

OPTIMALIZÁCIA PRÍPRAVY VZORIEK ONKOLOGICKÝCH PACIENTOV NA PROTEOMICKÚ ANALÝZU SUBPOPULÁCII MONONUKLEÁRNYCH LEUKOCYTOV

M. Šulíková¹, M. Kacířová², M. Marcin¹, M. Menkyna¹, D. Tóth³, M. Lenárt⁴, J. Sabo¹

¹ Ústav lekárskej a klinickej biofyziky, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, SR

² CKPV Medipark, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, SR

³ Gynekologicko-pôrodná klinika, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, SR

⁴ 1. chirurgická klinika, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, SR

Úvod

Analýza zloženia krvi poskytuje relevantné informácie o metabolickom a imunologickom stave ľudského organizmu. Medzi krvné bunky radíme aj mononukleárne leukocyty, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v imunitnom systéme. Pod túto skupinu buniek patria aj cytotoxické T-lymfocyty s CD8⁺ znakom, pomocné T-lymfocyty s CD4⁺ znakom, monocyty s CD14⁺ znakom a B-lymfocyty s CD19⁺ znakom. Zamerali sme sa na analýzu týchto subpopulácií mononukleárnych leukocytov. Cytotoxické T-lymfocyty chránia organizmus pred rozvojom vírusových infekcií a nádorov. Pomocné T-lymfocyty sú dôležitými koordinátormi pre antigénovú špecifickú imunitu a súčasne uľahčujú aktiváciu B-lymfocytov a cytotoxických T-lymfocytov. Monocyty sú súčasťou nešpecifickej imunity a sú schopné fagocytózy. B-lymfocyty sú súčasťou humorálnej imunity. Proteomická analýza týchto buniek môže zohrávať kľúčovú rolu pri zisťovaní zmien, ktoré nastávajú v základných stavebných jednotkách organizmu pri patologických stavoch [1, 2].

Materiál a metódy

Mononukleárne leukocyty s CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ a CD19⁺ znakmi boli vyzisťované z periférnej krvi pomocou magnetickej separácie. Získané frakcie buniek s jednotlivými CD znakmi boli následne lyzované a koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou BCA metódy. Po vykonaní in-solution digescie (štiepenie proteínov na peptidy v roztoku) boli jednotlivé frakcie vzorky analyzované pomocou metódy LC-MS. V práci sme sa zamerali aj na optimalizáciu procesu in-solution digescie, pri ktorom sme menili množstvá pridávaného ditiotritolu (DTT), jódacetamidu (IAA), chloridu vápenatého (CaCl₂) a trypsínu.

Výsledky

Pri optimalizácii a analýze jednotlivých metodík proteomickej analýzy sa preukázalo, že najvyšší počet kvalitatívne a kvantitatívne identifikovaných proteínov v jednotlivých subpopuláciách mononukleárnych leukocytov je získaný pri hodnote koncentrácie DTT 5 mM, a koncentrácie IAA 11,4 mM. Množstvo trypsínu a CaCl₂ vo vzorkách nevykazuje významné zmeny vo výsledkoch.

Záver

Optimalizácia prípravy vzoriek subpopulácie mononukleárnych leukocytov z periférnej krvi nám umožňuje lepšie identifikovať a klasifikovať jednotlivé typy proteínov za účelom hľadania nových signálnych dráh u onkologických pacientov.

Štúdia bola vypracovaná s finančnou podporou projektov APVV-19-0476 a ITMS2014+: 313011V446.

Literatúra

- [1] Somamoto, T., Kondo, M., Nakanishi, T., & Nakao, M. (2014). Helper function of CD4⁺ lymphocytes in antiviral immunity in ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorffii*. *Developmental and Comparative Immunology*, 44(1), 111–115.
- [2] Jílek, M.: *Imunologie stručně, jasně, přehledně*, Grada Publishing, Praha, 2019, ISBN 978-80-271-0595-3, pp. 38-67.