

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Alena Pechová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**VLIV MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK
NA HODNOTY LYMFOCYTÁRNÍHO PROLIFERAČNÍHO
TESTU**
Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 20.3.2016

.....
vlastnoruční podpis

Děkuji Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení bakalářské práce, poskytování cenných odborných rad, podnětů a materiálních podkladů. Dále děkuji své rodině za podporu a především Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň za možnost využití laboratoří k vypracování praktické části bakalářské práce.

Anotace

Příjmení a jméno: Pechová Alena

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Vliv mesenchymálních kmenových buněk na hodnoty lymfocytárního proliferačního testu

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran číslovaných: 38

Počet stran nečíslovaných: 19

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 34

Klíčová slova: mesenchymální kmenové buňky - lymfocyty – imunosuprese – transplantace - proliferace - imunologie

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá mesenchymálními kmenovými buňkami a jejich vlivem na proliferaci lymfocytů. V teoretické části rozebírá charakteristiku buněčných populací použitých při výzkumu a princip jejich vzájemné interakce. V praktické části byl proveden výzkum za použití testu blastické transformace a vyhodnocení průtokovou cytometrií. Tento výzkum prokázal imunomodulační vliv mesenchymálních kmenových buněk na proliferaci lymfocytů, tudíž mohou být využity pro imunosupresivní léčbu u pacientů po transplantacích.

Annotation

Surname and name: Pechová Alena

Department: Department of theoretical fields

Title of thesis: The influence of the mesenchymal stem cells to the values of lymphocyte proliferation testing

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of numbered pages: 38

Number of unnumbered pages: 19

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 34

Key words: mesenchymal stem cells – lymphocytes – immunosuppressant – transplantation – proliferation - immunology

Summary:

This bachelor work concentrates on mesenchymal stem cells and their influence on proliferation of lymphocytes. The theoretical part deals with characteristic of cell populations used for research and their mutual interaction. In practical part was performed a research with application of lymphocyte activation test and evaluation with flow cytometry. This research proves the immunomodulating influence of mesenchymal stem cells to proliferation of lymphocytes, so they can be used for immunosuppressive therapy for patients after transplantation.

OBSAH

ÚVOD	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY	12
1.1 Charakteristika	12
1.2 Diferenciace	12
1.3 Imunofenotyp a povrchové znaky	13
1.4 Reakce s imunocyty	13
2 T- LYMFOCYTY	14
2.1 Charakteristika	14
2.2 Diferenciace	14
2.3 Vývoj TCR a selekce	15
2.4 Imunofenotyp T lymfocytů	16
2.5 Subpopulace T lymfocytů	16
2.6 Aktivace specifické imunity	18
3 IMUNITNÍ ODPOVĚĎ A VLIV MSC	18
3.1 T _H 1 imunitní odpověď	18
3.2 T _H 2 imunitní odpověď	19
3.3 Imunitní reakce typu T _H 17	20
3.4 Transplantace	20
3.4.1 Aloimunitní reakce	21
3.5 Rejekce a reakce štěpu proti hostiteli	21
3.5.1 Akutní rejekce	21
3.5.2 Chronická rejekce	22
3.5.3 Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)	22
3.6 Předtransplantační opatření a imunosuprese	22
3.7 Imunomodulace pomocí MSC	22
4 BUNĚČNÝ CYKLUS	23
4.1 Regulace buněčného cyklu	23
4.2 Fáze buněčného cyklu	24
4.3 Interfáze	24
4.3.1 G1 fáze	24
4.3.2 S fáze	24
4.3.3 G2 fáze	25

4.4 Mitóza (M-fáze).....	25
4.4.1 Profáze.....	25
4.4.2 Prometafáze.....	26
4.4.3 Metafáze.....	26
4.4.4 Anafáze.....	26
4.4.5 Telofáze.....	26
4.5 Cytokineze.....	27
PRAKTICKÁ ČÁST.....	28
5 FORMULACE PROBLÉMU.....	28
5.1 Hlavní problém.....	28
5.2 Dílčí problémy.....	28
6 CÍL A ÚKOL VÝZKUMU.....	28
7 OBECNÝ ÚVOD DO PRAKTICKÉ ČÁSTI.....	29
7.1 Test blastické transformace.....	29
7.2 Průtoková cytometrie.....	30
7.3 Mitogeny.....	31
8 METODIKA.....	32
8.1 Zkoumaný vzorek.....	32
8.2 Získávání mesenchymálních kmenových buněk.....	32
8.3 Izolace a kultivace mesenchymálních kmenových buněk.....	33
8.4 Izolace lymfocytů.....	33
8.4.1 Postup.....	33
8.5 Kultivace.....	34
8.6 Test blastické transformace.....	34
8.6.1 Postup.....	35
8.7 Stanovení procenta aktivovaných lymfocytů.....	35
8.8 Statistické metody.....	37
9 VÝSLEDKY.....	38
DISKUZE.....	42
ZÁVĚR.....	47
LITERATURA A PRAMENY.....	49
SEZNAM ZKRATEK.....	52
SEZNAM TABULEK.....	53
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	53
SEZNAM GRAFŮ.....	53
SEZNAM PŘÍLOH.....	53

PŘÍLOHY	54
Příloha 1	54
Příloha 2	55
Příloha 3	56
Příloha 4	57

ÚVOD

Bakalářská práce s názvem "Vliv mesenchymálních kmenových buněk na hodnoty lymfocytárního proliferačního testu" se zabývá problematikou využití mesenchymálních kmenových buněk v moderní medicíně.

Toto téma bylo vybráno kvůli jeho aktuálnosti v současné době. Kolem kmenových buněk a jejich využití se dnes vedou velké debaty. Jejich pozitivní účinky i jejich všestrannost byly již v mnoha směrech prokázány, ale přesto ještě nebyl plně využit jejich potenciál, stejně jako se o jejich možnostech málo mluví v široké veřejnosti.

Hlavním cílem této práce je dokázat výhody a účinnost jejich využití v imunologii, a to jako prostředků pro imunomodulační léčbu pacientů po transplantacích, která by byla účinná a zároveň šetrná k organismu pacienta.

Teoretická část práce shrnuje informace o mesenchymálních kmenových buňkách a T lymfocytech, jejich charakterizaci, imunofenotypu a diferenciaci. Dále se zabývá jejich vzájemnou interakcí a principem imunosupresivních vlastností mesenchymálních kmenových buněk, přičemž nastiňuje i základní informace o buněčném cyklu.

V praktické části je uvedena metodika výzkumu jako izolace kmenových buněk a lymfocytů, hlavní částí je test blastické transformace, jeho princip i postup a nakonec analýza získaných výsledků.

V diskuzi je pak rozebrána problematika z praktického hlediska. Jsou zde popsány možnosti praktického terapeutického využití mesenchymálních kmenových buněk včetně jeho výhod i nevýhod.

TEORETICKÁ ČÁST

1 MESENCHYMÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

1.1 Charakteristika

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní nehematopoetické prekurzory buněk, jež jsou získávány z kostní dřene, tukové tkáně, či pupečnickové krve. Dále se diferencují na specializované buňky různých tkání. Poprvé byly objeveny A.J. Friedensteinem a jeho kolegy, kteří MSC popsali jako nehematopoetickou buňku nacházející se v kostní dřeni rozdílných živočišných druhů, která dokáže *in vitro* tvořit vazivovou tkáň. Buňky byly pojmenovány CFU-Fs (fibroblasticcolony-formingunites) a později bylo zjištěno, že se nemění pouze na buňky vazivové, ale dokážou se diferencovat například i na buňky kostní, tukové či chrupavkové tkáně. Poté, co byla objevena prekurzorová buňka hematopoetického systému, byla mesenchymálním kmenovým buňkám přiřčena funkce prekurzoru nehematopoetických buněk, což ovlivnilo především chápání vzniku pojivových tkání. MSC se staly takovým fenoménem především díky jejich schopnosti růst a vyvíjet se jak v umělých podmínkách, tak při implantaci do živého organismu. V oblasti tkáňového inženýrství a vývoje biomateriálů se předpovídá těmto kmenovým buňkám slibná budoucnost. Hlavní cíl je v současnosti založen na myšlence programovatelnosti těchto buněk, aby byly schopné znovuobnovovat poškozené tkáně přímo *in vivo*.⁽¹⁾⁽²⁾

1.2 Diferenciace

Mesenchymální kmenové buňky se diferencují ve specializované buněčné typy různých tkání.

V první řadě to jsou osteoblasty, totiž metabolicky aktivní buňky organické kostní tkáně. Dále to jsou chondrocyty, buňky tvořící chrupavku, tenocyty, buňky tvořící vazivovou tkáň, adipocyty neboli buňky tukové tkáně a také myocyty a kardiomyocyty - buňky kosterní a srdeční svaloviny.⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

1.3 Imunofenotyp a povrchové znaky

Mesenchymální kmenové buňky jako takové nelze charakterizovat jakýmkoliv specifickým markerem. Chybí i klasické hematopoetické antigeny (jako jsou CD14, CD19, CD34, CD45 atd.). Na svém povrchu ale nesou molekuly CD73, CD90, CD105 a mnohé další, což je dáno zdrojem buněk a podmínkami jejich kultivace. Jejich exprese HLA I. třídy je velmi nízká, stejně tak exprese kostimulačních molekul CD80, CD86 a CD40. Z toho vyplývá, že mesenchymální kmenové buňky nevyvolávají u lymfocytů téměř žádnou imunitní odpověď, tudíž je můžeme transplantovat příjemci, aniž bychom museli brát v úvahu shodu hlavního histokompatibilního systému. ⁽⁴⁾

1.4 Reakce s imunocyty

Mesenchymální kmenové buňky reagují s buňkami jak vrozené, tak získané imunity tak, že dokážou ovlivňovat a zasahovat do některých funkcí imunitního systému. MSC tak můžou navodit silnější protizánětlivou reakci, nebo naopak tolerantnější imunitní prostředí. Tento jev je způsoben změnou cytokinového profilu, který exprimují buňky jako aktivované Th1 lymfocyty, NK či dendritické buňky. ⁽⁴⁾

U T_H1 lymfocytů dokážou MSC snížit produkci IFN- γ , u lymfocytů T_H2 zvyšují míru sekrece IL-4. V přítomnosti MSC zvyšují nezralé dendritické buňky a regulační T lymfocyty expresi IL-10, oproti tomu vyztřelé dendritické buňky snižují sekreci TNF- α a IL-12.

Důležitou vlastností mesenchymálních kmenových buněk je jejich schopnost tlumit proliferaci T lymfocytů, a to zastavením jejich buněčného cyklu v G0/G1 fázi. Klíčovou látkou v tomto ději je enzym indoleamine 2,3- dioxygenáza (IDO). Ta dokáže katalyzovat přeměnu tryptofanu na kynurenin a snižuje tak proliferaci T lymfocytů pomocí deplece tryptofanu a kumulace jeho toxických metabolitů. MSC také produkují enzym cyklooxygenázu (COX) a ovlivňují imunitní funkce T lymfocytů sekrecí prostaglandinu E2, který vyvolává diferenciaci na regulační T lymfocyty. ⁽⁴⁾

Za působení mesenchymálních kmenových buněk je tedy významně snižena jak proliferace lymfocytů antigenně specifická, tak proliferace nespecifická mitogenně indukovaná. Kromě snížení proliferace dochází ke stimulaci regulačních T lymfocytů. Tato vlastnost MSC není selektivní a týká se proto kompletně všech T buněk, od nativních T lymfocytů po paměťové buňky a stejně tak CD4 a CD8 pozitivních populací. Zajímavé

také je, že tento jev mohou vyvolávat jak kmenové buňky alogenní, tak autologní, a míra účinku závisí především na množství implantovaných buněk.

Těchto faktů je v praxi využíváno především tam, kde je třeba ovlivnit imunitní systém a zajistit tolerantní až protizánětlivé prostředí. MSC jsou tudíž podávány jako imunosupresiva u řady onemocnění a používány pro posttransplantační léčbu. Jako příklad se nabízí problematika GVHD (chronická reakce štěpu proti hostiteli) po transplantaci kostní dřeně, nebo cokoliv, kde hrozí auto či aloreaktivní imunitní odpověď. ⁽⁴⁾

2 T- LYMFOCYTY

2.1 Charakteristika

T lymfocyty jsou hlavní buněčnou složkou antigeně specifických mechanismů imunitního systému. Jejich hlavní funkcí je rozpoznat komplex *MHC* gp - antigení peptid zpracovaný a předkládaný antigen prezentujícími buňkami. Takové antigeny rozpoznávají pomocí TCR - antigeně specifických receptorů - na svém povrchu. Pokud jsou T lymfocyty takto stimulovány, začínají se diferencovat na buňky efektorové a buňky paměťové. Tak se mohou angažovat v obranných imunitních reakcích, například proti nádorovým buňkám či buňkám napadeným virem. ^{(5) (6) (7)}

2.2 Diferenciace

Lymfocyty patří mezi imunocyty - buňky imunitního systému, obecně známé jako bílé krvinky (leukocyty). Všechny leukocyty vznikají stejně jako ostatní krevní buňky v kostní dřeni z pluripotentních kmenových buněk. Pluripotentní kmenová buňka se diferencuje na dvě základní buněčné větve - myeloidní a lymfoidní. Myeloidní prekurzor se dále diferencuje na monocyty, granulocyty, dendritické buňky, mastocyty, ale také na trombocyty a erytrocyty. Z lymfoidního progenitoru pak vznikají NK buňky a T a B lymfocyty. ^{(5) (6) (7)}

Přestože vývoj T lymfocytů začíná v kostní dřeni, hlavní část vývoje se přesouvá do brzlíku (latinsky thymus - odtud "T" v názvu T lymfocytů). V thymu dozrávají dvě hlavní subpopulace buněk ($\alpha\beta$ T lymfocyty), a to prekurzory T_H lymfocytů (pomocné T lymfocyty) a T_C lymfocytů (cytotoxické T lymfocyty). Další lymfocytární subpopulace se vyvíjejí mimo

thymus ($\gamma\delta$ T lymfocyty). Ve zralé efektorové buňky se prekurzory lymfocytárních subpopulací mění až po setkání s antigenem na povrchu vhodných antigen prezentujících buněk. Část T lymfocytů (spolu s částí B lymfocytů) pak tvoří základ imunologické paměti. Po setkání s antigenem se nemění v buňky efektorové, ale v buňky paměťové, které přetrvávají v krvi roky a po druhém setkání se stejným antigenem se rychle aktivují a zajišťují tak rychlejší (tzv. sekundární) odpověď. ^{(5) (6) (7)}

2.3 Vývoj TCR a selekce

Nezralé T lymfocyty, které přecházejí do brzlíku z kostní dřeně, se nazývají pro-thymocyty. Na takových lymfocytech začne nejprve probíhat přeskupování genů pro antigenně specifické T receptory (TCR). Geny, které kódují variabilní úseky TCR, se během vývoje lymfocytů přeskupují libovolně, čímž vzniká velké množství rozličných lymfocytárních klonů. Pokud je přeskupování úspěšné, vznikne na povrchové membráně T lymfocytu pre-TCR složený jen z řetězce β , pre-TCR α a CD3 komplexu. Dále dochází i k přeskupování genu pro TCR α a vznikne tak finální podoba receptoru složeného ze dvou řetězců - α a β . Buňky v této fázi vývoje tvoří většinu všech buněk v thymu - tzv. kortikální thymocyty. V této době se na jejich membráně vyskytují též koreceptory CD4 a CD8. ^{(5) (6) (7)}

Jelikož během přeskupování dochází též ke tvorbě autoreaktivních klonů, je třeba je ještě během vývoje eliminovat. K tomu dochází pomocí takzvané negativní selekce, kdy jsou rozpoznány a apoptoticky odstraněny lymfocyty, které svým TCR příliš silně vážou komplex MHC proteinů s normálními přirozenými peptidy, jež se vyskytují na povrchu například epiteliálních buněk brzlíku. Kromě autoreaktivních buněk je třeba dále eliminovat také buňky poškozené a s nefunkčním TCR, díky čemuž nemohou rozpoznávat molekuly MHC s dostatečnou afinitou. Taková eliminace se nazývá pozitivní, je velmi přísná a je při ní odstraněno 98% původních pro-thymocytů. Jedinou výjimkou, kdy autoreaktivní lymfocyty apoptovány nejsou, je u vývoje regulačních T lymfocytů. Z ostatních buněk pak vznikají zralé (medulární) T lymfocyty, které obsahují množství různě specifických TCR, zachovávají si expresi CD4 nebo CD8 a přesouvají se z thymu do sekundárních lymfatických orgánů. ^{(5) (6) (7)}

2.4 Imunofenotyp T lymfocytů

Molekuly, které se nacházejí na povrchu leukocytů, se řídí tzv. "*CD názvoslovím*". Tento systém pojmenovávání povrchových znaků pořadovými čísly má přispět k systematizaci a přehlednosti, především kvůli neustálému objevování nových povrchových molekul. Mnohé z těchto molekul však mají i druhý název, který víc vypovídá o jejich struktuře či funkci. ^{(5) (6) (7)}

Nejdůležitějším povrchovým znakem T lymfocytů je již zmiňovaný TCR. Je složený z části vázající antigen, která je strukturně podobná imunoglobulinům. Má dva transmembránové řetězce označované α a β , na jejichž N terminální konec se váže antigen. Dále obsahuje proteinový CD3 komplex, který slouží k přenosu signálu.

Na povrchu T lymfocytů se také vyskytují koreceptory spolupracující s TCR při rozpoznávání antigenu. Označují se jako CD4 (pro subpopulaci pomocných T lymfocytů) a CD8 (pro subpopulaci cytotoxických T lymfocytů). Tyto koreceptory napomáhají vázat MHC glykoproteiny. ^{(5) (8) (7)}

Aby se T lymfocyt plně aktivoval, potřebuje obdržet dostatečně silný signál. Ten mu zajišťují další povrchové molekuly, totiž kostimulační receptory CD28, které posilují signál tím, že se navážou na CD80 a CD86 znaky antigen prezentujících buněk. ^{(5) (8) (9) (6)}

Antagonistou kostimulačního receptoru je pak inhibiční receptor CD152 (nebo také CTLA-4), který po navázání na receptory CD80 a CD86 antigen prezentujících buněk inhibuje aktivaci T lymfocytů. ⁽¹⁰⁾

Na povrchu nezralých T lymfocytů můžeme naopak najít povrchové molekuly CD2 a nebo CD7, pokud se T lymfocyt nachází ještě v brzlíku. ⁽⁵⁾

2.5 Subpopulace T lymfocytů

Jak již bylo naznačeno, T lymfocyty se dělí na několik dalších typů - subpopulací - dle toho, jaké nesou povrchové molekuly. Samozřejmě všechny zralé T lymfocyty nesou TCR, ale už zde je třeba rozlišovat, zda se jedná o TCR typu $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$. Zatímco lymfocyty s receptorem $\alpha\beta$ jsou populací většinovou, receptorů $\gamma\delta$ je mnohonásobně méně. Vykazují menší různorodost TCR, mohou se vyvíjet i mimo thymus a zřejmě rozeznávají jiné antigeny, než MHC gp. Přesná funkce T lymfocytů s TCR typu $\gamma\delta$ není dosud přesně definovaná, ale předpokládá se, že mohou rozpoznávat jisté jednoduché organické látky obsažené v potravě.

Mohou se také uplatňovat při obraně proti některým specifickým patogenům a dokonce byla prokázána účast na protinádorové a imunoregulační aktivitě. ^{(5) (11) (7) (12)}

Zvláštními typy T lymfocytů jsou takzvané intraepiteliální T lymfocyty nacházející se v kůži a sliznicích. Produkují řadu specifických cytokinů, a tak zajišťují regulaci slizniční imunity. Jejich TCR jsou jak typu $\alpha\beta$, tak $\gamma\delta$. Další takovou skupinou jsou invariantní NKT lymfocyty (iNKT), jež mají TCR pouze typu $\alpha\beta$, ale dalšími receptory se velmi podobají NK buňkám. Mají vcelku úzké vazebné možnosti, avšak na stimulaci reagují velmi rychle a v organismu pravděpodobně plní funkci regulační. ^{(5) (6) (12)}

Důležitou skupinou T lymfocytů jsou cytotoxické T lymfocyty (T_C) exprimující znaky CD8. Jejich funkcí je imunitní reakce proti buňkám napadeným virem nebo intracelulárním parazitům. Také jsou schopné rozeznat buňky poškozené stresem nebo buňky nádorové. Takové buňky následně velmi razantně ničí přímým navázáním na jejich povrch a produkcí cytotoxických látek (perforiny a granzimy). Fungují tedy na podobném principu jako NK buňky, jen jsou antigenně specifické. Aktivace se spustí, pokud rozpozná MHC gp I například s navázanými virovými proteiny. Cílem je úplné zničení hrozící nákazy a jelikož je taková imunitní reakce velmi radikální, dochází i k určitému poškození zdravých buněk. ^{(5) (13) (14) (12)}

Další neméně významnou skupinou jsou T lymfocyty mající na povrchu znaky CD4, totiž lymfocyty pomocné (T_H - "*helper*"). Podle produkce cytokinů se dále dělí na podskupiny. Podskupina T_H1 produkuje IL-2, IFN- γ a zajišťuje pomoc makrofágům, T_H2 produkuje IL-4, 5, 6 a 10 a zajišťuje pomoc B lymfocytům. Obě tyto skupiny produkcí svých cytokinů regulují vývoj skupiny druhé. T_H3 podskupina produkuje především růstový faktor- β (TGF- β) a spolu s B lymfocyty napomáhá hojení tkání. Prekurzorem všech předchozích podskupin jsou lymfocyty T_H0 . Méně známou podskupinou jsou pak lymfocyty T_H17 , které zajišťují ochranu proti extracelulárním bakteriím ^{(13) (15) (9) (16) (14) (17) (12)}

Důležitou roli zaujímají regulační T lymfocyty (Treg), které se kvůli CD4 znakům na svém povrchu také zařazují jako podskupina T_H lymfocytů. Hrají roli při udržování tolerance vůči vlastním tkáním. Na svém povrchu nesou znaky CD25, CTLA-4 a transkripční faktor FoxP-3, který hraje nezastupitelnou roli v jejich vývoji. Regulační T lymfocyty nesou potenciálně autoreaktivní TCR, ale přesto potlačují autoimunitní reakci, nevyvolávají ji, jak by se zprvu zdálo. ^{(5) (14) (12)}

Nejde opomenout ani skupinu lymfocytů T_M ("*memory*"), neboli paměťové T lymfocyty, které zajišťují imunologickou paměť. ^{(14) (12)}

2.6 Aktivace specifické imunity

Získaná imunita, neboli specifická imunita, je založena na principu reakce proti konkrétnímu antigenu. Buněčnou složkou specifické imunity jsou T a B lymfocyty, humorální složkou jsou protilátky produkované plazmatickými buňkami vzniklými z B lymfocytů po rozpoznání specifického antigenu. K tomu napomáhají antigen prezentující buňky a pomocné T lymfocyty.

V organismu existují desítky milionů různorodých T a B lymfocytů, které čekají na setkání s příslušným antigenem. Zatímco B lymfocyty jsou schopné reagovat přímo s rozpustným nativním antigenem, T lymfocyty vyžadují, aby jim byl antigen rozložen na jednotlivé peptidy a prezentován pomocí APC. TCR je totiž schopný peptidy rozpoznat, jen když tvoří nerozpustný komplex s molekulami HLA.

Všechny jaderné buňky lidského těla dokážou prezentovat antigenní peptidy pomocí MHC gp I. třídy. Jsou to krátké peptidy o přibližně 9 AMK, které buňka sama rozložila v cytoplazmě, a rozpoznávají je T_C lymfocyty. Antigen prezentující buňky prezentují delší peptidy o délce 15-20 AMK pomocí MHC gp II. třídy. Tyto peptidy pocházejí přímo z částic, které APC fagocytují, zpracovávají v endozomech a předkládají pomocným T lymfocytům.

Pokud se stane, že do těla pronikne antigen a je rozpoznán dostatečně specifickým receptorem, dojde k proliferaci daných lymfocytů a vytvoří se množství klonů stejné specifity, které dozrávají v plně funkční efektorové buňky. Aby došlo k pomnožení však nestačí pouze signál specifického receptoru. Většinou se musí zapojit další buňky imunitního systému, aby vznikl tzv. kostimulační signál. Toto "opatření" je důležité proto, aby nedocházelo k bezpředmětné, časté a nebezpečné proliferaci lymfocytů. ^{(5) (14) (6) (12)}

3 IMUNITNÍ ODPOVĚĎ A VLIV MSC

3.1 T_H1 imunitní odpověď

T_H1 lymfocyty, jak už bylo řečeno, chrání organismus před intracelulárními patogeny (tzn. intracelulárně parazitujícími bakteriemi, viry, intracelulárními parazity atd.). Jejich funkcí je pomoc makrofágům při přeměně na aktivované, a to produkcí potřebného interferonu gama ($IFN-\gamma$). Díky těmto interferonům se makrofágy aktivují a začínají produkovat oxid dusnatý, který likviduje intracelulární patogeny, jako jsou například

mykobakterie, jež jsou schopné přežít i po pohlcení makrofágem. Makrofágy po aktivaci mimo prezentace patogenních peptidů na MHC gp. II také secernují různé druhy kostimulačních molekul a cytokinů. Jaký druh cytokinů budou produkovat, záleží na druhu receptorů, které dané patogeny stimulují. ^{(5) (14) (18)}

V případě imunitní reakce typu T_H1 produkují makrofágy například IL-12, který je rozpoznáván prekurzory T_H1 lymfocytů. Infikované makrofágy tak způsobují vznik lokálního zánětu, který vede k potlačení infekce. Proto se T_H1 imunitní reakci říká také reakce zánětlivá a T_H1 lymfocytům zánětlivé T lymfocyty. Vzniklé efektorové buňky jsou následně schopné samy navyšovat diferenciaci dalších T_H1 lymfocytů a aktivaci makrofágů, jelikož rovněž začnou produkovat $IFN\gamma$ a IL-2 (autokrinní růstový faktor T_H1 lymfocytů). Důležitá je také kostimulace pomocí makrofágového receptoru CD40 a jeho ligandu CD40L (CD154) na povrchu efektorových T_H1 lymfocytů. Tento složitý proces předávání signálů a stimulací vede k aktivaci i neinfikovaných makrofágů, které efektivněji produkují další látky (cytokiny, TNF, IL-1,...), což vede k dalšímu zvýšení diferenciaci T_H1 lymfocytů a navýšení zánětlivé reakce. ^{(5) (6) (14) (7) (18)}

Makrofágy ve spolupráci s T_H1 lymfocyty jsou také zodpovědné za imunopatologickou reakci IV. typu (jinak také opožděná nebo buněčná, zkratkou DTH). Jedná se o typ přecitlivělosti vůči alergenu, kdy se v krvi nevyskytují volné protilátky a reakce je způsobena T_H1 lymfocyty. Reakce je lokální a nastává až po 24-72 hodinách. ⁽²⁴⁾

Kromě aktivace makrofágů hrají T_H1 lymfocyty důležitou roli při podpoře diferenciaci cytotoxických T lymfocytů. Je ale možné, že některé funkce dnes připisované T_H1 lymfocytům, jsou ve skutečnosti vykonávány spíše T_H17 lymfocyty, které vykazují významné protizánětlivé účinky. ^{(5) (15) (18)}

3.2 T_H2 imunitní odpověď

T_H2 lymfocyty zajišťují ochranu vůči extracelulárním patogenům, a to včetně mnohobuněčných parazitů. Spolupracují s eosinofily, bazofily a mastocyty. Dále podporují tvorbu IgE protilátek B lymfocyty.

K proliferaci prekurzorů T_H2 buněk je nutné setkání s antigenem v komplexu s MHC gp. II na profesionálních antigen prezentujících buňkách za přítomnosti IL-4, který je produkován bazofily či mastocyty. Signály přijaté přes specifický T receptor, CD28, receptor pro IL-4 a IL-12 nasmartují dělení a dozrávání prekurzorů ve zralé efektorové T_H2 lymfocyty.

Zralé T_H2 lymfocyty pak komunikují s B lymfocyty pomocí přímého mezibuněčného kontaktu kostimulačních receptorů (CD40 a CD40L) a cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6). Interakce mezi kostimulačními receptory obou lymfocytů je důležitá pro vznik somatických mutací, izotypový přesmyk a následný vznik paměťových buněk. ⁽⁵⁾⁽¹⁴⁾⁽⁷⁾⁽¹⁸⁾

3.3 Imunitní reakce typu T_H17

Tyto lymfocyty získaly své označení díky produkci IL-17, který působí protizánětlivě. T_H17 lymfocyty zajišťují obranu především proti extracelulárním bakteriím a plísním. Jejich prekurzory se označují jako rT_H17 (regulační T_H17), vznikají na popud různých faktorů, jako jsou například TGF- β nebo IL-6, a jako takové mají silně protizánětlivé účinky. Regulační T_H17 prekurzory jsou ale velmi nestabilní a za přítomnosti IL-23 se následně diferencují v efektorové T_H17 lymfocyty, které naopak zánět podporují a aktivují neutrofilní granulocyty.

Nejvýznamnější cytokiny produkované T_H17 lymfocyty jsou IL-17 a IL-22, ale je tu řada i jiných, například IL-6, IL-8, IL-26, TNF- α a mnoho dalších, jež aktivují endoteliální buňky, fibroblasty, epiteliální buňky či makrofágy. Efektorové T_H17 lymfocyty tedy způsobují prozánětlivou reakci ve tkáních, která vede k migraci neutrofilů do místa infekce a jejich následné aktivaci. Tyto mechanismy však mohou také vést k rozvoji autoimunitních onemocnění nebo ke zhoršení chronických zánětů. ⁽⁵⁾⁽¹⁷⁾

3.4 Transplantace

Transplantace znamená voperování zdravé tkáně či orgánu příjemci, pokud jeho vlastní tkáň či orgán přestaly fungovat správně a příjemce je tím ohrožen na životě. Nejběžnější jsou krevní transfuze, z orgánových transplantací je pak nejčastější transplantace ledvin. Pokud jde o transplantaci autologní (dárce = příjemce, nejčastěji přenos kůže na jiné místo na těle) nebo syngenní (dárce je geneticky identické dvojče), štep je imunitním systémem přijímán bez potíží. Jde-li ale o transplantaci alogenní, kdy dárce je člověk, který nemá identickou genetickou výbavu jako příjemce (třebaže je to blízký příbuzný), hraje imunitní systém při zákroku velkou roli a je třeba počítat s imunitní reakcí proti štěpu. ⁽⁵⁾⁽¹⁸⁾

3.4.1 Aloimunitní reakce

Úspěšnost transplantace podmiňuje řada faktorů: věk, zdravotní stav, základní onemocnění, úroveň lékařské péče, stav transplantovaného orgánu a podobně. Z imunologického hlediska hraje ale nejdůležitější roli genetická kompatibilita dárce a příjemce. Rozdílnost genetického materiálu totiž znamená i rozdílnost histokompatibilních molekul a to je příčinou aloimunitních reakcí proti transplantátu a jeho akutní rejekce nebo (při transplantaci kostní dřeně) reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). Za reakci štěpu proti hostiteli jsou zodpovědné T lymfocyty dárce, které příjemce obdrží spolu se štěpem (kostní dřeň). GvHD se projevuje především u lidí s oslabenou imunitou, kdy transplantované T lymfocyty napadají buňky příjemce, což může vést až k jeho smrti. ⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾

Hlavní roli při aloimunitních reakcích hraje rozdílnost antigenů v MHC komplexech. Tyto individuální odlišnosti ve vazebných místech pro antigen způsobují velkou rozdílnost ve škále prezentovaných peptidů na buňkách dárce a příjemce. T lymfocyty příjemce (nebo dárce u GvHD) tudíž rozpoznávají tyto komplexy jako cizorodé, jelikož se s takovými antigeny během svého vývoje v thymu nemohly setkat. Samozřejmě aloimunitní reakci mohou vyvolat jiné polymorfismy, tzv. vedlejší histokompatibilní antigeny. ⁽⁵⁾⁽¹⁷⁾

T lymfocyty rozpoznávají cizorodé buňky buď přímo přes TCR, nebo nepřímo, kdy jsou jim aloantigeny prezentovány přes APC. Kromě T lymfocytů se aloreakce mohou účastnit i NK buňky, a to v případě, že se jejich KIR receptor neshoduje s HLA molekulami I. třídy na transplantovaných buňkách.

Protilátková reakce nastává, jsou-li za pomoci T lymfocytů aktivovány a diferencovány i specifické B lymfocyty. Nejznámějšími takovými případy jsou přirozená imunizace Rh negativní matky proti otcovským antigenům Rh pozitivního plodu při porodu nebo reakce na krevní transfuzi s inkompatibilní krevní skupinou. ⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾

3.5 Rejekce a reakce štěpu proti hostiteli

3.5.1 Akutní rejekce

Jde o primární imunitní reakci organismu proti transplantátu, kdy k odvržení dojde v řádu několika dnů až týdnů. Příčinou bývá ukončení podávání imunosupresivních přípravků, kdy proti štěpu začnou bojovat specifické T_H1 a T_c lymfocyty příjemce. ⁽⁵⁾

3.5.2 Chronická rejekce

Tento typ rejekce se vyvíjí později a je způsoben buď protilátkami, nebo T lymfocyty. T lymfocyty proliferují a postupně se diferencují převážně na subpopulace T_{H2} a T_{H3} a zároveň se tvoří množství aloprotilátek a cytokinů, které poškozují cévy. V důsledku toho se nahrazuje tkáň cév vazivem, poškozují se endotel a cévy selhávají, až dojde k ischemizaci tkáně a rejekci štěpu.⁽⁵⁾

3.5.3 Reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)

Tato reakce nastává v případě transplantace krvetvorné tkáně. T lymfocyty dárce přítomné v kostní dřeni rozpoznají buňky příjemce jako cizorodé, což spustí imunitní reakci. I tato reakce může být jak akutní, tak chronická.⁽⁵⁾⁽¹⁹⁾

3.6 Předtransplantační opatření a imunosuprese

Je samozřejmé, že před i po samotné transplantaci je snaha přijmout taková opatření, aby riziko pro příjemce bylo co nejmenší a zabránilo se aloimunitním reakcím. Taková opatření jsou:

- nalezení geneticky přijatelného dárce (nejlépe jednovaječné dvojče, či blízký příbuzný)
- podávání imunosupresivních přípravků (po určité době dojde k toleranci štěpu, vyvstává však zvýšené riziko infekcí)
- odstranění T lymfocytů ze štěpu dárce (ozařováním štěpu před transplantací, tzv. purifikace kmenových buněk)

Jako imunosupresiva se používají nescifické látky postihující jak nežádoucí T lymfocyty, tak i ostatní buňky imunitního systému, což vede ke zvýšenému riziku infekčních a nádorových onemocnění.⁽⁵⁾

3.7 Imunomodulace pomocí MSC

Jak už bylo popsáno v první kapitole, mesenchymální kmenové buňky reagují s buňkami vrozené i získané imunity a vykazují významné imunomodulační vlastnosti. Jejich

vlastnost ovlivňovat imunitní reakci a navozovat tolerantní prostředí je přímo předurčuje k využití v posttransplantační imunopresivní léčbě.

Jelikož mohou snižovat proliferaci T lymfocytů a NK buněk a podporují vznik regulačních T lymfocytů, navozují imunitní toleranci bez většího zásahu do ostatních složek imunitního systému a z většiny tím řeší oslabení ochrany proti infekcím a vzniku nádorů.⁽⁴⁾

4 BUNĚČNÝ CYKLUS

Buněčný cyklus buňky je proces koloběhu buněčného života, během něhož buňka prochází sledem několika na sebe navazujících fází, jejichž cílem je předat svou genetickou informaci buňkám dceřiným. Celý tento děj hraje nezastupitelnou roli při růstu organismu, nahrazování odumřelých buněk, nebo při hojení tkání. Nutno podotknout, že většina buněk v tkáních lidského těla se již nedělí. Jsou plně diferencované a setrvávají v tzv. G₀ fázi, totiž ve fázi klidové, a jejich hlavní funkcí je vykonávat své metabolické děje. Proto ve vyvinutých tkáních k buněčnému dělení zpravidla nedochází. Zvláštní případ jsou kmenové buňky a naivní lymfocyty, které setrvávají v G₀ fázi, dokud není potřeba ve tkáních nahradit odumřelé buňky, nebo se, v případě lymfocytů, diferencovat na zralé efektorové buňky. Nefyziologickým případem jsou pak nádorové buňky, které vlivem některých mitogenních faktorů získaly schopnost se znovu a nekontrolovatelně množit.⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾

4.1 Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus má řadu opatření, která zajišťují, aby celý cyklus proběhl správně a nevznikaly buňky s pozměněnou, deformovanou či neúplnou DNA. Hlavní roli v tomto procesu zaujímá celá řada regulačních proteinů. Hlavními pozitivními regulátory jsou cyklin-dependentní kinázy (CDK) a hlavními negativními regulátory pak inhibitory CDK.

V průběhu buněčného cyklu se nacházejí kontrolní body, které hlídají přechod do jednotlivých fází. Hlavní kontrolní body jsou mezi G₁ a S fází a pak mezi G₂ a M fází.⁽²⁰⁾

(22)

4.2 Fáze buněčného cyklu

Buněčný cyklus se označuje jako děj začínající koncem prvního buněčného dělení a končící začátkem druhého. Můžeme jej rozdělit na několik fází, z čehož dvě základní fáze jsou interfáze a tzv. M-fáze (mitóza, buněčné dělení).

4.3 Interfáze

4.3.1 G1 fáze

Jako první fází interfáze bývá označována G1 fáze ("G" od anglického slova "gap" = mezera) Tato fáze navazuje na buněčné dělení z předešlého cyklu, a proto bývá také označována jako fáze "postmitotická". Jedná se o rozmezí devíti až dvanácti hodin, kdy buňka roste a připravuje se na další buněčné dělení. V této fázi buňka zdvojnásobuje počet svých organel, syntetizuje RNA, proteiny, tvoří zásobu nukleotidů a enzymů pro nadcházející syntézu DNA. G1 fáze končí se začátkem replikace jaderné DNA. Vstup do S fáze je zapříčiněn aktivovaným komplexem cyklin E/ CDK2.

Na konci G1 fáze, než buňka vstoupí do fáze S, proběhne hlavní kontrolní bod buněčného cyklu. Tady proběhne kontrola DNA, její integrity a možného vzniku nových mutací. Při detekci mutací následuje jejich automatická reparace reparačními mechanismy. Ve vyhledávání mutací mají hlavní funkci ATM a ATR kinázy a pak takzvané "checkpoint" kinázy CHK1 a CHK2, jež mají za úkol zesílit cytotoxický stresový signál, což vede k vyplavení stresových proteinů, zastavení buněčného cyklu a při velké míře mutací také k apoptóze - buněčné smrti. Hlavním faktorem kontrolního bodu v G1 fázi je proto protein p53, také nazývaný "strážce genomu", jehož mutací a nefunkčností či delecí vzniká velká část nádorových buněk. ^{(20) (21) (23) (24)}

4.3.2 S fáze

Nejdůležitější částí interfáze je S-fáze (syntetická). Zde dochází ke zdvojení genetického materiálu replikací jaderné DNA buňky spolu s histony a regulačními proteiny. Buňka se tak připravuje na své dělení. K tomu, aby sesterské chromatidy držely do příštího dělení u sebe, slouží proteinový komplex cohesin. Tato fáze trvá zhruba šest až osm hodin. ⁽²⁰⁾
^{(21) (23)}

4.3.3 G2 fáze

Tato fáze začíná při dokončení syntézy DNA v S fázi. V této části buněčného cyklu se syntetizují a aktivují proteiny potřebné pro zahájení buněčného dělení. Dochází tedy k syntéze celého mitotického aparátu, začínají se kondenzovat chromosomy a rozpadá se jaderný obal. Tato fáze trvá dvě až čtyři hodiny a končí zahájením mitózy, a to působením mitotických cyklinů (cyklin B), které na konci G2 fáze aktivují CDK1 a vytvoří s ní komplex.

Na přechodu mezi G2 a M fází se nachází druhý kontrolní bod, který rozhoduje, zda je buňka způsobilá buněčného dělení. Kontroluje se především správnost replikace DNA. Pokud je DNA nějakým způsobem poškozená, dojde k zastavení buněčného cyklu.^{(20) (21) (23) (24) (22) (25)}

4.4 Mitóza (M-fáze)

Mitóza je nejčastější typ buněčného dělení, kdy z jedné diploidní (somatické) buňky vznikají dvě identické diploidní dceřiné buňky. Kromě pohlavních buněk se mitoticky dělí všechny buňky lidského těla, což zajišťuje diferenciaci a dozrávání buněk a růst celého organismu. Mitózou je označováno vlastní rozdělení jádra - karyokineze, na což navazuje rozdělení celé buňky - cytokineze.

Do mitózy vstupují buňky, které mají zdvojenou veškerou svou buněčnou hmotu, mají replikovanou jadernou DNA, mají vytvořené proteiny budoucího mitotického aparátu a prošli kontrolním bodem na konci G2 fáze. Již během S-fáze je v buňce vytvořen základ dělicího vřeténka - centrosom, který v této fázi obsahuje dva páry centriolů. Celá mitóza pak trvá 1-2 hodiny a má čtyři části (profáze, metafáze, anafáze, telofáze), někdy se uvádí ještě pátá část (prometafáze).^{(21) (26) (22) (23) (25) (27)}

4.4.1 Profáze

V první fázi mitózy se spiralizuje jaderný chromatin a dochází ke kondenzaci na jednotlivé chromosomy, které jsou zdvojené a spojené v oblasti centroméry. Tento děj je ovlivňován proteinem zvaným condensin. Centrosom se rozděluje na dva centrioly, které putují do pólových částí buňky, a začíná polymerace mikrotubulů mitotického vřeténka a astrosféry. Jadérka zanikají a fáze končí zánikem jaderné membrány.^{(21) (26) (28) (22)}

4.4.2 Prometafáze

Fáze, která je někdy řazena mezi profázi a metafázi. V této mezifázi stále ještě kondenzují chromosomy a po rozpuštění jaderné membrány se dostávají do cytoplasmu buňky. Mikrotubuly se napojují na kinetochory - proteiny navázané v oblasti centroméry chromosomů, které napomáhají navázání chromosomů na mitotické vřeténko k oběma centriolám. ^{(21) (26) (28) (22)}

4.4.3 Metafáze

Chromosomy jsou plně spiralizované, napojené na mikrotubuly mitotického vřeténka a seřazené v ekvatoriální rovině buňky. Chromatidy jsou plně oddělené a spojené jen v centroméře, leží kolmo k ose dělicího vřeténka.

Mezi metafází a následnou anafází se nachází kontrolní bod, který pomocí tvorby látek, jako jsou kolchiciny, zastaví buněčné dělení a zabrání vstupu do anafáze. Děje se to tehdy, jestliže se chromosomy nenavázaly nebo nesprávně navázaly na mikrotubuly dělicího vřeténka. ^{(21) (26) (28) (22)}

4.4.4 Anafáze

Je to nejkratší fáze celé mitózy, trvá jen několik málo minut. Někdy bývá rozdělována ještě na anafázi A a B, kdy v anafázi A dochází k oddělení sesterských chromatid chromosomů a jejich putování k opačným pólům buňky, v anafázi B pak dochází k oddalování samotných pólů buňky a buňka se až dvojnásobně roztáhne. Rozchod chromatid probíhá rovnoměrně a anafáze končí, když všechny chromatidy doputují ke svým pólům buňky. ^{(21) (26) (28) (22)}

4.4.5 Telofáze

Během telofáze jsou již oba póly buňky vzdáleny na dvojnásobek délky, než při metafázi. Chromosomy se postupně despiralizují a znovu vzniká jadérko. Zároveň se začíná vytvářet jaderný obal a zaniká dělicí vřeténko. Telofáze končí začínající cytokinezí. ^{(21) (26) (28)}
⁽²²⁾

4.5 Cytokineze

Cytokineze je vlastní rozdělení buňky, která prodělala mitotické dělení jádra na dvě samostatné dceřiné buňky. Jedná se o rozdělení buněčného obsahu a organel tak, aby obě vzniklé buňky získaly přibližně stejný buněčný obsah. U živočišné buňky probíhá cytokineze zaškrčením buněčné membrány. Po obvodu membrány se vytvoří vlákna aktinu a myosinu, jejichž postupným zkracováním dojde k úplnému přeškrčení. Vznikne tzv. dělicí rýha a buňka se rozdělí. ⁽²⁸⁾ ⁽²²⁾

PRAKTICKÁ ČÁST

5 FORMULACE PROBLÉMU

5.1 Hlavní problém

Hlavním problémem této bakalářské práce je tematika kmenových buněk a jejich využití v praxi. O kmenových buňkách všeobecně a jejich praktickém terapeutickém využití se hodně hovoří a diskutuje, ale v současné době stále není jejich potenciál plně využit.

Vzhledem k tomu, že tato problematika je velmi rozsáhlá a složitá, je tato práce zaměřena na využití mesenchymálních kmenových buněk pro imunosupresivní léčbu například v potransplantační léčbě.

5.2 Dílčí problémy

Dílčí problémy této práce jsou orientovány na míru utlumení proliferace lymfocytů po přidání mesenchymálních kmenových buněk. Dále se práce zaměřila na možnost imunogenity mesenchymálních kmenových buněk vůči lymfocytům a také na závislost ve shodě HLA antigenů dárce kmenových buněk a HLA antigenů příjemce.

6 CÍL A ÚKOL VÝZKUMU

Cílem této práce je zjistit, zda mají mesenchymální kmenové buňky imunomodulační vliv na proliferaci lymfocytů, popřípadě jaký, a je-li možné jejich univerzální využití v imunosupresivní léčbě, a to nezávisle na HLA fenotypu.

Výzkumná otázka č. 1: Ovlivňují mesenchymální kmenové buňky nespecificky indukovanou proliferaci lymfocytů?

Výzkumná otázka č. 2: Jaká je míra výsledného vlivu mesenchymálních kmenových buněk na nespecificky indukovanou proliferaci lymfocytů?

Výzkumná otázka č. 3: Má na proliferaci vliv kompatibilita HLA antigenů dárce MSC a jejich příjemce?

Výzkumná otázka č. 4: Mají mesenchymální kmenové buňky dárce imunogenní vliv na lymfocyty příjemce?

7 OBECNÝ ÚVOD DO PRAKTICKÉ ČÁSTI

7.1 Test blastické transformace

Test blastické transformace, neboli test proliferace lymfocytů, je důležitá metoda používaná v imunologii především pro diagnostiku primárních imunodeficiencí a pro monitorování štěpu po transplantaci kostní dřeně.

Ačkoliv je to metoda poměrně časově náročná a velmi obtížně standardizovatelná, pro vyšetření T lymfocytů je stále využívána a pro pacienty a jejich diagnostiku těžko nahraditelná. ⁽²⁹⁾

Pro hodnocení proliferace lymfocytů nejprve musí dojít k jejich aktivaci, čehož se dosahuje stimulací různými látkami. Jednou z možností je stimulace pomocí antigenů, se kterými se buňky periferní krve již setkaly, čímž se aktivují paměťové buňky. Pro tento typ stimulace se používají takové látky jako tetanový toxin nebo tuberkulin. Druhou a velmi často používanou skupinu látek tvoří mitogeny, totiž látky polyklonálně stimuluující lymfocytární populaci (viz podkapitola 7.3) a mezi nimi nejčastěji používaný rostlinný lektin fytohemaglutinin (PHA). Tyto látky slouží k tzv. nespecifické stimulaci a stimuluji více lymfocytárních subpopulací. Ke specifické stimulaci T lymfocytů slouží monoklonální protilátka proti molekule CD3. Pro experimentální účely je možné také pro specifickou stimulaci použití ozářených (neproliferujících) alogenních T lymfocytů. ⁽²⁹⁾

Proliferaci T lymfocytů spustí aktivace TRC, a to tehdy, je-li rozpoznán antigen na MHC I. a II. třídy. Po aktivaci TCR se v lymfocytech spustí signalizační cesty zakončené transkripcí genů v jádře buňky, které jsou zodpovědné za produkci cytokinů nebo právě proliferaci. ^{(5) (29)}

Pro test blastické transformace se používají čisté lymfocyty izolované na ficollovém gradientu z heparinované periferní krve. Lymfocyty je před testem samotným nutno naředit na takovou koncentraci, aby byl test pokud možno co nejvíce standardizován.

Inkubace nespecificky stimulovaných lymfocytů trvá 3 dny (72 hodin), inkubace lymfocytů stimulovaných specificky až 7 dní, vše v termostatu při 37°C v 5% atmosféře CO₂.

Technická náročnost tohoto vyšetření není zanedbatelná, a proto je možné test provádět jen na specializovaných pracovištích. V první řadě je zapotřebí pracovat ve sterilních podmínkách v laminárním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků, přestože jsou vzorky kultivovány v mediu s přidavkem antibiotik a antimykotik. Dále je zapotřebí přístrojového zařízení pro vyhodnocení výsledků. Pro klasickou a dnes málo používanou metodu se značením radioizotopy (³H-thymidin) je potřeba přístroj na detekci beta-záření (β-counter). Šetrnější je pak metoda značení fluorescenčními barvivy (např.: propidium jodid), které lze stanovovat na průtokovém cytometru.

Test blastické transformace je zatížen velkou chybou a jeho výsledky jsou pouze orientační. Lze jím hodnotit pouze výrazné poruchy funkce imunity, přesto je v mnoha případech velmi užitečný, ať už v diagnostice nebo na experimentální úrovni. Důležitým faktorem pro správnost výsledků je stav vyšetřovaného vzorku krve - tedy preanalytická fáze. Se vzorkem by mělo být zacházeno co nejšetrněji, měl by být brát zřetel na zachování životnosti buněk, a to jak zajištěním přiměřených podmínek převozu a uchovávání vzorku, tak včasným zpracováním, které by mělo proběhnout nejpozději do 24 hodin od odběru. Výsledky by se měly porovnávat pouze s výsledky získanými ze stejného souboru vzorků zpracovávaných za stejných podmínek. ⁽²⁹⁾

7.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je dnes používána jako standardní metoda analýzy buněk v buněčné suspenzi. Jejím principem je označení analyzovaných buněk fluorochromem, který je navázán nejčastěji na monoklonální protilátku. Tyto protilátky se následně specificky vážou na svůj příslušný antigen na povrchu či uvnitř buňky. V cytometru je vyšetřovaný vzorek vypuzován pod velkým tlakem malým otvorem, což umožní buňkám seřadit se těsně za sebou v jednolitém proudu. Ten je po vypuzení z trysky protínán laserovým paprskem.

Průtokový cytometr dokáže rozlišit jednotlivé populace buněk na základě odrazu či rozptýlení dopadajícího světla. Čím je buňka více granulovaná, tím víc světla odrazí

(Tyndallův jev) a čím je buňka větší, tím více dopadající světlo rozptýlí. Fluorochromy, které se před analýzou pomocí protilátky navázaly na určité vyšetřované buňky, dokážou pod dopadajícím laserovým paprskem excitovat a vyzáří se tak fluorescenční (excitované) světlo. V současné době lze díky filtrům použít několik fluorochromových barviv, měřit několik vlnových délek naráz a vyšetřit tak více populací během jedné analýzy a z jednoho vzorku, či vyšetřit několik antigenů přítomných na jedné buňce. Zároveň tato metoda dokáže zobrazit vztahy mezi několika měřenými parametry, což zajišťuje lepší vyhodnocení populačního zastoupení buněk. K tomu je samozřejmě zapotřebí použít i odpovídající počítačový software.

Průtoková cytometrie má v medicíně široké využití a to nejen v imunologii, ale například v onkologii, hematologii či ve výzkumu. Vyšetření se provádí z nesrážlivé krve a na základní vyšetření zastoupení buněčných subpopulací stačí pouhé dva mililitry krve, ale lze vyšetřit i například mozkomíšni mok a podobně. Jedná se především o rychlé vyšetření, které poskytne velké množství dat, jež je třeba řádně analyzovat, utřídit a vybrat z výsledků jen to podstatné. Nevýhodou především pro malá pracoviště může být, že přístrojové vybavení je velmi nákladné.⁽²⁹⁾

7.3 Mitogeny

Mitogeny obecně jsou látky bílkovinné povahy, jejichž vlastností je vyvolat buněčné dělení - mitózu. Některé rostlinné lektiny (tzn. proteiny vázající sacharidové molekuly) se dnes hojně využívají při laboratorních testech jako mitogeny, a to jako polyklonální mitogeny pro lymfocyty, zvláště pak T lymfocyty. Jejich výhodou oproti jiným specifickým antigenům, které nejsou specifické pro všechny TCR, je schopnost aktivovat k mitóze většinovou populaci lymfocytů ve vyšetřovaném vzorku. Tyto mitogeny se vážou na sacharidové části TCR a způsobují tak stejnou reakci, jakou by vyvolala samotná antigen prezentující buňka.

Lektinové mitogeny se získávají z rostlin. Nejběžněji používanými jsou například konkanavalin A (ConA) získávaný ze semen rostliny *Canavalia ensiformis*, fytohemagglutinin (PHA) ze semen fazolu obecného (*Phaseolus vulgaris*), nebo takzvaný "pokeweed-mitogen" (PWM) obsažený v lícidle americkém (*Phytolacca Americana*).^{(29) (30)}

8 METODIKA

8.1 Zkoumaný vzorek

Vyšetření bylo provedeno na dvaceti vzorcích patientské krve, výběr byl náhodný a nebyla vyžadována HLA kompatibilita s kmenovými buňkami. Každý vzorek byl vyšetřen čtyřikrát: dvakrát s nestimulovanými lymfocyty s přidáním MSC a bez MSC, dvakrát vzorek lymfocytů stimulovaný fytohemaglutininem opět s i bez MSC. Celkem tedy bylo provedeno osmdesát testů blastické transformace.

8.2 Získávání mesenchymálních kmenových buněk

Mesenchymální kmenové buňky jsou získávány od zdravých dárců, a to punkcí kostní dřeně z lopaty kosti pánevní. Tento zákrok je pro dárce zatěžující, vyžaduje plnou třídní hospitalizaci a provádí se většinou v plné narkóze. Zároveň zde hrozí i určité riziko infekce. Buňky s krví se odebírají do heparinu, načež se oddělují gradientovou centrifugací.^{(4) (31) (32)}

Dále lze kmenové buňky získat z periferní krve či podkožní tukové tkáně. K izolaci z periferní krve se opět využívá gradientové centrifugace, buňky jsou následně sbírány z mononukleární buněčné frakce. Z podkožní tukové tkáně se získávají následně po liposukci nebo lipektomií. Po takovém odběru se musí nejprve tkáň enzymaticky natrávit kolagenázou a následně se buňky centrifugují a důkladně promývají.⁽³¹⁾

Je zjevné, že získávání mesenchymálních kmenových buněk není snadné, a to především proto, že jen velmi malé množství z darovaných buněk jsou mesenchymální kmenové buňky. Během jednoho odběru se může (dle váhy dárce) odebrat maximálně 1500 ml krve s kostní dření. Z tohoto množství je ale pouze 0,001 - 0,01% mesenchymálních kmenových buněk. Z milionu buněk periferní krve je jen asi 1,2-13 MSC. Oproti tomu z jednoho gramu tukové tkáně získáme 5×10^3 MSC, což je pět set krát víc, než z kostní dřeně.

⁽³¹⁾

8.3 Izolace a kultivace mesenchymálních kmenových buněk

Tento projekt probíhal v rámci *in vitro* testování mesenchymálních kmenových buněk (MSC), které je součástí klinického hodnocení probíhajícího na Hematologicko-onkologickém oddělení (HOO) v Plzni. V této studii byly použity rozmražené a rekultivované MSC, které byly získány v Laboratoři buněčné terapie na HOO. Pracoviště ÚIA, kde bylo testování jejich vlivu na proliferaci lymfocytů prováděno již dostalo suspenzi MSC připravenou k testování.

8.4 Izolace lymfocytů

Biologický materiál:

Plná nesrážlivá krev odebraná do heparinu.

Pomůcky a vybavení:

Tkáňové zkumavky, skleněné zkumavky, Pasteurova pipeta, centrifuga, stojan na zkumavky, rukavice, laminární box.

Chemikálie:

Roztok Ficoll-Paque (Ficol- PaqueTM Premium, GE Healthcare), propírací roztok RPMI 1640 (Biosera).

8.4.1 Postup

- Skleněná zkumavka byla z poloviny naplněna flotačním roztokem Ficoll-Paque o hustotě $1,077 \text{ g/cm}^3$ ($+20^\circ\text{C}$; $\pm 0,001 \text{ g/cm}^3$).
- Plná krev z odběrové zkumavky byla Pasteurovou pipetou opatrně navrstvena do skleněné zkumavky na flotační roztok tak, aby mezi oběma tekutinami vznikla ostrá hranice a nedošlo k jejich vzájemnému promíchání.
- Zkumavky byly vloženy do centrifugy na 25 minut při 3000 otáčkách za minutu.
- Po dokončení centrifugace jsou ve zkumavce viditelně odděleny jednotlivé frakce buněk. Na dně jsou usazené erytrocyty a další těžké buňky, nad nimi je flotační roztok a na jeho hranici s vrstvou plazmy (obsahující též trombocyty) leží viditelný mléčně zakalený prstenec lymfocytů.

- Prstenec byl opatrně odsátý Pasteurovou pipetou a přendán do nových označených plastových tkáňových zkumavek. Tyto zkumavky byly naplněny propíracím roztokem RPMI 1640 cca 1 cm pod okraj a centrifugovány 10 minut při 1000 otáčkách za minutu.
- Supernatant ze zkumavky byl slit a znovu doplněn čistý propírací roztok, přičemž se centrifugace ještě jednou opakovala, aby byla získaná populace lymfocytů zbavena flotačního roztoku a plazmy, která se při sběru prstence z hustotního gradientu dostala do Pasteurovy pipety.
- Supernatant byl slit a buňky byly připraveny pro kultivaci.
- Z důvodu rizika kontaminace byla veškerá manipulace prováděna v laminárním boxu se sterilními zkumavkami.

8.5 Kultivace

Pro testování aktivace lymfocytů byla zvolena metoda nespecifické aktivace leukocytů pomocí mitogenu PHA (fytohemaglutinin, Sigma).

Izolované lymfocyty byly kultivovány z kultivačního média X-VIVO 10 (X-VIVO 10TM, Lonza) a to: s přidavkem PHA (o koncentraci 0,04 mg/ml), s přidavkem PHA a 4×10^5 mesenchymálních kmenových buněk, bez přidavku PHA a bez přidavku PHA s přidavkem 4×10^5 mesenchymálních kmenových buněk.

Celá inkubace probíhala v termostatu při teplotě 37°C v pětiprocentní atmosféře CO₂ po dobu 72 hodin a po uplynutí této doby se stanovilo procento aktivovaných lymfocytů v jednotlivých zkumavkách.

8.6 Test blastické transformace

Biologický materiál:

Pro test blastické transformace byly použity lymfocyty izolované z plné krve odebrané do heparinu. Lymfocyty každého vzorku byly rozděleny do čtyř zkumavek a kultivovány 72 hodin v termostatu při teplotě 37°C v pětiprocentní atmosféře CO₂ s přidavkem nebo bez přidavku MSC a PHA, dle daného testu.

Chemikálie: Cycle-Test (BD, USA): roztok A (trypsin, detergenty, PBS), roztok B (inhibitor tripsinu, enzym RNAza), roztok C (propidium jodid v destilované vodě).

Pomůcky a vybavení:

Cytometrické zkumavky, automatická pipeta s minimálním rozsahem 100-500 μ l, časovač, chladnička, membránový filtr 45 μ m, rukavice, průtokový cytometr.

8.6.1 Postup

- Do označených cytometrických zkumavek bylo napipetováno 500 μ l suspenze izolovaných lymfocytů.
- Do zkumavek bylo přidáno 125 μ l roztoku A z laboratorního setu Cycle-Test. Zkumavky byly inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě.
- Do zkumavek bylo přidáno 100 μ l roztoku B z laboratorního setu Cycle-Test. Inkubace probíhala dalších 10 minut při laboratorní teplotě.
- Do zkumavek bylo napipetováno 100 μ l roztoku C z laboratorního setu Cycle-Test. Zkumavky byly inkubovány 15 minut v chladničkové teplotě 2 - +6°C.
- Po inkubaci přefiltrujeme do nových řádně označených cytometrických zkumavek přes 45 μ m filtr.

8.7 Stanovení procenta aktivovaných lymfocytů

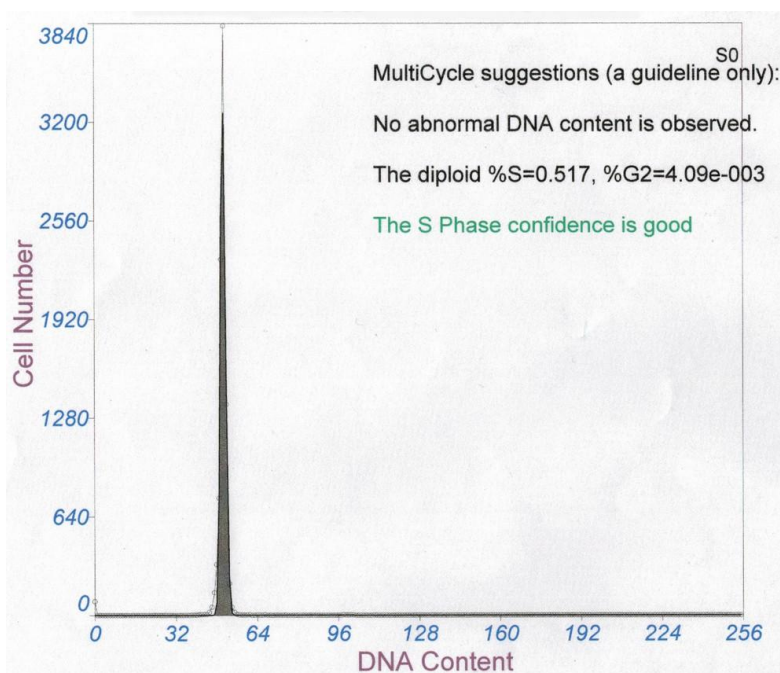
Pro zjištění míry aktivace zkoumaných lymfocytů byla použita analýza fází buněčného cyklu průtokovým cytometrem. Pro tuto analýzu byl využit průtokový cytometr FC500 (Beckmann-Coulter, USA) a vyhodnocení bylo provedeno v softwaru MultiCycle AV (Phoenix flow systems, USA) a CXP (Beckmann-Coulter, USA).

Před samotným stanovením byla permeabilizována buněčná membrána a odstraněna interferující RNA (CycleTEST PLUS, Becton Dickinson, USA).

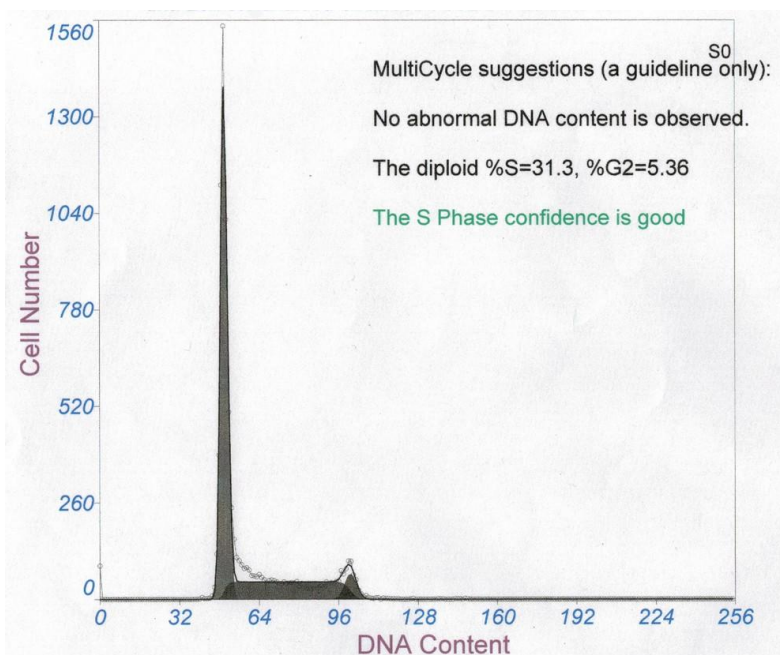
V průtokovém cytometru byla zjišťována intenzita fluorescence jaderné DNA předem označené fluorescenčním barvivem - propidium jodidem.

Procenta aktivovaných lymfocytů byla procentuelně vyhodnocena v každém vzorku, a to jako procento lymfocytů v růstové fázi G2 a M fázi, procento lymfocytů v klidové G0 fázi a procento v S fázi (Obrázek 1 a 2).

Obrázek 1, Analýza fází buněčného cyklu průtokovou cytometrií, negativní kontrola bez přidavku PHA a MSC



Obrázek 2, Analýza fází buněčného cyklu průtokovou cytometrií, test stimulovaný PHA bez přidavku MSC



8.8 Statistické metody

Pro statistické vyhodnocení výsledků z průtokového cytometru byl použit Wilcoxonův párový test. Tato metoda využívá vyhodnocování párových hodnot dvou měření jednoho souboru vzorků (hodnoty X a X' - to například v tomto případě znamená měření před a po přidání MSC).⁽³³⁾

Samotná analýza pak proběhla ve statistickém programu R project (The R Foundation for Statistical Computing).

9 VÝSLEDKY

Test aktivace lymfocytů po nespecifické stimulaci fytohemaglutininem byl proveden na dvaceti vzorcích patientské krve. Vzorky byly analyzovány čtyřikrát. Dvakrát byla provedena negativní kontrola, a to s přidáním a bez přidání mesenchymálních kmenových buněk. Dvakrát byl proveden test s nespecifickou aktivací po přidání rostlinného mitogenu fytohemaglutininu, a to opět s přidáním i bez přidání mesenchymálních kmenových buněk.

V rámci předem stanovené hypotézy byl testován vliv mesenchymálních kmenových buněk na míru aktivace lymfocytů. Stěžejní pro vyhodnocení hypotézy byla S a G2/M fáze, která odráží schopnost mesenchymálních kmenových buněk zadržet proliferaci lymfocytů v G0/G1 fázi. Hodnoty byly zpracovány do tabulky (Tabulka 1), kde jsou porovnány průměrné hodnoty všech dvaceti výsledků ze součtu S a G2/M fáze u všech čtyř testů. Dále byla u všech testů hodnocena minimální a maximální naměřená hodnota a také medián.

Tabulka 1, Nespecifická aktivace lymfocytů v závislosti na přítomnosti MSC [%]

	Negativní kontrola bez MSC	Negativní kontrola s MSC	Test s PHA	Test s PHA a MSC
Počet měření	20	20	20	20
Průměr	0,60	0,77	40,89	7,50
Minimum	0,09	0,20	22,40	3,80
Maximum	1,82	1,80	53,80	20,61
Medián	0,53	0,64	40,85	6,45

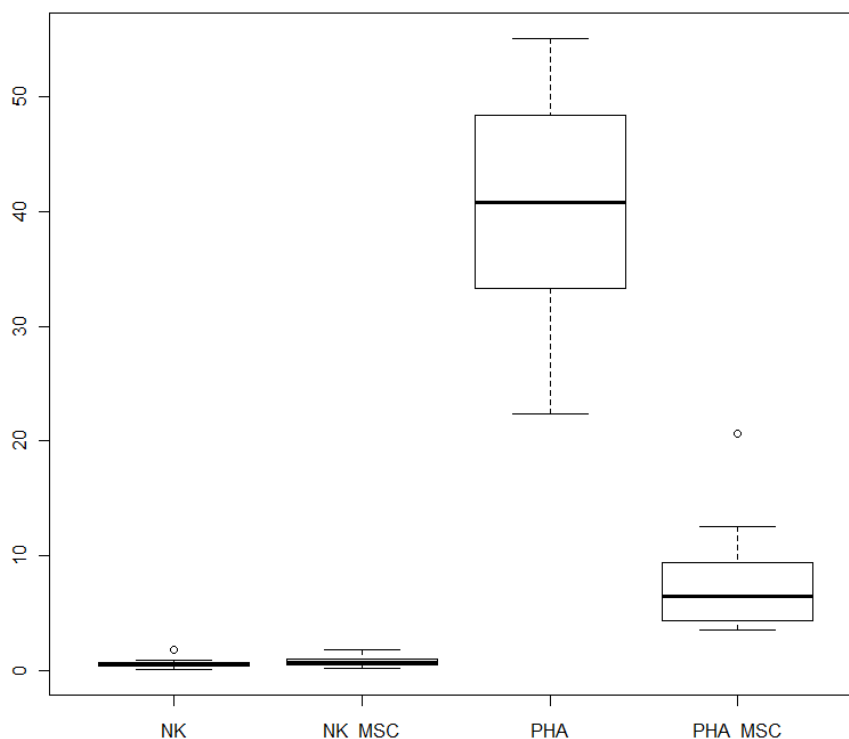
MSC - mesenchymální kmenové buňky, PHA - fytohemaglutinin, SD - směrodatná odchylka

Z naměřených hodnot (viz Příloha 2 a 3) je jasně patrné, že mesenchymální kmenové buňky utlumily aktivaci lymfocytů ve všech testovaných vzorcích. Negativní kontrola proběhla v pořádku, v tomto případě bylo naměřeno v průměru jen 0,6% aktivovaných buněk. U negativní kontroly s přidávanými kmenovými buňkami můžeme pozorovat nepatrný nárůst aktivity vyvolaný kmenovými buňkami samotnými o 0,17% ($p=0,3$). Jelikož ale největší naměřený vzestup v přítomnosti MSC byl pouhých 1,44% a téměř polovina výsledků zaznamenala naopak pokles aktivace, je tento údaj z praktického hlediska bezvýznamný.

Medián (tzn. střední hodnota) u buněk aktivovaných fytohemaglutininem byl bez přidání mesenchymálních kmenových buněk 40,85%. Oproti tomu medián u PHA stimulovaných lymfocytů s přidáním kmenových buněk byl pouze 6,45%. Z toho vyplývá, že ve zkoumaných vzorcích byl pokles aktivace způsobený přítomností mesenchymálních kmenových buněk o 34,4% (medián, 40,85-6,45%, $p < 0,01$). Viz Graf 1.

Ovšem důležitějším ukazatelem by mohlo být spíš rozložení výsledků. Největší zaznamenaný pokles aktivace ze zkoumaných vzorků byl o 49,5%. Jedenáct z dvaceti vzorků mělo pokles aktivace nad třicet procent, z čehož 4 byly nad čtyřicet procent. Naopak nejmenší pokles aktivace byl o 14%, druhý nejmenší o 18%. Všechny další výsledky měly pokles mezi 20 a 30 procenty.

Graf 1, Boxplot srovnání čtyř prováděných testů

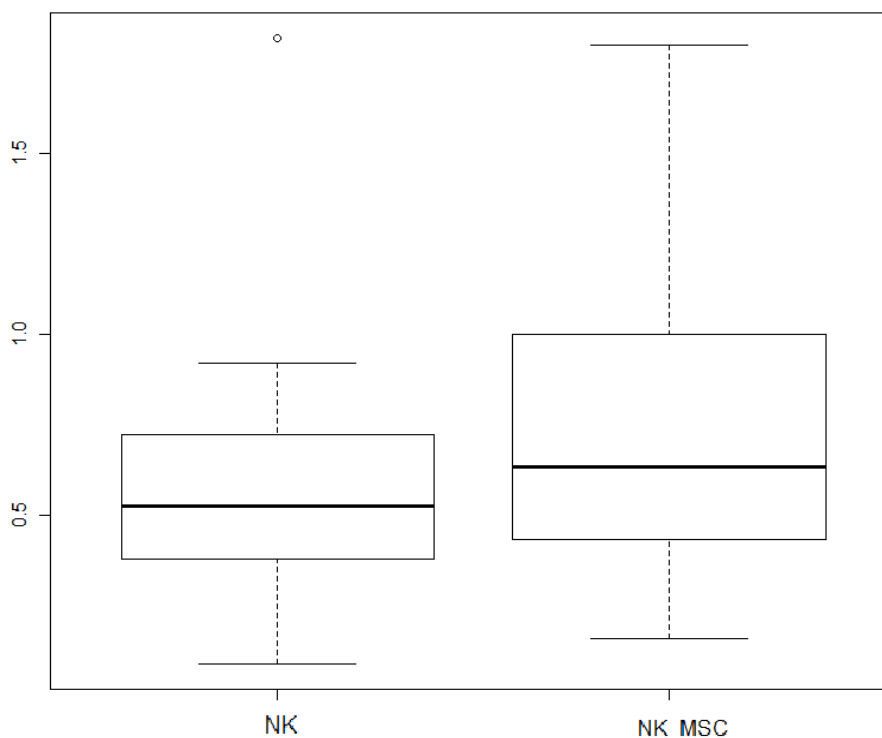


NK- negativní kontrola, PHA - stimulováno fytohemaglutininem, MSC - s přidáním mesenchymálních kmenových buněk

Na grafu č.1 je názorně vidět, jak zanedbatelné hodnoty oproti PHA stimulovaným testům byly u negativních kontrol naměřeny. Negativní kontroly se drží na nejnižších hladinách a rozložení jednotlivých výsledků se liší jen o zlomky procent. Všechny naměřené hodnoty jsou podobné, ať už u testu s nebo bez přidání MSC, a rozdíl hodnot mezi oběma testy je zanedbatelný.

Graf č. 2 už lépe znázorňuje porovnání negativních kontrol. Díky přiměřenému měřítku grafu lze ověřit, že mediány hodnot se skutečně liší jen o zlomek procenta. Ale přestože jde jen o hodnoty zanedbatelné a statisticky nevýznamné, je na výsledcích negativní kontroly s přidavkem mesenchymálních kmenových buněk patrné širší rozložení výsledků.

Graf 2, Boxplot - negativní kontroly



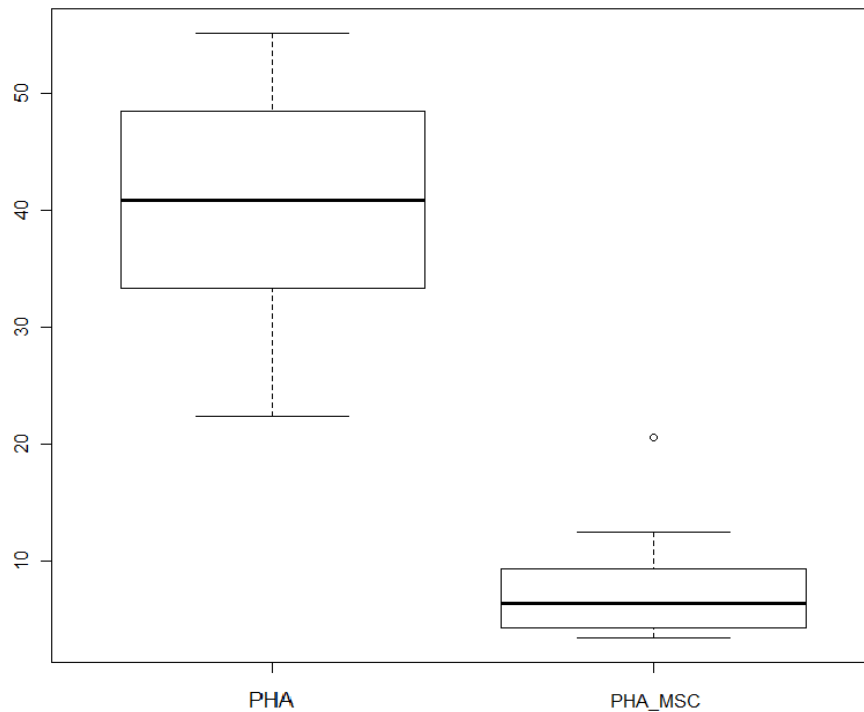
NK- negativní kontrola, MSC - s přidáním mesenchymálních kmenových buněk

Graf č. 3 je pro téma této bakalářské práce stěžejní. Znázorňuje graficky rozložení výsledků naměřených při analýze testů stimulovaných fytohemaglutininem, a to s a bez přidavku mesenchymálních kmenových buněk.

Z grafu je na první pohled patrné, že hodnoty vzorků stimulovaných pomocí PHA bez přidavku MSC jsou oproti testu s přidavkem MSC velmi vysoké. A to natolik, že se ani krajní hodnoty nepřekrývají, z čehož lze usuzovat jistý statistický význam. Zatímco hodnoty testu stimulovaného pouze pomocí PHA zaujímají široké rozmezí překračující na jedné straně 50% a na spodní hranici se blíží 20%, všechny testy kultivované s MSC se drží v rozmezí kolem 10%. Tento graf tak doplňuje statistické výpočty průměrných hodnot, jelikož zohledňuje všechny naměřené hodnoty a jejich rozdílnosti.

Wilcoxonův test potvrdil, že rozdíly naměřených hodnot mezi testem PHA stimulovaných lymfocytů s MSC a bez MSC jsou statisticky významné.

Graf 3, Boxplot - testy stimulované PHA



PHA - stimulováno fytohemaglutininem, MSC - s přidáním mesenchymálních kmenových buněk

DISKUZE

V bakalářské práci s názvem "Vliv mesenchymálních kmenových buněk na hodnoty lymfocytárního proliferačního testu" byl stanoven jeden hlavní cíl.

Cílem práce bylo ověřit, zda mesenchymální kmenové buňky mají skutečně prokazatelný vliv na proliferaci lymfocytů. Dílčími úkoly pak bylo zjistit, do jaké míry je proliferace lymfocytů ovlivňována, zda-li mají mesenchymální kmenové buňky výrazné a efektivní imunomodulační vlastnosti, zda záleží na HLA kompatibilitě a jestli nemohou mít kmenové buňky na lymfocyty příjemce naopak imunogenní vliv.

Samotný výzkum byl proveden v laboratořích Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň. Mesenchymální kmenové buňky použité při výzkumu byly odebrány zdravým dárčům a připraveny hematologickým oddělením Fakultní nemocnice Plzeň. Krev použitá při výzkumu byla odebrána dvaceti pacientům Fakultní nemocnice Plzeň, jejich identita nemá pro tuto práci význam, proto veškeré vzorky nesou jen číselné označení 1-20.

Hlavní metodou výzkumu byl test aktivace lymfocytů, neboli test blastické transformace, založený na principu nespecifické aktivace lymfocytů izolovaných z plné krve s fytohemaglutininem (PHA), rostlinným mitogenem získávaným z fazolu obecného. Tento test je velmi časově a technicky náročný. Veškerá manipulace se vzorky a především izolace lymfocytů probíhala v laminárním boxu za přísně sterilního prostředí, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků, které by mohly během kultivace přerůst infekčními kulturami. Lymfocyty byly izolovány gradientovou centrifugací na ficollové vrstvě. Kultivace probíhala 72 hodin v termostatu při 37°C v pětiprocentní atmosféře CO₂ a vyhodnocování výsledků v průtokovém cytometru.

Každý z dvaceti vzorků byl kultivován čtyřikrát. Jednou jako negativní kontrola bez přidání PHA a MSC, podruhé jako negativní kontrola bez přídavku PHA ale s přídavkem MSC, potřetí s přídavkem PHA a bez přídavku MSC a počtvrté s přídavkem PHA a MSC. Během kultivace došlo k mitogenem indukovanému spuštění intracelulární kaskády, která je zakončena v jádře buňky a započíná transkripci genů přímo zodpovědných za buněčnou proliferaci. U vzorků aktivovaných pomocí fytohemaglutininu tedy došlo k přechodu lymfocytů z klidové fáze buněčného cyklu G₀/G₁ do aktivní fáze S+G₂/M. Během těchto změn v aktivitě buňky a jejího přechodu mezi fázemi došlo ke změnám v koncentraci DNA, které bylo možné detekovat v průtokovém cytometru FC500 (Beckmann-Coulter,

USA), a to kvantitativním označením DNA fluorescenčním barvivem propidium jodidem (PI).

K vyhodnocení byl použit počítačový software MultiCycle AV (Phoenix flow systems, USA) a CXP (Beckmann-Coulter, USA). Výsledky byly statisticky zpracovány Wilcoxonovým párovým testem ve statistickém programu R project (The R Foundation for Statistical Computing) do boxplotů, které graficky znázorňují rozložení výsledků, medián, první i třetí kvartál a maximální, a minimální hodnoty (Graf 1,2 a 3).

Dle teorie dokážou mesenchymální kmenové buňky interagovat s imunitním systémem, a to tak, že přímo ovlivňují imunitní odpověď inhibováním dvou nejdůležitějších protizánětlivých cytokinů - TNF- α a IFN- γ . Zároveň také zvyšují expresi imunosupresivních cytokinů jako například IL-10.

Studie prokázaly, že jsou mesenchymální kmenové buňky schopny ovlivnit (inhibovat) proliferaci T lymfocytů, jsou-li s nimi kokultivovány. Výsledky této práce se shodují s výsledky dalších výzkumů a potvrdily, že MSC skutečně výrazně inhibují nespecificky indukovanou proliferaci T lymfocytů.

Medián výsledných hodnot aktivace buněk aktivovaných fytohemaglutininem byl bez přidání mesenchymálních kmenových buněk 40,85%. Medián aktivace buněk stimulovaných fytohemaglutininem a kultivovaných v přítomnosti MSC byl pouze 6,45%. Z těchto hodnot můžeme vypočítat rozdíl obou výsledků, který říká, že pokles aktivace při kultivaci lymfocytů s mesenchymálními kmenovými buňkami je 34,4%, což už je hodnota velmi významná. Samozřejmě u všech vzorků byl rozdíl hodnot individuální (Graf 3). To je připisováno individuálním fyziologickým rozdílům mezi pacienty a také nemožnosti úplné standardizace vyšetření testem blastické transformace, které je kvůli použití periferní krve zatížené velikou chybou.

Největší vliv na správnost výsledků mají preanalytické vlivy jako odběr, teplota transportu, délka transportu, doba uchovávání před zpracováním, které by mělo proběhnout co nejdříve (ideálně do 4 hodin po odběru). Svůj vliv na různorodost výsledků má i lidský faktor a fakt, že test aktivace lymfocytů není běžně prováděným vyšetřením. Dvacet vzorků bylo od pacientů nasbíráno během necelých čtyř měsíců. Proto je test blastické transformace považován za takzvanou semikvantitativní metodu, kterou je možné určit pouze orientačně, zda k poklesu aktivace došlo, či nikoliv a případně o kolik, ovšem toto číslo můžeme porovnávat jen s výsledky získanými za stejných podmínek.

Výsledky můžeme porovnat s výzkumem, který proběhl na Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice v Plzni v roce 2011. ⁽⁴⁾ Dle tehdejšího výzkumu

na dvaceti vzorcích byly naměřeny hodnoty poklesu aktivace o 17%, přičemž PHA stimulované lymfocyty bez MSC dosáhly v mediánu stupně aktivace 35,4% a stimulované lymfocyty kultivované s MSC 18,5%. Rozdíl těchto výsledků je zhruba o polovinu menší než výsledek naměřený v rámci této bakalářské práce. Tento rozdíl je přikládán individuální rozdílnosti jednotlivých pacientů, již zmiňovaným preanalytickým vlivům a především době, která oba výzkumy dělila. Jelikož nemůžeme zaručit stejné podmínky dodržované u obou výzkumů, nemůžeme jejich výsledky kvantitativně srovnávat. Nicméně kvalitativně oba výzkumy prokázaly významný imunopresivní vliv MSC.

Ze zahraničních výzkumů je dobré zmínit výzkum prováděný v Chicagu (University of Illinois) z roku 2001.⁽³⁴⁾ Výzkum se prováděl s mesenchymálními kmenovými buňkami pavíánů a zkoumala se jejich schopnost potlačit proliferaci stimulovaných lidských lymfocytů jak *in vitro*, tak i *in vivo* u transplantace kožního štěpu. Výsledky tohoto výzkumu zaznamenaly pokles proliferace lymfocytů o cca 50%. Tento efekt byl ještě zvýšen přidáním většího množství a mohl být snížen přidáním IL-2. Zároveň tento výzkum dokázal, že při podání MSC dochází k delšímu přežívání transplantovaného kožního štěpu.

Vezmeme-li v potaz cíle a výzkumné otázky stanovené na začátku této práce, je možné na ně již odpovědět.

Mesenchymální kmenové buňky skutečně a prokazatelně ovlivňují nespecificky indukovanou proliferaci lymfocytů. U lymfocytů aktivovaných fytohemaglutininem došlo při vzájemné kokultivaci s mesenchymálními kmenovými buňkami k výraznému poklesu aktivace.

Tímto zjištěním je možné navázat na další výzkumnou otázku, kterou je míra účinku mesenchymálních kmenových buněk na proliferaci lymfocytů. Z výsledků této práce získaných testem blastické transformace lze říci, že pokles aktivace je velmi významný. V mediánu došlo k poklesu z původních 40,85% na 6,45%. To je pokles o 34,4%, což je o více než tři čtvrtiny. Z tabulky v Příloze č.5 lze jednoduše vyčíst, že největší pokles aktivace byl o celých 49,5% a jedenáct z dvaceti vzorků měli pokles aktivace nad třicet procent, z čehož 4 byly nad čtyřicet procent. Naopak nejmenší pokles aktivace byl o 14%, ovšem jen dva výsledky byly pod dvacet procent.

Z výsledků provedených negativních kontrol lze usuzovat, že i když nebyl při výběru použitých mesenchymálních buněk brán zřetel na kompatibilitu HLA systému dárce a příjemce, nedošlo k žádné reakci na cizorodý antigen. Kompatibilita HLA systémů nebyla přezkoumána, proto je možné, že u některých vzorků došlo ke shodě HLA antigenů

u MSC a lymfocytů. Přesto je statisticky nepravděpodobné, že by tento stav nastal u všech dvaceti vzorků od dvaceti různých pacientů. U žádného vzorku ale nedošlo v negativní kontrole (test bez stimulace PHA a s přidavkem MSC) k imunitní reakci v podobě aktivace lymfocytů. Z toho lze usuzovat, že mesenchymální kmenové buňky samy o sobě nevyvolávají u příjemce imunitní odpověď, a to i v případě, že se neshodují v HLA systému.

Dále nás zajímalo, zda nemají mesenchymální kmenové buňky imunogenní vliv na lymfocyty příjemce. Z výsledků lze vyčíst, že v průměru došlo k nepatrnému navýšení aktivace u negativní kontroly inkubované v přítomnosti MSC oproti negativní kontrole inkubované bez MSC. Průměr těchto rozdílů byl 0,17%. Nejvyšší naměřený rozdíl byl nárůst o 1,44%, ovšem jen u dvou výsledků byl nárůst aktivace větší než jedno procento a téměř polovina výsledků naopak zaznamenala pokles aktivity. Tím pádem lze tyto hodnoty považovat za bezvýznamné, pro použití v praxi zanedbatelné, a říct, že mesenchymální kmenové buňky imunogenní vliv na lymfocyty pacienta nemají.

Pokud vezmeme v úvahu všechna fakta a přihlídneme k výsledkům získaným v rámci výzkumu k této práci, můžeme všechny poznatky shrnout a získat tak odpověď na hlavní problém, kvůli kterému tento výzkum vůbec proběhl. Je jím praktické využití mesenchymálních kmenových buněk jako imunosupresivního terapeutického prostředku, například pro pacienty po transplantaci kostní dřeně. Vzhledem k naměřeným hodnotám můžeme říct, že mesenchymální kmenové buňky lze skutečně použít v praxi jako imunosupresivum a jsou pracoviště, jako například Fakultní nemocnice v Plzni, kde se tato léčba úspěšně využívá.

Jejich využití má mnoho nesporných výhod. V první řadě nezatěžují toxicky organismus jako chemické léky podávané k potlačení imunitní odpovědi a jejich funkční mechanismus je na principu udržení lymfocytů příjemce v klidové G0/G1 fázi, aniž by je poškodily nebo usmrtily. Čili je jejich použití pro pacienta šetrnější a mechanismus účinku je přirozenější. Dále samy o sobě nevyvolávají imunitní reakci v organismu pacienta. Nejsou imunogenní a nezáleží ani na kompatibilitě HLA systému, takže MSC mohou být podány jakémukoliv pacientovi, což velmi usnadňuje jejich podávání. Jejich účinek je velmi vysoký. Aktivaci lymfocytů nedokážou potlačit úplně, ale dokážou imunitní odpověď snížit průměrně na necelou čtvrtinu jejího normálního účinku. Tyto vlastnosti mnohonásobně snižují možnost odvrhnutí transplantovaného štěpu, popřípadě naopak reakci štěpu proti hostiteli.

Nevýhodou pak může být nutnost zajištění zdravých dárců kmenových buněk a jejich získávání včetně náročné a zdlouhavé přípravy a kultivace. Na to je potřeba specializované a vybavené pracoviště napojené na systém získávání dárců, které dokáže buňky správně zpracovat. Každá dávka mesenchymálních kmenových buněk se musí před podáním nejprve otestovat, zda reagují tak, jak mají, a to právě použitím testu blastické transformace. I k tomu je potřeba dalšího vybavení, protože jak už bylo řečeno, test blastické transformace je jak technicky, tak časově náročný.

Přesto ale pozitiva vyvažují negativa. Využití MSC v praxi jako imunosupresiva je poměrně nová metoda, která posouvá medicínu dál k modernějšímu způsobu léčby, účinnějšímu a šetrnějšímu pro pacienta.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce s názvem "Vliv mesenchymálních kmenových buněk na hodnoty lymfocytárního proliferačního testu" bylo zjistit, zda je vhodné používat mesenchymální kmenové buňky pro imunosupresivní léčbu pacientů po transplantacích, především po transplantacích kostní dřeně. Léčba pomocí MSC obecně je poměrně nově a v poslední době velmi diskutované téma, což byl hlavní důvod k tomu zjistit, zda je jejich využití jako léčebného prostředku pro pacienta vhodné.

V teoretické části byla nastíněna fakta potřebná k pochopení celkové problematiky. Práce se zabývala charakteristikou a diferenciací mesenchymálních kmenových buněk i T lymfocytů, dále jejich vzájemné interakci a principu tlumení lymfocytární imunitní odpovědi. Nastínila průběh buněčného cyklu, který MSC dokážou ovlivňovat, a také se zabývala problematikou transplantací a jejich komplikací, jako je odvrhnutí štěpu či naopak reakce štěpu proti hostiteli.

V praktické části byl stanoven hlavní cíl, a to zjistit, zda MSC ovlivňují proliferaci lymfocytů. Dílčími problémy pak byla míra tlumení proliferace lymfocytů v závislosti na kokultivaci s mesenchymálními kmenovými buňkami. Dále se práce zaměřila na možnost imunogenity mesenchymálních kmenových buněk vůči lymfocytům a také na závislost ve shodě HLA antigenů dárce kmenových buněk a HLA antigenů příjemce, což by komplikovalo jejich použití jako univerzálního léčebného prostředku.

Výzkum byl proveden v Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň. Biologickým materiálem byla nesrážlivá plná krev získaná od dvaceti pacientů, u nichž nebyla zjišťována HLA kompatibilita s použitými mesenchymálními kmenovými buňkami. Vzorky byly analyzované testem blastické transformace s nespecifickou aktivací fytohemaglutininem a s použitím lymfocytů izolovaných gradientovou centrifugací na ficollové vrstvě. Všechny vzorky byly kultivovány čtyřikrát. Jednou jako negativní kontrola bez přidání PHA a MSC, podruhé jako negativní kontrola bez přídavku PHA ale s přídavkem MSC, potřetí s přídavkem PHA a bez přídavku MSC a počtvrté s přídavkem PHA a MSC. Kultivace probíhala 72 hodin při 37°C v 5% CO₂ atmosféře. Po kultivaci byly vzorky fluorescenčně označeny propidium jodidem a analyzovány na průtokovém cytometru.

Po statistickém vyhodnocení výsledků bylo dokázáno, že mesenchymální kmenové buňky skutečně ovlivňují proliferaci lymfocytů do takové míry, že je lze použít jako

imunosupresivum. Zároveň nevykazují výraznou imunogenitu ani nutnost shody HLA systému, tudíž je jejich použití univerzální.

Výsledkem této práce je tedy potvrzení, že MSC lze využít k potransplantační léčbě jak k utlumení lymfocytů příjemce, tak k zabránění reakce štěpu proti hostiteli. Jejich použití je univerzální a oproti chemickým imunosupresivům i šetrnější, přičemž toxicky nezatěžuje organismus. To jsou zjevné a významné výhody použití kmenových buněk, které vyváží i náročnější postup jejich získávání, který je nejvíce závislý na dostatečném množství dárců. Z tohoto důvodu by bylo přínosné rozšířit informace o možnostech této léčby do obecného povědomí veřejnosti.

LITERATURA A PRAMENY

1. **LYSAK, Daniel, a další.** In vitro testing of immunosuppressive effects of mesenchymal stromal cells on lymphocytes stimulated with alloantigens. *Biomedical papers*. [Online] 28. Červen 2015. [Citace: 5. Prosinec 2015.] <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.072>. 10.5507/bp.2013.072.
2. **MEIRELLES, Lindolfo da Silva, a další.** Cytokine & Growth Factor Reviews. *Elsevier*. [Online] 2009. [Citace: 5. Prosinec 2015.] 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
3. CellMaGel. *CellMaGel*. [Online] CellMaGel, s.r.o. [Citace: 6. Prosinec 2015.] <http://cellmagel.cz/cs/uvodni-stranka/moznosti-lecby-kmenovymi-bunkami>.
4. **VLAS, Tomáš, a další.** Imunomodulační vliv mesenchymálních kmenových buněk na nespecificky indukovanou proliferaci lymfocytů. *Alergie*. Duben 2011, Sv. 13, 4, stránky 254-258.
5. **BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, a další.** *Základy imunologie*. Praha : Triton, 2013. 978-80-7387-713-2.
6. **DOAN, T.** *Immunology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 978-0-7817-9543-2.
7. **LUTTMANN, Werner.** *Immunology*. Oxford : Academic, 2006. 978-0-1208-8544-2.
8. **COICO, Richard a SUNSHINE, Geoffrey.** *Immunology: A short course*. Hoboken : Wiley-Blackwell, 2015. 9781118396919.
9. **ŠTERZL, Ivan.** *Základy imunologie*. Praha : Karolinum, 2005. 978-80-246-0972-0.
10. **CARRENO, a další.** CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation by Two Different Mechanisms Depending on Its Level of Cell Surface Expression. *The journal of immunology*. [Online] The American Association of Immunologists, 22. Květen 2000. [Citace: 10. Prosinec 2015.] <http://www.jimmunol.org/content/165/3/1352.short>. 10.4049/jimmunol.165.3.1352.
11. **HODGES, E., a další.** Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *US National Library of Medicine*. [Online] Leden 2003. [Citace: 12. Únor 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1769865/>. 10.1136/jcp.56.1.1.
12. **BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, ŠEDIVÁ, Anna a JANDA, Aleš.** *Imunodeficiency*. Praha : Grada, 2007. 978-80-247-1980-1.
13. Imunologie . *Imunologie Ústí nad Labem o.p.s.* [Online] Centrum imunologie a mikrobiologie Ústí nad Labem. [Citace: 12. Prosinec 2015.] <http://www.imunol-usti.cz/?stranka=bunecnai-imunita>.
14. **FERENČÍK, Miroslav, a další.** *Imunitní systém - Informace pro každého*. Praha : Grada, 2005. 80-247-1196-6.
15. **VERNAL, Rolando a GARCIA-SANZ, Jose A.** Th17 and Treg Cells, Two New Lymphocyte Subpopulations with a Key Role in the Immune Response Against Infection. *US National Library of Medicine*. [Online] Infect Disord Drug Targets, 8. Prosinec 2008. [Citace: 13. Únor 2016.] https://www.researchgate.net/publication/23656671_Th17_and_Treg_Cells_Two_New_Lymphoc

yte_Subpopulations_with_a_Key_Role_in_the_Immune_Response_Against_Infection.
10.2174/187152608786734197.

16. **KONRÁDOVÁ, Václava, UHLÍK, Jiří a VAJNER, Luděk.** *Funkční histologie*. Jinočany : H & H, 2000. 80-86022-80-3.

17. E-imunologie. *Moderní trendy studia imunologie*. [Online] Univerzita Palackého. [Citace: 16. Prosinec 2015.] <http://e-imunologie.cz>.

18. **JÍLEK, Petr.** *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha : Grada, 2014. 978-80-247-4822-1.

19. **ŘEHÁČEK, Vít a MASOPUST, Jiří.** *Transfuzní lékařství*. Praha : Grada, 2013. 978-80-247-4534-3.

20. **KLENER, Pavel jr. a KLENER, Pavel.** *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha : Grada, 2013. 978-80-247-4171-0.

21. **LÜLLMANN-RAUCH, Renate.** *Histologie*. Praha : Grada, 2012. 978-80-247-3729-4.

22. **MIHALOVÁ, Romana a OTOVÁ, Berta.** *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha : Karolinum, 2012. 978-80-246-2109-8.

23. **ŠÍPEK, Antonín.** Genetika-biologie. [Online] [Citace: 21. Prosinec 2015.] <http://www.genetika-biologie.cz/bunecny-cyklus>.

24. Buněčný cyklus. *Ústav buněčné biologie a patologie*. [Online] Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. [Citace: 21. Prosinec 2015.] <http://lge.lf1.cuni.cz/heslo/priklady/files/cell-cycle-ce-signalising.htm>.

25. WikiSkripta. [Online] [Citace: 22. Prosinec 2015.] http://www.wikiskripta.eu/index.php/Bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%BD_cyklus.

26. **ŠÍPEK, Antonín.** Genetika-biologie. [Online] [Citace: 21. Prosinec 2015.] <http://www.genetika-biologie.cz/mitoza>.

27. **SILBERNAGL, Stefan a LANG, Florian.** *Atlas patofyziologie*. Praha : Grada, 2012. 978-80-247-3555-9.

28. **OTOVÁ, Berta.** *Lékařská biologie a genetika I. díl*. Praha : Karolinum, 2008. 978-80-246-1594-3.

29. **BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, PAULÍK, Milan a kol., a.** *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha : Grada, 2011. 978-80-247-3533-7.

30. *Purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from kidney beans (Phaseolus vulgaris L.) cv.PDR14.* **BISWAS, Shyamsri, KAYASTRA, ARVIND M. a SECKLER, Robert.** Varanasi : Journal of plant histology, 2003.

31. **HASS, Ralf, a další.** Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *US National Library of Medicine*. [Online] National Institutes of Health, 14. Květen 2011. [Citace: 5. Únor 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3117820/>. 10.1186/1478-811X-9-12.

32. **KRAMPERA, Mauro, a další.** Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *US National Library of Medicine*. [Online] Blood transfus, 5. Červenec 2007. [Citace: 12. Únor 2016.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2535891/>. 10.2450/2007.0029-07.
33. Wilcoxon. *Biostatistika*. [Online] FVHE. [Citace: 10. Únor 2016.] <http://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn4/Wilcoxon.htm>.
34. **BARTHOLOMEW, Amelia, a další.** Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Elsevier*. [Online] 30. Leden 2002. [Citace: 18. Březen 2016.] [http://www.exphem.org/article/S0301-472X\(01\)00769-X/abstract](http://www.exphem.org/article/S0301-472X(01)00769-X/abstract). [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X).

SEZNAM ZKRATEK

atd. - a tak dále

AMK - aminokyselina

APC - antigen prezentující buňka

CDK - cyklin-dependentní kinázy

ConA - konkanavalin A

COX - cyklooxygenáza

DTH - delayed type hypersensitivity

gp - glykoprotein

GvHD - reakce štěpu proti hostiteli

HLA - hlavní lidský antigen

IDO - indoleamine 2,3- dioxigenáza

IFN- γ - interferon gama

IL - interleukin

MHC - hlavní histokompatibilní komplex

MSC - mesenchymální kmenové buňky (mesenchymal stromal cells)

NK - "natural killer", přirození zabíječi

PI - fluorescenční barvivo propidium jodid

rTh17 - regulační Th17

TCR - T-cell receptor

Tc - cytotoxické T lymfocyty

TGF- β - růstový faktor- β

Th - pomocné T lymfocyty

TNF- α - tumornekrotizující faktor alfa

Treg - regulační T lymfocyty

tzn. - to znamená

tzv. - takzvaný

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1, Nespecifická aktivace lymfocytů v závislosti na přítomnosti MSC

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1, Analýza fází buněčného cyklu průtokovou cytometrií, negativní kontrola bez přídavku PHA a MSC

Obrázek 2, Analýza fází buněčného cyklu průtokovou cytometrií, test stimulovaný PHA bez přídavku MSC

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1, Boxplot - srovnání čtyř prováděných testů

Graf 2, Boxplot - negativní kontroly

Graf 3, Boxplot - testy stimulované PHA

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1, Mikroskopický snímek kultury MSC adherované na stěny kultivační nádoby

Příloha 2, Tabulka hodnot naměřených průtokovou cytometrií

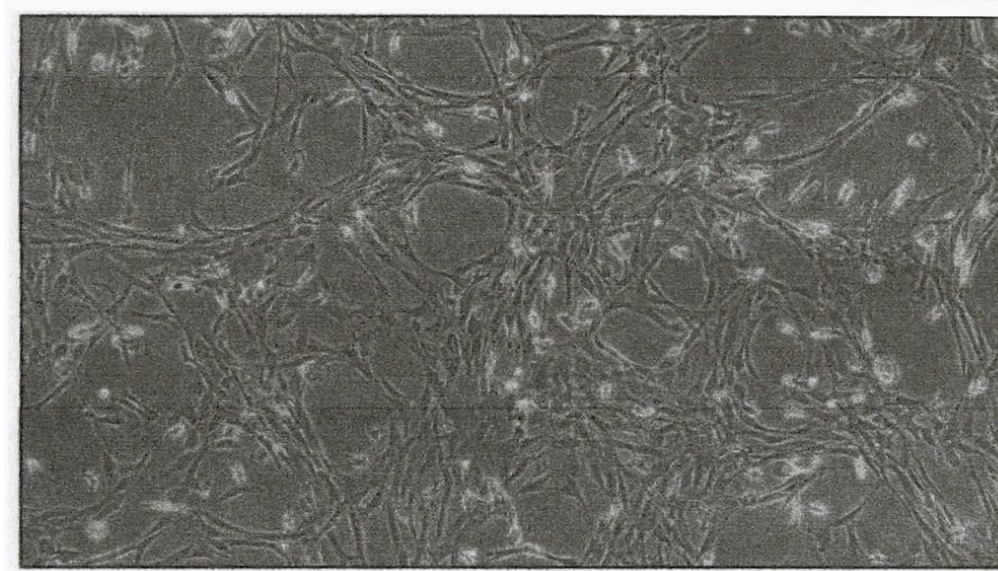
Příloha 3, Tabulka hodnot aktivace lymfocytů

Příloha 4, Potvrzení o poskytnutí informací z FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha 1

Mikroskopický snímek kultury MSC adherované na stěny kultivační nádoby



Zdroj: (4)

Příloha 2

Tabulka hodnot naměřených průtokovou cytometrií

č. vz.	Bez PHA, bez MSC			Bez PHA, s MSC			S PHA, bez MSC			S PHA, s MSC		
	GO	S	G2/M	GO	S	G2/M	GO	S	G2/M	GO	S	G2/M
1	99,6	0,3	0,06	98,2	1,8	0	66,5	25,6	7,8	96,2	2,5	1,3
2	99	0,7	0,2	99,1	0,9	0,01	77,6	18	4,4	91,8	5,4	2,8
3	99,7	0,2	0,08	99,6	0,39	0,03	61,3	30,6	8,05	95,7	2,9	1,4
4	99,9	0,07	0,02	99,4	0,6	0	50,8	45,9	3,2	87,5	10,2	2,3
5	99,4	0,6	0,08	99,8	0,19	0	46,2	45,2	8,6	95,7	4,3	0
6	99,6	0,14	0,2	98,8	0,76	0,4	62,7	37	0,25	90,8	9,1	0
7	99,7	0,2	0,03	99,8	0,13	0,03	54,8	35,6	9,5	90,4	7,3	2,3
8	99,2	0,76	0	98,4	1,6	0	58,09	35,86	6,04	91,8	6,15	2,06
9	99,6	0,39	0,05	99,2	0,6	1,15	47,6	42,7	9,6	90,3	9,7	0
10	98,2	1,8	0,02	99,4	0,6	0,03	59,6	31,3	9,1	93,6	6,4	0
11	99,4	0,4	0,13	99,5	0,5	0	70	24	5,5	88,9	9,8	1,24
12	99,1	0,9	0	99,8	0,2	0	68,9	25,9	5,2	96,12	3,87	0,008
13	99,3	0,69	0	99,5	0,5	0	68	25,5	6,4	95,3	4,3	0,38
14	99	0,91	0,01	99,2	0,8	0	44,9	47,9	7,2	91,5	8,5	0,14
15	99,5	0,47	0,05	99	0,6	0,4	58,6	33,4	7,9	96,5	2,9	0,58
16	99,5	0,47	0,01	99,3	0,5	0,3	66,8	26,8	6,4	94,7	5,19	0,13
17	99,6	0,43	0	99,8	0,2	0	49,3	41,1	9,6	94	4,96	0,9
18	99,4	0,4	0,16	99,4	0,5	0,14	59,9	32,6	7,5	93,5	4,2	2,3
19	99,4	0,49	0,12	99,5	0,45	0	56,9	36	6,9	96,2	2,7	1,1
20	99,6	0,4	0	99	0,7	0,3	52,2	39	8,7	79,12	18,36	2,25

Příloha 3

Tabulka hodnot aktivace lymfocytů

Aktivované lymfocyty - S+G2/M				
č. vz.	Bez PHA, bez MSC	Bez PHA, s MSC	S PHA, bez MSC	S PHA, s MSC
1	0,36	1,8	33,4	3,8
2	0,9	0,91	22,4	8,2
3	0,28	0,42	38,65	4,3
4	0,09	0,6	49,1	12,5
5	0,68	0,19	53,8	4,3
6	0,34	1,16	37,25	9,1
7	0,23	0,16	45,1	9,6
8	0,76	1,6	41,9	8,21
9	0,44	1,75	52,3	9,7
10	1,82	0,63	40,4	6,4
11	0,53	0,5	29,5	11,04
12	0,9	0,2	31,1	3,878
13	0,69	0,5	31,9	4,68
14	0,92	0,8	55,1	8,64
15	0,52	1	41,3	3,48
16	0,48	0,8	33,2	5,32
17	0,43	0,2	50,7	5,86
18	0,56	0,64	40,1	6,5
19	0,61	0,45	42,9	3,8
20	0,4	1	47,7	20,61

Příloha 4

Povolení sběru informací ve FN Plzeň



Vážená paní
Alena Pechová
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem informací o laboratorních metodách, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Vliv mesenchymálních kmenových buněk na hodnoty lymfocytárního proliferačního testu*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚIA souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb.** o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je **Ing. Bc. Tomáš Vlas, odb. prac. v laboratorních metodách ÚIA FN Plzeň**.

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná a je vyjádřením ochoty ke spolupráci oslovených zaměstnanců FN Plzeň s Vámi.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

22. 3. 2016