

Aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

část II

Lukáš Kubala
kubalal@ibp.cz

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
- diagnostice alergických onemocnění

Hematologie

- Diagnóza maligních onemocnění
- Stanovení funkčních vlastností trombocytů

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**

 - Změna exprese vybraných povrchových markerů

 - (většinou receptory nezbytné pro funkci daného fagocytu)

 - mikrobicidní aktivita*

 - Produkce volných radikálů fagocyty

 - Fagocytární aktivita

 - Tvorba oxidu dusnatého

- **Diagnostice alergických onemocnění**

- **Stanovení funkčních vlastností trombocytů**

Změna povrchové exprese antigenu (receptoru)

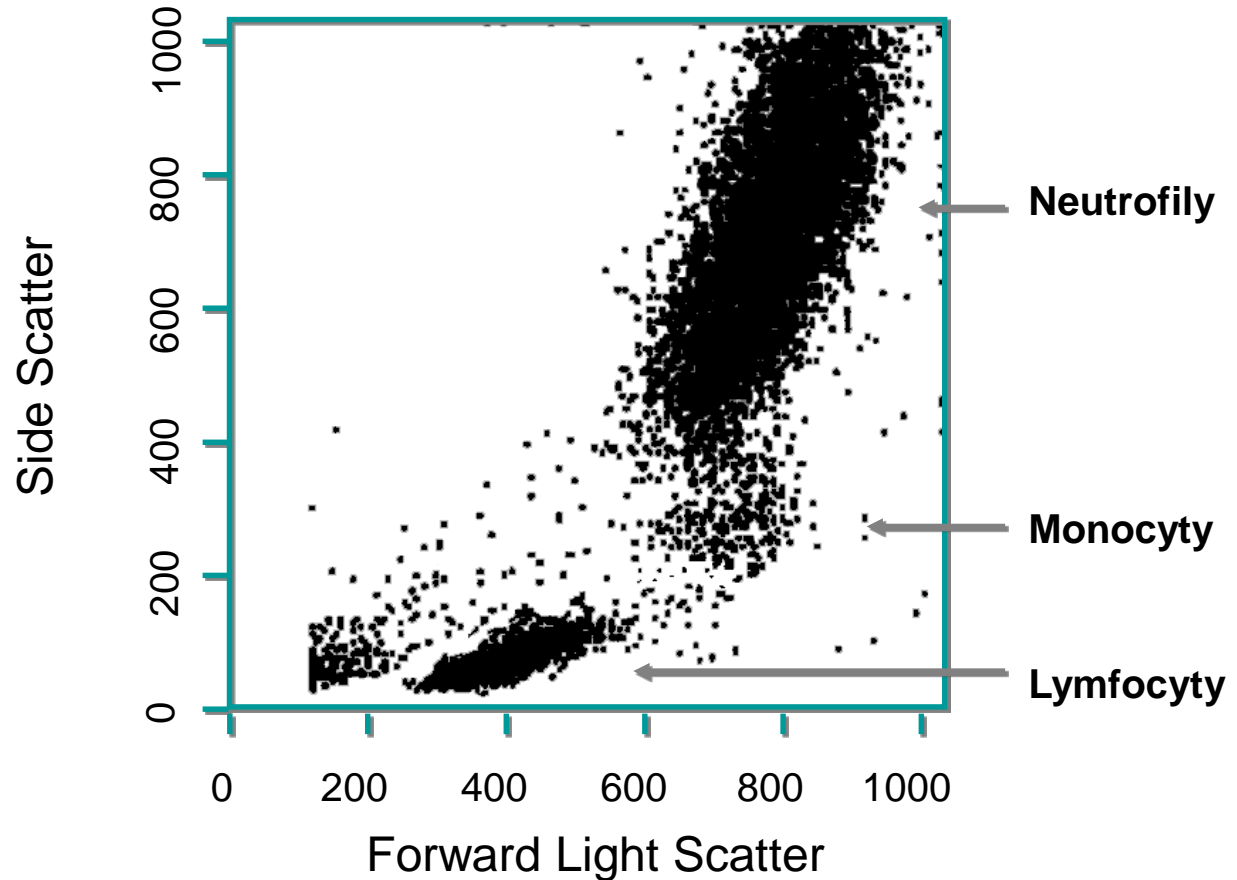
Změna povrchové exprese antigenu charakteristického pro aktivovaný stav dané buněčné subpopulace.

Antigenem je většinou receptor spojený s funkcí toho určitého typu buněk

Příklady:

- CD25, CD69, HLA-DR - aktivace lymfocytů
- CD11b - aktivace polymorfonukleárních granulocytů a monocytů
- CD62P - aktivace krevních destiček

SS a FS leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů

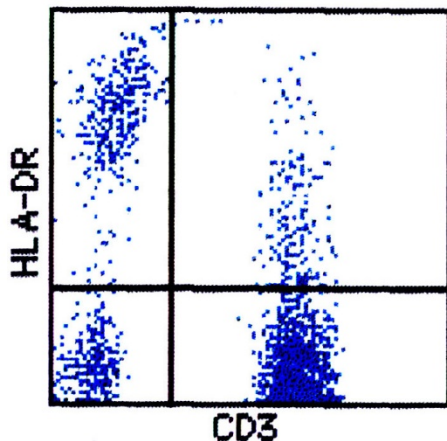


Změna povrchové exprese antigenu (receptoru) u lymfocytů

Např. současně s imunofenotypizací v programu Simulset jako krok č. 7 - Stanovení aktivace T-lymfocytů

Events acquired: 14000 Data set: [1]
Gated Events: 2369

Means: FSC SSC
149 27
Marker FL1 FL2
76 73



CD3/HLA-DR		Conv %L
Q	Cell Type	
Q1	CD3- DR+	15
Q2	CD3+ DR+	8
Q3	CD3- DR-	9
Q4	CD3+ DR-	68

Subset Name	Conv %L
Total T (CD3+) Lymphocytes	76
Activated T (CD3+) Lymphocytes	8

OK
N/A

Operator defined markers are in effect.

Tube Name/ Consistency	Ck	Subset Name/ Ck Name	Conv. Percent Lymphs	
Average CD3		Total T (CD3+) Lymphocytes	77	OK
Sum of Cells		T + B + NK	99	OK
Ratio		T Lymph H/S CD3,CD4/CD3,CD8 Ratio	1.48	OK

Aktivace lymfocytů v klinické laboratoři



Veronika Kanderová

CLIP (Childhood Leukaemia Investigation Prague) - Cytometrie

Klinika dětské hematologie a onkologie

2. LF UK a FN v Motole

<http://clip.lf2.cuni.cz/cs/prezentace-ke-stazeni/>

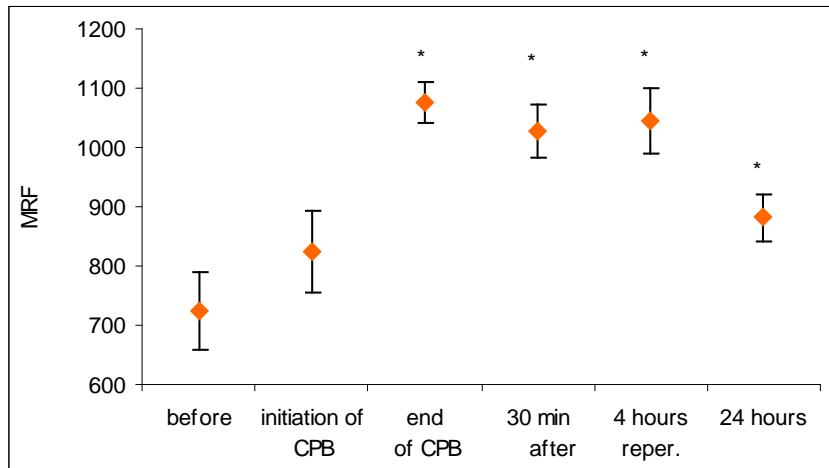
Detekce fyziologických fagocytů

- Změna povrchové exprese antigenu (receptoru) u fagocytů
- Produkce volných radikálů fagocyty (detekce chronické granulomatózní choroby)
- Stanovení fagocytární aktivity (detekce poruch fagocytovat patogeny)

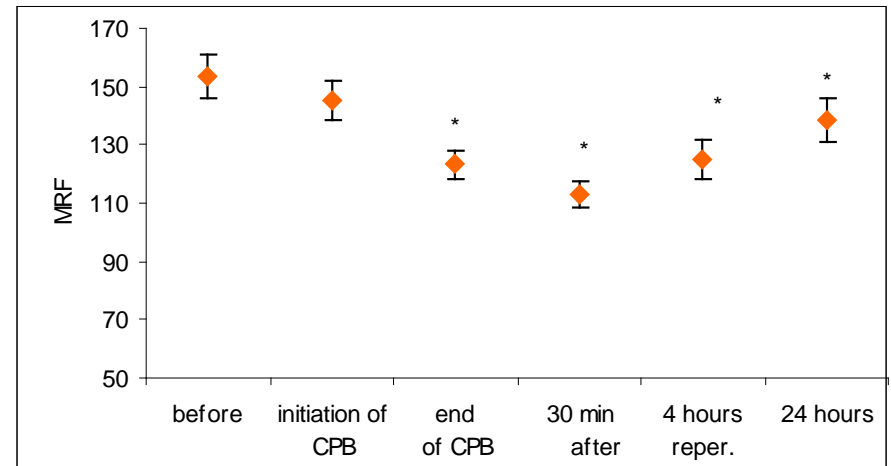
Stanovení aktivace granulocytů v periferní cirkulaci s využitím detekce povrchové exprese CD11b a CD62L

Aktivace neutrofilních granulocytů během otevřené operace srdce

CD11b



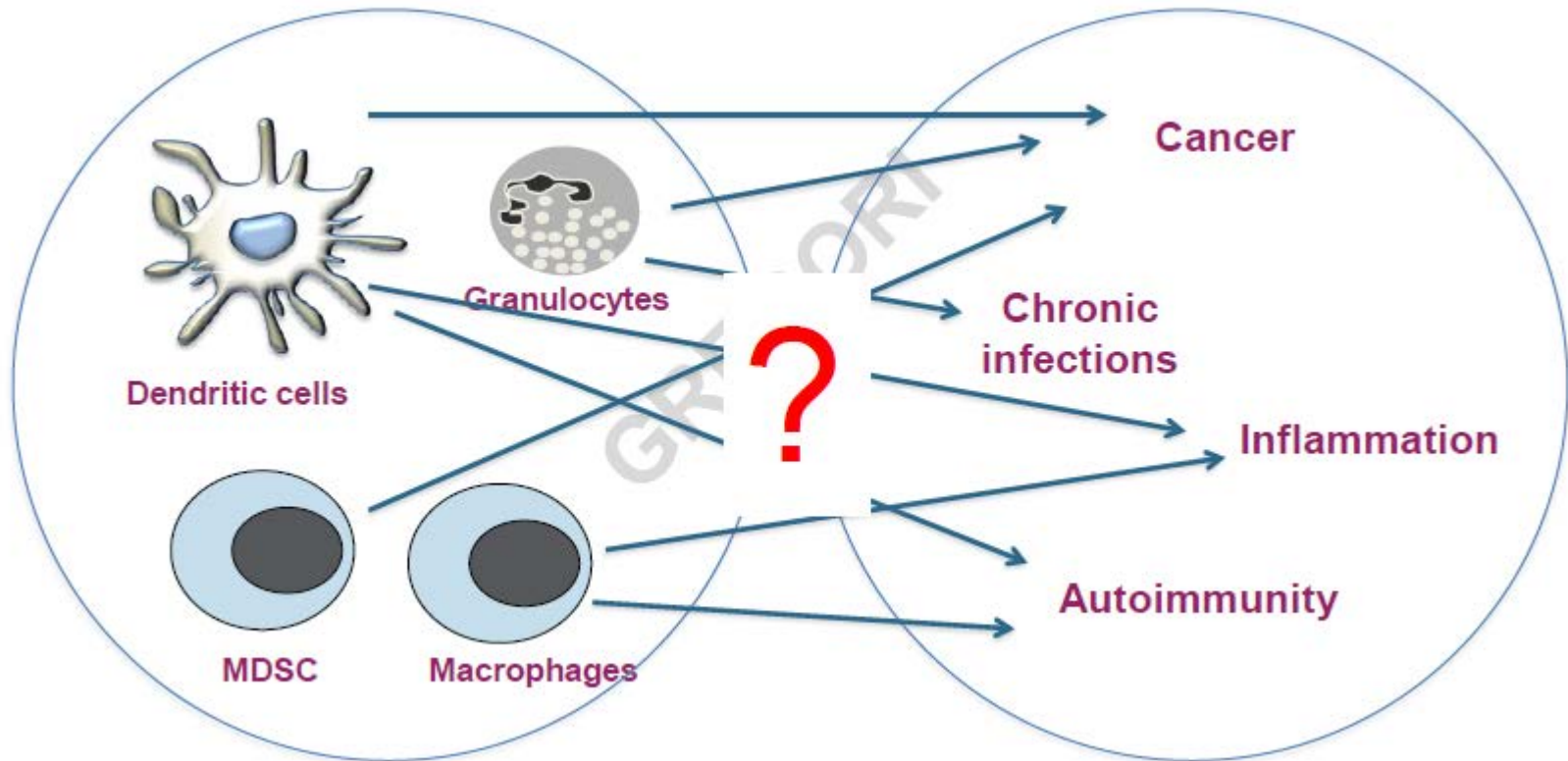
CD62L



Identifikace a funkční analýza subpopulací makrofágů a neutrofilů

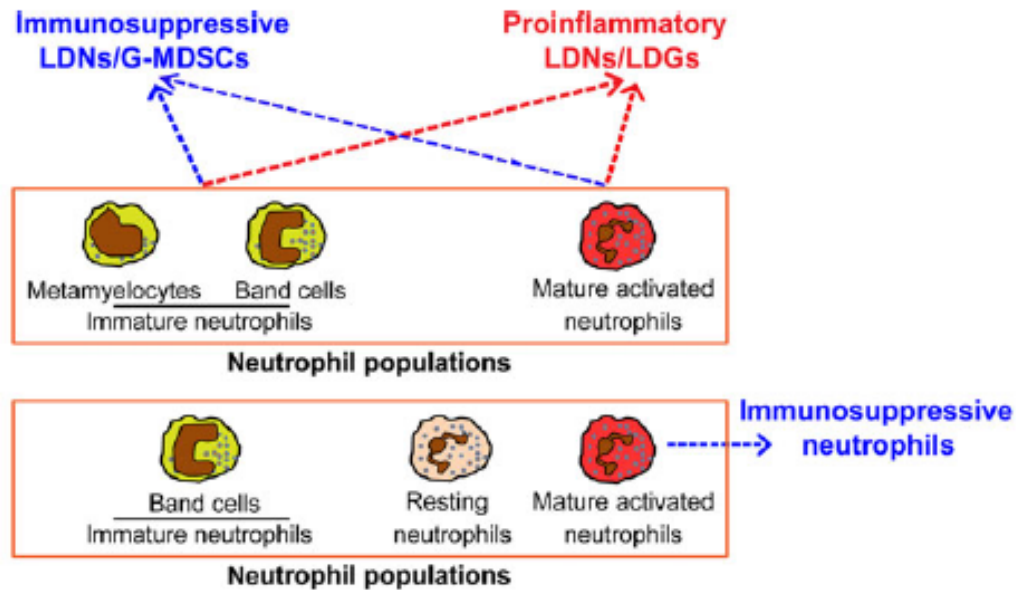
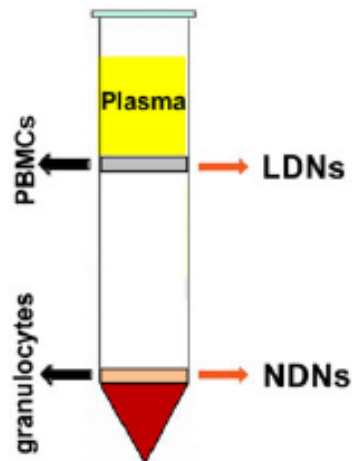
- patologické procesy a choroby jsou spojeny s výskytem konkrétních regulačních populací imunitních buněk
 - identifikace buněčných subpopulací pomocí FC
 - funkční analýza
- zlepšení a standardizaci diagnostiky různých onemocnění spjatých s jednotlivými subpopulacemi regulačních monocytů/makrofágů a neutrofilů

Identifikace a funkční analýza subpopulací makrofágů a neutrofilů



Imunoregulační neutrofilý

A Density gradient centrifugation of blood



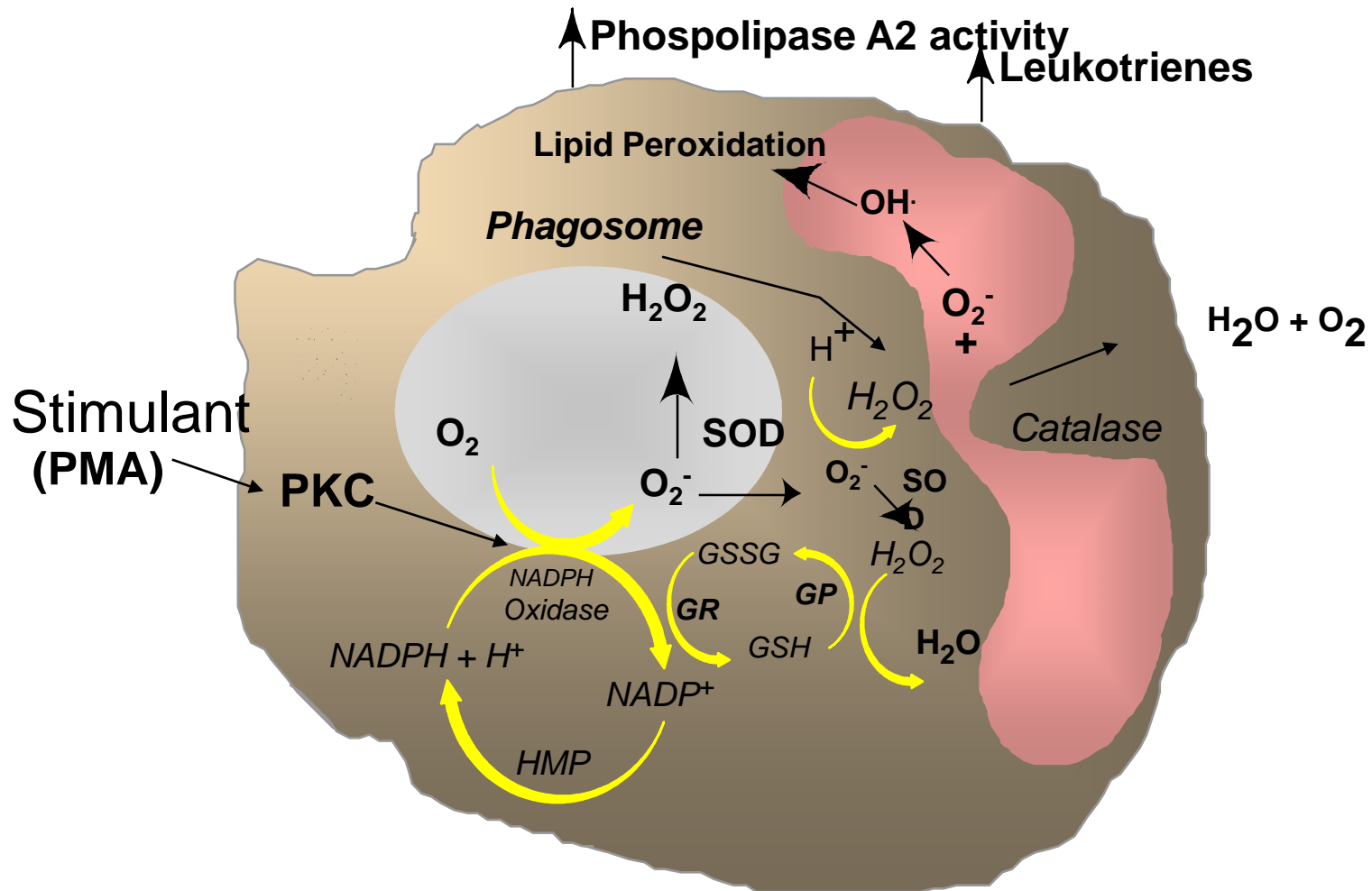
Imunosupresivní neutrofilny

Experimental setting	Neutrophil Immunophenotype	Maturation/activation status	Functional properties and immunosuppression mechanism
Solid tumors			
Pancreas, colon, and breast	CD15 ⁺ cells	Mature, activated cells	Contact-dependent inhibition of IFN γ production by T cells via H ₂ O ₂ release
Renal carcinoma	CD15 ⁺ CD11b ⁺ CD66b ^{high} VEGFR1 ⁺ CD62L ^{low} CD16 ^{low} cells	Mature activated cells	Inhibition of proliferation and IFN γ production by T cells, likely via Arg1 release
Non-small cell lung cancer (NSCLC)	CD15 ⁺ CD11b ⁺ CD33 ^{low} CD14 ⁻ IL-4R ⁺ IFN γ R ⁺ cells	Not reported	Suppression of CD3 ζ expression in CD8 ⁺ T lymphocytes
Glioblastoma	CD15 ⁺ CD66b ⁺ CD11b ⁺ CD33 ^{low} CD14 ⁻ HLA-DR ⁻ cells	Mature activated cells	Inhibition of proliferation and IFN γ production by T cells via Arg1 release
Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), urologic and lung cancer	CD66b ⁺ CD33 ^{low} HLA-DR ⁻ CD125 ⁻ CD11b ^{+/-} CD16 ^{+/-} CXCR1 ^{low} CXCR2 ^{low} CXCR4 ⁺ cells	Heterogeneous with several immature cells	Reduced apoptosis, ROS production and chemotaxis; inhibition of proliferation and IFN γ production by T cells

Scapini et al, 2016

Detekce volných radikálů

Oxidativní vzplanutí fagocytů

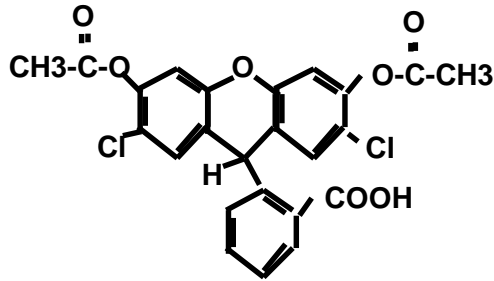


Fluorescenční próby pro detekci volných radikálů

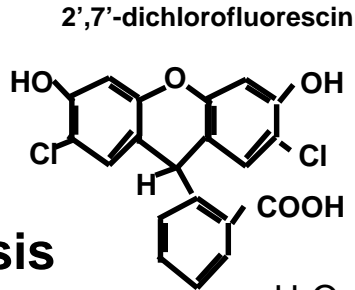
- dichlorodihydrofluorescein diacetate ($H_2DCF-DA$) and derivatives
- dihydroethidine (HE)
- dihydrorhodamine 123 (DHR 123) and dihydrorhodamine 6G
- dihydrocalcein AM
- Amplex Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)
- 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein (APF) and 3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF)
- (pentafluorobenzoyl)aminofluorescein diacetate (PFB- H_2FDA)
- MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator
- MitoTracker Orange (CM- H_2TMRos) and MitoTracker Red (CM- H_2XRos)



2',7'-dichlorofluorescein diacetate

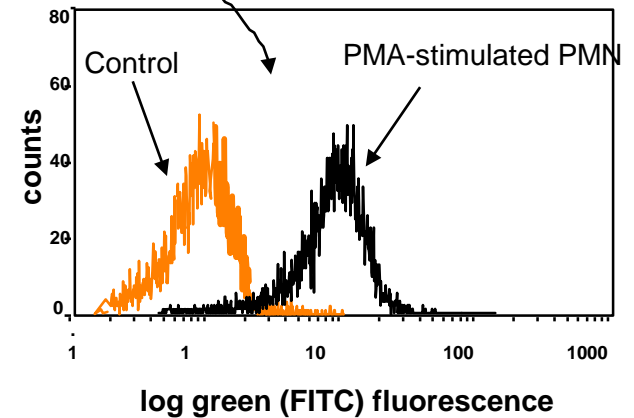
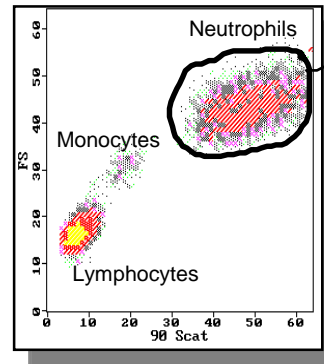
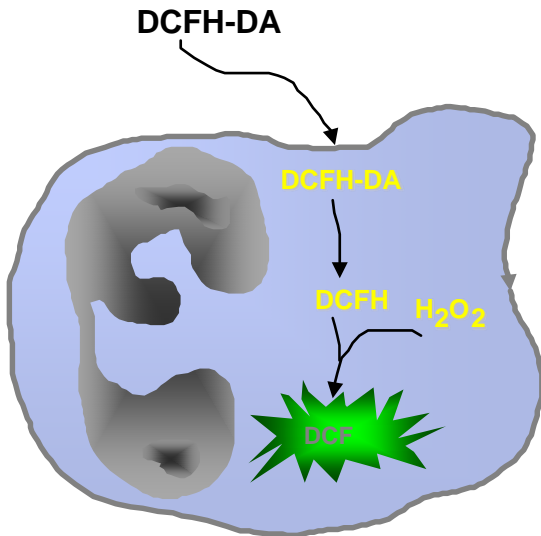
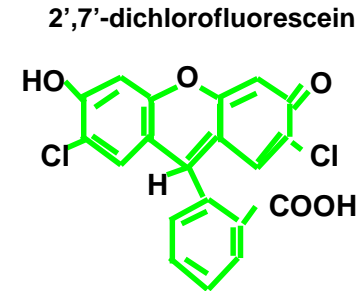


Cellular Esterases
Hydrolysis



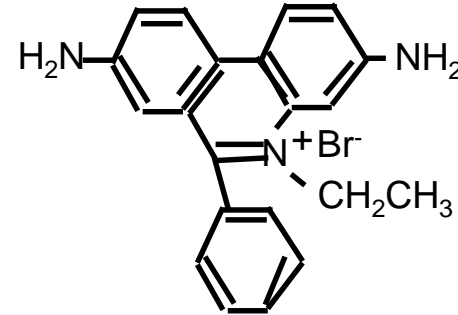
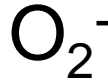
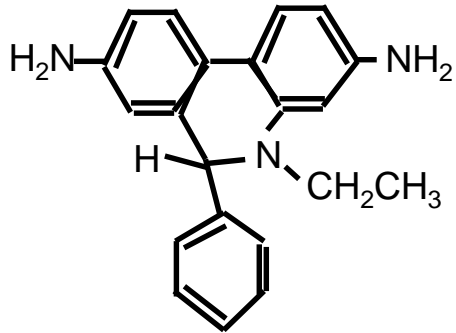
H_2O_2
Oxidation

Fluorescent



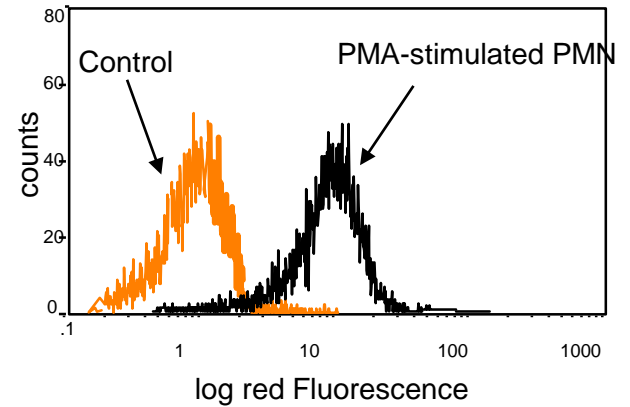
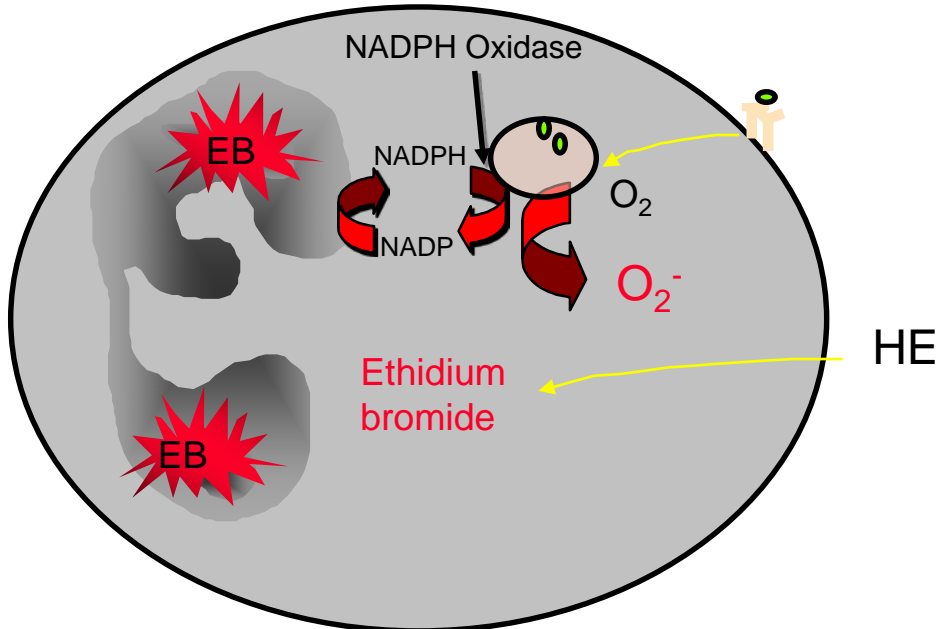
Hydroethidine

HE



EB

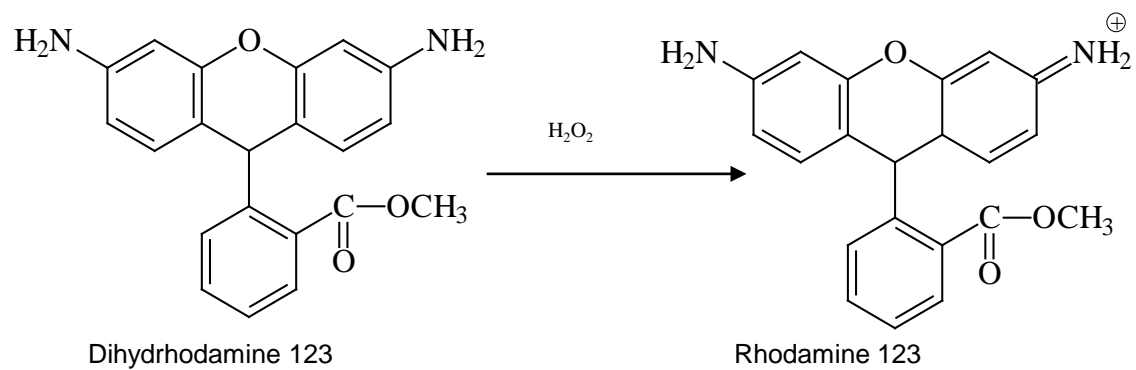
Fluorescent
Exc. 488
Em. 600



J.P. Robinson et al. 1998

<http://www.cyto.purdue.edu/>

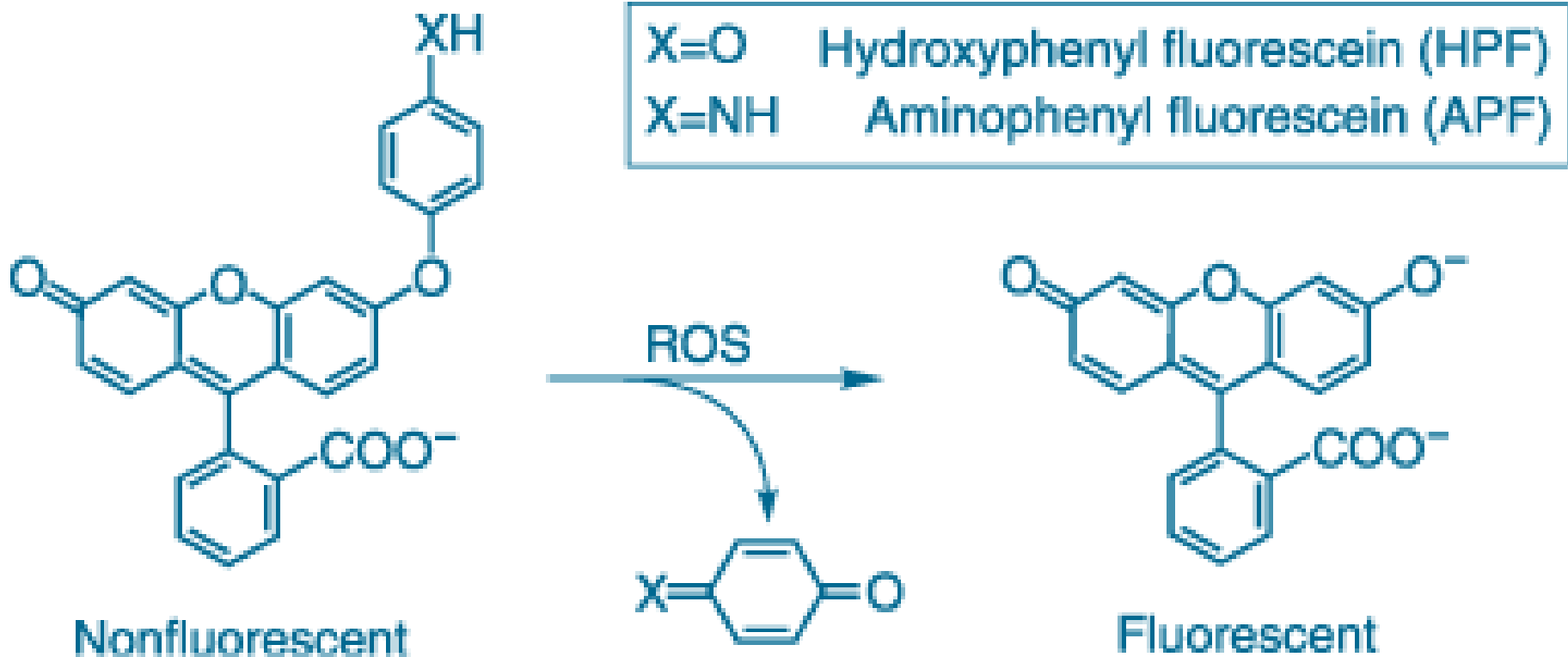
Dihydrhodamine 123



3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF) a 3'-(p-aminophenyl) fluorescein (APF)

HFP / AFP - detekce hydroxylových radikálů

AFP - detekce kyseliny chlorné



Srovnání specificity APF, HPF, and H₂DCFDA

ROS	APF	HPF	H ₂ DCFDA
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	<1	2	190
Hydroxyl radical (HO·)	1200	730	7400
Hypochlorite anion (-OCl)	3600	6	86
Nitric oxide (NO)	<1	6	150
Peroxyl radical (ROO·)	2	17	710
Peroxynitrite anion (ONOO-)	560	120	6600
Singlet oxygen (¹ O ₂)	9	5	26
Superoxide anion (·O ²⁻)	6	8	67
Autooxidation -exposure to fluorescent light	<1	<1	2000

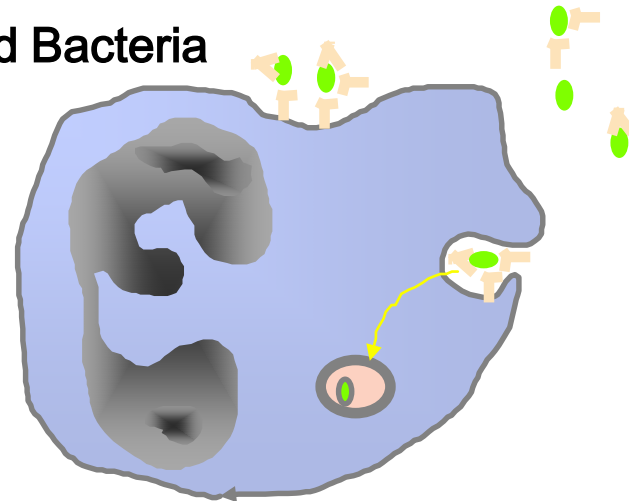
Detekce fagocytární aktivity s využitím FITC

- Pohlcení fluorescenčně značených částic (např. latexové částice, zymosanové částice, obarvené bakterie)
- Oponizace částice – porovnání s neopsonizovanou částicí udává informaci o expresy a funkčnosti opsoninových receptorů

Postup:

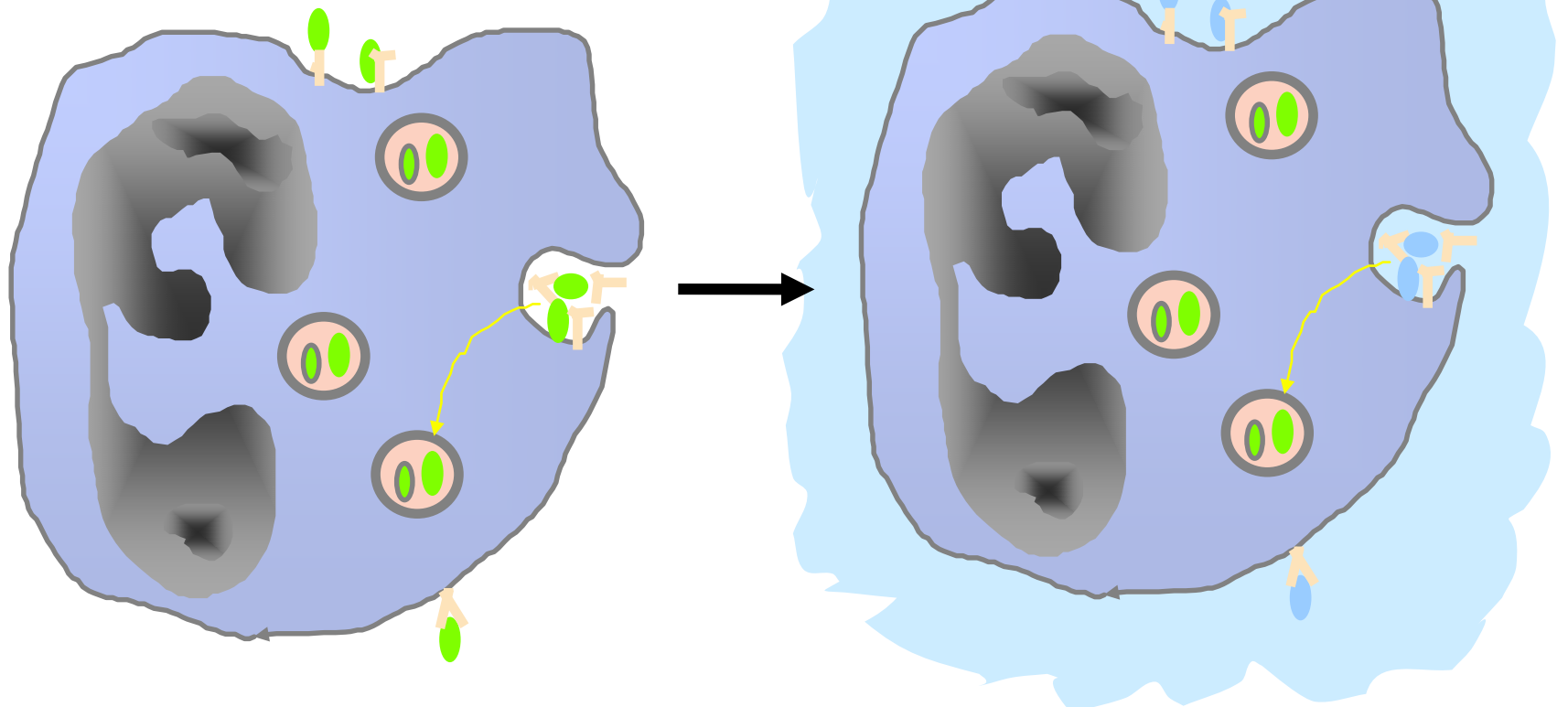
- Značení částice fluorescenční próbou
- Oponizace částic vybranými opsoníny (např. IgG, C3) nebo kompletním sérem daného druhu
- Izolované leukocyty jsou inkubovány dohromady s částicemi při teplotě fyziologické pro daný druh

FITC-Labeled Bacteria



- Rozlišení pohlcení částice do uzavřeného fagozómu od adherence na povrch fagocytu – aplikace trypanové modři (neprostupuje do živých buněk), která má zhášecí vlastnosti pro FITC

FITC-Labeled Bacteria



Detekce fagocytární aktivity s využitím buněk exprimujících fluorescenční proteiny

Obdobný princip jako u fluorescenčně značených

Výhody

bez potřeby bakterie nebo buňky určené k fagocytóze barvit fluorescenční značkou

Nevýhody

Není možné určit mezi buňkou která je plně pohlcena nebo jenom na povrchu fagocytu

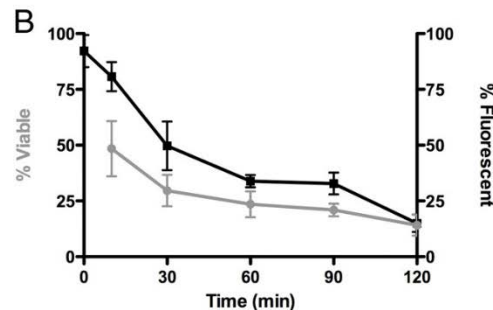
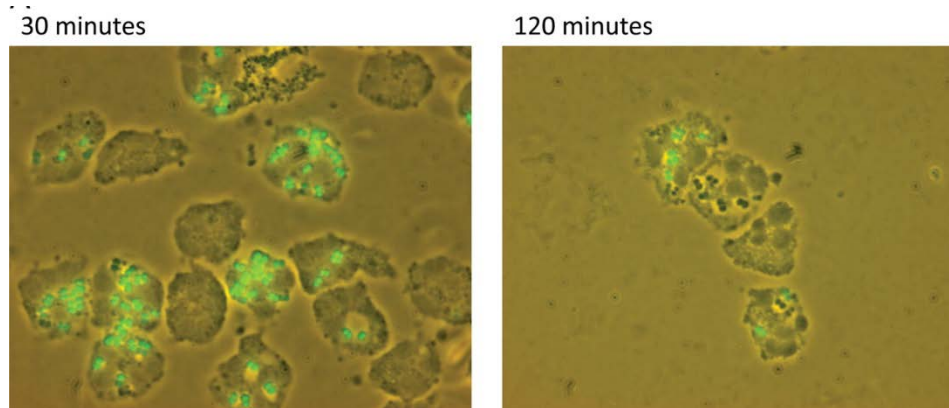
Ztráta signálu z fluorescenčního proteinu (např. GFP) díky jeho degradaci ve fagozómu

Degradace GFP ve fagozómu

Usmrcování bakterií nebo buněk exprimujících fluorescenční proteiny (např. GFP)
- degradace i těchto proteinů a postupná ztráta fluorescenčního signálu

Nevýhoda: Falešně negativní data při detekci fagocytózy

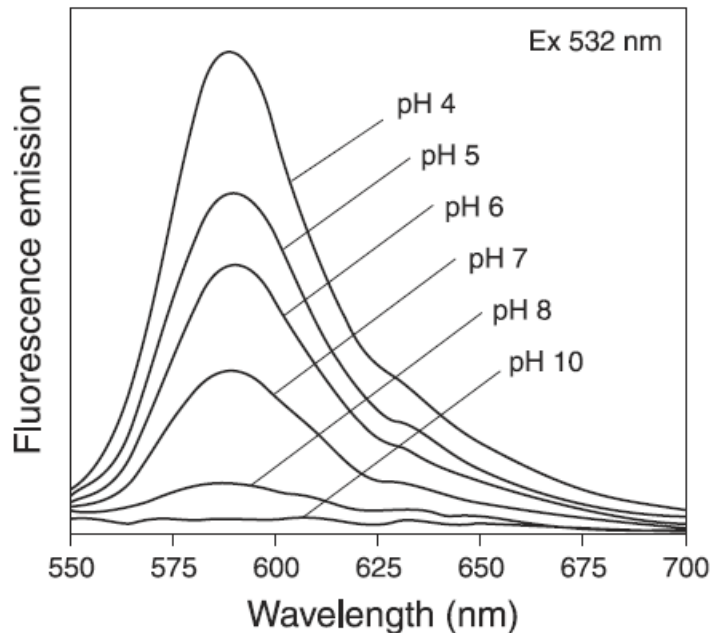
Využití: pro stanovení relativní viability bakterií ve fagozómu



Jamie Schwartz et al. J
Immunol 2009;183:2632

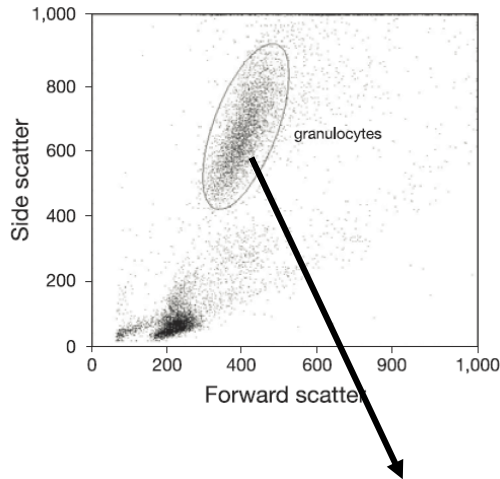
Detekce fagocytózy pomocí pHrodo-succinimidyl ester

- Nefluorescenční pHrodo se změní na fluorescenční při změně pH, ke které dochází ve fagozómu
- Detekce pouze plně pohlcených částic či buněk



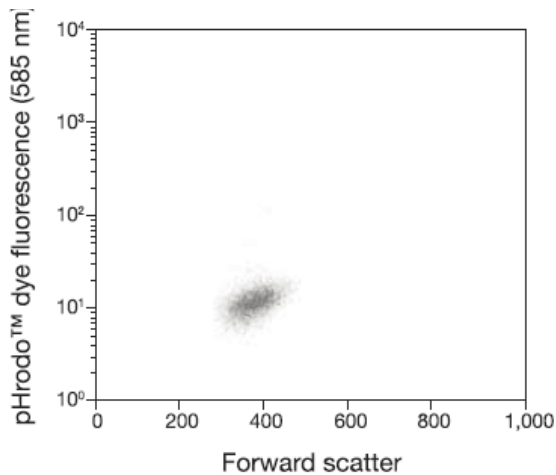
Fluorescenční emisní spektra
pHrodo™ barvených *E. coli* v pufrach
pH od 4 do 10.

Detekce fagocytózy pomocí pHrodo-succinimidyl ester

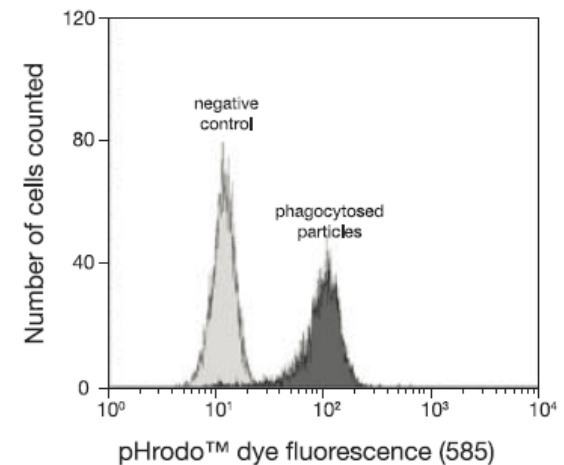
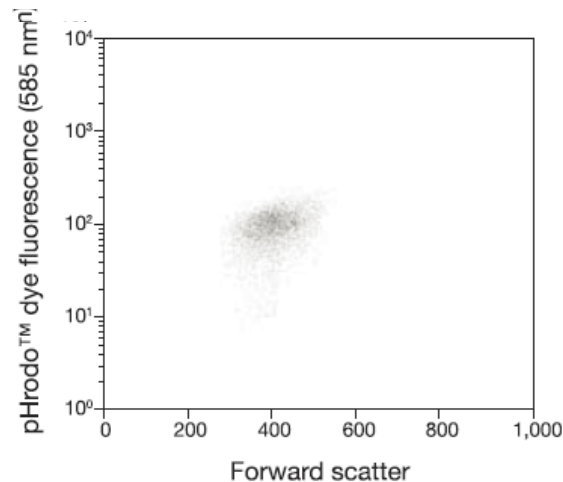


Detekce fagocytózy pHrodo značených latexové částic, zymosanových částice, obarvených bakterií.

Nestimulovaná kontrola



Buňky stimulované pHrodo barvenými latex. částicemi

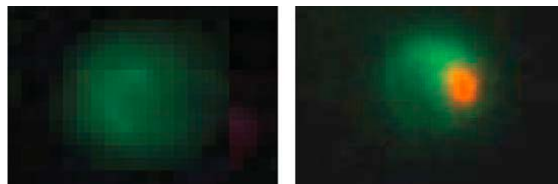
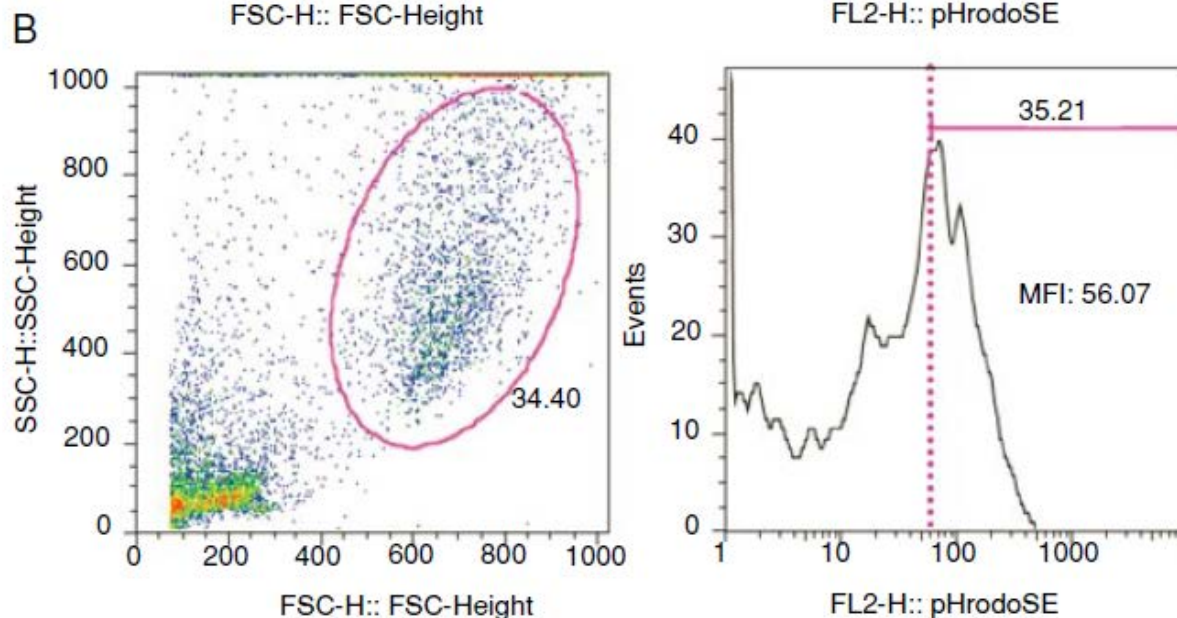
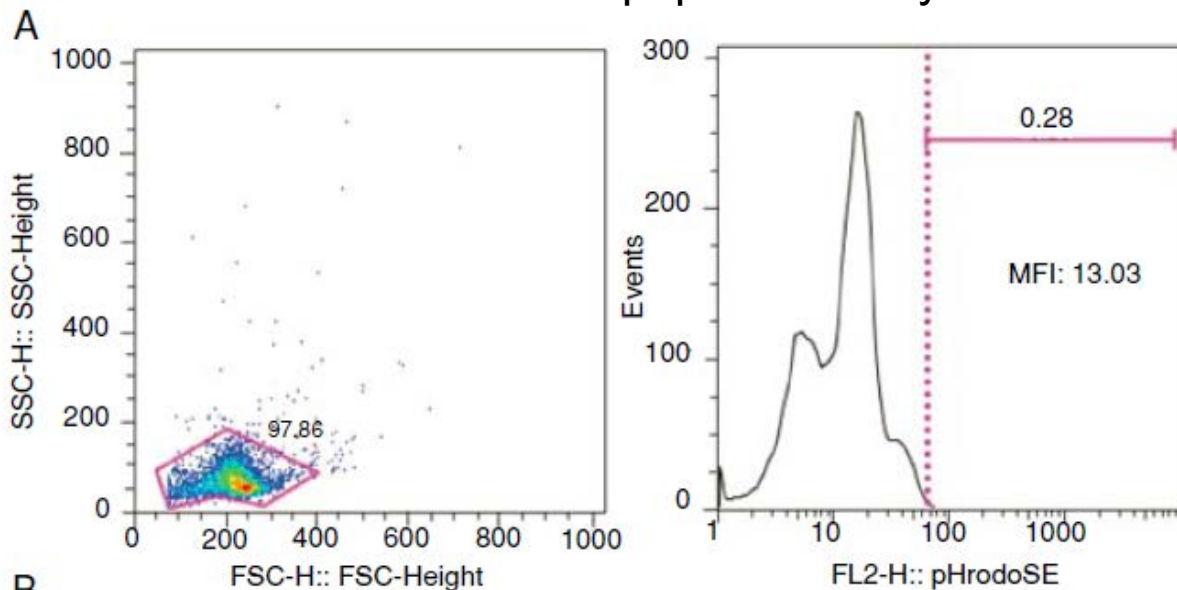


Detekce fagocytózy s využitím pHrodo-SE

Detekce pohlcení (fagocytózy) apoptických buněk, které byly označeny **pHrodo-succinimidyl ester (SE)**

Makrofágy pohlcující apoptické buňky

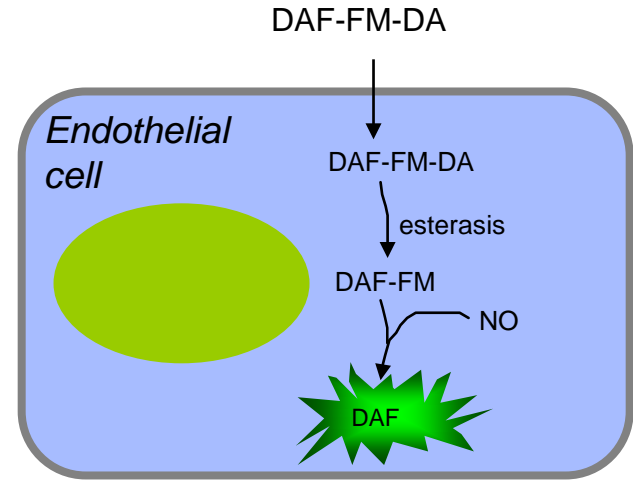
Značené apoptické buňky



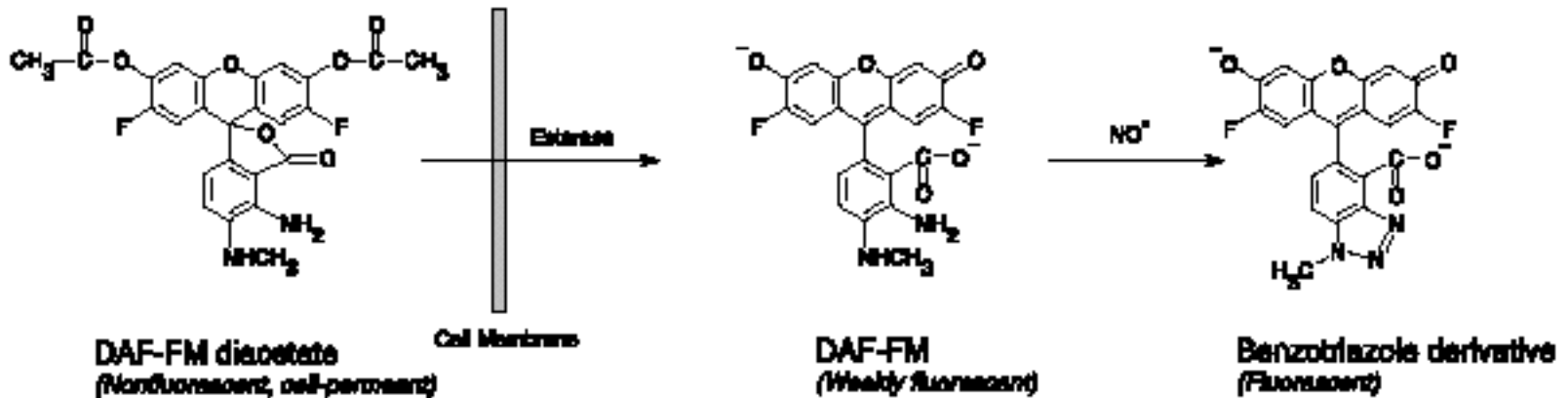
Detekce produkce oxidu dusnatého (NO)

4,5-diaminofluorescein diacetate
(DAF-2 diacetate)

4-amino-5-methylamino- 2',7'-
difluorofluorescein
(DAF-FM diacetate)



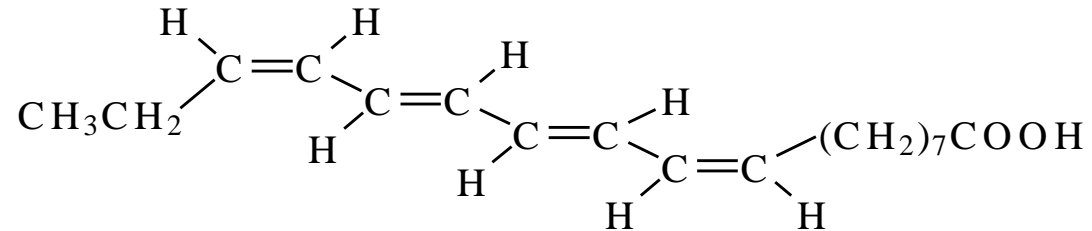
Exc. 495nm Em. 515nm



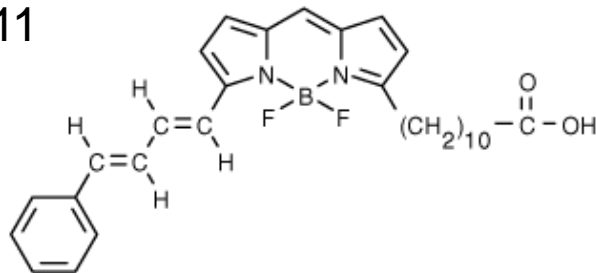
Detekce lipidové peroxidace

Oxidace lipidové detekční látky spojena s nárůstem nebo spektrální změnou fluorescence

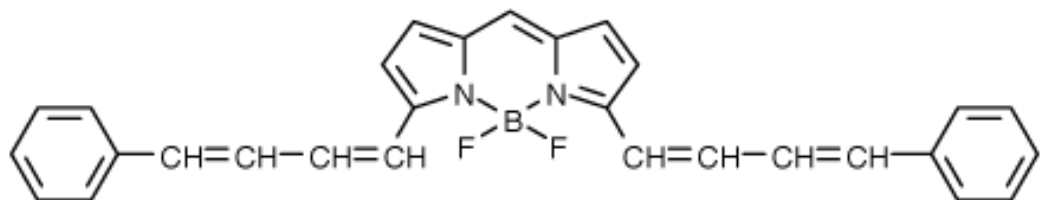
cis-Paranaric Acid



BODIPY581/591 C11



BODIPY
665/667



Detekce intracelulární produkce cytokinů

- Charakterizace různých subpopulací leukocytů, které lze rozlišit na základě rozdílné produkce cytokinů
- Charakterizace funkčních vlastností buněk odpověď na vybraný stimul

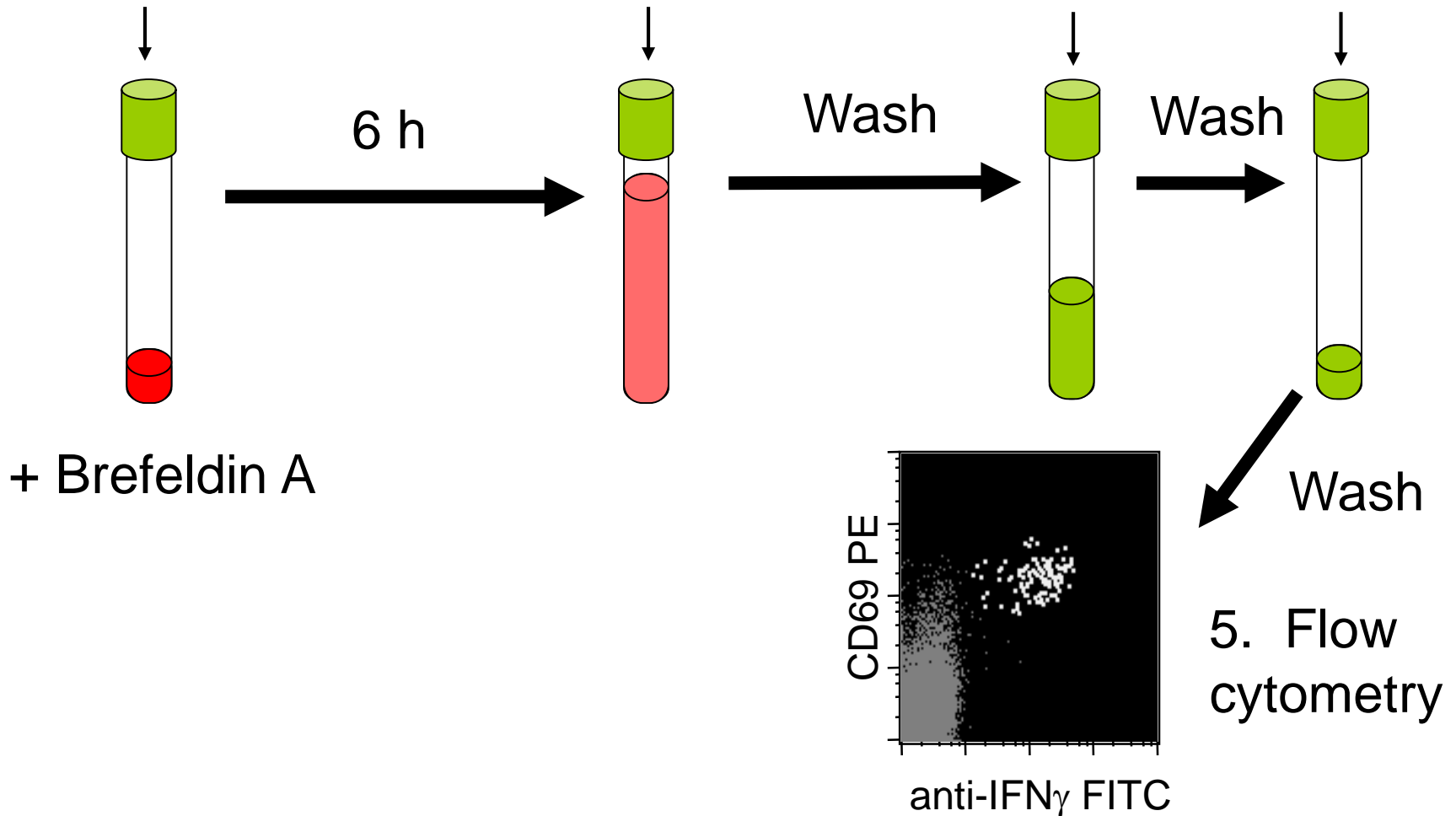
BD FastImmune™ Cytokine Flow Cytometry Protocol

1. Stimulate whole blood or PBMC

2. Lyse/Fix

3. Permeabilize

4. Stain



Využití průtokové cytometrie v diagnostice alergických onemocnění

Diagnostika alergií a hypersensitivit

- Výsledek neadekvátní reakce na neškodné vnější alergeny
- Alergen - jakýkoliv Ag schopný vyvolat alergickou odpověď
- Reakce typu I-IV
- Nejčastější je reakce typu I - spojena s tvorbou IgE proti alergenům zevního prostředí

- o Kožní testy (Prick test, Epikutánní testy)
- o Provokační testy (oční-spojivkový, nosní, bronchiální)
- o Krevní testy - vyšetření specifických IgE

(CAST ELISA, microarray, průtoková cytometrie - Test aktivace bazofilů (BAT))



Test aktivace bazofilů

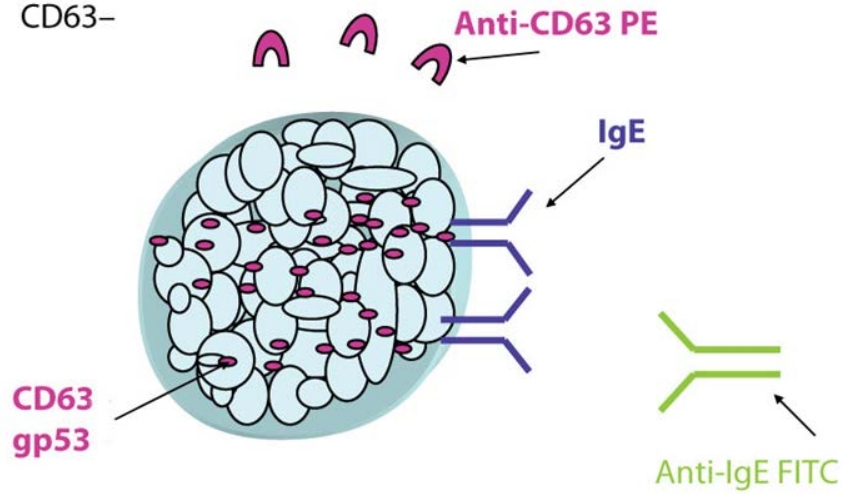
- *in-vitro* test založen na sledování znaků objevujících se po aktivaci bazofilů alergenem ⇒ CD63, CD203c

- Výsledkem - % aktivovaných bazofilů
- BASOTEST[®], Flow-CAST[®], CAST[®]-COMBI

Alergen	Pozitivní nález
Inhalační alergeny	> 15 %
Potraviny	> 15 %
Latex	> 15 %
Hmyzí jedy	> 10 %
Léky	> 5 %
Acylpyrin	> 5 %
Pozitivní kontrola (anti IgE)	> 15 %

Basophil phenotype at rest:

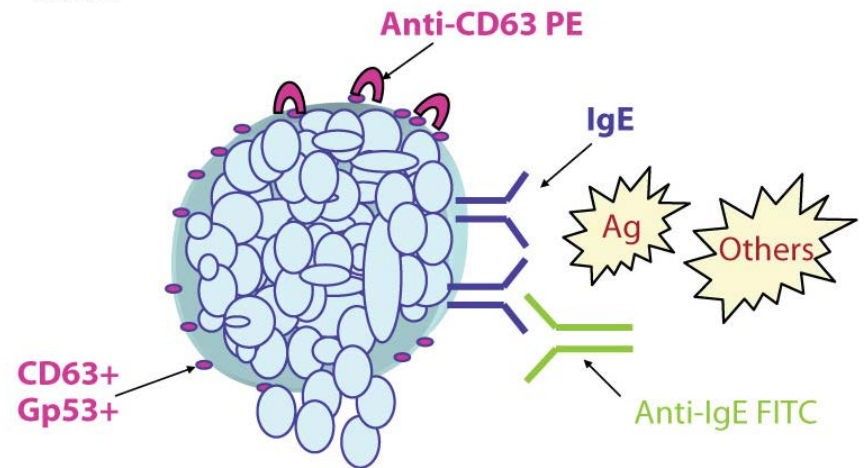
IgE+
CD63-



aktivace

Basophil phenotype after activation:

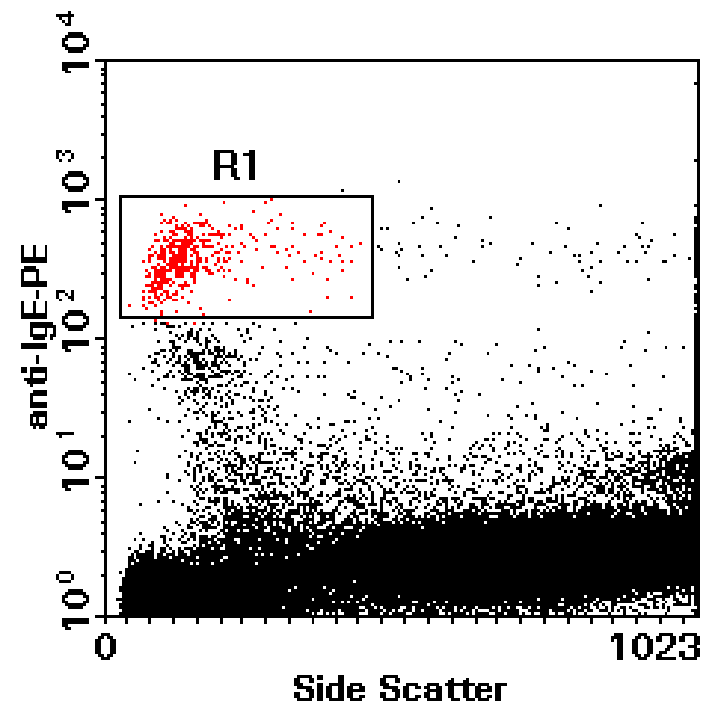
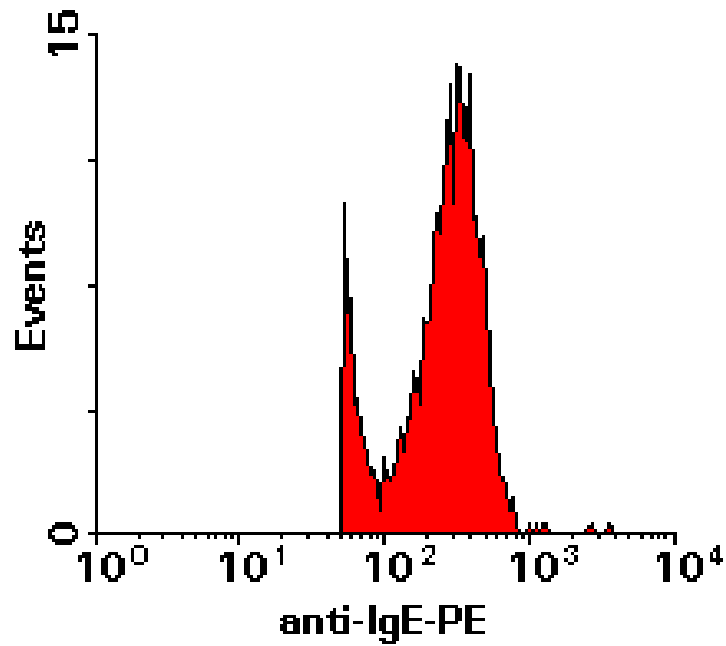
IgE+
CD63+



BASOTEST®

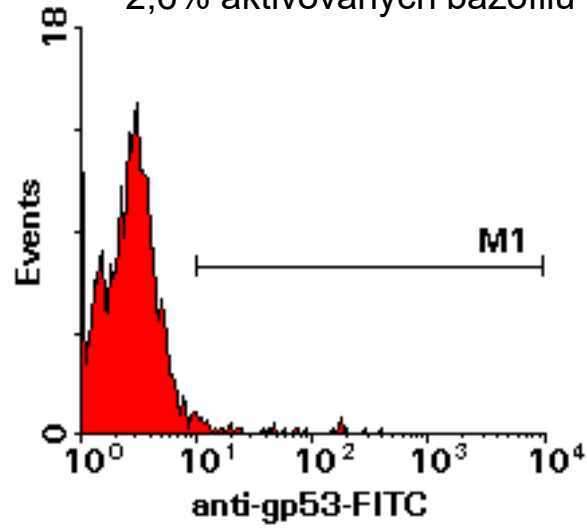
- o Plná krev odebrána do heparinu, inkubována se stimulačním pufrem (10 min/37°C) ⇒ inkubace s alergenem (20 min/37°C)
- o Pozitivní kontrola – fMLP
- o Aktivace bazofilních granulocytů indukuje fúzi granulí a uvolňování zánětlivých mediátorů ⇒ proces degranulace zastaven inkubací vzorku na ledu
- o Buňky jsou značeny
 - monoklonální protilátka anti-IgE-PE
 - monoklonální protilátka anti-CD63-FITC (anti-gp53-FITC) (rozpozná CD63 (gp53) na povrchu aktivovaných bazofilů)
- o Lýze erytrocytů ⇒ promytí ⇒ procento aktivovaných bazofilů určeno pomocí průtokového cytometru

BASOTEST[®]



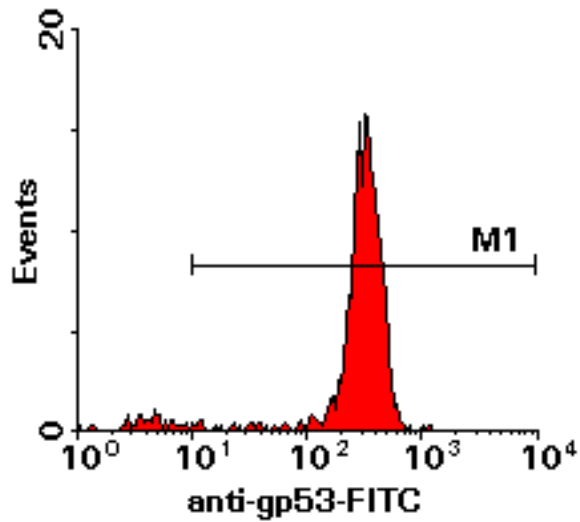
negativní kontrola (1.8-9.5%)

2,6% aktivovaných bazofilů



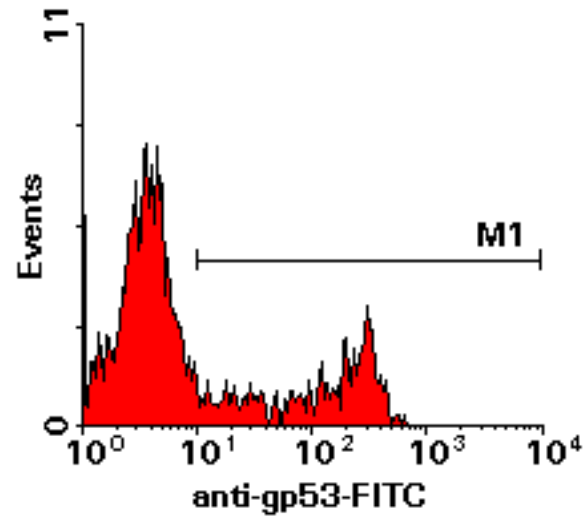
pozitivní kontrola (25.2.-100%)

95,1% aktivovaných bazofilů



vzorek

29,5% aktivovaných bazofilů



Basotest (BAT) - shrnutí

- o Patří mezi méně často používané vyšetřovací metody (pouze při diagnostických nejasnostech)
- o BAT má vyšší senzitivitu než široce užívané vyšetření specifických IgE a poměrně vysokou specificitu
- o Možnost využití při diagnostice alergií na pyly, potraviny, hmyzí jedy, léky

Krevní destičky (trombocyty)

- **Imunofenotypizace receptorů krevních destiček**

Určení vrozených poruch, stavu aktivace destiček in vivo a aktivovatelnost destiček

- Detekce a charakterizace **prokoagulačních mikročástek** derivovaných z krevních destiček

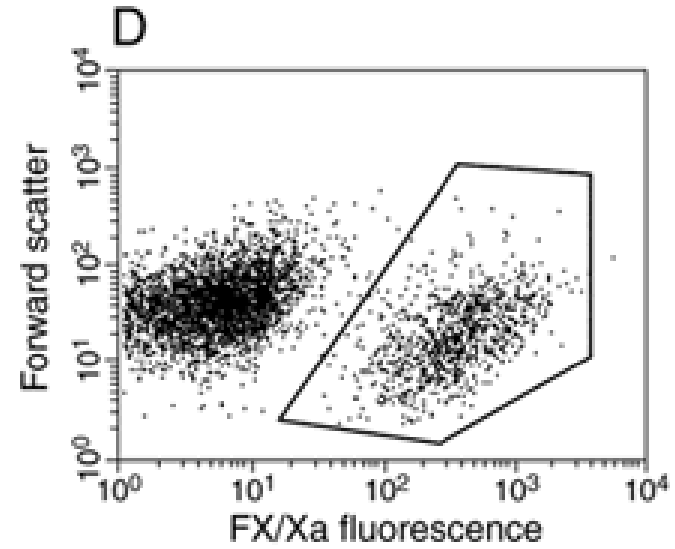
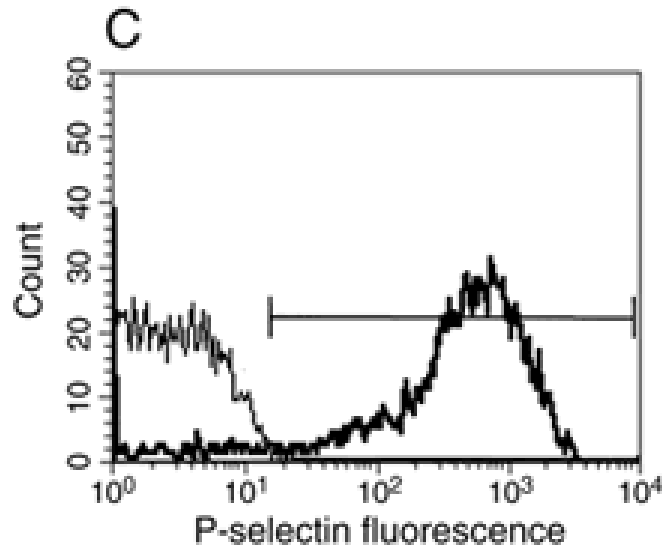
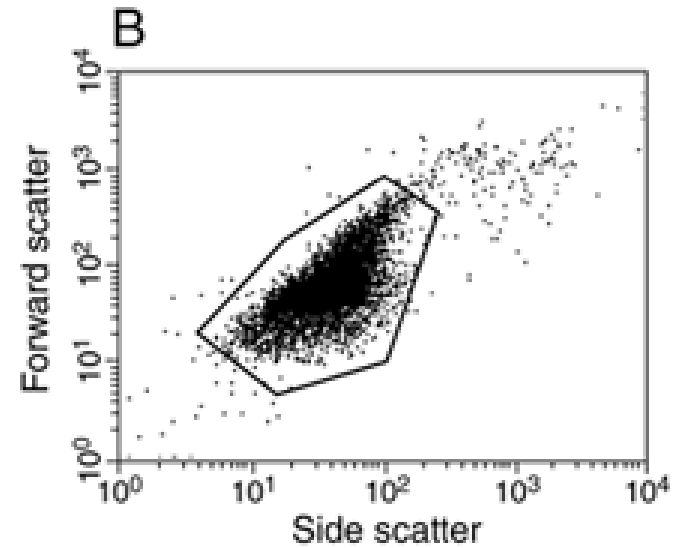
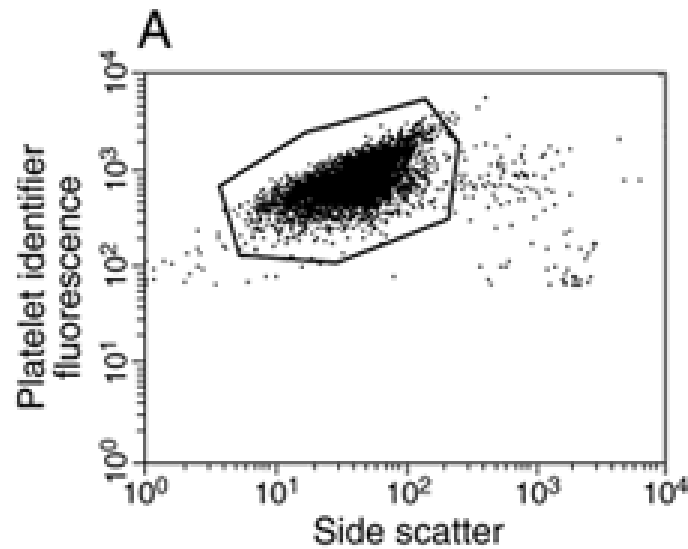
Imunofenotypizace receptorů trombocytů

- Stanovení fenotypu (stavu destiček v čerstvě odebraném vzorku)
- Zhodnocení reaktivity destiček jako odpověď na agonistu
- Stanovení receptorů klidových destiček jako jsou GPIIb-IIIa (CD41, CD61)
GPIb-IX-V (CD42a, CD42b, CD42d)
- Aktivované exprese - P-selektinu (CD62P) nebo PAC1

Určení prokoagulačních mikročástek

- Derivované z trombocytů po jejich aktivaci
- Určení díky navázání annexinu V nebo protilátek specifických pro koagulační faktory V/Va nebo X/Xa
- Zhodnocení schopnosti destiček vytvářet mikročástky

Průtoková cytometrie



Defekty trombocytů

- **Bernard – Soulierův syndrom**

- absence komplexu GPIb-IX-V

- projevy: mírná trombocytopenie

- zvětšení krevních destiček

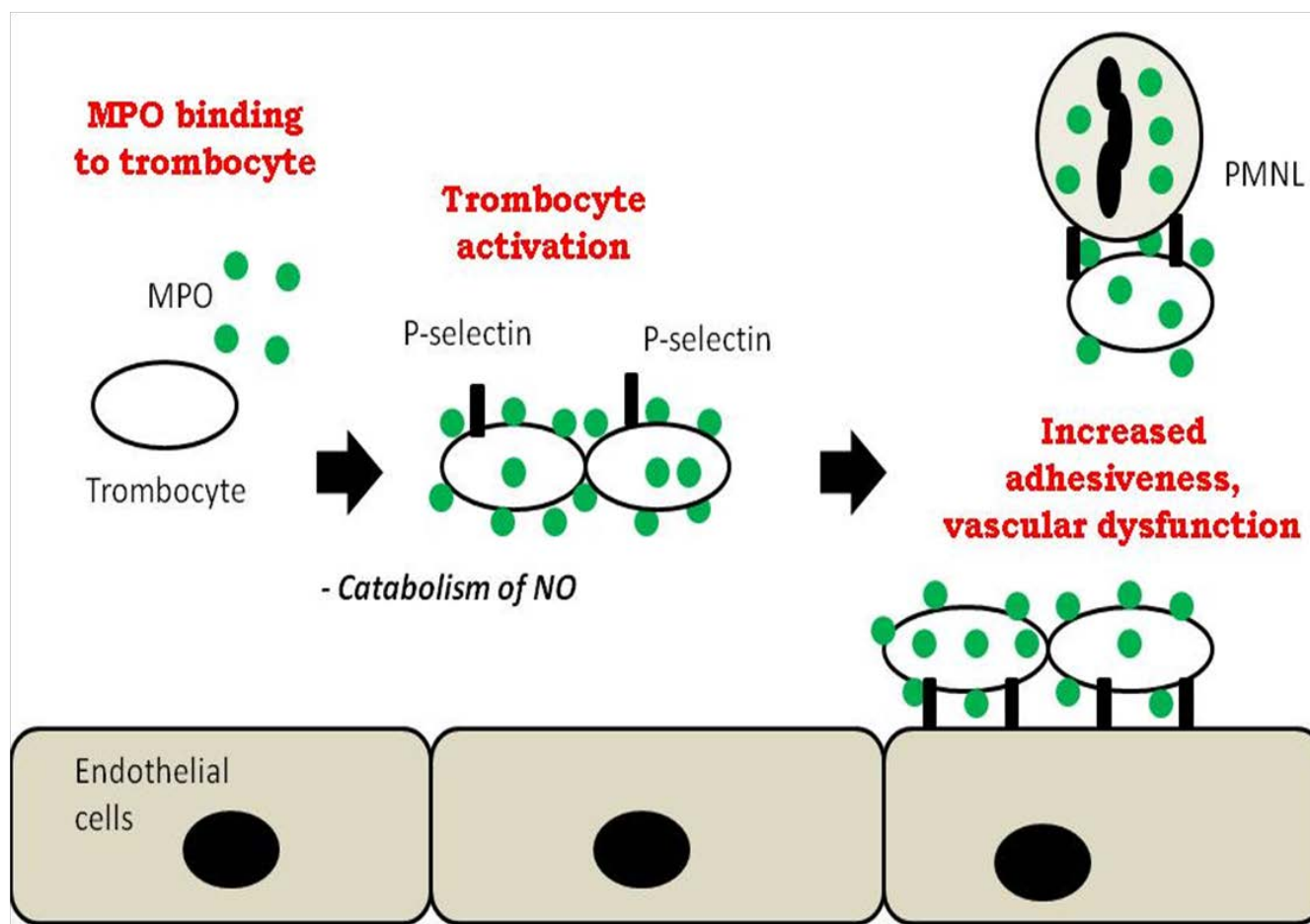
- absence agregace destiček

- určení pomocí anti-CD 41 nebo anti-CD 61

Defekty trombocytů

- **Glanzmannova trombastenie**
 - autosomálně recesivní porucha
 - defekt integrinu komplexu GPIIb-IIIa
 - projevy: delší čas krvácení (fibrinogen nespustí dominový efekt destiček)
pomalé rozpouštění sraženiny
 - určení pomocí anti-CD42a nebo anti-CD42b

Experimentální studie sledující vazbu myeloperoxidázy (MPO) na trombocyty a vliv na jejich aktivaci

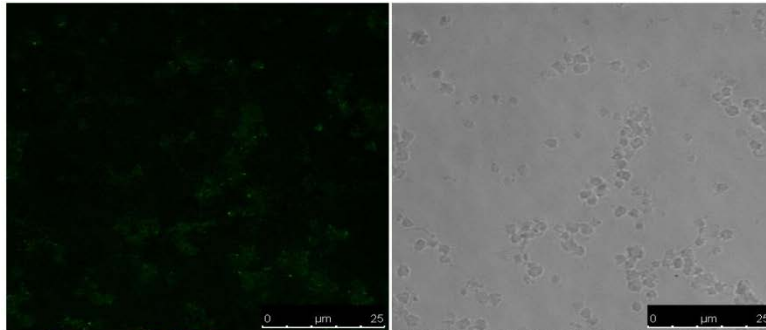


MPO localization on human thrombocytes

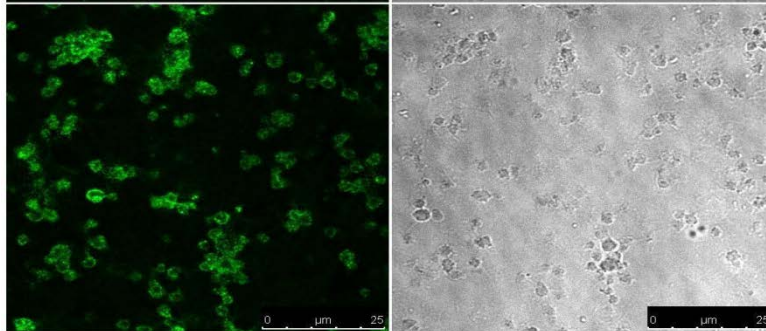
Anti-MPO Ab

Goat anti-rabbit IgG Alexa 488

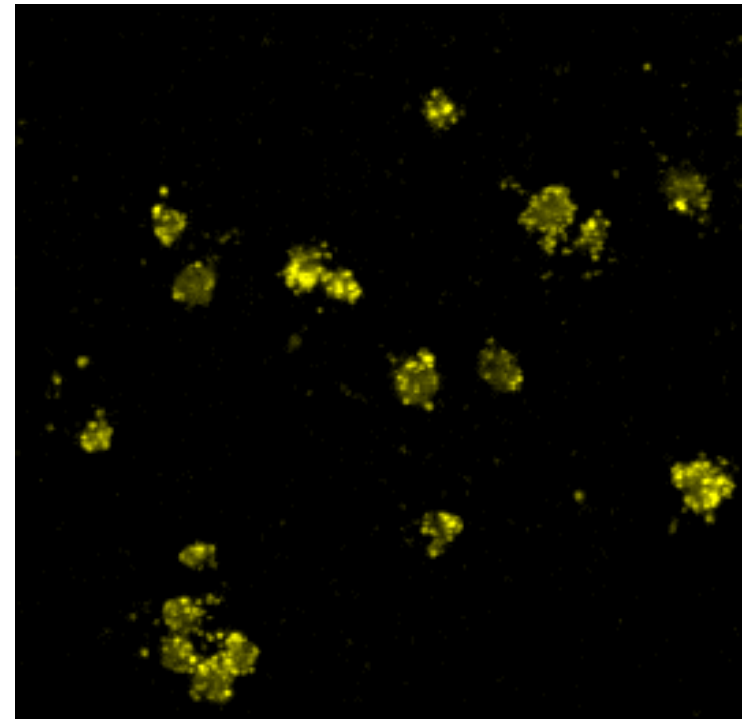
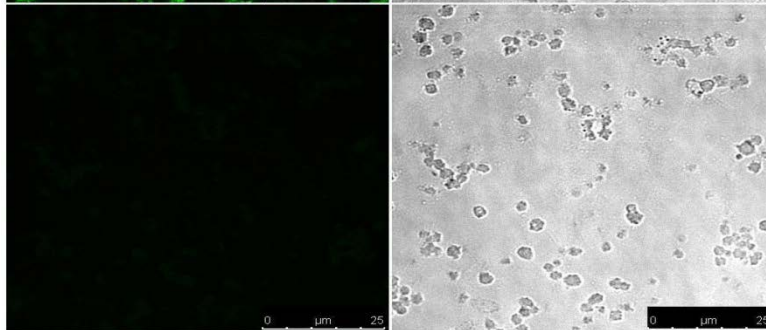
- MPO



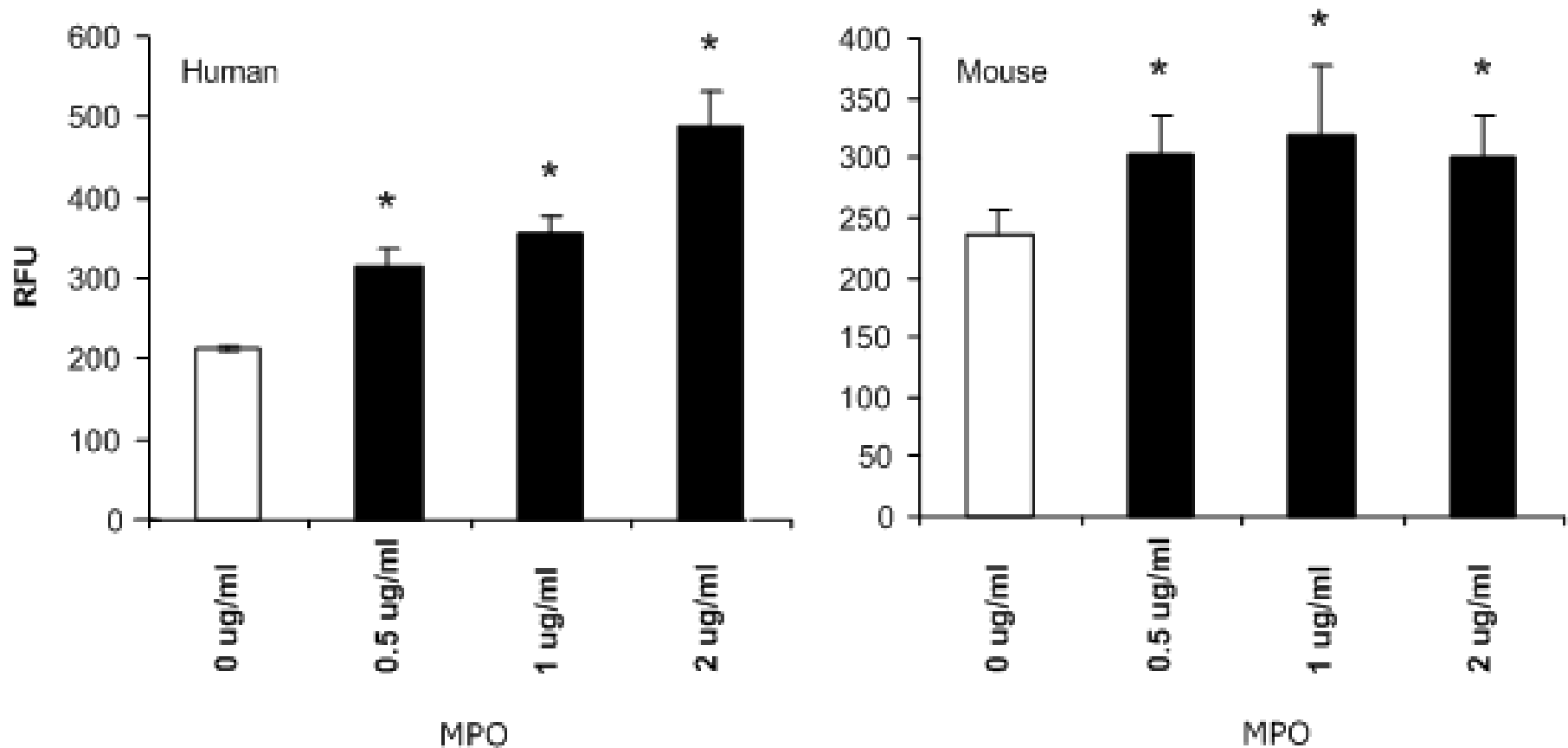
+ MPO



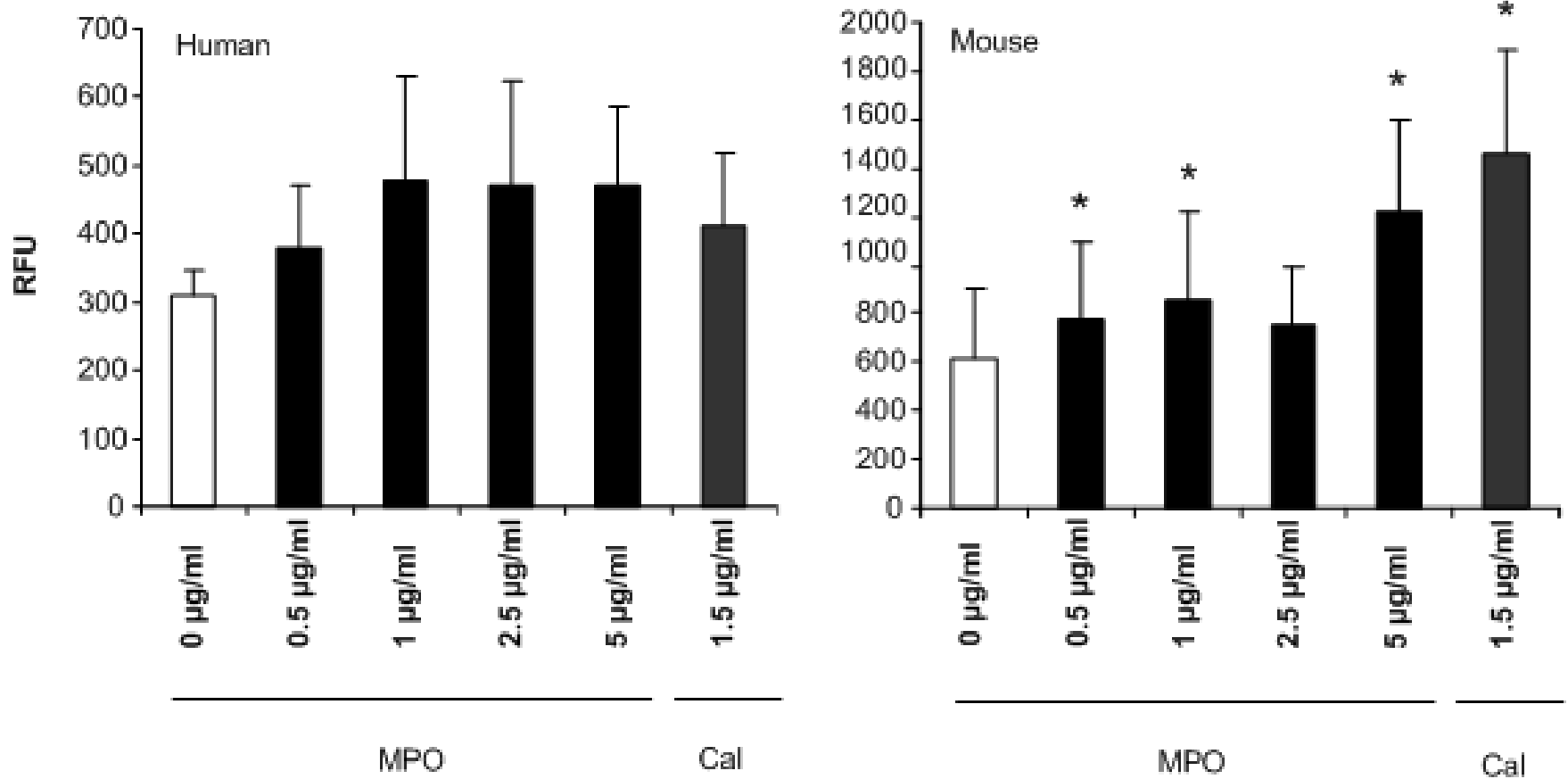
Control
(- Anti- MPO Ab)



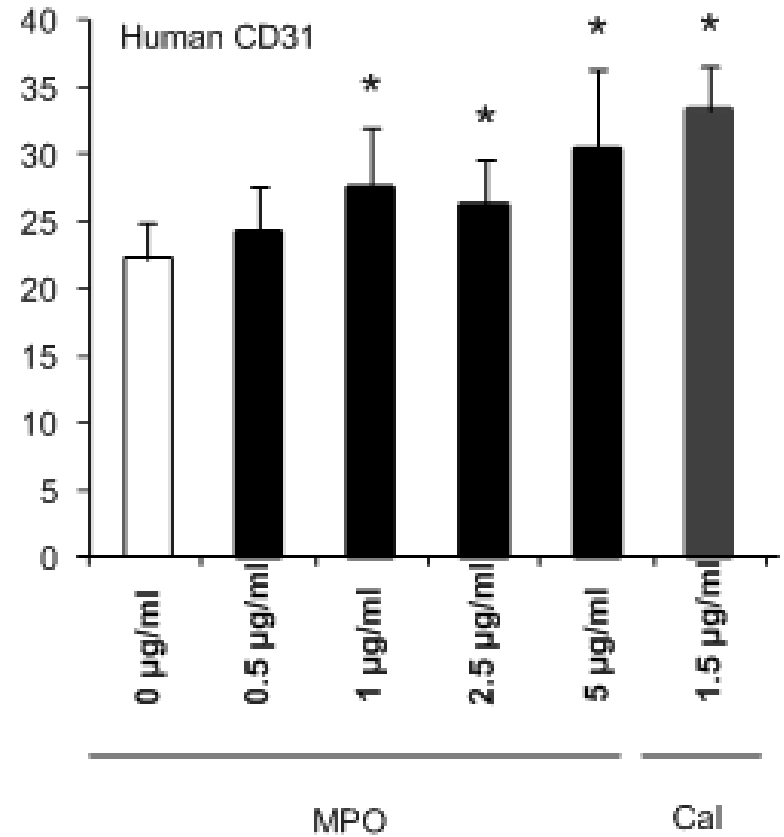
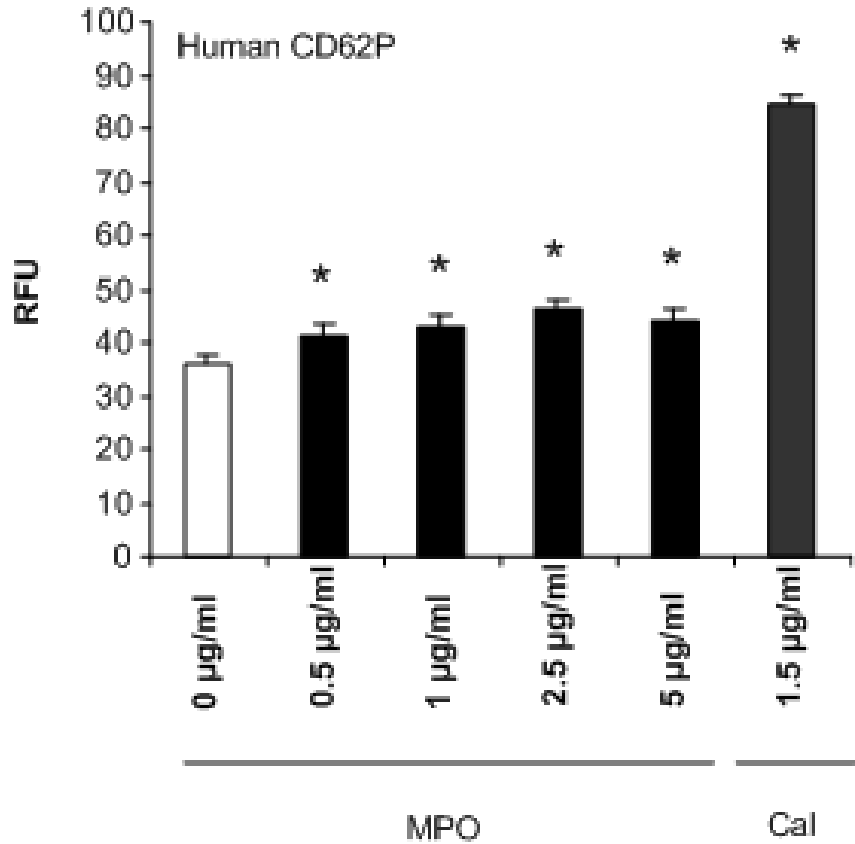
Detekce navázané MPO na povrch destiček průtokovým cytometrem



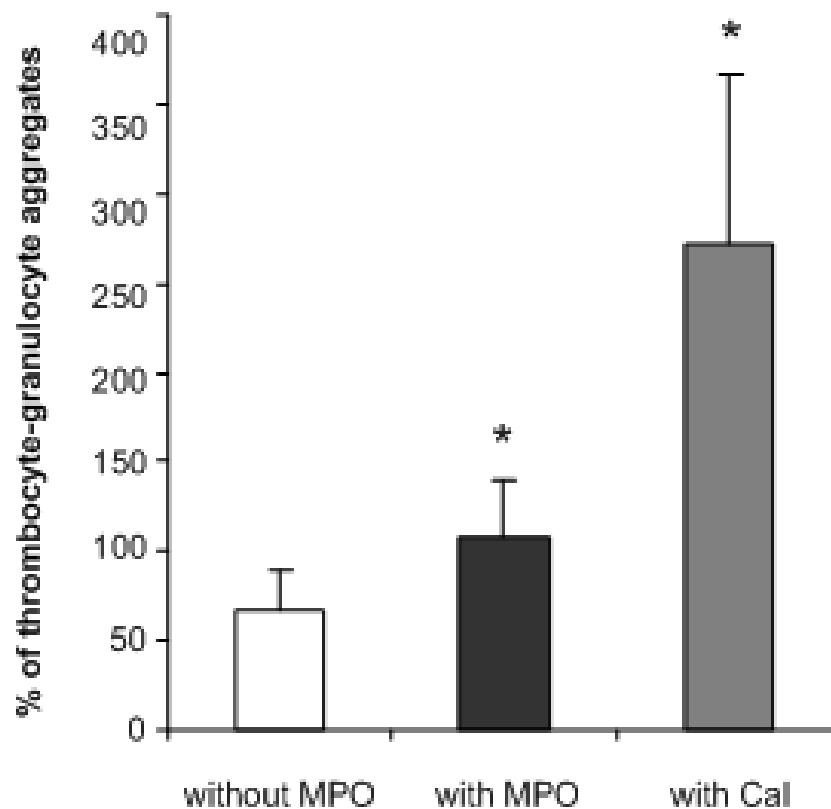
Detekce aktivovaných stresových vláken F-aktinu v destičkách – znak aktivace



Detekce CD62P (P-selectin) and CD31 (PECAM-1) na povrchu destiček – znak aktivace



Detekce agregátů destiček s polymorfonukleárními granulocyty



Úskalí detekce vlastností a funkcí destiček pomocí průtokové cytometrie

- Zpracování vzorků krve do 30 minut
- Použití dostatečně široké jehly
- Nepoužívat jako antikouagulant EDTA a heparin
- Fixace formalinem pro lepší rozpoznávání protilátkami (x PAC1)
- Prokoagulační částičky často vykazují intenzivní autofluorescenci
- Při použití trombinu nutné přidat CaCl_2

Shrnutí přednášky příklady aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

- **Imunofenotypizace**

- **Funkční testy**

Změna exprese vybraných povrchových markerů

Produkce cytokinů

Produkce volných radikálů fagocyty

Fagocytární aktivita

Tvorba oxidu dusnatého

Lipidová peroxidace

Aktivace bazofilů

Stanovení funkčních vlastností trombocytů