

# Aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

Lukáš Kubala  
[kubalal@ibp.cz](mailto:kubalal@ibp.cz)

Laboratoř patofyziologie volných radikálů  
BFÚ AV ČR

## **Imunologie - Stanovení stavu 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, kostní dřeni nebo mozkomíšním moku)

- 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)**

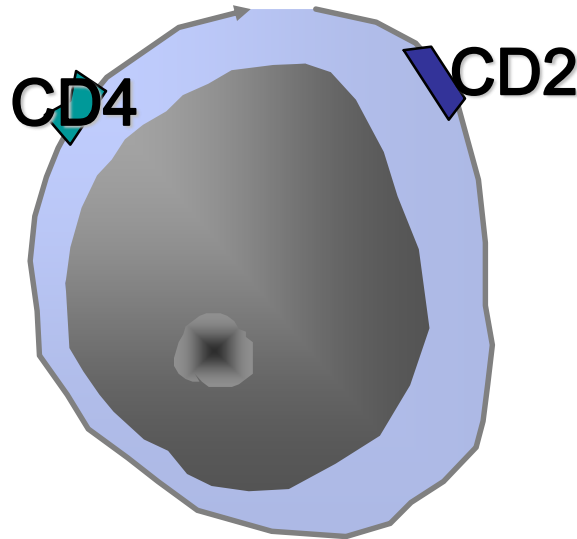
Produkce volných radikálů fagocyty

Fagocytární aktivita

- **Stanovení funkčních vlastností trombocytů**

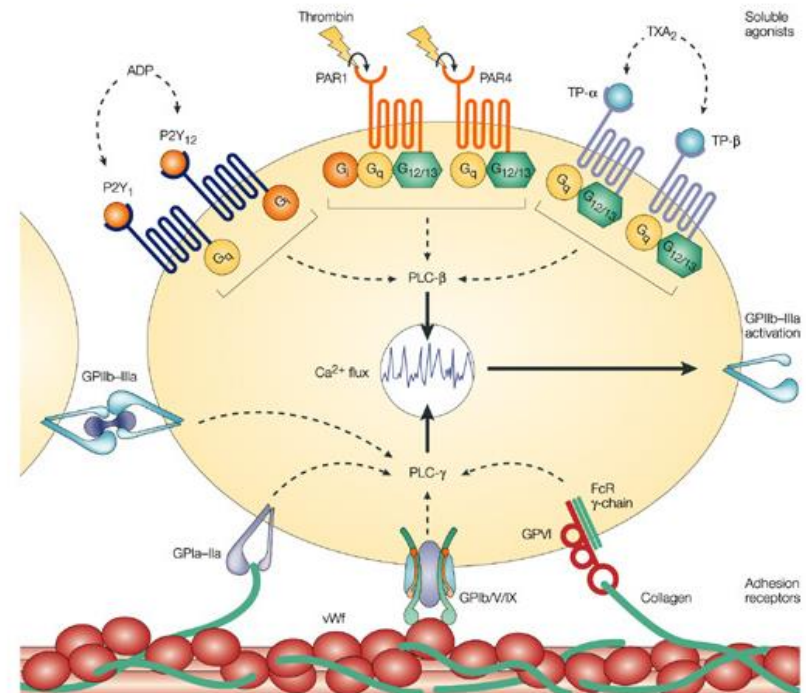
# Imunofenotypizace

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



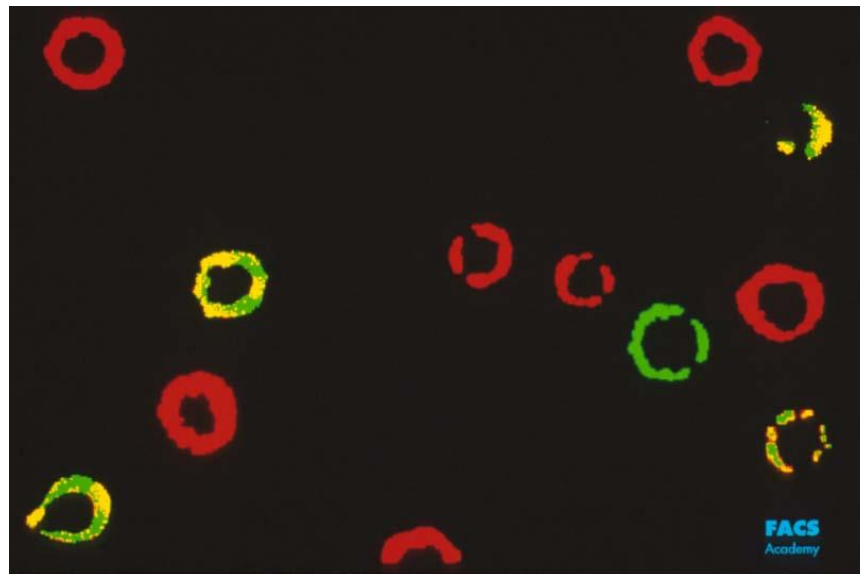
# CD markery

- Skupina povrchových molekul buňky mající stejný epitop, identifikovatelný stejnou protilátkou
- Rozpoznávání buněčných populací při imunofenotypizaci
- Pojí se s určitými funkcemi a vlastnostmi buňky
- Typické receptory trombocytů: CD 41, CD 61, CD 42a/b



# Imunofenotypizace leukocytů

- 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/](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/prow/)

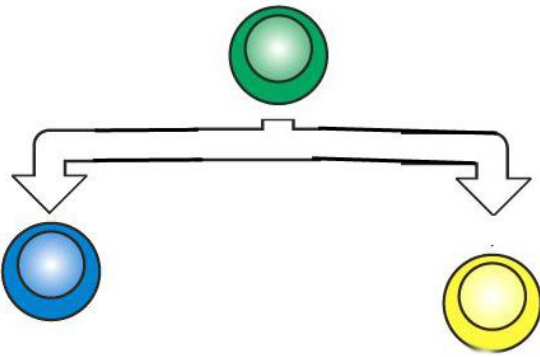
# Expresie vybraných povrchových znaků během vývoje B lymfocytů

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

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



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



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

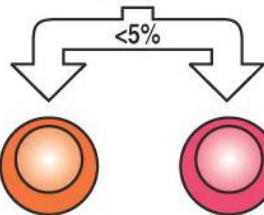
$pT\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$   
velké dvakrát-  
pozitivní tymocyty



$\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$   
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

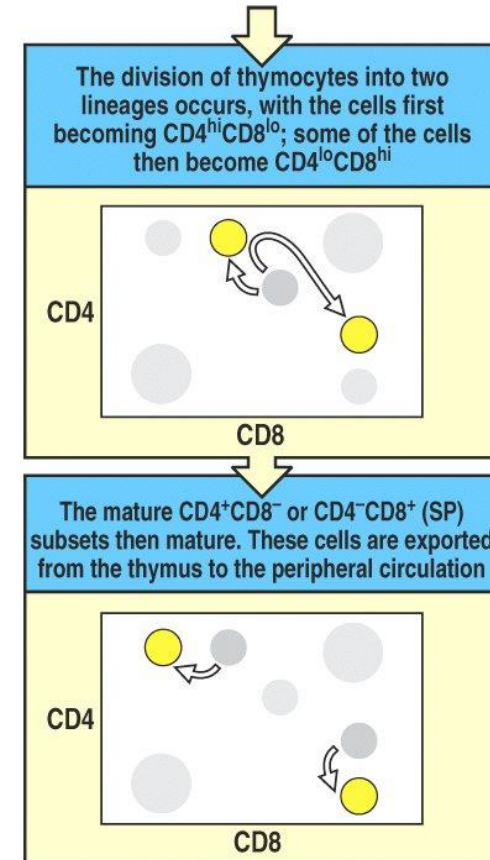
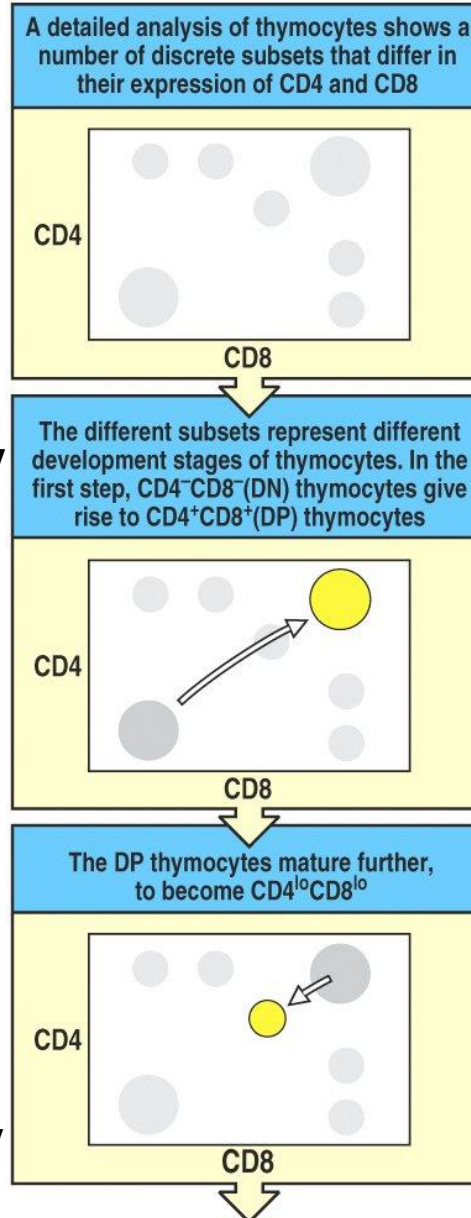
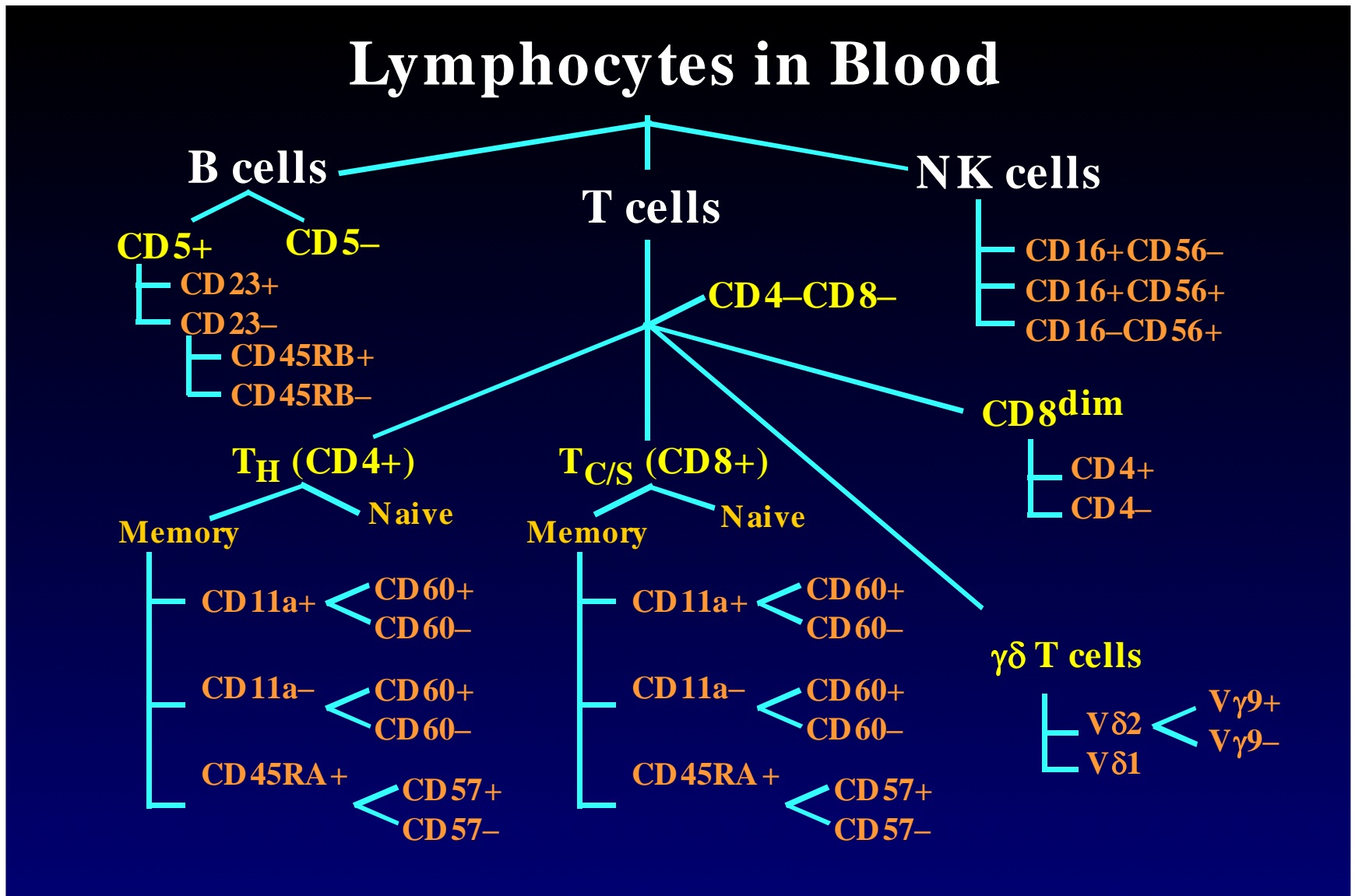


Figure 7-31 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

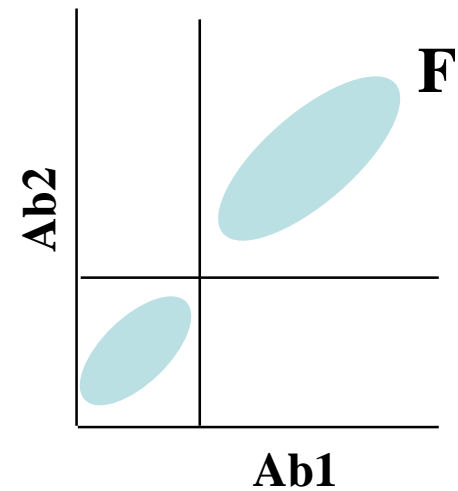
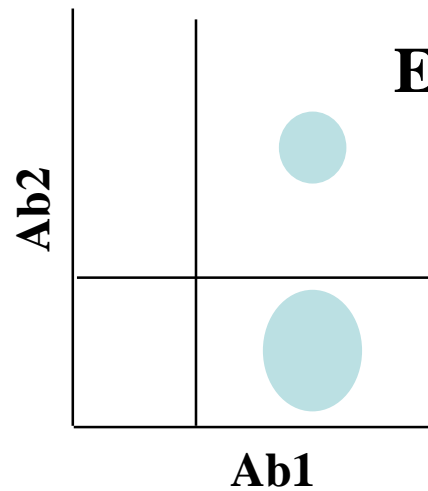
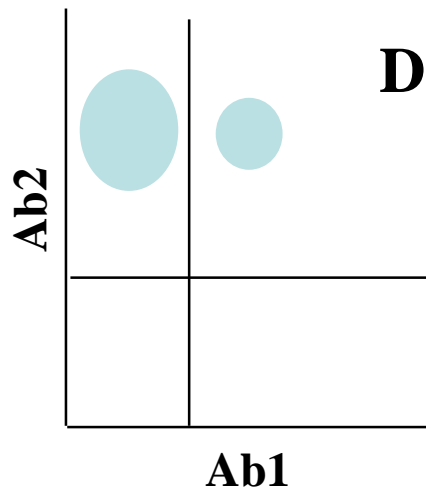
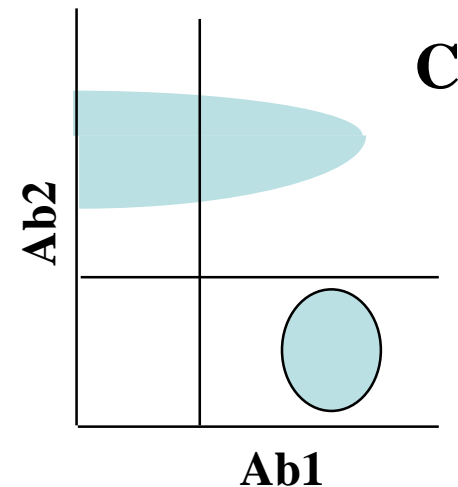
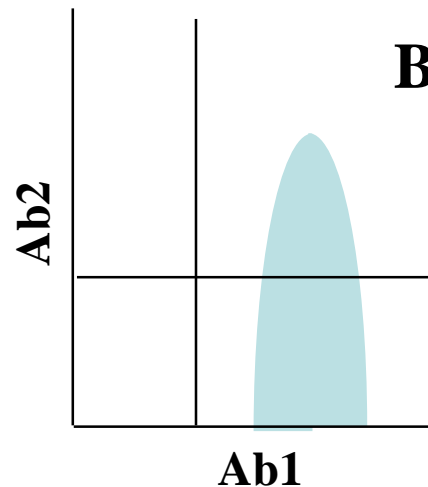
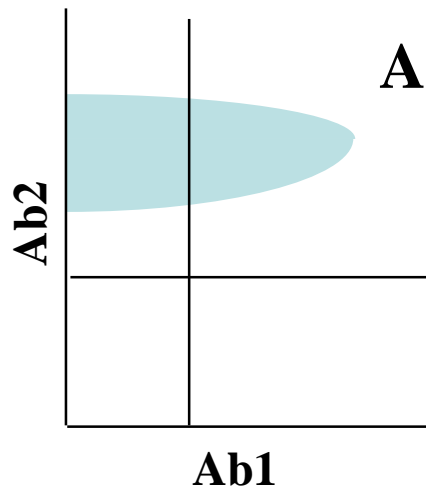
# Možné rozdělení jednotlivých subpopulací lymfocytů podle exprese vybraných povrchových antigenů



# 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



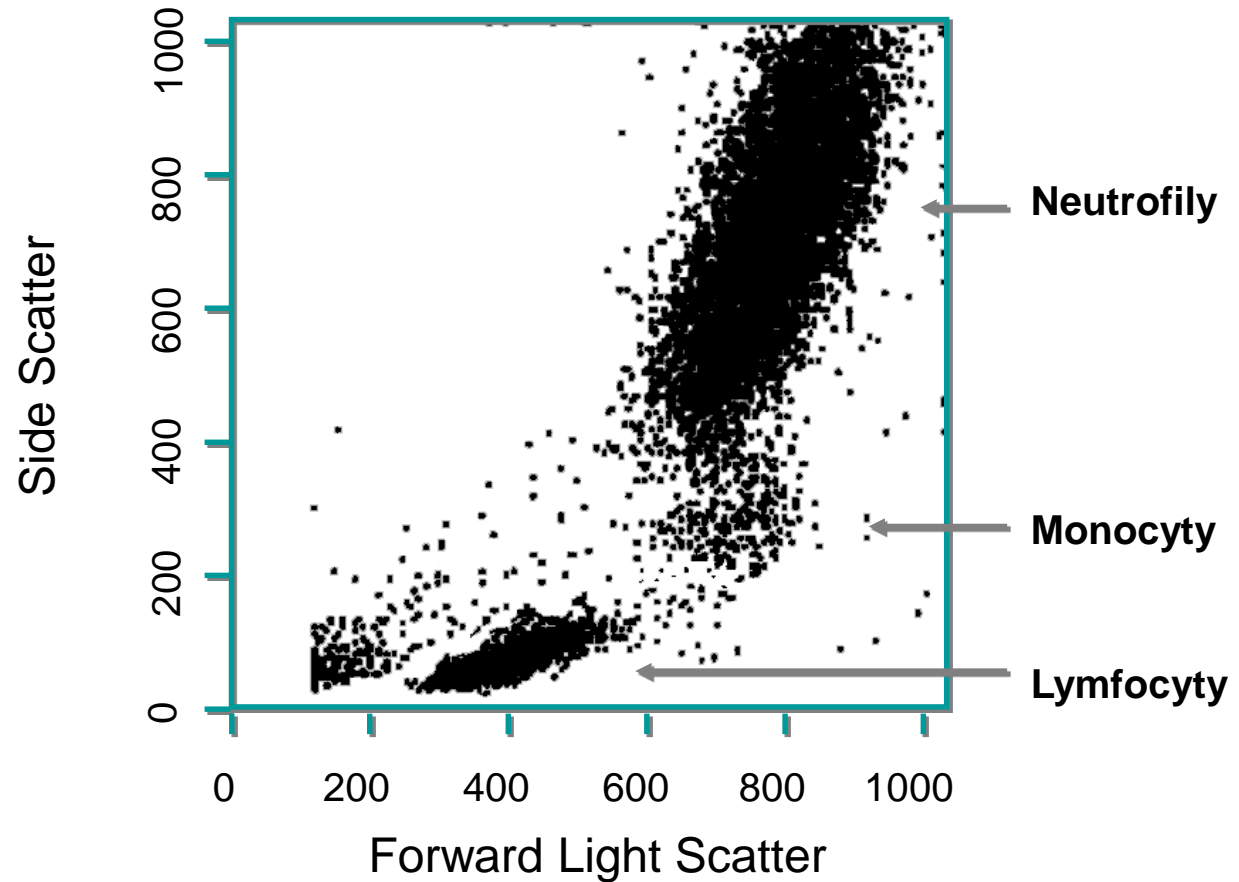
# Příklad výběru detekovaných antigenů pro určení zastoupení a počtu jednotlivých subpopulací lymfocytů v periferní krvi

|                    |   |
|--------------------|---|
| 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

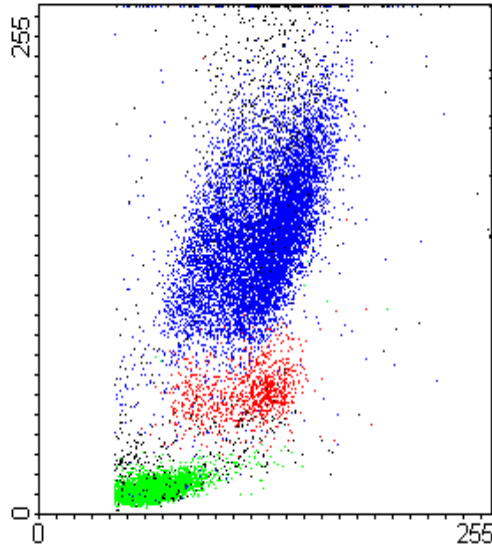
| Zkumavka | FITC     | PE        | Stanovení                                    |
|----------|----------|-----------|--|
| 1        | CD45     | CD14      | %lymfocytů v ohraničení (gate) pro lymfocyty |
| 2        | Iz.kont. | Iz. kont. | Nespecifická vazba – autofluorescence        |
| 3        | 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

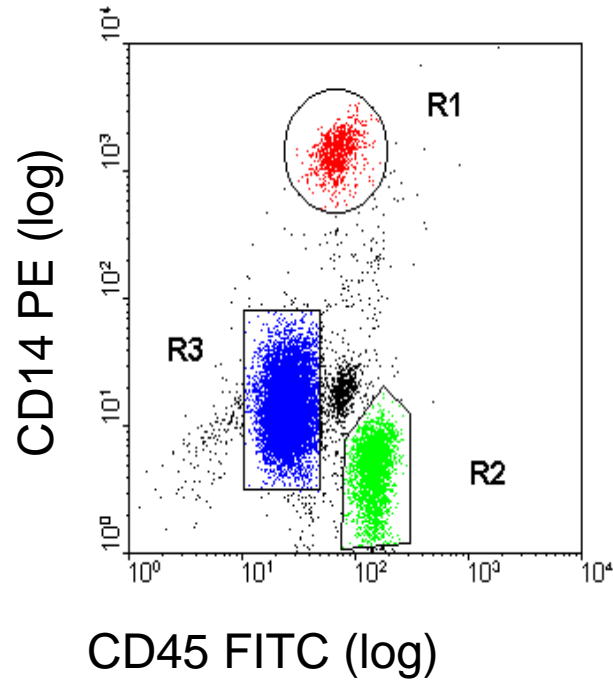


# Kontrola “čistoty” lymfocytárního ohraničení na základě FS a SS

Side Scatter (linear)



Forward Scatter (linear)



R1=monocyty (CD14+)

R2=lymfocyty (CD45>monocyty)

R3=granulocyty (CD45<monocyty)

Vzorek akceptovatelný pokud

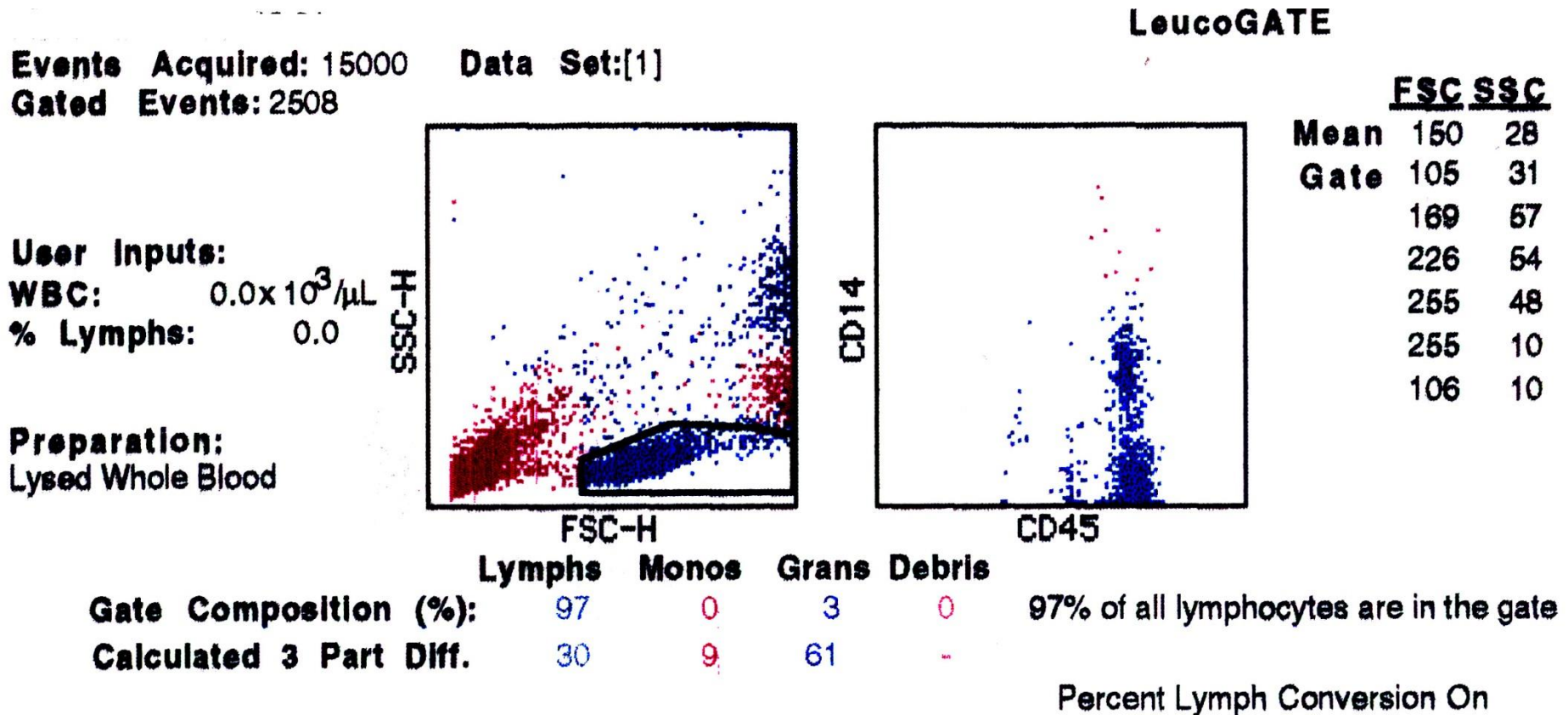
- minimálně 90% fenotypově CD14- a CD45+ lymfocytů je v SS-FS ohraničení pro lymfocyty
- v SS-FS ohraničení pro lymfocyty je maximálně 15% buněk které nejsou fenotypově lymfocyty (CD14- a CD45+)



# 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

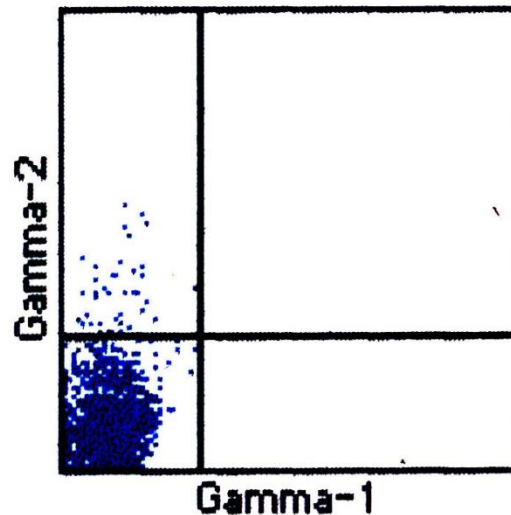
## Krok 2 - izotypové kontroly

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.

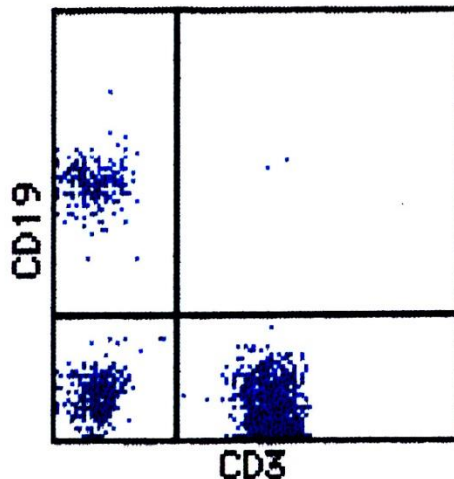
# Imunofenotypizace v programu Simulset

## Krok 3 - Stanovení T- a B- lymfocytů

FITC CD3 PE CD19

Events acquired: 14000  
Gated Events: 2251

Data set: [1]



**FSC SSC**  
Means: 149 27  
**FL1 FL2**  
Marker 76 73

| 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

Operator defined markers are in effect.

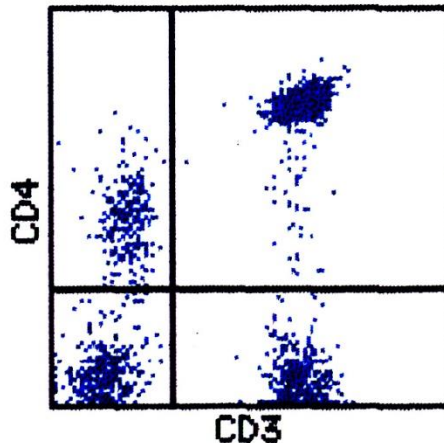
# Imunofenotypizace v programu Simulset

## 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 %L |
|---------|-----------|---------|
| Q       | Cell Type |         |
| 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

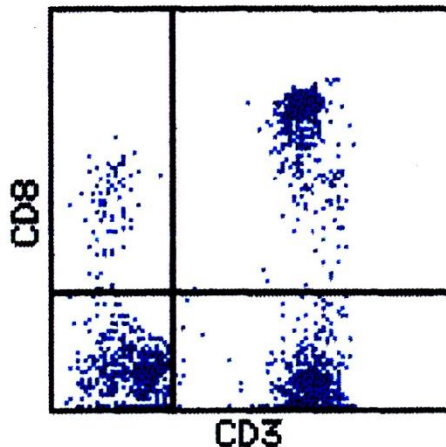
## Krok 5 - Stanovení cytotoxických T-lymfocytů

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

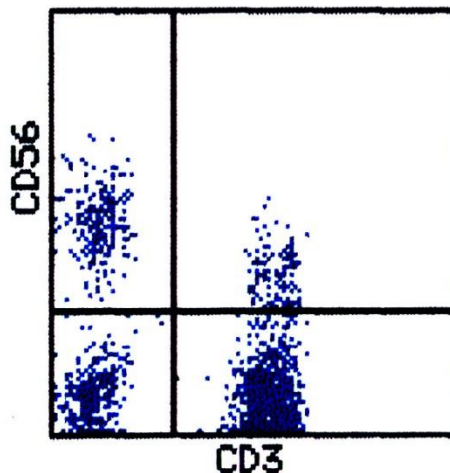
## Krok 6 - Stanovení NK-lymfocytů

FITC CD3 PE CD56

Events acquired:14000  
Gated Events:2077

Data set: [1]

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

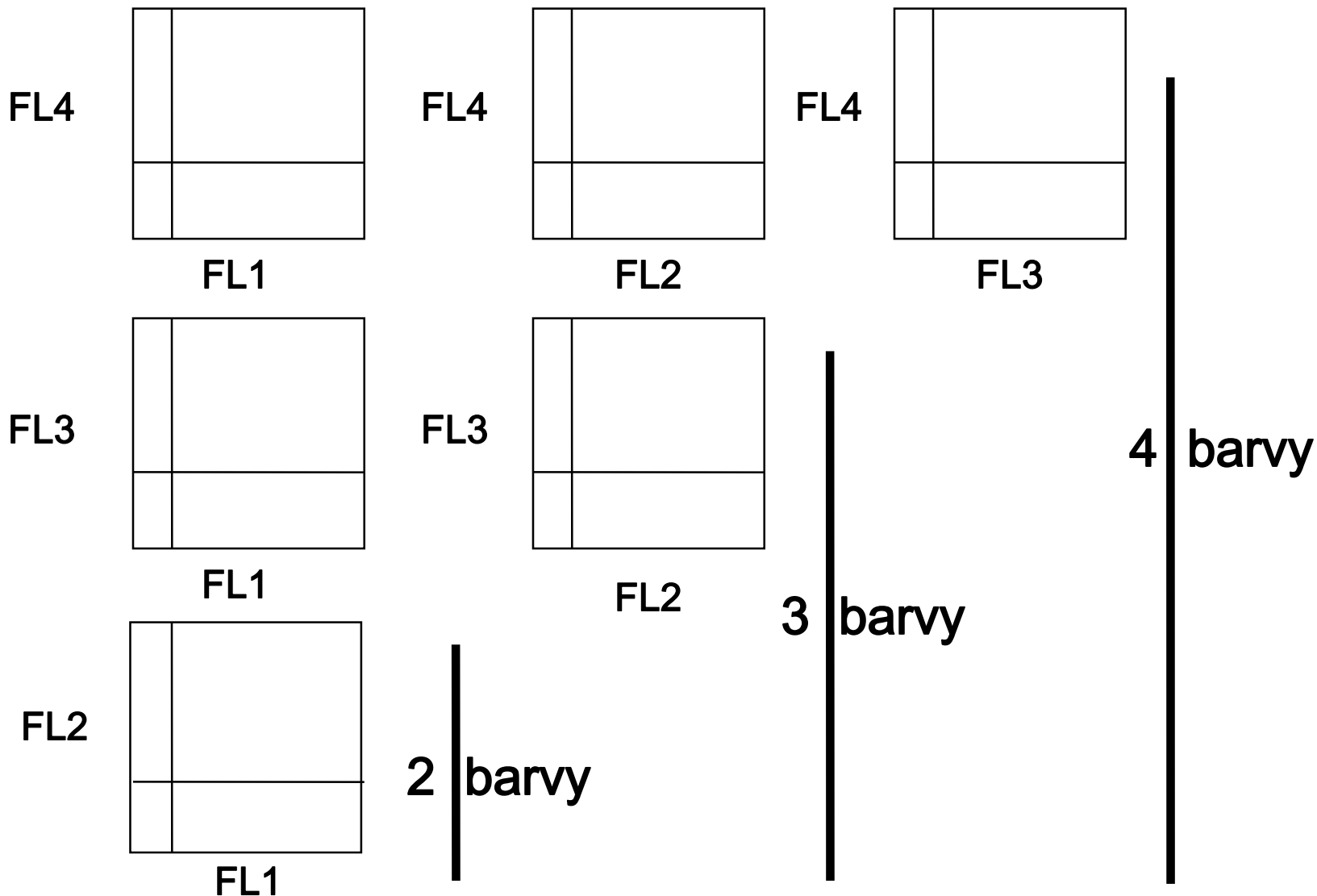
Operator defined markers are in effect.

# 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

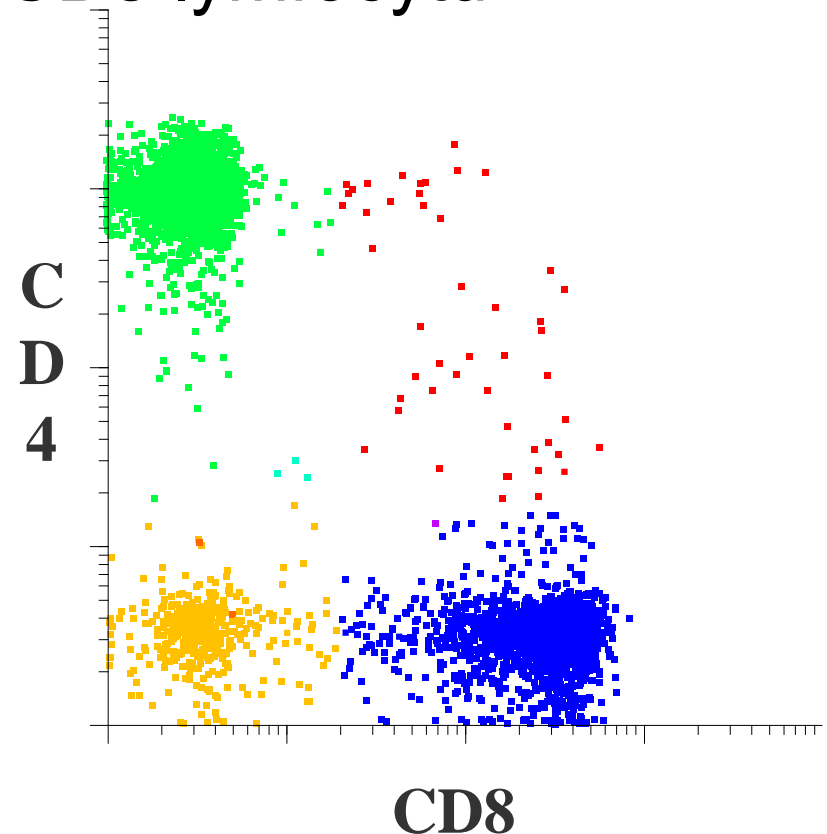
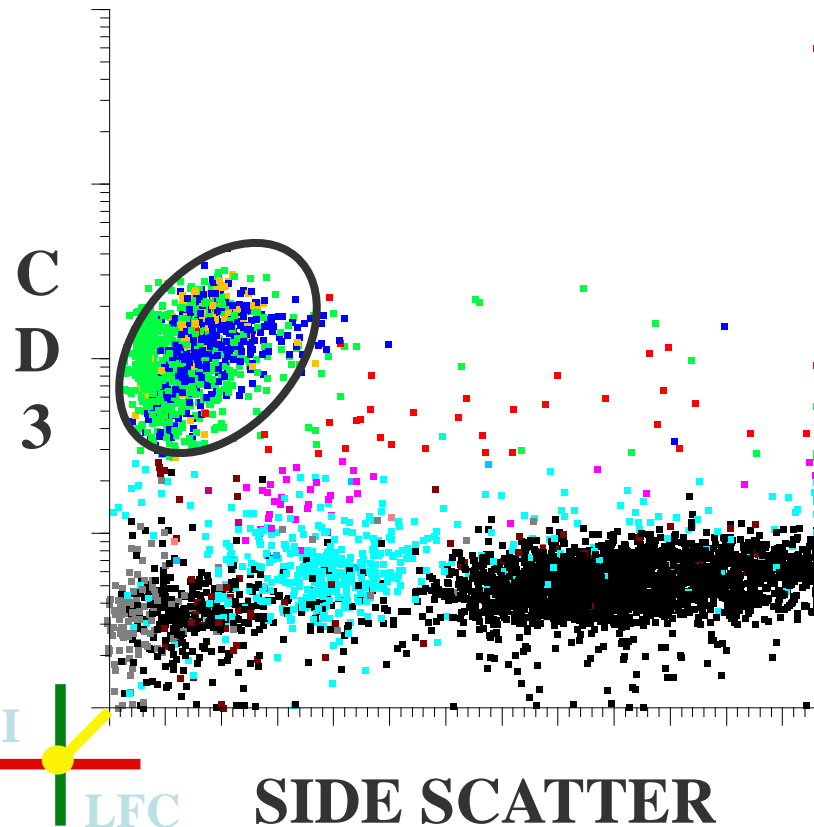




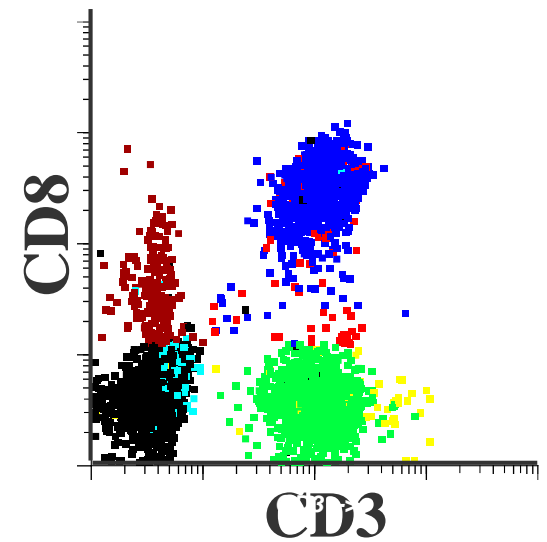
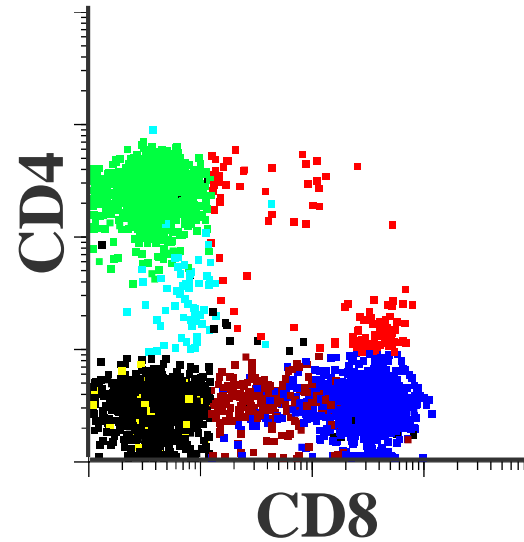
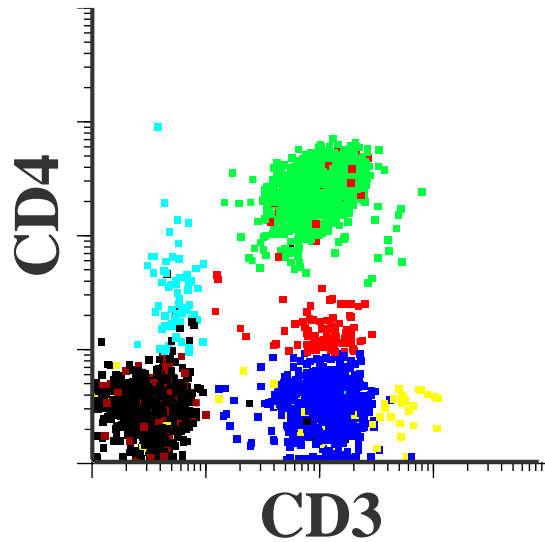
# Tří barevná imunofenotypizace

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

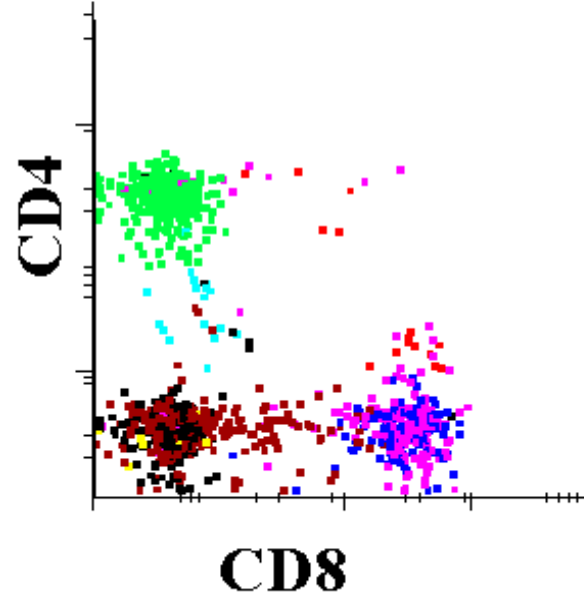
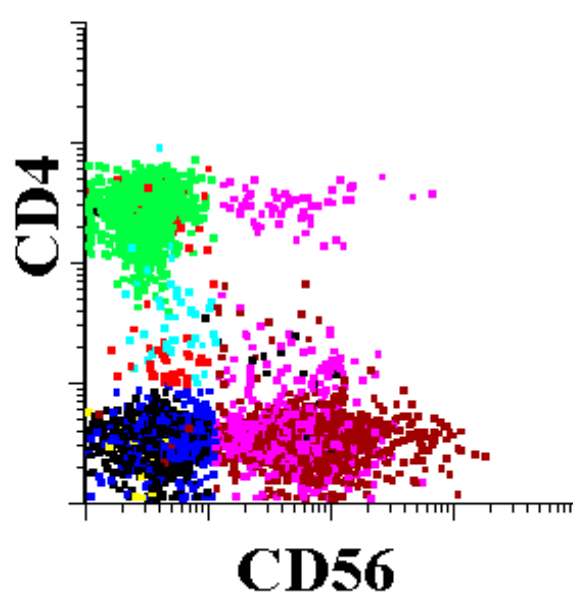
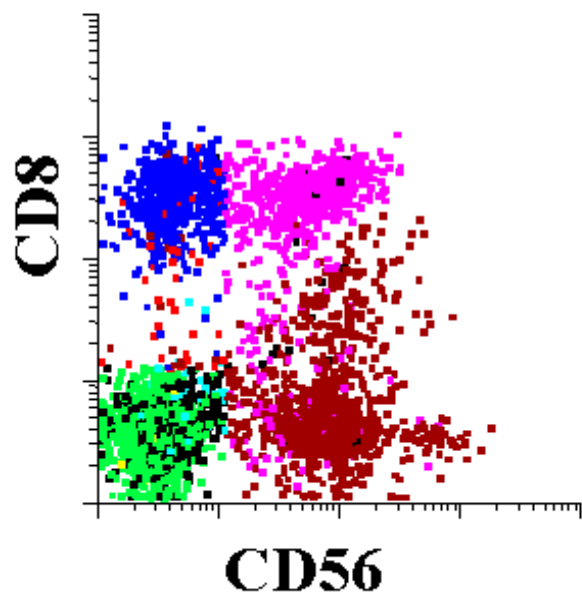
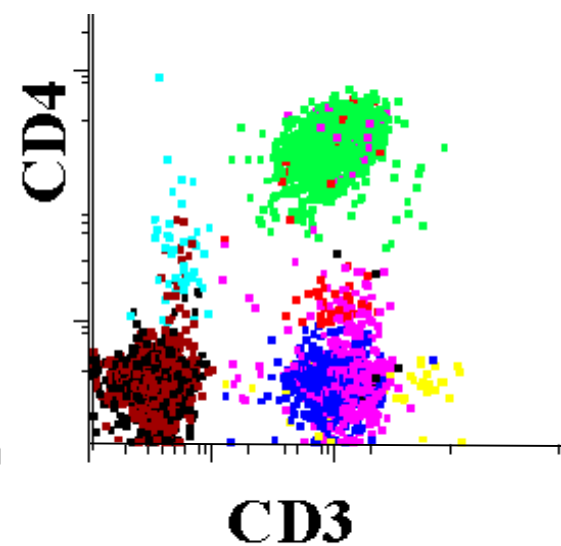
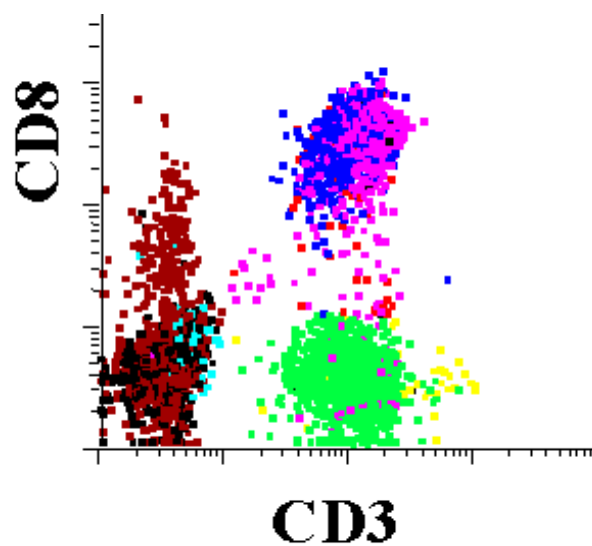
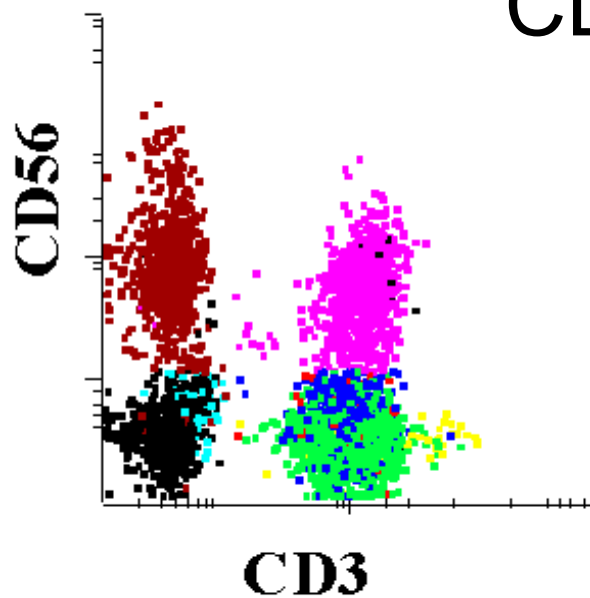
Antibodies labeled with complex PE/Texas Red

Antibodies labeled with complex PE/CY5 or PerCP

Antibodies labeled with complex APC, CY5 or CY7

Antibodies labeled with ALEXA dyes from  
Molecular Probes

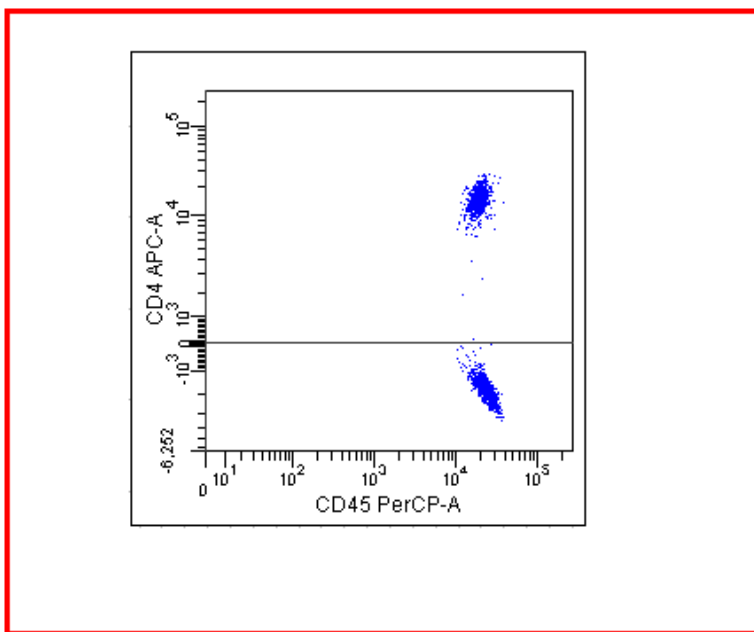
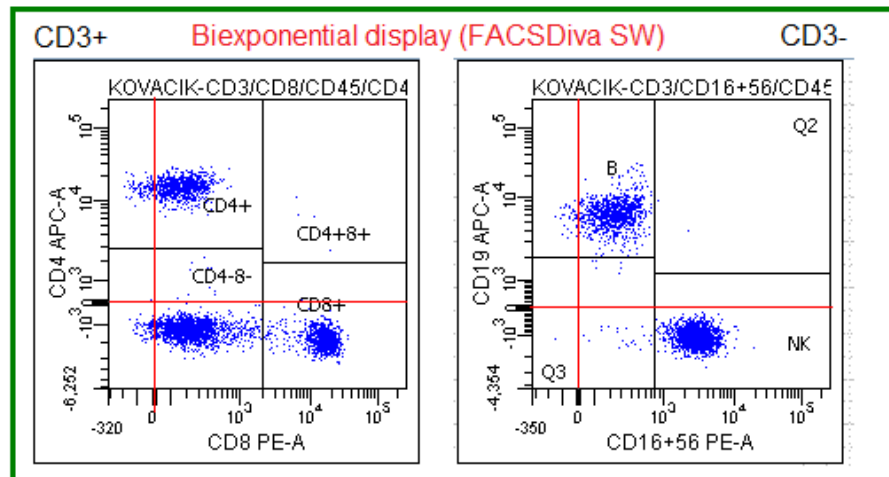
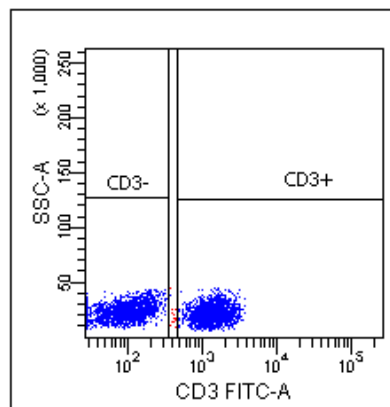
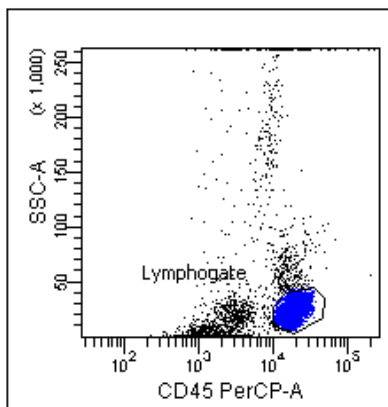
# Čtyř barevná imunofenotypizace CD3, CD4, CD8, CD56



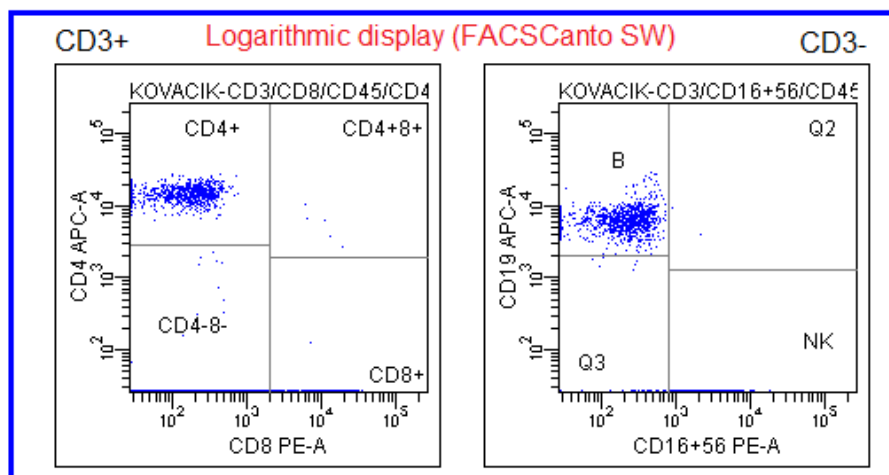
# Čtyřbarevná imunofenotypizace

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 (%):

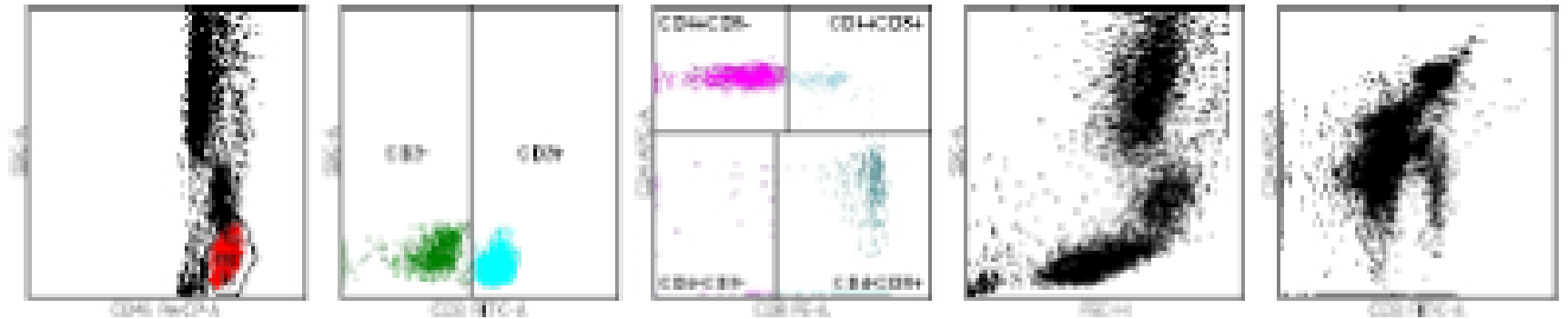
Lymphs (x1000):

BD FACScan v2.3.00497

BD FACScan v2.3.0701.0078

CD3/CD8/CD45/CD4

Total Events: 10017

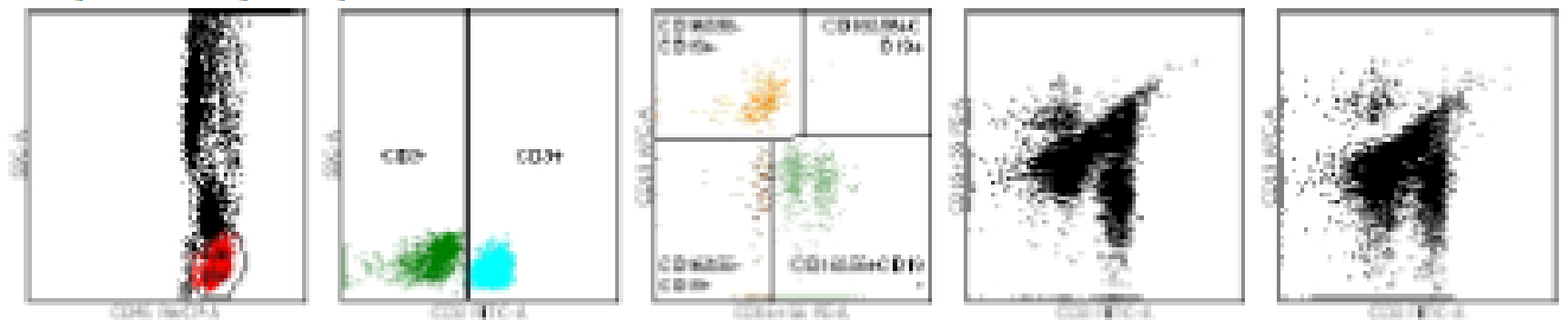


751001.001.5a

Reagent Lot ID: 58262

CD3/CD16+56/CD45/CD19

Total Events: 10011



751001.001.5a

Reagent Lot ID: 57957

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



751201.0012a

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

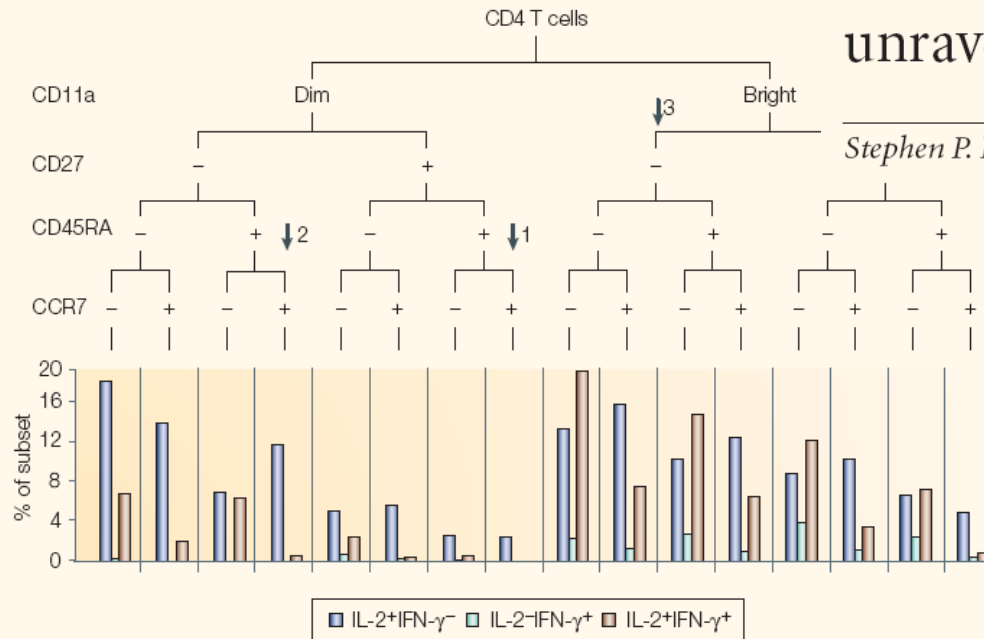
| Ab Conjugate           | Laser |                        |
|------------------------|-------|------------------------|
| CD28 PerCP-Cy5.5       | 488   | Surface staining       |
| CD45RA PE-Cy7          | 488   |                        |
| CD27 APC               | 633   |                        |
|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



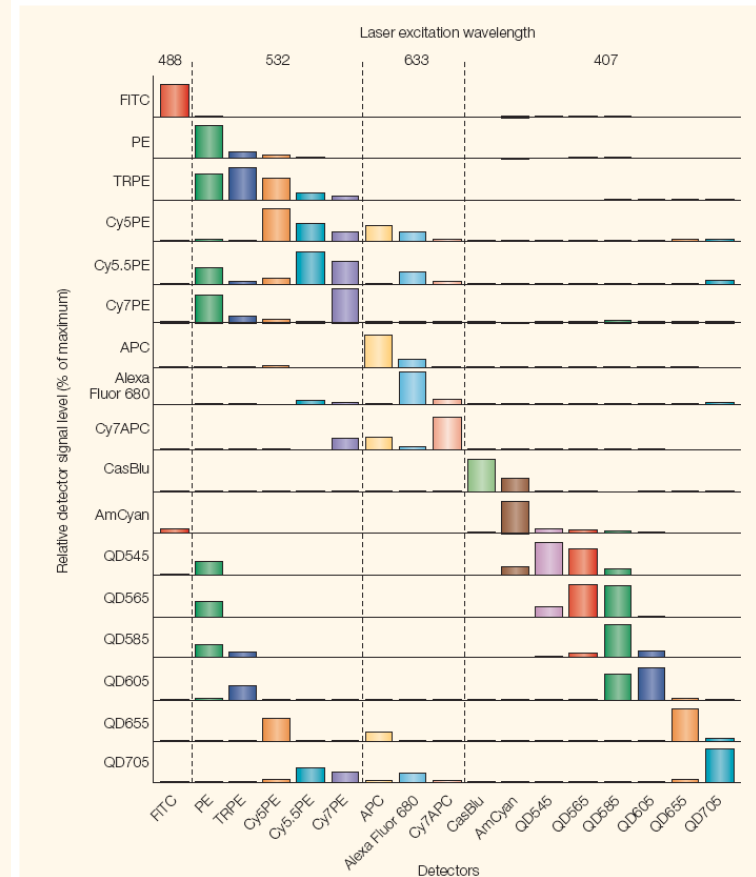
# Příklad 17 barevná imunofenotypizace

## 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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD11a<sup>dim</sup>CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>. 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<sup>dim</sup>CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> 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<sup>dim</sup>CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> 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<sup>bright</sup>CD27<sup>-</sup> 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.

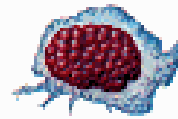


# Hematologie

## Použití imunofenotypizace pro detekci hematologických onemocnění

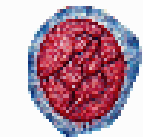
- Stanovení zastoupení jednotlivých buněčných linií
- Stanovení stupně diferenciacce
- Stanovení monoklonální populace (B-lymfocyty)

# Haematopoéza

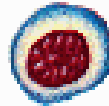


Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

proerythroblast



basophilic erythroblast



erythroblast



normoblast

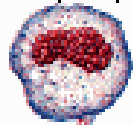


reticulocyte



erythrocyte

megakaryoblast

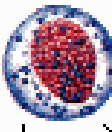
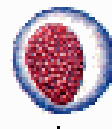


megakaryocyte

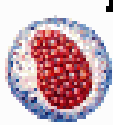


platelets

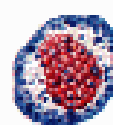
myeloblast



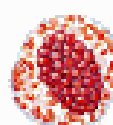
promyelocyte



neutrophil



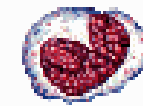
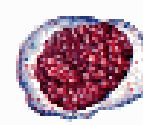
basophil



eosinophil

granulocytes

monoblast



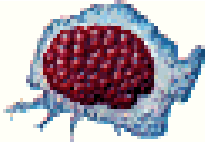
monocyte

lymphoblast



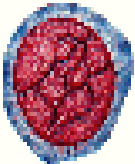
lymphocyte

# Příklad identifikace buněk myeloidních linií



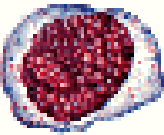
Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

proerythroblast



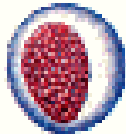
CD34+  
CD13-  
(CD36+)

monoblast

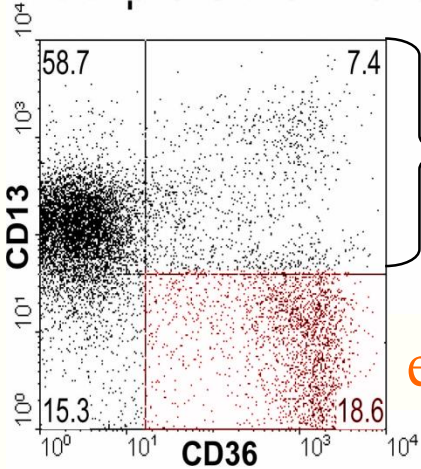


CD34+  
CD13+  
CD115+

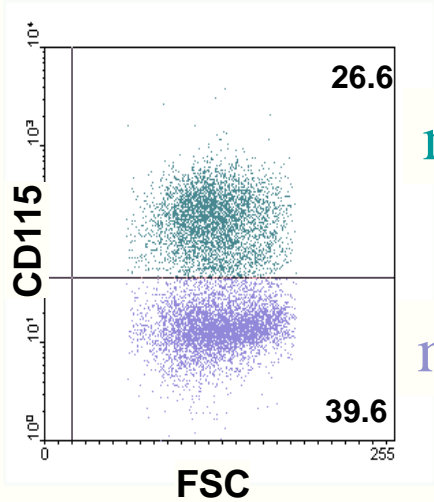
myeloblast



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.

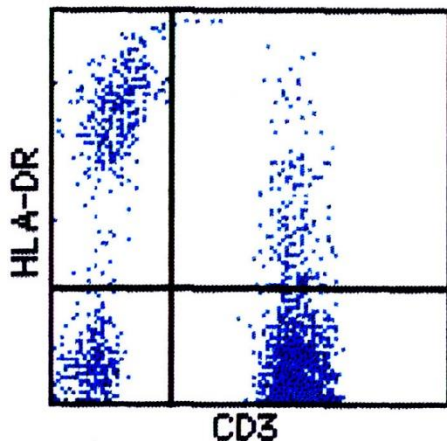
Příklady:

- 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  
Marker FL1 FL2  
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/<br>Consistency | Ck | Subset Name/<br>Ck Name           | Conv.<br>Percent<br>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)

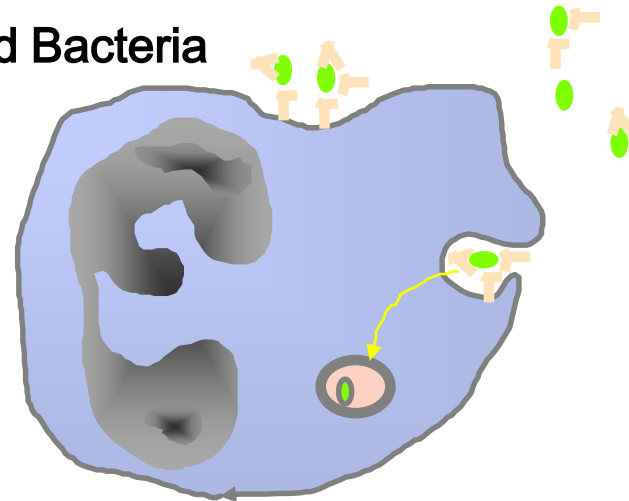
# Detekce fagocytární aktivity

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

## *Postup:*

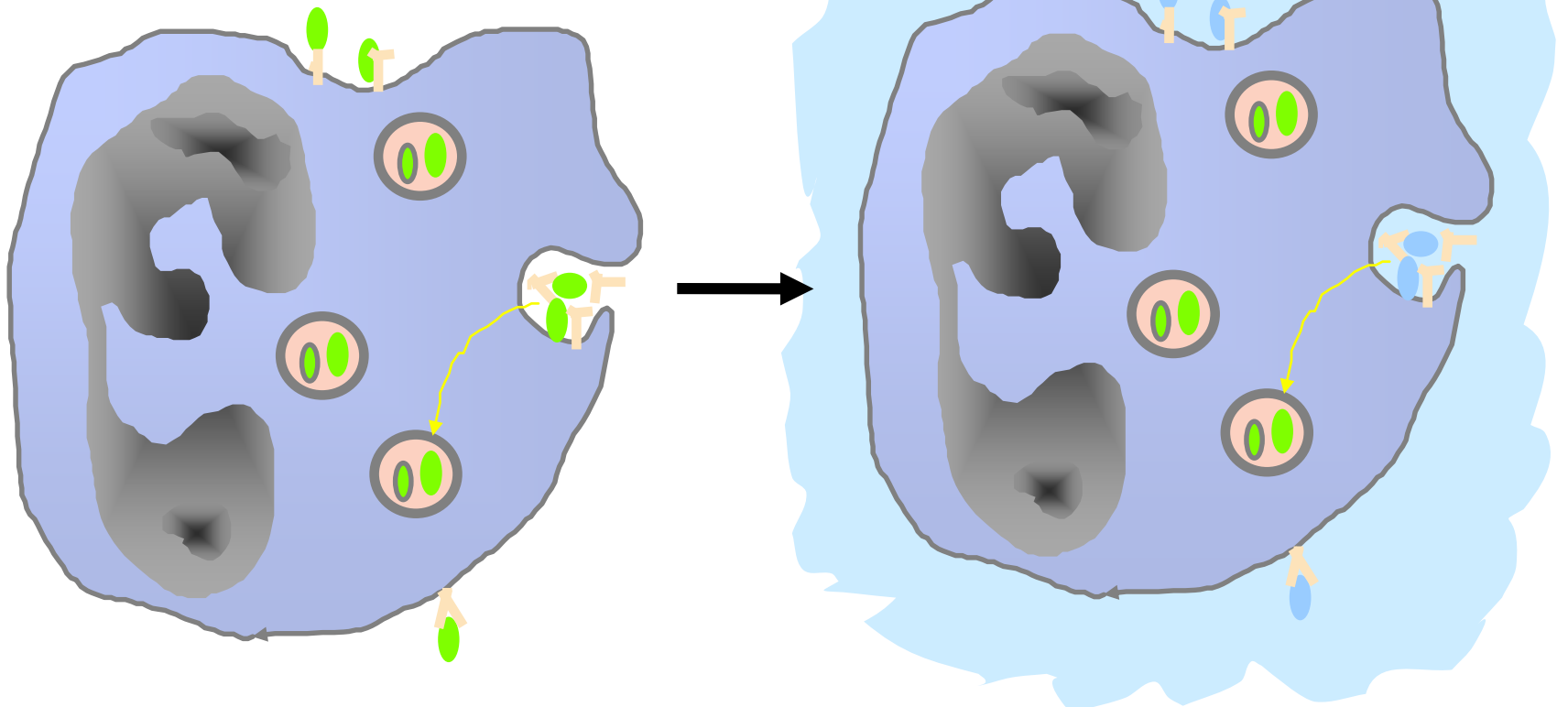
- Značení částice fluorescenční próbou
- Oponizace částic vybranými opsoníny (např. IgG, C3) nebo kompletním sérem daného druhu
- Izolované leukocyty jsou inkubovány dohromady s částicemi při teplotě fyziologické pro daný druh

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

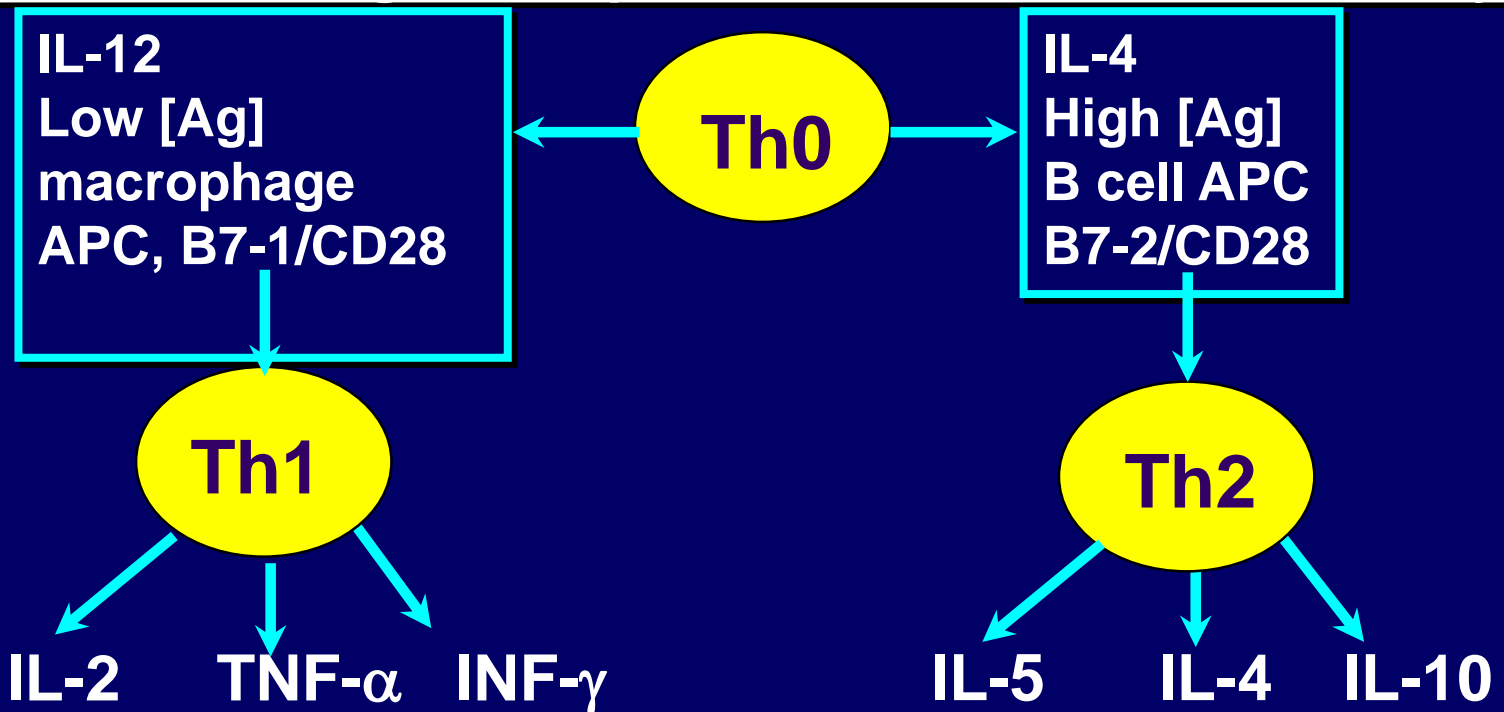


# Detekce intracelulární produkce cytokinů

- 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

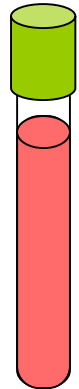
whole

blood or PBMC



6 h

+ Brefeldin A



## 2. Lyse/Fix

## 3. Permeabilize

## 4. Stain

Wash



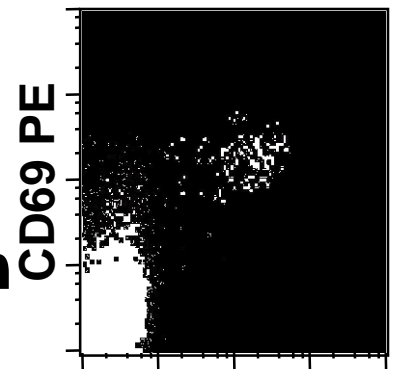
Wash



Wash

Optional: cool to 18°C O/N

Optional: freeze directly in  
BD FACS Lysing Solution



## 5. Flow cytometry

# Krevní destičky

- klidové
- aktivované - změna exprese povrchových receptorů

## Metody zkoumání trombocytů

- Imunofenotypizace receptorů krevních destiček - určení vrozených poruch, stavu aktivace destiček in vivo a aktivovatelnost destiček
- Určení prokoagulačních mikročástiček derivovaných z krevních destiček

# Imunofenotypizace receptorů trombocytů

- Stanovení receptorů klidových destiček jako jsou  
GPIIb-IIIa (CD 41, CD 61)  
GPIb-IX-V (CD 42a, CD 42b, CD 42d)
- Aktivované exprese - P-selektinu (CD62P) nebo  
PAC1
- Stanovení fenotypu (aktivovaného stavu  
destiček v cirkulaci)
- Zhodnocení reaktivity destiček jako odpověď na  
agonistu



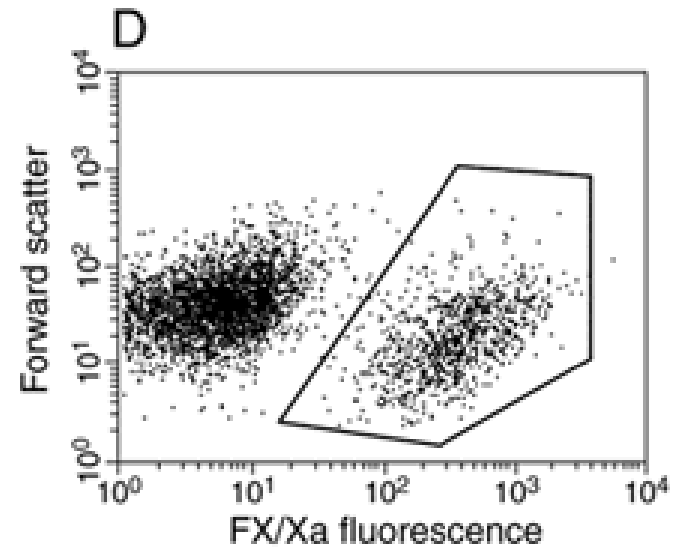
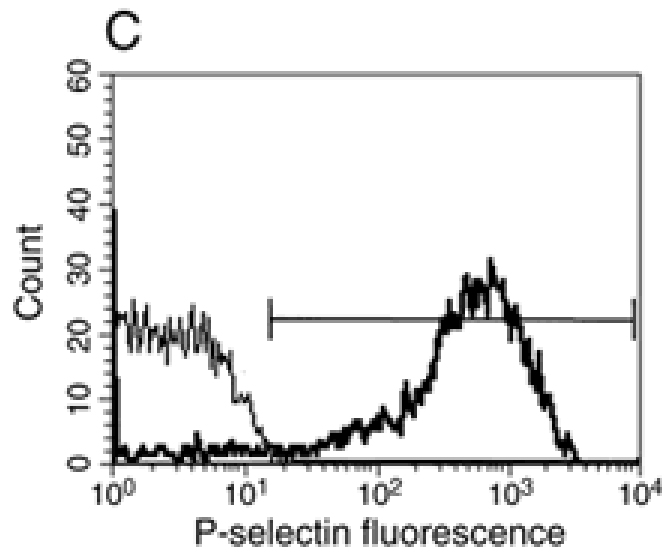
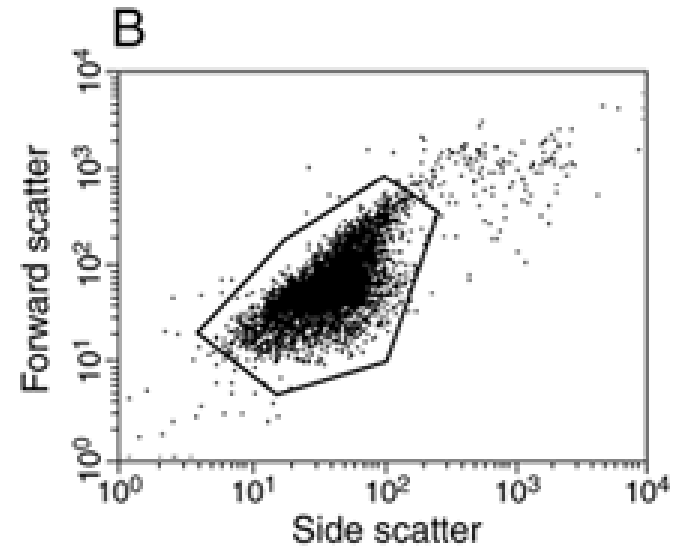
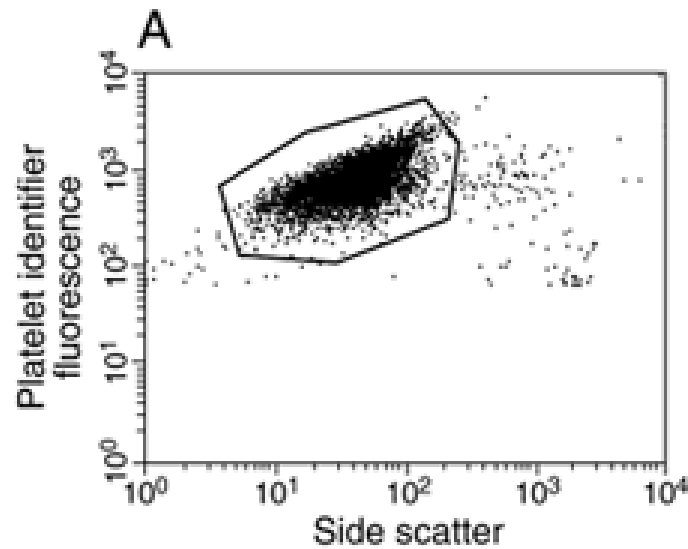
# Určení prokoagulačních mikročástek

- Derivované z trombocytů po jejich aktivaci
- Určení díky navázání annexinu V nebo protilátek specifických pro koagulační faktory V/Va nebo X/Xa
- Zhodnocení schopnosti destiček vytvářet mikročástky

# Úskalí laboratorní práce

- Zpracování vzorků krve do 30 minut
- Použití dostatečně široké jehly
- Nepoužívat jako antikouagulant EDTA a heparin
- Fixace formalinem pro lepší rozpoznávání protilátkami (x PAC1)
- Prokoagulační částičky často vykazují intenzivní autofluorescenci
- Při použití trombinu nutné přidat  $\text{CaCl}_2$

# Průtoková cytometrie



# Defekty trombocytů

- **Bernard – Soulierův syndrom**

- absence komplexu GPIb-IX-V

- projevy: mírná trombocytopenie

- zvětšení krevních destiček

- absence agregace destiček

- určení pomocí anti-CD 41 nebo anti-CD 61

# Defekty trombocytů

- **Glanzmannova trombastenie**
  - autosomálně recesivní porucha
  - defekt integrinu komplexu GPIIb-IIIa
  - projevy: delší čas krvácení (fibrinogen nespustí dominový efekt destiček)  
pomalé rozpouštění sraženiny
  - určení pomocí anti-CD 42a nebo anti-CD 42b

# 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