

# DOLOČANJE DELEŽA CELIC T POMAGALK IN ZAVIRALK V POLNI KRVI

## (Demonstracijska vaja)

### A. Princip

Po dodatku reagenta v vzorec polne krvi, se specifična protitelesa vežejo na površinske levkocitne antigene, ki so poglavitnega pomena za razlikovanje med različnimi vrstami T limfocitov. Protitelesa so označena z različnimi fluorokromi, ki pri analizi s pretočnim citometrom oddajajo svetlobo specifične valovne dolžine. To omogoča detekcijo celic, ki so pozitivne za posamezen antigen. Z analizo podatkov lahko nedvoumno določimo odstotek posamezne populacije T limfocitov.

### B. Reagent

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4: vsebuje protitelo proti CD3 (označeno s FITC), protitelo proti CD8 (označeno s PE), protitelo proti CD45 (označeno s PerCP), protitelo proti CD4 (označeno z APC) v 1mL fiziološkega pufra z 0,1% natrijevega azida.

Fluorokromi: FITC – fluorescein izotiocianat; PE – fikoeritrin; PerCP – peridinin klorofil; APC – alofikocianin.

### C. Vzorec

Potrebujemo najmanj 0,1 ml polne krvi, ki mora biti aseptično odvzeta z antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Vzorec moramo z reagentom inkubirati najkasneje 48 h po odvzemu, analiziramo pa ga lahko najkasneje 24h po inkubaciji. V tem primeru vzorec hranimo pri sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo.

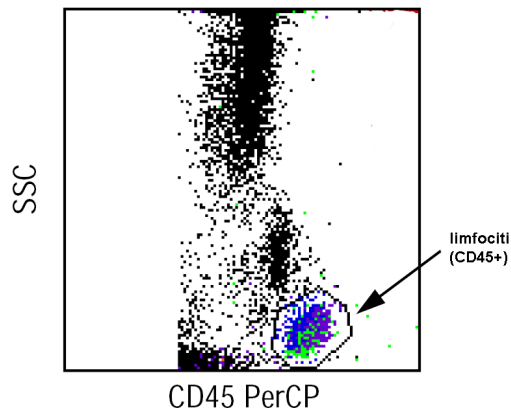
### D. Raztopina za lizo eritrocitov

BD FACSLysing solution (10x): vsebuje pufer za lizo eritrocitov, etilen glikol in formaldehid. Omogoča odstranitev eritrocitov, ki motijo analizo. Pred uporabo jo redčimo z bidestilirano vodo (1:9).

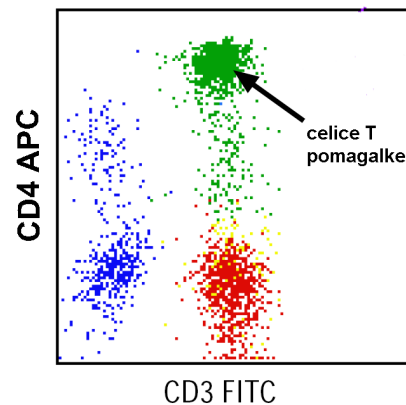
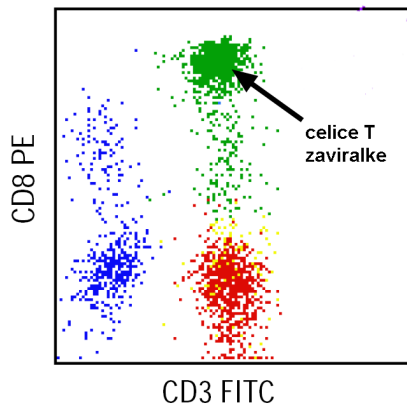
### E. Aparatura

Pretočni citometer BD FACSCalibur s sistemom dveh laserjev (488 in 633 nm) in štirih fluorescenčnih detektorjev (FL1: 530 nm; FL2: 585nm; FL3: 670nm; FL4: 661 nm)

## F. Dvoparametrski histogrami za določitev deleža populacij limfocitov T



CD45 je levkocitni marker, ki omogoča identifikacijo limfocitov v kompleksni mešanici krvnih celic. Levkocite na diagramu (levo) najdemo desno spodaj pri visoki intenziteti barvila PerCP in jih lahko izberemo za nadaljnjo analizo.



Z uporabo različno označenih protiteles lahko ločimo različne populacije T limfocitov. (*Levo*) Celice T zaviralke (CD3+CD8+) se nahajajo pri visoki intenziteti barvil FITC in PE. (*Desno*) Celice T pomagalke (CD3+CD4+) se nahajajo pri visoki intenziteti barvi FITC in APC.

## DOLOČANJE DELEŽA CELIC T POMAGALK IN ZAVIRALK V POLNI KRVI

### Princip:

### Postopek:

#### A. Označevanje s protitelesi in liza eritrocitov

- Označimo epruvete, primerne za analizo s pretočnim citometrom (12x75 mm).
- Pipetiramo 20 ul reagenta Multitest CD3/CD8/CD45/CD4 na dno epruvete.
- Dodamo 50 ul dobro premešane polne krvi na dno epruvete. Pri tem pazimo, da vzorec ne ostane na steni epruvete.
- Zapremo epruveto in kratko vorteksiramo.
- Inkubiramo 15 minut zaščiten pred svetlobo pri sobni T.
- Dodamo 450 ul delovne raztopine za lizo, ki jo predhodno redčimo z bidestilirano vodo. (1x FACSLysing solution).
- Zapremo epruveto in kratko vorteksiramo.
- Inkubiramo 15 minut zaščiten pred svetlobo pri sobni T.

#### B. Analiza s pretočnim citometrom

- Pred pričetkom analize vzorec dobro premešamo (vorteks), da zmanjšamo agregacijo celic.
- Vzorec analiziramo s pretočnim citometrom. Opazujemo dvoparametrski histogram (SSC-CD45\_PerCP) in identificiramo populacijo limfocitov ter jo označimo za nadaljnjo analizo. Prav tako se prepričamo, da sta populaciji monocitov in granulocitov dobro ločeni.
- Analiziramo dvoparametrske histograme (npr. CD3\_FITC-CD8\_PE in CD3\_FITC-CD4\_APC) in odčitamo odstotek populacij, ki nas zanimajo.

### Referentne vrednosti:

Podskupina celic v celotni populaciji limfocitov	n	Povprečje	95% interval zaupanja
celice T pomagalk (%)	164	45	33-58
celice T zaviralke (%)	164	24	13-39
vsi T limfociti (%)	164	72	56-86

### Reagenti:

BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4, BD FACSLysing solution (10x).

## Rezultati praktičnega dela

### 1. Opis vzorcev, materiala in opreme:

### 2. Sheme dvoparametrskih histogramov:

Skiciraj dobljene dvoparametrške histograme in označi posamezne populacije celic ter njihove deleže!

a) SSC-FSC

b) SSC-CD45\_PerCP

c) CD3\_FITC-CD8\_PE

d) CD3\_FITC-CD4\_APC

e) CD4\_APC-CD8\_PE

### 4. Rezultati:

Podskupina celic v celotni populaciji limfocitov	Vzorec 1	Vzorec 2
celice T pomagalke (%)		
celice T zaviralke (%)		
vsi T limfociti (%)		

### Komentar rezultatov

Komentirajte sheme dvoparametrskih histogramov ter rezultate deležev celic T in poskušajte klinično interpretirati rezultat!

---

Pregledal-a:

Datum:

Ocena: