

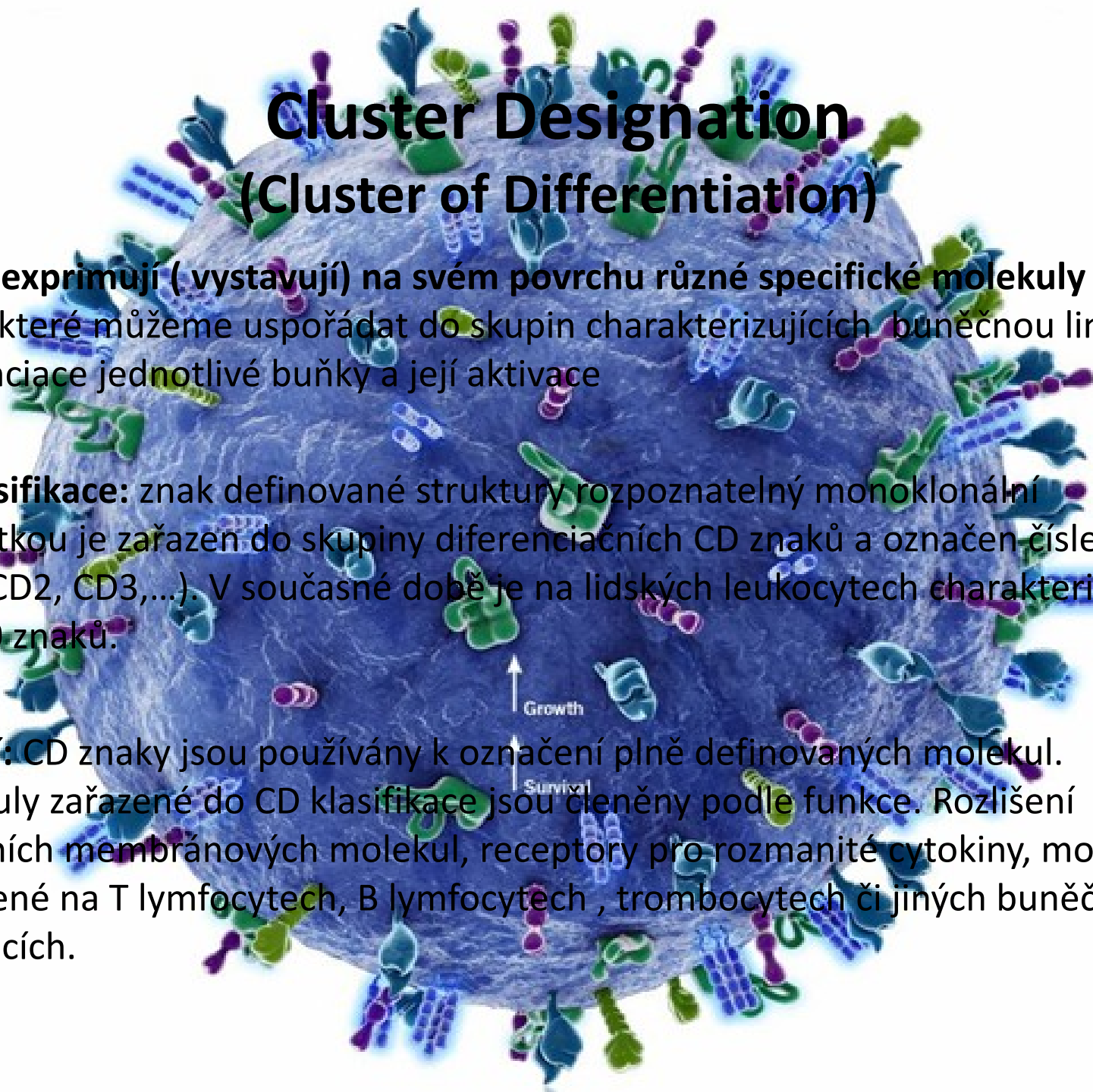
Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulací

Jana Nechvátalová

Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

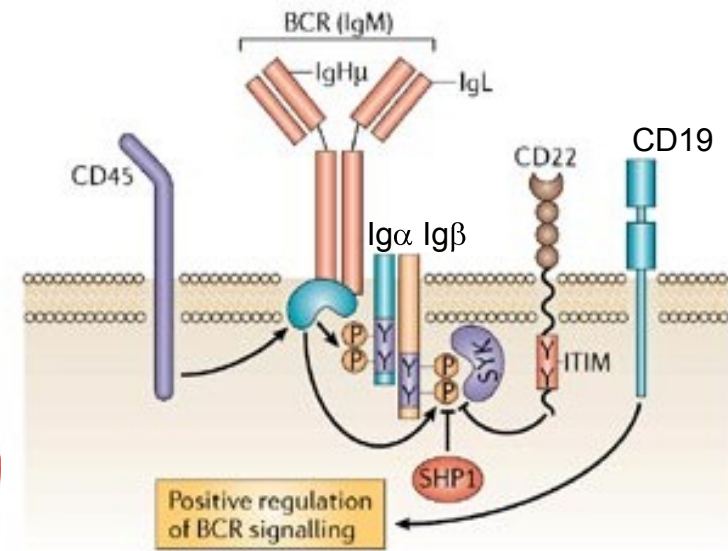
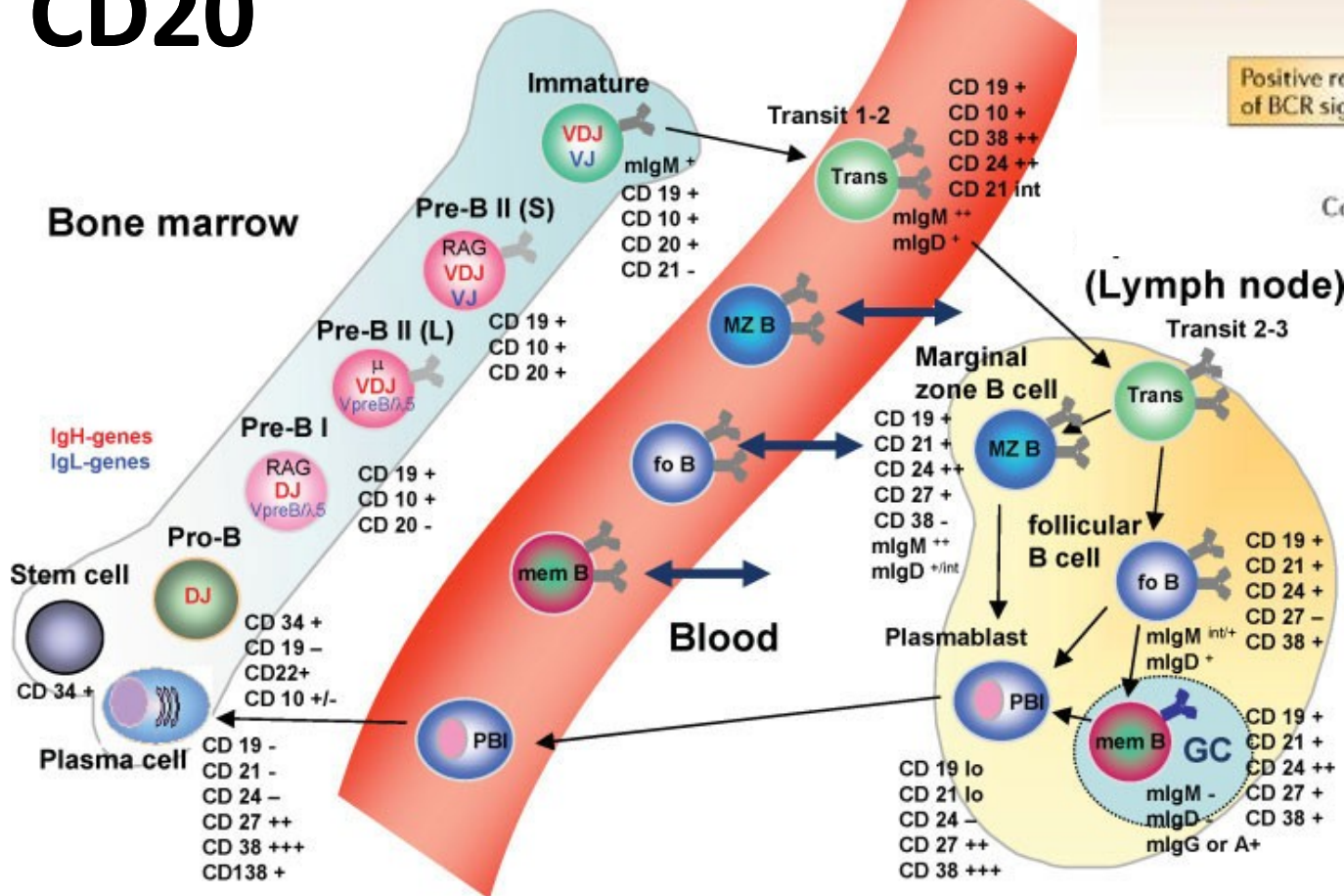
- **buňky exprimují (vystavují) na svém povrchu různé specifické molekuly** – znaky, které můžeme uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav diferenciaci jednotlivé buňky a její aktivace
- **CD klasifikace:** znak definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou je zařazen 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



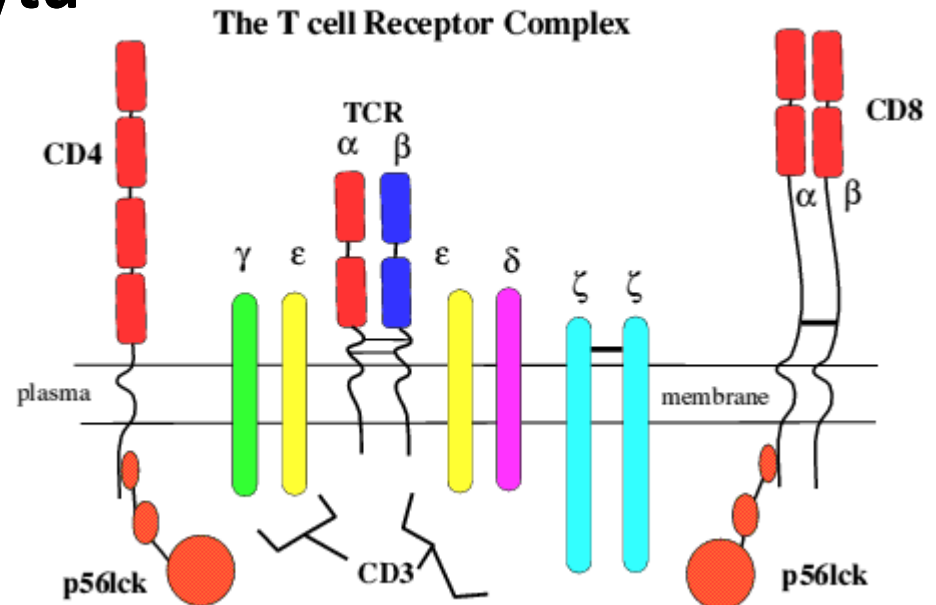
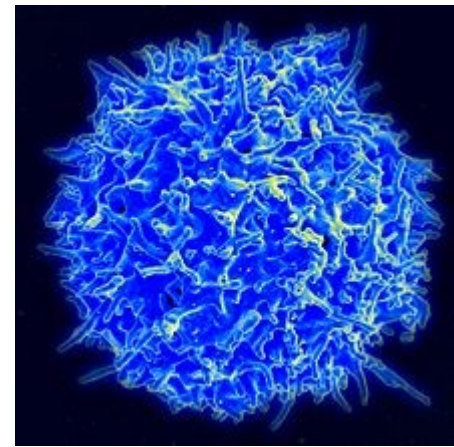
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

T lymfocyty

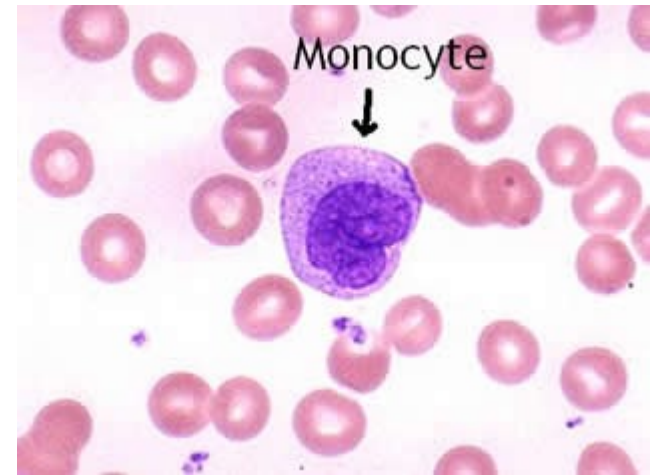
CD3 na povrchu všech T lymfocytů

CD4 na povrchu T_H lymfocytů (T_H1 , T_H2)

CD8 na povrchu T_C lymfocytů



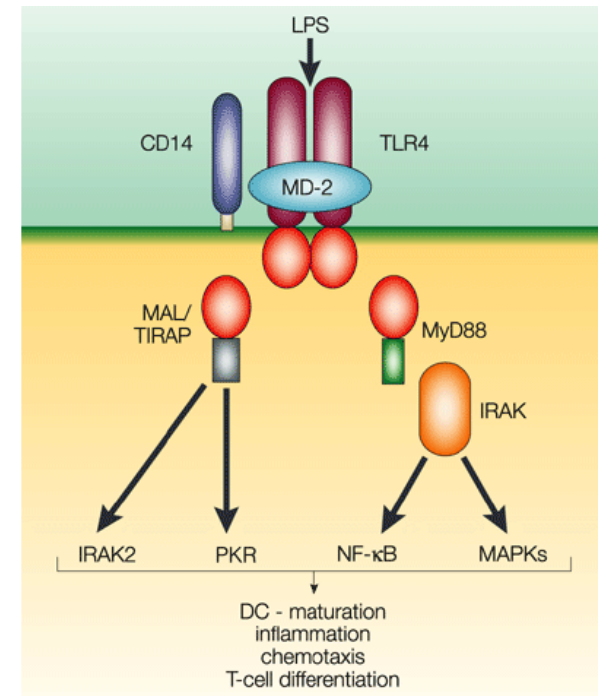
Monocyty



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)

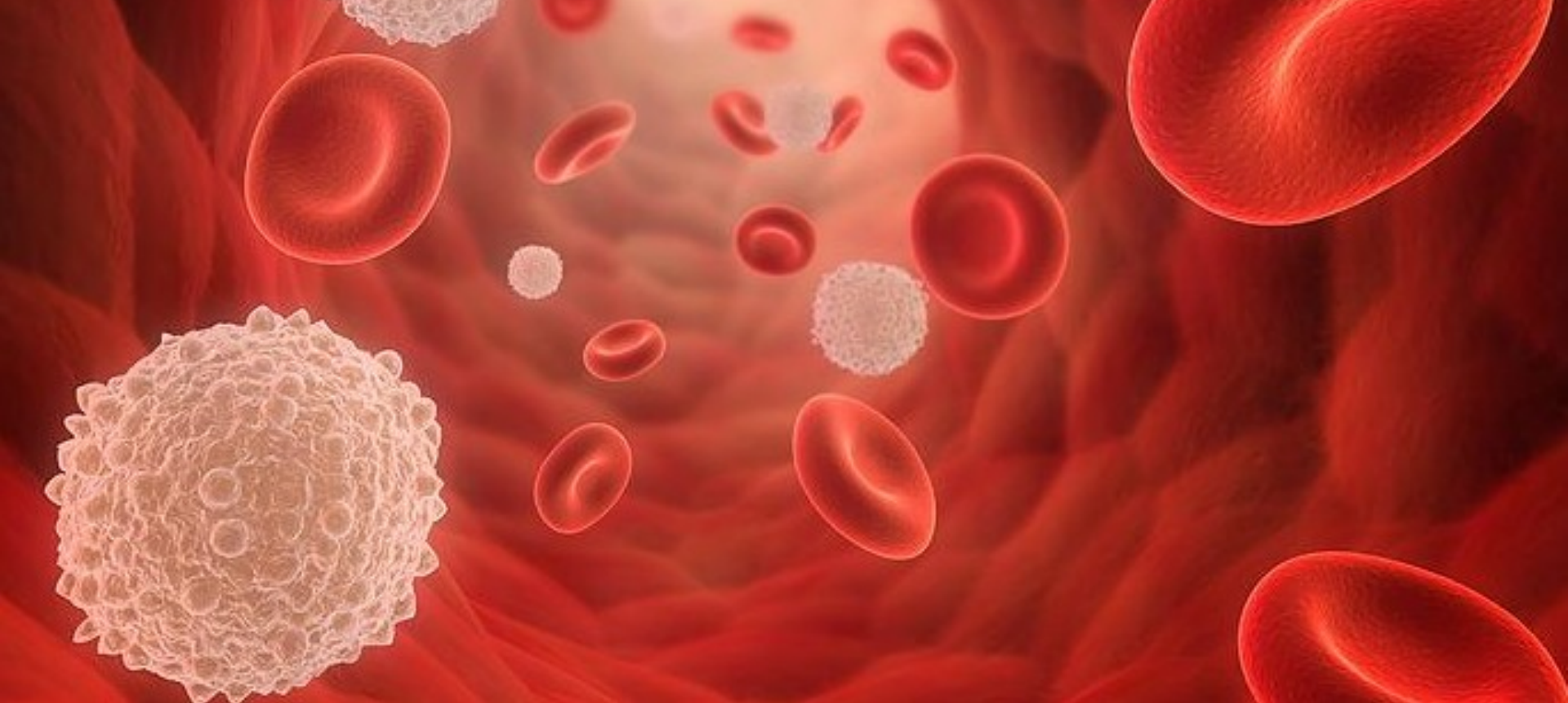


Pozn. **NKT** buňky

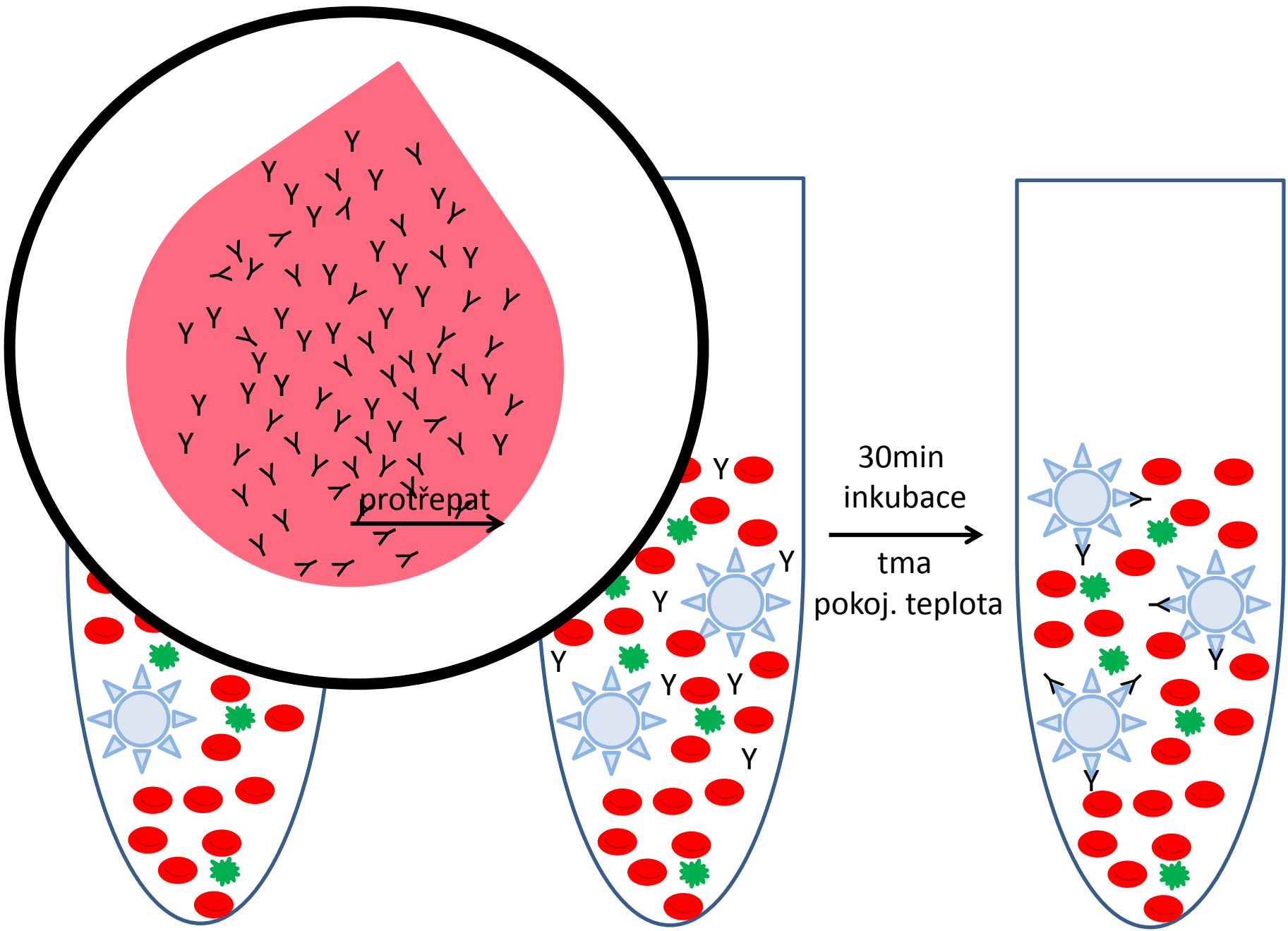
CD16+

CD56+

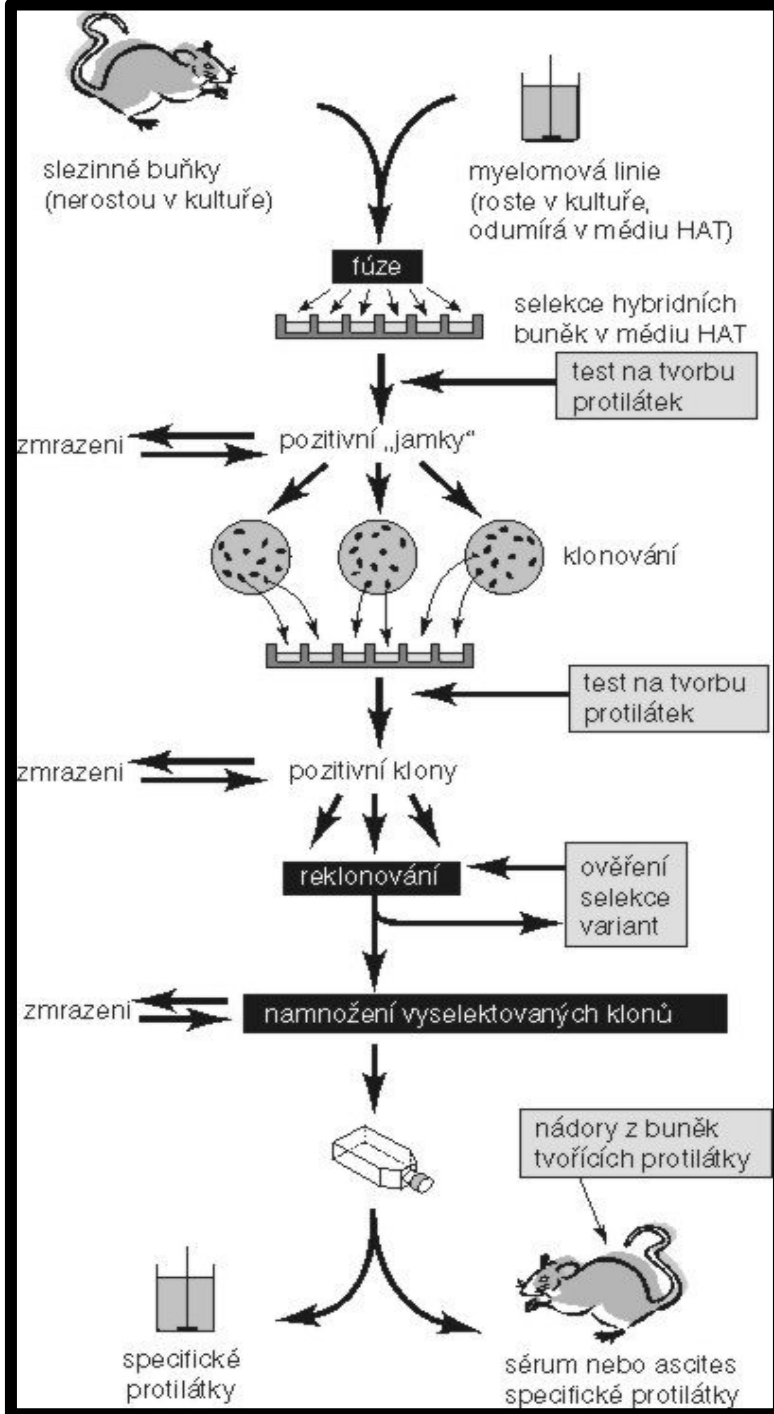
CD3+



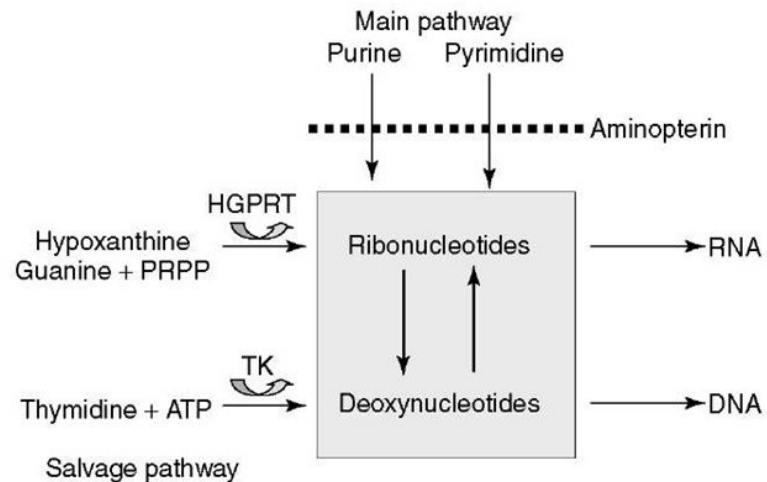
Pro stanovování
lymfocytárních subpopulací
odebírat krev do zkumavky s **EDTA**



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 Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl,
46,95 g bezvodého Na_2SO_4

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

Průtoková cytometrie

FLOW CYTOMETRY

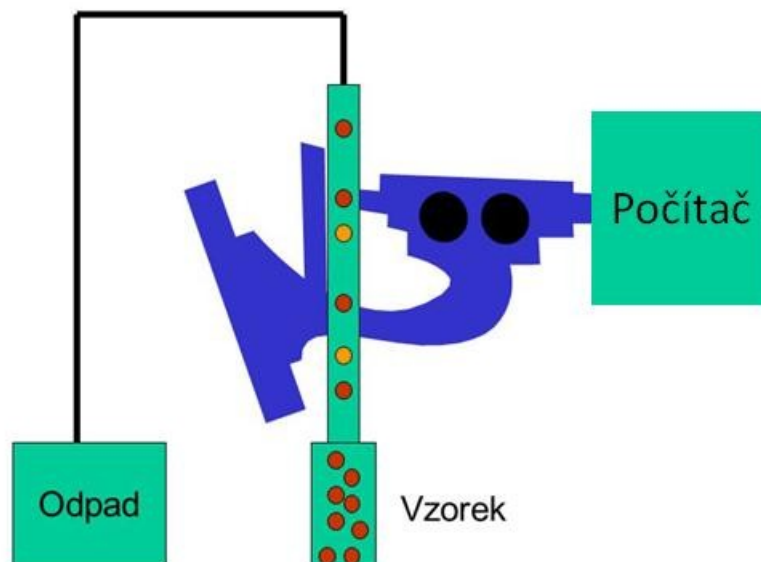


Průtoková cytometrie

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)
- Buněčná biologie (DNA, RNA analýza)
- Mikrobiologie (rezistence na antibiotika, kintetika)

Co měříme?

- Odražené světlo a emitovanou fluorescenci
- Částice o velikosti 0,2-150 μm

- Prokaryotické a eukaryotické buňky
- Virové částice, bakterie, houby
- Komplexy antigen-protilátky

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

Tři hlavní systémy průtokového cytometru

Fluidní systém

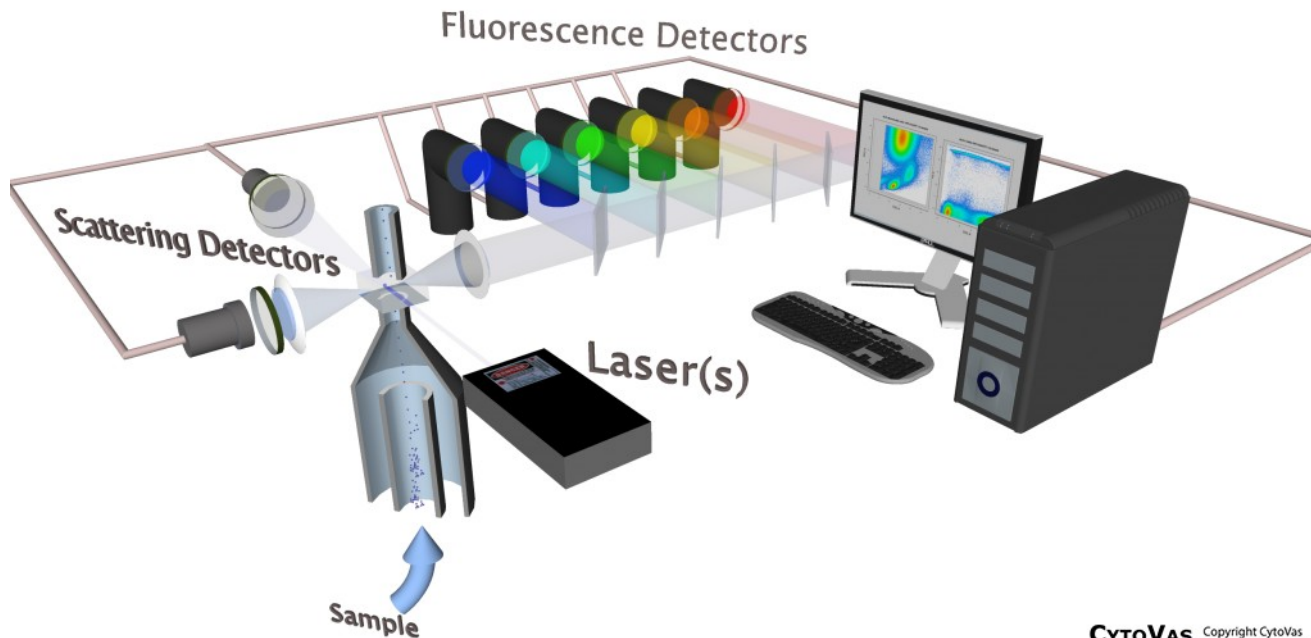
transport částic k laserovému paprsku

Optický systém

laser, zrcadla a optické filtry

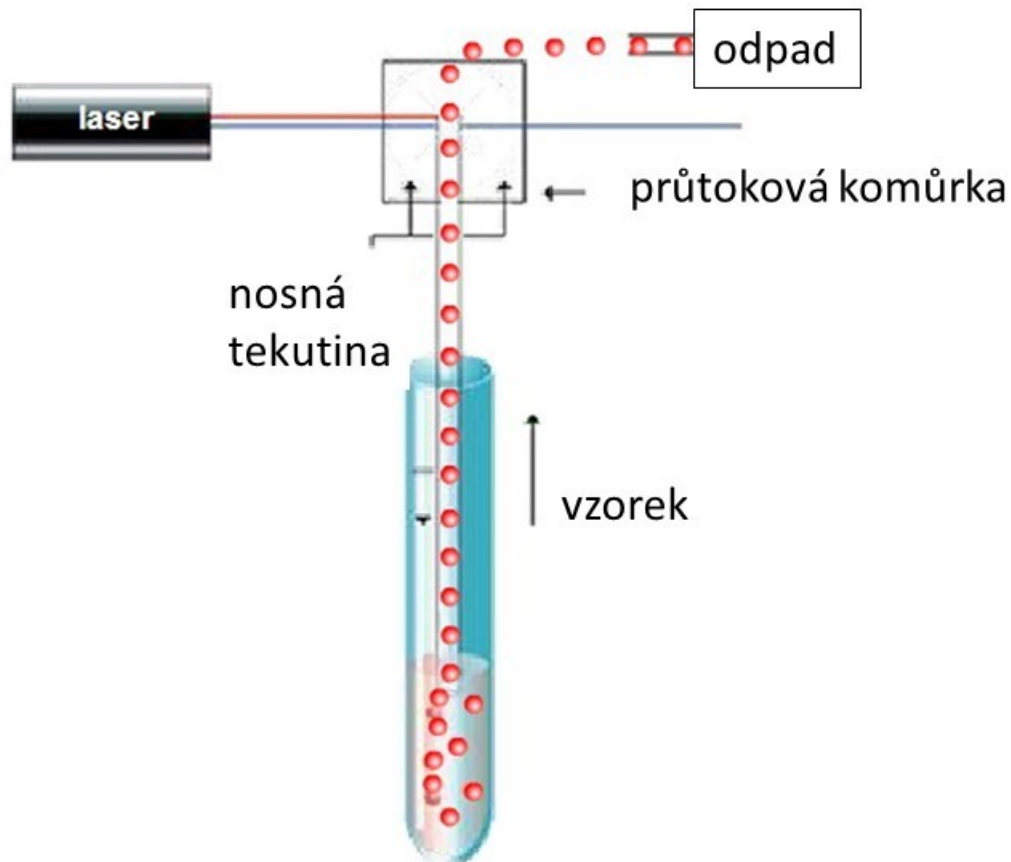
Elektronický systém

převod detekovaných světelných signálů na signály elektronické, které mohou být vyhodnoceny počítačem



Fluidika

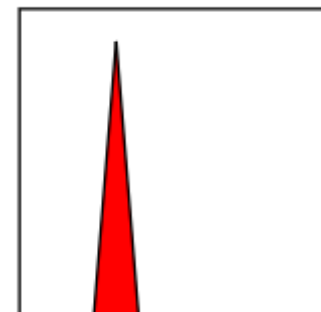
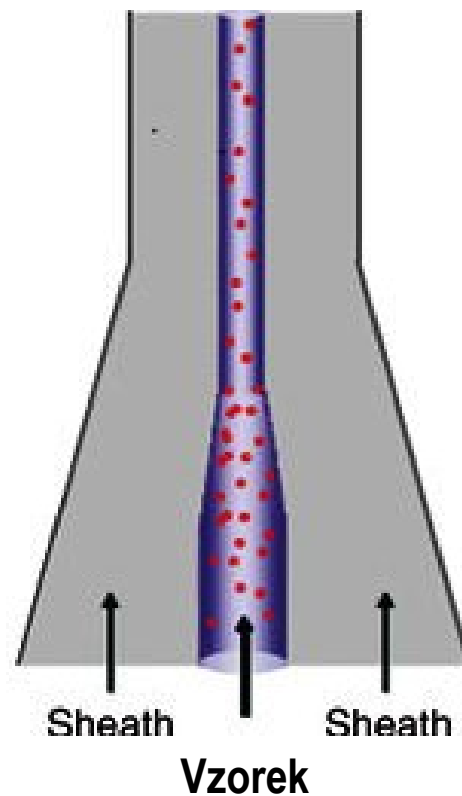
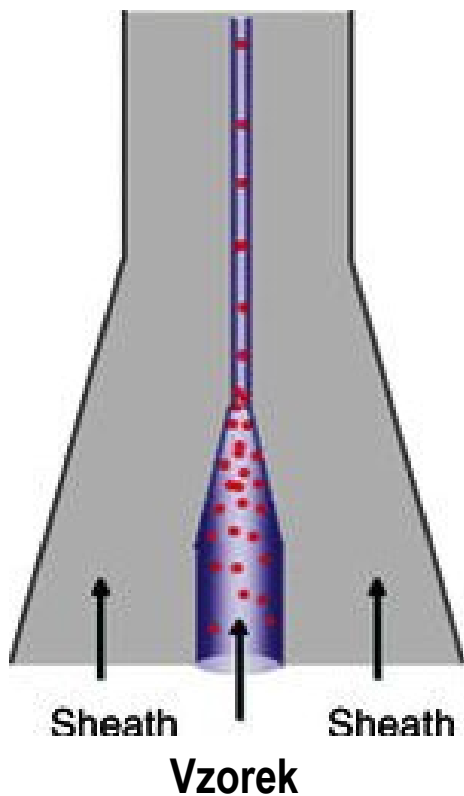
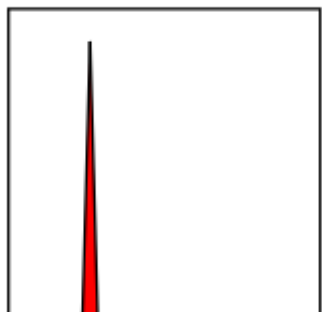
- transport částic v proudu nosné tekutiny k laserovému paprsku



[Hydrodynamická fokusace](#)

Nízký tlak vzorku
Úzký proud vzorku
Vhodné pro DNA analýzu

Vysoký tlak vzorku
Široký proud vzorku
Nevhodné pro DNA analýzu



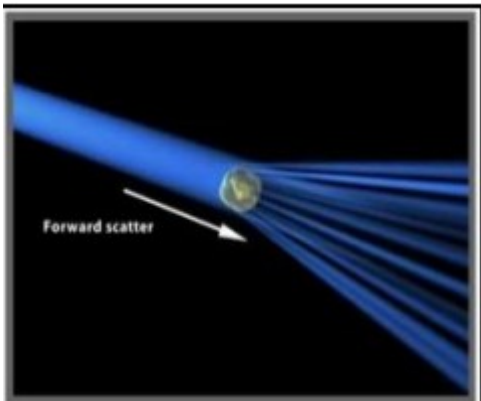
Velikost vs. granularita

Light Scatter: procházející částice vychýlí dopadající světlo

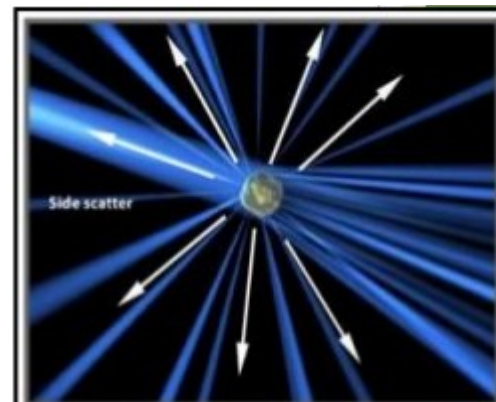
Forward Scatter (velikost)

Side Scatter (granularita)

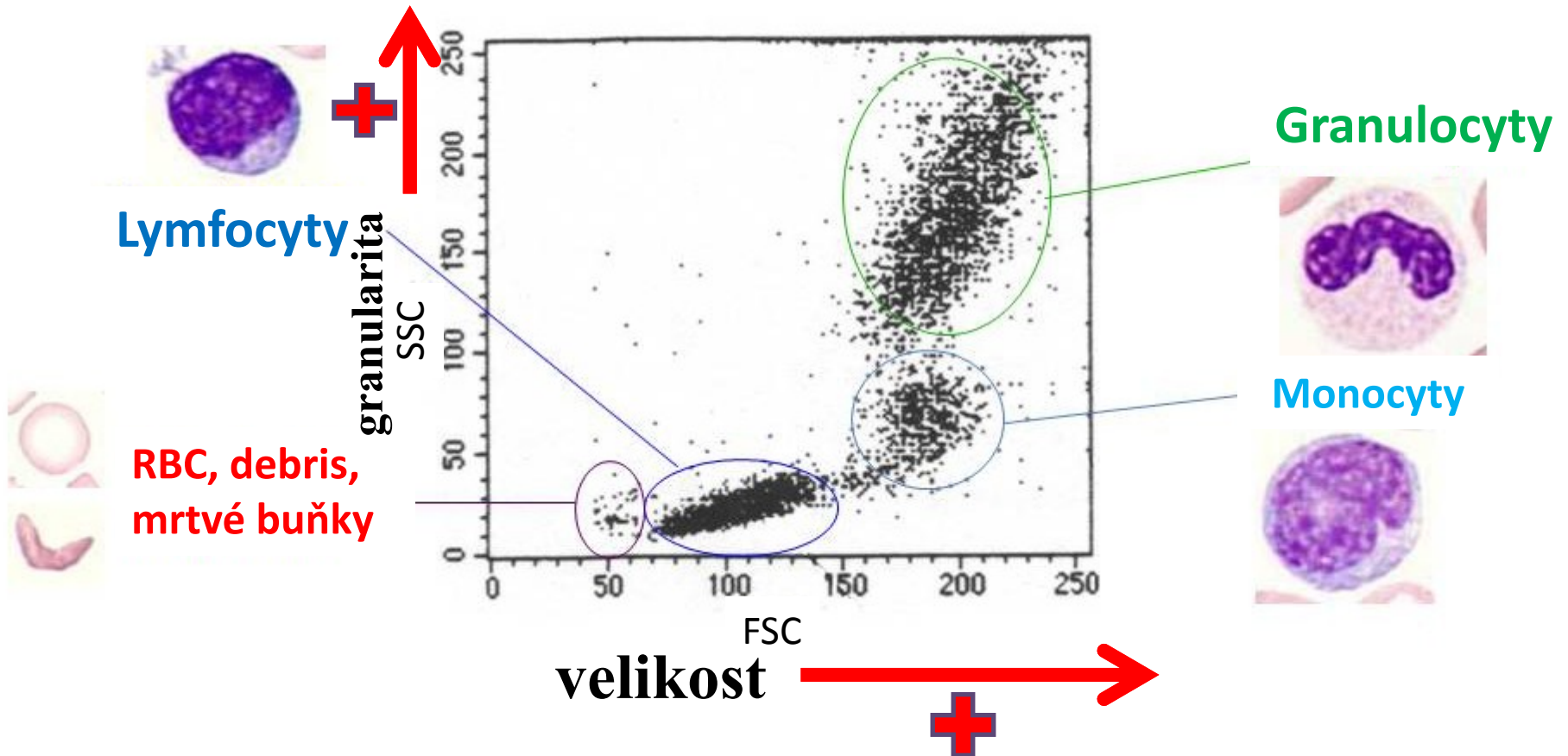
Přímý rozptyl - velikost buněk



Boční rozptyl - granularita buněk



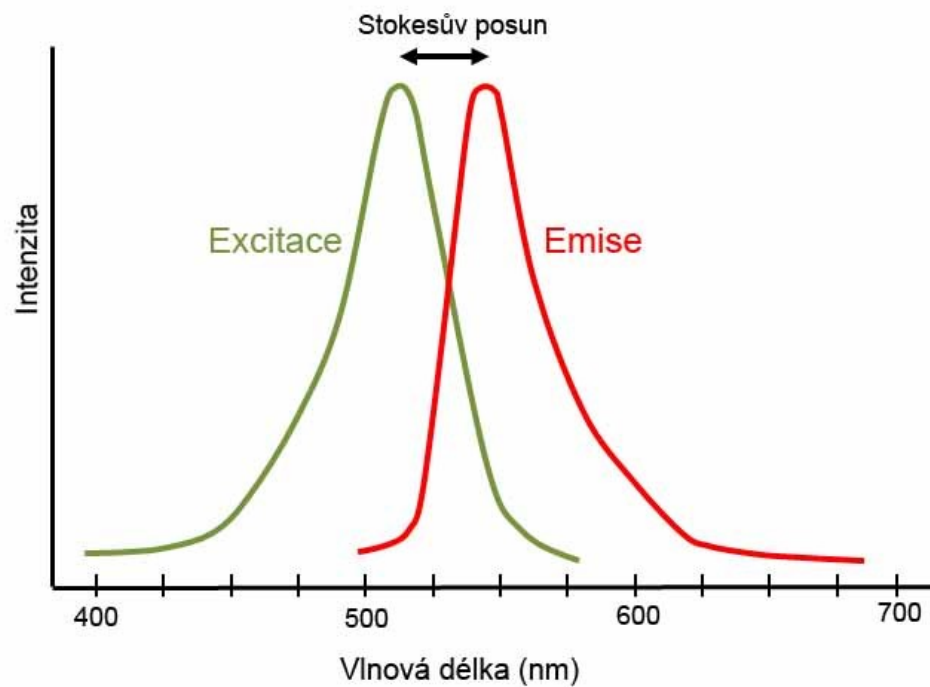
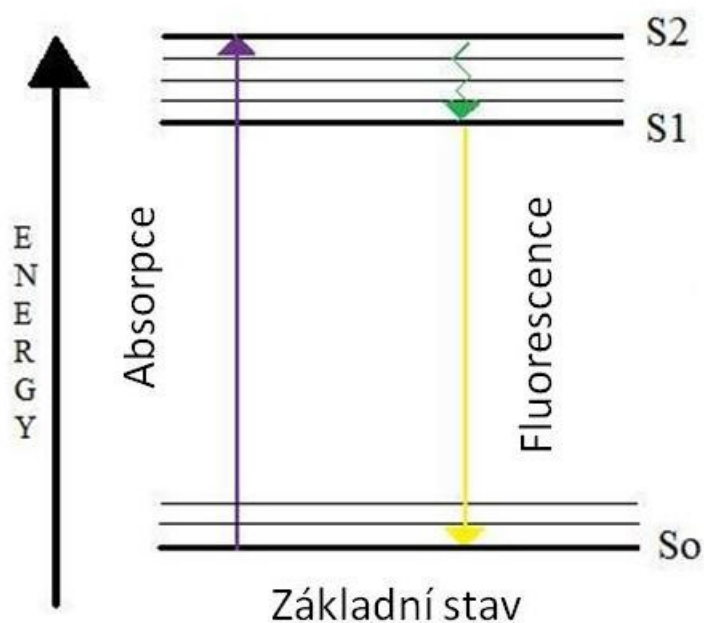
FSC vs. SSC



Fluorescence

Mnoho buněk má stejnou či podobnou morfologii

- fluorochromy značené monoklonální protilátky specifické k určitému epitopu



Fluorochromy

- Jsou excitovány vhodnou vlnovou délkou
- Emitují světlo o specifické delší vlnové délce
- I neznačené buňky mohou být fluorescentní díky slabé autofluorescenci

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

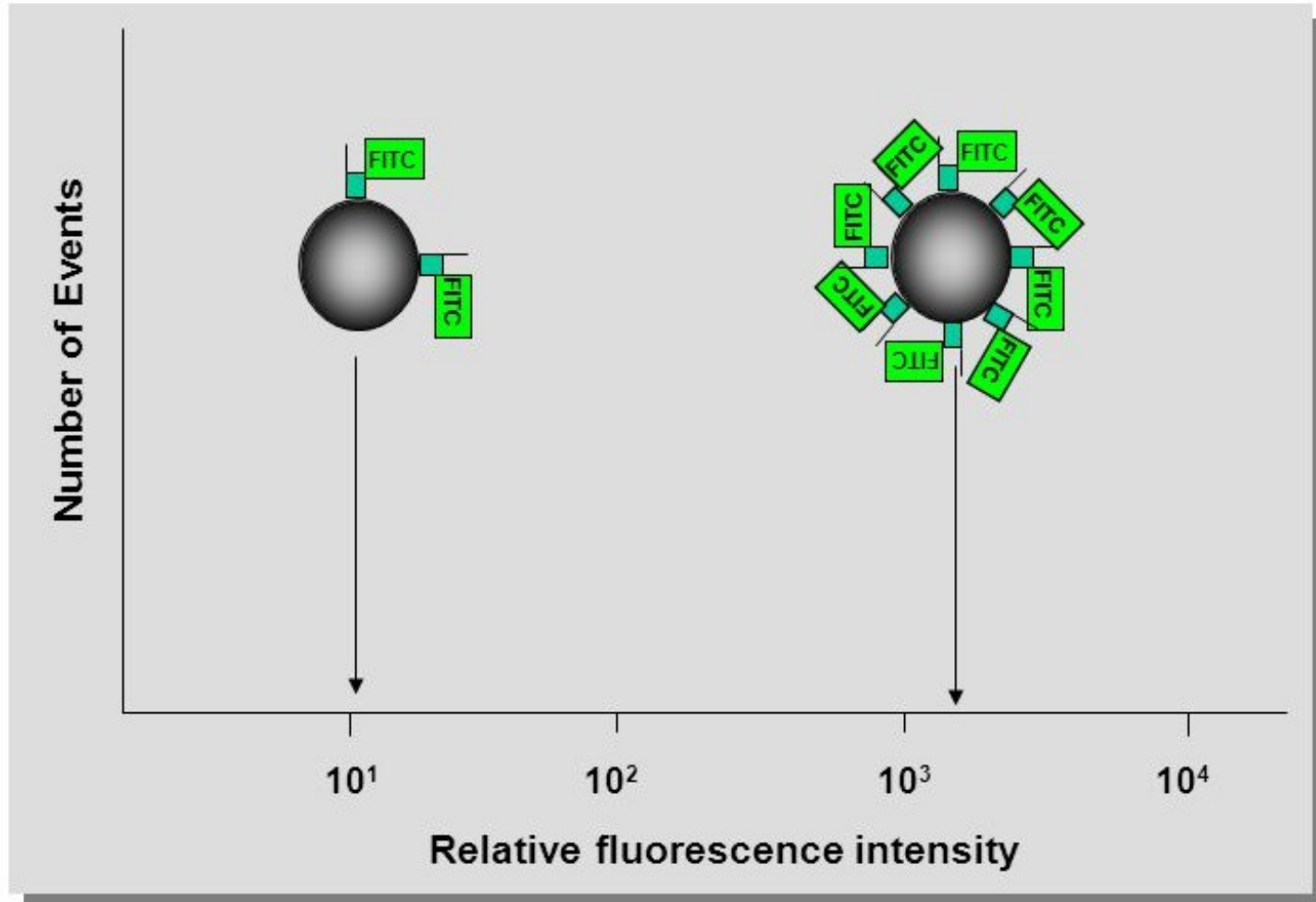
Schopné absorbovat fotony budícího záření (např. 488 nm)

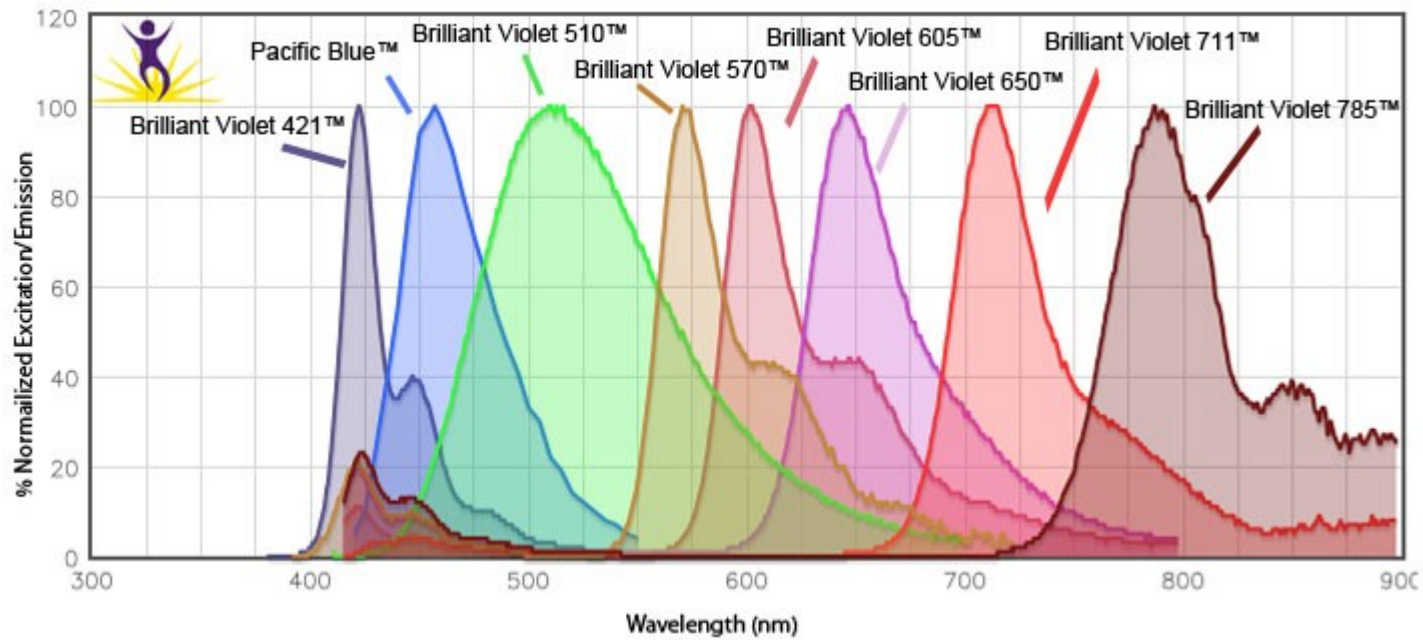
a následně (10^{-8} s) emitovat fotony s

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

Fluorescenční světlo má tedy jinou barvu

Intenzita fluorescencije

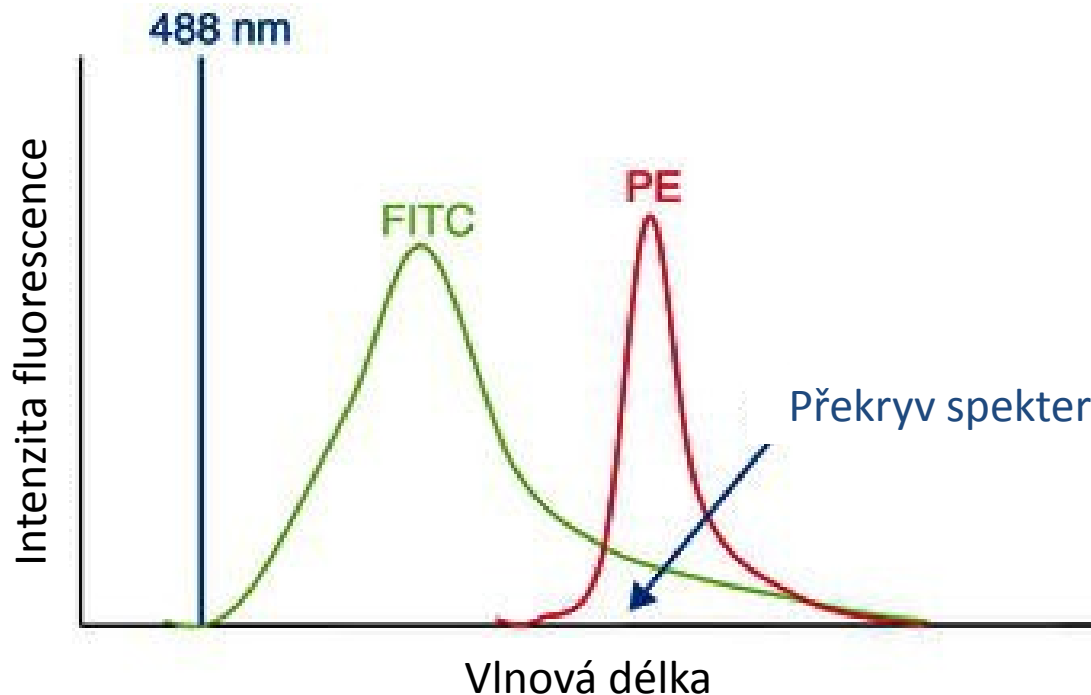




Překryv spekter

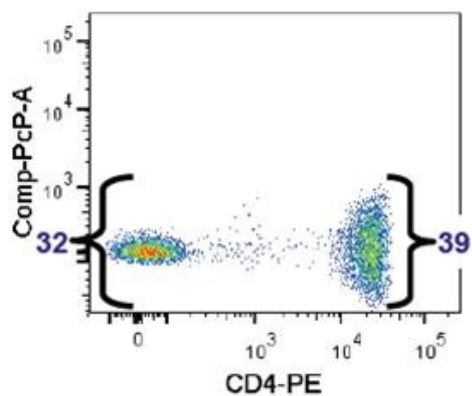
Fluorochromy typicky emitují světlo v širokém spektru vlnových délek

V závislosti na uspořádání filtrů, detektory mohou zachytit fluorescenci od jiných fluorochromů, které jsou detekovány v jiných kanálech (tzv. přesvit, překryv spekter)

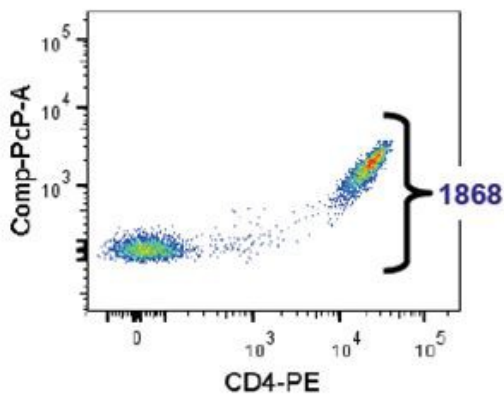


Kompenzace

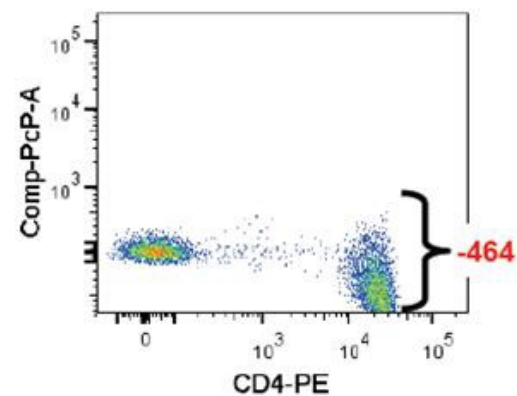
Přesvit je třeba „kompenzovat“, tak aby detektor zaznamenal signál pouze 1 fluorochromu



Properly compensated



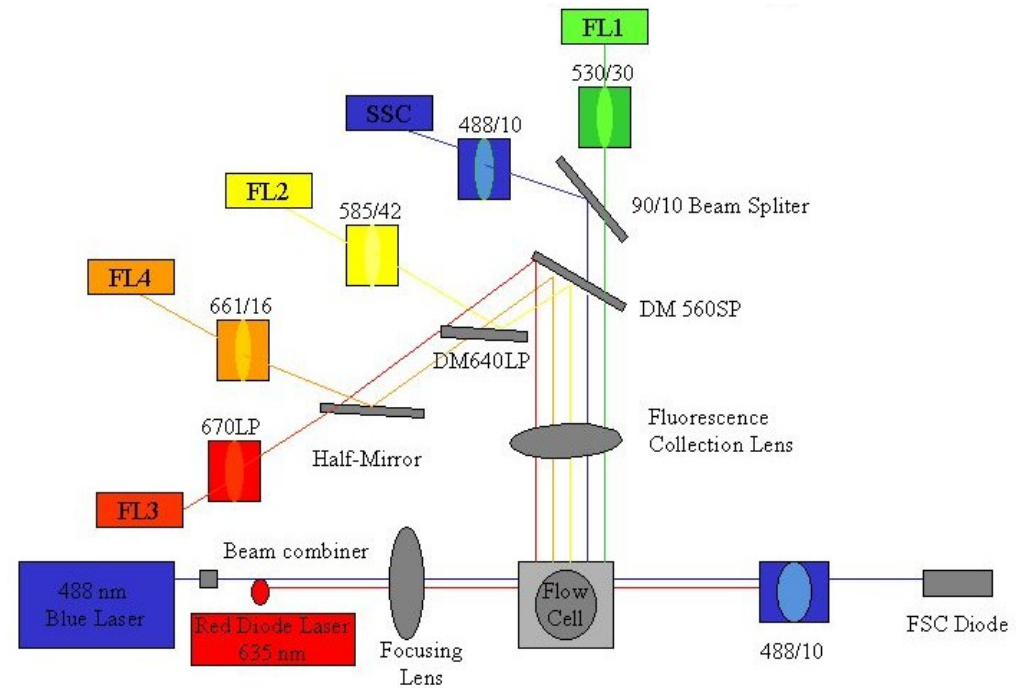
Under compensated

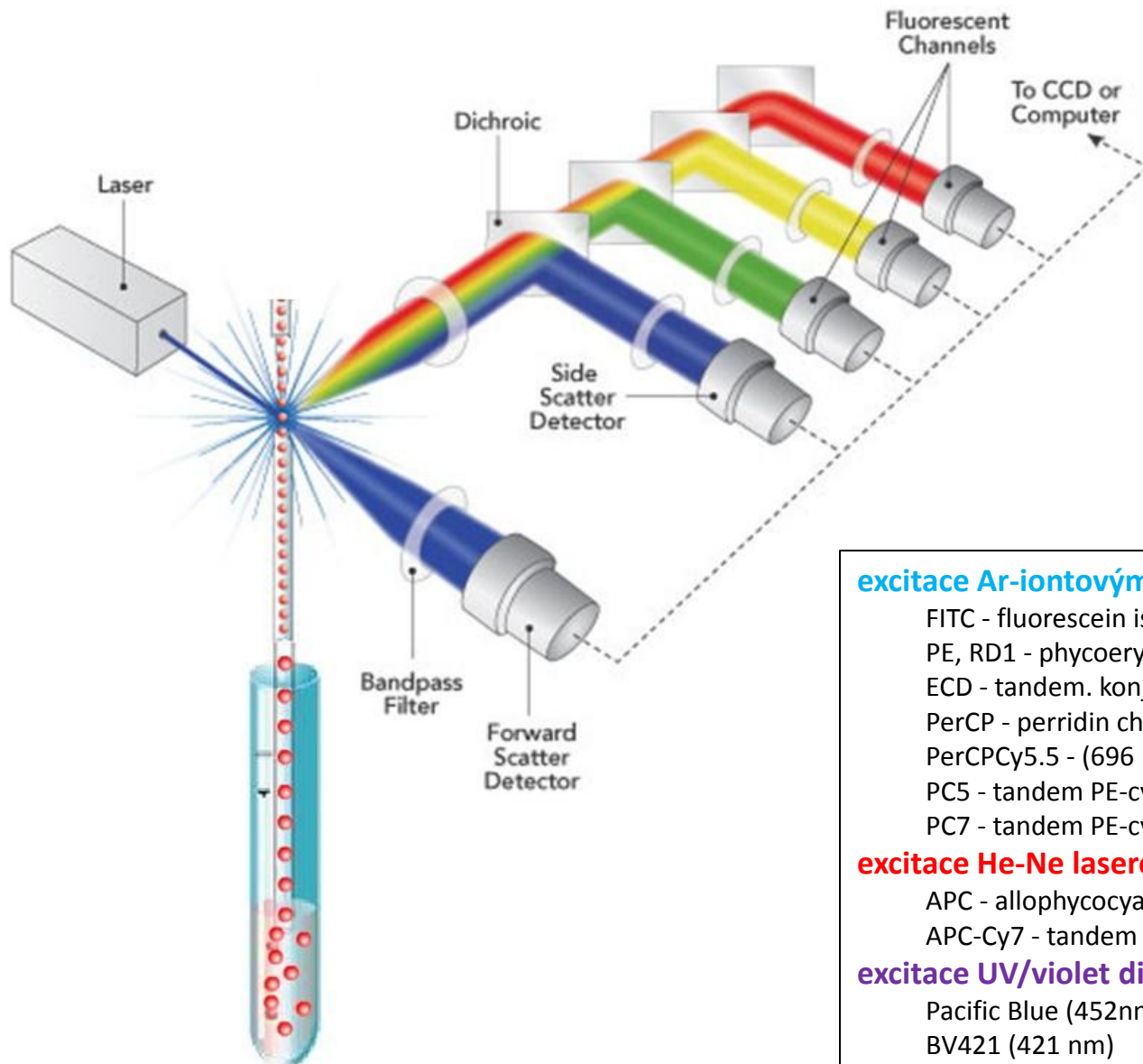


Over compensated

Optika

- Excitační optika
laser a systém čoček,
které zaostřují a směřují
laserový paprsek
- Sběrná optika
soustava čoček, zrcadel
a filtrů, které vedou
a rozdělují světlo různých
vlnových délek na
příslušné detektory





excitace Ar-iontovým laserem (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)

excitace He-Ne laserem/red diode (červený) - 633 nm

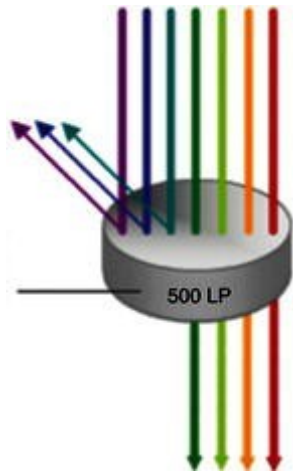
- APC - allophycocyanin (670 nm)
- APC-Cy7 - tandem APC-cyanine 7 (778 nm)

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

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

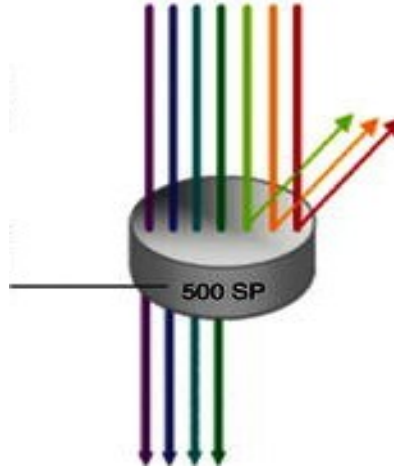
Optické filtry

Long Pass filtry (LP)
propouští všechny délky
vyšší než specifikovaná
vlnová délky



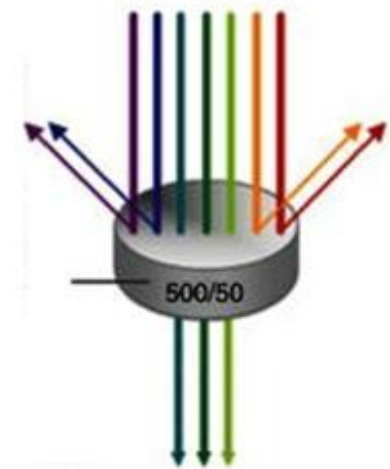
500LP

Short Pass filtry (SP)
propouští všechny délky
kratší než specifikovaná
vlnová délka



500SP

Band Pass filtry (BP)
propouští specifické
rozmezí vlnových délek

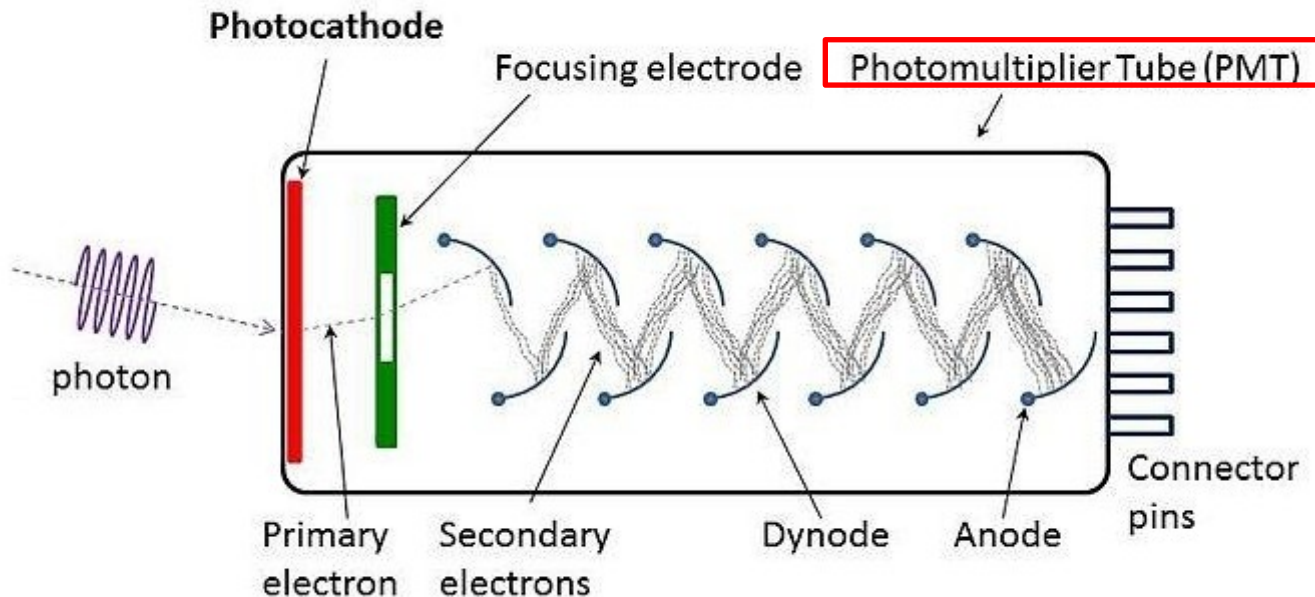


500/50
500±25

Dichroické filtry - umístěny pod úhlem 45°
část světla odráží pod úhlem 90°, část propouští

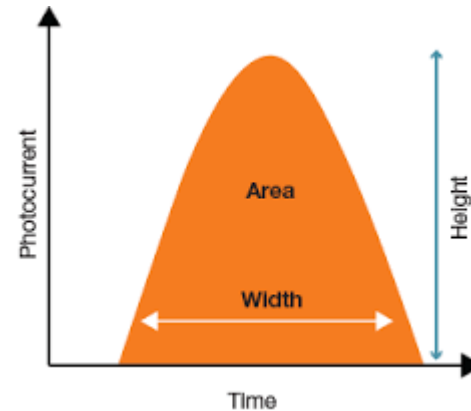
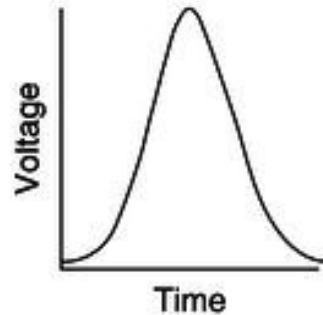
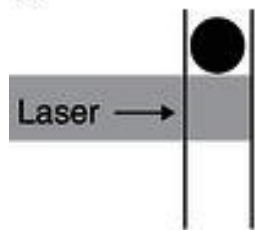
Elektronika

- Světelné signály jsou převáděny na elektrické
- Detektory:
 - diody a fotonásobiče (PMT, photomultiplier tube)
 - (FSC) (SSC a fluorescence)

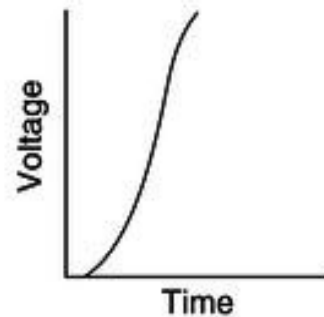
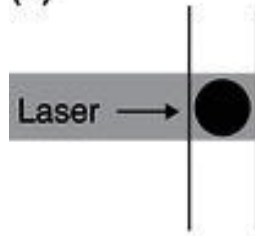


Vznik napět'ového pulzu

(c)



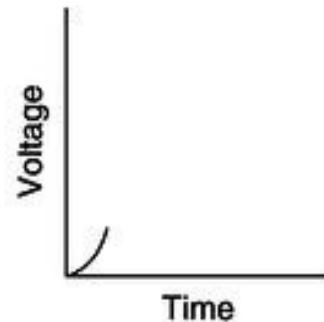
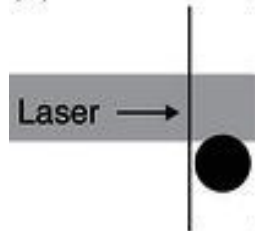
(b)



Výška:
maximální hodnota fluorescence či scatteru

Plocha:
Integral pulzu

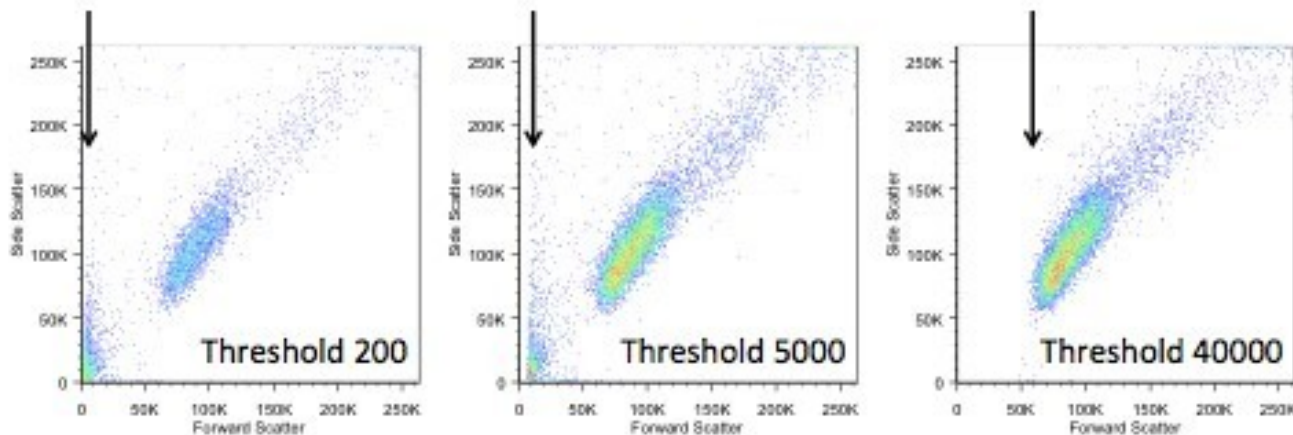
(a)



Šířka:
Čas trvání pulzu

Threshold (práh)

- Detektory jsou extrémě citlivé a detekují signály z různých zdrojů - prach, malé částice, debris
- K jejich eliminaci je třeba nastavit treshold
- Nastavuje se na jednom parametru
- Při imunofenotypizaci většinou FSC

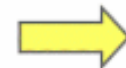


Amplifikace a digitalizace signálu (Analogue to digital convertor, ADC převodník)

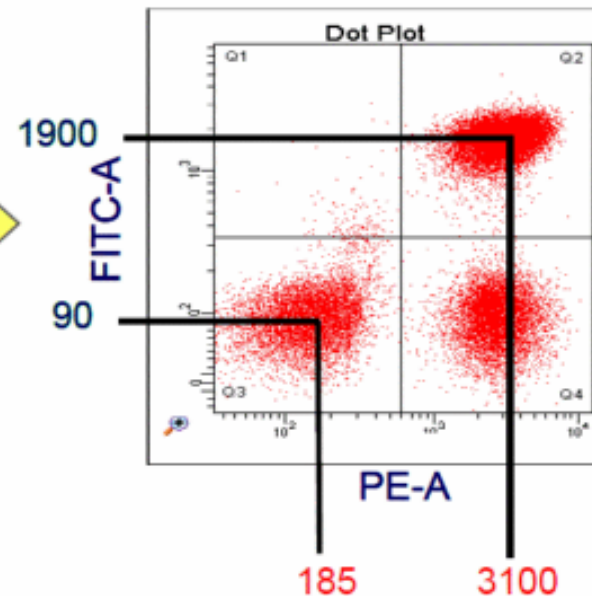
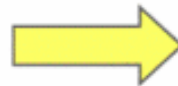
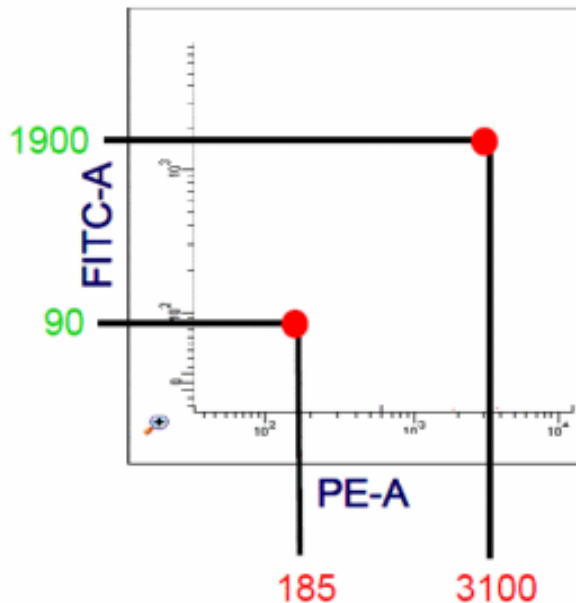
Analýza - pro každou buňku hodnoty všech parametrů

FCS-Data

	Time	FSC	SSC	FITC	PE
Event 1	0	60	120	90	185
Event 2	10	160	65	1900	3100
Event 3	30	650	160	2,688	3,189



Exportable as FCS File



Analýza naměřených dat

Data v LIST MODE FILE

Analyzační software

Kaluza

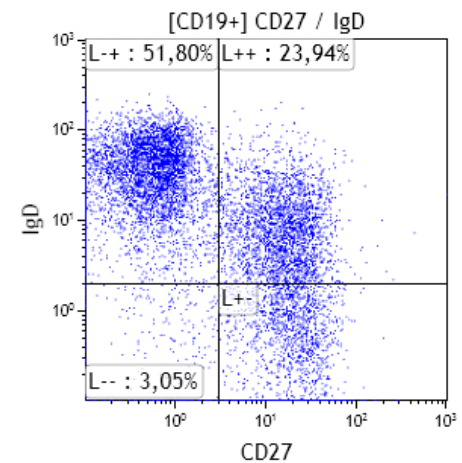
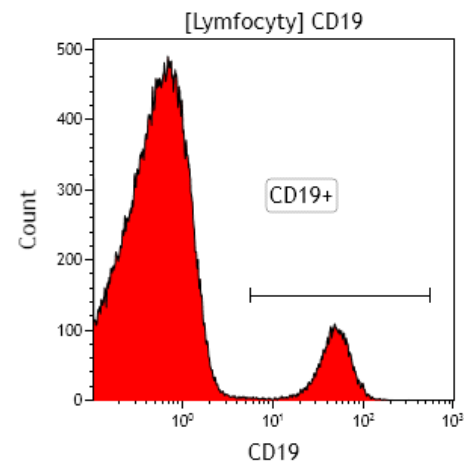
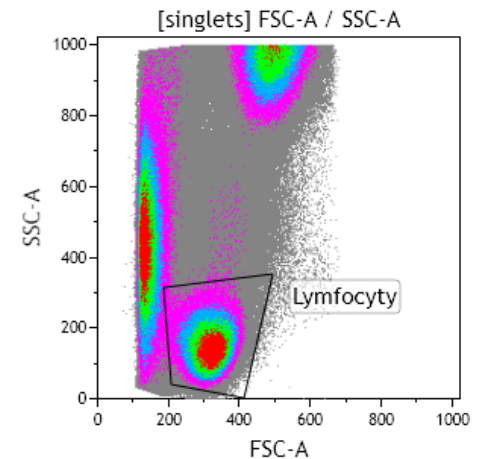
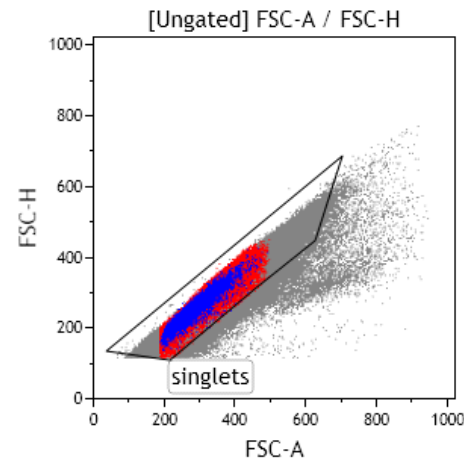
Infinicyt

DiVa

FlowJo

Summit

Vytvoření statistik



Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

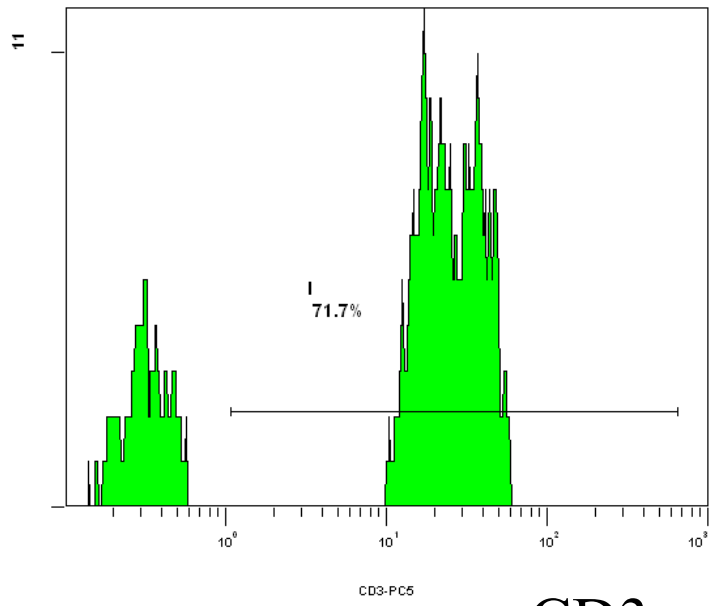
výhody

- Velké množství analyzovaného materiálu - velké množství dat
- Analýza trvá pouze několik minut a poskytuje velké množství informací.
- Lze provádět jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu.
- Jsou zde možné manipulační operace - např. třídít buňky s vybranými vlastnostmi (cell sorting)

nevýhody

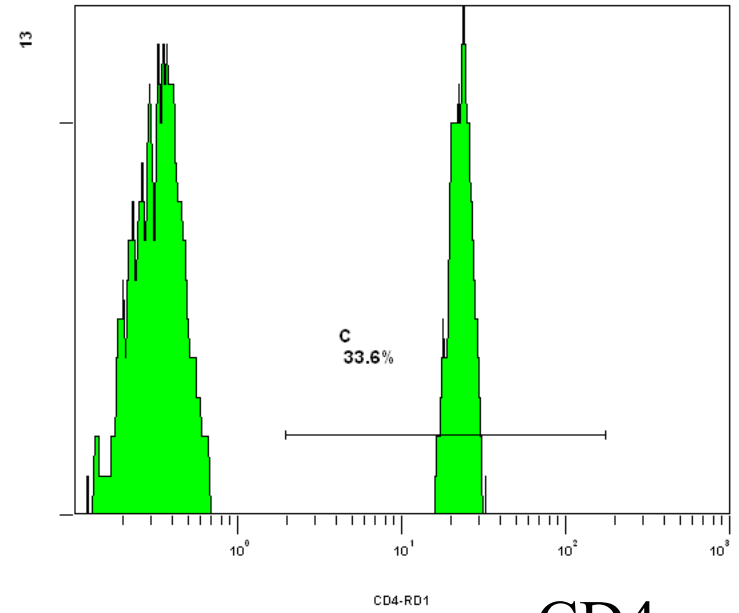
- Vysoká finanční náročnost
- Sestavení experimentu, analýza a vyhodnocování dat závisí na zkušenostech obsluhy
- Analýza vzorků co nejdříve po odběru
- Nevidíme, kde v/na buňce je signál lokalizován

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



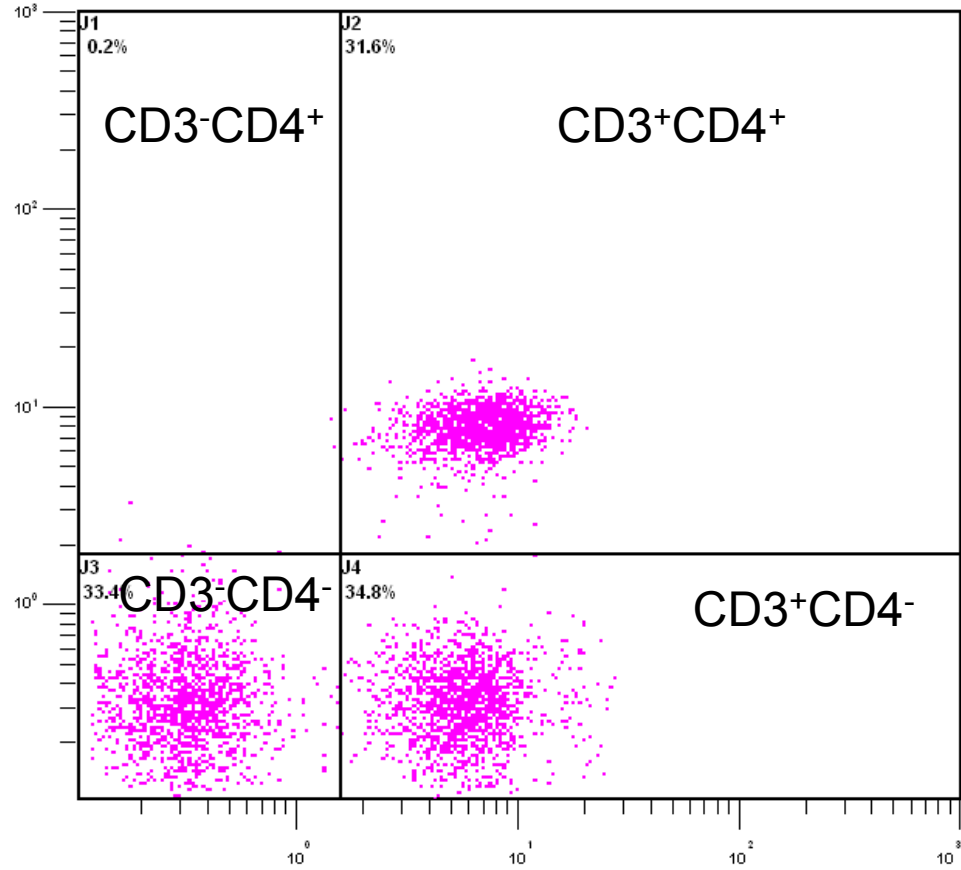
CD3

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



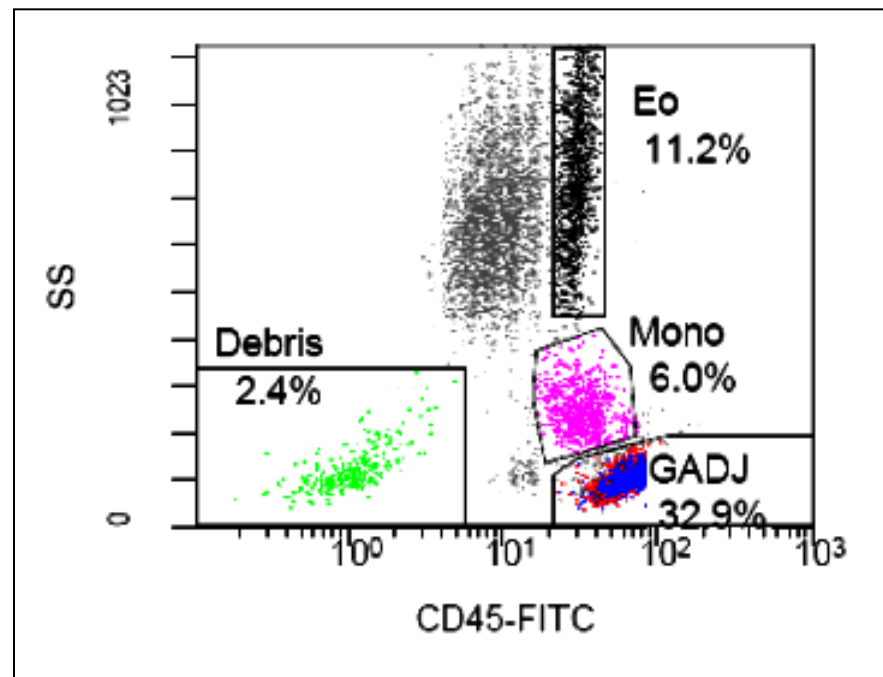
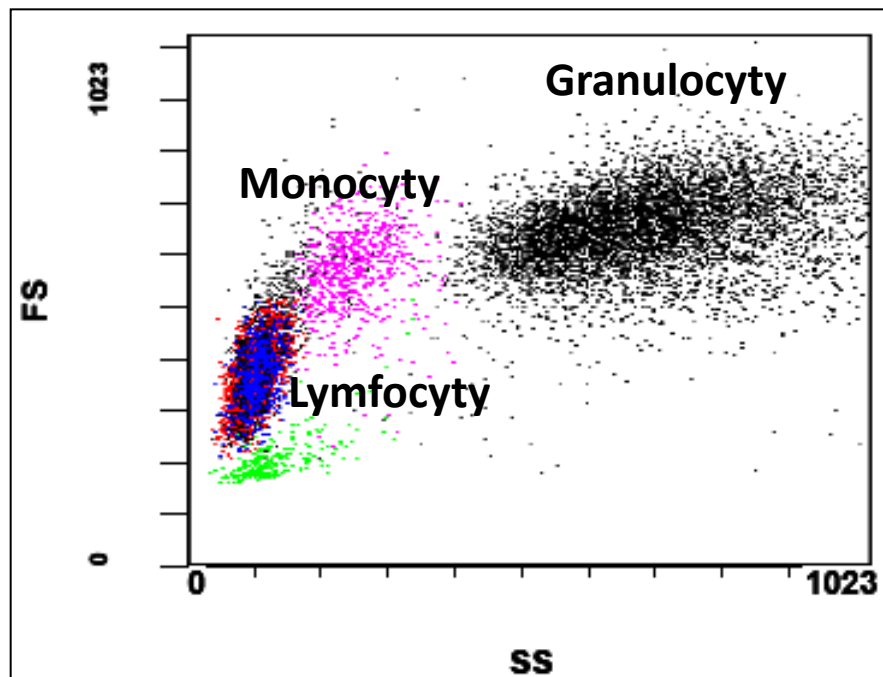
CD4

CD4 PE

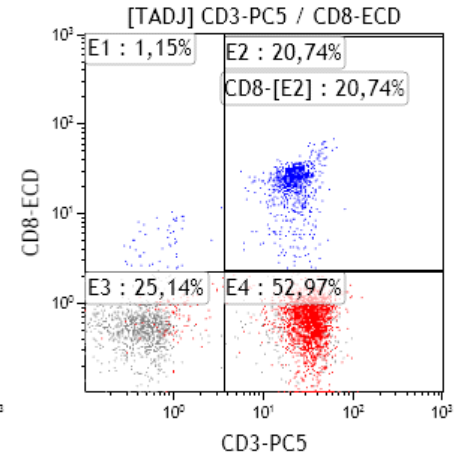
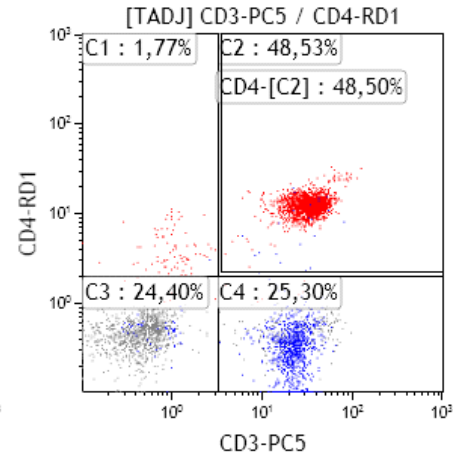
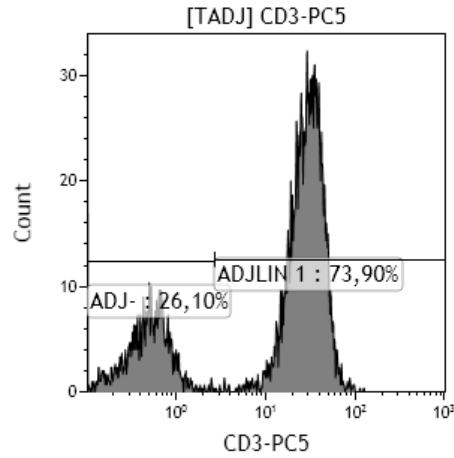
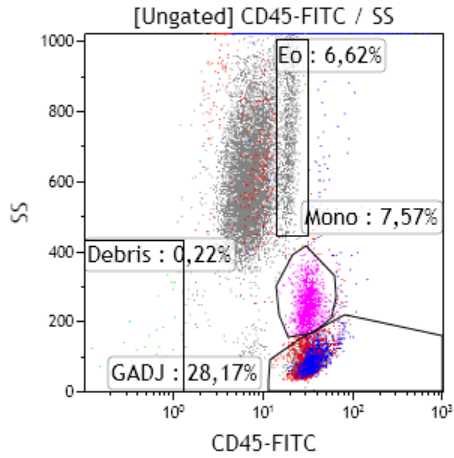


CD3 PC5

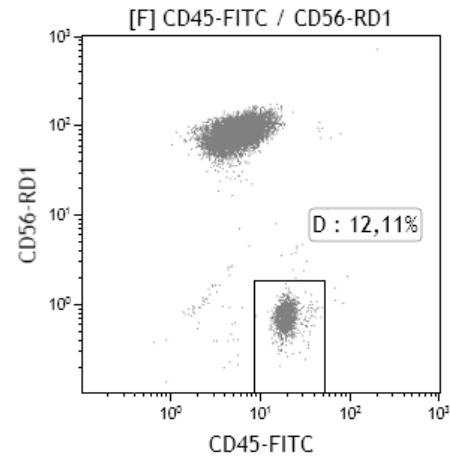
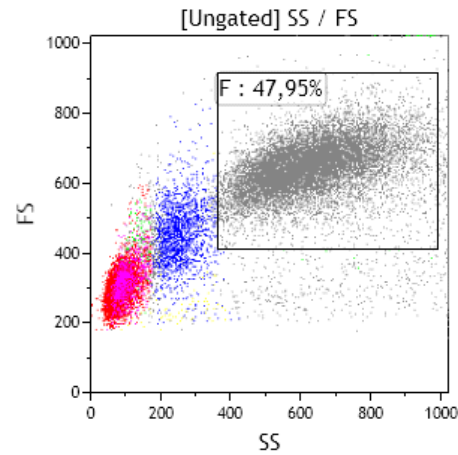
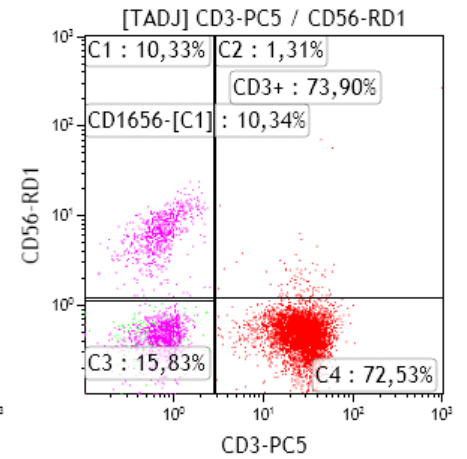
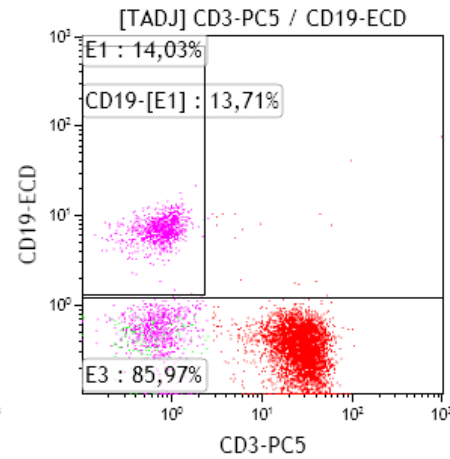
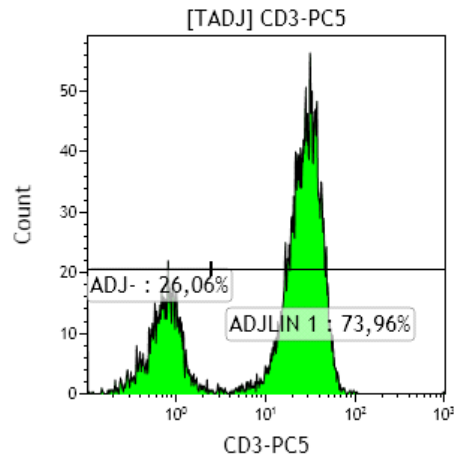
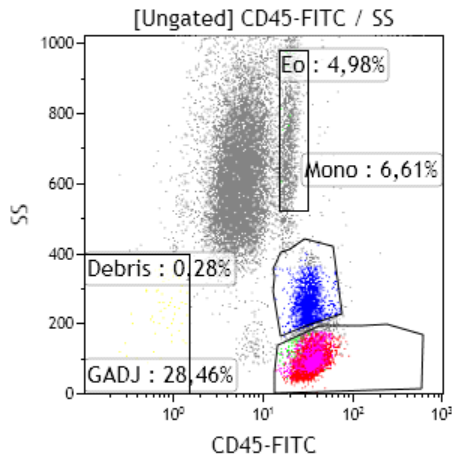
Krevní diferenciál



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), T-lymfocyty 3-7 (na aktivovaných T-lymfocytech)

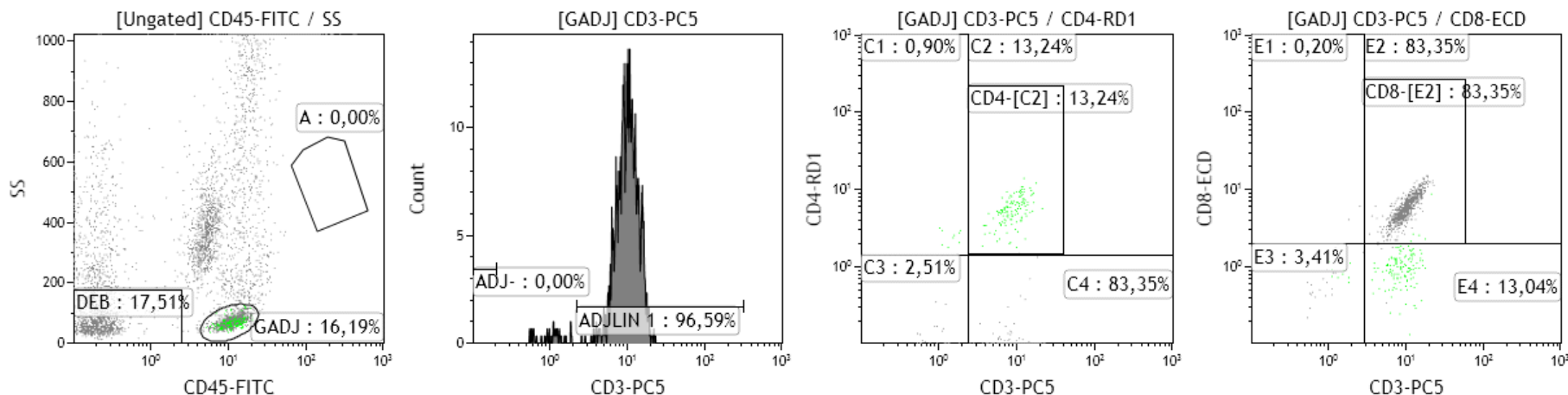
Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

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> mmunode <u>f</u> iciency) - 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 využití průtokové cytometrie v praxi

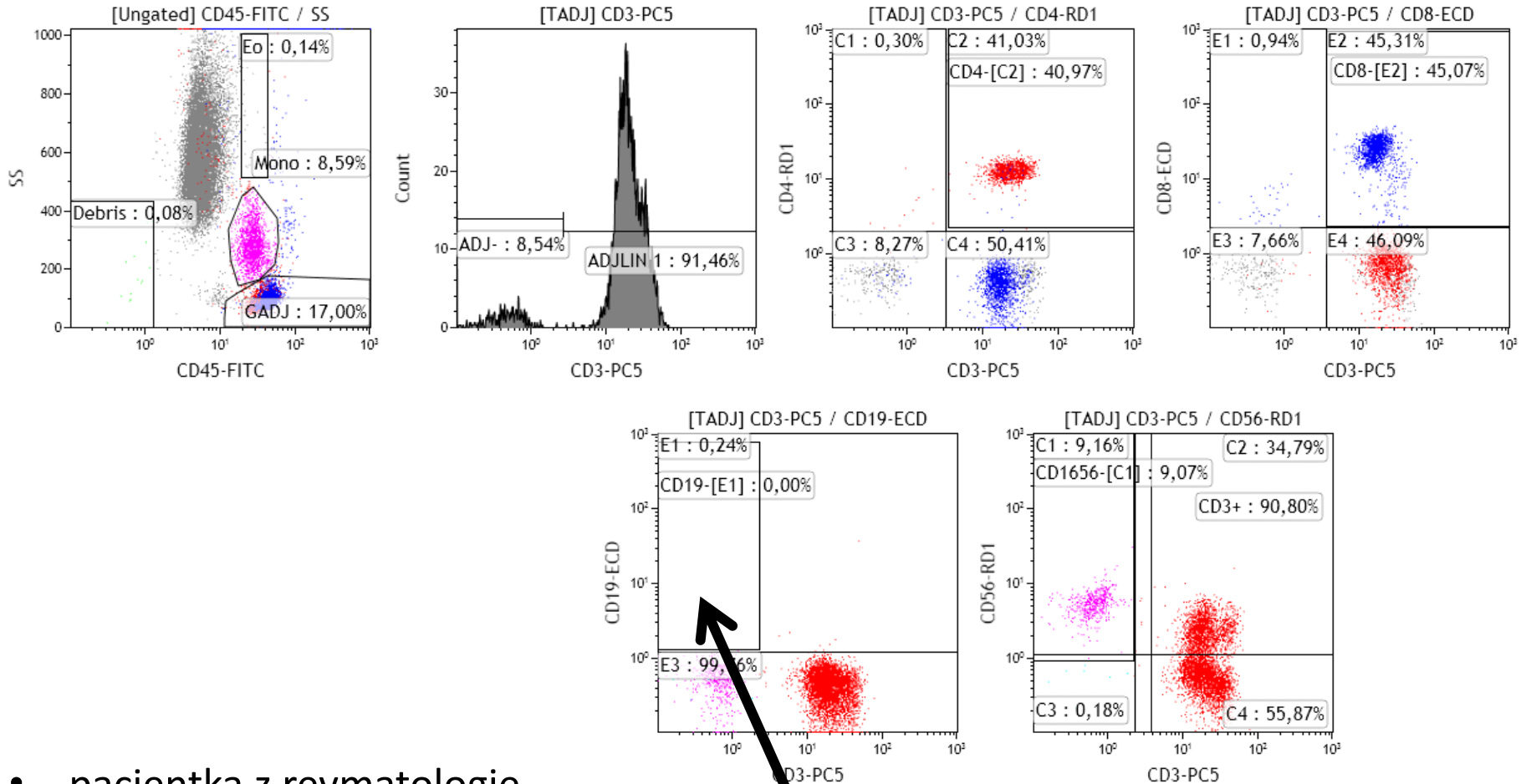
Bronchoalveolární laváž (BAL)

- imunofenotypizace



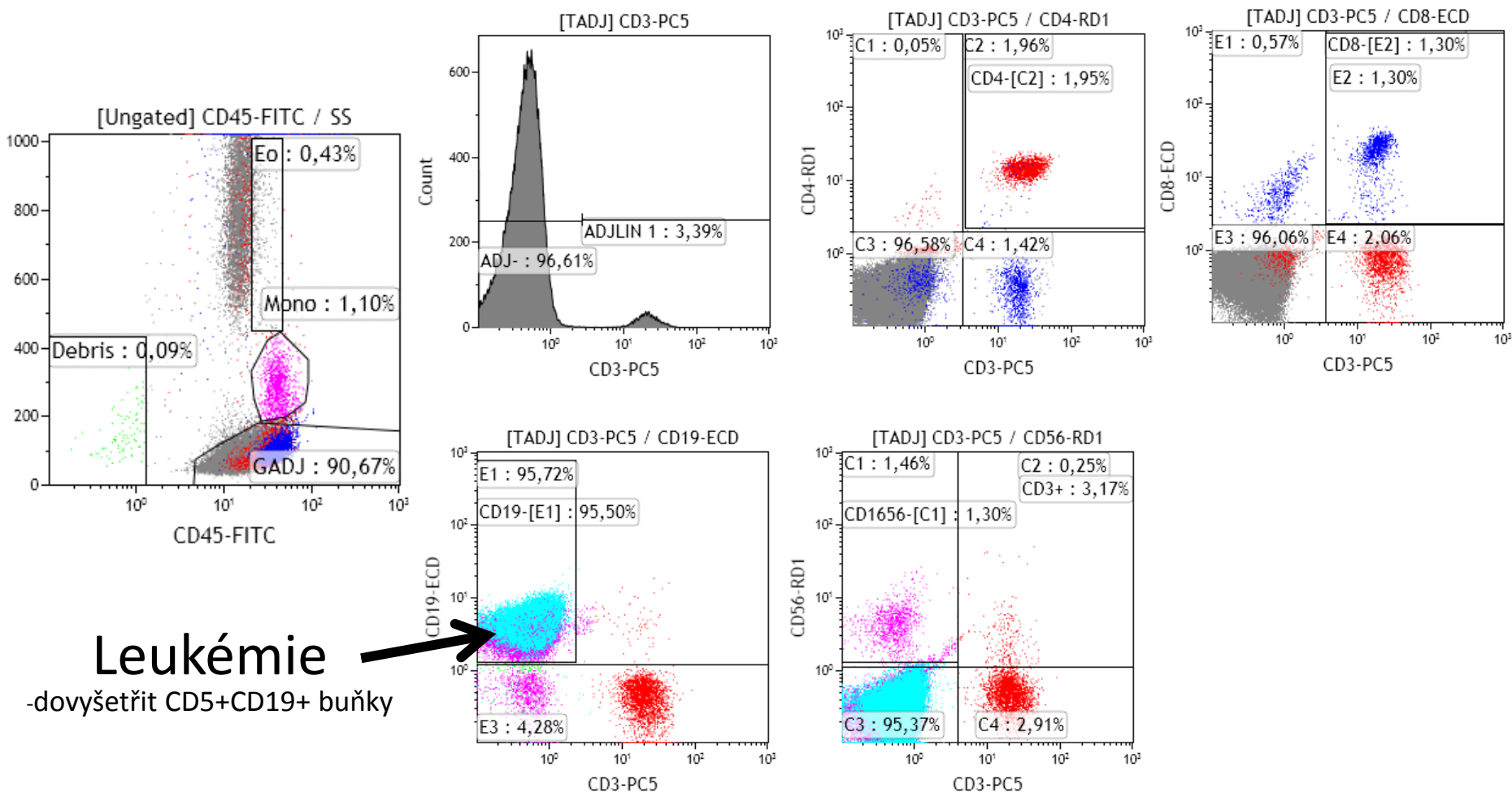
při převráceném poměru CD4+/CD8+
- podezření na sarkoidózu

Pacientka: Ž, *1957

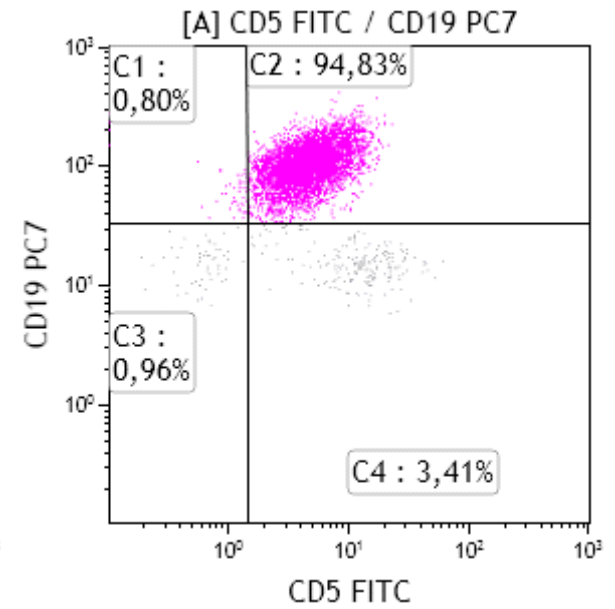
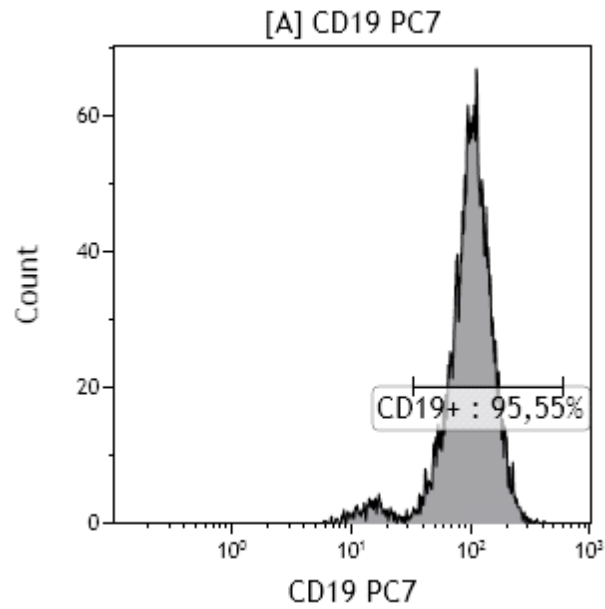
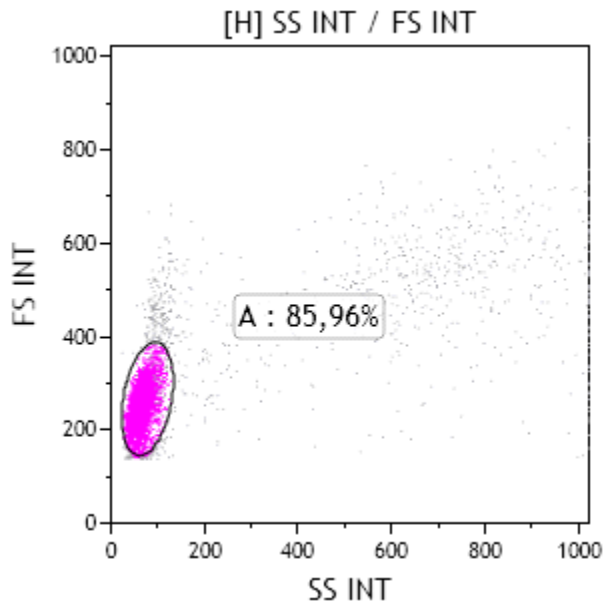


- pacientka z revmatologie
- léčba např. rituximabem způsobuje depleci B-lymfocytů (po 4-6 měsících návrat k normálním hladinám)

Pacient: muž, * 1966

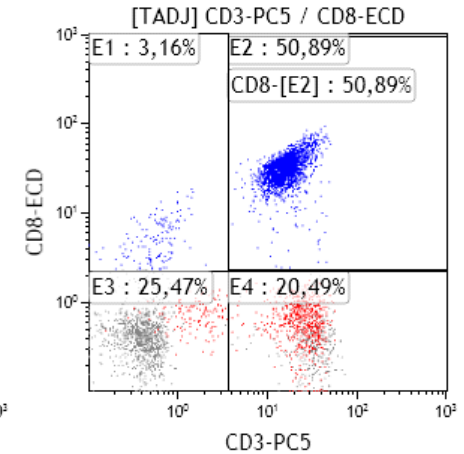
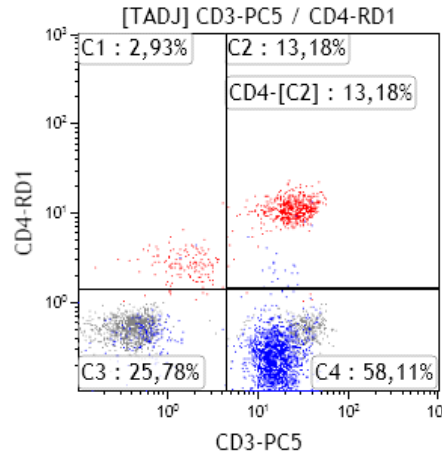
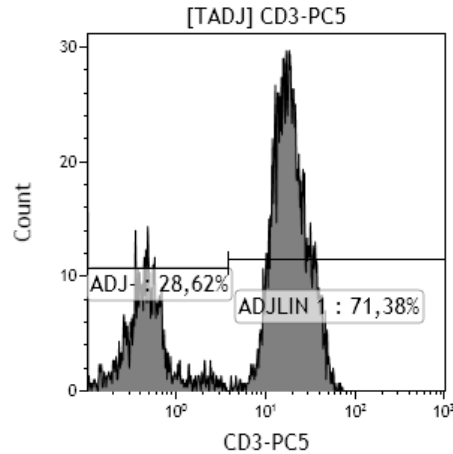
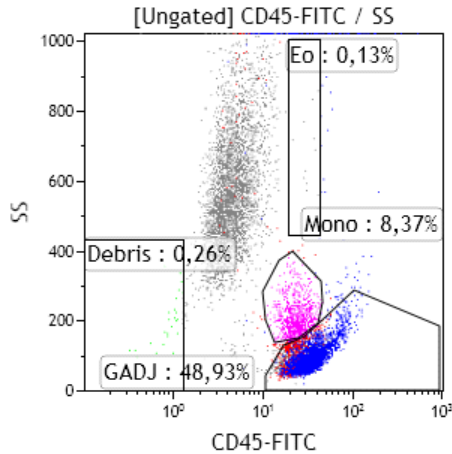


CD5+CD19+



CD5+CD19+ : 94.8%

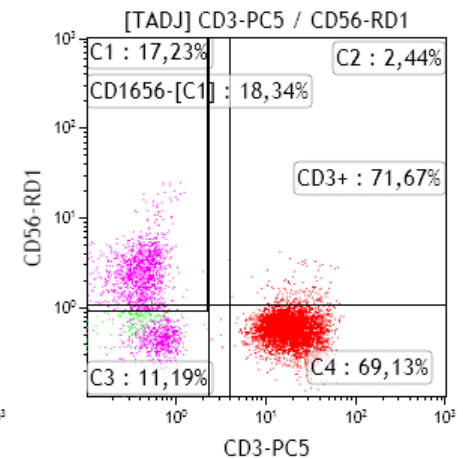
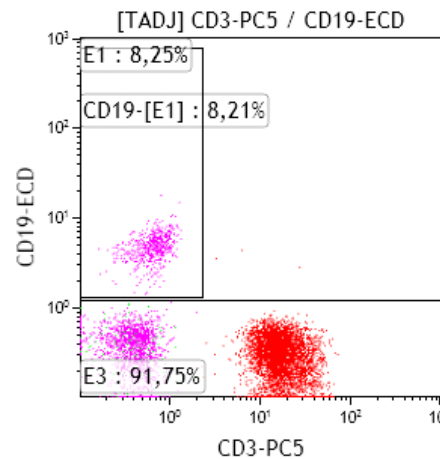
Pacient: M, *1999



**převrácený poměr
CD4/CD8!**

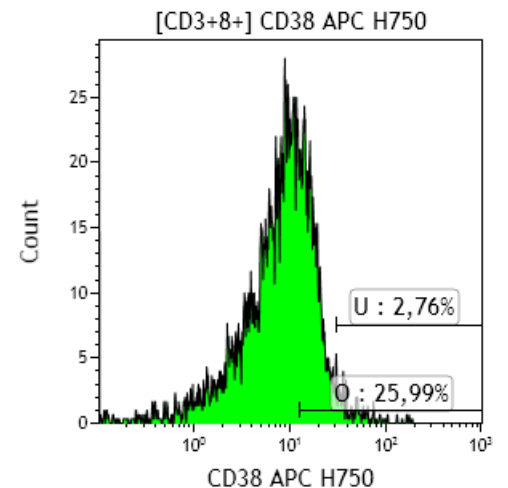
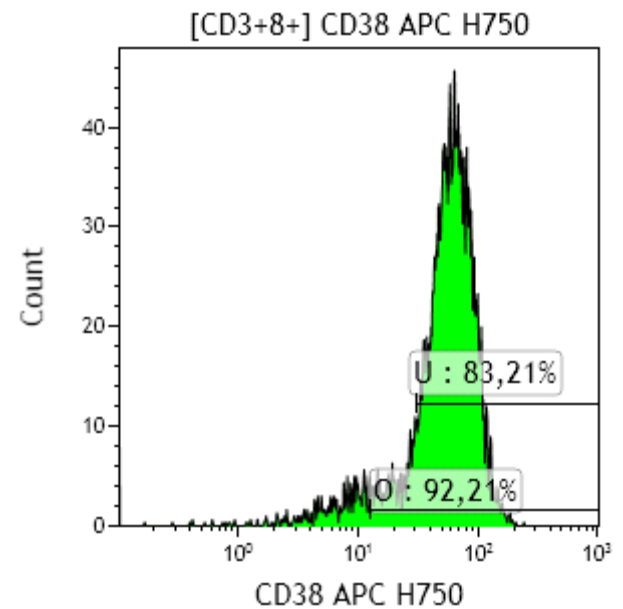
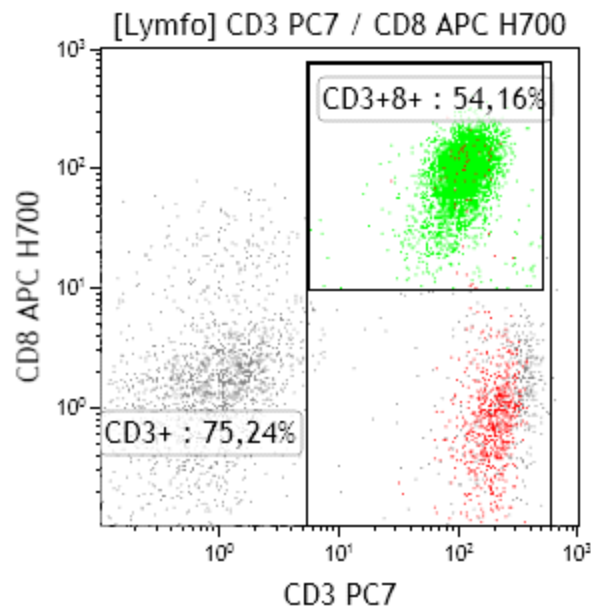
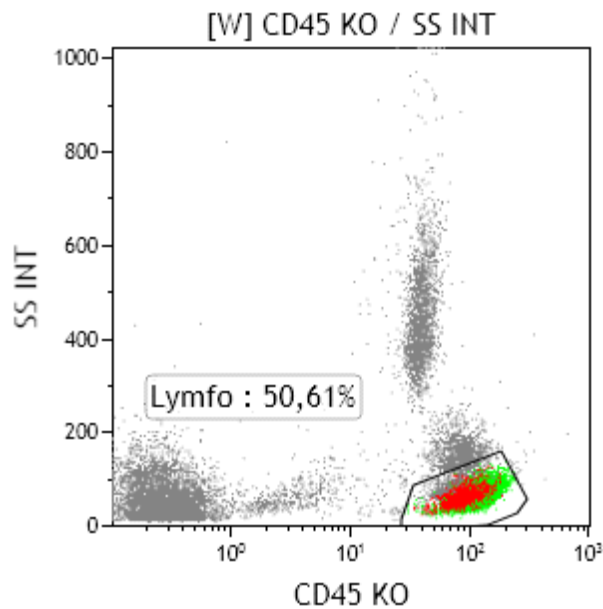
CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

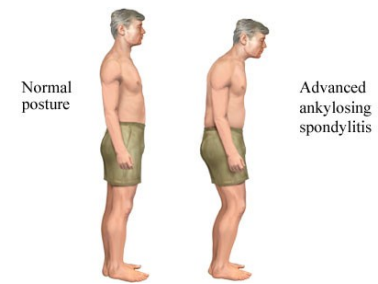


virová infekce???

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

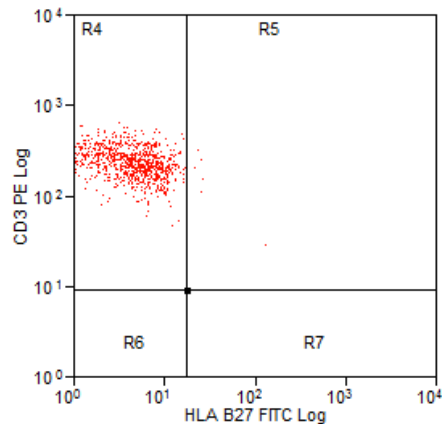


HLA-B27

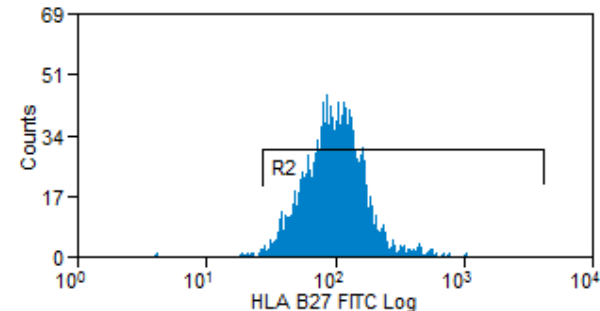
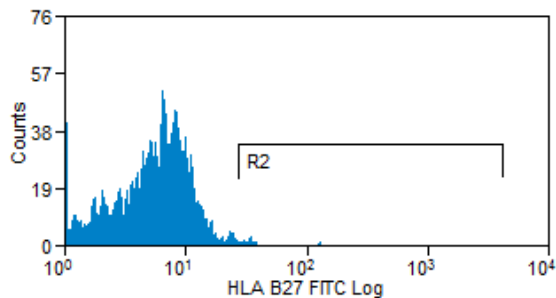
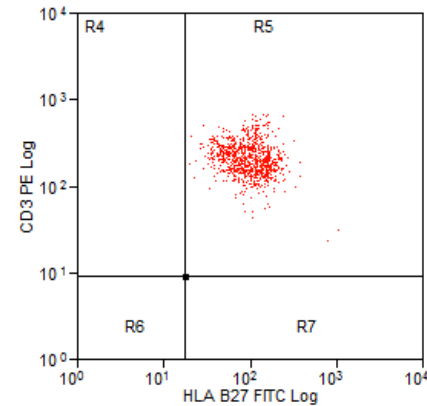


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida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

negativní



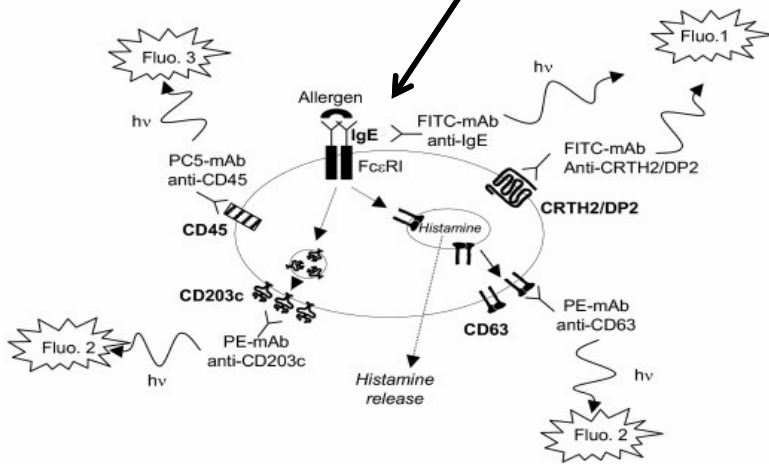
pozitivní



Test aktivace bazofilů (bazotest)

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

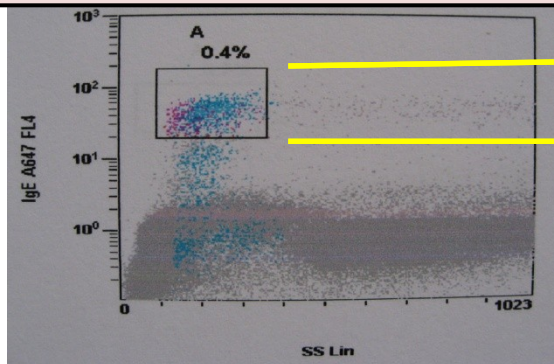
na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)
- CD203c



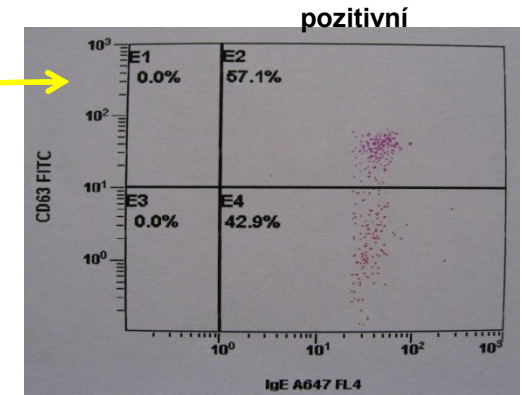
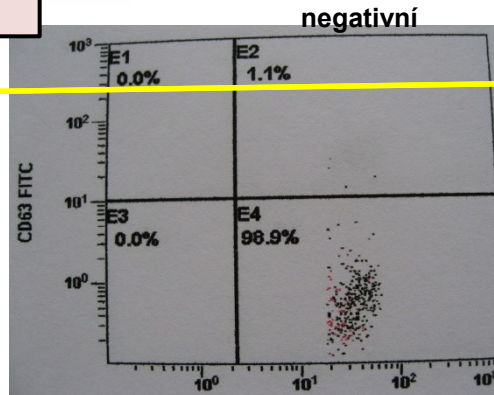
založen na expresi aktivačního znaku (CD63) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem in vitro

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!