

**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**Lékařská fakulta**

**VYŠETŘOVACÍ METODY V IMUNOLOGICKÉ A  
ALERGOLOGICKÉ LABORATOŘI**

**Marcela Vlková a kol.**

BRNO 2019



*Autoři:*

**Mgr. Marcela Vlková, Ph.D**

Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně

**MUDr. Roman Hakl**

Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně

**MUDr. Zita Chovancová, Ph.D**

Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně

**Mgr. Julie Štíhová**

Ústav klinické imunologie a alergologie, Fakultní nemocnice u Sv. Anny v Brně

*Recenze:*

**RNDr. Veronika Kanderová, Ph.D.**

Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

**RNDr. Alexandra Lochmanová, Ph.D.**

Oddělení imunologie a alergologie, Zdravotní Ústav Ostrava

# Obsah

1	Separáční metody.....	8
1.1	Preanalytick� fáze vyšetření buněčné imunity .....	8
1.2	Základní principy separace buněk .....	9
1.3	Pozitivní a negativn� selekce .....	11
1.4	Izolace PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) .....	11
1.5	Rozetové separace .....	12
1.6	Separace pomocí adherence na plastov� povrchy .....	13
1.7	Magnetick� selekce.....	13
1.8	Sortování.....	14
2	Vyšetřovací metody v laboratoři buněčné imunologie .....	15
2.1	Pr�tokov� cytometrie.....	15
2.2	Vyšetření lymfocytárních subpopulací v laboratoři buněčné imunologie.....	20
2.2.1	T-lymfocytární subpopulace .....	21
2.2.2	B-lymfocytární subpopulace .....	23
2.3	Funkc�n� testy v laboratoři buněčné imunologie .....	25
2.3.1	Aktivace buněk.....	26
2.3.2	Blastick� transformace lymfocytů.....	26
2.3.3	Metody měření aktivace a proliferace lymfocytů .....	27
2.3.4	Sledování funkce p�rozen�ch cytotoxických buněk.....	38
2.3.5	Sledování apoptózy či dalších typů buněčné smrti .....	40
2.3.6	Sledování funkcnosti signálních drah .....	41
2.4	Možnosti vyšetření sekrece humorálních faktorů na buněčné úrovni .....	46
2.4.1	ELISPOT .....	46
2.4.2	FLUROSPOT .....	54
3	Využití monoklonálních protilátek k l�ečebn�m �el�m .....	55

4	Diagnostika alergických stavů .....	57
4.1	Alergeny .....	57
4.2	Zkřížené reakce.....	59
4.3	Zdroje alergenů pro laboratorní diagnostiku .....	63
4.3.1	Diagnostické využití alergenových extraktů a rekombinantních alergenů .....	64
4.4	Alergologické vyšetření.....	64
4.4.1	Laboratorní diagnostika.....	64
4.4.2	Stanovení počtu eozinofilů.....	65
4.4.3	Stanovení koncentrace celkových imunoglobulinů ve třídě IgE.....	65
4.4.4	Stanovení koncentrace specifických IgE protilátek .....	65
4.4.5	Multiplexové metody .....	68
4.4.6	Stanovení ECP.....	69
4.4.7	Stanovení tryptázy.....	70
4.4.8	Test aktivace bazofilů.....	70
4.4.9	Test proliferace lymfocytů pro pozdní alergickou reakci na léky.....	71

## SEZNAM ZKRATEK

Ab	protilátka
Ag	antigen
AP	alkalická fosfatáza
APC	antigen prezentující buňka
ATB	antibiotikum
BFA	brefeldin A
BrdU	bromdeoxyuridin
CCD	zkříženě reagující uhlovodíkové determinanty (cross-reactive carbohydrate determinants)
CD	cluster of differentiation
ConA	konkanavalin A
CSFE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CTLA	cytotoxický T-lymfocytární antigen (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein)
CVID	běžný variabilní imunodeficit (common variable immunodeficiency)
DELFIA	dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay
EIA	enzymatická imunoanalýza
ELISA	enzym-imunoanalýza probíhající na pevné fázi
ELISPOT	enzymatická buněčná imunoesej
FACS	fluorescence activated cell sorting
FEIA	fluorescenční enzymatická imunoanalýza
FITC	fluorescein-isothiokyanát
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FS, FSC	forward scatter
GPA	glykoforin A
HLA	hlavní lidský histokompatibilní systém (human leucocyte antigens)
HRP	křenuv peroxidáza (horseradish peroxidase)
IL	interleukin
IM	ionomycin
IFN	interferon
IU/ml	mezinárodní jednotka (international unit)/mililitr
LPS	lipopolysacharid

LTP	lipid transfer protein
mAb	monoklonální protilátka
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fosfátový pufr (phosphatebuffered saline)
PD-1	receptor programované buněčné smrti (programed cell death-1)
PE	phycoerythrin
PHA	phytohemagglutinin
PI	propidium jodid
PMA	phorbol myristát acetát
PWM	pokewed mitogen
RAST	radio allegro sorbent test
SCID	těžký kombinovaný imunodeficit
SFC	buňky tvořící spoty (spot forming cells)
SS (SSC)	side scatter
TNF	tumor nekrotizující faktor
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

## Úvod

V současné době prochází buněčné metody v klinické imunologii rychlým vývojem. Je to dáno především rozvojem separačních a detekčních metod, což je doprovázeno neustále se zlepšujícím vybavením výzkumných, ale i klinických laboratoří.

Skripta mají za úkol seznámit studenty se základy moderních testů v imunologické buněčné laboratoři, významná část je věnována i novým metodám v alergologické diagnostice. Skripta jsou doplněna i o kapitolu o klinickém využití monoklonálních protilátek; jedná se o velmi moderní směr klinické medicíny, se kterým musí být seznámeni i studenti nelékařských medicínských oborů.

Skripta jsou určena zejména pro studenty předmětu Klinická imunologie magisterského oboru Bioanalytik a doplňují skripta Základy vyšetření v klinické imunologii.

# 1 Separční metody

Izolace jednoho nebo více buněčných typů z heterogenní populace je nedílnou součástí moderního biologického výzkumu, rutinní klinické diagnostiky i léčby. V nedávné době došlo k rychlému rozvoji separačních metod, které se navzájem liší ve výtěžnosti, čistotě separovaných buněk a jejich životaschopnosti. To se odrazilo nejen ve významném pokroku v různých oblastech diagnostiky, ale také v biologii kmenových buněk, onkologii a regenerační medicíně.

## 1.1 Preanalytická fáze vyšetření buněčné imunity

Vyšetřovaným materiálem pro buněčná imunologická vyšetření je nejčastěji nesrážlivá tzv. plná krev. Správně provedený odběr krve, výběr odběrového média, skladování odebrané krve a její transport do laboratoře jsou faktory, které mohou zásadně ovlivnit výsledky požadovaných vyšetření. Pro cytometrické stanovení zastoupení subpopulací leukocytů a lymfocytů se odebírá krev do **EDTA** (ethylendiamintetraoctová kyselina), která chelatuje vápník a tím zamezuje aktivaci buněk. V krvi. Tuto krev lze také použít pro separaci buněk, protože při ní je EDTA při zpracování vzorku odstraněna. Provedení mnoha funkčních testů je možné i z plné krve. Zde je výhodné odebrat krev do heparinu, který zabraňuje srážení tím, že aktivuje antitrombim III, který pak inhibuje trombin a faktory vnitřního srážení a tím zabraňuje přeměně fibrinogenu na fibrin. Zkumavka s odebranou krví musí být označena štítkem s jednoznačnou identifikací pacienta a také opatřena průvodkou, která opět obsahuje identifikaci pacienta, kontakt na odesílajícího lékaře či oddělení, požadavky na provedení vyšetření a také dobu odběru.

Počty některých leukocytů a funkční vlastnosti jednotlivých buněčných populací v odebrané krvi se mění při jejím skladování. Zejména pro funkční vyšetření monocytů, neutrofilů a také lymfocytů je třeba odebranou krev dopravit do laboratoře co nejdříve po odběru. Nejnáchylnější ke změnám co do funkčnosti i počtu buněk jsou monocyty a neutrofilové. Pro funkční testy by měla být krev dopravena do laboratoře do několika hodin, pro stanovení zastoupení lymfocytárních populací do 24 hodin.

Přežívání buněk v odběrovém médiu ovlivňuje nejen doba skladování či transportu, ale také teplota. Odebraná krev by neměla být vystavena přímému slunečnému či světelnému záření ani vysokým teplotám. Vzorky krve odebrané do heparinu by měly být skladovány a



transportovány do laboratoře při pokojové teplotě, 16-25°C, vzorky krve v EDTA pak za chladu při 4-8°C.

Důležitým bodem pro správné provedení funkčních testů je dodržování sterility zpracovaného materiálu a pěstovaných kultur. Tu je potřeba zachovávat po celou dobu zpracování a kultivaci vzorku tak, aby nedošlo k nespecifické aktivaci a znehodnocení celého stanovení např. plísněmi, bakteriemi apod.

Další kapitoly obsahují metody, jak separovat různé typy buněk a jakým způsobem provádět některé z funkčních testů. U mnoha separací a následných vyšetření se jedná o poměrně drahé metody a při nedodržení některého z výše uvedených bodů preanalytické fáze může vést ke zkreslení výsledků.

Mnoho funkčních testů uvedených v této kapitole lze provést nejen ze separovaných buněk, ale také z plné heparinizované krve – produkce cytokinů, proliferační testy, aktivace NK buněk, fagocytární testy apod. Plná krev lépe odráží stav in-vivo než separované buňky. Při provedení některých testů je však zapotřebí získat větší množství určitého typu buněk pro provedení cíleného vyšetření, tam je možné s výhodou použít separační metody.

## 1.2 Základní principy separace buněk

Při oddělování buněk z heterogenní směsi se s úspěchem využívá jedné nebo více vlastností, které jsou pro daný typ buňky jedinečné. Nejpoužívanější metody separace buněk jsou založeny na základních buněčných vlastnostech, mezi které patří:

**Povrchový náboj a adheze:** schopnost adherence (přilnutí) buněk k plastickým a jiným povrchům polymeru může být použita k oddělení adherentních buněk od suspenzních buněk (například při separaci monocytů).

**Velikost a hustota:** tyto vlastnosti buněk se běžně používají pro izolaci velkého počtu buněk, a to sedimentací, filtrací nebo centrifugací v hustotním gradientu (například při separaci PBMC).

**Buněčná morfologie a fyziologie:** různé typy buněk lze rozlišit podle tvaru, histologického barvení, růstu v selekčních médiích, redoxního potenciálu a podle dalších vizuálních a behaviorálních vlastností, které pak mohou být využity k izolaci těchto buněk.

**Využitím monoklonálních protilátek ke specifické vazbě na povrchové antigeny buněk:** tím může dojít k selektivnímu zachycení buněk požadovaného fenotypu. Označené buňky se následně detekují pomocí měřitelných sond (obvykle fluorochromů nebo magnetických částic, kterými jsou protilátky označeny).

Výše uvedené principy mohou být kombinovány, aby se zvýšila specifičnost izolace buněk. V prvním kroku se většinou využívá separačních metod bez značení monoklonálními protilátkami (např. izolace PBMC pomocí hustotního gradientu). Následuje povrchové značení buněk pomocí monoklonálních protilátek označených fluorescenčním konjugátem a rozdělení buněk pomocí sortování průtokovou cytometrií nebo magnetickou selekcí při použití monoklonálních protilátek konjugovaných s magnetickými částicemi.

Separace buněk je nutná pro některá imunologická vyšetření, jako je vyšetření fenotypu lymfocytů, proliferační aktivity lymfocytů nebo cytotoxické aktivity NK buněk. Separace buněk se také využívá v mnoha výzkumných metodách. Nejčastěji používaným materiálem je periferní krev nebo kostní dřeň, nicméně buňky mohou být separovány také z tkání.

Často je také zapotřebí odstranění erytrocytů (zejména pro cytometrické stanovení). Zde si pomáháme hypotonickou lýzou, která je založena na větší citlivosti erytrocytů k hypotonickému šoku ve srovnání s leukocyty. Jako lyzační roztok se používá 0,84% roztok chloridu amonného, kyselina mravenčí nebo jsou k dispozici různé protokoly s použitím destilované vody. Lýza erytrocytů může být provedena před značením plné krve monoklonálními protilátkami nebo až po použití monoklonálních protilátek a používá se pro testy kvantifikace lymfocytárních subpopulací, případně dalších leukocytů, a to jak pro určení jejich relativních, tak absolutních počtů.

**Výběr metody izolace buněk pro experiment závisí na následujících kritériích:**

1. Kolik stresu (mechanického, chemického nebo fyziologického) separovaná buňka vydrží a při tom zůstane životaschopná.
2. Potřebná úroveň čistoty a výtěžnosti buněk spolu s přijatelným rizikem kontaminace, (nulová kontaminace je nutná v případě, že jsou buňky potřebné pro následnou sterilní kultivaci).
3. Jaké jsou přijatelné náklady na přístroje, činidla, práci a podobně.
4. Jakékoliv specifické požadavky následných aplikací (například kultivace buněk, extrakce nukleových kyselin nebo proteinů a podobně).

S výše uvedenými kritérii také souvisí typ metody izolace pomocí monoklonálních protilátek, která může být založena na negativní nebo pozitivní selekci.

### 1.3 Pozitivní a negativní selekce

Pozitivní selekce je zaměřena na separaci konkrétního buněčného typu, zatímco negativní selekce zahrnuje odstranění všech ostatních buněčných typů z celé populace buněk, což v konečném důsledku vede k získání populace buněk cílových. Oba typy izolačních metod mají své výhody i nevýhody. Pozitivní selekce umožňuje lépe získat čistě vyseparovanou buněčnou populaci, protože k vybrání cílových buněk využívá specifických protilátek zaměřených na konkrétní buněčný typ. Pozitivní separací získané cílové buňky jsou však označeny protilátkami a rovněž ovlivněny dalšími činidly, což může mít vliv na funkční vlastnosti buněk (např. pěstování v kultuře). Při negativní selekci se využívá směsi monoklonálních protilátek namířených proti všem nepotřebným buněčným subpopulacím ve vzorku tak, aby nebyla označena právě pouze cílová populace buněk. To však může být velmi složité a v důsledku toho se po negativní selekci běžně setkáváme s horší čistotou získaného vzorku, kde je cílová populace stále doprovázena malou či větší příměsí nepotřebných buněk.

### 1.4 Izolace PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

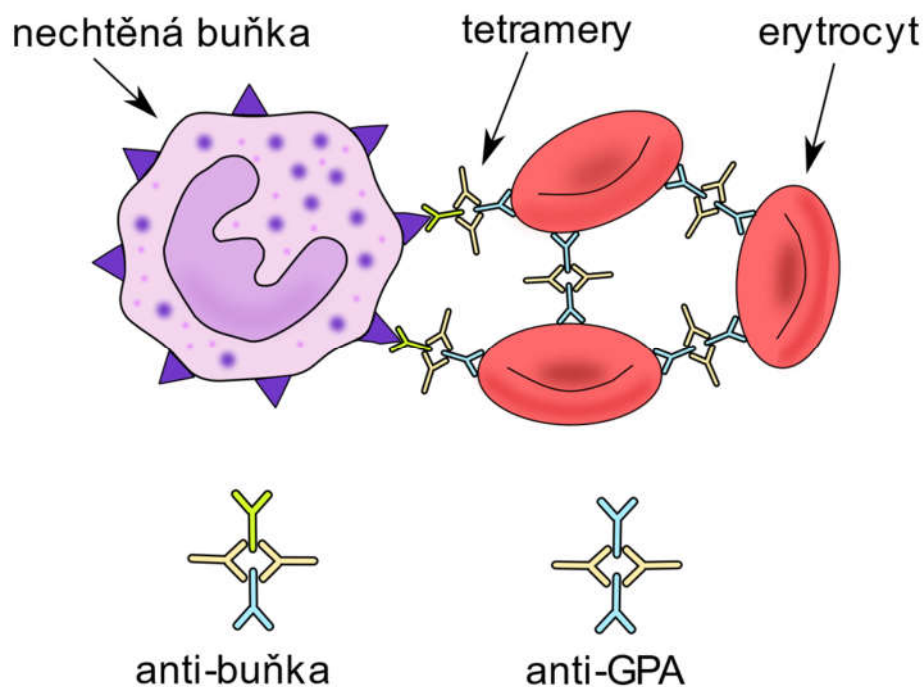
Separace buněk je založena na rozdílných fyzikálních vlastnostech sledovaných buněk, jako je jejich velikost a hustota. Separace může probíhat na spojitém nebo nespojitém hustotním gradientu. Zatímco spojitý gradient se používá spíše pro separaci proteinů, nespojitý gradient se využívá zejména pro separaci tzv. mononukleárních buněk periferní krve (lymfocyty a monocyty neboli PBMC; z anglického peripheral blood mononuclear cells). Při této separaci je nesrážlivá krev nanášena na separační médium o hustotě 1,077 g/ml, což je syntetický vysokomolekulární polymer disacharidu sukrozy a epichlorohydrinu (komerční názvy Ficoll 400, Ficoll-Paque PLUS, či Lymphoprep<sup>TM</sup>). Na Ficoll se navrství vzorek periferní krve a nechá se centrifugovat při nižších otáčkách s nulovou brzdící rychlostí. Buňky sedimentují určitou rychlostí podle své velikosti, hustoty a tvaru až do chvíle, kdy je dosažena rovnováha mezi hustotou roztoku a buňkami. Hustota erytrocytů je 1,1 g/l, trombocytů 1,05 g/l, lymfocytů 1,06 g/l, monocytů 1,07 g/l a granulocytů 1,08 g/l. Po centrifugaci jsou buňky rozděleny v separačním médiu a zahuštěny do zón. Nejnižší hustotu má plazma, proto tvoří nejvyšší vrstvu

obsahu zkumavky, pod ní se nachází prstenec mononukleárních buněk (tedy monocytů a lymfocytů), dále vrstva separačního média a na dně zkumavky jsou granulocyty a erytrocyty. Lymfocytární prstenec je pak přemístěn do čisté zkumavky. Následuje promytí buněk ve fosfátovém pufru PBS (phosphate-buffered saline). Jedná se o izotonický roztok, který má stejnou osmolaritu jako přirozené prostředí buněk (krev). Udržuje přirozené pH v rozmezí 7,2–7,4 a obvykle neobsahuje vápenaté a hořečnaté ionty.

## 1.5 Rozetové separace

Rozetové separace vycházejí z přítomnosti specifických receptorů T- a B-lymfocytů. T-lymfocyty vystavují na svém povrchu receptor CD2, na který se vážou beraní erytrocyty svým LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen 3) a tvoří tzv. E-rozety. B-lymfocyty vážou myší erytrocyty a vznikají tzv. M-rozety. Lymfocyty s navázanými erytrocyty lze separovat pomocí gradientové centrifugace a erytrocyty pak odstranit hypotonickou lýzou.

V současné době se spíše používá jiný typ rozetové separace, který využívá speciálně připravené monoklonální protilátky spojené do tetramerů či také tzv. tetramerních komplexů. Ty jsou tvořeny čtyřmi protilátkami spojenými do jedné molekuly, viz obrázek č.1. V reakci se používají dva typy tetramerních komplexů současně. První komplex má vazebná místa, kterými se váže na glykoforin A (GPA) na povrchu erytrocytů a další vazebná místa, kterými reaguje s vybranými receptory buněk, které je nutné při izolaci odstranit. Druhý typ tetramerních komplexů má vazebná místa pouze pro GPA na povrchu erytrocytů. K plné krvi odebrané do nesrážlivého činidla se přidá výše uvedená směs dvou tetramerních komplexů a takto připravená krev se inkubuje 20 minut při pokojové teplotě. V době inkubace se buňky, vůči jejichž receptorům byly přidány monoklonální protilátky v tetrameru s GPA, pomocí těchto tetramerů navážou na erytrocyty a erytrocyty s navázanými buňkami se působením tetramerů proti GPA provážou mezi sebou. Takto upravená krev je navrstvena na hustotní médium, následuje hustotní gradientová centrifugace. Po ní v prstenci mezi plazmou a separačním médiem zůstanou pouze ty buňky, vůči jejichž povrchovým znakům nebyly přidány monoklonální protilátky. Ostatní buňky během separace klesnou spolu s erytrocyty na dno zkumavky (viz obrázek č. 1).



**Obrázek č. 1: Rozetvé separace.**

Izolační koktejl protilátek obsahuje tetramery proti receptorům buněk spolu s anti-GPA, které prováží nechtěnou buňku s erytrocyty a dále tetramery tvořené pouze anti-GPA, které provazují erytrocyty navzájem.

## 1.6 Separace pomocí adherence na plastové povrchy

Je jednou z nejlevnějších variant separací, kterou je možno využít pro získání monocytů. Tyto buňky mají přirozenou schopnost adherovat k povrchu kultivačního plastiku. PBMC izolované z periferní krve se nechají inkubovat několik hodin v plastické misce (např. plastová Petriho miska), přičemž monocytů během inkubace postupně adherují k plastovému povrchu, zatímco lymfocyty zůstávají v médiu. Nevýhodou této metody je, že nezískáme čistou populaci monocytů (v získané buněčné směsi je pouze 70–80 % monocytů), navíc se touto metodou vyseparuje většinou méně než 50 % všech přítomných monocytů ve zpracovávaném vzorku. K tomu hraje důležitou roli také variabilita jak v čistotě, tak účinnosti separace mezi jednotlivými dárci.

## 1.7 Magnetické selekce

Pomocí těchto metod lze získat specifickou vybranou populaci buněk. Magnetická selekce je založena na označení buněk v suspenzi monoklonálními protilátkami, které jsou konjugovány s magnetickými částicemi. Zkumavka s takto označenými buňkami je pak

vložena do magnetu, přičemž magnetické částice se spolu s cílovými buňkami zachytí na stěnách zkumavky, zatímco ostatní buňky v supernatantu jsou odstraněny. Reakce může probíhat buď ve zkumavkách, nebo tzv. kolonách. I zde jsou v prvním kroku označeny buňky protilátkami s navázanými magnetickými partikulami. Po ukončení inkubace buňky procházejí kolonou umístěnou v silném magnetickém poli. Magneticky označené buňky jsou zadrženy v koloně a odděleny od neznačených buněk. Po vyjmutí kolony z magnetického pole jsou vymyty zadržené buňky. Obě populace buněk (značené i neznačené) jsou následně použitelné k dalším experimentům.

## 1.8 Sortování

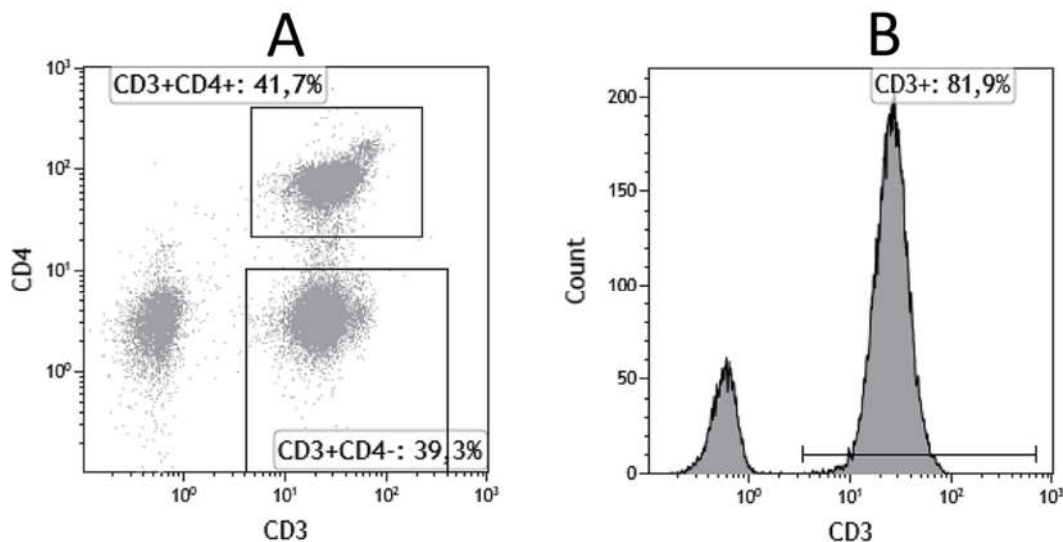
Další metodou k získání určité buněčné populace je sortování (nebo též sortrování). Tato metoda se provádí na přístrojích, které se dříve označovaly názvem FACS (z anglického „fluorescence-activated cell sorting“). Přístroje využívají principu průtokové cytometrie. Pro toto stanovení jsou buňky v roztoku označeny monoklonální protilátkou s navázaným fluorochromem. Po inkubaci a promytí vzorku následuje vlastní separace. Vzorek je nasáván pod tlakem do tenké kapiláry, kde se buňky řadí jedna za druhou. Následuje detekce založená na stejném principu, jako u klasického průtokového cytometru. Vzorky vstupují do měřicí komůrky (tzv. průtokové cely), kde jsou ozářeny paprskem laseru. Přítomné fluorochromy na protilátkách, které jsou navázány na specifických receptorech buňky, začnou po ozáření paprskem laseru emitovat světlo příslušné vlnové délky, které je snímáno pomocí detektorů. Sorty pracují na základě dvou principů, podle kterých je můžeme rozdělit na fluidní sortery a kapénkové sortery. U fluidního sorteru prochází proud nosné kapaliny se vzorkem průtokovou celou a při identifikaci částice splňující požadovaná kritéria je sepnut piezoelektrický ventil a proud s částicí vybočí mimo hlavní proud, a tam je posléze zachycen do sběrných zkumavek. U kapénkového sorteru je proud buněk roztržěn na jednotlivé kapičky ideálně tak, aby jedna kapička obsahovala právě jedinou buňku. Jakmile je detekována buňka, která splňuje požadovaná kritéria (obsahuje sledovaný fluorescenční znak), je celé kapičce pomocí elektrického výboje udělen buď pozitivní nebo negativní náboj. Nabité kapičky jsou vychýleny z proudu pomocí elektromagnetů a zachyceny do sběrných zkumavek. Obě metody se vyznačují vysokou čistotou separace, ale jsou finančně náročné, a to nejen z hlediska přístrojového vybavení, ale i samotné separace. V současné době existují i další typy sorterů, které třídí buňky na odlišných fyzikálních principech (např. akustické sortery a další).

## 2 Vyšetřovací metody v laboratoři buněčné imunologie

### 2.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda určená k měření buněk nebo částic v roztoku. Průtokový cytometr se skládá ze tří systémů: fluidního, optického a elektronického. Fluidním systémem jsou buňky určené k analýze ve vzorkovém pufru unášeny proudem nosné kapaliny do měřicí komůrky (tzv. průtoková cela) tak, aby komůrkou procházely jedna buňka za druhou (princip hydrodynamické fokusace). V průtokové cele dopadá na buňky paprsek jednoho či postupně více laserů v závislosti na konfiguraci daného cytometru, čímž se do měření zapojuje optický systém. Optický systém je tvořen jedním nebo více lasery v závislosti na konfiguraci cytometru, dále soustavou čoček a hranolů, které upravují laserový paprsek do požadovaného tvaru a dále optickými zrcadly a filtry, jež zajišťují vlastní měření jednotlivých optických parametrů. Při průchodu buňky laserovým paprskem dochází k rozptylu světla laserového paprsku. Rozptyl světla v kolmém směru na dopad paprsku laseru je závislý na morfologických vlastnostech buňky (povrchové struktuře membrán, přítomných granulích a celkové hustotě buňky). Měří se detektorem nazývaným **Side Scatter** (SSC nebo SS). Rozptyl světla v rovnoběžném směru je závislý na velikosti buňky a měří se detektorem s názvem **Forward Scatter** (FSC nebo FS). Pokud jsou buňky označeny monoklonálními protilátkami, které jsou konjugovány s fluorochromy, dochází při ozáření laserovým světlem k excitaci elektronů v atomech tohoto fluorochromu. Při návratu elektronů do základního stavu je přebytečná energie vyzářena ve formě elektromagnetického záření s delší vlnovou délkou, než byla vlnová délka dopadajícího laserového paprsku. Emise fotonů je závislá na vstupní energii a na tzv. **Stokesově posunu** (rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emitovaného záření). Konkrétní vlnová délka takto vzniklého emitovaného fluorescenčního záření je tedy závislá na vlnové délce použitého laserového světla a na konkrétním fluorochromu. Fluorescenční záření procházejícího vzorku je postupně systémem dichroických zrcadel a soustavy filtrů, propouštějících specifické rozmezí vlnových délek (long pass, short pass a band pass filtry), rozděleno mezi jednotlivé detektory, které snímají vždy jen určitou část spektra v určitém rozsahu vlnových délek, (tedy zaznamenávají intenzitu záření typickou pro určité skupiny fluorochromů). Např. první detektor snímá záření v rozsahu vlnových délek 500–545 nm, které jsou typické pro fluorochromy FITC (Fluorescein isothiokyanát) nebo Alexa Fluor 488 a ruční detektor snímá záření v rozsahu vlnových délek 560–590 nm, které jsou charakteristické pro fluorochromy PE (Phycoerythrin),

Alexa Fluor 647 aj. Pomocí tohoto systému jsou zaznamenány signály jednotlivých fluorochromů, kterými jsou označeny monoklonální protilátky navázané na buněčných povrchových strukturách. Používanými detektory v cytometrech jsou fotodiody (pouze pro Forward Scatter) a fotonásobiče. Na kladně nabitou desku fotonásobiče (katodu) dopadne foton, který z ní vyrazí dva elektrony a ty se tzv. násobí na sérii dynod. Na konci fotonásobiče je anoda, na které se měří změna napětí, která vzniká ve fotonásobiči po dopadu fotonů. Při ozáření buňky a fluorochromů (přítomných na monoklonálních protilátkách navázaných na buněčných receptorech) paprskem laseru vznikají na jednotlivých detektorech napěťové pulzy. Elektronický systém pak zpracovává zaznamenané napěťové pulsy jako tzv. intenzitu fluorescence. Relativní škála intenzit se zpravidla vynáší na logaritmickou stupnici. Výsledek cytometrického měření se odečítá z grafů, a to buď dvouparametrově pomocí tzv. **dot plotů** (obrázek č. 2A), nebo z **jednoparametrového histogramu** (na ose X je zobrazena intenzita



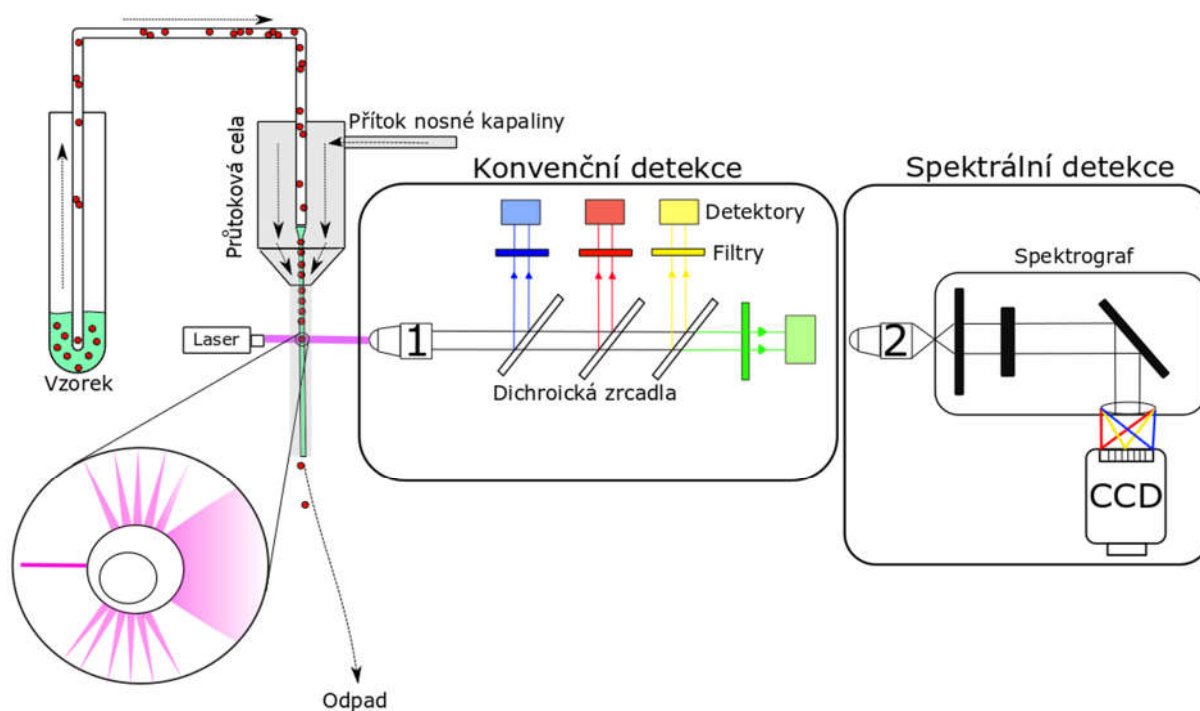
**Obrázek č.2:** A) Dot plot - stanovení procentuálního zastoupení pomocných CD3+CD4+ T-lymfocytů a CD3+4- T-lymfocytů. B) Histogram procentuálního zastoupení T-lymfocytů CD3+.

fluorescence, na ose Y je počet buněk, obrázek č. 2B). Jednotlivé tečky v dot plotech představují buňky, které jsou definovány intenzitou fluorescence pro každý ze sledovaných fluorescenčních signálů. Od určité intenzity fluorescence je sledovaný fluorescenční signál považován za pozitivní a sledovaný znak je pak označen znaménkem plus (+). Buňky s nižší intenzitou fluorescence sledovaného markeru jsou pak považovány za negativní a jsou označovány znaménkem mínus (-).

U fluorochromů je vhodné, aby se jejich absorpční maximum co nejvíce blížilo vlnovým délkám běžně používaných laserů. V cytometrii se nejčastěji používá vzduchem chlazený



argonový laser s vlnovou délkou záření 488 nm (modrá oblast spektra), helium-neonový laser s vlnovou délkou 633 nm (červená oblast spektra), fialový laser s vlnovou délkou 407 nm nebo UV laser s vlnovou délkou 350 nm. V současné době je v průtokové cytometrii běžným standardem využití více-laserového uspořádání. Na buňky v měřící cele dopadají paprsky různých laserů s časovým odstupem a z nich vzniklé signály jsou vyhodnoceny samostatně. Dříve využívaný jedno-laserový cytometr s argonovým laserem byl schopen analyzovat měření pro 5 různých fluorochromů, dnes se v běžné rutinní diagnostice využívají cytometry v rozsahu 8-10 barev. Pro výzkumné účely jsou dnes využívány mnoho-laserové cytometry, které jsou schopny hodnotit 18–20 barev, nebo tzv. spektrální cytometry, které jsou schopny shromažďovat úplné spektrální informace na úrovni jedné buňky. Konfigurace používaných detektorů spektrálního cytometru zabírá celé fluorescenční spektrum a není explicitně vyladěna na konkrétní barvicí panel. Tímto způsobem lze detekovat i fluorochromy, které mají své podobné emisní spektrum a při měření na běžném průtokovém cytometru by od sebe nebyly rozeznatelné (obrázek č. 3).



**Obrázek č. 3: Schéma konvenčního a spektrálního cytometru**

Modifikováno dle: Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2013;Chapter 1:Unit1.27. doi:10.1002/0471142956.cy0127s63

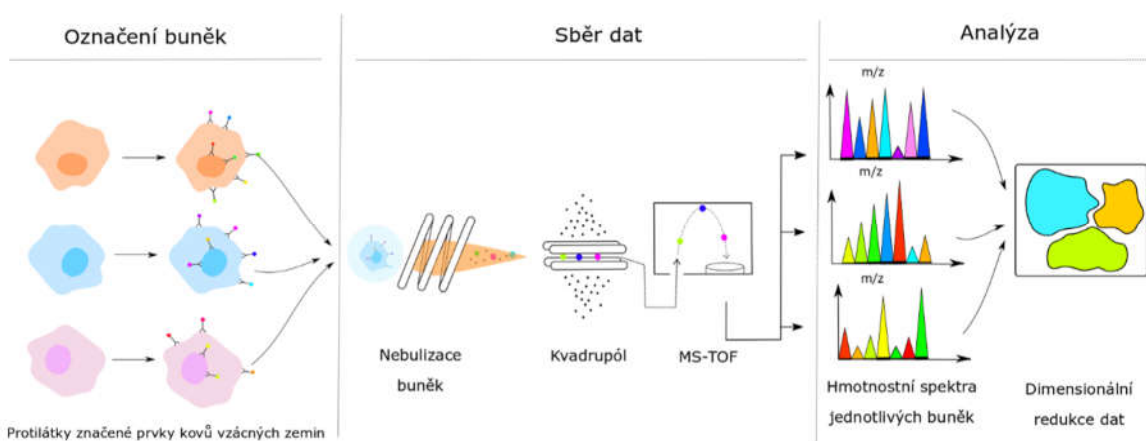
Při běžném cytometrickém měření se často stává, že průtokovou celou procházejí dvě buňky najednou. Tato naměřená data musí být softwarově z celkového souboru všech dat

odstraněna. Tento problém řeší novější typ cytometru (tzv. akustický cytometr). Tento přístroj pracuje s technologií akustického zaostřování vzorku, při které se generuje ultrazvukový tlak (při frekvenci  $> 2$  MHz), kterým se přenáší částice do středu proudu vzorku. V kombinaci s hydrodynamickým tlakem vzniká centralizovaný úzký proud částic, který je vstříkovan do středové osy kapiláry, kde dochází k rovnoměrnému laserovému ozáření bez ohledu na vstupní rychlost vzorku.

Omezením průtokové cytometrie je relativně málo typů antigenů, které jsme schopni detekovat na jedné buňce. Například při stanovení efektorových pomocných T-lymfocytů potřebujeme znak CD45 (což je znak typický pro leukocyty), dále znaky CD3 (všechny T-lymfocyty) a CD4 (pomocné T-lymfocyty), znaky CD45RA a CCR7 (definují vývojová stádia T-lymfocytů), a znaky CD69, CD25, CD38 a další, které vypovídají o aktivaci buňky. Dále potřebujeme stanovit intracelulární produkci cytokinů (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4), přítomnost kostimulačních molekul CD40 ligand nebo CTLA-4 a přidat značení oddělující živé a mrtvé buňky.

Pro jednotlivá vývojová či aktivační stádia lymfocytů jsou dnes známy charakteristické markery. Protože zpravidla pracujeme s buněčnou suspenzí, ve které jsou efektorové T-lymfocyty stimulované periferní krve v různém stádiu vývoje, nebudeme schopni při omezeném počtu detektorů tyto buňky zcela přesně charakterizovat. Při měření na například deseti-barevném cytometru nemáme k dispozici dostatek kanálů, které by byly schopny snímat více než 10 různých fluorescenčních záření a tím pádem nemůžeme detekovat více než 10 znaků na jedné buňce. Navíc používané fluorochromy vždy emitují záření v určitém relativně širokém pásmu spektra a tyto pásy se mohou v závislosti na použitých fluorochromech částečně překrývat. To vede k falešnému zvýšení signálu a tím i k falešně vyšší intenzitě fluorescence. Takto naměřená data proto musí být tzv. kompenzována. Část signálu, ve které dochází k překryvu, je softwarově odečtena od skutečně naměřené intenzity fluorescence. Tento problém řeší atomová hmotnostní cytometrie pomocí přístroje CyTOF (obrázek č. 4), kdy se místo fluorescenčních značek na monoklonálních protilátkách používají izotopy lanthanoidů. Buňku lze takto teoreticky označit až 100 různými monoklonálními protilátkami. Při vlastním měření je každá buňka suspenze rozprášena neboli nebulizována do jedné kapky. Tato kapka je pak vnesena do argonového plamene, který má teplotu vyšší než 5000 °C. Následně dojde k odpaření všech organických součástí. Buňka je tímto procesem atomizována, z přítomných lanthanoidů jsou vyraženy elektrony, čímž se z nich stanou ionty. Tyto ionty jsou urychleny v elektrostatickém poli a při svém letu k detektoru jsou odděleny pomocí deflektorů

na jednotlivé paprsky v závislosti na jejich hmotnosti. Hmotnostní spektrometr je odlišný od ostatních izotopů na základě rozdílných atomových hmotností jednotlivých prvků. Detektory pak sčítají přicházející ionty a kvantifikují množství každého kovu, které je závislé na množství navázaných protilátek pro každou buňku. Výsledkem jsou čárová spektra, ve kterých nedochází k překryvu, jako je tomu v případě běžných fluorochromů (obrázek č. 4). Navíc lze takto stanovit relativně velký počet buněčných znaků (v současnosti se používá 30–40 monoklonálních protilátek současně), ale analýza takového měření zatím převyšuje běžný diagnostický rámec. S tím souvisí také to, že zatím není rutinně k dispozici nabídka lanthanoidy značených monoklonálních protilátek, pořizovací cena přístroje je vysoká a provedení vyšetření je drahé.



**Obrázek č. 4: Atomová hmotnostní cytometrie CyTOF**

Průtoková cytometrie se v imunologické vyšetření nejčastěji používá ke stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých lymfocytárních populací, ale je možné její využití také ke stanovení kvantitativní. Jedná se o stanovení založené na měření meanu intenzity fluorescence, který představuje střední hodnotu intenzity fluorescence, kterou pro daný fluorochrom konjugovaný s protilátkou hodnotíme u sledované populace buněk. Tato hodnota je přímo úměrná navázanému množství protilátek, což můžeme využít pro zjištění množství exprimovaného receptoru, například se při sepsích zvyšuje exprese CD64 na neutrofilech, u monocytů se na jejich povrchu snižuje exprese HLA-DR, při monitorování exprese CD274 při sledování účinnosti léčby pomocí monoklonální protilátky anti-PD-L1 (CD274) a podobně.

Průtoková cytometrie se využívá nejen k imunologickému a hematologickému vyšetření lidí, ale má také široké využití ve veterinární medicíně, v biologii, mikrobiologii apod.

## 2.2 Vyšetření lymfocytárních subpopulací v laboratoři buněčné imunologie

Hodnocení lymfocytárních populací je nezbytné pro diagnostiku maligních onemocnění, vrozených primárních imunodeficiencí či získaných sekundárních imunodeficiencí, které se mohou rozvinout v důsledku infekcí, autoimunitních onemocnění, traumat, nádorů, malnutrice, nebo terapie primárního onemocnění (ozařování, chemoterapie, antibiotická léčba, kortikoidy, a podobně). Diagnostické laboratorní postupy jsou navrhovány na základě podrobného klinického vyšetření a měly by být hodnoceny v kontextu s klinickým stavem pacienta.

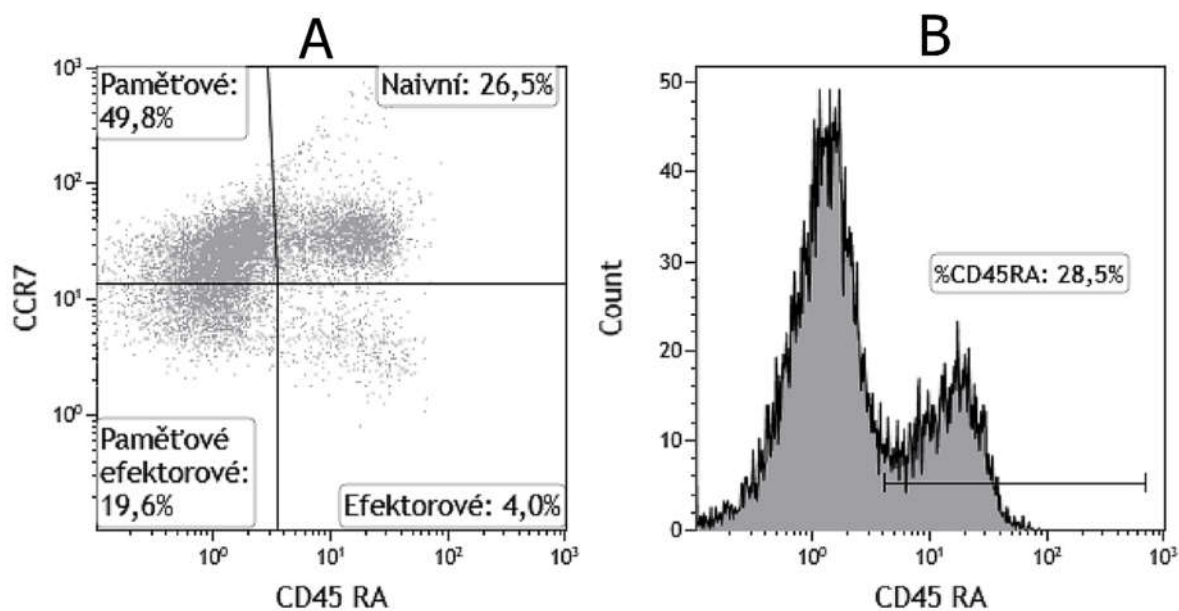
Základním buněčným vyšetřením v imunologické laboratoři je sledování změn v zastoupení a funkci jednotlivých populací lymfocytů. Ty se významně podílejí na funkci imunitního systému, například efektorové pomocné  $CD4^+$  T-lymfocyty ovlivňují aktivaci makrofágů, pomáhají při aktivaci  $CD8^+$  T-lymfocytů a B-lymfocytů. Efektorové cytotoxické  $CD8^+$  T-lymfocyty a NK buňky (natural killer cells, přirození zabíječi) zabíjejí především infikované nebo nádorově změněné buňky. B-lymfocyty po své aktivaci a diferenciaci na plasmablasty a plazmatické buňky jsou odpovědné za produkci protilátek.

V periferní krvi zdravého člověka se vyskytují různé buněčné populace, mezi kterými se nacházejí buňky účastnící se primárně imunitních reakcí. Mezi ně patří T-lymfocyty (pomocné Th, cytotoxické Tc a regulační Treg T-lymfocyty), B-lymfocyty a NK buňky. Každá z těchto buněk nese na svém povrchu některé jedinečné znaky, podle kterých je možné danou populaci buněk identifikovat. **T-lymfocyty** charakterizuje povrchový znak **CD3**, **Th-lymfocyty** **CD3** a **CD4**, **Tc-lymfocyty** **CD3** a **CD8**, **Treg lymfocyty** **CD3**, **CD4**, **CD25** a **CD127**, **B-lymfocyty** **CD19** nebo **CD20**, **NK buňky** **CD16** a **CD56**. Zkrácený zápis definované populace se provádí pomocí CD znaku a znaménka plus (+; sledovaný znak u buněk přítomen je) či mínus (-; sledovaný znak přítomen není). Existují ještě další formy zápisu, kdy je definována síla exprese daného znaku, např. „high“ nebo znakem „++“, což okazuje na vysokou expresi daného znaku na povrch buňky. Nízká exprese je označena jako „low“ nebo také „+/-“. Regulační T-lymfocyty jsou pak označeny jako  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$ . Pomocí fluorochromem konjugovaných monoklonálních protilátek, které jsou namířeny proti sledovaným znakům, je možné tyto buněčné populace od sebe odlišit metodou průtokové cytometrie. Kromě základních lymfocytárních populací můžeme stanovit i další, tzv. efektorové fáze vývoje T a B-lymfocytů (pomocí znaků, které se na těchto lymfocytech vyskytují při jejich aktivaci) nebo pomocí selektivních či chemokinových receptorů (umožňují vstup lymfocytů do uzlin).

Výsledkem základního imunologického vyšetření je procentuální zastoupení lymfocytárních populací ve vyšetřovaném vzorku. Součtem procentuálního zastoupení hlavních lymfocytárních populací v periferní krvi (T-lymfocytů, B-lymfocytů a NK-buněk) získáváme hodnotu, která se blíží 100%. Kromě procentuálního zastoupení lymfocytárních populací (tzv. relativní počet lymfocytů), je neméně důležitou hodnotou také tzv. absolutní počet lymfocytů, který nám udává reálný počet buněk dané populace v litru krve. Změny absolutního počtu lymfocytů jsou závislé na celkovém počtu lymfocytů a celkovém počtu leukocytů v daném vyšetřovaném vzorku. Pokles počtu leukocytů a lymfocytů může vést ke snížení absolutního počtu lymfocytů, ačkoli relativní počty zůstávají v normálních hodnotách. Tyto hodnoty jsou důležité zejména u sledování počtu pomocných CD4+ T-lymfocytů u pacientů s HIV infekcí, kde snižující se počet těchto buněk v krvi odráží tíži klinického stavu pacienta.

### 2.2.1 T-lymfocytární subpopulace

T-lymfocyty jsou tvořeny populacemi pomocných a cytotoxických T-lymfocytů. Obě tyto populace můžeme dále rozdělit na **naivní** (dosud se s antigenem nesetkaly), **paměťové** (vznikají po setkání se s antigenem), **efektorové nebo efektorové paměťové T-lymfocyty** (obrázek č. 5A). Obě efektorové subpopulace jsou v krvi běžného člověka zastoupeny ve velmi malém množství, neboť se vyskytují jen v místě probíhající infekce či zánětu a v krvi je tedy můžeme zachytit jen při jejich putování do cílového orgánu. Tento poměr se však může měnit u imunodeficitních stavů, těžce probíhajících infekcí či autoimunit. Jednotlivé subpopulace pomocných (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) nebo cytotoxických (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) T-lymfocytů můžeme stanovit pomocí protilátek proti CCR7 a CD45RA nebo CD45RO (obrázek č. 5). CCR7 je chemokinový receptor vyskytující se na naivních nebo paměťových T-lymfocytech, s jehož pomocí se lymfocyty dostávají do uzlin či sekundárních lymfatických orgánů. T-lymfocyty při své aktivaci tento receptor ztrácejí, což jim umožňuje vycestovat z uzlin a putovat do místa zánětu. Ztráta receptoru CCR7 tedy definuje tzv. efektorový stav T-lymfocytů. Efektorové T-lymfocyty jsou plně diferencované T-lymfocyty ve stádiích Th1, Th2, Th17 případně dalších forem Th-lymfocytů, které pošly celou aktivaci T-lymfocytů prostřednictvím antigenu prezentovaného na APC.



Obrázek č. 5: T-lymfocytární subpopulace

A) Dotplot subpopulací  $CD4^+$  T-lymfocytů. B) Histogram  $CD45RA^+$  T-lymfocytů.

**CD45RA** je znak, který se vyskytuje **na naivních** T-lymfocytech, a **CD45RO** se vyskytuje **na paměťových** T-lymfocytech. Jedná se o produkt jednoho genu, který se v závislosti na vývojovém stádiu lymfocytu přepisuje v rozdílných formách. Při aktivaci T-lymfocytu se zkracuje délka proteinového řetězce tohoto antigenu, přičemž forma RA označuje nejdelší formu a RO výrazně kratší formu proteinového řetězce. Tento receptor je enzym tyrosin fosfatáza, která se podílí na přenosu intracelulárního signálu při aktivaci lymfocytu. Kombinací znaků CCR7 a CD45RA, nebo CCR7 a CD45RO můžeme definovat jednotlivé subpopulace pomocných i cytotoxických T-lymfocytů. Dalším důležitým znakem, označujícím T-lymfocyty odcházející z thymu, je znak CD31. S jeho pomocí můžeme definovat tzv. „recent thymic emigrants“ neboli  $CD31^+$  T-lymfocyty. Jejich nepřítomnost je důležitým pomocným markerem při diagnostice pacientů s těžkým kombinovaným imunodeficitem (SCID). Zastoupení zejména naivních a paměťových T-lymfocytů se mění v závislosti na věku pacienta. U novorozenců, kojenců a dětí převažují naivní T-lymfocyty, v seniorském věku pak paměťové T-lymfocyty. V rámci efektorových populací dále můžeme stanovit aktivované T-lymfocyty pomocí znaku HLA-DR, znak CD57 nalezneme na tzv. vyčerpaných (exhausted) T-lymfocytech. S chronickou aktivací se rovněž zvyšuje exprese PD-1 na těchto buňkách. PD-1 receptor (Programmed cell Death-1) po vazbě na PD-1 ligand (PD-L1) aktivuje apoptózu u lymfocytů. Jedná se o regulaci počtu, případně nadměrné funkce efektorových T-lymfocytů. PD-L1 může být po aktivaci exprimován na buňkách endotelu, makrofázích, monocitech, neutrofilech či

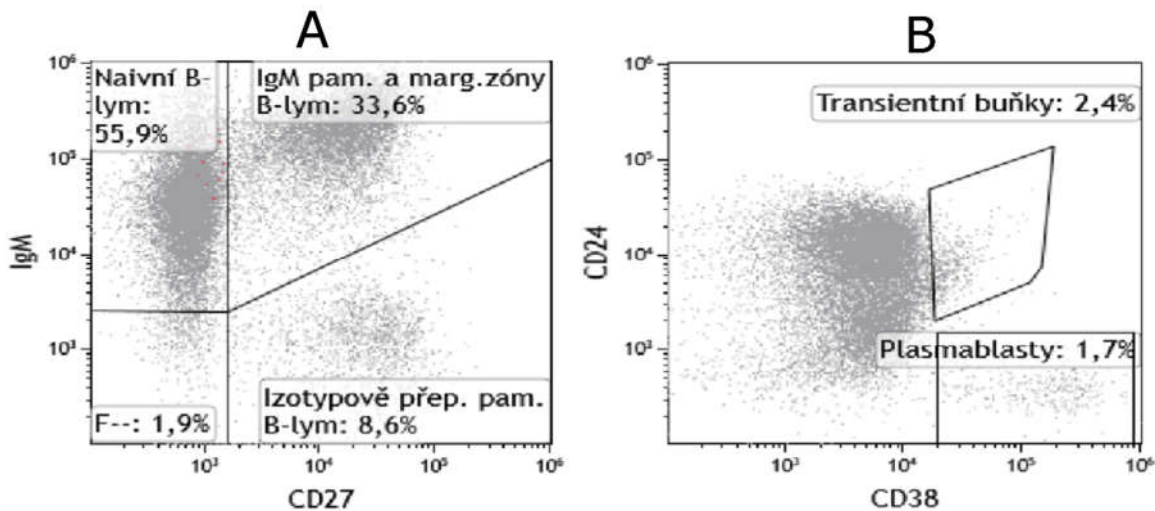
dalších buňkách. Zvýšené počty CD57<sup>+</sup> a PD-1<sup>+</sup> T-lymfocytů nacházíme u pacientů s chronickými záněty.

### 2.2.2 B-lymfocytární subpopulace

Rovněž u B-lymfocytů můžeme v periferní krvi identifikovat některá z jejich vývojových stádií. Definujeme je pomocí monoklonálních protilátek proti znaku CD27, membránovému IgD nebo IgM, CD38 a CD21. Vývojově nejmladší B-lymfocyty jsou nazývány **transientní B-lymfocyty** s fenotypem **CD19<sup>+</sup>IgM<sup>high</sup>CD27<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup>**. Pokud mají tyto buňky navíc nízkou expresi CD21 a IgD, jedná se o nejmladší formu transientních B-lymfocytů (tzv. **T1 B-lymfocyty**). Při dalším dozrávání začínají transientní B-lymfocyty exprimovat **IgD a CD21** a stávají se z nich **T2 B-lymfocyty**. Obě formy transientních B-lymfocytů dozrávají ve slezině nebo v sekundárních lymfatických orgánech v **naivní B-lymfocyty (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>)**. Naivní B-lymfocyty putují krevním řečištěm do uzlin či sekundárních lymfatických orgánů a hledají svůj specifický antigen. Po setkání se „svým“ antigenem se z nich stávají **IgM paměťové B-lymfocyty (IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>)**. Při další aktivaci B-lymfocytů za pomoci CD4<sup>+</sup> folikulárních pomocných T<sub>FH</sub>-lymfocytů a folikulárních dendritických buněk v germinálním centru se ze sekundárních lymfatických orgánů dostávají do krve **izotypově přepnuté paměťové B-lymfocyty (IgM<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>)** a **plasmablasty (CD19<sup>low</sup>IgM<sup>-</sup>CD27<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>)**. Plasmablasty putují do kostní dřeně, kde se usazují jako **plazmatické buňky (CD19<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>CD38<sup>high</sup>CD138<sup>high</sup>)**. V této chvíli také ztrácejí typické znaky pro B-lymfocyty (CD19 a CD20). Znak CD21 (jedná o receptor pro C3d, také označovaný jako CR2; tento receptor také využívá virus Epstein-Barr) je normálně přítomen na všech vývojových stádiích B-lymfocytů kromě T1 B-lymfocytů a plasmablastů či plazmatických buněk. Ve zvýšené míře je exprimován na **B-lymfocytech marginální zóny**, které mají podobně jako IgM paměťové B-lymfocyty fenotyp **IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>**. V krvi pacientů s autoimunitními chorobami, s CVID či hepatitidami někdy nacházíme **subpopulaci CD21<sup>low</sup>CD38<sup>low</sup> B-lymfocytů**. Jejich vyšší procento můžeme nalézt také u starších osob. Jedná se zřejmě o B-lymfocyty, které při svém vývoji do paměťových forem unikly apoptóze při selekcích v germinálních centrech. U osob s autoimunitními onemocněními jsou částečně odpovědné za produkci autoprottilátek.

Zastoupení subpopulací B-lymfocytů se podobně jako u T-lymfocytů liší v závislosti na věku pacienta. V pupečnickové krvi, u novorozenců a kojenců nacházíme převahu

transientních B-lymfocytů. K jejich dozrávání dochází postupně s věkem a to do naivních B-lymfocytů a dalších paměťových B-lymfocytárních subpopulací. U kojenců a batolat také můžeme pozorovat zvýšenou tvorbu plasmablastů, která je dána reakcí imunitního systému na styk s běžnými patogeny, proti kterým si děti vytvářejí protilátky, které jsou už u dospělých běžně přítomny. Chybění zejména paměťových forem B-lymfocytů a plasmablastů u dospělých osob může být známkou imunodeficitu. Přítomnost zejména paměťových forem B-lymfocytů podává informaci o funkčnosti pomocných  $CD4^+$  T-lymfocytů, které pomáhají B-lymfocytům při vyžívání izotypově přepnutých paměťových forem do stádia plasmablastů a plazmatických buněk. Při významném úbytku  $CD4^+$  T-lymfocytů nebo při jejich nefunkčnosti (u pacientů s imunodeficity), dochází k přerušení vývoje izotypově přepnutých paměťových B-lymfocytů a v krvi pacientů nacházíme jen naivní formy či IgM paměťové B-lymfocyty, přičemž plasmablasty mohou chybět úplně.

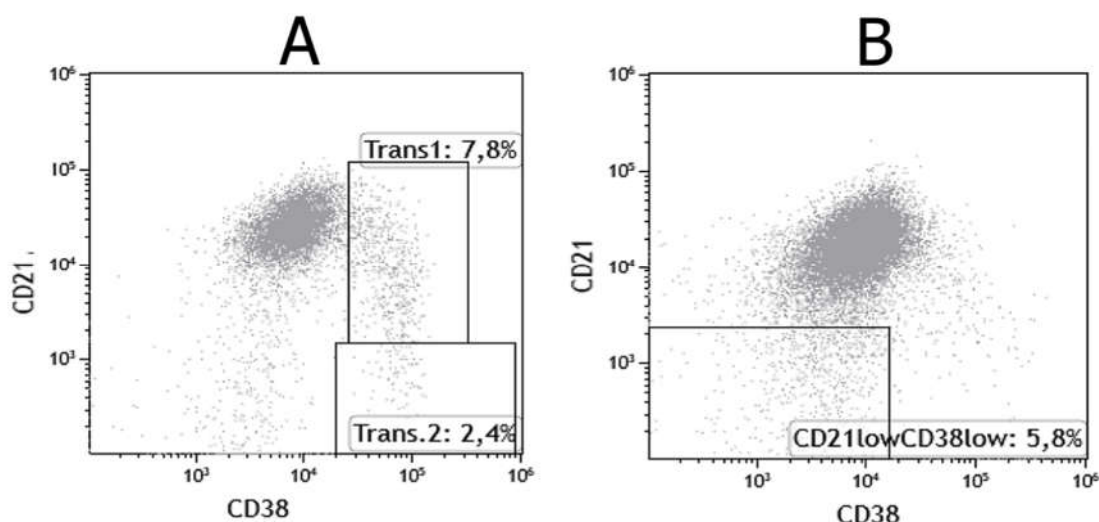


Obrázek č. 6: B-lymfocytární subpopulace

A) Dot plot vyobrazující B-lymfocyty naivní (IgM+CD27-), IgM paměťové (IgM+CD27+) a izotypově přepnuté paměťové (IgM-CD27+).

B) Dot plot vyobrazující B-lymfocyty transientní (CD24+CD38+) a plasmablasty (CD24-CD38++).





**Obrázek č. 7: B-lymfocytární subpopulace**

**A)** Dot plot znázorňující transientní B-lymfocyty T1 a T2.

**B)** Subpopulace CD21<sup>low</sup> B-lymfocytů.

Jak už bylo dříve uvedeno, průtoková cytometrie se v imunologické vyšetření nejčastěji používá ke stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých lymfocytárních populací, ale je možné ji využít také ke kvantimetrickému stanovení. Jedná se o stanovení založeném na měření meanu intenzity fluorescence (MFI) pro daný fluorochrom konjugovaný s protilátkou. MFI představuje střední hodnotu intenzity fluorescence, která je přímo úměrná navázanému množství protilátek na sledovaný receptor. Měření MFI můžeme využít pro sledování míry exprese receptoru, například se při sepsích zvyšuje exprese CD64 na neutrofilech, u monocytů se na jejich povrchu snižuje exprese HLA-DR, při monitorování exprese CD274 při sledování účinnosti léčby pomocí monoklonální protilátky anti-PD-L1 (CD274) na nádorových buňkách a podobně.

Průtoková cytometrie se využívá nejen k imunologickému a hematologickému vyšetření lidí, ale má také široké využití ve veterinární medicíně, v biologii, mikrobiologii apod.

### 2.3 Funkční testy v laboratoři buněčné imunologie

V rámci sledování parametrů buněčné imunity nás kromě počtu jednotlivých buněčných subpopulací zajímá také jejich funkčnost. Specifické funkční testy často vyžadují izolaci některé z lymfocytárních subpopulací. Například sledování proliferace T-lymfocytů vyžaduje izolaci PBMC nebo přímo T-lymfocytů, produkce protilátek izolaci PBMC nebo přímo

B-lymfocytů, produkce cytokinů izolaci T-lymfocytů a stanovení cytotoxicity izolaci cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů nebo NK buněk. Po izolaci buněk následuje *in vitro* kultivace v různých typech kultivačních desek v závislosti na počtu buněk, době kultivace a spotřebě kultivačního média. Kultivace zpravidla probíhá v kultivačních médiích, která mohou obsahovat různé látky (růstové faktory, cytokiny a podobně), a to za vhodných podmínek (při teplotě 37 °C v atmosféře CO<sub>2</sub>).

### 2.3.1 Aktivace buněk

V závislosti na konkrétním funkčním testu jsou používána různá stimulančia. Pro vyšetření aktivace a proliferace T-lymfocytů nespecifickým mitogenem se často používají tzv. **polyklonální mitogeny**, které se vážou na specifické membránové sacharidy a aktivují buňky bez závislosti na jejich antigenní specifitě. Příkladem takovýchto mitogenů působících na T-lymfocyty jsou **phytohemagglutinin (PHA)** a **concanavalin (ConA)**. B-lymfocyty i T-lymfocyty aktivuje **pokeweed mitogen (PWM)**. **Lipopolysacharid (LPS, endotoxin)** aktivuje především B-lymfocyty, ale při delším působení se aktivují prostřednictvím B-lymfocytů i T-lymfocyty. Dalším možným způsobem stimulace T-lymfocytů je využití monoklonálních protilátek **anti-CD3** společně s **anti-CD28**. Všechny lymfocyty je možné aktivovat také pomocí **phorbol myristát acetátu (PMA)** a **ionomycinu (IM)**, kdy obě tyto složky působí jako nízkomolekulární aktivátory signálních drah. **PMA a ionomycin** pronikají přes buněčnou membránu do nitra buňky. PMA je přímý stimulátor proteinkinázy C a ionomycin působí na vápníkovou pumpu. PMA a IM působí jako velice silné aktivátory buněk a zejména při aktivaci ionomycinem často dochází k jejich předčasnému usmrcení. K aktivaci lymfocytů je možno také použít **specifické antigeny** (například tetanus, virus varicely, pneumokoky, kandidy a podobně). Stanovení odpovědi na specifické antigeny může sloužit ke sledování odpovědi pacienta na očkování daným antigenem. Nevýhodou této specifické stimulace je aktivace a proliferace jen malého množství lymfocytů.

### 2.3.2 Blastická transformace lymfocytů

Termín blastická transformace vznikl na základě sledování morfologických změn lymfocytů při proliferaci. Při přeměně klidových lymfocytů na proliferující lymfocyty dochází k výraznému zvětšení buněk včetně podílu cytoplazmy uvnitř buněk. Buněčný cyklus zahrnuje následující fáze: G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> a M fázi. G<sub>0</sub> fáze je klidovou fází buněčného cyklu. Při aktivaci

buňky přecházejí do fáze G1. Při ní se přepisují geny a syntetizují se enzymy a nukleotidy potřebné pro replikaci DNA. G1 fáze zaujímá 30–40 % délky buněčného cyklu. Jakmile jsou připraveny potřebné enzymy a nukleotidy, přechází buňka do S fáze, při které probíhá syntéza DNA. Tato fáze zaujímá 30–50 % délky buněčného cyklu. Po dokončení syntézy DNA vstupuje buňka do G2 fáze. V této fázi probíhá syntéza a aktivace proteinů zodpovědných za kondenzaci chromozomů, tvorbu mitotického aparátu a destrukci jaderného obalu. G2 fáze představuje 10–20 % délky buněčného cyklu. Poslední fází buněčného cyklu je M-fáze, neboli mitóza. Při ní dochází k rozdělení jádra a jadérka (karyogenezi) a poté k rozdělení cytoplazmy (cytokinezi). Při karyogenezi jsou chromozomy vzniklé v S fázi ohraničeny, přičemž každý duplikovaný (zdvojený) chromosom má dvě sesterské chromatidy, které obsahují identické kopie DNA. Sesterské chromatidy jsou spojeny po celé délce, později jsou poutány pouze v oblasti centromery. V průběhu mitózy se sesterské chromatidy od sebe oddělí a putují k opačnému konci buňky. Na konci mitózy dochází u lymfocytů k zaškrcení buňky od okrajů do středu a vzniku dvou dceřiných buněk, z nichž každá má své vlastní jádro. Pokud buňka obdrží signál k opakování buněčného cyklu, opět vstoupí do G1 fáze. Pokud mitogenní signál již přítomen není, buňka dále neproliferuje a vstupuje do klidové fáze G0.

### 2.3.3 Metody měření aktivace a proliferace lymfocytů

K měření aktivace a proliferace lymfocytů se často používají cytometrické metody. Výhodou těchto metod je možnost měření více znaků zároveň, například stupeň aktivace jednotlivých T-lymfocytárních buněčných populací pomocí znaků CD69, CD71, CD25 a HLA-DR. Znak **CD69** je nejčasnějším markerem aktivace. Při stimulaci pomocí PMA a IM dosahuje 80% exprese už po 4 hodinách aktivace. CD69 je selektinový receptor, který se podílí na udržení aktivovaného lymfocytu v lymfatické uzlině. Později se na povrchu T-lymfocytu objevuje receptor pro transferin (**CD71**) a následně také **CD25** (řetězec receptoru pro IL-2) a **HLA-DR**.

Proliferační test patří mezi funkční vyšetření T a B-lymfocytů. Kromě výzkumného využití jsou rutinně využívány zejména jako diagnostický test u pacientů s podezřením na těžký variabilní imunodeficit (SCID), u deficitu CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů nebo k monitorování imunosupresivní účinků onkologické léčby. Proliferační testy lze provádět různými způsoby. Mezi nejcitlivější metody řadíme inkorporaci triciem (<sup>3</sup>H) značeného thymidinu a metodu DELFIA. V současné době se s výhodou využívá metody průtokové cytometrie, přičemž

stanovit proliferační aktivitu je možné několika způsoby. Je možné využít inkorporaci značených pyrimidinových bazí do DNA proliferujících lymfocytů. V těchto testech se používají syntetické analogy thymidinu: bromdeoxyuridin (BrdU) či 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU). Dále je možné proliferační aktivitu buněk sledovat pomocí kvantifikace blastů v procesu proliferace, kvantifikace celkové DNA pomocí interkalace (vmezeření se mezi jednotlivé báze DNA) speciálních barviv do DNA dělících se buněk. Další možnost představuje měření intracelulárních aktivačních markerů (Ki-67) či obarvení cytoplazmy nebo membrány buněk pomocí barev Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE), PKH-26, CellVue Claret a dalších. Spolu se stimulovanými buňkami je třeba také sledovat nestimulované buňky, výsledky vznikají právě srovnáním obou typů buněk v závislosti na sledovaném markeru proliferace.

Test proliferace pro jednoho pacienta probíhá nejméně ve dvou zkumavkách nebo jamkách. Pokud jsou použity izolované buňky nebo předem určený objem plné krve odebrané do heparinu, je v obou zkumavkách nebo jamkách stanovený počet buněk. V první zkumavce/jamce probíhá inkubace vzorku bez přídavku stimulancia, ve druhé s přídavkem definovaného množství stimulační látky. Případně mohou být použity další zkumavky s různými stimulancii, v závislosti na druhu testu. Současně s proliferací krve či buněk pacienta by měla být provedena **proliferace stejným způsobem taky u zdravé kontrolní osoby**. Izolované buňky nebo krev se inkubují v médiu, které obsahuje dostatek zásobních látek umožňujících proliferaci buněk po dobu zpravidla 72 hodin. Při stimulaci B-lymfocytů se doba inkubace prodlužuje na pět dní, přičemž v tomto případě je třeba si uvědomit, že současně přítomné T-lymfocyty se stimulují rychleji, je jich více a zpravidla díky tomu spotřebují životně důležité látky z média dříve, než se začnou množit samotné B-lymfocyty. Výsledkem pak může být falešně nižší naměřená proliferace B-lymfocytů.

## **Metody měřící proliferaci**

Nejjednodušším stanovením proliferace je sledování počtu buněk po stimulaci ve srovnání s nestimulovanou kontrolou. Tato metoda je však zatížena velkou chybou, proto se v praxi příliš nepoužívá.

Zlatým standardem detekce proliferace je dlouhodobě používána metoda sledující **inkorporaci triciem značeného thymidinu** ( $^3\text{H}$  thymidin), který se přidává do média 12–24 hodin před ukončením inkubace.  $^3\text{H}$  thymidin se během inkubační doby zabudovává jako jeden

ze základních kamenů do DNA proliferujících buněk. Po ukončení inkubace se proliferující buňky zamrazí a poté rozmrazí, čímž dojde k jejich rozpadu. Vzniklá směs je filtrována přes speciální filtrační papír, na kterém je pak zachycena buněčná drť a s ní i DNA se zabudovaným thymidinem značeného triciem. Filtrační papír je poté vložen do scintilační tekutiny a měří se počet záblesků, který je dán množstvím navázaného tricia v proliferujících buňkách. Scintilace je fyzikální jev, při kterém vznikají slabé světelné záblesky. Tyto záblesky jsou způsobeny dopadem ionizujícího záření na povrchy některých anorganických či organických látek, které nazýváme scintilátory. Při dopadu ionizujícího záření na scintilátor, či scintilační tekutinu, vniká cizí iont do krystalické mřížky scintilátoru, čímž se excitují elektrony krystalu a při jejich následné deexcitaci dochází k emisi fotonů viditelného světla, čili světelného záblesku. Počet záblesků se měří pomocí tzv.  $\beta$ -counteru. Výsledkem se udává jako počet záblesků za minutu (jednotka cpm; z anglického „counts per minute“) nebo jako proliferační index, což je poměr mezi množstvím záblesků ve stimulované a nestimulované zkumavce. Počet záblesků je závislý na množství navázaného thymidinu v proliferujících buňkách. Jedná se o metodu s vysokou citlivostí, avšak s vysokými náklady na přístrojové vybavení.

Jednou z levnějších metod je **měření celkové DNA pomocí interkalačních sond**, jako jsou ethidium bromid, propidium jodid (PI) nebo hexidium jodid a podobně. Tato barviva s červenou fluorescencí se vmezeří mezi páry bází dvojité šroubovice DNA. Protože DNA je uvnitř jádra buňky, je třeba před přidáním tohoto barviva buňky fixovat a permeabilizovat. Zároveň je nutné odstranit RNA přidáním ribonukleázy (RNázy štěpící řetězce RNA), protože dochází i k nespecifickému obarvení této nukleové kyseliny. Výsledkem je stanovení počtu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Měření proliferace pomocí PI nedává informaci o nově syntetizované DNA a nekoreluje se stanovením inkorporace  $^3\text{H}$  thymidinu. K měření proliferace metodou obarvení cytoplazmy nebo membrány buněk se používá zelené fluorescenční barvivo označující bílkoviny Carboxyfluorescein succinimidyl ester (**CFSE**) a červené fluorescenční lipofilní membránové barvivo **PKH26, CellVue Claret** a podobně. Tato barviva se liší ve svých chemických a fluorescenčních vlastnostech. Membránová barviva (PKH26 a CellVue Claret) jsou vysoce lipofilní barviva, která se stabilně, ale nekovalentně zachycují v lipidech buněčných membrán. Proteinové barviva (CSFE), kterými jsou typické amino-reaktivní sloučeniny, tvoří stabilní kovalentní vazby s buněčnými proteiny. CSFE je lipofilní molekula, která dokud není transportována do buňky, vykazuje jen minimální fluorescenci. CSFE proniká do buňky pasivní difuzí. Buněčné esterázy štěpí acetylové skupiny CSFE a vzniklý produkt (succinimidyl ester) se stává výrazně fluorescenční. Tento ester se

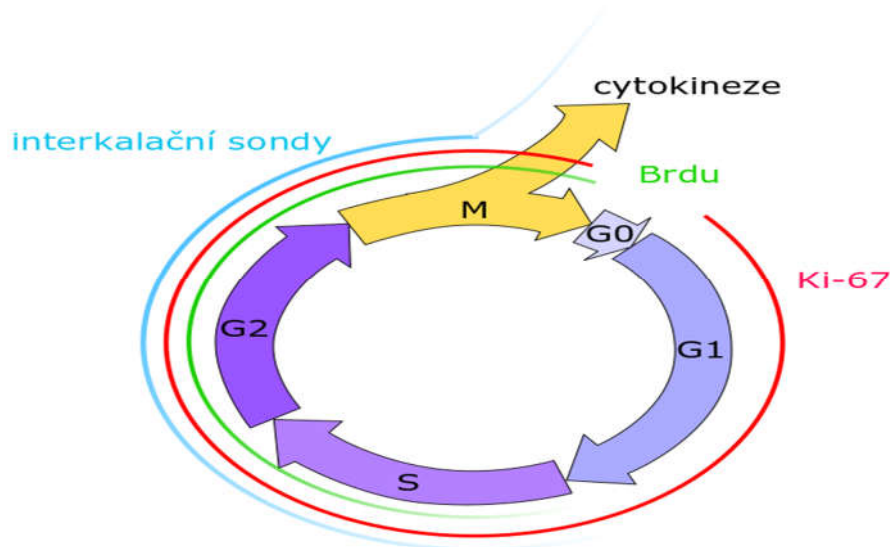
kovalentně váže k volným aminoskupinám na makromolekulách v cytoplasmě. Jak toto proteinové, tak výše uvedená membránová barviva zbarvují buňky jasnou homogenní fluorescencí. Intenzita fluorescence při každém následujícím dělení klesá u dceřiných buněk přibližně na polovinu. Proto porovnáním původní a konečné intenzity fluorescence vyšetřovaných buněk získáme informaci také o počtu dělení, kterým vyšetřované buňky prošly. Ze znalosti počtu dělení a relativního počtu buněk v každé dceřiné generaci lze zpětně vypočítat počet buněk v původní populaci (tj. buněk přítomných v době stimulace), které se následně začaly dělit. Pomocí těchto informací lze vypočítat rozsah expanze prekurzorových buněk na zkoumaný specifický antigen nebo buněčný mitogen. Nevýhodou barvení CSFE je relativně vysoká cytotoxicita. Podobně probíhá značení i vyhodnocení proliferace při použití membránových barviv **PKH26**, **CellVue Claret** a dalších.

Mezi další metody sledování buněčné proliferace patří metoda **inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU)**, při které se využívá zabudování značených pyrimidinových bází do DNA dělících se buněk s následným měřením pomocí průtokové cytometrie. Ve standardním BrdU testu se buňky společně se stimulací inkubují také s BrdU. Následně je provedena denaturace DNA pomocí enzymů, kyseliny nebo tepla tak, aby byla umožněna detekce zabudovaných molekul BrdU pomocí protilátek anti-BrdU. Používané metody denaturace DNA mohou negativně ovlivnit morfologii buněk a rozpoznávání antigenů, stejně jako kvalitu obrazu při cytometrickém měření. Denaturační činidla rovněž omezují schopnost BrdU vázat se s fluorescenčními proteiny (např. GFP, RFP, mCherry) nebo fluorescenčními barvami na bázi phycoerythrinu, které se pravidelně používají v mikroskopickém zobrazování nebo v průtokové cytometrii.

Vylepšením BrdU testu je **metoda Click-iT® Plus EdU**, kdy se v průběhu aktivní syntézy DNA začleňuje do jejího řetězce analog thymidinu EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) obsahující alkyne. Vložený EdU obsahuje ve své ethynylové části alkyne. Při konečném zpracování se k buňkám přidají fluorescenčními barviva, např. Alexa Fluor® nebo Pacific Blue™ obsahující pikolylyl azidovou skupinu, která se váže na alkyne v EdU tzv. azid-alkynovou cykloadicí (tzv. přepínací reakcí neboli kliknutím, která dala metodě název). Reakce je katalyzovaná měďnatými ionty. Standardní fixace buněk na bázi aldehydu a jejich následující permeabilizace pomocí detergentu postačí k tomu, aby detekční činidlo obsahující fluorescenční barvu s pikolylyl azidem získalo přístup k EdU v DNA. Není tedy třeba žádných tzv. tvrdých denaturantů. Nově syntetizovaná DNA může být detekována a kvantifikována za použití obrazových technik nebo průtokové cytometrie.

Velice citlivou alternativou k měření proliferace pomocí BrdU je měření proliferace **metodou DELFIA**, (z anglického „Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay“), která je založena na časově modulovaném měření fluorescence (TRF; z anglického „time-resolved fluorescence“). Metoda je založen na inkorporaci bromdeoxyuridinu (BrdU), při které se vyžívá zabudování značených pyrimidinových bází do DNA dělících se buněk. Pro detekci proliferujících buněk se používají anti-BrdU protilátky značené fluorescenční sondou, což bývá stabilní chelát lanthanidu (nejčastěji europia - Eu). Po přidavku europiem značené protilátky dochází k její vazbě na BrdU zabudovaný v DNA. Po ukončení inkubace s protilátkou následuje promytí, čímž se odstraní přebytek nenavázané protilátky. Dalším reakčním krokem je přidavek ligandu  $\beta$ -diketonu. Tato část reakce probíhá v kyselém prostředí, které způsobí odtržení europia, a na jeho místo se v chelátu naváže přidávaný ligand. Nově vzniklá sloučenina vykazuje intenzivní fluorescenci, která je dlouhodobá (řádově stovky mikrosekund) a navíc s velkým rozdílem mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence (Stokesův posun). Měření probíhá na přístroji EnSight, kde je vzorek pulzně excitován vlnovou délkou světelného záření (např. vlnovou délkou 340 nm). Záření se pak elektronicky měří se zpožděním, jakmile vyhasne fluorescence pozadí. Měření záření se provádí opakovaně během přednastaveného časového intervalu (za 1 s lze získat až 1000 měření). Výsledkem je (podobně jako u metody inkorporace thymidinu) počet impulsů, který se zvyšuje s počtem proliferujících buněk.

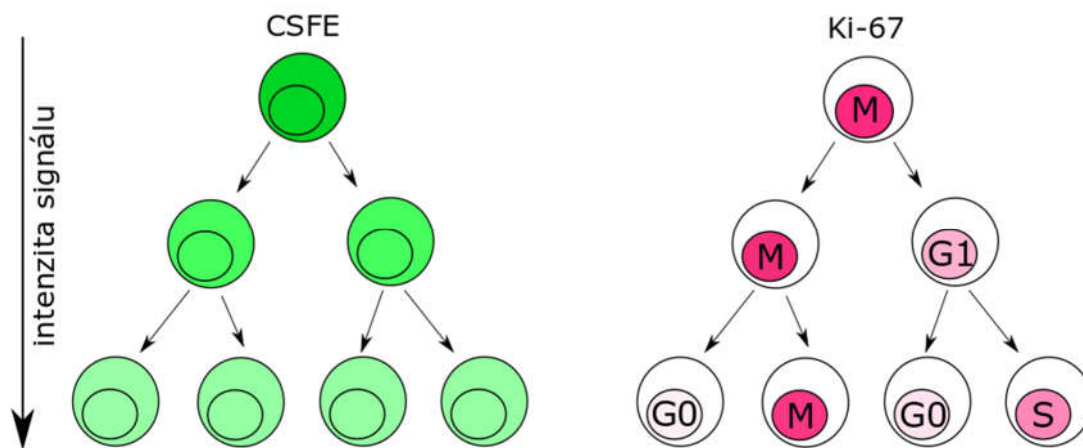
V současné době se často používá k měření proliferace **detekce jaderného proteinu Ki-67**. Tento protein je exprimován během všech aktivních fází buněčného dělení, avšak není exprimován v klidové fázi G0. Toto měření je relativně jednoduché, neboť nevyžaduje přidávky dalších reagensů během inkubační doby proliferačního testu. Výsledkem vyšetření je procento Ki-67 pozitivních lymfocytů. Nevýhodou této metody je, že protein Ki-67 se exprimuje už v G1 fázi buněčného cyklu, kdy se buňka k proliferaci teprve chystá, ale nemusí ji ještě dokončit (například při selektivním působení cytostatik). Z tohoto důvodu je zapotřebí v rámci kontroly správnosti výsledku tohoto měření sledovat také velikost a počet proliferujících buněk, přičemž oba tyto parametry by měly při úplné proliferaci lymfocytů stoupat. Ki-67 se také stanovuje jako diagnostický znak pro některé typy nádorů (karcinom, prsu, prostaty a další). Protože se jedná o protein vnitřku buněčného jádra, je třeba k jeho měření použít fixaci a permeabilizaci buněk. Tato metoda zpracování (tedy fixace a permeabilizace) se používá ve většině metod vyšetření proliferace a dále např. při měření cytokinové produkce leukocytárních populací pomocí průtokové cytometrie.



**Obrázek č. 2: Buněčný cyklus a proliferační sondy**

Různé metodiky měření proliferace se vyznačují odlišnou dynamikou ve vztahu k buněčnému cyklu. Zatímco jaderný protein Ki-67 (červená) je exprimován ve všech fázích buněčného cyklu (nikoli v G0 fázi), Brdu či interkalační sondy (zelená a modrá) cílí na inkorporaci či interkalaci do nově vznikající DNA během S fáze.





**Obrázek 3: Intenzita fluorescence u metodik CSFE a Ki-67**

Proteinové barvivo CSFE zbarvuje homogenně buněčnou cytoplazmu a v průběhu buněčného dělení je i CSFE děleno mezi dceřinné buňky. S každým dělením intenzita fluorescence klesá přibližně o polovinu vzhledem k buňce mateřské. Naproti tomu Ki-67 protein je exprimován pouze v jádře buněk, přičemž jeho množství stoupá v pořadí  $G1 < S < G2 < M$ . V klidové  $G0$  fázi není tento protein v jádře buněk přítomen.

### Intracelulární stanovení antigenů

Cytometrické stanovení intracelulárních proteinů je založeno na **permeabilizaci** buněčné membrány, při které se detekční protilátky (zpravidla konjugované s fluorochromy) navazují na struktury uvnitř buněk nebo buněčného jádra. Aby při permeabilizaci nedocházelo k úniku buněčného obsahu přes porušenou buněčnou membránu, je třeba buňky nejprve **fixovat**. K tomu se používají alkoholy nebo aldehydy.

### Fixace buněk: Alkohol, aldehyd paraformaldehyd

**Alkoholy** (obvykle ethanol nebo methanol) jsou precipitační nebo denaturační fixační látky, které **koagulují proteiny**. Rozpouštějí také lipidy, což vede k tvorbě relativně velkých pórů v plazmatických i jaderných buněčných membránách. Alkoholy jsou vhodné pro analýzu DNA. Koagulace proteinů kolem DNA totiž umožňuje rovnoměrný přístup barviva, což vede k dobrému variačnímu koeficientu při měření intenzity fluorescence pro jednotlivé píky

(například při měření buněčného cyklu pomocí propidium jodidu). Někdy však může koagulace proteinů vadit, zejména pokud je detekce epitopu závislá na konkrétní konformaci proteinu tak, aby epitop po fixaci zůstal přístupný pro danou monoklonální protilátku. Výjimku tvoří malé epitopy proteinů signálních drah, k jejichž detekci se používají fosforylačně specifické protilátky.

Další skupinou látek používanou pro fixaci buněk jsou **aldehydy**. Jedná se o **zesít'ovací** fixační látky, které vytvářejí vazby především mezi zbytky lyzinu. Proto udržují strukturu většiny proteinů neporušenou, což z nich činí optimální fixační činidla pro barvení proteinů pomocí monoklonálních protilátek, protože cílový epitop díky tomu zůstane pravděpodobně nedotčen. Obvyklým fixačním činidlem na bázi aldehydu používaným v cytometrii je **formaldehyd**. Pokud není do roztoku formaldehydu přidáno malé množství metanolu, polymeruje za vzniku paraformaldehydu (PFA). Častou chybou je tvrzení, že se k fixaci buněk používá paraformaldehyd. Ve skutečnosti se jedná o nerozpustný bílý prášek, který nemá na fixaci žádný vliv. Pro účely fixace buněk se formaldehyd rozpouští v PBS a jeho koncentrace by se měla pohybovat v rozmezí 0,5–4 %.

Další látkou používanou k fixaci buněk je **glutaraldehyd**. Ten se intenzivně používá v elektronové mikroskopii, zatímco v průtokové cytometrii není tak rozšířen. Je účinnější při zesít'ování proteinů a proto je pak pro monoklonální protilátky a barviva těžší vázat se efektivně na cílové struktury. Při jeho použití také výrazně stoupá autofluorescence vzorku. Z těchto důvodů je pro průtokovou cytometrii lépe využitelný formaldehyd nebo alkohol. Jejich použití potom závisí na molekulárním charakteru cílového antigenu.

Buňky fixované v etanolu jsou stabilní bez promytí při teplotě 4 °C nebo -20 °C po celé měsíce. Buňky fixované formaldehydem jsou stabilní přibližně 1–2 týdny, ale je zapotřebí je po 2–3 hodinách z formaldehydu promýt a uchovávat v roztoku PBS. To zamezuje zvýšení autofluorescence, která je přítomna u všech fixací a může zkreslit výsledek u slabě exprimovaných antigenů. Fixace může rovněž změnit vlastnosti rozptylu světla buněk, tj. velikost a granulaci měřené na FS a SS.

Fixace formaldehydem a etanolem je možné kombinovat. Nejprve se buňky fixují formaldehydem (uchování všech složek uvnitř buňky) a poté následuje fixace v alkoholu (vytvoří větší otvory v buňce, což umožňuje snazší přístup protilátek či používaných sond). Po fixaci formaldehydem lze buňky permeabilizovat i pomocí jiných činidel jako je Triton X-100 nebo Tween-20.

## Permeabilizace

Permeabilizace je proces, při kterém se mění propustnost buněčné membrány pro kapaliny, avšak buňka zůstává celistvá, tj. nedojde k její lýze, což je většinou zajištěno předchozí fixací buňky. Permeabilizace umožňuje monoklonálním protilátkám získat přístup k intracelulárním strukturám, přičemž morfologické rozptylové charakteristiky buněk zůstávají nedotčeny, neboť jsou zajištěny fixací. Při tomto kroku je důležitá úroveň permeabilizace. Detekce různě umístěných epitopů může vyžadovat odlišnou úroveň permeabilizace (např. cytoplazmatické a nukleární epitopy). Rovněž je nutné dostatečné vymytí zbytku nevyvázané protilátky z buněk. Obecně se používají dva typy činidel: **organická rozpouštědla** (methanol a aceton) a **detergenty** (saponin, Triton X-100 a Tween 20). Organická rozpouštědla rozpouštějí lipidy v buněčných membránách, čímž je činí propustné i pro monoklonální protilátky. Protože organická rozpouštědla také koagulují proteiny, mohou být ve stejnou dobu použita jak k fixaci, tak permeabilizaci buněk.

### Permeabilizace pomocí detergentů

**Saponin** interaguje s membránovým cholesterolem, selektivně ho odstraňuje a tím vytváří otvory v buněčné membráně. Nevýhodou je, že permeabilizace saponiny je reverzibilní a při dalších krocích zpracování vzorku se mohou saponiny vymýt. Tudíž i při dalších krocích zpracování buněk musí být v používaných činidlech přítomný saponin. Další nevýhodou je, že saponin nepermeabilizuje jadernou membránu a nelze jej tedy použít ke značení jaderných proteinů či nukleových kyselin. Na druhou stranu výhodou tohoto permeabilizačního činidla je, že může být použit k selektivní permeabilizaci savčích buněčných membrán na základě jejich obsahu cholesterolu nebo jeho schopnost zachování integrity proteinových povrchových antigenů.

**Triton X-100** a **Tween 20** jsou detergenty neselektivní povahy a mohou extrahovat proteiny spolu s lipidy, čímž rovněž tvoří póry v buněčné membráně. Nevýhodou těchto činidel je, že při použití vyšších koncentrací nebo při dlouhých inkubačních časech je vysoce pravděpodobné, že způsobí také lýzu analyzované buňky. Oba absorbují UV světlo, protože obsahují fenylový kruh. To může mít negativní důsledky při použití UV laseru v průtokové cytometrii. Výhodou těchto činidel je, že permeabilizují všechny lipidové dvojvrstvy, čímž umožňují stanovení také struktur uvnitř buněčného jádra. Také ve srovnání se saponinem méně ovlivňují struktury lektinových antigenů.

## **Možnosti kombinace fixace a permeabilizace**

Existuje mnoho způsobů intracelulárního barvení, ale je třeba pečlivě vyhodnotit výběr metody a činidel na základě povahy analyzovaného antigenu a použité metody pro hodnocení. Například pro průtokovou cytometrii je obvykle důležité zachovat morfologii a způsob rozptylu světla buňky. Tyto buněčné charakteristiky mohou být nesprávným výběrem fixace a permeabilizace zásadně ovlivněny. Také typ stanovované molekuly a jeho umístění v buňce zásadně ovlivňuje výběr fixačního a permeabilizačního postupu. Pokud jsou antigeny blízko plazmatické membrány, anebo jsou stanovovány rozpustné cytoplazmatické antigeny, stačí jemná buněčná permeabilizace bez fixace. Pro stanovení cytoskeletálních, virových či některých enzymových antigenů se používá fixace s vysokou koncentrací acetonu, alkoholu nebo formaldehydu. Při intracelulárním barvení pro cytometrii se buňky obvykle nejprve fixují a následně se provádí permeabilizace buněčné membrány. Zde jsou příklady obvykle používaných metod:

### **Fixace formaldehydem následovaná permeabilizací pomocí ne-ionogenního detergentu pro jaderné antigeny**

Fixace buněk probíhá v roztoku 0,01% formaldehydu po dobu 10–15 minut, poté se vzorek promyje PBS a následuje permeabilizace membrány za použití jednoho z následujících detergentů: Triton X-100 nebo NP-40 (Nonidet P-40; octyl phenoxyethoxyethanol). Obvyklá koncentrace těchto činidel je 0,1–1% roztok v PBS. Oba detergenty částečně rozpouštějí i jadernou membránu, takže jsou vhodné i pro barvení jaderných antigenů. Ztráta buněčné membrány a cytoplazmy má za následek snížení rozptylu světla na FS a SS, někdy také dochází ke snížení autofluorescence.

### **Fixace formaldehydem následovaná permeabilizací pomocí ne-ionogenního detergentu pro nejaderné antigeny**

Pro stanovení antigenů v cytoplazmě nebo na cytoplazmatické ploše plazmatické membrány a rozpustné nukleární antigeny je vhodné po fixaci formaldehydem použít Tween 20, Saponin nebo Digitonin či Leucoperm (0,5 % objemu v PBS).

### **Fixace formaldehydem (0,01%) s následnou fixací a permeabilizací pomocí metanolu**

Fixace probíhá v roztoku 0,01% formaldehydu po dobu 10–15 minut, poté se vzorek promyje. Do každého vzorku se přidá ledově chladný 100% roztok metanolu, a to v takovém množství, aby konečná koncentrace metanolu byla 90 %. Vzorek se mírně promíchá a inkubuje při -20 °C po dobu 10 minut. Poté následuje centrifugace a 2 promytí v PBS s 1% bovinním sérovým albuminem (BSA). Toto stanovení je vhodné pro analýzu DNA.

### **Fixace a permeabilizace acetonem**

Do každého vzorku se přidá 1 ml ledově chladného acetonu. Vzorek se mírně promíchá a uchová při -20 °C po dobu 10 minut.

*Poznámka: Při práci s acetonem nejsou vhodné plastové zkumavky. Tento postup je možné použít pro fluorescenční mikroskopii.*

### **Pořadí barvení při intracelulárním cytometrickém stanovení**

Pořadí značení protilátkami se může mezi jednotlivými testy lišit, v závislosti na stanovovaném antigenu. Pokud mají být vyšetřeny zároveň povrchové a intracelulární epitopy, je nejlepší nejprve označit povrchové antigeny a teprve poté buňky fixovat. Při tomto postupu je třeba dát pozor na fluorochromy, které jsou na fixaci citlivé (fluorochromy na bázi phycoerythrinu (PE) nebo alophycocyaninu (APC)). Jedná se totiž o velké molekuly bílkovin, které budou fixací ovlivněny stejným způsobem jako jiné proteiny. Malé fluorochromy (Alexa Fluor 488 nebo FITC) nejsou obecně ovlivněny žádným fixačním prostředkem. Buňky by měly být během přidávání fixačního činidla jemně vortexovány, aby se zajistilo dobré proniknutí fixativa do buněk a zároveň došlo k dostatečnému rozrušení buněčných shluků. Do buněčné pelety je lepší vždy přidat větší objem fixačního roztoku, aby činidlo mohlo kvalitně působit na všechny buňky v roztoku.

## Intracelulární detekce sekretovaných proteinů pomocí průtokové cytometrie

Detekce sekretovaných proteinů (například cytokinů) může být náročná, protože se v čase rychle mění jejich koncentrace v buňce. Z tohoto důvodu se přidává na poslední 4 hodiny stimulace látka **brefeldin A (BFA)** nebo **monensin**, které brání uvolňování cytokinů z intracelulárního prostoru buňky do jejího okolí. Takto uvnitř buňky „zadržené“ cytokiny lze pak stanovit pomocí intracelulárního barvení některým z výše uvedených postupů. Brefeldin A funguje jako reverzibilní inhibitor translokace proteinu z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu. Inhibuje vazbu cytosolického obalového proteinu (p-COP) a ADP-ribosylačního faktoru (ARF) na Golgiho membrány a inhibuje výměnu GDP-GTP. Monensin uzavírá produkované cytokiny v endosomech, čímž znemožní jejich sekreci do okolí buňky. Po ošetření buněk brefeldinem nebo monensinem zůstávají nově vytvořené proteiny v buňce, kde se hromadí. Obě látky mohou na buňky působit jen omezenou dobu, protože při jejich dlouhodobějším působení dochází ke smrti buňky. K cílenější identifikaci buněk, které produkují cytokiny nebo protilátky je určena metoda ELISPOT (viz. kapitola 3.3).

### 2.3.4 Sledování funkce přirozených cytotoxických buněk

NK buňky, (natural killer cells, přirození zabijáci), mohou být rozděleny do dvou populací, z nichž první obsahuje  $CD56^{++}$  NK buňky a druhá  $CD56^{low}$  buňky. Tyto populace se navzájem liší schopností působit cytotoxicky a produkcí IFN- $\gamma$ . NK buňky  $CD56^{++}$  vykazují vysokou produkci IFN- $\gamma$  a nízkou přirozenou cytotoxicitu, zatímco NK buňky  $CD56^{low}$  vykazují nízkou produkci IFN- $\gamma$  a vysokou přirozenou cytotoxicitu. Zvýšená aktivita buněk NK byla pozorována během virových infekcí. Rovněž u žen s opakovanými spontánními potraty byl nalezen vyšší počet aktivovaných cirkulujících NK buněk a vysoké hladiny NK-buněčné cytotoxicity.

Aktivace NK buněk se stanovuje pomocí průtokové cytometrie, kdy se detekuje exprese aktivačního znaku CD69 po předchozí aktivaci NK buněk různými stimulanty. Jako nespecifické stimulační činidlo může být použita HLA-I negativní buněčná linie K562. Dále se aktivace NK buněk používá při vyšetřování poruch reprodukce, kdy jsou NK buňky stimulovány např. trofoblastem nebo spermii partnera. Procento  $CD69^{+}$  NK buněk se porovnává s pozitivní a negativní kontrolou (tj. kontrolní vzorek stimulovaný pomocí PMA a vzorek bez stimulace).

U NK buněk je také možno intracelulárně stanovovat množství perforinu a granzymu a jejich změny po aktivaci těchto buněk. Jako marker degranulace NK buněk lze také použít znak CD107a, jehož povrchová exprese se při degranulaci NK buněk zvyšuje a změnu jeho exprese lze stanovit pomocí průtokové cytometrie.

Funkční cytotoxická aktivita NK buněk bývá vyšetřována u onemocnění hemofagocytární syndrom (HS) nebo hemofagocytární lymfocytóza (HLH). Jedná se o heterogenní skupinu poruch charakterizovaných aktivací deregulovaných T lymfocytů a NK buněk. To vede k aberantnímu uvolňování cytokinů z těchto buněk a následné nekontrolované aktivaci a proliferaci makrofágů, které začnou fagocytovat buňky vlastního těla, k orgánové infiltraci aktivovanými histiocyty, což vyúsťuje nakonec až do multiorgánového selhání. U pacientů nacházíme nepřítomnost nebo nízkou aktivitu NK buněk. Jako stimulancia u tohoto vyšetření se používají linie K562, PHA a PHA v kombinaci s IL-2.

Ke sledování cytotoxických funkcí NK buněk lze použít několik metod. Za klasickou metodu se považuje stanovení lytické aktivity NK buněk, kdy je k izolované suspenzi NK buněk nebo k PBMC přidána terčová buněčná linie erytroleukemoidního původu K562, která je označena radioaktivním chromem (Cr). Během inkubace jsou terčové buňky lyzovány přidanými NK buňkami a do supernatantu se uvolní radioaktivní Cr. Naměřená radioaktivita je pak úměrná cytotoxické funkci NK buněk. V současné době se používají i další metody, které buď přímo monitorují proliferaci NK buněk po jejich aktivaci, nebo jejich lytickou aktivitu. Proliferaci NK buněk stanovujeme stejnými metodami jako proliferaci T-lymfocytů, jen se používají rozdílná stimulancia v závislosti na tom, čím potřebujeme, aby byly NK buňky stimulovány (např. přidavek nádorových buněk k izolovaným NK buňkám při sledování cytotoxicity vůči nádoru). Je také možno sledovat množství usmrcených terčových buněk, a to například pomocí propidium jodidu nebo Anexinu V. K rozlišení efektorových populací (NK buněk) a terčových populací (buněčných linií) lze při měření na průtokovém cytometru použít scaterové vlastnosti, které se zpravidla liší (zejména SS). Cílovou populaci terčové linie lze také obarvit pomocí fluorescenčních sond, například karboxyfluoresceinem (BCECF), acetomethylestery (AM) a různými deriváty fluorescein diacetátu. Tyto sondy jsou malé molekuly, které se dostávají do buněk pasivním průnikem přes membránu. Jakmile se tyto sondy dostanou do buněk, jsou přeměněny intracelulárními esterázami do fluorescenčních produktů, které jsou buňkami zadrženy. Při zabití terčové buňky NK buňkou dochází k uvolnění fluorescenčních produktů z mrtvých buněk do média, což můžeme také měřit, protože intenzita fluorescence média je závislá na počtu usmrcených buněk.

### 2.3.5 Sledování apoptózy či dalších typů buněčné smrti

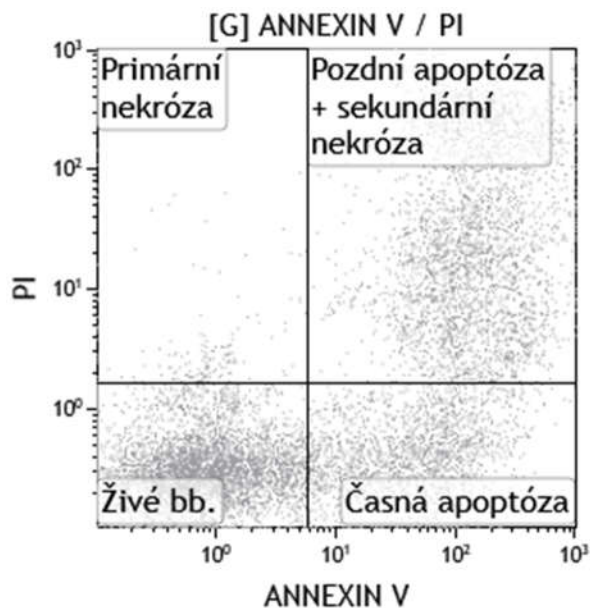
Vyšetření apoptózy je v imunologii využíváno při vyšetření některých nádorů a malignit, při sledování kvality spermií v reprodukční imunologii, případně může být výzkumně vyšetřováno u některých typů imunodeficitů. Ke stanovení lze použít metodu barvení **propidium jodidem (PI)** a **Annexinem V**. Annexin V je protein, který má vysokou afinitu k fosfatidylserinovým a ethanolaminovým strukturám, které se v průběhu apoptózy dostávají na povrch buňky. Fluorochromem značený Annexin V se tedy váže na apoptotické buňky. PI neproniká do živé a časně apoptotické buňky, ale díky porušené membránové integritě až do pozdně apoptotické či nekrotické buňky. Tímto způsobem lze od sebe rozlišit jednotlivé populace (obrázek č. 10).

Další metodou pro sledování apoptózy je sledování **aktivace kaspáz**. Kaspázy (cystein rich aspartate protease) jsou enzymy, které spouští proces apoptózy. Jejich substrátem jsou proteiny obsahující specifickou sekvenci třech až čtyř aminokyselin následovanou aspartátem, za níž je protein kaspázami štěpen. Metoda sledování aktivace kaspáz využívá uměle vyrobených substrátů s výše uvedenou aminokyselinovou sekvencí, jejichž rozštěpením dochází k uvolnění fluorescenční molekuly. Další možností stanovení apoptózy je **sledování funkce mitochondrií**, a to uvolňováním cytochromu C, nebo sledování změny membránového potenciálu mitochondriální membrány. Změny v permeabilitě mitochondriálních membrán jsou detekovatelné již v časných fázích apoptózy. Změny membránového potenciálu mitochondriální membrány se detekují pomocí fluorescenčního barviva JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzamidazolocarboxyanin jodid) pomocí průtokové cytometrie. Při tomto stanovení mají mitochondrie v neapoptotických buňkách červenou fluorescenci, zatímco v apoptotických buňkách dochází ke změnám na mitochondriální membráně, k vyloučení JC-1 a vzniku agregátů, které fluoreskují zeleně.

Relativně drahou metodou je sledování fragmentace DNA pomocí metody **TUNEL** (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), využívající fluorescenčně značené nukleotidy dUTP, které jsou pomocí enzymu terminální deoxynukleotidyltransferasy (TdT) inkorporovány na 3' konce DNA zlomů.

*Pozn. Při cytometrickém stanovení apoptózy nelze dělat závěry z jedné metodiky, vždy je třeba vzorek vyšetřit alespoň dvěma principiálně odlišnými metodikami detekce apoptózy.*





Obrázek č. 10: Stanovení apoptózy pomocí annexinu V a propidium jodidu

### 2.3.6 Sledování funkčnosti signálních drah

Při aktivaci lymfocytů jsou v závislosti na druhu použité stimulace aktivovány příslušné receptory pro dané signální dráhy. Poté můžeme pomocí průtokové cytometrie sledovat **fosforylaci** příslušných proteinů signálních drah pomocí monoklonálních protilátek, které se váží na aktivní fosforylované formy zkoumaných proteinů. I při tomto stanovení musí být buňky nejprve aktivovány, přičemž aktivace může být relativně krátká v řádu minut nebo hodin, poté jsou povrchové znaky definující zkoumanou populaci označeny monoklonálními protilátkami. Po fixaci a permeabilizaci buněk jsou pomocí monoklonální protilátky označeny fosforylované formy příslušného proteinu. Toto stanovení se využívá zejména pro potvrzení poruchy daného proteinu při nově nalezené genetické poruše či mutaci v diagnostice imunodeficiencí.

### 1.2.8. Funkční vyšetření fagocytujících buněk

Fagocytóza patří mezi základní nespecifické mechanismy likvidace cizorodých mikroorganismů. Prostřednictvím fagocytózy také dochází k odstranění apoptotických a jinak změněných buněk a k nastartování opravných mechanismů v zánětem poškozené tkáni. Jedná se o složitý proces, který se skládá z několika fází: **adheze** (navázání fagocytující buňky na endotelovou výstelku cévy), **chemotaxe** (putování fagocytujících buněk za stoupajícím

gradientem chemotaktických faktorů do místa zánětu), **adherence** (obklopení cizorodé částice výběžky membrány fagocytující buňky) a nakonec **ingescence** (úplné pohlcení cizorodého organismu jeho uzavření do váčku, který se nazývá fagozom). Na fagozom se pak navážou a splynou s ním granula fagocytující buňky, která obsahují různé látky, které se podílejí na rozkladu cizorodého mikroorganismu. Důležitým procesem při rozkladu cizorodého materiálu je oxidační vzplanutí, při kterém membránový enzym NADPH oxidáza katalyzuje přeměnu molekuly kyslíku na superoxidový aniont ( $O_2^-$ ), který je produkován dovnitř fagolysosomu. Za přítomnosti enzymu superoxid dismutázy reaguje superoxidový aniont s vodíkem a vzniká peroxid vodíku. Ten reaguje s chloridovými anionty za přítomnosti enzymu myeloperoxidázy a vzniká kyselina chlorná, která je také mikrobicidní.

Vyšetření fagocytární aktivity provádíme při podezření na primární či sekundární deficit některé z fází fagocytózy. Obvykle jsou vyšetřovanými buňkami neutrofilů, ale podobně reagují i monocyty. Laboratorně je možné vyšetřit prakticky všechny fáze fagocytózy, ale v rutinní praxi se provádí jen některé metodiky. Mezi ně patří vyšetření poruchy adheze, kdy se pomocí průtokové cytometrie vyšetřuje exprese integrinů CD11/CD18. Deficit těchto molekul je přítomen u primární imunodeficiency s názvem „deficit leukocytárních integrinů“ (LAD syndrom, z anglického leukocyte adhesion deficiency syndrome). Další možností vyšetření fagocytárních funkcí je vyšetření ingescence. K tomuto účelu se používají metakrylátové partikule, které jsou fagocyty pohlcovány. Počet pohlcených partikulí se stanovuje mikroskopicky, nebo jsou partikule označeny fluorescenční značkou, například FITC a cytometricky se stanovuje procento „FITC pozitivních neutrofilů či monocytů“. Test ingescence se v současné době již příliš nevyužívá, byl nahrazen vyšetřením respiračního vzplanutí (tzv. burst testem), který zároveň monitoruje ingescenci i oxidační vzplanutí.

### **Burst test**

Při burst testu jsou neutrofilů a monocyty v plně heparinizované krvi stimulovány při 37°C pomocí:

1. bakterií *E. coli*, které jsou opsonizovány protilátkami ze smíšeného séra
2. chemotaktickým peptidem fMLP
3. přímým aktivátorem proteinkinázy C: PMA

Po 10 minutách stimulace se do zkumavky přidává roztok dihydrorhodaminu 123. Stimulace pokračuje dalších 10 minut a celá reakce je zastavena přidáním ledového činidla PBS. Následuje centrifugace, po které se ze zkumavky odstraní supernatant. Buněčná peleta na dně zkumavky obsahující erythrocyty a leukocyty je dále zpracována pro cytometrické měření a to lýzou erythrocytů.

Stimulace fagocytujících buněk pomocí opsonizovaných *E. coli* v sobě zahrnuje kroky ingescence a oxidačního vzplanutí. Opsonizace usnadňuje vazbu *E. coli* na buněčnou membránu fagocytu a zvyšuje jeho aktivaci. Dochází k pohlcení mikroorganismu fagocytem, tedy k ingesci, a poté k výše popsanému oxidačnímu vzplanutí. To je detekováno pomocí dihydrorhodaminu 123. Dihydrorhodamin patří mezi fluorescenční sondy, které pasivně pronikají dovnitř buňky. Při oxidačním vzplanutí je vznikajícími oxidačními produkty oxidován na rhodamin 123, který vykazuje zelenou fluorescenci (podobně jako FITC). Výsledkem úspěšně proběhlé stimulace funkčních fagocytů jsou zeleně fluoreskující neutrofilové či monocytové. Pomocí průtokové cytometrie pak hodnotíme procentuální zastoupení zeleně fluoreskujících neutrofilů a monocytů.

Aktivace fagocytujících buněk pomocí fMLP (N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanin) probíhá prostřednictvím receptoru pro fMLP, který mají neutrofilové i monocytové na svém povrchu. Vazba tohoto malého chemotaktického peptidu fagocytující buňky aktivuje, ale neměla by vést k plně rozvinutému oxidačnímu vzplanutí u všech fagocytujících buněk. Zvýšené oxidační vzplanutí po stimulaci fMLP bylo zaznamenáno u akutně probíhajících infekcí.

PMA neboli phorbol myristát acetát je rovněž malá molekula, která se pasivní difuzí dostává dovnitř buňky a je přímým stimulatorem proteinkinázy C. Proteinkináza C dále aktivuje NADPH oxidázu, což vede u fagocytujících buněk k oxidačnímu vzplanutí. Stimulace pomocí PMA je nejsilnější ze všech stimulací používaných u burst testu. Porucha mechanismů oxidačního vzplanutí po stimulaci *E. coli* i PMA bývá přítomna u pacientů s chronickou granulomatózní chorobou. Ke snížení hladiny oxidačního vzplanutí může docházet i u deficitu myeloperoxidázy. Toto snížení však nebývá tak výrazné jako u chronické granulomatózy.

## **Stanovení myeloperoxidázy**

Při podezření na deficit myeloperoxidázy (MPO) stanovujeme přítomnost tohoto enzymu v leukocytech. Stanovení provádíme průtokovou cytometrií. Hledaný enzym, který je přítomen uvnitř buňky, je označen pomocí intracelulárního barvení monoklonální protilátkou namířenou proti MPO. Měříme pak procentuální zastoupení MPO<sup>+</sup> neutrofilů a monocytů. U zdravého člověka dosahují tyto hodnoty 100%.

## **Mikrobicidní test**

Dalším testem, který se především v minulosti používal pro vyšetření fagocytózy, je mikrobicidní test. Jeho výhoda spočívá v tom, že nám umožňuje monitorovat celý proces fagocytózy. Při něm jsou k heparinizované krvi přidávány některé mikroorganismy (sacharomycety, *Candida albicans*, *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus aureus*). Zkumavku inkubujeme 30 min při teplotě 37 °C. V době inkubace fagocytující buňky přidány mikroorganismus pohltní a zabijí. Usmrcené kvasinky se z fagocytů uvolní deoxycholátem sodným a jejich množství se určí obarvením methylenovou modří, kdy stanovujeme počet modrých (tzn. usmrcených kvasinek). Nevýhodou mikrobicidního testu je nutnost kultivování mikroorganismů nutných k provedení vyšetření při zároveň většinou malé frekvenci jeho provádění.

## **Redukce tetrazoliových solí**

Oxidační vzplanutí může být také hodnoceno pomocí redukce tetrazoliových solí. Při něm je k aktivovaným buňkám (např. pomocí PMA nebo latexových částic) přidáván roztok některé z tetrazoliových solí (nitrobluetetrazolia nebo iodonitrotetrazolia). Molekuly soli pronikají do buňky, kde jsou při oxidačním vzplanutí redukovány na nerozpustný modrý formazan, který buď můžeme po uvolnění z buněk měřit spektrofotometricky, nebo reakci odečíst přímo ve fagocytu mikroskopicky. Pro mikroskopické stanovení je nutná izolace fagocytujících buněk, nejčastěji neutrofilů.

## **Chemiluminiscenční test**

Při oxidačním vzplanutí vzniká a působí ve fagolysozomu singletový kyslík, který je vysoce nestabilní, a během fagocytózy rychle reaguje s pohlcenými mikroorganismy. Při těchto reakcích vznikají elektronově nestabilní karboxylové skupiny, které při návratu svých elektronů

do základního stavu vyzařují luminiscenční záření. Tuto luminiscenci lze zesílit vhodným luminoforem (například luminolem nebo lucigeninem), které vzniklé záření zesilují a posouvají do viditelné oblasti. Protože se jedná o luminiscenci vznikající chemickou reakcí, je nazývána chemiluminiscencí. Test se opět provádí v plně heparinované krvi, ke které je přidána stimulační látka (rýžový škrob nebo opsonizovaný zymozan). Do zkumavky se také přidává luminol nebo lucigenin. Chemiluminiscenční záření vznikající při oxidačním vzplanutí po stimulaci se měří v impulsech za minutu. Výsledkem je graf, kdy na ose X je čas v minutách a na ose Y intenzita luminiscence v impulsech. Měření v jednotlivých časových intervalech jsou spojeny do křivky a vyhodnocuje se plocha pod křivkou, která se normalizuje počtem fagocytujících buněk ve vyšetřované krvi.

U všech fagocytárních testů, ale obecně u všech funkčních testů musí být pro vyloučení chyby v průběhu testu a předcházení vzniku falešně negativních výsledků souběžně s krví pacienta vyšetřován i zdravý dárce.

*Poznámka:*

*U všech výše uvedených testů jsou popisovány pouze základní principy používaných metod. Ve skutečnosti je tato problematika složitější. Jako příklad uvádíme metodiku ELISPOTu jako reálnou ukázkou toho, jak musí vyšetřující laboratoř každou metodiku připravit a provádět.*

## 2.4 Možnosti vyšetření sekrece humorálních faktorů na buněčné úrovni

Jednotlivé buňky lidského těla uvolňují do extracelulárního prostředí různé druhy působků, které se uplatňují v rámci zajišťování jejich fyziologické funkce a komunikace s ostatními buňkami. Koncentrace sekretovaných buněčných produktů se konvenčně měří pomocí enzymové imunoanalýzy (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA). Stanovením celkového množství humorálních faktorů přítomných v séru nebo vyšetřovaných kultivačních médiích získáme pouze nepřímou informaci o sekreční schopnosti skupiny buněk. Nedokážeme ale zjistit typ buňky a její schopnost produkovat sledované humorální faktory. Znalost těchto informací je často důležitá pro zjištění aktivačního stavu nebo funkce různých buněk našeho organismu. Proto byly jako doplnění serologických metod zavedeny funkční buněčné eseje, které umožňují sledování produkce humorálních faktorů (nejčastěji protilátek, cytokinů, chemokinů a dalších humorálních faktorů) přímo na buněčné úrovni.

### 2.4.1 ELISPOT

ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT assay) představuje funkční laboratorní buněčné vyšetření, které umožňuje *in vitro* detekci produkce sledovaných molekul jednotlivými buňkami. Tato metoda vychází z tzv. metod Jerneho plaků, které byly vyvinuty na počátku šedesátých let, a ve své době patřily mezi nejcitlivější postupy biologického měření. V zásadě se tyto testy podobají technikám plaků pro detekci bakteriálních virů.

Při testu Jerneho plaků se smíchá agar nebo agaróza s erytrocyty a se suspenzí PBMC obsahující B-lymfocyty. Pokud B-lymfocyty vylučují protilátky proti antigenním determinantám přítomným na povrchu cílových červených krvinek, protilátka se naváže na erytrocyty. V přítomnosti zdroje komplementu (obvykle séra králíka nebo morčete) dochází k lýze opsonizovaných erytrocytů, což se projeví tvorbou světlých zón. Ve středu každé takto vzniklé zóny je jediný B-lymfocyt produkující protilátky. Metoda ELISPOT pak byla vytvořena na tomto principu dvěma na sobě nezávislými skupinami na počátku 80. let minulého století. Původně sloužila k detekci počtu buněk tvořících **protilátky**, později byla modifikována ke zjišťování produkce **cytokinů**, **chemokinů** nebo **jiných sekretovaných molekul**. Výsledkem tohoto vyšetření jsou různé vypadající „skvrny“ na bílé filtrační membráně dna jamek mikrotitrační destičky (tzv. spoty), které představují otisk jednotlivých buněk ve smyslu zachycení produkce molekul na jednobuněčné úrovni. Vyšetření poskytuje informaci nejen o počtu buněk tvořících sledované molekuly, ale umožňuje též kvantifikaci buněčných produktů a poskytuje informaci o rychlosti a síle této produkce. Vše přímo koreluje

s charakterem, velikostí a intenzitou zbarvení jednotlivých spotů. Mezi další výhody tohoto vyšetření patří, že se jedná o funkční test s vynikající citlivostí (umožňuje funkční sledování i jedné jediné buňky) a metoda může být snadno přizpůsobena pro detekci různých sekretovaných produktů. V dnešní době existují různé modifikace ELISPOTu, které umožňují sledovat funkci T-lymfocytů, B-lymfocytů i buněk vrozeného imunitního systému.

#### 2.4.1.1 Princip vyšetření

##### 1. Potažení bílé membrány mikrotitrační destičky

K provedení metody ELISPOT je možné použít mikrotitrační destičky o 96 nebo 384 jamkách. Jejich použití závisí na počtu vyšetřovaných buněk. Běžně se používají 96 jamkové mikrotitrační destičky (pro  $2-4 \times 10^5$  buněk/jamku), nicméně pro dosažení optimálních stimulačních podmínek při menším počtu buněk (typicky okolo  $0,5 \times 10^5$  buněk/jamku) je možné použít destičky 384 jamkové. Dno jamek mikrotitrační destičky může být potaženo nitrocelulózou, ale většinou se používá polyvinylidenfluorid (PVDF), protože na ten se nejlépe vážou molekuly tvořící potah dna jamek destičky. Při potahování destičky je důležitá také koncentrace potahovacích molekul, která ovlivňuje kvalitu získaných spotů. Dna jamek mikrotitrační destičky mohou být potažena buď protilátkou namířenou proti sledovanému cytokinu či jinému buněčnému produktu nebo antigenem, na který se budou vázat produkované protilátky. Koncentrace potahovacího činidla zásadně ovlivňuje kvalitu získaných spotů, co se týče velikosti a intenzity jejich zbarvení. Větší koncentrace potahovací molekuly vede k tvorbě malých a intenzivněji zbarvených spotů, protože sekretované analyty jsou zachyceny okamžitě po svém uvolnění z buňky v její blízkosti. Naopak při nižší koncentraci potahovací molekuly dojde k tvorbě větších a méně intenzivně zbarvených spotů, protože sekretované analyty se musí dostat dále od buňky, aby se navázaly na odpovídající molekuly přítomné na dně mikrotitračních destiček.

Při B-buněčných (protilátkových) ELISPOT esejích je třeba většinou použít vyšší koncentrace potahovacího antigenu. Následně se mikrotitrační destička inkubuje nejlépe přes noc při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo alternativně 2 hodiny při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po promytí potahovacího roztoku se do jamek přidává blokovací činidlo [1% roztok bovinního sérového albuminu (BSA) ve fosfátovém pufru (PBS)], které se inkubuje 2 hodiny při pokojové teplotě. Po promytí jamek je destička připravená k dalšímu kroku.

## 2. Po inkubaci a promytí se do reakce přidají vyšetřované buňky

Do jednotlivých jamek se následně přidají vyšetřované buňky společně se stimulancii (peptidy, proteiny, buněčnými lyzáty, nádorovými nebo infikovanými buňkami či profesionálními antigen prezentujícími buňkami), které umožňují vyvolat produkci sledovaných analytů vyšetřovanými buňkami během asi 16 až 48 hodinové inkubace ve vhodných podmínkách. Tyto analyty se pak vážou na protilátky nebo antigeny, kterými byla jamka destičky potažena v prvním kroku. K vyšetření se používají většinou izolované mononukleární buňky periferní krve (PBMC). Nejlepší výsledky jsou dosaženy při použití čerstvých PBMC, kde je jejich kvalita negativně ovlivněna zejména časovým odstupem mezi krevním odběrem a izolací PBMC, ale také samotným procesem jejich izolace. Kromě nativních buněk je možné testovat i buňky zamražené, kdy je však třeba pomýšlet na to, že funkční kvalita testovaných buněk je navíc negativně ovlivněna procesem zamražení buněk včetně vlivu média pro zamražení, teplotou a dobou jejich zamražení. Všechny tyto procesy totiž negativně ovlivňují funkčnost buněk a vedou k nastartování apoptózy. Proto se v některých modifikacích metody vkládají přídatné kroky (ponechání předtím zmražených PBMC v klidovém stavu přes noc v inkubátoru, odstranění apoptotických buněk), které mají zajistit dobrou kvalitu buněk pro funkční testování. Jedna vrstva buněk na dně jamky 96 jamkové mikrotitrační destičky je tvořena asi  $1-1,5 \times 10^5$  buněk. Nicméně k zajištění dostatečné stimulace buněk k produkci analyzovaných cytokinů nebo protilátek ve formě efektivní prezentace antigenu a kostimulace je nutno do jamky přidat větší množství PBMC buněk. Optimálním množstvím buněk pro dosažení efektivní stimulace je  $2-4 \times 10^5$  buněk na jamku. Je třeba si uvědomit, že buňky ve vyšších vrstvách nebudou esejí detekovány a mohou naopak nežádoucím způsobem zvyšovat pozadí. Při vyšším počtu buněk v jamce bude i vyšší počet spotů na jejím dně, které se pak mohou překrývat a znemožnit přesný odečet jejich počtu.

S aplikací buněk a jejich několikahodinovou inkubací souvisí také nejdůležitější promývací krok celého procesu. Nedostatečné promytí buněk ze dna jamky totiž vede k nárůstu nežádoucího pozadí, které může ztížit nebo i znemožnit odečtení výsledku celé eseje (obrázek č. 12B).



### 3. Po inkubaci a promytí se do reakce přidá sekundární protilátka označená enzymem a následně vhodný substrát

Navázané analyty na dně mikrotitrační destičky se detekují pomocí změny intenzity zbarvení. K té se využívá reakce mezi enzymem a substrátem. Po proběhnutí enzymatické reakce se vytvoří barevný nerozpustný produkt, který precipituje na bílé membráně dna jamky mikrotitrační destičky a tvoří tzv. **spoty**. Každý jednotlivý spot představuje jednu sekretující buňku, která tvořila sledovaný analyt (obrázek č. 11). Koncentrace sekundární protilátky pro následnou detekci navázaného analytu na dně jamky je obvykle nižší (asi 0,1 µg/jamku), než koncentrace antigenu nebo protilátky potřebná pro potažení jamek dna mikrotitrační destičky. Většina ELISPOT esejí využívá amplifikační krok pomocí kaskády **biotin-avidin-enzym-substrát**. Avidin se vyskytuje buď v komplexu s **křenovou peroxidázou** (HRP) nebo **alkalickou fosfatázou** (AP). Použitý enzym určuje, jaký substrát musí být použit, což udává výslednou barvu spotů. Substrátem pro HRP je 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC; červené spoty) nebo tetramethylbenzidin (TMB; modré spoty), substrátem pro AP je 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT; modrofialové spoty). Sekundární protilátka se inkubuje v jamkách mikrotitrační destičky 2 hodiny v temnotě při pokojové teplotě. Po promytí se přidá substrát a enzymatická reakce se nechá probíhat 10–30 minut, kdy se na dně jamek mikrotitrační destičky začnou objevovat spoty. Reakce se zastavuje přidáním destilované vody. Následně se celá destička promyje pod tekoucí vodou a nechá se vysušit.

### 4. Zjišťování počtu spotů

Počet spotů získaných při vyšetření se pro standardizaci a zpřesnění většinou odečítá automaticky pomocí **ELISPOT/FLUOROSPOT readerů** (obrázek č. 13). V dnešní době existuje několik automatických systémů pro odečet počtu spotů vybavených různými možnostmi nastavení softwaru. Obecně je možné si manuálně nastavit sledování velikosti, barvy, intenzity zbarvení, tvaru a změny zbarvení spotu od centra do periferie. Spoty jsou charakterizovány určitými vlastnostmi, mezi které patří zejména postupná změna barvy od sytější centrální do bledší periferní a určitá minimální velikost, což umožňuje odlišit reálné spoty od artefaktů nebo dalších nechtěných signálů (obrázek č. 14). Výsledek vyšetření se u cytokinových esejí udává jako počet buněk [tzv. „**spot forming cells**“ (SFC)] na  $10^6$  PBMC a u protilátkových ELISPOT esejí jako SFC/ $10^6$  B-lymfocytů. Spoty jsou stabilní po dlouhou

dobu (měsíce nebo roky), zejména pokud jsou chráněny proti světlu. Dokonce také spoty získané FLUOROSPOTEM jsou při světelné protekci stabilní několik měsíců (zejména Cy3 cyanine fluorescenční barva), na druhou stranu FITC signály začínají blednout po opakované dlouhé expozici světlu.

#### 2.4.1.2 Modifikace metody

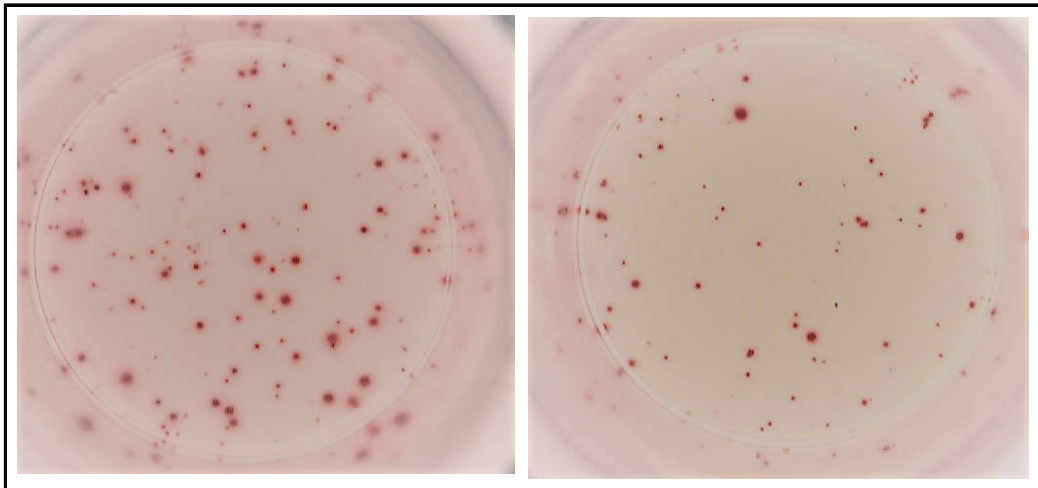
##### **ELISPOT pro detekci tvorby protilátek**

B-buněčný ELISPOT je citlivým nástrojem pro sledování tvorby protilátek na B-buněčné úrovni. U protilátek tvořených jedním B-lymfocytom může být metodou ELISPOT detekována jejich antigenní specifita, třída nebo podtřída. Antigenní specifita tvořených protilátek je určena jejich vazbou na antigen, kterým je potaženo dno mikrotitrační destičky, kde jsou B-lymfocyty kultivovány. K vazbě protilátky na antigen dochází v těsné blízkosti samotného B-lymfocyty. Tato vazba je detekována sekundární protilátkou namířenou proti stanovované třídě produkovaných protilátek značenou enzymatickou značkou. Barevný spot, který se vytvoří na dně jamky mikrotitrační destičky tak představuje otisk jednoho B-lymfocyty, který tvořil příslušené protilátky. Dnes existují modifikace ELISPOT eseje, které umožňují detekci celkem sedmi imunoglobulinových tříd a podtříd v jedné metodice (IgM, IgA, IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>). Existuje také reverzní podoba B-buněčné ELISPOT eseje, kdy místo antigenu jsou destičky potaženy protilátkou namířenou proti IgG, na kterou se vážou IgG protilátky produkované B-lymfocyty. Tato modifikace ELISPOT eseje přinesla zlepšení kvality spotů při použití nižší koncentrace potahovacího antigenu. Kromě tvorby protilátek se mohou B-lymfocyty v imunitních reakcích podílet také tvorbou cytokinů, chemokinů nebo granzymů. Antigen-specifické B-lymfocyty, na rozdíl od antigen-specifických T-lymfocytů, nemohou být identifikovány pomocí průtokové cytometrie. Proto byly vyvinuty multiplexové B-buněčné ELISPOT eseje, které slouží pro identifikaci funkčních B-buněčných subpopulací. B-lymfocyty, které tvoří kromě protilátek ještě další cytokiny, budou vykazovat dvojí pozitivitu. Při této modifikaci ELISPOT eseje je možné použít až 7 barev, což umožňuje sledovat 6 analytů a protilátku produkované buňkou.

##### **ELISPOT pro detekci tvorby cytokinů**

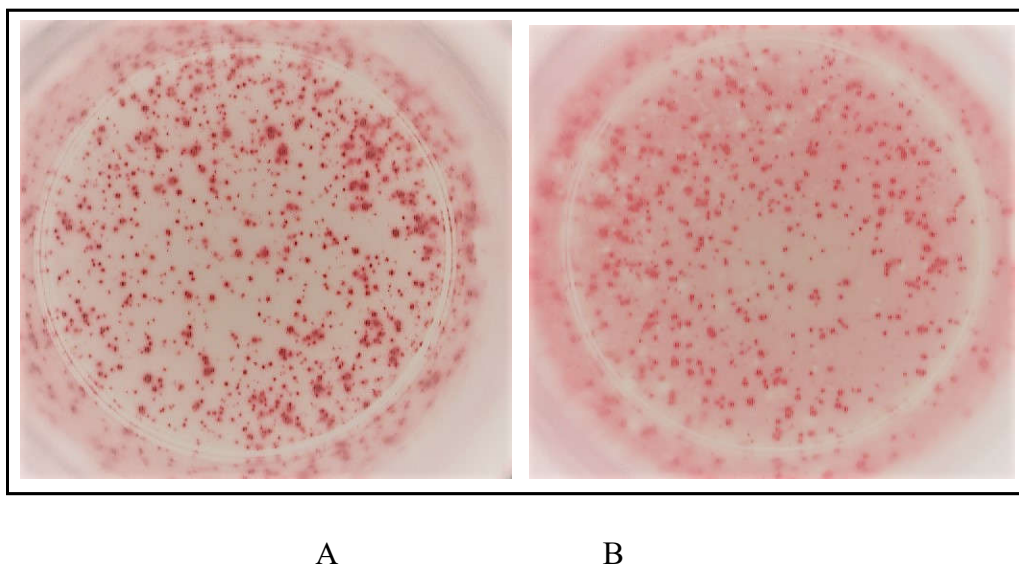
Jednobarevná IFN- $\gamma$  ELISPOT esej byla vyvinuta jako vysoce citlivé metoda pro detekci T-buněčných funkcí. Původně modifikace metody umožňovala detekci produkce IFN- $\gamma$  T-lymfocyty po antigenní expozici, což umožňovalo měřit počet antigen-specifických

pomocných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů (Th1) u vyšetřovaných pacientů. Tím byla získána informace o klonální expanzi těchto buněk, které po stimulaci antigenem produkují IFN- $\gamma$ . Nicméně jednobarevná IFN- $\gamma$  ELISPOT esej není vhodná pro určení buněčné odpovědi Th2 nebo Th17 buněk, ani neposkytuje informaci o diferenciačních stádiích cytotoxických CD8<sup>+</sup> Tc-lymfocytů. Proto byly následně vyvinuty další eseje, které umožňují sledovat také tvorbu jiných cytokinů T-lymfocytů. Jakmile se totiž Th1, Th2 a Th17 buňky diferencují do svých efektorových stádií, jsou charakterizovány jedinečným cytokinovým profilem, který je od sebe odlišuje. Po opětovném setkání se specifickým antigenem produkují Th1 lymfocyty IFN- $\gamma$  (ale ne IL-4 nebo IL-17), Th2 lymfocyty IL-4 nebo IL-5 (ale ne IFN- $\gamma$  nebo IL-17) a Th17 lymfocyty IL-17 (ale ne IFN- $\gamma$ , IL-4 nebo IL-5). Procentuální zastoupení Th1/Th2/Th17 buněk mezi antigen-specifickými Th-lymfocyty určuje kvalitu imunitní odpovědi. Toto zastoupení se mění dle antigenu, na který imunitní systém odpovídá. Proto měření počtu a tvorby cytokinů těmito buňkami je důležité pro sledování funkčnosti imunitního systému. Protože se však maximum produkce jednotlivých cytokinů po stimulaci se u různých T-lymfocytů liší (u IFN- $\gamma$  24 h, u IL-17 96 h, u IL-4 48 h a u IL-5 96 h po stimulaci), je lepší pro detekci použít jednobarevné ELISPOT eseje. Nicméně nedávno bylo popsáno, že koexprese IL-2, TNF- $\alpha$ , granzymu B společně s IFN- $\gamma$  umožňuje odlišit různé subpopulace CD8<sup>+</sup> cytotoxických Tc-lymfocytů, které produkují různá množství těchto cytokinů po setkání s antigenem. Proto byla vyvinuta čtyřbarevná fluorescenční ELISPOT esej, která umožňuje detekovat produkci IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  a granzymu B u každého Tc-lymfocytu a tím určit aktivační a diferenciační stádium těchto buněk.



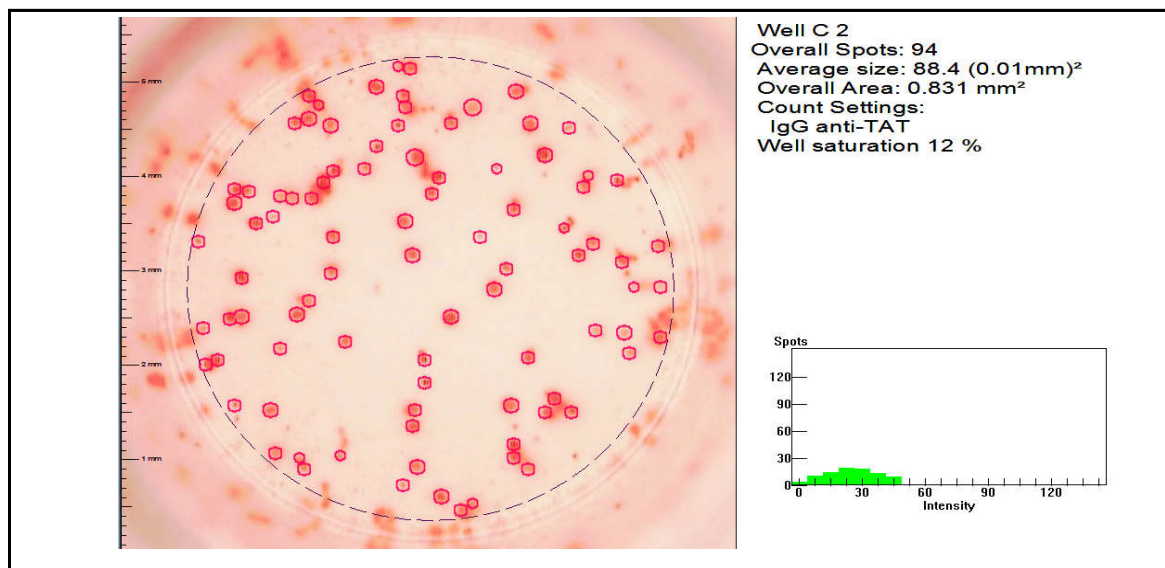
**Obrázek č.11: Ukázka spotů na bílé membráně dna mikrotitrační destičky**

Typický spot je charakterizován tmavší centrální částí s postupným ubýváním intenzity zbarvení do periferní části. To je způsobeno zachycením produkované molekuly nejvíce v blízkosti samotné buňky a její následné difúze do periferie na základě množství a rychlosti sekrece této molekuly v čase. Velikost spotu a intenzita jeho zbarvení koreluje s aktivací zkoumané buňky. Čím větší je spot a čím vyšší má intenzitu zbarvení, tím větší množství této molekuly daná buňka v čase vytvořila. Je třeba mít však na paměti, že vzhled spotů může být silně ovlivněn technickými aspekty testu, proto je nutné dbát na standardní optimalizaci testu pro jeho konkrétní použití.



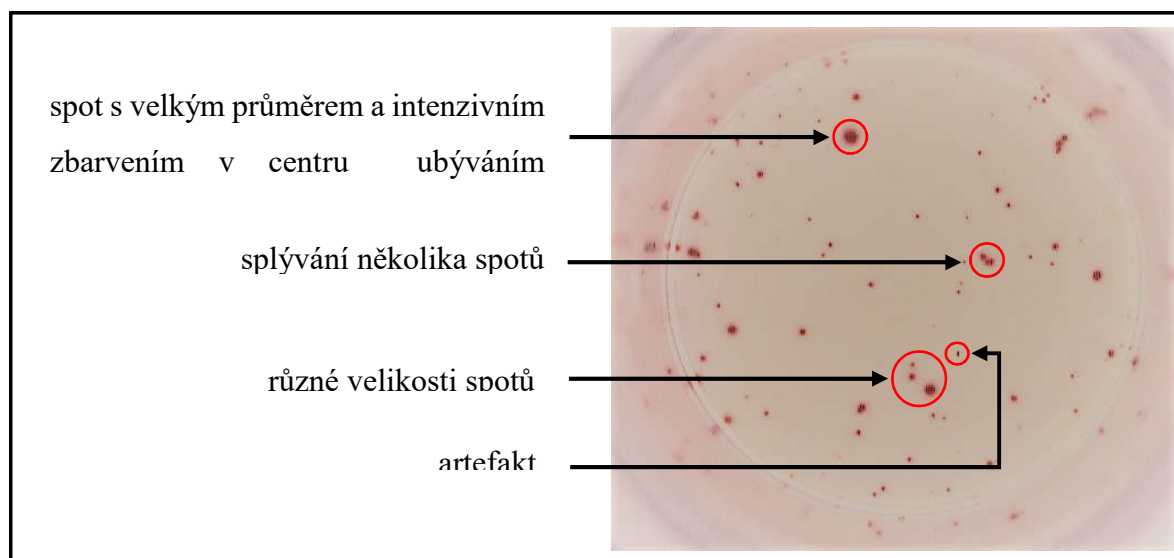
**Obrázek č. 12: Ukázka spotů na bílé membráně dna mikrotitrační destičky**

Obrázek 12A) ukazuje příliš vysokou koncentraci spotů na dně mikrotitrační destičky, která byla způsobena velkým počtem zkoumaných buněk v jedné jamce. Obrázek 12B) ukazuje navíc příliš velkou barevnost pozadí způsobenou nedostatečným promytím destiček po inkubačním buněčném kroku. Obě dvě tyto nežádoucí situace pak zhoršují správné odečtení počtu spotů.



**Obrázek č. 43: Automatický odečet počtu spotů pomocí ELISPOT readeru**

ELISPOT reader provádí odečet počtu spotů dle předem nastavených parametrů, kam patří průměrná velikost, velikost povrchu a barevná saturace jednotlivých spotů. Tento konkrétní obrázek ukazuje počet SFC tvořících protilátky proti tetanickému toxoidu ve třídě IgG u zdravé osoby.



**Obrázek č. 5: Ukázka typu spotů na bílé membráně dna mikrotitrační destičky**

## 2.4.2 FLUOROSPOT

Kromě klasického ELISPOTU na bázi detekce pomocí změny zbarvení při reakci enzym substrát existuje i modifikace následné detekce pomocí fluorescenčního zbarvení, tzv. FLUOROSPOT. Původně byl vytvořen pro detekci T-buněčné cytokinové sekrece, ale postupně byla modifikována také pro detekci B-buněčné tvorby. FLUOROSPOT je podobně citlivý jako ELISPOT a je schopný detekovat v jednom vyšetření až tři analyty. To umožňuje sledování 7 subpopulací v rámci jednoho vyšetření, a to buď tři subpopulace sekretující jeden analyt, tři subpopulace sekretující kombinaci dvou analytů nebo jedna subpopulace tvořící tři analyty. FLUOROSPOT eseje umožňují získání většího množství dat za použití menšího množství buněk a antigenu než klasické ELISPOT eseje.

### **Shrnutí**

ELISPOT/FLUOROSPOT eseje představují citlivé funkční laboratorní metody, které umožňují detekci tvorby nejrozličnějších molekul přímo na buněčné úrovni. Je tak možno vyšetřovat funkci T-lymfocytů, B-lymfocytů nebo dalších buněk imunitního systému, kdy se nejčastěji stanovuje tvorba protilátek nebo cytokinů. Výsledkem vyšetření je zjištění počtu buněk, které tvořily sledované buněčné produkty. V současné době jsou na trhu dostupné jak samostatné destičky potažené příslušnými protilátkami, tak i diagnostické soupravy obsahující všechny složky potřebné k provedení testu (např. T-SPOT využívaný v diagnostice latentní tuberkulózy).

### 3 Využití monoklonálních protilátek k léčebným účelům

V posledních 20 letech prodělala medicína revoluci v oblasti terapeutických možností zavedením tzv. biologické léčby do běžné klinické praxe. Jedná se o léčbu pomocí molekul, které původně byly biologického původu (od toho odvozen název této terapeutické skupiny). Tyto molekuly jsou buď produktem živého organismu, nebo ze živého organismu vychází. Dnes navíc patří do této skupiny různé inhibitory kináz, inhibitory proteazomů a podobně, které biologického původu nejsou a i přesto jsou do skupiny biologických léčiv zahrnovány. Biologika zasahují do imunopatologických mechanismů účastnících se rozvoje autoimunitních, zánětlivých a nádorových onemocnění a tím ovlivňují jejich průběh. Do této skupiny léčiv patří i **monoklonální protilátky (mAb)**. Zavedení biologické léčby do klinické praxe bylo umožněno spoluprací tří základních oborů, a to imunologie, molekulární biologie a genetického inženýrství.

První mAb byly vyrobeny Milsteinem a Köhlerem, za což tito vědci v roce 1984 získali Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Tyto mAb byly stoprocentně **myší** bílkovinou, proto byly pro člověka imunogenní a nehodily se k dlouhodobé léčbě. Toto omezení bylo překonáno metodami molekulární biologie a genetického inženýrství, což umožnilo vytvořit mAb s menším podílem myší a větším podílem lidské bílkoviny, které již nebyly pro člověka tolik imunogenní. Nejdříve byla nahrazena Fc oblast myší protilátky Fc oblastí lidské protilátky procesem označovaným jako chimerizace (napojení myšího Fab fragmentu na lidskou Fc část molekuly IgG), čímž byly získány tzv. **chimerické mAb**. Později došlo k přenesení hypervariabilních oblastí myší protilátky na zbytek protilátky lidské za vzniku tzv. **humanizovaných mAb**. Nejnovější technologie umožňují výrobu tzv. plně **humánních mAb**. Léčba monoklonálními protilátkami se dnes používá zejména při léčbě nádorových a autoimunitních onemocnění, ale i při rejekcích transplantátů či některých dalších onemocnění, přičemž počty biologických léčiv a jejich indikace se neustále rozšiřují (Příloha č. 1).

Fúzní proteiny jsou tvořeny umělým spojením dvou nebo více proteinů, za vzniku nového proteinu, který může nést obě funkce původních proteinů. Může se jednat například o spojení enzymu či cytokinu a protilátky zaměřené proti konkrétní antigenní struktuře. Při aplikaci takto připraveného fúzního proteinu dojde k jeho navázání na cílovou buňku či strukturu a přítomný enzym nebo cytokin tak může působit v konkrétním místě.

Biologická léčba je mnohdy velmi účinná ve smyslu léčby nebo tlumení příznaků léčeného základního onemocnění, ale jejich používání s sebou bohužel nese také celou řadu nežádoucích účinků (systémových nebo orgánově specifických), z nichž některé mohou být velmi závažné. Mezi nejdůležitější patří infekční komplikace (například reaktivace latentní tuberkulózy při terapii monoklonálními protilátkami antagonisty účinky TNF- $\alpha$  nebo rozvoj progresivní multifokální encefalopatie způsobené John Cunningham virem (JCV) po léčbě natalizumabem, rituximabem nebo efalizumabem), porucha funkce destiček (po léčbě infliximabem, efalizumabem nebo rituximabem), dermatitida (po léčbě cetuximabem, panitumumabem), rozvoj autoimunitních (lupus-like syndromy, autoimunitní postižení štítné žlázy, autoimunitní kolitida) nebo nádorových onemocnění nebo příznaky tzv. cytokinové bouře (masivní uvolnění cytokinů do krevního oběhu, které vede k mnohočetnému orgánovému postižení).

Tabulka na konci skript dokumentuje širokou škálu v současnosti léčebně používaných monoklonálních protilátek a fúzních proteinů. Některé z nich mohou výrazně ovlivnit i laboratorní výsledky, například při použití monoklonální protilátky Rituximab dochází k depleci B-lymfocytů. V periferní krvi by se po jejím podání pacientovi neměly B-lymfocyty vyskytovat. Stanovení relativního a absolutního počtu B-lymfocytů se pak může stát součástí monitorování účinku podávané protilátky. Protože je Rituximab protilátkou proti receptoru CD20 na povrchu B-lymfocytu, je třeba k laboratornímu stanovení počtu B-lymfocytů využít jiný receptor tak, aby nedošlo k blokování vazby diagnostické protilátky na případných přeživších B-lymfocytech. Ke stanovení počtu B-lymfocytů by pak měla být použita protilátka proti znaku CD19. Z tohoto důvodu je dobré znát cílové molekuly, na které se používaná biologická léčiva vážou. Škála používaných biologických léčiv se neustále rozrůstá a pro správnou diagnostiku je proto zapotřebí komunikace mezi lékařem požadujícím cílené vyšetření, například vyšetření počtu B-lymfocytů, a laboratoří, která toto vyšetření bude provádět. V současné době již existují i diagnostické soupravy umožňující stanovit v séru pacienta jak hladinu podávaného preparátu, tak hladinu protilátek, které může pacient během terapie vytvořit, což přispívá k užitečnosti hodnocení podávaného léku v klinické praxi.



## 4 Diagnostika alergických stavů

Pojem „alergie“ zavedl v roce 1906 rakouský vědec Clemens von Pirquet. Toto slovo pochází z řeckých slov „allos“ (jiný) a „ergon“ (reakce, reaktivita) a použito dohromady znamená něco jako „odlišná reaktivita.“

Alergická onemocnění jsou způsobena neadekvátní reakcí imunitního systému na běžné a jinak neškodné antigeny pocházející z vnějšího prostředí, na něž imunitní systém zdravého člověka nereaguje. Tyto antigeny se nazývají **alergeny**. Alergická onemocnění jsou zprostředkována humorálními nebo buněčnými mechanismy. Mají sice dědičný základ, ale na jeho vzniku a rozvoji se významně podílejí i faktory vnějšího prostředí. Alergické reakce náleží do skupiny imunopatologických reakcí, které jsou běžně děleny podle **klasifikace dle Coombse a Gella** do čtyř základních typů. Na vzniku alergických stavů se sice může podílet každá z těchto imunopatologických reakcí, nicméně většina alergických onemocnění (tak, jak jsou chápána v dnešním pohledu), jsou přecitlivělostí časného typu závislou na IgE protilátkách (tzv. imunopatologická reakce časné přecitlivělosti neboli I. typu). Časná přecitlivělost prvního typu se vyvíjí ve dvou krocích. Prvním z nich je tvorba specifického IgE na daný alergen a jeho navázání na  $Fc_\epsilon$  receptory žírných buněk. Ve druhém kroku při opětovném setkání s alergenem dochází k vazbě alergenu na navázané molekuly IgE, což vede k aktivaci signální kaskády a buněčné degranulaci.

**Atopie** je genetická predispozice odpovídat tvorbou specifického IgE po stimulaci některými cizorodými antigeny (alergeny).

### 4.1 Alergeny

**Alergen** je exogenní antigen, který je schopen u vnímavých jedinců vyvolat patologickou imunitní reakci. Spektrum alergenů je velmi široké. Z inhalačních alergenů se jedná zejména o složky pylových zrn, roztoče nebo spory plísní. Z potravinových a lékových alergenů se může uplatňovat prakticky kterákoliv potravinu či lék. Velmi rizikovým alergenem je jed blanokřídlého hmyzu. Potravinové alergeny můžeme rozdělit do dvou tříd:

U **alergenů první třídy** dochází k senzibilizaci jedince orální cestou. Jedná se o alergickou reakci, která se spouští zpravidla během několika minut po konzumaci potravin. Potravinová alergie se může projevovat s různou intenzitou, a to od mírného svědění v dutině

ústní až po plně rozvinutou anafylaxi s otoky, obstrukcí dýchacích cest a oběhovým selháním. To vše nastává během několika minut od konzumace spouštěcího druhu potravin. Potravinové alergeny první třídy jsou převážně glykoproteiny, které podle vazby glykanů nazýváme N-vázané nebo O-vázané. Mají relativně nízkou molekulovou hmotnost v rozmezí 10–50 kDa a jsou dobře rozpustné ve vodě. Bývají odolné proti působení žaludeční kyseliny i proti enzymům, jako je pepsin, trypsin a chymotrypsin. Mají rovněž zvýšenou odolnost vůči působení vyšších teplot. Vyvolávají lokální i celkové reakce.

**Alergeny druhé třídy** „alergizují“ inhalační cestou. Jsou vysoce termolabilní a nestabilní, tudíž je obtížná příprava diagnostických extraktů. Tyto alergeny jsou odvozeny z rostlinných pylů. Často vyvolávají pouze lokální příznaky. Alergeny rostlinného původu jsou často proteiny, které mají v rostlinách různé funkce. Patří sem tzv. **skladovací proteiny**, které se nacházejí zejména v ořeších, semenech a obilných zrnech, dále **inhibitory enzymů**, například inhibitory alfa amyláz, které by mohly štěpit škroby; anti-trypsin chránící před trypsinovým rozkladem proteinů v obilných zrnech, tzn. inhibitory takových enzymů, které by mohly působit destruktivně při skladování potravin. Mezi alergeny druhé třídy řadíme také **regulační proteiny** (například profiliny, které jsou důležité v rozmnožování rostlin a jsou přítomny v pylích), **proteiny související s patogenezi** (podílejí se na obranných reakcích rostliny; například hevaminy, což jsou enzymy podobné lysozomu, které štěpí buněčné stěny hub a chrání tak rostlinu před napadením plísněmi). Mezi alergeny rostlinného původu rovněž řadíme **proteiny zajišťující transport lipidů** (LTP), které jsou nezbytné pro vlastní fungování rostlinné buňky.

Obsah proteinů v konkrétní části rostliny může být různý, např. pšeničná bílkovina tvoří zhruba 12 % suchých jader pšenice. Pšeničné bílkoviny dělíme na gliadiny, gluteniny, albuminy a globuliny. Gliadiny obsahují 40–60 různých složek, gluteniny obsahují nejméně 15 různých složek a podobně, přičemž alergeny se mohou vyskytovat ve všech těchto složkách. Kromě rostlinných alergenů také existuje spousta alergenů živočišných, např. alergeny mléka, kterých je známo asi 30: kaseiny ( $\alpha$ ;  $\beta$ ;  $\kappa$ ), které jsou termostabilní nebo  $\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin, které jsou termolabilní. Mezi alergeny vajec patří ovalbumin, ovomukoid, ovotransferin a lysozym vaječného bílku. Alergeny se rovněž vyskytují v korýších, různých druzích masa a podobně. Děti bývají nejčastěji alergické na vejce, kravské mléko a burské ořechy. K senzibilizaci u nich dochází přímo v gastrointestinálním traktu při kojení. Tato alergie bývá obvykle přechodného charakteru a v předškolním věku zpravidla vymizí. U dospělých jsou častými potravinovými alergeny měkkýši nebo korýši, arašídy, různé druhy

ořechů, ryby, vejce a luštěniny. Tyto alergie dospělých vznikají po senzibilizaci inhalačními alergeny, zejména pyly a dochází pak ke vzniku zkřížené reaktivity.

V současnosti je známo aminokyselinové uspořádání většiny alergenů, což umožňuje rozlišit **hlavní a vedlejší alergen**. Hlavní alergen je látka, na kterou reaguje více než 50 % jedinců přecitlivělých na daný alergen, a to tvorbou specifických protilátek, nejčastěji třídy IgE. Ostatní alergeny jsou označovány jako vedlejší. Například pylové zrno břízy (latinsky *Betula verrucosa*) obsahuje okolo třiceti alergenů, ale pouze proti jednomu z nich se specifické protilátky tvoří téměř u všech osob alergických na pyl břízy. Tento alergen, označován v alergologické nomenklatuře jako Bet v 1 (odvozeno z prvních tří písmen rodového a prvního písmena druhového latinského názvu rostliny), je tedy hlavním alergenem břízy. Na hlavní alergeny tedy reaguje většina vnímavých osob (50–90 %) a na vedlejší alergeny reaguje menšina vnímavých osob (<10 %). Jako hlavní alergen může být označeno i více alergenů, například mezi hlavní alergenové komponenty arašídů (*Arachis hypogaea*) patří Ara h 1, 2 a 3.

## 4.2 Zkřížené reakce

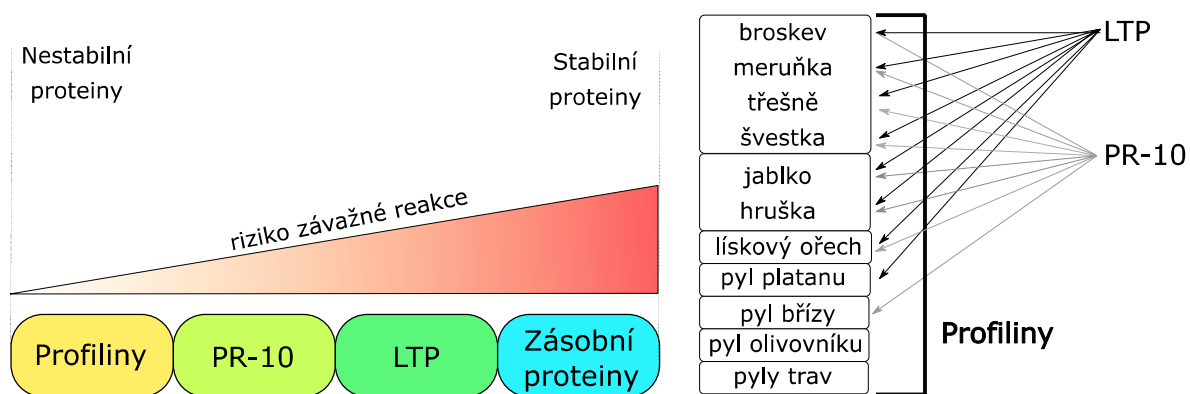
Relativně velká část alergenů si je navzájem podobná ve svém aminokyselinovém složení. Alergeny s větším než 50% homologickým aminokyselinovým složením pak vykazují výraznou zkříženou reaktivitu. Je-li homologie alergenů vyšší než 80 %, pak hovoříme o tzv. **panalergenech**. Obsahují 91–95 % aminokyselin, jejichž základní sekvence je fylogeneticky velmi konzervativní. Tyto panalergeny často způsobují potravinovou alergii asociovanou s pyly. U vnímavých jedinců nejprve dochází k jejich senzibilizaci za účasti inhalačních alergenů, následně prostřednictvím zkřížené reaktivity mezi proteiny inhalačních alergenů (pyly, roztoči, peří, kočičí epitel) a potravinami dojde k rozvoji potravinové alergie. Panalergeny můžeme rozdělit do čtyř skupin, a to na profiliny, PR-10 proteiny, lipid transfer proteiny a zásobní proteiny (obrázek č. 12).

**Profiliny** jsou cytoplazmatické bílkoviny vážící aktin. Nalezneme je v pylech trav, plevelů a stromů. Mezi profiliny patří vedlejší alergeny břízy Bet v 2 a Bet v 6, alergen bojínku Phl p 12 nebo alergen arašídů Ara h 5. Jedná se o termolabilní proteiny. U pacientů s alergiemi na profiliny můžeme pozorovat zkříženou reakci na pyl – ovoce (hrušky, banány, pomeranče) – zelenina (brambory, mrkev, paprika, rajčata) – ořechy.

**PR-10 proteiny** (pathogenesis related proteins 10) patří mezi termolabilní proteiny, které se často vyskytují v dužině ovoce. Jejich úlohou je obrana rostliny proti bakteriím a plísním. Jedná se o proteiny, které jsou homologní s hlavním alergenem břízy Bet v 1 a alergenem arašídů Ara h 8, dále sem patří alergeny jablka, hrušky, třešně a meruňky. U senzibilizovaných pacientů můžeme pozorovat zkřížené alergie na pyl břízy – ovoce (jablka, hrušky) – zeleninu (mrkev, celer). Z obilnin sem můžeme zařadit sóju. Do této skupiny náleží také alergeny latexu. Zkřížená alergie mezi různými antigeny latexu se nazývá latex-fruit syndrom. U latexu, který se získává z kaučukovníku, je popsáno 12 alergenů. Často jde o panalergeny, které jsou homologní (shodné) s alergeny některých druhů exotického ovoce, např. alergen glukonáza se nachází v latexu, banánu, kiwi, fíku, avokádu a bramborách, chitináza se nalézá v latexu a avokádu a thaumatin se nachází v latexu, jablku a třešni.

**Lipid transfer proteiny** (LTP) jsou ubikvitní bílkoviny transportující fosfolipidy v buněčných stěnách rostlinných buněk. Vyskytují se především v ovoci (broskve, meruňky, jablka), v obilovinách (kukuřice, ječmen) a v arašidech (zde se jedná o alergen Ara h 9). U těchto typů alergií nebývá asociace s alergií na pyly.

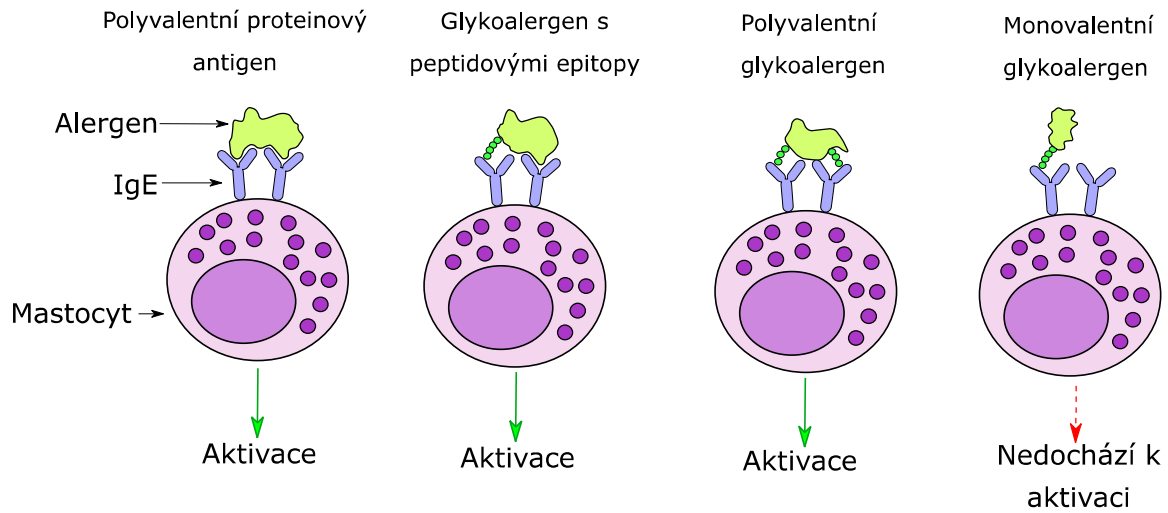
**Zásobní proteiny** nalézáme především v ořeších, arašidech, jádrech, peckách plodů, semenech a luštěninách. Patří sem viciliny (7S globuliny), leguminy (11S globuliny) a ve vodě rozpustný 2S albumin. Viciliny jsou hlavní alergeny luštěnin, které jsou velmi odolné vůči proteolýze. Najdeme je také v ořeších a sezamovém semínku. Patří sem Ara h 1 (hlavní arašídový alergen), který představuje nejlépe charakterizovaný alergenní vicilin. K této rodině alergenních vicilinových proteinů patří i Jug r 2 vlašského ořechu, Jug n 2 černého ořechu, Cor a 11 lískového ořechu, Ana o 1 kešu ořechů, Ses i 3 sezamu, Pis s 1 a Pis s 2 hrachu, Pis v 3 pistáciových oříšků, a Len c 1 čočky. Alergenní leguminy zahrnují vedlejší arašídové alergeny Ara h 3 a Ara h 4. Další popsané leguminy jsou Cor a 9 lískového ořechu, Ber e 2 para ořechů, Pis v 2 pistáciových ořechů, Ana o 2 kešu ořechů, sójového glycininu Gly m 6, a Ses i 6 a Ses i 7 sezamu. 2S albumin je velice stabilní a nachází se v arašidech (Ara h 2). Dále sem patří alergeny orientálních hořčičných semen (Bra j 1), řepky (Bra n 1), tuřinu (Bra r 1), žlutého hořčičného semene (Sin a 1), para ořechu (Ber e 1), černého ořechu (Jug n 1), vlašského ořechu (Jug r 1 a Jug r 4), sezamu (Ses i 1 a Ses i 2), skočcových bobů (Ric c 1), kešu ořechu (Ana o 3) a pistácií (Pis v 1).



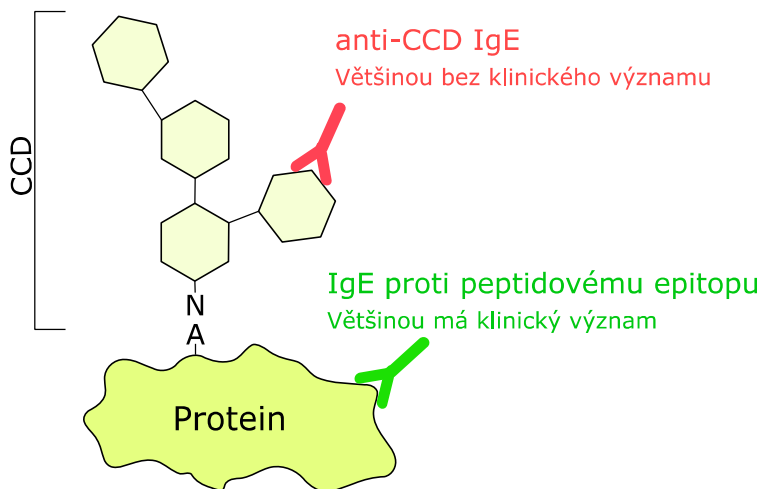
Obrázek č. 65: Základní skupiny panalergenů

Dalším typem zkřížené reaktivity je biochemická podobnost alergenů vycházející z přítomnosti zkříženě reagujících sacharidových determinant (CCD znaky). Právě **anti-CCD protilátky** jsou často odpovědné za falešnou pozitivitu diagnostických testů, které používají standardizované alergenové extrakty. Ovšem i tyto látky mohou být odpovědné za alergické reakce. CCD alergenů jsou popsány u hrušky, mrkve, celeru, měkkýšů, členovců a dvoukřídlého i blanokřídlého hmyzu.

Jestli bude mít vazba IgE se sacharidovou složkou alergenu klinický význam závisí na tom, zda se IgE protilátka váže na jeden sacharidový epitop alergenu, tzv. **monovalentní glykoalergen** (např. Ara h 1), nebo prováže mezi sebou více sacharidových epitopů, tzv. **polyvalentní glykoalergen** (obrázek č. 16). Při monovalentní vazbě nedochází zpravidla ke klinickým projevům alergie, neboť nedochází k provázání IgE protilátek navázaných na povrchu mastocytů, čímž nedojde k uvolnění mediátorů z těchto buněk. U polyvalentních glykoalergenů však k takovému provázání dochází, což může vyústit v klinické příznaky alergie. Z tohoto důvodu je zapotřebí přesně určit senzibilizující alergenový epitop (obrázek č. 17).

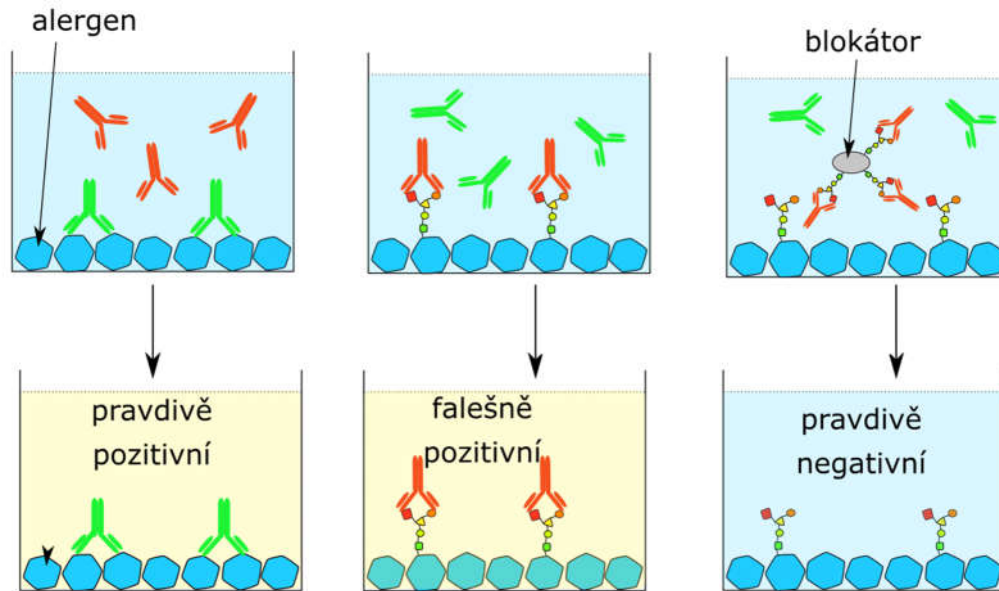


Obrázek č. 16: Monovalentní a polyvalentní alergeny



Obrázek č. 17: Vazba IgE na sacharidovou složku alergenu, tzv. anti-CCD IgE

Pokud jsou anamnéza, symptomy nebo kožní testy v rozporu s výsledky stanovení IgE protilátek, je třeba zvážit pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků v závislosti na možné falešné reakci na sacharidovou komponentu (obrázek č. 18).



**Obrázek č. 78: Blokování anti-CCD protilátek:** zeleně jsou značeny IgE protilátky proti peptidovým epitopům daného alergenu a červeně IgE protilátky proti sacharidovým komponentám alergenu

#### 4.3 Zdroje alergenů pro laboratorní diagnostiku

Původně se pro diagnostické a terapeutické účely používaly málo definované alergenové **extrakty** získané purifikací přírodních zdrojů. V současnosti se používají **standardizované alergenové extrakty**, ve kterých je výrobcem stanoven obsah hlavních alergenů a jejich schopnost vázat se s lidskými protilátkami. Kvantitativní množství alergenů výrobce stanovuje ELISA testem. Kvalitativní stanovení, neboli aktivita, se měří pomocí prick testů (*in vivo*) u skupiny lidských dobrovolníků s pozitivní reakcí na daný alergen nebo ELISA testem. Množství a aktivita daného alergenu v připravovaném extraktu se pak srovnává se standardem. Tím se zajišťuje kvalita a bezpečnost diagnostických alergenových preparátů. Nicméně alergenové extrakty obsahují mimo hlavní alergeny také další vedlejší nealergenní látky (proteiny, glykoproteiny a sacharidy). Tyto součásti extraktů pak mohou vést k falešné pozitivitě u diagnostických testů, které jsou s nimi prováděny. Z tohoto důvodu byly vyvinuty **rekombinantní alergeny**. Jedná se o biotechnologicky produkováné molekuly původně

identifikované z alergenových extraktů, které se připravují pomocí molekulárně biologických metod. Ze zdroje alergenu je izolována RNA, která je použita pro syntézu DNA. Ta se amplifikuje a je vložena do genu bakteriofága. Hostitelem bakteriofága je bakterie, která bude konkrétní alergen produkovat. Rekombinantní alergeny jsou v současné době produkovány bakterií *Escherichia coli* (E. coli), která je výhodná v tom, že produkováný alergen není třeba posttranslačně upravovat a má stálou strukturu. V současné době jsou rekombinantní alergeny využívány k diagnostice, ale také terapii stále více. Rekombinantní alergeny umožňují tzv. **komponentovou diagnostiku**, kterou je možné určit konkrétní alergenní molekuly vyvolávající senzibilizaci. Komponentová diagnostika umožňuje definovat také správné složení přípravků používaných pro **specifickou alergenovou imunoterapii** a posoudit riziko vzniku systémové reakce při jejich podávání.

#### 4.3.1 Diagnostické využití alergenových extraktů a rekombinantních alergenů

V současné době se k laboratornímu stanovení alergické reakce užívají alergenové extrakty i rekombinantní alergeny. V extraktech se nachází více alergenových komponent a zvyšuje se pravděpodobnost nalezení příčiny alergie. Přesnější komponentová diagnostika pak umožňuje určit přecitlivělost na jednotlivé složky alergenových směsí a pomáhá vysvětlit zkřížené reakce na různé alergeny.

### 4.4 Alergologické vyšetření

Základem alergologického vyšetření je důkladná **anamnéza** zaměřená na vytipování možných alergenů. Následuje **fyzikální vyšetření**, které vychází z interního vyšetření pacienta. **Alergologické testy** se dělí na testy prováděné *in vivo* nebo *in vitro*. První z nich jsou podrobně popsány ve skriptech s názvem „*Základy vyšetření v klinické imunologii, 2015*“. V této kapitole se budeme podrobněji zabývat *in vitro* testy, při kterých se používají standardizované alergenové extrakty i rekombinantní alergeny.

#### 4.4.1 Laboratorní diagnostika

Při podezření na alergické onemocnění pacienta můžeme laboratorně vyšetřovat počet eozinofilů, koncentraci celkových sérových IgE imunoglobulinů, koncentraci specifických sérových IgE protilátek proti nativním i rekombinantním alergenům a test aktivace bazofilů. U vybraných případů se dále provádí stanovení hladiny tryptázy a eozinofilního kationického



proteinu (ECP). Pro stanovení pozdní přecitlivělosti, zejména u lékových alergií, se dá využít test proliferace lymfocytů.

#### 4.4.2 Stanovení počtu eozinofilů

Eozinofilní granulocyty hrají fyziologicky důležitou roli v obraně organismu proti mnohobuněčným parazitům, přičemž patologicky se podílejí na vzniku alergického zánětu. Informaci o absolutním a relativním počtu eozinofilů získáme vyšetřením diferenciálního rozpočtu leukocytů. Počet eozinofilů v krvi kolísá v závislosti na věku pacienta, denní době, námaze a na vlivu okolního prostředí. Horní hranice normálního absolutního počtu se pohybuje kolem  $0,7 \times 10^9/l$ , relativní počet do 5 % leukocytů v periferní krvi.

#### 4.4.3 Stanovení koncentrace celkových imunoglobulinů ve třídě IgE

Koncentrace celkových imunoglobulinů je za fyziologických okolností velmi nízká a z tohoto důvodu se stanovuje v **mezinárodních jednotkách (IU/ml; kU/l)**. Za zvýšené jsou považovány hodnoty **od 100 IU/ml** (v některých laboratořích až od 200 IU/ml), avšak **i zdravý člověk** může mít **zvýšenou koncentraci celkových IgE imunoglobulinů**. Z hlediska diagnostiky alergie není samotné zvýšení koncentrace celkového IgE v séru příliš podstatné, na druhou stranu normální celková hladina IgE nevylučuje přítomnost alergického onemocnění. Pro interpretaci výsledků je důležité zdůraznit, že měříme koncentraci volných IgE protilátek nacházejících se v séru, IgE protilátky navázané a buněčných povrchích toto vyšetření nezahrnuje. Stanovení sérové koncentrace IgE imunoglobulinů je prováděno celou řadou metodik, nejčastěji však pomocí nefelometrie a enzymové imunoanalýzy (EIA). Ke stanovení diagnózy alergie však vyšetření celkového IgE **nestačí**. Zvýšené hladiny celkového IgE v séru můžeme rovněž nalézt u některých typů imunodeficiencí (např. Jobova syndromu Wiskottova-Aldrichova syndromu a dalších), u parazitárních onemocnění a někdy mívají zvýšenou hladinu celkového IgE také zdravé osoby.

#### 4.4.4 Stanovení koncentrace specifických IgE protilátek

Stanovení koncentrace IgE protilátek namířených proti konkrétním alergenům (tedy tzv. **specifických IgE protilátek**) patří v současné době k nejrozšířenějším vyšetřením v rutinní

laboratorní diagnostice alergií. V současnosti lze specifické IgE protilátky stanovit proti směsím alergenů (např. proti pylům trav, stromů nebo bylin), proti jednotlivým alergenům nebo proti přesně definovaným složkám jednotlivých alergenů (tzv. rekombinantním alergenům v rámci komponentové diagnostiky neboli molekulární diagnostiky alergií). **Komponentová diagnostika** doplňuje klasické stanovení specifických IgE protilátek proti nativním alergenům a dostává se do popředí v situacích, kdy existuje rozpor mezi anamnézou, výskytem příznaků a výsledky testů u polysenzibilizovaného pacienta. Při testování se nejdříve zjišťují primární alergeny a dále zkříženě reagující komponenty. Diagnostika alergií pomocí rekombinantních alergenů umožňuje zpřesnit a specifičtěji indikovat alergenovou imunoterapii u konkrétního pacienta. Další výhodou komponentové diagnostiky je možnost přesnějšího stanovení rizika frekvence a závažnosti alergické reakce u potravinových alergií.

Stanovení koncentrace specifických IgE protilátek namířených proti sledovaným alergenům (která je velmi nízká) vyžaduje velmi senzitivní testy. Původně se ke stanovení koncentrace specifických IgE protilátek používal tzv. **RAST test** (Radio Allergo Sorbent Test), nicméně byl většinou nahrazen metodou **ELISA**.

RAST je historicky první laboratorní metoda ke stanovení specifického IgE. Jeho principem je sendvičová radioimunoesej. Vyšetřovaný alergen je navázán na pevnou fázi. Následně dochází k inkubaci se sérem pacienta, při které se na alergen naváží specifické IgE protilátky pro daný alergen obsažené v séru pacienta. Zbylé nenavázané proteiny se odstraní promytím. V posledním kroku se přidá anti-IgE protilátka označená radioaktivním izotopem jódu  $^{125}\text{I}$ . Platí, že intenzita radioaktivního záření po promytí je přímo úměrná množství specifického IgE.

**ELISA** je nejspíše dostupnou metodou pro stanovení koncentrace specifického IgE. Na pevnou fázi naváže výrobce alergen. V laboratoři se do mikrotitrační destičky přidává už jen sérum vyšetřované osoby s předpokládaným obsahem specifických IgE protilátek. Po inkubaci a promytí se přidá konjugát s navázaným enzymem, v dalším kroku po inkubaci a promytí pak substrát, který je štěpen enzymem z konjugátu a vzniklá barevná reakce se měří fotometricky.

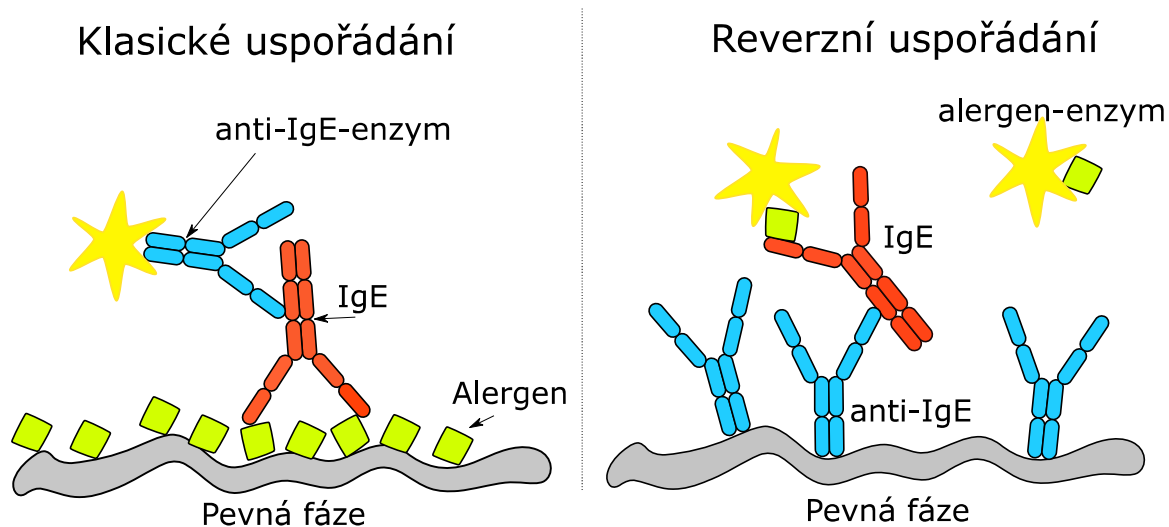
Moderní techniky stanovení specifického IgE dělíme podle způsobu vazby alergenu v pevné či kapalně fázi. V současné době existuje několik základních systémů na detekci specifického IgE: ImmunoCAP, Immulite a AlaSTAT.

**ImmunoCAP** využívá fluorimetrické detekce enzymatické reakce v tzv. „kepech“ (kalíšcích). Na vnitřním povrchu jednotlivých kalíšků je celulóza a na ni je navázaný specifický alergen. Do kalíšků se přidá sérum pacienta a během inkubace se pacientovy IgE protilátky naváží na alergen. Následně jsou promyty ostatní nenavázané složky séra a přidá se konjugát, což je anti-IgE protilátka značená enzymem  $\beta$ -D-galaktosidázou. Po inkubaci a promytí je přidáno vyvíjecí činidlo obsahujícího substrát 4-methylumbelliferon- $\beta$ -D-galaktosid, z něhož  $\beta$ -D-galaktosidáza odštěpí  $\beta$ -D-galaktosid za vzniku 4-methylumbelliferonu, který po excitaci světelným paprskem (Hg-výbojka) emituje fluorescenční záření o delší vlnové délce (Stokesův posun). Na závěr se přidá stop činidlo (uhlíčan sodný), které celou reakci zastaví. Výsledné koncentrace specifických IgE protilátek jsou rozděleny do šesti tříd, kdy nultá třída s koncentrací **do 0,35 IU/ml** je považována za **negativní**.

U klasicky postavených metod může při monitorování léčby pacienta na alergické terapii docházet ke **zkreslení výsledků vlivem specifických IgG protilátek**, které při této terapii vznikají. IgG protilátky se mohou na volný alergen vázat s větší afinitou a blokovat tak vazbu specifického IgE. Detekční systém klasických metod, který je založen na vazbě anti-IgE protilátek, pak naměří nižší hladinu specifického IgE než ve skutečnosti je. Z tohoto důvodu byl vyvinut tzv. reverzní systém, při kterém jsou na pevnou fázi navázány anti-IgE protilátky a při aplikaci vzorku se všechny IgE protilátky v séru naváží. Jako detekční systém se pak přidává hledaný alergen, který je značen enzymem.

**Analyzátor Immulite 2000** je založen na principu enzymově zesílené chemiluminiscence. Pevnou fázi představuje v reakci jediná kulička. Do připravených zkumavek analyzátor přidá polystyrénovou kuličku obalenou biotinem a napipetuje také alergen s navázaným streptavidinem. Vytvoří se vazba streptavidin-biotin, čímž je alergen na kuličce imobilizován. Poté se přidává vyšetřované sérum pacienta. Pokud jsou v séru přítomny specifické IgE protilátky proti sledovanému alergenu, dojde v průběhu inkubace k jejich navázání na alergen. Po promytí je analyzátořem do zkumavky přidán konjugát (anti-IgE protilátka značená alkalickou fosfatázou) a následuje další inkubace a promytí, kterým dojde k odstranění přebytečného konjugátu. Na závěr je přidán substrát (dioxetan-adamantyl-fosfát), který obsahuje vysoce energicky bohatou vazbu mezi dvěma kyslíky a pyrimidinové jádro s fosfátovou skupinou  $PO_3$ . Alkalická fosfatáza z konjugátu odštěpí  $PO_3$  a molekula se rozloží za současné emise fotonů. Intenzita vzniklého záření je úměrná množství specifických IgE protilátek přítomných v séru pacienta. Jednotlivé reakce se rozdělují do šesti tříd podle citlivosti.

**AlaSTAT** používá alergeny označené biotinem. Vazba na přítomné specifické IgE protilátky obsažené v séru probíhá v tekutém prostředí ve zkušavce nebo jamce mikrotitrační desky, jejichž stěny a dno jsou potaženy biotinem. Poté se do reakční směsi přidá avidin, který připojí biotinylovaný alergen s navázaným specifickým IgE na biotin na dně a stěnách jamky nebo zkušavky. Jako detekční protilátka se pak přidává protilátka proti lidskému IgE konjugovaná s enzymem (křenuvou peroxidázou) a přidá se substrát. Výsledkem je enzymatická přeměna bezbarvého substrátu na barevný produkt (kolorimetrická reakce).



Obrázek č. 19: Způsoby detekce specifických IgE protilátek.

#### 4.4.5 Multiplexové metody

Multiplexové metody jsou multialergenní testy stanovující několik analytů v jednom reakčním kroku. Testy využívají principu microarraye neboli biočipu, kdy jsou alergeny nebo alergenové extrakty navázány na malé plochy podložního sklíčka, či jiného podobného materiálu a na těchto malých plochách dochází k reakcím se specifickým IgE obsaženým v séru pacienta. Reakce je zviditelněna kolorimetricky či fluorescenčně a výsledek je odečten pomocí čtečky s vysokou rozlišovací schopností a pak vyhodnocen pomocí počítače, přičemž je přesně dána poloha jednotlivých alergenů.

#### Immunocap ISAC

Technologie založená na bázi biočipu umožňuje v jednom testu vyhodnotit specifické IgE protilátky namířené proti 112 různým alergenovým složkám z více než 50 původních

alergenových zdrojů. Jedná se o semikvantitativní diagnostický test probíhající ve dvou krocích. V prvním kroku jsou rekombinantní a purifikované nativní alergeny navázány na pevný nosič. Následně je přidáno sérum pacienta. Po inkubaci se IgE protilátky ze séra váží na imobilizované alergenové složky. Následuje promytí, poté je přidána fluorescenčně značená anti-IgE protilátka. Výsledná fluorescence se měří laserovým snímačem a je softwarově vyhodnocena. Intenzita fluorescence odpovídá množství specifických IgE protilátek ve vzorku. Hodnoty jsou vyjádřeny v arbitrárních jednotkách ISU-E (ISAC Standardised Units). Výsledky  $\geq 0,30$  ISU-E jsou považovány za pozitivní.

### **Testovací systém Allergy Explorer (ALEX)**

Vysoce specializované vyšetření založené na makročipové technologii a kolorimetrické enzymové analýze umožňuje vyšetřit simultánně v rámci jednoho stanovení specifické IgE protilátky proti více jak 100 rekombinantním alergenům a více jak 150 alergenním extraktům, které pochází z několika desítek alergenových zdrojů. ALEX pro imunoanalýzu využívá pevnou fázi. Extrakty alergenů nebo molekulární alergeny, které jsou navázány na nanočástice, jsou systematicky nanášeny na pevnou fázi tvořící macroarray. Nejprve alergeny navázané na částicích reagují se specifickým IgE, které se nachází ve vzorku pacienta. Po inkubaci dojde k vymytí nespecifického IgE. Postup pokračuje přidáním enzymem značené detekční protilátky proti lidskému IgE, která tvoří komplex se specifickým IgE navázaným na částici. Po druhém promývacím kroku je přidán substrát, který je enzymem vázající protilátku změněn na nerozpustný zabarvený precipitát. Nakonec je reakce mezi enzymem a substrátem zastavena blokujícím činidlem. Množství precipitátu je úměrné koncentraci specifického IgE ve vzorku pacienta. Hodnoty stanovení specifických IgE protilátek jsou vyjádřeny v jednotkách kUA/l (mezinárodní jednotka/l) a klasifikovány ve čtyřech semikvantitativních třídách. Výsledky  $\geq 0,30$  kUA/l jsou považovány za pozitivní. Analytický protokol ALEX obsahuje vysoce účinný inhibitor zkříženě reagujících uhlovodíkových determinantů (CCD) v průběhu inkubace séra, což zvyšuje specifitu výsledků testu.

#### **4.4.6 Stanovení ECP**

Eozinofilní kationický protein (ECP) je cytotoxický protein, který je secernován aktivovanými eozinofily. Přispívá k poškození bronchiální sliznice u astmatiků. Vyšetření hladiny ECP v séru (plazmě) pacienta slouží ke sledování dynamiky eozinofilního zánětu a k monitoraci protizánětlivé terapie u astmatiků. Normální sérové hladiny ECP jsou **do 24 ng/ml**. Stanovuje se metodikou FEIA (analyzátor Immulite 2000).

#### 4.4.7 Stanovení tryptázy

Tryptáza je mediátor uvolňovaný z žírných buněk po expozici alergenem a je považován za vhodný marker průkazu **anafylaktické reakce**. Stanovení hladiny tryptázy v séru (plazmě) má význam zejména při diferenciální diagnostice anafylaktických reakcí, např. polékových nebo po bodnutí hmyzem, dále při retrospektivním průkazu proběhlé anafylaktické reakce a při diagnostice mastocytózy. Výhody stanovení tryptázy oproti stanovení hladiny histaminu spočívají v tom, že tryptáza není na rozdíl od histaminu uvolňována z buněk periferní krve (bazofilů) – tím je vyloučeno „falešně pozitivní“ uvolnění *in vitro*, a má i delší poločas rozkladu *in vivo*, takže stanovení může být provedeno i několik hodin po prodělané alergické reakci. Stanovení hladiny tryptázy se může použít i k posouzení anafylaxe jako možné příčiny smrti, zde je nutný odběr do 48 hodin od smrti. Při stanovení pro diagnostiku anafylaktické reakce se provádí 1. odběr v intervalu 15 min až 3 hodin po počátku příznaků anafylaxe, 2. odběr za 24 hodin nebo později po odeznění příznaků. Pro uchování vzorku je nejlépe oddělit sérum/plazmu do 2 – 3 hodin od odběru, uchovat v teplotě 2 - 8 °C do jednoho týdne, nebo uchovávat déle při -20 až -70 °C. V případě potřeby pro transport možno vzorky (sražená krev nebo krev s EDTA či heparinem) uchovávat chlazené při 2 - 8 °C nebo při pokojové teplotě max. do 2 dnů a poté sérum/plazmu oddělit centrifugací.

Tryptázu stanovujeme enzymatickou imunoanalýzou s fluorescenční detekcí na analyzátoru ImmunoCAP. Normální hladina tryptázy v séru je **do 13,5 µg/l**.

#### 4.4.8 Test aktivace bazofilů

Test aktivace bazofilů je funkční test sloužící k diagnostice IgE zprostředkované alergické reakce. Principem je detekce znaků aktivace bazofilů (**CD203c a CD63**) průtokovým cytometrem. Bazofilní granulocyty plně heparinizované krve jsou nejprve stimulovány alergenem, následně je detekována exprese aktivačních znaků na jejich povrchu pomocí průtokové cytometrie. Aby došlo k aktivaci bazofilů, musí mít tato buňka na svém povrchu navázány přes Fcε receptory specifické IgE protilátky proti sledovanému alergenu. Po přidavku alergenu dojde k zesíťování Fcε receptorů pomocí těchto navázaných protilátek a aktivaci bazofilů. Hodnotí se procento aktivovaných bazofilů z celkového počtu bazofilů, a to pomocí změn exprese povrchových znaků CD63 a CD203c. Procento CD63<sup>+</sup> a CD203c<sup>+</sup> bazofilů se porovnává s negativní kontrolou (tj. vzorek periferní krve pacienta bez stimulace) a pozitivní kontrolou (jako stimulans se používá chemotaktický peptid fMLP). Zvýšení exprese **CD63**

koreluje s **degranulací** a uvolněním histaminu. Molekula CD203c je v nízkých hladinách exprimována na klidových bazofilech a její exprese se rychle zvyšuje po aktivaci bazofilů. Zvýšení exprese CD203c je přechodné a rychlejší než zvýšení exprese CD63. Proto testy, které používají jako aktivační marker molekulu CD203c, vyžadují pečlivé načasování detekce zvýšení exprese CD203c. K detekci bazofilů lze rovněž použít anti-IgE protilátku, která se váže na IgE protilátky přítomné na senzibilizovaných bazofilech. Senzitivita testu se pohybuje v rozmezí 50–90 %, specificita je 70–100 %. Přibližně 10 % pacientů jsou tzv. non-responderi, takže u nich test nelze interpretovat. Test aktivace bazofilů nachází uplatnění zejména v diagnostice **hmyzích a potravinových alergií**. Zkouší se v diagnostice **lékových alergií**. V současnosti je test aktivace bazofilů považován za pomocnou laboratorní metodiku.

#### 4.4.9 Test proliferace lymfocytů pro pozdní alergickou reakci na léky

Pacienti, u kterých proběhla závažná reakce na určitý **lék** (penicilin, sulfonamidová antibiotika, opiáty a nesteroidní analgetika), mohou být ve speciálních laboratořích *in vitro* otestováni na reakci pozdní přecitlivělosti. Při tomto testu se k heparinizované plné krvi pacienta přidá testovaný lék nejlépe v injekční formě, aby nebyly přítomny žádné vedlejší složky (např. obal tablety). Ke krvi se přidá médium a takto připravený vzorek se nechá inkubovat 7 dní při 37 °C v atmosféře CO<sub>2</sub>. Poté se změří proliferací aktivita lymfocytů. Pokud je po přidavku léků blastická transformace zvýšena, považuje se testovaný lék za spouštěč **pozdní alergické reakce**. Spolu s testováním proliferací reakce na sledovaný lék je třeba také nasadit pozitivní kontrolu proliferací schopnosti lymfocytů pacienta (např. můžeme použít PHA nebo ConA) a nestimulovanou kontrolu, pro případ výskytu nespecifické lymfoproliferace u vyšetřovaného pacienta. Současně s pacientem, je také zapotřebí provést stejné vyšetření u kontrolní nealergické osoby pro posouzení funkčnosti testu. Proliferaci můžeme sledovat za použití některých z metod, které jsou popsány v kapitole 3.2.2. Proliferace neboli blastická transformace. Pro testování opožděné alergické reakce pomocí proliferací testů je třeba brát na zřetel několik omezení:

1. Senzitivita testu se liší v jednotlivých studiích v závislosti na lécích a typu klinické reakce.
2. Nejsou testovány případné metabolity léku – některé účinné látky jsou oxidovány v játrech enzymatickým systémem cytochromu P450 a právě tyto metabolity mohou být příčinou klinických obtíží pacienta.

3. Některé léky samy o sobě působí jako stimulantia či inhibitory proliferace lymfocytů: prostaglandin E2 má supresivní efekt na produkci IL-2, který je nezbytný pro aktivaci a proliferaci T-lymfocytů.

4. Možnost přítomnosti falešně pozitivních výsledků, tj. pozitivní výsledek proliferačního testu bez klinických příznaků u pacienta, proto je zapotřebí dávat vždy výsledek do souvislosti s klinickým nálezem.



4.5 Příloha č. 1. Přehled některých monoklonálních protilátek a fúzních proteinů používaných v klinické praxi

Monoklonální protilátky	Cílová molekula	Mechanismus účinku léčiva		Použití v klinické praxi
<b>Adalimumab</b>	TNF- $\alpha$	<i>Inhibuje biologické aktivity TNF (vazbou na TNF inhibuje jeho vazbu na buněčné povrchové receptory p55 a p75), moduluje biologickou odpověď, která je indukována nebo regulována TNF, včetně změn hladin adhezních molekul odpovědných za migraci leukocytů</i>	rekombinantní humánní IgG1 mAb namířená proti TNF- $\alpha$	RA, JIA, axiální spondylartritida, PSA, psoriáza, hidradenitis suppurativa, CD, UC, uveitida
<b>Certolizumab pegol</b>			rekombinantní humanizovaný Fab fragment mAb namířený proti TNF- $\alpha$ a konjugovaný s polyethylenglykolem	RA, axiální spondylartritida, ankylozující spondylitida, PSA
<b>Golimumab</b>			plně humánní IgG1-kappa mAb namířená proti TNF- $\alpha$	RA, JIA, PSA, axiální spondylartritida, UC
<b>Infliximab</b>			chimérická IgG1 mAb namířená proti TNF- $\alpha$	RA, PSA, psoriáza, ankylozující spondylitida, CD, UC
<b>Etanercept</b>			fúzní protein (vazebná doména lidského receptoru 2 TNF (TNFR2/p75) a Fc oblast lidského IgG1)	RA, JIA, PSA, axiální spondylartritidy, ložisková psoriáza

<b>Ustekinumab</b>	p40 podjednotka IL-12 a IL-23	<i>Vazba na protein p40 (podjednotka IL-12 a IL-23) blokuje vznik vazby IL-12 a IL-23 na jejich receptorový protein IL-12Rβ1, což pravděpodobně vede k přerušení signalizace a cytokinové kaskády, které se účastní patologie psoriázy, PSA a CD</i>	plně humánní IgG1-kappa mAb namířená proti IL-12 a IL-23	PSA, plaková psoriáza, CD
<b>Abatacept</b>	CTLA-4	<i>selektivní blokátor CD28-zprostředkované kostimulace, čímž zabraňuje aktivaci T-lymfocytů mechanismem kostimulační modulace</i>	fúzní protein (extracelulární část lidského CTLA-4 a fragment Fc domény lidského IgG1)	RA, polyartikulární juvenilní revmatoidní artritida
<b>Belatacept</b>				profylaxe rejekce štěpu u příjemců transplantované ledviny
<b>Canakinumab</b>	IL-1	<i>neutralizuje biologickou aktivitu IL-1 a tím zabraňuje tvorbě zánětlivých mediátorů</i>	humánní IgG1 mAb namířená proti IL-1β	autoinflamatorní syndromy, Stillova choroba, dnavá artritida
<b>Anakinra</b>				antagonista humánního receptoru pro IL-1
<b>Siltuximab</b>	IL-6	<i>neutralizace účinku pleiotropního prozánětlivého cytokinu IL-6 produkovaného různými typy buněk; nadprodukce IL-6 hraje důležitou roli při systémových projevech u pacientů s Castlemanovou nemocí</i>	chimérická IgG1-kappa mAb namířená proti IL-6	Castlemanova choroba
<b>Tocilizumab</b>	IL-6R	<i>inhibice vazby IL-6 na jeho receptor (IL-6 je prozánětlivý cytokin, který se podílí na patogenezi řady zánětlivých onemocnění)</i>	rekombinantní humanizovaná IgG1 mAb namířená proti receptoru pro IL-6	RA, systémová JIA, juvenilní idiopatická polyartritida

<b>Omalizumab</b>	IgE	<i>vazba na IgE znemožňuje tak ďalší vazbu IgE na receptory efektorových buněk a spuštění kaskády alergické reakce</i>	humanizovaná IgG1 mAb protilátka namířená proti IgE	alergické astma bronchiale, chronická spontánní urtikárie
<b>Reslizumab</b>	IL-5	<i>inhibice biologické aktivity IL-5 (diferenciace, zrání, migrace a aktivace eozinofilů) blokováním jeho vazby na receptor na povrchu eozinofilů, což vede ke zkrácenému přežívání a snížení aktivity eozinofilů</i>	humanizovaná IgG4-kappa mAb namířená proti IL-5	astma bronchiale
<b>Mepolizumab</b>				
<b>Natalizumab</b>	$\alpha 4\beta 1$ -integrin	<i>vazbou na <math>\alpha 4\beta 1</math>-integrin, který je exprimován na povrchu všech leukocytů s výjimkou neutrofilů, blokuje interakci s jeho analogickým receptorem (VCAM-1)</i>	rekombinantní humanizovaná mAb namířená proti $\alpha 4\beta 1$ -integrinu*	SM
<b>Vedolizumab</b>	$\alpha 4\beta 7$ -integrin	<i>působí jako imunosupresivum se selektivním účinkem na zažívací trakt</i>	humanizovaná IgG1 mAb proti $\alpha 4\beta 7$ -integrinu	CD, UC
<b>Ixekizumab</b>	IL-17A	<i>neutralizace IL-17A snižuje proliferaci a aktivaci keratinocytů</i>	rekombinantní humanizovaná IgG4 mAb namířená proti IL-17A	psoriáza
<b>Alemtuzumab</b>	CD52	<i>lýza buněk s povrchovým znakem CD52 (přítomný především na T a B-lymfocytech, v nižších hladinách na NK buňkách, monocytech a makrofázích)</i>	humanizovaná IgG1-kappa mAb namířená proti antigenu CD52	SM
<b>Basiliximab</b>	CD25	<i>blokáda vazby IL-2 na CD25 (receptor pro IL-2) na povrchu T-lymfocytů po jejich aktivaci antigenním podnětem, což vede k zabránění následné proliferaci T-buněk</i>	chimerická IgG1 mAb proti $\alpha$ -řetězci receptoru pro IL-2	SM
<b>Daclizumab</b>			humanizovaná mAb IgG1 namířená proti CD25	SM
<b>Rituximab</b>	CD20	<i>po vazbě na antigen CD20 se indukuje imunitní reakce, která působí cytolyzu B-lymfocytů</i>	rekombinantní chimerická IgG1 mAb namířená proti antigenu CD20	RA, B-buněčné nádory

<b>Ofatumumab</b>	CD20	<i>vyvolává ADCC přibližně stejné intenzity jako Rituximab a výrazně intenzivnější CDC</i>	čistě humánní IgG1 mAb namířená proti antigenu CD20	CLL
<b>Ibritumomab tiuxetan</b>		<i>po označení radioaktivním [90Y] se ibritumomab-tiuxetan váže specificky na B-buňky (včetně maligních buněk s expresí CD20)</i>	rekombinantní myši IgG1-kappa mAb proti antigenu CD20	CD20 pozitivní folikulární B NHL
<b>Obinutuzumab</b>		<i>váže se specificky na extracelulární smyčku antigenu CD20 na povrchu nemaligních i maligních pre-B a zralých B-lymfocytů (Fc fragment syntetizovaný inženýrstvím glykoproteinů vede k významnému zvýšení ADCC)</i>	rekombinantní humanizovaná IgG1 mAb namířená proti antigenu CD20 druhé generace	CLL, folikulární lymfom
<b>Daratumumab</b>	CD38	<i>CD38 exprimovaný ve velkém množství na povrchu nádorových buněk mnohočetného myelomu a v různém množství i na dalších typech buněk a tkání</i>	lidská IgG1-kappa mAb namířená proti antigenu CD38	MM
<b>Blinatumomab</b>	CD3/CD19	<i>působí současně na 2 proteiny (CD19 na povrchu B-buněk a CD3 na povrchu T-buněk), zprostředkovává tvorbu cytolytické synapse mezi T a B-buňkami, tak aktivuje T-buňky k uvolnění proteolytických enzymů proti B-buňkám</i>	bispecifický protilátkový fragment	ALL
<b>Nivolumab</b>	CD279/PD-1	<i>zesiluje odpověď T-buněk (včetně protinádorové odpovědi) blokádou vazby receptoru PD-1 (negativní regulátor aktivity T-buněk) na ligandy PD-L1 a PD-L2</i>	humánní IgG4 mAb namířená proti receptoru PD-1	melanom, metastazující nemalobuněčný karcinom plic, refrakterním klasickým HL, renální karcinom
<b>Pembrolizumab</b>			humanizovaná IgG4 mAb namířená proti receptoru PD-1	melanom, metastazující nemalobuněčný karcinom plic, refrakterním klasickým HL

<b>Belimumab</b>	BAFF	<i>inhibuje přežití B-lymfocytů, včetně autoreaktivních B-lymfocytů a snižuje diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky produkující imunoglobuliny</i>	humánní IgG1-lambda mAb namířená proti proteinu BLyS	SLE
<b>Ipilimumab</b>	CTLA4/ CD152	<i>specifická blokáda inhibičního signálu CTLA-4 (negativní regulátor aktivity T-lymfocytů) vyvolává aktivaci T-buněk, proliferaci a lymfocytární infiltraci nádorů, což vede k usmrcení nádorových buněk</i>	rekombinantní plně humánní mAb namířená proti CTLA-4	melanom
<b>Dinutuximab</b>	glykolipid GD2	<i>mění buňky neuroblastomu, ty se tak stávají cílem imunitního systému</i>	chimérická IgG1 mAb namířená proti karbohydrátové doméně GD2	neuroblastom
<b>Trastuzumab</b>	HER2	<i>inhibice důležitých nitrobuněčných na ligandech závislých signálních drah, což může vést k inhibici proliferace nádorových buněk a k apoptóze, navíc také aktivace mechanismu ADCC</i>	humanizovaná IgG1-kappa mAb namířená proti HER2	karcinom prsu, adenokarcinom žaludku
<b>Pertuzumab</b>	HER2		humanizovaná IgG1 mAb namířená proti HER2	karcinom prsu
<b>Cetuximab</b>	EGFR	<i>blokáda dráhy přes EGFR vede k inhibici proliferace, angiogeneze a dediferenciace, stimulaci apoptózy a prevenci tvorby metastáz</i>	chimérická IgG1 mAb namířená proti EGFR	kolorektální karcinom, spinocelulární karcinom hlavy a krku
<b>Panitumumab</b>	EGFR	<i>vazba na EGFR vede k internalizaci receptoru, inhibici buněčného růstu, indukci apoptózy a snížené produkci IL-8 a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru</i>	rekombinantní plně humánní IgG2 mAb namířená proti EGFR	kolorektální karcinom

<b>Bevacizumab</b>	VEGF	<i>inhibice vazbu VEGF na jeho receptory na povrchu endoteliálních buněk vede k neutralizaci biologické aktivity VEGF, což snižuje vaskularizaci nádoru a inhibuje tak jeho růst</i>	rekombinantní humanizovaná IgG1 mAb namířená proti VEGF	karcinom tlustého střeva, rekta, prsu, plic, ledvin, děložního čípku, nádory vaječníků, vejcovodů nebo primární nádor pobříšnice
<b>Ramucirumab</b>	VEGF	<i>inhibice ligandy stimulovanou aktivací VEGF receptoru 2 a neutralizuje ligandy indukovanou proliferaci a migraci lidských endoteliálních buněk</i>	lidská IgG1 mAb namířená proti VEGF receptoru 2	karcinom žaludku, adenokarcinom gastroesofageální junktce, kolorektální karcinom, nemalobuněčným karcinom plic
<b>Aflibercept</b>	VEGF	<i>působí jako solubilní falešný receptor, který váže VEGF-A a PlGF s vyšší afinitou než jejich přirozené receptory a blokuje tak angiogenní účinek VEGF</i>	rekombinantní fúzní protein (extracelulární domény humánního VEGF receptoru 1 a 2 fúzovaných na Fc fragment humánního IgG1)	makulární degenerace, makulární edém v důsledku okluze retinální žíly, poruchy zraku při diabetickém makulárním edému, myopická chorioideální neovaskularizace
<b>Ranimizumab</b>	VEGF	<i>silně se váže na především na VEGF-A a tím brání jeho navázání na receptory VEGFR-1 a VEGFR-2 (to by vedlo k proliferaci endoteliálních buněk a neovaskularizaci, a také ke zvýšené propustnosti cév)</i>	fragment humanizované mAb namířené proti VEGF	

<b>Denosumab</b>	RANKL	<i>napomáhá rovnováze mezi kostní resorpcí a novotvorbou (vazba na RANKL inhibuje vznik vazby RANK/RANKL, čímž zabraňuje diferenciaci nových a aktivaci zralých osteoklastů a následnému zvýšení osteoklastické kostní resorpce), zvyšuje denzitu kostního minerálu i mechanickou odolnost kosti</i>	plně humánní IgG2 mAb namířená proti ligandu RANKL	osteoporóza
<b>Evolocumab</b>	PCSK9	<i>selektivní vazbou na enzym PCSK9 zabraňuje cirkulujícím PCSK9 vázat se na LDLR na povrchu jaterní buňky a tím zabraňuje degradaci LDLR zprostředkované PCSK9; zvýšení počtu LDLR v játrech má za následek snížení hladin LDL-cholesterolu v séru</i>	lidská IgG2 mAb namířená proti enzymu PCSK9	primární hypercholesterolemie nebo smíšená dyslipidémie
<b>Elotuzumab</b>	SLAMF7/C D319	<i>přímo aktivuje NK buňky jak cestou SLAMF7 (protein silně exprimován na buňkách MM nezávisle na cytogenetických abnormalitách), tak přes Fc receptory, a tím zvyšuje anti-myelomovou aktivitu</i>	humanizovaná IgG1 mAb namířená proti proteinu SLAMF7	MM
<b>Idarucizumab</b>	dabigatran	<i>silně a specificky váže na dabigatran a jeho metabolity a neutralizuje jejich antikoagulační účinek</i>	Fab fragment humanizované mAb namířené proti dabigatranu	reverze účinku dabigatranu u dospělých pacientů
<b>Abciximab</b>	CD41	<i>inhibuje agregaci destiček, prokoagulačních vlastností destiček a proliferativních vlastností buněk endotelu a hladké svaloviny cévních stěn; účinně blokuje spuštění generační kaskády trombinu</i>	Fab fragment chimerické IgG1 mAb namířené proti glykoproteinovému IIb/IIIa receptoru na povrchu trombocytů	prevence ischemických kardiálních komplikací u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenční zákrok, nestabilní angina pectoris

<b>Brentuximab vedotin</b>	CD30	<i>kombinace protilátky proti molekule CD30 (člen TNF receptorové rodiny) a antimikrotubulové látky vedotinu (monomethylauristatin E)</i>	konjugát protilátky a léku (chimerická IgG1 mAb namířená proti CD30 a vedotin)	HL, anaplastický velkobuněčný lymfom
<b>Eculizumab</b>	C5	<i>specificky váže na lidský protein komplementu C5 a inhibuje aktivaci terminálního komplementu</i>	humanizovaná IgG2/4-kappa mAb namířená proti C5 složce komplementu	paroxysmální noční hemoglobinuria, atypický HUS
<b>Olaratumab</b>	PDGF	<i>inhibuje vazbu mezi PDGF a jeho receptorem, který je exprimován na nádorových a stromálních buňkách, což vede k inhibici růstu nádoru</i>	plně humánní IgG1 mAb namířená proti receptoru PDGFR- $\alpha$	sarkom měkkých tkání

**Vysvětlivky:** VEGF-A (vaskulární endoteliální růstový faktor), PlGF (placentární růstový faktor), RANKL (receptor activator of nuclear factor NF-kappaB-ligand), PCSK9 (proprotein konvertáza subtilisin/kexin typu 9), PDGFR-alfa (alfa růstového faktoru odvozeného z trombocytů), TNF- $\alpha$  (tumor nekrotizující faktor  $\alpha$ ), mAb (monoklonální protilátka), RA (revmatoidní artritida), CD (Crohnova choroba), UC (ulcerózní kolitida), PSA (psoriatická artritida), JIA (juvenilní idiopatická artritida), CTLA-4 (cytotoxický antigen asociovaný s T lymfocyty), IL (interleukin), VCAM-1 (vaskulární buněčná adhezni molekula), SM (sclerosis multiplex), ADCC (cytotoxicita závislá na buňkách), CDC (cytotoxicita závislá na komplementu), HL (Hodgkinův lymfom), NHL (non-Hodgkinův lymfom), CLL (chronická lymfatická leukémie), ALL (akutní lymfatická leukémie), MM (mnohočetný myelom), Blys (solubilní aktivační protein B-lymfocytů), GD2 (disialogangliosid 2), SLE (systémový lupus erythematoses), EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru), VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), RANKL (receptor activator of nuclear factor NF-kappaB-ligand), LDL (lipoprotein o nízké hustotě), LDLR (receptor pro lipoprotein o nízké hustotě), PCSK9 (proprotein konvertáza subtilisin/kexin typu 9), HUS (hemolyticko-uremický syndrom), PDGF (růstový faktor z destiček), PDGFR- $\alpha$  (receptor  $\alpha$  pro růstový faktor z destiček), SLAMF7 (signaling lymphocyte activation molecule family member 7)

\* monoklonální protilátka proti adhezni molekule, která redukuje přestup buněk přes hematoencefalickou bariéru do CNS