

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

LENKA KNOTOVÁ

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

Lenka Knotová

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

**STANOVENÍ ZNAKŮ H2AX A KI67
U EXTRAKORPORÁLNÍ FOTOFERÉZY**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2019

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lenka KNOTOVÁ
Osobní číslo: Z16B0108P
Studijní program: B5345 Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Téma práce: Stanovení znaků H2AX a Ki67 u extrakorporální fotoferezy
Zadávající katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Zásady pro vypracování

Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma Stanovit cíl kvalifikační práce Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
Popsat metodiku praktické části Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

CETKOVSKÝ, Petr, Jiří MAYER, Jan STARÝ, Mariana HRIČINOVÁ, et al. Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk. 1. vyd. Praha: Galén, 2016. 460 s. ISBN 978-80-7492-267-1.
PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ, et al. Hematologie a transfuzní lékařství I. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. 424 s + 64 barevných příloh. ISBN 978-80-247-3459-0.
HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. Základy imunologie. 6. aktual. vyd. Praha: Stanislav Juháňák – TRITON, 2017. 304 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
GREINIX, Hildegard T., Nina WOREL, Ulrike JUST a Robert KNOBLER, Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. Transfusion and Apheresis Science. 2014, 50(3) 349-357. ISSN 1473-0502.
KITKO, L. Carrie a E. John LEVINE. Extracorporeal photopheresis in prevention and treatment of acute GVHD. Transfusion and Apheresis Science. 2015, 52(2), 151-156. ISSN 1473-052.
KIKI, Ilhami. What is the role of apheresis technology in stem cell transplantation?. Transfusion and Apheresis Science. 2017, 56(6), 788-794. ISSN 1473-0502.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Vlas**
Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: 31. ledna 2018
Termín odevzdání bakalářské práce: 29. března 2019

V Plzni dne 1. února 2019

PhDr. Lukáš Štich
pověřen vedením fakulty



PhDr. Alena Pistulková
vedoucí katedry

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 3. 2019



vlastnoruční podpis

ABSTRAKT

Příjmení a jméno: Knotová Lenka

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Stanovení znaků H2AX a Ki67 u extrakorporální fotoferézy

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Počet stran: číslované 51, nečíslované 29

Počet příloh: 6

Počet titulů použité literatury: 36

Klíčová slova: GvHD – ECP – gama záření – H2AX – Ki67 – kaspáza 3

Souhrn:

Extrakorporální fotoferéza je metoda známá již od 80. let 20. století. Tato bakalářská práce se zabývá jejím znovuoobjevením a využitím při kontrole kvality transfuzních přípravků pomocí stanovení histonu H2AX, antigenu Ki67 a kaspázy 3. Cílem práce bylo ověřit, zda ECP poskytuje stejné výsledky jako ozáření vzorků gama zářením a nalézt vhodný protokol, který by umožnil sledování kvality vzniklého transfuzního přípravku. U vzorků připravených ozářením UVA nebo gama zářením bylo pomocí průtokové cytometrie sledováno zastoupení H2AX, Ki67 a kaspázy 3. Bylo ověřeno, že vzorky ozářené UVA zářením pomocí extrakorporální fotoferézy poskytují shodné výsledky jako vzorky ozářené gama zářením. Vlivem záření docházelo k velmi výrazným zlomům, které byly sledovány expresí histonu H2AX. Po ozáření nedocházelo k proliferaci buněk ve vzorku. Proliferace byla sledována po stimulaci vzorků mitogenem (PHA) a expresí Ki67. Po ozáření buňky vstupují do apoptózy, což bylo ověřeno detekcí kaspázy 3. Během psaní této bakalářské práce byl navržen vhodný protokol, který umožňuje sledování kvality vzniklého transfuzního přípravku.

ABSTRACT

Surname and name: Knotová Lenka

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Detection of markers H2AX and Ki67 at extracorporeal photopheresis

Consultant: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Number of pages: numbered 51, unnumbered 29

Number of appendices: 6

Number of literature items used: 36

Keywords: GvHD – ECP – gamma radiation – H2AX – Ki67 – caspase 3

Summary:

Extracorporeal photopheresis has been a method known since the 1980s. This bachelor thesis deals with its rediscovery and use in the control of the quality of transfusion products, by the determination of histone H2AX, the Ki67 antigen and caspase 3. The aim of this work was to verify whether the ECP provides the same results as irradiation of gamma radiation samples and to find a suitable protocol to monitor the quality of the transfusion product. For samples prepared by UVA or gamma irradiation, the presence of H2AX, Ki67 and caspase 3 was monitored by flow cytometry. Due to radiation, there were very significant breaks, which were monitored by histone H2AX expression. After irradiation, cells did not proliferate in the sample. Proliferation was monitored after stimulation with mitogen samples (PHA) and Ki67 expression. After irradiation the cells enter apoptosis, which was verified by the detection of caspase 3. During the writing of this bachelor thesis a suitable protocol was designed which allows the quality of the transfusion product to be monitored.

PŘEDMLUVA

Dlouho jsem přemýšlela, jaké téma si svoji bakalářskou práci zvolit. Přemýšlela jsem o nejrůznějších tématech týkajících se hematologie, hematoonkologie, transfuzní služby nebo imunologie, protože bych v jednom z těchto oborů ráda po ukončení studia pracovala. Nakonec jsem si vybrala téma: „Stanovení znaků H2AX a Ki67 u extrakorporální fotoferézy“, které bylo vypsáno Ing. Bc. Tomášem Vlasem. Jde o poměrně náročnou, ale velice zajímavou problematiku, která v sobě skrývá ideální kombinaci hematoonkologie a imunologie.

Poděkování:

Nejdříve bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Bc. Tomáši Vlasovi za pomoc při výběru tématu, za množství cenných rad, doporučení, připomínek a odbornou pomoc, kterou mi poskytoval při zpracování mé bakalářské práce. Rovněž za velikou trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval při konzultacích ke zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň a Hematologicko-onkologickému oddělení FN Plzeň za poskytnutí laboratorního vybavení a možnost využití laboratoří k vypracování praktické části mé bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům, kteří mi umožnili studium, vždy mě plně podporovali a tvořili potřebné zázemí. Rovněž můj velký dík patří mému příteli, zejména za jeho inspirativní připomínky, podporu a trpělivost, kterou se mnou při psaní této práce měl.

Tato bakalářská práce byla podpořena grantem institucionálního výzkumu MZČR-FNPI , 00669806.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK.....	12
SEZNAM GRAFŮ.....	13
SEZNAM ZKRATEK.....	14
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1 TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK	19
1.1 Historie transplantace hematopoetických buněk	19
1.2 Hematopoetická kmenová buňka a její transplantace	21
1.2.1 Zdroje hematopoetických kmenových buněk	22
1.2.2 Typy transplantací hematopoetických kmenových buněk dle dárce	24
1.3 Předtransplantační přípravné režimy.....	25
1.4 Indikace k transplantaci hematopoetických kmenových buněk	26
1.5 Kontraindikace transplantace hematopoetických kmenových buněk	27
2 PŘEDTRANSPLANTAČNÍ VYŠETROVÁNÍ.....	28
2.1 Vyšetření příjemce hematopoetických kmenových buněk.....	28
2.2 Vyšetření dárce hematopoetických kmenových buněk	30
2.3 HLA kompatibilita	30
2.4 Výběr vhodného dárce hematopoetických kmenových buněk	32
2.4.1 Postup při hledání nepříbuzného dárce.....	33
3 PROVEDENÍ ALOGENNÍ TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK.....	35
4 KOMPLIKACE PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK.....	36
4.1 Reakce štěpu proti hostiteli.....	36
4.1.1 Akutní reakce štěpu proti hostiteli.....	37
4.1.2 Chronická reakce štěpu proti hostiteli.....	38
4.1.3 Léčba reakce štěpu proti hostiteli	38
5 EXTRAKORPORÁLNÍ FOTOFERÉZA	40
6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	42
6.1 Měřené povrchové a intracelulární znaky leukocytů.....	44
6.1.1 Molekula CD45	44
6.1.2 Molekula CD3	44
6.1.3 Molekula H2AX	45
6.1.4 Molekula Ki67	45
6.1.5 Kaspáza 3	45
7 TESTY METABOLICKÉ AKTIVITY BUNĚK.....	46

PRAKTICKÁ ČÁST	47
8 CÍL A ÚKOLY PRÁCE.....	48
9 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY	49
10 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	50
11 METODIKA PRÁCE	51
11.1 Separace na hustotním gradientu.....	51
11.2 Příprava vzorku pro extrakorporální fotoferézu	52
11.3 Příprava vzorku pro ozáření gama zářením	52
11.4 Inkubace.....	52
11.5 Intracelulární značení.....	53
11.6 Stanovení na průtokovém cytometru	54
11.7 Stanovení Alamarblue®.....	54
12 VÝSLEDKY	55
12.1 Statistické zhodnocení	55
12.2 Výsledky stanovení H2AX.....	56
12.2.1 Stanovení H2AX po 48 hodinové inkubaci	56
12.2.2 Stanovení H2AX po 72 hodinové inkubaci	57
12.3 Výsledky stanovení Ki67	58
12.3.1 Stanovení Ki67 po 48 hodinové inkubaci	58
12.3.2 Stanovení Ki67 po 72 hodinové inkubaci	59
12.4 Výsledky stanovení kaspázy 3.....	60
12.4.1 Stanovení kaspázy 3 po 48 hodinové inkubaci	60
12.4.2 Stanovení kaspázy 3 po 72 hodinové inkubaci	61
12.5 Výsledky stanovení Alamarblue® po 48 hodinové inkubaci.....	62
13 DISKUZE.....	63
ZÁVĚR	66
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67
SEZNAM PŘÍLOH.....	71
PŘÍLOHY	72

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 HLA oblast na 6. chromozomu	31
Obrázek 2 Schéma extrakorporální fotoferézy	41
Obrázek 3 Separace na hustotním gradientu.....	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Schéma rozložení výsledků získaných během analýzy	55
---	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Grafické zhodnocení dat z průtokového cytometru	43
Graf 2 Stanovení H2AX po 48 hodinové inkubaci	56
Graf 3 Stanovení H2AX po 72 hodinové inkubaci	57
Graf 4 Stanovení Ki67 po 48 hodinové inkubaci	58
Graf 5 Stanovení Ki67 po 72 hodinové inkubaci	59
Graf 6 Stanovení kaspázy 3 po 48 hodinové inkubaci	60
Graf 7 Stanovení kaspázy 3 po 72 hodinové inkubaci	61
Graf 8 Stanovení Alamarblue® po 48 hodinové inkubaci.....	62

SEZNAM ZKRATEK

8-MOP	8-methoxypsoralen, Methoxsalen
AML	akutní myeloidní leukémie
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
ALS	antilymfocytární sérum
APC	<i>antigen presenting cell</i> , antigen prezentující buňka
ATG	antithymocytární globulín
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ataxia telangiectasia a Rad3-related</i>
CBU	<i>cord blood unit</i> , jednotka pupečnickové krve
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i> , jednotka tvořící kolonie
CML	chronická myeloidní leukémie
CLL	chronická lymfatická leukémie
CsA	Cyklosporin A
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i> , molekuly uvolněné z poškozených vlastních buněk
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependentní proteinkináza
ECP	<i>extracorporeal photopheresis</i> , extrakorporální fotoforéza
EKG	elektrokardiografie
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetální hovězí sérum
FC	<i>flow cytometry</i> , průtoková cytometrie
Fsc	<i>Forwar Scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i> , faktor stimuluující granulocytární kolonie
GvHD	<i>graft versus host disease</i> , reakce štěpu proti hostiteli

GVL	<i>graft versus leukemia</i> , reakce štěpu proti leukemii
GvT	<i>graft versus tumor</i> , reakce štěpu proti nádoru
HCT-CI	<i>hematopoietic cell transplantation – comorbidity index</i> , index komorbidit transplantace hematopoetických kmenových buněk
HDC	<i>high dose chemotherapy</i> , vysokodávkovaná chemoterapie
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , virus lidské imunitní nedostatečnosti
HL	Hodgkinův lymfom
HLA	<i>human leucocyte antigens</i> , lidské leukocytární antigeny
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> , hematopoetická kmenová buňka
HSCs	<i>hematopoietic stem cells</i> , hematopoetické kmenové buňky
KD	kostní dřeň
KO	krevní obraz
MDS	myelodysplastický syndrom
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , hlavní histokompatibilní komplex
MM	mnohočetný myelom
MNCs	<i>mononuclear cells</i> , mononukleární buňky
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NHL	non-Hodgkinův lymfom
NK	<i>natural killer</i> , přirozený zabíječ
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , fosfátový pufr
PBSCs	<i>peripheral blood stem cells</i> , periferní hematopoetické kmenové buňky
PFA	paraformaldehyd
PHA	phytohemaglutinin
PK	periferní krev
PPR	předtransplantační přípravné režimy

RIC	<i>reduced intensity conditioning</i> , režim s redukovanou intenzitou
Ssc	<i>Side Scatter</i>
TBI	<i>total body irradiation</i> , celotělové ozáření
TCR	<i>T-cell receptor</i> , receptor na povrchu T – lymfocytů
UVA	<i>ultraviolet</i> , ultrafialové záření typu A
WHO	<i>World health organization</i> , Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Bakalářská práce s názvem „Stanovení znaků H2AX a Ki67 u extrakorporální fotoferézy“ je zpracována metodou kvantitativního výzkumu a zabývá se znovuobjevením metody extrakorporální fotoferézy, známé od 80. let 20. století, a jejím využitím při kontrole kvality transfuzních přípravků, pomocí stanovení histonu H2AX, antigenu Ki67 a kaspázy 3.

Hlavním cílem této práce bylo ověřit, zda ECP poskytuje stejné výsledky jako ozáření vzorků gama zářením, nalézt vhodný protokol, který by umožnil sledování kvality vzniklého transfuzního přípravku a zavést metodu sledování exprese znaků H2AX a Ki67 na průtokovém cytometru.

V teoretické části je podrobně rozebírána problematika transplantace hematopoetických kmenových buněk a jejich komplikací. Teoretická část práce také shrnuje informace o metodě extrakorporální fotoferézy a o její aplikaci při terapii hemato-onkologických onemocnění. Dále jsou také rozebírány metody laboratorní diagnostiky.

V praktické části je uveden kompletní podrobný postup k vyšetření separovaných buněk, včetně výběru patientských vzorků, použitého intracelulárního značení antigenů (CD45, CD3, H2AX, Ki67 a kaspázy 3), realizace samotného testování a měření na průtokovém cytometru. Dále jsou rozebírány způsoby hodnocení a návrh pro kontrolu kvality transfuzních přípravků.

Diskuze je věnována srovnání našich výsledků s odbornými články od různých autorů ve smyslu interpretace námi získaných dat.

TEORETICKÁ ČÁST

1 TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

Hematopoetické kmenové buňky (*hematopoietic stem cells*, HSCs) jsou buňky, které mají schopnost sebeobnovy a představují tak nevyčerpatelný zdroj buněk, s čímž úzce souvisí jejich proliferační schopnost, díky níž jsou schopny velkého počtu opakovaných buněčných dělení. Zároveň se dokáží diferencovat v buňky lymfoidní linie a všech nelymfoidních vývojových řad – dávají tak vzniknout funkčně specializovaným buňkám. HSCs se nacházejí v hlavním hematopoetickém orgánu, kterým je kostní dřeň (KD). Transplantace HSC buněk je dnes běžnou součástí léčby nejen hematologických pacientů. (Cetkovský, 2016; Penka, 2011)

1.1 Historie transplantace hematopoetických buněk

Patrně první zmínka o HSCs buňkách pochází z roku 1909 od rusko-amerického vědce A. A. Maximowa. Po výbuchu atomové bomby, na konci 2. světové války, dochází k vedení intenzivních výzkumů radiční biologie a následnému poznání ničivých následků výbuchu. Díky zjištění letální dávky pro myši, se ukázalo, že hlavní příčinou smrti je selhání kostní dřeneš po masivním ozáření. Pokusy o transplantaci KD mezi zvířaty vedly jen k částečným úspěchům, jelikož nebylo zcela jasné, zda regeneraci krve tvorby způsobují buňky vlastní, nebo podané, či dokonce látky uvolňující se z transplantovaných buněk.

Koncem 40. let 20. století se význam transplantace HSCs potvrdil, nicméně zvířata po těchto alogenních transplantacích nepřežívala dlouho. Stav, ve kterém se zvířata po transplantaci KD nacházela, byl popisován jako homologní nemoc. Poznání tohoto stavu, dnes nazývaného *graft versus host disease* (nemoc z reakce štěpu proti hostiteli, GvHD), nastalo až koncem 50. let 20. století, kdy také proběhly první pokusy týmu E. D. Thomase o transplantace po celotělovém ozáření. Nicméně nepříliš povzbudivé výsledky odhalily zásadní komplikace.

V roce 1958 byly položeny základy lidského hlavního histokompatibilního systému (*major histocompatibility complex*, MHC) neboli lidských leukocytárních

antigenů (*human leucocyte antigens*, HLA). Ukázalo se, že HLA systém má dva lokusy, označené jako A a B. Později se systém rozšířil ještě o lokus C a D. Důležitost tohoto systému nebyla nejprve zřejmá, dnes je však propracovaným vědním oborem a nedílnou součástí při identifikaci HSCs zejména u nepříbuzných dárců.

Roku 1959 J. E. Lovelock a M. W. H. Bishop popsali kryoprotektivní působení dimethylsulfoxidu (DMSO). Díky tomuto objevu, společně s objevem kryoprotektivního účinku glycerolu (roku 1949), se podařilo vyřešit proces kryokonzervace transplantátů, které jsou běžně uchovávány při teplotě tekutého dusíku (-196 °C). Koncem 60. let 20. století došlo k objevení prvního separátoru krevních elementů použitelného pro klinickou praxi. Současně vstoupilo do oblasti transplantací HSC antilymfocytární sérum (ALS), jenž má zásadní vliv na imunitní reakce.

Roku 1961 popsali dva kanadští vědci, J. Till a E. McCulloch, skutečnost, že krvetvorná tkáň myší, kterým byla podána zdravá KD, obsahuje buňky, schopné vytvořit ve slezině ozářených myší viditelné kolonie buněk (CFU). Jednalo se o první *in vitro* kultivaci HSCs, přítomnost CFU i v lidské periferní krvi se prokázala zhruba o deset let později.

Profesor Thomas, od roku 1963, se svými kolegy pokračoval ve svém výzkumu klinických transplantací. Jeho práce probíhala v Seattlu, kde vybudoval velké transplantační centrum a společně se svým týmem představil základní imunosupresivní předtransplantační režim, zakládající se na celotělovém ozáření (*total body irradiation*, TBI) a cyklofosfamidu. Také zavedli základní profylaxi GvHD. Na začátku 70. let se klinické transplantace KD dostávaly do rutinního života a spustil se velký klinický výzkum, zaměřující se na indikace transplantace u jednotlivých osob, optimalizaci předtransplantačního režimu, zvládnání komplikací (zejména infekčních) a na další oblasti. Thomas byl za svoji práci oceněn až v roce 1990, kdy získal Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu za vývoj transplantace buněk a orgánů. Dále se v 70. letech začaly zakládat registry dárců KD a díky možnosti HLA typizace se umožnilo provádění alogenních transplantací od nepříbuzných dárců shodných v HLA systému s příjemci. Během 70. let 20. století dále došlo ke zjištění, že ke zvýšení koncentrace HSCs v periferní krvi

dochází při obnově krvetvorby po podání chemoterapie. O deset let později se zjistilo, že k takovému zvýšení může dojít i po podání růstových faktorů, což vytvořilo základy tzv. stimulace periferních HSCs neboli vyplavování buněk z KD do periferie. Koncem 70. let 20. století se objevily první zprávy o transplantacích pomocí HSCs získaných z periferní krve.

V laboratořích firmy Sandoz objevili roku 1976 cyklický polypeptid *Cyclosporin A* (CsA), u kterého později zjistili imunosupresivní účinky, bez nichž by dnešní transplantace byly nepředstavitelné. CsA se poprvé klinicky uplatnil v roce 1978 u pacientů po alogenní transplantaci KD s akutní GvHD. Během 80. let se pak tento lék stal standardně využívaným imunosupresivem, čímž umožnil rozvoj klinické transplantologie.

V roce 1984 C. I. Civin et al., poprvé uveřejnili poznatek, že kmenové buňky a mladé vývojové formy raných stádií diferenciaci na svém povrchu exprimují znak CD34. Později se díky experimentům na zvířatech zjistilo, že regeneraci krvetvorby může zajistit pouze frakce CD34+ buněk. Toto zjištění postavilo základy transplantace tzv. selektovaných CD34+ buněk.

Od 90. let se začaly více objevovat transplantace periferních hematopoetických kmenových buněk (*peripheral blood stem cells*, PBSCs), které v dnešní době převažují, zejména při indikaci autologních transplantací. Také počet autologních transplantací za rok, převýšil roční počet alogenních transplantací. (Cetkovský, 2016; Penka, 2011)

1.2 Hematopoetická kmenová buňka a její transplantace

Produkce krevních buněk probíhá nepřetržitě během celého života organismu a HSCs jsou tzv. architekti definitivní hematopoézy. Proces hematopoézy probíhá za fyziologického stavu v KD, při chorobných stavech se může tvorba přesunout do jater nebo sleziny. HSCs jsou definovány jako multipotentní kmenové buňky se schopností generovat všechny typy krevních elementů. Pokud dojde ke zničení kostní dřeně, jsou HSCs schopné ji plně nahradit a zajistit tak dlouhodobou produkci všech krevních buněk. Pro HSCs je charakteristická exprese povrchových znaků CD31, CD33, CD34 a CD45. (Ng Ashley P, 2017; Čedíková, 2012)

Cílem transplantace HSCs je osídlení kostní dřeně příjemce HSCs dárce, které restaurují pacientovu krevetvorbu a imunitní systém. Termín transplantace HSCs nahrazuje dříve využívaný termín transplantace KD. Díky dnešním technikám může být zdrojem pluripotentních kmenových buněk hematopoézy nejen KD, ale také periferní krev dárce po stimulaci růstovými faktory nebo krev pupečnicková. HSCs se nacházejí ve stromatu KD, kde proliferují a diferencují se, v počtu 1 HSC na 100 000 jiných buněk. V periferní krvi (PK) je počet HSCs řádově nižší, proto se dříve využívala nejvíce metoda získávání HSCs odběrem KD. Tento způsob odběru dnes poněkud zastihuje jeho alternativa – HSCs izolované pomocí separátoru z PR, kdy se z KD mobilizují HSCs pomocí faktoru stimulující granulocytární kolonie (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF). Transplantace mohou být autologní nebo alogenní. (Hořejší, 2017; Krejsek, 2016; Čedíková, 2012)

1.2.1 Zdroje hematopoetických kmenových buněk

V současné klinické praxi se pro potřeby transplantací využívají tři zdroje HSCs: KD, periferní krev a pupečnicková krev.

Primárním zdrojem pro transplantaci HSCs je KD jakožto hlavní orgán hematopoézy. U dospělých jedinců je krevetvorba v KD omezena na lebku, obratle lopatky, hrudní kost, žebra a kosti pánve. Pro transplantaci se odběr KD provádí na operačním sále v poloze na břiše z horní části lopaty kosti kyčelní. Podle typu transplantace je dárce nebo samotný nemocný v celkové nebo epidurální anestezii. Dřeň odebírají dva lékaři pomocí speciálních jehel, opakovanými vpichy a aspiracemi dřeňové krve. Místa vpichu a aspirace je nutné měnit. Pro jednu transplantaci KD je potřeba odebrat cca 10 – 20 ml dřeňové krve na 1 kg hmotnosti příjemce. Odebraná dřeňová krev obsahuje jaderné buňky, tuk, drobné úlomky kostní hmoty, příměs PK. Proto je nutné pro transplantaci odebraný materiál nejprve zpracovat. V množství získaných jaderných buněk je méně než 1 – 2 % mononukleárních buněk (*mononuclear cells*, MNCs), mezi které patří HSCs, které jsou cílem odběru. Samotnou frakci mononukleárních buněk lze zís-

kat pomocí separátoru nebo centrifugací. V odebraném štěpu je cílem získat alespoň $2,0 \cdot 10^8/\text{kg}$ mononukleárních buněk. Množství, které by mělo být dostatečné pro přihojení a rekonstituci hematopoézy.

Sekundárním zdrojem HSCs pro transplantaci je PK, kde fyziologicky cirkuluje jen velmi malé množství HSCs, které je pro transplantaci nedostatečné. Proto musí být HSCs metodou mobilizace, stimulovány v KD a posléze vyplavovány do PK. Odtud jsou pomocí separátoru krevních elementů odebírány v dostatečném počtu pro transplantaci. O buňkách, které jsou takto odebrány z PK, se hovoří jako o periferních kmenových buňkách hematopoézy. Metody mobilizace mohou být různé. V PK se zvýšený počet PBSCs vyskytuje:

- 1) po aplikaci růstových faktorů,
- 2) po odeznění myelosupresivního účinku aplikované chemoterapie, kdy dochází k regeneraci hematopoézy,
- 3) při kombinaci obou předchozích způsobů; po aplikaci myelosupresivní chemoterapie s následným podáním růstového faktoru.

Z hlediska vyplaveného počtu PBSCs a jejich sběru separátorem, je třetí uvedená metoda nejefektivnější. Tento způsob mobilizace, je možné použít pouze před autologními transplantacemi. Při alogenních transplantacích lze použít k mobilizaci pouze aplikaci růstových faktorů. Využívá se výhradně rekombinantní G-CSF. Podává se po dobu 3 – 4 dnů před vlastním odběrem, 2 krát denně v podobě subkutánních injekcí. G-CSF stimuluje proliferaci a vyplavování granulocytů z KD. Následkem je zvýšené vyplavování také PBSCs buněk, v PK se jejich koncentrace zvýší až tisíckrát. Pro HSCs je charakteristická exprese antigenu CD34, čehož se využívá při zjišťování koncentrace hematopoetických buněk v PK nebo v transplantátu. Monitorování koncentrace probíhá pomocí průtokového cytometru (*flow cytometry*, FC). Díky znalosti koncentrace CD34+ buněk je možné optimální načasování odběru buněk. Ve chvíli, kdy dojde k dostatečnému vzestupu CD34+ buněk, se zahájí leukaferéza na separátoru. Při opakovaném průtoku krve dárce se centrifugací odseparovává frakce MNC s vysokým obsahem PBSCs. Celkový počet odebraných buněk ukazuje na kvalitu transplantátu. Za cílové množství buněk pro transplantaci je považován počet alespoň $4,0 \cdot 10^6/\text{kg}$. Jednoznačná dolní mez počtu transplantovaných PBSCs, která

by byla bezpečná, nebyla dosud stanovena. Klinická praxe totiž ukázala, že z hlediska stabilního připojení a regenerace krve lze provést transplantaci HSCs i s menšími počty PBSCs.

Pupečnicková krev představuje spíše alternativní zdroj HSCs. I když obsahuje relativně velký počet nezralých HSCs, je její objem ve většině případů menší než 100 ml. Odběr se provádí z pupečnicku bezprostředně po porodu. Poté musí být krev zpracována. Změří se počet jaderných buněk a HSCs. Doplní se typizace HLA. Následně jsou buňky vitálně zamrazeny a uskladněny v tekutém dusíku v bance pupečnickové krve jako tzv. jednotka pupečnickové krve (CBU). V bance pak CBU čeká na případného příjemce, jehož hmotnost by neměla být víc než 25 – 30 kg. Díky tomu a díky nižšímu počtu použitelných krvevorných buněk jsou takové CBU používány pouze pro transplantace u dětí. (Raida, 2013; Penka, 2011)

1.2.2 Typy transplantací hematopoetických kmenových buněk dle dárce

Transplantace HSCs je možné principiálně dělit podle toho, kdo je jejich dárce na autologní, alogenní a syngenní. Indikace jednotlivých typů transplantací HSCs se významně liší a do značné míry odráží zvolený typ léčby i prognózu příjemce.

Smyslem autologní transplantace HSCs je podání vlastních krvevorných buněk pacienta, tj. nemocný daruje buňky sám sobě. Přesnější než autologní transplantace, je však termín vysoko dávkovaná chemoterapie s podporou autologních hematopoetických buněk. Principem tohoto léčebného postupu je totiž eliminace zbytku nádoru, nejčastěji po myeloablativní chemoterapii, která ireverzibilně poškodí pacientovu fyziologickou hematopoézu. Následné podání předem odebraných a vitálně zamražených autologních HSCs zajistí potřebnou obnovu hematopoézy a normalizaci krevního obrazu (KO) do 2 – 3 týdnů.

Alogenní transplantace HSCs je přenos HSCs mezi dvěma jedinci stejného druhu. Důležitá je zejména transplantace imunity dárce. Jedná se o komplexní imunologický proces, při kterém dochází nejen k substituci příjemcovi hematopoézy dárcovskou, po předchozí myeloablaci, ale také dochází k substituci a doplnění imunitního systému příjemce. Hlavním efektem je tzv. reakce štěpu

proti nádoru, kdy dochází k potlačení zbytkového nádoru imunokompetentními buňkami dárce (zejména T lymfocyty). Ty jsou schopné rozeznat u některých hematologických malignit nádorové buňky a zničit je, což vede k definitivnímu potlačení nádorového onemocnění a posléze k vyléčení pacienta. Imunokompetentní buňky dárce také umožňují stabilní přihojení dárcovské hematopoézy. Během přípravného režimu je kladen velký důraz na potlačení imunity příjemce, protože jedině tak organismus příjemce přijme hematopoézu a imunitu dárce. Následkem tohoto imunosupresivního efektu je vyšší riziko komplikací v potransplantačním období. Imunita příjemce je zcela rozvrácena a nefunkční. Transplantovaná imunita se teprve vytváří. Několik měsíců po transplantaci se musí, zdánlivě paradoxně, kontrolovat a tlumit imunitní odpověď dárce pro organismus příjemce imunosupresivy. Bohužel, i přesto je pacient v tomto období ohrožen všemi typy oportunních infekcí a neméně GvHD.

Syngenní transplantace HSCs je specifický a vzácný typ. Dárce je jednováček dvojčete nemocného/příjemce. U tohoto typu transplantace odpadá riziko imunologických komplikací díky genoidentickým buňkám. (Raida, 2013; Penka, 2011)

1.3 Předtransplantační přípravné režimy

Předtransplantační přípravné režimy (PPR) se využívají u pacientů po odstranění jejich původní, často nemocné krvevotvorby. Vytvářejí se podmínky k přijetí nového krvevotvorného štěpu. Správně zvolený předtransplantační přípravný režim a kontrola kvality jeho podání má zásadní vliv na úspěšný výsledek léčby, ale také na časnou úmrtnost. Cílem PPR je:

- 1) vytvoření prostoru ve stromatu KD pro přijetí dárcovských HSCs,
- 2) masivní imunosuprese s cílem snížit riziko nepřijetí štěpu,
- 3) eliminace nádorových buněk z postižených tkání.

Režimy lze rozdělit na myeloablativní a nemyeloablativní.

Myeloablativní PPR vedou ke všem výše uvedeným cílům, a proto jsou považovány za standard. Jsou charakterizovány vysokodávkovanou chemoterapií (*high dose chemotherapy*, HDC) s nebo bez TBI s celkovou dávkou 10 – 15 Gy. V případě HDC je nejčastěji užívaným cytostatikem *Cyklofosfamid*

nebo jeho kombinace s *Busulfanem*. Jde o nejběžnější myeloablativní PPR, který zajišťuje vysoce účinnou imunosupresi. Toxicita tohoto režimu spočívá v TBI.

Nemyeloablativní PPR neboli přípravné režimy s redukovanou intenzitou (reduced intensity conditioning, RIC) využívají imunosupresi a střední dávky cytostatik. Mají sice menší cytotoxický účinek, ale zbylé nádorové buňky mohou být dodatečně eliminovány při imunitní reakci štěpu proti nádoru (*graft versus tumor*, GvT). Tento přípravný režim je indikován zejména u nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML), akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), chronickou myeloidní leukémií (CML), myelodysplastickým syndromem (MDS), mnohočetným myelomem (MM), non-Hodgkinovým lymfom (NHL), aplastickou anémií. Nejčastěji se užívá kombinace léků *Fludarabin* s *Busulfanem* a antilymfocytárním globulinem (ATG). ATG se podílí na intenzivní imunosupresi, která je nezbytná pro přihojení štěpu a zamezení jeho rejekce. A to zejména při alogenních transplantacích HSCs. Výhodou tohoto režimu je možnost podání i starším pacientům, pro které by TBI mohlo být fatální. Nevýhodou je vyšší riziko relapsu nádorového onemocnění než u myeloablativních PPR. (Cetkovský, 2016; Raida, 2007; Slovák, 2005)

1.4 Indikace k transplantaci hematopoetických kmenových buněk

Indikace k provedení transplantace HSCs se liší v závislosti na typu transplantace, jelikož jejich princip i očekávaný efekt je rozdílný. Indikace se také liší v různých transplantačních centrech. S nástupem nových léků a postupů některé tradiční indikace vymizeli. Naopak někde se možnosti transplantace rozšířili i pro pacienty vyššího věku či s pokročilejší formou onemocnění. Hlavní indikaci dnes představují zejména hematologické malignity. Další indikace představují vrozené poruchy imunity, dědičné poruchy metabolismu, autoimunitní onemocnění a solidní nádory. V léčbě solidních nádorů však transplantace HSCs nespĺnila očekávání, proto se indikace omezily.

Autologní transplantace HSCs je preferována u lymfoproliferativních onemocnění a MM. Nejčastější indikací pro alogenní transplantaci HSCs jsou NHL, Hodgkinův lymfom (HL) a MM. V posledních letech se u leukémií zvyšuje počet

spíše alogenních transplantací HSCs. Indikacemi pro alogenní transplantaci HSCs jsou AML, ALL, MDS, CML, chronická lymfatická leukémie (CLL), myeloproliferativní onemocnění, aplastická anémie, paroxysmální noční hemoglobinurie a vrozené poruchy imunity.

K indikaci pacienta pro transplantaci HSCs nestačí pouze základní diagnóza. Indikace závisí i na proměnných faktorech jako je věk, současně přítomná jiná nemoc, celkový stav pacienta a jeho motivace podílet se na léčbě. (Cetkovský, 2016; Penka, 2011)

1.5 Kontraindikace transplantace hematopoetických kmenových buněk

S ohledem na dlouhodobé přežití a kvalitu pacientova života existují stavy, při kterých transplantace HSCs není doporučena jako vhodná léčba. Kontraindikací pro transplantaci HSCs může být současně probíhající jiná nemoc, která postihuje jednotlivé orgány, které mají vliv na potransplantační úmrtnost. Jedná se především o srdce a plíce. Mezi kontraindikace dále patří věk, prodělané a aktivní infekce, stav základní nemoci a tzv. *noncompliance* neboli nedodržení, nespolupráce pacienta při dodržování léčebného režimu. Noncompliance je absolutní kontraindikací pro transplantaci HSCs. Ke všem kontraindikačním stavům je nutné zohlednit agresivitu nemoci a průměrné přežití pacienta, kterého by dosáhl jinou, alternativní léčbou bez provedené transplantace HSCs. Při posuzování aspektů kontraindikujících transplantaci HSCs neexistuje objektivní rozhodnutí. (Cetkovský, 2016)

2 PŘEDTRANSPLANTAČNÍ VYŠETROVÁNÍ

Léčba zejména maligních onemocnění transplantací HSCs dává mnohým pacientům významnou možnost úplného vyléčení. Jde však o léčebný postup, který je svázán značnou rizikovostí. Z tohoto důvodu je nutné vycházet z charakteru základního onemocnění, rychlosti jeho progresu, očekávaného GvT efektu, celkového stavu pacienta, jeho přidružených chorob, věku a dosud aplikované léčby. Součástí předtransplantačního vyšetřování není jen vyšetření pacienta nebo příjemce. Interní vyšetření, které by mělo včas vyloučit případná skrytá rizika spojená s odběrem HSCs buněk, absolvuje každý dárce. (Český národní registr dárců dřeně, 2017; Cetkovský, 2016)

2.1 Vyšetření příjemce hematopoetických kmenových buněk

Při hodnocení celkového stavu pacienta je třeba znát základní onemocnění včetně jeho stadia i rozsahu, jelikož ovlivňuje výběr typu transplantace, ale i přípravný režim a jeho intenzitu. U pacientů, kteří podstupují transplantaci HSCs v kompletní remisi základního onemocnění je mnohem nižší riziko relapsu onemocnění.

K posouzení celkového stavu příjemce bylo vypracováno několik škál hodnocení. Ty mají snahu objektivizovat konkrétní nález a poskytují srovnání mezi jednotlivými pacienty i dynamikou vývoje u jednotlivců. Nejčastěji používané hodnocení pro dospělé pacienty je dle Světové zdravotnické organizace (*World health organization*, WHO) Karnofského skórovací systém.

Pacienti před transplantací mají často různá orgánová postižení a další přidružená onemocnění, jejichž včasná diagnostika a stabilizace redukuje komplikace spojené s výkonem. Mimo vyšetření a posouzení jednotlivých orgánů, lze pacienta charakterizovat pomocí tzv. comorbidity indexů. V současnosti je nejběžněji používán tzv. hematopoietic cell transplantation – comorbidity index (HCT-CI, index komorbidity transplantace hematopoetických buněk).

Jedním z hlavních faktorů při hodnocení příjemce je jeho věk. S vyšším věkem vzrůstá nejen nemocnost, ale také úmrtnost spojená s výkonem. Jde o důsledek menší kapacitní rezervy jednotlivých orgánů a vyšší výskyt těžších

forem GvHD. Každé transplantační centrum si horní věkový limit určuje samo, ale vždy je třeba přihlédnout i k biologickému věku pacienta.

K předtransplantačním vyšetřením srdce patří EKG (elektrokardiografie) k vyloučení poruchy rytmu a ischemické choroby srdeční. Důležitá je také diagnostika a kompenzace případné arteriální hypertenze.

Jedním z nejčastějších důvodů peritransplantační nemoci a úmrtnosti jsou plicní komplikace. Proto se během předtransplantačního vyšetřování mimo základních zobrazovacích metod doporučují funkční testy.

Základním předtransplantačním vyšetřením pro játra, která bývají transplantací často postižena, je ultrazvukové vyšetření. Dále hodnota bilirubinu, transamináz, sérologické vyšetření hepatitid A, B a C.

Pro posouzení stavu pacienta před transplantací HSCs je nezbytné posouzení renálních funkcí. Vždy je nutné vzít v úvahu i nefrotoxicitu běžně podávaných léků během transplantace HSCs, např. cyklosporin, aminoglykosidy a další, pečlivě zvážit jejich indikaci, dávkování případně kombinace.

Je třeba věnovat dostatečnou pozornost také infekčním komplikacím. Důležitá je jejich diagnostika a léčba, již v předtransplantačním období. U bakteriálních infekcí je nutná znalost kolonizace trávicího ústrojí z důvodu translokace bakterií ze střeva, která může vést až k septickým stavům. Podstatná je samozřejmě eradikace infekčních ložisek. U mykotických infekcí je nezbytná eradikace onemocnění ještě před transplantací HSCs a vhodná sekundární profylaxe. Před transplantací HSCs se běžně sérologicky testují herpetické viry (cytomegalovirus, virus Epstein-Barrové, virus herpes simplex 1,2 a virus varicella zoster), viry hepatitid a human immunodeficiency virus (HIV, virus lidské imunitní nedostatečnosti).

V období před transplantací HSCs je v neposlední řadě nutné posoudit, zda je pacient schopen dodržovat základní a nezbytné pokyny. Jedná se o dlouhodobé dodržování režimových opatření, užívání léků, časté kontroly či rehospitalizace. Porušení těchto opatření by mohlo vést k fatálním následkům.

Zásadním aspektem pro provedení transplantace HSCs je souhlas pacienta s transplantací a jeho připravenost na dlouhodobý charakter celého procesu transplantace. Musí mu být vysvětlena rizika spojená s tímto léčebným postupem

společně s alternativními možnostmi. Dále by měl být informován o nejčastějších komplikacích a způsobu jejich léčby. (Cetkovský, 2016)

2.2 Vyšetření dárce hematopoetických kmenových buněk

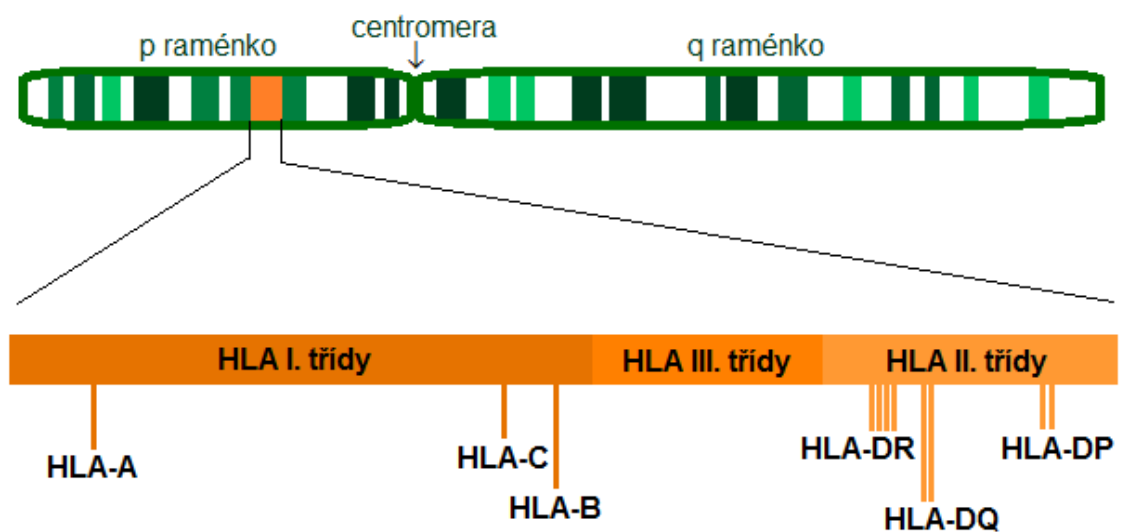
Pokud se ukáže, že konkrétní dárce může být pro daného pacienta nejvhodnějším dárce a trvá dárceův souhlas s odběrem, je pozván k lékařskému vyšetření. Vyšetření provádí nezávislý lékař, který se nepodílí na vyšetřování pacienta. Dárce si může vybrat způsob odběru HSCs, je informován o dalším postupu a podroben internímu vyšetření. Vyšetření sestává z rentgenu plic, EKG, základního rozboru krve (KO, koagulace, krevní skupina, erytrocytární protilátky, jaterní testy, bilirubin, kreatinin, urea, clearance). Kvůli prevenci přenosu infekčních onemocnění přenášených krví se vyšetřují infekční markery (cytomegalovirus, virus Epstein-Barrové, virus herpes simplex 1,2, virus varicella zoster, viry hepatitid A, B, C, HIV a syfilis). U dárců HSCs se provádí ještě těhotenský test – gravidita je kontraindikací pro dárcovství. (Český národní registr dárceů dřeně, 2017; Cetkovský, 2016)

2.3 HLA kompatibilita

HLA systém jednoznačně určuje vlastní struktury a brání přijetí cizích buněk, čímž komplikuje práci transplantační medicíně. Jde o vysoce polymorfní systém. Každý člověk nese na povrchu svých buněk unikátní kombinaci HLA molekul I. a II. třídy. Ta je výsledkem kombinací genetické informace od matky a od otce. Genetická informace pro HLA systém člověka je uložena na krátkém raménku 6. chromozomu. Geny pro HLA se rozdělují do tří tříd a nacházejí se na jednotlivých lokusech. Molekuly HLA I. třídy se skládají z β 2-mikroglobulinu a transmembránového glykoproteinu α . Dle složení α řetězce kódují geny pro HLA I. třídy klasické molekuly HLA A, B a C, ale také neklasické HLA molekuly E, F a G. Klasické molekuly HLA I. třídy se nacházejí na všech jaderných buňkách. HLA molekuly II. třídy se skládají ze dvou transmembránových řetězců α a β . Nacházejí se na 6. chromozomu v tzv. HLA-D oblasti. Geny pro molekuly HLA II. třídy kódují tři izotypy HLA DP, DQ a DR. Oblast DP obsahuje dva funkční geny, které jsou silně polymorfní, HLA-DPA1 a HLA-DPB1. V oblasti DQ existují

dva vysoce polymorfní geny HLA-DQA1 a HLA-DQB1, kódující α a β řetězce pro HLA-DQ molekuly. Nejvíce funkčních polymorfních genů ukrývá oblast DR. Funkční gen kódující α řetězec všech HLA-DR molekul se nazývá HLA-DRA. Řetězce β molekul kódují funkční geny HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 a HLA-DRB5. Za fyziologických okolností se molekuly HLA II. třídy nacházejí jen na antigen prezentujících buňkách (APC, antigen presenting cell). Geny HLA III. třídy kódují celou řadu proteinů souvisejících s imunitním systémem. (Hořejší, 2017; Krejsek, 2016; Bartůňková, 2001)

Obrázek 1 HLA oblast na 6. chromozomu



Zdroj: vlastní tvorba

Míra shody v HLA molekulách dárce a příjemce je klíčová pro úspěch transplantace. Transplantace HSCs je díky střetu aloreaktivity dvou různých jedinců z hlediska histokompatibility jedinečným a velmi složitým výkonem. Aloreaktivita transplantovaného štěpu krvevorných buněk působící proti příjemci je dominantní. Projevuje se negativně jako GvHD, ale i pozitivně jako reakce štěpu proti leukémii (GVL, graft versus leukemia). Méně výrazně se projevuje aloreaktivita imunitního systému příjemce, zejména díky myeloablativnímu či imunoablativnímu přípravnému režimu. Projevuje se jako rejekce. Předpokladem, úspěšné alogenní, nepříbuzenské transplantace HSCs, je současné navození určitého stupně imunitní tolerance a rekonstituce. Zároveň také zachování základní imunokompetence příjemce nutné pro imunitu a pro alorektivní působení

štěpu proti maligním buňkám. Z tohoto důvodu je nutná kontrola GvHD, GVL a rejekce. To je možné pouze díky optimální shodě v HLA systému příjemce a dárce. U alogenních nepříbuzenských transplantací, kdy mají jedinci odlišné HLA haplotypy, je situace složitější než u genoidentických sourozenců, kteří zdědili stejné sady HLA molekul. Proto je nutné hledat, co největší shodu na molekulární úrovni. Primárně se hledá shoda v jednotlivých alelách každého HLA genu. V současné době je za optimální považována shoda v pěti HLA genech. Označují se jako transplantační. Jedná se o geny HLA-A, -B, -C, -DRB1 a -DQB1. Při kompletní alelické shodě v těchto lokusech se hovoří o shodě na úrovni 10/10. Takováto shoda je pro výsledek alogenní nepříbuzenské transplantace HSCs optimální. Ve výjimečných případech lze akceptovat, po zhodnocení klinické situace pacienta a dostupnosti dárce, i shodu 9/10 nebo 8/10.

Problematika vlivu HLA shody případně neshody na výsledek transplantace HSCs je velice složitá. Výsledek transplantace kromě HLA shody ovlivňuje celá řada dalších faktorů, proto je nutné shodu nebo akceptovatelnou neshodu v HLA systému hodnotit vzhledem k celkovému stavu individuálního pacienta. (Krejsek, 2016; Pospíšilová, 2013)

2.4 Výběr vhodného dárce hematopoetických kmenových buněk

Výběr dárce HSCs je kritickým momentem, který z velké části ovlivňuje výsledek transplantace. Je-li třeba provést alogenní transplantaci, hledá se potenciální dárce nejprve v rodině. Začíná se u sourozenců, z důvodu pravděpodobnosti zdědění stejných haplotypů, čili úplné shody v HLA systému. Pokud se nalezne dárce z rodiny, jedná se o tzv. genoidentického dárce. V případě, že se dárce nenajde ani v širším příbuzenstvu je nutné obrátit se na registry dobrovolných dárců HSCs. Jedná se pak o tzv. alternativního dárce, kam lze zařadit shodného či částečně shodného nepříbuzného dárce, pupečnickovou krev nebo haploidentického příbuzného dárce. Haploidentickým příbuzným dárce může být například rodič nebo potomek. Výběr vhodného dárce závisí na řadě faktorů. (Cetkovský, 2016; Adam, 2008)

Faktory, které ovlivňují výběr dárce lze dělit na HLA faktory a non-HLA faktory. HLA faktory posuzují míru shody v HLA antigenech a jsou při výběru dárce na prvním místě. K non-HLA faktorům patří věk, pohlaví a hmotnost dárce, dále klinický stav, stadium onemocnění a CMV sérostatus příjemce a v neposlední řadě ABO kompatibilita, i když její vliv na transplantaci HSCs je sporný. Tyto faktory se zohledňují až na druhém místě. (Cetkovský, 2016)

Typizace HLA alel je prováděna pomocí molekulárně genetických metod s vysokým rozlišením. Existuje přímá závislost mezi stupněm HLA shody a výsledkem transplantace. Zjednodušeně lze říci, že čím vyšší je shoda v HLA alelách, tím menší je riziko rozvoje GvHD a vyšší pravděpodobnost úspěšného po-transplantačního průběhu. Nejideálnější je stav, kdy je shoda HLA alel ve všech pěti testovaných lokusech, jedná se o shodu 10/10. (Cetkovský, 2016; Adam, 2008)

Vzhledem k nutné shodě dárce a příjemce v obou HLA třídách je nalezení vhodného dárce HSCs výrazným způsobem komplikovanější než u transplantací solidních orgánů. Pro řadu pacientů není k dispozici plně shodný dárce, proto je nutné přijmout či dokonce aktivně vyhledávat dárce s neshodou.

U nízké rizikových malignit je dopad HLA neshody větší, proto se upřednostňují plně shodní dárce. U vysoce rizikových onemocnění nebo při opětovném návratu onemocnění je možné volit dárce se shodou 8/10, je však nutné počítat s vyšší transplantační mortalitou a horším přežitím příjemce. Obecně platí, že nemožnost nalézt vhodného dárce není kontraindikací transplantace HSCs. Vždy je nutné u každého konkrétního pacienta zvážit rizika plynoucí z použití štěpu od neshodného dárce. (Cetkovský, 2016; Penka, 2011)

2.4.1 Postup při hledání nepříbuzného dárce

Při hledání dárce pro nepříbuzenskou alogenní transplantaci je třeba oslovit registry nepříbuzných dárců s požadavkem na vyhledání dárce pro pacienta s konkrétním HLA fenotypem. V současné době je po celém světě několik desítek registrů s celkem více než 5 miliony registrovaných dárců. Největší světový registr se nachází v USA. V Evropě je největší registr nepříbuzných dárců v Ně-

mecku. Všechny registry jsou mezi sebou propojeny, díky tomu se při vyhledávání získávají informace od všech potenciálních dárců. Šance na nalezení plně shodného dárce závisí na frekvenci daného HLA fenotypu příjemce v registrech a také na jeho etnické příslušnosti. Výběr vhodného dárce závisí na spolupráci transplantačního centra, koordinačního centra registru dárců a laboratoře HLA. Bez odborníka na histokompatibilitu by vyhledávání dárce bylo neefektivní a obtížně proveditelné. Vyhledávání dárce je nutné zahájit hned po indikaci nemocného k nepříbuzenské alogenní transplantaci HSCs, jelikož proces vyhledávání může trvat řadu týdnů – v závislosti na frekvenci transplantačních znaků. Pokud je to možné, je pro pacienta vybrán větší počet shodných dárců, kteří jsou kompletně typizováni na HLA –A, –B, –C, –DRB1 a –DQB1 na alelické úrovni. Mimo preferovaného dárce je na místě zvolit i dárce náhradního. Takový dárce slouží jako záloha pro případ, že by zvolený dárce nebyl schopen darování nebo darování odmítl. Až 10% plánovaných odběrů HSCs je zrušeno dárce. (Cetkovský, 2016; Adam, 2008)

3 PROVEDENÍ ALOGENNÍ TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

Převod dárcovského štěpu není složitý a komplikovaný úkon, ale je nezbytné, aby byl proveden pečlivě a přesně. Obvykle bývá převod transplantátu proveden 1 – 2 dny po ukončení předtransplantačního přípravného režimu. Transplantace spočívá v nitrožilním podání buněčné suspenze, obsahující především vysokou koncentraci mononukleárních leukocytů, nemocnému. Většinou je podáván příjemci nativní štěp formou transfuze, cestou centrálního žilního katetru, rychlostí 2 – 5 ml/kg za hodinu. Kvalita štěpu se hodnotí především na základě počtu HSCs připadajících na 1 kg hmotnosti příjemce.

Alogenní transplantát se obvykle podává čerstvý, tzn. do 24 – 48 hodin po odběru. Jde tedy vlastně o plazmu bohatou na mononukleární buňky, granulocyty a trombocyty. Transplantát obsahuje také malé množství erytrocytů v závislosti na způsobu odběru, typu transplantovaného materiálu a metodě zpracování. Skladování probíhá v chladu při teplotě 4 – 6 °C. Při podávání čerstvého transplantátu není potřeba žádných zvláštních opatření. Pacient před transplantací musí být zvýšeně hydratován a jsou mu podávány kortikoidy. V průběhu převodu a bezprostředně po něm by se pacientovi měly monitorovat základní vitální funkce.

V případě retransplantací z důvodu rejekce štěpu nebo relapsu základního onemocnění se mohou podávat i kryoprezervované alogenní štěpy HSCs. Těsně před podáním zamrazeného transplantátu je potřeba provést jeho rozmrazení ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Po vyjmutí z vodní lázně by teplota štěpu neměla přesáhnout 5 °C, ideálně by měl obsahovat ledové krystalky. Vak s HSCs se připojí pomocí soustavy hadiček ke kanyle zavedené pacientovi do žíly. Lékař aplikuje transplantát stříkačkou, do které nasaje HSCs z vaku. Rychle, ale šetrně pak aplikuje buněčnou suspenzi přes soustavu hadiček do žíly pacienta. HSCs obsažené v aplikovaném štěpu se společně s krevním proudem dostávají do KD, kde se uchytí. Transplantace bývá provázena vedlejšími účinky, jako je škrábání v krku, dráždivý kašel, nevolnost, návaly horka, atd. Tyto nežádoucí účinky vyvolává přítomnost DMSO v transplantátu. (Raida, 2013; Penka, 2011)

4 KOMPLIKACE PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

Potransplantační období je pro pacienta velmi náročná léčebná fáze, charakterizovaná pancytopenií. Jeho vlastní KD byla v předtransplantačním přípravném režimu zničena a darované buňky se teprve připojují. To trvá obvykle 2 – 4 týdny. Při nekomplikovaném průběhu alogenní transplantace HSCs trvá organismu minimálně 12 měsíců, než se obnoví základní funkce imunitního systému pacienta. Alogenní transplantace s sebou bohužel také často přináší komplikace, ke kterým je organismus pacienta náchylnější, zejména díky dlouhodobému útlumu imunitního systému organismu, který je prohlouben imunosupresivní léčbou. Hlavní imunologický problém a komplikaci alogenních transplantací HSCs představuje GvHD. Dále jsou to nejčastěji infekční komplikace, zejména septické stavy. Infekce bývají způsobeny bakteriemi, kvasinkami, plísněmi i viry, časté jsou zejména pneumonie.

(LINKOS – Česká onkologická společnost ČLS JEP, 2018; klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, 2012; HAIMAOM Nadace pro podporu transplantace kostní dřeně, 2002)

4.1 Reakce štěpu proti hostiteli

Reakce štěpu proti hostiteli je závažná a stále jedna z hlavních komplikací alogenní transplantace HSCs. GvHD znamená, že transplantovaný štěp (respektive darovaný imunitní systém) reaguje, napadá a poškozuje prostřednictvím T-lymfocytů cílové struktury na buňkách a tkáních příjemce. Následkem je vznik imunitní reakce s poškozením organismu pacienta. Aby došlo k rozvoji GvHD musí být splněny minimálně dvě podmínky:

1. mezi dárce a příjemcem musí existovat neshoda v HLA systému. Čím větší neshoda v HLA systému, tím větší je pravděpodobnost rozvoje GvHD.
2. Organismus příjemce musí být do určité míry poškozen předchozí léčbou cytostatiky nebo radiací, infekcemi, apod. Rozlišují se dvě formy GvHD, a sice akutní a chronická. (Cancer research UK 2017; Krejsek, 2016; Greinix, 2014)

Samotné onemocnění GvHD probíhá v několika etapách. Nejprve dochází k aktivaci příjemcových APC cestou signálů z poškozených vlastních buněk a tkání (DAMP, *damage associated molecular patterns*). Dendritické buňky pohlcují, zpracovávají a prezentují na svých molekulách HLA antigenní peptidy, které pochází mimo jiné z vlastních HLA molekul. Dendritické buňky pomocí produkce cytokinů a exprese kostimulačních molekul zajistí vhodný kontext rozpoznávání. Dárcovské T-lymfocyty s odpovídající specifitou TcR receptorů tyto molekuly spolu s dalšími proaktivačními signály přijímají a aktivují se. Nativní T-lymfocyty jsou přednostně diferencované do Th1 a Th17 buněk a podporují tzv. *natural killer* (NK, „přirozené zabíječe“) buňky a cytotoxické T lymfocyty, které jsou hlavními efektorovými buňkami schopnými poškodit buňky a tkáně příjemce. Následně se rozvíjí zánětlivá odpověď. Do reakce se mohou zapojit i další imuno-kompetentní buňky dárce i příjemce. Nejvíce postižené jsou orgány charakteristické svojí vysokou proliferační aktivitou buněk, se kterou je spojena vysoká exprese HLA molekul. Jde především o kůži a zažívací trakt příjemce.

Z klinického pohledu jde o velmi závažnou komplikaci transplantace HSCs, nicméně ve většině případů je léčebně zvládnutelná. GvHD se po nepřibuzenské alogenní transplantaci HSCs projevuje v cca 50 – 60 % případů. (Krejsek, 2016; Kitko, 2015; Jílek, 2014)

4.1.1 Akutní reakce štěpu proti hostiteli

Akutní GvHD nastává několik dní až týdnů po alogenní transplantaci HSCs, nejpozději však do 100. dne. Existuje několik forem manifestace, které mohou být různě vyjádřeny. Nejčastěji dochází při akutní GvHD k poškození kůže, střevní sliznice a jater. Všechny formy mohou být různě intenzivní nebo může dojít k jejich kombinaci. Postižení kůže může být různé, od vyrážky přes puchýře až k olupování kůže. Postižení zažívacího traktu se projevuje nechutenstvím, zvracením či průjmem. Jaterní postižení se projevuje hyperbilirubinémií a elevací, zejména obstrukčních, jaterních enzymů. Částečně lze reakci zabránit výběrem dárce, odstraněním T-lymfocytů z transplantátu a účinnou imunosupresí. (Hořejší, 2017; Adam, 2008)

4.1.2 Chronická reakce štěpu proti hostiteli

Chronická GvHD se vyvíjí po řadu měsíců až let po alogenní transplantaci HSCs, nejdříve však po 100. dni. Může vzniknout *de novo*, nebo vznikne z předchozí akutní formy GvHD. Je charakterizována infiltrací tkání a orgánů Th2 buňkami, tvorbou aloprotilátek a produkcí cytokinů, podporující fibrotizaci tkání. Klinickými projevy se podobá některým autoimunitním onemocněním, jako je např. vaskulitida nebo sklerodermie. U pacienta dochází ke chronickému zánětu cév, kůže, vnitřních orgánů nebo žláz, který vede k náhradě funkční tkáně vazivem. Dále má za následek poruchy prokrvení a ztrátu funkce příslušných orgánů a tkání. (Hořejší, 2017; Adam, 2008)

4.1.3 Léčba reakce štěpu proti hostiteli

Terapeutické možnosti léčby GvHD jsou určovány několika faktory: klasifikací onemocnění, celkovým stavem pacienta, postiženými orgány a dalšími souvisejícími symptomy.

Terapií první linie při akutní GvHD jsou kortikosteroidy v dávce 1 – 2 mg/kg po dobu 7 – 14 dní. Pokud se dostaví efekt, je dávka postupně snižována. Terapie první linie je účinná asi v 50 % případů. Pokud do 3 – 14 dnů nedojde k léčebné odpovědi na podání kortikosteroidů, je reakce považována za steroid-rezistentní. Taková GvHD je obtížně terapeuticky zvládnutelná a je spojena s vysokou morbiditou i mortalitou. Během steroid – rezistentní GvHD se většinou ponechává úvodní imunosuprese, CsA a kortikosteroidy. Terapii steroid – refrakterní akutní GvHD je možné rozdělit do 4 skupin:

1. využití nescifické eliminace T-lymfocytů,
2. preparáty ovlivňující cytokiny nebo jejich receptory,
3. cytostatika a nescifická imunosupresiva,
4. buněčná terapie a další postupy. Kam mimo jiné patří také extrakorporální fototerapie.

Všechny druhy terapie však vykazují pouze částečnou účinnost a steroid – rezistentní GvHD je i nadále závažným terapeutickým problémem.

Základem léčby chronické GvHD je Prednisolon. Systémová léčba je zahájena buď Prednisolonom samotným, nebo v kombinaci např. s CsA (či jiným

kalcineurinovým inhibítozem). Kombinovaná terapie se využívá především u pacientů s rizikem trombocytopenie nebo při snaze minimalizovat toxicitu při přetrvávajícím podávání steroidů. V současné době je pro většinu center kombinovaná terapie volbou léčby první linie. Léčba se zahajuje Prednisolonem v dávce 1 mg/kg/den ráno a CsA 5 mg/kg dvakrát denně. Dávkování Prednisolonu přetrvává do doby, než dojde k objektivnímu zlepšení symptomů chronické GvHD. Teprve poté dochází k postupné redukci dávek až na 1 mg Prednisolonu na kilogram obden. V tomto dávkování se pokračuje až do dosažení kompletní remise reverzibilních změn chronické GvHD. Pokud přetrvává kompletní remise i po ukončení podávání steroidů, je možné začít snižovat dávky CsA o 0,5 mg/kg týdně. Pokud v průběhu jednoho měsíce chronická GvHD progreduje, rozvíjí se nové projevy dříve nepostižených orgánů, nedaří se snižovat, nebo vysadit první linii léčby, klinické projevy jsou stabilní, ale bez zlepšení, zahajuje se záchranná léčba. Není však jasně definována, a tak hlavním postupem, při snaze identifikovat efektivní léčbu pro každého jednotlivého pacienta, zůstává „pokus – omyl“. (Rodrigues, 2018; Cetkovský, 2016)

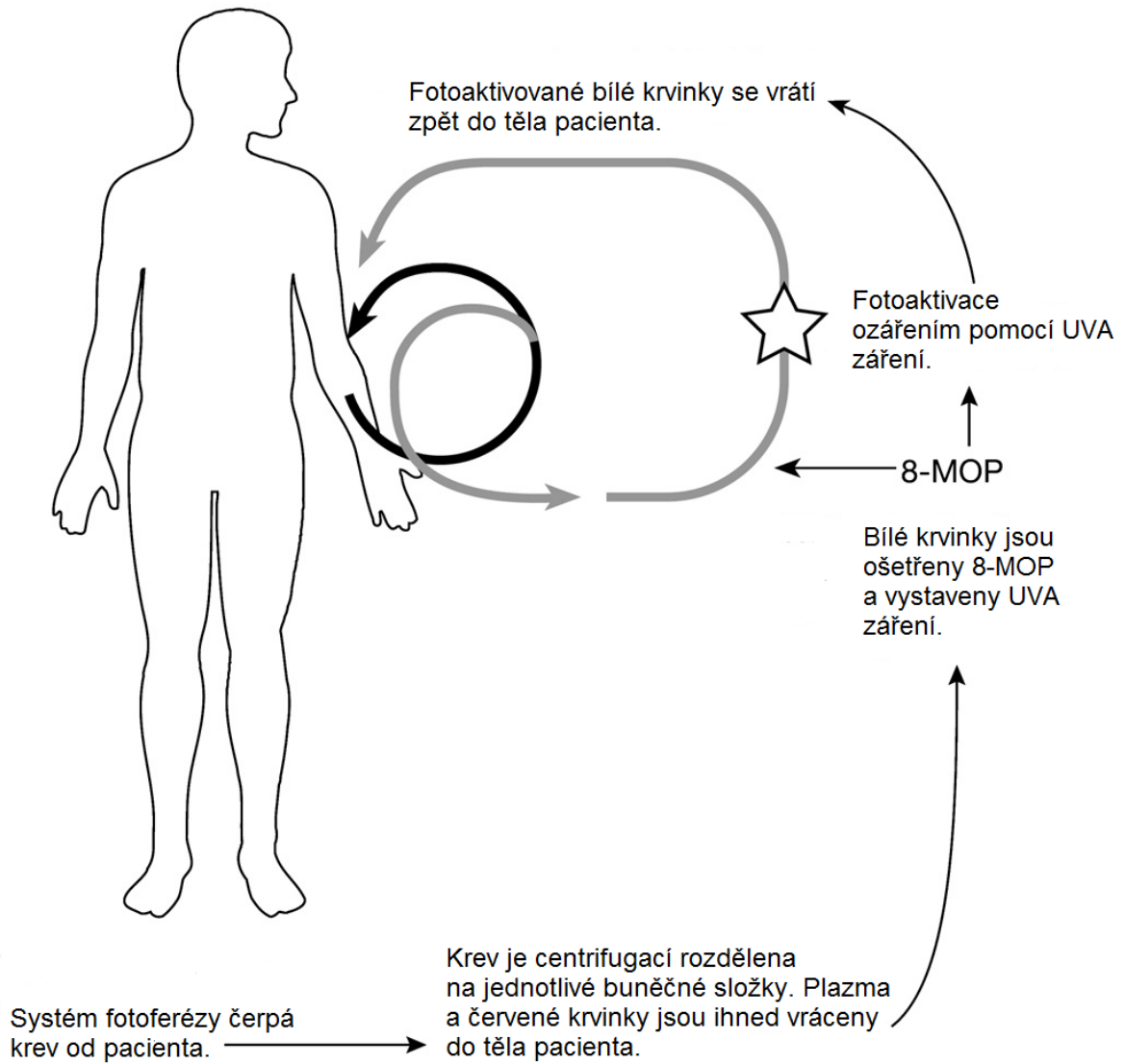
5 EXTRAKORPORÁLNÍ FOTOFERÉZA

Extrakorporální fototerapie (ECP, *extracorporeal photopheresis*) je terapeutický přístup založený na biologickém účinku 8 – methoxypsoralenu (8-MOP) na mononukleární buňky odebrané leukaferézou, extrakorporálně ozářené ultrafialovým zářením typu A (UVA) a vrácených zpět do těla pacienta.

8-MOP patří do skupiny chemických látek zvaných furokumariny, které se nacházejí v mnoha druzích ovoce a zeleniny. Po perorálním podání se 8-MOP vstřebává z trávicího traktu a během 2 – 4 hodin dosahuje v krvi a jiných tkáních maximálních hodnot. Během 24 hodin je z těla téměř vyloučen a pokud není vystaven světlu je 8-MOP inertní. Po vystavení UVA záření dochází u buněk k zesíťování molekuly DNA (*deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina*). To vede k zastavení proliferace léčených buněk. Důležitou charakteristikou a výhodou 8-MOP je, že jeho aktivace po vystavení UVA záření trvá pouze několik milisekund. Jeho působení se omezuje na dobu ozáření, poté se ihned vrací do inertního stavu.

ECP se provádí standardním postupem leukaferézy. Při každé léčbě se odseparuje buffy coat, obsahující lymfocyty. Do vaku, který obsahuje bílé krvinky zředěné plazmou, se přidá 8-MOP a buněčný roztok je poté vystaven UVA záření o intenzitě 2 J/cm^2 po dobu 10 – 90 minut v závislosti na použitém přístroji. Poté se buňky vrátí zpět pacientovi. Léčba obvykle probíhá dva po sobě následující dny ve 2 – 4 týdenních intervalech. Vedlejší účinky léčby pomocí ECP jsou minimální a obvykle mírné. Jde zejména o zimnici, bolest hlavy a potransfuzní horečku. (Kiki, 2017; Knobler, 2009; Oliven 2001)

Obrázek 2 Schéma extrakorporální fotoferézy



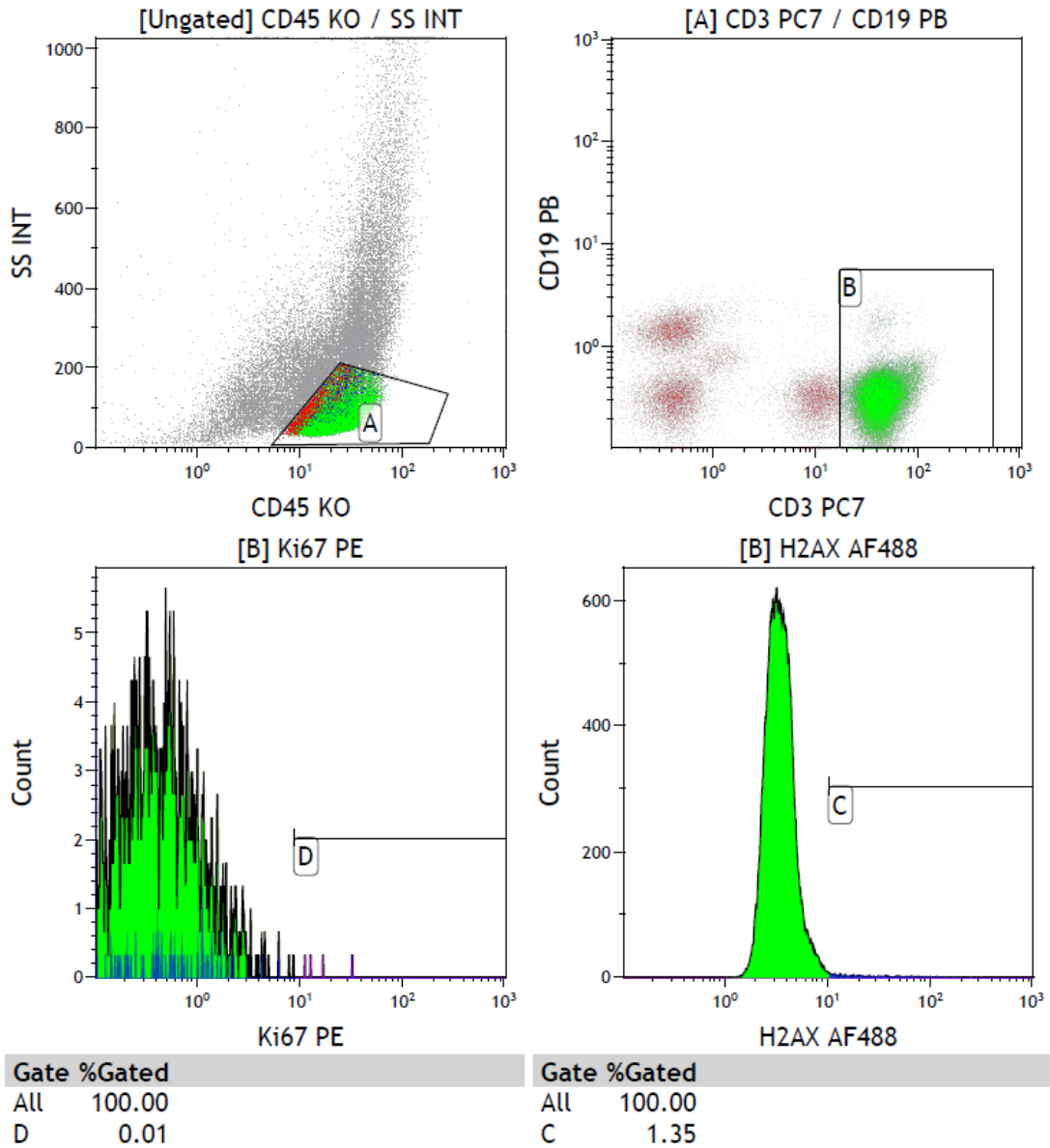
Zdroj: Knobler, 2009

6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie je standardní metodou pro analýzu suspenze buněk. K detekci jednotlivých povrchových nebo intracelulárních antigenů se používají monoklonální protilátky konjugované s fluorescenčními značkami, tzv. fluorochromy. Monoklonální protilátky se specificky váží na antigeny vyšetřovaných buněk. Suspenze označených buněk se vloží do průtokového cytometru, kde jsou buňky seřazeny do úzkého proudu kapaliny a vysokou rychlostí jsou tryskou vstříkovány do komory, kudy proudí. Tento proud protíná laserový paprsek. Jakákoliv částice v suspenzi způsobí, že se od ní laserové světlo odrazí do strany (čím více je částice granulovaná, tím více se světlo odrazí) a rozptýlí (čím je částice větší, tím více se světlo rozptýlí). Pokud jsou na částici navázány molekuly fluorochromů, laserové světlo je excituje. Každý excitovaný fluorochrom emituje světlo o vlnové délce dané specifickými fyzikálními vlastnostmi molekuly. Průtokové cytometry se zapojením 1 – 3 laserů mohou excitovat 3 – 9 různých fluorescenčních fluorochromů zároveň. Pro každou jednotlivou buňku je zapsána kvantita každého fluorescenčního znaku a dva nefluorescenční optické parametry. Parametr popisující velikost buňky tzv. Forward Scatter, Fsc a parametr popisující granularitu buňky tzv. Side Scatter, Ssc. Podle Fsc a Ssc je možné cytometricky rozlišit základní subpopulace buněk.

Získaná digitální data se následně analyzují pomocí speciálních softwarů, které umožňují grafické a statistické znázornění změřených dat. Nejjednodušším zobrazením jsou histogramy, které ukazují kolik procent buněk je pozitivních pro daný parametr, případně jaké intenzity fluorescence dosahuje určitá subpopulace. Základním dvourozměrným grafem jsou tzv. dot ploty, kde jedna tečka znamená jednu buňku či částici, a lze tak zjistit vzájemný vztah dvou parametrů. (Pospíšilová, 2013; Bartůňková, 2011)

Graf 1 Grafické zhodnocení dat z průtokového cytometru



Zdroj: vlastní

Příklad grafického zhodnocení dat z průtokového cytometru. Data neozářeného vzorku byla analyzována v programu Kaluza®. (A) lymfocyty, (B) T – lymfocyty, (C) buňky s DNA poškozenou zlomy, (D) proliferující T – lymfocyty.

6.1 Měřené povrchové a intracelulární znaky leukocytů

Cluster of differentiation (CD) antigeny jsou molekuly buněčného povrchu exprimované na leukocytech a dalších buňkách relevantních pro imunitní systém. CD nomenklatura byla všeobecně přijata vědeckou komunitou a je oficiálně schválena Mezinárodní unií imunologických společností a schválena WHO. Poskytuje jednotný systém označení pro monoklonální protilátky, stejně jako pro molekuly buněčného povrchu, které rozpoznávají. Lidských leukocytárních diferenciačních antigenů je charakterizováno a formálně označeno více než 400. Jedná se o různé proteiny a další molekuly, které jsou exprimované na buňkách lidského těla. CD molekuly se běžně používají jako buněčné markery, což umožňuje identifikaci a izolaci populací leukocytů, podskupin a stadií diferenciace. (Engel, 2015)

6.1.1 Molekula CD45

Molekula CD45 je antigen, který se nachází na povrchu všech buněk hematopoetické linie s výjimkou erytrocytů a plazmatických buněk. Jedná se o receptorový protein tyrosinofosfatázu, který má zásadní vliv na aktivaci zejména T⁺, ale i B⁻ lymfocytů. Její exprese u T⁻ lymfocytů je silná a může tvořit až 10 % proteinů na povrchu buněk. (Bio-Rad Laboratories, 2018; Pospíšilová, 2013; Vokurka, 2009)

6.1.2 Molekula CD3

Molekula CD3 působí jako mediátor přenosu signálu. Jedná se o multimerní protein složený ze čtyř odlišných polypeptidových řetězců (ϵ , γ , δ , ζ). Molekula CD3 je vysoce exprimována na cirkulujících T buňkách, které tvoří TCR (*T-cell receptor*, receptor na povrchu T⁻ lymfocytů) komplex. Objevuje se na povrchu T⁻ buněk během jejich vyžívání v thymu. Je exprimována intracelulárně u nezralých buněk, u zralých povrchově, a protože je přítomen ve všech stupních vývoje T buněk, je vysoce účinným markerem. (Bio-Rad Laboratories, 2018; Pospíšilová, 2013; Vokurka, 2009)

6.1.3 Molekula H2AX

Molekula H2AX je jednou z minoritních variant histonů rodiny H2A objevených v 80. letech 20. století. Jde o vysoce konzervativní peptid. Při poškození DNA a vzniku dvouřetězcových zlomů jsou aktivovány molekulárně biologické cesty, jejichž výsledkem je rozpoznání poškození DNA a snaha o jeho reparaci. Jedním z prvních aktivovaných dějů je fosforylace H2AX. Díky tomu je možné fosforylaci H2AX využít jako indikátor přítomnosti dvouřetězcových zlomů v DNA. (Řezáčová, 2011)

6.1.4 Molekula Ki67

Expres proteinu Ki67 je spoje s buněčnou proliferací. Během interfáze může být antigen detekován výhradně v jádře, zatímco v mitóze je většina proteinu přemístěna na povrch chromozomů. Skutečnost, že protein Ki67 je přítomen ve všech aktivních fázích buněčného cyklu (G_1 , S, G_2 a mitóza), ale není přítomen v klidové fázi G_0 , ho činí vynikajícím markerem pro stanovení takzvané růstové frakce dané buněčné populace. (Scholzen, 2000)

6.1.5 Kaspáza 3

Enzym kaspáza 3 patří mezi endoproteázy. Reguluje zánětlivé procesy a signalizační sítě apoptózy. Hraje významnou roli při koordinaci destrukce buněčných struktur jako je fragmentace DNA nebo degradace cytoskeletálních proteinů. Aktivita kaspázy 3 je přísně regulována a je produkována v neaktivní formě jako proenzym. Kaspáza 3 slouží jako vynikající biomarker pro monitorování indukce apoptózy. Lze detekovat hladiny prokaspázy 3 nebo hladiny její aktivní formy, kterou je kaspáza 3. (Novus biologicals a biotechne brand, 2015)

7 TESTY METABOLICKÉ AKTIVITY BUNĚK

Pro stanovení metabolické aktivity buněk se využívají metody, které posuzují kyslíkový metabolismus granulocytů. Jako marker se nejčastěji využívá redukovaný nikotinamidadeninukleotid (NADH), který se účastní například redukce tetrazoliových sloučenin na barevný produkt formazán. Do buněk se dostává rozpuštěná nebarevná forma substrátu, která se oxidačními pochody ve fagocytární vakuole nebo na aktivovaných membránách redukuje na nerozpustný tmavě modrý formazán, jehož signál se detekuje. Pomocí testů metabolické aktivity lze prokázat, zda jsou granulocyty bez snížené schopnosti fagocytózy schopné tvořit kyslíkové radikály aktivací oxidázy NADPH. (Bartůňková, 2011; Řeháčková, 2010)

PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je ověřit, zda ECP poskytuje stejné výsledky jako ozáření vzorků gama zářením. Dále nalézt vhodný protokol, který by umožnil sledování kvality vzniklého transfuzního přípravku. A na závěr zavést metodu sledování exprese znaků H2AX a Ki67 na průtokovém cytometru.

9 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY

Výzkumný problém č. 1: Jaká je shoda mezi buněčnou suspenzí vzniklou metodou ECP a ozářením vzorku gama zářením?

Výzkumný problém č. 2: Jaká je aktivace buněk v tkáňové kultuře po ozáření gama zářením nebo UV zářením a stimulaci mitogenem PHA?

Výzkumný problém č. 3: Vyvolá metoda ECP dostatečnou apoptotickou aktivitu buněk?

10 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

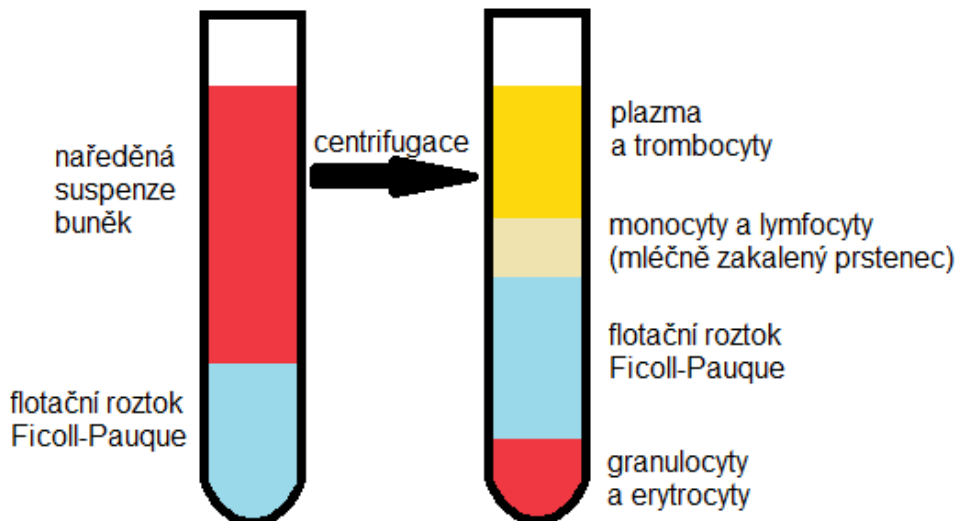
Stanovení bylo provedeno ze šestnácti vzorků plné krve od zdravých dárců. Jednotlivé vzorky byly odebrány do heparinu. Potřebná mononukleární frakce buněk byla získána separací na hustotním gradientu.

11 METODIKA PRÁCE

11.1 Separace na hustotním gradientu

Plná krev se zředila v poměru 1:1 s kultivačním médiem RPMI 1640 (*Biosera, France*). Na dno centrifugačních zkumavek byly napipetovány 2 ml flotačního roztoku Ficoll-Pauque (*GE Healthcare, Sweden*) o $\rho = 1,036 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a pře-
vrstveny naředěnou suspenzí buněk. Zkumavky byly vloženy do centrifugy na 20 minut při 2200 otáčkách za minutu. Po centrifugaci bylo třeba velmi opatrně odsát vzniklý mléčně zakalený prstenec buněk do nové zkumavky, kde došlo k promytí pomocí roztoku RPMI 1640. Následně byla směs centrifugována 10 minut při 1800 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl slitím odstraněn supernatant a celé promytí buněk bylo znovu zopakováno až po slití supernatantu. Poté byla vzniklá suspenze naředěna na konečný počet buněk $2\cdot 10^6$ na 1 ml. Kvůli riziku kontaminace byla veškerá manipulace se vzorkem prováděna v laminárním boxu.

Obrázek 3 Separace na hustotním gradientu



Zdroj: vlastní tvorba

11.2 Příprava vzorku pro extrakorporální fotoferézu

Do transfuzního vaku bylo převedeno 20 ml buněčné suspenze, ke které byl přidán 1 ml roztoku Methoxsalen (*Macopharma, France*) o koncentraci 333 ng/ml. Transfuzní vak s buněčnou suspenzí byl ozářen UVA zářením o intenzitě 2 J/cm² při 340 – 380 nm pomocí přístroje Macogenic G2 (*Macopharma, France*).

11.3 Příprava vzorku pro ozáření gama zářením

Do zkumavky byly převedeny 2 ml buněčné suspenze, která byla následně ozářena gama zářením o intenzitě 25 Gy. Ozáření proběhlo na přístroji Gamma-cell 1000 (*Best Theratronics, Canada*).

11.4 Inkubace

Vzorky vzniklé ozářením UVA a gama zářením byly rozděleny na tři části. První část tvořila pouze ozářená suspenze buněk, která se nijak dále neupravovala a sloužila jako negativní kontrola. Druhá a třetí část vzorků se lišila pouze v době inkubace, nikoli v přípravě.

Vzorky pro druhou a třetí část byly převedeny z injekční stříkačky do 12 ml zkumavky. K ozářené buněčné suspenzi bylo přidáno 10 ml kultivačního média RPMI 1640 (*Biosera, France*). Zkumavky byly vloženy do centrifugy na 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl slitím odstraněn supernatant a buňky resuspendovány. Poté byly k resuspendovaným buňkám přidány 2 ml kultivačního média RPMI 1640. Do nové 12 ml zkumavky bylo napipetováno 9 ml kultivačního média RPMI, 50 µl heparinu (*Zentiva, Česká republika*) o koncentraci 5000 m.j./1ml a 50 µl zásobního roztoku PHA. Do takto připravené druhé zkumavky byl převeden 1 ml vzorku buněk z původní 12 ml zkumavky. Každá zkumavky s připraveným vzorkem byla označena příslušným štítkem a vložena do termostatu. Vzorky pro druhou část byly inkubovány 48 hodin při 37° C a 5 % CO₂, vzorky pro část třetí byly inkubovány při stejných podmínkách 72 hodin. Kvůli riziku kontaminace byla veškerá manipulace se vzorkem prováděna v lamiárním boxu.

11.5 Intracelulární značení

Po 48 a 72 hodinové inkubaci byly vzorky analyzovány pomocí průtokové cytometrie. Před samotnou analýzou byly vzorky intracelulárně obarveny. V prvním kroku byly vzorky převedeny do cytometrické zkumavky a centrifugovány 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu. Poté byl slitím odstraněn supernatant a buňky promyty 250 μ l roztoku fosfátového pufru (*phosphate buffered saline*, PBS) a pH 7,4. Vzorky byly znovu centrifugovány 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu. Opět byl slitím odstraněn supernatant a buňky resuspendovány. Po promytí bylo ke vzorkům přidáno 250 μ l 4,2% fixačního roztoku paraformaldehydu (PFA; *BD Bioscience, USA*) a vzorky se nechaly stát. Po 5 minutách byly vzorky zcentrifugovány po dobu 3 minut při 1800 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl znovu odstraněn supernatant, buňky resuspendovány a přidáno 250 μ l 4,2% PFA. Poté se zkumavky vložily zpět do centrifugy na 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu, slil se supernatant a buňky byly resuspendovány. K buňkám bylo napipetováno 250 μ l 0,1% roztoku Tritonu® X-100 (*Life Technologies, USA*), který se ředí, dle počtu vzorků ze zásobního 1% roztoku pomocí PBS pufru 1 : 9. Poté probíhala 10 minut inkubace. Po uplynutí doby inkubace byly zkumavky se vzorkem vloženy do centrifugy na 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu. Po vyjmutí zkumavek z centrifugy byl odstraněn supernatant a buňky resuspendovány. Následně bylo k buňkám napipetováno 250 μ l 3% roztoku fetálního hovězího séra (*fetal bovine serum*, FBS; *Gibco, UK*). Poté opět probíhala centrifugace po dobu 3 minut a 1800 otáčkách za 1 minutu. Byl slit supernatant a buňky resuspendovány. K resuspendovaným buňkám bylo přidáno 250 μ l 3% FBS. Z takto připraveného vzorku bylo přeneseno 100 μ l do nové cytometrické zkumavky, ve které bylo předem napipetováno 5 μ l každé monoklonální protilátky. Pro stanovení na průtokovém cytometru byl použit panel 5 monoklonálních protilátek: CD45 KO (*Beckman Coulter, USA*), CD3 PB (*Beckman Coulter, USA*), H2AX FITC (*BioLegend, USA*), Ki67 PE (*EXBIO, Česká Republika*), Kaspáza3 APC-AF647 (*BioLegend, USA*). Směs monoklonálních protilátek spolu se 100 μ l buněk resuspendovaných v 3% roztoku FBS byla inkubována 30 minut ve tmě. Po uplynutí doby inkubace se zkumavky vložily do centrifugy na 3 minuty při 1800

otáčkách za minutu. Následně byl slit supernatant a buňky resuspendovány. Na závěr bylo k buňkám přidáno 450 μ l 3% roztoku FBS. Takto zpracované vzorky byly připraveny pro měření na průtokovém cytometru.

11.6 Stanovení na průtokovém cytometru

Připravená buněčná suspenze byla označena pomocí monoklonálních protilátek CD45 KO, CD3 PB, H2AX FITC, Ki67 PE, Kaspáza3 APC-AF647. Ke 100 μ l buněčné směsi bylo přidáno 5 μ l jednotlivých monoklonálních protilátek. Směs byla inkubována 30 minut v temné komůrce. Před stanovením byl vzorek promyt pomocí PBS a resuspendován do 400 μ l PBS. Vzorky byly označeny následovně: „foto – pracovní číslo – jméno pacienta“ a měřeny na průtokovém cytometru Navios (Beckman Coulter, USA) pomocí protokolu „*fotoforeza.pro*.“ Při měření bylo načítáno více než 35 000 buněk. Získaná data byla analyzována v programu Kaluza® (Beckman Coulter, USA). Gatovací strategie byla následující. Pomocí dot-plotu CD45/SSc byla vybrána populace lymfocytů (gate A). Z této populace buněk byl vytvořen dot-plot CD3/SSc, kde jsou rozlišeny dvě populace buněk Ssc low, CD3 negativní jako suma B lymfocytů a NK buněk, Ssc low a CD3 pozitivní jako T-lymfocyty. Z těchto populací byly vytvořeny histogramy se znaky H2AX a Ki67. Pomocí přímkou „B“ je zobrazeno procento T lymfocytů se zlomy v DNA. Přímkou „C“ je zobrazeno procento proliferaujících T-lymfocytů. Přímkou „E“ ukazuje procento sumy B-lymfocytů a NK buněk se zlomy v DNA. Gatem „F“ je vyjádřeno procento sumy B-lymfocytů a NK buněk, které proliferaují. Grafický výstup z programu Kaluza® je zobrazen v příloze 4.

11.7 Stanovení Alamarblue®

Pro stanovení metabolické aktivity byla využita druhá část ozářených vzorků, suspenze buněk po 48 hodinách inkubace. Do mikrotitrační destičky pro fluorimetrické stanovení bylo napipetováno 100 μ l buněčné suspenze a 200 μ l roztoku Alamarblue® připraveného k přímému použití. Vzorky byly inkubovány nejméně 1 až 4 hodiny v termostatu při 37°C, 5 % CO₂ a pH 6,8 – 7,4. Po inkubaci byla změřena intenzita fluorescence pomocí (BioTek, USA) při excitační vlnové délce 560 nm a emisní vlnové délce 590 nm.

12 VÝSLEDKY

Pro analýzu bylo použito šestnáct vzorků plné krve od zdravých dárců krevních destiček. Potřebná mononukleární frakce byla získána separací z heparinizovaných vzorků plné krve na hustotním gradientu. Měření bylo získáno celkem 448 výsledků. Jednotlivé kombinace naměřených výsledků jsou zobrazeny v následující tabulce (viz Tabulka 1). Při porovnávání výsledků byly mediány vzorků vztahovány k hodnotě mediánu negativní kontroly. Dále byly vzájemně porovnány výsledky vzorků ozářených UVA zářením a vzorků ozářených gama zářením.

Tabulka 1 Schéma rozložení výsledků získaných během analýzy

	Inkubace 48 hodin				Inkubace 72 hodin		
	H2AX	Ki67	Kaspáza 3	Alamarblue®	H2AX	Ki67	Kaspáza 3
Negativní kontrola	X	X	X	X	X	X	X
Pozitivní kontrola	X	X	X	X	X	X	X
Vzorek ozářený UVA zářením	X	X	X	X	X	X	X
Vzorek ozářený gama zářením	X	X	X	X	X	X	X

Zdroj: vlastní tvorba

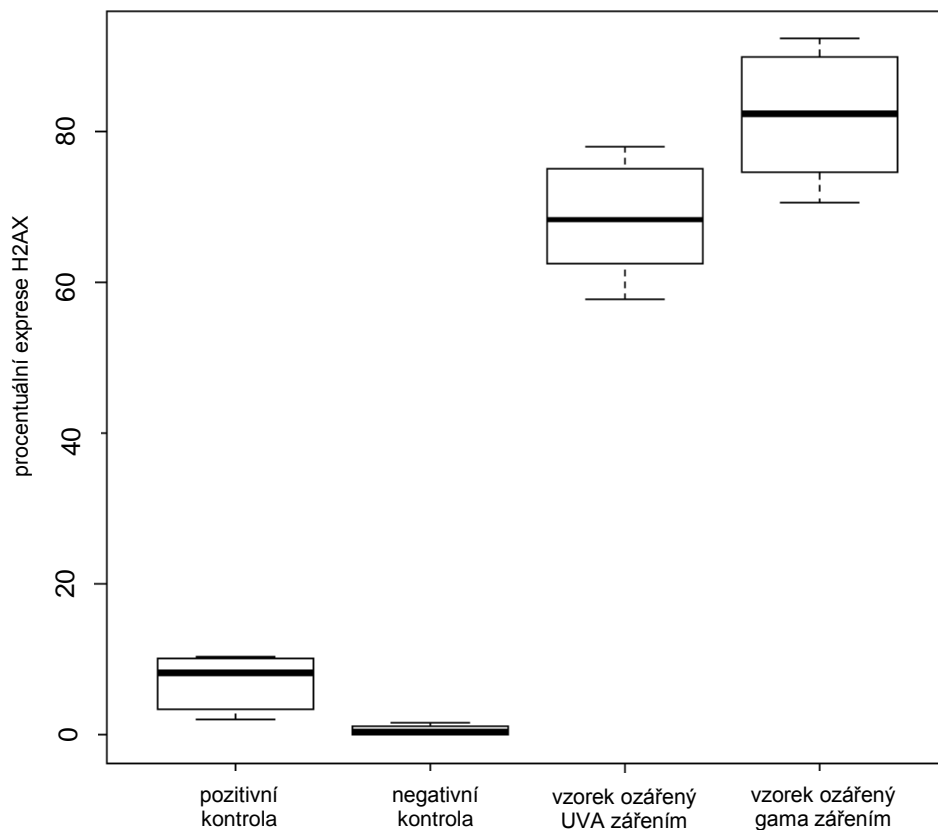
12.1 Statistické zhodnocení

Jednotlivé výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu MS Excel 2013 a R Project. Pro statistické zhodnocení byl zvolen neparametrický Wilcoxonův test, který sleduje rozdíly mediánů. Neparametrické rozdělení bylo ověřeno pomocí Shapirova - Wilkova testu.

12.2 Výsledky stanovení H2AX

12.2.1 Stanovení H2AX po 48 hodinové inkubaci

Graf 2 Stanovení H2AX po 48 hodinové inkubaci



Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku H2AX mezi mediánem negativní kontroly, kterou představoval nestimulovaný vzorek a mediánem pozitivní kontroly, kterou představoval vzorek stimulovaný mitogenem. Rozdíl mediánů činil 2,73 % exprese znaku H2AX, $p < 0,05$.

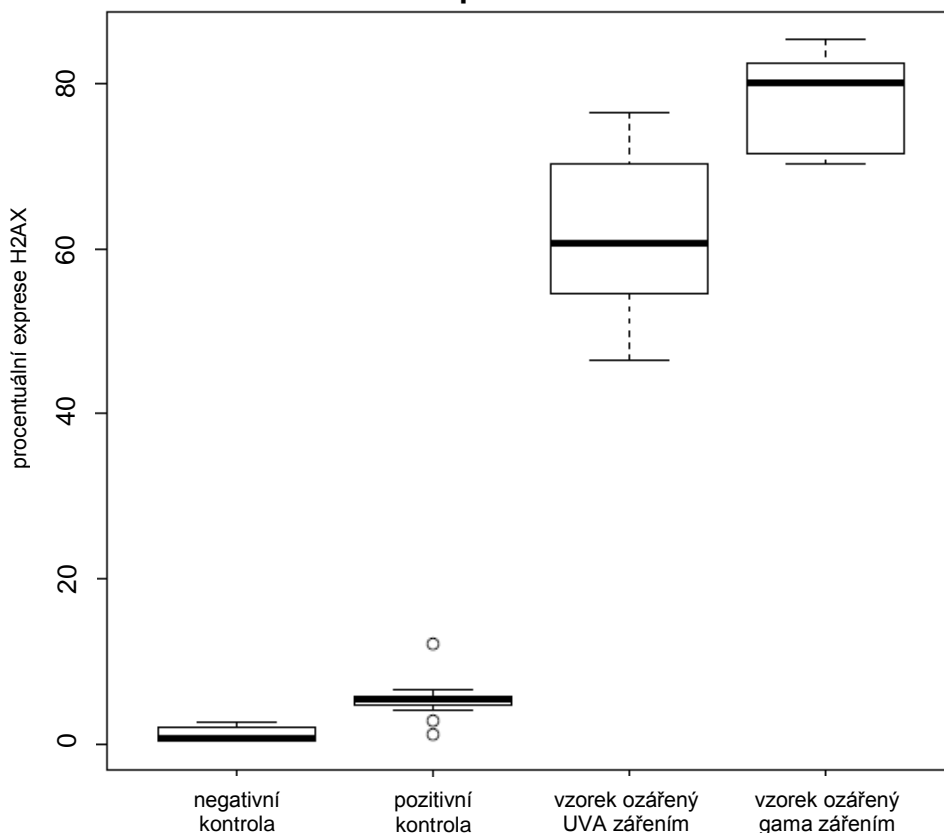
Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného UVA zářením, kdy rozdíl mediánů činil 64,04 % exprese znaku H2AX, $p < 0,01$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného gama zářením, kdy rozdíl mediánů činil 89,16 % exprese znaku H2AX, $p < 0,01$.

Mezi mediánem vzorku ozářeným UVA zářením a mediánem vzorku ozářeným gama zářením byl zjištěn statisticky významný rozdíl 25,12 % exprese znaku H2AX, $p < 0,01$.

12.2.2 Stanovení H2AX po 72 hodinové inkubaci

Graf 3 Stanovení H2AX po 72 hodinové inkubaci



Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku H2AX mezi mediánem negativní kontroly, kterou představoval nestimulovaný vzorek a mediánem pozitivní kontroly, kterou představoval vzorek stimulovaný mitogenem. Rozdíl mediánů činil 4,85 % exprese znaku H2AX, $p < 0,05$.

Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného UVA zářením, kdy rozdíl mediánů činil 60,02 % exprese znaku H2AX, $p < 0,01$.

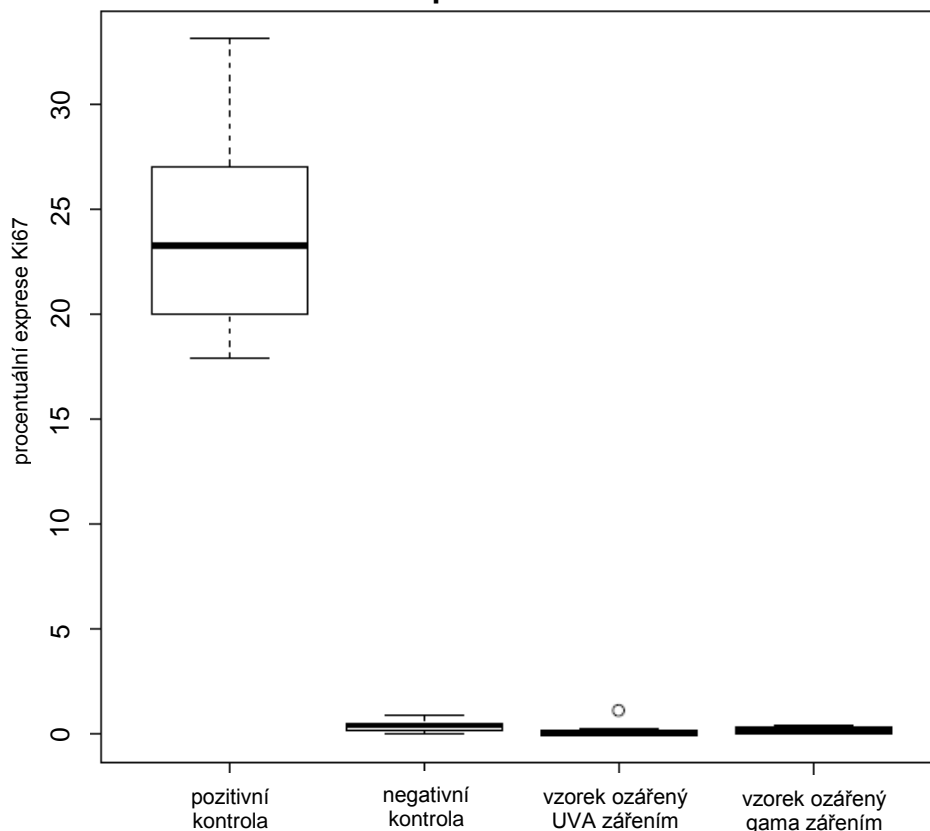
Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného gama zářením, kdy rozdíl mediánů činil 79,45 % exprese znaku H2AX, $p < 0,01$.

Mezi mediánem vzorku ozářeným UVA zářením a mediánem vzorku ozářeným gama zářením byl zjištěn statisticky významný rozdíl 19,43 % exprese znaku H2AX, $p < 0,01$.

12.3 Výsledky stanovení Ki67

12.3.1 Stanovení Ki67 po 48 hodinové inkubaci

Graf 4 Stanovení Ki67 po 48 hodinové inkubaci



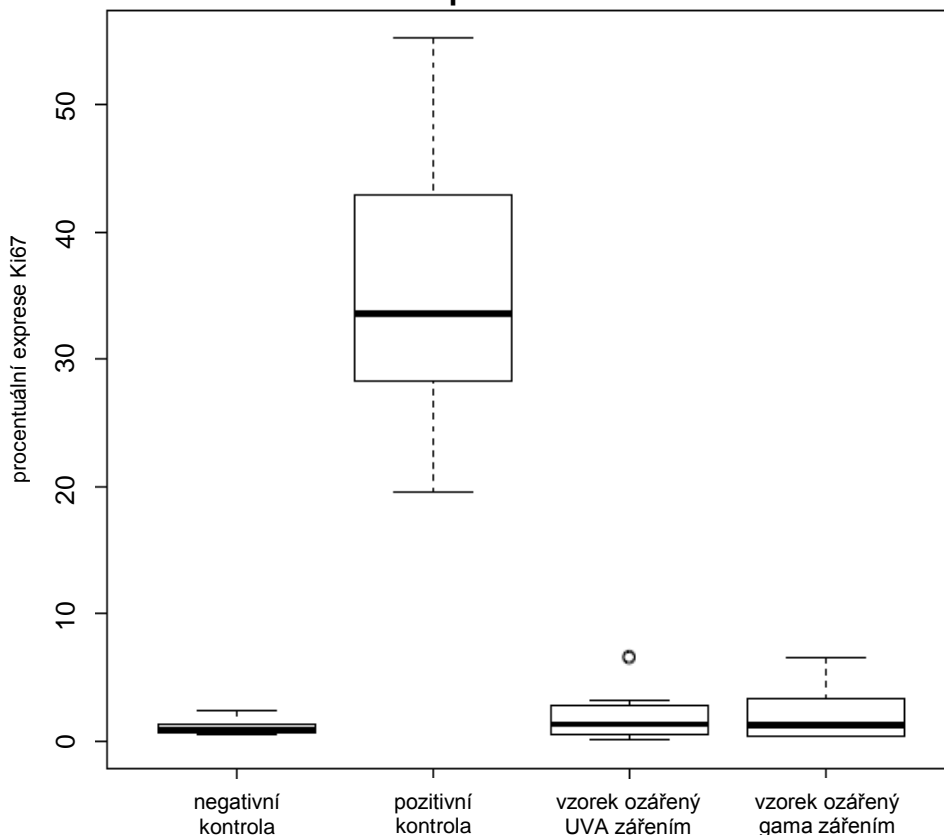
Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku Ki67 mezi mediánem negativní kontroly, kterou představoval nestimulovaný vzorek a mediánem pozitivní kontroly, kterou představoval vzorek stimulovaný mitogenem. Rozdíl mediánů činil 26,36 % exprese znaku Ki67, $p < 0,01$.

Při porovnání mediánů negativní kontroly, vzorku ozářeného UVA zářením a vzorku ozářeného zářením gama nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl. Rozdíl mediánů negativní kontroly a vzorku ozářeného UVA zářením činil 0,29 % exprese znaku Ki67, $p > 0,05$. Rozdíl mediánů negativní kontroly a vzorku ozářeného gama zářením činil 0,13 % exprese znaku Ki67, $p > 0,05$.

Mezi mediánem vzorku ozářeným UVA zářením a mediánem vzorku ozářeným gama zářením nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rozdíl mediánů činil 0,16 % exprese znaku Ki67, $p > 0,05$.

12.3.2 Stanovení Ki67 po 72 hodinové inkubaci

Graf 5 Stanovení Ki67 po 72 hodinové inkubaci



Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi znaku Ki67 mezi mediánem negativní kontroly, kterou představoval nestimulovaný vzorek a mediánem pozitivní kontroly, kterou představoval vzorek stimulovaný mitogenem. Rozdíl mediánů činil 32,8 % exprese znaku Ki67, $p < 0,01$.

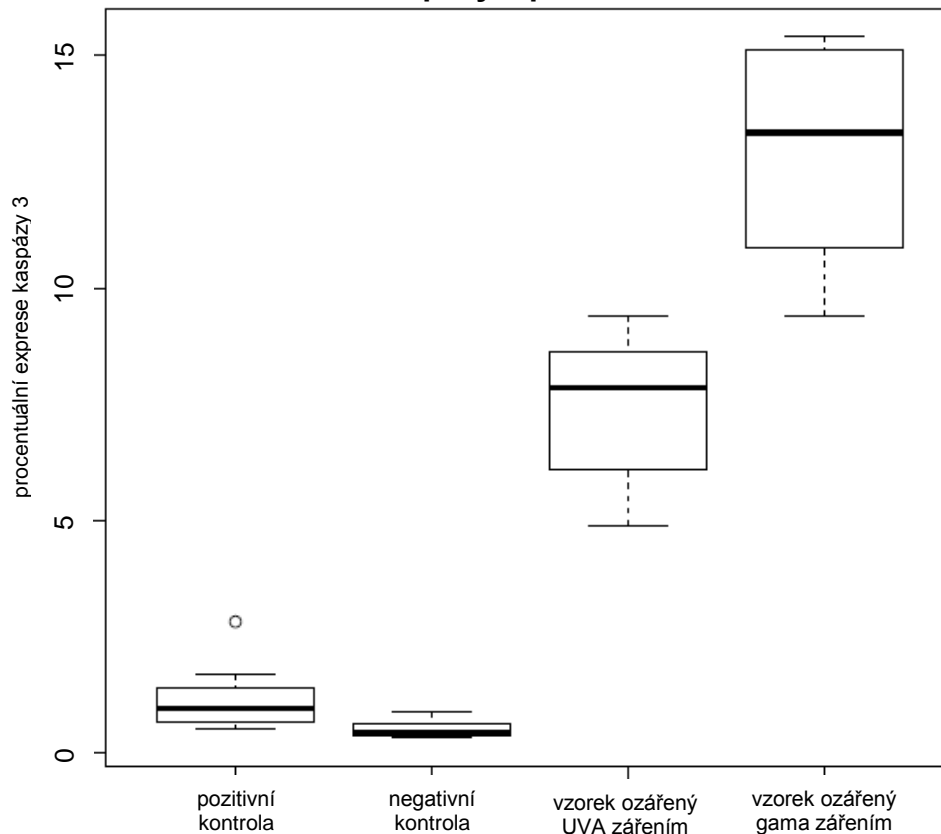
Při porovnání mediánů negativní kontroly, vzorku ozářeného UVA zářením a vzorku ozářeného zářením gama nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl. Rozdíl mediánů negativní kontroly a vzorku ozářeného UVA zářením činil 0,50 % exprese znaku Ki67, $p > 0,05$. Rozdíl mediánů negativní kontroly a vzorku ozářeného gama zářením činil 0,40 % exprese znaku Ki67, $p > 0,05$.

Mezi mediánem vzorku ozářeným UVA zářením a mediánem vzorku ozářeným gama zářením nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rozdíl mediánů činil 0,10 % exprese znaku Ki67, $p > 0,05$.

12.4 Výsledky stanovení kaspázy 3

12.4.1 Stanovení kaspázy 3 po 48 hodinové inkubaci

Graf 6 Stanovení kaspázy 3 po 48 hodinové inkubaci



Mezi mediánem negativní kontroly, kterou představoval nestimulovaný vzorek a mediánem pozitivní kontroly, kterou představoval vzorek stimulovaný mitogenem byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rozdíl mediánů činil 1,26 % exprese kaspázy 3, $p < 0,05$.

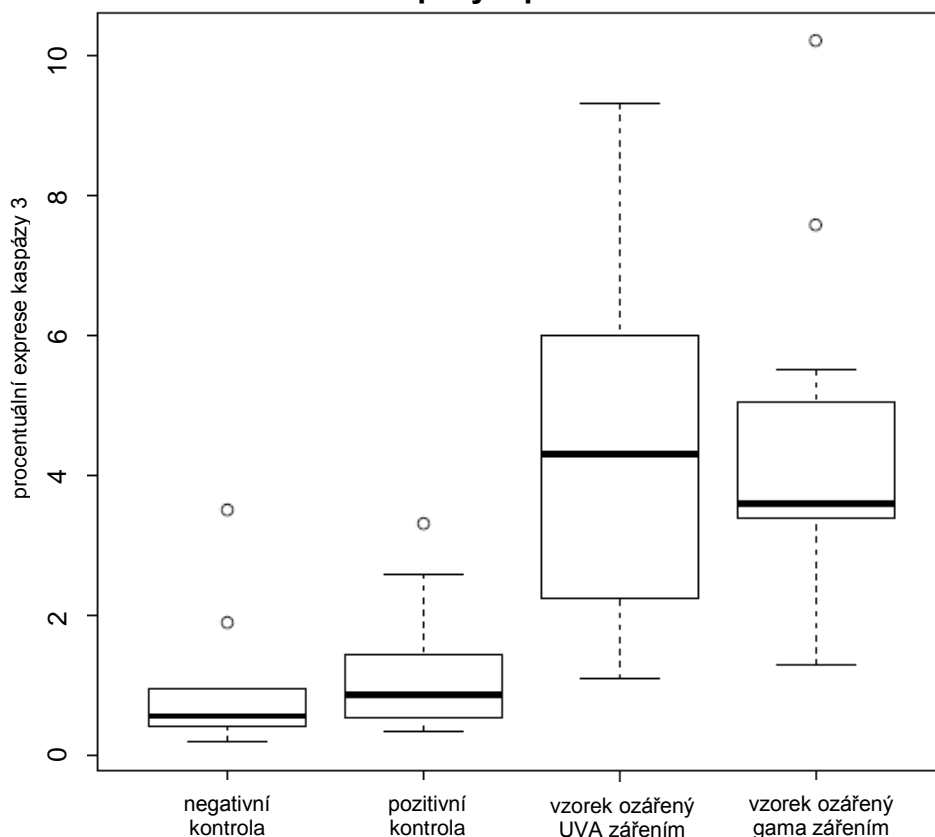
Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného UVA zářením, kdy rozdíl mediánů činil 7,71 % exprese kaspázy 3, $p < 0,01$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného ma zářením, kdy rozdíl mediánů činil 14,27 % exprese kaspázy 3, $p < 0,01$.

Mezi mediánem vzorku ozářeným UVA zářením a mediánem vzorku ozářeným gama zářením byl zjištěn statisticky významný rozdíl 6,56 % exprese kaspázy 3, $p < 0,01$.

12.4.2 Stanovení kaspázy 3 po 72 hodinové inkubaci

Graf 7 Stanovení kaspázy 3 po 72 hodinové inkubaci



Mezi mediánem negativní kontroly, kterou představoval nestimulovaný vzorek a mediánem pozitivní kontroly, kterou představoval vzorek stimulovaný mitogenem byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rozdíl mediánů činil 0,30 % exprese kaspázy 3, $p < 0,05$.

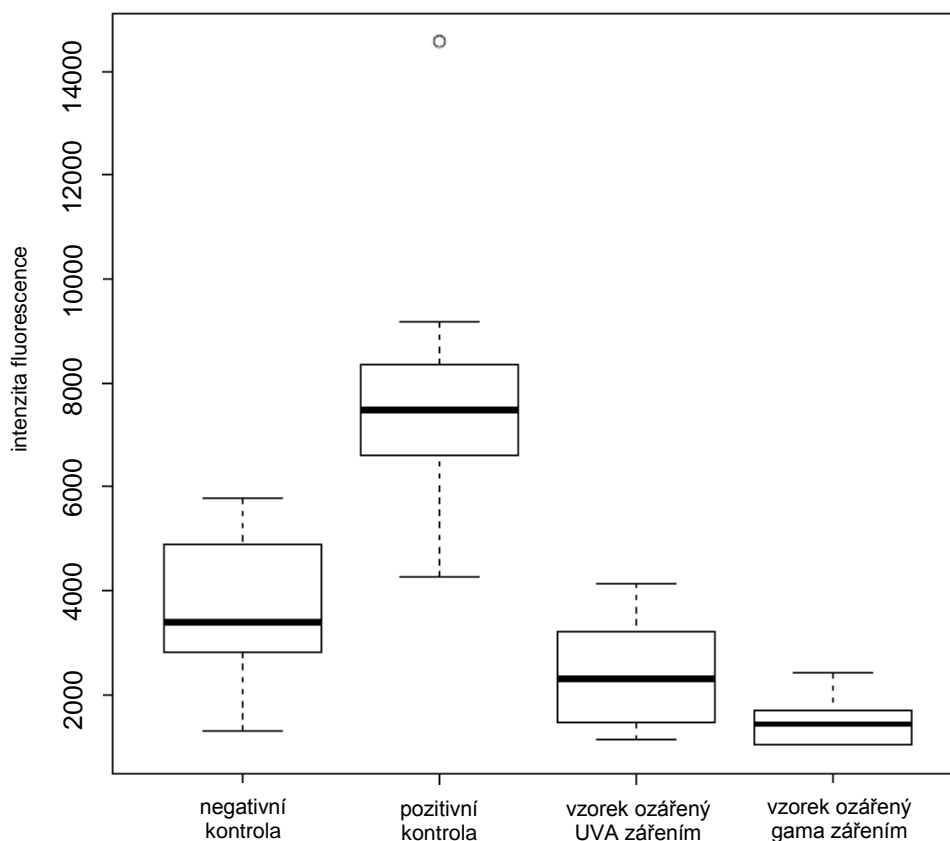
Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného UVA zářením, kdy rozdíl mediánů činil 3,73 % exprese kaspázy 3, $p < 0,01$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného gama zářením, kdy rozdíl mediánů činil 3,03 % exprese kaspázy 3, $p < 0,01$.

Mezi mediánem vzorku ozářeným UVA zářením a mediánem vzorku ozářeným gama zářením byl zjištěn statisticky významný rozdíl 0,7 % exprese kaspázy 3, $p < 0,01$.

12.5 Výsledky stanovení Alamarblue® po 48 hodinové inkubaci

Graf 8 Stanovení Alamarblue® po 48 hodinové inkubaci



Mezi mediánem negativní kontroly, kterou představoval nestimulovaný vzorek a mediánem pozitivní kontroly, kterou představoval vzorek stimulovaný mitogenem byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rozdíl mediánů intenzity fluorescence činil 4083 fluorescenčních jednotek , $p < 0,01$.

Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného UVA zářením, kdy rozdíl mediánů intenzity fluorescence činil 5176 fluorescenčních jednotek, $p < 0,05$.

Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mediánem negativní kontroly a mediánem vzorku ozářeného ma zářením, kdy rozdíl mediánů intenzity fluorescence činil 6051 fluorescenčních jednotek, $p < 0,01$.

Mezi mediánem vzorku ozářeným UVA zářením a mediánem vzorku ozářeným gama zářením byl zjištěn statisticky významný rozdíl intenzity fluorescence 875 fluorescenčních jednotek, $p < 0,01$.

13 DISKUZE

Tato bakalářská práce si dává za cíl ověřit, zda vzorky připravené ozářením UVA zářením pomocí extrakorporální fotoferézy mají shodné vlastnosti (exprese H2AX, Ki67 a kaspázy 3) jako vzorky ozářené gama zářením. Výsledky byly statisticky zhodnoceny. V grafické formě jsou prezentovány ve formě boxplotů. Při statistickém hodnocení jsou porovnávány mediány exprese konkrétního znaku. Výsledky vzorků ozářených UVA nebo gama zářením jsou porovnány s hodnotou mediánu negativní kontroly. Dále jsou také vzájemně porovnány výsledky vzorků ozářených UVA zářením a vzorků ozářených gama zářením. V průběhu práce byl navržen vhodný protokol, který umožňuje sledování kvality vzniklého transfuzního přípravku. Byla také zavedena metoda sledování exprese znaků H2AX a Ki67 na průtokovém cytometru.

Celkem bylo analyzováno 448 vzorků plné krve od 16 zdravých dárců. Od každého dárce byla krev zpracována ve 28 kombinacích. Jako pozitivní kontrola byly použity vzorky stimulované mitogenem PHA, který má silný účinek na aglutinační a mitotickou aktivitu buněk (Movafagh, 2011). PHA díky tomuto účinku slouží jako pozitivní kontrola. Jako negativní kontrola byly použity vzorky buněčné suspenze v kultivačním médiu, do kterých nebylo nijak zasahováno. Vzorky ozářené UVA zářením byly cílem testování. Jako kontrola ozáření byly použity vzorky ozářené zářením gama, protože gama záření způsobuje intenzivní poškození buněčné DNA (UNEP, 2016). Ozáření gama zářením je také standardně využíváno pro ošetření transfuzních přípravků u pacientů po transplantaci kostní dřeně. Gama záření tedy způsobí zastavení buněčného cyklu a navození buněčné smrti. U čtveřice vzorků (negativní kontrola, pozitivní kontrola, vzorek ozářený UVA a vzorek ozářený gama zářením) byly měřeny tyto parametry: H2AX, Ki67 a kaspáza 3. Pro měření byly zvoleny časové body 48 a 72 hodin, pro Alamarblue® pouze 48 hodin. Časové intervaly byly zavedeny z důvodu optimálního zachycení exprese lymfoproliferačního znaku Ki67 a exprese kaspázy 3. Porovnání exprese znaků po 48 a 72 hodinové inkubaci umožňuje porovnat intenzitu poškození DNA. Stanovení těchto znaků se provádí až po ozáření,

pro ověření kontroly kvality již podaného transfuzního přípravku pacientovi. Stanovení se využívá pro detekci zlomů v DNA, posouzení proliferační schopnosti buněk přejít do apoptózy.

U metody ECP, kdy byl vzorek ozářen UVA zářením, i při ozáření vzorku zářením gama byly sledovány znaky H2AX, Ki67 a kaspáza 3.

Fosforylace molekuly H2AX detekuje dvouřetězcové zlomy v molekule DNA. Je jedním z prvních aktivovaných dějů pro reparaci DNA po vzniku zlomů v její molekule (Řezáčová, 2011). Srovnáním mediánů naměřených hodnot bylo zjištěno, že exprese molekuly H2AX po ozáření UVA i gama zářením narůstá. Ozáření buněk už dávkou 1 Gy záření gama způsobuje vznik cca 40 dvouřetězcových zlomů a fosforylaci cca 1 % H2AX (Řezáčová, 2011). Při ozáření buněk dávkou 25 Gy záření gama došlo k fosforylaci cca 90 % H2AX. Klíčovými kinázami pro fosforylaci DNA jsou: ataxia telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia Rad3-related (ATR) a DNA-dependentní proteinkináza. V reakci na dvouřetězcové zlomy způsobené gama zářením dochází k aktivační autofosforylaci ATM kinázy, tato kináza pak fosforyluje H2AX a hromadí se v místě zlomů. K aktivaci ATR kinázy dochází při ozáření buněk UVA zářením (Řezáčová, 2011). S tímto faktem souvisí i naměřené hodnoty, kdy při ozáření buněk UVA zářením o intenzitě 2 J/cm² došlo k fosforylaci cca 5 % H2AX. Díky těmto skutečnostem je molekula H2AX vhodný marker pro detekci zlomů v DNA, ale je možné ho využít také ke zpětnému odhadu obdržené dávky ionizujícího záření. U obou typů vzorku byly pozorovány velmi vysoké hodnoty exprese znaku H2AX, tím se potvrdilo, že metoda ECP se v poškození DNA vyrovná ozáření gama zářením.

Expresa proteinu Ki67 je přísně spojena s buněčnou proliferací. Během interfáze může být antigen detekován výhradně v jádře, zatímco v mitóze je většina proteinu přemístěna na povrch chromozomů. Skutečnost, že protein Ki67 je přítomen ve všech aktivních fázích buněčného cyklu (G₁, S, G₂ a mitóza), ale není přítomen v klidových buňkách (G₀), ho činí vynikajícím markerem pro stanovení proliferace dané buněčné populace (Scholzen, 2000). Při porovnání vzorků ozářených UVA zářením a ozářených zářením gama bylo zjištěno, že proliferace buněk se pohybuje 48 hodin po ozáření UVA zářením kolem

0,26 % a po ozáření gama zářením kolem 0,42 %. Po 72 hodinách se proliferace buněk nevýznamně zvyšovala na 1,30 % po ozáření UVA zářením a na 1,20 % po ozáření zářením gama. Z toho lze usuzovat, že obě metody velmi účinně zabraňují aktivaci buněk. Při posouzení dynamiky se ale ukázalo, že při ozáření buněk UVA zářením byl mezi 48 a 72 hodinami rozdíl mediánů 1,04 % a při ozáření buněk zářením gama byl rozdíl mediánů 0,78 %. Na základě toho můžeme říci, že jsou obě metody stejně účinné a i po 72 hodinách od ozáření účinně zabraňují proliferaci buněk.

Michelin S. et al (2004) ve své studii prokázali zapojení kaspázy 3 do apoptotického procesu indukovaného gama zářením. Námi naměřená data ukazují, že při ozáření buněk gama zářením je po 48 hodinách vyšší apoptotická aktivita kaspázy 3 než při ozáření UVA zářením. Při zohlednění dynamiky se ale ukázalo, že při ozáření buněk UVA zářením byl mezi 48 a 72 hodinami rozdíl mediánů 3,84 %, zatímco při ozáření buněk zářením gama byl rozdíl mediánů 11,10 %. To ukazuje, že rychlost apoptotických procesů je pravděpodobně vyšší u poškození buněk zářením gama, což může být způsobeno ostrými zlomy v DNA. U ECP je poškození DNA spojeno se zlomy vyvolanými UVA zářením, zároveň však dochází k reakci mezi DNA a 8-MOP, který vytváří vazby v DNA, čímž se ztěžuje průběh apoptózy. Buňky zůstávají déle metabolicky aktivní. To dokazuje i stanovení Alamarblue®, kde byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v metabolické aktivitě buněk ozářených gama zářením a ozářených UVA zářením při metodě ECP.

Proliferační aktivita buněk po 48 hodinách byla u kontrolního vzorku buněk stimulovaných mitogenem 26,65 %. Zatímco po ozáření buněk gama zářením byla proliferační aktivita 0,42 % a po ozáření pomocí UVA záření byla proliferační aktivita 0,26 %. Proliferační aktivita buněk po 72 hodinách byla u kontrolního vzorku buněk stimulovaných mitogenem 33,60 %. Zatímco po ozáření buněk gama zářením byla proliferační aktivita 1,30 % a po ozáření pomocí UVA záření byla proliferační aktivita 1,20 %. Z uvedeného vyplývá, že metoda ECP i ozáření gama zářením velmi účinně zamezují lymfoproliferaci buněk.

ZÁVĚR

Bylo ověřeno, že vzorky ozářené UVA zářením pomocí extrakorporální fototerézy poskytují shodné výsledky jako ozáření vzorků gama zářením. U obou způsobů přípravy vzorků byl prokázán přechod buněk do apoptózy. Měření Alamarblue® byla prokázána zbytková metabolická aktivita buněk spojená s procesem buněčné smrti. U vzorků připravených pomocí ECP dochází k nižšímu poklesu apoptotické aktivity. U transfuzních přípravků byla navržena vhodná metoda pro kontrolu kvality a postupy pro stanovení na průtokovém cytometru. Navržená metoda byla zařazena do standardního vyšetřovacího protokolu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ, Jiří VORLÍČEK, et al. *Hematologie - přehled maligních hematologických nemocí*. 2. dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. 404 s. ISBN 978-80-247-2502-4.

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Anna ŠEDIVÁ. *Imunologie – minimum pro praxi*. 3. vyd. Praha: Triton, 2001. 95 s. ISBN 80-7254-205-2.

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK, et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. 168 s. ISBN 978-80-247-3533-7.

Bio-Rad Laboratories, 2018 [online]. Kidlington: Bio-Rad Laboratories [cit. 24. 3. 2019]. Dostupné z <https://www.bio-rad-antibodies.com/anti-cd3-antibodies-products.html>.

Bio-Rad Laboratories, 2018 [online]. Kidlington: Bio-Rad Laboratories [cit. 24. 3. 2019]. Dostupné z <https://www.bio-rad-antibodies.com/cd45-characterization-isoforms-structure-function-antibodies-minireview.html>.

Cancer research UK, 2017 [online]. London: *Cancer research UK* [cit. 21. 3. 2019]. Dostupné z <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/coping/physically/gvhd/about>.

CETKOVSKÝ, Petr, Jiří MAYER, Jan STARÝ, Mariana HRIČINOVÁ, et al. *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*. 1. vyd. Praha: Galén, 2016. 460 s. ISBN 978-80-7492-267-1.

ČEDÍKOVÁ, Miroslava, et al. On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů [online]. *Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze*, 2012 [cit. 1. 3. 2019]. Dostupné z http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/On-line_atlas_kmenovych_bunek.pdf.

Český národní registr dárců dřeně, 2017 [online]. Plzeň: Český národní registr dárců dřeně [cit. 13. 3. 2019]. Dostupné z <http://www.kostnidren.cz/darci/jak-se-dren-daruje2>.

ENGEL, Pablo, Laurence BOUMSELL, Robert BALDERAS, Armand BENSUSSAN, Valter GATTEI, Václav HOŘEJŠÍ, Bo-Quan JIN, FABIO MALAVASI, Frank MORTARI, Reinhard SCHWARTZ-ALBIEZ, Hannes STOCKINGER, Menno C. van ZELM, Heddy ZOLA a Georgina CLARK. *CD Nomenclature 2015: Human leukocyte differentiation antigen workshops as a driving force in immunology*. *The Journal of immunology*. 2015, **195** (10), 4555–4563. ISSN 0022-1767.

GREINIX, Hildegard T., Nina WOREL, Ulrike JUST a Robert KNOBLER, Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfusion and Apheresis Science*. 2014, **50** (3) 349-357. ISSN 1473-0502.

Haimaom Nadace pro podporu transplantace kostní dřeně, 2002 [online]. Olomouc: Nadace Haimaom [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z https://www.haimaom.cz/sites/default/files/pruvodce_transplantaci_krvetvornych_bunek.pdf.

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6. aktual. vyd. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. 304 s. ISBN 978-80-7553-250-3.

JÍLEK, Petr. *Imunologie, stručně, jasně, přehledně*. 4. přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. 96 s. ISBN 978-80-247-4822-1.

KIKI, Ilhami. What is the role of apheresis technology in stem cell transplantation?. *Transfusion and Apheresis Science*. 2017, **56** (6), 788-794. ISSN 1473-0502.

KITKO, L. Carrie a E. John LEVINE. Extracorporeal photopheresis in prevention and treatment of acute GVHD. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015, **52** (2), 151-156. ISSN 1473-052.

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, 2012 [online]. Praha: Fakultní nemocnice v Motole [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z <http://www.fnmotol.cz/microsite-kdho/pacientum-a-rodinam/v-lecbe/lecba-a-jeji-komplikace/transplantace/>.

KNOBLER, Robert, Mark L. BARR, Daniel R. COURIEL, James L. M. FERRARA, Lars E. FRENCH, Peter JAKSCH, Walter REINISCH, Alain H. ROOK, Thomas SCHWARZ a Hildegard GREINIX. Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009, **61** (4), 652 – 665. ISSN 0190-9622.

KREJSEK, Jan, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ. *Imunologie člověka*. 1. vyd. Hradec Králové: Garamon s.r.o., 2016. 495 s. ISBN 978-80-86472-74-4.

Linkos – Česká onkologická společnost ČLS JEP, 2018 [online]. Praha: Linkos - Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J.E. Purkyně [cit. 20. 3. 2019]. ISSN 2570-8791. Dostupné z <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/jak-se-lecit/transplantace-krvetvornych-bunek/komplikace-transplantaci-a-jeji-pozdni-nasledky/>.

MICHELIN, Severino, Maria del Rosario PEREZ, Diana DUBNER a Pablo GISONE. Increased activity and involvement of caspase-3 in radiation-induced apoptosis in neural cells precursors from developing rat brain. *NeuroToxicology*. 2004, **25** (3), 387 – 398. ISSN 0161-813X.

MOVAFAGH, Abolfazl, Hassan HEYDARY, Seyed Abdol Reza MORTAZAVI-TABATABAEI a Eznollah AZARGASHB. The significance application of indige-nous phytohemagglutinin (PHA) mitogen on metaphase and cell culture proce-dure. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2011, **10** (4), 895 – 903. ISSN 1735-0328.

NG, Ashley P a Alexander S WARREN. Haematopoietic stem cells: past, pre-sent and future [online]. *Cell Death Discovery*. 2017, **3** (17002). Dostupné z <https://www.nature.com/articles/cddiscovery20172>.

Novus biologicals a Biotechne brand, 2015 [online]. Centennial: Novus Biologi-cals a Biotechne Brand [cit. 24. 3. 2019]. Dostupné z <https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/caspase-3-the-execu-tioner-of-apoptosis>.

OLIVEN, Anna a Yael SHECHTER. Extracorporeal photopheresis: a review. *Blood Reviews*. 2001, **15** (2), 103 – 108. ISSN 0268-960X.

PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ, et al. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. 424 s + 64 barevných příloh. ISBN 978-80-247-3459-0.

POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ, Jiří MAYER, et al. *Molekulární he-matologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2013. 316 s. ISBN 978-80-7262-942-8.

RAIDA, Luděk. Nemyeloablativní alogenní transplantace krvetvorných kmeno-vých buněk v léčbě hematologických malignit [online]. *Interní medicína*. 2007, **9** (7 – 8), 331 – 333. Dostupné z <https://www.in-ternimedicna.cz/pdfs/int/2007/07/07.pdf>

RAIDA, Luděk. *Transplantace krvetvorných buněk – základní principy*. 1. vyd. Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. 50 s. ISBN 978-80-244-3393-6.

RODRIGUES, S. Karla, Carla OLIVEIRA-RIBEIRO, Silvia de Abreu Fiuza GOMES a Robert KNOBLER. Cutaneous graft-versus-host disease: diagnosis and treatment. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2018, **19** (1), 33 – 50. ISSN 1175-0561.

ŘEHÁČKOVÁ, Renata. *Stanovení cytotoxicity vybraných skupin xenobiotik*. Hradec Králové, 2010. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceu-tická fakulta v Hradci Králové. František Trejtnar.

ŘEZÁČOVÁ, Martina, Radim HAVELEK, Emilie LUKÁŠOVÁ a Jiřina VÁVROVÁ. Fosforylovaný histon H2AX – Nový indikátor poškození DNA. [online]. *Chemické listy*. 2011, **105**, 108 – 113. Dostupné z http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_02_108-113.pdf.

SCHOLZEN, Thomas a Johannes GERDES. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [online]. *Journal of cellular physiology*. 2000, **182** (3), 311 – 322. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653597>.

SLOVÁČEK, Ladislav, Ladislav JEBAVÝ, Martin BLAŽEK, Miroslav KMONÍČEK a Pavel ŽÁK. Transplantace kostní dřeně. Přehled základních pojmů, typy transplantací, indikace, vlastní provedení [online]. *Vojenské listy*. 2005, **74** (3 – 4), 125 – 134. Dostupné z <https://www.mmsl.cz/pdfs/mms/2005/03/05.pdf>.

UNEP. *Ionizující záření: účinky a zdroje*. Program OSN pro ochranu životního prostředí, 2016. 64 s. ISBN 978-92-807-3600-7.

VOKURKA, Martin, Jan HUGO, et al. *Velký lékařský slovník*. 9. vyd. Praha: Maxdorf s. r. o., 2009. 1159 s. ISBN 978-80-7345-202-5.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1	Návod pro separaci buněk na hustotním gradientu	72
Příloha 2	Návod na inkubaci ozářeného vzorku	74
Příloha 3	Návod pro intracelulární značení buněk po inkubaci	75
Příloha 4	Grafické zhodnocení dat z průtokového cytometru	77
Příloha 5	Návod pro stanovení metabolické aktivity pomocí Alamarblue®	78
Příloha 6	Povolení sběru informací ve FN Plzeň	79

PŘÍLOHY

Příloha 1 Návod pro separaci buněk na hustotním gradientu

SEPARACE BUNĚK NA HUSTOTNÍM GRADIENTU

Teoretický úvod: Pro řadu funkčních testů buněčné imunity je třeba z plné krve izolovat krevní elementy. Existuje celá řada metod a dle účelu, ke kterému je třeba buňky oddělit, se volí metoda separace. (Bartůňková, 2011)

Princip metody: Principem izolace mononukleárních buněk je tzv. gradientová centrifugace, která spočívá v separaci buněk na základě rozdílů v jejich hustotě. (Bartůňková, 2011)

Technické pomůcky: centrifugační zkumavky, Pasteurovy pipety, pístová pipeta ($V = 2 \text{ ml}$)

Chemické pomůcky: kultivačním medium RPMI 1640 (*Biosera, France*), flotační roztok Ficoll-Pauque (*GE Healthcare, Sweden*) o $\rho = 1,036 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Biologický materiál: plná krev

Přístroje: laminární box, centrifuga

Postup:

Pracovat v laminárním boxu!!

1. Plnou krev zředit 1:1 s kultivačním medium RPMI 1640.
2. Na dno centrifugační zkumavky napipetovat 2 ml flotačního roztoku Ficoll-Pauque.
3. Převrstvit flotační roztok celkovým objemem naředěné suspenze buněk.
4. Centrifugovat 20 minut při 2200 otáčkách za minutu.
5. Velmi opatrně odsát vzniklý mléčně zakalený prsteneček do nové centrifugační zkumavky.

6. Přidat 5 ml kultivačního media RPMI 1640.
7. Centrifugovat 10 minut při 1800 otáčkách za minutu.
8. Slít supernatant.
9. Doplnit do 12 ml kultivačním mediem RPMI 1640.
10. Centrifugovat 10 minut při 1800 otáčkách za minutu.
11. Slít supernatant.
12. Naředit kultivačním mediem RPMI 1640 na počet buněk $2 \cdot 10^6$ na 1 ml.

Příloha 2 Návod pro inkubaci ozářeného vzorku

PŘÍPRAVA VZORKU PRO KONTROLU KVALITY TRANSFUZNÍHO PŘÍPRAVKU

Teoretický úvod: Inkubace vzorku je důležitá pro dostatečné působení mitogenu (PHA), který má vliv na jejich mitotickou aktivitu.

Princip metody: Dělení buněk na základě specifické hmotnosti.

Technické pomůcky: zkumavky, pístová pipeta ($V = 50 \mu\text{l} - 10 \text{ ml}$)

Chemické pomůcky: kultivační médium RPMI 1640 (*Biosera, France*), heparin (*Zentiva, Česká republika*) o $c = 5000 \text{ m.j./1ml}$, zásobní roztok PHA

Biologický materiál: ozářená buněčná suspenze

Přístroje: laminární box, centrifuga, termostat

Postup:

Pracovat v laminárním boxu!!

1. Vzorek z injekční stříkačky převést do zkumavky.
2. Přidat 10 ml kultivačního média RPMI 1640.
3. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.
4. Slít supernatant
5. Resuspendovat buňky.
6. Přidat 2 ml kultivačního média RPMI 1640.
7. Do druhé (nové) zkumavky napipetovat 9 ml kultivačního média RPMI 1640.
8. Přidat 50 μl heparinu.
9. Přidat 50 μl zásobního roztoku PHA.
10. Přidat 1ml vzorku z první (původní) zkumavky.
11. Označit štítkem.
12. Inkubovat dle určení 48 hodin nebo 72 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.

Příloha 3 Návod pro intracelulární značení buněk po inkubaci

INTRACELULÁRNÍ ZNAČENÍ BUNĚK PRO KONTROLU KVALITY TRANSFUZNÍHO PŘÍPRAVKU

Teoretický úvod: Intracelulární značení antigenů je důležité pro následné měření na průtokovém cytometru. Molekula CD45 se nachází zejména na lymfocytech, molekula CD3 se nachází na T-lymfocytech. Histon H2AX značí poškození DNA dvouřetězcovými zlomy. Antigen Ki67 ukazuje na proliferační aktivitu buněk a kaspáza 3 je zodpovědná za proces apoptózy.

Princip metody: Intracelulární značení antigenů CD45, CD3, H2AX, Ki67 a kaspázy 3.

Technické pomůcky: cytometrické zkumavky, pístová pipeta ($V = 5 - 450 \mu\text{l}$)

Chemické pomůcky: PBS pufr o pH 7,4; 4,2% fixační roztok PFA (*BD Bioscience, USA*), 1% roztok Tritonu® X-100 (*Life Technologies, USA*), roztok FBS (*Gibco, UK*); monoklonální protilátky: **CD45 KO** (*Beckman Coulter, USA*), **CD3 PB** (*Beckman Coulter, USA*), **H2AX FITC** (*BioLegend, USA*), **Ki67 PE** (*EXBIO, Česká Republika*), **Kaspáza 3 APC-AF647** (*BioLegend, USA*)

Biologický materiál: ozářená buněčná suspenze po inkubaci 48 nebo 72 hodinách

Přístroje: laminární box, centrifuga, termostat, průtokový cytometr Navios (*Beckman Coulter, USA*)

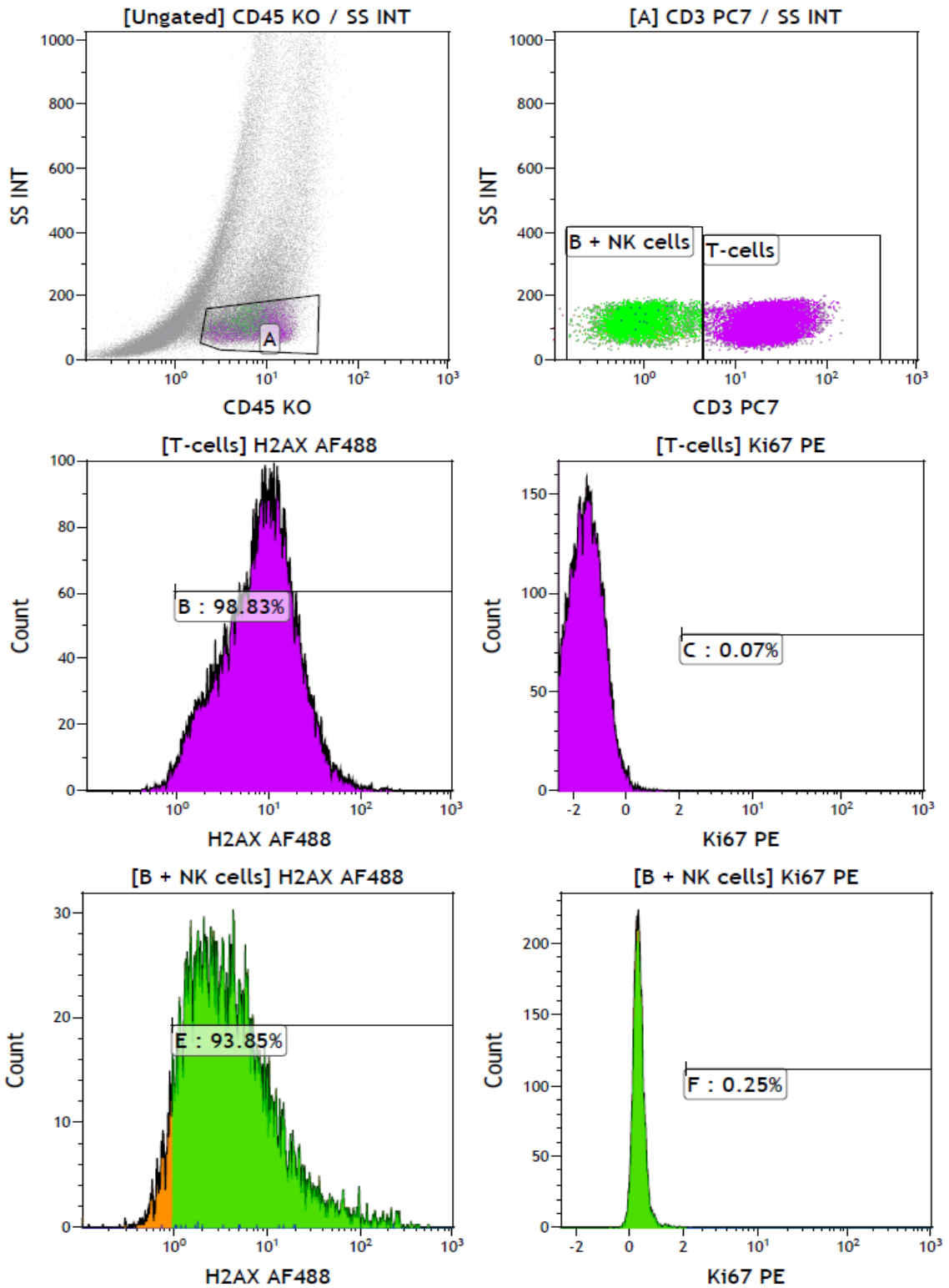
Postup:

Pracovat v laminárním boxu!!

1. Buněčnou suspenzi převést do cytometrické zkumavky.
2. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.

3. Slít supernatant.
4. Přidat 250 μ l PBS.
5. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.
6. Slít supernatant a resuspendovat buňky.
7. Přidat 250 μ l fixačního roztoku PFA.
8. Nechat 5 minut inkubovat.
9. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.
10. Slít supernatant a resuspendovat buňky.
11. Přidat 250 μ l fixačního roztoku PFA.
12. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.
13. Slít supernatant a resuspendovat buňky.
14. Přidat 250 μ l 0,1% roztoku Tritonu® X-100 (= naředit z 1% zásobního roztoku Tritonu® X-100 v poměru 1:9 s PBS puřrem).
15. Inkubovat 10 minut.
16. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.
17. Slít supernatant a resuspendovat buňky.
18. Přidat 250 μ l 3% roztoku FBS (= ředí se roztokem PBS).
19. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.
20. Slít supernatant a resuspendovat buňky.
21. Přidat 250 μ l 3% roztoku FBS.
22. Do druhé (nové) cytometrické zkumavky napipetovat 5 μ l každé vybrané monoklonální protilátky.
23. Přidat 100 μ l resuspendovaných buněk v 3% roztoku FBS z první (původní) cytometrické zkumavky.
24. Inkubovat 30 minut **ve tmě!!**
25. Centrifugovat 3 minuty při 1800 otáčkách za minutu.
26. Slít supernatant a resuspendovat buňky.
27. Přidat 450 μ l 3% roztoku FBS.
28. Vzorky změřit pomocí průtokového cytometru Navios.

Příloha 4 Grafické zhodnocení dat z průtokového cytometru



Zdroj: vlastní

Příloha 5 Návod pro stanovení metabolické aktivity pomocí Alamarblue®

STANOVENÍ ALAMARBLUE®

Teoretický úvod: Pomocí testů metabolické aktivity lze prokázat, jaký je výkon mitochondriální aktivity.

Princip metody: Rozpuštěná nebarevná forma substrátu, která se dostává do buněk, se oxidačními pochody na mitochondriálních membránách redukuje na fluorescenční produkt, jehož signál se detekuje.

Technické pomůcky: mikrotitrační destička, pístová pipeta ($V = 100 \mu\text{l}$)

Chemické pomůcky: roztok Alamarblue®

Biologický materiál: ozářená buněčná suspenze po 48 hodinové inkubaci

Přístroje: termostat,

Postup:

1. Do mikrotitrační destičky napipetovat $100 \mu\text{l}$ buněčné suspenze.
2. Přidat $200 \mu\text{l}$ roztoku Alamarblue®.
3. Inkubovat 1 – 4 hodiny v termostatu při 37°C , 5 % CO_2 a pH 6,8 – 7,4.
4. Změřit fluorescenci pomocí přístroje BioTek při excitační vlnové délce 560 nm a emisní vlnové délce 590 nm.

Příloha 6 Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alaj Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Lenka Knotová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Stanovení znaků H2AX a Ki67 u extrakorporální fototerapie*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚIA souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.,** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a **pod přímým vedením** oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým **je Ing. Bc. Tomáš Vlas, odb. prac. v laboratorních metodách ÚIA FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovass@fnplzen.cz

12. 3. 2018