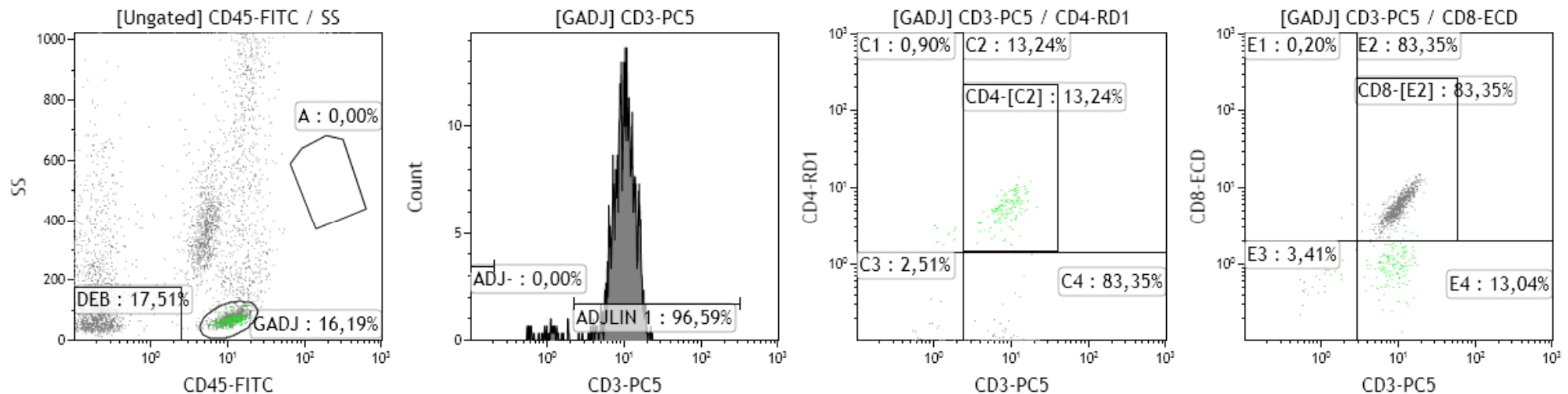
# Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

| Snížení/<br>zvýšení | subpopulace                | onemocnění   |
|---------------------|----------------------------|--|
| ↓                   | CD19+, CD3+,<br>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>common variable immunodeficiency</u> )<br>- virové infekce (EBV, CMV, HIV) |
| ↑                   | CD4+                       | autoimunity, alergie   |
| ↓                   | CD8+                       | autoimunity (roztroušená skleróza, <u>systematický lupus erythematoses-SLE</u> )   |
| ↑                   | CD8+                       | u některých pacientů s CVID<br>- virové infekce (EBV, CMV, HIV)  |

**Příklady využití  
průtokové cytometrie  
v praxi**

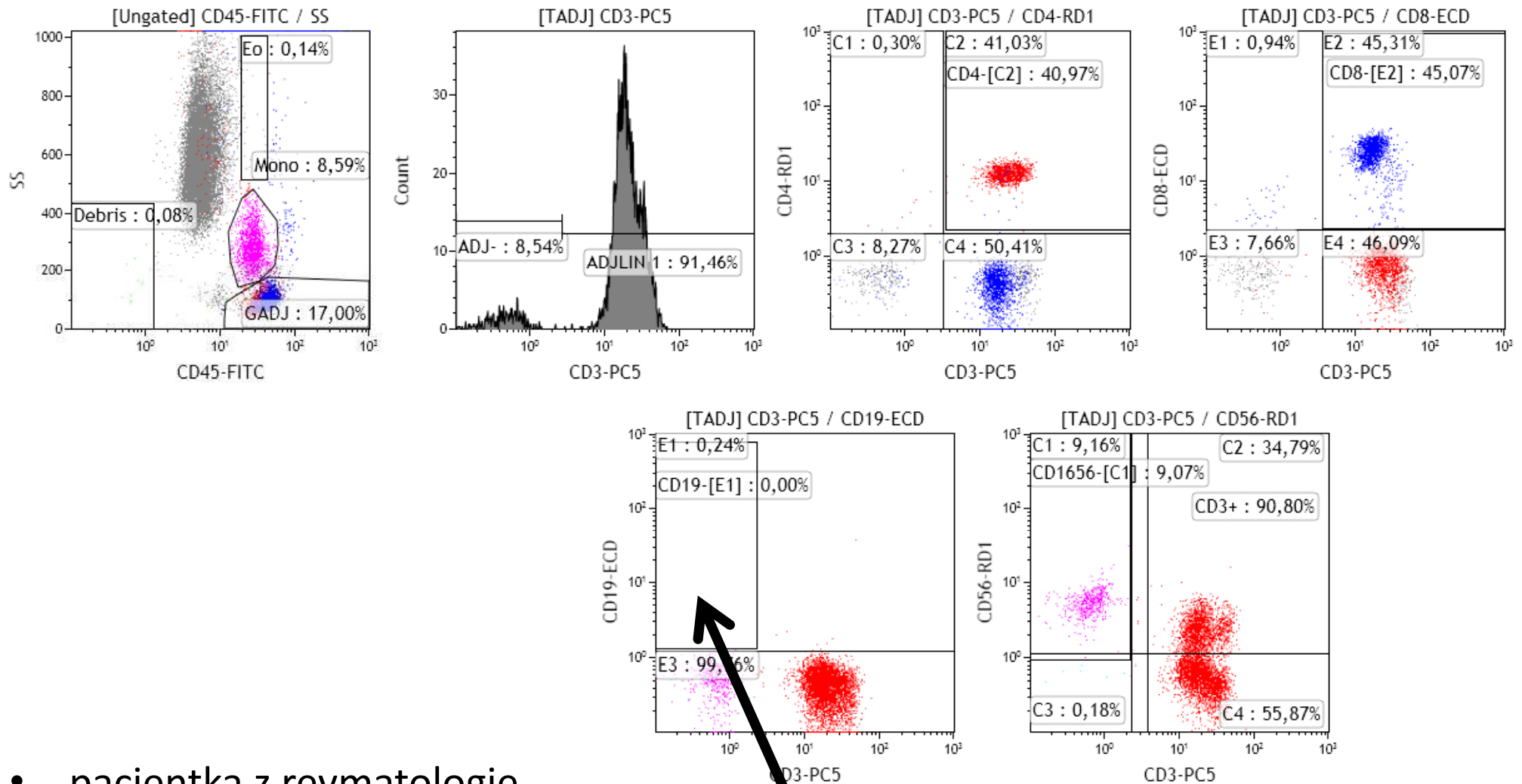
# Bronchoalveolární laváž (BAL)

- imunofenotypizace



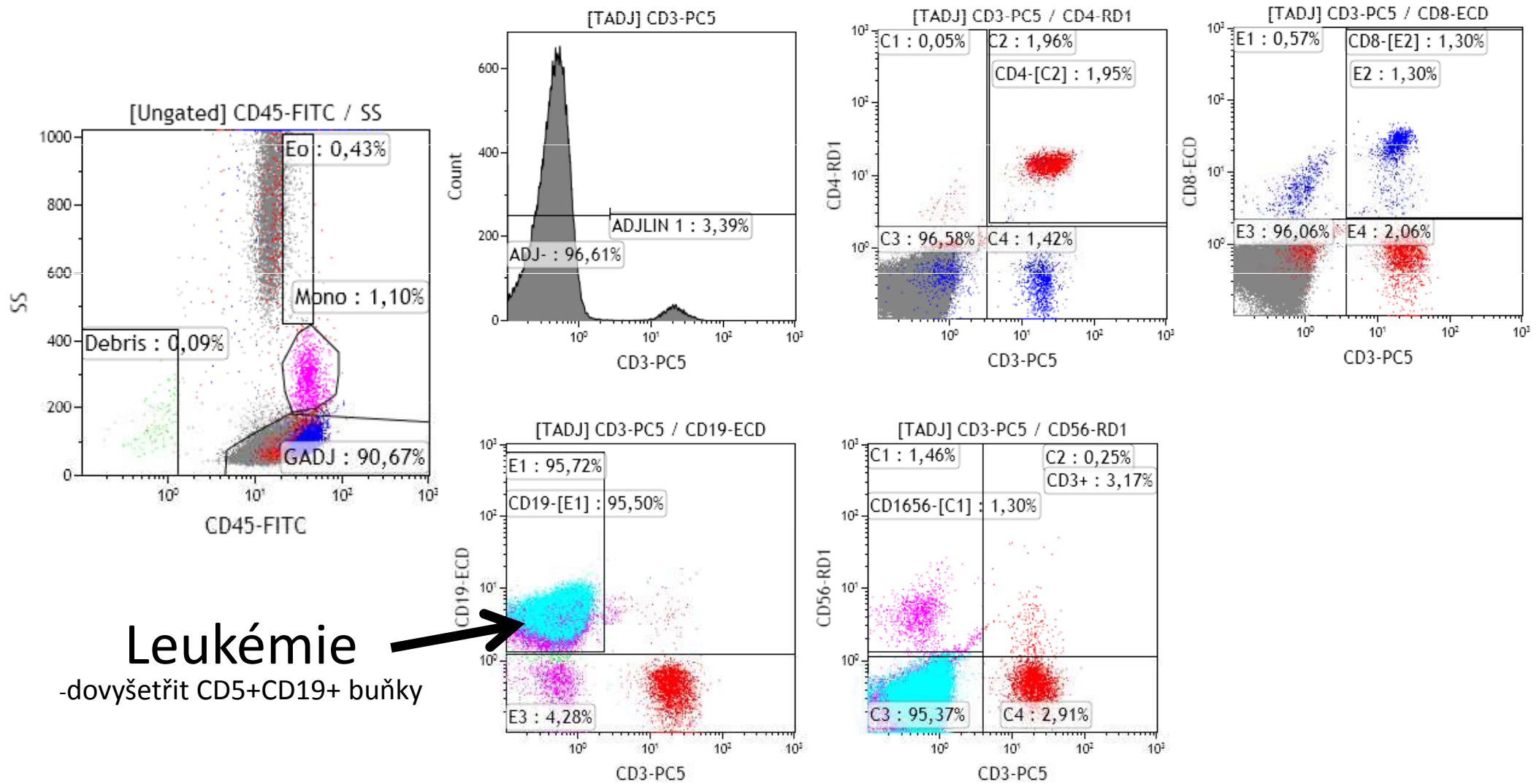
při převráceném poměru CD4+/CD8+  
- podezření na sarkoidózu

# Pacientka: Ž, \*1957



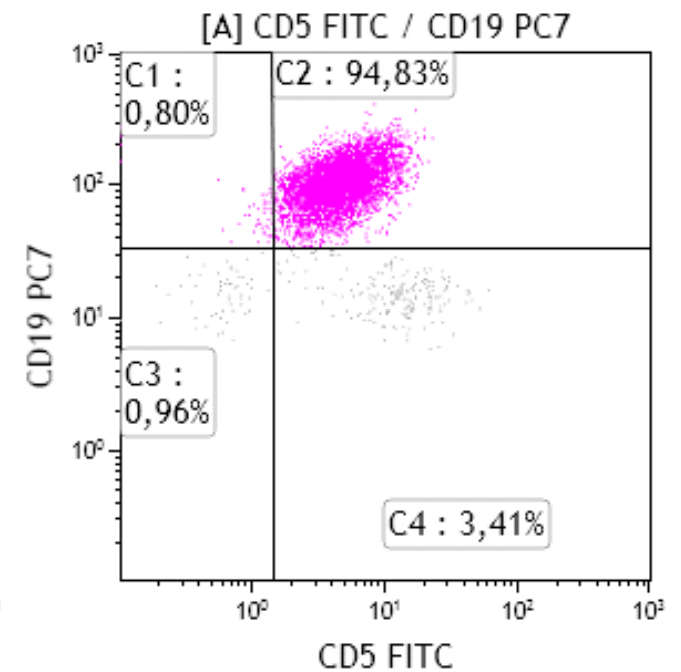
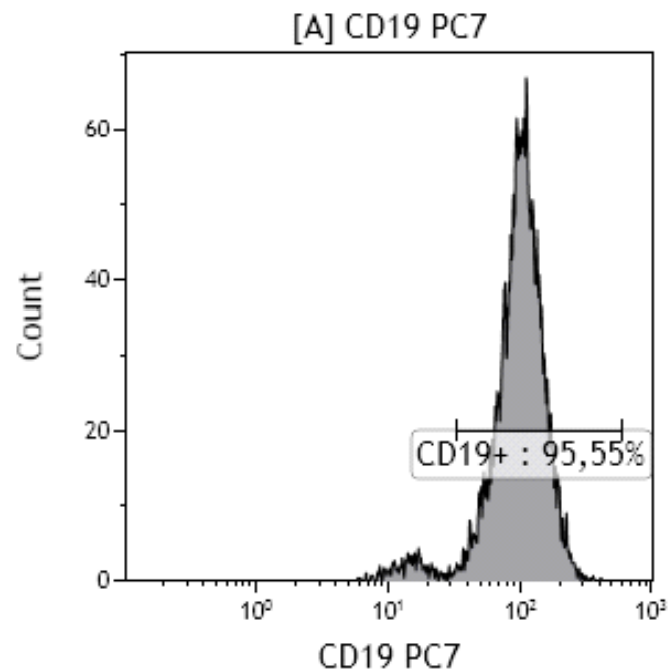
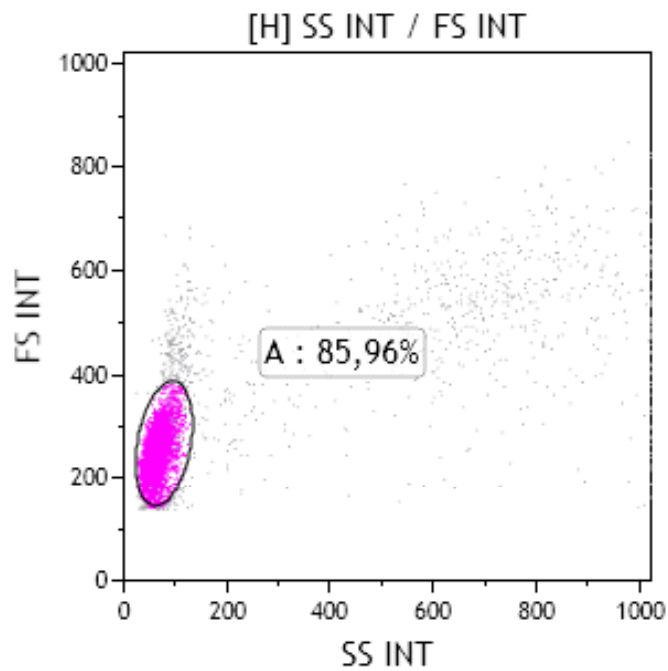
- pacientka z revmatologie  
- léčba např. rituximabem způsobuje depleci B-lymfocytů (po 4-6 měsících návrat k normálním hladinám)

# Pacient: muž, \* 1966



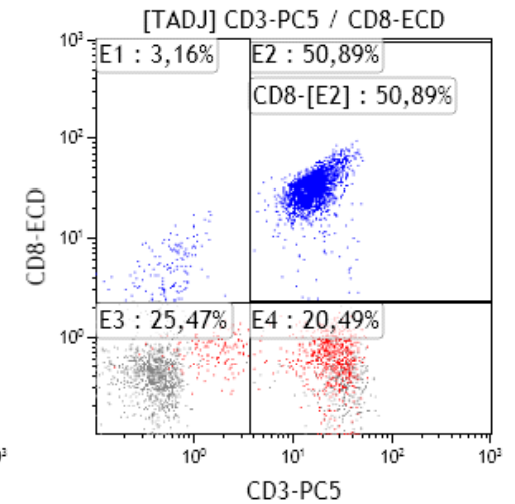
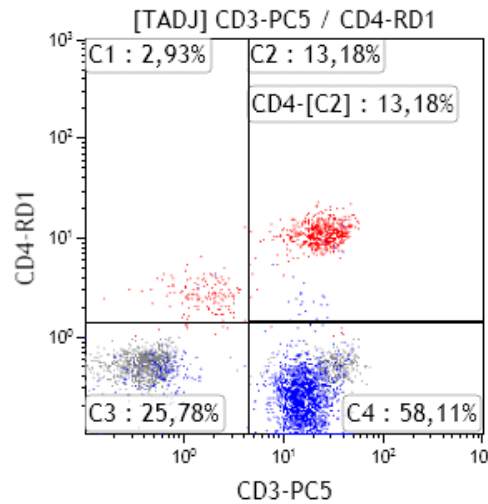
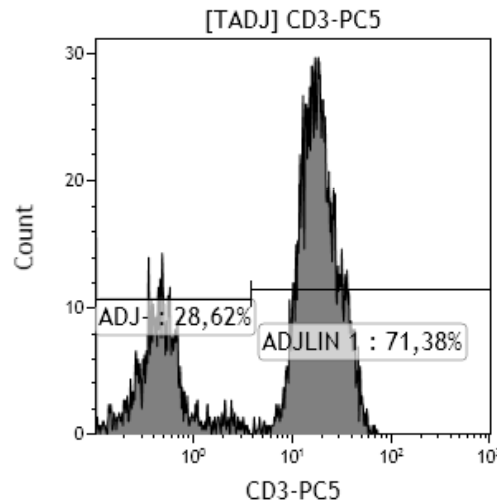
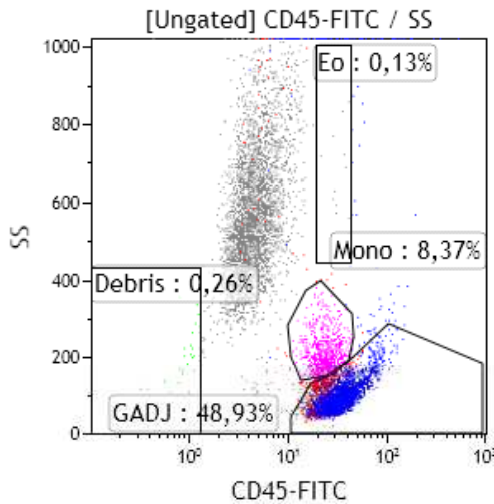


# CD5+CD19+



**CD5+CD19+ : 94.8%**

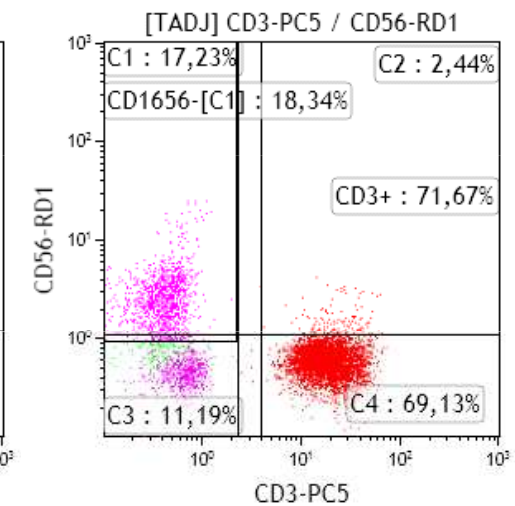
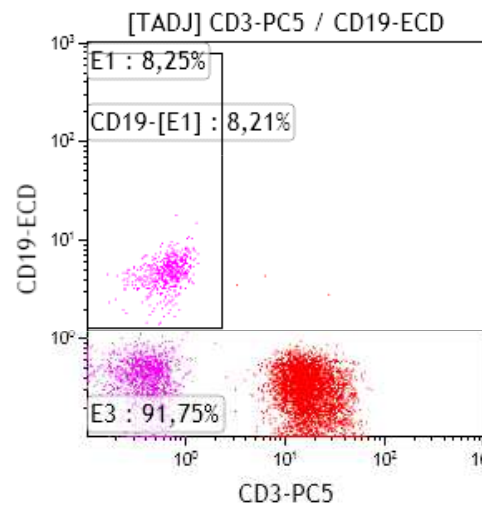
# Pacient: M, \*1999



**převrácený poměr  
CD4/CD8!**

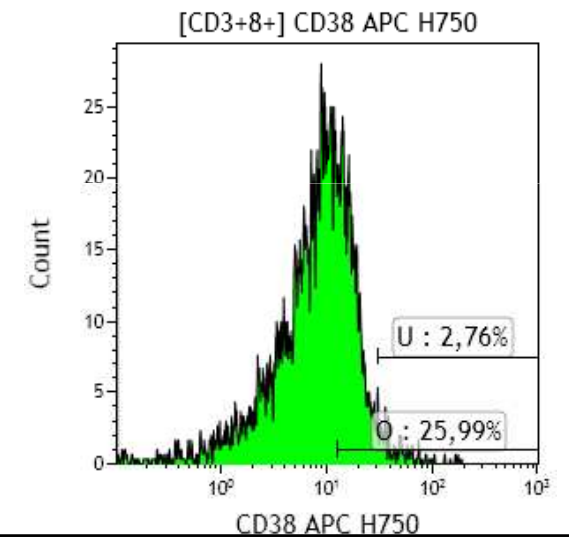
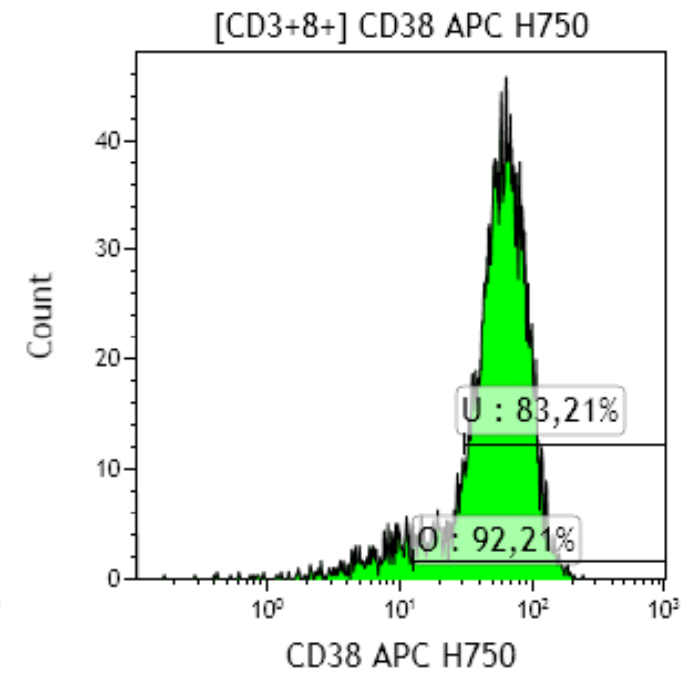
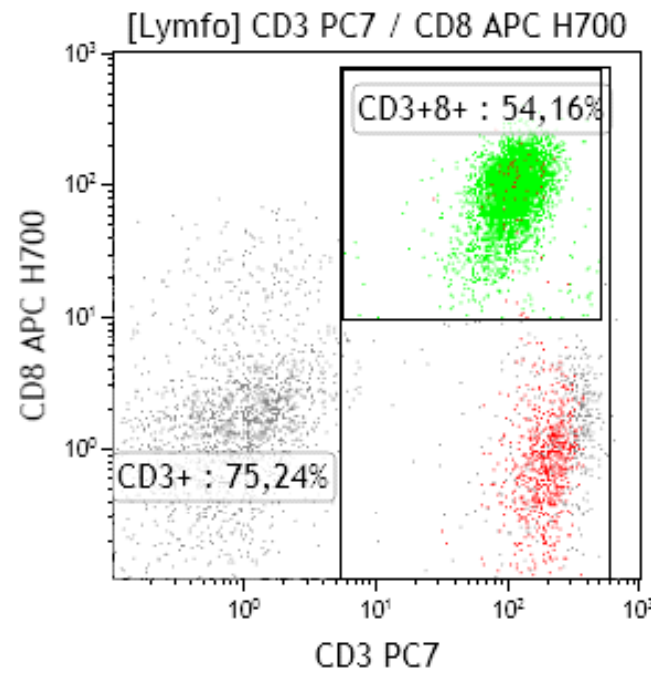
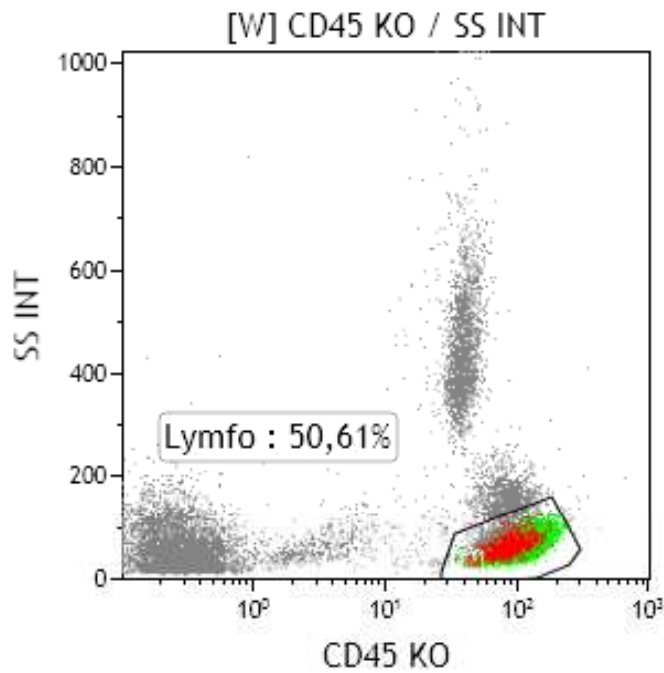
CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

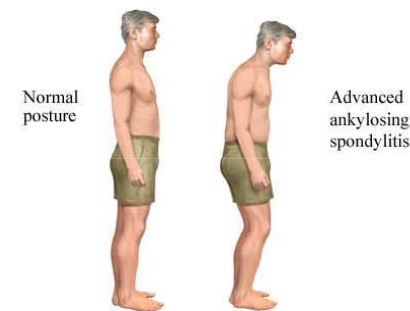


**virová infekce???**

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

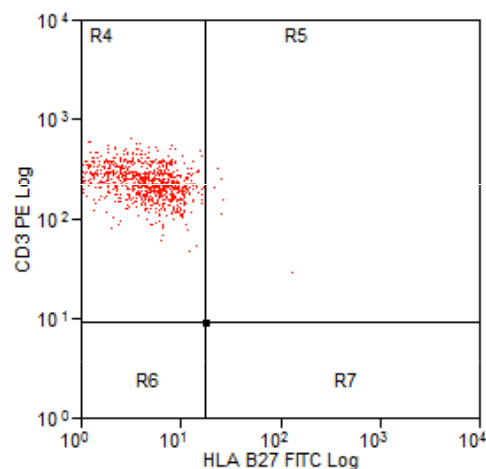


# HLA-B27

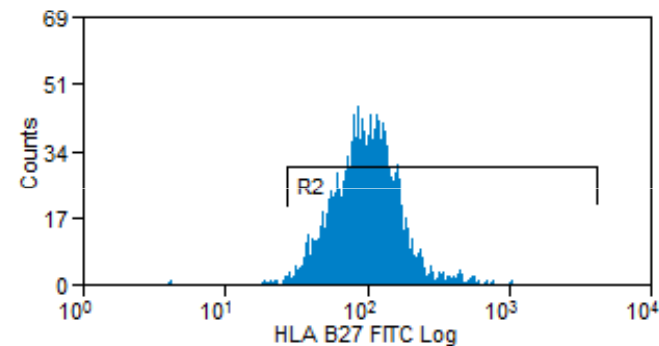
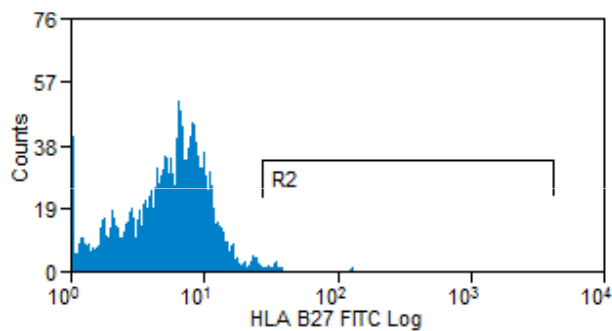
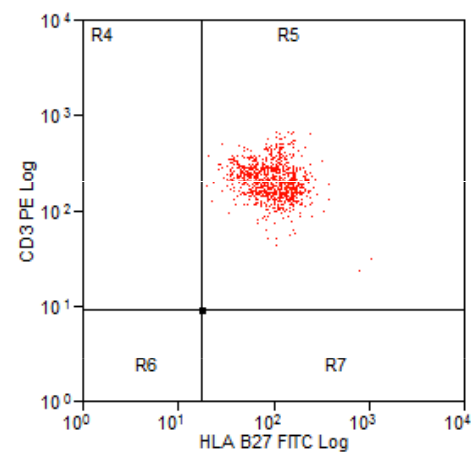


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida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

negativní



pozitivní

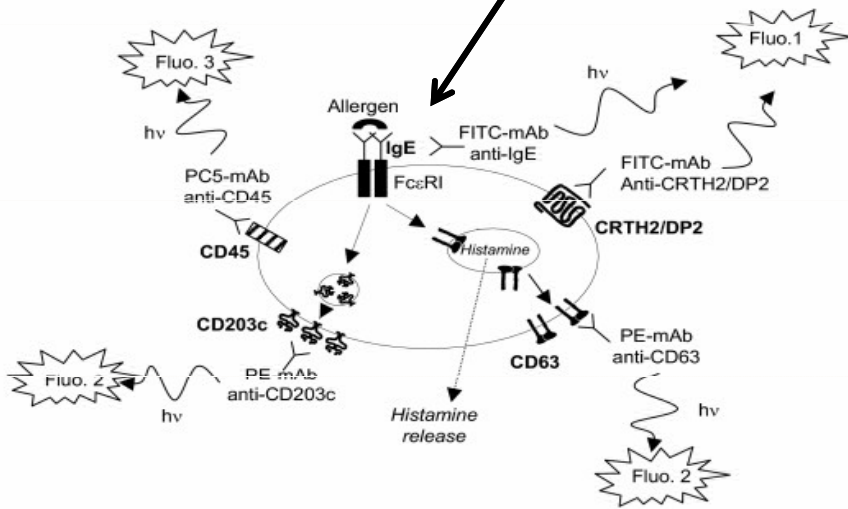


# Test aktivace bazofilů (bazotest)

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

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

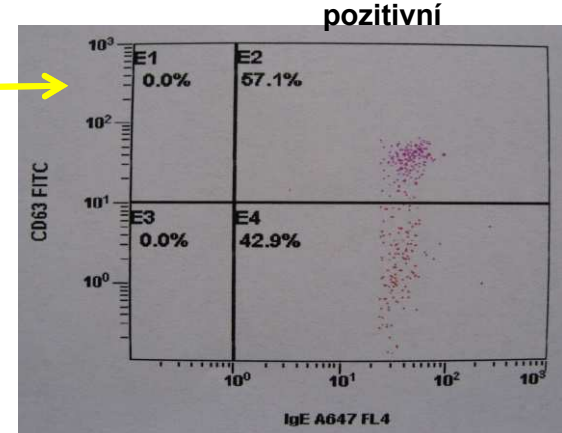
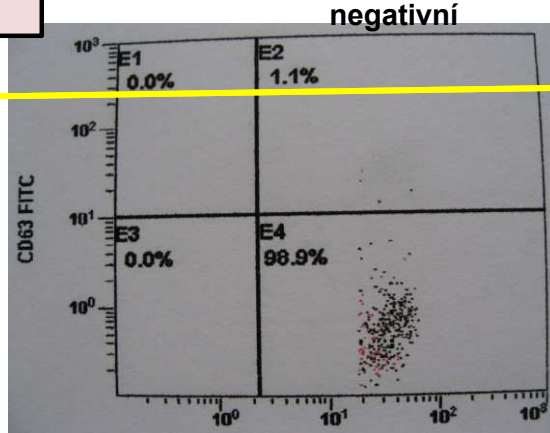
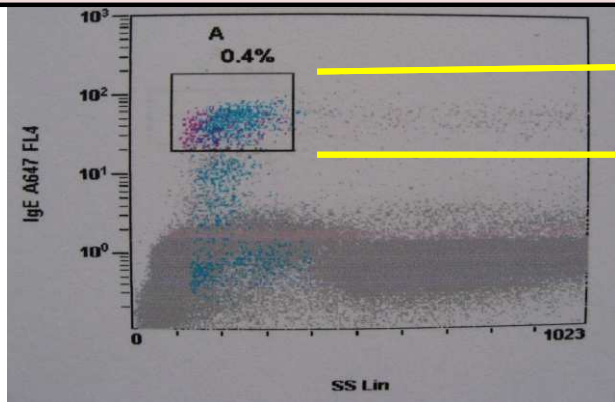
**založen na expresi aktivačního znaku (CD63) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem in vitro**



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





**DĚKUJI ZA POZORNOST!**