



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Fagocytární aktivita neutrofilů v pupečnickové a periferní krvi

Phagocytic activity of neutrophils of cord and peripheral blood

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Markéta Babičková

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Kladno 2020/2021



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Babičková** Jméno: **Markéta** Osobní číslo: **474163**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Fagocytární aktivita neutrofilů pupečnickové a periferní krve

Název bakalářské práce anglicky:

Phagocytic activity of neutrophils of cord and peripheral blood

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude porovnání proporčního zastoupení a funkčních vlastností jednotlivých subpopulací neutrofilů v pupečnickové a periferní krve. V teoretické části budou shrnuty aktuální poznatky o neutrofilech jako o značně heterogenní populaci buněk, jak popisují recentní publikace. Budeme se věnovat zejména funkčním vlastnostem neutrofilů se speciálním zaměřením na netózu a fagocytózu. V praktické části bude porovnána fagocytární aktivita neutrofilů v periferní krvi rodiček a pupečnickové krvi novorozenců. Imunitní systém novorozenců je obecně nezralý, a proto bude zajímavé zjištění, jak (a zda) neutrofile pupečnickové krve budou odpovídat na stimulaci bakteriálními antigeny. Fagocytární aktivita neutrofilů pupečnickové krve a periferní krve rodiček bude porovnána s fagocytární aktivitou neutrofilů v periferní krvi zdravých netěhotných žen. Fagocytární aktivita bude testována pomocí průtokové cytometrie.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Gordon S., Phagocytosis: An Immunobiologic Process, Immunity, ročník 463-475, číslo 44(3), 2016, ISSN 10747613
- [2] Eslaba I., Angeles D. M., Milford T. M., Salto L. M., Payne K. J., Kidder M. Y. a Boskovic D. S., Platelet-Neutrophil Interactions Are Lower in Cord Blood of Premature Newborns, Neonatology, ročník 149-155, číslo 115(2), 2019, ISSN 1661-7800
- [3] Yang P., Li Y., Xie Y., Liu Y., Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function, Journal of Immunology Research, 2019, ISSN 2314-8861

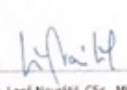
Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Jiří Hrdý, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**


prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucího katedry


prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis doktoranta

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Fagocytární aktivita neutrofilů v pupečníkové a periferní krvi vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 13.05.2021

.....
Markéta Babičková

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou chci poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Jiřímu Hrdému, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a ochotu pomoci mi při zpracování mé bakalářské práce. Dále chci poděkovat pracovníkům laboratoře Obecné imunologie z Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, kde jsem mohla vykonávat praktickou část své práce. Samostatně chci ještě poděkovat mé kolegyni Bc. Elišce Mikové, která mi ochotně pomáhala a věnovala mi svůj čas. Dále děkuji své rodině, která mě během tohoto všeho velmi podporovala.

ABSTRAKT

Předmětem této bakalářské práce je shrnutí informací o neutrofilech jako o heterogenní buněčné populaci s mnoha funkcemi se zaměřením na popis nově popsanych subpopulací. Hlavní cílem je porovnání fagocytární aktivity neutrofilů v pupečnickové krvi novorozence a v periferní krvi matky a zdravých netěhotných dáreků.

Teoretická část shrnuje aktuální poznatky o neutrofilech, jejich jednotlivých subpopulacích včetně jejich funkčních vlastností v imunitní obraně lidského organismu. Diskutován je i stručný popis rozdílu mezi neutrofilů v pupečnickové krvi novorozenců a periferní krvi dospělých jedinců. Dále se zde popisuje princip fagocytózy, která je nedílnou součástí antimikrobiální aktivity neutrofilů. Rozebírám samotný mechanismus fagocytózy a roli receptorů, které fagocyty používají na rozpoznávání infekčního agens. Jako poslední kapitolu uvádím NETózu, která je poměrně nově objevenou funkcí pozorovanou u neutrofilů. Opět popisují mechanismus a dva typy NETózy – vitální a suicidální.

V praktické části popisují odebraný materiál, reagentie, přístroje a metody, které byly použity na měření fagocytární aktivity neutrofilů.

Bylo zjištěno, že protisrážlivé činidlo K₂EDTA inhibuje vápníkovou signalizaci neutrofilů. Neutrofilů v tomto protisrážlivém činidle vykazovaly podstatně nižší schopnost fagocytózy. Naopak protisrážlivé činidlo heparin zachovává metabolickou aktivitu neutrofilů a nemá vliv na jejich fagocytózu. Proto se hodnoty fagocytárního indexu pohybují v kladných hodnotách při použití heparinu.

Klíčová slova

Neutrofilly; fagocytóza; NETóza; pupečníková krev; periferní krev; průtoková cytometrie

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is a summary of knowledge about neutrophils as a heterogeneous population of cells with several functions with special focus on the description of recently described neutrophil subpopulations. The main aim is the comparison of phagocytic activity of neutrophils in umbilical cord blood of newborn and peripheral blood of the mothers and non-pregnant healthy women donors.

The theoretical part summarizes current knowledge of neutrophils, their particular subpopulations including their functional characteristics in the immune defense of the human body. It also focuses on a brief description of the difference between neutrophils in cord and peripheral blood. Furthermore, the principle of phagocytosis as an integral part of antimicrobial activity of neutrophils is described here. The mechanism of phagocytosis itself and the role of receptors that phagocytes use to recognize an infectious agent is introduced. I am presenting NETosis that has been discovered in neutrophils recently in the last chapter. The mechanism and two types of NETosis are described – vital and suicidal.

In the practical part the collected material, reagents, instruments and methods that were used to measure the phagocytic activity of neutrophils are described.

I was ascertained the anticoagulant agent K₂EDTA inhibits calcium signaling of neutrophils, therefore neutrophils collected in tubes with K₂EDTA exerted substantially lower phagocytic capacity. In contrast, the anticoagulant agent heparin preserves metabolic activity of neutrophils and has no effect on neutrophil phagocytosis. Therefore, values of phagocytic index are in the positive values when heparin was used.

Keywords

Neutrophils; phagocytosis; NETosis; cord blood; peripheral blood; flow cytometry

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíle práce.....	12
3	Přehled současného stavu.....	13
3.1	Neutrofilý.....	13
3.1.1	Vývoj neutrofilů	14
3.1.2	Diapedéza	18
3.1.3	Subpopulace neutrofilů.....	18
3.1.4	Neutrofilý v pupečníkové a periferní krvi.....	20
3.2	Fagocytóza	22
3.2.1	Mechanismus fagocytózy	23
3.2.2	Receptory	25
3.3	NETóza.....	26
3.3.1	Princip NETózy	27
3.3.2	Vitální a suicidální NETóza.....	27
4	Metodika.....	29
4.1	Materiál.....	29
4.2	Přístroje.....	29
4.2.1	Box s laminárním prouděním	29
4.2.2	Inkubátor.....	30
4.2.3	Vortex	30
4.2.4	Průtokový cytometr.....	30
4.3	Použité metody	32
4.3.1	Průtoková cytometrie.....	32

4.3.2	Měření fagocytární aktivity	33
5	Výsledky	35
5.1	Vyhodnocení dat z průtokového cytometru.....	35
6	Diskuze	43
7	Závěr	47
8	Seznam použitých zkratk.....	48
9	Seznam použité literatury	50
10	Seznam použitých obrázků	57
11	Seznam použitých tabulek.....	58

1 ÚVOD

Bakalářská práce předkládá informace o buněčné populaci neutrofilů, která tvoří podstatnou část imunitních buněk (leukocytů) a kterou v současné době vnímáme jako heterogenní populaci s mnoha funkcemi v lidském organismu. Rozebírám zde patrné rozdíly mezi neutrofilii v pupečnickové krvi a periferní krvi. Dále se v práci zaměřuji na specifické funkce neutrofilů, ke kterým patří fagocytóza a schopnost tvořit tzv. neutrofilní extracelulární pasti (z angl. názvu Neutrophil Extracellular Traps, NET) procesem nazvaným NETóza. Právě tyto dvě funkce patří mezi hlavní mechanismy hrající klíčovou roli při eliminaci mikroorganismů v lidském těle.

Fagocytóza je proces, kdy fagocyt především tedy neutrofil pomocí svých receptorů rozpoznává, pohlcuje a následně usmrcuje patogenní agens v lidském organismu. Podílí se tedy na imunitní odpovědi s cílem zajistit homeostázi organismu.

Další kapitola popisovaná v bakalářské práci se zaměřuje na roli NETózy neboli tvorby neutrofilních extracelulárních pastí v procesech imunitních odpovědí. Tvoří se hlavně při zánětlivých onemocněních, kdy buňka uvolňuje intracelulární složky (zejména deoxyribonukleovou kyselinu, DNA) za účelem zachycení a imobilizace infekčního agens. NET můžeme pozorovat při chronických zánětlivých onemocněních, autoimunitních onemocněních nebo i při trombóze.

Má hypotéza na začátku celého výzkumu byla, že novorozenecké neutrofilie budou mít nižší fagocytární aktivitu v porovnání s neutrofilii periferní krve dospělých jedinců. Proto jsem si také toto téma vybrala a bylo zajímavé zjišťovat, zda je má hypotéza správná.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo studium fagocytární aktivity neutrofilů v pupečnickové krvi novorozenců a v periferní krvi rodiček a zdravých netěhotných dobrovolnic.

Neutrofily patří mezi nejpočetnější buňky ze skupiny leukocytů, které jsou důležité v rámci imunitního systému v boji proti patogenním agens způsobujícím zánětlivou reakci v lidském organismu. Velmi důležitá je také jejich funkce při onemocněních, např. kardiovaskulárních, autoimunitních nebo nádorových. Mým cílem práce bylo se zaměřit hlavně na fagocytózu, což je jedna z funkcí, kterou neutrofilové používají k pohlcování mikroorganismů v lidském těle. Na závěr jsem popsala funkci NETózy neboli tvorby neutrofilních extracelulárních pastí, což je relativně nedávno objevená funkce neutrofilů, ale i jiných buněk v organismu při obraně proti mikroorganismům.

V laboratorní části mé bakalářské práce bylo za úkol porovnat fagocytární aktivitu neutrofilů v pupečnickové krvi a periferní krvi matek a zdravých netěhotných žen. Má hypotéza byla, že neutrofilové v periferní krvi žen budou mít vyšší fagocytární aktivitu než neutrofilové v pupečnickové krvi novorozence. Prováděla jsem měření fagocytární aktivity neutrofilů na průtokovém cytometru.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Neutrofilly

Neutrofilly, také známé jako neutrofilní granulocyty nebo polymorfonukleární neutrofilly (PMN), jsou nejhojnějším typem bílých krvinek. Společně s eozinofily a bazofily patří do skupiny polymorfonukleárních granulocytů. Do této skupiny patří proto, že mají segmentované jádro a typická granula v cytoplazmě [1].

Tyto buňky byly poprvé pozorovány Paulem Ehrlichem v roce 1880 a v roce 1883 Ilja Mečnikov viděl jako první tyto buňky fagocytovat cizí látky. Nazval je mikrofágy, protože byly menší než makrofágy. Později byly tyto buňky přejmenovány na neutrofilly. Mnoho let se tvrdilo, že neutrofilly jsou čistě homogenní populací zralých buněk a byly považovány za plně diferencované buňky. Ovšem v posledních dvou desetiletích nové studie prokázaly, že jsou neutrofilly fenotypově i funkčně heterogenní, vysoce univerzální a také hrají roli v různých patologických procesech [2,3,4].

Neutrofilly tvoří klíčovou složku vrozeného imunitního systému a poskytují informace buňkám adaptivního imunitního systému. Jsou tzv. druhou obranou před mikroorganismy po kůži, sliznicích a hlenu. Buňky vrozeného imunitního systému reprezentované např. neutrofilly, makrofágy a dendritickými buňkami, jsou schopné okamžité imunitní reakce, zatímco u buněk adaptivního imunitního systému se tvoří imunitní odpověď prostřednictvím přímého buněčného kontaktu T a B lymfocytů s buňkami prezentujícími antigeny. Neutrofilly patří mezi nepostradatelné buňky při obraně organismu proti bakteriím, houbám, plísním a prvokům. Mezi mechanismy, které neutrofilly používají k obraně proti infekcím, při zranění a chronických onemocněních, řadíme schopnost fagocytózy, tvorbu neutrofilních extracelulárních pastí a uvolňování obsahu

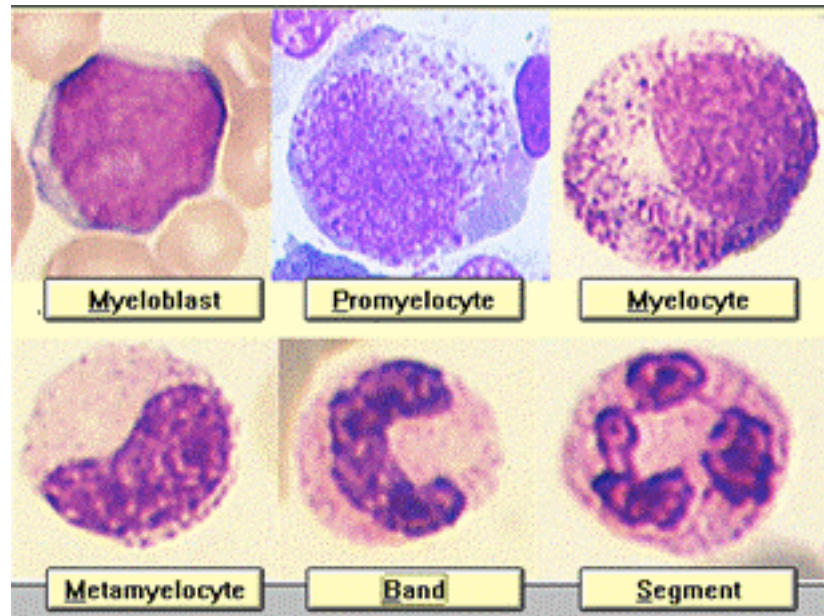
granulí. Ačkoliv jsou neutrofilů prospěšné pro hostitele např. při udržování homeostáze, nebo proteosyntéze, jejich deregulovaná aktivace může vést k poškození okolní tkáně v těle při autoimunitní nebo jiné neadekvátní imunitní reakci včetně dlouhodobého chronického zánětu. V místě infekce neutrofilů fagocytují mikroby, které jsou následně ničeny reaktivními radikály kyslíku (ROS) a antimikrobiálními peptidy a proteázami [1,4,5,6,7,9].

Bylo předpokládáno, že krátce žijící neutrofilů obvykle umírají v průběhu antimikrobiální odpovědi. Tato představa se změnila, protože neutrofilů jsou schopné se po vykonání své funkce vrátit zpět do kostní dřeně a ovlivňovat hematopoézu. Neutrofilů uvolňují cytokiny a přispívají k řízení imunitní/zánětlivé odpovědi. Neutrofilů jsou schopné uvolnit svůj jaderný obsah (včetně DNA) v komplexu s proteiny uvolněné z granulí do extracelulárního matrixu a tento komplex může inhibovat mikrobiální růst bez nutnosti fagocytózy. Při NETóze dojde ke snížení pohybu bakterie a další fagocytující buňky je snáze pohltní. DNA a odumřelé fagocytující buňky (neutrofilů a makrofágy) se často vyskytují v místě infekce ve formě hnisu [1].

3.1.1 Vývoj neutrofilů

Neutrofilů vznikají v kostní dřeni z kmenových buněk, kde se množí a terminálně diferencují a následně jsou uvolňovány do periferní krve, kde cirkulují několik hodin a v možném místě zánětu migrují do tkáně. V případě infekce/zánětu dochází k masivnímu uvolňování neutrofilů z kostní dřeně. Mezi další rezervoáry neutrofilů se řadí lymfatické orgány jako jsou slezina, játra a plíce. Je tomu tak proto, že do plic jde celý výdej krve ze srdce, a tím budou všechny neutrofilů vykazovat dočasnou plicní sekvestraci. Doba přežití neutrofilů v plicích je značně vyšší než v jiných tkáních [4,6,7,8].

Obecně jsou granulocyty klasifikovány na základě morfologie jejich jádra a barvitelnosti granulí. V kostní dřeni se neutrofilů vyvíjejí od myeloblastu přes promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt a tyčový neutrofil, což je časná forma neutrofilů až po zralý segmentovaný neutrofil. Zralá forma neutrofilů má jádro se třemi až pěti laloky a velké množství granul v cytoplazmě. Neutrofil má po dozrání velikost v průměru 7-10 μm . Jak vypadají jednotlivá stadia neutrofilů je vidět na Obrázku 1. Během zrání se vyvine několik intracelulárních kompartmentů (tři typy sekrečních granulí a vezikuly), které uchovávají potřebné prozánětlivé proteiny. Sekreční granula slouží jako rezervoár antimikrobiálních faktorů a enzymů. Primární azurofilní granula obsahují myeloperoxidázu (MPO) a speciální proteázu-azurocidin. Sekundární specifická granula obsahují laktoferin a terciární želatinázová granula obsahují matrixovou metaloproteinázu. Výše uvedené enzymy chrání hostitele před infekcemi a jejich přítomnost umožňuje rozlišení jednotlivých typů zánětu. Dále neutrofilů nesou mobilizované sekreční vezikuly. Ty transportují molekuly, které jsou nutné pro buněčnou adhezi na buněčný povrch, kde jsou zainkorporovány do cytoplasmatické membrány [8,10,11].



Obrázek 1 – Vývojová stádia neutrofilu [12]

Lymfatické orgány vyprodukují až $5 \cdot 10^{11}$ neutrofilů za den u dospělého zdravého člověka. Neutrofily tvoří 50 až 70 % všech cirkulujících leukocytů. Jsou to krátce žijící buňky a po určitém čase v oběhu odumírají. V oběhu cirkulují pouze 8-12 hodin a v tkáních mohou přežít až 5 dnů. Jejich tvorba je tak inhibována rychlostí jejich spontánní apoptózy případně NETózou v tkáních. To přispívá k tvorbě hnisu v infikovaných tkáních, kde je „odklízejí“ další velmi důležité fagocytární buňky makrofágy [1,6,7,9].

Pro produkci neutrofilů je nezbytný faktor stimulující kolonie granulocytů (z angl. Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF), který se ukázal jako velmi důležitým faktorem při samotném vývoji neutrofilů. Funkce G-CSF je nejvíce potřebná během infekcí, kdy musí být produkce neutrofilů zvýšena. Mezi další faktory stimulující vývoj neutrofilů patří interleukin-6 (IL-6) a interleukin-8 (IL-8). Retence neutrofilů v kostní dřeni závisí do značné míry na chemokinovém receptoru CXCR4. Chemokiny jsou malé signální molekuly,

kteřé vedou bílé krvinky na specifická místa v tkáni. Chemokinový receptor CXCR2, oproti chemokinovému receptoru CXCR4, podporuje uvolňování neutrofilů z kostní dřene. Tento receptor funguje díky svým ligandům CXCL1 a CXCL2, které spolu s CXCL10 vedou k rozvoji zánětu a následné eliminaci jeho zdroje tím, že přitahují neutrofilu do postiženého místa, kde probíhá vlastní zánět či infekce [5,7,10,11].

Po uvolnění do oběhu následují neutrofilu koncentrační gradient interleukinu-8 (IL-8) lákající je do místa zánětu. Tento sled událostí vyvrcholí prostupem cévní stěnou do tkáně. Když neutrofil rozpozná infekční částici, zahájí antimikrobiální reakci. Vlastní rozpoznání patogenního mikroorganismu probíhá pomocí receptorů vázajících se na charakteristické molekulární vzory přítomné na patogenech. Obecně můžeme tyto vzory označit jako molekulární vzory charakteristické pro povrch buněk patogenů (z angl. Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP) nebo obecný vzor typický pro povrch mikrobů (z angl. Microbe-Associated Molecular Pattern, MAMP). Tyto charakteristické mikrobiální vzory jsou rozpoznávány širokou škálou receptorů fagocytujících buněk označovaných jako receptory rozpoznávající molekulové vzory (z angl. Pattern Recognition Receptors, PRR). Po rozpoznání dochází k fagocytóze infekční částice za tvorby tzv. fagosomu, který následně fúzuje s lysozomem, kdy dojde k uvolnění rozličných pro mikroby škodlivých enzymů. Mezi mechanismy přispívající k destrukci patogenu patří reaktivní formy kyslíku generované aktivitou NADPH oxidázy a funkcí enzymů z intracelulárních granulí. V samotném fagosomu může dojít k usmrcení daného mikroorganismu a následně jsou zbytky patogenní částice prezentovány složkám adaptivní imunity [1,10,21].

3.1.2 Diapedéza

Zralé neutrofilý jsou první linií buněčné obrany proti mikroorganismům a hrají hlavní roli ve vrozené imunitě a zánětlivých procesech. Prostup neutrofilů z krve do místa zánětu či infekce v dané tkáni se označuje jako diapedéza. V cévách a zejména v postkapilárních žilkách poblíž místa zánětu nebo infekce dochází ke zvýšené expresi adhezivních molekul v cévní stěně umožňující adhezi neutrofilů. Zde je cévní stěna poměrně tenká a průměr dostatečně malý na to, aby se neutrofilý mohly dostat do kontaktu se stěnou cévy. Sled reakcí se iniciuje změnami na povrchu endotelu, které byly stimulovány zánětlivými mediátory (včetně histaminu, cytokinů) po styku patogenů s leukocyty v tkáních [8,11,13]. Tato vícestupňová kaskáda se skládá z následujících kroků:

- a) Interakce neutrofilu s endotelem cévní stěny;
- b) Rolování neutrofilu podél endotelu;
- c) Adheze neutrofilu k endotelu;
- d) Transmigrace neutrofilu k poškozené tkáni.

V závěrečné fázi diapedézy nastává samotná aktivace buňky v poškozené tkáni. Pomocí fagocytózy dochází k usmrcení mikroorganismu ve fagosomu, kde dojde k uvolnění obsahu granulí nebo volných kyslíkových radikálů, dále může docházet k degranulaci nebo vytvoření neutrofilní extracelulární pasti [8,11,13].

3.1.3 Subpopulace neutrofilů

Zmínky o možné heterogenitě neutrofilů můžeme najít již v letech 1970–1980. V té době byl výzkum zaměřen hlavně na zkoumání funkčních rozdílů, hustoty a biosyntézy proteinů. Ani dnes není definován konkrétní znak, podle kterého by se dala jednoznačně určit daná subpopulace neutrofilů. Rozlišením podle fyzikálních vlastností neutrofilů (vztlak, hustota) jsme schopni oddělit populaci

neutrofilů s nízkou hustotou (z angl. Low Density Neutrophils, LDN) a neutrofilů s vysokou hustotou (z angl. High Density Neutrophils, HDN) [2,3].

Do první skupiny patří **neutrofilý s vysokou hustotou**. Tyto buňky se nacházejí v granulocytární frakci po centrifugaci na hustotním gradientu (např. Ficoll). HDN nalezneme v organismu jak u zdravých lidí, tak i u nemocných. Ve zkumavce jsou HDN po centrifugaci v hustotním gradientu zastoupeny spolu s erytrocyty na dně zkumavky [2].

Druhá skupina je zastoupena **neutrofilý s nízkou hustotou**. Poprvé byly tyto buňky pozorovány v roce 1986, kdy byly separovány po centrifugaci v hustotním gradientu, kde kolokalizovaly s frakcí mononukleárních buněk u pacientů s lupusem a revmatoidní artritidou. Bylo zjištěno, že LDN potlačují proliferaci T-buněk a ke zvýšení jejich hladin dochází hlavně při patologických stavech [2,15,16].

LDN se dělí na dvě skupiny: imunosupresivní a protizánětlivé. Imunosupresivní aktivita neutrofilů se ukázala u pacientů s rakovinou, autoimunitními chorobami, infekcemi a plicními chorobami. Neutrofilý s protizánětlivými vlastnostmi byly u pacientů s různými autoimunitními stavy [16].

Poslední skupinou, kterou můžeme zařadit mezi subpopulace neutrofilů jsou **myeloidní supresorové buňky** (z angl. Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSC). Tento název byl do vědecké literatury zaveden před 10 lety. MDSC jsou heterogenní populací myeloidních buněk, které se u zdravých jedinců vyskytují ve velmi malém množství, ovšem dochází k jejich nárůstu při chorobných a patologických stavech. MDSC vznikají z alternativně aktivovaných myeloidních prekurzorů a relativně nezralých myeloidních buněk. V současné době se dají rozdělit do dvou hlavních skupin: polymorfonukleární (PMN-MDSC) a

monocytární (M-MDSC). PMN-MDSC sdílejí mnoho morfologických i fenotypových charakteristik s neutrofilu, zatímco M-MDSC jsou podobné monocytům. PMN-MDSC mají povrchové molekuly společné i s jinými buňkami. Mezi tyto molekuly patří: CD11b, CD14, CD15, CD66b a CD33 [6, 11,17,18,20].

PMN-MDSC vykazují imunosupresivní aktivitu a omezují imunitní odpovědi hostitele proti rakovinným buňkám, chronickým infekčním onemocněním, traumatech, sepsi a mnoha dalších patologických stavech. V těchto stavech se v těle pacienta hromadí a koexistují s dalšími buňkami. Mají schopnost přímo inhibovat aktivitu T-buněk v organismu, a tím přispívají k patogenezi různých onemocnění [11,19,20].

PMN-MDSC se vyznačují odlišnou sadou biochemických znaků a odlišují se specifickými povrchovými molekulami. Během chronického zánětu, jako je přetrvávající infekce, rakovina a další chronické stavy, se liší jejich povaha aktivující signály myeloidních buněk. Tyto signály jsou relativně slabé a dlouhodobé a často se vyskytují ve formě růstových faktorů nebo zánětlivých mediátorů. PMN-MDSC charakterizuje fenotyp a morfologie nezralých buněk zahrnující slabou fagocytární aktivitu, zvýšené hladiny volných kyslíkových radikálů, nebo vysoká exprese arginázy a řady protizánětlivých cytokinů. Tento patologický stav nevede k eliminaci ohrožení nebo aktivaci imunity, ale k inhibici adaptivní imunity a podpoře progresu a metastáz nádoru [18,20].

3.1.4 Neutrofilu v pupečníkové a periferní krvi

Obecně je krev specializovaná tekutina podílející se na udržování vnitřního prostředí našeho organismu. Je tvořena krevní plazmou, ve které jsou rozpuštěny krevní elementy. Mezi krevní elementy patří erytrocyty, leukocyty a trombocyty. Krev má mnoho pro tělo specifických a důležitých funkcí včetně zajištění

termoregulace, transportu důležitých látek ke tkáním a naopak odpadních látek ven z organismu, podílu na imunitní reakci nebo zastavení krvácení pomocí krevních elementů. Krevní plazma je tvořena z 90 % vodou a organickými a anorganickými látkami.

Ukázalo se, že neutrofilů jsou v těhotenství přítomny v membráně lemující dělohu. Během těhotenství napomáhají při rozvoji adaptivní tolerance mateřského imunitního systému. Přechodná modulace vrozené a adaptivní imunity matky přispívá k vytvoření imunosupresivního stavu, který umožňuje implantaci a růst plodu. Během těhotenství existuje oboustranná komunikace a migrace mezi buňkami plodu a matky [22, 23].

Celý život nám v krvi kolují různé buněčné populace neutrofilů. Během těhotenství se v krvi objevují hlavně neutrofilů s nízkou hustotou (LDN). Tento buněčný typ v těhotenství exprimuje arginázu. Ta přispívá k potlačení imunitního systému těhotné ženy. Vedle LDN se v krvi objevují i neutrofilů s normální nebo vysokou hustotou (HDN). Oba tyto typy buněk jsou přítomné v mateřské i pupečnickové krvi. Nyní se zaměříme na funkci LDN buněk v krvi mateřské a pupečnickové. Aktivita LDN buněk je v obou krvích vyšší než aktivita buněk HDN, a to díky zvýšené expresi CD66b. Buňky také více exprimují diferenciační antigen CD33 v obou krvích. Tato exprese značí vyšší heterogenitu buněk LDN. To znamená, že krev obsahuje jak zralé, tak nezralé typy neutrofilů. Oba typy neutrofilů obsahují na povrchu CD15, ovšem LDN buňky mají během těhotenství zvýšenou expresi tohoto antigenu. CD15 na povrchu molekuly reguluje aktivaci a degranulaci LDN. V pupečnickové krvi buňky LDN vylučují větší množství arginázy než v krvi mateřské. Na druhou stranu v mateřské krvi arginázu zvýšeně vylučují buňky HDN. Co se týče buněk HDN je v obou krvích snižená exprese CD63. Tím pádem jsou tyto buňky v těhotenství méně aktivované a obsahují azurofilní granula [23].

V mateřské a pupečnickové krvi exprimují tyto dva typy neutrofilů různé úrovně markerů zrání, aktivace a degranulace. Buňky HDN jsou v mateřské a pupečnickové krvi fenotypicky podobné, zatímco buňky LDN vykazují v těchto dvou typech krve zvýšenou úroveň exprese CD66b, a tím i zvýšenou aktivitu LDN buněk. Pupečnicková krev vykazuje vyšší frekvenci buněk LDN než krev mateřská. Fenotypicky jsou tyto dva typy buněk v obou krvích podobné [23].

Během těhotenství je normální zvýšený systémový zánět. Počty neutrofilů a obecně polymorfonukleárních leukocytů se v těhotenství výrazně zvyšují a buňky procházejí funkčními a metabolickými změnami. To může přispívat k neutrofilii. Počet neutrofilů se zvyšuje také v pupečnickové krvi vlivem gestačního věku. Zánětlivé změny neutrofilů v periferní krvi vyvolané těhotenstvím jsou podobné sepsi. Jde o patologické změny, kdy se fyziologické změny začínají překrývat se změnami hemodynamickými. Už toto je známka počáteční přítomnosti sepse. Patří tam např. tachykardie, která ukazuje na normální adaptaci organismu na těhotenství, ale může také ukazovat na bolest a zvýšené úsilí matky během porodu. Funkce neutrofilů tak musí být v krvi přesně regulovány, neboť zvýšení zánětlivé reakce je spojeno s těhotenskými komplikacemi, jako je preeklampsie. Sepse tak zůstává hlavní příčinou morbidit a úmrtnosti matek, ale i u novorozenců [23, 24, 25].

3.2 Fagocytóza

Fagocytóza byla poprvé sledována pod mikroskopem v 80. letech 19. století ruským přírodovědcem Iljou Mečnikovem. Nejprve se věnoval studiu zoologických věd, kde studoval bezobratlé mořské organismy. Poté se zaměřil na srovnávací imunologii a patologii. Byl průkopníkem studia buněčné imunologie a zasloužil se o objev fagocytózy, když studoval organismus mořských bezobratlých živočichů. Popsal speciální buňky, které útočily na trny

umístěné do larev hvězdic. Mečnikov prosazoval roli fagocytózy v buněčné imunitě a usoudil, že vyšší živočichové jsou chráněni pomocí fagocytů před napadením všudypřítomnými mikroorganismy ve vnitřním a vnějším prostředí. Za tyto objevy dostal Nobelovu cenu. Působil dokonce i na Pasteurově institutu v Paříži. Jeho kroky nezůstaly pouze u imunologie. Zabýval se i jinými obory jako např. fyziologií, medicínou a výzkumem gerontologie a probiotik. Zasloužil se také o výzkum střevní mikrobioty. Jeho život a dílo v Rusku, na Sicílii a na Pasteurově institutu v Paříži sepsala po jeho smrti jeho žena Olga [26, 27, 28, 29].

Fagocytóza je evolučně konzervativní proces, který je důležitý pro řadu živočichů a to jak primitivních tak vyšších. U prvoků plní mechanismus výživy, zatímco u metazoi se fagocytóza diverzifikovala do mechanismu využívaného specializovanými buňkami zvanými fagocyty. Díky diverzifikaci hrají fagocyty různé role v organismu, včetně imunitní obrany, udržování homeostáze a remodelace tkání. Fagocyty vykazují vysokou úroveň plasticity ve své schopnosti rozpoznávat, pohlcovat a zpracovávat cíle, které se liší svým složením a morfologií. U lidí umírají miliony buněk denně, které jsou pohlcovány pomocí fagocytujících buněk. Mezi nejdůležitější fagocyty patří makrofágy, dendritické buňky, osteoklasty, eozinofily a jak už jsem zmiňovala výše neutrofilů. Nazývají se profesionální fagocyty a tento pojem jako první zavedl vášnivý student fagocytózy Michel Rabinovitch, pro svou vysoce účinnou aktivitu v myeloidních leukocytech. Dále se v těle vyskytují buňky, které jsou schopné eliminovat apoptotické buňky, ale nemohou pohlcovat mikroorganismy. Přezdívá se jim neprofesionální fagocyty, kam patří fibroblasty, epitelové buňky a endoteliální buňky [26, 27, 30, 31].

3.2.1 Mechanismus fagocytózy

Určité buňky v organismu mají schopnost selektivně přijímat částice a intracelulárně je degradovat pomocí fagocytózy. Mají tedy schopnost rozpoznat

a následně pozřít mikrobiální částici, která je větší než $0,5 \mu m$ do tzv. fagosomu. To je vezikul vznikající vchlípením plazmatické membrány. Mikrobiální patogeny, dále také apoptotické a nekrotické buňky jsou pohlcovány do fagosomu. Fagocytární buňky mají na povrchu speciální receptory, které rozpoznávají a následně iniciují signální kaskádu. Mezi hlavní receptory patří lektiny a adhezivní receptory, které rozpoznávají odlišné endogenní vzory na povrchu molekul [27, 30, 32].

Po rozpoznání patogenu receptory agregují a zahajují signální kaskádu, která remodeluje lipidy v buněčné membráně a reguluje aktinový cytoskelet s cílem rozšířit buněčnou membránu okolo patogenní částice. Jakmile je částice pohlcena do fagosomu, fúzuje s vezikuly pocházejícími z endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Tyto dva komplexy dodávají do fagosomu molekuly MHC třídy I (MHC-I), kde dochází k vazbě peptidu na MHC-I a následně vezikuly fúzují s plazmatickou membránou. Částice je nakonec uzavřena do nového vezikulu uvnitř fagocytu a vzniká sevřením plazmatické membrány [26, 27, 32].

Fagosom poté mění své membránové složení i obsah vezikul, aby se mohl změnit na fagolyzozom. Tato transformace se nazývá zrání fagosomu. Je to dynamický proces, ve kterém dochází k fúzím s lyzozomem a vezikulárním událostem. Tyto interakce přináší ohromné změny ve fagosomálním obsahu a membráně. Fagolyzozom získává mikrobicidní enzymy, vakuolární ATPázy a komplex NADPH oxidázy. Uvnitř obsahuje fagolyzozom velmi kyselé a degradující prostředí, což mu umožňuje degradaci požití částice [26, 27, 32].

Fagocytóza přispívá k obraně hostitele, ale také k patogenezí autoimunitních, maligních nebo metabolických poruch [27].

3.2.2 Receptory

Prvním krokem fagocytózy je rozpoznávání patogenních částic pomocí speciálních receptorů na buněčné membráně fagocytárních buněk. Patogeny lze rozpoznat přímo pomocí receptorů vázajících se na povrchové molekuly, nebo nepřímo prostřednictvím opsoninů. Opsoniny jsou látky, které v našem organismu usnadňují a urychlují fagocytózu a váží se na cílové struktury na patogenních částicích. Na jednom fagocyty se nachází řada receptorů, které spolupracují při rozpoznávání a požití částice. Některé receptory se mohou vázat na PAMP, ale nemusí nutně iniciovat fagocytózu. Toll-like receptor (TLR) a některé další receptory připravují buňku na fagocytózu aktivací fagocytárních integrinů [26]. Mezi charakteristické fagocytární receptory patří:

Receptory pro opsoniny jsou receptory rozpoznávající opsonizované částice, na jejichž povrchu jsou navázány opsoniny umožňující lepší rozpoznání a následně i jednodušší pohlcení takto označených částic. Opsoniny jsou tzv. můstkem mezi fagocytem a patogenní částicí. Obecně patří do této skupiny protilátky, komplement, fibronektin a lektin. Mezi charakteristické a hlavní opsonické receptory patří Fc γ receptory (Fc γ R), komplementové receptory (CR) a integriny typu b2. Ty se váží na částice, které mají na povrchu imunoglobuliny (IgG) nebo komplementové fragmenty. Mezi Fc receptory lidských klidových neutrofilů patří Fc γ RIIa (CD32) a Fc γ RIIIb (CD16). Vysoce afinitní receptor Fc γ RI (CD64) je exprimován až po aktivaci fagocyty interferonem [26].

Receptory rozpoznávající charakteristické vzory mikroorganismů patří mezi fagocytární receptory a váží se na tyto vzory např. MAMP, PAMP atd. Patří tam dectin-1, manóзовé receptory, SR-A (Scavenger Receptor A) a CD14. Dectin-1 je nejdůležitějším receptorem pro aktivaci fagocytózy a váže se na polysacharidy kvasinkových buněk. Manóзовý receptor váže manan, receptor CD14 se váže na

lipopolysacharid (LPS) a receptor SR-A je schopen tento polysacharid detekovat na některých gramnegativních bakteriích [26].

Receptory pro apoptotické buňky. Kromě cizích antigenů pocházejících z mikroorganismů nám v organismu umírají denně miliony buněk apoptózou. Tyto buňky musí být také odstraněny pomocí fagocytů. Apoptotické buňky uvolňují molekuly, které se mimo buňku normálně nevyskytují. Tyto molekuly zahrnují ATP, lysofosfatidylcholin a sfingosin-1-fosfát. Na odstranění těchto buněk se také podílejí molekuly nazývané jako chemoatraktanty, které vysílají tzv. „najdi mě“ signály. Apoptotické buňky zobrazují povrchové molekuly, které jsou přítomné na plazmatické membráně. Tyto molekuly vysílají tzv. „sežer mě“ signály. Patří tam hlavně fosfatidylserin (PS), který se na povrchu normálně nevyskytuje [26, 27].

3.3 NETóza

NETóza byla poprvé popsána roku 2004 a je považována za jeden z obranných mechanismů organismu proti patogenům pomocí tvorby NET. Je to část programované buněčné smrti a patří k formám vrozené imunity. Pomocí NET jsou patogeny zachytávány a zabíjeny tak, aby nedošlo k jejich dalšímu šíření. Nemusí ji vykazovat pouze neutrofilové. Ve spoustě studií se můžeme dočíst, že ji jsou schopny tvořit např. eozinofily, bazofily a makrofágy. Mezi patogeny, které indukují tvorbu NET patří bakterie jak grampozitivní, tak gramnegativní a také houby. Abnormální regulace NETózy může hrát roli při vzniku a rozvoji různých onemocnění, jako je trombóza, fibrotická a kardiovaskulární onemocnění, preeklampsie, sepse, autoimunitní onemocnění, ateroskleróza a diabetes [33, 34, 35, 36, 37].

3.3.1 Princip NETózy

Během NETózy buňka uvolňuje do prostředí svou mitochondriální DNA s antimikrobiálními proteiny. Tento proces vyžaduje glykolytickou produkci ATP pro přesmyky v síti mikrotubulů a aktinu. NETóza závisí také na elastáze, myeloperoxidáze, peptidylarginindeimináze-4 (PAD-4) a na cyklin-dependentních kinázách (CDK4 a CDK6). Elastáza rozkládá aktiny, aby se zastavila jejich dynamika. Následně se přesune do jádra, kde částečně degraduje specifické histony a podporuje dekonenzaci chromatinu. Poté synergizuje s myeloperoxidázou při dekonenzaci chromatinu. PAD-4 je protein nezbytný pro antimikrobiální účinek vzniklé extracelulární pasti a také se podílí na dekonenzaci chromatinu pomocí hypercitrulinace histonů. Mezi antimikrobiální proteiny patří lipopolysacharidy (LPS), zánětlivé cytokiny IL-6 a IL-8 atd. Po tomto celém procesu dojde ke vzniku extracelulární pasti společně se specifickými antimikrobiálními proteiny na povrchu. Patogeny jsou buď usmrceny toxicitou antimikrobiálních látek asociovaných přímo s NET, nebo imobilizovány za účelem usnadnění fagocytózy jinými buňkami imunitního systému [34, 35, 37].

3.3.2 Vitální a suicidální NETóza

Vitální a suicidální NETóza se liší povahou stimulace v buňce. Suicidální NETóza je většinou indukovaná pomocí různých látek, zatímco vitální NETóza je spuštěna na základě mikrobiálně specifických molekulárních vzorů rozpoznávaných receptory pro rozpoznávání vzorů hostitele. Ačkoliv jak suicidální tak vitální NETóza hrají důležitou roli při eliminaci mikroorganismů, nadměrná tvorba suicidálních NET, vyvolá poškození tkání a buněk. Deregulace tvorby NET se výrazně podílí na patogenezi autoimunitních onemocnění hlavně lupusu [36].

U **vitální NETózy** nemusí nutně docházet k buněčné smrti. Tvorba extracelulárních pastí nastane i při zachování buněčných funkcí, včetně fagocytózy a chemotaxe. Tato NETóza vyžaduje vezikulární přenos jaderné DNA z jádra do extracelulárního prostředí. Vezikuly procházejí cytoplazmou a splývají s plazmatickou membránou. Nedochozí tedy k ruptuře membrány a k usmrcení např. neutrofilní buňky. K tomuto procesu dochází nezávisle na ROS a probíhá rychleji než suicidální NETóza, nejčastěji do půl hodiny [33, 36].

Suicidální NETóza vyžaduje aktivaci dráhy Raf-MEK-ERK (řetězec proteinů v buňce, který zprostředkuje signalizaci z receptoru na povrchu buňky do buněčného jádra), produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí NADPH oxidázy a signalizaci zprostředkovanou proteinovou kinázou. Během tohoto mechanismu dochází k citrulinaci histonů pomocí PAD-4 a dekonenzaci DNA pomocí myeloperoxidázy (MPO) a neutrofilní elastázy (NE). Toto vede k vytvoření komplexu DNA a antimikrobiálních proteinů. Tyto látky jsou poté vyloučeny z narušené plazmatické membrány, čímž dochází k usmrcení buňky. Tento proces je pomalejší než u vitální NETózy. Trvá přibližně 3 hodiny [33, 36].

4 METODIKA

V této kapitole bude podrobně popsán použitý materiál, přístroje, reagentie, pomůcky a technické postupy potřebné k dosažení vytčených cílů experimentální části bakalářské práce.

4.1 Materiál

Biologickým materiálem používaným při realizování této práce byla pupečnicková a periferní krev získaná od matek po předchozím podpisu písemného informovaného souhlasu v Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí v Praze.

Periferní krev byla odebírána ze žíly matky před porodem v rámci standardní předporodní prohlídky do zkumavky s nesrážlivým roztokem K₂EDTA (didraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové) nebo heparinu.

Pupečnicková krev byla odebírána kvalifikovaným pracovníkem nemocnice po porodu z pupečnicku do speciální nádoby s heparinem, což je činidlo zabraňující srážení krve.

Krev byla zpracována bezprostředně po odebrání.

4.2 Přístroje

4.2.1 Box s laminárním prouděním

Laboratorní zařízení, které slouží k udržení sterilního prostředí pro práci s biologickým materiálem. Přístroj obsahuje speciální HEPA filtry, dále také germicidní UV lampu. Filtry slouží k zabránění kontaminace námi

analyzovaného vzorku a zároveň chrání experimentátora před možnou kontaminací chemickými látkami, infekcí z testovaného vzorku krve atd. UV lampa slouží ke sterilizaci plochy, na které se pracuje. Použit byl: Hotte MSC.12 STD GAZ, Jouan, Francie a Sentinel, ESCO, Singapur.

4.2.2 Inkubátor

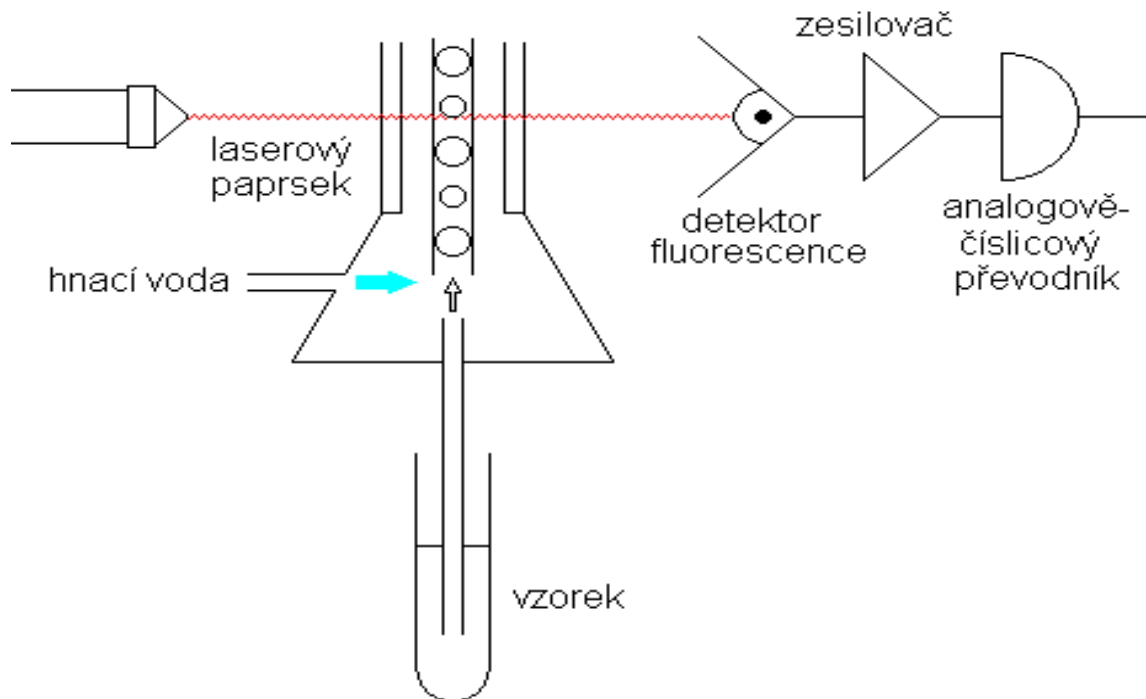
Zařízení, které slouží k udržování teploty nezávisle na teplotě okolí. Používá se pro pěstování mikroorganismů a rostlin, uchování vzorků a materiálu k biochemickému a mikrobiologickému výzkumu. Inkubátor využívaný v laboratoři má regulovatelnou CO₂ atmosféru.

4.2.3 Vortex

Laboratorní přístroj používaný v biologických a biochemických laboratořích. Slouží k pečlivému a rychlému promíchání roztoku ve zkumavce. Použit byl: Vortex-Genie, Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y. 11716.

4.2.4 Průtokový cytometr

Za poslední desetiletí se metoda průtokové cytometrie velice vyvíjela, jak v části mechanické, fluidice, rychlosti analýzy, počtu sledovaných znaků v rámci jednoho měření, tak i v počtu dostupných reagensů od různých firem. V současné době lze využít k multiparametrické analýze buněk v suspenzi. Přítomnost jednotlivých antigenů na buněčném povrchu detekujeme pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorochromy [39, 40].



Obrázek 2 – Schéma funkce průtokového cytometru [42]

Tradiční průtokový cytometr je složen ze tří částí: fluidiky, optiky a elektroniky. Fluidní systém se skládá z nosné tekutiny (z anglického Sheat Fluid), nejčastěji je to pufrovaný solný roztok. Vzorek je nasáván skrz malou trysku a regulace průtoku nosné tekutiny cytometrem, umožňuje postupné měření jednotlivých buněk při jejich průchodu tzv. vyšetřovacím bodem, kde jsou buňky ozářeny laserem o dané vlnové délce. Právě tato vlnová délka je důležitá pro excitaci fluorochromů navázaných na protilátkách, které nám umožní detekci určitých znaků přítomných na buňkách. Optický systém se skládá z excitační optiky, kam patří lasery, a sběrná optika, což jsou fotodiody a fotonásobiče, které generují viditelné a fluorescenční světelné signály používané k analýze vzorku. Dichroické filtry směřují fluorescenční světlo na konkrétní detektor a pásmové filtry určují vlnovou délku procházejícího světla. Vlnové délky jsou čteny a tím je možné detekovat jednotlivé fluorochromy na základě jejich charakteristických vlnových délek emisního spektra. Elektronický systém převádí signály

z detektorů na digitální signály, které pak vidíme na počítači. Detektory zaznamenávají 2 optické parametry. Těmi jsou Side Scatter (boční rozptyl) a Forward Scatter (přímý rozptyl). Výstupem je mnohočetný graf, tím může být klasický histogram, nebo tzv. dot plot (tečkový graf), kde je každá buňka znázorněna tečkou [39, 40]. V naší studii byl použit průtokový cytometr: BD FACS Canto™ II Flow Cytometer, BD Biosciences, USA.

4.3 Použité metody

4.3.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technologie, která umožňuje rychlou analýzu jednotlivých částic nebo buněk v suspenzi. Obecně se průtoková cytometrie řadí mezi molekulárně biologické metody, které označí a kvantifikují námi požadované znaky v buňce. Průtoková cytometrie se uplatňuje v mnoha oborech jako je imunologie, virologie, onkologie, hematologie a jiné. Je velmi užitečná při studiu imunitního systému a imunitní odpovědi na infekční onemocnění a nádorová onemocnění (zejména leukémie). Příprava vzorku před samotným měřením spočívá v získání buněčné suspenze. Pokud chceme měřit buněčné populace v tkáních, je nutné je homogenizovat a také převést na buněčnou suspenzi v nosném médiu. Princip celé metody vychází z detekce vlnových délek emitovaných fluorochromy ve fluorescenčních kanálech pomocí sady laserů, které mají různé vlnové délky. Sleduje se míra vyzářené fluorescence. Samotné buňky procházejí speciální komůrkou (flow cell), která je uzpůsobena tak, aby v jeden okamžik byla v komůrce pouze jedna námi označená buňka. Výstupem je mnohočetný graf. Tento celý proces se nazývá imunofenotypizace a můžeme tak typizovat jakoukoliv buňku [39, 40, 41, 42].

4.3.2 Měření fagocytární aktivity

Pro toto měření jsme použili kit FagoFlowEx Kit od společnosti Exbio Praha, a.s. Tato sada je určena pro stanovení fagocytární aktivity neutrofilních granulocytů měřením respiračního vzplanutí po jejich stimulaci bakteriemi *E. coli* v lidské heparinizované plné krvi pomocí průtokové cytometrie.

Během procesu fagocytózy bakterií dochází k aktivaci NADPH oxidázy za vzniku volných kyslíkových radikálů a dalších oxidačních meziproductů, popsany proces se nazývá respirační vzplanutí. Výsledné ionty chlornanu uvnitř fagocytů silně oxidují dihydrorhodamin123 (DHR123) na fluorescenční rhodamin123, který je detekován průtokovým cytometrem. V případě nedostatku enzymu myeloperoxidázy (MPO) je DHR123 oxidován s menší intenzitou jinými oxidačními produkty, což vede k nižší intenzitě fluorescence stimulovaných granulocytů. Pozitivní kontrolní vzorek je stimulován pomocí phorbol-myristát acetát (PMA), který aktivuje respirační vzplanutí granulocytů bez adheze a požití patogenu. Fluorescence rhodaminu123 vzniklá oxidací DHR123 je detekovatelná ve FITC kanálu při vlnové délce 525 nm. Vzhledem k tomu, že se rhodamin123 uvolňuje z granulocytů velmi rychle, je třeba vzorky měřit bezprostředně po přípravě.

Postup:

- 1) Bylo připraveno 6 zkumavek (u netěhotných dárek pouze 3 zkumavky) určených pro měření fagocytární aktivity neutrofilů pomocí průtokové cytometrie. 3 zkumavky byly pro pupečnickovou krev 3 zkumavky pro periferní krev matky. Zkumavky jsme si pečlivě označili.

- 2) Do každé zkumavky bylo napipetováno 50 μ l nesrážlivé krve.
- 3) Dále bylo do zkumavky s pozitivní kontrolou napipetováno 10 μ l phorbol-myristát-acetátu (PMA), do stimulovaného vzorku 10 μ l suspenze bakterie *E. coli* a do negativní kontroly nic. Vše bylo jemně zvortexováno.
- 4) Poté bylo do všech zkumavek přidáno 10 μ l DHR123 a znovu jemně zvortexováno.
- 5) Vzorky byly inkubovány 30 minut v inkubátoru při 37 °C a při 5,7 % CO₂.
- 6) Po inkubaci bylo přidáno do všech zkumavek 50 μ l lyzačního roztoku, jemně zvortexováno a inkubováno 5 minut při pokojové teplotě ve tmě.
- 7) Na závěr se do všech zkumavek přidal 1 ml demineralizované vody, obsah zkumavek byl jemně zvortexován a následovala 8-mi minutová inkubace vzorků ve tmě.
- 8) Po skončení inkubace byly vzorky přemístěny na led, aby nedocházelo k další lýze a měřili jsme výslednou fluorescenci rhodaminu123 poukazující na míru fagocytární aktivity.
- 9) Takto jsem měřila 20 vzorků krve. Poté jsem měřila dalších 20 vzorků stejným způsobem s tím rozdílem, že jsem do vzorků přidala ještě 1 μ l protilátky proti CD15+ na obarvení neutrofilů.

5 VÝSLEDKY

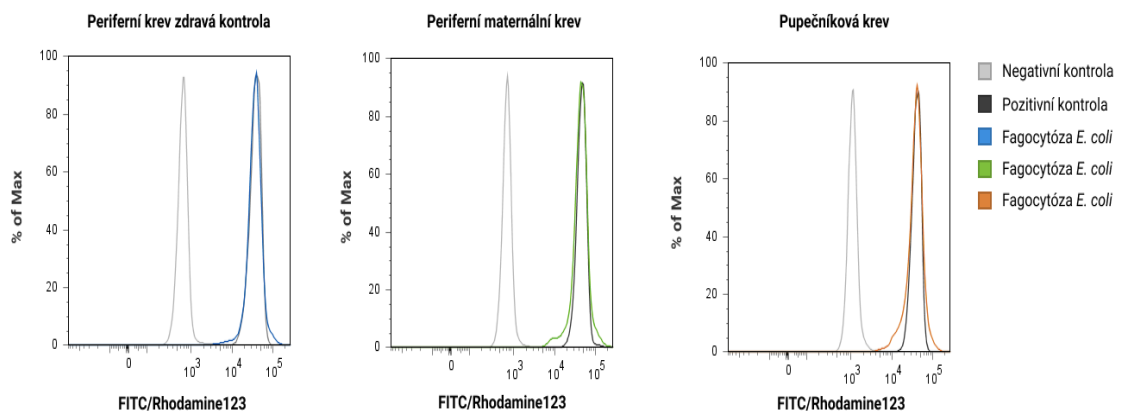
Po celou praktickou práci jsem zpracovávala pupečnickovou a periferní krev. Připravila jsem si tedy ke každé krvi 3 zkumavky, kde jsem si připravila roztoky s pozitivní, negativní kontrolou a suspenzi s bakterií *E. coli*. Celkem jsem měla 60 krevních vzorků, a použila jsem tedy 30 vzorků periferní krve od těhotných žen, 10 vzorků periferní krve od zdravých netěhotných žen a 20 vzorků pupečnickové krve. 30 vzorků periferní krve jsem měla proto, že jsem doměřovala krev těhotných žen odebraných do heparinových zkumavek. Celkem nám chybně vyšla jen 2 měření, kdy mohlo dojít k záměně periferní krve za pupečnickovou krev.

Rozdíly v pupečnickové a periferní krvi jsem analyticky porovnávala v programu FlowJo a vytvořila jsem histogramy. Následně jsem je zpracovala graficky a statisticky.

5.1 Vyhodnocení dat z průtokového cytometru

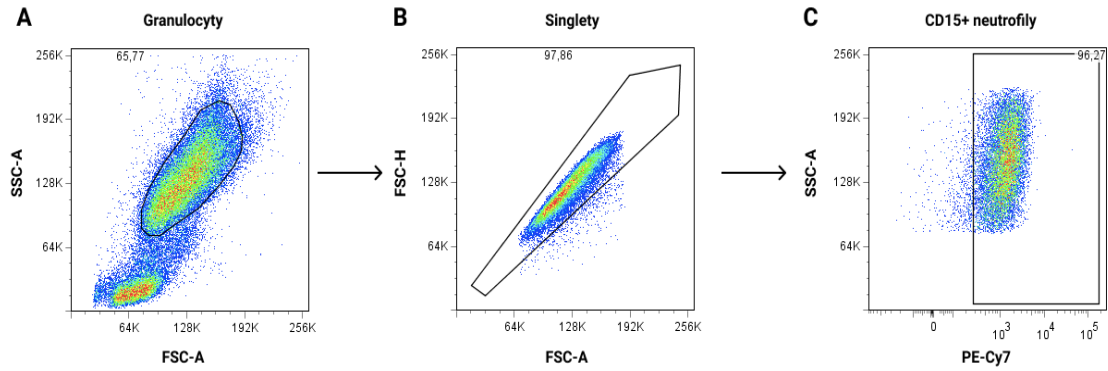
Z naměřených dat jsem na základě rozdílné velikosti a komplexity buněk pomocí výběru detekovala populaci neutrofilů. Nejprve jsou vybrány granulocyty a poté jednotlivé buňky tzv. singlety pomocí přímého rozptylu (Forward Scatter) a bočního rozptylu (Side Scatter). Z jednotlivých buněk jsem získala dot ploty (tečkované grafy) pro analýzu aktivity neutrofilů. Na ose X se nachází fluorochrom Rhodamine123, protože Rhodamine123 je viditelný v emisním spektru pro FITC při vlnové délce 525 nm, na ose Y se nachází procentuální zastoupení neutrofilních buněk. Nejvyšší vrchol v histogramu značí MFI (medián intenzity fluorescence) tedy posun v intenzitě fluorescence populace neutrofilů.

Reprezentativní ukázka fagocytární aktivity neutrofilů v maternální periferní krvi, periferní krvi u zdravé kontroly a pupečnickové krvi u buněk inkubovaných s *E. coli* je prezentována na Obrázku 3. Můžeme vidět fagocytární aktivitu jak u pozitivní tak negativní kontroly u pupečnickové a periferní krve (viz Obr.3).



Obrázek 3 –Histogramy fagocytární aktivity neutrofilů - Histogramy ukazují aktivitu neutrofilů u jednotlivých zkoumaných skupin s přidanou CD15+. Světle šedě je vždy znázorněna negativní kontrola, tmavě šedě pozitivní kontrola stimulovaná PMA. Barevně je odlišena aktivita neutrofilů po stimulaci *E. coli* u jednotlivých zkoumaných skupin. Fluorescence Rhodaminu123 odráží aktivitu MPO, která se aktivuje po stimulaci neutrofilů. [vlastní zdroj]

Postup při analýze buněčné populace neutrofilů, kdy vybírám nejprve granulocyty a poté ponechávám pouze singlety (jednotlivé buňky). To je demonstrováno na Obrázku 4. Ze singletů jsou následně vybrány CD15+ neutrofilů.



Obrázek 4 – Výběr populace neutrofilů – A) Granulocyty vybrány podle FSC-A a SSC-A, B) Singlety vybrány podle FSC-A/FSC-H a C) Nakonec byly vybrány neutrofilly pozitivní na CD15+. [vlastní zdroj]

FSC – přední rozptyl (Forward Scatter)

SSC – boční rozptyl (Side Scatter)

Vzoreček na výpočet relativní MFI (median of fluorescence intensity – medián intenzity fluorescence)

$$Rel. MFI = \frac{MFI_S \cdot MFI_N}{MFI_P \cdot MFI_N}$$

Písmeno S značí vzorek stimulovaný bakterií *E. coli*, N je negativní kontrola a P pozitivní kontrola.

Tabulka 1 – Ukázka hodnot MFI vzorků maternální a pupečnickové krve pro ukázkový výpočet relativní MFI

	MFI maternální krve s K ₂ EDTA	MFI pupečnickové krve s heparinem
Negativní kontrola	254,34	432,69
Pozitivní kontrola	8812,08	13139,08
Vzorek s <i>E. coli</i>	444,71	15179,17

MFI – medián intenzity fluorescence

K₂EDTA – didraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

E. coli – *Escherichia coli*

1) Vzorový výpočet relativní MFI u maternální krve s K₂EDTA

$$Rel. MFI = \frac{MFI_S \cdot MFI_N}{MFI_P \cdot MFI_N} = \frac{444,71 \cdot 254,34}{8812,08 \cdot 254,34} = 0,05 = 5 \%$$

2) Vzorový výpočet relativní MFI u pupečnickové krve s heparinem

$$Rel. MFI = \frac{MFI_S \cdot MFI_N}{MFI_P \cdot MFI_N} = \frac{15179,17 \cdot 432,69}{13139,08 \cdot 432,69} = 0,115 = 115 \%$$

Tabulka 2 – Porovnání relativní MFI maternální krve s protisrážlivým činidlem K₂EDTA a pupečnickové krve s protisrážlivým činidlem heparinem

	Relativní MFI maternální krve s K ₂ EDTA	Relativní MFI pupečnickové krve s heparinem
1 vzorek	5 %	115 %
2 vzorek	3 %	101 %
3 vzorek	11 %	93 %
4 vzorek	7 %	114 %

MFI – medián intenzity fluorescence

K₂EDTA – didraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

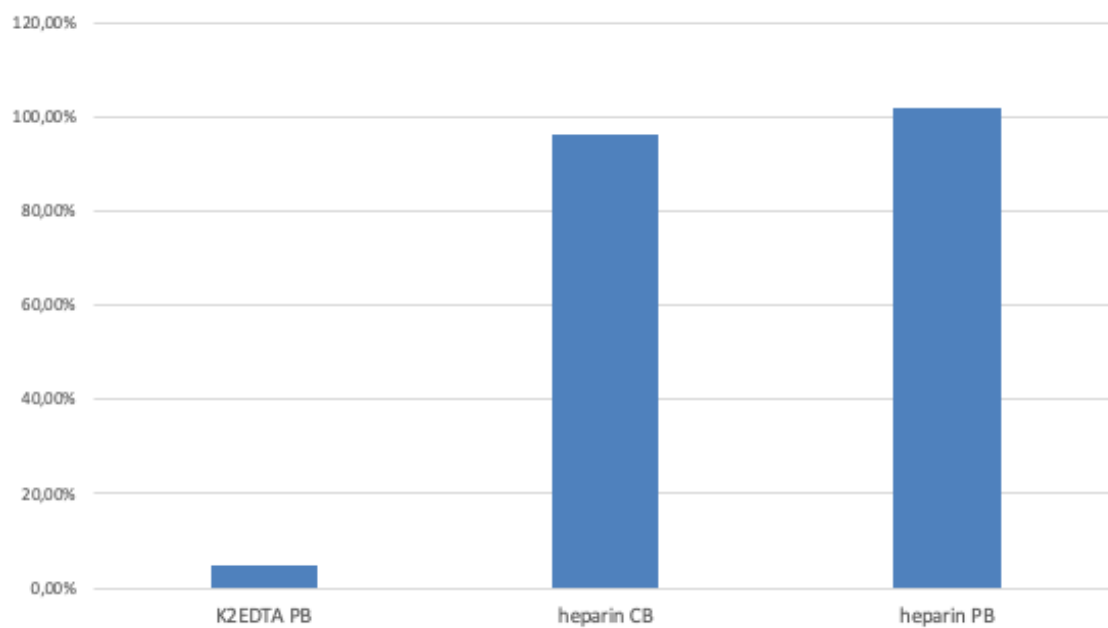
Tabulka 3 – Porovnání relativních MFI maternální krve s činidlem K₂EDTA a heparinem, pupečnickové krve s heparinem a s přidanou CD15+

	Relativní MFI maternální krve s K ₂ EDTA, s CD15+	Relativní MFI pupečnickové krve s heparinem, s CD15+	Relativní MFI maternální krve s heparinem, s CD15+
1 vzorek	8 %	95 %	97 %
2 vzorek	5 %	99 %	99 %
3 vzorek	5 %	97 %	98 %
4 vzorek	2 %	95 %	83 %
5 vzorek	3 %	95 %	113 %

MFI – medián intenzity fluorescence

K₂EDTA – didraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

CD15+ – monoklonální protilátka proti CD15



Obrázek 5 – Graf procentuálních hodnot relativity MFI (medián intenzity fluorescence) v krvích s antikoagulačními činidly [vlastní zdroj]

Tabulka 4 – Porovnání relativní MFI maternální krve s K₂EDTA a CD15+ a zdravých netěhotných dobrovolnic s heparinem

	Relativní MFI maternální krve s K ₂ EDTA a CD15+	Relativní MFI zdravých netěhotných dobrovolnic v heparinu a s CD15+
1 vzorek	4 %	96 %
2 vzorek	5 %	135 %
3 vzorek	2 %	109 %
4 vzorek	3 %	92 %

MFI – medián intenzity fluorescence

K₂EDTA – didraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

CD15+ – monoklonální protilátka proti CD15

V tabulkách je vidět porovnání relativní MFI v maternálních a pupečnickových krvích, a to s různými protisrážlivými činidly – heparinem a K₂EDTA. Činidlo K₂EDTA patří mezi chelatační činidla a vycytává v krvi vápenaté ionty. Proto je např. v Tabulce 2 jasně vidět, že je relativní MFI v nízkých procentech tedy má nízkou aktivaci neutrofilů při fagocytóze oproti vzorkům, které byly odebrány do zkumavek s heparinem. Heparin tedy nijak neovlivňuje efektivitu fagocytózy.

6 DISKUZE

V rámci této bakalářské práce byla sledována fagocytární aktivita neutrofilů v pupečnickové krvi novorozenců a periferní krvi těhotných matek a zdravých netěhotných dáreků.

Novorozenci mají relativně nezralý imunitní systém v porovnání s dospělými jedinci. V neonatální krvi je pozorováno více nezralých forem subpopulací neutrofilů než u dospělého člověka. Novorozenec je tedy v prvních dnech života obzvláště náchylný k bakteriálním infekcím, což je přičítáno nezralosti vrozené imunity. Nedostatečnost fagocytózy může přispívat ke zvýšené náchylnosti k infekcím a u dětí se mohou vyskytovat fagocytární defekty např. Wiskott-Aldrichův syndrom. Hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti novorozenců je seps. Nejčastější patogen, který je spojen s touto nemocí je gramnegativní bakterie *E. coli* [43, 44, 45]. Na začátku jsem tedy předpokládala, že při stimulaci neutrofilů určitou bakterií či virem (v mém případě gramnegativní bakterií *Escherichia coli*) nebude efektivita fagocytózy v pupečnickové krvi tak vysoká jako u neutrofilů v periferní krvi dospělých jedinců.

Během těhotenství dochází v organismu matky k imunologickým změnám. Umožňují tak těhotné ženě toleranci semialogenního plodu, ale také zvyšují její náchylnost k virovým i bakteriálním infekcím. Organismus ženy tedy vykazuje během těhotenství imunosupresivní stav. Virová i bakteriální onemocnění jsou spojena se spektrem nepříznivých důsledků pro matku i její plod. Přenos infekce z matky na plod např. pomocí placenty může způsobit vývojové anomálie, předčasný porod nebo narození mrtvého dítěte a matka je náchylná ke zvýšené morbiditě a smrti [46].

V praktické části bakalářské práce byl sledován rozdíl mezi fagocytární aktivitou neutrofilů v pupečnickové krvi novorozenců a periferní krvi matek a

zdravých netěhotných dáreků. Abych neutrofilů na průtokovém cytometru dobře rozeznala, přidala jsem do vzorků monoklonální protilátku proti CD15 (konjugovanou s fluorochromem PE-Cy7), což je specifický znak pro neutrofilů.

Má studie jasně ukazuje, že fagocytární aktivita neutrofilů v krvi těhotných žen, která byla odebrána do zkumavky s činidlem K₂EDTA, je snížena podle výpočtu relativní MFI oproti krvi pupečnickové, periferní krvi zdravých netěhotných dáreků a těhotných žen odebraných do zkumavky s heparinovým činidlem.

Ve studii Filiase Athanasiose a kol. [47] jsou výsledky odlišné. Zjistili, že po stimulaci pupečnickové krve bakterií *E. coli* je fagocytární aktivita snížena oproti periferní krvi dospělých jedinců. Dále měřili periferní krev u novorozenců. Ta podle jejich studie dosahuje stejné fagocytární aktivity jako u zdravých dospělých, ale až po třech dnech po narození. Toto pozorování je v rozporu s mými výsledky. Můj výzkum ukázal, že pupečnicková krev byla výrazně aktivnější než periferní krev matek odebraná do zkumavek s antikoagulačním činidlem K₂EDTA. Nicméně při odběru jak pupečnickové tak periferní krve do zkumavek s heparinem nebyl pozorován žádný staticky významný rozdíl ve fagocytární aktivitě neutrofilů mezi pupečnickovou a maternální krví. Otázkou ale zůstává, jak je možné, že v mé studii vyšly takto odlišné výsledky, když vzorky krve v jejich studii byly všechny odebrané do zkumavek s heparinovým činidlem. Dle mého názoru použití jiného typu soupravy a jiného metodologického postupu sehrál významnou roli ve stanovení fagocytární aktivity buněk [47].

Dále jsem se zabývala možností, zda odlišné výsledky nebyly způsobeny tím, že odebraná pupečnicková krev byla pouze od novorozenců narozených císařským řezem. Avšak ve studii Filiase Athanasiose a kol. [47] bylo ze 42

novorozenců 21 narozeno vaginálně a 21 císařským řezem. Tedy moje domněnka byla touto studií vyvrácena [47].

Ve výzkumu publikovaném Gille a kol. [48] měřili makrofágy v pupečnickové krvi a periferní krvi. Tyto buňky vykazují v pupečnickové krvi nedostatky imunitních funkcí. Dříve se zjistilo, že fagocytární aktivita makrofágů po stimulaci bakterií *Streptokoka* ze skupiny B se neliší od fagocytární aktivity u zdravých dospělých. V této práci sledovali sice jinou buněčnou populaci, ale použili stejnou bakteriální kolonii *E. coli* a aktivitu měřili jako v mém případě na průtokovém cytometru. Vzhledem k tomu, že fagocytární kapacita pupečnickové krve v této studii je obdobná jako u dospělých jedinců, zdá se, že náchylnost novorozenců k bakteriálním infekcím nijak nesouvisí s abnormalitou fagocytární funkce buněk [48].

Zjištěny nebyly ani rozdíly ve studii Márodiho a kol. [49], kteří uvádí, že fagocytární aktivita buněk v pupečnickové krvi se od periferní krve dospělých také nijak neliší. V této studii rovněž byla krev odebrána do zkumavek s heparinem [49].

Studie [47, 48, 49] ukazovaly pozitivní i negativní korelace mezi fagocytózou pupečnickové krve novorozenců a periferní krve dospělých. Výzkumy, které porovnávaly fagocytární aktivitu buněk v pupečnickové a periferní krvi, uváděly sníženou a zvýšenou schopnost fagocytózy. Takovéto nekonzistentní výsledky mohou odrážet rozdílné metodologické postupy. V každé studii se totiž liší typ vzorku (izolovaná čistá buněčná populace nebo plná krev), použité reagenty, druhy bakterií atd. [45].

Má hypotéza na začátku celé bakalářské práce byla taková, že novorozenec nebo pupečnicková krev (odrazující neonatální imunitní systém) bude vykazovat po stimulaci bakterií nízkou fagocytární aktivitu u neutrofilů. Imunitní systém

matky je v lokálním feto-maternálním rozhraní imunosupresivní, a proto neutrofilů v periferní krvi matky vykazují nižší fagocytární aktivitu. Po naměření fagocytární aktivity neutrofilů zdravých netěhotných žen jsem ale zjistila, že mají neutrofilů vysokou fagocytární aktivitu, a proto jsem změřila fagocytární aktivitu neutrofilů v periferní krvi těhotných žen, jejichž krev byla odebrána do zkumavek s heparinem. Zjistila jsem, že neutrofilů v krvi odebrané do zkumavek s heparinem vykazovaly vysokou aktivitu fagocytózy. Tím jsem tedy zjistila výrazný vliv jednotlivých protisrážlivých činidel na efektivitu fagocytózy u neutrofilů. K₂EDTA je chelatační činidlo, které v krvi vychytává vápenaté ionty. Tato vápníková signalizace je důležitá pro spuštění samotné fagocytózy. Tím, že nedochází k signalizaci vápenatých iontů, nedochází ani k fagocytóze *E. coli*. Nedojde tedy k aktivaci MPO a oxidaci DHR123 na Rhodamine123. Proto vidíme nízké hodnoty MFI u periferní krve matek odebrané do K₂EDTA.

V průběhu preanalytické fáze odběru krve mohlo dojít k určitým chybám, které mohly ovlivnit konečnou fázi analýzy vzorků na průtokovém cytometru. Chyby mohly být způsobeny nesprávným odběrem krve, např. nezachováním sterility hlavně u pupečnickové krve. Dále nedostatečně rychlým transportem a zpracováním materiálu v laboratoři.

Dále mohlo v průběhu přípravy materiálu dojít k chybám způsobeným lidským zaviněním, a to nedostatečně sterilním prostředím, či chybným napipetováním vzorku a reagentů.

Výsledky, ke kterým jsem v průběhu mé bakalářské práce došla, nebyly natolik signifikantní. Dle mého názoru by se mělo pokračovat v dalším výzkumu, aby byly naměřené hodnoty validovány.

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat fagocytární aktivitu neutrofilů v pupečnickové krvi novorozenců a periferní krvi matek. Zjistila jsem, že fagocytární aktivita neutrofilů závisí na použitém protisrážlivém činidle. Krev, ať už pupečnicková nebo periferní, je fagocytárně aktivnější v heparinovém činidle než v činidle s K₂EDTA. To znamená, že se tedy nijak neliší aktivita neutrofilů v pupečnickové krvi novorozence a periferní krvi matky, ale závisí to na antikoagulačním činidle při odběru krve.

Pro praktickou část bakalářské práce jsme měli dostatek krví, a proto jsme byli schopni porovnat velké množství dat, porovnat vliv různých antikoagulačních látek na funkční vlastnosti neutrofilů (fagocytární aktivitu).

Výsledky ukázaly, že neutrofilů v periferní krvi od těhotných matek, které byly odebrány do zkumavek s protisrážlivým činidlem K₂EDTA, vykazovaly menší fagocytární aktivitu než neutrofilů v krvi, která byla odebrána do zkumavek s heparinem. Schopnost fagocytární aktivity neutrofilů v krvi odebrané do zkumavek s K₂EDTA byla snižena, protože K₂EDTA je chelatační činidlo a vychytává vápenaté ionty v krvi. Tím pádem inhibuje fagocytární aktivitu neutrofilů. Získané výsledky poukazují na důležitost volby vhodného antikoagulačního činidla s ohledem na následné funkční analýzy jednotlivých leukocytárních populací.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CD	diferenční antigen
CDK	cyklin-dependentní kináza
CR	komplementový receptor
CXCL	chemokinový ligand
CXCR	chemokinový receptor
DHR123	dihydrorhodamin 123
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FACS	průtokový cytometr (z angličtiny Fluorescence – Activated Cell Sorter)
Fc	fragment imunoglobulinu tvořený částí těžkého řetězce
FcγR	Fc gama receptor
FITC	z angličtiny Fluorescein Isothiocyanate
FSC	přední rozptyl (z angličtiny Forward Scatter)
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (z angličtiny Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
HDN	neutrofil s vysokou hustotou (z angl. High Density Neutrophils)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
K ₂ EDTA	didraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
LDN	neutrofil s nízkou hustotou (z angl. Low Density Neutrophil)
LPS	lipopolysacharid
MAMP	vzor typický pro povrch mikrobů (z angl. Microbe Associated Molecular Pattern)

MDSC	supresorové buňky odvozené od myeloidních buněk (z angl. Myeloid Derived Suppressor Cells)
MFI	medián intenzity fluorescence (z angličtiny Median Fluorescence Intensity)
MHC-I	MHC glykoproteiny 1. třídy (z angličtiny Major Histocompatibility Complex class I)
MPO	myeloperoxidáza
NE	neutrofilní elastáza
NET	neutrofilní extracelulární pasti (z angličtiny Neutrophil Extracellular Traps)
PAD-4	peptidylarginindeimináza-4
PAMP	vzor typický pro povrch buněk patogenů (z angličtiny Pathogen Associated Molecular Pattern)
PE-Cy7	z angličtiny Phycoerytrin-Cyanin7
PMA	phorbol-myristát acetát
PMN	polymorfonukleární neutrofil (z angličtiny Polymorphonuclear Neutrophil)
PRR	receptor rozpoznávající molekulové vzory (z angličtiny Pathogen Recognition Receptor)
PS	fosfatidylserin
ROS	reaktivní radikály kyslíku (z angličtiny Reactive Oxygen Species)
SR-A	z angličtiny Scavenger Receptor A
SSC	boční rozptyl (z angličtiny Side Scatter)
TLR	z angličtiny Toll-like Receptor

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. MÓCSAI, Attila. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *Journal of Experimental Medicine* [online]. 2013, **210**(7), 1283-1299 [cit. 2020-11-23]. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.20122220
2. JABLONSKA, Jadwiga a Zvi GRANOT. Neutrophil, quo vadis? *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2017, **102**(3), 685-688 [cit. 2020-11-23]. ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.3MR0117-015R
3. GARLEY, Marzena a Ewa JABŁOŃSKA. Heterogeneity Among Neutrophils. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* [online]. 2018, **66**(1), 21-30 [cit. 2020-11-23]. ISSN 0004-069X. Dostupné z: doi:10.1007/s00005-017-0476-4
4. YANG, Peiqing, Yanhong LI, Yan XIE a Yi LIU. Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function. *Journal of Immunology Research* [online]. 2019, **2019**, 1-18 [cit. 2020-11-23]. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2019/8016254
5. KOBAYASHI, Scott D., Natalia MALACHOWA a Frank R. DELEO. Influence of Microbes on Neutrophil Life and Death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2017, **7** [cit. 2020-11-23]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00159
6. DENISET, Justin F. a Paul KUBES. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states? *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2018, **103**(5), 829-838 [cit. 2020-11-23]. ISSN 07415400. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.3RI0917-361R
7. BORREGAARD, Niels. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* [online]. 2010, **33**(5), 657-670 [cit. 2020-11-23]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011

8. KOLACZKOWSKA, Elzbieta a Paul KUBES. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2013, **13**(3), 159-175 [cit. 2020-11-23]. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3399
9. MAYADAS, Tanya N., Xavier CULLERE a Clifford A. LOWELL. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. 2014, **9**(1), 181-218 [cit. 2020-11-23]. ISSN 1553-4006. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pathol-020712-164023
10. LEIDING, Jennifer W. Neutrophil Evolution and Their Diseases in Humans. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, **8**[cit. 2020-11-23]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.01009
11. ZHOU, Jie, Yulia NEFEDOVA, Aihua LEI a Dmitry GABRILOVICH. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Seminars in Immunology* [online]. 2018, **35**, 19-28 [cit. 2020-11-23]. ISSN 10445323. Dostupné z: doi:10.1016/j.smim.2017.12.004
12. Neutrofilní metamyelocyt v nátěru sternální punkce: granulopóéza [online]. [cit. 2021-05-11]. Dostupné z: http://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_09547-L0000006.htm
13. Filippi, Marie-Dominique (2016). [*Advances in Immunology*] Volume 129 || *Mechanism of Diapedesis.* , (), 25–53. doi:10.1016/bs.ai.2015.09.001
14. SØRENSEN, Ole E. a Niels BORREGAARD. Neutrophil extracellular traps — the dark side of neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2016, **126**(5), 1612-1620 [cit. 2020-11-23]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI84538
15. HASSANI, Marwan, Pien HELLEBREKERS, Na CHEN, Corneli AALST, Suus BONGERS, Falco HIETBRINK, Leo KOENDERMAN a Nienke VRISEKOOOP. On the origin of low-density neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*[online]. 2020, **107**(5), 809-818 [cit. 2020-11-23]. ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1002/JLB.5HR0120-459R

16. Brandau, Sven; Hartl, Dominik (2017). *Lost in neutrophil heterogeneity? CD101!*. *Blood*, 129(10), 1240–1241. doi:10.1182/blood-2017-01-761585
17. BRUGER, Annika M., Anca DORHOI, Gunes ESENDAGLI, et al. How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2019, 68(4), 631-644 [cit. 2020-11-24]. ISSN 0340-7004. Dostupné z: doi:10.1007/s00262-018-2170-8
18. Tesi, R.J. (2018). *MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of*. *Trends in Pharmacological Sciences*, (), S0165614718301895–.doi:10.1016/j.tips.2018.10.008
19. AARTS, Cathelijn E. M., Ida H. HIEMSTRA, Eelke P. BÉGUIN, et al. Activated neutrophils exert myeloid-derived suppressor cell activity damaging T cells beyond repair. *Blood Advances* [online]. 2019, 3(22), 3562-3574 [cit. 2020-11-24]. ISSN 2473-9529. Dostupné z: doi:10.1182/bloodadvances.2019031609
20. Veglia, Filippo; Perego, Michela; Gabrilovich, Dmitry (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, 19(2), 108–119. doi:10.1038/s41590-017-0022-x
21. RAJAMUTHIAH, Rajmohan a Eleftherios MYLONAKIS. Effector triggered immunity. *Virulence* [online]. 2014, 5(7), 697-702 [cit. 2020-11-30]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.4161/viru.29091
22. NADKARNI, Suchita, Joanne SMITH, Amanda N. SFERRUZZI-PERRI, et al. Neutrophils induce proangiogenic T cells with a regulatory phenotype in pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, 113(52), E8415-E8424 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1611944114
23. SSEMAGANDA, Aloysius, Lindsay KINDINGER, Philip BERGIN, et al. Characterization of Neutrophil Subsets in Healthy Human

- Pregnancies. *PLoS ONE* [online]. 2014, **9**(2) [cit. 2021-03-07]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0085696
24. BEAULIEU, Emilie, Edith MASSÉ a Frederic DALLAIRE. Reference Values for Cord Blood Neutrophils: Neutrophil Count Is Strongly Influenced By Gestational Age, Sex and Caesarian Section. In: *Section on Neonatal-Perinatal Medicine* [online]. American Academy of Pediatrics, 2017, 2017-09-02, s. 60-60 [cit. 2021-03-07]. Dostupné z: doi:10.1542/peds.140.1_MeetingAbstract.60
25. BURLINSON, C.E.G., D. SIROUNIS, K.R. WALLEY a A. CHAU. Sepsis in pregnancy and the puerperium. *International Journal of Obstetric Anesthesia* [online]. 2018, **36**, 96-107 [cit. 2021-04-19]. ISSN 0959289X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijoa.2018.04.010
26. ROSALES, Carlos a Eileen URIBE-QUEROL. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International* [online]. 2017, **2017**, 1-18 [cit. 2020-12-22]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2017/9042851
27. GORDON, Siamon. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* [online]. 2016, **44**(3), 463-475 [cit. 2020-12-22]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2016.02.026
28. GORDON, Siamon. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. *Journal of Innate Immunity* [online]. 2016, **8**(3), 223-227 [cit. 2020-12-22]. ISSN 1662-811X. Dostupné z: doi:10.1159/000443331
29. STOSSEL, Thomas P. Phagocytosis. *New England Journal of Medicine* [online]. 1974, **290**(13), 717-723 [cit. 2020-12-22]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM197403282901306
30. LANCASTER, Charlene E., Cheuk Y. HO, Victoria E.B. HIPOLITO, Roberto J. BOTELHO a Mauricio R. TEREbiznik. Phagocytosis: what's on the menu? *Biochemistry and Cell Biology* [online]. 2019, **97**(1), 21-29 [cit. 2020-12-22]. ISSN 0829-8211. Dostupné z: doi:10.1139/bcb-2018-0008

31. REBENDENNE, Antoine, Olivia AMIAR, Audrey HEMMI a Sophie DUPRÉ. Phagocytose : les professionnels dictent leur loi. *Médecine/sciences* [online]. 2017, **33**(8-9), 738-740 [cit. 2020-12-22]. ISSN 0767-0974. Dostupné z: doi:10.1051/medsci/20173308017
32. LEE, Warren L., Rene E. HARRISON a Sergio GRINSTEIN. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*[online]. 2003, **5**(14), 1299-1306 [cit. 2020-12-22]. ISSN 12864579. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2003.09.014
33. DE BONT, Cynthia M., Wilbert C. BOELENS a Ger J. M. PRUIJN. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cellular & Molecular Immunology* [online]. 2019, **16**(1), 19-27 [cit. 2020-12-29]. ISSN 1672-7681. Dostupné z: doi:10.1038/s41423-018-0024-0
34. HOPPENBROUWERS, Tamara, Anouchska S. A. AUTAR, Andi R. SULTAN, et al. In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(5) [cit. 2020-12-29]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0176472
35. HAMAM a PALANIYAR. Post-Translational Modifications in NETosis and NETs-Mediated Diseases. *Biomolecules*[online]. 2019, **9**(8) [cit. 2020-12-29]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9080369
36. MASUDA, Sakiko, Daigo NAKAZAWA, Haruki SHIDA, Arina MIYOSHI, Yoshihiro KUSUNOKI, Utano TOMARU a Akihiro ISHIZU. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2016, **459**, 89-93 [cit. 2020-12-29]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2016.05.029
37. YOUSEFI, Shida, Darko STOJKOV, Nina GERMIC, Dagmar SIMON, Xiaoliang WANG, Charaf BENARAFa a Hans-Uwe SIMON. Untangling “NETosis” from NETs. *European Journal of Immunology* [online]. 2019, **49**(2), 221-227 [cit. 2020-12-29]. ISSN 0014-2980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.201747053

38. DE BONT, Cynthia M., Wilbert C. BOELEN a Ger J. M. PRUIJN. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cellular & Molecular Immunology* [online]. 2019, **16**(1), 19-27 [cit. 2021-04-14]. ISSN 1672-7681. Dostupné z: doi:10.1038/s41423-018-0024-0
39. MCKINNON, Katherine M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* [online]. 2018, **120**(1) [cit. 2021-03-07]. ISSN 1934-3671. Dostupné z: doi:10.1002/cpim.40
40. Bartuňková, J. a kol. *Vysětrřovací metody v imunologii: 2., přěpracované a doplňěné vydání*. Vydání.: Grada Publishing a.s., 2011. ISBN: 9788024770895.
41. *Průtoková cytometrie* [online]. [cit. 9.3.2021]. Dostupné z: http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniiky/hippokrat/Pracoviste/UMTM/08_Prutokova_cytometrie.pdf
42. *Princip průtokové cytometrie Laboratoř AIDS a infekční imunologie* [online]. 2008 [cit. 9.3.2021]. Dostupné z: <https://infekce.lf1.cuni.cz/flowcyt1.htm>
43. MAKONI, Marjorie, Jeffrey ECKERT, H. ANNE PEREIRA, Victor NIZET a Shelley M. LAWRENCE. Alterations in neonatal neutrophil function attributable to increased immature forms. *Early Human Development* [online]. 2016, **103**, 1-7 [cit. 2021-04-06]. ISSN 03783782. Dostupné z: doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.05.016
44. ZHU, Yueniu, Liqun XU, Jennifer J.P. COLLINS, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Improve Survival and Bacterial Clearance in Neonatal Sepsis in Rats. *Stem Cells and Development* [online]. 2017, **26**(14), 1054-1064 [cit. 2021-04-06]. ISSN 1547-3287. Dostupné z: doi:10.1089/scd.2016.0329
45. PROSSER, Amy, Julie HIBBERT, Tobias STRUNK, Chooi Heen KOK, Karen SIMMER, Peter RICHMOND, David BURGNER a Andrew

- CURRIE. Phagocytosis of neonatal pathogens by peripheral blood neutrophils and monocytes from newborn preterm and term infants. *Pediatric Research* [online]. 2013, **74**(5), 503-510 [cit. 2021-04-06]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1038/pr.2013.145
46. CORNISH, Emily F., Iva FILIPOVIC, Fredrika ÅSENIUS, David J. WILLIAMS a Thomas MCDONNELL. Innate Immune Responses to Acute Viral Infection During Pregnancy. *Frontiers in Immunology* [online]. 2020, **11** [cit. 2021-04-07]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.572567
47. FILIAS, Athanasios, Georgios L THEODOROU, Sofia MOUZOPOULOU, Anastasia A VARVARIGOU, Stephanos MANTAGOS a Marina KARAKANTZA. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatrics*[online]. 2011, **11**(1) [cit. 2021-04-07]. ISSN 1471-2431. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2431-11-29
48. GILLE, Christian, Baerbel SPRING, Lena TEWES, Christian F. POETS a Thorsten ORLIKOWSKY. A new method to quantify phagocytosis and intracellular degradation using green fluorescent protein-labeled *Escherichia coli*: Comparison of cord blood macrophages and peripheral blood macrophages of healthy adults. *Cytometry Part A*[online]. 2006, **69A**(3), 152-154 [cit. 2021-04-07]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20222
49. MARODI, L, P C J LEIJH a R Van FURTH. Characteristics and Functional Capacities of Human Cord Blood Granulocytes and Monocytes. *Pediatric Research* [online]. 1984, **18**(11), 1127-1131 [cit. 2021-04-07]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1203/00006450-198411000-00014

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Vývojová stádia neutrofilu [12]	15
Obrázek 2 - Schéma funkce průtokového cytometru [39]	28
Obrázek 3 - Histogramy fagocytární aktivity neutrofilů.....	33
Obrázek 4 - Výběr populace neutrofilů.....	34
Obrázek 5 - Graf procentuálních hodnot relativních MFI (medián intenzity fluorescence) v krvích s činidly.....	39

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Ukázka hodnot MFI vzorků maternální a pupečnickové krve pro ukázkový výpočet relativní MFI.....34

Tabulka 2 - Porovnání relativní MFI maternální krve s protisrážlivým činidlem K₃EDTA a pupečnickové krve s protisrážlivým činidlem heparinem...35

Tabulka 3 - Porovnání relativních MFI maternální krve s činidlem K₃EDTA a heparinem, pupečnickové krve s heparinem a s přídáním CD15+.....36

Tabulka 4 - Porovnání relativní MFI maternální krve s K₃EDTA a CD15+ a zdravých netěhotných dobrovolnic s heparinem.....36

