

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

APLIKACE PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V TRANSFÚZNÍ
HEMATOLOGII

Dana-Victoria Vásquezová

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Dana-Victoria Vásquezová**
Osobní číslo: **C12304**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Aplikace průtokové cytometrie v transfúzní hematologii**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na průtokovou cytometrii - instrumentace, zdroje světla, fluidní systém, detekční systém. Seznamte se s novinkami v metodice.
2. Zaměřte se na aktuální použití průtokové cytometrie v diagnostiku v hematologii (nádorové, nenádorové) a v transfúzní hematologii. Srovnajte její roli s jinými diagnostickými přístupy.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Původní zdroje z webových databází <http://isiknowledge.com/>,
<http://www.pubmed.gov>, <http://www.sciencedirect.com/> ne starší 10 let.
Laboratorní encyklopedie SEKK (<http://www.enclabmed.cz/>).**


Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **12. prosince 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. července 2015**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2015

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Dana-Victoria Vásquezová

PODĚKOVÁNÍ:

Velké poděkování patří vedoucí bakalářské práce Mgr. Marcele Slovákové, PhD. za trpělivé vedení, cenné rady, podněty, připomínky a ochotu při konzultacích.

ANOTACE

Práce je zaměřena na průtokovou cytometrii a zejména její aplikaci v hematologii, transfuzním lékařství a transplantologii. Obsahuje stručné vysvětlení jejího principu metody společně popisem částí přístroje a způsobů použitých k diagnostice různých typů hematologických onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

průtoková cytometrie, nenádorová diagnostika, tranfuzní lékařství, transplantační hematologie

TITLE

Flow Cytometry in Transfusion Hematology

ANNOTATION

This thesis is focused on flow cytometry and especially its application in hematology, transfusion medicine and transplantology. It contains a brief explanation of its method principle together with a description of the device parts and methods used to diagnose various types of haematological diseases.

KEYWORDS

flow cytometry, non-oncology hematology, tranfuzion medicine, transplantation hematology

OBSAH

Úvod.....	11
1. Princip průtokové cytometrie	12
1.1. Obecný úvod	12
1.2. Historie použití průtokové cytometrie v hematologii.....	12
1.3. Jednotlivé komponenty průtokového cytometru	15
1.3.1. Fluidní systém.....	15
1.3.2. Optický a detekční systém.....	16
1.3.3. Elektronika	17
1.4. Parametry měření.....	17
1.4.1. Rozptyl světla	17
1.4.2. Fluorescence a fluorescenční barviva	18
1.5. Imunofenotypizace	19
1.6. Sortery.....	20
1.7. Nové technologické postupy	21
1.7.1. Hmotnostní cytometrie	21
1.7.2. Obrazová cytometrie	22
2. Použití v hematoonkologii	24
3. Použití v nenádorové hematologické diagnostice	26
3.1. Diagnostika erytrocytových kvalitativních poruch	26
3.1.1. Paroxysmální noční hemoglobinurie	26
3.1.2. Hereditární sférocytóza	30
3.2. Diagnostika trombocytárních kvalitativních poruch	31
3.2.1. Glanzmannova-Naegeliho trombastenien	31
3.2.2. Bernardův-Soulierův syndrom	32
3.2.3. Syndrom šedých trombocytů.....	32

3.3.	Diagnostika imunitních trombocytopení	32
3.4.	Diagnostika megakaryocytárních trombocytopení.....	33
3.5.	Imunologické stanovení absolutního počtu trombocytů	34
3.6.	Monitorování funkce trombocytů.....	34
3.7.	Diagnostika septického stavu	34
4.	Transplantační hematologie	35
4.1.	Alogenní transplantace orgánů.....	37
4.2.	Kmenové buňky	38
4.2.2.	Rozdělení a funkce kmenových buněk	39
5.	Použití v transfuzním lékařství.....	41
5.1.	Potransfuzní purpura.....	41
5.2.	Trombocytární koncentráty.....	41
6.	Závěr	42
7.	Použitá literatura.....	43

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Časová osa technického pokroku v průtokové cytometrii od roku 1969	14
Obrázek 2: Schéma průtokového cytometru.....	15
Obrázek 3: Schéma fluidního systému v průtokovém cytometru	16
Obrázek 4: Vynesení intenzity světelného signálu FSC proti SSC v bodovém grafu	18
Obrázek 5: Schematický přehled 34 podskupin imunitních buněk.....	20
Obrázek 6: Výstup obrazové cytometrie, dva obrazy Langerhansovy buňek	23
Obrázek 7: Vysoce citlivé hodnocení klonů erytrocytů PNH průtokovou cytometrií	28
Obrázek 8: Nátěr periferní krve	30
Tabulka 1: Klasifikace trombocytopenií v Česku.....	33
Obrázek 9: Počet transplantací jednotlivých orgánů v Česku	36

SEZNAM ZKRATEK

AA	Aplastická anémie
AIDS	Syndrom získaného imunodeficitu (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
AML	Akutní myeloidní leukemie
CD	Diferenční skupina (Cluster of Designation)
CLL	Chronická lymfoblastická leukémie
DC	Dendritické buňky (Dendritic cells)
EDTA	Kyseliny ethylendiamintetraoctová
EMA	Eosin-5-maleimid
FITC	Fluorescein isothiokyanát
FLAER	Fluorescenční aerolyzin
FSC	Dopřední rozptyl (Forward scatter channel)
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
GT	Glanzmannova trombastenie
GVHD	Reakce štěpu proti hostiteli (Graft Versus Host Disease)
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
HPA	Lidský trombocytární antigen
HS	Hereditární sférocytóza
HSC	Hematopoetické kmenové buňky (Hematopoetic Stem Cells)
Ig	Imunoglobulin
mAb	Monoklonální protilátka
NK	Přirozeně zabíječské buňky (Natural Killer Cells)
PBSC	Kmenové buňky periferní krve (Peripheral Blood Stem Cells)
PE	Phytoerythrin
PI	Propidium iodid
PIG-A	Třída A genu fosfatidyl-inositol-glykanu
PNH	Paroxysmální noční hemoglobinurie
PTP	Potransfuzní purpura
RES	Retikulo-endoteliární systém
RT	Retikulované trombocyty
SC	Kmenové buňky (Stem Cells)
SSC	Boční rozptyl (Side scatter channel)

ÚVOD

Průtoková cytometrie je velmi výkonná moderní laboratorní metoda, která umožňuje stanovení velkého množství parametrů jednotlivých částic nebo buněk v roztoku značně vysokou rychlostí. Jedná se o velice citlivý a specifický způsob stanovení, který umožňuje měřit kvantitativní i kvalitativní vlastnosti částic. V nedávné historii dosáhla významného pokroku, rozšíření své působnosti a zařazení do běžného chodu laboratoří.

Cílem bakalářské práce je přehledně vysvětlit princip průtokové cytometrie, načrtnout novinky v metodice a zejména popsat a objasnit aktuální použití průtokové cytometrie v onkologické a neonkologické hematologii, v transfuzní hematologii a transplantačním lékařství.

První část je zaměřena na vysvětlení fungování jednotlivých komponent průtokového cytometru, je zde stručně popsán princip imunofenotypizace a druhy průtokových třídičů společně s dalšími nově využívanými technologickými postupy cytometrie.

Druhá část je rozdělena na hematoonkologii, kde se nachází velice stručný přehled diagnostiky a charakteristiky onkologických nemocí rozpoznávaných průtokovou cytometrií, nenádorovou hematologii, kde společně s výčtem chorob najdeme možnosti léčby a diagnostiku, transplantační hematologii, kde jsou popsány způsoby orgánové transplantace a kmenové buňky, a nakonec transfuzní lékařství obsahující informace o potransfuzní nemoci.

1. PRINCIP PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

1.1. Obecný úvod

Průtoková cytometrie je rychle se rozvíjející flexibilní laboratorní metoda diagnostiky optických a fluorescenčních vlastností buněk (nebo jakýkoliv jiných částic, včetně buněčných částí, mikroorganismů, chromozomů, latexových perliček aj.) v suspenzi vzorku. Její výhodou je její přesnost, citlivost a také možnost měření velkého počtu buněk v krátkém časovém intervalu. [1-2] Umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu rychlostí až 100 000 částic za sekundu. [1] Své použití najde v molekulární biologii, například diagnostika hematopoetických malignit a monitorování HIV/AIDS (virus lidské imunitní nedostatečnosti/syndrom získaného selhání imunity) a dalších částí výzkumu souvisejících s buněčnou signalizací, životaschopností a apoptózou, veterinární medicíně, zemědělském, a dokonce i astronomickém výzkumu. [2]

1.2. Historie použití průtokové cytometrie v hematologii

První kroky ke vzniku průtokového cytometru můžeme datovat do čtyřicátých let dvacátého století, kdy po popsání fotoelektrické techniky pro počítání buněk Moldavan Caspersson vyvinul primitivní průtokový cytometr pro měření vlastností buněk, byl patentován první neoptický elektronický snímač krvinek patentovaný firmou Wallace Coulter, Crosland a Taylor vyvinuli počítadlo krevních buněk. První model Coulter Counter byl vynalezen kvůli počítání eryocytů a leukocytů z krve, poté několik let po něm následoval model, který již bych schopný určit velikost buněk. Začátkem šedesátých let minulého stolení se začal používat imunofenotyp, když Coons, Creech a Jones začali používat protilátky konjugované s fluorescein isothiokyanatem (FITC). [4-5] Od té doby již nemuseli být vědci závislí na morfologii buněk, ale mohli buňky identifikovat podle specifických bílkovin, které se nacházejí na jejich buněčné membráně. V té době byly jako novinka představeny počítače a ty se společně s jejich softwarovým vývojem velmi rychle zařadily do vývoje průtokových cytometrů. [4-6]

Opravdový začátek moderní průtokové cytometrie se povedl Fulwyerovi, když postavil třídič buněk založený na Coulterově principu pro velikost buněk a elektrostatické nabíjení kapiček pro jejich třídění. Impulzní cytofotometr vyvíjel Dittrich a Gohde. Buňky byly zavedeny do proudu nosné tekutiny pod vysoce výkonný objektiv mikroskopu zajišťujícímu měření rozptylu a fluorescence. Kombinací měření objemu, rozptýlení světla a fluorescence

v jednom přístroji se zrodila Paulovi Mullaneyovi víceparametrová průtoková cytometrie. Název Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) můžeme překládat jako sortování (třídění) buněk na základě jejich fluorescence. [3]

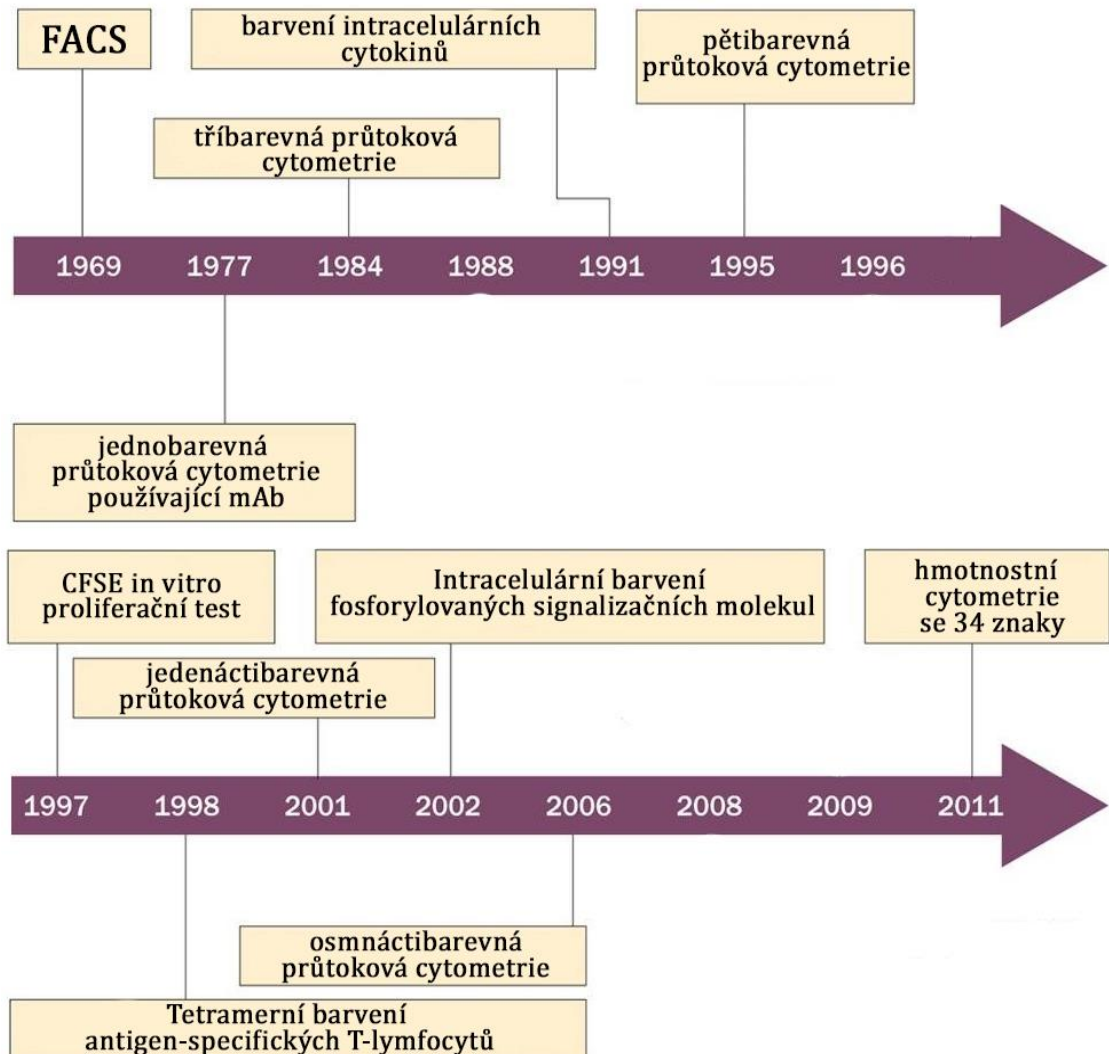
V osmdesátých letech dvatenáctého století se ukázalo, že syndrom získaného imunodeficitu (Acquired Immune Deficiency Syndrome-AIDS) zničil CD 4 (CD – diferenciační skupina – Cluster of Differentiation) T lymfocyty, což vedlo k pokroku imunofenotypizace. Prvními charakterizovanými monoklonálními protilátkami (mAb) na membránové proteiny se staly CD 3, CD 4 a CD 8 T-lymfocytů. [4] Mezi první klinické aplikace imunofenotypizace průtokovou cytometrií patří sledování progresu AIDS měřením CD 4 znaků T lymfocytů. V tomto desetiletí je také zaznamenáno pokračování ve vývoji vícebarevné technologie a imunologie a příchod polychromatické průtokové cytometrie (detekování 5 a více znaků současně), která umožňuje identifikaci podskupin naivních a paměťových T-lymfocytů. Dále se přišlo na možnost měření markerů membránové povrchové vrstvy buněk a tato se začala využívat k měření u nádorů, diagnostice a sledování hematopoetické malignity a paroxysmální noční hemoglobinurie a také ke sledování rejekce transplantátu a hematopoetických reakcí. V roce 1975 je datován převratný objev Köhlera a Milsteina, za něž získali Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Hybridomy, neustále rostoucí a stabilní klony neschopné produkovat vlastní imunoglobulin, které vznikají fúzí buněk myelomových a buněk produkujících protilátku, mají schopnost produkovat specifické imunoglobuliny, a to monoklonální protilátky (mAb). Každá jednotlivá monoklonální protilátka se specificky váže k jednomu epitopu, jehož výskyt je vázaný na různé druhy populací a stádia diferenciací buněk. Podle typizace mAb se vytvořila v Paříži v roce 1982 CD nomenklatura, bývá aktualizována a doplňována pravidelně na mezinárodních pracovních setkáních o lidských buněčných diferenciačních molekulách. [3-4] [7-8]

Brzy se také průtoková cytometrie začala používat i pro měření intracelulárních markerů, což se stává významnou další aplikací průtokové cytometrie. [3]

Jiným uplatněním průtokové cytometrie může být chromozomové barvení a třídění pro klonování DNA pro produkci sekvencí specifických pro chromozomy, což provedl Larry Deaven a Scott Crame nebo Joe Gray a Ger van den Ehghen. První vysokorychlostní třídící buněk s účelem třídění každého lidského genomu byl zkonstruován díky této nové aplikaci. Toto byl začátek projektu lidského genomu. [3]

Nyní již moderní průtokové cytometry běžně provádějí desetiparametrovou analýzu, kromě bočního a dopředního rozptylu také osm fluorescentních kanálů. [5] S tím souvisejí vysoké požadavky na pracovníky, kteří multiparametrovou analýzu vedou a dokážou interpretovat.

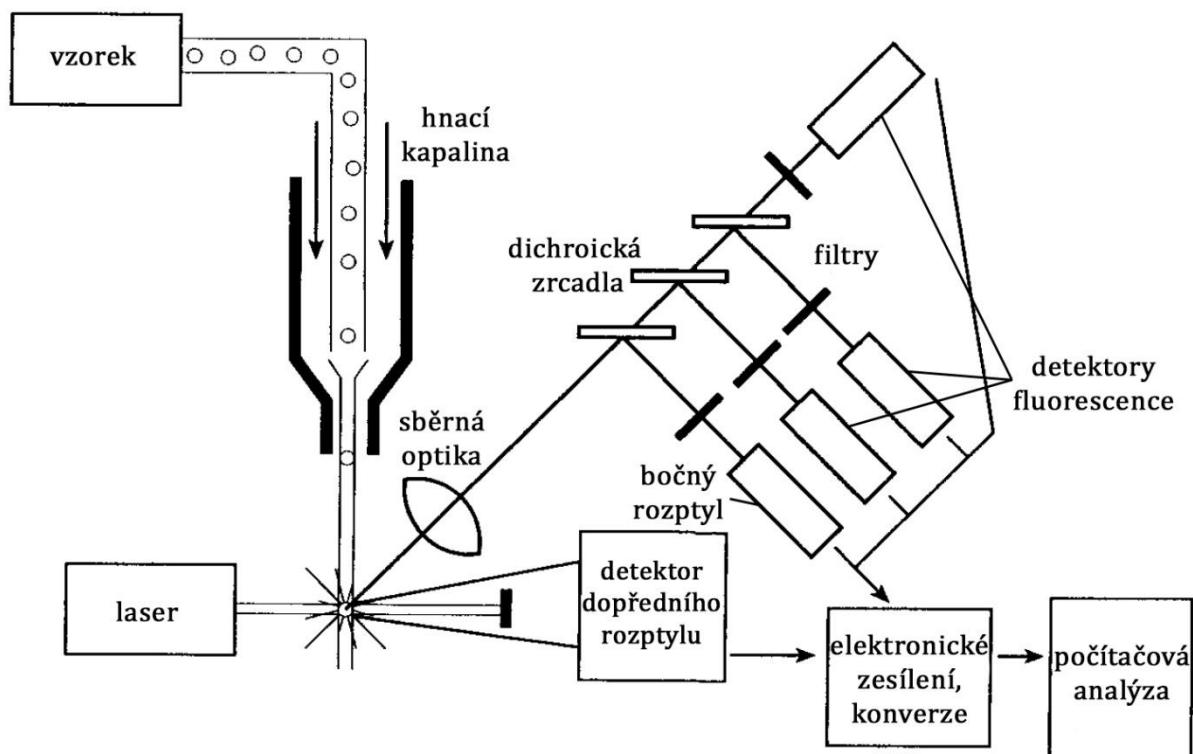
Přehledné shrnutí technického pokroku v průtokové cytometrii na časové ose zobrazuje obrázek č. 1.



Obrázek 1: Časová osa technického pokroku v průtokové cytometrii od roku 1969. FACS – sortování buněk na základě jejich fluorescence; mAb – monoklonální protilátka. Upraveno podle [5]

1.3. Jednotlivé komponenty průtokového cytometru

Průtokové cytometry mají dva hlavní typy: analyzátoři a sortery. [6] Průtokový cytometr se dělí na tři základní části: fluidní systém, optický systém a detekční systém-elektroniku. Fluidní systém dopravuje vzorek pro měření; optický systém zajišťuje paprsek světla a detekci emisního spektra; a elektroniku zařizující interpretaci a digitalizaci naměřených dat. Schéma průtokového cytometru znázorňuje obrázek č. 2. [3] [10-12]

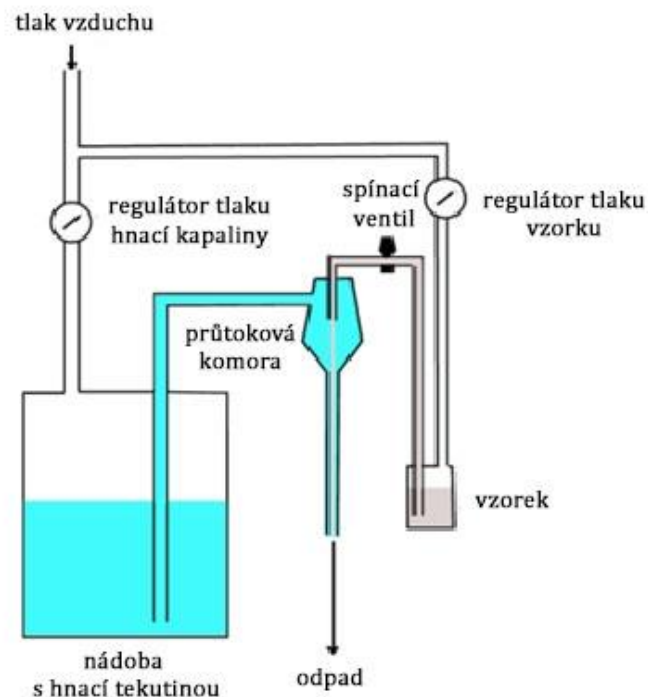


Obrázek 2: Schéma průtokového cytometru. Upraveno podle [10]

1.3.1. Fluidní systém

Fluidika obstarává transport částic ze suspenze, odkud částice postupně za sebou přicházejí do průtokové komory, aby mohly být analyzovány jednotlivě. [2-4] Toto seřazení je zajištěno hydrodynamickou fokuzací, což znamená rozdělení buněk na jednotlivé kusy v řadě, což se děje vmísením proudu suspenze do rychleji tekoucí hnací tekutiny. Takto seřazené částice nesené hnací tekutinou do proudnice o konstantní rychlosti procházejí jednotlivými laserovými paprsky. Při průchodu dochází k fluorescenci a ta se následně společně s rozptylem záření detekuje. Následně jsou částice unášeny do třídící jednotky nebo do odpadní nádoby. Na obrázku č. 3 najdeme schéma fluidního systému průtokového

cytometru. Vzorek se před samotným měřením zpracovává například enzymatickou degradací, centrifugací, popřípadě filtrací, aby se izolovaly žádané buňky. [2] [7] [13-14]



Obrázek 3: Schéma fluidního systému v průtokovém cytometru. Upraveno podle [7]

1.3.2. Optický a detekční systém

Optický systém můžeme rozdělit na dvě části, excitační a sběrnou optiku. [3]

Excitační část tvoří zdroj světla a čočky, které se používají k vytvarování a zaostření excitačního (laserového) paprsku. [3] [7]

Zdrojem světla může být laser, oblouková lampa nebo dokonce i LED lampa. V dnešní době se nejvíce využívají lasery, protože produkují velmi intenzivní paprsek monochromatického světla. Obloukové lampy oproti nim potřebují optické filtry, aby byly schopné vyzářit určitou vlnovou délku. [7]

Sběrnou optiku tvoří soubor čoček shromažďujících světlo emitované světlo vyzářené částicí, systém optických zrcadel a optických filtrů, které zachycují fluorescenční záření a následně ho usměrňují na aktivní vrstvu příslušných detektorů (fotonásobičů a fotodiod), kde se nachází rozhraní optického a elektronického systému průtokového cytometru. [3] [4] [12-13]

Když měřená částice prochází laserovým paprskem a rozptýlí světlo, připojené fluorescenční markery jsou excitovány a vyzaří světlo o specifické vlnové délce, která závisí na typu fluorochromů. Podle způsobu rozptylu světla z jednotlivých částic se zjišťuje fyzikální charakteristika částic. [3-4] [4]

Specifita detekce je zajištěna jednotlivými optickými filtry blokujícími jisté vlnové délky, zatímco úzký rozsah vlnových délek pro konkrétní fluorescenční barvivo propustí. Prvním ze tří hlavních typů filtrů je dlouhý průchodový (long pass) filtr, který umožňuje pouze průchod záření nad limitní vlnovou délkou. Druhým typem je krátký průchodový filtr, který propustí jen světlo pod hraniční vlnovou délkou a třetí typ jsou pásmové propusti, které propouštějí záření ve specifickém rozmezí vlnových délek. [3] [8]

1.3.3. Elektronika

Monitorování a řízení provozu průtokového cytometru obstarává elektronika. Jedná se o technicky nejsložitější část celého cytometru. Fotodetektory provádí přeměnu světelného signálu na měřený elektrický impuls. Tento elektronický signál je uložen na datový diagram, kam přístroj podle nastavení prahové hodnoty uloží pouze signály pocházející od částic na rozdíl od signálů z nečistot nebo elektronického šumu. [3] [7]

Data se ukládají ve formátu pro standartní průtokovou cytometrii, ve formě seznamu jednotlivých buněk a parametrů jejich jednotlivých měření. [7]

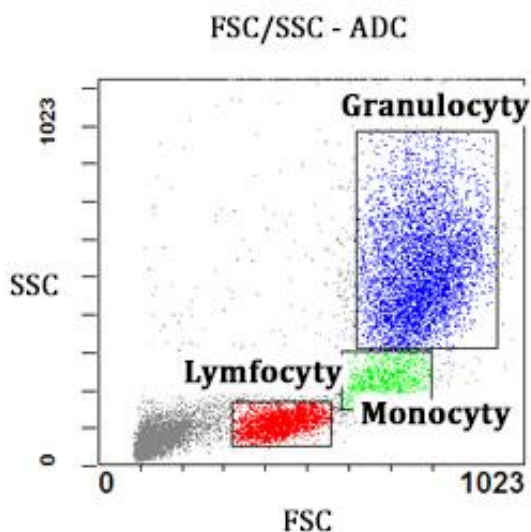
1.4. Parametry měření

1.4.1. Rozptyl světla

Rozptyl světla se detekuje ve dvou úhlech: dopředním rozptylu Forward scatter channel (FSC) a bočním rozptylu Side scatter channel (SSC). Fotodiody shromažďující dopřední rozptyl detekuje signál v úhlu 20° od osy laserového paprsku a poskytuje informace o velikosti, tvaru a homogenitě částic. V úhlu 90° od osy laserového paprsku zachycuje fotonásobící trubice (Photomultiplier tube – PMT) boční rozptyl, který poskytuje údaje o granularitě buněk, což je užitečné při rozlišování mezi lymfocyty a granulocyty. [3-4] [8] [9]

Základním prostředkem vizualizace dat získaných průtokovou cytometrií se stal scatter diagram. V tomto grafu se na ose x nachází data získaná FSC a na ose y data z SSC. Osy grafů značíme názvem fluorochromu a povrchovým markerem. V případě pozitivitu pro oba

markery budou buňky zobrazeny v pravém horním kvadrantu scatter diagramu a v případě negativity pro oba markety v dolním kvadrantu levém. Gating je odborný výraz elektronického ohraničení, který se používá pro popis vybrání pouze určité subpopulace analyzovaných buněk. Gating provádíme podle fyzikálních a fyzikálně chemických vlastností buněk. Na obrázku č. 4 se nachází bodový graf nesrážlivé promyté plné krve, kde je vynesena míra světelného signálu z FSC na ose x oproti signálu z SSC na ose y. [8] [9]



Obrázek 4: Vynesení intenzity světelného signálu FSC proti SSC v bodovém grafu poskytující informace o morfologii buněčné populace. Upraveno podle [3]

1.4.2. Fluorescence a fluorescenční barviva

Při absorpci světla určité vlnové délky a společně s ním i energie se elektrony ve sloučenině excitují a zpátky do neexcitovaného stavu se vrací různými energetickými přechody, které mohou zahrnovat emise kvantového světla o delší vlnové délce v řádech nanosekund neboli fluorescence. Díky tomu, že se z důvodu rozdílné vlnové délky liší barva světla, je možné emitované světlo oddělit pomocí optických filtrů. [10] [3] [11] [12] Detekce fluorescence vyžaduje velice citlivou techniku, zároveň je možná detekce až 18 sloučenin fluoreskujících za rozdílných vlnových délkách. [13] Tímto způsobem je zajištěna víceparametrová analýza buněk. Intenzita vyzařované fluorescence je přímo úměrná množství míst, kde jsou navázány na buňce nebo částici fluorochromy. [1] [3] [11] Fluorescenčními markery jsou fluorochromy, molekuly schopné fluoreskovat, což je vyzařování světla o určité vlnové délce při dopadu laserového světla. [3]

V průtokové cytometrii se používají dva druhy fluorochromů. První druh se nekovalentně váže na intracelulární struktury a druhý druh se kovalentně váže na jiné sondy. Pro kovalentní značení proteinů se používá většinou protilátka, méně často další proteiny. Nejčastěji se používá fluorescein isothiokyanát (FITC), konjugáty phycoerythrinu (PE). Oba tyto fluorochromy excituje argonový iontový laser. [3] [11] Dalším typem jsou fluorescenční nanokrystaly o velikosti 10 až 20 nm. Se svým širokým absorpčním světlem mohou být excitovány nejrůznějšími fluorescenčními faktory. Používají se zejména v imunologii pro vyčíslování mnoha podskupin T-lymfocytů v jedné analýze. [13] [11] Nejčastěji používaným barvivem pro deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je propidium jodid (PI). [11] V praxi se často společně se samostatnými fluorochromy používají také fluorochromy tandemové, které mají schopnost excitováním primárního fluorochromu aktivovat excitaci i sekundárního fluorochromu. Pro detekci antigenů vyznačujících se slabší expresí (např. CD 56, CD 13 nebo CD 33) se používají zářivější fluorochromy jako PE, PE-Texas Red. [1]

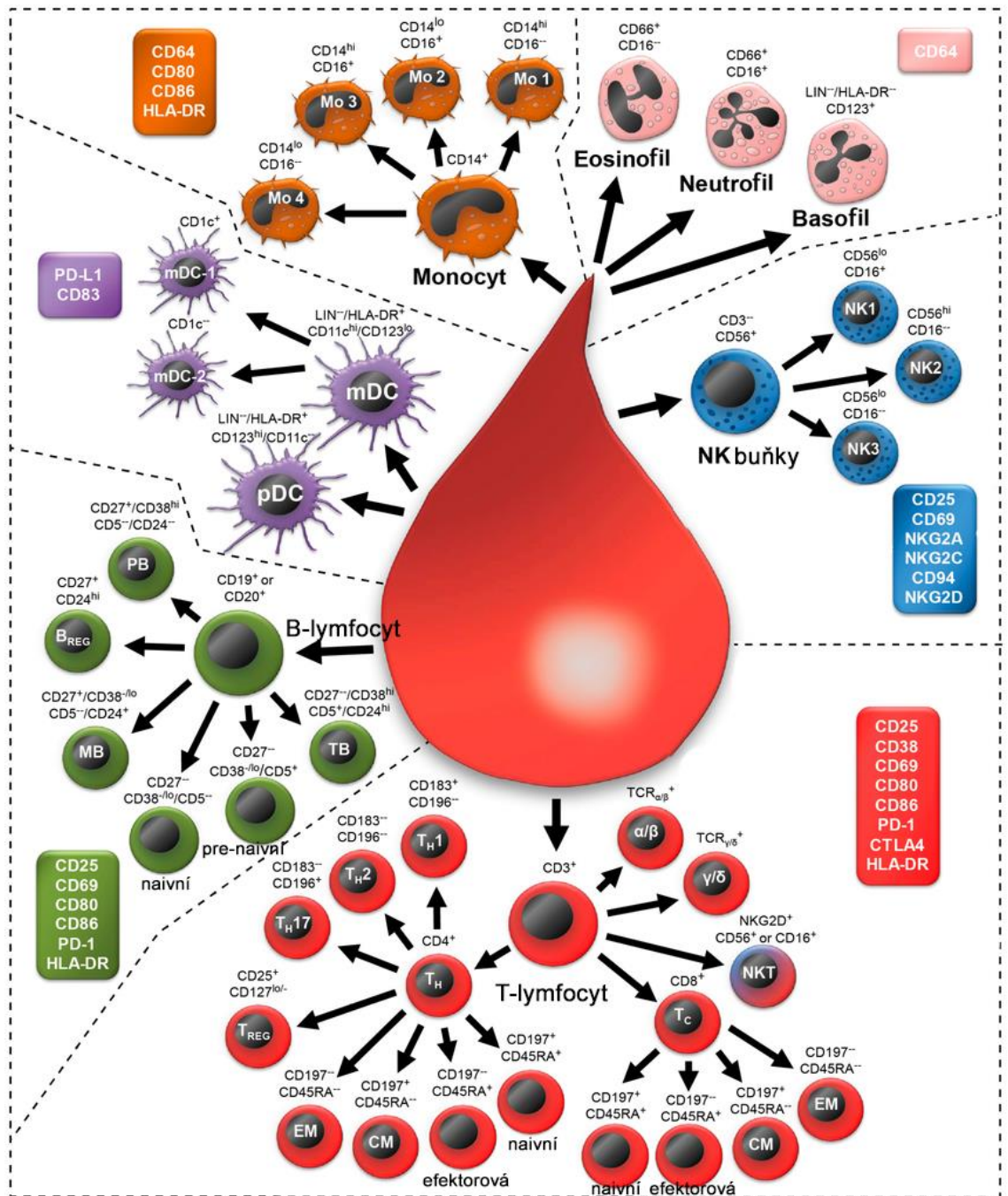
Kvantifikace fluorescence se provádí srovnáním naměřené světelné intenzity fluorescence naměřené s fluorescencí externího standardu. [1]

1.5. Imunofenotypizace

Imunofenotypizace, jinými slovy klasifikace buněk za pomoci identifikace povrchových, cytoplazmatických nebo jaderných molekul specifických proteinů pomocí monoklonálních protilátek, se stala jedním z nejdůležitějších použití průtokové cytometrie. Imunofenotypizací je možné určit přítomnost klonu maligních buněk hematopoetického původu, jejich liniíovou příslušnost anebo stupeň diferenciací. Jednotlivé antigeny mohou být na buňce ve velkém počtu stejně tak jako v malém. CD znaků existuje velké množství, spousta buněk exprimuje více než jeden CD znak. [3] [17-19] Při charakterizaci plné krve je možné využít detailní imunofenotypizaci krve, která zvládne rozpoznat 34 podskupin imunitních buněk, jako například podskupiny T-lymfocytů, B-lymfocytů, přirozených zabíječských buněk (Natural killer cells – NK buňky), monocytů, dendritických buněk (Dendritic Cells-DC), neutrofilů, eozinofilů a bazofilů. [14]

CD molekuly definují mononukleární protilátky, na které se váží. Systém jejich číslování byl dohodnut založením CD systému nomenklatury v roce 1982 v Paříži, aby se zabránilo chaosu v terminologii těchto znaků. Toto názvosloví imunologové průběžně aktualizují na pravidelných mezinárodních pracovních setkáních. [1] [15]

Graficky znázorněný přehled CD znaků zobrazuje obrázek číslo 5.



Obrázek 5: Schematický přehled 34 podskupin imunitních buněk, které můžeme rozlišit pomocí podrobného testu imunofenotypizace buněk. Červené T-lymfocyty, zelené B-lymfocyty, fialové dendritické buňky, hnědé monocyty a růžové granulocyty a modře vyznačené NK buňky. V rámečkách je vypsáných 27 přiřazených aktivačních markerů. Směru šipek znázorňuje zjednodušeně třídění. Upraveno podle [14]

1.6. Sortery

Průtokové cytometry byly původně vyvinuty jako nástroje schopné oddělovat a třídit částice na základě jejich měření. [16]

Byly vyvinuty dva hlavní typy sorterů, česky třídičů. První je kapénkový třídič a druhý fluidní třídič. [3] Kapénkové třídiče rozdělují buňky na základě elektrostatického vychýlení jednotlivých kapének ve směru s nabitým postranním deskám. Nevychýlené kapénky pokračují do odpadu. [21-23] Fluidní třídiče využívají mechanismus pro odklon proudu podle detekce částice, která odpovídá vytřizení. Pro třídění biologicky nebezpečného materiálu nejsou vhodné kapénkové třídiče, protože při jejich používání vznikají aerosoly, které mohou ohrozit pracovníky laboratoře. Přístroje s nižší rychlostí vytřídí 10 000 - 15 000 buněk za sekundu. V dnešní době jsou k dispozici i vysokorychlostní třídiče schopné třidit buňky rychlostí vyšší než 20 000 buněk za sekundu, toto třídění však probíhá za velmi vysokých tlaků, a proto není vždy vhodné z důvodu škodlivého účinku na vytříděné buňky. Vytříděná substance má čistotu větší než 95 % a používá se zejména pro morfologické nebo genetické vyšetření, funkční testy, popřípadě k léčebným účelům. [3] [6] [17]

1.7. Nové technologické postupy

Základní rozsah tradiční průtokové cytometrie můžeme ještě více rozšířit moderními technologiemi. Například hmotnostní cytometrie, což je spojení průtokové cytometrie s atomovou hmotnostní spektrometrií, nám může poskytnout nesrovnatelně více údajů o imunitních buňkách díky většímu množství sond, anebo zobrazovací obrazová cytometrie, popisující jednobuněčnou dynamiku v heterogenních směsích. [18]

1.7.1. Hmotnostní cytometrie

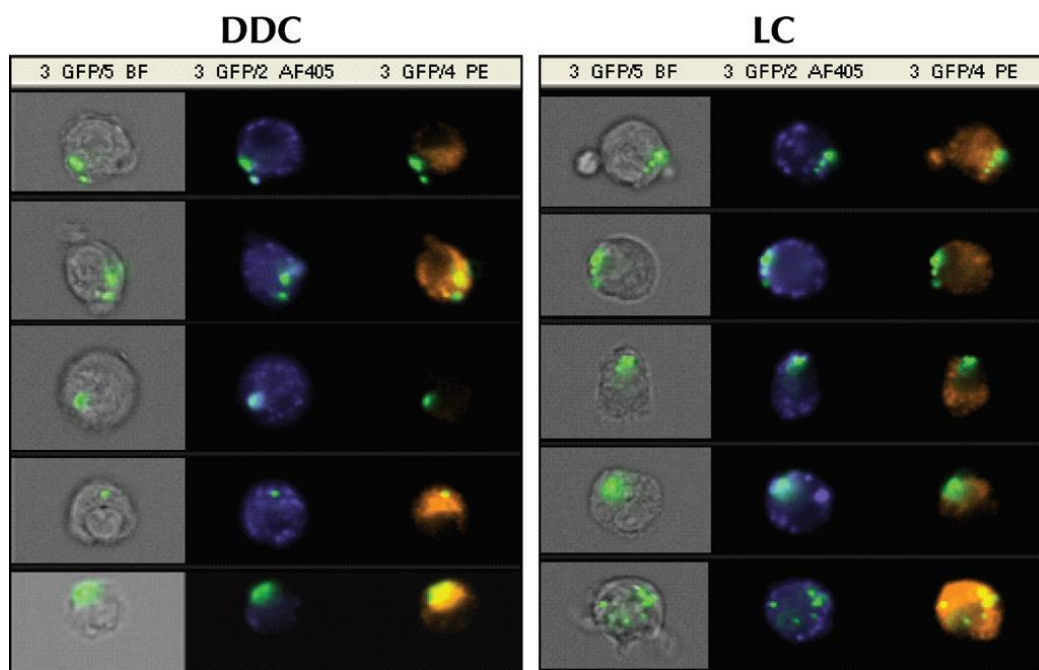
Speciálním spojením atomové hmotnostní spektrometrie a průtokové cytometrie spatřila světlo světa hmotnostní cytometrie. Pro analýzu používá protilátky konjugované na stabilní izotopy prvků vzácných zemin stejným způsobem jako klasická průtoková cytometrie používá fluorochromy, které diagnostikuje vysoce přesným hmotnostním spektrometrem. Izotopy kovů se používají jako štítky a vyvíjí se další. [18] [19] Tímto způsobem je možné stanovit například fosfoproteiny nebo polysacharidy. [18] Hmotnostní cytometrie umožňuje charakterizaci více buněčných a subcelulárních paramentů zároveň. Jedná se o více než 40 značek na každé buňce. [18] [20] Nevýhodou hmotnostní cytometrie je, že všechny buňky jsou v analyzátoru zničeny, takže nemohou být vytříděny pro další analýzu jako tomu je u klasické průtokové cytometrie. [18] Samotná detekce buněk probíhá jejich vstřikováním do argonové průtokové komory, kde je nosný plyn ve specializované komoře vystaví plazmovému hořáku velmi vysoké teploty (10 000 K), následkem čehož se buňky odpařují, atomizují a ionizují. Tato iontová mlha se poté měří hmotnostním spektrometrem, který

zaznamenává dobu letu iontů z plazmy do detektoru, který měří obsah kovů obsažený v buňce. [18] [20]

1.7.2. Obrazová cytometrie

V obrazové cytometrii se kombinuje přístroj imunofluorescenční mikroskopii a vysoce citlivý průtokový cytometr, aby zachytil obraz každé jednotlivé částice procházející detektorem. Současné vybavení obrazové cytometrie umožňuje naráz získat až dvanáct snímků každé buňky s fluorescenční citlivostí, která je srovnatelná s běžnou průtokovou cytometrií. Tato metodá snímkuje buňky rychlostí pět tisíc buněk za sekundu, což nám zprostředkovává detekci i velmi vzácných buněk. [18] [21] Moderní přístroje jsou schopny detekovat částice až do velikosti 20 nm, což velice zvyšuje potenciální využití této techniky například pro experimenty objasňující mezibuněčné interakce, lokalizaci buněčné signalizace, apoptózu, transfekční účinnost a interakci buněčných patogenů. [18]

Na obrázku č. 6. jsou v tabulce znázorněny mikrospektrální snímky měření obrazovým cytometrem. Levý světle šedý sloupec je klasický mikroskopický obraz překrytý zeleně zbarvenou informací o fluorescenci proteinu *Staphylococcus aureus*. Obrazy ve sloupci uprostřed s modrým barvivem demonstrují fluorescenci barviva Alexafluor 405 konjugovanou ranými endozomy a v pravém sloupci najdeme červenooranžové obrázky s fluorescencí lysozomů označených PE.



Obrázek 6: Výstup obrazové cytometrie, dva obrazy Langerhansových buněk. Multispektrální snímky, na kterých v jednotlivých sloupcích vidíme různé kanály informací. Převzato z [18]

2. POUŽITÍ V HEMATOONKOLOGII

Průtoková cytometrie je velmi citlivá a účinná metoda pro rozlišení myeloidních a lymfoidních řad akutních leukémií. [10]

V případě normálního vývinu krevních buněk z kmenových buněk se v kostní dřeni buňky postupně diferencují, rozdělují do různých linií buněk (například linie myeloidních buněk, lymfoidních T nebo B lymfocytů) a postupně dozrávají svou příznačnou cestou. Každou fází buňky nesou určitou sadu CD znaků. Malignity se mohou projevit ve kterékoliv části vývinu. Leukemie nebo lymfomy můžeme klasifikovat podle specifické jiné sady markerů, podle nichž můžeme onemocnění klasifikovat. Různé leukémie i lymfomy mají často jemné rozdíly v jejich antigenních profilech, což je ideální pro diagnostiku průtokovou cytometrií. [22] Průtoková cytometrie je ideální i pro rozlišování lymfomů, protože ze lymfatických tkání lze získat měřitelné buněčné suspenze. [23] První hodnocení se provádí pomocí panelu protilátek ve třech nebo čtyřech barevných kombinacích. [22] Přítomnost nebo nepřítomnost antigenů umožňuje provést diagnózu. [10]

Základní značky jsou pro B-lymfocyty CD 5, CD 10, CD 19, CD 20, CD 45, Kappa, Lambda, pro T-lymfocyty CD 2, CD 3, CD 4, CD 5, CD 7, CD 8, CD 45, CD 56, pro myelomonocyt se jedná o značky CD 7, CD 11b, CD 13, CD 14, CD 15, CD 16, CD 33, CD 34, CD 45, CD 56, CD 117, HLA-DR a pro plazmatickou buňky CD 19, CD 38, CD 45, CD 56 a CD 138. Znak CD 45 je přítomný na všech leukocytech. [22]

Leukémie se dělí do několika skupin. Akutní leukémie probíhají rychle a mohou zabít již během několika dnů nebo týdnů od svého vzniku, oproti tomu chronické leukémie probíhají velmi pomalu a mají delší začátek, který trvá měsíce až roky. Dále leukémie členíme na myeloidní a lymfatické. [24] Při klasifikaci akutních leukémií je cytologické vyšetření s potvrzeným výskytem blastů doplňováno průtokovou cytometrií, která podle typu blastů zařadí leukémii mezi lymfoidní nebo myeloidní. Akutní lymfoblastickou leukémii (ALL) vznikající z prekurzorů B a její podtypy lze rozlišit podle znaků CD 10, CD 19, CD 79a, CD 34, CD 24 (silně pozitivní), CD 45 negativní. ALL vznikající z prekurzorů T lymfocytů charakterizují znaky CD 3, CD 7, CD 2, CD 5, CD 1a, CD 4 a CD 8. [25]

Chronickou lymfoblastickou leukémii (CLL) můžeme diagnostikovat za pomoci znaků CD 38 a ZAP-70 (Zeta-asociovaný protein 70). [26]

U akutní myeloidní leukemie (AML) se projevuje exprese CD 34 společně s expresí HLA-DR, neexistuje exprese cytoplazmatického CD 3 a cytoplazmatického CD 79a. Někdy také může být patrná exprese CD 20 (24 %). Pro myeloidní linie je CD 33 citlivější, ale méně specifický než CD 13. [27]

Maligní lymfomy jsou zhoubné nádory pocházející z lymfocytů. Dělíme je na Hodgkinův lymfom a skupinu Non-Hodgkinových lymfomů. Hodgkinovy lymfomy charakterizuje smíšená celularita a pocházejí z nádoru B-lymfocytů. Non-Hodgkinské lymfomy se dělí na T-lymfomy a B-lymfomy podle původu. Nejčastějším typem je difúzní velkobuněčný lymfom B prekurzorů, folikulární lymfom a lymfom z buněk marginální zóny. [23] [28] Patogenní buňky HL vykazují pozitivitu na CD 30, CD 70 a CD 15 s charakteristickou CD 45 negativitou a spolu s nimi jsou v polovině případů zachyceny markery T-lymfocytů CD 2, CD 3 a CD 4. [23]

Bakalářská práce se zaměřuje především na nenádorovou hematologii, a proto se jí podrobněji budu věnovat v následující kapitole.

3. POUŽITÍ V NENÁDOROVÉ HEMATOLOGICKÉ DIAGNOSTICE

V neonkologické hematologii se průtoková cytometrie používá zejména pro diagnostiku dědičných defektů krevních buněk, nejčastěji erytrocytů a trombocytů. Je používána také pro stanovení celkového počtu trombocytů a pro diagnostiku septických stavů.

3.1. Diagnostika erytrocytových kvalitativních poruch

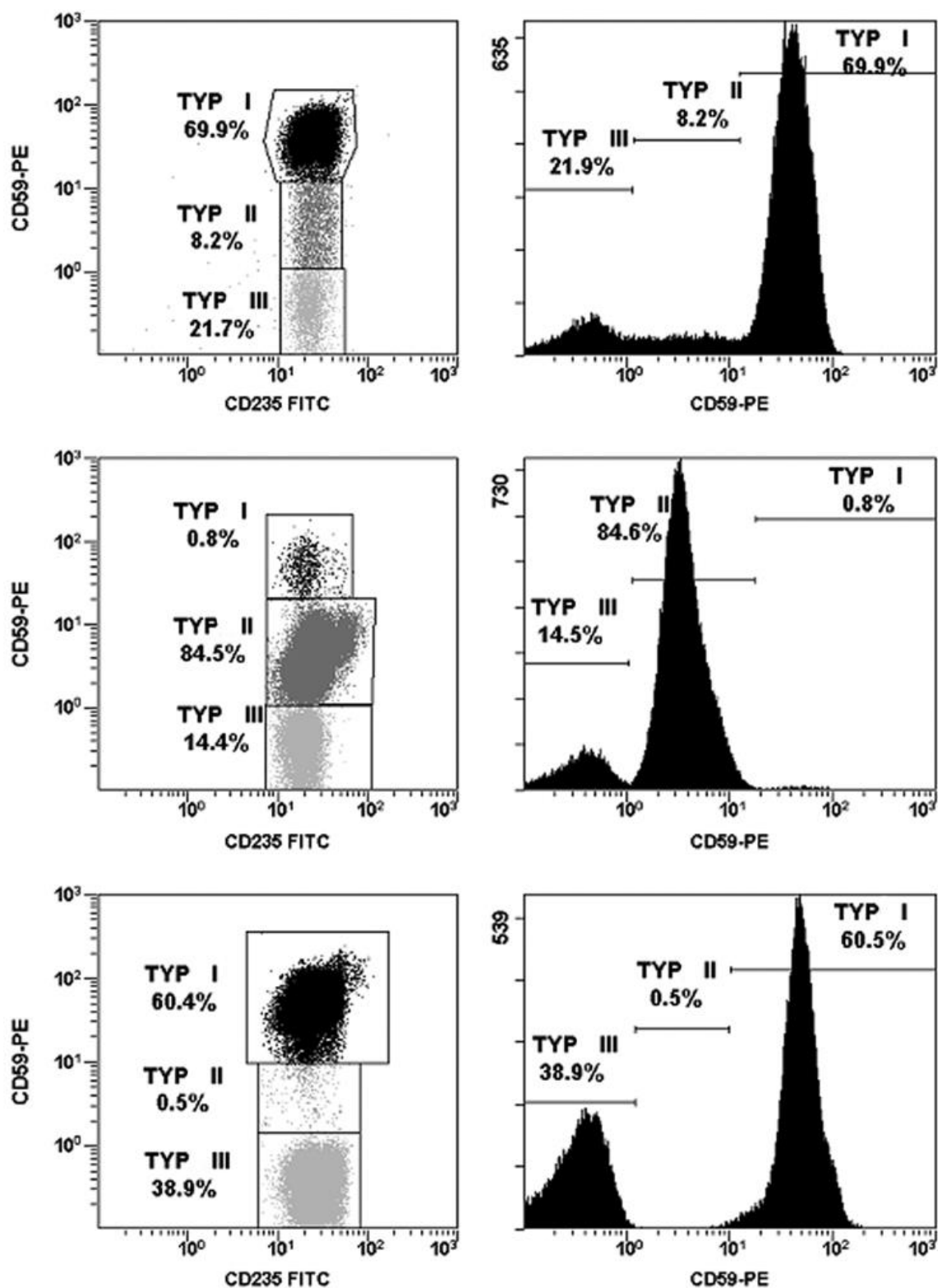
3.1.1. Paroxysmální noční hemoglobinurie

Paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH) je velmi vzácné získané hemolytické onemocnění, pro které je charakteristická intravaskulární hemolýza, hyperkoagulabilita a selhání kostní dřeně. Vzniká somatickou mutací hematopoetické kmenové buňky ve třídě A genu fosfatidyl-inositol-glykanu (PIG-A), který syntetizuje kotvu glykosylfosfatidylinositolu (GPI). Tato GPI kotva váže k buněčné membráně velké množství proteinů (např. CD 55, CD 59, CD 14, CD 48, CD 58, NCAM, ALP, a další). Membrána erytrocytů nebo také trombocytů, monocytů či granulocytů je zvýšeně citlivá na lýzu komplementem. Fenotypickým znakem tohoto onemocnění je nepřítomnost, popřípadě výrazné snížení proteinů CD 59, CD 55 a dalších navázaných na buněčnou membránu krvetvorné buňky pomocí GPI kotvy, které před lýzou komplementem chrání zdravou buňku. Antigen CD 55 inhibuje aktivaci C3 a C5 složky komplementu a antigen CD 59 utlumuje aktivitu terminálního komplexu komplementu. Nedostatek CD 59 má za následek intravaskulární hemolýzu. [1] [35-39]

Nejrozšířenější a stále používaný test pro průkaz PNH, test okyseleným sérem, byl poprvé použit v roce 1937 Hamem (tzv. Hamův test). Využívá toho, že krvinky PNH jsou hemolyzovány normálním sérem stejné skupiny. Hamovým testem ovšem nemůžeme odlišit malé populace erytrocytů (<5-10 %). Dalším velmi rozšířeným testem se stal Hartmanův test z roku 1970 (tzv. water-sugar test) založený na absorpci komplementu ze séra při nízké iontové koncentraci. Pro diagnostiku PNH se stalo důležitým přínosem použití průtokové cytometrie k průkazu proteinů CD 59 a CD 58 v roce 1990 Plesnerem a kol. a van der Schootem a kol. Díky její vysoké citlivosti je možné zachytit i velmi malé populace erytrocytů zastoupené 0,5-1 %, které se mohou vyskytovat i u pacientů, u kterých vyšel Hamův test negativně. Z tohoto důvodu je průtoková cytometrie nadřazeným diagnostickým postupem pro určení PNH. Tento objev také vedl k rozdělení PNH do dvou skupin: první je hemolytická PNH, kterou charakterizují hlavně epizody hemolytické anémie s hemoglobinurií

a žilní trombózy; a druhou skupinu hypoplastické PNH, jejíž klony GPI deficientních hematopoetických buněk nemají zjevnou hemolýzu, ale vyskytuje se u nich například aplastická anémie, trombocytopenie nebo leukopenie. Velké množství pacientů také nespadá ani do jedné kategorie, ale vykazuje rysy obou skupin. K časnému zachycení klonu PNH se průtoková cytometrie může použít i u nemocných aplastické anémie. [29] [30]

K rozpoznávání dospělých erytrocytů se používá CD 235a, což je monoklonální protilátka glykoprin A, využívající se k analýze červených krvinek a jejich stanovení. Pro analýzu PNH erytrocytů se nedoporučuje stanovovat samotný znak CD 55, protože oproti znaku CD 59 je málo exprimován, a následně vykazuje slabý signál, což je způsobeno nízkou epitopovou denzitou. Znak CD 59 má tedy lepší poměr mezi signálem a šumem. Doporučený fluorochrom je PE (Phycoerythrin). Na obrázku č. 7 se nachází hodnocení klonů erytrocytů PNH průtokovou cytometrií. Výskyt CD59 na erytrocytech v několika případech s různými procenty PNH postižených klonů červených krvinek zobrazených na bodovém grafu v levém sloupci a na jím odpovídajících histogramech ve sloupci pravém. Zdravé erytrocyty jsou zakryty CD 235a. Tři různé typy PNH jsou zobrazeny černou (typ I), šedou (typ II) a světle šedou barvou (typ III). [1] [35-42]



Obrázek 7: Vysoce citlivé hodnocení klonů erytrocytů PNH průtokovou cytometrií. Výskyt CD59 na erytrocytech ve třech případech s různými procenty PNH postižených klonů erytrocytů zobrazených na bodovém grafu v levém sloupci a histogramech v sloupci pravém. Zdravé erytrocyty jsou zakryty CD 235a. Tři různé typy PNH jsou zobrazeny černou (typ I), šedou (typ II) a světle šedou barvou (typ III). Upraveno podle [45]

Dalšími diagnostickými markery vhodnými pro detekci GPI připojených proteinů na povrchu granulocytů a monocytů jsou například CD 14, CD 16, CD 26, CD 66b a CD 157. Pro stanovení klonů PNH lymfocytů je neúčinnějším činidlem fluorescenční aerolyzin (FLAER), který se používá k analýze exprese antigenů CD 14 u monocytů a CD24 u neutrofilů a vazby praerolyzinu. Toto činidlo se vyrábí jako mutovaná forma proaerolyzinu konjugovaného s fluorochromem. Má schopnost vázat se přímo na glykanovou část GPI kotvy a tím následně detekovat klon PNH. Dále se zavádí také antigen CD 157, který stejně jako FLAER umožňuje detekovat buňky s GPI připojených proteinů u neutrofilů a monocytů. [42-44]

Pacienti trpící PNH sužují bolesti břicha a život ohrožující žilní trombofilie nejčastěji postihující žíly jaterní, žílu slezinnou, mezenterální žíly a mozkové žíly. Žilní trombóza je příčinou smrti ve 40 až 60 %. PNH je velmi podobná aplastické anémii (AA). [1] [35-42]

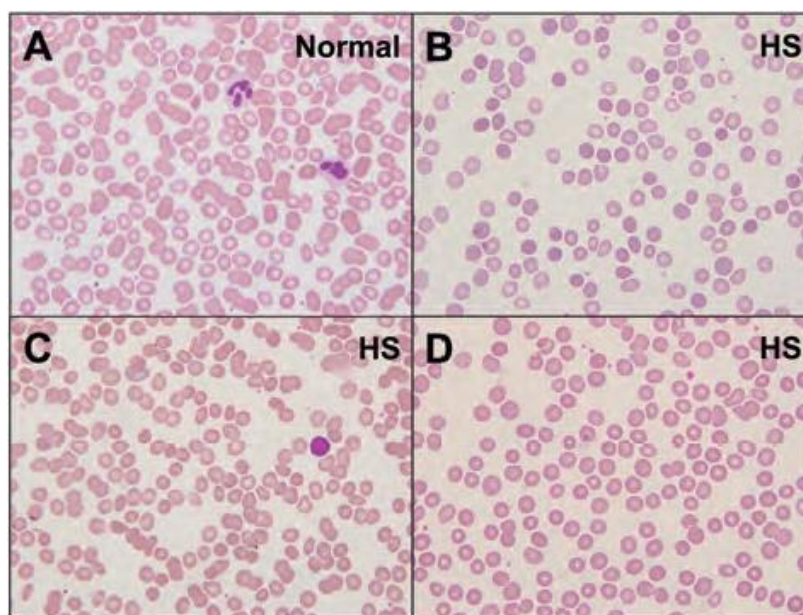
Možností léčby je podávání Eculizumabu, což je humanizovaná myší monoklonální protilátka proti komplementové složce C5a, které blokuje koncovou část aktivace. Medikace pomocí Eculizumabu u nemocných PNH vede k vymizení hemolýzy účinkem aktivovaného komplementu a k normalizaci koagulačního nálezu, snížení závislosti na transfuzích erytrocytů a snížení trombotických komplikací, dále tento přípravek výrazně zlepšuje funkci ledvin, které bývají poškozené opakovanými hemolytickými epizodami. Léčba pacientů s epizodami těžké hemolýzy s případnou komplikací trombóz nebo poškozenými ledvinami, ale bez známek aplazie kostní křemě, tedy spočívá v přípravku Eculizumab. Mezi nevýhody jeho používání můžeme zařadit jeho vysokou cenu a nutnost trvalého podávání udržovací léčby. [31] [45-47]

Význam léčby PNH transplantací krvetvorných buněk záleží na eliminaci PNH klonu a imunokompetentních buněk, které jsou zodpovědné za potlačení zdravé krvetvorby. Důvodem k indikaci transplantace krvetvorných buněk je těžký stupeň hemolýzy refrakterní na léčbu nebo rozvoj těžké dřevné aplazie a opakované trombotické komplikace. Prognosticky nepříznivý činitel pro výsledek transplantace krvetvorných buněk je přítomnost trombózy, těžká pancytopenie, věk nad 55 let, trombocytopenie v době diagnózy, iniciální aplazie kostní dřevě a vývin choroby směrem k myelodysplastickému syndromu nebo akutní myelodní leukémii. [31]

3.1.2. Hereditární sférocytóza

Syndrom hereditární sférocytózy (HS) je běžné vrozené onemocnění membrány erytrocytů, konkrétně vada nebo nedostatek jednoho či několika proteinů. Z tohoto důvodu mají červené krvinky abnormální tvar, jiné metabolické požadavky a následně jsou předčasně shromažďovány a zničeny ve zvětšené slezině. Jedná se o autozomálně dominantně dědičné onemocnění charakteristické přítomností sférocytů, splenomegalie a žloutenky. V severoevropských zemích je to jedna z nejčastějších příčin hemolytické anémie. [1] [48-51]

HS má různé formy od částečného deficitu spektrinu, bílkoviny účastnící se formování cytoskeletu buňky, přes těžký deficit spektrinu, nebo kombinovaný deficit spektrinu a anakyrinu anebo defekty proteinu pásu 3 a pallidinu. Tyto abnormality vedou ke snížení lipidů, ztrátě membránového materiálu a vzniká sférocyt. Na obrázku č. 8 jsou sférocyty jasně patrné u pacientů s HS na krevních nátěrech B-D. Krvinka má zvýšenou propustnost pro sodík, takže Na-K pumpa energeticky velmi náročně vypumpovává nahromaděný sodík pryč, což vede ke zvýšení rigidity a snižování deformovatelnosti buňky. Erytrocyt ztratí další membránový povrch a neprojde slezinnými sinusy více než 20x-30x, kde je následně fagocytován. [48-52]



Obrázek 8: Nátěr periferní krve. U pacientů HS je patrné velké množství sférocytů (B-D) narozdíl od zdravého jedince (A). Zvětšení 400x. Převzato z [43]

Při diagnostice dědičné sférocytózy se přihlíží k rodinné anamnéze a provádí se vyšetření periferní krve, nepřímé testy, které měří osmotickou křehkost červených krvinek (např. Pink test nebo glycerolový test lýzy, které ale nejsou moc specifické), a biochemický

test odhalující míru snížení různých membránových a cytoskeletárních proteinů. Citlivost testu glycerolového lyzování je 61 %, u testu osmotické křehkosti je to 68 % a u PINK testu až 91 %. Oproti tomu má vysokou citlivost i specifitu test eosin-5-maleimidem (EMA). Eosin-5-maleimid je fluorochrom kovalentně vázaný na skupině lyzinu, která je součástí 3 pásu proteinů membrány červených krvinek, ale zároveň může interagovat se sulfhydrylovými skupinami. Měří se jeho množství, kdy z důvodu nesprávného erytrocytárního skeletonu postižené erytrocyty vážou méně EMA a tím pádem poskytují slabší fluorescenční signál než zdravé buňky. Jedná se o rychlý a snadný test malého množství krve odlišující HS od ostatních imunitních i neimunitních hemolytických anémií. Test EMA je nezávislý na fenotypu a je pozitivní i v případě kompenzované HS. Je-li pozitivní, diagnóza HS je potvrzující v 97,8 % případů, je-li negativní, můžeme HS vyloučit u 96,9 % pacientů. EMA test dokáže bohužel diagnostikovat pouze HS charakterizovanou defekty proteinů pásu 3, defekty proteinů pásů 4.1 nebo ankyrinu se musí diagnostikovat jinak. Je možné, že EMA test bude pozitivní i při pyropoikilocytóze, kvůli velké fragmentaci buněk, což má za následek tvorbu erytrocytů s menší povrchovou plochou. Dalším testem prokazujícím hereditární sférocytózu je také separace bílkovin na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE), která ale bývá indikována jen ve sporných případech. [1] [48-49] [32]

Terapií je splenektomie, případně i cholecystektomie. [48-50]

3.2. Diagnostika trombocytárních kvalitativních poruch

3.2.1. Glanzmannova-Naegeliho trombastenienie

Mezi vrozené trombocytopatie, to jest onemocnění, při kterém selhává funkce trombocytů, patří Glanzmannova trombastenienie (GT). Je charakterizovaná středně těžkou až těžkou kožní krvácivostí a značně sníženou agregací trombocytů po všech induktorech kromě ristocetinu. Tato vzácně se vyskytující choroba popsána již roku 1918 je způsobena deficitem nebo funkční poruchou destičkového povrchového komplexu glykoproteinů (gp) IIb/IIIa (integrinu α IIb β 3), což je stěžejní komponenta trombocytární membrány, která váže fibrinogen a je důležitá pro agregaci trombocytů. Tato nemoc se dědí autozomálně recesivním způsobem a dělí se do tří podskupin (I-III) podle klinických projevů. Diagnostikuje se průtokovou cytometrií. Kvantitativně se stanovuje exprese komponent komplexu glykoproteinu IIb – CD 41 a glykoproteinu IIIa - CD 61. [1] [33] [53-55]

3.2.2. Bernardův-Soulierův syndrom

Další dědičné trombocytopatické autozomálně recesivní onemocnění je Bernardův-Soulierův syndrom (BSS), který se vyznačuje trombocytopenií, obrovskými trombocyty, a slizničním krvácením. U homozygotů se vyskytují velice vážné krvácivé projevy, jež mohou ohrozit i život. Tento syndrom způsobuje chybějící nebo snížená exprese povrchového glykoproteinového komplexu Ib/IXb/V, receptoru pro von Willebrandův faktor, na povrchu krevních destiček. V diagnostice je hojně využívána kvantitativní analýza defektní exprese komplexu GP Ib/IX/V průtokovou cytometrií. Jedná se o znak CD 42b. [10] [33] [54-55]

3.2.3. Syndrom šedých trombocytů

Syndrom šedých trombocytů je velmi vzácná vrozená krvácivá porucha granul krevních destiček. Toto onemocnění způsobuje mutace v genu NBEAL2, projevuje se blokadou zrání granul v megakaryocytech, takže trombocyty mají výrazně snížené množství granul a jejich obsahu. Vyznačuje se makrocytopenií, zvětšenou slezinou, rozvojem myelofibrózy ve vyšším věku a zhoršením hojení ran. Krevní destičky jsou zvětšené, mají patologický tvar a typicky naředlý vzhled. Projevem syndromu šedých trombocytů je nedostatečná exprese CD62P (aktivačního markeru P-selektinu) na povrchu trombocytů. Průtokovou cytometrií můžeme změřit míru exprese CD62P (GMP 140) po aktivaci krevních destiček ligandem TRAP (Thrombin Receptor Agonist peptide). [1] [54-55]

3.3. Diagnostika imunitních trombocytopenií

Trombocytopenie vzniká kvůli poruše trombocytopoézy, na základě zvýšené destrukce, jejich spotřebování, popřípadě ztrát trombocytů. Projevují se vznikem krvácivé diatézy a petechiálním kožním nebo slizničním krvácením. Mezi časté příznaky patří epistaxe, krvácení z dásní, hematurie, krvácení ze zažívacího traktu a krvácení gynekologická. Imunitní trombocytopenie vzniká následkem zvýšeného odumírání a rozpadu destiček v retikulo-endoteliálním systému (RES), z důvodu produkce protitrombocytárních protilátek namířených proti glykoproteinům trombocytární membrány. Zejména protilátek imunoglobulinů typu G (IgG) proti glykoproteinům IIb/III nebo GP Ib/IX. Destičky s těmito navázanými protilátkami jsou odstraněny z cirkulace lýzou, kterou indukuje komplement anebo fagocytózou. Množství exprese imunoglobulinů, které jsou navázané na trombocytech je možné stanovit konverzí průměrné fluorescenční intenzity exprese anti-kappa/lambda monoklonálních protilátek na trombocytech. [1] [33] [34]

Tabulka 1: Klasifikace trombocytopenií. Převzato z [1]

Poruchy trombocytopoézy	Zvýšená destrukce trombocytů	Zvýšená konzumpce trombocytů	Trombocytopenie ze ztrát trombocytů
trombocytopenie s aplazií radia	idiopatická trombocytopenická purpura	diseminovaná intravaskulární koagulace	trombocytopenie po masivní transfuzi nebo výměně krve
Fanconiho anémie	trombocytopenie poléková	trombotická trombocytopenická purpura	trombocytopenie z redistribuce trombocytů
aplastická anémie	trombocytopenie u autoimunitních chorob	hemolyticko-uremický syndrom	
syndrom Wiskottův-Aldrichův	akutní trombocytopenická purpura po infekční		
syndrom Epsteinův	potranfuzní trombocytopenie		

3.4. Diagnostika megakaryocytárních trombocytopenií

Podobně jako při erythropoéze vznikají retikulocyty, při megakaryopoéze nalezneme v krvi frakci krevních destiček nazvanou retikulované trombocyty (RT). Tyto buňky jsou čerstvě vyplavené do krevního řečiště a jsou charakteristické zbytkovým množstvím ribonukleové kyseliny (RNA). Měřením těchto buněk jde monitorovat trombocytární obrat. Využívá se vazebné afinity některých fluorochromů k RNA, díky ní můžeme odlišit poruchy megakaryopoézy (myelodysplastický syndrom, aplastická anémie, akutní leukémie) od trombocytopenií ze zvýšené destrukce, konzumpce nebo ztráty trombocytů (trombotická trombocytopenická purpura, trombocytopenie při sepsi, Kasabach-Merrittův syndrom, deseminovaná intravaskulární kagulopatie, hyperspleinismus) nebo sekundárních imunitně

podmíněných trombocytopenií (kolagenózy, systémový lupus erythematoses, antifosfolipidový syndrom, autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, chronická lymfatická leukémie, virové infekce). [1] [34]

3.5. Imunologické stanovení absolutního počtu trombocytů

Nepravé trombocytopenie neboli pseudotrombocytopenie je falešný laboratorní jev, který může vznikat kvůli shlukování krevních destiček již při odběru do kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), kvůli chladové aglutinaci destiček, popřípadě nesprávným sečtením hematologickým analyzátozem. Trombocytární shluky mohou totiž být zařazeny mezi malé lymfocyty. Neúspěšné rozpoznání těchto změn může vést až ke špatné diagnóze a nedostatečnou léčbu. Imunologická metoda stanovení absolutního počtu lymfocytů je metoda referenční. Trombocyty se identifikují díky jejich expresi trombocytárních znaků CD 41/ CD 61. Jejich absolutní počet se následně vztáhne k počtu erytrocytů, který se získává z hematologického analyzátoru. [1][55-56]

3.6. Monitorování funkce trombocytů

Zvýšené procento cirkulujících aktivovaných trombocytů nebo jejich hyperreaktivita mají důležitou roli v patologických stavech jako například nestabilní angina pectoris, akutní infarkt myokardu, angioplastika, kardiopulmonární by-pass, centrální mozková příhoda a další. Průtokovou cytometrií je možné sledovat hladinu aktivovaných destiček a nepřímo hodnotit jejich schopnost aktivace po přidání trombocytárních agonistů. Stanovuje se exprese aktivovaného komplexu GP IIb/IIIa, CD62P a GP53 (CD 63). [1] [34]

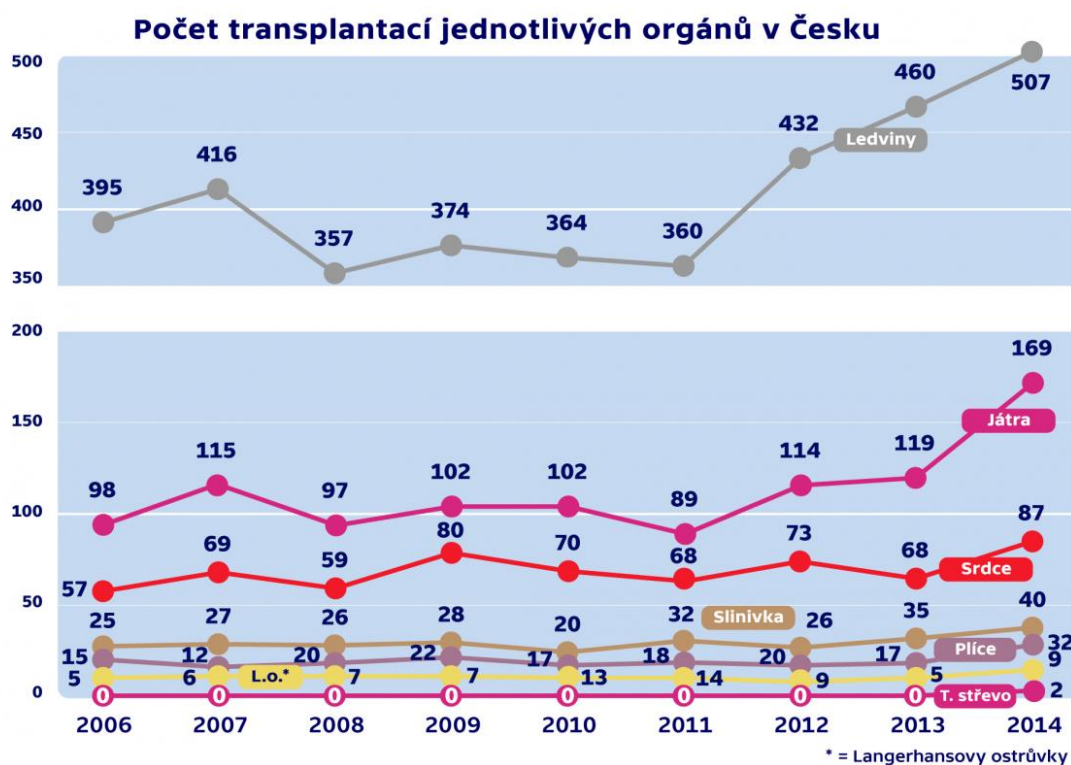
3.7. Diagnostika septického stavu

U sepse neboli otravy krve je nejdůležitější včasná rychlá diagnostika. Jedná se o zaplavení těla bakteriemi, kdy se náš organismus brání velmi silnou obrannou reakcí. [1] [35] Zjišťuje se kvantifikací znaku CD 64, což je transmembránový glykoprotein, receptor pro IgG. Běžný je jeho výskyt na povrchu monocytů, makrofágů a dendritických buněk. Míra exprese na granulocytech je zprostředkovaná takovými mediátory, že v průběhu zánětu stoupá. Jedná se o velice citlivou, specifickou a rychlou metodu diagnostiky sepse. [1]

4. TRANSPLANTAČNÍ HEMATOLOGIE

Průtokovou cytometrií můžeme identifikovat a prokázat anti-HLA protilátky. Po předchozích krevních tranfuzích, v průběhu těhotenství nebo po převodech orgánových štěpů se mohou protilátky proti HLA antigenům v organismu vytvořit. Přítomnost anti-HLA IgG protilátek je kontraindikací k transplantaci. Identifikace probíhá kvalitativní nebo kvantitativní průtokovou cytometrií, protože je to metoda citlivější, má vyšší specifitu a je možné detekovat i protilátky I a II třídy, které se obtížně detekují z důvodu nízkého titru, necytotoxické anti-HLA protilátky. Cytotoxický test lymfocytů, kterým se provádí monitorování anti-HLA protilátek, může mít nepřesné výsledky, jak falešně pozitivní, tak falešně negativní. [1] [58]

Transplantace je léčebný postup, kdy se přenáší živé tkáně nebo buňky z těla dárce do těla příjemce. Cílem je udržení funkčnosti transplantované tkáně nebo orgánu v těle příjemce. Jedná se o velmi organizačně, medicínsky i ekonomicky náročnou léčbu. Tato léčba dokáže většinu pacientů navrátit do normálního života, je to jeden z největších úspěchů medicíny minulého století. Používá se především u pacientů v konečném stádiu selhání orgánů. Nejčastěji ledvin, srdce, jater, slinivky břišní a plic. [59-64] Graf s počtem transplantací jednotlivých orgánů v Česku se nachází na obrázku č. 9.



Obrázek 9: Počet transplantací jednotlivých orgánů v Česku. Převzato z [64]

Transplantace ledvin je jediné možné léčení nezvratného chronického selhání ledvin, při této transplantaci je do těla voperována ledvina od zemřelého nebo živého dárce, přičemž ta od živého dárce je výhodnější. Přínosem je zde možnost provedení transplantace preemptivně, což znamená transplantaci ještě před zahájením dialyzační léčby. Pacient se tak nepotýká s problémy spojenými s dialýzou jako jsou anémie, poruchy metabolismu Ca/P nebo infekce. Ledviny příjemce v těle zůstávají. Mezi další onemocnění léčená transplantací ledviny můžeme zařadit chronické glomerulonefritidy, diabetickou nefropatii a chronickou pyelonefritidu. [63] [65-66]

Transplantace slinivky břišní se neprovádí z důvodu záchrany života, ale pro stabilizaci diabetu mellitu I. typu – závislého na inzulínu. Dále také jako prevence vzniku velmi vážných orgánových komplikací diabetu mellitu. Celá transplantovaná slinivka břišní se ukládá do podbřišku a vývod trávicích šťáv slinivky se drénuje do močového měchýře. Hormon inzulín se dostává do krevního oběhu napojením na pánevní cévy příjemce. Další možností je transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků, které tvoří inzulín, izolovaných z dárčovy slinivky. Tato metoda nevyžaduje významný chirurgický zásah, nemá však velkou využitelnost, protože je velmi obtížné získat vyčištěné ostrůvky, které jsou schopné života. [63] [67]

Dárce srdce se může stát muž mladší 40 let nebo žena mladší 45 let s prokázanou smrtí mozku. Musí mít stejnou krevní skupinu s příjemcem a nesmí od něj příliš lišit hmotností, stejně tak nesmí prodělat onemocnění srdce a nemá jevit známky přenosné nebo virové nemoci. Srdce se transplantuje pacientům v konečném stádiu srdečního onemocnění, které se nedá jinak vyléčit, a při maximální nechirurgické léčbě by jeho životní prognóza byla kratší než jeden rok. Uvádí se, že jedna čtvrtina pacientů považovaných za vhodné k srdeční transplantaci umírá dříve, než se najde vhodný dárce. Srdce se transplantuje na místo vyjmutého příjemcova srdce, do ortotropní polohy. V průběhu operace je vlastní krevní oběh nahrazen oběhem mimotělním. [68]

U pacientů trpících chronickou aktivní hepatitidou, primární biliární cirhózou, zánětem žlučovýchodů, sklerotizující cholangitidou, autoimunitní hepatitidou a alkoholickou cirhózou se provádí transplantace jater. U dětí je to také extrahepatická biliární atrezie. Tato transplantace, která dokáže zachránit život, se provádí ortotopickou metodou, což znamená, že příjemcova játra se vyjmou a nahrazení dárcovskými. Transplantace jater patří mezi nejnáročnější operace. U některých menších příjemců se také používá jen segment jater od živých příbuzných. [63] [69-70]

I přes veškerý pokrok v oblasti transplantací a možnost transplantace téměř každé tkáně, má tato oblast stále svá omezení. Největší nebezpečí spočívá v rejekční reakci vyvolané imunitní reakcí proti štěpu, která zničí každý orgán brzy po transplantaci. [59]

4.1. Alogenní transplantace orgánů

Transplantaci můžeme rozdělit na několik typů podle dárce. Při alogenní transplantaci je dárce jiný člověk, při sourozenecké je dárce hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) kompatibilní sourozenec, při syngenní transplantaci se jedná o sourozeneckou transplantaci mezi jednovaječnými geneticky identickými dvojčaty. Při příbuzenské transplantaci je dárce HLA kompatibilní příbuzný a při nepříbuzenské je dárce HLA identický nepříbuzný dárce. Tyto rozdíly s sebou přinášejí rozdílné riziko potransplantačních komplikací, pravděpodobnost relapsu choroby nebo léčebný potenciál štěpu. Existují také transplantace xenogenní, u kterých se jedná o přenos transplantátu mezi člověkem a zvířetem. Mezi tyto transplantace řadíme například xenotransplantace prasečích srdečních chlopní v případě onemocnění srdeční chlopní vadou. Obecně ale mezidruhová transplantace orgánů není úspěšná. [59-62]

Při výběru dárce je nejdůležitější shoda s příjemcem v systému ABO a v HLA systému. Ovšem nikdy nenalezneme naprosto dokonalou shodu mezi antigeny, a proto nedokážeme vyloučit rejekční reakci. Jedinou výjimku tvoří transplantace mezi jednovaječnými dvojčaty. Při transplantaci orgánů je důležité monitorovat buněčnou a humorální imunitní odpověď, aby se rejekci transplantovaného orgánu zabránilo. Průtoková cytometrie má svou nezastupitelnou roli v monitorování protilátky po transplantaci HLA antigenu a ve sledování buněčných složek imunitního systému. [58] [62]

Protilátky proti hlavnímu histokompatibilnímu komplexu jsou hlavní překážkou úspěšných transplantací orgánů. Rejekce transplantátu (štěpu) je závažná komplikace vznikající příjemcovou imunologickou reakcí proti neidentickým strukturám podle HLA antigenů na transplantátu. Je to reakce imunitního systému na cizorodou tkáň. Stejně tak mohou buňky v transplantátu rozpoznat antigeny příjemce a vyvolat reakci štěpu proti hostiteli (GVHD – Graft Versus Host Disease). V této reakci spolu interagují lymfocyty dárce a HLA-antigeny příjemce. [58-59] [62] [71]

Rejekci štěpu můžeme rozdělit na tři klinicky rozpoznatelné druhy: hyperakutní, akutní a chronické. Hyperakutní rejekce je okamžitá a nevratná forma, kdy se během několika minut až hodin dostaví totální destrukce a nekróza transplantovaného orgánu. Vyskytuje se kvůli přítomnosti protilátek v organismu příjemce, které jsou vytvořeny ještě před samotnou transplantací. Nejčastějším typem rejekce je náhlá neboli akutní rejekce, při které vzniká imunitní reakce proti transplantačním antigenům. Způsobují ji aktivované T-lymfocyty namířené proti transplantátu. Projevuje se snížením funkce darovaného orgánu a leukocytózou. Léčí se zvýšením podáváním imunosupresivních látek. Dále se může vyskytnout pozdní neboli chronická rejekce, při níž pozvolna klesá funkčnost přeneseného orgánu. Způsobuje ji příjemcova humorální aktivita. Může skončit i úplným selháním transplantátu, vznikem vazivové jizvy. [58-59] [62] [71]

4.2. Kmenové buňky

4.2.1. Stanovení periferních CD 34+ kmenových buněk

Při hematologických malignitách se k léčbě používají transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSC – Hematopoetic Stem Cells). Progenitorové buňky se nacházejí zejména v kostní dřeni, ale jejich malé množství je přítomno i v periferní krvi a pupečnickové krvi. Právě kmenové buňky periferní krve (PBSC – Peripheral Blood Stem Cells) se používají

jako hlavní zdroj kmenových buněk pro transplantaci. Prostředkem je jejich vynucené vyplavování do krve působením rekombinantních lidských hematopoetických růstových faktorů. Při transplantaci HSC je kromě fenotypové kompatibility dárce a příjemce důležitý také počet bílých krvinek se znakem CD 34+ v transplantátu vztažený k tělesné hmotnosti příjemce. Množství CD 34+ buněk totiž koreluje s úspěšností vyplavování. Výpočet životaschopných CD 34+ buněk je tedy důležitý ukazatel množství hematopoetických buněk, protože nám pomáhají zjistit množství progenitorových buněk a aferézy. Kvantifikace CD 34+ buněk průtokovým citometrem je nyní nejvíce používanou metodou pro optimalizování mobilizace a následné sklizně hematopoetických progenitorových neboli kmenových buněk pro PBSC nebo transplantaci kostní dřeně. Jako přístup s nejvyšší možnou spolehlivostí kvantifikace se ukázal přístup průtokové cytometrie na jedné platformě, který se velmi rychle dostal do spousty laboratorních směrnic. [72-73]

4.2.2. Rozdělení a funkce kmenových buněk

Kmenové buňky jsou primární a nediferencované buňky organismu. Mají jedinečnou schopnost diferencovat se na jakýkoliv jiný specializovaný typ buněk. Díky této schopnosti se v těle za běžných okolností vytváří nové buňky, které nahrazují ty staré zničené, a opravují poškozené tkáně nebo orgány. Kmenové buňky se také dokáží samy obnovit. Představují univerzální zásobu případných náhradních dílů pro jakoukoliv část těla. [74-7]

Kmenové buňky (stem cells-SC) můžeme rozdělit na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a buňky progenitorové neboli unipotentní. Jedná se o rozdělení podle jejich celulórní schopnosti difencovat se. Buňky totipotentní se mohou bez omezení měnit na libovolný typ buněk, například podle prostředí, kde se zrovna buňka nachází, včetně další totipotentní buňky. Mezi tyto buňky patří buňky vzniklé prvním dělením oplozeného vajíčka i samotné vajíčko. Oproti nim pluripotentní buňky, které jsou potomky totipotentních buněk, mohou produkovat všechny buňky až na buňky totipotentní. Dávají vzniknout všem buňkám budoucího organismu, všem třem zárodečným listům, ektodermu, entodermu a mezodermu. Multipotentní buňky mají schopnost produkovat pouze buňky příbuzné určitému buněčnému typu. Například jen krevní buňky nebo neurální buňka a vznik všech buněk nervového systému. Posledním typem jsou buňky progenitorové, které se dokáží plně obnovit či namnožit a mohou produkovat jen jediný typ buněk. Progenitorové buňky jsou takzvaným přechodným stádiem mezi kmenovými a zralými buňkami. [72-74]

Kmenové buňky můžeme dále rozdělit na primární existující in vivo a na sekundární, které existují in vitro. Primární bývají nejčastěji multipotentní, pluripotentní nebo unipotentní. Mezi jejich typické znaky patří pomalá proliferace a schopnost sebeobnovy. Tvoří základ pro regeneraci organismu a jeho homeostázu. Sekundární buňky jsou připravené z pluripotentních kmenových a embryonálních buněk, ze zárodečných buněk nebo z progenitorů embryonálních a dospělých tkání takřkajíc ve zkumavce. Poměrně rychle proliferují a také mohou být zdrojem pro regeneraci organismu. U savců byly popsány tři typy: embryonální kmenové buňky, embryonální zárodečné buňky a embryonální nádorové buňky. [71] [74-75]

5. POUŽITÍ V TRANSFUZNÍM LÉKAŘSTVÍ

Transfuzní lékařství je obor hematologie, který se věnuje intravenózním převodem krve nebo krevních částí. Jedná se o určitý způsob transplantace. Průtoková cytometrie v tomto oboru sleduje vlastnosti krvinek, stanovuje riziko vzniku potransfuzní purpury a diagnostikuje ji. Dále také zjišťuje kvalitu trombocytárních transfuzních koncentrátů.

5.1. Potransfuzní purpura

Potransfuzní purpura (PTP) je vzácná a potenciálně fatální imunohematologická reakce vedoucí k silné trombocytopenii. Vzniká 3-12 dnů po transfuzi krve obsahující trombocyty. Výrazná trombocytopenie vzniká z důvodu aloimunizace proti specifickým antigenům trombocytů, kdy se krev příjemce transfuze imunizuje proti antigenům trombocytů dárce a způsobuje destrukci krevních destiček dárce i příjemce vyvolanou komplementem. V největším počtu případů se jedná o polymorfni aloantigenní epitop lidského trombocytárního antigenu – HPA (P1A1), který se nachází v komplexu gp IIb/IIIa. Má dvě izoformy, HPA-1a a HPA-1b. K aloimunizaci může dojít při těhotenství nebo opakovaných tranfuzích. Tento antigen je přítomen pouze u 1,5 % populace, a proto je jeho výskyt přibližně 1 z 5 až 10 tisíc tranfuzí. Dalšími antigeny spojenými s tímto onemocněním jsou ZwB, Bak, Lek, Ko a Pen. [1] [33] [77-78]

PTP může přetrvávat zhruba pět týdnů od transplantace. Stav pacienta zlepšuje podání intravenózních imunoglobulinů a plazmaferéza, což je mimotělní očišťovací aferéza krve. [1] [33]

Průtokovou cytometrií můžeme kvantitativně prokázat výrazné zmnožení IgG a IgM imunoglobulinů navázaných na trombocytech. Dále můžeme zjistit genotyp dárce/příjemce. [1] [33] [77-78]

5.2. Trombocytární koncentráty

Průtoková cytometrie se používá pro monitorování kvality trombocytárních koncentrátů. Hlídá se, aby koncentráty neztrácely funkci a životnost. Používá se kvantitativní anebo kvalitativní analýza exprese P-selektinu, látky, která je aktivační molekula anti-CD 63 a také aktivovaného komplexu gp IIb/II. [1]

6. ZÁVĚR

Tato práce popisuje princip průtokové cytometrie, nastínit možnosti jejího dalšího vývoje a zejména přiblížit možnosti diagnostiky v hematologii, transplantačním odvětví a transfuzním lékařství.

Průtoková cytometrie se používá především pro diagnostiku hematopoetických onemocnění, hlavně leukémií a lymfomů. Je velice vyhledávaná z důvodu rychlosti, přesnosti a citlivosti měření. Její instrumentace se neustále modernizuje a také se pro ni nachází nová uplatnění.

Možnosti průtokové cytometrie jsou velmi nadějnou a slibnou cestou pro zjišťování rozsáhlejších informací o buňkách, buněčných strukturách a interakcích. V nenádorové hematologické diagnostice je čteně používána pro rozlišení erytrocytárních a trombocytárních membránových deficitů. V případě transplantace orgánů je významně nápomocná při rozlišení hlavního histokompatibilního komplexu. Tranfuznímu lékařství nabízí možnost monitorování stavu transfuzních přípravků a diagnostiku potranfuzních chorob. Vzhledem k tomu, že se jedná o metodu velmi rychle se rozvíjející, je jistě jen otázkou času, kdy nám otevře dveře k dalším netušeným poznatkům imunologie buněk.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PREFFER F, Dombkowski. Advances in complex multiparameter flow cytometry technology: Applications in stem cell research. *Cytometry Part B*. 2009, 295–314.
- [2] BROWN, M. a C WITTEWER. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry*. 2000, **46**(8), 1221-1229.
- [3] MARINOV, Iuri. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. Praha: Triton, 2008, 21-142. ISBN: 978-80-7387-143-7
- [4] BURPEE, A. a P. NOBES. Flow Cytometry Analysis from Applied Cytometry makers of VenturiOne & StarStation. *Applied Cytometry* [online]. [cit. 21. 5. 2017]. Dostupné z: http://www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php
- [5] SHAPIRO, Howard. The evolution of Cytometers. *Cytometry Part A*. 2004, **58**(1), 13-20.
- [6] BENDALL, Sean, Garry NOLAN, Mario ROEDERER a Pratip CHATTOPADHYAY. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in Immunology*. 2012, **33**(7), 323-332.
- [7] ŠINKOROVÁ, Z. a ZÁRYBNICKÁ L. *Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda*. Hradec Králové, 2008, (3).
- [8] CHATTOPADHYAY, Pratip a Mario ROEDERER. Cytometry: Today's Technology and Tomorrow's Horizons. *Methods*. Bethesda, 2012, **57**(3), 251-258.
- [9] ERMANN, Joerg, Deepak RAO TESLOVICH, Nikola C., Michael BRENNER a Soumya RAYCHAUDHURI. Immune cell profiling to guide therapeutic decisions in rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*. 2015, **11**(9), 541-551.
- [10] CHAPMAN, Graeme. Instrumentation for flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 2000, **243**(1), 3-12.
- [11] NOLAN, John, Danilo CONDELLO a Erika DUGGAN. *Visible and near infrared fluorescence spectral flow cytometry*. 2013, 253-264.

- [12] RAHMAN, Mischa. *Introduction to Flow cytometry*. Kidlington: MorphoSys UK Ltd, 2009, 4-32.
- [13] ORMEROD, Michael. The Flow Cytometer. *Flow Cytometry: Chapter 2 - A Basic Introduction* [online]. 2008 [cit. 4. 5. 2017]. Dostupné z: <http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-2-flow-cytometer>
- [14] JAHAN-TIGH, Richard, C., RYAN a K. SCHWARZENBERGER. Flow cytometry. *Journal of investigative dermatology*. The Society for Investigative Dermatology, 2012, **132**(10), 1-6.
- [15] ORMEROD, Michael. Fluorescence & Fluorochromes. *Flow Cytometry: Chapter 3 - A Basic Introduction* [online]. 2008b [cit. 28. 5. 2017]. Dostupné z: <http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-3-fluorescence-fluorochromes>
- [16] Fluorochromy | LabGuide.cz - Průvodce laboratoří. *LabGuide.cz - Průvodce laboratoří* [online]. 2014 [cit. 4. 7. 2017]. Dostupné z: <http://labguide.cz/fluorochromy/>
- [17] BAUMGARTH, Nicole a Mario ROEDERER. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods*. 2000, (243), 77-97.
- [18] INTERIMUN SPOL. S. R. O. Imunofenotypizace krevních malignit | InterImun - Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii. *InterImun* [online]. 2017 [cit. 5. 7. 2017]. Dostupné z: http://www.interimun.cz/18/Imunofenotypizace_krevnich_malignit/
- [19] SINO BIOLOGICAL. What is cluster od diffentiation. *Sino Biological - Biological Solutions Specialist* [online]. b.r. [cit. 5. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www.sinobiological.com/what-is-cluster-of-differentiation.html>
- [20] RÜHLE, Paul, R. FIETKAU, GAIPL S. a B. FREY. Development of a modular assay for detailed immunophenotyping of peripheral human whole blood samples by multicolor flow cytometry. *International journal of molecular sciences*. 2016, **17**(8),

1-29.

- [21] GIVAN, Alice. *Flow cytometry: first principles*. Lebanon, New Hampshire: A John Willey & Sons, Inc., 2001, s. 157-174, ISBN: 9780471223948
- [22] SHAPIRO, Howard. *Practical flow cytometry*. Four Edition. Hoboken, New Jersey: John Willey & Sons, Inc., 2002, 256-275, ISBN: 0-471-41125-6.
- [23] BATTYE, Francis, Amanda LIGHT a David TARLINTON. Single cell sorting and cloning. *Journal of Immunological Methods*. 2000, **243**(1), 25-32.
- [24] DOAN, Hung, Garrett CHINN a Richard JAHAN-TIGH. Flow cytometry II: mass and imaging cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015, **135**(9), 1-4.
- [25] TANNER, Scott, Vladimir BARANOV, Olga ORNATSKY, Dmitry BANDURA a C. THADDEUS. An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications. *Cancer Immunol Immunother*. 2013, (62), 955-965.
- [26] SPITZER, Matthew a Garry NOLAN. Mass cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell*. 2016, **165**(4), 780-791.
- [27] BASIJI, David a M. O'GORMAN. Imaging flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 2015, (1), 423.
- [28] ORMEROD, Michael. Some Clinical Applications. *Flow Cytometry: Chapter 7 - Some Clinical Applications* [online]. b.r. [cit. 5. 7. 2017]. Dostupné z: <http://flowbook.denovosoftware.com/chapter-7-some-clinical-applications>
- [29] VARMA, Neelam a Shano NASEEM. Application of Flow Cytometry in Pediatric Hematology-Oncology. *Pediatr Blood Cancer*. 2011, (57), 18-29.
- [30] DOUBEK, Michael. Leukemie >> Linkos.cz. *Linkos, Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně* [online]. 2014 [cit. 5. 6. 2017]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/leukemie-c91-c95-1/leukemie->

1/#typy

- [31] PATI, Hara a Sonal JAIN. Flow Cytometry in Hematological Disorders. *Indian Journal Pediatr.* 2013, **80**(9), 772-778.
- [32] WOO, Janghee, Alexandra BAUMANN a Vivian ARGUELLO. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology. *Expert review of molecular diagnostics.* 2014, **14**(1), 67-81.
- [33] KALEEM, Z., E. CRAWFORD, M. PATHAN, L. JASPER, M. COVINSKY, L. JOHNSON a G. WHITE. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2003, **127**(1), 42-48.
- [34] TRNĚNÝ, Marek. Maligní lymfomy >> Linkos.cz. *Linkos, Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně* [online]. 2014 [cit. 5. 6. 2017]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lymfomy-c81-85/maligni-lymfomy/>
- [35] MAHMOOD, Asad, Muhammad SHARIF a Badar MURTAZA. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan.* 2008, **18**(8), 512-514.
- [36] HILLMEN, Peter, S. LEWIS, Monica BESSLER, Lucio LUZZATTO a John DACIE. Natural History of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *New England Journal of Medicine.* 1995, **333**(19), 1253-1258.
- [37] CHROBÁK, L. a P., DULÍČEK. *Léčba paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH).* 2001, **47**(11), 880-896.
- [38] CHROBÁK, Ladislav. Historie paroxysmální noční hemoglobinurie. *ACTA MEDICA SUPPLEMENTUM.* 2002, **45**(1).
- [39] ČERMÁK, J. Paroxysmální noční hemoglobinurie - novinky v diagnostice a léčbě. *Postgraduální medicína - zdravieuro.cz* [online]. 2010 [cit. 16. 6. 2017].

- Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/paroxyzmalni-nocni-hemoglobinurie-novinky-v-diagnostice-a-v-lecbe-452341>
- [40] RICHARDS, Stephen, Andrew RAWSTRON a Peter HILLMEN. Application of Flow Cytometry to the Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Cytometry Part A*. 2000, **42**(4), 223-233.
- [41] MARINOV, Iuri. PNH-Motolský minikurz. *Česká společnost pro analytickou cytometrii* [online]. 2015 [cit. 30. 5. 2017]. Dostupné z: www.csac.cz/own_files/file/Minikurz2015/PNH-Motolsky_minikurz.pdf
- [42] GRIGORIOU, E. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Testing by Flow Cytometry: Brief Overview for Clinicians. *Hospital Chronicles*. 2016, **11**(1), 15-21.
- [43] KOHOUTOVÁ, Martina. *Laboratorní příručka - Laboratoř průtokové cytometrie ÚHKT*. Praha: ÚHKT Praha, 2015, 1-16.
- [44] ŠARIŠSKÝ, M. Prietoková cytometria v diagnostike PNH. *Interná medicína: VII. Bratislavské hematologické a transfuziologické dni*. Bratislava, 2014, 20.
- [45] ČERMÁK, Jaroslav a D. ŠPONEROVÁ. *Sbornik_abstrakt_ohd_2013.pdf*. *Olomoucké hematologické dny* [online]. 2013 [cit. 19. 6.2017]. Dostupné z: http://www.olhemdny.cz/sites/default/files/downloads/sbornik_abstrakt_ohd_2013.pdf
- [46] ČERMÁK, Jaroslav. VII. Bratislavské hematologické a transfuziologické dni. *Interná medicína*. Bratislava, 2014, 1-44.
- [47] HILLMEN, Peter. The Complement Inhibitor Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *The New England journal of medicine*. 2006, **355**(12), 1233-1243.
- [48] IOLASCON, A., R.A. AVVISATI a C. PISCOPO. Hereditary spherocytosis. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2010, **17**(3), 138-142.
- [49] PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. *Hematologie a transfúzní lékařství*.

- Praha: Grada Publishing, 2011, 115-275, ISBN 978-80-247-3459-0.
- [50] BRANDENBERG, J., F. BIASIUTTI, H. LUTZ a W. WUILLEMIN. Hereditary spherocytosis and hemochromatosis. *Annals of hematology*. 2002, **81**(4), 202-209.
- [51] POLPRASERT, Chantana a Wararat, CHIANGJONG. Marked changes in red cell membrane proteins in hereditary. *Molekular biosystems*. 2012, **8**(9), 2312-2322.
- [52] DA COSTA, Lydie, Julie GALIMAND, Odile FENNETEAU a Narla MOHANDAS. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood reviews*. 2013, **27**(4), 167-178.
- [53] FARSINEJAD, A., H. ABOLGHASEMI, A. KAZEMI, M. AGHAIPOUR, E. HADJATI, M. FARANOUSH, M. JAZEBI a F. ALA. *Classification of Iranian patients with Glanzmann's Thrombasthenia using a flow cytometric method*. 2011, **22**(5), 321-327.
- [54] GEIEROVÁ, Věra. Poruchy funkce krevních destiček - Zdraví.Euro.cz. *Postgraduální medicína - Zdraví.Euro.cz* [online]. 2015 [cit. 6. 6. 2017]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/poruchy-funkce-krevnich-desticek-480295>
- [55] MARINOV, Iuri, LUXOVÁ A. a TKÁČOVÁ V. Standardizované postupy pro analýzu krevních destiček metodou průtokové cytometrie ve vztahu k riziku trombózy a krvácení. *Klinická biochemie a metabolismus*. Praha, 2011, **19**(40), 9-14.
- [56] GUERRA, João, Ruth KANAYAMA, Sonia NOZAWA et al. Thrombocytopenia: diagnosis with flow cytometry and antiplatelet antibodies. *Einstein*. 2011, **9**(2), 130-134.
- [57] ŠTEFÁNEK, Jiří. Sepse - otrava krve. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2011 [cit. 5. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=seps-otrava-krve>

- [58] MAGUIRE, O., J. TARIO, T. SHANAHAN, P. WALLACE a H. MINDERMAN. *Flow Cytometry and Solid Organ Transplantation: A Perfect Match*. Immunological Investigations, 2014, **43**(8), 756-774.
- [59] Transplantace - Anamneza.cz. *Anamneza.cz* [online]. 2011 [cit. 2. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Transplantace-324>
- [60] KAJABA, Václav, Lucie KOUDELKOVÁ, Luděk RAIDA, Monika LABUDÍKOVÁ a Marie TRNKOVÁ. Život po transplantaci krvetvorných buněk - Chirurgie - Zdraví.Euro.cz. *Sestra - Zdraví.Euro.cz* [online]. 2011 [cit. 2. 7. 2017]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/zivot-po-transplantaci-krvetvornych-bunek-462706>
- [61] JAKUBÍKOVÁ, Kateřina. Transplantace krvetvorných kmenových buněk - Hematologie - Zdraví.Euro.cz. *Sestra - Zdraví.Euro.cz* [online]. 2011 [cit. 2. 7. 2017]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/sestra/transplantace-krvetvornych-kmenovych-bunek-457277>
- [62] ŠMÍD, David. ProSestry - Transplantace orgánů. *ProSestry.cz* [online]. 2006 [cit. 2. 7. 2017]. Dostupné z: http://www.prosestry.cz/studijni_materialy/chirurgie/transplantace-organu
- [63] IKEM. Transplantace nitrobršních orgánů. *IK + EM - Institut Klinické a Experimentální medicíny* [online]. 2011 [cit. 2. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www2.ikem.cz/www?docid=1003413>
- [64] ČESKÁ TELEVIZE. Závod s časem – transplantace v Česku na rekordu, primát drží IKEM - ČT 24 - Česká televize. *Česká televize - ČT 24* [online]. 2015 [cit. 3. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www.ceskatelevize.cz/ct24/domaci/1499430-zavod-s-casem-transplantace-v-cesku-na-rekordu-primat-drzi-ikem>
- [65] SLATINSKÁ, Janka, Sylvie BLOUDÍČKOVÁ RAJNOCHOVÁ, Tomáš ROHÁL, Ivana BRŮŽKOVÁ, Vladimír HANZAL, Štefan VÍTKO a Ondřej VINICKÝ. Transplantace ledvin od žijících dárců. *Zdraví.Euro.cz* [online]. 2013 [cit. 3. 7. 2017]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni->

- [66] Transplantace ledvin - Anamneza.cz. *Anamneza.cz* [online]. 2011 [cit. 3. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Transplantace-ledvin-320>
- [67] Transplantace slinivky břišní - Anamneza.cz. *Anamneza.cz* [online]. 2011 [cit. 3. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Transplantace-slinivky-brisni-322>
- [68] Transplantace srdce - Anamneza.cz. *Anamneza.cz* [online]. 2011 [cit. 2017]. Dostupné z: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Transplantace-srdce-323>
- [69] RYSKA, Miroslav a Pavel TRUNEČKA. Transplantace jater - Zdraví.Euro.cz. *Postgraduální medicína - Zdraví.Euro.cz* [online]. 2000 [cit. 2017]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/transplantace-jater-124565>
- [70] Transplantace jater - Anamneza.cz. *Anamneza.cz* [online]. 2011 [cit. 3. 7. 2017]. Dostupné z: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Transplantace-jater-317>
- [71] SLOVÁČEK, Ladislav, Ladislav JEBAVÝ, Martin BLAŽEK, Miloslav KMONÍČEK a Pavel ŽÁK. Transplantace kostní dřeně: Přehled základních pojmů, typy transplantací, indikace, vlastní provedení. *Vojenské zdravotnické listy*. 2005, (74), 125-134.
- [72] NGOMA, A., S. SAITO, H. OHTO et al. CD34+ Cell Enumeration by Flow Cytometry: A Comparison of Systems and Methodologies. *Archives Of Pathology & Laboratory Medicine*. 2011, **135**(7), 909-914.
- [73] MASSIN, F., C. HUILI, V. DECOT, J. STOLTZ, D. BENSOUSSAN a V. LATGER-CANNARD. Validation of a single-platform method for hematopoietic CD34+ stem cells enumeration according to accreditation procedure. *Bio-Medical Materials & Engineering*. 2015, **25**, 27-29.

- [74] ALISON, Malcolm, Richard POULSOM, Stuart FORBES a Nicholas WRIGHT. An introduction to stem cells. *Journal of Pathology*. 2002, (197), 419-423.
- [75] BIEHL, Jesse a Brenda RUSSEL. Introduction to Stem Cell Therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*. 2009, **24**(2), 98-105.
- [76] BUNĚČNÁ TERAPIE. Kmenové buňky, jejich vlastnosti a členění. *Buněčná terapie*. 2014 [cit. 3. 7. 2017].. Dostupné také z:
<http://www.bunecnaterapie.cz/miranda2/export/sitesavcr/data.avcr.cz/lifesci/bunecnaterapie/sys/pdf/kmenove-bunky-vlastnosti-zakladni-cleneni-2.pdf>
- [77] SOREL, Nathalie, Severine BRABANT, Luc CHRISTIAENS, Andre BRIZARD, Gerard MAUCO a Laurent MACCHI. A rapid and specific whole blood HPA-1 phenotyping by flow cytometry using two commercialized monoclonal antibodies directed against GP IIIa and GP IIb-IIIa complexes. *British Journal of Haematology*. 2004, **124**(2), 221-223.
- [78] PADHI, Parikshit, Gulam PARIHAR, Jason STEPP a Robert KAPLAN. Post-transfusion purpura: a rare and life-threatening aetiology of thrombocytopenia. *BMJ Case Reports*. Londýn: BMJ Publishing Group LTD, 2013.