

SEPARAREA CELULELOR

Separarea celulelor

- Obținerea unei populații celulare înalt purificate este un prim obiectiv atât în cercetările de imunologie fundamentală cât și în practica clinică curentă, pentru a caracteriza statusul imun al unui pacient.
- Se bazează pe utilizarea unei caracteristici morfologice sau funcționale pe baza căreia populațiile celulare ce urmează a fi separate prezintă aspecte diferite.

CRITERII DE SEPARARE

- Proprietati fizice:
 - Dimensiuni (filtrare, centrifugare)
 - Densitate (centrifugare in gradient de densitate)
 - Dispersia luminii (citometrie de flux)
- Proprietati biochimice:
 - Markeri de suprafata specifici
 - Markeri citoplasmatici

SEPARAREA CELULELOR

- Purificarea unor celule de interes
- Selectie negativa:
 - ~ Depletie
 - Indepartarea celulelor nedorite
- Selectie pozitiva:
 - ~ Purificare
 - Pastrarea celulelor dorite

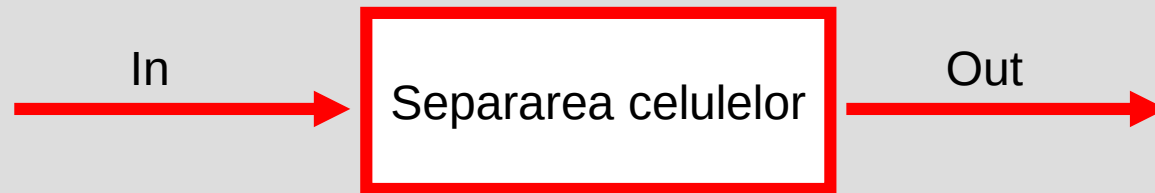
CONDITII DE FIABILITATE

- Pastreaza integritatea celulelor
- Nu altereaza statusul de activitate al celulelor
- Rapida (evitarea leziunii celulare)
- Eficienta

PROPRIETATI

- **Yield** = (numar de celule dorite din solutia rezultata) / (numar de celule dorite din proba initiala)
- **Puritate** = (numar de celule dorite din solutia rezultata) / (numar total de celule din solutia rezultata)

PROPRIETATI



- $N_{in} = CD_{in} + CN_{in}$
- $N_{out} = CD_{out} + CN_{out}$
- $Yield = CD_{out} / CD_{in}$
- $Puritate = CD_{out} / N_{out}$

METODE DE SEPARARE

- Pe baza diferentelor de densitate:
 - Separarea mononuclearelor prin sedimentare libera in mediu cu Dextran
 - Separarea mononuclearelor pe gradient de densitate
- Pe baza proprietatilor biologice:
 - Separarea mononuclearelor pe baza aderentei la suprafete de plastic
- Pe baza markerilor de suprafata specifici:
 - Sortarea cu citometrul de flux

DIFERENTE DE DENSITATE

- Utilizate frecvent pentru celule sanguine
- $\rho \uparrow$ (hematii, PMN-uri, celule moarte) $\rightarrow$ deplasare mai rapida in camp gravitational
- $\rho \downarrow$ (limfocite, monocite) $\rightarrow$ deplasare mai lenta
- Metode diferite:
 - Acceleratia gravitationala / centrifuga
 - Sedimentare libera / gradient de densitate
 - Diferite substante ca dextranul sau gelatina care determina agregarea eritrocitelor si cresc rata de sedimentare

SEDIMENTARE LIBERA IN MEDIU CU DEXTRAN

- Sange heparinat : Dextran 50% = 3:1
- Se incubeaza 1 ora la 37°C
- 2 straturi:
 - Superior: 90- 95% mononucleare (limfocite, monocite)
 - Inferior: eritrocite
- Se recolteaza stratul superior cu o pipeta
- Dezavantaje:
 - Separare grosiera
 - Puritate mica
- Avantaje:
 - Ieftina

SEPARAREA PE GRADIENT DE DENSITATE

- Gradient de densitate = mediu cu masa moleculara mare, care functioneaza ca un separator – permite trecerea particulelor mici si grele (nu si a celor mari si usoare)
- Preparate utilizate ca gradient de densitate pentru separarea celulelor:
 - Ficoll-Hypaque
 - Ficoll-Odiston
 - Sepcel

SEPARAREA PE GRADIENT DE DENSITATE

- Se introduce gradientul într-un tub de centrifuga
- Sangele heparinat se prelinge în tub și se evita amestecarea celor două medii
- Se centrifugheaza
- 4 straturi:
 - Plasma + trombocite (stratul superior)
 - Mononucleare - limfocite (“buffy coat”)
 - Gradient (stratul intermediar)
 - Hematii, PMN-uri, celule moarte (stratul inferior)
- Inelul alb-sidefiu de mononucleare se aspiră și se poate cultiva pe un mediu de cultură pentru limfocite sau se folosește pentru alte determinări.

FICOLL-HYPAQUE



Sange

Ficoll-Hypaque



Plasma +
trombocyte

Limfocyte

Ficoll-Hypaque

Hematii,
PMN-uri

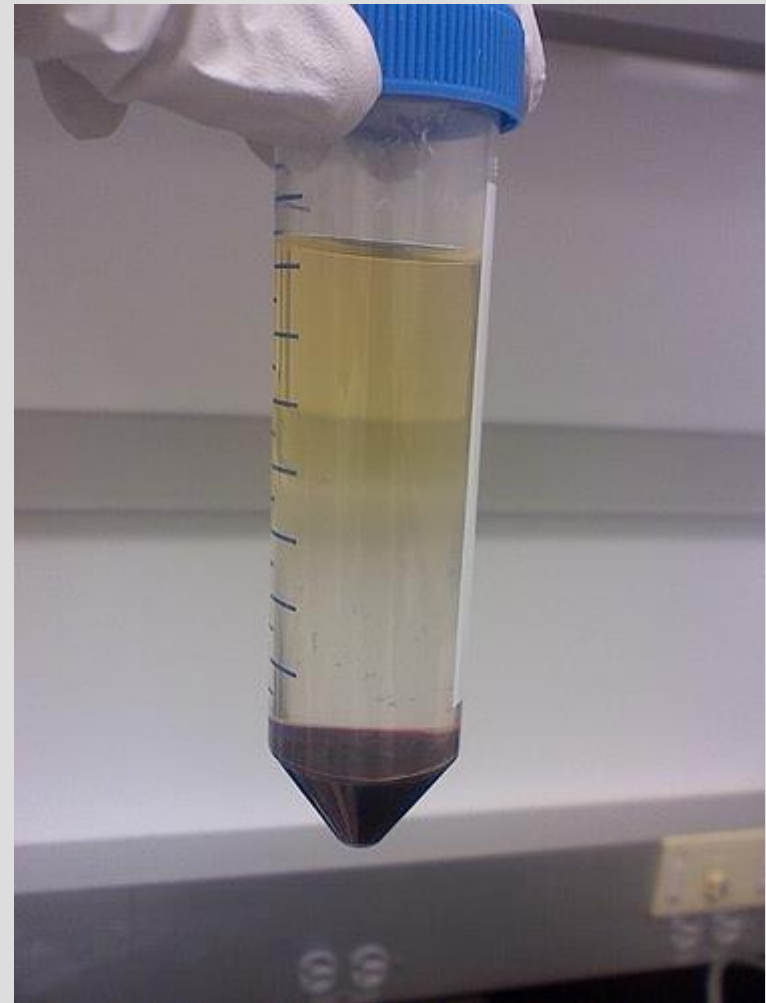


Limfocyte

Ficoll-Hypaque

Hematii,
PMN-uri

FICOLL-HYPAQUE



SEPARAREA PE BAZA PROPRIETĂȚILOR BIOLOGICE

- Macrofagele pot fi separate in camp magnetic datorita proprietatii lor specifice de a fagocita fierul coloidal.
- Aderenta la suprafete de plastic sau fibre de nailon permite separarea macrofagelor si a diferitelor subpopulatii de limfocite.

Separarea mononuclearelor pe baza aderenței la suprafețele de plastic

- Macrofagele și limfocitele B aderă la suprafețe de plastic în timp ce limfocitele T nu aderă
- Se obține o suspensie de mononucleare (metoda anterioară) și se fac trei spalări a celulelor prin centrifugare
- Celulele se incubează în cutii Petri la 37°C
- Celulele T neaderente rămân în supernatant
- Celulele B și monocitele aderă la placă de plastic

MARKERII DE SUPRAFATA

- Rozetarea:
 - Suspensia de mononucleare obtinuta in gradient de densitate + hematii de oaie → agregate de LT care cuplau hematiile de oaie prin CD2
 - Dezavantaje:
 - Lipsa de stabilitate a rozetelor (se desfac la centrifugare)
 - Numar mic de celule

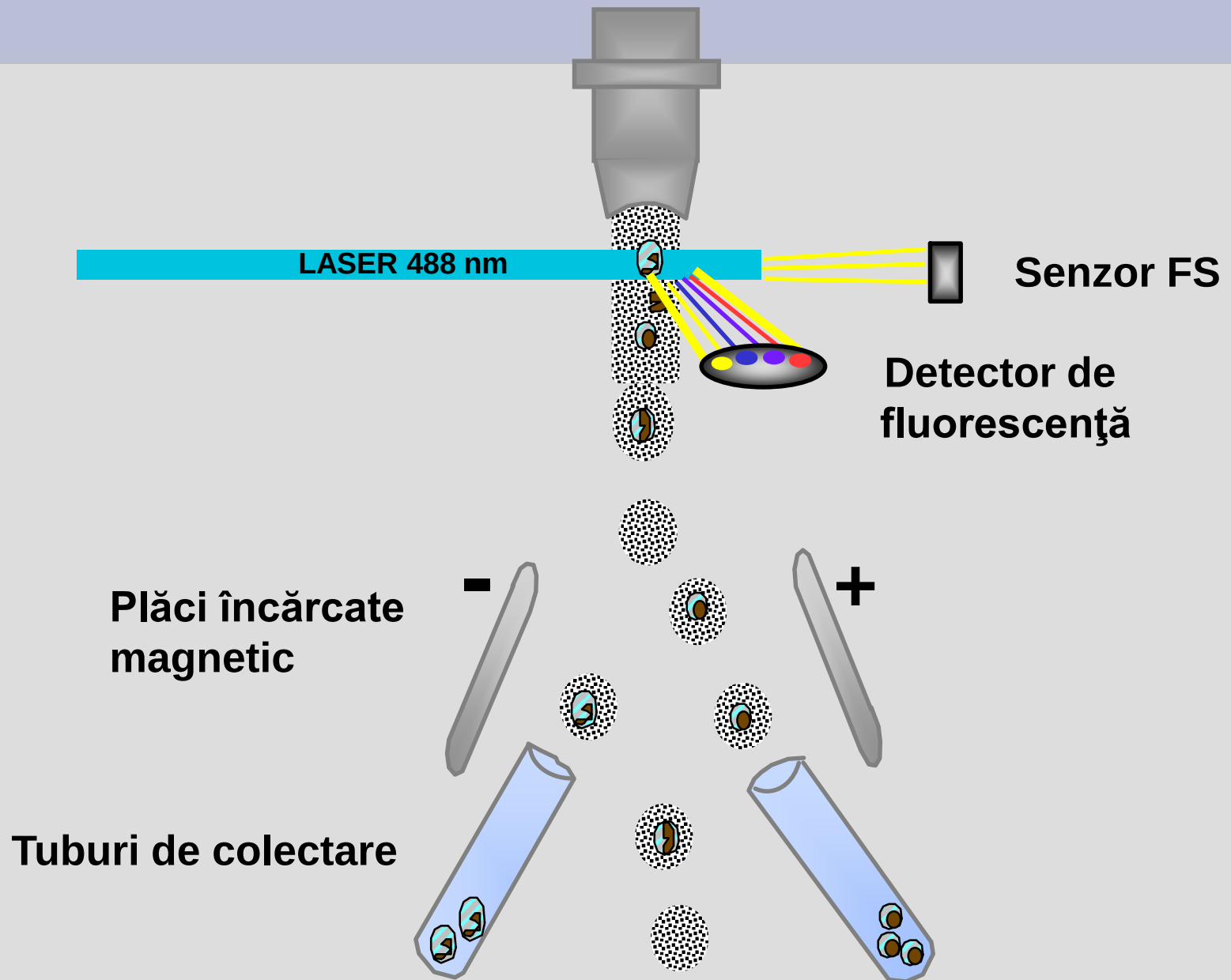
SORTAREA CELULELOR cu citometrul de flux

- Separarea unei (sub)populații celulare dintr-un amestec:
 - Mărime
 - Granularitate
 - Antigene de suprafață
- Celule (in suspensie) + AcM (specifici unui marker de suprafata si marcati fluorescent)

ETAPE

1. Marcarea cu AcM+fluorocromi
2. Identificarea celulei – e de interes?
3. Încărcare cu sarcini pozitive/negative/fără
4. Câmp magnetic – deflectare spre tuburi colectoare
5. Centrifugare (aducere la concentratia dorita)

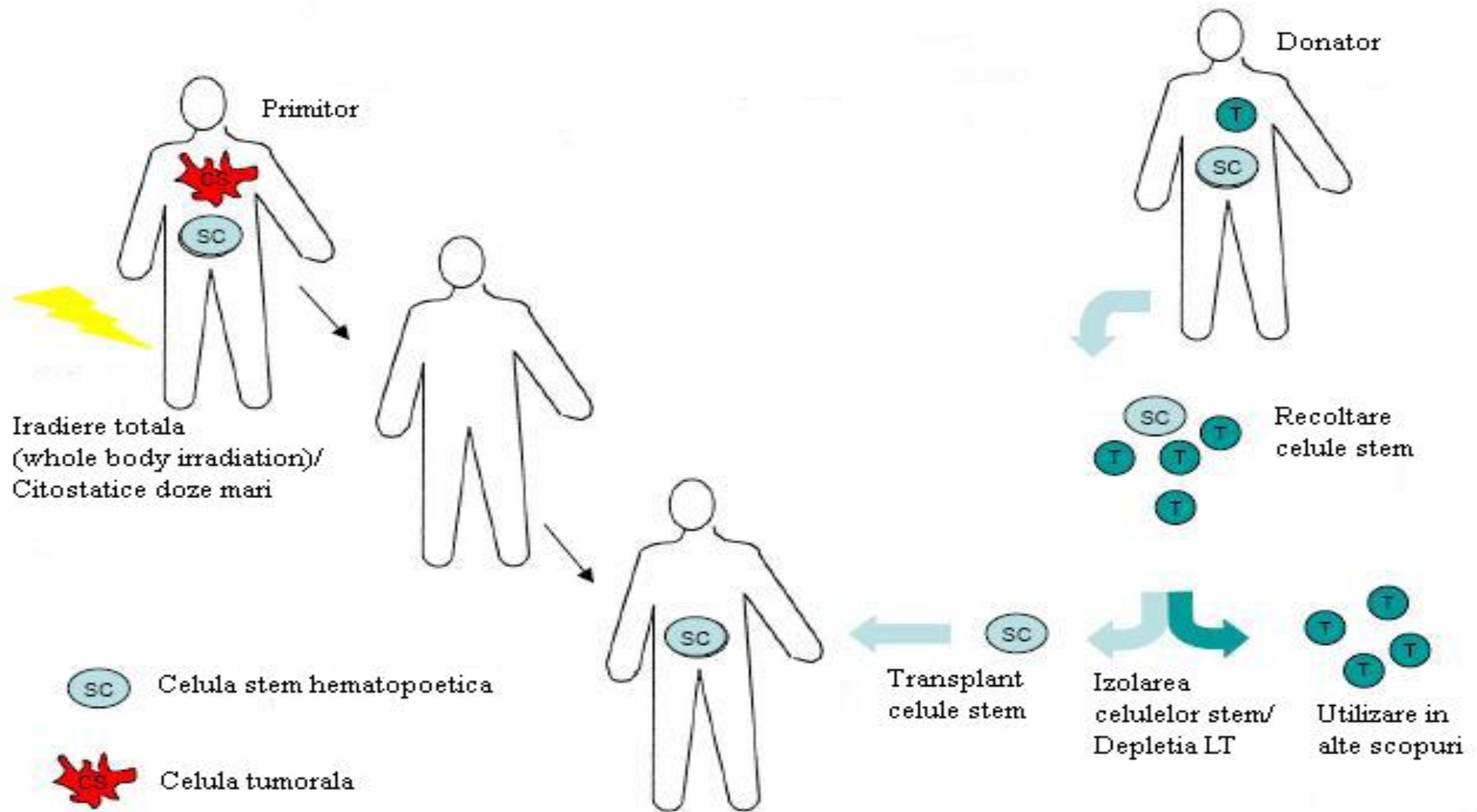
SORTAREA CELULELOR



APLICATII

- Indepartarea celulelor tumorale in transplantul autolog de celule stem (administrarea de CSH proprii pacientului, recoltate si conservate inaintea terapiei mieloablative, permitand astfel depasirea toxicitatii hematopoietice a chimio si / sau radioterapiei)
- Indepartarea fibroblastilor care contamineaza o biopsie de cartilaj
- Selectia de hepatocite
- Selectia de celule hematopoetice CD34+

TRANSPLANTUL ALOGEN DE CELULE STEM



TESTUL DE PROLIFERARE LIMFOCITARA

- Activarea limfocitara = proces fiziologic care survine in urma contactului dintre un limfocit si Ag specific
- Au loc modificari morfologice la nivelul limfocitelor mici in repaus
- Blastogeneza = limfocite → limfoblasti
 - Sinteza ↑ de fosfolipide
 - Permeabilitate ↑ la cationii divalenti
 - Activarea adenilat ciclazei
 - ↑ AMPc intracelular
 - Sinteza ↑ de ADN, ARN, proteine

ACTIVAREA LIMFOCITARA

- Test in vitro
- Masoara capacitatea functionala a LB si LT de a raspunde la stimularea Ag
- Stabilirea imunitatii celulare in diverse situatii patologice:
 - Immunodeficiente
 - Sindroame autoimune
 - Boli infectioase
 - Tumori

MITOGENI SI ANTIGENE

- Mitogen = substanta care activeaza nespecific o paleta larga de clone limfocitare (in general lectine vegetale dar si alte grupe de substante)
- Mai frecvent mitogeni:
 - Raspuns rapid, intens, usor de cuantificat
 - Fitohemaglutinina, pokeweed mitogen, proteina A stafilococica, streptolizina S
- Antigene:
 - Activeaza doar limfocitele specifice
 - PPD (purified protein derivative), Ag Candida, streptokinaza, toxoid tetanic, virus Vaccinia, virus Herpes simplex

ACTIVAREA LIMFOCITARA

- Sangele recoltat pt testare se diuleaza 1:1 cu solutie RPMI
- Se face separearea in gradient de densitate
- Se recolteaza “buffy coat”
- Se fac doua spalari cu RPMI +ser fetal de vitel
- Se aduce la 10^6 celule/ml
- Se adauga antibiotic
- Se adauga mitogen/antigen
- Se incubeaza 72h la 37°C si 5% CO_2
- 2 eprubete in paralel: 1 stimulat, 1 nestimulat

CUANTIFICAREA PROLIFERARII LIMFOCITARE

- Identificarea proportiei de limfocite activate
- Proportia blastilor in populatia de limfocite
- Fazele ciclului celular:
 - G0: faza de repaus, ADN $\sim 2n$
 - G1: faza de activare, ADN $\sim 2n$
 - S: faza de sinteza, ADN $\sim 2n \rightarrow 4n$
 - G2: faza premergatoare mitozei, ADN $\sim 4n$
 - M: mitoza ADN $\sim 4n$
- Stare de repaus $\rightarrow$ ADN $\sim 2n$
- Stare activata $\rightarrow$ ADN $\sim 4n$

CUANTIFICAREA PROLIFERARII LIMFOCITARE

- Cultura de limfocite obtinuta in urma stimulării se trateaza cu o substanta care lizeaza membrana celulara → suspensie de nuclei
- ADN + propidium iodid (fluorocrom)
- Se analizeaza proba la citometrul de flux

CUANTIFICAREA PROLIFERARII LIMFOCITARE

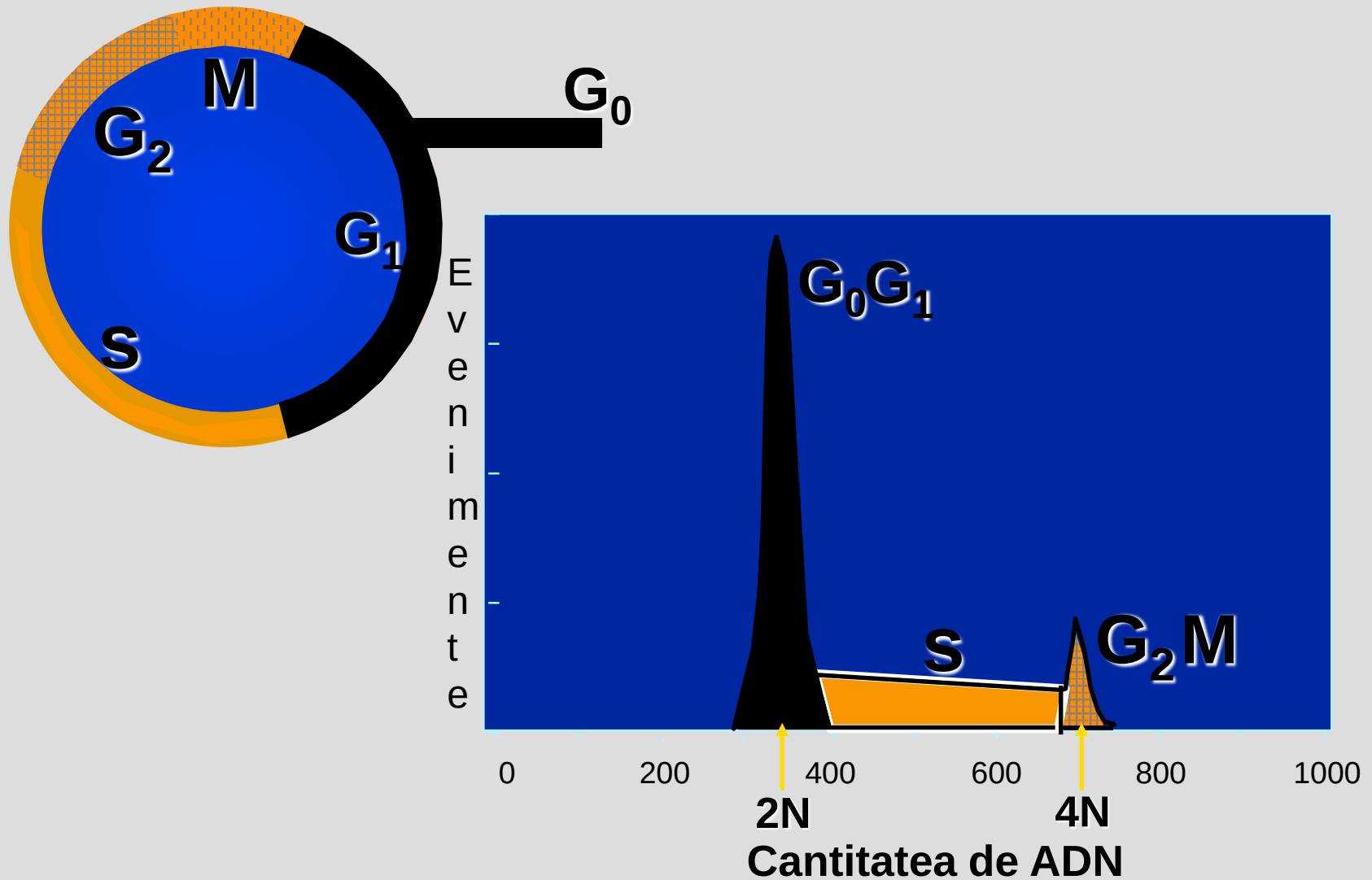
- Fiecare nucleu ajuns in dreptul razei laser din interiorul citometrului de flux va emite o cantitate de fluorescenta proportionala cu cantitatea de PI cuplata
- Un nucleu care contine o cantitate dubla de ADN nuclear ($4n$) de la un limfocit stimulat va cupla o cantitate dubla de PI
- Va emite o cantitate dubla de fluorescenta fata de limfocitul in repaus cu $2n$ ADN

CUANTIFICAREA PROLIFERARII LIMFOCITARE

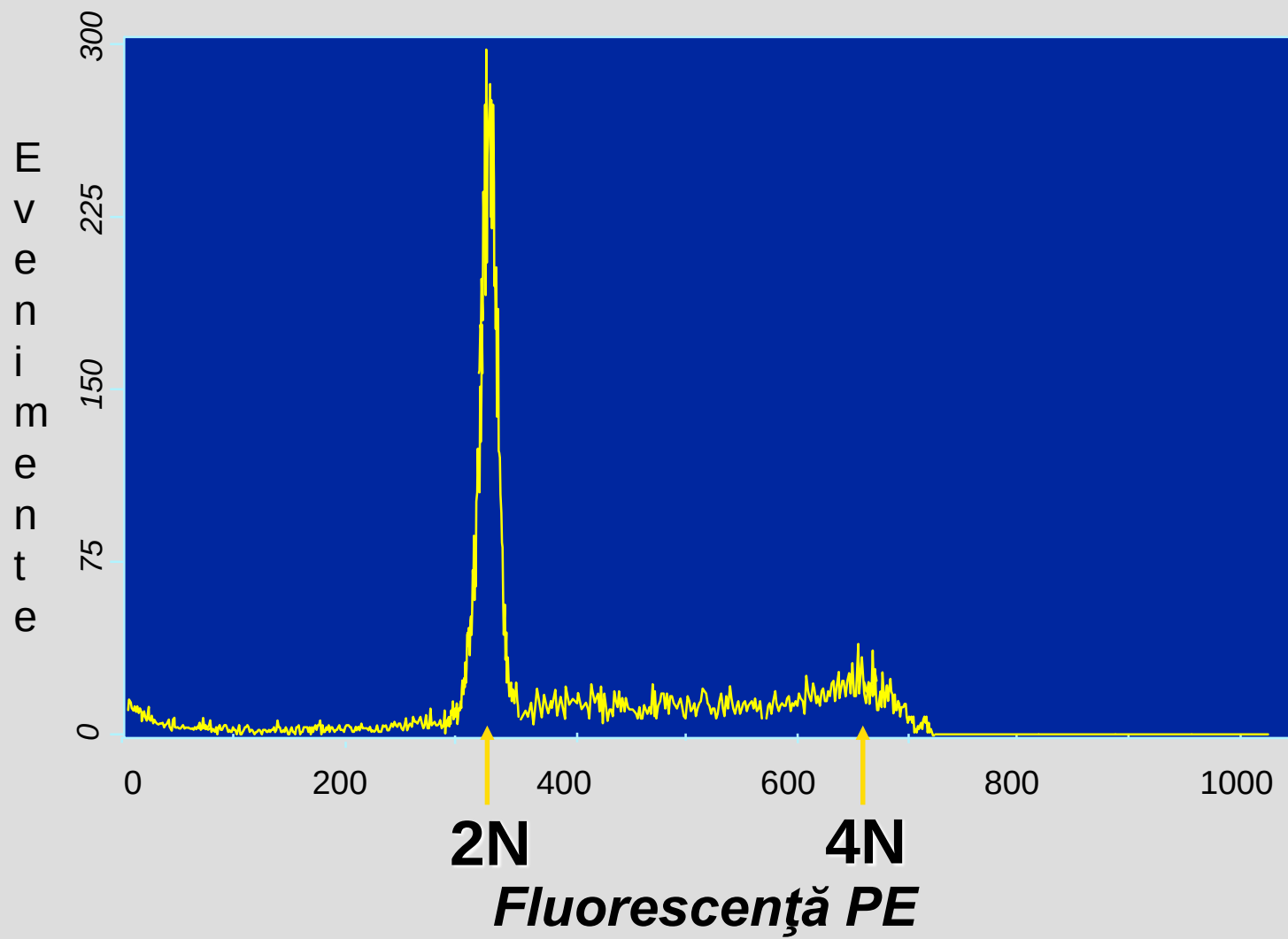
- Rezultatul final se obtine sub forma unei curbe intr-un grafic (pe abcisa cantitatea de ADN nuclear si pe ordonata numarul evenimentelor celulare)
- Cu ajutorul unor programe speciale se poate aprecia numarul de evenimente celulare corespunzatoare fiecărei faze (aria de sub curba) si se exprima rezultatul sub forma unui indice de proliferare (IP):

$$IP = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100$$

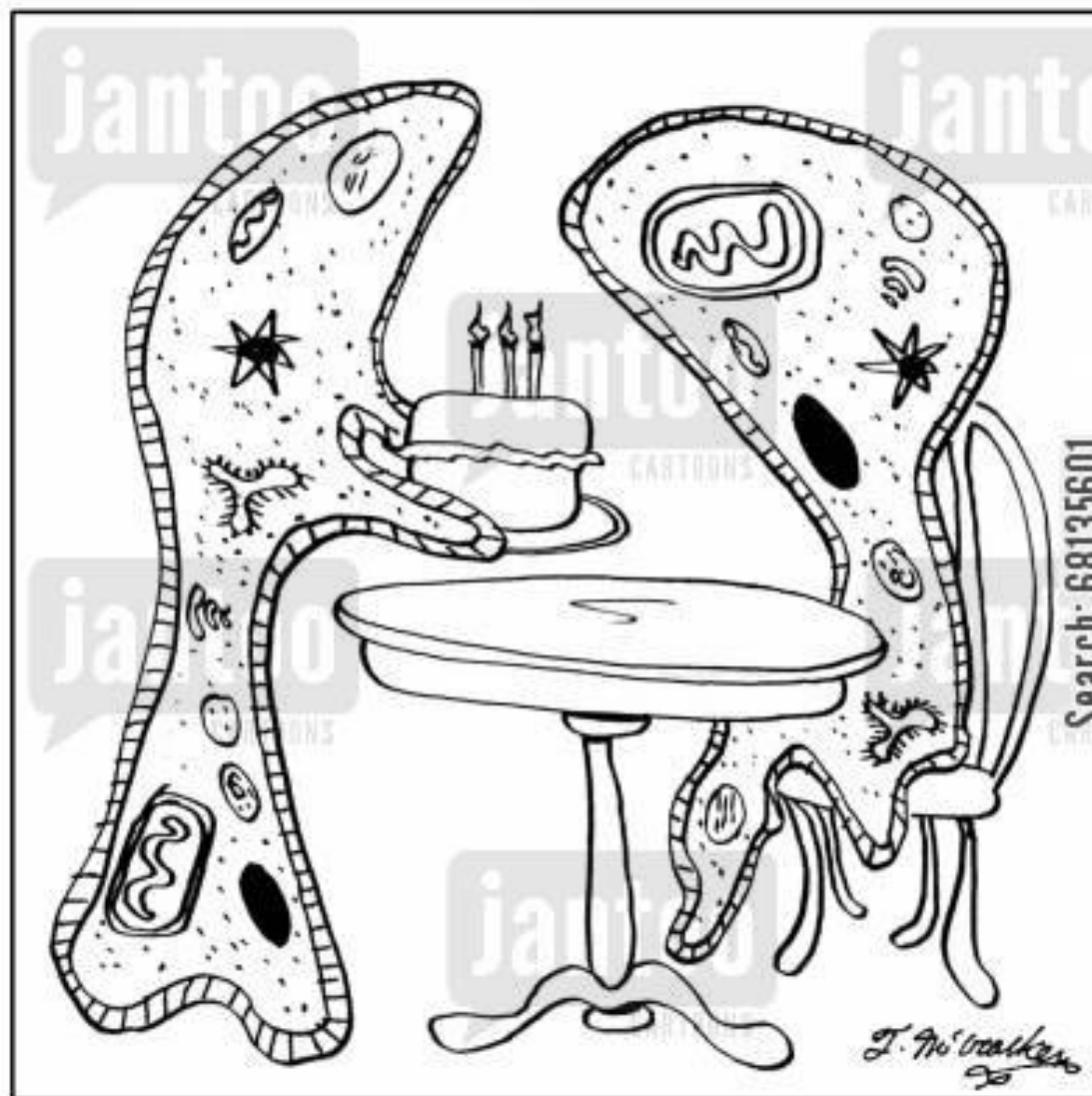
ANALIZA ADN



ANALIZA ADN



Vă mulțumesc!



"Happy Bifurcation Day."