



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



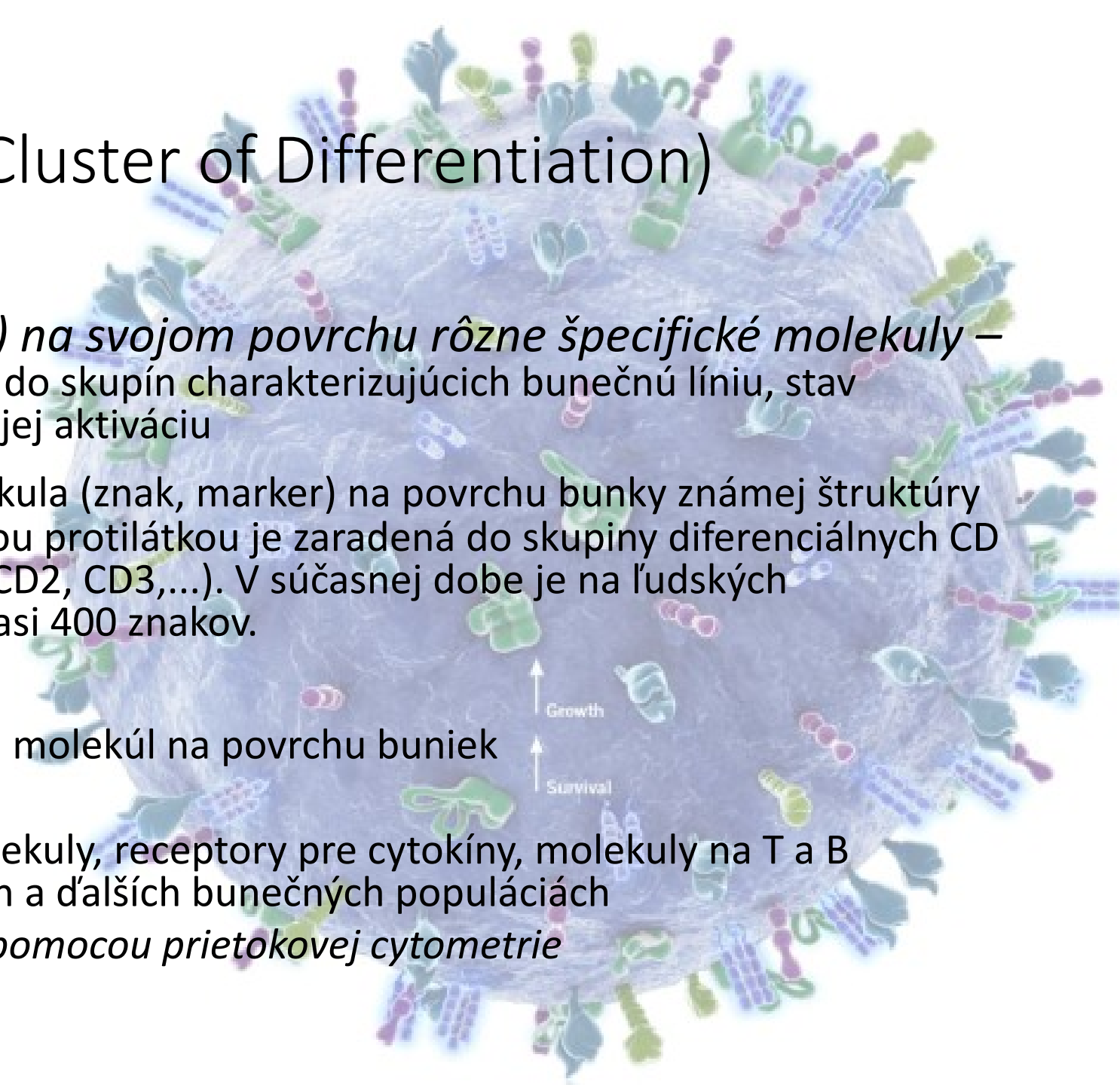
Eosinophil



Basophil

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:* pokiaľ je molekula (znak, marker) na povrchu bunky známej štruktúry a je rozpoznateľná monoklonálnou protilátkou je zaradená do skupiny diferenciálnych CD znakov a označená číslom (CD1, CD2, CD3,...). V súčasnej dobe je na ľudských leukocytoch charakterizovaných asi 400 znakov.
- **Využitie:**
 - označenie plne definovaných molekúl na povrchu buniek
 - rozdelenie podľa funkcie:
 - adhézne membránové molekuly, receptory pre cytokíny, molekuly na T a B lymfocytoch, trombocytoch a ďalších bunečných populáciách
 - **Imunofenotypizácia buniek pomocou prietokovej cytometrie**



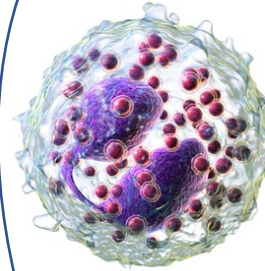
Všechny leukocyty: CD45

Panleukocytární znak

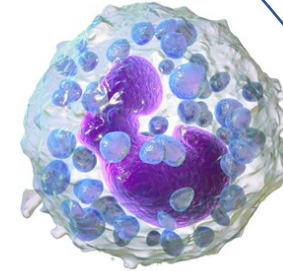
Monocyty: CD14



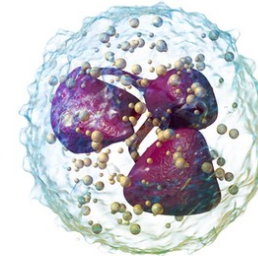
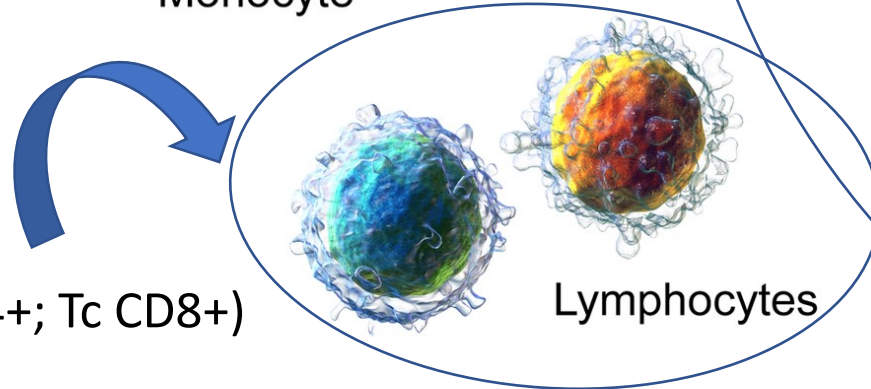
Granulocyty



Eosinophil



Basophil



Neutrophil

T-lymfocyty (Th CD4+; Tc CD8+)

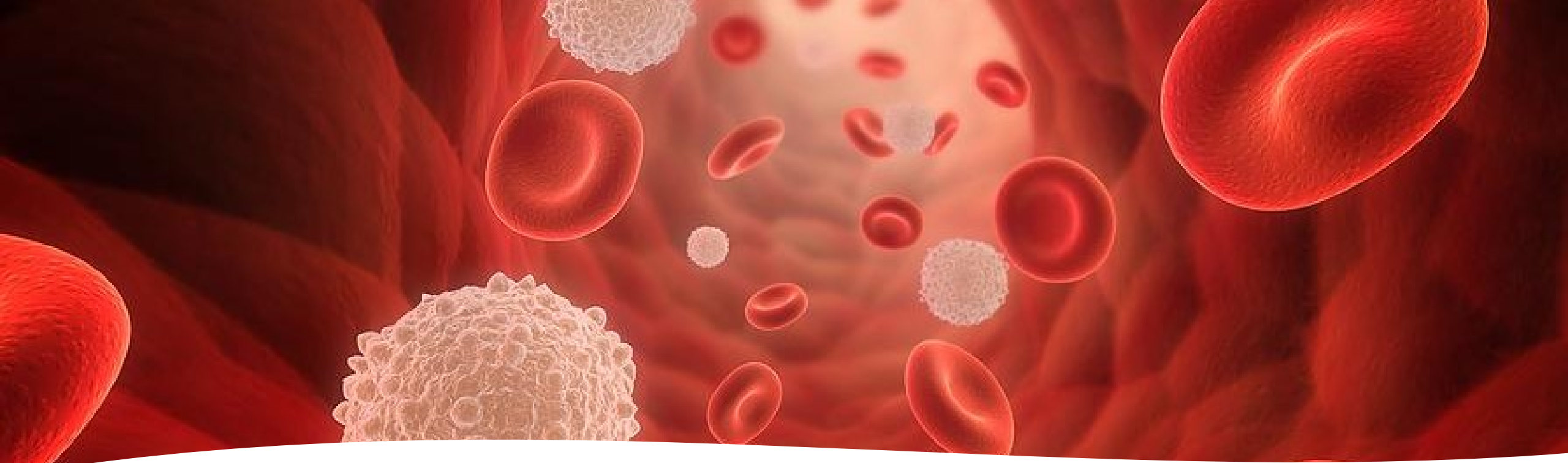
B-Lymfocyty

NK bunky

White Blood Cells

Neutrofilly: CD15

Leukocyty: počet leukocytov v krvi – $4-10 \times 10^9/l$



Imunofenotypizácia buniek

- stanovenie **leukocytárnych subpopulácií** pomocou prietokovej cytometrie (FACS- fluorescent-activated cell sorting)
- odber krvi do skúmavky s **EDTA**



T lymfocyty

CD3 - povrchová molekula prítomná na všetkých T-lymfocytoch

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **58-85 % z Lymfocytov**

T- lymfocyty sa delia na:

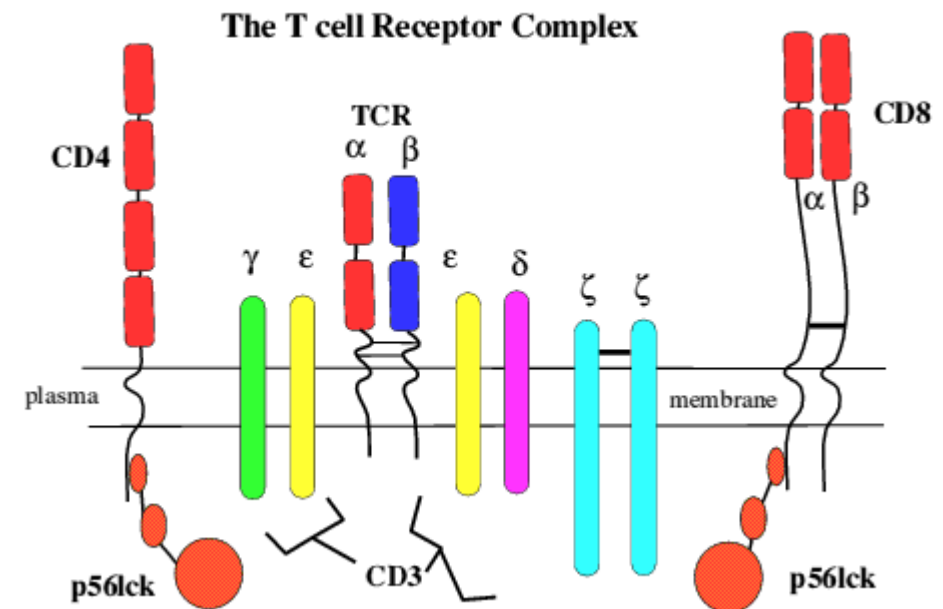


CD4+
 T_H (T_{H1} , T_{H2})
pomocné T-lymfocyty
(T helper cells)

CD8+
 T_C
cytotoxické T-lymfocyty
(cytotoxic T-cells)

Fyziologické zastúpenie z celkových CD3+ T-lymfocytov
30-60 % **15-35 %**

Stavba T- bunečného receptora TCR a umiestnenie koreceptorových molekúl CD3, CD4, CD8 zapojených do signalizácie cez T-bunečný receptor TCR

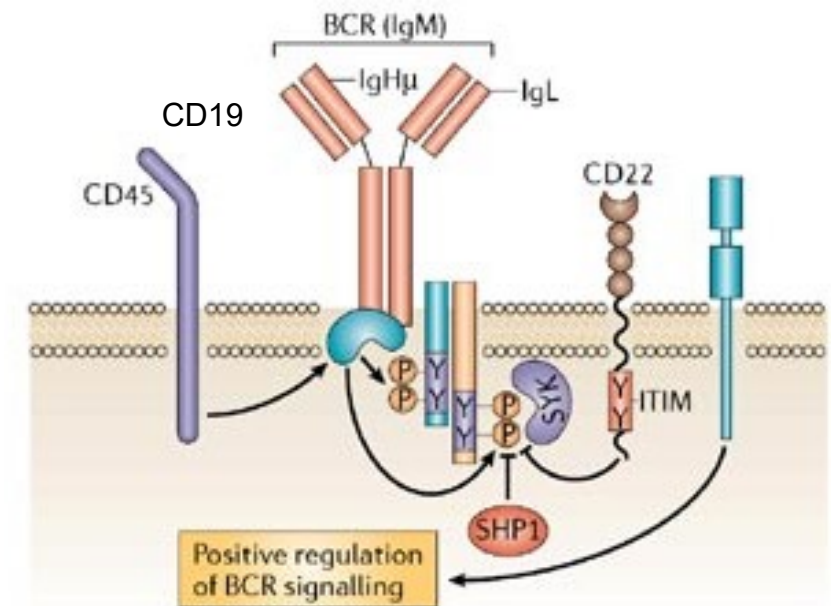


B lymfocyty

CD19, CD20 - povrchové molekuly najčastejšie využívané k rozlíšeniu B lymfocytov v prietokovej cytometrii

Vhodne zvolená kombinácia iných CD znakov slúži k presnejšej charakterizácii jednotlivých vývojových štádií a funkčných subpopulácií

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **7-23 % z Lymfocytov**



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

CD19 súčasťou B-bunečného receptoru BCR

NK (Natural Killer) bunky

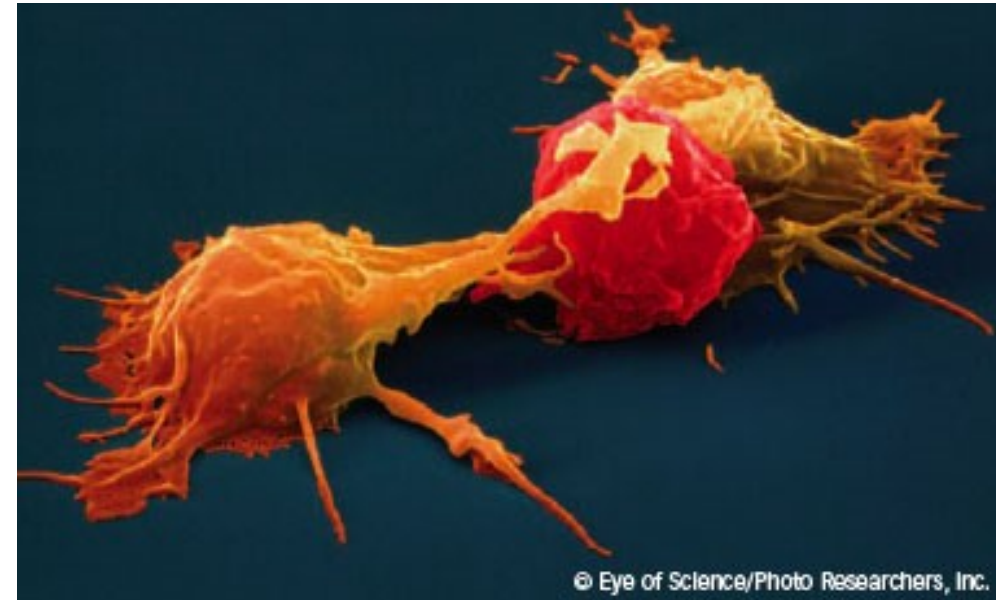
CD16⁺CD56⁺CD3⁻ - charakteristické povrchové markery

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **6-20 % z Lymfocytov**

- rozpoznávajú bunky, ktoré majú na povrchu abnormálne málo MHC I (= nádorové a vírom infikované bunky)
- Na zničenie bunky používajú cytotoxické mechanizmy (perforin, granzymy)

Pozor!!! Okrem klasických NK ešte existujú

NKT bunky: CD16⁺CD56⁺ **CD3⁺**



Monocyty

CD14 - povrchová molekula charakteristická pre monocyty

Fyziologické zastúpenie v periférnej krvi: **0-10 % z Leukocytov**

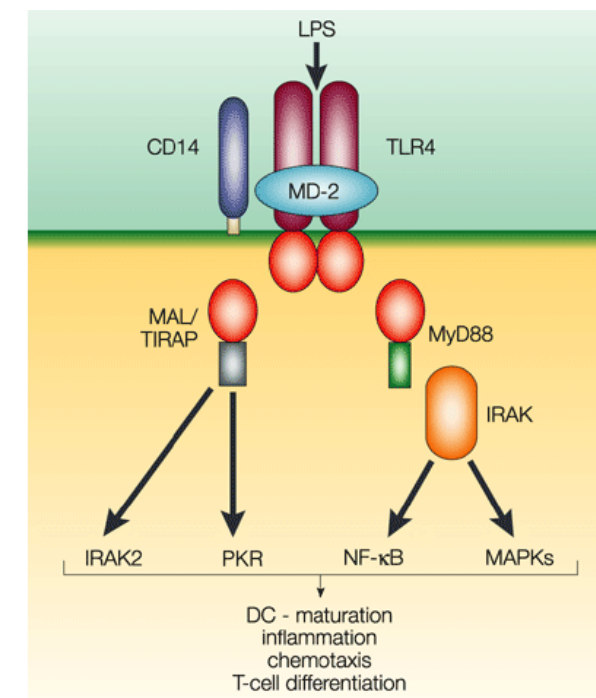
- súčasť nešpecifickej imunity
- schopnosť fagocytózy
- tkanivová forma = makrofág
- APC = antigén prezentujúca bunka

Na svojom povrchu exprimujú HLA DR – Human Leukocyte Antigen DR isotype

- naviazanie peptidov z pohltených patogénov →
- rozpoznanie pomocnými T-lymfocytmi
- cytometrický marker pre imunitnú odpoveď

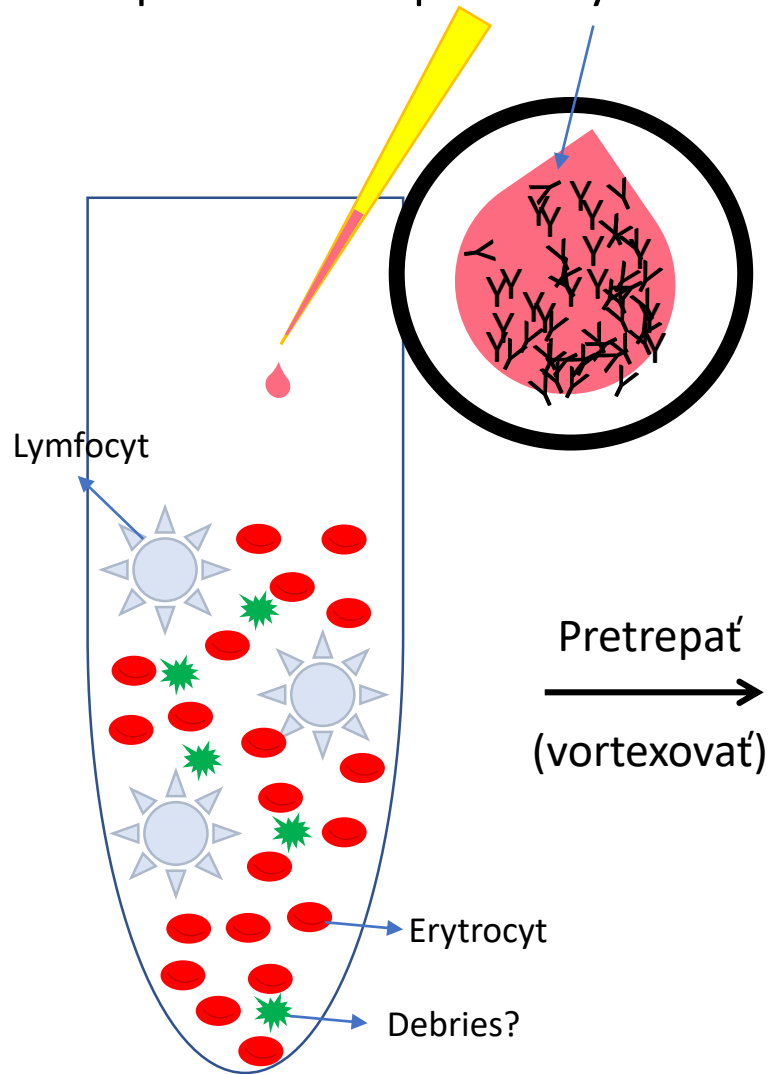


CD14 ako koreceptor TLR4 zapojený do detekcie bakteriálnych lipopolysacharidov (LPS)



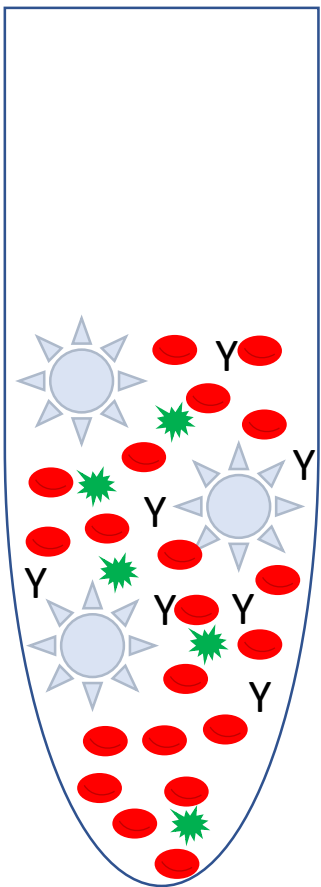
Príprava vzorky na FACS

Pipetovať MIX potrebných MPL



Vzorka krvi 45µl

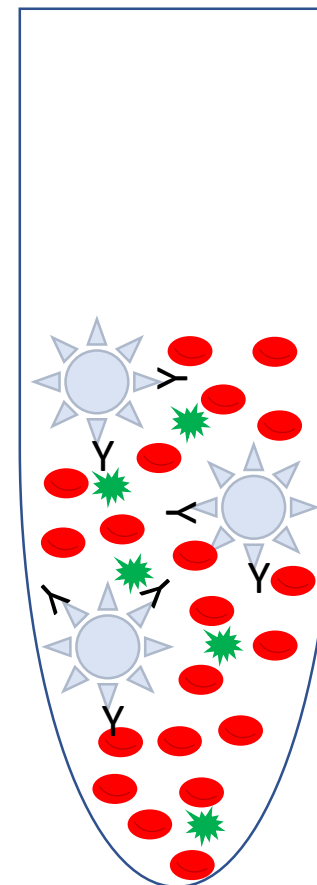
Voľné MPL - väzba na receptory



Vzorka krvi 45µl + MPL

30min.
inkubácia
→
tma
lab. teplota

Plná krv značená MPL



Príprava vzorky na FACS

Lýza erytrocytov

- Erytrocyty prítomné vo vzorke zahlcujú meranie (obraz je ťažko odčítateľný), preto po značení plnej krvi MPL je nutné previesť lýzu erytrocytov
- K vzorke sa postupne pridáva:
 - **Roztok A: 600ul**
 - **Príprava roztoku A:** 1,5 l destilovanej vody + 1,8 ml 99% kyselina mravenčia – spôsobuje lýzu erytrocytov v kyslom prostredí
 - **Roztok B: 300ul**
 - **Príprava roztoku B:** 1,5 l destilovanej vody + 9,0 g bezvodého Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl, 46,95 g bezvodého Na_2SO_4 – **alkalický roztok = zastavenie lýzy a úprava pH**
 - **Roztok C: 100ul**
 - **Príprava roztoku C.:** 1,5 l PBS (pH 7-7,4) + 15 g paraformaldehydu – **fixácia buniek**

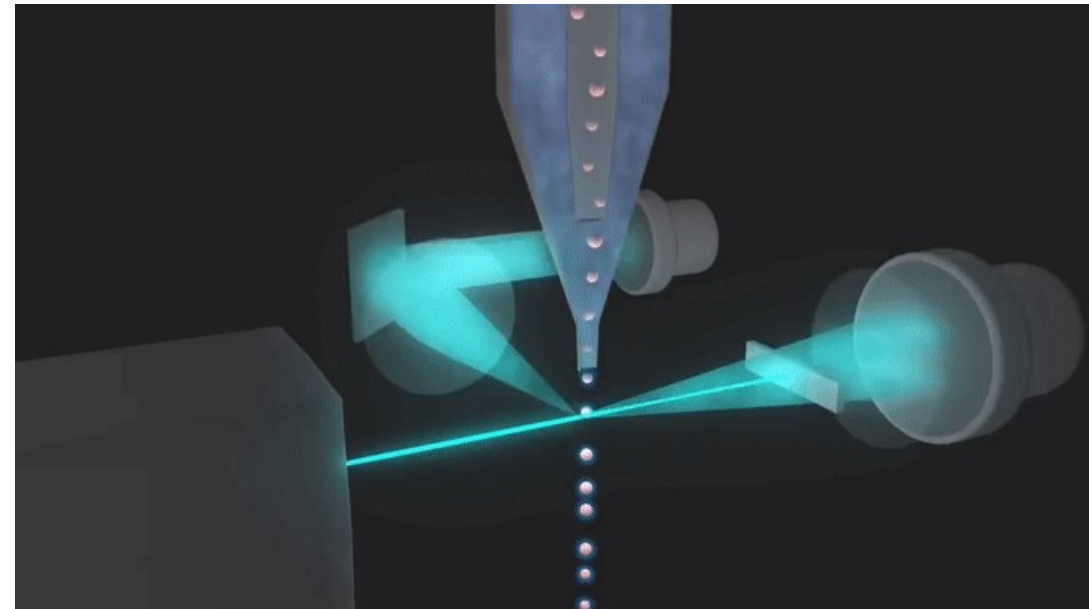
Vzorky sa do začiatku merania uchovávajú v tme pri 4°C

Automatický lyzátor TQ-prep od Firmy Beckman Coulter



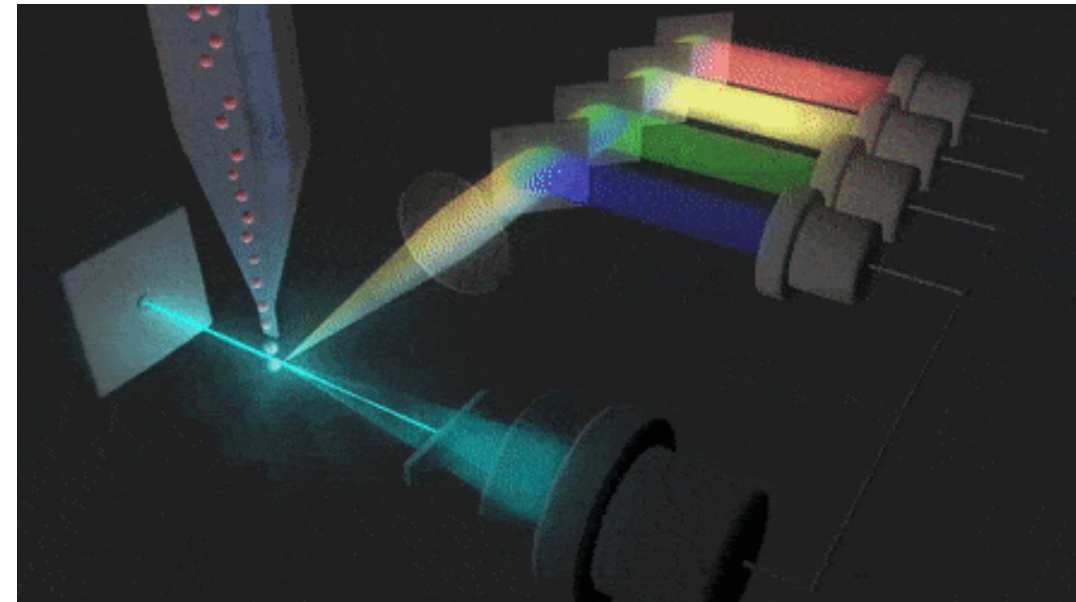
Flow+cyto+metria = „meranie buniek v pohybe“

- Možnosť analýzy mnohých vlastností a charakteristík na úrovni jednej bunky počas krátkeho časového úseku
 - Dnešné stroje umožňujú 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



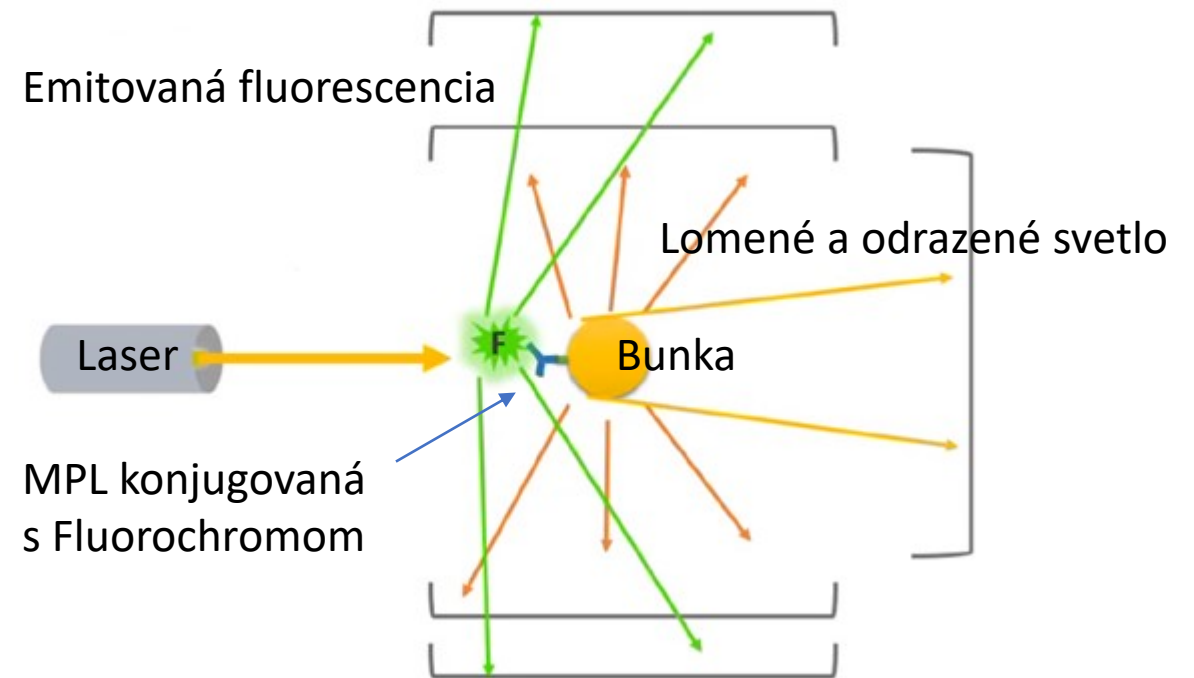
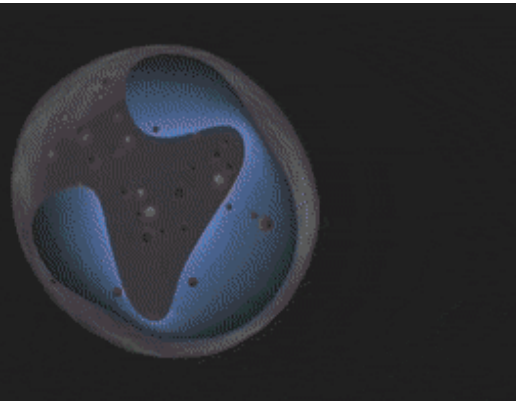
Princíp FACS

- 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 (rozptýlené svetlo + fluorescencia)
- Namerané dáta sa ukladajú a ďalej analyzujú

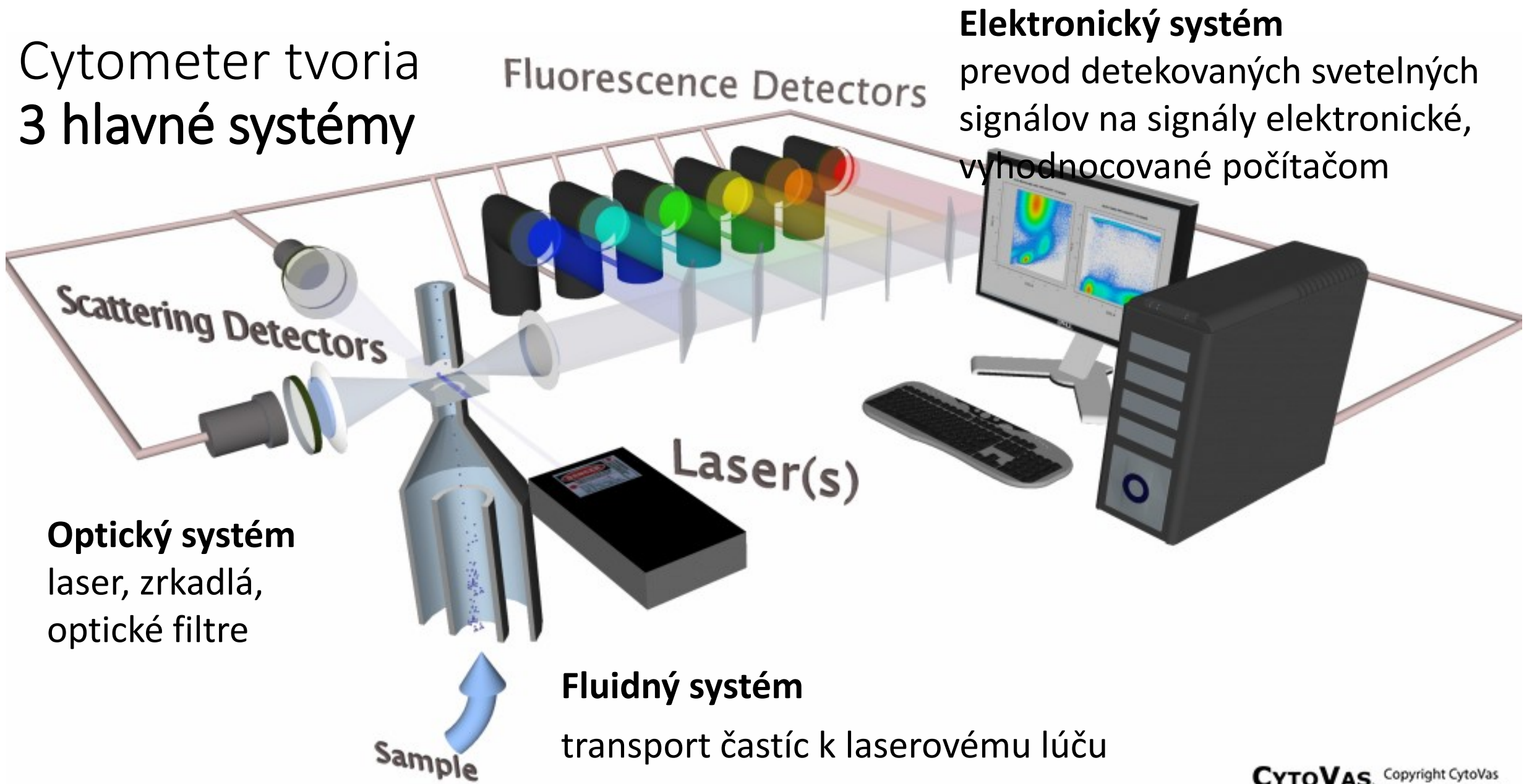


Čo meriame???

- **Lomené a odrazené svetlo** - pri prechode buniek laserovým lúčom (paprskom) dochádza k jeho lomu a odrazu na bunečnom povrchu a bunkových organelách
- **Emitovanú fluorescenciu** – pokiaľ použijeme MPL konjugované s fluorochromom
- Častice veľkosti 0,2-150 μm
 - prokaryotické a eukaryotické bunky
 - vírové častice, baktérie, huby
 - komplexy Ag-Ab



Cytometer tvoria 3 hlavné systémy



Optický systém
laser, zrkadlá,
optické filtre

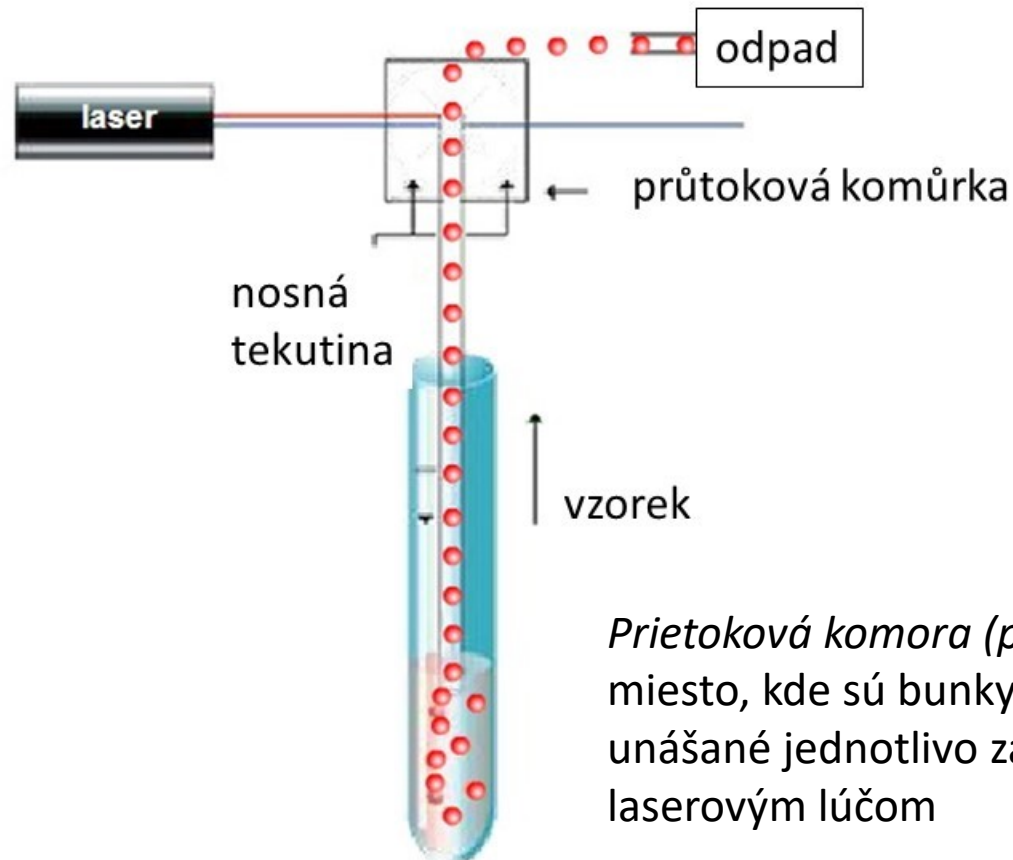
Fluidný systém
transport častíc k laserovému lúču

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

Fluidika

Zabezpečuje transport častíc (buniek) v prúde nosnej kvapaliny k laserovému lúču a ich odvod do odpadu – princíp hydrodynamické fokusace

Rez prietokovou celou: uprostred vzorka (bunečná suspenzia) unášaná nosnou kvapalinou (sheath fluid)



*Prietoková komora (prietoková cela)-
miesto, kde sú bunky v ideálnom prípade
unášané jednotlivo za sebou a ožiarené
laserovým lúčom*



Hydrodynamická fokusácia

- jav, ktorý zabezpečuje usporiadanie buniek jednotlivo za sebou
- vzorka, napr. bunečná suspenzia je vyvedená do prostredia tzv. Sheath fluid (nosná kvapalina)
- nosná kvapalina postupne strhá jednotlivé bunky a usporadúva ich do radu za sebou
- tlak nosnej kvapaliny je nastavený výrobcom, meniť môžeme tlak vzorky (nastavenie rýchlosti prietoku buniek)

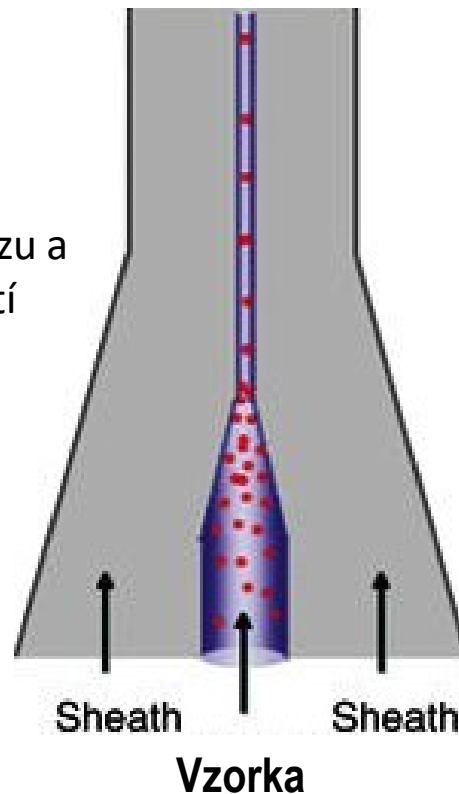
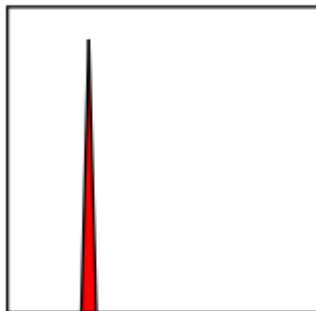
Nízky tlak vzorky

Úzky prúd vzorky

Menší prítok buniek

Presnejšie meranie

vhodné napr. pre DNA analýzu a meranie funkčných vlastností

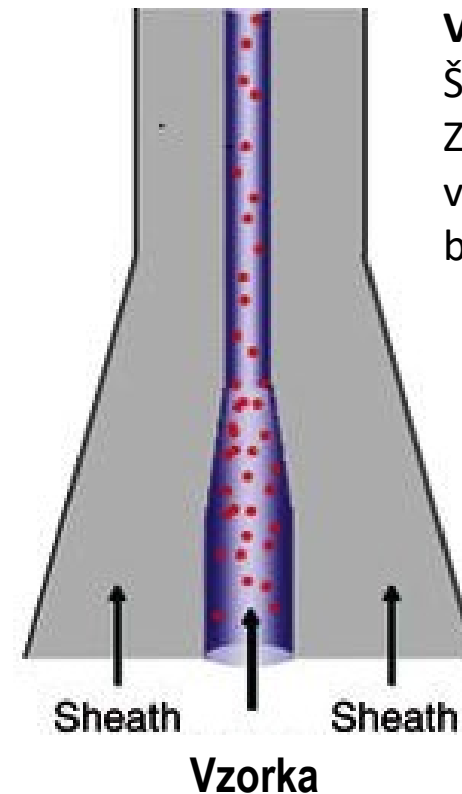
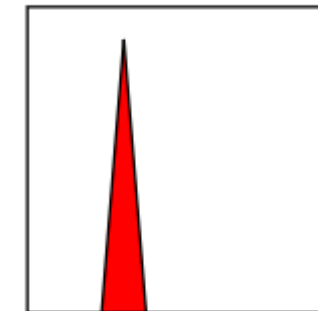


Vysoký tlak vzorky

Široký prúd vzorky

Zbieranie veľkého počtu častíc

vhodné napr. na imunofenotypizáciu buniek



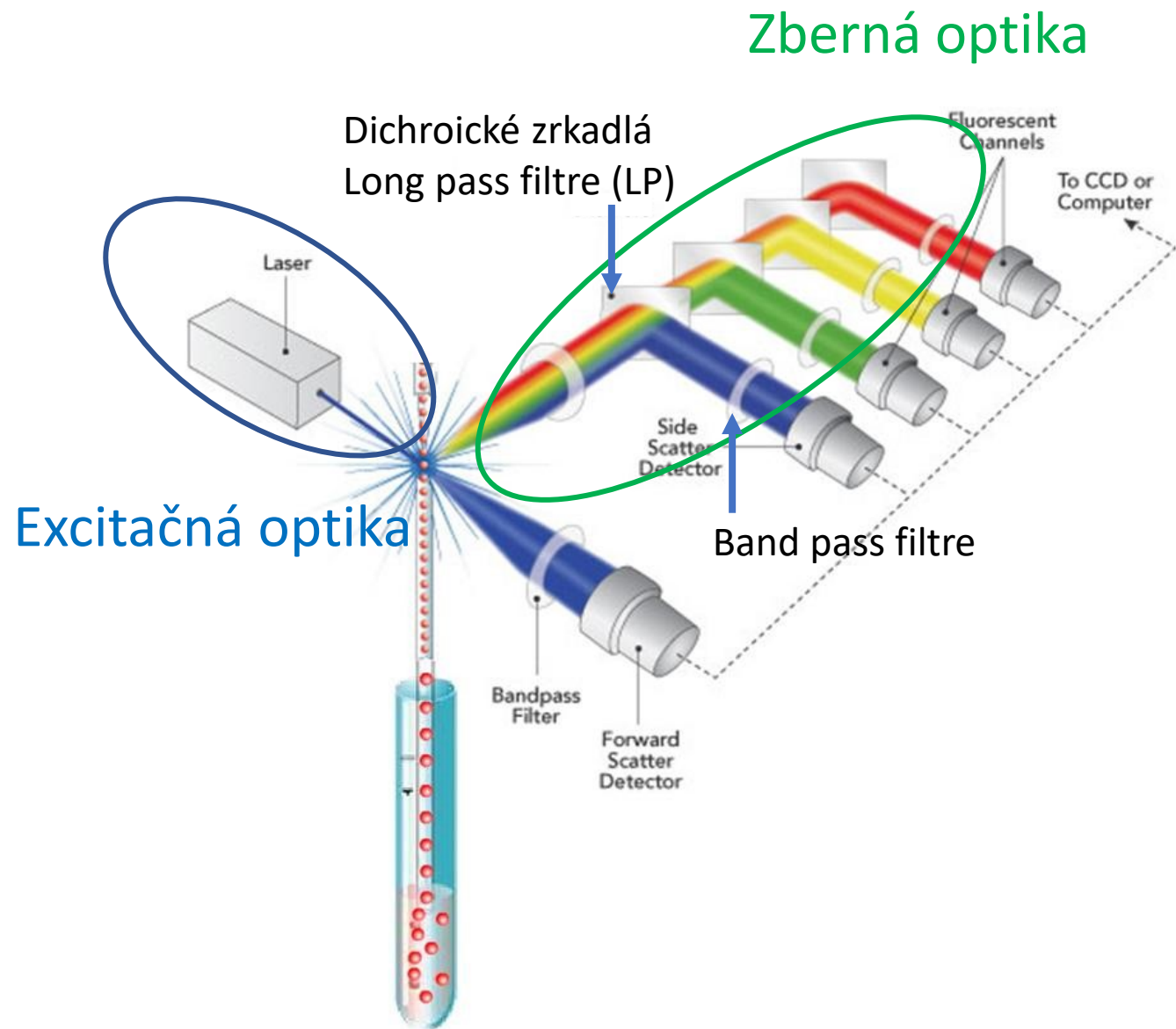
Optika

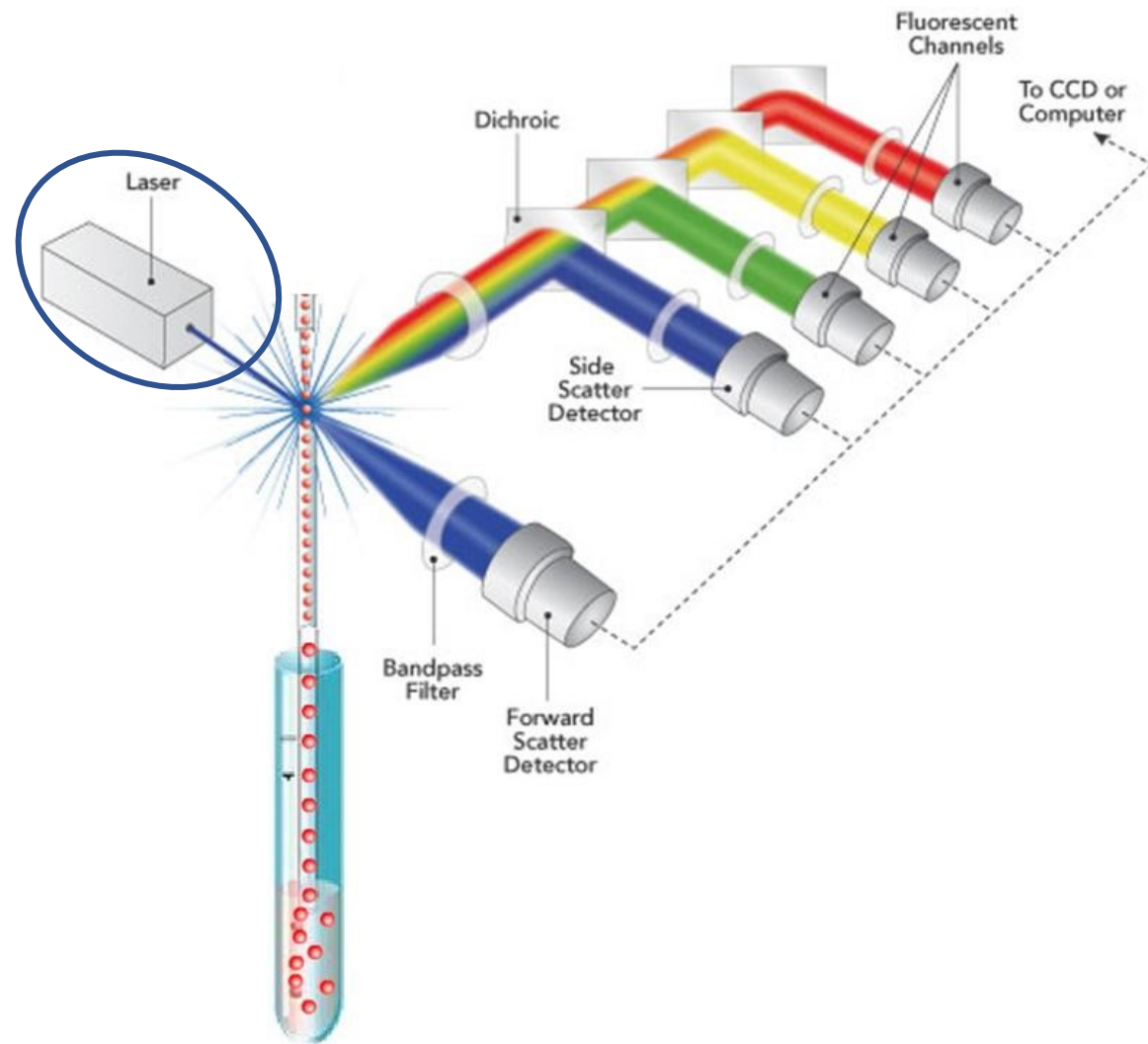
- **Excitačná optika**

laser a systém šošoviek (čočiek), ktoré zaostrujú a smerujú laserový lúč – pred ožiarením častíc

- **Zberná optika**

sústava šošoviek, ktorá vedie a rozdeľuje svetlo do rôznych vlnových dĺžok na príslušné detektory – odrazené a fluorescenčné žiarenie po ožiarení častíc

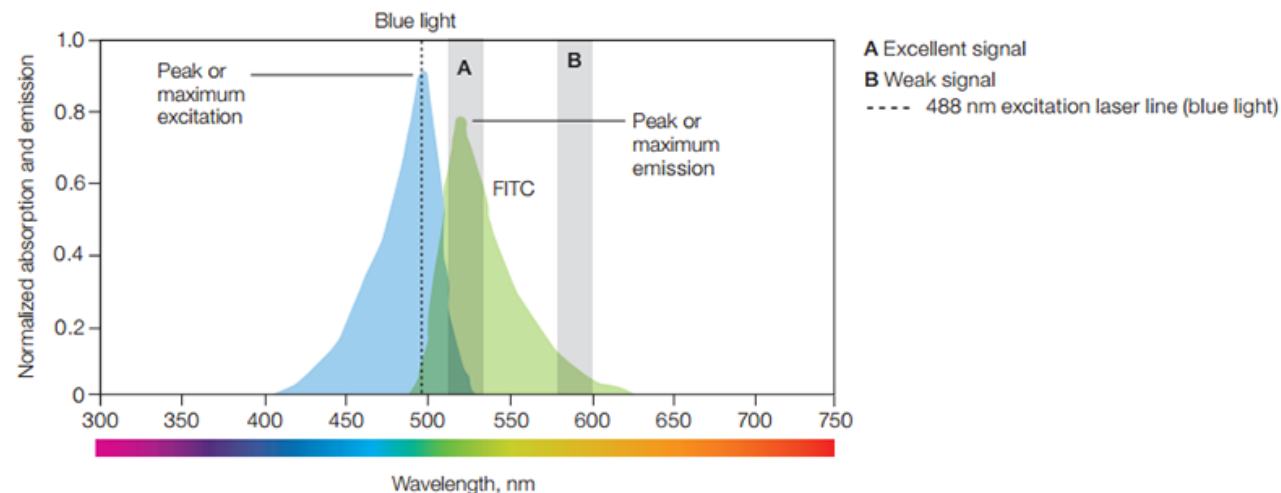




Lasery – zdroj žiarenia

- Každý cytometer obsahuje ako zdroj žiarenia laser
- Dnes: najčastejšie využívané 3 až 4 lasery súčasne v jednom stroji
- Každý laser má charakteristickú vlnovú dĺžku žiarenia → excitácia rôznych fluorochromov

Emisný peak: Pri ožiarení fluorochromu lúčom lasera je emitované žiarenie určitej vlnovej dĺžky. Podľa najvyššej intenzity vlnovej dĺžky emitovaného žiarenia sa volí vhodný detektor pre daný fluorochrom.



Zber optického signálu v prietokovej cytometrii

- Vo viacfarebnej prietokovej cytometrii dochádza k emisii niekoľkých fluorochromov naraz – tj. je emitované žiarenie rôznych vlnových dĺžok a je nutné takto vzniknuté žiarenie rozdeliť tak, aby bolo jasné, čo vyžarujú jednotlivé fluorochromy.
- Pri výbere fluorochromov sa v prietokovej cytometrii postupuje tak, aby sa emisné spektra vo svojich píkoch neprekrývali.
- K rozdeleniu emitovaného žiarenia slúžia filtre

Elektronika

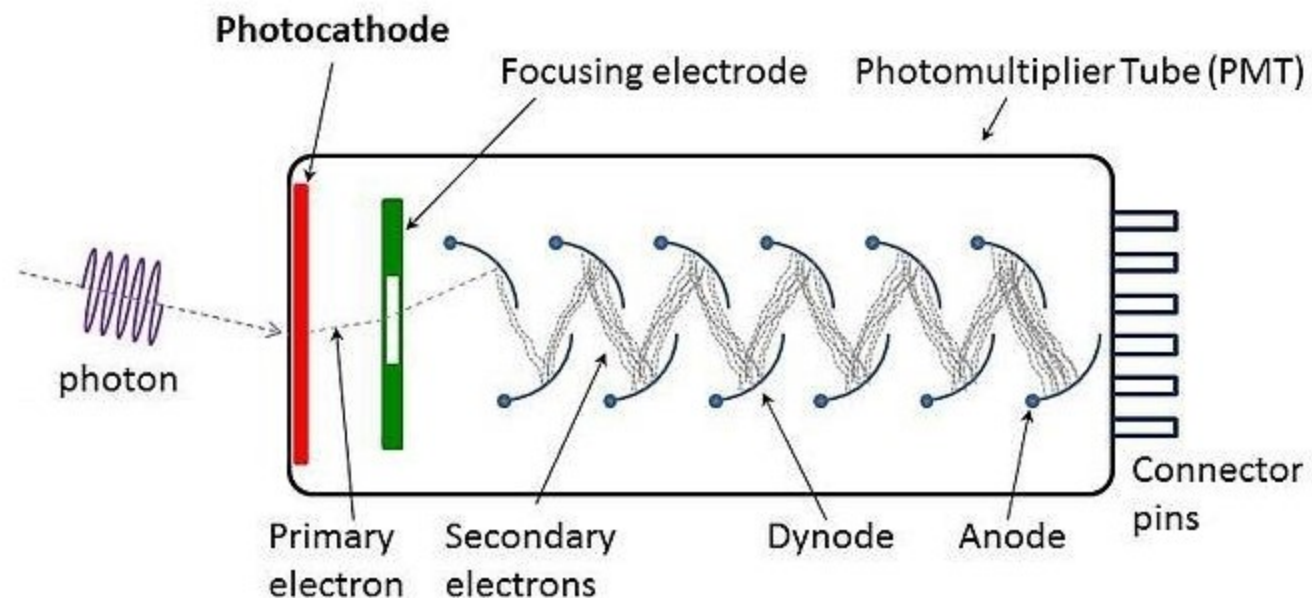
- Svetelné signály sú prevádzané na elektrické
- Typy detektorov:
 - lavinové fotodiódy: detekcia FSC
 - fotonásobiče PMT (PhotoMultiplierTube): detekcia SSC a fluorescencie

PMT

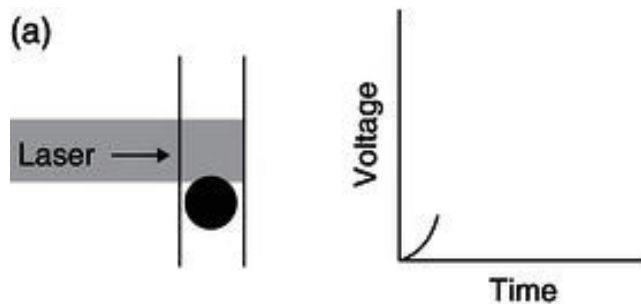
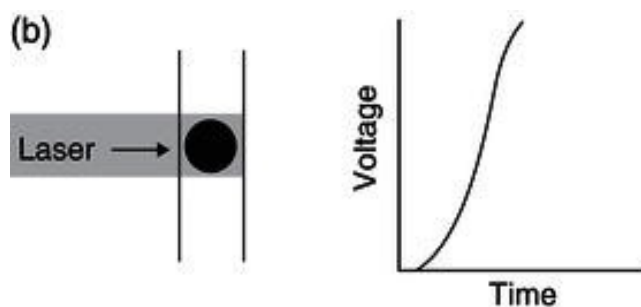
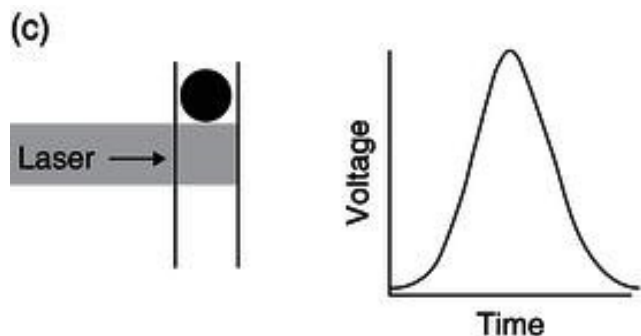
- veľmi citlivé, sú schopné zachytiť i slabé signály
- zvyšujú signál primárneho dopadajúceho žiarenia

Princíp PMT

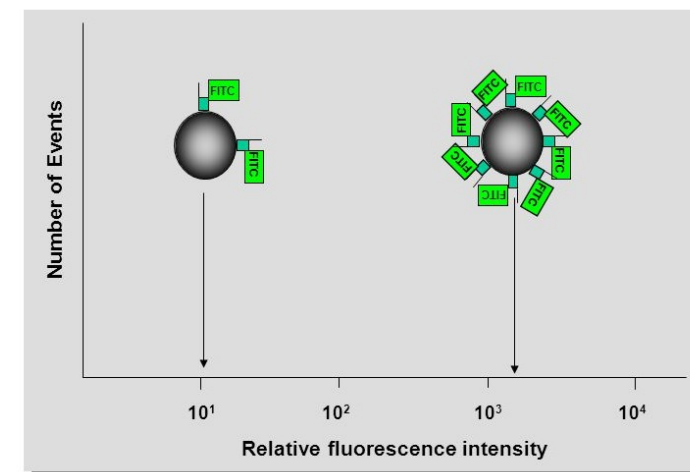
Žiarenie vo forme fotónov dopadá na fotokatódu. Z nej sú na základe fotoelektrického javu vyrazené elektróny, ktoré sú ďalej usmernené na tzv. dynódy (katódy z pozitívnym napätím). Na jednotlivé dynódy je privádzané stále vyššie napätie, čo umožňuje urýchlenie elektrónov a zvýšenie ich energie. Urýchlené elektróny majú dostatok energie na vyrazenie ďalších elektrónov z povrchu dynód. Počet elektrónov exponenciálne rastie. Vzniknuté elektróny dopadajú na koniec na anódu, na ktorej dochádza k vzniku napäťového pulzu. PMT umožňuje premeniť slabý počiatkový signál na silný napäťový pulz.



Vznik napätového pulzu / Intenzita fluorescence



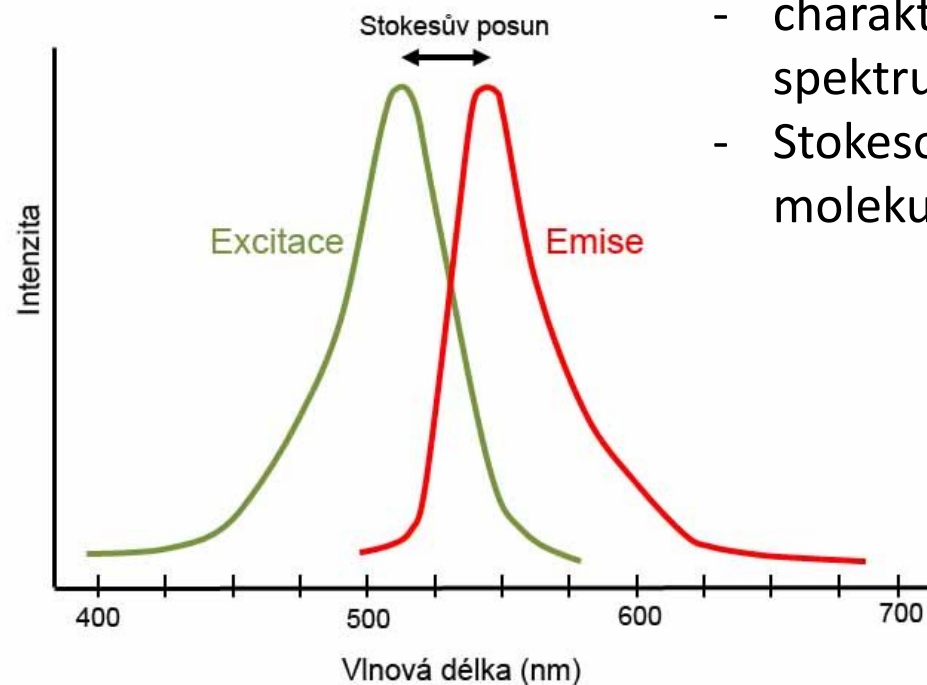
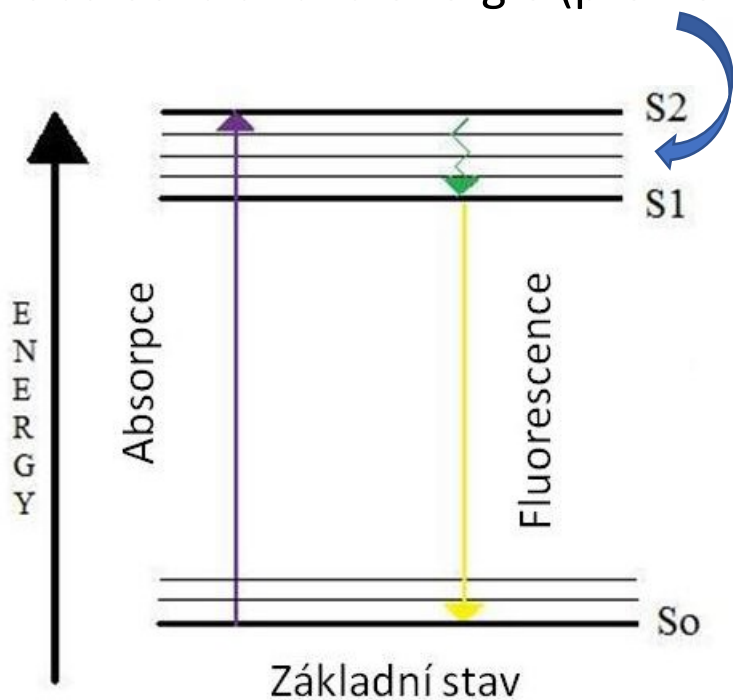
- prechod bunky laserovým lúčom generuje vznik napätového pulzu na detektore
- veľkosť napätového pulzu je daná intenzitou žiarenia (intenzitou fluorescence), ktoré dopadlo na PMT
- intenzita fluorescence závisí na:
 - expresii jednotlivých povrchových znakov
 - počte naviazaných fluorochromov
 - na sile fluorochromu (fluorochromy nevykazujú rovnakú intenzitu fluorescence)
- napätovým pulzom sú pomocou prevodníkov pridelené digitálne hodnoty rozdelené do 0-1024 kanálov na základe veľkosti pulzu
- každý z týchto kanálov odpovedá určitej intenzite fluorescence



Fluorescencia

Veľa buniek má rovnakú alebo podobnú morfológiu- na základe exprese povrchových znakov ich vieme roztriediť do skupín

- využívajú sa k tomu monoklonálne Ab značené **fluorochromom** špecifické k určitému epitopu
- fluorochrom je molekula schopná absorbovať žiarenie špecifickej vlnovej dĺžky (excitácia) a následne vyžiariť kvantum energie (emisie) vo forme fluorescenčného žiarenia
- čiastočná strana energie (premena na teplo) = Stokesov posun



Fluorochrom

- charakteristické excitačné a emisné spektrum
- Stokesov posun je daný štruktúrou molekuly

Fluorochromy

- Sú excitované vhodnou vlnovou dĺžkou (nutné zvoliť správny laser)
- Emitujú svetlo špecifickej vlnovej dĺžky (nutné zvoliť detektor v správnom pásme vlnových dĺžok)

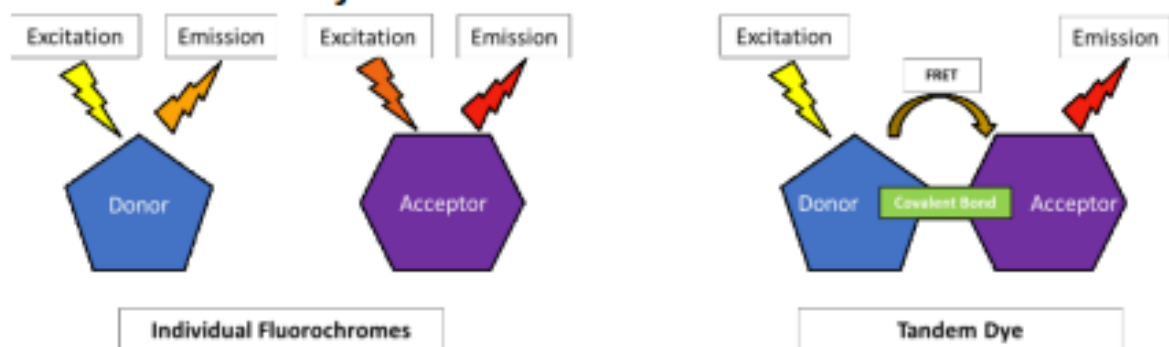
• I nezačlenené bunky môžu byť fluorescenčné vďaka slabej autofluorescencii

- **Příklady klasických fluorochromů:**

- FITC
- Phycoerythrin (PE)
- Krome orange (KO)

- **Tandemové fluorochromy:**

- 2 spojené fluorochromy: fluorochrom 1 (donor) excitován → emise světla → excitace fluorochromu 2 (akceptor) → emise světla
- Výhoda – velký rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou
- Nevýhoda – tandemové fluorochromy jsou náchylnější k rozpadu – podporuje jej vystavení světlu, čas
- Příklad: PE-CY5 (PC5) –phycoerythrin-cyanin 5.5



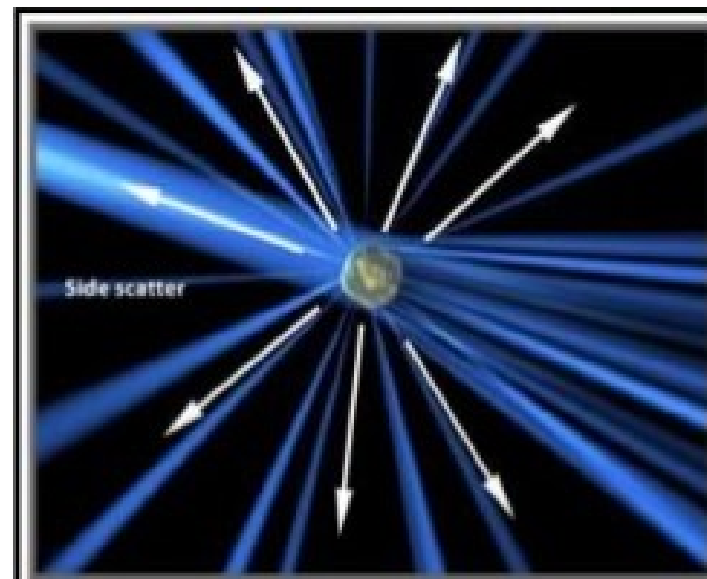
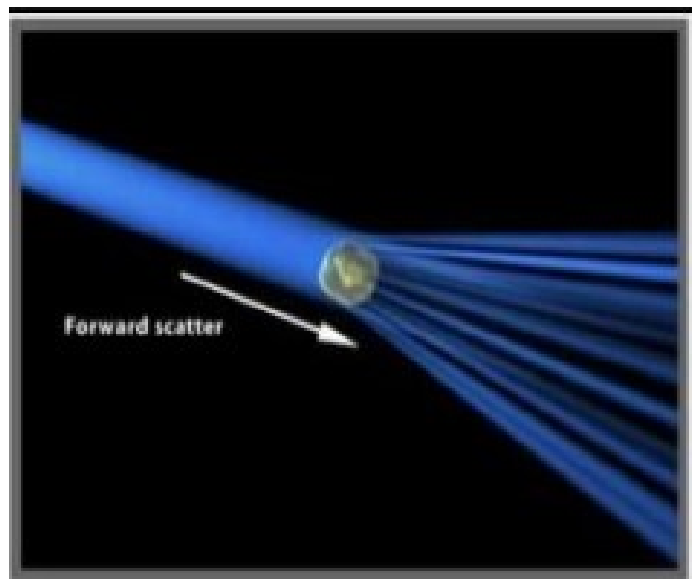
Veľkosť vs. granularita

- Veľkosť a členitosť bunky určujeme na základe rozptylu žiarenia (light scatter): prechádzajúca častica vychýli dopadajúce žiarenie

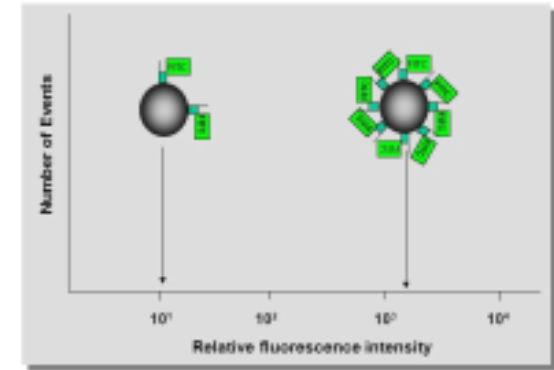
Forward Scatter (FSC) – rozptyl žiarenia v priamom smere → závisí na veľkosti buniek = určuje veľkosť

Side Scatter (SSC) – rozptyl žiarenia do strán → závisí na členitosti buniek = určuje granularitu

- Stačí jeden laser
- Nie je to fluorescenčné žiarenie (nepotrebujeme MPL s fluorochrómami)

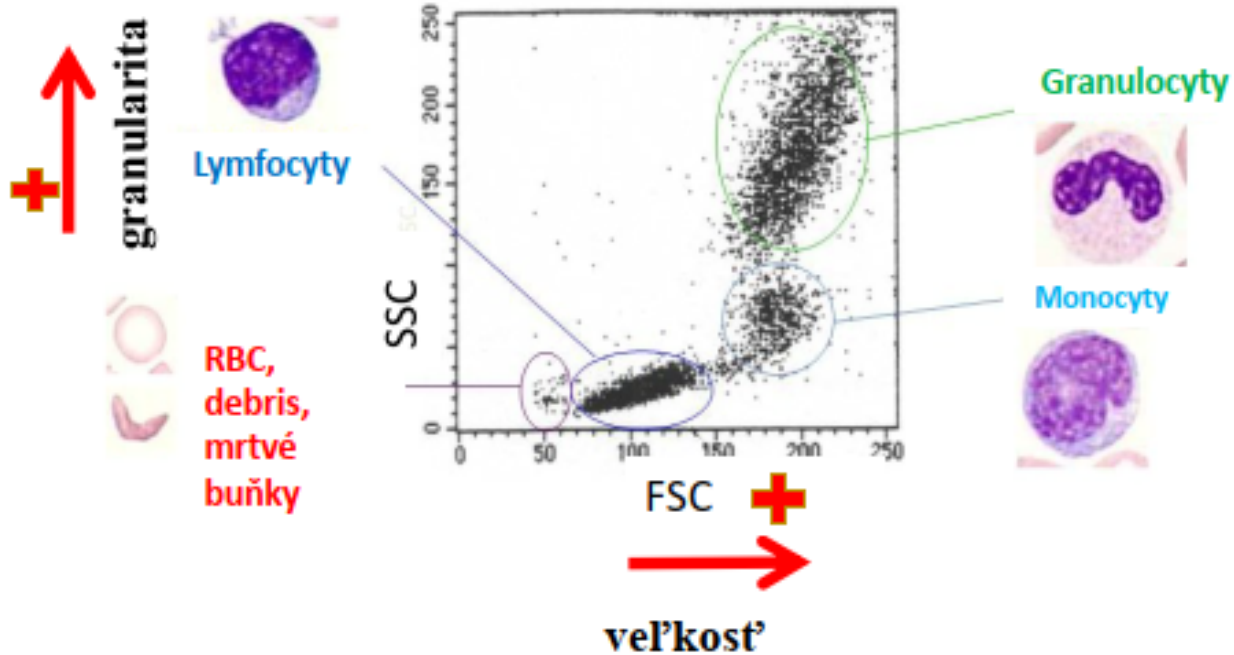


2 typy grafů



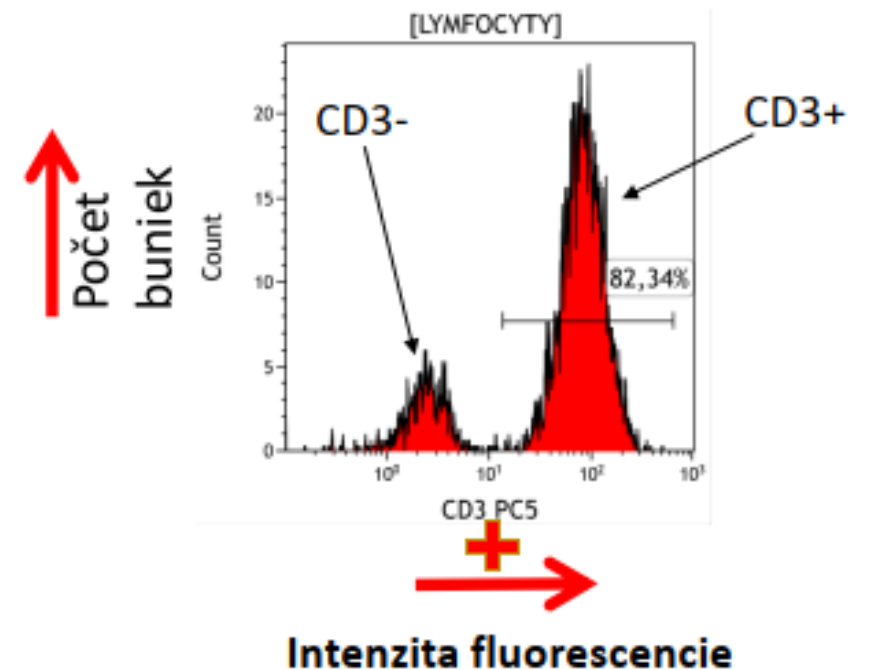
Dot plot

Volíme 2 libovolné parametry vůči sobě (osa x a y)



Histogram

Volíme 1 vybraný parametr (osa x), na ose y je vždy parametr count (= počet buněk)

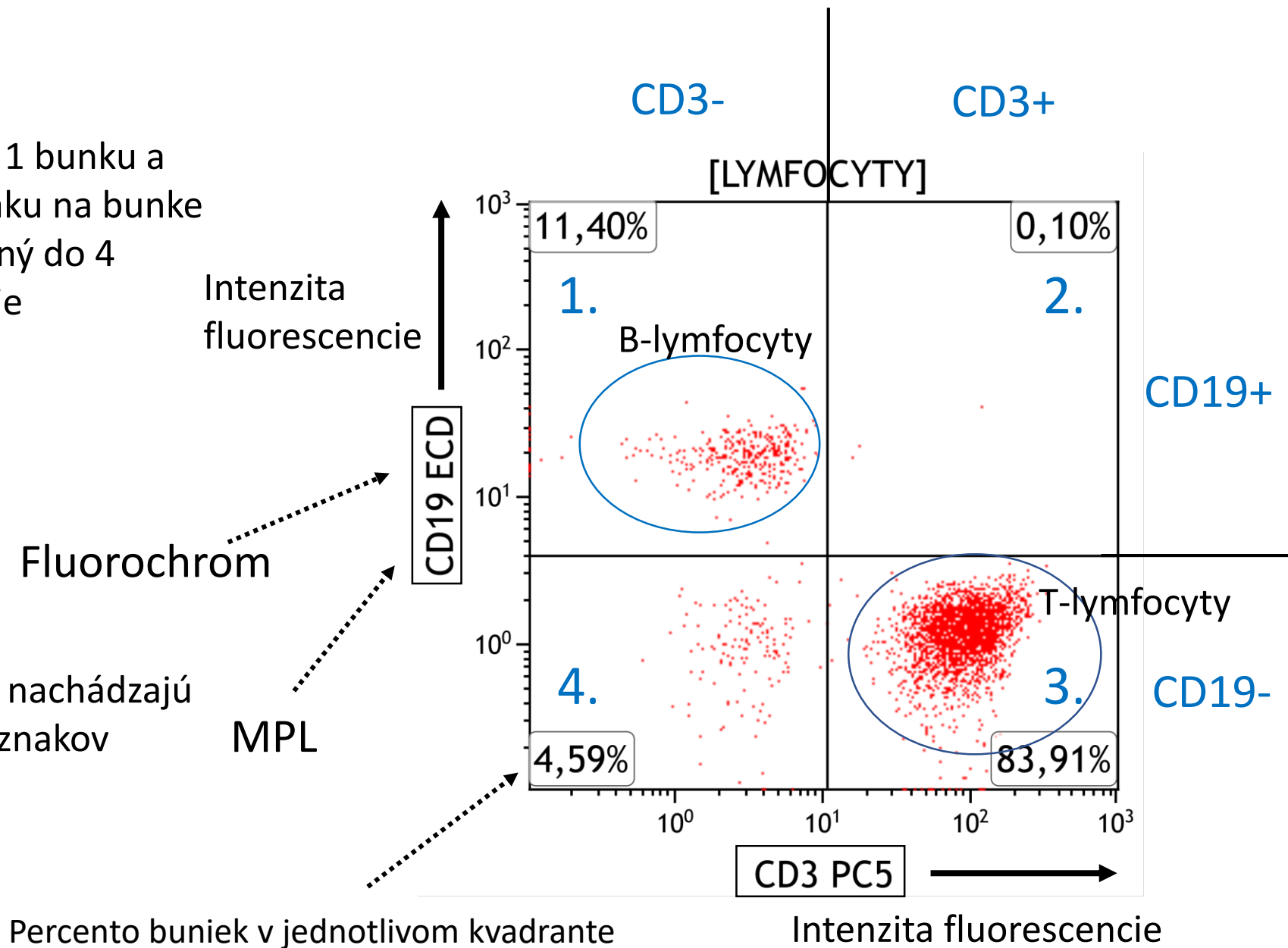


DOT PLOT

- každá bodka (tečka) zobrazuje 1 bunku a vyjadruje expresiu daného znaku na bunke
- príklad grafu: Dot Plot rozdelený do 4 kvadrantov, na základe expresie sledovaných znakov:

1. CD19+ CD3- = B-lymfocyty (11,40% z Lymfocytov)
2. CD19+ CD3+
3. CD19- CD3+ = T-lymfocyty (83,91% z Lymfocytov)
4. CD19- CD3-

- v jednotlivých kvadrantoch sa nachádzajú bunky s podobnou expresiou znakov



Výhody a nevýhody prietokovej cytometrie

Výhody

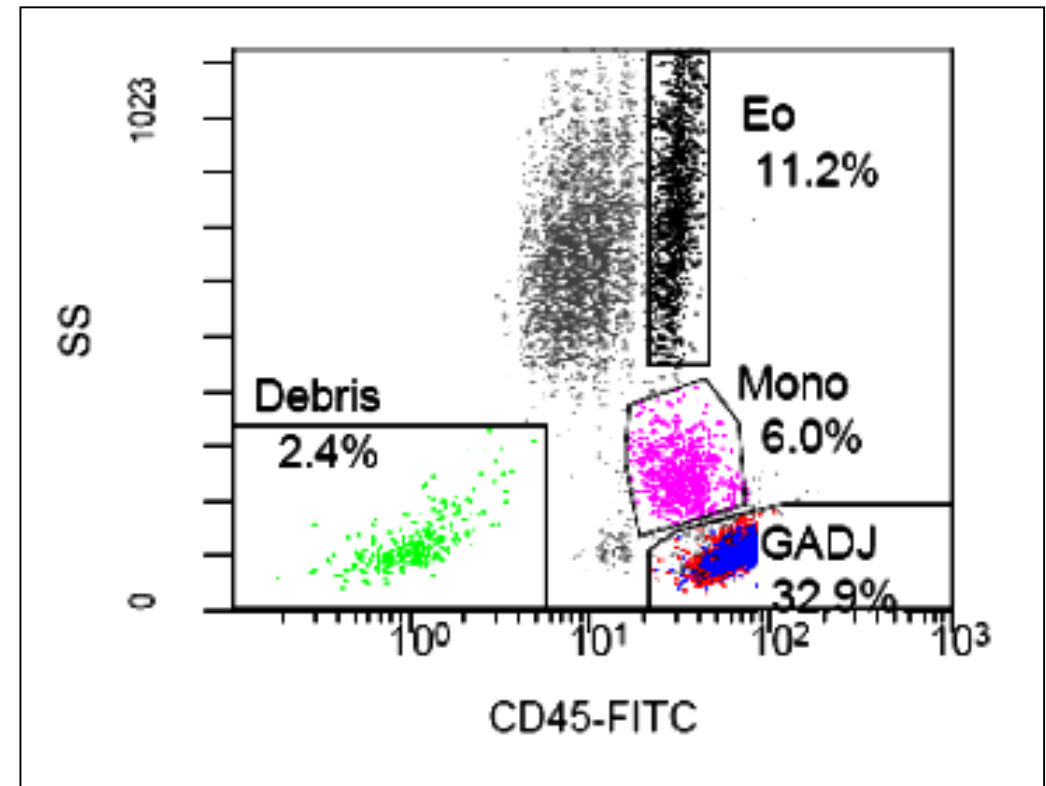
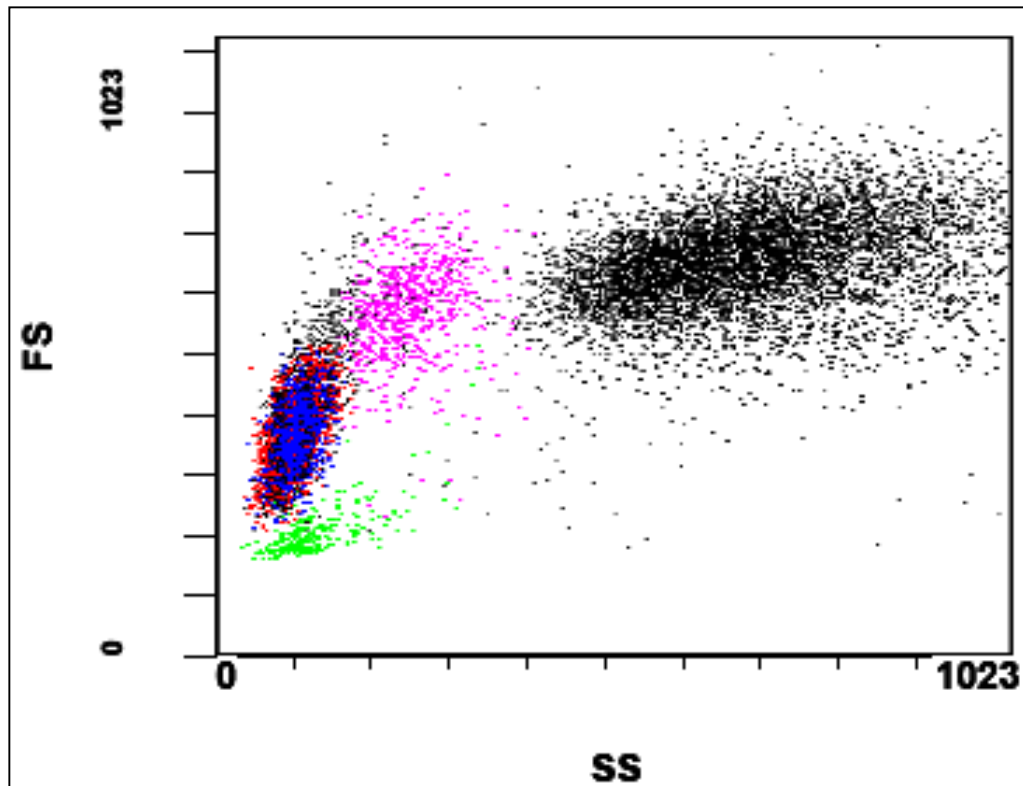
- Veľké množstvo analyzovaného materiálu – veľké množstvo dát
- Analýza trvá niekoľko minút
- Kvalitatívna + kvantitatívna analýza
- Možné manipulačné operácie- napr. triedenie buniek s vybranými vlastnosťami (cell sorting)

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

Krvný diferenciál

Základné vyšetrenie v imunologickom laboratóriu: stanovenie lymfocytárnych subpopulácií
Pripravujú sa **dve skúmavky**:



Sledujeme počet: Lymfocytov (GADJ); Monocytov (Mono); Eosinofilov (Eo); množstvo Debris (spád = mŕtve bunky)

Krvný diferenciál

Základné vyšetrenie v imunologickom laboratóriu: *stanovenie zastúpenia lymfocytárnych subpopulácií v plnej krvi*

Prietokovou cytometriou sa stanovuje počet buniek v jednotlivých subpopuláciách leukocytov a porovnáva sa s tabuľkovými hodnotami.

Pripravujú sa **dve skúmavky** s nasledujúcou kombináciou monoklonálnych protilátok MPL:

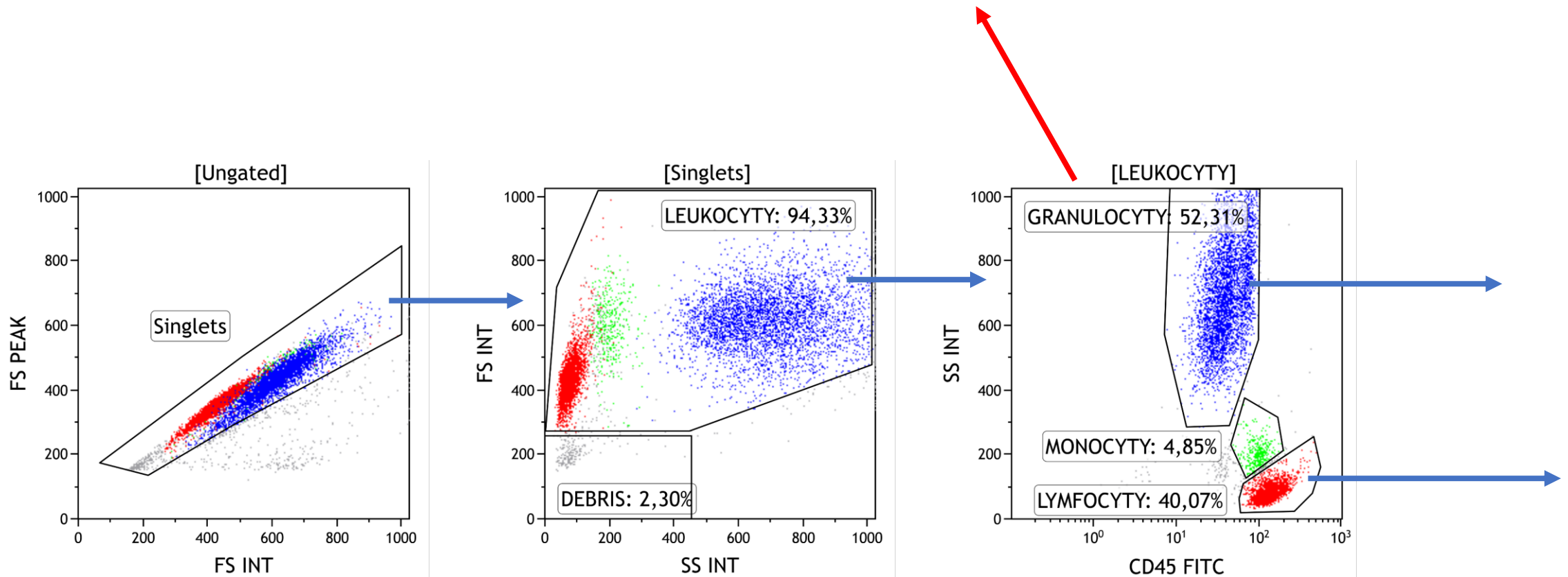
		MPL + Fluorochrom	
Skúmavka A:	45µl krvi + x µl MPL	CD45	FITC
		CD3	PC5
		CD4	RD-1
		CD8	ECD
Skúmavka B:	45µl krvi + x µl MPL	CD45	FITC
		CD3	PC5
		CD19	ECD
		CD16/56	RD-1

Rovnaké fluorochromy ale konjugované s inou MPL = musia byť rozdelené do dvoch skúmaviek

Vzorky krvi s MPL sa inkubujú 25 min, nasleduje lýza erytrocytov a meranie na prietokovom cytometry

Krvný diferenciál – gatovacia stratégia + výsledky

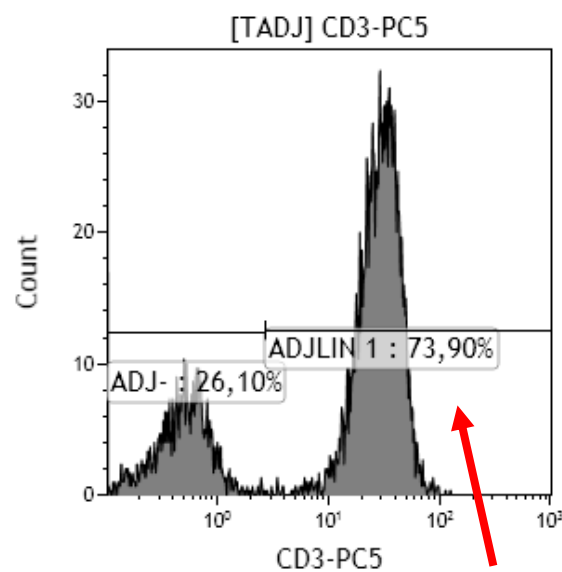
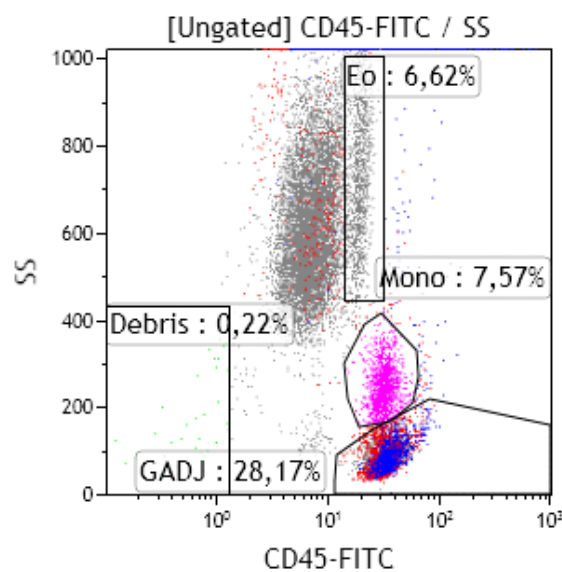
Z oboch skúmaviek získame relatívny počet (%): Lymfocytov + Monocytov + Granulocytov
Do výsledku sa zapisuje priemerná hodnota z oboch skúmaviek



Obsahuje: vzorka krvi + MPL (aCD45; aCD3; aCD4; aCD8)

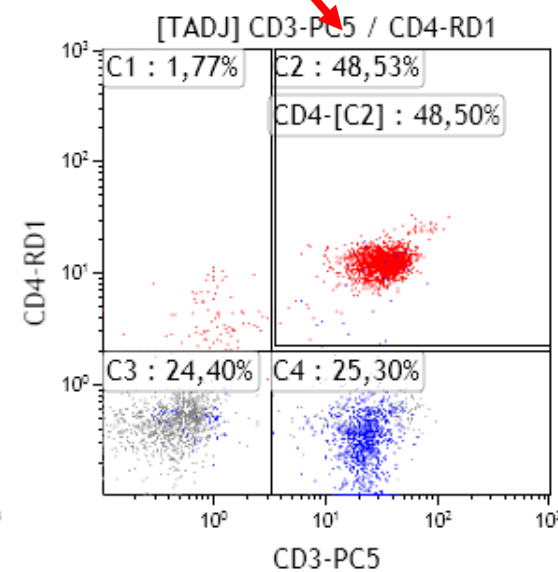
Skúmavka A

Získame relatívny počet:

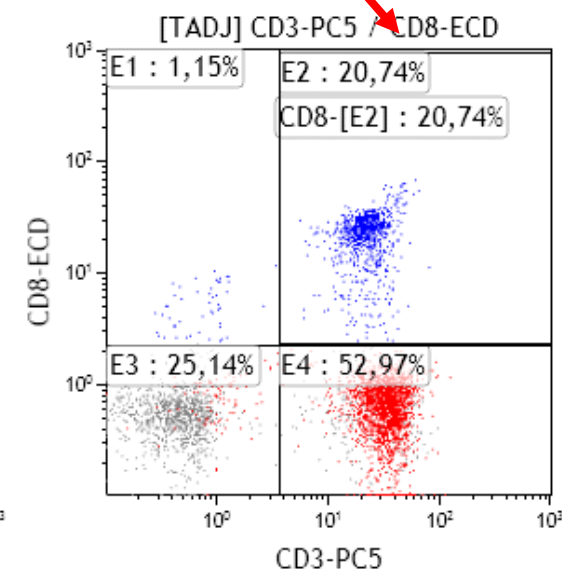


T-lymfocytov CD3+

Pomocných Th-lymfocytov
CD3+ CD4+



Cytotoxických Tc-lymfocytov
CD3+ CD8+

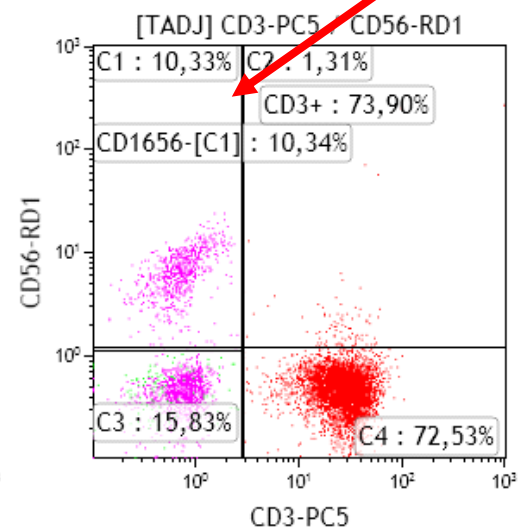
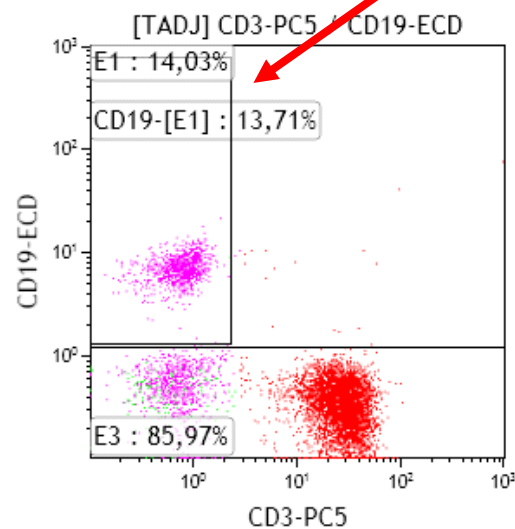
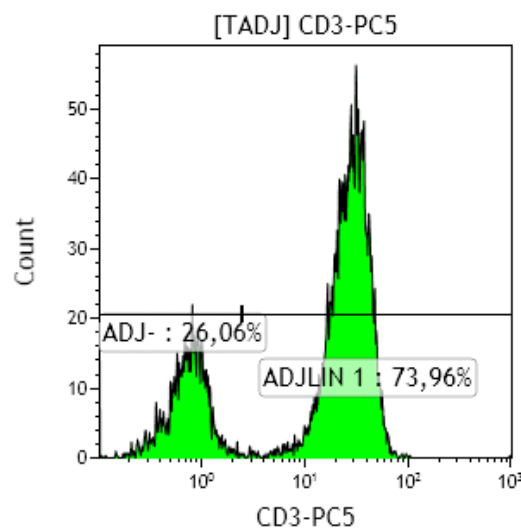
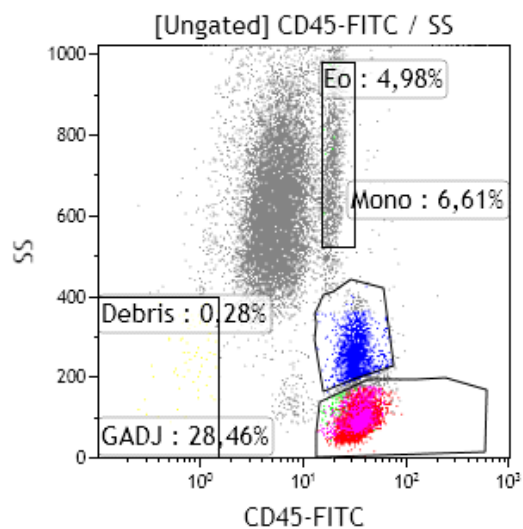


Obsahuje: vzorka krvi + MPL (aCD45; aCD3; aCD19; aCD56)

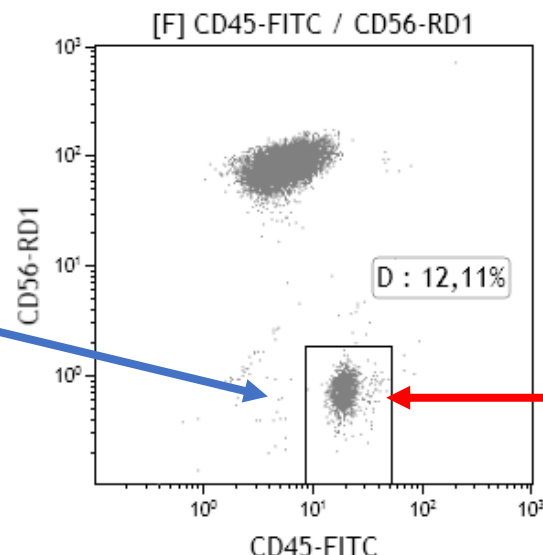
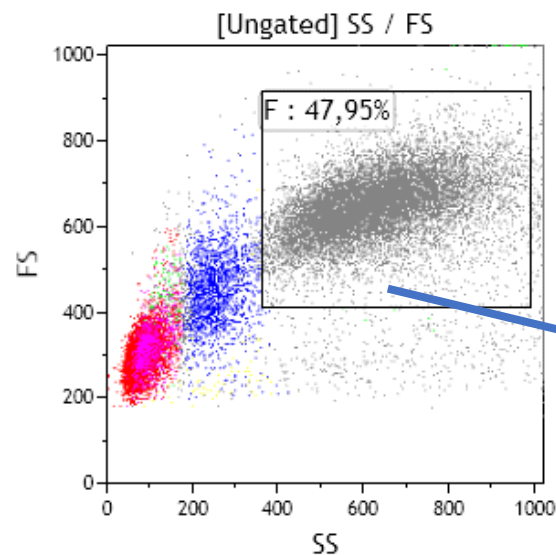
Skúmavka B

B-lymfocytov CD19+

NK buniek CD56+CD3-



Získame relatívny počet:



Eosinofilov

Krvný diferenciál – výsledky

Cytometrické meranie:

Zo **skúmavky A** získame relatívny počet:

CD3+ T-lymfocytov

CD3+CD4+ pomocných Th-lymfocytov

CD3+CD8+ cytotoxických Tc-lymfocytov

Zo **skúmavky B** získame relatívny počet:

CD3+ T-lymfocytov

CD19+ B-lymfocytov

CD16/56+ NK buniek

eosinofilov

Zo **skúmavky A+B** získame relatívny počet:

Monocytov

Lymfocytov

Granulocytov

Relatívny počet: percentuálne zastúpenie danej populácie buniek

Absolútny počet: počet buniek na 1l krvi

- Pomocou počítacia leukocytov stanovíme počet leukocytov na 1l krvi
- Z relatívneho počtu danej subpopulácie a absolútneho počtu leukocytov dorátame absolútny počet danej subpopulácie buniek

Vo výsledkovom liste sa udáva relatívny a taktiež absolútny počet buniek jednotlivých subpopulácií a porovnáva sa s fyziologickými/tabuľkovými hodnotami

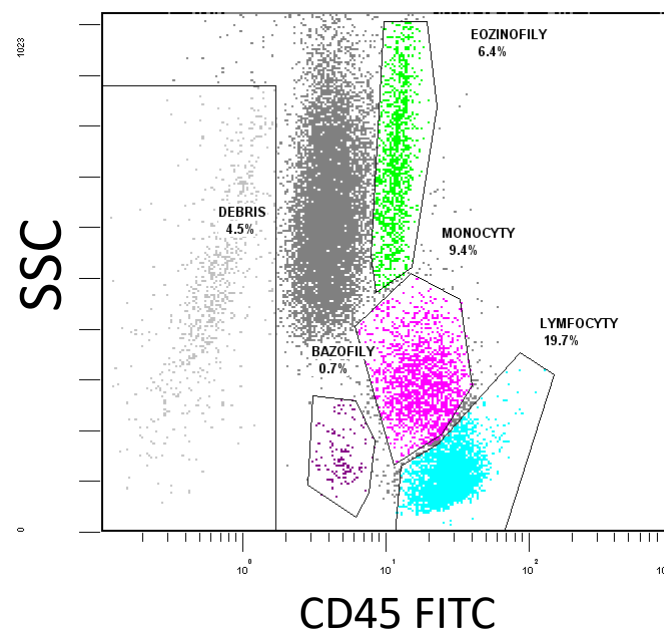
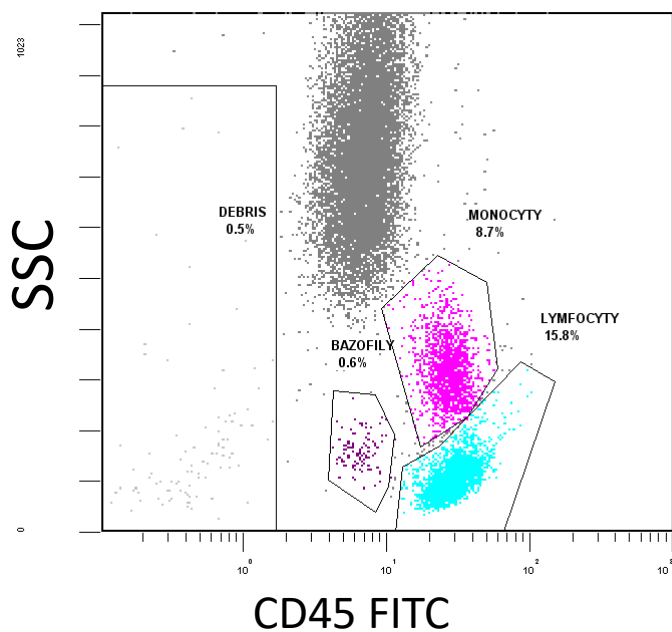
Stanovenie absolútneho počtu lymfocytárnych subpopulácií

Počet Leukocytov	4-10 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	Lymfocyty: 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

Diferenciálny rozpočet

Stanovenie relatívneho počtu leukocytárných a lymfocytárných subpopulácií pomocou prietokovej cytometrie



$$x \% \text{ Lymfocyty} + y \% \text{ Monocyty} + z \% \text{ Granulocyty}$$
$$x+y+z = 100 \% = \text{Leukocyty}$$

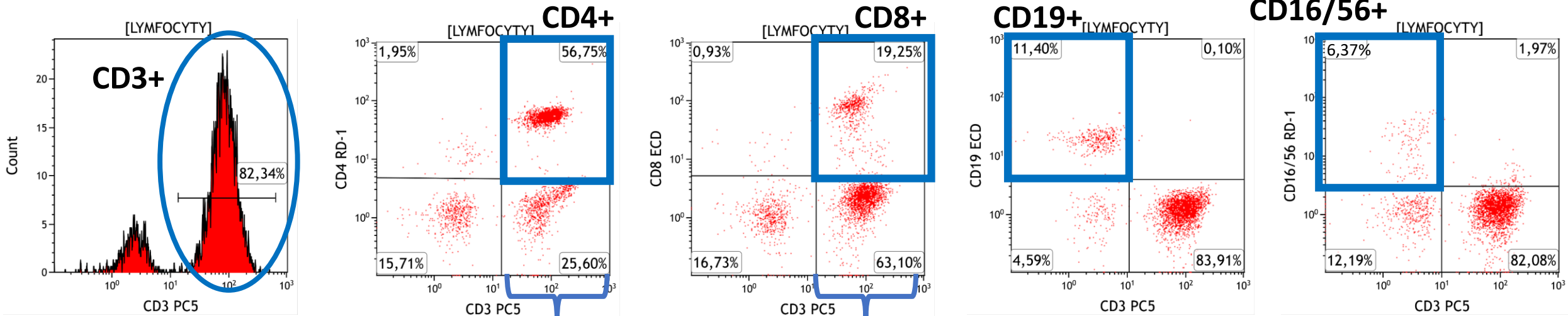
$$x_1 \% \text{ T-lym.} + x_2 \% \text{ B-lym} + x_3 \% \text{ NK bunky}$$
$$x_1+x_2+x_3 = 100 \% = \text{Lymfocyty}$$

$$x_{11} \% \text{ CD4 Th} + x_{12} \% \text{ CD8 Tc}$$
$$x_{11} + x_{12} = 100 \% = \text{T-lymfocyty}$$

CD45- panleukocytárny znak, prítomný na všetkých leukocytoch

Základom imunologického vyšetrenia je krvný diferenciál, určenie základných leukocytárných subpopulácií. V prípade patologických hodnôt je nutné merania doplniť s využitím iných MPL a bližšie charakterizovať možný patologický stav.

Zdravá osoba



Fyziologické hodnoty:

T LYMFOCYTY

- CD3+ : 82 (58-85)%
- CD3+ 4+ : 57 (30-60)%
- CD3+ 8+ : 19 (15-35)%

B LYMFOCYTY

- CD19+ : 11 (7-23) %

NK LYMFOCYTY

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

Vyšetrenie lymfocytov periférnej krvi

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

ZNÁT!!

Príklady využitia FACS v praxi

Vplyv infekcie

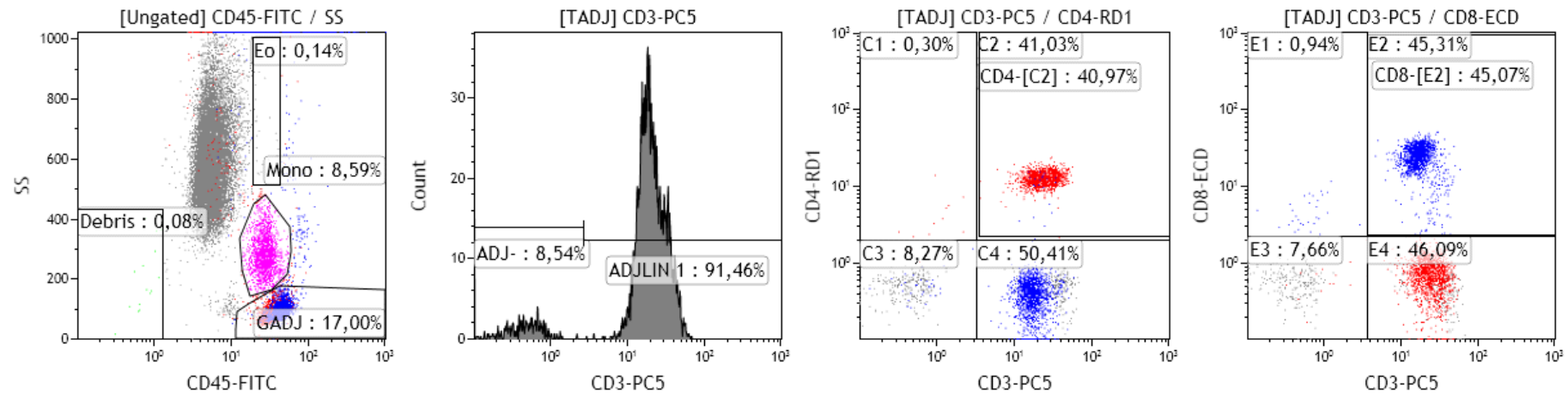
Bakteriální infekce

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

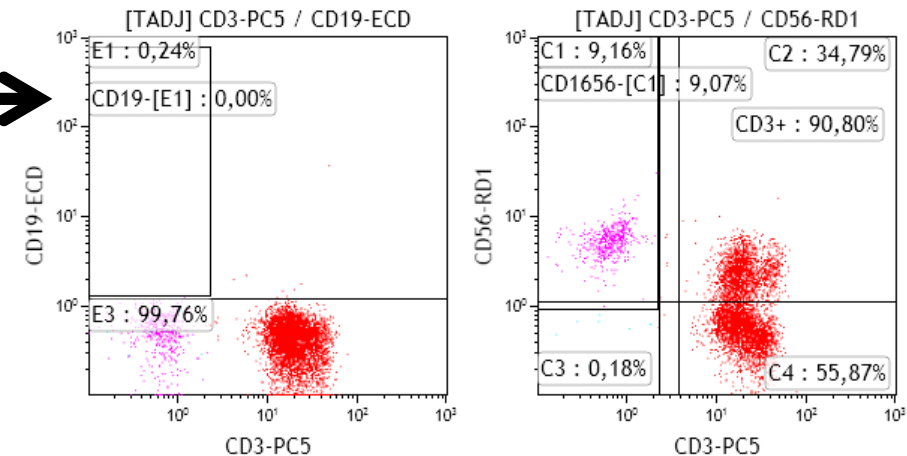
Virová infekce

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

Pacientka: Ž, *1957



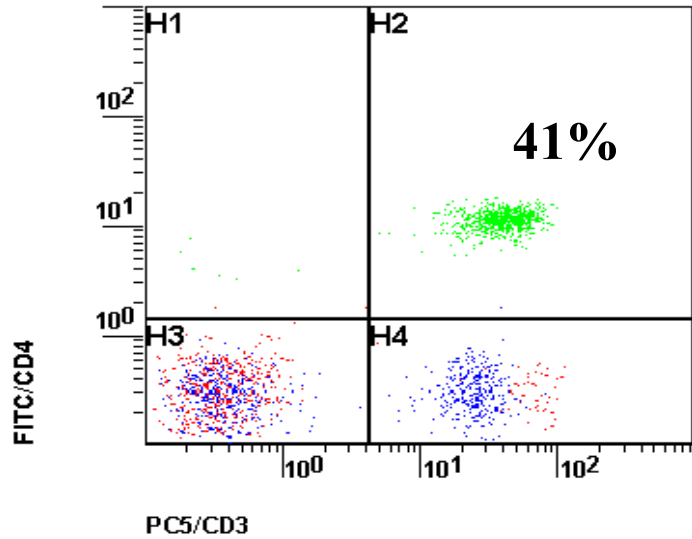
- v krvnom diferenciáli chýbajú B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytov)
- v nemocničnom systéme zistená liečba rituximabom – pacientka reumatológie
- výsledok: deplécia B lymfocytov vplyvom liečby (po 4-6 mesiacoch návrat k normálnym hladinám)
- odber a meranie nutné opakovať po niekoľkých mesiacoch



X-viazaná agamaglobulinémia

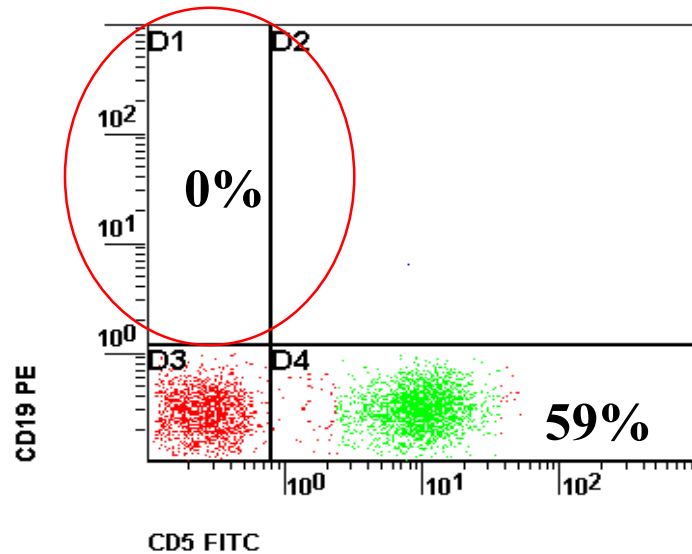
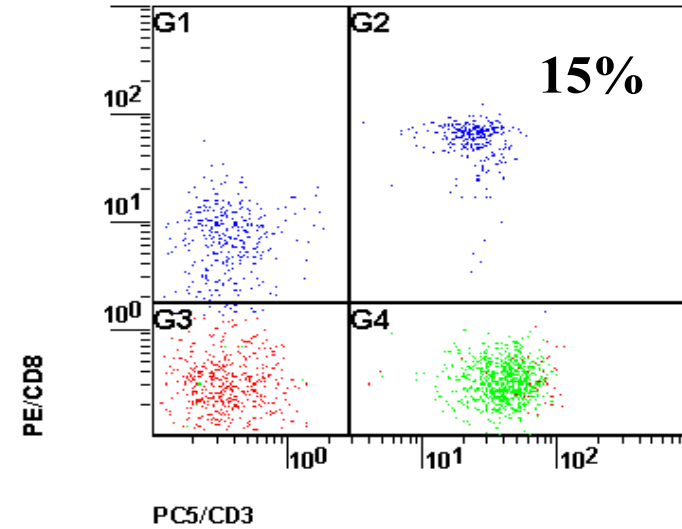
- mutácia v géne kódujúcom Brutonovu tyrosinkinázu – dôležitá pre diferenciáciu B lymfocytov
 - ženy prenášačky, manifestácia u mužov
 - dochádza k zastaveniu vývoja B lymfocytov
 - neprítomnosť B lymfocytov v krvnom obehu
-
- v krvnom diferenciáli chýbajú B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytov)
 - zastúpenie ostatných lymfocytárnych subpopulácií v norme
 - výsledok:

Krvný diferenciál: X-viazaná agamaglobulinémia



T LYMFOCYTY

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

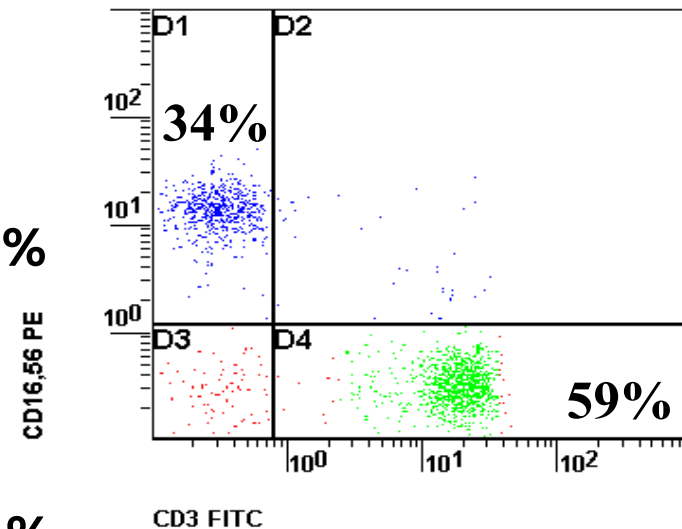


B LYMFOCYTY

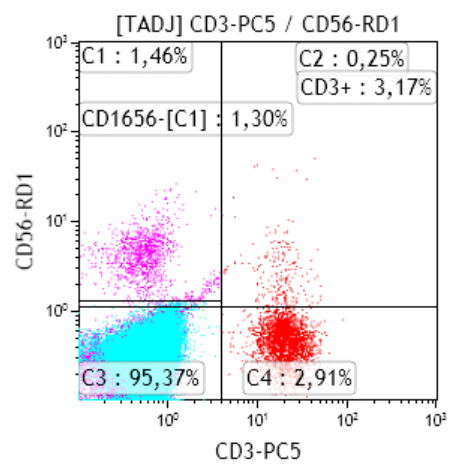
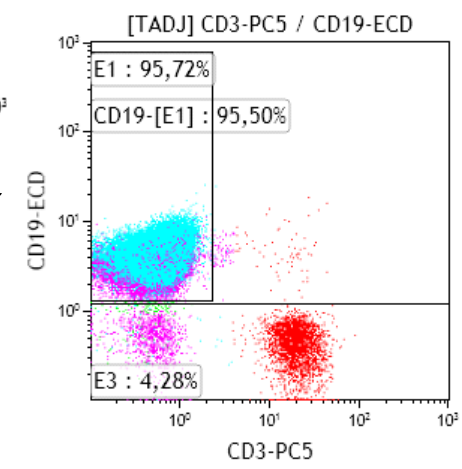
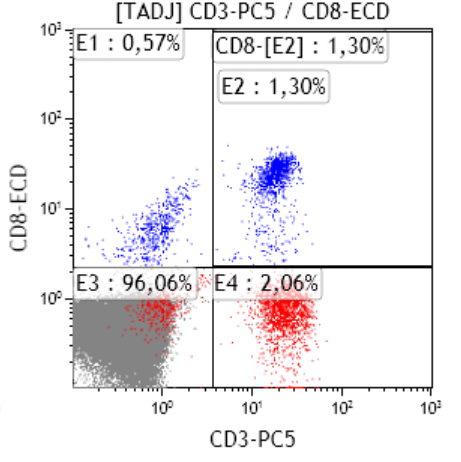
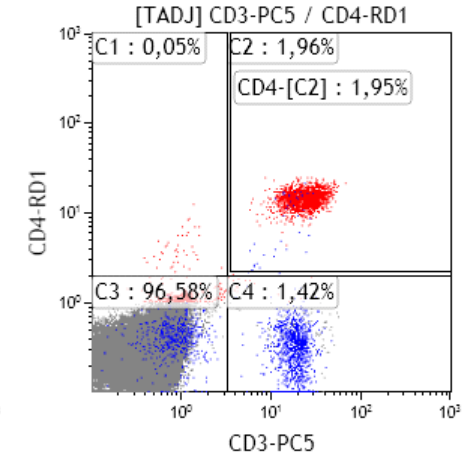
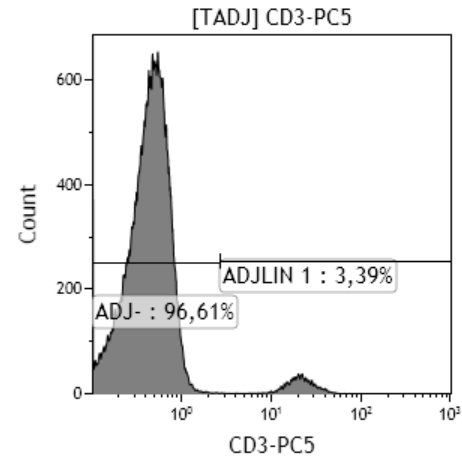
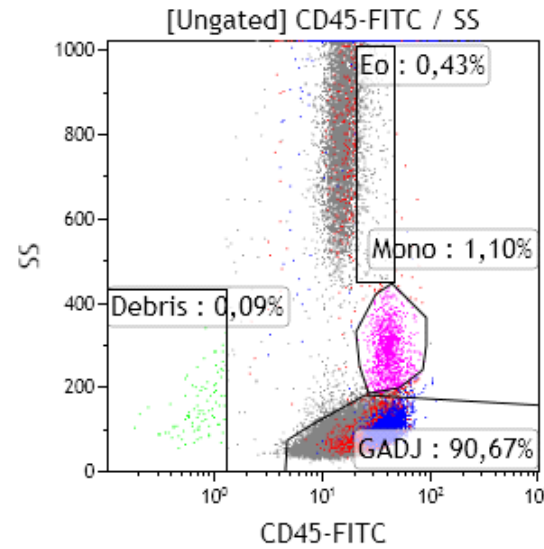
- CD19+ : 0 (7-23) %

NK LYMFOCYTY

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



Pacient: M, *1966

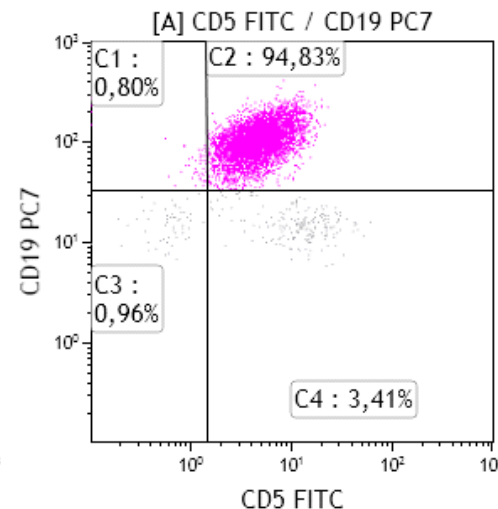
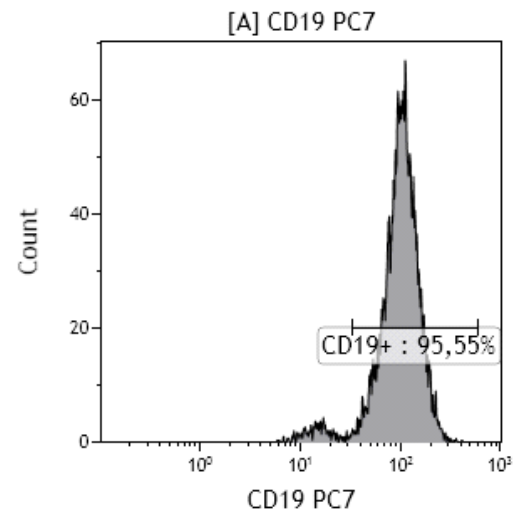
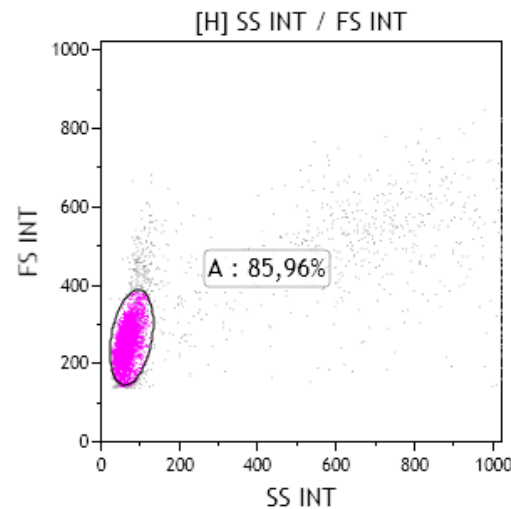


- v krvnom diferenciáli vysoké B-lymfocyty (95,50 % z celkových lymfocytov)
- Prvo-záchyt: bez histórie v nemocničnom systéme
- výsledok: podozrenie na leukémiu
- nutné doplniť vyšetrenie CD5+CD19+ buniek

Pacient: M, *1966

Doplnenie vyšetrenia na zistenie prítomnosti
CD5+CD19+ buniek

- CD5+CD19+ bunky = marker chronickej lymfoproliferatívnej choroby
- u zdravej osoby sa znak CD5 vyskytuje na T-lymfocytoch, normálne hodnoty CD5+ na B-lymfocytoch u zdravého dospelého človeka: do 10% zo všetkých B-lymfocytov



CD5+CD19+ : 94.8%

Vzorka: periférna krv odobraná do EDTA

Značenie MPL:

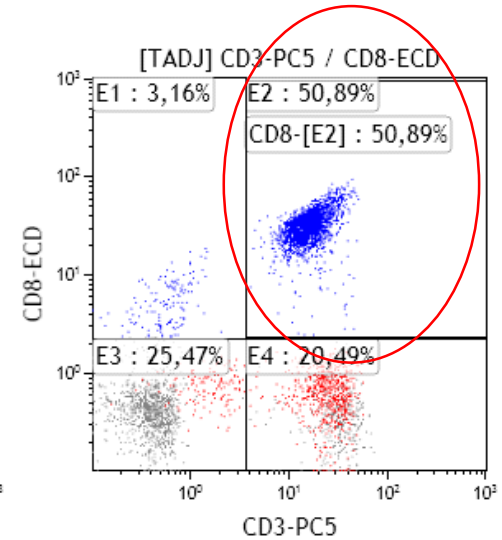
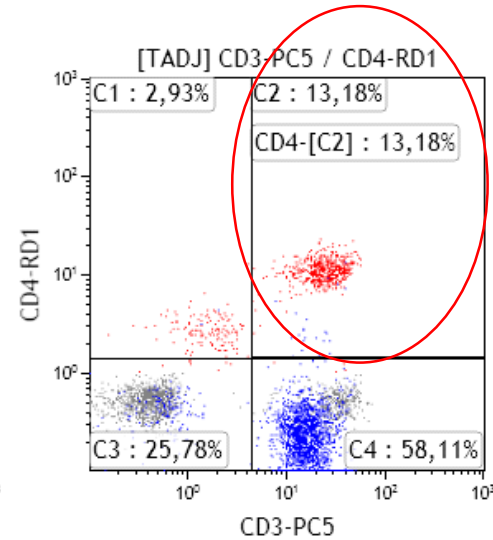
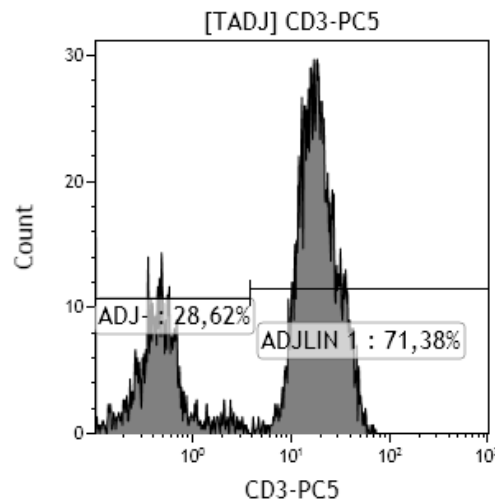
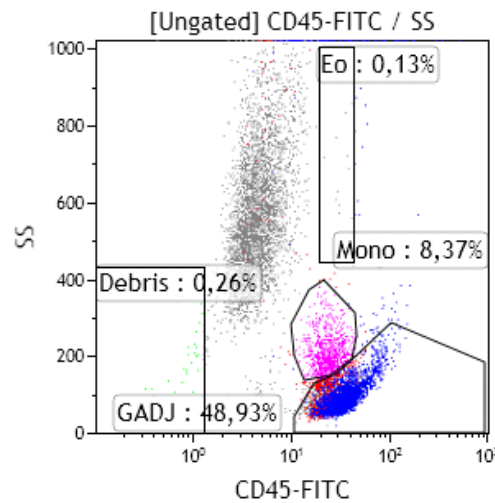
CD45 KO- panleukocytárny znak

CD19 PC7- B-lymfocyty

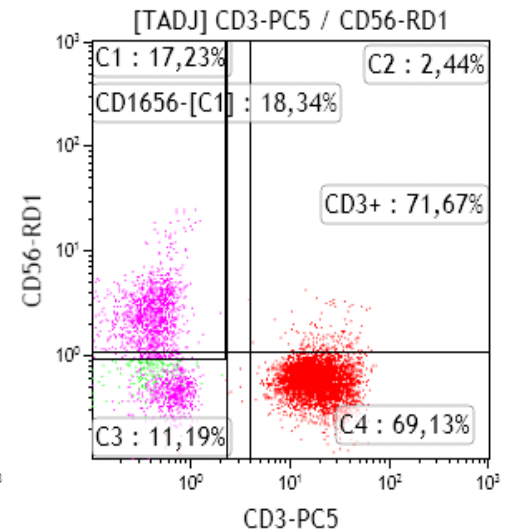
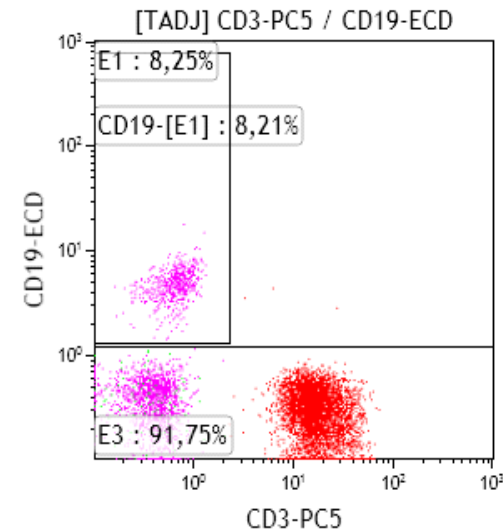
CD5 FITC

Výsledok: vysoký počet CD5+CD19+ = odporúčanie na
hematoonkologické vyšetrenie

Pacient: M, *1999



- v krvnom diferenciáli zistený obrátený pomer
CD3+**CD4+** k CD3+**CD8+** (**13,2 : 50,9**)
- Fyziologické hodnoty: pomer CD3+CD4+ > CD3+CD8+
- Prvo-záchyt: bez histórie v nemocničnom systéme
- výsledok: podozrenie na vírusovú infekciu
- nutné doplniť vyšetrenie CD8+CD38+ buniek



SCID - Severe Combined Immunodeficiency

Ťažká kombinovaná imunodeficiencie



- Primární imunodeficiencie (vrozená), postižena je buněčná složka imunity
- Jedná o nejzávažnější vrozenou imunodeficienci (záhy po narození těžké infekce)
- Bez léčby (transplantace kostní dřeně) úmrtí v prvním roce života (vyvíjí se také genová terapie)
- Klinické projevy:
 - Infekce způsobené atypickými patogeny (pneumocysty, kandidózy, atypické mykobakteriózy, cytomegalová pneumotitida)
 - Chronické průjmy (bez průkazu etiologického agens), neprospívání, kožní infekce, komplikace po vakcinaci BCG
- Molekulární podstata je heterogenní, rozlišuje se několik skupin SCID:
 1. **Porucha ADA (adenosindeaminázy):** Dysfunkce nebo absence tohoto enzymu způsobuje akumulaci produktů metabolismu purinů, které jsou pro časně thymocyty toxické → rozvíjí se těžká T lymfopenie
 2. **SCID T-B-:** Absence T i B lymfocytů, NK buňky zachovány. Molekulární podstata heterogenní (některé případy deficit rekombinázy RAG-2, porucha exprese receptoru pro IL-7)
 3. **SCID T-B+:** Chybí T lymfocyty a NK buňky, B lymfocyty zachovány. **Nejčastější forma SCID** (60% všech případů). 70% případů vázáno na chromosom X – mutace genu pro gama řetězec receptoru pro IL-2. Tento gama řetězec je ale společný i receptorům pro IL-4, IL-7, IL-9 a IL-15 → funkční porucha mnoha cytokinů.
 4. **Retikulární dysgeneze:** Postižení kmenové buňky, blokován vývoj myeloidní i lymfoidní linie.

SCID

Severe Combined Immunodeficiency – Ťažké kombinované imunodeficiencie

Príklad pacienta s SCID

- záchyt u novorodencov a detí
- nízky absolútny počet Leukocytov a Lymfocytov, v podstate chýbajú CD3+ T-lymfocyty, počet B-lymfocytov a NK buniek môže byť taktiež znížený

Leukocyty: $5,0 \times 10^9/l$

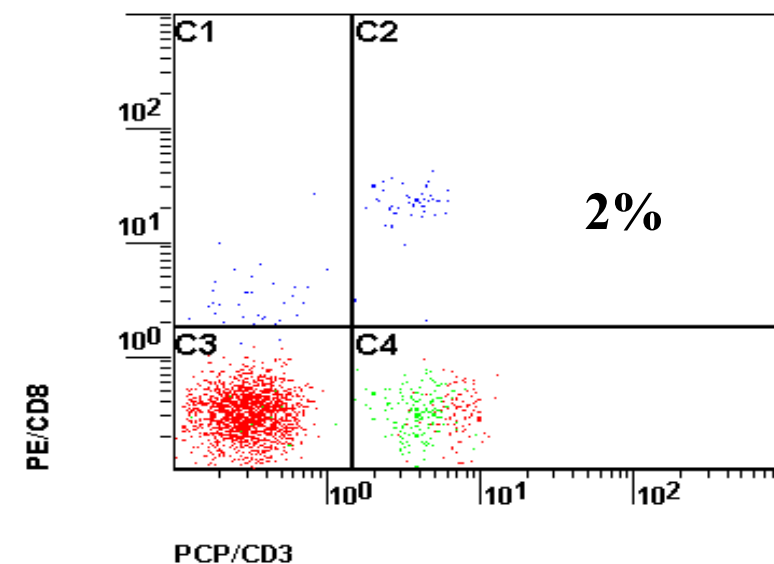
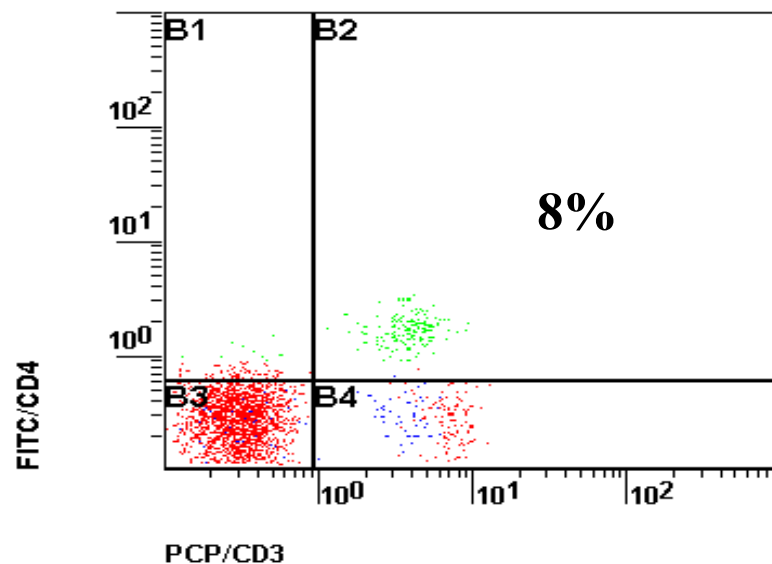
Lymfocyty: $4,0 \times 10^9/l$

Nízky počet leukocytů i lymfocytů vzhledem k věku pacienta

T LYMFOCYTY

- CD3+ : 14 (58-85)%
- CD3+ 4+ : 8 (30-60)%
- CD3+ 8+ : 2 (15-35)%

Velice nízký počet T-lymfocytů!!



SCID

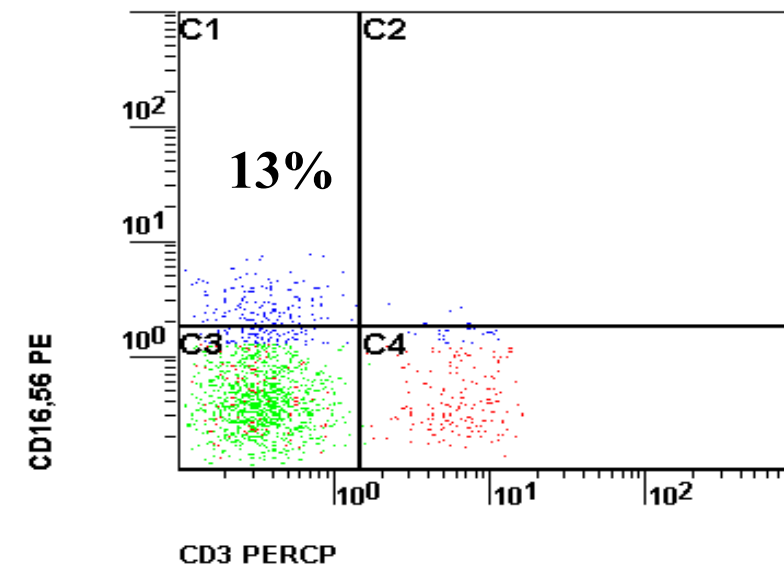
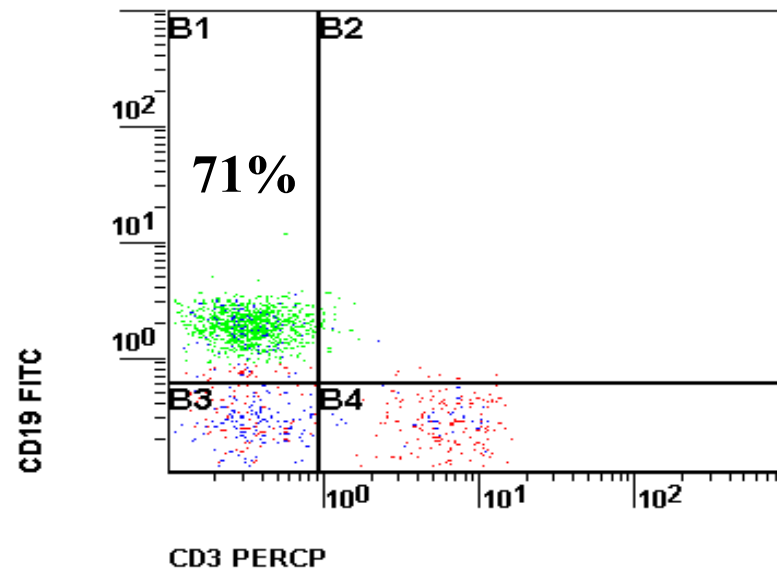
Severe Combined Immunodeficiency – Ťažké kombinované imunodeficiencie

B LYMFOCYTY

- CD19+ : 71 (7-23) %

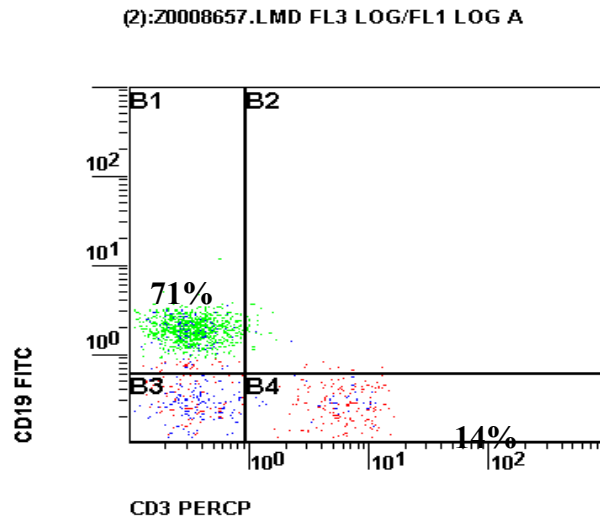
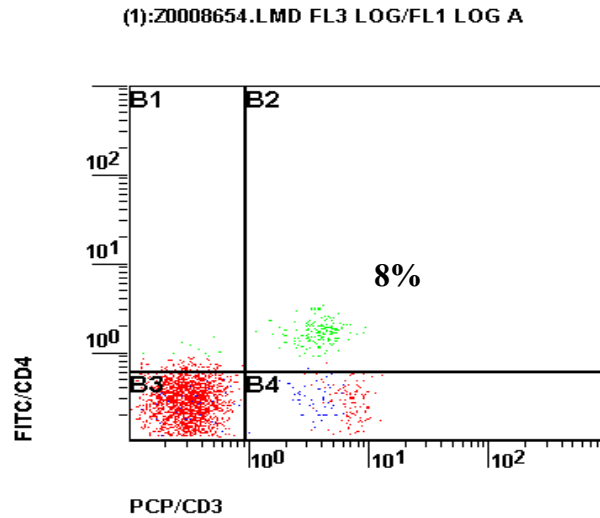
NK LYMFOCYTY

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



Výsledok: možné doplniť funkčný test proliferácie T-lymfocytov; dieťa je smerované k transplantácii kostnej drene

SCID



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)%

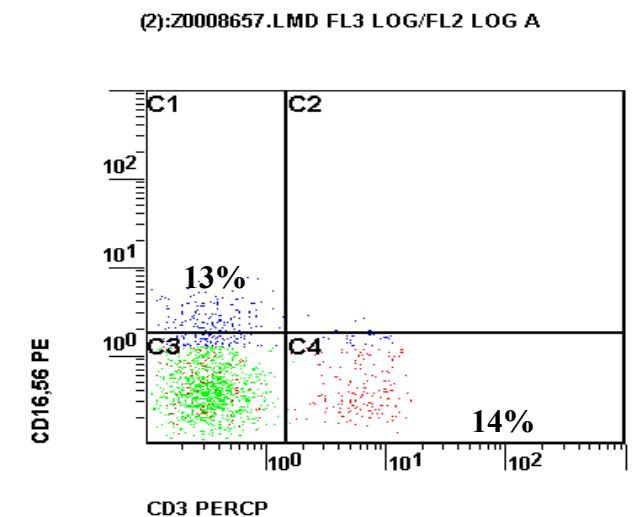
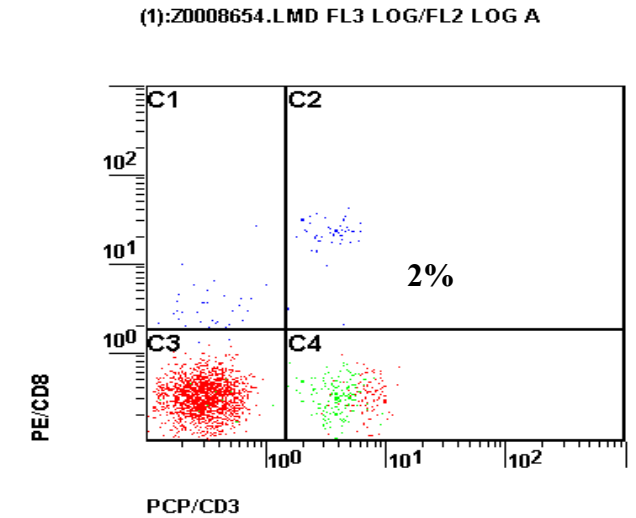
• CD3+ 8+: 2 (15-35)%

B LYMFOCYTY

• CD19+ : 71 (7-23) %

NK LYMFOCYTY

• CD16,56+: 13 (6-20)%

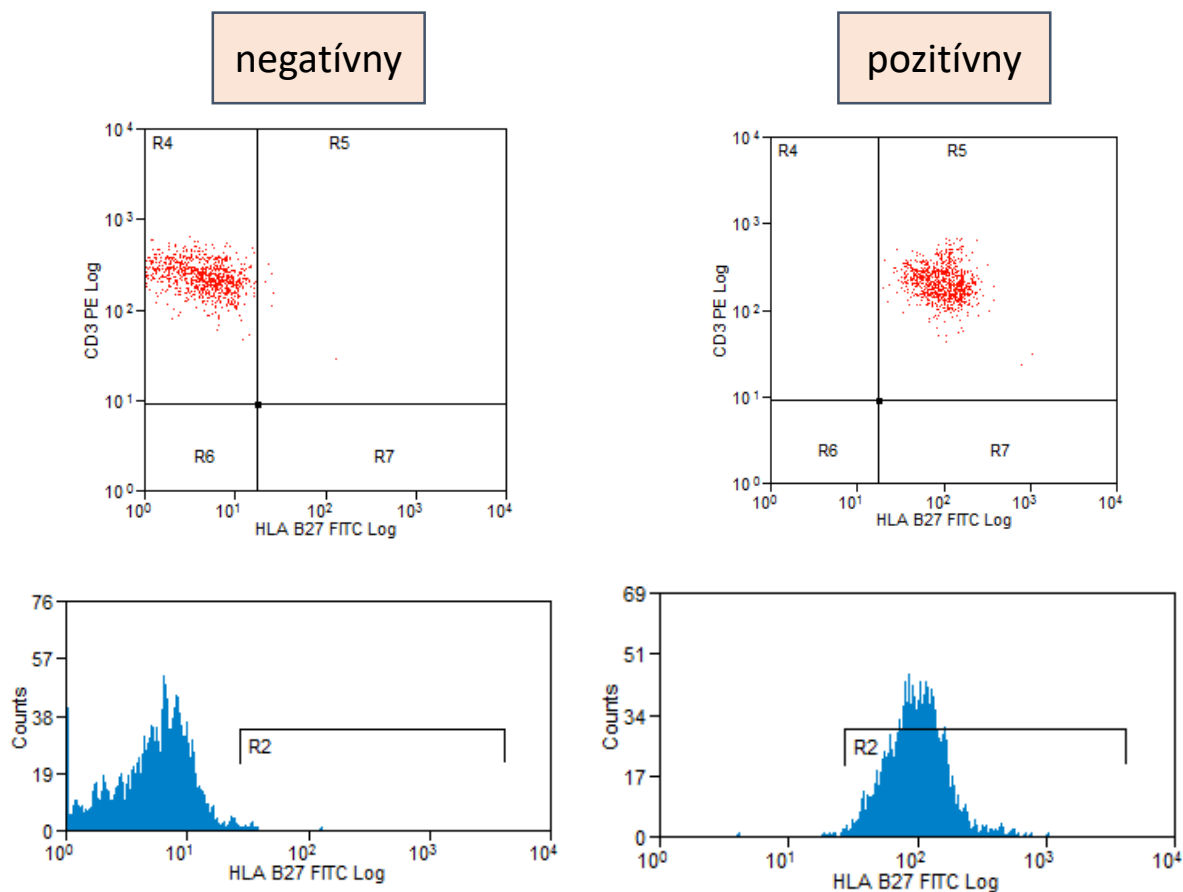


Výsledok: T-B+NK+ SCID

Poznámka: všetky jaderné T-lymfocyty boli materské, aktivované, vyvolávajúce reakciu štěpu proti hostiteľovi.

HLA-B27

Znak HLA-B27 je asociovaný s radou nešpecificky zápalových ochorení, akými sú zápaly kĺbov, vnútorných štruktúr oka (uveitída), krátkych kostí rúk, nôh a šliach, ďalej psoriázou, chronickými bolesťami spodnej časti chrbta (zad) a spondyloarthropatiou, z ktorej najznámejšou je ankylózujúca spondylitída (zápalové systémové ochorenie osového skeletu a kĺbov – **Bechtěrevova choroba**)



Výšetrenie HLA-B27 nie je doplňujúcim meraním ku krvnému diferenciuálu, je to samostatné meranie

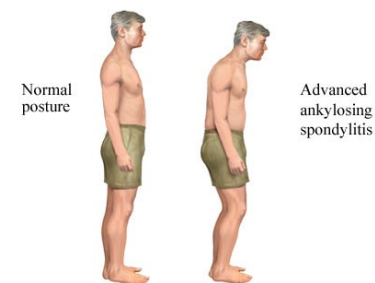
Vzorka: periférna krv odobraná do EDTA

Značenie MPL:

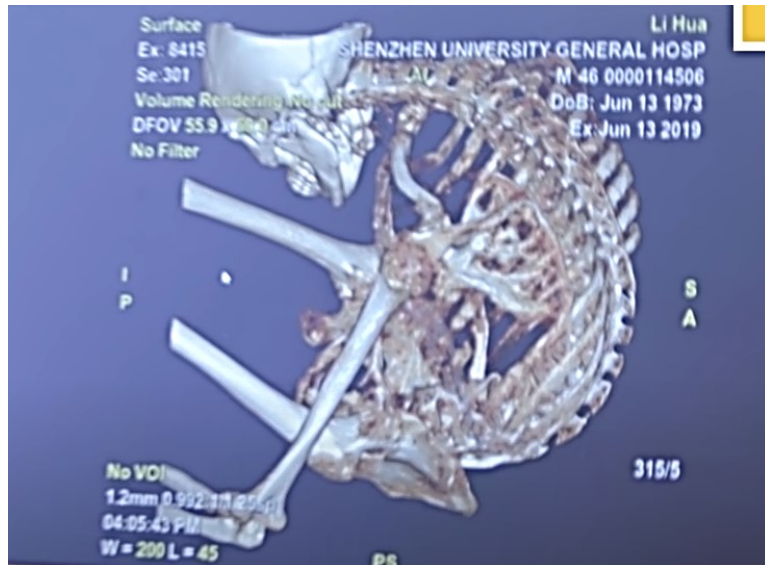
CD3 PE- T-lymfocyty

HLA-B27 FITC

Výsledok: cytometrické vyšetrenie HLA-B27 je len screeningová metóda, pozitívny výsledok sa vydáva s odporúčaním na genetické vyšetrenie



Folded man



https://www.youtube.com/watch?v=1ycLWc4bRtg&ab_channel=SouthChinaMorningPost



'Folded man' stands up straight after 28 years following surgery that broke bones

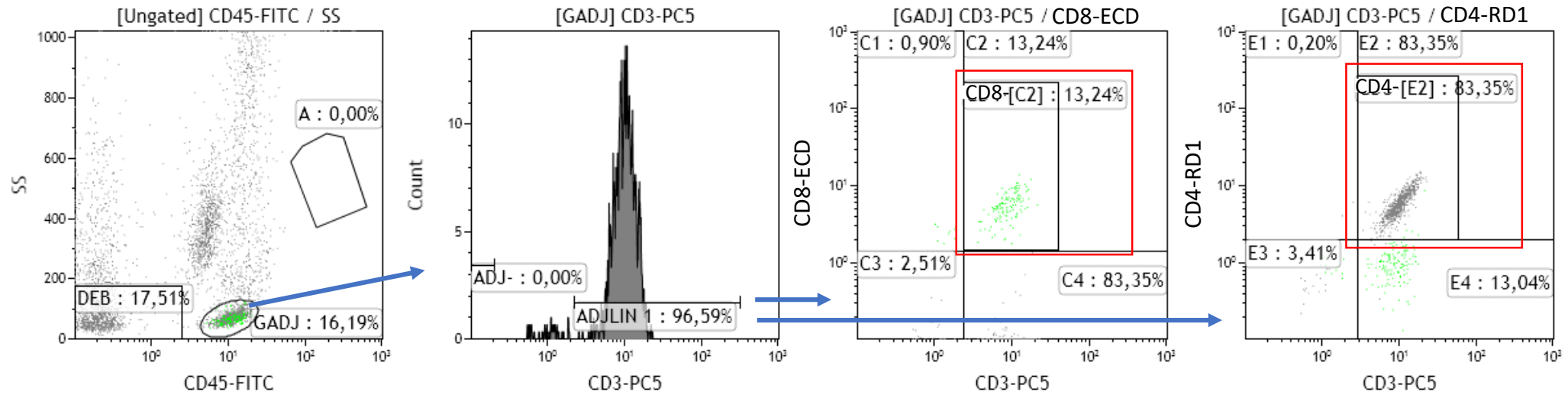
Bronchoalveolárna laváž - BAL

- diagnostické bronchoskopické vyšetrenie
 - pacientovi sa do bronchu (vetvy bronchu) pomocou fibrobronchoskopu aplikuje a následne späť aspiruje 150-200 ml fyziologického roztoku
 - sleduje sa zastúpenie množstva a percentuálneho podielu jednotlivých typov leukocytov
 - indikuje sa u zápalových pľúcnych ochorení, nádorových ochorení, intersticiálnych pľúcnych procesoch, pneumokoniózach
- vzorka: bronchoalveolárna tekutina
 - Spracovanie:
 - filtrácia vzorky kvôli prípadnému obsahu nečistôt, tkanív, premytie, značenie MPL:
 - CD45 FITC – panleukocytárny znak
 - CD3 PC5 – T-lymfocyty
 - CD4 RD1 – Th- lymfocyty
 - CD8 ECD – Tc-lymfocyty

Pozn. Vzorka BAL nesmie obsahovať krv.

V krvi je iné zastúpenie lymfocytárných subpopulácií ako v BAL, v prípade „znečistenia“ BAL krvou nie je možné rozpoznať, ktoré lymfocyty pochádzajú z krvi a ktoré z BAL, čo vedie k znehodnoteniu vyšetrenie.

Bronchoalveolárna laváž - BAL



- Diagnosticky dôležitý je pomer CD3+CD4+ k CD3+CD8+ T-lymfocytov (= imunoregulačný index)
- Fyziologické hodnoty: pomer CD3+CD4+/CD3+CD8+ = 1,1 až 3,5
- Patologické hodnoty:
 - výrazná prevaha pomocných CD4+ T-lymfocytov = podozrenie napr. na **sarkoidózu**, pneumóniu, nádory dýchacích ciest,...
 - prevaha cytotoxických CD8+ T-lymfocytov = podozrenie na hypersenzitívnu pneumonitídu,...

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> rythematodes-SLE)
↑	CD8+	u některých pacientů s CVID - virové infekce (EBV, CMV, HIV)