Cytometria przepływowa w diagnostyce alergii – protokoły identyfikacji bazofilów

Flow cytometry in allergy diagnosis – basophil identification protocols

mgr inż. Anna Skotny[1], mgr inż. Barbara Kmiecik[2], mgr inż. Ewa Zbrojewicz[1], mgr inż. Emilia Siwak[1], dr hab. n. med. Wojciech Mędrala, prof. nadzw.[1,3]

[1] Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Bernard Panaszek

[2] Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Kierownik: dr hab. n. med. Zbigniew Rybak, prof. nadzw.

[3] Zakład Badań Klinicznych, Wyższa Szkoła Medyczna w Legnicy
Kierownik: dr hab. n. med. Wojciech Mędrala, prof. nadzw.

For non-commercial use only

Streszczenie: Choroby alergiczne, ich diagnostyka i leczenie to temat bardzo aktualny. Unowocześnienie i poprawa istniejących metod diagnostycznych są kluczowe dla postępu medycyny. W obecny trend udoskonalania diagnostyki chorób alergicznych wpisuje się cytometria przepływowa. Należy podkreślić, że jest to metoda umożliwiająca badanie populacji komórek stanowiącej nawet poniżej 1% próbki. Pozwala ona na identyfikację i analizę kilku parametrów jednocześnie. W przypadku diagnostyki alergii badania in vitro są bardzo korzystne ze względu na bezpieczeństwo pacjenta. Nie ma niebezpieczeństwa wywołania anafilaksji czy doprowadzenia do groźnych powikłań, które mogą wystąpić w przypadku obecnie stosowanej diagnostyki alergii pokarmowych, na leki czy jady owadów błonkoskrzydłych. W artykule omówiono zalety cytometrii przepływowej w kontekście wykorzystania jej w diagnostyce chorób alergicznych. Przybliżono problematykę związaną z dokładną izolacją podstawowej puli bazofilów, która jest konsekwencją doboru odpowiednich protokołów identyfikacji w testach aktywacji bazofilów (BAT).

Abstract: Diagnosis and treatment of allergic diseases are a very up to date topics. The modernization and improvement of existing diagnostic methods are essential for the progress of medicine. Flow cytometry fits into this trend. It should be noted that this method allows one to study cell populations constituting less than 1% of the sample size. During flow cytometry diagnostics, several parameters can be identified and analyzed at the same time. There are few advantages (particularly in the case of safety) for patients in in vitro allergy diagnosis. There is no possibility to cause anaphylaxis or other dangerous complications as in in vivo food, drug or insect venom allergy diagnosis. The article discusses the advantages of flow cytometry in the context of using it in the diagnosis of allergic diseases. Problems associated with basophils identification and types of protocols used in basophils activation tests (BAT) are widely discussed.

Słowa kluczowe: alergia, diagnostyka, cytometria przepływowa, bazofil
Key words: allergy, diagnostics, flow cytometry, basophil

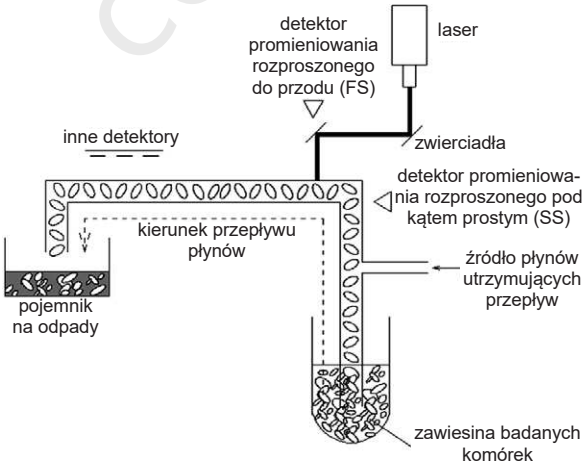
Alergoprofil 2012, Vol. 8, Nr 4, 14-18
Pracę otrzymano: 2012-12-05
Zaakceptowano do druku: 2012-12-12

"Copyright by Medical Education"
© Medical Education. For private and non-commercial use only. Downloaded from https://www.journalsmededu.pl/index.php/alergoprofil: 03.08.2025; 19:51,12

Szacuje się, że ponad 20% populacji krajów wysoko rozwiniętych boryka się z różnymi formami nadwrażliwości [1, 2]. Odsetek ten stale się zwiększa, a choroby alergiczne dotykają coraz większej liczby osób. Ich pojawienie się jest wypadkową czynników środowiskowych i genetycznych. Obecnie diagnostyka chorób alergicznych sprowadza się do wywiadu klinicznego (który pozwala na powiązanie bodźca wywołującego alergię z wywiadem klinicznym), testów skórnych i wykrycia alergenowo swoistego IgE w surowicy chorego. Niekiedy wykonanie testów skórnych lub testów prowokacyjnych jest niemożliwe ze względu na ryzyko wywołania zagrażającej życiu i zdrowiu pacjenta anafilaksji lub konieczność stałej terapii lekami negatywizującymi odpowiedź skórną na histaminę. Oznaczanie swoistych alergenowo IgE nie ma stuprocentowej czułości ani swoistości. Alternatywą, rozumianą jako uzupełnienie dotychczasowej diagnostyki, stają się metody diagnostyczne in vitro, w tym m.in. cytometria przepływowa.

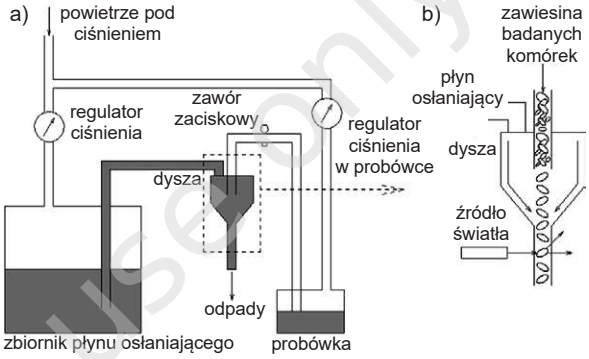
Dynamiczny rozwój cytometrii przepływowej obserwujemy od ponad 30 lat. Ta rewolucyjna metoda początkowo umożliwiała tylko liczenie komórek, obecnie zaś pozwala na wieloparametrową ocenę biochemicznych i fizycznych właściwości komórek. Komórki są odpowiednio znakowane i wprowadzane pod ciśnieniem do strefy pomiarowej (uproszczony schemat budowy cytometru przepływowego – ryc. 1).

Rycina 1. *Schemat budowy cytometru przepływowego.*



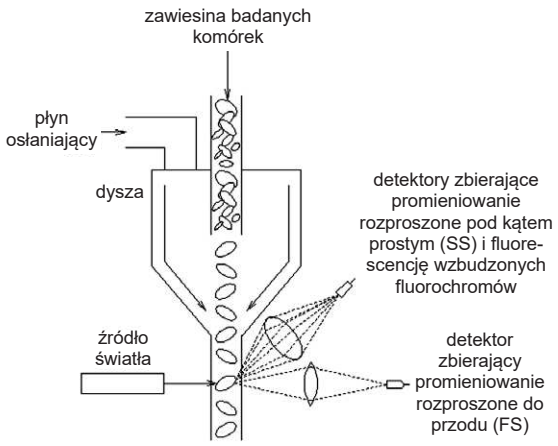
W trakcie pomiaru komórki oświetlane są odpowiednio zogniskowaną wiązką promieniowania laserowego. W skład cytometru przepływowego wchodzą układy optyczny, elektroniczny, powietrzny oraz układ transportu cieczy (ryc. 2). W trakcie pomiaru znaczenie ma wiele zjawisk, takich jak absorpcja, emisja czy rozproszenie.

Rycina 2. *Schemat budowy układu powietrznego i układu transportu cieczy (a). Układy wytwarzają podciśnienie w zbiorniku z cieczą osłaniającą i w probówce z zawiesiną badanych komórek. Komórki oznakowane odpowiednio dobranymi fluorochromami formowane są w cienki strumień i przesuwane do strefy pomiarowej, gdzie naświetlane są laserem (b).*



Współczesne cytometry umożliwiają pomiar kilku parametrów równocześnie. Odpowiednio dobrane dwa detektory rejestrują promienie rozpraszane na komórce. Pierwszy detektor rejestruje rozpraszanie do przodu (FS, *forward scatter*) – zgodne z kierunkiem padania wiązki promieniowania. Rozpraszanie to rejestrowane jest pod niewielkim kątem nieprzekraczającym 10º. Drugi detektor rejestruje promieniowanie rozproszone prostopadle do wiązki laserowej (SS, *side scatter*) (rozpraszanie na komórce – bieg promieni – ryc. 3) [3].

Rycina 3. *Bieg promieni po interakcji z badaną komórką.*

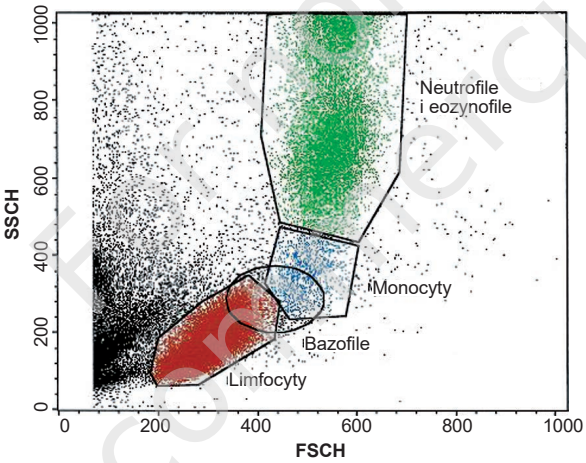


Natężenie promieniowania rozproszonego do przodu (FS) nie zależy od kształtu komórki ani od współczynnika załamania światła. Niesie natomiast informacje o wielkości komórki – silnie rośnie wraz ze wzrostem rozmiarów cząsteczki. Część promieniowania rozproszona na strukturach wewnątrzkomórkowych jest zbierana detektorem ustawionym pod kątem

© Medical Education. For private and non-commercial use only. Downloaded from https://www.journalsmededu.pl/index.php/alergoprofil: 03.08.2025; 19:51,12

90º do wiązki padającej (SS). Natężenie tej fali silnie zależy od kształtu komórek oraz ich współczynników załamania i odbicia światła. Im więcej niewielkich struktur wewnątrzkomórkowych, tym silniejszy sygnał rozproszony pod kątem prostym. Zatem sygnał zebrany pod kątem 90º pozwala na wstępną ocenę kształtu i wewnętrznych ziarnistości komórek. Dzięki opisanym powyżej zależnościom możliwe jest różnicowanie komórek w dwuwymiarowym układzie FS vs SS (zróżnicowane populacji komórek – ryc. 4) [4]. Zaznaczony obszar bazofilów (ryc. 4) to region, w którym mogą występować, jest ich jednak niewiele i aby je zidentyfikować (przy użyciu cytometrii przepływowej), konieczne jest oznakowanie ich odpowiednimi przeciwciałami z przyłączonymi fluorochromami.

Rycina 4. *Schematyczny obraz pełnej krwi hemolizowanej analizowanej w cytometrze przepływowym.*



Promieniowanie padające, które nie uległo rozproszeniu, może zostać pochłonięte przez przyłączone do badanych komórek barwniki fluorescencyjne – fluorochromy. Molekuła, która zaabsorbowała energię, dąży do oddania jej, a tym samym do powrotu do stanu podstawowego. Powrotowi do stanu podstawowego towarzyszy krótkotrwała emisja kwantów promieniowania – fluorescencja. Jest to przejście promieniste o czasie trwania rzędu 10^{-8} s po zaniku czynnika wzbudzającego (w tym przypadku promieniowania laserowego). Do pomiaru natężenia fluorescencji przy wzbudzaniu jednowiązkowym wykorzystuje się minimum dwa detektory (najczęściej trzy – FL1, FL2, FL3).

Zachowanie promieniowania po interakcji z komórką (rozproszenie czy wzbudzenie emisji fluorochromów) niesie ze sobą informacje o badanym obiekcie. Aby informacja ta mogła być wykorzystana, musi ulec przetworzeniu na postać cyfrową i zostać wprowadzona do komputera umożliwiającego dalszą pracę z pozyskanymi danymi. Cały pomiar jest bardzo szybki – jego prędkość sięga od kilkuset do kilku tysięcy komórek na sekundę [4].

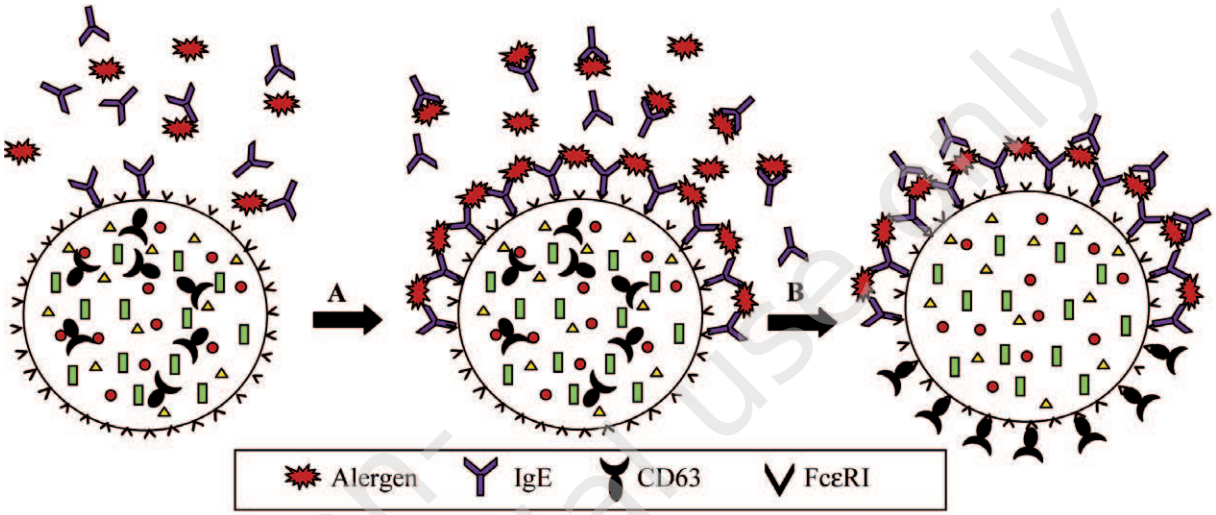
Znaczącą rolę w patogenezie chorób alergicznych odgrywają bazofile i mastocyty. Mastocyty występują w tkankach, ich analiza jest bardziej skomplikowana niż obecnych we krwi obwodowej bazofilów. Na powierzchni granulocytów zasadochłonnych (bazofilów) znajduje się receptor FcεRI (o wysokim powinowactwie do IgE). IgE wiąże alergen, co wywołuje degranulację bazofilów i wydzielenie przez nie trzech klas mediatorów zapalnych: amin (np. histamina), metabolitów lipidowych (np. leukotrien C4) i cytokin (m.in. IL-3, IL-4 i IL-5) [5, 6]. Procesowi temu towarzyszy wzrost ekspresji cząstek na powierzchni bazofilów (schematycznie przedstawiony na rycinie 5), której pomiar jest podstawą testów aktywacji bazofilów (BAT).

W roku 1994 Sainte-Laudy i wsp. jako pierwsi opisali test BAT [7]. Obecnie pracuje się nad udoskonaleniem tej metody, szczególne zainteresowanie skupia się wokół protokołów identyfikacji bazofilów oraz markerów ich aktywacji. Wiele badań dotyczących szczegółów procesu, takich jak rodzaje antykoagulantów wykorzystywanych przy pobieraniu krwi czy dobór buforu lub sposób izolacji leukocytów i dobór przeciwciał barwiących, opisali de Weck i wsp. [8]. Parametry te są istotne z punktu widzenia optymalizacji pracy laboratoryjnej, kluczowy jednak wydaje się dobór protokołu identyfikacji podstawowej puli bazofilów. Należy podkreślić zalety cytometrii przepływowej w testach diagnostycznych in vitro. Metoda ta idealnie nadaje się do testów BAT ze względu na to, że umożliwia identyfikację nawet bardzo niewielkich populacji (bazofile stanowią 0,2–1% leukocytów). Wciąż jednak istnieje konieczność doskonalenia tej metody, pozyskania bardziej precyzyjnych metod identyfikacji bądź odnalezienia optymalnego markera aktywacji. W niniejszej pracy skupiono się na identyfikacji, należy jednak podkreślić znaczenie markerów aktywacji. Obecnie uwagę naukowców przyciąga kilka markerów, takich jak: CD63, CD203c oraz później opisane CD13, CD164, CD107a czy CD107b [9]. Dotychczas nie przeprowadzono jednak obiektywnych badań porównujących właściwości większości z wymienionych markerów aktywacji [10].

Początkowo do identyfikacji podstawowej puli bazofilów stosowano protokół anty-IgE/CD63. Umożliwia on diagnostykę in vitro wielu chorób alergicznych. Opiera się on na fakcie, że antygen CD63 zakotwiczony jest w błonie i jego ekspresja spoczynkowa jest niska, natomiast po aktywacji bazofila silnie wzrasta. Ponieważ zaobserwowano pewne niepowodzenia w przypadku alergii na leki [11], zdecydowano

© Medical Education. For private and non-commercial use only. Downloaded from https://www.journalsmededu.pl/index.php/alergoprofil: 03.08.2025; 19:51,12

Rycina 5. *Proces wydzielenia mediatorów zapalnych przez bazofile. Na powierzchni bazofilów w stanie spoczynku znajduje się receptor FcεRI, który wykazuje wysokie powinowactwo do IgE (A). IgE to przeciwciało, które wiąże alergen (B), co prowadzi do degranulacji bazofila i uwolnienia mediatorów zapalnych i wzrostu ekspresji cząstki CD63 na powierzchni bazofila.*



się na ulepszenie technik identyfikacji. Bardzo obiecujący wydawał się CD203c, który wykazywał wybitną ekspresję po aktywacji bazofila [12]. Początkowo CD203c z sukcesami wykorzystywano jako marker aktywacji [13]. Udowodniono również jego przydatność jako markera identyfikacji [9]. Pewną niedoskonałością markera okazało się występowanie niskiej ekspresji na bazofilach spoczynkowych. Problem ten rozwiązali Boumiza i wsp. przez wykorzystanie trzech barwników w protokole CRTH2^{+}/CD3^{-}/CD203c^{+} [9]. W pierwszym etapie identyfikacji wybierano komórki wykazujące ekspresję cząstki CRTH2 (występuje ona również na eozynofilach i limfocytach Th2). Oddzielenie eozynofilów opiera się na ocenie rozproszeń światła na ziarnistościach wewnątrzkomórkowych SS. Limfocyty T odrzuca się przez znakowanie przeciwciałem anty-CD3. Bazofile wybiera się jako komórki CD203c^{+}/CD3^{-}. Protokół ten pozwala uzyskać wysoką czystość identyfikacji bazofilów, jego główną wadą jest jednak konieczność zastosowania trzech barwników.

Inną, bardzo dobrą metodą identyfikacji bazofilów jest wykorzystanie przeciwciał anty-CD123. Protokół CD123^{+}/HLA-DR^{-} początkowo przeznaczony był do identyfikacji komórek dendrytycznych. Zaobserwowano jednak na powierzchni bazofila obecność antygenu CD123, komórki te nie wykazują jednak ekspresji cząstki HLA-DR. Poziom ekspresji antygenu CD123 nie zależy od stopnia aktywacji bazofilów, lecz jest w zasadzie stały [6]. Protokół ten umożliwia więc identyfikację bazofilów z dużą czystością. Wadą jest konieczność wykorzystania dwóch barwników.

Wykazano, że przeciwciało anty-CCR3 jest bardzo dobrym narzędziem do identyfikacji bazofilów. Receptor CCR3 jest obecny na bazofilach, eozynofilach i aktywowanych limfocytach Th2 [14]. Ogromną zaletą protokołu z anty-CCR3 jest możliwość zastosowania tylko jednego barwnika. Bazofile oznacza się jako CCR3^{+}/SSC^{low}. Wykluczenie eozynofilów jest stosunkowo łatwe, gdyż mają one duże ziarnistości (są to komórki z CCR3^{+}/SSC^{high}). Pewną wadą protokołu jest możliwość występowania aktywowanych limfocytów Th2, nie stanowiły one jednak dużego odsetka zidentyfikowanych komórek (zwykle mniej niż 4%, mediana – 1%) [14].

Nie da się jednoznacznie określić, który z opisanych protokołów identyfikacji jest najlepszy. Uwzględniwszy parametry takie jak czystość, oddzielenie bazofilów i trudność wykonania procedury (np. liczba wykorzystanych barwników), najlepsze wydają się protokoły: CD123^{+}/HLA-DR^{-} i CCR3^{+}/SSC^{low}. Stabilność markera po stymulacji alergenem zdaje się mieć kluczowe znaczenie. Hausmann i wsp. udowodnili w swojej pracy z 40 pacjentami stabilność CCR3. Stwierdzili, że nie ma znaczących strat bazofilów po stymulacji alergenem w przypadku CCR3, natomiast CD123 wykazuje mniejszą stabilność [14]. Podobne wyniki opisał nasz zespół – odnotowano pewien spadek ekspresji CCR3 po stymulacji pyłkami traw i roztoczem kurzu domowego (*Dermatophagoides pteronyssinus*), ale populacja bazofilów wciąż mogła być doskonale oddzielona [15]. Odmienne stanowisko przedstawili natomiast Chirumbolo i wsp. Są oni zdania, że CD123 jest bardziej stabilnym markerem niż CCR3 [16].

© Medical Education. For private and non-commercial use only. Downloaded from https://www.journalsmededu.pl/index.php/alergoprofil: 03.08.2025; 19:51,12

W przypadku wykorzystania cytometrii przepływowej do diagnostyki często wymienianym ograniczeniem metody jest konieczność użycia zaawansowanych technologii, niedostępnych niestety w większości laboratoriów. Nie należy zapominać o kosztach, które nie są niskie, aczkolwiek postęp technologiczny sprawia, że badania te stają się coraz bardziej dostępne. Trudność stanowi brak standaryzacji testów aktywacji. Należy określać optymalne stężenia alergenu wywołującego aktywację komórek oraz poziom odcięcia – wzrostu ekspresji – powyżej którego uznajemy aktywację za proces swoisty.

Podsumowując, możemy stwierdzić, że cytometria przepływowa jest obiecującą, dodatkową metodą diagnostyczną. Znajduje zastosowanie szczególnie w przypadku istnienia niebezpieczeństwa wywołania anafilaksji. Doskonale nadaje się do badań eksperymentalnych i naukowych. Istnieje jednak konieczność wystandaryzowania tej metody diagnostycznej. Potrzebę tę podkreślano już na pierwszych międzynarodowych warsztatach cytometrii przepływowej w alergii, które odbyły się w Hiszpanii w 2007 roku. Specjaliści uznali, że według nich nie ma powodu, dla którego testy BAT nie miałyby znaleźć się wśród metod diagnostycznych chorób alergicznych wykorzystywanych klinicznie. Z roku na rok obserwuje się wzrost zainteresowania testami BAT, choć wciąż niesłusznie uznaje się je za metodę niedostosowaną do rutynowej diagnostyki.

Piśmiennictwo:

1. *Van Cauwenberge P., Watelet J.B., Van Zele T. et al.: Spreading excellance in allergy and asthma: the Gallen Project. Allergy 2005, 60: 858-864.*
2. *Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A.A. et al.: Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA 2008). Allergy 2008, 68: 8-160.*
3. *Kantorski J.: Podstawy cytometrii przepływowej. Central-European J. Immunol. 1996, 21: 87-93.*
4. *Kaczmarek A., Osawa T., Leporowska E. et al.: Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce klinicznej. Współczesna Onkologia 2002, 6: 366-373.*
5. *Schroeder J.T., Chichester K.L., Bieneman A.P.: Human basophils secrete IL-3: evidence of autocrine priming for phenotypic and functiona; responses in allergic disease. J. Immunol. 2009, 182: 2432-2438.*
6. *Potapińska O., Demkow U., Wąsik M.: Cytometryczna ocena aktywacji bazofilów w diagnostyce chorób alergicznych. Pneumonol. Alergol. Pol. 2009, 77: 152-158.*
7. *Sainte-Laudy J., Vallon C., Guérin J.C.: Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. Allergy Immunol. 1994, 26: 211-214.*
8. *De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M. et al.: Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2008, 18: 143-55.*
9. *Boumiza R., Debard A.L., Monneret G.: The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. Clin. Mol. Allergy 2005, 3: 9.*
10. *Wolańczyk-Mędrala A., Barg W., Mędrala W.: CD164 as a Basophil Activation Marker. Curr. Pharm. Des. 2011, 17: 3786-3796.*
11. *Gamboa P.M., García-Avilés M.C., Urrutia I. et al.: Basophil activation and sulfidoleukotriene production in patients with immediate allergy to lactam antibiotics and negative skintests. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2004, 14: 278-83.*
12. *Hoffmann H.J., Bogebjerg M., Nielsen L.P. et al.: Lysis with Saponin improves detection of the response through CD203c and CD63 in the basophil activation test after crosslinking on the high affinity IgE receptor FcεRI. Clin. Mol. Allergy 2005, 3: 10.*
13. *De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M. et al.: Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. Int. Arch. Allergy Immunol. 2008, 146: 177-189.*
14. *Hausmann O.V., Gentinetta T., Fux M. et al.: Robust expression of CCR3 as a single basophil selection marker in flow cytometry. Allergy 2011, 66: 85-91.*
15. *Wolańczyk-Mędrala A., Gogolewski G., Liebhart J. et al.: A new variant of the basophil activation test for allergen-induced basophil CD63 upregulation. The effect of cetirizine. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2009, 19: 465-473.*
16. *Chirumbolo S., Ortolani R., Vella A.: CCR3 as a single selection marker compared to CD123/HLADR to isolate basophils in flow cytometry: some comments. Cytometry A. 2011, 79: 102-106.*

Adres do korespondencji:

mgr inż. Anna Skotny

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

50-367 Wrocław, ul. Wybrzeże L. Pasteura 4

tel.: (71) 784-25-22

e-mail: annaskotny@gmail.com

© Medical Education. For private and non-commercial use only. Downloaded from https://www.journalsmededu.pl/index.php/alergoprofil: 03.08.2025; 19:51,12