

Test aktivity lymfocytů

Teorie: Proliferace je jedním z fyziologických jevů buněčné aktivace. Použitím radioaktivně značeného thymidinu (^3H -thymidin) jsme schopni v laboratoři proliferaci lymfocytů kvantitativně vyšetřit, neboť thymidin se zabuduje do DNA dělicích se buněk a takto je označí. Tvorba nové DNA je úměrná množství buněčných dělení. Další variantou pro rychlé stanovení proliferace a cytotoxicity savčích buněk je stanovení množství buněčného ATP (adenosin trifosfát). Tento test nahrazuje inkorporaci ^3H thymidinu..

K dělení můžeme lymfocyty stimulovat in vitro polyklonálně a nebo specificky. Lektiny, rostlinné proteiny vážící se na membránové glykoproteiny buňky, působí jako polyklonální mitogeny. Aktivují lymfocyt nezávisle na jeho antigenní specifitě. Pro stimulaci T-buněk se používají phytohemaglutinin (PHA) a konkavalin A (Con A), k aktivaci B-buněk pak pokeweed mitogen (PWM). Monoklonálních protilátek lze také použít, příkladem může být anti-CD3 protilátka. Tetanického toxoidu (antigen) využíváme ke specifické stimulaci, podobně též *E. coli* nebo tuberkulinu. Přítomnost buněk prezentujících antigen, jako jsou monocyty, je zde nezbytná.

Při vyšetření inkubujeme izolované buňky nebo plnou krev pacienta s příslušným stimulantem. Po několikadenní kultivaci přidáme do suspenze triciem značený thymidin a po několika hodinách oddělíme buněčnou suspenzi (s navázaným označeným thymidem) od kultivačního media (v němž se nachází thymidin, který nebyl do DNA inkorporován). Energii radiace převedeme na světelný signál, testované buněčné vzorky vyhodnocujeme ve scintilačním počítači. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet světelných impulzů za minutu. Celá metodika je náročná na sterilitu i přesnost provedení a je používána zejména při vyšetření nemocných s podezřením na závažnou primární nebo sekundární imunodeficienci.

Test blastické transformace na webu - <http://www.biothema.com/>

Cíl: Stanovení množství ATP u lymfocytů

Izolace lymfocytů ze sleziny myši

Myši jsou vykrváčeny krční tepnou a slezina odstraněna

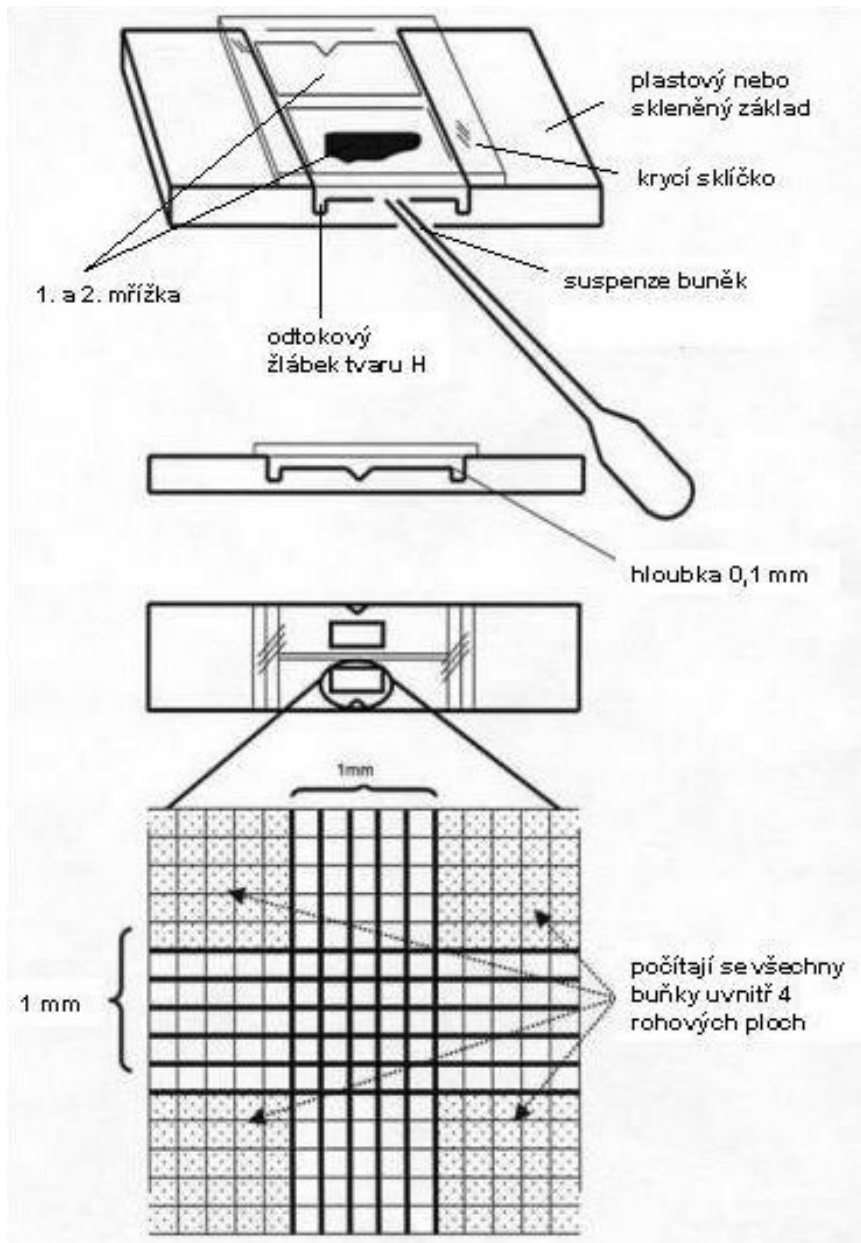
Slezina je jemně homogenizována v PBS. Suspenzi buněk se zbytky sleziny přelejeme opatrně přes gázu. Centrifugujeme 10 min. při 1000 ot/min. Sediment resuspendujeme v asi 300 μl NH_4Cl . Centrifugujeme 10 min při 1500 ot/min. Sediment resuspendujeme v asi 300 μl PBS. Konečné promytí 3x. Nakonec buňky resuspendujeme v cca 1,5 ml PBS a spočítáme.

Doředíme na potřebnou koncentraci. Pro zachování a kultivaci buněk používáme MEM médium. V roztoku se nachází kromě lymfocytů také mono a gra.

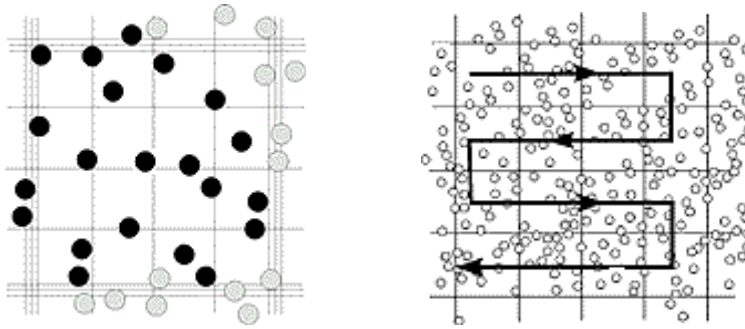
Pomůcky: centrifuga s malým rotorem, komůrky na počítání buněk, eppendorfky, umělohmotné testovací nádoby - kalibrované, nastavitelné mikropipety a špičky

Chemikálie: ajatin, 0,87% NH_4Cl , PBS roztok na uchování lymfocytů, myší slezina, MEM médium

Počítání v Bürkerově komůrce:



upraveno podle http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Figure_4.2.htm



Převzato z <http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info.html>

(viz též http://www.superior.de/pgr06_info_e.htm)

K výpočtu množství buněk v 1 ml suspenze je třeba znát tloušťku vzorku nad mřížkou. Každý z 25 čtverců obvykle měří 0,2 x 0,2 x 0,1 mm a má tedy objem 0,004 mm³. Takže v 25 čtverců má objem 0,1 mm³. Po vynásobení zjištěného počtu buněk v 25 čtvercích hodnotou 10 000 dostaneme tedy počet buněk v 1 ml suspenze.

Postup

Pomůcky: eppendorfky, pipety, špičky, stripy do luminometru, luminometr

Chemikálie: ATP Reagent, ATP standard, Somatic Release Reagent

1. V triplicátech smícháme 100 ml Somatic Release Reagent s 50 ml destilované vody a 50 ml vzorku.
2. Ke směsi přidáme 50 ml ATP Reagent, zamícháme a okamžitě změříme luminiscenci.
3. Stejný postup zopakujeme s tím, že místo vody přidáme 50 ml ATP standard (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} mol/l).

Výsledky

Množství ATP ve vzorku buněk lze vypočítat pomocí následující rovnice:

$$ATP_{(SAM)} = \frac{ATP_{(IS)} \times L_{(SAM)}}{L_{(SAM+IS)} - L_{(SAM)}}$$

$ATP_{(SAM)}$ je ATP ve vzorku buněk (v molech)

$ATP_{(IS)}$ je ATP v přidaném vnitřním standardu (v molech)

$L_{(SAM)}$ je světlo emitované vzorkem buněk

$L_{(SAM+IS)}$ je světlo emitované vzorkem buněk plus vnitřní standard

Měření:

V Bürkerově komůrce jsme zjistili koncentraci 4 000 000 U/ml, kterou jsme upravili na výslednou koncentraci 1 000 000 U/ml.

Výpočet:

MĚŘENÍ	RLU
Standard 10^{-5}	27483,33
Standard 10^{-7}	604,33
Standard 10^{-9}	370,33
Vzorek	374,67

Hodnotami je nejbližší vzorku ředění standardu 10^{-7} (měla by být zhruba polovina), proto:

$$ATP_{(SAM)} = \frac{10^{-7} \times 374,67}{604,33 - 374,33} = 162,9 * 10^{-9} \text{ mol}$$

Závěr:

Naše lymfocyty ze sleziny myši produkovaly ATP v množství $162,9 * 10^{-9}$ mol. Vzhledem k tomu, že jedna živá somatická buňka obsahuje přibližně $2 * 10^{-15}$ mol ATP, a my jsme měli vzorek s milionem buněk, náš výsledek odpovídá předpokládaným hodnotám.