

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Tereza Běhounková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Tereza Běhounková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**PŘÍPRAVA SEPARACE A KULTIVACE BAZOFILNÍCH
GRANULOCYTŮ**

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: **Tereza BĚHOUNKOVÁ**
Osobní číslo: **Z17B0077P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Příprava separace a kultivace bazofilních granulocytů**
Zadávací 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 podle 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:

- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Paulík, Milan. Vyšetřovací metody v imunologii. 2. upr. vyd. Praha : Grada Publishing, a.s., 2011. str. 172. ISBN 978-80-247-3533-7.
- JÍLEK, Petr. Imunologie stručně, jasně, přehledně. Praha : Grada Publishing, a.s., 2014. str. 96. ISBN 978-80-247-4822,1.
- ABASS, Abul K., Lichtman, Andrew H. a Pillai, Shiv. Basic immunology. 5. upr. vyd. St. Louis : Elsevier Inc., 2016. str. 327. ISBN 978-0-323-39082-8.
- KREJSEK, Jan, Andrýs, Ctirad a Krčmová, Irena. Imunologie člověka. Hradec Králové : Garamon s.r.o., 2016. str. 495. ISBN 978-80-86472-74-4.
- ŠTERZL, Ivan. Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékařství. Praha : Karolinum, 2007. str. 208. ISBN 978-80-246-0972-0.

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

.....

vlastnoruční podpis

ABSTRAKT

Příjmení a jméno: Běhounková Tereza

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Příprava separace a kultivace bazofilních granulocytů

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 56

Počet stran – nečíslované: 20

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 27

Klíčová slova: bazofilní granulocyt, alergie, průtoková cytometrie, distribuovaná dielektroforetická cytometrie

Souhrn:

Bakalářská práce je zaměřena na test aktivace bazofilních granulocytů a metodu 2DEP cytometrie. Teoretická část zahrnuje charakteristiku bazofilních granulocytů, alergické reakce, jejich diagnostiku, metody separace a analýzy. V praktické části byl využit test aktivace bazofilů za pomoci průtokové cytometrie, který sloužil k porovnání s výsledky získanými na 2DEP cytometru. K porovnání výsledků byla použita plocha pod křivkou, CD-sens a hodnoty specifických IgE a z 2 DEP cytometru DE podpisy buněk. Výsledky metod poukazují na shodu a možnost využití 2DEP cytometrie v budoucnosti.

ABSTRACT

Surname and name: Běhouňková Tereza

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

Title of thesis: Preparation of separation and cultivation basophiles granulocytes

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 56

Number of pages – unnumbered: 20

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 27

Keywords: basophil granulocyte, allergies, flow cytometry, distributed dielectrophoretic cytometry

Summary:

The bachelor thesis is focused on basophil activation test and 2DEP cytometry method. The theoretical part includes basophil characteristics, allergic reactions, their diagnostics, methods of separation and analysis. In the practical part, the basophil activation test using flow cytometry was used, which was used for comparison with the results obtained on 2DEP cytometry. The area under the curve, the CD-sens and the specific IgE values were used to compare the results and the DE cell signatures from the 2 DEP cytometry. The results of the methods show the agreement and possibility of using 2DEP cytometry in the future.

Předmluva

Tuto práci jsem si vybrala z důvodu zájmu o předmět imunologie, o kterém jsem se chtěla dozvědět více a zjistit, jaké veškeré možnosti tento obor přináší. Chtěla jsem se více dozvědět o teorii a zaujala mě nabídka spolupráce s výzkumným centrem NTIS. Tato nabídka pro mě byla možností zkusit si, jak to ve výzkumných centrech probíhá a také být součástí testování nové nezavedené metody a dostat se tak k novým možnostem.

Poděkování

Děkuji Ing. Tomáši Vlasovi za pomoc při tvorbě této bakalářské práce, za poskytnutí rad a materiálů. Také děkuji za trpělivost, ochotu kdykoliv pomoci a za vysvětlení všeho potřebného. Dále bych chtěla poděkovat výzkumnému centru NTIS a Ing. Pavlu Fikarovi Ph.D. za poskytnutí výzkumné laboratoře a možnosti provedení praktické části této bakalářské práce. Mé díky také patří Bc. Adrianě Kašpárkové, která mne po celou dobu výzkumu provázela, poskytovala mi cenné rady a kdykoliv byla ochotná pomoci.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ.....	12
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	13
SEZNAM TABULEK.....	14
SEZNAM ZKRATEK.....	15
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1 BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....	18
1.1 Charakteristika leukocytů.....	18
2 BAZOFILNÍ GRANULOCYTY A MASTOCYTY.....	20
2.1 Bazofilní granulocyty.....	20
2.1.1 Charakteristika.....	20
2.1.2 Morfologie.....	20
2.1.3 Vývoj.....	20
2.1.4 Povrchové znaky.....	21
2.1.5 Funkce.....	21
2.2 Žírné buňky (mastocyty).....	21
2.2.1 Charakteristika.....	21
2.2.2 Funkce.....	22
3 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE.....	23
3.1 Charakteristika.....	23
3.2 Imunopatologická reakce I. typu.....	23
3.3 Imunopatologická reakce II. typu.....	24
3.4 Imunopatologická reakce III. typu.....	25
3.5 Imunopatologická reakce IV. typu.....	25
4 ALERGIE.....	26
4.1 Charakteristika.....	26
4.2 Struktura IgE, receptory.....	26
Struktura.....	26
4.3 Alergeny.....	28
4.3.1 Inhalační alergeny.....	28
4.3.2 Profesní alergeny.....	29
4.3.3 Potravinové alergeny.....	29
4.3.4 Léky.....	29
4.3.5 Hmyz.....	30
4.3.6 Využití alergenů.....	30

4.4	Diagnostika alergických onemocnění	30
4.4.1	Anamnéza.....	30
4.4.2	Klinický obraz	31
4.4.3	Kožní testy.....	31
4.4.4	Stanovení koncentrace protilátek IgE	33
4.4.5	Expoziční testy	33
4.5	Léčba alergických onemocnění	33
5	PŘÍPRAVA A SEPARACE	35
5.1	Metody separace buněk.....	35
5.1.1	Hustotní gradient	35
5.1.2	Separace pomocí paramagnetických částic	36
6	KULTIVACE.....	38
6.1	Kultivační média.....	38
6.1.1	Druhy médií.....	38
6.2	Kultivační podmínky	39
7	METODY STANOVENÍ BAZOFILNÍCH GRANULOCYTŮ	40
7.1	Průtoková cytometrie	40
7.2	Aktivační test bazofilních granulocytů	41
7.3	Distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP cytometrie).....	42
7.3.1	Popis čipu	42
7.3.2	Měření na 2DEP cytometrii.....	43
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	44
8	CÍL PRÁCE	45
9	VÝZKUMNÉ OTÁZKY	46
10	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	47
11	METODIKA PRÁCE.....	48
11.1	Měření specifických IgE.....	48
11.2	Separace a kultivace bazofilních granulocytů.....	49
11.3	Měření na průtokovém cytometru - BAT	50
11.4	Měření na 2DEP cytometru	52
12	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	55
12.1	Výsledky stanovení specifických IgE	55
12.2	Porovnání výsledků pacientů BAT a 2DEP.....	56
12.3	Souhrnné zhodnocení výsledků BAT a 2DEP	66
	DISKUZE.....	70
	ZÁVĚR	72
	SEZNAM LITERATURY	73

SEZNAM PŘÍLOH.....	76
PŘÍLOHY.....	77

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: BAT, vzorek č. 1	56
Graf 2: DE podpisy buněk, vzorek č. 1	56
Graf 3: BAT, vzorek č. 2.....	57
Graf 4: DE podpisy buněk, vzorek č. 2.....	57
Graf 5: BAT, vzorek č. 3.....	58
Graf 6: DE podpisy buněk, vzorek č. 3.....	58
Graf 7: BAT, vzorek č. 4.....	59
Graf 8: DE podpisy buněk, vzorek č. 4.....	59
Graf 9: BAT, vzorek č. 5.....	60
Graf 10: DE podpisy buněk, vzorek č. 5.....	60
Graf 11: BAT, vzorek č. 6.....	61
Graf 12: DE podpisy buněk, vzorek č. 6.....	61
Graf 13: BAT, vzorek č. 1	62
Graf 14: DE podpisy buněk, vzorek č. 1	62
Graf 15: BAT, vzorek č. 2.....	63
Graf 16: DE podpisy buněk, vzorek č. 2.....	63
Graf 17: BAT, vzorek č. 3.....	64
Graf 18: DE podpisy buněk, vzorek č. 3.....	64
Graf 19: BAT, vzorek č. 4.....	65
Graf 20: DE podpisy buněk, vzorek č. 4.....	65
Graf 21: Aktivace bazofilů pozitivních pacientů z 2DEP	66
Graf 22: AUC - plocha pod křivkou u pozitivních pacientů	66
Graf 23: CD-sens u pozitivních pacientů	67
Graf 24: Aktivace bazofilů negativních kontrol z 2DEP	68
Graf 25: AUC - plocha pod křivkou u negativních kontrol	68
Graf 26: CD-sens u negativních kontrol	69

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Bazofilní granulocyt v nátěru periferní krve	20
Obrázek 2: Obecné schéma imunoglobulinu	28
Obrázek 3: Negativní selekce pomocí MACS	37
Obrázek 4: Schéma čipu	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Typy leukocytů a jejich morfologie	19
Tabulka 2 : Hodnoty specifických IgE	55

SEZNAM ZKRATEK

2DEP – distributed dielectrophoretic cytometry

ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity – na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita

AIDS – acquired immune deficiency syndrome – syndrom získaného selhání imunity

AUC – area under the curve – plocha pod křivkou

BAT – basophil activation test – aktivační test bazofilů

BSA – bovine serum albumin – hovězí sérový albumin

CCD – charge-coupled device

CD – cluster of differentiation

DC – dýchací cesty

DE – dielektroforetické

Fc receptor – crystallizable fragment – fragment pro vazbu s Fc receptory

Fc ϵ RI – Fc region of immunoglobulin E

FITC – fluorescein isothiocyanate

FSC – forward scatter – přímý rozptyl světla

GIT – gastrointestinální trakt

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor – granulocytární-makrofágový kolonie stimulující faktor

HLA – human leukocyte antigen

Ig – imunoglobulin

IL – interleukin

MACS – magnetic-activated cell sorting – magnetická separace

MC_T – mastocyt produkující tryptázu

MC_{TC} – mastocyt produkující tryptázu a chymázu

NF κ B – nuclear factor kappa of activated B cells – nukleární faktor kappa B

NK – natural killers cells

PBS – phosphate-buffered saline – fosfátový pufr

PDMS – polydimethylsiloxan

PIV – particle image velocimetry

SCF – stem cell factor

SSC – side scatter – boční rozptyl světla

STAT6 – signal transducer and activator of transcription 6 – přenašeč signálů a
transkripčních faktorů

TGF- β – transforming growth factor β

TLR – Toll-like receptor

TNF – tumor necrosis factor – tumor nekrotizující faktor

UV – ultrafialové

V – objem

ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá porovnáním výsledků získanými pomocí aktivačního testu bazofilů na průtokovém cytometru s výsledky získanými na 2DEP cytometru ve formě DE podpisů. Z aktivačního testu bazofilů jsme získali výsledky AUC (plocha pod křivkou) a CD-sens, které byly porovnány s procentem aktivovaných bazofilů z 2DEP cytometru.

Hlavním cílem této práce tedy bylo porovnání výsledků těchto dvou metod a zjistit, zda výsledky z 2DEP cytometrie odpovídají výsledkům z aktivačního testu bazofilů získaných na průtokovém cytometru. 2DEP metoda by tak v budoucnu mohla být alternativou průtokového cytometru.

Teoretická část se zabývá popisem buněk imunitního systému se zaměřením na mastocyty a bazofily, imunopatologickými reakcemi, alergeny a diagnostikou alergických onemocnění. Dále popisuje různé metody separace buněk, jejich kultivaci a metody stanovení se zaměřením na průtokový cytometr, aktivační test bazofilů a distribuovanou dielektroforetickou cytometrii.

Praktická část popisuje principy, pomůcky a pracovní postupy u měření specifických IgE, u separace a kultivace bazofilních granulocytů, aktivačního testu bazofilů a u distribuované dielektroforetické cytometrie. Dále obsahuje porovnání výsledků alergických pacientů, a to pomocí AUC a CD-sens s DE podpisy buněk. Stejně tak je tomu u skupiny negativních kontrol.

Diskuze je věnována porovnáním našich výsledků s odbornými články od různých autorů.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

1.1 Charakteristika leukocytů

Leukocyty představují hlavní složku obranyschopnosti organismu. Jedná se o morfologicky a funkčně heterogenní skupinu. Všechny druhy bílých krvinek pochází z pluripotentních kmenových buněk, které jsou přítomné v kostní dřeni. Pod vlivem různých faktorů se poté tyto buňky diferencují na různé typy leukocytů. Z kmenových buněk vznikají dvě základní linie, a to myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají agranulocyty, kam řadíme monocyty a makrofágy. Tento druh bílých krvinek neobsahuje ve své cytoplazmě granula a granulocyty: neutrofil, eozinofil a bazofil. Tyto leukocyty mají ve své cytoplazmě obsažena specifická granula, podle nichž se dělí. (Hořejší, a další, 2017)

Do myeloidní linie také patří dendritické buňky a žírné buňky, které se nacházejí ve tkáních. Všechny buňky myeloidní linie tvoří základ vrozené části imunitního systému. Většina z nich má schopnost fagocytózy, což je proces pohlcení cizorodé částice z okolí a produkce cytokinů. (Hořejší, a další, 2017)

Z lymfoidní linie vznikají T a B lymfocyty a NK buňky. Vývoj B lymfocytů probíhá v kostní dřeni a dokončuje se po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, uzliny). Konečným stadiem B lymfocytu jsou plazmatické buňky, které produkují protilátky (imunoglobuliny). Vývoj T lymfocytů probíhá v brzlíku, ale některé subpopulace se vyvíjejí i mimo něj. Brzlík opouštějí subpopulace pomocných T buněk (Th), které mají na svém povrchu receptor CD4, a cytotoxické T buňky (Tc), které mají na svém povrchu receptor CD8. (Hořejší, a další, 2017)

Určitá část T a B lymfocytů má schopnost měnit se v tzv. paměťové buňky, které vznikají po setkání s antigenem. Vzniká tak imunologická paměť, kdy po dalším setkání se stejným antigenem dochází k rychlejší a efektivnější sekundární odpovědi. (Hořejší, a další, 2017)

Tabulka 1: Typy leukocytů a jejich morfologie

Leukocyt	Zastoupení	Rozměr	Barvení	Znaky
neutrofilní granulocyty	60 - 70 %	10 - 12 μm	růžová granula	segmentované jádro
eozinofilní granulocyty	1 - 3 %	13 - 14 μm	červená granula	dvoulaločné jádro
bazofilní granulocyty	0 - 1 %	10 μm	tmavě fialová granula	esovité jádro
monocyty	4 - 8 %	15 - 25 μm	modrá plazma	ledvinovité jádro
lymfocyty	25 - 40 %	6 - 8 μm	úzký lem modré plazmy	velké kulaté jádro

Zdroj: Studijní materiály z výuky hematologie od MUDr. Zdeňky Hajšmanové

Počet leukocytů v periferní krvi je $4-9 \times 10^9/\text{L}$. Počet leukocytů není ovlivněn pohlavím, avšak může záviset na stravě, námaze, denní době atd. Jejich počet se zvyšuje hlavně při zánětlivých onemocněních. (Mourek, 2012)

2 BAZOFILNÍ GRANULOCYTY A MASTOCYTY

2.1 Bazofilní granulocyty

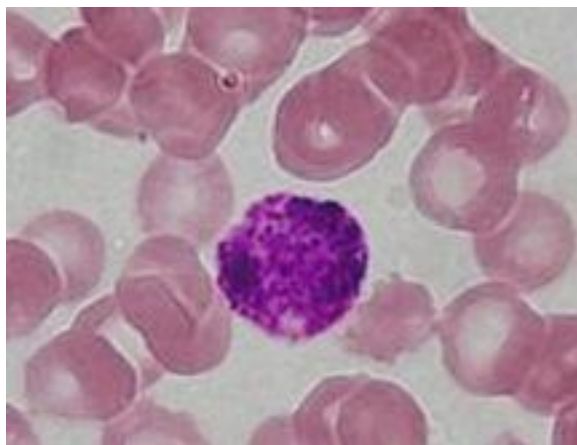
2.1.1 Charakteristika

V periferní krvi koluje méně než 1 % bazofilních granulocytů. Hlavní složkou specifických granul je histamin a heparin, které se uplatňují při alergických a zánětlivých reakcích. Ovlivňují proudění krve a prostupnost krevních kapilár. Vyskytují se v krvi a do tkání mohou přestupovat na základě prozánětlivých signálů. Životnost bazofilních granulocytů je přibližně 1 den, maximálně týden. (Trojan, 2003)

2.1.2 Morfologie

Bazofilní granulocyty mají v průměru od 10 do 12 μm , jádro bývá nepravidelné laločnaté s malým množstvím chromatinu, často špatně rozpoznatelné, protože je překryto silně bazofilními granuly, která se barví zásaditými složkami barviva. Tato granula se v hematologickém panoptickém barvení jeví silně fialově až fialovočerně. Cytoplazma bazofilních granulocytů bývá růžová. (Trojan, 2003)

Obrázek 1: Bazofilní granulocyt v nátěru periferní krve



Zdroj: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Basophil.jpg>

2.1.3 Vývoj

Bazofilní granulocyty se tvoří diferenciací v kostní dřeni z pluripotentní kmenové buňky, ze které se vytvoří myeloidní progenitor. Ten se může vyvinout v jakýkoliv granulocyt, monocyt, erytrocyt nebo megakaryocyt. Progenitor se musí vyvinout v prekurzorovou buňku, ze které poté vzniká myeloblast \rightarrow promyelocyt \rightarrow myelocyt (v této fázi se začínají v cytoplazmě objevovat specifická granula) \rightarrow metamyelocyt \rightarrow

granulocyt, který je schopen plnit svojí funkci v periferní krvi. Pro vývoj bazofilů je nutná přítomnost IL-3 a růstového faktoru GM-CSF. (Sasaki, a další, 2016)

2.1.4 Povrchové znaky

Bazofilní granulocyty exprimují vysokoafinní Fc-receptor pro IgE, prostřednictvím tohoto receptoru jsou na povrchu bazofilu vázány molekuly protilátek třídy IgE, kdy je s jejich pomocí možné rozeznávat příslušné antigeny. Po vazbě antigenu na povrch bazofilu, kde je navázán IgE dojde k degranulaci, tj. fúze cytoplazmatických granúl s membránou a vylití obsahu. (Hořejší, a další, 2017) Můžeme také prokázat receptory pro C5a a CR3a a pro IL-3 a IL-4, GM-CSF a histaminový H₂ receptor. (Šterzl, 2007) Součástí membrány granúl je znak CD63, kdy při aktivaci bazofilu dojde k exocytóze a k jeho přemístění na povrch. (Hořejší, a další, 2017) Bazofily jsou výraznými producenty IL-4 a IL-13. Obsahují receptory pro anafylotoxiny, cytokinové a chemokinové receptory a TLR. (Ochotná, a další, 2013)

2.1.5 Funkce

Ačkoliv se bazofily vyskytují pouze v malé míře, jejich význam je pro imunitní systém nezanedbatelný. Mají podobnou řadu funkcí jako mastocyty, ale na rozdíl od nich se vyskytují v krvi. (Krejsek, 2016) Bazofily stejně jako eozinofily hrají roli v reakci na parazity, podílejí se na akutní a chronické alergické reakci. Po navázání cirkulující protilátky dojde k degranulaci a uvolní se obsah jejich granúl. Histamin, jedna z nejznámějších látek obsažená v bazofilech, zvyšuje permeabilitu cév a aktivitu hladkého svalstva, dochází k tvorbě otoku a snížení krevního tlaku. Bazofily také mohou uvolňovat cytokiny, které ovlivňují jiné krevní elementy, zejména eozinofily a lymfocyty. (Punt, a další, 2018)

2.2 Žírné buňky (mastocyty)

2.2.1 Charakteristika

Mastocyty morfologicky řadíme mezi granulocyty. Při barvení anilinovou modří se barví typicky nachově a toto zbarvení je dáno reakcí mezi barvivem a kyselým heparinem, který je obsažen v granulech. Vznikají v kostní dřeni, kde probíhá i počáteční část diferenciací. Další část diferenciací probíhá v periferní tkáni, hlavně ve sliznicích a v kůži. Důležitými růstovými faktory jsou cytokiny IL-3, IL-4 a SCF, který je přítomný na fibroblastech a váže se na mastocyty pomocí Kit receptoru. (Šterzl, 2007)

Bylo zjištěno, že existují dva fenotypy mastocytů na základě jejich imunohistochemického barvení. První fenotyp, který se označuje jako MC_T fenotyp, se vyskytuje hlavně v plicích a ve sliznici gastrointestinálního traktu a obsahuje enzym tryptázu. Druhý typ, označovaný jako MC_{TC} fenotyp, převažuje v kůži a slizničním vazivu gastrointestinálního traktu a obsahuje enzymy tryptázu a chymázu. (Šterzl, 2007)

V cytoplazmě mastocytů nacházíme velké množství granul, kde jsou uloženy mediátory. Ty jsou zde ve formě krystalové struktury a jsou iontově vázány k proteoglykanové matrix. Během aktivace mastocytů, dojde ke ztrátě krystalického uspořádání granul, stávají se rozpustné a uvolňují se do okolí. Hlavním mediátorem je histamin, který je zodpovědný za časnou alergickou reakci, vazodilataci, zvýšenou permeabilitu cév, kontrakci hladkého svalstva bronchů a zvýšenou produkci hlenu. Další látkou obsaženou v granulích mastocytů je heparin, kdy jeho uvolnění vede ke stabilizaci ostatních mediátorů, působí také proti komplementu a antikoagulačně. Tryptáza se vyskytuje ve dvou formách, a to jako α -tryptáza a β -tryptáza, z nichž je enzymaticky aktivní α -tryptáza. Během anafylaxe jsou přítomny vysoké hodnoty tryptázy, maximální hladina je za 1 - 2 hodiny, ustálení během 6 hodin. (Šterzl, 2007) Při zánětu se tyto buňky aktivují mezi prvními. Spolu s bazofily mají za následek anafylaktický šok. (Hořejší, a další, 2017)

2.2.2 Funkce

Žírná buňka je nápomocná při vyvolávání zvýšené propustnosti krevních cév v důsledku uvolňování obsahu cytoplazmatických granul. Granula žírných buněk obsahují velké množství histaminu. Degranulace žírných buněk může být vyvolána anafylatoxiny C3a a C5a a navázáním specifického antigenu na třídu protilátky IgE, která se váže na buňky prostřednictvím povrchových receptorů. Histamin vyvolá dilataci cév a zvyšuje permeabilitu krevních cév. Stimulací nervového zakončení dochází k dalšímu uvolňování histaminu, který je zodpovědný za bolest často spojenou se zánětem, evoluční adaptací, která s největší pravděpodobností podporuje hostitele, aby chránil infikovanou oblast. (Delves, a další, 2017) Mastocyty uvolňují i některé cytokiny, které podporují rozvoj lokálního zánětu a další imunitní reakce. Například TNF aktivuje fagocyty, TGF- β napomáhá při hojení ran, IL-6 napomáhá v produkci imunoglobulinů, IL-5 podněcuje eozinofily. IL-4 rozhoduje o tom, zda dojde k diferenciaci prekurzorů Th na Th₂. Th₂ lymfocyty jsou buňky, které ovlivňují diferenciaci B lymfocytů na plazmocyty. (Hořejší, a další, 2017)

3 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE

3.1 Charakteristika

Imunitní systém za normálních podmínek funguje fyziologicky, ale za určitých okolností může imunitní reakce vyvolat poškození organismu. V tomto případě se jedná o imunopatologickou reakci. Toto poškození může být důsledkem obranných reakcí proti nebezpečným antigenům, následkem reakce na vnější antigeny (alergie) a důsledkem imunitní reakce na autoantigeny (autoimunitní reakce). (Hořejší, a další, 2017)

Imunologické reakce můžeme na základě mechanismu vzniku a patologických projevů rozdělit na humorální a buněčně zprostředkovatelné. Podle klasifikace dle Commbse a Gella rozdělujeme imunopatologické reakce do čtyř základních typů (I-IV). (Hořejší, a další, 2017)

3.2 Imunopatologická reakce I. typu

Imunopatologická reakce I. typu se také často nazývá jako reakce časné přecitlivělosti, která je zprostředkována IgE protilátkami. Ty vznikají proti některým antigenům (alergenům) ze zevního prostředí. Alergeny mohou být složky pylových zrn, prachu, potravinové alergeny nebo zvířecí srst atd. Jedinci, kteří reagují tvorbou protilátek typu IgE na neškodné antigeny, označujeme jako atopiky. Tato reakce se označuje jako reakce časné přecitlivělosti z důvodu rychlé reakce po kontaktu s alergenem. Při prvním setkání jedince s antigenem, dochází ke zvýšené citlivosti pacienta, stimuluje se diferenciaci klonů Th₂ lymfocytů a následně plazmocytů, které produkují protilátky třídy IgE. (Hořejší, a další, 2017) Ty se váží na mastocyty nebo na bazofily pomocí vysokoafinního receptoru pro IgE. Alergen poté aktivuje buňku, která má na svém povrchu navázanou molekulu IgE a dochází k uvolnění mediátorů (histamin, heparin, tryptáza, kalikrein atd.). (Šterzl, 2007)

Alergická reakce může probíhat buď lokálně (alergická rýma, konjunktivitida) nebo systémově (anafylaxe), v závislosti na vstupu alergenu. Lokálními projevy se organismus snaží z povrchů sliznic vypudit parazita, k systémové reakci dochází, pokud se alergeny dostanou do oběhu senzibilizovaného jedince. Ty mohou způsobit život ohrožující anafylaktický šok. (Hořejší, a další, 2017) Anafylaxe postihuje více systémů, zahrnující poškození kůže (erytém, exantém), dýchacího traktu (laryngální edém), kardiovaskulárního

systému (hypotenze, arytmie), urogenitálního systému (křeče dělohy a močového měchýře) a nervového systému (strach, bolesti hlavy, poruchy vědomí). (Šterzl, 2007)

Dále můžeme reakci I. typu rozdělit na časnou a pozdní fázi. Kdy k časně fázi dochází po několika minutách od vystavení alergenu, účastní se hlavně mastocyty a bazofily. Po jejich aktivaci dochází k rychlé degranulaci a uvolnění nově vytvořených mediátorů. Za časnou fázi jsou zodpovědné zejména histamin, heparin, prostaglandin D2 a cysteinylové leukotrieny. Prostaglandin D2 má vliv na zvýšenou propustnost cév kůže, způsobuje zarudnutí a vyvolává bronchokonstrikci a přitahuje neutrofilů. (Šterzl, 2007)

Pozdní fáze se objevuje za 4 - 6 hodin a podílejí se zde především eozinofily, bazofily a makrofágy. V této fázi se uplatňuje tryptáza, TNF- α , IL-4, IL-3, IL-13 a IL-5. (Šterzl, 2007)

3.3 Imunopatologická reakce II. typu

Reakce II. typu se také nazývá jako reakce cytotoxická a tvoří se protilátky typu IgG a IgM, které jsou namířeny proti antigenům na membráně vlastních buněk (erytrocyty, leukocyty, trombocyty). (Šterzl, 2007) Tyto protilátky mají schopnost aktivovat komplement nebo způsobovat reakci typu ADCC (na protilátkách závislá buněčná cytotoxicita). (Hořejší, a další, 2017)

Do této reakce řadíme transfuzní reakce, kdy příčinou jsou protilátky proti některým povrchovým antigenům erytrocytů. Hlavními antigeny krevních skupin jsou oligosacharidy, které určují krevní skupinu 0 (trisacharid, který je složený z N-acetylglukosaminu, galaktózy a frukózy), A (modifikovaný jedním zbytkem N-acetylglukosaminu), B (modifikovaný jedním zbytkem galaktózy). Sérum jedince, který má na svých buňkách látku krevní skupiny A, neobsahuje anti-A protilátky, ale anti-B protilátky. Jedinec se skupinou B má zase anti-A protilátky a jedinec se skupinou AB nemá žádné protilátky. Při transfuzi B krvinek příjemci A, by došlo k navázání protilátek, aktivaci komplementu a následné lýze krvinek. Proto se musí vyšetřovat krevní skupina dárce a příjemce, aby se shodovali v AB0 systému. (Hořejší, a další, 2017)

Dále sem řadíme hemolytickou nemoc novorozence, která je způsobena protilátkami proti RhD antigenu. Pokud je matka RhD negativní a plod RhD pozitivní, může při porodu dojít k imunizaci matky krvinkami dítěte a při dalším těhotenství mohou anti-RhD protilátky transplacentárně přestupovat do oběhu plodu a způsobit jeho poškození. (Hořejší, a další, 2017)

Reakce II. typu se dále projevuje jako leukopenie, trombocytopenie, thyroditida a Goodpasturov pulmorenální syndrom. (Šterzl, 2007)

3.4 Imunopatologická reakce III. typu

Reakce III. typu nebo také s tvorbou imunokomplexů, je způsobena hlavně protilátkami třídy IgG, které nejsou plně odstraňovány fagocyty. Může tak dojít k jejich hromadnému ukládání do tkání, kde způsobí aktivaci komplementu, zánět a sekundární poškození. Vytváření imunokomplexů je fyziologický jev, ale záleží na genetické predispozici a na vlivu vnějšího prostředí. Imunokomplexy se nejčastěji ukládají v ledvinách, v kloubních synoviích a způsobují glomerulonefritidy a artritidy. (Šterzl, 2007)

Příkladem této reakce je sérová nemoc, která nastává po podání nadměrného množství xenogenního antiséra, např. proti hadímu jedu. U autoimunitních onemocnění se jedná o lupus erythematodes, kryoglobulinemie a revmatoidní artritidy. (Hořejší, a další, 2017)

3.5 Imunopatologická reakce IV. typu

Reakce IV. typu je také označována jako přecitlivělost oddáleného typu, je zprostředkována T lymfocyty a makrofágy. Podstatou je tuberkulinová reakce, kterou se zjišťuje stav imunity proti tuberkulóze. U této reakce dochází k poškození tkání, častým znakem je tvorba granulomu.

Dělíme je na dva podtypy dle účasti buněk. U prvního podtypu dochází k senzibilizaci Th1 (CD4+) lymfocytů aktivujících makrofágy. Pokud makrofágy nejsou schopny příčinu zánětu eliminovat, vzniká chronický granulomatózní zánět jako u tuberkulózy, lepry, sarkoidózy nebo granulomatózních vaskulitid. U druhého typu se uplatňují cytotoxické T-lymfocyty (CD8+) a Th17 lymfocyty zapříčiňující kontaktní dermatitidu, poškození při virových infekcích a akutní rejekci transplantátu. (Hořejší, a další, 2017)

4 ALERGIE

4.1 Charakteristika

Pojem alergie vychází ze dvou řeckých slov – „jiná“ a „reakce“. Neboli změněná schopnost reakce. Tento termín byl poprvé použit rakouským pediatrem Clemensem von Pirquetem v roce 1906. Zmínky o alergických onemocněních jsou známy už z dob starého Egypta, takže se nejedná o onemocnění pouze poslední doby. (Šterzl, 2007)

Alergie je přehnaná, nepřiměřená reakce imunitního systému organismu na látky, se kterými se běžně setkáváme v našem prostředí. Je způsobena nesprávnou aktivací protilátek ze skupiny imunoglobulinu E (IgE) vlivem daného alergenu. Ty mohou způsobovat zánětlivé změny v různých tkáních a orgánech a ty pak mohou vést k poruchám jejich funkce. (Hořejší, a další, 2017) Spektrum projevů alergických reakcí je velmi široké, od banální rýmy až po anafylaktický šok, který může končit i smrtí. (Šterzl, 2007)

Alergická onemocnění rozdělujeme na základě typu imunopatologické reakce. Hlavní příčinou vzniku je porucha rovnováhy mezi Th1 a Th2 lymfocyty s převahou Th2 lymfocytů. Může zde hrát roli rovnováha mezi pro- a protizánětlivými faktory spolu s působením T regulačních lymfocytů. (Šterzl, 2007) Příčinou nadbytku Th2 lymfocytů mohou být i zevní faktory, jako je tzv. hygienická hypotéza v útlém dětství, ta se opírá o předpoklad, že pro vyhovující vyžívání imunitního systému, je v určité míře vhodná expozice k mikrobiálním antigenům. Tudíž se jako nevhodné jeví přehnaná sterilita prostředí dítěte, sterilní strava apod. Nedostatečná stimulace imunitního systému dítěte poté může vést k přebytku Th2 lymfocytů. (Bartůňková, a další, 2019)

4.2 Struktura IgE, receptory

Struktura

Stejně jako další protilátky se i IgE skládá z 2 lehkých a 2 těžkých řetězců. Každý z řetězců se skládá z okolo 100 aminokyselin a ty se nazývají imunoglobulinové domény, které jsou kovalentně vázány disulfidovými vazbami. Lehký řetězec se skládá z jedné variabilní (V_L) N-terminální domény a z jedné konstantní (C_L) domény. Těžký řetězec obsahuje jednu variabilní (V_H) N-terminální doménu a čtyři konstantní (C_H) domény. Protilátky se do tříd rozdělují podle C_H sekvence, které se označují jako C_{μ} , C_{δ} , C_{γ} , C_{α} ,

C ϵ pro IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Některý B lymfocyt produkuje protilátku pouze jedné specifity dané kombinací V_L a V_H. Během protilátkové odpovědi může dojít k izotopovému přesmyku, který je určen genovou rekombinací a dochází k přesunu segmentu V_H k dalšímu segmentu po směru C genů na chromozomu 14. Díky izotopovému přesmyku je protilátkám umožněno vykonávat novou funkci v imunitní odpovědi. (Šterzl, 2007)

Těžký řetězec ϵ má čtyři konstantní domény (C ϵ 1-C ϵ 4), kdy C ϵ 3 je homologní s C γ 2 a C ϵ 4 s C γ 3. IgE obsahuje oblast, která je štěpitelná papainem, jedná se o místo mezi C ϵ 1 a C ϵ 2 a receptorové vazebné místo, které bylo na základě studií s rekombinantními peptidy a chimérickými protilátkami nalezeno v oblasti C ϵ 3. Na IgE molekule můžeme najít dvě vazebná místa, která jsou tvořena páry V_L a V_H domén. (Šterzl, 2007)

Syntéza IgE je dána izotopovým přesmykem, který je regulován cytokiny, ty jsou produkovány Th lymfocyty. Pokud dojde ke změně koncentrací těchto cytokinů, dochází k ovlivnění směru izotopového přesmyku. K těmto cytokinům patří Th2 lymfocyty produkované cytokiny jako IL-4, IL-5 a IL-13. Th1 produkovaný IFN- γ naopak tento přesmyk inhibuje. Cytokiny se váží na specifické receptory na B lymfocytech, avšak k izotopovému přesmyku je nutná spolupráce T a B lymfocytů pomocí ligandu CD40 na T lymfocytech a molekule CD40 na B lymfocytech, CD40 pak spolu s IL-4 indukují signál a dochází k tvorbě komplexu NF κ B (nukleární faktor kappa B) a STAT6 (transduktor signálu a aktivátor transkripce 6), který se váže na promotory C ϵ genů. (Šterzl, 2007)

Receptory

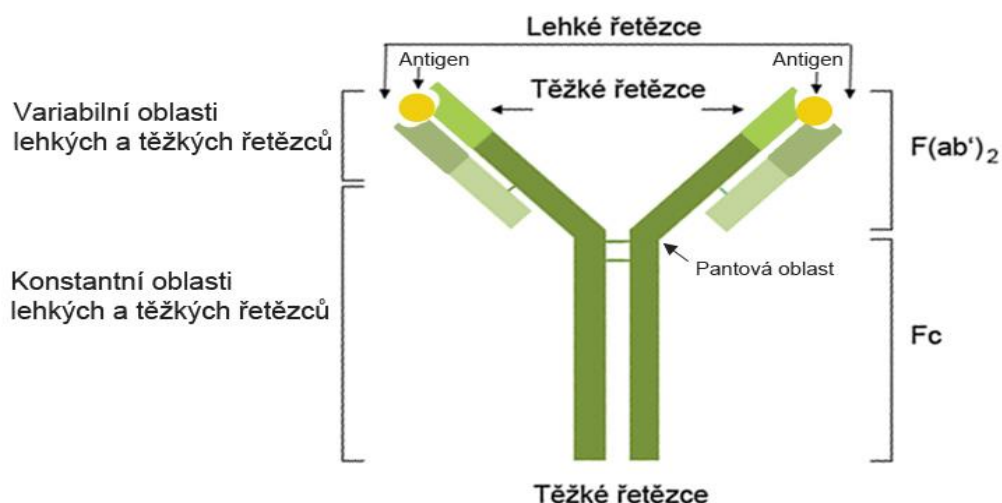
Protilátka IgE a její aktivita je závislá na schopnosti vazby na specifické receptory Fc částí těžkého řetězce. Rozlišujeme dvě třídy Fc ϵ receptorů. (Šterzl, 2007)

Fc ϵ RI je vysokoafinitní receptor, který se nachází na žírných buňkách a bazofilech a méně na trombocytech, eozinofilech a makrofázích. Tomuto receptoru je umožněna vazba na IgE díky jeho vysoké afinitě, i přes jeho nízkou koncentraci v séru. **Fc ϵ RI** se skládá ze čtyř polypeptidových řetězců: alfa, beta a dvou řetězců gama. Větší část řetězce alfa je umístěna extracelulárně, tato část je strukturovaná do domén, které jsou podobné imunoglobulinům. Solubilní fragment alfa řetězce váže molekulu IgE. Řetězce alfa a beta jsou odpovědné za přenos signálu. (Šterzl, 2007)

Fc ϵ RII je nízkoafinitní receptor (CD23), který se vyskytuje na T a B lymfocytech, eozinofilech a trombocytech. CD23 se řadí do rodiny C lektinů, jedná se o integrální

membránový protein, kdy C konec je lokalizován extracelulárně a N konec cytoplazmaticky. Cytoplazmatická část se nachází ve dvou formách jako CD23a a CD23b, které se liší šesti nebo sedmi aminokyselinami na N konci. CD23a se nachází na B lymfocytech a účastní se procesu prezentace antigenů T lymfocytům v komplexu s IgE. Exprese CD23b je zprostředkována IL-4 na buňkách, které se účastní zánětlivých procesů, například lymfoidní buňky, monocyty a dendritické buňky. (Šterzl, 2007)

Obrázek 2: Obecné schéma imunoglobulinu



Zdroj: <https://labguide.cz/protilatky/>

4.3 Alergeny

Alergeny mají většinou glykoproteinovou povahu a jsou schopny vyvolat alergickou odpověď. Komplexní organické sloučeniny vyvolávají převážně odpověď protilátkovou a látky anorganické odpověď buněčnou. Do organismu se dostávají přes kůži, inhalací nebo gastrointestinálním traktem. (Hořejší, a další, 2017) Mezi alergeny řadíme pyly (travin, obilovin, keřů, stromů), plísně, živočišné produkty, živočišnou srst, alergeny pracovního prostředí, léky, hmyz, potraviny apod. (Šterzl, 2007)

4.3.1 Inhalační alergeny

„Pylové alergeny jsou nejčastější příčinou inhalačních alergií a podílejí se zhruba na 10-20 % alergických onemocněních, s největším podílem alergické rhinitidy.“ (Šterzl, 2007) Největší obtíže jsou pozorovány u pylů trav, plevelů a stromů. Pylová zrna se odlišují svojí velikostí, ta se však mohou rozpadat a částičky, které jsou v nich obsažené, mohou působit jako alergeny. (Šterzl, 2007)

Plísně jsou saprofytické organismy, kterým se dobře daří ve vlhkém a teplém prostředí. Vzdušné plísně vnějšího prostředí (*Cladosporium*, *Altterna*) mohou uvolňovat spory do okolí a je u nich prokázána souvislost při rozvoji astmatu. (Šterzl, 2007)

S **živočišnými alergeny** se setkáváme v domácím i pracovním prostředí. Řadíme sem zvířecí srst, epitelie i exkrementy. V našich podmínkách je nejčastějším zvířecím alergenem kočka a poté následuje pes. Tyto alergeny mají vyšší přilnavost k povrchům a dokážou kontaminovat i velmi malé prachové částice. (Šterzl, 2007)

Roztoči jsou z klinického hlediska závažným zdrojem alergenů na celém světě. Jejich alergeny jsou obsaženy hlavně v exkretech a tělních schránkách. Jedním z hlavních alergenů jsou hydrolytické enzymy, které pochází ze zažívacího traktu roztočů. Řadíme sem cysteinové protézy, serinové protézy, amylázy apod. (Šterzl, 2007)

4.3.2 Profesionální alergeny

Patří sem celá řada látek od nízkomolekulárních látek až po látky s vysokou molekulovou hmotností. „*Mezi nízkomolekulární sloučeniny, které vyvolávají IgE odpověď, řadíme kovy a anhydrid kyselin. Mezi ty, které vyvolávají non-IgE odpověď, patří disocyanáty, dřevný prach, aminy, glutaraldehyd, formaldehyd, farmaceutické produkty a další. Mezi profesionální alergeny s vysokou molekulovou hmotností pak řadíme alergeny rostlinné a živočišné povahy, enzymy, proteiny z mořských plodů. Významným profesionálním alergenem je i latex.*“ (Šterzl, 2007)

4.3.3 Potravinové alergeny

Nejhorší antigeny, jsou glykoproteiny rozpustné ve vodě. U potravinových alergenů je třeba rozlišovat termostabilitu, kdy u některých alergenů dochází po tepelné úpravě k denaturaci a ke ztrátě alergenicity. Mezi nejvýznamnější alergeny řadíme kravské mléko zejména v dětském věku, vejce, ořechy, ovoce, zelenin apod. (Bartůňková, a další, 2019) Potraviny mohou obsahovat i alergizující aditiva (barviva, konzervační látky, antioxidanty), v některých potravinách mohou být stopy léků, v rostlinných potravinách stopy pesticidů a jiných alergizujících látek. (Šterzl, 2007)

4.3.4 Léky

Lék jako inzulín je dostatečně velká molekula, aby sama vyvolala imunitní reakci, dochází k rozpoznání antigenu jako cizího a k jeho následnému pohlcení a zpracování antigenem prezentující buňkou. Většina léků a jejich metabolity jsou však malé molekuly, které imunitní systém nedokáže rozpoznat, a tak musí být navázány na makromolekulární nosič, kterým bývá bílkovina, jako hapteny. „*Imunitní odpověď je pak zaměřena na různé*

epitopy, kterými může být přímo lék (haptén), komplex haptén-nosič (neoantigen) nebo nosič samotný (vlastní antigen).“ (Šterzl, 2007) Velká část polékových reakcí nemusí být IgE zprostředkovaná, a tak se komplikuje diagnostika. Nejčastějšími léky, které mohou způsobovat potenciální alergickou reakci, jsou penicilinová antibiotika, lokální anestetika, kontrastní látky atd. V těchto případech většinou dominuje jiná imunopatologická reakce, než je reakce I. typu. (Bartůňková, a další, 2019)

4.3.5 Hmyz

Jed blanokřídlého hmyzu (včela, vos, sršeň, čmelák) obsahuje alergizující látky, které mohou vyvolat IgE zprostředkovanou reakci, někdy i anafylaxi. Složky jedu mají i toxické vlastnosti, které mohou způsobovat degranulaci žírných buněk a bazofilů. Tudíž je nutno posoudit, zda se jedná o výsledek alergické reakce nebo pouze o toxické působení, které bývá nejčastěji při větším počtu žihadel. (Bartůňková, a další, 2019) Můžeme odlišit tři různé typy reakce na hmyzí bodnutí. **Reakce toxická**, zde se jedná o přímé, toxické účinky jedu. **Reakce na IgE nezávislá**, kdy složky jedu působí přímo na mastocyty a bazofily a dochází k aktivaci komplementu. **Alergická reakce zprostředkovaná IgE**, tato reakce se považuje za nejzávažnější a projevuje se jako anafylaktický šok. (Šterzl, 2007)

4.3.6 Využití alergenů

Dnes se využívají k diagnostice a k terapii. Dnes je požadavkem standardizovaný alergen, který by měl splňovat kritéria jako je: čistota a definice výchozí alergenové suroviny, stanovení složení extraktu, určení a zastoupení biologicky aktivních hlavních alergenů, kvantifikaci obsahu a vytvoření referenčních standardů pro zajištění shody jednotlivých výrobních šarží. (Šterzl, 2007)

4.4 Diagnostika alergických onemocnění

Diagnostickým úkolem je přesné stanovení alergenu, který je příčinou potíží. Diagnostika vychází z rodinné a osobní anamnézy a z popisu alergických potíží. Dále se provádí zhodnocení stavu a provedou se kožní testy. Poté se zařídí laboratorní vyšetření a expoziční testy. (Šterzl, 2007)

4.4.1 Anamnéza

U alergických stavů se jedná o nezbytnou součást celkového vyšetření. Alergická reakce se může objevit po opakovaném setkání s velkým množstvím antigenu a při rutinních diagnostických metodách může docházet k falešné pozitivitě či negativitě. V rodinné anamnéze pátráme po dalším výskytu alergických onemocnění, protože

přítomnost alergie u dalších členů rodiny poukazuje na vyšší riziko výskytu alergického onemocnění. V osobní anamnéze musí být důležité údaje ohledně výskytu ekzému, kopřivky, vyrážky, reakce na slunce, hmyzího bodnutí, apod. Požadují se i údaje o kašli a rýmě a jejich trvání, důležité jsou i údaje o charakteru bydlení, přítomnosti zvířat, kouření, o zaměstnání, o užívání všech léků. V praxi se využívají dotazníky, které se zaměřují na problematiku respiračních, kožních a GIT potíží. Dále také obsahují část, která se zabývá bydlením, zaměstnáním a otázkami týkající se způsobu života. U pylových alergií je vhodné vést si pylový kalendář, kde můžeme sledovat souvislost mezi potížemi a počasím, s místem pobytu a léčbou. (Bartůňková, a další, 2011)

4.4.2 Klinický obraz

Projevy alergie mohou způsobit poškození orgánů. Začátek bývá prudký a má bouřlivý průběh, dochází k subjektivním potížím s proměnným charakterem. K alergické reakci může dojít i při velmi malé dávce alergenu a mezi nejčastější projevy v praxi patří alergická rýma, atopický ekzém a bronchiální astma. (Bartůňková, a další, 2011)

Alergická rýma je nejčastější projev alergického onemocnění a rozeznáváme sezónní a celoroční rýmu. Kdy sezónní rýma se vyskytuje u přecitlivělosti na pyly a celoroční při přecitlivělosti na roztoče a zvířecí alergeny. Mezi klinické projevy řadíme vodnatý sekret z nosu, svědění, kýchání a zvýšené slzení očí. U chronické rýmy může dojít až ke ztrátě čichu nebo výskytu dalších onemocnění, např. sekretní otitidy. (Bartůňková, a další, 2011)

Atopický ekzém je druhé nejčastější onemocnění a jeho výskyt stále roste. Původ atopického ekzému je různý a příčinou je přecitlivělost na potravinové či inhalační alergeny. Hlavními projevy je svědění, zhrubění kůže, erytém, zarudnutí atd. (Bartůňková, a další, 2011)

Bronchiální astma je chronické zánětlivé onemocnění DC, kterého se účastní eozinofilní granulocyty a mastocyty a méně také bazofilní a neutrofilní granulocyty. Zánět zvyšuje hyperreaktivitu průdušek, čímž dochází k bronchiální obstrukci. Klinickými projevy jsou dušnost, kašel, sípavé dýchání a tíže na hrudi a mezi spouštěcí mechanismy patří virové infekce, alergeny, kouř atd. (Bartůňková, a další, 2011)

4.4.3 Kožní testy

Kožní testy se používají ke zjištění přítomnosti mastocytů v kůži, které jsou senzibilizované vůči alergenu, který testujeme. Pokud testovaný alergen nalezneme specifické

IgE protilátky, které jsou navázané na mastocytech, dojde k jeho aktivaci a následné degranulaci. Histamin, uvolněný z granul, má vazoaktivní účinky a to vede k tvorbě otoku, zarudnutí a svědění. Takto vypadá pozitivní reakce na přítomnost alergenů, kterou hodnotíme po 5 - 20 minutách, kdy se jedná o časnou reakci, popřípadě druhý den, kdy jde o pozdní reakci.

Nejpoužívanějším kožním testem je **prick test**, který se provádí na vnitřní straně předloktí nebo na zádech. Provedení se dělá pomocí speciálních lancet, které mají asi 1 mm dlouhé ostří. Alergen se nanese na očištěnou kůži ve formě kapky a pomocí lancety se provede kolmý vpich do kůže středem kapky alergenů. Dojde k narušení povrchové vrstvy kůže, ale nedochází k nežádoucímu krvácení, takže dojde k průniku alergenů do místa reakce. Je potřeba, aby diagnostické alergeny měly požadovanou koncentraci a kvalitu a je vhodné dodržovat vzdálenost přibližně 5 cm mezi jednotlivými aplikovanými testy. (Bartůňková, a další, 2011)

Méně často se také používají **intradermální testy**, které jsou citlivější, ale je vyšší riziko nežádoucích reakcí a falešné positivity. Tento test se stejně jako prick test provádí na vnitřní straně předloktí nebo na zádech a používají se intradermální jehly a injekční stříkačky, které jsou vhodně nakalibrované. Intradermální injekcí se aplikuje 0,02 - 0,05 ml standardizovaného extraktu, kde je ředění 10x vyšší než u alergenů pro prick testy. Falešnou negativitu může způsobit příliš hluboká aplikace nebo arteficiální krvácení. Falešná pozitivita bývá způsobena podáním vyššího objemu testovaného alergenů. Vzdálenost mezi jednotlivými testy by měla být 6 cm. (Bartůňková, a další, 2011)

U obou testů se musí provést negativní (ředící roztok) a pozitivní (histamin) kontrola. U intradermálních testů se jako pozitivní hodnotí vytvořený pupen o minimálním průměru 5 mm. U prick testů se jako pozitivní hodnotí pupen o velikosti 2 - 3 mm. Pokud dojde k pozitivní reakci u negativní kontroly, tak nejspíše došlo k chybně provedenému testu. A pokud dojde k negativitě u pozitivní kontroly, značí nám to celkové onemocnění nebo nedovolenou farmakoterapii. (Bartůňková, a další, 2011)

Před provedením těchto testů by mělo dojít k zajištění základního vyšetření, i přesto, že metoda je relativně bezpečná. Avšak stále zde hrozí riziko systémové reakce, a tak je třeba mít připravený adrenalin. (Bartůňková, a další, 2011)

I přesto, že jsou kožní testy diagnostickým přínosem, jejich výsledky nejsou zcela spolehlivé. Tudíž *in vitro* vyšetření je nezbytnou součástí celkového vyšetření. (Bartůňková, a další, 2011)

4.4.4 Stanovení koncentrace protilátek IgE

Je potvrzeno, že celková koncentrace IgE úzce souvisí s alergickým onemocněním. Specifita je téměř 90 % a senzitivita 30 – 40 %. U dospělého člověka bývá fyziologická hodnota IgE 50 - 150 IU/ml. Přesto koncentrace celkové hladiny IgE v séru není dostatečným ukazatelem v určení přítomnosti alergie, protože zvýšenou koncentraci IgE nacházíme například i u alergické bronchopulmonální aspergilózy, nosních polypů, AIDS, myelomu, atd. Z nízké senzitivity vyšetření vyplývá, že spousta alergiků nemusí mít zvýšenou hladinu IgE v séru a naopak, normální celková koncentrace IgE nevylučuje přítomnost alergického onemocnění. Měříme hladinu IgE v séru a protilátky, které jsou navázané v tkáních, nejsou zachyceny. (Bartůňková, a další, 2011)

4.4.5 Expoziční testy

Tato metoda se využívá u pacientů s alergií na potraviny. Je velice spolehlivá a vylučuje falešné stanovení. Pro pacienta je však vyšetření rizikem, a proto se provádí pouze ve zdravotnických zařízeních. Pacientovi se podává želatinová kapsle s určitým množstvím podezřelé potraviny a stejné množství placebo (např. cukr). Pacient ani personál neví, ve které kapsli je podezřelá potravinu a ve které placebo. Hodnotí se klinická reakce a kontroluje se dýchání. (Bartůňková, a další, 2011)

4.5 Léčba alergických onemocnění

Anihistaminika jsou jedním z prvních léků používaných v léčbě alergií. Jedná se o blokátory H1 receptorů pro histamin. Histamin se po jejich podání sice vyplaví z žírné buňky, ale jeho receptor je na ostatních buňkách zablokovan a tak nemůže působit na tkáň. Antihistaminika jsou v podobě tablet nebo roztoků a podávají se perorálně nebo v injekční podobě, v podobě kapek do nosu či očí. (Bartůňková, a další, 2019)

Protilátky proti lidským alergickým protilátkám IgE

Mezi nejnovější léky na alergické astma patří uměle vyrobené protilátky proti lidským alergickým protilátkám IgE. Tlumí alergický zánět blokováním jejich funkce. Tyto léky mají nežádoucí vedlejší účinky, a tak se používají jen při těžkých alergických astmatech. Podávají se injekčně každé 2 - 4 týdny. (Bartůňková, a další, 2019)

Kortikoidy jsou jedny z nejsilnějších léků na alergii a také mají nejvíce nežádoucích účinků. Jedná se o uměle vyrobené hormony kůry nadledvin, potlačující imunitní odpověď. Jejich podání musí být cílené na postiženou tkáň, protože ovlivnění celého organismu je nežádoucí. Podávají se v podobě kapek do nosu a očí, tablet a injekcí. Mezi jejich vedlejší

nežádoucí účinky patří například odvápnění kostí, obezita, rozvoj cukrovky, zpomalení růstu u dětí atd. (Bartůňková, a další, 2019)

Autovakcíny

Jedná se o desenzibilizaci, která se dnes nazývá alergenová vakcinace. Pacient dostává pravidelné vakcíny vyrobené ze svého séra. Vakcíny obsahují alergen, jehož množství se postupně v podávaných vakcínách zvyšuje a organismus si tak na alergen postupně zvyká. (Bartůňková, a další, 2019)

5 PŘÍPRAVA A SEPARACE

5.1 Metody separace buněk

Ve výzkumu je často třeba vybrat a separovat určitý druh buňky, například z krve nebo z buněčné kultury. K tomu se využívají různé postupy, které jsou založeny na molekulárně biologických nebo mikroskopických metodách. Buňky, které izolujeme, poté dále využíváme k analýze, ke kultivaci nebo se mohou použít k transplantaci.

Abychom odlišili jednotlivé typy buněk, je třeba znát jejich charakteristické specifické znaky. Těmito znaky mohou být membránové struktury, které můžeme detekovat. Mezi takovéto struktury patří například membránové proteiny nebo specifické proteiny uvnitř buňky, jako jsou transkripční faktory a jaderné receptory. Podle toho jakou zvolíme specifikaci buněk, volíme i metodu jejich separace.

Před každou metodou je třeba zajistit, aby byla rozpoznatelná specifická struktura buňky. K tomu se nejčastěji používají protilátky, které jsou nějak značené. Mohou na svém konci nést fluorochrom a v tomto případě použijeme separaci založenou na detekci fluorescence.

Při separaci buněk se snažíme o maximální výtěžek při maximální čistotě. To znamená, abychom obdrželi co největší počet buněk, které potřebujeme získat, s co nejmenší možnou kontaminací jinými buňkami. (OrganoNET, 2020)

5.1.1 Hustotní gradient

Nenáročná metoda, která využívá morfologii buněk, a to jejich hustotu. Erytrocyty a granulocyty mají vyšší hustotu než monocyty a lymfocyty. Používá se periferní krev nebo kostní dřev, kdy se navrství na hustotní gradient (Ficoll, Histopaque) a provede se centrifugace. Výsledkem je oddělená směs lymfocytů a monocytů, které se zachytí na hladině a granulocyty a erytrocyty se usazují na dně zkumavky. (Penka, a další, 2011) Úskalím metody je po celou dobu práce dodržovat sterilní podmínky. Pro maximální zisk buněk je třeba pečlivě sebrat prstenec na rozhraní mezi Ficoll a sérem, který obsahuje mononukleární buňky. Pro centrifugaci je optimální teplota 18 - 20 °C, vyšší teplota může zpomalit životaschopnost buněk a při nižších teplotách může dojít ke snížení úspěšnosti separace, protože je třeba delší centrifugace. Výhodou je jednoduchost provedení a finanční nenáročnost metody. Buňky po centrifugaci zůstávají zcela funkční. (Bartůňková, a další, 2011)

5.1.2 Separace pomocí paramagnetických částic

Využívá se pro izolaci specifických buněk, buněčných komponent nebo k odstranění toxických látek. (Penka, a další, 2011)

Principem je využívání značení specifických povrchových znaků buněk pomocí monoklonální protilátky s paramagnetickou částicí. (Penka, a další, 2011) Separace může být pozitivní či negativní. Kdy u pozitivní selekce se buňky naváží na povrch paramagnetických částic se specifickou protilátkou, poté suspenze buněk projde magnetickou kolonou a paramagnetické částice s navázanými buňkami zůstávají zachyceny uvnitř kolony, zatímco zbytek buněk projde kolonou. V případě pozitivní selekce nám tedy jde o buňky, které zůstávají zachyceny uvnitř kolony pomocí specifických protilátek. Naopak pokud chceme frakci buněk, která kolonou prochází bez navázání na povrch paramagnetických částic, jedná se o negativní selekci. (Dušková, 2010)

Při této separaci se jako paramagnetické částice nejčastěji používají magnetické kuličky, které na sobě mají protilátku proti specifickému antigenu. Jako magnetický separátor se využívá silný permanentní magnet na bázi kovů vzácných zemin. (OrganoNET, 2020)

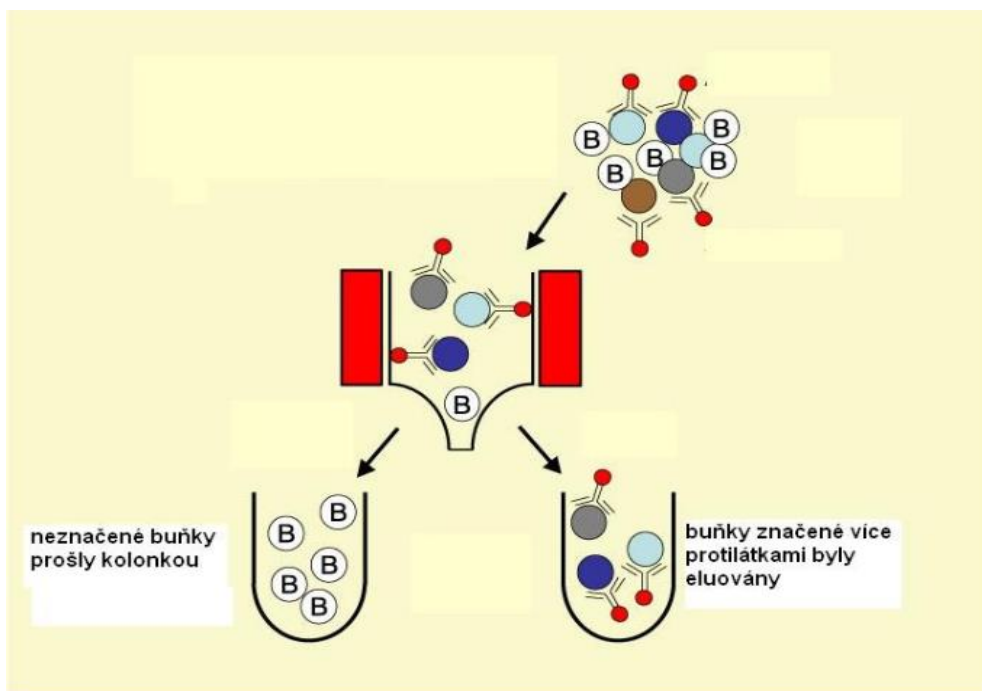
Výhodou této metody je, že může být využita pro jakýkoliv typ buněk, pokud známe jejich specifické povrchové znaky. Metoda je jednoduchá a rychlá. (OrganoNET, 2020)

Magneticky aktivované třídění buněk (MACS)

Je separační technika, kterou vyvinula firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, kdy se využívá průchodu značených buněk magnetickou kolonou. Po vazbě buněk na magnetické kuličky se směs přenesení do magnetické kolony a přes tu proteče pouze frakce neznačených buněk. Značené buňky zůstávají zachycené a mohou být promyty z kolony (obr. 3). MACS mikrokuličky jsou velice malé (50 nm), nemění strukturu, funkci ani aktivitu buněk a tak není třeba je po proběhlé separaci odstraňovat z izolovaných buněk. (OrganoNET, 2020)

Značení probíhá ve dvou krocích. Nejdříve se buňky značí specifickou protilátkou namířenou proti antigenu na povrchu buněk a poté se značí MACS mikrokuličkami, které se váží na specifickou protilátku. (OrganoNET, 2020)

Obrázek 3: Negativní selekce pomocí MACS



Zdroj: http://organonet.med.muni.cz/media/62509/vy_03.pdf

6 KULTIVACE

Kultivace buněk probíhá *in vitro*, v překladu z latiny tedy „ve skle“. Tato metoda se používá v biologii, medicíně a dalších oborech. Je založena na pěstování buněčných či tkáňových kultur, které jsou mimo organismus, ale které z něho pochází.

Aby kultivace proběhla úspěšně, musí se odebraná tkáň či buňky ihned přenést do živného média. Médium ve svém složení obsahuje takové chemické a fyzikální vlastnosti, aby se co nejlépe přiblížilo přirozenému prostředí organismu. Musí se kontrolovat koncentrace organických živin, solí, hodnota pH, teplota atd. Důraz se musí klást i na sterilitu prostředí a používaných nástrojů, aby nedošlo ke kontaminaci kultury. (Brno, 2020)

6.1 Kultivační média

Buňkám poskytuje optimální prostředí a slouží jako zdroj živin pro udržení jejich životaschopnosti a pro jejich růst. Média obsahují předem určené množství solí, glukózy, aminokyselin, vitaminů, transferinu, specifických růstových faktorů a bovinního fetálního séra. Do média se také mohou přidávat antibiotika jako prevence bakteriální kontaminace. Většina buněk dobře roste při pH 7,4. Při poklesu nebo vzestupu pH buňky ztrácí životaschopnost, proto se jako indikátor pH přidává fenolová červeň. Kdy při pH 7,4 je médium zbarveno do červena, při poklesnutí pH se barva mění na žlutou a to značí výměnu média za nové. (OrganoNET, 2020)

6.1.1 Druhy médií

RPMI1640

Toto médium bylo vyvinuto George E. Moorem, Robertem E. Gernerem a H. Addisonem Franklinem v roce 1966 v Roswell Park Memorial institutu. Toto médium se vyznačuje obsahem redukčního činidla glutationu a vysoké koncentrace vitaminů. Dále obsahuje biotin, glukózu, sole, aminokyseliny, vitamin B12. Vitamin inositol a cholin jsou přítomny ve velmi vysokých koncentracích. Neobsahuje žádné proteiny, lipidy ani růstové faktory, proto je vyžadována suplementace obvykle 10% fetálním bovinním sérem. V RPMI 1640 médiu se využívá systému bikarbonátového pufru a poskytuje tedy prostředí s 5 - 10 % CO₂ k zajištění optimálního pH.

Používá se pro růst lidských lymfoidních buněk a od ostatních kultivačních médií pro savčí buněčné linie se liší svým pH, které je zde 8. RPMI 1640 je doplněné sérem, a to

umožňuje kultivaci mnoha typů buněk, zejména lidských T a B lymfocytů, buněk kostní dřeně a hybridomových buněk. (P-LAB, 2020)

MEM

Minimální esenciální médium vyvinul Harry Eagle. Je k dispozici s Earlovými solemi pro použití v CO₂ inkubátoru nebo s Hanksovými solemi pro použití bez CO₂. Tento produkt se vyrábí s Earlovými solemi. MEM neobsahuje žádné proteiny, lipidy ani růstové faktory. Proto vyžaduje suplementaci obvykle 10% fetálním bovinním sérem. V MEM médiu se využívá systému bikarbonátového pufru a poskytuje tedy prostředí s 5 - 10 % CO₂ k zajištění optimálního pH. (P-LAB, 2020)

Minimální esenciální médium má široké využití pro savčí buňky. Obsahuje Earlovy soli, velkou koncentraci aminokyselin, které jsou svým proteinovým složením podobné lidským buňkám. Dále obsahuje vysokou koncentraci vitaminů a další nezbytné živiny, které umožňují delší kultivační období. Toto médium je vhodné pro kultivaci širokého spektra savčích buněčných linií a primárních buněk. (P-LAB, 2020)

6.2 Kultivační podmínky

Aby buňky byly schopné přežít *in vitro*, je nutné jim zajistit vhodné kultivační podmínky. Mezi důležité podmínky patří složení kultivačního média, povrch kultivační nádoby a další vlastnosti prostředí. Většina buněk je adherentních, to znamená, že rostou na kultivačním povrchu. Nejčastěji se používají polystyrenové nádoby, kde se povrch upravuje, aby byl hydrofilní.

Buňky se kultivují většinou při 37 °C, kdy se jedná o teplotu blízkou tělesné teplotě. V termostatu se atmosféra obohacuje o CO₂ a to většinou s obsahem 5 % CO₂. Zvýšená koncentrace napomáhá udržet optimální pH médií. Musí se také udržovat relativní vlhkost atmosféry, a to okolo 90 %, aby nedocházelo k odpařování vody z kultivačního média a ke změně koncentrace jeho složek.

Existují speciální inkubátory, kde se buňky kultivují a mohou zajistit všechny uvedené parametry. Regulují teplotu a musí být vybaveny i pro řízení koncentrace CO₂. Také je nutné, aby nedošlo ke kontaminaci kultur bakteriemi, protože uvedené podmínky jsou optimální i pro jejich růst. Inkubátory tedy musí být snadné na čištění, dezinfekci a sterilizaci, některé jeho součásti bývají vyrobeny z materiálů, které růstu bakterií brání a také mohou být vybaveny ultrafialovým zářičem, které snižují riziko kontaminace. (Vejražka, 2019)

7 METODY STANOVENÍ BAZOFILNÍCH GRANULOCYTŮ

7.1 Průtoková cytometrie

Jedná se o molekulárně biologickou metodu, která umožňuje měření a analýzu fyzikálních a chemických vlastností buňky při průchodu laserem. Při dopadu laserového paprsku na buňku, dochází k jeho rozptylu a lomu. Podle směru a úhlu lomu se označuje jako přímý rozptyl – forward scatter (FSC) a boční rozptyl – side scatter (SSC). FSC nám udává informaci o velikosti buňky a SSC o vnitřní buněčné struktuře, tj. granularitě buňky. Zároveň se detekuje fluorescence procházející buňkami, kdy fluorochromy, značené monoklonálními protilátkami, jsou navázané na detekované buňce a ty absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a poté vyzařují část tohoto absorbovaného světla, ale o jiné vlnové délce.

Analyzátoary se nazývají průtokové cytometry a skládají se z fluidního, optického a elektronického systému. (ČR, 2016)

Fluidika

Pro analýzu je nutné, aby se buňky nacházely ve formě suspenze, protože musí plynule procházet systémem jedna za druhou. Suspenze se dávkuje do zkumavky, ze které vychází kapilára. Laminárním prouděním se z kapiláry strhávají jednotlivé buňky, a aby měřicím bodem prošla pouze jedna částice, je zajištěno hydrodynamickou fokusací. (MEFANET, 2020)

Optika

Se skládá z části excitační, která je tvořena laserem, soustavou čoček a hranolů a sběrné části. Tato část se skládá z optických zrcadel a filtrů, které umožňují detekci světelných kvant specifické vlnové délky.

Jako zdroj monochromatického záření se nejčastěji používají lasery. Průtokové cytometry bývají dvoulaserové nebo třílaserové. Nejčastějším laserem je vzduchem chlazený argonový laser, helium-neonový laser, fialový laser a UV laser. Každý z těchto laserů se liší svojí vlnovou délkou.

Zrcadla a filtry rozdělují emitované fotony podle vlnové délky na příslušné detektory. Používají se různé druhy filtrů, a to long pass filtry, short pass filtry, pásmové a dichroické filtry. (MEFANET, 2020)

Elektronika

Převádí optické signály na elektrické impulsy a ty jsou pak zpracovány počítačovým programem. Výsledek je vyjádřen graficky a to v podobě jednoparametrového histogramu, kde na osu X se vynáší intenzita signálu a na osu Y množství buněk nebo dvouparametrových dot plotů. Ty se používají častěji a na ose X je zobrazena intenzita signálu a na ose Y intenzita druhého signálu. Každá událost je zobrazena jako tečka a množství částic je dáno hustotou bodů. (MEFANET, 2020)

V cytometrii se také vyskytuje proces gatování, ten využíváme v případě, kdy nás zajímá pouze určitá populace buněk, kterou chceme dále analyzovat a vytvoří se pro ni dot plot histogram, kde se na obě osy vynesou parametry, které je třeba zkoumat. Můžeme pozorovat přímý rozptyl (FSC), boční rozptyl (SSC) a fluorescenci. Vytvořený dot plot histogram se rozděluje na kvadranty, v jednotlivých kvadrantech můžeme kvantifikovat množství buněk.

Využití průtokové cytometrie zasahuje do všech odvětví klinické praxe, ale největší uplatnění nachází v klinické imunologii, hematologii, nádorové biologii a molekulární biologii. V klinické imunologii slouží k imunofenotypizaci lymfocytů, k aktivaci jednotlivých subpopulací T lymfocytů, testování alergií, detekce autoantilát, HLA typizace, apod. (Roubalová, 2017)

7.2 Aktivační test bazofilních granulocytů

Při tomto vyšetření se sledují znaky, které se objevují po inkubaci bazofilních granulocytů s alergenem. Znaky se značí monoklonálními protilátkami a ty jsou detekovány pomocí průtokové cytometrie. Nejčastějšími znaky na bazofilních granulocytech jsou CD63 a CD203c. Vyšetřením získáme informaci o procentu aktivovaných bazofilních granulocytů. Vyšetření se provádí z plné krve, jako protisrážlivé činidlo se používá heparin. Plná krev se inkubuje s alergenem a současně se inkubuje i negativní a pozitivní kontrola. Do negativní kontroly se místo alergenu přidává ředící roztok a do pozitivní kontroly látka, která způsobuje aktivaci co největšího počtu bazofilních granulocytů.

Metoda BAT má vyšší senzitivitu než vyšetření specifických IgE a má i vysokou specifitu. Uplatňuje se v případech, kdy klinické vyšetření a základní laboratorní vyšetření jsou nedostatečné k určení diagnózy. Také se využívá při diagnostické nejasnosti u alergie na hmyz, na léky a na latex. (Honzová, 2009)

7.3 Distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP cytometrie)

2DEP cytometrie může být do budoucna alternativou průtokové cytometrie, zpracovává informace o heterogenitě populace, objemu buněk i expresi povrchových znaků a pracuje s mikrofluidními čipy, které nám rozšiřují možnosti v poznávání a manipulování s buňkami. Na rozdíl od průtokové cytometrie nevyžaduje k rozpoznání buněk značení pomocí protilátek a snižuje tak provozní náklady.

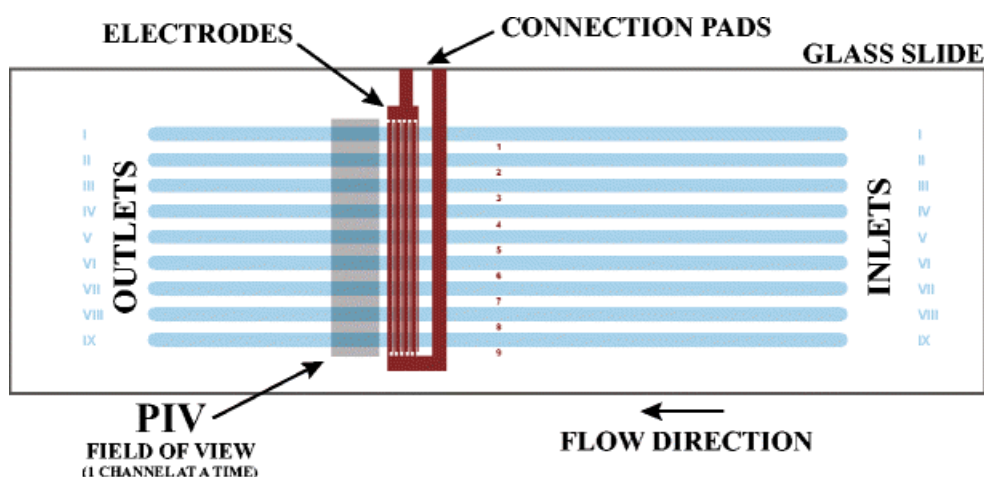
Tato metoda probíhá na mikrofluidním čipu a k měření buněk využívá elektrické pole. Výsledkem 2DEP cytometrie jsou dielektrické podpisy buněk, které mohou být prospěšné k identifikaci biomarkerů. Lze měřit různé fyziologické procesy buněk, lékové rezistence, apoptózu, atd. Není potřeba žádné značení ani barvení buněk. (Fikar, 2016)

7.3.1 Popis čipu

Mikrofluidní čip se skládá ze tří vrstev. První část je tvořena skleněnou podložkou, která tvoří dno kanálu. Druhou částí jsou interdigitální elektrody, které tvoří elektrické pole uvnitř kanálu. Třetí vrstva je tvořena PDMS (polydimethylsiloxan), jedná se o křemíkový polymer, který je netoxický, stabilní, nepodporuje adhezi buněk a je průhledný.

Celková velikost čipu je 20 x 12 mm, šířka kanálu je 1 mm a vysoký je 75 μm . Sestava elektrod jde zprava doleva a na horním okraji jsou umístěny dvě kovové destičky, které umožňují připojení k sadě interdigitálních elektrod. (Fikar, 2016)

Obrázek 4: Schéma čipu



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

7.3.2 Měření na 2DEP cytometrii

Ke generátoru elektrického pole jsou připojeny interdigitální elektrody. Elektrické pole, které vytváří generátor, ovlivňuje chování buněk v kanálu během měření. Je možno vystřídat 20 rozdílných frekvencí a pozorovat reakci buněk. Pumpa, která je připojená ke konci kanálu, zajišťuje plynulý průchod buněk. Pomocí ní je tedy možno regulovat rychlost průtoku buněk kanálem. Částicová velocimetrie (PIV) slouží k detekci pohybu buněk a to tak, že pořizuje dva snímky v krátkém časovém intervalu, který je předem definovaný.

CCD Záznamová kamera spolu s inverzním mikroskopem snímá proudící buňky v kanálu těsně za elektrodami. Snímky se poté přenáší do počítače a buňky, které jsou vyfoceny, se po dvou po sobě jdoucích snímcích rozpoznávají a párují pomocí softwaru. Z dráhy a časové prodlevy mezi snímky se poté vypočítá rychlost buňky. Tento proces trvá pouze několik milisekund, proto měření probíhá skoro v reálném čase a je možné takto zachytit přes 5 tisíc buněk za minutu. (Fikar, 2016)

PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je porovnat výsledky získané měřením na průtokovém cytometru v elektrickém poli (2DEP) s výsledky získanými pomocí testu aktivace bazofilních granulocytů. Metody budou porovnány na základě výsledků zjištěných z měření aktivační křivky bazofilů se zaměřením na výsledky AUC (plocha pod křivkou) a CD sense. U metody 2DEP budou zjišťovány pomocí DE podpisů buněk. Obě metody porovnávají výsledky mezi alergickými a nealergickými pacienty.

9 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Výzkumná otázka č. 1: Lze detekovat změny z aktivace bazofilních granulocytů u alergických pacientů na pyl břízy pomocí 2DEP?

Výzkumná otázka č. 2: Lze detekovat změny z aktivace bazofilních granulocytů u alergických pacientů na pyl břízy pomocí průtokové cytometrie?

Výzkumná otázka č. 3: Jaká je shoda mezi měřením aktivace bazofilních granulocytů pomocí 2DEP a průtokové cytometrie?

Výzkumná otázka č. 4: Jaký je rozdíl mezi alergickými pacienty a skupinou negativních kontrol při měření na průtokovém cytometru?

Výzkumná otázka č. 5: Jaký je rozdíl mezi alergickými pacienty a skupinou negativních kontrol při měření na 2DEP?

10 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Výzkum celkově probíhal na 20 vzorcích plné krve. Plná krev byla odebrána do zkumavky s heparinem. Ze vzorku plné krve jsme separovali čistou populaci bazofilních granulocytů, která byla použita pro měření aktivace bazofilních granulocytů v 2DEP a část plné krve byla použita pro měření aktivace bazofilů pomocí průtokové cytometrie. Ze skupiny 20 vzorků bylo 10 pacientů pozitivních a 10 negativních. Pro stanovení bylo použito pouze 6 pozitivních pacientů a 4 negativní kontroly kvůli zavedení nové metody – 2DEP cytometr. Před samotným výzkumem byly všechny vzorky vyšetřeny na přítomnost specifického IgE vůči alergenů břízy.

11 METODIKA PRÁCE

11.1 Měření specifických IgE

Princip

Imunoanalýza je založena na chemiluminiscenční detekci, která je dvoukroková a probíhá na pevné fázi. Pevná fáze je zde ve formě kuličky a kapalná fáze je směs alergenů či alergenů, které se váží na matrici polymeru, která je značena ligandem. Pevná fáze je potažena antiligandem.

V první fázi se vzorek pacienta a alergen, který je značený ligandem inkubují 30 minut s kuličkou, která je potažena antiligandem. Dochází k navázání specifických IgE protilátek na alergen, který se naváže na antiligand na kuličce. Přebytek se odstraní promytím.

Ve druhé fázi se ke vzorku přidává enzym, nejčastěji alkalická fosfatáza. Ta je konjugovaná monoklonální myší protilátkou proti lidskému IgE a znovu probíhá inkubace po dobu 30 minut. Alkalická fosfatáza se naváže na IgE a přebytek se opět odstraní promytím.

Nakonec se do vzorku přidává substrát, který je díky přítomnosti alkalické fosfatázy defosforylován. Vzniká produkt, který je nestabilní a dochází k jeho rozpadu, za současného vyzáření fotonu. Množství vyzářených fotonů je přímo úměrné množství enzymu navázaného na kuličce a je detekováno luminometrem.

Biologický materiál

Sérum ze srážlivé plné krve

Reagencie

- **Diagnostická souprava 3gAllergy™ Specific IgE Universal Kit (Siemens, UK)**
 - specifické IgE zásobník s kuličkami, specifické IgE reagencie, specifické IgE kalibrátory = adjustory, specifické IgE protilátka proti kalibrátoru, specifické IgE (SPE) kontroly z univerzální soupravy, specifické IgE protilátka proti kontrole, specifické alergenů 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 práce

Před zahájením analýzy je potřeba provést denní údržbu přístroje a zkontrolovat, jestli je dostatek všech reagensů a spotřebního materiálu. Poté se provádí měření kontrolního materiálu, který by měl vyjít v referenčním rozmezí, které je dáno výrobcem. Dále následuje vlastní analýza vzorku, kdy se do stojánku vloží zkumavka s patientským sérem. Ta je označena barcodem, který obsahuje informace o údajích pacienta a také o stanovení, které má být provedeno. Je třeba kontrolovat, jestli je v analyzátoru dostatek alergenu, který má být na stanovení použit, popřípadě se doplní nový. Po analýze je získán výsledek o pozitivitě nebo negativitě specifických IgE pacienta.

11.2 Separace a kultivace bazofilních granulocytů

Princip

Lidské bazofilní granulocyty jsou separovány pomocí negativní selekce, kdy ostatní leukocyty jsou magneticky značeny pomocí směsi biotinem konjugovaných myších protilátek. Dále se leukocyty značí anti-biotinovými monoklonálními protilátkami, které jsou konjugované s magnetickými kuličkami. Mezi těmito kroky není potřeba žádné promývání. Magneticky značené leukocyty jsou zadrženy na koloně v magnetickém poli a neznačené bazofilní granulocyty procházejí kolonou.

Biologický materiál

Plná krev odebraná do zkumavky s heparinem

Pomůcky

- zkumavky (V=15ml, 50ml)
- Pausterovy pipety
- pipety (V=10 µl, 50 µl, 1000 µl)
- Magnetické LS kolony a magnetický stojan (Miltenyi Biotec Inc., USA)

Reagencie

- Ficoll-Paque (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 (MilliporeSigma, USA)

Přístroje a analyzátory

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

Postup práce

Do 15ml zkumavky jsme pomocí Pausterovy pipety přenesli 5 ml Ficoll-Paque. Do 50ml zkumavky jsme vylili obsah krve ze všech odebraných zkumavek s heparinem, obsah jsme poté naředili 1:1 pomocí RPMI kultivačního média a promíchali. Separační roztok (Ficoll-Paque) jsme poté pomocí Pausterovy pipety pomalu převrstvovali takto naředěnou krví. Zkumavky jsme dali centrifugovat na 750 g na 20 minut. Po centrifugaci se ve zkumavce nad peletem objevil jemný bílý „obláček“, který jsme odebrali a přendali do čisté 15ml zkumavky a doplnili RPMI médiem po okraj. Po promíchání jsme zkumavky dali opět centrifugovat na 500 g na 3 minuty. Poté jsme médium slili a ve zbytku resuspendovali pelet. K leukocytům jsme přidali 10 μ l FcR Blocking Reagent a 10 μ l Basophil Biotin-antibody Cocktail. Vše jsme promíchali a dali inkubovat na 10 minut do lednice při 2 – 8 °C. Po inkubaci jsme přidali 30 μ l RPMI média a 20 μ l Anti-biotin Microbeads, promíchali a dali inkubovat na 15 minut do lednice. Následně jsme přidali 1 ml RPMI média a centrifugovali na 620 g na 10 minut, poté jsme odsáli celý supernatant a přidali 500 μ l RPMI. Nakonec jsme si připravili magnetickou kolonu tak, že jsme ji navlhčili RPMI médiem a nechali médium odtéct do jiné zkumavky. Poté jsme zkumavku vyměnili za čistou, umístili ji pod kolonu a do kolony nalili připravenou suspenzi buněk. Kolonu jsme poté ještě 3x naplnili po 1 ml RPMI a promyli ji pro získání co nejvíce bazofilních granulocytů. Nakonec jsme do separovaných bazofilních granulocytů přidali 40 μ l Interleukinu – 3 pro lepší kultivaci a přežití buněk.

11.3 Měření na průtokovém cytometru - BAT

Princip

Pomocí senzibilujícího alergenu je vyvolána aktivace bazofilů a následně se měří expozice jejich aktivačního znaku, který je na povrchu, pomocí monoklonální protilátky. Měření probíhá na průtokovém cytometru.

Molekuly IgE, které jsou přítomny ve vzorku, jsou navázány na povrchu bazofilů pomocí vysokoafinitního receptoru FcεRI. Pokud je molekul IgE dostatek, dochází k překlenutí receptorů pomocí přidaného alergenu, to vede k plné aktivaci bazofilů a k následnému vylití obsahu granul. Degranulací také dochází k expozici transmembránového proteinu – CD63 na povrch. Tento znak je poté detekován pomocí monoklonální protilátky anti-CD63, která je konjugovaná s fluorescenčním barvivem (FITC). Bazofily jsou ve směsi leukocytů identifikovány monoklonální protilátkou anti-CD203c. Používá se zde pozitivní kontrola, kde jsou bazofily aktivované monoklonální protilátkou anti-IgE, která způsobuje aktivaci co největšího počtu bazofilů. Do negativní kontroly se místo alergenu přidá pouze ředící roztok.

Biologický materiál

Plná krev odebraná do zkumavky s heparinem

Pomůcky

- zkumavky (V=5 ml)
- pipety (V= 10 µl, 100 µl, 500 µl)

Reagencie

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

Přístroje a analyzátory

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

Postup práce

Pro každý vzorek jsme připravili pozitivní a negativní kontrolu a potřebný počet zkumavek, které jsou stimulovány alergenem, který chceme stanovit. Mohou se použít i

různé komerčně vyráběné alergeny. Vzorky jsme připravili podle následujícího postupu. Do zkuševky, která byla určena pro alergenem stimulovaný vzorek jsme napipetovali 10 µl alergenu. Do negativní kontroly jsme nenapipetovali nic a do pozitivní kontroly jsme napipetovali 10 µl Stimulation Control (rekonstituovaný stimulantu). Do všech zkumavek jsme napipetovali 100 µl Stimulation Buffer (rekonstituovaný stimulační pufr), poté jsme do všech zkumavek přidali 100 µl krve a promíchali je na vortexu. Vše jsme dali inkubovat při teplotě 37 °C na 25 minut do termostatu. Dále jsme do všech zkumavek napipetovali 20 µl Staining Reagent (koktejl protilátek) a obsah jsme opět promíchali pomocí vortexu a inkubovali 20 minut v lednici při 2 – 8 °C. Poté jsme přidali 300 µl Lysing Solution (lyzační roztok) a opět promíchali na vortexu a inkubovali 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme přidali 3 ml demineralizované vody, promíchali a inkubovali 5 – 10 minut při laboratorní teplotě, dokud nedošlo k lýze erytrocytů. Následně jsme vzorky centrifugovali po dobu 5 minut na 300 g. Po centrifugaci jsme odstranili supernatant a sediment jsme resuspendovali v 0,4 ml pufru PBS. Vzorky jsme následně změřili na průtokovém cytometru a vyhodnotili je.

11.4 Měření na 2DEP cytometru

Princip

Principem této metody je postupné ustálení výšky a sedimentace buněk plujících v kanálu. Výška levitace buňky závisí na objemu buňky, struktuře povrchu a poměru iontů v cytoplazmě a ta má vliv na rychlost buňky. Částicová velocimetrie (PIV) zachycuje rychlost těchto plujících buněk a ta se softwarově přepočítává na výšku levitace ode dna kanálu.

Měření začíná po ustálení toku, kdy nejsou přítomny vlivy elektrického pole. Poté následuje měření s vlivem elektrického pole, které ovlivňuje výšku levitace buněk. Na buňky působí negativní dielektroforetické síly, které odpuzují buňky ode dna kanálu a pozitivní dielektroforetické síly, které působí ve prospěch sedimentace. Rozložení buněk se porovnává s referenční částí měření bez vlivu elektrického pole a rozdíly se vynášejí do grafu. Výsledný graf se nazývá dielektroforetický podpis buňky.

Biologický materiál

Čistá buněčná kultura bazofilních granulocytů

Pomůcky

- pipety (V=20 μ l, 100 μ l, 500 μ l, 1000 μ l)
- zkumavky Eppendorf (V=1,5 ml)
- zkumavky (V=15 ml)

Reagencie

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

Přístroje a analyzátory

- CO₂ termostat (Thermo, USA)
- centrifuga
- DEP cytometr
- laminární box

Postup práce

Před samotným měřením jsme si připravili čip, kdy jsme zapnuli pumpu a cytometr. Do stříkačky jsme nasáli destilovanou vodu a připojili ji k výstupu kanálu čipu a rychlostí 300 nl/s kanál napustili. Když se na druhém konci výstupu kanálu objevila kapička (kanál je naplněný), převrstvili jsme ji nízkovodivostním médiem s BSA (BSA zabraňuje adhezi buněk na dno kanálu), nasáli do kanálu a inkubovali po dobu 10 minut. Před měřením jsme kanál propláchli čistým nízkovodivostním médiem.

Poté jsme si v laminárním boxu připravili buňky na měření. Do 15ml zkumavky s buňkami a RPMI médiem jsme přidali 1 ml roztoku želatiny pro lepší sedimentaci buněk a dali centrifugovat na 300 g po dobu 6 minut. Poté jsme odsáli supernatant a u sedimentu nechali přibližně 500 μ l RPMI média. Buňky v sedimentu jsme resuspendovali a rozdělili po 250 μ l do dvou eppendorfek. Do jedné eppendorfky jsme přidali 200 μ l alergenu břízy (k lyofilizátu jsme přidali 200 μ l RPMI) a do druhé 200 μ l RPMI. Buňky jsme dali do CO₂ termostatu a hodinu čekali na senzibilizaci bazofilů. Po hodině jsme zcentrifugovali eppendorfku bez alergenu na 20 g po dobu 5 minut, odsáli supernatant a k sedimentu přidali 250 μ l nízkovodivostního média a resuspendovali. Takto připravenou suspenzi jsme poté kápili na vstup kanálu a nasáli ji rychlostí 600 nl/s, poté jsme rychlost snížili na 60

nl/s. Nastavili jsme si zorné pole těsně za elektrody a 4 minuty čekali na ustálení levitace buněk. Poté jsme nastavili požadované parametry a spustili měření. Po měření jsme čip očistili a promyli kanál pomocí nízkovodivostního média. Stejný postup jsme poté opakovali u vzorku, kde je přidán alergen. Po dokončení měření jsme kanál promyli destilovanou vodou, kterou jsme vypustili a kanál nechali prázdný, vypustili jsme destilovanou vodu i ze stříkačky. Výsledky jsme poté vyhodnotili.

12 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

12.1 Výsledky stanovení specifických IgE

Tabulka 2: Hodnoty specifických IgE

Č. vzorku	Hodnota specifických IgE [kUI/L]
Vzorek č. 1	7,812
Vzorek č. 2	0,989
Vzorek č. 3	2,650
Vzorek č. 4	1,430
Vzorek č. 5	9,440
Vzorek č. 6	0,390
Kontrola č. 1	< 0,350
Kontrola č. 2	0,450
Kontrola č. 3	0,367
Kontrola č. 4	< 0,350

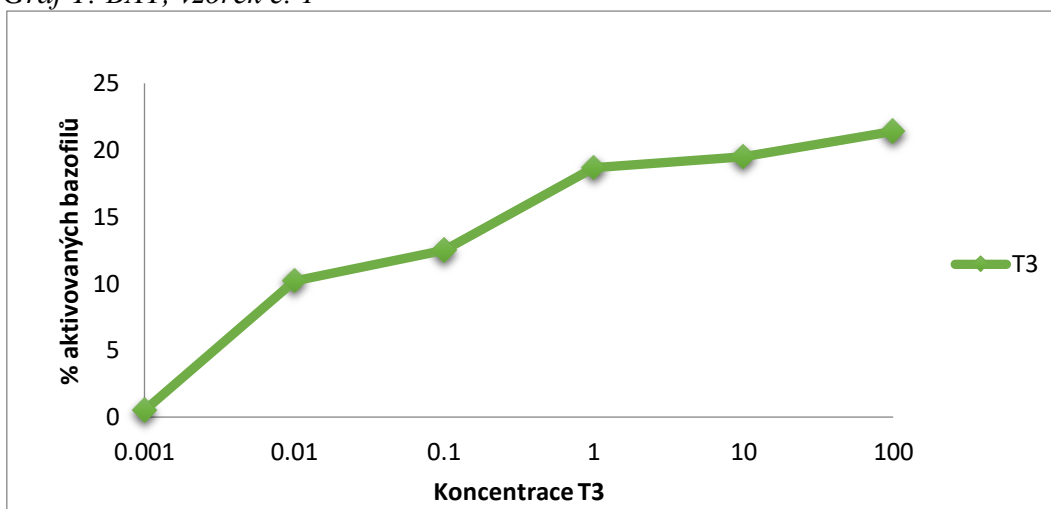
Zdroj: vlastní

12.2 Porovnání výsledků pacientů BAT a 2DEP

Skupina pozitivních pacientů

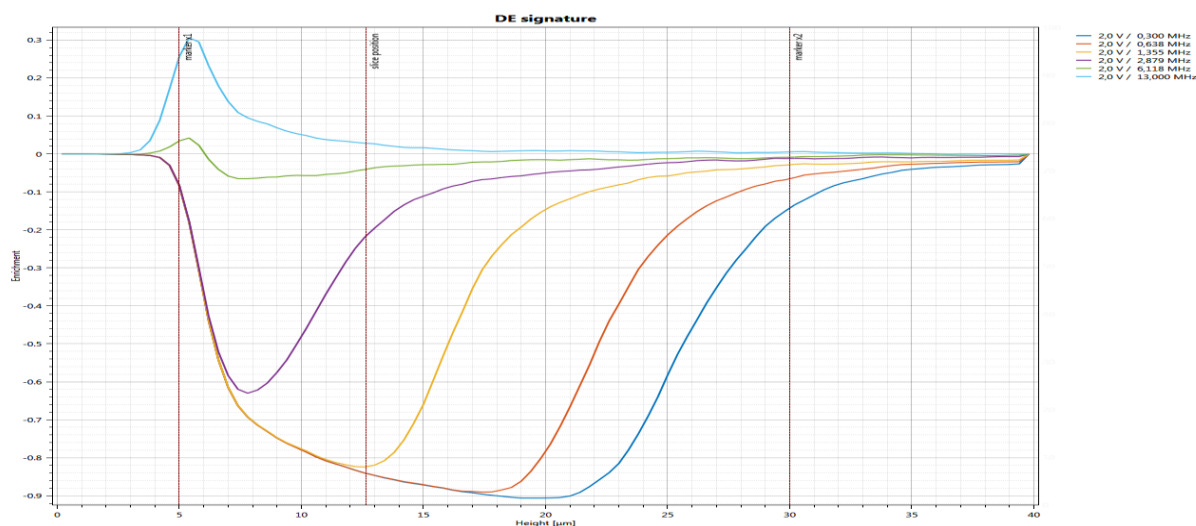
Vzorek č. 1

Graf 1: BAT, vzorek č. 1



Zdroj: vlastní

Graf 2: DE podpisy buněk, vzorek č. 1

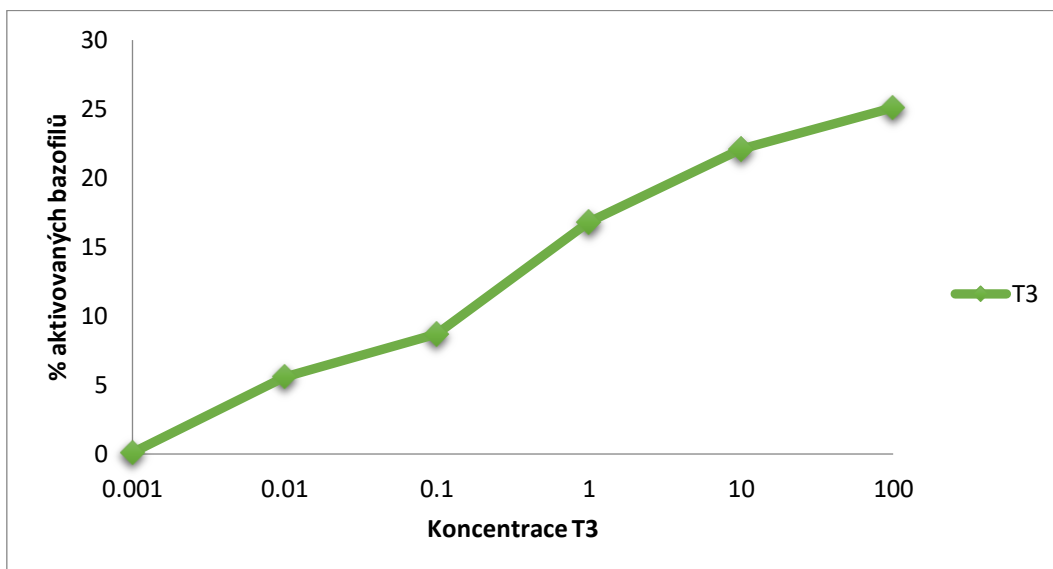


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 1 jsme u BATu naměřili pozitivní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 7,812 kUI/l. Plocha pod křivkou je 2027,462 a CD-sens 0,428. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 8 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 µm.

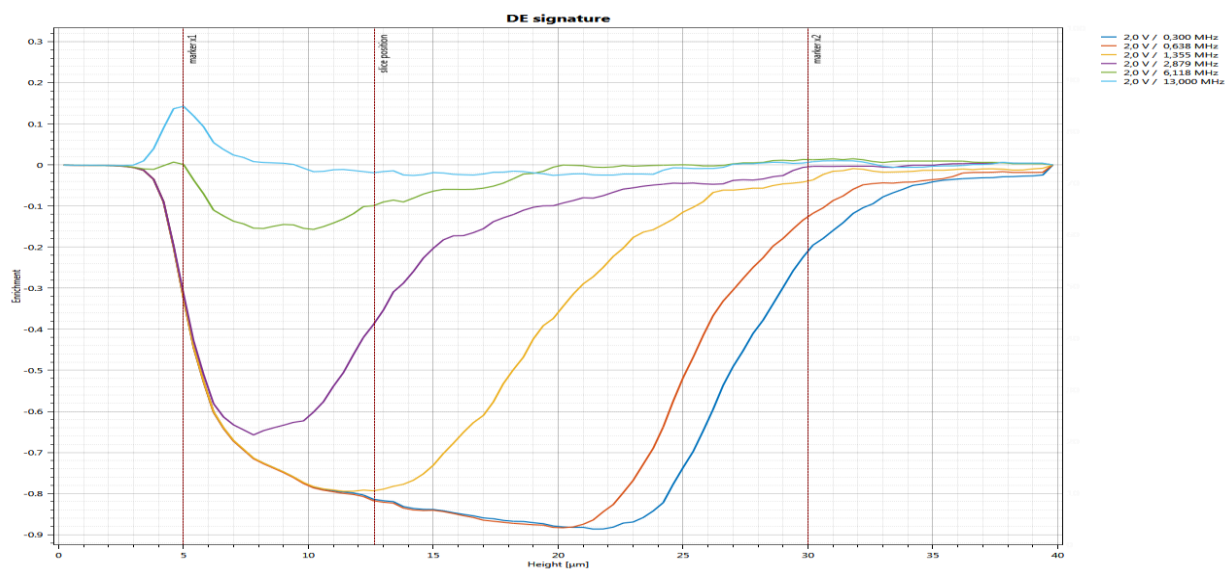
Vzorek č. 2

Graf 3: BAT, vzorek č. 2



Zdroj: vlastní

Graf 4: DE podpisy buněk, vzorek č. 2

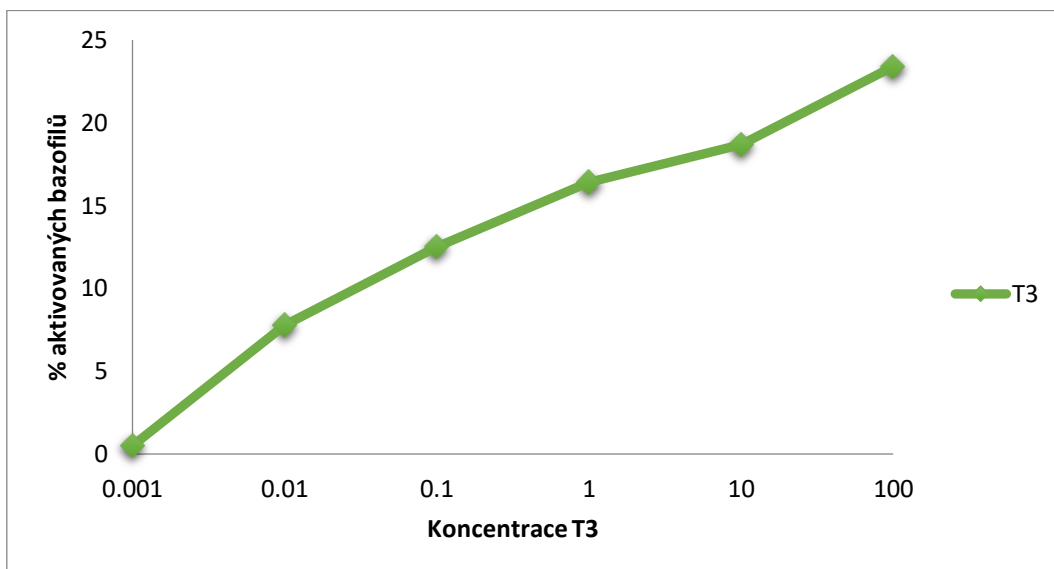


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 2 jsme u BATu naměřili pozitivní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 0,989 kUI/l. Plocha pod křivkou je 2311,169 a CD-sens 0,502. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 9,1 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm.

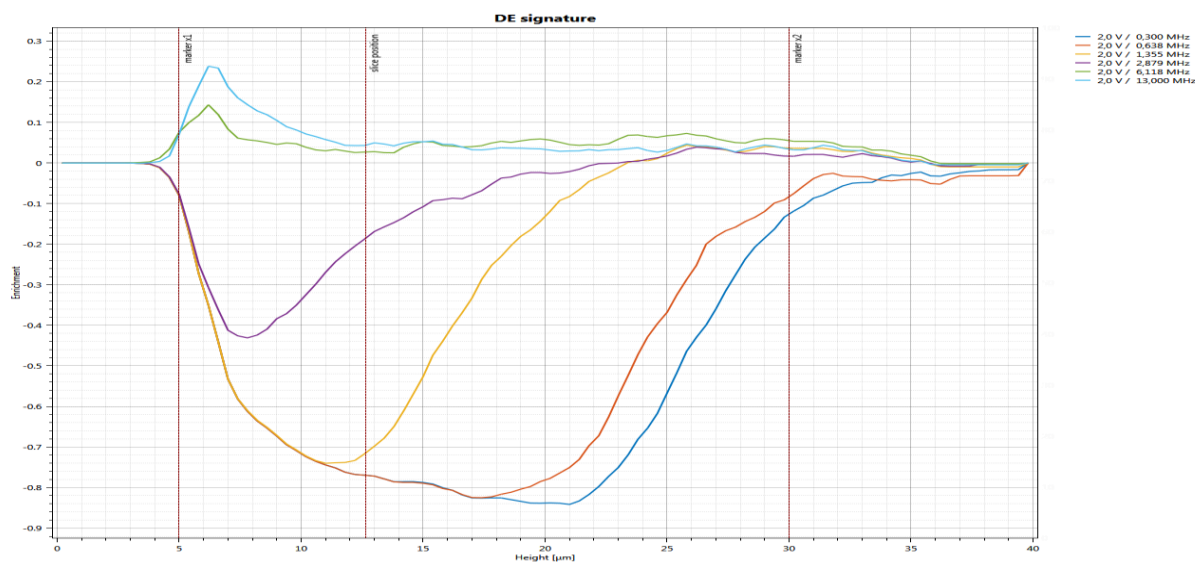
Vzorek č. 3

Graf 5: BAT, vzorek č. 3



Zdroj: vlastní

Graf 6: DE podpisy buněk, vzorek č. 3

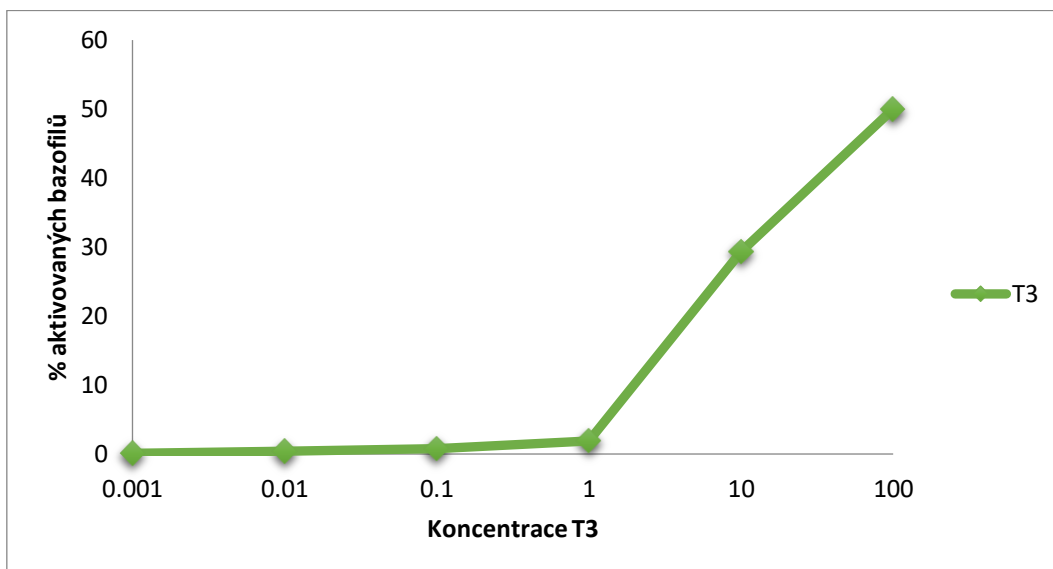


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 3 jsme u BATu naměřili pozitivní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 2,650 kUI/l. Plocha pod křivkou je 2066,369 a CD-sens 0,468. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 7,6 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm.

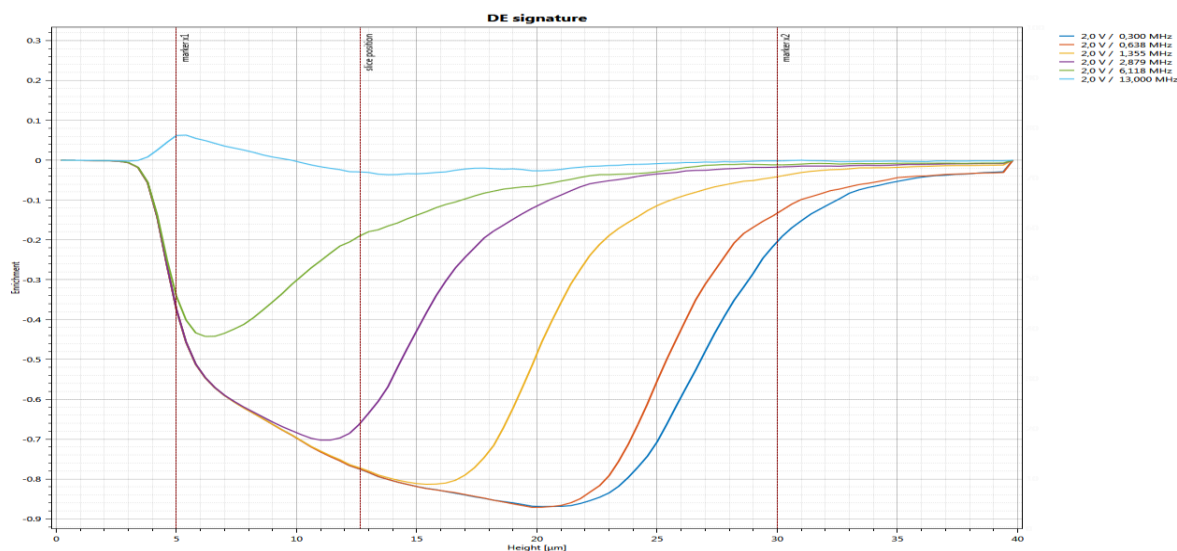
Vzorek č. 4

Graf 7: BAT, vzorek č. 4



Zdroj: vlastní

Graf 8: DE podpisy buněk, vzorek č. 4

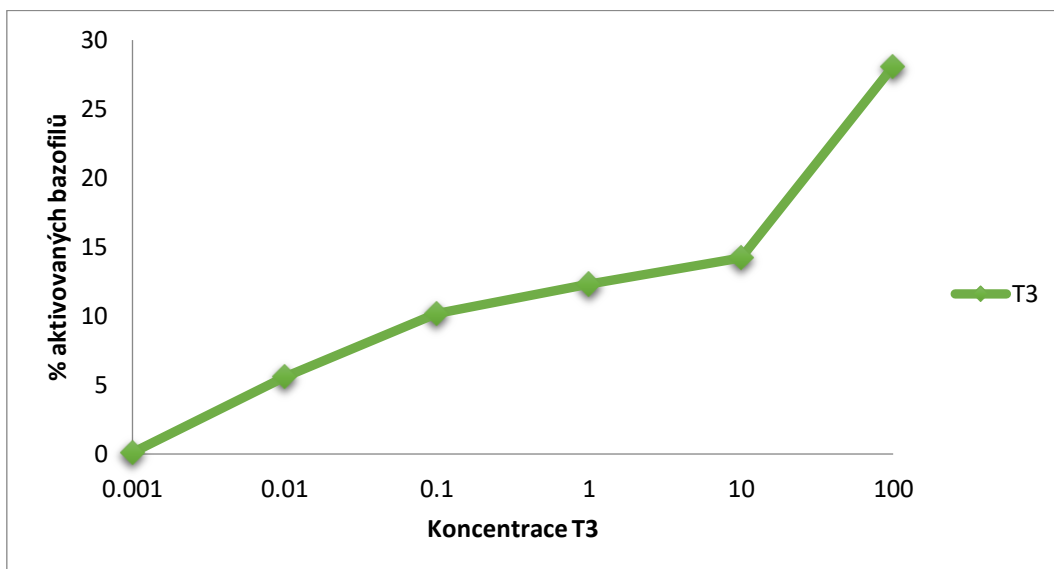


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 4 jsme u BATu naměřili pozitivní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 1,430 kUI/l. Plocha pod křivkou je 3712,487 a CD sens 1. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 5,1 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm .

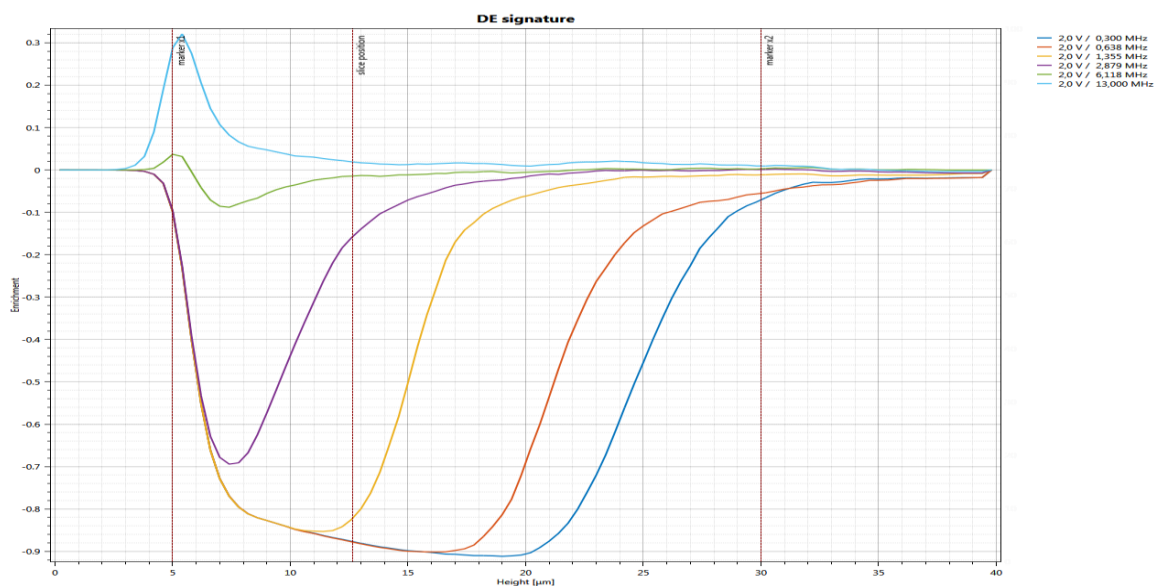
Vzorek č. 5

Graf 9: BAT, vzorek č. 5



Zdroj: vlastní

Graf 10: DE podpisy buněk, vzorek č. 5

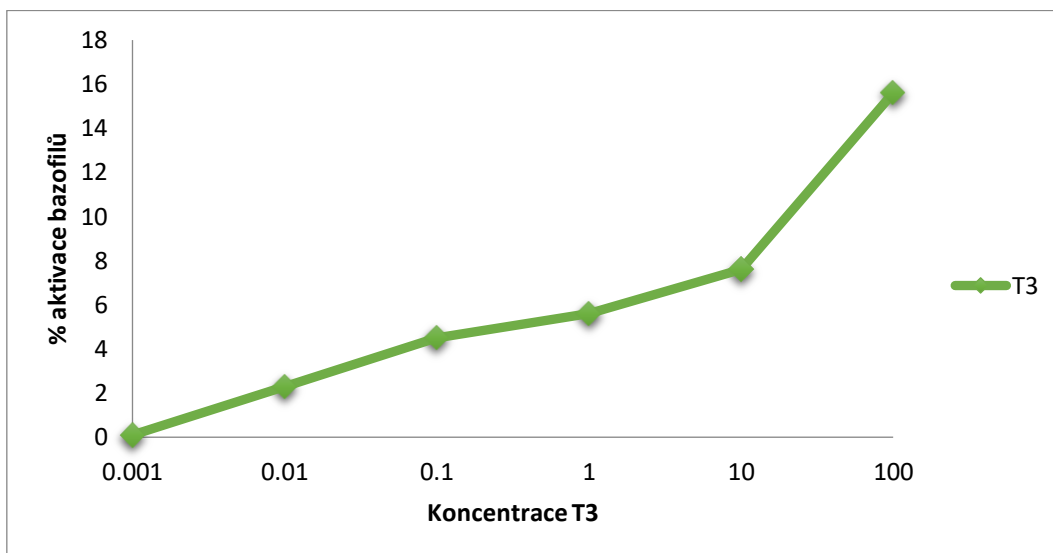


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 5 jsme u BATu naměřili pozitivní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 9,440 kUI/l. Plocha pod křivkou je 2033,586 a CD-sens 0,562. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 23,1 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm.

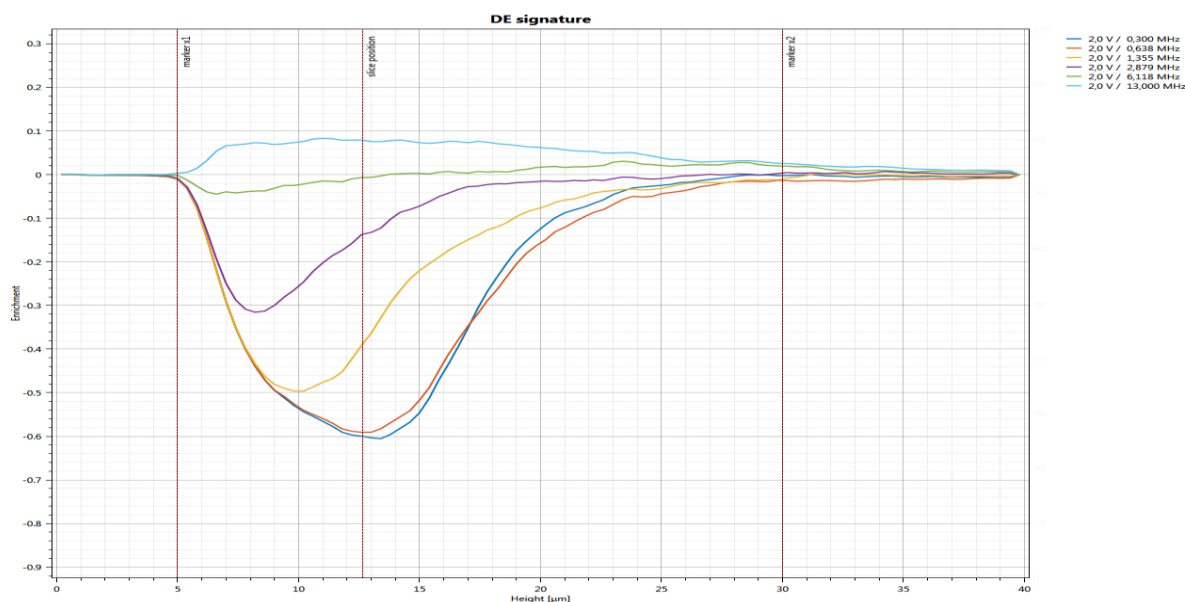
Vzorek č. 6

Graf 11: BAT, vzorek č. 6



Zdroj: vlastní

Graf 12: DE podpisy buněk, vzorek č. 6



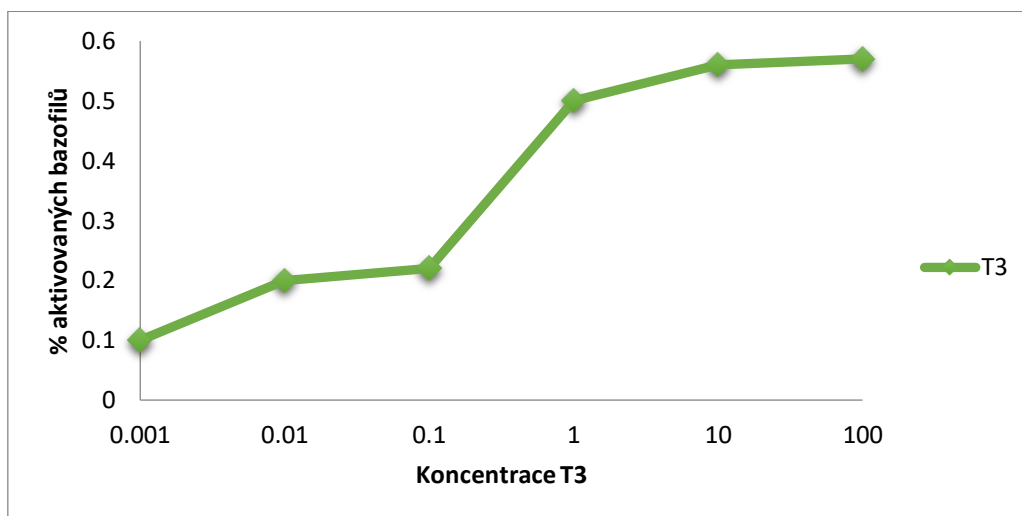
Zdroj: vlastní

U vzorku č. 6 jsme u BATu naměřili pozitivní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 0,390 kUI/l. Plocha pod křivkou je 1108,251 a CD-sens 0,312. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 47,5 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm.

Skupina negativních kontrol

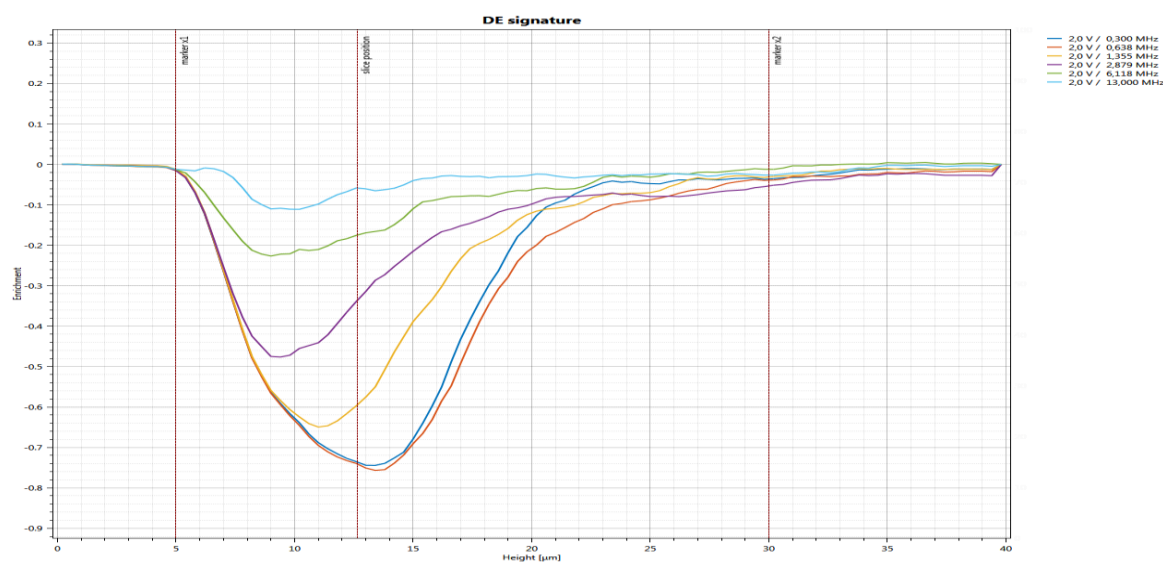
Vzorek č. 1

Graf 13: BAT, vzorek č. 1



Zdroj: vlastní

Graf 14: DE podpisy buněk, vzorek č. 1

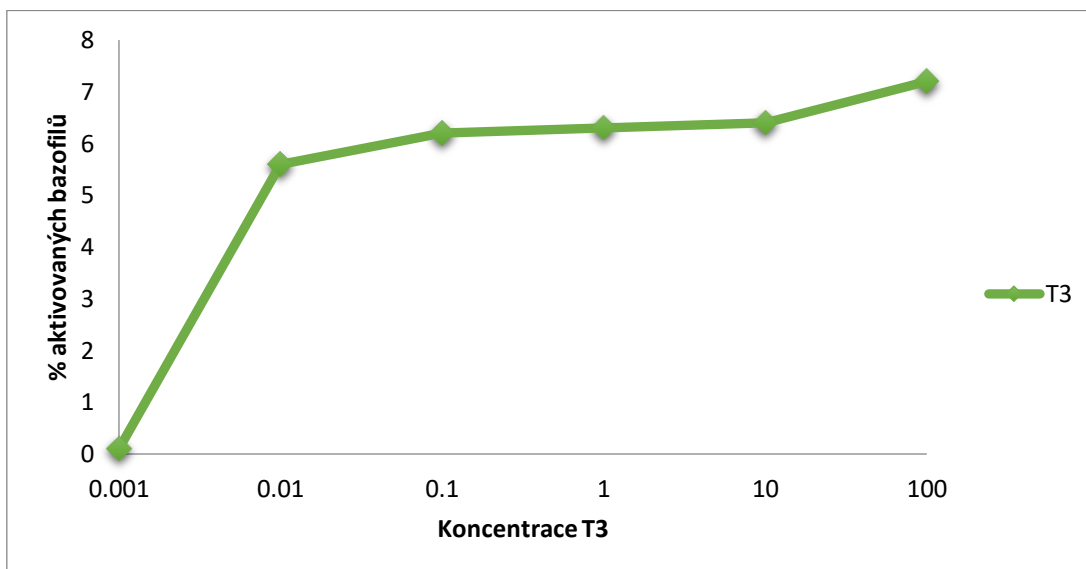


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 1 jsme u BATu naměřili negativní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = < 0,350 kUI/l. Plocha pod křivkou je 55,962 a CD-sens 0,011. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen -51,7 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm .

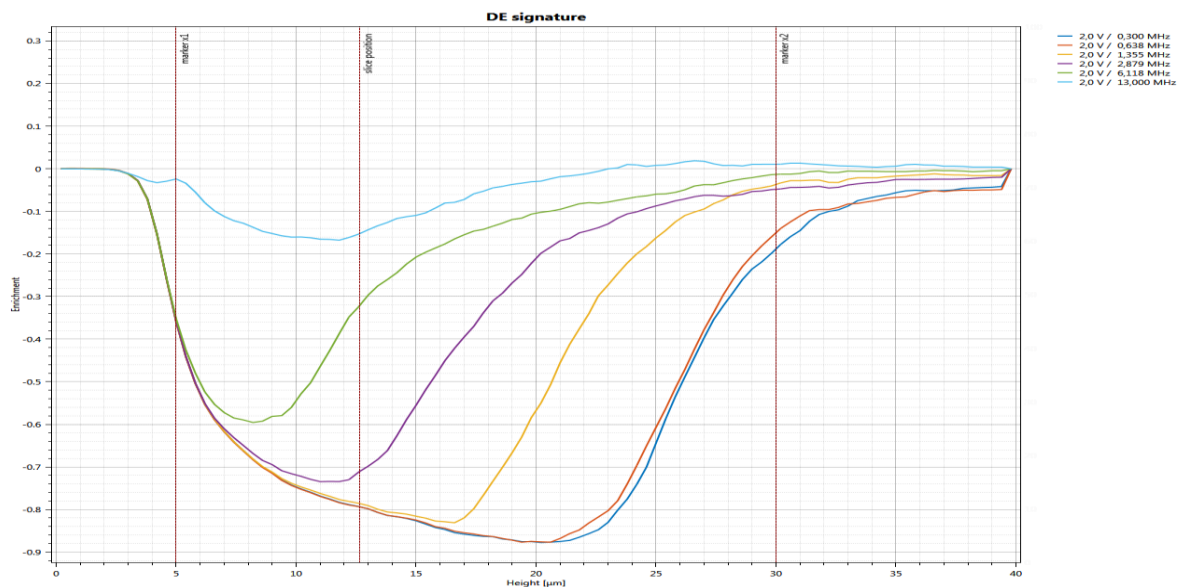
Vzorek č. 2

Graf 15: BAT, vzorek č. 2



Zdroj: vlastní

Graf 16: DE podpisy buněk, vzorek č. 2

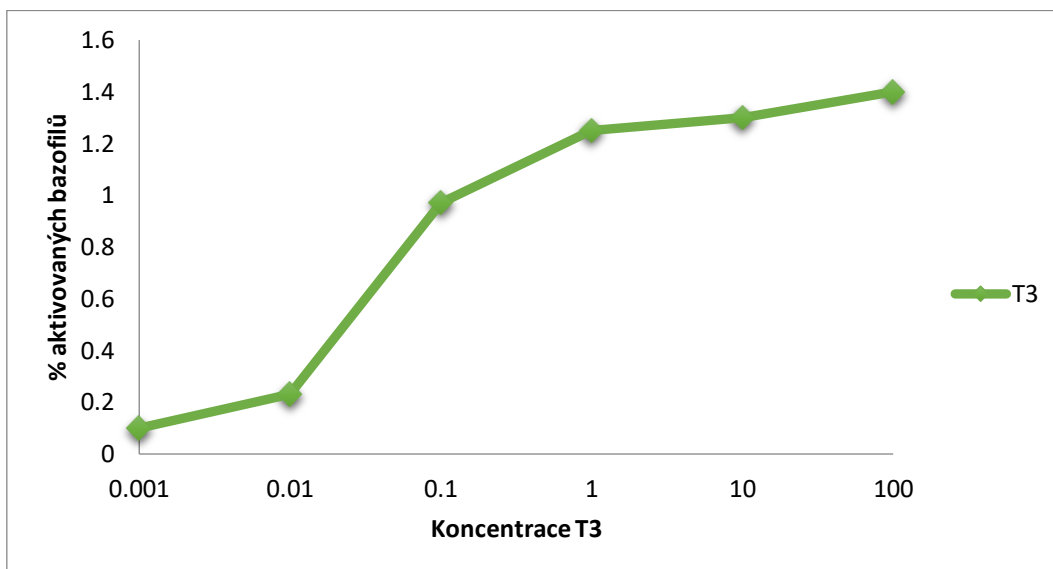


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 2 jsme u BATu naměřili negativní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 0,450 kUI/l. Plocha pod křivkou je 675,306 a CD-sens 0,144. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 30 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm.

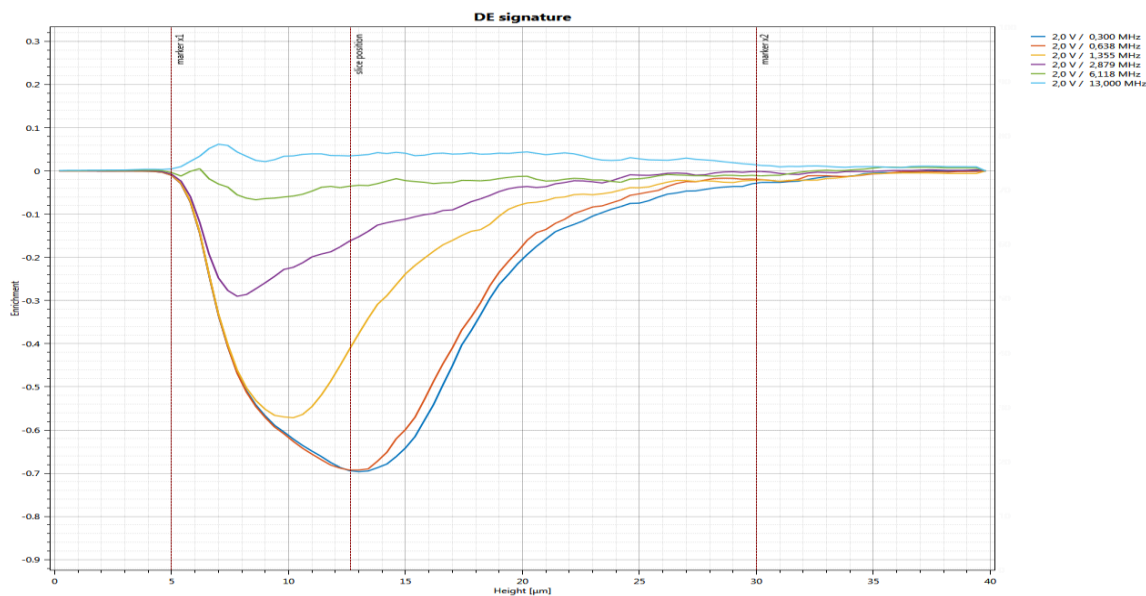
Vzorek č. 3

Graf 17: BAT, vzorek č. 3



Zdroj: vlastní

Graf 18: DE podpisy buněk, vzorek č. 3

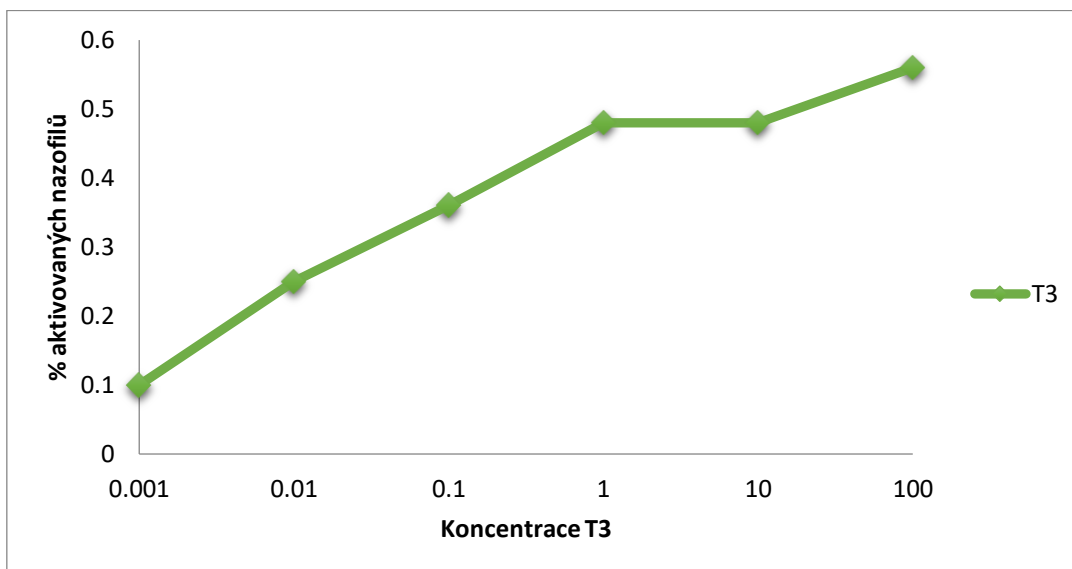


Zdroj: vlastní

U vzorku č. 3 jsme u BATu naměřili negativní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = 0,367 kUI/l. Plocha pod křivkou je 134,028 a CD-sens 0,028. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen 29,7 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm.

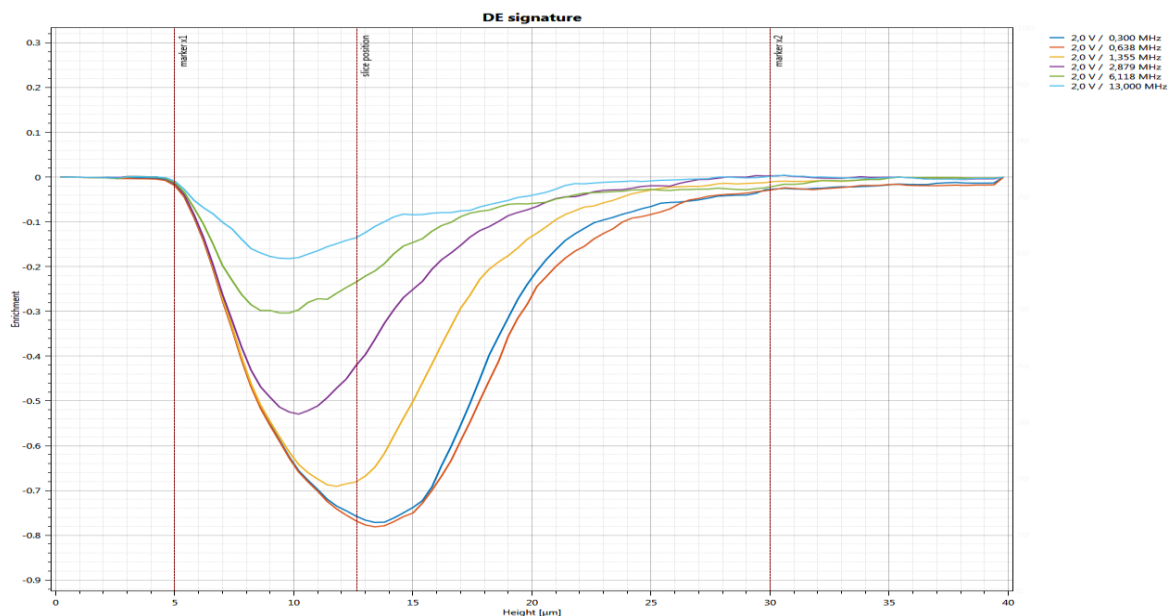
Vzorek č. 4

Graf 19: BAT, vzorek č. 4



Zdroj: vlastní

Graf 20: DE podpisy buněk, vzorek č. 4



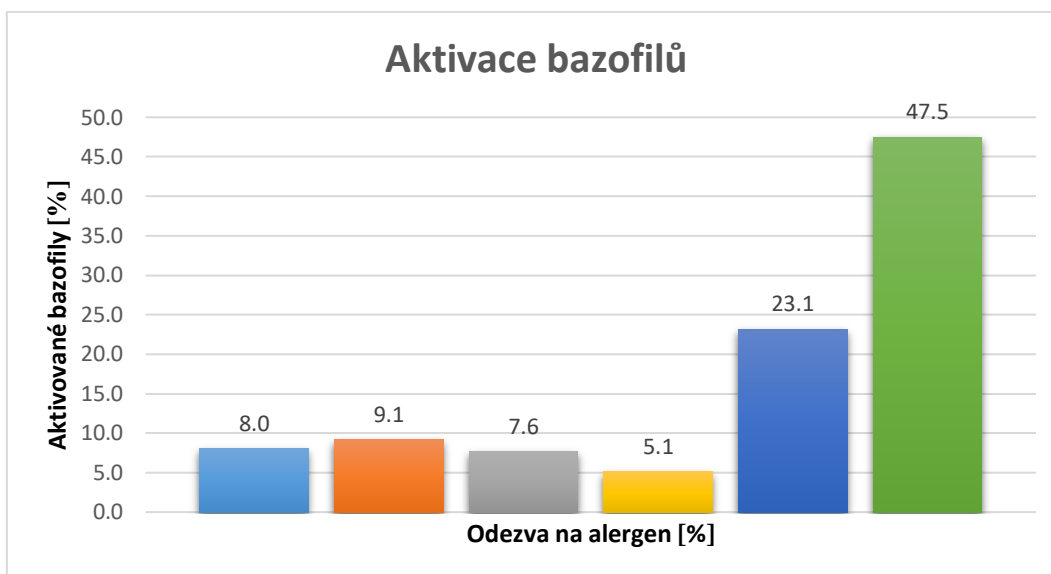
Zdroj: vlastní

U vzorku č. 4 jsme u BATu naměřili negativní odezvu na alergen T3 s naměřenými specifickými IgE = < 0,350 kUI/l. Plocha pod křivkou je 51,525 a CD-sens 0,011. U 2DEP cytometrie byla odezva na alergen -12,5 % a měření probíhalo při frekvenci 0,3 až 13 MHz, pro hodnocení byly použity frekvence 0,3 a 13 MHz. Změny byly zaznamenány u buněk o velikosti 14 – 32 μm .

12.3 Souhrnné zhodnocení výsledků BAT a 2DEP

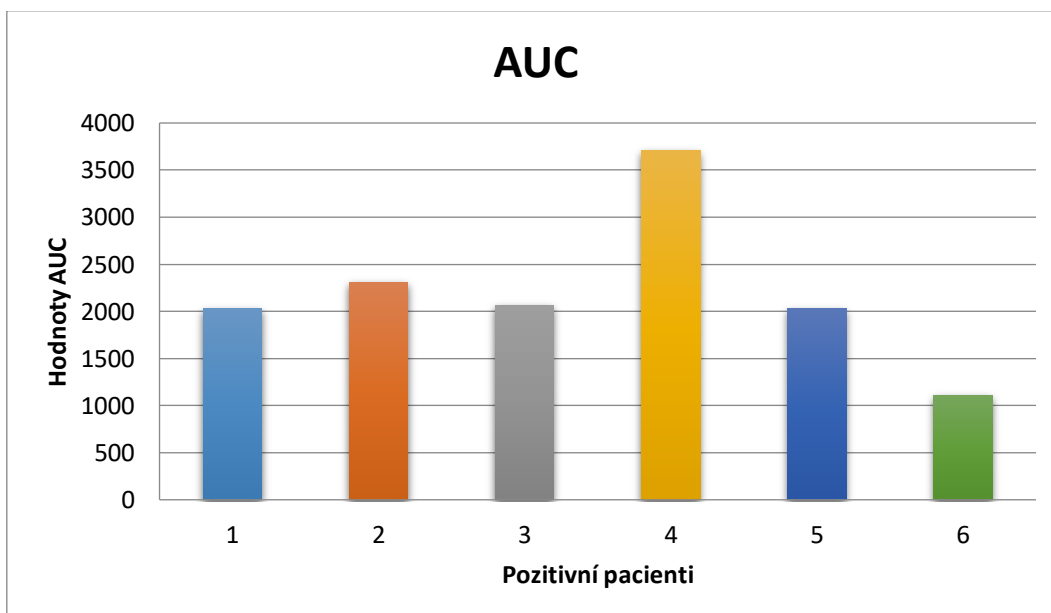
Skupina pozitivních pacientů

Graf 21: Aktivace bazofilů pozitivních pacientů z 2DEP



Zdroj: vlastní

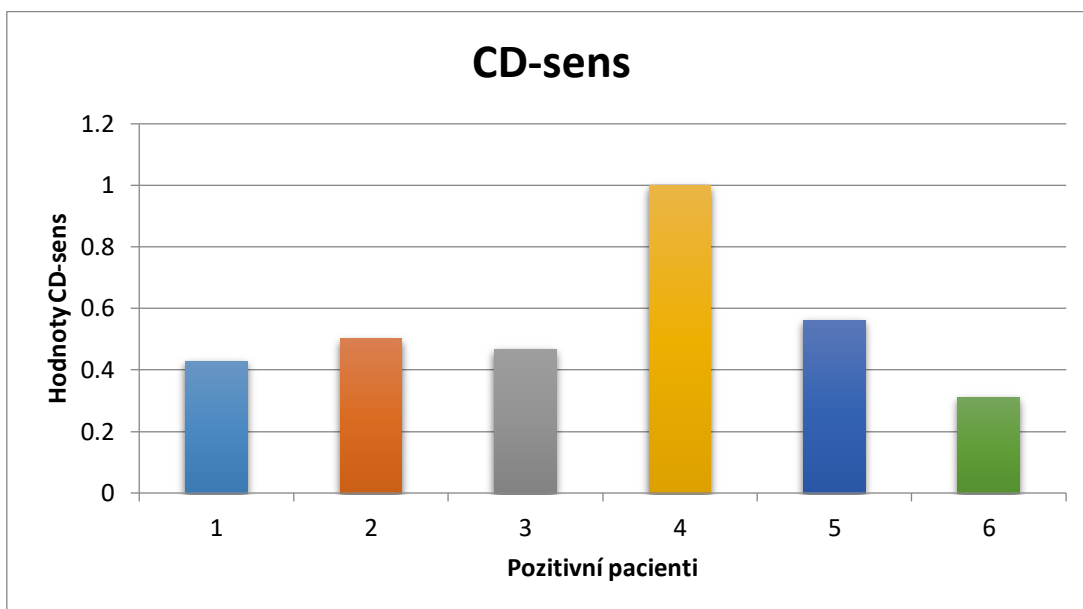
Graf 22: AUC - plocha pod křivkou u pozitivních pacientů



Zdroj: vlastní

Zde můžeme vidět hodnoty aktivace bazofilů, které jsme získali měřením na 2DEP a hodnoty plochy pod křivkou, které jsme získali měřením z BATu. Z grafů vyplývá, že čím vyšší je odezva na alergen (aktivace bazofilů), tím menší je plocha pod křivkou. U pacienta č. 6 můžeme vidět, že plocha pod křivkou je nízká, tudíž se jedná o hraničního pacienta.

Graf 23: CD-sens u pozitivních pacientů

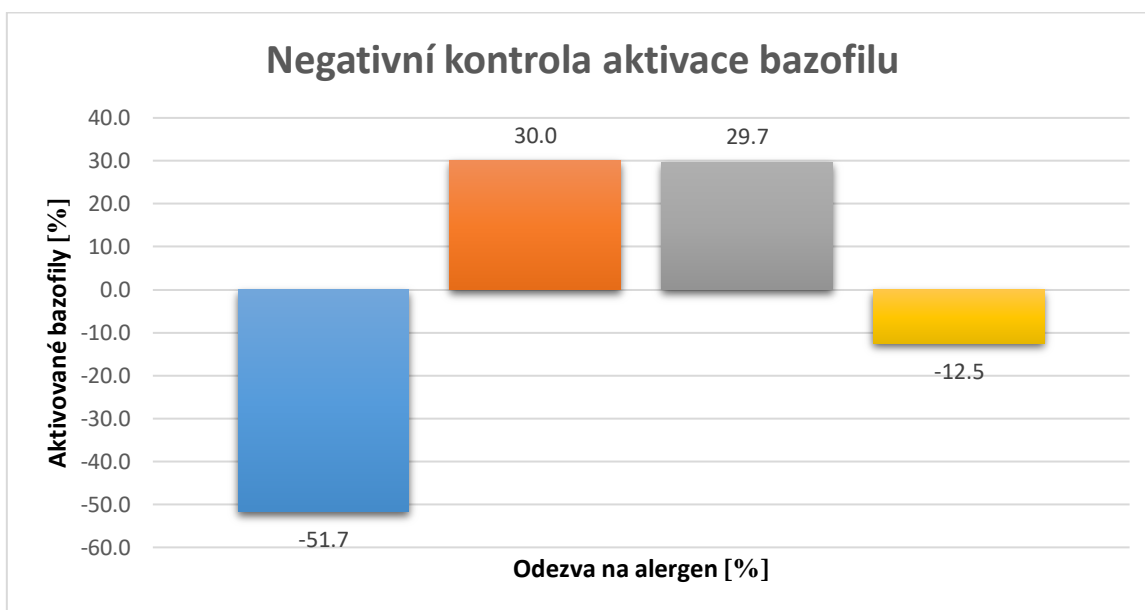


Zdroj: vlastní

Zde můžeme vidět hodnoty aktivace bazofilů, které jsme získali měřením na 2DEP a hodnoty CD-sens, které jsme získali měřením z BATu. Z grafů vyplývá, že čím vyšší je odezva na alergen (aktivace bazofilů), tím menší je CD-sens. U pacienta č. 6 můžeme vidět, že CD-sens je nízké, tudíž se jedná o hraničního pacienta.

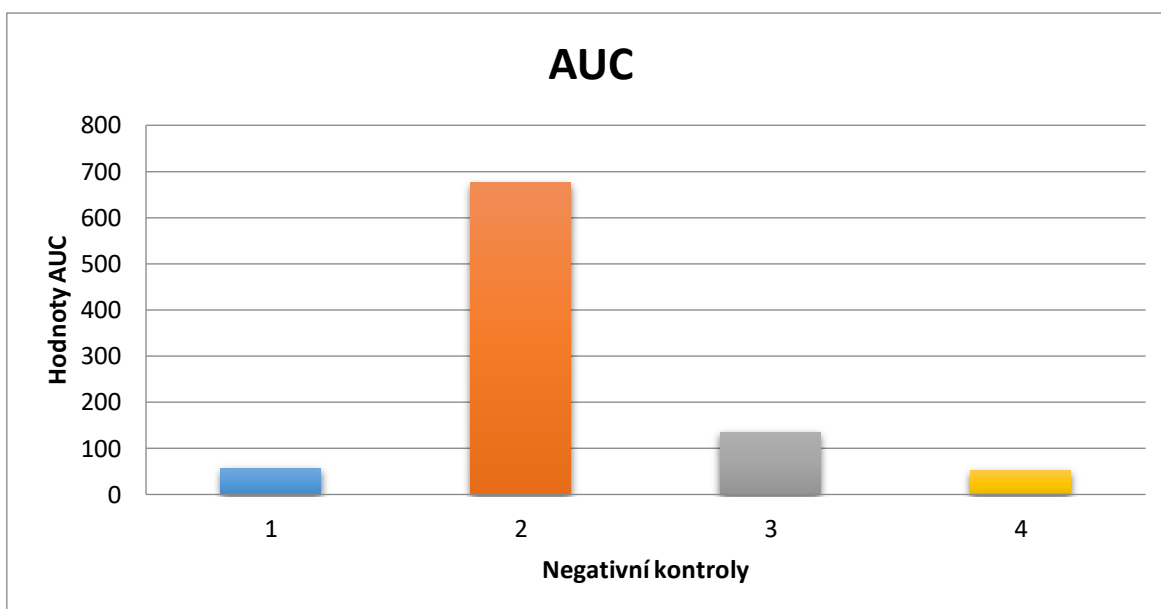
Skupina negativních kontrol

Graf 24: Aktivace bazofilů negativních kontrol z 2DEP



Zdroj: vlastní

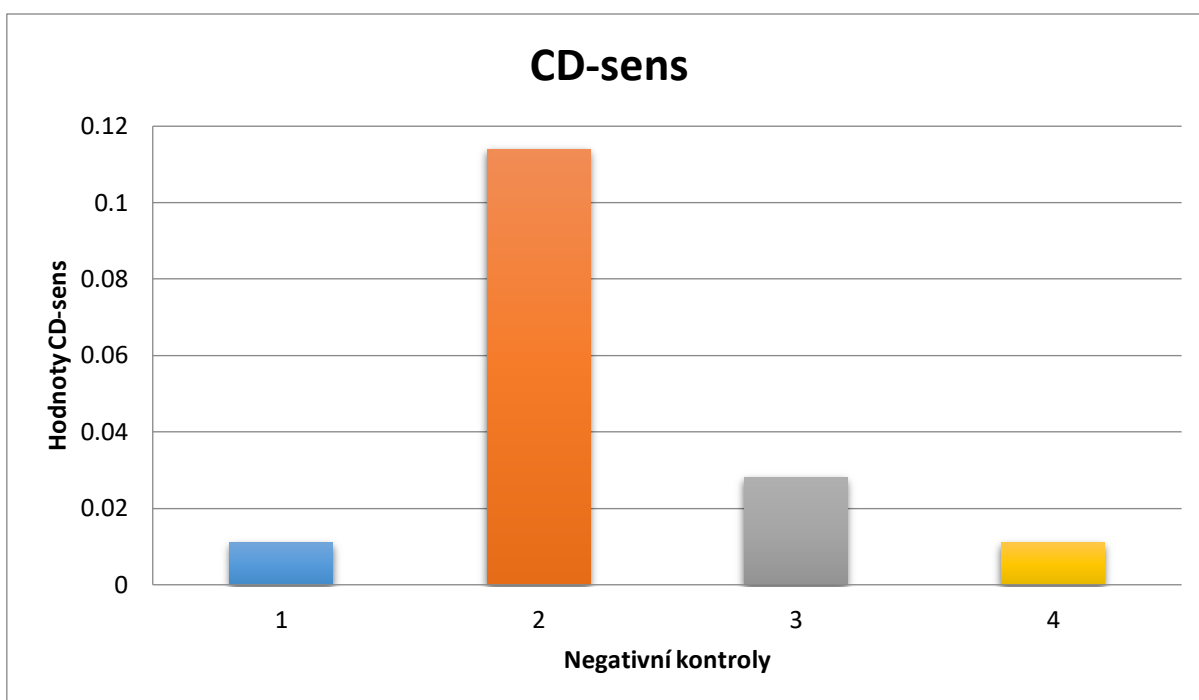
Graf 25: AUC - plocha pod křivkou u negativních kontrol



Zdroj: vlastní

U skupiny negativních kontrol, která má velmi nízké hodnoty AUC, kromě kontroly č. 2, vidíme, že odpovědi v 2DEP cytometrii jsou různé ať ve smyslu kladné nebo záporné odezvy na alergen.

Graf 26: CD-sens u negativních kontrol



Zdroj: vlastní

U skupiny negativních kontrol, která má velmi nízké hodnoty CD-sens, kromě kontroly č. 2, vidíme, že odpovědi v 2DEP cytometrii jsou různé ať ve smyslu kladné nebo záporné odezvy na alergen.

DISKUZE

Cílem této bakalářské práce je ověřit, zda hodnoty z 2DEP cytometrie odpovídají hodnotám získaným z aktivačního testu bazofilů pomocí průtokové cytometrie, protože by 2DEP metoda v budoucnu mohla být alternativou průtokové cytometrie. Tyto výsledky byly následně porovnány s DE podpisy buněk a s procenty aktivovaných bazofilních granulocytů. Porovnávána byla skupina pozitivních pacientů a negativních kontrol.

Po setkání bazofilních granulocytů s alergenem dochází k jejich aktivaci a k následnému splývání specifických granul s cytoplazmatickou membránou, na povrch je exprimován vysokoafinní receptor pro IgE a dochází k degranulaci. Součástí membrány je také znak CD63, který se při aktivaci přesouvá na povrch. (Nakashima, a další, 2018) Z tohoto lze usuzovat, že se mění struktura membrány, což mělo za následek vyvolání odezvy v 2DEP cytometrii. Tyto změny jsme detekovali pomocí 2DEP cytometrie u alergických pacientů. Kvůli odlišnosti DE podpisů buněk můžeme měřit různé intracelulární a fyziologické mechanismy buněk. DEP metodami můžeme také detekovat apoptózu buněk, která se projevuje změnou propustnosti plazmatické membrány a s tím související změnou hladiny iontů v cytoplazmě. (Kašpárková, 2019) Změny v 2DEP cytometrii se tedy projevily i u apoptotických buněk.

Z aktivačního testu bazofilů lze výpočty získat hodnoty AUC a CD-sens. Kdy hodnota CD-sens poukazuje na senzitivitu bazofilů, jedná se o odpověď na alergen ku koncentraci alergenu a je stanovena vyvolávací koncentrace, při které reaguje 50 % bazofilů, to lze vyjádřit inverzí a násobením 100. Senzitivita bazofilů je také spojena se závažností alergického onemocnění. To tedy znamená, že čím vyšší je hodnota CD-sens, tím citlivější je pacient k alergenům a tím závažnější má alergické onemocnění. (Santos, a další, 2015) Tuto skutečnost jsme ověřili a u našich hodnot CD-sens, získaných z aktivačního testu bazofilů, můžeme vidět, že platí stejná přímá úměra.

Hodnota AUC nám vyjadřuje reaktivitu bazofilů, je podobná systému citlivosti, ale zahrnuje částečnou anergii indukovanou při vysokých koncentracích alergenu a lze ji vypočítat i v případech, kdy odpovědi nejsou typické pro křivku. (Eberlein, a další, 2016) Opět zde platí přímá úměra, čím vyšší je plocha pod křivkou, tím jsou bazofily reaktivnější. Naše hodnoty plochy pod křivkou této skutečnosti odpovídají.

U skupiny alergických pacientů se nachází určitá shoda mezi měřením aktivace bazofilních granulocytů na 2DEP a průtokové cytometrii. V obou případech byly zaznamenány změny.

Aktivační test bazofilů se spoléhá na identifikaci změn specifických aktivačních markerů na povrchové membráně nebo uvnitř bazofilů. Tyto změny mohou být detekovány a kvantifikovány pomocí specifických monoklonálních protilátek vázaných na konkrétní fluorochromy. Prakticky jsou bazofily identifikovány markery jako jsou: CD3, CD123 a hlavně CD203c a CD63. (Ebo, 2008) U alergických pacientů tedy dochází k identifikaci těchto markerů a u negativních kontrol nikoliv. Avšak je možné zaznamenat změny na membráně, aniž by pacient byl alergický a naopak. Průměrná hodnota CD-sens u pozitivních pacientů je 0,545; u negativních kontrol je 0,041. Průměrná hodnota AUC u pozitivních pacientů je 2209,887; u negativních kontrol je tato hodnota 229,205. Oba tyto znaky poukazují na rozdíl.

V případě 2DEP cytometrie u pozitivních pacientů nacházíme změny, které jsou poté graficky vyhodnoceny. V grafu se nachází pík, který je nejvyšší při frekvenci 13 MHz. Tento pík poukazuje na to, že pacient je alergický. U negativních kontrol byly změny různorodé, nevykazovaly stejnou změnu, podle které by bylo možné usoudit, že se jedná o negativního jedince. Bylo malé množství subjektů na provedení měření, a tak nebylo možné provést statistické zhodnocení, jestli jsou změny významné či nikoliv.

ZÁVĚR

Bylo ověřeno, že metoda 2DEP by v budoucnu mohla být alternativou průtokové cytometrie. Avšak tento potenciál je třeba před větším zavedením metody do praxe více prozkoumat. Výhodou této metody je menší finanční náročnost, kdy buňky není třeba značit protilátkami ani dále nijak barvit jako je tomu u průtokové cytometrie. Jedna z dalších výhod je úspora místa, jedná se o velmi malé zařízení – čip s kamerou, pumpou a PC. Díky provádění testování na mikrofluidním čipu byly potřeba malé objemy vzorku i reagensů, zároveň bylo možné proměřit několik tisíc buněk najednou. Nevýhodou je velká časová náročnost, kdy je potřeba připravit čistou buněčnou kulturu bazofilních granulocytů. V postupu hrozí, že může nastat spousta chyb, které poté mohou negativně ovlivnit celé měření a tedy i výsledky.

Dle mého názoru tato nově objevená metoda v sobě nese potenciál, avšak netuším, jestli by i po prozkoumání a jejím rozšíření, mohla plně zastupovat průtokovou cytometrii. Tato metoda se příliš nehodí pro běžné rutinní vyšetření aktivace buněk.

SEZNAM LITERATURY

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

Bartůňková, Jiřina a Paulík, Milan. 2011. *Výšetřovací metody v imunologii.* Praha : Grada Publishing, a.s., 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

Brno, VFU. 2020. Teorie - biologie. *cit.vfu.cz.* [Online] 2020. [Citace: 20. Duben 2020.] https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-biologie_tisk&lang=cz&teorie=yes.

ČR, Ministerstvo zdravotnictví. 2016. číselníky.dasta. [Online] 12. prosinec 2016. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJDJU.htm.

Delves, Peter J. a Martin, Seamus J. 2017. *Roitt's essential immunology.* Pondicherry : Chichester, West Sussex: John Wiley , 2017. ISBN 9781118415771.

Dušková, Monika. 2010. *is.muni.cz. Metody separace buněk.* [Online] 2010. http://organonet.med.muni.cz/media/62509/vy_03.pdf.

Eberlein, Bernadette, Santos, Alexandra a Ferrer, Montse. 2016. Basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergo Journal International.* [Online] 2016. https://www.researchgate.net/publication/304495602_Basophil_activation_testing_in_diagnosis_and_monitoring_of_allergic_disease_-_an_overview?enrichId=rgreq-329b9213045ff680f784213d73f8d4b1-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMwNDQ5NTYwMjtBUzozNzgyNDQwMDA5NjA1M.

Ebo, D. G. 2008. The basophil activation test in the diagnosis of anaesthesia-related allergy. *elsevier.com.* [Online] 2008. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0335745708000233?token=43099E6C81F35AB09F17A7026346FBF6628D5267EA24CB5C29F80C49BF78460593B52244E3C305380ED379C453F47838>.

Fikar, Pavel. 2016. Dielectrophoretic cytometry for measurement of live cell dielectric signatures on population level. *Dizertační práce.* [Online] Université Paris-Est,

Západočeská univerzita v Plzni, 2016. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01534827/document>.

Honzová, Stanislava. 2009. Internimedicina.cz. *Možnosti laboratorní diagnostiky alergie*. [Online] 2009. <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/04/05.pdf>.

Hořejší, Václav a Bartůňková, Jiřina. 2017. *Základy imunologie*. Praha : Stanislav Juhaňák - TRITON, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

Kašpárková, Adriana. 2019. Aplikace LAB-ON-A-CHIP technologie v léčbě nádorových onemocnění. *Bakalářská práce*. 2019.

Krejsek, Jan. 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové : Garamon s.r.o., 2016. ISBN 978-80-86472-74-4.

MEFANET, síť lékařských fakult ČR a SR. 2020. Wikiskripta. *Průtoková cytometrie*. [Online] 25. únor 2020. https://www.wikiskripta.eu/w/Pr%C5%AFtokov%C3%A1_cytometrie.

Mourek, Jindřich. 2012. *Fyziologie: Učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. Praha : Grada Publishing a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3918-2.

Nakashima, Chisa, Otsuka, Atsushi a Kabashima, Kenji. 2018. Recent advancement in the mechanism of basophil activation. *Journal of Dermatological Science*. [Online] 2018. <https://www.jdsjournal.com/action/showPdf?pii=S0923-1811%2818%2930132-4>.

Ochotná, Jitka, Liška, Martin a Panzern, Petr. 2013. *Základy alergologie a klinické imunologie pro studenty lékařských fakult I. část*. 2013.

OrganoNET. 2020. www.muni.cz. *OrganoNET*. [Online] 2020. http://organonet.med.muni.cz/media/62509/vy_03.pdf.

Penka, Miroslav a Tesařová, Eva. 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I - Hematologie*. místo neznámé : Grada Publishing a.s., 2011. ISBN 9788024734590.

P-LAB. 2020. P-LAB = Potřeby pro laboratoř, Life Science. [Online] Praha: P-LAB a.s., 2020. https://www.p-lab.cz/katalog/medium-mem-eagle/-/earle-s-roti-reg-cell_11545p.

Punt, Jenni a Stranford, Sharon. 2018. *Kuby Immunology*. New York : W. H. Freeman, 2018. ISBN-978-1-319-11470-1.

Roubalová, L. 2017. Česká společnost klinické biochemie. *bulletinfons.cz*. [Online] 12. březen 2017. <http://www.bulletinfons.cz/22012/lab01.pdf>.

Santos, Alexandra, Toit, George Du a Douiri, Abdel. 2015. Distinct parameters of the basophil activation test reflect the severity and threshold of allergic reactions to peanut. *elsevier.com*. [Online] 2015. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0091674914012664?token=232D6376644C9C945CA853C1D2937A78F3F21525C86D3CAFC376321F09A4983A86C566AEBE2331B488FBE99C783A83D6>.

Sasaki, Haruka a Kurotaki, Daisuke. 2016. *Allergology International*. Yokohama : autor neznámý, 2016. ISSN 1323-8930.

Šterzl, Ivan. 2007. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékařství*. Praha : Karolinum, 2007. str. 208. ISBN 978-80-246-0972-0.

Trojan, Stanislav. 2003. *Lékařská fyziologie*. Praha : Grada Publishing a.s., 2003. ISBN 80-247-0512-5.

Vejražka, Martin. 2019. Buněčné kultury. *Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta univerzity Karlovy v Praze*. [Online] 2019. <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN

PŘÍLOHY

Příloha 1: Povolení sběru informací ve FN



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

Tereza Běhouňková

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 vypracování Vaší bakalářské práce s názvem „*Příprava separace a kultivace bazofilních granulocytů*“.

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: chabrovass@fnplzen.cz

11. 11. 2019