

Vásárhelyi Barna

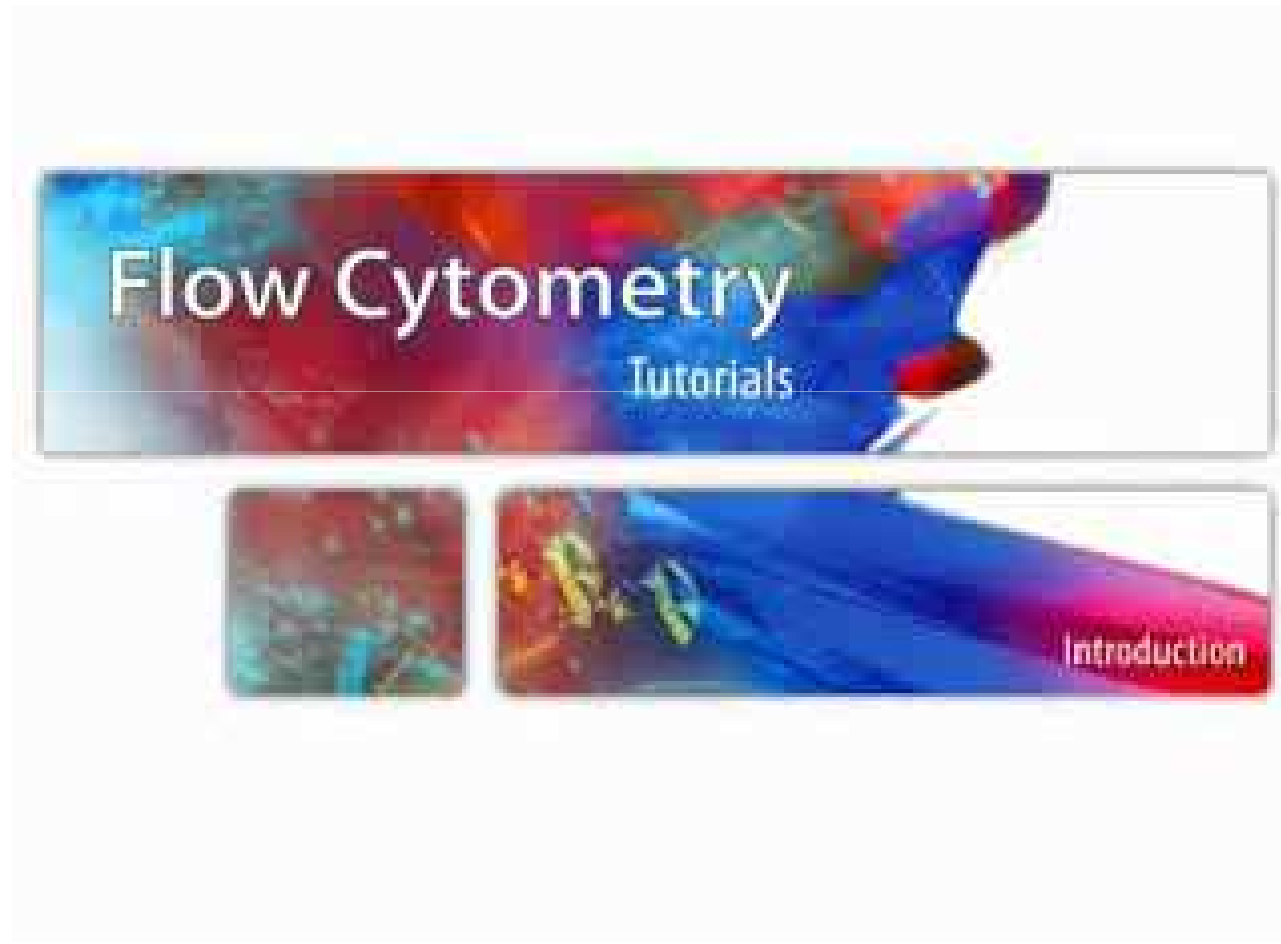
Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina
Intézet

**Áramlási citométerek:
klinikai és kutatási
alkalmazás**

Előadás tartalma

- Áramlási citométer részei, működési elve
- Vizsgálható paraméterek
- Saját kutatások

Hogyan működik?





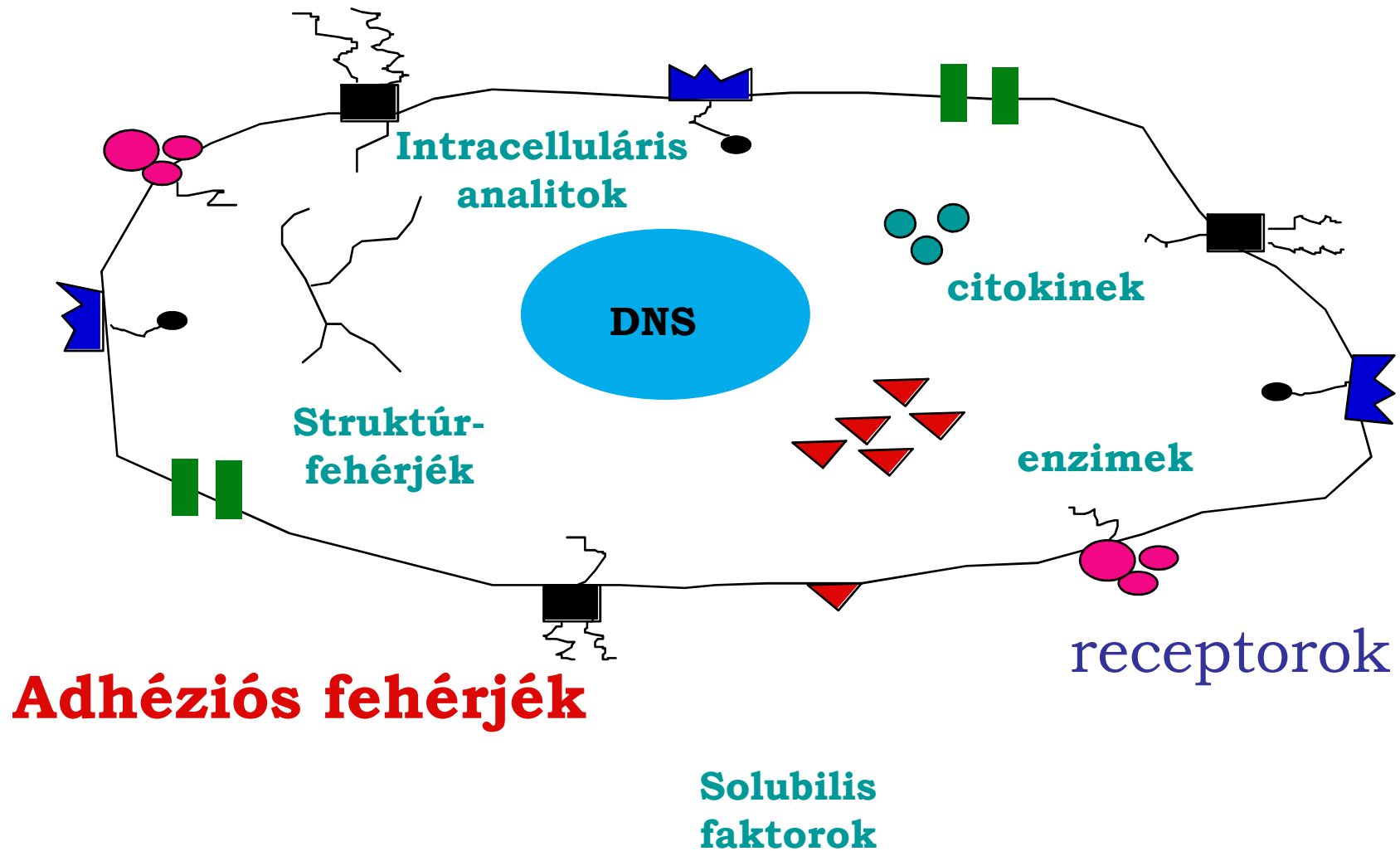




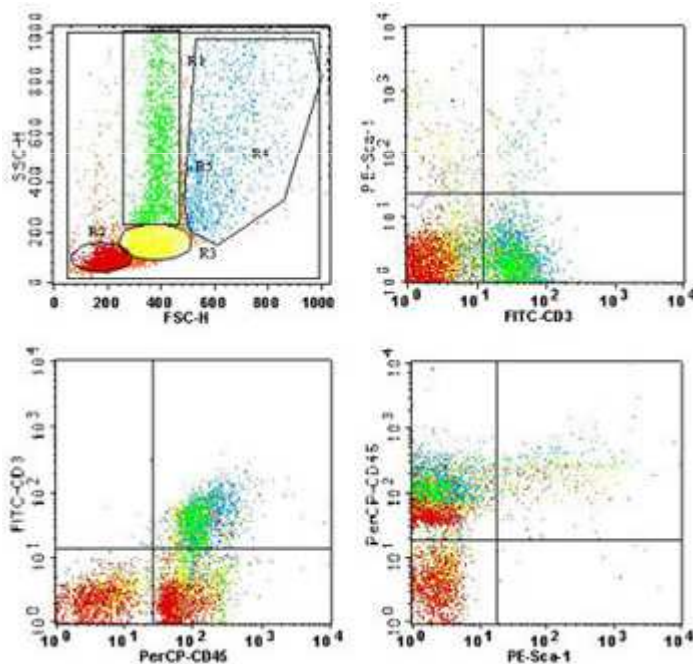
<http://cyto.mednet.ucla.edu/images/FACSAria.jpg>



MIRE JÓ? - Mit lehet mérni vele?



Immunfenotipizálás



COMBINATION POPULATION IDENTIFIED

CD4+/CDw29+ Helper/effector, more mature memory cells

CD4+/CD45R+ Suppressor inducer, less mature non-memory cells

CD4+/Leu8+ Suppressor inducer, some helper function

CD4+/Class II MHC Activated cells, immature cells

CD4+/CD25+ Activated cells (IL2 receptor)

CD4+CD38+ Immature cells, activated cells

CD8+/CD11b+ Of the CD11b+ cells the suppressors are bright CD8+ and NK are dim

CD8+ CD8+/CD28+ Cytotoxic precursor/effector cells

CD8+/CD57+ Cytotoxic function

CD8+/Class II MHC+ Activated cells, immature cells

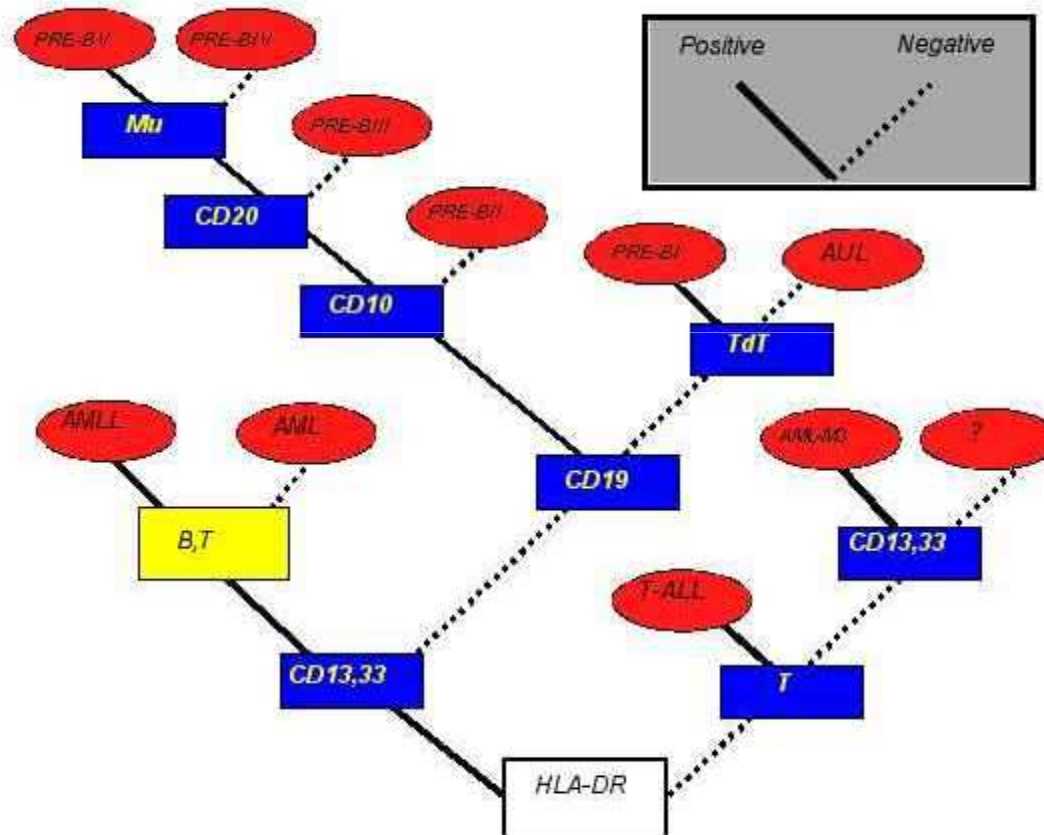
CD8+/CD25+ Activated cells (IL2 receptor)

CD8+/CD38+ Immature cells, activated cells

CD16+/CD57+ Low NK activity

CD16+/CD56+ Most potent NK activity

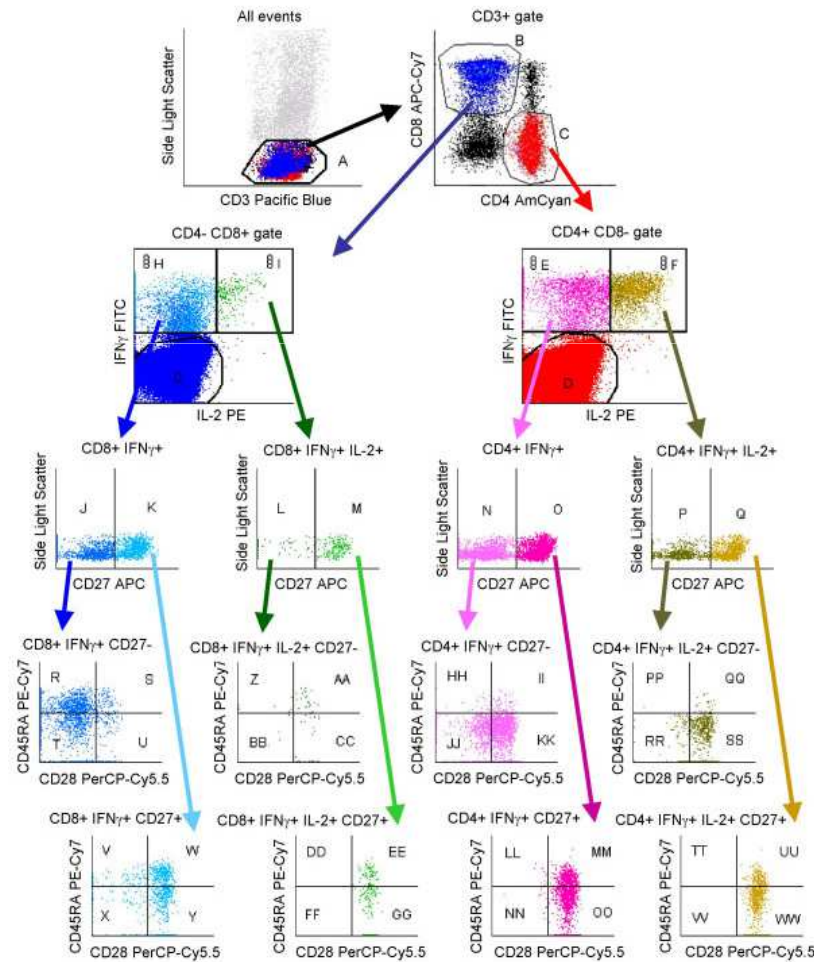
Leukémia-diagnosztika



Decision Tree in Acute Leukemia

From Duque et al, Clin Immunol News.

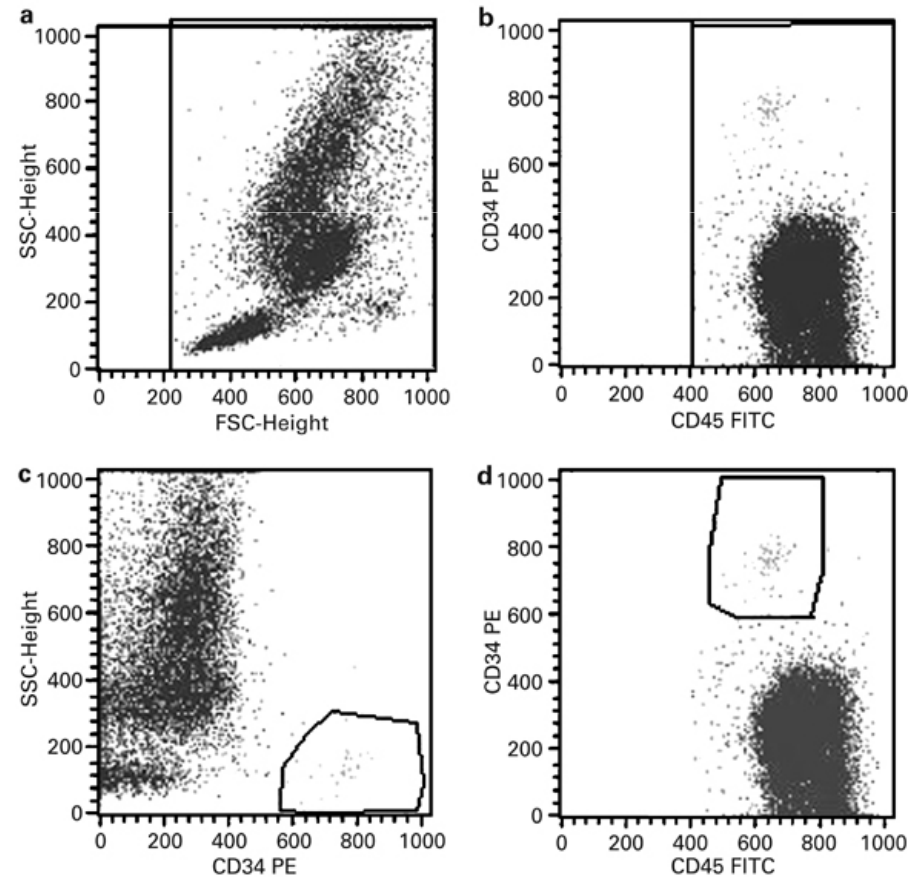
Intracelluláris festés – sejtfelszíni marker kombinálása



Őssejtek kimutatása

- CD34+ őssejtek

- Irradiációs kezelést követően az őssejtszám normalizálódásának a monitorozása
- Őssejtmobilizálás sikere



Sejtciklus elemzése

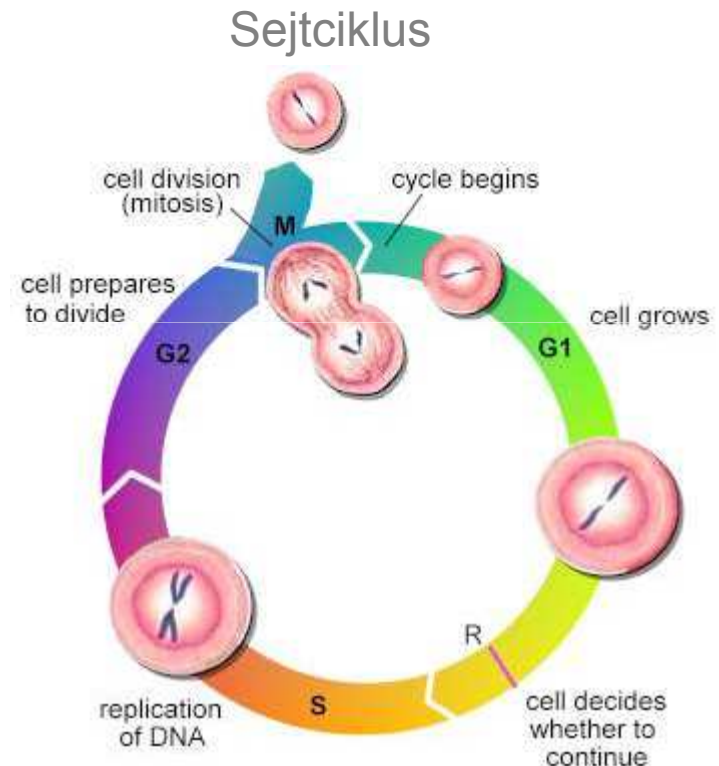
DNS próbák

DAPI }
Hoechst } UV

Propidium iodide (PI) }
7-AAD } 488

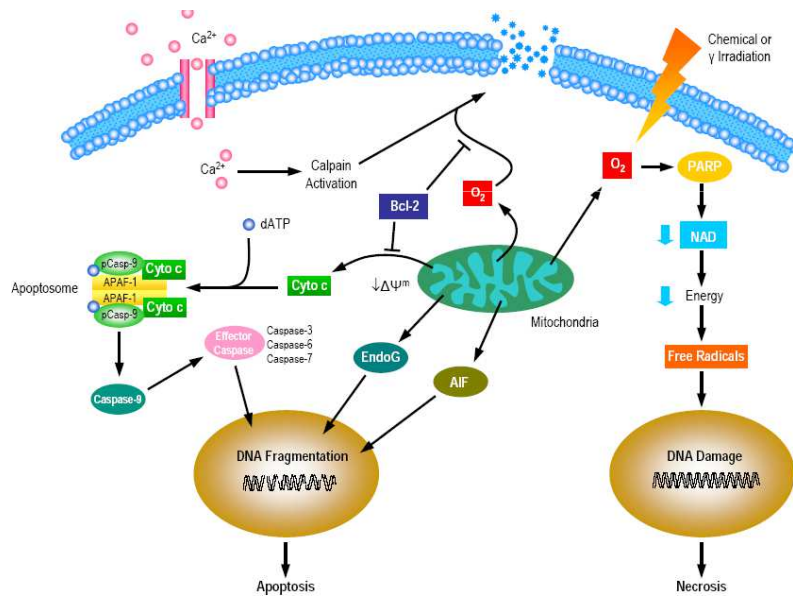
TOPRO-3 }
DRAQ5 } 633

Kötött molekulák száma megfelel a sejtben lévő DNS-molekulák számának



Sejtciklus során a sejt *mérete* és *DNS-tartalma* változik

Apoptózis

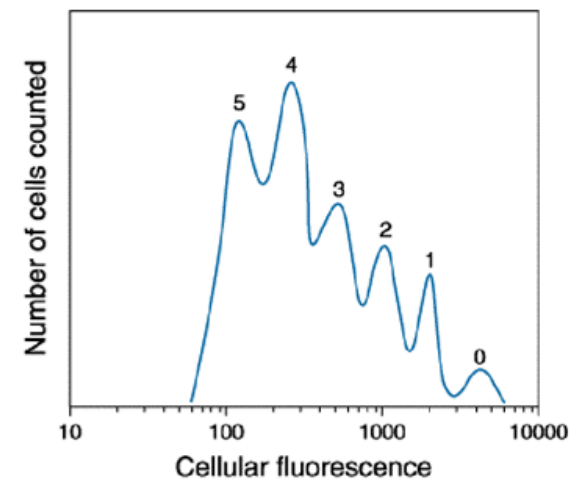
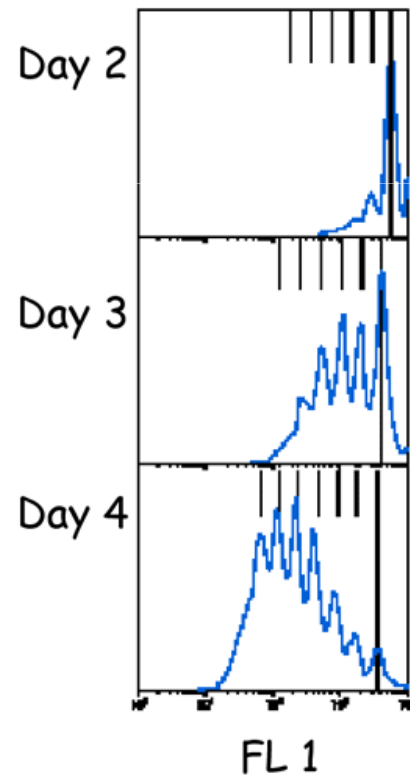
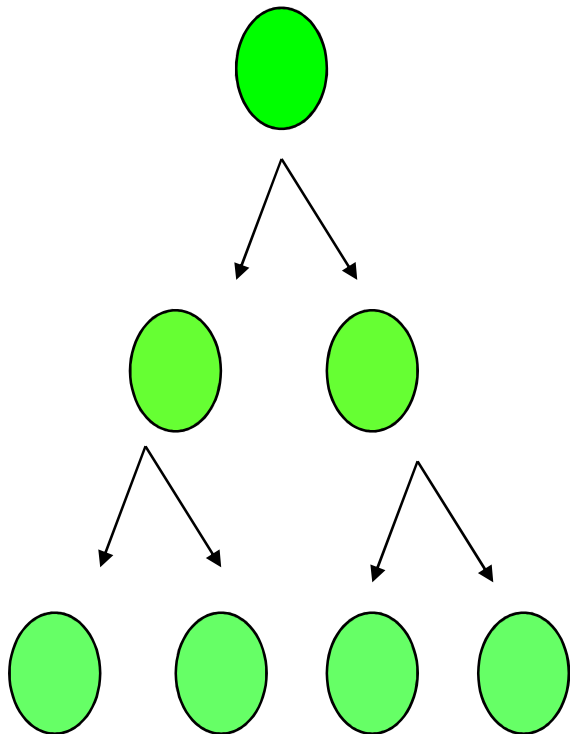


FACS-szal mérhető:

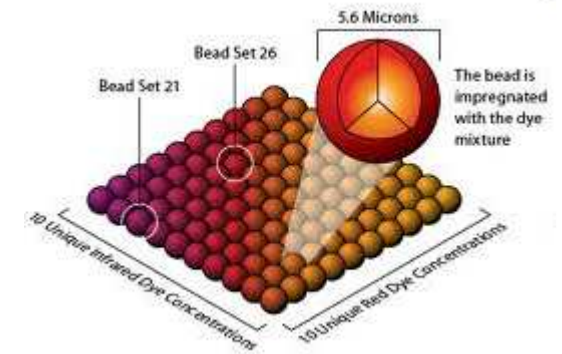
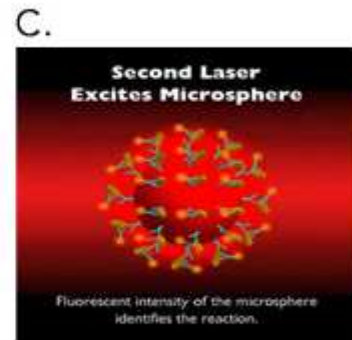
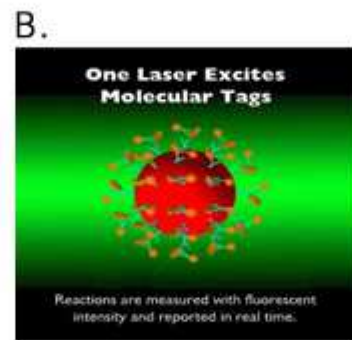
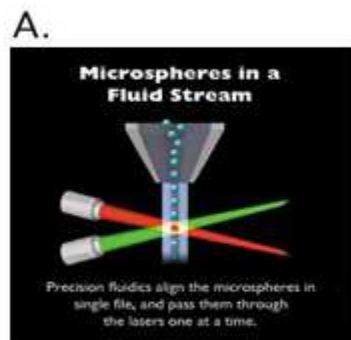
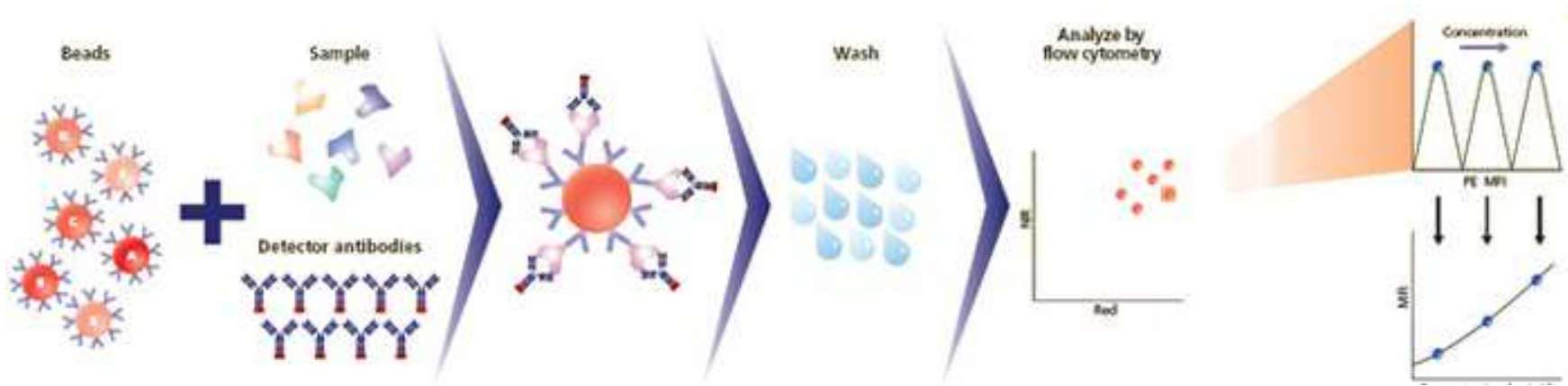
- DNS-fragmentek
- Membránstruktúra és $-$ integritás (Annexin-V, PI)
- Mitokondrium-funkció (Mitotracker Red)
- Kaszpáz aktivitás (ellenanyagokkal)

Sejtproliferáció vizsgálata

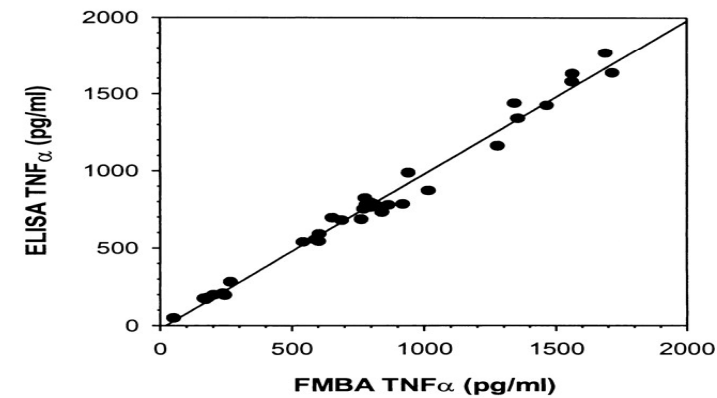
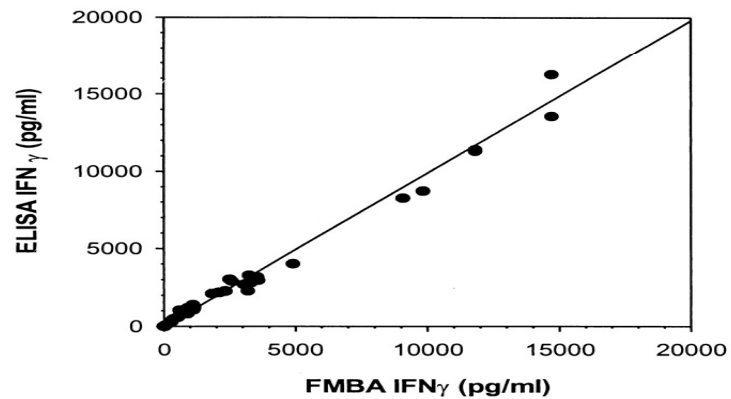
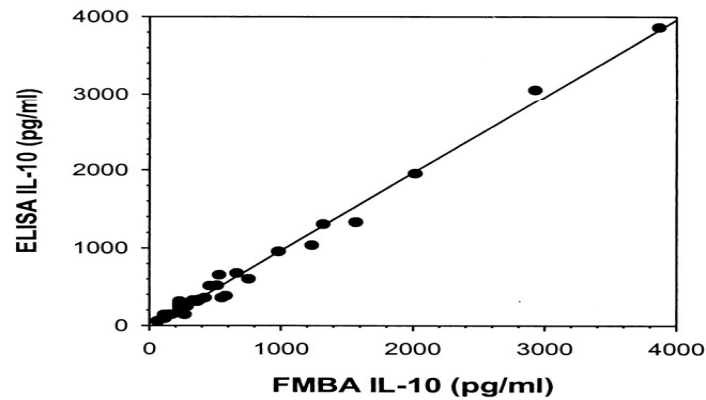
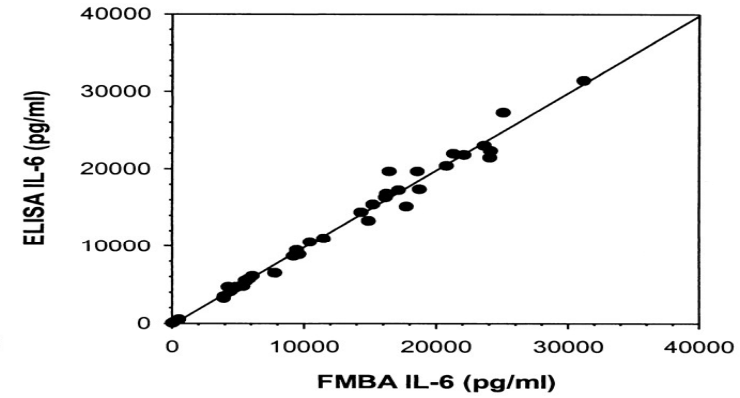
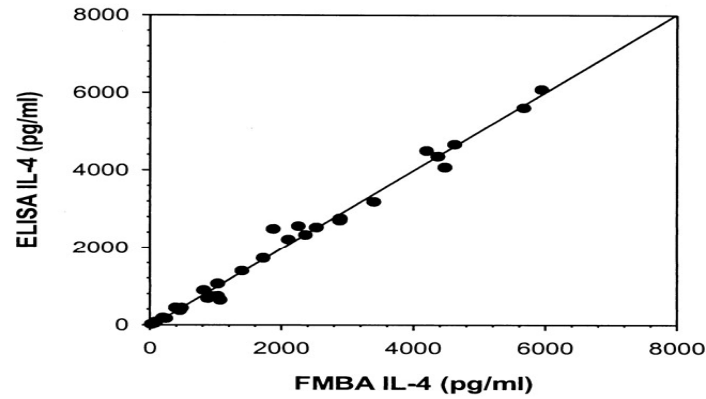
CFSE-festés



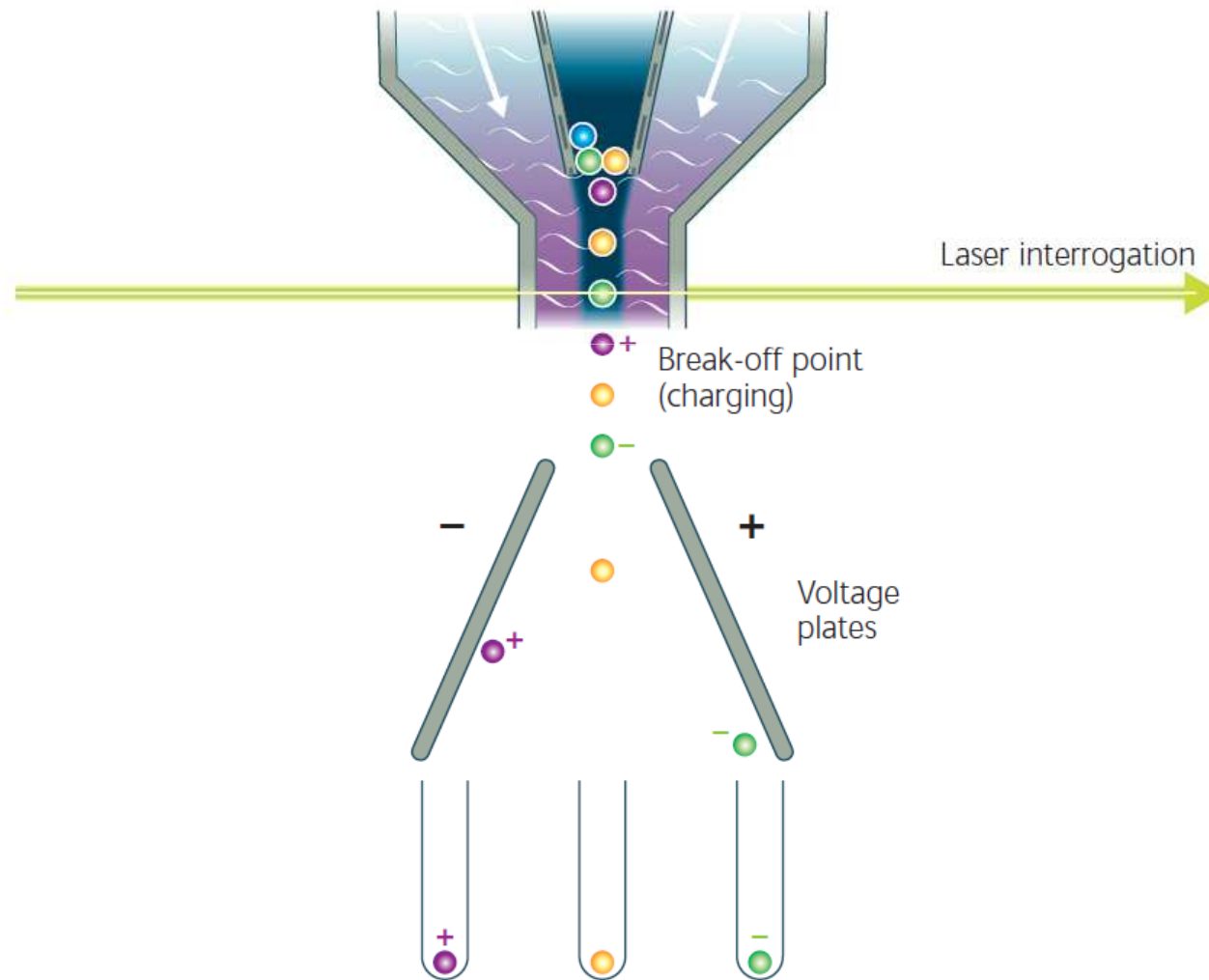
Solubilis paraméterek (citokinszintek) mérése



ELISA vs. FACS citokinszint mérése



Sejtizolálás - sorting



Minta

Csontvelő: legalább 3 ml javasolt.

Heparinos fecskendőbe való vétel esetén: azonnal a laborba küldeni (20-25°C)

, Éjszakára: RPMI oldatba kell tenni és hűteni

Perifériás vérminta (20-25°C)

ACD (72 óra)

Na Heparin (48 óra)

K2-K3EDTA (30 óra)

Liquor (CSF): sterilen kell venni; (2-8°C) azonnal a laborba kell vinni

Minta feldolgozása

- Izolálás
 - Ficoll-gradiens fugálás (PBMC = peripheral blood mononuclear cells)
 - Mágneses gyöngy
 - Szöveteknél emésztés
 - Speciális eszközzel egy sejt méretre darabolás
 - Lyse – no wash technika (EDTAs vér!)

Minta feldolgozása

- **Festés**

- Megfelelő minőségű, mennyiségű jelzett antitesttel inkubálás (fényérzékenyek!)
- Izotípus-kontroll használata (aspecifikus kötődés kimutatására)
- Szükség esetén: permeabilizálás

- **Fixálás**

- formaldehiddel

Előnyök

- Nagy sebességű elemzés
- Egyedi sejtek mérése
- Nagy számú adat
- Többféle paraméter egyidejű elemzése
- Ritka események detektálása
- Fluoreszcens intenzitás alapján kvantitatív mérés
- Előre meghatározott sejtípusok kiválasztása

Hátrányok

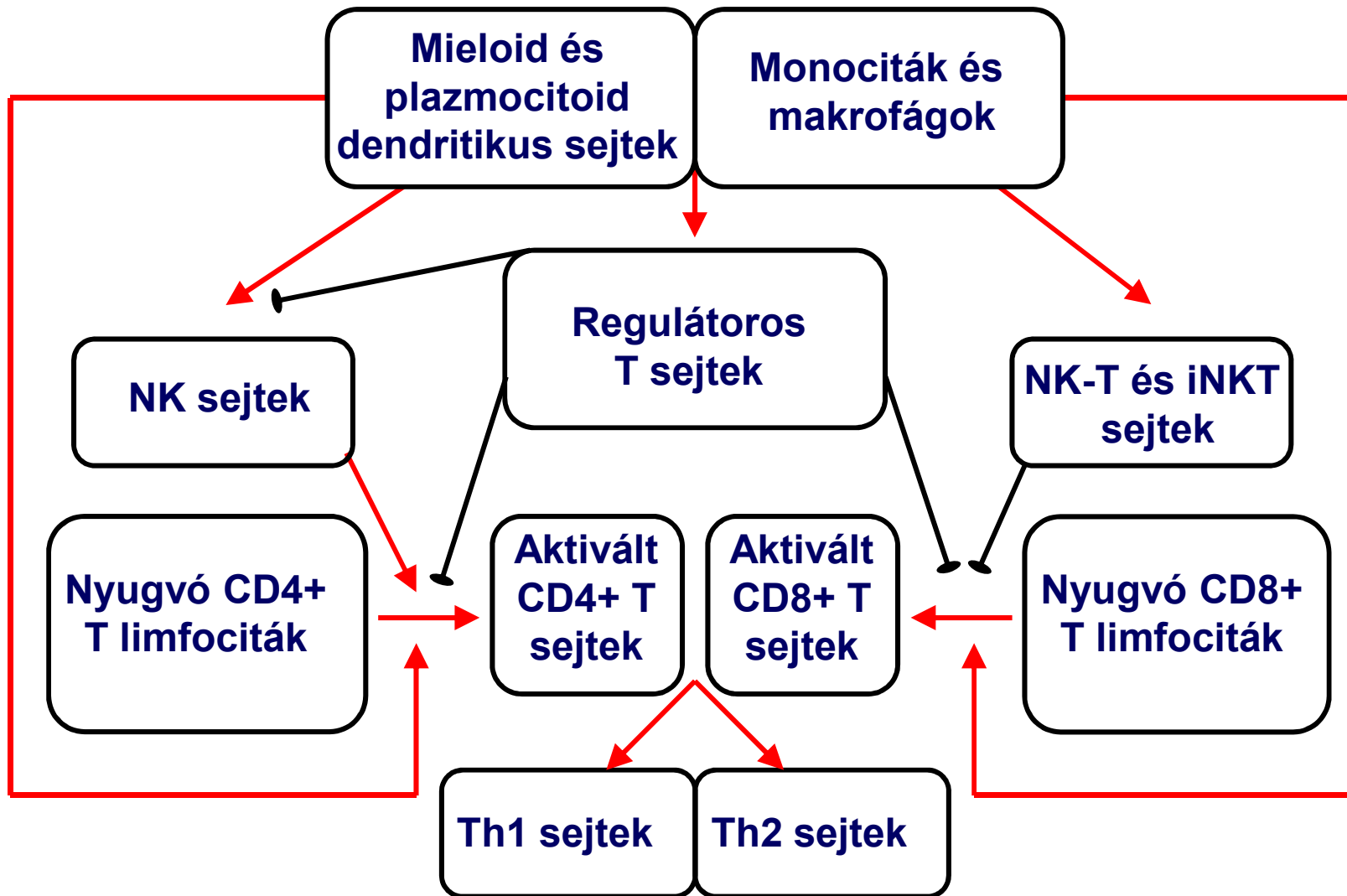
- Drága és összetett műszerek
- Szöveti szerkezet megszűnése
- Intracelluláris megoszlásra vonatkozóan korlátozott adat

Kutatás –
a rutin diagnosztikán túl

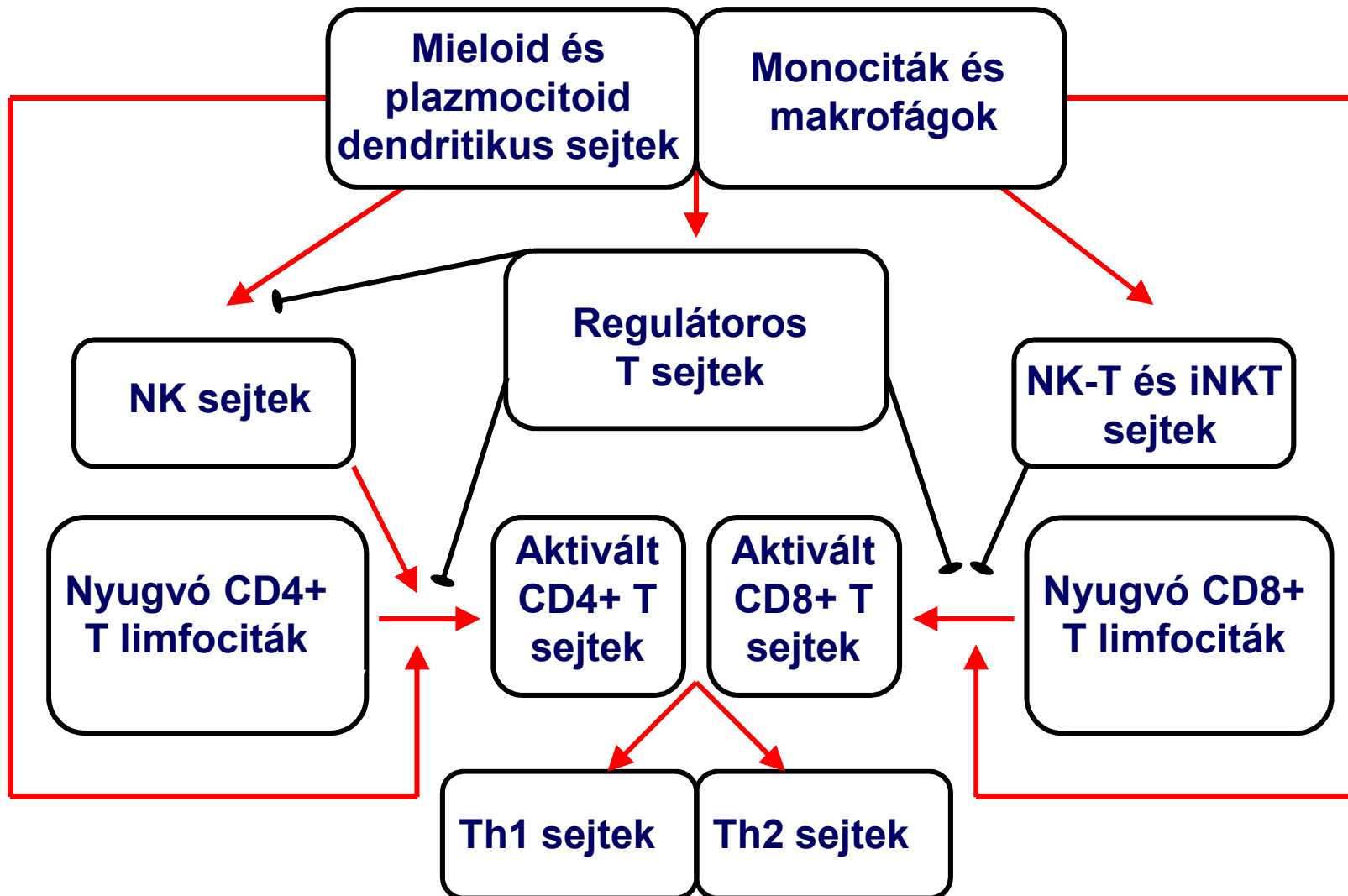
Saját vizsgálatok

Immunfenotipizálás

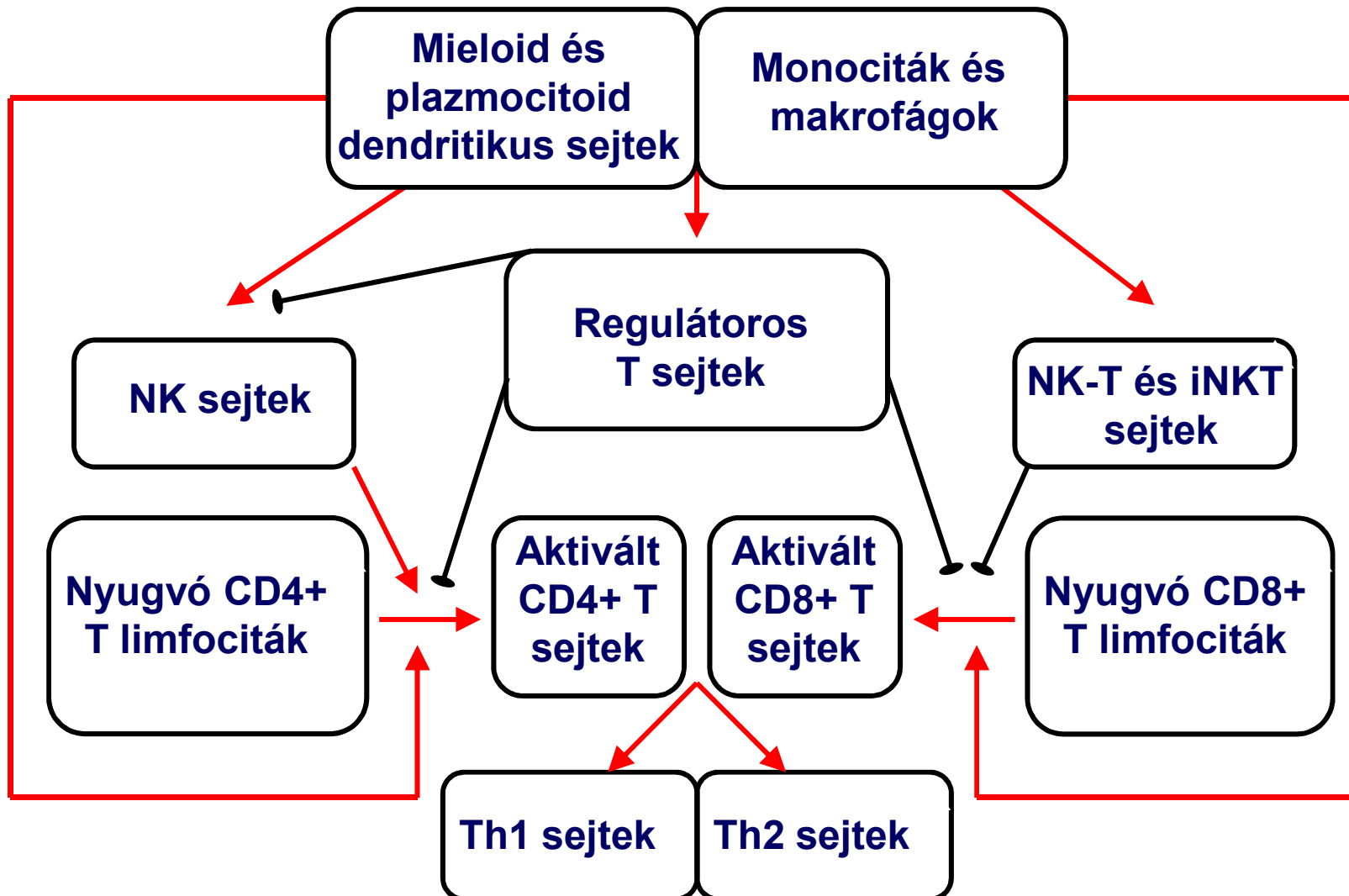
- Szerzett immunitás: regulátoros T sejtek és sejtes környezetük
- regulátoros T sejtek: immunválaszt kontrollálják
- Ha számuk csökken: autoimmunitás
- Ha számuk nő: immunszupprimált állapot



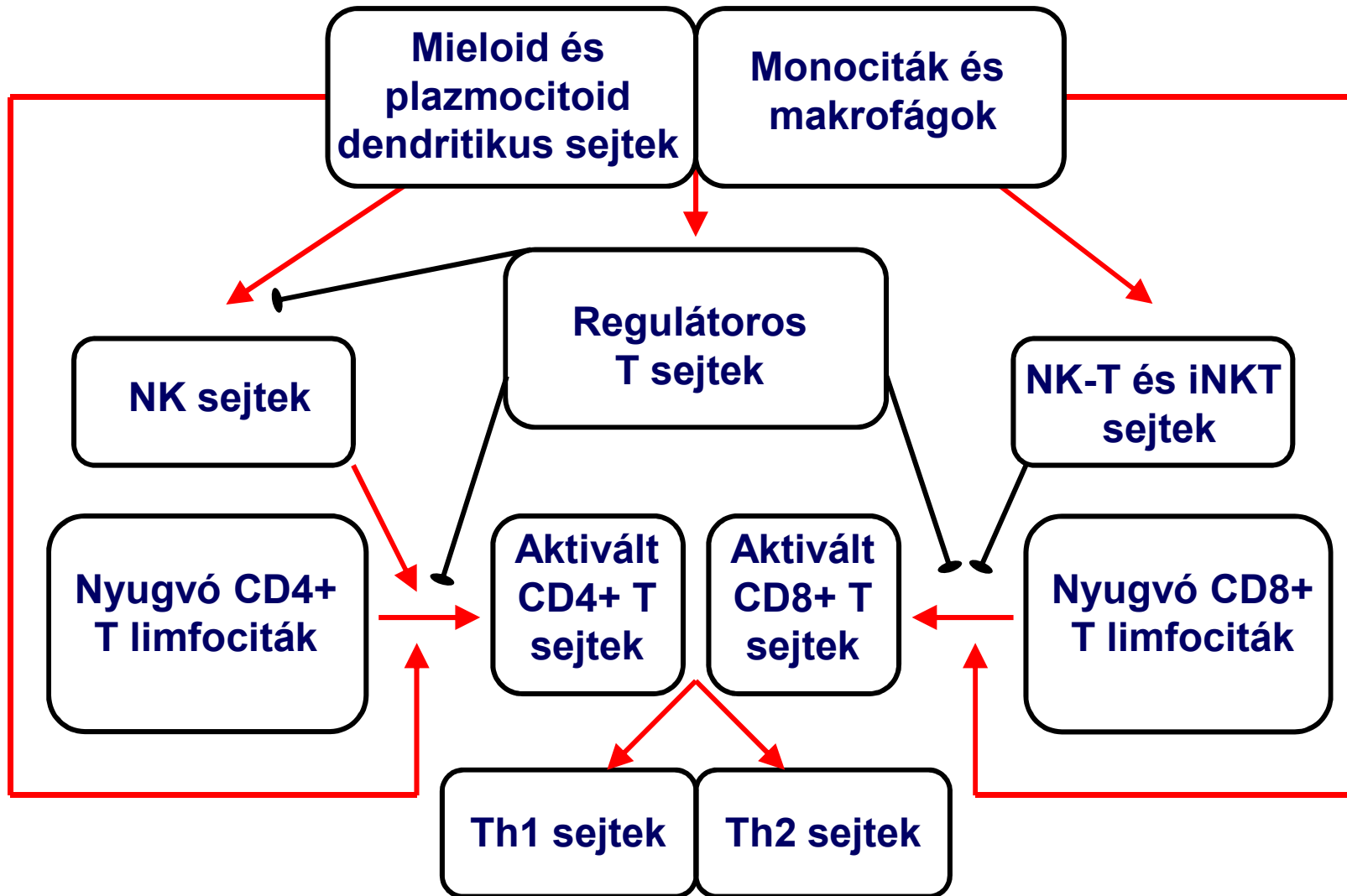
Preeklampszia



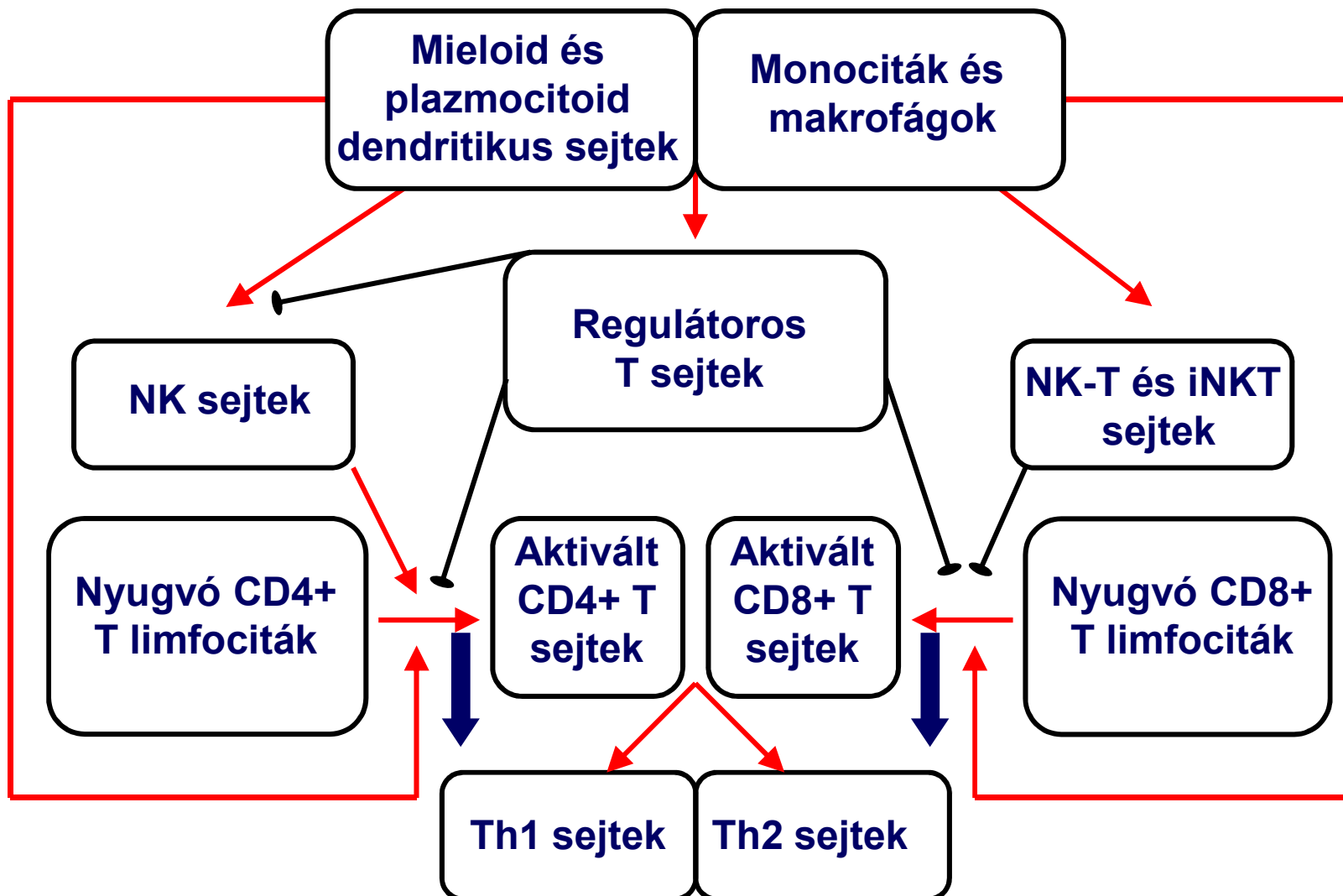
Hematokézia



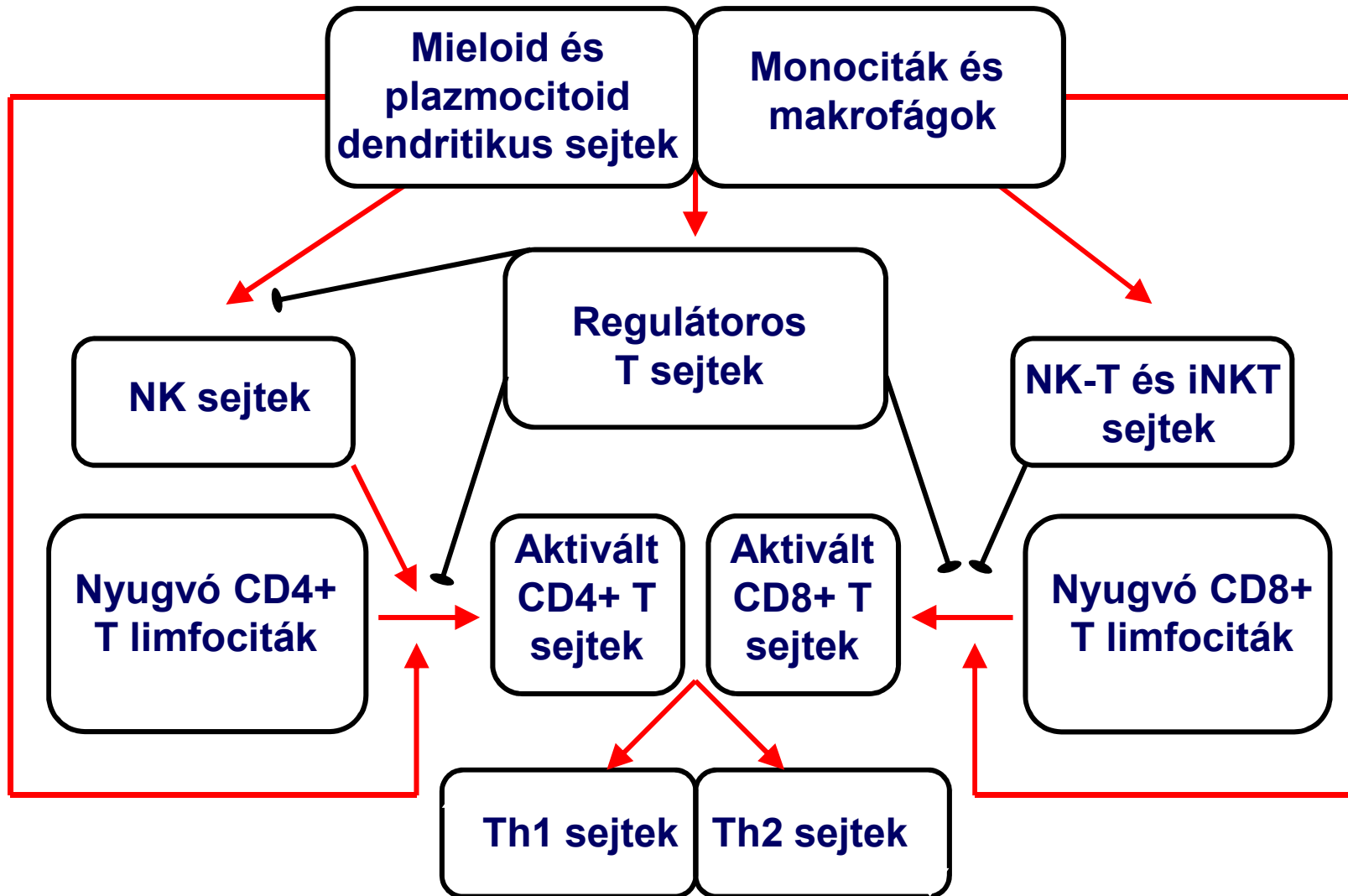
Migrén



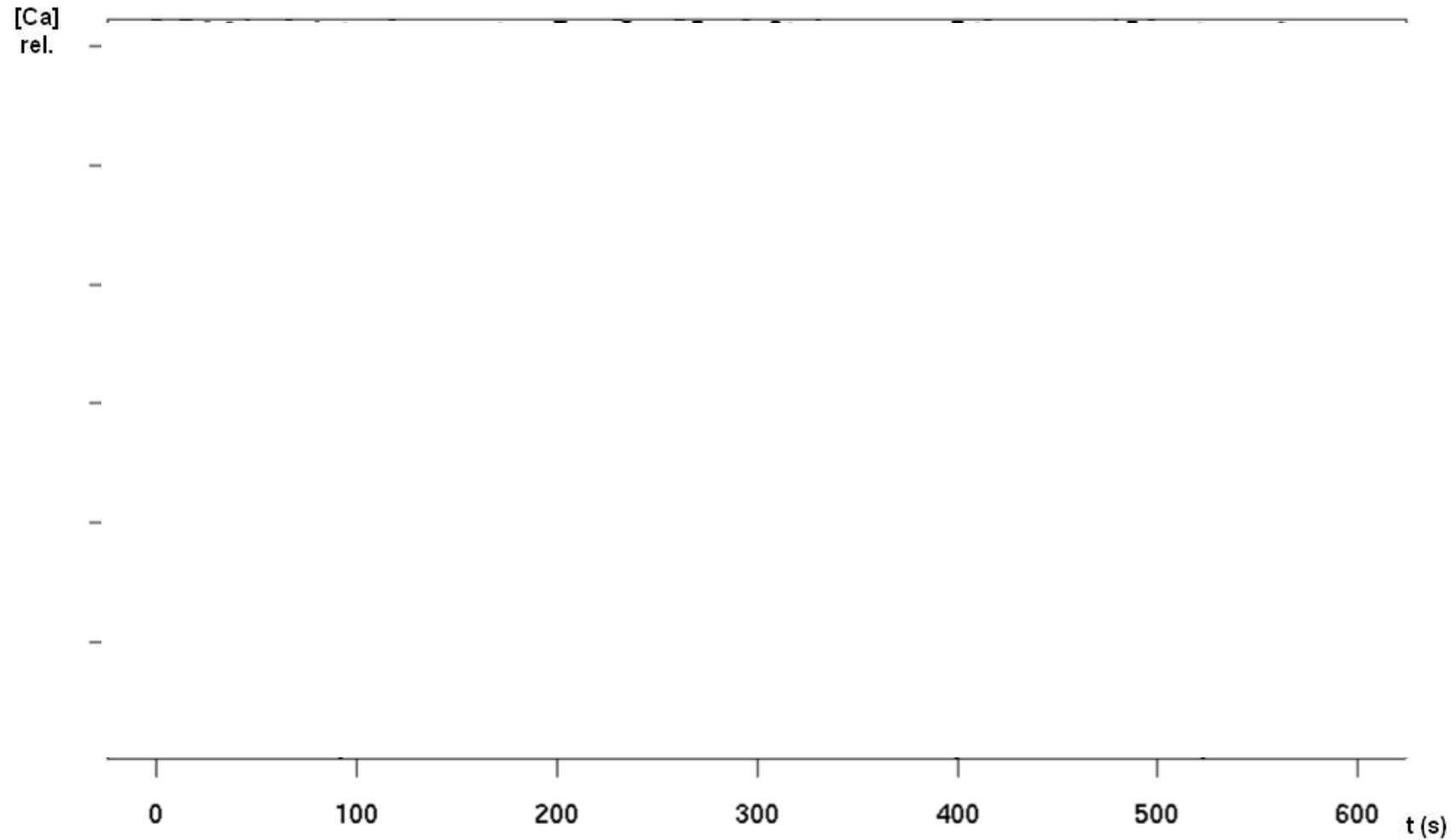
Anorexia nervosa



Obezitás



Kinetikus áramlási citometriás mérés – kalcium jel



Kutatócsoportunk által fejlesztett szoftver kinetikus áramlási citométeres adatok értékelésére



FacsKin
Kinetic Analysis of Flow Cytometry Data

My account Log out

Current version of FacsKin:
0.5.8 (released on 31 Aug 2011)

Welcome

FacsKin is a software for the kinetic analysis of flow-cytometry acquired data. Applications include **intracellular processes** such as calcium flux measurements, generation of intracellular free radicals etc. At the current stage of development you are **welcome to use FacsKin**. Following a [simple online registration process](#) you can **download** the beta version of FacsKin from this website and use it for the analysis of your data.

[What is this all about?](#)

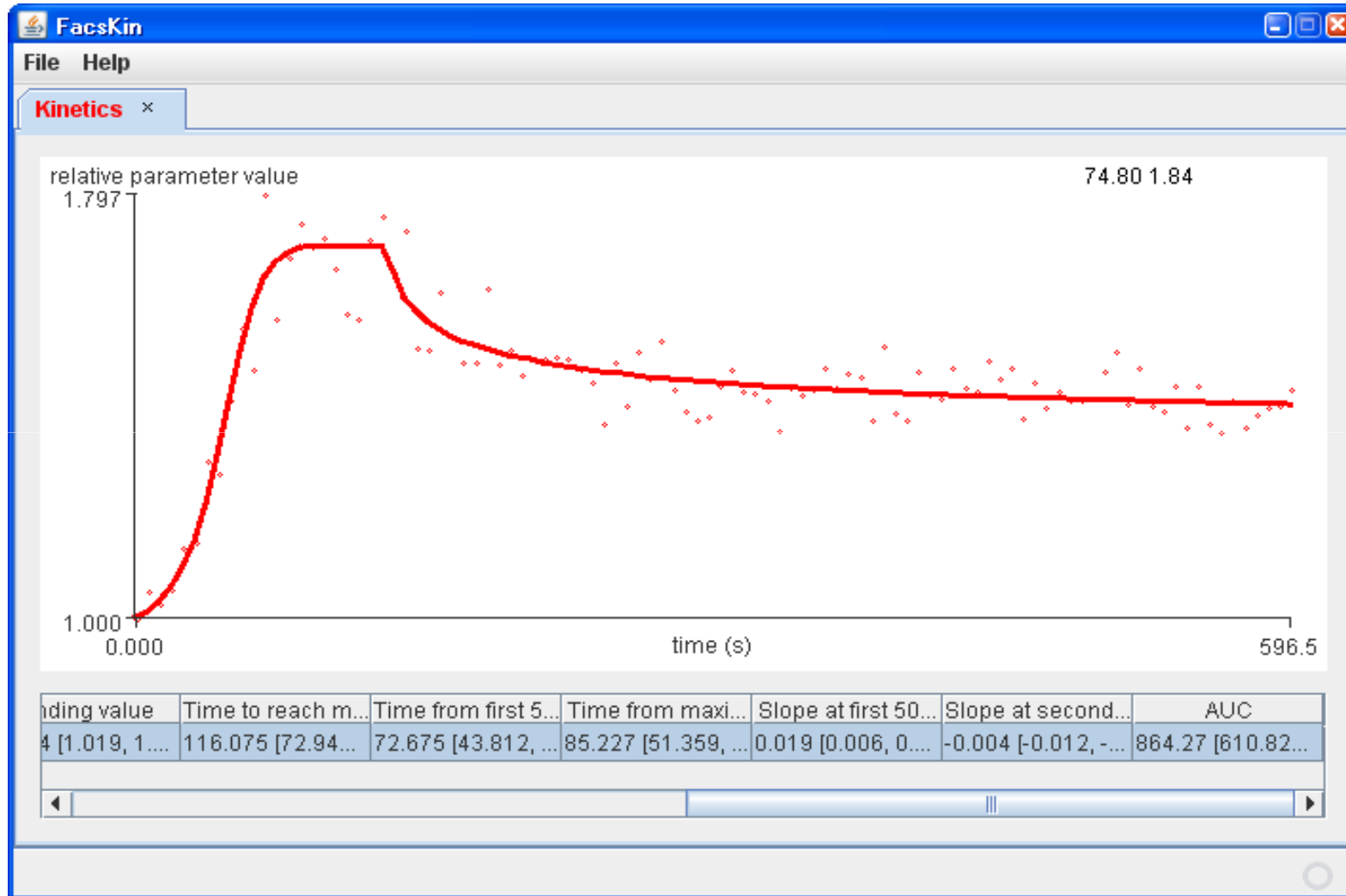
Short **introduction** to using FacsKin

Download FacsKin

www.facskin.com

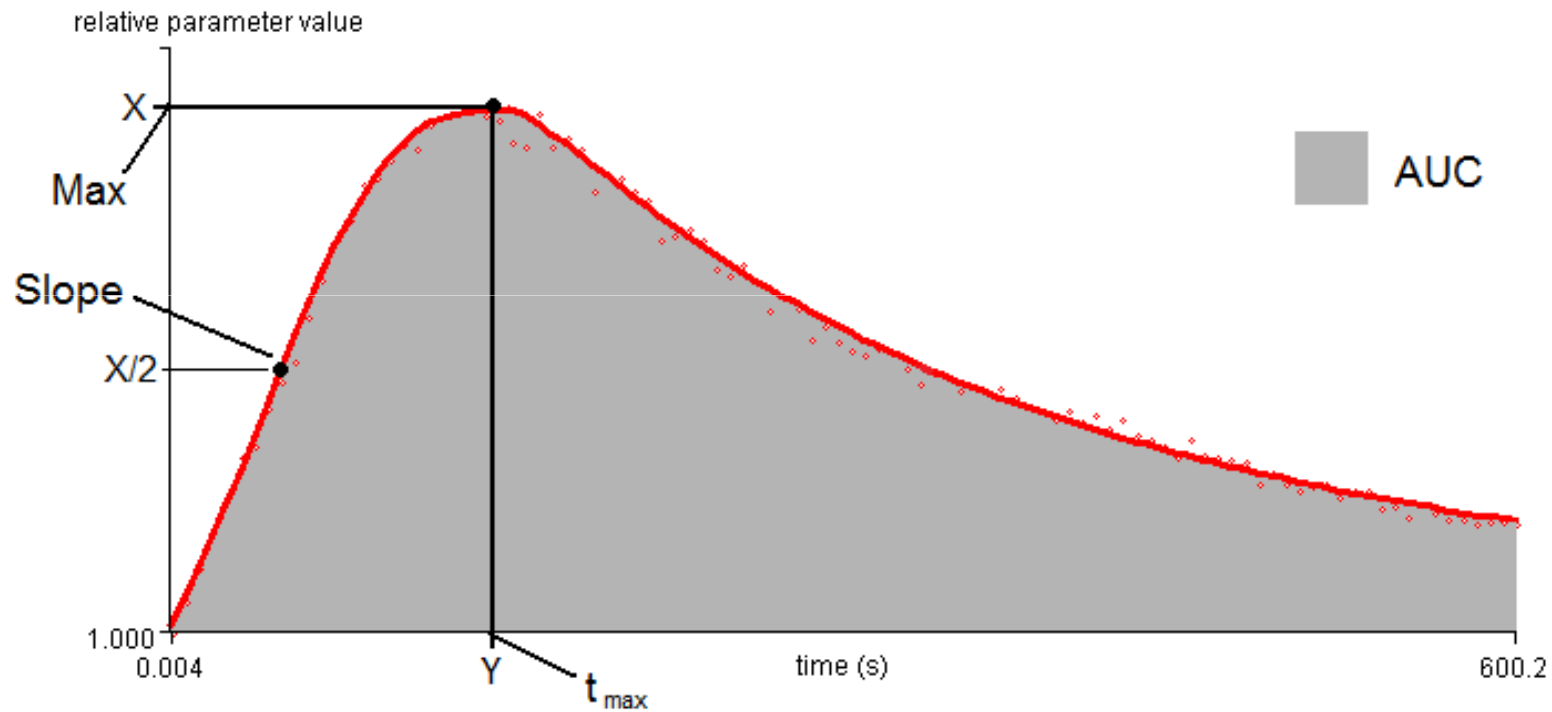
[Cytometry A](#). 2008 Mar;73(3):246-53.

FacsKin

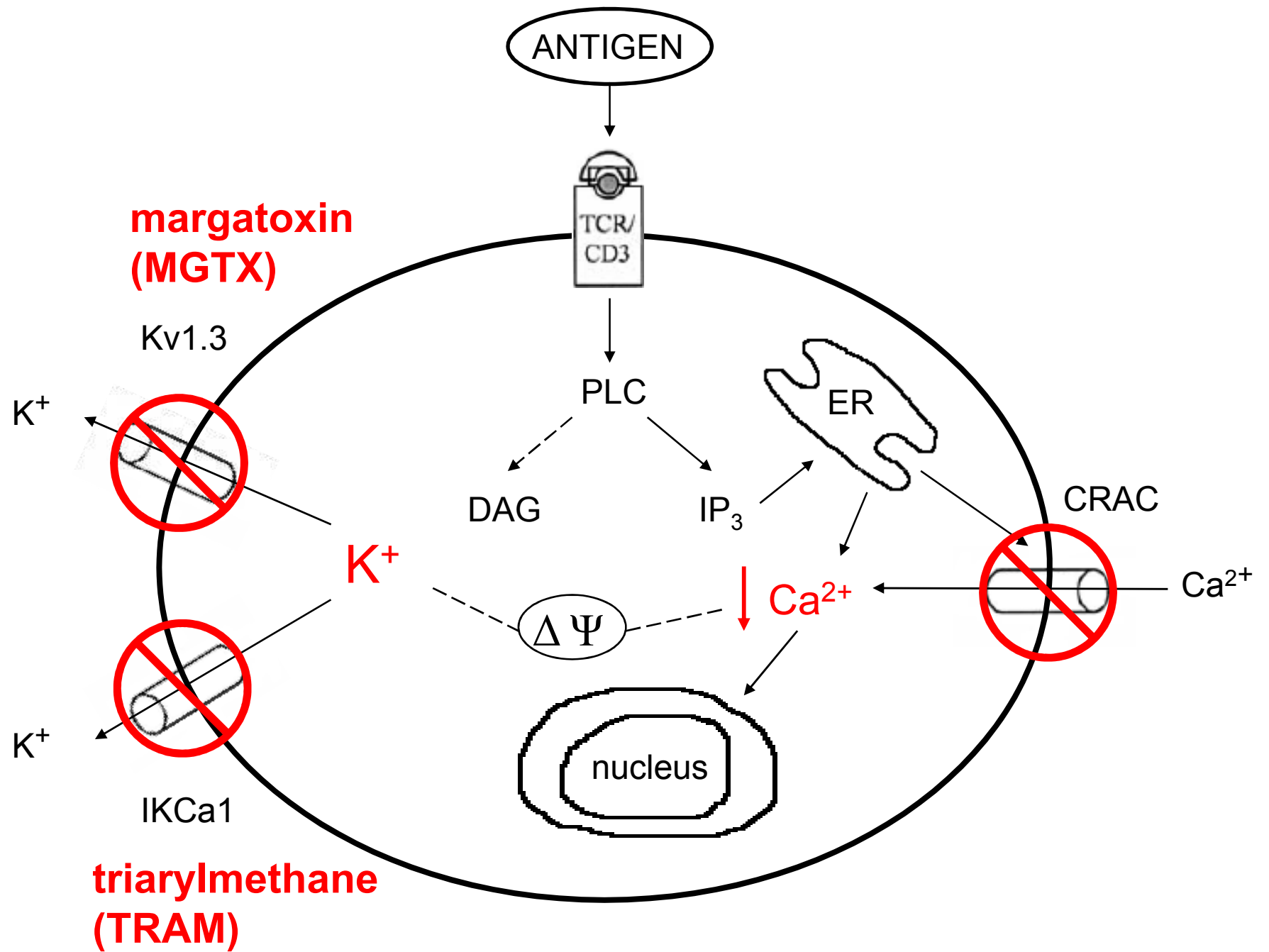


Függvény illesztése

Vizsgált paraméterek



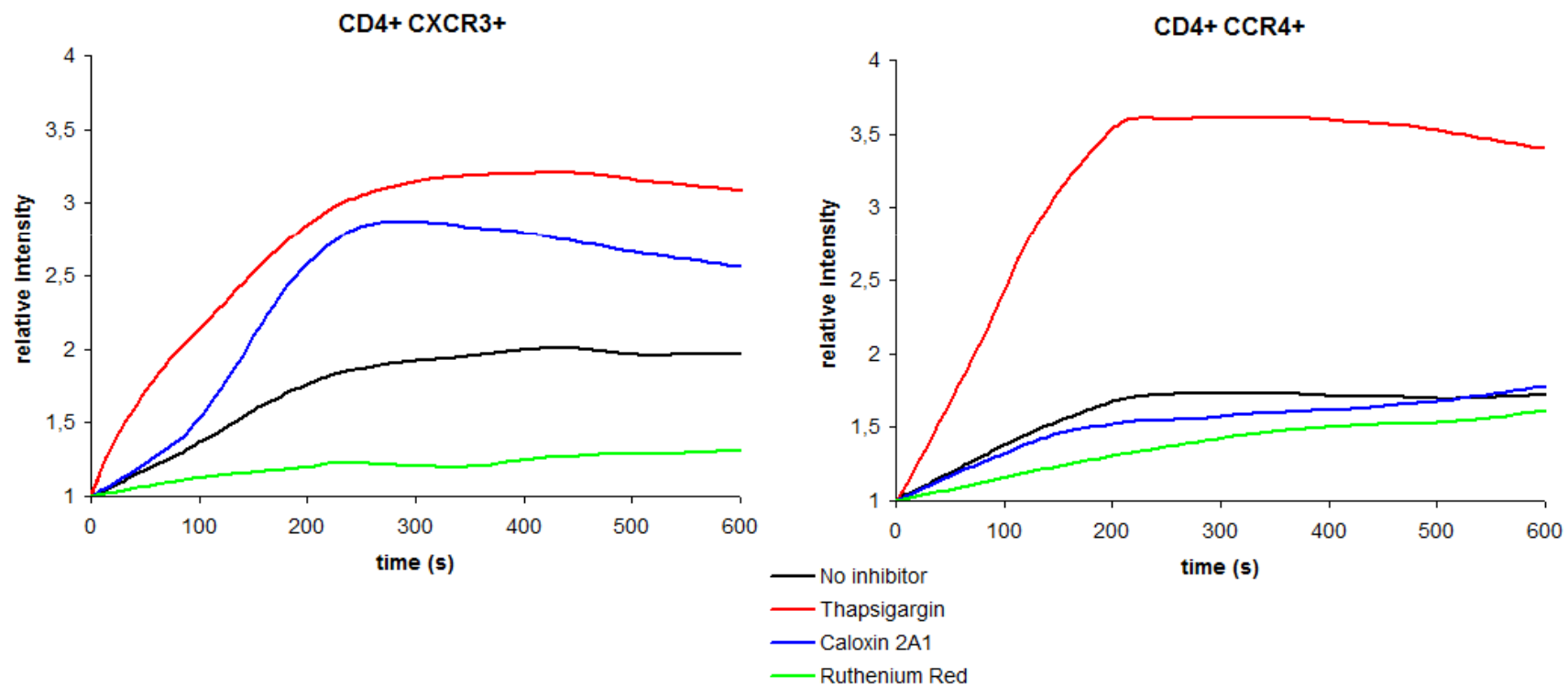
AUC, maximum érték, meredekség,



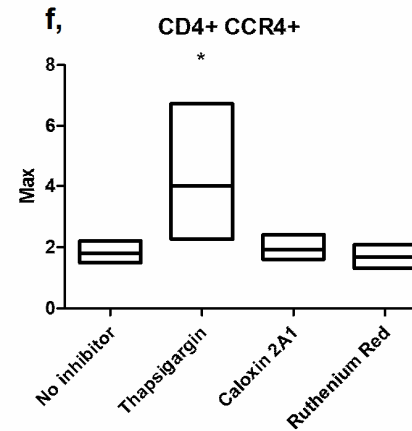
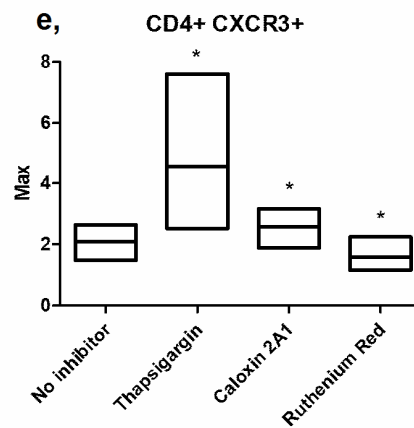
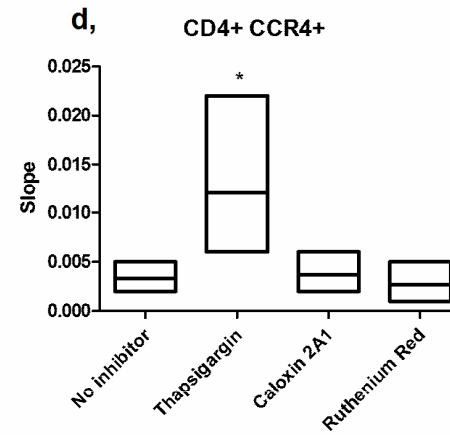
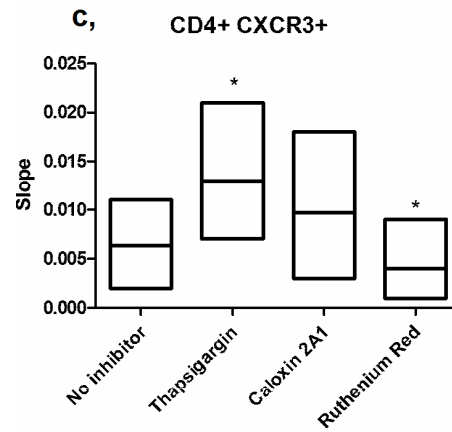
		No inhibitor			MGTX (60 nM)			TRAM (60 nM)		
Subset		Healthy	Without IFN b	With IFN b	Healthy	Without IFN b	With IFN b	Healthy	Without IFN b	With IFN b
C D 4 +	AUC (U)	785 [738-867]	740 [719-863]	736 [695-756]	90% ^c [83-93%]	93% ^d [89-96%]	90% ^e [89-93%]	93% ^c [89-98%]	92% ^d [82-94%]	93% ^e [90-95%]
	Max (rpv)	1.377 [1.228-1.634]	1.318 [1.267-1.683]	1.179 [1.165-1.378]	95% ^c [84-102%]	90% ^d [80-94%]	86% ^e [80-87%]	99% ^c [91-107%]	90% ^d [78-94%]	89% ^e [83-91%]
	t _{max} (s)	416 [261-504]	201 ^a [169-251]	284 [166-413]	90% ^c [42-184%]	102% ^d [93-126%]	98% ^e [58-104%]	118% ^c [89-135%]	94% ^d [64-121%]	100% ^e [39-110%]
C D 4 + C X C R 3+	AUC (U)	868 [781-1002]	872 [800-1106]	738 [733-753]	90% ^c [84-93%]	90% ^d [74-93%]	92% ^e [90-95%]	86% ^c [85-93%]	91% ^d [82-96%]	98% ^e [91-99%]
	Max (rpv)	1.588 [1.333-1.931]	1.564 [1.392-2.101]	1.303 [1.181-1.349]	87% ^c [82-93%]	86% ^d [72-96%]	88% ^e [73-88%]	89% ^c [79-94%]	87% ^d [81-94%]	99% ^e [95-99%]
	t _{max} (s)	353 [227-486]	184 ^a [137-241]	414 ^b [386-566]	118% ^c [66-162%]	167% ^d [78-324%]	109% ^e [104-192%]	107% ^c [82-221%]	115% ^d [72-224%]	86% ^e [76-100%]
C D 4 + C C R 4 +	AUC (U)	777 [752-854]	808 [754-840]	718 [695-885]	87% ^c [86-93%]	88% ^d [86-91%]	85% ^e [85-91%]	92% ^c [88-94%]	90% ^d [86-93%]	89% ^e [84-93%]
	Max (rpv)	1.460 [1.258-1.546]	1.535 [1.330-1.611]	1.204 [1.076-1.383]	88% ^c [81-90%]	88% ^d [81-93%]	89% ^e [74-96%]	88% ^c [86-98%]	87% ^d [80-88%]	92% ^e [87-100%]
	t _{max} (s)	393 [228-536]	189 ^a [163-438]	254 [248-316]	110% ^c [100-174%]	118% ^d [95-169%]	125% ^e [37-171%]	134% ^c [117-174%]	101% ^d [69-127%]	66% ^e [13-95%]
C D 8 +	AUC (U)	831 [727-950]	840 [738-996]	727 [680-753]	92% ^c [87-98%]	83% ^d [79-93%]	93% ^e [91-95%]	86% ^c [82-91%]	90% ^d [86-95%]	95% ^e [93-96%]
	Max (rpv)	1.462 [1.260-2.041]	1.709 [1.336-1.899]	1.194 [1.154-1.349]	92% ^c [87-97%]	86% ^d [75-89%]	87% ^e [74-88%]	84% ^c [69-89%]	85% ^d [82-93%]	91% ^e [89-99%]
	t _{max} (s)	326 [205-478]	364 [265-503]	439 [338-566]	84% ^c [68-125%]	63% ^d [47-103%]	88% ^e [68-98%]	108% ^c [68-156%]	91% ^d [56-123%]	77% ^e [77-95%]

MIRE HASZNÁLTUK EDDIG?

Eredmények: Th1 vs. Th2

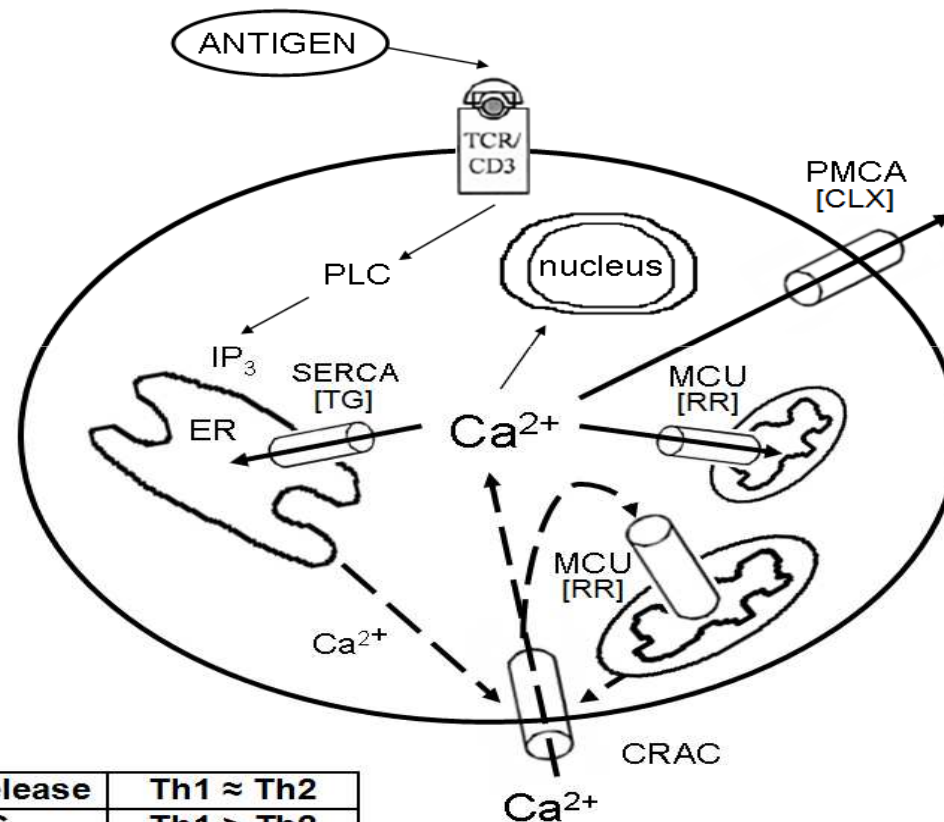


Eredmények: Th1 vs. Th2



* $p < 0.05$ vs. No inhibitor

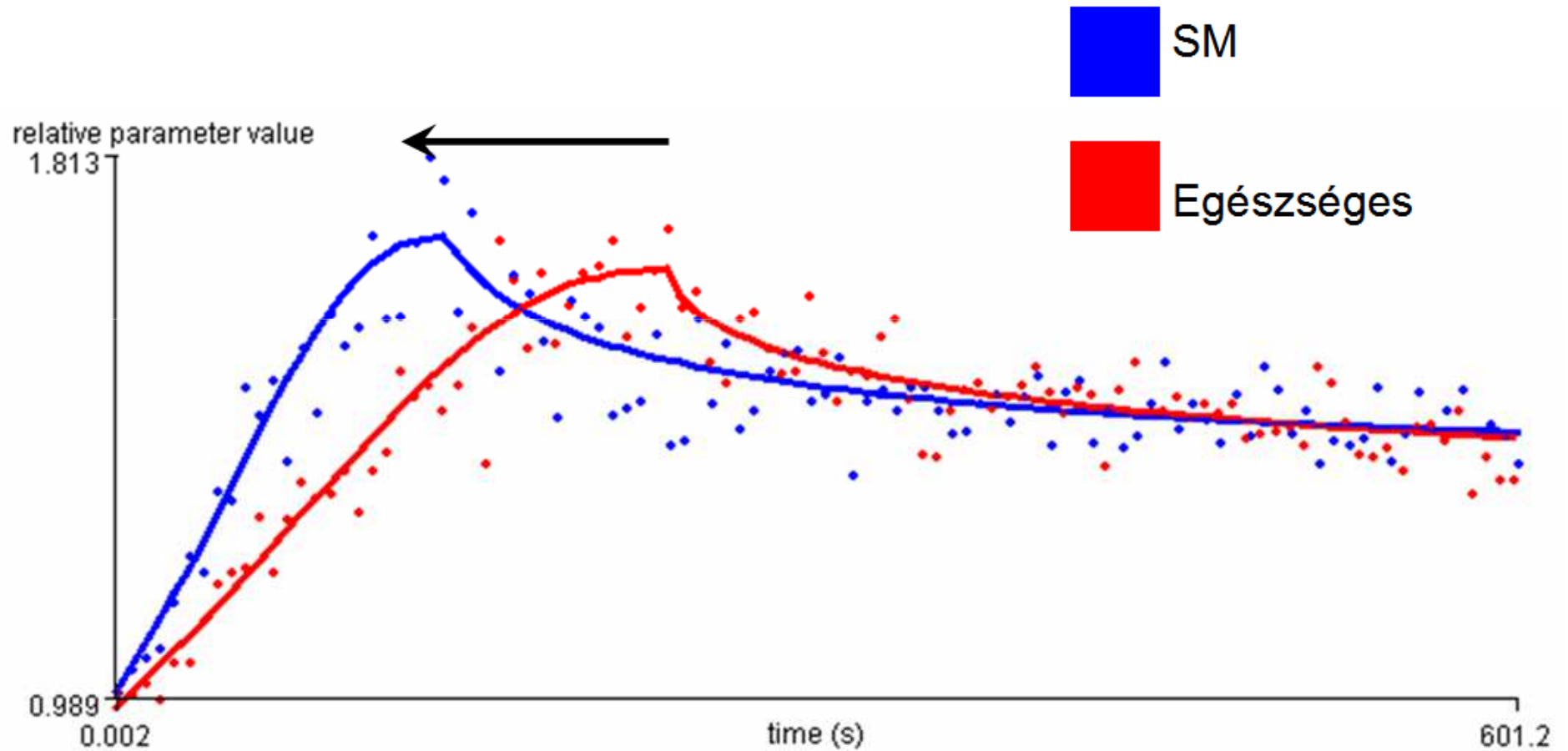
Markáns különbségek a Th1 és a Th2 sejtek kalciumszignáljában



ER Ca ²⁺ release	Th1 ≈ Th2
CRAC	Th1 > Th2
MCU	Th1 > Th2
SERCA	Th1 < Th2
PMCA	Th1 > Th2

Kalciumflux,
kálium csatornák
autoimmun betegségek

Sclerosis multiplex

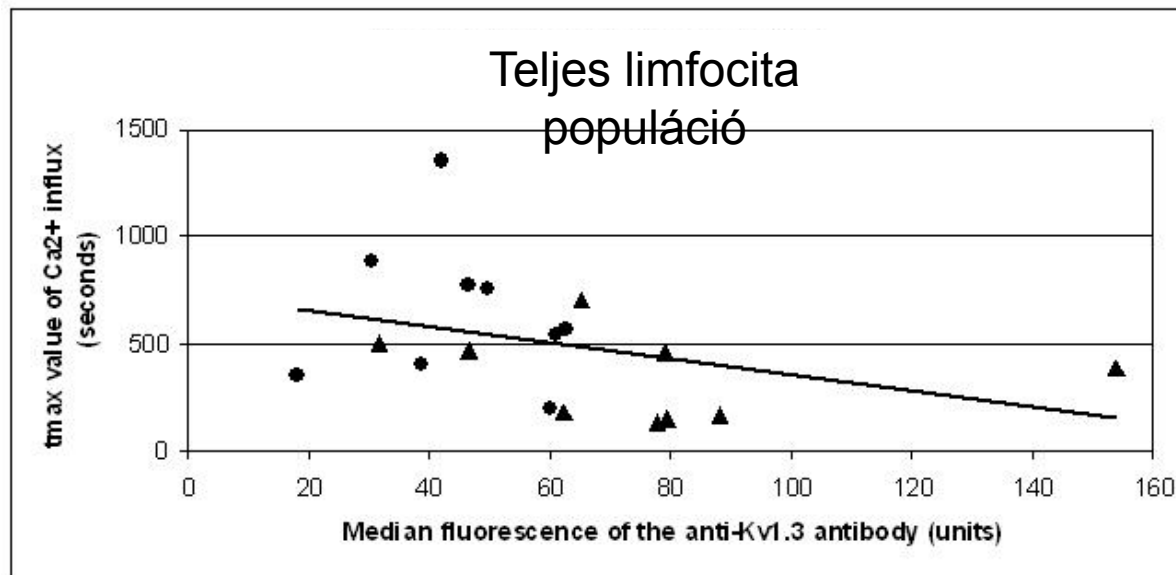


A limfocita kálium csatornák 1-es típusú diabetesben

- A t_{\max} érték alacsonyabb T1DM-ben
- T1DM-ben a limfociták érzékenyebbek a Kv1.3 csatornák gátlására
- T1DM-ben a MGTX minden vizsgált altípusban hasonló mértékben csökkentette a limfocita aktiváció mértékét, a TRAM azonban csak CD4 sejtekben

A limfocita kálium csatornák 1-es típusú diabetesben

- A Th1 sejtek esetén és a teljes limfocita populációt vizsgálva fokozott a Kv1.3 csatorna expressziója T1DM-ben
- Ennek szerepe lehet a fokozott reaktivításban



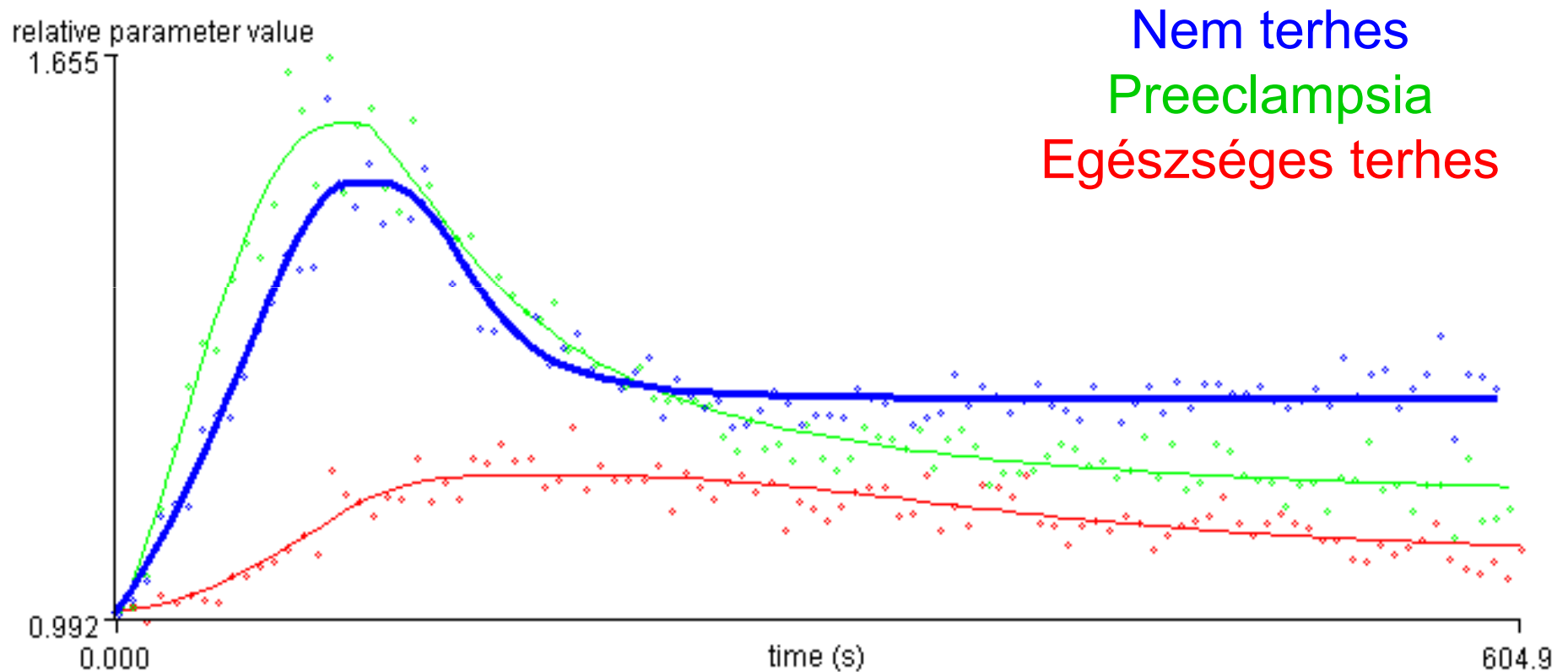
$$r = -0.59$$

$$p = 0.01$$

● egészs.

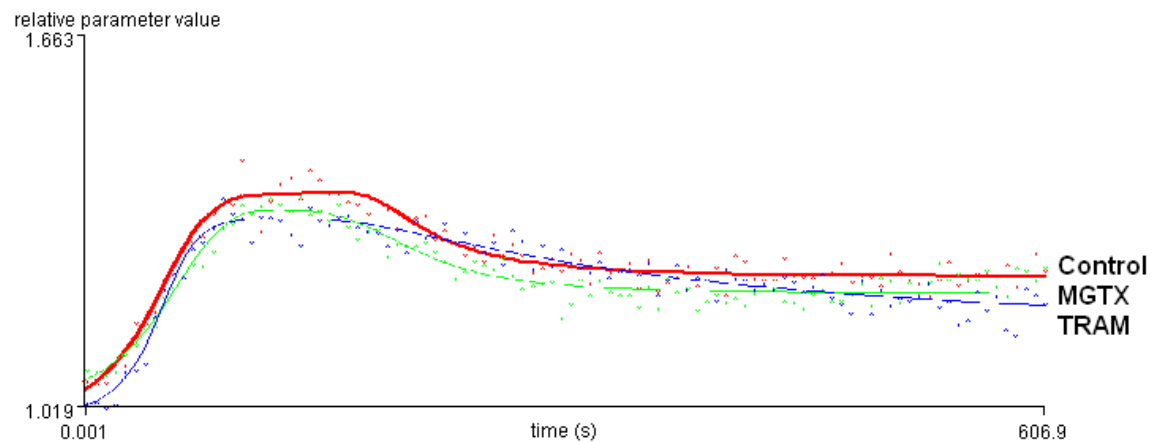
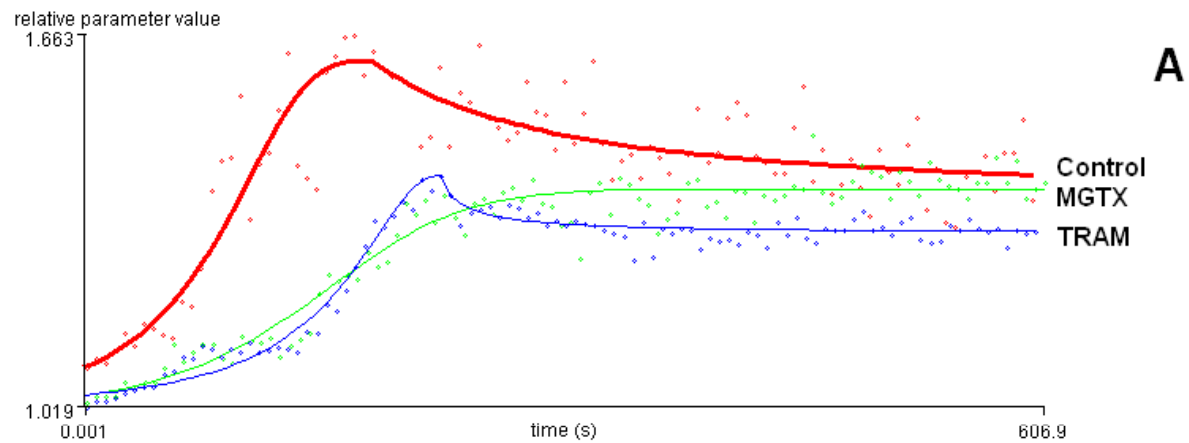
▲ T1DM

A limfocita kálium csatornák egészséges terhességben és preeclampsziában



Kalcium beáramlás a Th1 sejttípusban

Felnöttek vs. Újszülöttek



Az egyéb intracelluláris paraméterek meghódítása

Új módszer: **Simultaneous Monitoring of Intracellular Processes (SMIP-technika)**

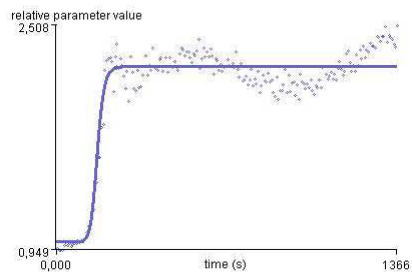
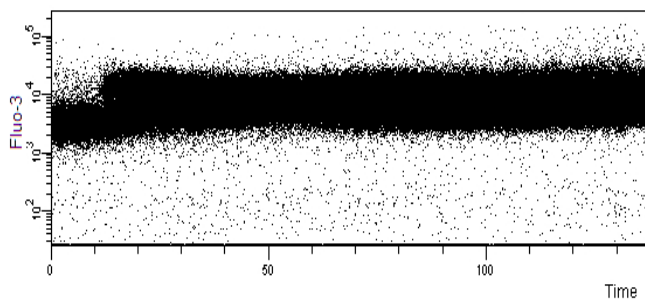
Két rendszer: CD4+ és CD8+ limfocitákban

SMIP-1

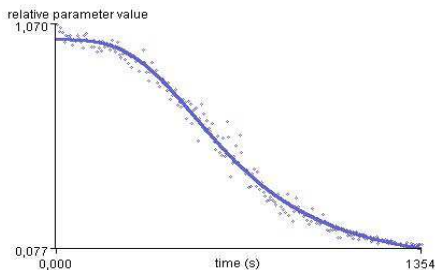
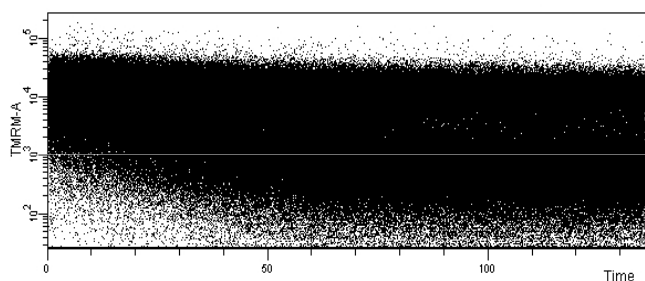
- kalcium szint (**Fluo-3**)
- mitokondriális membránpotenciál (**TMRM**)
- ROS képződés (**HE**)

SMIP-2

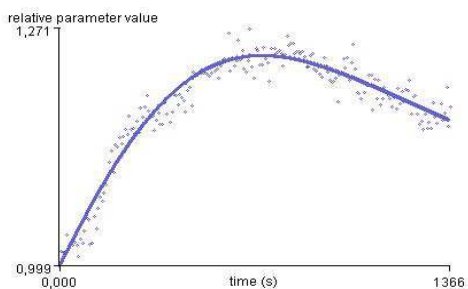
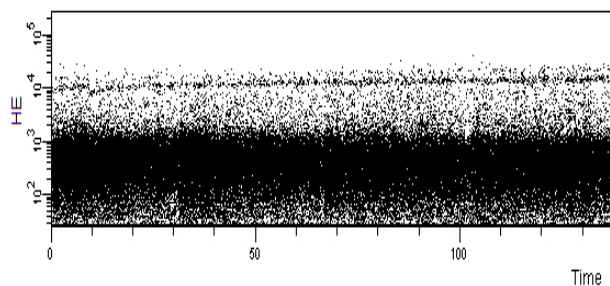
- nitrogén-monoxid (NO) (**DAF-FM**)
- mitokondriális kalcium szint (**Rhod2**)
- sejtmembrán-potenciál (**DiBAC₄(5)**)



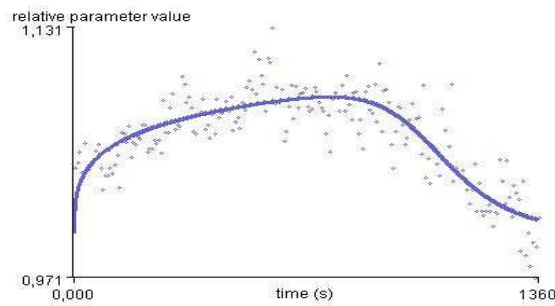
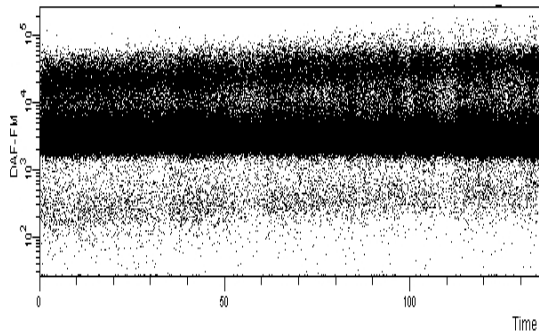
	Kezdeti érték (átlag ±SD)	Maximum érték (átlag ±SD)	Az első 50%-os érték elérésének ideje másodpercben (átlag ±SD)	Meredekség az első 50%-os értéknél (átlag ±SD)
Kalcium szint	1,0 ± 0,006	2,222 ± 0,004	164,446 ± 1,564	0,022 ± 0,002



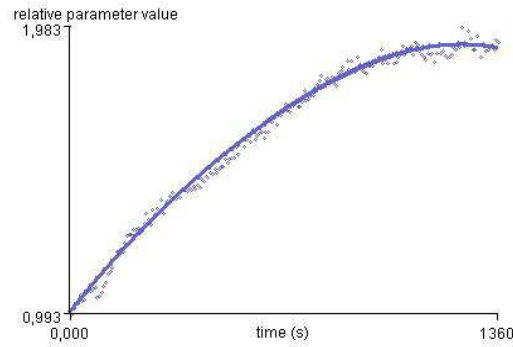
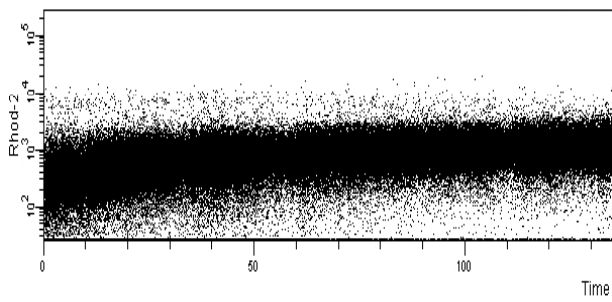
	Kezdeti érték (átlag ±SD)	Maximum érték (átlag ±SD)	Az első 50%-os érték elérésének ideje másodpercben (átlag ±SD)	Meredekség az első 50%-os értéknél (átlag ±SD)
Mitochondrium potenciál	1,0 ± 0,004	-	-	-



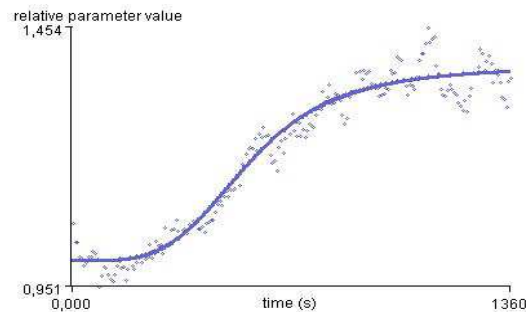
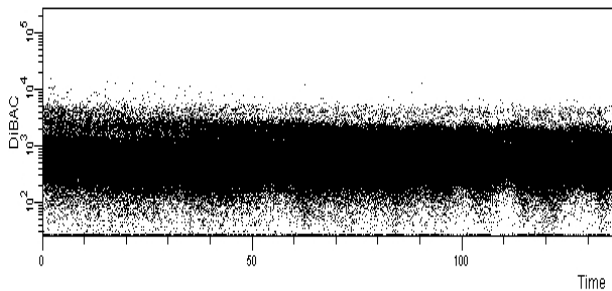
	Kezdeti érték (átlag ±SD)	Maximum érték (átlag ±SD)	Az első 50%-os érték elérésének ideje másodpercben (átlag ±SD)	Meredekség az első 50%-os értéknél (átlag ±SD)
ROS képződés	1,0 ± 0,004	1,239 ± 0,001	204,564 ± 6,146	0,001 ± 0,0



	Kezdeti érték (átlag ±SD)	Maximum érték (átlag ±SD)	Az első 50%-os érték elérésének ideje másodpercben (átlag ±SD)	Merekség az első 50%-os értéknél (átlag ±SD)
NO képződés	1,0 ± 0,004	1,087 ± 0,001	51,356 ± 13,053	0,0 ± 0,0



	Kezdeti érték (átlag ±SD)	Maximum érték (átlag ±SD)	Az első 50%-os érték elérésének ideje másodpercben (átlag ±SD)	Merekség az első 50%-os értéknél (átlag ±SD)
Mitochondrium kalcium szint	1,0 ± 0,004	1,92 ± 0,003	400,597 ± 3,282	0,001 ± 0,0



	Kezdeti érték (átlag ±SD)	Maximum érték (átlag ±SD)	Az első 50%-os érték elérésének ideje másodpercben (átlag ±SD)	Merekség az első 50%-os értéknél (átlag ±SD)
Sejtmembrá -potenciál	1,0 ± 0,003	1,239 ± 0,003	330,066 ± 6,284	0,001 ± 0,0

Távlatok

Egyidejűleg

- 4, sejtfelszíni marker alapján azonosított sejtcsoporton
- 3 intracelluláris paraméter monitorozása
- Sejtek közötti interakciók objektív jellemzése