

Aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

Lukáš Kubala
kubalal@ibp.cz

Laboratoř patofyziologie volných radikálů
BFÚ AV ČR

Imunologie - Stanovení statusu imunitního systému

- Vrozené nebo získané imunodeficience
 - monitorování HIV pozitivních pacientů a stanovení efektivity terapie
 - monitorování efektivity imunosupresivní terapie u transplantovaných pacientů
- Monitorování autoimunitních onemocnění a efektivity terapie

Hematologie

- Diagnóza maligních onemocnění
- Stanovení funkčních vlastností trombocytů

Metodologické přístupy

- Imunofenotypizace

Stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů (obecně krevních elementů v krvi nebo kostní dřeni)

- Funkční testy

- **Aktivace lymfocytů**

Změna exprese vybraných povrchových markerů (většinou receptory nezbytné pro funkci daného lymfocytu)

Indukce proliferace (stanovení buněčného cyklu)

Produkce cytokinů

Stanovení cytotoxicity NK buněk a cytotoxických lymfocytů

- **Aktivace fagocytů (mikrobicidní aktivita)**

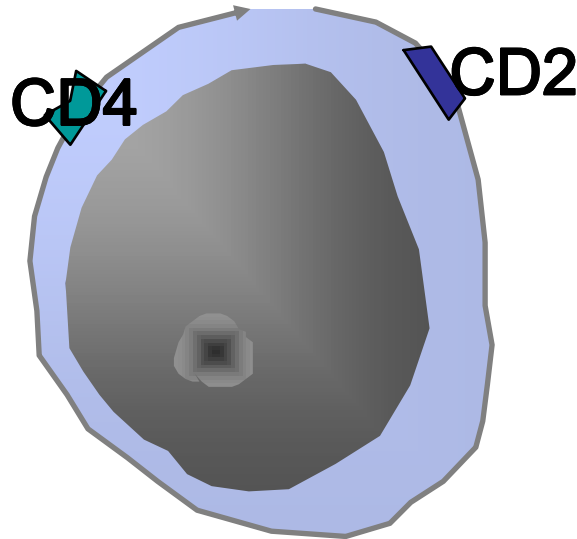
Produkce volných radikálů fagocyty

Fagocytární aktivita

- **Stanovení funkčních vlastností trombocytů**

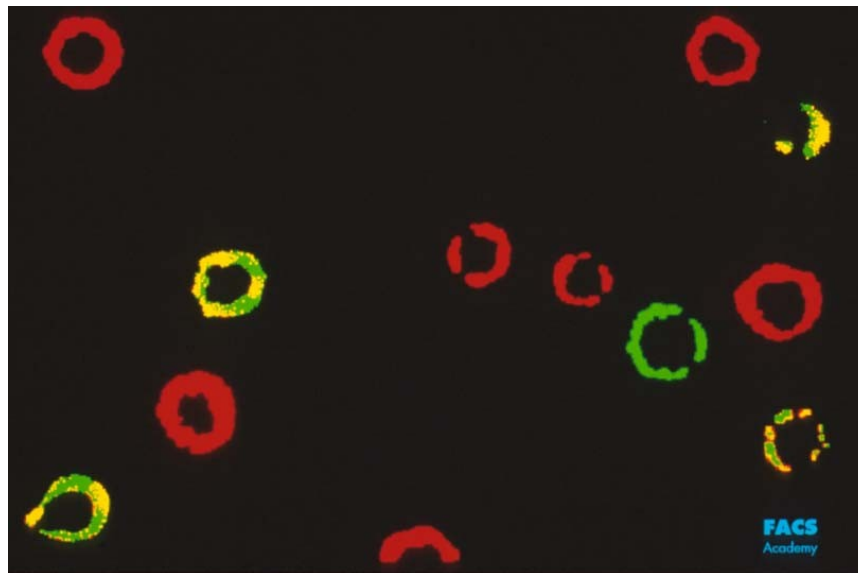
Imunofenotypizace

- Stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů na základě exprese vybraných povrchových antigenů případně v kombinaci s intracelulární produkcí cytokinů a expresí intracelulárních antigenů



Imunofenotypizace

- Na základě rozptylu světla jsou buněčné populace rozděleny podle velikosti a granularity
- Specifické monoklonální protilátky označené různými fluorochromy proti kombinaci vybraných antigenů umožňující rozdělení populací



CD Antigeny

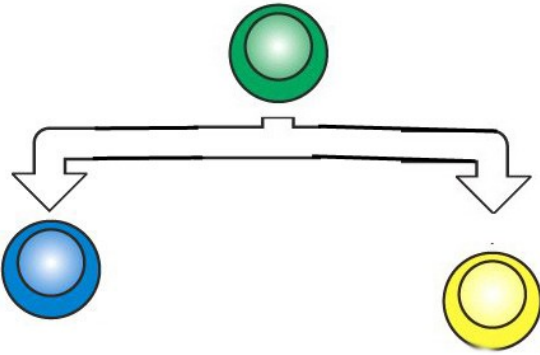
- Systém označení povrchových molekul leukocytů
- Většina má alternativní názvy vztahující se k jejich funkci nebo struktuře
- Dodnes definovány CD1 až CD350
- Některá CD jsou skupinami příbuzných molekul, a jednotlivé molekuly se označují písmeny (např. CD62L, CD62P, CD62E)
- Zdroj informací o CD nomenklatuře – učebnice imunologie, www např. PROW www.Ncbi.nlm.nih.gov/prow/

Expresie vybraných povrchových znaků během vývoje B lymfocytů

| Vývojové stádium | Expresie vybraných povrchových znaků |
|--------------------|--|
| Kmenová buňka | CD34 |
| Časný pro-B lymf. | CD34; CD45R; IL-7R; CD10; CD19; CD38 |
| Pozdní pro-B lymf. | CD45R; IL-7R; CD10; CD19; CD38; CD20; CD40 |
| Velký pre-B lymf. | CD45R; IL-7R; CD19; CD38; CD20; CD25 (rec. IL-2); CD40 |
| Malý pre-B lymf. | CD45R; CD19; CD38; CD20; CD40 |

| Vývojové stádium | Expresie vybraných povrchových znaků |
|----------------------|--------------------------------------|
| Nezralý B lymf. | CD45R; CD19; CD20; CD40 |
| Zralý naivní B lymf. | CD45R; CD19; CD20; CD21; CD40 |
| Lymfoblast | CD45R; CD19; CD20; CD21; CD40 |
| Paměťová buňka | CD45R; CD19; CD20; CD21; CD40 |
| Plasmatická buňka | CD135; CD38 |

Nezralé CD3-(jen v cytoplasmě)4-8-
dvakrát-negativní tymocyty



$\gamma:\delta^+ CD3^+ 4^- 8^-$

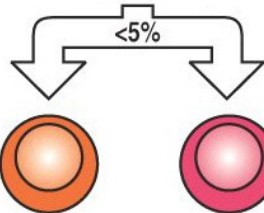
$pT\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
velké dvakrát-
pozitivní tymocyty



$\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
malé klidové dvakrát-
pozitivní tymocyty



>95%



$\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^-$ $\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
malé jedenkrát-
pozitivní tymocyty

Export do periferie

Vývoj T-lymfocytů

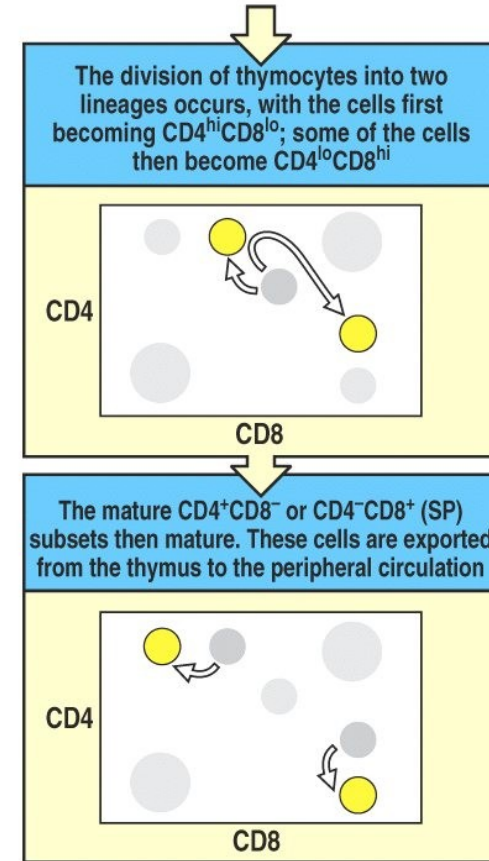
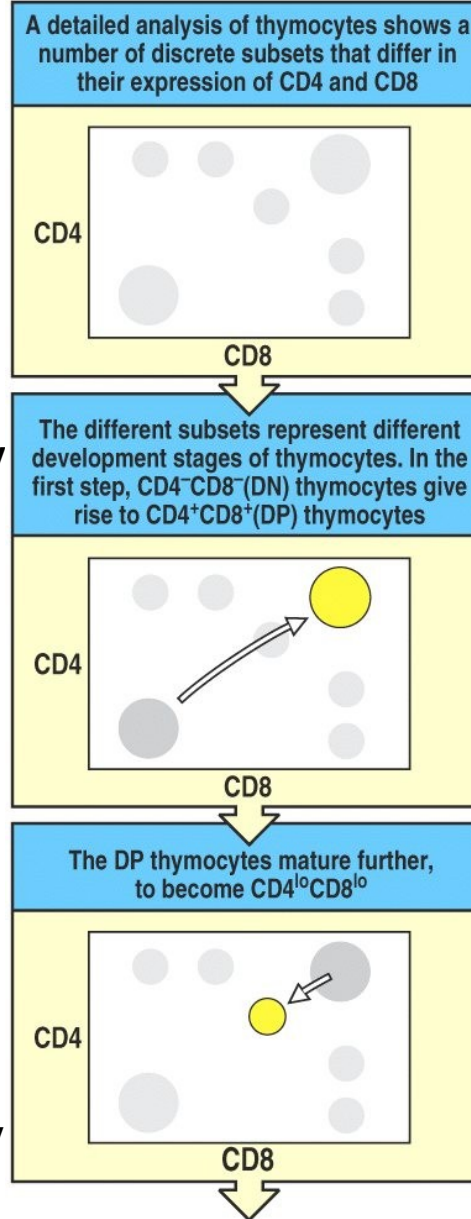
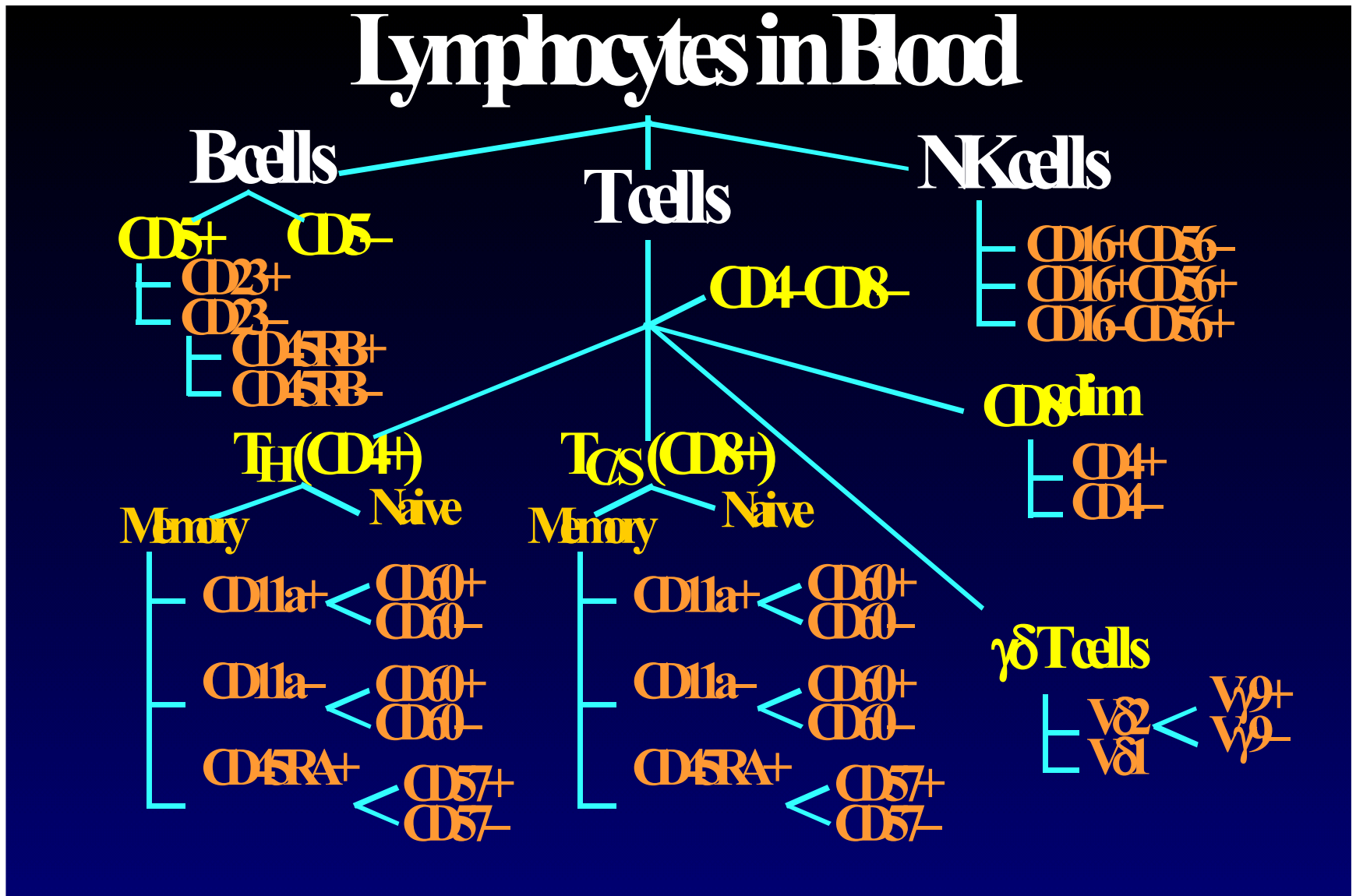


Figure 7-31 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

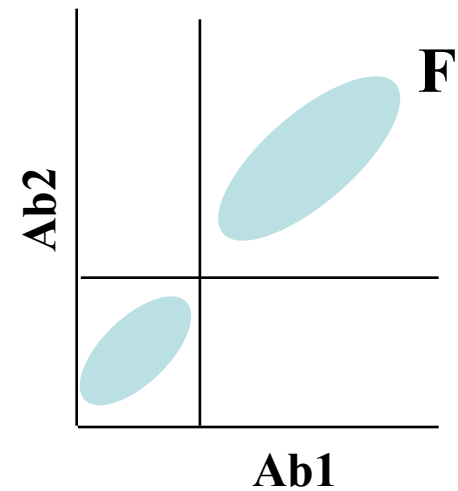
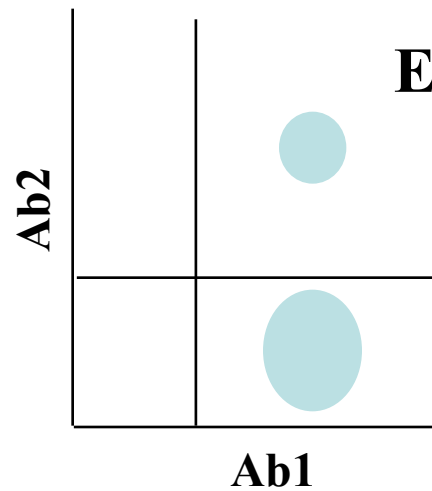
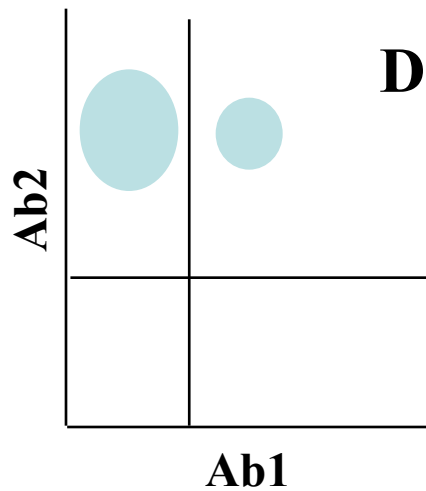
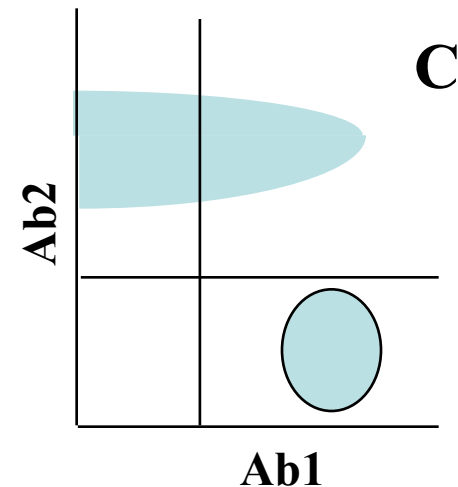
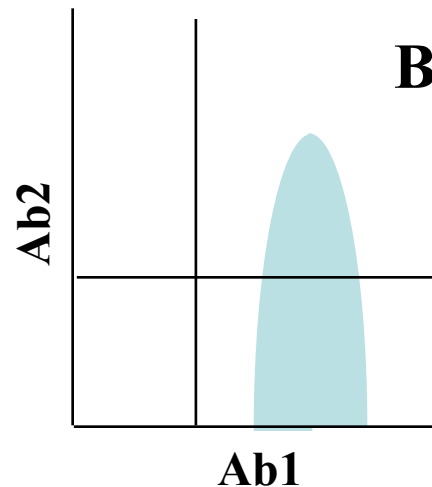
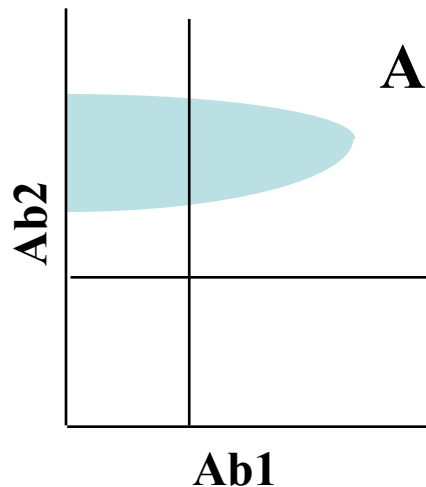
Možné rozdělení jednotlivých subpopulací lymfocytů podle exprese vybraných povrchových antigenů



Vybrané povrchové molekuly charakteristické pro různé typy leukocytů (“markery” jednotlivých typů)

| Buněčný typ | Charakteristické povrchové molekuly |
|-------------------------|--|
| Leukocyty (všechny) | CD53, CD45, CD43 |
| Hematopoetické prekurz. | CD34, CD117, CD137 |
| T lymfocyty | CD2, CD3, CD5, CD6, CD7, CD27, CD28, CD96, TCR |
| T pomocné I. (Th) | CD4 |
| T cytotoxické I. (Tc) | CD8 |
| B lymfocyty | CD19, CD20, CD22, CD37, CD39, CD40, CD79, BCR |
| Pre-B lymfocyty | CD9, CD10, CD138 |
| Plasmatické buňky | CD28, CD138 |
| NK lymfocyty | CD2, CD11b, CD16b, CD56, CD57, Cd94, CD158 |
| Neutrofilní granulocyty | CD11b, CD15, CD87 |
| Monocyty | CD14, CD33, CD64, CD87, CD89 |
| Dendritické buňky | CD83, Cd86, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209 |

Možnosti exprese antigenu v rámci dané populace



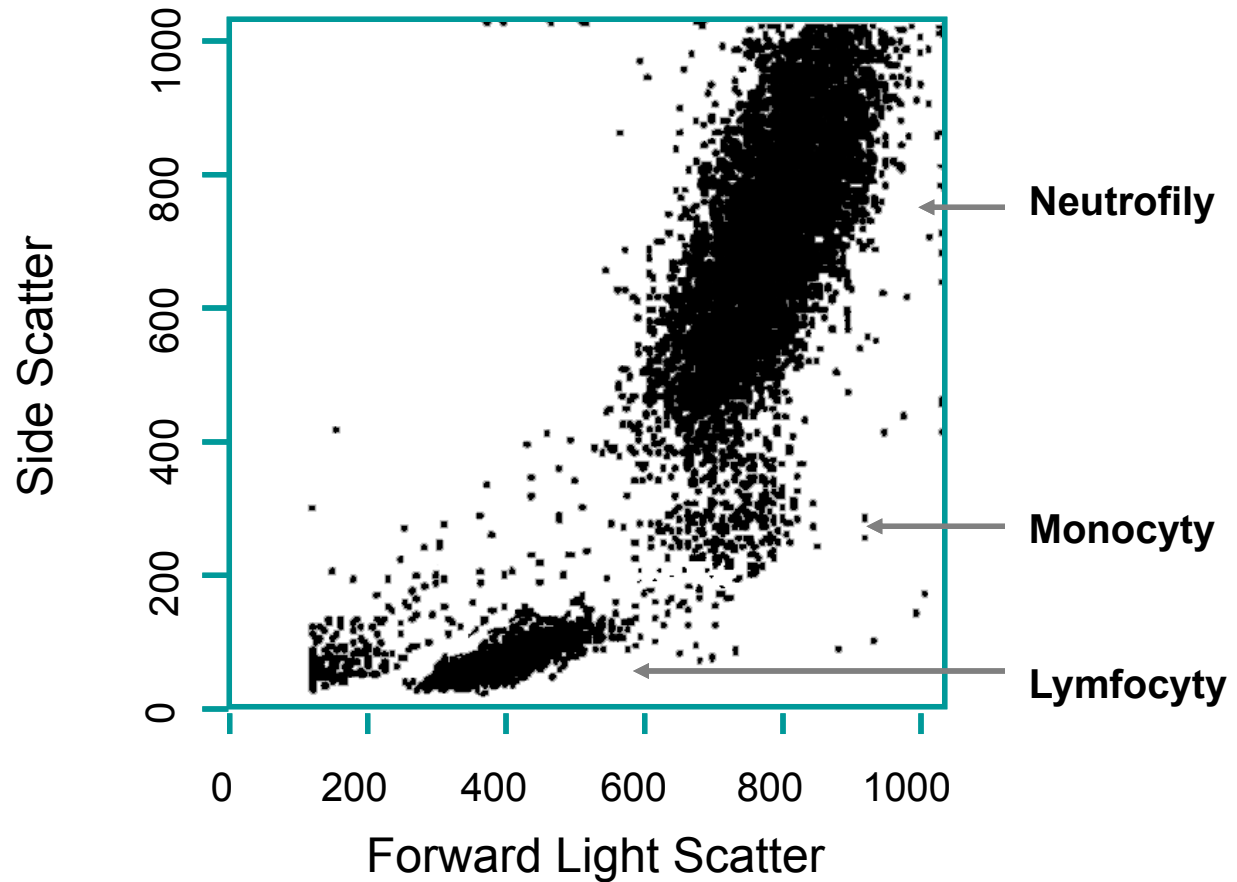
Příklad výběru detekovaných antigenů pro určení zastoupení a počtu jednotlivých subpopulací lymfocytů v periferní krvi

| | |
|--------------------|---|
| Izotypová kontrola | Monoklonální protilátky stejné třídy proti irelevantním antigenům |
| CD45 | Všechny leukocyty, lymfocyty silněji |
| CD14 | Monocyty |
| CD3 | Všechny T lymfocyty |
| CD19 | Všechny B lymfocyty |
| CD4 | Pomocný T lymfocyt |
| CD8 | Cytotoxický T lymfocyt |
| CD56 | NK lymfocyt |

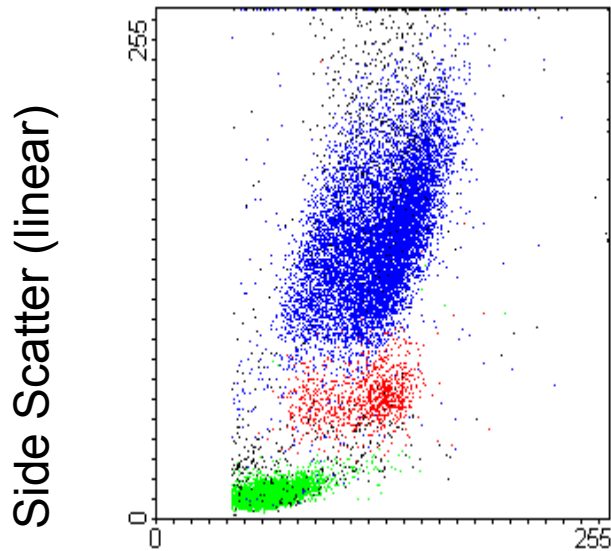
Příklad kombinace jednotlivých protilátek při použití dvojího značení

| Zkumavka | FITC | PE | Stanovení |
|----------|----------|-----------|--|
| 1 | CD45 | CD14 | %lymfocytů v ohraničení (gate) pro lymfocyty |
| 2 | Iz.kont. | Iz. kont. | Nespecifická vazba – autofluorescence |
| 3 | CD3 | CD4 | Pomocné (Th) lymfocyty |
| 4 | CD3 | CD8 | Cytotoxické (Tc) lymfocyty |
| 5 | CD3 | CD19 | Celkové B- lymfocyty |
| 6 | CD3 | CD56 | NK buňky |

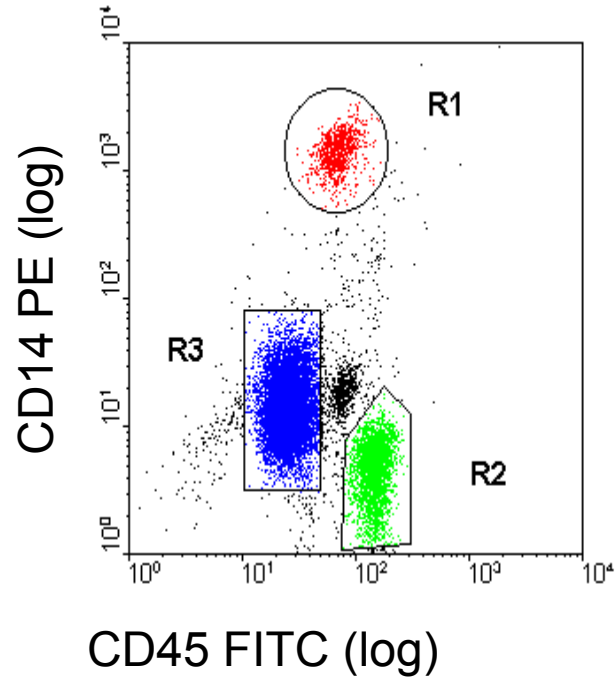
SS a FS leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů



Kontrola “čistoty” lymfocytárního ohraničení na základě FS a SS



Forward Scatter (linear)



- R1=monocyty (CD14+)
- R2=lymfocyty (CD45>monocyty)
- R3=granulocyty (CD45<monocyty)

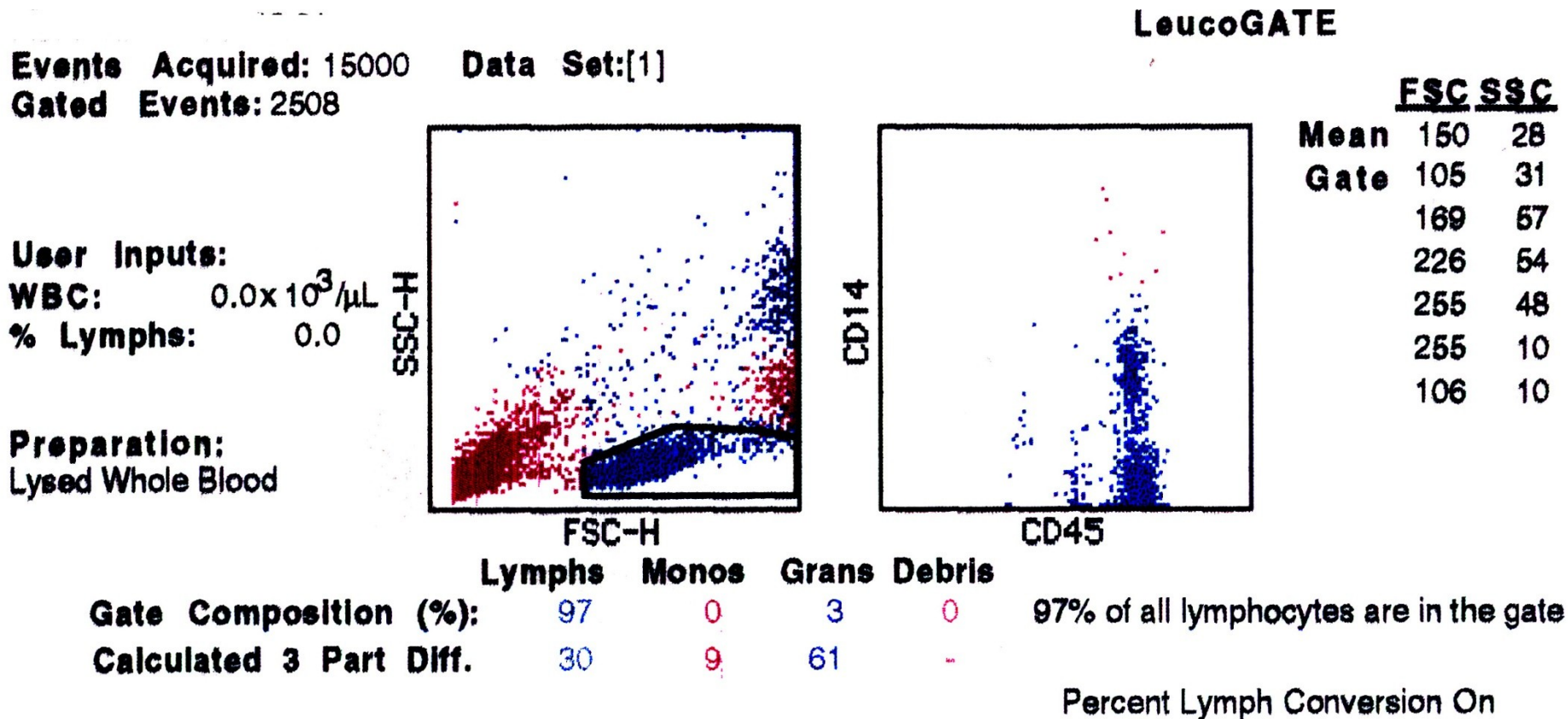
Vzorek akceptovatelný pokud

- minimálně 90% fenotypově CD14- a CD45+ lymfocytů je v SS-FS ohraničení pro lymfocyty
- v SS-FS ohraničení pro lymfocyty je maximálně 15% buněk které nejsou fenotypově lymfocyty (CD14- a CD45+)

Imunofenotypizace v programu Simulset

Krok 1 - ověření čistoty lymfocytárního gatu

FITC CD45 PE CD14



An automatic gate was found, a manual override gate is in use.

Imunofenotypizace v programu Simulset

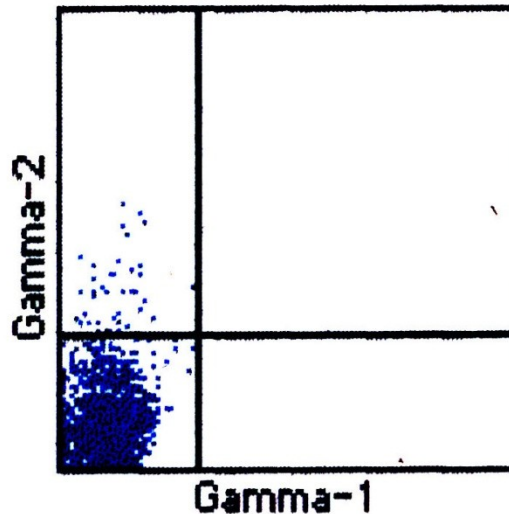
Krok 2 - izotypové kontroly

FITC – monoklonální protilátka proti irelevantnímu antigenu

PE - monoklonální protilátka proti irelevantnímu antigenu

Events acquired:14000
Gated Events:2295

Data set:[1]



| | <u>FSC</u> | <u>SSC</u> |
|--------|------------|------------|
| Means: | 150 | 28 |
| | <u>FL1</u> | <u>FL2</u> |
| Marker | 76 | 73 |

| | Control | IgG1/IgG2 | Conv |
|----|-----------|-----------|------|
| Q | Cell Type | | %L |
| Q1 | NSS | PE | 2 |
| Q2 | NSS | ++ | 0 |
| Q3 | Unstained | | 98 |
| Q4 | NSS | FITC | 0 |

Fluorescence markers were found. Manual override markers are in effect.

Imunofenotypizace v programu Simulset

Krok 3 - Stanovení T- a B- lymfocytů

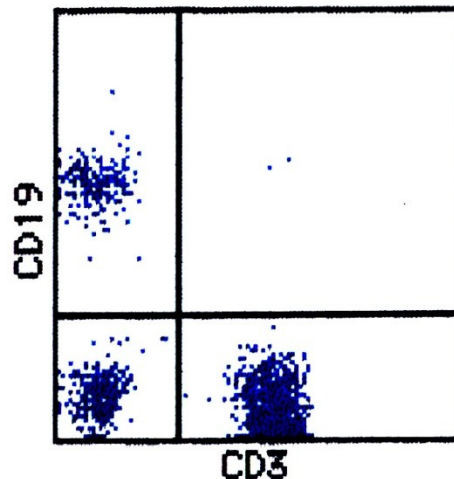
FITC CD3 PE CD19

Events acquired: 14000 Data set: [1]
 Gated Events: 2251

| CD3/CD19 | | Conv |
|----------|------------|------|
| Q | Cell Type | %L |
| Q1 | CD3- CD19+ | 10 |
| Q2 | CD3+ CD19+ | 0 |
| Q3 | CD3- CD19- | 12 |
| Q4 | CD3+ CD19- | 78 |

| Subset Name | Conv %L |
|-----------------------------|---------|
| Total T (CD3+) Lymphocytes | 78 |
| Total B (CD19+) Lymphocytes | 10 |

OK
OK



FSC SSC
 Means: 149 27
FL1 FL2
 Marker 76 73

Operator defined markers are in effect.

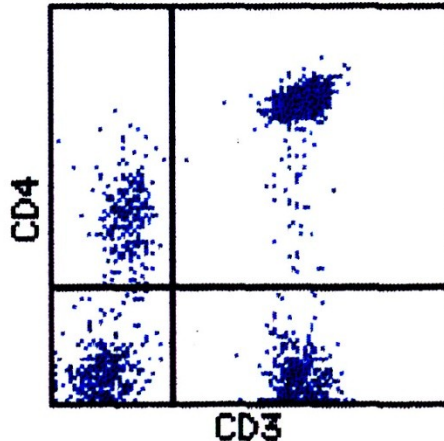
Imunofenotypizace v programu Simulset

Krok 4 - Stanovení pomocných T-lymfocytů

FITC CD3 PE CD4

Events acquired:14000 Data set:[1]
Gated Events:2206

| | <u>FSC</u> | <u>SSC</u> |
|--------|------------|------------|
| Means: | 150 | 28 |
| | <u>FL1</u> | <u>FL2</u> |
| Marker | 76 | 73 |



| CD3/CD4 | | Conv |
|---------|-----------|------|
| Q | Cell Type | %L |
| Q1 | CD3- CD4+ | 12 |
| Q2 | CD3+ CD4+ | 43 |
| Q3 | CD3- CD4- | 12 |
| Q4 | CD3+ CD4- | 34 |

| Subset Name | Conv %L |
|-----------------------------------|---------|
| Total T (CD3+) Lymphocytes | 77 |
| T Helper (CD3+, CD4+) Lymphocytes | 43 |

OK
OK

Operator defined markers are in effect.

Imunofenotypizace v programu Simulset

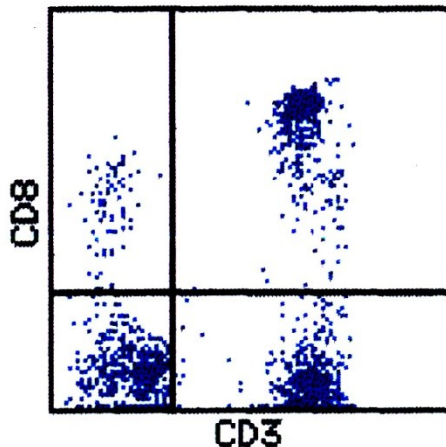
Krok 5 - Stanovení cytotoxických T-lymfocytů

FITC CD3 PE CD8

Events acquired:14000
Gated Events:2105

Data set:[1]

| | <u>FSC</u> | <u>SSC</u> |
|--------|------------|------------|
| Means: | 151 | 28 |
| | <u>FL1</u> | <u>FL2</u> |
| Marker | 76 | 73 |



| CD3/CD8 | | Conv |
|---------|-----------|------|
| Q | Cell Type | %L |
| Q1 | CD3- CD8+ | 4 |
| Q2 | CD3+ CD8+ | 29 |
| Q3 | CD3- CD8- | 20 |
| Q4 | CD3+ CD8- | 47 |

| Subset Name | Conv |
|--------------------------------|------|
| | %L |
| Total T (CD3+) Lymphocytes | 76 |
| T Cytotoxic (CD3+,CD8+) Lymphs | 29 |

OK
OK

Operator defined markers are in effect.

Imunofenotypizace v programu Simulset

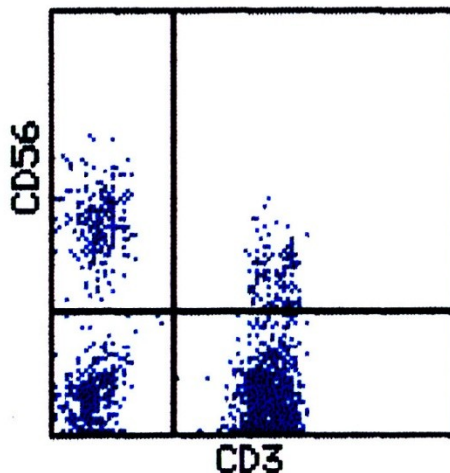
Krok 6 - Stanovení NK-lymfocytů

FITC CD3 PE CD56

Events acquired:14000
Gated Events:2077

Data set: [1]

FSC **SSC**
Means: 151 28
FL1 **FL2**
Marker 76 73



| CD3/CD56 | | Conv |
|----------|------------|------|
| Q | Cell Type | %L |
| Q1 | CD3- CD56+ | 12 |
| Q2 | CD3+ CD56+ | 6 |
| Q3 | CD3- CD56- | 12 |
| Q4 | CD3+ CD56- | 70 |

| Subset Name | Conv |
|------------------------------|------|
| | %L |
| Total T (CD3+) Lymphocytes | 76 |
| Total NK (CD56+)Lymphocytes | 12 |

OK
OK

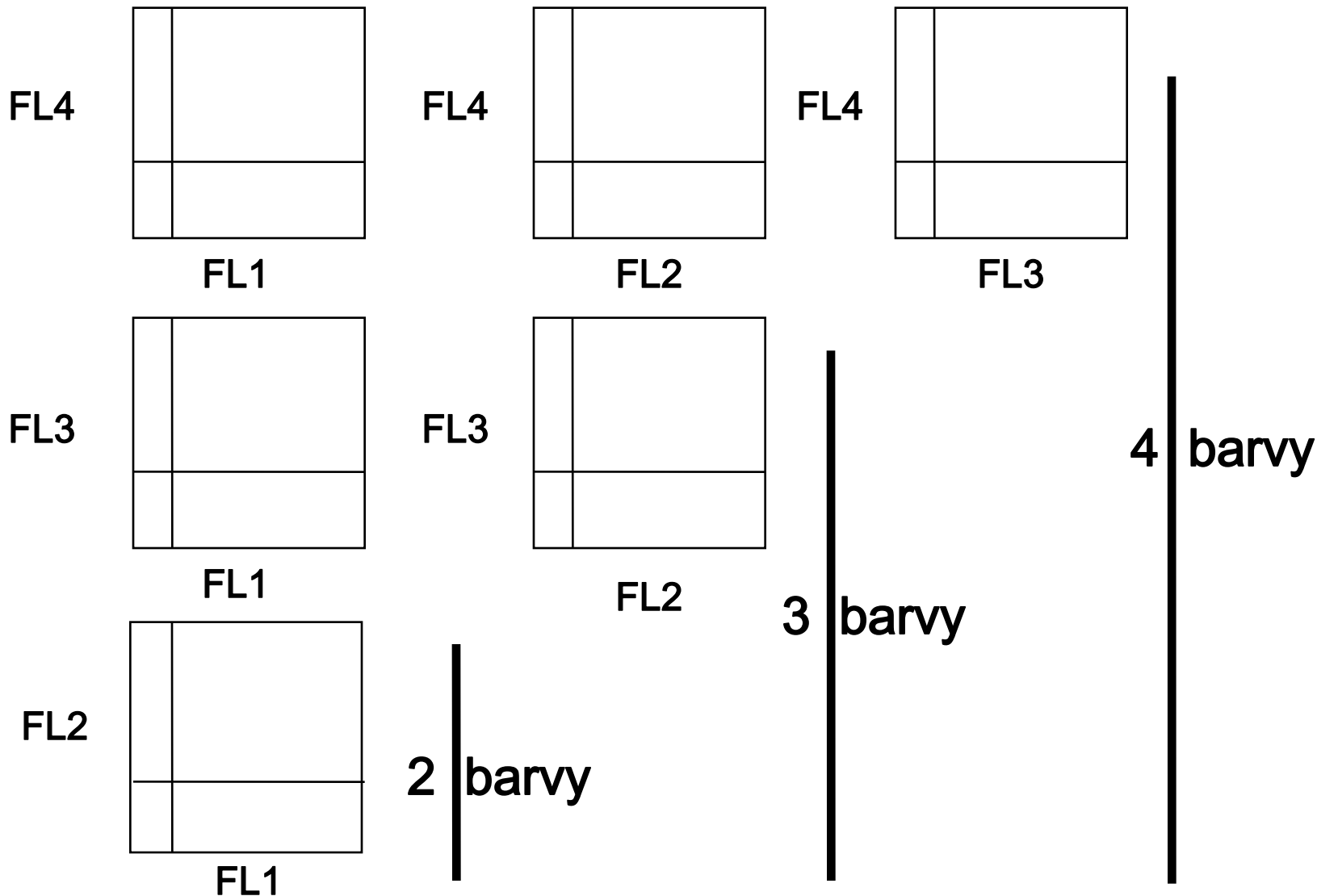
Operator defined markers are in effect.

Příklad panelu antigenů stanovovaných při detekci plasmatických buněk

| | |
|---------|---------------------------------|
| CD138 | Plasma cells |
| CD38 | Plasma cells, Activated T-cells |
| CD56 | Natural Killer Cells |
| CD45 | Human Leukocytes |
| cKappa | Cytoplasmic light chain |
| cLambda | Cytoplasmic light chain |

Více barevná imunofenotypizace

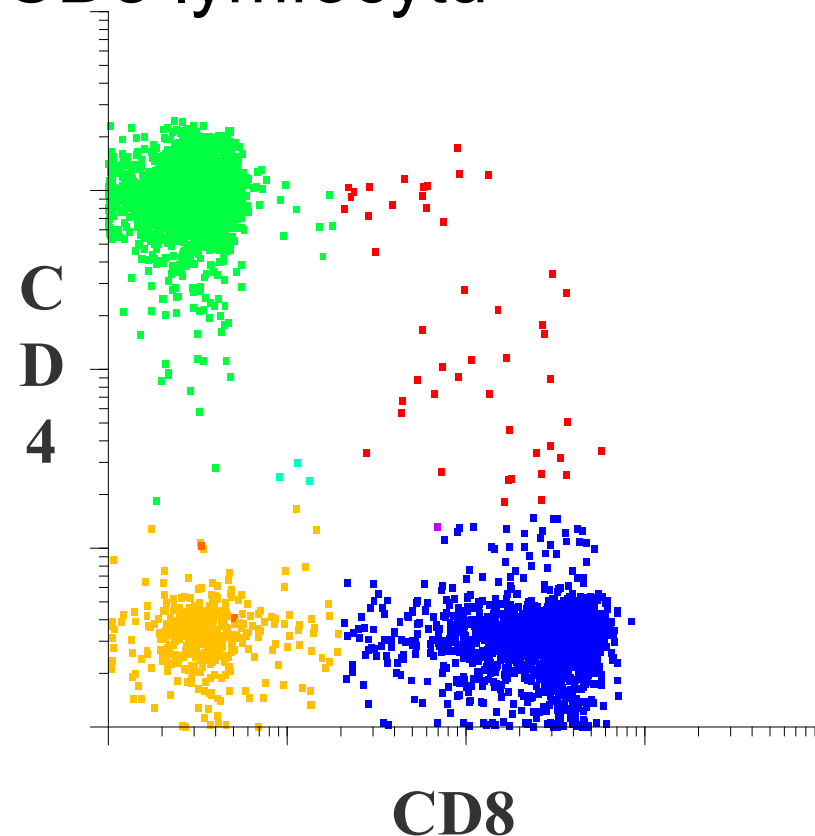
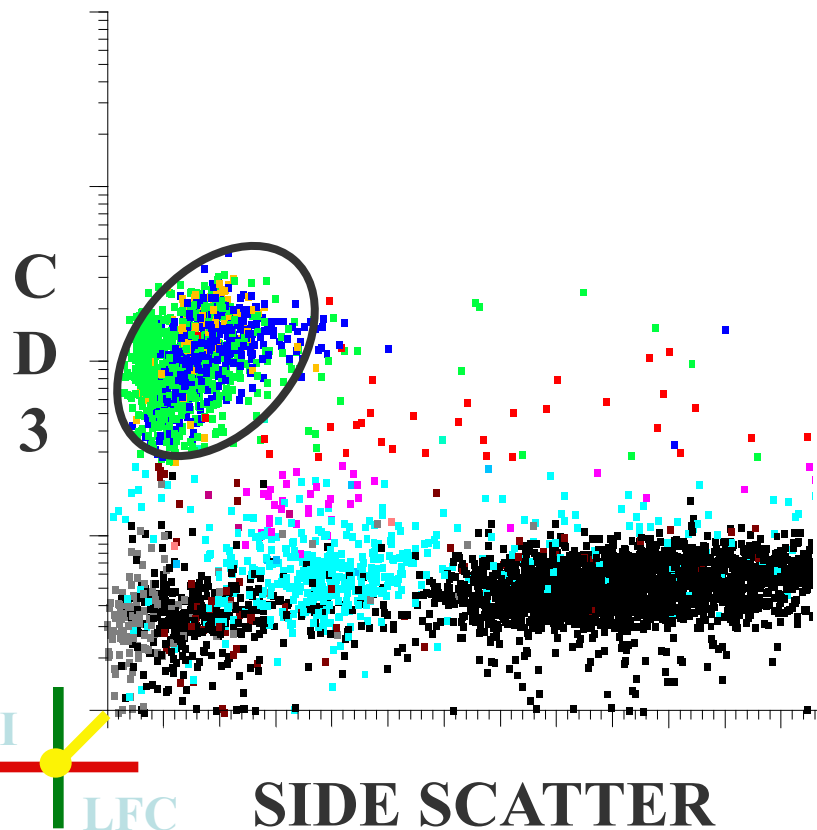
Vizualizace jednotlivých populací



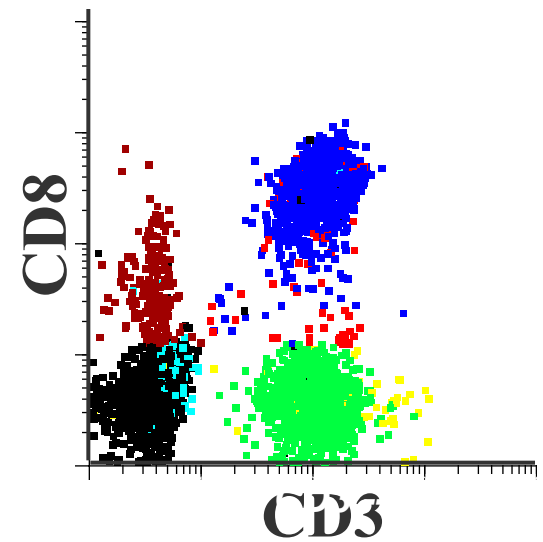
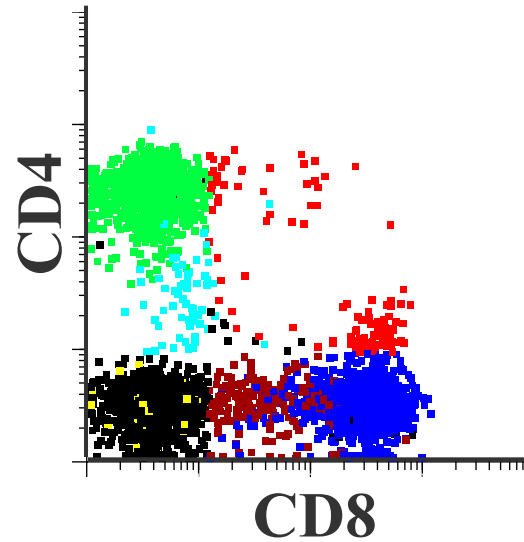
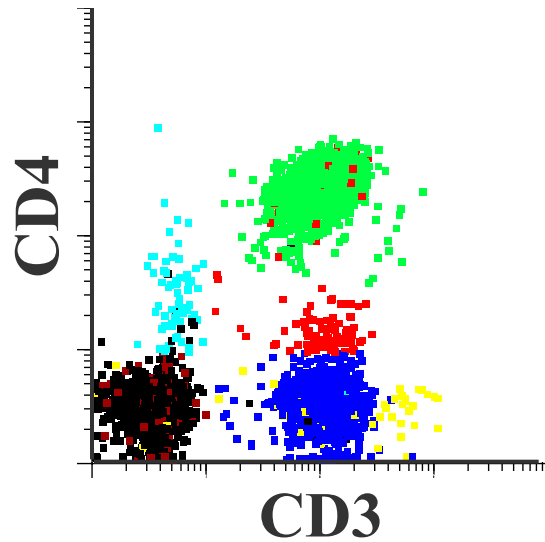
Tří barevná imunofenotypizace

Kombinace protilátek značených FITC, PE a třetí protilátkou značenou např. Texas Red, Per CP, ALEXA barvy od Molecular Probes.

Stanovení CD4 a CD8 lymfocytů



Tří barevná imunofenotypizace CD3, CD4, CD8



CD3-CD4-

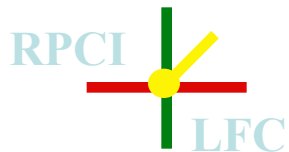
CD3-CD4+

CD3-CD8+

CD3+CD4+ Th lymf

CD3+CD8+ Tc lymf

CD3+CD4-



Čtyřbarevná imunofenotypizace

Antibodies labeled with FITC

Antibodies labeled with PE

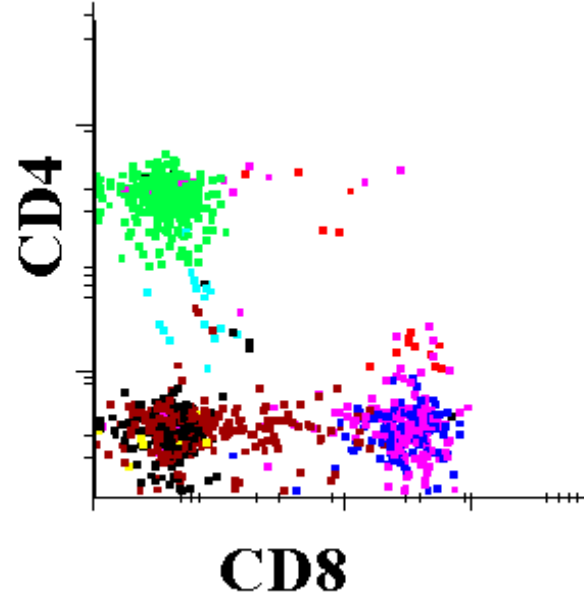
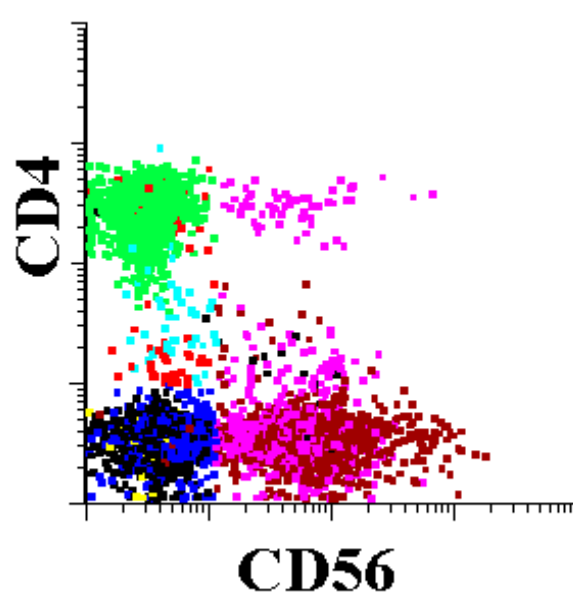
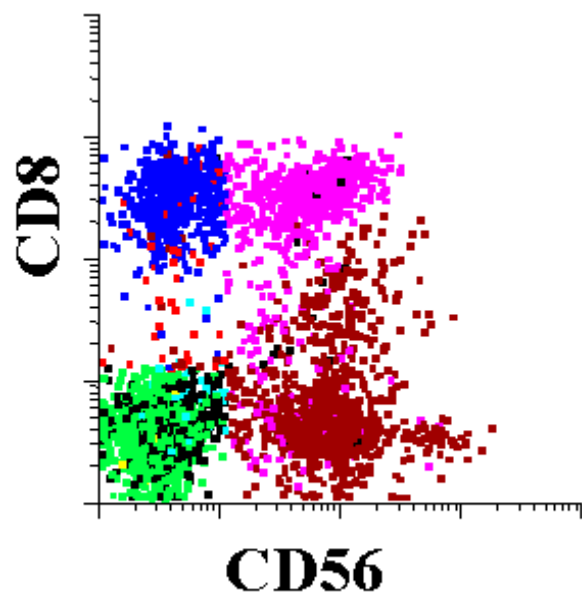
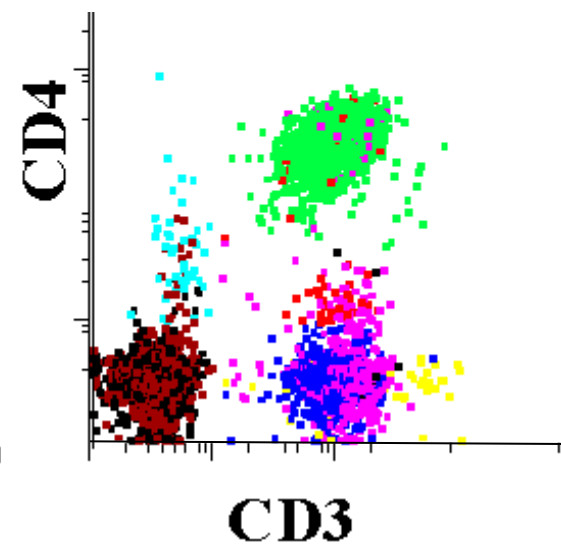
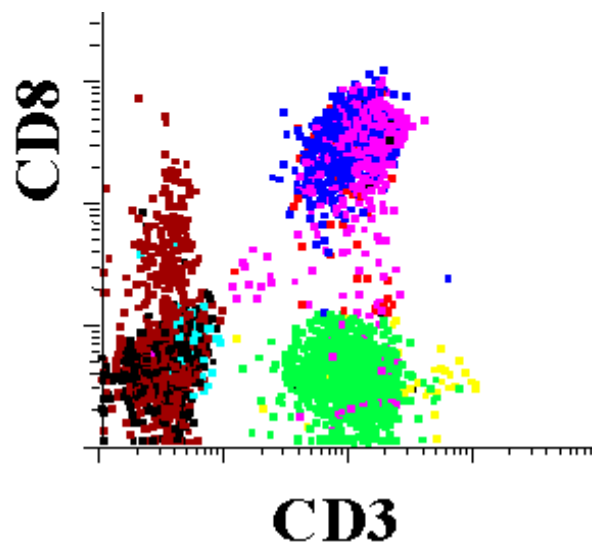
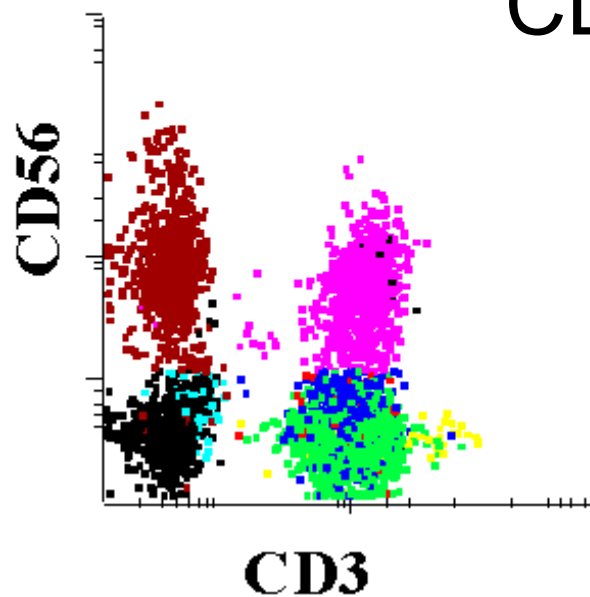
Antibodies labeled with complex PE/Texas Red

Antibodies labeled with complex PE/CY5 or PerCP

Antibodies labeled with complex APC, CY5 or CY7

Antibodies labeled with ALEXA dyes from
Molecular Probes

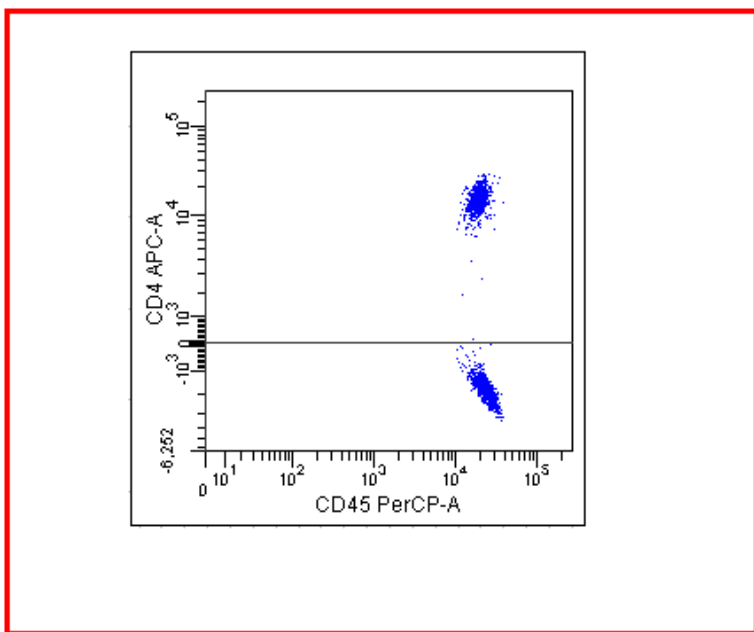
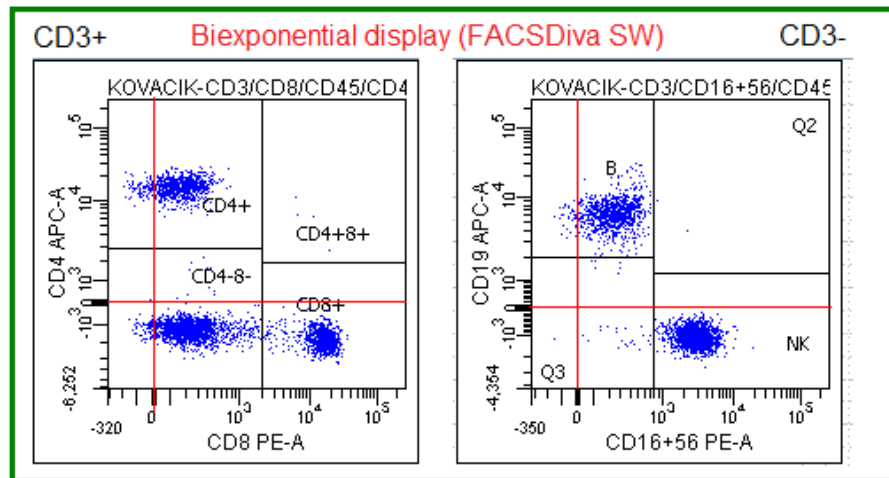
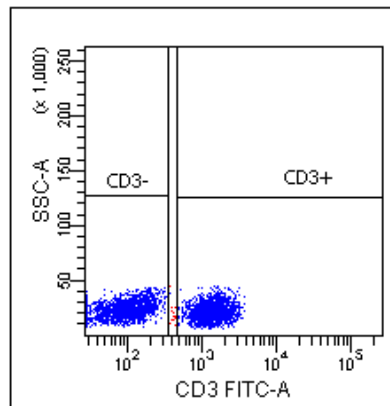
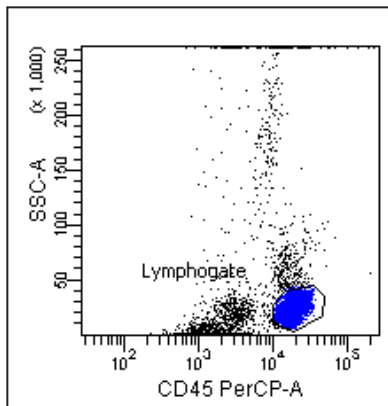
Čtyř barevná imunofenotypizace CD3, CD4, CD8, CD56



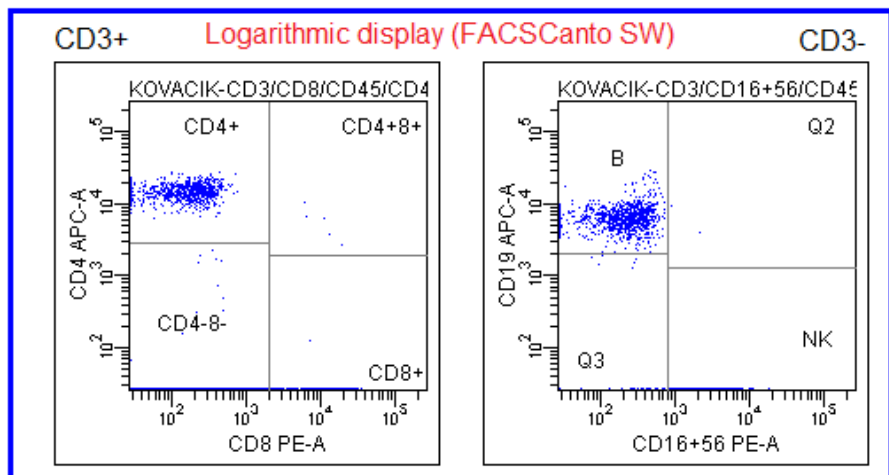
Čtyřbarevná imunofenotypizace

1. Zkumavka CD3FITC, CD45PerCP, CD4APC, CD8PE

2. Zkumavka CD3FITC, CD45PerCP, CD19APC, CD16+56PE



| Population | z CD3+ | z Lymphogate | Population | z CD3- | z Lymphogate |
|------------|--------|--------------|------------|--------|--------------|
| ☒ CD4+ | 46.8 | 24.4 | ☒ B | 39.3 | 17.9 |
| ☒ CD4+8+ | 0.3 | 0.1 | ☒ NK | 59.6 | 27.2 |
| ☒ CD4-8- | 7.2 | 3.7 | | | |
| ☒ CD8+ | 45.8 | 23.9 | | | |



Výsledný report

7511

WBC Count (x1000):

Lymphs (%):

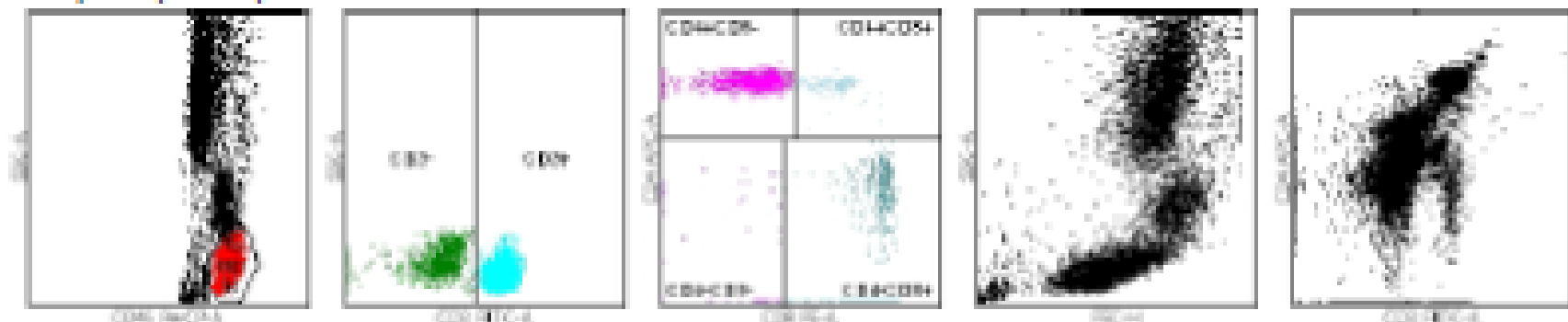
Lymphs (x1000):

ID: FACScan v3.2.2761.907

ID: FACScan v3.2.2761.907

CD3/CD8/CD45/CD4

Total Events: 10017

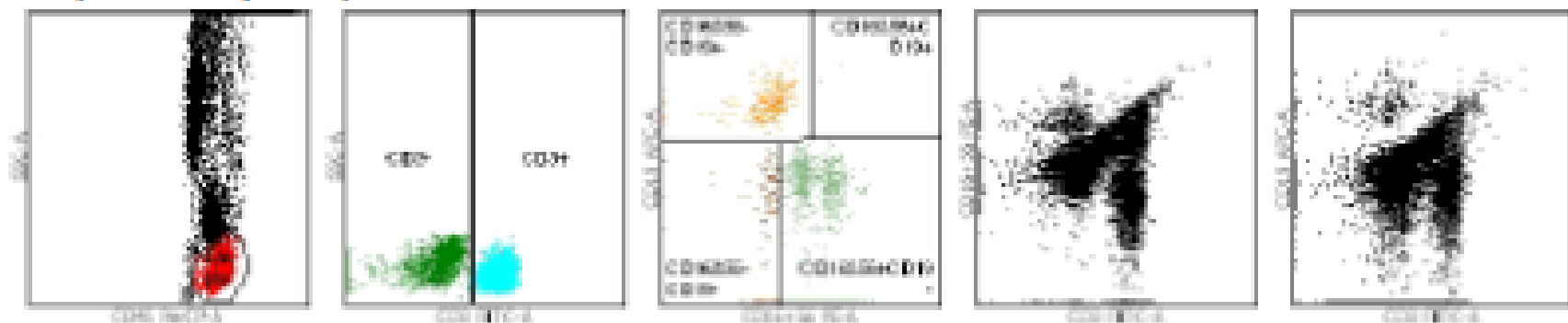


7511001.001.0a

Reagent Lot ID: 58762

CD3/CD16+56/CD45/CD19

Total Events: 10011



7511001.001.0a

Reagent Lot ID: 57957

| Parameter | Tube 1 | Tube 2 | Average |
|--------------|--------|--------|---------|
| Lymph Events | 3350 | 4371 | 3860.50 |
| CD3+ %Lymphs | 76.48 | 76.50 | 76.49 |



7512001.0032a

Request Lot ID: S

| Parameter | Tube 1 | Tube 2 | Average |
|----------------------|--------|--------|---------|
| Lymph Events | 3350 | 4371 | 3860.50 |
| CD3+ %Lymphs | 76.48 | 76.50 | 76.49 |
| CD3+ Abs Cnt | 0 | 0 | 0 |
| CD3+CD8+ %Lymphs | 33.91 | | |
| CD3+CD8+ Abs Cnt | 0 | | |
| CD3+CD4+ %Lymphs | 44.30 | | |
| CD3+CD4+ Abs Cnt | 0 | | |
| CD3+CD4+CD8+ %Lymphs | 3.88 | | |
| CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt | 0 | | |
| CD45+ Abs Cnt | 0 | 0 | 0 |
| 4/8 Ratio | 1.31 | | |
| CD16+CD56+ %Lymphs | | 16.89 | |
| CD16+CD56+ Abs Cnt | | 0 | |
| CD19+ %Lymphs | | 4.37 | |
| CD19+ Abs Cnt | | 0 | |

QC Messages

CD3% difference is: 0.03

% T-Sum is: 1.72

Lymphocsum is: 97.74

4/8 ratio is: 1.31

One or more results are outside the alarm range.

Comments

Výsledný report

Příklad osmi barevná imunofenotypizace

8-color Antigen-Specific Immunophenotyping

| Ab Conjugate | Laser | |
|------------------------|-------|------------------------|
| CD28 PerCP-Cy5.5 | 488 | Surface staining |
| CD45RA PE-Cy7 | 488 | |
| CD27 APC | 633 | |
| CD8 APC-Cy7 | 633 | |
| CD3 Pacific Blue | 405 | |
| CD4 AmCyan | 405 | |
| Anti-IFN γ FITC | 488 | Intracellular staining |
| Anti-IL-2 PE | 488 | |

Příklad 17 barevná imunofenotypizace

Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system

Stephen P. Perfetto, Pratip K. Chattopadhyay and Mario Roederer

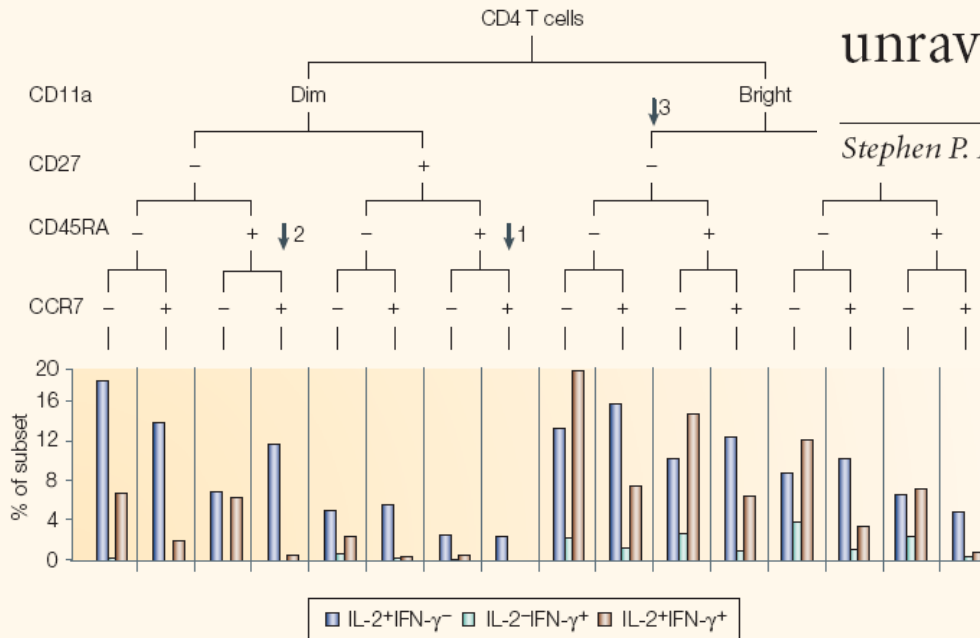
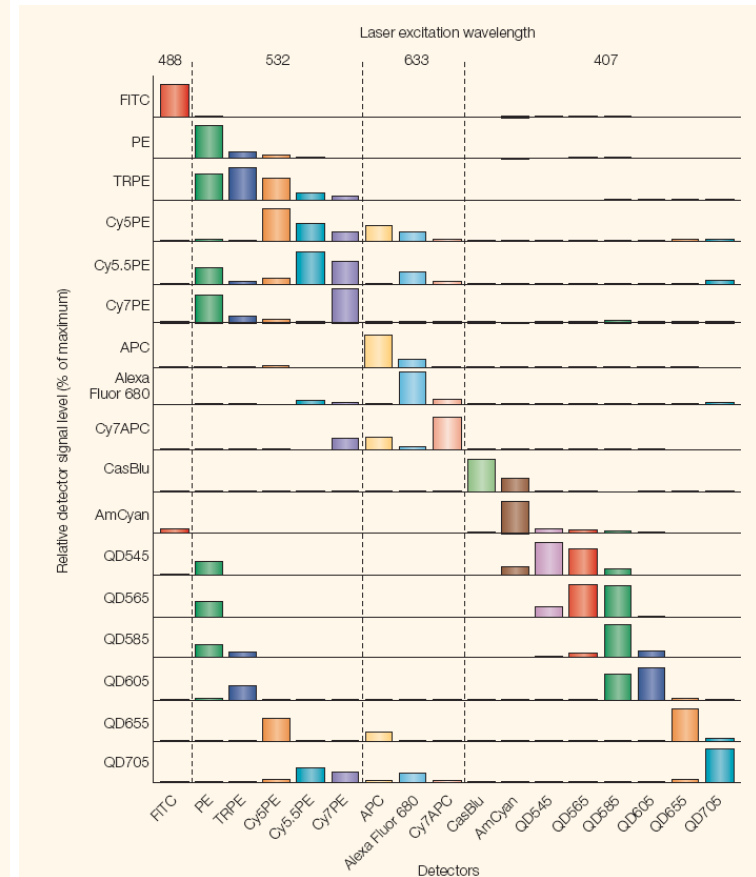


Figure 6 | Visualization of polychromatic data using hierarchical trees. The data shown in this hierarchical tree were obtained from peripheral-blood mononuclear cells stimulated with staphylococcal enterotoxin B (for 6 hours in the presence of brefeldin A). The cells were subsequently permeabilized and stained for various cell-surface markers and intracellular cytokines. Branches of the tree segregate based on the expression level (for example, positive versus negative or bright versus dim) of a particular marker, and each terminal branch represents one fully gated subset. So, reading from the top, the branch below arrow 1 represents cells that are CD3⁺CD4⁺CD11a^{dim}CD27⁺CD45RA⁺CC-chemokine receptor 7 (CCR7)⁺. The frequency histogram below the tree indicates the relative proportion of cells in each subset that express interleukin-2 (IL-2) (blue bars), interferon- γ (IFN- γ) (green bars) or both (red bars). So, the CD11a^{dim}CD27⁺CD45RA⁺CCR7⁺ cell population indicated by arrow 1 expresses only IL-2, which is consistent with a naive phenotype. Interestingly, IL-2 is expressed by a greater fraction of a naive-like subset (CD11a^{dim}CD27⁻CD45RA⁺CCR7⁺ cells), in which cells have lost expression of CD27 but not other markers (arrow 2). In contrast, high expression of IFN- γ is mainly observed in CD11a^{bright}CD27⁻ cells (arrow 3), a phenotype previously associated with effector memory T cells. Graphical representations such as this offer many options for data exploration, especially when the hierarchy can be rearranged to bring patterns into view.



Hematologie

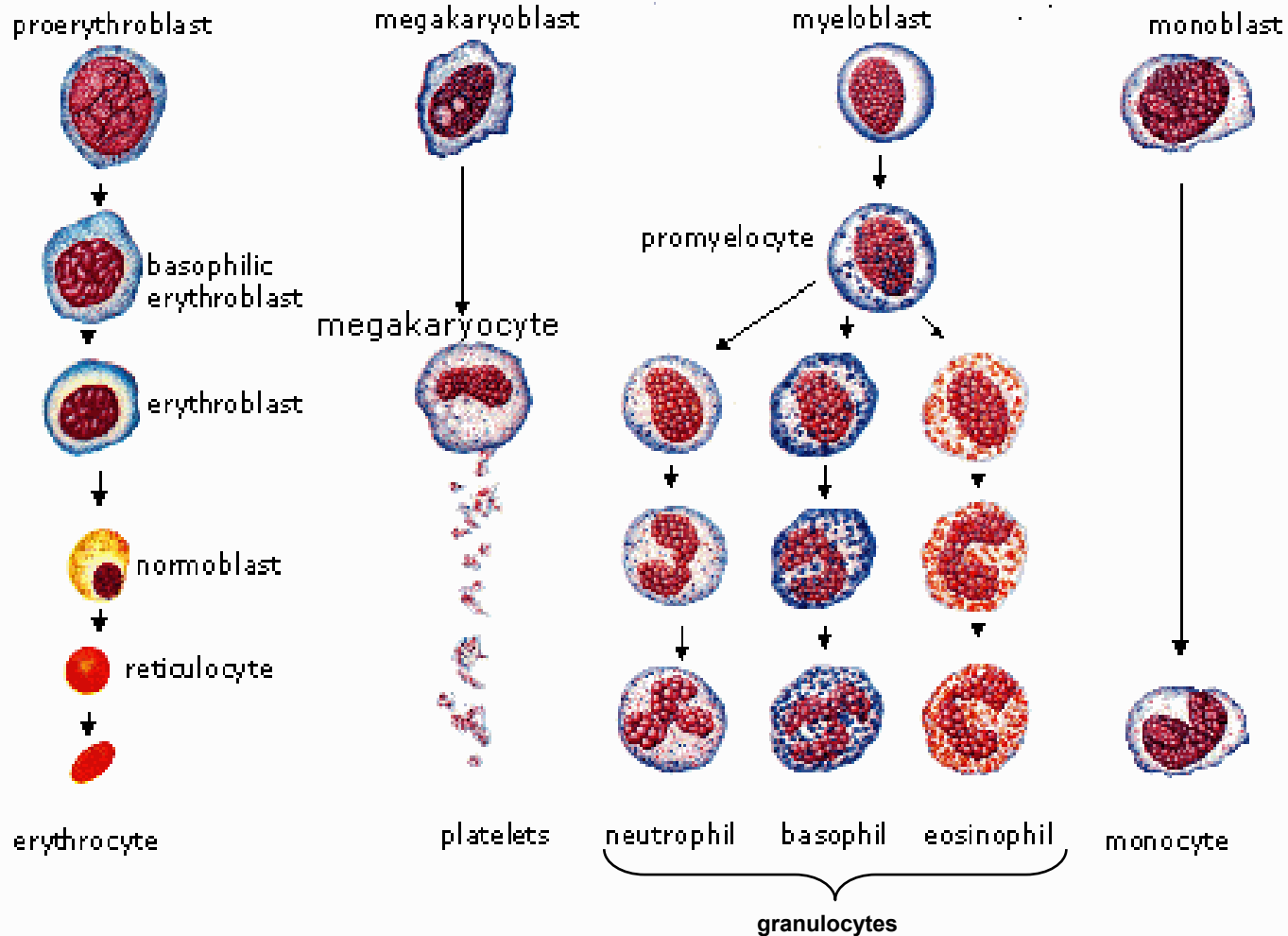
Použití imunofenotypizace pro detekci hematologických onemocnění

- Stanovení zastoupení jednotlivých buněčných linií
- Stanovení stupně diferenciacce
- Stanovení monoklonální populace (B-lymfocyty)

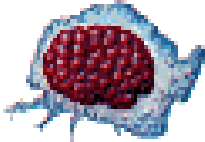
Haematopoéza



Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

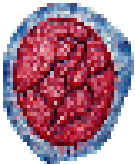


Příklad identifikace buněk myeloidních linií



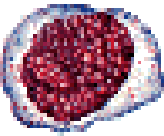
Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

proerythroblast



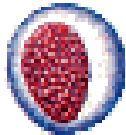
CD34⁺
CD13⁻
(CD36⁺)

monoblast

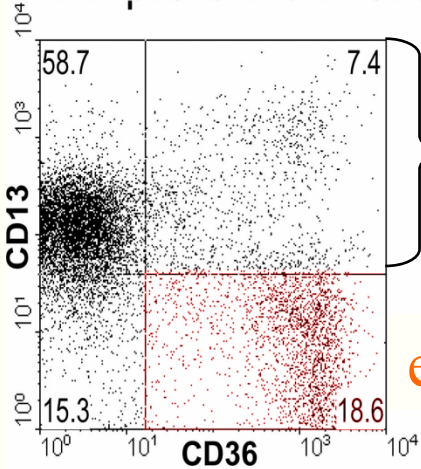


CD34⁺
CD13⁺
CD115⁺

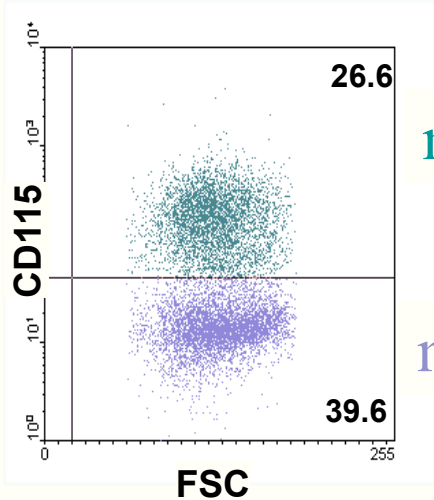
myeloblast



CD34⁺
CD13⁺
CD115⁻



erythroid



monoblasts

myeloblasts

Příklad panelu CD antigenů stanovovaných při detekci lymfomů

| | |
|--------|------------------------------------|
| CD45 | Human Leukocytes |
| CD3 | Pan T Lymphocytes |
| CD5 | Pan T Lymphocytes |
| CD7 | Pan T Lymphocytes |
| CD4 | T-helper Lymphocytes |
| CD8 | T-suppressor/cytotoxic Lymphocytes |
| CD10 | B-cells |
| CD19 | Pan B-cells |
| CD20 | Mature B-cells |
| FMC7 | Activated B-cells |
| CD23 | Activated B-cells |
| CD38 | Plasma cells, activated T-cells |
| CD103 | T and B Lymphocytes |
| CD11c | T and B cells, NK cells, monocytes |
| CD25 | Activated B-cells |
| CD22 | B-cells |
| Kappa | Light chains |
| Lambda | Light chains |

Příklad panelu
CD antigenů
stanovovaných
při detekci
leukemií

| | |
|-------------|---------------------------------|
| CD45 | Human Leukocytes |
| CD5 | Pan T Lymphocytes |
| CD10 | B Lymphocytes |
| CD19 | Pan B Lymphocytes |
| CD20 | Mature B Lymphocytes |
| HLA-DR (I3) | Activated T and B Lymphocytes |
| CD34 | Progenitor Cell |
| CD117 | Progenitor Cell |
| CD15 | Monocytes/Granulocytes |
| CD33 | Myelocyte/Monocyte |
| CD56 | Natural Killer Cells |
| CD14 | Monocyte |
| CD13 | Myelocyte/Monocyte |
| CD64 | Monocytes |
| cMPO | Myeloperoxidase |
| c79a | B Cells |
| C3 | Cytoplasmic CD3 T Cells |
| cTDT | Immature Lymphocytes/thymocytes |

Detekce fyziologických funkcí leukocytů a trombocytů

Změna povrchové exprese antigenu (receptoru) charakteristického pro aktivovaný stav dané buněčné subpopulace.

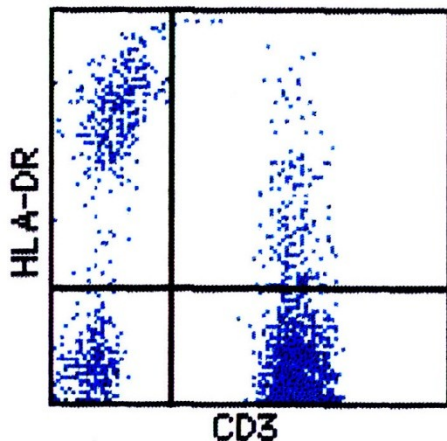
Příklady:

- CD11b - aktivace polymorfonukleárních granulocytů a monocytů
- HLA-DR - aktivace T-lymfocytů
- CD69 - aktivace lymfocytů
- CD62L - aktivace krevních destiček

Např. současně s imunofenotypizací v programu Simulset jako krok č. 7 - Stanovení aktivace T-lymfocytů

Events acquired: 14000 Data set: [1]
 Gated Events: 2369

Means: FSC SSC
 149 27
FL1 FL2
 Marker 76 73



| CD3/HLA-DR | | Conv %L |
|------------|-----------|---------|
| Q | Cell Type | |
| Q1 | CD3- DR+ | 15 |
| Q2 | CD3+ DR+ | 8 |
| Q3 | CD3- DR- | 9 |
| Q4 | CD3+ DR- | 68 |

| Subset Name | Conv %L |
|--------------------------------|---------|
| Total T (CD3+) Lymphocytes | 76 |
| Activated T (CD3+) Lymphocytes | 8 |

OK
N/A

Operator defined markers are in effect.

| Tube Name/ Consistency | Ck | Subset Name/ Ck Name | Conv. Percent Lymphs | |
|---------------------------|----|-----------------------------------|----------------------------|----|
| Average CD3 | | Total T (CD3+) Lymphocytes | 77 | OK |
| Sum of Cells | | T + B + NK | 99 | OK |
| Ratio | | T Lymph H/S CD3,CD4/CD3,CD8 Ratio | 1.48 | OK |

Detekce fyziologických funkcí leukocytů a trombocytů

- Produkce volných radikálů fagocyty
(detekce chronické granulomatózní choroby)

- Stanovení fagocytární aktivity
(detekce poruch fagocytovat patogeny)

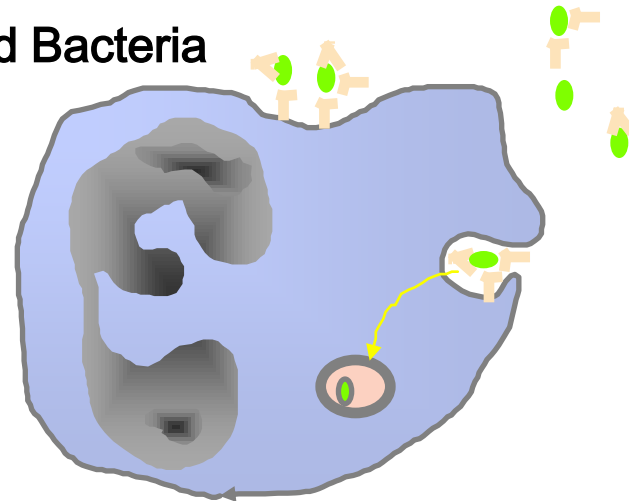
Detekce fagocytární aktivity

- Pohlcení fluorescenčně značených částic (např. latexové částice, zymosanové částice, obarvené bakterie)
- Oponizace částice – porovnání s neopsonizovanou částicí udává informaci o expresi a funkci opsoninových receptorů

Postup:

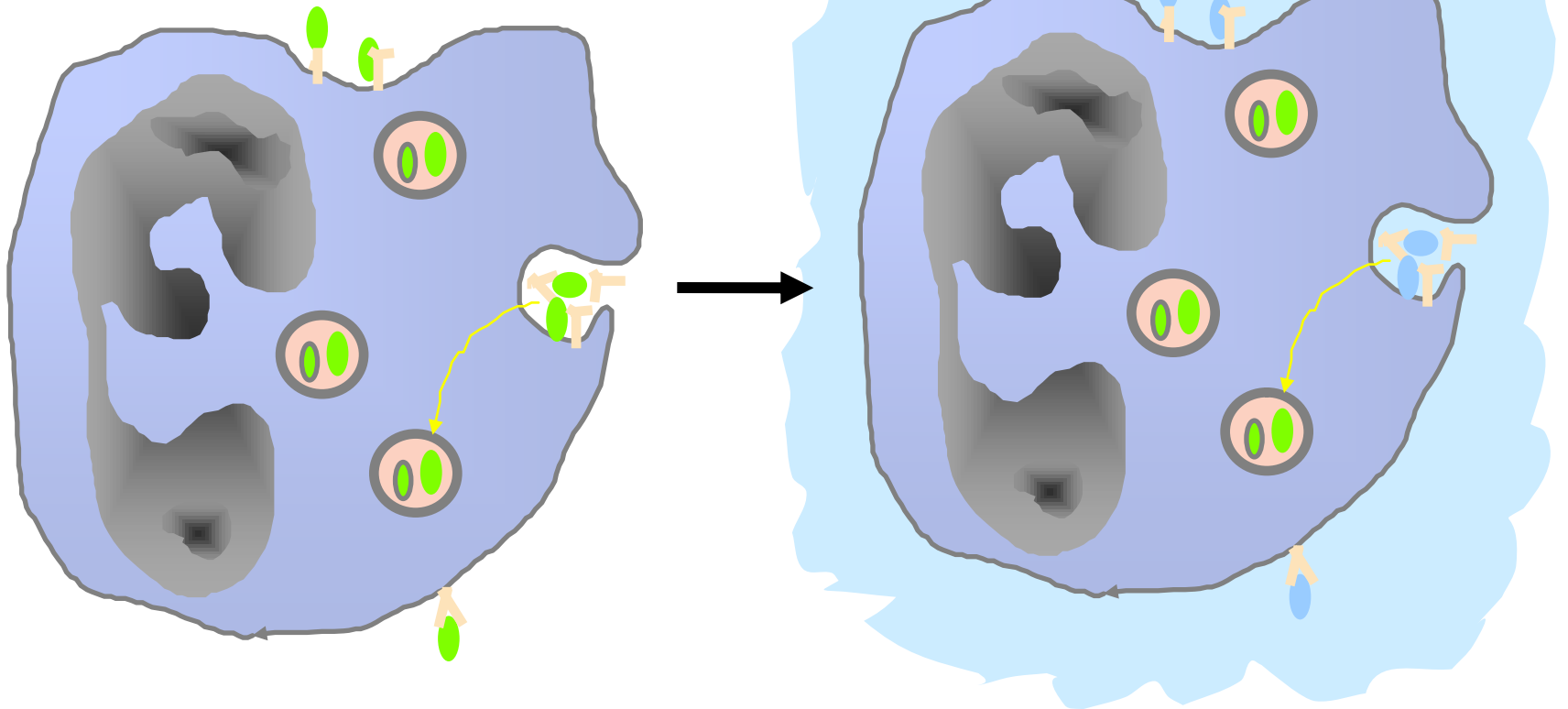
- Značení částice fluorescenční próbou
- Oponizace částic vybranými opsoníny (např. IgG, C3) nebo kompletním sérem daného druhu
- Izolované leukocyty jsou inkubovány dohromady s částicemi při teplotě fyziologické pro daný druh

FITC-Labeled Bacteria



- Rozlišení pohlcení částice do uzavřeného fagozómu od adherence na povrch fagocytu – aplikace trypanové modři (neprostupuje do živých buněk), která má zhášecí vlastnosti pro FITC

FITC-Labeled Bacteria

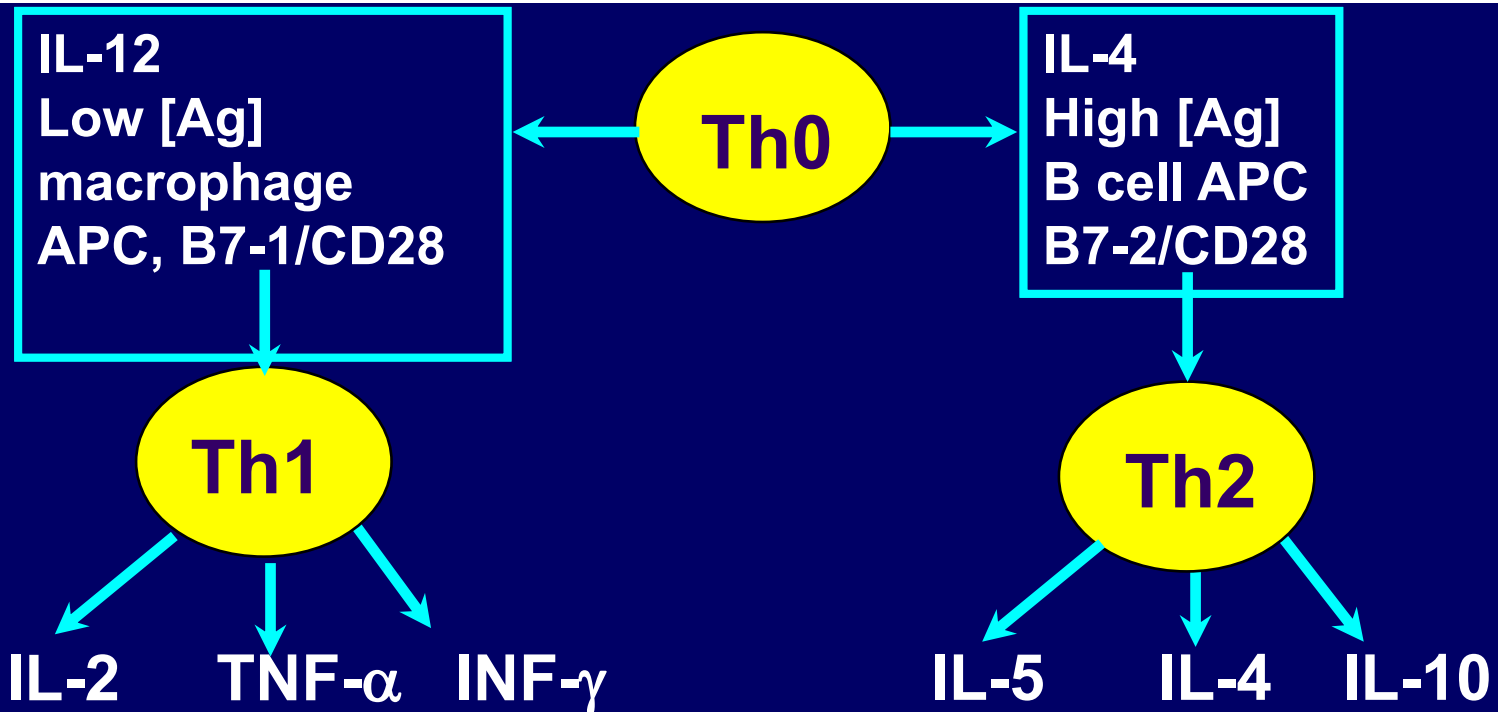


Detekce intracelulární produkce cytokinů

- Charakterizace různých subpopulací leukocytů, které lze rozlišit na základě rozdílné produkce cytokinů
- Charakterizace funkčních vlastností buněk odpověď na vybraný stimul

Cytokiny produkované TH1 a TH2 lidskými lymfocyty

Factors influencing development of Th1 and Th2 cell subtypes



BD FastImmune™ Cytokine Flow Cytometry Protocol

1. Stimulate

whole

blood or PBMC

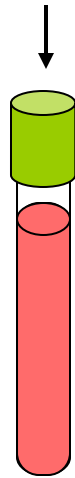


6 h

+ Brefeldin A



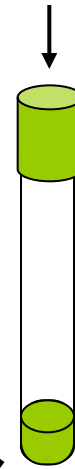
2. Lyse/Fix



Wash



Wash



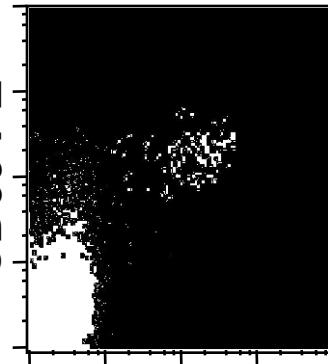
Wash



Optional: cool to 18°C O/N

Optional: freeze directly in
BD FACS Lysing Solution

CD69 PE



anti-IFN γ FITC

5. Flow
cytometry

Shrnutí přednášky příklady aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

- **Imunofenotypizace**
- **Funkční testy**
 - Změna exprese vybraných povrchových markerů (většinou receptory nezbytné pro funkci daného lymfocytu)
 - Indukce proliferace (stanovení buněčného cyklu)
 - Produkce cytokinů
 - Stanovení cytotoxicity NK buněk a cytotoxických lymfocytů
 - Produkce volných radikálů fagocyty
 - Fagocytární aktivita