

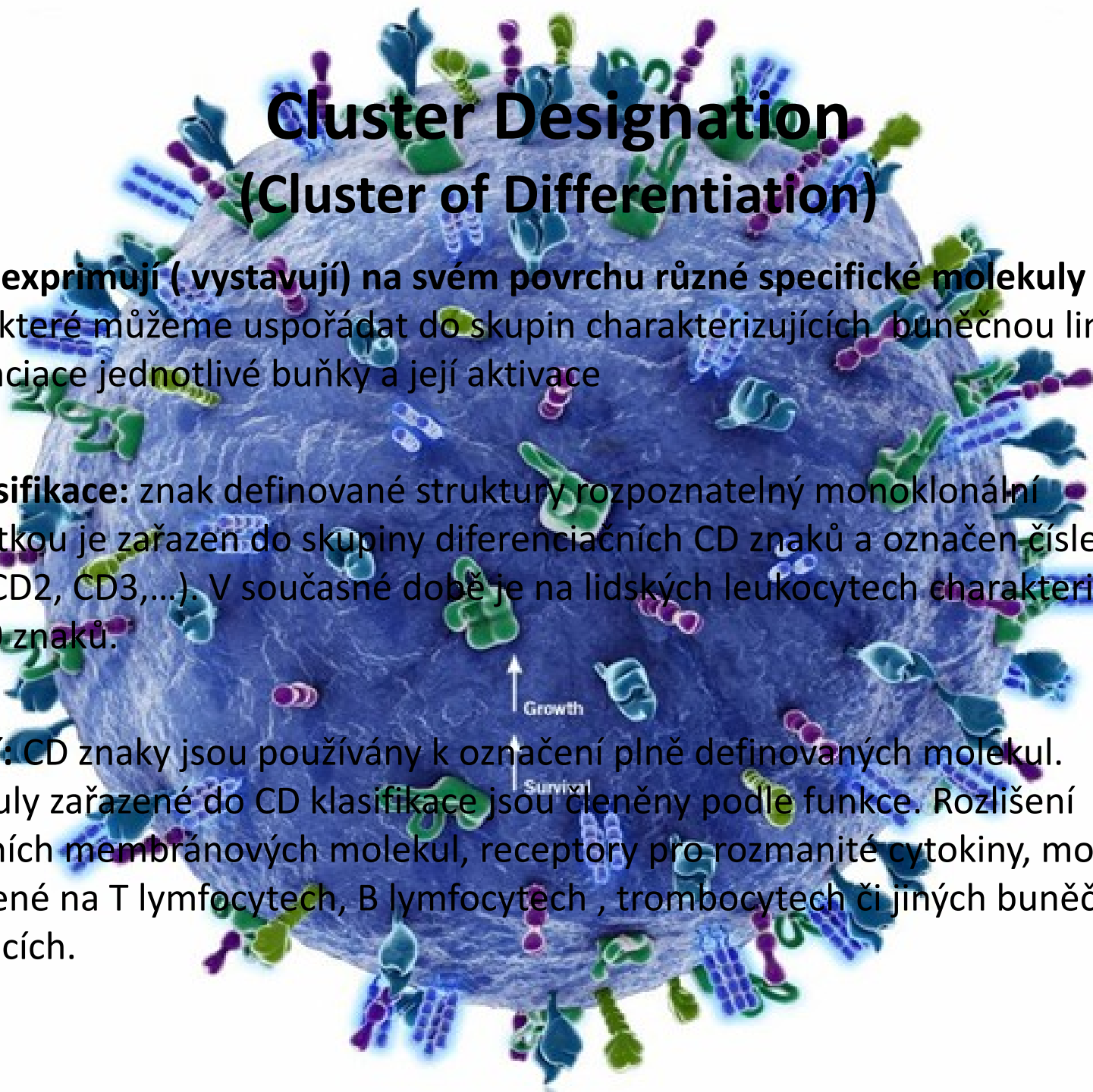
Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulací

Jana Nechvátalová

Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

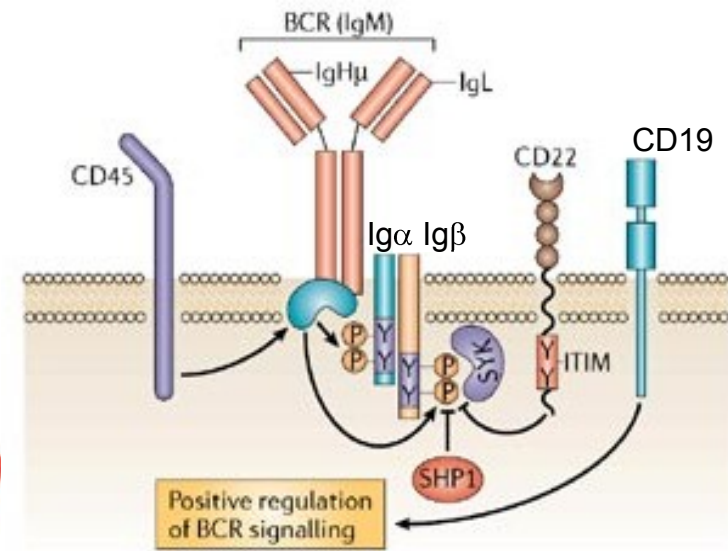
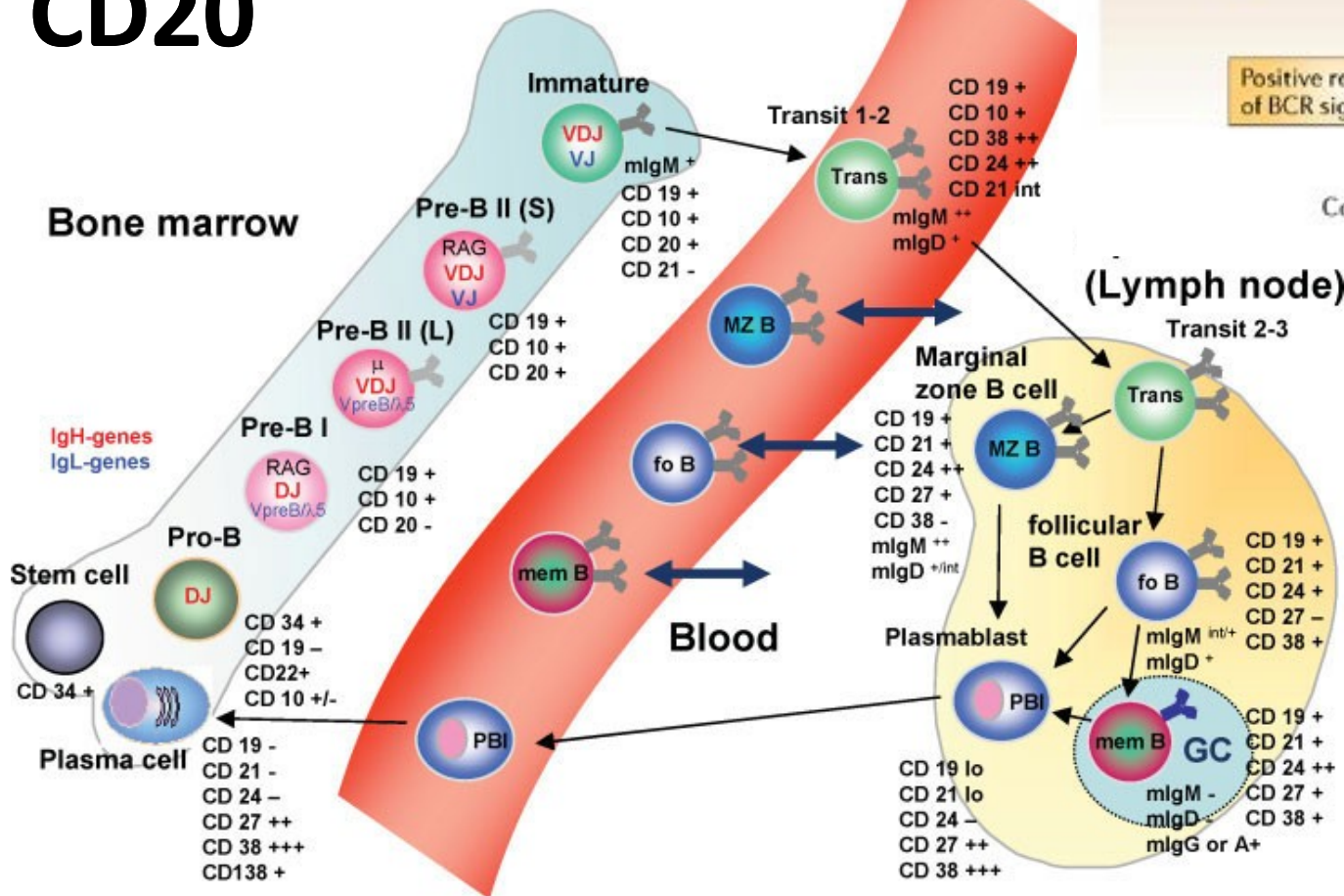
- **buňky exprimují (vystavují) na svém povrchu různé specifické molekuly** – znaky, které můžeme uspořádat do skupin charakterizujících buněčnou linii, stav diferenciaci jednotlivé buňky a její aktivace
- **CD klasifikace:** znak definované struktury rozpoznatelný monoklonální protilátkou je zařazen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



B lymphocyty

CD19

CD20



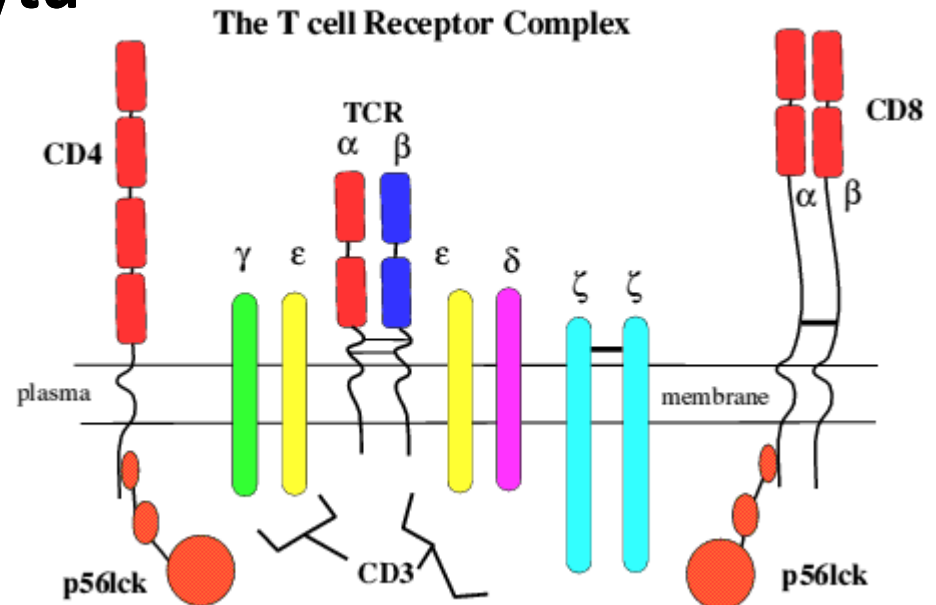
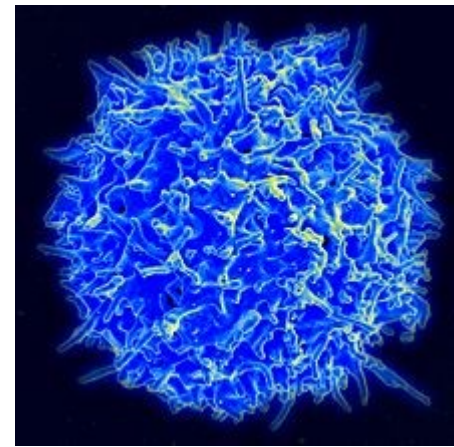
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

T lymfocyty

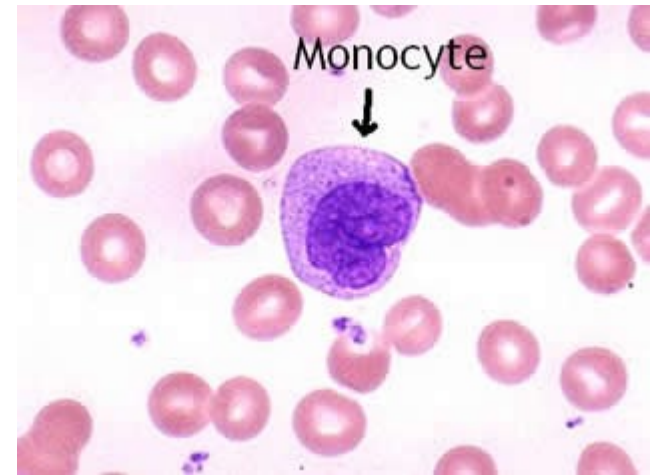
CD3 na povrchu všech T lymfocytů

CD4 na povrchu T_H lymfocytů (T_H1 , T_H2)

CD8 na povrchu T_C lymfocytů



Monocyty



CD14

HLA DR

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

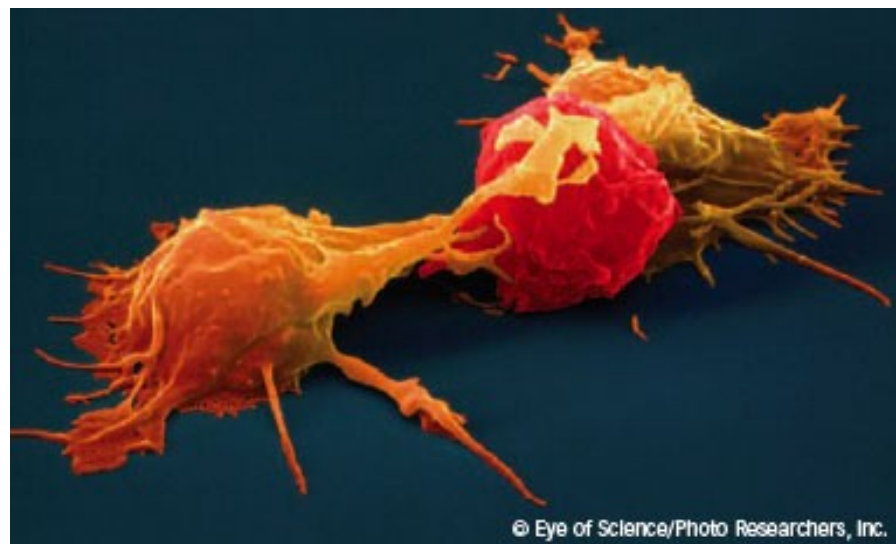
NK buňky

CD16+

CD56+

CD3-

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

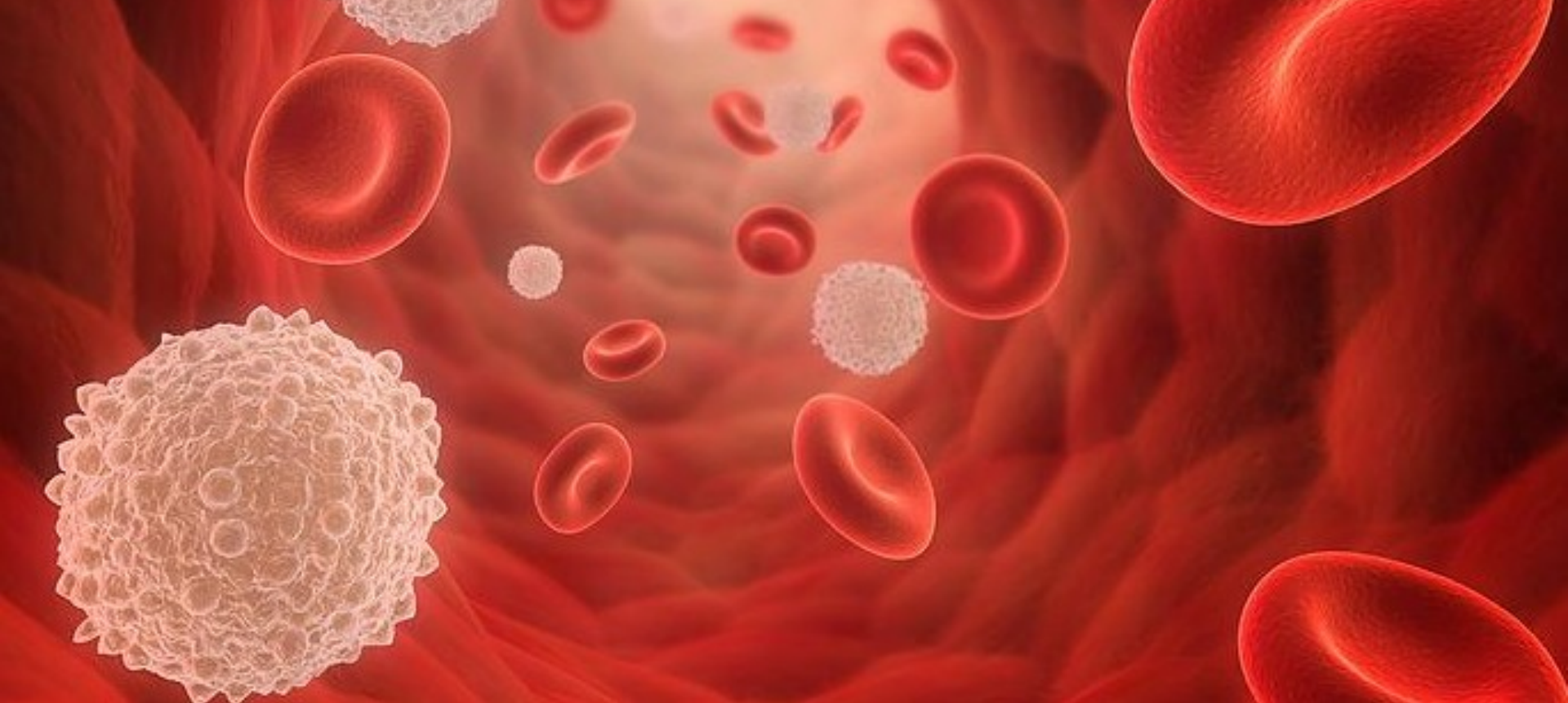


Pozn. **NKT** buňky

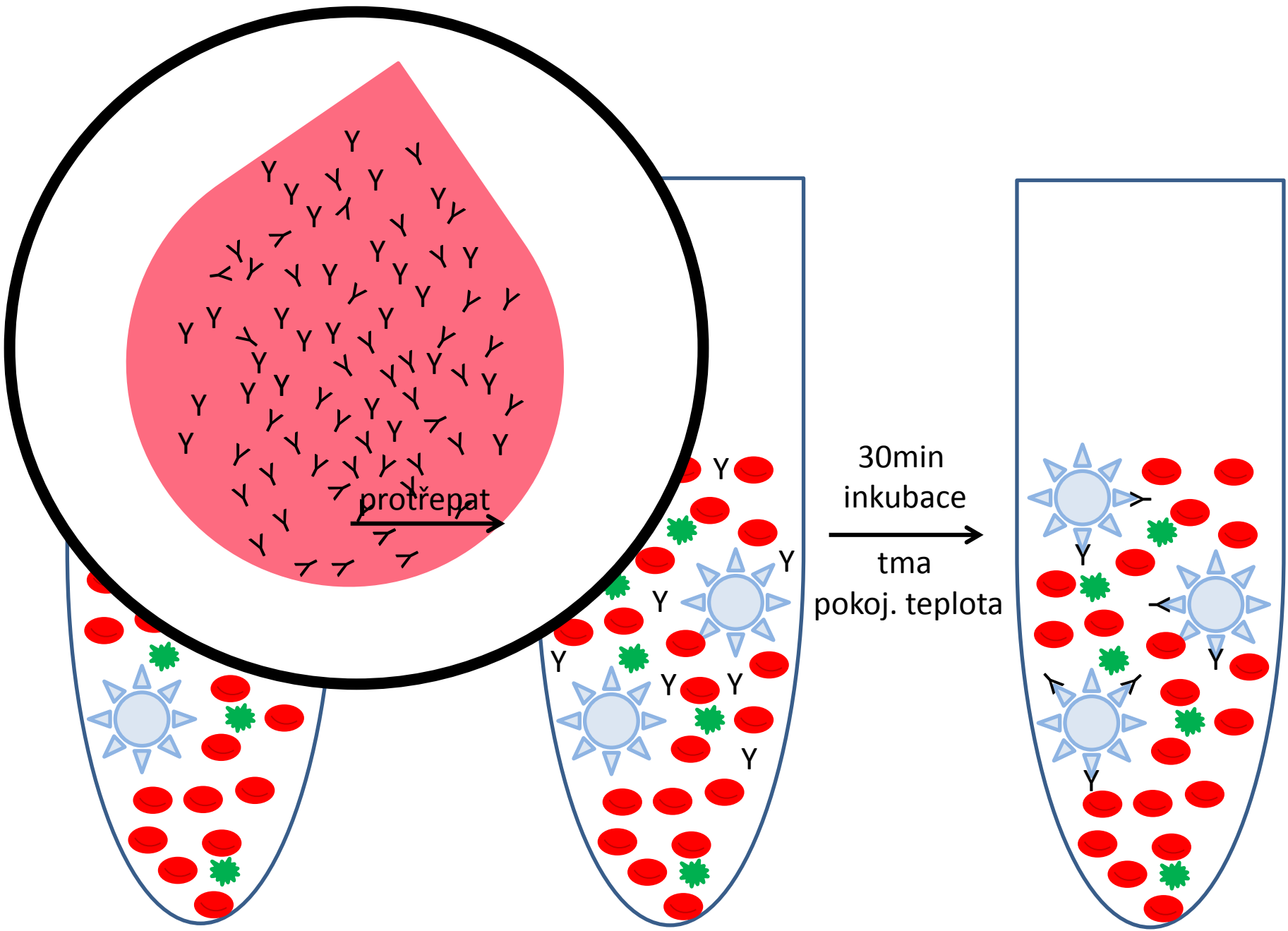
CD16+

CD56+

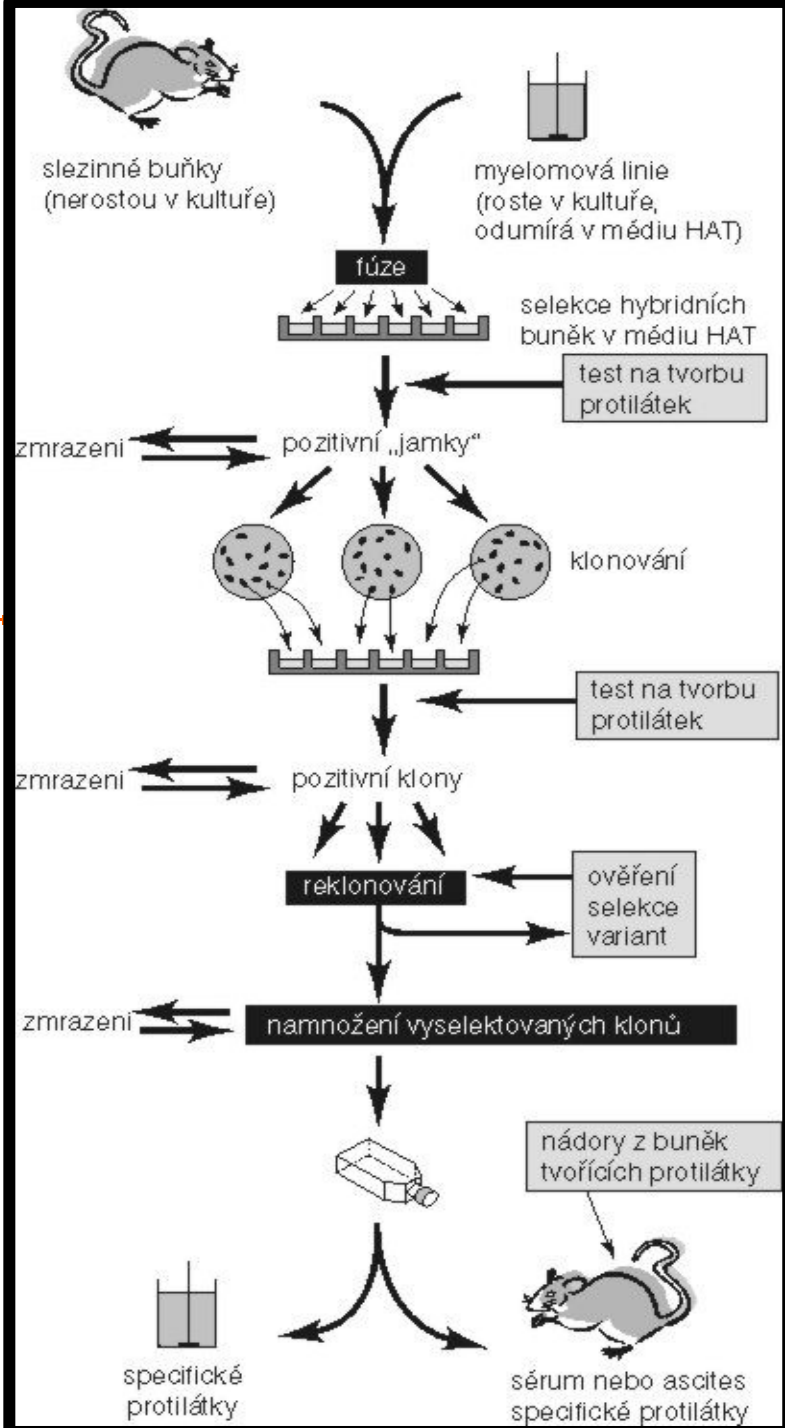
CD3+



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



Mnoklonální protilátky



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





LYZOVÁNÍ ERYTROCYTŮ

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

Roztok B: na 1,5 l destilované vody 9,0 g bezvodého Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl,
46,95 g bezvodého Na_2SO_4

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

Průtoková cytometrie

FLOW CYTOMETRY

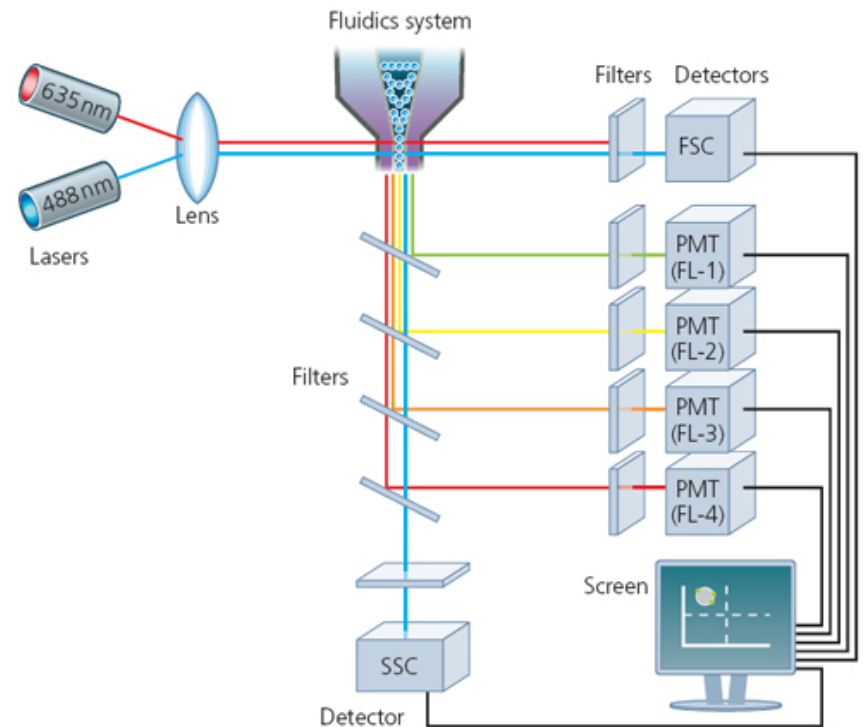


Průtokový cytometr

1. FLUIDNÍ SYSTÉM

2. OPTIKA

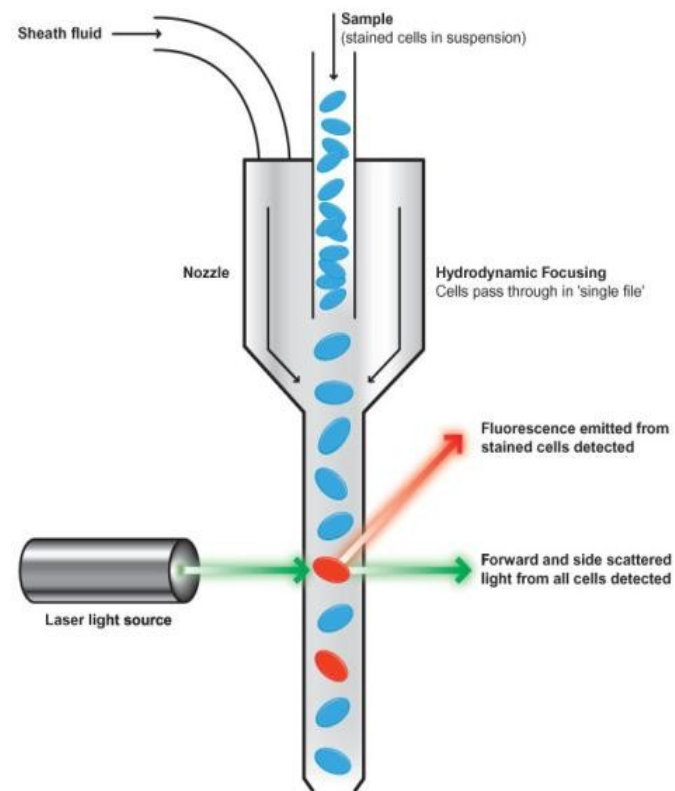
3. ELEKTRONIKA



1. FLUIDNÍ SYSTÉM

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

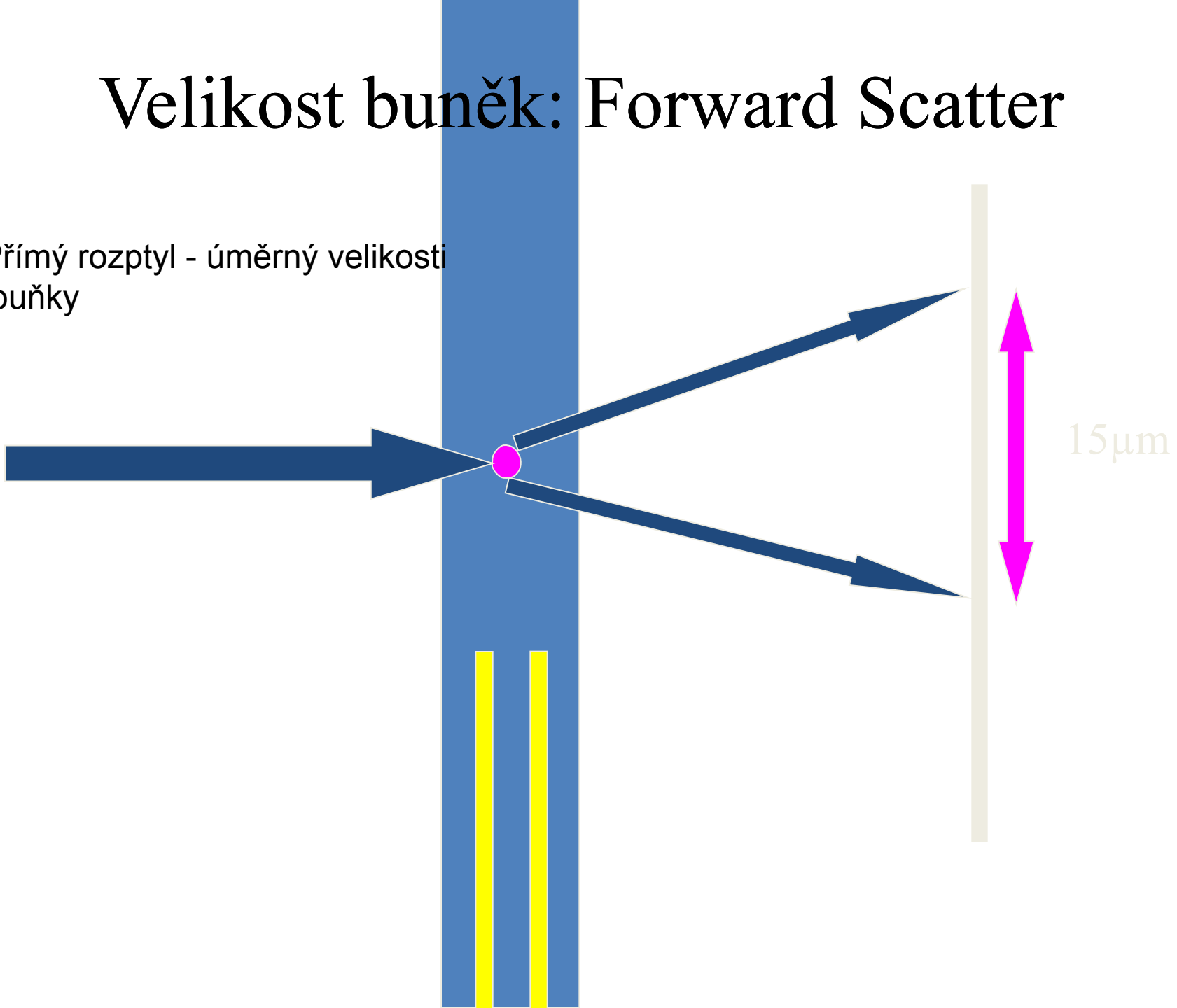
na základě hydrodynamické fokusace - nosná tekutina (destil. voda, komerční tekutiny) bývá do komory přinášena tenkou kapilárou pod větším tlakem než suspenze částic, které jsou tak udržovány jen v úzké centrální části proudu. Zrychlení vznikající při výstupu vodního paprsku z komůrky nutí částice pohybovat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



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

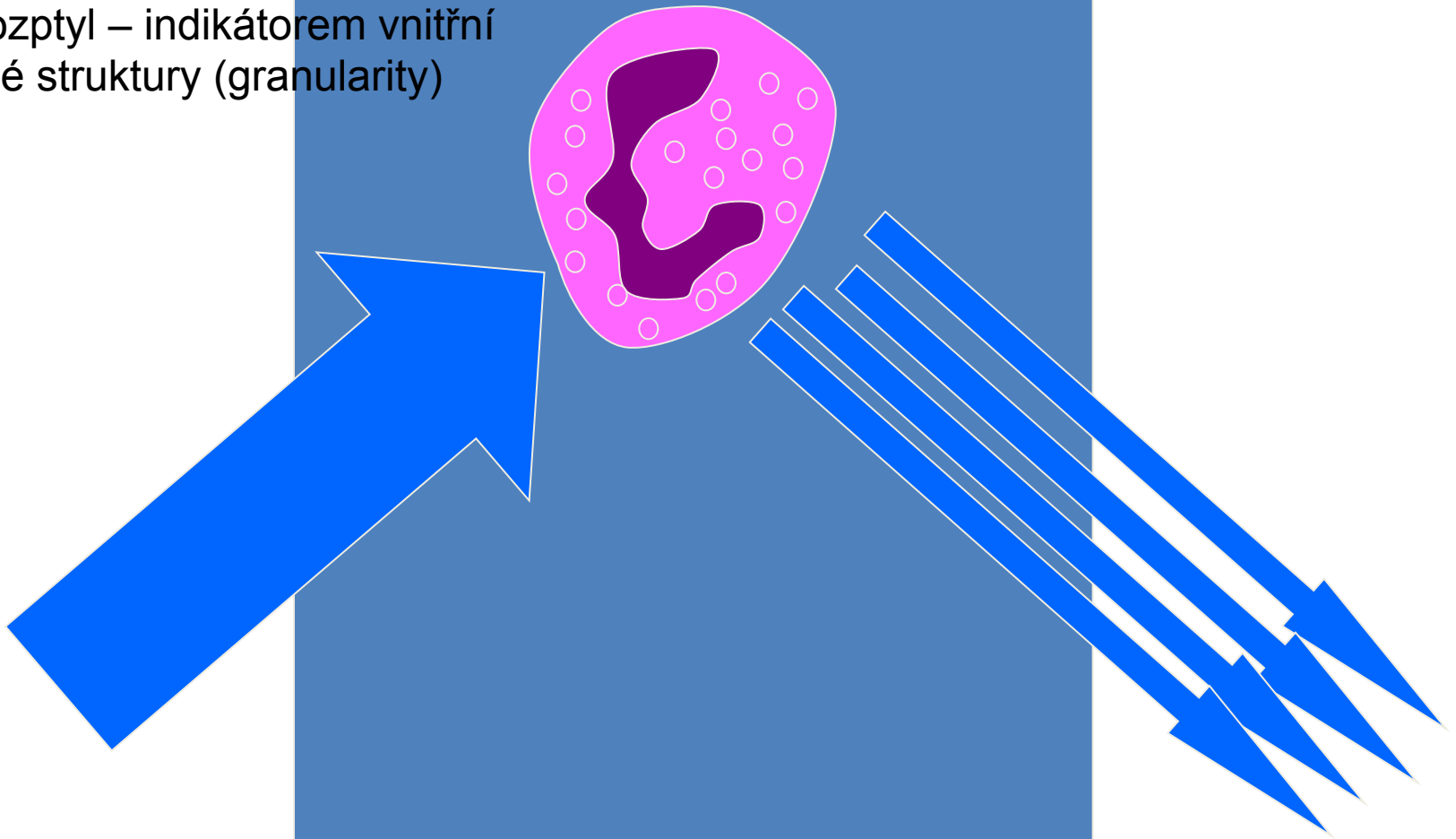
Velikost buněk: Forward Scatter

Přímý rozptyl - úměrný velikosti
buňky



Granularita buněk: Side Scatter

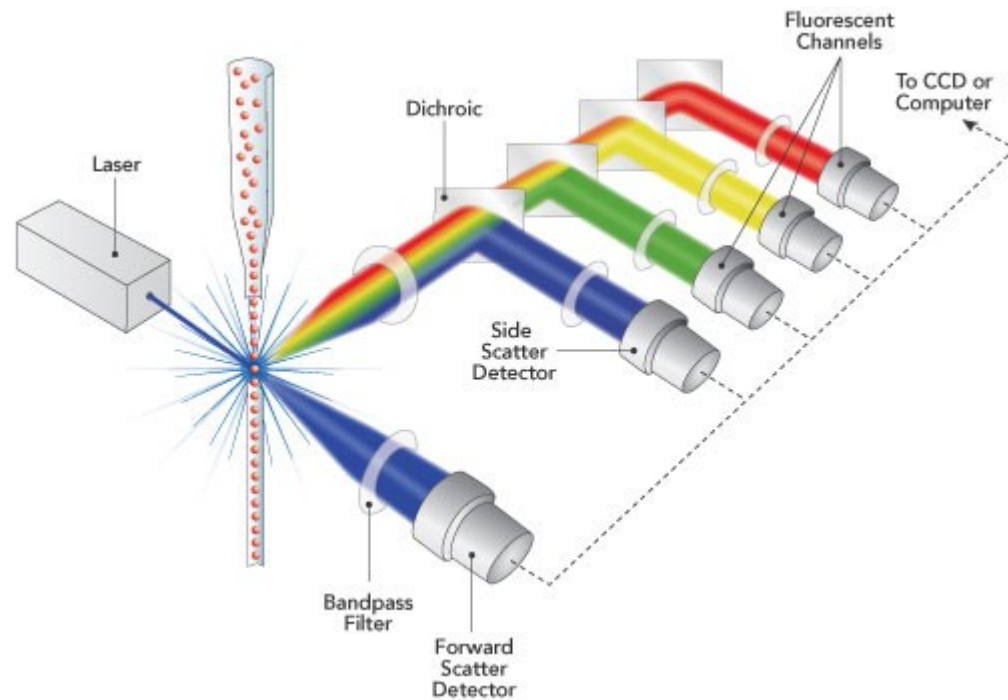
Boční rozptyl – indikátorem vnitřní buněčné struktury (granularity)



2. OPTIKA

Excitační část – laser

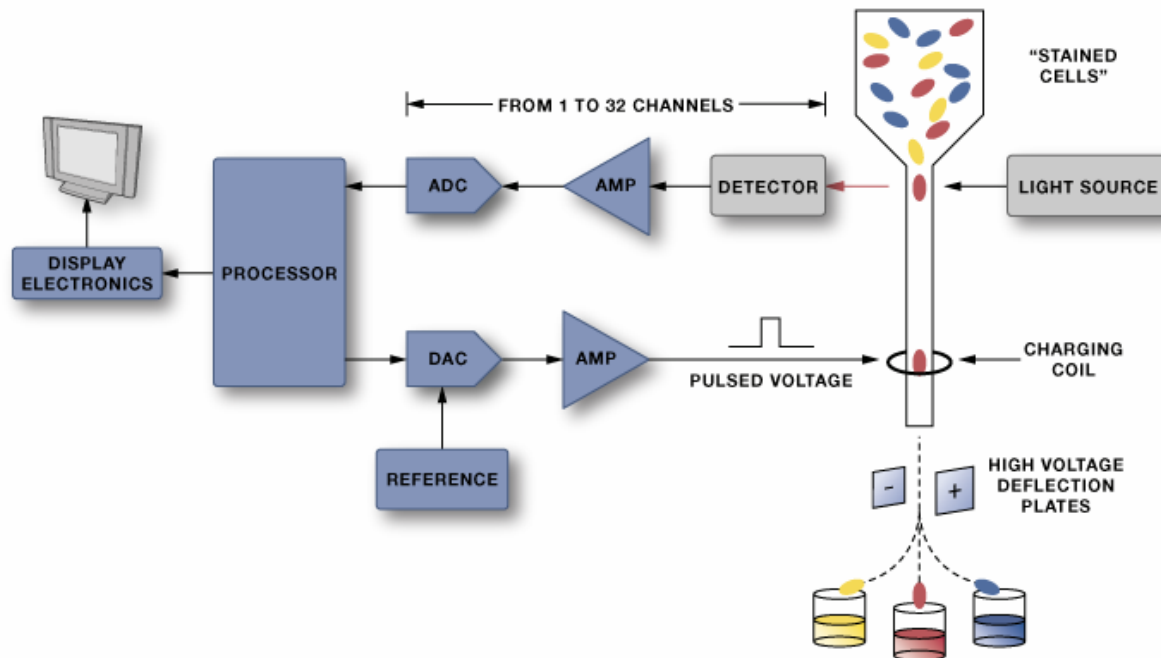
Sběrná část – systém čoček, zrcadel a optických filtrů zachycující fluorescenci částic vyzářenou po jejich projití světelným paprskem



3. ELEKTRONIKA

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

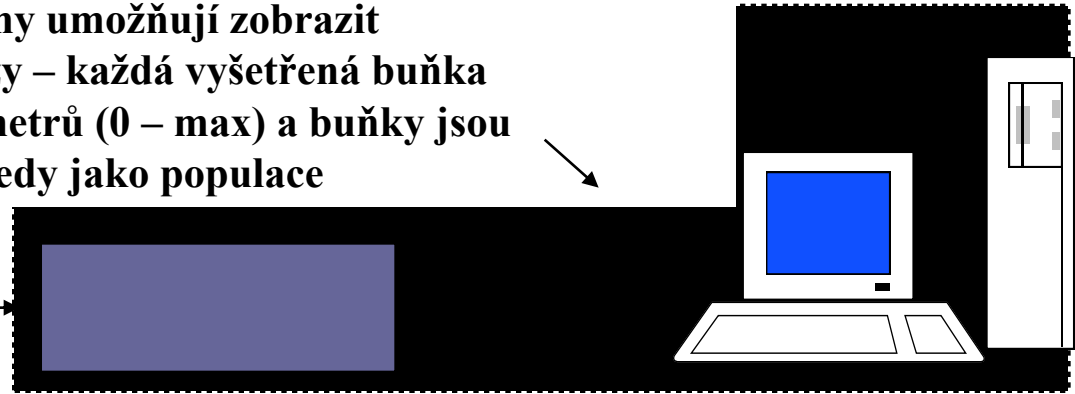
Po zesílení signálu a dalším zpracování dojde k jeho digitalizaci pro počítačovou analýzu



Průtokový cytometr

Speciální počítačové programy umožňují zobrazit a vyhodnotit výsledky analýzy – každá vyšetřená buňka má přiřazené hodnoty parametrů (0 – max) a buňky jsou vyhodnocovány kolektivně, tedy jako populace

(Opto)elektronika převádí optický signál na elektrický, ten zpracovává a údaje jsou posílány do počítače

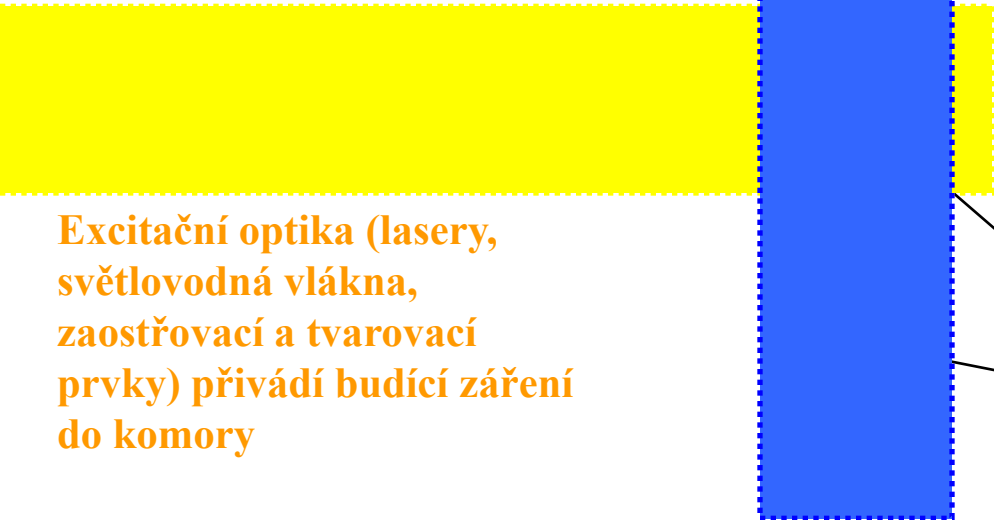


Sběrná optika (čočky, zrcadla, filtry, světlovodná vlákna) třídí světelný signál Podle barvy se světlo a přivádí ho na jednotlivé detektory

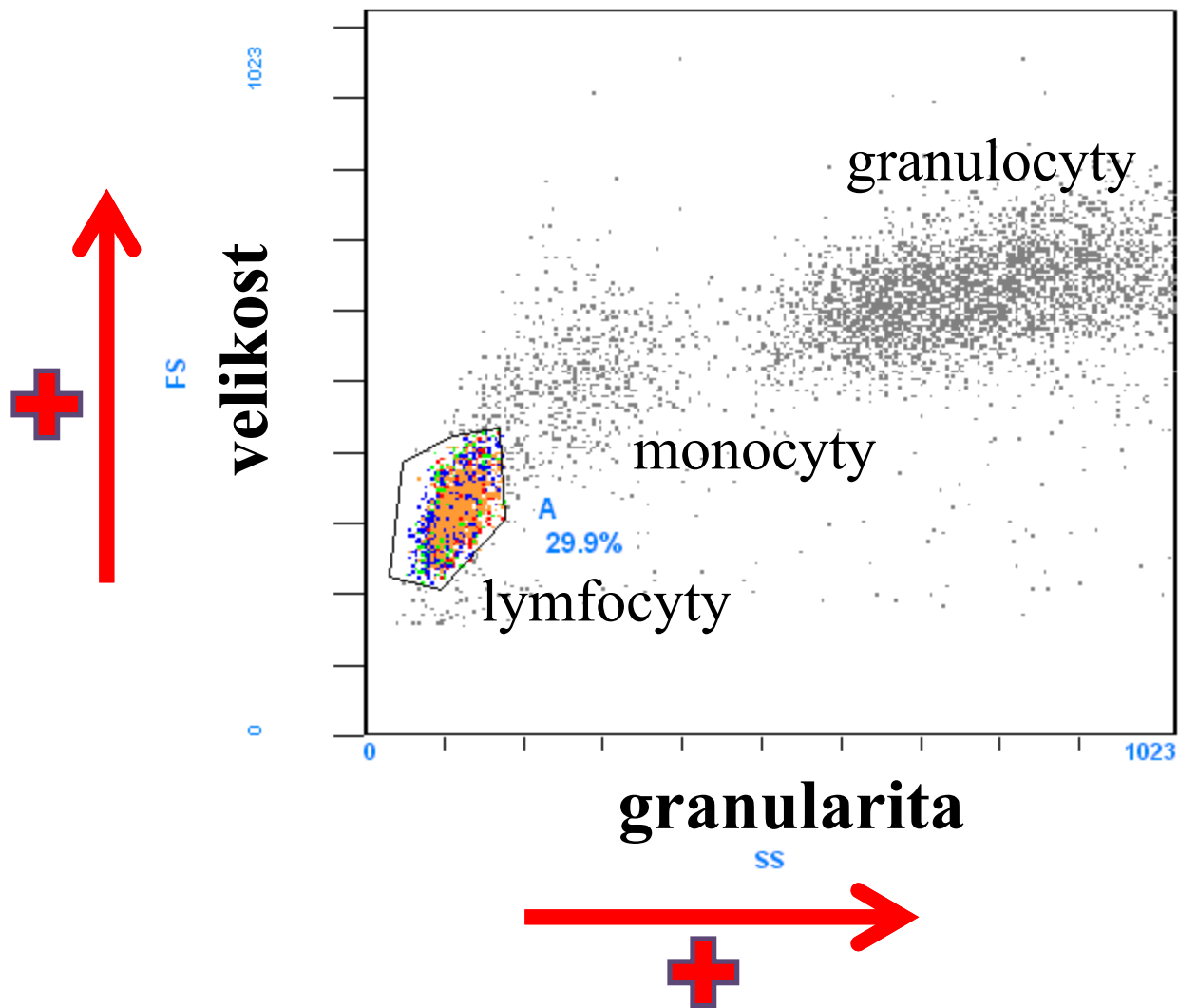
System hnací tekutiny přináší vzorek do komory kde jsou buňky jedna po druhé vyšetřovány laserovým paprskem

Zkumavka se suspenzí buněk

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



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



Fluorescence

Fluorochromy:

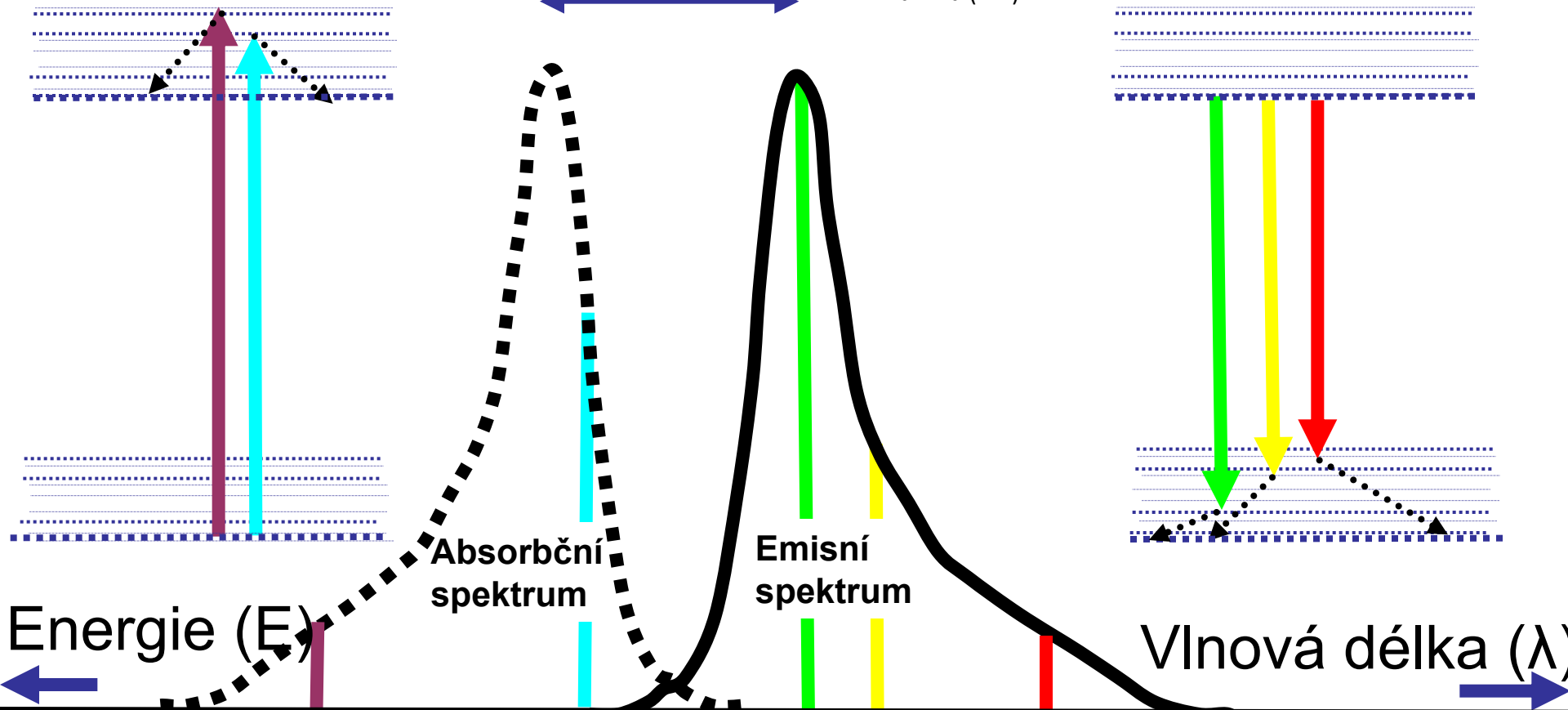
- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
 - Fluorescein isothiokyanát (FITC)**, Cyaniny, Texas Red, řada Alexa, řada Pacific and Cascade,
AmCyan, *Propidium iodide*, 7-AAD, CFSE,
- Fluorescenční proteiny
 - Phycoerythrins (PE)**, Allophycocyanin, PerCP, GFP a jiné fluorescenční proteiny

***Schopné absorbovat fotony budícího záření (např. 488 nm)
a následně (10^{-8} s) emitovat fotony s
delší vlnovou délkou (v tomto případě 500 – 800 nm).
Fluorescenční světlo má tedy jinou barvu***

Fluorescence

Barva pohlceného a vyzářeného světla se liší

Stokesův posuv - rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima (nm)



Energie (E)

Absorbční spektrum

Emisní spektrum

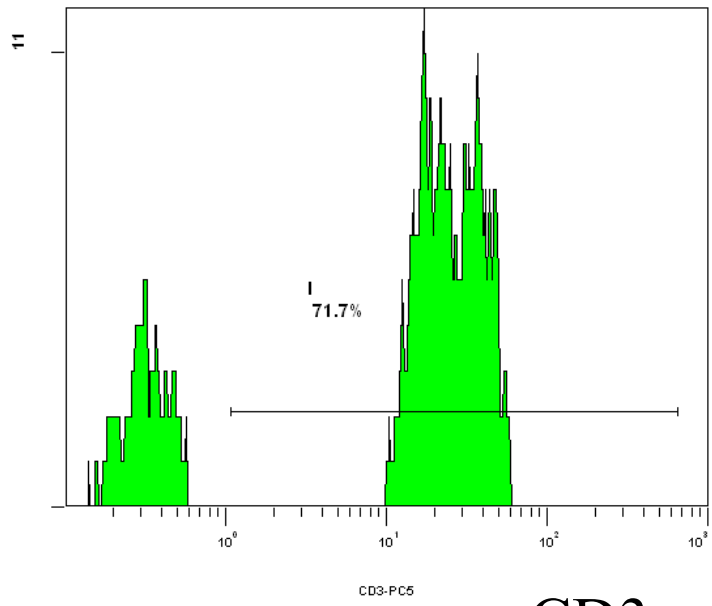
Vlnová délka (λ)

Část energie se přemění na energii vibrační

Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

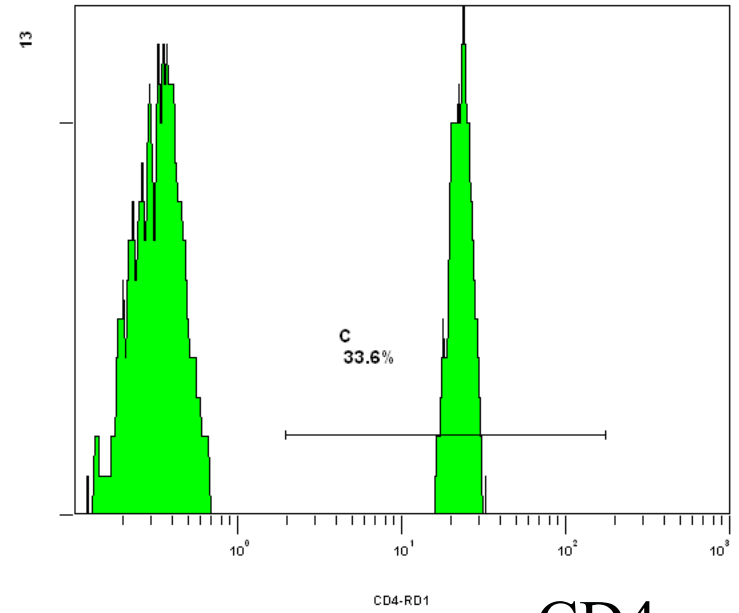
$$E = h \cdot c / \lambda$$

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

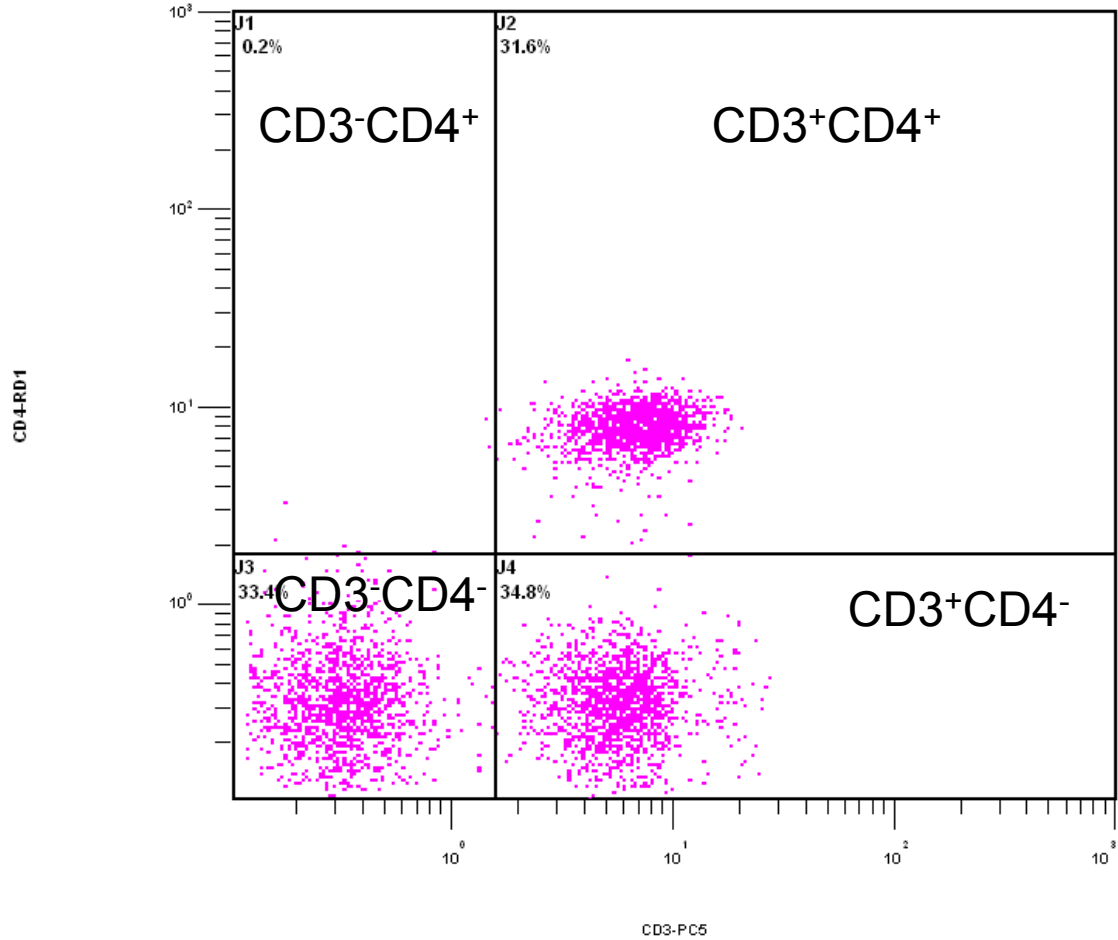


CD3

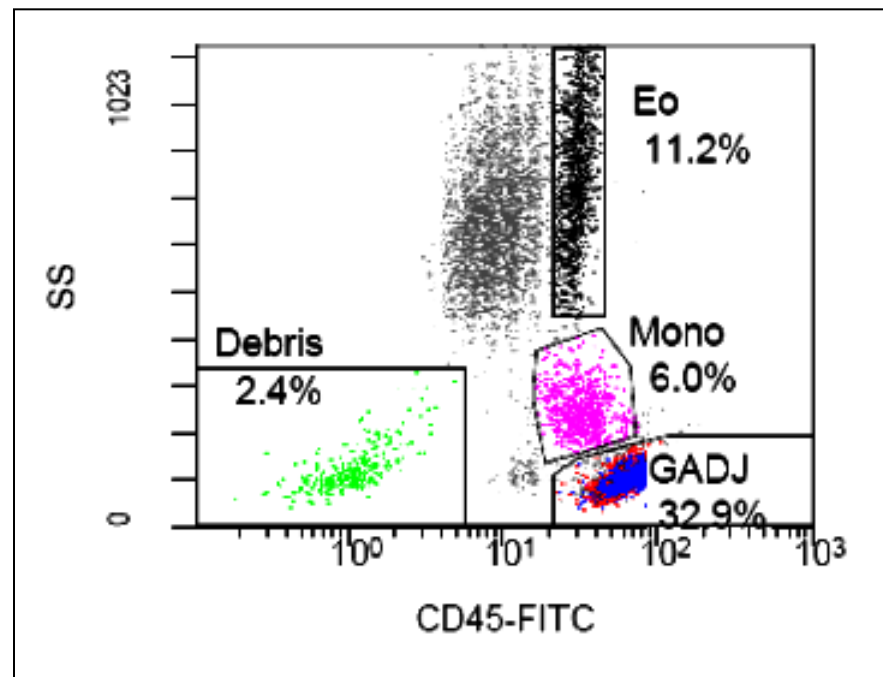
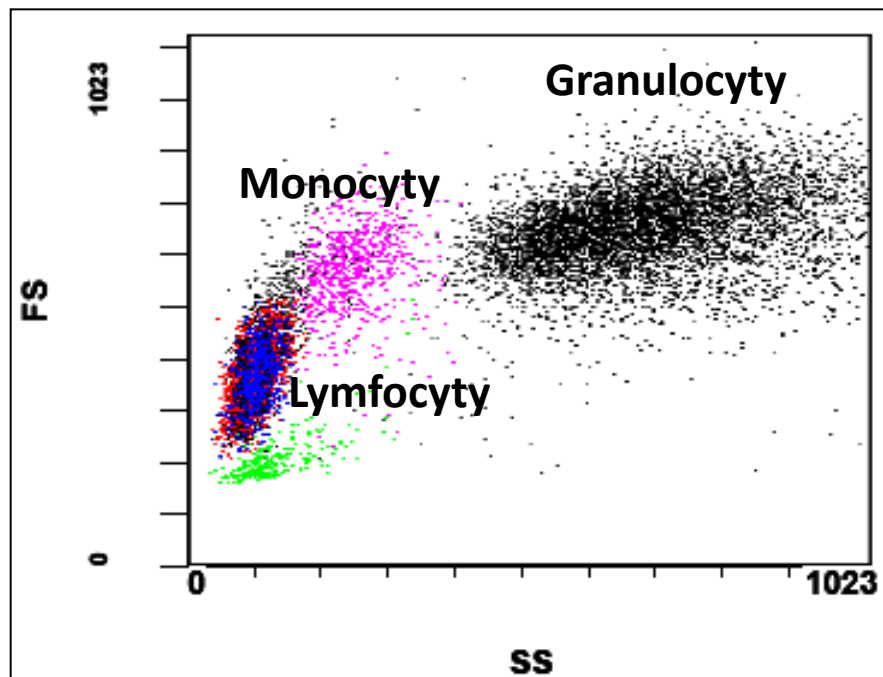
[F1][A] 20051674.LMD : FL2 LOG



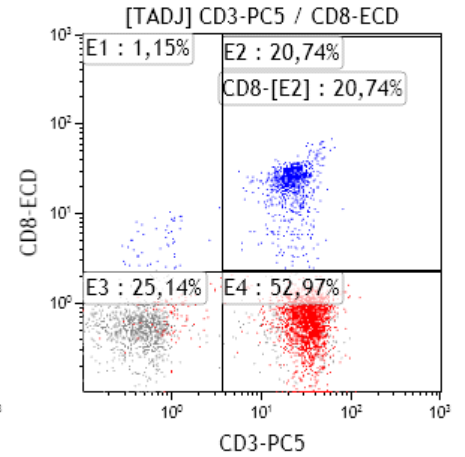
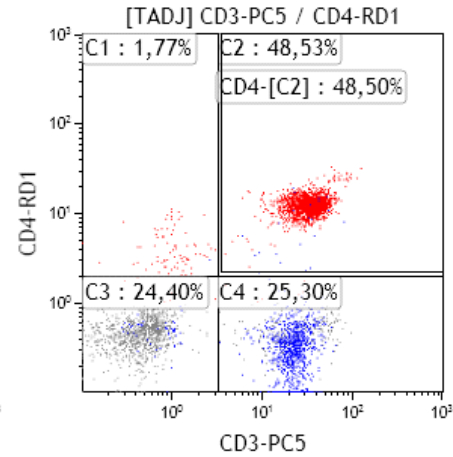
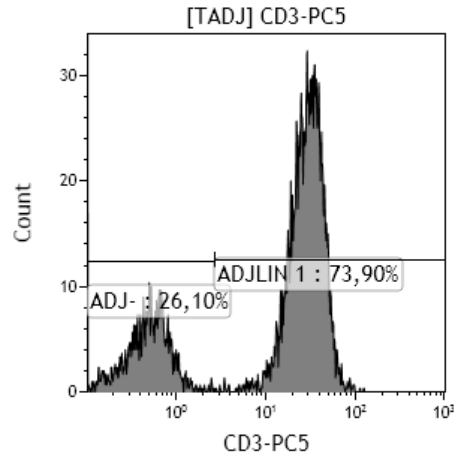
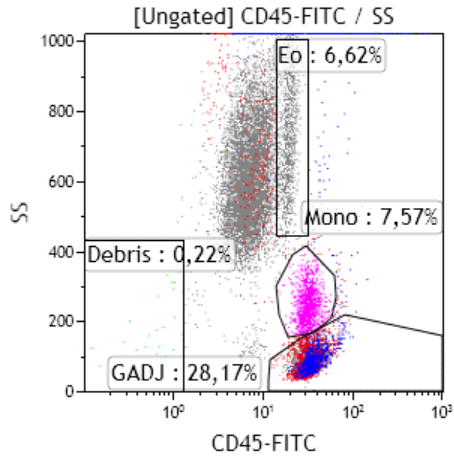
CD4



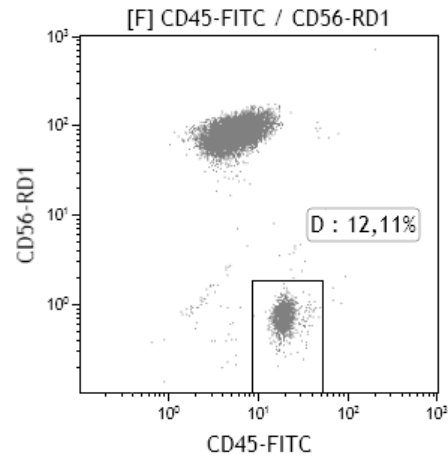
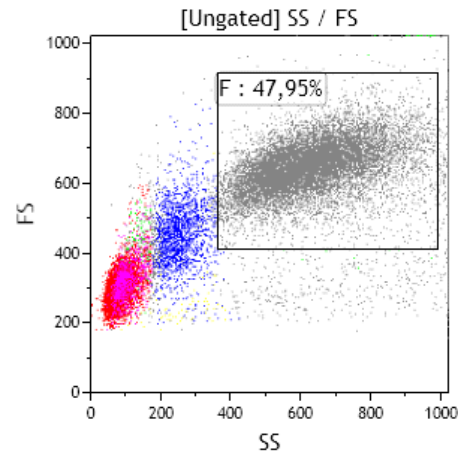
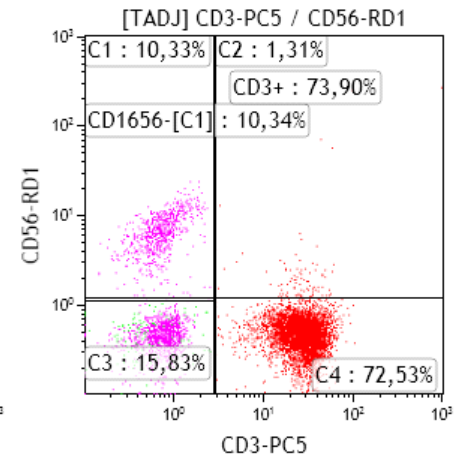
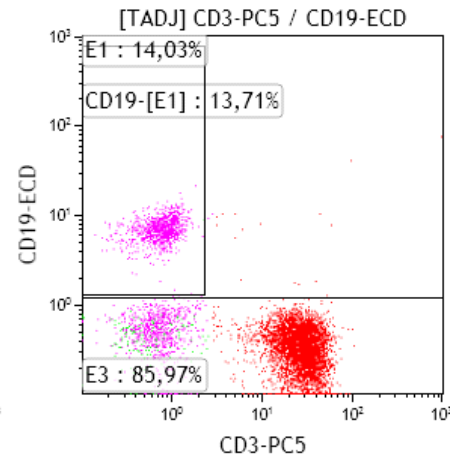
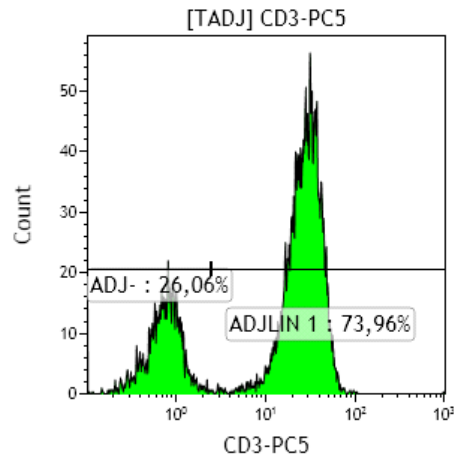
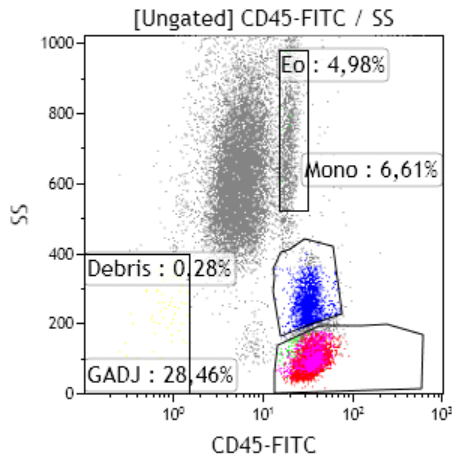
Krevní diferenciál



Zkumavka A



Zkumavka B



Vyšetření lymfocytů periferní krve

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

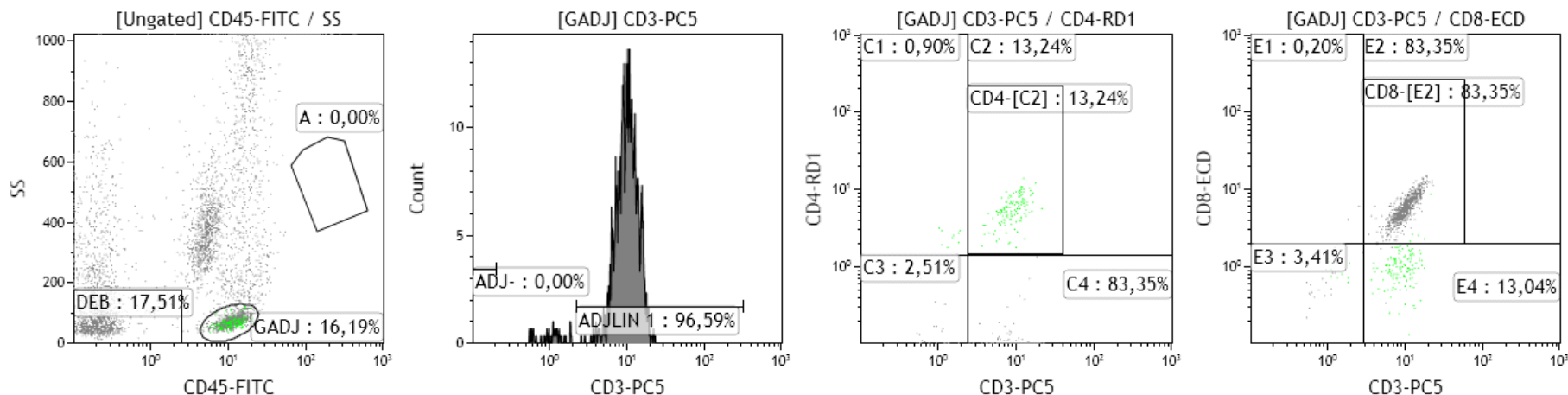
Hodnocení nálezu jednotlivých subpopulací

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

Příklady využití průtokové cytometrie v praxi

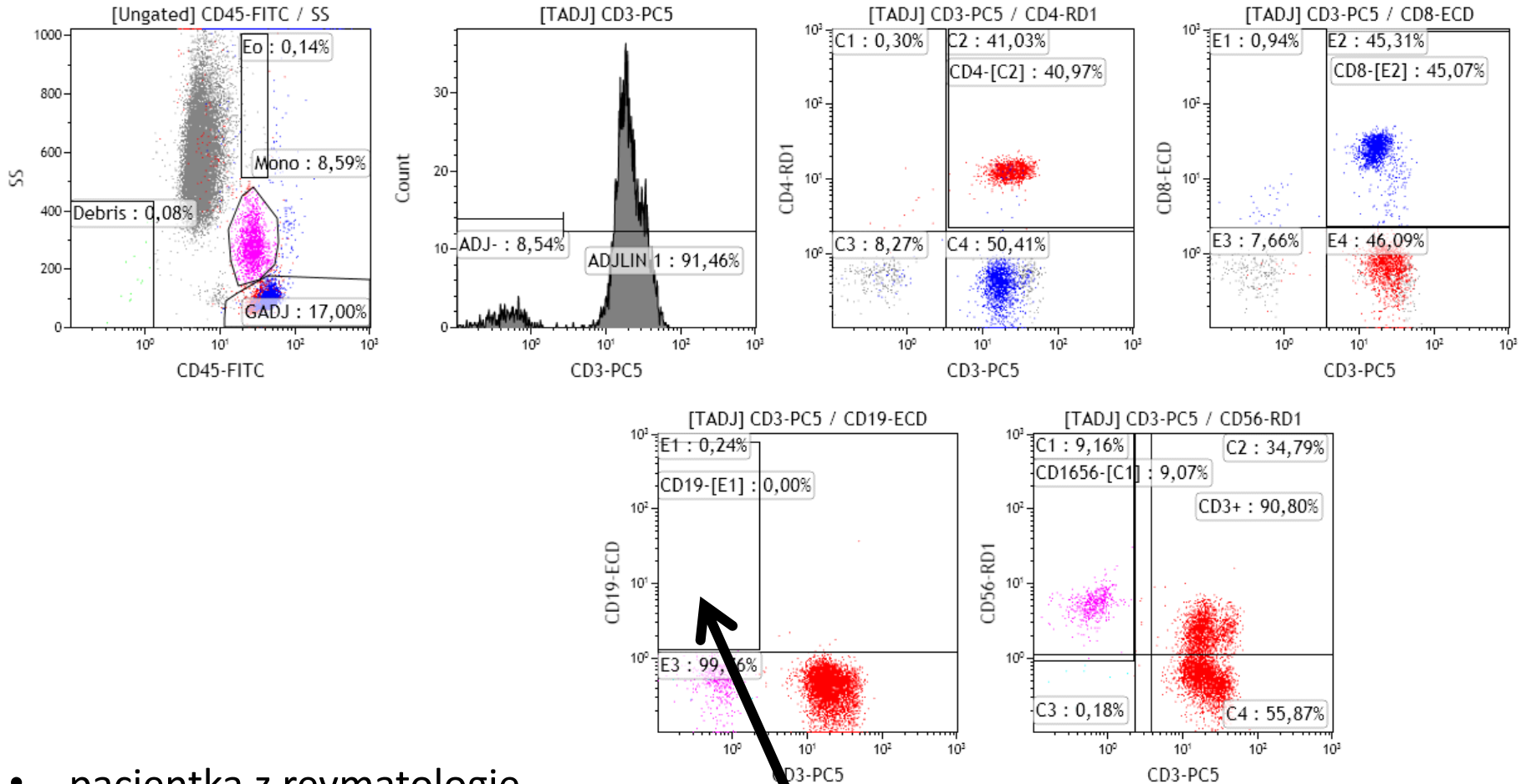
Bronchoalveolární laváž (BAL)

- imunofenotypizace



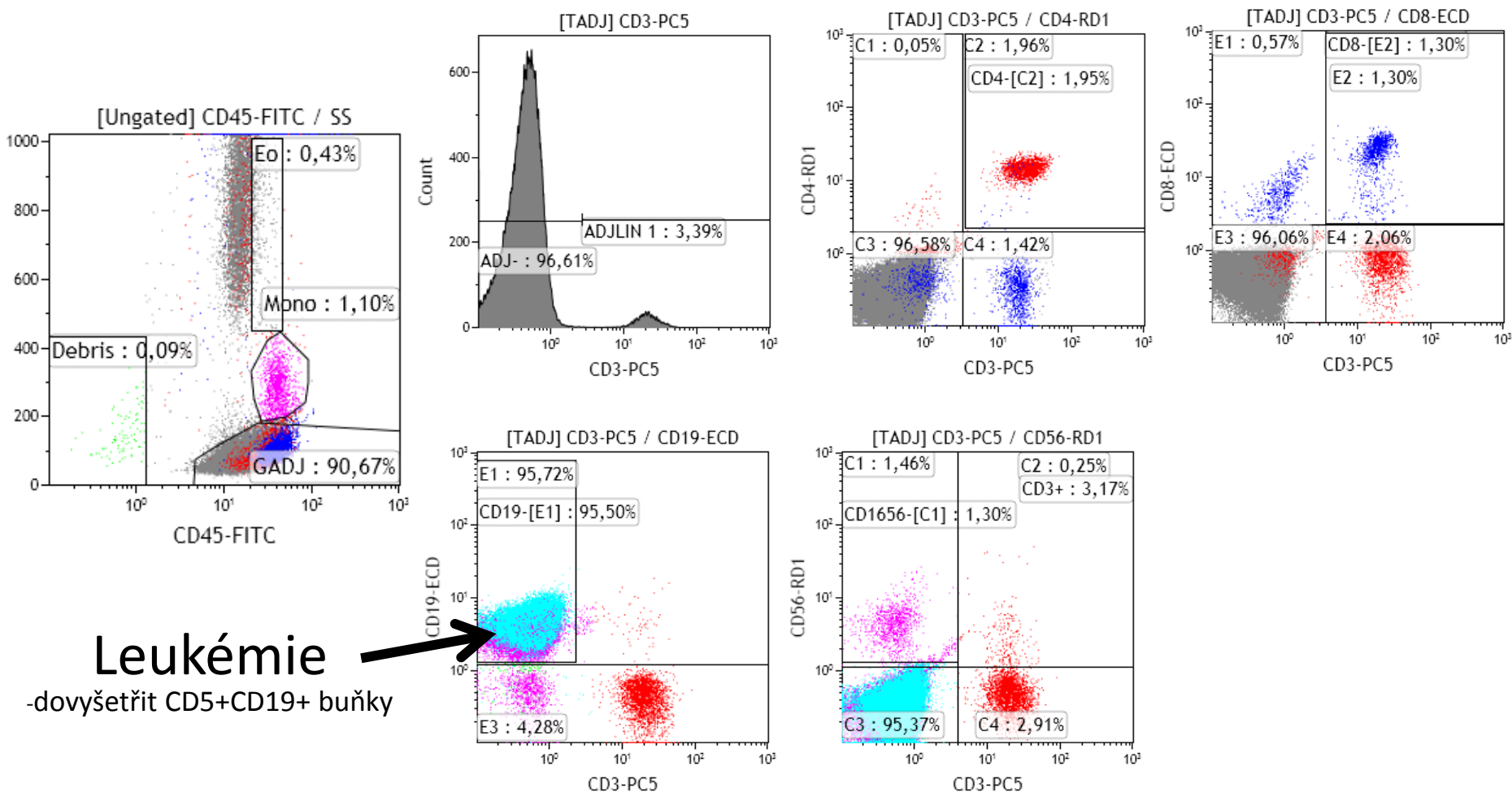
při převráceném poměru CD4+/CD8+
- podezření na sarkoidózu

Pacientka: Ž, *1957

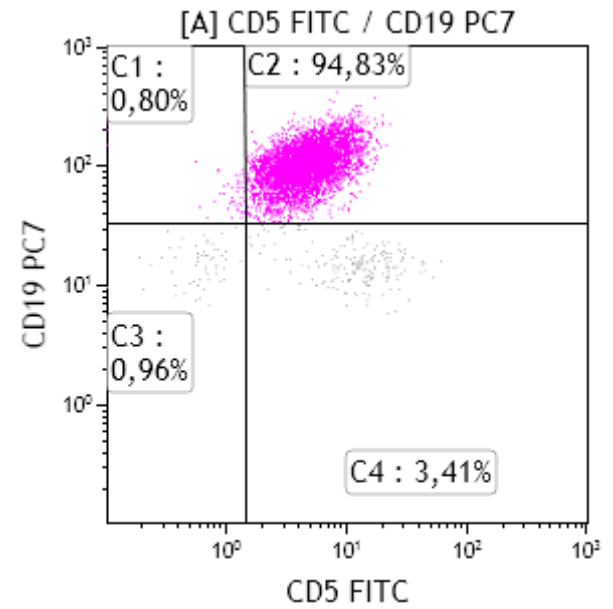
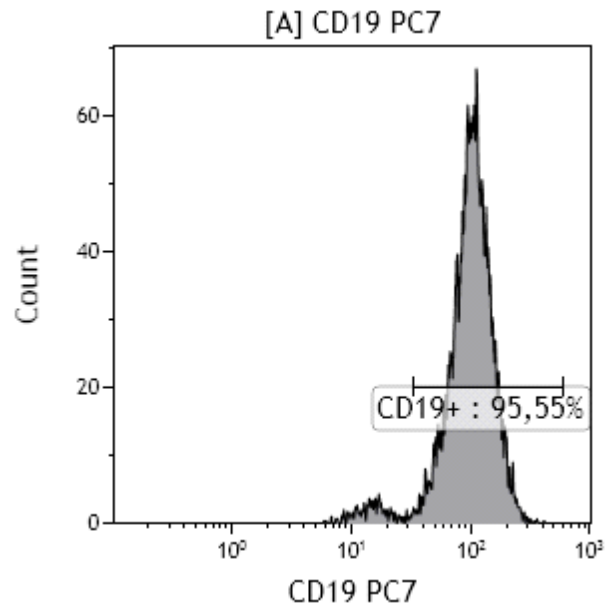
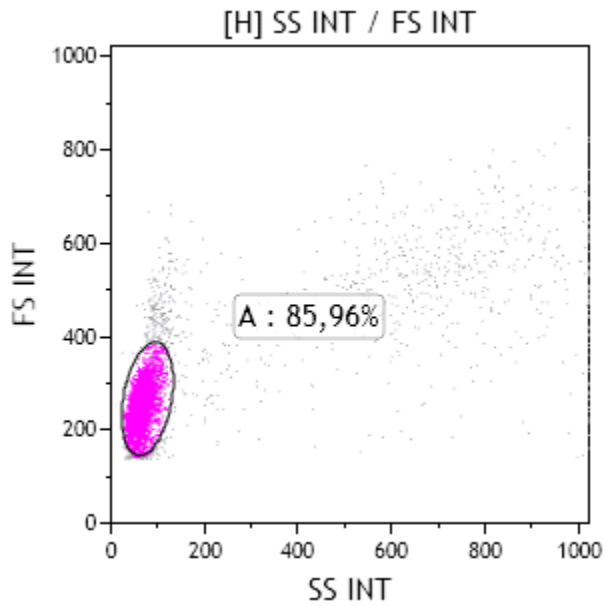


- pacientka z revmatologie
- léčba např. rituximabem způsobuje depleci B-lymfocytů (po 4-6 měsících návrat k normálním hladinám)

Pacient: muž, * 1966

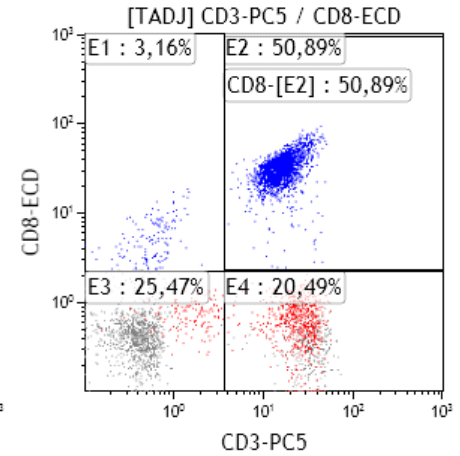
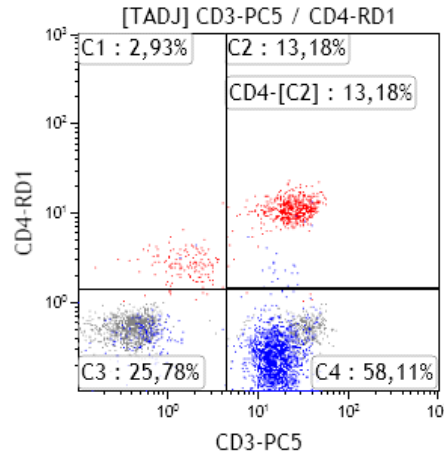
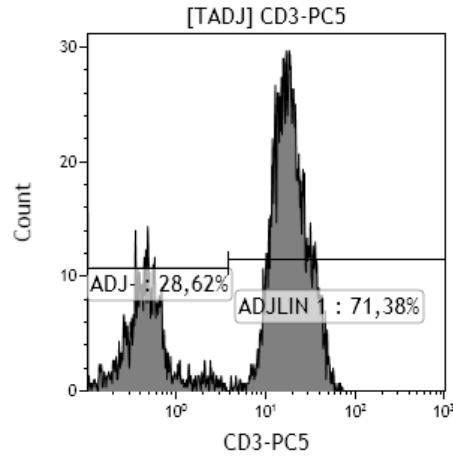
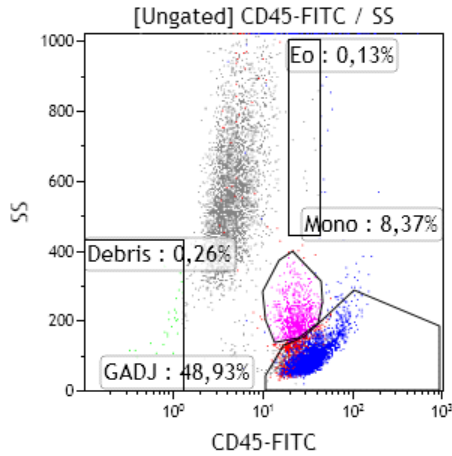


CD5+CD19+



CD5+CD19+ : 94.8%

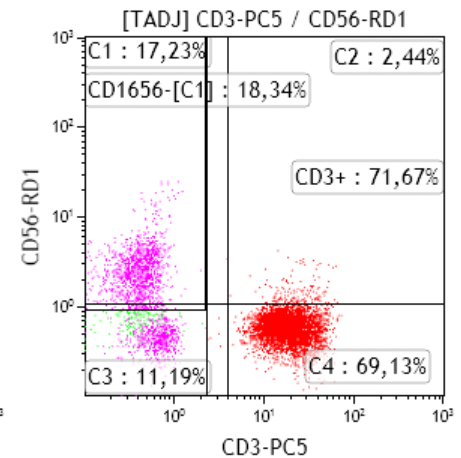
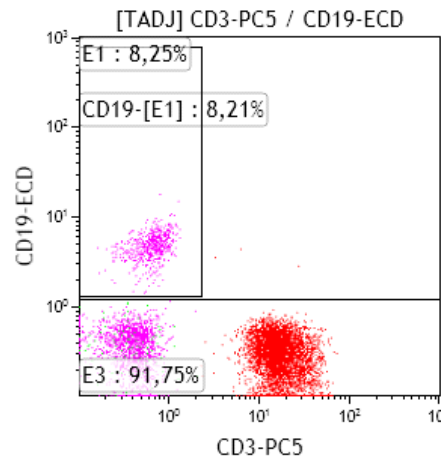
Pacient: M, *1999



**převrácený poměr
CD4/CD8!**

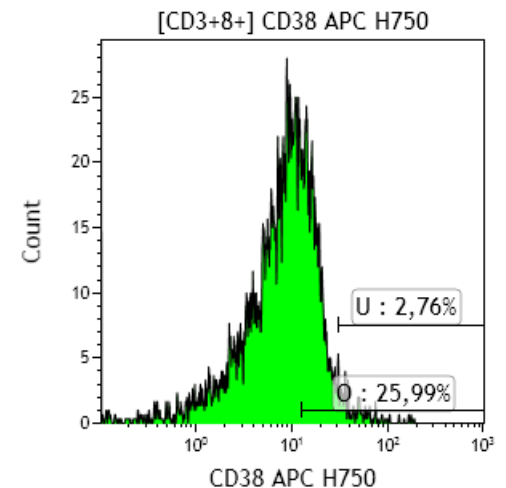
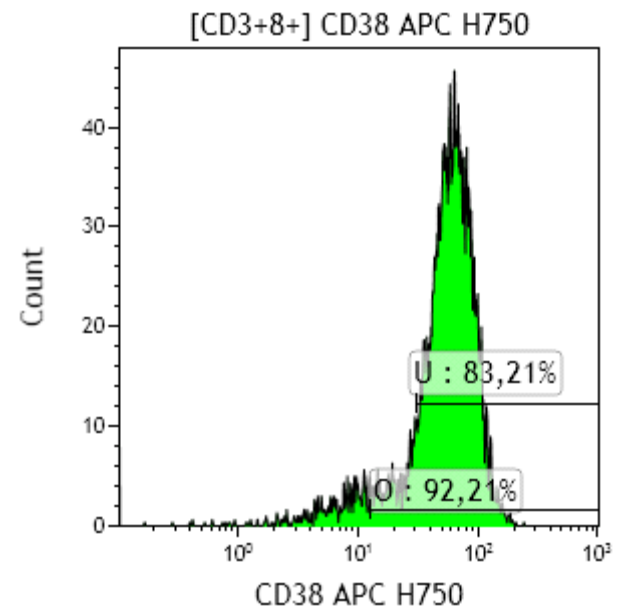
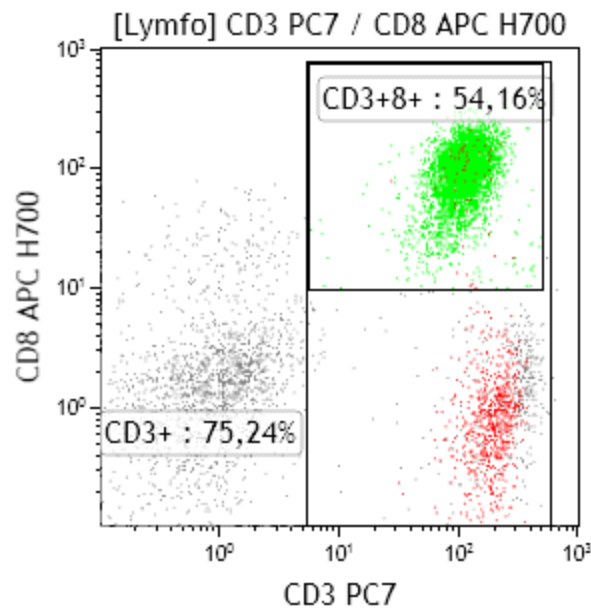
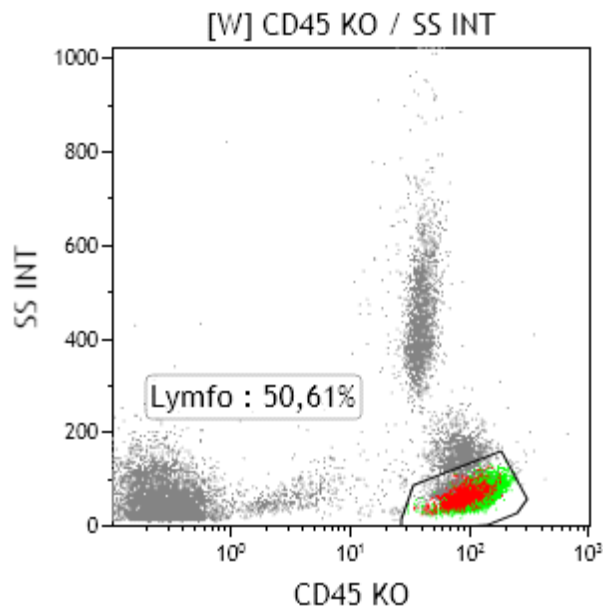
CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

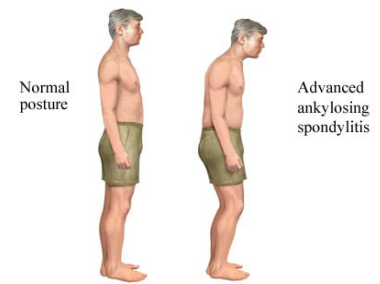


virová infekce???

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

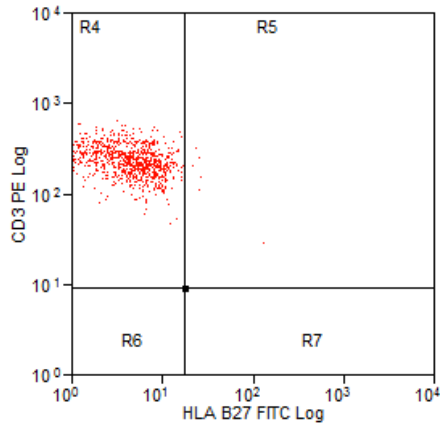


HLA-B27

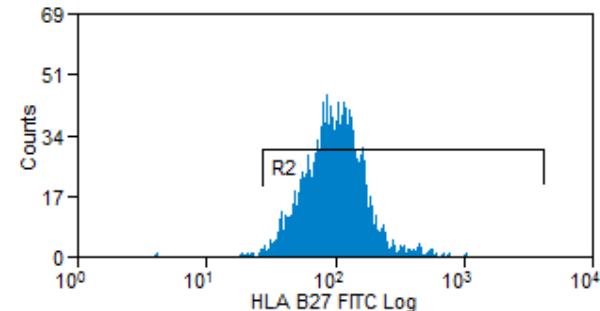
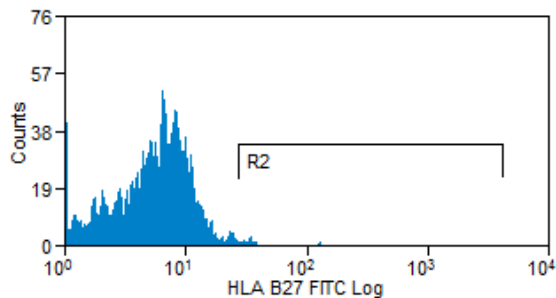
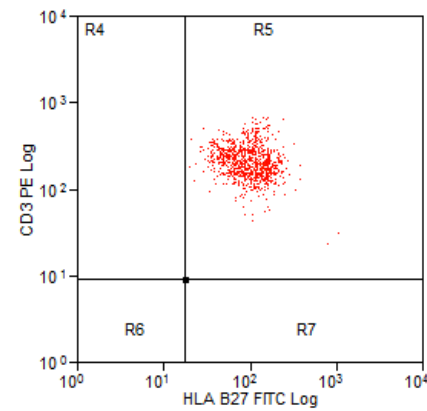


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida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

negativní



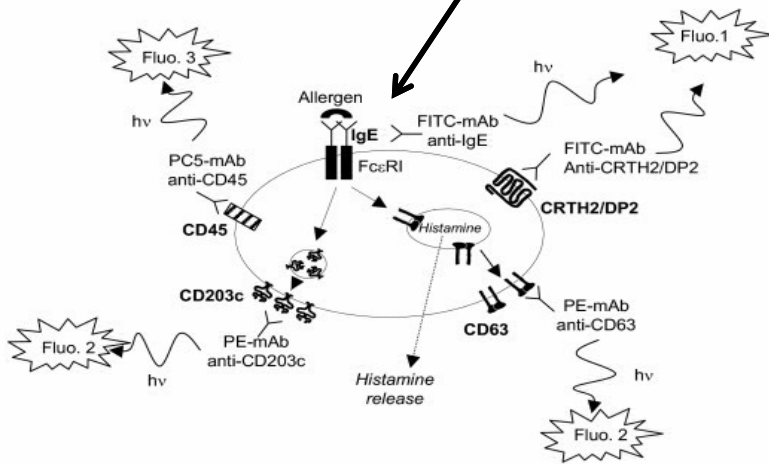
pozitivní



Test aktivace bazofilů (bazotest)

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

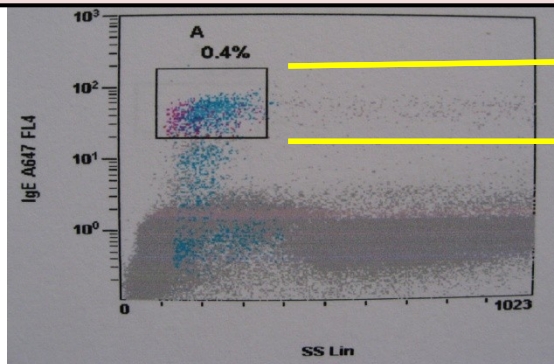
na povrchu **bazofilů** - FcεRI (receptor pro **IgE**)
- CD203c



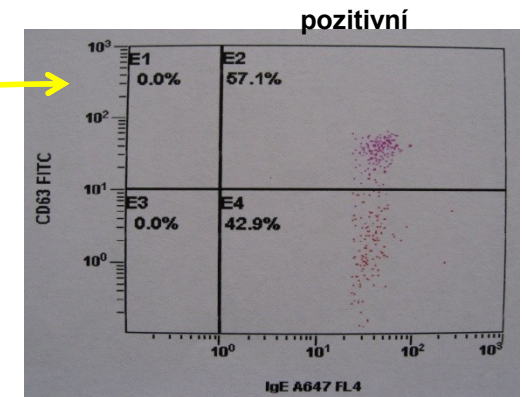
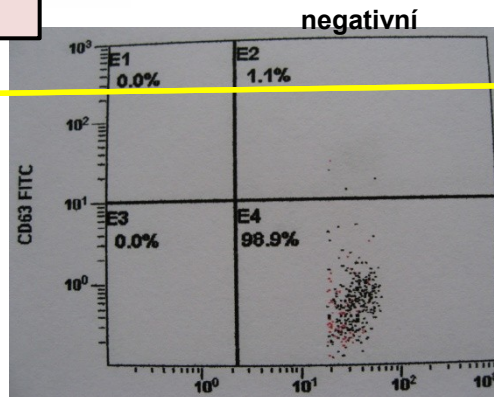
založen na expresi aktivačního znaku (CD63) na povrchu periferních bazofilů po jejich expozici alergenem in vitro

Reakce přecitlivělosti jsou podstatou alergických onemocnění. Reakce přecitlivělosti I. typu neboli **IgE** **mediovaná alergie** - je zprostředkována protilátkami IgE. IgE se naváže na bazofily ve fázi senzibilizace. Při dalším setkání s alergenem – alergen přemostí IgE, to vede k aktivaci bazofilů - masivnímu uvolnění produktů degranulace bazofilů a mastocytů → **zvýšená exprese CD63 a CD203c** na aktivovaných bazofilech.

ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)



Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů





DĚKUJI ZA POZORNOST!