



Průtoková cytometrie a stanovení lymfocytárních subpopulcí

Jana Nechvátalová

Ústav klinické imunologie a alergologie

FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil

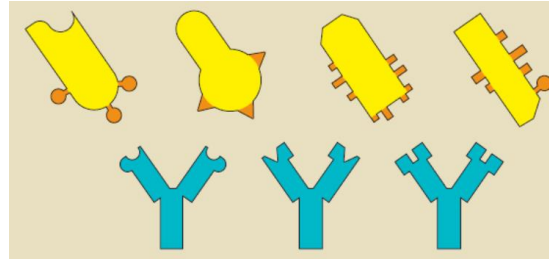


Eosinophil



Basophil

Rozdělení imunologických laboratorních metod



serologické (humorální)- detekce antigenů a protilátek,
průkaz tvorby protilátek proti infekčním agens

buněčné- stanovení počtu (relativního, absolutního) a funkčnosti
jednotlivých typů leukocytů

- odběr nesrážlivé krve do EDTA, heparinu, citrátu sodného



Monocyte



Lymphocyte



Neutrophil



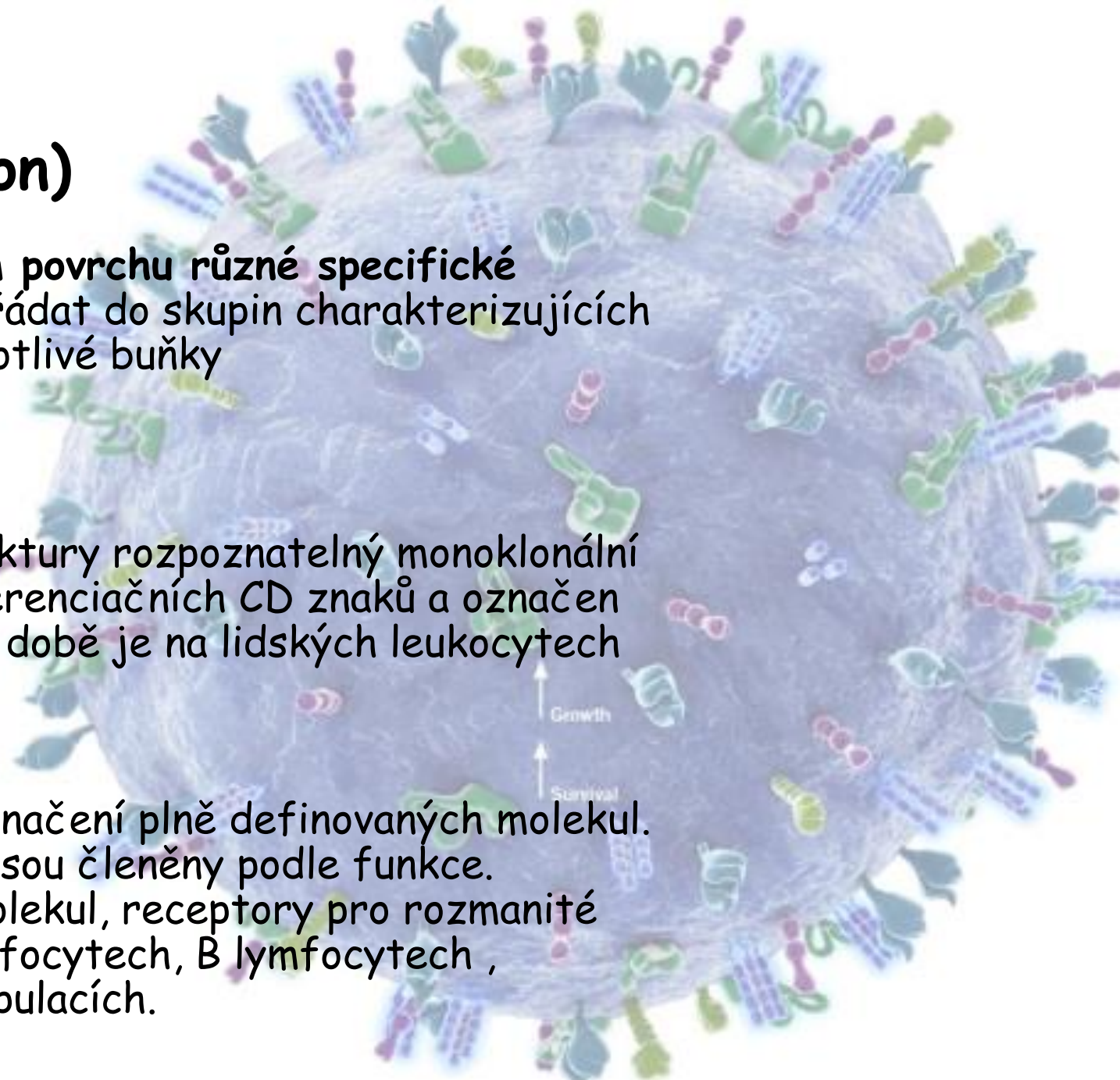
Eosinophil

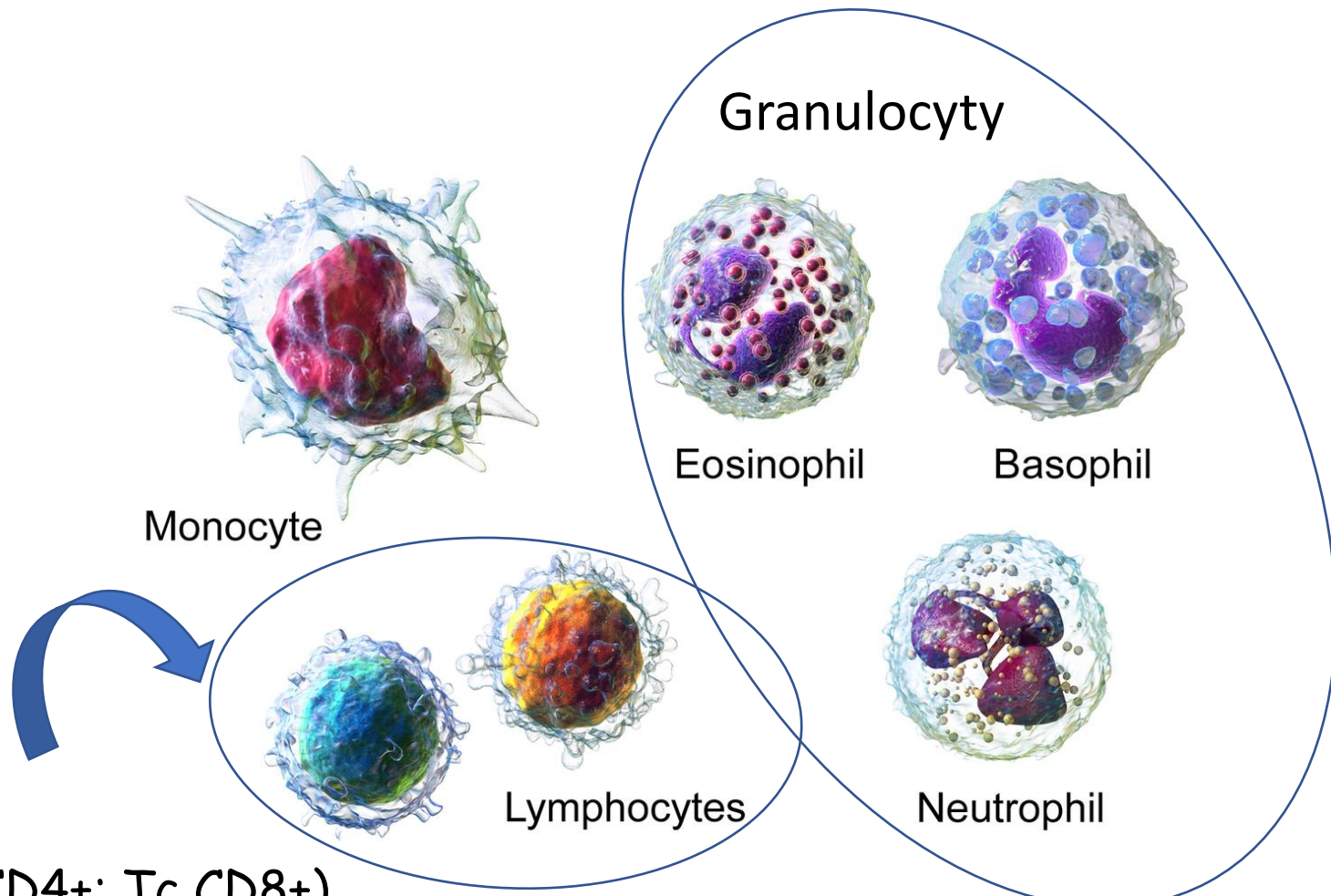


Basophil

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.





T-lymfocyty (Th CD4+; Tc CD8+)
 B-Lymfocyty
 NK bunky

White Blood Cells

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

Imunofenotypizace buněk

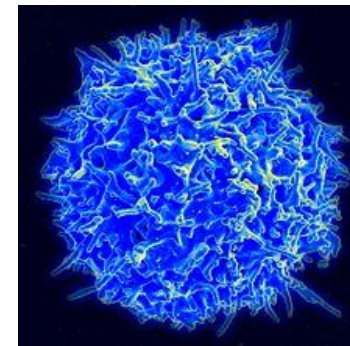
- stanovení leukocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie (FACS- fluorescent-activated cell sorting)
- odběr krve do zkumavky s EDTA



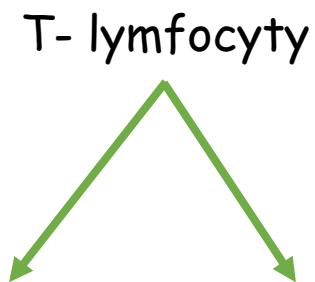
T lymfocyty

CD3 - povrchová molekula přítomná na všech T-lymfocytech

Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **58-85 % z lymfocytů**



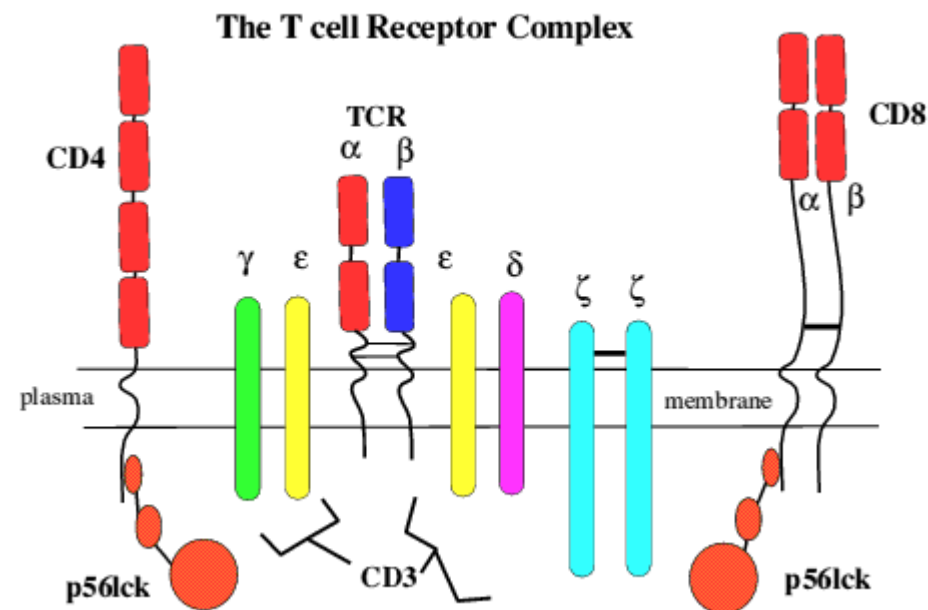
Stavba T- bunečného receptoru TCR a umístění koreceptorových molekul CD3, CD4, CD8 zapojených do signalizace přes T-bunečný receptor TCR.



CD4+
T_H (T_H1, T_H2)
pomocné
T-lymfocyty
(T helper cells)

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

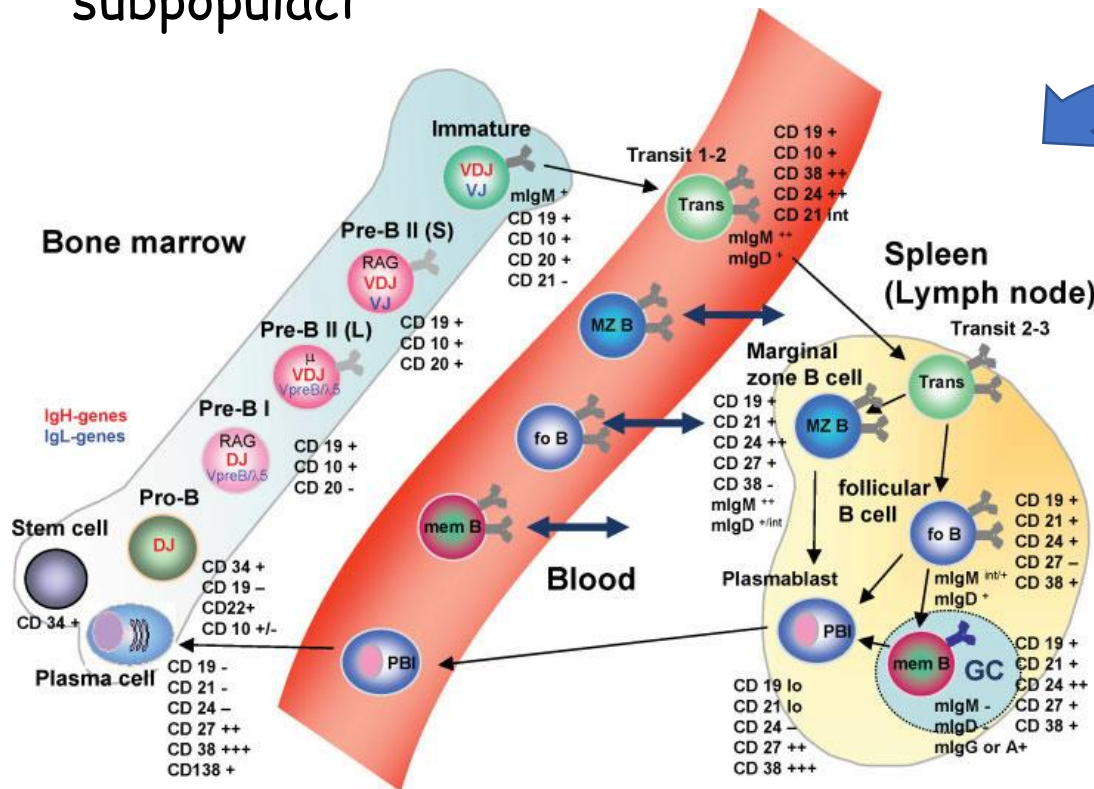
fyziologické zastoupení z celkových lymfocytů
30-60 % **15-35 %**



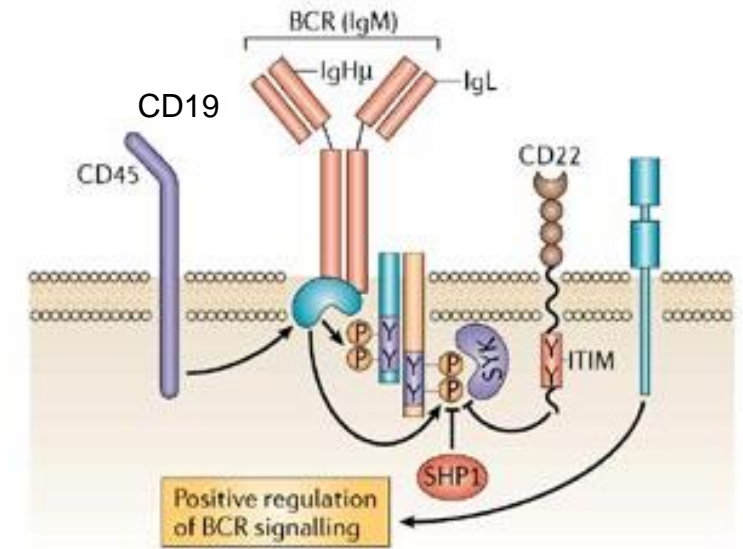
B lymfocyty

CD19, CD20 - povrchové molekuly využívané k detekci B lymfocytů v průtokové cytometrii

Vhodně zvolená kombinace dalších CD znaků slouží k charakterizaci jednotlivých vývojových stadií a funkčních subpopulací



CD19 součástí B-bunečného receptoru BCR



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Expresse CD znaků na povrchu B lymfocytů během jejich vývoje v kostní dřeni, sekundárních lymfatických orgánech a periferní krvi

NK (Natural Killer) bunky

$CD16^+CD56^+CD3^-$ - charakteristické povrchové markery

Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **6-20 % z lymfocytů**

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

Pozor!!!

NK**T** bunky: $CD16^+CD56^+ CD3^+$



© Eye of Science/Photo Researchers, Inc.

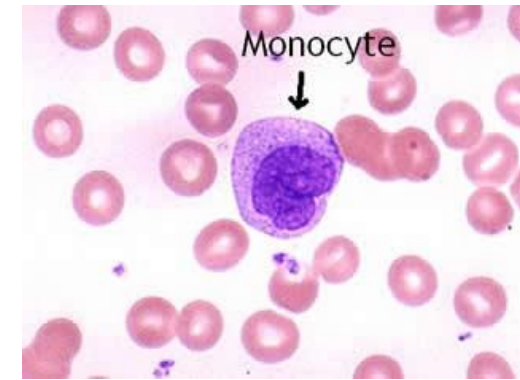
Monocyty

CD14 - povrchová molekula charakteristická pro monocyty
Fyziologické zastoupení v periferní krvi: **0-10 % z leukocytů**

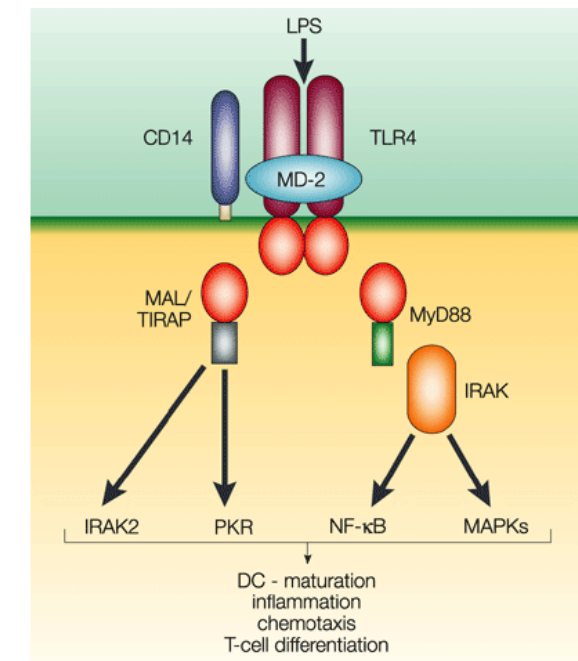
- součást nespecifické imunity
- schopnost fagocytózy
- tkaňová forma = makrofág

Na svém povrchu exprimují HLA DR
(Human Leukocyte Antigen DR isotype)

- navázání peptidů z pohlcených patogenů →
→ rozpoznání pomocnými T-lymfocyty
- APC = antigen prezentující buňka

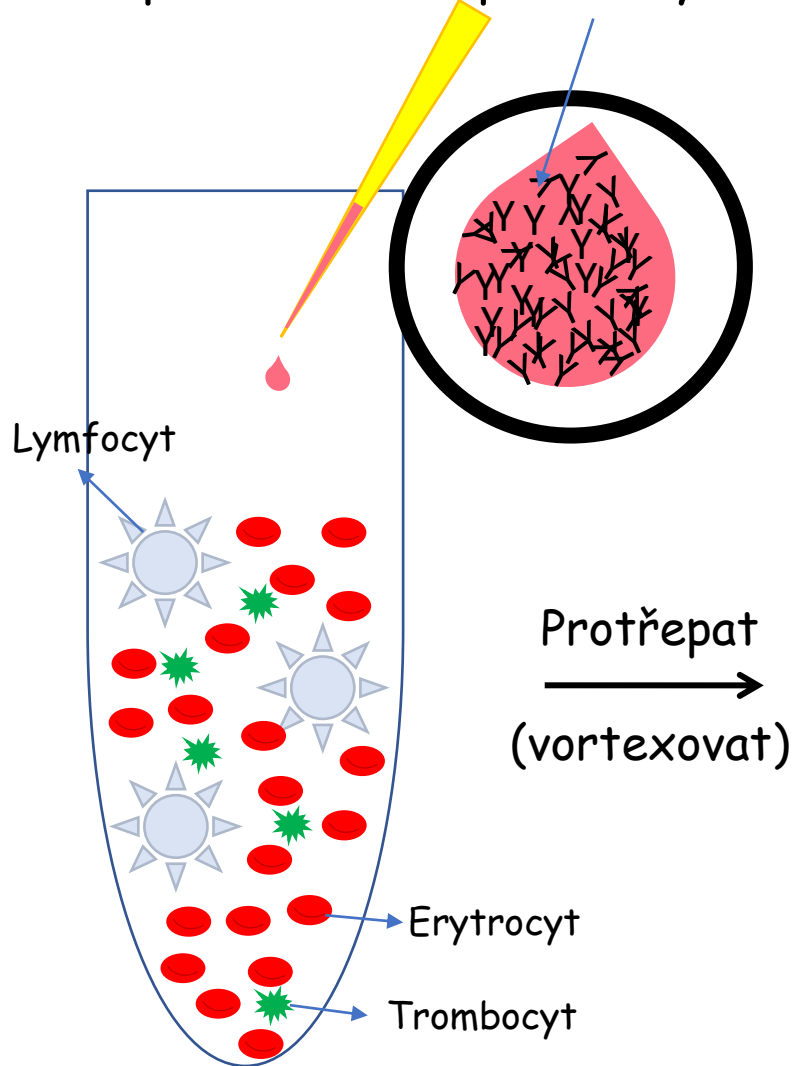


CD14 jako koreceptor TLR4
- rozpoznání bakteriálních lipopolysacharidů (LPS)



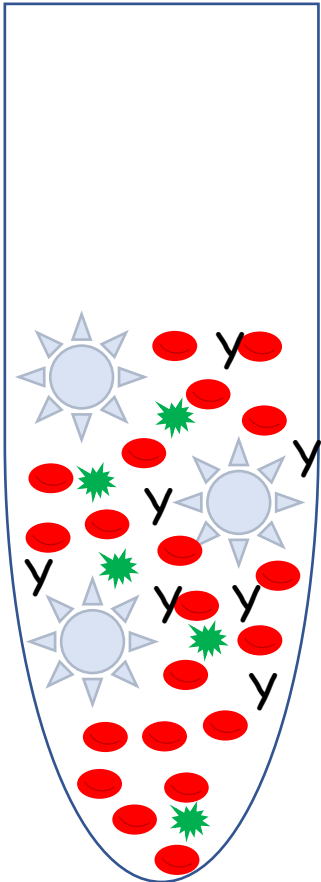
Příprava vzorku na FACS

Pipetovat MIX potřebných MPL



Vzorek krve 45 μ l

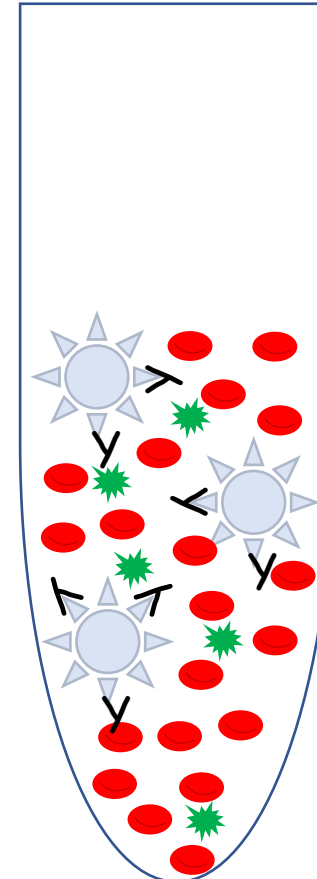
Volné MPL - vazba na receptory



Vzorek krve 45 μ l + MPL

30min.
inkubace
→
tma
lab. teplota

Plná krev značená MPL



Lýza erytrocytů

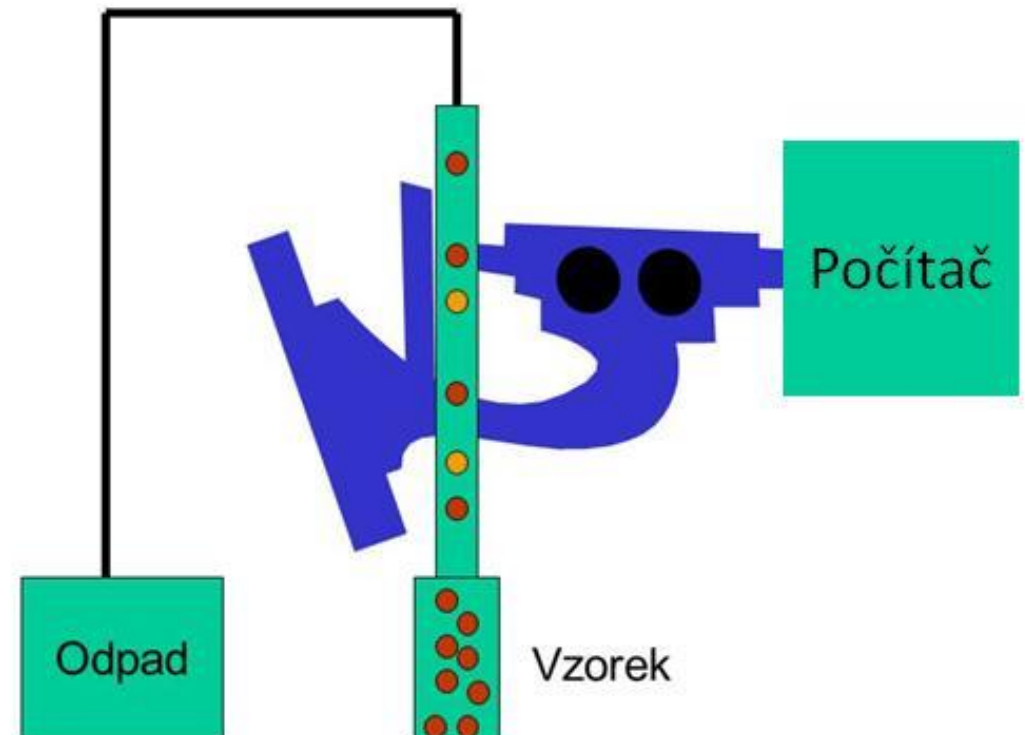
- Erytrocyty přítomné ve vzorku zahlcují cytometr proto po značení plné krve MPL je nutné erytrocyty lyzovat
- Ke vzorku se postupně přidává:
 - **Roztok A: 600ul**
 - Příprava roztoku A: 1,5 l destilované vody + 1,8 ml 99% kyselina mravenčí - způsobuje lýzu erytrocytů v kyselém prostředí
 - **Roztok B: 300ul**
 - Příprava roztoku B: 1,5 l destilované vody + 9,0 g bezvodého Na_2CO_3 , 21,75 g NaCl , 46,95 g bezvodého Na_2SO_4 - alkalický roztok = zastavení lýzy a úprava pH
 - **Roztok C: 100ul**
 - Příprava roztoku C.: 1,5 l PBS (pH 7-7,4) + 15 g paraformaldehydu - fixace buněk

Vzorky se do začátku měření uchovávají ve tmě při 4°C

Automatický lyzátor TQ-prep od firmy Beckman Coulter používaný na lýzu erytrocytů



Průtoková cytometrie je technologie umožňující současně měření a analýzu několika fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých částic, které jsou unášeny v proudu kapaliny a prochází paprskem světla.



flow+cyto+metrie - „měření buněk v pohybu“

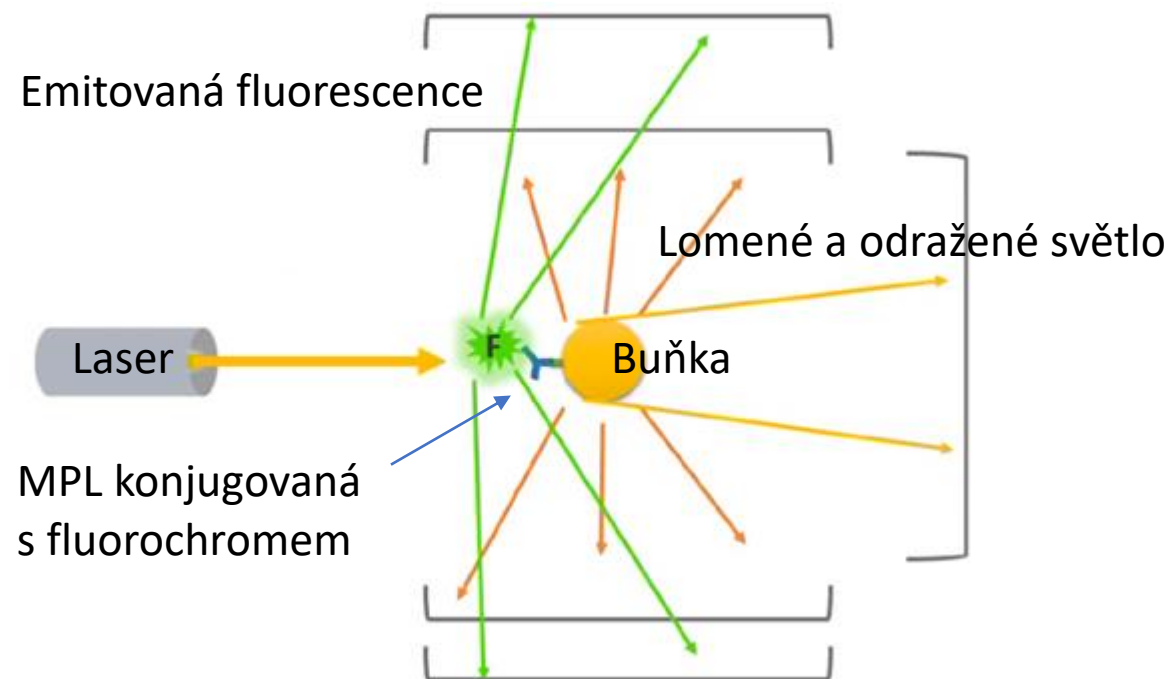
- možnosti analýzy mnoha vlastností a charakteristik na úrovni jedné buňky během krátkého časového úseku
- měření současně více než 20 markerů na jedné buňce
- určování fenotypu buněk, monitorování odpovědi na léčbu, výzkum signalizačních drah
- klíčovým nástrojem pro výzkum poruch krvetvorby

Využití

- Klinické využití (imunofenotypizace a měření funkčních vlastností buněk)
- Buněčná biologie (DNA, RNA analýza)
- Mikrobiologie (rezistence na antibiotika, kintetika)

Co měříme:

- **Lomené a odražené světlo** - při průchodu buněk laserovým paprskem dochází k jeho lomu a odrazu na buněčném povrchu a buněčných organelách
- **Emitovanú fluorescenci** - pokud použijeme MPL konjugované s fluorochromem
- částice velikosti 0,2-150 μm
- prokaryotické a eukaryotické buňky
- virové částice, bakterie, houby
- komplexy Ag-Ab



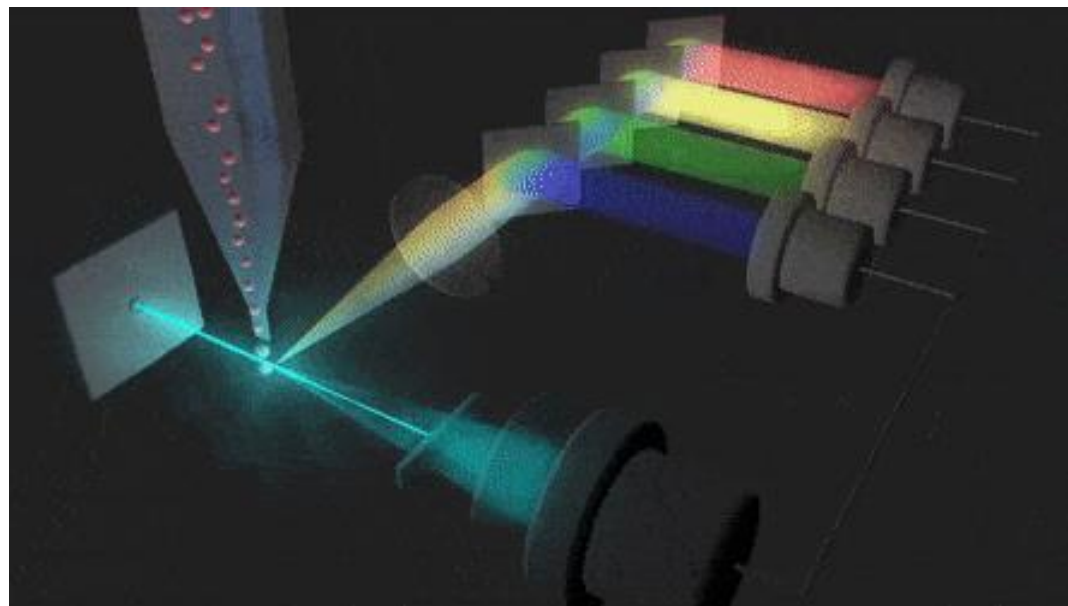
Princip průtokové cytometrie

Při průchodu částic laserovým paprskem dochází k rozptylu světla a k fluorescenci navázaných fluorochromů

Světelné signály jsou převedeny na elektrické pomocí detektorů (fotonásobiče)

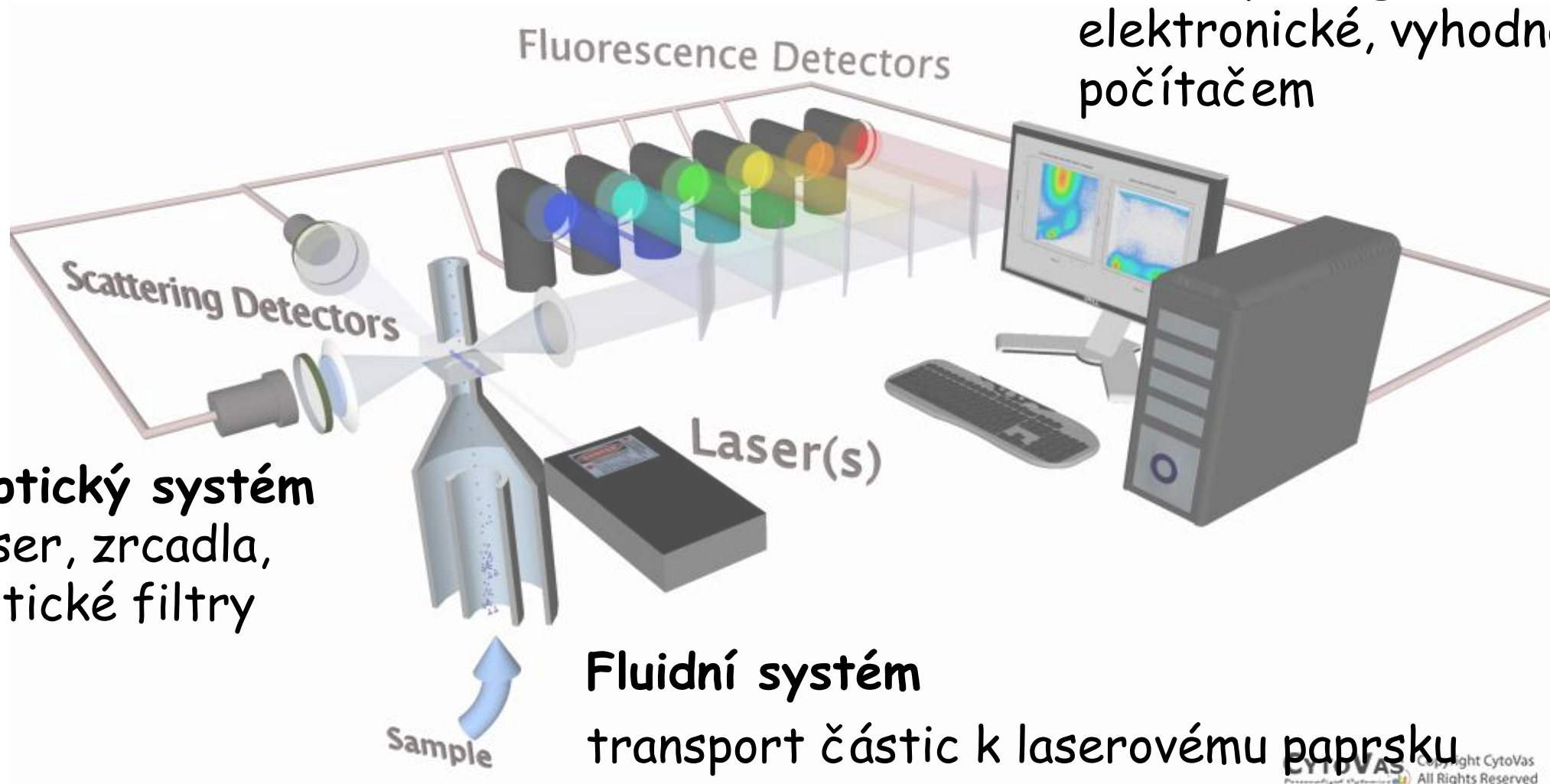
Na každé buňce je možné změřit několik parametrů zároveň

Naměřená data se ukládají a dále analyzují



Cytometr je tvořen třemi hlavními systémy

Elektronický systém převod detekovaných světelných signálů na signály elektronické, vyhodnocované počítačem

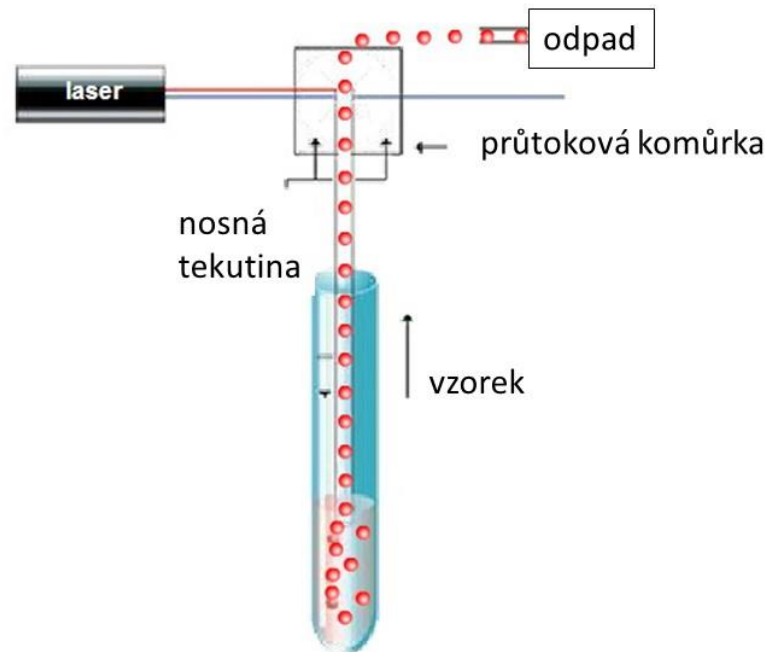


Optický systém
laser, zrcadla,
optické filtry

Fluidní systém
transport částic k laserovému paprsku

Fluidika

- zajišťuje transport bb. v nosné tekutině (pod tlakem) do průtokové komory
- buňky se pohybují jedna za druhou



Řez průtokovou komorou:
uprostřed vzorek (bunečná suspenze)
unášaná nosnou kvapalinou (sheath
fluid)

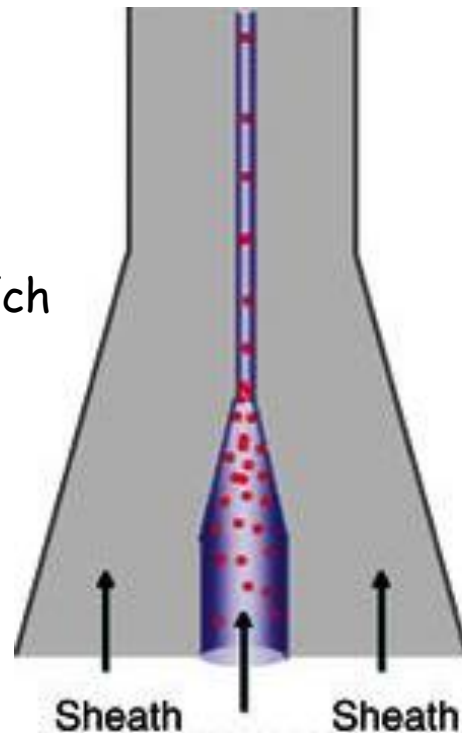
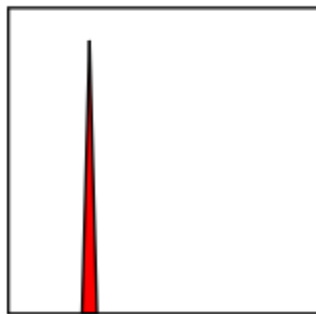


Hydrodynamická fokusace

- jev, který zabezpečuje uspořádání buněk jednotlivě za sebou
- rozdíl v tlaku a rychlosti nosné tekutiny a suspenze částic
- vzorek, např. buněčná suspenze je vstříknut doprostřed tzv. sheath fluid (nosná kapalina)
- nosná kapalina postupně strhává jednotlivé buňky a uspořádává je do řady za sebou
- tlak nosnej kapaliny je nastavený výrobcem, měnit můžeme tlak vzorku (nastavení rychlosti průtoku buněk)

Nízky tlak vzorku

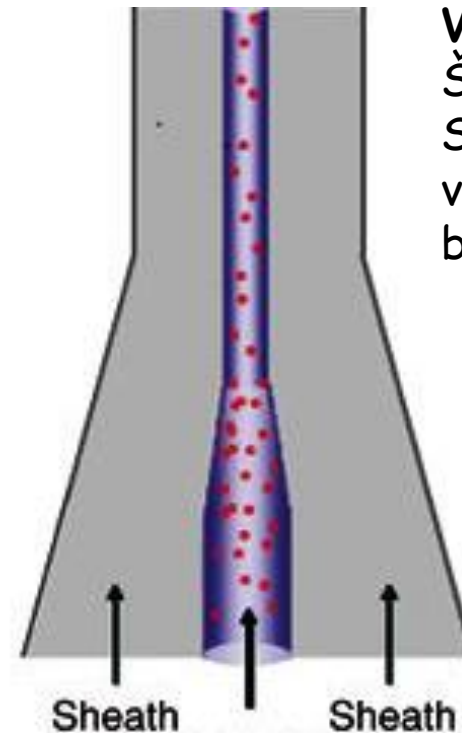
Úzký proud vzorku
Menší průtok buněk
Přesnější měření
vhodné např. pro DNA
analýzu a měření funkčních
vlastností



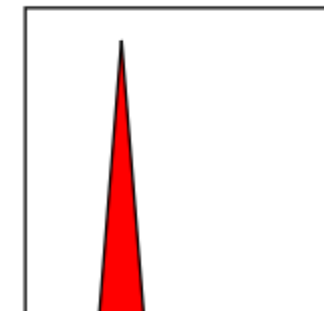
Vzorek

Vysoký tlak vzorku

Široký proud vzorku
Sbírání velkého počtu částic
vhodné např. na imunofenotypizaci
buněk



Vzorek



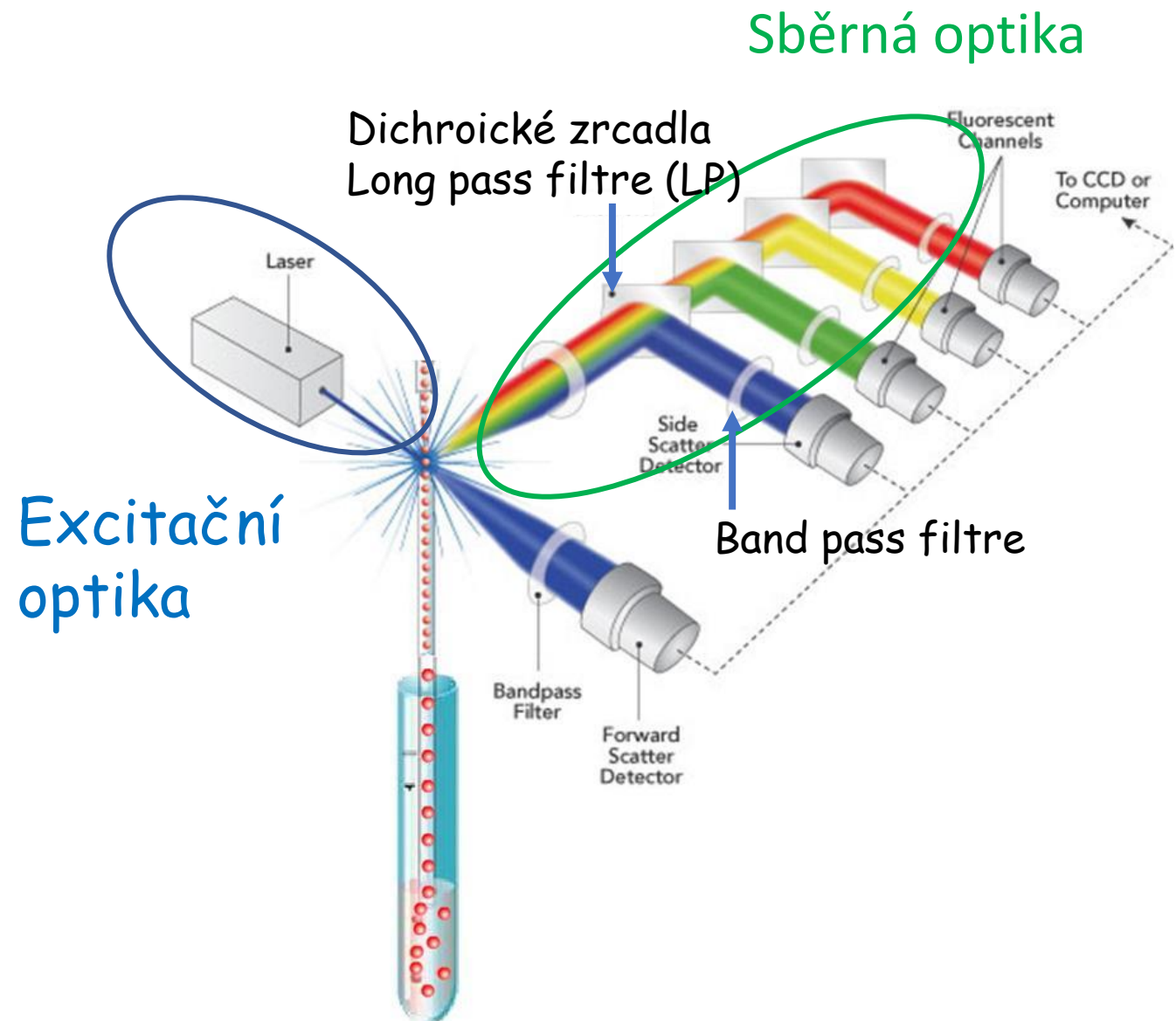
Optika

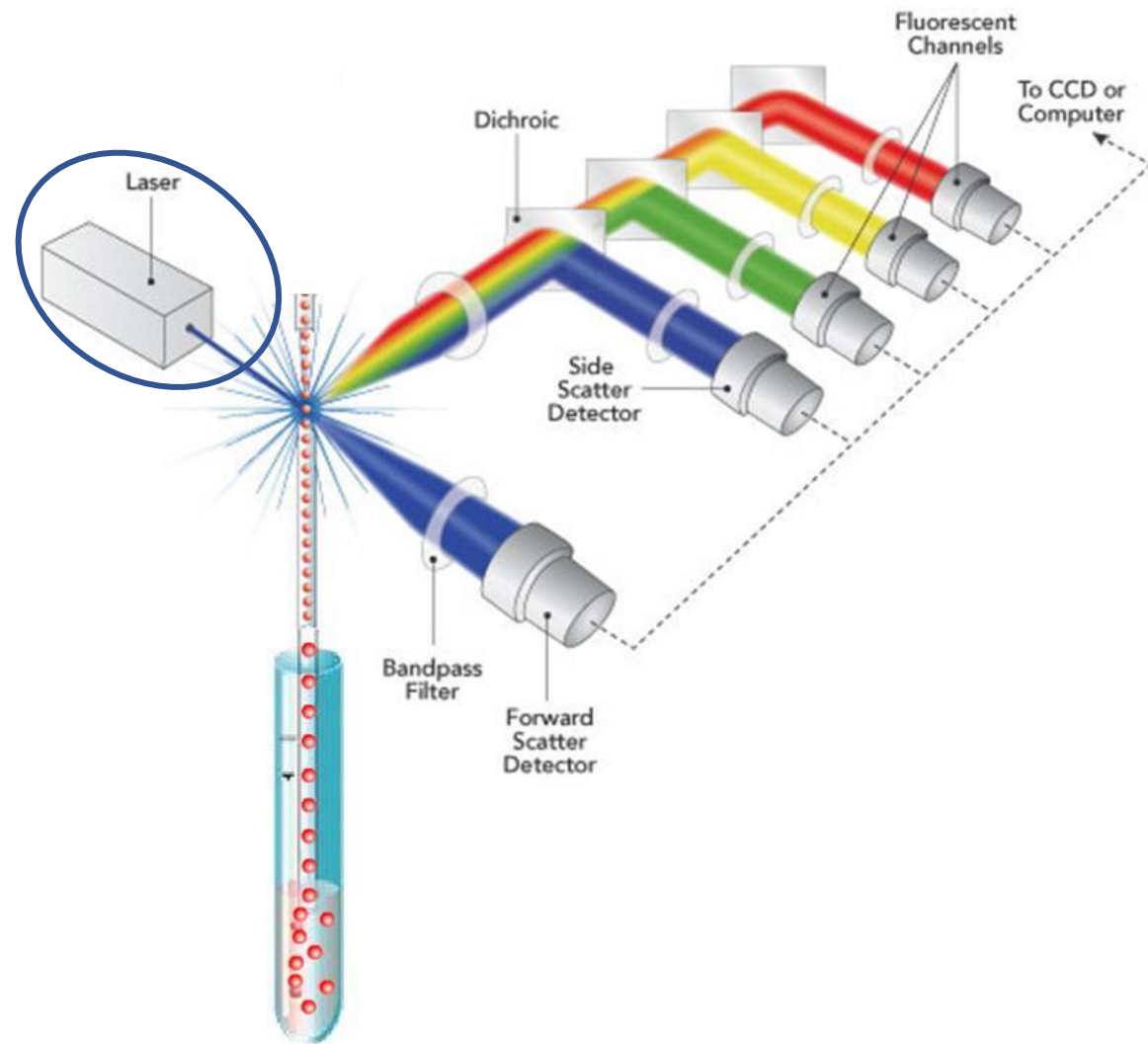
- **Excitační optika**

laser a systém čoček, které zaostřují a směřují laserový paprsek - před ozářením částic

- **Sběrná optika**

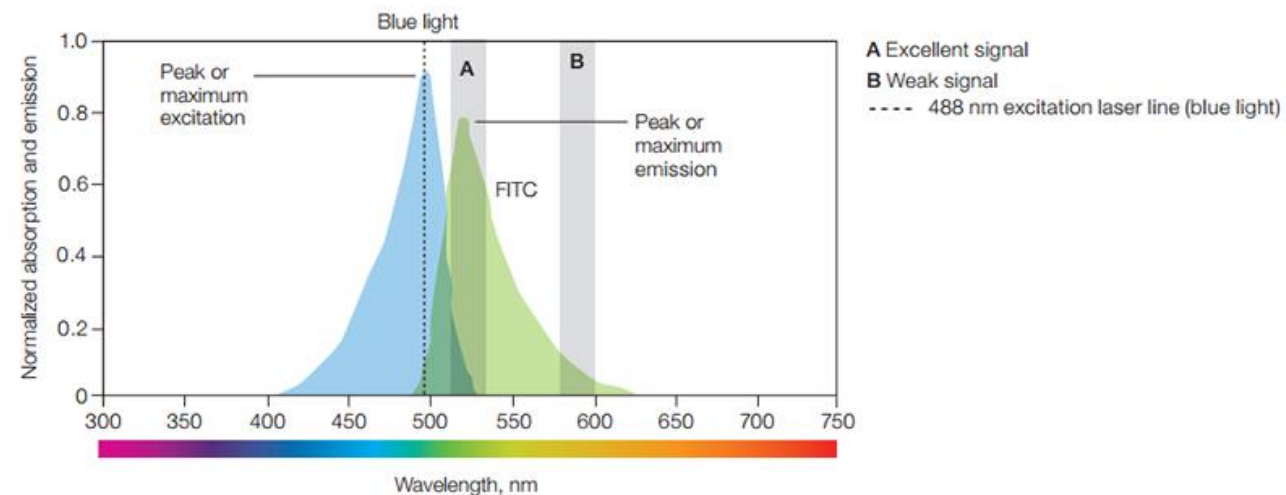
soustava čoček, která vede a rozděluje světlo do různých vlnových délek na příslušné detektory - odražené a fluorescenční záření po ozáření částic





Lasery – zdroj záření

- každý cytometr obsahuje jako zdroj záření laser
- dnes: nejčasteji využívané 3 až 4 lasery v cytometru
- každý laser má charakteristickou vlnovou délku záření → excitace různých fluorochromů



Emisní peak: při ozáření fluorochromu paprskem laseru je emitované záření určité vlnové délky. Podle nejvyšší intenzity vlnové délky emitovaného záření se volí vhodný detektor pro daný fluorochrom.

Sběr optického signálu v průtokové cytometrii

- ve vícebarevné průtokové cytometrii dochází k emisi několika fluorochromů najednou - tj. je emitované záření různých vlnových délek a je nutné takto vzniklé záření rozdělit tak, aby bylo jasné, co vyzařují jednotlivé fluorochromy
- při výběru fluorochromů se v průtokové cytometrii postupuje tak, aby se píky emisních spekter nepřekrývali

Elektronika

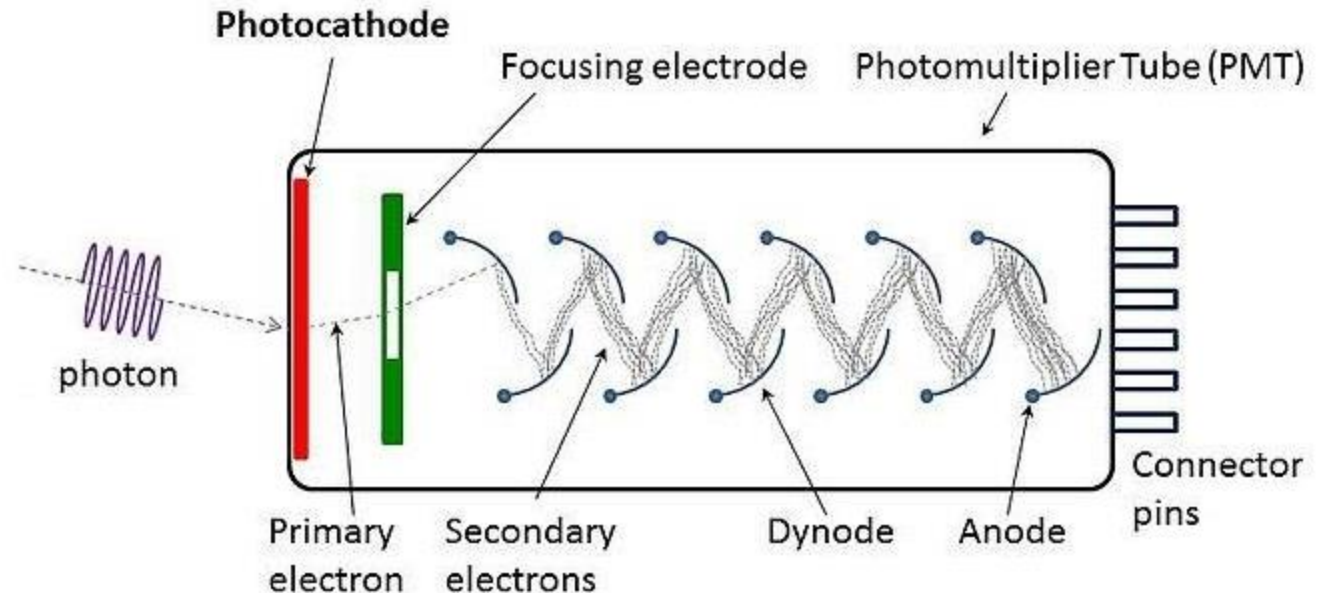
- Světelné signály jsou převáděny na elektrické
- Typy detektorů:
 - lavinové fotodiódy: detekce FSC
 - fotonásobiče PMT (PhotoMultiplierTube): detekce SSC a fluorescence

Princíp PMT

Záření ve formě fotonů dopadá na fotokatodu. Z ní jsou na základě fotoelektrického jevu vyraženy elektrony, které jsou dále usměrněny na tzv. dynody (katody s pozitivním napětím). Na jednotlivé dynody je priváděné stále vyšší napětí, což umožňuje urychlení elektronů a zvýšení jejich energie. Urychlené elektrony mají dostatek energie na vyražení dalších elektronů z povrchu dynod. Počet elektronů exponenciálně roste. Vyražené elektrony dopadají nakonec na anodu, na které dochází ke vzniku napěťového pulzu. PMT umožňuje přeměnit slabý počátečný signál na silný napěťový pulz.

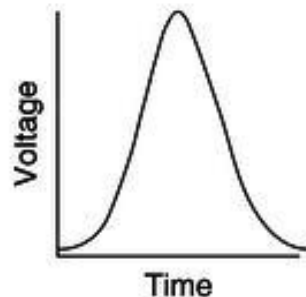
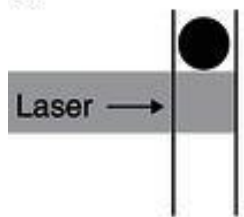
PMT

- velmi citlivé, jsou schopné zachytit i slabé signály
- zvyšují signál primárního dopadajícího záření

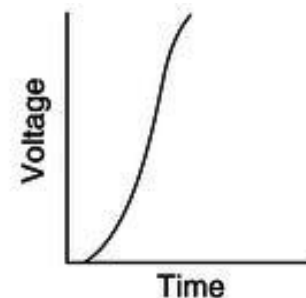
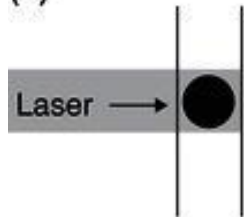


Vznik napěťového pulzu / Intenzita fluorescence

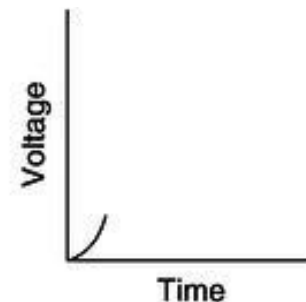
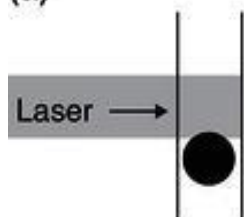
(c)



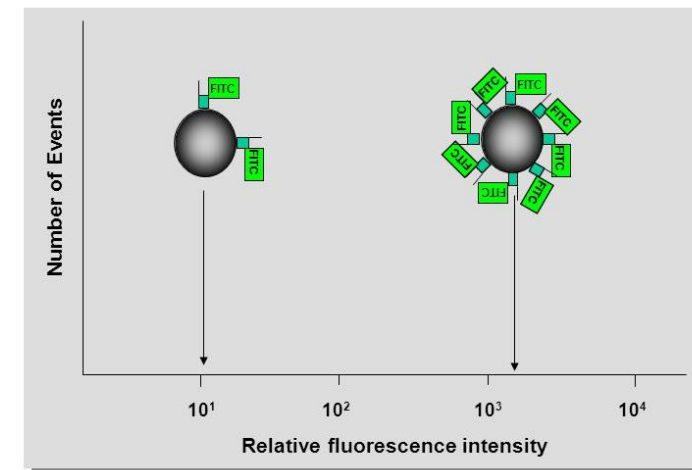
(b)



(a)



- přechod buňky laserovým paprskem generuje vznik napěťového pulzu na detektoru
- velikost napěťového pulzu je daná intenzitou záření (intenzitou fluorescence), které dopadlo na PMT
- intenzita fluorescence závisí na:
 - expresi jednotlivých povrchových znaků
 - počtu navázaných fluorochromů
 - na síle fluorochromu (fluorochromy nevykazují stejnou intenzitu fluorescence)
- napěťovým pulzům jsou pomocí převodníků přidělené digitální hodnoty rozdělené do 0-1024 kanálů na základě velikosti pulzu
- každý z těchto kanálů odpovídá určité intenzitě fluorescence



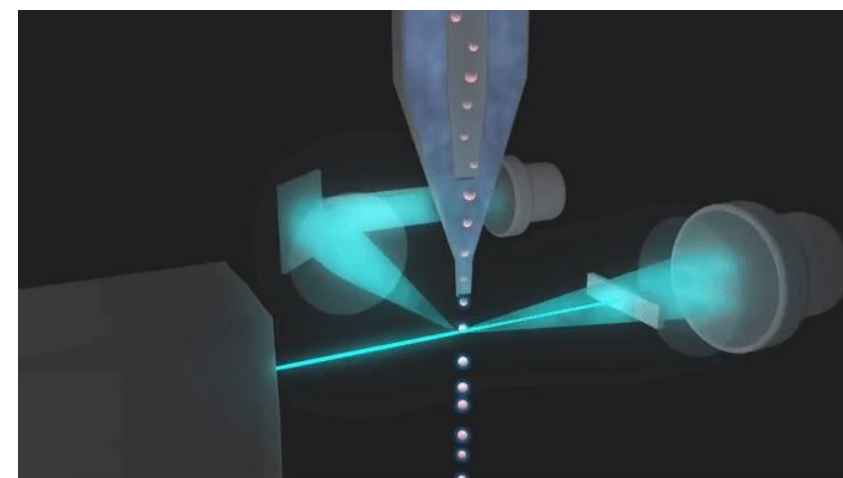
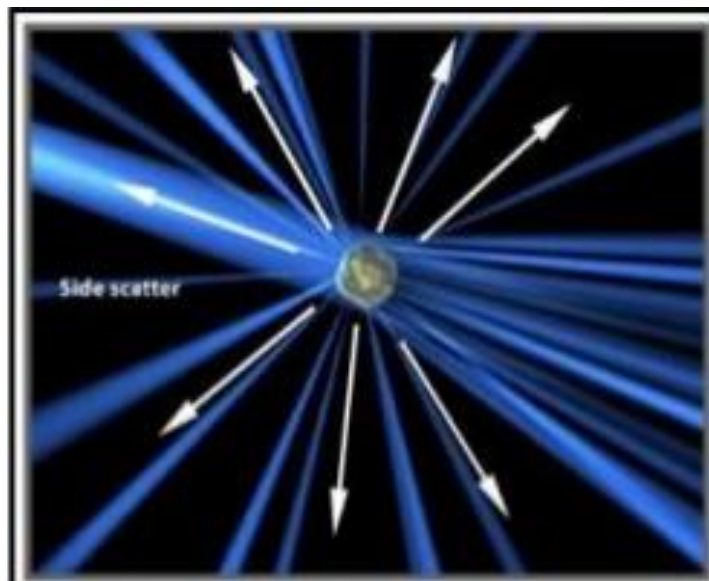
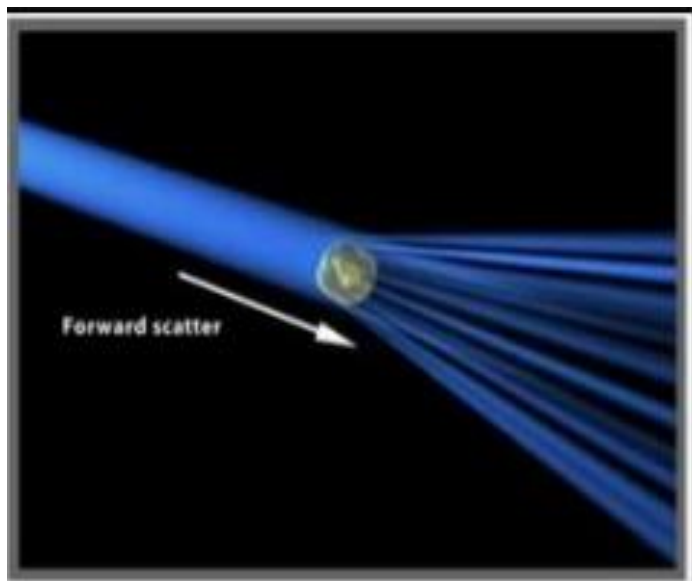
Velikost vs. granularita

- Velikost a členitost buňky určujeme na základě rozptylu záření (light scatter): procházející částice vychýlí dopadající záření

Forward Scatter (FSC) – rozptyl záření v přímém směru → závisí na velikosti buněk = určuje velikost

Side Scatter (SSC) – rozptyl záření do stran → závisí na členitosti buněk = určuje granularitu

- Stačí jeden laser
- Není to fluorescenční záření (nepotřebujeme MPL s fluorochromi)



Fluorochromy

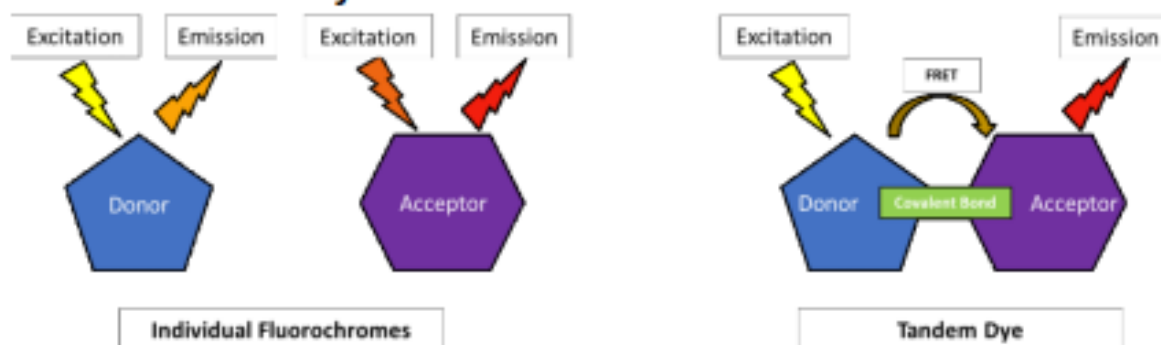
- Sú excitované vhodnou vlnovou dĺžkou (nutné zvoliť správny laser)
- Emitujú svetlo špecifickejšej vlnovej dĺžky (nutné zvoliť detektor v správnom pásme vlnových dĺžok)
- I neznačené bunky môžu byť fluorescenčné vďaka slabej autofluorescencii

- **Příklady klasických fluorochromů:**

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

- **Tandemové fluorochromy:**

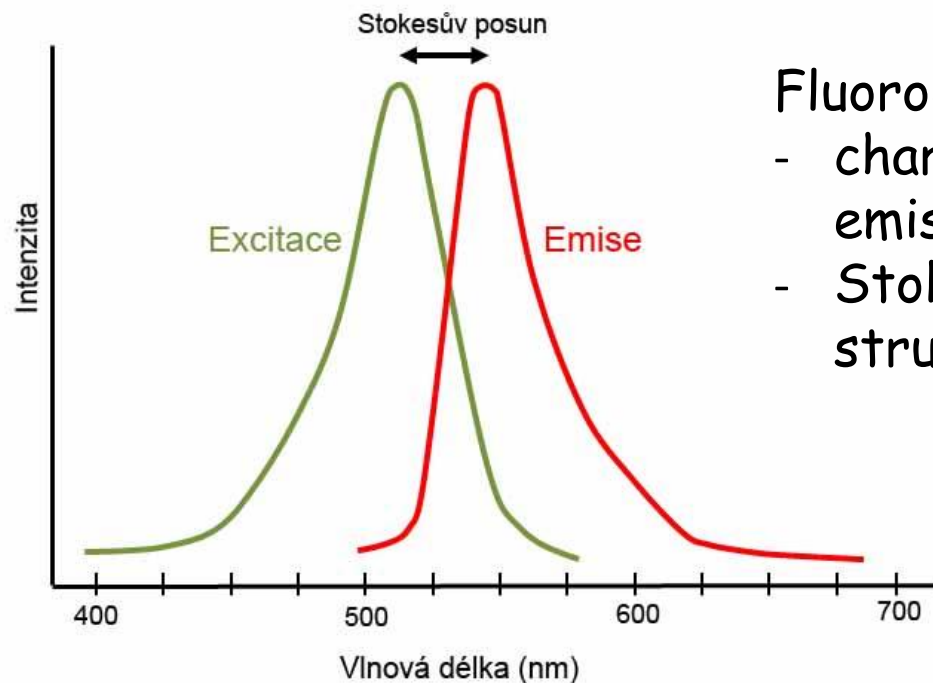
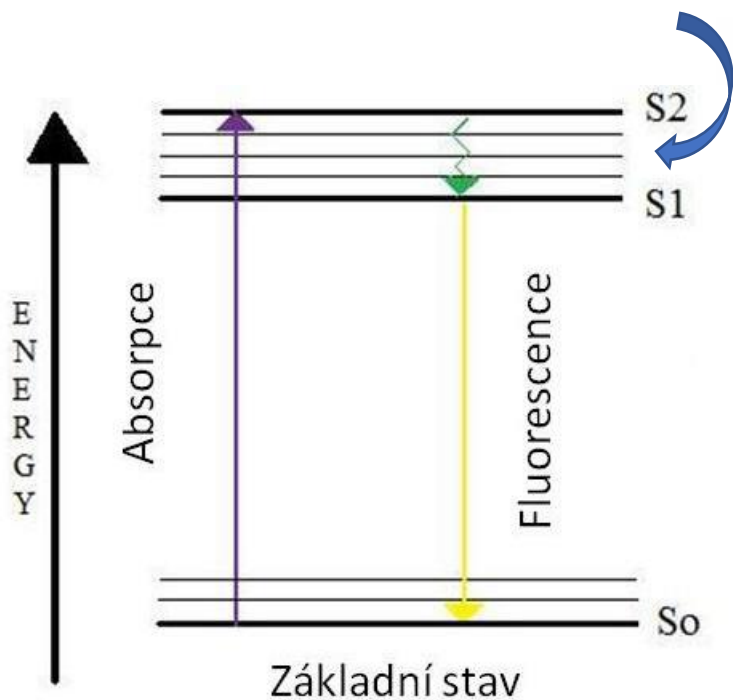
- 2 spojené fluorochromy: fluorochrom 1 (donor) excitován → emise světla → excitace fluorochromu 2 (akceptor) → emise světla
- Výhoda – velký rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou
- Nevýhoda – tandemové fluorochromy jsou náchylnější k rozpadu – podporuje jej vystavení světlu, čas
- Příklad: PE-CY5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



Fluorescence

Mnoho buněk má stejnou anebo podobnou morfologii- na základě exprese povrchových znaků je můžeme rozdělit do skupin:

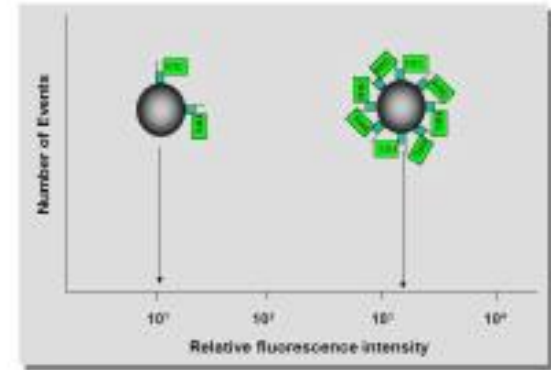
- využívají se k tomu monoklonální Ab značené **fluorochromy** specifické k určitému epitopu
- fluorochrom je molekula schopná absorbovat záření specifické vlnové délky (excitace) a následně vyzářit kvantum energie (emise) ve formě fluorescenčního záření
- částečná ztráta energie (přeměna na teplo) = Stokesův posun



Fluorochrom

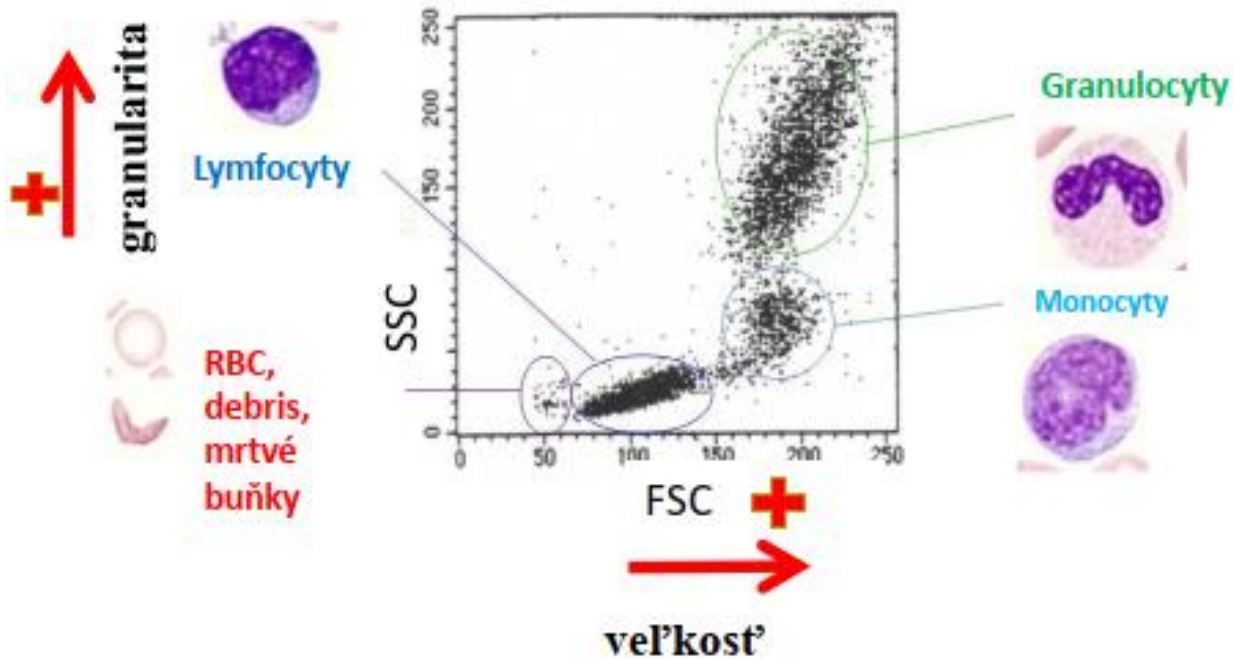
- charakteristické excitační a emisní spektrum
- Stokesov posun je daný strukturou molekuly

2 typy grafů



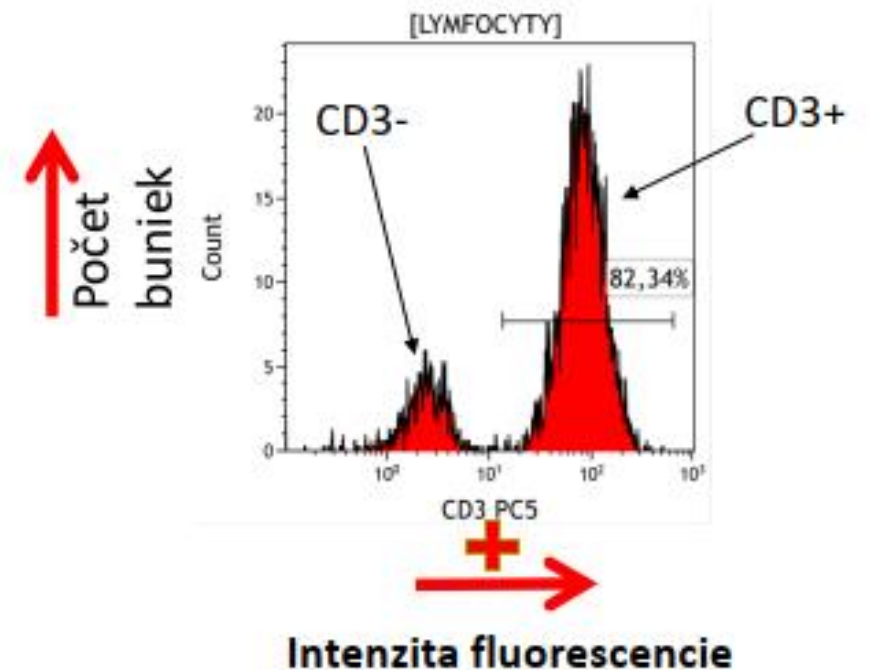
Dot plot

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



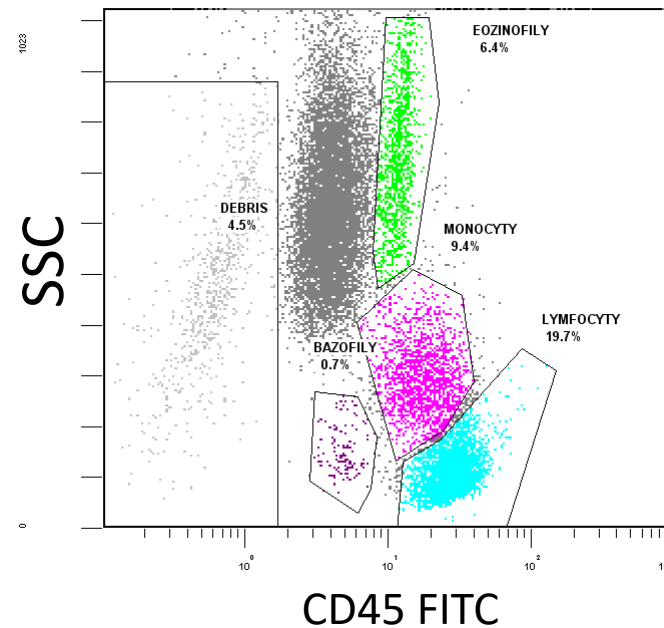
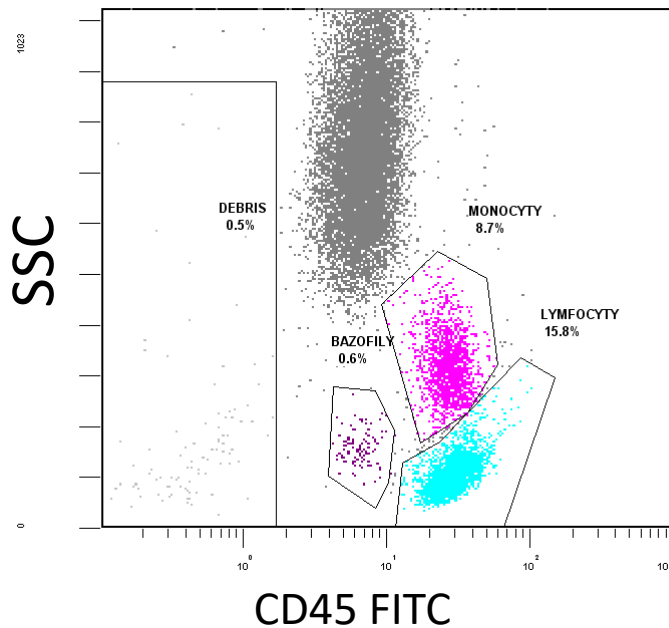
Histogram

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



Diferenciální rozpočet

Stanovení relativního počtu leukocytárních a lymfocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie



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

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

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

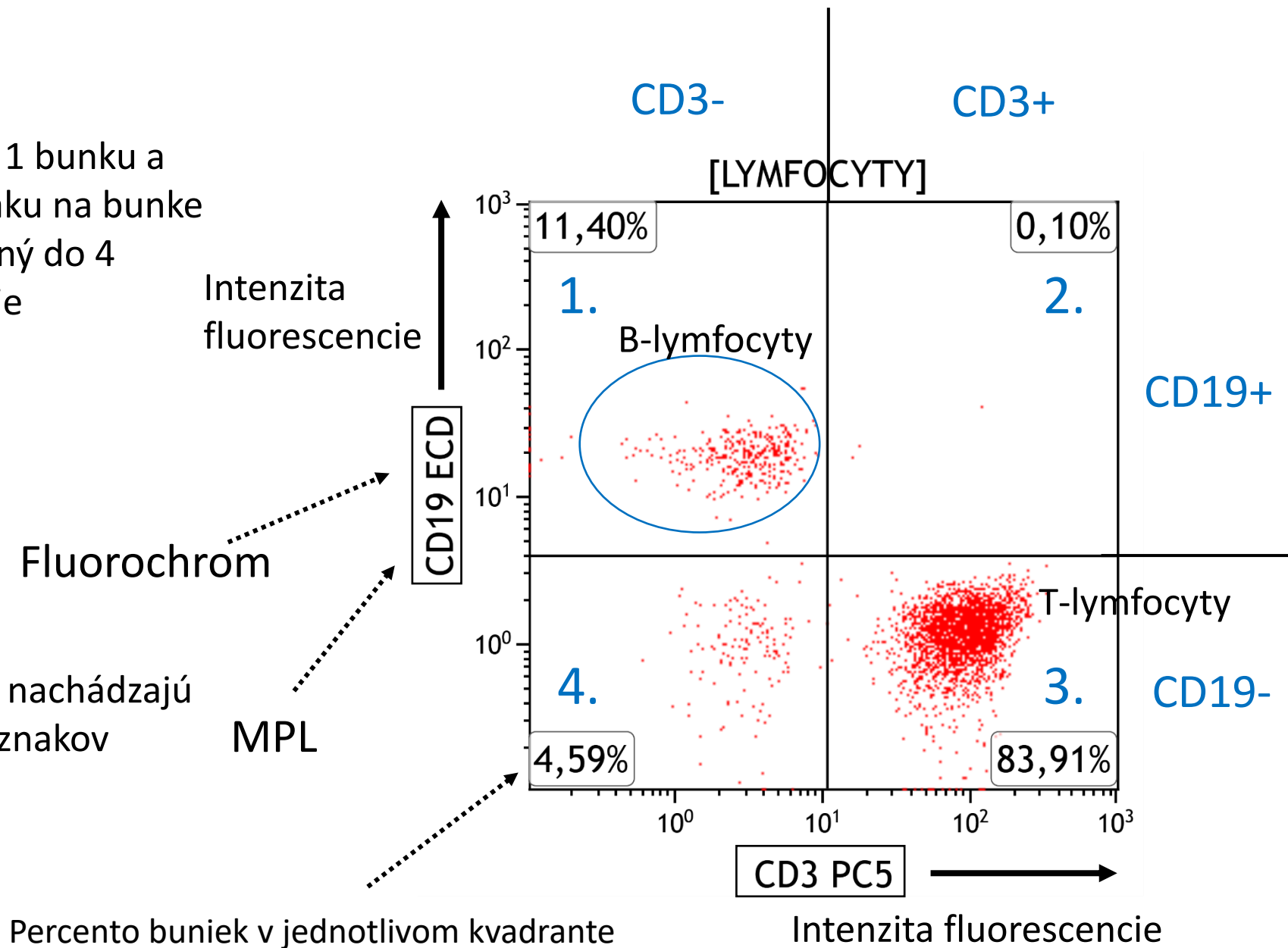
CD45- panleukocytární znak, přítomný na všech leukocytech

DOT PLOT

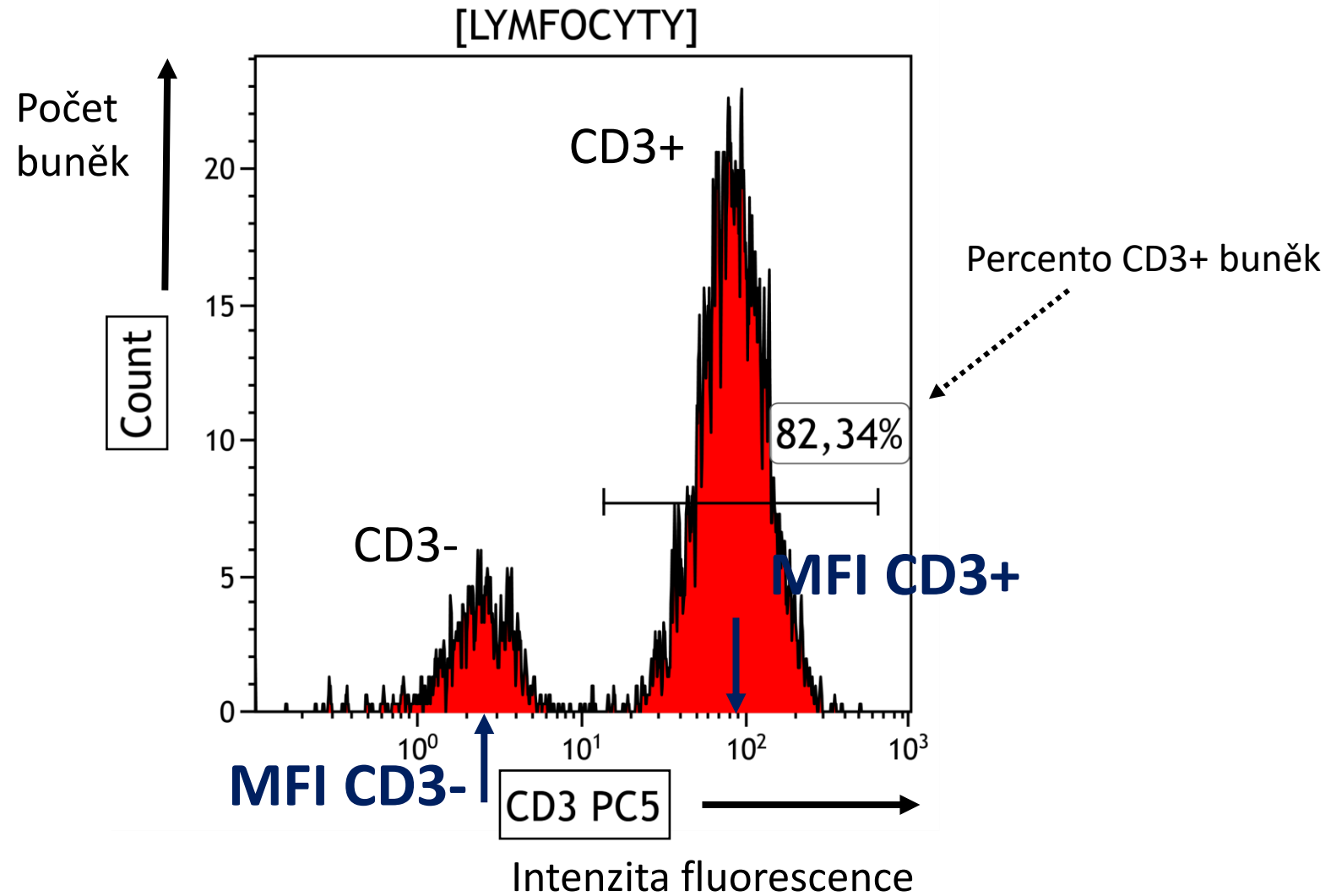
- každá bodka (tečka) zobrazuje 1 bunku a vyjadruje expresiu daného znaku na bunke
- príklad grafu: Dot Plot rozdelený do 4 kvadrantov, na základe expresie sledovaných znakov:

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



HISTOGRAM



Fluorochromy

- jsou excitované vhodnou vlnovou délkou (nutné zvolit správný laser)
- emitují světlo specifické vlnové délky (nutné zvolit detektor ve správném pásmu vlnových délek)
- i nezačtené bunky mohou být fluorescenční kvůli slabé **autofluorescenci**

- Polycyklické organické molekuly a jejich deriváty
 - **Fluorescein isothiokyanát (FITC)**, Cyaniny, Texas Red, rada Alexa, Pacific a Cascade
 - AmCyan, Propidium Iodide, 7-AAD, CFSE
- Fluorescenční proteiny
 - **Phycoerythriny (PE)**, Allophycocyaniny, PerCP, GFP,...

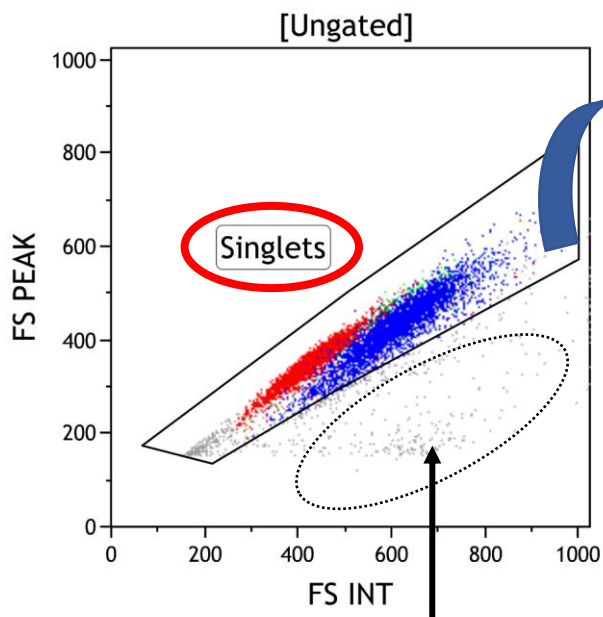
Schopné absorbovat fotony budícího záření (napr. 488 nm) a následně (10⁻⁸ s) emitovat fotony s delší vlnovou délkou (nap. 500 - 800 nm). Fluorescenční záření má tedy jinou „barvu“.

Analýza naměřených dat – Gating Strategy

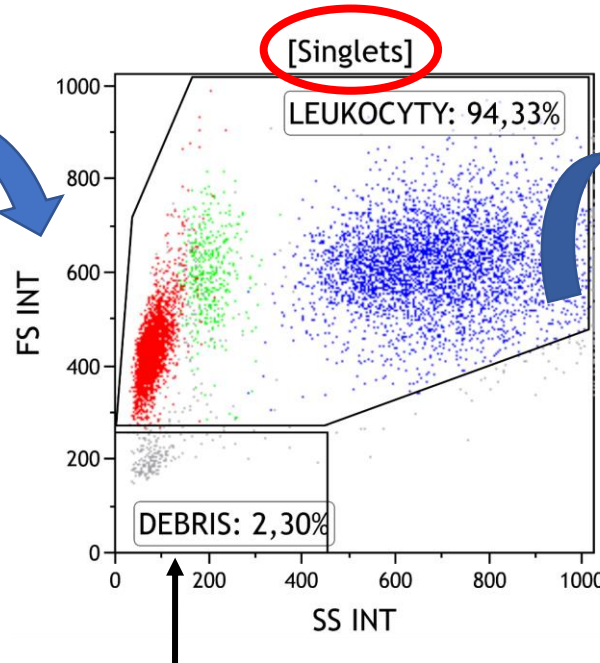
Gatovací strategie: postupný výběr buněk

Naměřené vzorky obsahují, kromě různých typů buněk, také spleené buňky, mrtvé buňky anebo prachové částice. Gatovací strategie slouží k odfiltrování nechtěných částic z analýzy a k výběru cílové populace buněk na základě různé kombinace použitých znaků. V grafu se následně ohraničí jen buňky, které nás zajímají (vytvoří se tzv. gate). Další graf už zobrazuje jen buňky výběru (ohraničené) z předcházejícího grafu.

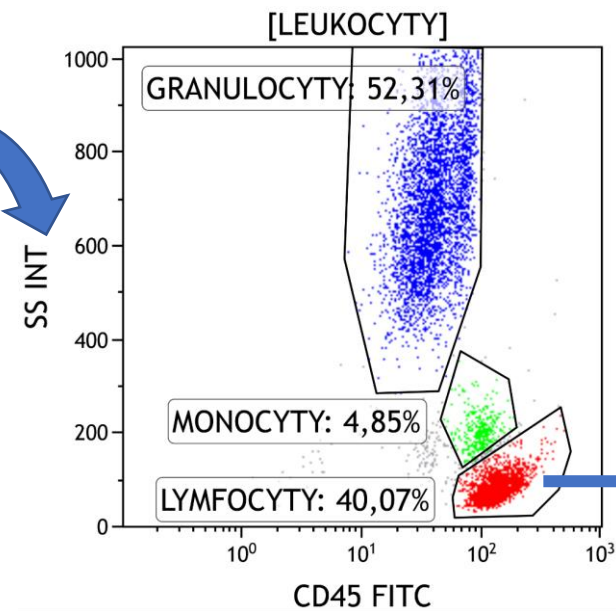
Název gate, z kterého se zobrazují buňky



Oddělení doubletu - spleených buněk



Mrtvé buňky a prachové částice



Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

Výhody

- Velké množství analyzovaného materiálu - velké množství dat
- Analýza trvá několik minut
- Kvalitativní + kvantitativní analýza
- Možné manipulační operace
např. třídění buněk podle vybraných vlastností (cell sorting)

Nevýhody

- Vysoká finanční náročnost
- Sestavení experimentu, analýza a vyhodnocení dat závislé na zkušenostech obsluhy
- Analýza vzorků co nejdříve po odběru
- Nevidíme lokalizaci signálu na buňce

Krevní diferenciál

Základní vyšetření v imunologické laboratoři: *stanovení zastoupení lymfocytárních subpopulací v plné krvi*

Průtokovou cytometrií se stanovuje počet buněk v jednotlivých subpopulacích lymfocytů a porovnává se s referenčními hodnotami.

Připravují se **dvě zkumavky** s následující kombinací monoklonálních protilátek MPL:

MPL + Fluorochrom

Zkumavka A: 45μl krve + x μl MPL

CD45	FITC
CD3	PC5
CD4	RD-1
CD8	ECD

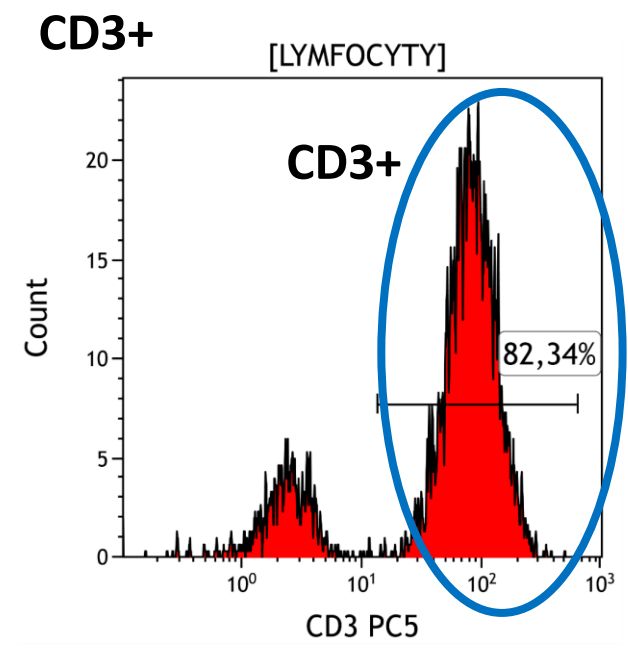
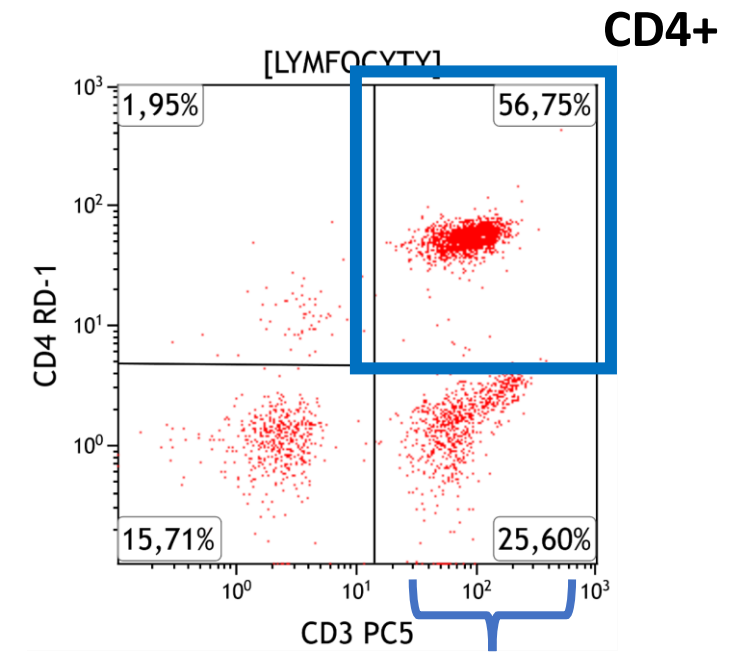
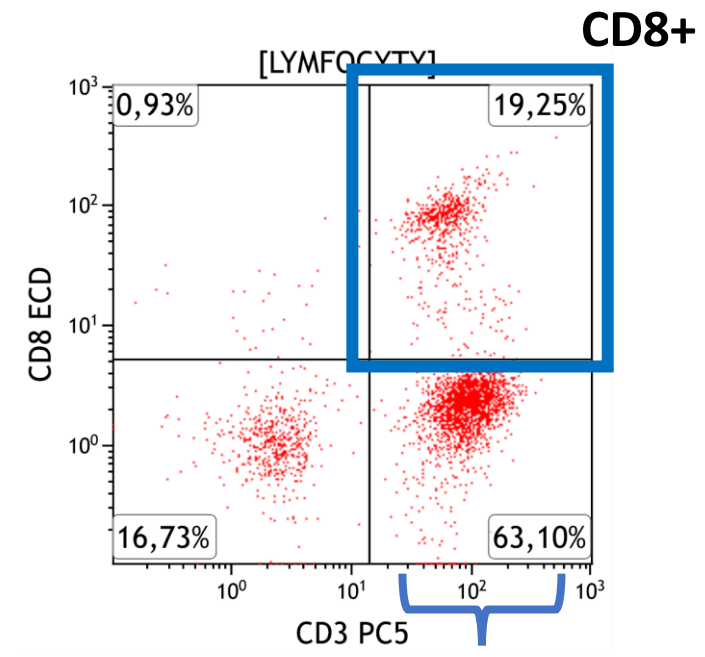
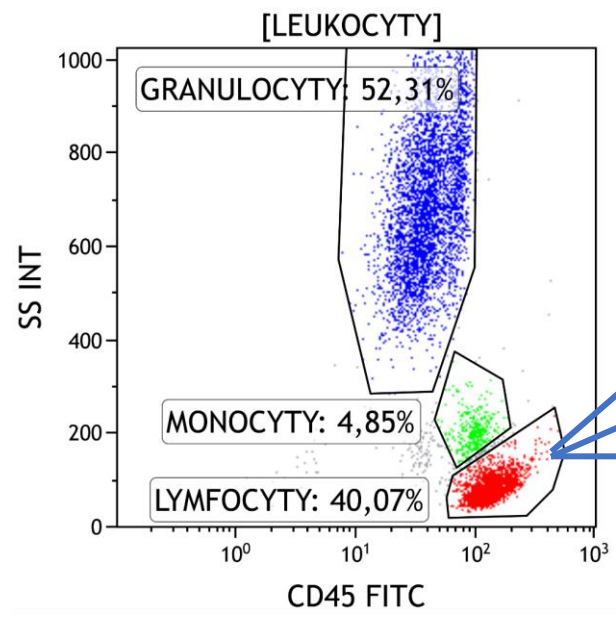
Zkumavka B: 45μl krve + x μl MPL

CD45	FITC
CD3	PC5
CD19	ECD
CD16/56	RD-1

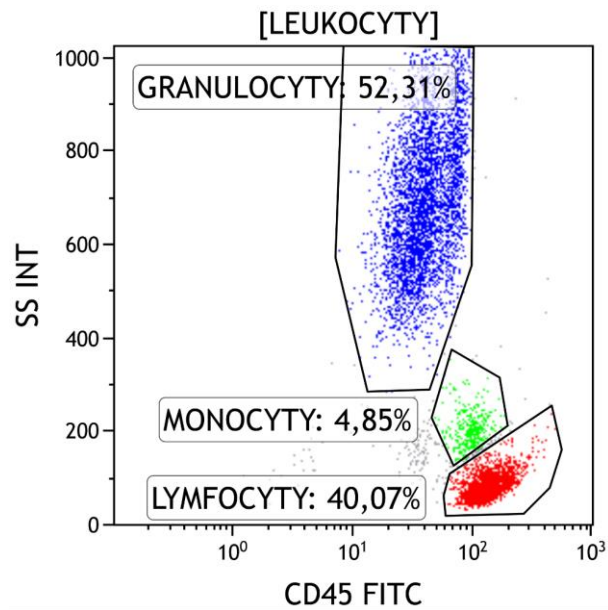
Vzorky krve s MPL se inkubují 30 min, následuje lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

Krevní diferenciál - gatovací strategie

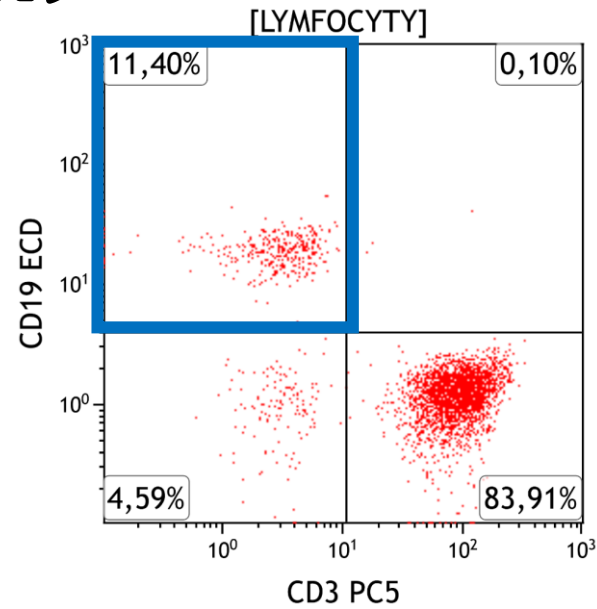
Zkumavka A:



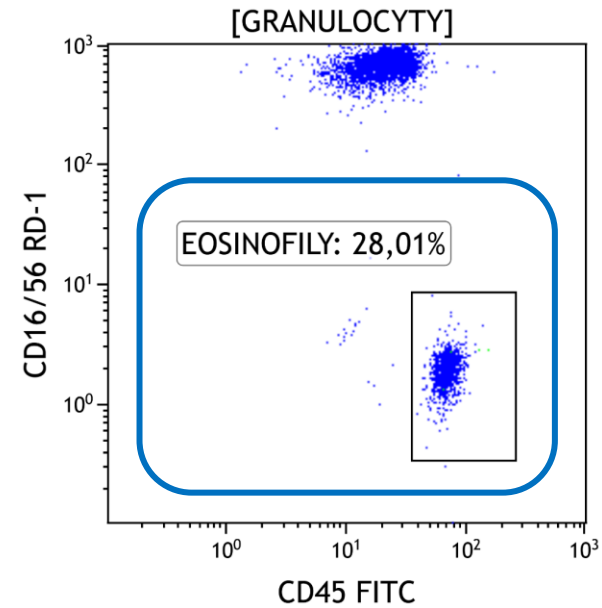
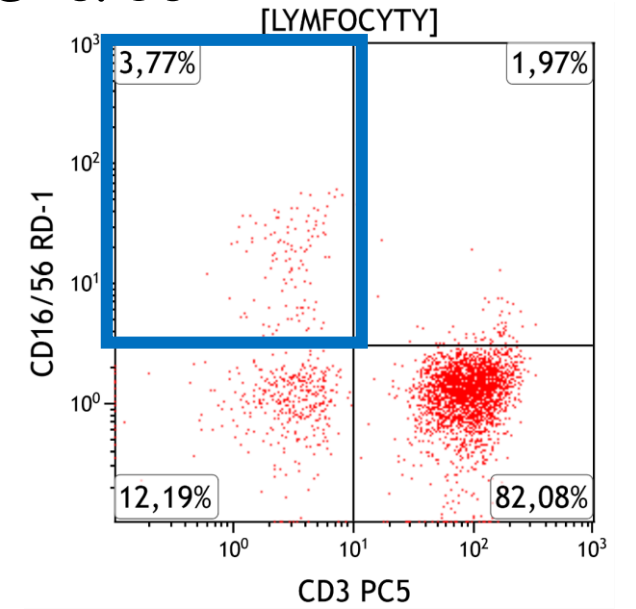
Zkumavka B:



CD19+

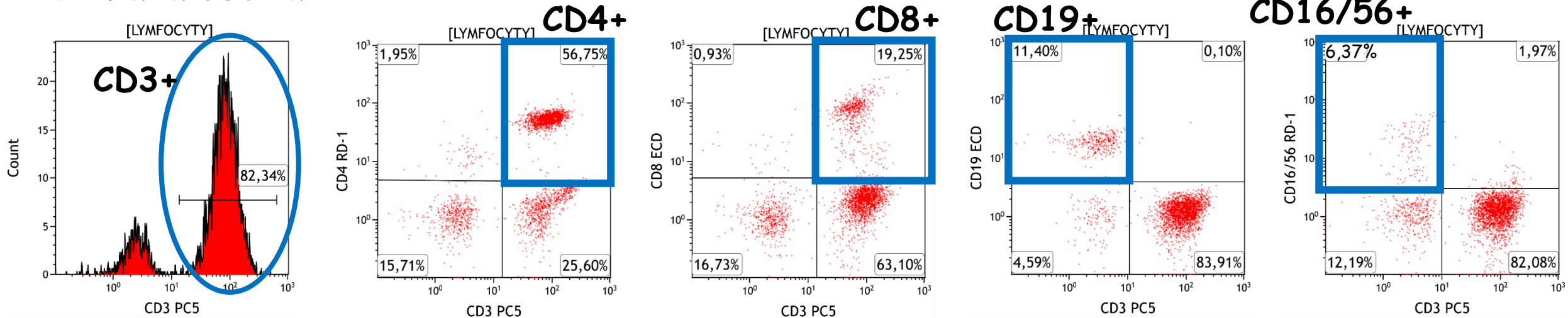


CD16/56+



Základem imunologického vyšetření je krevní diferenciál, určení základních lymfocytárních subpopulací.

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)%

Stanovení absolutního počtu lymfocytárních subpopulací

!Počet leukocytů

lymfocyty

3,6-10 $\times 10^9/l$

monocyty

20-55 %

0-10 %

granulocyty - neutrofily, eosinofily, bazofily

37-75 %

Příklad:

Leukocyty 5 $\times 10^9/l$

relativny počet

abs. počet

Lymfocyty: 20%

1,0 $\times 10^9/l$

CD3: 75%

0,75 $\times 10^9/l$

CD19: 10%

0,1 $\times 10^9/l$

CD15,56: 15%

0,15 $\times 10^9/l$

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)

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)

Příklady využití FACS v praxi

Vliv infekce

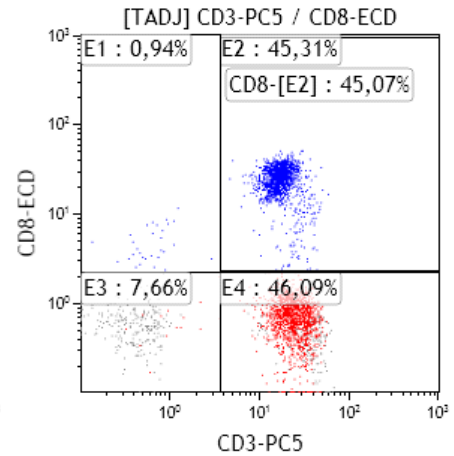
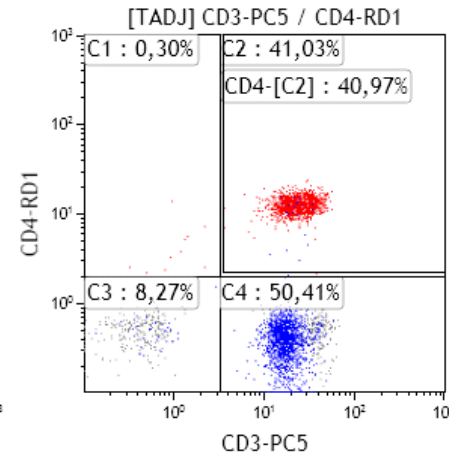
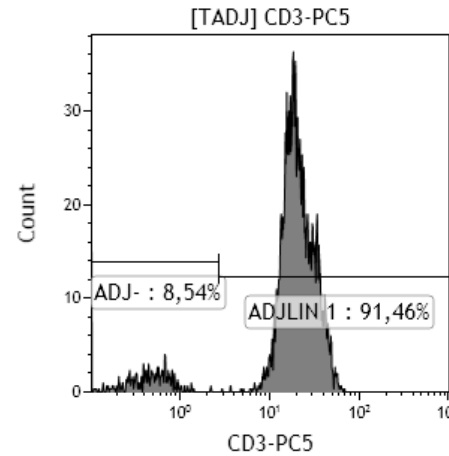
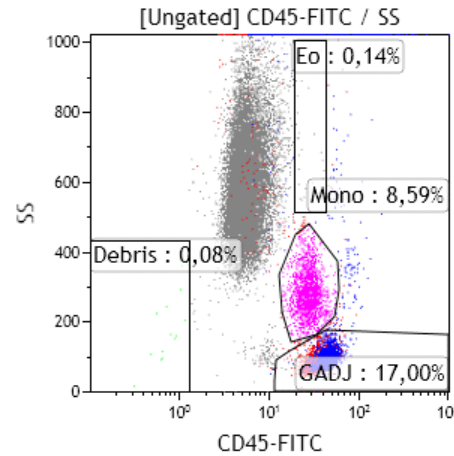
Bakteriální infekce

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

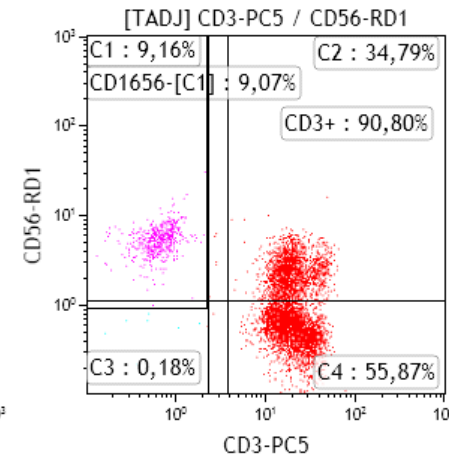
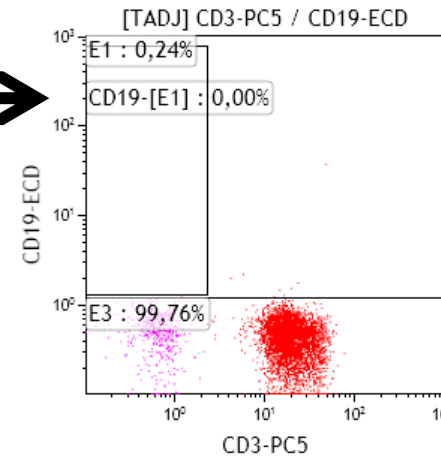
Virová infekce

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

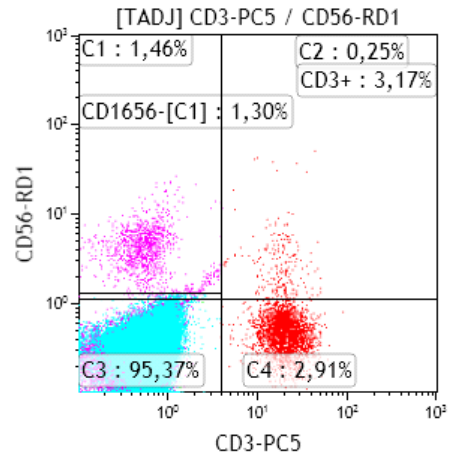
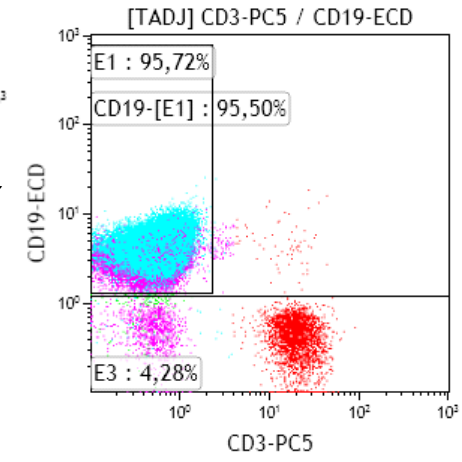
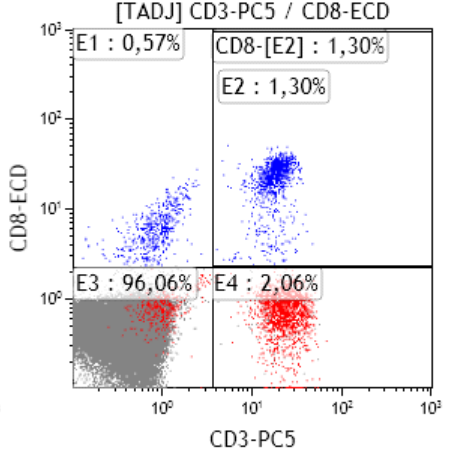
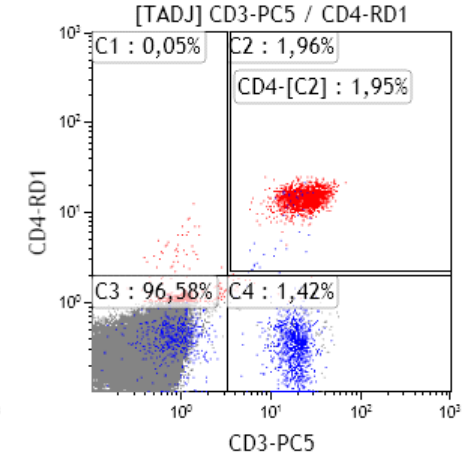
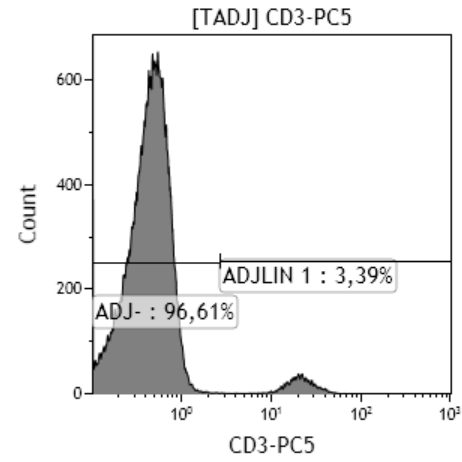
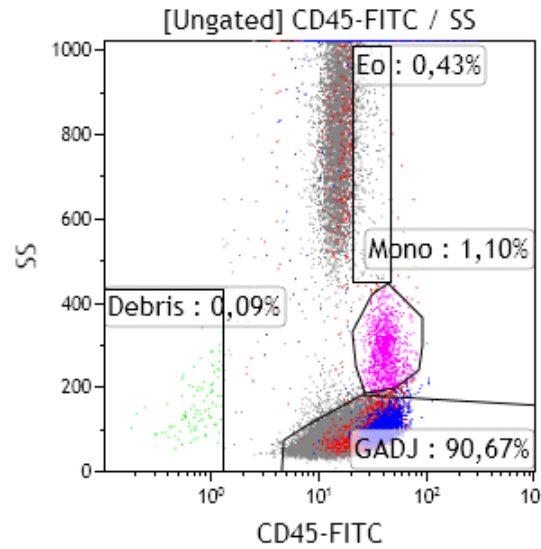
Pacientka: Ž, *1957



- v krevním diferenciálu chybí B-lymfocyty (0,0 % z celkových lymfocytů)
- v nemocničním systému zjištěná léčba rituximabem - pacientka revmatologie
- výsledek: deplece B lymfocytů vlivem léčby (po 4-6 měsících návrat k normálním hodnotám)



Pacient: M,
*1966

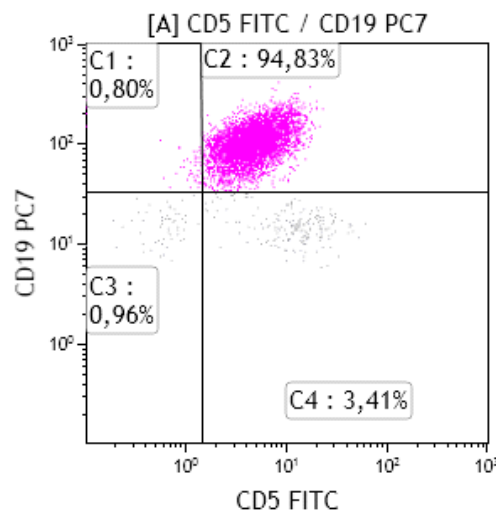
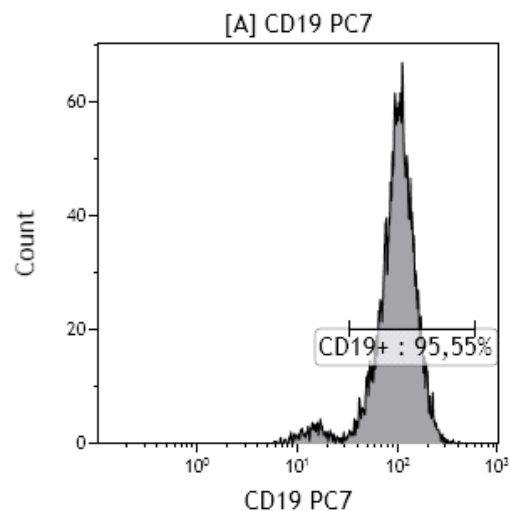
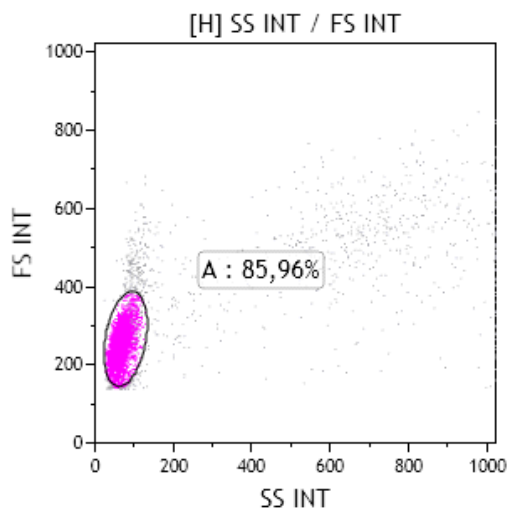


- v krevním diferenciálu vysoké B-lymfocyty (95,50 % z celkových lymfocytů)
- Prvo-záchyt: bez historie v nemocničním systému
- výsledek: podezření na leukémii
- nutné doplnit vyšetření CD5+CD19+ buněk

Pacient: M, *1966

Doplnění vyšetření na přítomnost CD5+CD19+ buněk

- CD5+CD19+ buňky = marker chronické lymfoproliferativní choroby
- u zdravé osoby se znak CD5 vyskytuje na T-lymfocytech, normální hodnoty CD5+ na B-lymfocytech u zdravého dospělého člověka: do 10% ze všech B-lymfocytů



CD5+CD19+ : 94.8%

Vzorek: periferní krev odebraná do EDTA

Značení MPL:

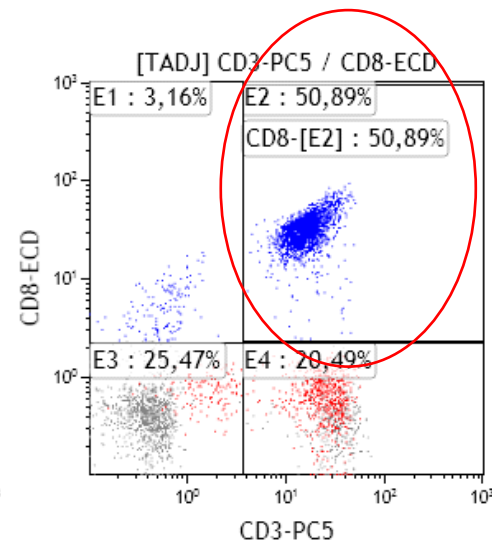
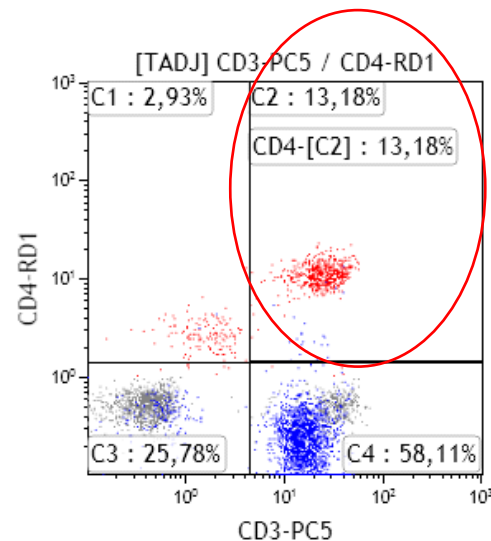
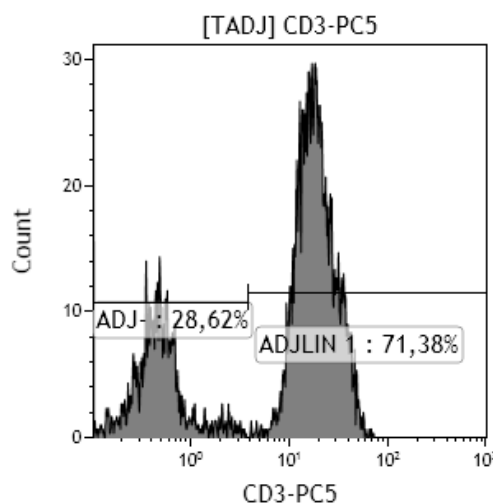
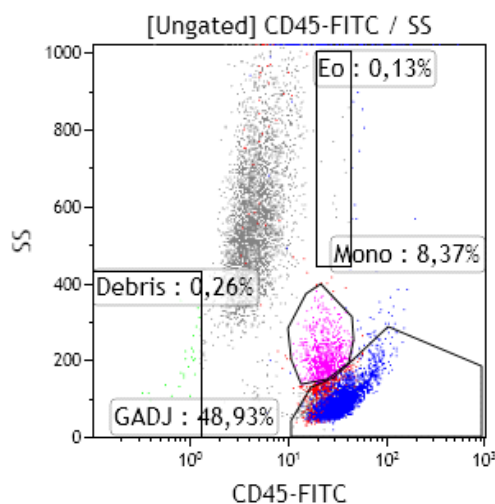
CD45 KO - panleukocytární znak

CD19 PC7- B-lymfocyty

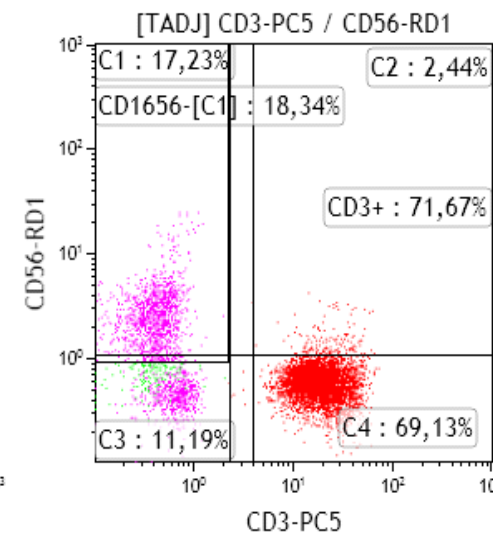
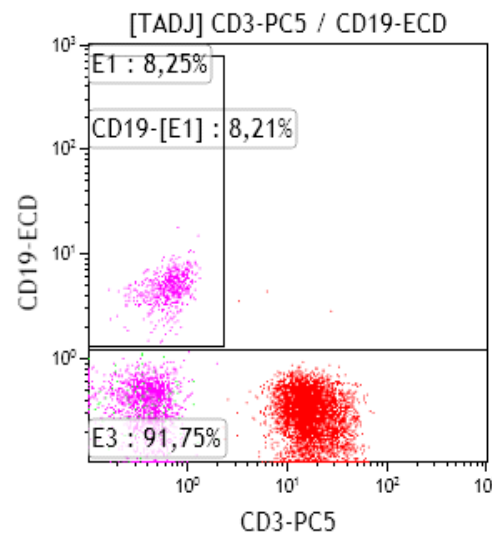
CD5 FITC

Výsledek: vysoký počet CD5+CD19+ = doporučení
na hematologické vyšetření

Pacient: M, *1999

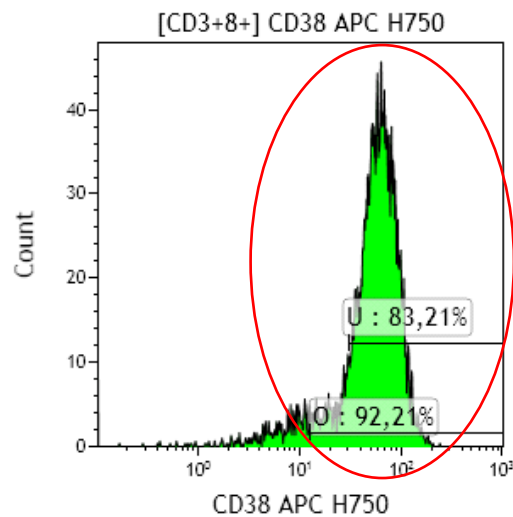
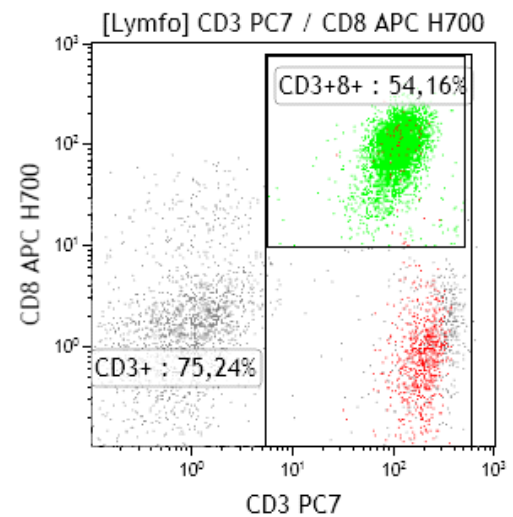
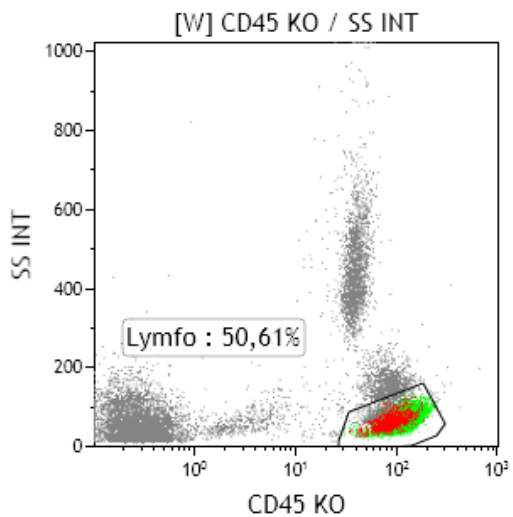


- v krevním diferenciálu zjištěný obrácený poměr CD3+CD4+ k CD3+CD8+ (13,2 : 50,9)
- Fyziologické hodnoty: poměr CD3+CD4+ > CD3+CD8+
- Prvo-záchyt: bez historie v nemocničním systému
- výsledek: podezření na virovou infekci (často EBV, CMV)
- nutné doplnit vyšetření CD8+CD38+ buněk



Pacient: M, *1999

Doplnění vyšetření na přítomnost zvýšené exprese znaku CD38 na CD3+CD8+ T-lymfocytech

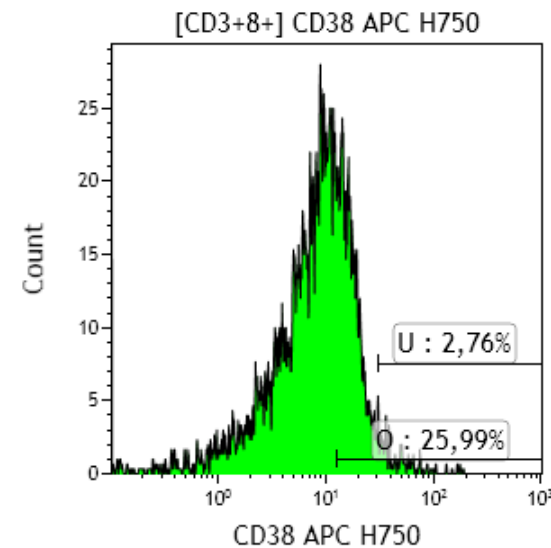


- CD8+CD38+ buňky = marker virových infekcí
- u zdravé osoby je zastoupení CD8+CD38+ T- buněk nízké, u virových infekcí se zvyšuje, patologické hodnoty = ???
- hodnoty vyšší než 50% CD8+CD38+ T-buněk z celkových CD3+CD8+ T-buněk nutně výsleděk hlásit ošetřujícímu lékaři

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

Výsledek: vysoký počet CD8+CD38+ T-lymfocytů = možná např. EBV infekce (mononukleóza), doporučeno mikrobiologické vyšetření

Fyziologický obraz
Nastavení polohy gatí je fixní- nastavené podle zdravých kontrol



SCID - Severe Combined Immunodeficiency

Těžký kombinovaný imunodeficiencit



- 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 mykobakteriízy, 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 časné thymocyty toxické - rozvíjí se těžká T lymfopenie
 2. **SCID T-B-NK+:** 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+NK-:** 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 pro IL-4, 7, 9 a 15 - funkční porucha mnoha cytokinů.
 4. **Retikulární dysgeneze:** Postižení kmenové buňky, blokován vývoj myeloidní i lymfoidní linie.

SCID

Severe Combined Immunodeficiency - Těžký kombinovaný imunodeficit

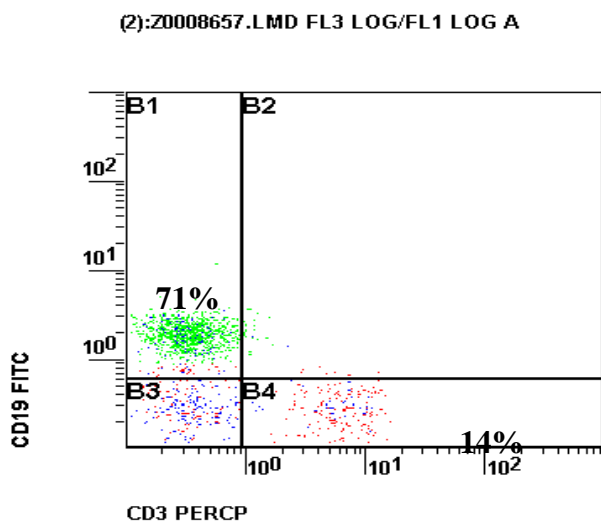
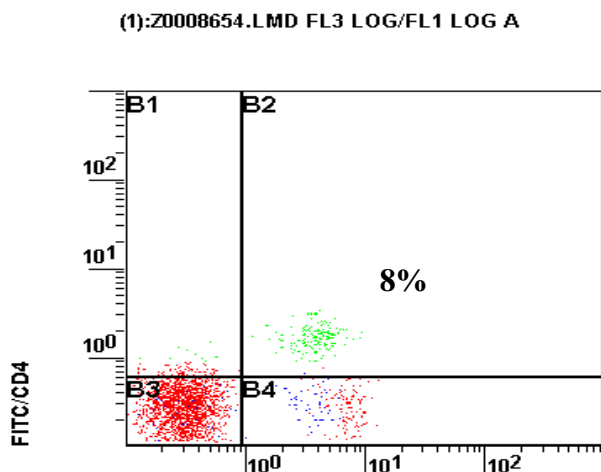
Příklad pacienta se SCID

- záchyt u novorozenců a dětí
- nízký absolutní počet leukocytů a lymfocytů, v podstatě chybí CD3+ T-lymfocyty, počet B-lymfocytů a NK buněk může být také snížený

Leukocyty: $5,0 \times 10^9/l$
Lymfocyty: $4,0 \times 10^9/l$

Nízký počet leukocytů i lymfocytů vzhledem k věku pacienta

SCID



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

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

T LYMFOCYTY

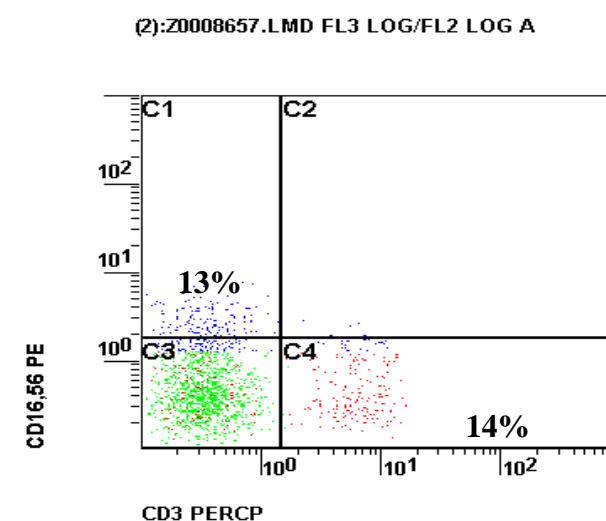
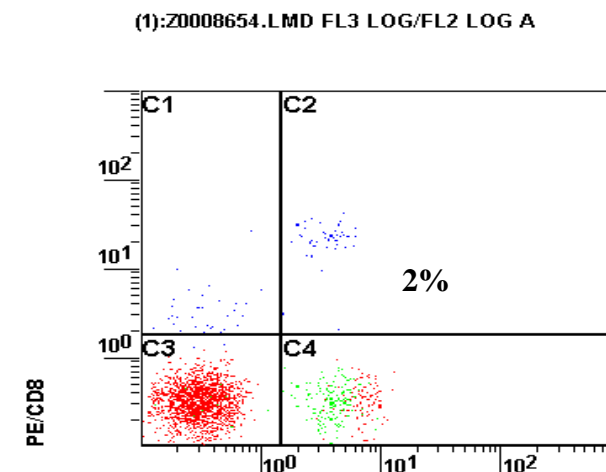
- CD3+: 14 (58-85)%
- CD3+4+: 8 (30-60)%
- CD3+8+: 2 (15-35)%

B LYMFOCYTY

- CD19+: 71 (7-23) %

NK LYMFOCYTY

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



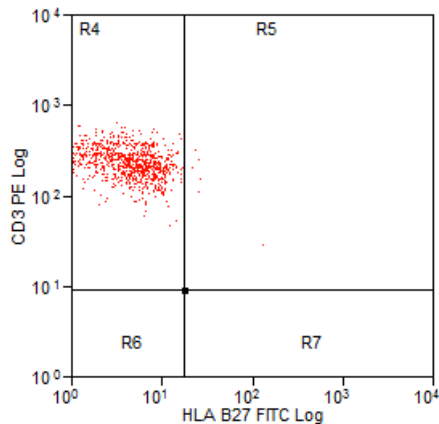
Výsledek: T-B+NK+ SCID

- všechny T-lymfocyty byly mateřské, aktivované, rozpoznávají HLA antigeny kojence jako „cizí“
- možné doplnit funkční test proliferace T-lymfocytů; dítě je směřované k transplantaci kostní dřeně

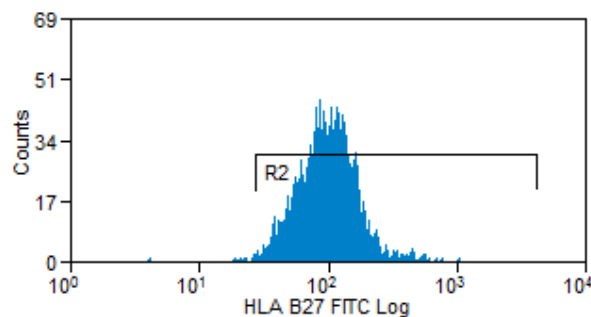
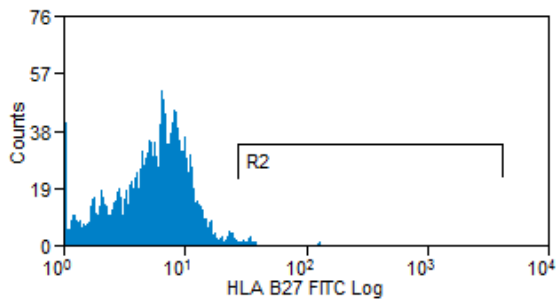
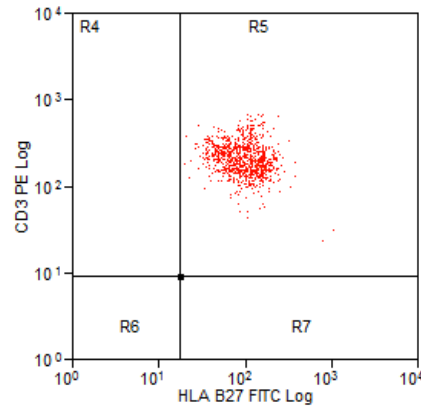
HLA-B27

Znak HLA-B27 je asociovaný s řadou zánětlivých onemocnění jako zánět kloubů, vnitřních struktur oka (uveitida), krátkých kostí rukou, noh a šlach, dále psoriázou, chronickými bolestmi spodní částmi zad a spondyloarthropatiou - nejznámější je ankylozující spondylitida (zánětlivé systémové onemocnění páteře a kloubů - **Bechtěrevova choroba**)

negativní



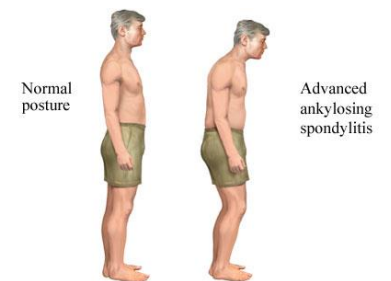
pozitivní



Vyšetření HLA-B27 není doplňujícím měřením ke krvnímu diferenciatu, je to samostatné měření

Vzorek: periferní krev odebraná do EDTA
Značení MPL:
CD3 PE- T-lymfocyty
HLA-B27 FITC

Výsledek: cytometrické vyšetření HLA-B27 je jen **screeningová metoda**. Pozitivní výsledek je třeba **konfirmovat metodou PCR**



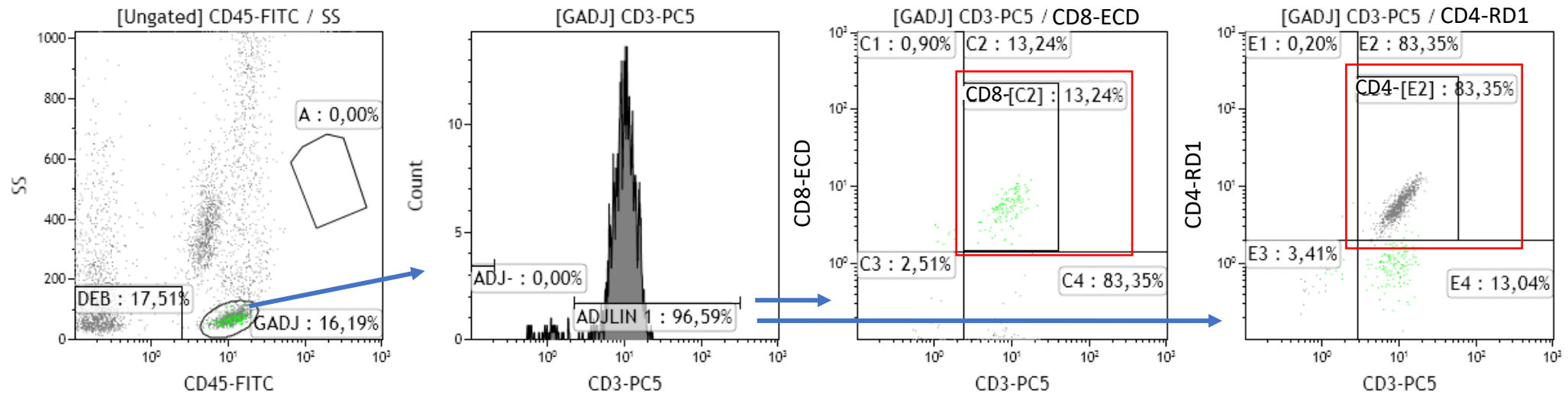
Bronchoalveolární laváž - BAL

- diagnostické bronchoskopické vyšetření
 - pacientovi se do bronchu (větve bronchu) pomocí fibrobronchoskopu aplikuje a následně zpět aspiruje 150-200 ml fyziologického roztoku
 - sleduje se procentuální zastoupení jednotlivých typů leukocytů
 - indikuje se u zánětlivých plicních onemocnění, nádorových onemocnění, intersticiálních plicních procesech, pneumokoniózách
-
- vzorek: bronchoalveolární tekutina
 - zpracování:
 - filtrace vzorku kvůli případnému obsahu nečistot, promytí, značení MPL:
 - CD45 FITC - panleukocytární znak
 - CD3 PC5 - T-lymfocyty
 - CD4 RD1 - Th- lymfocyty
 - CD8 ECD - Tc-lymfocyty

Pozn. Vzorek BAL nesmí obsahovat krev.

V krvi je jiné zastoupení lymfocytárních subpopulací než v BAL, v případě kontaminace BAL krví není možné rozpoznat, které lymfocyty pocházejí z krve a které z BAL, což vede ke zkresleným výsledkům.

Bronchoalveolární laváž - BAL



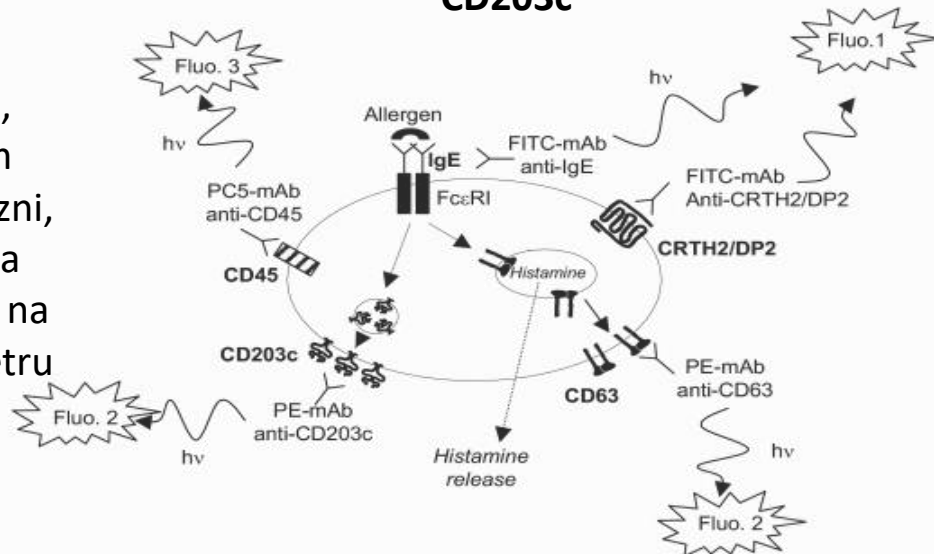
- Diagnosticky důležitý je poměr $CD3+CD4+$ k $CD3+CD8+$ T-lymfocytů (= imunoregulační index)
- Fyziologické hodnoty: poměr $CD3+CD4+/CD3+CD8+$ = 1,1 až 3,5
- Patologické hodnoty:
 - výrazná převaha pomocných $CD4+$ T-lymfocytů = podezření např. na sarkoidózu, pneumónii, nádory dýchacích cest,...
 - převaha cytotoxických $CD8+$ T-lymfocytů = podezření na hypersenzitivnu pneumonitidu,...

Využití průtokové cytometrie v alergologii

Test aktivace bazofilů (bazotest - BAT)

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

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



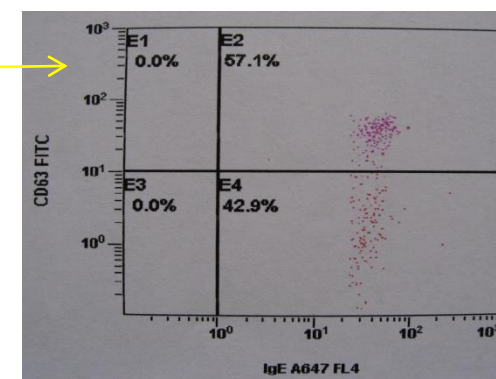
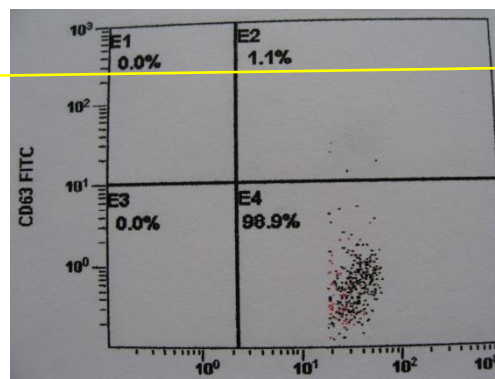
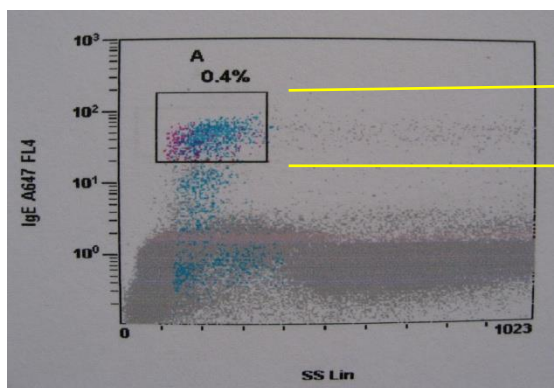
Vyšetření periferní heparinizované krve, stimulace alergenem při 37 °C ve vodní lázni, zastavení reakce, lýza erytrocytů a měření na průtokovém cytometru

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.

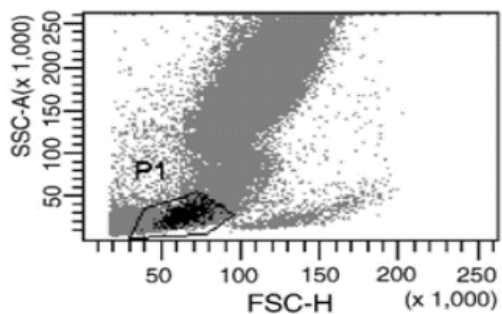
ohraničíme **subpopulaci bazofilů** (IgE pozitivní)
- sledujeme expresi CD63 (viz.obr.) a CD203c (není uvedeno)

Sledujeme expresi **CD63** na povrchu bazofilů

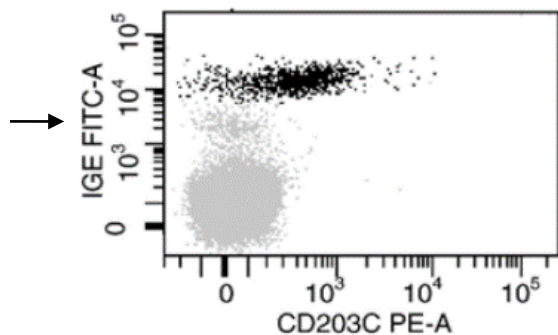


Test aktivace bazofilů – gatovací strategie

(Pacient alergický na kočku – alergen *Fel*)



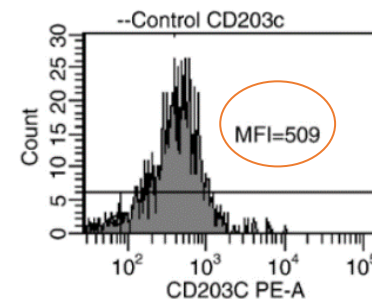
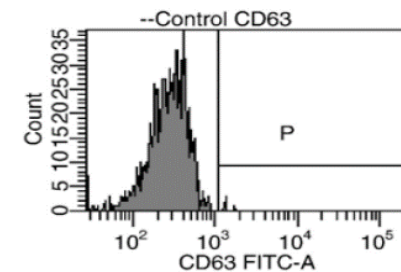
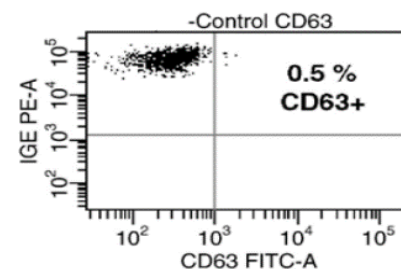
1. Na Forward scatteru a Side scatteru gatovány lymfocyty



2. Z lymfocytů gatovány pouze IgE pozitivní buňky - bazofily

3. Bazofily – sledujeme CD63 a CD203c

Negativní kontrola
Bazofily jsou CD63 neg.



Pozitivní pacient – vidíme populaci CD63 pozitivních bazofilů

