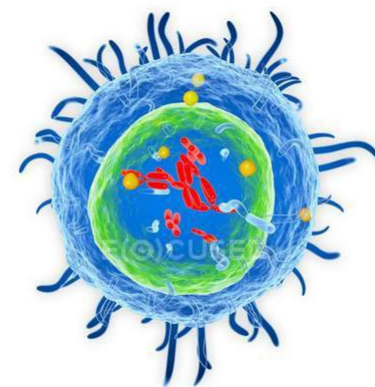


Aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

Lukáš Kubala



Imunologie - Stanovení stavu imunitního systému

- Vrozené nebo získané imunodeficience
 - monitorování HIV pozitivních pacientů a stanovení efektivity terapie
 - monitorování efektivity imunosupresivní terapie u transplantovaných pacientů
- Monitorování autoimunitních onemocnění a efektivity terapie

Hematologie

- Diagnóza maligních onemocnění
- Stanovení funkčních vlastností trombocytů

Metodologické přístupy

- **Imunofenotypizace**

Stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů (obecně krevních elementů v krvi, kostní dřeni nebo mozkomíšním moku)

- **Funkční testy**

- **Aktivace lymfocytů**

Změna exprese vybraných povrchových markerů (většinou receptory nezbytné pro funkci daného lymfocytu)

Indukce proliferace (stanovení buněčného cyklu)

Produkce cytokinů

Stanovení cytotoxicity NK buněk a cytotoxických lymfocytů

- **Aktivace fagocytů (mikrobicidní aktivita)**

Změna exprese vybraných povrchových markerů

Produkce volných radikálů fagocyty

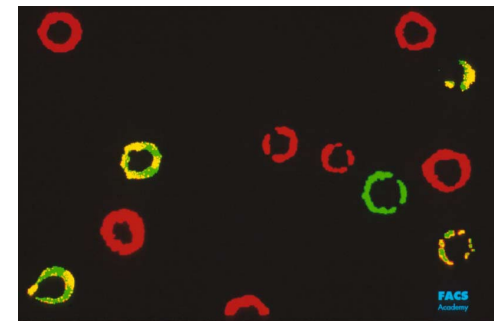
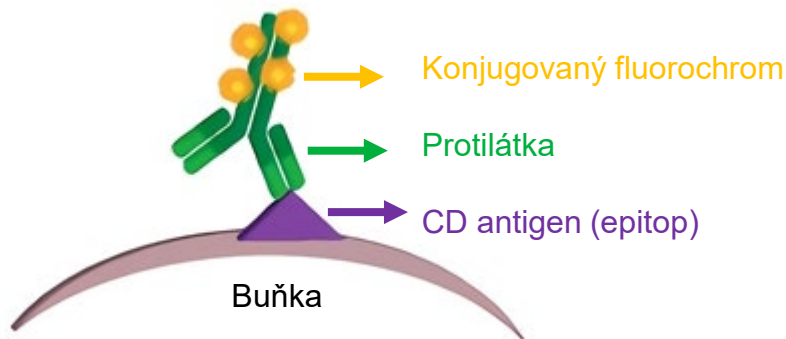
Fagocytární aktivita

- **Stanovení funkčních vlastností trombocytů**

Imunofenotypizace

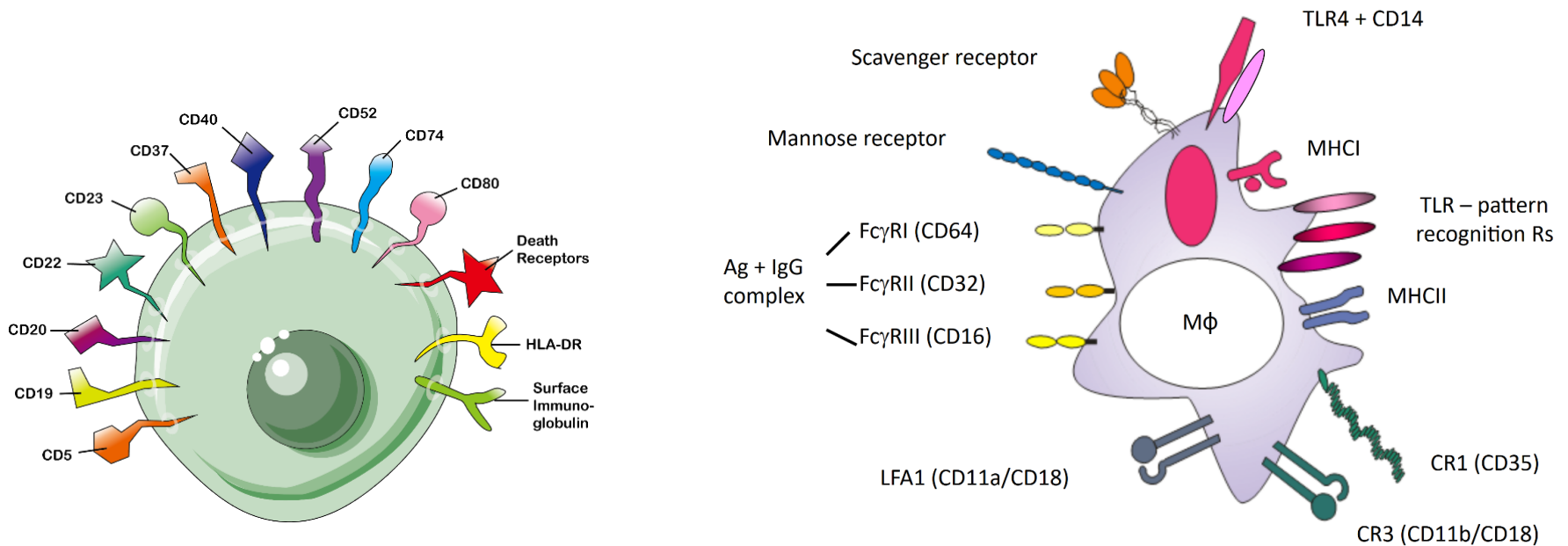
Stanovení zastoupení jednotlivých subpopulací buněk (primárně leukocytů) na základě exprese vybraných povrchových antigenů případně v kombinaci s intracelulární produkcí cytokinů a expresí intracelulárních antigenů

- Na základě rozptylu světla jsou leukocytární populace rozděleny podle velikosti a granularity
- Specifické monoklonální protilátky označené různými fluorochromy proti vybraným CD antigenům umožňující rozdělení buněk do populací



CD Antigeny

- Systém označení povrchových molekul leukocytů (buněk) mající stejný epitop, identifikovatelný stejnou protilátkou umožňující rozpoznávání buněčných populací při imunofenotypizaci
- Většina má alternativní názvy vztahující se k jejich funkci nebo struktuře buňky



CD Antigeny

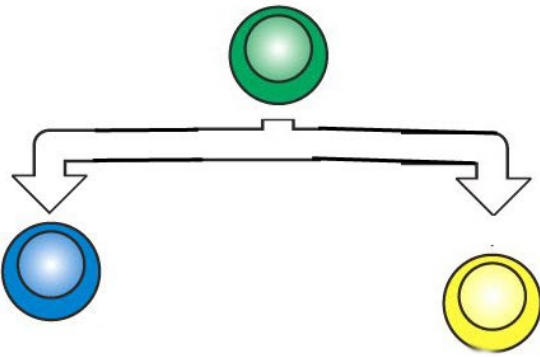
- Dodnes definovány CD1 přes CD300
- Některá CD jsou skupinami příbuzných molekul, a jednotlivé molekuly se označují písmeny (např. CD62L, CD62P, CD62E)
- Zdroj informací o CD nomenklatuře – učebnice imunologie, www např. PROW www.Ncbi.nlm.nih.gov/prow/

Expresie vybraných povrchových znaků během vývoje B lymfocytů

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

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

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



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

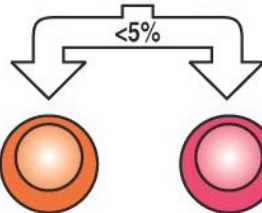
$pT\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
velké dvakrát-
pozitivní tymocyty



$\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
malé klidové dvakrát-
pozitivní tymocyty



>95%



$\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^-$ $\alpha:\beta^+ CD3^+ 4^+ 8^+$
malé jedenkrát-
pozitivní tymocyty

Export do periferie

Vývoj T-lymfocytů

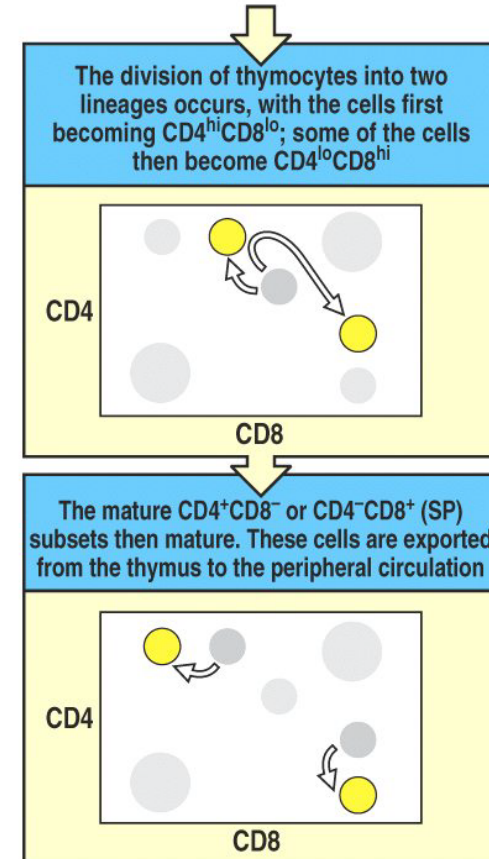
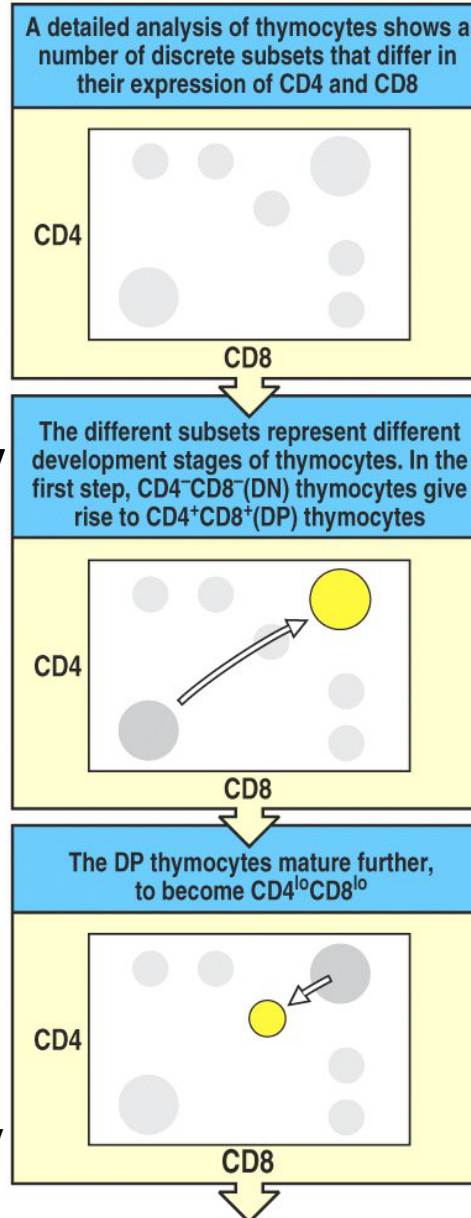
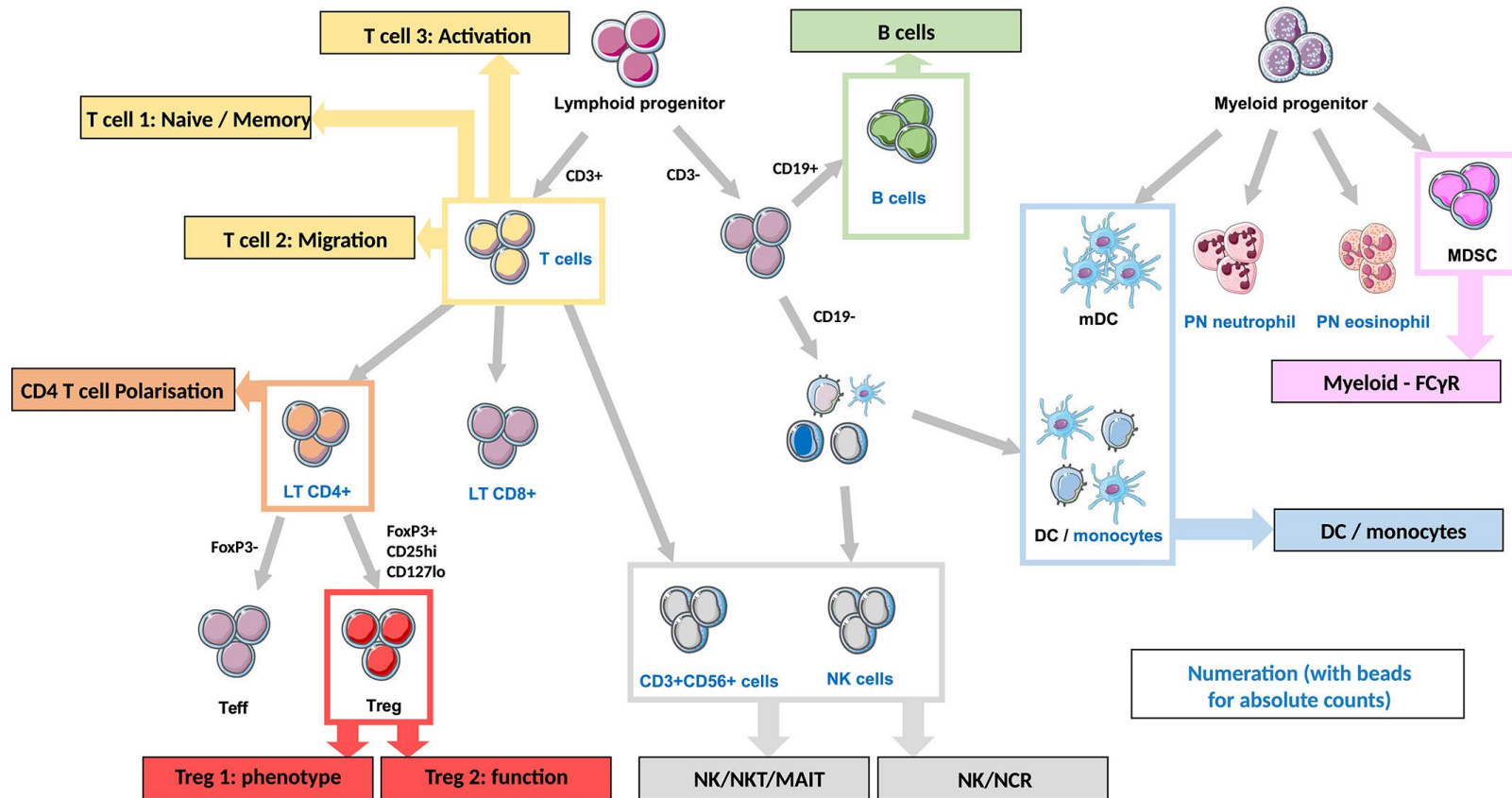


Figure 7-31 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Vybrané povrchové molekuly charakteristické pro různé typy leukocytů (“markery” jednotlivých typů)

Buněčný typ	Charakteristické povrchové molekuly
Leukocyty (všechny)	CD53, CD45, CD43
Hematopoetické prekurz.	CD34, CD117, CD137
T lymfocyty	CD2, CD3, CD5, CD6, CD7, CD27, CD28, CD96, TCR
T pomocné I. (Th)	CD4
T cytotoxické I. (Tc)	CD8
B lymfocyty	CD19, CD20, CD22, CD37, CD39, CD40, CD79, BCR
Pre-B lymfocyty	CD9, CD10, CD138
Plasmatické buňky	CD28, CD138
NK lymfocyty	CD2, CD11b, CD16b, CD56, CD57, Cd94, CD158
Neutrofilní granulocyty	CD11b, CD15, CD87
Monocyty	CD14, CD33, CD64, CD87, CD89
Dendritické buňky	CD83, Cd86, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209

Příklad panelů pro měření imunitních buňek

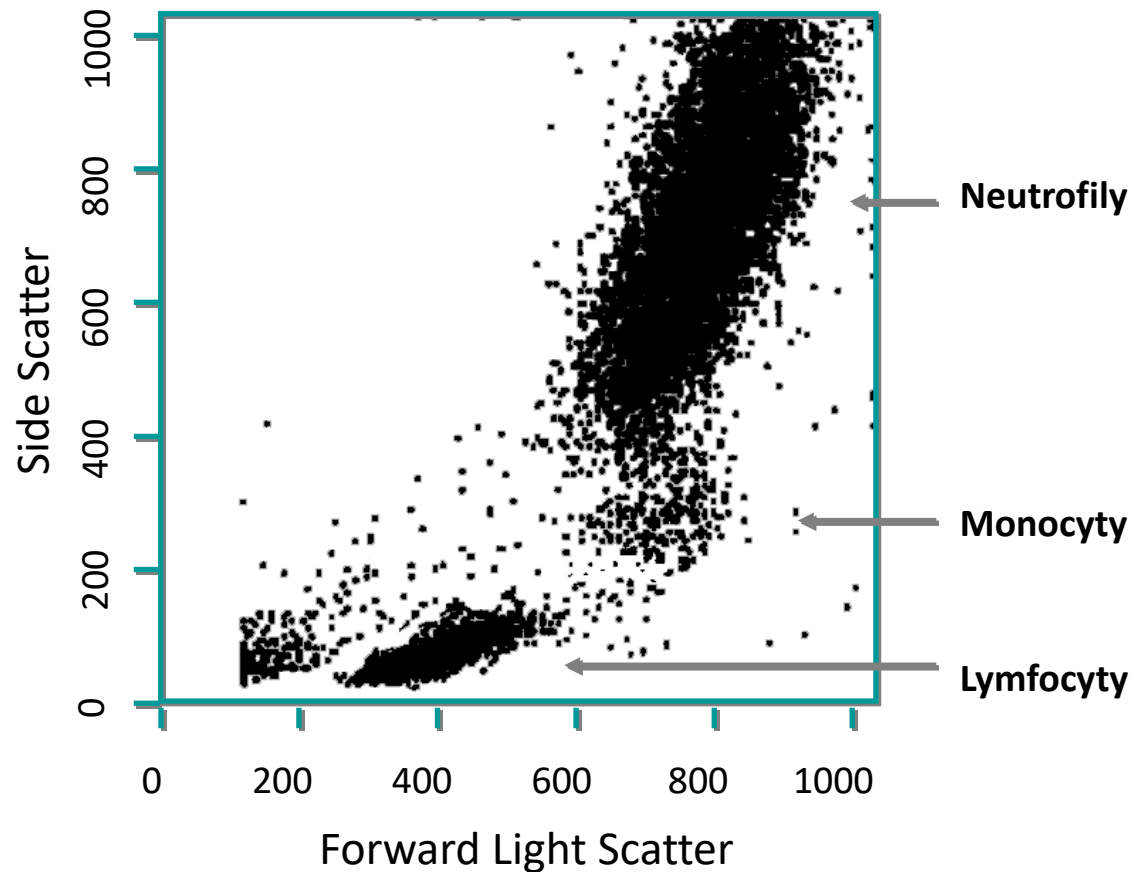
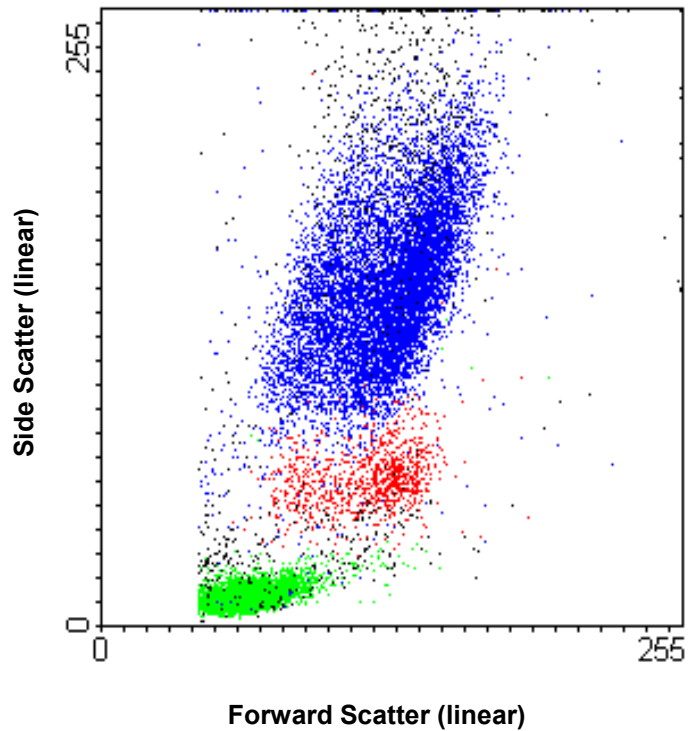


	FITC	PE	ECD	PE-Cy5.5	PC7	APC	AA700	AA750	PB	KRO
Numeration	CD 16	CD56	CD19	CD244	CD 14	CD8	CD4	CD3	CD15	CD45
T cell 1	CD95	CCR7	HLA-DR	CD25	CD45RA	ICOS	CD3	CD127	CD4	CD8
T cell 2	CLA	CD49a	CCR7	β7 integrin	CD45RA	CD103	CD3	CD49d	CD4	CD8
T cell 3	CD57	CD160	CD69	PD-1	CD 137	OX40	CD3	CDS	CD4	CD8
CD4 T-cell polarization	CXCR3	CCR10	CCR7	CCR6	CCR4	CXCR5	CD3	CD45RA	CD4	CD 161 or PD-1
Treg 1 (liquid)	Helios	CD25	iCXCR5	Ki67	CTLA-4	Foxp3	CD8	CD127	CD4	CD3
Treg 2 (liquid)	LAP	GITR	CD25	CD39	CD45RA	LAG-3	CD3	CD 127	CD4	CD8
B cells	IgD	CD10	CD5	CD27	CD38	IgM	CD19	CD24	CD21	CD32
MAIT cells/NKT	TCR Va 7.2	CD 54	HLA-DR	CD56	TCR-Va2.4	TCR-Vβ11	CD3	CD 161	CD4	CD8
NK/NCRs	TCRγδ	NKp44	HLA-DR	NKp30	NKp46	NKG2D	CD3	CD 16	CD56	CD8
DC/monocytes	CD 16	CCR5	CD14	BDCA-3	CD1c	CD123	LIN CD3-CD19-CD56	CD11c	HLA-DR	CD45
Myeloid/FcyRs	CD16	-	HLA-DR	CD244	CD64	CD33	CD14	CD11b	CD15	CD32

Praktické provedení imunofenotypizace

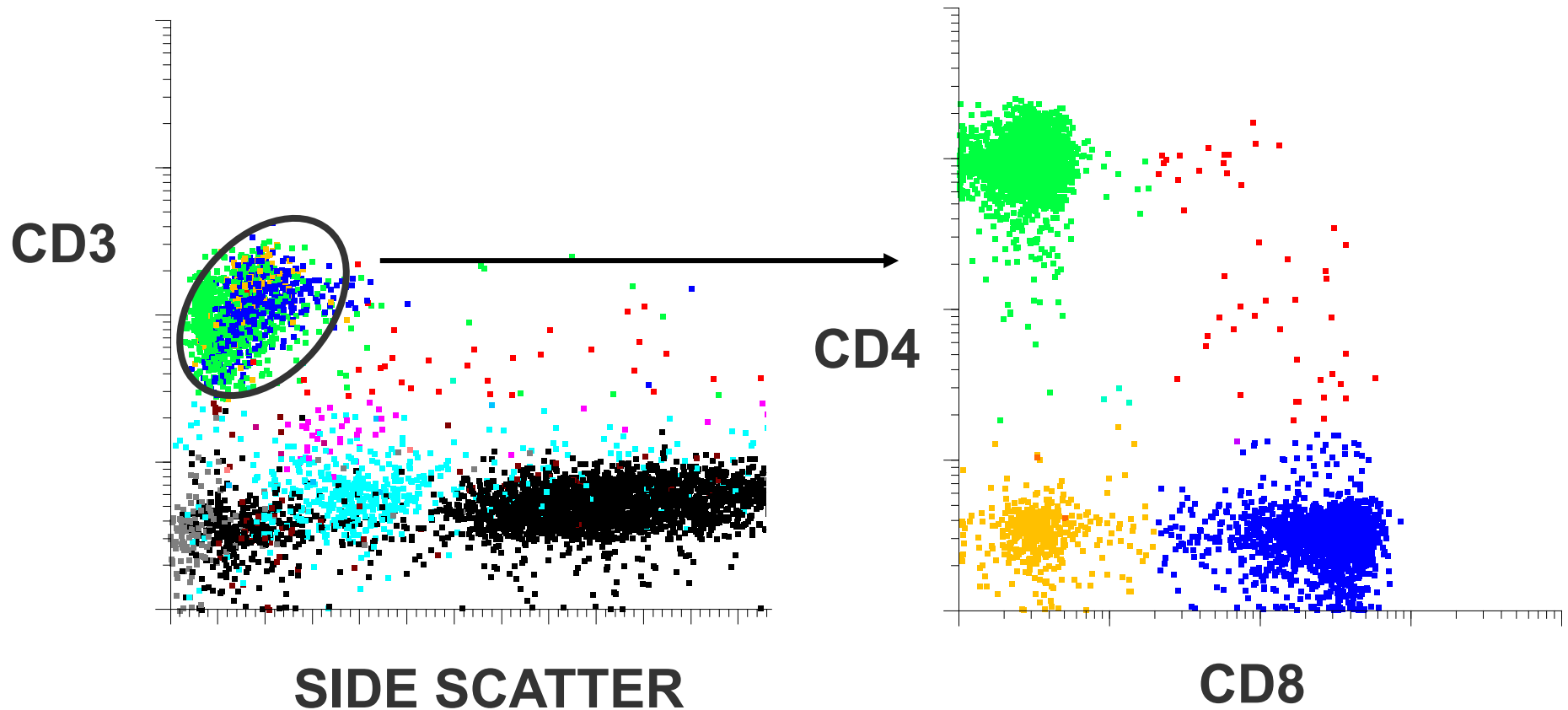
Zkumavka s 100 mikrolitry nesrážlivé krve
Přidání protilátek kombinace protilátek
Inkubace, fixace, lyze erytrocytů.

Klíčová informaci poskytuje SS a FS leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů

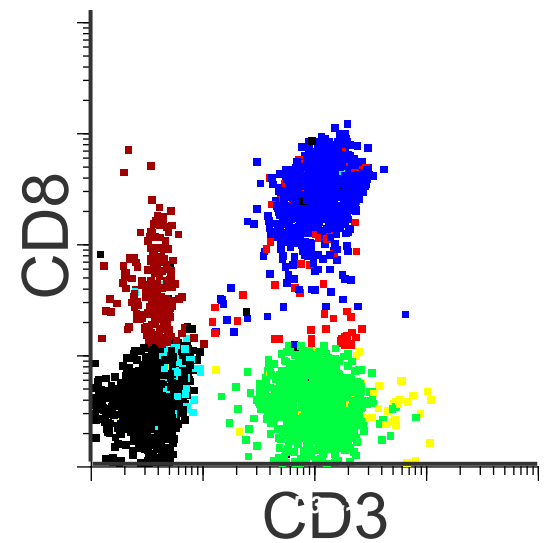
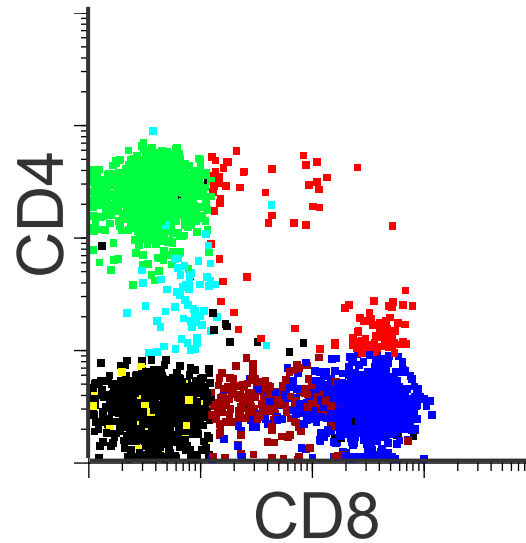
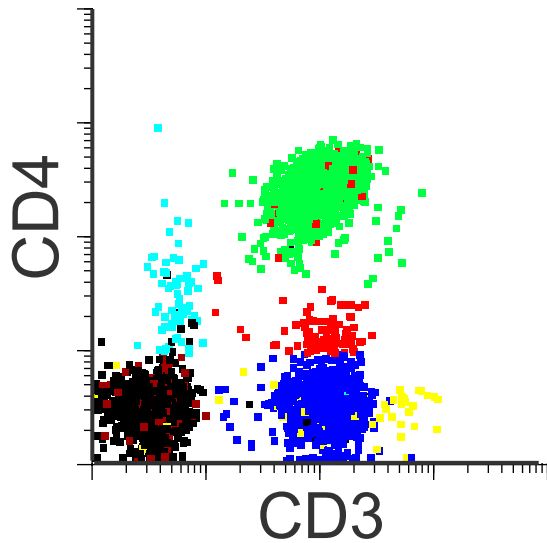


Tří barevná imunofenotypizace pro stanovení CD4 a CD8 lymfocytů

Kombinace tří protilátek anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 označených třemi různými fluorchromy např. FITC, PE, Per CP



Kombinace grafů - tří barevná imunofenotypizace CD3, CD4, CD8



CD3-CD4-

CD3-CD4+

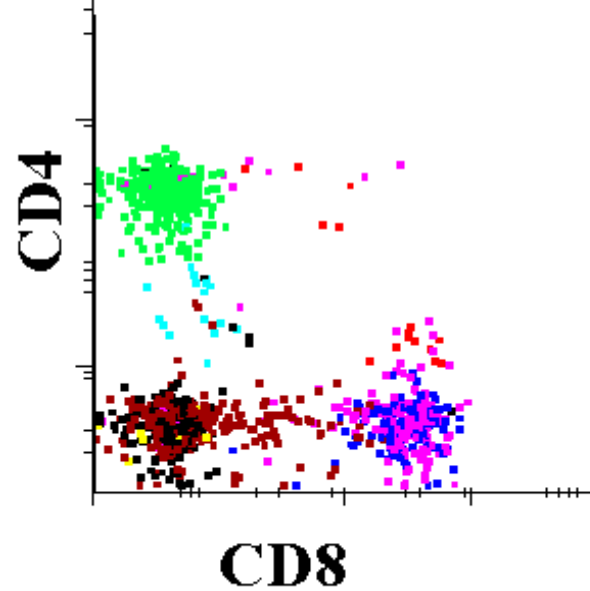
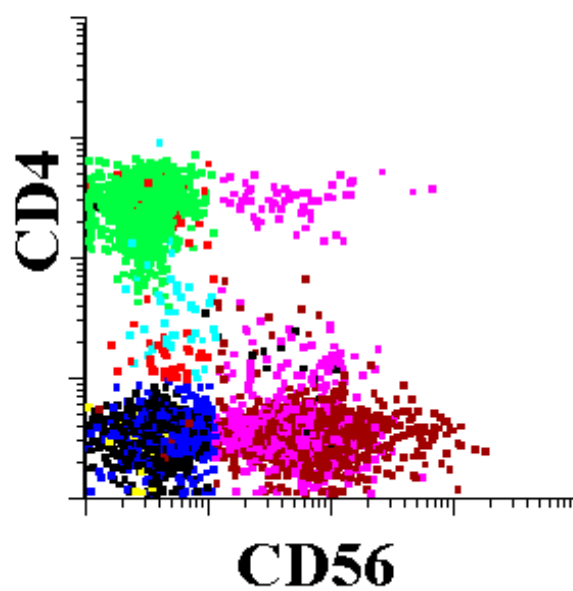
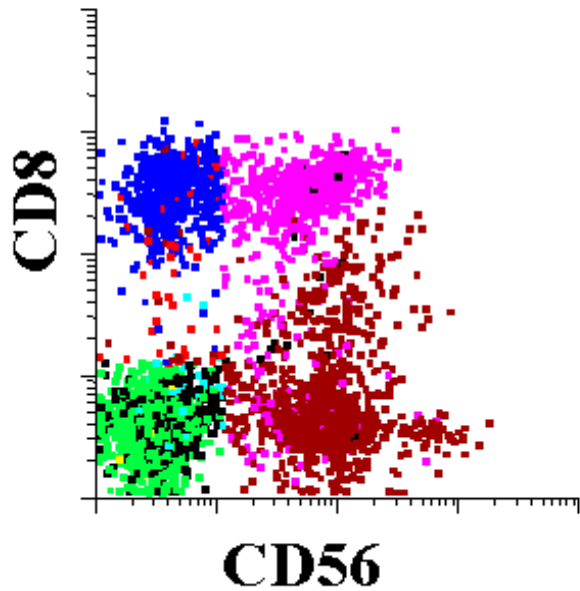
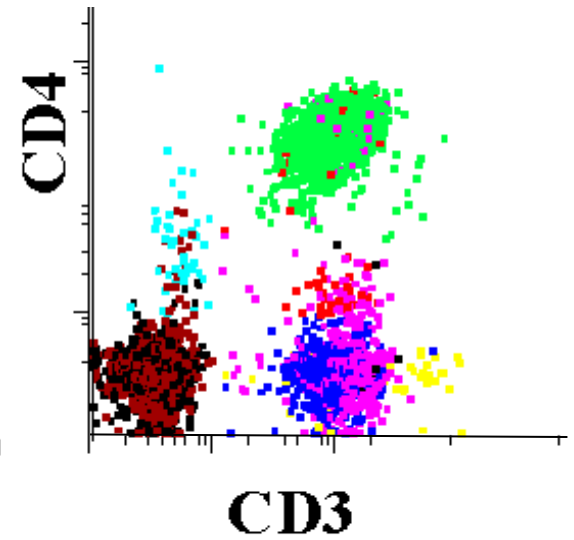
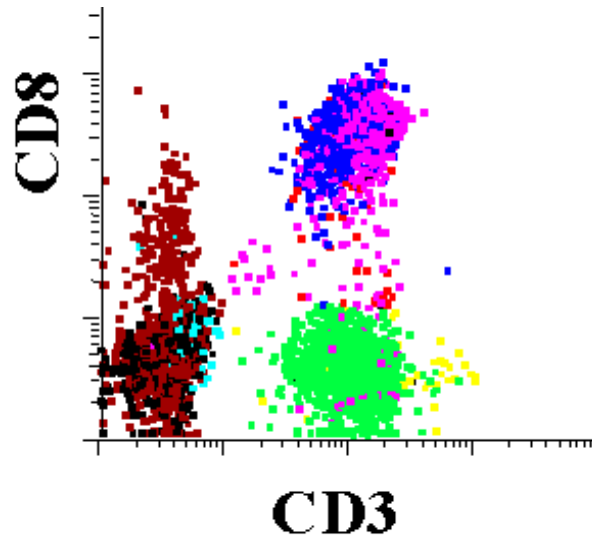
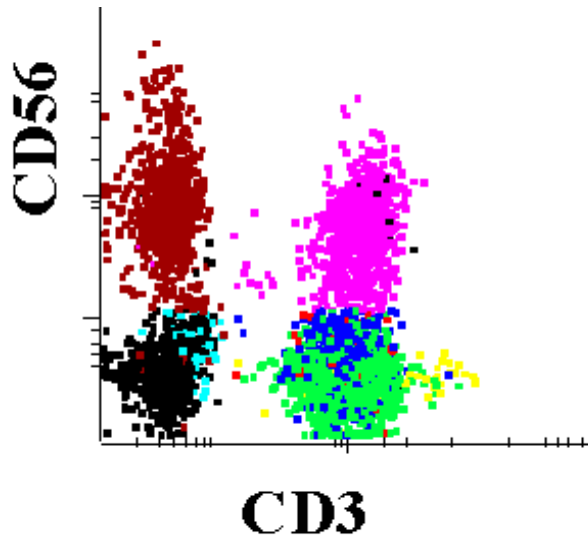
CD3-CD8+

CD3+CD4+ Th lymf

CD3+CD8+ Tc lymf

CD3+CD4-

Čtyř barevná imunofenotypizace CD3, CD4, CD8, CD56 v jedné zkumavce



Čtyřbarevná imunofenotypizace v klinice (př. BD kity a HW/SW)

1. Zkumavka CD3 - FITC, CD45 - PerCP, CD4 - APC, CD8 - PE

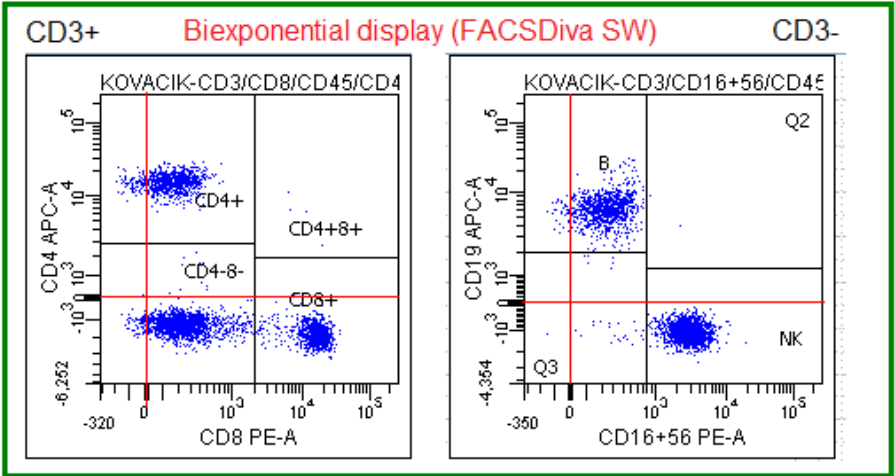
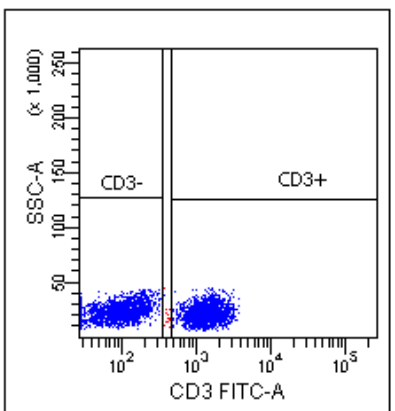
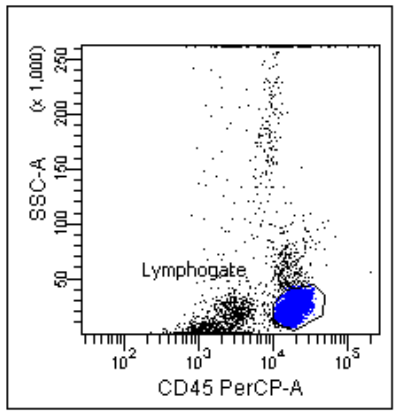
Specificity	Clone	Format	Isotype
CD4	SK3 (also known as Leu3a)	APC	IgG ₁ , κ
CD3	SK7 (also known as Leu-4)	FITC	IgG ₁ , κ
CD8	SK1	PE	IgG ₁ , κ
CD45	2D1	PerCP	IgG ₁ , κ

2. Zkumavka CD3 - FITC, CD45 - PerCP, CD19 - APC, CD16 a CD 56 - PE

Specificity	Clone	Format	Isotype
CD19	SJ25C1 (also known as SJ25-C1)	APC	IgG ₁ , κ
CD3	SK7 (also known as Leu-4)	FITC	IgG ₁ , κ
CD16 (FcγRIII)	B73.1	PE	IgG ₁ , κ
CD56 (NCAM-1)	NCAM16.2 (also known as NCAM 16)	PE	IgG _{2b} , κ
CD45	2D1	PerCP	IgG ₁ , κ

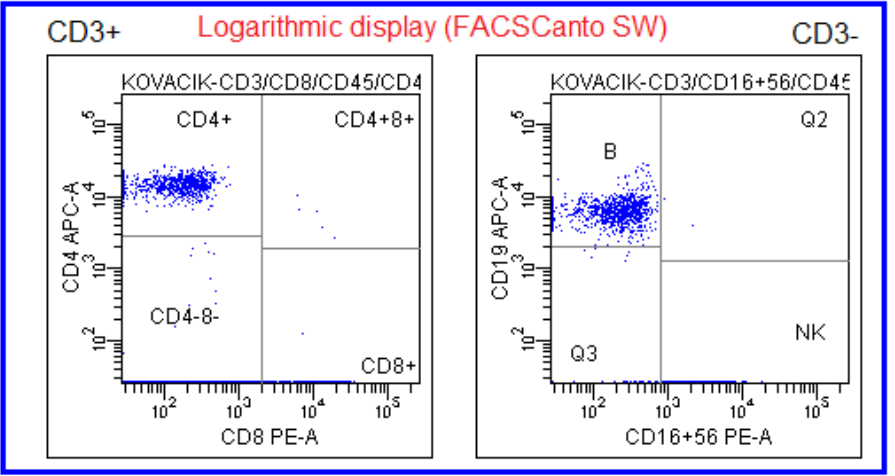
Čtyřbarevná imunofenotypizace v klinice (př. BD kit a HW/SW)

1. Zkumavka CD3FITC, CD45PerCP, CD4APC, CD8PE
2. Zkumavka CD3FITC, CD45PerCP, CD19APC, CD16+56PE



Population	z CD3+	z Lymphogate
☒ CD4+	46.8	24.4
☒ CD4+8+	0.3	0.1
☒ CD4-8-	7.2	3.7
☒ CD8+	45.8	23.9

Population	z CD3-	z Lymphogate
☒ B	39.3	17.9
☒ NK	59.6	27.2



Výsledný report

7511

WBC Count (x1000):

ID: FACScan v3.3.2761.4078

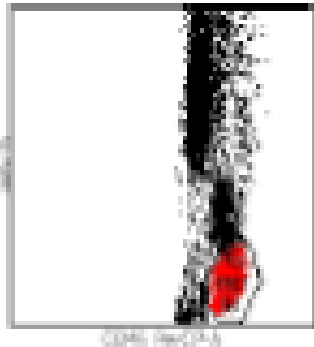
Lymphs (%):

Lymphs (x1000):

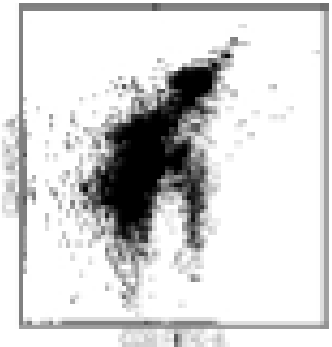
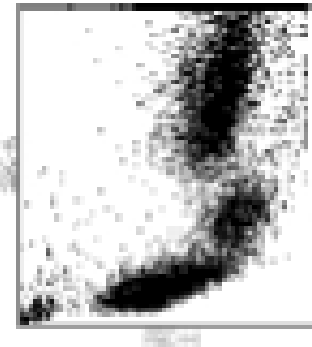
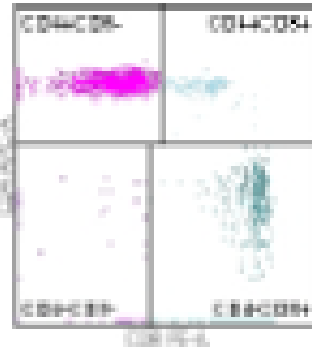
ID: FACScan v3.3.2761.4078

CD3/CD8/CD45/CD4

Total Events: 10017



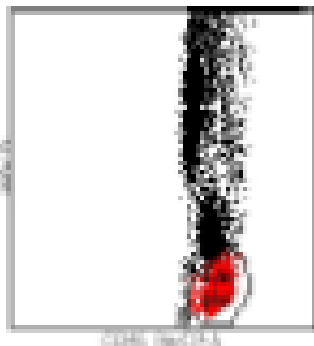
7511001.001.0a



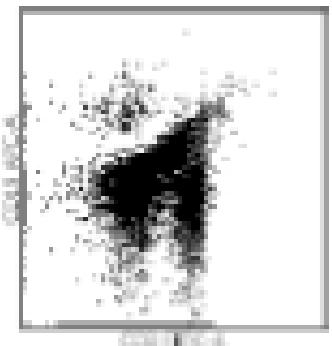
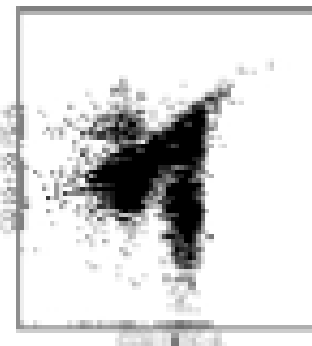
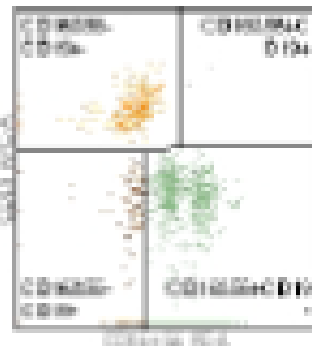
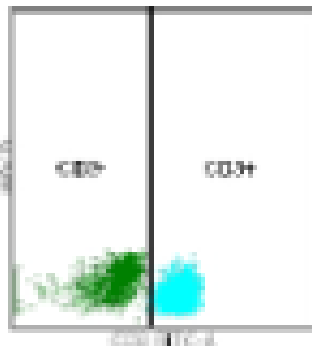
Reagent Lot ID: 58760

CD3/CD16+56/CD45/CD19

Total Events: 10011



7511001.002.0a



Reagent Lot ID: 57607

Parameter	Tube 1	Tube 2	Average
Lymph Events	3350	4371	3860.50
CD3+ %Lymphs	76.48	76.50	76.49
CD3+ Abs Cnt	0	0	0
CD3+CD8+ %Lymphs	33.91		



7512001.0003a

Request Lot ID: S

Parameter	Tube 1	Tube 2	Average
Lymph Events	3350	4371	3860.50
CD3+ %Lymphs	76.48	76.50	76.49
CD3+ Abs Cnt	0	0	0
CD3+CD8+ %Lymphs	33.91		
CD3+CD8+ Abs Cnt	0		
CD3+CD4+ %Lymphs	44.30		
CD3+CD4+ Abs Cnt	0		
CD3+CD4+CD8+ %Lymphs	3.88		
CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt	0		
CD45+ Abs Cnt	0	0	0
4/8 Ratio	1.31		
CD16+CD56+ %Lymphs		16.89	
CD16+CD56+ Abs Cnt		0	
CD19+ %Lymphs		4.37	
CD19+ Abs Cnt		0	

QC Messages

CD3% difference is: 0.03

% T-Sum is: 1.72

Lymphocsum is: 97.74

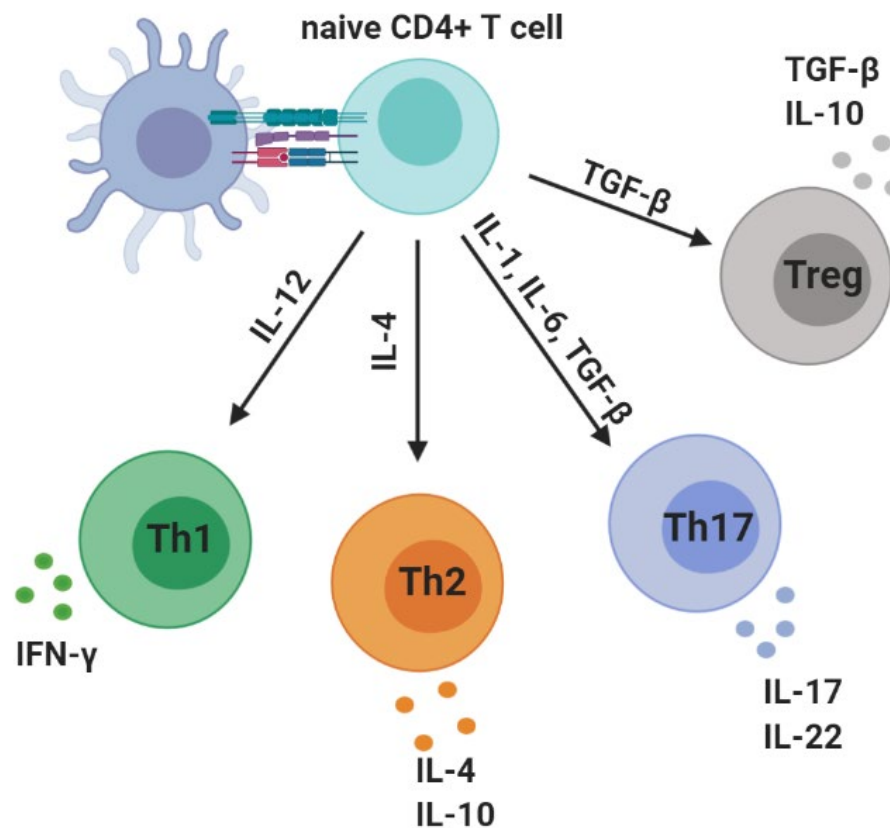
4/8 ratio is: 1.31

One or more results are outside the alarm range.

Comments

**Výsledný
report**

Diferenciace pomocných T-lymfocytů (CD4⁺ T-lymfocyty; Th lymfocyty)



Detekce intracelulární produkce cytokinů

Tyto cytokiny jsou zodpovědné za funkci buněk

→ Imunofenotypizace - charakterizace různých subpopulací leukocytů, které lze rozlišit na základě rozdílné produkce cytokinů

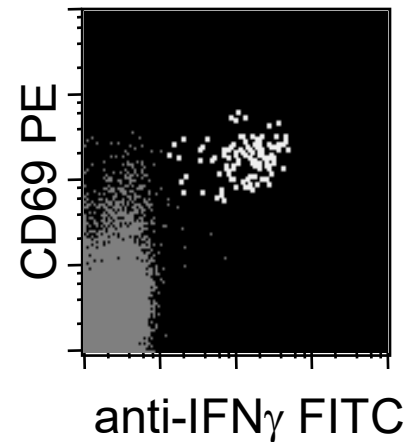
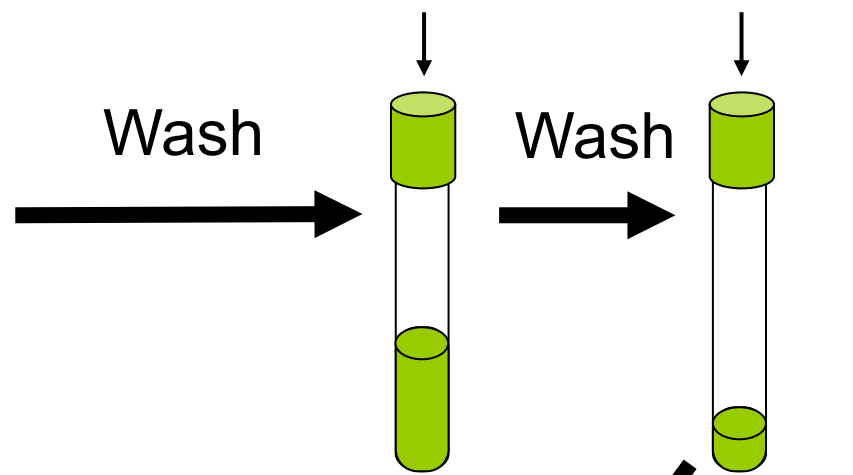
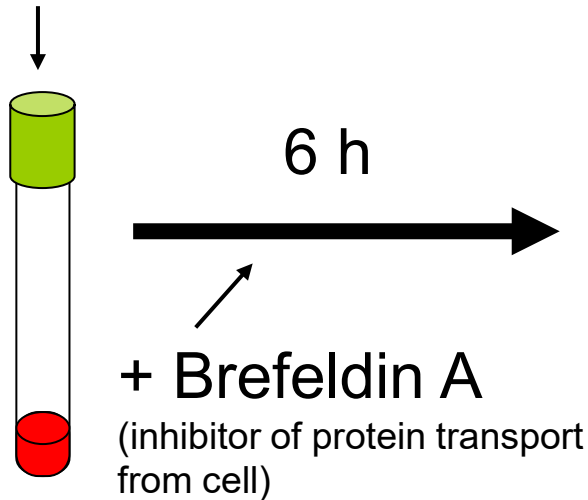
→ Charakterizace funkčních vlastností buněk - odpověď na vybraný stimul

BD FastImmune™ Cytokine Flow Cytometry Protocol

1. Stimulate whole blood or PBMC

2. Lyse/Fix

3. Permeabilize 4. Stain

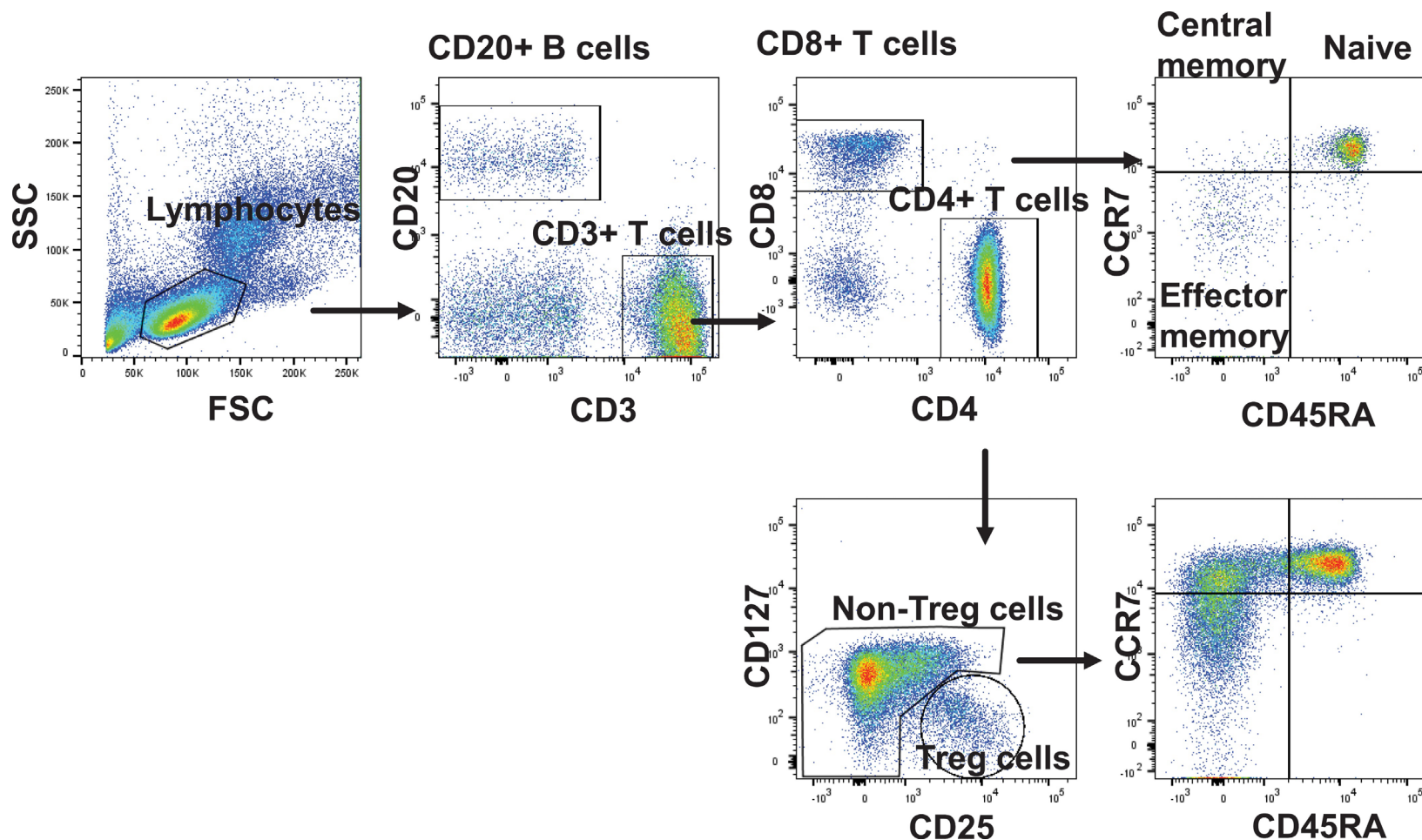


Wash

5. Flow cytometry

Pokročilé imunofenotypizace T lymfocytů z lidské krve

Stanovení různých druhů paměťových buněk, vrozených lymfoidních buněk, odlišení různých typů NK buněk, ..



Příklad různých 35-barevné imunofenotypizace

INNA TE Panel					ADAPTIVE Panel				
Laser	Specificity	Clone	Fluorophore	Supplier	Laser	Specificity	Clones	Fluorophores	Supplier
355 nm	CDw125	A14	BUV395	BD Biosciences	355 nm	CD183	1C6/CXCR3	BUV395	BD Biosciences
	Viability	N/a	Fixable Blue dead	ThermoFisher		Viability	N/a	Fixable Blue dead	ThermoFisher
	CD94	HP-3D9	BUV496	BD Biosciences		CD196	11A9	BUV496	BD Biosciences
	CD159c	134591	BUV563	BD Biosciences		CD19	HIB19	BUV563	BD Biosciences
	CD16	3G8	BUV615	BD Biosciences		CD21	B-ly4	BUV615	BD Biosciences
	CD86	BU63	BUV661	BD Biosciences		CD185	RF8B2	BUV661	BD Biosciences
	CD62L	DREG-56	BUV737	BD Biosciences		CD27	O323	BUV737	BD Biosciences
	FcεRI	AER-37	BUV805	BD Biosciences		CD3	UCHT1	BUV805	BD Biosciences
405 nm	CD141	M80	BV421	Sony Biotechnology	405 nm	MR1	N/a	BV421	NIH
	CD66b	G10F5	Pacific Blue	Sony Biotechnology		IgD	IA6-2	Pacific Blue	Sony Biotechnology
	CD159a	131411	BV480	BD Biosciences		CD8b	2ST8.5H7	BV480	BD Biosciences
	CD2	RPA-2.10	BV510	Sony Biotechnology		IgM	MHM-88	BV510	BioLegend
	CD11c	B-ly6	BV570	BD Biosciences		CD194	L291H4	BV605	Sony Biotechnology
	CD117	104D2	BV605	Sony Biotechnology		TCRgd	11F2	BV650	BD Biosciences
	CD184	12G5	BV650	BD Biosciences		IgG	G18-145	BV711	BD Biosciences
	CD63	H5C6	BV711	Sony Biotechnology		CD56	5.1H11	BV750	Sony Biotechnology
CD56	5.1H11	BV750	Sony Biotechnology	CD197	G043H7	BV785	BioLegend		
CD127	A019D5	BV785	Sony Biotechnology	488 nm	IgA	IS11-8E10	FITC	Miltenyi Biotec	
CD123	6H6	AF532	ThermoFisher		CD45RA	HI100	AF532	ThermoFisher	
CD32	FLI8.26	BB630-P2	BD Biosciences		CD8a	SK1	PerCP	Sony Biotechnology	
CD8α	SK1	PerCP	Sony Biotechnology		CD279	EH12.1	BB700	BD Biosciences	
CD161	DX12	BB700	BD Biosciences		CD95	DX2	PerCP-eFluor710	ThermoFisher	
CD69	FN50	PerCP-eFluor710	ThermoFisher	561 nm	CD1d	N/a	PE	NIH	
CD14	M5E2	BB790-P	BD Biosciences		CD45	HI30	Spark YG™ 593	Sony Biotechnology	
CD294	BM16	PE	BD Biosciences		CD25	BC96	PE-Dazzle594	BioLegend	
CD45	HI30	Spark YG™ 593	Sony Biotechnology		CD184	12G5	PE-Cy5	Sony Biotechnology	
CD25	BC96	PE-Dazzle594	BioLegend		CD127	eBioRDR5	PE-Cy5.5	ThermoFisher	
CD7	M-T701	PE-Cy5	BD Biosciences		CD38	S17015F	PE/Fire™ 810	Sony Biotechnology	
CD34	581	PE-Cy5.5	ThermoFisher		CD14	M5E2	PE-Cy7	BD Biosciences	
CD1c	L161	PE-Cy7	Sony Biotechnology	CD66b	G10F5	PE-Cy7	ThermoFisher		
637 nm	CD274	MIH1	APC	BD Biosciences	CD16	3G8	PE-Cy7	Sony Biotechnology	
	CD57	HNK-1	AF647	Sony Biotechnology	CD278	C398.4A	APC	Sony Biotechnology	
	HLA-DR	L243	AF700	Sony Biotechnology	CRTh2	BM16	AF647	BD Biosciences	
	CD3	SK7	APC-Cy7	Sony Biotechnology	HLA-DR	L243	AF700	Sony Biotechnology	
	CD19	HIB19	APC-Cy7	Sony Biotechnology	CD24	ML5	APC-Cy7	BioLegend	
	CD4	SK3	APC/Fire™ 810	Sony Biotechnology	CD4	SK3	APC/Fire™ 810	Sony Biotechnology	

Technické proměnné v imunofenotypizaci a přístupy k jejich minimalizaci

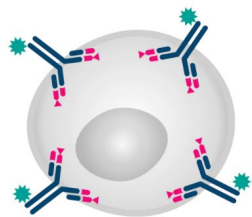
Technické proměnné	Přístupy k minimalizaci negativních dopadů
Reagencie	Definice standardních panelů protilátek pro imunofenotypizaci Použití předem nakonfigurovaných lyofilizovaných protilátek
Manipulace se vzorky	Automatizace zpracování vzorků v místě odběru Jasně definovaný protokol pro kryoprezervaci PBMC a/nebo pro barvení na místě
Nastavení přístroje	Použití softwaru pro automatické nastavení kanálů Nastavení amplifikace detektorů pomocí standardních částic na pro reprodukovatelné nastavení přístroje v čase a mezi více přístroji
Analýza dat	Centrální analýza jedním nebo několika koordinovanými odborníky Použití automatických algoritmů stanovení populací

Izotypová a FMO (fluorescence minus one) kontrola

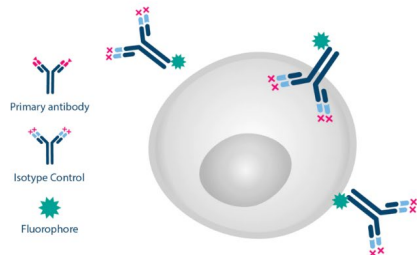
- Pomáhají k určení intenzity autofluorescence vzorku a přěsvěcování dalších použitých protilátek do daného detektoru
- Izotypová kontrola slouží ke stanovení nespecifická vazba protilátek a podobně jako FMO také k určení intenzity autofluorescence vzorku a přěsvěcování dalších použitých protilátek do daného detektoru

Nezbytné pro správný „gating“ (ohraničení) populací

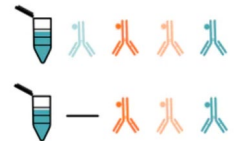
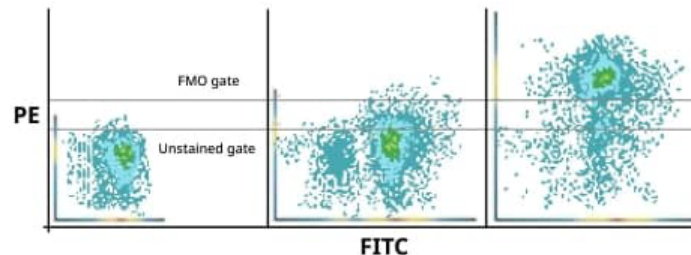
Primary Antibody



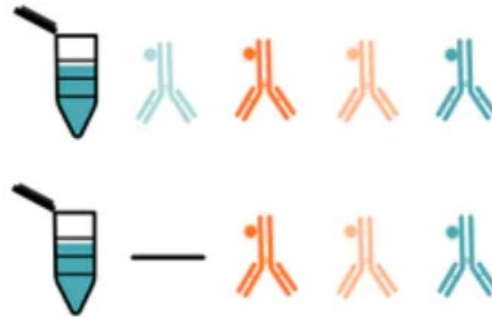
Isotype Control



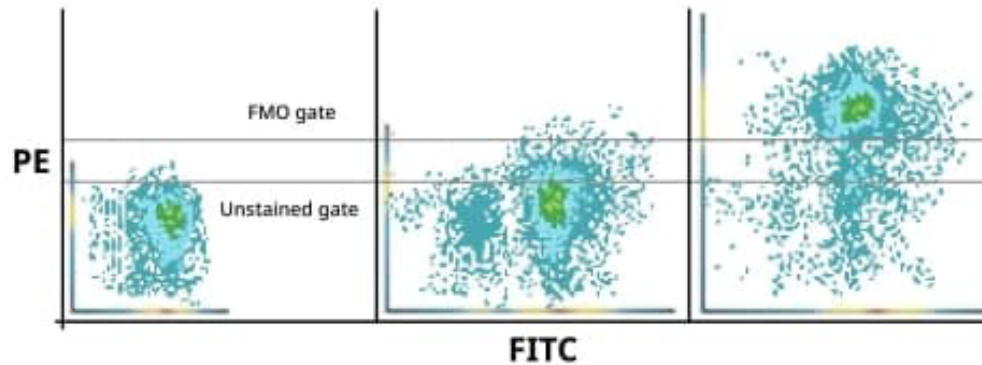
Dye	Unstained control	FMO control	Sample
FITC	-	CD3	CD3
Cy7PE	-	CD8	CD8
Cy7PE	-	CD45RO	CD45RO
PE	-	-	CD4



FMO (fluorescence minus one) kontrola



Dye	Unstained control	FMO control	Sample
FITC	-	CD3	CD3
CyPE	-	CD8	CD8
Cy7PE	-	CD45RO	CD45RO
PE	-	-	CD4



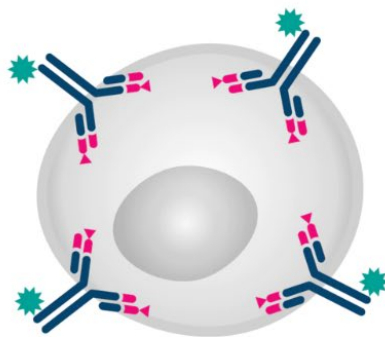
Izotypová kontrola

- Protilátka, která se používá jako negativní kontrola k detekci nespecifické vazby
- Je vytvořena proti antigenu, který není přítomen na analyzovaném buněčném typu - byla speciálně vyvinuta pro stanovení úrovně povrchového barvení pozadí
- Izotypové kontroly musí odpovídat hostitelskému druhu, podtřídě protilátky a konjugaci primární protilátky

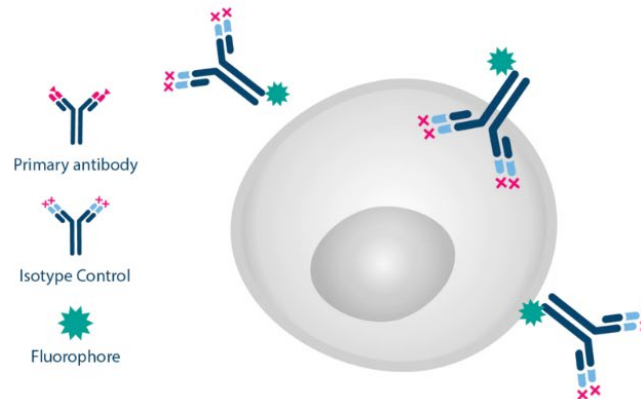
Avšak

- Nejsou vhodné pro intracelulární barvení
- Použití izotypových kontrol v průtokové cytometrii je kontroverzní
- Jsou pouze jednou z řady vhodných kontrol, které zlepšují data průtokové cytometrie.

Primary Antibody



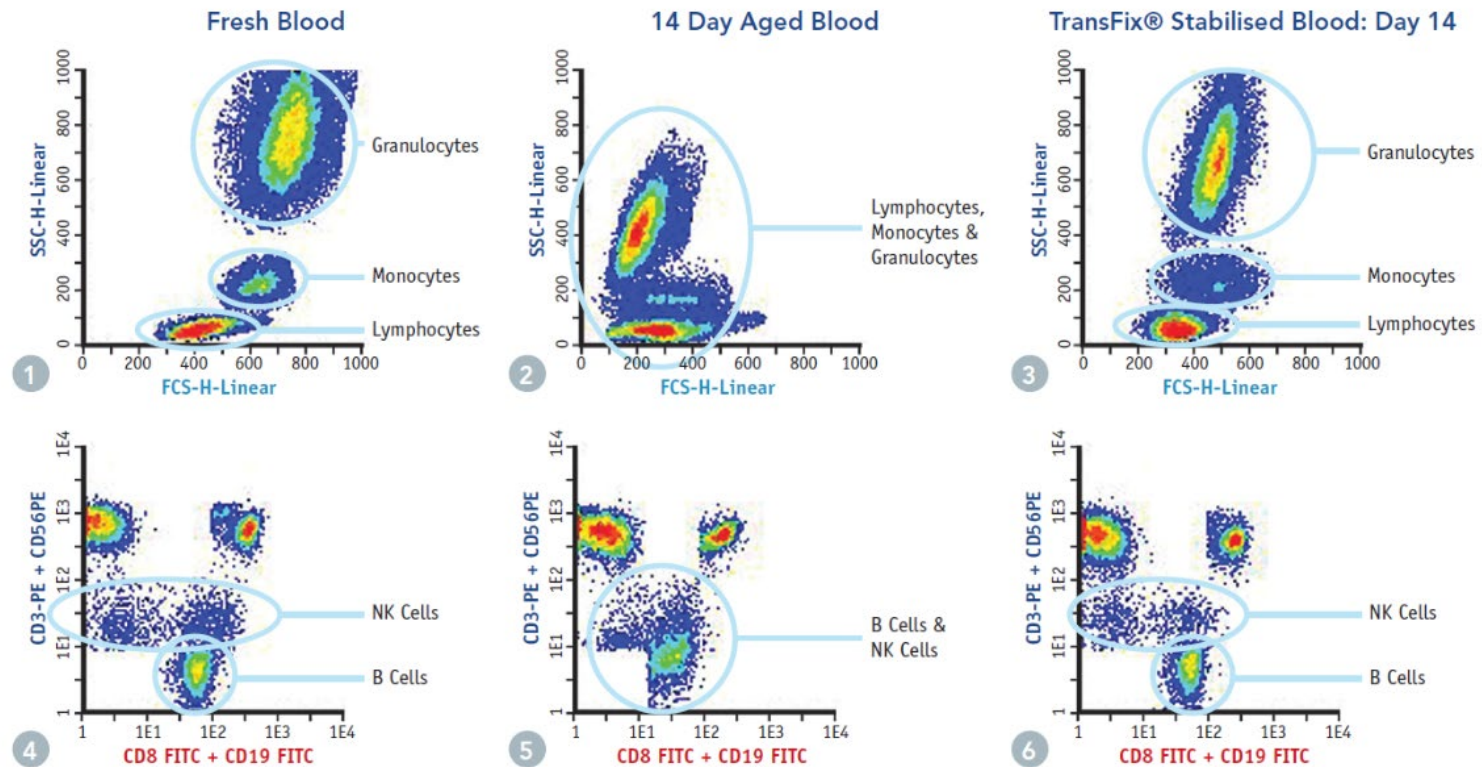
Isotype Control



Kryoprezervace a fixace

Někdy je potřeba zejména při prevozu patientských vzorků stabilizace vzorků pomocí fixace nebo kryoprezervace

- Fixace – formaldehyd, etanol, Transfix
- Zamražování živých buněk – Cellcover, Cytodelics



Negativní efekty kryoprezervace

Červené označení u jednotlivých protilátek značí nekompatibilitu s daným způsobem prezervace

INNATE Panel					
Laser	Specificity	Clone	Fluorophore	Supplier	CellCover
355 nm	CDw125	A14	BUV395	BD	
	CD94	HP-3D9	BUV496	BD	
	NKG2C	134591	BUV563	BD	
	CD16	3G8	BUV615	BD	
	CD86	BU63	BUV661	BD	
	CD62L	DREG-56	BUV737	BD	
	FcεRI	AER-37	BUV805	BD	
405 nm	CD141 (BDCA-3)	M80	BV421	SONY	
	CD66b	G10F5	Pac blue	SONY	
	NKG2A	131411	BV480	BD	
	CD2	RPA-2.10	BV510	SONY	
	CD11c	B-ly6	BV570	BD	
	CD117	104D2	BV605	SONY	
	CXCR4	12G5	BV650	BD	
	CD63	H5C6	BV711	SONY	
	CD56	5.1H11	BV750	SONY	
CD127	A019D5	BV785	SONY		
488 nm	CD123	6H6	AF532	Thermofisher	
	CD32	FLI8.26	BB630	BD	
	CD8α	SK1	PercP	SONY	
	CD161	DX12	BB700	BD	
	CD69	FN50	PercP-EF710	Thermofisher	
	CD14	M5E2	BB790	BD	
561 nm	CRTh2	BM16	PE	BD	
	CD45	HI30	Spark YG™ 593	SONY	
	CD25	BC96	PE-Dazzle594	Biolegend	
	CD7	M-T701	PE-Cy5	BD	
	CD34	581	PE-Cy5.5	Thermofisher	
CD1c (BDCA-1)	L161	PE-Cy7	SONY		
647 nm	PDL-1	MIH1	APC	BD	
	CD57	HNK-1	AF647	SONY	
	HLA-DR	L243	AF700	SONY	
	CD3	SK7	APC-Cy7	SONY	
	CD19	HIB19	APC-Cy7	SONY	
	CD4	SK3	APC/Fire™ 81C	SONY	

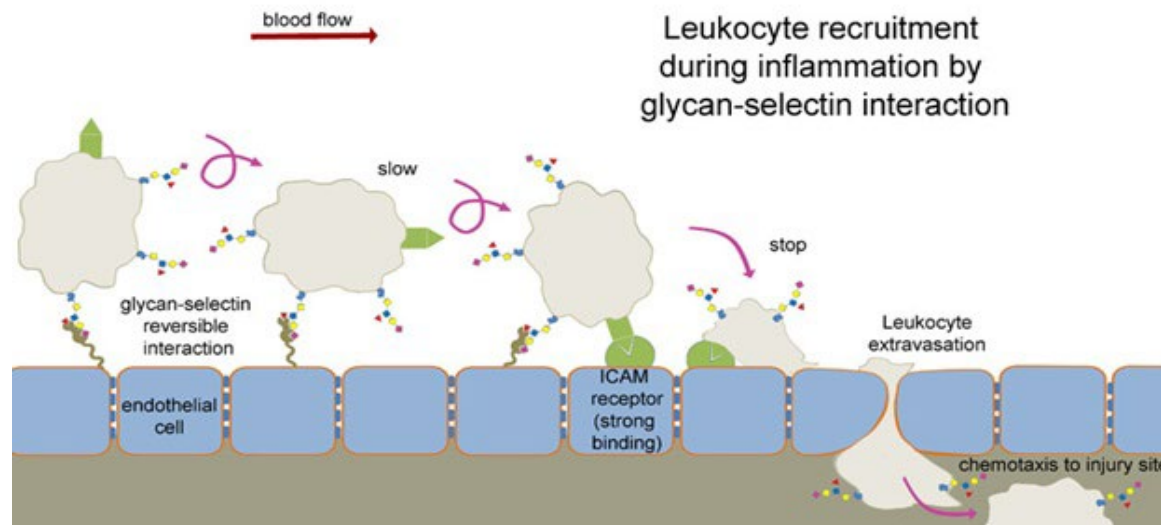
Adaptive Panel					
Laser	Specificity	Clone	Fluorophore	Supplier	CellCover
355 nm	CD183 (CXCR3)	1C6/CXCR3	BUV395	BD	
	CD196 (CCR6)	11A9	BUV496	BD	
	CD19	HIB19	BUV563	BD	
	CD21	B-ly4	BUV615	BD	
	CXCR5	RF8B2	BUV661	BD	
	CD27	O323	BUV737	BD	
	CD3	UCHT1	BUV805	BD	
	405 nm	MR1 5-OP-RU	N/a	BV421	NIH
IgD		IA6-2	PacBlue	SONY	
CD8β		2ST8.5H7	BV480	BD	
IgM		MHM-88	BV510	Biolegend	
CD194 (CCR4)		L291H4	BV605	SONY	
TCRgd		11F2	BV650	BD	
IgG Fc		G18-145	BV711	BD	
CD56		5.1H11	BV750	SONY	
CCR7		G043H7	BV785	Biolegend	
488 nm	IgA	IS11-8E10	FITC	Miltenyi	
	CD45RA	HI100	AF532	Thermofisher	
	CD8α	SK1	PercP	SONY	
	PD1	EH12.1	BB700	BD	
	CD95	DX2	PercP-EF710	Thermofisher	
561 nm	CD1d PBS-57	N/a	PE	NIH	
	CD45	HI30	Spark YG™ 593	SONY	
	CD25	BC96	PE-Dazzle594	Biolegend	
	CXCR4	12G5	PE-Cy5	SONY	
	CD127	eBioRDR5	PE-Cy5.5	Thermofisher	
	CD14	M5E2	PE-Cy7	BD	
	CD66b	G10F5	PE-Cy7	Thermofisher	
	CD16	3G8	PE-Cy7	SONY	
CD38	S17015F	PE/Fire™ 810	SONY		
647 nm	ICOS	C398.4A	APC	SONY	
	CRTh2	BM16	AF647	BD	
	HLA-DR	L243	AF700	SONY	
	CD24	ML5	APC-Cy7	Biolegend	
	CD4	SK3	APC/Fire™ 81C	SONY	

Co všechno jde imunofenotypizovat?

- Buňky (povrchové epitopy, fosforylované epitopy, intracelulární markery jako cytokíny a transkripční faktory)
- Tkáně (biopsie...)
- Synoviální tekutina
- Pro **tkáňově-residentní buňky** se často využívá místo průtokové cytometrie imunofluorescence/imunohistochemie

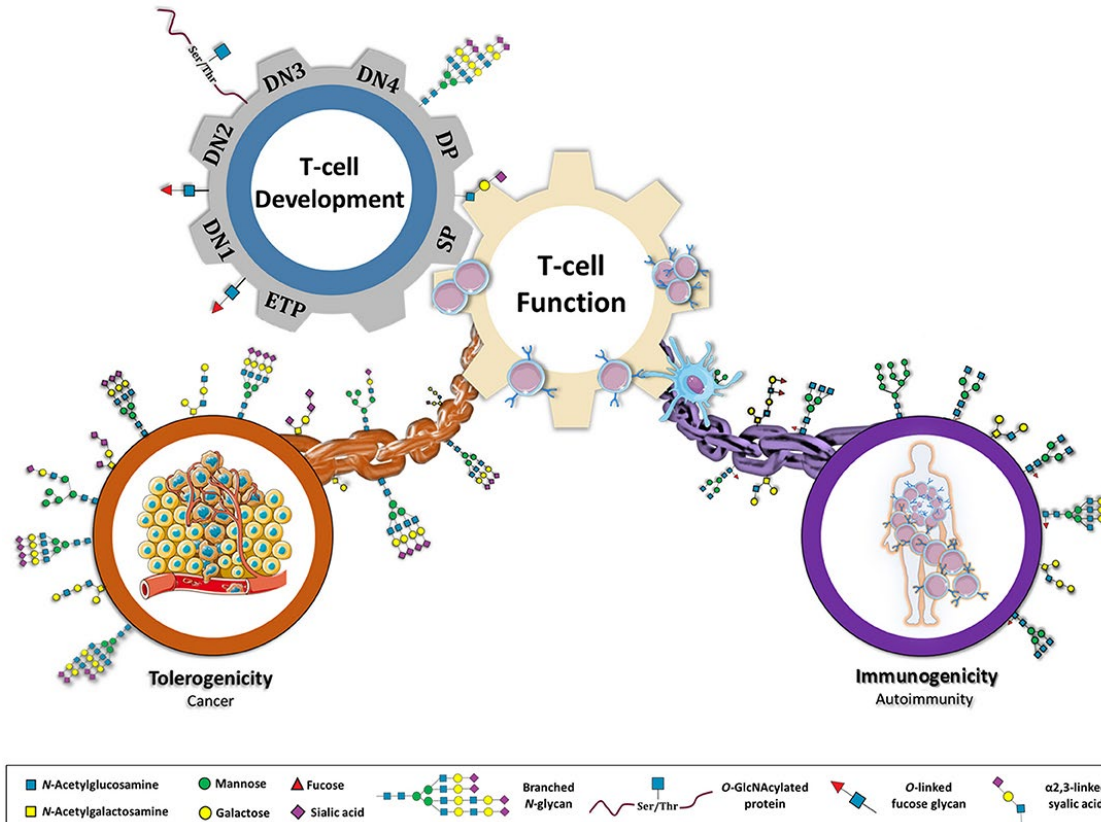
Analýza glykanů

- Glykosylace proteinů – důležitá pro migraci, diferenciaci a maturaci imunitních buněk
- Lektíny (proteíny, které vážou glykany) – důležité pro aktivaci a funkci buněk
- Mnoho CD markerů nebo PAMPs tvoří lektíny a glykany
- Důležité hlavně při interakci imunitních a rakovinových buněk



Glykany a imunitní systém

- Glykany zahrnuté ve vývoji, proliferaci a diferenciaci lymfocytů
- Poruchy glykosylací spojené s:
 - **Autoimunitní onemocnění** – např. IBD (hyperreaktivní CD4+ T lymfocyty mající snížený počet větvených glykanů na svém povrchu)
 - **Rakovina** – nádorové buňky se maskují před imunitním systémem pomocí povrchové glykosylace
 - Glykany jako možné biomarkry



Studying T Cells N-Glycosylation by Imaging Flow Cytometry

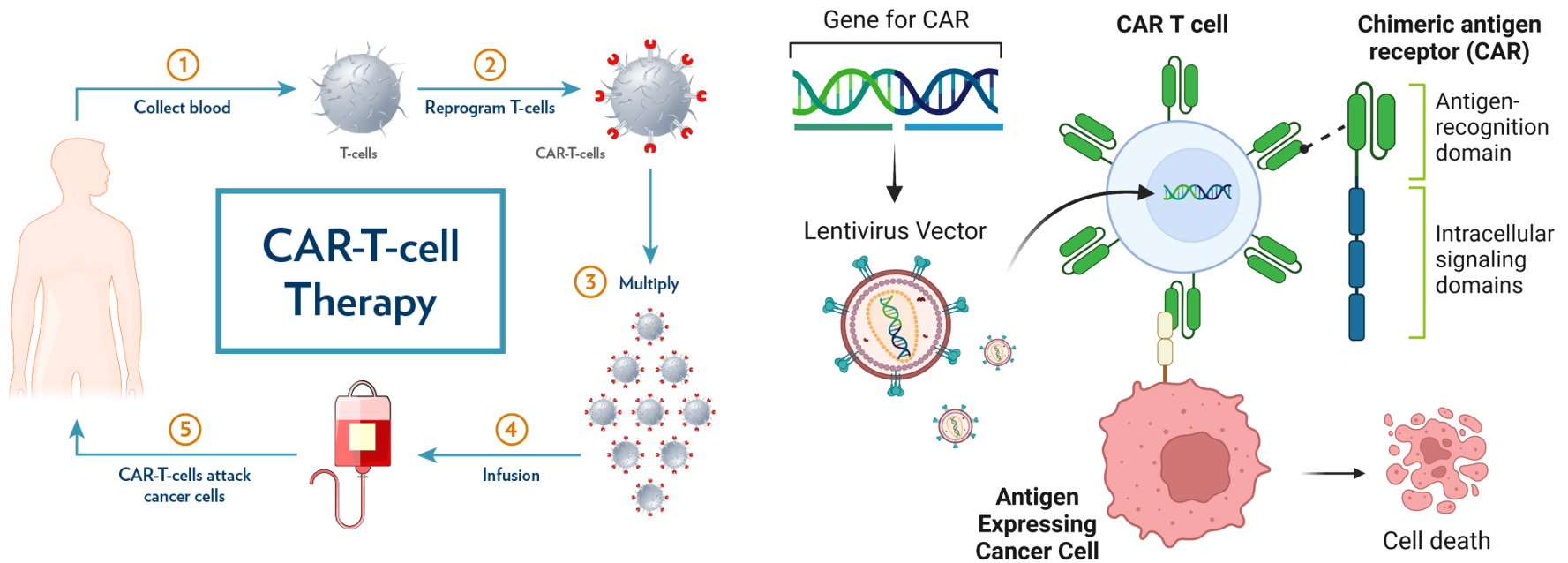
Ana M Dias^{1,2}, Catarina R Almeida³, Celso A Reis^{1,2,4}, Salomé S Pinho^{5,6}

Affiliations + expand

PMID: 27460244 DOI: 10.1007/978-1-4939-3302-0_11

CAR T cell terapie

- T buňky pro CAR terapii se pomocí průtokové cytometrie vysortují z krve pacienta
- Průtoková cytometrie i na ověření CAR-T buněčného specifického usmrcení nádorových buněk



Hematologie

Použití imunofenotypizace pro detekci hematologických onemocnění

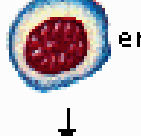
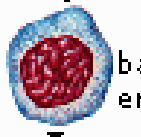
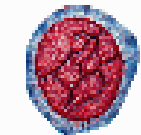
- Stanovení zastoupení jednotlivých buněčných linií
- Stanovení stupně diferenciacce
- Stanovení monoklonální populace (B-lymfocyty)

Haematopoéza



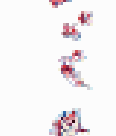
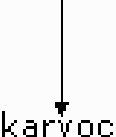
Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

proerythroblast



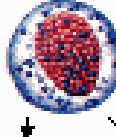
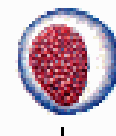
erythrocyte

megakaryoblast

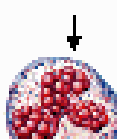
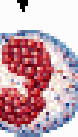
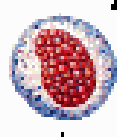


platelets

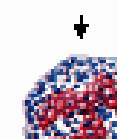
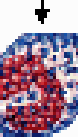
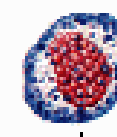
myeloblast



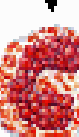
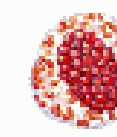
promyelocyte



neutrophil



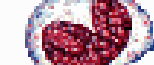
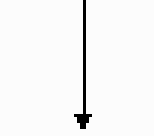
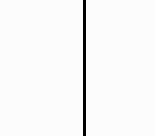
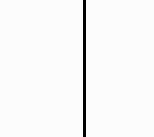
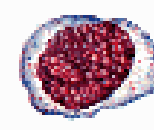
basophil



eosinophil

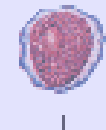
granulocytes

monoblast



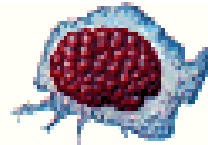
monocyte

lymphoblast



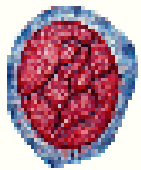
lymphocyte

Příklad identifikace buněk myeloidních linií



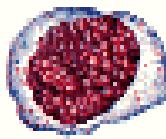
Uncommitted stem cell gives rise to committed cells

proerythroblast



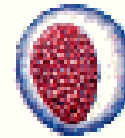
CD34⁺
CD13⁻
(CD36⁺)

monoblast

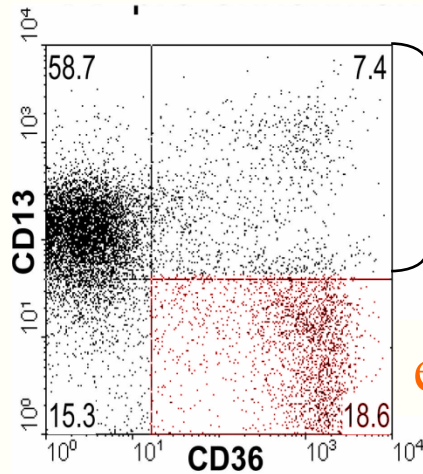


CD34⁺
CD13⁺
CD115⁺

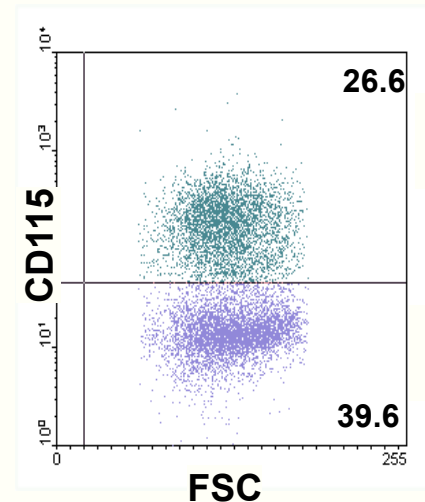
myeloblast



CD34⁺
CD13⁺
CD115⁻



erythroid



monoblasts

myeloblasts

Příklad panelu CD antigenů stanovovaných při detekci **lymfomů**

CD45	Human Leukocytes
CD3	Pan T Lymphocytes
CD5	Pan T Lymphocytes
CD7	Pan T Lymphocytes
CD4	T-helper Lymphocytes
CD8	T-suppressor/cytotoxic Lymphocytes
CD10	B-cells
CD19	Pan B-cells
CD20	Mature B-cells
FMC7	Activated B-cells
CD23	Activated B-cells
CD38	Plasma cells, activated T-cells
CD103	T and B Lymphocytes
CD11c	T and B cells, NK cells, monocytes
CD25	Activated B-cells
CD22	B-cells
Kappa	Light chains
Lambda	Light chains

Příklad panelu
CD antigenů
stanovovaných
při detekci
leukemií

CD45	Human Leukocytes
CD5	Pan T Lymphocytes
CD10	B Lymphocytes
CD19	Pan B Lymphocytes
CD20	Mature B Lymphocytes
HLA-DR (I3)	Activated T and B Lymphocytes
CD34	Progenitor Cell
CD117	Progenitor Cell
CD15	Monocytes/Granulocytes
CD33	Myelocyte/Monocyte
CD56	Natural Killer Cells
CD14	Monocyte
CD13	Myelocyte/Monocyte
CD64	Monocytes
cMPO	Myeloperoxidase
c79a	B Cells
C3	Cytoplasmic CD3 T Cells
cTDT	Immature Lymphocytes/thymocytes

Pokračování druhé části přednášky Příklady aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

Funkční testy

Změna exprese vybraných povrchových markerů (většinou receptory nezbytné pro funkci daného lymfocytu)

Produkce volných radikálů fagocyty

Detekce oxidu dusnatého

Fagocytární aktivita

Stanovení funkčních vlastností trombocytů