

IMUNOLOGIJA V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI

ANALIZA POPULACIJ LIMFOCITOV T S PRETOČNO CITOMETRIJO

1. Osnove analize populacij limfocitov

Z metodo pretočne citometrije lahko analiziramo limfocitne populacije v krvi. Analiza je zlasti pomembna za opredeljevanje prirojenih in pridobljenih imunskih pomanjkljivosti, pri katerih lahko ugotovimo pomanjkanje določene vrste limfocitov. Ker manjkajoči limfociti ne opravljajo predvidenih nalog, imunski odziv ni popoln ali pa ga ni. Dve najbolj znani pomanjkljivosti limfocitov T sta DiGeorgejev sindrom in SCID (angl. *Severe Combined Immune Deficiency*). Aids je pridobljena imunska pomanjkljivost, pri kateri je najizrazitejše pomanjkanje celic T pomagalk. Merjenje koncentracije oz. določanje deleža celic T pomagalk v krvi ja najboljši laboratorijski pokazatelj napredovanja bolezni, kakor tudi uspešnosti zdravljenja.

Monoklonska protitelesa proti CD3 se vežejo na receptorje, ki omogočajo limfocitom T prepoznavanje antigenov (T celični receptor), zato s protitelesi proti CD3 zanesljivo prikažemo le limfocite T. Protitelesa proti CD4 se specifično vežejo na proteine, ki jih na svoji površini izraža del limfocitov T, ki jih imenujemo celice pomagalk in jih dobro prikažemo s kombinacijo CD3 in CD4. Monoklonska protitelesa CD8 specifično prepoznajo proteine, ki jih na površini izražajo citotoksični limfociti T oz. celice T zaviralke in jih prikažemo s kombinacijo CD3 in CD8. V primeru normalne krvne slike, ko pretočni citometer omogoča razločevanje med limfociti in monociti, je za razlikovanje med zaviralkami in pomagalkami mogoče samo z označevalcema CD4 in CD8. V primeru nenormalnih rezultatov pa je potrebno s kombinacijami CD3, CD4 in CD8 natančneje analizirati T limfocite.

S pretočno citometrijo je mogoče analizirati celice, obarvane z več fluorescentnimi barvili hkrati. To pomeni, da lahko celice barvamo z dvemi, tremi ali več različnimi vrstami monoklonskih protiteles in prikažemo, katere kombinacije antigenov izražajo posamezne celice. Če želimo npr. ugotoviti delež zaviralnih/citotoksičnih limfocitov T, barvamo celice z monoklonskimi protitelesi proti CD3 in CD8. Celice, ki se označijo z monoklonskimi protitelesi proti CD8 in obenem s CD3, so zaviralni/citotoksični limfociti T. Celice, obarvane z monoklonskimi protiteles proti CD8, ne pa proti CD3, so celice NK.

Pri uporabi več fluorokromov naenkrat (angl. *multicolor flow cytometry*) je pri pretočni citometriji nujna uporaba kompenzacije. Kompenzacija je metoda, s katero upoštevamo prekrivanje emisijskih spektrov dveh fluorokromov in posledično lažno povečane intenzitete fluorescence zaradi emisije prvega fluorokroma v območje merjenja intenzitete za drug fluorokrom. Na vaji boste kompenzirali intenziteto fluorokromov za FITC in PE.

2. Kompenzacija fluorokromov in določanje deleža celic T pomagalk in zaviralk

A. Princip

Po dodatku reagenta v vzorec polne krvi, se specifična protitelesa vežejo na površinske levkocitne antigene, ki so pglavitnega pomena za razlikovanje med različnimi vrstami T limfocitov. Protitelesa so označena z različnimi fluorokromi, ki pri analizi s pretočnim citometrom oddajajo svetlobo specifične valovne dolžine. To omogoča detekcijo celic, ki so pozitivne za posamezen antigen. Z analizo podatkov lahko nedvoumno določimo odstotek posamezne populacije T limfocitov. Protitelesa proti CD45 uporabimo za identifikacijo limfocitov v kompleksni mešanici krvnih celic, saj prav v limfocitih (v primerjavi z granulociti in monociti) izražanje tega antigena najvišje.

Za kompenzacijo izvedemo posamično barvanje vzorca polne krvi samo s protitelesi CD20-FITC in samo s CD5-PE. To omogoča prilagoditev intenzitete fluorescence za oba fluorokroma, kar izvedemo s pomočjo programske opreme pretočnega citometra.

B. Reagenti

Reagent CD20 vsebuje protitelesa proti CD20 (označeno s FITC).

Reagent CD5 vsebuje protitelesa proti CD5 (označeno s PE).

Reagent BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4: vsebuje protitelo proti CD3 (označeno s FITC), protitelo proti CD8 (označeno s PE), protitelo proti CD45 (označeno s PerCP), protitelo proti CD4 (označeno z APC) v 1mL fiziološkega pufra z 0,1% natrijevega azida.

Fluorokromi: FITC – fluorescein izotiocianat; PE – fikoeritrin; PerCP – peridinin klorofil; APC – alofikocianin.

C. Vzorec

Za vsak vzorec potrebujemo najmanj 50 µl polne krvi, ki mora biti aseptično odvzeta z antikoagulantom K₃EDTA. Vzorec moramo z reagentom inkubirati najkasneje 48 h po odvzemu, analiziramo pa ga lahko najkasneje 24h po inkubaciji. V tem primeru vzorec hranimo pri sobni temperaturi, zaščitena pred svetlobo.

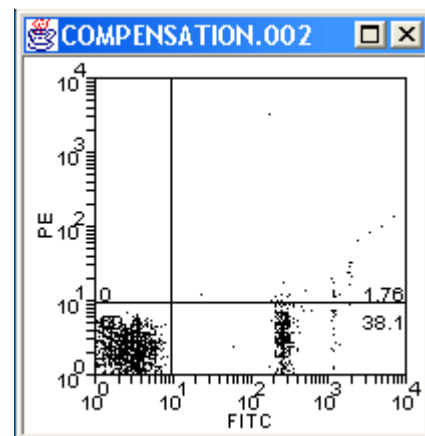
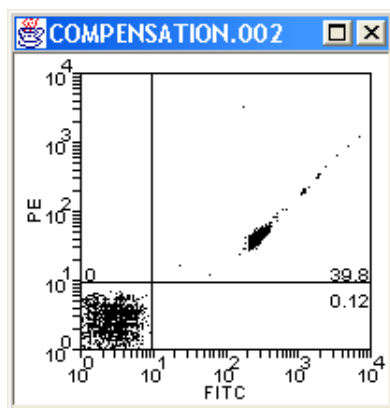
D. Raztopina za lizo eritrocitov

BD FACSLysing solution (10x): vsebuje pufer za lizo eritrocitov, etilen glikol in formaldehid. Omogoča odstranitev eritrocitov, ki motijo analizo. Pred uporabo jo redčimo z bidestilirano vodo (1:9).

E. Aparatura

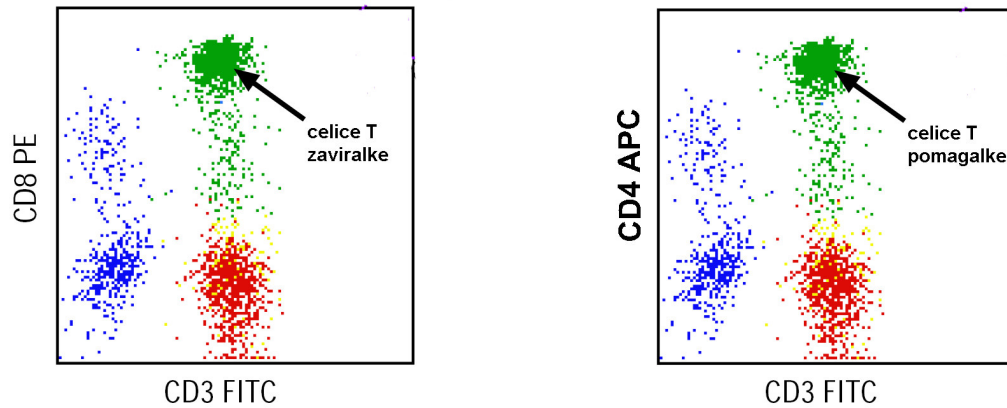
Pretočni citometer BD FACSCalibur s sistemom dveh laserjev (488 in 633 nm) in štirih fluorescenčnih detektorjev (FL1: 530 nm; FL2: 585nm; FL3: 670nm; FL4: 661 nm)

F. Dvoparametrski histograma za kompenzacijo fluorokromov FITC in PE



Celice obarvane le s protitelesi proti CD20-FITC. (Levo) Brez kompenzacije. (Desno) S kompenzacijo.

G. Dvoparametrski histogrami za določitev deleža populacij limfocitov T



Z uporabo različno označenih protiteles lahko ločimo različne populacije T limfocitov. (*Levo*) Celice T zaviralke (CD3+CD8+) se nahajajo pri visoki intenziteti barvil FITC in PE. (*Desno*) Celice T pomagalke (CD3+CD4+) se nahajajo pri visoki intenziteti barvi FITC in APC.

Referentne vrednosti:

Podskupina celic v celotni populaciji limfocitov	n	Povprečje	95% interval zaupanja
celice T pomagalke (%)	164	45	33-58
celice T zaviralke (%)	164	24	13-39
vsi T limfociti (%)	164	72	56-86

DOLOČANJE DELEŽA CELIC T POMAGALK IN ZAVIRALK V POLNI KRVI

Princip:

Postopek:

Razdelite se v dve skupini. Vsaka skupina pripravi 3 vzorce, enega obarva z CD3-FITC, enega z CD20-PE in enega z Multitest reagentom.

A. Označevanje s protitelesi in liza eritrocitov

- Označimo tri epruvete, primerne za analizo s pretočnim citometrom (12x75 mm).
- Pipetiramo 20 ul reagenta Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 na dno prve epruvete, 5ul CD20-FITC v drugo in 5ul CD5-PE v tretjo.
- Dodamo 50 ul dobro premešane polne krvi na dno vsake epruvete. Pri tem pazimo, da vzorec ne ostane na steni epruvete.
- Zapremo epruvete in kratko vorteksiramo.
- Inkubiramo 15 minut zaščiten pred svetlobo pri sobni T.
- V vsako epruveto dodamo 450 ul delovne raztopine za lizo, ki jo predhodno redčimo z bidestilirano vodo NUJNO v ločeni epruveti. (1x FACSLysing solution).
- Zapremo epruvete in kratko vorteksiramo.
- Inkubiramo 15 minut zaščiten pred svetlobo pri sobni T.

B. Analiza s pretočnim citometrom

- Pred pričetkom analize vzorec dobro premešamo (vorteks), da zmanjšamo agregacijo celic.
 - Vzorec analiziramo s pretočnim citometrom. Pri kompenzaciji opazujemo dvoparametrski histogram CD20-FITC vs. CD5-PE in s pomočjo programske opreme odšteto določen odstotek fluorescence od zelenega fluorokroma.
- Za določanje limfocitnih populacij opazujemo dvoparametrski histogram (SSC-CD45_PerCP) in identificiramo populacijo limfocitov ter jo označimo za nadaljnjo analizo. Prav tako se prepričamo, da sta populaciji monocitov in granulocitov dobro ločeni.
- Analiziramo dvoparametrske histograme (npr. CD3_FITC-CD8_PE in CD3_FITC-CD4_APC) in odčitamo odstotek populacij, ki nas zanimajo.

Referentne vrednosti:

Podskupina celic v celotni populaciji limfocitov	n	Povprečje	95% interval zaupanja
celice T pomagalk (%)	164	45	33-58
celice T zaviralke (%)	164	24	13-39
vsi T limfociti (%)	164	72	56-86

Reagenti:

CD20-FITC, CD5-PE, BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4, BD FACSLysing solution (10x)

Rezultati praktičnega dela

1. Opis vzorcev, materiala in opreme:

2. Sheme dvoparametrskih histogramov:

I. Kompenzacija

Skiciraj dvoparametrške histograme (FITC vs. PE) pred in po kompenzaciji za posamezen vzorec (označen samo s FITC ali samo s PE)!

a) vzorec CD3-FITC

brez kompenzacije

s kompenzacijo

b) vzorec CD20-PE

brez kompenzacije

s kompenzacijo

II. Analiza populacij limfocitov T (Multitest reagent)

Skiciraj dobljene dvoparametrške histograme in označi posamezne populacije celic ter njihove deleže!

a) SSC-FSC

b) SSC-CD45_PerCP

c) CD3_FITC-CD8_PE

d) CD3_FITC-CD4_APC

e) CD4_APC-CD8_PE

4. Rezultati:

Podskupina celic v celotni populaciji limfocitov	Vzorec 1	Vzorec 2
celice T pomagalke (%)		
celice T zaviralke (%)		
vsi T limfociti (%)		

Komentar rezultatov

Komentirajte sheme dvoparametrskih histogramov ter rezultate deležev celic T in poskušajte klinično interpretirati rezultat!

Pregledal-a:

Datum:

Ocena: