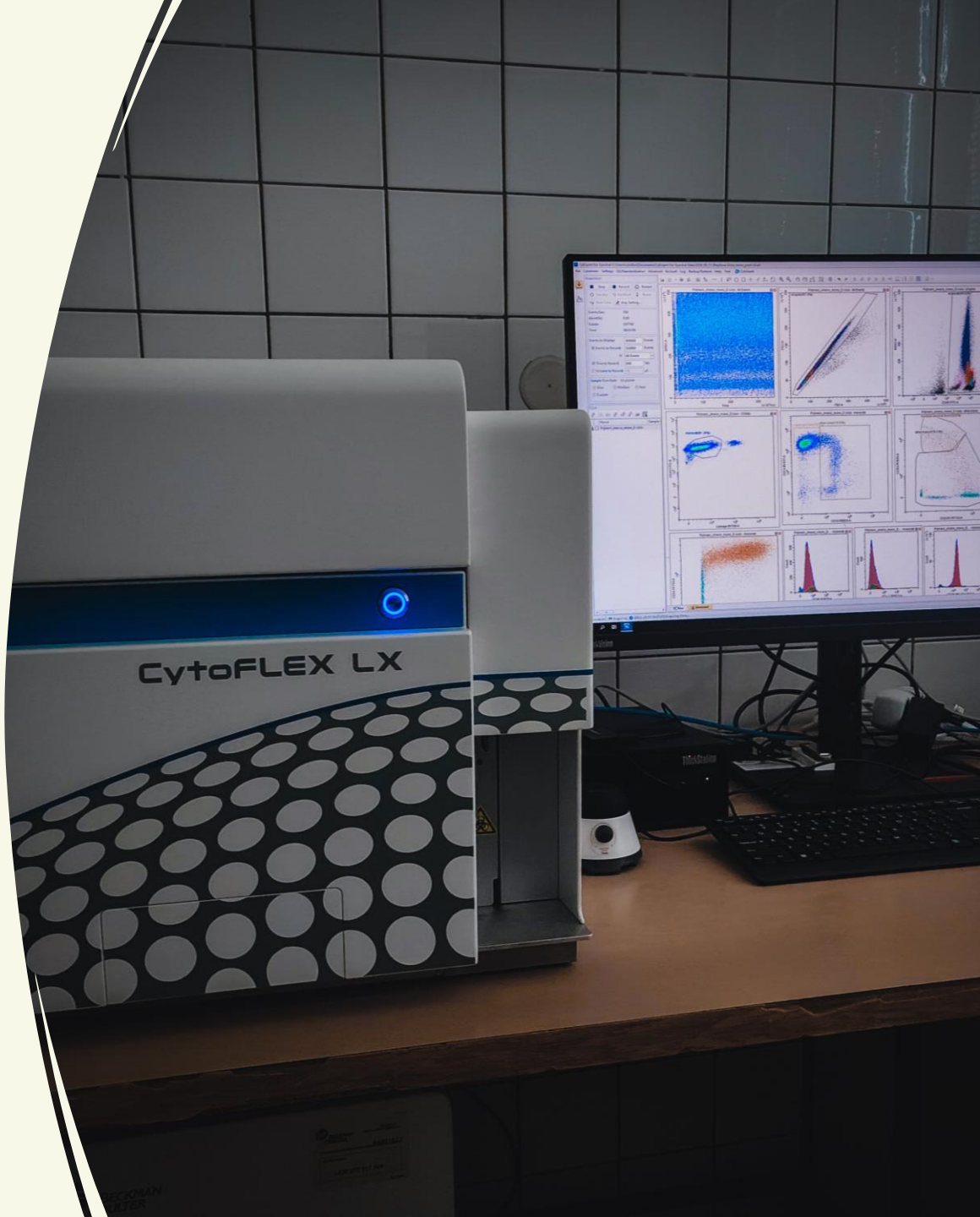
CytoFLEX mosaic v praxi

Zavedení a využití imunofenotypizačních panelů

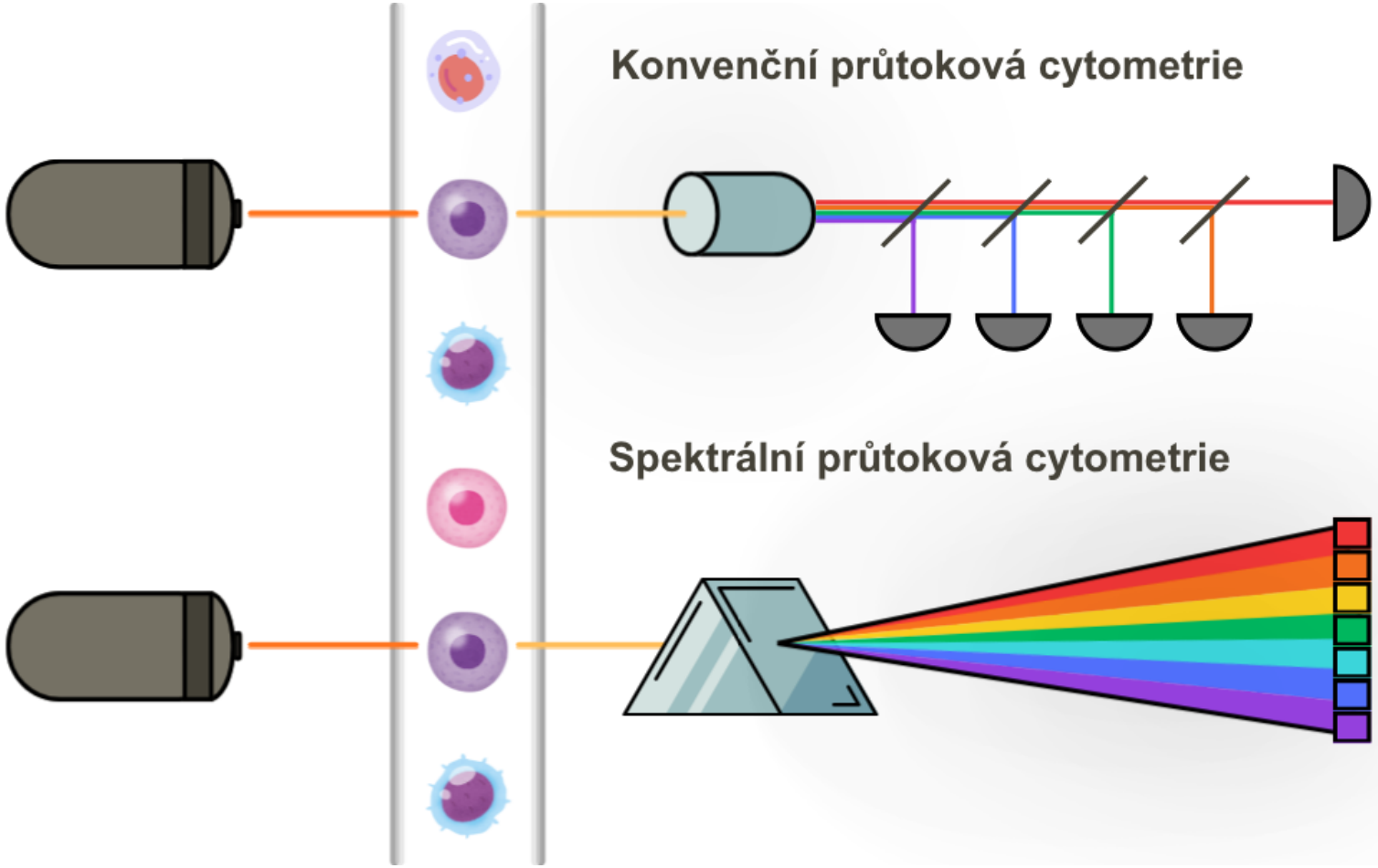
RNDr. Aneta Houfková, Ph.D.

Ústav klinické imunologie a alergologie

Fakultní nemocnice Hradec Králové



Spektrální průtoková cytometrie



- **optika:** band-pass filtry a zrcadla
- **detekce:** pouze vybrané vlnové délky
- **výsledek:** ztráta nedetekované spektrální informace

- **optika:** disperzní prvek
- **měření:** souvislé pole detektorů
- **výsledek:** spektrální profil v měřeném rozsahu

Výhody spektrální cytometrie

- větší kapacita panelů
- detekce překrývajících se fluorochromů
- extrakce autofluorescence
- spolehlivější matematický unmixing bez nutnosti manuálních kompenzací
- maximální datová výtěžnost z limitovaných biologických vzorků

Náš spektrální cytometr

CytoFLEX LX mosaic 63

4 lasery

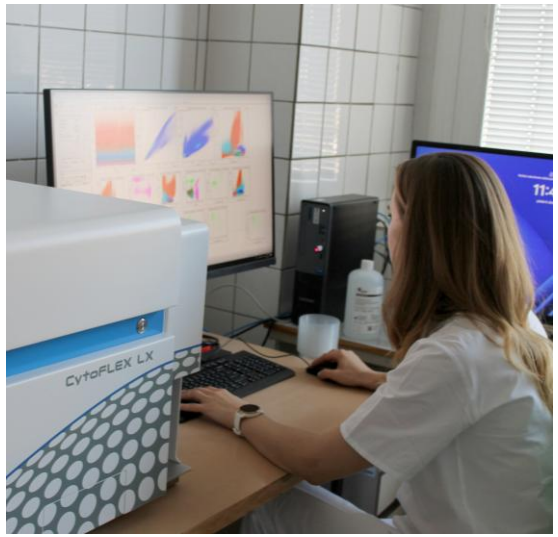
- Violet (405 nm), Blue (488 nm), Yellow-Green (561 nm), Red (638 nm)

63 detekčních kanálů

- V1-V20, B1-B16, Y1-Y12, R1-R10, FSC, VSSC, BSSC, RSSC, YSSC

Přepínání mezi konvenčním a spektrálním režimem







První využití: CAR-T terapie

- geneticky modifikované T-lymfocyty s expresí chimerického antigenního receptoru (CAR) – významná léčba u opakovaně relabujících pacientů (B-buněčné malignity, mnohočetný myelom)
- variabilita léčebné odpovědi
- riziko rozvoje CRS a ICANS – chybí pochopení kompletní imunitní reakce
- **cíl:** kompletní mapování imunitní odpovědi pro včasnou predikci účinnosti a nežádoucích účinků

Lymfocyty **Monocyty** **Neutrofily**

Metodický postup



Návrh panelů: monocyty

Definice biologie a výběr znaků | Párování svítivosti k expresi | Strategie pro úsporu fluorochromů | Kontrola podobnosti a rozptylu

Biologická otázka

Jak se během CAR-T terapie mění subpopulace a fenotyp monocytů a jak tyto změny souvisejí se závažností toxicity?

Výběr monocytů

- **CD45:** leukocyty
- **CD66b:** vyloučení granulocytů
- **CD3, CD19, CD56:** vyloučení T, B, NK buněk,
- **CD123:** vyloučení T, B, NK buněk, pDCs a basofilů

Fenotyp monocytů

- **Subpopulace:** CD14, CD16, CCR2, CX3CR1, SLAN
- **Aktivace a kostimulace:** CD86, CD11c
- **Prezentace a fagocytóza:** HLA-DR, CD64
- **Protizánětlivá odpověď, chronická aktivace:** PD-L1, CD163, CD38

Návrh panelů: monocyty

Definice biologie a výběr znaků | **Párování svítivosti k expresi** | Strategie pro úsporu fluorochromů | Kontrola podobnosti a rozptylu

1) **Míra exprese pro jednotlivé znaky**
   - nízká exprese
   - střední exprese
   - vysoká exprese
   - kontinuální exprese

Znak	CD45	CD66b	CD3	CD123	CD19	CD56	CD64	CD14	CD16	CCR2	CX3CR1	SLAN	HLA-DR	CD163	CD11c	CD86	PD-L1	CD38
Exprese	+++	+++	+++	+++	+++	+ → +++	+++	+ → +++	+ → +++	++	++	+ → ++	+++	+	++	++	+ → ++	++
Fluorochrom																		

Návrh panelů: monocyty

Definice biologie a výběr znaků | **Párování svítivosti k expresi** | Strategie pro úsporu fluorochromů | Kontrola podobnosti a rozptylu

1) **Míra exprese pro jednotlivé znaky**
2) Pro málo exprimované znaky – vybíráme **silný fluorochrom**
3) Pro středně exprimované znaky – vybíráme **střední fluorochrom**
4) Pro vysoce exprimované znaky – vybíráme **slabý fluorochrom**
5) Pro znaky s kontinuální expresí – vybíráme **spektrálně čistý střední až silný fluorochrom**

Znak	CD45	CD66b	CD3	CD123	CD19	CD56	CD64	CD14	CD16	CCR2	CX3CR1	SLAN	HLA-DR	CD163	CD11c	CD86	PD-L1	CD38
Exprese	+++	+++	+++	+++	+++	+ → +++	+++	+ → +++	+ → +++	++	++	+ → ++	+++	+	++	++	+ → ++	++
Fluorochrom	*	*	*	*	*	***	*	***	***	***	***	*****	*	*****	***	***	*****	***

Návrh panelů: monocyty

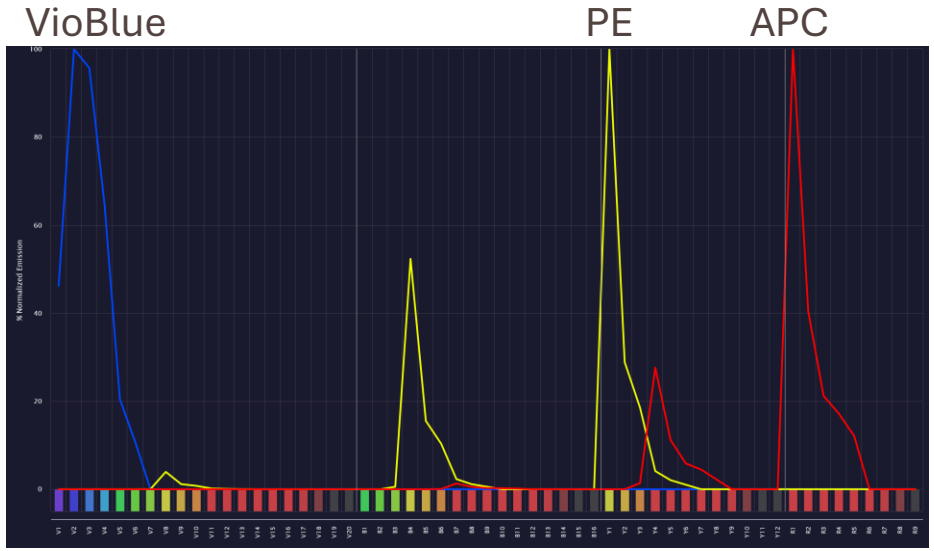
Definice biologie a výběr znaků | Párování svítivosti k expresi | **Strategie pro úsporu fluorochromů** | Kontrola podobnosti a rozptylu

- použití jednoho fluorochromu pro více sledovaných znaků současně → úspora spektrálního prostoru a redukce spektrálního rozptylu
- **přístupy:**
  - zachování analýzy – kombinace vzájemně se vylučujících znaků (např. CD20 + CD4)
  - vyřazení nežádoucích buněčných populací – sloučení markerů pro kompletní odstranění neanalyzovaných populací (ozn. *Lin*)
- **zvolená kombinace: sloučení CD3 + CD19 + CD56 + CD123 do jednoho fluorochromu** pro vyřazení T, B, NK buněk, pDCs a bazofilů
  - střední svítivost a spektrální čistota

Návrh panelů: monocyty

Definice biologie a výběr znaků | Párování svítivosti k expresi | Strategie pro úsporu fluorochromů | **Kontrola podobnosti a rozptylu**

- **samotný návrh:**
  - nepostupujeme náhodně
  - slabě exprimované a biologicky nejasné znaky
  - znaky s omezenou komerční dostupností konjugátů
  - znaky, které by mohly rozptylovat šum
  - následuje doplnění zbylých znaků
- příklad:
  - **SLAN** – výběr limitován dostupností na trhu (PE/APC/VioBlue)
  - **liniové markery** – spektrálně čistý, ne příliš silný flurochrom



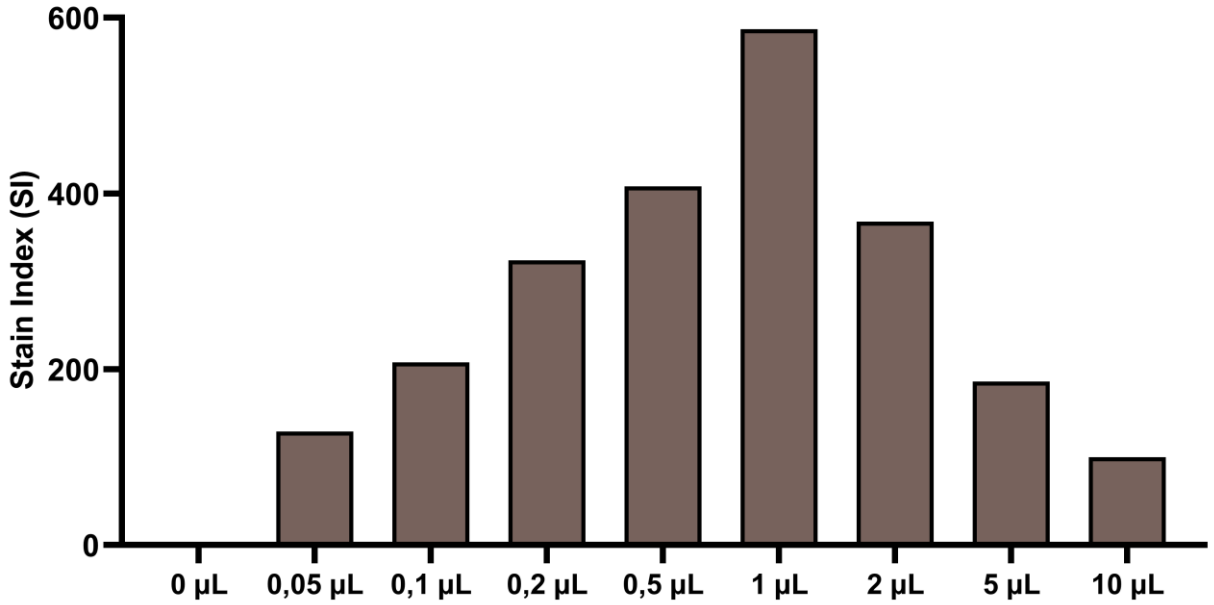
Titrace protilátek

$$SI = \frac{MFI_{pos} - MFI_{neg}}{2 \times rSD_{neg}}$$

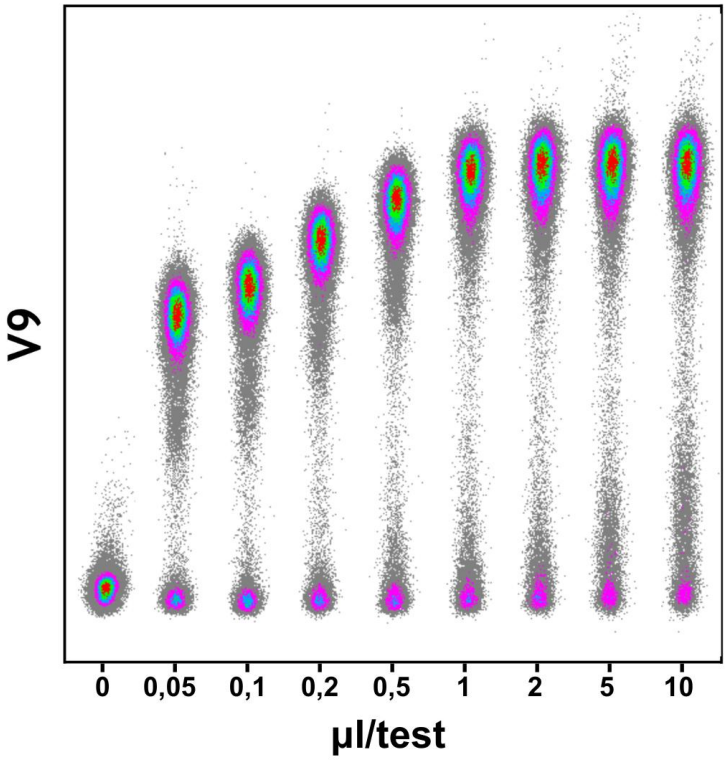
Příklad: **CD16 (BV605) – neutrofilní panel**

Doporučení výrobce: 5 µl/test; titrační řada: 0–10 µl/test

Stain Index



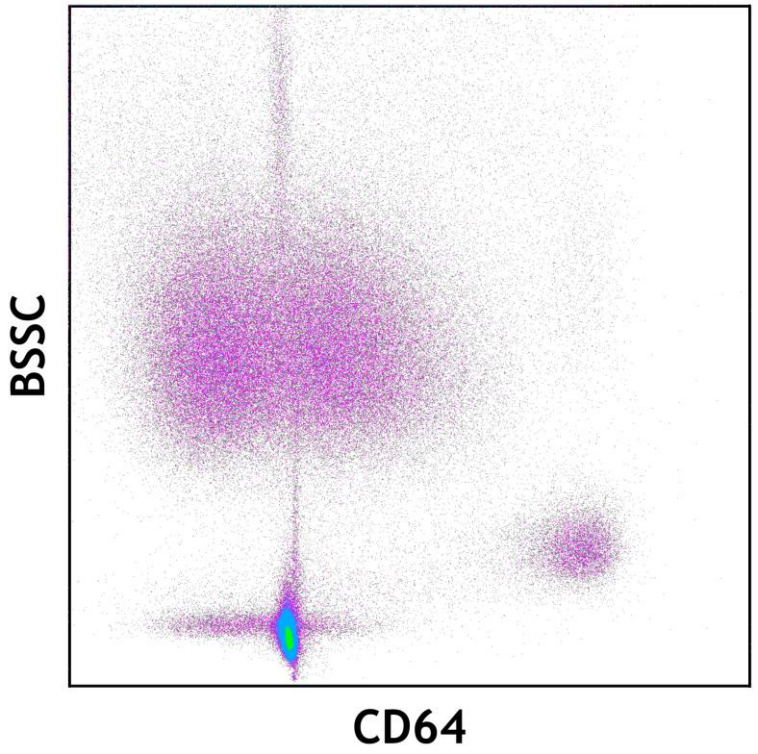
Koncentrační řada



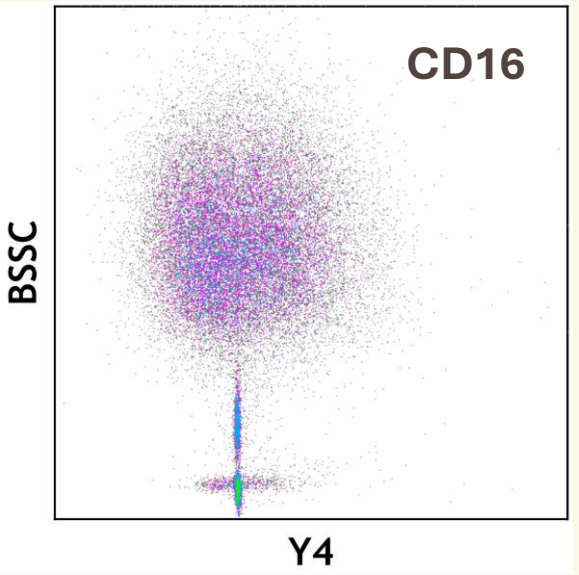
1 µL/test

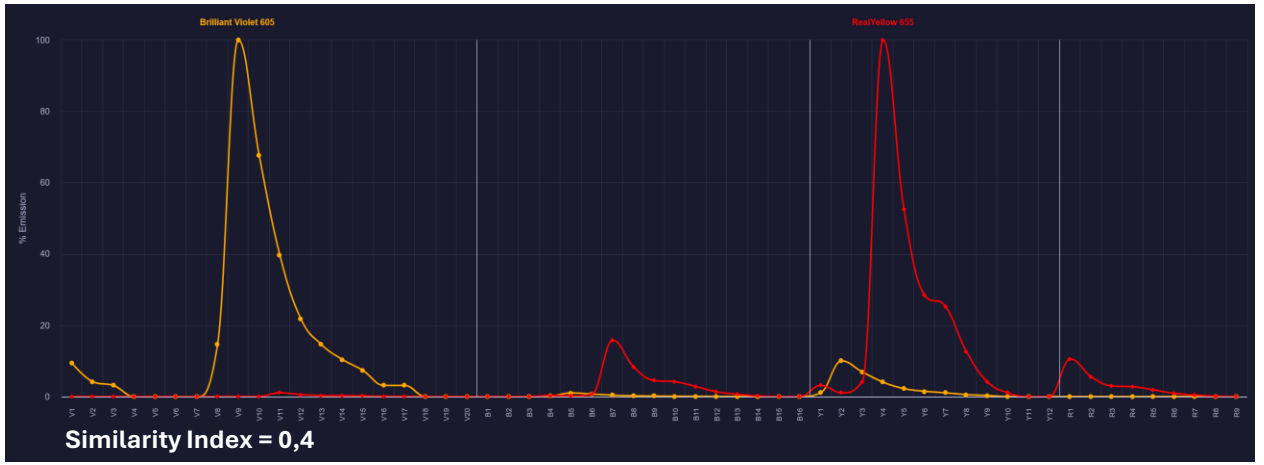
Titrace protilátek: CD16

Kompletní panel



Kontrola jednobarevných vzorků



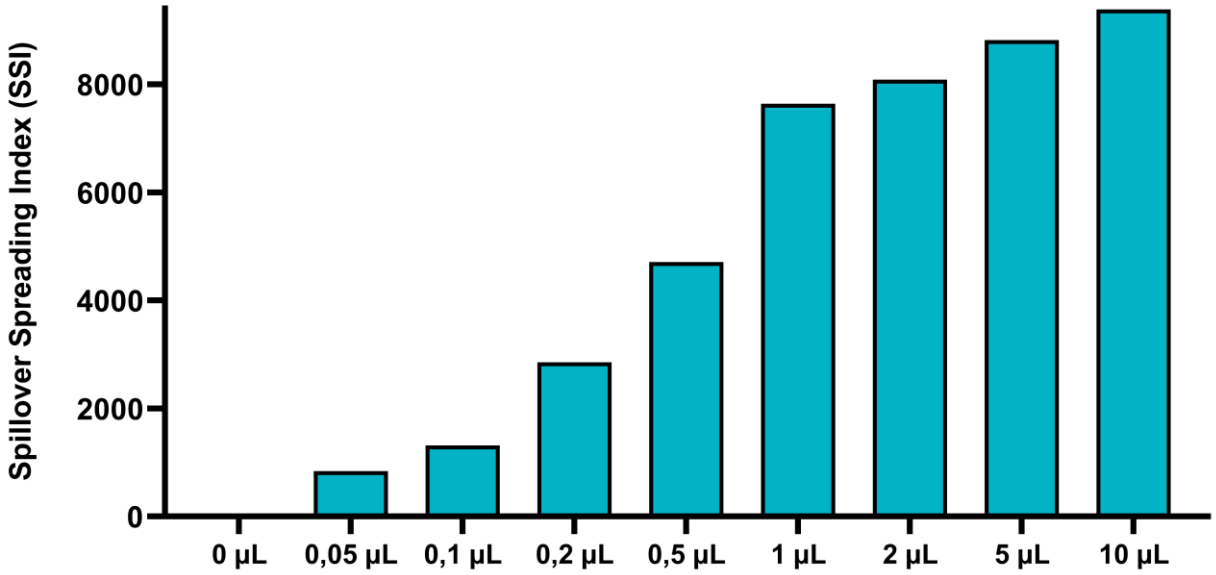


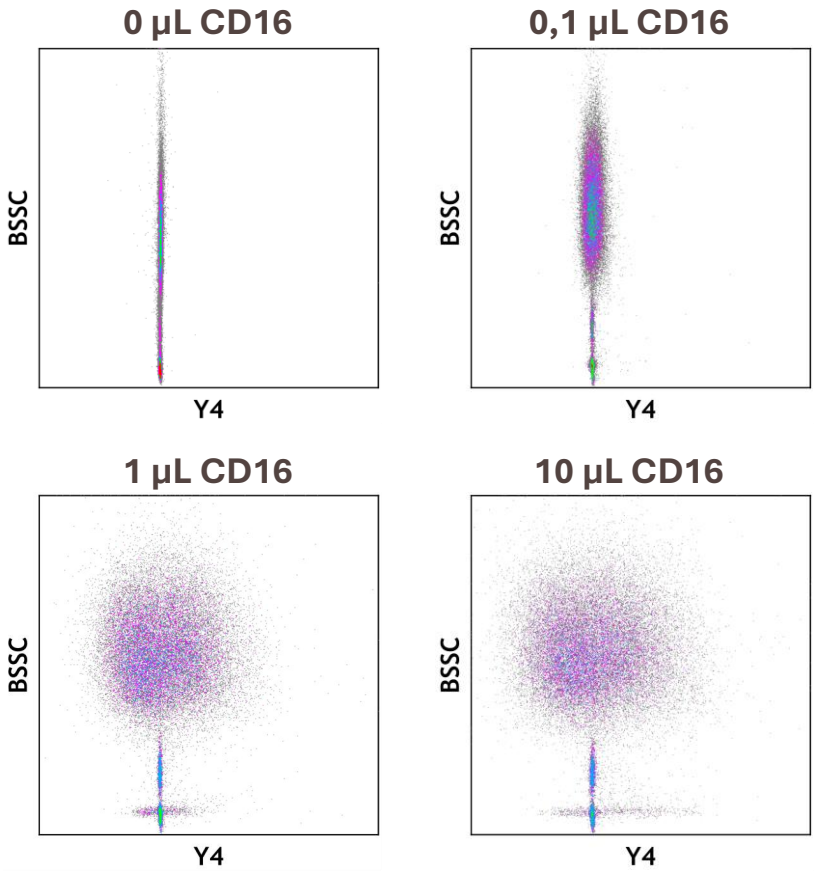
CD64: výrazný rozptyl negativní populace okolo nuly

Titrace protilátek: CD16

$$SSI = \sqrt{rSD_{pos}^2 - rSD_{neg}^2}$$

Vyhodnocení rozptylu



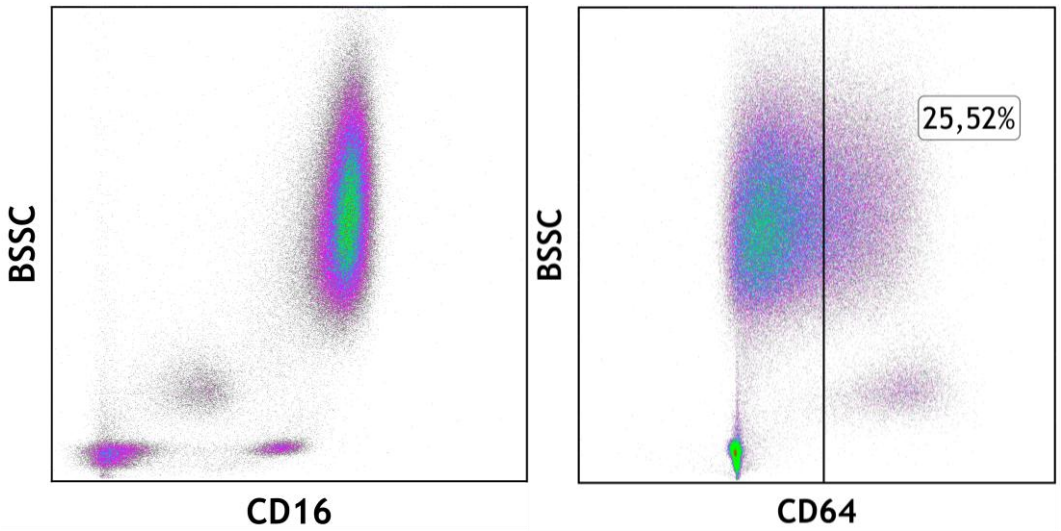


0,1 µL/test → nízký rozptyl, zachovaná separace

Titrace protilátek: CD16

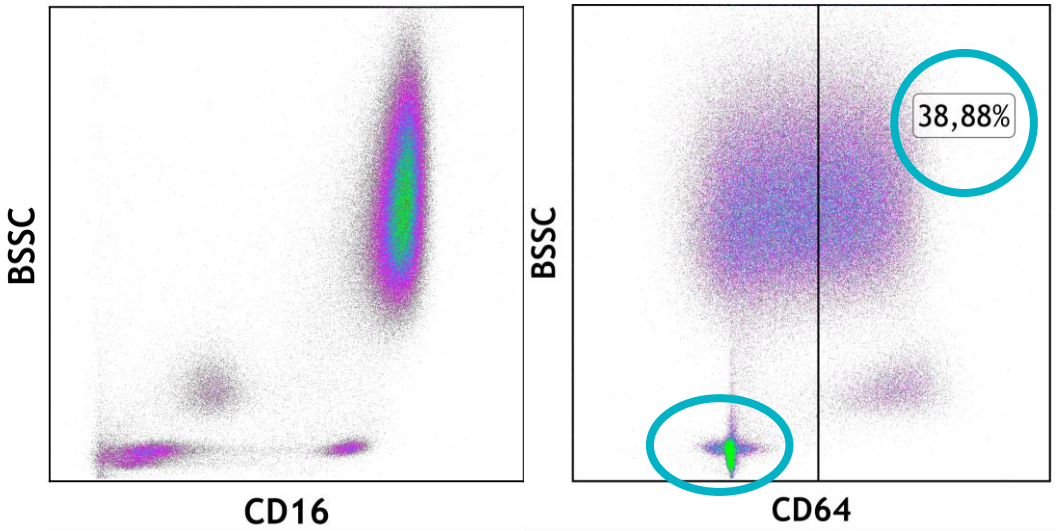
Stejný panel, odlišné procentuální výsledky

0,1 µL CD16



25,52 % CD64⁺

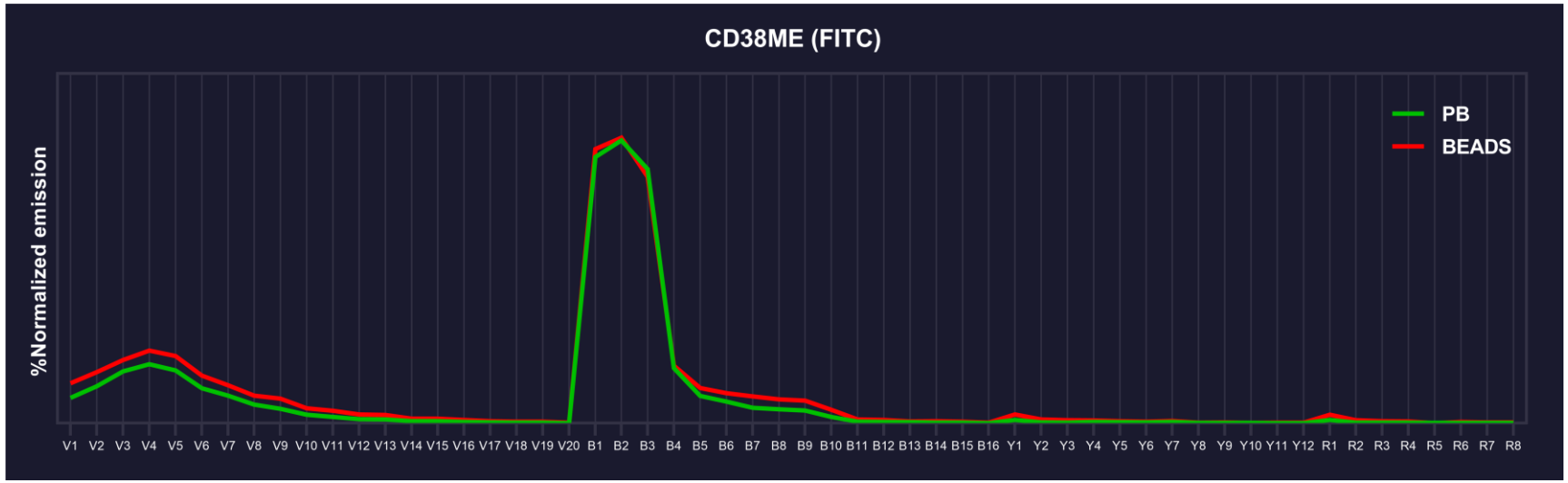
0,5 µL CD16

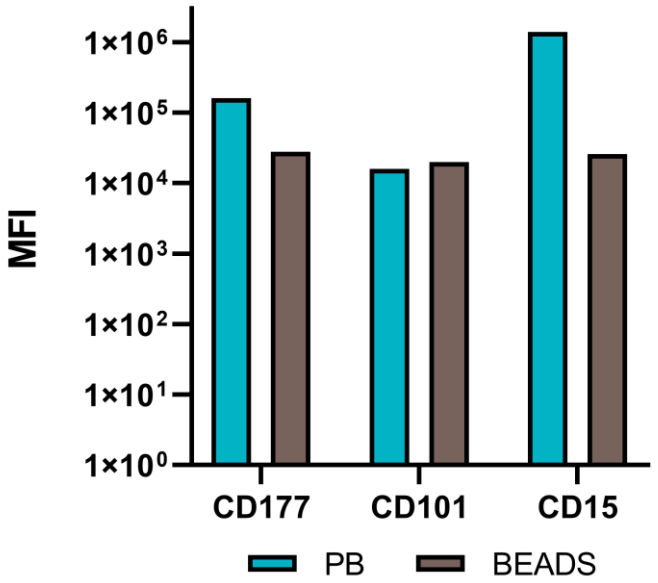


38,88 % CD64⁺

Unmixing

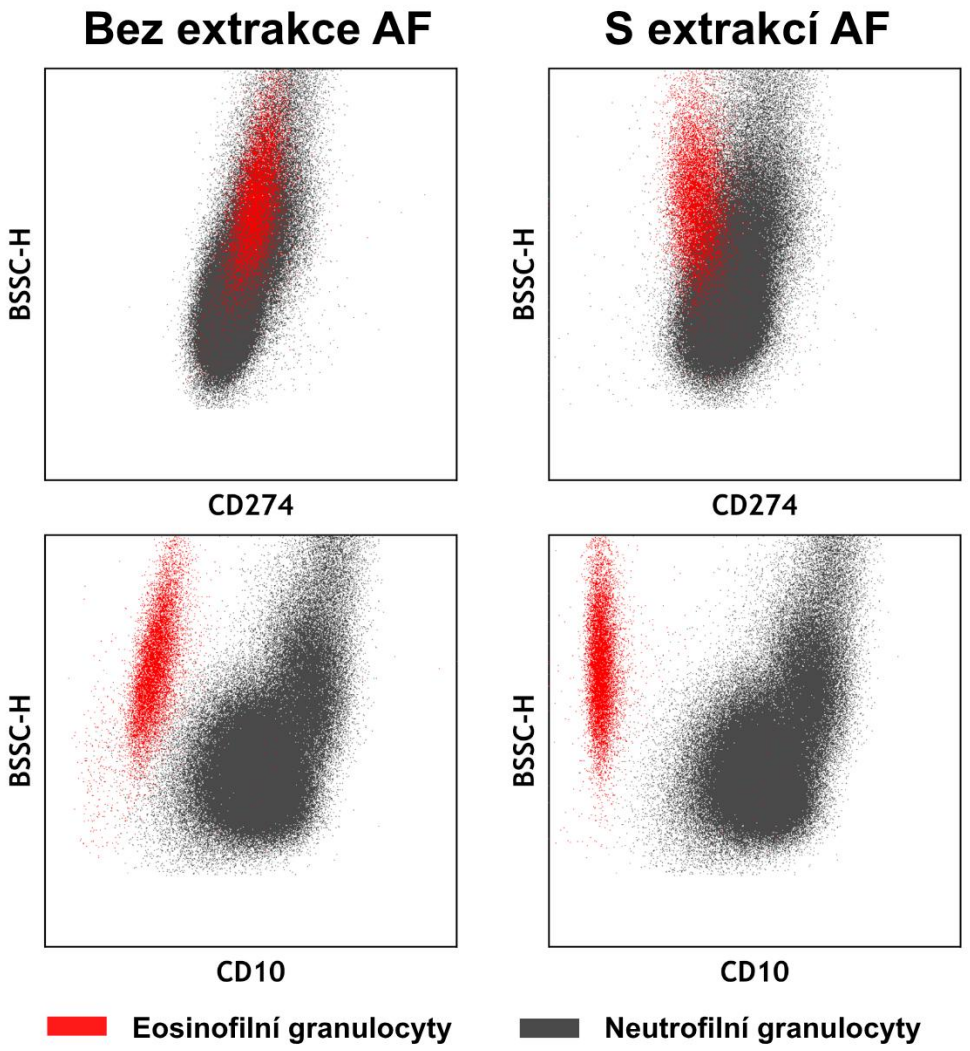
- **volba jednobarevných kontrol**
  - **buňky vs. kuličky:** odlišnosti ve spektrálním profilu
  - co nejjasnější pozitivní kontrola
  - slabě exprimované znaky: např. CD4 se stejným konjugátem
- **unmixing na cílovou populaci:** např. CD16 – neutrofily vs. monocyty
- dodržovat metodický postup





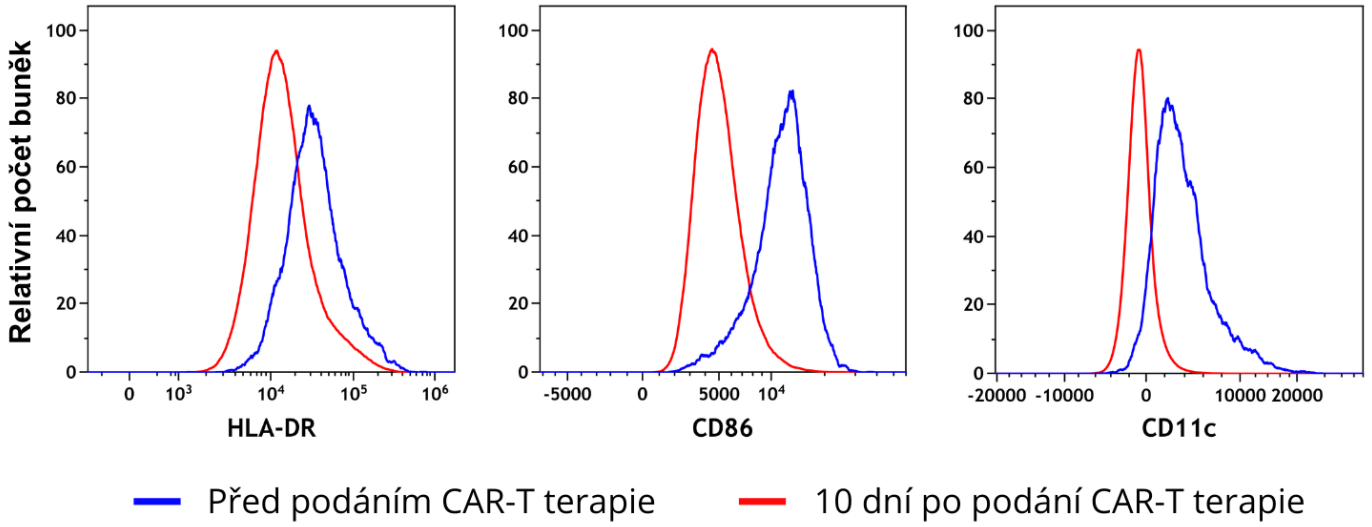
Extrakce AF

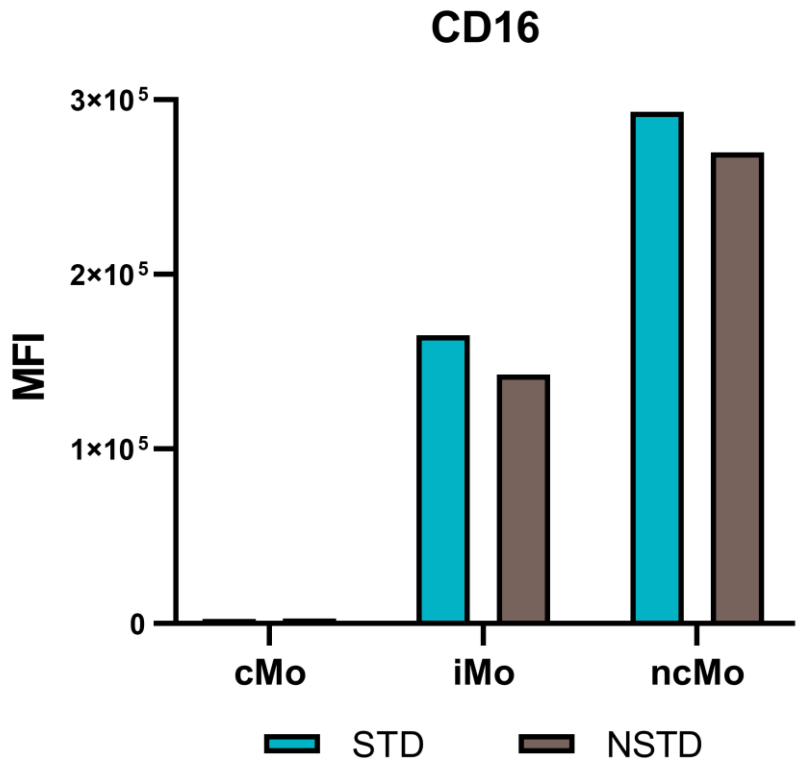
- korekce spektrálního pozadí u vysoce autofluorescenčních buněk
- autofluorescenční profil jako samostatný „fluorochrom“
- využití: **neutrofilní panel**
- dopad na výsledná data: **čistší separace eozinofilů a neutrofilů**



Standardizace

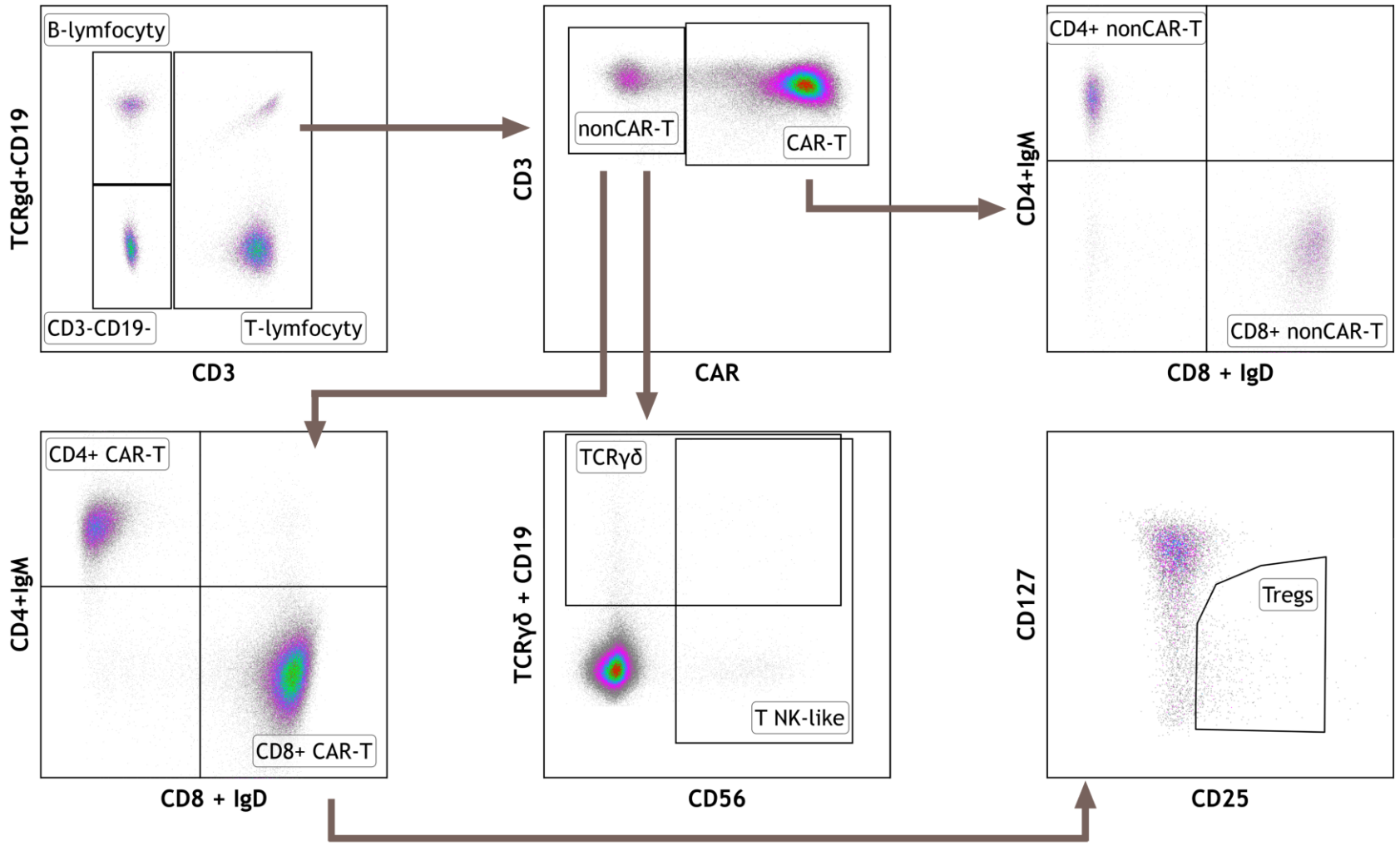
- **sledování dynamiky exprese znaků v čase** (před a po terapii)
- využíváme pro **monocytární a neutrofilní panel**
- standardní postup jako u konvenční cytometrie



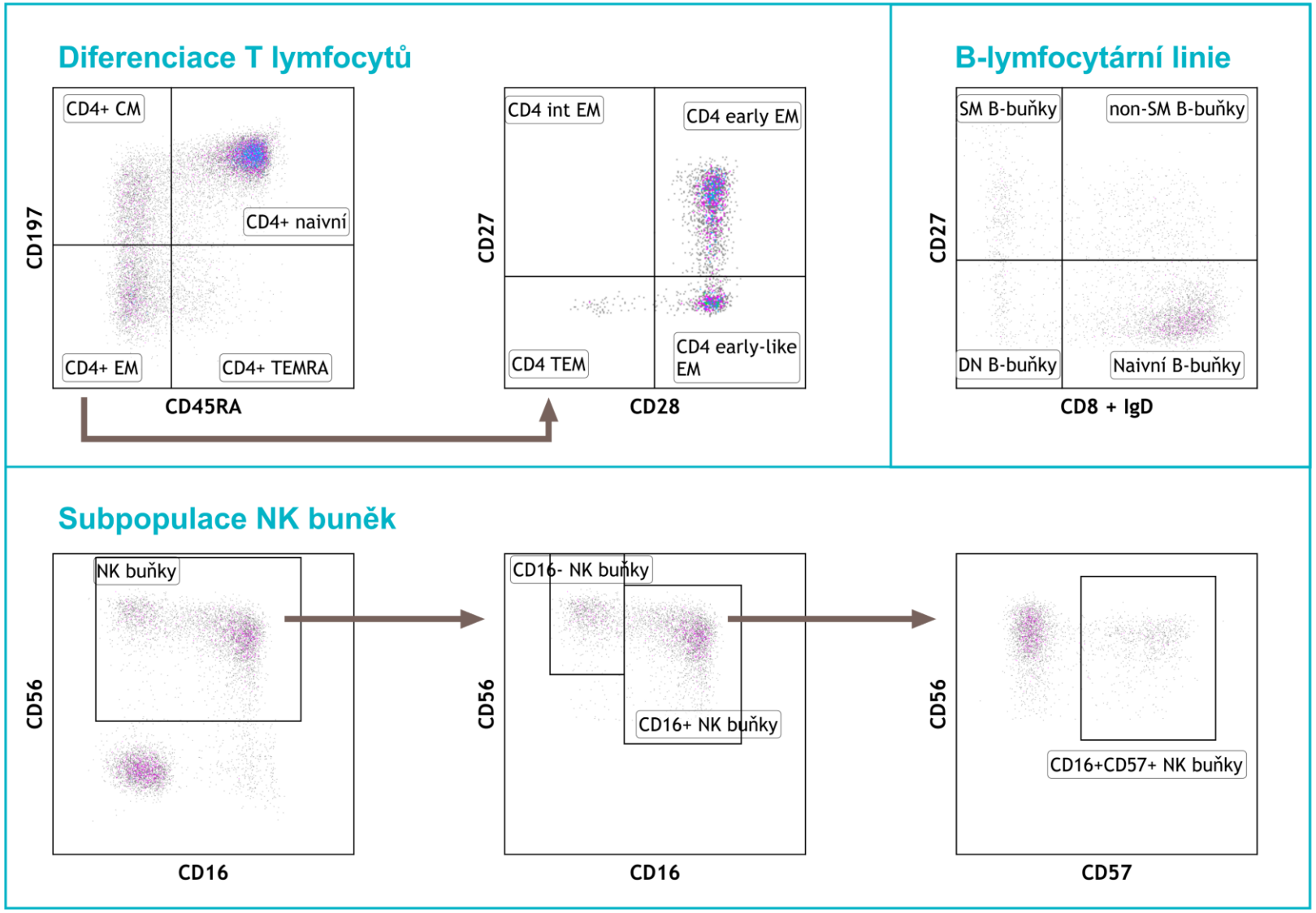


Lymfocytární panel

Vymezení T-buněčné linie a hlavních subpopulací T lymfocytů

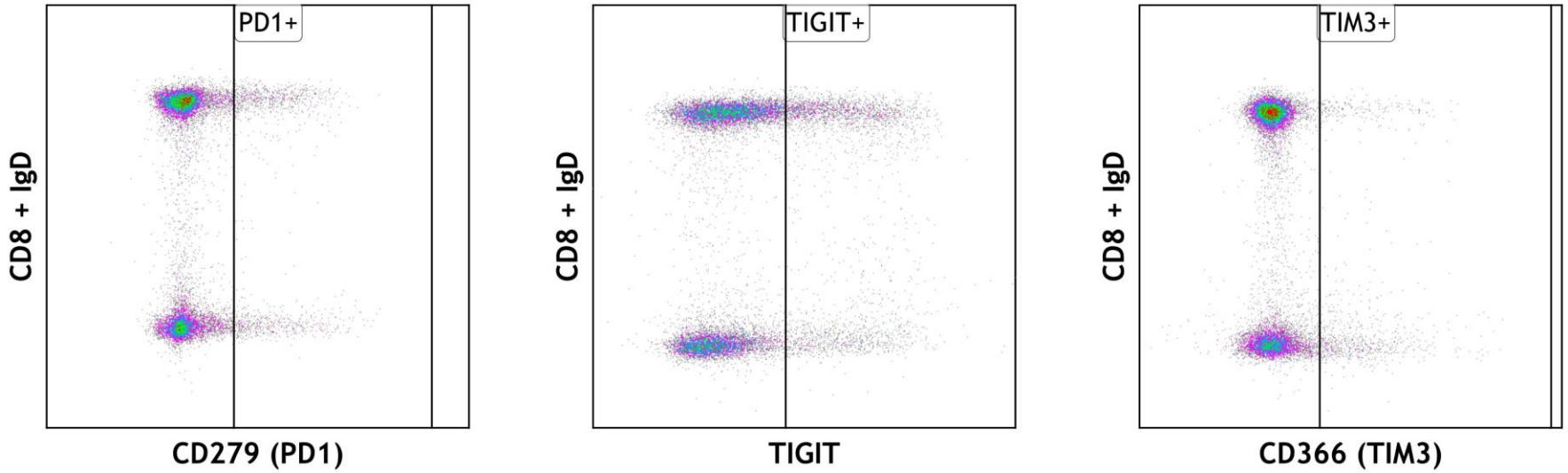


Lymfocytární panel

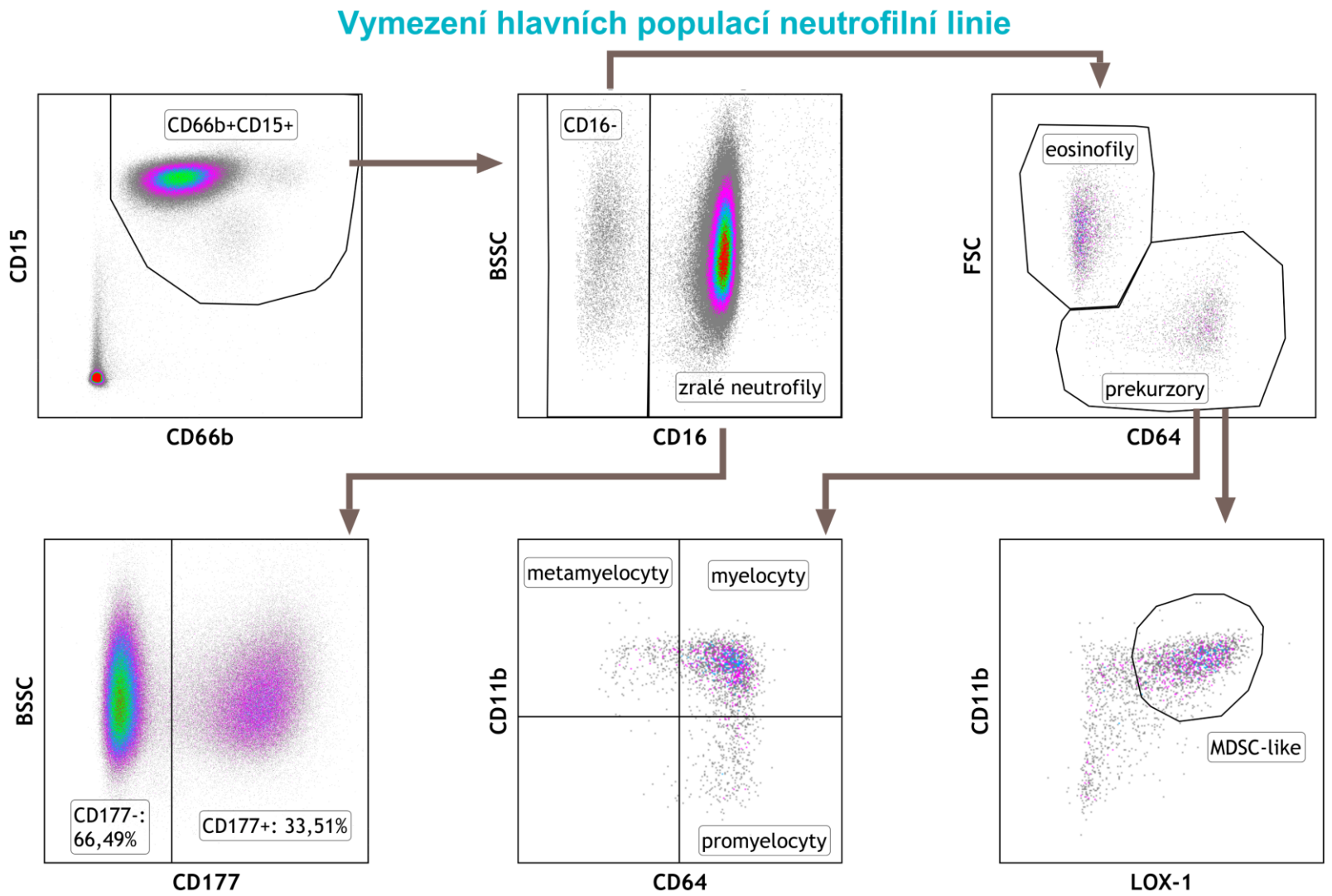


Lymfocytární panel

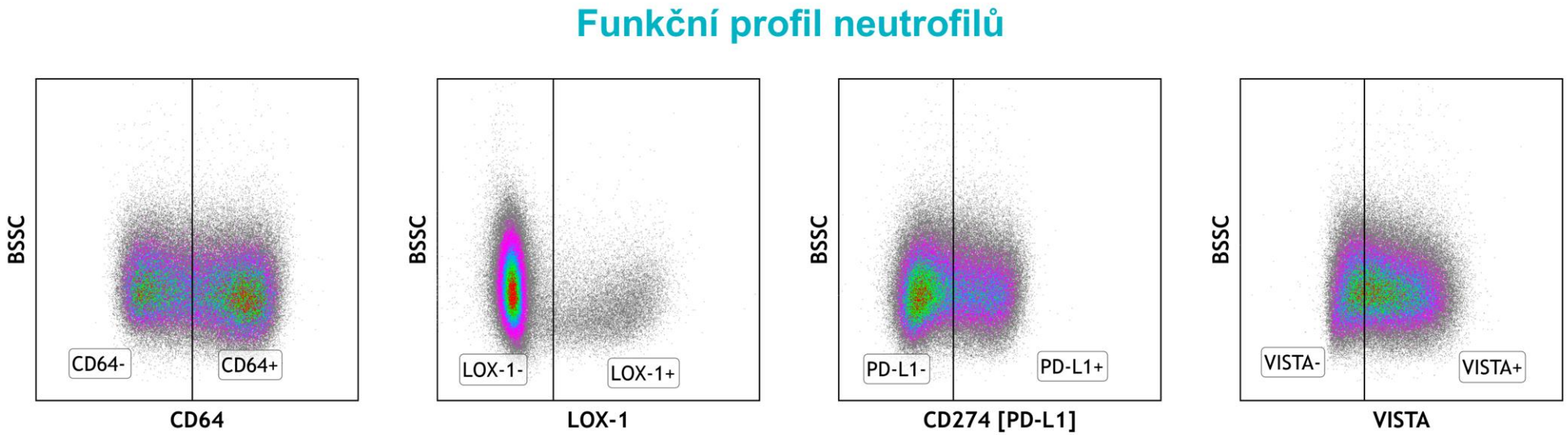
Zastoupení buněk pozitivních pro aktivační a inhibiční markery



Neutrofilní panel

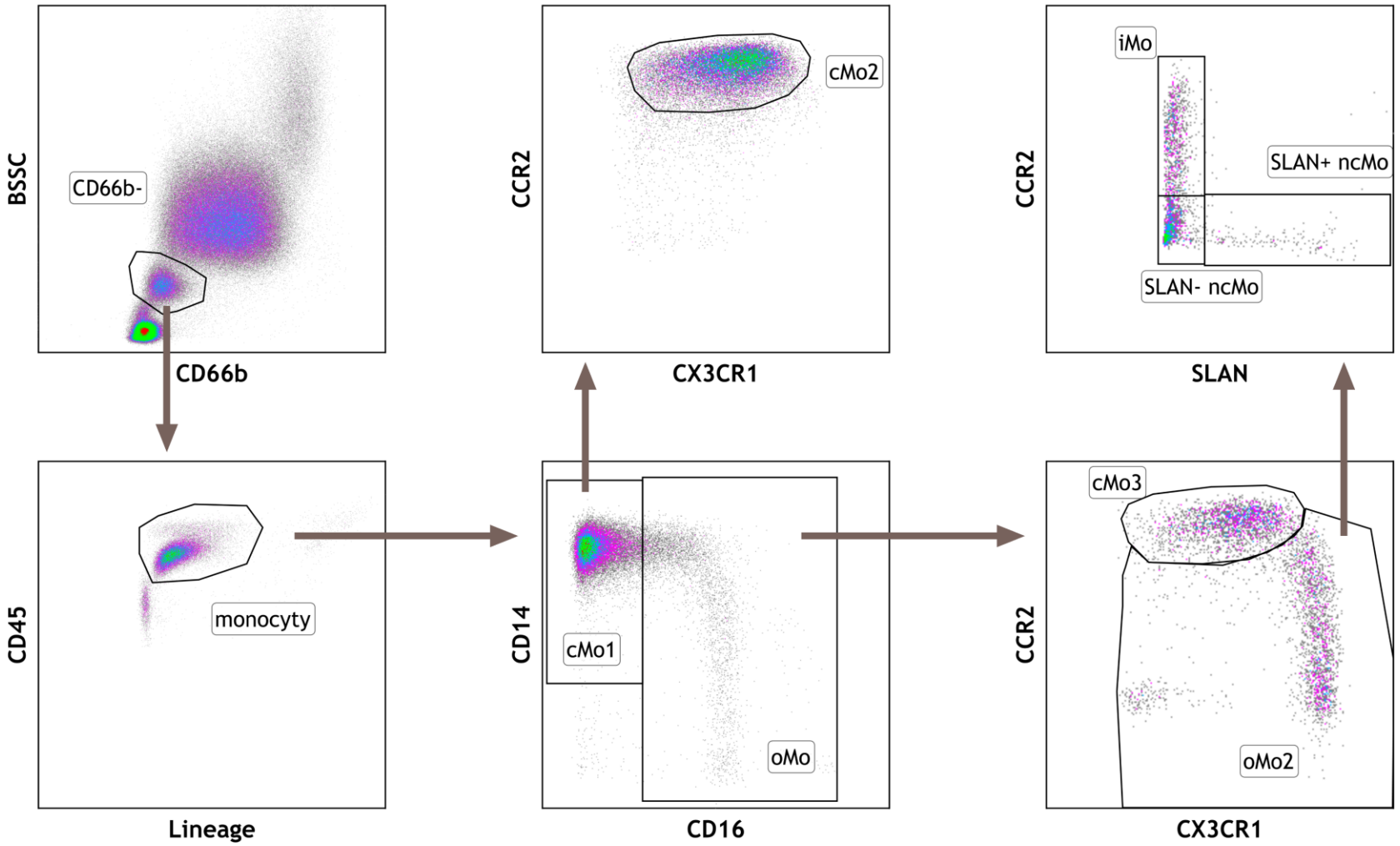


Neutrofilní panel



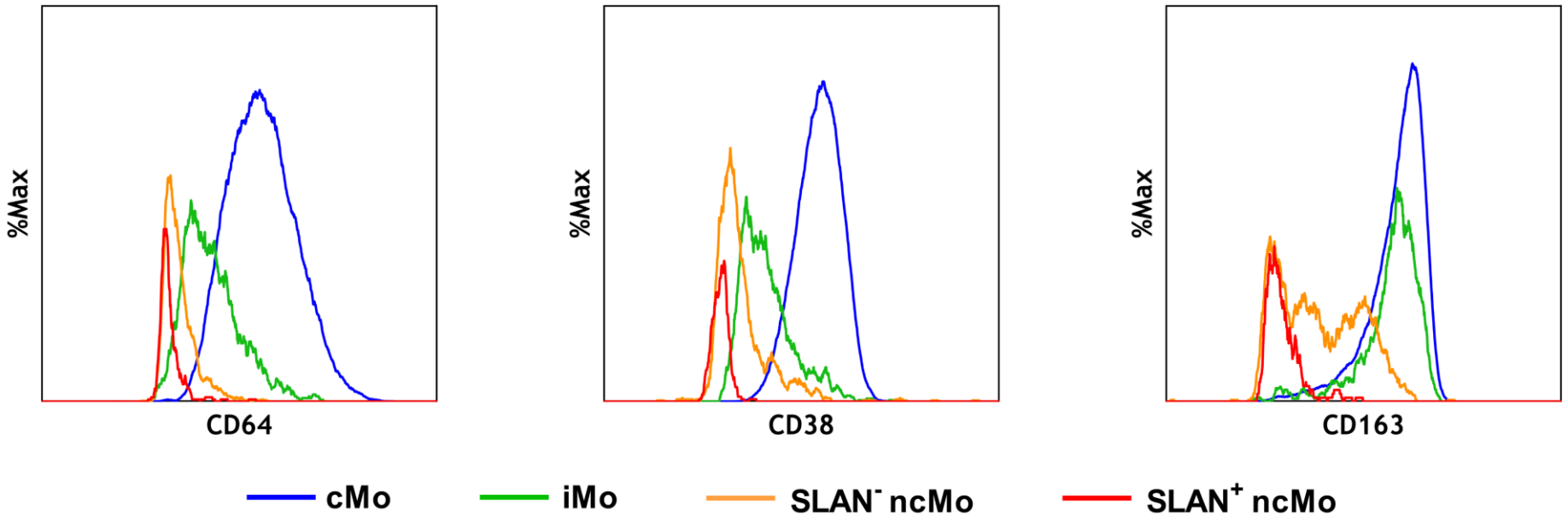
Monocytární panel

Hlavní subpopulace monocytů



Monocytární panel

Exprese funkčních markerů v jednotlivých subpopulacích



Děkuji za pozornost

