Stanovení intracelulární produkce cytokinů pomocí průtokové cytometrie

Vlas T.*, Hanzlíková J.*, Panzner P. *
*Ústav imunologie a alergologie LF a FN Plzeň
Autor: t.vlas@seznam.cz

Úvod:

V dnešní době se jak pro výzkumné tak běžné diagnostické postupy využívá stanovení různých druhů cytokinů v séru pacientů, avšak je také velice zajímavé sledovat možnosti produkce cytokinů u jednotlivých buněčných populací, jak po stimulaci různými chemickými látkami či antigeny tak u samotných nestimulovaných buněk. Ke stanovení produkce u jednotlivých populací můžeme postupovat tak, že vyseparujeme hledanou populaci a u ní provádíme inkubaci a následně v kultivačním mediu detekujeme různými metodami hledané cytokiny. V tomto případě se však jeví jako vhodnější použití metodiky detekce pomocí průtokové cytometrie, která hledanou populaci vybírá pomocí kombinací vhodných CD znaků. Tento postup bychom chtěli předvést na výzkumných projektech, které jsme prováděli na našem ústavu.

- **Možnosti aktivace HIV-1-specifických CD8+ T lymfocytů po inkubaci s IL-2 a Histaminem**
  (ve spolupráci s Infekční klinikou FN Plzeň)
- **Stanovení produkce IFN – g u CD4+ T lymfocytů po stimulaci peptidem CMV**
  (ve spolupráci s Interní klinikou FN Plzeň)
- **TH1-TH2 odpovědi a riziko atopie u pacientek s poruchou reprodukce**
  (ve spolupráci s Gynekologicko-porodnickou klinikou FN Plzeň)

Soubor nemocných metodika:

Vždy se jednalo o skupiny nemocných jejíž výsledky byly porovnávány proti skupině zdravých jedinců. Pacienti v jednotlivých skupinách byli vždy komplexně vyšetřeni a byli jim prováděny další testy podle jednotlivých plánů výzkumných záměrů. Pro potřebná vyšetření intracelulární produkce cytokinů byly vzorky odebírány do zkumavek s antikoagulačním činidlem (heparin Na, Li). A následně ihned zpracovány v laboratoři a to tak, že došlo k oddělení populace lymfocytů pomocí separace na hustotním gradientu a tyto buňky byly následně inkubovány v mediu pro tkáňové kultury dle předpisu pro jednotlivé protokoly. A následně byly měřeny pomocí průtokové cytometrie a analyzovány.

Metody:

Separace na hustotním gradientu

Využívá rozdílné hustoty krevních elementů ty jsou pak zachytávány na hustotním gradientu vytvořeném mediem o požadovaná hustotě (polysacharosa ρ=1,071 g · cm^{-3}).

Stanovení intracelulární produkce cytokynu

Stanovení využívá detekce požadovaného cytokynu pomocí značené monoklonální protilátky, které po perforaci buněčné membrány proniká do endoplasmatického retikula, kde jsou zadržovány jednotlivé cytokyny po inhybyci procesu uvolňování cytokynu z endoplazmatického retikula pomocí Monensinu. Monensin je antibiotikum izolované z Streptomyces cinnamonensis, tato látka ovlivňuje antiport Na+/H+ a tim zadržuje peptidy v endoplazmatickém retikulu. Kde jsou po inkubaci značeny mnoklonálními protilátkami a stanovovány pomocí průtokové cytometrie.

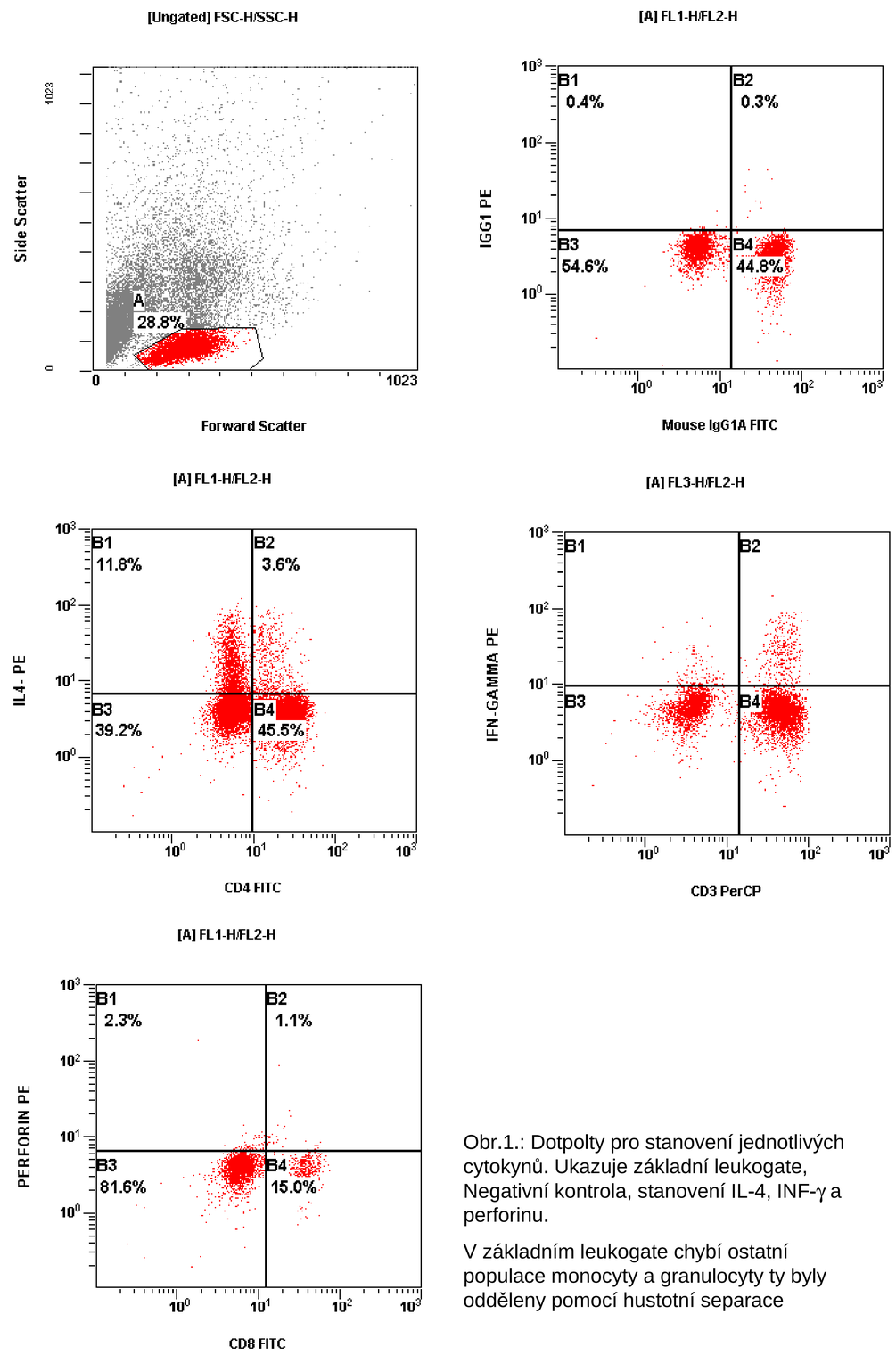
- ***Při stanovení aktivace HIV-1-specifických CD8+ T lyfocytů.***
  Byly separované buňky inkupovaný po dobu 24h v reakčním mediu s přídavky IL-2, histaminu a cimetidinu s peptidy viru HIV gag a gp120. Po 24 hodinách byla sledována pomocí průtokové cytometie produkce perforinu.

- ***Při stanovení produkce INF – γu CD4+ T lymfocytů***
  Byly separované buňky inkupovaný po dobu 5h v reakčním mediu s přídavky peptidu CMV o dvouch koncentracích. Po 5 hodinách byla sledována pomocí průtokové cytometie produkce INF – γ .

- ***Při sledování TH1-TH2 odpovědi u pacientů s poruchou reprodukce***
  Po separaci a naředění buněk na koncentraci 1 106 b.b. na 1 ml media byla směs inkubovábna 5 hodin se stimulačními reagenciem PMA (phorbolmyristate-acetate), monensin a ionomycin. Po 5 hodinách byla sledována intracelulární produkce IL-4 a INF-γ.

Výsledky:

Výsledky byly stanovený po analýze na průtokovém cytometru. A vyhodnoceny jako procentuální zastoupení populace produkující hledaný cytokin. Postupem analýzy bylo v základním leukogate vybraní lymfocytární populace, která byla dála analyzována. Na jednotlivé subpopulace dle příslušných CD znaku CD3+, CD4+ a CD8+ na subpopulacích byly stanoveny intracelulárním značením jednotlivé cytokiny.



Obr.1.: Dotpolty pro stanovení jednotlivých cytokynů. Ukazuje základní leukogate, Negativní kontrola, stanovení IL-4, INF-γ a perforinu.

V základním leukogate chybí ostatní populace monocyty a granulocyty ty byly odděleny pomocí hustotní separace

Závěr:

Podařilo se nám vytvořit metodiku, která umožňuje stanovení produkce námi sledovaných cytokinů za využití průtokové cytometrie. Díky své univerzálnosti můžeme tuto metodu modifikovat pro různé analytické postupy. Pokusíme si metodu dále rozvíjet aby bylo možné sledovat produkce cytokinu po stimulaci různými látkami.

Při sledování TH1-TH2 odpovědi u pacientek s poruchou reprodukce
Se podařilo prokázat sníženou TH2 aktivitu u žen s poruchou reprodukce u této skupiny byla také nalezena snížená hodnota CD4+/IL4+ pozitivní populace oproti kontrolní skupině.

Při stanovení aktivace HIV-1-specifických CD8+ T lymfocytů
Během tohoto stanovení se podařilo prokázat stimulační účinek IL-2 na HIV-1 specifickéCD8+ T lymfocyty. Zlepšení cytotoxických funkcí T lymfocytů *in vivo* může řešit jeden z nejdůležitějších problému v terapii AIDS – reziduální nemoc.

Stanovení produkce IFN – g u CD4+ T lymfocytů po stimulaci peptidem CMV
Tento výzkumný záměr zatím pokračuje, ale dle předběžných výsledků se jeví, že u pacientů, kteří mají vyšší virovou nálož, stoupá produkce INF – γ více než u pacientů, u kterých je toto zatížení nízké.

Tato studie byla podpořena výzkumným záměrem VZ MSM 002 1620812