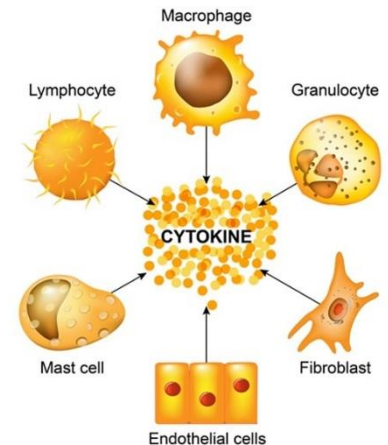


Intracelulární produkce Th1, Th2 cytokinů

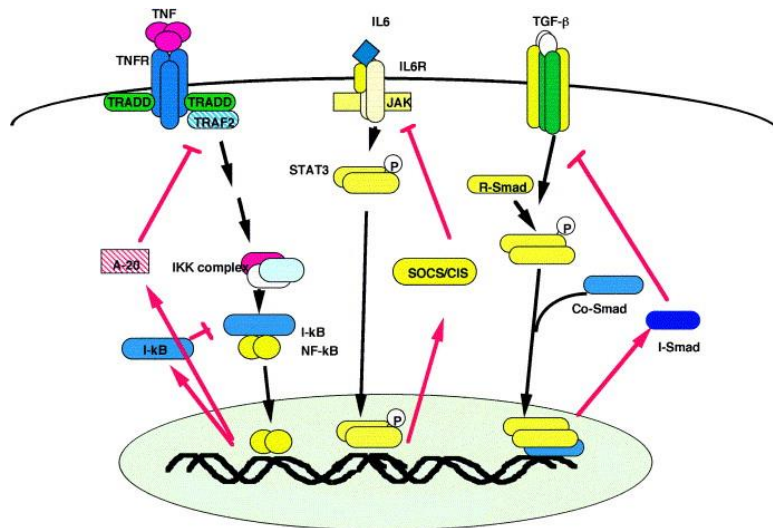


Cytokiny

- proteiny, které zásadním způsobem regulují imunitní děje
- produkované hlavně buňkami imunitního systému
- působí jako stimulační nebo inhibiční signály mezi buňkami
- ke svému účinku potřebují specifický receptor na cílové buňce

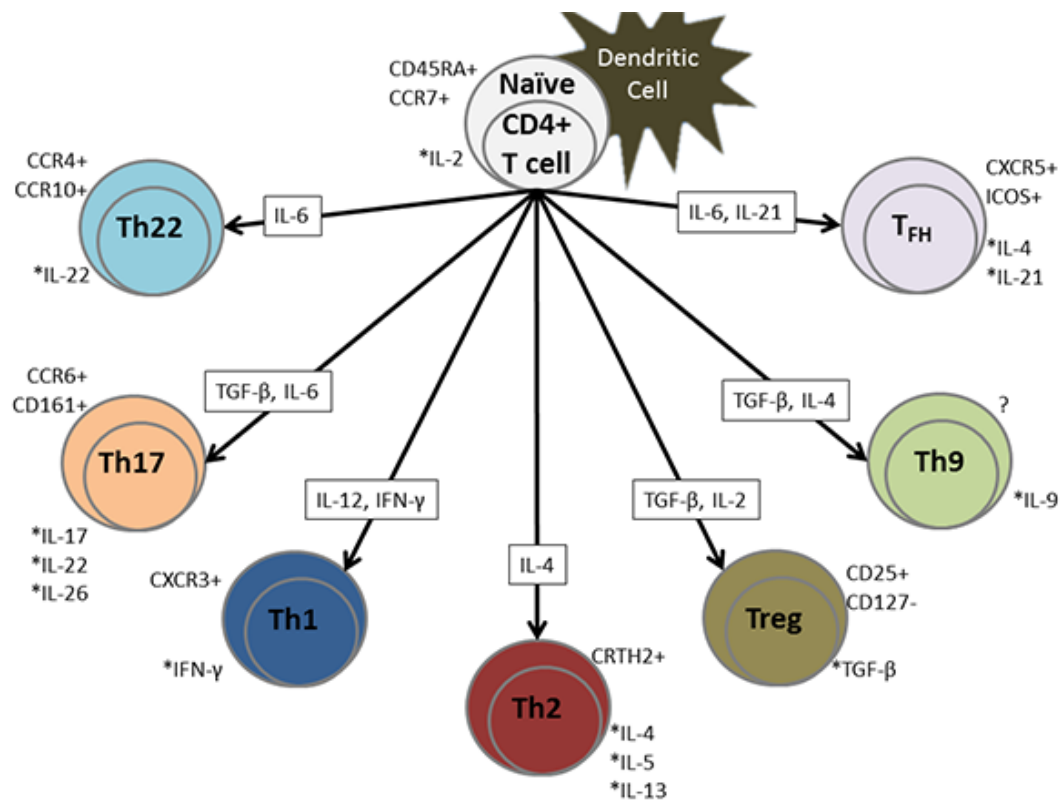


www.Chromnet.net

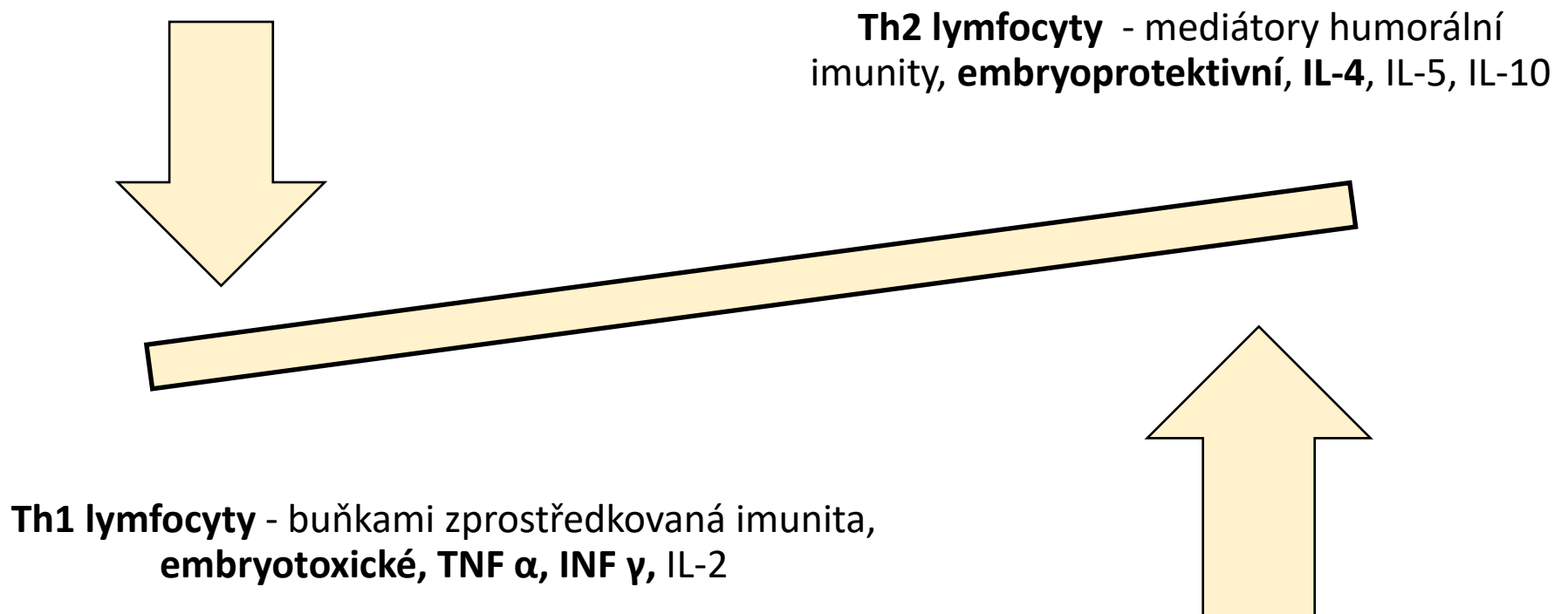


www.sciencedirect.com

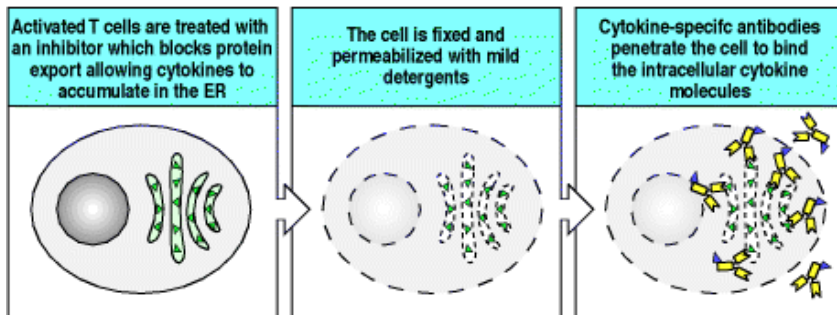
Th lymfocyty – klíčové buňky imunitního systému



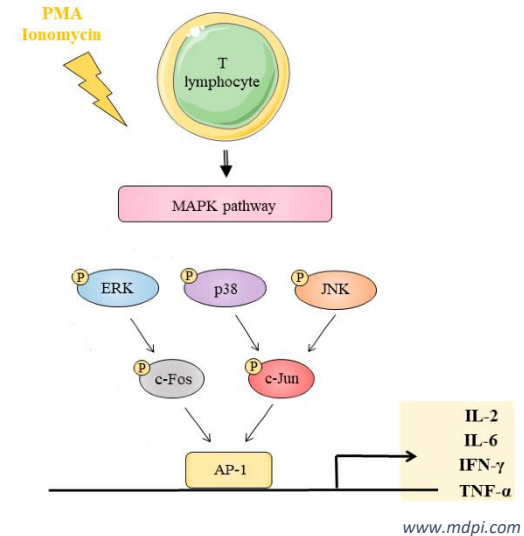
Wegmann a kol. (1993), **paradigma Th1/Th2** v těhotenství - posun k Th2 imunitní odpovědi jako indukce tolerance plodu



- **Materiál** : periferní krev, zkumavka s **heparinem Li** (heparin Na), skladování laboratorní teplota
- **Stimulace**: **PMA** (phorbol 12-myristate 13-acetate) a **Ionomycin**
- **Brefeldin A**: blokuje transport proteinů z endoplazmatického retikula



Immunobiology, Janeway, 2004



- Stanovujeme cytokiny **TNFα**, **IFNγ** a **IL-4**

Pracovní postup

- Vzorek (500 µl) ředíme 1:1 v kultivačním mediu **RPMI**, stimulace **PMA**, **Ionomycin**, **Brefeldin** inkubace 4 hodiny při 37 C
- Fixace, permeabilizace a lyzace pomocí kitu **PerFix-nc**, dle protokolu Beckman coulter

PerFix-nc

R1 (fixace), inkubace 15 minut
promytí PBS, centrifugace 5 minut při 1500

R2 (permeabilizace), extracelulární a intracelulární značení, BSA
inkubace **45 minut**

R3 (lyzace) centrifugace 5 minut při 1500



Monoklonální protilátky

CD3 APC

CD4 APC
AF 750

IFN γ PB

IL-4 PC7

TNF- α PE

CD69 PE



www.beckmancoulter.com



www.beckmancoulter.com

Měření na průtokovém cytometru NAVIOS

Vyhodnocení vzorku pomocí softwaru KALUZA

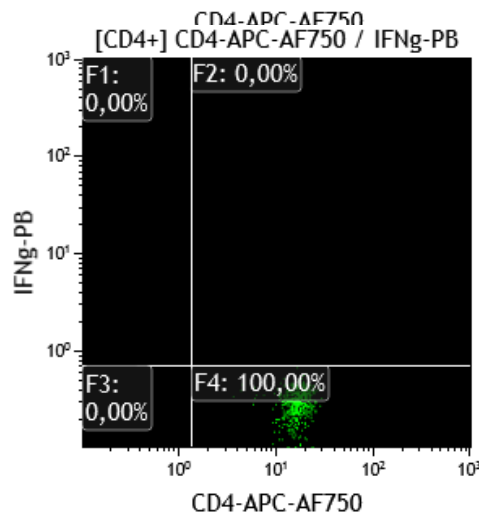
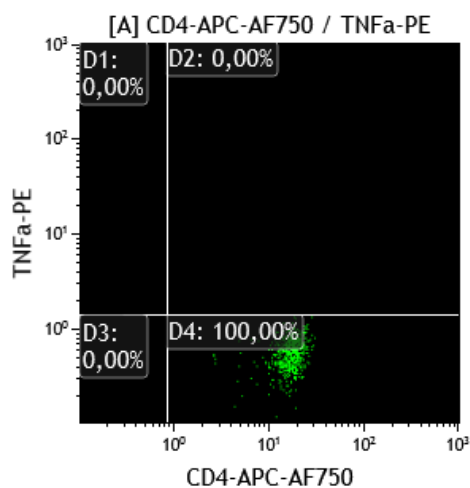
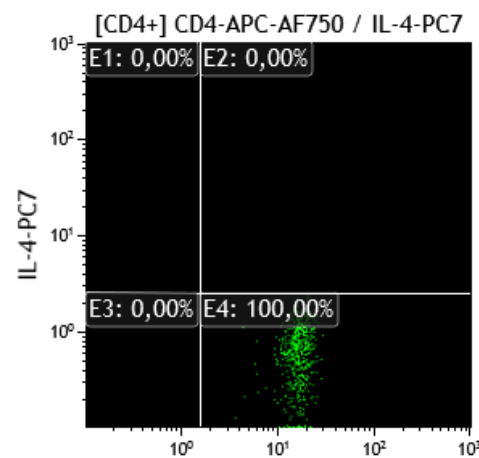
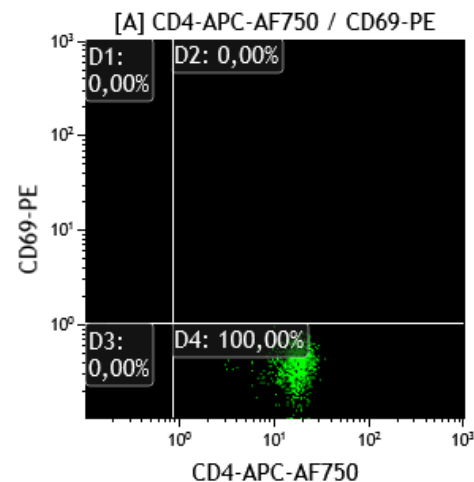


www.expertcytometry.com



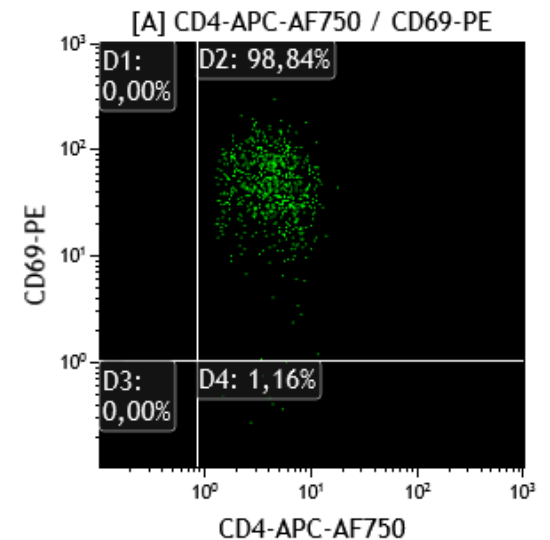
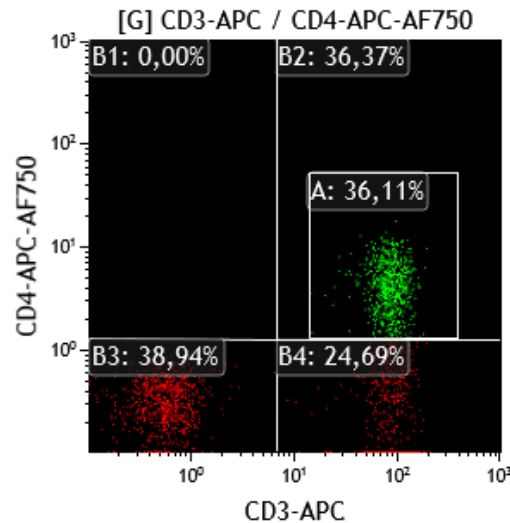
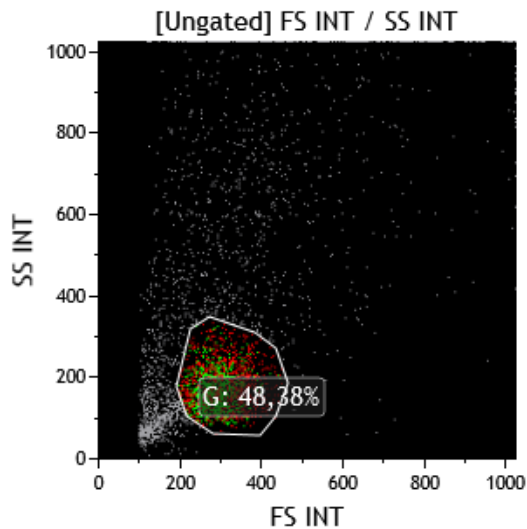
Vyhodnocení – negativní kontrola

Přidáváme pouze BFA, bez PMA a Ionomycinu

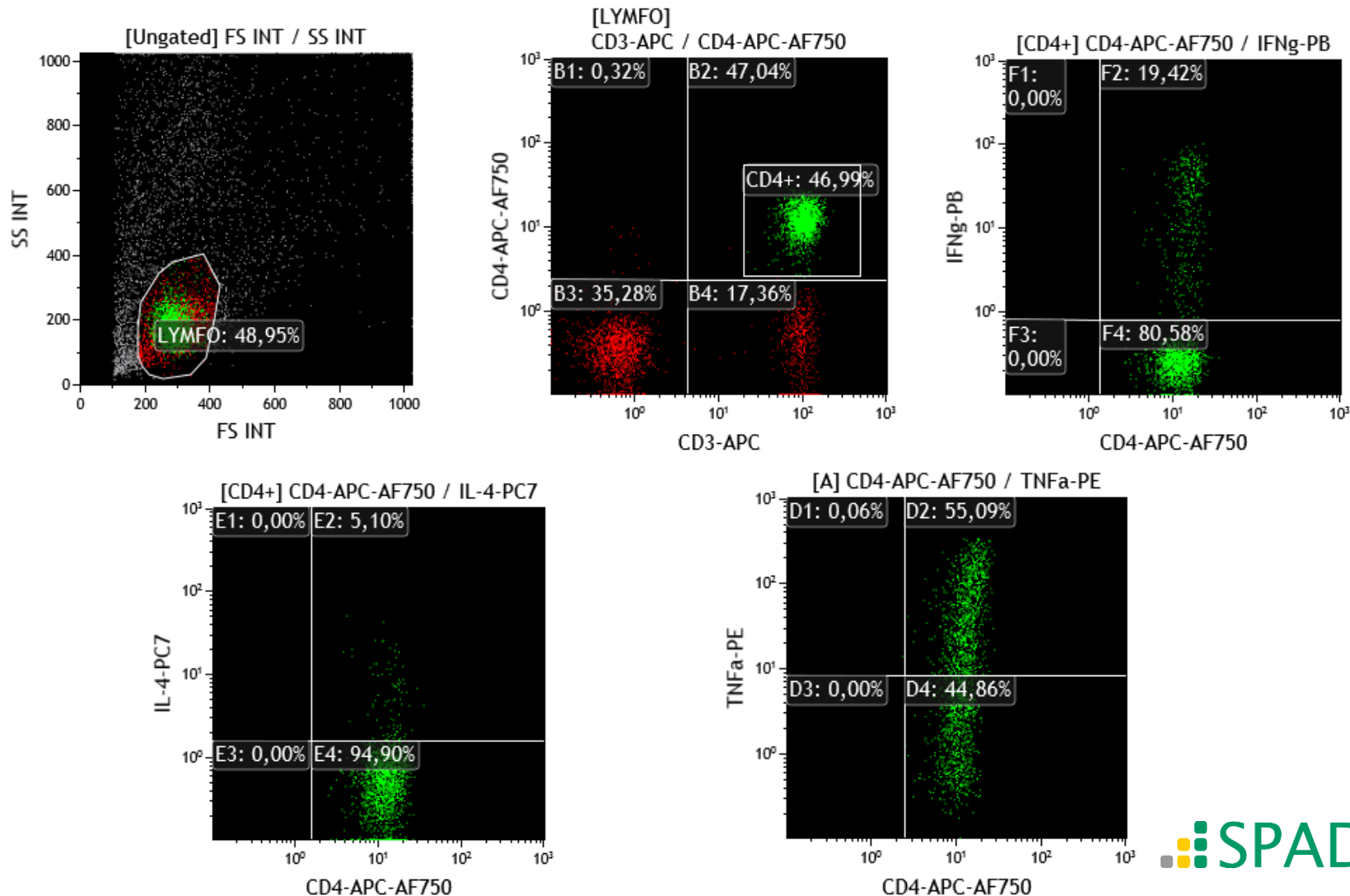


Vyhodnocení – pozitivní kontrola

CD 69 – exprese aktivačního antigenu T lymfocytů, přidáváme PMA a Ionomycin

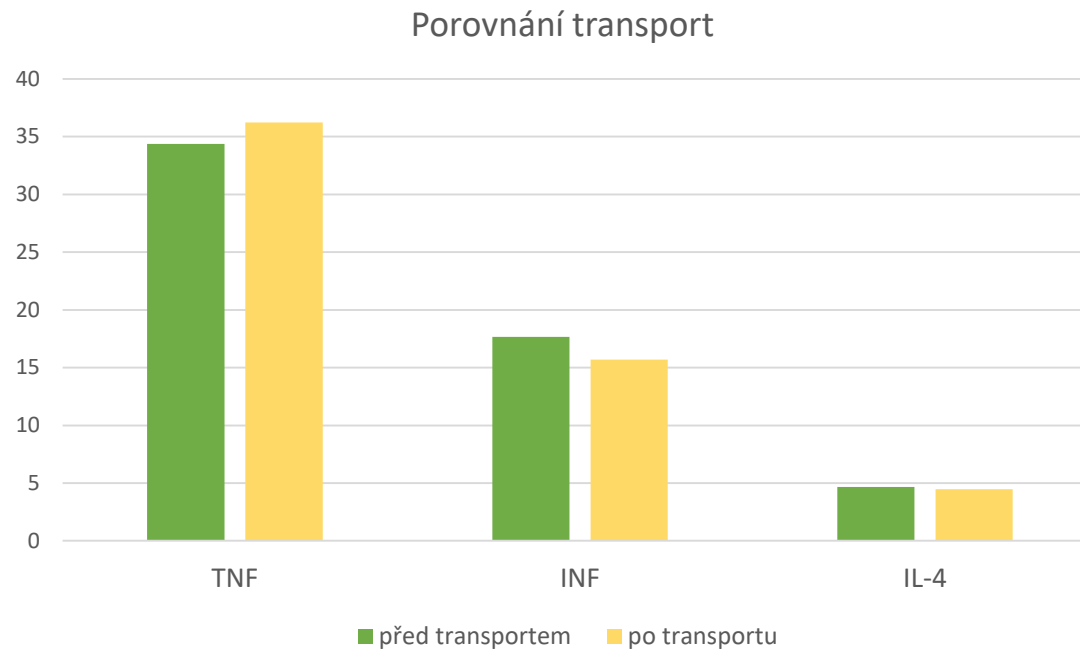


Vyhodnocení - pacient



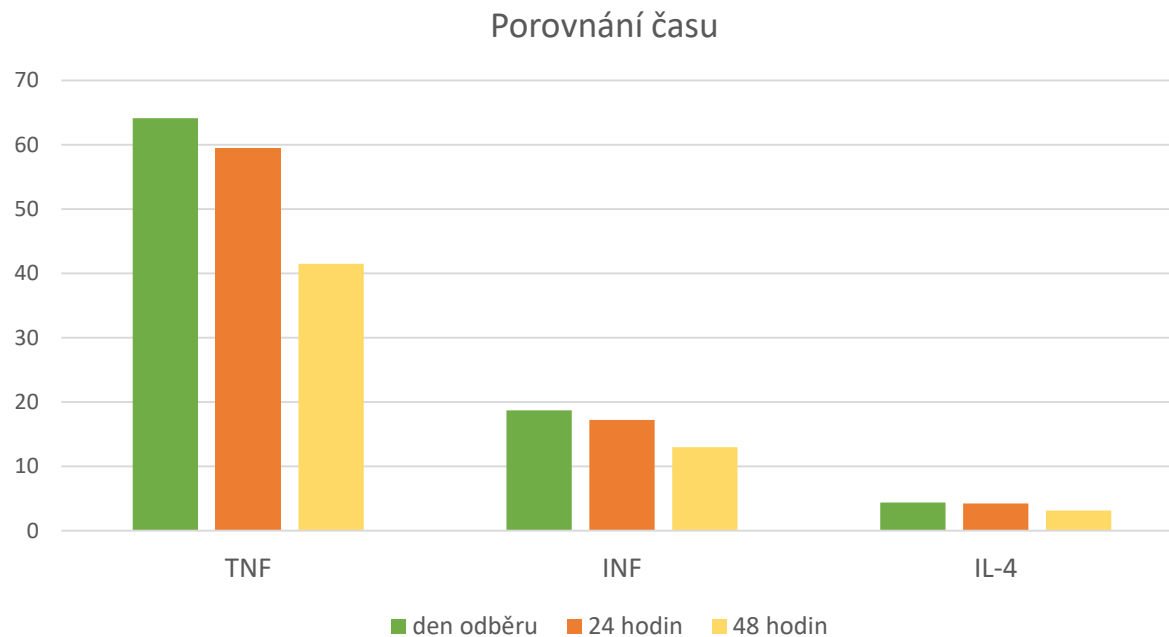
Preanalytická fáze – vliv transportu na produkci cytokinů

Transport při pokojové teplotě – vzorek zpracován po odběru a pak po transportu následující den, testováno 6 vzorků



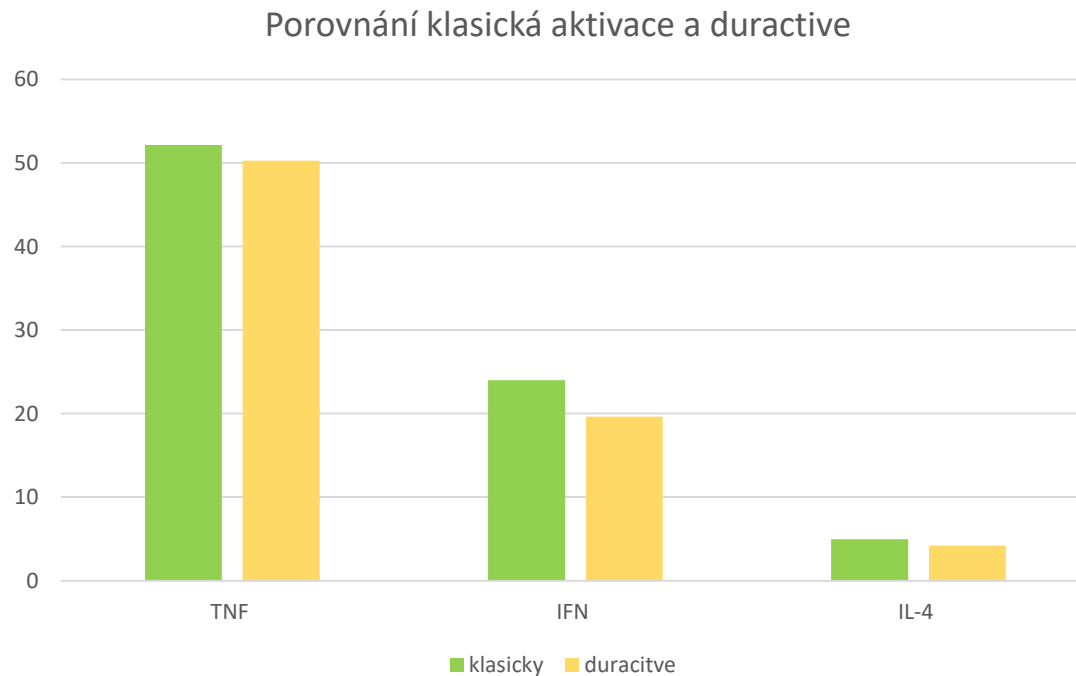
Preanalytická fáze – vliv času 24 a 48 hodin na produkci cytokinů

Vzorek zpracován po odběru a pak po 24 a 48 hodinách po odběru,
testováno 6 vzorků



Duractive – ready to use kit obsahující PMA, Ionomycin a Brefeldin v jedné zkumavce

Vzorek zpracován klasickým protokolem a pomocí Duractivu, testováno 11 vzorků



Shrnutí

- Funkční test, intracelulární produkce cytokinů může poskytnout důležitou informaci o nastavení imunitního systému u různých imunopatologií
- Důležitá je svědomitá příprava a přesné pipetování
- Zatížen chybovostí v jakékoli fázi přípravy (mitogeny, permeabilizace, protilátky....)
- Transport vzorků a zpracování do 24 hodin od odběru výrazně neovlivňuje hodnoty jednotlivých cytokinů
- Možná standardizace pomoci Duractive a Duraclone kitů

DĚKUJI ZA POZORNOST