Epidemiologie 3/05 18.7.2005 13:25 Stránka 109
proLékaře.cz | 29.11.2026

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 54, 2005, č. 3, s. 109–115

Hodnocení přežití a proliferace T-lymfocytů ve smíšené lymfocytární reakci s dendritickými buňkami metodou diferenciálního gatingu

Obrtlíková P., Pytlík R., Hofman P., Červinková P.

1. interní hematoonkologická klinika VFN a 1. LF Praha

Souhrn

Smíšená lymfocytární reakce (MLC) T-lymfocytů s dendritickými buňkami je jedním ze základních nástrojů studia imunologických mechanismů. Tato práce přináší popis nové metodiky hodnocení alogenní a autologní MLC pomocí průtokové cytometrie a diferenciálního gatingu. Metoda je založena na časově omezené akvizici událostí a na jejich rozdělení podle hodnot forward a side scatteru. Gatována je jednak populace všech živých buněk (R1), dále populace živých neproliferujících buněk (R2) a populace mrtvých/apoptotických buněk (R4). Pomocí fluorescenčních mikrosfér (R3) je navíc možno vypočítat absolutní množství buněk ve stanoveném gatu. Pomocí 7-AAD exkluze bylo ověřeno, že zhruba 90 % 7-AAD pozitivních buněk se promítá do gatu R4, navíc poměr R1: R2 výtečně koreluje s procentem buněk pozitivních na aktivační/proliferační marker CD71. Příklady dalších výsledků dosažených touto metodikou jsou uvedeny v textu. Vzhledem k tomu, že metoda diferenciálního gatingu ve své základní podobě nevyžaduje užití žádné fluorescenční protilátky, umožňuje rychlý a levný skríning velkého množství vzorků bez použití radioaktivně značených nukleotidů.

Klíčová slova: průtoková cytometrie – smíšená lymfocytární reakce – T lymfocyty – dendritické buňky.

Summary

Obrtlíková P., Pytlík R., Hofman P., Červinková P. Flow cytometric differential gating strategy for evaluation of T-lymphocyte survival and proliferation in mixed lymphocyte reaction with dendritic cells

Mixed lymphocyte reaction (MLC) of T-lymphocytes with dendritic cells is one of the basic tools for studying of immune reaction mechanisms. This work describes a new method of evaluation of allogeneic and autologous MLC by flow cytometry and differential gating. This method is based on fixed time acquisition of events and their sorting according to their forward and side scatter properties. Differential gating distinguishes populations of all living cells (R1), living non-proliferating cells (R2) and dead/apoptotic cells (R4). Addition of fluorescence microspheres (R3) enables the calculation of absolute number of cells in a given sample volume. Using the method of 7-AAD exclusion, we have shown that approximately 90% of 7-AAD positive cells project into the R4 gate. Moreover, there was an excellent correlation between the R1: R2 ratio and the percentage of cells positive for activation/proliferation marker CD71. The method of differential gating in its basic version does not require use of any fluorescent antibody and therefore is suitable for rapid screening of large number of samples at reasonable cost and without the use of radiolabeled nucleotides.

Key words: flow cytometry – mixed lymphocyte reaction – T-lymphocytes – dendritic cells.

Dendritické buňky jsou profesionální antigen-prezentující buňky, které jsou v poslední době intenzivně studovány pro svoji roli v protinádorové imunitě [1–3]. Klasickým prostředkem zkoumání interakcí mezi dendritickými buňkami a T-lymfocyty je smíšená lymfocytární reakce, a to buď alogenní (společně jsou kultivovány dendritické buňky a T-lymfocyty od různých jedinců) nebo autologní, kdy je zkoumána schopnost dendritických buněk vyvolat proliferaci vlastních T-lymfocytů na nový či již známý antigenní podnět [4, 5].

Klasickou metodou zkoumání proliferace T-lymfocytů ve smíšené lymfocytární reakci (MLC) je inkorporace radioaktivního ^{3}H-thymidinu do proliferujících buněk. Tato metoda má četné

Epidemiologie 3/05 18.7.2005 13:26 Stránka 110
proLékaře.cz | 29.11.2026

Tab. 1. Charakteristika dárců
Tab. 1. Characteristics of donors

Dárce	Pohlaví	Věk	*Stav onemocnění	**Počet leukocytů
Zdraví dobrovolníci				
D1	žena	27		
D2	muž	29		
D3	muž	39		
D4	žena	52		
Pacienti s CLL				
CLL1	žena	38	neléčena	$17{,}3 \times 10^9$/l
CLL2	muž	62	kompletní remise	$6{,}6 \times 10^9$/l
CLL3	žena	67	neléčena	$21{,}4 \times 10^9$/l
CLL4	žena	58	neléčena	$34{,}5 \times 10^9$/l
Pacienti s folikulárním lymfomem				
FL1	žena	62	neléčena	
FL2	žena	55	kompletní remise	

* Pouze u pacientů
* Pouze u pacientů s CLL
* in patients only
** in CLL patients only

nevýhody. Za prvé, je možno sledovat pouze proliferující populaci T-lymfocytů, zatímco lymfocyty, které pouze přežívají, ale neproliferují, jsou tímto způsobem nepostižitelné. Za druhé, není možno současně sledovat expresi aktivačních znaků (CD25, CD69, CD71 – 6) ani produkci intracelulárních cytokinů (IFN-g, IL-4) stimulovanými T-lymfocyty [7], eventuálně dávat do souvislosti expresi povrchových molekul s produkcí cytokinů. Za třetí, není možno sledovat absolutní počet proliferujících buněk. Navíc se v poslední době objevují práce, které ukazují, že radioaktivní thymidin může způsobit poruchy buněčného cyklu či buněčnou smrt v určitých buněčných liniích [8].

Z těchto důvodů jsme vyvinuli jednoduchou a ve své základní podobě i velmi lacinou metodu sledování přežívání a proliferace T-lymfocytů v autologní či alogenní reakci. Za základ jsme zvolili rok starou práci Nguyenovu [9] s několika modifikacemi. Pomocí diferenciálního gatingu živých proliferujících, živých neproliferujících a apoptotických buněk se nám podařilo sledovat přežívání a kinetiku T-lymfocytů v autologní i alogenní lymfocytární reakci, a to jak u zdravých dobrovolníků, tak u pacientů s lymfoidními malignitami.

Materiály a metodika

Pacienti a zdraví dobrovolníci

Studie byla schválena etickou komisí a pacienti i zdraví dobrovolníci podepsali informovaný souhlas. Celkem byli zkoumáni čtyři pacienti s chronickou lymfatickou leukémií, dvě pacientky s folikulárním lymfomem a čtyři zdraví dobrovolníci. Charakteristiky účastníků studie jsou uvedeny v tabulce 1. Účastníkům studie bylo odebráno 50 ml krve na přípravu dendritických buněk a o týden později dalších 50 ml krve k získání T-lymfocytů.

Příprava dendritických buněk

Dendritické buňky byly připraveny z periferních monocytů metodou Spíška a spolupracovníků [10]. Periferní monocyty byly získány adhezí na plast po dobu 12 hodin. U pacientů s chronickou lymfatickou leukémií byla nejprve provedena předběžná CD19 deplece pomocí imunomagnetické CD19 protilátky (Miltényi Biotec, LV Biomed, Hýskov). Monocyty byly dále pěstovány po dobu 7 dnů v RPMI médiu (Gibco, KRD Praha) s 10% fetálním telecím sérem a se suplementy (1000 U/ml GM-CSF, 10 000 U/ml IL-4, obojí Invitrogen, I.T.A.-Intertakt Praha). Suplementy byly do média znovu přidány 4. den kultivace. 6. den kultivace byly dendritické buňky vyzrávány pomocí 10 ng/ml TNF-α (Invitrogen, I.T.A-Intertakt Praha) a 50 μg/ml poly I:C (Sigma-Aldrich, ČR). Dendritické buňky pro autologní MLR byly od 4. dne pěstovány s čistým tetanovým toxoidem (dar firmy Sevapharma, Praha) a vyzrávány výše popsaným způsobem.

Získávání T-lymfocytů a smíšená lymfocytární reakce

T-lymfocyty byly získány po centrifugaci na Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsalla) a pozitivně selektovány pomocí imunomagnetických protilátek CD4 a CD8 (Miltényi, LV-Biomed). U pacientů s chronickou lymfatickou leukémií byla provedena předběžná imunomagnetická CD19-deplece. Čistota CD4 lymfocytů činila v průměru 87,9 % (62,1–96,4 %) a čistota CD8 lymfocytů 73,7 % (55,3–90,4 %).

T-lymfocyty byly pěstovány s dendritickými buňkami v 96-jamkových destičkách ve 300 μl RPMI s 10% FCS v poměru 10:1 (10^5 lymfocytů na 10^4 dendritických buněk). Alogenní reakce byly prováděny tak, že dendritické buňky pacienta byly kultivovány s lymfocyty jednoho dobrovolníka a dendritické buňky téhož dobrovolníka s T-lymfocyty pacienta. Jako pozitivní kontrola sloužily dendritické buňky druhého zdravého dobrovolníka, jako negativní kontrola pak samotné dendritické buňky pacientů a kontrol. Při autologních reakcích byly dendritické buňky pacienta pulzovány 1,5–15 μg/ml tetanového toxoidu a smíchány s autologními lymfocyty. Jako negativní kontroly sloužily nepulzované dendritické buňky (zralé a nezralé) a samotný tetanový toxo-

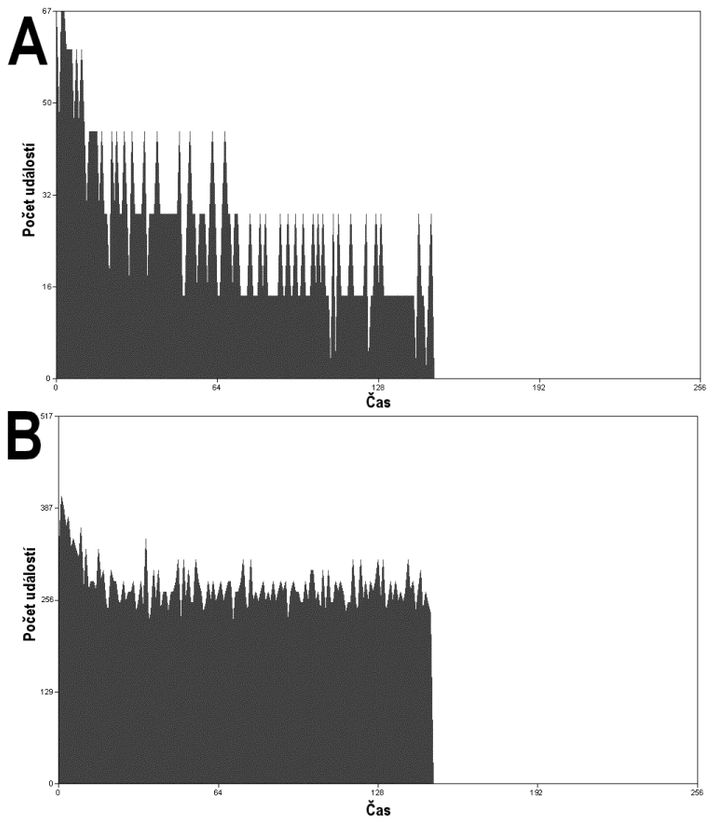
proLékaře.cz | 29.11.2026

id v uvedených koncentracích. Ve všech experimentech byly zvlášť použity CD4 lymfocyty a CD8 lymfocyty, v některých experimentech byly CD4 a CD8 lymfocyty opět smíchány 1:1. Všechny experimenty byly prováděny trojitě.

Průtoková cytometrie a metodika diferenciálního gatingu

Na dendritických buňkách byly zkoumány znaky CD1a, CD83 a CD54 (Invitrogen); dále CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD20, CD40, CD45, CD80, CD86, HLA-II (klon CR3/R3) a HLA-I (vše Dako Cytomation, Brno) a ILT3 (Immunotech, Praha). Povrchové znaky T-lymfocytů byly měřeny pomocí CD3 FITC, CD4 PE a CD8 PE-Cy5. Jako aktivační znak bylo použito protilátky CD71 FITC (vše Dako Cytomation). Mrtvé buňky byly hodnoceny podle akumulace 7-AAD (Sigma Aldrich). Analýza dat byla provedena pomocí programu Summit® V3.3 (zapůjčen laskavostí Dako Cytomation, ČR).

Absolutní počty buněk byly získány následujícím způsobem: po důkladném a opatrném promíchání obsahu jamky bylo 100 µl buněčné suspenze smícháno se 100 µl PBS a s určeným množstvím protilátek. Do některých zkumavek nebylo přidáváno PBS, ale 100 µl fluorescenčních kuliček CytoCount™ (Dako) o známé koncentraci technikou reverzního pipetování podle doporučení výrobce. Akvizice probíhala po fixně stanovenou dobu 30 s a počet událostí byl hodnocen pouze v měřeních se stabilní akvizicí (obr. 1). Při akvizici nebyl použit žádný treshold ani žádný negativní gate k vyloučení buněčné drtě, což by mohlo vést jednak k vyloučení kuliček CytoCount z akvizice, jednak ke ztrátě některých pozdně apoptotických buněk. Buňky byly měřeny v pozitivních gatech: R1 = všechny lymfocyty, R2 = malé, živé, avšak neproliferující lymfocyty, R4 = apoptotické/mrtvé buňky. Absolutní počet buněk v jednotlivých gatech je pak možno vypočítat podle vzorce:



Obr. 1. Sledování stability akvizice událostí na časové ose
Na grafu A je znázorněna situace, kde akvizice událostí (buněk, buněčné drtě či fluorescenčních mikročástic) klesá spolu s dobou akvizice. To svědčí pro částečnou obstrukci kapiláry cytometru a takový vzorek není možno použít k výpočtům. Graf B znázorňuje stabilní průtok kapilárou cytometru po celou dobu měření vzorku.
Fig. 1. Stability of acquisition of events on the time axis
Fig. A shows a situation where acquisition of events (cells, cell detritus or fluorescent microparticles) decreases with acquisition time. This is suggestive of partial obstruction of the cytometer capillary tube and such a sample cannot be used for the calculation. Fig. B shows stable flow through the capillary tube over the whole sample measurement period.

$$\text{počet buněk} = \frac{\text{počet naměřených událostí v příslušném gatu}}{\text{počet kuliček CytoCount}^{TM}} \times$$

$$\times \text{ koncentrace CytoCount}^{TM} \times \text{diluční faktor,}$$

kde diluční faktor je poměr celkového objemu vzorku k původnímu objemu vzorku (např. pokud bylo k původním 100 µl vzorku přidáno 100 µl CytoCount™ a 15 µl protilátek, je celkový objem vzorku 215 µl a diluční faktor je 2,15). Procento fluorescenčních událostí bylo měřeno v jednotlivých diferenciálních gatech. Počet kuliček CytoCount byl měřen v histogramu SSCxFL2. Princip diferenciálního gatingu je uveden na reprezentativním příkladu na obr. 2. Validita gatingu byla ověřena stanovením mrtvých buněk pomocí 7-AAD.

Zpracování dat a statistická analýza

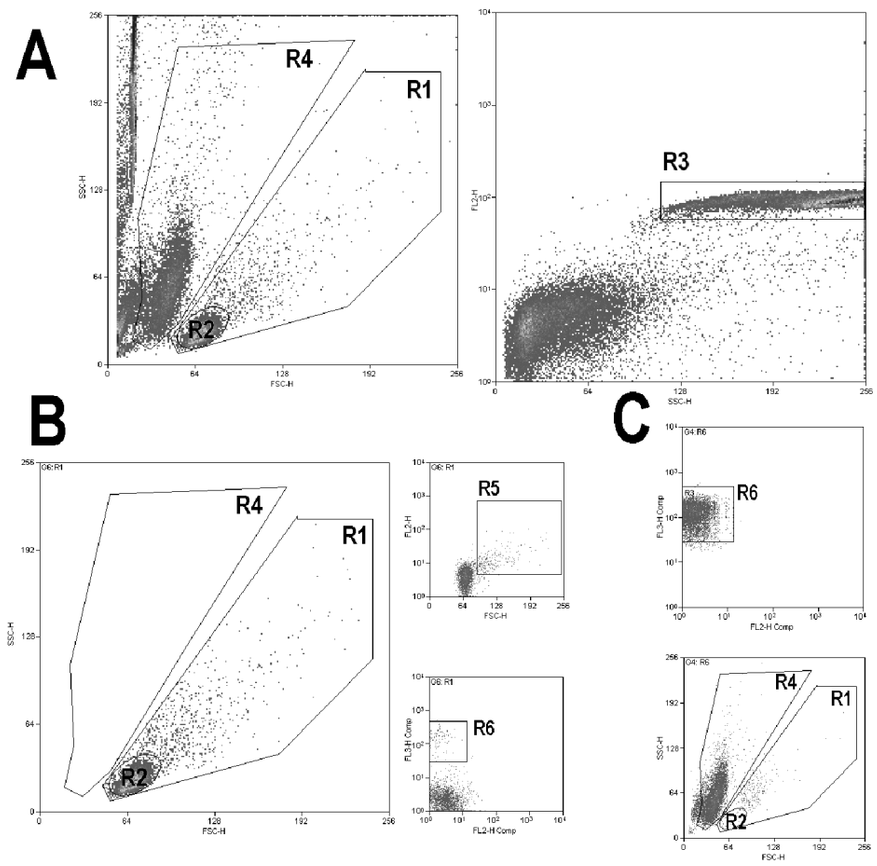
Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly měřeny pomocí Studentova párového testu a Studentova testu s nerovností rozptylů. Korelace byly měřeny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Hodnoty $p \leq 0{,}05$ byly pokládány za statisticky významné.

Výsledky

Generace dendritických buněk

Generace dendritických buněk se zdařila u pacientů i u zdravých kontrol. Značná část dendritických buněk byla CD4 pozitivních (5,6 až 74,2 %), $CD8^+CD3^-$ buněk bylo minimum (0–1,3 %). Dendritické buňky pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) exprimovaly molekulu CD40 podstatně méně oproti dendritickým buňkám zdravých dobrovolníků a pacientů s folikulárním lymfomem (v průměru 28,4 % CD40 pozitivních buněk u CLL v. 75,9 % u ostatních dárců, $p = 0{,}008$), jinak se imunofenotypické profily dendritických buněk získaných od pacientů a zdravých dárců výrazněji nelišily. Vyzrávání dendritických buněk s tetanovým toxoidem nemělo statisticky významný vliv na expresi jejich povrchových znaků.

proLékaře.cz | 29.11.2026



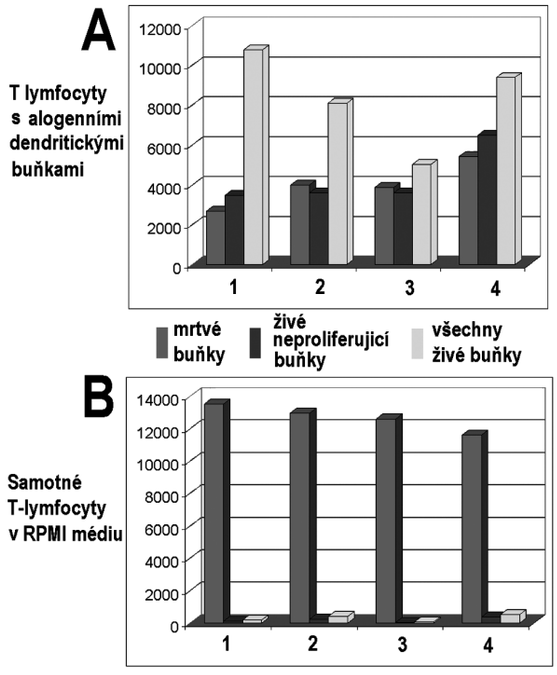
Obr. 2. Princip diferenciálního gatingu
Diferenciální gating využívá distribuce viditelného světla na T-lymfocytech k jejich rozdělení do jednotlivých populací. Validita tohoto rozdělení je pak hodnocena pomocí specifických markerů (např. 7-AAD pro mrtvé buňky, CD71 pro aktivované a proliferující buňky).
1A – základní distribuce T-lymfocytů do tří gatů. **R1** = živé lymfocyty, **R2** = živé, ale klidové lymfocyty, **R4** = apoptotické a mrtvé lymfocyty. Vlevo nahoře na histogramu FSCxSSC je vidět populace buněčné drtě, která již neakumuluje ani 7-AAD. S touto drtí částečně splývá oblast fluorescenčních mikrosfér, které se však vzhledem ke svému vysokému side scatteru a dobré fluorescenci lépe gatují na histogramu SSCxFL2 **(R3)**.
1B představuje gating na živé lymfocyty. Z celkového počtu 5118 lymfocytů tvoří 4421, tj. 86 % malé, neproliferující lymfocyty. Tomu odpovídá i procento CD71 pozitivních buněk (8,5 % z R1 gatu). Pouze 5 % buněk v R1 gatu je 7-AAD pozitivních.
1C představuje gating na 7-AAD pozitivní, tj. mrtvé buňky. Z celkového množství mrtvých buněk se 88,6 % nachází v R4 gatu a pouze 3,2 % v R1 gatu.
Fig. 2. Differential gating principle
Differential gating uses the visible light distribution on T-lymphocytes to divide them into different populations. Validity of this division is tested by specific markers (e.g. 7-AAD for dead cells, CD71 for activated and proliferating cells).
1A shows basic distribution of T-lymphocytes into three gates. R1 = live lymphocytes, R2 = live but resting lymphocytes, R4 = apoptotic and dead lymphocytes. The cell detritus population that does not accumulate 7-ADD any longer is shown top left in the histogram FSCxSSC. This detritus is partly confluent with the area of fluorescent microspheres whose high side scatter and good fluorescence enable better gating in the histogram SSCxFL2 (R3).
1B shows gating on live lymphocytes. As many as 4421 (86 %) of 5118 lymphocytes are small nonproliferating lymphocytes. The percentage (8.5 % from R1 gate) of CD71-positive cells is in agreement with this finding. Only 5% in R1 gate are 7-AAD-positive.
1C shows gating on 7-ADD-positive, i.e. dead, cells. Of all dead cells, 88.6% are found in R4 gate and only 3.2% in R1 gate.

Validita výsledků získaných diferenciálním gatingem

V R4 gatu bylo průměrně 74,5 % buněk 7-AAD pozitivních, přičemž široké rozmezí (17,4–96,7 %) vypovídá nejspíše o tom, že ne všechny apoptotické buňky v R4 gatu již byly mrtvé. Za podstatnější pokládáme fakt, že ze 7-AAD pozitivních buněk se jich průměrně 90,5 % (rozmezí 78,9–96,1 %) nacházelo v R4 gatu, což svědčí pro validní a reprodukovatelné nastavení této sběrné oblasti.

Počet 7-AAD pozitivních buněk v R1 gatu byl velmi výrazně ovlivněn tím, zda buňky byly či nebyly stimulovány. Při společné kultivaci lymfocytů s dendritickými buňkami v alogenní reakci bylo v R1 gatu průměrně 2,8 % 7-AAD pozitivních buněk oproti 16,7 % v jamkách, do nichž alogenní dendritické buňky přidány nebyly (p = 0,04). Stejně tak, v autologní reakci bylo v R1 gatu průměrně 3,3 % 7-AAD pozitivních buněk, pokud byly lymfocyty pěstovány s dendritickými buňkami pulzovanými tetanovým toxoidem. Pokud byly lymfocyty pěstovány se samotnými dendritickými buňkami či se samotným tetanovým toxoidem, bylo v R1 gatu v průměru 30,5 % 7-AAD pozitivních událostí (p <0,001).

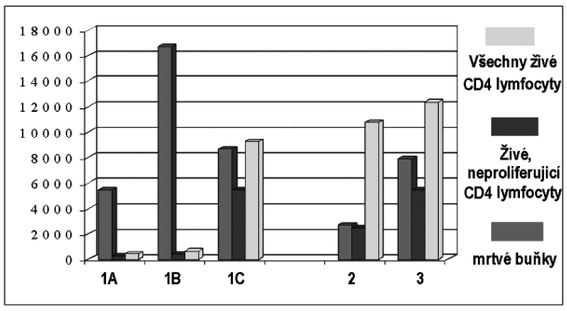
proLékaře.cz | 29.11.2026



Obr. 3. Alogenní smíšená lymfocytární reakce
V horním grafu (A) jsou T-lymfocyty stimulované alogenními dendritickými buňkami, v dolním grafu (B) tytéž lymfocyty bez stimulace. Jednotlivé sloupce: **1** – CD4 lymfocyty dobrovolník 1 + dendritické buňky dobrovolník 2, **2** – CD4 lymfocyty pacientka s CLL1 + dendritické buňky dobrovolník 1, **3** – CD8 lymfocyty dobrovolník 1 + dendritické buňky dobrovolník 2, **4** – CD8 lymfocyty pacientka s CLL1 + dendritické buňky dobrovolník 1.
Fig. 3. Allogenic mixed lymphocyte reaction
The top diagram (A) shows T-lymphocytes stimulated by allogenic dendritic cells while nonstimulated T-lymphocytes are shown in the bottom diagram (B). Bar 1: volunteer 1 CD4 lymphocytes + volunteer 2 dendritic cells, Bar 2: CLL1 patient CD4 lymphocytes + volunteer 1 dendritic cells, Bar 3: volunteer 1 CD8 lymphocytes + volunteer 2 dendritic cells, Bar 4: CLL1 patient CD8 lymphocytes + volunteer 1 dendritic cells

Alogenní a autologní MLC

V alogenní smíšené reakci se nám podařilo prokázat funkční zdatnost lymfocytů zdravých dobrovolníků i pacientů. Poměry mezi nestimulovanými a stimulovanými buňkami jsou uvedeny na obr. 3. Na rozdíl od metody ^{3}H thymidinové inkorporace, ale i Nguyenovy práce bylo možné pozorovat, že přidání dendritických buněk k lymfocytům nejen stimuluje jejich proliferaci, ale i zvyšuje přežívání nestimulovaných buněk. Na druhé straně, stimulační schopnost dendritických buněk pacientů s chronickou lymfatickou leukémií v alogenní MLC byla podstatně snížená jak oproti zdravým dobrovolníkům, tak i oproti pacientce s folikulárním lymfomem. Je přitom pozoruhodné, že dendritické buňky od téže pacientky s CLL, pulzované tetanovým toxoidem, dobře stimulovaly proliferaci vlastních T-lymfocytů v autologní reakci (obr. 4). Tyto výsledky je nutno ověřit na větším počtu pacientů a zdravých dárců.



Obr. 4. Alogenní a autologní smíšená lymfocytární reakce u pacientky CLL1.
Ukázány jsou pouze výsledky s CD4 lymfocyty. **V prvním sloupci** jsou dendritické buňky pacientky s T-lymfocyty zdravého dárce 1, **ve druhém sloupci** dendritické buňky pacientky bez tetanového toxoidu s T-lymfocyty pacientky a **ve třetím sloupci** dendritické buňky pacientky pulzované tetanovým toxoidem s T-lymfocyty pacientky. **Čtvrtý a pátý sloupec** pro srovnání ukazují alogenní reakci dendritických buněk zdravého dárce 2 a lymfocytů zdravého dárce 1 **(4)** a dendritických buněk pacientky FL1 a zdravého dárce 3 **(5)**.
Fig. 4. Allogenic and autologous mixed lymphocyte reaction in CLL1 patient
Only results for CD4 lymphocytes are shown. Bar 1A: patient dendritic cells + healthy volunteer T-lymphocytes, Bar 1B: patient dendritic cells without tetanus toxoid + patient T-lymhocytes, Bar 1C: patient tetanus toxoid pulsed dendritic cells + patient T-lymphocytes, For comparison: Bar 2: healthy donor 2 dendritic cells + healthy donor 1 lymphocytes and Bar 3: FL1 patient dendritic cells + healthy donor 3 lymphocytes.

Ve všech pokusech jsme pozorovali zvýšenou proliferaci CD4 lymfocytů oproti CD8 lymfocytům (R1-R2, obr. 5). Aktivační marker CD71+ byl přítomen téměř výhradně na velkých, blastických buňkách (obr. 1B) a procento CD71+ buněk velmi dobře korelovalo s poměrem R1: R2 (obr. 6)

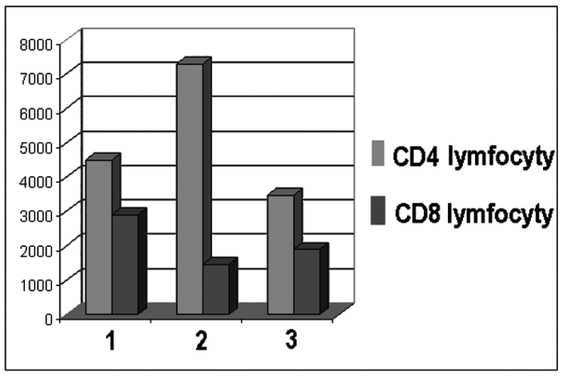
Ověření přesnosti pipetování pomocí imunofluorescenčních částic

V průběhu 30vteřinové akvizice bylo celkem ze 34 měření zaznamenáno v průměru 61 699 mikrosfér na 100 ml suspenze (95% interval spolehlivosti: 60527–62571 mikrosfér). V praxi to znamená, že u 95 % měření výsledky oscilovaly o méně než 1,5 % kolem průměrné hodnoty. Počet mikrosfér jsme neužívali ke stanovení absolutního počtu lymfocytů, protože naše výpočty byly založeny na poměrech mezi experimentálními a kontrolními vzorky.

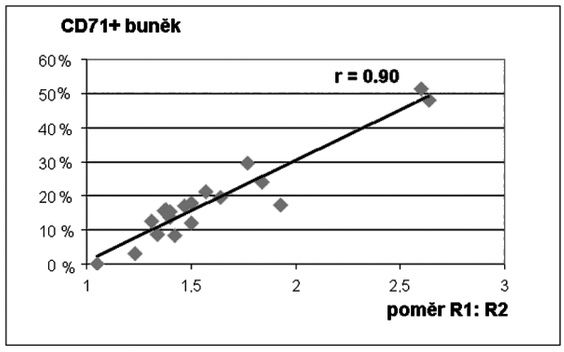
Diskuse

Současný rozvoj aplikací průtokové cytometrie ke studiu buněčné proliferace je způsoben jednak potřebou získat detailnější přehled o chování jednotlivých buněčných subpopulací, jednak dostupností nových intravitálních fluorescenčních barviv. Barvivo CFDA-SE [11] je hojně využívaným

Epidemiologie 3/05 18.7.2005 13:29 Stránka 114
proLékaře.cz | 29.11.2026



Obr. 5. Rozdíly v proliferaci CD4 a CD8 T-lymfocytů.
Sloupec 1 – dendritické buňky zdravý dárce 1 a lymfocyty pacientky CLL1, **sloupec 2** – dendritické buňky zdravý dárce 2 a lymfocyty zdravého dárce 1, **sloupec 3** – autologní reakce T-lymfocytů pacientky CLL1 s vlastními dendritickými buňkami pulzovanými tetanovým toxoidem.
Fig. 5. Differences in proliferation of CD4 and CD8 T-lymphocytes
Bar 1: healthy donor 1 dendritic cells + CLL1 patient lymphocytes, Bar 2: healthy donor 2 dendritic cells + healthy donor 1 lymphocytes, Bar 3: CLL1 patient T-lymphocytes + CLL1 patient tetanus toxoid pulsed dendritic cells



Obr. 6. Závislost CD71 pozitivity na poměru celkového počtu lymfocytů (R1) s neproliferujícími lymfocyty.
Fig. 6. Effect of the total lymphocyte count to the nonproliferating lymphocyte count ratio on CD71 positivity

prostředkem, umožňujícím nejen označení buněk našeho zájmu, ale i sledování počtu buněčných dělení. Nevýhodou tohoto barviva je jednak to, že pozorované buňky musí být přibližně stejné velikosti, jinak je nutno křivky počítačově upravovat [12], jednak emisní spektrum tohoto barviva je poměrně široké, což do jisté míry limituje možnost užití fluorochromů s emisí detekovanou ve FL2 kanálu. CFDA-SE se váže na cytoplazmatické bílkoviny a při dělení buňky se rovnoměrně rozdělí do obou buněk dceřiných. Jiné, lipofilní barvy, jako např. PKH26 či CM-DiI, se váží na buněčné membrány buněk a jejich nevýhodou je možný přenos barviva na neoznačené buňky, pokud jsou tato barviva užívána v dostatečných koncentracích [13].

Naše metoda diferenciálního gatingu je velmi jednoduchá a ve své základní verzi i velmi laciná, protože nevyžaduje žádné fluorescenční protilátky. To umožňuje skríningové proměření velkého množství vzorků a základní odhad úspěšnosti experimentu dříve, než přikročíme k sofistikovanějším metodám zkoumání buněčných subpopulací pomocí povrchových či intracelulárních protilátek. Diferenciální gating rovněž umožňuje plné využití detekčních možností každého průtokového cytometru, protože žádný fluorescenční kanál k detekci cílové populace není zapotřebí. Jediné, co tato metoda vyžaduje, je přesné pipetování pravidelně kalibrovanými pipetami a reverzní technikou a sledování pravidelnosti akvizice. Použití fluorescenčních mikrosfér je na místě tam, kde chceme zjistit absolutní množství určitých buněk nebo ověřit přesnost pipetování. V našich experimentech těmito mikrosférami kontrolujeme náhodně cca 25 % vzorků.

Relevantní námitkou je, že bez použití fluorescenčních barviv se mohou do diferenciálně gatovaných populací dostat i jiné buňky, než T-lymfocyty. Toto je třeba v každé aplikaci této metody vyzkoušet a zvolené gaty validovat způsoby podobnými těm, kterých jsme použili v této práci. Co se MLC reakce týče, žádnou kombinací fluorescenčních protilátek se nám nepodařilo zachytit relevantní množství dendritických buněk, makrofágů ani B lymfocytů (data neuvedena).

Konkrétní pozorování, uvedená v této práci si nekladou za cíl sdělovat nové poznatky z oblasti imunologie pacientů s lymfoidními malignitami, spíše jsou uvedeny jako příklady využití metody diferenciálního gatingu. Proto také nechceme dosažené výsledky nikterak komentovat dříve, dokud nebudou ověřeny na větším souboru. Za pomoci výše popsané, jednoduché a flexibilní metody by mělo být poměrně snadné zjistit, zda se jedná o obecně platné jevy, či pouze o kazuistiky podmíněné individuálními vlastnostmi zkoumaných pacientů a zdravých dobrovolníků.

Tato práce byla financována pomocí grantů FRVŠ 991 a IGA MZ ČR 8092-3/2004

Literatura

1. **Fong, L., Engleman, E. G.** Dendritic cells in cancer immunotherapy. Annual Reviews in Immunology, 2000, 18, s. 245–273.
2. **Hájek, R., Křivanová, A., Bourková, L. et al.** Biologie dendritických buněk a jejich příprava pro klinické užití (přehled a předběžné výsledky). Klin. onkol., 2001, 14, 3, s. 79–83.
3. **O'Neill, D. W., Adams, S., Bhardwaj N.** Manipulating

Epidemiologie 3/05 18.7.2005 13:29 Stránka 115
proLékaře.cz | 29.11.2026

dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. Blood, 2004, 104, s. 2236–2246.
4. **Scheinecker, C., Machold, K. P., Majdic, O. et al.** Initiation of the autologous mixed lymphocyte reaction requires the expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on human peripheral blood dendritic cells. The Journal Of Immunology, 1998, 161, s. 3966–3973.
5. **Pettit, S. J., Neal, D. E., Kirby, J. A.** Evaluation of dendritic cell immunogenicity after activation and chemical fixation: a mixed lymphocyte reaction model. Journal of Immunotherapy, 2002, 25, 2, s. 152–161.
6. **Caruso, A., Licenziati, S., Corulli, M. et al.** Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. Cytometry, 1997, 27, 1, s. 71–76.
7. **Caraher, E. M., Parenteau, M., Gruber, H., Scott, F. W.** Flow cytometric analysis of intracellular IFN-gamma, IL-4 and IL-10 in CD3(+)4(+) T-cells from rat spleen. Journal of Immunological Methods, 2000, 244, 1–2, s. 29–40.
8. **Yanokura M., Takase K., Yamamoto K., Teraoka H.** Cell death and cell cycle arrest induced by incorporation of [3H] thymidine into human haematopoietic cell lines. International Journal of Radiation Biology, 2000, 76, 3, s. 295–303.
9. **Nguyen, X. D., Eichler, H., Dugrillon, A. et al.** Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. Journal of Immunological Methods, 2003, 275, 1–2, s. 57–68.
10. **Spisek, R., Bretaudeau, L., Barbieux, I. et al.** Standardized generation of fully mature p70 IL-12 secreting monocyte-derived dendritic cells for clinical use. Cancer Immunology and Immunotherapy, 2001, 50, 8, s. 417–427.
11. **Lyons, B. A.** Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. Journal of Immunological Methods, 2000, 243, s. 147–154.
12. **Hodgkin, P. D., Chin, S. H., Bartell, G. et al.** The importance of efficacy and partial agonism in evaluating models of B-lymphocyte activation. International Reviews in Immunology, 1997, 15, 1–2, s.101–127.
13. **Harraz, M., Jiao, C., Hanlon, H. D. et al.** CD34$^-$ blood-derived human endothelial cell progenitors. Stem cells, 2001, 19, s. 304–312.

Do redakce došlo 30. 12. 2004

MUDr. R.Pytlík
I. interní hematoonkologická klinika VFN a 1. LF UK
U nemocnice 2
128 08 Praha 2
e-mail: pytlik@seznam.cz

POŽADAVEK NTS A TISKÁRNY PRO DODÁVÁNÍ PODKLADŮ DO TISKU

Příspěvky dodané v kvalitní formě lze dodávat tiskárně na elektronických médiích. Nakladatelské a tiskové středisko (NTS) přijímá rukopisy pouze v textovém editoru WORD pro Windows (W7/WIN98 nebo novější verze). Příspěvky musí být napsány formou tzv. hladké sazby: bez zarážek, odrážek, tvrdých konců řádek (s výjimkou oddělení odstavců), podtrhávání, změn velikosti písma, formátování (na střed, pomocí tabulátorů), automatického číslování odstavců (např. u citací v literatuře nutno číslice vypisovat) a veškerých grafických experimentů, které moderní tiskový editor umožňuje. **Veškerá přednastavení je nutno zrušit**. Každý elektronicky dodaný příspěvek musí být zároveň dodán i v tištěné formě ve dvojím vyhotovení. Papírový a elektronický text musí být identický, na disketě smí být jen definitivní verze zasílané práce.
Disketa musí být popsána názvem souboru (text také), prosta virů a ochráněna proti náhodnému smazání. Pojmenování souborů vychází ze jména autora. V názvu souboru nelze používat háčky a čárky.
Elektronickou obrazovou dokumentaci [tj. grafy, fotografie (i barevné), výstupy z přístrojů] NTS přijímá pro přímé tiskárenské zpracování, a to ve formátech .tif a .eps, přičemž možná média jsou kromě disket 3,5“ také CD-ROM, zip 100 MB, jaz.
Grafy musí být zpracovány pro jednobarevný tisk, veškerá dokumentace musí být zaslána i v papírové podobě (mohou být dodány i v .ai, .cdr, i .xls v křivkách).
Pokud jsou obrázky ve formátu .jpg, je třeba užít velkého rozlišení (nejlepší kompresní poměr) z důvodů kvality.
Skenování barevných obrázků vyžaduje minimálně rozlišení 300 dpi v požadovaném tiskovém rozměru.
V komplikovaných případech lze autorům vyjednat kontakt přímo s tiskárnou.
Časopisy jsou zpracovávány technologií CTP (výstup z počítače v kompozitním .pdf formátu je ripován přímo na ofsetové desky).
Dodržením uvedených pravidel zjednodušíte předtiskovou přípravu svých příspěvků a zajistíte jeho kvalitnější reprodukci.