

# Prietoková cytometria a stanovenie lymfocytárných subpopulácií

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil

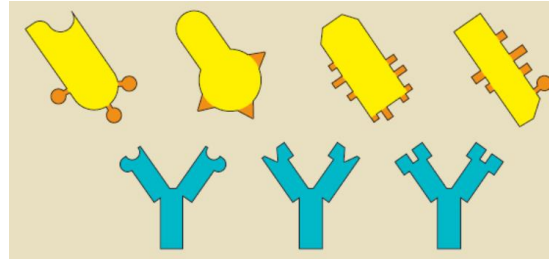


Eosinophil



Basophil

# Rozdelenie imunologických laboratórnych metód



Metódy  $\left\{ \begin{array}{l} \text{serologické (humorálne)- detekcia antigénov a protilátok,} \\ \text{preukázanie tvorby protilátok proti infekčnému agens} \\ \text{bunečné- počty a funkcie jednotlivých typov leukocytov} \end{array} \right.$



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



Eosinophil



Basophil

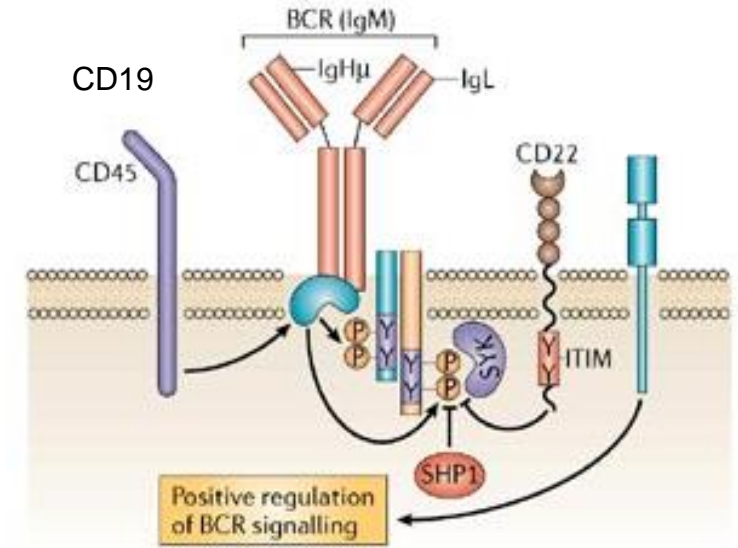
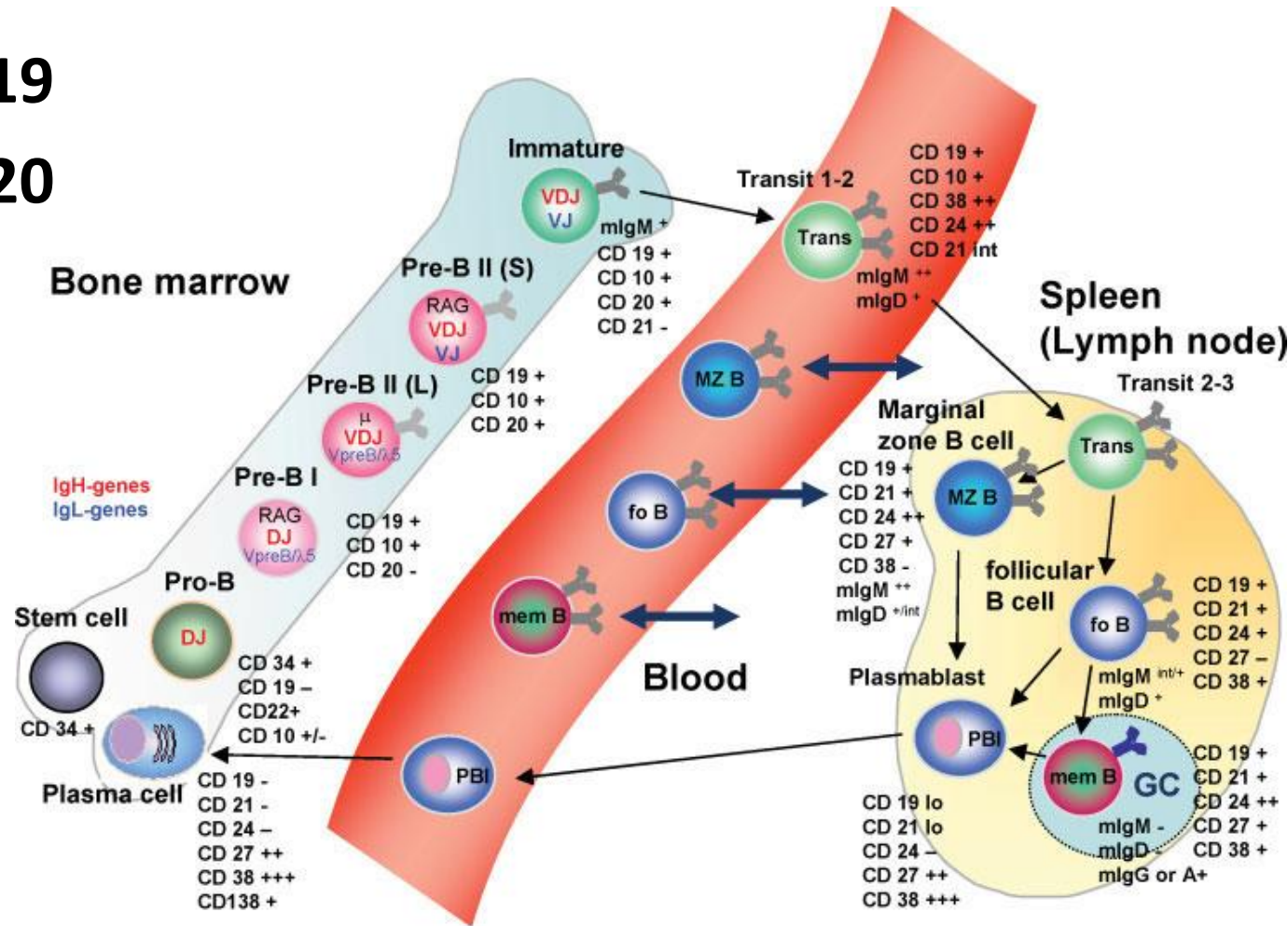
# Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

- *Bunky exprimujú (vystavujú) na svojom povrchu rôzne špecifické molekuly* – znaky, ktoré môžeme usporiadať do skupín charakterizujúcich bunečnú líniu, stav diferenciácie jednotlivkej bunky a jej aktiváciu
- *CD klasifikácia:* znak definovanej štruktúry rozpoznateľný monoklonálnou protilátkou je zaradený do skupiny diferenciálnych CD znakov a označený číslom (CD1, CD2, CD3,...). V súčasnej dobe je na ľudských leukocytoch charakterizovaných asi 400 znakov.
- **Využitie:**
  - označenie plne definovaných molekúl
  - členenie podľa funkcie
  - adhézne membránové molekuly, receptory pre cytokíny, molekuly na T a B lymfocytoch, trombocytoch a ďalších bunečných populáciách



# B lymphocyty

- CD19
- CD20



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Immunology

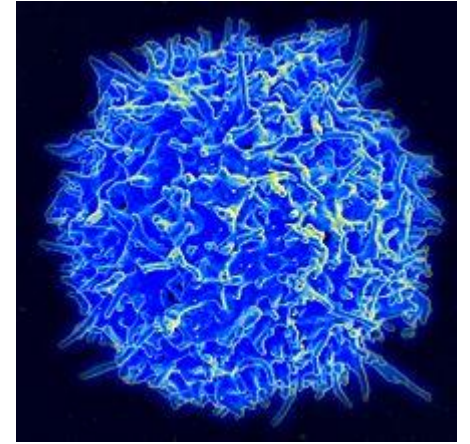
7-23 %

(Warnatz K, Schlesier M 2008)

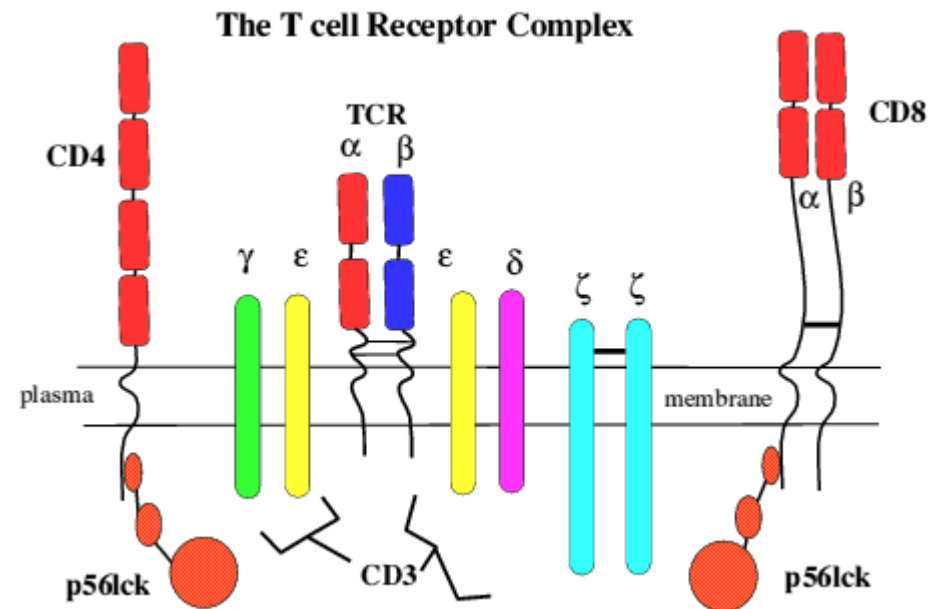


# T lymfocyty

- **CD3** – všetky T lymfocyty      **58-85 %**



- **CD4** –  $T_H$  ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ )  
**30-60 %**
- **CD8** –  $T_C$   
**15-35 %**

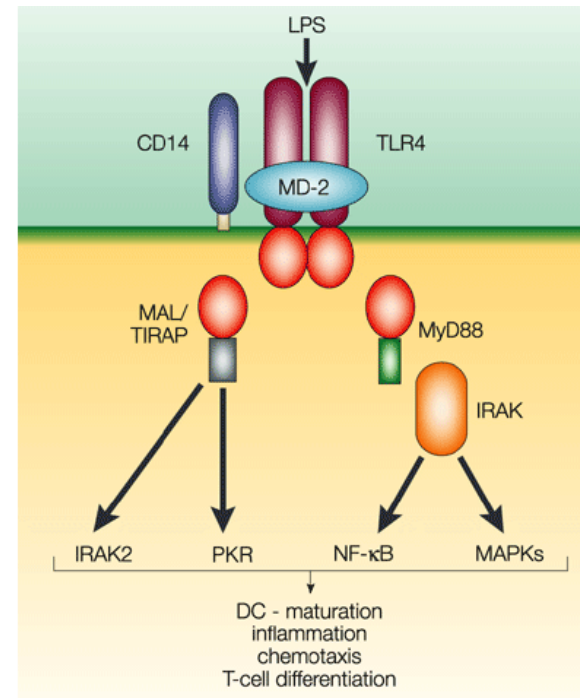
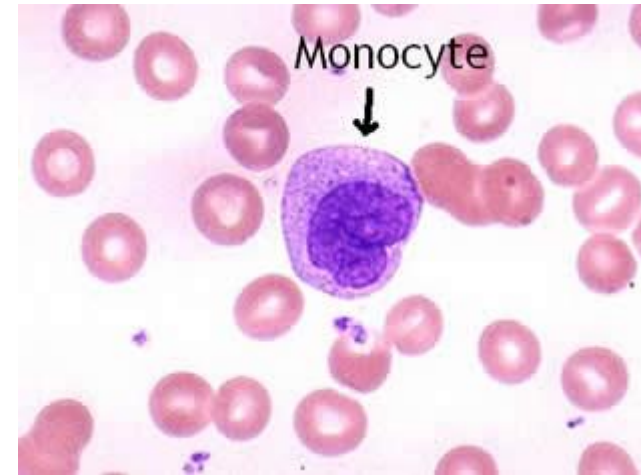


# Monocyty

- CD14
- HLA DR

0-10 %

- súčasť nešpecifickej imunity
- schopnosť fagocytózy
- tkanivová forma = makrofág



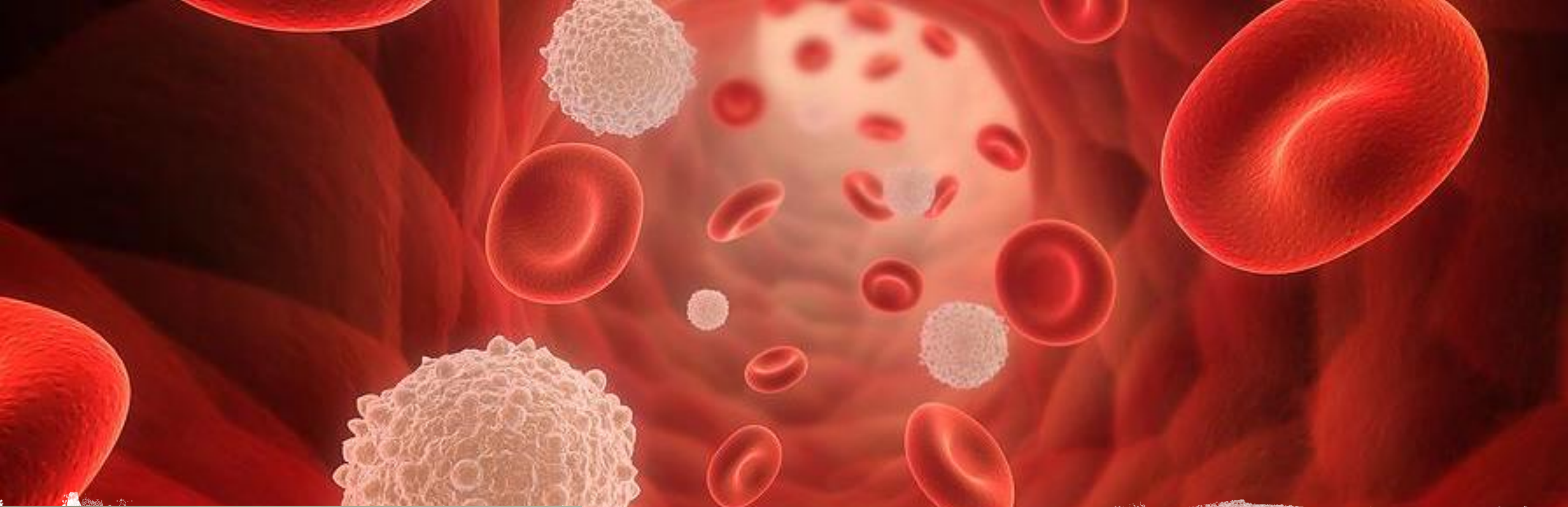
# NK bunky

- **CD16<sup>+</sup>**
- **CD56<sup>+</sup>**
- **CD3<sup>-</sup>**

**6-20%**

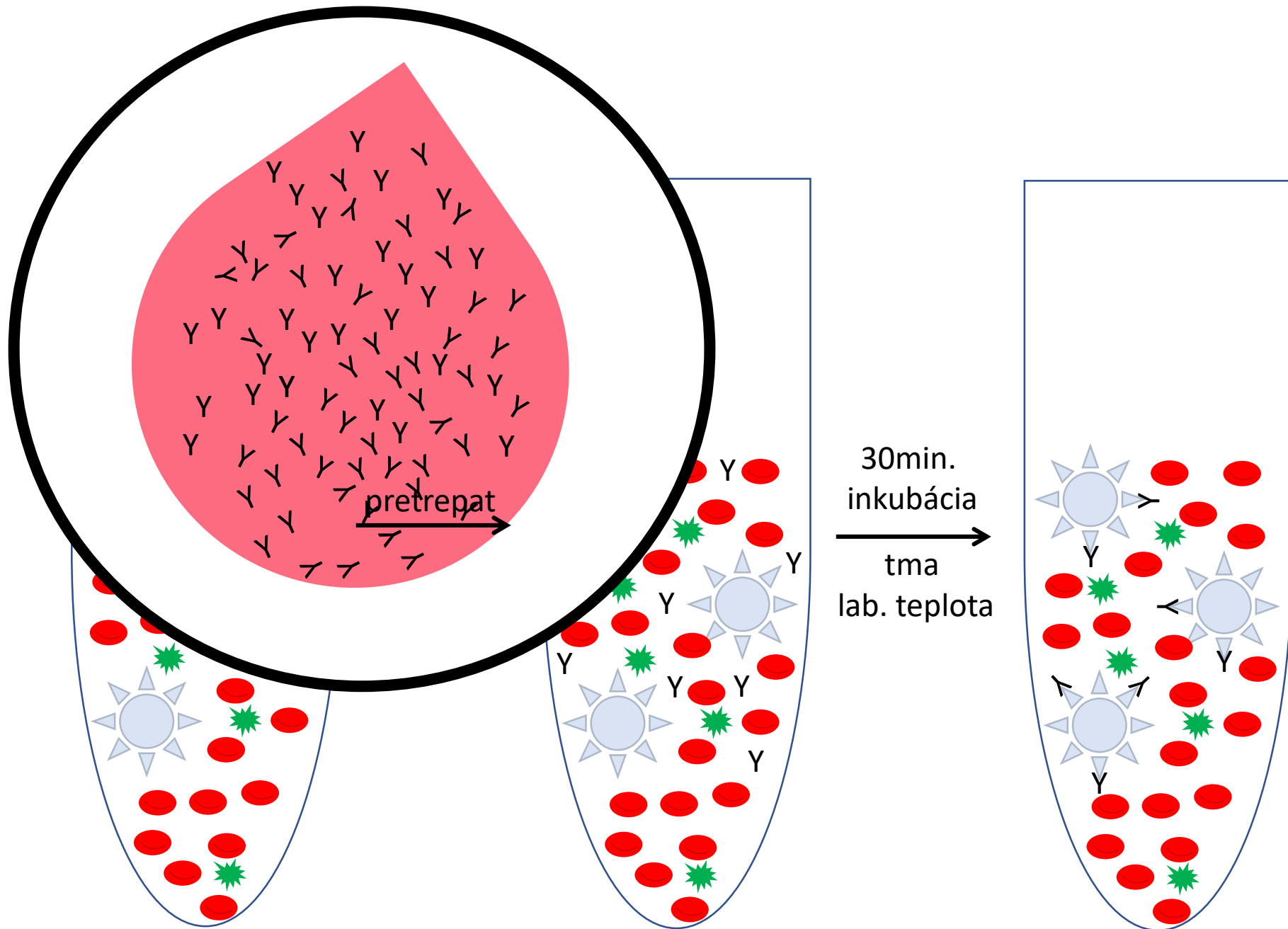


- rozpoznávají bunky, ktoré majú na povrchu abnormálne málo MHC I (= nádorové a vírom infikované bunky)
- používajú cytotoxické mechanizmy (perforin, granzymy)
- Pozn. NKT bunky: CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> **CD3<sup>+</sup>**



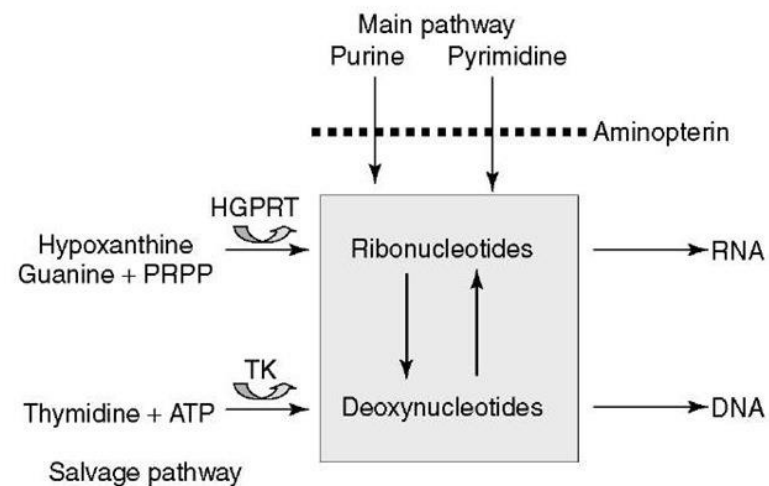
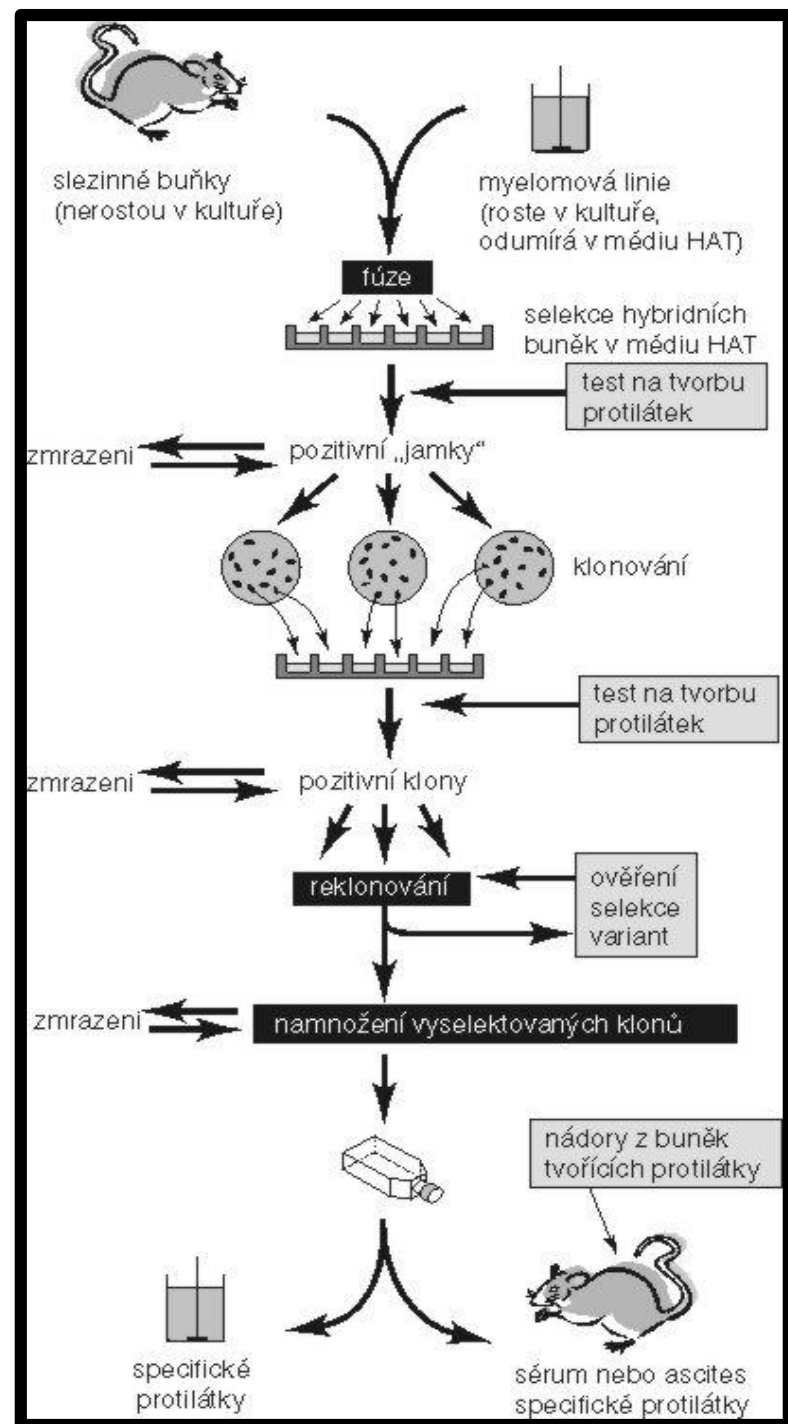
Pre stanovenie **lymfocytárnych subpopulácií**  
→ odber krvi do skúmavky s **EDTA**





# Monoklonálne protilátky

- produkt jediného klonu B lymfocytov (klony vzniknuté fúziou buniek produkujúcich Ab a myelomových buniek, ktoré schopnosť produkcie vlastného Ig ztratili)
- totožné a prísne špecifické proti jednému epitopu

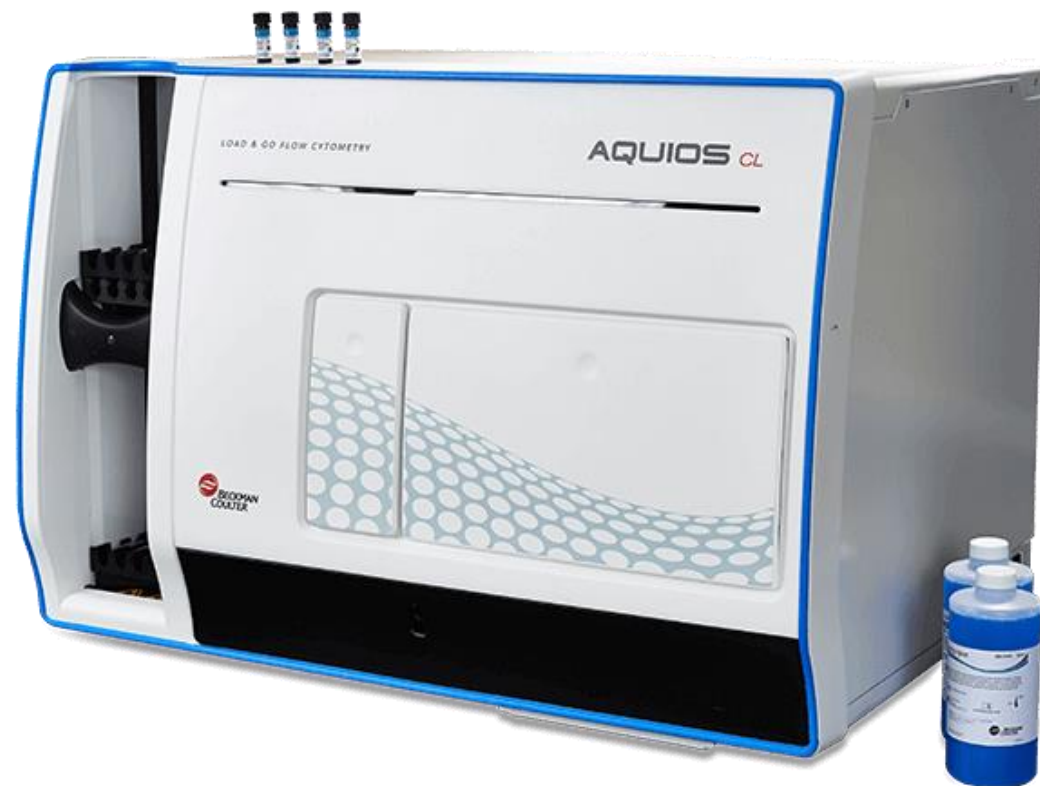


# Lýza erytrocytov

- **Roztok A:** 1,5 l destilovanej vody – 1,8 ml 99% kyselina mravenčí
- **Roztok B:** 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:** 1,5 l PBS (pH 7-7,4) – 15 g paraformaldehydu



# Prietoková cytometria (Flow Cytometry, FACS)

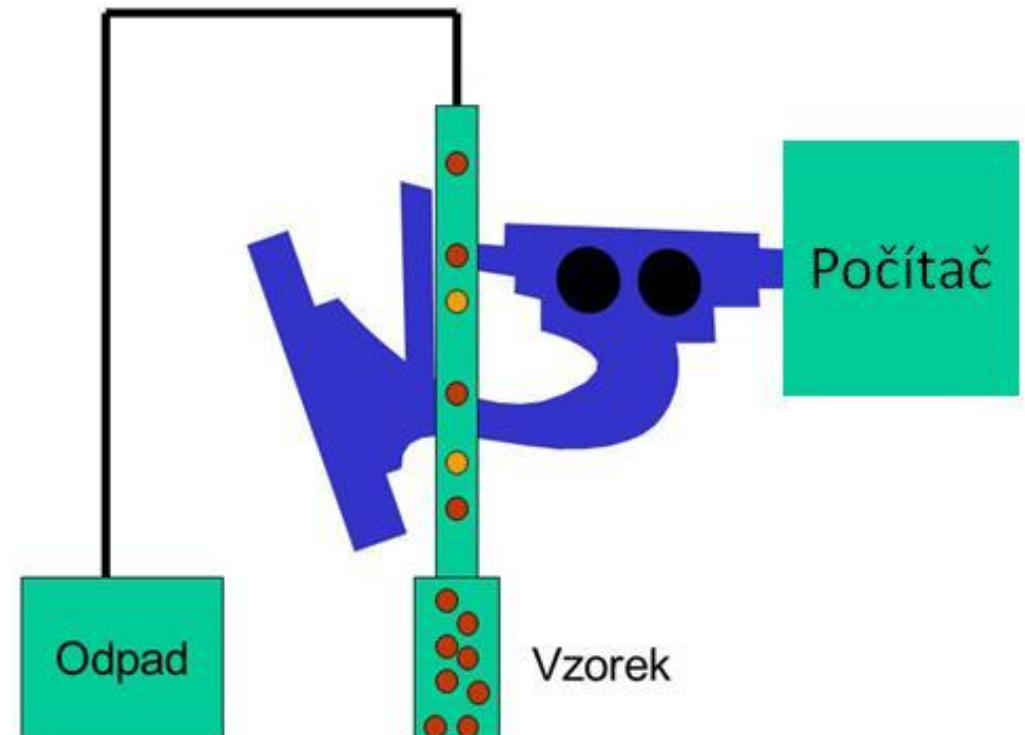




# Flow+cyto+metria = „meranie buniek v pohybe“

- Možnosť analýzy mnohých vlastností a charakteristík na úrovni jednej bunky počas krátkeho časového úseku
- Meranie súčasne viac než 25 markerov na jednej bunke
  - Určovanie fenotypu buniek
  - Monitorovanie odpovede na liečbu
  - Výskum signalizačných dráh
- Kľúčový nástroj pre výskum porúch krvotvorby

**Prietoková cytometria** je technológia umožňujúca súčasné meranie a analýzu niekoľkých fyziálnych a chemických vlastností jednotlivých častíc, ktoré sú unášané v prúde kvapaliny a prechádzajú lúčom svetla



# Využitie

- Klinické využitie – imunofenotypizácia
- Bunečná biológia – DNA, RNA analýza
- Mikrobiológia – rezistencia na ATB, kinetika

# Čo meriame???

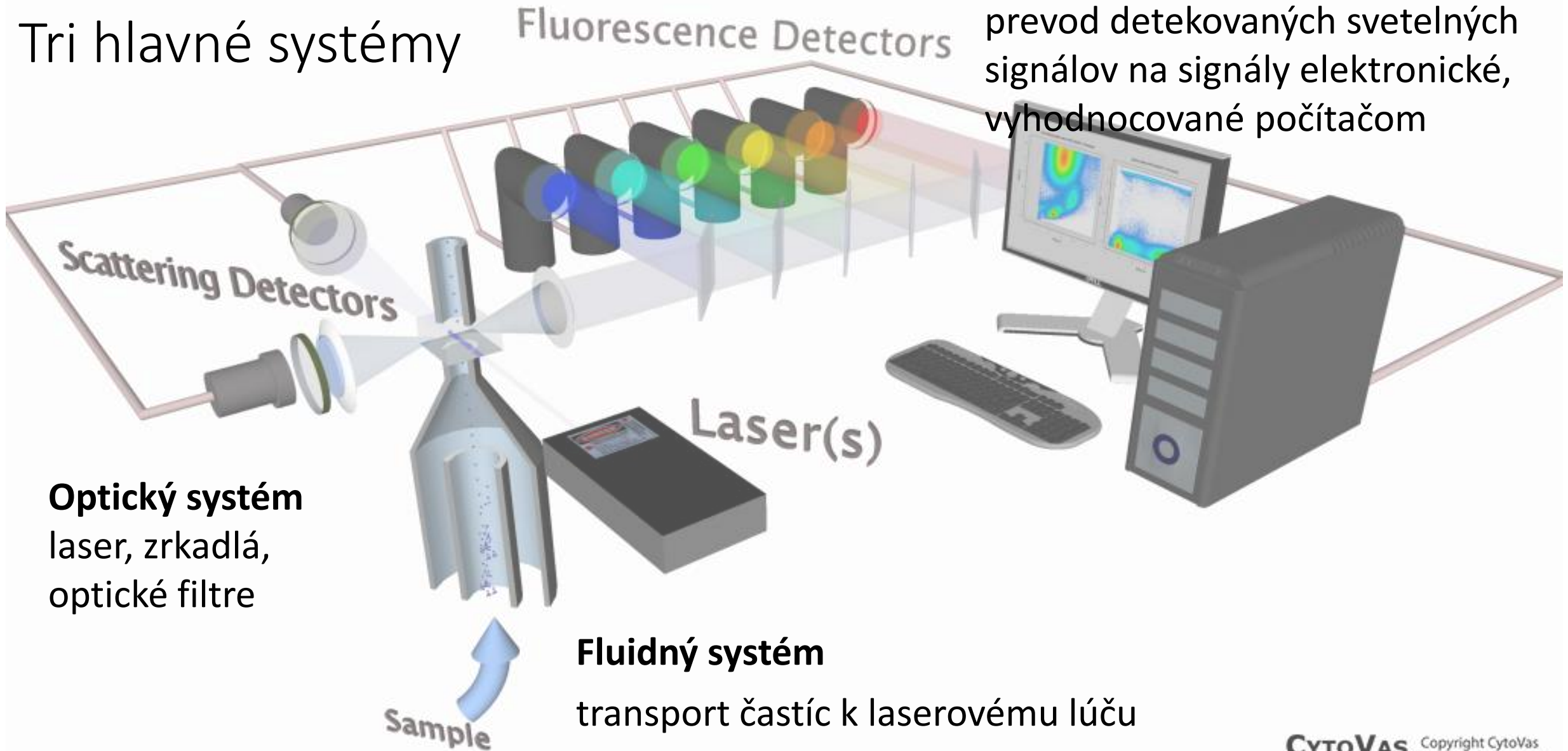
- Odrazené svetlo a emitovanú fluorescenciu
- Častice veľkosti 0,2-150  $\mu\text{m}$ 
  - prokaryotické a eukaryotické bunky
  - virové častice, baktérie, huby
  - komplexy Ag-Ab



# Princíp FACS

- Pri prechode častíc laserovým lúčom dochádza k rozptylu svetla a k fluorescencii naviazaných fluorochrómov
- Svetelné signály sú prevedené na elektrické pomocou detektorov (PMT)
- Na každej bunke je možné zmerať niekoľko parametrov zároveň
- Namerané dáta sa ukladajú a ďalej analyzujú

# Tri hlavní systémy



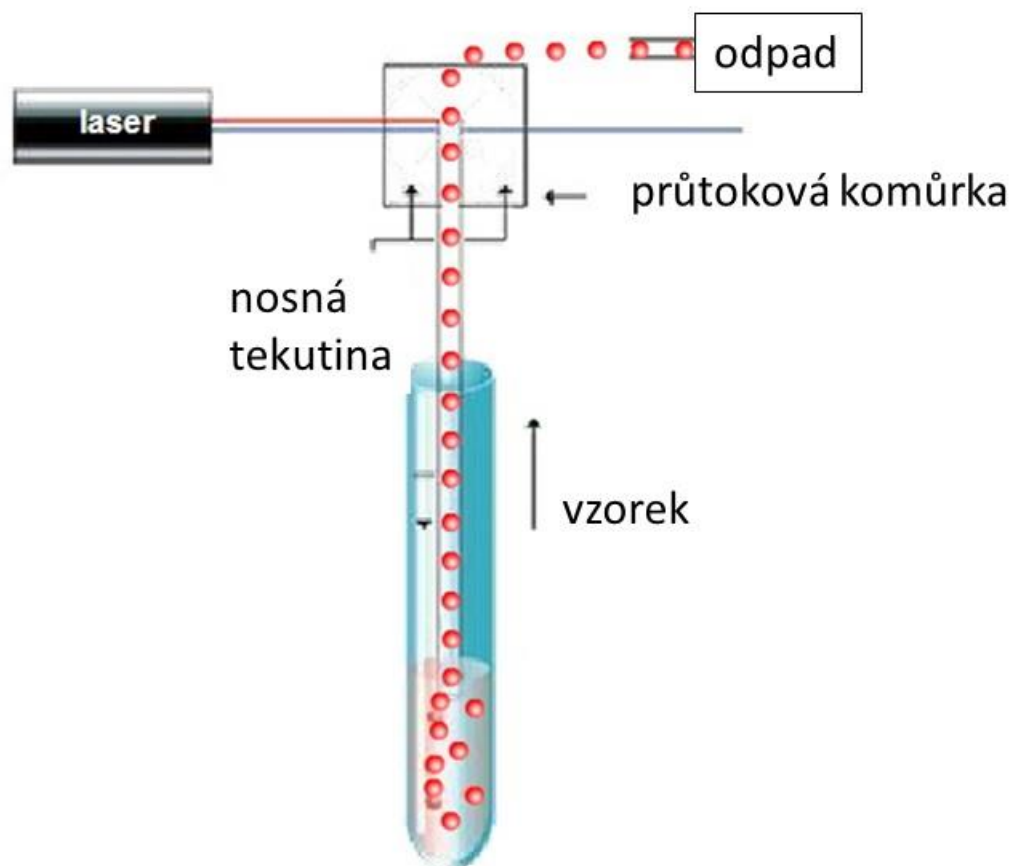
**Optický systém**  
laser, zrkadlá,  
optické filtre

**Fluidný systém**  
transport častíc k laserovému lúču

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

# Fluidika

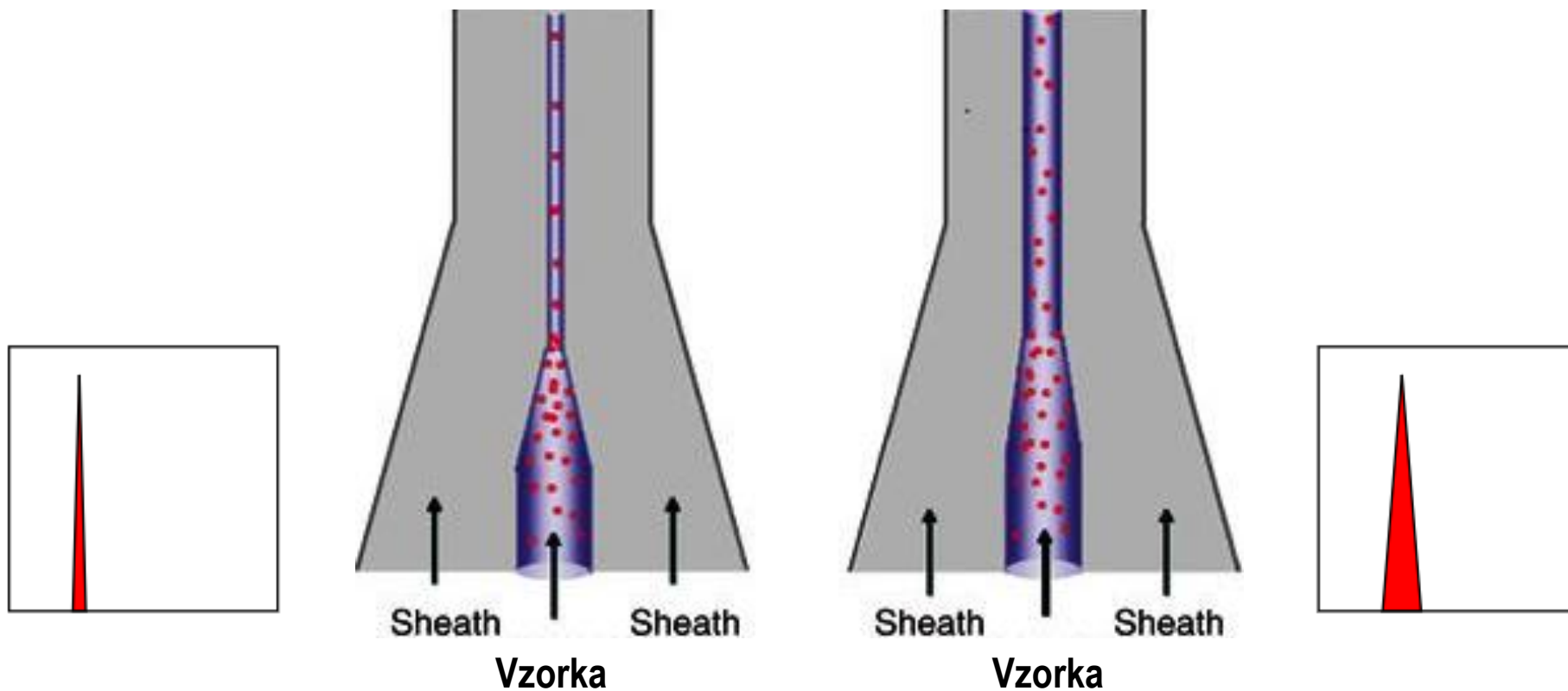
## Transport částic v prúde nosnej kvapaliny k laserovému lúču



# Hydrodynamická fokusácia

Nízky tlak vzorky  
Úzky prúd vzorky  
Vhodné pre DNA analýzu

Vysoký tlak vzorky  
Široký prúd vzorky  
Nevhodné pre DNA analýzu





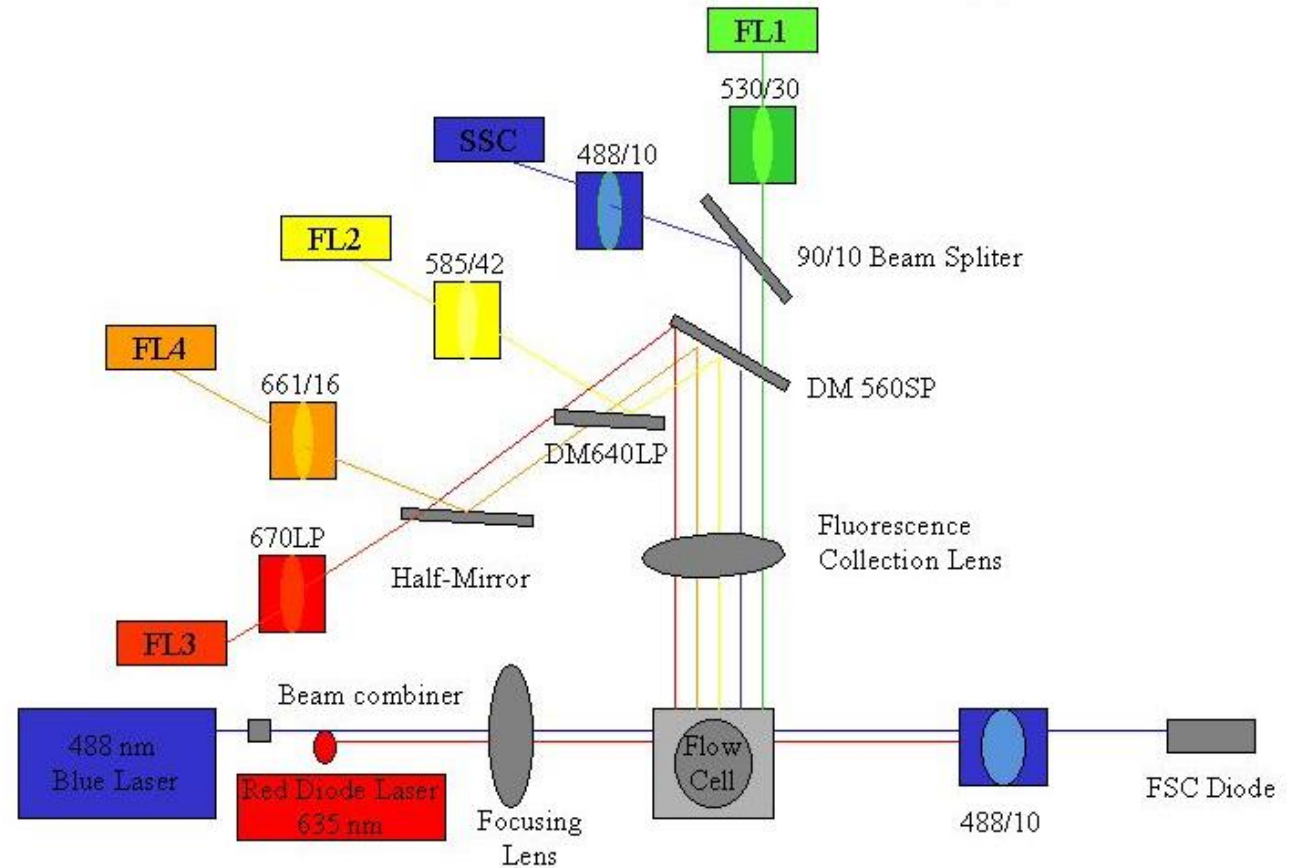
# Optika

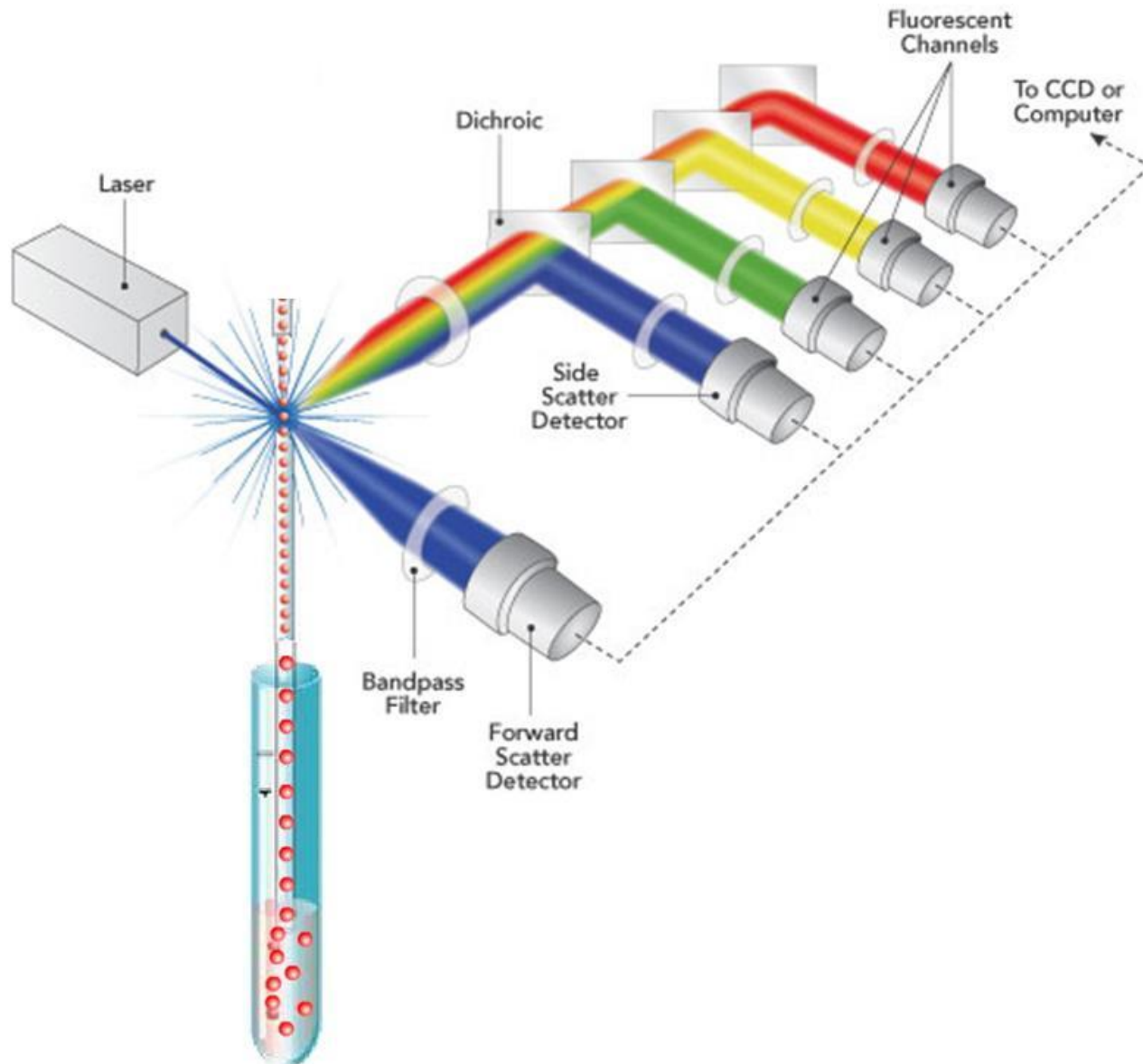
- Excitačná optika

laser a systém šošoviek, ktoré zaostrujú a smerujú laserový lúč

- Zberná optika

sústava šošoviek, ktorá vedie a rozdeľuje svetlo do rôznych vlnových dĺžok na príslušné detektory





### excitácia Ar-iontovým laserom (modrý) - 488 nm

- FITC - fluorescein isothiokyanát (530 nm)
- PE, RD1 - phycoerythrin (580 nm)
- ECD - tandem. konjugát PE-texaská červeň (620 nm)
- PerCP - perridin chlorophyl (678 nm)
- PerCPCy5.5 - (696 nm)
- PC5 - tandem PE-cyanine 5 (620 nm)
- PC7 - tandem PE-cyanine 7 (778 nm)

### excitácia He-Ne laserom/red diode (červený) - 633 nm

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

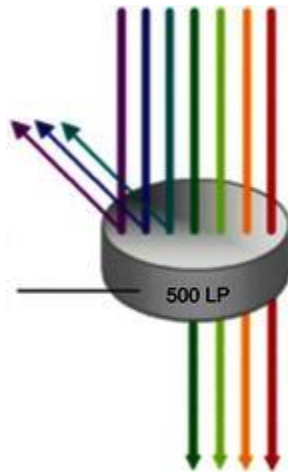
### excitácia UV/violet diode (fialový laser) - 405 nm

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

# Optické filtre

## Long Pass (LP)

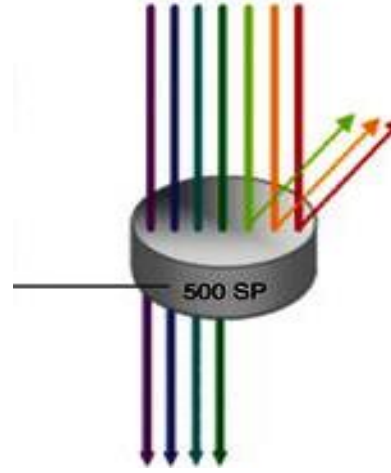
Prepúšťa všetky dĺžky vyššie ako špec. vlnová dĺžka



500LP

## Short Pass (SP)

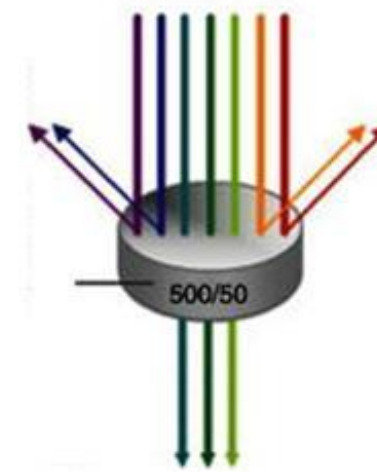
Prepúšťa všetky dĺžky kratšie ako špec. vlnová dĺžka



500SP

## Band Pass (BP)

Prepúšťa špecifické rozmedzie vlnových dĺžok



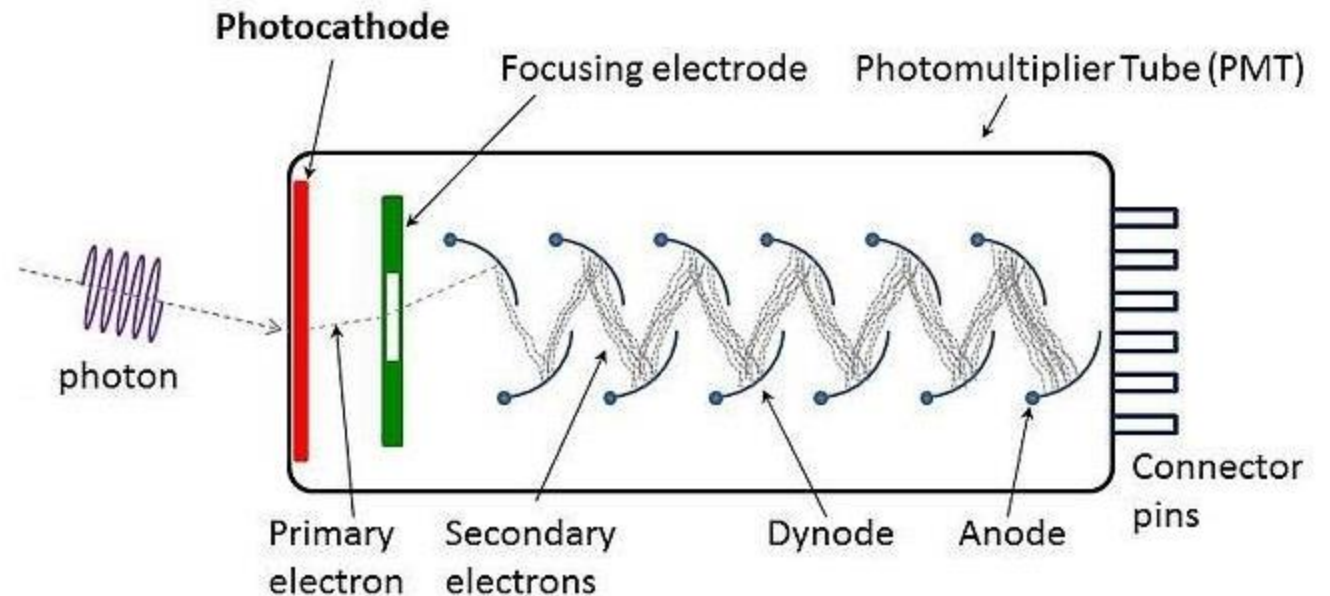
500/50  
500±25

**Dichroické filtre** – umiestnené pod uhlom 45°

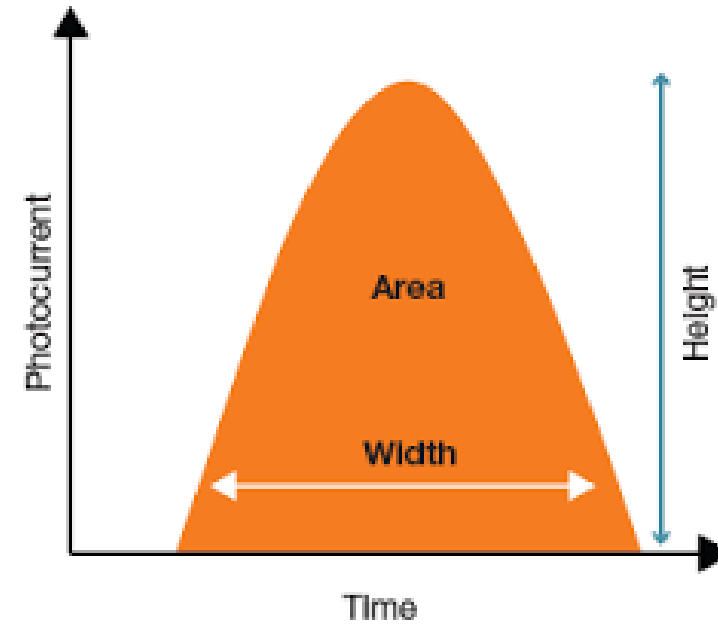
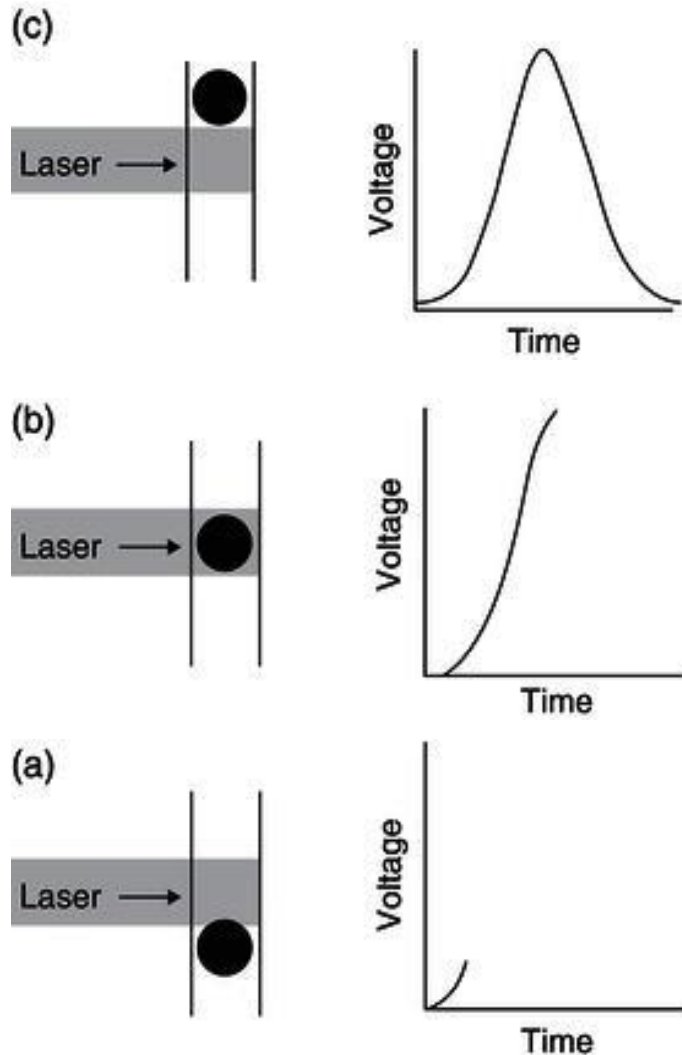
– časť svetla odráža pod uhlom 90°, časť prepúšťa

# Elektronika

- Svetelné signály sú prevádzané na elektrické
- Detektory:
  - diódy: FSC
  - fotonásobiče PMT (PhotoMultiplierTube): SSC a fluorescencie



# Vznik napätového pulzu



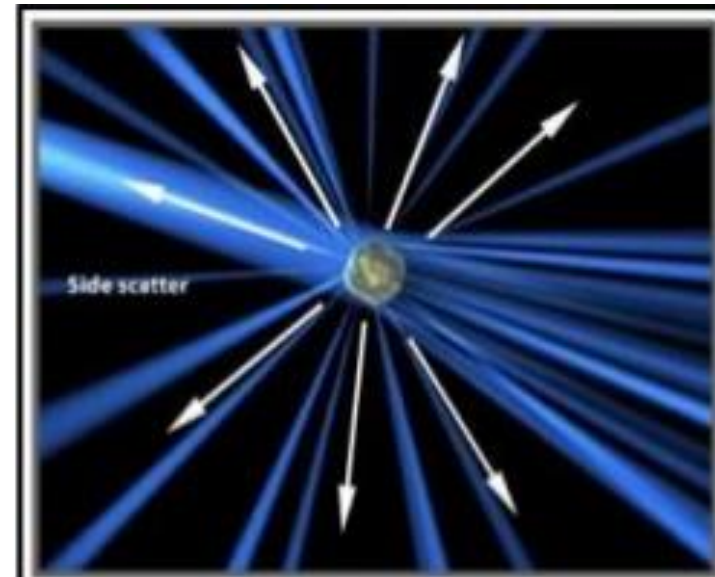
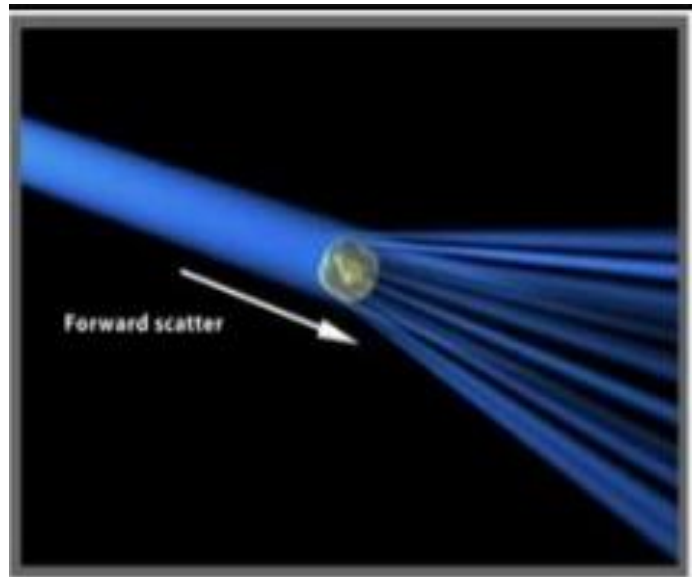
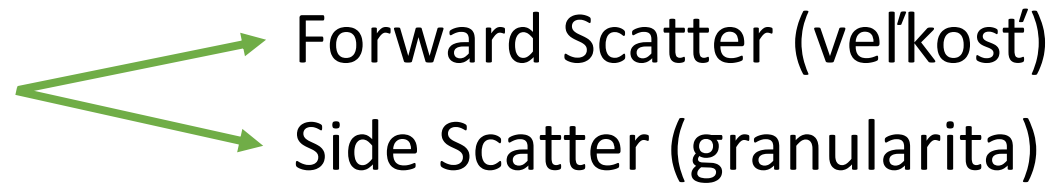
**Výška:**  
maximálna hodnota fluorescencie alebo scatteru

**Plocha:**  
Integrál pulzu

**Šírka:**  
Čas trvania pulzu

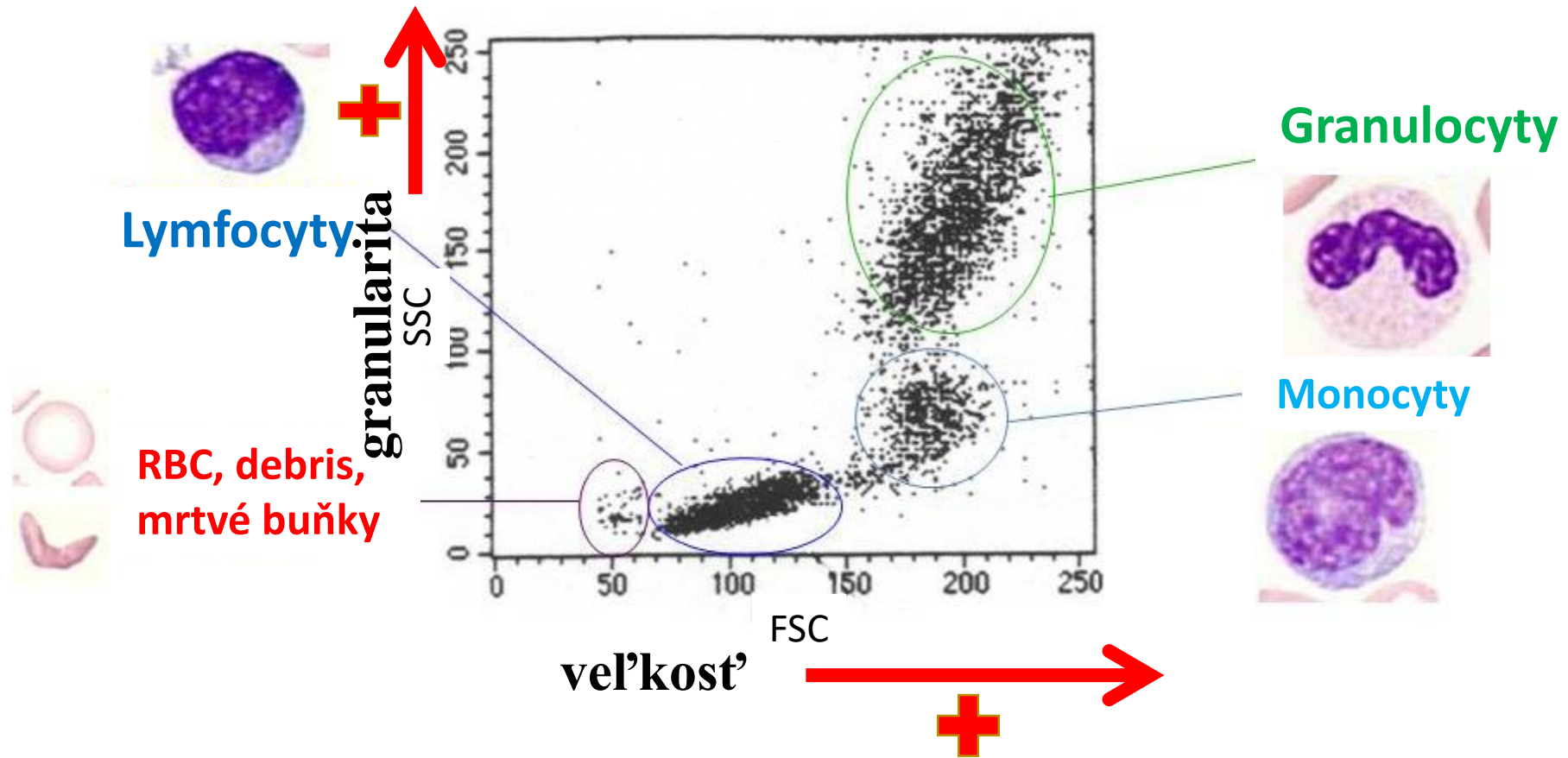
# Veľkosť vs. granularita

- Light scatter: prechádzajúca častica vychýli dopadajúce žiarenie

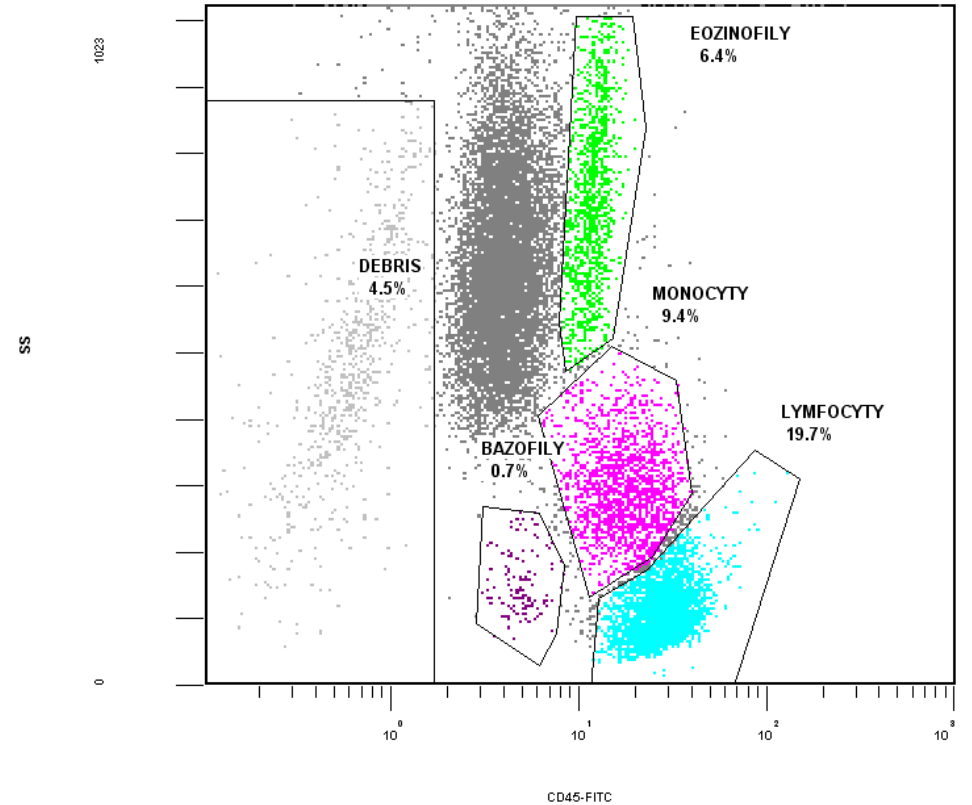
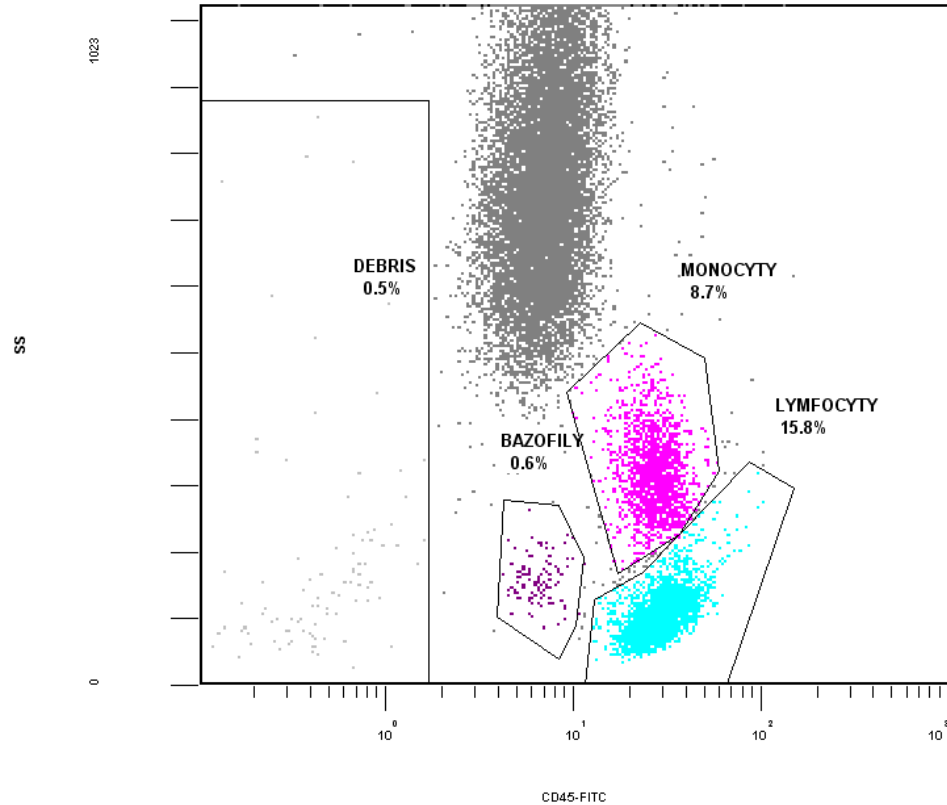




# FSC vs. SSC



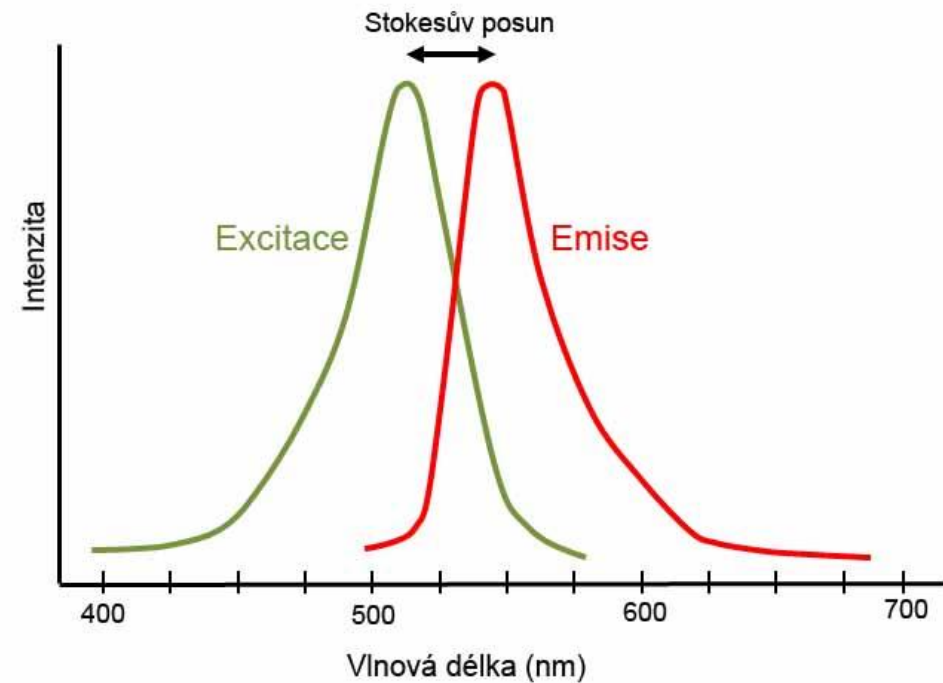
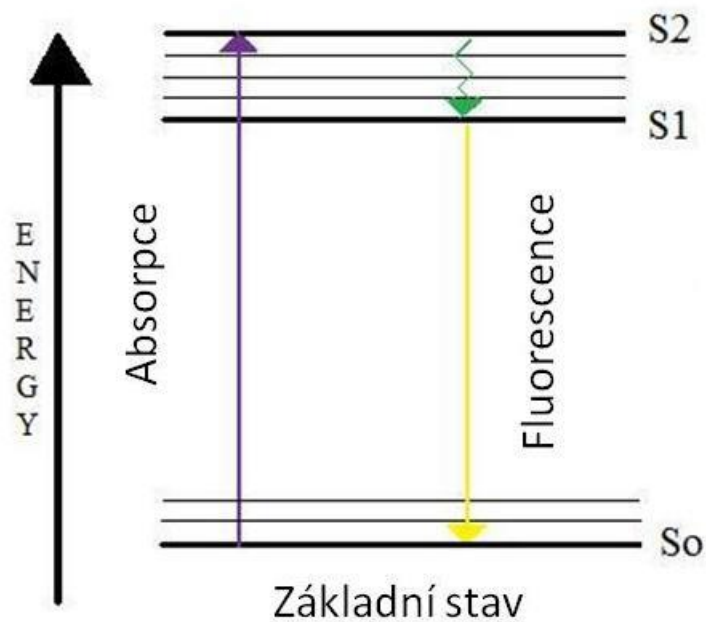
# Diferenciálny rozpočet



# Fluorescencia

Veľa buniek má rovnakú alebo podobnú morfológiu

- monoklonálne Ab značené fluorochromom špecifické k určitému epitopu



# Fluorochromy

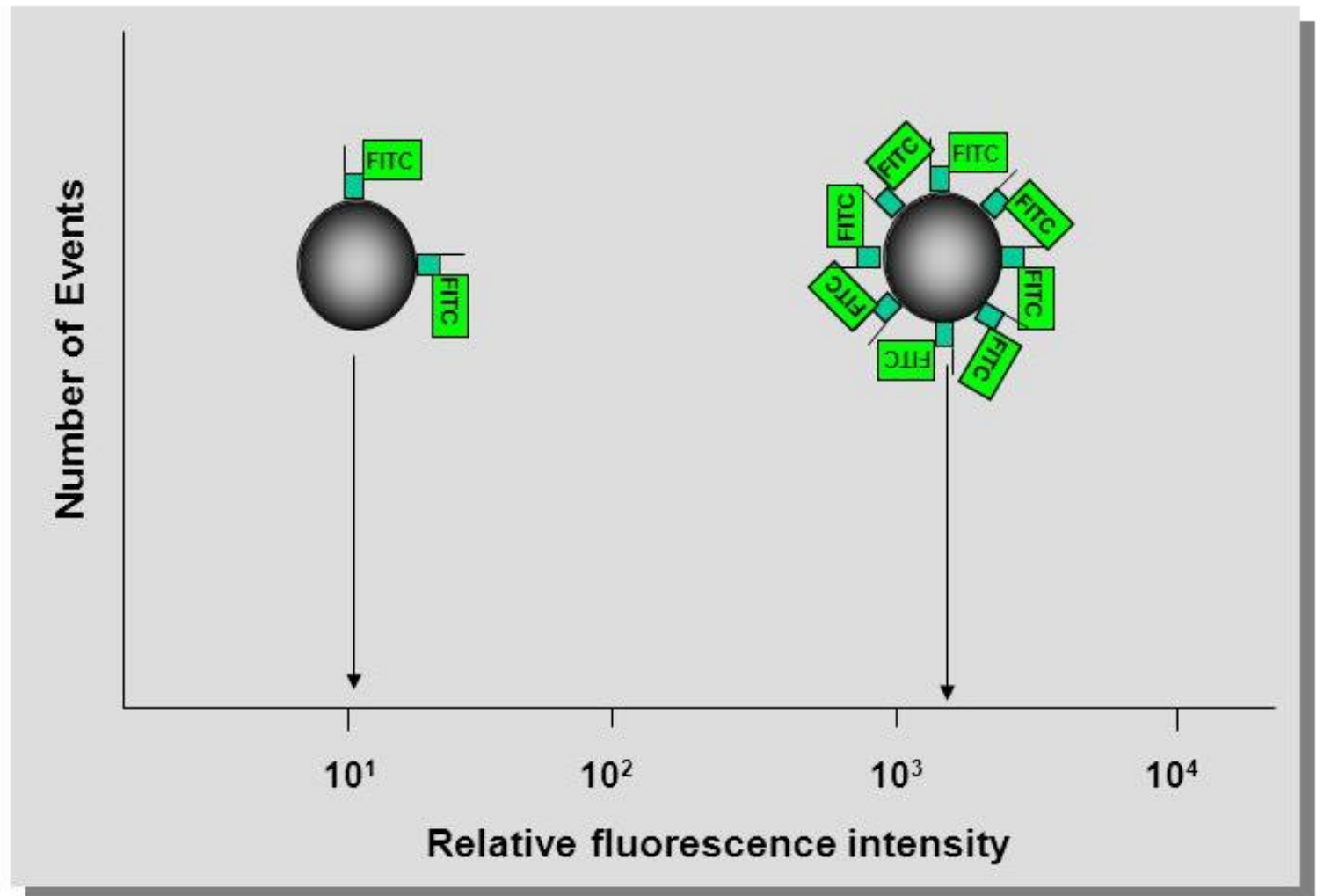
- Sú excitované vhodnou vlnovou dĺžkou
- Emitujú svetlo špecifickej vlnovej dĺžky
- I neznačené bunky môžu byť fluorescenčné vďaka slabej autofluorescencii

# Fluorochromy

- Polycyklické organické molekuly a ich deriváty
  - Fluorescein isothiokyanát (FITC), Cyaniny, Texas Red, rada Alexa, Pacific a Cascade
  - AmCyan, Propidium Iodide, 7-AAD, CFSE
- Fluorescenčné proteíny
  - Phycoerythríny (PE), Allophycocyaniny, PerCP, GFP,...
- Quantum Dots

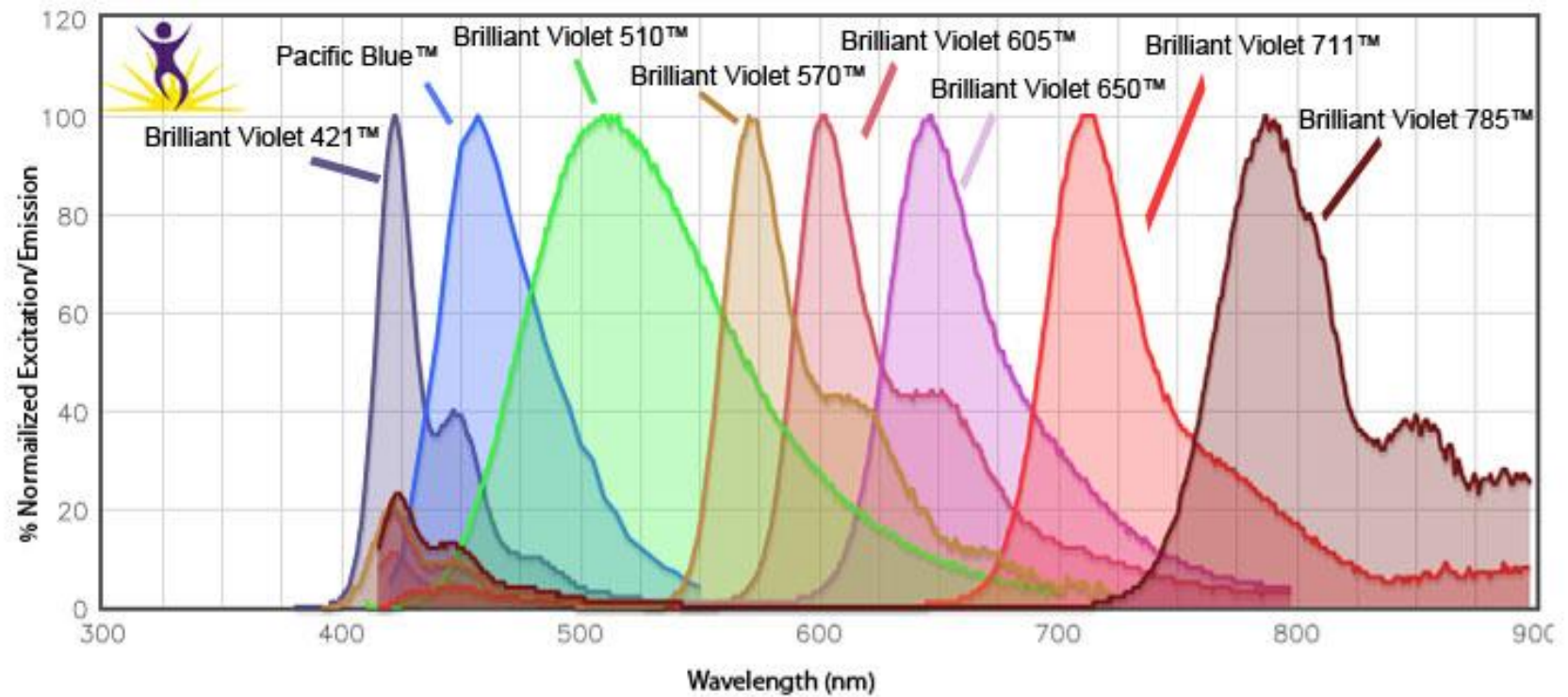
Schopné absorbovať fotóny budiaceho žiarenia (napr. 488 nm) a následne ( $10^{-8}$  s) emitovať fotóny s dlhšou vlnovou dĺžkou (nap. 500 – 800 nm). Fluorescenčné žiarenie má teda inú farbu.

# Intenzita fluorescencie



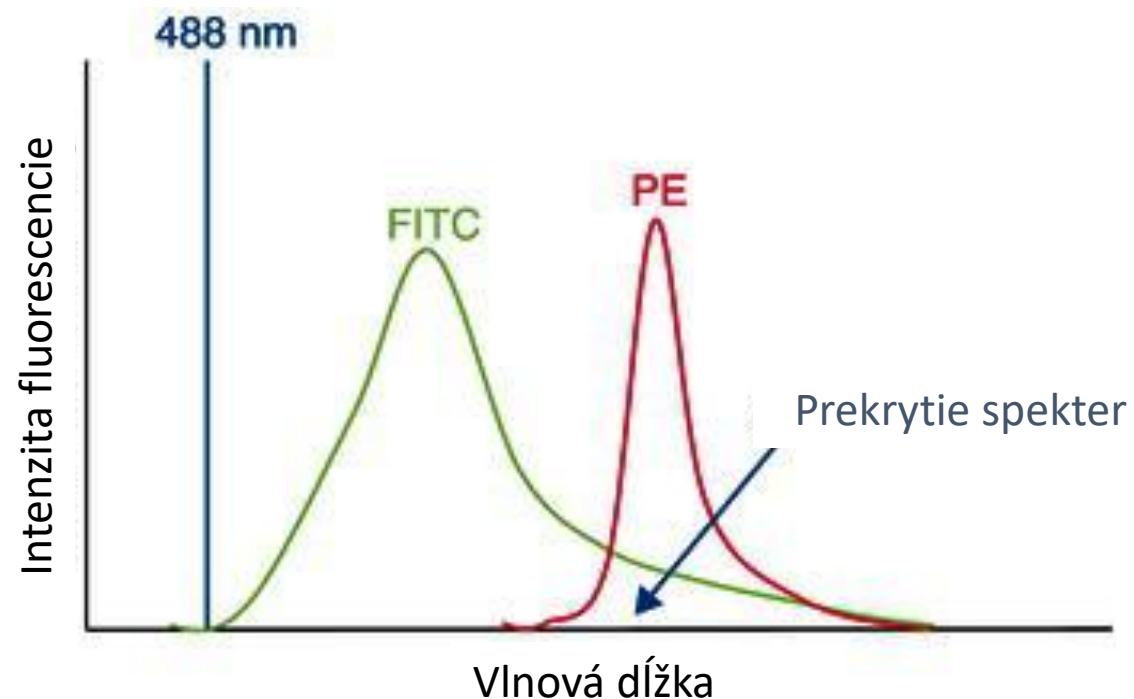


# Emisné spektrá



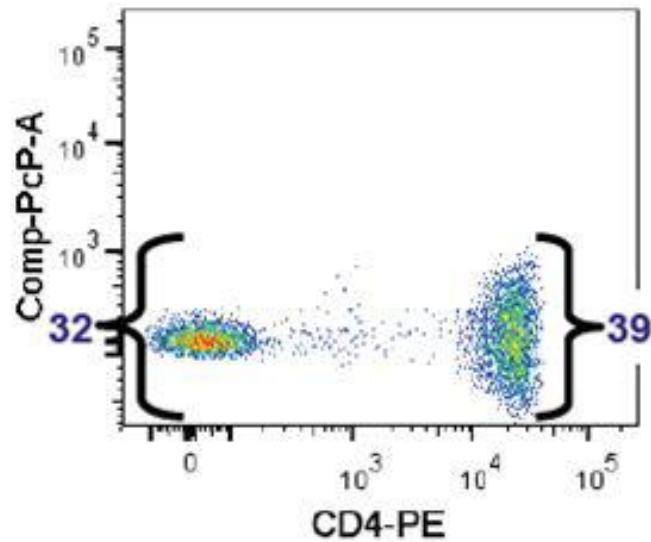
# Prekrytie spektier

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

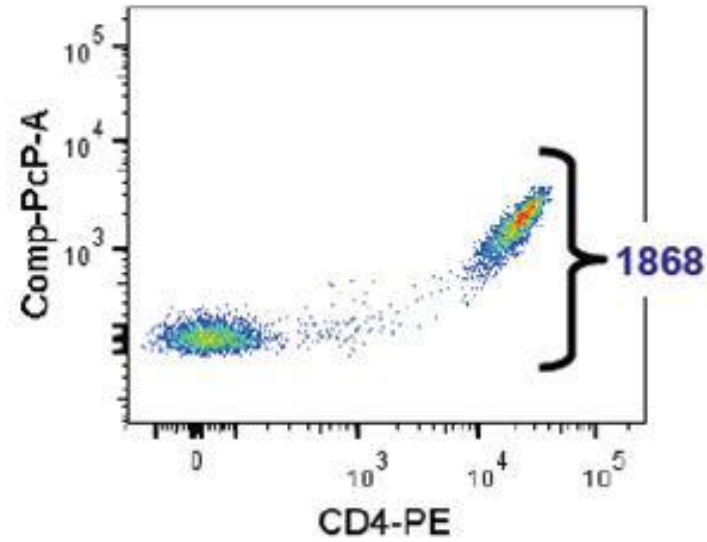


# Kompenzácie

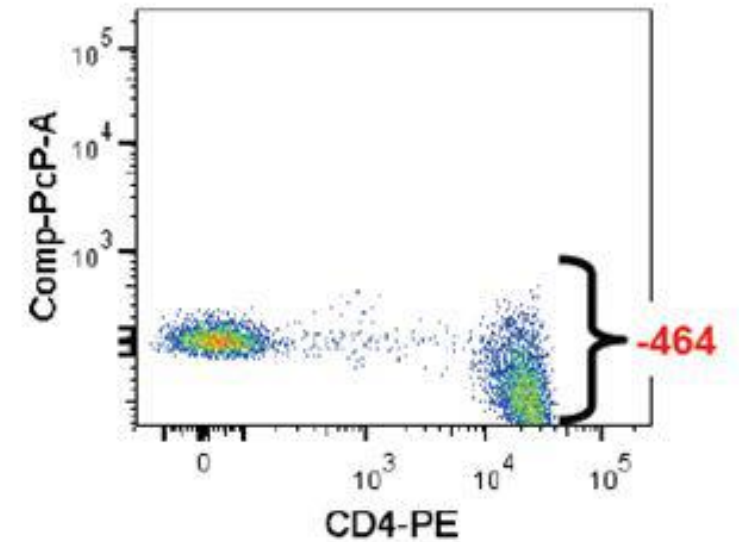
- Priesvit je treba „kompenzovať“, tak aby detektor zaznamenal signál 1 fluorochromu



Properly compensated



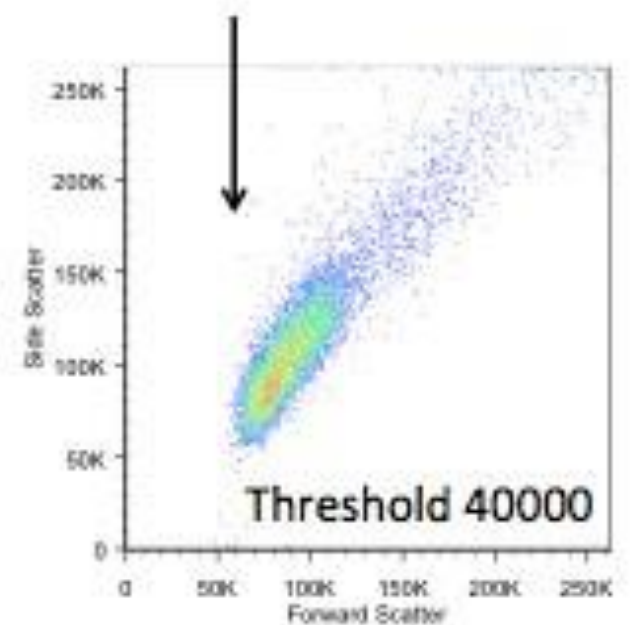
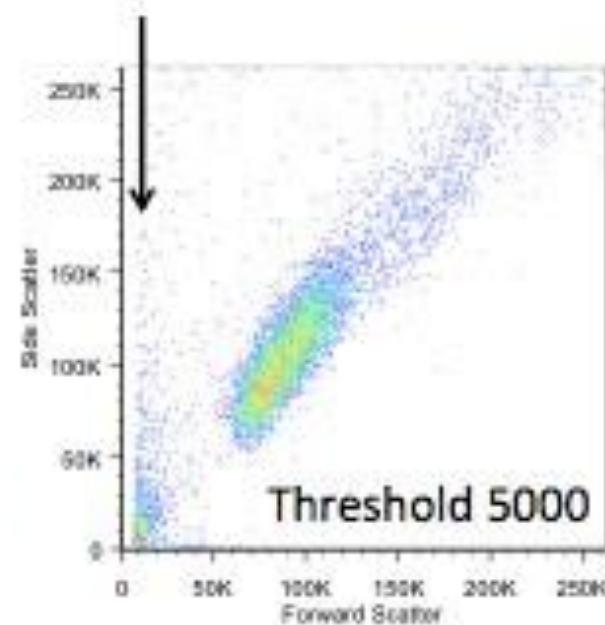
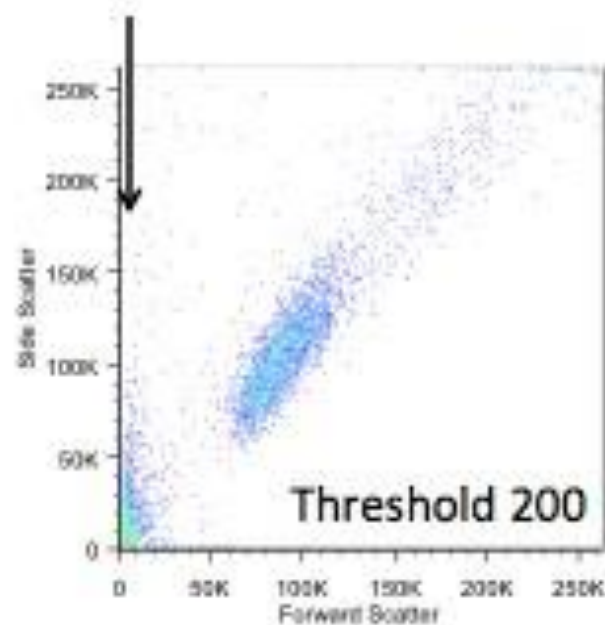
Under compensated



Over compensated

# Threshold (prah)

- Detektory sú extrémne citlivé = detekujú signály z rôznych zdrojov – prach, malé častice, debris
- Eliminácia = threshold
- Nastavenie na jednom parametre (FSC)



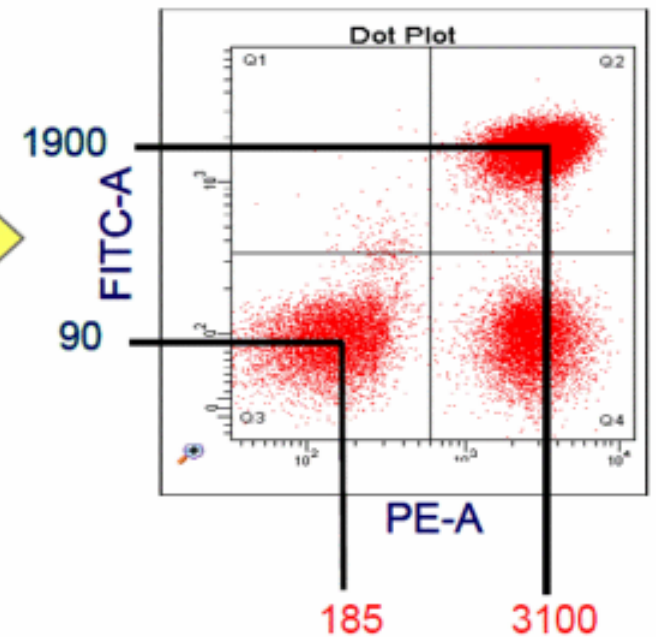
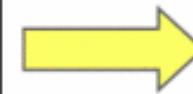
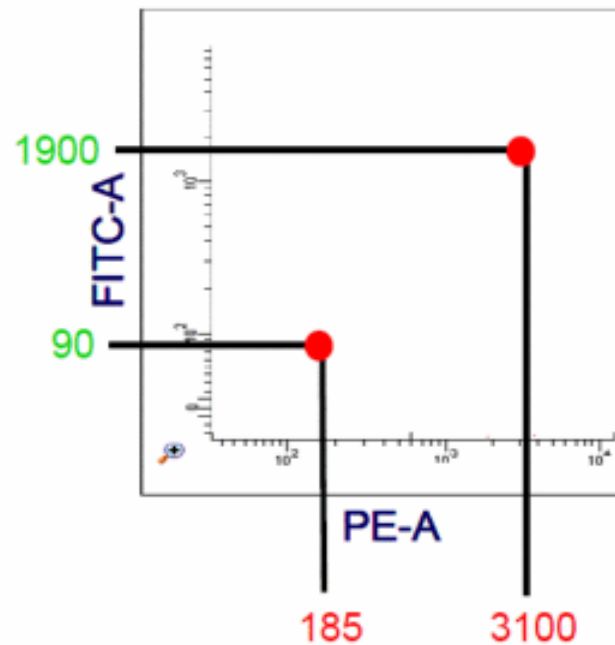
Amplifikácia a digitalizácia signálu (ADC prevodník)

Analýza- pre každú bunku hodnoty všetkých parametrov

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



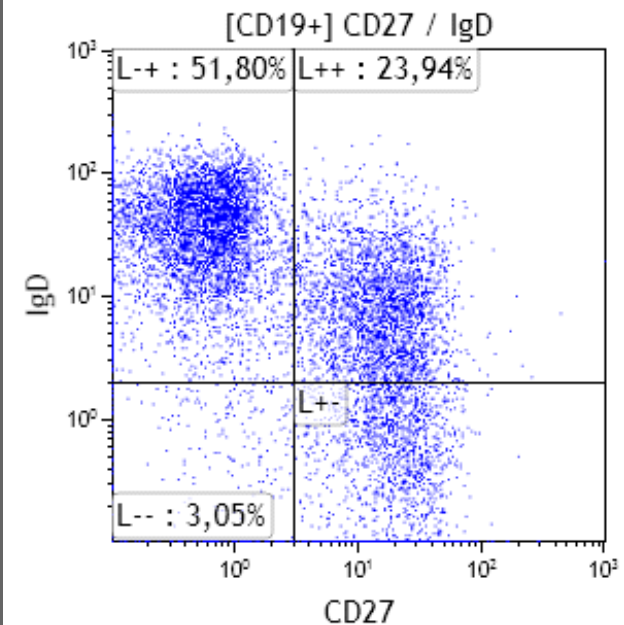
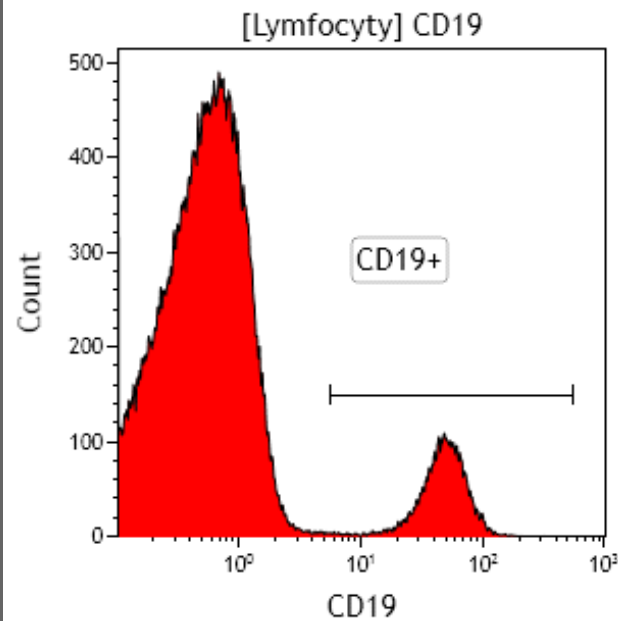
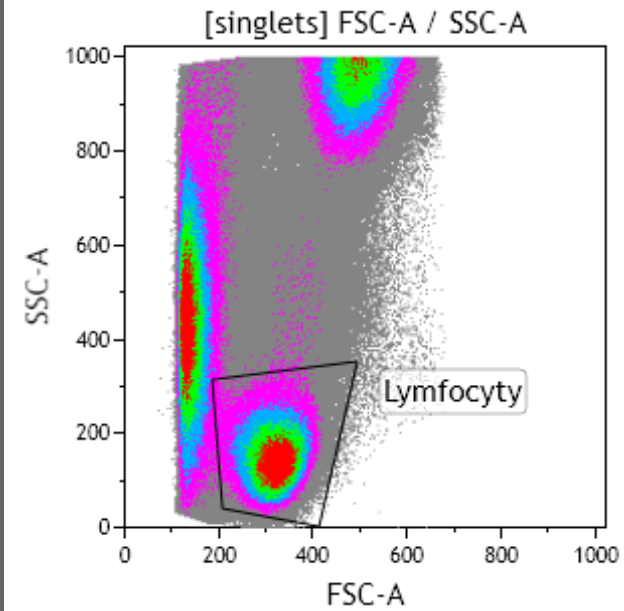
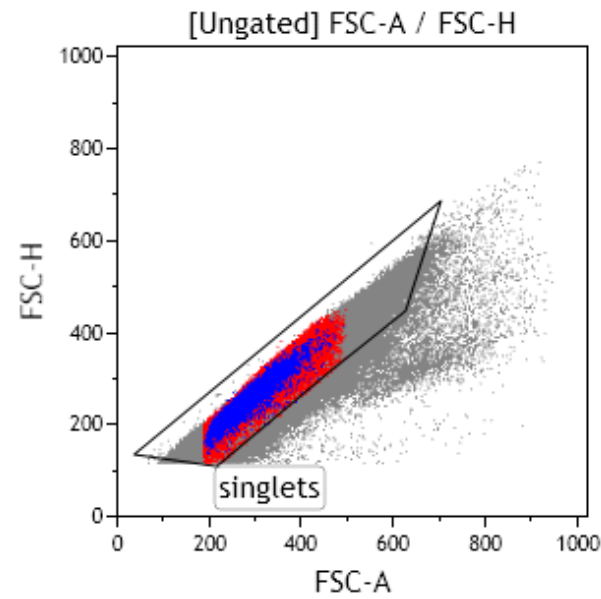
# Analýza nameraných dát

Dáta v LIST MODE FILE

Analyzačný softvér

*Kaluzia; Infinicyt; DiVa; FlowJo;  
Summit*

Vytvorenie štatistík





# Výhody a nevýhody prietokovej cytometrie

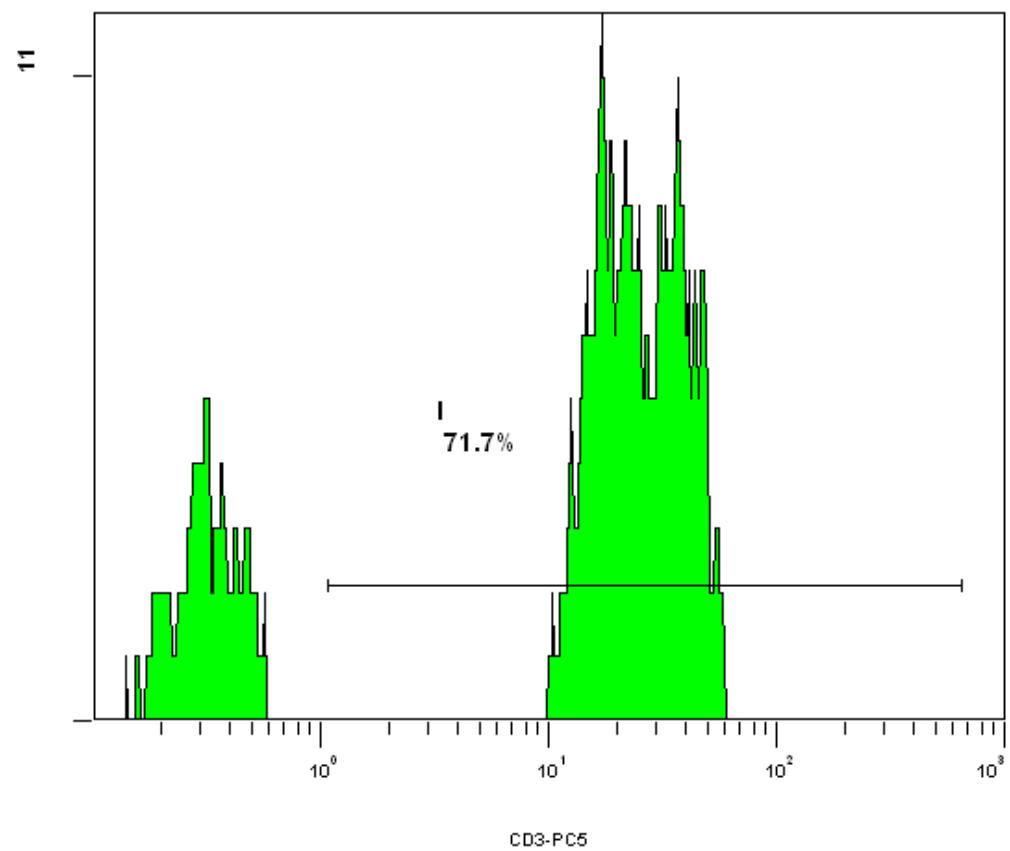
## Výhody

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

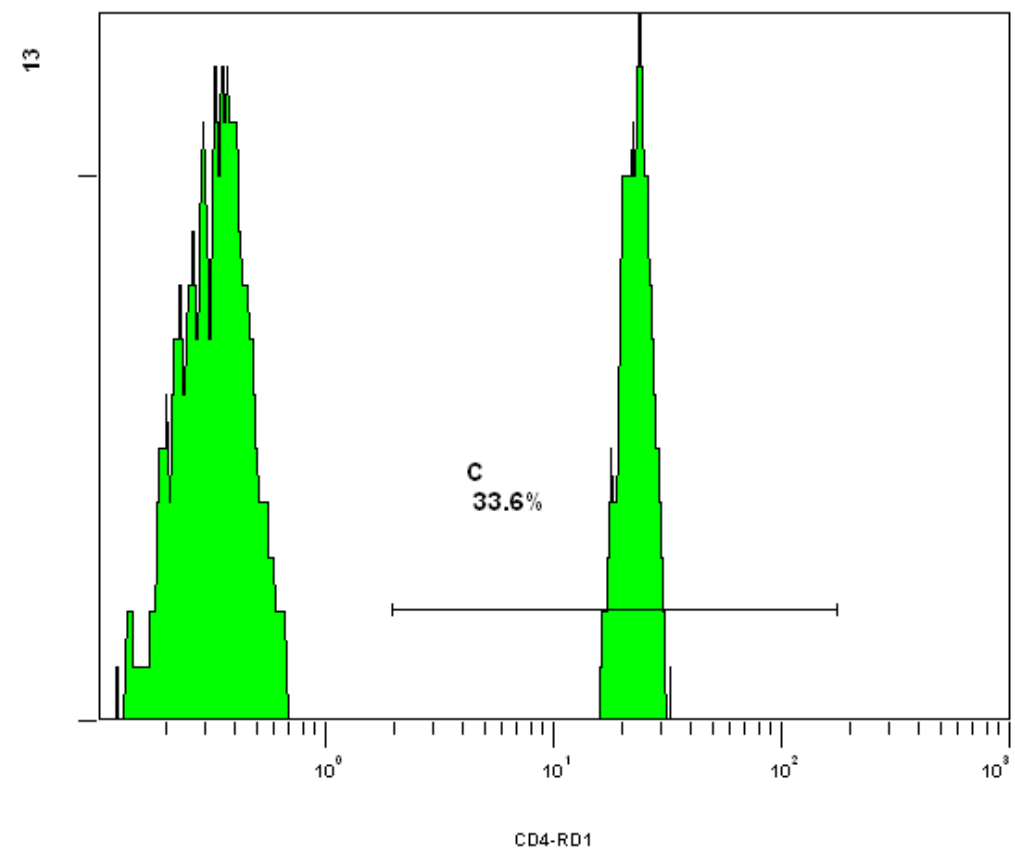
## Nevýhody

- Vysoká finančná náročnosť
- Zostavenie experimentu, analýza a vyhodnotenie dát závislé na skúsenostiach obsluhy
- Analýza vzoriek čo najskôr po odbere
- Nevidíme lokalizáciu signálu na bunke

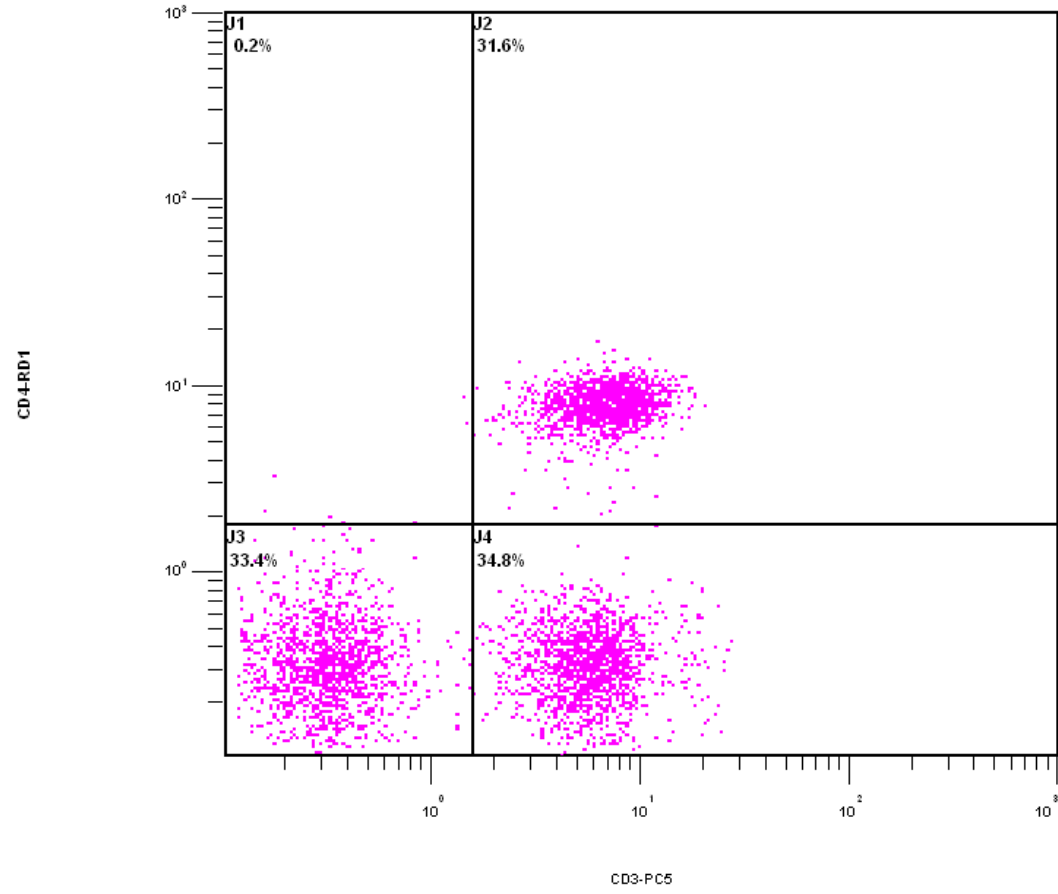
(F1)[A] 20051674.LMD : FL4 LOG



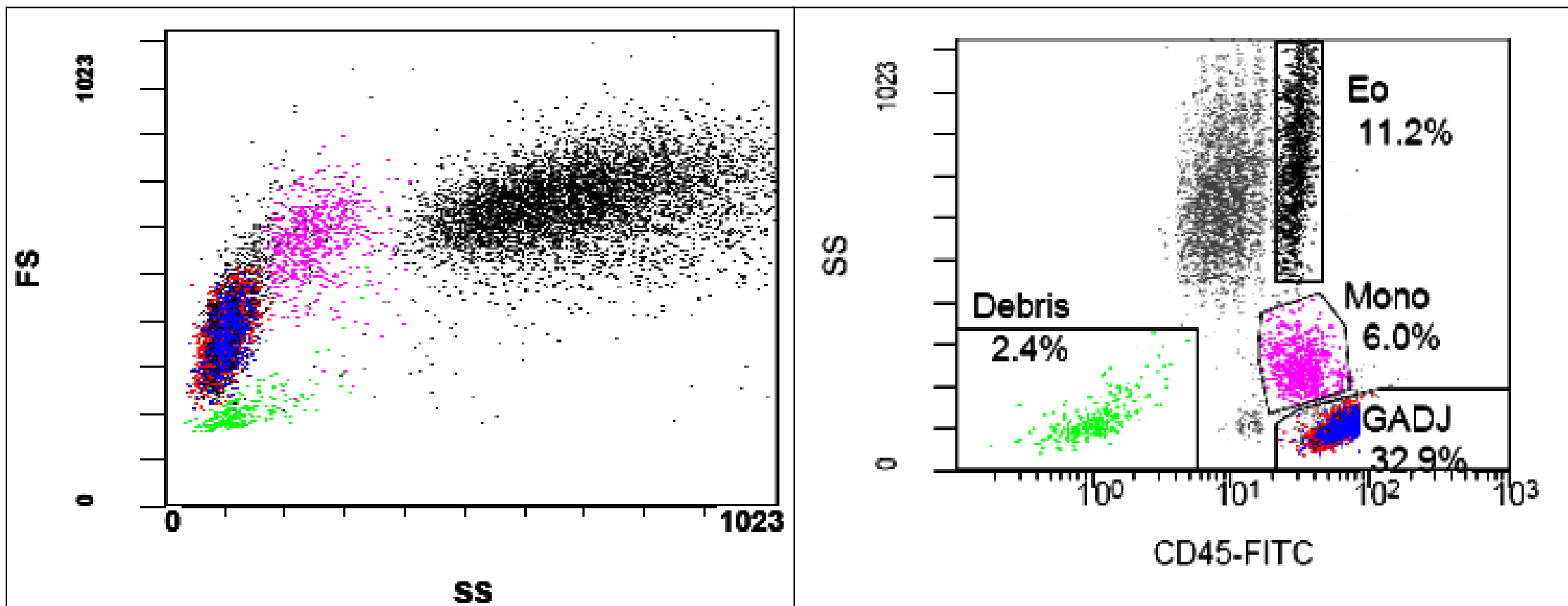
(F1)[A] 20051674.LMD : FL2 LOG



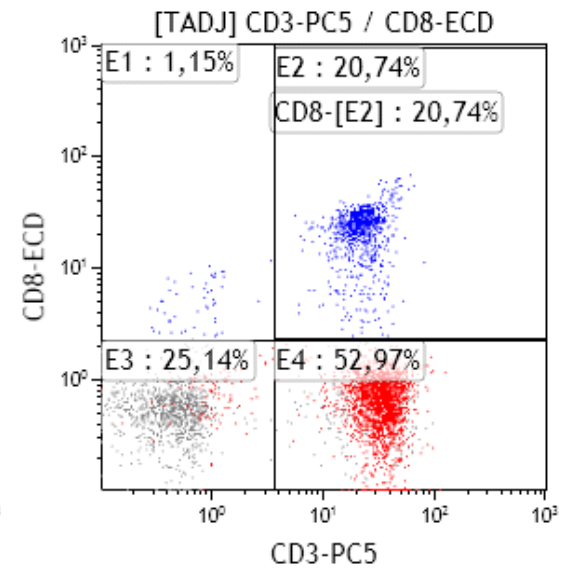
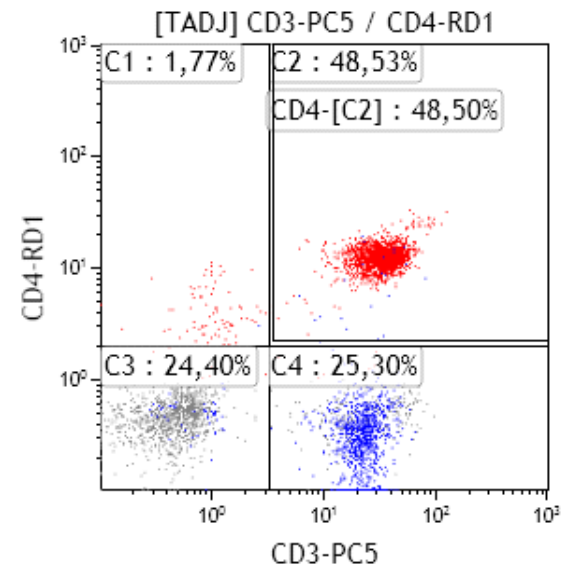
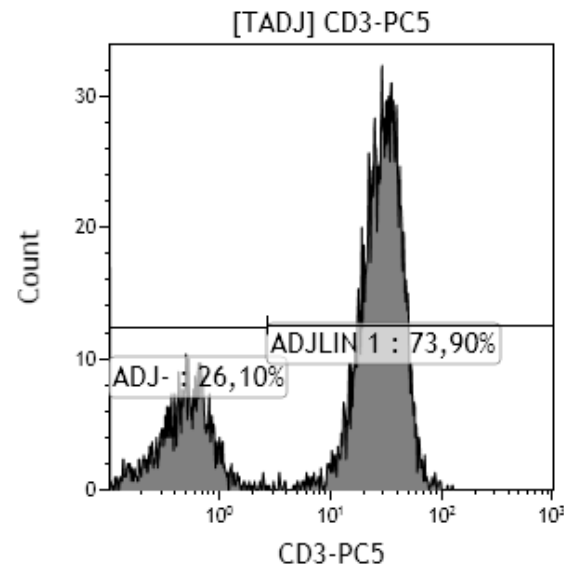
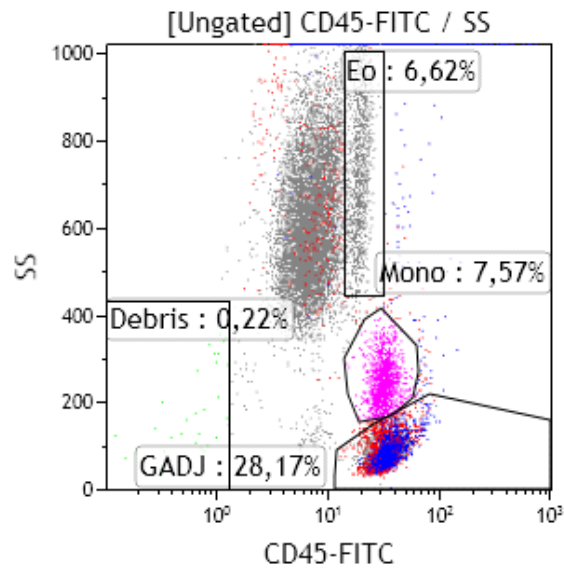
(F4)[Lymfo] 20089743.LMD : FL4 LOG/FL2 LOG



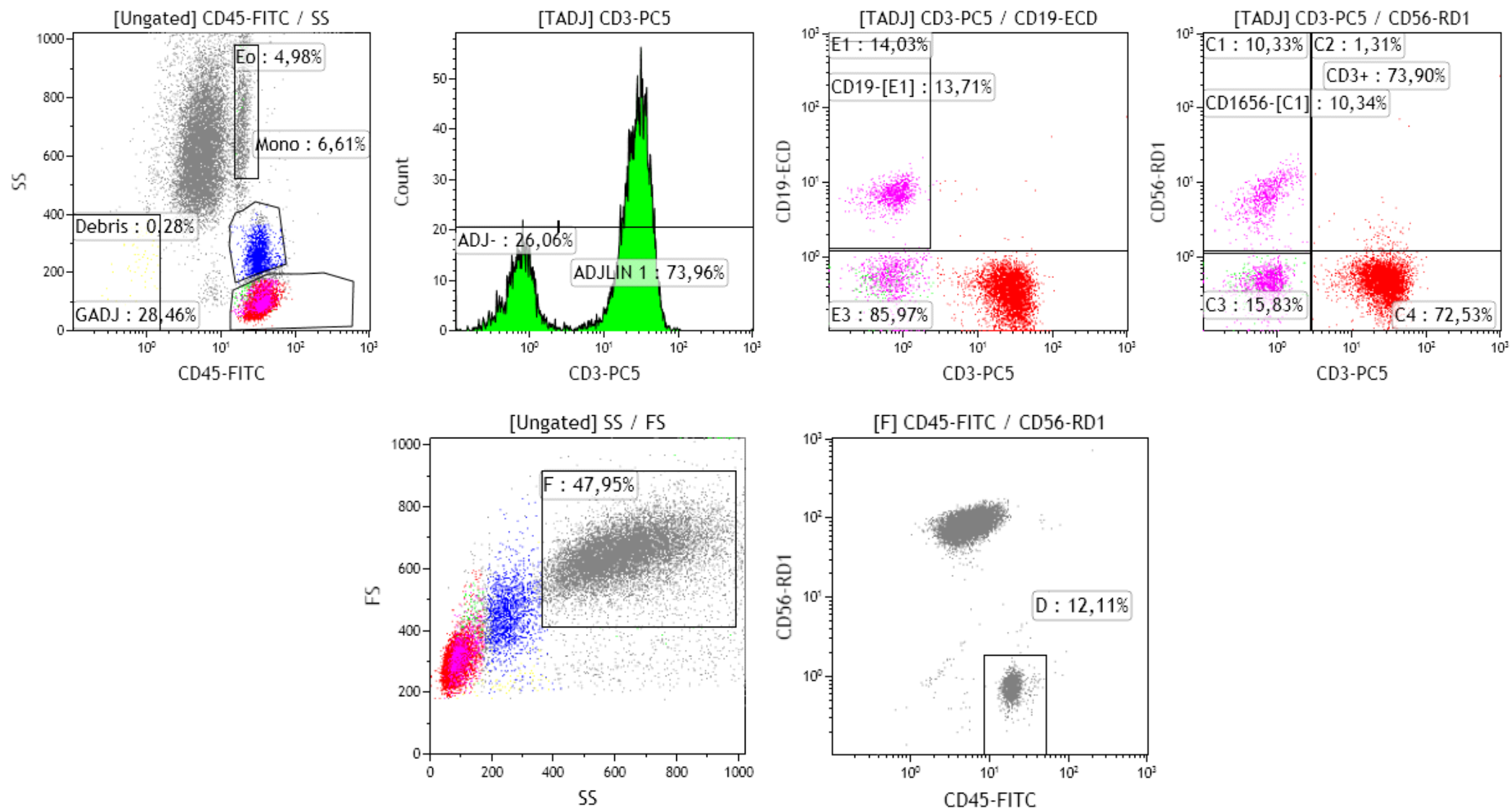
# Krvný diferenciál



# Skúmanvka A




# Skúmavka B





# Hodnotenie výsledkov

- Lýza
- Prítomné všetky MPL → boli pridané? ; pacient? ; liečba?
- Kompenzácie
- Gatovacia stratégia
- Hodnoty  v norme  
zvýšené/znížené → opakovať, doplniť, potvrdiť

# Stanovenie absolútneho počtu lymfocytárnych subpopulácií

Počet Leukocytov	3,6-10 x10 <sup>9</sup> l
Lymfocyty	20-55 %
Monocyty	0-10 %
Granulocyty – neutrofily, eosinofily, bazofily	37-75 %

Príklad:		relatívny počet	abs. počet
Leukocyty	5 x10 <sup>9</sup> l	Lymocyty: 20%	1,0 x10 <sup>9</sup> l
		CD3: 75%	0,75 x10 <sup>9</sup> l
		CD19: 10%	0,1 x10 <sup>9</sup> l
		CD15,56: 15%	0,15 x10 <sup>9</sup> l

# Vyšetrenie lymfocytov periférnej krvi

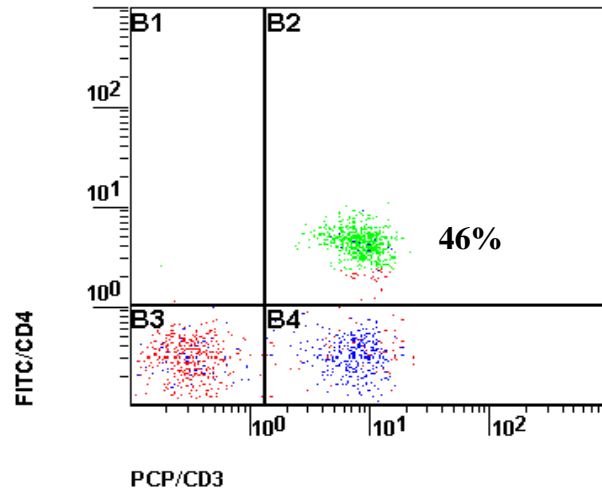
ZNAK	EXPRESE	FUNKCE	ZASTOUPENÍ NA LYMFOCYTECH PERIFERNÍ KRVE (%)
CD3	všetchny T-lymfocyty	asociován s TCR, přenos signálu	58-85
CD4	pomocné T-lymfocyty	receptor pro MHC II, aktivace	30-60
CD8	cytotoxické T-lymfocyty	receptor pro MHC I, aktivace	15-35
CD19	B-lymfocyty	regulátor aktivace	7-23
CD16/CD56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

# Hodnotenie nálezu jednotlivých subpopulácií

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

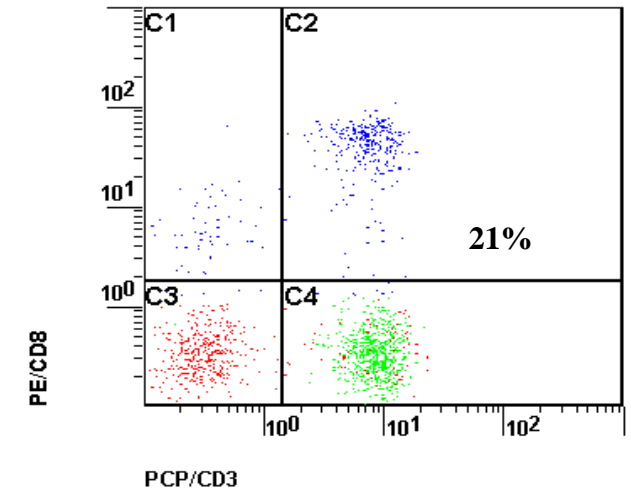
# Príklady využitia FACS v praxi

# Zdravá osoba



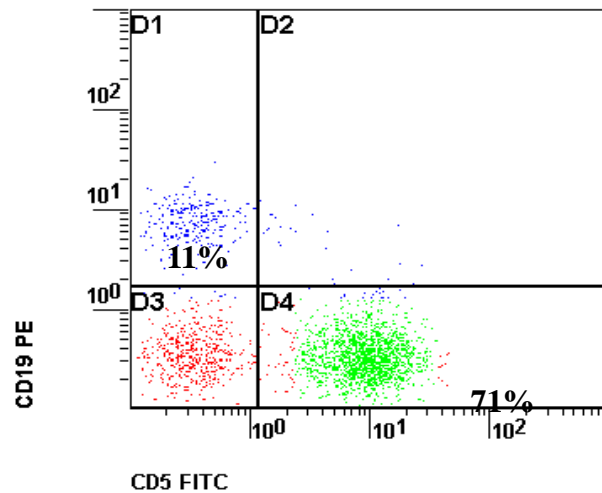
## T LYMFOCYTY

- CD3+ : 71 (58-85)%
- CD3+ 4+ : 46 (30-60)%
- CD3+ 8+ : 21 (15-35)%



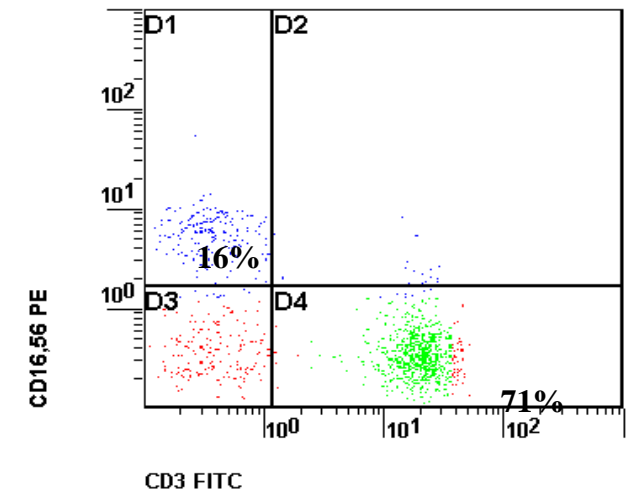
## B LYMFOCYTY

- CD19+ : 11 (7-23) %



## NK LYMFOCYTY

- CD16,56+ : 16 (6-20)%



# Vplyv infekcie

## Bakteriální infekce

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

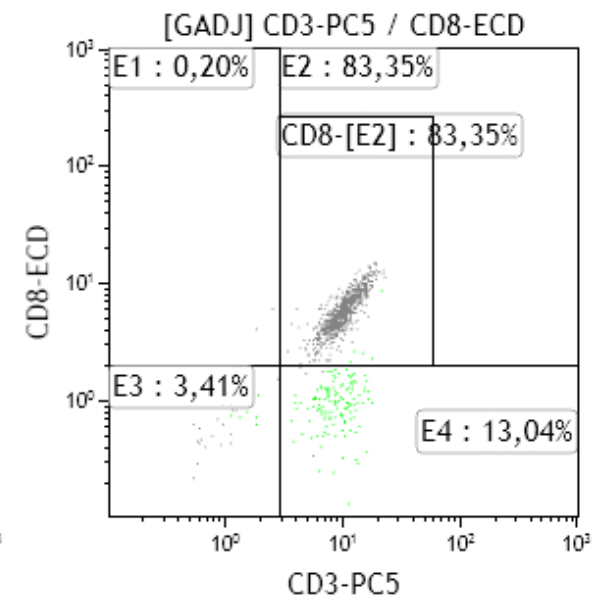
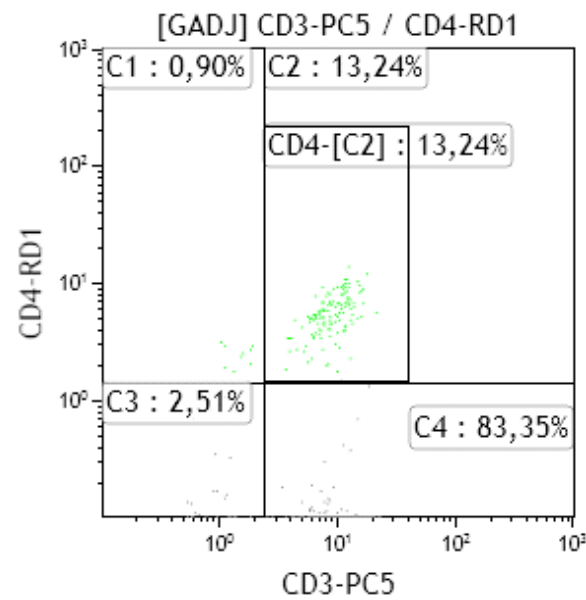
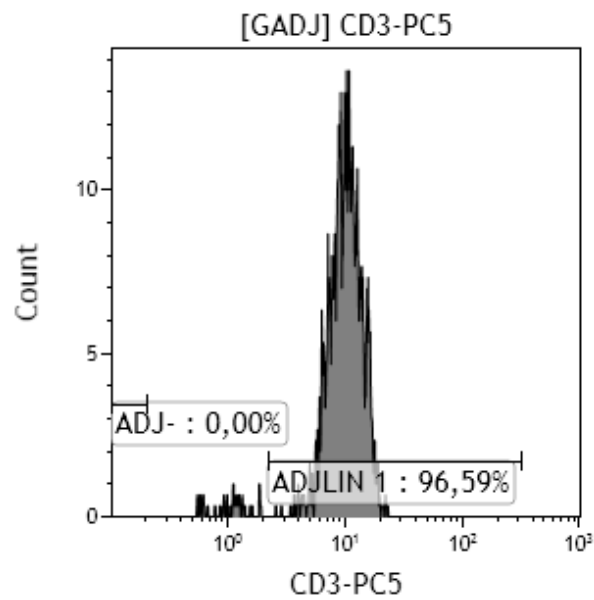
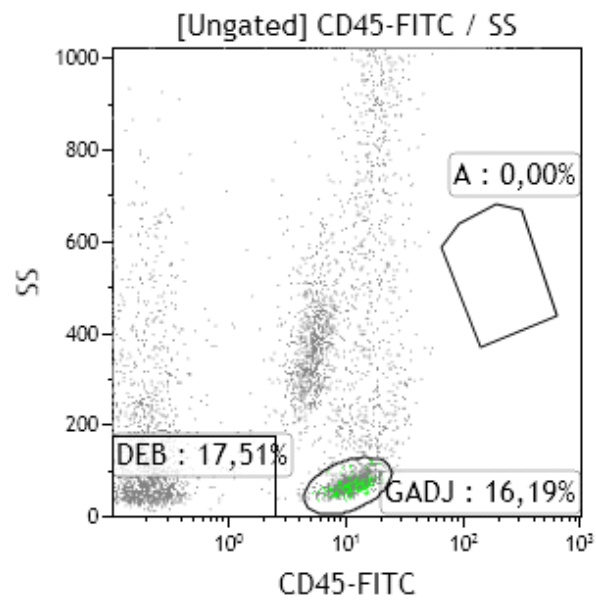
## Virová infekce

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

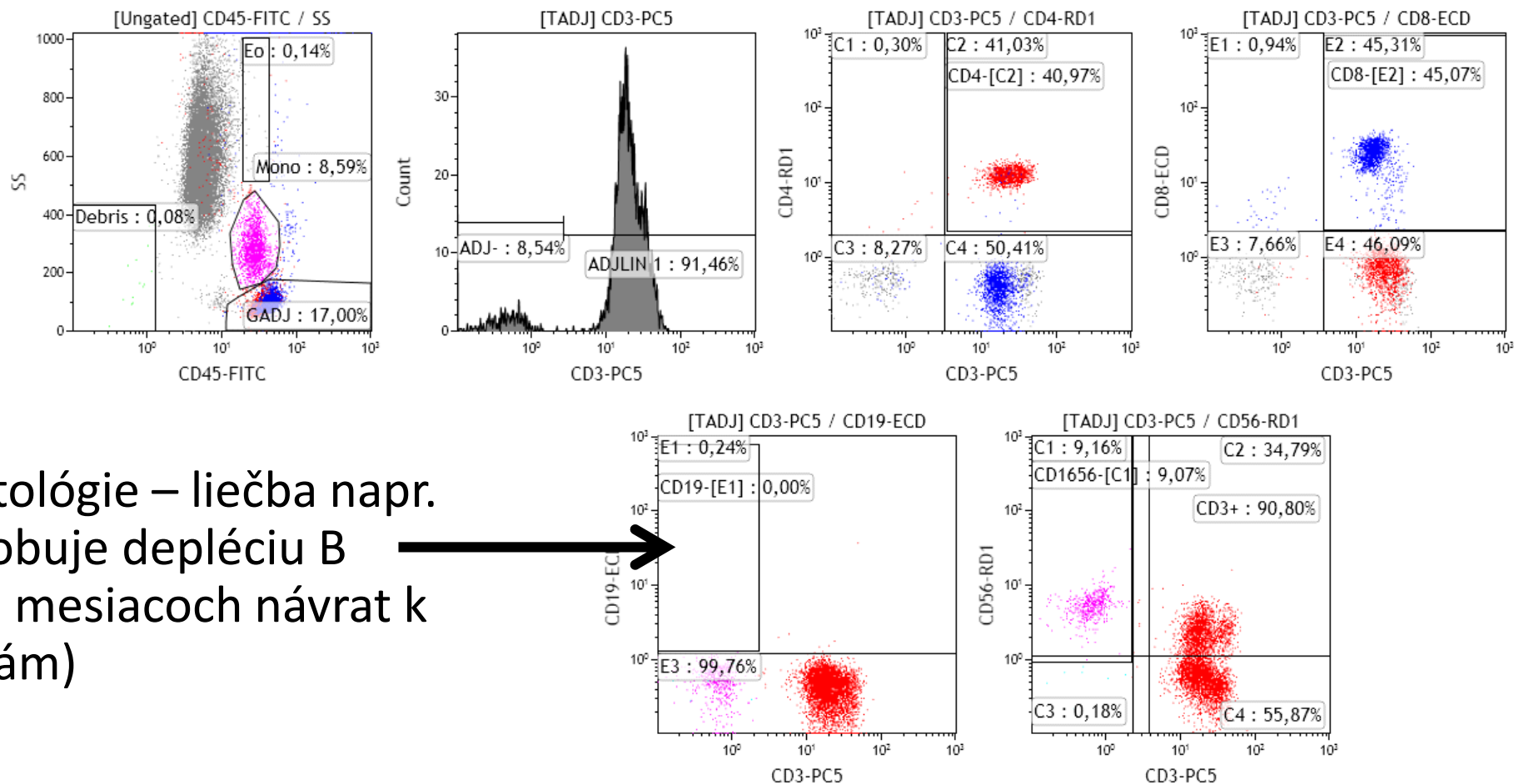


# Bronchoalveolárna laváž (BAL)

Prevrátený pomer CD4+/CD8+ = podozrenie na sarkoidózu



# Pacientka: Ž, \*1957

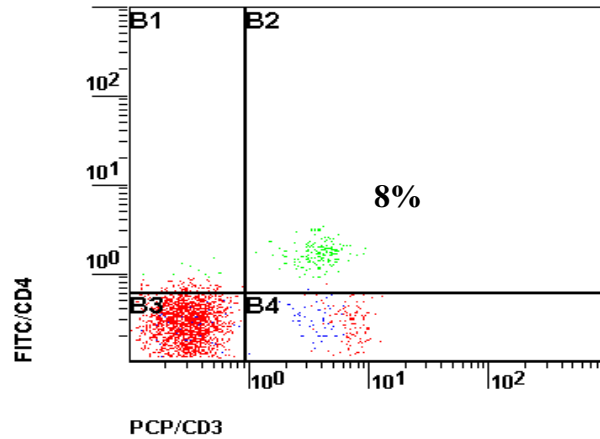


Pacientka z reumatológie – liečba napr. rituximabom spôsobuje depléciu B lymfocytov (po 4-6 mesiacoch návrat k normálnym hladinám)

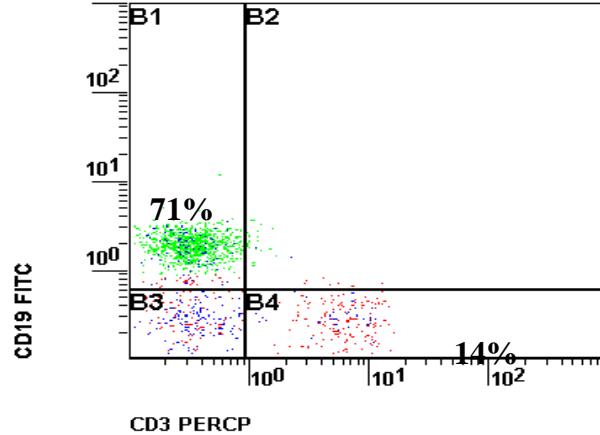


# SCID

(1):Z0008654.LMD FL3 LOG/FL1 LOG A



(2):Z0008657.LMD FL3 LOG/FL1 LOG A



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)%

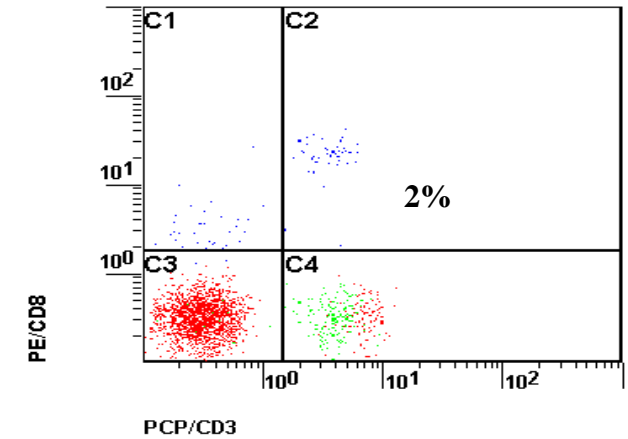
## B LYMFOCYTY

- CD19+ : **71** (7-23) %

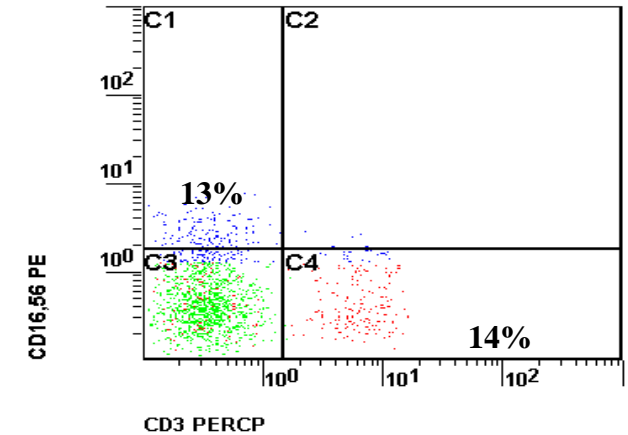
## NK LYMFOCYTY

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

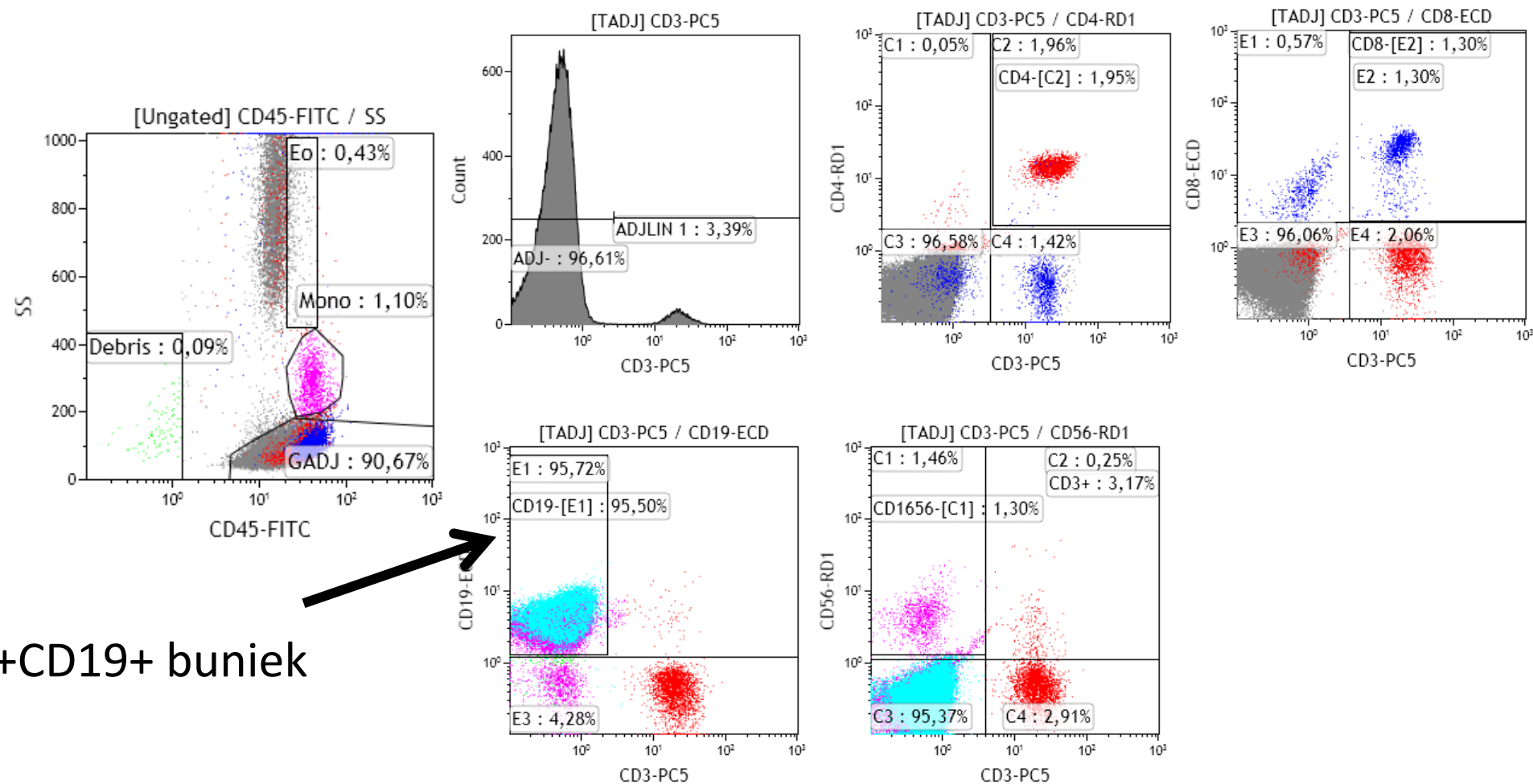
(1):Z0008654.LMD FL3 LOG/FL2 LOG A



(2):Z0008657.LMD FL3 LOG/FL2 LOG A



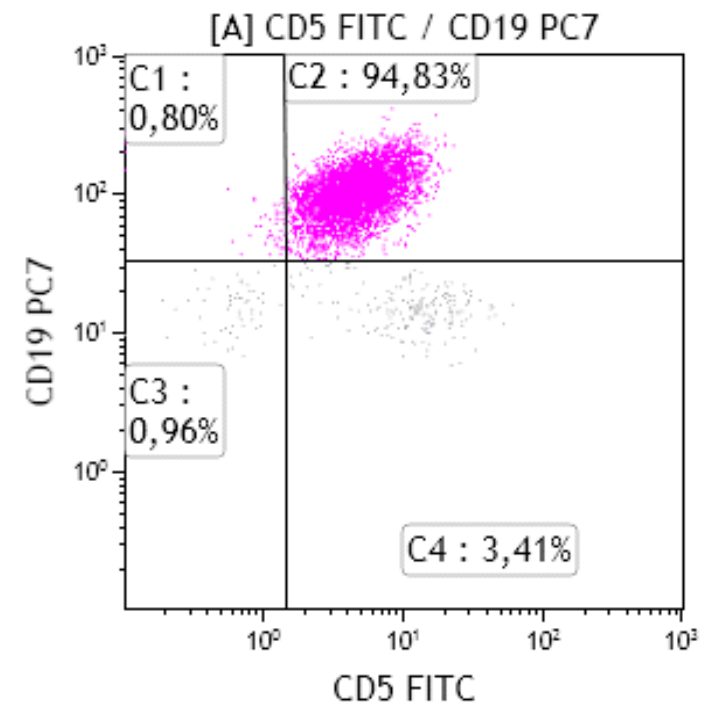
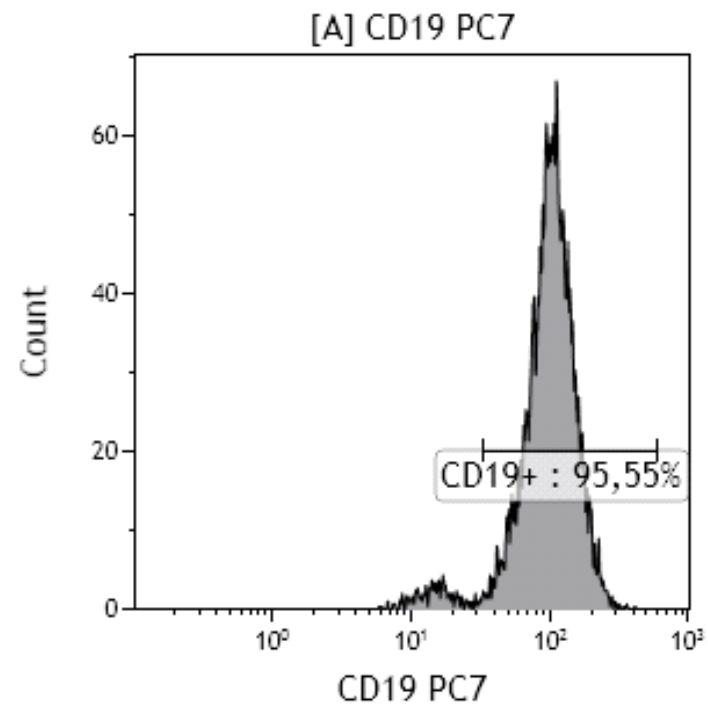
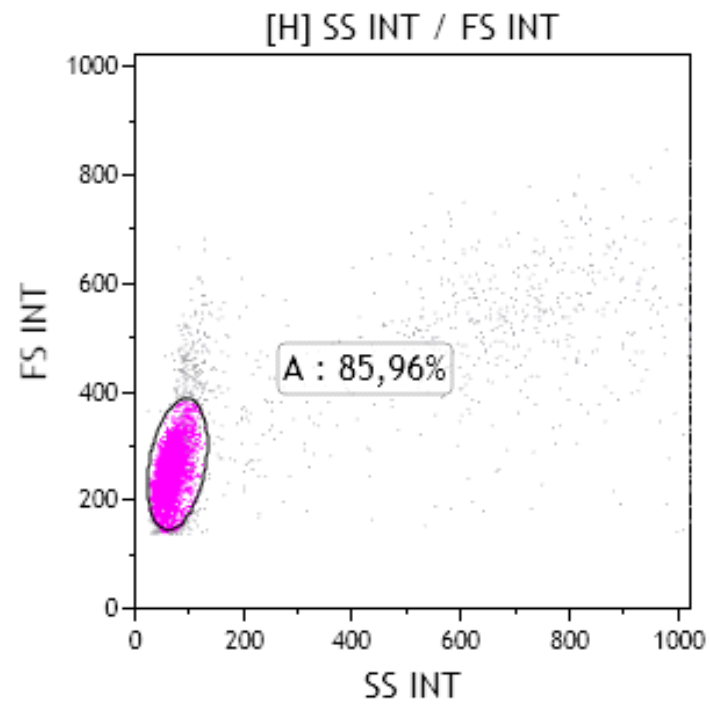
Pacient: M, \*1966



Leukémia

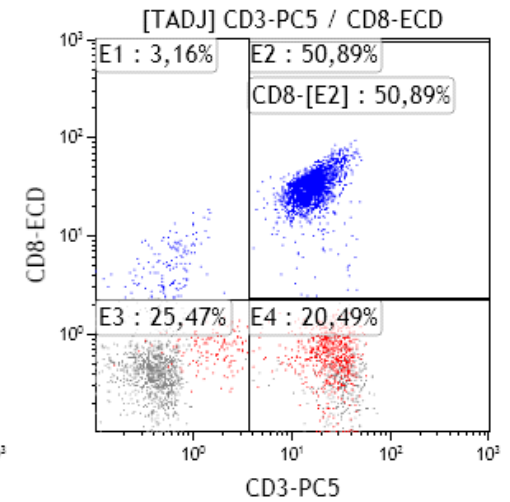
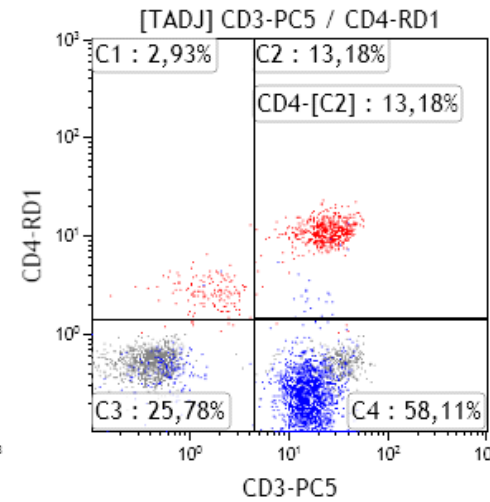
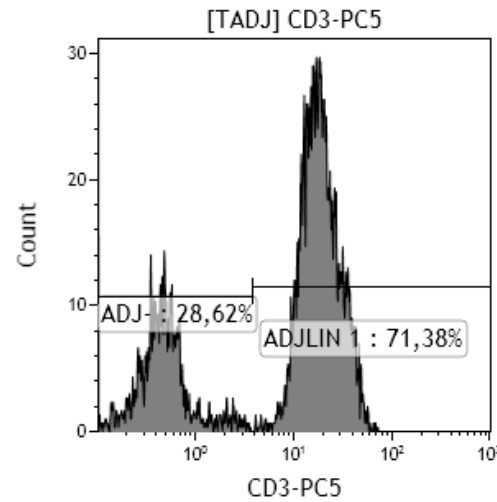
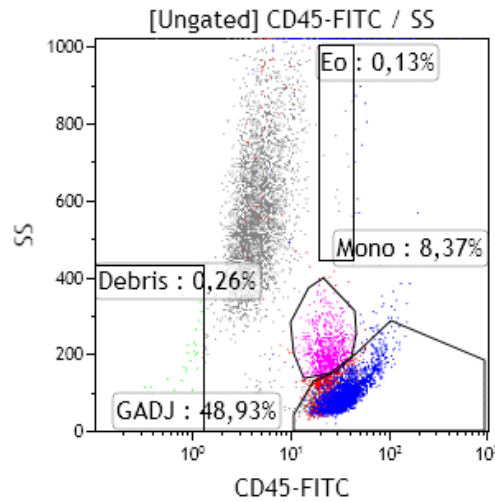
vyšetrenie CD5+CD19+ buniek

# CD5+CD19+



**CD5+CD19+ : 94.8%**

Pacient: M, \*1999

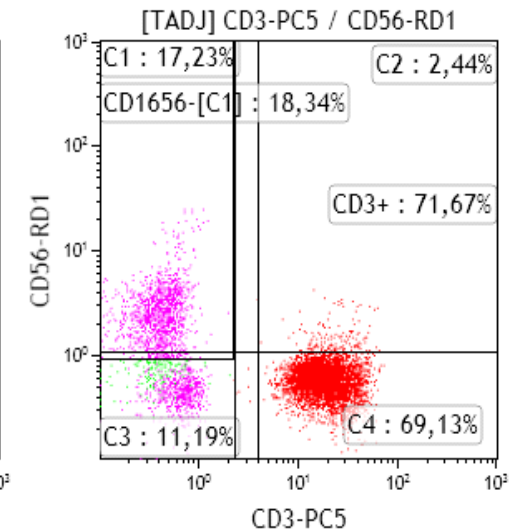
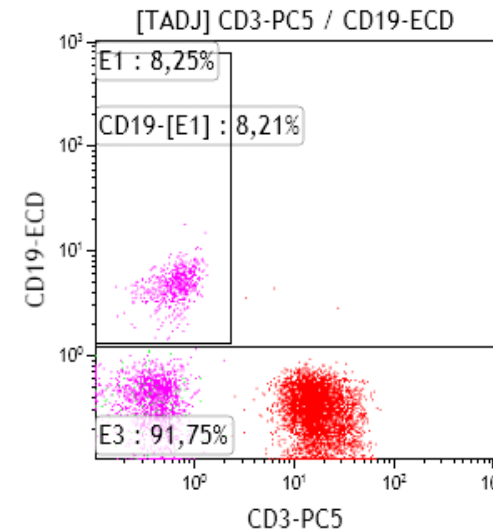


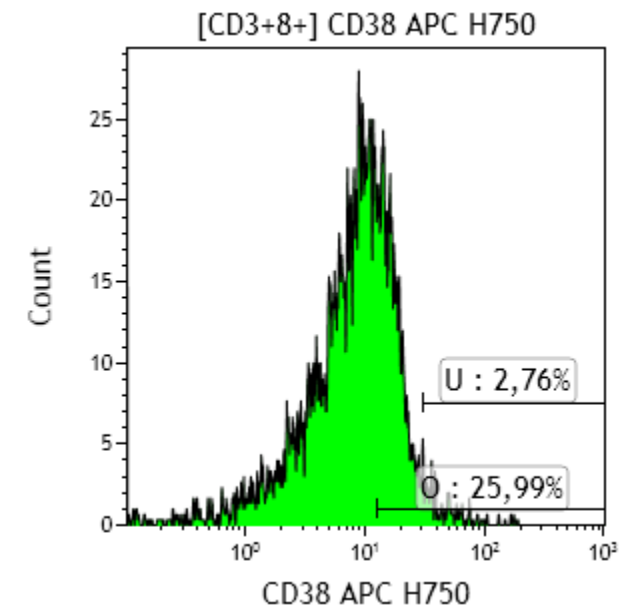
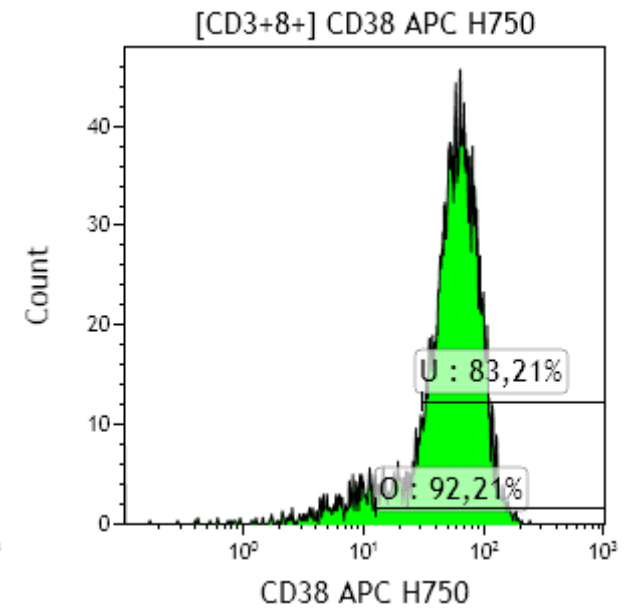
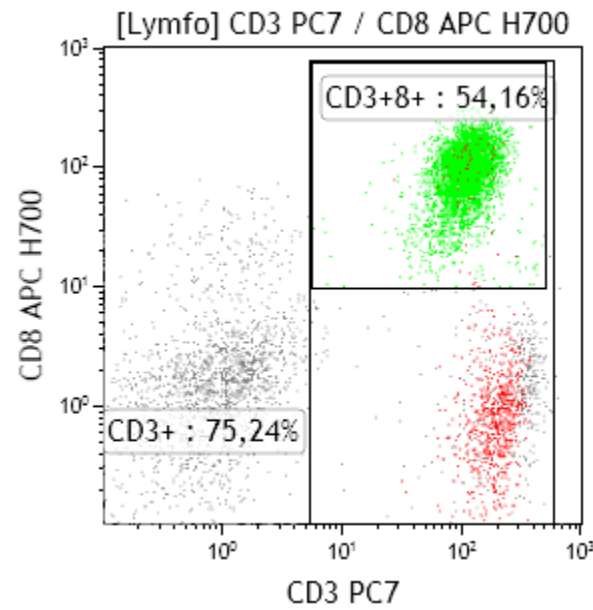
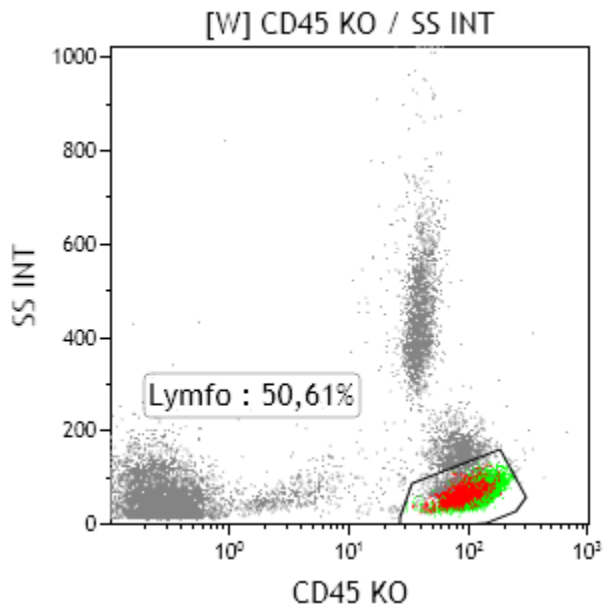
**obrátенý pomer CD4/CD8!**

CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

**virová infekcia???**





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

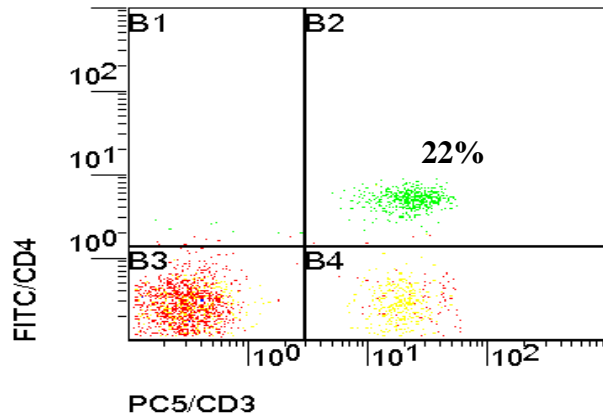


# DiGeorgův syndrom

- Embryonálna porucha – narušenie vývoja v oblasti 3. a 4. embryonálného oblúka
- Abnormality v arteriálnom obehu, srdci, jícne a čeľustiach
- Porucha vo vývoji thymu – znížené zastúpenie T lymfocytov

# DiGeorgiuv syndrom

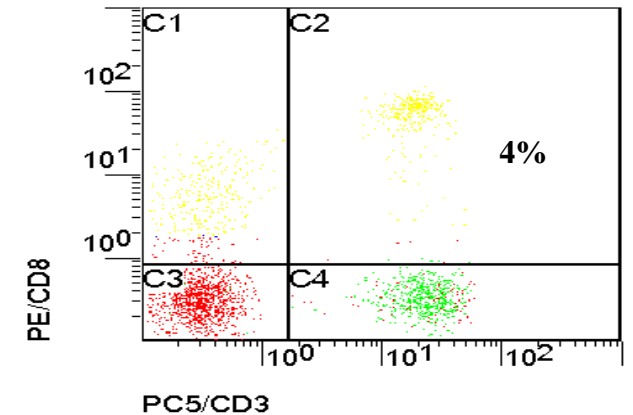
(3):Z0001091.LMD FL4 LOG/FL1 LOG A



## T LYMFOCYTY

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

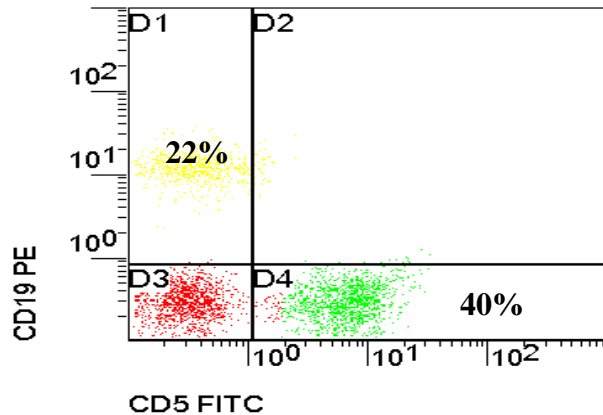
(3):Z0001091.LMD FL4 LOG/FL2 LOG A



## B LYMFOCYTY

- CD19+ : 22 (7-23) %

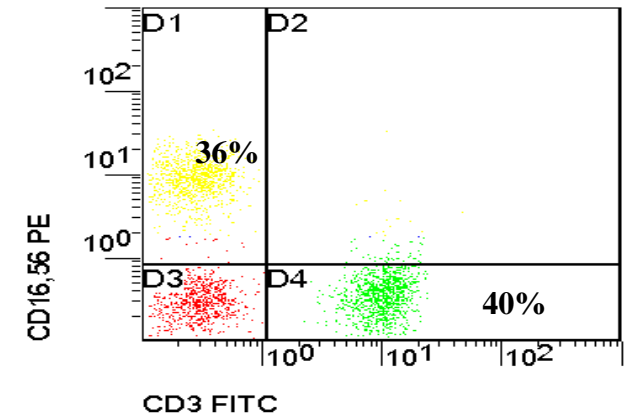
(1):Z0001094.LMD FL1 LOG/FL2 LOG A



## NK LYMFOCYTY

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

(2):Z0001095.LMD FL1 LOG/FL2 LOG A

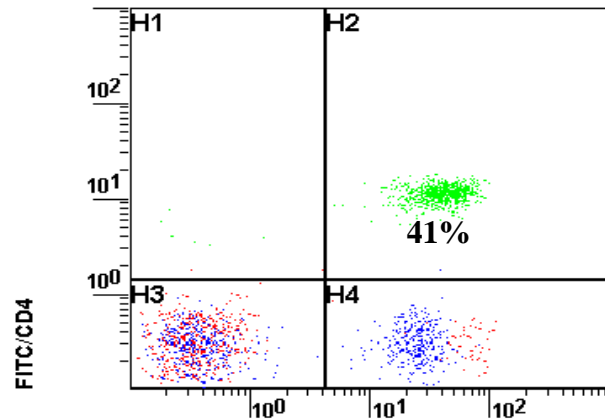


# X-viazaná agamaglobulinémia

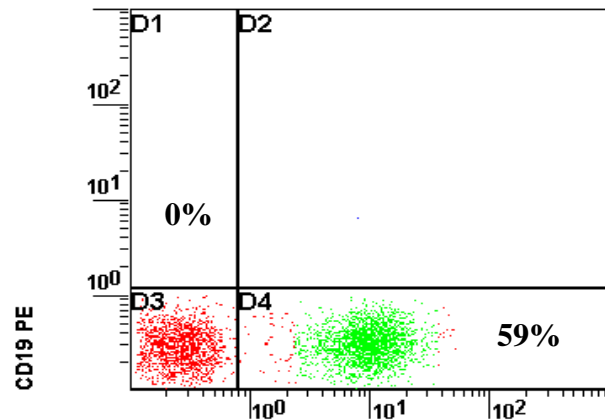
- Mutácia v géne kódujúcom Brutonovu tyrosinkinázu – dôležitá pre diferenciáciu B lymfocytov
- Ženy prenášačky, manifestáciu u mužov
- Dochádza k zastaveniu vývoja B lymfocytov
- Neprítomnosť B lymfocytov v krvnom riečišti

# X-viazaná agamaglobulinémia

(1):Z0009576.LMD FL4 LOG/FL1 LOG A



(2):Z0009578.LMD FL1 LOG/FL2 LOG A

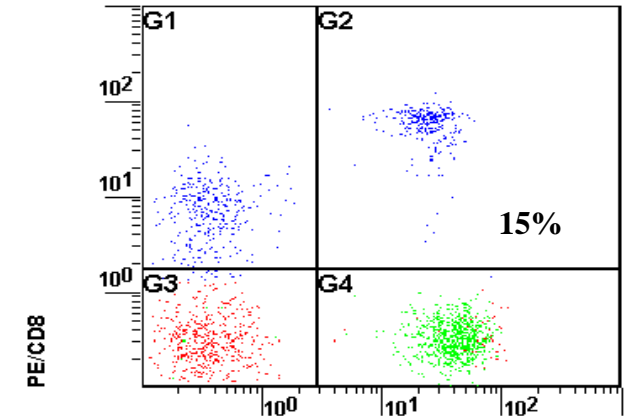


CD5 FITC

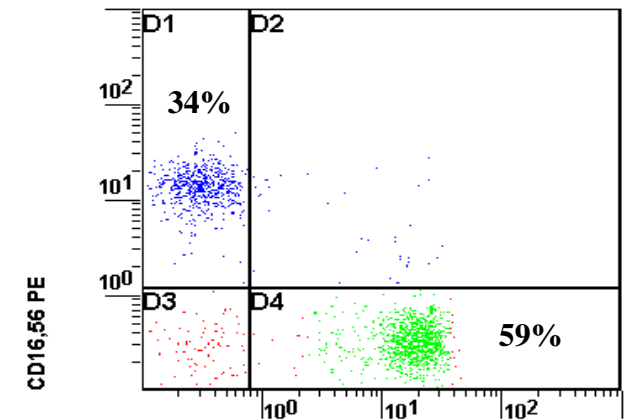
## T LYMFOCYTY

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

(1):Z0009576.LMD FL4 LOG/FL2 LOG A



(3):Z0009579.LMD FL1 LOG/FL2 LOG A



CD3 FITC

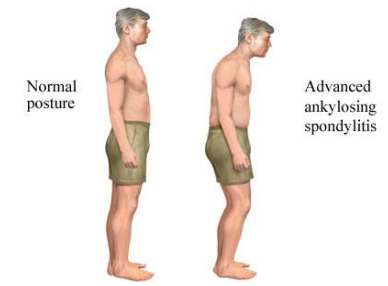
## B LYMFOCYTY

- CD19+ : 0 (7-23) %

## NK LYMFOCYTY

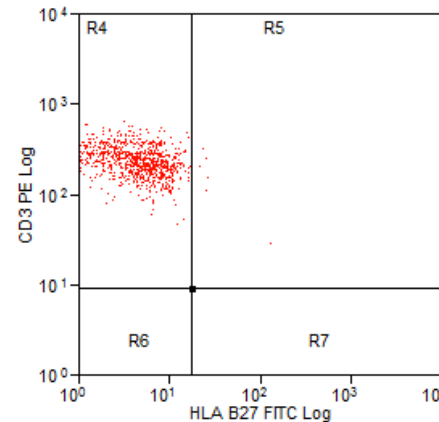
- CD16,56+ : 34 (6-20)%

# HLA-B27

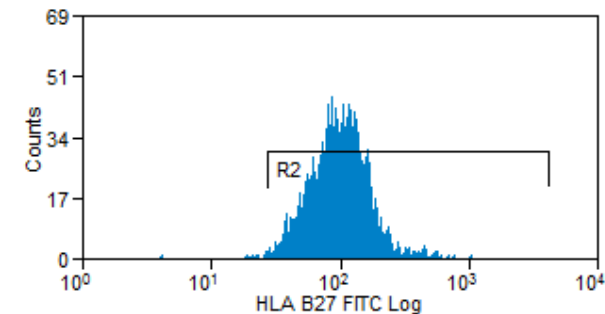
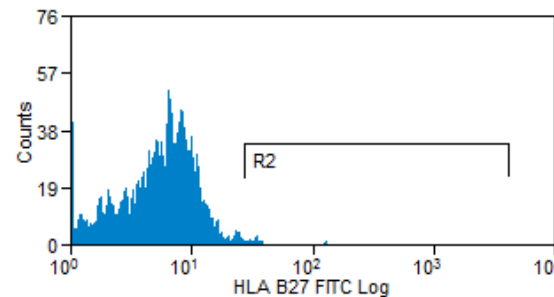
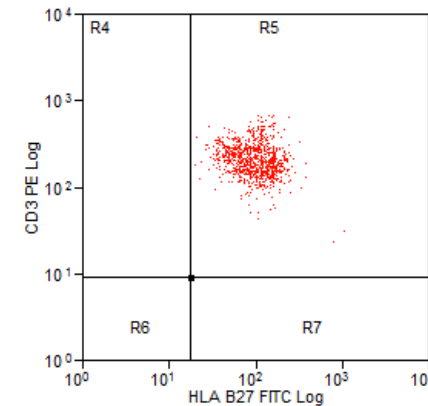


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida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

negativní



pozitivní

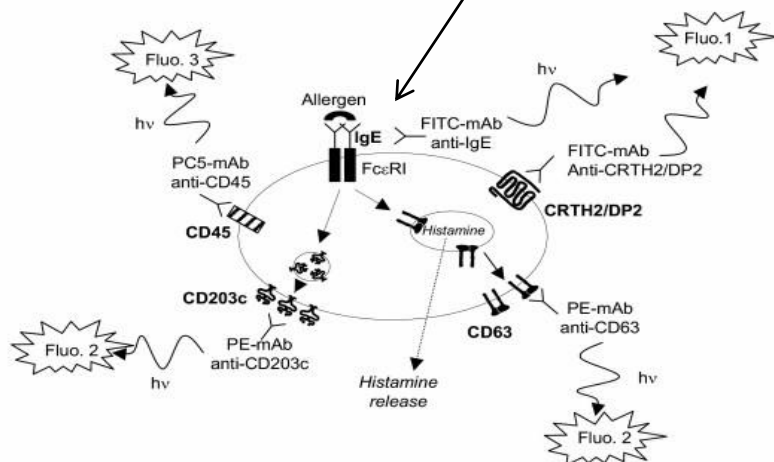


# Test aktivace bazofilů (bazotest)

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

