

Ocena metody proliferacji limfocytów T CD8+ po swoistej i nieswoistej stymulacji komórek krwi obwodowej z zastosowaniem cytometrii przepływowej i użyciem barwienia CFSE

Assessment of lymphocyte T CD8+ proliferation method after specific and non – specific stimulation of peripheral blood cells using flow cytometry and CFSE dying methods.

A. Michalak, A. Lewandowska-Polak, M. L. Kowalski, J. Ł. Grzegorzczak

1. Zakład Mikrobiologii i Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

2. Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wprowadzenie

Metoda oceny proliferacji limfocytów z zastosowaniem cytometrii przepływowej pozwala śledzić podziały komórkowe za pomocą barwnika fluorescencyjnego CFSE, który jest trwale wiązany przez białka znajdujące się w cytoplazmie. Zastosowanie odpowiednich przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z innym barwnikiem pozwala ocenić fenotyp proliferujących komórek. Dlatego też cytometria przepływowa pozwala na wieloparametrową analizę komórek umożliwiającą ocenę zarówno proliferacji jak i subpopulacji limfocytów.

Cel

Celem pracy była ocena proliferacji subpopulacji limfocytów T (CD8+) po stymulacji swoistymi i nieswoistymi czynnikami z zastosowaniem barwnika CFSE.

Metodologia

Komórki jednojądrowe izolowano z krwi obwodowej od pacjentów uczulonych na pyłek brzozy *Bet.v.1*, hodowano 7 dni w temp. 37°C, 95% wilgotności, 5% CO₂ bez i w obecności *Bet.v.1* 100ng/ml i PHA. Proliferację limfocytów T CD8+ różnicowano na podstawie niskiej fluorescencji CFSE oraz ekspresji cząsteczki CD8+ i wyrażono wskaźnikiem proliferacji przyjmując za dodatni ≥ 2 . Za istotność statystyczną przyjmowano $p \leq 0,05$ dla $t_{\alpha} = 0,05$.

Wyniki

W grupie 7 osób chorych zaobserwowano nasilenie proliferacji limfocytów T (CD8+) po swoistej stymulacji *Bet.v.1* jak i po stymulacji PHA. Średnie wartości wskaźnika proliferacji wynosiły odpowiednio: $45,12 \pm 23,43$ ($p < 0,01$); $83,00 \pm 26,38$ ($p < 0,01$). W grupie osób zdrowych zaobserwowano proliferację limfocytów T (CD8+) zarówno po stymulacji *Bet.v.1* jak i po stymulacji PHA. Średnie wartości wskaźnika proliferacji wynosiły odpowiednio: $8,98 \pm 3,72$ ($p < 0,01$); $32,81 \pm 17,64$ ($p < 0,01$) i były istotnie niższe niż u osób uczulonych.

Wnioski

Metoda cytometrii przepływowej z zastosowaniem barwnika CFSE może być rozważana do oceny proliferacji limfocytów T (CD8+).