

Metoda: Cytotoxické testy

Tereza Hnídková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitelé: Ing. Tomáš Vlas

Princip: Tato metoda je používána v klinice pro detekci defektní funkce systému granzym/perforin. Využívá se hlavně při diagnostice hemofagocytyujících lymfohistiocytóz. Cytotoxické lymfocyty T zabíjí cílové buňky poté, co rozpoznají cílový antigen, který je na jejich povrchu. Důležitý mechanismus pro imunitní odpovědi proti virům, nádorům a transplantovaným tkáním. Perforin/granzym B jsou lokalizovány v intracelulárních granulech. Po aktivaci cytotoxické aktivitě-CTL-migrují tato granula k místu kontaktu CTL a cílové buňky a jejich obsah je uvolněn do mezibuněčného prostoru. Perforin se naváže na membránu cílové buňky a dochází ke vstupu granzymu B do buňky. Poté je spuštěna kaskáda proteolytických štěpení. Důsledkem je apoptóza cílové buňky. Prvním předpokladem pro provedení testu je indukce efektorových lymfocytů T, nebo buněk NK. Pro diagnostiku HLH jsou lymfoblasty získány z lymfocytů pacienta.

Druhou částí pokusu je příprava vhodné cílové buňky (buňka infikovaná testovacím virem, nádorovou buňkou). U HLH se používají myší linie, které neexprimují na svém povrchu molekulu Fas a nemůže být, proto izolována jiným systémem. Cílové buňky jsou kultivovány po krátkou dobu s ^{51}Cr , který vstupuje do buněk. Buňky jsou poté inkubovány s několika populacemi efektorových buněk, NK nebo CTL. Po 6 h jsou odebrány vzorky supernatantu a v nich je stanovena aktivita gama záření. Dvě kontroly: Jamky, do kterých nebyly přidány efektorové buňky pro zjištění množství uvolněného ^{51}Cr – kontrola a jamky kde byly všechny buňky lyzovány detergentem- max. Procento cytotoxické aktivity je stanoveno podle vzorce $100 \cdot (\text{aktivita vzorku}) / (\text{max. kontrola})$

Uplatnění metody: Defekty mají v systému perforin/granzym B za následek selhání cytotoxické funkce CTL a jsou podkladem velmi vážné skupiny chorob – hemofagocytyující lymfohistiocytózy. Aktivované a proliferující CTL a také buňky NK nejsou schopny likvidovat buňky infikované jako se tomu děje za normálních okolností. Následkem je progresivní infekce a pokračující aktivace buněk prezentující antigen. Produkce cytokinů těmito buňkami a lymfocyty se označuje jako cytokinová bouře, vede k multiorgánovému selhání a krvácení. Interferon Gama. Primární HLH, jediná možnost terapie je transplantace kmenových hematopoetických buněk. Pro diagnózu HLH slouží testy prokazující cytotoxickou aktivitu. Metodou pro tento pokus je uvolňování radioaktivního ^{51}Cr .

Úskalí metody: možnost provádět pouze na pracovišti s laboratoří schválenou pro práci s radioaktivními látkami. Interpretaci výsledků vždy provádí imunolog.

Přístrojové vybavení: Laboratoř musí být vybavená pro práci s buněčnými kulturami a radioizotopy, včetně gama counteru

Odběr a transport: Vstupním materiálem je nesrážlivá krev a separované periferní mononukleární buňky. Způsob přípravy efektorových buněk trvá několik dnů až týdnů. Samotný cytotoxický test v klasické formě trvá 6-8 hodin.