

MH Dr. Radó György Honvéd Egészségügyi Központ,
Állami Egészségügyi Központ*

Eozinofil sejtek vizsgálati lehetőségei áramlási citometriával

Dr. Fent János,
Dr. habil. Fűrész József* orvosezredes, Ph.D.,
Dr. habil. Lakatos Zsuzsanna Ph.D.

Kulcsszavak: eozinofil granulociták, CD 69, áramlási citometria, aktivációs markerek, CD 16, GM-CSF, fő bázikus fehérje

Szerzők jelen munkájukban bemutatják az eozinofil sejtek áramlási citométerrel történő vizsgálati lehetőségeit. Módszert mutatnak az eozinofil sejtek százalékos arányának, valamint aktiváltsági szintjének mérésére. Az aktiváltsági állapot kimutatását mind sejt felszíni, mind intracelluláris antigének detektálásán alapuló módszerekkel demonstrálják. Ezen módszerek gyakorlati alkalmazhatóságát teljes vérben GM-CSF-fel *in vitro* aktivált eozinofil sejteken mutatják be.

Rövidítések jegyzéke:

GM-CSF: Granulocita- makrofág kolónia stimuláló faktor,
MBP: fő bázikus protein,
CD 69: korai aktivációs antigén,
CD 16: Fc gamma III receptor
CD 14: LPS receptor

Bevezetés

Az eozinofil granulociták fontos szerepet játszanak számos kór állapot patomechanizmusában. Jelentőségük az allergiás betegségekből, a parazitózisokban közzismert [1, 2]. A perifériás vérben az eozinofil sejtek aktiválódása és/vagy szám arányának növekedése mögött azonban sokféle betegség rejtőzhet.

Emelkedett eozinofil sejtszámot mutatnak ki többek között orrpolipban [3-5], idiopátiás hipereozinofil szindrómában [6], eozinofiliás nyelőcsőgyulladásban [7], valamint gyermekkori eozinofiliás rendellenességeknél [8].

Ugyanakkor aktivált eozinofilek mutathatók ki például eozinofil tüdőgyulladásban, illetve enyhe asztmában szenvedő betegek tudományos folyadékában [9-11]. Ez jellemző a familiáris eozinofiliában szenvedő betegek perifériás vérére is, de ebben az esetben az eozinofilek aktiváltsági szintje alatta marad a hipereozinofiliás szindrómás betegek vérében mérhető értékeknek [12]. Ezzel szemben az epizódikus angioödémás eozinofiliát nem kíséri eozinofil aktiváció, s ily módon elkülöníthető a hipereozinofiliás szindrómától [13].

A fentiek alapján látható, hogy a differenciál diagnózist segítheti, ha az eozinofil sejtszám változása mellett egyidejűleg információt

nyerünk az eozinofil granulociták aktivációs állapotáról is.

Az aktivációs állapotra vonatkozóan a hagyományos vérszámoló hematológiai automaták már nem szolgáltatnak információt. Az aktivációs állapot mérésére kínáló egyik módszer az, hogy megmérjük a szérumban az eozinofil sejtek működése során felszabaduló mediátorok koncentrációját. Az eozinofil sejtek 4 féle granulumjában található sokféle mediátor anyag (ld. I. táblázat, [14]) közül leggyakrabban az eozinofil kationos proteint (ECP), a fő bázikus proteint (MBP), és az eozinofil peroxidázt (EPO), valamint az eozinofil eredetű neurotoxint (EDN) szokták mérni – viszonylag drága módszerekkel. Számos más, nagy mennyiségben felszabaduló anyag, mint pl. az oxigén szabadgyökök, a leukotriének, a trombocita aktivációs faktor (PAF), a TNF-alfa vagy az IL-6 azonban nemcsak eozinofil sejtől szabadulhat fel, ezért ezen anyagok eozinofil eredetét csak izolált sejteken végzett mérésekkel lehet igazolni.

Az áramlási citométer egy olyan eszköz, amelynek segítségével viszonylag gyorsan és olcsón meg lehet határozni az egyes mediátorok felszabadulását. A sejtek membránjait permeabilizálva lehetőség van intracelluláris komponensek fluoreszcens elenanyaggal történő jelölésére. Amennyiben ismert a vizsgálni kívánt komponens nyugalmi állapotra jellemző kiindulási értéke, a maradék intracelluláris mennyiségből következtetni lehet a degranuláció mértékére.

Az eozinofil sejtek aktivációja során, a degranulációval egyidejűleg változik néhány sejt felszíni molekula expressziója is. Ez utóbbi jelenség is jól mérhető áramlási citometriával, akár teljes vérben is. Többféle eozinofil aktivációs marker közül – irodalmi adatok szerint [15-18] – a CD 69 molekula, az ún. korai aktivációs marker tűnik leginkább használhatónak. A CD 69 antigén egy 60 kDa molekulásúlyú két alegységből álló glikoprotein, amely csak az aktivált állapotban levő eozinofilek felszínén jelenik meg, a nyugalmi állapotúakon nem. Ezért ez a molekula egyaránt alkalmas az *in-vivo* és az *in-vitro* aktiváció nyomon követésére.

Az áramlási citométer egy olyan eszköz, amelynek segítségével viszonylag gyorsan és olcsón meg lehet határozni az egyes mediátorok felszabadulását. A sejtek membránjait permeabilizálva lehetőség van intracelluláris komponensek fluoreszcens elenanyaggal történő jelölésére. Amennyiben ismert a vizsgálni kívánt komponens nyugalmi állapotra jellemző kiindulási értéke, a maradék intracelluláris mennyiségből következtetni lehet a degranuláció mértékére.

<p><u>ELSŐDLEGES GRANULUM</u></p> <p>Charcot-Leyden kristályok</p>	<p><u>KIS GRANULUMOK</u></p> <p>Aril szulfatáz B Savas foszfatáz Kataláz Elasztáz</p>
<p><u>MÁSODLAGOS GRANULUMOK</u></p> <p>Eozinofil fő bázikus fehérje (MBP) Eozinofil kationos fehérje (ECP) Eozinofil neurotoxin (EDN) Eozinofil peroxidáz (EPO) Interleukinok (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6) Tumor nekrozis faktor (TNFα)</p>	<p><u>LIPID TESTECKÉK</u></p> <p>5-lipoxigenáz Ciklooxygenáz Leukotrién C4-szintáz Eozinofil peroxidáz Arachidon sav</p>

I. táblázat: Az eozinofil sejtek granulumjainak főbb elemei ([14] alapján)

re is [19, 20]. A CD 69 molekula az aktivált eozinofil sejteken kívül megtalálható még az aktivált T és B limfociták, NK sejtek, és a trombociták felszínén is, ezért nagyon fontos ezen sejtpopulációk megfelelő elkülönítése.

Noha az eozinofil granulociták a vérben relatíve kis (átlagosan 2,7) százalékban fordulnak elő [21], bizonyos, az áramlási citométerben jól mérhető tulajdonságaik alapján nagy biztonsággal azonosíthatók. Viszonylag magas az autofluoreszcenciájuk, erős granulálságuknak köszönhetően nagy mértékű oldalszórást mutatnak, amelyek együttesen már jó kapuzási stratégiát nyújtanak. A sejtek azonosítása még tovább pontosítható, ha kihasználjuk, hogy az FcγIII-R (CD 16) expressziója az eozinofileken minden esetben lényegesen alacsonyabb érték, mint a neutrofileken. Zavarólag hathat a monociták CD 16 pozitív alpopulációja, amelyek közel azonos intenzitással expresszálják e molekulát. Azonban a monociták oldalirányú szórása kisebb, mint az eozinofileké, és szükség esetén specifikus, monocitákra jellemző (pl. CD 14) jelöléssel elkülöníthetők [22-24].

Az eozinofil sejtek áramlási citometriás vizsgálatának lehetőségeit teljes vérben GM-CSF-fel [25] *in vitro* aktivált sejteken végzett kísérleteink segítségével mutatjuk be.

Anyagok és módszerek

A Központi Honvéd Kórház különböző betegségeinek különböző okok miatt *Vacurette*[®] csőbe (Greiner Bio-One, Ausztria) levett EDTA-val alvadásgátolt vérmintáit vizsgáltuk a betegek előzetes hozzájárulásával. A kvalitatív és kvantitatív vérképeket a kórház Központi Laboratóriuma határozta meg Abbot Cell-Dyn 3500 hematológiai auto-

matával. Összesen 45 vérmintát vizsgáltunk, amelyek széles (0,4 – 24,3%) eozinofil koncentráció tartományt fedtek le.

Eozinofilek sejt felszíni jelölése teljes vérben

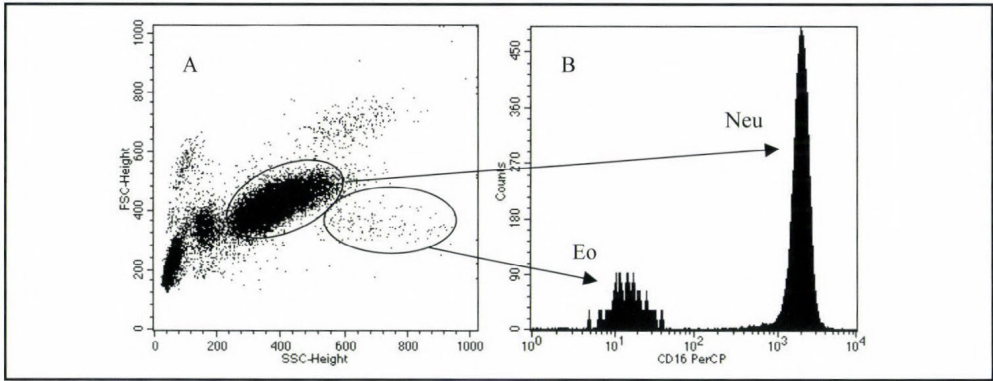
100-100μl vért inkubáltunk 30 percig, szobahőn, sötétben a következő antitestekkel:

1. 10 μl egér IgG1 (FITC-konjugált negatív kontroll, DAKO - Dánia) + 10 μl egér anti-humán CD16 (PC5-konjugált, Immunotech – Franciaország);
2. 10 μl egér anti-humán CD69 (FITC-konjugált, DAKO - Dánia) + 10 μl egér anti-humán CD16 (PC5-konjugált, Immunotech – Franciaország).

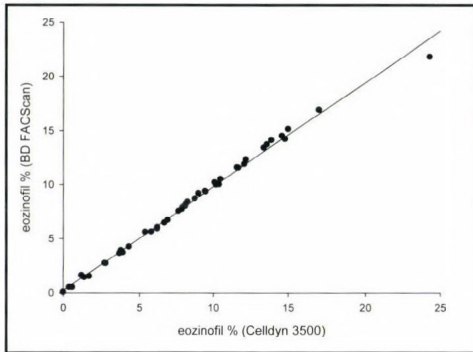
Ezt követően a vörösvértesteket 20-szoros térfogatú FacsLysing oldattal (Becton Dickinson, USA) hemolizáltuk 10 percig, majd a mintákat 3-szor mostuk (300 g, 5 perc) 2-2 ml 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel (16 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl), végül 0,5-0,5 ml 2% paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk.

Eozinofilek intracelluláris jelölése teljes vérben

A vérmintákat először a fenti módon felszíni CD 16-ra jelöltük. A hemolizálást és mosást követően az IntraStain kit (DAKO, Dánia) előírásait követve fixáltuk, majd permeabilizáltuk a sejteket. Az így kezelt sejteket jelöletlen egér anti-humán MBP-vel inkubáltuk 15 percig. Majd egyszeri mosást követően egy FITC konjugált másodlagos ellenanyaggal (anti-egér IgG, DAKO, Dánia) inkubáltuk 15 percig, majd 1-szer mostuk. Kontrollként az MBP ellenes ellenanyagnak megfelelő izotípussal kezelt mintát használtunk.



1. ábra: **A:** hemolizált, mosott, fixált vér fényszórási felhőképe. SSC-Height: oldalirányú szórás intenzitása, FSC-Height: előreirányú szórás intenzitása. Az egyedi pontok egy-egy sejtet reprezentálnak. **B:** Az A ábrán jelölt populációk CD 16 hisztogramja. Eo: eozinofil sejtek, Neu: neutrofil granulociták.



2. ábra: A Celldyn hematológiai automatával és a FACScan áramlási citométerrel meghatározott eozinofil sejtek százalékos arányai közötti összefüggés. $R=0,997$ $p<0,001$

Eozinofilek in-vitro aktiválása teljes vérben

Az eozinofil sejteket az egészséges, önkéntes donorok ($n=7$) EDTA-val alvadástátolt vérben $0,4 \mu\text{g/ml}$ GM-CSF-fel (LEUCOMAX® - Novartis Pharma AG, Svájc). A mintákat 37°C fokon, 5% CO_2 környezetben, sötétben, 240 percig inkubáltuk. Kontrollként aktiváló ágens nélküli, 37 illetve 20°C -on inkubált mintákat alkalmaztunk.

Áramlási citometria

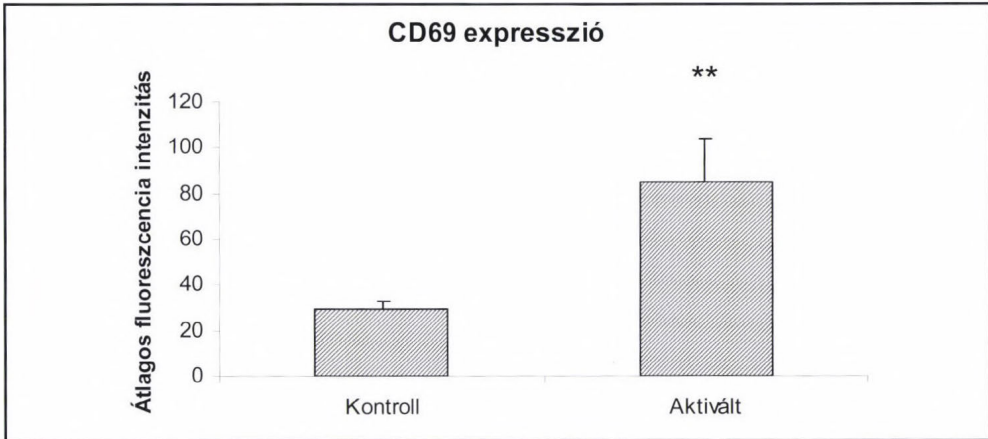
A felszíni vagy intracelluláris antigének jelölését követően a mintákat FACScan (Becton Dickinson, USA) készüléken mértük. A készülék kalibrálásához Calibrite (Becton Dickinson, USA) intenzitás standardot használtunk. Tekintettel az eozinofil sejtek viszonylag alacsony számára mérésenként $50\,000$ eseményt gyűjtöttünk. Az adatokat CellQuest 3.1 (Becton Dickinson, USA) program segítségével analizáltuk. Az eozinofil populációt a magas oldalirányú szórás és erős autofluoreszcencia, valamint az alacsony CD 16 jelölődés alapján kapuztuk ki.

Statisztika

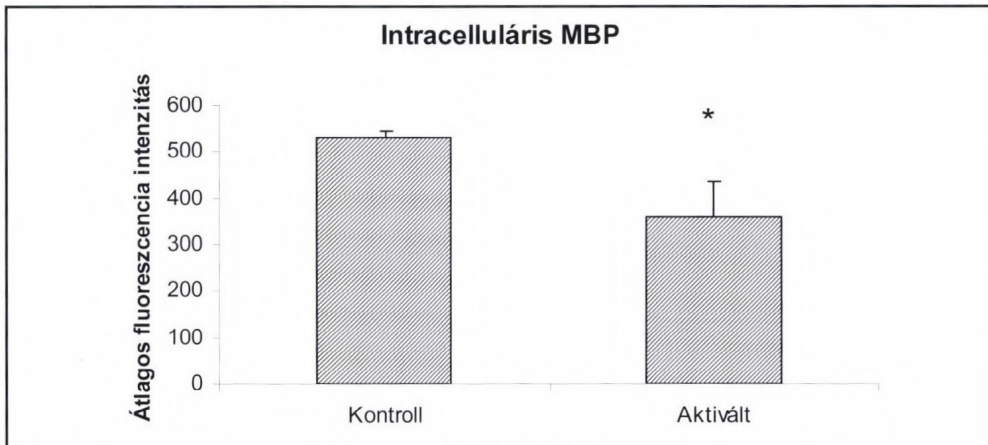
A regressziós analízist és az adatok összehasonlítására használt t-próbát SigmaStat for Windows ver. 3.11 (Systat Software Inc., USA) programcsomaggal végeztük.

Eredmények

A hemolizált, mosott, fixált vér fényszórási felhőképe látható az 1A. ábrán. Az eozinofil sejtpopuláció jól elkülöníthető nagymértékű oldalirányú (SSC) szórása révén, mi-



3. ábra: CD 69 expresszió aktivált és nyugalmi állapotú eozinofil sejtek felszínén teljes vérben.** $p < 0.001$ (t-próba)



4. ábra: Nyugalmi állapotú és aktivált eozinofil sejtek intracelluláris MBP tartalma teljes vérben. * $p < 0.05$ (t-próba)

vel ez lényegesen meghaladja nemcsak a limfocitákét és monocitákét, hanem az erősen granulált neutrofil granulocitákét is. Az ábrán szereplő kapukhoz tartozó sejtípusok a rájuk jellemző markerekre történő festés alapján azonosíthatók. Az eozinofilek esetében azonosítási lehetőséget nyújt a kismértékű CD16 jelölődés (1B. ábra).

A Magyar Honvédség Központi Honvédkórház Központi Laboratórium Cell-dyn 3500 automatájával illetve az általunk a FACScan Becton Dickinson áramlá-

si citométerben mért eozinofil százalékokat regressziós analízissel vetettük össze (2. ábra). A vizsgálatba bevont 45 vérminta adataira vonatkozó korrelációs egyenes meredeksége 1.036, tengelymetszete – 0.191 korrelációs együtthatója pedig 0,997 ($p < 0.001$). Ezen adatok a kétféle eljárás nagymértékű egyezését mutatják.

A GM-CSF-hatására az eozinofilek felszínén megjelenik a CD 69 korai aktivációs marker (3. ábra) és egyúttal csökken az intracelluláris MBP tartalom, a degranuláció

jeleként (4. ábra). Mindkét paraméter jó indikátora az eozinofil aktivációnak.

Diszkusszió

Tapasztalataink szerint az eozinofil sejtek azonosítására a magas oldalirányú fényszórás, az emelkedett autofluoreszcencia és a CD 16 expresszió alacsony értéke együttesen alkalmas kapuzási módszert biztosít az eozinofil sejtek nagybiztonságú azonosítására az áramlási citométerben. Az így vázolt kapuzási technika lehetővé teszi, hogy teljes vérben az eozinofil sejtek százalékos arányát a fehérvérsejtek között és aktiváltsági állapotát egyidejűleg határozhassuk meg. Az eozinofil sejtek aktiválódására bekövetkező mediátor(ok) szérum koncentrációja nemcsak az eozinofil sejtszám, hanem azok aktiváltsági szintjének függvénye. A hagyományos szérum koncentráció meghatározási módszerekkel a sejtek átlagos aktiváltsági állapotára jellemző adat nyerhető. Ezzel szemben az áramlási citométerben egyedileg határozható meg a sejtek aktiváltsági szintje, azaz információ nyerhető mind az aktivált sejtek arányára, mind azok aktiváltsági szintjére vonatkozóan. Más szavakkal ez azt jelenti, hogy különbséget tudunk tenni aközött, hogy sok eozinofil sejt aktiválódik kis mértékben, vagy néhány sejt nagymértékben.

A teljes vérben végezhető vizsgálatok előnye az izolált sejteken végezhető mérésekkel szemben, hogy ily módon elkerülhetők az izolálás következtében fellépő morfológiai és/vagy funkcionális nem kívánatos változások. Ezáltal lehetővé válik, hogy olyan *in vitro* modelleket hozzunk létre, amelyek közelítik az *in vivo* körülményeket. Ezeket a modelleket áramlási citométerrel vizsgálható az eozinofil sejtek aktiválhatósága, viabilitása, fagocitáló és aktív oxigéngyök termelő képessége a sejtek többé-kevésbé természetes környezetében.

Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti dr. Tomcsányi Katalint és dr. Mátyus Máriát (Központi Honvédkórház, Klinikai Laboratórium) az egyes vérképek mérésében nyújtott segítségükért.

IRODALOM

- [1] Dombrowicz, D. és Capron, M.: Eosinophils, allergy and parasites. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001, 13: 716-720.
- [2] Bignold, L. P.: The eosinophil leukocyte: controversies of recruitment and function. *Experientia*, 1995, 51: 317-327.
- [3] Saigusa, H., Miyazawa, T., Suzuki, M. és mts: [Eosinophil chemoattractants and related factors in nasal polyps]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*, 2006, 109: 774-780.
- [4] Gevaert, P., Lang-Loidolt, D., Lackner, A. és mts: Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, 118: 1133-1141.
- [5] Perez-Novo, C. A., Claeys, C., Van Zele, T. és mts: Eicosanoid metabolism and eosinophilic inflammation in nasal polyp patients with immune response to *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Am. J. Rhinol.*, 2006, 20: 456-460.
- [6] Lampinen, M., Oberg, G., Venge, P. és mts: Selective priming of peripheral blood eosinophils in patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *APMIS*, 2006, 114: 757-763.
- [7] Konikoff, M. R., Blanchard, C., Kirby, C. és mts: Potential of blood eosinophils, eosinophil-derived neurotoxin, and eotaxin-3 as biomarkers of eosinophilic esophagitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, 4: 1328-1336.
- [8] Wagelie-Steffen, A. és Aceves, S. S.: Eosinophilic disorders in children. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2006, 6: 475-482.
- [9] Foerster, M., Haefner, D., és Kroegel, C.: Bcl-2-mediated regulation of CD 69-induced apoptosis of human eosinophils: identification and characterization of a novel receptor-induced mechanism and relationship to CD 95-transduced signalling. *Scand. J. Immunol.*, 2002, 56: 417-428.

- [10] Hartnell, A., Robinson, D. S., Kay, A. B. és mts: CD 69 is expressed by human eosinophils activated *in vivo* in asthma and *in vitro* by cytokines. *Immunology*, 1993, 80: 281-286.
- [11] Nishikawa, K., Morii, T., Ako, H. és mts: *In vivo* expression of CD 69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD 69 as a possible activation marker for eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992, 90: 169-174.
- [12] Klion, A. D., Law, M. A., Riemenschneider, W. és mts: Familial eosinophilia: a benign disorder? *Blood*, 2004, 103: 4050-4055.
- [13] Kawano, M., Muramoto, H., Tsunoda, S. és mts: Absence of CD 69 expression on peripheral eosinophils in episodic angioedema and eosinophilia. *Am. J. Hematol.*, 1996, 53: 43-45.
- [14] Giembycz, M. A. és Lindsay, M. A.: Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.*, 1999, 51: 213-340.
- [15] Tachimoto, H. és Bochner, B. S.: The surface phenotype of human eosinophils. *Chem. Immunol.*, 2000, 76: 45-62.
- [16] Ziegler, S. F., Ramsdell, F., és Alderson, M. R.: The activation antigen CD 69. *Stem. Cells*, 1994, 12: 456-465.
- [17] Matsumoto, K., Appiah-Pippim, J., Schleimer, R. P. és mts: CD 44 and CD 69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1998, 18: 860-866.
- [18] Mawhorter, S. D., Stephany, D. A., Ottesen, E. A. és mts: Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. Application of whole-blood flow cytometry to eosinophils. *J. Immunol.*, 1996, 156: 4851-4858.
- [19] Hartnell, A., Robinson, D. S., Kay, A. B. és mts: CD 69 is expressed by human eosinophils activated *in vivo* in asthma and *in vitro* by cytokines. *Immunology*, 1993, 80: 281-286.
- [20] Pignatti, P., Perfetti, L., Galdi, E. és mts: Increased CD 69 expression on peripheral blood eosinophils after specific inhalation challenge. *Allergy*, 2002, 57: 411-416.
- [21] Williams W.J., Nelson, D. A., és Morris, M. W.: Examination of the blood. 1991, 4th. International Edition: 9-24.
- [22] Carulli, G., Sbrana, S., Azzara, A. és mts: Detection of eosinophils in whole blood samples by flow cytometry. *Cytometry*, 1998, 34: 272-279.
- [23] Gopinath, R. és Nutman, T. B.: Identification of eosinophils in lysed whole blood using side scatter and CD 16 negativity. *Cytometry*, 1997, 30: 313-316.
- [24] Thurau, A. M., Schylz, U., Wolf, V. és mts: Identification of eosinophils by flow cytometry. *Cytometry*, 1996, 23: 150-158.
- [25] Giembycz, M. A. és Lindsay, M. A.: Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.*, 1999, 51: 213-340.

J. Fent M.D.,
Col. habil. J. Fűrész M.D.M.C., Ph.D.,
habil. Zsuzsanna Lakatos, Ph.D.

Flow cytometry in studying eosinophils

Eosinophil granulocytes are important participants in the pathophysiology of many diseases. This paper presents how eosinophils can be studied by flow cytometry. Flow cytometry is capable to determine both the relative number and the activation level of the eosinophilic cells. The activation state of these cells can be determined by measuring either specific surface markers or using intracellular staining. How these methods can be used in the everyday practice is demonstrated on eosinophils activated *in vitro* in whole blood by GM-CSF and analyzed by flow cytometry.

Key-words: eosinophil granulocytes, CD 69, flow cytometry, activation markers, CD 16, GM-CSF, major basic protein

Dr. Fent János
 1553 Budapest, Pf. 1.