

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

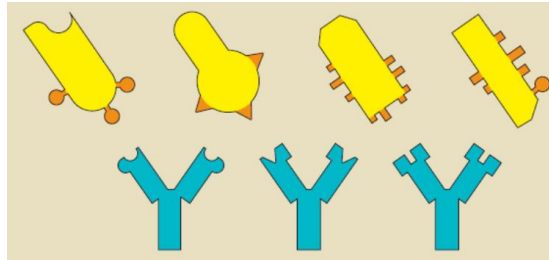


Eosinophil



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

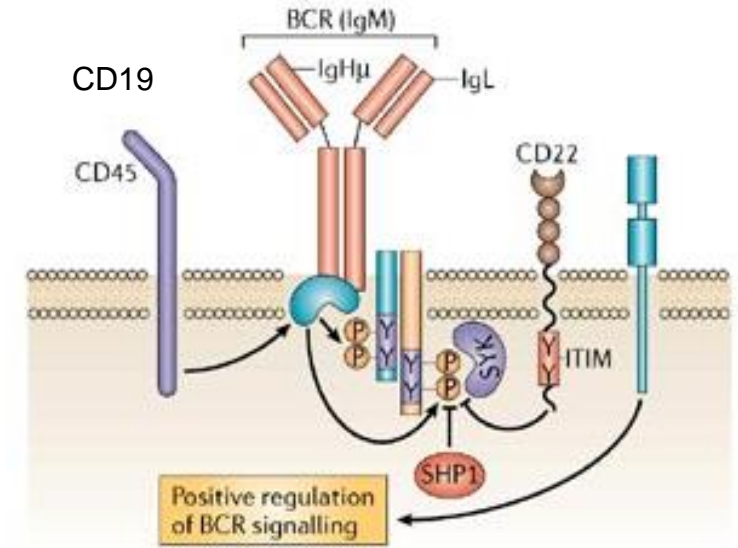
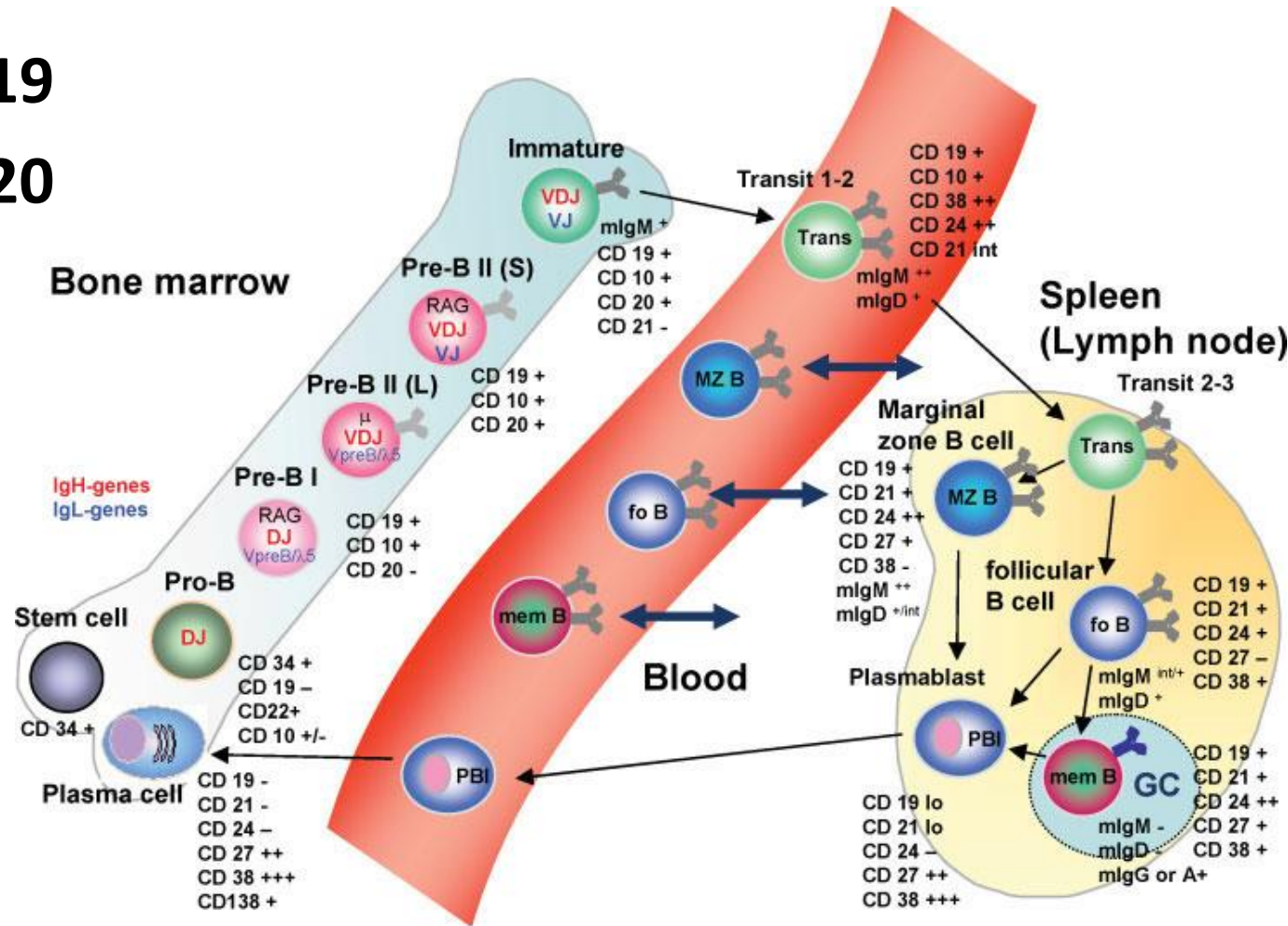
Cluster Designation (Cluster of Differentiation)

- *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



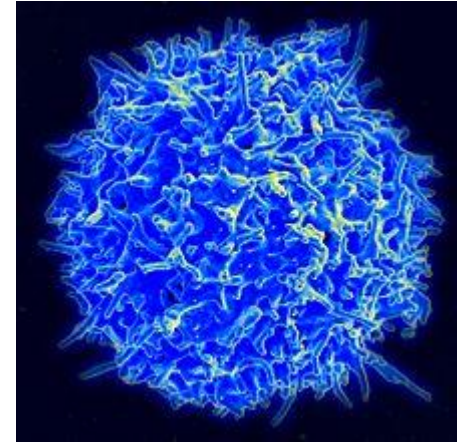
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

7-23 %

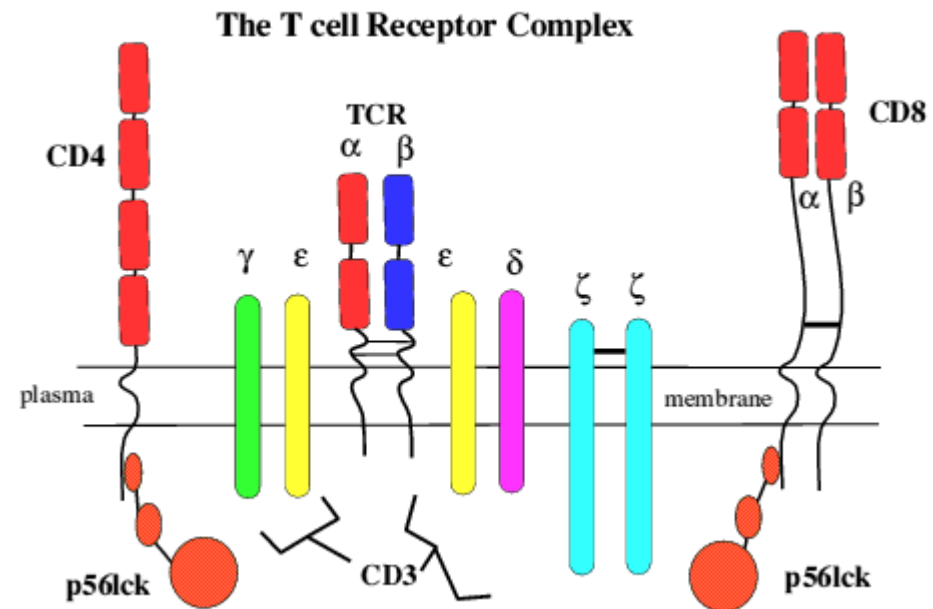
(Warnatz K, Schlesier M 2008)

T lymfocyty

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



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

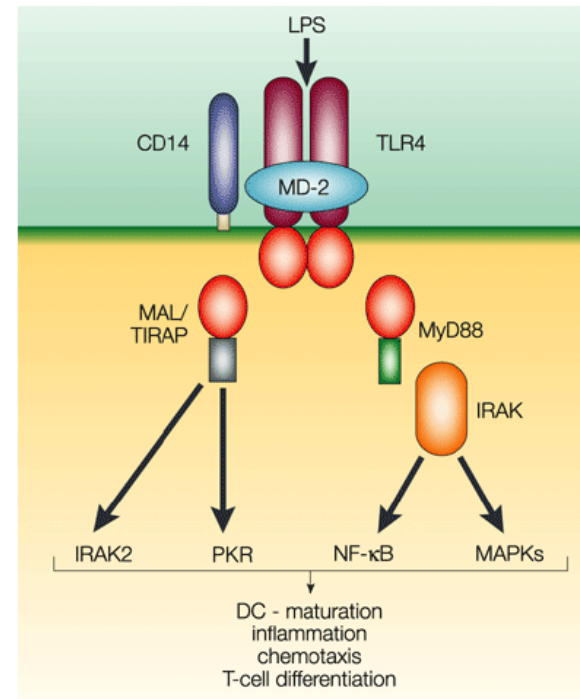
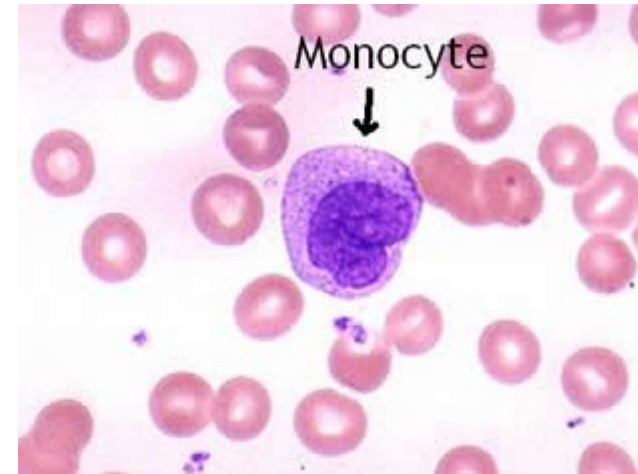


Monocyty

- CD14
- HLA DR

0-10 %

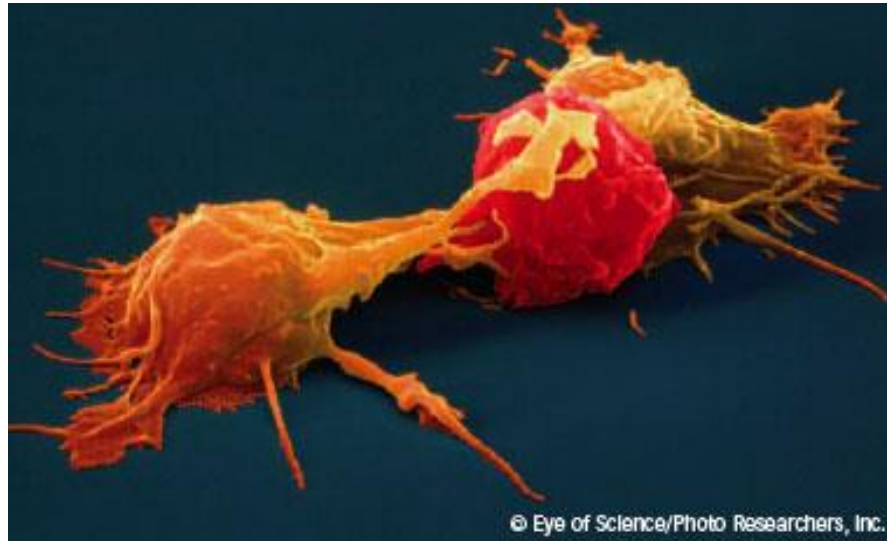
- súčasť nešpecifickej imunity
- schopnosť fagocytózy
- tkanivová forma = makrofág



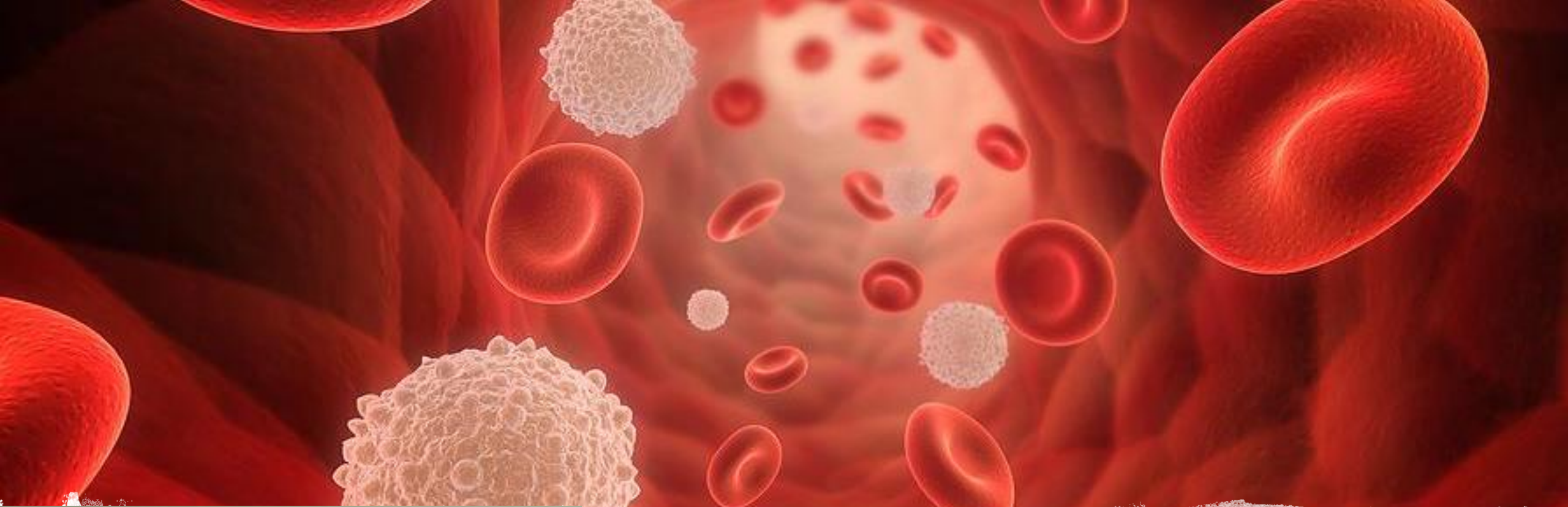
NK bunky

- **CD16⁺**
- **CD56⁺**
- **CD3⁻**

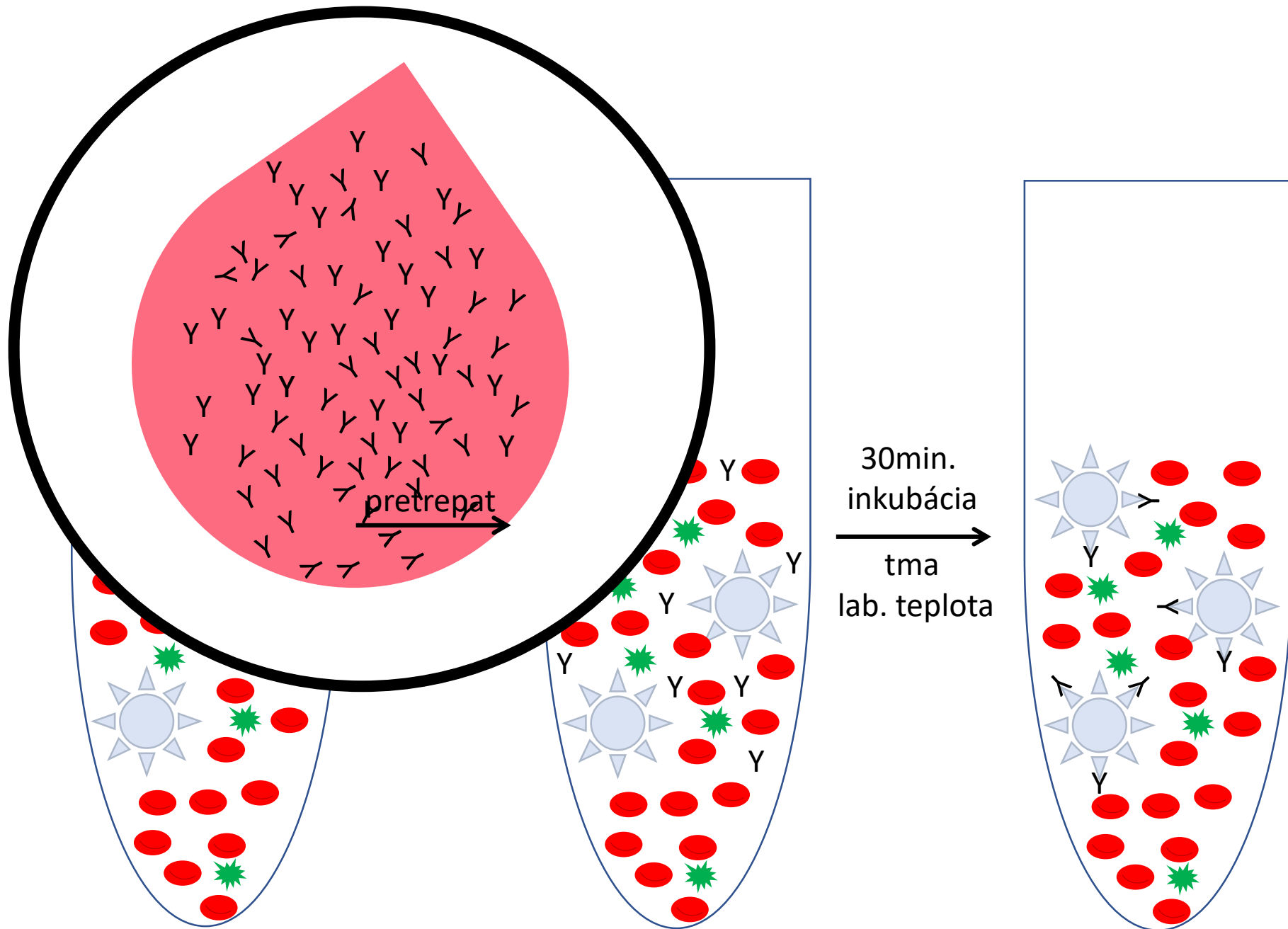
6-20%



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

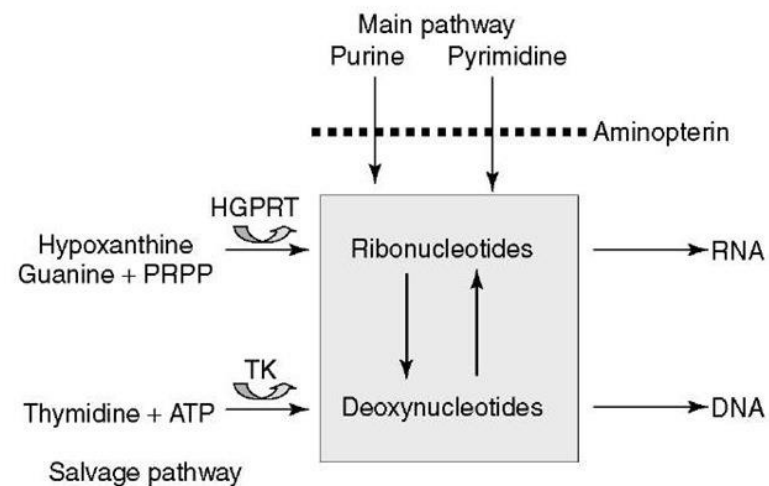
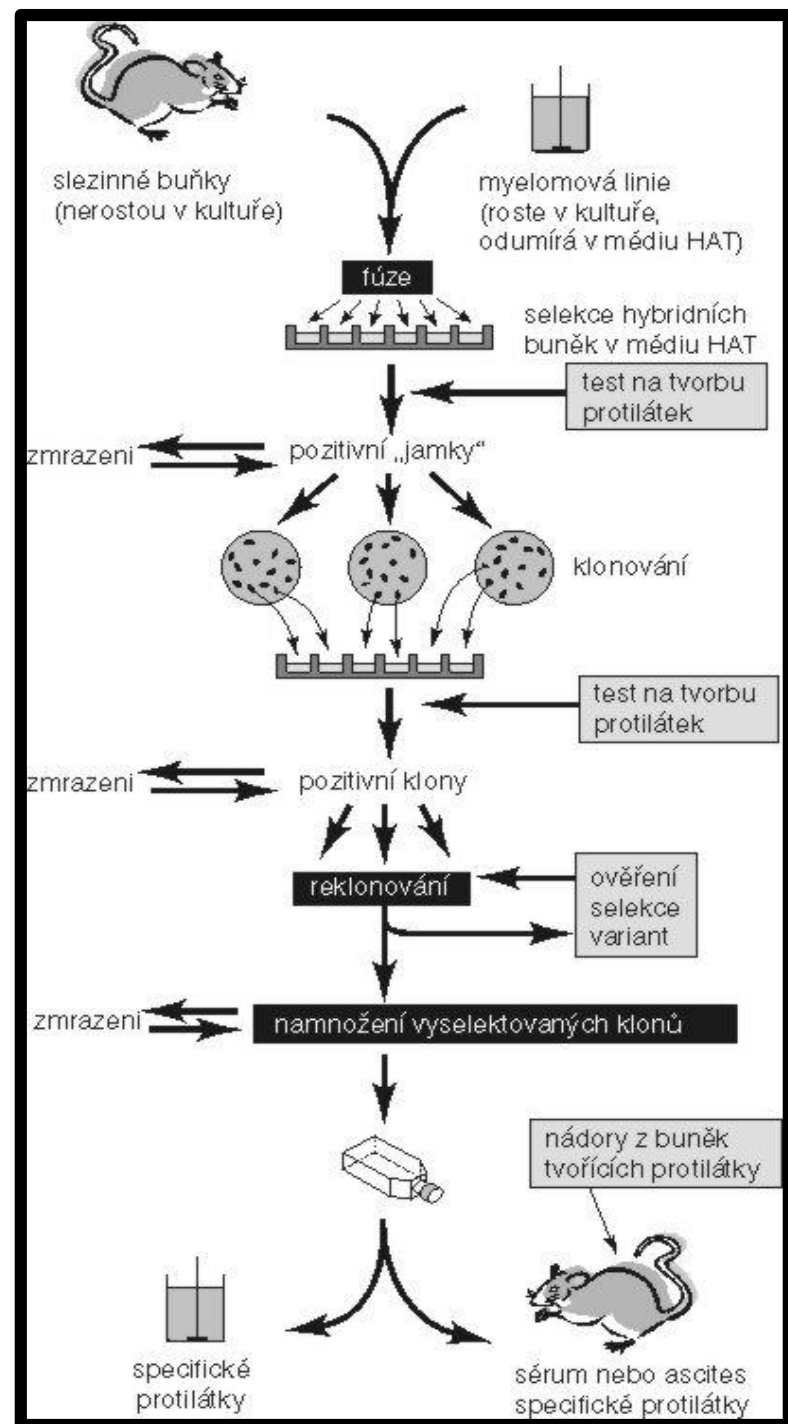


Pre stanovenie **lymfocytárnych subpopulácií**
→ odber krvi do skúmavky s **EDTA**



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

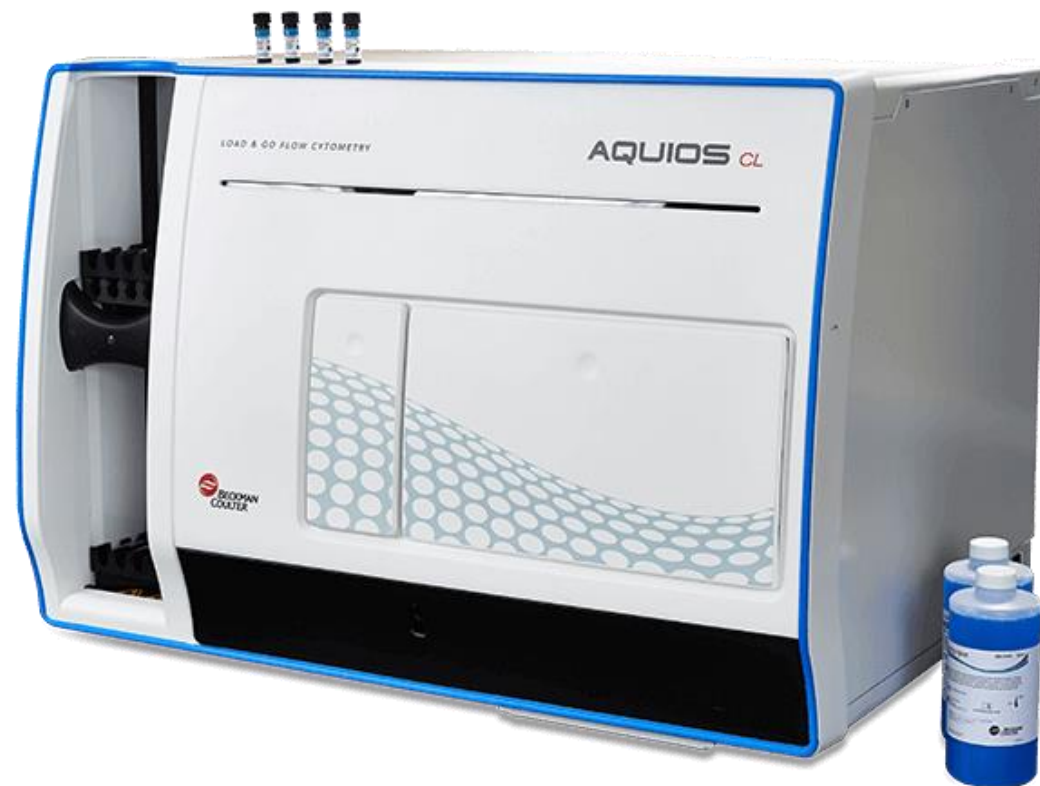


Lýza erytrocytov

- **Roztok A:** 1,5 l destilovanej vody – 1,8 ml 99% kyselina mravenčí
- **Roztok B:** 1,5 l destilované vody 9,0 g bezvodého Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl, 46,95 g bezvodého Na_2SO_4
- **Roztok C:** 1,5 l PBS (pH 7-7,4) – 15 g paraformaldehydu



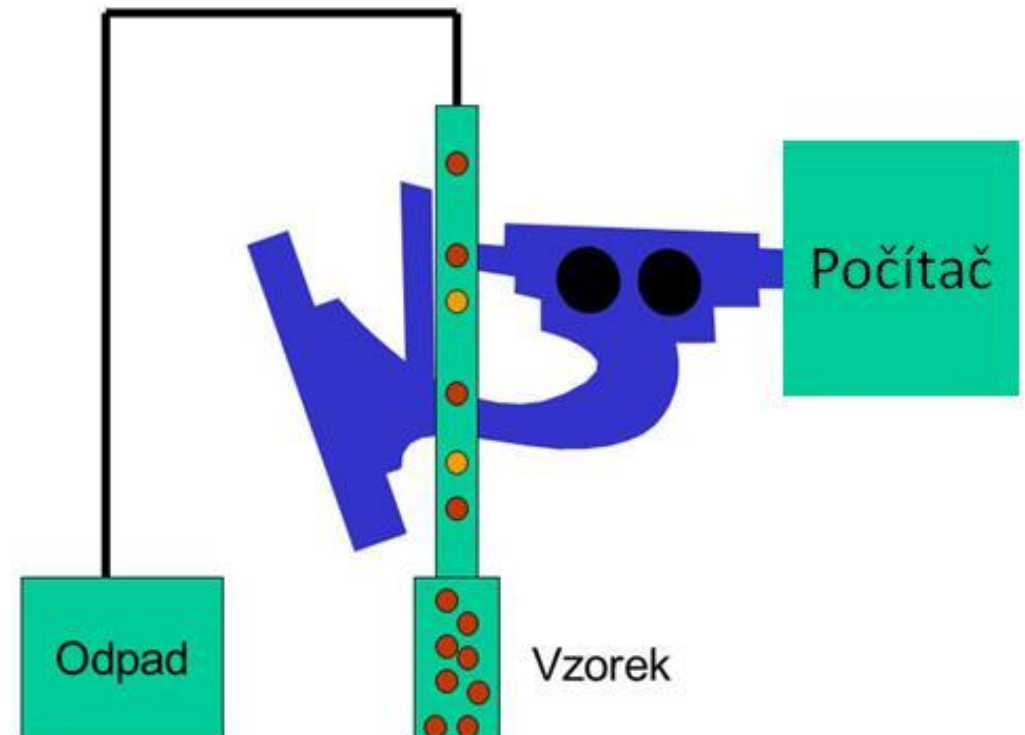
Prietoková cytometria (Flow Cytometry, FACS)



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

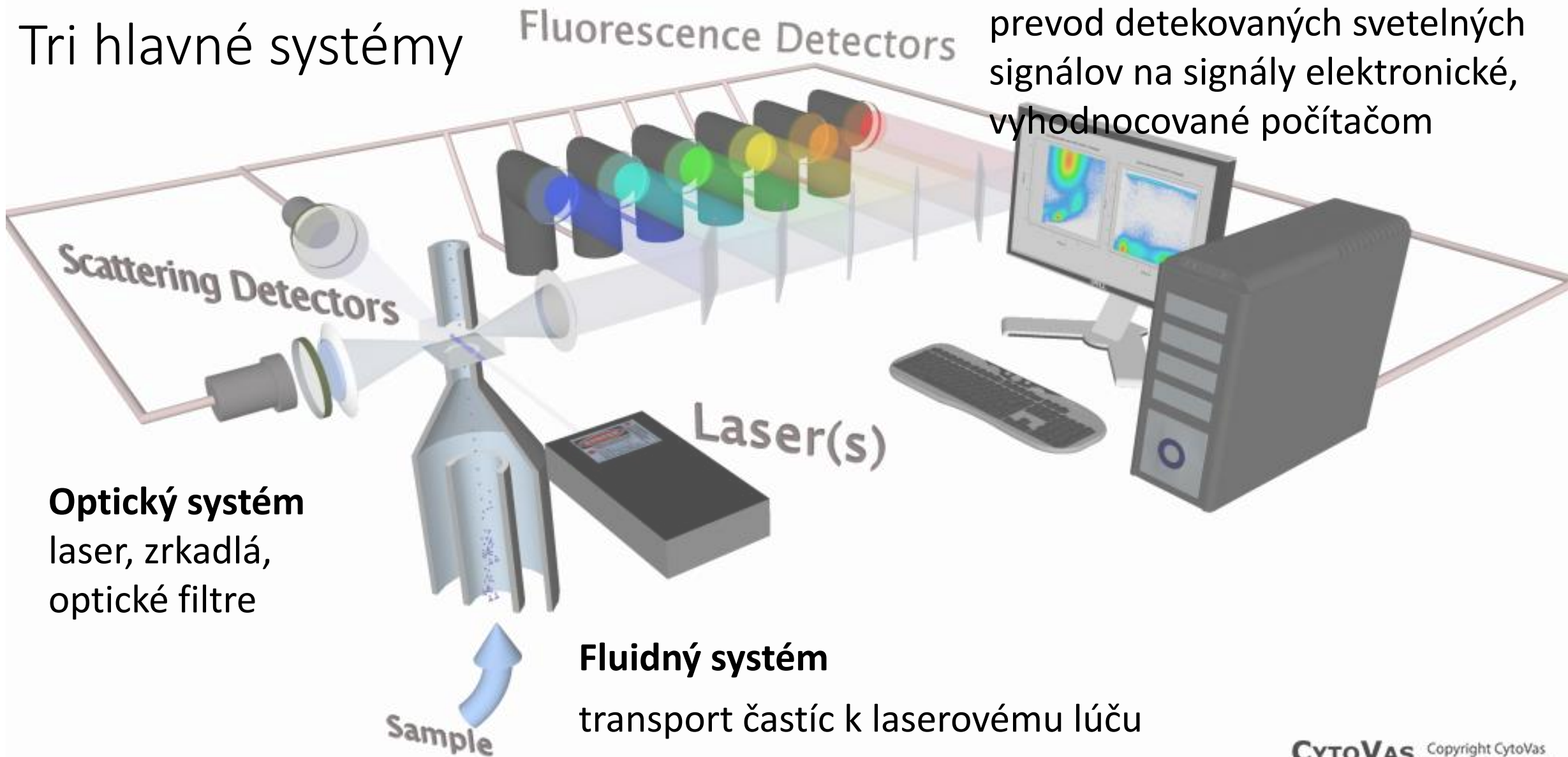
Čo meriame???

- Odrazené svetlo a emitovanú fluorescenciu
- Častice veľkosti 0,2-150 μm
 - 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 hlavné systémy



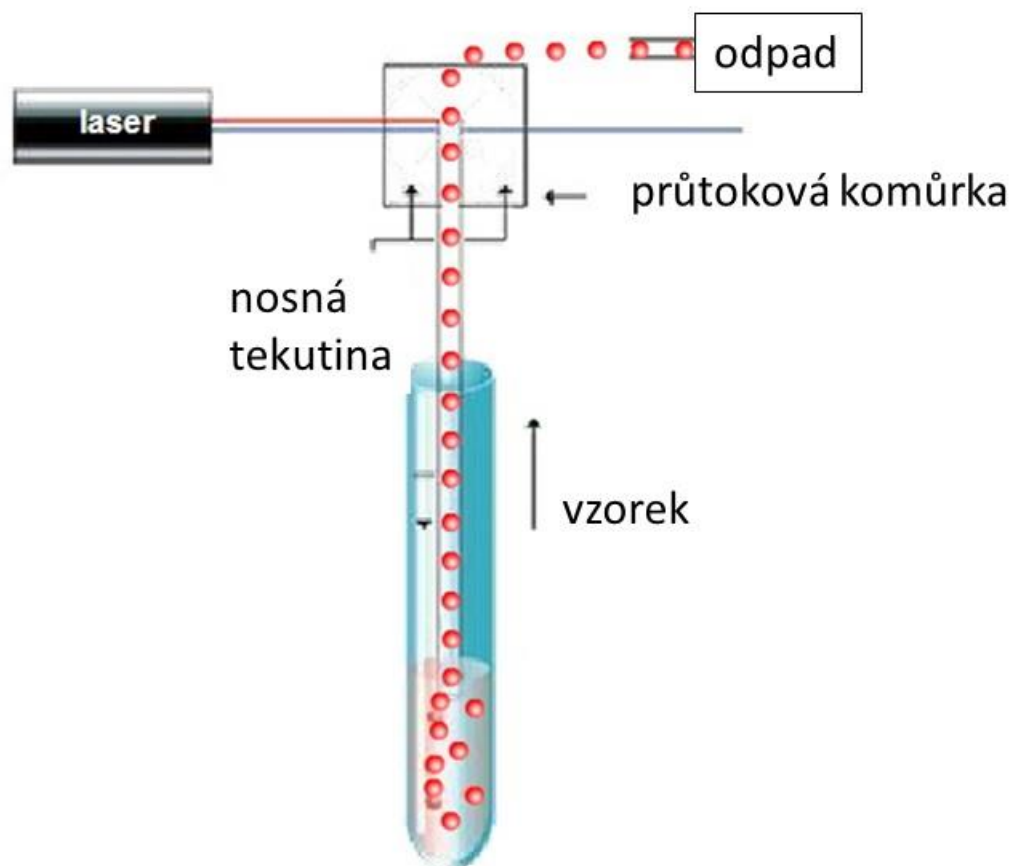
Optický systém
laser, zrkadlá,
optické filtre

Fluidný systém
transport častíc k laserovému lúču

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

Fluidika

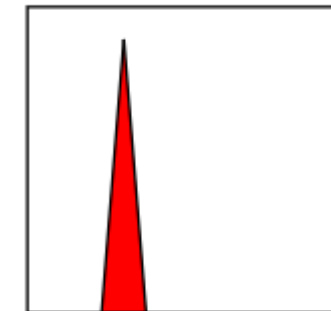
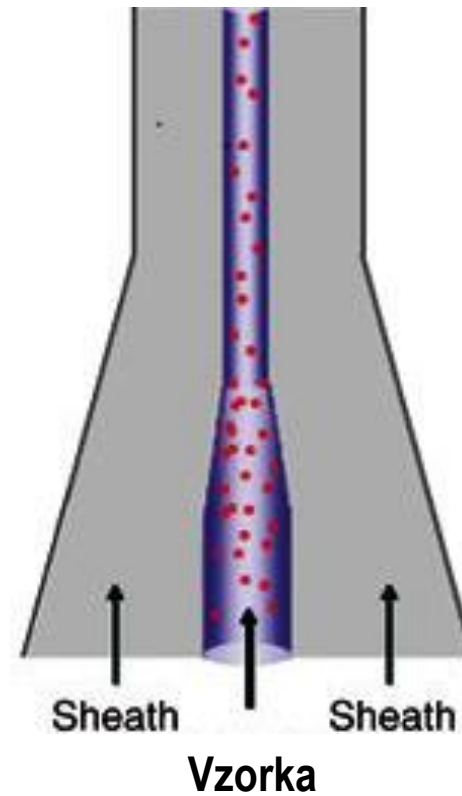
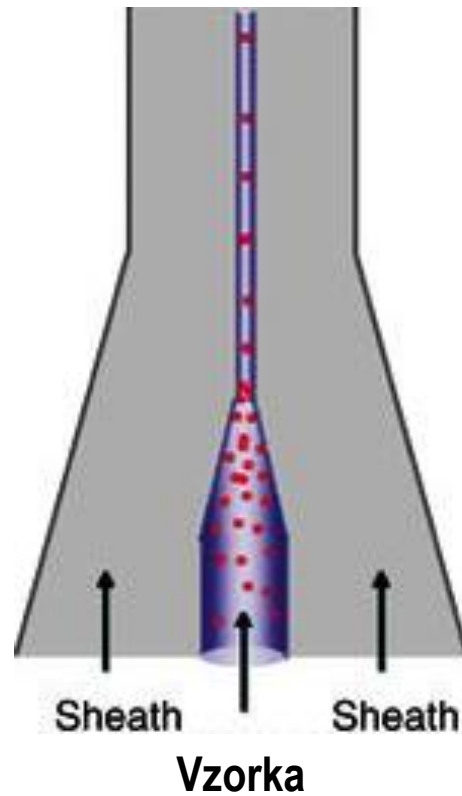
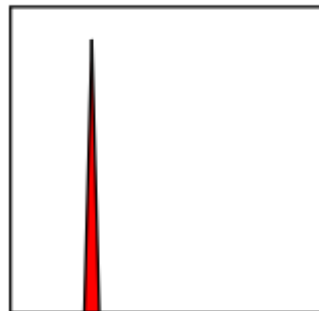
Transport částic v prúde nosnej kvapaliny k laserovému lúču



Hydrodynamická fokusácia

Nízky tlak vzorky
Úzky prúd vzorky
Vhodné pre DNA analýzu

Vysoký tlak vzorky
Široký prúd vzorky
Nevhodné pre DNA analýzu



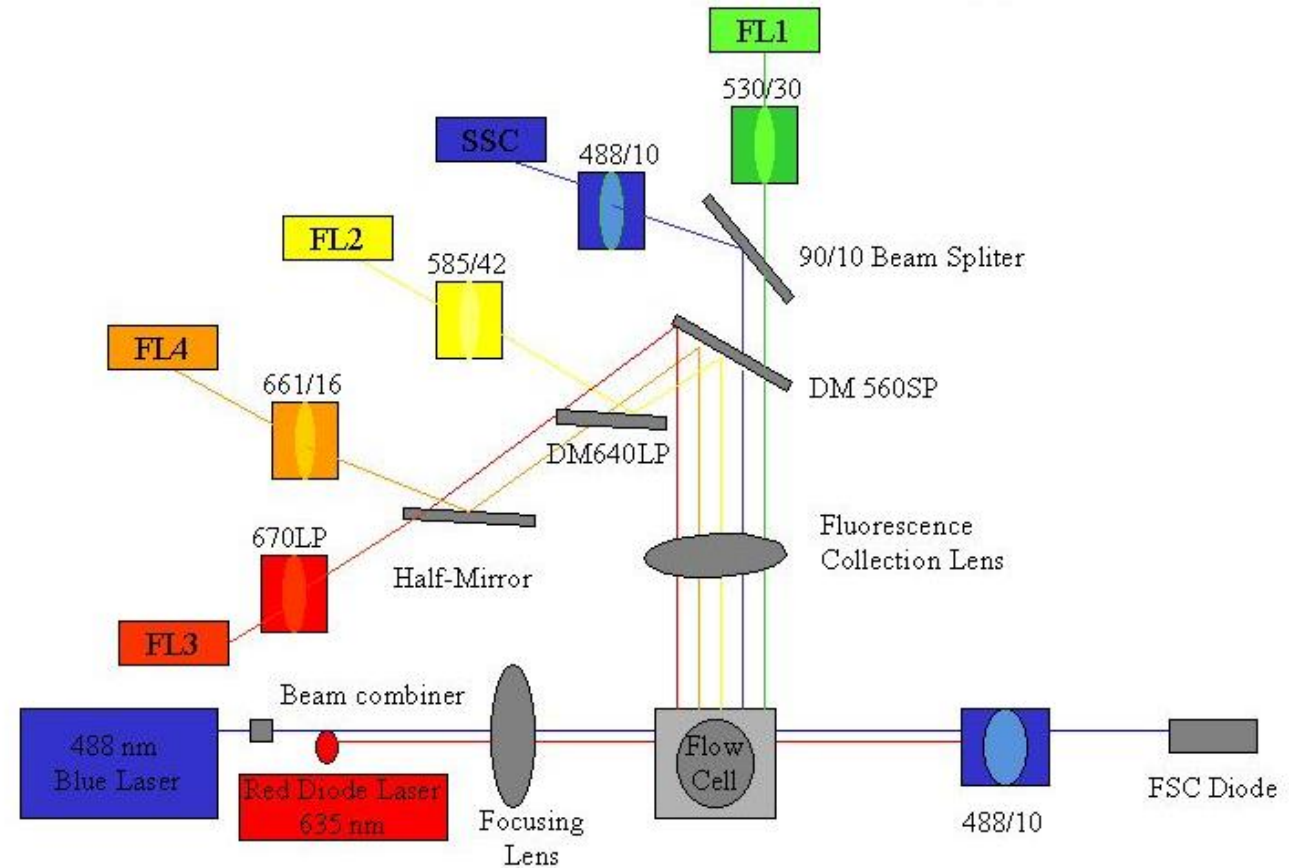
Optika

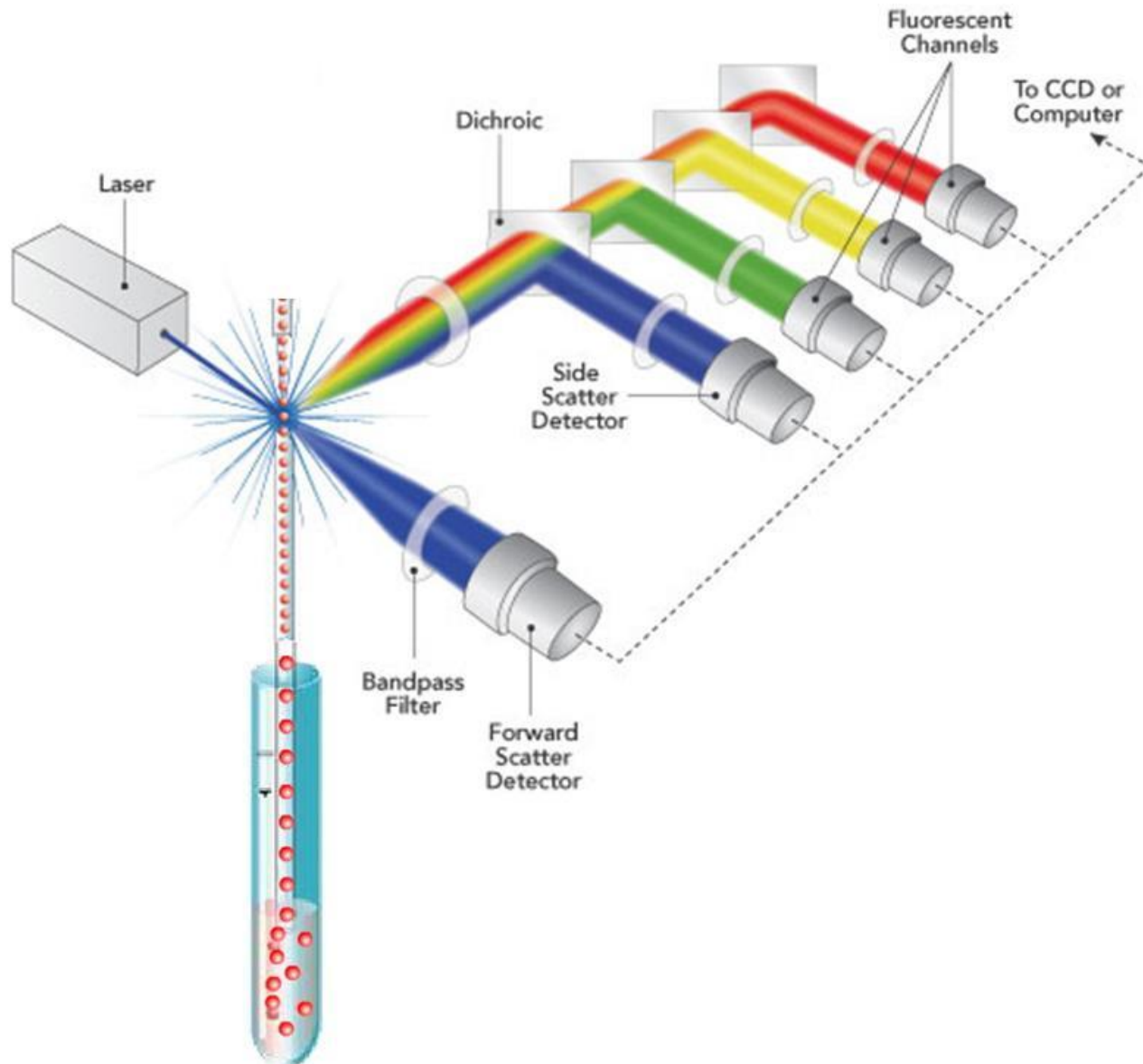
- Excitačná optika

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)

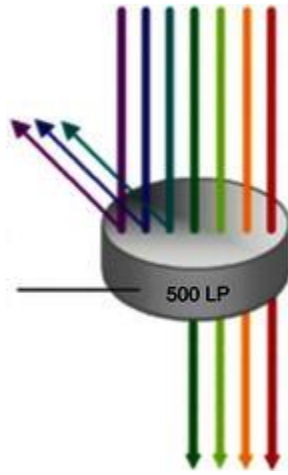
excitácia UV/violet diode (fialový laser) - 405 nm

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

Optické filtre

Long Pass (LP)

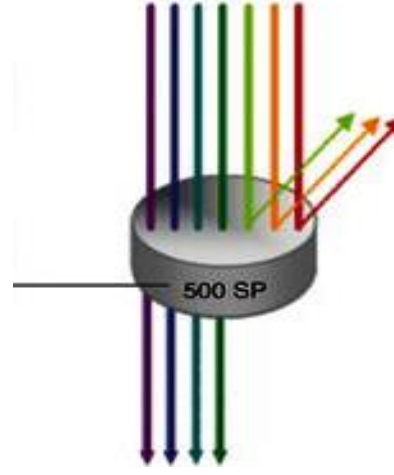
Prepúšťa všetky dĺžky vyššie ako špec. vlnová dĺžka



500LP

Short Pass (SP)

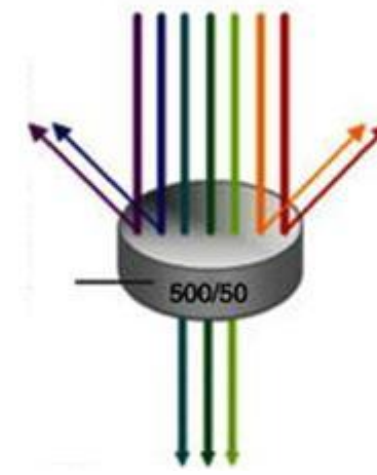
Prepúšťa všetky dĺžky kratšie ako špec. vlnová dĺžka



500SP

Band Pass (BP)

Prepúšťa špecifické rozmedzie vlnových dĺžok



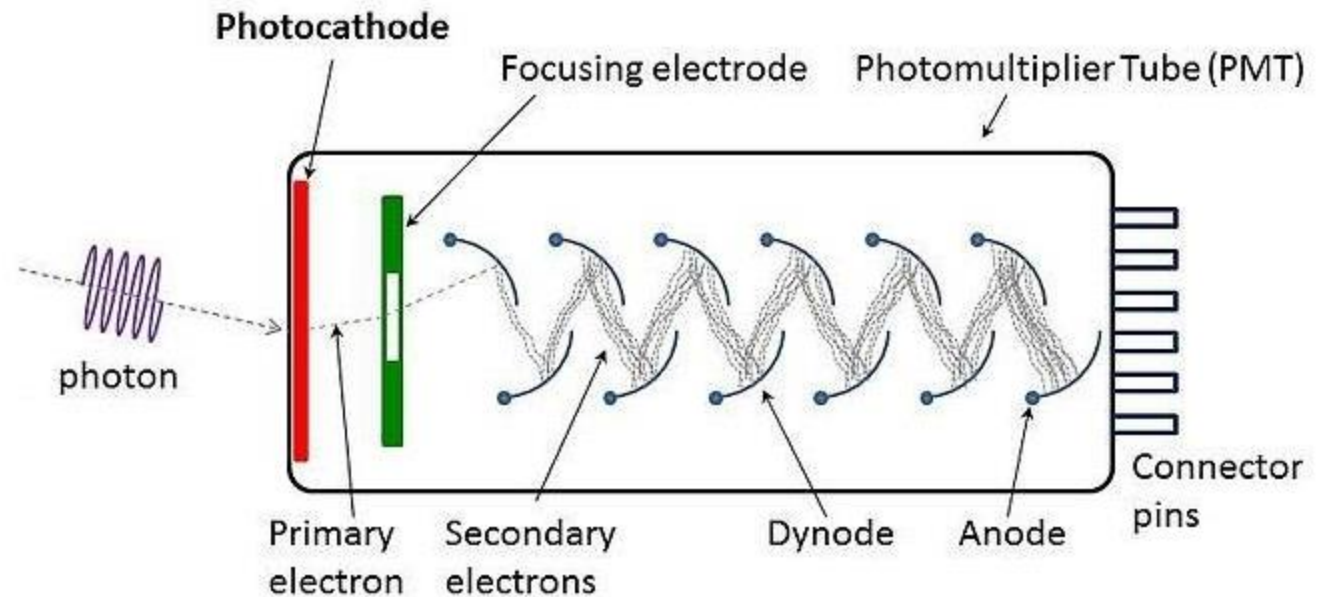
500/50
500±25

Dichroické filtre – umiestnené pod uhlom 45°

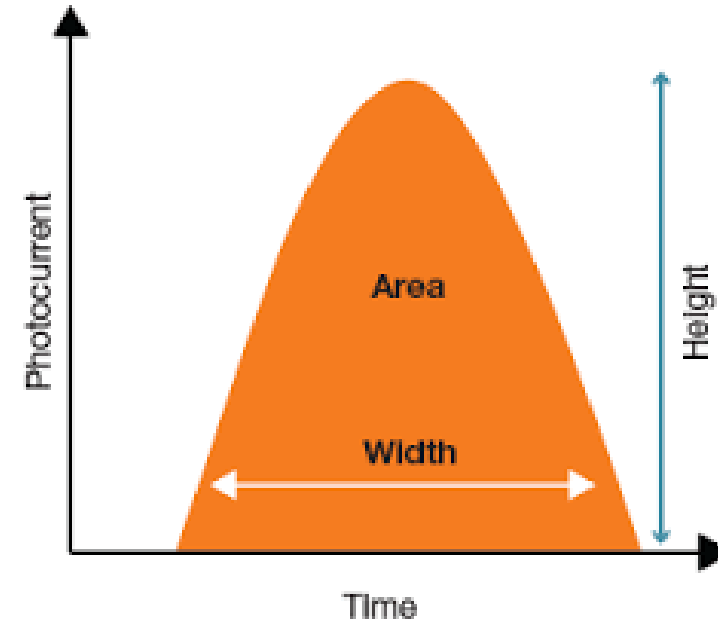
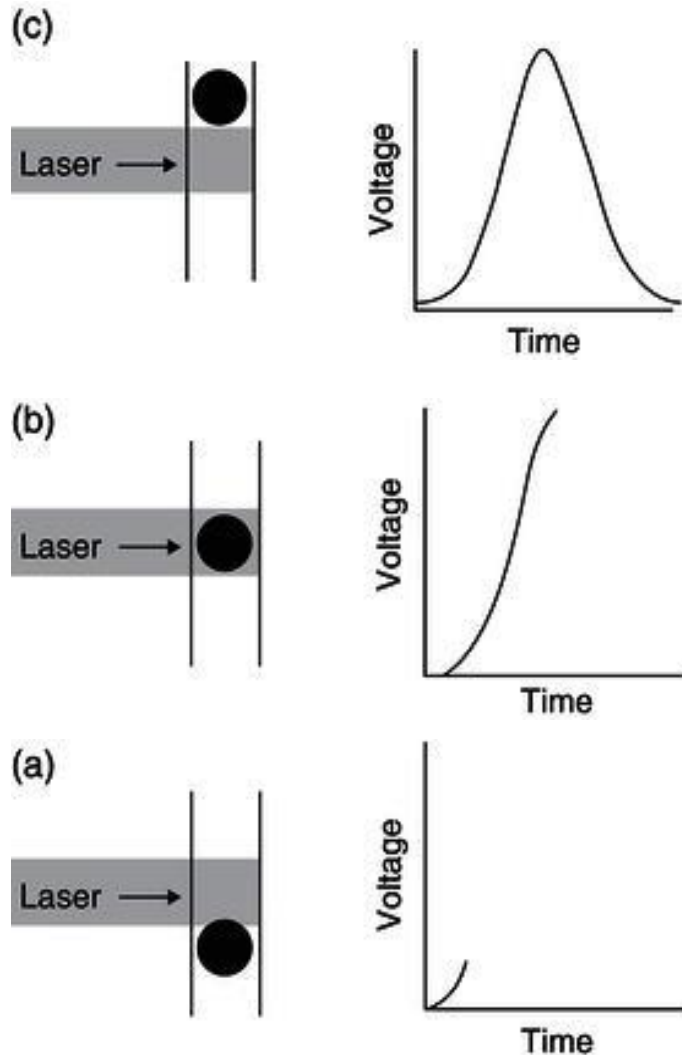
– časť svetla odráža pod uhlom 90°, časť prepúšťa

Elektronika

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



Vznik napätového pulzu



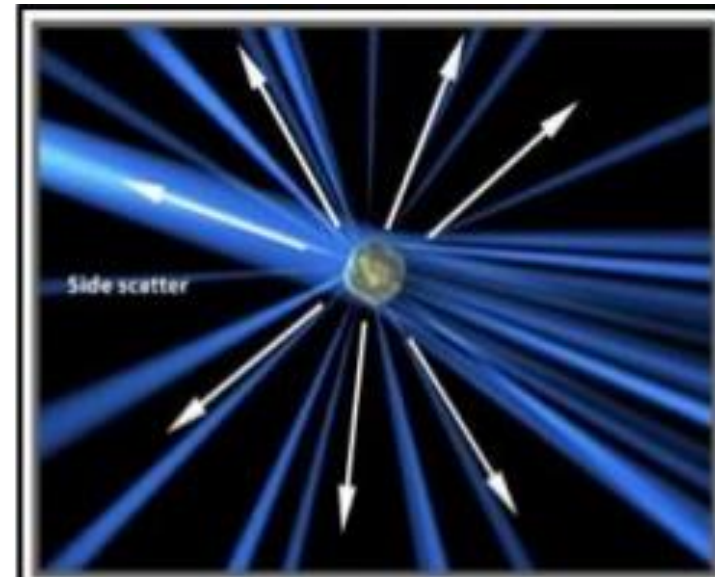
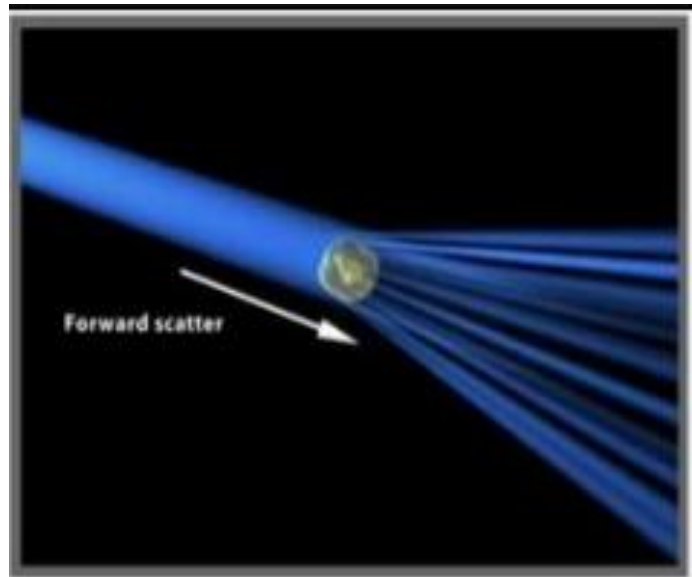
Výška:
maximálna hodnota fluorescencie alebo scatteru

Plocha:
Integrál pulzu

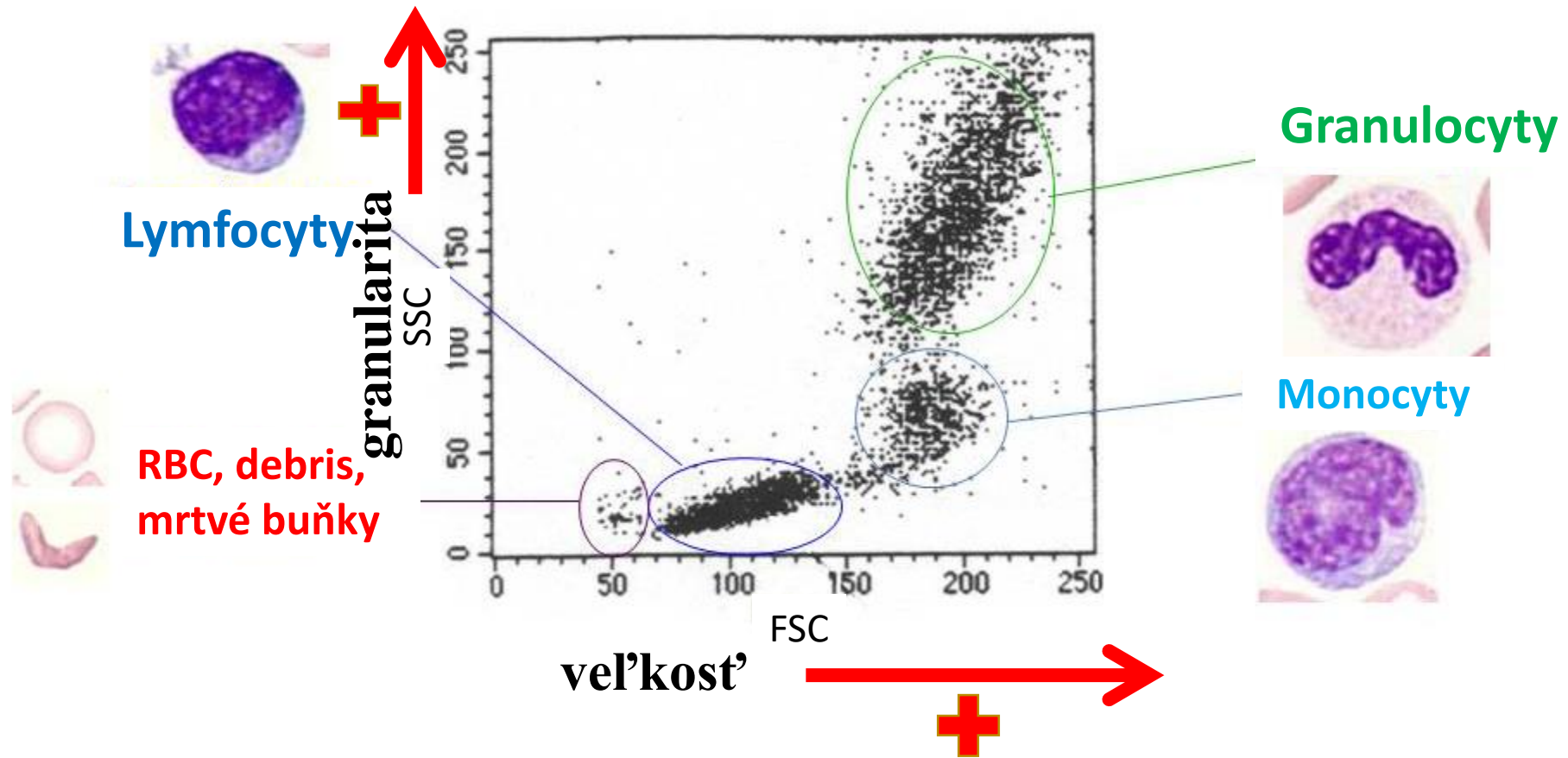
Šírka:
Čas trvania pulzu

Veľkosť vs. granularita

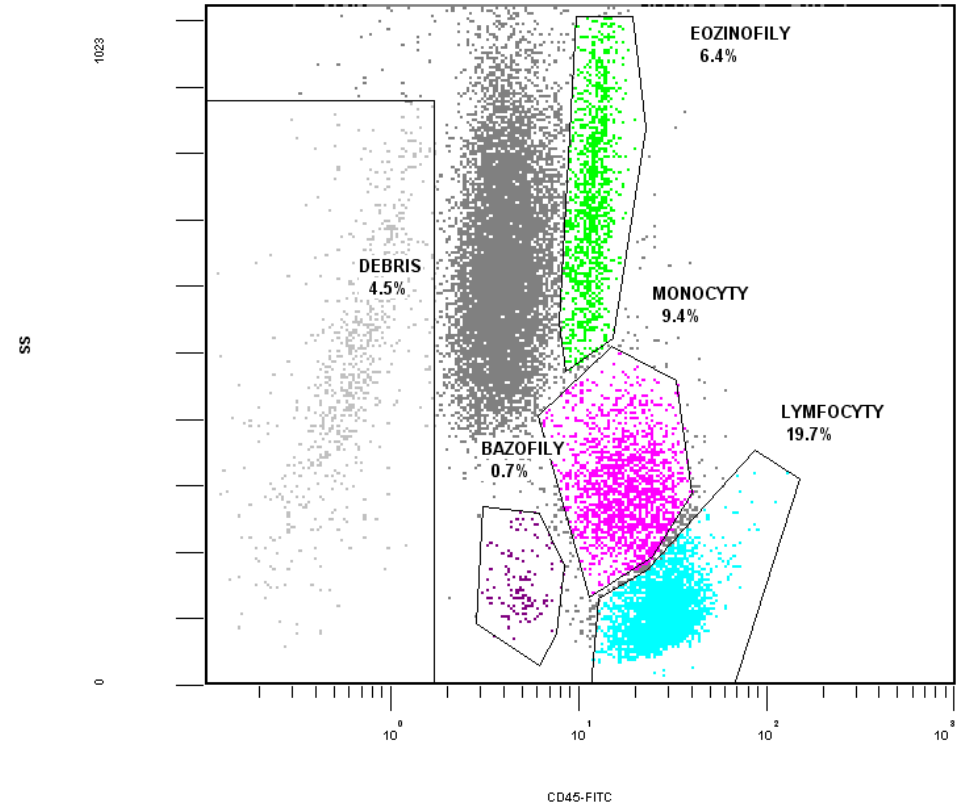
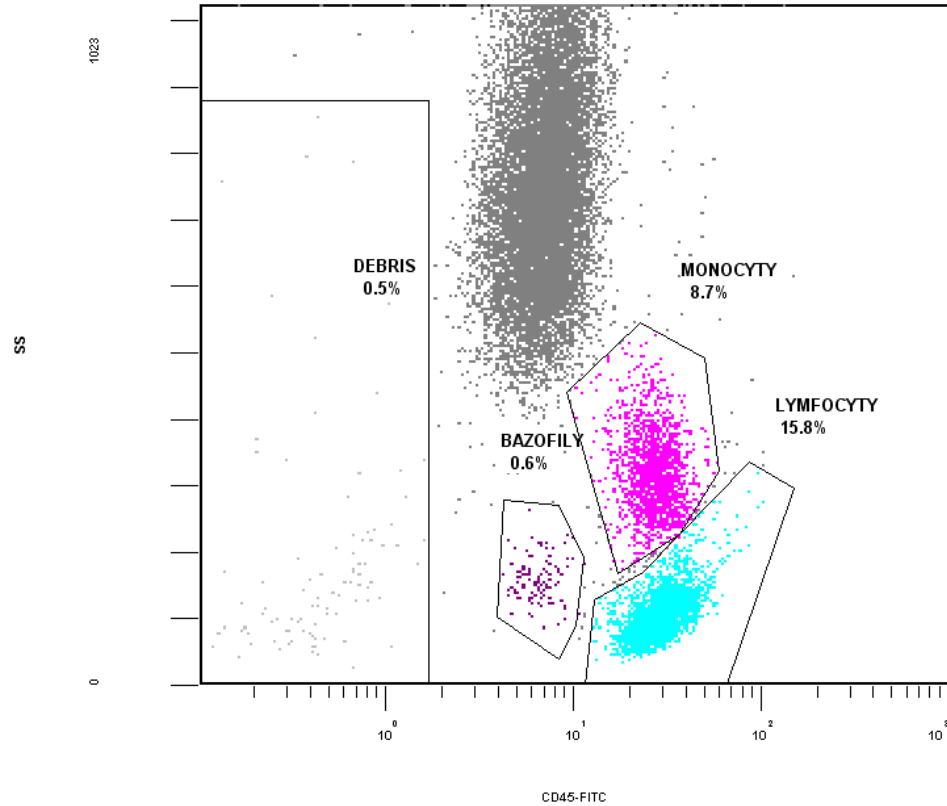
- Light scatter: prechádzajúca častica vychýli dopadajúce žiarenie



FSC vs. SSC



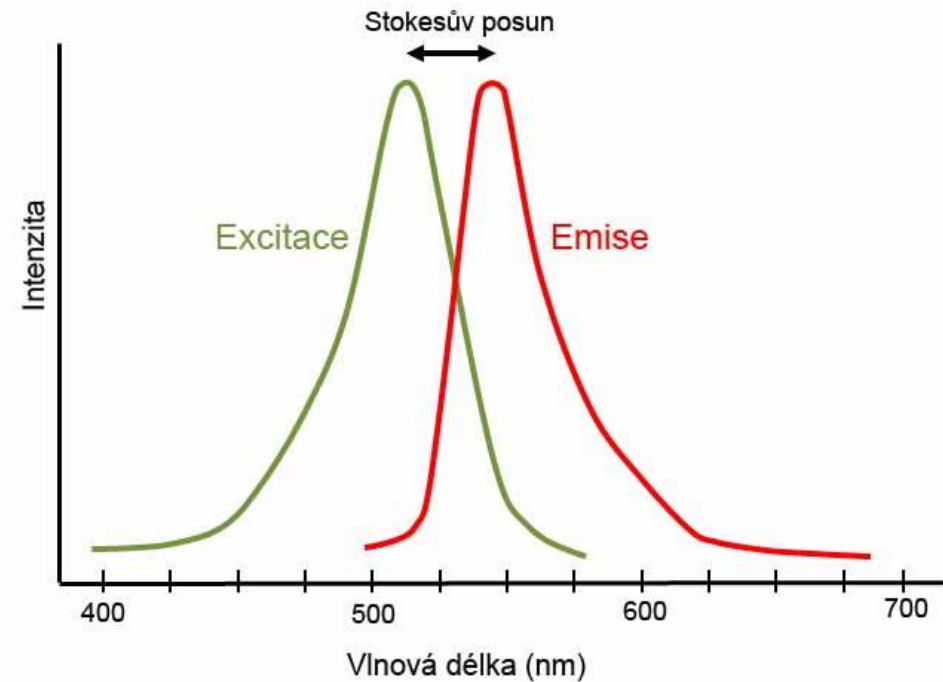
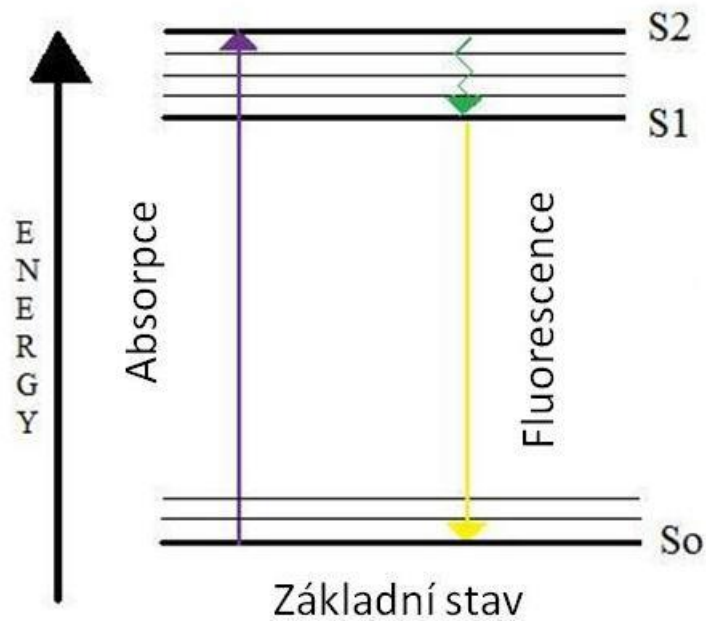
Diferenciálny rozpočet



Fluorescencia

Veľa buniek má rovnakú alebo podobnú morfológiu

- monoklonálne Ab značené fluorochromom špecifické k určitému epitopu



Fluorochromy

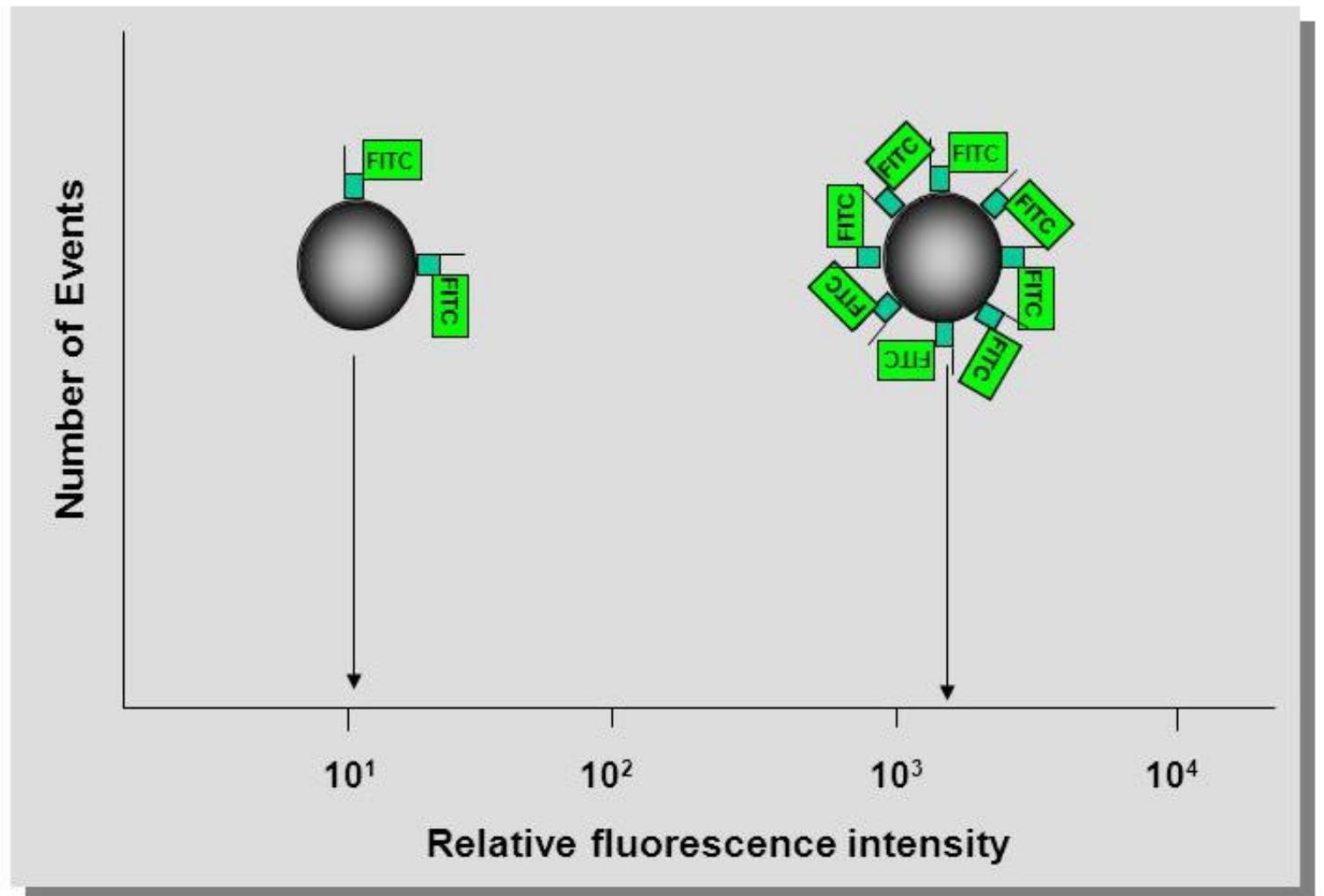
- Sú excitované vhodnou vlnovou dĺžkou
- Emitujú svetlo špecifickej vlnovej dĺžky
- I neznačené bunky môžu byť fluorescenčné vďaka slabej autofluorescencii

Fluorochromy

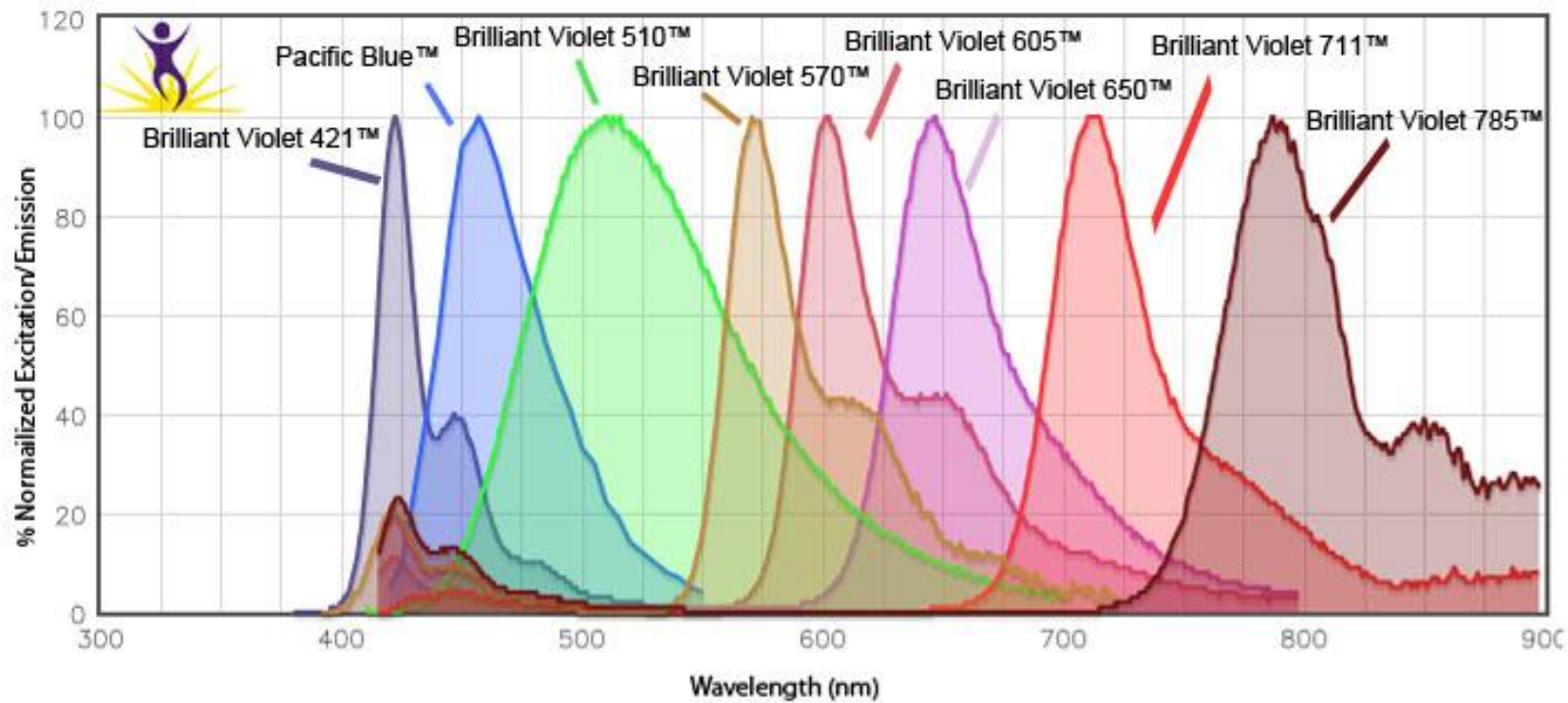
- Polycyklické organické molekuly a ich deriváty
 - Fluorescein isothiokyanát (FITC), Cyaniny, Texas Red, rada Alexa, Pacific a Cascade
 - AmCyan, Propidium Iodide, 7-AAD, CFSE
- Fluorescenčné proteíny
 - Phycoerythríny (PE), Allophycocyaniny, PerCP, GFP,...
- Quantum Dots

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

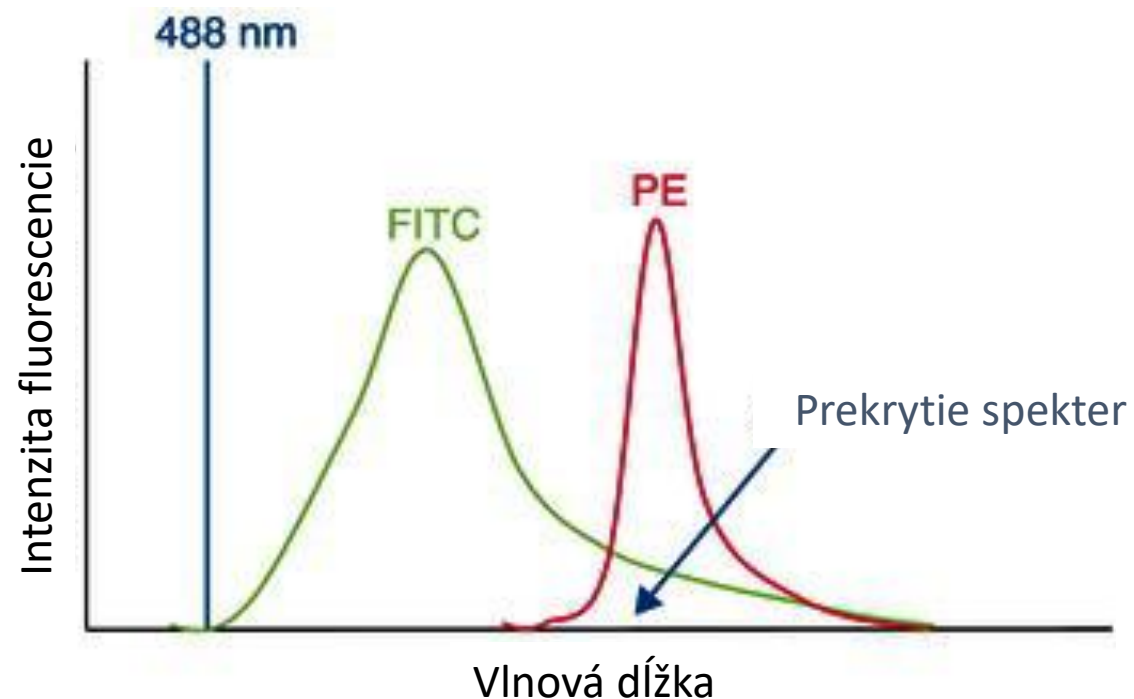


Emisné spektrá



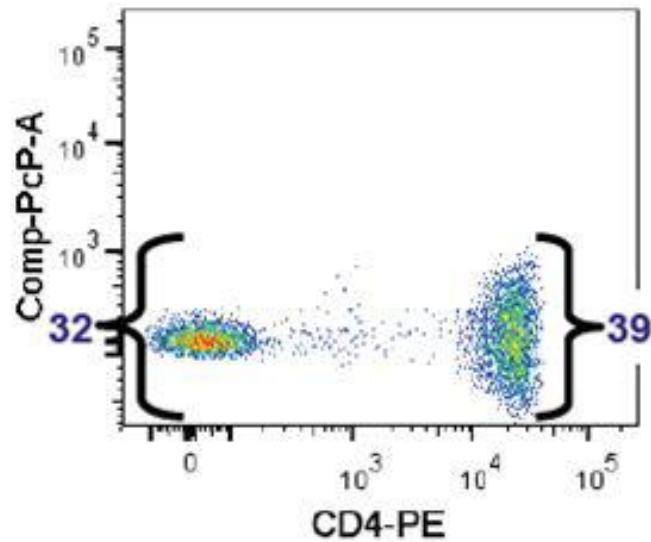
Prekrytie spektier

- 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)

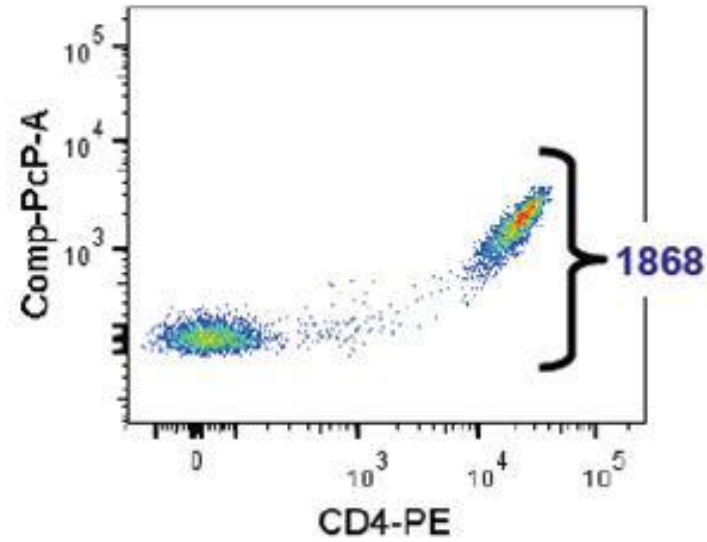


Kompenzácie

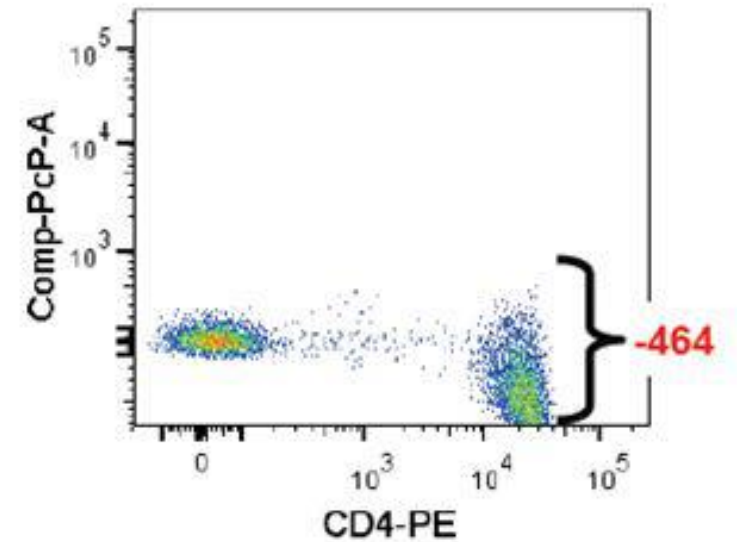
- Priesvit je treba „kompenzovať“, tak aby detektor zaznamenal signál 1 fluorochromu



Properly compensated



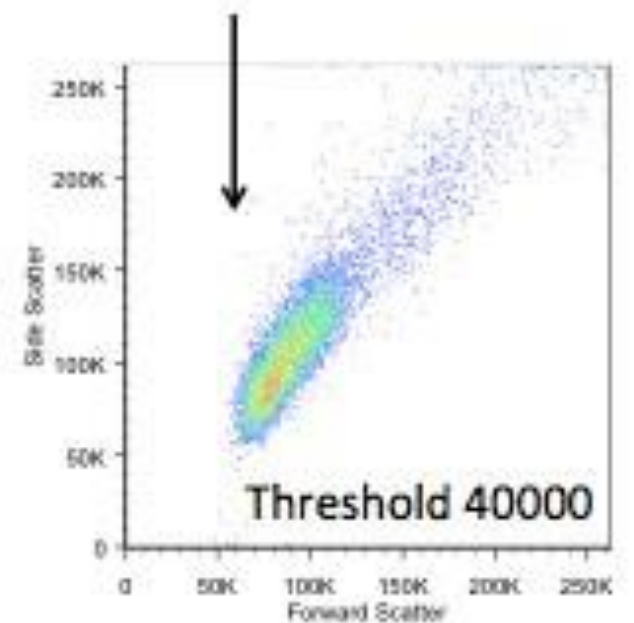
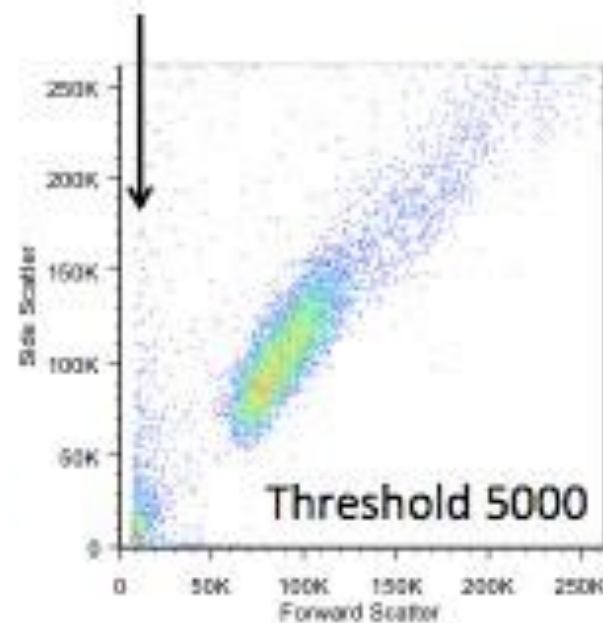
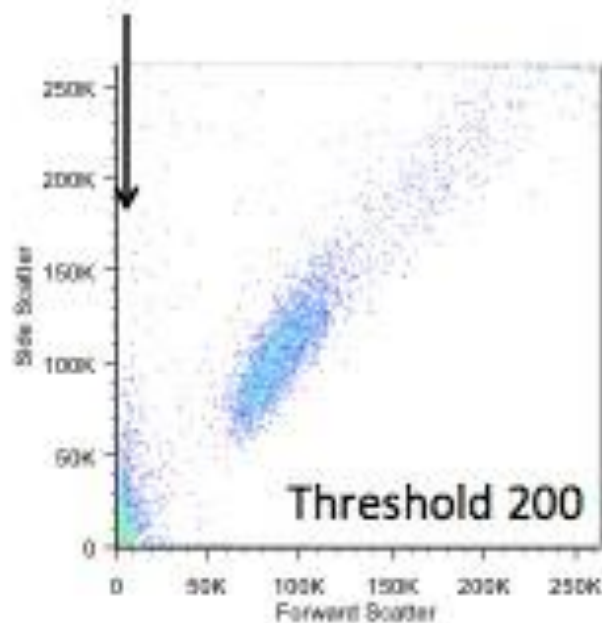
Under compensated



Over compensated

Threshold (prah)

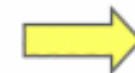
- Detektory sú extrémne citlivé = detekujú signály z rôznych zdrojov – prach, malé častice, debris
- Eliminácia = treshold
- Nastavenie na jednom parametre (FSC)



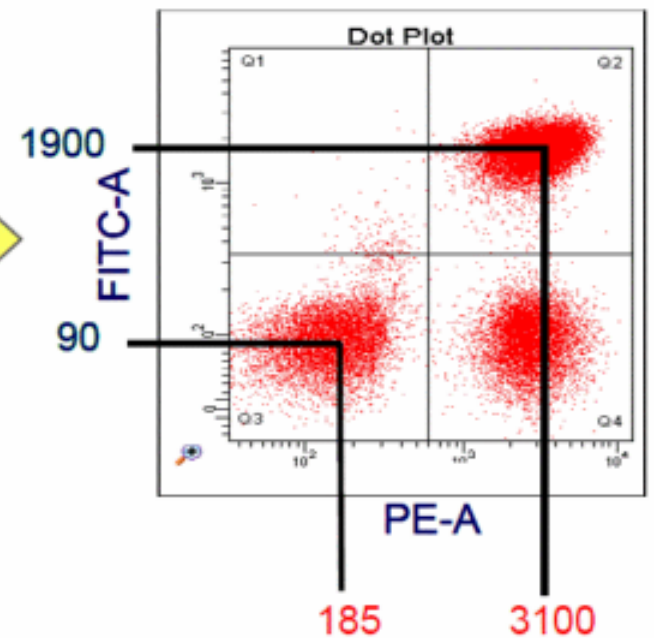
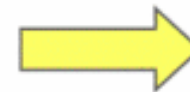
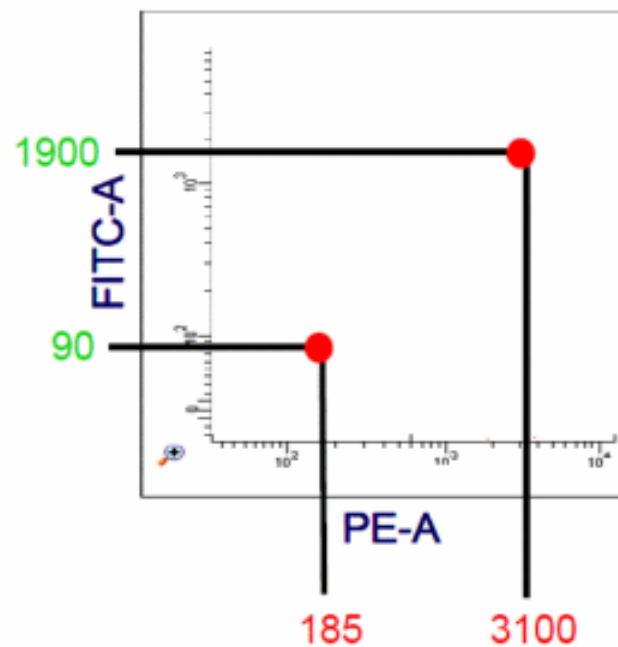
Amplifikácia a digitalizácia signálu (ADC prevodník)

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



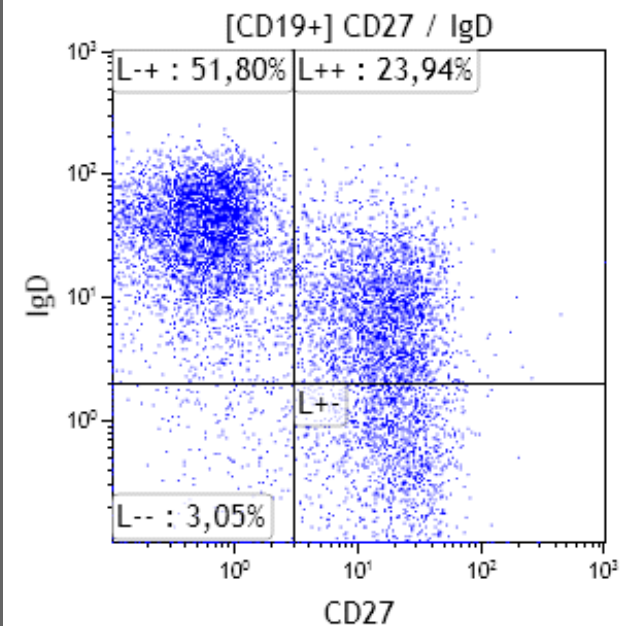
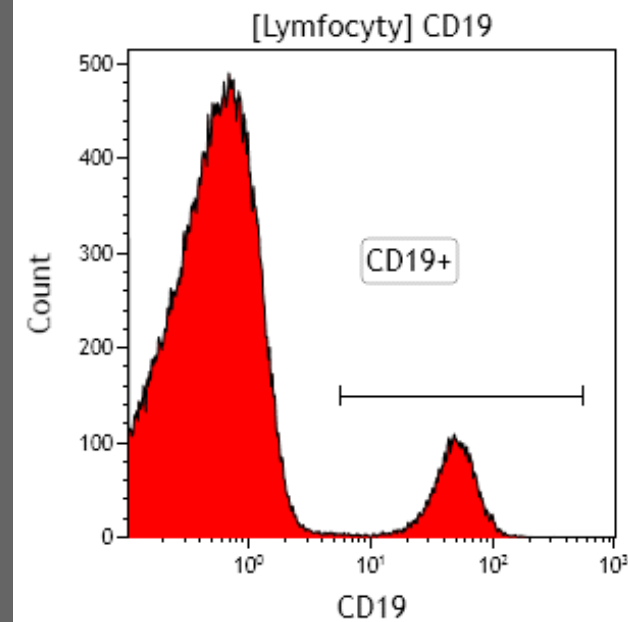
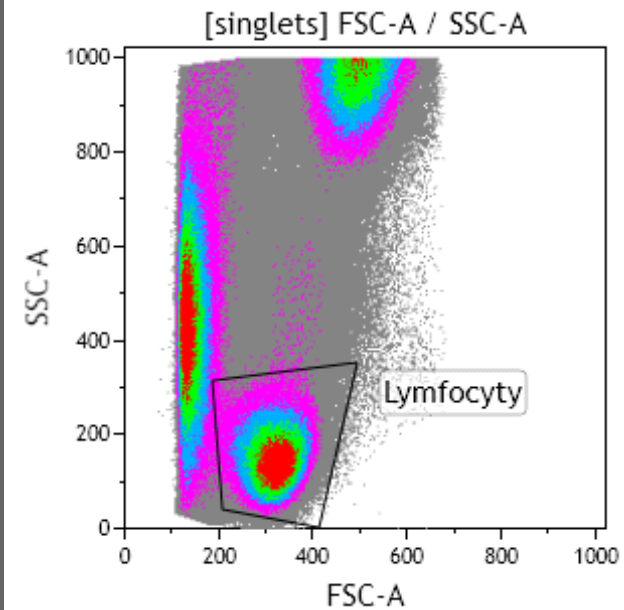
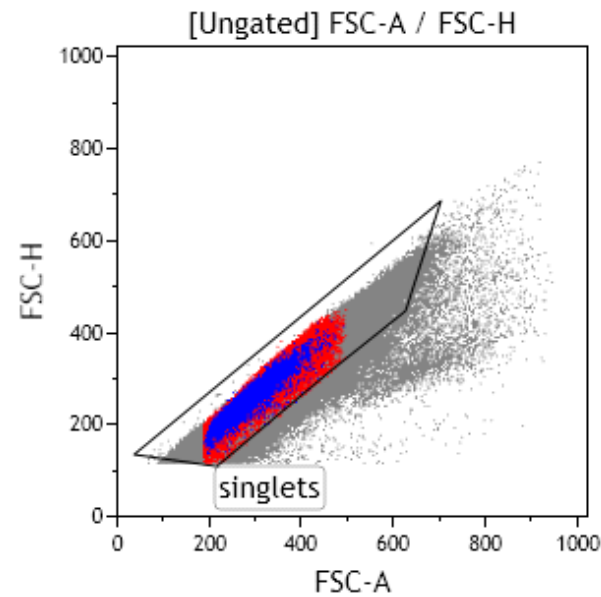
Analýza nameraných dát

Dáta v LIST MODE FILE

Analyzačný softvér

Kaluzia; Infinicyt; DiVa; FlowJo; Summit

Vytvorenie štatistík



Výhody a nevýhody prietokovej cytometrie

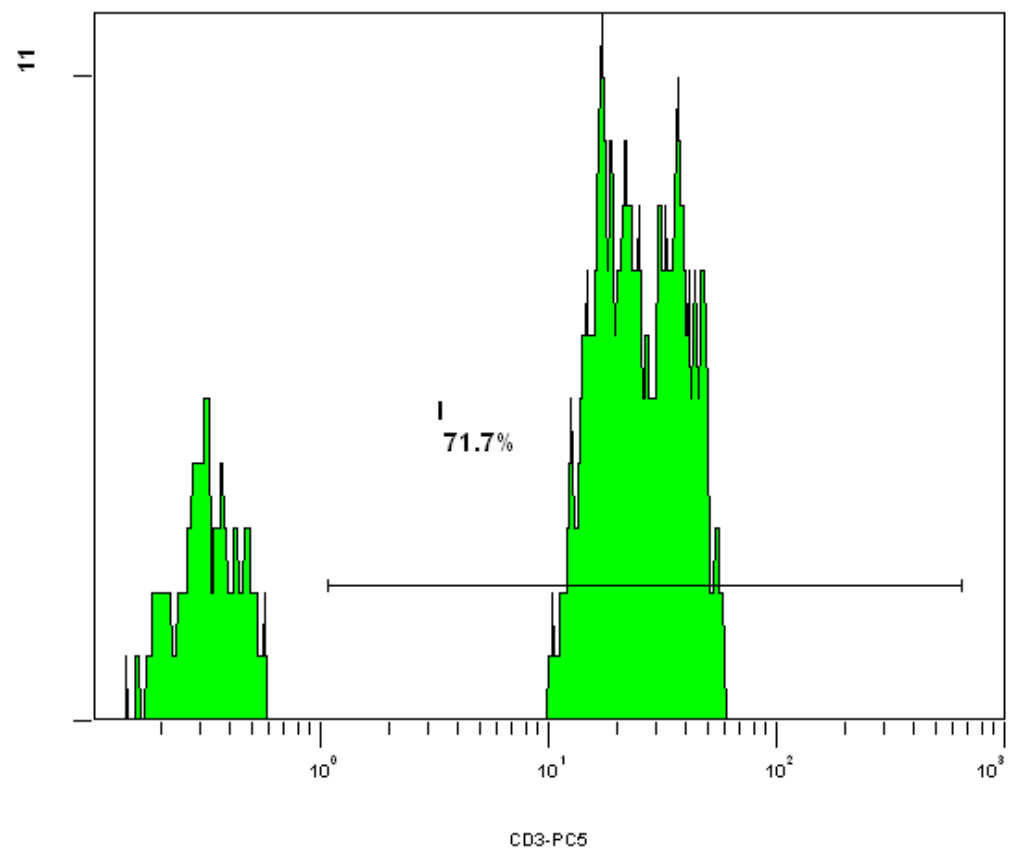
Výhody

- 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)

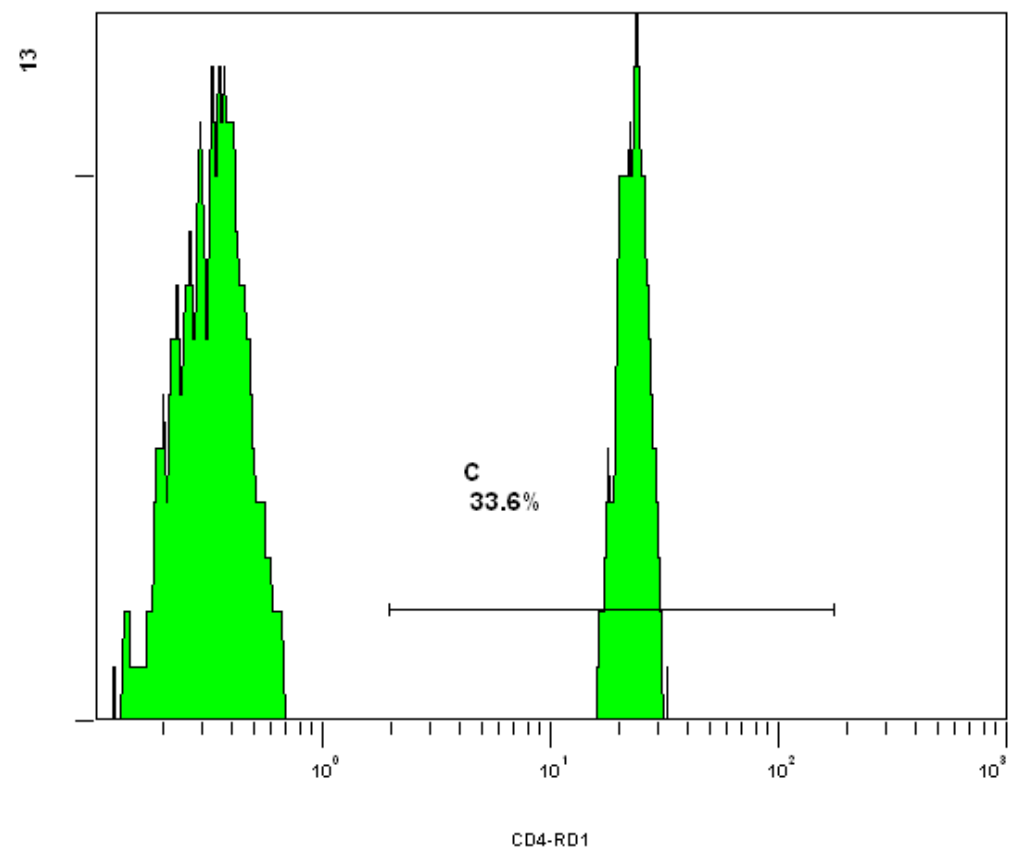
Nevýhody

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

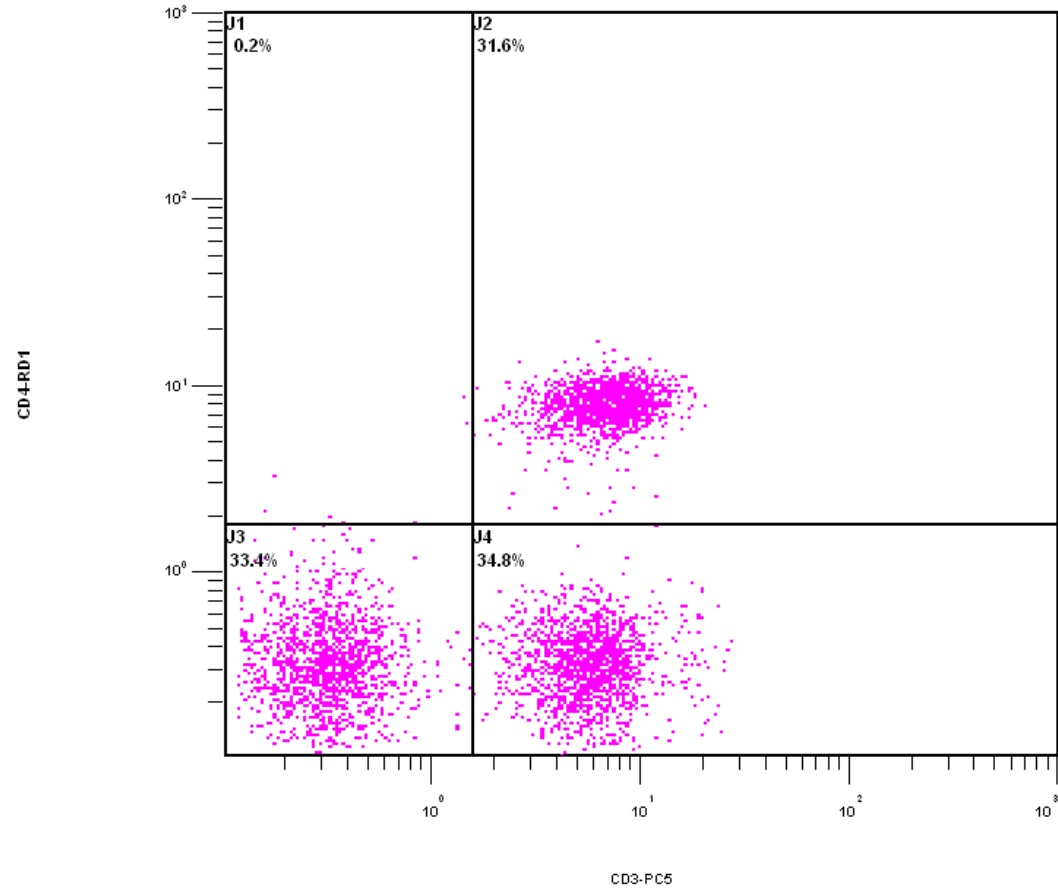
(F1)[A] 20051674.LMD : FL4 LOG



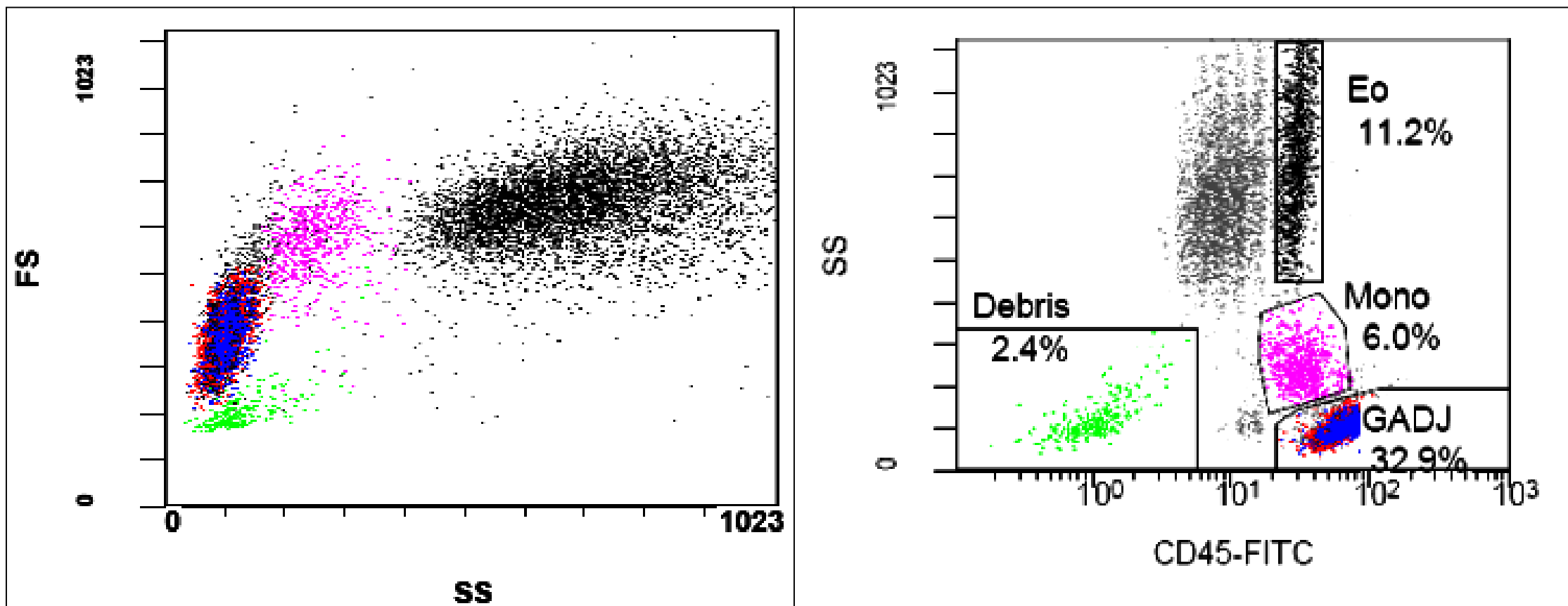
(F1)[A] 20051674.LMD : FL2 LOG



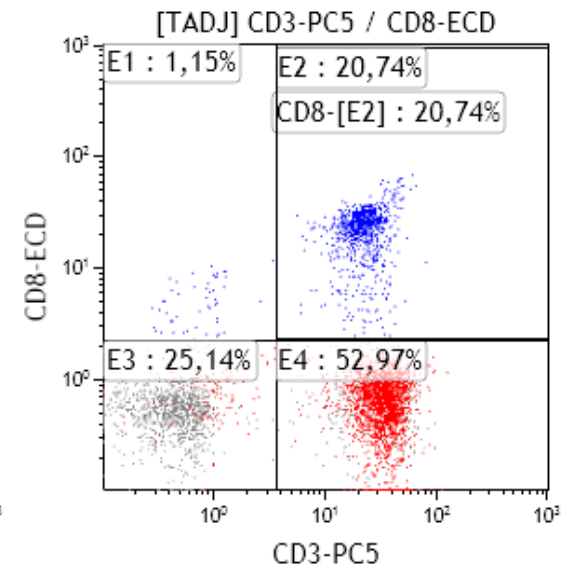
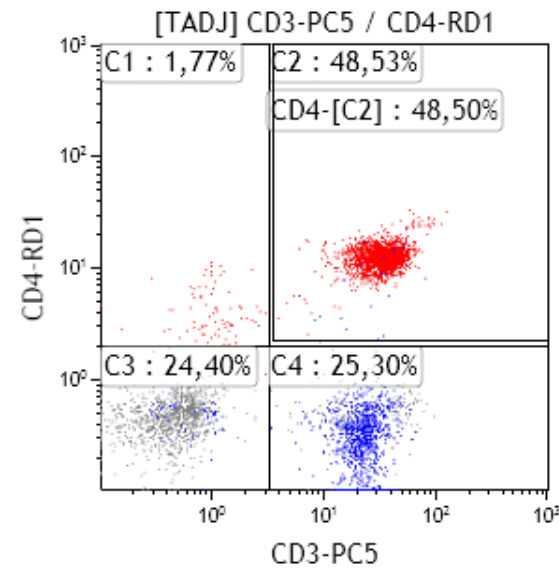
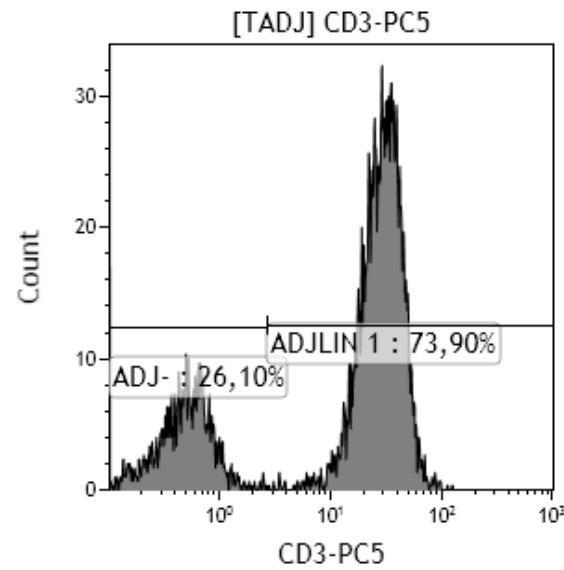
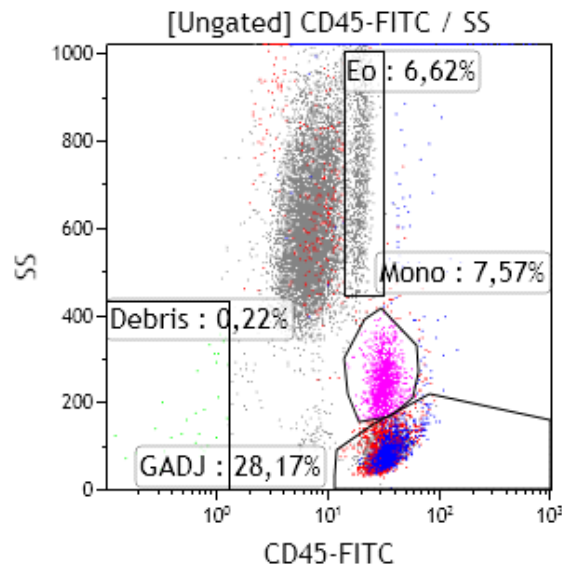
(F4)[Lymfo] 20089743.LMD : FL4 LOG/FL2 LOG



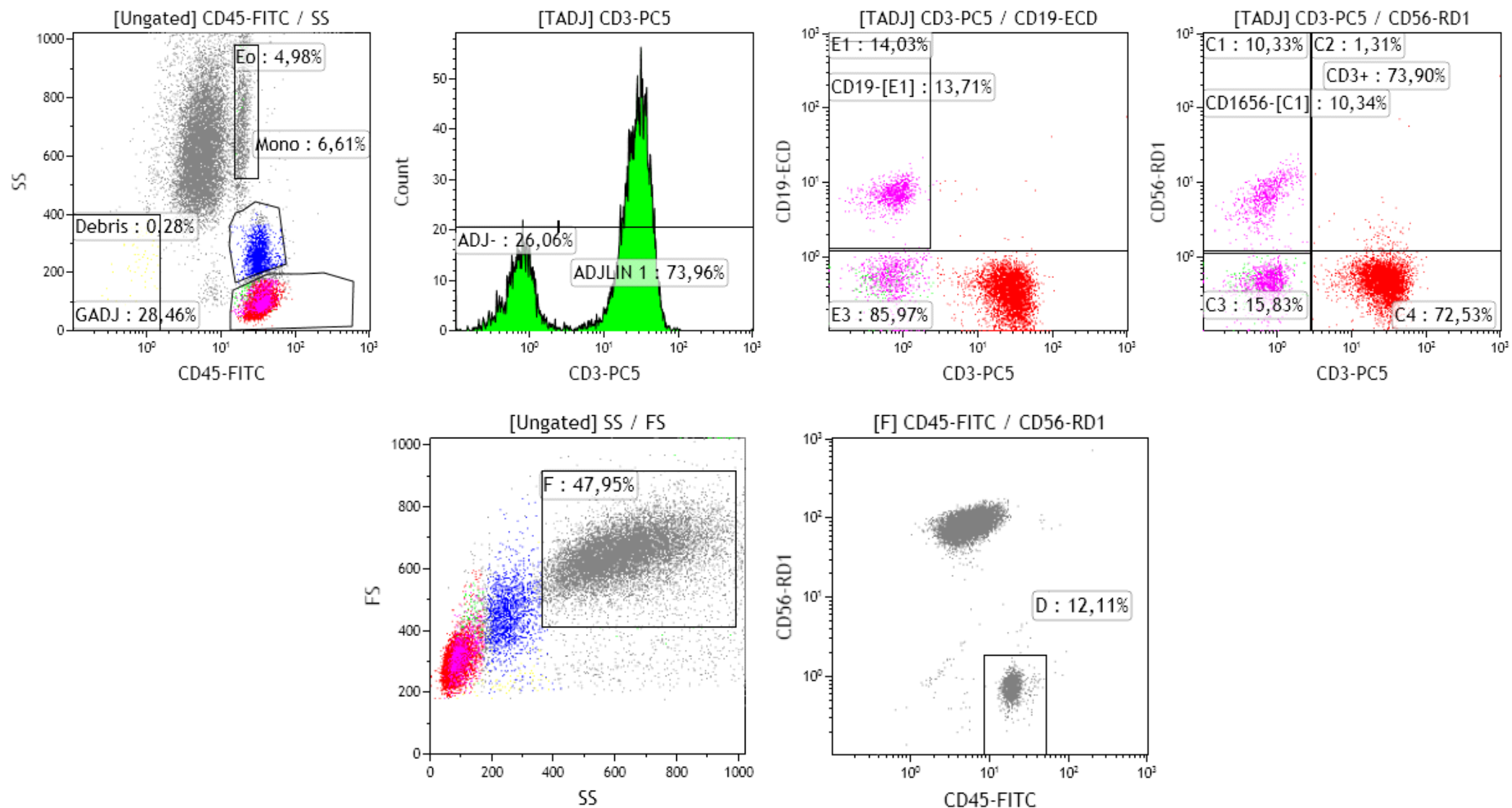
Krvný diferenciál




Skúmavka 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 ⁹ l
Lymfocyty	20-55 %
Monocyty	0-10 %
Granulocyty – neutrofily, eosinofily, bazofily	37-75 %

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

Vyšetření lymfocytů periférnej krvi

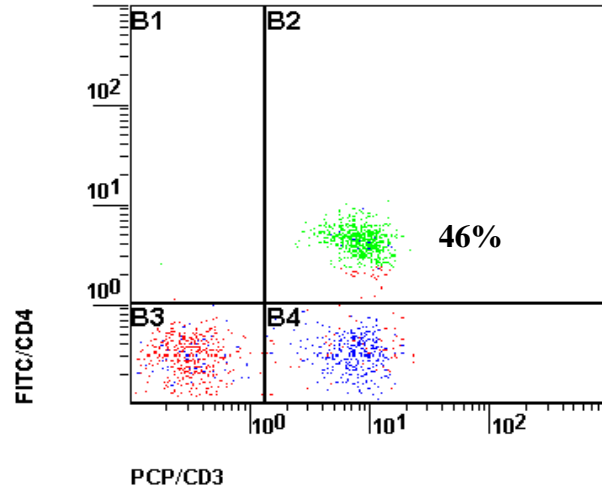
ZNAK	EXPRESE	FUNKCE	ZASTOUPENÍ NA LYMFOCYTECH PERIFERNÍ KRVE (%)
CD3	všechny T-lymfocyty	asociován s TCR, přenos signálu	58-85
CD4	pomocné T-lymfocyty	receptor pro MHC II, aktivace	30-60
CD8	cytotoxické T-lymfocyty	receptor pro MHC I, aktivace	15-35
CD19	B-lymfocyty	regulátor aktivace	7-23
CD16/CD56	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)

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)

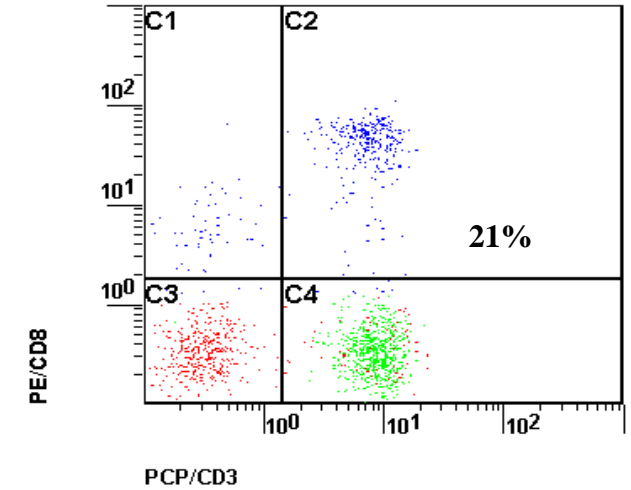
Príklady využitia FACS v praxi

Zdravá osoba



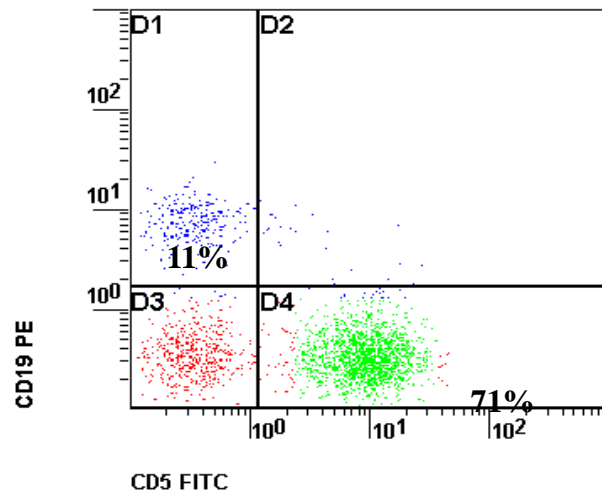
T LYMFOCYTY

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



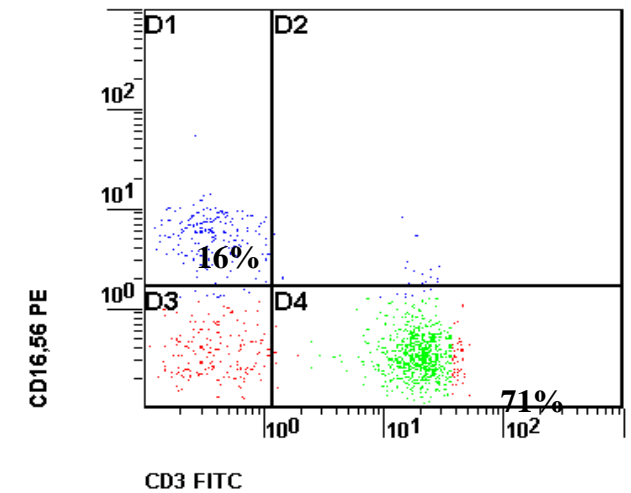
B LYMFOCYTY

- CD19+ : 11 (7-23) %



NK LYMFOCYTY

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



Vplyv infekcie

Bakteriální infekce

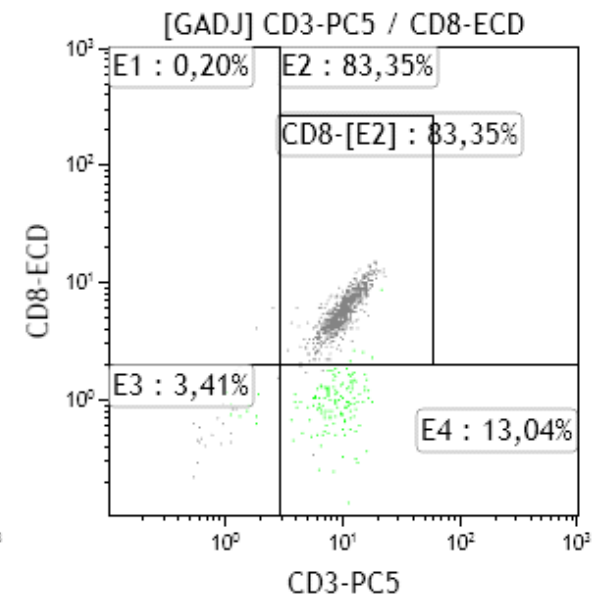
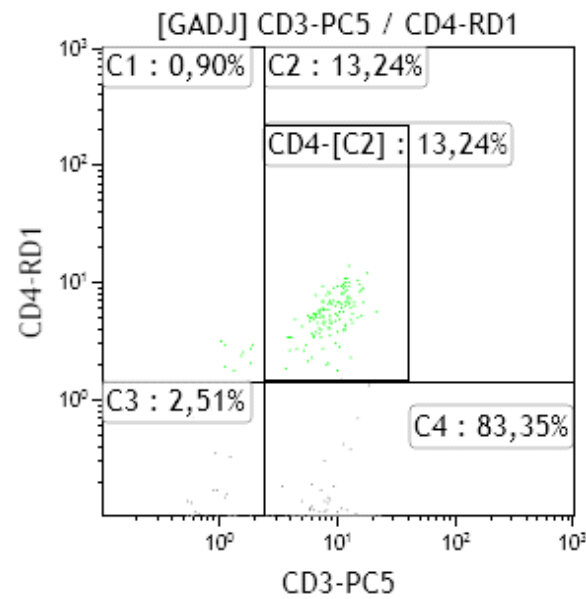
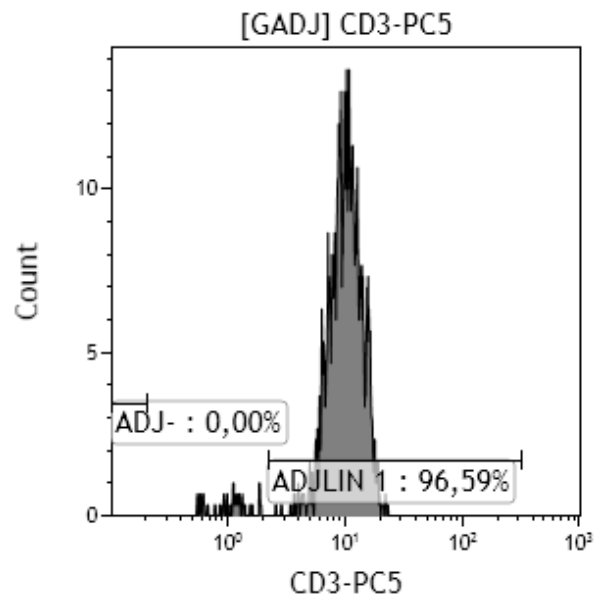
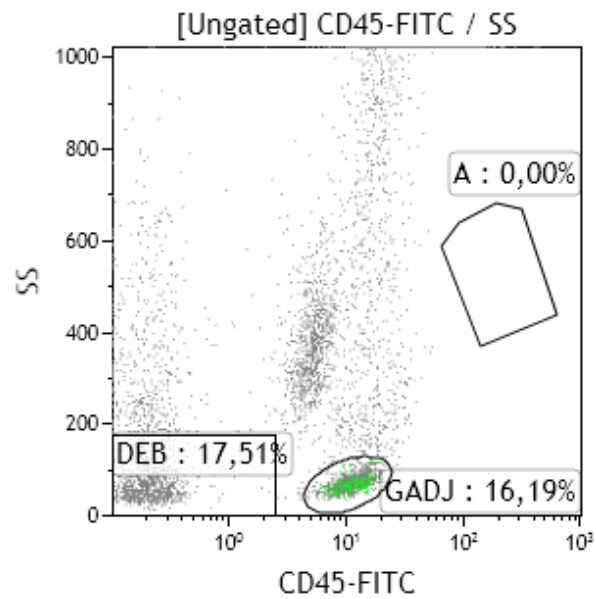
• Počet leukocytů:	↑	Th:	CD3+ 4+:	↑
• Lymfocyty:	↓	Monocyty:	CD14+HLA DR+ :	↓
• Granulocyty:	↑			

Virová infekce

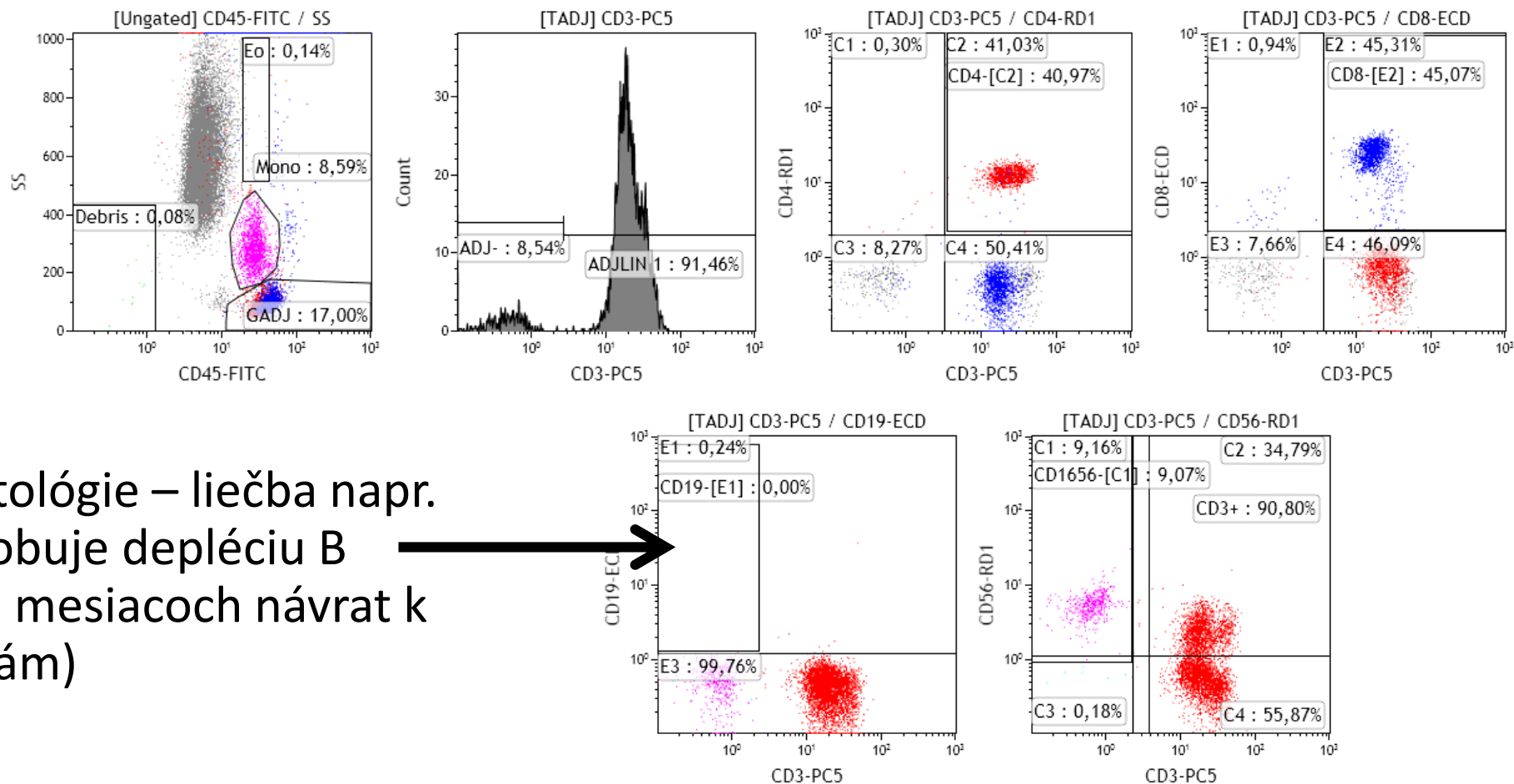
• Počet leukocytů:	↓	Tc:	CD3+ 8+:	↑
• Lymfocyty:	↑		CD3+8+HLA DR+ :	↑
• Granulocyty:	↓		CD3+8+38+ :	↑

Bronchoalveolárna laváž (BAL)

Prevrátený pomer CD4+/CD8+ = podozrenie na sarkoidózu



Pacientka: Ž, *1957

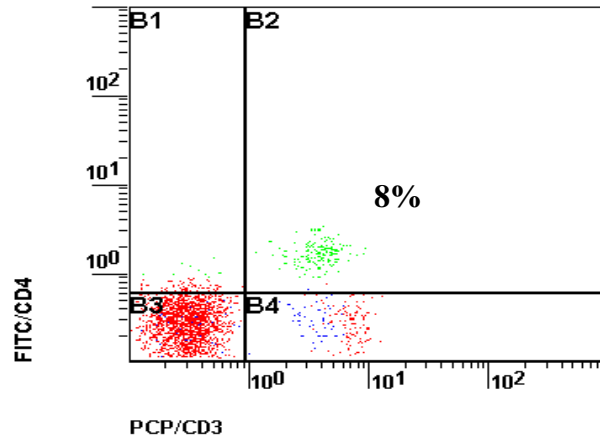


Pacientka z reumatológie – liečba napr. rituximabom spôsobuje depléciu B lymfocytov (po 4-6 mesiacoch návrat k normálnym hladinám)

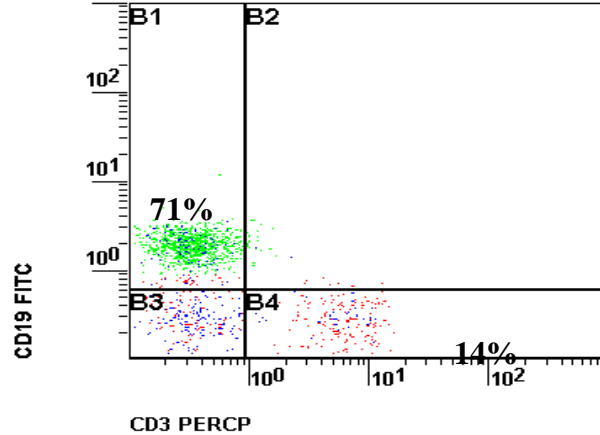


SCID

(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)%

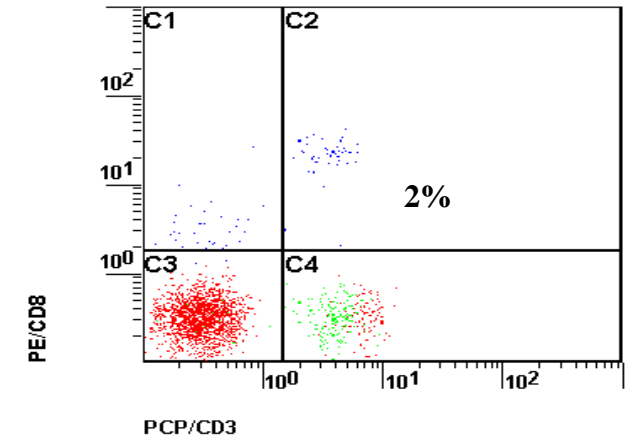
B LYMFOCYTY

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

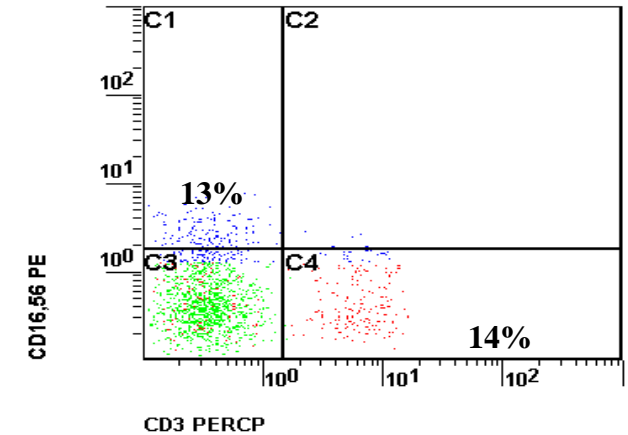
NK LYMFOCYTY

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

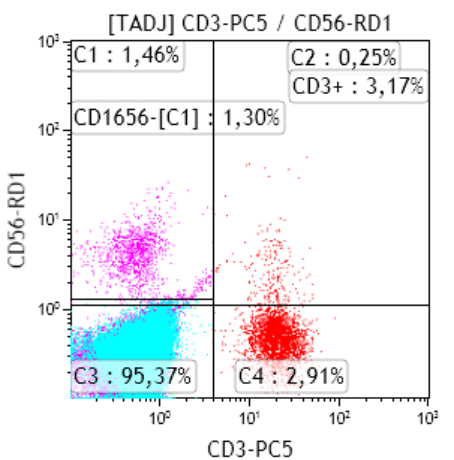
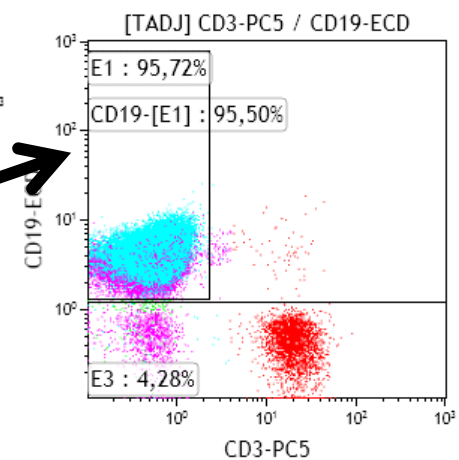
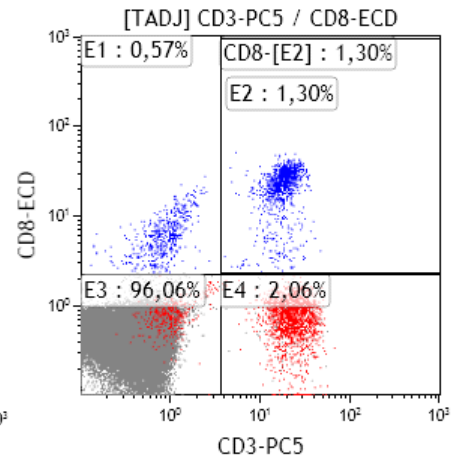
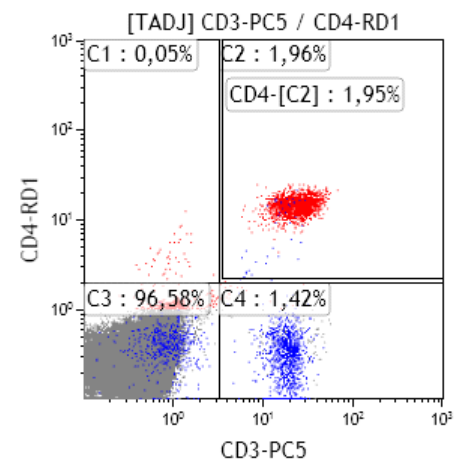
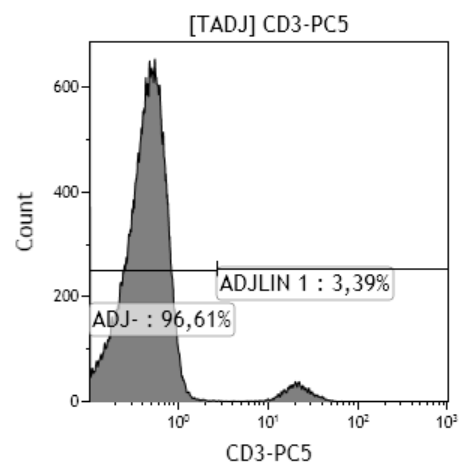
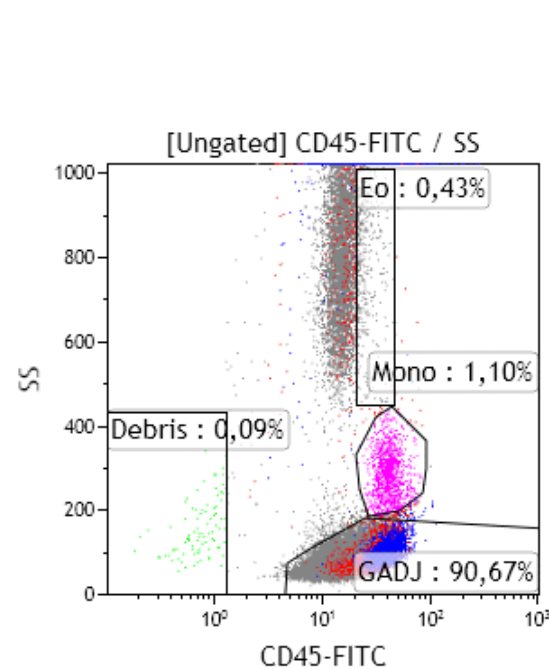
(1):Z0008654.LMD FL3 LOG/FL2 LOG A



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



Pacient: M, *1966

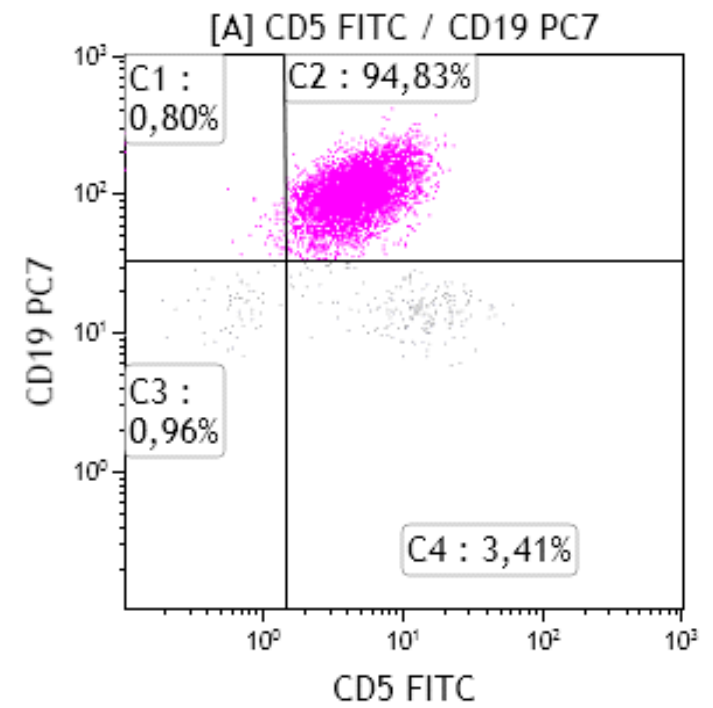
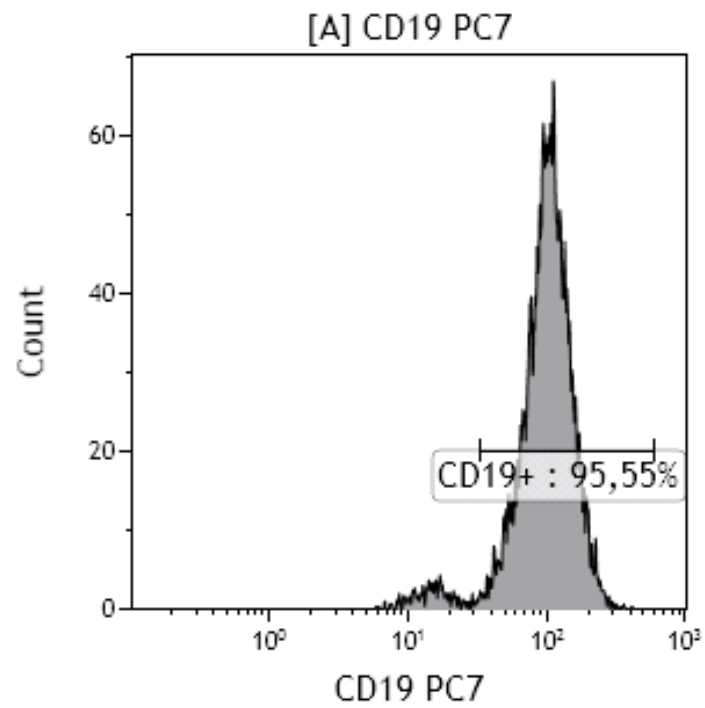
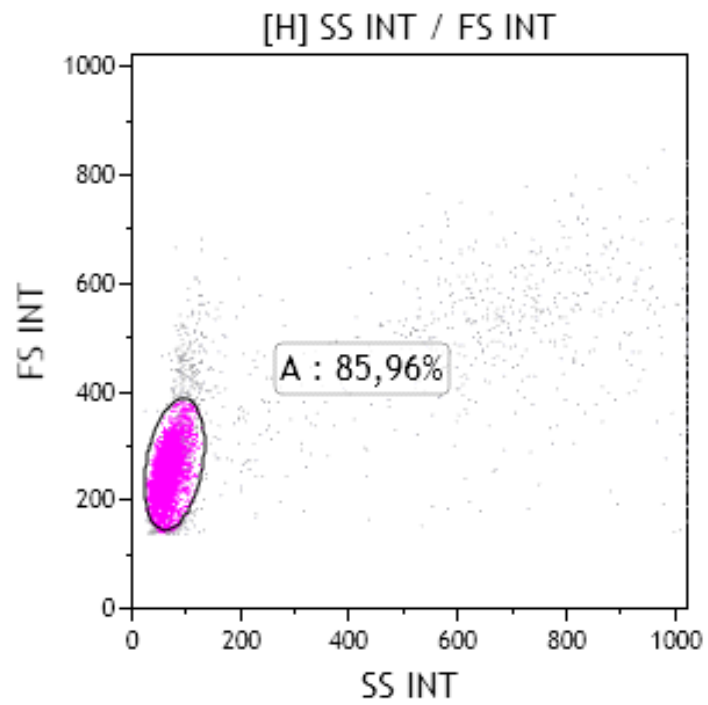


Leukémia

vyšetrenie CD5+CD19+ buniek

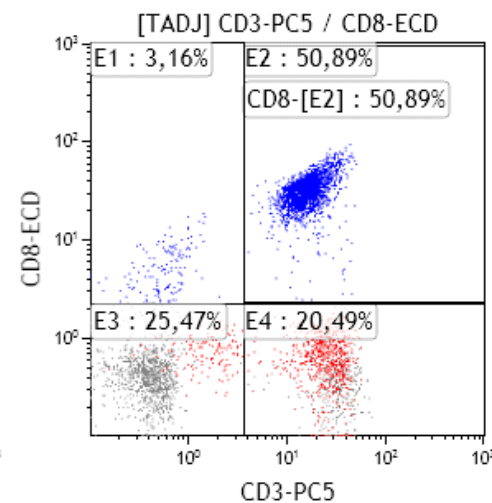
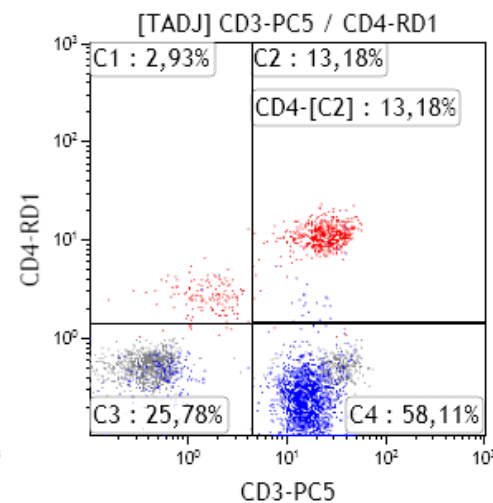
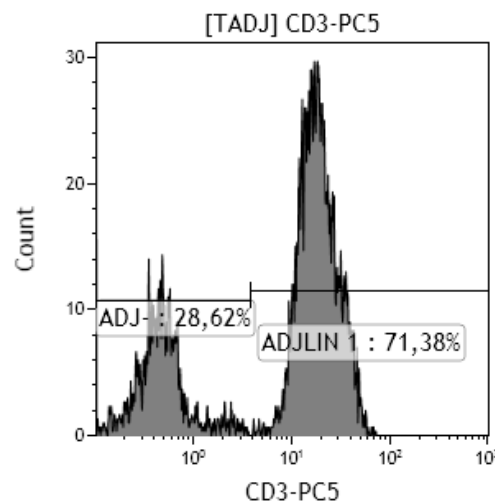
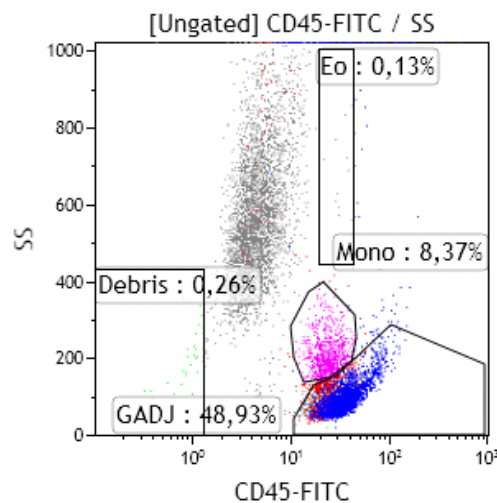


CD5+CD19+



CD5+CD19+ : 94.8%

Pacient: M, *1999

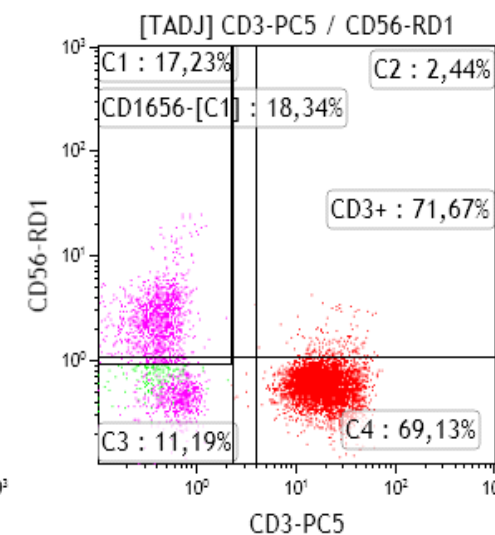
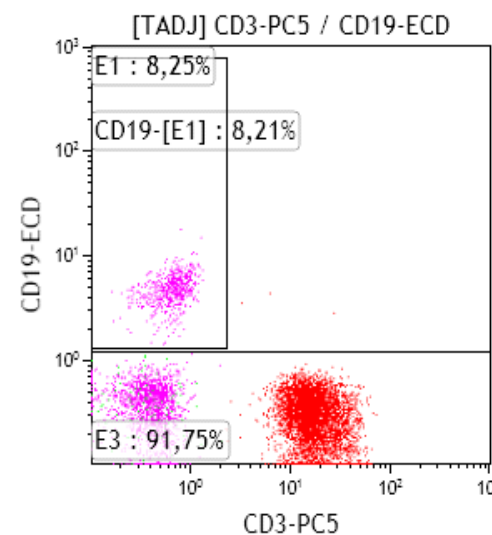


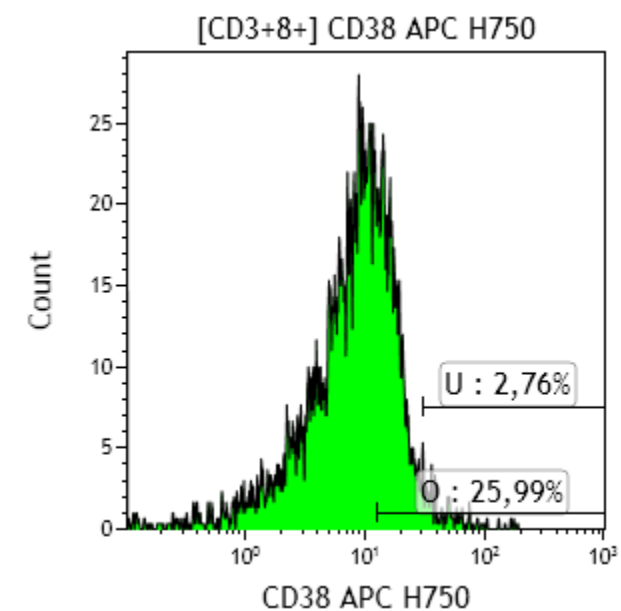
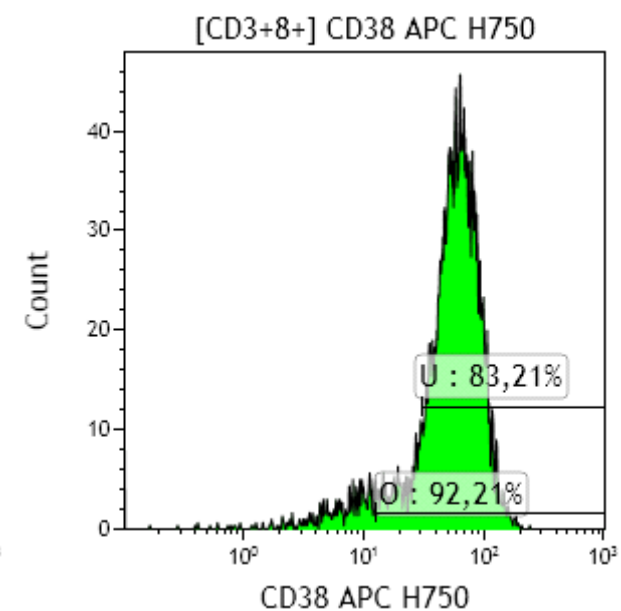
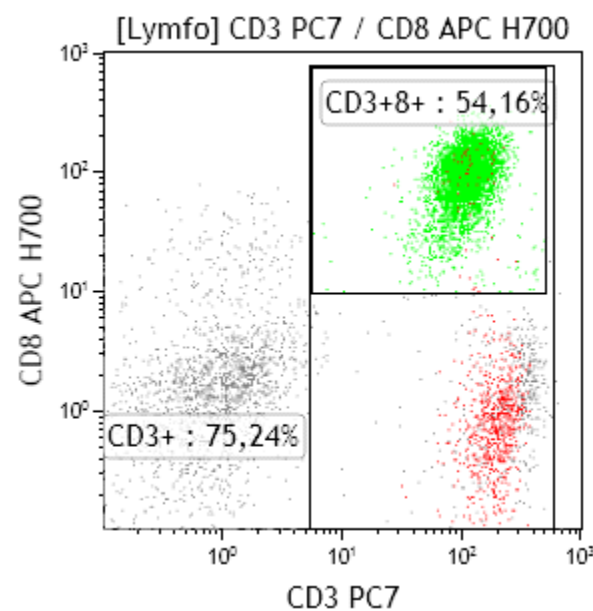
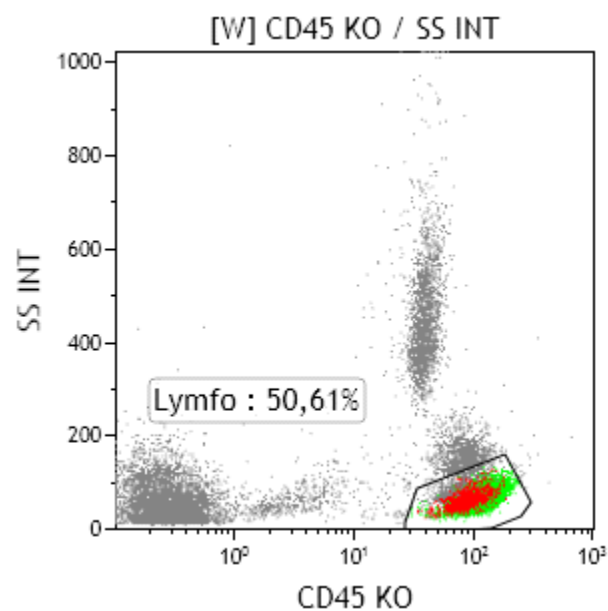
obrátенý pomer CD4/CD8!

CD4+ 13,2%

CD8+ 50,9%

virová infekcia???





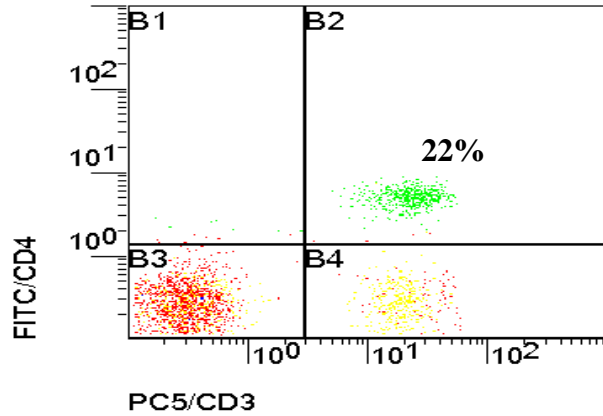
CD8+CD38+ 83,2%
 CD8++CD38++ 92,2%
 EBV infekce

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

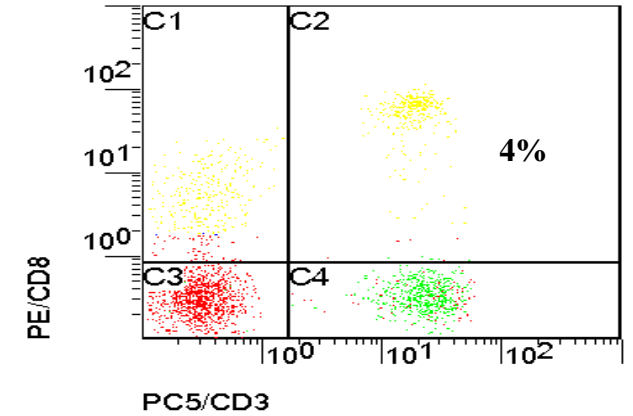
(3):Z0001091.LMD FL4 LOG/FL1 LOG A



T LYMFOCYTY

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

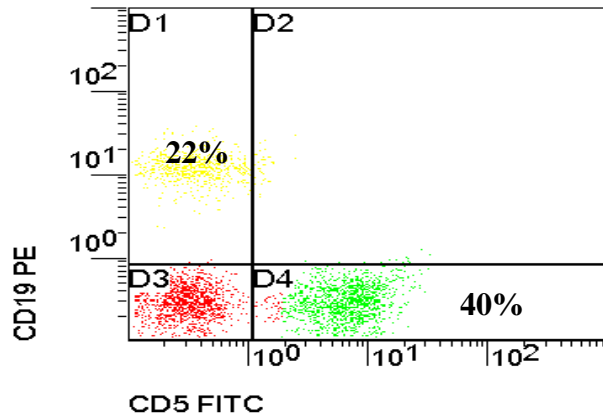
(3):Z0001091.LMD FL4 LOG/FL2 LOG A



B LYMFOCYTY

- CD19+ : 22 (7-23) %

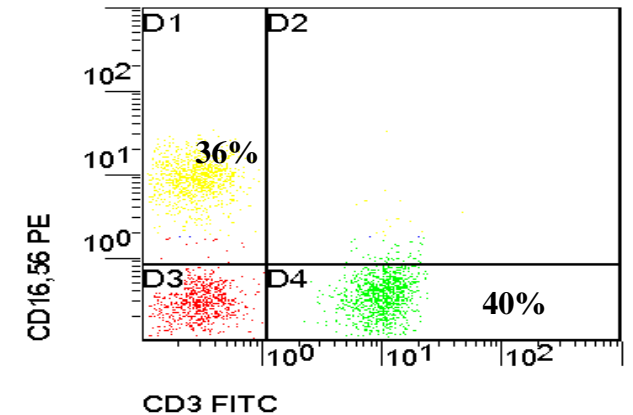
(1):Z0001094.LMD FL1 LOG/FL2 LOG A



NK LYMFOCYTY

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

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

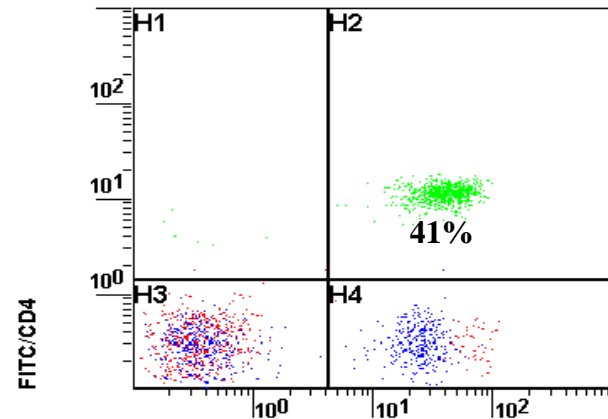


X-viazaná agamaglobulinémia

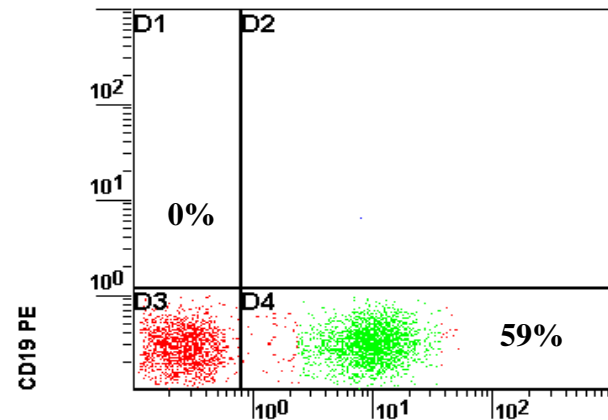
- Mutácia v géne kódujúcom Brutonovu tyrosinkinázu – dôležitá pre diferenciáciu B lymfocytov
- Ženy prenášačky, manifestáciu u mužov
- Dochádza k zastaveniu vývoja B lymfocytov
- Neprítomnosť B lymfocytov v krvnom riečišti

X-viazaná agamaglobulinémia

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



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

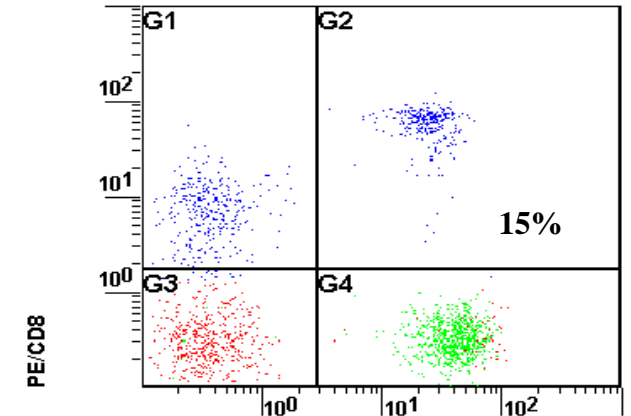


CD5 FITC

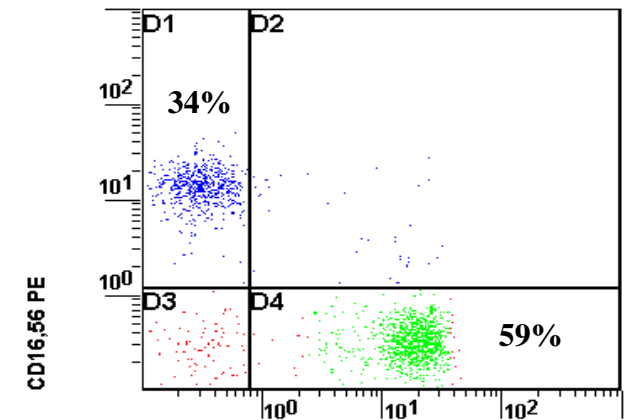
T LYMFOCYTY

- 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

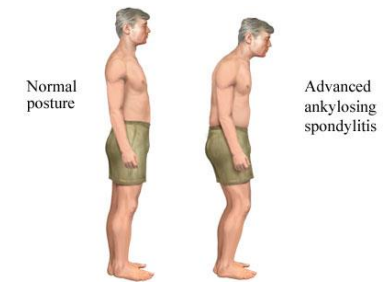
B LYMFOCYTY

- CD19+ : 0 (7-23) %

NK LYMFOCYTY

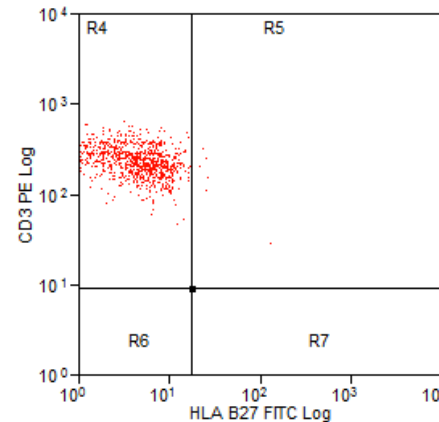
- CD16,56+ : 34 (6-20)%

HLA-B27

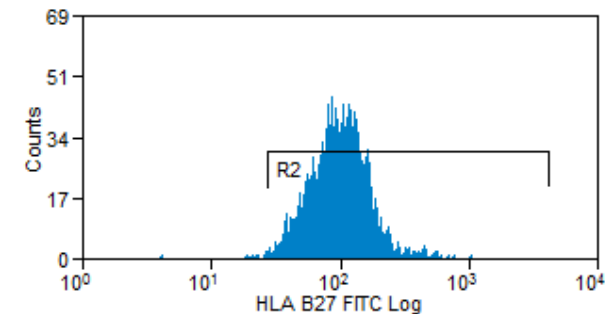
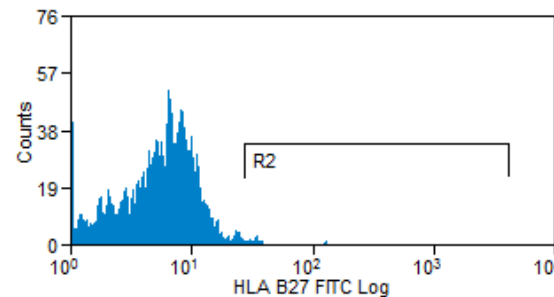
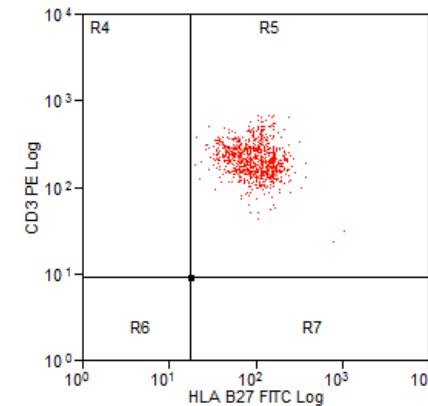


asociace HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění, jako jsou záněty kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, nohou a šlach, dále lupénka (psoriasis), vyrážek, chronické bolesti spodní části zad a spondyloarthropatie, z nichž nejznámější je ankylozující spondylitida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

negativní



pozitivní

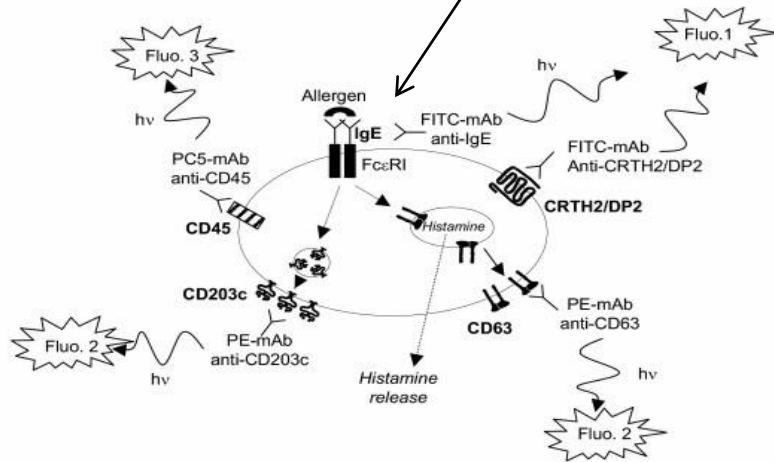


Test aktivace bazofilů (bazotest)

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

