

## **Porovnání stanovení exprese znaku CD25 pomocí nové metody Pheno-Immuno Computing a průtokové cytometrie u aktivovaných lymfocytů.**

Markéta Šafandová - 3. ročník Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Školitel: Ing. Tomáš Vlas

**Východisko:** Průtoková cytometrie je využívána jako jedna ze standardních metod pro analýzu buněk v suspenzi. Metoda funguje na základě specifické vazby monoklonálních protilátek na hledané antigeny. Ke značení cílených znaků se ve většině případů používají protilátky, na které je vázána fluorescenční značka nazývaná fluorochrom. Samotný analyzátor se skládá ze tří částí. Ve fluidním systému dochází pomocí přetlaku k vhánění buněk přes drobný otvor. Takto dosáhneme stavu, kdy přístrojem prochází buňky jednotlivě, řazeny za sebou. Následujícími důležitými prvky v průtokovém cytometru je laser. Laserový paprsek se využívá jako zdroj světla pro excitaci fluorochromu na vyšetřovaných buňkách. Po průchodu světla buňkou získáváme difrakční signál. Rozptýlené záření, které vzniká, má stejnou vlnovou délku jako světlo excitujícího laseru. Dostáváme tedy dopředný rozptyl označovaný jako Forward scatter FSc, informaci o obvodu buňky. Při dopadu světla na buňku dochází také k jeho bočnímu rozptylu a odrazu od vnitřních komponent buňky. Tento jev popisujeme jako Side scatter SSc. Detekce SSc probíhá pod úhlem 90 stupňů pomocí sběrného objektivu. Pravoúhlý boční rozptyl udává míru granularity buňky její vnitřní členění. Poslední je elektronický systém, který slouží k detekci konečného signálu. Používají se zde fotonásobiče nebo fotodiodové detektory. Signálem je foton, který produkuje puls elektrického proudu.

Metoda Pheno-Immuno Computing (PIC) je nový, rychle se vyvíjející způsob vyhledávání raritních buněk. Celý proces tvoří dva principy. Prvním krokem je značení cílových antigenů, které se nacházejí na povrchu buněčné membrány. Značení se provádí pomocí komerčně vyráběných protilátek. Následuje vázání značených antigenů na geneticky upravené mikroby, které jsou přidávány do reakce. Zbývající část se děje automaticky.

**Cíl:** Zjistit a popsat, zda mezi vybranými metodami, existuje korelace, při měření exprese CD25.

**Metodika:** Pro účely této bakalářské práce, byla odebrána žilní krev skupině dobrovolníků. Následně proběhla separace frakce, obsahující lymfocyty, jejich aktivace pomocí PHA-L, a 72 hodinová kultivace v termostatu při 37 °C.

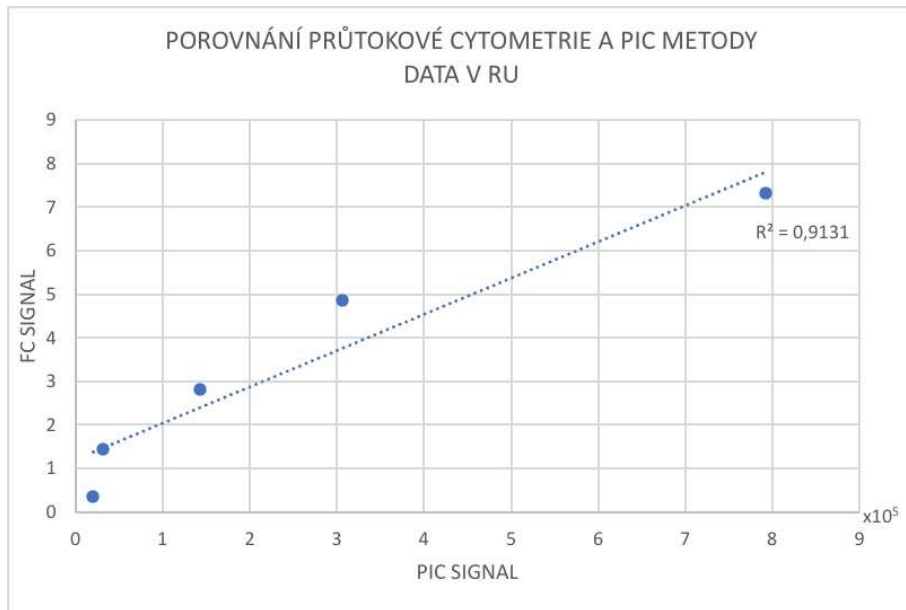
Zpracování vzorků pro průtokovou cytometrii: Referenční postup zahrnoval značení vzorků pomocí primárních monoklonálních protilátek, dle instrukcí jejich výrobce. Dále proběhl pokus o modifikaci PIC-long protokolu i pro průtokovou cytometrii. Vzorky byly značeny PIC protilátkou a zároveň sekundární protilátkou Anti – Hu CD25 PE, která se pro značení CD znaků na průtokové cytometrii používá referenčně.

Zpracování vzorků pro PIC: Vybrané protokoly nesly název PIC-short a PIC-long. U PIC-long byly separované, aktivované a promyté buňky jsou značeny pomocí PICBODY. Protilátka se váže na hledaný znak vystavený na buněčné membráně. Dalším krokem je přidání geneticky upravených mikrobu do reakce. Mikroby se na buňky navazují přes Fc receptor již upevněné protilátky. Zbytek reakce probíhá automaticky během vyhodnocování molekulárních profilů. V případě, že se molekulární imunitní profil

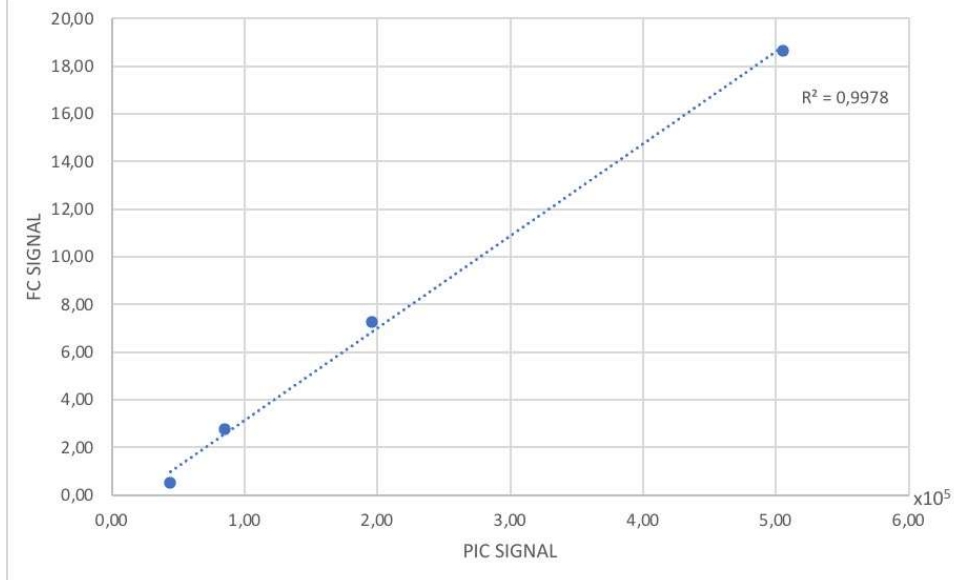
liší od toho cíleného, mikroby zůstávají neaktivní. Dojde-li ke shodě imunitního profilu hledané buňky s cílovým, mikroby se stávají aktivními. Dochází k tvorbě signálu, který lze detekovat.

Pro PIC-short se DOT značka během reakce váže přímo na hledaný marker aktivované buňky. Není potřeba vazba primární protilátky. Při vyhodnocování reakce se uplatňuje stejný princip jako u PIC long protokolu. Imunitní profil analyzované buňky se musí shodovat s předem známým cílovým profilem, aby došlo ke vzniku signálu.

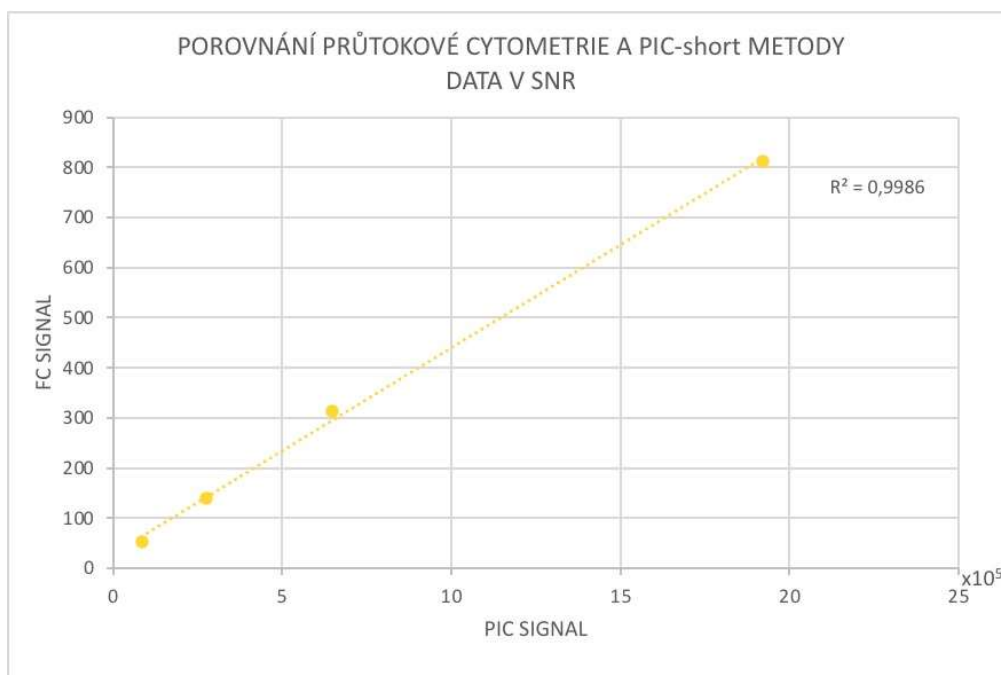
**Výsledky:**



Graf 1 Porovnání obou metod pomocí grafu. Zvolené hodnoty ředění 0 3,7 11 33 a 100. Zpracování série vzorků pomocí PIC-long protokolu.



Graf 2 Porovnání obou metod pomocí grafu. Hodnoty ředění 0 11 33 a 100. Pro osu X byl zvolen PIC signál, pro osu Y signál naměřený pomocí průtokové cytometrie.



*Graf 3 Porovnání obou metod pomocí grafu. Měření stejné série vzorků, jako v předchozím grafu, data byla převedena do SNR jednotek.*

**Závěr:** Zvolený marker CD25 lze stanovit průtokovou cytometrií. Při značení vzorků protilátkou Anti – Hu CD25 PE, tedy dodržení referenčního postupu, jsem získala přesnější výsledky. Zpracování vzorků pomocí modifikovaného PIC protokolu, za pomoci primární PIC protilátky a sekundární Anti – Hu CD25 PE, bylo méně přesné. Hledaný aktivační znak můžeme měřit i pomocí obou PIC protokolů. Mezi metodami existuje silná korelace. Nejlepší dosažený výsledek byl získán při zachování referenčního postupu přípravy vzorků, pro průtokovou cytometrii, a zavedení PIC short protokolu. Koeficient determinace zde nabývá hodnoty  $R^2 = 0,9986$  pro SNR jednotky.