

Příprava separace a kultivace bazofilních granulocytů

Studentka: Tereza Běhounková, ZL3

Školitelé: Ing. Tomáš Vlas

Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Východisko:

Pomocí senzibilujícího alergenu je vyvolána aktivace bazofilů a následně se měří expozice jejich aktivačního znaku, který je na povrchu, pomocí monoklonální protilátky. Měření probíhá na průtokovém cytometru. Molekuly IgE, které jsou přítomny ve vzorku, jsou navázány na povrchu bazofilů pomocí vysokoafinitního receptoru FcεRI. Pokud je molekul IgE dostatek, dochází k překlenutí receptorů pomocí přidaného alergenu, to vede k plné aktivaci bazofilů a k následnému vylití obsahu granul. Degranulací také dochází k expozici transmembránového proteinu – CD63 na povrch. Tento znak je poté detekován pomocí monoklonální protilátky anti-CD63, která je konjugovaná s fluorescenčním barvivem (FITC). Bazofily jsou ve směsi leukocytů identifikovány monoklonální protilátkou anti-CD203c. Aktivaci bazofilů se pokusíme změřit i na 2DEP cytometru a budeme tak chtít zjistit shodu mezi metodami.

Cíl:

Cílem této práce je porovnání výsledků získaných z aktivačního testu bazofilů pomocí průtokové cytometrie s výsledky, které jsme získali na 2DEP cytometrii. Bazofilní granulocyty byly testovány na pyl břízy. Hlavním úkolem je, zjistit zda by nová metoda 2DEP mohla být alternativou průtokové cytometrie.

Metodika:

Sledovaný soubor zahrnuje 20 vzorků, z toho 10 vzorků bylo pozitivních a 10 negativních. Pro samotné stanovení však bylo použito pouze 6 pozitivních vzorků a 4 vzorky negativní, z důvodu zavádění nové metody – 2DEP cytometrie. Byla použita plná krev, odebraná do zkumavky s heparinem. Ze vzorku plné krve jsme separovali čistou buněčnou populaci bazofilních granulocytů, která byla použita na měření v 2DEP cytometrii a část plné krve byla použita pro měření aktivace bazofilů pomocí průtokové cytometrie.

Výsledky:

Při měření aktivace bazofilů na průtokovém cytometru a 2DEP cytometru byly nalezeny rozdíly mezi pozitivními pacienty a skupinou negativních kontrol. Při měření na průtokovém cytometru jsme vycházeli z hodnot AUC a CD-sens. Kdy u pozitivních pacientů se nám tyto hodnoty zvyšují, čím vyšší CD-sens, tím jsou bazofily vůči alergenu senzitivnější a čím vyšší AUC, tím je vyšší reaktivita bazofilů. U negativních kontrol nedochází ke zvyšování těchto hodnot. V případě 2DEP cytometrie se u pozitivních pacientů výsledky přenáší do grafů. V grafu vzniká pík, jehož hodnota je nejvyšší při 13 MHz. U negativních kontrol se tento pík nenachází. Výsledky jsou zde ve formě procent aktivovaných bazofilů.

Srovnání výsledků z 2DEP a průtokové cytometrie

Skupina pozitivních pacient

Vzorek	AUC	CD-sens	aktivované bazofily [%]
1	2027,462	0,428	8,0
2	2311,169	0,502	9,1
3	2066,369	0,468	7,6
4	3712,487	1,000	5,1
5	2033,586	0,562	23,1
6	1108,251	0,312	47,5

Skupina negativních kontrol

Vzorek	AUC	CD-sens	aktivované bazofily [%]
1	55,962	0,011	-51,7
2	675,306	0,114	30,0
3	134,028	0,028	29,7
4	51,525	0,011	-12,5

Závěr:

Výsledky z 2DEP cytometru a průtokové cytometrie se nedají uznat za shodné. Pouze u pozitivních pacientů vidíme jisté změny, které se dají zaznamenat 2DEP cytometrií a u skupiny negativních kontrol jsou výsledky nejasné, změny jsou různorodé.