



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Úloha NK buněk u transplantace ledviny

The role of NK cells in kidney transplantation

Bakalářská práce

Specializace ve zdravotnictví
Zdravotní laborant

prof. MUDr. Ilja Stříž CSc.

Alexandra Korbová

Kladno, květen 2019

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Korbová** Jméno: **Alexandra** Osobní číslo: **469726**
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:

Úloha NK buněk u transplantace ledviny

Název bakalářské práce anglicky:

The Role of NK Cells in Kidney Transplantation

Pokyny pro vypracování:

V imunitní reakci proti alotransplantátu se uplatní celá řada imunokompetentních buněk, přičemž hlavní efektorovou funkci zastávají zejména cytotoxické T lymfocyty a NK buňky. V teoretické části práce budou popsány hlavní mechanismy imunitního odhojení transplantované ledviny se zaměřením na úlohu NK buněk. V praktické části studentka provede imunofenotypizaci leukocytárních populací včetně stanovení NK buněk průtokovou cytometrií a na souboru pacientů po transplantaci ledviny vyhodnotí, zda nedochází v časném pooperačním průběhu ke změnám dynamiky této populace v periferní krvi ve vztahu k sérovým hladinám chemokinů. Záměrem práce bude sledování pacientů v rané pooperační fázi po transplantaci ledviny.

Seznam doporučené literatury:

[1] STŘÍŽ, Ilja a Vladimír HOLÁN, Cytokiny v klinické medicíně, ed. Praha: Maxdorf, Jessenius, 2015, ISBN 978-80-7345-427-2

[2] HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPIŠEK, Základy imunologie, ed. 6., Praha - Triton, 2017, ISBN 978-80-7553-250-3

[3] STŘÍŽ, Ilja, Eva Brabcova, Libor Kolesar a Alena Sekerková, Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy, Clinical Science, ročník 126 (9), 2014, 593-612 s., ISSN: 1470-8736

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

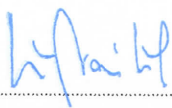
prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Mgr. Martina Fialová

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**


prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry


prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Student(ka) bere na vědomí, že je povinnen(a) vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

7. 11. 2018

Datum převzetí zadání

Kortera

Podpis studenta(ky)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Úloha NK buněk u transplantace ledviny 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).

V Kladně dne 15.05.2019

.....
podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala p. prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc. za pomoc a odborné vedení, které mi poskytoval po celou dobu mé bakalářské práce v části teoretické i výzkumné.

Mé poděkování patří též zaměstnancům laboratoří oddělení klinické imunologie IKEM za spolupráci při získávání údajů pro praktickou část práce.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá mechanismy imunitního odhojení transplantované ledviny. Zaměřuje se na úlohu NK buněk, které v imunitní reakci proti alotransplantátu zastávají spolu s cytotoxickými T lymfocyty hlavní efektorovou funkci. Práce je teoreticko-praktického charakteru.

V první části této práce jsou objasněna teoretická východiska, která se vztahují k hlavním mechanismům imunitního odhojení transplantované ledviny se zaměřením na úlohu NK buněk. Práce porovnává vrozené a adaptivní mechanismy imunitních reakcí, definuje NK buňky a jejich subpopulace, stručně představuje historii transplantace ledvin, imunobiologii rejekce transplantované ledviny, imunosupresi a indukční léčbu. Tyto teoretické poznatky jsou dále uplatněny při vyhodnocení výsledků praktické části práce.

Praktická část práce spočívá v imunofenotypizaci leukocytárních populací, včetně stanovení NK buněk z periferní krve pacientů. Podskupiny NK buněk byly stanoveny v plné krvi s použitím čtyřbarevné fluorescenční průtokové cytometrie u pacientů před a po transplantaci ledviny v průběhu jednoho roku.

Formou výzkumu se zde zjišťuje funkce NK buněk u ledvinného transplantátu, sleduje se jejich hladina v periferní krvi, zejména v časně pooperační fázi. Jádrem práce je, na vzorku 54 pacientů s ročním sledováním, zjistit vliv NK buněčných subpopulací na dobrý výsledek štěpu. Důraz je kladen na sledování dynamiky leukocytárních populací v periferní krvi ve vztahu k sérovým hladinám chemokinů.

Práce odhaluje vlastnosti NK buněk u různých skupin pacientů krátce po transplantaci. Součástí práce jsou taky navržené alternativní metody výzkumu tak, aby při dalším studiu podobně zaměřené práce bylo možné dojít k lepším výsledkům.

Klíčová slova

NK buňky; transplantace ledviny; imunitní systém; imunitní odpověď; rejekce; průtoková cytometrie; buněčné markery;

Abstract

This bachelor thesis deals with mechanisms of immune rejection of transplanted kidney. It focuses on the role of NK cells, which, together with cytotoxic T lymphocytes, play a major effector function in the immune response against graft. The work is theoretical-practical.

The first part of this work explains the theoretical bases that relate to the main mechanisms of immune rejection of the transplanted kidney, focusing on the role of NK cells. The work compares innate and adaptive mechanisms of immune responses, defines NK cells and their subpopulations, it briefly presents the history of kidney transplantation, immunobiology of transplanted kidney rejection, immunosuppression and induction treatment. These theoretical findings are further applied in the evaluation of the results of the practical part of the thesis.

The practical part consists of immunophenotyping of leukocyte populations including NK cells. NK cell subgroups were determined in whole blood using four-color fluorescence flow cytometry in patients before and after kidney transplantation over one year.

In this research, the function of NK cells in the kidney transplant is investigated and their level in the peripheral blood is monitored, especially in the early postoperative phase. The core of the work is, on a sample of 54 patients with annual follow-up, to determine the effect of NK cell subpopulations on good graft outcomes. Emphasis is put on monitoring the dynamics of leukocyte populations in peripheral blood in relation to serum chemokine levels.

The work reveals the properties of NK cells in different patient groups in early period after transplantation. The thesis also proposes alternative research methods, which could be helpful in the next study of similarly focused work.

Keywords

NK cells; kidney transplantation; immune system; immune response; rejection; flow cytometry; cell markers;

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Současný stav.....	13
2.1	Imunitní systém.....	13
2.1.1	Vrozené mechanismy imunitních reakcí.....	13
2.1.2	Adaptivní mechanismy.....	14
2.1.3	Aktivace vrozených mechanismů imunity.....	15
2.2	Molekuly CD.....	16
2.3	NK buňky a jejich subpopulace.....	16
2.3.1	Povrchové molekuly.....	18
2.4	Transplantace ledviny.....	19
2.5	Imunobiologie rejekce transplantované ledviny.....	20
2.5.1	HLA antigeny – hlavní terčové molekuly rejekčních mechanismů.....	20
2.5.2	Role HLA antigenů v imunitní odpovědi.....	21
2.5.3	Časná fáze imunitní odpovědi proti alotransplantátu.....	22
2.6	Imunosuprese a indukční léčba.....	23
2.7	Průtoková cytometrie.....	24
2.7.1	Princip metody.....	24
2.7.2	Fluorescenční komponenty cytometru a tvorba histogramu.....	25
2.7.3	Hydrodynamická fokusace.....	26
2.7.4	Nefluorescenční optické komponenty cytometru – side scatter a forward scatter, princip vizualizace dat ve formě scatter-plotu.....	27
2.7.5	Kombinování fluorescenčního a nefluorescenčního modu cytometru v praxi, gating a cesta k multibarevné průtokové cytometrii.....	29
3	Cíl práce.....	30

4	Metodika	32
4.1	Pracovní postup	32
4.1.1	Odběr a příjem materiálu.....	32
4.1.2	Použitý materiál, přístroje a pomůcky.....	33
4.1.3	Použité reagensy:	34
4.1.4	Postup přípravy vzorku na vyšetření lymfocytárních subpopulací s použitím základního panelu protilátek	34
4.2	Zpracování naměřených dat	39
4.2.1	Statistická analýza.....	39
5	Výsledky.....	40
5.1	Analýza dat pacientů před a po transplantaci.....	40
5.2	Analýza dat souboru pacientů rozdělených podle pohlaví, věku a podané indukce.....	41
5.2.1	Rozdíly mezi procentuálním zastoupením NK buněk u mužů a žen.....	42
5.2.2	Rozdíly mezi procentuálním zastoupením NK buněk u skupin pacientů rozdělených podle věku	43
5.2.3	Znázornění časového průběhu procentuálního zastoupení NK buněk u různých skupin pacientů.....	45
6	Diskuze	50
7	Závěr	54
8	Seznam použitých zkratk.....	55
9	Seznam použité literatury.....	56
10	Seznam použitých obrázků	58
11	Seznamu použitých tabulek	59

12	Seznam Příloh.....	60
----	--------------------	----

1 ÚVOD

Imunitní systém hraje důležitou roli při ochraně integrity organismu. Jeho funkcí je obranyschopnost, imunitní dohled a autotolerance. Moderní transplantační medicína se usiluje nechtěnou mobilizaci imunitních mechanismů potlačit. Proto se snaží stále hlouběji poznávat, jak imunitní systém přimět, aby proti alotransplantátu vedl imunitní reakce v co nejmenší míře. Z tohoto důvodu jsou při transplantaci ledviny pečlivě sledovány HLA antigeny dárce a příjemce, proti kterým následně bojují imunokompetentní buňky a celá řada chemokinů. Navzdory moderním operačním postupům a imunosupresivní léčbě nejsou zcela známy všechny vlivy působící na odmítnutí štěpu.

V bakalářské práci se zabývám mechanismy imunitního odhojení transplantované ledviny. V časně pooperační fázi dochází k největším výkyvům hladin leukocytárních populací. Zaměřovala jsem se zejména na NK buňky, zastávající jednu z hlavních efektorových funkcí v reakci proti alotransplantátu. Zajímá mě vliv cytotoxických a imunoregulačních subpopulací NK buněk. Je možné, že zvýšení nebo snížení hladiny těchto subpopulací ovlivňuje rychlejší nástup rejekce nebo naopak lepší prognózu přežití štěpu.

Objasnění vlastností NK buněk po transplantaci může pozitivně ovlivnit léčbu pacientů a zvýšit možnost přežití štěpu s minimální imunosupresí. Proto je cílem mojí práce lepší pochopení funkce NK buněk u ledvinného transplantátu a sledování jejich hladin v periferní krvi zejména v časně pooperační fázi. Rozdíly hladin NK buněk u různých skupin pacientů jsem statisticky zpracovala. Soubor 54 pacientů jsem rozdělila podle toho, zda došlo k rejekci či nikoliv. Dále jsem rozdělila pacienty podle pohlaví, věku a indukce, která jim byla podávána před transplantací. Všechny dosažené výsledky a cíle jsem popsala v závěru práce.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodlivého a chrání tak organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu [1].

Jeho další funkce jsou obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. Obranyschopnost je děj, kdy imunitní systém rozpozná vnější škodliviny a chrání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům. Díky autotoleranci rozpoznává imunitní systém jemu vlastní tkáně a udržuje vůči nim toleranci. Při rozpoznávání škodlivin vnitřního původu se uplatňuje imunitní dohled, který dokáže průběžně odstraňovat staré, poškozené nebo mutované buňky [1]. Existují i neimunitní obranné mechanismy, které je možné rozdělit na mechanické, chemické a mikrobiální.

Existují dvě základní kategorie imunitních mechanismů. Jde o kategorii vrozené a adaptivní imunity. Vrozená nebo také neadaptivní imunita reaguje jen na podezřelé motivy a během života se nijak nevyvíjí. Druhou kategorií je imunita adaptivní neboli antigenně specifická, která se dokáže během života vyvíjet a má funkci imunologické paměti. Obě kategorie zahrnují humorální složku, která je představována sérovými proteiny a sekretovanými molekulami a složku buněčnou, tvořenou různými typy buněk [1] [2].

2.1.1 Vrozené mechanismy imunitních reakcí

Mechanismy vrozené imunity jsou vývojově starší, proto je jejich mechanismus obrany organismu založen na jednodušších principech. Jde o molekuly a buňky,

kteřé jsou v organismu připraveny předem a jsou účinné proti mnoha různým patogenům tím, že reagují na strukturní a funkční rysy, které jsou jim společné [1].

Vrozená buněčná imunita je reprezentována zejména fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými NK buňkami. Humorální složku tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné proteiny obsažené v séru. Tento systém tvoří takzvanou „druhou linii“ obranných mechanismů, kdy už agens proniklo přes „linii první“ a škodlivinu je v těle. Do „první linie“ řadíme obranné mechanismy našeho organismu zabraňující samotnému průniku nebezpečného agens do těla. Jde o kůži, která musí být celistvá a pokrytá potem. Pot obsahuje enzym lysozym, který má antimikrobiální účinky, protože katalyzuje rozpad polysacharidových řetězců v buněčných stěnách bakterií [3].

Pro zachování integrity organismu musí naše tělo reagovat na přítomnost škodliviny velice rychle, proto probíhá reakce vrozené imunity po kontaktu s patogenem řádově v minutách a připravuje organismus na reakce adaptivní imunity, která se rozvíjí až po několika dnech až týdnech.

2.1.2 Adaptivní mechanismy

Jde o evolučně mladší mechanismy, které jsou antigenně specifické. Na každou cizorodou strukturu reagují pomocí vysoce specifických molekul. Mechanismy humorální jsou založené na protilátkách. V buněčně zprostředkovaných mechanismech hrají hlavní roli především T lymfocyty [1].

Pro tyto mechanismy je charakteristické, že se spouštějí až po setkání s určitým antigenem a k jejich úplnému rozvoji je potřeba několik dní až týdnů. Dalším rysem těchto mechanismů je jejich imunologická paměť. Pokud se organismus setká s agens podruhé, je imunologická reakce několikanásobně vyšší [1].

K iniciaci adaptivní imunity je zapotřebí aktivity složek neadaptivní imunitní odpovědi. Z toho je zřejmé, že pro fungování organismu jsou oba mechanismy, jak adaptivní, tak vrozená imunita, nepostradatelné a životně důležité a musí spolu vzájemně kooperovat [1]. Díky jejich delší reakční prodlevě a schopnosti reagovat až po iniciaci vrozenou imunitou je řadíme do „třetí linie“ obranných mechanismů.

2.1.3 Aktivace vrozených mechanismů imunity

Vrozená imunita se do obranných reakcí zapojuje jako první, je důležitá pro celkový výsledek imunitní reakce a je založená hlavně na rozpoznání chemických struktur charakteristických pro mikroorganismy. Tyto struktury jsou nezbytné pro jejich život a označují se jako PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Může jít například o endotoxiny u gramnegativních bakterií, peptidoglykany, charakteristické pro grampozitivní bakterie nebo glukany a manany, typické pro kvasinky a plísňe [1].

Kromě toho dokáží buňky vrozené imunity rozeznávat i molekuly, které jsou uvolňovány z poškozených buněk a tkání. Bývají souhrnně nazývány jako DAMP (damage-associated molecular patterns). Jde o látky, které se za normálních okolností nacházejí v intracelulárním prostoru a vykonávají běžné fyziologické funkce. K jejich přesunu do extracelulárního prostoru dochází, pokud je buňka nebo tkáň poškozená a signalizují nebezpečí [1]. Na povrchu leukocytů se nachází taky receptory označované jako PRR (pattern recognition receptors), pro rozpoznávání výše zmíněných charakteristických komponent [1].

Po rozeznání cizorodých struktur se aktivují efektorové mechanismy buněk vrozené imunity, hlavně různé druhy fagocytů, a humorální složka zastoupena komplementovým systémem, jejichž cílem je zlikvidovat cizorodé agens. Dochází taky k aktivaci antigeně specifických imunitních procesů pomocí fagocytů sloužících jako APC (antigen prezentující buňky). Antigeny nebo fragmenty

proteinů pohlčenými APC jsou prezentovány na MHC glykoproteinech na povrchu těchto fagocytujících buněk [1].

2.2 Molekuly CD

Na povrchu leukocytů se nacházejí stovky různých druhů molekul, které můžeme dělit podle jejich funkce či struktury. Některé molekuly se nachází na povrchu ve velmi malém množství, některé ve velkém (10^4 – 10^6) [1].

Většina povrchových molekul leukocytů se označuje CD názvy. Tyto molekuly byly definovány na základě skupin (clusters) monoklonálních protilátek, s kterými reagovaly a vzájemně se tím od sebe diferencovaly, proto se pro ně začala používat zkratka CD (cluster of differentiation). Systém pojmenovávání neříká nic o struktuře nebo funkci molekul, čísla jsou přiřazována podle toho, v jakém pořadí byla molekula objevena. Mnohé molekuly mají taky alternativní názvy, které souvisejí s jejich strukturou či funkcí, jako například molekula FcγRIII – CD16. Do dnešní doby bylo definováno CD1 – CD371 molekul, přičemž některé CD molekuly mají ještě připojená písmena, která odlišují skupiny příbuzných molekul [1]. Názvosloví CD se netýká TCR, BCR a MHC glykoproteinů.

2.3 NK buňky a jejich subpopulace

NK buňky, z anglického názvu „natural killer cells“, jsou bílé krvinky, které svým vzhledem připomínají velké granulární lymfocyty. Nacházejí se zejména v krvi, játrech a v sekundárních lymfatických orgánech jako jsou slezina a se sliznicí asociovaná lymfatická tkáň (MALT). Jejich základní funkcí je schopnost zabíjet cílové buňky i bez přítomnosti protilátek a antigenní stimulace. V současné době se řadí do imunity přirozené, ale díky jejich podobnosti s CD8+ T lymfocyty v expresi antigen-specifických receptorů, které zajišťují proliferační aktivitu, mají taky rysy adaptivního imunitního systému. Byla u nich popsána i schopnost

diferenciace do paměťových buněk. Můžeme tedy říct, že díky svým vlastnostem spadají přesně na rozhraní mezi přirozenou a adaptivní imunitu [2].

Existuje podskupina NKT buněk, která je podobná T lymfocytům v membránovém znaku CD3. Exprimuje také znak CD161, typický pro NK buňky, nazývaný také NK1.1. NKT dokáží aktivovat či inhibovat imunitní reakce [2] a rozpoznávají antigeny prezentované na neklasických hlavních histokompatibilních komplexech I. typu, kterými jsou molekuly CD1d nacházející se na povrchu APC. Dokáží reagovat na výskyt lipidových antigenů, jako například bakteriálních glykolipidů, glykolipidů izolovaných z mořských hub, endogenních a nádorově odvozených glykolipidů a fosfolipidů. Dělí se na dva typy, které mají odlišné imunoregulační vlastnosti. NKT typu I jsou schopny pozitivně regulovat imunitní odpovědi a účastnit se dohledu nad nádorovými buňkami, protože exprimují invariantní T buněčný receptor. NKT typu II mají úlohu imunosupresivní a využívají různorodé TCR genové segmenty k útlumu protinádorové imunitní odpovědi [2] [4].

NK buňky jsou považovány za účinné cytokinové producenty s imunoregulačními vlastnostmi, ale po vhodné aktivaci se mohou také stát cytotoxickými. NK buňky CD56^{bright} mají špatnou cytotoxickou funkci, kompenzující rychlou tvorbou cytokinů. Zralejší buňky CD56^{dim} jsou při reakcích na buněčné stimuly hlavně cytotoxické. [5]. Bylo prokázáno, že tyto buňky hrají roli v různých chorobných stavech, jako je rakovina, autoimunita, záněty nervů a infekce. Ačkoliv jejich fenotyp a funkční vlastnosti jsou dobře známy a byly rozsáhle studovány není zcela definován jejich vztah k linii s jinými podmnožinami NK buněk, ani jejich přesný hematopoetický původ [6]. Víme ale, že vznikají v kostní dřeni z kmenových buněk, stejně jako ostatní krevní buňky a elementy. Spolu s T a B lymfocyty mají společný lymfoidní progenitor, z čehož můžeme usuzovat i vlastnosti NK buněk, které jsou podobné některým buňkám z této řady.

2.3.1 Povrchové molekuly

Buňky mají na svém povrchu molekuly, které odpovídají za rozpoznávání. Pomocí unikátních NK receptorů rozpoznávají MHC molekuly. NK buňky exprimují dva druhy receptorů. Expres MHC proteinů I. třídy na většině normálních zdravých buněk brání NK buňkám v jejich usmrcování. Inhibice tohoto vlivu je narušena virem, který snižuje expresi MHC I. třídy nebo zásahem do MHC I molekul, což vede k NK buňkami mediovanému zabití buněk. Dochází k tomu buď přímo, kdy dojde k uvolnění granzymů nebo perforinů, cestou FcRIII a ADCC, nebo sekrecí IFN- γ a TNF- α [7].

Existují však některá nespecifická agens, která je mohou dále aktivovat. Jsou to například mitogeny IFN- γ a IL-12 [7].

IL-12 jsou produkované makrofágy a dendritickými buňkami. Působí diferenciaci a proliferaci T lymfocytů. Jedná se o determinující faktor pro vývoj Th1 buněk, který podporuje růst T lymfocytů redundantně s IL-2. Tento cytokin sehrává důležitou roli v buňkami zprostředkované imunitní odpovědi. Dokáží ho rozpoznávat receptory I. typu [2].

IFN- γ je molekula významně se podílející na buňkami zprostředkované imunitní odpovědi. Tento prozánětlivý cytokin podporuje zánětlivé reakce, atrahuje další leukocyty do místa zánětu a zesiluje imunitní reakce. Je produkován Th1, aktivuje taky makrofágy a buňkami zprostředkované reakce. Váže se na receptory II. typu. Je to interferon II. typu

NK buňky jsou integrální složkou časně hostitelské odpovědi na virovou infekci. Využívají k tomu buněčných povrchových receptorů, ale přesný mechanismus je stále studován [7].

NK buňky nepodléhají klonální restrikci, čímž se podobají makrofágům. Mají nízkou specifitu a nemají paměť, z toho důvodu nejsou imunitními buňkami v nejužším smyslu. Mohou být namířeny proti mnoha cílům, proto pacienti s vzácnou poruchou funkce NK buněk mají zvýšenou incidenci virových infekcí a určitých nádorů. Podskupina NK buněk, buňky NKT jsou významné v protinádorové obraně. Nepřítomnost NKT podskupiny u X-vázaného lymfoproliferativního syndromu vyvolává tumory navozené přítomností EBV [7].

2.4 Transplantace ledviny

Na přelomu 50. a 60. let minulého století došlo v medicíně k řadě významných objevů, které umožnili vznik dnešním moderním transplantačním technikám. Byl objeven antigen HLA a popsán význam leukocytů na rejekci transplantátu. Začalo se s vyhledáváním příjemců ledvin podle HLA typizace a optimální shody v HLA antigenech. Zjistili se pozitivní účinky hypotermie pro ochranu před ischemií orgánu s použitím perfuzních roztoků. Byla taky vylepšena chirurgická stránka transplantací ledvin a po zaměření se na potlačení rejekce se postupně vyvíjeli nové antirejekční a indukční léčby. Důležitým bodem ve vývoji imunosuprese byl objev cyklosporinu A, který umožnil transplantace i jiných orgánů. V dnešní době se díky imunosupresivní léčbě snížila incidence akutních rejekcí na 10-15 %. Nevýhodami podávání imunosupresiv jsou zvýšená rizika vzniku infekcí, například BK virem a rizika malignit způsobené virovými původci.

První úspěšná transplantace ledviny v České republice proběhla v r. 1966. Do konce 60. let jich proběhlo ještě 32, ze živých i zemřelých dárců. V 90. letech 20. století se Česká republika dostala na přední místa v počtu transplantací na milion obyvatel. V roce 2018 se v ČR provedlo 895 transplantací orgánů.

2.5 Imunobiologie rejekce transplantované ledviny

K odvrhnutí transplantovaného štěpu dochází i přes moderní imunosupresivní indukci pacientů. Jde o imunitní reakci, buněčnou nebo humorální, proti histokompatibilním HLA antigenům. Právě HLA antigeny indukují následné rejekční mechanismy. Shoda HLA antigenů dárce a příjemce je v případě transplantací ledvin pro dlouhodobé přežití štěpu velmi důležitá [8].

V posledních letech se do popředí dostávají mechanismy nezávislé na aloantigenech, z toho důvodu buňky přirozené imunity mají nezanedbatelný vliv na rejekční reakce. Tento poznatek by mohl v budoucnu pomoci vytvořit účinnou imunosupresivní léčbu nebo navodit imunitní toleranci vůči transplantovanému orgánu [8].

2.5.1 HLA antigeny – hlavní terčové molekuly rejekčních mechanismů

Jednotliví jedinci se odlišují membránovými molekulami, proto je při transplantaci štěpu imunitní systém vyhodnotí jako cizí antigeny. Patří mezi ně antigeny charakterizující krevní skupiny, ale zejména HLA antigeny, které mají zásadní význam při buněčných nebo orgánových transplantacích. Tento komplex tkáňové slučitelnosti MHC (major histocompatibility complex), kterému se u člověka říká HLA, se nachází na 6. chromozomu, na jeho krátkém raménku, a má 3 oblasti. První a druhý region se obsahuje geny kódující HLA. Ve třetí oblasti se nachází geny komplementu, tumor nekrotizujícího faktoru TNF- α a další geny, které se od HLA liší strukturálně či funkčně.

Existují 3 geny pro I. třídu a 3 geny pro II. třídu HLA systému. Do tohoto klasického systému řadíme lokusy HLA-A, B, C (I. třída) a HLA-DR, DQ a DP (II. třída). Geny HLA jsou značně variabilní a nejrozmanitější v lidském genomu. Díky této variabilitě genů jsou vytvářeny různé sekvence aminokyselin HLA antigenů, které se nazývají alely [8].

Každý antigen má číslo např. HLA-A1, A2, A10 atd. Geny HLA se dědí haplotyp neboli jako celá sada. Jedinec má sady dvě, jedna je od otce a druhá se dědí po matce. Navíc tyto alely mají kodominantní expresi, dochází tedy k projevu obou děděných alel. Geny HLA jsou ve vazebné nerovnováze (linkage disequilibrium), kdy určité kombinace alel se dědí často společně a mají nízkou frekvenci rekombinace (např. haplotyp HLA-A1, B8, DR3) [8].

2.5.2 Role HLA antigenů v imunitní odpovědi

Antigeny I. třídy se vyskytují skoro na všech jaderných buňkách, ale jejich exprese se v různých tkáních liší (10^4 – 10^6 antigenů na povrchu buňky). Antigeny II. třídy se vyskytují pouze na APC (antigen prezentující buňky - makrofágy, B-buňky, dendritické buňky, aktivované T-lymfocyty, epitelové buňky v thymu), s čímž souvisí i jejich důležitost v imunitní odpovědi. V některých případech může být indukována exprese antigenů II. třídy i na buňkách, které je normálně neexprimují. Stát se to může například při akutní celulární rejekci, kdy je vlivem interferonu- γ indukována exprese DR antigenů na tubulárních buňkách ledvinového štěpu [8].

Základní funkcí HLA je předkládat peptidové fragmenty extracelulárních a extracelulárních antigenů imunitnímu systému (T-lymfocytům). Antigeny HLA I. třídy váží peptid pocházející z endogenních proteinů vlastních i cizích a mají délku 8-9 aminokyselin. Antigeny II. třídy prezentují peptidy exogenního původu a mají délku 12-28 aminokyselin. Proteiny, které HLA prezentuje, jsou štěpeny v proteazomu, proto mohou být označeny jako restriční elementy, které imunitní systém rozpoznává spolu s exogenními, či vlastními antigeny. Tomuto fenoménu se říká MHC restrikce, která je zodpovědná za charakter všech specifických imunitních odpovědí vůči antigenům [8].

Imunitní reakce nemusí být indukována výhradně HLA antigeny. U pacientů po transplantaci ledviny se v séru prokazují protilátky proti příbuzným antigenům

typu MICA (MHC třída I related chain antibodies), které mají vztah k rejekci ledviny. Mezi tzv. non-HLA antigeny indukující tvorbu protilátek patří také některé epitopy exprimované na endotelu. Zjistilo se ale, že značná část protilátkové odpovědi proti endotelu ledvinného štěpu je zaměřena proti vimetinu, který se uvolňuje z poškozených buněk. V případě inkompatibility v systému KIR nebyl u transplantace ledvin zjištěn jednoznačný vliv na přežití štěpu či příjemce [8].

2.5.3 Časná fáze imunitní odpovědi proti alotransplantátu

Proti transplantovanému orgánu se projevují zejména specifické mechanismy imunitní odpovědi. V počáteční fázi však převažují nejspíše mechanismy přirozené imunitní odpovědi organismu na alotransplantát. Po reperfuzi transplantovaného orgánu dochází k uvolnění prozánětlivých cytokinů, zejména $\text{TNF-}\alpha$ a $\text{IL-1}\beta$, produkovaných již během několika minut endotelem a parenchýálními buňkami. V časném období lze zachytit i zvýšené sérové koncentrace IL-6 , IL-8 a IL-10 . Indukce prozánětlivých cytokinů je způsobená operačním traumatem a ischemicko/reperfuzním poškozením štěpu s oxidativním stresem. Lokálním účinkem prozánětlivých cytokinů je indukce chemokinů a adhezivních molekul [8].

Tvorba některých chemokinů má význam pro rejekci štěpu. Chemokiny tvořené aktivovanými buňkami parenchymu a endotelem jsou odpovědné za chemokinový gradient, který způsobí migraci leukocytů do štěpu. Dále se pak chemokiny tvoří infiltrovanými lymfocyty a makrofágy. V prvotní fázi jsou do štěpu atrahovány hlavně leukocyty bez antigen-specifických vlastností, až později jsou přitahovány aloantigen-specifické T-lymfocyty. V řadě studií bylo prokázáno, že zvýšené hladiny chemokinů mají za následek rejekci štěpu a mohou být považovány za indikátory této reakce. Pro potlačení infiltrace leukocytů do transplantované tkáně

je možné použít blokuující protilátky nebo solubilní receptory, a tím oddálit rejekci štěpu [8].

Chemokiny produkované ve štěpu můžeme orientačně dělit na časné (tvorba během 3–72 hodin) a pozdní (tvorba více než 48-72 hodin). Během prvních 3 hodin po transplantaci je prokázána nadprodukce Gro- α , MIP-2 a IL-8, protože prvními buňkami infiltrující štěp jsou neutrofilní leukocyty. Chemokiny MCP-1, MIP-1 α a MIP-1 β jsou tvořeny v této fázi v mnohem nižší koncentraci, proto nejsou NK buňky, makrofágy nebo T-lymfocyty příliš atrahovány.

2.6 Imunosuprese a indukční léčba

Úspěch transplantace ledviny závisí na kvalitě dárcovského orgánu, chirurgického výkonu a imunosupresivním režimu. Bezprostředně před a krátce po transplantaci se používá indukční imunosuprese, která je založená na depleci nebo blokádě funkce T lymfocytů. U nemocných v riziku rejekce se používá antithymocytární globulin, u nemocných v nízkém riziku pak monoklonální protilátka basiliximab proti receptoru pro interleukin 2. Dlouhodobá imunosuprese se skládá většinou z kombinace inhibitoru kalcineurinu (takrolimus nebo cyklosporin A) spolu s inhibitorem syntézy purinů mykofenolát mofetilem a steroidy. V případě anamnézy malignit připadá do úvahy alternativní léčba inhibitory proliferačního signálu (sirolimem nebo everolimem). V případě výskytu rejekce se používají pulzy steroidů a v případě neúspěchu této léčby pak antithymocytární globulin. Dlouhodobá imunosuprese je zatížena výskytem mnoha vedlejších účinků – infekcí, kardiovaskulárních komplikací, nefrotoxicity a tumorů. Mezi nová nadějná nonnefrotoxická imunosupresiva patří fúzní protein belatacept. U ostatních nových molekul zatím probíhá klinické zkoušení [9].

Simulect je přípravek používaný k profylaxi akutní rejekce orgánu u allogenních transplantací ledvin de novo dospělých i pediatrických pacientů. Jeden ml roztoku

Simulect obsahuje 4 mg Basiliximabum. Basiliximab je rekombinantní lidská chimérická monoklonální protilátka proti α řetězci receptoru pro IL-2 (antigen CD25), který se vyskytuje na povrchu T-lymfocytů jako odpověď na antigenní podnět. Zabránění navázání IL-2 vede k znemožnění proliferace T-buněk u celulární imunitní odpovědi, a tedy zabránění odmítnutí allografu. Tvorba antigenu CD25 se obnovuje během 1–2 týdnů po vysazení léčby. Simulect se používá současně s cyklosporinem a s kortikosteroidy, které jsou určeny pro imunosupresi [10].

2.7 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je analytická metoda, díky které umožňuje v krátkém čase zanalyzovat velký soubor buněk. Tato metoda se časem stala nezastupitelnou technikou s širokým použitím při analýze tělních tekutin, mezi které řadíme hlavně periferní krev a kostní dřeň. Používá se taky při analýze in vitro kultivovaných buněčných linií. Mimo biomedicínu lze použít tuto metodu i pro analýzu buněk rostlin, semen, spor, bakterií či prvoků [11]. V dnešní době existují i moderní průtokové cytometry, které umožňují naměření hodnot a poté rozdělení buněk do populací pomocí sorteru (FACS).

2.7.1 Princip metody

Technické a softwarové řešení průtokového cytometru můžeme rozdělit na popis komponent, které zajišťují detekci a vyhodnocení fluorescenčně značených buněk, a na ty které zajišťují optickou detekci a vyhodnocení buněk bez využití fluorescence [11]. Dále můžeme dělit průtokový cytometr podle jeho komponentů na fluidiku, optiku, elektroniku a na interpretaci výsledků [12].

Touto metodou jsme schopni rozpoznávat buňky podle toho, jaké makromolekuly a makromolekulární komplexy obsahují na svém povrchu nebo intracelulárně. Nejznámějšími komplexy využívanými ke značení buněčných

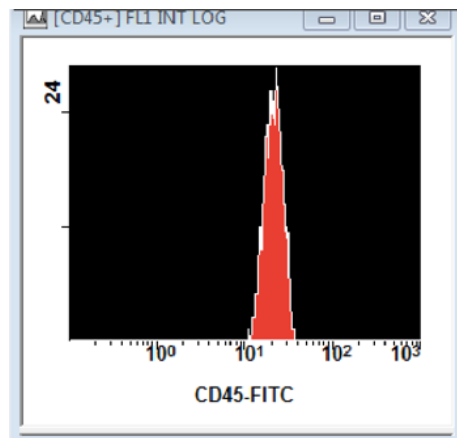
populací jsou CD znaky. Při setkání makromolekul nebo CD znaku s vyrobenou protilátkou dochází k silné vazbě. Vyrobené protilátky jsou označeny fluorescenční sondou a po jejich navázání na specifickou makromolekulu či CD znak můžeme pozorovat v místě navázání fluorescenční oblast. Toto fluorescenční značení není důležité jen pro techniky průtokové cytometrie, ale využívá se také v řadě klinických metod při fluorescenční mikroskopii.

Fluorescenční sondy používané v cytometrii musejí splňovat specifické požadavky. K specifickým požadavkům patří rozdílné excitační a emisní spektra, kvůli přesnému vyhodnocení buněčných populací.

2.7.2 Fluorescenční komponenty cytometru a tvorba histogramu

Cílem průtokové cytometrie je zjištění procentuálního zastoupení částic v analyzovaném roztoku. Nejčastěji jde o zastoupení leukocytárních populací, stejně jak je tomu v našem případě. Je známo, že leukocyty na svém povrchu exprimují molekuly CD. Pokud tedy leukocyty označíme specifickou protilátkou antiCD svázanou s fluorescenční značkou, buňky se jimi obalí a po průchodu v proudu kapaliny laserovým paprskem, které tvoří excitační světlo, budou na krátký okamžik fluoreskovat. Tento krátký světelný záblesk můžeme detekovat pomocí fotonásobiče nebo ultrarychlé světlosenzitivní diody [11]. V moderních cytometrech je takovýchto detektorů více, na každý z nich dopadá díky předřazenému filtru jen určitá světelná vlnová délka, určitá barva.

V okamžiku fluorescenčního záblesku se na jednom z detektorů objeví napěťový signál, který podle fluorescenčně značeného CD znaku signalizuje, o jakou buněčnou populaci se jedná [11].



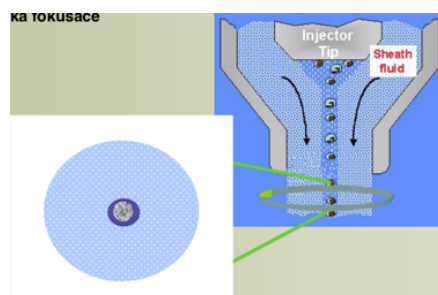
Obrázek 1 Příklad reálného histogramu z klinické praxe. Na horizontální ose nejsou zobrazovány absolutní hodnoty v mV, ale jen relativní jednotky. Histogram zobrazuje počet buněk analyzovaných průtokovým cytometrem. Obrázek jsem získala při provádění praktické části této práce.

Dnes jsou používány detektory fluorescenčního signálu, které jsou schopny nejen rozpoznat záblesk dané barvy, ale i kvantifikovat intenzitu záblesku. Intenzita fluorescenčního záblesku je přímo úměrná počtu komplexů antiCD navázaných na povrchu buňky, tudíž přímo úměrná počtům makromolekul CD na povrchu dané buňky. Podle počtu buněčných makromolekul pak při průchodu detekčním systémem čítač zaregistruje různé hodnoty, které budou postupně zobrazovány v jednotkách mV (milivolt) na výstupu fotonásobiče. Posloupnost hodnot může být vypsána buď tabulkou, nebo častěji ve formě histogramu. V praxi se na horizontální ose neznázornují hodnoty v mV, ale jen relativní jednotky. Příklad histogramu z klinické praxe je znázorněn na obrázku 1.

2.7.3 Hydrodynamická fokusace

Bez hydrodynamické fokusace by nebyla existence průtokového cytometru možná. Buňky k laseru musí putovat jednotlivě, v řadě za sebou, čehož jde dosáhnout protlačováním buněčné suspenze velmi malým otvorem neboli tryskou. Jednoduše jde o usměrnění částic proudem nosné kapaliny. Vzorek je nasáván

jehlou a vypuštěn do proudu kapaliny, kde se zaostří do velmi malého paprsku, tak, aby buňky procházeli jedna za druhou do místa měření.



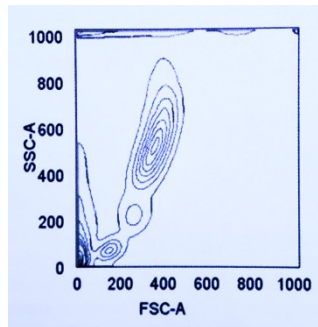
Obrázek 2 Hydrodynamická fokusace. Vzorek je injikován do průtokového cytometru. Leukocyty jsou zaostřeny do tenkého paprsku, aby putovala jedna za druhou, a každá zvlášť mohla být analyzována FS nebo SS laserem. Laser zaznamenává intenzitu a vlnovou délku fluorescenčního signálu [12].

2.7.4 Nefluorescenční optické komponenty cytometru – side scatter a forward scatter, princip vizualizace dat ve formě scatter-plotu

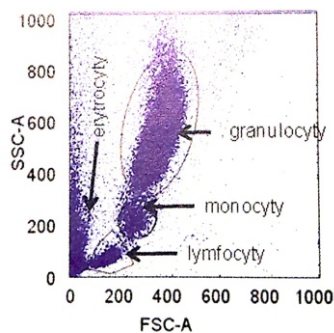
Buňky nemusíme rozlišovat jen podle jejich povrchových znaků, které značíme fluoreskujícími sondami. Cytometry jsou vybavovány tzv. FS a SS detektorem. FS je zkratkou pro forward scatter neboli detektor prošlého paprsku a SS je side scatter, detektor odraženého paprsku. FS a SS optický systém je nefluorescenční komponentou cytometru. Při vzniku a detekci FS a SS světelného záření dochází k několika typům absorpce a rozptylů světla různými částmi buňky [11].

Když světlo laseru dopadne na buňku, část paprsků projde, část se rozptýlí do všech prostorových úhlů a část se absorbuje. Na FS detektoru se stanovuje intenzita prošlého světla, která je úměrná velikosti buňky. Intenzita světla v prostorovém úhlu kolmém na původní směr laserového paprsku je detekována SS detektorem a je úměrná granularitě buňky. Hodnoty FS a SS scatteru načtené během měření se zaznamenávají na grafu, který je označován jako scatter plot. Graf typický pro buňky periferní krve je na obrázku 3 a 4. Na grafu se nám vytvoří množiny buněk, ze kterých můžeme vyčíst například velikost populace

granulocytů s vysokou hodnotou SS, a tudíž vysokou granularitou. Lymfocyty jsou méně granulární, a proto je hodnota SS nižší. Erytrocyty mají nejmenší velikost ze všech typů krevních buněk, mají tedy nízké FS [11].



Obrázek 3 Scatter plot znázornění pomocí vrstevnic. Graf leukocytární buněčné populace v periferní krvi pacienta, zaznamenávají na ose x se data naměřená FS detektorem. SS detektor zaznamenává data na ose y. Pomocí SS a FS detektoru se rozdělí buňky dle jejich velikosti a granularity. Buňky v grafu nejvýše a nejvíce napravo jsou ty s největší granularitou a největší velikostí [11].



Obrázek 4 Obdoba scatter plotu z obrázku 3. Každý fialový bod značí jednu buňku. Na ose x znázorněna data FS detektoru, dávající informaci o velikosti naměřeného počtu buněk. Osa y znázorňuje data SS scateru, vypovídající informaci o rozptylu světla o granula buňky. Čím je rozptyl větší, tím je buňka více granulární a leží více napravo. Jsou popsány a ohraničeny populace leukocytů. Nejpočetnější skupinu uloženou na grafu nejvýše tvoří granulocyty. Pod nimi jsou monocyty s menší velikostí a nejnižší leží lymfocyty. Erytrocyty tvoří nejméně granulární shluk buněk nalepených na osu y. V ideálním případě, by erytrocyty ve vzorku být vůbec neměly, aby nerušili výsledek analýzy leukocytů. V praxi se snažíme, aby jich bylo ve vzorku co nejméně, použitím lyzačních roztoků [11].

2.7.5 Kombinování fluorescenčního a nefluorescenčního modu cytometru v praxi, gating a cesta k multibarevné průtokové cytometrii

Většina laboratorních vyšetření a analýz používající cytometr nepotřebuje komplexnější charakteristiku buněčných subpopulací. Vystačí si s výsledky o počtu buněk určitého fenotypu ve směsi, rozložením četností buněk dle markeru, anebo s celkovou statistikou buněčného souboru rozděleného podle různých buněčných velikostí a granularity pomocí detekce SS a FS. Některá vyšetření vyžadují, aby byli buněčné subpopulace charakterizovány komplexněji podle různých parametrů, jako je velikost buňky, granularita či exprese povrchových molekul. Toho docílíme vygenerováním kvalitního scatter-plotu, kde je celkové složení buněčné směsi zobrazeno ve formě SS versus FS. V takovém grafu si můžeme ohraničit, tzv. „zogatovat“ studovanou subpopulaci.

Analyzátor můžeme dále rozdělit na tři části, mezi které patří fluidika, optika a elektronika.

- Fluidika – vzorek je injikován do proudu kapaliny, kde je zaostřen do velmi úzkého paprsku tak, aby do místa měření procházely buňky jednotlivě, jedna za druhou.
- Fotonásobiče – dynody (elektronové násobiče), jsou elektrody, které po dopadu elektronu emitují jejich větší množství. Na konci trubice fotonásobiče (zkratka PMT – photomultiplier tube) je umístěna sběrná anoda. Na dynodách jsou umístěny rezistory, které určují její citlivost.
- Detektory – Pomocí této metody dokážeme za krátký časový úsek analyzovat vzorek s velkým počtem buněk. Mezi vzorky měřené na tomto stroji patří krev, krevní dřeň, bronchoalveolární laváž, výpotky, likvory. Mezi nejčastěji diagnostikované vzorky přicházející do laboratoře patří plná krev.

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo sledovat pacienty v rané pooperační fázi po transplantaci ledviny. Zpracovávaný soubor obsahoval 54 pacientů. Každý měl odebráno několik zkumavek plné krve v čase před i několik měsíců po transplantaci. Důležité bylo hledání rozdílů v souboru pacientů s rejekcí a s dobrou dlouhotrvající funkcí štěpu.

Nejdůležitějším obdobím byl týden po transplantaci, kde jsem procentuální zastoupení NK buněk v periferní krvi studovala nejdůkladněji, jelikož jsem předpokládala největších výkyvů s normálními hladinami NK buněk.

Analyzovala jsem výsledky různých skupin pacientů a zjišťovala, zda mají výsledky statistickou hodnotu a bude možné s nimi pracovat v dalších studiích. Porovnávala jsem skupinu žen a mužů, a rozdělila pacienty podle věku a indukce podané před transplantací.

Všechny naměřené výsledky mi poskytlo pracoviště OKI IKEM. Výzkum probíhal od roku 2011 do roku 2013. Vyhodnocené výsledky pomohou s další prací týkající se NK buněk v IKEM.

Zabývala jsem se vyhodnocením dynamiky leukocytárních populací, zejména NK buněk. NK buňky jsou, spolu s cytotoxickými T lymfocyty, imunokompetentní buňky mající hlavní efektorovou funkci v imunitní reakci proti alotransplantátu.

Hledala jsem odpověď na otázku, zda jsou NK buněčné subpopulace spojeny s dobrým výsledkem štěpu, zda byly vyšší nebo nižší po transplantaci v porovnání před transplantací, a zda se jejich hladiny po transplantaci zvýšili v sledované periodě trvající jeden rok. Již je známo, že subpopulace CD56^{bright} je spojována s dobrou dlouhotrvající funkcí štěpu, zatímco CD56^{dim} je s poškozením a následným odhojením transplantované ledviny.

V bakalářské práci jsem se snažila odhalit informace prospěšné pro další výzkum v transplantační medicíně a imunologii. Případné výsledky, které se neprojevily jako signifikantní mohou pomoci vyloučit cesty v dalším výzkumu.

4 METODIKA

Data, která jsem statisticky zpracovávala mi byly poskytnuty laboratoří oddělení klinické imunologie IKEM. Jde o soubor 54 pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny. V souboru se nachází jak ženy, tak muži, přičemž ženy tvoří menší skupinu zahrnující 15 pacientek, mužů je 39.

4.1 Pracovní postup

Všechny naměřená data, která jsem zpracovávala mi poskytlo oddělení klinické imunologie IKEM. Při vlastních měřeních jsem pracovala na průtokovém cytometru (NAVIOS firmy Beckman Coulter) v laboratoři IKEM na oddělení klinické imunologie. Cytometr měl 3 barevné lasery, kterými dokázal vytvořit až 16 barevných kanálů.

4.1.1 Odběr a příjem materiálu

Pacient je nalačno odebrán z kubitální žíly do zkumavky s EDTA. Pro stanovení subpopulací lymfocytů můžeme použít i zkumavky s heparinem (koncentrace heparinu 20 jednotek na 1 ml krve) nebo citrátem. Nejčastěji se používají zkumavky s K₃EDTA s fialovým uzávěrem.

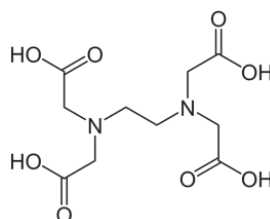
U dospělého pacienta je vhodné odebrat 3 ml periferní krve, dětsí pacienti mají minimální náběr 1,5 ml. Pro zjištění absolutního počtu buněk se zároveň odebere krev do krevní zkumavky s K₃EDTA na stanovení krevního obrazu a diferenciálního krevního rozpočtu.

Po odběru je nutné zkumavku s obsahem opatrně promíchat pomalým převrácením. Vzorky je nutné dostat do laboratoře co nejrychleji, nechladíme je, ani nezamrazujeme, uchováváme je vždy při pokojové teplotě. Chlazené vzorky by totiž mohly vykazovat nesprávné výsledky.

Z příjmu jsou vzorky nesrážlivé krve doručeny na oddělení imunologie do laboratoře s průtokovým cytometrem. Vyšetřovat je možné nejenom krev, ale i jiné tělesné tekutiny, jako například bronchoalveolární laváž a aspirát kostní dřeně.

4.1.2 Použitý materiál, přístroje a pomůcky

- Zkumavky EDTA jsou odběrové zkumavky s K3EDTA používány pro molekulárně biologické testy z plné krve. EDTA jako antikoagulační činidlo vyváže vápenaté ionty a tím blokuje koagulační kaskádu. EDTA je zkratka pro organickou sloučeninu kyselinu ethylendiamintetraoctovou.



Obrázek 5 Strukturální vzorec kyseliny ethylendiamintetraoctové. Používanějším termínem pro tuto chemickou látku je její zkratka EDTA. [13]

- stojánky na zkumavky;
- 2 automatické pipety od firma Eppendorf (2-20 µl a 20-200 µl);
- vibrační třepačka vortex – nastavená na velmi nízké otáčky, abychom nepoškodili buňky obsažené v testované krvi;
- hematologická třepačka;
- průtokový cytometr Cytomics FC 500, výrobce Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA.;

- nesterilní vyšetřovací rukavice;
- špičky k pipetám;
- testové zkumavky 12 x 75 mm;
- buničitá vata.

4.1.3 Použité reagensy:

- Monoklonální protilátky tetrachrome CD45/4/8/3 (kat. číslo 6607013) a tetrachrome CD45/56/19/3 (kat. číslo 6607073), výrobce Beckman Coulter, CD16-PE (kat. číslo A07766), výrobce Beckman Coulter;
- lyzační činidlo: OptilyseC® (kat. číslo A11895) od výrobce Beckman Coulter;
- unášecí roztok ISOFLOW SHEAT FLUID (kat. číslo 8547008), výrobce Beckman Coulter nebo Hemasol od výrobce Hemax diagnostika;
- cellWASH optimized PBS (kat. číslo 349524) od výrobce Beckman Coulter.

Doporučená životnost buněk ve vzorcích krve by měla být >90 %, u některých abnormálních vzorků však může být obtížné tyto hodnoty dosáhnout.

4.1.4 Postup přípravy vzorku na vyšetření lymfocytárních subpopulací s použitím základního panelu protilátek

Nejprve jsem si primární vzorek k práci připravila promícháním na hematologické třepačce (Sigma-Aldrich, USA). Vzorek je míchán až do chvíle, než se ním začne pracovat.



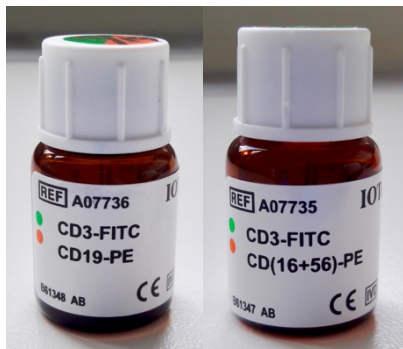
Obrázek 6 Hematologická třepačka firmy Sigma-Aldrich, USA. Vzorky se míchají od okamžiku příjmu vzorku laboratoří až do samotného začátku zpracování a přípravy vzorku na měření. Fotografii jsem pořídila během pracovního postupu zpracování vzorků praktické části bakalářské práce.

Mezitím jsem si označila testové zkumavky identifikačním číslem pacienta a používanými protilátkami. Na každého pacienta jsem připravila 2 zkumavky a další zkumavku na kontrolní přípravek pro kontrolu kvality plné krve (Immuno-Trol™ Control Cells) kvůli ověření správnosti a přesnosti jednotlivých stanovení. V cytometru jsou denně proměřovány částice Flowcheck pro kontrolu optických systémů a průtokového systému. Částice Flowcheck jsem neproměřovala.



Obrázek 7 Automatická pipeta firmy Eppendorf s nastaveným objemem 10 μ l. Při práci v laboratoři je nevyhnutelné celou dobu dbát na používání ochranných pomůcek, hlavně rukavic a ochranného oděvu. Fotografii jsem pořídila během pracovního postupu zpracování vzorků praktické části bakalářské práce.

Na dno zkumavek jsem přidala 10 μ l monoklonální protilátky, do kterých jsem následně napipetovala 100 μ l dobře promíchané nesražené krve pacienta.



Obrázek 8 Monoklonální protilátky IgG1 použité k inkubaci se vzorkem plné krve od firmy Beckman Coulter, Inc. Z lahviček bylo napipetováno 10 μ l na dno zkumavky a následně byl přidán vzorek krve pacienta. Protilátky jsou značeny fluorescenčním barvivem FITC a PE. Fotografii jsem pořídila během pracovního postupu zpracovávání vzorků praktické části bakalářské práce.



Obrázek 9 Automatická pipeta firmy Eppendorf s nastaveným objemem 100 μ l. Pipetou jsem přidala nastavený objem krve do zkumavky k fluorescenčnímu barvivu. Takto připravené vzorky se musí protřepat. Fotografii jsem pořídila během pracovního postupu zpracovávání vzorků praktické části bakalářské práce.

Zkumavky jsem velmi opatrně a krátce protřepala na třepačce vortex tak, aby se nepoškodily buňky. Takto připravené zkumavky jsem nechala inkubovat 20 min ve tmě při teplotě 18-24 °C (laboratorní teplota).



Obrázek 10 Třepačka vortex firmy VELP Scientifica používaná k promíchání vzorků. Nastavená byla na velmi nízké otáčky, aby nedošlo k poškození leukocytů. Po promíchání musí být vzorky inkubovány v temné komoře při laboratorní teplotě. Fotografie jsem pořídila během pracovního postupu zpracovávání vzorků praktické části bakalářské práce.

Po inkubaci jsem přidala 0,5 ml lyzačního roztoku Optilyse C, který obsahuje i fixační roztok a zkumavku jemně promíchala na třepačce opět při nízké rychlosti. Dále následovala inkubace 10 min ve tmě, která nepřekročila 12 minut.



Obrázek 11 Roztok na lýzu Optilyse C. Používá se k diagnostickému použití in vitro. Rortok distribuuje firma Beckman Coulter, Inc. pro IMMUNOTECH s kat. číslem A11895. Fotografie jsem pořídila během pracovního postupu zpracovávání vzorků praktické části bakalářské práce.

Po přidání 1 ml CellWASH (PBS s 0,1% azidem sodným), jsem opatrně protřepala a inkubovala v temné komoře při pokojové teplotě po dobu pěti minut.



Obrázek 12 Roztok CellWASH (optimized PBS), kat. číslo 349524, výrobce Beckman Coulter. Přidává se ke vzorku pro ukončení lyzace. Poté jsou vzorky připraveny k měření na průtokovém cytometru NAVIOS firmy Beckman Coulter. Fotografie jsem pořídila během pracovního postupu zpracovávání vzorků praktické části bakalářské práce.

Tím jsem dokončila přípravu vzorku k měření na průtokovém cytometru (Cytomics FC 500, výrobce Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA).

Zkumavky s připravenými vzorky jsem ihned proměřila na analyzátoru. V případě pozdějšího měření by se musely skladovat přikryté ve tmě při 2-8 °C, přičemž analýza by měla být provedena do 24 hodin od barvení vzorku. Abych předešla agragaci buněk, před měřením jsem zkumavky ještě jemně protřepala.

Pokud je potřeba vzorky promýt nebo analyzovat později, centrifugují se po dobu 5 minut při 300 g při laboratorní teplotě a následně se odstraní supernatant a resuspendujte se buněčný pelet v 0,5 ml PBS nebo v 1 ml PBS s 0,1% paraformaldehydem.

4.2 Zpracování naměřených dat

Získané výsledky jsou v relativních hodnotách, které se vydávají v procentech. Ty nám udávají, jaké zastoupení má daná lymfocytární subpopulace v měřeném materiálu. Data jsem zpracovávala pomocí statistických testů. Soubor pacientů jsem rozdělila podle rejekce, pohlaví, věku a podané indukční léčby.

4.2.1 Statistická analýza

Pro statistické vyhodnocování jsem použila program Prism 8 (GrafPed). Před použitím testu jsem musela určit, zda výběry mají normální rozdělení – normalitu. Pokud byla normalita pozitivní mohla jsem použít párový t-test.

Pokud výběry neměli normální rozdělení použila jsem neparametrický test. Wilcoxon test je párový neparametrický test. Ten jsem využívala při porovnávání výběrů, které se týkali stejných pacientů s náběrem v jiném časovém horizontu. Mann-Whitney neparametrický test slouží pro testování nepárových výběrů.

Hladinu významnosti jsem nastavila na 0,05 pro všechny statistické testy. P-hodnoty menší než 0,05 byly považovány za významné. V programu Prism 8 byl výsledek signifikantně znázorněn počtem hvězdiček podle statistické významnosti. Nejvýznamnější výsledek mohl vyjít s maximálním počtem čtyř hvězdiček.

Z celé lymfocytární populace jsem se zaměřovala pouze na NK buňky, u kterých jsem porovnávala hladiny NK buněk při prvním náběru před transplantací s náběry po transplantaci. Sledovala jsem dynamiku změn

5 VÝSLEDKY

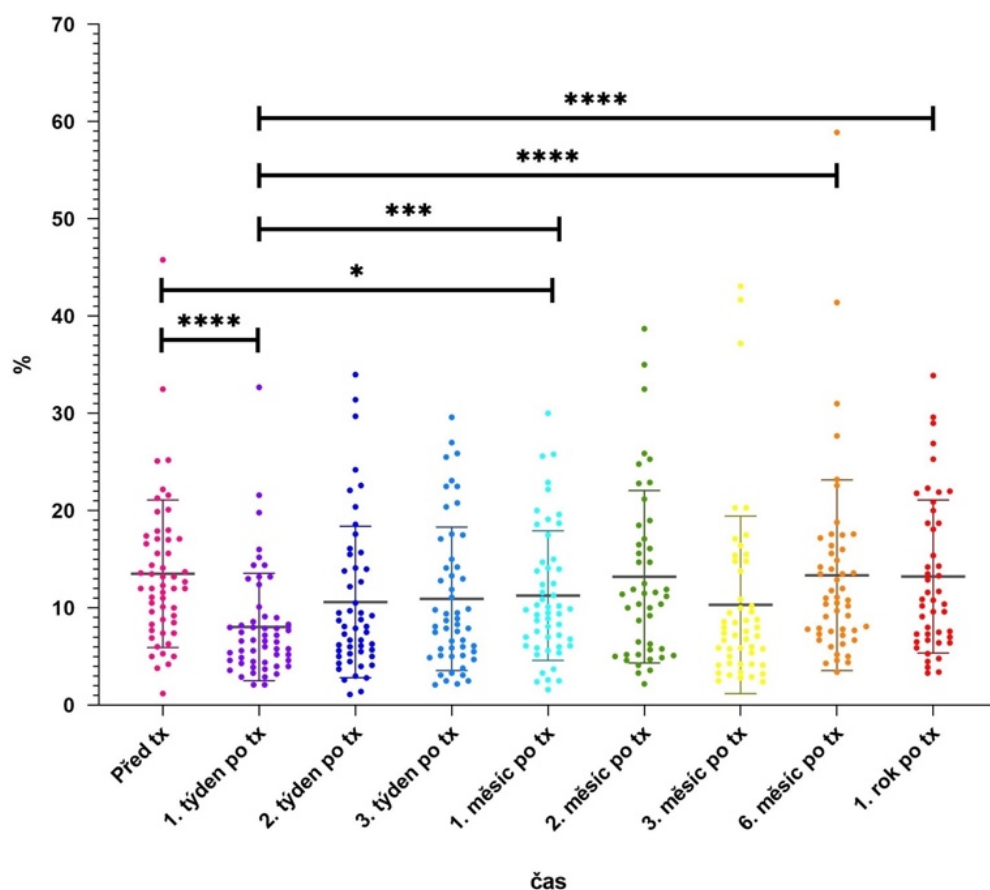
Sledovala jsem skupinu 54 pacientů, kterou jsem statisticky zpracovávala podle jejich přijetí ledvinného štěpu po transplantaci. Dále podle věku, pohlaví a indukce.

5.1 Analýza dat pacientů před a po transplantaci

Nejprve jsem mezi sebou porovnávala procentuální zastoupení NK buněk všech 54 pacientů v čase (viz obrázek 13). Při použití Wilcoxon párového testu pro náběr před a týden po transplantaci vyšel na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky signifikantní. P-hodnota byla menší než 0,0001. Výsledek vyšel významný na 4 hvězdičky.

Analýza Wilcoxon testem mezi 1 týdnem po a 1 měsícem po transplantaci vyšla signifikantní s p-hodnotou 0,0004. Výsledek je na hladině významnosti signifikantní. Test vyšel na 3 hvězdičky. Při Analýze Wilcoxon testem 1 týdne a 6 měsíce po transplantaci hodnoty vyšli na hladině významnosti signifikantní s p-hodnotou menší než 0,0001. Test vyšel na 4 hvězdičky.

Když jsem první měsíc po transplantaci analyzovala data s hladinami NK buněk krve nabrané před transplantací Wilcoxon testem, výsledky vyšli ještě signifikantní, ale jen na 1 hvězdičku. P-hodnota u analýzy byla 0,0102. Při analýze dat z prvního náběru před transplantací a náběrů starších, než měsíc již výsledky nebyly signifikantní a p-hodnoty vyšly vyšší než nastavená hladina významnosti.



Obrázek 13 Procentuální zastoupení NK buněk u pacientů před a po transplantaci v různém časovém období. Na ose y jsou znázorněny data vztahující se k procentuálnímu zastoupení NK buněk v periferní krvi pacientů. Osa x obsahuje jednotlivé náběry vztažené k časovému průběhu. Statistickým porovnáním krevního náběru před a po transplantaci vyšli výsledky signifikantní na 4 hvězdičky, mají velkou statistickou hodnotu. Po statistické analýze dat před transplantací a starších, než jeden měsíc po transplantaci nebyly výsledky signifikantní, z čehož vyplývá, že se procentuální hladiny NK buněk vrátily do normálních hodnot před transplantací. Ne v každém časovém úseku byl proveden náběr u každého pacienta, v celkovém statistickém hodnocení to má pomíjivý význam.

Použité zkratky:

Před tx: První náběr plné krve 54 pacientů před transplantací, analyzované na průtokovém cytometru.

1. týden po tx: Druhý náběr plné krve souboru pacientů jeden týden po transplantaci.

2. týden po tx: Třetí náběr plné krve souboru pacientů 2 týdny po transplantaci.

3. týden po tx: Čtvrtý náběr plné krve souboru pacientů 3 týdny po transplantaci.

1. měsíc po tx: Pátý náběr plné krve souboru pacientů 1 měsíc po transplantaci.

2. měsíc po tx: Šestý náběr plné krve souboru pacientů 2 měsíce po transplantaci.

3. měsíc po tx: Sedmý náběr plné krve souboru pacientů 3 měsíce po transplantaci.

6. měsíc po tx: Osmý náběr plné krve souboru pacientů půl roku po transplantaci.

1 rok po tx: Devátý náběr plné krve souboru pacientů jeden rok po transplantaci.

5.2 Analýza dat souboru pacientů rozdělených podle pohlaví, věku a podané indukce

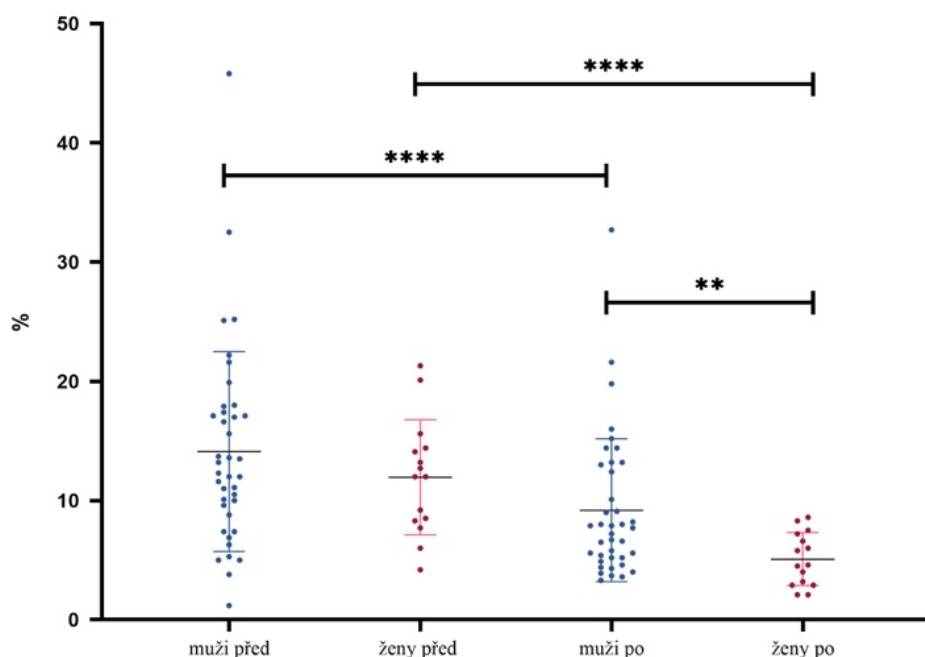
Celý soubor pacientů jsem dále analyzovala podle tří skupin, do kterých jsem je rozdělila podle pohlaví, věku a podané indukce před transplantací ledviny. Vzniklá pozorování jsem znázornila graficky a popsala statistickými parametry.

5.2.1 Rozdíly mezi procentuálním zastoupením NK buněk u mužů a žen

Mann-Whitney testem jsem analyzovala získaná data žen a mužů před transplantací. U této analýzy byla p-hodnota 0,5247, což podle nastavené hladiny významnosti není statisticky významné.

Při další analýze dat testem Mann-Whitney, jsem porovnála ženy a muže jeden týden po transplantaci. P-hodnota vyšla 0,006 což jsem mohla považovala za signifikantní a souhrnně vyšla analýza na 2 hvězdičky.

Další analýzou jsem porovnála data mužů před a 1 týden po transplantaci. Toto statistické hodnocení vyšlo na 4 hvězdičky, stejně jako u žen.



Obrázek 14 Procentuální zastoupení NK buněk u pacientů před a po transplantaci v různém časovém období. Na ose y jsou znázorněny data vztahující se k procentuálnímu zastoupení NK buněk v periferní krvi pacientů.

Osa x obsahuje náběry souboru mužů a žen vztahované k časovému průběhu před a jeden týden po transplantaci. Z grafu můžeme pozorovat procentuální zastoupení NK buněk po transplantaci mezi skupinou mužů a žen, které je signifikantní na 2 hvězdičky. Soubor žen obsahoval 15 pacientek. Soubor mužů 39 pacientů.

Použité zkratky:

muži před: Soubor pacientů mužského pohlaví před transplantací.

muži po: Soubor pacientů mužského pohlaví 1 týden po transplantaci.

ženy před: Soubor pacientů ženského pohlaví před transplantací.

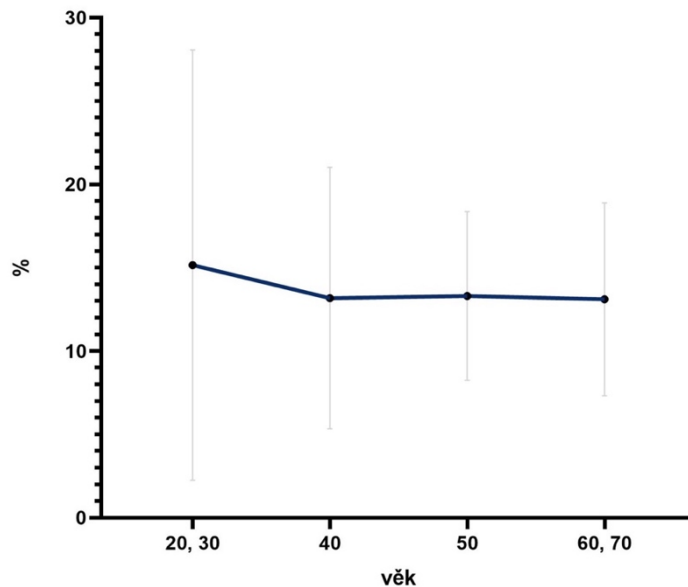
ženy po: Soubor pacientů ženského pohlaví 1 týden po transplantaci.

5.2.2 Rozdíly mezi procentuálním zastoupením NK buněk u skupin pacientů rozdělených podle věku

U věkových skupin pacientů jsem analyzovala data rozdělená na věk 20-39 let a pacienty 60-79 let. Pomocí t-testu výsledky nevyšli signifikantní na hladině významnosti 0,05. Stejně tomu bylo v případě Mann-Whitney testu pro skupinu pacientů ve věku 20-49 let a 50-79 let. Z toho vyplynulo, že na hladině významnosti

výsledku nejsou signifikantní. Pacienty jsem rozdělila do věkových skupin tak, aby v každé byl přibližně stejný počet pacientů.

Obrázek 16 znázorňuje graf průměrných procentuální hodnot NK buněk pacientů v závislosti na věku po transplantaci. Je z něj patrné, že se stoupajícím věkem pacientů má hladina NK buněk tendenci růstu. Graf na obrázku 15 ukazuje, že pacienti různého věku mají před transplantací stejné procentuální zastoupení NK buněk v periferní krvi.



Obrázek 15 Procentuální zastoupení NK buněk u pacientů před transplantací. Na ose y jsou znázorněny data vztahující se k procentuálnímu zastoupení NK buněk v periferní krvi pacientů. Osa x obsahuje skupiny pacientů rozdělených podle věku. Statistické testy porovnávající věkové skupiny pacientů nevyšly signifikantní, nemají statistickou hodnotu. Procentuální zastoupení NK buněk před transplantací nezávisí na věku.

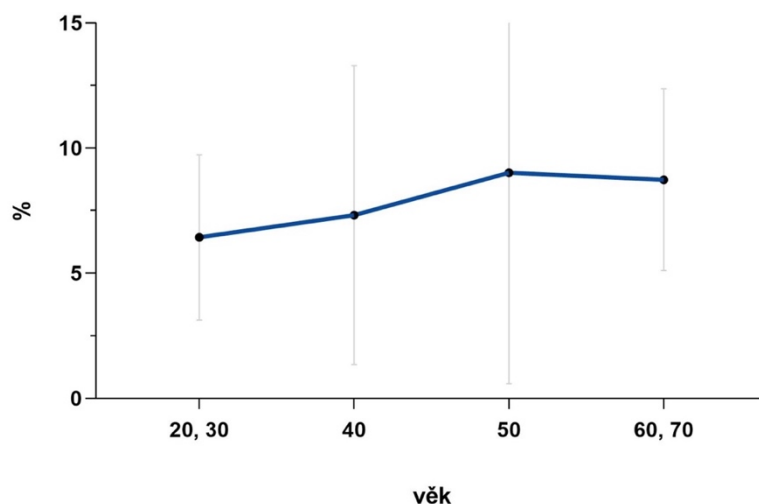
Použité zkratky:

20, 30: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 20-39 let (9 pacientů).

40: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 40-49 let (14 pacientů).

50: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 50-59 let (12 pacientů).

60, 70: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 60-79 let (19 pacientů).



Obrázek 16 Procentuální zastoupení NK buněk u pacientů po transplantaci ledviny. Na ose y jsou znázorněny data vztahující se k procentuálnímu zastoupení NK buněk v periferní krvi pacientů. Osa x obsahuje skupiny pacientů rozdělených podle věku. Statistické testy porovnávající věkové skupiny pacientů nevyšly signifikantní, ale pokud se podíváme na grafické znázornění můžeme usuzovat, že se zvyšujícím se věkem má procentuální zastoupení NK buněk po transplantaci rostoucí tendenci.

Použité zkratky:

20, 30: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 20-39 let (9 pacientů).

40: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 40-49 let (14 pacientů).

50: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 50-59 let (12 pacientů).

60, 70: Soubor pacientů ve věkovém rozmezí 60-79 let (19 pacientů).

5.2.3 Znázornění časového průběhu procentuálního zastoupení NK buněk u různých skupin pacientů

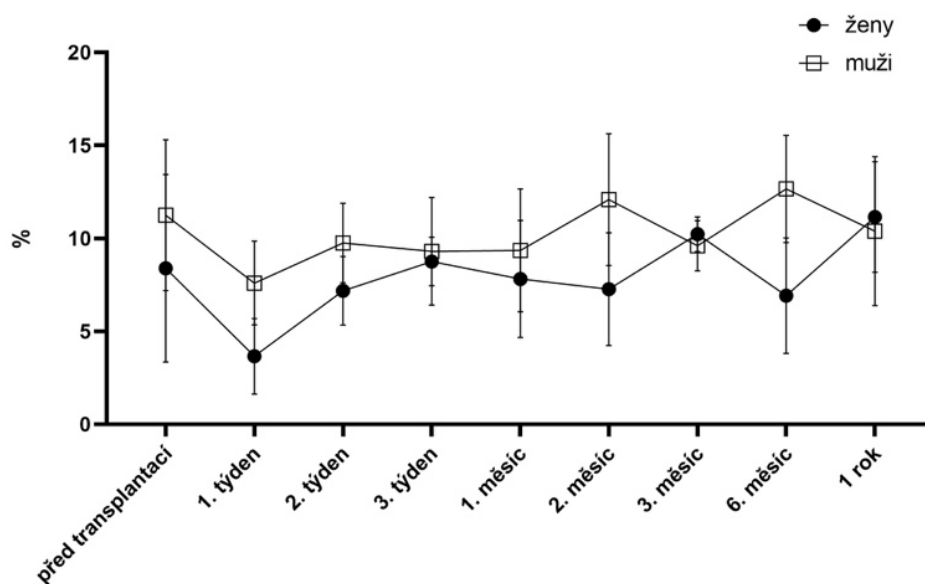
Na obrázku 17, 18 a 19 pozorujeme celkový vývoj procentuálního zastoupení NK buněk v periferní krvi v závislosti na čase před a po transplantaci. Po statistickém zpracování jsem zjistila, že analyzovaná data nebyla signifikantní na hladině významnosti a nemají tak statistický význam. Nicméně z grafů je dobře čitelné, jaký průběh měli hladiny NK buněk v čase po transplantaci.

Obrázek 17 porovnává pacienty podle pohlaví. Každý bod v grafu značí průměrnou hodnotu procentuálního zastoupení NK buněk všech pacientů

v určitém čase. K průměrné hodnotě jsou přiřazeny i její směrodatné odchylky. Z grafu je patrné, že ženy mají před transplantací nižší hodnoty NK buněk v periferní krvi. Nižší hladiny NK v porovnání s opačným pohlavím, provázejí ženy po celou dobu po transplantaci. Teprve po roce jsou procentuální zastoupení obou pohlaví stejná. I přes to, že mají muži vyšší hladiny NK buněk v periferní krvi, rejekci mělo 41,0 % mužů ze souboru. V souboru žen bylo rejekovaných pouhých 13,3 %.

Na obrázku 18 porovnávám pacienty, kteří před transplantací dostali dávku léku simulect a ti, kteří byli bez indukční léčby. Na tomto grafu jsem nepozorovala žádné rozdíly mezi pacienty, kteří měli různou léčbou před transplantací. Dokonce i rejekce se projevila u obou skupin ve stejném množství. Pacienti indukovaní Simulectem postihla rejekce v 34,2 % případů. Pacienti bez indukce prodělali odmítnutí štěpu v 31,3 %.

Obrázek 19 znázorňuje celkový časový průběh procentuálního zastoupení NK buněk u pacientů s prodělanou rejekcí a s dobrým přijetím štěpu. Zde nebylo možné vidět rozdíly mezi skupinami statisticky ani graficky. Můžeme ale vidět, že po 2 měsících se hladiny NK buněk vrátily na stejnou úroveň jako před transplantací. Rejekovaných pacientů z celkového souboru 54 pacientů bylo 18, což tvoří 33,3 %.



Obrázek 17 Časový průběh procentuálního zastoupení NK buněk u souboru žen a mužů. Ženy mají průměrně nižší hladiny NK buněk v periferní krvi. Muži mají vyšší podíl rejekcí i přes vyšší procentuální zastoupení NK buněk.

Použité zkratky:

před transplantací: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů prvního náběru před transplantací.

1. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů druhého náběru jeden týden po transplantaci.

2. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů třetího náběru druhý týden po transplantaci.

3. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů čtvrtého náběru třetí týden po transplantaci.

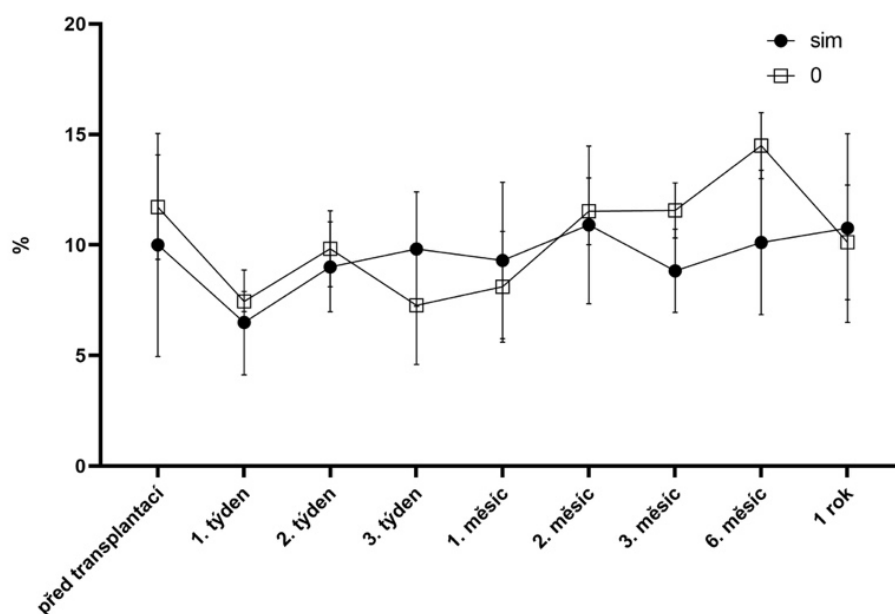
1. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů pátého náběru jeden měsíc po transplantaci.

2. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů šestého náběru dva měsíce po transplantaci.

3. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů sedmého náběru čtvrt roku po transplantaci.

6. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů osmého náběru půl roku po transplantaci.

1 rok: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů devátého náběru rok po transplantaci.



Obrázek 18 Časový průběh procentuálního zastoupení NK buněk u souboru pacientů léčených před transplantací Simulectem a pacientů bez léčby. Hladiny NK buněk v periferní krvi jsou u obou skupin v prvním týdnu po transplantaci téměř stejné. Rejekci orgánů prodělalo v obou skupinách stejné procentuální množství pacientů.

Použité zkratky:

před transplantací: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů prvního náběru před transplantací.

1. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů druhého náběru jeden týden po transplantaci.

2. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů třetího náběru druhý týden po transplantaci.

3. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů čtvrtého náběru třetí týden po transplantaci.

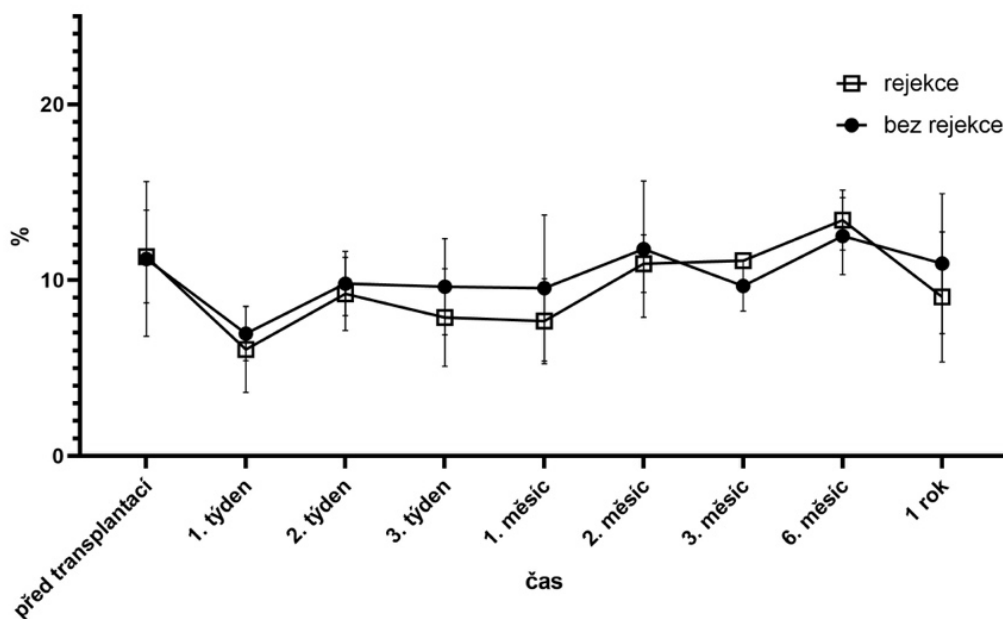
1. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů pátého náběru jeden měsíc po transplantaci.

2. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů šestého náběru dva měsíce po transplantaci.

3. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů sedmého náběru čtvrt roku po transplantaci.

6. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů osmého náběru půl roku po transplantaci.

1 rok: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů devátého náběru rok po transplantaci.



Obrázek 19 Časový průběh procentuálního zastoupení NK buněk u souboru pacientů rozdělených podle prodělané rejekce.

Použité zkratky:

před transplantací: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů prvního náběru před transplantací.

1. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů druhého náběru jeden týden po transplantaci.

2. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů třetího náběru druhý týden po transplantaci.

3. týden: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů čtvrtého náběru třetí týden po transplantaci.

1. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů pátého náběru jeden měsíc po transplantaci.

2. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů šestého náběru dva měsíce po transplantaci.

3. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů sedmého náběru čtvrt roku po transplantaci.

6. měsíc: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů osmého náběru půl roku po transplantaci.

1 rok: Průměrná hodnota procentuálního zastoupení NK buněk pacientů devátého náběru rok po transplantaci.

6 DISKUZE

V praktické části jsem pozorovala pomocí statistických analýz a grafů, že k nejsilnějšímu poklesu NK buněk dochází zejména v prvním týdnu po transplantaci ledviny. Výsledky byly v programu Prism 8 statisticky významné na 4 hvězdičky. U všech statistických analýz byla nastavena hladina významnosti $\alpha = 0,05$.

Zjistila jsem, že NK buňky mají tendenci po transplantaci růst, až na totožné procentuální zastoupení jako před transplantací. Již po druhém měsíci nejsou data signifikantní v porovnání s hladinami NK před transplantací. V analýze období jednoho měsíce po transplantaci a před transplantací byl vliv jedné veličiny na druhou podle Wilcoxon testu významný. P-hodnota byla 0,0102. Usuzuji z toho, že první čtyři týdny po transplantaci jsou NK buňky výrazně sníženy. Po osmi týdnech NK buňky mají již normální hodnoty.

Mann-Whitney testem analyzovaná data žen a mužů u transplantace ledviny nebyly před operací signifikantní. Analýza dat týden po alotransplantaci Mann-Whitney testem byla s p-hodnoto 0,006 a s dvěma hvězdičkami. Vyšlo najevo, že ženy měly nižší hodnoty NK buněk. U žen proběhlo taky menší procento rejekcí než u mužů. Je tedy možné, že snížené počty NK buněk mají vliv na dobrou dlouhodobou funkci ledvinného transplantátu. Z toho vyplývá, že ženy by mohly být méně rizikovou skupinou.

Z článku Ahmada Al-Attara [5] vyplývá, že rozdílné pohlaví nebo věk by mohlo mít vliv na subpopulace. Studie probíhala u zdravých mužů a žen starších 70 let. Starší ženy měly významně více cirkulujících B lymfocytů než muži, zatímco muži měli více CD4 centrálních paměťových T buněk a vyšší hladiny monocytů. Ženy měly vyšší poměr nezralých NK buněk buněk CD56 k zralým NK buňkám

CD56^{dim}. To ukazuje na rozdíl mezi pohlavími v maturaci NK buněk u starších pacientů.

Porovnáním pohlaví byly u mužských zralých NK buněk prokázány silnější cytotoxické reakce. Tato data ukazují, že pohlaví ovlivňuje aktivitu NK buněk u starších lidí. Muži a ženy se liší v několika aspektech fyziologie, včetně imunitních odpovědí. Rozdíly v imunitních buňkách a imunitní odpovědi mohou být spojeny s hladinami estrogenů, progesteronu a testosteronu, geny vázanými s X, socioekonomickými faktory a dalšími rozdíly [5].

Bylo obtížné určit, zda dochází ke změnám dynamiky jen vzhledem k věku, protože po rozdělení pacientů do skupin nevznikly skupiny o stejných počtech vzorků a statistické výběry byli příliš malé. Jediné, co bylo pozorovatelné byl pokles NK buněk v prvním týdnu po transplantaci. Z grafického znázornění procentuálního zastoupení NK buněk u pacientů týden po transplantaci ledviny v závislosti na věku by se dalo předpokládat, že s rostoucím věkem mají NK buňky tendenci růst.

Indukční léčba Simulectem z hlediska statistiky nebyla významná. U skupiny pacientů s indukční léčbou a bez indukční léčby nebyl rozdíl v množství vzniklých rejekcí. Dynamika průběhu počtu NK buněk se v čase po transplantaci po roce ustálila na stejném množství jako před transplantací.

Z publikace Li Zhuna [14] je patrné, že existují subpopulace NK, které mají zásadní vliv na funkci transplantované ledviny. Cytotoxická subpopulace CD56^{dim} působí na štěp negativně, a indukuje jeho odhojení. Zatímco subpopulace s povrchovým znakem CD56^{bright} přispívá k vyvolání tolerance alotransplantátu. NK buňky jsou rozděleny na subpopulace na základě relativní exprese nízkoafinitního FcyR CD16 a adhezní molekuly CD56. Podle Tatiany Michel [15],

populace CD56^{dim}CD16^{bright} je převažující v periferní krvi, zatímco NK buňky ze sekundární lymfoidní tkáně a jiných tkání jsou primárně CD56^{bright}.

Na základě těchto informací by pro prozkoumání funkce NK buněk při transplantaci ledviny bylo vhodné rozlišit tyto dvě subpopulace. Prvotním úmyslem praktické části bakalářské práce bylo zakomponovat techniku, která by tyto subpopulace rozlišila. Chceme-li subpopulace rozlišit je potřeba znak CD56 a CD16 barvit dostatečně odlišnými fluorescenčně značenými protilátkami. Při zpracování praktické části práce byla vybrána nesprávná fluorescenční značka pro CD16, a tím jsme znemožnili dostatečnému odlišení NK buněčných subpopulací.

Li Zhuna použil 8 fluorescenčních barev a došel k závěru, že pacienti s odmítnutím štěpu měli snížené imunoregulační a zvýšené cytotoxické NK buňky. Velikost vzorků studie byla malá a do budoucna doporučil provést větší studii s větším počtem pacientů, která by potvrdila jeho data.

Pro zlepšení kvality výsledků této bakalářské práce a pro budoucí studie by bylo přínosné provést lepší techniku barvení NK buněk. Do budoucna navrhuji použití monoklonálních protilátek tetrachrome CD45/4/8/3 a tetrachrome CD45/56/19/3 od výrobce Beckman Coulter. K druhému tetrachrom mixu bylo přidáno CD16-PE výrobce Beckman Coulter, ve stejné barvě jako CD56. Znemožnilo to zkoumat výsledky na úrovni NK buněčných subpopulací.

Pokud by barvení bylo provedeno správně mohla bych s jistotou určit jaké subpopulace se ve větším množství vyskytují v procentuálním zastoupení NK buněk po transplantaci. Z výsledků práce vyplívá, že se počty NK buněk po čase snižují. Nicméně by bylo vhodné vědět jaké subpopulace se vyskytují s vyšším procentuálním zastoupením. Tím by se dalo určit, která ze subpopulací by mohla mít funkci štěp odhoyit a která působit na fungování ledviny příznivě.

Při transplantaci tělesných orgánů bylo prokázáno, že NK buňky mohou ovlivňovat a možná regulovat adaptivní imunitní odpověď během rejekce štěpu i při léčbě. [14] V z mých výsledků není jasně definováno ovlivnění NK buněk léčivý a vliv na přežití štěpu.

V praktické části jsem pracovala s průtokovým cytometrem NAVIOS společnosti Beckman Coulter. Přístroj jsem si vybrala, jelikož je to v dnešní době je to jediná, kvalitní a rychlá cesta jak imunofenotypizovat subpopulace leukocytů. Přístroje průtokových cytometrů se používají po celé ČR a mají své nenahraditelné zastoupení v klinických i výzkumných laboratořích. Nejdůležitějším obdobím je týden po transplantaci, kde jsem viděla největší změny hladin NK buněk. V prvních dnech po operaci bylo vidět, zda pacient ledvinu přijímá, nebo zda musí nastoupit léčba.

Existuje stále více důkazů, že NK buňky mohou regulovat imunitní odpovědi závislé na T buňkách a existují informace, které dokazují, že NK buňky přispívají k indukci tolerance aloštěpu. NK-buňky s nižší cytotoxicitou a imunoregulační funkcí mohou přispět k dobrému dlouhodobému výsledku štěpu, zatímco cirkulující NK-buňky s normální nebo dokonce zvýšenou cytotoxicitou a nižší imunoregulační kapacitou jsou pozorovány u pacientů s ledvinným alotransplantátem [16].

7 ZÁVĚR

Sledováním pacientů v rané pooperační fázi po transplantaci ledviny, jsem zjistila, že procentuální zastoupení NK buněk se výrazně snížilo v prvním týdnu po transplantaci. NK buňky zůstaly snižené až do druhého měsíce, kdy došlo k postupnému návratu k původním hodnotám statisticky srovnatelným s hladinami před transplantací.

Soubor pacientů jsem si rozdělila podle pohlaví, kdy po jednom týdnu po transplantaci měla skupina žen signifikantně nižší procentuální zastoupení NK buněk v periferní krvi oproti mužům. Prokázala jsem, že přibližně 13 % žen prodělalo rejekci ledvinného transplantátu. V mém souboru pacientů trpí rejekcí až 41 % mužů. Usuzuji, že snížené hladiny NK buněk v rané fázi po transplantaci, mají pozitivní vliv na dobré přežití štěpu.

Při zpracování dat rozdělených podle věku, jsem nedošla k velmi přesným výsledkům. Byla by potřeba většího počtu pacientů. Ani při zkoumání skupin rozdělených dle indukční léčby před transplantací, nemám statisticky významné výsledky. Pacienti léčení před transplantací Simulectem měli stejné četnosti rejekcí jako pacienti bez indukce.

Moje práce přináší další pohled na vlastnosti NK buněk po alotransplantaci. Do budoucna by bylo vhodné zvětšit zkoumaný počet pacientů a získaná data potvrdit. Nicméně jsem v práci použila výběr 54 pacientů, což je více než jsem se dočetla z většiny dosud dostupných výsledků jiných laboratoří.

Dále je vhodné změnit metodu barvení při analýze NK buněčných povrchových markerů. Bez toho nelze dospět k cíli studovat NK buněčné subpopulace CD56^{dim} a CD56^{bright}, lišící se svými cytotoxickými a imunoregulačními vlastnostmi.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADCC – angl. zkr. antibody dependent cellular cytotoxicity. Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách;

FcIII – CD16, také známý jako FcyRIII, je molekula nacházející se na povrchu buněk NK buněk;

APC – antigen presenting cells; buňky prezentující antigen;

MHC glykoproteiny – *major* histocompatibility complex; hlavní komplex tkáňové slučitelnosti;

HLA antigeny – human leukocyte antigens; systém antigenů vyskytující se na buňkách lidského organismu;

TNF- α – *cytokin* z rodiny *TNF*. Je uvolňován z řady buněčných typů, zejména pak aktivovanými makrofágy. Patří mezi reaktanty akutní fáze.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] V. Hořejší, Základy imunologie, 6. aktualiz. vyd. editor, Praha: Stanislav Juhaňák - TRITON, 2017.
- [2] STŘÍŽ, Ilja a Vladimír HOLÁŇ, Cytokiny v klinické medicíně, Praha: Maxdorf, [2015]. Jessenius.
- [3] 3.0 Česká republika (CC BY 3.0 CZ), Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Lysozym>. ISSN 1804-6517, 2011.
- [4] 3.0 Unported (CC BY-SA 3.0), NK T-lymfocyt. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/NK_T-lymfocyt, 2016.
- [5] Ahmad Al-Attara, Steven R. Presnella, Charlotte A. Petersonb, D.Travis Thomasc, Charles T. Lutz., The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men, *Mechanisms of Ageing and Development*, 2016, p. 25.
- [6] Tatiana Michel, Aurélie Poli, Angelica Cuapio, Benjamin Briquemont, Gilles Iserentant, Markus Ollert and Jacques Zimmer, Human CD56bright NK Cells: An Update, *The Journal of Immunology*, 2016.
- [7] CHAPEL, Helen, Mansel HAENEY, Siraj A. MISBAH a Neil SNOWDEN, Základy klinické imunologie, 6. vydání editor, Praha: Triton, 2018.
- [8] VIKLICKÝ, Ondřej, Libor JANOUŠEK a Peter BALÁŽ, Transplantace ledviny v klinické praxi, 1. vydání editor, Praha: Grada Publishing, 2008, p. 173.
- [9] Ondřej Viklický, Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2010/02/09.pdf>, Praha: Klinická farmakologie a farmacie, 2010, p. 98.
- [10] NOVARTIS s.r.o., Souhrn údajů o přípravku, Dostupné z: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2005/200507089937/anx_9937_cs.pdf, 2008.
- [11] J. Skopalík, R. Héžová a T. Loja, „Průtoková cytometrie a příbuzné techniky,“ v *Molekulární medicína*, Praha, Galén, 2015.
- [12] Vladan Bernard. Biofyzikální ústav Lf, MU, Průtoková cytometrie flow-

-] cytometire. Dostupné z:
http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf.
- [13 Saphz Hons. Biomedical Biology, Ethylenediaminetetraacetic acid. Dostupné z:
] <https://en.wikipedia.org/wiki/EDTA?oldid=315380949>, 2009.
- [14 Li Zhua, Mostafa Alya, Haihao Wangd, Hristos Karakizlise, Rolf Weimere,
] Changes of NK cell subsets with time post-transplant in peripheral blood of T renal transplant recipients, *Transplant Immunology*, 2018, pp. 62-68.
- [15 Tatiana Michel, Aurélie Poli, Angelica Cuapio, Benjamin Briquemont, Gilles
] Iserentant, Markus Ollert and Jacques Zimmer, Human CD56bright NK Cells: An Update, *J Immunol*, 2016;, pp. 2923-2928.
- [16 Li Zhu, Mostafa Aly, Haihao Wang, Hristos Karakizlis, Rolf Weimer, Christian
] Morath., Decreased NK cell immunity in kidney transplant recipients late post-transplant and increased NK-cell immunity in patients with recurrent miscarriage, Golo Ahlenstiel, University of Sydney, AUSTRALIA , 2017.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Příklad reálného histogramu z klinické praxe	26
Obrázek 2 Hydrodynamická fokusace.....	27
Obrázek 3: Scatter plot znázornění pomocí vrstevnic	28
Obrázek 4: Obdoba scatter plotu z obrázku 3.....	28
Obrázek 5: Strukturální vzorec kyseliny ethylendiamintetraoctové	33
Obrázek 6: Hematologická třepačka	35
Obrázek 7: Automatická pipeta	35
Obrázek 8 Monoklonální protilátky	36
Obrázek 9 Automatická pipeta.....	36
Obrázek 10 Třepačka vortex	37
Obrázek 11 Optilyse C	37
Obrázek 12 CellWASH	38
Obrázek 13 Graf	41
Obrázek 14 Graf	43
Obrázek 15 Graf	44
Obrázek 16 Graf	45
Obrázek 17 Graf	47
Obrázek 18 Graf	48
Obrázek 19 Graf	49

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

12 SEZNAM PŘÍLOH