

Abstrakt

Metoda real-time PCR je varianta klasické PCR, která umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu a využívá se především k analýze genové exprese.

Na základě předchozích experimentů jsme se rozhodli otestovat účinek antikoagulačních činidel EDTA, heparin, citrát sodný a CPDA na expresi vybraných genů imunologického spektra, a dále doby času od odběru krve do zpracování vzorku na hladiny mRNA vybraných genů, jež jsou dány změnami genové exprese a/nebo degradací mRNA. Pro kvantifikaci mRNA sledovaných genů jsme z leukocytů periferní krve izolovali celkovou RNA a tu přepsali pomocí reverzně transkriptázové PCR do cDNA, jež sloužila jako templát pro real-time PCR.

Pro sledování změn exprese způsobených vlivem jednotlivých antikoagulačních činidel byla použita krev od 10 dobrovolníků (každý dárce krve byl odebrán do 3 vakuových zkumavek s antikoagulačním činidlem EDTA, heparinem a citrátem sodným). Deset vzorků buffy coatů jsme získali od dárců krve v transfuzních vacích s antikoagulačním agens CPDA. Buňky krve ovlivněné CPDA vykazovaly statisticky významně nižší hladiny mRNA genů *TLR4*, *MYC* a *CCL2* ve srovnání s buňkami krve odebrané do jednoho ze 3 typů vakuet, a naopak, hladiny mRNA *IL-10* a *TNFa* byly v buňkách těchto vzorků signifikantně zvýšeny. Antikoagulační agens používaná v námi testovaných vakuových odběrových zkumavkách však vykazují rozdílné účinky na krevní buňky i samy mezi sebou: Citrát sodný zřejmě působí negativně na expresi mRNA prozánětlivých markerů *TNFa* a *CCL2*, neboť jsme detekovali významně nižší hladiny jejich mRNA oproti vzorkům krve odebraných do EDTA či heparinu.

Z těchto výsledků vyvozujeme, že v rámci expresních studií kvantifikujících mRNA je bezpodmínečně nutné používat jednotný odběrový systém; v opačném případě velmi pravděpodobně dojde k nezanedbatelnému zkreslení dat.

Sledování vlivu prodlevy od odběru krve do zpracování vzorku bylo testováno na 11 dobrovolnících. Po stanovených intervalech 0.5, 1.5, 2, 3 a 9 hodin jsme postupně z vakuity odebírali potřebné množství krve na izolaci RNA. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými časy byly zjištěny u 4 z celkem 7 sledovaných genů. Signifikantní

nárůst genové exprese mezi 3 a 9 hodinami byl zaznamenán u prozánětlivého genu *CCL2* a protizánětlivého genu *IL-10*. Statisticky významný pokles hladin mRNA v závislosti na době od odběru krve do zpracování vzorku byl pozorován u genů *TLR4* a *MYC*. Nejkritičtější perioda, tedy první 2 hodiny od odběru krve, odhalila u genů *MYC*, *BCL2* a *TNFa* vysokou interindividuální variabilitu v buněčné odpovědi na stres spojený s odběrem krve, a *ex vivo* stav. Pro odhalení určitého vzoru reakce by bylo potřeba testovat větší soubor.

Klíčová slova: real-time PCR, RNA, cDNA, efektivita PCR, antikoagulační činidlo, TaqMan® chemie