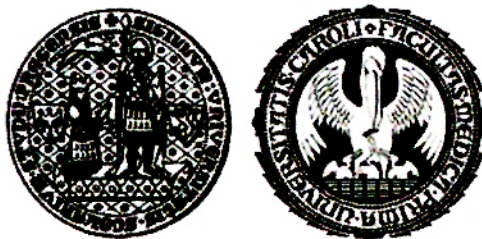


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Stanovení podocytů v moči metodou průtokové cytometrie
u zánětlivých onemocnění ledvin**

**Detection of podocytes in the urine by flow cytometry
in inflammatory renal diseases**

Zpracovala: Bc. Žaneta Bryšková

**studentka II. ročníku navazujícího
magisterského studia**

Obor: Zdravotnická technika a informatika

Vedoucí práce: MUDr. Karin Malíčková

**Klinická imunologie a alergologie –
laboratoř ÚKBLD I.LF UK a VFN v Praze**

Praha, červen 2006

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu literatury.

Praha, červen 2006

Be. Šarada, Boryllová!

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji MUDr. Karin Malíčkové za cenné rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce.

Praha, červen 2006

OBSAH

1. ABSTRAKT.....	6-8
2. CÍL PRÁCE	7
3. ÚVOD.....	7
3.1. ANATOMIE.....	7
3.1.1. Ledviny.....	7-8
3.1.2. Stavba nefronu.....	9
3.1.3. Glomerulus.....	9
3.1.4. Tubulus.....	10
3.2. FYZIOLOGIE.....	11
3.2.1. Funkce ledvin.....	11
3.2.2. Glomerulární filtrace.....	11-12
3.2.3. Močový sediment.....	12-13
3.3. IMUNOLOGIE.....	13
3.3.1. Charakteristika imunitního systému.....	13
3.4. GLOMERULONEFRITIDA.....	13-15
3.5. PODOCYTY.....	15
4. METODIKA.....	16
4.1. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	16-18
4.2. SEPARACE.....	18-19
4.2.1. Separace dle Maška.....	20
4.2.2. Separace systémem OncoQuick.....	21
4.2.3. Separace s filtrací Millipore.....	22
4.3. ODSŤŘEĐOVÁNÍ (centrifugace).....	23
4.4. ZNAČENÍ.....	24
4.4.1. Příprava buněčné suspenze.....	24
4.4.2. Monoklonální protilátky proti podocalyxinu a cytokeratinům.....	24-25
4.4.3. Propidium jodid.....	25

4.5.	PROMÝVÁNÍ.....	26
5.	VÝSLEDKY.....	27
5.1.	SROVNÁNÍ SEPARACÍ.....	27
5.2.	ZNAČENÍ BUNĚČNÝCH JADER PROPIDIUM JODIDEM- VIABILITA BUNĚK.....	28
5.3.	ZDRAVÁ KONTROLA.....	29
5.4.	TYPICKÉ PŘÍKLADY POZITIVNÍHO NÁLEZU PODOCALYXIN – POZITIVNÍCH BUNĚK V MOČOVÉM SEDIMENTU.....	30-31
5.5.	PODOCYTURIE U VYBRANÝCH DIAGNÓZ	32-33
6.	DISKUZE.....	34-35
7.	ZÁVĚR.....	35
8.	LITERATURA.....	36-37
9.	PŘÍLOHY.....	38
9.1.	ZKRATKY.....	38-39
9.2.	OBRÁZKY.....	40
4.2.1.	Stavba nefronu.....	40
4.2.2.	Glomerulus 1	40
4.2.3.	Glomerulus 2.....	41
4.2.4.	Podocyt.....	41
4.2.5.	Průtokový cytometr Facscalibur firmy Becton Dickinson.....	42
4.2.6.	Separace systémem OncoQuick.....	42
4.2.7.	Separace systémem Millipore.....	43
4.2.8.	Fotografie z fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX 51).....	43
4.2.9.	Centrifugace.....	44
4.2.10.	Monoklonální protilátky.....	44

1. ABSTRAKT

Stanovení podocytů v moči metodou průtokové cytometrie u zánětlivých onemocnění ledvin

Úvod: Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující současné měření řady parametrů na velkém množství částic. Již dříve prezentované studie prokázaly, že močové podocyty jsou známkami glomerulárního poškození. Podocyty mají omezenou schopnost buněčného dělení a poškození vede ke snížení jejich počtu. Podocyturie odráží aktivitu a závažnost glomerulárního poškození. Cílem této práce bylo vypracovat metodiku analýzy buněk močového sedimentu pacientů s onemocněními glomerulů na průtokovém cytometru.

Metodika: Průtoková cytometrie je založena na imunofluorescenci nebo na stanovení obsahu buněčné DNA. Při detekci podocytů v moči jsem užívala monoklonální protilátky proti podocalyxinu, značené phycoerythrinem (PE), a proti cytokeratinům, značené fluoresceinizothiocyanatem (FITC). Gate byl stanoven pomocí propidium jodidu, který penetruje pouze buněčnou membránou mrtvých buněk. Hlavním hlediskem byla správná volba separace močového sedimentu. Nejvíce zdařilou metodou se stala separace ultrafiltrací na systému Millipore (ultrafiltry s otvory o průměru 5 μm).

Výsledek: Nejvýznamnějším výsledkem mé práce je vypracování standardní metody separace a značení podocytů pro měření na průtokovém cytometru. Provedla jsem analýzu močových sedimentů u 13 náhodně vybraných pacientů s akutním zánětlivým onemocněním ledvin. Podocyty chyběly u zdravých kontrol. Nejvyšší naměřené hodnoty výskytu podocytů v močovém sedimentu byly 35,43%, 56,49%, 70,44%. U pacienta s naměřenou hodnotou až 40% podocytů v močovém sedimentu došlo po imunosupresivní terapii k poklesu na 16,28%.

Závěr: Byla nalezena vhodná metoda zpracování a separace močového sedimentu s následným značením pomocí monoklonálních protilátek. Eliminována se autofluorescence močového sedimentu. Tato metoda uchovává životaschopnost podocytů. Domnívám se, že je třeba vyzkoušet dvojí značení s použitím druhého specifického znaku podocytů.

2. CÍL PRÁCE

Hlavní cílem diplomové práce bylo vypracování metody detekce podocytů v moči metodou průtokové cytometrie u zánětlivých onemocnění ledvin a určit závislost vylučování podocytů na průběhu onemocnění.

3. ÚVOD

3.1. ANATOMIE

3.1.1. Ledviny

Ledviny očišťují krev od odpadních látek, které předávají do moči. Močí se dostávají z těla ven do vnějšího prostředí organismu. Svou činností udržují stálé složení vnitřní prostředí organismu.

Ledviny jsou párový orgán ve tvaru fazole. Jsou uloženy v tukovém polštáři po obou stranách páteře ve výši 11. torakálního až 3. lumbálního obratle. Na řezu ledvinou rozlišujeme dvě vrstvy: kůru (cortex renis) a dřev (medulla renis). Dřev vyběhá k hilu v ledvinové papily (papillae renales), které jsou obemknuty ledvinovými kalichy

(calyces renales). Ty se otvírají do ledvinové pánvičky (pelvis renalis). Z pánvičky je moč aktivně odváděna močovodem (ureter) do močového měchýře (vesica urinaria). [1]

U dospělého člověka jsou rozměry ledviny následující: podélná osa činí 12 cm, šířka 6 cm a tloušťka 3 cm.

Ledviny mají pružnou a tuhou konzistenci, u dospělého jedince je povrch hladký a je krytý jemným fibrózním pouzdem.

Krev přitéká do ledviny tepnou (arteria renalis), která se ještě před vstupem do ledviny dělí na 2-3 větve. Většinou 2 větve probíhají před pánvičkou a jedna po její zadní straně.

Po vstupu do ledviny se větve dělí na tzv. artérie interlobární, které probíhají mezi jednotlivými pyramidami, a to až k hranici mezi kůrou a dření. Zde se prudce ohýbají a tvoří obloukovité (arkuátní) artérie, které probíhají na bázích pyramid a navzájem se spojují. Z arkuátních artérií odstupují artérie interlobulární. Z nich jdou tzv. přívodné tepénky glomerulů (aférentní arterioly). Glomerulus je tvořen klubíčkem kapilár, které se opět spojují v odvodnou tepénku.

U glomerulů uložených v zevní části kůry se odvodná tepénka rozpadá v síť kapilár, opřádajících stěny tubulů. Z těchto peritubulárních kapilár se sbírají malé žilky, které se postupně spojují ve větší, až nakonec v ledvinou žílu.

U glomerulů poblíž dřeně se eferentní arteriola rozpadá do tenkostěnných kapilár vytvářející trubice tvaru písmene U probíhající ve dření. Glomeruly uložené při hranicích s dření se nazývají juxtamedulární.

3.1.2. Stavba nefronu

Ledvina je tvořena tubuly a glomeruly. Glomerulus s tubulem tvoří nefron. Nefron je základní anatomická a funkční jednotka. Každá ledvina má 1 až 1,25 milionů nefronů. Po narození se tento počet nemění.[obr.9.2.1.]

3.1.3. Glomerulus

Glomerulus je tvořen klubíčkem kapilár, které vzniká rozpadem přívodné tepénky. Kapilární klubíčko je vloženo do pohárkovitého útvaru, tvořeného rozšířením počáteční části kanálku. Tento pohárkovitý útvar se nazývá Bowmanovo pouzdro. Stavba glomerulárního klubíčka je: aferentní arteriola rozpadající se do 4-8 segmentů, z nichž se tvoří 40 kapilárních kliček. Kapiláry se spojují v odvodnou (eferentní) tepénku.

Mikroskopem na stěně glomerulární kapiláry rozlišujeme tři základní vrstvy:

1. na vnitřní straně kapiláry jsou uloženy ploché endoteliální buňky,
2. bazální membrána,
3. epitelové buňky (podocyty), které jsou uloženy na zevní straně bazální membrány. Tyto buňky mají četné výběžky (pedicely), kterými jsou navzájem spojeny.

Prostor mezi glomerulárními kapilárami vyplňuje jemná pojivová tkáň (mezangium). Mezangiální buňky jsou schopné se smršťovat a ovlivňovat velikost plochy glomerulárních kapilár.[obr.9.2.2., 9.2.3.]

3.1.4. Tubulus

Kanálkovitý útvar nefronu je tvořen několika částmi.

Proximální tubulus má vlastní stočenou část a část konečnou, která je přímá. Stěna proximálního tubulu je tvořena jednovrstevným epitelem. Tyto buňky mají na vnitřním povrchu četné výběžky, kterými zvětšuje velikost plochy, kontaktní s tekutinou proudící uvnitř tubulu. Přímá část přechází do Henleovy kličky.

Henleova klička vytváří charakteristickou U trubici, jejichž ohyb je v různé hloubce pyramid. Stavba Henleových klíček je předpokladem činnosti dřevňového protiproudového systému umožňující tvorbu koncentrované moči.

Distální tubulus. Stočená část tohoto tubulu je tvořena jednou vrstvou kubických buněk, které na rozdíl od buněk proximálního tubulu nemají kartáčový lem. Buňky na přechodu tlusté části Henleovy kličky a začátku stočené části distálního tubulu má odlišný vzhled, než buňky sousední. Jeví se hustší. Tento úsek se nazývá macula densa. Macula densa spolu s modifikovanou stěnou (znaky se podobají epiteliálním buňkám) aferentní tepénky vytváří juxtaglomerulární aparát, ve kterém se tvoří renin.

Spojovací segment. Spojovací segment je část tubulu, která spojuje konec distálního tubulu se sběracími kanálky.

Sběrací kanálky se spojují a konečnými částmi ústí na vrcholek papil, kde se definitivní moč dostává do kalíšků a pánvičky.

Moč tvořená ledvinami je transportována pánvičkou a močovodem do močového měchýře, kde je přechodně uskladňována. Dle potřeby je měchýř vyprazdňován a moč opouští organismus močovou trubicí. [4]

3.2. FYZIOLOGIE

3.2.1. Funkce ledvin

1. Vylučování z organismu látky, které jsou produkty metabolismu, a tím zajistit homeostázu vnitřního prostředí.
2. Udržování stálého objemu a složení extracelulární tekutiny z hlediska elektrolytového složení, osmotické koncentrace a acidobazické rovnováhy.
3. Vylučování cizorodých látek, které pronikly do organismu a narušují složení vnitřního prostředí.
4. Funkce metabolicko-endokrinní. Ledvinách se tvoří hormonální látky. Příklad lze uvést tvorbu hormonu erythropoetinu, stimujícího kostní dřeň k tvorbě erytrocytů, či přeměnu provitaminu D na jeho aktivní formu. V ledvinách dále dochází k inaktivaci některých hormonů. Uvést lze metabolickou degradaci inzulinu nebo parathormonu.

Ledviny jsou jeden z nejdůležitějších orgánů umožňujících udržovat homeostázu vnitřního prostředí. Narušení této homeostázy je pro organismus nebezpečné a často neslučitelné se životem.

3.2.2. Glomerulární filtrace

Filtrace v glomerulech je ovlivněna souhrnem řady fyzikálních faktorů a vlastností glomerulární membrány. Aby došlo k filtraci v glomerulech, musí být dostatečně vysoký hydraulický tlak. Velikost tohoto tlaku je ovlivňován stupněm koncentrace aferentní a eferentní arterioly.

Filtrace je dále ovlivňována vlastnostmi glomerulární membrány. Propustnost (permeabilita) této membrány je dána řadou faktorů. Jde o biologickou membránu a její permeabilita závisí na struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech bazální membrány a na vlastnostech jednotlivých buněčných komponent membrány. Množství vytvořeného filtrátu závisí na velikosti plochy filtrační membrány.

Při posuzování permeabilitních vlastností glomerulární membrány je nutno odlišit posuzování její permeability pro vodu a pro molekuly různé velikosti. Za normálních okolností je glomerulární membrána volně propustná pro látky o malé molekule a ionty. Do filtrátu nepřecházejí molekuly bílkovin o velké molekulární hmotnosti. Albuminy pronikají v nepatrné míře. V glomerulárním filtrátu se nacházejí ve větším množství bílkoviny o malé molekulární hmotnosti. Za normálních okolností jsou mikroproteiny v tubulech vstřebávány nazpět.

V průniku molekul hraje roli jejich elektrický náboj. Glomerulární membrána má negativní náboj, a proto molekuly s negativním nábojem jsou odpuzovány.

3.2.3. Močový sediment

Vyšetření močového sedimentu hraje stále důležitou roli. Při hodnocení močového sedimentu se posuzuje přítomnost buněčných elementů (leukocytů, erytrocytů, epiteliálních buněk), válců a krystalů.

Při běžném vyšetřování sedimentu vznikají rozpaky při rozlišování leukocytů a malých epiteliálních buněk. Velké epiteliální jsou obvykle odloupané buňky z povrchových vrstev epitelu močového měchýře.

V moči jsou často identifikovány krystaly. Jejich výskyt závisí na pH moči. Nejčastěji se nacházejí krystaly kalciumoxalátové, urátové a fosfátové. V infikované moči mohou vzniknout v alkalickém prostředí při hydrolyze urey bakteriální ureázou konkrementy struvitové. [4]

3.3. IMUNOLOGIE

3.3.1. Charakteristika imunitního systému

Imunitní systém se v organismu spolu s nervovým a endokrinním systémem podílí na udržení homeostázy organismu.

Základní funkcí je :

- obranyschopnost – rozpoznávání vnějších škodlivin a ochrana organismu proti infekci,
- imunitní dohled – rozpoznání vnitřních škodlivin,
- autotolerance – rozpoznávání vlastní tkáně organismu a udržování tolerance vůči nim.

3.4. GLOMERULONEFRITIDY

Glomerulonefritidy vznikají zpravidla v důsledku aktivace imunologických mechanismů se zánětlivými změnami v glomerulech.

Akutní glomerulonefritida má náhlý začátek, často s rozvojem renální insuficience během několika dnů, obvykle s postupnou úpravou renální funkce během několika týdnů.

Chronické glomerulonefritidy ohrožují obvykle velmi pomalou, ale soustavnou, a často obtížně ovlivnitelnou progresí do chronického selhání ledvin.

Etiologie glomerulonefritid není vždy jasná. Zdrojem antigenu vyvolávajícího imunitní reakci můžou být např. různá infekční agens nebo autoantigeny.

Klinické projevy glomerulopatií mohou být různé. Není vzácností zcela asymptomatický průběh charakterizovaný pouze patologickým nálezem v moči.

U některých nemocných lze v předchorobí zjistit proběhlou respirační infekci nebo tonzilitidu, jejíž etiologický vztah ke glomerulonefritidě je však často nejistý, a může jít o provokující faktor vyvolávající relaps onemocnění nebo může základní laboratorní vyšetření provedené odkrýt již déle probíhající renální onemocnění.

U sekundárních glomerulopatií mohou být přítomny extrarenální projevy onemocnění, např. kožní purpura, recidivující sinusitidy a hemoptýzy, těžká periferní neuropatie, trofické defekty na končetinách, bolesti kloubů, motýlový exantém, polyserositida či známky poškození CNS.

Vedle toho můžeme u nemocných pozorovat akutní nefritický syndrom a nefrotický syndrom.

Akutní nefritický syndrom je charakterizován náhlým vznikem otoků, hypertenze, často i oligurie v důsledku snížené renální funkce s nálezem mikroskopické hematurie a většinou střední proteinurie.

Nefrotický syndrom je soubor příznaků vznikajících v důsledku velké proteinurie. V klinickém obraze dominují otoky, laboratorně velké proteinurie, hypoproteinémie, hypoalbuminémie a hyperlipidémie.

Glomerulonefritidy jsou jednou z nejčastějších příčin chronického selhání ledvin. Jejich třídění je založeno na nálezů v ledvinové biopsii, které zahrnuje čtyři základní formy: proliferativní s řadou podtypů,

membranózní, nefrotický syndrom s minimálními změnami a fokálně-segmentární glomerulosklerózu. Prognóza glomerulonefritid je dána nejen změnami glomerulů, ale zejména stupněm intersticiální sklerózy, tubulární atrofie a arteriosklerózy. Pro úspěšnost léčby je velmi důležitá včasná diagnóza, která se opírá o klinický obraz a laboratorní vyšetření včetně močového nálezu. Možnou známkou glomerulonefritidy je přítomnost podocytů v močovém sedimentu.

3.5. PODOCYTY

Podocyty jsou vysoce specializované epitelální buňky lemující povrch glomerulu. Jsou částí filtrační bariéry spolu s endoteliálními buňkami kapilár a bazální membrány glomerulu (glomerular basal membrane, GBM). Zabezpečují selektivní permeabilitu stěny glomerulárních kapilár.

Mají objemné buněčné tělo, které ústí do močového prostoru a obepíná kapiláry glomerulů. Mezi výběžky jsou přemostěné filtrační štěrby. Filtrační štěrby jsou místa, kudy protéká tekutina skrz vnitřní epitelium a jejich konstantní šířka je 30-40 nm.

Podocyty mají omezenou schopnost buněčného dělení, poškození vede ke snížení jejich počtu, zvýšené propustnosti glomerulární kapilární stěny a k vývoji glomerulosklerózy v úsecích bazální membrány, které nejsou kryty podocyty. Odloupané podocyty jsou poté nalezeny v moči. Do moči se uvolňují nejen poškozené, ale i živé podocyty.

Podocyturie odráží aktivitu a závažnost glomerulárního poškození.[obr.9.2.4.]

4. METODIKA

4.1. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie je laboratorní metoda umožňující současné měření řady parametrů na velkém množství částic. Využívá se v mnoha vědeckých disciplínách. Parametrem průtokové cytometrie může být fyzikální nebo chemická vlastnost buňky (granularita, velikost, životnost a další) a vše, co můžeme označit monoklonální protilátkou (povrchové molekuly, intracelulární molekuly apod.).

Nejčastěji měřeným parametrem je rozptyl světla v malém úhlu (přímo úměrný velikosti buněk), rozptyl světla v 90° úhlu (ovlivněn hlavně granularitou částic) a fluorescence různé vlnové délky.

Buňky obarvené různými fluorochromy jsou unášeny laminárním proudem nosné buňky v izotonickém roztoku tryskou do silnější kapiláry, kterou proudí tekutina. Toto usměrní buňky do tenkého proudu, postupují jedna za druhou průtokovou komůrkou a v ní protínají světelný paprsek. Tento jev se nazývá hydrodynamická fokusace.

Světlo vznikající interakcí buněk usměrněných hydrodynamickou fokusací při průchodu paprskem laseru je rozděleno systémem hranolů, optických filtrů a zrcadel podle vlnové délky emitované fluorescence. Základními prvky optické soustavy jsou filtry.

Logaritmická transformace, její výhodou je zvýšení senzitivity u fluorescencí o nižší intenzitě a větší šíře rozsahu detekce fluorescence. Lineární zesílení měří přesněji menší rozdíly ve vazbě fluorochromů. Zpravidla se měří plocha elektrického signálu. Používají se i další možnosti zpracování signálu, jako měření jeho šíře nebo výšky, které se využívá v odlišení agregátů buněk od buněk se zvýšeným obsahem DNA. Signály jsou zpracovávány počítačem.

Počítačové zpracování naměřených dat umožňuje získávat údaje o subpopulacích buněk charakterizovaných na základě jiných znaků, tzv. gatování.

Výstupem měření jsou výsledky v grafické a číselné podobě. U grafického zobrazení se používají jak jednoparametrové histogramy, kde na ose x je znázorněna intenzita signálu a na ose y množství buněk tak histogramy dvouparametrové.

U dvouparametrových histogramů je na ose x vynesena intenzita jednoho a na ose y druhého signálu. Množství buněk je znázorněno hustotou bodů nebo čarami, které připomínají vrstevnice na mapě.

Oproti fluorescenční mikroskopii umožňuje průtoková cytometrie vyšetřit více buněk, je rychlejší a spotřeba biologického materiálu i reagentů je podstatně menší. Průtokovou cytometrií je možné provádět současné značení více fluorochromy a detekovat najednou více znaků, prokázat i velmi řídké se vyskytující populace.

Průtoková cytometrie je proces při kterém se analyzují jednotlivé buňky.

V průtokové cytometrii se měří:

- čelní rozptyl světla, FSC
- boční rozptyl světla, SSC
- intenzita fluorescence emitované aplikovanými fluorescenčními probami
- tvar a čas trvání světelného pulsu (rozptylu světla, fluorescence)

Nejčastěji měřené parametry průtokové cytometrie:

- velikost
- granularita
- povrchové a CD znaky

- intracelulární cytokiny
- pH, intracelulární vápník, hořčík
- enzymatická aktivita
- viabilita
- nukleová kyseliny (obsah DNA, RNA, ploidie)
- membránový potenciál

Analýza dat.

Zobrazením dat naměřených na průtokovém cytometru jsou grafy.

Nejčastěji se používají

- histogramy
- dvojrozměrné dot-plot diagramy a jejich deriváty
- contour ploty
- density ploty
- pseudocolor ploty
- zebra ploty [3]

[obr.9.2.5.]

4.2. SEPARACE

Ústředním problémem práce byla správná volba separace buněk močového sedimentu.

Zpočátku jsem při zpracování ranní moče postupovala dle Návodu na morfologické vyšetření moče (sazebník výkonů VZP 50045,

odb.801) s určitými drobnými modifikacemi. Problémem této metody (dále v textu označené jako *klasická separace dle Maška* podle autora výše uvedeného metodického postupu VZP) bylo nedokonalé oddělení buněk sedimentu od jiných (nebuněčných) součástí, které vykazovaly značnou autofluorescenci interferující s fluorochromem značenými buňkami, dalším problémem byla zřejmě nespecifická vazba použitých protilátek na proteiny v močích nemocných s proteinurií. Pro velkou přítomnost drtě, krystalů, hlenu, bakterií a jiné nežádoucí příměsi byl obraz získaného sedimentu velmi nepřehledný.

Abych omezila vliv výše uvedených faktorů, pokusila jsem se o specifitější separaci sedimentu. Zkusila jsme použít separační zkumavky OncoQuick, primárně určené ke gradientové separaci buněk epiteliálního původu (buněk metastazujících solidních tumorů) z periferní krve. Vycházela jsem z toho, že i podocyt je buňka epiteliálního původu a že výsledkem této separace moči by mohla být buněčná suspenze obsahující pouze epiteliální buňky. Tato separace byla úspěšná: získané buňky měly na průtokovém cytometru poměrně homogenní granularitu, byly různě velké a nespecifická izotypová kontrola byla uspokojivá. Tento způsob separace byl uživatelsky velmi příjemný a výstup z něj dobrý, obtížně překonatelným problémem je však cena jedné separační zkumavky – cca 1700 Kč na 1 vzorek.

To byl důvod pro hledání cenově přijatelnějšího způsobu „vyčištění“ sedimentu. Řešení jsem našla v ultrafiltrech firmy Millipore. Zvolila jsem filtr Millipore Ultrafree-CL s membránou Durapore® o velikosti pórů 5 µm. Póry této velikosti propustí většinu krystalů, bílkovin, hlenu a další nežádoucí příměsi, ponechají však ve zkumavce všechny buněčné elementy. Výstup z měření značených buněk takto připravené buněčné suspenze byl přijatelný pro další hodnocení a významně se nelišil od systému OncoQuick. Vzhledem k uspokojivé ceně (cca 70 Kč za jeden filtr) jsem dále pokračovala pouze tímto způsobem separace.

4.2.1. Separace dle Maška

Příprava močového sedimentu

1. - pacient 2. - zdravá kontrola

moče před přípravou zchladit – ponechat 20 min při 4°C

1. 50 ml zkumavku s močí stočit při 2000 rpm.
2. Aspirovat supernatant pomocí pipety, na dně 50 ml zkumavky ponechat buněčný sediment s tekutinou o objemu cca 1 ml.
3. Do stříkačky natáhnout 9 ml PBS o teplotě 4°C, omýt stěny zkumavky s močí a cca 10 ml buněčné suspenze přetáhnout do 10 ml plastové zkumavky s modrým víčkem.
4. Centrifugovat 5 min při 200 rpm.
5. Aspirovat supernatant pomocí pipety. Na dně 10 ml plastové zkumavky ponechat cca 1 ml buněčné suspenze.
6. Do stříkačky natáhnout 9 ml PBS o teplotě 4°C a omýt stěny zkumavky.
7. Centrifugovat 5 min při 2000 rpm.
8. Aspirovat supernatant pomocí pipety. Na dně plastové zkumavky ponechat cca 0,2-0,5 ml buněčné suspenze.

Nyní je možné přistoupit ke značení.

4.2.2. Separace systémem OncoQuick

Příprava močového sedimentu

1. - pacient 2. - zdravá kontrola

moče před přípravou zchladit – ponechat 20 min při 4°C

1. Opatrně přemístit 50 ml moče do horního kompartmentu zkumavky OncoQuick.
2. Centrifugovat po dobu 20 min rychlostí 1500 rpm. Po ukončení centrifugace se případné buňky epiteliálního původu (např. podocyty) nacházejí těsně nad modrým separačním médiem. Tato vrstva buněk obvykle není okem viditelná.
3. Opatrně odsát jehlou a stříkačkou nebo pipetou cca 45 ml tekutiny z horní části kompartmentu nad separačním médiem. Zbytek moče (asi 5 ml) nad separačním médiem odsát sterilní jehlou a přemístit do nových centrifugačních zkumavek o objemu 10 ml.
4. Vymýt stěny zkumavky OncoQuick a povrch modrého separačního média cca 5 ml promývacího roztoku. Přemístit do centrifugační zkumavky s 5 ml stočené moči.
5. Zlehka promíchat.
6. Centrifugovat 5 minut při 1000 rpm.
7. Nasát pomocí pipety 9 ml supernatantu a odstranit jej. V centrifugační zkumavce na dně zůstanou buňky v cca 1 ml roztoku.
8. Resuspendovat a doplnit promývacím roztokem do celkového objemu 10 ml, poté promíchat.
9. Centrifugovat 5 minut při 1000 rpm.
10. Odstranit supernatant tak, aby se neporušila buněčná vrstva na dně zkumavky.

Nyní je možné přistoupit ke značení.[obr.9.2.6.]

4.2.3. Separace s filtrací Millipore

Příprava močového sedimentu

1. - pacient 2. - zdravá kontrola

moče před přípravou zchladit – ponechat 20 min při 4°C

1. 50 ml zkumavku s močí stočit 20 min při 1500 rpm.
2. Aspirace supernatantu pomocí pipety, na dně 50 ml zkumavky ponechat buněčný sediment s tekutinou o objemu cca 2 ml.
3. Buněčný sediment přemístit do horního kompartmentu filtrační zkumavky Millipore.
4. Centrifugovat 5 minut při 1000 rpm. Přemístit tekutinu do dolního kompartmentu centrifugační zkumavky, na filtru a nad filtrem v horní části zůstanou pouze buňky.
5. Odstranit tekutinu tak, aby nedošlo k poškození filtru.
6. Vyjmout filtr a vložit do kádinky.
7. Do stříkačky o objemu 10 ml nasát předchlazený promývací roztok a vymýt stěny a povrch filtru. Poté filtr vymýt promývacím roztokem v kádince (5x vyjmout a vložit).
8. Přelit do centrifugační zkumavky o objemu 10 ml s modrým víčkem.
9. Centrifugovat 10 minut při 1000 rpm.
10. Odstranit supernatant tak, aby se neporušila buněčná vrstva na dně zkumavky.

Nyní je možné přistoupit ke značení.

[obr.9.2.7.]

4.3. Odstředování (centrifugace)

Centrifugace je jednoduchá základní laboratorní metoda sloužící zejména k oddělování pevných částic z roztoku. Přirozená sedimentace pevných částic způsobená gravitací je urychlena použitím odstředivky (centrifugy), ve které se zkumavky pohybují v tzv. rotoru po kruhové dráze. Působí tak na ně odstředivá síla, která je tím větší, čím větší rychlostí a po delší dráze se zkumavky pohybují. Tato síla tedy závisí na poloměru rotoru a na rychlosti, se kterou se rotor otáčí. Odstředivá síla se vyjadřuje v jednotkách g , které vyjadřují, kolikrát se při odstředování znásobí hmotnost částic.

Centrifugy s tzv. výkyvnými rotory umožňují vychýlení nosiče zkumavek podle intenzity odstředivé síly až do horizontální roviny, podobně, jako se při zvyšujících se otáčkách vychylují sedátka řetězového kolotoče. Výhodou je, že odstředivá síla pak působí kolmo ke dnu zkumavky, nevýhodou je omezená mechanická odolnost kloubů, ve kterých dochází k vychýlení nosiče zkumavek, takže lze dosáhnout obvykle odstředivé síly jen kolem 5000 g . Takové odstředování je vhodné především pro sedimentaci buněk a jiných větších a těžších částic.

Běžné laboratorní centrifugy s pevnými tzv. úhlovými rotory dosahují odstředivé síly mezi 10-30 000 g , která zcela postačuje pro rychlou sedimentaci např. sražených molekul DNA. Odstředivá síla v nich působí šikmo, takže i sediment na dně zkumavky je po centrifugaci zešikmený.

Pro speciální techniky se používají ultracentrifugy, dosahující odstředivé síly až kolem 80 000 g .

[obr.9.2.9.]

4.4. ZNAČENÍ

4.4.1. Příprava

1. pacient – vzorek bez monoklonálních protilátekv této zkumavce nebude žádná protilátka.
2. zdravý – vzorek bez monoklonálních protilátekv této zkumavce nebude žádná protilátka.
3. pacient – kontrola (2PPK)v této zkumavce bude po 10 ul nespecifické kontroly – myší IgG1/IgG2a-FITC/PE.
4. zdravý – kontrola (2PPK)v této zkumavce bude po 10 ul nespecifické kontroly – myší IgG1/IgG2a-FITC/PE.
5. pacient – značení podocytů anti-podocalyxinem PE a anti-cytokeratinem FITC.....přidat po 10 ul anti- podocalyxin PE a anti- pancytokeratin FITC.
6. zdravý – značení podocytů anti-podocalyxinem PE a anti-cytokeratinem FITC.....přidat po 10 ul anti- podocalyxin PE a anti- pancytokeratin FITC.

4.4.2. Monoklonální protilátky proti podocalyxinu a cytokeratinům

Jak již bylo zmíněno, k průkazu buněčných antigenů na průtokovém cytometru slouží monoklonální protilátky konjugované s fluorochromem či nekonjugované protilátky, kdy je k detekci používána další (značená) protilátka proti protilátce.

Ke značení podocytů jsme používali monoklonální protilátku proti podocalyxinu značenou phycoerytrinem (anti-podocalyxin PE). Podocalyxin je hlavní sialoprotein podocytů, nachází se na membráně diferencovaných podocytů, má cytoplazmatickou doménu (která se váže

na cytoskelet podocyty) a ektodoménu, proti které je namířena použitá protilátka. Používala jsem monoklonální protilátku firmy R&D Systems, jde o produkt hybridomu vzniklého fúzí myších myelomových buněk a B-lymfocytů myši imunizovaných purifikovaným rekombinantním lidským podocalyxinem, přesněji jeho extracelulární doménou. Jak vyplývá z výše uvedeného, jde o konjugovanou monoklonální protilátku s fluorochromem PE.

Jako druhý znak jsem zvolila molekuly cytokeratinů 6,8,18 a 19 a monoklonální protilátku proti těmto cytokeratinovým molekulám značenou FITC (výrobce DAKO Cytomation). Imunogenem při výrobě této monoklonální protilátky je buněčná linie epidermálního karcinomu A431, protilátka specificky reaguje s buňkami epiteliálního původu. Úmyslem bylo odlišit případné podocyty od ne-epiteliálních buněk v sedimentu.

4.4.3. Propidium jodid

Propidium jodid je interkalární barvivo, které neprochází neporušenými membránami živých buněk, pokud mají buňky cytoplazmatickou membránu porušenu, barvivo volně proudí do buněk. Má vysokou afinitu k nukleovým kyselinám a po vazbě cca 40x větší fluorescenci. Toho se využívá právě ke značení mrtvých buněk, které po excitaci UV zářením svítí intenzivně červeně.

Odběr, transport a následné zpracování vzorku moči vede k odumření menší části buněk. Počítačovou analýzou po značení monoklonálními protilátkami následně procházely pouze buňky živé, definované v PI gate.

[obr.9.2.10.]

4.5. PROMÝVÁNÍ

K promývání buněk se používá roztok PBS, který se připravuje z následujících komponent:

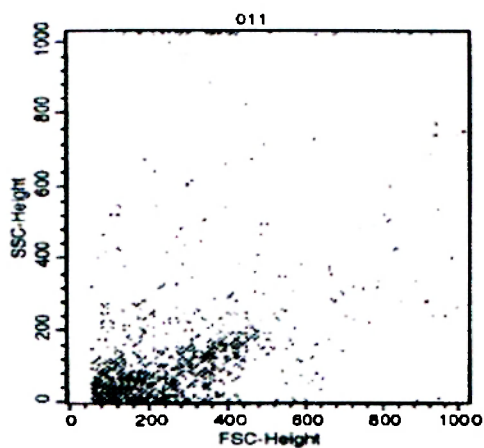
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 2,16 g Na₂HPO₄
- 0,2 g KH₂PO₄

ad 1000 ml destilované vody, pH upravíme na 7,2 – 7,4. [3]

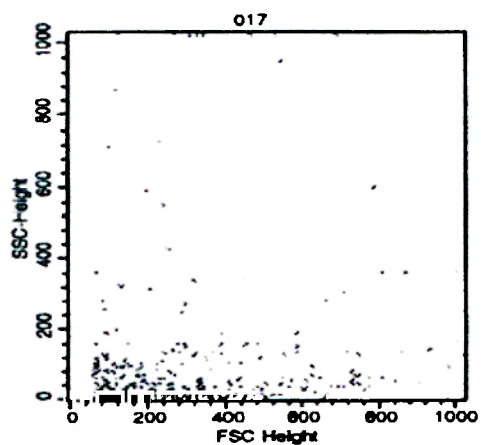
5. VÝSLEDKY

5.1. SROVNÁNÍ SEPARACÍ

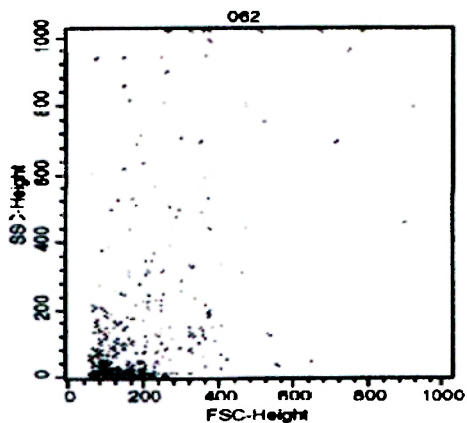
Dvourozměrné grafy, ve kterých je každá buňka zobrazena jako tečka. Na ose X je uvedena velikost buněk a na ose Y granularita buněk. Nahoře se nachází separace dle Maška, uprostřed systémem OncoQuick a dole ultrafiltrace Millipore.



ZPRACOVÁNÍ
MOČOVÉHO SEDIMENTU
- KLASICKÁ
SEPARACE DLE MAŠKA



ZPRACOVÁNÍ
MOČOVÉHO SEDIMENTU
- ONCOQUICK



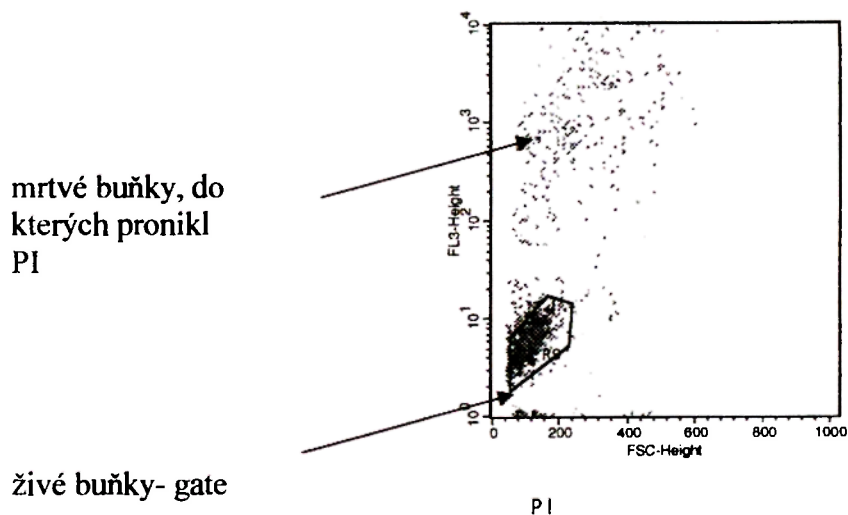
ZPRACOVÁNÍ
MOČOVÉHO SEDIMENTU
- MILLIPORE

5.2. ZNAČENÍ BUNĚČNÝCH JADER PROPIDIUM JODIDEM – VIABILITA BUNĚK

Gatování buněk určených k analýze provádíme pomocí značení jader propidium jodidem.

Propidium jodid je interkalární barvivo, které neprochází neporušenými membránami živých buněk. Pokud mají buňky cytoplazmatickou membránu porušenu, barvivo volně proudí do buněk. Má vysokou afinitu k nukleovým kyselinám a po vazbě cca 40x větší fluorescenci. Toho se využívá ke značení mrtvých buněk, které po excitaci svítí intenzivně červeně.

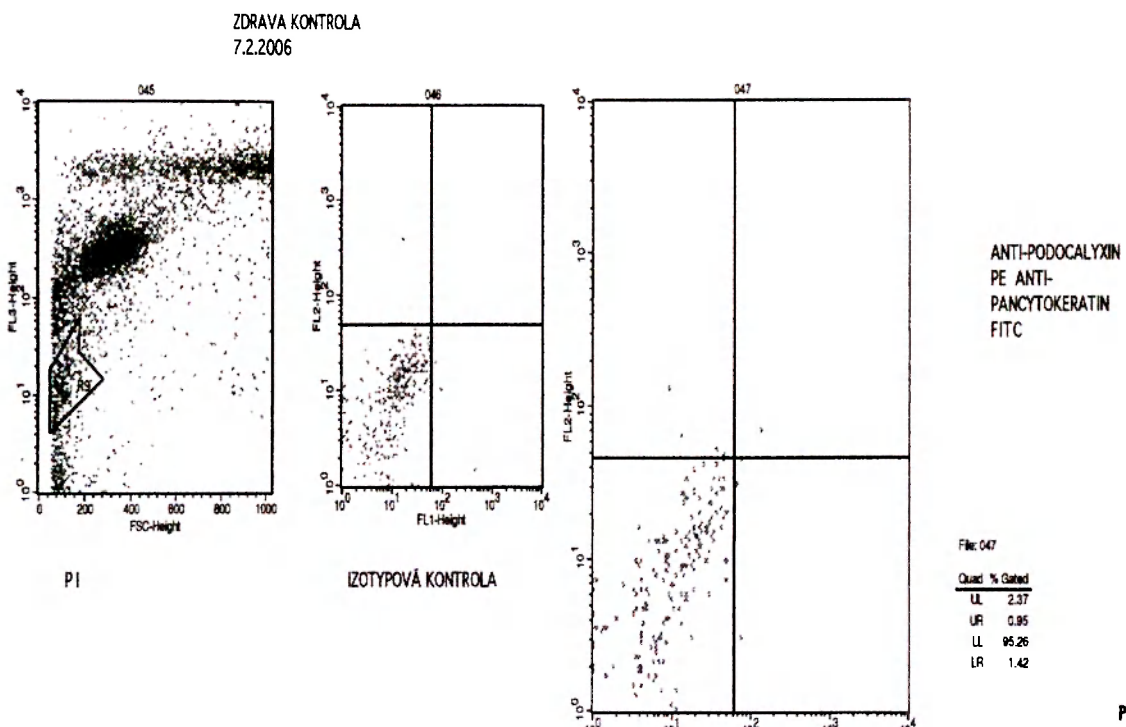
Odběr, transport a následné zpracování vzorku moči vede k odumření menší části buněk. Počítačovou analýzou po značení monoklonálními protilátkami následně procházely pouze buňky živé, definované v PI gate.



5.3. ZDRAVÁ KONTROLA

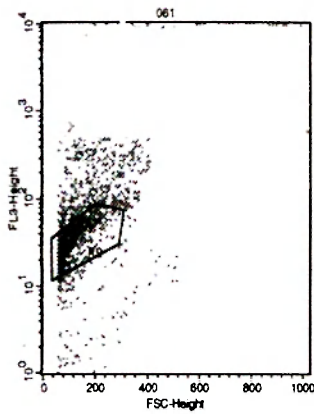
Na níže uvedených obrázcích jsou graficky znázorněny výsledky vyšetření:

1. první graf ukazuje gatování pomocí PI,
2. druhý graf nescifickou izotypovou kontrolu (myší protilátky IgG1 FITC/ IgG2 PE, kontrola ukazuje množství vazeb monoklonální protilátky, které nesouvisejí s našimi cílovými antigeny, tato neimunologická vazba může být způsobena např. Fc receptory na buňkách),
3. ve třetím grafu jsou na ose X anti-pancytokeratin FITC negativní/pozitivní buňky a na ose Y anti-podocalyxin PE negativní/pozitivní buňky. Double-positivní buňky v pravém horním kvadrantu by měly být podocyty.

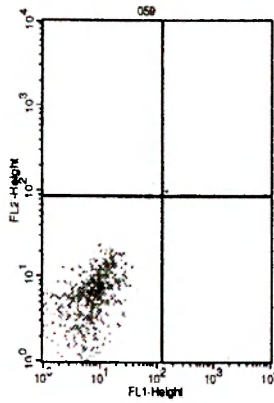


5.4. TYPICKÉ PŘÍKLADY POZITIVNÍHO NÁLEZU PODOCALYXIN – POZITIVNÍCH BUNĚK V MOČOVÉM SEDIMENTU

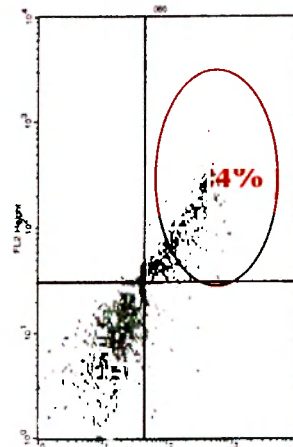
BRODSKY
28.2.2006



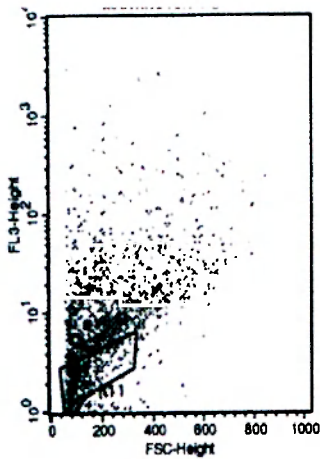
PI



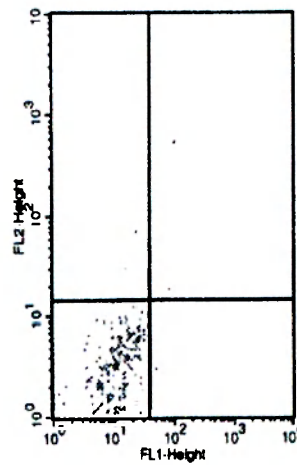
IZOTYPOVÁ KONTROLA



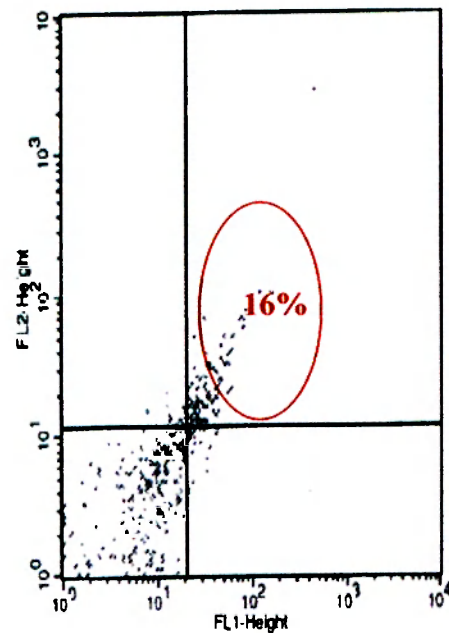
Page 1

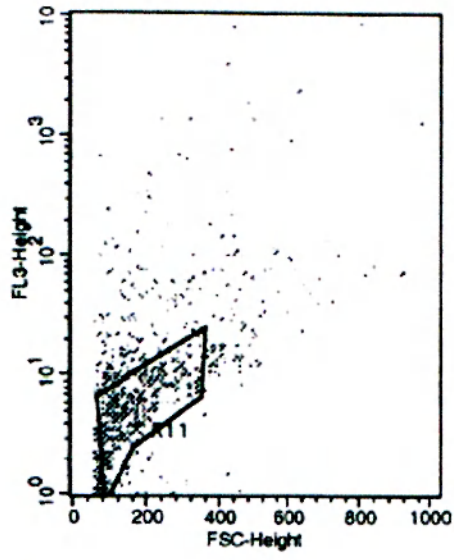


PI

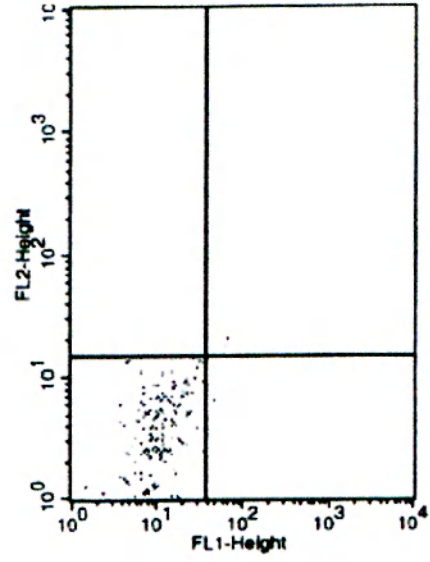


IZOTYP. K.

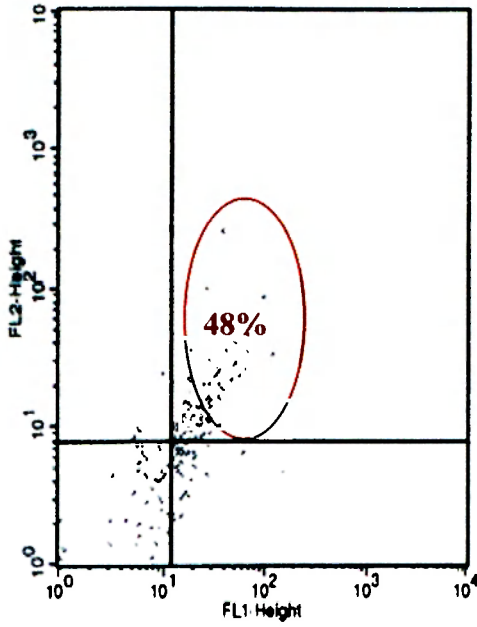




PI



IZOTYP. K.



Quad	% Gated
UL	2.86
UR	48.00
LL	31.43
LR	17.71

PODOCALYXIN

5.5. PODOCYTURIE U VYBRANÝCH DIAGNÓZ

	PACIENT	DIAGNOZA
1.	p. B.	nefrotický syndrom na podkladě FSGS – 1. projevy 11/05 RB 25.1.06
2.	p. V.	srpkovitá IgA nefropatie – 1. projevy – hematurie 1999, 2000 ASL postrenální et. 23/3/06
3.	p. R.	nefrotický syndrom na podkladě MCD/FSGS – dg 6/93 -refrakterní na terapii (CyA,MMF), kortikodependentní, stp embolizaci 1. ledviny 2/06 28/2/06
4.	p. D.	IgA nefropatie –dg 3/06
5.	p. H.	membranózní nefropatie – 3/06, anamnéza RA, stp. terapii MTX
6.	p. F.	IgA nefropatie 3/06 29/3/06
7.	p. Br.	IgA nefropatie + hypertenzní nefropatie, RB 2/06 29/3/06
8.	p. K.	nefrotický syndrom na podkladě FSGS – RB 1998 – IgM, dříve CyA 31/1/06
9.	p. P.T.	lupoidní nefritida dg 2004, RB 1/06
10.	p. W.	FSGS – RB 3/06 – mikrohematurie od mládí (teratom ledviny) 7/3/06

	PACIENT	KREA	PÚ g/den	ALB	MIKRO- HEMAT.	TERAPIE	POD O- CYT Y
1.	p. B.	223	8,28	16	25	vysoké dávky kortikoidů (70mg)	24%
		114	6,03	12	-		14%
2.	p. V.	170	7,62	39	250	bez IsU terapie – ACEi + sartany již před vyš.	7%
3.	p. R.	179	12,0 3	12	-	15mg Prednisonu/ den	1%
4.	p. D.	89	7,7	37	-	bez terapie	56%
5.	p. H.	70	1,11 (i 10)	28	50	bez terapie	35%
6.	p. F.	96	0,25	41	150	bez terapie	70%
7.	p. Br.	368	4,96	-	250	Prednison 60mg 1 měsíc	0%
8.	p. K.	79	5	-	-	CyA do 23.1, dále rapamycin, 10mg Prednisonu	1%
9.	p. P.T.	79	3,04	23	+	stp 3 pulsech CFA + Medrol 12mg	27%
10.	p. W.	88	1,97	36	250	bez terapie	0%

6. DISKUZE

Úvodem chci zmínit velkou důležitost preanalytické fáze každého laboratorního stanovení. I v této práci byla důležitým bodem standardizace postupů odběru vzorků, jejich transportu a následného zpracování. Odběr moče byl *lege artis* pokud:

1. Je zajištěn noční klid pacienta.
2. Po probuzení pacient provede hygienickou očistu genitálu.
3. Odebere se střední proud první ranní moče

Zdravotnický personál takto odebranou moč uloží do chladicího boxu o teplotě 4°C. Vzorek moče se dopraví do jedné hodiny po odběru do laboratoře. Dlouhým stáním by se v moči pomnožili bakterie, které štěpí ureu na amoniak, a v takto vzniklém alkalickém prostředí se všechny elementy rychle rozpadají.

Zpracování v laboratoři je další důležitý bod. V laboratoři pracujeme zcela asepticky. Moč neponecháváme dlouho stát v teple. Separace probíhá dle metodického postupu. Používáme jednorázové pomůcky a předem zchlazený promývací roztok a monoklonální protilátky. Nepracujeme rychle na úkor kvality, ale s rozvahou, aby se případné podocyty „nerozbily“ či nevyplavily.

Pro správné nastavení cytometru neboli kalibraci přístroje se užívá speciálních mikrokuliček nesoucích na svém povrchu různé fluorochromy. Během procesu kalibrace dochází jednak k optimalizaci signálu parametrů lomu a rozptylu světla a jednak kompenzaci jednotlivých fluorochromů. Řada fluorochromů užívaných v průtokové cytometrii se totiž ve svých emisních spektrech do určité míry překrývá. Pomocí speciálního nastavení optických filtrů lze a je zapotřebí vzájemný překryv těchto signálů výrazně eliminovat.

V budoucnosti je třeba uvážit značení podocytů druhým podocyt-specifickým znakem, což by mělo přispět k lepší definici cílové

populace. Budeme zkoušet anti-WT1, komerčně je dostupná pouze nekonjugovaná monoklonální protilátka.

Předmětem diskuse by mohl být i způsob vyjadřování výsledků, tj. přepočet relativního zastoupení podocytů v sedimentu na jiný parametr, např. koncentraci kreatininu v moči.

V současné době probíhá vyšetřování podocyturie u zdravých lidí s cílem vytvoření referenčních hodnot.

7. ZÁVĚR

Nalezli jsme vhodnou metodu zpracování a separace močového sedimentu s následným značením pomocí monoklonálních protilátek proti podocyt-specifickým znakům. Zdařilá je separace podocytů systémem Millipore. Eliminovali jsme autofluorescenci močového sedimentu.[obr.9.2.8.]

Naše metoda uchovává životaschopnost podocytů. Domníváme se, že je třeba vyzkoušet dvojí značení s použitím druhého specifického znaku podocytů.

Značení podocytů druhým podocyt - specifickým znakem, což by mělo přispět k lepší definici cílové populace.

Míra podocyturie je úměrná závažnosti a průběhu onemocnění.

8. LITERATURA

- [1] Trojan S. TĚLOVĚDA. Grada Publishing, 1997, 6.vydání
- [2] Schuck O., Tesař V., Teplan V., a kol.. KLINICKÁ NEFROLOGIE. Medprint, 1995
- [3] Eckschlager T., a kol. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE V KLINICKÉ PRAXI. Grada Publishing, 1999, 1. vydání
- [4] Teplan V. PRAKTICKÁ NEFROLOGIE. Grada Publishing, 1998, 1. vydání
- [5] Human Glomerulonephritis Accompanied by Active Cellular Infiltrates Shows Effector T Cells in Urine, Journal of the American Society of Nephrology, J Am Soc Nephrol 12: 2636–2644, 2001
- [6] Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease, Am J Physiol Renal Physiol 285: F40–F48, 2003. First published March 11, 2003
- [7] Microscopic Urinalysis and Automated Flow Cytometry in a Nephrology Laboratory, Clinical Chemistry 49, No. 9, 2003
- [8] Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface, Journal of Cell Science 117, 3281-3294 Published by The Company of Biologists 2004
- [9] Podocyturie může být pro posouzení závažnosti glomerulárního poškození specifitější než proteinurie, Yu D, Petermann A, Kunter U, et al. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. J Am Soc Nephrol 2005;16:1733–1741. KOMENTÁŘ Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.
- [10] Preservation of Urine for Flow Cytometric and Visual Microscopic Trstiny, Clinical Chemistry 48, No. 6, 2002
- [11] Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface, Nephrol Dial Transplant (2000) 15: 1379 -1383
- [12] Enhanced podocalyxin expression alters the structure

- of podocyte basal surface, Nephrol Dial Transplant (2000) 17: 798 – 802
- [13] Monoclonal Anti-human Podocalyxin antibody, R&D Systems, Inc.,
1-800-343-7475, 9/24/04
- [14] Monoclonal Anti-human Podocalyxin (PODXL)-Phycoerythrin,
R&D Systems, Inc. 1-800-343-7475, 10/04

9. PŘÍLOHY

9.1. POUŽITÉ ZKRATKY

% - procenta

°C - stupeň Celsia

µg - mikrogram

µm - mikrometr

5x - pětkrát

ALB - albuminurie

cca - circa

CNS - centrální nervový systém

DNA - deoxyribonukleová kyselina

FSC - forward scatter (přímý rozptyl)

g - gram

kDa - kilodalton

Kol. - kolektiv

M - mol

Mg- miligram

MIKROHEMAT. - mikrohematurie

Min - minuta

ml - mililitr

např. - například

nm - nanometr

obr. - obrázek v příloze

p. - pacient

PBS - 0,01 M fosfátový fyziologický roztok, pH 7,4

pH - záporný dekadický logaritmus vodíkových (oxoniových) kationtů

PÚ - proteinurie

RNA - ribonukleová kyselina

rpm - (rounds per minute) - vyvažovací otáčky

SSC - side scatter (boční rozptyl)

tzv - takzvaný

UV - ultrafialové záření

Vyš. - vyšetření

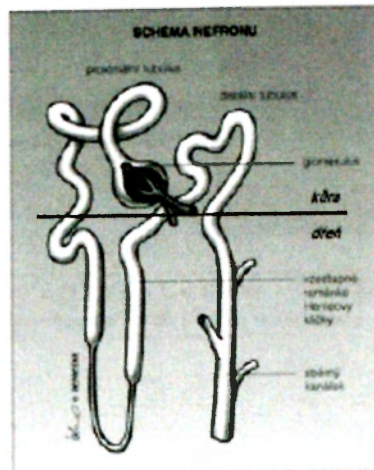
9.2. OBRÁZKY

9.2.1. STAVBA NEFRONU

Stavba nefronu

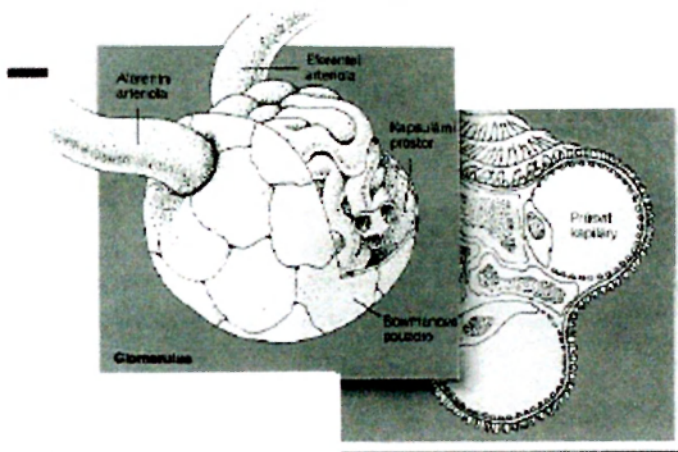
= funkční jednotka ledviny,
ledvina člověka cca 10^6

- Glomerulus (filtrace)
- Proximální tubulus (resorpce)
- Henleova smyčka (koncentrace)
- Distální tubulus (sekrece)
- Sběrný kanálek (resorpce vody)

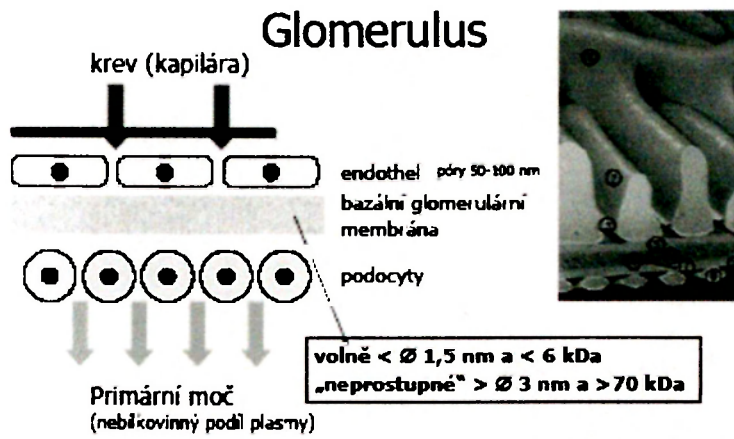


9.2.2. GLOMERULUS 1

Glomerulus



9.2.3. GLOMERULUS 2



9.2.4. PODOCYT

Glomerulární membrána

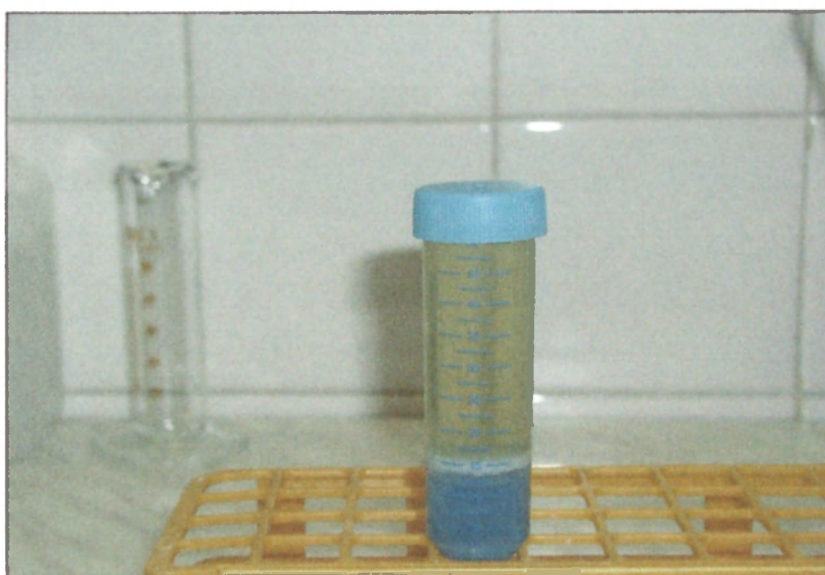


- permeabilita: propouští molekuly $M_r < 70\ 000$
- selektivita: nepropouští negativně nabitě molekuly

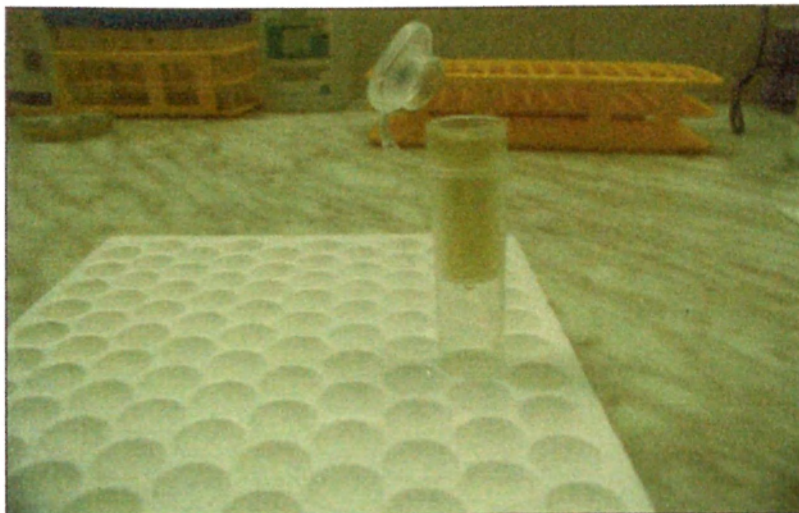
9.2.5. PRŮTOKOVÝ CYTOMETR FACSCALIBUR FIRMY BECTON DICKINSON



9.2.6. SEPARACE SYSTÉMEM ONCOQUICK

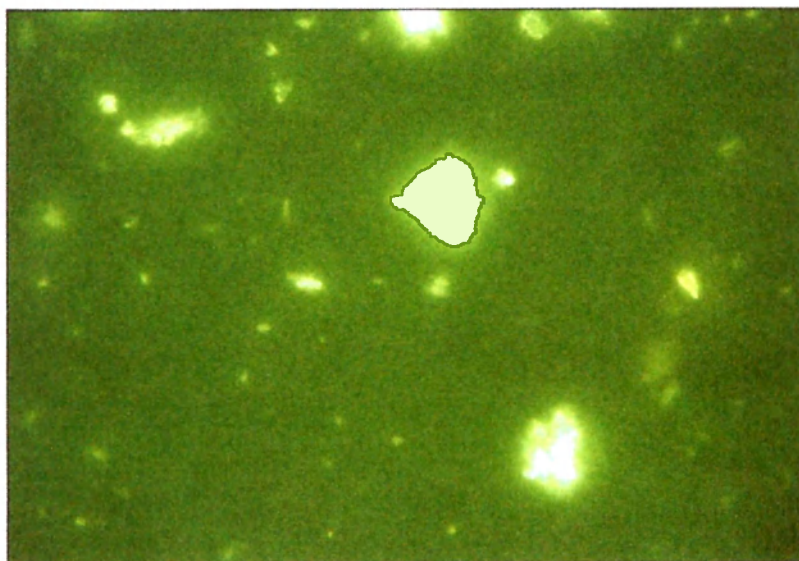


9.2.7. SEPARACE SYSTÉMEM MILLIPORE



9.2.8. FOTOGRAFIE Z FLUORESCENČNÍHO MIKROSKOPU (OLYMPUS BX 51)

Močový sediment připravený klasičnou separací dle Maška. Pod mikroskopem patrné močové krystaly vykazují značnou fluorescenci.



9.2.9. CENTRIFUGACE



9.2.10. MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

