

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Dominika Nová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Dominika Nová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE V ELEKTRICKÉM POLI

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2020

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Dominika NOVÁ**
Osobní číslo: **Z17B0094P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Průtoková cytometrie v elektrickém poli**
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**

Seznam doporučené literatury:

- HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. Základy imunologie. 6., aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. 297 stran. ISBN 978-80-7553-250-3.
- JÍLEK, Petr. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. Praha: Grada Publishing, 2019. 97 stran. ISBN 978-80-271-0595-3.
- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. 172 stran. ISBN 978-80-247-3533-7.
- KREJSEK, Jan, a další. Imunologie člověka. Hradec Králové: Garamon, 2016. 495 stran. ISBN 978-80-86472-74-4.
- PUNT, Jenni, a další. Kuby immunology. New York: Macmillan Education, 2019. 944 stran. ISBN 978-1-319-11470-1.
- DEVELS, Peter J., a další. Roitt's essential immunology. Chichester: Wiley Blackwell, 2017. 556 stran. ISBN 978-1-118-41577-1.

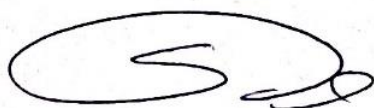
Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Bc. Tomáš Vlas

Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**



PhDr. Lukáš Štich
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

Prohlášení

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

V Plzni dne 30.4. 2020

.....

Dominika Nová

Abstrakt

Příjmení a jméno: Dominika Nová

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Průtoková cytometrie v elektrickém poli

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 45

Počet stran – nečíslované: 19

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 21

Klíčová slova: buňky imunitního systému, průtoková cytometrie, 2DEP cytometrie, test aktivace basofilů

Souhrn:

Tato bakalářská práce se bude zabývat porovnáním metodiky stanovení aktivace basofilních granulocytů stimulovaných alergenem břízy na průtokovém cytometru a na nově vyvíjející se 2DEP cytometrii. Stanovení bude probíhat u pozitivních pacientů na alergen břízy a u negativních kontrol pro porovnání výsledků. Teoretická část bude shrnovat obecný popis buněk imunity, bude se zabývat popisem principu a konstrukce průtokového cytometru a 2DEP cytometru. Praktická část se věnuje popisu měření na průtokovém cytometru, vyhodnocení výsledků a jejich interpretace. Bude se zde srovnávat měření na 2DEP cytometru, jejich rozdíly při zpracování biologického materiálu, hodnocení výsledků a následné porovnání mezi sebou. Výsledky bakalářské práce ukazují na výrazné rozdíly mezi jednotlivými metodami, hlavně z pohledu odlišného stanovení aktivace basofilů, tak rozdílnost v interpretaci naměřených výsledků.

Abstract

Surname and name: Dominika Nová

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

Title of thesis: Flow cytometry in electric field

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 45

Number of pages – unnumbered: 19

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 21

Keywords: cells of the immune system, flow cytometry, 2DEP cytometry, basophil activation test

Summary:

This Bachelor thesis will be about comparison of methodologies for determining the activation of basophilic granulocytes stimulated by the birch allergen on a flow cytometer and on newly developed 2DEP cytometry. Determination will take place on positive patients for birch allergen and negative controls for comparison of results. Theoretical part will summarize general description of cell immunity, more than will be describing function and construction of flow cytometer and 2DEP cytometer. Practical part will describe measuring on flow cytometer, evaluation of results and their interpretation. There will be comparison of measuring on 2DEP cytometer, difference in processing results, evaluation of results and their comparison. Results of this Bachelor thesis shows significant differences between individual methods, mainly from view of different determination of basophil activation and difference in interpretation of measured values.

Předmluva

Tuto práci jsem si zvolila díky možnosti účastnit se výzkumu ve výzkumném centru NTIS, kde jsem měla možnost se seznámit s nově se vyvíjející metodou 2DEP cytometrie. Dalším důvodem ke zvolení tohoto tématu byl můj kladný technický vztah k analyzátorům, zejména tedy k tomu, které se právě prozkoumávají a je snaha objevit jejich potenciál. Vznikl tak nápad otestovat více tento přístroj (2DEP cytometr) a porovnat s rutinně využívaným stanovením na průtokovém cytometru. Tato bakalářská práce si dává za cíl ověřit možnost využití a nalezení výhod či nevýhod při použití 2DEP cytometru v praxi.

Poděkování

Mé díky za pomoc a odborné vedení bych velice ráda věnovala panu Ing. Tomáši Vlasovi, který mě vždy správně inspiroval a nasměroval v psaní této práce. Další obrovské díky patří paní Bc. Adrianě Kašpárkové za trpělivé a vstřícné jednání při práci ve výzkumném centru NTIS. Zároveň bych chtěla poděkovat panu Dr. Ing. Pavlovi Fikarovi, Ph.D., z výzkumného centra NTIS, za poskytnutí možnosti podílet na práci na 2DEP cytometru. Díky také patří samotnému výzkumnému centru NTIS a Ústavu imunologie a alergologie ve FN Plzeň za poskytnutí prostor, materiálu a vzorku potřebných pro zpracování této práce.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ.....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	12
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM ZKRATEK.....	14
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1 BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	16
1.1 Vznik a vývoj.....	16
1.2 Charakteristika leukocytů.....	16
1.3 CD názvosloví.....	22
2 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE.....	23
2.1 Charakteristika.....	23
2.2 Imunopatologická reakce typu I.....	23
2.3 Imunopatologická reakce typu II.....	23
2.4 Imunopatologická reakce typu III.....	24
2.5 Imunopatologická reakce typu IV.....	25
2.6 Alergie a atopie.....	26
3 PRŮTOKOVÝ CYTOMETR.....	27
3.1 Princip stanovení na průtokovém cytometru.....	27
3.2 Konstrukce průtokového cytometru.....	28
3.3 Značení fluorescenčními monoklonálními protilátkami.....	30
4 UPLATNĚNÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE.....	32
5 ÚSKALÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE.....	33
6 DISTRIBUOVANÁ DIELEKTROFORETICKÁ CYTOMETRIE (2DEP).....	34
PRAKTICKÁ ČÁST.....	35
7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE.....	36
8 VÝZKUMNÉ OTÁZKY.....	37
9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU.....	38
10 METODIKA PRÁCE.....	39
10.1 Stanovení specifických IgE.....	39
10.2 Separace a kultivace basofilních granulocytů.....	40
10.3 Měření na průtokovém cytometru – BAT test.....	42
10.4 Měření na 2DEP cytometru.....	44
11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ.....	46
11.1 Výsledky stanovení specifických IgE.....	46

11.2	Výsledky stanovení na průtokovém cytometru.....	46
11.3	Výsledky stanovení na 2DEP cytometru.....	54
12	DISKUZE	57
13	ZÁVĚR.....	60
14	SEZNAM LITERATURY	61
	SEZNAM PŘÍLOH.....	64
15	PŘÍLOHY	65

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Hodnoty AUC u pozitivních pacientů.....	50
Graf 2 Hodnoty AUC u negativních kontrol.....	51
Graf 3 Hodnoty CD – sens u pozitivních pacientů.....	52
Graf 4 Hodnoty CD – sens u negativních kontrol.....	53
Graf 5 Výsledky stanovení na 2DEP cytometru – pozitivní pacienti.....	56
Graf 6 Výsledky stanovení na 2DEP cytometru – negativní kontroly.....	56

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Graf rozložení leukocytů pomocí bočního a předního rozptylu	28
Obrázek 2 Schéma konstrukce průtokového cytometru	30
Obrázek 3 Ukázka gatingu u T – lymfocytů (značeno PE anti – CD8 a FITC anti – CD4)	31
Obrázek 4 Schéma 2DEP cytometrie.....	34
Obrázek 5 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (0,01 mg/ml)	46
Obrázek 6 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (0,1 mg/ml)	47
Obrázek 7 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (1 mg/ml)	47
Obrázek 8 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (10 mg/ml)	48
Obrázek 9 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (100 mg/ml)	48
Obrázek 10 Příklad stanovení aktivace basofilů u pozitivního pacienta (koncentrace – 10 mg/ml)	49
Obrázek 11 Příklad stanovení aktivace basofilů u negativní kontroly (koncentrace – 10 mg/ml)	49
Obrázek 12 Příklad výsledku měření na 2DEP cytometru – pozitivní pacient	54
Obrázek 13 Příklad výsledku měření na 2DEP cytometru – negativní kontrola.....	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled nejvýznamnějších CD znaků u leukocytů	22
Tabulka 2 Přehled nejpoužívanějších fluorochromů	31
Tabulka 3 Naměřené hodnoty specifických IgE.....	46
Tabulka 4 Hodnoty AUC u pozitivních pacientů	50
Tabulka 5 Hodnoty AUC u negativních kontrol.....	50
Tabulka 6 Hodnoty CD – sens u pozitivních pacientů	52
Tabulka 7 Hodnoty CD – sens u negativních kontrol.....	52

SEZNAM ZKRATEK

APC.....	antigen prezentující buňka
AUC.....	plocha pod křivkou
BAT.....	test aktivace basofilů
BPI.....	propustnost zvyšující baktericidní protein
BSA.....	hovězí sérový albumin
CD.....	cluster of differentiation, diferenciační skupina
CSFs.....	kolonie stimulující faktor
DEP.....	dielektroforetické
2DEP.....	distribuovaná dielektroforetická cytometrie
FasL.....	transmembránový protein typu II z rodiny TNF cytokinů
FITC.....	fluorescein isothiocyanate
fMLP.....	N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin
IL.....	interleukin
INF γ	interferon gamma
MHC.....	hlavní histokompatibilní komplex
PBS.....	fosfátový pufr
PE.....	phycoerythrin
PIV.....	částicová velocimetrie
Tc.....	cytotoxické T – lymfocyty
Th.....	pomocné T – lymfocyty
TSH.....	tyreotropní hormon

ÚVOD

Buňky imunitního systému jsou nedílnou součástí našeho imunitního systému, který má jako svůj hlavní úkol bránit organismus proti všem možným antigenům či patogenům, se kterými se každý den setkáváme. Likviduje také poškozené vlastní buňky těla (nádorové). Na imunitní systém často bohužel působí, ve většině případů negativně, civilizační vlivy, od životního stylu (složení potravy, chemické látky v našem okolí, stres) až po životní prostředí, ve kterém žijeme. Jedním druhem nesprávného fungování naší imunity jsou projevy alergie, přehnané reakce organismu na látku, které běžně nacházíme ve svém okolí. Lidé mohou být přecitlivělí na nejběžnější věci, jako jsou pyly, prach či některé potraviny. Alergie mohou mít různé projevy jako je alergická rýma, svědění, otoky očí, zúžení průdušnice či průdušek a tím následná dušnost. Typickým příznakem jsou různé typy vyrážek, ekzémů nebo jiných dalších kožních projevů. U alergií je důležitá také jejich diagnostika. V dnešní době lze využít několik způsobů stanovení toho, zdali je člověk na danou věc alergický či nikoliv. Jedním z testů je tzv. kožní test, kdy se narušením kůže aplikuje daný alergen a čeká se, jestli dojde k reakci. U laboratorního vyšetření se spoléháme na stanovení specifických IgE protilátek nebo právě využíváme stanovení testu aktivace basofilních granulocytů.

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením testu aktivace basofilů na průtokovém cytometru u pacientů alergických na břízu a zároveň se zde bude porovnávat toto stanovení testu aktivace basofilů za použití distribuované dielektroforetické cytometrie. Bude se zaměřovat na rozdíly mezi metodami – jaké jsou jejich výhody a nevýhody, vyhodnocení výsledků.

V teoretické části bakalářské práce obsahuje informace o všech buňkách imunitního systému a imunopatologických reakcích. Dále je zde rozebrán princip, konstrukce a vlastnosti průtokového cytometru. Část je věnována i popisu distribuované dielektroforetické cytometrie.

V praktické části bakalářské práce je uvedena metodika jednotlivých analytických metod, a to stanovení specifických IgE protilátek, stanovení testu aktivace basofilů na průtokovém cytometru a popis měření na 2DEP cytometru.

Diskuze se bude zaměřovat na rozdíly mezi zvolenými analytickými metodami, jaké jsou jejich výhody a nevýhody, vyhodnocení výsledků a jejich interpretace.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

1.1 Vznik a vývoj

Proces hematopoézy je děj, při kterém vznikají všechny krevní buňky z jedné základní neboli pluripotetní kmenové buňky. Kmenová buňka je ve velmi malém množství zastoupena v populaci buněk a nelze ji v mikroskopu rozeznat. Její stanovení lze provést pomocí specifického CD34 znaku, který exprimuje na svém povrchu. Kmenové buňky se mohou neomezeně dělit a tento proces probíhá v organismu v kostní dřeni a je důležitý k zajištění neustálé obnovy všech krevních elementů. Tato buňka je schopna, po stimulaci růstovými faktory, se dělit a dozrávat v jednotlivé buněčné linie. Mezi regulující růstové faktory řadíme IL – 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, erythropoetin, trombopoetin, CSFs (kolonie stimulační faktor), c – kit ligand (Stem Cell Factor). Její dělení probíhá asymetricky, aby jedna z dceřiných buněk opět plnila funkci kmenové buňky a nedocházelo k jejich zániku. Z druhé se posléze stává multipotentní kmenová buňka. Dochází ke vzniku dvou linií buněk myeloidních a lymfoidních. Z řady myeloidní vznikají granulocyty, monocyty, makrofágy, dendritické buňky, vyvíjejí se z ní i erytrocyty a krevní destičky. Z řady lymfoidní vznikají T a B – lymfocyty a NK buňky. (Hořejší, a další, 2017) (Jílek, 2019)

1.2 Charakteristika leukocytů

Nejdůležitější částí, kterou tvoří imunitní systém, jsou bílé krvinky (leukocyty). Leukocyty můžeme rozdělit dle různých hledisek. Podle obsahu svých granul v cytoplazmě dělíme leukocyty na granulocyty a agranulocyty. Mezi granulocyty patří neutrofil, eosinofil, basofil a jim podobné mastocyty. Mezi agranulocyty následně pak řadíme lymfocyty a monocyty. Dalším možným hlediskem dělení je členitost jádra na laloky. Rozeznáváme polymorfonukleáry a mononukleáry, kdy do polymorfonukleárů řadíme neutrofil, eosinofil, basofil a do mononukleárů patří lymfocyty a monocyty. (Hořejší, a další, 2017)

Buňky, které vycházejí z myeloidní řady, jsou hlavní součástí imunity vrozené. Většiny z nich je hlavní funkcí účastnit se procesu fagocytózy, což je evolučně velmi starý děj, při kterém dochází k opsonizaci a pohlcení cizorodé částice, kterou nejčastěji bývají mikroorganismy. Dále jsou významní producenti velké řady cytokinů a dalších různých mediátorů. (Hořejší, a další, 2017)

Nejpočetnější skupinu představují granulocyty neutrofilní. Více než 90 % z nich je uloženo jako zásobárna v kostní dřeni, kde se mohou v případě potřeby uvolnit a také udržovat potřebný počet v kolující krvi. Jejich hladina se zvedá po zvýšení koncentrace cytokinů, které jsou uvolňovány během probíhajícího zánětu v organismu. Jejich pobyt v krvi je relativně krátký. Průměrně asi 6 – 8 hodin. Pokud v organismu dochází k zánětlivé reakci, mají schopnost vycestovat do tkáně, kde zánět probíhá. Jsou hlavními zbraněmi organismu proti extracelulárním bakteriím. Jejich nejvýznamnější funkcí je fagocytóza. Z granulocytů dokáží nejúčinněji pohlcovat a následně usmrcovat bakterie. Proces ničení pohlcených mikroorganismů je založen na degranulaci obsahu cytoplazmy neutrofilního granulocytu. Ten ve své cytoplazmě obsahuje dva druhy granul – azurofilní a specifické. Azurofilní granula obsahují antimikrobiální proteiny jako je myeloperoxidáza, lysozym, defenziny, BPI, dále neutrální proteinázy jako elastázu, katepsin Gp, následně kyselá hydrolázy jako katepsin B a D, β – D – glukoronidázu a mnoho dalšího. Granula specifická obsahují také antimikrobiální proteiny lysozym, laktoferin, z neutrálních proteináz obsahují kolagenázu a komplementový aktivátor, z kyselých hydroláz obsahují fosfolipázu A₂. Dále specifická granula obsahují CR3 a CR4, FMLP receptor a spousty dalších složek. Část granul slouží k procesům, které se podílejí na ničení patogenů. Mezi ně řadíme tzv. oxidační vzplanutí, kdy při aktivaci NADPH-oxidázy vznikají velmi reaktivní kyslíkové radikály. Při této reakci vzniká také peroxid vodíku, který pokračuje do reakce katalyzované myeloperoxidázou a vznikají chloranové anionty, které mají také schopnost ničit patogeny. (Hořejší, a další, 2017) (Devels, a další, 2017) (Punt, a další, 2019)

Mezi další způsob likvidace mikroorganismů řadíme proces, kdy neutrofil vypudí část svého chromatinu do extracelulárního prostoru. Jedná o speciální druh buněčné smrti – netózy. Na vyvržené vlákno DNA následně adherují další proteiny a takto připravená „past“ zachycuje a nejspíše za přítomnosti baktericidních látek i usmrcuje přítomné mikroorganismy. Tento mechanismus se označuje jako tzv. neutrofilová extracelulární past. Při vyčerpání sil neutrofila při boji proti zánětu hynou a jsou makrofágy pohlceni a odstraněni. (Devels, a další, 2017)

Dalším v pořadí v četnosti výskytu granulocytů řadíme granulocyty eosinofilní. Eosinofily nalézáme ve většině případů uložené ve tkáních. Zejména tedy v kůži, gastrointestinálním traktu a plicích. Část jich koluje v periferní krvi. Společnou vlastností s granulocyty neutrofilními je obsah granulí ve své cytoplazmě a v případě potřeby jejich schopnost degranulace. Eosinofil také obsahuje ve svých granulích látky potřebné k usmrcení mikroorganismů a dále pak řadu enzymů. Jeho granula obsahují bazické proteiny jako je eosinofilní kationický protein, hlavní bazický protein a eosinofilní neurotoxin. Dále pak peroxidázu

a histaminázu. Jejich hlavní funkcí v organismu je obrana proti parazitům a pohlcování imunitních komplexů. (Hořejší, a další, 2017) (Punt, a další, 2019)

Nejméně zastoupenou skupinu tvoří basofilní granulocyty. Basofily kolují zejména v periferní krvi. Jejich základní funkcí je opět degranulace obsahu své cytoplazmy, a tím dochází k uvolnění protizánětlivých molekul jako je histamin, leukotrieny a prostaglandiny. Tato situace nastává po vazbě alergenu na receptor umístěný na povrchu basofilu. Basofily infiltrují tkáň až po několika hodinách po setkání s alergenem. (Hořejší, a další, 2017)

Velká podobnost panuje mezi basofilními granulocyty a tzv. žírnými buňkami neboli mastocyty, proto se také řadí mezi granulocyty. Na rozdíl od basofilů, žírné buňky se po opuštění kostní dřeně dostávají do periferní krve a následně vycestují do tkáně. Podle toho, kde se nalézají a podle jejich složení, je dělíme na dva typy mastocytů – slizniční a pojivové. Pojivové nalézáme především v kůži a pojivech, zatímco slizniční v plicích, nosní a střevní sliznici. Mastocyty v organismu hrají roli v obraně před parazity. Účastní se správného fungování sliznic a pomáhají k fungování metabolismu pojiva. Mastocyty mají ve své cytoplazmě mnoho granulí, které obsahují hydrolytické enzymy, heparin, chondroitinsulfát, dále pak histamin a serotonin. Po vylití obsahu cytoplazmy uvolněný histamin způsobuje zvýšení propustnosti cév a jejich rozšíření, díky tomu se to do okolní tkáně dostane více tekutiny (vznik otoků), dále pak zapříčiňuje bronchokonstrikci (zúžení průdušek). Typickým znakem mastocytů je vysokoafinní Fc receptor pro IgE. Pokud je na povrchu mastocytu navázána IgE protilátka a dojde k vazbě antigenu na jeho povrchu spouští to řadu signálů, kdy výsledkem je degranulace buňky. Látky uvolněné z cytoplazmy mohou tak rovnou útočit na přítomného parazita. Stejný princip nastává u patologického stavu, jakým je alergie, kdy takto buňka nepřiměřeně reaguje na neškodný antigen. (Siracusa, 2013) (Devels, a další, 2017)

Poslední ze skupiny leukocytů, které se diferencují z myeloidní řady, jsou monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Makrofágy jsou buňky, které mají schopnost fagocytózy a nalezneme je víceméně v každé tkáni či orgánu. Vznikají přeměnou z monocytů přestupem do tkáně. V závislosti na tom, ve které tkáni se nacházejí, se od sebe různé makrofágy liší, a to jak morfologicky, tak funkcí. Makrofágy jsou buňky, které žijí v těle dlouho a jejich hlavním úkol je pohlcování buněk, které prošly buněčnou smrtí (apoptózou) a starají se o odstranění tkáňového odpadu. Příkladem mohou být například Kupfferovy buňky, které nalezneme v játrech a slouží jako bariéra pro odstranění mikrobiálních částic, endotoxinů či jiných škodlivých látek. Osteoklasty jsou příkladem vysoce specializovaných makrofágů, které se účastní přestavby kostní tkáně, respektive degradují kostní matrix a uvolňují vápník z kostí.

Alveolární makrofágy zase pohlcují vdechnuté cizorodé částice, které se dostávají do dýchacích cest jako je prach, alergeny atd. V nervové tkáni nalézáme rovněž druh makrofágů a nazýváme je mikroglie. (Hořejší, a další, 2017) (Jílek, 2019)

V boji se zánětem v organismu jsou makrofágy v čele v první fázi, kdy pohlcují mikroorganismy způsobující infekci a zároveň jsou producenti důležitých cytokinů a dalších markerů zánětu. Vyjma toho, i makrofágy dokáží produkovat látky, které jsou pro patogeny toxické, jako jsou reaktivní kyslíkové radikály nebo oxid dusný. (Hořejší, a další, 2017)

Makrofágy můžeme rozdělit na skupiny podle toho, jak byli aktivováni na – M1 a M2 makrofágy. M1 makrofágy neboli klasicky aktivované makrofágy jsou silně prozánětlivé a vznikají pod vlivem cytokinu $INF\gamma$ a jsou hlavním producentem $IL - 12$, který slouží ke stimulaci T – lymfocytů. M1 mají za úkol fagocytózu odumřelých buněk a likvidaci patogenů. Naproti tomu pod vlivem cytokinů $IL - 4$ vznikají M2 makrofágy. M2 se podílejí na regeneraci tkání a napomáhají procesu vedoucí ke zhojení, avšak na druhou stranu paradoxně podporují růst tumorů. Jsou producenti $IL - 10$. (Punt, a další, 2019)

Monocyty dělíme je na dvě subpopulace s odlišnou funkcí – klasické monocyty a neklasické monocyty. Volně v krvi se pohybují klasické monocyty. Pokud dojde ke vzniku infekce, v tom okamžiku monocyty migrují do místa poškození a začnou se účastnit imunitní reakce. Tím dojde k jejich diferenciaci na makrofágy popřípadě na dendritické buňky. Neklasické monocyty mají obdobné funkce jako makrofágy. Přichycují se na stěnu cévy, kde pohlcují odumřelé endoteliální buňky, odstraňují odpadní částice a přispívají k udržení celistvosti endotelií. Avšak také se účastní na zánětlivé reakci při zánětu nebo poranění, obdobně jako klasické monocyty. (Hořejší, a další, 2017)

Dendritické buňky v organismu hrají důležitou roli v prezentaci antigenu. Jsou to takzvané antigen prezentující buňky (APC). Slouží jako spojení mezi vrozenou imunitní odpovědí, která reaguje rychle, a získanou imunitní odpovědí, která se rozvíjí až za několik dní po průniku infekce. Dendritické buňky se v těle vyskytují jak v nezralé, tak i ve formě zralé. Nezralé formy jsou umístěny tam, kde se nachází rozhraní mezi organismem a okolním prostředím, jakým je především kůže, dále pak sliznice dýchacích cest či gastrointestiálního traktu. Dendritické buňky, které se nalézají ve sliznicích, mají schopnost „vysouvat“ své výběžky mezi buňkami na slizniční povrch a sbírat tam částičky např. alergenů. (Kumar, 2019)

Nezralé dendritické buňky takto obvykle pohlcují i odumřelé buňky z různých tkání a další jiné molekuly kolem sebe. Tyto pohlcené molekuly zpracují a společně s komplexem MHC proteinů exprimují na svůj povrch. Takto vystavené molekuly tzv. autoantigeny rozpoznají T – lymfocyty, ale tímto kontaktem jsou buď utlumeny, nebo se z nich diferencují

Treg (regulační lymfocyty), které slouží k potlačení imunitní odpovědi. Tím se tedy nezralé dendritické buňky zúčastňují zachování tolerance vůči vlastním tkáním. Když naopak dojde k tomu, že dendritická buňka se setká s potenciálním nebezpečím, patogenem, dojde k její aktivaci a stane se z ní zralá dendritická buňka. Takto zralá dendritická buňka má zvýšenou produkci MHC proteinů, kostimulačních molekul (CD80, CD86) a dalších druhů cytokinů či adhezivních molekul, které jsou nutné ke stimulaci naivních T – lymfocytů a k jejich diferenciaci v efektorové T – lymfocyty. (Kumar, 2019) (Devels, a další, 2017)

Buňky, které se naopak vyvíjejí z řady lymfoidní, se podílejí především na získané imunitě. Výjimku tvoří tzv. NK buňky jinými slovy „přirození zabíječi“. Jejich dominantní schopností je, že mohou velmi rychle a bez předchozí stimulace napadat a likvidovat některé nádorové buňky a buňky, které byly napadeny virem. Další odlišností od ostatních lymfocytů je, že na svém buněčném povrchu neexprimují žádné antigenně specifické receptory. Díky tomu je spíše řadíme do mechanismů vrozené imunity. Avšak disponují podobnými nástroji cytotoxicity jako cytotoxické T – lymfocyty. (Hořejší, a další, 2017) (Šterzl, 2007)

T – lymfocyty, které svůj vývoj dokončují v brzlíku, čekají v organismu dva osudy. Část je diferenciována v tzv. T – pomocné buňky (Th), které v závislosti na tom, pod vlivem kterého cytokinu dozrávají, se mohou diferenciovat Th1 nebo Th2 buňky. Mezi základní funkci Th1 buněk je obrana před intracelulárními parazity, kam řadíme parazitující mikroorganismy, které vstupují přímo do buněk organismu. Příkladem mohou být mykobakterie, viry a některé další mikroorganismy. Pokud dojde k napadení organismu z výše uvedených mikroorganismů, začnou dendritické buňky pohlcovat dané patogeny a na svůj povrch vystavovat jejich peptidy. Zároveň dochází k zvýšení produkce různých molekul, nejvýznamnější pro diferenciaci Th1 je produkce IL – 12. Obranu před extracelulárními mikroorganismy, ale i velkými mnohobuněčnými parazity, se kromě eosinofilů, basofilů, mastocytů podílejí taktéž Th2 buňky, které mimoto pomáhají B – lymfocytům k tvorbě specifických IgE protilátek. K tomu, aby došlo k jejich dozrání, je potřeba opět spolupráce s antigen prezentujícími buňkami a produkce IL – 4, který zřejmě nepochází z APC, ale produkují ho basofily nebo žírné buňky. Mezi další důležitý interleukin patří IL – 2. O tom zdali dojde k diferenciaci směrem k Th1 nebo Th2 buňkám závisí právě na poměru množství mezi IL – 12 a IL – 4. Regulace, která probíhá mezi Th1 a Th2 reakcí je v organismu velice podstatná. (Ralph C. Budd, 2017) (Šterzl, 2007)

Cytotoxické T – lymfocyty rozpoznávají buňky napadené virem či jinak abnormálně poškozené. Jejich funkce je takto odlišné buňky zničit přímým kontaktem nebo pomocí látek, které produkují. Tento postup je velmi extrémní, kdy snaha cytotoxických lymfocytů je, co nejrychleji eliminovat zdroj infekce i za cenu toho, že může docházet k narušení okolní

zdravé tkáně. Vytvoření vzniku efektorových cytotoxických T – buněk je opět na základě spolupráce s APC, která na svůj povrch může vystavovat MHC I. třídy, které pohltí ze svého okolí, nebo sama buňka může být infikována např. daným virem. Cytotoxické T – lymfocyty mají tři druhy mechanismů, které využívají k ničení poškozených buněk. Jedním je obsah cytotoxických granúl ve své cytoplazmě, které obsahují granzymy a perforin. Obsah cytoplazmy se degranuluje v přítomnosti postižené buňky. Perforin slouží k tvorbě pórů v její membráně, do kterých následně prostoupí granzymy, které pomocí aktivací kaspáz vedou ke spuštění apoptózy. Dalším způsobem navození apoptózy je tzv. FasL, který se nachází na povrchu Tc a váže se na buňku. Navázáním na příslušný receptor dojde k navození apoptózy a buňka spustí proces buněčné smrti. Podobně jako FasL slouží ještě lymfotoksin, který taktéž indukuje navození buněčné smrti. (Devels, a další, 2017) (Ralph C. Budd, 2017)

Malou skupinu T – lymfocytů tvoří tzv. T – regulační lymfocyty. Jejich úkolem je potlačení aktivity a proliferace jiných efektorových T – lymfocytů, ale účinně potlačují i funkci APC. Udržují homeostázu v imunitním systému, což znamená, že tlumí zánět a zabraňují poškození okolní tkáně. Hrají také roli v regulaci autoimunitních onemocnění a v nádorové a post transplantační imunitě. Typická je pro ně produkce transkripčního faktoru FoxP3, který je důležitý pro jejich vývoj. (Hořejší, a další, 2017)

Zajímavou skupinu T – lymfocytů tvoří populace buněk produkující IL – 17. Hrají nezbytnou roli v obraně organismu proti infekčním extracelulárním patogenům. Podílejí se na aktivaci neutrofilů a makrofágů tím, že stimulují jejich migraci do postižené tkáně. Indukují produkci potřebných cytokinů a antimikrobiálních peptidů. Populace Th17 se dává do spojitosti s celou řadou převážně autoimunitních onemocnění (např. revmatoidní artritida). (Hořejší, a další, 2017) (Jílek, 2019)

Mezi další buňky, které vznikají v kostní dřeni z lymfoidní linie, jsou B – lymfocyty. Jejich vývoj probíhá v kostní dřeni, avšak úplná diferenciace probíhá až po setkání s antigénem, kdy konečným stádiem je plazmatická buňka, jejíž hlavním úkolem je produkce protilátek neboli imunoglobulinů. Skládají se z dvou těžkých a dvou lehkých řetězců. Podle typu těžkého řetězce rozlišujeme pět tříd imunoglobulinu – IgG, IgE, IgD, IgM a IgA. (Jílek, 2019)

Imunoglobulin G je v největší míře zastoupen v krvi a je schopen přestupovat přes placentu. Tvoří se až v sekundární fázi imunitní odpovědi. Jeho hlavní funkcí je neutralizace, opsonizace (váže se na fagocyty) a aktivace komplementu. (Hořejší, a další, 2017) (Bartůňková, a další, 2019)

Imunoglobulin M je první, který se začne tvořit po setkání s antigénem. Sekretovaný IgM se vyskytuje ve formě pentameru, což mu dává možnost mít 10 vazebných míst. Snadno

aktivuje klasickou dráhu komplementu, ale na rozdíl od IgG se neváže na fagocyty. (Devels, a další, 2017)

Imunoglobulin A se vyskytuje rovněž v séru, ale hojně také na sliznicích, kde slouží jako jejich ochrana proti mikroorganismům. Dále ho pak nalézáme v slzách či v mateřském mléce. Neslouží k aktivaci komplementu. (Hořejší, a další, 2017)

Imunoglobulin E se uplatňuje při obraně proti mnohobuněčným parazitům. Je také hlavní příčinou alergických reakcí. Imunoglobulin D se v séru nachází jen ve velmi malých koncentracích a jeho funkce není zcela známa. (Hořejší, a další, 2017)

B – lymfocyty mají na svém povrchu tzv. komplex BCR, který se skládá z vlastního povrchového imunoglobulinu a asociovaných signalizačních molekul. (Šterzl, 2007)

Důležitou součástí imunitního systému je i to, že část B a T – lymfocytů, které se setkali s antigenem, se mění v tzv. paměťové buňky. Ty hrají roli v opakovaném setkání se stejným antigenem. Mnohem dříve, rychleji a efektivněji je zahájena sekundární odpověď organismu a je účinnější než odpověď primární. (Hořejší, a další, 2017)

1.3 CD názvosloví

Leukocyty na svém povrchu mají nepřehledné množství různých povrchových molekul. Proto bylo zavedeno jakési CD názvosloví a každá nově objevená molekula dostala svoje označení. Číslo, jaké bylo dané molekule přiřazeno, nevypovídá nic o jejích vlastnostech či funkci. Je popsáno více než 300 různých CD znaků. (Hořejší, a další, 2017)

Tabulka 1 Přehled nejvýznamnějších CD znaků u leukocytů

Leukocyt	CD znaky
B – lymfocyty	CD45, CD69, CD40, CD20, CD19
T – lymfocyty	CD45, CD3, CD4 (Th), CD8 (Tc), CD25
Granulocyty	CD16, CD14, CD34
Monocyty	CD16, CD14, CD34
NK – buňky	CD45, CD26, CD56
Znaky aktivace	CD25, CD69, HLA – Dr, FasL

Zdroj dat: <https://www.jimmunol.org/content/195/10/4555>

2 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE

2.1 Charakteristika

Při imunopatologických reakcích může v organismu docházet k poškození organismu s různou závažností. Spouštěčem mohou být nepřiměřené reakce organismu na neškodný antigen (alergie) nebo jako důsledek obranné reakce proti nebezpečným patogenům. Při reakci organismu na vlastní autoantigeny mluvíme o autoimunitní reakci. Imunopatologické reakce se dají zařadit do čtyř skupin a to podle klasické klasifikace dle Coombsa a Gella. Rozdělujeme je tedy na imunopatologickou reakci typu I, II, III a IV. (Marshall, 2018) (Jílek, 2019)

2.2 Imunopatologická reakce typu I.

Imunopatologická reakce typu I. je nejčastější typ, který je spojen s produkcí IgE protilátek proti některým antigenům z běžného prostředí. Typickým příkladem takového antigenu mohou být zrna pylů, antigeny potravin, zvířecí srsti či roztočů. Na tyto víceméně běžné antigeny citlivý jedinci mohou začít produkovat již výše zmíněné IgE protilátky. Tyto lidé jsou nazýváni atopici a jejich přecitlivělost jako atopie. Atopie je tedy genetické predispozice pro tvorbu protilátek s rizikem vzniku alergie. V první fázi dochází k senzibilizaci jedince a to při prvním setkání s antigenem potažmo alergenem. Tato reakce se velmi podobá té, kdy se organismus setkává s mnohobuněčným parazitem a začne stimulovat pod vlivem cytokinů tvorbu Th2 lymfocytů. Následuje diferenciaci B – lymfocytů v plazmatické buňky za pomoci Th2 (produkují IL – 4, IL – 5) a začínají produkovat IgE protilátky. Vzniklé protilátky se prostřednictvím vysokoafinního receptoru Fc vážou na basofily a žírné buňky. K vyplavení mediátorů obsažených v granulích basofilů nebo žírných buněk dochází po opětovném setkání organismu s alergenem. (Marshall, 2018)

2.3 Imunopatologická reakce typu II.

Imunopatologická reakce typu II. je založena na cytotoxických protilátkách IgG a IgM, které se vážou na povrch vlastních buněk a mohou díky tomu aktivovat komplement nebo zapříčinit reakci typu ADCC (na protilátkách založená buněčná cytotoxicita). Leukocyt vybaven na svém povrchu Fc receptorem rozpozná buňku s navázanými protilátkami a svými cytotoxickými mechanismy se jí bude snažit zlikvidovat. Typickým příkladem je transfúzní reakce po podání inkompatibilní krevní transfúze. Na povrchu erytrocytu je řada antigenů a mezi ty nejvýraznější patří antigeny krevních skupin. Rozlišujeme antigeny určující krevní skupinu 0, A a B. V séru jedince krevní skupiny 0 kolují protilátky anti – A i anti

– B. Zatímco u jedince s krevní skupinou A kolují přirozeně pouze protilátky anti – B. U jedince s krevní skupinou B je to naopak a u člověka s krevní skupinou AB v séru žádné protilátky nejsou. Pokud dojde k podání inkompatibilní krevní transfuze, na podané erythrocyty se naváží v séru přítomné protilátky, které zaktivují komplement, a nastane hemolýza. (Marshall, 2018)

Dalším příkladem imunopatologické reakce II. typu je hemolytická nemoc novorozenců, která je způsobena protilátkami proti antigenu RhD. Tato situace nastává, kdy těhotná žena je RhD⁻ a její plod je RhD⁺. Při porodu dojde k imunizaci matky, která si následně začne tvořit anti – D protilátky. To má význam při druhém těhotenství, kdy opět čeká RhD⁺ plod. Vytvořené protilátky při prvním porodu mohou procházet přes placentu a poškozovat tak krvinky plodu v děloze. (Devels, a další, 2017)

Cytotoxické protilátky ale také hrají roli u orgánově specifických autoimunitních chorob. Autoimunitní reakce je cíleně mířena na určitou skupinu buněk nebo tkáň. Tělo si tak tvoří protilátky proti vlastním erytrocytům, neutrofilům, trombocytům nebo bazálním membránám glomerulů atd. (Marshall, 2018) (Devels, a další, 2017)

Existuje podtyp imunopatologických reakcí typu II., kdy vzniklé autoprottilátky mohou blokovat či stimulovat funkci daných buněk nebo tkání. Příkladem může být Graves – Basedowova choroba, kdy si organismus tvoří stimulační protilátky proti receptoru pro hormon TSH, dochází tak ke zvýšené produkci hormonů štítné žlázy a z toho plynoucích komplikací. Při vytvoření blokujících prottilátek proti acetylcholinovému receptoru dojde k blokadě nervosvalového přenosu a toto onemocnění nazýváme myasthenia gravis. U perniciozní anémie zase dochází k produkci prottilátek proti vnitřnímu faktoru, díky kterému je vstřebáván vitamin B₁₂, kterého je následně nedostatek a tím dojde k rozvoji anémie. U poruch plodnosti u žen mohou být na vině protilátky mířené proti oocytům a u mužů se mohou naopak tvořit protilátky proti vlastním spermiiám a tím jim snižovat jejich hybnost. Protilátky proti koagulačnímu faktoru FVII mají zase za následek vznik krvácivého onemocnění – hemofilie (konkrétně typu A). (Marshall, 2018)

2.4 Imunopatologická reakce typu III.

Imunopatologická reakce typu III. je založena na tvorbě imunokomplexů. Je vyvolána protilátkami IgG, které po vazbě na antigen tvoří imunokomplexy. Imunokomplexy se naváží na Fc receptory fagocytů, které je eliminují. Druhou možností je, že aktivují komplement, který započne kaskádu reakcí. Pokud jich v organismu vzniká větší množství, začnou se ukládat do tkání. Patologická imunokomplexová reakce vzniká tehdy, je-li dávka antigenu

veliká nebo antigen v organismu přetrvává. Reakce vzniká až po 7 – 14 dní po vystavení antigenu. Imunokomplexy se usazují velmi často v ledvinách, dále na povrchu endotelií či v kloubních synoviích. V ledvinách tyto imunokomplexy mohou způsobovat glomerulonefritidy, v cévních stěnách se mohou objevovat vaskulitidy a v kloubním mazu pak artritidy. (Punt, a další, 2019)

Příkladem je sérová nemoc, která může nastat po terapeutické aplikaci xenogenního séra (př. podání antiséra proti hadímu jedu). Klinickými projevy je kopřivka, artralgie, myalgie, edém či teplota. Tzv. farmářská plíce vzniká ukládáním imunokomplexů do plic, kdy se v organismu vytvořily IgG protilátky proti inhalačním antigenům (plísně, seno). Když se vytvoří protilátky proti jaderným antigenům, hovoříme o systémovém lupusu erythematoses, při kterém dochází k poškození mnoha životně důležitých orgánů. U vnímavých jedinců může docházet k imunokomplexovým poškozením v důsledku prodělání nějaké infekční choroby. Příkladem může být poststreptokoková glomerulonefritida, revmatoidní artritidy či postinfekční artritidy. (Punt, a další, 2019)

2.5 Imunopatologická reakce typu IV.

Imunopatologická reakce typu IV. se dá jinak pojmenovat jako reakce oddáleného typu. Jedná se o lokální reakci způsobenou lymfocyty Th1 a monocyty, potažmo tedy makrofágy. Tato reakce fyziologicky slouží k odstranění intracelulárních parazitů za pomoci makrofágů. Při prvním setkání organismu s antigenem vzniknou antigeně specifické Th1 lymfocyty. Část se změní v buňky paměťové. Pokud následně dojde k opětovnému kontaktu a antigenem tak za 24 – 72 hodin vzniká lokální reakce a vzniká tzv. granulom (došlo k infiltraci Th1 buňkami a makrofágy). Pokud je stimulace déletrvající, mohou se makrofágy měnit na mnohojaderná syncytia (obrovské buňky). (Hořejší, a další, 2017)

Přecitlivělost oddáleného typu je principem tuberkulinové reakce, kdy se tímto testem dá zjistit stav imunity proti tuberkulóze. U onemocnění sarkoidóza některé neznámé autoantigeny způsobují tvorbu granulomů. Roztroušená skleróza, jako vážná demyelizační autoimunitní choroba, je typická infiltrací Th1 s tvorbou interferonu γ . (Hořejší, a další, 2017) (Devels, a další, 2017)

Reakce oddáleného typu je obdobná jako reakce buněčná cytotoxická. Kromě Th1 buněk se do reakce zapojují i další efektorové T – lymfocyty a to především cytotoxické (CD8+). Význam hrají u virových exantémů a u akutních rejekcí transplantovaných orgánů. (Hořejší, a další, 2017) (Marshall, 2018)

2.6 Alergie a atopie

Termíny alergie a atopie se v dnešní době často zaměňují, ačkoliv se jedná o rozdílné pojmy. „*Atopie je pojem vyjadřující dědičně podmíněný sklon ke vzniku imunologické přecitlivělosti časného typu zprostředkované protilátkami IgE.*“ (Šterzl, 2007) Zatímco o alergii se dá hovořit jako o fenotypickém projevu atopie. (Šterzl, 2007)

Pokud se organismus setká s alergenem, dochází k navázání na molekulu imunoglobulinu E na jeho specifické vazebné místo, tím dojde k aktivaci buněk (zejména eozinofily, basofily, mastocyty), které následně začnou uvolňovat spektrum různých mediátorů. Nejvýznamnějším produktem je histamin, který je už obsažen v jejich cytoplazmě. Dále dochází k dalším syntézám jako aktivačních produktů metabolismu kyseliny arachidonové, následně pak leukotrienů a prostaglandinů. Jejich působením dochází k rozšíření cév, zvýšení propustnosti cévní stěny a smrštění hladké svaloviny. Příznaky alergií právě vycházejí z těchto účinků mediátorů. (Bartůňková, a další, 2019) (Siracusa, 2013)

3 PRŮTOKOVÝ CYTOMETR

Cytometrie je proces, ve kterém jsou měřeny fyzikální a/nebo chemické vlastnosti jednotlivých buněk, nebo dalších biologických či nebiologických částic, které mají zhruba stejnou velikost. V průtokové cytometrii se měření provádí tak, že buňky nebo částice procházejí měřicím zařízením, průtokovým cytometrem, v proudu tekutiny. Průtokové cytometry využívají jako zdroje světla lasery a to jak k produkci rozptýlených, tak fluorescenčních světelných signálů. Tyto signály jsou posléze zachytávány na detektorech, kterými bývají fotodiody nebo fotonásobiče. Signály jsou převáděny na elektronické signály, kterou jsou analyzovány v počítači v příslušném softwaru. Populace buněk mohou být analyzovány na základě jejich fluorescenčních nebo rozptylových charakteristik. V průtokovém cytometru se využívá celá řada fluorescenčních značení. Patří mezi ně fluorescenčně značené konjugované protilátky, barviva vázající DNA, barviva životaschopnosti, iontová indikátorová barviva a fluorescenční expresní proteiny. (McKinnon, 2018) (Shapiro, 2003)

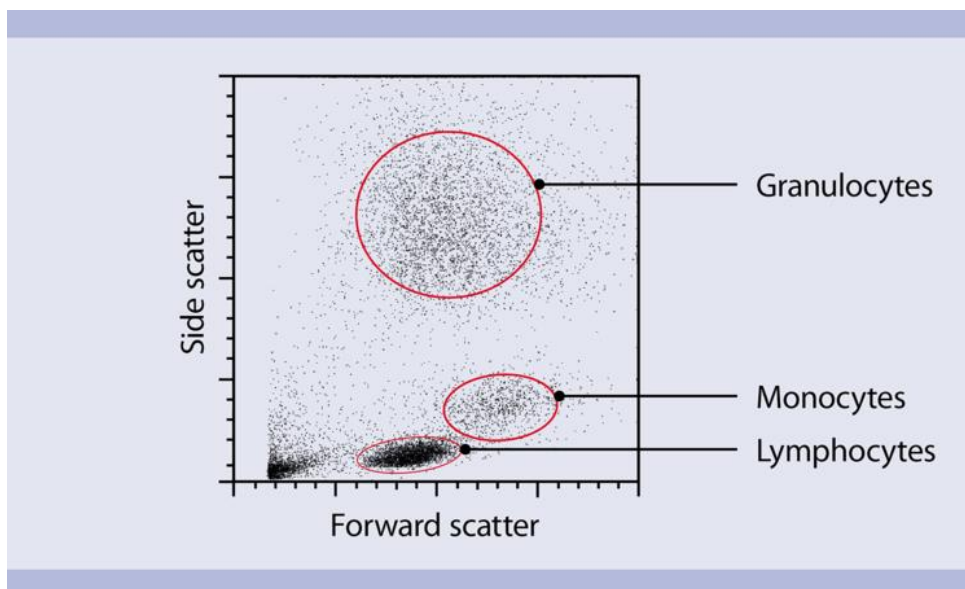
Průtokový cytometr je výkonný analyzátor, který nalézá uplatnění v mnoha oborech jako imunologie, molekulární biologie, bakteriologie, virologie apod. Během posledních 30 let došlo k výraznému pokroku, což umožňuje možnosti rozvoje studia imunitního systému a dalších oblastí buněčné biologie. (McKinnon, 2018) (Lima, 2020)

3.1 Princip stanovení na průtokovém cytometru

Princip analýzy na průtokovém cytometru spočívá v interakci částic a záření. Dochází zde k třídění jednotlivých populací buněk heterogenní směsi v biologickém materiálu pomocí použití laserů. Toto dělení probíhá na základě dvou možností měření a to buď fyzikálních, nebo chemických. Fyzikální měření vlastností můžeme rozdělit jako měření předního rozptylu (forward scatter) a bočního rozptylu (side scatter). Měření předního rozptylu se využívá pro odhad velikosti buněk procházejícím kanálem. Dokáže rozlišit živé buňky od těch mrtvých (apoptické buňky, buněčné fragmenty). O tom jakou vnitřní strukturu má daná buňka (např. obsah granul, buněčných inkluzí), nás informuje rozptyl boční. Paprsek dopadá na buňku pod 90° úhlem a rozlišuje nám tak hlavně lymfocyty (neobsahují vesměs granula) a granulocyty, které mají granule ve své cytoplazmě hojně zastoupena. (Jahan-Tigh, a další, 2012)

Chemické měření využívá principu fluorescence, při které se využívají monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy. Buňka je označena pomocí vazby antigen – protilátka. Mezi nejčastěji využívané fluochromy řadíme fluoresceinisothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) a mnoho dalších. (Jahan-Tigh, a další, 2012)

Obrázek 1 Graf rozložení leukocytů pomocí bočního a předního rozptylu



Zdroj: <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/resources/macs-handbook/macs-technologies/flow-cytometry/flow-cytometry-basics.html#gref>

3.2 Konstrukce průtokového cytometru

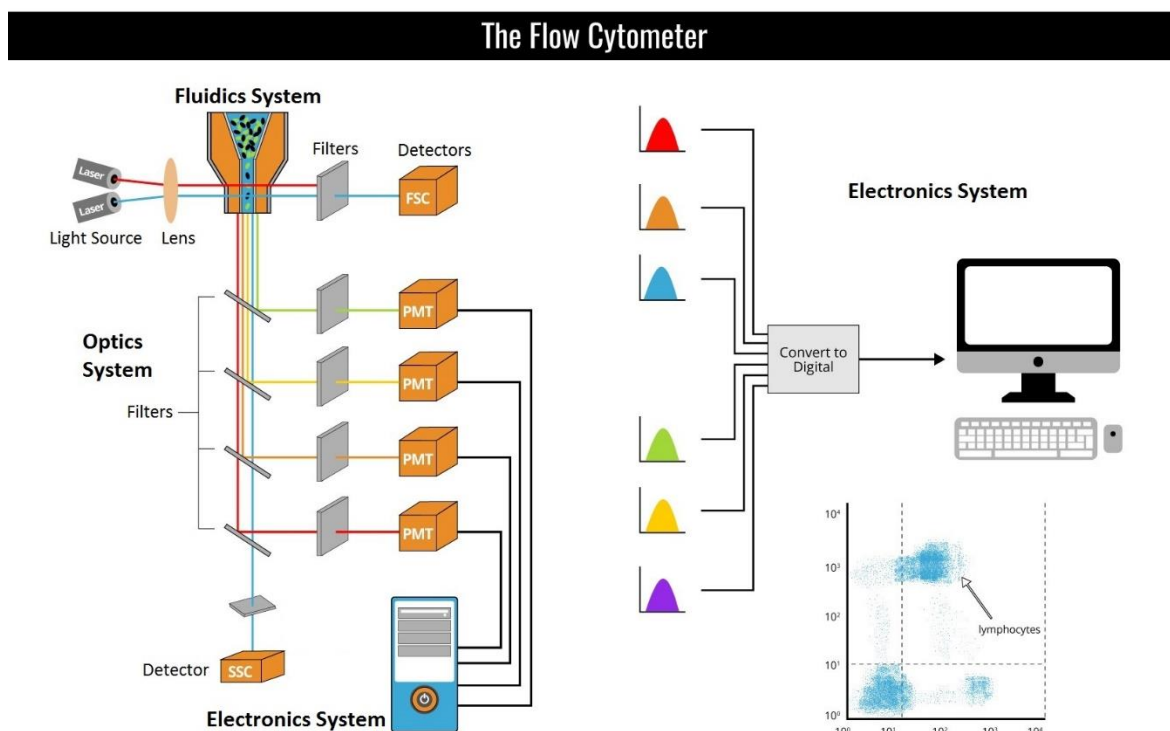
Základní části, ze kterých se skládá průtokový cytometr, tvoří tři systémy – fluidika, optika a elektronika. Fluidní systém zahrnuje průtokovou komoru, do které je vstřikována tekutina vzorku. Většina moderních optických průtokových cytometrů využívá principu hydrodynamické fokusace, která zajišťuje usměrnění proudění buněk kanálem řazených jedna za druhou. Tímto je zajištěno, že tok tekutiny vzorku se pohybuje laminárně a je zlepšena přesnost, s jakou může být vzorek snímán optickou částí cytometru. Stabilní, neomezený tok minimalizuje změny polohy a rychlosti hlavního proudu. Pokud by zde nastala situace, že tok by byl nestabilní či turbulentní, což může být zapříčineno například nějakou blokácí či jiným důvodem, tak toto měření se stává nepřesné. Proto je nutno, aby přístroj udržoval laminární průtok a rychlost fluidním systémem, což nám zajistí správné a přesné výsledky. (McKinnon, 2018) (Shapiro, 2003)

Optický systém průtokového cytometru se skládá z excitační optiky a sběrné optiky. Z technického hlediska je průtokový cytometr zařízení schopné detekovat fotony různých vlnových délek ve vysokém dynamickém rozsahu. Pro dosažení vysokého dynamického rozsahu je nutné pečlivé navržení optiky a detekce signálů. Součástí optického systému jsou čočky, které v průtokovém cytometru slouží ke sběru světla odraženého z požadované buňky pouze z místa, ze kterého sběr světla potřebujeme. Dále se využívají k tomu, aby mohlo dojít k nasměrování světla na detektory. Průtokový cytometr využívá sběrné a kolimační

čočky. Sběrné čočky se používají k zaostření světla z bodu na konec optického vlákna nebo kolimační čočky. Některé přístroje využívají optická vlákna pro nasměrování detekovaného toku světla k detektorům, které jsou nainstalovány v osmiúhelníku. V tomto případě je kolimační čočka umístěna na druhém konci optického vlákna, a tím je zajištěno to, že je veškeré světlo vedeno rovnoběžně osmiúhelníkem. Uvnitř osmiúhelníku je před každým detektorem umístěna další kolimační čočka pro zaostření paralelního světla dopadajícího na detektor. U přístrojů, které optické vlákno nemají, je paralelní světlo směřováno „optickou lavicí“ a následně zaostřeno na detektor kolimační čočkou. Fotodetektory, které se využívají v průtokových cytometrech jsou spektrálně širokopásmové, a proto nemohou detekovat signál, který je výhradně ze specifických vlnových délek, a tedy specifických markerů. Právě proto je třeba použití optických filtrů ke zvýšení specifičnosti. Kromě optických filtrů se využívají i dichroická zrcadla. Optické filtry v průtokovém cytometru slouží k propouštění světla pouze v určitém spektrálním rozsahu. Využívají se filtry pásmové, short pass filtry a long pass filtry. Short pass filtry propouštějí vlnové délky, které jsou nižší než specifická vlnová délka. Long pass filtry naopak propouštějí vlnové délky delší než je konkrétní vlnová délka. Pásmový filtr slouží k propouštění specifických vlnových délek pro zvolený fluorochrom, proto použití konkrétního filtru souvisí s emisní vlnovou délkou používaného fluorochromu. Nezbytnou součástí průtokového cytometru jsou také lasery. Laser je světelný zdroj koherentního světla, který umožňuje vysílat vysokou hustotu fotonů do určitého bodu a to slouží k efektivnímu přenosu energie do fluorochromu. Lasery používané pro průtokovou cytometrii jsou hlavně vzduchem chlazené argonové lasery (pro modrou oblast spektra), helium – neonový laser (červená oblast spektra) nebo UV laser a další. Jak jich bylo výše zmíněno, součástí konstrukce průtokového cytometru jsou i fotodetektory. Používají se fotodiody a fotokatody. (Cossarizza, a další, 2017) (Shapiro, 2003)

Výsledkem měření na průtokovém cytometru jsou signály, které je třeba převést na elektrické impulsy. Tyto impulsy jsou následně pomocí softwaru v počítači zpracovávány. Graficky je pak výsledek vyjádřen buď pomocí jednoparametrového histogramu (osa x – intenzita signálu, osa y – četnost) nebo dvouparametrově a to nazýváme dot ploty. Metodou gatování si pak z grafu lze vybírat danou populaci, kterou analyzujeme. (Cossarizza, a další, 2017) (Lima, 2020)

Obrázek 2 Schéma konstrukce průtokového cytometru



Zdroj: https://www.bosterbio.com/media/images/The_Flow_Cytometer.jpg

3.3 Značení fluorescenčními monoklonálními protilátkami

Monoklonální protilátky jsou neocenitelnou součástí průtokové cytometrie. Jejich objev přinesl významný posun a neomezený přísun vysoce specifických protilátek a dramaticky vývoj této metody ovlivnil. Monoklonální protilátky jsou produkty B – lymfocytů, respektive uměle vytvořených hybridomů, které vznikly fúzí B – lymfocytu (z imunizovaných zvířat) a linie myelomových buněk. Z kultury se vyseparují hybridomy, které produkují požadovanou specifickou monoklonální protilátku. Takto připravené protilátky lze využít na analytické účely, diagnostické či dokonce terapeutické. (BD Biosciences, 2014)

Pro využití v průtokové cytometrii se na monoklonální protilátky vážou fluorescenční barviva, která po excitaci laserem emitují fluorescenční záření. Většina buněk přirozeně žádné fluorescenční záření nevyzařují, ale pokud se na buňku naváže fluorescenčně značená monoklonální protilátka, které je přímo mířena na některou strukturu buňky, tak při průchodu kanálem v analyzátoru, kde buňku ozáří laser, následně začne fluorochrom emitovat specifické záření. Každý fluorochrom se od sebe bude odlišovat tím, jaké záření bude vyzařovat. Tyto odlišnosti mezi různými fluorochromy usnadňuje rozlišení mezi jednotlivými populacemi buněk nebo různými buněčnými aktivitami. U fluorochromů dochází ke Stokesovu posunu, což je rozdíl mezi excitační vlnovou délkou a vlnovou délkou emitovanou.

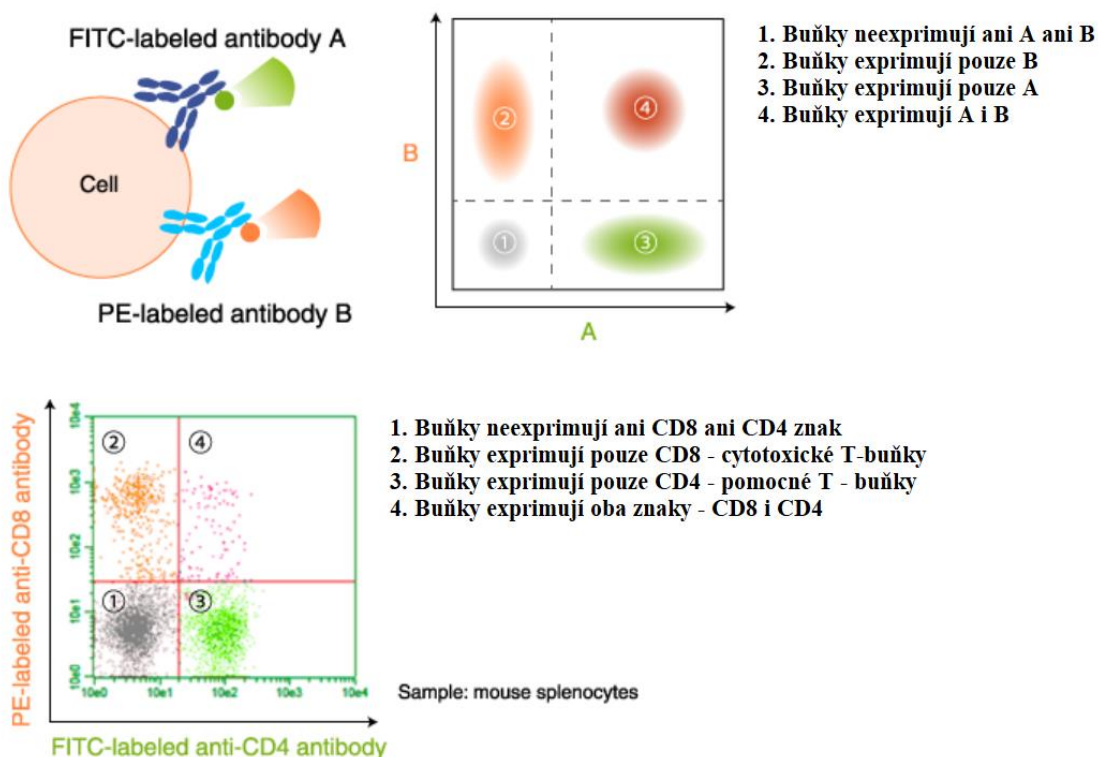
Je vhodné je volit tak, aby se jejich absorpční maximum blížilo vlnovým délkám u použitých laserů. (BD Biosciences, 2014)

Tabulka 2 Přehled nepoužívanějších fluorochromů

Fluorochrom	Excitační vlnová délka [nm]	Emitovaná vlnová délka [nm]
FITC	495	520
Phycoerythrin (PE)	565	575
Pacific Blue	405	455
Allophycocyanin (APC)	650	660
PE-Cy5	565	670
Alexa 568	568	605
Alexa 680	680	700

Zdroj dat: <https://www.sinobiological.com/category/fcm-facs-fluorochrome-selection>

Obrázek 3 Ukázka gatingu u T – lymfocytů (značeno PE anti – CD8 a FITC anti – CD4)



Zdroj: <https://www.mblbio.com/bio/g/support/method/conjugated.html> (upraveno)

4 UPLATNĚNÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie je metoda, která se rychle vyvíjí a potenciál využití je velice široký a rozmanitý napříč různými obory. (Říhová, 2016)

Největší uplatnění nalézá v klinické imunologii, kde se využívá ke stanovení jednotlivých buněčných populací, zjištění stavu imunity (imunodeficiencí, monitorace autoimunitních chorob), k funkčním testům (př. aktivace basofilních granulocytů, testu oxidačního vzplanutí), celkového stavu T – lymfocytů – absolutní i relativní počty pomocných T – lymfocytů, cytotoxických T – lymfocytů, supresorových T – lymfocytů, dále pak B – lymfocytů nezralých nebo aktivovaných, NK buňky, lze vyšetřovat i trombocyty (př. aktivované). Stanovují se i autoprotilátky proti leukocytům, erytrocytům nebo trombocytům. (Říhová, 2016)

Uplatnění nalézá také v oboru hematatoonkologie, kdy se pomocí imunofenotypizace diferenciálně diagnostikují leukémie (rozlišení akutní lymfoblastické a myeloidní leukemie), lymfomy nebo zda nedochází u onemocnění k remisi či relapsu. Diferenciální diagnostika hematologických malignit vyplývá ze znalosti exprese povrchových znaků i těch uložených intracelulárně v buňkách v průběhu jejich diferenciaci. Tím vzniká možnost odhalení přítomnosti patologických buněk, které mají odlišný fenotyp, a lze určit, z jaké linie buňky pocházejí (lymfoidní, myeloidní, monocytární...). (Říhová, 2016) (Syunsuke, a další, 2020)

Průtokovou cytometrii lze také využít na analýzu DNA či RNA. Je možno stanovit diagnózu i u jiných onemocnění jako je například hereditární sférocytóza či paroxysmální noční hemoglobinurie. Užití průtokové cytometrie může spočívat také v analýze nejen buněk lidských, ale také živočišných či dokonce rostlinných. (Říhová, 2016) (Lima, 2020)

5 ÚSKALÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

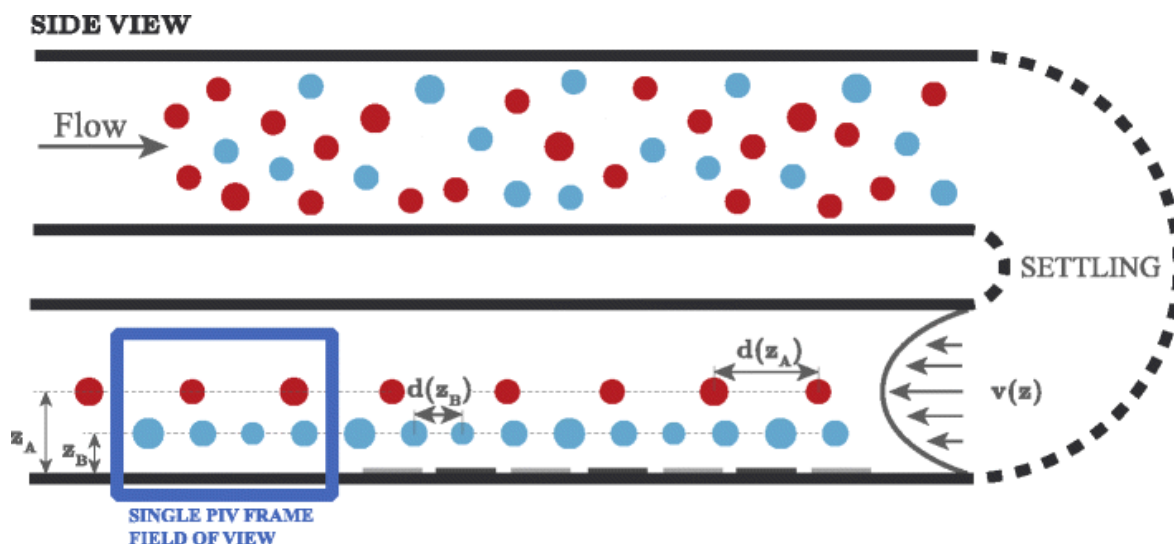
Každá analytická metoda má svoje úskalí, výhody a nevýhody. U průtokové cytometrie tomu není jinak. Přednost této metody tkví v tom, jak rychle dokáže analyzovat jednotlivé částice vzorku a zároveň jsme schopni získat i velké množství dat. Výhodou je, že tyto informace získáme za relativně krátkou dobu. Analýza ve většině případu zabere pár minut. U vzorků také můžeme analyzovat i více markerů současně, což také usnadňuje následné hodnocení výsledků. Průtokovou cytometrií můžeme stanovovat nejen povrchové znaky na buňkách, ale také intracelulární markery. Analýza může být kvantitativní, ale i kvalitativní. Výhodu lze shledat i v tom, že samotná příprava vzorku na stanovení nebývá nikterak náročná či zdlouhavá. Co v klinické praxi nemívá takový význam je možnost třídění buněk, která je velkou výhodou a využívá se spíše pro vědecké účely. (Jahan-Tigh, a další, 2012) (Říhová, 2016)

Nevýhodou u průtokových cytometrů je především pořizovací cena přístrojů, která sahá velmi vysoko. Samotné používání monoklonální protilátek je značně finančně nákladné. K sestavení analýzy a k samotné analýze a vyhodnocení výsledků je také třeba vyškolený personál, který správně data z analyzátoru zpracuje, což se vzhledem k množství dat může někdy jevit jako obtížné. Může také nastávat situace, kdy je složité rozlišit a analyzovat více fluorochromů najednou a musí se provádět tzv. kompenzace, která vyžaduje určitou znalost obsluhy. (Jahan-Tigh, a další, 2012) (Říhová, 2016)

6 DISTRIBUOVANÁ DIELEKTROFORETICKÁ CYTOMETRIE (2DEP)

Distribuovaná dielektroforetická cytometrie je nově vyvíjející se lab-on-chip metoda, kdy měření probíhá na mikrofluidním čipu, kde se na dně kanálu nachází interdigitální elektrodové pole. Metoda je založena na principu vertikálního přenosu buněk indukovaných dielektroforézou (DEP) ve spojení s velocimetrií obrázků částic (PIV). Buňky, které procházejí tímto kanálem, jsou ovlivňovány sedimentačními silami a zároveň proti nim působí tzv. DEP síly, které působí buď proti sedimentaci, nebo naopak sedimentaci podporují či nikterak neovlivňují. Toto závisí na dielektrických podpisech buněk, které jsou ovlivněny výškou, ve které se buňky v kanálu ustálí. Buňky, které jsou v kanálu a působí na ně nejednotné elektrické pole, vykazují specifickou DEP reakci. Rozdíly mezi DE podpisech buněk závisí na jejich strukturálních a dielektrických vlastnostech. (Fikar, 2018)

Obrázek 4 Schéma 2DEP cytometrie



Zdroj: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10544-017-0253-5/figures/8>

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je porovnat metodu 2DEP s měřením na průtokovém cytometru. Metody budou porovnány z hlediska náročnosti přípravy vzorku a rozdílnosti ve zpracování. Hodnotit budu také metody detekce aktivace basofilních granulocytů a jaká je náročnost interpretace výsledků. Budu se zaměřovat na to, zdali by do budoucna byla možnost 2DEP cytometrii využít v rutinní praxi, tak jako je tomu doposud s průtokovým cytometrem.

8 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

1. Jaké jsou rozdíly ve zpracování biologického materiálu pro stanovení aktivace buněk pomocí metody 2DEP a metody využívající průtokovou cytometrii?
2. Jaké jsou rozdíly ve výsledcích a jejich hodnocení pro stanovení aktivace buněk pomocí metody 2DEP a metody využívající průtokovou cytometrii?
3. Jaké jsou rozdíly v interpretaci dat pro stanovení aktivace buněk pomocí metody 2DEP a metody využívající průtokovou cytometrii?
4. Jaká jsou omezení pro zvolené analytické metody (2DEP a průtoková cytometrie)?

9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Výzkum probíhal celkově na 20 vzorcích plné krve. Plná krev byla odebírána do zkumavky s heparinem. Ze vzorků plné krve jsme separovali čistou buněčnou kulturu basofilních granulocytů, která byla následně použita na analýzu na 2DEP cytometru a část vzorku plné krve byla využita na analýzu na průtokovém cytometru. Před samotným výzkumem jsme provedli ověření na přítomnost specifických IgE proti alergenů břízy, ze kterých bylo 10 pacientů pozitivních a 10 negativních. Z důvodu zavádění metody na 2DEP cytometru, nastavování potřebných hodnot, bylo použito 6 pozitivních pacientů a 4 negativní kontroly.

10 METODIKA PRÁCE

10.1 Stanovení specifických IgE

Princip metody

Imunoanalýza je založena na chemiluminiscenční detekci, kdy se jedná o dvoukrokovou metodu imunochemické reakce v pevné fázi, která využívá pevnou fázi ve formě kuličky a ve své kapalné podobě jsou zde použity alergeny či směsi alergenů, které jsou navázány na rozpustnou matici, která je značena ligandem. Použitím aminokyselinového kopolymeru se zvyšuje počet alergenů, které může matrice pojmout. Kuličky jsou dále potaženy antiligandem.

V první fázi se patientské sérum inkubuje s ligandem, který je značený specifickým alergenem a kuličkou po dobu 30 minut. Dochází zde k navázání specifických IgE protilátek ze vzorku pacienta s ligandem značený alergenem, který se posléze naváže na antiligand na kuličce. Dále je třeba odmytím odstranit nenavázaný vzorek.

Ve fázi druhé se do zkumavky, ve které probíhá reakce, přidává enzym (alkalická fosfatáza) konjugovaný s monoklonální protilátkou proti lidskému IgE. Tato směs je dalších 30 min inkubována. Enzymem konjugovaná monoklonální protilátka proti lidskému IgE se naváže na imobilizovaný IgE. Nenavázaný zbytek směsi se odstraňuje centrifugačním promytím.

V poslední fázi se do zkumavky obsahující kuličku přidává substrát a ten se vzhledem k přítomnosti enzymu alkalické fosfatázy (je vázána na kuličce) defosforyluje. Vzniká tak nestabilní meziproduct, který se rozkládá a dochází k vyzáření fotonu. Množství těchto vyzářených fotonů je přímo úměrné množství enzymu, který byl navázan na kuličkách. Detekce probíhá pomocí luminometru.

Biologický materiál

- sérum ze srážlivé plné krve (s obsahem separačního gelu)

Pomůcky

- rukavice, pracovní protokol

Reagencie

- diagnostická souprava **3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit** (Siemens, UK) – specifické IgE zásobníky s kuličkami, specifické IgE reagencie, specifické IgE kalibrátory (adjustory), specifické IgE protilátka proti kalibrátoru, specifické IgE kontroly z univerzální soupravy, specifické IgE protilátka proti kontrole, specifické alergeny a smíšené panely alergenů

- spotřební materiál – chemiluminiscenční substrát, promývací roztok, čistící roztok na jehly

Přístroje a analyzátory

- Immulite® 2000 XPi (Siemens, USA)
- centrifuga Rotina 46 (Hettich, Německo)

Postup

Před vlastní analýzou vzorků jsme provedli denní údržbu přístroje. Zkontrolovali se, zdali je dostatek všech potřebných reagensů a spotřebního materiálu v analyzátoru. Dále jsme provedli měření kontrolních materiálů, které se svými hodnotami musí pohybovat v rozmezí dané výrobcem. Následně jsme spustili měření v analyzátoru. Do analyzátoru se vkládá ve stojánku zkumavka s barcodem, který obsahuje informace o pacientovi a daném stanovení. Je třeba dbát na dostatečné množství séra, jestli neobsahuje sraženiny, které by narušilo měření. Po analýze jsme zhodnotili naměřené výsledky.

10.2 Separace a kultivace basofilních granulocytů

Princip metody

Principem metody separace pomocí magnetických kuliček je využití negativní selekce basofilních granulocytů, kdy všechny ostatní leukocyty jsou označeny směsí biotinu konjugovaného s monoklonálními protilátkami a následně jsou na to navázány magnetické kuličky s anti – biotinem. Tato vazba způsobuje zadržení všech ostatních buněk v magnetické kolonce a pouze basofily jsou kolonkou separovány do zkumavky.

Biologický materiál

- plná nesrážlivá krev (obsahuje heparinát)

Pomůcky

- zkumavky (15ml)
- Pausterovy pipety
- pipety (objem 10 μ l, 50 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)
- magnetické LS kolony a magnetický stojan (Miltenyi Biotec Inc., USA)

Reagencie

- Ficoll – Paque™ PREMIUM (GE Healthcare, Švédsko)
- RPMI 1640 (Biosera, Francie)
- Basophil Isolation Kit II, human (Miltenyi Biotec Inc., USA) – FcR Blocking reagent, Basophil biotin – antibody cocktail, Anti – biotin MicroBeads

- Interleukin – 3, human (MiliporeSigma, USA)

Přístroje a analyzátory

- centrifuga Rotina 46 (Hettich, Německo)
- lednice
- laminární box (Esco Technologies, Inc., USA)

Postup

Do laminárního boxu jsme si připravili všechny potřebné pomůcky potřebné k provedení separace – 15ml zkumavky, 50ml zkumavky, Ficoll – Paque, RPMI a Basophil Isolation Kit II atd. 15ml zkumavky jsme si pomocí jehly naplnili po první vyznačenou rysku gelem Ficoll – Paque. Takto připravené zkumavky jsme označili číslem, pod kterým byl uveden pacient. Vzorky krve pacientů jsme v odebraných zkumavkách mírně promíchali a všechny jejich obsah jsme přemístili do 50ml zkumavky. Krev v 50ml zkumavce jsme poté pomocí média RPMI naředili v poměru 1:1. Obsah zkumavky jsme promíchali a pomocí Pausterovy pipety jsme naředěnou krev opatrně a po stěně převrstvovali gel, který jsme měli připravený v 15ml zkumavkách. Krví jsme zkumavky s gelem naplnili až po horní rysku. Zkumavky jsme umístili do centrifugy a při 750g jsme nechali 20 min centrifugovat. Ve zkumavce se nám oddělí jednotlivé vrstvy a pomocí Pausterovy pipety jsme odebrali viditelný jemně bílý „obláček“ umístění kolem poloviny zkumavky. Přemístili jsme ho do čisté popsané 15ml zkumavky. Poté po horní rysku zkumavky jsme doplnili médiem RPMI. Následovala centrifugace při 500g po dobu 3 minut. Slitím jsme odstranili médium v supernatantu a ve zbytku média jsme resuspendovali pelet na dně zkumavky. K resuspendovaným buňkám jsme přidali 10 μ l FcR Blocking Reagent a poté 10 μ l Basophil Biotin – Antibody Cocktail. Jemně jsme obsah zkumavky promíchali a inkubovali jsme 10 minut v lednici při teplotě 8 °C. Po inkubaci jsme přidali 30 μ l RPMI média a 20 μ l Anti – Biotin MicroBeads. Opět jsme nechali inkubovat v lednici při 8 °C 15 minut. Po doběhnutí inkubace jsme do zkumavky přidali 1 ml média RPMI a zkumavky jsme umístili do centrifugy a po dobu 10 min a 620g jsme nechali centrifugovat. Poté jsme odpipetovali celý supernatant a pelet buněk umístěný na spodku zkumavky jsme resuspendovali v 500 μ l média. Připravili jsme si magnetickou kolonku a umístili jsme ji do magnetického stojanu. Pod magnetickou kolonku jsme umístili čistou zkumavku a kolonku jsme propláchli čistým médiem RPMI, abychom ji navlhčili. Po protečení média jsme zkumavky vyměnili za čisté a popsané číslem pacienta. Do kolonky jsme přelili obsah připravené suspenze buněk v médiu a poté jsme postupně přidávali 3 x 1 ml média RPMI. Po separování veškeré směsi do zkumavky jsme do čisté suspenze

basofilních granulocytů přidali 40 µl interleukinu 3, který nám zajistí lepší kultivaci a přežití buněk.

10.3 Měření na průtokovém cytometru – BAT test

Princip metody

Principem testu je zapříčinění aktivace basofilních granulocytů in vitro v přítomnosti senzibilizujícího alergenu. Posléze dochází k expozici aktivačního znaku basofilů (znak CD63) na povrch jeho buněčné membrány. Pomocí monoklonální protilátky a průtokového cytometru můžeme tuto změnu pozorovat.

V závislosti na dostatečném množství alergenně specifických molekul IgE, které jsou zachyceny na povrchu basofilů prostřednictvím vysokoafinitního receptoru FcεRI, dodaný alergen způsobí přemostění receptorů, které vyvolají plnou aktivaci basofilů spojené s procesem vyprázdnění obsahu zánětlivých mediátorů z granulí v cytoplazmě – degranulaci. Právě degranulace má za následek mimo jiné expozici povrchového znaku CD63 na membránu basofilů. Tento povrchový znak je možno detekovat pomocí monoklonální protilátky anti – CD63 konjugované s FITC (fluorescenční barvivo). Ve směsi leukocytů identifikujeme populaci basofilů pomocí monoklonální protilátky anti – CD203c konjugované s PE (fluorescenční barvivo). Vzorek, který nám slouží jako pozitivní kontrola, obsahuje basofily aktivované monoklonální protilátkou anti – IgE, která nahrazuje účinek specifického alergenu, a chemotaktický peptid, který aktivuje basofily pomocí fMLP receptoru. Do negativní kontroly se namísto alergenu přidává ředící roztok.

Biologický materiál

- plná nesrážlivá krev (obsahuje heparinát)

Pomůcky

- zkumavky (5ml)
- pipety (10 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 µl)

Reagencie

- **BasoFlowEx[®] Kit** (Exbio, CZ) – Stimulation Buffer, Stimulation Control, Staining Reagent, Lysing Solution
- alergen břízy (Exbio, CZ)
- fosfátový pufr – PBS (Gibco, USA)
- ultračistá demineralizovaná voda

Přístroje a analyzátory

- vortex (Biosan, Lotyšsko)
- centrifugace Rotina 46 (Hettich, Německo)
- termostat
- lednice
- průtokový cytometr (Beckman Coulter, USA)

Postup

Připravili jsme si všechny potřebné pomůcky. Připravené zkumavky jsme si označili číslem pacienta. Dále pro vyšetření jednoho vzorku jsme si připravili negativní, pozitivní kontrolu a potřebný počet zkumavek stimulovaných testovanými alergeny. Vzorky jsme si připravili tak, že do zkumavky určené pro alergenem stimulovaný vzorek jsme napipetovali 10 μ l alergenu. Do zkumavky s negativním kontrolním vzorkem jsme nepipetovali nic a do pozitivního kontrolního vzorku jsme napipetovali 10 μ l rekonstituovaného stimulantu (Stimulation Control). Následně jsme do všech zkumavek napipetovali 100 μ l rekonstituovaného stimulačního pufru (Stimulation Buffer). Dále jsme do všech zkumavek napipetovali 100 μ l plně heparinizované krve a pomocí vortexu jsme směs promíchali. Zkumavky jsme umístili do termostatu a nechali jsme je inkubovat 25 min při 37 °C. Po inkubaci jsme do všech zkumavek napipetovali 20 μ l koktejlu protilátek (Staining Reagent). Zkumavky jsme pomocí vortexu promíchali a uložili na 20 min inkubovat do lednice při 2 – 8 °C. Po proběhnutí inkubace v lednici jsme do zkumavek napipetovali 300 μ l lyzačního roztoku (Lysing Solution). Zkumavky jsme opět pomocí vortexu promíchali a nechali 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následně jsme do zkumavek přidali 3 ml demineralizované vody, směs jsme promíchali vortexem a dále jsme je inkubovali 10 min při laboratorní teplotě (dokud nedošlo k hemolýze červených krvinek). Zkumavky jsme poté centrifugovali při 300 g po dobu 5 minut. Po dokončení centrifugace jsme pomocí pipety odstranili supernatant a sediment ve zkumavce jsme pomocí 0,4 ml pufru PBS resuspendovali. S takto připravenými vzorky jsme provedli analýzu na průtokovém cytometru. Provedli jsme také kompenzaci fluorescenčních signálů naměřených dat (FITC a PE kanál). Po měření jsme pomocí počítačového softwaru vyhodnotili aktivaci basofilů. Provedli jsme vyhodnocení výsledků pomocí procenta aktivovaných basofilů, AUC a CD – sens.

10.4 Měření na 2DEP cytometru

Princip metody

Princip metody zvané distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP) je použití vertikální translace živých buněk indukovaných elektroforézou ve spojení s velocimetrií obrazů částic (PIV), za účelem měření pravděpodobnostního rozdělení sil DEP, které působí na celou buněčnou populaci.

Metoda probíhá v mikrofluidním zařízení, kdy buňky plující v kanálu postupně sedimentují a ustalují výšku své levitace. Na objemu buňky, její struktuře plazmatické membrány je pak odrážena výška levitace buňky v kanálu, která následně ovlivňuje i rychlost, kterou se buňka v kanálu pohybuje. Čím je buňka blíže ke středu, tím se pohybuje rychleji, naopak je – li blíže ke dnu, pluje pomaleji. Pomocí částicové velocimetrie je zachycována rychlost buněk, které procházejí kanálem, posléze pomocí softwaru je tato rychlost přepočítávána na výšku levitace ode dna kanálu. Před samotným měřením je třeba nechat ustálit tok bez vlivu elektrického pole a to slouží jako reference daného měření. Poté lze přejít k měřením s vlivem elektrického pole, které už mění výšku levitace buněk. Na buňky působí dvě síly – negativní dielektrické síly (N – DEP), které odpuzují buňky ode dna kanálu a pozitivní dielektrické síly (P – DEP), které naopak působí ve prospěch sedimentace. To jak jsou buňky rozloženy v kanále, se porovnává s referenční částí měření bez vlivu elektrického pole. Tyto rozdíly jsou vynášeny do grafu. Tento graf se označuje jako dielektrický popis buněk.

Biologický materiál

- čistá buněčná kultura basofilních granulocytů (v PBS pufru)

Pomůcky

- zkumavky (15ml, 50ml)
- mikrozkušavka Eppendorf (1500 μ l)
- pipety (10 μ l, 50 μ l, 1000 μ l)

Reagencie

- médium RPMI 1640 (Biosera, France)
- BSA (Gibco, USA)
- nízkovodivostní médium (deionizovaná voda; 8,5 g/l sacharózy; 0,3 g/l glukózy)
- želatina
- alergen břízy (Exbio, CZ)

Přístroje a analyzátory

- centrifuga
- CO₂ termostat (Thermo, USA)

- laminární box
- DEP cytometr

Postup práce

Před zahájením měření je nutno provést přípravu čipu. Zapnuli jsme pumpu a samotný cytometr. Do stříkačky jsme nasáli destilovanou vodu a pomocí hadičky jsme připojili pumpu k výstupu kanálu čipu. V čipu jsme následně spuštěním pumpy naplnili kanál. Po naplnění kanálu (objevila se kapička na druhém konci kanálu), jsme výstup kanálu převrstvili LC médiem s BSA a pustili jsme tok pumpy obráceným směrem. Takto naplněný kanál jsme nechali 10 min inkubovat. Před samotným měřením jsme kanál propláchnuli kanál nasátím čistého nízkovodivostního média.

Příprava samotného vzorku byla následující. Připravili jsme si potřebné pomůcky do laminárního boxu. Do zkumavky s čistou populací basofilních granulocytů resuspendovaných v médiu RPMI jsme napipetovali 1 ml roztoku želatiny a tuto směs jsme dali centrifugovat na 6 min při 300 g. Po centrifugaci jsme v laminárním boxu odsáli supernatant tak, aby na dně zkumavky zbylo cca 500 μ l směsi. Ve zbytku média RPMI jsme buňky resuspendovali a rozdělili jsme je do mikrozkuvek (cca po 250 μ l). Připravili jsme si roztok alergenu břízy tak, že do lyofilizátu alergenu jsme přidali 200 μ l média RPMI. Tento připravený alergen jsme napipetovali do jedné z mikrozkuvek a do druhé jsme napipetovali 200 μ l RPMI pro zachování poměru objemů. Obě zkumavky jsme hodinu inkubovali v termostatu se zvýšením tenzí CO₂ při 37 °C.

Po uplynutí doby inkubace jsme mikrozkuvky zcentrifugovali při 20 g po dobu 5 minut. Následně jsme odsáli supernatant a přidali jsme 250 μ l nízkovodivostního média. Směs jsme resuspendovali. Poté jsme si připravili čip propláchnutím čistým nízkovodivostním médiem a touto připravenou suspenzí buněk jsme převrstvili vstup kanálu. Provedli jsme nastavení parametrů metody a spustili jsme nasávání čipu rychlostí 600 nl/s, poté jsme rychlost snížili na 60 nl/s. Po snížení rychlosti jsme čekali 4 minuty na ustálení levitace buněk. Po ustálení buněk jsme zahájili měření. Mezi každým měřením vzorku jsme čip proplachovali čistým nízkovodivostním médiem. Po skončení analýz jsme čip propláchnuli destilovanou vodou a následně jsme z čipu odstranili veškerou kapalinu. Odpojili jsme stříkačku z pumpy a její obsah jsme vyprázdnili. Poté jsme vyhodnotili naměřené hodnoty.

11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

11.1 Výsledky stanovení specifických IgE

V následující tabulce jsou přiřazeny naměřené hodnoty specifických IgE pacientů a negativních kontrol naměřených na přístroji Immulite® 2000 XPi.

Tabulka 3 Naměřené hodnoty specifických IgE

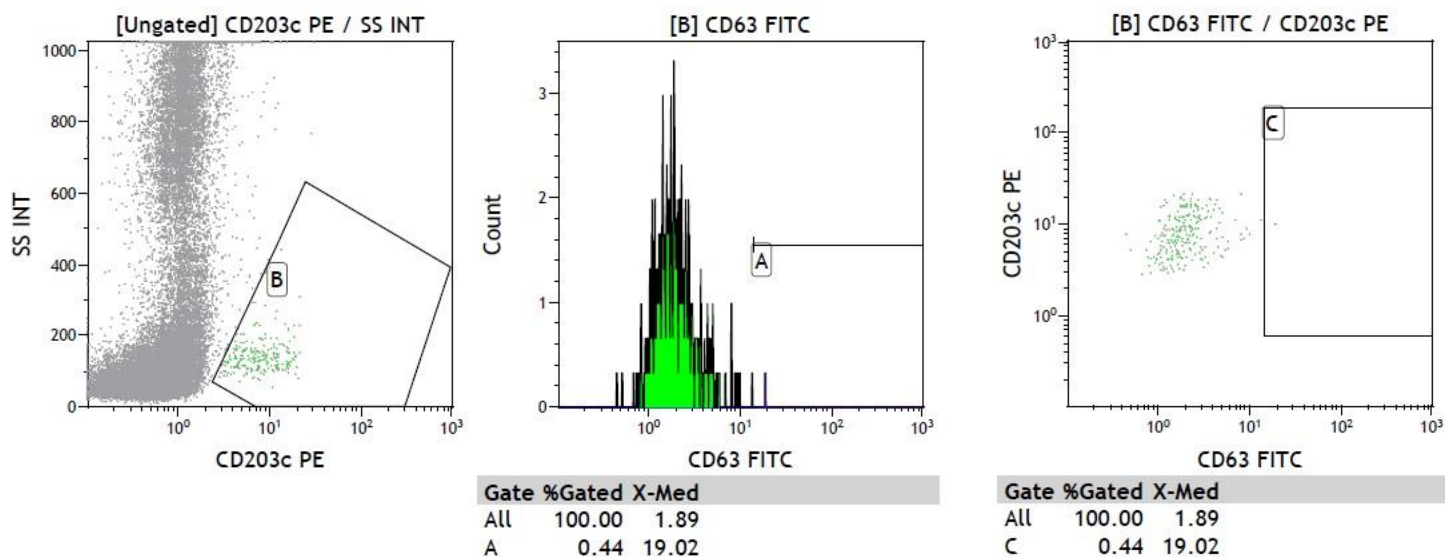
Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6	K1	K2	K3	K4
Hodnota IgE [kUI/L]	7,812	0,989	2,650	1,430	9,440	0,390	< 0,350	0,450	0,367	< 0,350

11.2 Výsledky stanovení na průtokovém cytometru

Titrační křivka u pozitivního pacienta

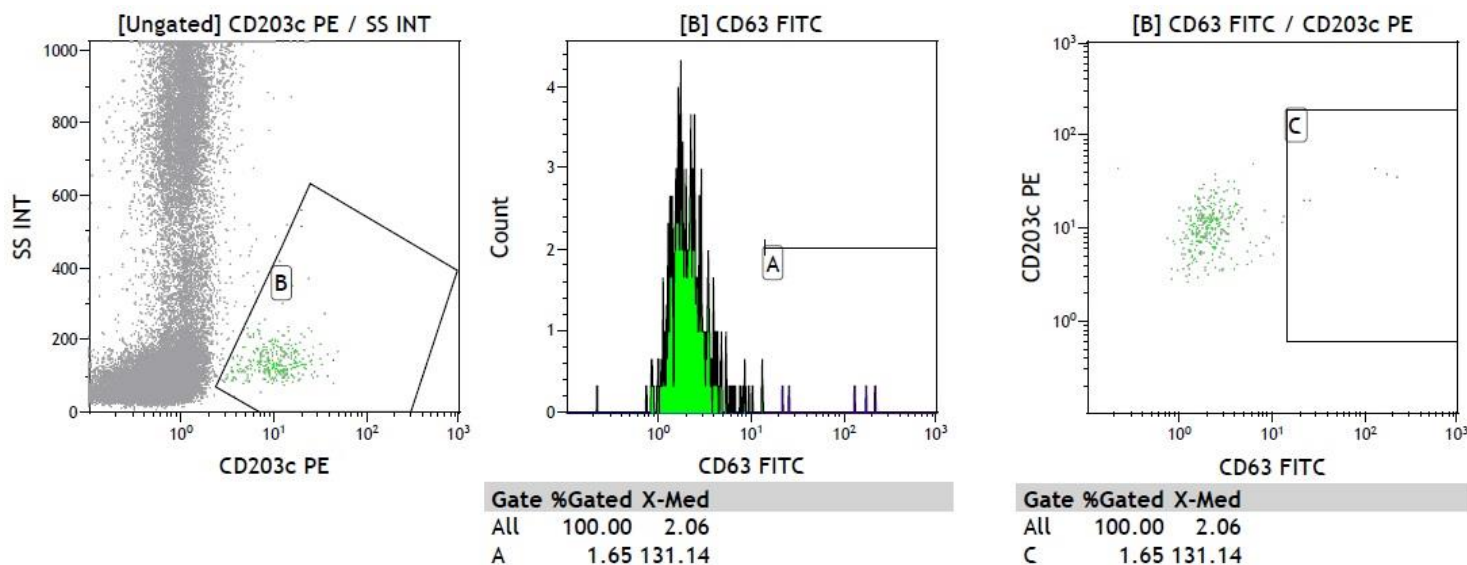
V histogramech (obr. č 1, 2, 3, 4, 5) lze pozorovat postupné zvyšování procenta aktivovaných basofilních granulocytů v titrační křivce u pozitivního pacienta. U nejvyšší koncentrace alergenu (100 mg/ml) došlo pak k mírnému snížení procenta aktivace oproti předchozí koncentraci alergenu (10 mg/ml).

Obrázek 5 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (0,01 mg/ml)



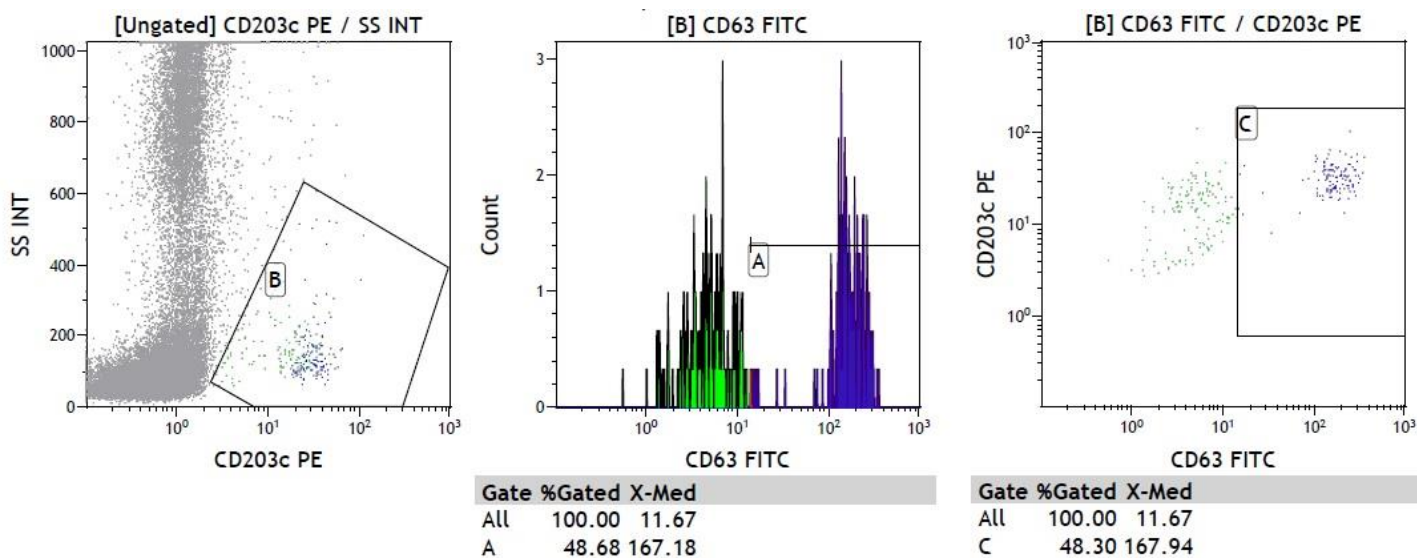
Na obrázku č. 5 gatingem byly basofily označeny pomocí znaku CD63 a CD203c. Procento aktivace basofilů, při koncentraci alergenu břízy 0,01 mg/ml, bylo 0,44 %.

Obrázek 6 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (0,1 mg/ml)



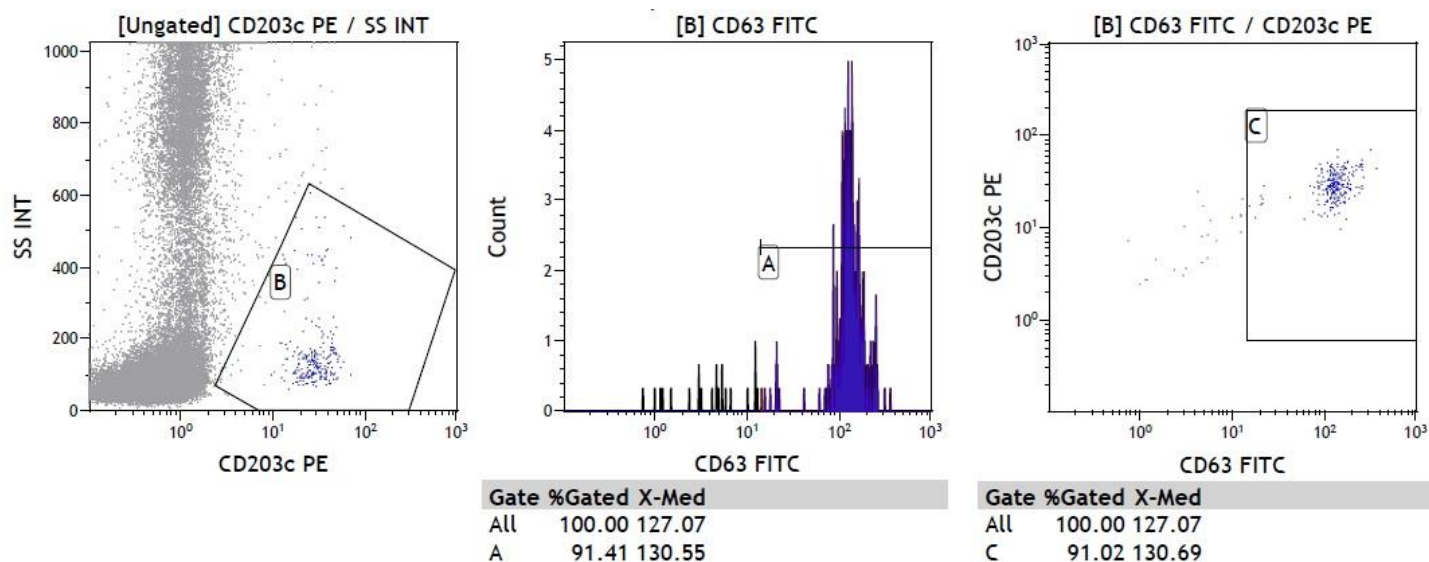
Na obrázku č. 6 gatingem byly basofily označeny pomocí znaku CD63 a CD203c. Procento aktivace basofilů, při koncentraci alergenu břízy 0,1 mg/ml, bylo 1,65 %.

Obrázek 7 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (1 mg/ml)



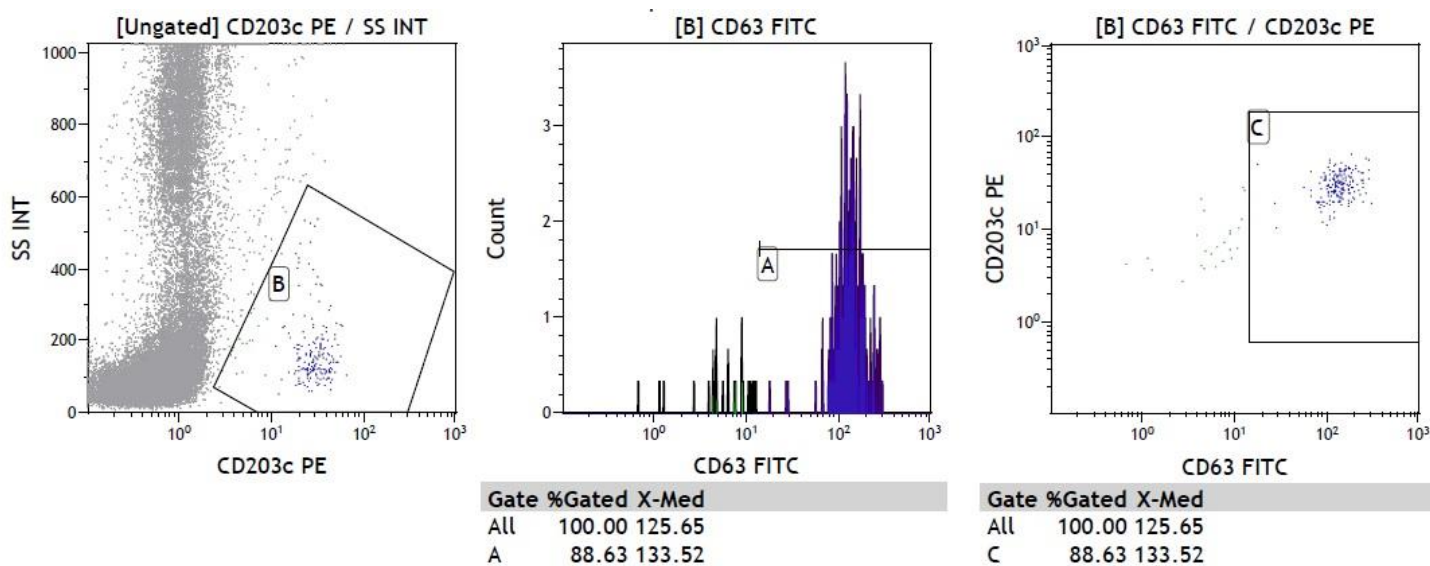
Na obrázku č. 7 gatingem byly basofily označeny pomocí znaku CD63 a CD203c. Procento aktivace basofilů, při koncentraci alergenu břízy 1 mg/ml, bylo 48,68 %.

Obrázek 8 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (10 mg/ml)



Na obrázku č. 8 gatingem byly basofily označeny pomocí znaku CD63 a CD203c. Procento aktivace, při koncentraci alergenu břízy 10 mg/ml, bylo 91,41 %.

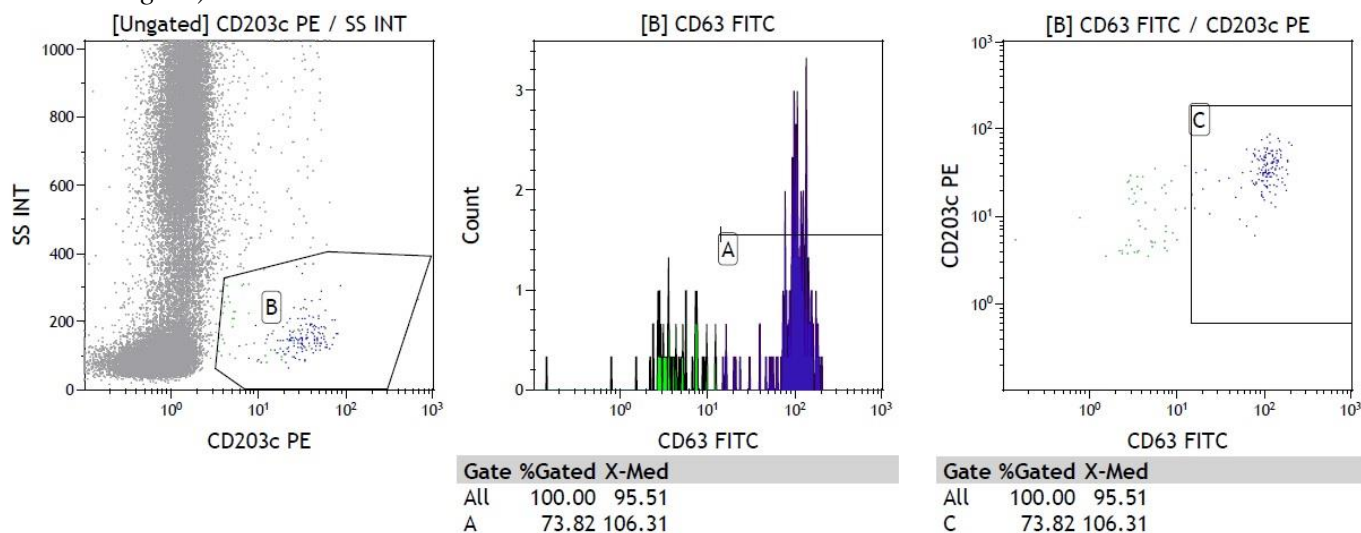
Obrázek 9 Stanovení titrační křivky u aktivace basofilů alergenem břízy (100 mg/ml)



Na obrázku č. 9 gatingem byly basofily označeny pomocí znaku CD63 a CD203c. Procento aktivace basofilů, při koncentraci alergenu břízy 100 mg/ml, bylo 88,63 %.

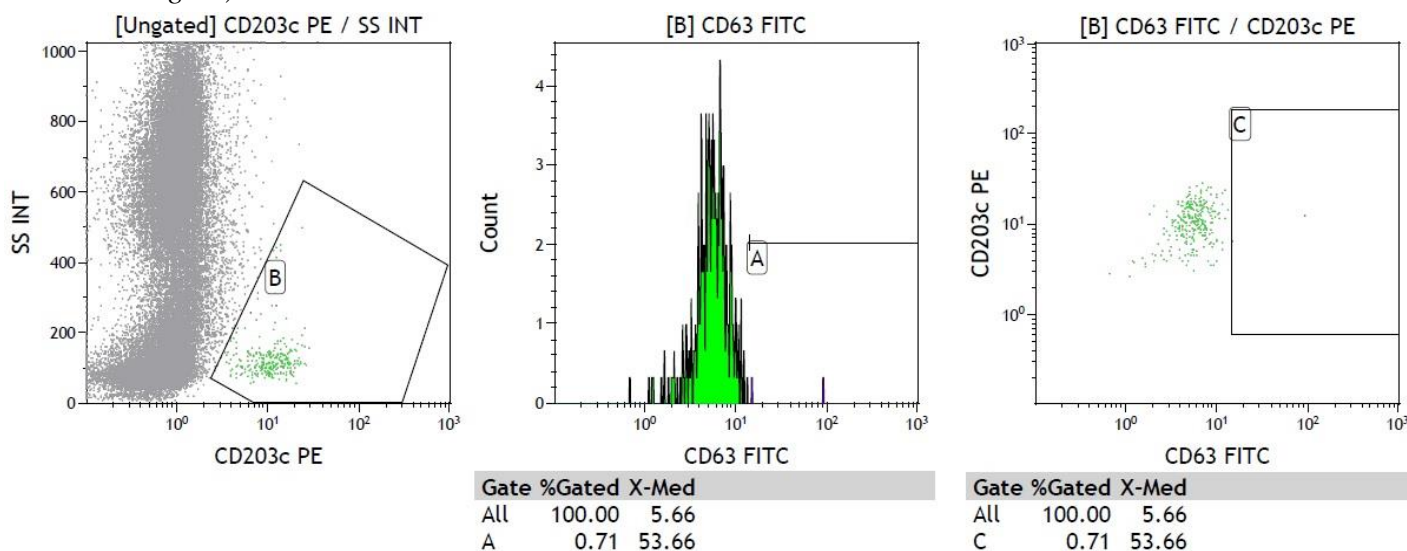
Stanovení aktivace basofilů u pozitivního pacienta a negativní kontroly

Obrázek 10 Příklad stanovení aktivace basofilů u pozitivního pacienta (koncentrace – 10 mg/ml)



Na obrázku č. 10 gatingem byly basofily označeny pomocí znaku CD63 a CD203c. Procento aktivace basofilů, při koncentraci alergenu břízy 10 mg/ml, bylo 73,82 %.

Obrázek 11 Příklad stanovení aktivace basofilů u negativní kontroly (koncentrace – 10 mg/ml)



Na obrázku č. 11 gatingem byly basofily označeny pomocí znaku CD63 a CD203c. Procento aktivace basofilů, při koncentraci alergenu břízy 10 mg/ml, bylo 0,71 %.

Hodnoty plochy pod křivkou (AUC)

Hodnoty ploch pod křivkami (AUC) vycházejí z grafů, který byly vytvořeny ze snesení kalibračních křivek do bodů naměřených hodnot procent aktivovaných basofilních granulocytů při různých stoupajících koncentracích alergenu (0,01 – 100 mg/ml). Křivka je díky těmto zvoleným bodům nespojitá a zároveň pod křivkou vznikají plochy ve tvaru čtyřúhelníků, jejíž součty využíváme k určení hodnoty AUC.

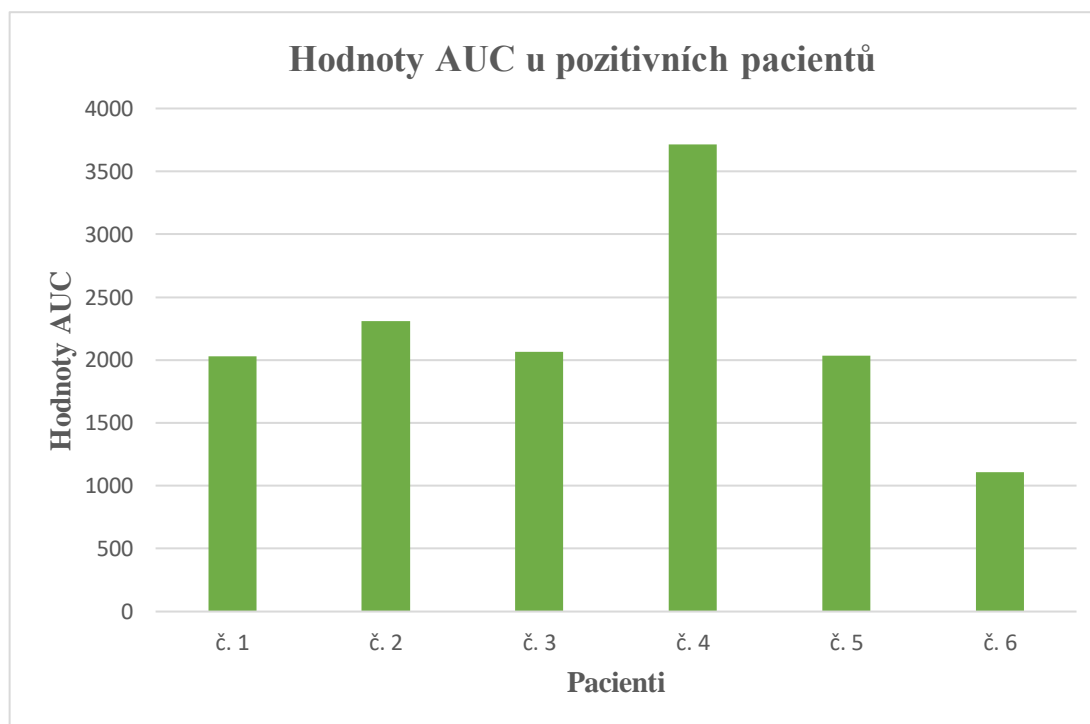
Tabulka 4 Hodnoty AUC u pozitivních pacientů

Pacient	1	2	3	4	5	6
Hodnota AUC	2027,462	2311,169	2066,369	3712,487	2033,586	1108,251

Tabulka 5 Hodnoty AUC u negativních kontrol

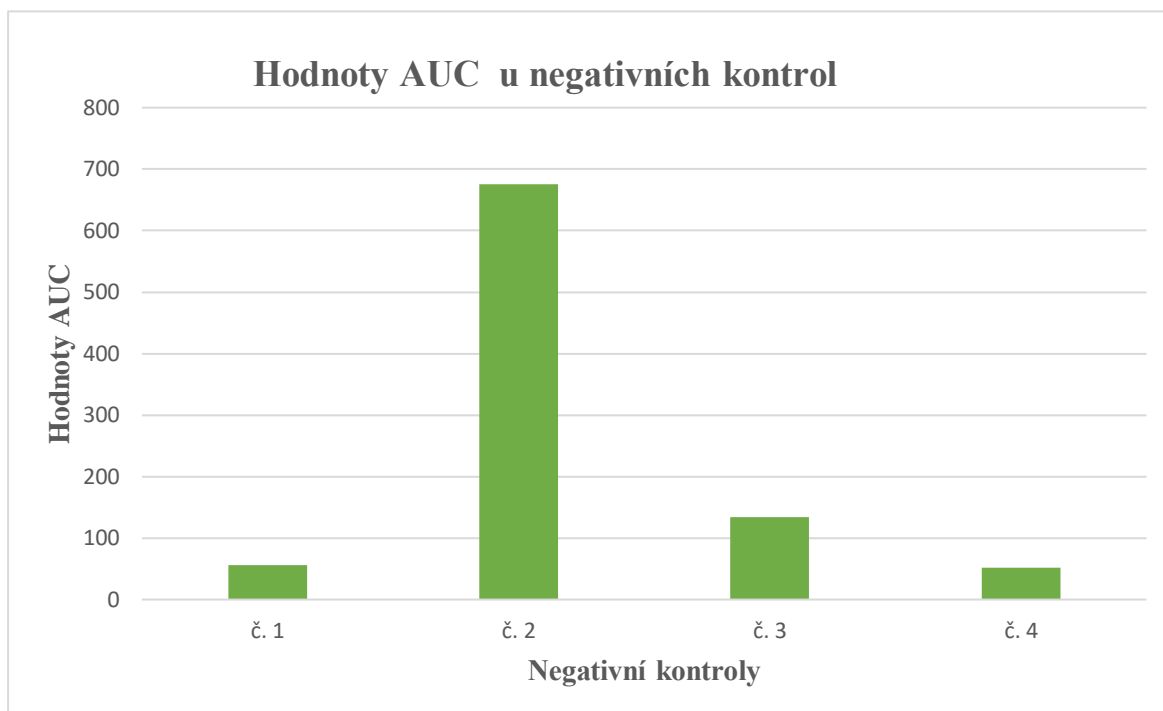
Kontrola	1	2	3	4
Hodnota AUC	55,9629	675,306	134,028	51,5255

Graf 1 Hodnoty AUC u pozitivních pacientů



V grafu č. 1 vidíme zanesené hodnoty AUC u pozitivních pacientů, které dosahují vyšších hodnot než u negativních kontrol (graf č. 2), což ukazuje na to, že při pozitivitě na alergen se hodnota AUC u pacientů zvyšuje.

Graf 2 Hodnoty AUC u negativních kontrol



V grafu č. 2 vidíme zanesené hodnoty AUC, které jsou u negativních kontrol výrazně nižší než u pozitivních pacientů (graf č. 1). U negativní kontroly č. 2 došlo k větší aktivaci basofilů než jakým byl předpoklad, zřejmě se jednalo o pacienta, který na alergen břízy reaguje, ale pouze mírně (bez příznaků).

CD – sens

Mezi jednotlivými pacienty existuje velká variabilita odpovědi basofilů na alergen. Za účelem popsání této heterogenity a porovnání basofilních odpovědí mezi různými pacienty lze stanovit různé parametry na základě křivky závislosti reakce na dávce, jako je CD-max nebo CD sens. CD max je maximální aktivace a odpovídá maximálnímu podílu aktivovaných basofilů při jakékoliv koncentraci alergenu. Při 50 % aktivaci basofilní granulocytů označujeme tuto hodnotu jako CD – sens. CD – sens je inverzní hodnota poloviční maximální efektivní koncentrace, proto tato hodnota musí být vynásobeno 100x. Rostoucí hodnota CD – sens ukazuje na i vyšší citlivost basofilu na alergen. Zavedení tohoto způsobu hodnocení citlivosti basofilu na alergen má za výhodu odhalení falešně nižších hodnot při vyšších koncentracích alergenu.

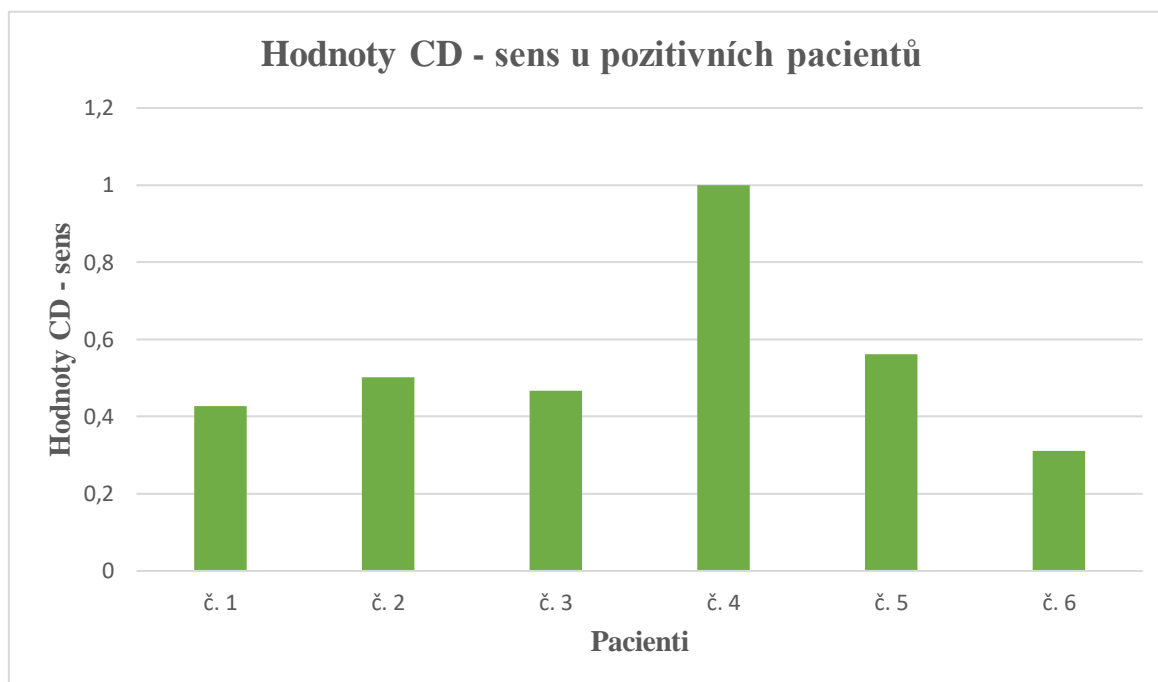
Tabulka 6 Hodnoty CD – sens u pozitivních pacientů

Pacient	1	2	3	4	5	6
Hodnota CD – sens	0,428	0,502	0,468	1,000	0,562	0,312

Tabulka 7 Hodnoty CD – sens u negativních kontrol

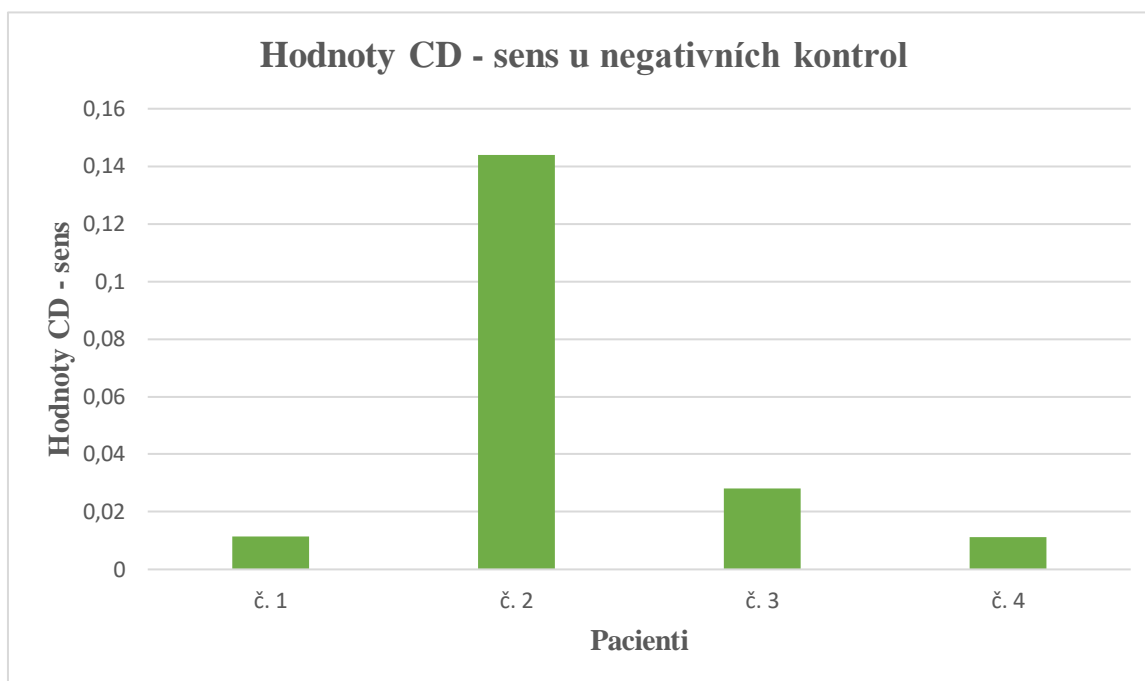
Kontrola	1	2	3	4
Hodnota CD – sens	0,0114	0,1440	0,0280	0,0112

Graf 3 Hodnoty CD – sens u pozitivních pacientů



V grafu č. 3 vidíme zanesené hodnoty CD – sens u pozitivních pacientů, jejichž hodnoty jsou větší než u negativních kontrol (graf č. 4), z toho vyplývá, že při pozitivitě na alergen se hodnota CD – sens zvětšuje.

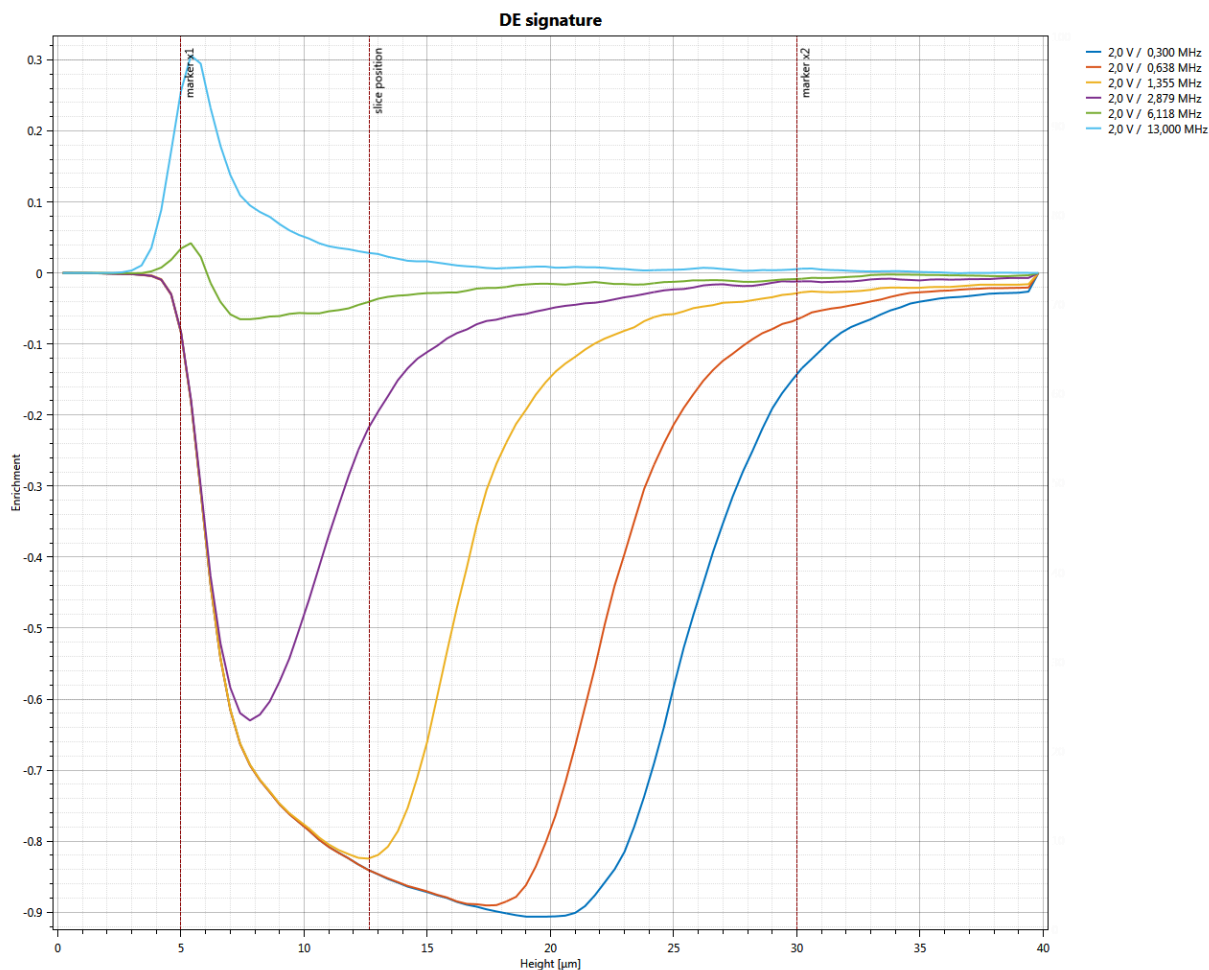
Graf 4 Hodnoty CD – sens u negativních kontrol



V grafu č. 4 vidíme zanesené výsledky CD – sens u negativních kontrol, jejichž výsledky dosahují nižších hodnot než u pozitivních pacientů (graf č. 3). Výjimku tvoří kontrola č. 2, kdy hodnota je vyšší než u ostatních negativních kontrol a to zřejmě vlivem, že se jednalo o pacienta, který slaběji reagoval na alergen břízy (bez příznaků).

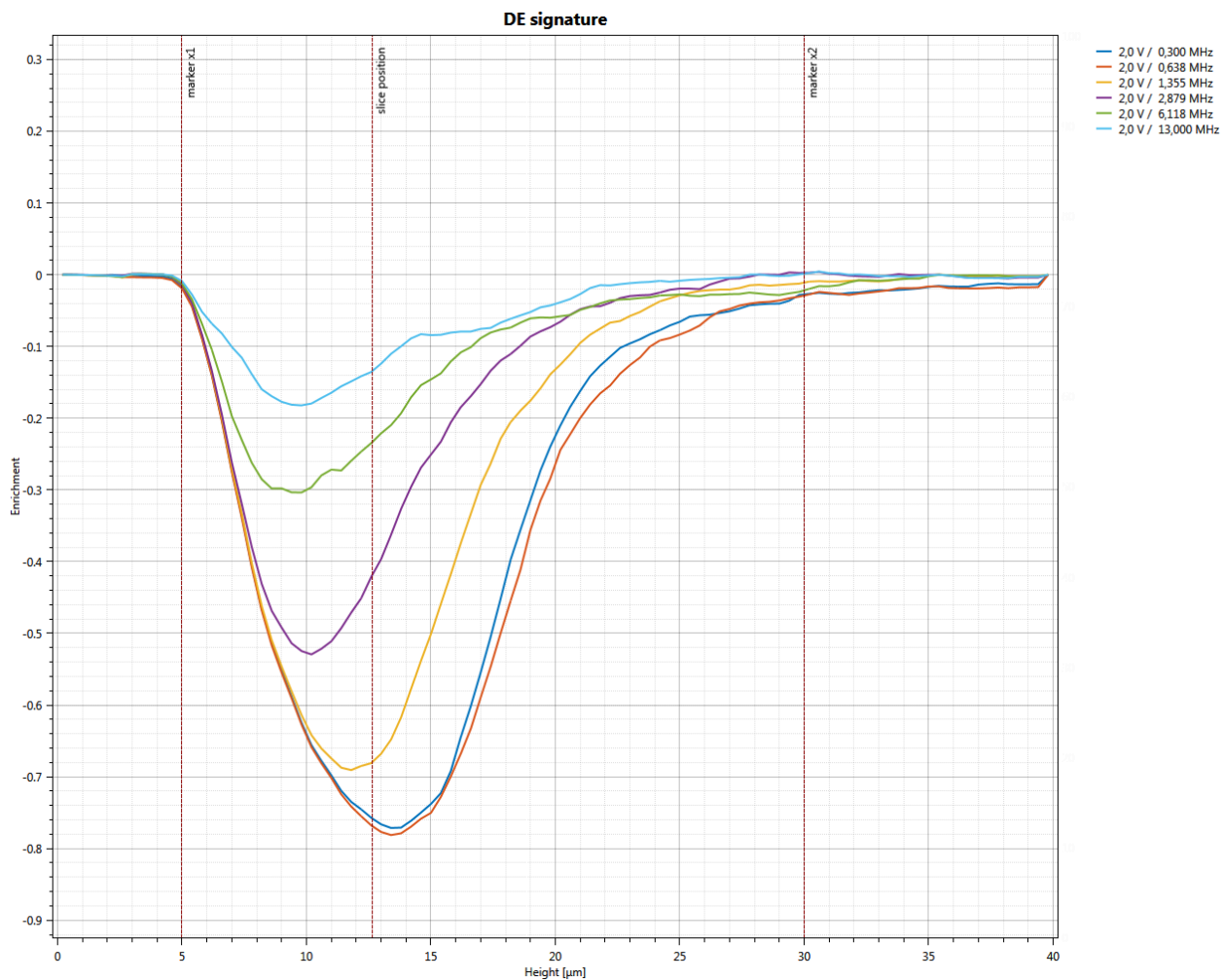
11.3 Výsledky stanovení na 2DEP cytometru

Obrázek 12 Příklad výsledku měření na 2DEP cytometru – pozitivní pacient



Výsledkem měření na 2DEP cytometru je dielektrický podpis buněk měřených při určitých frekvencích (0,3 – 13 MHz). Na obrázku č. 12 můžeme vidět patrný výrazný pík naměřený při 13 MHz (světle modrá křivka), který se vyskytoval u všech pozitivních pacientů po stimulaci alergénem.

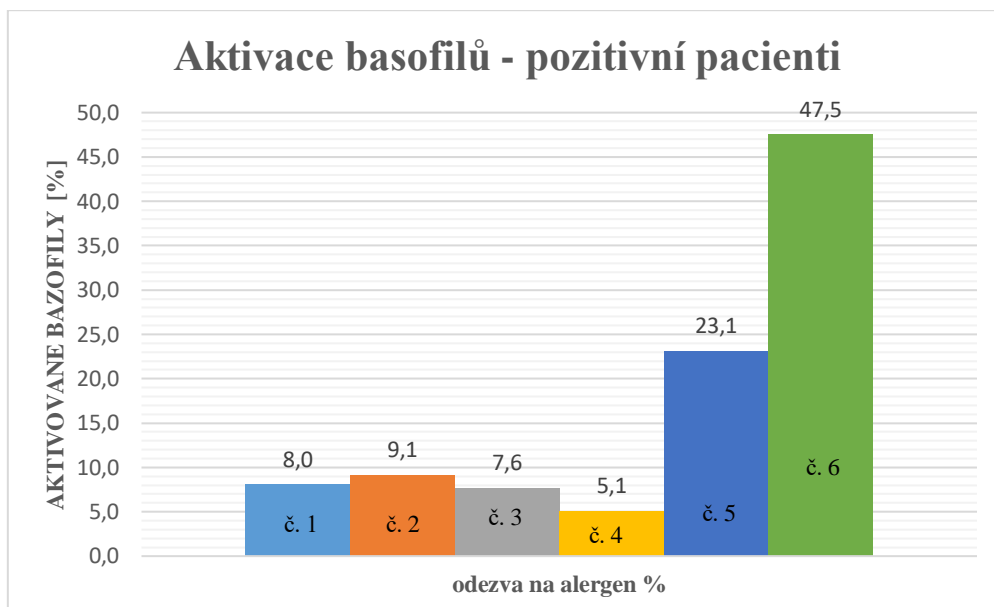
Obrázek 13 Příklad výsledku měření na 2DEP cytometru – negativní kontrola



Na obrázku č. 13 vidíme dielektrický podpis buněk u negativní kontroly měřených při určitých frekvencích (0,3 – 13 MHz), kdy oproti pozitivnímu pacientu (obrázek č. 12) chybí pík naměřený při 13 MHz (světle modrá křivka). Tento podobný podpis buněk jsme zaznamenali u všech negativních kontrol, avšak pokaždé s mírně jiným průběhem.

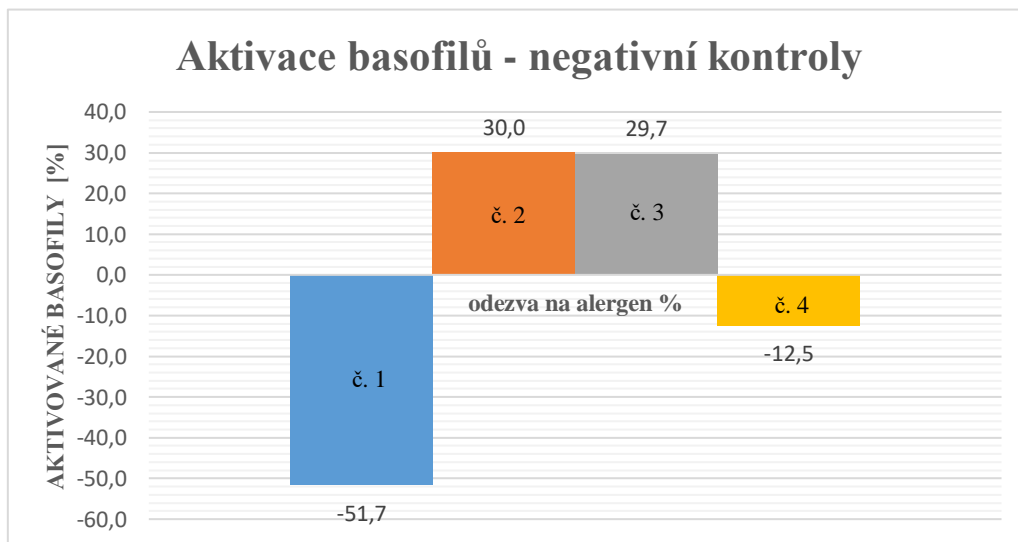
Souhrnné výsledky 2DEP cytometrie

Graf 5 Výsledky stanovení na 2DEP cytometru – pozitivní pacienti



Na grafu č. 5 jsou zaneseny procentuální hodnoty odezvy na alergen u pozitivních pacientů. Výsledky se liší, zejména pacient č. 6 vykazuje vysokou odezvu na alergen.

Graf 6 Výsledky stanovení na 2DEP cytometru – negativní kontroly



Na grafu č. 6 jsou zaneseny procentuální hodnoty odezvy na alergen u negativních kontrol. Můžeme pozorovat, že výsledky jsou velmi odlišné. U kontroly č. 2 a č. 3 vidíme, že odezva dosahuje kolem 30 %, což jsou vyšší hodnoty než u většiny pozitivních pacientů z grafu č. 5. U kontrol č. 1 a č. 4 se naopak hodnoty dosahují záporných čísel. Vzhledem k nízkému počtu zkoumaných vzorků nelze výsledky statisticky zhodnotit.

12 DISKUZE

Tato bakalářská práce si dala za cíl otestovat, zdali by bylo v budoucnu možno nahradit průtokovou cytometrii s použitím monoklonálních protilátek za metodu distribuované dielektroforetické cytometrie. K hodnocení byl zvolen test aktivace basofilních granulocytů. Měli jsme k dispozici skupinu pacientů (6 vzorků), kteří prokazatelně vykazovali senzibilizaci na alergen břízy. Druhou skupinu pacientů (4 vzorky) jsme zařadili jako negativní kontroly. U všech těchto pacientů jsme změřili hladinu specifických IgE proti alergenu břízy.

V rutinní klinické imunologické laboratoři se ke stanovení testu aktivace basofilních granulocytů využívá průtokový cytometr s využitím monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorochromem. Zpracování biologického materiálu na toto vyšetření je oproti 2DEP cytometrie podstatně jednodušší. Pracujeme zde s plnou heparinizovanou krví, do které se přidávají specifické monoklonální protilátky namířené na konkrétní CD znaky vyskytující se na membráně basofila (CD63). Ve zpracování je důležité, že je třeba zlyzovat červené krvinky, které by při stanovení vadily. Čas u stanovení hraje také roli. Čím delší dobu od odběru se vzorek analyzuje, tím je aktivita basofilů nižší. Ideální je stanovení provést stanovení do 4 hodin. (Hemmings, 2018) Na rozdíl při zpracování biologického materiálu pro distribuovanou dielektroforetickou cytometrii je zde potřeba mít co nejvíce čistou buněčnou kulturu, která obsahuje pouze basofilní granulocyty. Kultura se separovala pomocí magnetických kuliček s využitím negativní selekce. Magnetická separace je zdouhavější proces, při kterém může snadněji nastat chyba jakéhokoliv charakteru, která pak následně může ovlivňovat stanovení na 2DEP cytometru. U buněk vždy bylo riziko, že se buněčná kultura nějakým způsobem kontaminuje a výsledky by se následně nedaly považovat za validní. Důležitou roli zde taky hrálo prostředí, ve kterém byla buněčná kultura kultivována. Muselo být zvoleno prostředí s dostatečným množstvím potřebných látek a také bylo třeba dodat k udržení životaschopnosti buněk IL – 3.

Mezi zásadními rozdíly mezi měřeními na průtokovém cytometru a na 2DEP cytometru byl shledán čas, který zabral samotné stanovení. Jak bylo výše zmíněno, u 2DEP cytometru byla nutnost použít čistou buněčnou kulturu basofilních granulocytů, která nemá zatím žádný rychlejší vyzkoušený princip, který by se dal zařadit do laboratorní rutinní praxe. Toto je jedním z největších nevýhod 2DEP cytometrie. Avšak na druhou stranu oproti využití průtokového cytometru má nespornou výhodu v tom, že není nutno využívat na buňky již další značení či barvení. To je otázka ekonomické rozvahy vzhledem k ceně monoklonálních protilátek, které mají při použití svá omezení. Další výhodou 2DEP cytometrie je úspora

místa v laboratoři. Jedná se o velmi malé zařízení – pouze o čip s kamerou pod ním a připojeným generátorem a pumpou, kdy k obsluze je zapotřebí také počítač s daným softwarem na ovládání pumpy a je zde vidět obraz kamery, který snímá kanál čipu. (Fikar, 2018)

Při stanovení testu aktivace basofilů na průtokovém cytometru máme několik možností interpretace naměřených výsledků. Jedním z nich stanovení procenta aktivovaných basofilů z titrační křivky pomocí vzrůstající koncentrace od 0,01 do 100 mg/ml alergenu, která se vyhodnocuje z histogramů v programu Kaluza, kterým se ovládá software průtokového cytometru Navios. Dalším možným parametrem je hodnota plochy pod křivkou a hodnota CD – sens. U pacientů s alergií je prokázáno, že čím vyšší je hodnota CD – sens, tím vyšší je senzitivita basofilu na daný alergen. (Hemmings, 2018) Což se projevilo i u vzorků pacientů, kteří byli označeni jako pozitivní, ti měli hodnoty CD – sens vyšší než vzorky zařazené do skupiny negativní kontrol. Takto vycházeli i hodnoty AUC. Hodnoty pozitivních pacientů vycházeli vyšší než u negativních kontrol. (Eberlein, 2016) K hodnocení výsledků z 2DEP cytometrie se využívají dielektrické podpisy buněk. Rozložení buněk, konkrétně populace basofilů, plujících v kanálu se porovnává s referenční částí měření bez vlivu elektrického pole a tyto rozdíly jsou zaneseny do grafu. Ten je následně třeba vyhodnotit v příslušném softwaru. (Fikar, 2018) Výsledky jsou vydávány jako procenta odezvy na alergen u basofilních granulocytů. Toto hodnocení již vyžaduje větší zkušenost a praxi v hodnocení než v softwaru průtokového cytometru, kde hodnoty např. CD – sens jasným způsobem ukazují, že jejich zvýšená hodnota poukazuje na to, že pacient bude na daný alergen senzibilizovaný. Interpretace výsledků z 2DEP cytometru je i vzhledem komplikovanosti práce s DE podpisy složitější než vyjadřování výsledků z průtokového cytometru. Výsledky z obou přístrojů se také hůře srovnávají vzhledem k tomu, že u průtokové cytometrie se hodnotí exprimované znaky na povrchu basofila, který se v přítomnosti alergenu aktivoval, pomocí monoklonálních protilátek, zatímco u 2DEP cytometrie se hodnotí vyvolané změny na membráně, která se mění vlivem působení alergenu na basofil.

Obě metody, jak měření na průtokovém cytometru, tak měření na 2DEP cytometru mají svá pro a proti. Jak již bylo zmíněno výše, stanovení na průtokovém cytometru je rutinní metodou, která oproti 2DEP cytometrii zabírá méně času, ať už díky tomu, že není nutná taková příprava vzorku, tak i samotné měření zde probíhá podstatně rychleji. Je možnost si zde připravit více vzorků najednou, což u 2DEP cytometrie v případě aktivace testu basofilů jde pouze omezeně. Nespornou výhodou ovšem u 2DEP cytometrie zůstává nepotřebnost využití monoklonálních protilátek či jiných barviv.

Dle mého názoru je třeba metodu 2DEP více prozkoumat. Zatím si myslím, že vzhledem k náročnosti přípravy vzorku k měření a doby trvání stanovení nelze usoudit, že stanovení na průtokovém cytometru v současné chvíli předčila. Snížila by se zřejmě finanční náročnost na stanovení odpadnutím používání značených protilátek nebo barviv.

13 ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo cílem ověřit možnost využití 2DEP cytometrie jako konkurenta v stanovení testu aktivace basofilů na průtokové cytometrii. Z výsledků, které jsem získala stanovením oběma analytickými metodami, lze usoudit, že tyto výsledky nelze snadno porovnávat. Obě metody jsou založeny na jiném principu stanovení aktivace basofilního granulocytu.

U ověřené metody stanovení testu aktivace basofilních granulocytů na průtokovém cytometru jsem si potvrdila platnost toho, že u pozitivních pacientů na alergen břízy nalézáme vyšší hodnoty CD – sens a AUC než u negativních kontrol, kde tyto hodnoty nalézáme výrazně nižší.

U výsledků aktivace basofilních granulocytů změřených pomocí distribuované dielektroforetické cytometrie jsem zjistila, že u většiny pozitivních pacientů vycházeli nižší hodnoty odezvy na alergen, než tomu bylo u dvou negativních kontrol. Vzhledem nízkému počtu analyzovaných vzorků nelze určit, zda se jednalo o chyby v měření či nějaké interference. Z tohoto důvodu nebylo možno porovnat využití 2DEP cytometrie na stanovení testu aktivace basofilních granulocytů s měřením na průtokovém cytometru.

Do budoucna by metoda stanovení na 2DEP cytometru mohla najít jistá uplatnění v praxi na stanovení i jiných biomarkerů, ale mezitím bude na této metodě potřeba ještě spousta výzkumu a testování. Metodu 2DEP hodnotím jako méně vhodnou pro stanovení aktivačních znaků u citlivých buněk.

14 SEZNAM LITERATURY

Bartůňková, Jiřina a Panzner, Petr. 2019. *Klinická imunologie a alergologie*. Praha : Nakladatelství Dr. Josef Raabe s.r.o., 2019. ISBN 978-80-7496-423-7.

BD Biosciences. 2014. Cell Analysis Facility. *Flow Cytometry*. [Online] 16. leden 2014. [Citace: 17. duben 2020.]

<https://depts.washington.edu/flowlab/Cell%20Analysis%20Facility/Intro%20to%20Flow.pdf>.

Cossarizza, Andrea a Hyun-Dong Chang, a kol. 2017. Wiley Online Library. *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies*. [Online] 11. říjen 2017. [Citace: 1. únor 2020.]

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201646632>.

Devels, Peter J., a další. 2017. *Roitt's essential immunology*. Chichester : Wiley Blackwell, 2017. 978-1-118-41577-1.

Eberlein, Bernadette & Santos, Alexandra & Mayorga, Cristobalina & Nopp, Anna & Ferrer, Montse & Rouzaire, Paul & Ebo, Didier & Sabato, Vito & Sanz, Maria & Pecaric-Petkovic, Tatjana & Patil, Sarita & Hausmann, Oliver & Shreffler, Wayne & Korosec, Peter &. 2016. Allergo Journal Internationa. *Basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease – an overview*. [Online] 2016. [Citace: 25. duben 2020.]

https://www.researchgate.net/publication/304495602_Basophil_activation_testing_in_diagnosis_and_monitoring_of_allergic_disease_-_an_overview.

Fikar, P., Georgiev, V., Lissorgues, G. a kol. 2018. UltraDNS Client Redirection Service. *2DEP cytometry: distributed dielectrophoretic cytometry for live cell dielectric signature measurement on population level*. [Online] 2018. [Citace: 16. Duben 2020.]

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10544-017-0253-5#citeas>.

Hemmings, Oliver et al. 2018. PubMed Central®. *Basophil Activation Test: Old and New Applications in Allergy*. [Online] 14. listopad 2018. [Citace: 20. duben 2020.]

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6244909/>.

Hořejší, Václav, a další. 2017. *Základy imunologie*. Praha : Triton, 2017. 978-80-7553-250-3.

Jahan-Tigh, Richard a Ryan, Caitriona. 2012. Core. *Flow Cytometry*. [Online] 2012. [Citace: 20. březen 2020.] <https://core.ac.uk/download/pdf/82716365.pdf>.

Jílek, Petr. 2019. *Imunologie : stručně, jasně, přehledně*. Praha : Grada Publishing, 2019. 978-80-271-0595-3.

Kumar, Sunil et al. 2019. PubMed. *Dendritic Cell-Mediated Th2 Immunity and Immune Disorders*. [Online] 20. květen 2019. [Citace: 13. listopad 2019.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6539046/>.

Lima, Margarida. 2020. ScienceDirect. *Laboratory studies for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, with emphasis on flow cytometry*. [Online] 2020. [Citace: 20. duben 2020.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323316965000127?via%3Dihub>.

Marshall, J.S., Warrington, R., Watson, W. et al. 2018. Biomedcentral. *An introduction to immunology and immunopathology*. [Online] 12. říjen 2018. [Citace: 20. listopad 2019.] <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-018-0278-1#citeas>.

McKinnon, Katherine M. 2018. PubMed Central®. *Current protocols in immunology*. [Online] Flow Cytometry: An Overview, 21. únor 2018. [Citace: 20. leden 2020.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5939936/>.

Punt, Jenni, a další. 2019. *Kuby immunology*. New York : Macmillan Education, 2019. 978-1-319-11470-1.

Ralph C. Budd, Karen A. Fortner. 2017. ScienceDirect. *T- Lymphocytes*. [Online] Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition), 2017. [Citace: 17. listopad 2019.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323316965000127?via%3Dihub>.

Říhová, Lucie. 2016. Informační systém Masarykovi univerzity. *Průtoková cytometrie pro biochemii*. [Online] 11. srpen 2016. [Citace: 14. prosinec 2019.] https://is.muni.cz/el/med/podzim2016/KBOMII/um/Rihova_prutokova_cytometrie_pro_biochemii.pdf.

Shapiro, Howard M. 2003. *Practical Flow Cytometry*. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc. , 2003. ISBN 0-471-41125-6.

Siracusa, Mark C et al. 2013. PubMed. *Basophils and allergic inflammation*. [Online] říjen 2013. [Citace: 5. prosinec 2019.]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3903395/>.

Syunsuke, Yamamoto, a další. 2020. ScienceDirect. *Quantitative application of flow cytometry for the analysis of circulating human T cells: A preclinical pharmacokinetic study*,. [Online] duben 2020. [Citace: 20. duben 2020.]
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1347436719302344>.

Šterzl, Ivan. 2007. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-0972-0.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Povolení sběru informací ve FN Plzeň.....	65
---	----

15 PŘÍLOHY

Příloha 1 Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

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

Vážená paní

Dominika Nová

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 „*Průtoková cytometrie v elektrickém poli*“.

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 na ÚIA a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým **je Ing. Bc. Tomáš Vlas, odborný pracovník 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: chabrovas@fnplzen.cz

14. 11. 2019