

# Aplikace průtokové cytometrie v klinické imunologii a hematologii

## *část II*

Lukáš Kubala  
[kubalal@ibp.cz](mailto: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)
- Produkce volných radikálů fagocyty
- Fagocytární aktivita
- Tvorba oxidu dusnatého

## Diagnostice alergických onemocnění

- Stanovení funkčních vlastností trombocytů

# Změna povrchové exprese antigenu (receptoru)

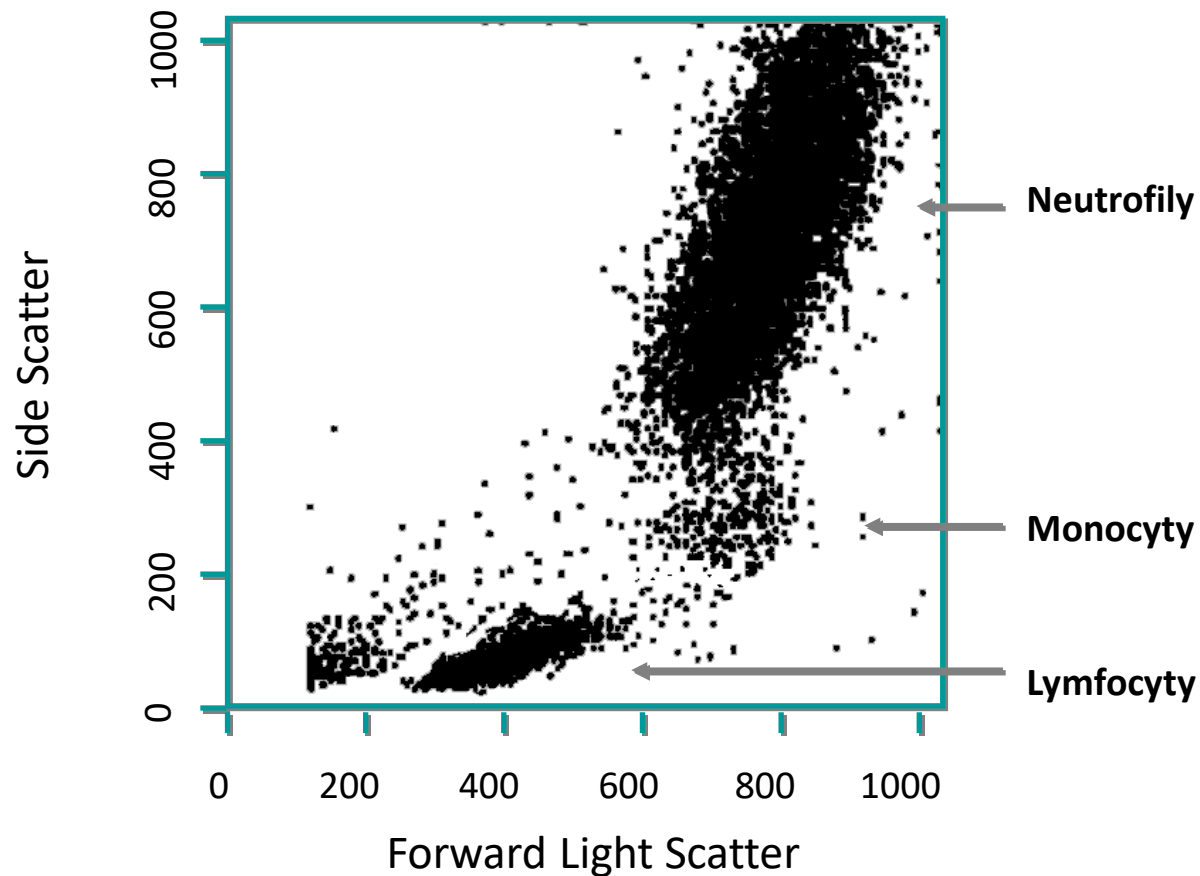
Změna povrchové exprese antigenu charakteristického pro aktivovaný stav dané buněčné subpopulace. Antigenem je většinou receptor spojený s funkcí toho určitého typu buněk

## *Příklady:*

- CD62L - obecně na klidových leukocytech (snížení = aktivace)
- CD25, CD69, HLA-DR – zvýšený = aktivace lymfocytů
- CD11b - aktivace polymorfonukleárních granulocytů a monocytů
- CD62P - aktivace krevních destiček

# **Změna povrchové exprese antigenu (receptoru) u lymfocytů**

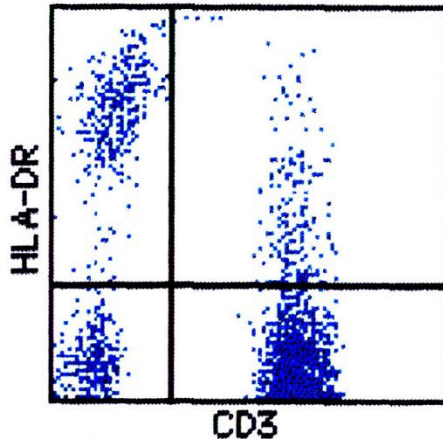
# SS a FS leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů



# 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  
FL1 FL2  
 Marker 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

# 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

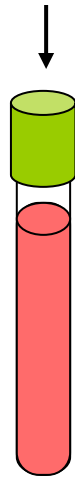
1. Stimulate whole blood or PBMC



6 h



2. Lyse/Fix



Wash



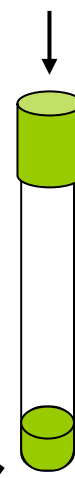
3. Permeabilize



Wash



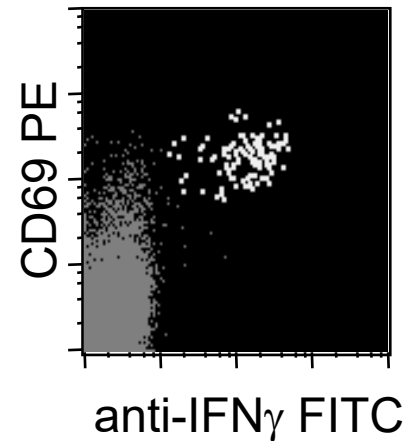
4. Stain



Wash



+ Brefeldin A



5. Flow cytometry

# 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

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

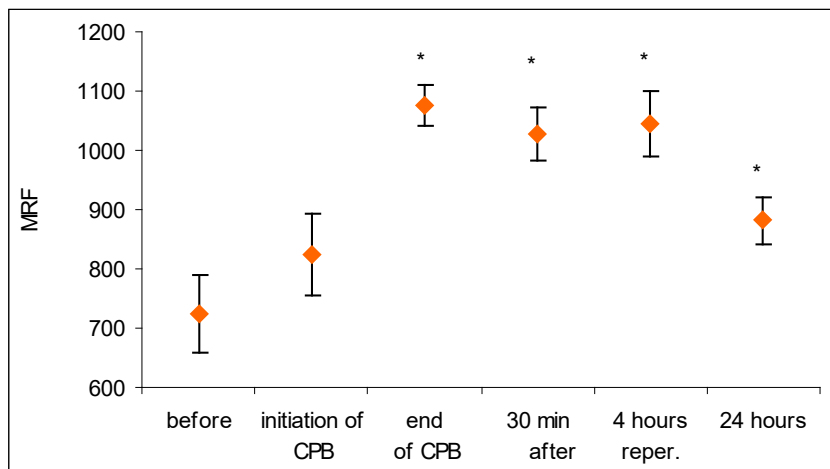
# Detekce funkcí fagocytů

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

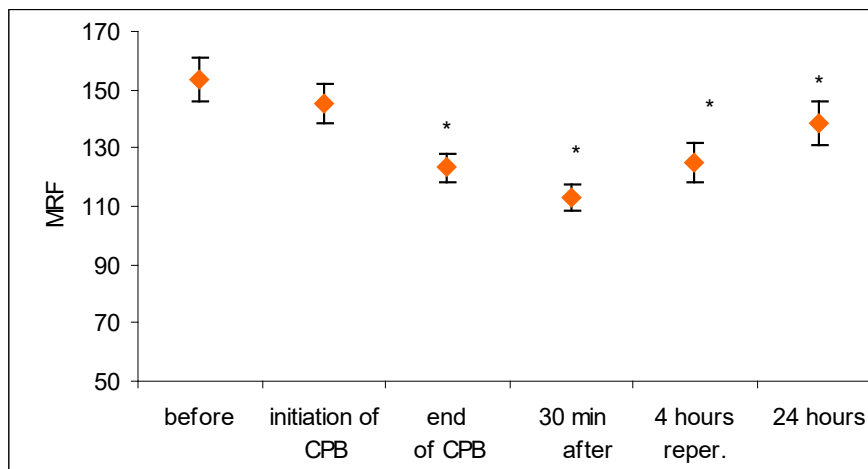
# Stanovení aktivace granulocytů v periferní cirkulaci s využitím detekce povrchové exprese CD11b a CD62L

## Aktivace neutrofilních granulocytů během otevřené operace srdce

CD11b

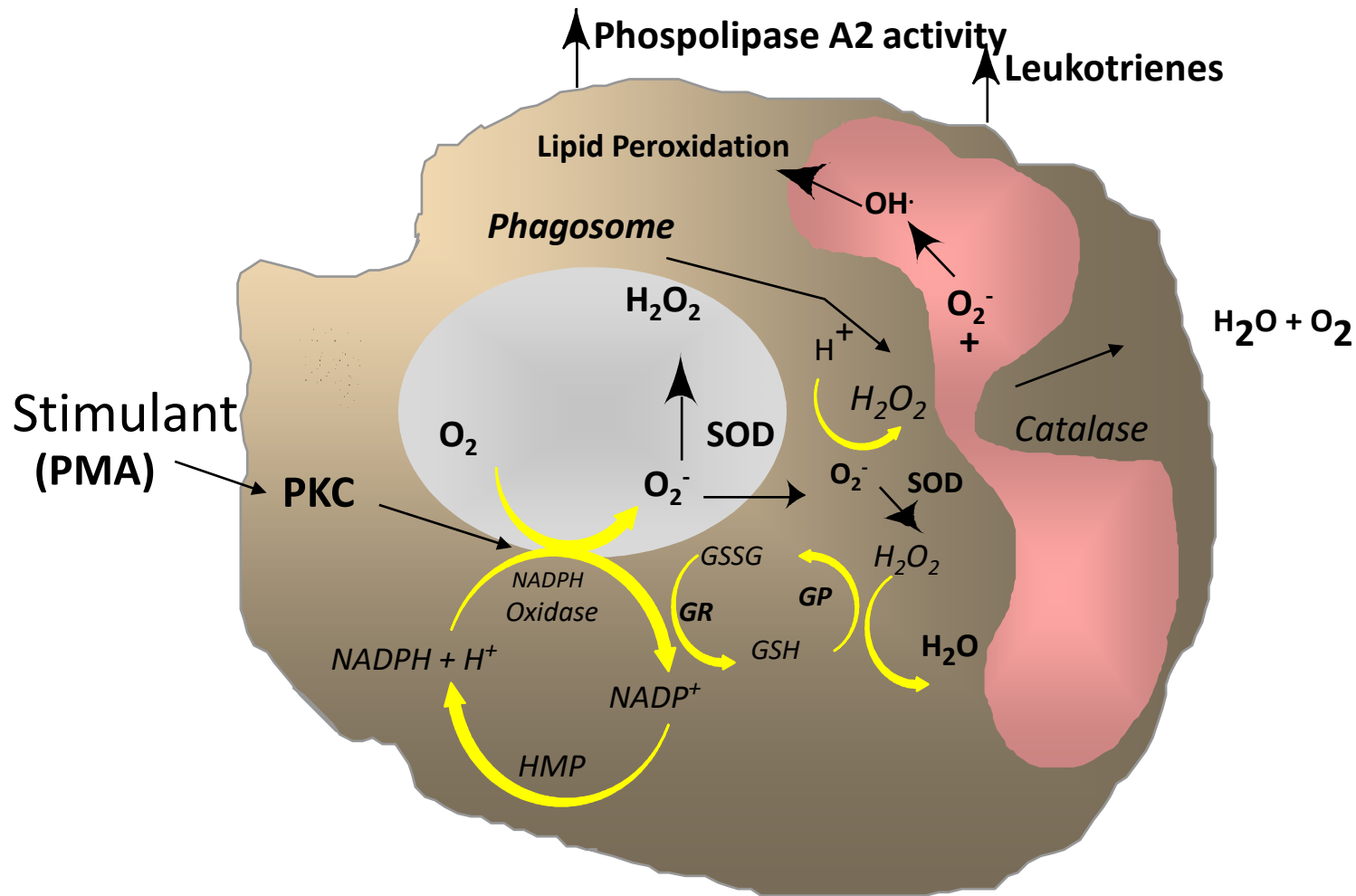


CD62L



# Detekce volných radikálů

## *Oxidativní vzplanutí fagocytů*

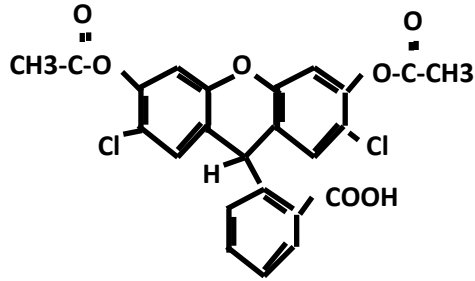


# Fluorescenční próby pro detekci volných radikálů

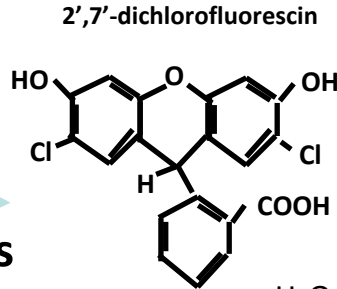
- dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) and derivatives
- dihydroethidine (HE)
- dihydrorhodamine 123 (DHR 123) and dihydrorhodamine 6G
- dihydrocalcein AM
- Amplex Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)
- 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein (APF) and 3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF)
- (pentafluorobenzoyl)aminofluorescein diacetate (PFB-H<sub>2</sub>FDA)
- MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator
- MitoTracker Orange (CM-H<sub>2</sub>TMRos) and MitoTracker Red (CM-H<sub>2</sub>XRos)



**2',7'-dichlorofluorescein diacetate**

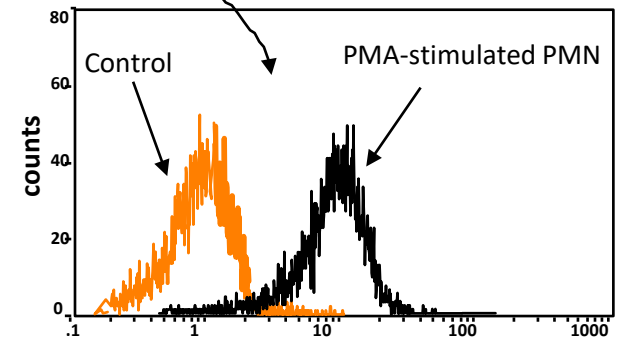
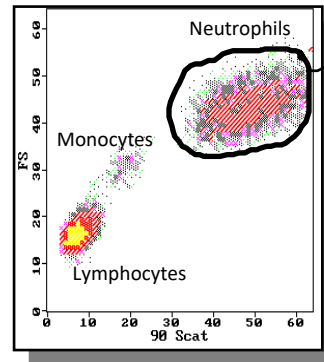
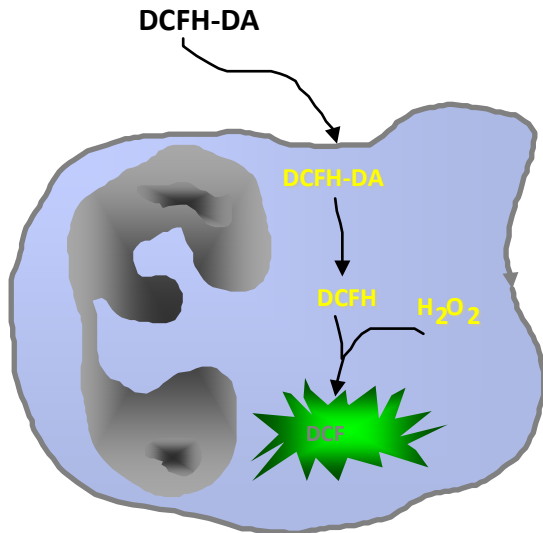
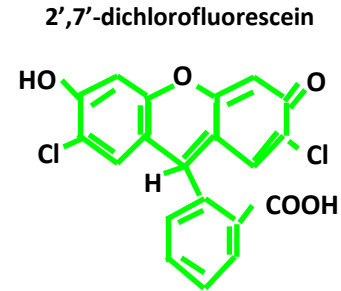


Cellular Esterases  
**Hydrolysis**



$H_2O_2$   
**Oxidation**

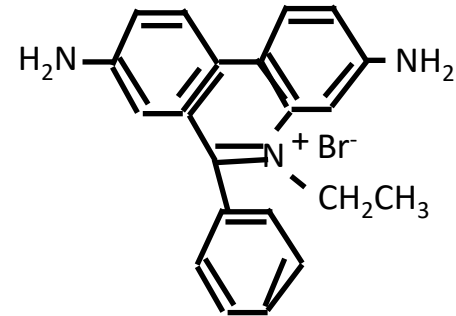
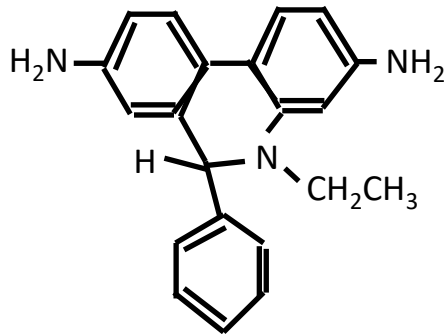
**Fluorescent**



log green (FITC) fluorescence

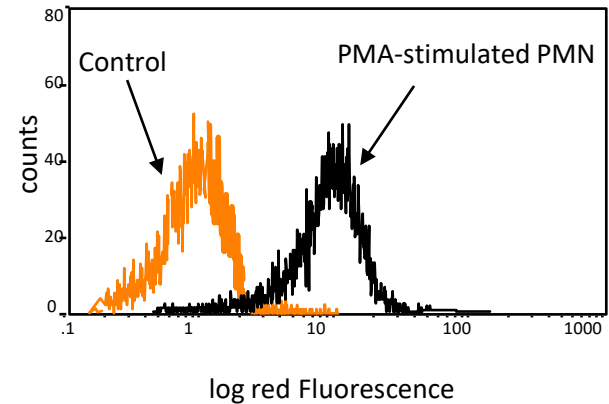
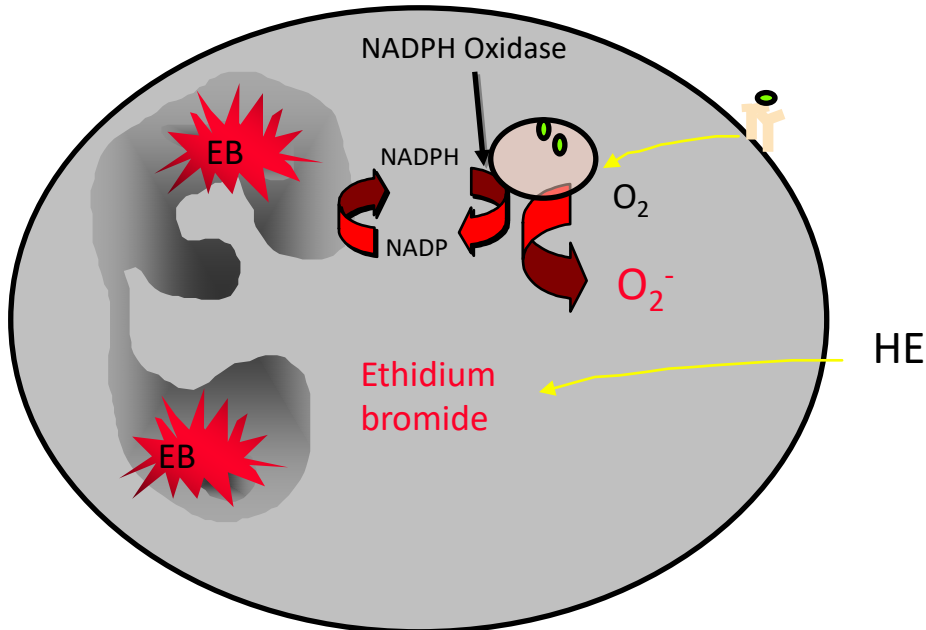
# Hydroethidine

HE



EB

Fluorescent  
Exc. 488  
Em. 600

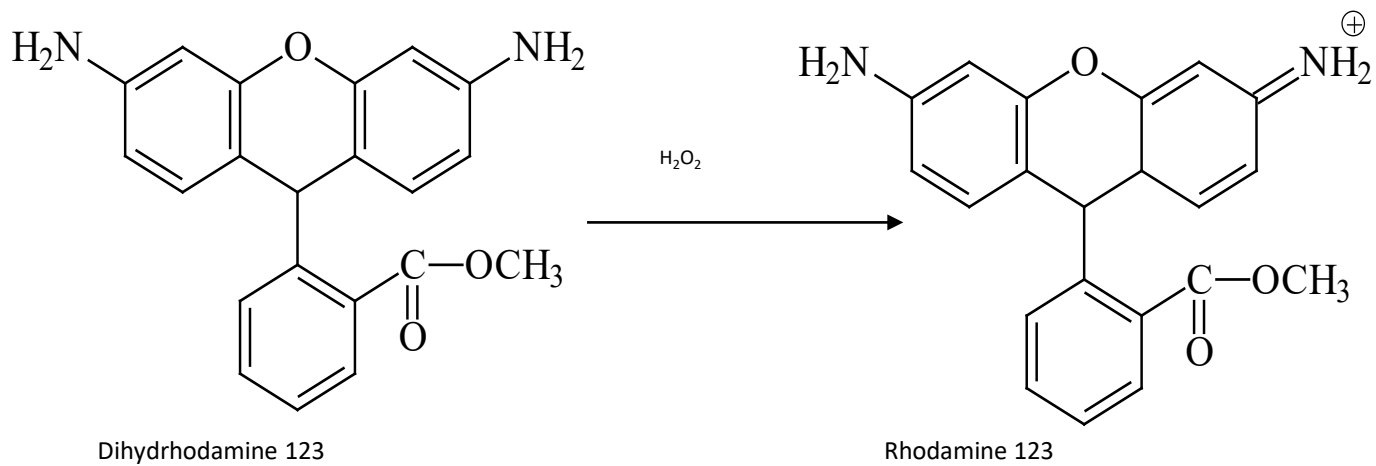


J.P. Robinson et al. 1998

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



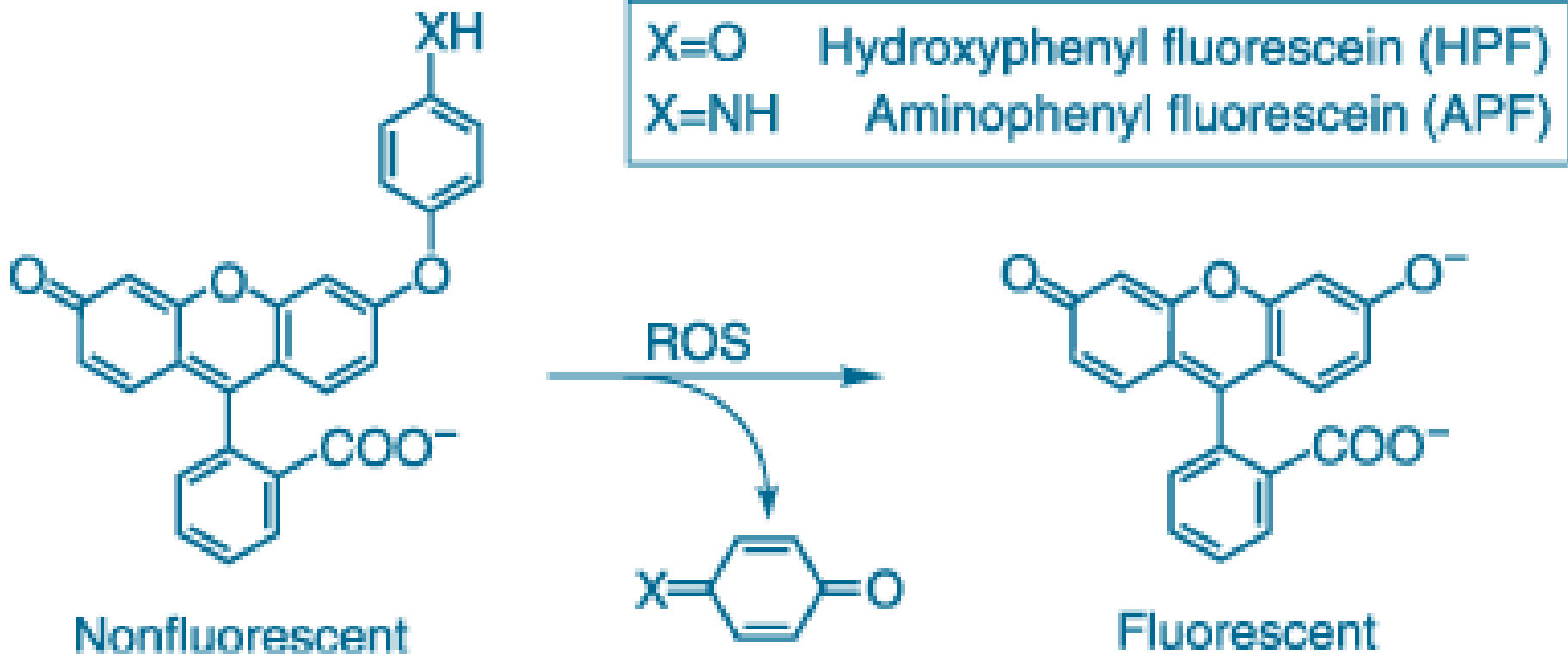
# Dihydrhodamine 123



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

HPF / APF - detekce hydroxylových radikálů

APF - detekce kyseliny chlorné



# Srovnání specificity APF, HPF, and H<sub>2</sub>DCFDA

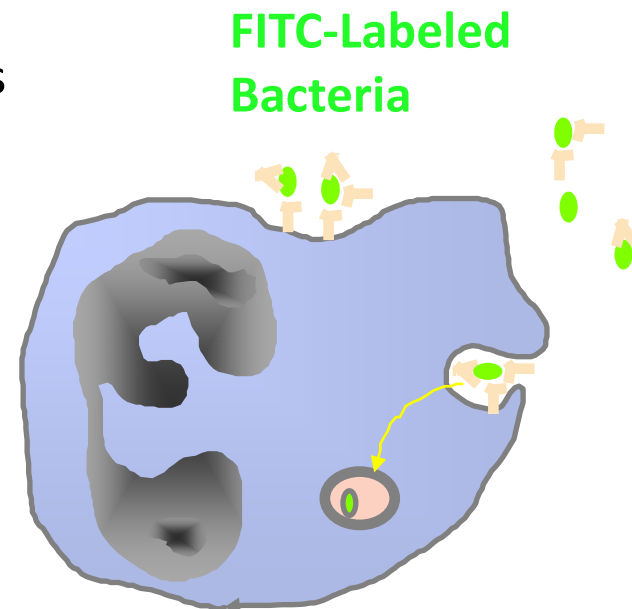
ROS	APF	HPF	H <sub>2</sub> DCFDA
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<1	2	190
Hydroxyl radical (HO·)	1200	730	7400
Hypochlorite anion (-OCl)	3600	6	86
Nitric oxide (NO)	<1	6	150
Peroxyl radical (ROO·)	2	17	710
Peroxynitrite anion (ONOO-)	560	120	6600
Singlet oxygen ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	9	5	26
Superoxide anion (·O <sup>2-</sup> )	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

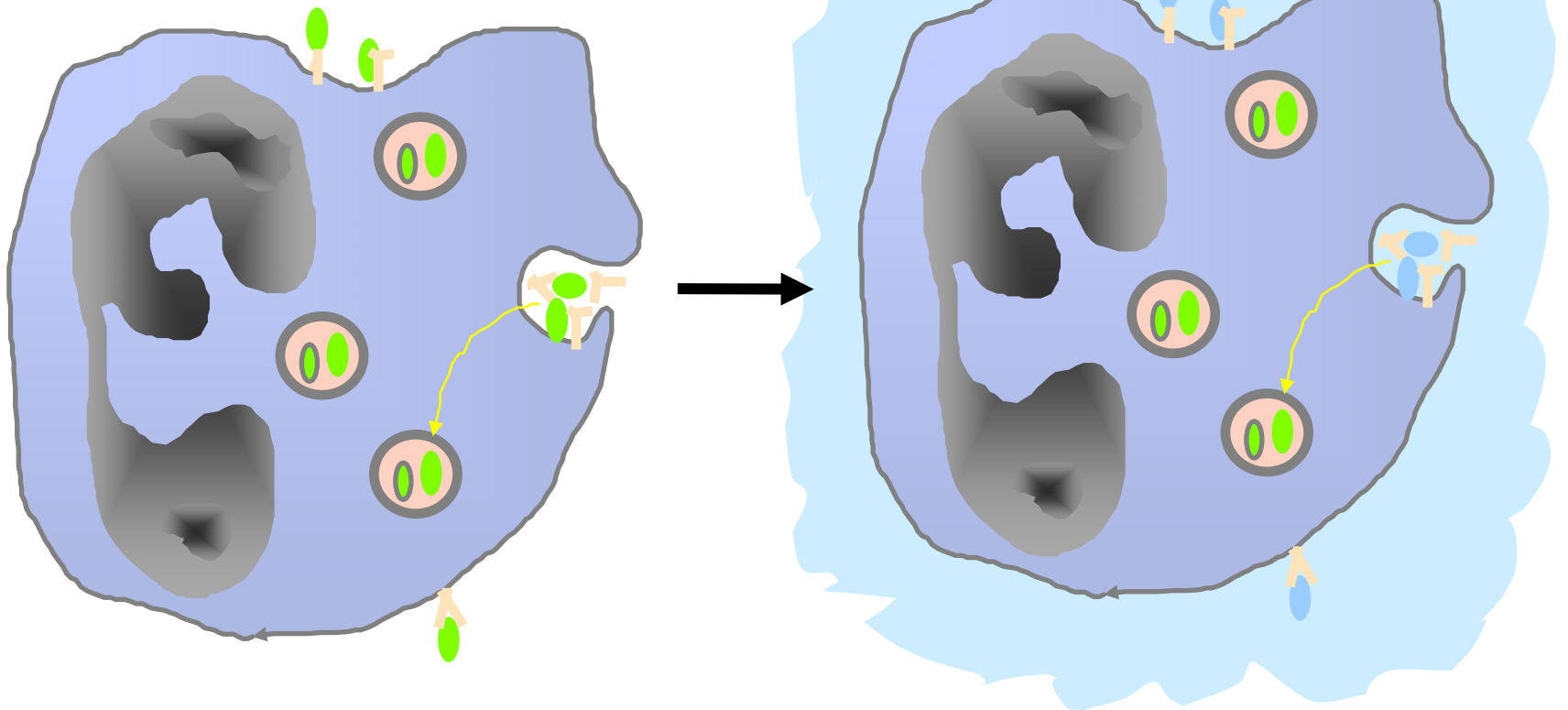
## ***Postup:***

- 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



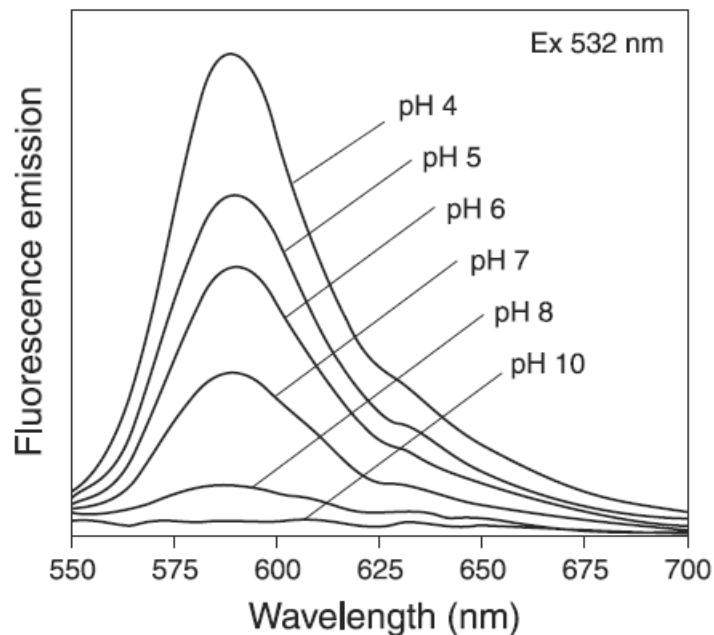
- Rozlišení pohlcení částice do uzavřeného fagozómu od adherence na povrch fagocytu – aplikace trypanové modři (neprostupuje do živých buněk), která má zhášecí vlastnosti pro FITC

FITC-Labeled Bacteria



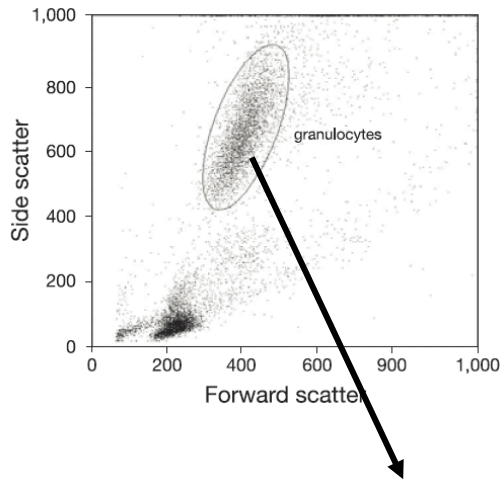
# Detekce fagocytózy pomocí pHrodo-succinimidyl ester

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



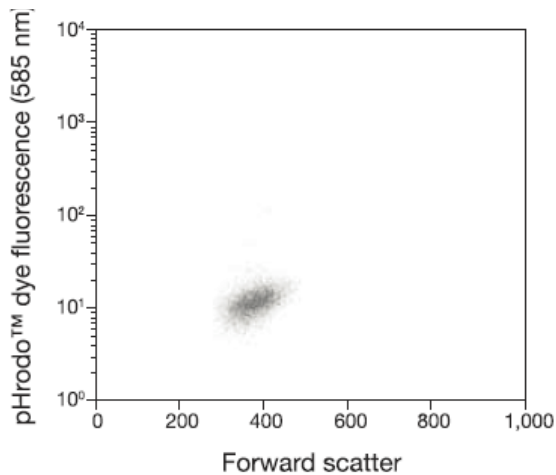
Fluorescenční emisní spektra pHrodo™  
barvených *E. coli* v pufrch pH od 4 do 10.

# Detekce fagocytózy pomocí pHrodo-succinimidyl ester

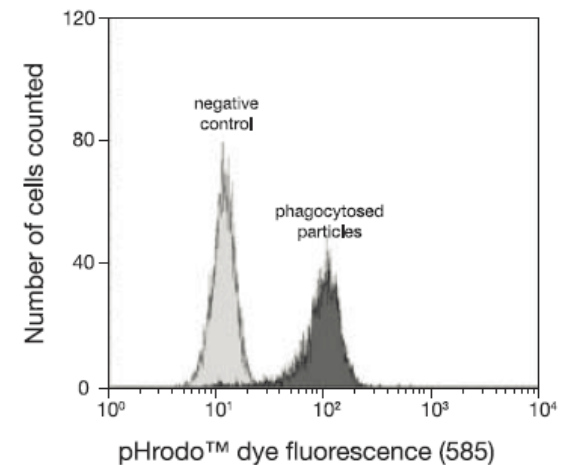
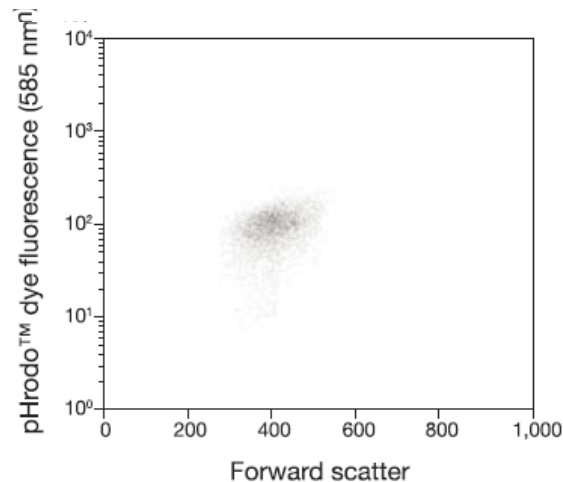


Detekce fagocytózy pHrodo značených latexové částic, zymosanových částice, obarvených bakterií.

Nestimulovaná kontrola



Buňky stimulované pHrodo barvenými latex. částicemi

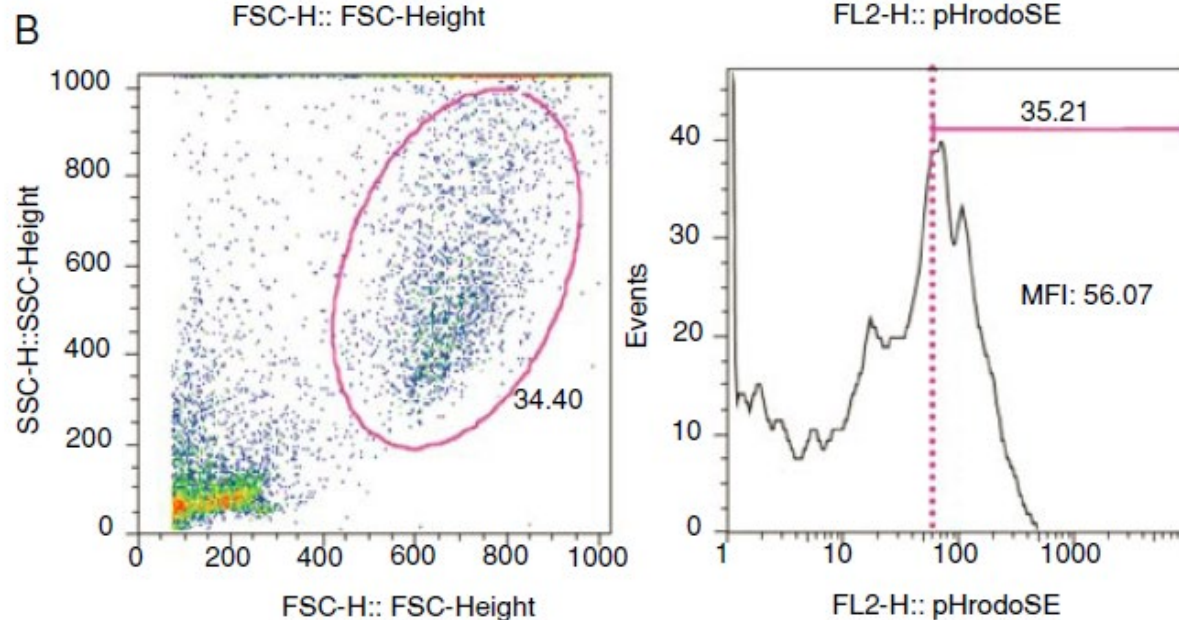
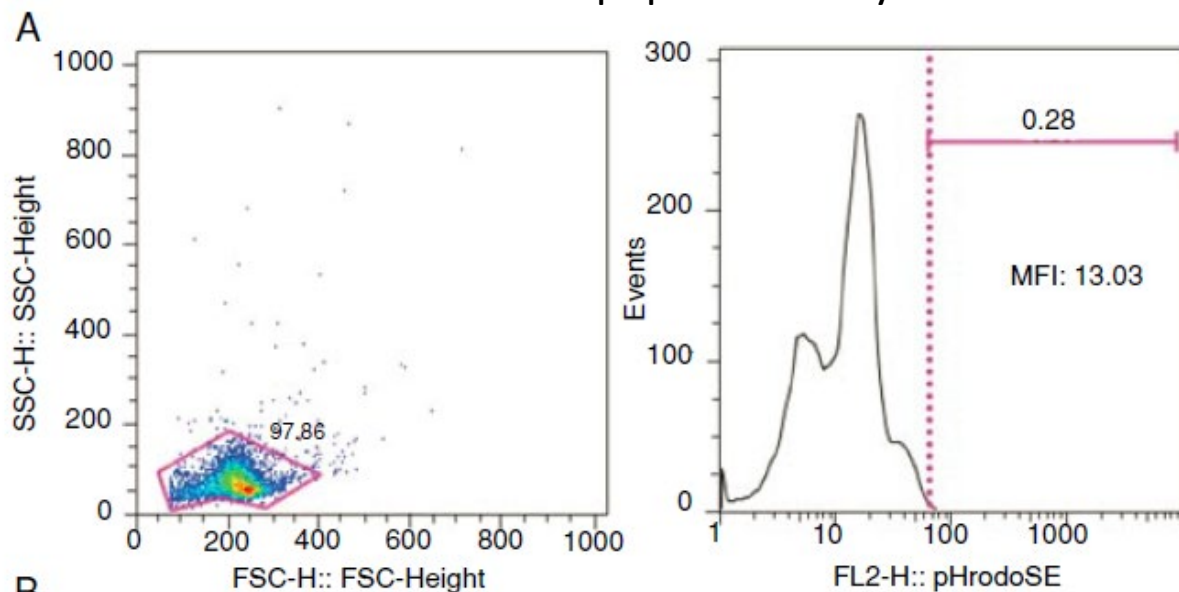


# Detekce fagocytózy s využitím pHrodo-SE

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

Makrofágy pohlcující  
apoptické buňky

Značené apoptické buňky





# Detekce fagocytární aktivity s využitím bakterií (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

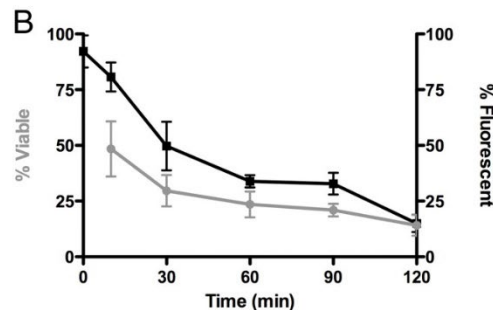
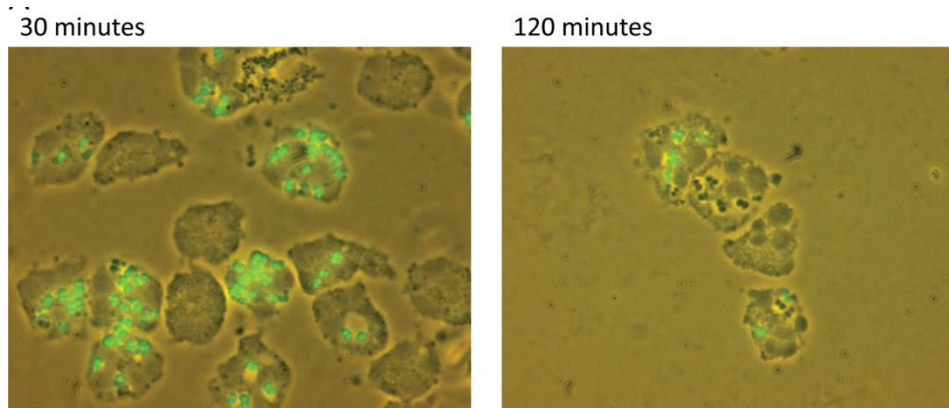
Ztráta signálu z fluorescenčního proteinu (např. GFP) díky jeho degradaci ve fagozómu

# 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

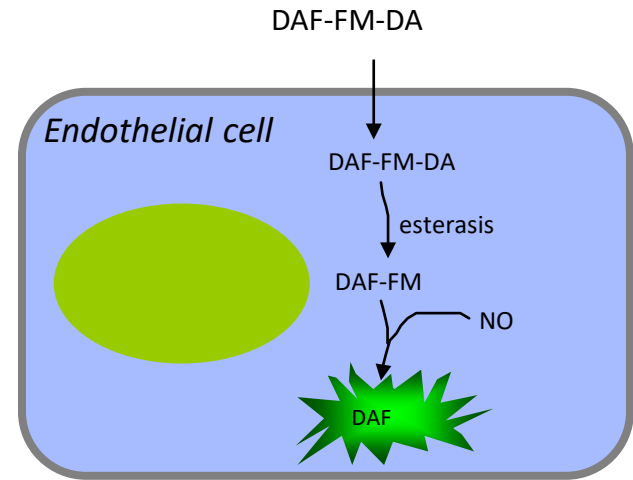
*Využití:* pro stanovení relativní viability bakterií ve fagozómu



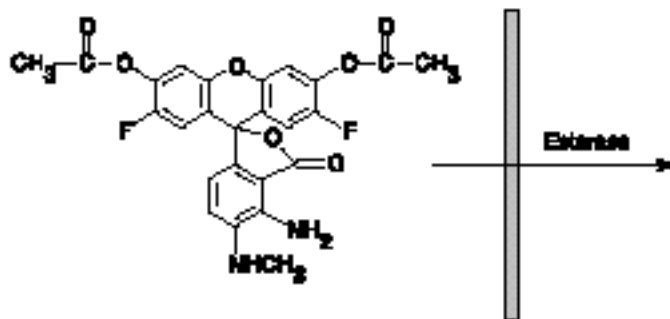
# Detekce produkce oxidu dusnatého (NO)

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

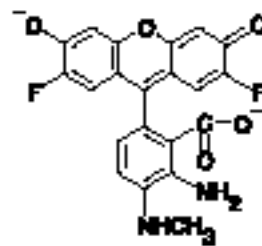
4-amino-5-methylamino- 2',7'-  
difluorofluorescein  
(DAF-FM diacetate)



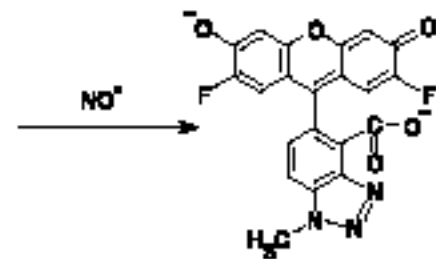
Exc. 495nm Em. 515nm



**DAF-FM diacetate**  
(Nonfluorescent, cell-permeant)



**DAF-FM**  
(Weakly fluorescent)

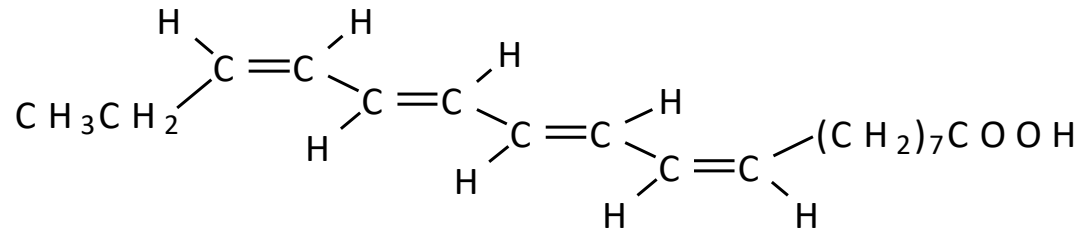


**Benzobenzoxazole derivative**  
(Fluorescent)

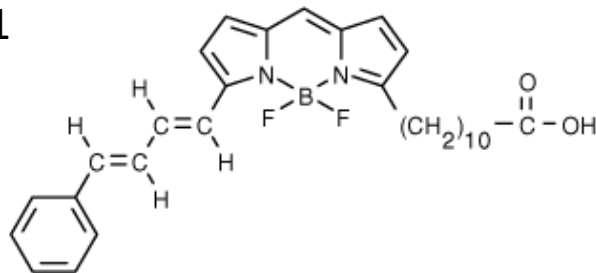
# Detekce lipidové peroxidace

Oxidace lipidové detekční látky spojena s nárůstem nebo spektrální změnou fluorescence

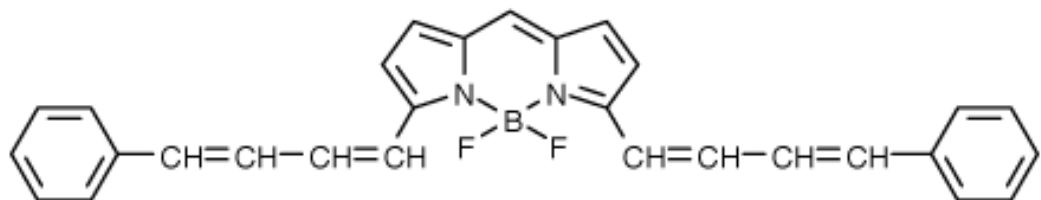
*cis*-Paranaric Acid



BODIPY581/591 C11



BODIPY  
665/667

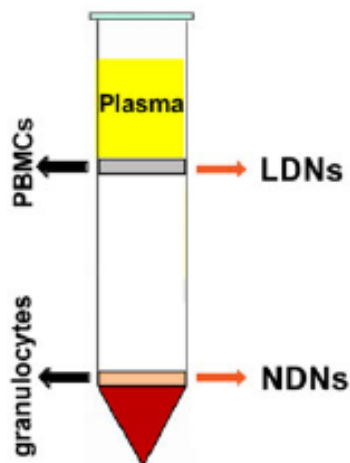


# Identifikace a funkční analýza subpopulací makrofágů a neutrofilů

- 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

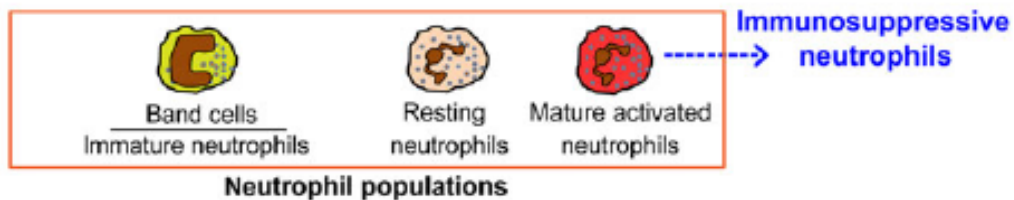
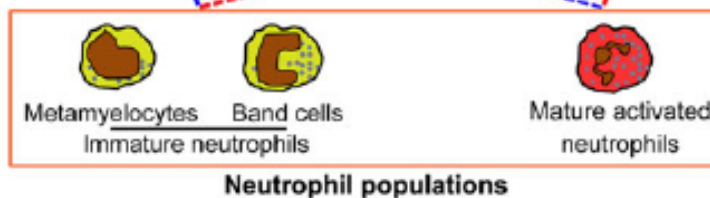
# Imunoregulační neutrofilny

A Density gradient centrifugation of blood



Immunosuppressive  
LDNs/G-MDSCs

Proinflammatory  
LDNs/LDGs



# Imunosupresivní neutrofilý

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

Scapini et al, 2016

# Využití průtokové cytometrie v diagnostice alergických onemocnění



# Diagnostika alergií a hypersensitivit

- Výsledek neadekvátní reakce na neškodné vnější alergen
- 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

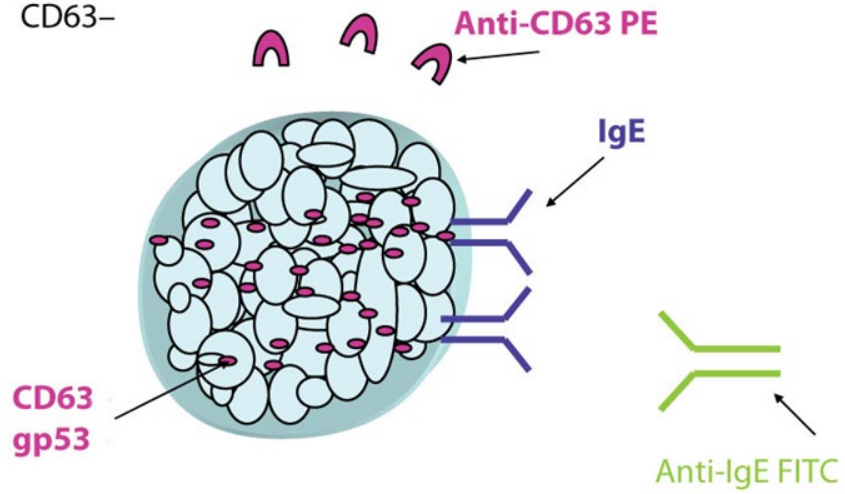
- *in-vitro* test založen na sledování znaků objevujících se po aktivaci bazofilů alergenem  $\Rightarrow$  CD63 (gp53), CD203c

- Výsledkem - % aktivovaných bazofilů
- BASOTEST<sup>®</sup>, Flow-CAST<sup>®</sup>, CAST<sup>®</sup>-COMBI

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

Basophil phenotype at rest:

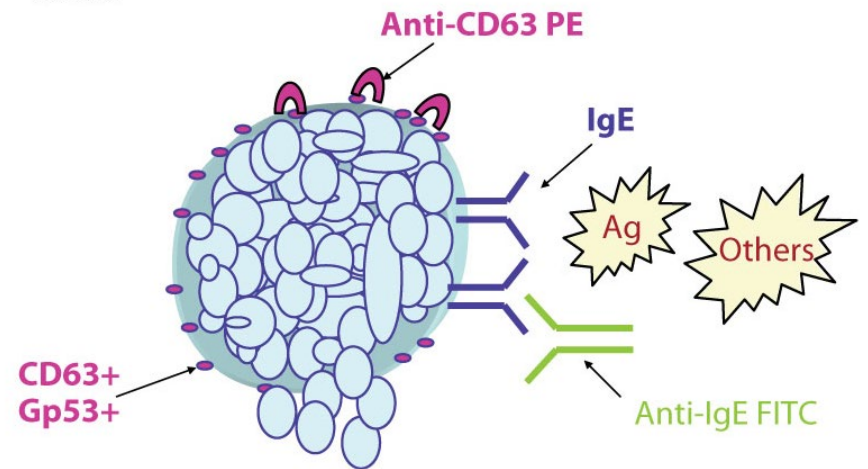
IgE+  
CD63-



aktivace

Basophil phenotype after activation:

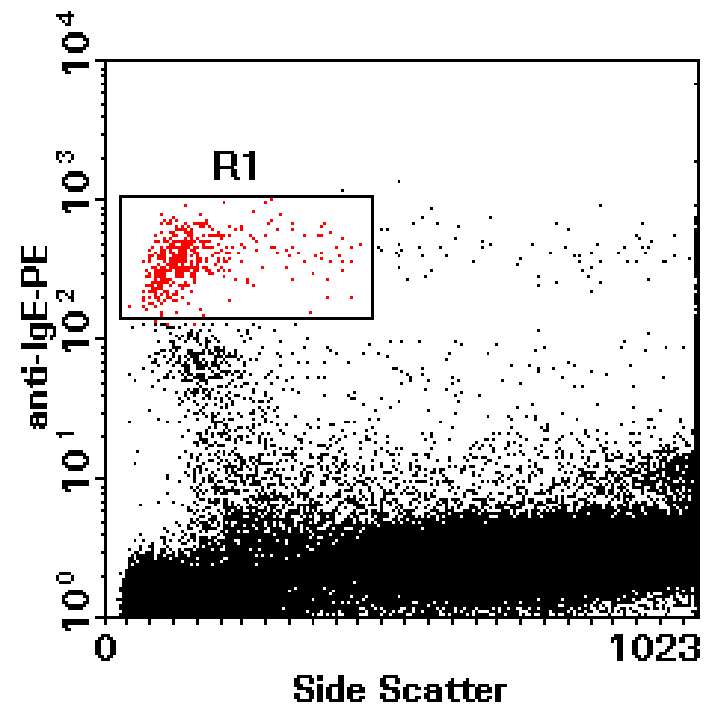
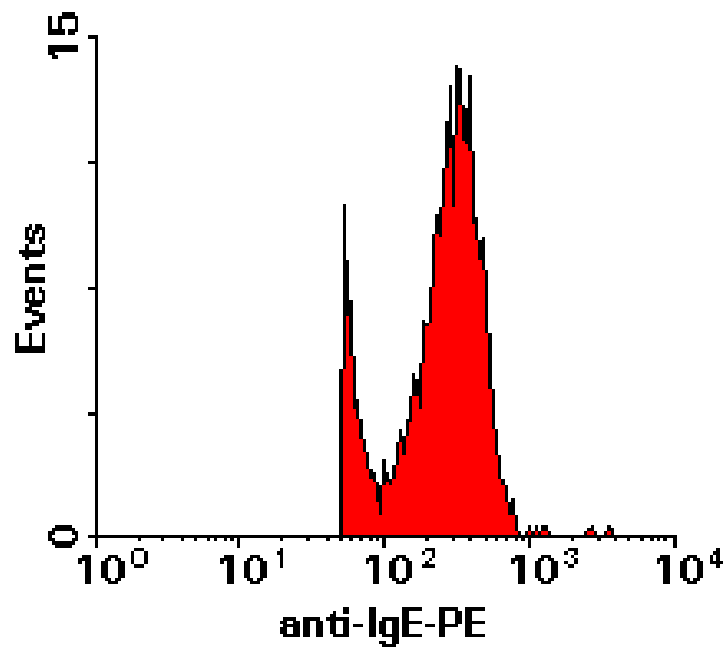
IgE+  
CD63+



# BASOTEST<sup>®</sup>

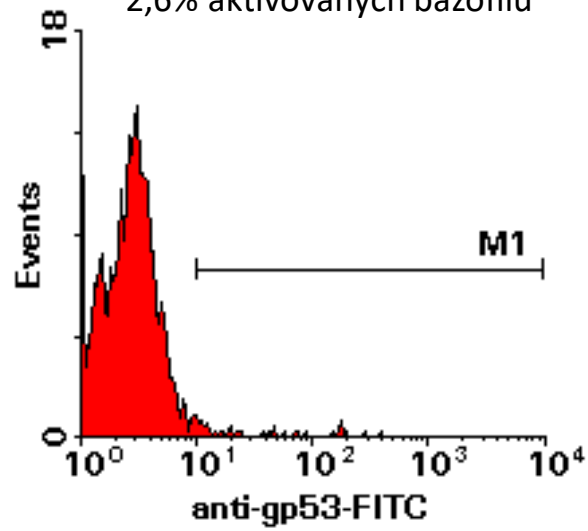
- o Plná krev odebrána do heparinu, inkubována se stimulačním pufrem (10 min/37°C) ⇒ inkubace s alergenem (20 min/37°C)
- o Pozitivní kontrola – fMLP
- o Aktivace bazofilních granulocytů indukuje fúzi granulí a uvolňování zánětlivých mediátorů ⇒ proces degranulace zastaven inkubací vzorku na ledu
- o 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<sup>®</sup>



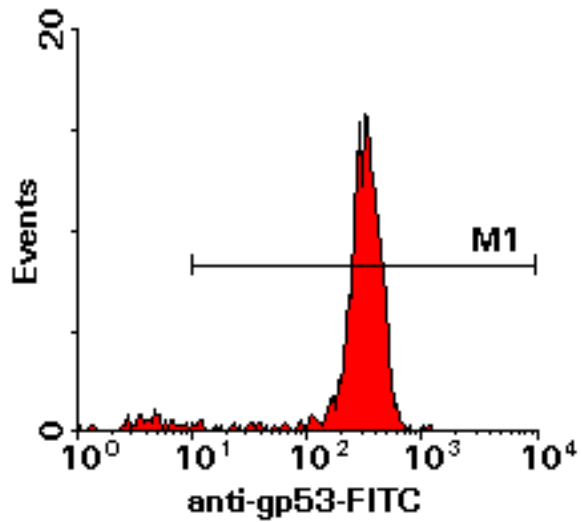
negativní kontrola (1.8-9.5%)

2,6% aktivovaných bazofilů



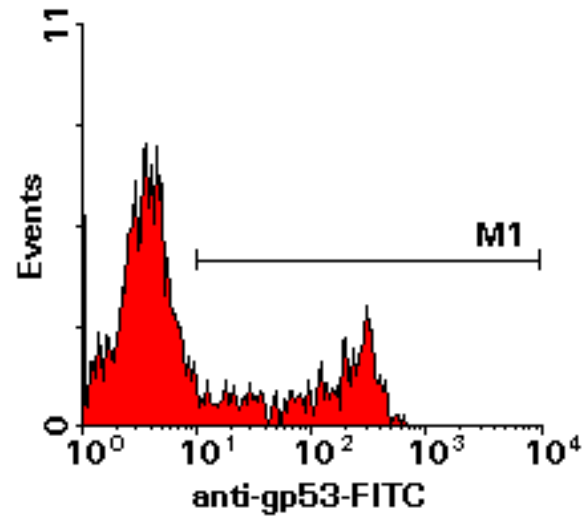
pozitivní kontrola (25.2.-100%)

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



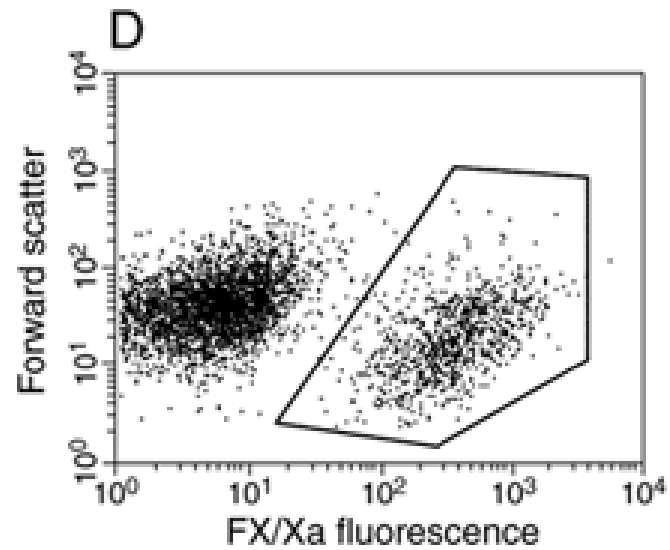
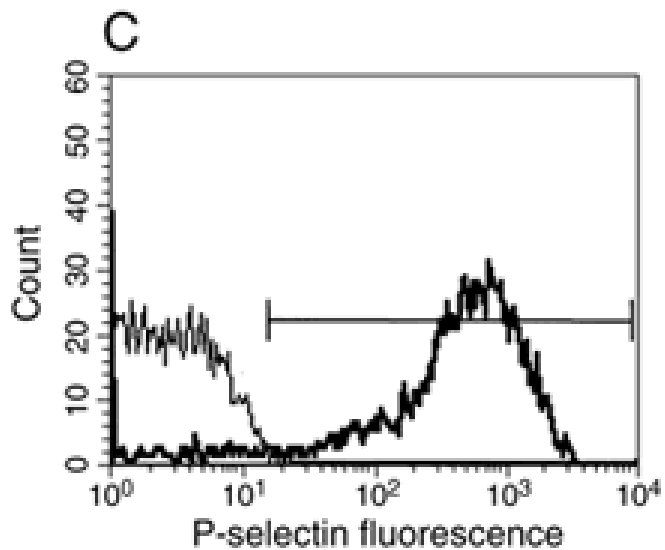
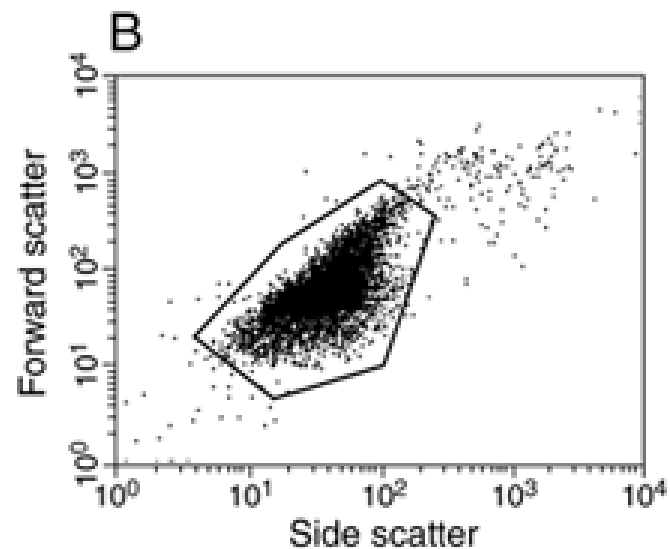
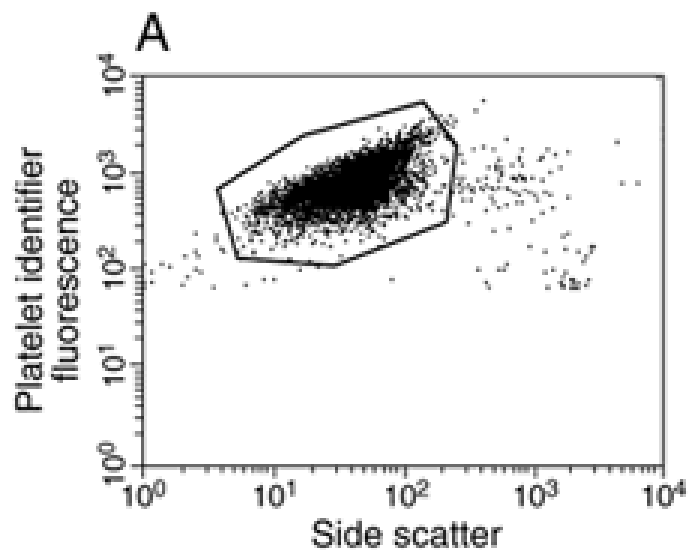
# Imunofenotypizace receptorů trombocytů

- 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 mikročásteček

- 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 mikročástečky

# Průtoková cytometrie



# Defekty trombocytů

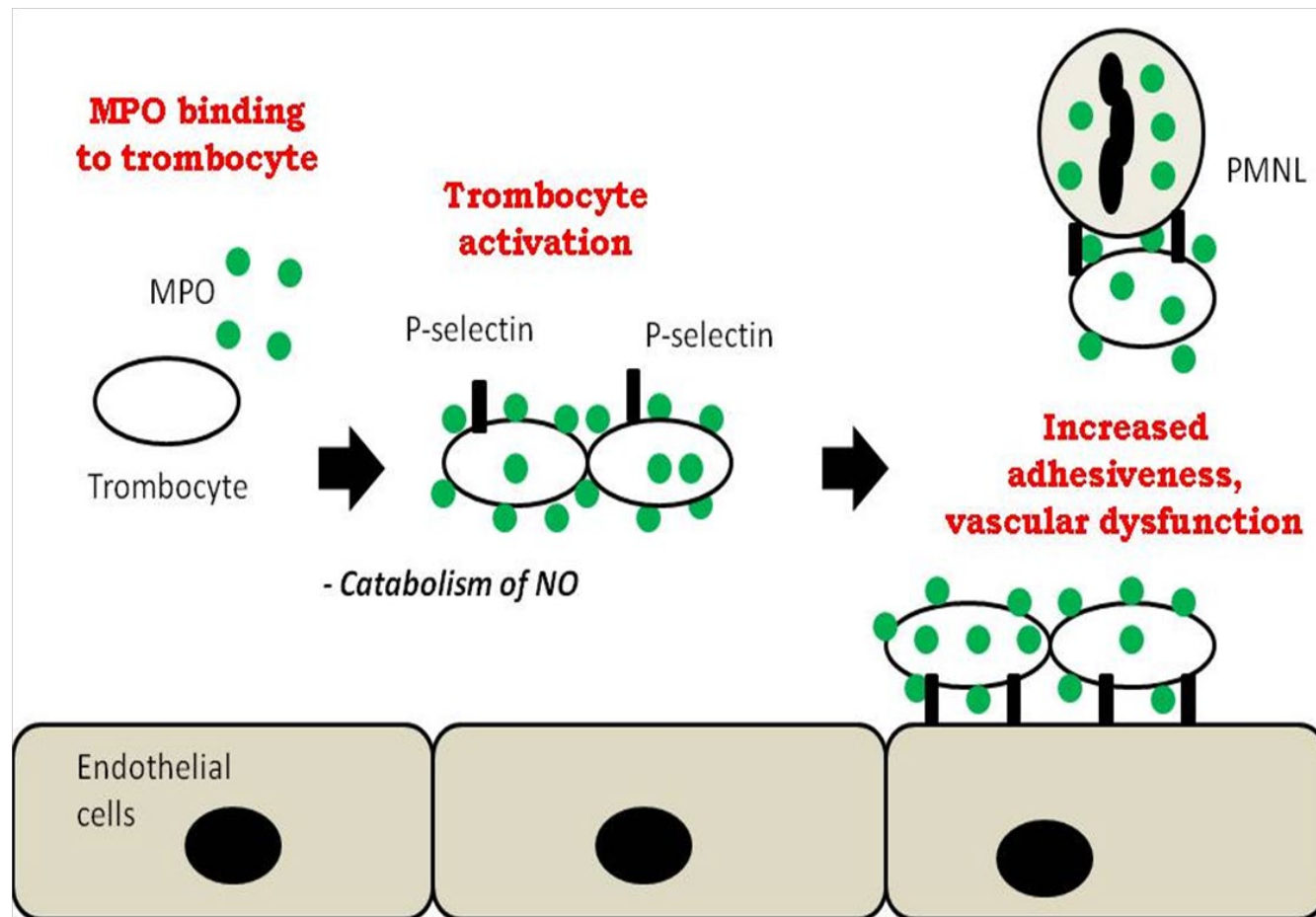
- **Bernard – Soulierův syndrom**

- 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

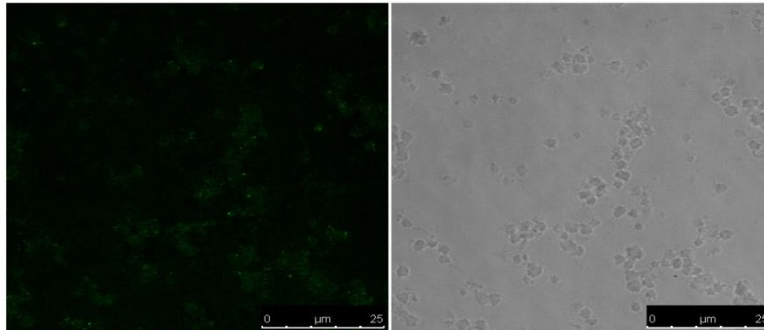


# MPO localization on human thrombocytes

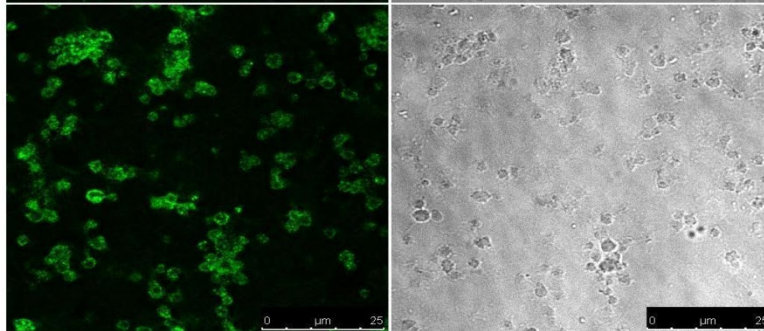
Anti-MPO Ab

Goat anti-rabbit IgG Alexa 488

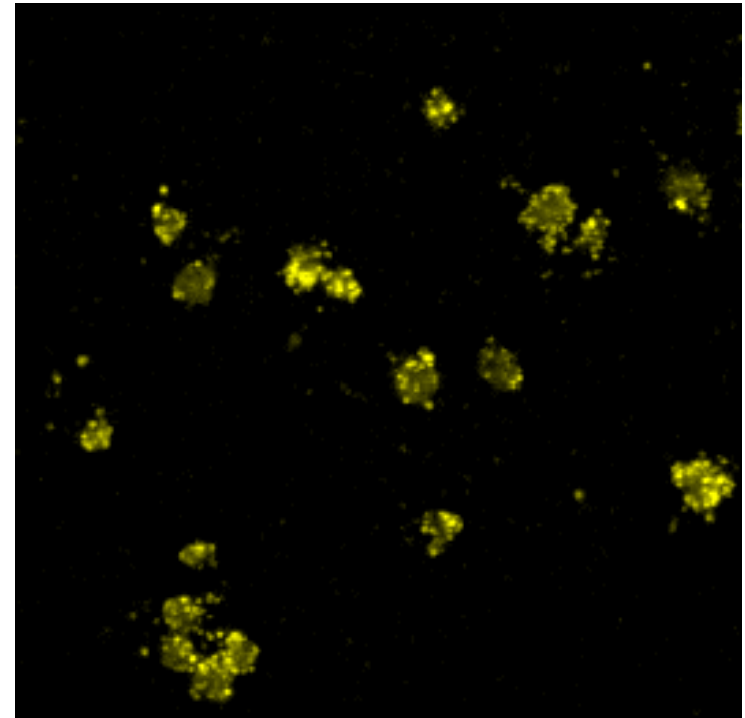
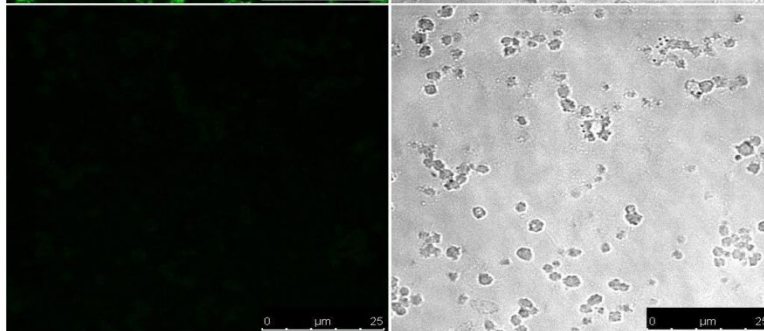
- MPO



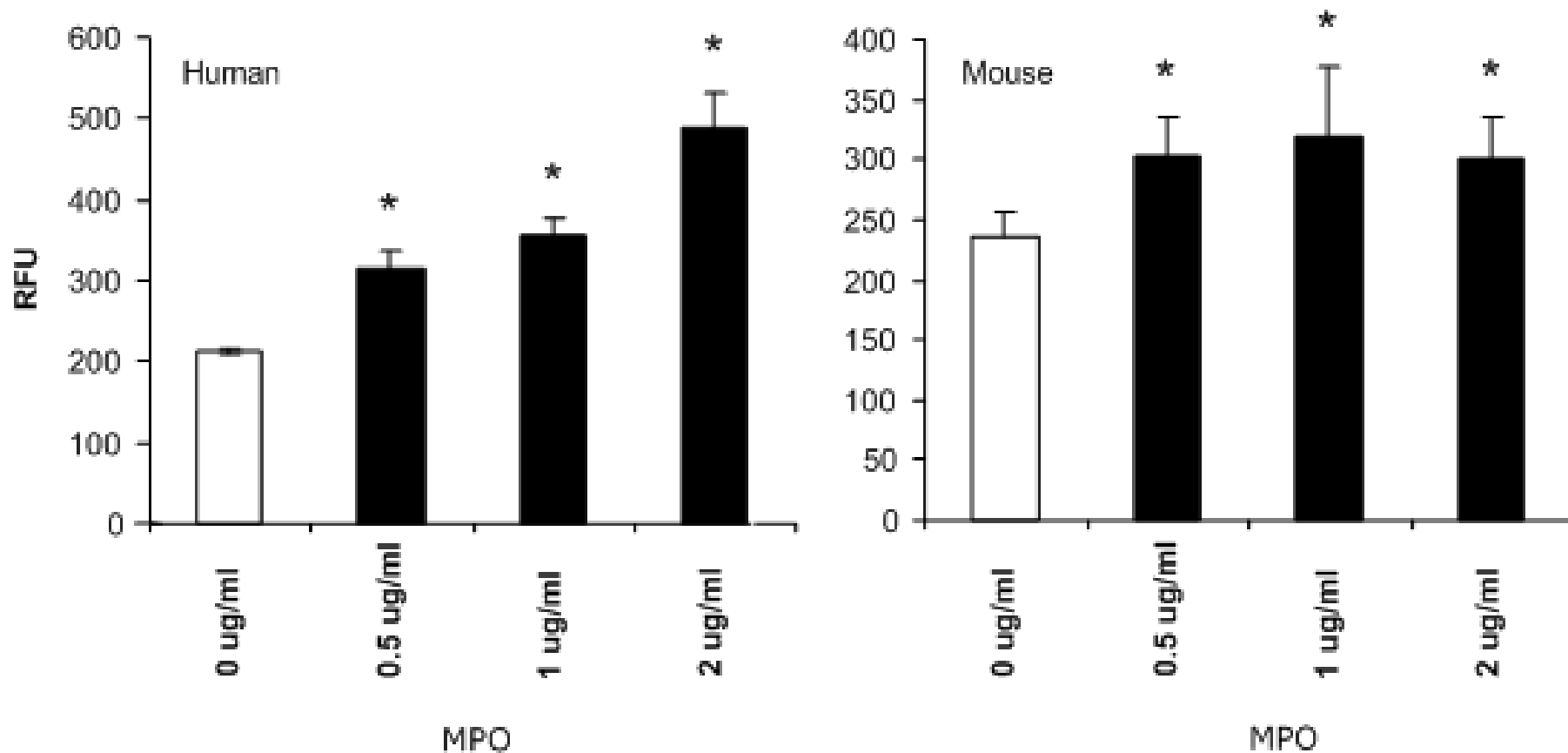
+ MPO



Control  
(- Anti- MPO Ab)

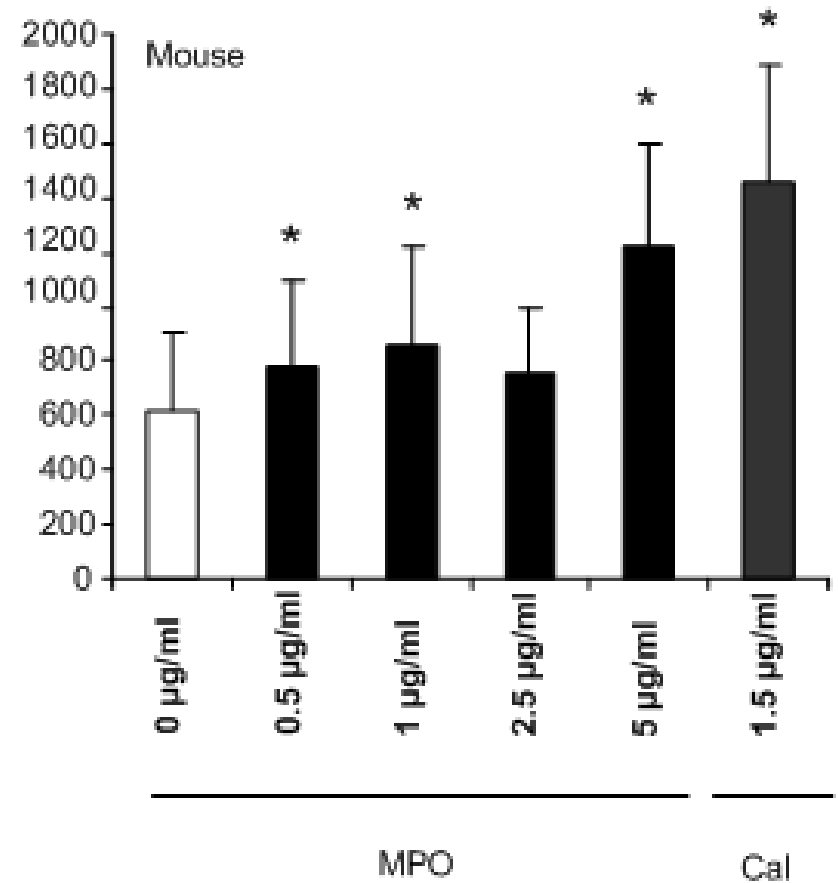
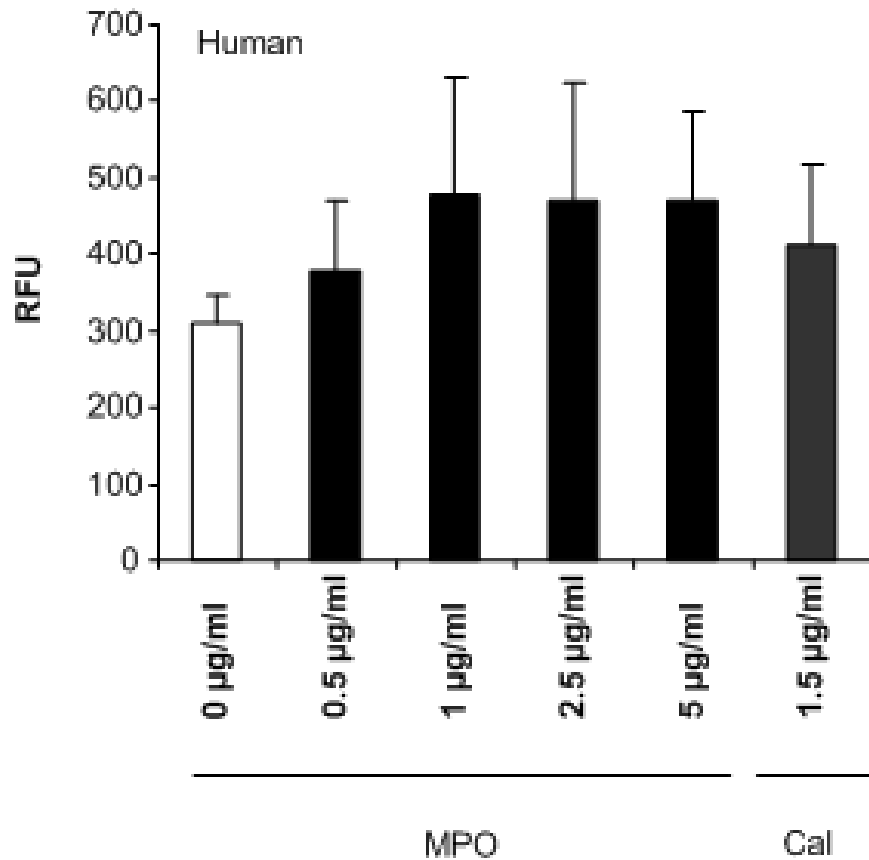


# Detekce navázané MPO na povrch destiček průtokovým cytometrem

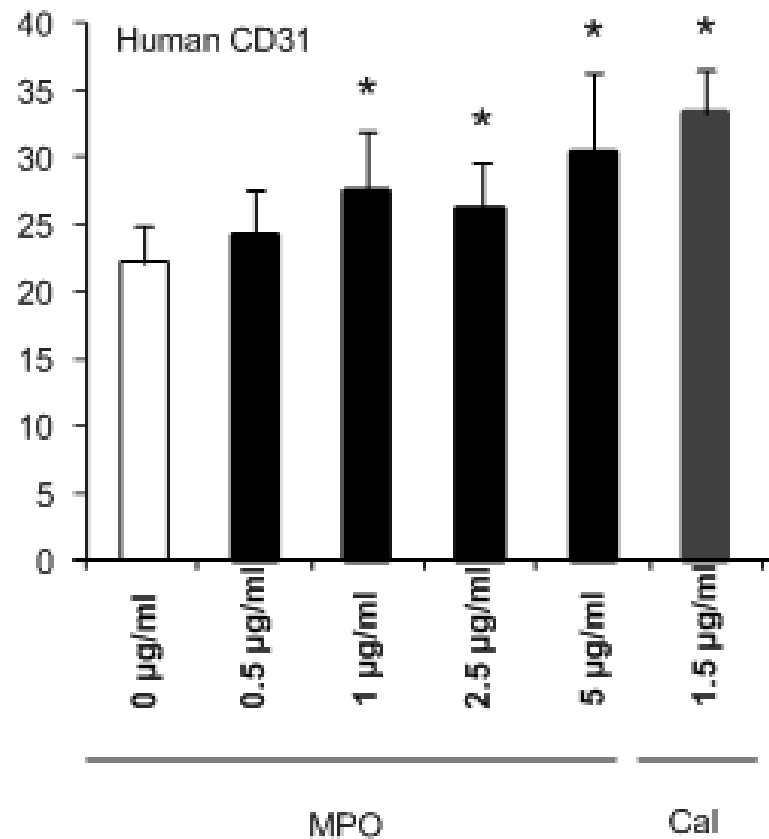
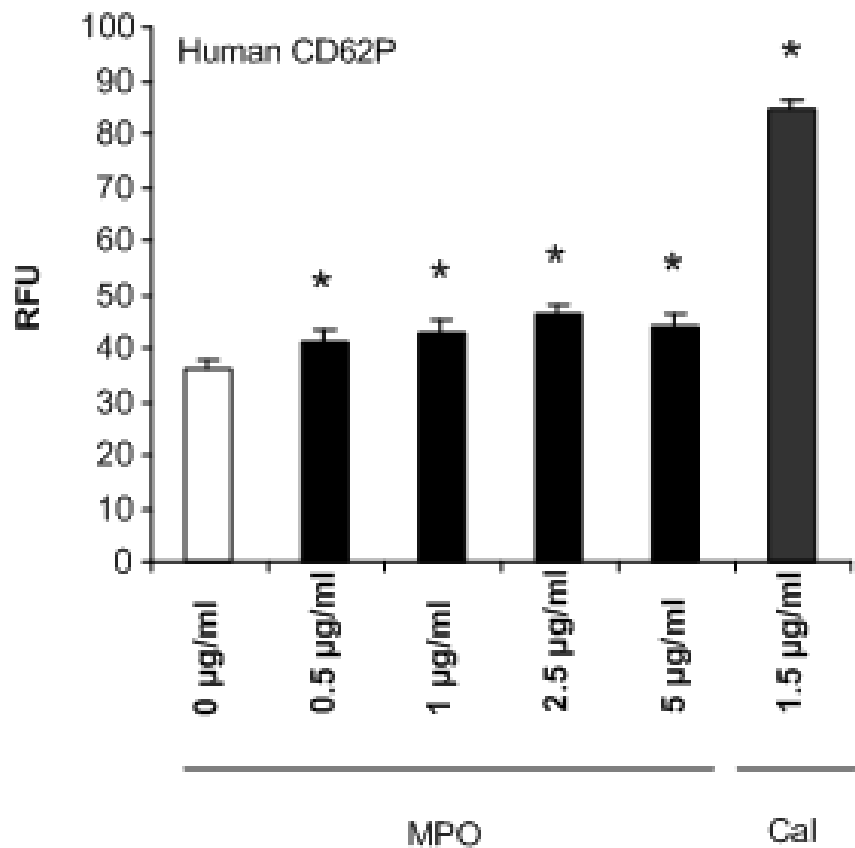




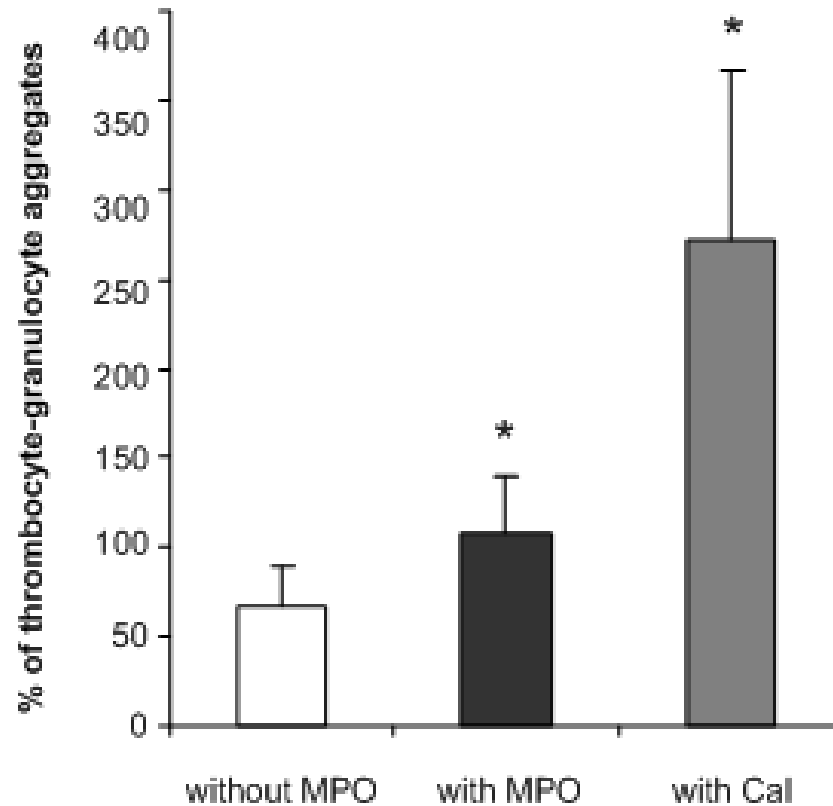
# Detekce aktivovaných stresových vláken F-aktinu v destičkách – znak aktivace



# 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  $\text{CaCl}_2$

# 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