

Optimizacija izolacije mononuklearnih stanica periferne krvi

Šokčević, Anamaria

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:734451>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Anamaria Šokčević

OPTIMIZACIJA IZOLACIJE
MONONUKLEARNIH STANICA
PERIFERNE KRVI

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Anamaria Šokčević

OPTIMIZACIJA IZOLACIJE
MONONUKLEARNIH STANICA
PERIFERNE KRVI

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Željko Debeljak

Rad ima: 27 stranica, 5 tablica i 10 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Leukociti	1
1.2. Mononuklearne stanice periferne krvi	2
1.2.1. Limfociti	2
1.2.2. Monociti	3
1.3. PBMC i dijagnostika tumora	3
1.4. Postupci izolacije stanica	4
2. CILJ	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Ustroj studije	7
3.2. Ispitanici	7
3.3. Materijali	7
3.3.1. Uzorci ispitanika	7
3.3.2. Priprava fosfatnog pufera (<i>engl. phosphate buffer saline, PBS</i>)	8
3.4. Metode	8
3.4.1. Određivanje broja stanica u punoj krvi	8
3.4.2. Centrifugiranje krvi – optimizacija izolacije PBMC-a	8
3.4.3. Izolacija PBMC-a	8
3.4.4. Određivanje broja PBMC u izolatu	9
3.5. Statističke metode	10
4. REZULTATI	11
4.1. Srednje vrijednosti apsolutnog broja stanica u izolatu	11
4.2. Iskorištenje izoliranih stanica	15
4.3. Utjecaj promjenjivih parametara na broj stanica u izolatu i % iskorištenja izolacije....	19
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČAK	22

7. SAŽETAK.....	23
8. SUMMARY	24
9. LITERATURA.....	25
10. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

APC – antigen predočne stanice (*engl. antigen presenting cells*)

CEA – karcinoembrionalni antigen

CPT – epruveta za pripremu stanica (*engl. Cell Preparation Tube*)

FACS – fluorescentno razvrstavanje stanica (*engl. Fluorescence-activated cell sorting*)

GM-CSF – čimbenik poticanja granulocitno-monocitnih kolonija (*engl. granulocyte-monocyte colony stimulating factor*)

LDH – laktat dehidrogenaza

M-CSF – čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (*engl. macrophage colony stimulating factor*)

NK-stanice – prirodno ubojičke stanice (*engl. natural killer*)

NSE – neuron specifična enolaza

PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi (*engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS – fosfatni pufer (*engl. phosphate buffer saline*)

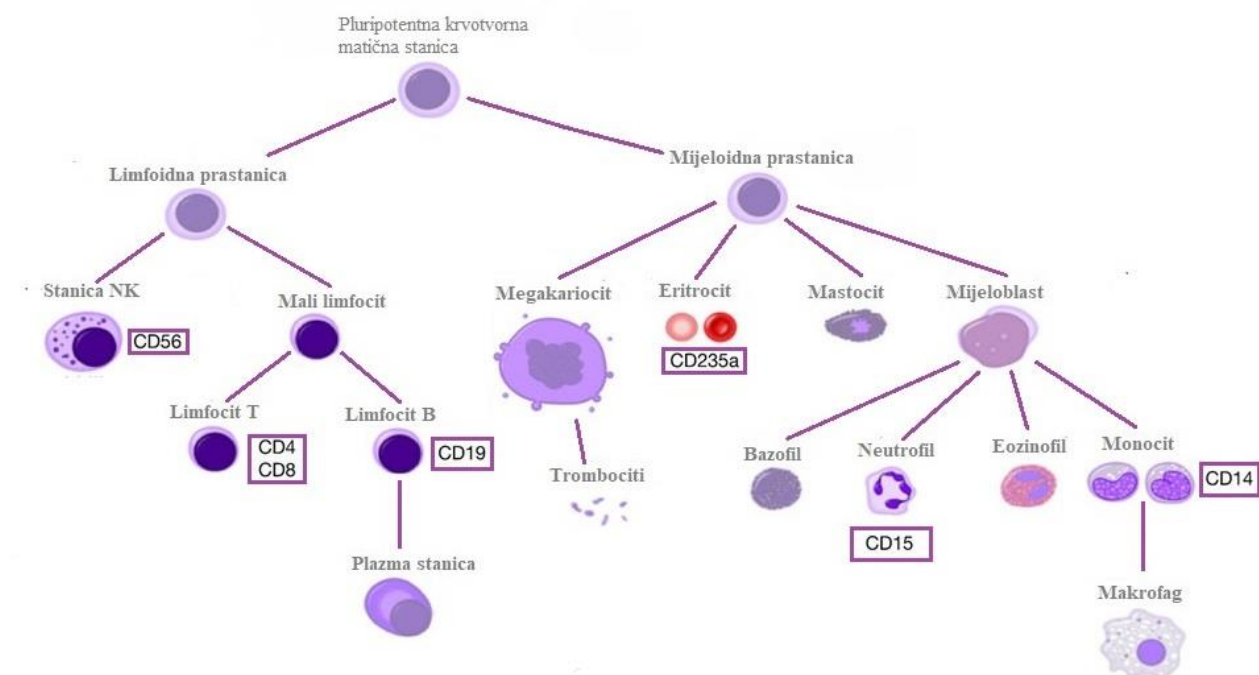
RCF – relativna centrifugalna sila (*engl. relative centrifugal force*)

SCLC – karcinom pluća malih stanica (*engl. Small cell lung cancer*)

1.UVOD

1.1. Leukociti

Leukociti ili bijele krvne stanice su nositelji imunosti organizma. Nastaju od zajedničke pluripotentne krvotvorne matične stanice (*engl. hematopoietic stem-cells*) koštane srži iz koje nastaju prastanice (*engl. progenitors*) koje se dijele na mijeloidne i limfoidne stanice (Slika 1.). Zajednička mijeloidna progenitorska stanica se diferencira u granulocite, monocite, mastocite, megakariocite (trombociti) i eritrocite u koštanoj srži. Granulociti imaju kratak životni vijek i njihov broj se povećava u upali. Razlikujemo neutrofilne granulocite koji imaju sposobnost fagocitoze čestica i mikroorganizama, eozinofilne granulocite čija je uloga obrana od parazita te bazofilne granulocite. Makrofagi nastaju od monocita periferne krvi i važno svojstvo im je fagocitoza. Mastociti oslobađaju tvari koje sudjeluju u procesu upale. Limfoidna prastanica limfopoezom sazrijeva u limfocite T i B i NK-stanice. Limfociti su nosioci svih vrsta specifične imunosti, no neke skupine limfocita kao što su NK-stanice i intraepitelni limfociti ne pripadaju adaptivnoj imunosti nego imaju važnu ulogu u urođenoj imunosti (1). Antigen predočne stanice (*engl. antigen presenting cells, APC*) izlažu antigen na svoju površinu i na taj način pomažu limfocitima u prepoznavanju antigena te potiču njihovu aktivaciju, a posredničke stanice izlučuju različite citokine i kemokine, tj. topljive tvari kojima pojačavaju upalu. Fiziološki broj leukocita u odraslih je $3,4 - 9,7 \times 10^9/L$, od toga relativni udio eozinofila 0 – 7 %, bazofila 0 – 1 %, nesegmentiranih neutrofilnih granulocita 0 – 2 %, neutrofilnih granulocita 44 – 72 %, limfocita 20 – 46 %, monocita 2 – 12 % (2).



Slika 1. Razvoj stanica imunskog sustava. Sliku izradila autorica.

1.2. Mononuklearne stanice periferne krvi

Jedna od podjela leukocita je podjela na mononuklearne i polimorfonuklearne stanice. Mononuklearne stanice periferne krvi (*engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*) su stanice koje imaju jednu okruglu jezgru (3, 4). PBMC uključuju limfocite (T-stanice, B-stanice i NK-stanice), monocite i dendritičke stanice. Zastupljenost ovih skupina stanica unutar populacije mononuklearnih stanica varira kod pojedinaca, ali obično su limfociti u rasponu od 70 do 90 %, monociti od 10 do 20 %, dok su dendritične stanice rijetke, samo 1 – 2 %. (3).

1.2.1. Limfociti

Limfociti nastaju limfopoezom iz pluripotentne hematopoetske matične stanice. U embriogenezi naprije nastaju u žumanjčanoj vreći, nakon toga u fetalnoj jetri, i konačno u koštanoj srži (5). Kod odraslih, iz zajedničke limfoidne prastanice nastaju pro-T, pro-B i pro-NK prastanice koje se diferenciraju u različitim organima. Limfociti B i NK-stanice se razvijaju u koštanoj srži do stadija zrelih stanica, te zbog toga limfociti imaju specifičnu oznaku „B“ koja potječe od engleskog naziva za koštanu srž (*engl. bone marrow*). U ptica limfociti B sazrijevaju u posebnom organu koji se zove Fabriciusova burza, te su prema tome izvorno dobili naziv (1, 5). Naziv NK-stanica nije vezan za mjesto njihovog nastanka nego za funkcijsko obilježje (*engl.*

UVOD

natural killer). Sazrijevanje limfocita T odvija se u timusu te zbog toga imaju specifičnu oznaku „T“ (6).

1.2.2. Monociti

Monociti nastaju u koštanoj srži od mijeloidne prastanice koja sazrijeva u prastanicu monocitne loze. Iz prastanice monocitne loze nastaju promonociti koji sazrijevaju u monocite te prelaze u krv gdje borave jedan do četiri dana, a nakon toga odlaze u tkiva i tamo postaju tkivni makrofagi. Sazrijevanje monocita pomažu citokini kao što su čimbenik poticanja granulocitno-monocitnih kolonija (*engl. granulocyte-monocyte colony stimulating factor, GM-CSF*) te čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (*engl. macrophage colony stimulating factor, M-CSF*) (1). Makrofagi su mononuklearne stanice koje potječu iz monocita u krvi, a nalaze se u tkivima. Glavna zadaća makrofaga je fagocitoza te kemotaksija, liziranje mikroorganizama i predočivanje antigena limfocitima T. Makrofagi su nositelji nespecifične imunosti: fagocitiraju strane tvari i čestice i razgrađuju ih svojim enzimima.

1.3. PBMC i dijagnostika tumora

Biomarkeri se u laboratorijskoj praksi određuju rutinskim imunokemijskim tehnikama u pacijentovom serumu ili plazmi. Za laboratorijsku dijagnostiku malignih bolesti mogu se koristiti neki unutarstanični biomarkeri kao što su neuron specifična enolaza (NSE), laktat dehidrogenaza (LDH) te feritin. NSE je tumorski marker za praćenje karcinoma pluća malih stanica (*engl. Small cell lung cancer, SCLC*), a povišene vrijednosti mogu se naći i u drugim tumorima kao što su neuroblastomi, maligni melanom, feokromocitom, metastazirani renalni karcinom itd. NSE se koristi u postavljanju dijagnoze te praćenju uspješnosti terapije i tijeka bolesti. LDH je nespecifičan biljeg oštećenja tkiva. Koristi se za dijagnozu i praćenje progresije stanja koja dovode do oštećenja tkiva (npr. oštećenja jetre), bolesti krvnih stanica ili malignih oboljenja. Za razliku od nekih izvanstaničnih biomarkera (kao npr. CEA) koji se gube pripremom uzoraka za analizu, biomarkeri koje nalazimo unutar mononuklearnih stanica su raniji dijagnostički pokazatelj malignih bolesti. Budući da su mononuklearne stanice važne u obrani organizma, njihov unutarstanični sastav bitan je za dijagnozu malignih bolesti. Pripravci mononuklearnih stanica mogu se koristiti za različite *in vitro* testove kako bi se procijenile različite funkcije limfocita kao što su proliferacija potaknuta stimulacijom mitogenima i imunofenotipizacija površinskih markera kao i unutarstaničnih molekula (7, 8).

1.4. Postupci izolacije stanica

Imunomagnetsko odvajanje stanica je tehnika kojom se magnetske čestice koriste za izoliranje ciljnih stanica od heterogenih smjesa. Magnetske čestice se vežu na specifične proteine stanične površine na ciljanim stanicama putem antitijela, enzima, lektina ili streptavidina (9). Uzorak se zatim stavi u elektromagnetsko polje koje povlači magnetske čestice s obilježenim stanicama, a neobilježene stanice ostaju u supernatantu. Imunomagnetsko odvajanje stanica ima nekoliko prednosti, uključujući: brzi i jednostavni protokoli, niski troškovi opreme, izolacija većeg broja stanica odjednom, potencijal za automatizaciju i visoka održivost stanica (9).

Fluorescentno razvrstavanje stanica (*engl. Fluorescence-activated cell sorting, FACS*) metoda je koja koristi protočnu citometriju i fluorescentne sonde za odvajanje stanica iz heterogenih smjesa stanica. Antitijela označena fluoroforom vezuju se na epitope na specifičnim antigenima na ciljne stanice unutar suspenzije. Nakon označavanja stanica fluoroforom, protočni citometar usmjerava staničnu suspenziju u tok pojedinačnih stanica. Stanice su osvijetljene s nekoliko laserskih zraka različitih valnih duljina, čime dolazi do pobuđivanja fluorofora i emisije karakterističnih valnih duljina. Fotonski signali (na temelju valnih duljina) pretvaraju se u proporcionalan broj elektronskih impulsa koji dodjeljuju naboj kapljici koja se formira oko stanice. Kako svaka kap kaplje između nabijenih ploča, naboj kapljice uzrokuje da se kapljica odbaci u cijevi za sakupljanje ili padne u komoru za otpad (9).

Sedimentacija odvaja stanice na temelju toga što će gravitacija izazvati taloženje većih i gušćih komponenata brže od komponenata koje su manje i manje gustoće. Najveće i najgušće komponente u uzorku mogu se izdvojiti početnim centrifugiranjem male sile zbog velike brzine sedimentacije. Supernatant se tada može ponovo centrifugirati i uzastopnim centrifugiranjem mogu se izolirati komponente sa sve nižim stupnjem sedimentacije. Leukociti se obično odvajaju od eritrocita putem sedimentacije dekstrana (9).

Centrifugiranje u gradijentu gustoće oslanja se na različite gustoće stanica unutar heterogene smjese. Uzorak se nanosi na sredinu medija s gradijentom gustoće prije nego što se centrifugira. Jedna od tehnika izolacije mononuklearnih stanica koristi tekući medij s gradijentom gustoće napravljen od fikola (hidrofilni polisaharid koji razdvaja slojeve krvi) i otopine natrijevog metrizoata ili natrijevog diatrizoata (10, 11). Postupak je analitički zahtjevan (12). U postupku se upotrebljava krv prikupljena rutinskom flebotomijom, koja se razrjeđuje

UVOD

pufferiranom otopinom, a zatim pažljivo nanosi na medij. Ovaj pripravak se zatim centrifugira da se izoliraju mononuklearne stanice iznad medija. Stanice se skupljaju pažljivim pipetiranjem iz tekućeg okruženja.

BD Vacutainer CPT (*engl. Cell Preparation Tube, CPT*) epruveta za izolaciju stanica sa natrijevim citratom kombinira epruvetu za prikupljanje krvi koja sadrži citratni antikoagulans s graduiranim fikolom i gel separatorom koji razdvaja dvije tekućine (12). Rezultat je prikladan sustav s jednom epruvetom za prikupljanje pune krvi i odvajanje PBMC-a koji smanjuje rizik od onečišćenja uzorka i eliminira potrebu za dodatnim epruvetama, pipetama i reagensima. Dosadašnja istraživanja nisu utvrdila značajnu razliku u PBMC izoliranim korištenjem CPT sustava ili uobičajenom metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće fikola (13, 14).

CILJ

2. CILJ

Cilj ovog istraživanja je optimizacija izolacijskog postupka u svrhu postizanja što većeg iskorištenja i čistoće humanih pripravaka PBMC-a. Parametri koji će se ispitivati kod izolacije mononuklearnih stanica su duljina centrifugiranja te broj okretaja. Brojanjem stanica na hematološkom brojaču utvrditi će se optimalni uvjeti pri kojima je postignuto najbolje iskorištenje uz najveću čistoću pripravaka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Ova klinička opservacijska studija dio je šireg projekta optimizacije validacije kandidata za tumorske biljege karcinoma pluća ne-malih stanica. Studija je prethodno odobrena od strane Etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Osijek (Broj: 25-1:13152-5/2011), Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Klasa: 8.1-16/ 158-1, Broj: 02/21 AG) i Opće bolnice Našice (Broj: 01-664/2-2014.). Istraživanje pod nazivom “Validacija kandidata za tumorske biljege nemikrocelularnog karcinoma pluća” u svrhu izrade doktorske disertacije provela je mr.sci. Sandra Dundović, spec. med. bioch. (mentor: doc. dr. sc. Željko Debeljak).

3.2. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 40 odraslih zdravih ispitanika oba spola sa područja Osječko-baranjske županije. Uzorci su uzorkovani na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek. Osobni podaci ispitanika su se obrađivali elektronički, a glavni istraživač i njegovi suradnici pridržavali su se interne procedure za zaštitu osobnih podataka. Svi ispitanici su detaljno obaviješteni o protokolima i procedurama ovog istraživanja, te su prije uzorkovanja potpisali informirani pristanak. Ispitanici su podijeljeni u 4 skupine kako bi se ispitali različiti uvjeti pripreme izolata.

3.3. Materijali

3.3.1. Uzorci ispitanika

Krv je uzorkovana ujutro prema uputama proizvođača (15) iz antekubitalne vene u dvije epruvete: BD Vacutainer CPT za izolaciju mononuklearnih stanica s gradijentom fikola, gel separatorom i natrijevim-citratom kao antikoagulansom (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, SAD) i K₃-EDTA epruveta za određivanje broja stanica pune krvi i evaluaciju uspješnosti izolacije PBMC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Svaka epruveta je adekvatno označena.

3.3.2. Priprava fosfatnog pufera (*engl. phosphate buffer saline, PBS*)

Za ispiranje stanica nakon izolacije korišten je fosfatni pufer koji je priređen kao otopina 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄ u 1L destilirane vode.

3.4. Metode

3.4.1. Određivanje broja stanica u punoj krvi

Ukupan broj leukocita i trombocita te diferencijalna krvna slika za dobivanje apsolutnog broja mononukleara iz pune krvi su određeni iz K₃-EDTA epruvete na hematološkom brojaču Sysmex XN 2000 (Sysmex, Kobe, Japan) u „Whole blood“ analitičkom modulu.

3.4.2. Centrifugiranje krvi – optimizacija izolacije PBMC-a

Za centrifugiranje se koristila Sigma 3-16 PK centrifuga (Sigma Centrifuges, Newton, UK). Epruvete BD Vacutainer CPT za izolaciju PBMC centrifugirale su se pod 4 različita uvjeta (različita brzina i vrijeme centrifugiranja) (Tablica 1.).

Tablica 1. Uvjeti centrifugiranja izolacijskih epruveta – optimizacija izolacije PBMC-a.

Uvjet		Dobrovoljci (redni broj)
1	20 min, 1600 RCF	1-10
2	20 min, 1800 RCF	11-20
3	30 min, 1600 RCF	31-40
4	30 min, 1800 RCF	21-30

Centrifugiranje se provelo unutar 2 sata od uzorkovanja krvi na sobnoj temperaturi.

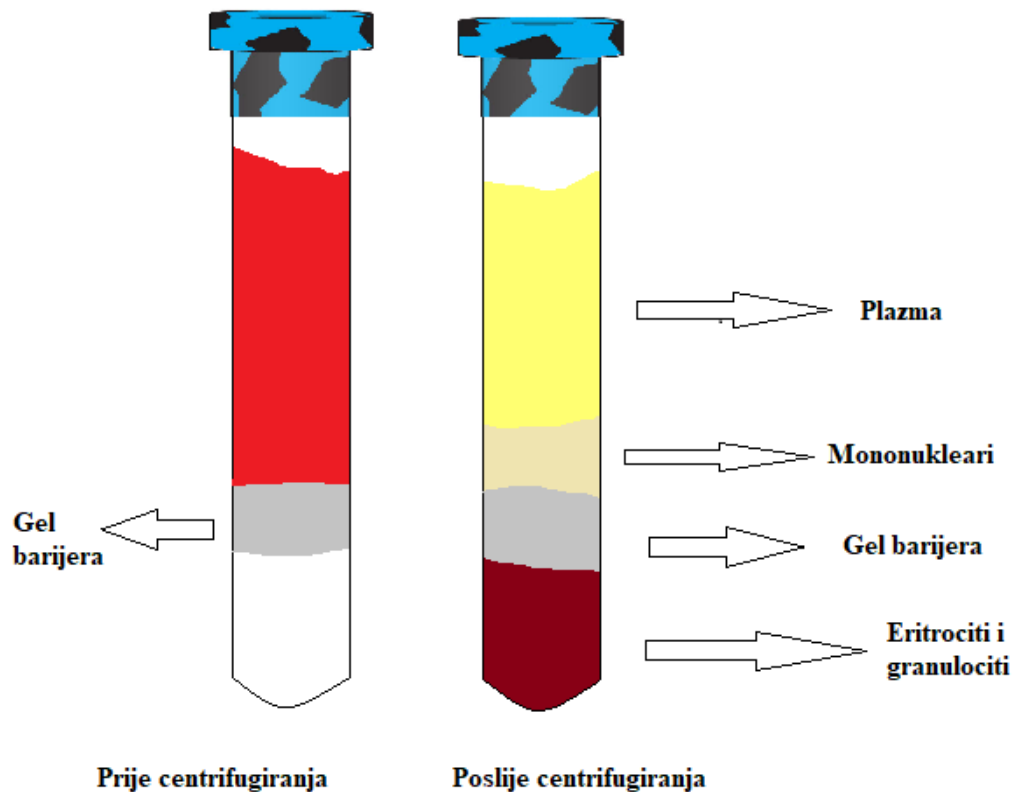
3.4.3. Izolacija PBMC-a

Nakon centrifugiranja stanice su bile raspoređene u nekoliko slojeva, a mononuklearne su se stanice nalazile u sloju iznad gela i ispod sloja plazme (Slika 2.). Na epruveti se označilo mjesto koje odgovara polovici volumena ukupne tekućine iznad gela i Pasteurovom pipetom se uklonila gornja polovica volumena tekućine iznad gela koja se zatim odbacila. Pasteurovom se pipetom prikupio preostali dio tekućine iznad gela (bez dodirivanja ruba gela) u kojem su se

MATERIJALI I METODE

nalazile mononuklearne stanice i tekućina se prenijela u čistu označenu epruvetu s konusnim dnom.

Nakon izolacije slijedilo je ispiranje u 10 ml PBS-a te centrifugiranje 15 minuta na 300 RCF (*engl. relative centrifugal force, RCF*). Zatim se uklonio supernatant, a talog u kojem su stanice resuspendirao se u 1 ml PBS-a.



Slika 2. Epruveta za izolaciju stanica prije i poslije centrifugiranja. Sliku izradila autorica.

3.4.4. Određivanje broja PBMC u izolatu

Ukupan broj leukocita i trombocita, te diferencijalna krvna slika za dobivanje apsolutnog broja mononukleara iz prethodno dobivenih izolata su određeni na hematološkom brojaču Sysmex XN 2000 (Sysmex, Kobe, Japan) u „Body Fluid“ analitičkom modulu.

3.5. Statističke metode

Numerički podaci opisani su aritmetičkom sredinom, standardnom devijacijom i koeficijentom varijacije. Izračuni su se proveli primjenom računalnog programa Microsoft Office Excel 2007 (Redmond, WA, SAD). Značajnost utjecaja duljine centrifugiranja (t) i brzine centrifugiranja (RCF) na broj stanica i iskorištenje izolacije stanica (%) izračunata je dvofaktorskim ANOVA testom u statističkom programu STATISTICA - data analysis software system (inačica 7.0. StatSoft, Inc., Tulsa, OK, SAD) (16).

REZULTATI

4. REZULTATI

Iz svakog uzorka određivala se kompletna krvna slika koja je služila za evaluaciju izolacije mononuklearnih stanica. Dobivena koncentracija leukocita, limfocita, monocita i trombocita pomnožila se sa volumenom epruvete (4 ml) kako bi se dobio apsolutni broj stanica u punoj krvi.

$$C \text{ stanica, puna krv} \times 4 \text{ ml} = \text{apsolutni broj stanica (puna krv)}/L \quad (1)$$

Za svaki uzorak iz dobivene koncentracije stanica u izolatu računao se apsolutni broj stanica koji se nalazi u izolatu na način da se koncentracija stanica u izolatu pomnožila sa volumenom u kojem su stanice resuspendirane (1ml PBS-a).

$$C \text{ stanica, izolat} \times 1 \text{ ml} = \text{apsolutni broj stanica (izolat)}/L \quad (2)$$

Zatim se iz apsolutnog broja stanica u izolatu izračunala aritmetička sredina, standardna devijacija i koeficijent varijacije za svaki uvjet posebno.

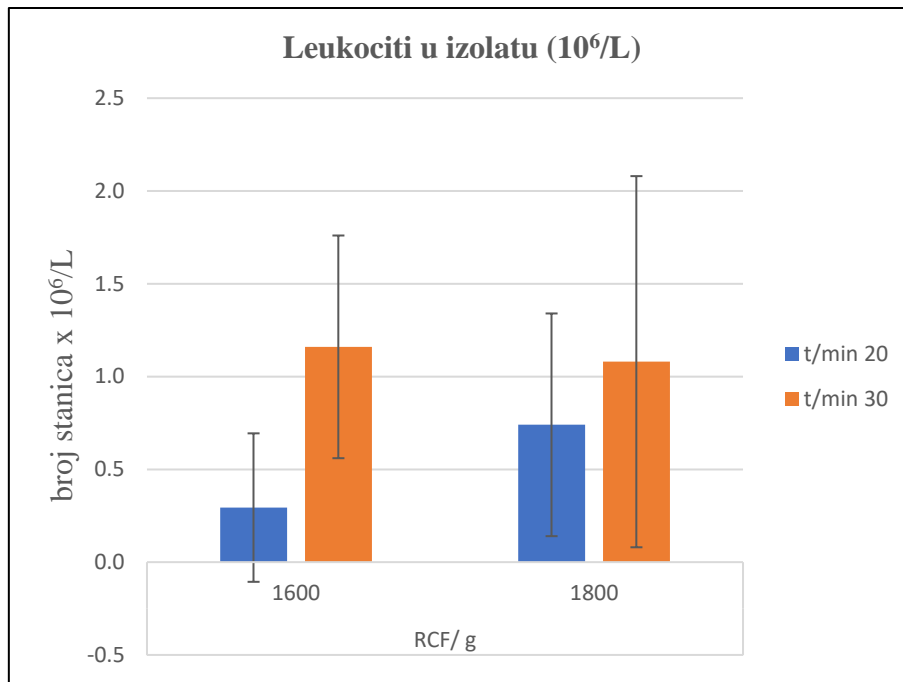
4.1. Srednje vrijednosti apsolutnog broja stanica u izolatu

Na Slikama 3. – 6. prikazane su aritmetičke sredine i standardne devijacije apsolutnog broja stanica leukocita, limfocita, monocita i trombocita za svaki uvjet.

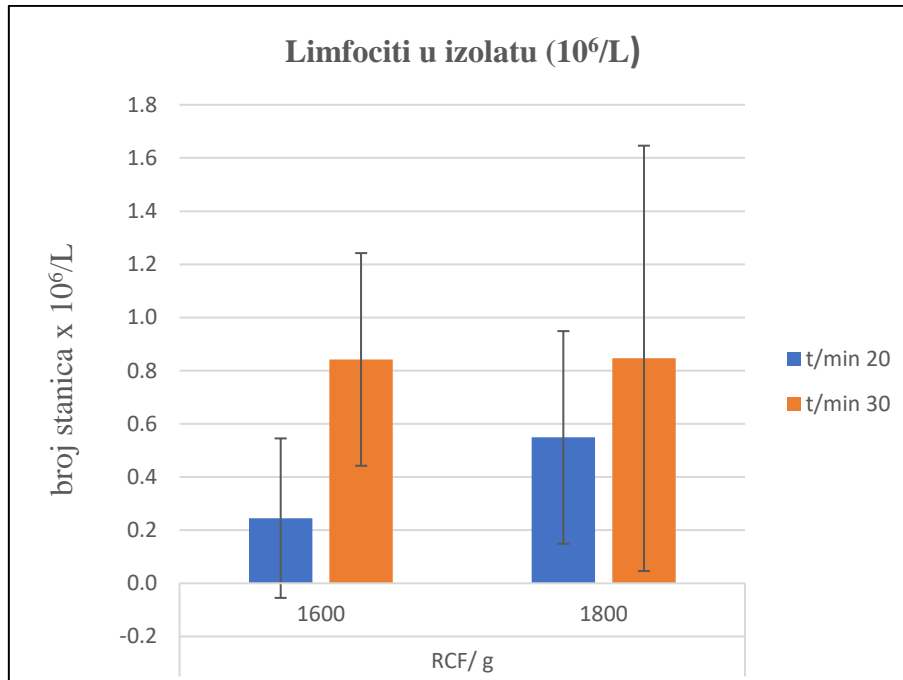
Na Slici 3. prikazane su aritmetičke sredine apsolutnog broja leukocita u izolatu. Najveća aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) izoliranih leukocita je na uvjetu broj 3 (30 minuta centrifugiranja na 1600 RCF) i ona iznosi $1,16 \pm 0,6 \times 10^6/L$. Najmanja aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) izoliranih leukocita je na uvjetu broj 1 (20 minuta centrifugiranja na 1600 RCF) i ona iznosi $0,29 \pm 0,4 \times 10^6/L$.

Na Slici 4. prikazane su aritmetičke sredine apsolutnog broja limfocita u izolatu. Najveća aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) izoliranih limfocita je na uvjetu broj 4 (30min, 1800 RCF) i iznosi $0,85 \pm 0,8 \times 10^6/L$. Najmanja je aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) izoliranih leukocita pod uvjetom broj 1 (20 min, 1600 RCF) i iznosi $0,25 \pm 0,3 \times 10^6/L$.

REZULTATI

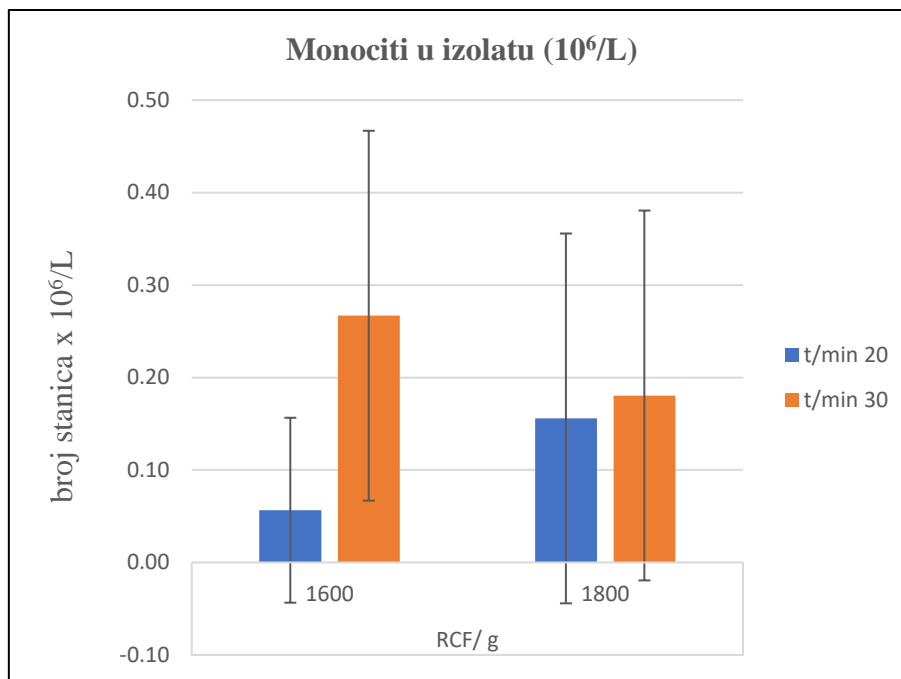


Slika 3. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) apsolutnog broja leukocita u izolatu.



Slika 4. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) apsolutnog broja limfocita u izolatu.

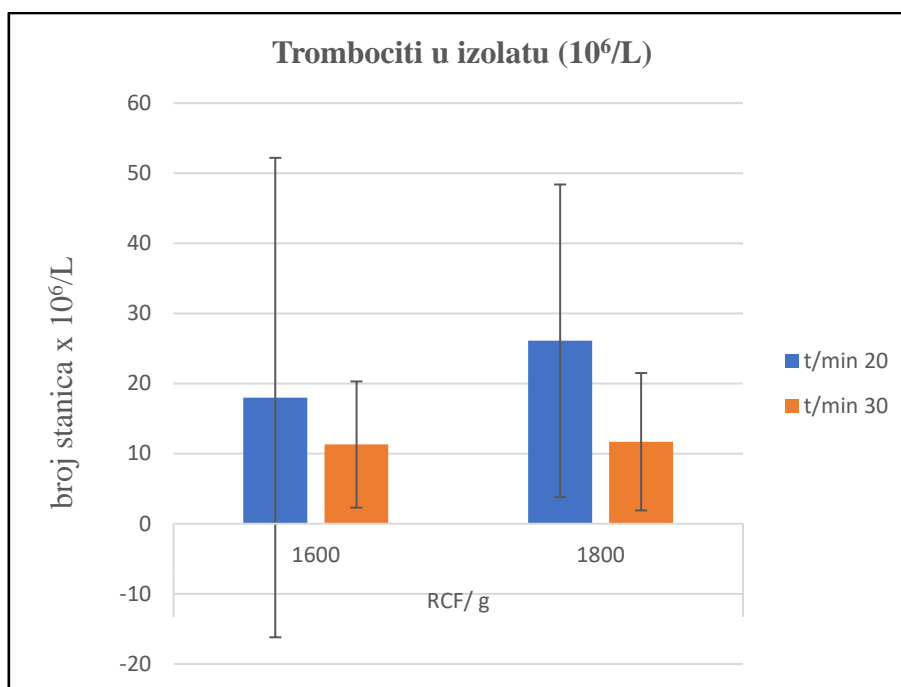
REZULTATI



Slika 5. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) apsolutnog broja monocita u izolatu.

Na Slici 5. prikazana je aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) apsolutnog broja monocita u izolatu za sva 4 uvjeta. Ona je najveća pod uvjetom broj 3 (30 min, 1600 RCF) i iznosi $0,27 \pm 0,2 \times 10^6/L$, dok je najmanja aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) dobivena pod uvjetom broj 1 (20 min, 1600 RCF) i iznosi $0,06 \pm 0,1 \times 10^6/L$.

REZULTATI



Slika 6. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) apsolutnog broja trombocita u izolatu.

Na Slici 6. prikazana je aritmetička sredina (\pm standardna devijacija) apsolutnog broja trombocita u izolatu, tj. prikazano je onečišćenje izolata. Ono je najveće pod uvjetom broj 2 (20 min, 1800 RCF) i iznosi $26,1 \pm 22,3 \times 10^6/L$, a najmanje je pod uvjetom broj 3 (30 min, 1600 RCF) i iznosi $11,3 \pm 9 \times 10^6/L$.

U Tablici 2. prikazani su koeficijenti varijacija (CV, %) za leukocite, limfocite, monocite i trombocite po sva 4 uvjeta. Varijabilnost apsolutnog broja stanica u izolatu najveća je za uvjet broj 1 (20 min, 1600 RCF) i iznosi 130,6 % za leukocite, 135,3 % za limfocite, 138,7 % za monocite i 190 % za trombocite.

Tablica 2. Koeficijent varijacije (CV, %) za broj stanica u izolatu.

Uvjet	CV-leukociti (%)	CV-limfociti (%)	CV-monociti (%)	CV-trombociti (%)
20 min, 1600 RCF	130,6	135,3	138,7	190
20 min, 1800 RCF	84,6	79,8	127,6	85,5
30 min, 1600 RCF	47,8	46,9	61,2	79,9
30 min, 1800 RCF	92,5	95,6	106,2	83,5

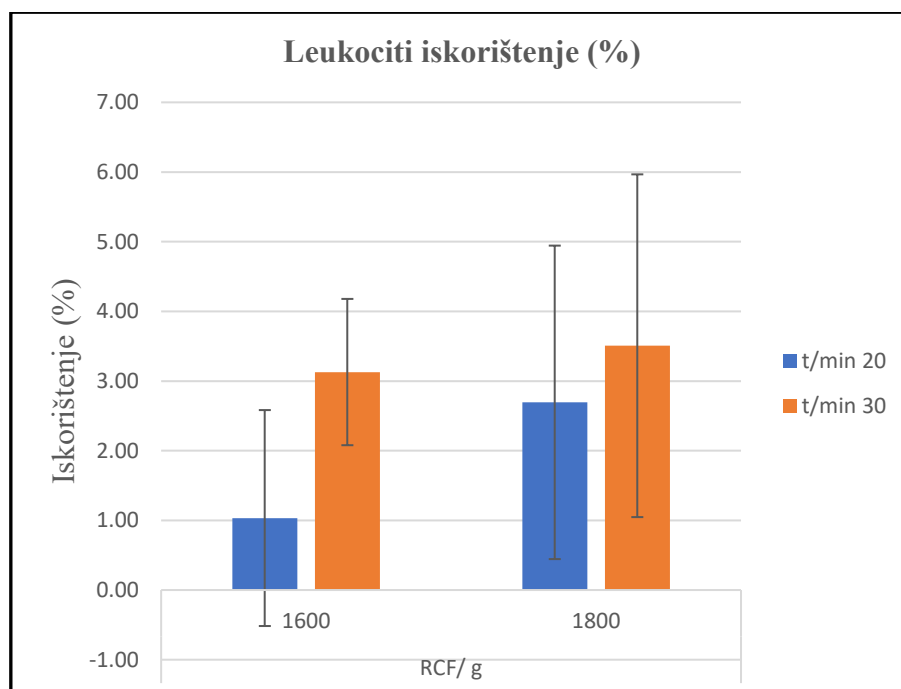
REZULTATI

4.2. Iskorištenje izoliranih stanica

Iz apsolutnog broja stanica leukocita, limfocita, monocita i trombocite u punoj krvi, te iz apsolutnog broja tih stanica u izolatu izračunao se postotak izoliranih stanica na način da se apsolutni broj stanica u izolatu podijeli s apsolutnim brojem stanica u punoj krvi te dobiveni broj pomnoži sa 100.

$$\frac{\text{apsolutni broj stanica (izolat)}}{\text{apsolutni broj stanica (puna krv)}} \times 100 = \text{iskorištenje stanica (\%)} \quad (3)$$

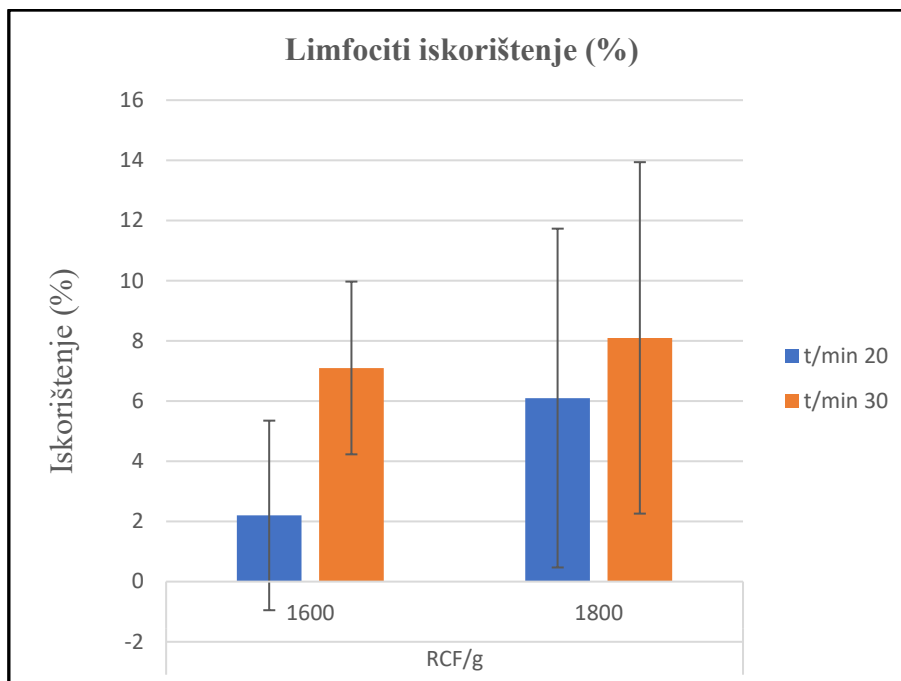
Na taj način izračunalo se iskorištenje leukocita, limfocita i monocita za svakog ispitanika po svakom uvjetu. Iz dobivenih postotaka računala se aritmetička sredina, standardna devijacija i koeficijent varijacije. Slike 7. – 10. prikazuju iskorištenje izoliranih stanica po svakom uvjetu.



Slika 7. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) iskorištenja leukocita u izolatu.

Na Slici 7. vidljivo je najveće iskorištenje leukocita dobiveno izolacijom stanica pod uvjetom broj 4 (30 min, 1800 RCF) i iznosi 3,51 % ($\pm 2,46$ %), dok je najmanje iskorištenje pod uvjetom broj 1 (20 min, 1600 RCF) i iznosi 1,03 % ($\pm 1,55$ %).

REZULTATI

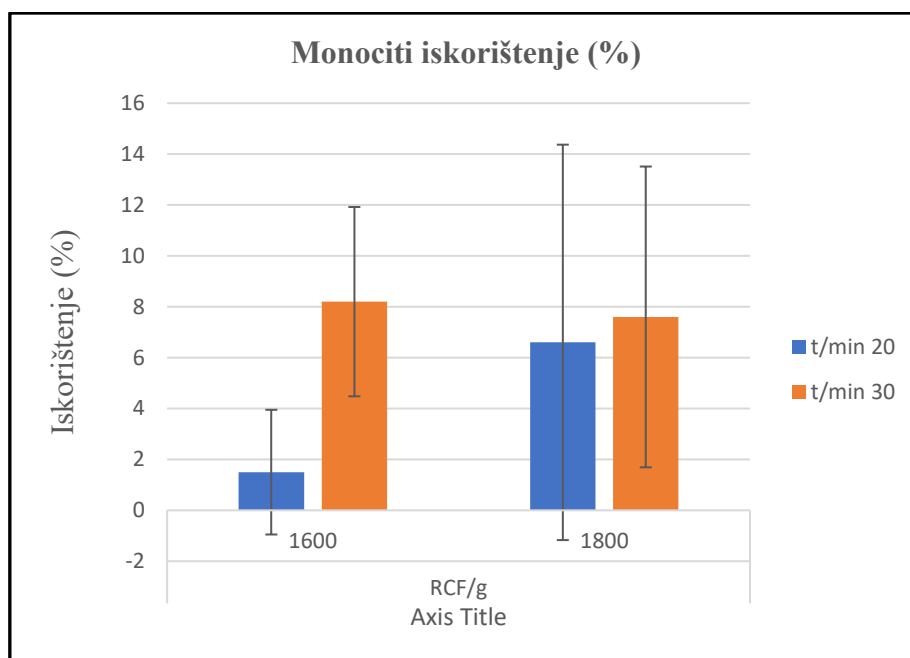


Slika 8. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) iskorištenja limfocita u izolatu.

Slika 8. prikazuje iskorištenje limfocita koje je najveće pod uvjetom broj 4 (30 min, 1800 RCF) i iznosi 8,06 % ($\pm 5,84$ %), a najmanje je pod uvjetom broj 1 (20 min, 1600 RCF) i iznosi 2,19 % ($\pm 3,15$ %).

Slika 9. prikazuje iskorištenje monocita koje je najveće pod uvjetom broj 3 (30 min, 1600 RCF) i iznosi 8,24 % ($\pm 3,72$ %), a najmanje je za uvjet broj 1 (20 min, 1600 RCF) i iznosi 1,53 % ($\pm 2,45$ %).

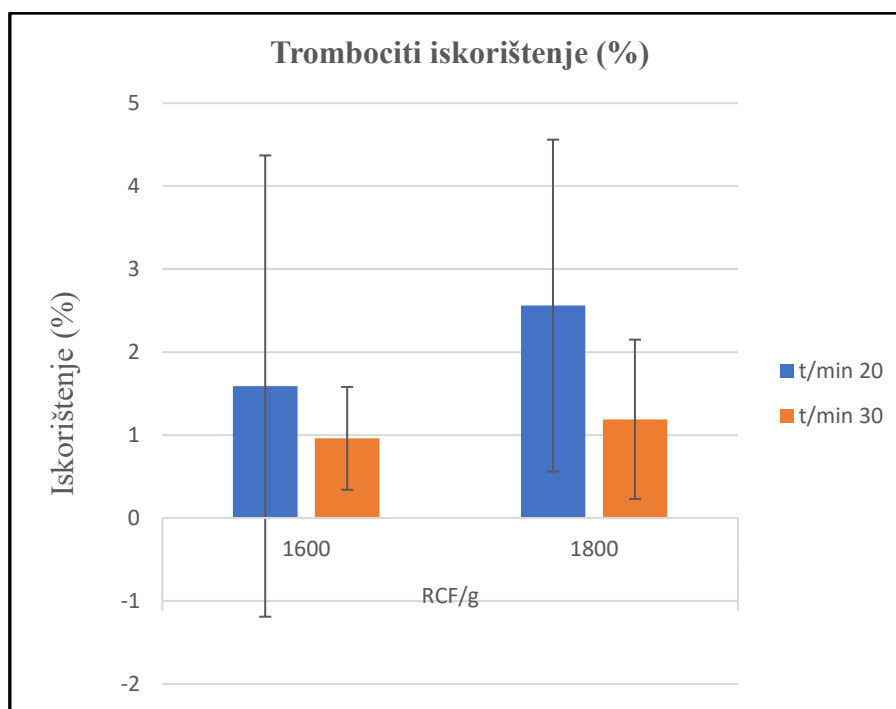
REZULTATI



Slika 9. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) iskorištenja monocita u izolatu.

Na Slici 10. vidljivo je iskorištenje trombocita, tj. onečišćenje izolata. Najveće je za uvjet broj 2 (20 min, 1800 RCF) i iznosi 2,56 % (± 2 %), a najmanje je za uvjet broj 3 (30 min, 1600 RCF) i iznosi 0,96 % ($\pm 0,62$ %).

REZULTATI



Slika 10. Aritmetičke sredine (stupčasti prikaz) i standardne devijacije (traka pogreške) iskorištenja trombocita u izolatu.

Izračunat je i koeficijent varijacije (CV, %) za % izoliranih stanica leukocita, limfocita, monocita i trombocita za sva četiri uvjeta. Varijabilnost iskorištenja stanica u izolatu najveća je za uvjet broj 1 (20 min, 1600 RCF) i iznosi 149,61 % za leukocite, 143,89 % za limfocite, 160,20 % za monocite i 175,51 % za trombocite (Tablica 3.).

Tablica 3. Koeficijent varijacije (CV, %) za % izoliranih stanica.

Uvjet	CV-leukociti (%)	CV-limfociti (%)	CV-monociti (%)	CV-trombociti (%)
20 min, 1600 RCF	149,61	143,89	160,20	175,51
20 min, 1800 RCF	83,48	92,53	118,48	78,04
30 min, 1600 RCF	33,55	40,72	45,11	64,54
30 min, 1800 RCF	70,14	72,40	77,95	80,48

REZULTATI

4.3. Utjecaj promjenjivih parametara na broj stanica u izolatu i % iskorištenja izolacije

Dvofaktorskim ANOVA testom izračunata je značajnost utjecaja duljine centrifugiranja (t) i brzine centrifugiranja (RCF) na broj (Tablica 4.) i iskorištenje izolacije (%) stanica (Tablica 5.).

Tablica 4. Utjecaj duljine (t) i brzine (RCF) centrifugiranja na broj izoliranih stanica

Utjecaj	Ukupni leukociti (*10 ⁶ /L), p	Limfociti (*10 ⁶ /L), p	Monociti (*10 ⁶ /L), p	Trombociti (*10 ⁶ /L), p
RCF (g)	0,402	0,360	0,904	0,531
t (min)	0,008	0,010	0,035	0,125

Iz Tablice 4. je vidljivo da brzina centrifugiranja ne utječe značajno na broj izoliranih stanica, dok vrijeme centrifugiranja utječe značajno na ukupan broj leukocita ($p = 0,008$), broj limfocita ($p = 0,010$) i broj monocita ($p = 0,035$). Iz Tablice 4. je također vidljivo da duljina i brzina centrifugiranja ne utječu značajno na broj trombocita, tj. na onečišćenje uzorka ($p > 0,05$).

Tablica 5. Utjecaj duljine (t) i brzine (RCF) centrifugiranja na % iskorištenja izolacije

Utjecaj	Ukupni leukociti (%)	Limfociti (%)	Monociti (%)	Trombociti (%)
RCF (g)	0,100	0,099	0,216	0,269
t (min)	0,021	0,024	0,032	0,087

Iz Tablice 5. je vidljivo da brzina centrifugiranja ne utječe značajno na % izoliranih stanica, dok vrijeme centrifugiranja utječe značajno na % izoliranih leukocita ($p = 0,021$), limfocita ($p = 0,024$) i monocita ($p = 0,032$). Iz Tablice 5. je također vidljivo da duljina i brzina centrifugiranja ne utječu značajno na % izoliranih trombocita, tj. na onečišćenje uzorka ($p > 0,05$).

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju određeni su optimalni uvjeti za izolaciju mononuklearnih stanica. Parametri koji su se ispitivali su duljina centrifugiranja i broj okretaja pod četiri različita uvjeta: 20 min na 1600 RCF, 20 min na 1800 RCF, 30 min na 1600 RCF i 30 min na 1800 RCF. Uobičajena procjena izolacijskog protokola PBMC uključuje praćenje iskorištenja i čistoće. Do neke mjere onečišćenje se može odrediti vizualno jer će kontaminacija eritrocita zacrveniti sloj PBMC-a nastao nakon centrifugiranja (12). Iskorištenje se lako utvrđuje bilo ručnim ili automatiziranim brojenjem stanica, a otprilike je jednako između CPT i ručnih metoda centrifugiranja u gradijentu fikola (14). Iskorištenje leukocita i limfocita najveće je pri centrifugiranju 30 minuta na 1800 RCF, a za monocite je najveće pri centrifugiranju 30 minuta na 1600 RCF. Onečišćenje izolata frakcijom trombocita najmanje je pri centrifugiranju 30 minuta na 1600 RCF. Onečišćenje trombocitima je najveće pri centrifugiranju 20 minuta na 1800 RCF.

Brzina centrifugiranja ne utječe značajno na broj izoliranih stanica i njihovo iskorištenje, dok vrijeme centrifugiranja utječe značajno na ukupan broj leukocita ($p = 0,008$), broj limfocita ($p = 0,010$) i broj monocita ($p = 0,035$). Također vrijeme centrifugiranja utječe na % izoliranih stanica leukocita ($p = 0,021$), limfocita ($p = 0,024$) i monocita ($p = 0,032$). Duljina i brzina centrifugiranja ne utječu značajno na broj trombocita i % izoliranih trombocita, tj. na onečišćenje uzorka ($p > 0,05$).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je izolacija mononukleara optimizirana na 30 minuta centrifugiranja koje značajno utječe na broj i iskorištenje izoliranih stanica. Izolacija je optimizirana na brzini od 1600 RCF jer je na taj način smanjena kontaminacija izolata mononuklearnih stanica ostalim krvnim frakcijama (npr. trombociti).

Nedostaci ovog istraživanja su mali broj uzoraka po skupini, tj. uvjetu izolacije. Istraživanje bi se moglo poboljšati dodavanjem parametara koji bi se promatrali i čijom bi se optimizacijom smanjilo onečišćenje izolata ostalim staničnim frakcijama, kao što je npr. ispiranje u PBS-u nakon pipetiranja stanica iz epruvete s fikolom (nakon postupka izolacije).

Izoliranje stanica centrifugiranjem u gradijentu gustoće nije najbolji način izoliranja stanica, ima ograničenu specifičnost i malu čistoću, ali se često koristi jer je jeftina tehnika. FACS ima nekoliko prednosti u odnosu na odvajanje stanica centrifugiranjem u gradijentu gustoće, uključujući sposobnost odvajanja pojedinačnih stanica, izolacije stanica na temelju unutarstaničnih markera, izolacije stanica na temelju razine ekspresije površinskih markera, te

RASPRAVA

odvaja složene vrste stanica s više markera (9). FACS je bolja metoda izolacije, ali je skupa i nije dostupna svima.

Mononuklearne stanice su važne u obrani organizma, a njihov unutarstanični sastav bitan je za detekciju biomarkera (specifičnih tumorskih produkata) u tjelesnim tekućinama, najčešće u serumu i plazmi. Otkrivanje tumorskih produkata upućuje na tumorske stanice u organizmu. Biokemijski pokazatelji koje nalazimo unutar mononuklearnih stanica su rani dijagnostički pokazatelj malignih bolesti te su stoga kandidati za tumorske markere. Poznavanje optimalnih uvjeta za izolaciju mononuklearnih stanica iz periferne krvi čini važan preduvjet pripremanje pripravaka PBMC-a što veće čistoće koji će se koristiti za različite *in vitro* testove te omogućiti bržu i točniju dijagnostiku malignih bolesti.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Brzina centrifugiranja ne utječe značajno na broj izoliranih stanica i njihovo iskorištenje, dok vrijeme centrifugiranja utječe značajno na ukupan broj leukocita, broj limfocita i broj monocita. Također vrijeme centrifugiranja utječe značajno na % izoliranih stanica leukocita, limfocita i monocita.
- Duljina i brzina centrifugiranja ne utječu značajno na broj trombocita i % izoliranih trombocita, tj. na onečišćenje uzorka.
- Izolacija mononukleara optimizirana je na 30 minuta centrifugiranja pri 1600 RCF jer je pri tim uvjetima najveće iskorištenje PBMC-a i smanjena je kontaminacija izolata mononuklearnih stanica ostalim krvnim frakcijama.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Optimizacija izolacije PBMC-a u svrhu postizanja što većeg iskorištenja i čistoće pripravaka

Nacrt studije: Ova klinička opservacijska studija dio je šireg projekta optimizacije validacije kandidata za tumorske biljege karcinoma pluća ne-malih stanica.

Materijali i metode: U istraživanju je sudjelovalo 40 ispitanika koji su bili podijeljeni u 4 skupine kako bi se ispitali različiti uvjeti pripreme izolata. Krv se uzorkovala u dvije epruvete; za izolaciju PBMC-a (komercijalna epruveta s gradijentom fikola) i za evaluaciju uspješnosti izolacije PBMC-a (epruveta s K₃-EDTA). Parametri koji su ispitivani su duljina centrifugiranja i broj okretaja. Brojanjem stanica na hematološkom brojaču utvrđeni su optimalni uvjeti za izolaciju PBMC-a.

Rezultati: Brzina centrifugiranja ne utječe značajno na broj izoliranih stanica i njihovo iskorištenje, dok vrijeme centrifugiranja utječe značajno na ukupan broj leukocita, limfocita i monocita. Također vrijeme centrifugiranja utječe značajno na % izoliranih stanica leukocita, limfocita i monocita. Duljina i brzina centrifugiranja ne utječu na broj trombocita i % izoliranih trombocita.

Zaključak: Izolacija mononukleara optimizirana je na 30 minuta centrifugiranja pri 1600 RCF jer je pri tim uvjetima najveće iskorištenje PBMC-a i smanjena je kontaminacija izolata mononuklearnih stanica ostalim krvnim frakcijama.

Ključne riječi: centrifuga; hematološki brojač; izolacija; mononuklearne stanice; optimizacija

SUMMARY

8. SUMMARY

Optimization of peripheral mononuclear blood cells isolation

Objectives: The aim of this research is to optimize the isolation of PBMCs in order to maximize the yield and purity of the preparations

Study design: This clinical observational study is part of a wider project. The goal of that project is to optimize the validation of candidates for non-small cell lung cancer tumor markers.

Materials and methods: The study involved 40 subjects (healthy volunteers) who were divided into 4 groups to examine different conditions of isolate preparation. Blood was sampled in two tubes; for PBMC isolation (a commercial Ficoll gradient tube) and for PBMC isolation performance evaluation (a K₃-EDTA tube). The examined parameters were the centrifugation length and the relative centrifugal force. Optimal conditions for the isolation of PBMC are determined by counting cells in a hematology counter.

Results: Centrifugation speed does not affect the number of cells isolated and their utilization, while centrifugation time significantly affects the total number of leukocytes, lymphocytes and monocytes. Also, centrifugation time affects on % of isolated cells of leukocytes, lymphocytes and monocytes. The length and speed of the centrifugation do not affect the platelet count and % of platelets isolated.

Conclusion: Mononuclear cells isolation is optimized at 30 minutes of centrifugation at 1600 RCF because under these conditions the highest utilization of PBMCs was obtained and the contamination of the mononuclear cell isolate by other blood fractions was reduced.

Keywords: centrifuge; hematology counter; isolation; mononuclear cells; optimization

9. LITERATURA

1. Čulo F i Batinić D. Stanice, tkiva i organi imunskog sustava. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, i sur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 18-57.
2. Stavljenić-Rukavina A. i Čvorišćec D. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije, Zagreb: Medicinska naklada Zagreb, 2007.
3. Charlotte R. Kleiveland, Peripheral Blood Mononuclear Cells in The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models, K. Verhoeckx, P. Cotter, C. Kleiveland, (Eds.), Cham: Springer, 2015., 161-169
4. Sen P, Kemppainen E and Orešič M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front. Mol. Biosci.* 2018; 4:96. doi: 10.3389/fmolb.2017.00096
5. Schuurman, Henk-Jan & Quesniaux, VFJ. Development and maturation of T and B cells. 1999; 23-40
6. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Stanična i molekularna imunologija*. 8.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
7. Panda, S. K., Ravindran, B. In vitro Culture of Human PBMCs. *Bio-protocol* 2013; 3(3): e322. DOI: 10.21769/BioProtoc.322.
8. Raulf-Heimsoth M. T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods Mol Med.* 2008;138:17-30. doi: 10.1007/978-1-59745-366-0_2.
9. Cell Separation and Cell Isolation Methods. Dostupno na adresi : https://www.stemcell.com/cell-separation/methods?utm_source=facebook&utm_medium=social&utm_campaign=cs_efficient#section-immunomagnetic Datum pristupa: 11.9.2019
10. Pourahmad J, Salimi A. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran J Pharm Res.* 2015; 14 (4): 679-980
11. Fotino, M., Merson, E.J. and Allen, F.H. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1971; 1:131-133
12. Puleo, A., Carroll, C., Maecker, H. T. and Gupta, R. Isolation of PBMCs Using Vacutainer® Cellular Preparation Tubes (CPT™). *Bio-protocol* 2017;7(2): e2103. DOI: 10.21769/BioProtoc.2103.

LITERATURA

13. Corkum, C., Ings, D., Burgess, C., Karwowska, S., Kroll, W. and Michalak, T. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunology* 2015; 16:48.
14. Ruitenber, J. J., Mulder, C. B., Maino, V. C., Landay, A. L. and Ghanekar, S. A.VACUTAINER CPT and Ficoll density gradient separation perform equivalently in maintaining the quality and function of PBMC from HIV seropositive blood samples. *BMC Immunol* 2006; 7: 11
15. CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate. Dostupno na adresi:
https://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/PI_CPT_citrate_March_2016_VDP4010-4-06-WEB_500010322.pdf Datum pristupa: 11.9.2019.
16. StatSoft, Inc. (2004), www.statsoft.com.

ŽIVOTOPIS

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Anamaria Šokčević

Datum i mjesto rođenja:

5. veljače 1997., Slavonski Brod

Adresa:

Kupina 51, 35221 Velika Kopanica

Obrazovanje:

2011. – 2015. Gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod

2015. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku