

Průtoková cytometrie v elektrickém poli

Studentka: Dominika Nová, 3ZL

Školitelé: Ing. Tomáš Vlas

Východisko: Průtokový cytometr se skládá ze tří částí – fluidní systém, optický systém a elektronika. Fluidní systém zajišťuje správné dávkování vyšetřovaných buněk v suspenzi do měřící komůrky. Buňky dále procházejí paprsky laserů. Pokud jsou buněčné struktury označené fluorochromy, je zvolen laser o takové vlnové délce, aby fluorochrom absorboval světlo a vyemitoval záření o specifické vlnové délce. Vzniklá fluorescence či odražené světlo proniká filtry k detektorům. Na průtokovém cytometru můžeme provést stanovení testu aktivace basofilních granulocytů. Principem testu je zapříčinění aktivace basofilních granulocytů in vitro v přítomnosti senzibilizujícího alergenu. Posléze dochází k expozici aktivačního znaku basofilů (znak CD63) na povrch jeho buněčné membrány. Pomocí monoklonální protilátky a průtokového cytometru můžeme tuto změnu pozorovat. V závislosti na dostatečném množství alergenně specifických molekul IgE, které jsou zachyceny na povrchu basofilů prostřednictvím vysokoafinitního receptoru FcεRI, dodaný alergen způsobí přemostění receptorů, které vyvolají plnou aktivaci basofilů spojené s procesem vyprázdnění obsahu zánětlivých mediátorů z granulí v cytoplazmě – degranulaci. Právě degranulace má za následek mimo jiné expozici povrchového znaku CD63 na membránu basofilů. Tento povrchový znak je možno detekovat pomocí monoklonální protilátky anti – CD63 konjugovanou s FITC (fluorescenční barvivo).

Cíl: Cílem této práce je porovnat stanovení testu aktivace basofilních granulocytů na průtokovém cytometru s nově vyvíjející se metodou distribuované dielektroforetické cytometrie (2DEP)

Metodika: Výzkum probíhal na 10 vzorcích od pacientů, kdy 6 pacientů bylo pozitivních na alergen břízy, a 4 pacienti byli zařazeni do skupiny negativních kontrol. U všech vzorků jsme provedli stanovení specifických IgE protilátek pro potvrzení či vyloučení senzibilizace na alergen břízy. Provedli jsme nejprve stanovení testu aktivace basofilních granulocytů na průtokovém cytometru s použitím monoklonálních protilátek (CD63). Výsledky jsme hodnotili pomocí hodnot plochy pod křivkou (AUC) a hodnot CD – sens. Měření jsme také provedli na 2DEP cytometru, kde jsme získali jako výsledek dielektroforetický podpis buněk.

Výsledky: Stanovením testu aktivace basofilů na průtokovém cytometru jsme prokázali změny mezi hodnotami AUC a CD – sens u pozitivních pacientů a negativních kontrol. Naším cílem bylo ověřit možnost využití 2DEP cytometru na tento funkční test. Na dielektroforetických podpisech buněk měřených při různých frekvencích jsme zaznamenali určité změny mezi pozitivními pacienty a negativními pacienty.

Výsledky – pozitivní pacienti

	Pacient	1	2	3	4	5	6
Průtoková cytometrie	AUC	2027,462	2311,169	2066,369	3712,487	2033,586	1108,251
	CD – sens	0,428	0,502	0,468	1,000	0,562	0,312
2DEP cytometrie	Odezva na alergen [%]	8,0	9,1	7,6	5,1	23,1	47,5

Výsledky – negativní kontroly

	Kontrola	1	2	3	4
Průtoková cytometrie	AUC	55,9629	675,306	134,028	51,5255
	CD – sens	0,0114	0,1440	0,0280	0,0112
2DEP cytometrie	Odezva na alergen [%]	-51,7	30,0	29,7	-12,5

Závěr: V této bakalářské práci bylo cílem ověřit možnost využití 2DEP cytometrie jako konkurenta v stanovení testu aktivace basofilů na průtokové cytometrii. Z výsledků, které jsme získali stanovením oběma analytickými metodami, lze usoudit, že tyto výsledky nelze snadno porovnávat vzhledem k odlišnosti principu stanovení aktivace basofila, tak interpretace výsledků. Do budoucna by metoda stanovení na 2DEP cytometru mohla najít jistá uplatnění v praxi na stanovení i jiných biomarkerů, ale mezitím bude na této metodě potřeba ještě spousta výzkumu a testování, avšak ke stanovení aktivačních znaků u citlivých buněk je metoda méně vhodná.