

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

ADRIANA KAŠPÁRKOVÁ

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Adriana Kašpárková

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**APLIKACE LAB-ON-A-CHIP TECHNOLOGIE V LÉČBĚ
NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Dr. Ing. Pavel Fikar, Ph.D.

PLZEŇ 2019

Čestné prohlášení:

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

V Plzni dne



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Tato práce vznikla za podpory projektu "VaV inteligentních komponent pokročilých technologií pro plzeňskou metropolitní oblast (InteCom)" reg.č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267 financovaného z EFRR.

The work was supported from ERDF under project "Research and Development of Intelligent Components of Advanced Technologies for the Pilsen Metropolitan Area (InteCom)" No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007267.

Poděkování:

Děkuji Dr. Ing. Pavlovi Fikarovi, Ph.D. za odborné vedení, inspiraci, konstruktivní kritiku i za povzbuzení při práci s lab-on-a-chip technologií. Dále děkuji Mgr. Monice Holubové, Ph.D. za cenné rady ohledně použití chemoterapie a konvenčních metod a Hematoonkologickému oddělení FN Plzeň za poskytnutí vzorků.

ABSTRAKT

Příjmení a jméno: Kašpárková Adriana

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Aplikace lab-on-a-chip technologie v léčbě nádorových onemocnění

Vedoucí práce: Dr. Ing. Pavel Fikar, Ph.D.

Počet stran: číslované 52, nečíslované 21

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 53

Klíčová slova: Lab-on-a-chip technologie, 2DEP cytometrie, chronická B-lymfocytární leukémie, apoptóza

Tato práce je zaměřena na aplikaci lab-on-a-chip technologie v léčbě nádorových onemocnění. Blíže popsáným onemocněním je chronická B-lymfocytární leukémie. Teoretická část se zabývá léčbou hematologických malignit a s ní často spojenou rezistencí k lékům. Dále se práce zabývá apoptózou a vybranými metodami k jejímu průkazu, jelikož cílem chemoterapeutické léčby je navození apoptózy maligních buněk. V poslední kapitole teoretické části je popsána distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP cytometrie), lab-on-a-chip technologie, jež byla použita v experimentální části. Praktická část se věnuje měření B-lymfocytů izolovaných z krve pacientů s prokázanou chronickou B-lymfocytární leukémií a jejich reakci na léčbu. Účinnost léčby byla v podobě sledování progresu apoptózy monitorována 2DEP cytometrií. Výsledky naměřené pomocí 2DEP cytometrie byly porovnávány s konvenčními metodami (Alamar blue, 7-Aminoaktinomycinem D a barvením trypanovou modří). Výsledky práce poukazují na potenciál 2DEP cytometrie konkurovat konvenčním metodám pro měření buněk, jejich vlastností a identifikaci důležitých biomarkerů, a to i bez nutnosti barvení či jiného značení buněk.

ABSTRACT

Surname and name: Kašpárková Adriana

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Application of lab-on-a-chip technology in the treatment of cancer

Consultant: Dr. Ing. Pavel Fikar, Ph.D.

Number of pages: numbered 52, unnumbered 21

Number of appendices:2

Number of literature items used: 53

Keywords: Lab-on-a-chip technology, 2DEP cytometry, B-cell chronic lymphocytic leukemia, apoptosis

This thesis is focused on the application of lab-on-a-chip technology in the treatment of cancer. The disease described herein is chronic B-cell leukemia. The theoretical part deals with the treatment of haemato-oncological malignancies and the corresponding drug resistance that is often associated with them. Furthermore, the thesis deals with apoptosis and with selected methods for its detection, as the goal of chemotherapeutic treatment is to induce apoptosis of malignant cells. The last chapter of the theoretical part describes distributed dielectrophoretic cytometry (2DEP cytometry), lab-on-a-chip technology, which is used in the experimental part. The practical part deals with the measurement of B-lymphocytes isolated from the blood of patients with confirmed chronic B-cell leukemia and their response to treatment. Treatment efficiency was monitored by 2DEP cytometry and corresponds to the progression of apoptosis. 2DEP cytometry results were compared with conventional methods (Alamar blue, 7-aminoactinomycin D and trypan blue dying). The results of the work show the potential of 2DEP cytometry to compete with conventional methods for measuring cells, their properties and identifying important biomarkers, even without dying or other labeling of the cells.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM ZKRATEK

ÚVOD	15
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 CHRONICKÁ B-LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE.....	17
1.1 B-lymfocyty	17
1.1.1 Lymfopoéza	17
1.1.2 Morfologie vývojových stádií B-lymfocytů	18
1.1.3 Funkce B-lymfocytů	18
1.2 Příčiny, příznaky	19
1.3 Diagnostika a vyšetření.....	20
1.3.1 Stanovení diagnózy	20
1.3.2 Morfologický nález v periferní krvi	20
1.3.3 Nález v kostní dřeni	21
1.3.4 Imunofenotypizace	22
1.3.5 Genetická vyšetření a prognosticky významné biomarkery.....	22
2 LÉČBA.....	24
2.1 Chemoterapie	24
2.1.1 Bortezomib	25
2.2 Imunoterapie – monoklonální protilátky	25
2.3 Kombinované léčebné režimy	26
2.4 Nežádoucí účinky chemoterapie	27
3 LÉKOVÉ REZISTENCE.....	28
3.1 Obecné mechanismy vzniku rezistencí k chemoterapiím.....	28
3.2 Mnohočetná léková rezistence	29

4	APOPTÓZA.....	30
4.1	Apoptóza versus nekróza	30
4.2	Cesty apoptózy.....	31
4.2.1	Intrinzická (vnitřní/mitochondriální) cesta	32
4.2.2	Extrinzická (receptorová) cesta	32
4.2.3	Perforin/granzymová cesta	33
4.2.4	Dráha endoplazmatického retikula	33
4.2.5	Společná dráha.....	34
4.3	Testy apoptózy	34
4.3.1	Trypanová modř	35
4.3.2	Alamar blue	35
4.3.3	7-Aminoaktinomycin D.....	36
5	LAB-ON-A-CHIP TECHNOLOGIE	37
5.1	Distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP cytometrie).....	37
5.1.1	Princip metody.....	38
5.1.2	Popis čipu	40
5.1.3	Schéma 2DEP systému	41
5.1.4	Vynášení výsledků do grafů	42
5.1.5	Princip identifikace biomarkerů	43
5.1.6	Dielektroforetická cytometrie a apoptóza.....	44
	PRAKTICKÁ ČÁST	46
6	CÍL VÝZKUMU A VÝZKUMNÝ VZOREK	46
6.1	Hypotéza	46
6.2	Cíl práce	46
6.3	Soubor pacientů	46

7	METODY VÝZKUMU	47
7.1	Materiál, reagentie a přístroje.....	47
7.2	Separace mononukleárů pomocí hustotního gradientu	48
7.3	Magnetická izolace buněk	48
7.4	Kultivace a zamrazení buněk	49
7.5	Rozmražení a aplikace chemoterapie.....	49
7.6	Měření odezvy chemoterapie – Vlastní experiment	50
7.6.1	Alamar blue – test metabolické aktivity	50
7.6.2	Trypanová modř – test viability	51
7.6.3	7-Aminoaktinomycin D a stanovení čistoty populace.....	51
7.6.4	2DEP cytometrie	52
8	VÝSLEDKY.....	53
8.1	Izolace a kultivace buněk.....	53
8.2	Viabilita buněk - Trypanová modř.....	53
8.3	Viabilita buněk – 7-Aminoaktinomycin D	54
8.4	Metabolická aktivita – Alamar Blue	55
8.5	Distribuovaná dielektroforetická cytometrie	56
8.5.1	Marker apoptózy.....	59
8.6	Výsledné grafy metod	60
	DISKUZE	61
	ZÁVĚR	65
	SEZNAM LITERATURY	
	SEZNAM PŘÍLOH	
	PŘÍLOHY	

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Nátěr periferní krve B-CLL s jadernými stíny.....	21
Obrázek 2 Schéma průběhu apoptózy	31
Obrázek 3 Proudění buněk mikrokanálem	38
Obrázek 4 Schéma čipu	40
Obrázek 5 Schéma 2DEP cytometru	41
Obrázek 6 Proces vynášení výsledků do grafu	42
Obrázek 7 Ilustrace postupu při vyhodnocení biomarkeru progresu apoptózy	44
Obrázek 8 2 DEP cytometr a čip	52
Obrázek 9 Výstup cytometrického měření vzorku 1 s chemoterapeutikem po 24h a 48h ..	54
Graf 1 Trypanová modř – nárůst zastoupení apoptotických buněk ve vzorcích	53
Graf 2 7-AAD – Nárůst zastoupení mrtvých buněk ve vzorcích	54
Graf 3 Změna metabolické aktivity léčených buněk oproti kontrolám bez léků.....	55
Graf 4 Progrese apoptózy dle 2DEP cytometrie.....	59
Graf 5 Viabilita - Trypanová modř.....	60
Graf 6 Viabilita - 7-AAD.....	60
Graf 7 Metabolická aktivita.....	60
Graf 8 Marker apoptózy	60

SEZNAM ZKRATEK

- 2DEP - Distributed dielectrophoretic cytometry
- 7-AAD - 7-Aminoaktinomycin D
- ABC - ATP Binding Cassette - ATP transportní proteiny
- ADCC - antibody dependent cellular cytotoxicity - buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
- AIF - Apoptosis-inducing factor - faktor indukující apoptózu
- AML - akutní myeloidní leukémie
- ATP - adenosintrifosfát
- B-CLL - chronická B-lymfocytární leukémie
- BCR - B-cell receptor - receptory B-lymfocytů
- BSA - hovězí sérový albumin
- CAD - caspase activated DNase - endonukleázová Dnáza
- CASP - kaspáza
- CD - cluster of differentiation
- CDC - complement-dependent cytotoxicity - cytotoxicita závislá na komplementu
- CDF - cumulative distribution function
- CLL - chronická lymfocytární leukémie
- CML - chronická myeloidní leukémie
- CTL - cytotoxické T-lymfocyty
- DE - dielektrické
- del - delece
- DEP - dielektroforetické
- DISC - death inducing signaling complex - proteinový komplex indukující apoptózu
- DMSO - dimethylsulfoxid
- E - Enrichment - Obohacení
- ER - endoplazmatické retikulum
- Fab - antigen-binding fragment - fragment vázající antigen
- FasL - Fas ligand
- FasR - Fas receptor
- FBS - fetální bovinní sérum
- Fc - crystallizable fragment - fragment pro vazbu s Fc receptory
- FCR - léčebný režim - fludarambin, cyklofosfamid, rituximab
- FISH - fluorescenční *in situ* hybridizace

gp - glykoprotein

HLA - human leukocyte antigen

ICAD – inhibitor endonukleázové DNázy

ID - interdigitated - interdigitální

Ig - imunoglobulin

IgVH - variabilní fragment těžkého řetězce imunoglobulinu

IL - interleukin

M - marker apoptózy

MDR - multi-drug resistance - Mnohočetná léková rezistence

MHC - major histocompatibility complex - Hlavní histokompatibilní komplex

N-DEP - negativní dielektroforetické

NK - natural killers cell

Off-DEP - Off-chip passivated-electrode insulator-based dielectrophoresis

PARP - poly-ADP-ribóza-polymeráza

PBS - phosphate-buffered saline - promývací médium

PCR - Polymerase chain reaction - Polymerázová řetězová reakce

P-DEP - pozitivní dielektroforetické

PDF - probability density function

PDMS - polydimethylsiloxan

PIV - Particle image velocimetry - částicová velocimetrie

PKB- pluripotentní kmenová buňka

PL - prolymfocyt

RT-PCR - Real time-PCR

TCR - T- cell receptor - receptory T-lymfocytů

TNF - tumor necrosis factor - tumor nekrotizující faktor

TNFR – tumor necrosis factor receptor - receptor TNF

ÚVOD

Každá buňka podléhá kontrolám v různých fázích buněčného cyklu. Jestliže kontrolní body fungují správně, možné chyby přepisu DNA jsou buď opraveny, nebo je buňka odsouzena k řízené buněčné smrti. Pokud nějaký z kontrolních bodů selže, hromadí se v nových buňkách abnormality způsobující například inhibici apoptózy. Takto mutované buňky se nekontrolovatelně množí (proliferují), na úkor buněk zdravých a je nutno zahájit protinádorovou léčbu.

Jedním z nejčastějších maligních onemocnění krve je chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL). Standardní léčbou tohoto onemocnění je chemoterapie. Léčba založena na indukci apoptózy maligních buněk bohužel není vždy úspěšná, a to i díky vzniku rezistence k určitému druhu chemoterapeutik. Účinnost léčby není u každého pacienta se stejným onemocněním stejná a nese s sebou řadu obtíží.

Existuje mnoho laboratorních metod, jimiž lze prokázat hematologické malignity, stanovit prognosticky významné biomarkery, detekovat změnu metabolické aktivity nebo přímo různá stadia apoptózy buněk. Tyto metody s sebou nesou řadu kladů i záporů, využívají různých barviv interagujících s buňkami, zaměřují se na různé body v procesu apoptózy a jsou časově či finančně náročné. *In vitro* testování vlivu chemoterapeutik na nádorové buňky pacienta dosud není běžnou praxí, přestože léčiva, podávající se v řadě lékařských oborů, bývají před podáním testována pacientovi na míru. Měřením buněk v průběhu chemoterapie můžeme získat informace o reakci buněk na léčbu, o míře progresu apoptózy či o rezistenci k léčivům. Takové testování může pomoci zvýšit efektivitu léčby a vyhnout se některým komplikacím. V této práci se věnujeme monitorizaci účinnosti léčby pomocí lab-on-a-chip technologií.

Lab-on-a-chip systémy jsou velice zajímavým řešením miniaturizace a automatizace biologických a chemických testů. Měření probíhá v mikrofluidních čípech a umožňuje provádět experimenty s velice malými objemy vzorků a činidel. Mikrofluidní čipy se skládají ze sítí mikrokánálů o průměru od deseti do několika set mikrometrů. Do čipu jsou vháněny vzorky o nano – až pikolitrových objemech, se kterými je spojeno minimální množství reagentů. I přes malé použité objemy je dosahováno vysoké výtěžnosti metody, a to za podstatně nižší náklady. Lab-on-a-chip technologie umožňují měření rozptylu populace, rozlišení buněčné viability či třídění buněčných populací.

Mikrofluidní systémy jsou též aplikovány v genovém sekvenování nové generace. Miniaturizace, paralelizace a integrace metod otevírá v biologii zcela nové příležitosti. Umožňuje rozšířené poznávání, hodnocení a manipulování s buňkami či jednotlivými molekulami.

Novou metodu, využívající mikrofluidní zařízení k měření buněk, je distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP). Tato metoda může být atraktivní alternativou průtokové cytometrie. 2DEP poskytuje informace o struktuře a objemu buněk, o heretogenitě buněčné populace i o expresi intracelulárních a povrchových biomarkerů. Na rozdíl od průtokové cytometrie nevyžaduje k rozpoznání biomarkerů značení pomocí protilátek, s čímž souvisí znatelně nižší provozní náklady. Podstatou 2DEP cytometrie je mapování chování buněk v elektrickém poli odrážející buněčné změny. Mapování tohoto chování umožňuje měřit nativní buňky neinvazivně a v krátkém čase.

Přestože metoda 2DEP může detekovat celou škálu nových biomarkerů, není zatím brána za běžný nástroj k identifikaci buněk a její potenciál je třeba plně prozkoumat.

Naším cílem je pomocí této lab-on-a-chip technologie zaznamenat účinnost chemoterapeutik v léčbě chronické lymfocytární leukémie a porovnat výsledky s výstupy konvenčních metod.

TEORETICKÁ ČÁST

1 CHRONICKÁ B-LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE

Chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL) je klonální maligní onemocnění zralých B-lymfocytů s charakteristickým imunofenotypem. Poměr maligně transformovaných buněk ke zdravým postupně vzrůstá díky nekontrolované klonální proliferaci a zřejmě i díky zvýšené expresi genu BCL2 odpovědnému za poruchu apoptózy.

1.1 B-lymfocyty

1.1.1 Lymfopoéza

Vývoj krevních elementů u dospělých probíhá za fyziologických podmínek v kostní dřeni plochých kostí, u dětí ve všech kostech. Základní krvetvornou buňkou je pluripotentní kmenová buňka (PKB), schopná nekonečné sebeobnovy, proliferace (dělení se) a diferenciaci (odlišení buněk do různých vývojových linií). Dalším stádiem je progenitorová kmenová buňka (specifičtější a s omezeným počtem dělení). Vlivem humorálních působků se PKB diferencuje v lymfoidní progenitorovou buňku a ta dále v lymfoblast. Maturací lymfoblastu vznikne prolymfocyt a později zralý naivní lymfocyt. Zralý naivní lymfocyt opouští kostní dřeň a dokončuje svůj vývoj v sekundárních lymfatických tkáních, kde probíhá selekce vysoce reaktivních či málo reaktivních klonů a první setkání s antigeny. Buňky musí být přísně kontrolovány mechanismy způsobujícími apoptózu defektních buněk. Patologicky pozměněné buňky mívají schopnost abnormální proliferace, zvýšenou schopnost sebeobnovy, neodpovídají adekvátně na proapoptotické stimuly. Tyto změny mohou za vznik a rozvoj patologické krvetvorby, kdy produkce autonomního maligního klonu začne utlačovat zdravou krvetvorbu (Klener, 2011).

1.1.2 Morfologie vývojových stádií B-lymfocytů

Kmenová lymfocytární buňka v kostní dřeni maturuje v lymfoblast. Lymfoblasty jsou menší buňky než myeloblasty, jen s úzkým lemem bazofilní cytoplazmy. Jádro lymfoblastu je kulaté, bazofilní, zabírající většinu buňky, s hutným chromatinem. Viditelné bývají jen 1-2 jadérka. Dalším vývojovým stádiem jsou prolymfocyty - jsou menší než blasty a mají hutnější hrudkovitý chromatin, v centru jádra bývá zřetelný nukleolus. Zralé naivní lymfocyty jsou morfologicky i funkčně různé, rozlišujeme však dva typy – malý a velký lymfocyt. Malý lymfocyt má lehce vpáčené jádro a hutný chromatin, jeho cytoplazma bývá nepatrná. Velký lymfocyt má ve světle modré cytoplazmě nespecifická granula a má vtačené oválné či kulaté jádro obsahující hutný chromatin (Penka a Tesařová, 2011).

1.1.3 Funkce B-lymfocytů

B-lymfocyty jsou nedílnou součástí specifické imunity. V buněčné membráně mají ukotveny molekuly imunoglobulinů (protilátek) typu IgM, známé jako BCR receptory s vazebnými místy vně buňky. Specifita BCR receptorů se u každého lymfocytu liší (díky přeskupování subgenů pro imunoglobulin). Po navázání antigenu na receptor je informace o navázání přenesena pomocí imunoglobulinových řetězců $Ig\alpha$ a $Ig\beta$ do buňky. Lymfocyt, který dosud nereagoval s antigenem, nazýváme naivní nebo panenský. Ten je připraven reagovat se specifickou strukturou antigenu. Navázáním antigenu na BCR receptor přechází B-lymfocyt za pomoci kostimulačních signálů Th2 lymfocytů do dalšího stádia vývoje. Dochází k pomnožení daného B-lymfocytu a přeměně na plazmatické (efektorové) buňky, produkující do plazmy protilátky stejné specifity, jako byl BCR mateřského lymfocytu. Pokud se antigenní struktura pasující k vazebnému místu BCR receptoru v těle nevyskytne, B-lymfocyt dále přetrvává v nativní formě. Jestliže se na BCR receptor antigen naváže, ale B-buňka nedostane signál od Th-lymfocytu, po několika hodinách začne místo tvorby protilátek proces apoptózy (Jílek, 2014).

Tvorba protilátek není ani zdaleka jedinou funkcí B-lymfocytů. B-lymfocyty jsou antigeny prezentující buňky, pohlcující antigeny s následným vystavením antigenních peptidů společně se svými MHC (major histocompatibility complex) glykoproteiny

II. třídy na povrchu buňky. Komplex antigenního peptidu a MHCgpII rozeznává TCR (T-cell receptor) a iniciuje T-buněčnou imunitní odpověď. B-lymfocyty produkují imunomodulační cytokiny ovlivňující funkce T-lymfocytů, dendritických buněk, regulují neogenezi a organizaci lymfatických tkání, ovlivňují hojení ran. Jsou buňkami schopnými odmítnout transplantovanou tkáň. (LeBien a Tedder, 2008) Interleukin-6 (IL-6) produkovaný B-buňkami ovlivňuje diferenciaci CD4 pomocných lymfocytů do Th1 a Th2 (Diehl a Rincón, 2002).

1.2 Příčiny, příznaky

Incidence v Evropě je 3 nové případy na 100 000 obyvatel za rok. V Evropě tvoří 25 – 30 % všech leukemií (Adam a Vorlíček, 2007). Chronická lymfocytární leukémie se jen zřídka objevuje u osob mladších padesáti let (Šimkovič a Smolej, 2013; Adam a Vorlíček, 2007).

Etiologie B-CLL není známá, vyloučena byla i přímá souvislost s expozicí ionizujícímu záření, jak je tomu například u chronické myeloidní leukémie. Přestože u většiny nemocných jsou popsány genetické aberace, není spolehlivě prokazatelné, že tyto genetické mutace jsou primárním podnětem pro vznik B-CLL (Klener, 2011).

Některé formy chronické leukémie mohou přetrvávat v bezpříznakové formě roky – odhalí se při prohlídkách či při podezření na jinou chorobu. Jiné formy mohou mít agresivnější průběh. Typické příznaky B-CLL jsou infekce způsobené nedostatečnou protilátkovou imunitou, která není schopná opsonizace bakterií a jejich následnému odstranění dalšími složkami buněčné imunity. Snížen je na úkor B-lymfocytů i počet lymfocytů T a je taktéž snížena i aktivita NK buněk. Vzhledem k takovému zásahu do imunity jsou u nemocných B-CLL běžné infekce viry, bakteriemi i infekce oportunní. Mezi další typické příznaky patří tvorba autoprotilátek proti erytrocytům a trombocytům, majících za následek hemolytickou anémii a trombocytopenii. Anémie, trombocytopenie nebo aplazie může být způsobena taktéž vlivem útlaku fyziologické hematopoézy maligním klonem akumulujících se leukemických buněk. V pozdějších stádiích jsou u nemocných typickým projevem ztráta hmotnosti, svalové hmoty a zvýšený katabolismus (Adam a Vorlíček, 2007). U pacientů s B-CLL je možný zvrát v Richterův syndrom, při transformaci buněk v agresivnější formu, nazývanou difuzní velkobuněčný B-lymfom.

Tento stav je pozorován u 5 - 10 % pacientů s B-CLL a medián přežití je přibližně 10 měsíců (Jain a O'Brien, 2012).

1.3 Diagnostika a vyšetření

1.3.1 Stanovení diagnózy

Stanovit diagnózu B-CLL je možné z periferní krve na základě vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem a z průtokové cytometrie, kde je nalezeno více než $5 \cdot 10^9/l$ klonálních lymfocytů s imunofenotypem typickým pro B-CLL. Pacientům s nejednoznačným nálezem či při podezření na agresivnější lymfoproliferaci je uděláno vyšetření kostní dřeně nebo případně lymfatických uzlin. Prognosticky významná jsou například cytogenetická vyšetření (Hadrabová, 2015).

1.3.2 Morfologický nále z v periferní krvi

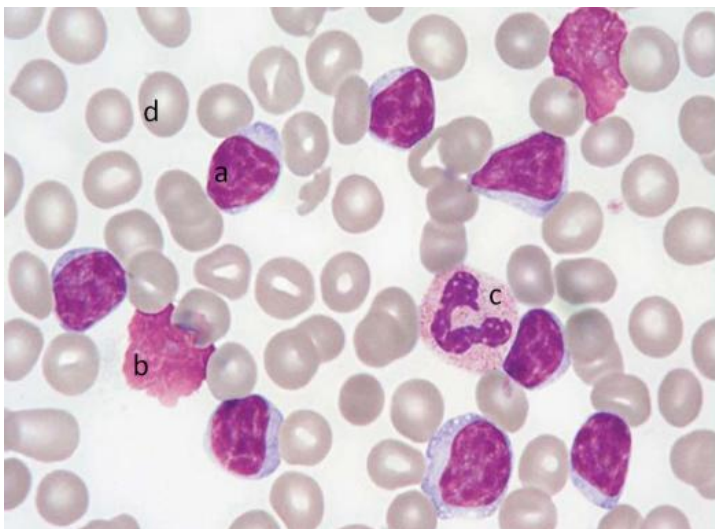
Z morfologického hlediska dělíme B-CLL na dvě formy - na typickou a atypickou. Lymfocyty typické formy jsou malé a dosahují velikosti maximálně dvojnásobku erytrocytu. Mají spíše kulatý tvar, mírně excentricky položené kulaté jádro bez viditelných nukleolů a pouze úzký lem světlé cytoplazmy, ve které nejsou granula. V cytoplazmě vzácně nalézáme vakuoly. Jaderný chromatin je kondenzovaný, hutný, uspořádaný do tmavších a světlejších bloků. Tuto strukturu nazýváme mozaikovitou. Pacienti s typickou formou leukémie mají morfologicky uniformní populaci lymfocytů a maximálně 10 % všech lymfocytů tvoří prolymfocyty.

Nález typický pro B-CLL jsou v nátěru Gumprechtovy stíny, které vznikají mechanickým poškozením fragilních lymfocytů při zhotovování nátěru. Jde tedy o holá lymfocytární jádra. Znamky anémie, retikulocytózy, hemolýzy či trombocytopenie mohou poukazovat na autoimunitní onemocnění často doprovázející B-CLL.

Atypické formy chronické leukémie bývají agresivnějšího rázu. Tuto formu, známou také jako smíšenou buněčnou leukemii, je možné dále dělit na dvě varianty. První varianta je dimorfní a najdeme v ní buňky B-CLL/PL (čili buňky chronické lymfoidní leukémie společně s buňkami prolymfocytárními). Malé lymfocyty a prolymfocyty tvoří 10 – 55 % všech lymfocytárních buněk periferní krve. Druhou variantou je nález

pleomorfních buněk – lymfocyty jsou různě velké, s různým tvarem i velikostí jádra a liší se i poměrem jádra k cytoplazmě. Jádro bývá tvarově nepravidelné, různě přeskládané, s nekondenzovaným chromatinem. Prolymfocytů je u pleomorfní varianty méně než u varianty dimorfní a občasně v nich mohou být viditelná jadérka (Kačírková a Campr, 2007).

Obrázek 1 Nátěr periferní krve B-CLL s jadernými stíny



Převzato z Kačírková a Campr, 2007

Na obrázku jsou malé lymfocyty (a), mající větší poměr jádra k cytoplazmě, kondenzovaný chromatin mozaikovitě struktury. V šedomodré cytoplazmě jsou ojedinelé vakuoly. Dále jsou na obrázku dva Gumprechtovy stíny (b), neutrofilní segment (c) a erytrocyty (d).

1.3.3 Nález v kostní dřeni

V kostní dřeni pacienta s B-CLL je častým nálezem infiltrace lymfocytárními buňkami. Lymfocytární elementy tvoří 5-20 % buněk v kostní dřeni za fyziologických podmínek. Lymfocyty pacientů s B-CLL zaujímají minimálně 35 % buněk v kostní dřeni, utlačují ostatní krvetvorbu a to má za následky anémii, granulocytopenii a trombocytopenii v periferní krvi. Uspořádání buněk infiltrátu v dřeni má také prognostický význam. (Klener, 2011) V nádorové tkáni kostní dřeni jsou lymfocyty malé, stejné jako v periferní krvi, s různou příměsí prolymfocytů střední velikosti. V proliferačních centrech jsou větší

paraimunoblasty. Kostní dřeň je vyšetřována dále imunohistochemicky (Kačírková a Campr, 2007).

1.3.4 Imunofenotypizace

Imunofenotypizace slouží kromě jiného k odhalení klonality buněk a díky expresi povrchových antigenů i k zařazení do stádia jejich vývoje. Charakteristická pro buňky B-CLL je pozitivita antigenu CD19, CD23 a znaky CD20 a CD52, využívané k léčbě monoklonálními protilátkami, které jsou namířeny proti těmto antigenům. Dále je na buňkách přítomná koexprese antigenu CD5, který je jinak běžný pro T-lymfocyt, a slabá exprese znaku CD79b. Exprese lehkých řetězců typu kappa nebo lambda poukazuje na klonalitu buněk. Průtoková cytometrie je kromě diagnostiky hojně využívaná ke zjištění prognostických faktorů a k monitoraci minimální reziduální nemoci. (Panovská, Doubek, 2013, str. 118) Na buňkách B-CLL může být exprimován protein ZAP-70, který se na zdravých B-lymfocytech nevyskytuje. Stanovením tohoto proteinu je možno prokázat mutaci IgV_H, mající značný vliv na prognózu onemocnění. Dalším cenným biomarkerem pro prognózu onemocnění může být pozitivita znaku CD38 (Schroers et al., 2005; Adam a Vorlíček, 2007).

1.3.5 Genetická vyšetření a prognosticky významné biomarkery

Klasické metody pro analýzu karyotypu jsou u B-CLL obtížně proveditelné z důvodu jejich špatné mitogenní odpovědi *in vitro*. Standardní metodou pro průkaz aberací je Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), díky které je možno odhalit chromozomové aberace až u 80 % pacientů s B-CLL a to na chromatinu v interfázi.

Nejvýznamnější z hlediska prognózy B-CLL je gen kódující variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu. Mutace pro IgV_H bývá nálezem u přibližně poloviny pacientů s B-CLL a je spojena s lepší prognózou projevující se například pomalejší progradací onemocnění. Nejčastější aberací je u B-CLL del(13)(q14), která pokud je jedinou aberací, je spojena s lepší prognózou, než mají pacienti s normálním karyotypem. Dalším poměrně častým nálezem je del(11)(q22-3) provázená špatnou reakcí na léčbu výrazným zvětšením uzlin a celkově horší prognózou. (Kozák 2008) Tato aberace zahrnuje gen pro ATM, který má schopnost zastavit buněčný cyklus a aktivovat cesty opravy či spustit apoptózu.

Se špatnou prognózou je spojována též del(6)(q21) charakteristická pro Non-Hodgkinské lymfomy (Leyden, 2008). Některé studie uvádějí výrazně horší prognózu u karyotypu lymfocytů s trizomií chromozomu 12. Přesto bývá zařazena mezi mutace s intermediární prognózou. Aberace s nižší frekvencí výskytu a se špatnou prognózou je del(17)(p14). Postihuje gen TP53, tudíž je spojena s výraznou progresí a chemorezistencí.

Průkaz ZAP-70 (Zeta chain-associated protein) je možný například pomocí molekulárně genetických metod PCR, Western blotu či průtokovou cytometrií. Nízká exprese odpovídá mutovaným a vysoká exprese nemutovaným IgVH. Nezávislým prognostickým faktorem je přítomnost povrchového antigenu CD38 prokazatelného průtokovou cytometrií, který býval spojován s nemutovaným genem pro IgVH. Výsledky však plně nekorelují (Kozák, 2008).

2 LÉČBA

Postup léčby pacientů s diagnózou B-CLL se odvíjí od jejich způsobilosti podstoupit cytotoxickou léčbu. Podstatným faktorem je věk, celkový stav nemocného (PS - performance status), funkce ledvin a další probíhající onemocnění (Šimkovič a Smolej, 2013).

2.1 Chemoterapie

Chemoterapie je podávána za účelem navození apoptózy nádorových buněk a to hlavně navozením genotoxického stresu. Genotoxický stres působí zástavu replikace, transkripce, zlomy v DNA a tím zásadní poškození buňky. Chemoterapie vede buňku k apoptóze dráhou p53, spuštěním mitochondriální i receptorové apoptózy. Další možností je aktivace stresových kináz, usnadňujících spuštění apoptózy snížením apoptotického prahu mutované buňky. Pokud není funkční signální dráha p53, je alternativní cestou likvidace buněk nekróza, autofagie či mitotická katastrofa, kdy pro velkou kumulaci mutací DNA není buňka schopná života a zaniká.

Mezi klasická genotoxická cytostatika způsobující inhibici replikace a transkripce jsou řazeny alkylační a interkalační látky, látky působící rozštěpení molekuly DNA a inhibitory DNA-topoizomeráz. Alkylační látky, které jsou používány nejčastěji, jsou schopny tvořit kovalentní vazby s cytosinem, guaninem a adeninem, čímž zamezují separaci vláken DNA potřebné pro replikaci. Zástupcem alkylačních cytostatik pro léčbu chronické lymfocytární leukémie je chlorambucil. Interkalační látky působí interkalaci – tedy nekovalentní vazbu cytostatika s dvoušroubovicí DNA. Tam se molekuly cytostatik naváží na vodíkové můstky a brání replikaci, transkripci i syntéze RNA. Mezi interkalační cytostatika patří například antracyklinová antibiotika – i přes kardiotoxické účinky jsou hojně užívána při kombinované chemoterapii hematologických malignit. Látky rozštěpující molekuly DNA označované jako radiomimetika, navozují zlomy v DNA a inhibují opravné mechanismy DNA. Topoizomerázy, které zodpovídají za rozpojení a spojení dvoušroubovice při replikaci DNA, a tak i za průběh mitózy při separaci chromozomů, jsou blokovány inhibitory DNA-topoizomeráz.

Zesílení účinku genotoxických cytostatik je dosaženo inhibicí opravných mechanismů DNA. Za inhibici průchodu buněčným cyklem jsou odpovědná antimitotika

způsobující narušení mitózy, aktivaci kontrolních bodů a buněčné smrti. Svou funkci v léčbě plní také inhibitory proteosyntézy a inhibitory degradace proteinů (Klener Jr. a Klener, 2013).

2.1.1 Bortezomib

Bortezomib je cytostatikum patřící mezi takzvané inhibitory proteazomu. Proteazom je komplex proteinů zodpovědný za degradaci nefunkčních, starých, patologicky mutovaných proteinů a jejich vystavení společně s molekulami HLA I. třídy na povrchu buněk. Kromě dalších funkcí je též zodpovědný za regulaci exprese mediátorů proliferace, buněčného růstu či apoptózy. Zvýšení aktivity proteazomu má zpravidla za následek inhibici apoptózy anebo zrychlený buněčný cyklus. Bortezomib inhibicí proteazomu tedy nepřímo indukuje stabilizaci stěžejních antiproliferačních a proapoptotických molekul, jako je například protein p53, BAX a další. Blokáci proteazomu se též hromadí aberantní proteiny v buňce, což indukuje stresovou reakci endoplazmatického retikula. Mezi klady bortezomibu patří též fakt, že jeho účinek není závislý na bodu buněčného cyklu, ve kterém se buňka nachází. Nežádoucím účinkem bortezomibu je častý vznik lékové rezistence, hematologická toxicita a periferní neuropatie (Klener Jr. a Klener, 2013).

2.2 Imunoterapie – monoklonální protilátky

Protilátky anti-CD20 používané v imunoterapii se skládají ze dvou Fab specifických pro vazbu k povrchovým antigenům nádorové buňky a z jednoho Fc fragmentu pro vazbu a aktivaci imunokompetentních buněk (cytotoxických T-lymfocytů, NK buněk, makrofágů). Navázáním protilátky na specifický antigen nádorové buňky se takto označená buňka stává terčem imunitního systému, bývá fagocytována anebo je indukována její apoptóza cytotoxickými působky (perforinem a granzymem B) NK buněk a T-lymfocytů. Tato imunitní odpověď je nazývána buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC - antibody-dependent cell mediated cytotoxicity). Vazba protilátky s buněčným antigenem je spouštěčem kaskády komplementového systému atakujícího membránu a usmrcení buňky. Tento mechanismus je označován jako cytotoxicita závislá na komplementu (CDC - complement-dependent cytotoxicity) (Klener Jr. a Klener, 2013).

2.3 Kombinované léčebné režimy

Dříve byli pacienti s diagnózou B-CLL léčeni monoterapií či kombinací alkylačních cytostatik. Vzhledem k postupujícímu výzkumu a novým terapeutikům je ideální léčiva kombinovat – s ohledem na jejich schopnost zasahovat do specifických signálních drah a s ohledem na stav pacienta (Adam a Vorlíček, 2007).

Zavedení monoklonálních protilátek v imunochemoterapeutickém režimu, nazývaném FCR a sestaveném z fludarabinu, cyklofosfamidu a rituximabu (monoklonální anti-CD20 protilátka), vede ke zvýšení účinku léčby, avšak ne u každého pacienta je vhodné tuto kombinaci použít. Tato terapie je standardně brána za léčbu 1. linie u pacientů bez mutace TP53, kteří jsou v dobrém stavu, ale u části z nich je schopna navodit kompletní remisi. Pacientům s mutací TP53 je podána v režimu FCR monoklonální protilátka anti-CD20 (Obrtlíková, 2013; Hadrabová, 2015). Komorbidním pacientům je podáván chlorambucil a anti-CD20 protilátka. Méně často je indikován fludarambinový režim se sníženými dávkami (Hadrabová, 2015; Šimkovič a Smolej, 2013). Léčba pacientů s B-CLL je stejně jako léčba pacientů s jinými nádorovými onemocněními komplikovaná. Mnohdy je provázena relapsy s refrakterními onemocněními projevujícími se rezistencí k purinovým analogům (fludarambin) a progresí onemocnění do 6 měsíců po dosažení částečné či úplné remise. Vznik rezistence k různým léčebným přípravkům je dán zpravidla aberacemi TP53, mutacemi genu ATM regulujícím p53 a deregulací exprese proteinů souvisejících s BCL2 (Hadrabová, 2015). I přes snahu individualizovat léčbu a prodloužit dobu přežití pacientů, je stále B-CLL považováno za nevléčitelné onemocnění (Obrtlíková, 2013).

2.4 Nežádoucí účinky chemoterapie

Chemoterapie s sebou nese mnoho nežádoucích účinků jako jsou zažívací potíže, nevolnosti, zvracení a průjemy, které bývají potlačovány množstvím dalších léčiv. Přejídným stavem je padání vlasů a ochlupení závisající na použitém cytostatiku.

Záněty sliznic týkající se ústní dutiny a pokračující celým trávicím traktem až po konečník jsou způsobeny vysokou citlivostí buněk sliznice k cytostatikům. Poškození sliznice se projevuje vznikem aftů, bolestmi úst při polykání a průjemy.

Závažná komplikace, ke které dochází vlivem cytostatické léčby, je značné snížení počtu a porušení funkce leukocytů. Tento stav trvá ještě několik týdnů po chemoterapii.

Cytostatiky je narušena také erytrocytární a trombocytární řada. Anémie s sebou nese slabost, únavu, bledost, dušnost a další obtíže. S trombocytopenií je spojena zvýšená krvácivost. Někdy je nutno přistoupit k podání krevních přípravků, se kterými jsou spojena další rizika (Brychtová a kol., 2016).

S nedostačujícím počtem a funkčností krevních elementů je spojena problematika infekčních komplikací. Jakákoli, byť menší infekce, musí být neprodleně a velice radikálně léčena širokospektrými antibiotiky. Pacient s chronickou lymfocytární leukemií by z ambulance neměl odcházet bez změření pulsu a krevního tlaku. Snížení tlaku a zrychlení pulsu může být známkou septického stavu. Podezření na herpes zoster je podnětem k léčbě antivirotiky. Při neléčení může tato infekce u pacientů s cytostatiky vyvolanou leukopenií způsobit velice závažné herpetické encefalidity (Adam a Vorlíček, 2007).

3 LÉKOVÉ REZISTENCE

Léčbu nádorových buněk komplikuje velice často rezistence k chemoterapeutikům. Tato rezistence může být primární nebo sekundární. Primární rezistence je dána histopatologickým typem buňky a není závislá na předcházejícím kontaktu buňky s léčivem. Sekundární neboli získaná rezistence se objevuje mnohem častěji a to v průběhu cytostatické léčby. Buňky původně dobře reagující na léčbu snižují účinnost léčby vlivem různých buněčných mechanismů (Klener a Klener Jr., 2009).

3.1 Obecné mechanismy vzniku rezistencí k chemoterapiím

Rezistence buněk k léčbě jsou způsobeny většinou komplexnějšími změnami jako jsou změny farmakokinetiky, cytokinetiky nebo zamezením průniku chemoterapeutika membránou buňky, zvýšením vypuzování cytostatik z buňky, schopností rychleji opravit DNA, poruchou v procesu apoptózy a faktory mikroprostředí. Změnou farmakokinetiky je myšleno snížení resorpce farmaka, jeho zvýšené vylučování z organismu, omezení enzymů schopných konverze cytostatik v účinnou látku nebo zvýšená aktivita, či koncentrace enzymů degradujících účinné látky. Změny cytogenetiky bývají spojeny s rozrůstající se populací nádoru. V rozrůstající se populaci většina nádorových buněk přechází do G₀ fáze buněčného cyklu, kde je omezena citlivost k terapii. Proliferace mutovaných buněk dává též vzniknout rezistentním buněčným klonům. (Klener a Klener Jr., 2009) Zvýšenou expresí buněčných transportérových proteinů je dosaženo zvýšeného efluxu chemoterapeutik z buňky. Narušení procesu apoptózy je způsobeno inaktivací proapoptotických efektorů (např. p53) nebo zvýšenou expresí molekul s antiapoptotickými účinky jako je BCL2 (Klener Jr. a Klener, 2013).

3.2 Mnohočetná léková rezistence

Vážnou překážkou v léčbě malignit je mnohočetná léková rezistence (MDR). MDR je charakterizována zkříženou rezistencí na množství léčiv různé struktury. S MDR úzce souvisí nadměrná exprese membránových transportních proteinů z rodiny ABC (ATP-binding cassette) (Labeed et al., 2003). Jelikož MDR zahrnuje široké spektrum léčiv, je možná rezistence již před prvním podáním léčiva (Pechandová a kol., 2006). Nejznámějším proteinem rodiny ABC je produkt genu MDR1/ABCB1/CD263, P-glykoprotein (P-gp). Gen MDR1 je možno za použití PCR amplifikovat a odhadnout tak stupeň rezistence, což může být pomocí při plánování léčby (Klener Jr. a Klener, 2013). Do roku 2006 bylo nalezeno více než 50 polymorfizmů MDR1 genu. P-glykoprotein je za fyziologických podmínek zapojen do distribuce endogenních látek jako například kortizol a cholesterol. Další jeho funkcí je spoluúčast na syntéze steroidních hormonů. Nadměrnou expresí P-gp, sloužícího mimo jiné k obraně organismu proti xenobiotikům, se P-gp stává vysoce výkonnou efluxní membránovou pumpou schopnou pumpovat podávaná chemoterapeutika z nádorové buňky, čímž zamezuje jejich účinku. Nadměrnou expresí genu MDR1 způsobují kromě chemických látek a léčiv také rentgenové a UV záření a v neposlední řadě fyzický stres a tepelný šok.

Možnou strategií léčby MDR je využití inhibitorů P-glykoproteinu zamezující exportu chemoterapeutik ven z buňky. První generací inhibitorů P-gp jsou cyklosporin, verapamil (inhibitor kalciového kanálu) a amidaron. Kvůli nízkému potenciálu inhibice bylo potřeba podávat vysoké dávky, jež jsou toxické pro organismus. Toxicitu bylo nutné kompenzovat snížením dávkování chemoterapeutik. Inhibitory druhé generace (valspodar, biricodar) jsou mnohonásobně více účinné a méně toxické, ale stále je třeba značně redukovat dávku chemoterapeutika (Pechandová a kol., 2006). Nadějnými látkami v zamezení MDR se v kombinaci s chemoterapeutiky stávají inhibitory třetí generace (tariquidar). Léčiva třetí generace (narozdíl od prvních dvou) jsou vysoce účinná a specifická, inhibují jen P-gp, což snižuje jejich cytotoxicitu (Amin, 2013).

4 APOPTÓZA

Apoptóza je definována jako programovaná buněčná smrt, probíhající podle jasně daných pravidel. Fyziologicky probíhá apoptóza buněk ve prospěch organismu pro jeho obranu. Nadměrné indukce či inhibice apoptózy jsou jednou z příčin mnoha onemocnění jako jsou autoimunitní choroby, nádory, diabetes mellitus, Alzheimerova choroba, rejekce transplantovaných štěpů (Pethig a Talary, 2007). Zásadním úkolem apoptózy je udržení homeostázy ve tkáních obměňováním pozměněných, poškozených nebo nepotřebných buněk (Otová a Mihalová, 2012). Morfologické změny charakterizující apoptózu jsou smrštění buněk bez rozpadu jednotlivých organel, kondenzace jaderného chromatinu při okraji jádra (nazývána jako pyknóza), dále rozvolnění cytoplazmatické membrány (blebbing) a separace apoptotických tělísek. Apoptotická tělíska jsou ohraničena cytoplazmatickou membránou obsahují organely, jaderné fragmenty a za jejich odstranění jsou odpovědné fagocyty (makrofágy, parenchymální buňky).

4.1 Apoptóza versus nekróza

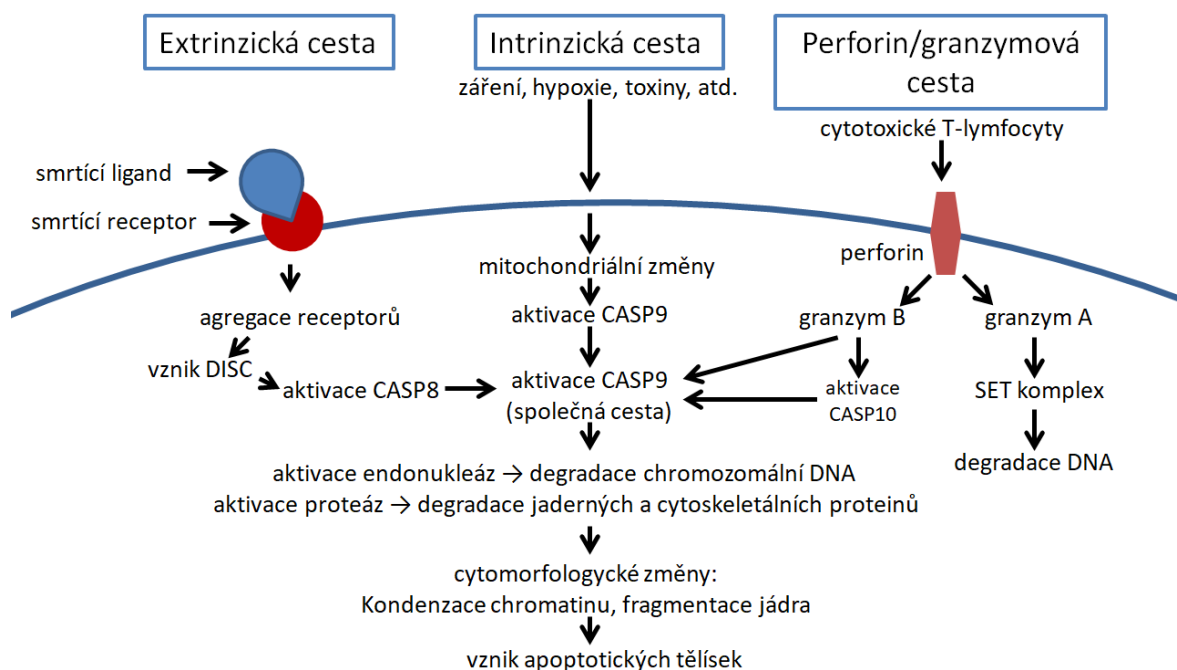
Na rozdíl od nekrózy apoptotické buňky nevyvolávají zánětlivou odpověď (Savill a Fadok 2000). Apoptotická tělíska jsou fagocyty rozpoznávána díky zvýšené expresi fosfatidilserinu na vnějším listu jejich buněčné membrány (Klener jr. a Klener, 2013).

Nekróza má od apoptózy odlišný průběh a je považována za toxickou. Nekróza není závislá na přísunu energie a podle Zaisse sdílí určité biochemické dráhy s apoptotickými drahami. Tak je možné, že při probíhající apoptóze a vyčerpání ATP buňky, začne apopto-nekrotický proces (Zeiss, 2003). Nekrotické buňky jsou často vakuolizované, mají narušené organely, zvětšují svůj objem. Povrch cytoplazmatické membrány tvoří bleby a je narušena její integrita. Narušením cytoplazmatické membrány uniká obsah buňky do okolní tkáně a vyvolává obsahujícími chemickými působky zánět (Elmore, 2007).

4.2 Cesty apoptózy

Iniciace apoptózy může být zahájena různými cestami. Základními cestami spuštění apoptózy je cesta extrinzická (receptorová), intrinzická (mitochondriální) a perforin/granzymová cesta A a B. Každá z cest, kromě granzym A cesty, vede kaskádovitým procesem k aktivaci kaspázy-3. Všechny tyto cesty však vedou k charakteristickým znakům, aktivaci endonukleáz, degradaci chromosomální DNA, aktivaci proteáz, degradaci jaderných a cytoskeletálních proteinů s celkovou reorganizací vyvolávající cytomorfologické změny popsané výše (Elmore, 2007). Další možností je dráha endoplazmatického retikula, končící stejným osudem buňky (Klener jr. a Klener, 2013).

Obrázek 2 Schéma průběhu apoptózy



Elmore, 2007, upraveno

4.2.1 Intrinzická (vnitřní/mitochondriální) cesta

Signalizace vedoucí k apoptóze intrinzickou cestou je zprostředkována na základě pozitivních či negativních intracelulárních stimulů. Negativní signály jsou reakcí na nepřítomnost určitých růstových faktorů, cytokinů, hormonů, které mohou potlačovat buněčnou smrt (při jejich chybění může být spuštěna apoptóza). Mezi jedny z pozitivních faktorů indukujících apoptózu, patří záření, hypoxie, hypotermie, toxiny, virové infekce a volné radikály. Pozitivní i negativní stimuly působí na integritu mitochondriální membrány a vedou k otevření mitochondriálních pórů. Mitochondrie ztrácí mitochondriální transmembránový potenciál ($\Delta\Psi_m$) a pro-apoptotické proteiny rodiny BCL2 uvolňují z intermembránového prostoru proapoptotické proteiny a reaktivní kyslíkové radikály (ROS) do cytosolu buňky (Saelens et al., 2004). Tyto proteiny aktivují na kaspázách závislou i nezávislou dráhu. Mezi proapoptotické proteiny patří cytochrom C, indukující tvorbu apoptosomů štěpením prokaspázy-9 (Hill et al., 2004). Aktivní kaspáza 9 (CASP9) spustí štěpení efektorových kaspáz (CASP3 a CASP7). Tímto momentem je zahájena aktivace společné ireverzibilní apoptotické dráhy. (Klener jr. a Klener, 2013) Kromě cytochromu C se do cytosolu uvolňují proteiny indukující apoptózu AIF (apoptosis-inducing factor) a endonukleáza G, fragmentující jadernou DNA nekaspázovou cestou (Susin et al., 2000).

4.2.2 Extrinzická (receptorová) cesta

Extrinzická cesta je spouštěna agregací smrtících receptorů (death receptors), rodiny TNF (tumor necrosis factor), ve vazbě se smrtícími ligandy (death ligands). Zástupci ligandu společně s receptorem, jsou například FasL/FasR, TNF- α /TNFR1. (Ashkenazi a Dixit 1998) Vazbou trimerního ligandu na death receptory dochází k agregaci receptorů a přesunu agregátu dovnitř buňky. Vzniká tak multiproteinový komplex zvaný DISC (death inducing signaling complex), ve kterém jsou autoaktivovány apikální kaspázy CASP8 a CASP10, dále štěpící efektorové CASP3 a CASP7 (Klener jr. a Klener, 2013).

4.2.3 Perforin/granzymová cesta

S perforin/granzymovou cestou jsou spojeny T-lymfocyty. Jedním způsobem, kterým cytotoxické T-lymfocyty (CTL) zabíjejí cílové buňky, je navázání svého FasL na FasR buňky s antigenem. Druhým způsobem je použití cytoplazmatických granul obsahujících serinové proteázy – granzym A a granzym B, kterým je perforinem umožněn vstup do cílové buňky (Brunner et al. 2003). Granzymy jsou spouštěči apoptotických drah na kaspázách závislých i nezávislých, což je výhodou, pokud je v buňce zvýšená exprese genů inhibitorů kaspáz. CTL-indukovaná apoptóza perforin/granzymovou cestou je hlavním mechanismem zabíjení transformovaných či virem infikovaných buněk (Trapani a Smyth, 2002).

Granzym B může přímo aktivovat kaspázu-3 (CASP3) a využívá mitochondriální dráhu uvolňující cytochrom C do buňky pro amplifikaci proapoptotických signálů. Dále aktivuje prokaspázu-10 a je schopen štěpit faktory inhibující DNázu (Elmore, 2007).

Funkce granzymu A je nezávislá na kaspázách. Granzym A štěpí proteinový komplex SET, který inhibuje tumor-supresorový gen NM23 H1. Produktem genu NM23 H1 je deoxyribonukleáza štěpící DNA. Komplex SET má, (kromě inhibice NM23 H1) úlohu při ochraně chromatinu a struktury DNA. Disfunkčnost SET tedy také přispívá k apoptóze (Lieberman a Fan, 2003).

4.2.4 Dráha endoplazmatického retikula

Endoplazmatické retikulum (ER) je organela ve které dochází k tvorbě disulfidických můstků, ke skládání proteinů z lineární do prostorové konformace a k úpravám nově translatovaných proteinů. Stresové signály, jako jsou oxidativní stres, nedostatek glukózy, virové infekce, cytostatika (inhibitory proteazomu), jsou příčinou nahromadění špatně složených či nesložených proteinů a indukce stresové dráhy UPR (unfolded protein response). Stresem endoplazmatického retikula jsou uvolněny transmembránové proteiny zastavující transkripci. Při překročení hladiny stresu je uvolněno z ER množství Ca^{2+} s následkem aktivace proapoptotických proteinů. Postupně jsou aktivovány i proapoptotické proteiny BCL2, inhibovány antiapoptotické proteiny a štěpeny apikální kaspázy (CASP2, CASP8 a CASP9) započínající nevratnou apoptotickou fází (Klener jr. a Klener, 2013).

4.2.5 Společná dráha

Dráhy závislé na kaspázách mají společnou konečnou část apoptózy a to od momentu aktivace efektorových kaspáz. Efektorové kaspázy jsou CASP3, CASP6 a CASP7 a způsobují změny pozorované u apoptotických buněk, jako je štěpení cytokeratinů, cytoskeletálních, jaderných proteinů, PARP (poly-ADP-ribóza-polymeráza) a dalších (Slee et al., 2001). Za nejdůležitější z kaspáz je považována kaspáza-3, kterou jsou schopny aktivovat iniciační kaspázy – kaspáza-8, kaspáza-9, kaspáza-10. Následně kaspáza-3 aktivuje endonukleázovou DNázu (CAD - caspase activated DNase). V proliferujících buňkách vytvoří CAD komplex s ICAD (inhibitorem CAD). V apoptotických buňkách kaspáza-3 štěpí ICAD. CAD se stává aktivní a degraduje jadernou DNA. Dochází ke kondenzaci chromatinu, indukci cytoskeletální konformace a k rozpadu buňky v apoptotická tělíska (Enari et al., 1998).

4.3 Testy apoptózy

Apoptóza je složitý komplexní proces souhry signalizačních kaskád a regulačních inhibičních mechanismů. Původně bylo studium apoptózy založeno na transmisní elektronové mikroskopii, pomocí níž byla zkoumána morfologie apoptotických buněk. S rozvojem biochemických, molekulárně genetických a genetických metod je možno detekovat kromě počtu apoptotických buněk různé body apoptózy, vyhodnotit aktivitu příslušných proteinů. Ke sledování apoptózy je využíváno kromě mikroskopie například elektroforézy pro posouzení fragmentace DNA, fluorescenčních barviv s průtokovou cytometrií pro rozpoznání časného a pozdního stádia apoptotických buněk, RT-PCR s Northwestern assay pro zachycení exprese BCL2. Některé jsou zaměřeny na iniciační procesy, jiné na pozdější stádium apoptózy. Každý test má řadu výhod a nevýhod, ke kterým je třeba přihlížet při výběru vhodné metody (Otsuki et al., 2003).

Doba od iniciace po skončení apoptózy může trvat 2-3 hodiny, buňky mohou tedy zemřít a zmizet poměrně rychle a test může mít falešně negativní výsledky, pokud je proveden příliš brzy či pozdě. Možnost rychlého zjišťování stavu buňky by mohla být více než přínosnou.

Testy apoptózy mohou být podle Elmorové rozděleny do šesti hlavních skupin. Jsou to testy prokazující cytomorfologické změny, DNA fragmentaci, alterace membrán,

detekce rozsahu apoptózy ve vzorku, mitochondriální testy a poslední skupinou jsou testy k detekci kaspáz, štěpených substrátů regulátorů a inhibitorů (Elmore, 2007).

4.3.1 Trypanová modř

Použití trypanové modři patří k nejjednodušším testům viability buněk i přes možnosti využití průtokové cytometrie, kde jsou nahrazena běžná barviva fluorochromy, jako je propidium jodid, fluorescein-di-acetát, či akridinová oranž (Hornicek a Malinin, 1998). Barvení trypanovou modří slouží k zjištění životaschopnosti buněk, ať už pro účely implantace buněk pacientům, ověření vhodných růstových podmínek kultivace či zjištění, zda prodloužení kultivace nevede ke smrti buněk. Trypanová modř je barvivo se záporným nábojem, stejně jako buněčná membrána u viabilní buňky, nemůže tedy prostoupit do buňky. Pokud je membrána poškozena, záporný náboj ztrácí a barvivo projde do buňky (Al-Sabah et al., 2018). Obarvené životaschopné buňky jsou malé, zabalené, refrakční, zatímco mrtvé buňky bývají nabobtnalé a tmavě modré (Jain et al., 2018).

4.3.2 Alamar blue

Alamar blue je vysoce citlivý indikátor metabolické aktivity buněk. Výhodou této látky je minimální toxicita na buňky, nevýhodou může být poměrně dlouhá doba inkubace (od jedné do několika hodin). Aktivní složkou činidla je resazurin, který je schopen projít buněčnou membránou do cytozolu buňky. Resazurin má modrou barvu a prakticky nefluoreskuje. Pokud je buňka živá, udržuje v cytozolu redukční prostředí díky cytoplazmatickým a mitochondriálním reduktázám, což působí degradaci resazurinu na resorufin. Resorufin je červená vysoce fluoreskující barva. Buňky životaschopné udržováním redukčního prostředí převádějí resazurin na resorufin, čímž je zvýšena celková fluorescence a dojde ke změně barvy média obklopujícího buňky. Výsledná fluorescence je závislá na počtu buněk a jejich metabolické aktivitě (Rampersad, 2012). Doporučená inkubace je 2-4 hodiny, v závislosti na zkoumaných buňkách může být doba inkubace i 24 hodin. S delší inkubační dobou bývá dosahováno vyšší citlivosti metody. Výsledky jsou získány měřením fluorescence za využití fluorescenčního spektrofotometru (Eilenberger et al., 2018).

4.3.3 7-Aminoaktinomycin D

7-Aminoaktinomycin D (7-AAD) je fluorescenční barvivo schopné se selektivně vázat na C-G oblasti DNA. Průtokovou cytometrií pak lze rozlišit barvení životaschopných časně apoptotických a pozdně apoptotických mrtvých buněk na základě změn buněčné membrány. Míra poškození membrány je přímo úměrná intenzitě naměřené fluorescence. Membránou živých buněk barvivo neprojde. Výhodou barvení 7-AAD je možnost kombinace testu s fluorescenčními monoklonálními protilátkami, což ale zvyšuje finanční náročnost metody. V úvahu je také třeba brát fakt, že samotné barvení ovlivňuje procento apoptotických buněk (Zembruski et al., 2012).

5 LAB-ON-A-CHIP TECHNOLOGIE

Lab-on-a-chip systémy využívají k měření mikrofluidní čipy, které umožňují miniaturizaci a automatizaci biologických a chemických testů. Mikrofluidní čipy jsou tvořeny soustavou mikrokanálů o průměru od deseti do několika stovek mikrometrů do kterých jsou vháněny vzorky nano- až pikolitrových objemů. Využití minimálních objemů reagensů snižuje náklady a nemá vliv na dosažení vysoké výtěžnosti metody.

Lab-on-a-chip technologie umožňují měření buněčné viability a rozlišení či třídění buněčných populací (Vyawahare et al., 2010). Aplikace mikrofluidních systémů je hojně využívána v genomické sekvenování nové generace. Zcela nové příležitosti v analýze jsou zajištěny díky miniaturizaci a paralelizaci metod. Práce s mikrofluidními čipy umožňuje rozšířené možnosti v poznávání, hodnocení a manipulování s buňkami či jednotlivými molekulami (Blow, 2007). Mezi nové metody využívající mikrofluidní čipy k měření buněk patří distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP). 2DEP cytometrie může být do budoucna alternativou průtokové cytometrie. Zpracovává informace o heterogenitě buněčné populace, o objemu a struktuře buněk i o expresi povrchových a intracelulárních biomarkerů. Na rozdíl od průtokové cytometrie 2DEP cytometrie nevyžaduje k rozpoznání biomarkerů značení pomocí protilátek. S identifikací buněk bez potřeby značení se znatelně snižují provozní náklady (Fikar, 2016). Metoda 2DEP cytometrie má potenciál detekovat celou škálu nových biomarkerů, avšak není zatím brána za běžný nástroj k identifikaci buněk. Její potenciál je třeba plně prozkoumat.

5.1 Distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP cytometrie)

Distribuovaná dielektroforetická cytometrie (2DEP cytometrie) probíhá na mikrofluidním čipu a využívá k měření buněk elektrického pole. Výstupem 2DEP cytometrie jsou dielektrické (DE) podpisy buněčných populací, které mohou pomoci identifikovat spolehlivé biomarkery buněčných stavů a intracelulárních procesů. 2DEP cytometrie tak může poskytnout žádanou alternativu standardním analytickým metodám (Fikar et al., 2018).

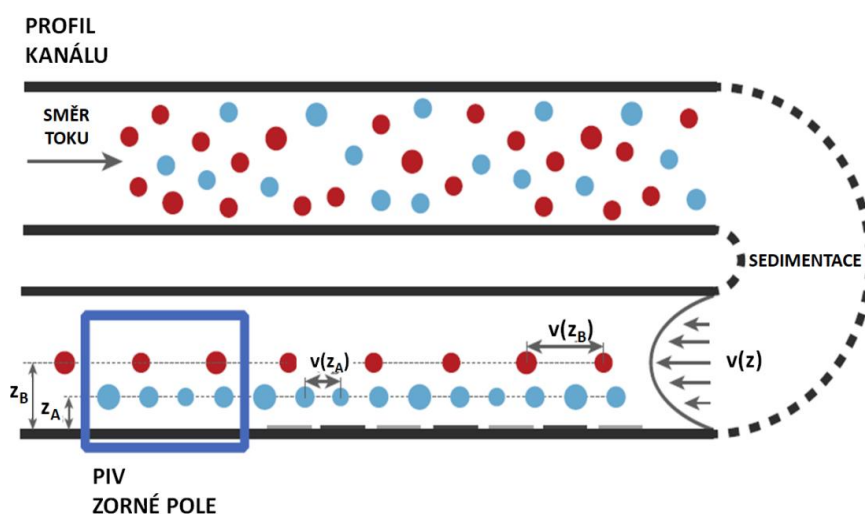
Díky rozdílnosti DE podpisů buněk lze nepřímo měřit různé fyziologické a intracelulární procesy buněk. Příkladem může být průkaz mnohočetné lékové rezistence u leukemických buněk (Demircan et al., 2014). DEP metodami je také možno detekovat

apoptózu projevující se změnou permeability plazmatické membrány se změnou hladiny iontů v cytoplazmě (Duncan et al., 2008). 2DEP cytometrie umožňuje rychlé, vysoce výkonné neinvazivní hodnocení buněk bez potřeby jakéhokoli barvení či značení.

5.1.1 Princip metody

Buňky resuspendované v isotonickém nízkovodivostním médiu vstupují do mikrokanálu čipu. Na buňky při průchodu mikrokanálem působí sedimentační síly dané poloměrem a strukturou buňky, gravitačním zrychlením a hustotou a viskozitou média. Elektrická síla působící na buňky je pak dána jejich dielektrickými vlastnostmi a dielektrickými vlastnostmi média. Rychlost buňky je dána výškou, ve které se buňka v mikrokanálu ustálí. Laminární proudění v mikrokanálu způsobuje, že buňky plující u dna se pohybují nižší rychlostí a buňky plující uprostřed mikrokanálu jsou unášeny rychleji. Rychlost buněk je měřena částicovou velocimetrií (PIV, particle image velocimetry). Pohyb buněk je znázorněn na obrázku 3.

Obrázek 3 Proudění buněk mikrokanálem



Upraveno z Fikar et al., 2018 se svolením autora

Pro znázornění jsou na obrázku dva typy buněk vstupující do mikrokanálu stejnou rychlostí. Buňky po určité vzdálenosti sedimentují ke dnu. Vlivem elektrického pole získají příslušnou výšku levitace, každá buňka podle svých DE vlastností. Jeden typ může levitovat níž a druhý výš, což způsobí rozdíly v jejich rychlostech.

Měření rychlosti buňky je tedy nepřímým měřením výšky, ve které buňky proplovají mikrokanálem. Ta je dána kombinací sedimentačních a elektrických sil, které odpovídají tzv. dielektrickému (DE) podpisu buněk. Tento DE podpis měřených buněk může pomoci identifikovat spolehlivé biomarkery buněčných stavů a intracelulárních procesů a poskytnout tak atraktivní alternativu standardním analytickým metodám nejen v protinádorové léčbě.

Měření je spuštěno ve chvíli, kdy je v mikrokanálu ustálený tok a buňky mají ustálenou výšku levitace. Nejdříve jsou po určitý čas sbírány podpisy buněk bez působení elektrického pole. Tyto hodnoty slouží jako reference měření a odráží velikost a strukturu buňky. Následuje spuštění generátoru elektrického pole. Měření probíhá při napětí 2V a při 8 různých frekvencích. Generované frekvence jsou rovnoměrně, ale v logaritmickém měřítku rozloženy v rozsahu od 300 kHz do 10 MHz.

V tuto chvíli jsou stěžejními dielektrické (DE) vlastnosti plazmatické membrány a elektrická vodivost buněčné cytoplazmy. DEP síly vyvolané průletem elektrickým polem nad elektrodami se kombinují s již zmíněnou sedimentační silou a ovlivňují výšku levitace buněk. Vliv DEP sil na buňku se mění v závislosti na frekvenci a napětí elektrického pole.

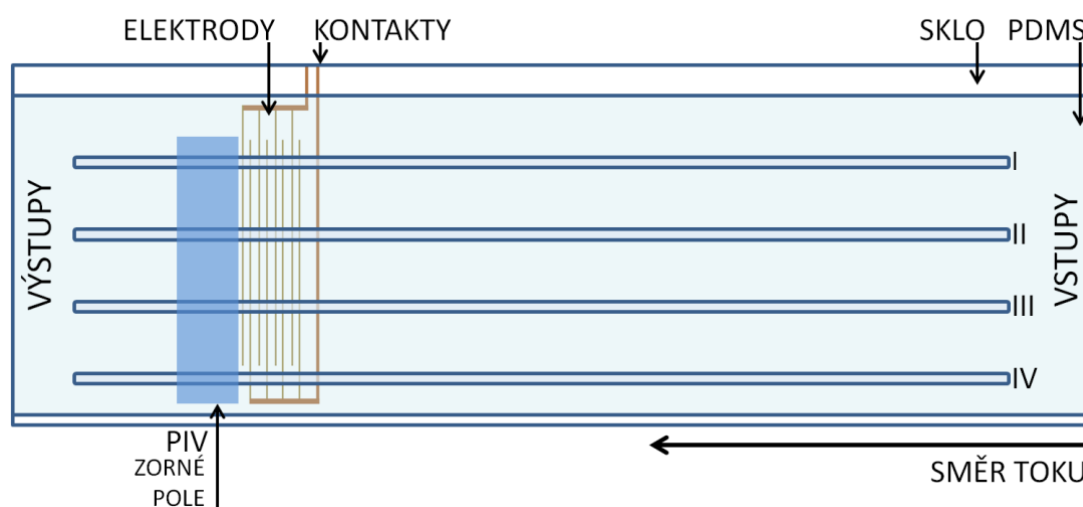
N-DEP (negativní dielektroforetické) síly působí proti sedimentaci a zvedají buňku ode dna mikrokanálu. Naopak P-DEP (pozitivní dielektroforetické) síly podporují sedimentaci a přitahují buňky ke dnu. S každou změnou frekvence se mění rozložení buněk v mikrokanálu. Změny rozložení buněk v mikrokanálu jsou vztahovány k referenci měření (měření bez elektrického pole) a po zpracování softwarem jsou zaneseny do grafu. Křivky nacházející se pod osou x odpovídají převažující N-DEP síle a hodnoty nad osou x převažující P-DEP síle. Se zvyšující se frekvencí rostou P-DEP síly (Fikar et al., 2018).

5.1.2 Popis čipu

Mikrofluidní čip (viz. Obrázek 4) má velikost 75x25 mm a skládá se ze tří vrstev. Spodní skleněná vrstva slouží jako mechanická opora čipu, tvoří dno mikrokanálů a je podkladem pro druhou vrstvu. Druhou vrstvou je pole interdigitálních (ID) elektrod, generující uvnitř mikrokanálů elektrické pole. Třetí vrstvou je polydimethylsiloxan (PDMS) (Fikar et al. 2018), což je flexibilní křemíkový polymer vhodný pro biomedicínské využití. Tento polymer je netoxický, stabilní, biokompatibilní, nepodporující adhezi buněk a jeho průhlednost poskytuje dobré optické vlastnosti (Subramaniam a Sethuraman, 2014).

Vrstva PDMS tvoří čtyři mikrokanály (I-IV). Každý mikrokanál je široký 1 mm a vysoký 75 μm . Do této vrstvy jsou vyvrtány shora vstupní a výstupní otvory. PDMS nepřekrývá postranní kontakty, které umožňují propojení elektrod s generátorem elektrického pole.

Obrázek 4 Schéma čipu



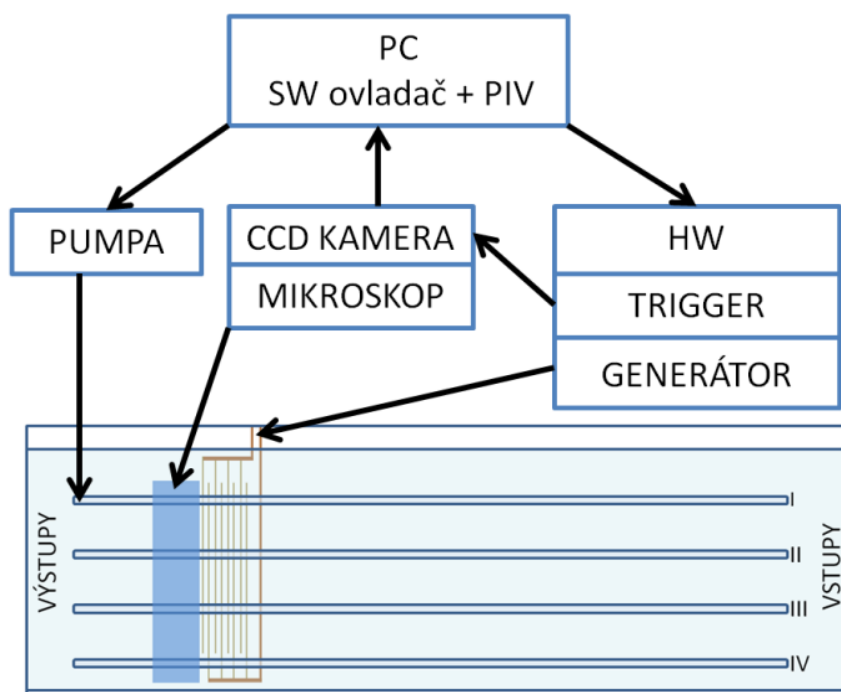
Fikar et al., 2018, upraveno s povolením autora

5.1.3 Schéma 2DEP systému

ID elektrody jsou přes kontakty připojeny ke generátoru elektrického pole. **Generátor** vytváří elektrické pole v průběhu měření a ovlivňuje jím chování buněk v měřicím mikrokanálu. Během jednoho měření je možné vystřídat i 20 různých frekvencí a sledovat odezvu buněk. Plynulý průchod vzorku mikrokanálem je zajištěn **pumpou** připojenou ke konci mikrokanálu. Nastavením pumpy je možno regulovat rychlost průtoku vzorku mikrokanálem. K detekci pohybu proudících buněk je použita částicová velocimetrie (PIV). PIV měření je realizováno pořízením dvou snímků v krátkém definovaném časovém intervalu (např. 60ms) (Fikar et al., 2018).

Pro použití metody PIV je nutné mít vhodnou koncentraci buněk. Vzdálenost mezi buňkami musí být větší, než je naměřený posun stejné buňky na dvou po sobě jdoucích snímcích. Aby se zamezilo elektrostatickým interakcím mezi buňkami, jejich rozestupy musí být větší než je trojnásobek průměru buňky. Vhodná koncentrace buněk zamezuje mezibuněčným interakcím a zároveň vyhovuje sběru množství dat (Gascoyne a Shim, 2014).

Obrázek 5 Schéma 2DEP cytometru



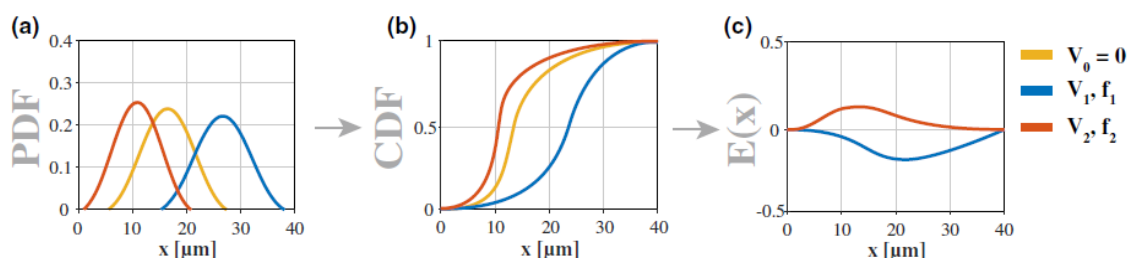
Fikar et al., 2018, upraveno s povolením autora

Mikrokanál s proudícími buňkami je snímán v oblasti těsně za elektrodami **CCD záznamovou kamerou** v kombinaci se systémem inverzního **mikroskopu**. Zorné pole musí být dobře osvětlené. Snímky jsou přenášeny do počítače. Vyfocené buňky jsou ve dvou po sobě jdoucích snímcích rozpoznány a spárovány pomocí dedikovaného softwaru. Rychlost buňky je vypočtena z dráhy a časové prodlevy mezi snímky. Proces zpracování dat ze snímků trvá několik milisekund a tak může probíhat měření téměř v reálném čase. Tímto způsobem je možné zachytit každou minutu přes 5 tisíc buněk (Fikar, 2016).

5.1.4 Vynášení výsledků do grafů

Proces vynášení DE podpisů do grafů můžeme rozdělit do tří kroků. Prvním krokem je výpočet hustoty pravděpodobnosti (PDF – Probability Density Function). Ve výpočtu je počítáno s výškami levitací buněk ode dna mikrokanálu, které se vztahují k jednotlivým frekvencím a napětím použitým v průběhu měření (Obrázek 6a). Druhým krokem je výpočet distribuční funkce (CDF – Cumulative Distribution Function), znázorněné na obrázku 6b. Třetím krokem je odečtení referenční CDF získané měřením buněk bez vlivu elektrického pole od distribučních funkcí měřených za působení elektrického pole na buňky. Výsledné hodnoty jsou označovány jako obohacení $E(x)$ (E – enrichment) a jsou znázorněny na obrázku 6c. Kladné hodnoty $E(x)$ odpovídají zvýšení koncentrace buněk v daném sektoru mikrokanálu vlivem působení elektrického pole (elektrické pole vtahuje procházející buňky blíže k elektrodám). Naopak záporné hodnoty $E(x)$ odpovídají snížení koncentrace buněk v daném sektoru mikrokanálu vytlačení buněk dále od elektrod (Fikar et al., 2018).

Obrázek 6 Proces vynášení výsledků do grafu



Fikar et al., 2018, převzato s povolením autora

5.1.5 Princip identifikace biomarkerů

Za účelem identifikace biomarkerů ve 2DEP cytometrických datech byl autory metody navržen obecný způsob vyhodnocení váhy biomarkeru zvolením čtyř jednoduchých parametrů:

1. Frekvence f_1
2. Frekvence f_2
3. Pozice v mikrokanálu x_1
4. Pozice v mikrokanálu x_2

Frekvence f_1 a f_2 definují frekvenční rozsah, ve kterém dochází vlivem pozorovaného děje k výrazné změně DE podpisu zkoumaného souboru buněk. Pozice x_1 a x_2 pak definují sektor mikrokanálu, ve kterém se tyto změny projeví nejvíce.

V první fázi ohodnocení váhy biomarkeru je vyjádřen rozdíl mezi obohacením $E(x)$ získaného na zvolených frekvencích v definovaném sektoru mikrokanálu pro kontrolní i zkoumaný vzorek následujícím způsobem:

$$S = \int_{x_1}^{x_2} [E(x, f_1) - E(x, f_2)] dx$$

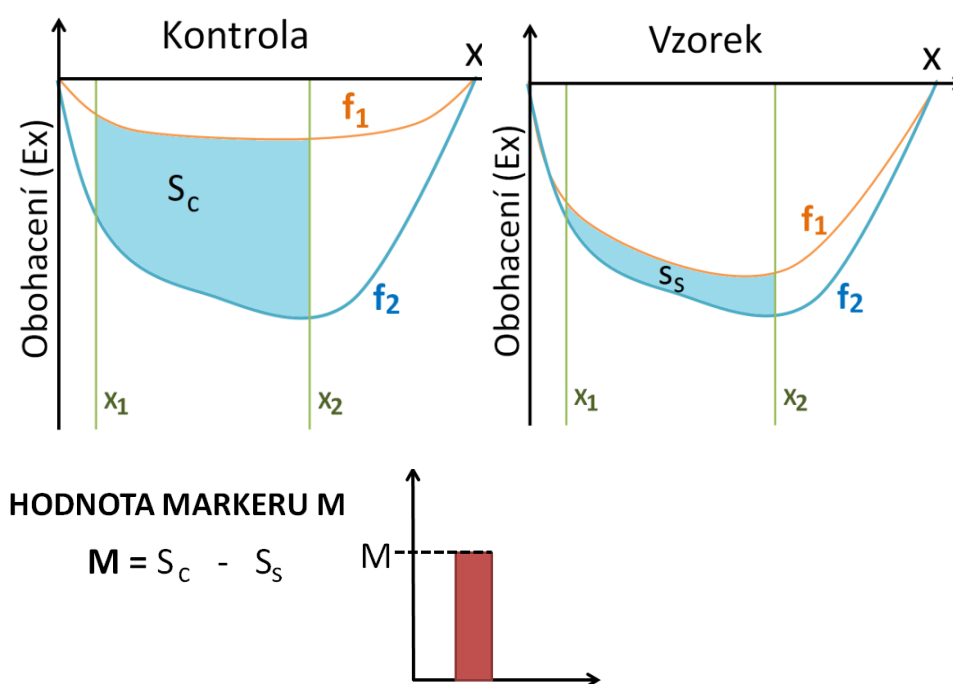
Hodnotu S vyjádřenou z DE podpisu kontrolního vzorku označujeme S_c a hodnotu S vyjádřenou z DE podpisu zkoumaného vzorku označujeme S_s . Hodnota váhy biomarkeru M je vyjádřena jejich rozdílem:

$$M = S_c - S_s$$

Hodnota M vyjadřuje rozdíl v obohacení $E(x)$ buněk v definovaném sektoru mikrokanálu v závislosti na použité frekvenci.

Hodnota váhy biomarkeru M může být použita například k porovnání DE podpisu zdravých, mutovaných nebo apoptotických buněk.

Obrázek 7 Ilustrace postupu při vyhodnocení biomarkeru progresu apoptózy



Zdroj: vlastní

5.1.6 Dielektroforetická cytometrie a apoptóza

Jak bylo psáno již v kapitole 4, uvnitř apoptotických buněk dochází k narušení mitochondriálních membrán. Z mitochondrií jsou uvolňovány proapoptotické proteiny a kyslíkové radikály do cytosolu buňky. (Saelens et al., 2004) Kyslíkové radikály vedou k přechodnému zvýšení transmembránových potenciálů ($\Delta\Psi_m$). V pozdějších stádiích apoptózy $\Delta\Psi_m$ vlivem depolarizace membrán klesají a z mitochondrií jsou vyplavovány Ca^{2+} ionty. (Labeed et al., 2006) Při překročení stresového limitu uvolní do cytoplazmy množství Ca^{2+} iontů také endoplazmatické retikulum. (Klener Jr. a Klener 2013) Procesem apoptózy jsou deregulovány iontové kanály (Na^+/H^+ ; $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) a je zvýšena permeabilita cytoplazmatické membrány. K^+ ionty jsou odčerpávány z buňky a je redukován objem buněk. (Labeed et al., 2006) Apoptóza je provázena i morfologickými změnami charakterizovanými mimo jiné tvorbou membránových blebů a apoptotických tělísek. (Savill a Fadok, 2000) Buňka je schopná apoptoticky zemřít během 2-3 hodin a zmizet. Tento fakt může pro mnoho testů apoptózy znamenat falešně negativní výsledky, ať už kvůli dlouhé inkubační době barvení nebo nízké citlivosti použité metody. (Elmore, 2007) Apoptotická buňka podstupuje změny objemu a tvaru, mění se plocha buněčné membrány a hladiny iontů v cytoplazmě. Zmíněné zvraty vedou ke změně kapacity cytoplazmatické

membrány, elektrické vodivosti cytoplazmy a značně modifikují DE podpisy buněk v závislosti na použité frekvenci (Fikar et al., 2018).

Progrese apoptózy byla již některými dielektroforetickými metodami testována. V práci Nikolic-Jaricové bylo popsáno sledování apoptózy buněk z linií ovárií čínského křečka s využitím dielektroforetické cytometrie v kombinaci s elektronickým detektorem, tedy bez potřeby mikroskopu (Nikolic-Jaric et al., 2013).

Další prací zabývající se dielektroforetickou metodou je studie Labeedové. K měření bylo použito primitivní experimentální zařízení, kdy experiment neprobíhal na mikročipu, ale na Petriho misce mezi dvěma elektrodami generujícími elektrické pole v rozsahu od 10 do 20 MHz a napětí 20 V. Mezi elektrody byl napipetován vzorek a po dobu jedné minuty byl pro každou frekvenci nahráván videozáznam z mikroskopu. Zpětně byly ze záznamu ručně počítány zachycené buňky. V její studii byly zachyceny a porovnány rozdíly v DEP odezvách buněčné linie K562 a k léčivům rezistentní linie K562AR (Labeed et al., 2003).

Dielektroforetickou metodou pracující na mikrofluidním čipu je kromě 2DEP cytometrie také metoda $O\pi$ DEP cytometrie. Touto metodou byly proměřovány buněčné linie karcinomu prsu při frekvencích od 50 kHz do 1 MHz a napětí 80 V. Využívá principu zachycení buněk na elektrodách při dosažení křížové frekvence. Při této frekvenci byl počítán poměr zachycených ku celkovému počtu proměřených buněk. $O\pi$ DEP cytometrií byly rozlišeny dvě buněčné linie karcinomu prsu, LCC1 a LCC9 a byla zaznamenána jejich citlivost k lékům projevující se iniciací apoptózy (Soltanian-Zadeh et al., 2017).

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL VÝZKUMU A VÝZKUMNÝ VZOREK

6.1 Hypotéza

Zmapováním patologických buněčných dějů a průkazem vlivu terapeutik na dané buňky lze docílit zvýšení efektivity léčby nádorových onemocnění. Neinvazivní mapování stavu buněk umožňuje 2DEP cytometrie bez potřeby značení a časově náročné přípravy.

6.2 Cíl práce

Cílem této práce je:

1. Za pomoci 2DEP cytometrie získat DE podpisy buněk chronické B-lymfocytární leukémie a zaznamenat jejich změny po přidání chemoterapeutik.
2. Porovnat standardní metody měření apoptózy s 2DEP cytometrií ve smyslu citlivosti a charakteru detekovatelných fyziologických změn nádorových buněk vlivem aplikace chemoterapeutik.

Cílem původního zadání této práce bylo měření standardizovaných imortalizovaných buněčných linií (AML, CML, BL), ale možnost práce s reálnými klinickými vzorky v kombinaci s jejich omezenou časovou dostupností vedla k jeho přehodnocení. Data naměřená s reálnými klinickými vzorky mají v klinické praxi dalekosáhlejší dopad a mnohonásobně vyšší vypovídající hodnotu.

6.3 Soubor pacientů

Předmětem zkoumání byly B-lymfocyty z periferní krve pacientů s potvrzenou chronickou B-lymfocytární leukémií (označené jako vzorek 1-5). Izolace byly provedeny před zahájením léčby pacientů. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas k izolaci a testování nádorových buněk. Bližší informace o souboru pacientů a přesných diagnózách jsou uvedeny v příloze.

7 METODY VÝZKUMU

7.1 Materiál, reagentie a přístroje

Materiál:

- spotřební materiál: zkumavky Eppendorf (0,2 a 1,5ml), centrifugační zkumavky (15 a 50ml), Pasteurovy pipety, nastavitelné pipety, jednorázové špičky
- zkumavky 12x75mm (BD Bioscience, USA)
- zryozkumavky 1,8ml (NUNC, USA)
- magnetické LS colony a magnetický stojan (Miltenyi, USA)
- Bürkerova komůrka
- kultivační destičky 12-jamkové (TPP, Švýcarsko)
- kultivační destičky 96-jamkové, černé pro měření fluorescence (NUNC, USA)

Reagentie:

- Ficoll-Paque (GE Healthcare, USA)
- Hybridoma médium (Gibco, USA)
- CLL izolační kit (Miltenyi, USA)
- PBS (Gibco, USA)
- DMSO (Wak-Chemie, Německo)
- FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco USA)
- RPMI médium (Gibco, USA)
- IL – 2 (Proleukin, Novartis, Švýcarsko)
- ATB (Gibco, USA, 100x koncentrované, finální koncentrace antibiotik je 100UI/mL penicilinu, 100µg/mL streptomycinu a 0,25µg/mL Amphotericinu B)
- Bortezomib (Velcade, Janssen-Cilag, finální koncentrace 10nM)
- Alamar Blue (Life Technologies)
- Trypan Blue (Life Technologies)

- nízkovodivostní médium (deionizovaná voda, 8,5 g/l sacharózy, 0,3 g/l glukózy)
- BSA (Gibco, USA)
- protilátky CD5-PE a CD19-PECy7 (Beckman Coulter, USA), CD45 – BrilliantViolet 510 (Biolegend, USA), 7-actinomycin (7-AAD, Exbio, ČR)

Přístroje:

- CO₂ inkubátor (Thermo, USA)
- PCR box (ESCO)
- destičkový reader Synergy HTX (Biotek, USA)
- centrifugy
- průtokový cytometr ARIA Fusion (BD Bioscience, USA)
- DEP cytometr

7.2 Separace mononukleárů pomocí hustotního gradientu

Do 50 ml zkumavky se přenese 9 ml heparinizované krve, přidá se k ní a řádně pomíchá 9 ml PBS. Do připravených 15 ml zkumavek se přidá přibližně 5 ml Ficoll-Paque separačního roztoku. Separační roztok se za použití Pasteurovy pipety opatrně převrství suspenzí krve s PBS. Následuje centrifugace 15 minut, při 1000g a při teplotě 20°C, za pomalého rozběhu i brzdě. Připraví se nové 50 ml zkumavky, do kterých se pomocí Pasteurovy pipety přenesou frakce mononukleárních buněk ze zcentrifugovaných zkumavek. 50 ml zkumavky s mononukleáry se doplní roztokem PBS a centrifugují se 8 minut, při 300 g za teploty 20 °C, za standardního rozběhu a brzdě. Supernatant ze zcentrifugovaných zkumavek se slije a sedimentované mononukleáry se rozvolní ve 40 µl RPMI.

7.3 Magnetická izolace buněk

Do zkumavky s resuspendovanými buňkami se přidá 15 µl směs protilátek Biotin Antibody z CLL izolačního kitu (Miltenyi, USA), která označí všechny ne CLL buňky (např. T-lymfocyty, monocyty, granulocyty). Po důkladném promíchání se inkubuje při 2–8 °C po dobu 5 minut a poté se přidá 30 µl RPMI média a 30 µl magnetických

mikročastic. Vše se promíchá a inkubuje 10 minut při teplotě 2–8 °C. Po inkubaci se k suspenzi buněk přidá 500 µl PBS a přenese se do magnetické kolony, kde probíhá samotná magnetická separace označených buněk. Kolona se na závěr dvakrát promyje 3 ml PBS. Buněčná suspenze, která prošla kolonou obsahuje lymfocyty, se sbírá do centrifugační zkumavky.

7.4 Kultivace a zamrazení buněk

Separované buňky se centrifugují 6 minut při 300 g a 20 °C. Po centrifugaci se buňky rozvolní v hybridoma médiu obsahujícím směs antibiotik a 10 % FBS. Objem média odpovídá výsledné koncentraci 3-5e6 buněk/ml. Malá část vzorku se odebere pro stanovení čistoty populace. Buňky se dále kultivují v kultivačních lahvích 75 cm² po dobu 3-5 dnů, při 37 °C a 5 % CO₂. Po kultivaci následuje centrifugace buněk při 20 °C, 300 g, 8 minut. Slije se supernatant a peleta se rozvolní v takovém objemu FBS, aby výsledná koncentrace byla 30e6 buněk/ml. Do připravené kryozkumavky se přenese 0,5 ml buněčné suspenze a 0,5 ml vychlazeného kryomédia (20% DMSO a FBS) a neprodleně se vloží na led. Buňky se mrazí za pomoci zamrazovače, který kontrolovaně snižuje teplotu každou minutu o 1 °C, dokud teplota nedosáhne -80 °C.

7.5 Rozmražení a aplikace chemoterapie

Pro samotné testování se použije krátkodobé kultivační médium složené z PMI, 10 % FBS, antibiotika a antimykotika. Médium a vodní lázeň se vytemperuje na 37 °C. Kryozkumavky s buňkami se vyjmou z tekutého dusíku a vloží se do vodní lázně – dokud neroztaje veškerý led ve vzorku (cca 4 minuty). K rozmraženému vzorku se pomalu přikape 1 ml vytemperovaného kultivačního média. Následně se celý objem vzorku převede do předem připravené 15 ml zkumavky obsahující 4 ml kultivačního média. Kryozkumavka se vypláchne 1 ml média a obsah se přidá ke vzorku.

Vzorek se dále centrifuguje 6 minut, při 300 g a 20 °C. Po centrifugaci se supernatant slije a peleta se rozvolní v 1 ml média. K rozvolněné peletě se přidá dalších 11 ml média a 12 µl IL-2 stimulačního buněčné dělení. Tato suspenze se rozdělí po 1 ml do jamek 12-jamkové destičky.

Do šesti jamek s buněčnou suspenzí se přidá 10 µl předředěného bortezomibu (999 µl kultivačního média + 1 µl bortezomibu, finální koncentrace 10nM), dalších šest jamek s buněčnou suspenzí bez terapeutika slouží jako kontrola pro porovnání účinnosti léčby. Buňky jsou kultivovány v inkubátoru se 37 °C a 5 % CO₂.

7.6 Měření odezvy chemoterapie – Vlastní experiment

Pro testování metody 2DEP cytometrie byly zvoleny vzorky B-lymfocytů chronické lymfocytární leukémie. Každý vzorek byl rozdělen na dvě části, z nichž jedna byla vystavena působení bortezomibu (10 nM) a druhá, bez přidání jakýchkoliv cytostatik, sloužila jako kontrola. Paralelně s měřením na 2DEP cytometru probíhalo měření vzorků konvenční průtokovou cytometrií pro možnost ověření naměřených výsledků.

Pro sledování stavu buněk v průběhu léčby byly k průtokové cytometrii (viz Kapitola 6.3.3) přidány dvě doplňkové metody. Viabilita buněk byla stanovena barvením trypanovou modří (viz Kapitola 6.3.1) a míra metabolické aktivity byla měřena pomocí fluorescenčního barviva Alamar blue (viz Kapitola 6.3.2). Po celou dobu práce s buňkami byl používán sterilní PCR box pro zamezení kontaminace buněk. Vzorky byly měřeny třikrát – hned po aplikaci terapeutik, po 24 hodinách a po 48 hodinách. Společně se vzorky byly měřeny kontroly – jednalo se o stejné vzorky buněk, ale bez terapeutika.

7.6.1 Alamar blue – test metabolické aktivity

Pro měření metabolické aktivity byla přichystána černá 96-jamková destička, do které bylo napipetováno 15 µl Alamar Blue se 150 µl buněk v kultivačním médiu. Každý vzorek se zpracoval v tripletu pro možnost eliminace nahodilé chyby pipetováním. S barvivem Alamar Blue se pracovalo taktéž v laminárním boxu při zhasnutém světle kvůli nestabilitě fluorescenčních barviv. Barvivo s buňkami bylo potřepáním destičky řádně promícháno a destička byla dána do inkubátoru se 37 °C na 4 hodiny. Po uplynutí doby inkubace byla měřena fluorescence na přednastaveném readeru s filtry excitace 540/35 a filtry emise 590/20. Na závěr byla vypočítána průměrná hodnota tripletu.

7.6.2 Trypanová modř – test viability

K měření viability buněk bylo použito 50 μ l buněk v kultivačním médiu a 50 μ l trypanové modři. Tato směs byla promíchána a po 5 minutách z ní bylo převedeno přibližně 10 μ l do Bürkerovy komůrky tak, aby roztok nepřetékal do postranních žlábků. Bürkerova komůrka byla vložena do světelného mikroskopu a byl počítán poměr bezbarvých (živých) buněk k buňkám modrým (mrtvým). Z každého vzorku bylo napočítáno minimálně 100 buněk. Byly počítány ve čtvercích 1x1mm (podle pravidel počítání buněk v Bürkerově komůrce). Z napočítaných buněk byl vypočten procentuální podíl mrtvých buněk.

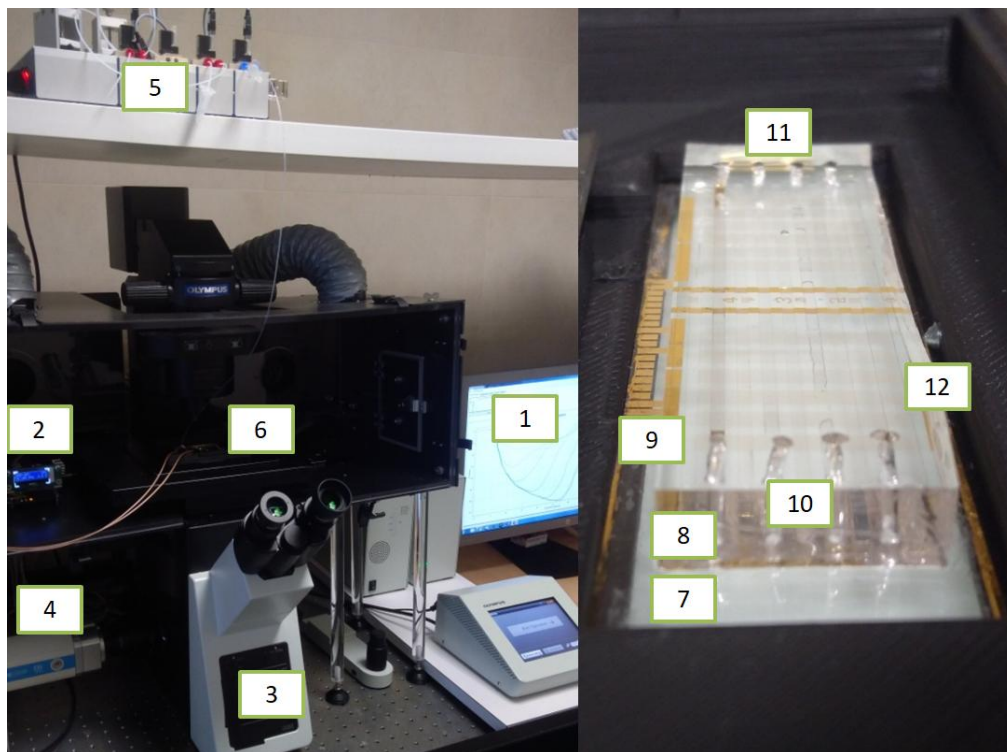
7.6.3 7-Aminoaktinomycin D a stanovení čistoty populace

Ke 100 μ l buněk bylo přidáno 5 μ l 7-AAD pro rozlišení živých a mrtvých buněk. Následovalo 15 minut inkubace bez přístupu světla, dále proplach přidáním 4 ml PBS a centrifugace při 350 g po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a pelet buněk rozvolněn v 300 μ l PBS. Buňky byly měřeny průtokovým cytometrem FACS ARIA Fusion, analýza probíhala v softwaru FlowJo. Buňky 7-AAD pozitivní odpovídají zastoupení mrtvých buněk.

7.6.4 2DEP cytometrie

Mikrofluidní čip byl před měřením 10 minut naplněn nízkovodivostním médiem se 3% příměsí BSA pro zamezení adheze buněk ke dnu mikrokanálu a poté propláchnut médiem bez BSA. Ze vzorku kultivovaných buněk bylo napipetováno 700 μl do zkumavky Eppendorf a následně centrifugováno po dobu 5 minut při 450 g při jemném rozjezdu i brzdě. Supernatant byl opatrně odsát a pelet rozvolněn ve 400 μl nízkovodivostního média. Takto připravený vzorek byl nanesen na mikročip, odkud byl nasáván do mikrokanálu konstantním průtokem 60nl/s. Po 4 minutách, kdy buňky procházely mikrokanálem mikročipu a došlo k ustálení výšky levitace buněk, bylo spuštěno měření. Nejdříve bylo měření prováděno bez působení elektrického pole a následně při všech předem definovaných frekvencích (jak je detailněji popsáno v kapitole 5.1).

Obrázek 8 2 DEP cytometr a čip



Zdroj: vlastní

*1 PC, 2 generátor, 3 mikroskop, 4 CCD kamera, 5 pumpa, 6 čip, 7 sklo, 8 PDMS,
9 kontakty, 10 vstupy do mikrokanálů, 11 výstupy, 12 pole elektrod*

8 VÝSLEDKY

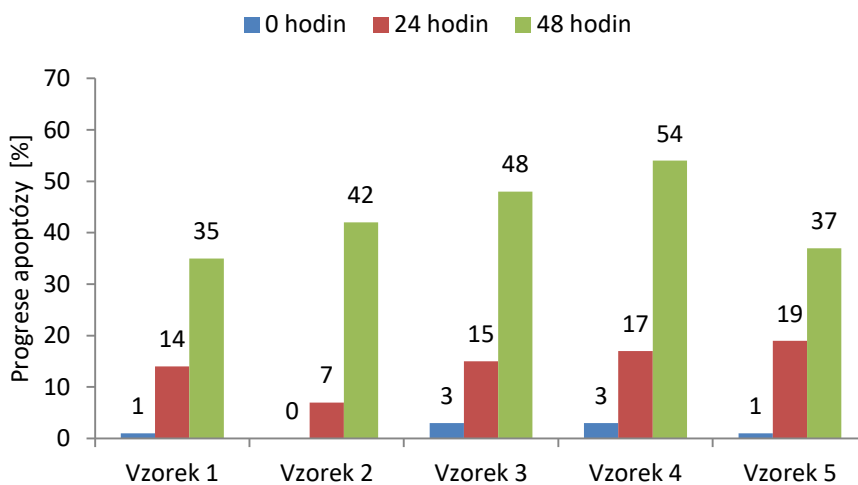
8.1 Izolace a kultivace buněk

Měřením zastoupení CD5+ a CD19+ buněk v jednotlivých vzorcích byla stanovena čistota populace izolovaných buněk – pohybovala se v intervalu 90 – 100 %. V průběhu první kultivace byla sledována viabilita buněk pomocí 7-AAD. Viabilita v průběhu kultivace mírně klesala, ale nikdy nebyla nižší než 80 %.

8.2 Viabilita buněk - Trypanová modř

Viabilita buněk prokazovaná barvením trypanovou modří byla po rozmražení u čtyřech vzorků vyšší než 80 % a u jednoho dosahovala jen 64 %. U kontrolních vzorků byl zaznamenán mírný nárůst zastoupení apoptotických buněk v průběhu 48 hodin. Vzorky, na něž bylo působeno bortezomibem, vykazovaly nárůst mnohem větší. Po 24 hodinách byl zaznamenán rozdíl poměru apoptotických buněk ve vzorku pod vlivem chemoterapie a kontrolou a zanesen do grafu. Nejnižší nárůst apoptotických buněk byl po 24 hodinách u vzorku 2, kde činil 7 %, naopak nejvyšší byl 19 % u vzorku 5. Po 48 hodinách byl nejnižší rozdíl byl zaznamenán u vzorku 1 (35%) a nejvyšší 54 % u vzorku 4.

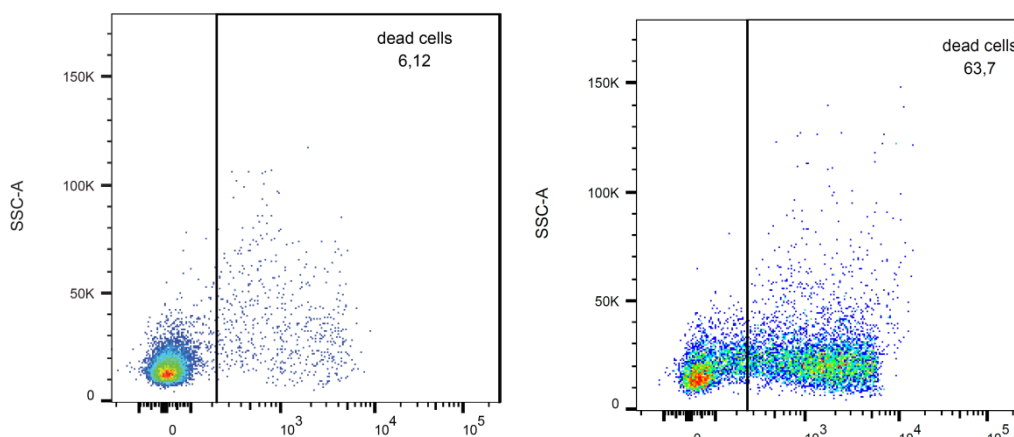
Graf 1 Trypanová modř – nárůst zastoupení apoptotických buněk ve vzorcích



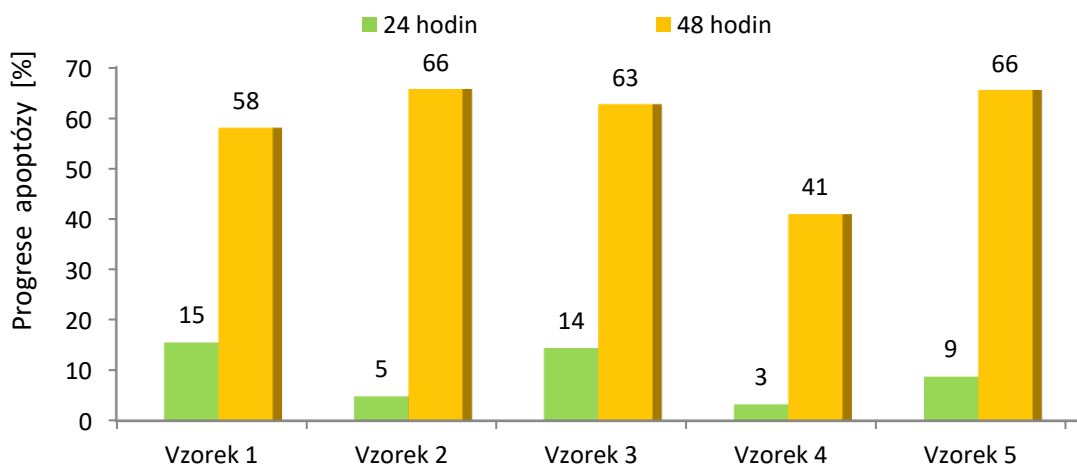
8.3 Viabilita buněk – 7-Aminoaktinomycin D

Viabilita buněk měřená na průtokovém cytometru po barvení 7-AAD ukazuje na nárůst apoptotických buněk vlivem působení chemoterapie. V grafu 2 je od každého vzorku odečtena kontrola bez léčby pro zaznamenání čistého vlivu terapie. Zastoupení apoptotických buněk v kontrolách podle průtokové cytometrie nedosahuje 20 % ani po 48 hodinách kultivace. Ve vzorcích s chemoterapií po 24 hodinách není nárůst mrtvých buněk ani 25 %. Znatelný rozdíl v poměrech živých a mrtvých buněk je až po 48 hodinách, kdy největší rozdíl mezi kontrolou vzorku a vzorkem léčeným je 66 % u vzorku 2 a vzorku 5. Nejnižší nárůst apoptotických buněk je 41 % u vzorku 4.

Obrázek 9 Výstup cytometrického měření vzorku 1 po 24h a 48h



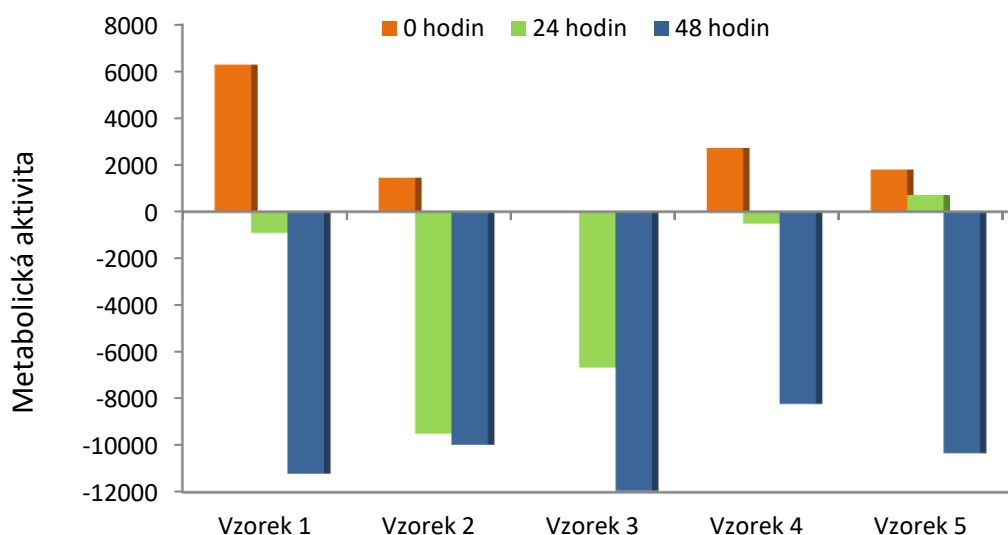
Graf 2 7-AAD – Nárůst zastoupení mrtvých buněk ve vzorcích



8.4 Metabolická aktivita – Alamar Blue

U všech vzorků byl sledován nárůst nebo pokles metabolické aktivity měřením fluorescence. Fluorescence kontroly vzorku bez chemoterapeutika byla odečtena od fluorescence vzorku s chemoterapeutikem. U čtyř vzorků byla naměřena po přidání chemoterapeutika zvýšená metabolická aktivita. U pátého vzorku byla metabolická aktivita srovnatelná s kontrolou. Po 24 hodinách se metabolická aktivita vzorků snížila (nejvíce u vzorku 2). Největší pokles metabolické aktivity byl po 48 hodinách zaznamenán u vzorku 3.

Graf 3 Změna metabolické aktivity léčených buněk oproti kontrolám bez léků



8.5 Distribuovaná dielektroforetická cytometrie

Výsledky měření DE podpisů na dalších stranách ukazují rozložení buněk v mikrokanálu při působení elektrického pole za použití 8 frekvencí v rozmezí od 300 kHz do 10 MHz. Výsledky jsou pro přehlednost rozděleny po pacientech, kdy v prvním řádku jsou tři grafy kontroly vzorku bez léčby a v druhém řádku vzorek s chemoterapií. První graf v řádku je vždy z měření v čase 0, druhý po 24 hodinách a třetí získaný po 48 hodinách.

DE podpisy vzorků ihned po přidání chemoterapeutika byly podobné kontrolám. Se snižující se frekvencí rostl počet buněk odpuzovaných elektrodami ode dna mikrokanálu.

Odpuzování buněk od elektrod se v grafu promítlo nejvíce při frekvenci 0,3 MHz (vyznačené modrou křivkou), kdy byl zaznamenán největší pokles koncentrace buněk ve výšce okolo 25 μm a to u vzorků i kontrol.

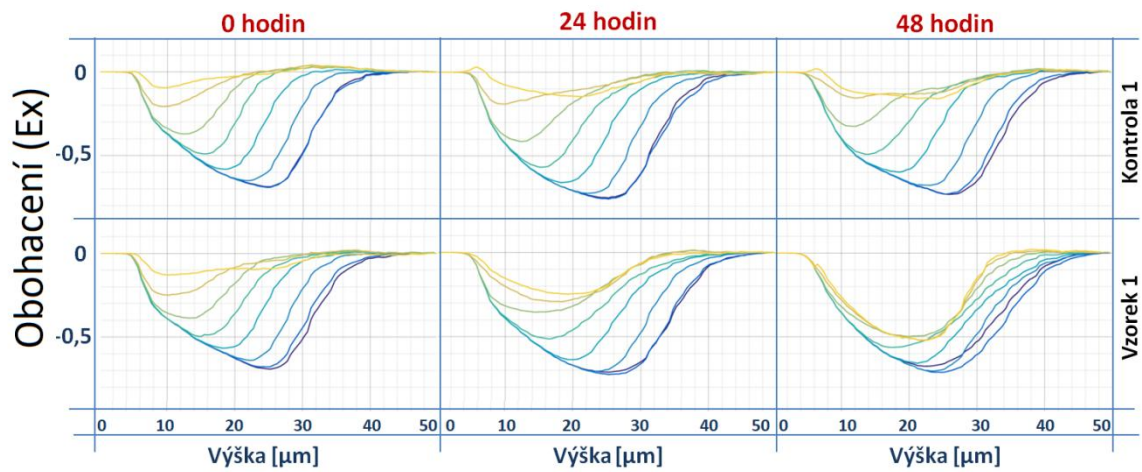
Koncentrace buněk odpuzováním od elektrod klesala, jelikož buňky, které jsou blíže ke středu mikrokanálu, jsou unášeny rychleji, tudíž jsou v PIV zorném poli kratší dobu a jsou zaznamenány méněkrát.

Při vysokých frekvencích (značených žlutou barvou) nebylo buněk odpuzovaných ode dna mikrokanálu tolik. U kontrol všech vzorků, kromě kontroly vzorku 4, byl zaznamenán nárůst koncentrace buněk ve výšce přibližně 5 μm . Stejný trend jsme pozorovali i u vzorků 2 a 5 ihned po přidání chemoterapeutika. Nárůst koncentrace buněk v této výšce byl naměřen při frekvenci 10 MHz a odpovídá převažujícím P-DEP silám podporujícím sedimentaci buněk.

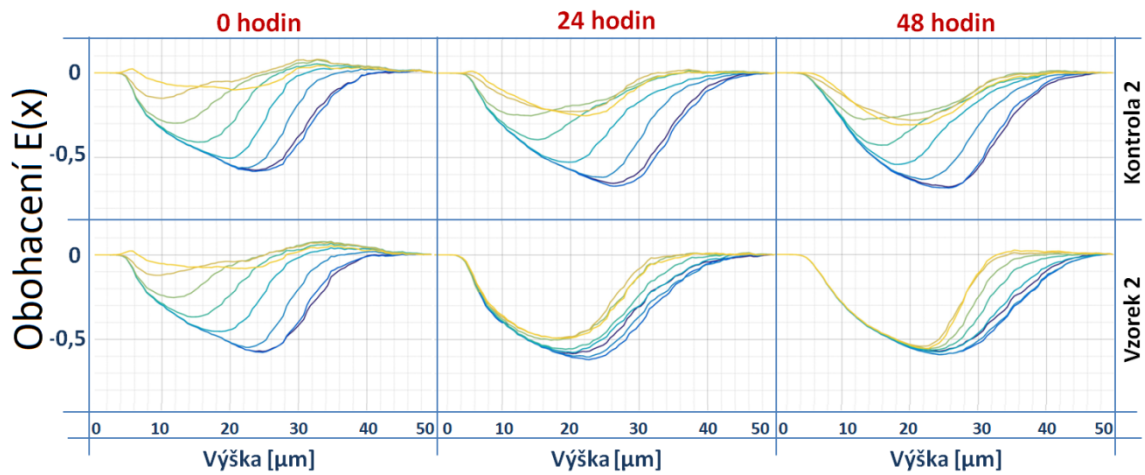
Po 24 hodinách byly pozorovány změny v podpisech všech vzorků. U buněk podléhajícím apoptotickým změnám převládaly N-DEP síly a byly více odpuzovány elektrodo­vým polem.

Stejný trend byl pozorován po 48 hodinách od přidání chemoterapie. Reakce buněk na vysoké frekvence se v části mikrokanálu do výšky 20 μm blížily reakcím buněk na nízké frekvence. Mezi kontrolami a vzorky byl markantní rozdíl.

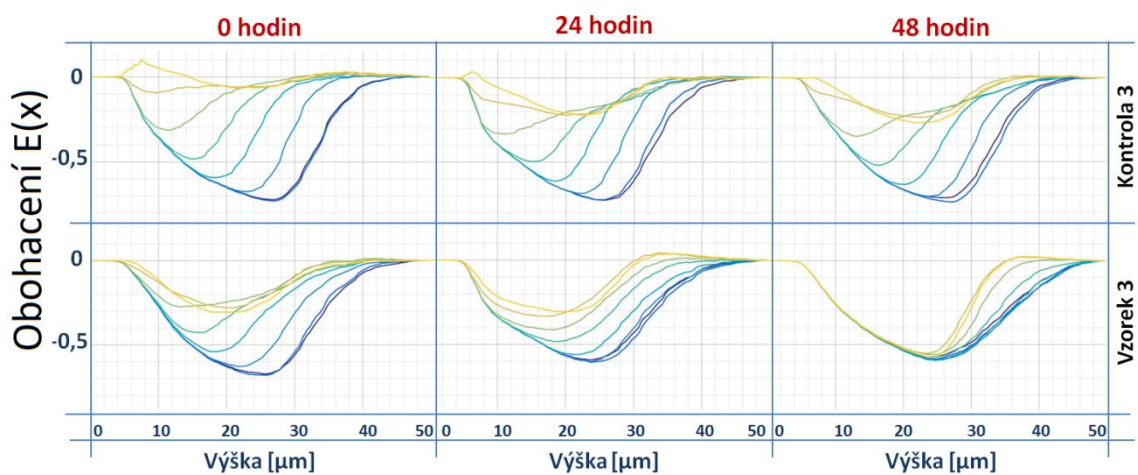
PACIENT 1



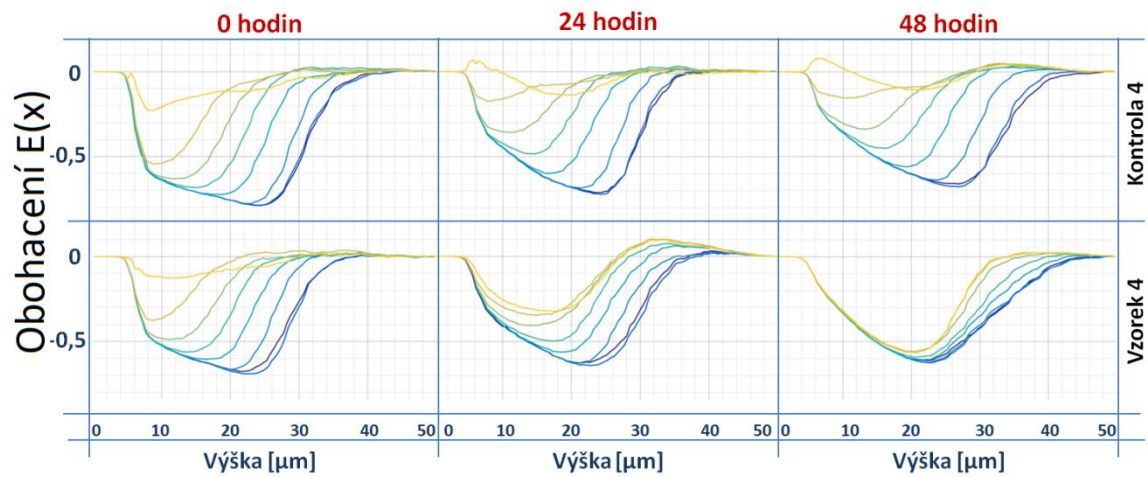
PACIENT 2



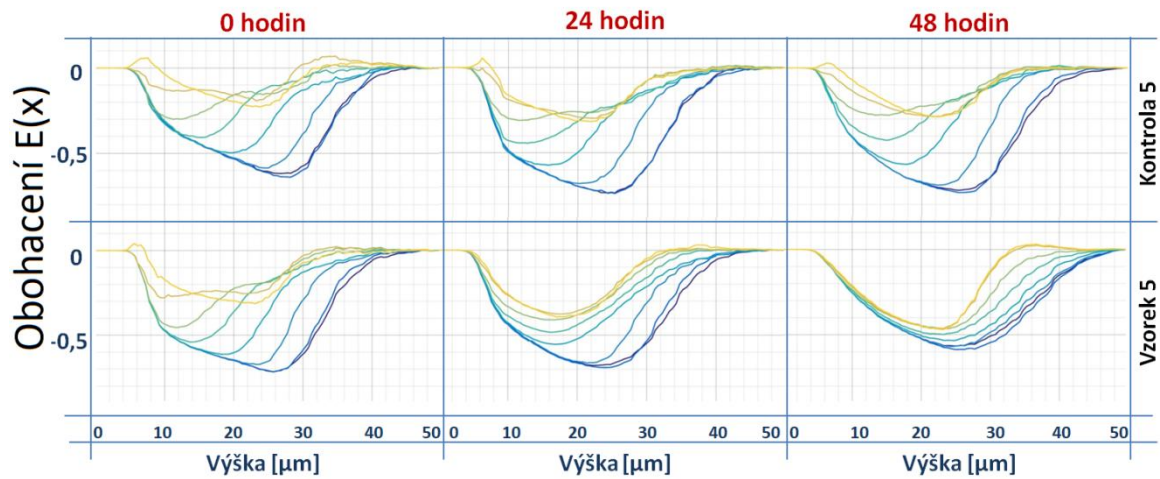
PACIENT 3



PACIENT 4



PACIENT 5



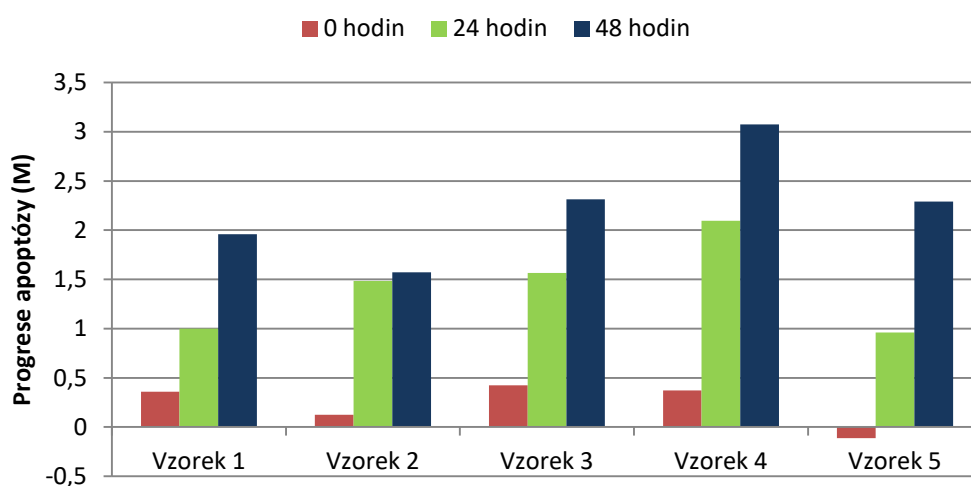
8.5.1 Marker apoptózy

DE podpisy se po přidání chemoterapeutik měnily a snižoval se jejich rozptyl. Pozorovaný trend byl u všech vzorků stejný a byly z něj odvozeny parametry markeru apoptózy. K hodnocení byly vybrány křivky obohacení $E(x)$ dvou frekvencí. První ($f_1=10\text{MHz}$) dosahující nejvyšších hodnot $E(x)$ a druhá ($f_2=0,3\text{MHz}$) dosahující nejnižších hodnot $E(x)$. Rozdíly obohacení $E(x)$ na těchto frekvencích byly hodnoceny v sektoru mikrokanálu od 0 do 20 μm ($x_1=0 \mu\text{m}$, $x_2=20 \mu\text{m}$). Sektor i frekvence byly vybrány tak, aby rozdíly $E(x)$ mezi kontrolou a vzorkem byly v daném sektoru co nejvyšší. Parametry markeru apoptózy byly tedy pro shrnutí definovány následovně (viz. kapitola 5.1.5):

1. Frekvence $f_1 = 10 \text{ MHz}$
2. Frekvence $f_2 = 0,3 \text{ MHz}$
3. Pozice v mikrokanálu $x_1 = 0 \mu\text{m}$
4. Pozice v mikrokanálu $x_2 = 20 \mu\text{m}$

Vyhodnocené hodnoty biomarkeru apoptózy M byly vyneseny do grafu 4. Apoptóza byla znatelná u všech vzorků a s delší dobou působení chemoterapeutik progresa narůstala. U čtyř z pěti vzorků buněk v procesu apoptózy rovnoměrně přibývalo. U vzorku 2 byl největší rozdíl mezi 0 a 24 hodinami od začátku chemoterapie a jen malý mezi 24 a 48 hodinami. Největší odezva na chemoterapii byla zpozorována u vzorku 4.

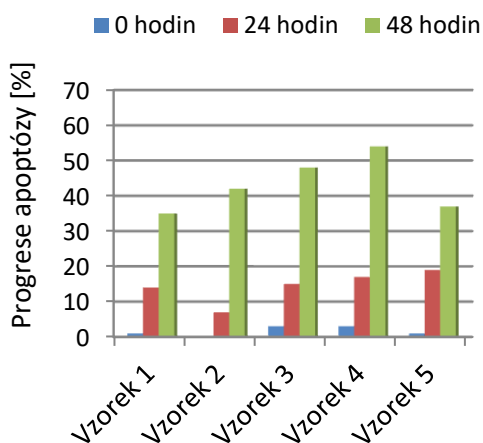
Graf 4 Progresa apoptózy dle 2DEP cytometrie



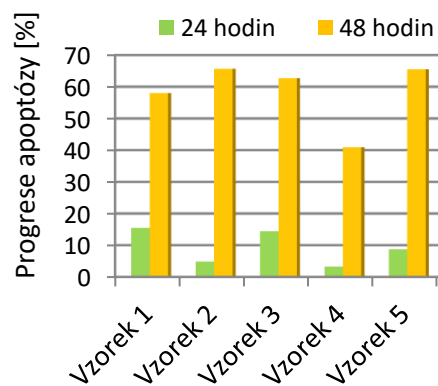
8.6 Výsledné grafy metod

Výsledky viability buněk, které byly vyznačeny v grafech 5 a 6, měly po 24 hodinách od přidání terapie podobný trend a rozdíly mezi nimi nebyly tak zásadní. Markantní rozdíly nastaly po 48 hodinách, kdy většina vzorků začala vykazovat větší progresi apoptózy s barvením 7-AAD a to až o 30 %. Metabolická aktivita zachycena barvením Alamar blue byla vynesena do grafu 7. Po přidání terapie ve většině případech narostla a po 24 hodinách byl zaznamenán pokles oproti kontrole bez léčby. Výsledky markeru progresu apoptózy naměřené pomocí 2DEP cytometrie jsou po 24 a 48 hodinách podobné výsledkům metabolické aktivity.

Graf 5 Viabilita - Trypanová modř

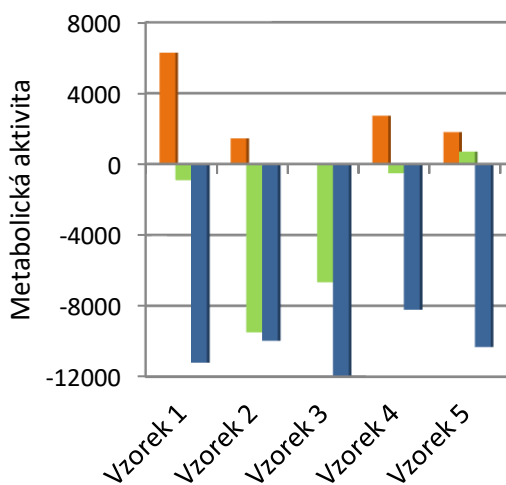


Graf 6 Viabilita - 7-AAD



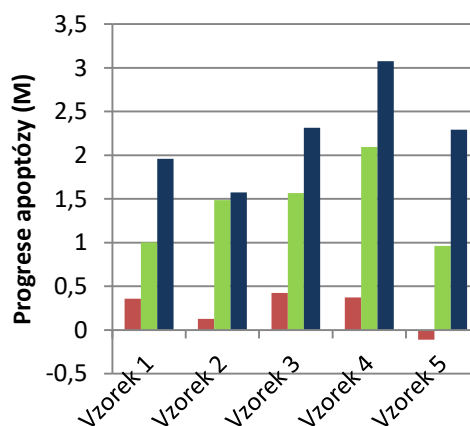
Graf 7 Metabolická aktivita

– Alamar blue



Graf 8 Marker apoptózy

– 2DEP



DISKUZE

B-lymfocyty ze vzorků krve pacientů s prokázanou B-CLL jsme izolovali a poté každý rozdělili do dvou jamek kultivační destičky. Polovina vzorku zůstala neléčená a sloužila jako kontrola a ke druhé polovině vzorku bylo přidáno chemoterapeutikum.

Pro porovnání citlivosti 2DEP cytometrie k progresi apoptózy jsme vybrali metody Alamar blue, Trypanovou modř a 7-AAD. Vzorky byly těmito metodami měřeny ihned po přidání chemoterapie, po 24 a 48 hodinách. Ve stejných časových intervalech byly měřeny kontroly. Přestože šlo o stejné vzorky, výsledky mezi metodami se různily.

Barvení trypanovou modří i 7-AAD založená na průniku barviva do buněk s porušenou integritou buněčné membrány detekují viabilitu buněk. Barvivo 7-AAD je fluorescenčním interkalačním barvivem se silnou afinitou k C-G oblastem, po průchodem porušenou membránou se tedy zachytí na DNA. Trypanová modř obarví modře celou apoptotickou buňku. Mezi těmito barveními nebyly po 24 hodinách podstatně velké rozdíly. Po 48 hodinách ale vykazovalo barvení trypanovou modří i o 20 % mrtvých buněk méně než výsledky barvení se 7-AAD. Tento rozdíl mohl být způsoben samotným barvivem, kdy makromolekuly trypanové modří vyžadují značněji narušenou membránu mrtvých buněk. Naopak barvení pomocí 7-AAD je schopno detekovat již časně apoptotické buňky vykazující nižší intenzitu fluorescence než pozdně apoptotické buňky (Zembruski et al., 2012). Jelikož buňky barvené trypanovou modří byly odečítány mikroskopicky, byl poměr mrtvých a živých buněk počítán ze sta odečtených buněk. Při barvení 7-AAD byl pomocí průtokového cytometru proměřen vyšší počet buněk přispívající k přesnosti výsledku. Jediný vzorek, kde bylo odečteno více mrtvých buněk s barvením trypanovou modří, byl vzorek 4.

Výsledky získané z barvení Alamar Blue poukazují na metabolickou aktivitu buněk. Principem barvení je schopnost vitálních buněk udržovat redukční prostředí a tím přeměňovat v buňce barvivo na fluoreskující produkt. Doba inkubace umožnila odečítání metabolické aktivity až po čtyřech hodinách od přidání terapie. Hodnoty léčených vzorků po odečtení neléčených kontrol ukazují, že po přidání chemoterapie metabolická aktivita u čtyř z pěti vzorků reakcí na terapeutika vzrostla. U jednoho ze vzorků byla srovnatelná s kontrolou. Po 24 hodinách jsme zpozorovali nárůst aktivity jen u vzorku 5 a u ostatních metabolická aktivita klesla pod hodnotu kontroly. Po 48 hodinách se pokles metabolické aktivity ještě více prohloubil. Toto značí ztrátu schopnosti buněk udržovat intracelulární redukční prostředí a odpovídá progresi apoptózy.

Výsledky 2DEP cytometrie stejně jako Alamar blue neukazují jen poměr živých ku mrtvým buňkám, ale komplexnější stav buněk. U čtyřech z pěti vzorků jsme hned po přidání terapie zaznamenali výrazné změny v reakci na přidání léčiva. Změny se s dobou účinku terapeutik zvyrazňovaly a již po 24 hodinách byly mezi kontrolami a vzorky markantní rozdíly. Výsledky z 2DEP cytometrie s výjimkou vzorku 4 značně korelovaly s výsledky metabolické aktivity, přičemž byl minimalizován čas potřebný k měření a nebylo třeba barviv, což je jednoznačně výhodou 2DEP cytometrického měření.

Vzorek 4 nesplnil plně naše očekávání, jelikož míra apoptózy ve vzorku se podle metod 7-AAD a Alamar blue jevila jako nejnižší. Naopak trypanová modř i 2DEP cytometrie poukazuje na nejvyšší progresi apoptózy právě u tohoto vzorku. Labeed et al. však udávají, že také naměřili více apoptotických/nekrotických buněk pomocí DEP v porovnání s průtokovou cytometrií. Zdůvodňují to jemnou manipulací s buňkami při měření DEP. Průtoková cytometrie totiž využívá smykových sil, které mohou fragmentovat pozdně apoptotické buňky a ty pak nejsou průtokovým cytometrem identifikovány (Labeed et al. 2006). Tvrzení Labeedové odpovídá i barvení trypanovou modří, při kterém je s buňkami manipulováno minimálně a vykazuje větší poměr mrtvých buněk. Výsledky měření metabolické aktivity ve vzorku 4 mohou být vysvětleny dvěma populacemi buněk ve vzorku, kdy část buněk již podlehla apoptóze a část se snaží udržet při životě. 2DEP cytometrie pak zachytila obě tyto populace. Uvedené tvrzení však nevysvětluje výsledky vzorku 2, u kterého byla naměřena vyšší hodnota progresu apoptózy průtokovou cytometrií. Úplné objasnění těchto souvislostí by tak vyžadovalo další zkoumání, dodatečná měření a porovnání dat z 2DEP i průtokové cytometrie.

Při měření byl identifikován marker apoptózy pro 2DEP cytometrii, který se podařilo definovat nad rámec vytyčených cílů bakalářské práce. Díky tomu jsme dosáhli zkrácení doby pro měření progresu apoptózy, jelikož k detekci apoptotického markeru již není nutné prozkoumat celé frekvenční spektrum, ale pouze dvě s markerem spojené frekvence. Parametry definující marker apoptózy jsou frekvence f_1 a f_2 ($f_1 = 10\text{MHz}$, $f_2 = 0,3\text{MHz}$) a pozice v mikrokanálu x_1 a x_2 ($x_1 = 0 \mu\text{m}$, $x_2 = 20 \mu\text{m}$). Proměření celého frekvenčního spektra o osmi frekvencích trvalo 24 minut včetně času k ustálení levitace buněk před začátkem měření. Progresi apoptózy jsme nyní schopni vyhodnotit do deseti minut od vstupu buněk na čip, bez jakéhokoli barvení a bez doby potřebné k inkubaci. Doba odezvy 2DEP cytometrického měření apoptózy je tedy oproti času potřebnému k inkubaci a měření Alamar blue o 94 % kratší.

Identifikací dalších markerů odrážejících buněčné procesy a stavy by mohlo vést k sestavení obsáhlé databáze markerů. Tato databáze by mohla zahrnovat DE podpisy různých buněčných linií – od lidských buněk imunitního systému a jejich maligních homologů až po v biotechnologiích hojně využívané kvasinky. Proměřením stěžejních frekvencí by bylo možné porovnat charakteristické DE podpisy s definicemi markerů uložených v databázi a určit, o jaké buňky jde, či určit jejich stav a podstatu procesů, které se v nich odehrávají.

Léková rezistence již byla pomocí dielektroforetických (DEP) metod odhalena. Za rezistence jsou odpovědné proteinové transportéry, jako multirezistentní proteiny (MRP) a P-glykoproteiny vylučující chemoterapeutika z buňky. Se zvyšujícím množstvím těchto transportérů v buňce se stává buňka rezistentnější k lékům (Khamenehfar et al., 2013). Při našem testování pěti patientských vzorků chronické lymfocytární leukémie všechny vzorky vykazovaly dobrou odezvu na léčbu. K odhalení lékové rezistence jsme tedy zatím nedošli. Vzhledem k malému množství testovaných vzorků nemůžeme určit, zda bychom s nynějším nastavením metody případnou rezistenci buněk odhalili, anebo by bylo třeba upravit některý z parametrů metody. 2DEP cytometrie však má k takovému využití potenciál a je třeba se na něj při dalším testování zaměřit.

Velmi zajímavé je porovnání 2DEP cytometrie s dalšími metodami využívající dielektroforézu. Rozdíly v cytoplazmatické vodivosti citlivých a rezistentních buněk byly Labeedovou dielektroforetickou prokázány v buněčných liniích chronické myeloidní leukémie K562 a K562AR na poměrně primitivní experimentální soustavě. Měření probíhalo ve frekvenčním rozsahu od 10 do 20 MHz, při napětí 20 V a s relativně nízkou propustností (Labeed et al., 2003). Soltanian-Zadehová π DEP cytometrií rozlišila dvě buněčné linie karcinomu prsu (LCC1 a LCC9) a získala zároveň výsledky progresu apoptózy při frekvenčním rozsahu od 50 kHz do 1 MHz a napětí 80 V (Soltanian-Zadeh et al., 2017). Obě zmíněné metody fungují na principu zachytávání buněk elektrickým polem na hranách elektrod. Zachytávání buněk v elektrickém poli s sebou nese vždy nevýhody. Měření na tomto principu probíhá přerušovaně a shlukování buněk v regionu kolem elektrod vede k jejich interakcím a snížení přesnosti měření (Sancho et al., 2010). Obě metody navíc vyžadují mnohanásobně vyšší elektrické napětí (konkrétně 10 – 40x vyšší) a není možné je zcela automatizovat. Nikolic-Jaric et al. (2013) ve své práci prezentují laboratoř na čipu schopnou mapování progresu apoptózy ovariálních buněk čínské křečka. Výhodou řešení, které kombinuje dielektroforézu s integrovaným

elektronických snímáním, je fakt, že měření nevyžaduje mikroskop. Princip metody však neumožňuje zvýšit propustnost na víc než 60 buněk za minutu (Nikolic-Jaric et al., 2013).

Se svojí schopností proměřit nad 5 000 buněk za minutu nabízí 2DEP cytometrie v porovnání s uvedenými dielektroforetickými metodami nejvyšší propustnost. Další výhodou je měření kontinuálním průtokem, které umožňuje plnou automatizaci sběru dat. Takový stupeň automatizace není u metod založených na koncentraci buněk v okolí elektrod možný. Výše zmíněné metody se navíc věnovaly výlučně měření buněčných linií. Kladem naší práce bylo mimo jiné použití patientských buněk majících vyšší vypovídající hodnotu pro klinickou praxi.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo s využitím lab-on-a-chip technologie detekovat odezvu léčby leukemických buněk.

Z lab-on-a-chip technologií jsme použili pro testování buněk 2DEP cytometrii. 2DEP cytometrie nevyžadovala značení buněk, což vyloučilo možný vliv barviv na buňky a snížilo finanční náročnost. Změna chování buňky v elektrickém poli, na jejímž principu metoda funguje, je odrazem buněčné struktury, objemu, povrchových i intracelulárních markerů. Díky testování na mikrofluidním čipu byly minimalizovány objemy vzorků i reagensů potřebné k měření, přičemž bylo možné proměřit tisíce buněk za minutu. Z těchto důvodů se 2DEP cytometrie jevila vhodnou metodou pro testování vlivu terapeutik na buňky pacienta. *In vitro* testování by zároveň mohlo pomoci k predikci účinnosti a možnosti zvýšení efektivity léčby nádorových onemocnění či k odhalení vznikající rezistence k lékům.

Detekci účinnosti chemoterapie 2DEP cytometrií jsme zkoumali na vzorcích B-lymfocytů izolovaných z krve pěti pacientů s prokázanou B-CLL.

Pomocí 2DEP cytometrie jsme získali DE podpisy buněk B-lymfocytární leukémie zaznamenávající chování těchto buněk v elektrickém poli. Proměřením buněk v daných časových intervalech po přidání chemoterapie jsme zaznamenali DE podpisy odpovídající odezvě buněk na léčbu.

Ačkoliv se 2DEP cytometrie již v základu řadí mezi časově spíše nenáročné metody, podařilo se nám nad rámec cílů práce identifikovat vhodné parametry apoptotického markeru. Díky tomu se nám podařilo snížit čas od vstupu buněk na čip po výsledek měření na méně než 10 minut. Pro detekci apoptotického markeru není tudíž již nutné prozkoumat celé frekvenční spektrum, ale jen dvě nejdůležitější vytipované frekvence.

Naším dalším cílem bylo srovnání citlivosti 2DEP cytometrie s konvenčními metodami. Jelikož chemoterapeutická léčba zahajuje apoptotické procesy, vybrali jsme tři metody odrážející progresi apoptózy. První dvě sledovaly viabilitu a byly postaveny na průniku barviva do buňky porušenou membránou, z čehož jedno se dále vázalo na DNA. Třetí metoda využívala barviva a schopnosti udržovat vně buňky redukční prostředí, odrážela metabolickou aktivitu. Všechny metody vykazovaly u vzorků progresi apoptózy, avšak výsledky se mezi metodami různily. Odlišnost výsledků konvenčních

metod jsme očekávali, protože metody nedetekují stejné apoptotické procesy a jsou zaměřeny na různou fázi apoptózy.

Stejně jako měření metabolické aktivity pomocí barvení Alamar blue zachycuje i 2DEP cytometrie komplexnější změny buněk, než je jen poměr mrtvých ku živým buňkám. Narozdíl od metody Alamar blue, která vyžaduje několikahodinovou inkubaci, jsme díky 2DEP cytometrii a identifikaci apoptotického markeru schopni naměřit srovnatelné výsledky do 10 minut.

Dle výsledků dosažených v této práci se jeví, že 2DEP cytometrie má velký potenciál najít uplatnění v medicínském prostředí. Ten je však třeba před širším zavedením metody do běžné praxe více prozkoumat. Očekáváme, že s přibývajícími experimenty, zachycením dalších markerů, optimalizací metody a se zjednodušením uživatelského rozhraní, bude 2DEP cytometrie nástrojem k detekci široké škály biomarkerů a bude schopna v určitých případech konkurovat průtokové cytometrii s výhodami v mnoha ohledech.

SEZNAM LITERATURY

ADAM, Zdeněk a Jiří VORLÍČEK, 2007. *Hematologie : pro praktické lékaře*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-453-9.

AL-SABAH, Ayesha, Zita JESSOP, Iain Stuart WHITAKER a C. THORNTON, 2018. *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2019-02-08]. ISBN 978-0-08-101103-4. Dostupné z: doi:10.1016/C2015-0-06000-2

AMIN, Md. Lutful, 2013. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* [online]. **7**, 27–34 [vid. 2019-02-20]. ISSN 1177-3928. Dostupné z: doi:10.4137/DTI.S12519

ASHKENAZI, Avi a Vishva M. DIXIT, 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* [online]. **281**(5381), 1305–1308 [vid. 2019-02-14]. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5381.1305

BLOW, Nathan, ed., 2007. Microfluidics: in search of a killer application. *Nature Methods* [online]. **4**, 665–670 [vid. 2019-02-24]. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth0807-665

BRUNNER, Thomas, Christoph WASEM, Ralph TORGLER, Igor CIMA, Sabine JAKOB a Nadia CORAZZA, 2003. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Seminars in Immunology* [online]. **15**(3), 167–176 [vid. 2019-02-14]. ISSN 10445323. Dostupné z: doi:10.1016/S1044-5323(03)00035-6

BRYCHTOVÁ, Yvona, Anna PANOVSÁ a Michael DOUBEK, 2016. *Chronická lymfocytární leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké*. ISBN 978-80-906212-5-1.

DEMIRCAN, Yalcın, Mehmed ERDEM, Mustecaplioglu E. OZGUR, Ulusoy GUNDUZ a Haluk KULAH, 2014. Determination of multidrug resistance level in K562 Leukemia cells by 3D-electrode contactless dielectrophoresis. In: *27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems* [online]. San Francisco, CA, USA: IEEE, s. 837–840 [vid. 2019-02-08]. ISBN 978-1-4799-3509-3. Dostupné z: doi:10.1109/MEMSYS.2014.6765771

DIEHL, Sean a Mercedes RINCÓN, 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology* [online]. **39**(9), Proceedings from the Autumn Immunology Conference (2001): Regulators of Immune Function, 531–536 [vid. 2019-02-16]. ISSN 0161-5890. Dostupné z: doi:10.1016/S0161-5890(02)00210-9

DUNCAN, L., H. SHELMERDINE, M. P. HUGHES, H. M. COLEY, Y. HÜBNER a F. H. LABEED, 2008. Dielectrophoretic analysis of changes in cytoplasmic ion levels due to ion channel blocker action reveals underlying differences between drug-sensitive and multidrug-resistant leukaemic cells. *Physics in Medicine and Biology* [online]. **53**(2), N1–N7 [vid. 2019-02-08]. ISSN 0031-9155, 1361-6560. Dostupné z: doi:10.1088/0031-9155/53/2/N01

EILENBERGER, Christoph, Sebastian Rudi Adam KRATZ, Mario ROTHBAUER, Eva-Kathrin EHMOSE, Peter ERTL a Seta KÜPCÜ, 2018. Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. *MethodsX* [online]. **5**, 781–787 [vid. 2019-02-19]. ISSN 2215-0161. Dostupné z: doi:10.1016/j.mex.2018.07.011

ELMORE, Susan, 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* [online]. **35**(4), 495–516 [vid. 2019-02-11]. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337

ENARI, Masato, Hideki SAKAHIRA, Hideki YOKOYAMA, Katsuya OKAWA, Akihiro IWAMATSU a Shigekazu NAGATA, 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* [online]. **391**(6662), 43–50 [vid. 2019-02-15]. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/34112

FIKAR, Pavel, Vjačeslav GEORGIEV, Gaelle LISSORGUES, Monika HOLUBOVA, Daniel LYSAK a Daniel GEORGIEV, 2018. 2DEP cytometry: distributed dielectrophoretic cytometry for live cell dielectric signature measurement on population level. *Biomedical Microdevices* [online]. **20**(1) [vid. 2019-02-08]. ISSN 1387-2176, 1572-8781. Dostupné z: doi:10.1007/s10544-017-0253-5

FIKAR, Pavel, 2016. *Dielectrophoretic cytometry for measurement of live cell dielectric signatures on population level*. B.m. PhD Thesis. Západočeská univerzita v Plzni, Université Paris-Est.

GASCOYNE, Peter a Sangjo SHIM, 2014. Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis. *Cancers* [online]. **6**(1), 545–579 [vid. 2019-02-08]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers6010545

HADRABOVÁ, Markéta, 2015. Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie*. **9**(3), 4. ISSN 1803-5345.

HILL, Michelle M., Colin ADRAIN, Patrick J. DURIEZ, Emma M. CREAGH a Seamus J. MARTIN, 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal* [online]. **23**(10), 2134–2145 [vid. 2019-02-14]. ISSN 0261-4189, 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7600210

HORNICEK, Francis J. a George I. MALININ, 1998. Viability, Methods Of Assessing Leukocyte. In: Peter J. DELVES, ed. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* [online]. Oxford: Elsevier, s. 2474–2475 [vid. 2019-02-08]. ISBN 978-0-12-226765-9. Dostupné z: doi:10.1006/rwei.1999.0623

JAIN, Abhishek K., Divya SINGH, Kavita DUBEY, Renuka MAURYA, Sandeep MITTAL a Alok K. PANDEY, 2018. Models and Methods for In Vitro Toxicity. In: Alok DHAWAN a Seok KWON, ed. *In Vitro Toxicology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 45–65 [vid. 2019-02-08]. ISBN 978-0-12-804667-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804667-8.00003-1

JAIN, Preetesh a Susan O'BRIEN, 2012. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. **26**(12), 1146–1152. ISSN 0890-9091.

JÍLEK, Petr, 2014. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. čtvrté vydání. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-4822-1.

KAČÍRKOVÁ, Petra a Vít CAMPR, 2007. *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-6775-8.

KHAMENEHFAR, Avid, Y. CHEN, D. E. HOGGE a P. C. H. LI, 2013. Measurement of drug accumulation in single acute myeloid leukemia (AML) patient cells using a microfluidic dielectrophoresis (DEP) chip. 3. ISSN 978-0-9798064-6-9.

KLENER JR., Pavel a Pavel KLENER, 2013. *Principy systémové protinádorové léčby*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-4171-0.

KLENER, Pavel, 2011. Hematologie. In: *Vnitřní lékařství*. Čtvrté vydání. B.m.: Galén Karolinum. ISBN 978- 80-7262-857-5.

KLENER, Pavel a Pavel KLENER JR., 2009. *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-6988-2.

KOZÁK, Tomáš, 2008. Chronická lymfocytární leukemie. *Onkologie* [online]. **2**(3), 156–162 [vid. 2019-02-09]. ISSN 18024475, 18035345. Dostupné z: <http://solen.cz/doi/10.nnnn/xon.2008.030.html>

LABEED, Fatima H., Helen M. COLEY a Michael P. HUGHES, 2006. Differences in the biophysical properties of membrane and cytoplasm of apoptotic cells revealed using dielectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. **1760**(6), 922–929 [vid. 2019-02-20]. ISSN 03044165. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bbagen.2006.01.018](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.01.018)

LABEED, Fatima H., Helen M. COLEY, Hilary THOMAS a Michael P. HUGHES, 2003. Assessment of Multidrug Resistance Reversal Using Dielectrophoresis and Flow Cytometry. *Biophysical Journal* [online]. **85**(3), 2028–2034 [vid. 2019-02-08]. ISSN 00063495. Dostupné z: [doi:10.1016/S0006-3495\(03\)74630-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74630-X)

LEBIEN, Tucker W. a Thomas F. TEDDER, 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* [online]. **112**(5), 1570–1580 [vid. 2019-02-15]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: [doi:10.1182/blood-2008-02-078071](https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071)

LIEBERMAN, Judy a Zusen FAN, 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Current Opinion in Immunology*. **15**(5), 553–559. ISSN 0952-7915.

NIKOLIC-JARIC, Marija, Tim CABEL, Elham SALIMI, Ashlesha BHIDE, Katrin BRAASCH, Michael BUTLER, Greg E. BRIDGES a Douglas J. THOMSON, 2013. Differential electronic detector to monitor apoptosis using dielectrophoresis-induced translation of flowing cells (dielectrophoresis cytometry). *Biomicrofluidics* [online]. **7**(2) [vid. 2019-03-27]. ISSN 1932-1058. Dostupné z: [doi:10.1063/1.4793223](https://doi.org/10.1063/1.4793223)

OBRTLÍKOVÁ, Petra, 2013. Moderní individualizovaná léčba chronické lymfocytární leukemie. ISSN 1803-5345.

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

OTSUKI, Yoshinori, Zhonglian LI a Masa-Aki SHIBATA, 2003. Apoptotic detection methods--from morphology to gene. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. **38**(3), 275–339. ISSN 0079-6336.

PECHANDOVÁ, Kristýna, H. BUZKOVÁ, Ondřej SLANAŘ a František PERLÍK, 2006. Efluxní transmembránový transportér - P-glykoprotein. *Klinická biochemie a metabolismus*. **14**(4), 196–201. ISSN 1210-7921.

PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ, 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství I - Hematologie*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-3459-0.

PETHIG, R. a M.S. TALARY, 2007. Dielectrophoretic detection of membrane morphology changes in Jurkat T-cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *IET Nanobiotechnology* [online]. **1**(1), 2 [vid. 2019-02-13]. ISSN 17518741. Dostupné z: doi:10.1049/iet-nbt:20060018

RAMPERSAD, Sephra N., 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)* [online]. **12**(9), 12347–12360 [vid. 2019-02-16]. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s120912347

SAELENS, Xavier, Nele FESTJENS, Lieselotte VANDE WALLE, Maria VAN GURP, Geert VAN LOO a Peter VANDENABEELE, 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* [online]. **23**(16), 2861–2874. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1207523

SANCHO, Miguel, Genoveva MARTÍNEZ, Sagrario MUÑOZ, José L. SEBASTIÁN a Ronald PETHIG, 2010. Interaction between cells in dielectrophoresis and electrorotation experiments. *Biomicrofluidics* [online]. **4**(2) [vid. 2019-03-27]. ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.3454129

SAVILL, John a Valerie FADOK, 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* [online]. **407**(6805), 784–788. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35037722

SCHROERS, R., F. GRIESINGER, L. TRÜMPER, D. HAASE, B. KULLE, L. KLEIN-HITPASS, L. SELLMANN, U. DÜHRSEN a J. DÜRIG, 2005. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* [online]. **19**(5), 750–758 [vid. 2019-02-09]. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/sj.leu.2403707

SLEE, Elizabeth A., Colin ADRAIN a Seamus J. MARTIN, 2001. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(10), 7320–7326 [vid. 2019-02-15]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M008363200

SOLTANIAN-ZADEH, Sepeedah, Kruthika KIKKERI, Ayesha N. SHAJAHAN-HAQ, Jeannine STROBL, Robert CLARKE a Masoud AGAH, 2017. Breast cancer cell obatoelax response characterization using passivated-electrode insulator-based dielectrophoresis. *Electrophoresis* [online]. **38**(16), 1988–1995 [vid. 2019-03-27]. ISSN 0173-0835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201600447

SUBRAMANIAM, Anuradha a Swaminathan SETHURAMAN, 2014. Chapter 18 - Biomedical Applications of Nondegradable Polymers. In: Sangamesh G. KUMBAR, Cato T. LAURENCIN a Meng DENG, ed. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* [online]. Oxford: Elsevier, s. 301–308 [vid. 2019-02-26]. ISBN 978-0-12-396983-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-396983-5.00019-3

SUSIN, Santos A., Eric DAUGAS, Luigi RAVAGNAN, Kumiko SAMEJIMA, Naoufal ZAMZAMI, Markus LOEFFLER, Paola COSTANTINI, Karine F. FERRI, Theano IRINOPOULOU, Marie-Christine PRÉVOST, Greg BROTHERS, Tak W. MAK, Josef PENNINGER, William C. EARNSHAW a Guido KROEMER, 2000. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. **192**(4), 571–580 [vid. 2019-02-14]. ISSN 0022-1007. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193229/>

ŠIMKOVIČ, Martin a Lukáš SMOLEJ, 2013. Léčba chronické lymfocytární leukemie u nemocných vyššího věku a s významnými přidruženými onemocněními. *Onkologie* [online]. **7**(1), 36–40 [vid. 2019-02-09]. ISSN 18024475, 18035345. Dostupné z: <http://solen.cz/doi/10.nnnn/xon.2013.009.html>

TRAPANI, Joseph A. a Mark J. SMYTH, 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* [online]. **2**(10), 735–747 [vid. 2019-02-15]. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri911

VYAWAHARE, Saurabh, Andrew D. GRIFFITHS a Christoph A. MERTEN, 2010. Miniaturization and Parallelization of Biological and Chemical Assays in Microfluidic Devices. *Chemistry & Biology* [online]. **17**(10), 1052–1065 [vid. 2019-02-23]. ISSN 1074-5521. Dostupné z: doi:10.1016/j.chembiol.2010.09.007

ZEISS, C. J., 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology* [online]. **40**(5), 481–495. ISSN 0300-9858. Dostupné z: doi:10.1354/vp.40-5-481

ZEMBRUSKI, Nadine C. L., Vanessa STACHE, Walter E. HAEFELI a Johanna WEISS, 2012. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry* [online]. **429**(1), 79–81 [vid. 2019-02-16]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2012.07.005

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Charakterizace souboru pacientů

Příloha 2 Povolení sběru informací ve FN Plzeň

PŘÍLOHY

Příloha 1 Charakterizace souboru pacientů

ID vzorku	Diagnóza	Konfirmace FACS?	Cytogenetika	Stupeň dle Raie	ročník	pohlaví
Vzorek 1	C911	ANO	nevyšetřeno	3	1947	muž
Vzorek 2	C911	ANO	der(12)t(6;12); trisomií chromosomu 12	2	1950	muž
Vzorek 3	C911	ANO	komplexní karyotyp	3	1947	muž
Vzorek 4	C911	ANO	nevyšetřeno	1	1955	žena
Vzorek 5	C911	ANO	bez aberací	2	1973	muž

Data Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň

Příloha 2 Povolení sběru informací ve FN Plzeň



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
ulaj Svobody 89, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00689806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní
Adriana Kašpárková
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta zdravotnických studií - Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví
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 léčebných a laboratorních metodách, analýzách a výsledcích těchto metod, používaných na *Hematoonkologickém oddělení (HOO) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracování Vaší bakalářské práce s názvem „*Aplikace Lab-on-a-chip technologie v léčbě nádorových onemocnění*“.

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

- Vrchní sestra HOO 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 pan **doc. MUDr. Daniel Lysák, Ph.D., vedoucí lékař HOO 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.

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

26. 2. 2019