

KONFERENCE PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

0268/252 - Subkatedra klinických laboratoří



Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů
Vinařská 6, 656 02 Brno

ve spolupráci se společností

Immunotech a.s.
Radiová 1, 102 27 Praha 10

23. – 24. března 2006

Konference „Průtoková cytometrie“

23. - 24. března 2006

Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů
Vinařská 6, 656 02 Brno

Kovářová L. : Analýza dendritických buněk a jejich prekurzorů.

Oddělení klinické hematologie, LEHABI, FN Brno

Vokurková D^{1.}, Smolej L^{2.}, Kudlová M^{1.} : Naše první zkušenosti s metodou stanovení endoteliálních partikulí v periferní krvi pacientů s B-CLL.

1 Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

2 II.interní klinika, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

Taubová J., Stružová K. : Záchyt ADA deficience u dítěte, kazuistika, laboratorní výsledky.

Laboratoře lékařské imunologie Frýdek-Místek

Koubek K., Hřebačková J., Písačka M. : CD antigeny a krevní skupiny na buňkách erytrocytární řady.

Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha 2

Hřebačková J., Koubek K. : Membránové molekuly na povrchu lidských destiček.

Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha 2

Suková V. : Denzita antigenu CD 52 na lymfocytech, CD 34+ buňkách transplantátu periferních hematopoetických kmenových buněk a nádorových buněk pacientů s chronickými B-lymfocytárními malignitami.

Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, Fakultní nemocnice Brno.
Černopolní 9, Brno

Lochmanová A., Mrázek J., Čermáková R.* : Průkaz HLA B27 na základě průtokové cytometrie a genové analýzy.

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Odbor imunologie a alergologie

* Dětská revmatologie, FNsP Ostrava

Vlková M. : Vztahy mezi anormalitami B a T lymfocytů a jejich závislost na věku u pacientů s CVID.

ÚKIA, Fakultní nemocnice u sv.Anny, Brno

Ondřejková A., *Bobovčák M. : Naše zkušenosti so spracovaním a analýzou bronchoalveolárných laváží.

Plicní oddělení Krajské nemocnice T.Bati, a.s., Zlín

*VÚCHP, Nová Polianka

Říčařová B. : Tetramery a jejich využití.

Immunotech a.s., Praha 10

Kružík P. : Multiplexová stanovení na partikulích v průtokové cytometrii.

Immunotech a.s., Praha 10

Moos J. : Nové biomarkery v lidských tělních tekutinách.

Immunotech a.s., Praha 10

Vlček R. : Netradiční aplikace v průtokové cytometrii.

Immunotech a.s., Praha 10

Naše skúsenosti so spracovaním a analýzou bronchoalveolárnych laváží.

Ondrejková A., *Bobovčák M.

Plicní oddělení Krajské nemocnice T.Bati, a.s., Zlín
*VÚCHP, Nová Polianka

Na základe niekoľkoročných skúseností hodnotíme význam analýzy bronchoalveolárnej laváže (BAL) v diagnostike imunopatologických pľúcnych procesov.

BAL sa získava pri vyšetrení flexibilným bronchoskopom, pri ktorom sa do bronchiálneho stromu postihnutej časti pľúc instiluje 100 -300 ml fyziologického roztoku zohriateho na 37°C a aspiruje sa bronchoalveolárna lavážna tekutina. Získaný materiál prefiltrujeme cez gázu a spočítame počet buniek. Zastúpenie imunokompetentných buniek v BAL hodnotíme mikroskopicky i metódou prietokovej cytometrie.

Nespornou výhodou tohoto vyšetrenia je, že počet a zastúpenie imunokompetentných buniek v BAL podáva informáciu o zápalových a imunitných procesoch priamo v postihnutom tkanive. V práci hodnotíme cytologickú analýzu BAL.

Súbor. V práci prezentujeme súbor 1705 spracovaných BAL. Zvýšené zastúpenie lymfocytov (nad 18,0 %) malo mikroskopicky 633 BAL (37,0 %) – tieto laváže sme ďalej hodnotili prietokovou cytometriou. Súbor 630 BAL s lymfocytárnou alveolitídou sme rozdelili do troch základných skupín: 1. aktívna sarkoidóza pľúc I-III (n =225), 2. sarkoidóza pľúc v liečbe kortikoidmi (n=102), 3.iné intersticiálne pľúcne procesy (n= 303).

V prvej fáze analýzy sme hodnotili zastúpenie lymfocytov v BAL a základné populácie T-lymfocytov (CD3, CD4, CD8).

Výsledky: všetky tri skupiny mali spoločnú výraznú lymfocytárnu alveolitídu s takmer výlučnou prevahou CD3+ T-lymfocytov (>90,0%). Štatisticky významná bola výrazná prevaha CD3+CD4+ T-ly a vyšší pomer CD4/CD8 u pacientov s aktívnou sarkoidózou pľúc oproti iným skupinám. V tejto skupine sme zaznamenali zvýšenu expresiu aktivačného markru HLA DR na T-lymfocytoch. V druhej skupine u pacientov so sarkoidózou pľúc v liečbe síce stále pretrváva pomerne výrazná lymfocytárna alveolitída, ale účinok imunosupresívnej terapie sa prejavuje znížením počtu CD4+ T-ly v alveolárnom priestore. V tretej heterogénnej skupine rôznych intersticiálnych pľúcnych procesov boli hlavnými bunkami alveolitídy CD3+ T-lymfocyty, ale s normálnou distribúciou subpopulácií CD4 a CD8.

Zo 633 analyzovaných lymfocytárných BAL sme len v troch prípadoch zaznamenali fenotypovo iný typ alveolitídy než CD3+T. V dvoch prípadoch boli v BAL zmnožené monoklonálne B-lymfocyty a histologicky bolo verifikované lymfoproliferatívne ochorenie. V jednom prípade boli v BAL zmnožené NK bunky. V prednáške predkladáme stručné kazuistiky týchto ojedinelých prípadov.

Z celkového počtu 1705 vyšetrených BAL sme dvakrát zistili alveolárnu lipoproteinózu pľúc a rovnako dvakrát bronchioloalveolárny adenokarcinóm.

Záver. 1. lymfocytárna alveolitída je patologický nález, ktorý sprevádza viaceré intersticiálne pľúcne procesy a musí byť ďalej bližšie špecifikovaný imunofenotypizáciou. 2. pri „klasickej“ lymfocytárnej alveolitíde sa nachádzajú v alveolárnom priestore výlučne T-lymfocyty. V bežnej rutinnej praxi preto úplne postačuje analýza CD3+ T-lymfocytov v BAL a ich subpopulácií CD4 a CD8, prípadne aktivačného markru HLA DR. 3. Cytologické vyšetrenie BAL má pomocný diagnostický význam pri intersticiálnych pľúcnych ochoreniach, najviac však pri sarkoidóze. 4. Diagnostický je prínos BAL pri alveolárnej lipoproteinóze, granulomatóze z Langerhansových buniek a zhubných nádoroch.

Průkaz HLA B27 na základě průtokové cytometrie a genové analýzy

*Lochmanová A., Mrázek J., Čermáková R.**

OKIA ZÚ Ostrava

**dětská revmatologie FNsPO*

Bechtěrevova choroba je zánětlivé onemocnění, které zasahuje převážně klouby páteře a pánve, v řadě případů mohou být zasaženy i jiné části těla. Patří do skupiny tzv. „séronegativních spondylartropatií“ a bývá označována také jako ankylozující spondylitida (AS). Je velmi silně asociována s antigenem I. třídy HLA-B27, který vyskytuje u 90-95 % pacientů. Samotný průkaz antigenu B27 však k diagnóze ankylozující spondylitidy nestačí, testování B27 se využívá jen pro vyloučení této diagnózy. Příčina vzniku Bechtěrevovy choroby je zatím stále neznámá, existuje řada hypotéz. Někteří autoři předpokládají, že B27 váže specifické patogenní peptidy a prezentuje je cytotoxickým T lymfocytům, jiní vznik „defektní“ molekuly B27, často bývá zmiňována tzv. zkřížená imunitní reakce mezi enteropatogenními bakteriemi a HLA-B27. Zatím je definováno patnáct alelních variant (B27 B*2701-15) Nejčastější alela, která je asociovaná s AS, je B*2705 (v české populaci se vyskytují pouze alely B*2705 a B*2702 a obě jsou stejně asociované s AS), zatímco alely B*2706 a B*2709 nejsou spojeny s AS a mají protektivní vliv.

Laboratorní průkaz antigenu HLA-B27 byl donedávna prováděn metodou mikrocytotoxického testu. V současné době je s úspěchem využívána metoda průtokové cytometrie a do popředí se dostávají i metody DNA analýzy. Ty detekují HLA-B27 na úrovni genotypu na rozdíl od výše uvedených metod, které jsou založeny na fenotypickém průkazu.

V naší práci jsme srovnávali průkaz antigenu HLA-B27 metodou průtokové cytometrie za užití diagnostické soupravy HLA-B27 Kit firmy BD Bioscience a monoklonální protilátky anti-HLA-B27/HLA-B7 firmy Beckman Coulter a metodou DNA analýzy za užití Reverzního hybridizačního kitu pro průkaz HLA-B alely B* a cytochromu P450 2D6 firmy GenID.

Vyšetřovaný soubor tvořilo 10 pacientů dětské revmatologické ambulance. Metodou průtokové cytometrie a genové analýzy bylo dosaženo stejných výsledků z hlediska HLA-B 27 pozitivivity. HLA-B7 pozitivitu nebylo možno hodnotit, neboť alela HLAB*7301, která je v soupravě fy GenID přítomna, slouží k vyloučení zkřížené reaktivity, nikoliv průkazu HLA-B7 pozitivivity. Riziková alela CYP2D6*4 byla prokázána u dvou pacientů, vzhledem k současné pozitivitě CYPD6 se však nejedná o homozygotní nosiče této alely.

Ve srovnání s metodou genové analýzy je metoda průtokové cytometrie pro průkaz HLA-B27 rychlejší a technicky i ekonomicky méně náročná. Použití monoklonální protilátky snižují riziko zkřížené reakce na minimum a umožňují kromě průkazu HLA B27 i detekci HLA B7. Vzhledem k tomu, že jak metoda průtokové cytometrie, tak metoda genové analýzy detekuje HLA-B27 alely komplexně a nikoli jednotlivě z hlediska jejich rizika, jeví se metoda průtokové cytometrie, za předpokladu, že laboratoř vlastní průtokový cytometr, jako výhodnější. Metoda genové analýzy může vhodně doplnit metodu průtokové cytometrie ve sporných případech HLA-B27 pozitivivity resp. negativivity. Možnost současné detekce CYP2D6 resp.homozygotních nosičů CYP2D6*4 poskytuje doplňující informaci z hlediska patogeneze a dalšího možného vývoje onemocnění.

Naše první zkušenosti s metodou stanovení endoteliálních partikulí v periferní krvi pacientů s B-CLL

Vokurková D¹., Smolej L²., Kudlová M¹.

¹Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

²II.interní klinika, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

Pro růst nádoru a jeho metastazování má zásadní význam novotvorba cév neboli angiogeneze, s jejíž pomocí je nádorové ložisko zásobováno živinami a kyslíkem. Jde o komplexní proces, zahrnující degradaci bazální membrány původní cévy, proliferaci a vyžívání endotelií se vznikem nové kapiláry a konečně vznik funkční cévy. Za fyziologických okolností jsou faktory podporující angiogenezi v dynamické rovnováze s faktory, které ji potlačují. Snížení účinnosti angiogenní aktivity má za následek poruchu hojení ran nebo pomalé hojení zlomenin, naopak zvýšená podpora novotvorby cév má kromě významné úlohy v růstu nádorového ložiska a v metastazování také podíl na patogenezi dalších nemocí, jako je revmatoidní artritida, retinopatie nebo chronický zánět.

Všechny cirkulující krevní buňky – endoteliální nevyjímaje – jsou schopny uvolňovat membránové fragmenty – endoteliální mikropartikule (EMP) o velikosti menší jak 1 μm , přičemž na svém povrchu nesou alespoň některý z antigenů původní buňky. Tímto způsobem vznikají i trombocytární (PMP), leukocytární (LMP) a erytrocytární mikropartikule (RBCMP). Zvýšené množství endoteliálních mikropartikulí bylo zjištěno u pacientů s akutním koronárním syndromem, s lupus anticoagulans, u trombotické trombocytopenické purpury, akutního infarktu myokardu, roztroušené sklerózy a paroxysmální noční hemoglobinurie.

Snažili jsme se metodu stanovení endoteliálních mikropartikulí zavést na našem pracovišti. Je to poměrně složitá metoda závislá na přesnosti a čistotě hadičkového systému průtokového cytometru. Částice 1 μm jsou již velice malé a pohybují se na rozhraní detekce cytometru. Je nutné používat čisté promývací roztoky, kontrolovat u nich množství načtených částic při nastavených parametrech a nasbírat minimálně 500 000 částic. Množství endoteliálních mikropartikulí je velice nízké, pohybuje se v promilových hodnotách, a tak se udávají hodnoty absolutní, které získáme přidáním značených kuliček k měřenému vzorku. Složitě bylo zpracování materiálu. Různí autoři používají různě zpracovanou periferní krev a různou škálu na endoteliálních buňkách vyskytujících se antigenů – CD31, CD51, CD54, CD44, CD105, CD144, apod.

Nám se nakonec osvědčilo použití plazmy chudé na trombocyty (platelet poor plasma, PPP) a kombinace protilátek proti endoteliálním buňkám (endoglin - CD105, VE-cadherin - CD144) a trombocytům (CD41), takže jsme získali informaci, jak o počtu endoteliálních (CD105+/CD41-, CD144+/CD41-), tak trombocytárních (CD105+/CD41+, CD144+/CD41+) mikropartikulích.

Touto metodou jsme stanovili počet endoteliálních a trombocytárních mikropartikulích u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (B-CLL) a kontrolního souboru zdravých dárců. Soubor pacientů je zatím malý, ale předběžná statistika prokázala statisticky významné zvýšení počtu endoteliálních a trombocytárních mikropartikulí u pacientů s B-CLL.

Práce vznikla za podpory společnosti Liga proti rakovině Praha a výzkumného záměru MZO 00179906 MZ ČR

Membránové molekuly krevních destiček

Hřebačková Jana, Koubek Kristián
Ústav hematologie a krevní transfúze

Krevní destičky se uplatňují při hemostáze, jak v časně fázi při tvorbě tzv. destičkového trombu, tak i při procesech koagulace. Krevní destičky adherují k porušenému cévnímu povrchu a agregují, přičemž uvolňují řadu látek, které ovlivňují reakci cév a mají vliv na další průběh hemostázy. Na povrchu krevních destiček jsou membránové molekuly, které zprostředkovávají celou řadu funkcí (aktivace, adheze, agregace), které se uplatňují při různých normálních i patologických procesech. Na adheze a agregaci krevních destiček se podílejí převážně $\beta 1$ integrin (CD29), gpIIb (CD36), gpIIb (CD41), gpIX (CD42a), gpIba (CD42b), gpIb β (CD42c), gpV (CD42d), gpIa (CD49b), gpIIIa (CD61), P-selektin (CD62P), JAM-1 (CD321). V rámci inventarizace lidského leukocytárního systému je snaha i jednotlivé destičkové molekuly zahrnout do CD nomenklatury, z nichž znaky CD9, CDw12, CDw17, CD23, CD29, CD31, CD36, CD41, CD42,a,b,c,d, CD46, CD47, CD49b, CD49e, CD49f, CD51, CD54, CD59, CD60a,b,c, CD61, CD62P, CD63, CD82, CD84, CD92, CD102, CD107a, CD107b, CD109, CD110, CD114, CD140a, CD140b, CD141, CD147, CD151, CD154, CD165, CD173, CD226, CD245, CD321 a CD324 jsou již zavzaty. U těchto molekul se detailněji objasňuje molekulární hmotnost, genetická determinace, jejich exprese a i funkce. Mimo to se upřednostňuje jejich význam pro patogenezi a patofysiologii krevních destiček. Molekuly CD41/CD61 jsou základním diagnostickým znakem pro Glanzmannovu trombastenii a molekuly CD42a,b,c,d mají význam u Bernard-Soulierova syndromu. Jednotlivé molekuly se prokazují průtokovou cytometrií za použití vhodně značených protilátek.

V tomto sdělení se zaměříme na charakter jednotlivých molekul na krevních destičkách, i když bude nastíněn jejich vývoj v rámci destičkové řady. Tato řada je ovlivňována pomocí hematopoetických růstových faktorů (TPO, EPO, GM-CSF, SCF, IL3, IL6, IL7, IL11), které v interakci se svými receptory navozují vznik krevních destiček. Krevní destičky také produkují některé cytokiny a chemokiny (EGF, TGF- β , PDGF, IL-1, HGF, PD-ECGF, CXCL-1), které se uplatňují ve zpětnovazebních mechanismech.

Poznámka: *Sdělení bylo podpořeno výzkumným záměrem UHKT pro léta 2005-2012.*

CD antigeny a krevní skupiny na buňkách erytrocytární řady

Koubek Kristán, Hřebačková Jana, Písačka Martin

Všeobecně se přijímá, že výchozí krevní buňkou **hemopoézy** je pluripotentní kmenová buňka, která u dospělého jedince se nachází v mikroprostředí kostní dřeně představované neurovaskulární sítí s organizovanými ložisky krvetvorných buněk. Pluripotentní kmenové buňky jsou mononukleární buňky o velikosti 7-10 μ s jemným rozptýleným chromatinem a s 1-3 velkými jádřičkami. Předpokládá se, že tvoří méně než 0,01% všech buněk kostní dřeně. Tato buňka může nést na svém povrchu HLA-DR a CD34 antigeny. Pluripotentní kmenové buňky mají schopnost sebeobranu a další proliferace do progenitorových a prekursorových buněk. Kmenová buňka je tak výchozí buňkou pro různé další buňky (monocyty, granulocyty, lymfocyty) a také pro erytrocyty a krevní destičky. Celá hematopoéza je ovládaná sítí různých hematopoetických růstových faktorů, kde navíc jsou vytvořeny různé zpětné vazby.

Vývoj buněk v **erytrocytární řadě** (červené krevní řadě) probíhá v kostní dřeni, kde z myeloidního progenitoru (CFU-GEMM) vzniká přes BFU-E a CFU-E progenitory časné normoblasty a ortochromatofilní normoblasty až k retikulocyту, jenž dává vznik normální červené krvince erytrocytu (normocyту). Celý vývoj vzniku erytrocytu z jeho progenitoru je provázen čtyřmi mitózami probíhajícími v dřeni kostní a probíhá přibližně čtyři dny. Erytrocyty se dostávají do obvodové krve hlavně diapedezí endotelovými buňkami kostní dřeně. Ke ztrátě buněčného jádra dochází v ortochromatofilním erytoblastu, retikulocyt je bez jádra. Normoblasty představují asi 1/5 buněk kostní dřeně a jejich poměr k buňkám myeloidní řady se pohybuje mezi 1:2 až 1:5. Zhruba se odhaduje, že se tvoří a také zaniká 2×10^{11} erytrocytů za den, přičemž v případě zvýšené potřeby se toto množství může zvýšit až 10x. Zánik erytrocytů probíhá extravaskulární fagocytózou retikuloendotelového systému ve stěně sinusoidů. Na povrchu erytrocytu je celá řada různých antigenů (vytvářející třeba krevní skupiny), které jsou zařazovány do tzv. CD nomenklatury. Buňky erytrocytární řady mají také na svém povrchu různé receptory pro transferin (CD71 antigen), kde komplex transferinu s receptorem vstupuje do buňky za uvolnění železa. Mimo to tyto buňky mají také receptory pro erytropoetin. EPO má základní dopad na hematopoetické buňky, speciálně na proliferaci a diferenciaci buněk erytrocytární řady a to tím způsobem, že se váže na svůj receptor a zprostředkovává tak přenos informace do buněčného jádra. Buňka na to pak reaguje, že dochází k její proliferaci a diferenciaci až k vytvoření červených krvinek. Počet červených krvinek u zdravého muže kolísá v rozpětí $4,5 - 6,3 \times 10^{12}/l$ a u ženy $4,2 - 5,4 \times 10^{12}/l$ v obvodové krvi. Erytrocyty mají životnost několik dnů, přičemž staré erytrocyty jsou eliminovány mononukleárním fagocytovým systémem. Erytrocyty mají na svém povrchu celou řadu molekul, z nichž některé jsou antigeny krevních skupin a jiné jsou zahrnuty do CD systému. V některých případech nesou krevní skupiny i CD označení. Hlavní krevní skupiny, které nesou i CD označení jsou (CD15 = Lewis, CD35 = Šnops, CD44 = Indian, CD77 = Pk, CD99 = XG, CD173 = H typ 2, CD233 = Band3/Diego, CD234 = Duffy, CD235a = MNs, CD236 = Gerbich, CD238 = Kell, CD239 = Lutheran, CD240CE = Rh30CE, CD240D = Rh30D, CD240DCE = Rh30D/CE.

V patogenézi a v patofysiologii různých vrozených či získaných defektů se uplatňují nejrozličnější molekuly způsobující poruchy erytrocytárních funkcí. Např. u paroxysmální noční hemoglobinurie dochází u nemocných k postižení membránových molekul kotvených GPI. Receptorem pro vstup některých patogenních plasmodií (*Plasmodium knowlesi*) je chemokinový receptor označovaný jako DARC. Pro *Plasmodium falciparum* je receptorem CD236 (glykoforin C), pro některé echoviry a *Escherichia coli* je receptor CD55 (DAF) a pro *Haemophilus influenzae* a poliovirus je molekula označovaná jako CD44.

Poznámka: *Sdělení bylo podpořeno výzkumným záměrem UHKT pro léta 2005-2012.*

Vztahy mezi abnormalitami B a T lymfocytů a jejich závislost na věku u pacientů s CVID

Vlková M.

Fakultní nemocnice u sv. Anny, Ústav klinické imunologie a alergologie (ÚKIA)

Běžný variabilní imunodeficit (CVID) je onemocnění s neznámou patogenezi. Ačkoliv byly popsány různé abnormality T- a B-lymfocytů, jejich patologická role je neznámá.

Vyšetřili jsem diferenciační znaky B-lymfocytů (CD21, CD27, IgM, IgD), CD4+ T lymfocytů (CD45RA, CD45RO, CD62L) a také aktivační znaky CD4+ lymfocytů (CD25, CD27, CD28, CD29, HLA-DR) u 42 pacientů s CVID a 33 zdravých kontrolních osob.

U pacientů s poklesem počtu zralých (CD21+) a paměťových (CD27+) B lymfocytů (skupina Ia podle "Freiburské" klasifikace) jsme pozorovali největší změny diferenciačních a aktivačních znaků (vzestup CD29, HLA-DR, CD45RO a pokles CD27, CD62L, CD45RA).

U pacientů CVID jsem pozorovali korelace mezi nezralými B lymfocyty (IgM+CD21-) a expresí znaků CD27, CD62L, CD45RA, CD45RO a HLA-DR na CD4+ lymfocytech. Žádná z těchto korelací nebyla nalezena u kontrolní skupiny.

Nalezli jsem korelace mezi věkem pacientů a expresí CD27 a CD45RA na CD4+ lymfocytech a IgD+CD27- a IgD+CD27+ na B lymfocytech. Tyto korelace nebyly nalezeny u kontrolní skupiny.

Naše studie ukázala, že změny v subpopulacích T a B lymfocytů jsou vzájemně závislé a navíc mohou být ovlivněny věkem pacientů.