

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Posouzení vhodnosti klonů protilátky anti CD 34 pro stanovení
počtu hematopoetických kmenových buněk**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Veronika Hornychová**
Studijní program: N1501 - Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **RNDr. Martin Novák, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 17. 5. 2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Veronika Hornychová
Název práce: Posouzení vhodnosti klonů protilátky anti CD 34 pro stanovení počtu hematopoetických kmenových buněk
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Hemato-onkologická klinika
Vedoucí práce: RNDr. Martin Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2024
Abstrakt:

Stanovení počtu CD 34+ buněk je důležitou informací pro transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Populace buněk nesoucí tento antigenní znak je po transplantaci zodpovědná za znovuosídlení kostní dřeně a obnovu krvetvorby. Cílem této práce je prostřednictvím mediánu fluorescenční intenzity porovnat komerčně dostupné klony 581, 4H11[APG] a QBEnd-10 protilátky anti CD 34 a otestovat jejich klinické laboratorní použití. Analýza vzorků byla provedena metodou průtokové cytometrie na základě ISHAGE protokolu. Statistická analýza ukazuje, že z těchto tří variant je nejvhodnější klon 581. Výsledek této práce by mohl být nápomocný při volbě komerčního kitu pro stanovení počtu hematopoetických kmenových buněk v souvislosti s nařízením IVDR. Důležitým zjištěním je i to, že pro kvantifikaci a selekci CD 34+ buněk by měly být vybírány protilátky specifické vůči epitopům III. třídy. Vhodnou úpravou by mohla být aktualizace používaného ISHAGE protokolu zařazením odlišení singletů od doubletů do analýzy, což by umožnilo přesnější kvantifikaci buněk.

Klíčová slova: Hematopoetická kmenová buňka, marker CD34, ISHAGE, medián fluorescenční intenzity, průtoková cytometrie
Počet stran: 57
Počet příloh: 6
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Veronika Hornychová
Title of thesis:	Assessment of clones of antibody anti CD34 used for enumeration hematopoietic stem cells
Type of thesis:	Diploma
Department:	Clinics of Hemato-oncology
Supervisor:	RNDr. Martin Novák, Ph.D.
The year of presentation:	2024
Abstract:	Determination of CD 34+ cell count is important information for hematopoietic stem cell transplantation. The population of cells carrying this antigenic marker is responsible for bone marrow engraftment and hematopoietic reconstitution after transplantation. The aim of this study is to compare commercially available clones 581, 4H11[APG] and QBEnd-10 anti-CD 34 antibodies through median fluorescence intensity and test their clinical laboratory use. Analysis of samples was performed through use of flow cytometry based on the ISHAGE protocol. Statistical analysis shows that clone 581 is the most suitable of the three variants. The result of this work could be helpful in choosing a commercial kit for the determination of hematopoietic stem cell enumeration in the context of IVDR regulation. Another important finding is that antibodies specific to class III epitopes should be selected for quantification and selection of CD 34+ cells. An adaptation of the ISHAGE protocol that includes the discrimination between singlet and doublet in the assay could be an appropriate modification that would allow a more accurate quantification of cells.
Keywords:	Hematopoetic stem cell, marker CD 34, ISHAGE, median fluorescence intensity, flow cytometry
Number of pages:	57
Number of appendices:	6
Language:	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Martina Nováka, Ph.D., za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 17.5.2024

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Martinu Novákovi Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, konzultace, věnovaný čas a možnost nahlédnutí do fungování klinické laboratoře. Velice si vážím jeho vstřícnosti, ochoty, flexibility, sdílení zkušeností a znalostí. Děkuji panu doktoru Novákovi i za umožnění vyjet na praktickou stáž do zahraničí v rámci mého studia. Mé poděkování také patří RNDr. Tomáši Fürstovi Ph.D. za statistické zpracování dat a jejich konzultaci.

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Úvod	8
1 Současný stav řešené problematiky	9
1.1 Kmenové buňky a krvetvorba	9
1.1.1 Objev kmenové buňky	10
1.2 Transplantace hematopoetických kmenových buněk	11
1.3 Marker CD34	14
1.4 Marker CD45	15
1.5 Stanovení počtu CD34+ buněk	16
1.5.1 ISHAGE protokol	16
1.6 Průtoková cytometrie	18
1.6.1 Titrace protilátek	20
1.6.2 Medián fluorescenční intenzity	21
2 Experimentální část	24
2.1 Cíl práce	24
3 Materiál a metodika	25
3.1 Biologický materiál	25
3.2 Chemikálie a protilátky	25
3.3 Přístrojové a laboratorní vybavení	25
3.4 Příprava vzorků	25
3.5 Analýza vzorků	26
3.6 Vnitřní kontrola kvality	26
3.7 Gatovací strategie	26
4 Výsledky	32
4.1 Titrace klonů protilátek	32
4.2 Výsledek statistického zpracování dat	36
5 Diskuze	39
6 Závěr	43
7 Bibliografie	44
8 Seznam příloh	49

Seznam použitých zkratk

7-AAD	7- amino actinomycin D
CAR	Chimérický antigenový receptor
CD	Cluster of differentiation neboli diferenciační skupina
ČNRDD	Český národní registr dárců dřeně
ČR	Česká Republika
ČRDKB	Český registr dárců krvetvorných buněk
FITC	Fluorochrom Fluorescein isothiocyanate
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
FSC	Forward scatter neboli přední rozptyl
HKB	Hematopoetická kmenová buňka
HLA	Human leukocyte antigens neboli lidské leukocytární antigeny
ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
IVDR	Regulace in vitro diagnostiky
KB	Kmenová buňka
MFI	Medián fluorescenční intenzity
MHC	Main histocompatibility complex neboli hlavní histokompatibilní komplex
PE	Fluorochrom Phycoerythrin
SSC	Side scatter neboli boční rozptyl

Úvod

Stanovení počtu CD 34+ buněk je důležitou informací pro transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Populace buněk nesoucí tento antigenní znak je po transplantaci zodpovědná za znovuosídlení kostní dřeně a obnovu krve tvorby. Metoda průtokové cytometrie v tomto směru nabídla rychlý, spolehlivý a reprodukovatelný test, který se stal díky ISHAGE protokolu zlatým standardem pro stanovení počtu CD 34+ buněk.

V roce 2022 v platnost vstoupilo nové Nařízení Evropského parlamentu a Rady EU o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro IVDR. Cílem tohoto nařízení je zvýšit kvalitu, bezpečnost a účinnost diagnostických prostředků, a tím přispět k ochraně veřejného zdraví v Evropské unii. Nařízení řídí výrobu a uvádění těchto prostředků na evropský jednotný trh a výrazně ovlivňuje možnost výběru a využití diagnostických zdravotnických prostředků v laboratořích. Zásadním způsobem toto nařízení také mění možnost využití in-house validovaných metod v klinických laboratořích. Nyní je tedy přechodné období, kdy klinické laboratoře musí tomuto nařízení přizpůsobit své vybavení, produkty, zavedené metody a testy, které využívají. Celkově musí laboratoře provést komplexní revizi svých procesů, postupů a zajistit, že budou plně v souladu s nařízením IVDR, aby mohly nadále poskytovat spolehlivé a kvalitní diagnostické služby.

Laboratoř průtokové cytometrie FNOL tedy v dohledné době čeká volba komerčního kitu, kterou bude nahrazena doposud používaná validovaná in-house metoda pro stanovení počtu CD 34+ buněk. Cílem této práce je prostřednictvím mediánu fluorescenční intenzity porovnat komerčně dostupné klony 581, 4H11[APG] a QBEnd-10 protilátky anti CD 34 a otestovat jejich klinické laboratorní použití. Výsledkem práce by měla být identifikace klonu s nejvhodnějšími vlastnostmi pro stanovení počtu hematopoetických kmenových buněk v dárcovském štěpu pomocí průtokové cytometrie.

1 Současný stav řešení problematiky

1.1 Kmenové buňky a krvetvorba

Kmenové buňky (KB) jsou základem pro vývoj celého organismu (Zakrzewski, 2019). Jsou to nesespecializované buňky schopné diferenciaci ve kteroukoliv buňku našeho těla. Zároveň si zachovávají schopnost sebeobnovy. Mítotickým dělením vzniká jedna buňka identická s mateřskou, která udržuje pool kmenových buněk (Seita, 2010). Druhá buňka dává vzniknout alespoň jednomu vysoce diferencovanému buněčnému typu. Z kmenových buněk vznikají základy jednotlivých tkání. V dospělosti tyto KB udržují tkáňovou homeostázu, obstarávají regeneraci poškozené tkáně a produkci nových buněk. Během vývoje organismu vzniká celá hierarchie KB lišících se svým diferenciačním potenciálem. Kmenové buňky se dají obecně dělit na embryonální KB a somatické KB (Seita, 2010).

Totipotentní KB jsou schopny se dělit a diferencovat na jakoukoliv buňku v celém organismu (Zakrzewski, 2019). Vykazují nejvyšší diferenciační potenciál a umožňují vytvářet embryonální i extraembryonální struktury. Po oplození, kdy dojde ke splynutí vajíčka se spermií, vzniká diploidní zygota. Buňky, které vznikají, jsou prvními KB a nazývají se embryonální KB. Tyto buňky se mohou později vyvinout do kterýchkoliv buněk ze tří zárodečných listů nebo vytvořit například placentu. Ve stádiu blastocytu se již vnitřní buňky stávají pluripotentními KB. To znamená, že se diferenciační potenciál těchto buněk snížil. Tyto buňky již nemohou dát vzniku extraembryonálních struktur. Dalším stupněm jsou multipotentní KB. Ty mají užší spektrum diferenciaci než pluripotentní. Mohou se specializovat na buňky specifických buněčných linií. Příkladem je hematopoetická kmenová buňka (HKB), která dává vzniku několika typů krvinek. Pokud jsou multipotentní buňky schopné přeměny na nepříbuzné typy buněk, označují se jako pluripotentní buňky. Oligopotentní KB se mohou diferencovat do několika typů buněk. Například hematopoetická KB se dále diferencuje na erythroidní, myeloidní a lymfoidní prekurzor. Tyto prekurzory jsou tedy oligopotentními KB. Unipotentní buňky se vyznačují nejnižším diferenciačním potenciálem se zachovanou vlastností opakovaného dělení. Často se označují jako takzvané progenitorové buňky. Tvoří tedy jeden konkrétní buněčný typ.

V hierarchické struktuře krevního systému je tedy na počátku multipotentní HKB (Seita, 2010). Krvetvorba je velice složitý a komplexně řízený proces, který je výsledkem působení cytokinů, hormonů, růstových faktorů a řady buněčných interakcí, na kterých se podílejí vlastní krvetvorné buňky spolu se stromatem kostní dřeně. Krvetvorba probíhá tak, že z HKB vznikají po celé řadě dělení a vývojových stadií terminální diferencované buňky. Tyto buňky jsou běžně přítomny v periferní krvi, ve které poté plní své funkce.

1.1.1 Objev kmenové buňky

Objev kmenových buněk byl výsledkem dlouhodobého výzkumu a postupného vývoje v oblasti buněčné biologie a hematologie. Historicky je spojen s vývojem mikroskopie a technik pro pozorování mikroskopických objektů.

Již starověcí Římané zkoumali schopnost skla zvětšovat předměty (Méndez, 2016). Všimli si, že sklo s tlustým středem a tenkými okraji způsobilo, že předměty vypadaly větší. Postupně se vyvinuly nástroje jako je ruční lupa a čočky. Jejich převládající funkcí bylo poskytnout hrubé zvětšení při detailních úkonech například ve šperkařství, hodinářství, posuzování vláken v textiliích či pozorování malých předmětů. V 16. století bratři Zacharias a Hans Jansenovi začali experimentovat s uspořádáním skleněných čoček, což vedlo k sestavení prvních mikroskopů (Méndez, 2016). Průlom v mikroskopii nastal v 17. století. Toto období je označováno jako zlatá éra mikroskopie. Díky technologickým inovacím, jako je například broušení čoček, bylo možné sestavit mikroskopy s lepším zvětšením a rozlišovací schopností (Noble, 2024). Ikonickými jmény tohoto období jsou Robert Hooke a Antoni van Leeuwenhoek. Jejich práce položila základy buněčné teorie a ukázala, že živý organismus je složen z buněk. Během tohoto období byla publikována řada klíčových děl. Jedním z nich je i *Micrographia* z roku 1665, jejímž autorem byl Robert Hooke (Gest, 2004). Mimo jiné v knize popisuje svá pozorování pod mikroskopem a zavedl termín buňka ve vědeckém kontextu. Antoni van Leeuwenhoek je považován za průkopníka v mikrobiologii díky objevu mikroorganismů. Jako první také pozoroval a popsal krevní buňky, což přispělo k pochopení složení a funkce krve. Významným dílem jsou jeho dopisy Královské společnosti (Gest, 2004). Založení vědeckých společností pak poskytlo možnost vědcům sdílet své poznatky, vyměňovat si názory a navázat spolupráci na výzkumných projektech, což přispělo k rozvoji mikroskopie v 17. století.

Díky pokroku v mikroskopických technikách bylo možné podrobněji studovat anatomii kostní dřevě a její funkce. Kombinace otázek z oblasti embryologie a hematopoézy vedla na konci 19. století ke vzniku konceptu kmenových buněk a za místo krvetvorby byla považována kostní dřevě (Ramalho-Santos, 2007). Definitivní důkazy o existenci KB však byly prokázány až v 60. letech 20. století. James Till a Ernest McCulloch zaměřili svou práci na senzitivitu kostní dřevě k ionizujícímu záření pro možný aplikační potenciál v léčbě rakoviny. V sérii experimentů pracovali s myším modelem, kdy po silném ozáření aplikovali myším buňky kostní dřevě (Till, 2011; Becker, 1963). Výsledkem jejich zkoumání bylo zjištění schopnosti aplikovaných buněk kostní dřevě tvořit uzliny ve slezině s koloniemi rychle proliferujících buněk s nediferencovanými a

diferencovanými buňkami krevní řady. Tyto objevy představily základní dvě kritéria definující kmenové buňky, mezi které se řadí a tím byla multipotence a sebeobnova.

1.2 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

První diskuse o použití kostní dřeně a aplikaci jejích extraktů jako léčebné procedury byly nastíněny v roce 1896 (De la Morena, 2011). Nicméně právě důsledky druhé světové války vnesly do popředí výzkum v oblasti transplantace tkání. Transfuze vyžadovaly pečlivé stanovení krevní skupiny dle systému AB0, kožní štěpy byly potřeba pro popálené oběti. Především však bylo zjištěno, že vysoké dávky radiačního záření vedou k selhání kostní dřeně a následné smrti.

V roce 1957 proběhla první úspěšná transplantace kostní dřeně pod vedením doktora Edwarda Donnalla Thomase i přes to, že se v té době o hematopoetických kmenových buňkách, transplantačních antigenech a možné imunitní reakci vědělo málo (Storb, 2012). Jednalo se o pacienta s leukémií, kterému byl darován štěp od jeho jednovaječného dvojčete. O rok později se francouzský onkolog a imunolog Georges Mathé podílel na transplantaci kostní dřeně od nepříbuzenského dárce pěti pracovníkům, kteří byli vystaveni celotělovému ozáření při nehodě jaderného reaktoru v Jugoslávii (Jansen, 2005). Po transplantaci u svých pacientů pozoroval a popsal odmítnutí štěpu hostitelem a uvažoval nad tím jako nad imunitní reakcí. Georg Mathé stejně jako Edward Thomas se nadále věnovali výzkumu ohledně možnosti transplantace jako léčebné metody hematologických onemocnění a 60. léta se vedla v duchu vývoje metod pro eradikaci nádorových buněk pomocí ozařování (Jansen, 2005; Storb, 2012). Až do začátku 70. let však byly transplantace kostní dřeně dále neúspěšné (Bortin, 1970). Pacienti podléhali infekcím nebo těžké imunitní reakci i přes to, že byla použita kostní dřeň od zdravých příslušníků rodiny. Docházelo ke komplikacím, které byly označeny jako sekundární onemocnění, což nyní známe jako reakci štěpu proti hostiteli. Předchozí studie na inbredních liniích hlodavců však nenaznačovali, že by k tak silným reakcím mělo docházet (De la Morena, 2011; Granot, 2020). Mnoho výzkumných pracovníků v té době od možnosti transplantace jako léčebné metody ustoupilo a označili individuální variabilitu jedinců jako nepřekonatelnou bariéru (Granot, 2020).

Klíčovou událostí bylo zjištění, že povrch všech buněk každého jedince je jedinečný, přičemž tento charakter je dán geny, které regulují tvorbu specifických protein-sacharidových komplexů (Cunningham, 1977). Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství v roce 1980 za své objevy získali Georg Snell, Jean Dausset a Baruj Benacerraf (The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1980). Georg Snell za objev genetických faktorů u myši, které určují možnosti transplantace tkáně z jednoho jedince na druhého a představení

konceptu H antigenů. Jean Dausset za prokázání existence H antigenů u člověka a objasnění genetických faktorů regulujících jejich tvorbu. Baruj Benacerraf za ukázání, že geny určující individuální konstituci H-antigenů ve skutečnosti regulují interakce mezi jednotlivými buňkami imunologického systému a jsou důležité pro sílu imunitní reakce. Rok 1958 se tak do historie zapsal jako důležitý milník počátků objevu HLA systému (Thorsby, 2009). Tento objev měl zásadní dopad na transplantaci kostní dřeně, která do té doby byla experimentální léčebnou metodou pro vybrané hematologické choroby. Od počátku však bylo zřejmé, že HLA systém dosahuje značného polymorfismu (Bodmer, 2023). V tomto ohledu laboratoře navázaly mezinárodní spolupráci a workshopy mezinárodního testování histokompatibility pokračují dodnes. V průběhu 20. století se rozvíjely techniky testování HLA antigenů, což umožnilo přesnější a spolehlivější vyhodnocení kompatibility mezi dárcem a příjemcem s minimalizováním rizika odmítnutí transplantátu. Dalším objevem, který byl jedním z velkých průlomů na poli transplantací a medicíny, se stal objev cyklosporinu v 70. letech 20. století. Toto imunosupresivum podpořilo úspěšnost transplantací kostní dřeně (Heusler, 2001). Další výzkumné úsilí se zaměřilo na účinné a tolerovatelné kondiční režimy celotělového ozáření. Výsledkem bylo zjištění, že celotělové ozáření v několika fázích s nižší intenzitou je šetrnější a snižuje poškození pomaleji reagujících tkání, přičemž účinek na dřeň a lymfoidní tkáně zůstává stejný (Deeg, 1981). Tradičně byly HKB pro autologní či alogenní transplantaci získávány aspirací kostní dřeně z lopaty kosti kyčelní při celkové anestezii. Koncem 80. let 20. století byla zjištěna možnost mobilizace HKB do krve pomocí růstového faktoru G-CSF (Bendall, 2014). To usnadilo i odběr HKB od dárců a stalo se to postupem času upřednostňovanou variantou odběru. V 90. letech došlo k mnoha změnám ve způsobu provádění transplantací, a to i díky pokroku v prevenci a léčbě infekčních onemocnění. Bylo zjištěno, že přípravné režimy byly příliš toxické pro starší pacienty či pacienty s více komorbiditami, což v kombinaci s tím, že většina hematologických malignit se vyskytuje u starších pacientů, bylo nežádoucí (Granot, 2020). Díky zavedení non-myeloablativních a přípravných režimů s nižší intenzitou byl v 21. století zaznamenán značný nárůst alogenních transplantací. Vyšla také najevo možnost příznivého účinku reakce štěpu proti nádoru, kdy dárcovské T lymfocyty mohou být prospěšné v odstranění reziduálních maligních buněk (Storb, 2012). Do popředí nyní vstupuje léčba pomocí CAR T-buněčné terapie, kdy jsou pacientovi odebrány T-lymfocyty, které jsou následně geneticky modifikovány tak, aby na svém povrchu exprimovaly chimérický antigenový receptor (CAR). Po zpětné infuzi upravené a aktivované T-lymfocyt reagují na specifický antigen přítomný na povrchu nádorových buněk (Maus, 2016). Tato léčba je nyní dostupná už i pro pacienty Fakultní

nemocnice Olomouc (FNOL). Díky nově dostupným léčivům bylo dosaženo pokroku v prevenci reakce štěpu proti hostiteli. Rozšířila se tak možnost transplantace mezi haploidentickými příbuznými (Granot, 2020).

Pravděpodobnost, že se sourozenci budou shodovat v HLA genech je 1:4 neboli 25 %. S rostoucí možností indikace transplantace kostní dřeně jako léčebného zákroku bylo třeba rozšířit okruh možných dárců dále než jen na HLA kompatibilní členy rodiny. Začaly se tedy na bázi dobrovolnosti zakládat registry dárců kostní dřeně a byla tak rozšířena možnost alogenní transplantace (Kharya, 2021). V České Republice existují dva registry, a to Český registr dárců krvetvorných buněk (ČRDKB) a Český národní registr dárců dřeně (ČNRDD), které kooperují na principu mezinárodní spolupráce. Dle výroční zprávy ČNRDD byl k 31.12.2022 počet aktivních dárců v registru 112 247 a bylo provedeno celkem 60 odběrů (ČNRDD, 2022). Zároveň od roku 2015 byla rozšířena hloubka typizace nově zařazených dárců na kompletní high-resolution typizaci 6 lokusů HLA -A,-B,-C,-DR,-DQ,-DP metodou sekvenování nové generace. Z výroční zprávy Českého registru dárců krvetvorných buněk z roku 2023 vyplývá, že počet aktivních dárců je zde 38 174 a bylo provedeno celkem 18 odběrů (ČRDKB, 2023). Registry dárců se staly nadějí pro pacienty a umožnily hledání nepříbuzného dárce napříč etniky a zeměmi.

Transplantace HKB se stala jednou z optimálních možností pro širokou škálu životohrožujících hematologických, onkologických, imunologických či genetických poruch. Pojí se s tím však i otázky etického a právního charakteru. Odstartovala totiž nová éra regenerativní medicíny s příslibem zlepšení péče o lidské zdraví znovuoobením funkčnosti buněk, tkání, orgánů, které jsou poškozené v důsledku nemoci nebo zranění s použitím kmenových buněk či jejich produktů (Kharya, 2021). Ne vždy je však odebrané množství HKB dostatečné, a z toho důvodu jsou již v dnešní době vyvíjeny techniky pro možnost expanze HKB ex vivo (Bastani, 2023). Co se týče transplantace HKB, jsou zde stále oblasti, ve kterých je třeba učinit pokrok (Akram, 2024; Granot, 2020; Feliciano, 2023). Patří mezi ně vzájemně související problémy, jako například toxicita přípravného režimu, relaps onemocnění, chronická reakce štěpu proti hostiteli v pozdějších fázích po transplantaci, poruchy funkce orgánů a další. I přes značný pokrok v této oblasti je transplantace HKB stále spojena s řadou komplikací a vedlejších účinků. Důležité je i neustálé hledání a rozšiřování registrů dárců krvetvorných buněk. Znevýhodnění jsou v tomto směru pacienti z etnických menšin či s genetickými specifiky, pro které je šance najít vhodného dárce omezená. I když je transplantace HKB nyní běžně dostupnou léčebnou terapií, v mnoha rozvojových zemích je přístup k této léčbě značně omezen.

1.3 Marker CD34

V roce 1984 byla vytvořena myší monoklonální protilátka, která se vážala na buňky nezralé myeloidní linie KG-1. Zároveň zde byla pozorována nereaktivita se zralými granulocyty (Civin, 1984). Takto byl tedy poprvé objeven znak CD34 a byla nastíněna možnost využití této protilátky pro identifikaci a purifikaci HKB z kostní dřeně. Tento marker se rychle dostal do popředí na poli základního výzkumu a klinické transplantace a do dnešní doby je široce využíván jako marker pro identifikaci, stanovení počtu a izolaci HKB. Mimo to byl tento marker identifikován i u některých typů buněk nehematopoetického původu. Například byla pozorována jeho exprese na endoteliálních prekurzorech především u kapilár či na progenitorech fibroblastů, které se podílejí na tvorbě pojivové tkáně (Fina, 1990; Brown, 1991). Některé studie potvrzují přítomnost markeru CD 34 na povrchu rakovinných kmenových buněk, což může interferovat s konvenční léčbou (Kapoor, 2020; Dawood, 2014). Na tuto skutečnost je třeba brát ohled v klinických aplikacích.

Existuje několik různých transmembránových proteinů, které patří do rodiny CD 34. Mezi tři nejvíce významné patří CD 34 hematopoetický antigen, endoglykan a podocalyxin (Nielsen, 2008). Jejich velikost se pohybuje od 90 do 170 kDa. Tyto proteiny jsou si navzájem strukturně podobné a jako podrodina patří do rodiny sialomucinů. Zdá se, že hrají důležitou roli v různých buněčných procesech a ukazuje se jejich zapojení do procesů jako je adheze, migrace, transdukce signálů, zvýšení proliferace progenitorových buněk, ale i udržení jejich fenotypu. Gen pro CD34 se nachází na chromozomu 1q32, což je zároveň oblast obsahující geny kódující molekuly vážající se na adhezivní matrix a komplementovou kaskádu. Genetická kolokalizace naznačuje potenciální součinnou expresi a tím i možné funkční propojení (Lanza, 2001). Nicméně kompletní funkce CD 34 prozatím není známá (Radu, 2023).

Antigen CD 34 je vysoce glykosilovaná mucinu podobná struktura a díky tomu existují různé epitopy této molekuly, které mohou být specificky rozpoznány řadou protilátek. Některé z nich jsou i přímo závislé na přítomnosti glykosilace či sialové kyseliny na epitopu. Na základě citlivosti antigenu CD 34 k degradaci enzymy neuramidasa z bakterie *Vibrio cholerae* a O-sialo-glycoproteasa z bakterie *Pasteurella haemolytica* byly epitopy spolu s protilátkami rozřazeny do tří tříd (Sutherland, 1992). Epitopy, které byly senzitivní k enzymatické degradaci oběma enzymy a tudíž i protilátky, které je identifikovaly, byly zařazeny do I. třídy epitopů. Protilátky s epitopy, které byly rezistentní k enzymu neuramidasa, ale senzitivní ke štěpení enzymem O-sialo-glycoproteasa byly zařazeny do II. třídy epitopů. V této třídě se nachází i protilátka

QBEnd-10, která je předmětem testování v této práci. Protilátky s epitopy, které byly rezistentní k oběma enzymům, byly zařazeny do III. třídy epitopů. V této třídě se nachází i protilátky 581 a 4H11, které jsou předmětem testování v této práci. Tento systém klasifikace byl vyvinut, aby pomohl s výběrem vhodné monoklonální protilátky pro výzkumný účel či klinickou aplikaci. Většina monoklonálních protilátek byla generována imunizací myši s využitím buněčné linie KG1 (Civin, 1984). Nicméně protilátka QBEnd-10 byla získána imunizací pomocí endoteliálních buněk (Fina, 1990).

Vzhledem k tomu, že antigen CD 34 je v hemapoetickém systému exprimován pouze na progenitorových buňkách a ne na zralých krevních buňkách, tak může být považován za marker HKB. Důležité však bylo i zjištění, jaká je distribuce epitopů I., II. a III. třídy markeru CD34 napříč maturačními stádii HKB. To by totiž mohlo ovlivnit i volbu protilátek používaných k detekci HKB. Vzorky kostní dřeně, buňky separátu z periferní krve a pupečnicková krev byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie z hlediska exprese epitopů I., II. a III. třídy (Steen, 1996; Steen, 1998). Výsledkem analýzy bylo zjištění, že některé CD 34+ buňky postrádají expresi epitopů I. a II. třídy, zatímco epitop III. třídy byl stabilně exprimován u všech CD 34+ buněk. Na základě toho byly diskutovány důvody rozdílné exprese jednotlivých epitopů na povrchu HKB. V úvahu byla vzata i jejich možná enzymatická degradace v průběhu maturace. Funkční význam však není doposud odhalen. Stanovení přesného počtu CD 34+ buněk je prioritou pro transplantaci. Na základě tohoto zjištění by měly být pro kvantifikaci a selekci CD 34+ buněk zvoleny protilátky spadající do III. třídy. Při použití protilátek z I. a II. třídy by mohlo dojít v průběhu analýzy ke ztrátě určité podskupiny CD 34+ buněk, což by mohlo prodloužit čas obnovy krvetvorby po transplantaci.

1.4 Marker CD45

Antigen CD45 známý také jako společný leukocytární antigen je transmembránový glykoproteinový receptor z rodiny tyrosin phosphatas o velikosti 180-220 kDa (Rheinländer, 2018). Antigen CD45 hraje životně důležitou roli v proliferaci, diferenciaci HKB, regulaci signálních drah a aktivaci imunitních buněk. Je všudypřítomně exprimovaný na povrchu všech jaderných hematopoetických buněk a jejich prekurzorech, kromě vyžralých erytrocytů a destiček. Tento receptor je exprimován v poměrně vysokém zastoupení a tvoří 5-10 % všech glykoproteinů na povrchu lymfocytů.

Gen kódující tyrosin phosphatasový receptor typu C neboli znak CD45 se skládá z 35 exonů, z čehož čtyři z nich podléhají alternativnímu mRNA splicingu (Hall, 1988). Tyto exony kódují sekvenci přibližně o délce 200 aminokyselin v blízkosti extracelulárního N-konce. Transmembránová a intracelulární doména pak zůstává

identická. I když je extracelulární doména variabilní, z evolučního hlediska se jedná o vysoce konzervativní proteinovou strukturu typu I. To znamená, že tento protein prochází membránou pouze jednou a C-konec je na vnitřní straně membrány.

Isoformy mají různou schopnost translokace do membránových domén. Jejich exprese se liší napříč buněčnými typy a odráží i maturační stádium buněk (Al Barashdi, 2021). V praktické části této práce pro potřeby experimentu bylo tedy důležité využít takovou protilátku anti CD45, která bude schopná identifikovat a vázat se na všechny isoformy receptoru.

1.5 Stanovení počtu CD34+ buněk

Stanovení počtu CD 34+ buněk v buněčné suspenzi je důležitou informací pro transplantaci HKB. Populace buněk nesoucí tento antigenní znak je po transplantaci zodpovědná za znovuosídlení kostní dřeně a obnovu krevetvorby. Kvantifikace CD 34+ buněk v periferní krvi se také používá k vhodnému načasování separace (Chapple, 2000). Metoda průtokové cytometrie v tomto směru nabídla rychlý, spolehlivý a reprodukovatelný test, který se stal zlatým standardem pro stanovení počtu CD 34+ buněk.

V rámci laboratoře průtokové cytometrie ve FNOL se absolutní počet CD 34+ buněk stanovuje výpočtem na základě tohoto vzorce:

$$\text{Absolutní počet CD34+} = \frac{\text{Počet CD 34 + buněk}}{\text{Počet CD45 + buněk}} \cdot 1000 \cdot \text{Celkový počet leukocytů}$$

Celkový počet leukocytů je údaj získaný z hematologického analyzátoru v jednotkách 10^9 na litr. Výsledná hodnota je absolutní počet CD34+ buněk v jednom mililitru. Separace se provádí, pokud je ve vzorku minimálně $100 \cdot 10^3$ buněk na mililitr. U štetu se pak následně přepočítává, jaký je dostupný počet 34+ buněk na kilogram hmotnosti příjemce, kdy minimální potřebný počet buněk je $5 \cdot 10^6$ na kilogram.

$$\text{Přepočet na hmotnost příjemce} = \frac{\left(\frac{\text{Absolutní počet CD34+ buněk v ml} \cdot V \text{ vaku}}{\text{Hmotnost příjemce}} \right)}{1000}$$

Tyto výpočty jsou provedeny v rámci laboratoře průtokové cytometrie FNOL a následně zadány do laboratorního systému.

1.5.1 ISHAGE protokol

Z počátku metoda pro stanovení počtu CD 34+ buněk nebyla standardizovaná a došlo ke generování značně odlišných dat napříč laboratořemi. Pracovní skupiny použily různé CD 34 protilátky a vyvinuly celou řadu testů (Trischmann, 1993; Kreissig, 1994;

Chen, 1994). Chyběla tedy validace těchto testů na úrovni mezilaboratorní reprodukovatelnosti, aby mohla být zhodnocena vhodnost pro širokou klinickou aplikaci. Základními předpoklady testů pro širokou klinickou aplikaci v tomto směru bylo splnění následujících kritérií (Sutherland, 1996). Jednoduchost, která by umožňovala širokou aplikovatelnost napříč laboratořemi. Vysoká senzitivita, protože se jedná o buňky s nízkým zastoupením. Přesnost a reprodukovatelnost pro poskytnutí klinicky relevantních a spolehlivých výsledků. V neposlední řadě pak rychlost pro analýzu v reálném čase.

Na začátku roku 1995 mezinárodní společnost International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) zřídila výbor, jehož úkolem bylo validovat rychlou, jednoduchou a citlivou metodu využívající průtokovou cytometrii pro stanovení počtu CD34+ buněk v periferní krvi a produktech aferézy (Sutherland, 1996). Výsledkem této práce byl ISHAGE protokol nabízející vysokou míru standardizace a minimalizace mezilaboratorní variability. Tento protokol se stal základem pro stanovení počtu CD 34+ buněk. Do opozice se však stavěl i návrh pro využití Milánského protokolu (Wunder, 1994; Johnsen, 1997; Venditti, 1999).

Pro jednoduchost aplikace a možnost širokého použití napříč laboratořemi byla detekce CD 34+ buněk založena na analýze 4 parametrů pomocí průtokové cytometrie (Sutherland, 1996). Byla použita kombinace monoklonálních protilátek anti CD45 s navázaným fluorochromem Fluoresceinisoithiocyanate (FITC) a anti CD34 s navázaným fluorochromem Phycoerythrin (PE). Dalšími dvěma parametry byly přední rozptyl forward sactter (FSC) a boční rozptyl side scatter (SSC). Právě detekce buněk s nízkým zastoupením, jako jsou HKB, zvyšuje problémy s nespécifickou vazbou protilátek na buněčné pozůstatky či mrtvé buňky, vliv autofluorescence a možnost rozlišení mezi skutečně negativními a skutečně pozitivními událostmi. V tomto směru napomáhá užití co nejvíce možných markerů, které by napomohly buňky charakterizovat. Rozšíření testu o další parametry by tak bezpochyb přineslo cenné informace a jisté výhody. To bylo však v přímém rozporu s vytvořením testu pro klinické použití, u kterého musí být brán zřetel na pořizovací cenu reagensů, komplexitu a náročnost interpretace výsledku stejně tak jako na použití multiparametrové analýzy, která je odvislá od laboratorního vybavení a v té době nebyla standardem napříč klinickými laboratořemi.

Selekce vhodných protilátek pro detekci HKB byla jedním z klíčových předpokladů pro úspěšnost celého protokolu (Sutherland, 1996). Antigen CD 34 je silně glykosilovaná mucinu podobná struktura. Schopnost protilátek anti CD 34 detekovat antigen je závislá na míře glykosilace a přítomnosti sialové kyseliny na epitopu antigenu. Důležité bylo tedy vybrat komerčně dostupné protilátky schopné detekovat všechny glykosilované varianty

molekuly. Dalším zjištěním bylo, že konjugace protilátky s fluorochromem může ovlivnit schopnost avidity a reaktivity protilátek. Jako vhodný fluorochrom k detekci HKB se nabízel PE díky jeho jasnosti, která je výhodou v detekci buněk s nízkým zastoupením. Důležitá tedy není jen selekce vhodného klonu protilátky, ale i výběr klonu, u kterého zůstala zachovaná silná avidita po konjugaci protilátky s fluorochromem. Monoklonální protilátka anti CD 45 se používá pro značení leukocytární populace a v kombinaci s protilátkou anti CD 34 pro poskytnutí doplňkového parametru k detekci populace CD 34+ buněk. Znak podléhá alternativnímu splicingu, a proto bylo důležité použít takovou protilátku anti CD 45, která bude schopná identifikovat a vázat se na všechny isoformy receptoru.

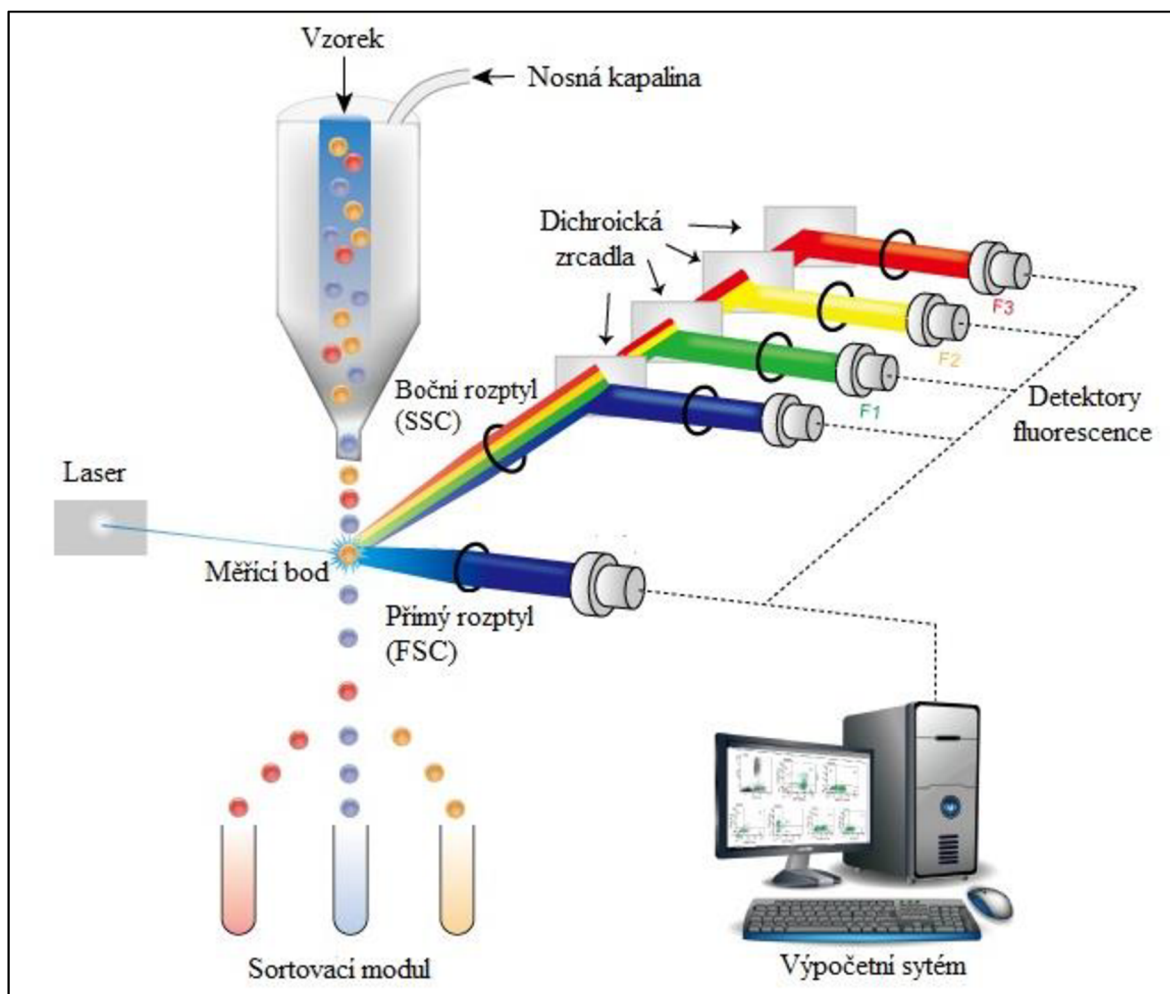
V průběhu let došlo k modifikacím a rozšíření tohoto protokolu a byly navrženy jeho možné úpravy. V ISHAGE protokolu z roku 1996 se absolutní počet CD 34+ buněk stanovoval výpočtem, kdy informace o počtu leukocytů byla získána z automatického hematologického analyzátoru. Jednalo se o takzvanou dual platformu. V roce 1998 byl tento protokol upraven tak, že ke vzorku byl přidán známý počet fluorescenčních částic Flow-Count (Keeney, 1998). Tato úprava převedla základní ISHAGE protokol na takzvanou single platform metodu, kterou bylo možné přímo stanovit absolutní počet CD 34+ buněk. Dále byla upravena metoda zpracování vzorku. Byla zavedena lýza chloridem amonným a pro omezení chyb vyplývajících z promývání, centrifugace a fixace byla zavedena metoda lýzy buněk bez promývání a fixace. Přidáno bylo i fluorescenční barvivo 7-amino actinomycin D (7-AAD) pro stanovení životaschopnosti buněk. Tyto úpravy zlepšily přesnost a senzitivitu původní ISHAGE metody a umožnily přímo stanovit absolutní počet viabilních CD 34+ buněk ve vzorku (Keeney, 1998).

1.6 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní bioanalytická metoda zabývající se analýzou fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých částic (Shapiro, 2003). Těmito částicemi jsou nejčastěji buňky živočišného či rostlinného původu. Lze však analyzovat i mnohem menší částice, jako jsou například buněčné organely, virové částice, jednotlivé molekuly proteinů a nukleové kyseliny. Cílem je zjištění jejich počtu, velikosti, denzity vnitřního obsahu a individuálních vlastností. V klinické praxi je nejčastějším materiálem krev, produkty aferézy, aspirát kostní dřeně, suspenze buněk připravená z tkání nebo buněčné kultury. Pro analýzu je nutné, aby se vzorek nacházel v suspenzi. Pro dosažení relevantních výsledků by analyzovaná suspenze měla obsahovat okolo 10^5 - 10^6 částic.

Základními komponentami průtokového cytometru je systém fluidiky, optický systém, výpočetní systém a může být zařazen i sortovací modul (Shapiro, 2003; Cibiček, 2014). Vzorek je nasán a pomocí systému fluidiky unášen nosnou kapalinou do měřicí cely. Díky hydrodynamické fokusaci se vytvoří takzvané koaxiální proudění vzorku a nosné kapaliny. Vzorek pak prochází kónicky zúženou sekci a tím je zajištěno, že měřicím bodem projde vždy jedna částice. To je důležité, protože průtoková cytometrie je metoda založená právě na analýze vlastností jednotlivých částic. V měřicím bodě dochází k interakci částic s monochromatickým světlem a rozptylu světla. Nejčastějším zdrojem světla bývají lasery či UV lampa. Výsledný signál je pomocí optických cest veden k detektorům. Rozptýlené světlo dopadající na detektor v rovině procházejícího světla se nazývá přímý rozptyl neboli forward scatter. Jeho velikost odpovídá povrchu analyzované částice. Rozptýlené světlo dopadající na detektor umístěný kolmo na osu dopadajícího paprsku se nazývá boční rozptyl neboli side scatter. Jeho velikost v sobě odráží vnitřní strukturu a granularitu částice. Pokud je částice značena protilátkou s navázaným fluorochromem či fluorescenčním barvivem, po ozáření světlem příslušné vlnové délky dochází k excitaci fluorochromu a následné emisi záření o vyšší vlnové délce. Všechny tyto získané signály jsou následně převáděny na elektrické impulzy a pomocí počítačového softwaru zpracovány.

Předností průtokové cytometrie je možnost získání detailních informací o každé jednotlivé buňce v krátkém časovém úseku na velkém počtu buněk (Shapiro, 2003). Je to metoda s širokým aplikačním potenciálem v různých oblastech biologie, medicíny a výzkumu. Umožňuje studium základních biologických procesů, diagnostiku nemocí a přispívá k vývoji terapeutických strategií. V klinických laboratořích můžeme najít její uplatnění v hemato-onkologii, imunologii, ale i v molekulární biologii. Dalšími speciálními variantami je například spekrální, obrazová či hmotnostní cytometrie, které rozšiřují analytické možnosti této metody.



Obr. 1 Schéma zobrazující základní komponenty průtokového cytometru. Převzato a upraveno dle: <https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm> (Flow Cytometry Guide, 2024)

1.6.1 Titrace protilátek

Po zjištění co nejvíce možných informací o vlastnostech cílové populace buněk, návržení vícebarevného panelu, zajištění buněk a potřebných reagentů může začít proces optimalizace panelu. Titrace protilátek je jedním z podstatných kroků v tomto procesu. Aby bylo možné provádět přesná měření fluorescence a identifikovat buněčné populace, je potřebné maximalizovat signál a co nejvíce snížit šum (Shapiro, 2003). Vlastní šum systému je nevyhnutelný stejně tak jako autofluorescence buněk. Možné je ale ovlivnit práci se vzorkem a nastavení experimentálních podmínek.

Značené protilátky se váží s vysokou afinitou na epitopy, vůči kterým jsou cíleně vyprodukovány (Bushnell, 2015). Pokud by ke vzorku bylo přidáno nadměrné množství protilátky a primární cíle by byly obsazeny, přebytečná protilátka se začne vázat na cíle s nízkou afinitou, a tak může docházet k nescifické vazbě protilátek. Důsledkem je zvýšení fluorescence pozadí a s tím související snížení schopnosti rozlišit jednotlivé populace. Dalším faktorem, na který je potřeba brát zřetel při plánování experimentu, je hustota zastoupení cílového antigenu či molekul, které buňka nese. Jedná se zde o přidání

adekvátního množství protilátky. Při nedostatku protilátky nemusí dojít k označení všech buněk s daným fenotypem. To by vedlo k podhodnocení počtu cílových buněk a falešně negativním výsledkům. Dále může dojít ke snížení intenzity fluorescence populace cílových buněk. Následkem by byl pokles citlivosti detekce a zvýšení poměru signálu k šumu, kdy fluorescenční signály jsou slabší.

Titrace se tedy používá k optimalizaci značení v průtokové cytometrii (Bushnell, 2015). Titrační experiment by měl probíhat v souladu se zvolenými experimentálními podmínkami (typ buněk a jejich počet, inkubační doba a teplota při které probíhá). Je dobrou praxí přidat i barvivo pro životaschopnost při titraci protilátek, protože mrtvé buňky mohou protilátky vázat nespecificky, což by mohlo ztížit interpretaci výsledku. Stejně tak je dobré při analýze vzorku vyloučit dublety.

Buňky se barví v sérii ředění protilátky. (Bushnell, 2015) K určení nejvhodnější koncentrace je možné z naměřených výsledků vypočítat staining index neboli index barvení. Tento termín označuje míru rozdílu mezi intenzitou fluorescence pozitivně značených buněk a intenzitou fluorescence negativních kontrolních buněk. Následuje sestavení titrační křivky závislosti koncentrace protilátky na indexu barvení. Cílem je zjistit ředění protilátky, které poskytuje nejjasnější intenzitu fluorescence s minimálním pozadím.

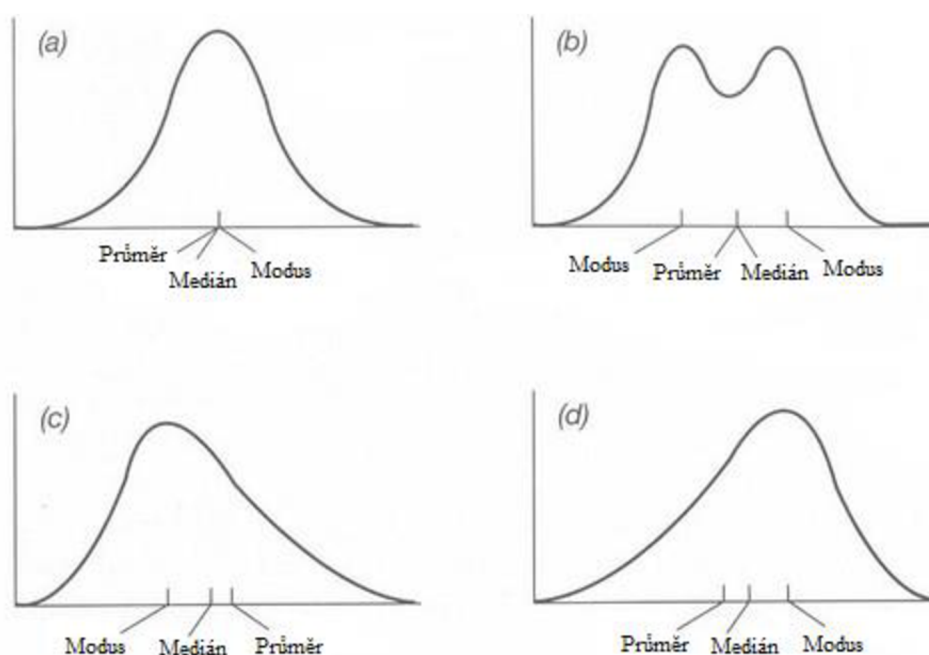
Používat protilátky ve správné koncentraci je tedy důležité. U komerčně dostupných protilátek je v datovém listu uvedeno doporučené ředění protilátky, což může posloužit jako dobrý výchozí orientační bod. Doporučená koncentrace však nemusí reflektovat specifické experimentální podmínky. Optimální koncentrace bývá často nižší než doporučovaná. Titrace protilátek tedy nejen zlepšuje značení buněk, ale může i ušetřit peníze z laboratorního rozpočtu určeného k nákupu reagentů.

1.6.2 Medián fluorescenční intenzity

Pomocí průtokové cytometrie jsou analyzovány buňky interagující se světelným paprskem (Shapiro, 2003). Všechny tyto získané signály jsou následně převáděny na elektrické impulzy a pomocí počítačového softwaru zpracovány. Výsledkem měření jsou data, která je následně třeba analyzovat, statisticky zpracovat a interpretovat. K zobrazení dat jsou používány různé grafické záznamy. To usnadňuje jejich vizuální analýzu a celkové posouzení datového rozložení. Vizuální analýza dat je v průtokové cytometrii prvním a klíčovým krokem. Pokud jde o FSC a SSC jsou hodnoty na osách vyjádřeny v relativních jednotkách a poskytují informace velikosti buněk a denzity vnitřního obsahu. Dále můžeme sledovat fluorescenci, která je na osách x a y zobrazena v jednotkách intenzity fluorescence. Hodnoty mohou být zobrazeny v lineární nebo logaritmické škále. V průtokové cytometrii se logaritmické měřítko často používá pro zobrazení rozsahu

fluorescenční intenzity, protože umožňuje efektivně zobrazit široký dynamický rozsah signálu od slabých hodnot po silné. Pro další zpracování je však potřeba data vhodně zredukovat tak, aby byla usnadněna jejich interpretace. Důležité je, aby z naměřených dat vyvstaly podstatné a relevantní informace.

Z dat se tedy dále počítají různé číselné charakteristiky, takzvané popisné statistiky, které zachycují různé aspekty dat (Hron, 2013). Jedná se především o charakteristiky míry centrální tendence a rozptýlenosti dat. Míry centrální tendence se snaží charakterizovat typickou hodnotu z naměřených dat. Určují, kde se na číselné ose tato hodnota nachází a kolem jaké hodnoty se data centrují. Patří mezi ně aritmetický průměr, medián a modus. Jejich podstatu můžeme vidět při bližším zaměření se na distribuci naměřených dat v porovnání s aritmetickým průměrem a modem viz obr. 2. Výhodou mediánu je to, že není tak citlivý na odlehlé hodnoty jako aritmetický průměr. Náhodně proměnlivá data však nestačí charakterizovat pouze střední hodnotou. Data se stejnou střední hodnotou mohou mít totiž různou rozptýlenost. K hodnocení míry rozptýlenosti je možné použít variační rozpětí, rozptyl, směrodatnou odchylku, variační koeficient či empirický kvantil. Jako další charakteristiky se mohou použít míry špičatosti a šikmosti. Na základě těchto informací lze porovnat, jak se rozložení dat podobá normální Gaussově křivce.



Obr. 2 Schéma zobrazující příklad určení mediánu, modu a aritmetického průměru v závislosti na rozložení dat u grafů a-d. Převzato a upraveno podle knihy Biostatistical Analysis (Zar, 1999)

Při grafickém zobrazení naměřených dat můžeme vidět, že buňky na základě své velikosti a denzity vnitřního obsahu tvoří pomyslné shluky buněk, které představují jednotlivé populace (Cibiček, 2014). V základním scattergramu FSC/SSC můžeme vizuálně odlišit populaci lymfocytů, monocytů a granulocytů. Intenzita fluorescence

poskytuje informaci o hladině exprese buněčných znaků. Na základě exprese unikátní kombinace buněčných markerů je umožněna identifikace různých buněčných populací, subpopulací a analýza jejich fenotypu. Existují barviva, která se přímo váží na DNA a díky tomu je možné identifikovat buňky v různé fázi buněčného cyklu. Analýza viability, apoptózy a nekrózy může poskytnout důležité informace o funkční aktivitě buněk. Měření fluorescenční intenzity u jednotlivých buněk v kombinaci s informacemi o rozptylu světla poskytuje řadu kvalitativních i kvantitativních informací, které mohou být využity pro studium buněčných populací a různých biologických procesů, diagnostiku onemocnění a výzkum v oblasti biologie a medicíny.

Jedním z parametrů, na základě kterého je možné naměřená data v průtokové cytometrii hodnotit, je medián fluorescenční intenzity (MFI). Medián je hodnota, jež dělí řadu vzestupně seřazených hodnot na dvě stejně početné poloviny. Jedná se tedy o střední hodnotu fluorescenčního signálu v dané populaci buněk. V závislosti na typu rozložení dat medián obvykle představuje „typickou“ událost a poskytuje tak informace o intenzitě fluorescence v rámci detekované buněčné populace. V této práci byly srovnávány jednotlivé klony protilátky anti CD 34 právě na základě MFI. Medián fluorescenční intenzity tedy představoval typickou hodnotu fluorescence u populace CD 34+ buněk a monocytů. Z těchto dat pak byla zpracována statistická analýza.

2 Experimentální část

2.1 Cíl práce

Cílem práce je prostřednictvím mediánu fluorescenční intenzity porovnat klony 581, 4H11[APG] a QBEnd-10 protilátky anti CD 34 a otestovat jejich klinické laboratorní použití. Výsledkem práce by měla být identifikace klonu s nejvhodnějšími vlastnostmi pro stanovení počtu hematopoetických kmenových buněk v dárcovském štěpu pomocí průtokové cytometrie.

3 Materiál a metodika

3.1 Biologický materiál

Vzorky byly získány odběrem HKB pomocí aferézního přístroje z periferní krve dárců pro autologní či alogenní transplantaci. Pacienti podstoupili odběr na Separační jednotce a odebraný materiál byl následně zpracován a uschován v laboratoři Tkáňové banky FNOL. Vzorky byly získávány v časovém období od listopadu 2022 do března 2024. Celkově byla provedena analýza 28 vzorků separátu HKB z periferní krve dárců. Analýza vzorků pro účely diplomové práce byla provedena v laboratoři Průtokové cytometrie v rámci Hemato-Onkologické kliniky FNOL. Pro potřeby tohoto experimentu nebylo třeba zvláštního odběru separátu HKB. Vyšetření byla provedena z materiálu získaného pro standardní analýzu dle zvyklostí pracoviště. Toto doplňující vyšetření bylo provedeno s informovaným souhlasem dárce.

3.2 Chemikálie a protilátky

Anti-Hu CD45 PerCP; Klon MEM-28; EXBIO Praha, a.s, ČR

Anti-Hu CD34 PE; Klon 581; EXBIO Praha, a.s, ČR

Anti-Hu CD34 PE; Klon 4H11[APG]; EXBIO Praha, a.s, ČR

Anti-Hu CD34 PE; Klon QBEnd-10; EXBIO Praha, a.s, ČR

RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich Corporation, Německo

Heparin Léčiva 5000 IU/ml injekční roztok, Zentiva, k. s., Praha, ČR

Lyzační roztok BD FACS lyse; Becton Dickinson, USA

BD FACS Diva™ CS&T IVD Beads; Becton-Dickinson Bioscience, USA

3.3 Přístrojové a laboratorní vybavení

Vortex Mixer 230V EU; Labnet International Incorporation, USA

Pipety s rozsahem 2 -200 µl; Eppendorf, Německo

Dávkovač Ceramus classic 1 -5 ml; Hirschmann, Německo

BD FACS Canto™ II Flow Cytometer; Becton-Dickinson Bioscience, USA

Analytický software BD FACS Diva verze 8.0; Becton-Dickinson Bioscience, USA

3.4 Příprava vzorků

Vzorky byly zpracovány metodou Lyse no wash neboli lyzí bez promytí. Do stojanu na zkumavky byly připraveny a popsány tři zkumavky dle typu daného klonu protilátky a dále jedna zkumavka na zředěný vzorek separátu HKB (5ml polystyrenové zkumavky s kulatým dnem o velikosti 12x75 mm). Nejprve bylo do každé ze tří zkumavek napipetováno 5 µl protilátky anti CD 45. Následně bylo do každé ze zkumavek přidáno 5 µl jednoho ze tří klonů protilátky anti CD 34. Vzorek separátu byl nejdříve naředěn

v poměru 1:10. Do zkumavky bylo tedy napipetováno 50 μ l separátu HKB a 500 μ l RPMI média obohaceného o Heparin. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. K protilátkám bylo do zkumavky napipetováno 50 μ l suspenze zředěného separátu HKB. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu. Vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 15 minut při laboratorní teplotě 25 °C. Po uplynutí doby inkubace byl pomocí dávkovače Ceramus classic ke vzorkům přidán 1 ml lyzačního roztoku BD FACS lyse pro odstranění případných erytrocytů. Obsah zkumavek byl opět promíchán na vortexu. Vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 20 minut při laboratorní teplotě 25 °C.

Pro určení optimální koncentrace pro daný experiment byla provedena titrace protilátek. Buňky byly barveny v sérii ředění protilátky, kdy k 50 μ l suspenze zředěného separátu HKB bylo přidáno 10, 5, 2 nebo 1 μ l klonu dané protilátky. Vzorky byly následně připraveny stejným způsobem dle přípravy vzorku a změřeny.

3.5 Analýza vzorků

Připravené vzorky byly analyzovány metodou vícebarevné průtokové cytometrie. Pomocí protilátek anti CD 45 a tří klonů protilátky anti CD 34 bylo provedeno určení a kvantifikace daných povrchových buněčných markerů. Analýza byla provedena na průtokovém cytometru BD FACS Canto™ II za použití analytického softwaru FACS Diva verze 8.0. K analýze dat bylo získáno minimálně 400 událostí CD 34 pozitivních HKB. Výsledkem bylo odečtení mediánu fluorescenční intenzity monocytů jako kontrolní negativní populace a CD 34 pozitivních HKB. Ověření pozitivity bylo provedeno pomocí mediánu fluorescenční intenzity. Získaná data dále statisticky zpracoval RNDr. Tomáš Fürst, Ph.D. za použití softwaru MATLAB verze 7.5.0.342 (R2007b) a Statistics Toolbox verze 6.1 (R2007b) s využitím Kruskal-Wallis testu.

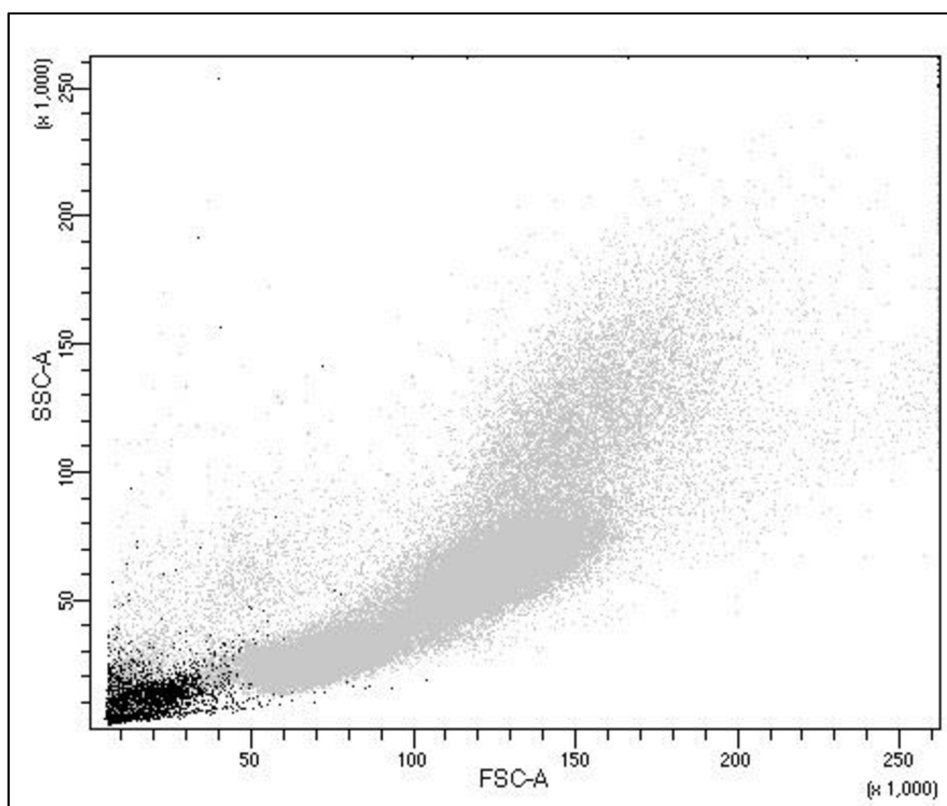
3.6 Vnitřní kontrola kvality

Průtokový cytometr BD FACS Canto™ II byl po celou dobu měření v pravidelných intervalech kalibrován. Přístroj byl kalibrován pomocí mikrosfér BD FACS Diva™ CS&T IVD Beads.

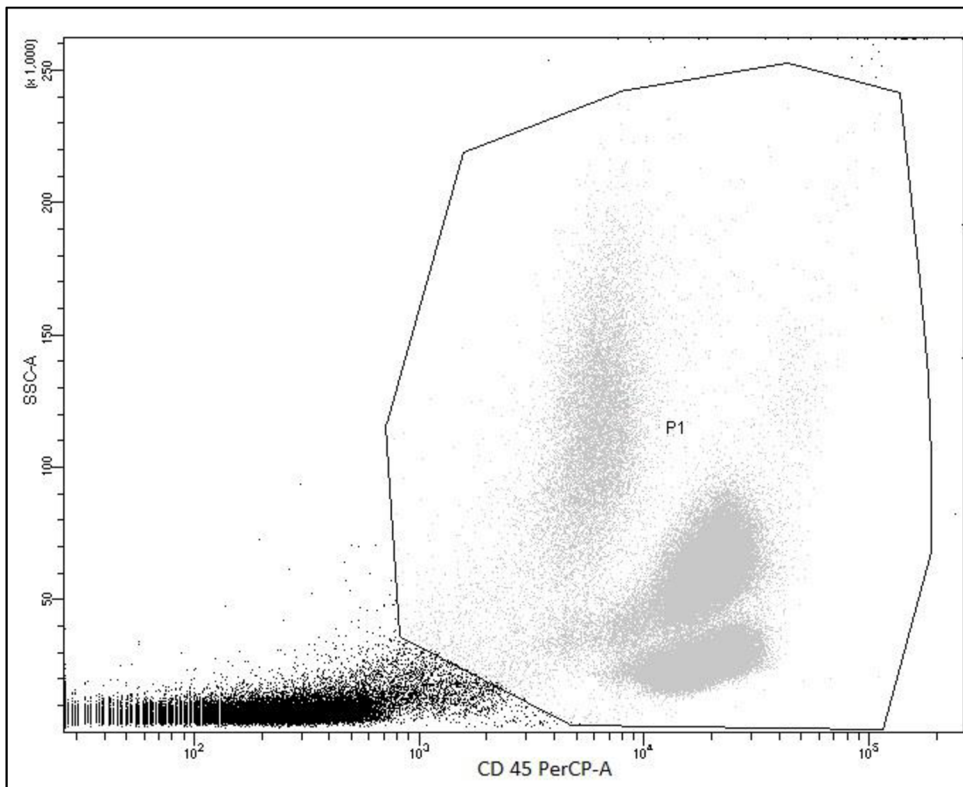
3.7 Gatovací strategie

Naměřená data byla analyzována pomocí sekvenčního gatování. Pomocí protilátky anti CD 45 byly označeny všechny buňky bílé krevní řady. Kolem těchto pozitivních buněk byl vytvořen gate P1. Buňky z gate P1 byly promítnuty do scattergramu CD 34 proti SSC. Potenciální CD 34 pozitivní buňky byly ohraničeny gatem P2. Stejně tak byla pomocí gate označena populace monocytů. Buňky z gate P2 byly promítnuty do scattergramu CD 45 proti SSC. Vyobrazené buňky tvoří shluk s charakteristicky nízkým SSC a nízkou až

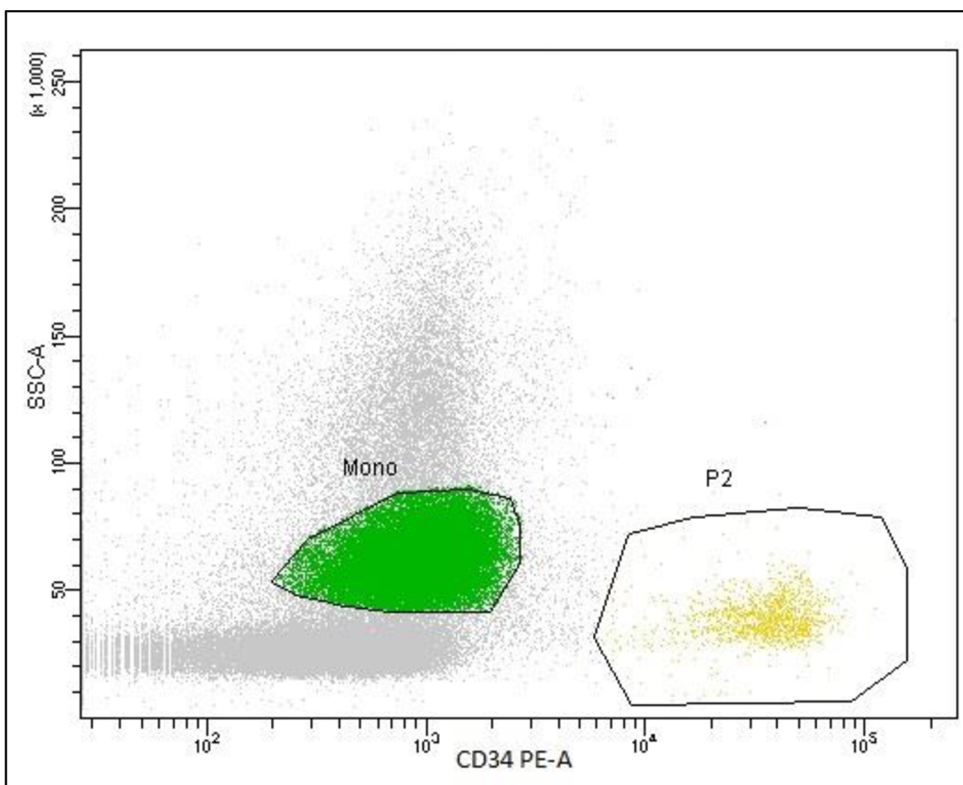
střední hodnotou fluorescence. Kolem těchto buněk byl vytvořen gate P3. Nespecificky značené události, agregáty buněk či buňky vybočující od této charakteristiky nebyly do tohoto gate zahrnuty. Buňky z gate P3 byly promítnuty do scattergramu FSC proti SSC. Buňky tvořící shluk událostí s charakteristikou mírně vyššího FSC a nízkého SSC byly ohraničeny gatem P4. Tyto buňky splňují všechny kritéria a jsou identifikovány jako cílová populace hematopoetických kmenových buněk dle protokolu ISHAGE. Následně byl vytvořen scattergram CD 34 PE proti SSC zobrazující populaci z gate P4 a populaci monocytů. Kolem těchto buněk byly vytvořeny gaty MFI Monocyty a MFI CD34+, ze kterých byla následně odečtena hodnota mediánu fluorescenční intenzity.



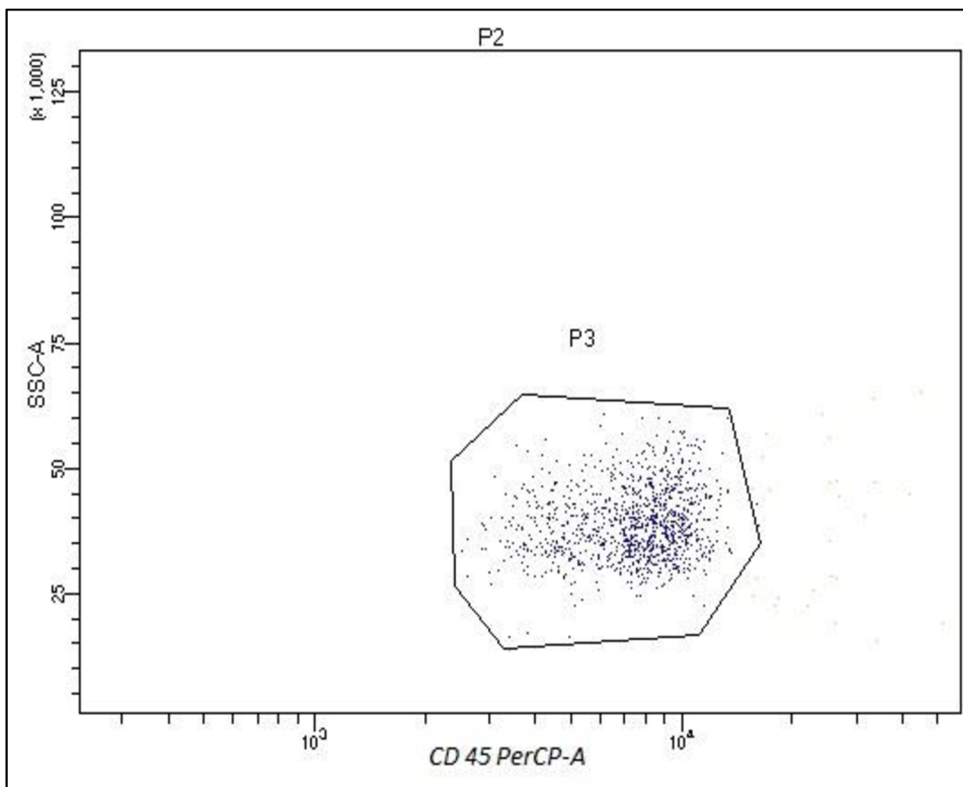
Obr. 3 Základní scattergram FSC/SSC naměřeného vzorku. Černé signály zobrazují malé částice, fragmenty buněk či jiné nečistoty označující se termínem debris neboli odpad.



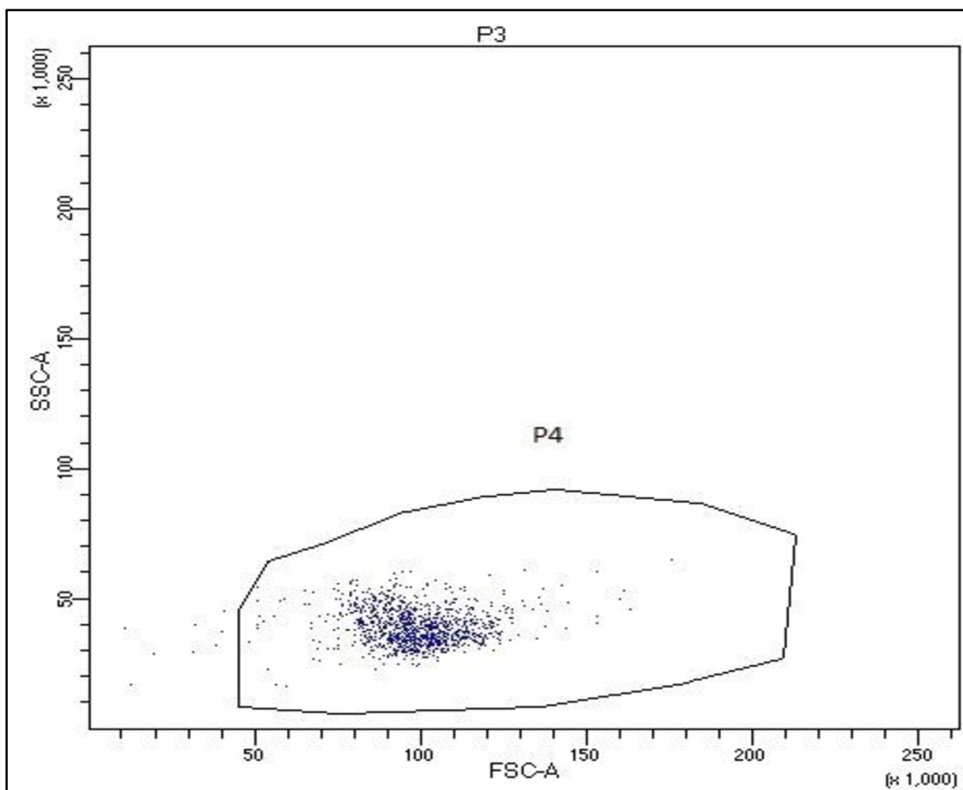
Obr. 4 Scattergram CD 45 PerCP proti SSC zobrazuje všetky naměřené události. Gate P1 ohraničuje CD 45 pozitívne buňky. Černé signály zobrazujú malé častice, fragmenty buniek či jiné nečistoty označujúce sa termínom debris neboli odpad.



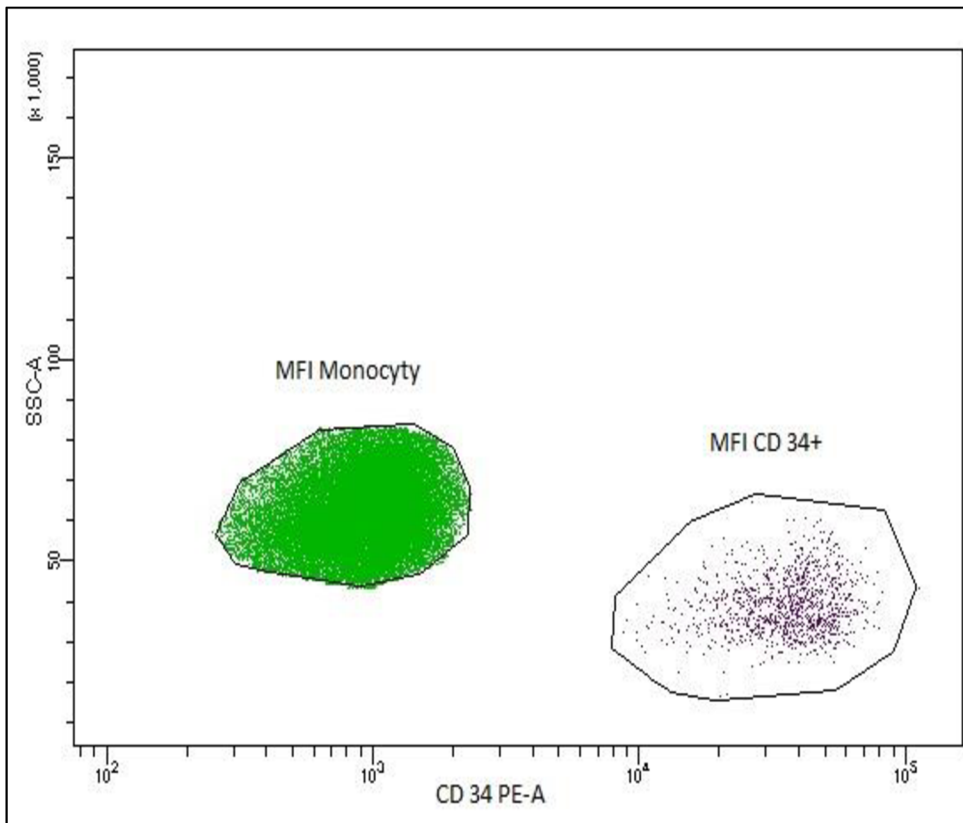
Obr. 5 Scattergram CD 34 PE proti SSC. Zelené signály odpovídají populaci monocytů na základě jejich nízké SSC charakteristiky a negativity na marker CD 34. Žluté signály značí potenciální CD 34 pozitívne buňky.



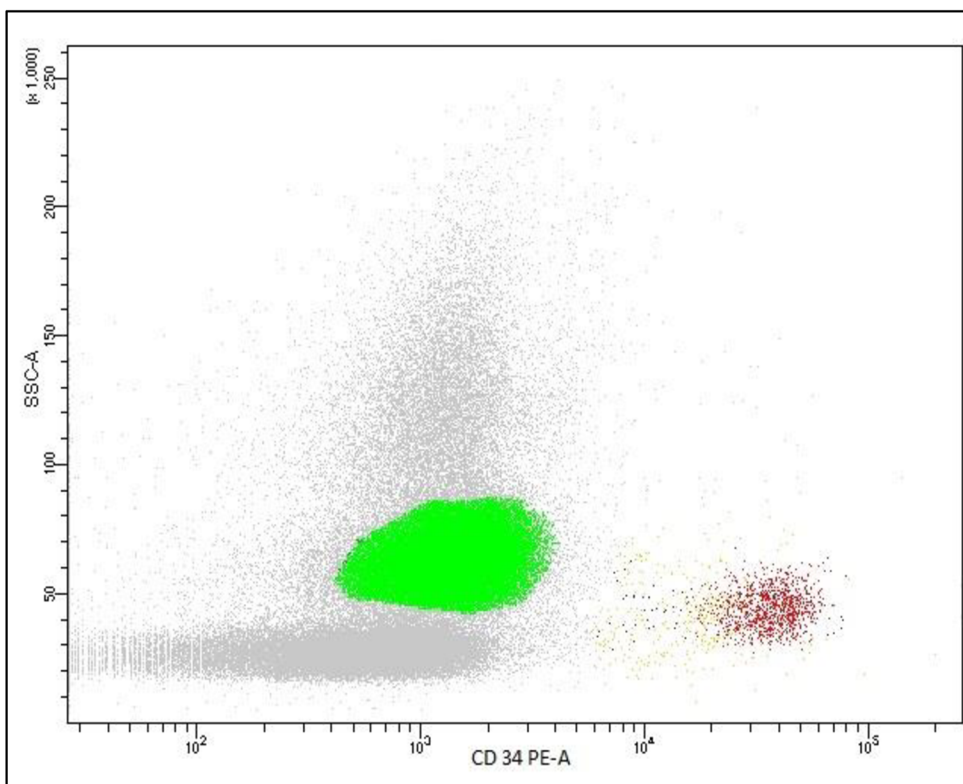
Obr. 6 Scattergram CD45 PerCP proti SSC zobrazuje buňky z gatı P2. Pomocı gatı P3 je blıže charakterizována populace s nízkým SSC a nízkou až střední hodnotou fluorescence. Nespecifický značené události, agregáty buněk či buňky vybočující od této charakteristiky nebyly do tohoto gatı zahrnuty.



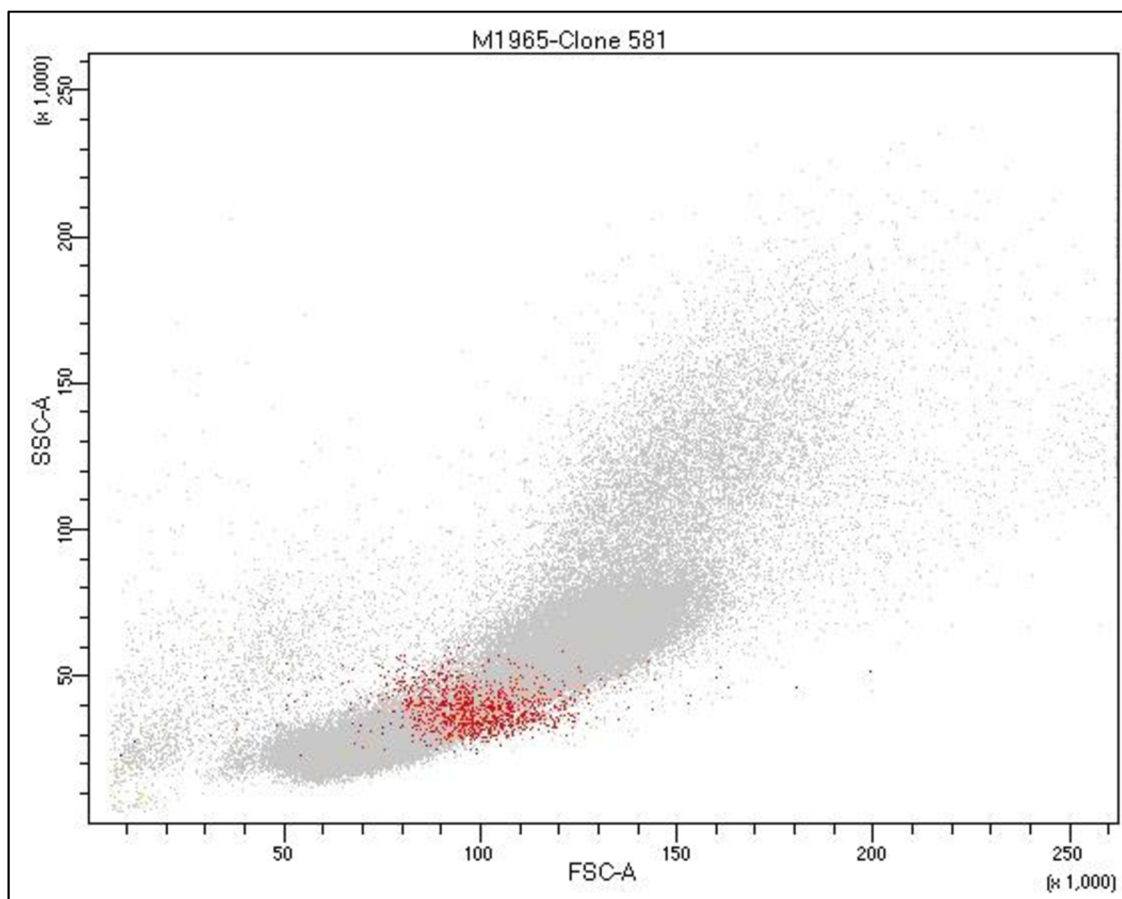
Obr. 7 Scattergram FSC proti SSC zobrazuje buňky z gatı P3. Pomocı gatı P4 je označena cílová populace hematopoetických kmenových buněk dle protokolu ISHAGE.



Obr. 8 Scattergram CD 34 PE proti SSC zobrazuje populace z gatı P4 a Monocytů. Kolem těchto buněk byly vytvořeny gaty MFI Monocyty a MFI CD 34+, ze kterých byla následně odečtena hodnota mediánu fluorescenční intenzity.



Obr. 9 Scattergram CD 34 PE proti SSC zobrazující populaci monocytů (zelené signály) a populaci CD 34+ hematopoetických kmenových buněk (červené signály).

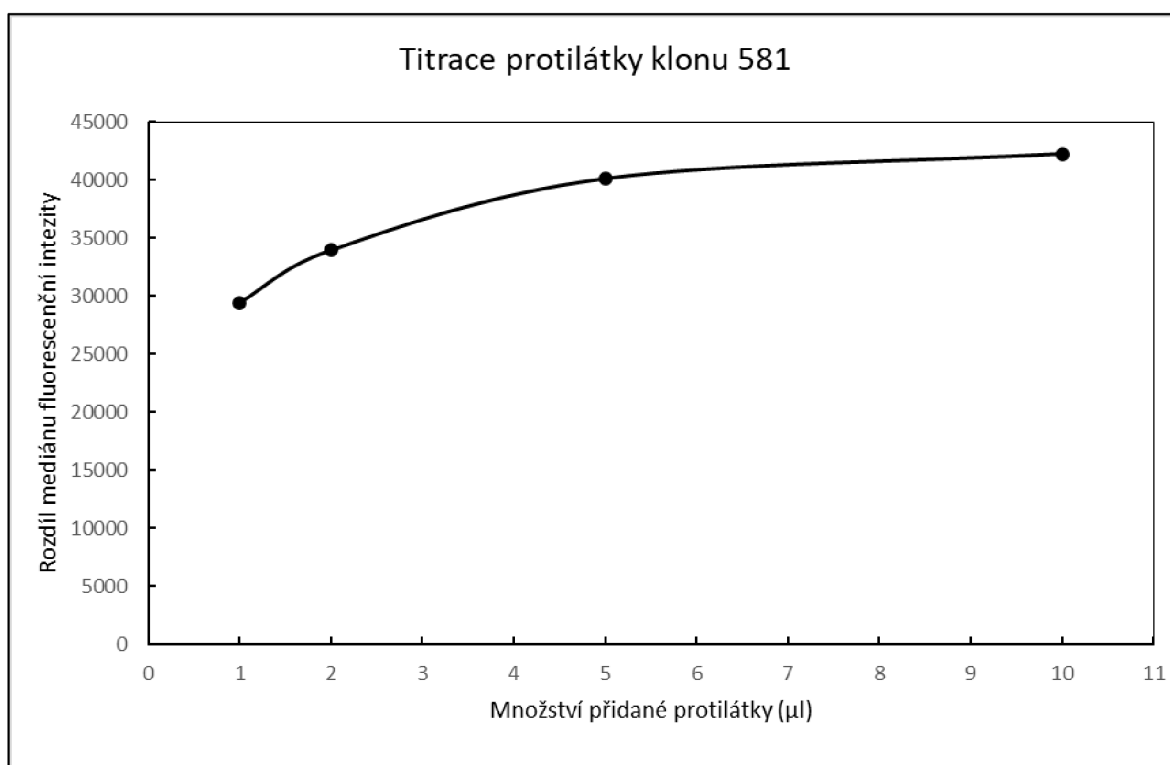


Obr. 10 Scattergram FSC proti SSC zobrazující populaci hematopoetických kmenových buněk (červené signály) na základě jejich velikosti a denzity vnitřního obsahu. Z grafu je možné pozorovat, že populace hematopoetických kmenových buněk se v základním FSC/SSC scattergramu nachází mezi lymfocyty (populace pod HKB) a monocyty (populace nad HKB).

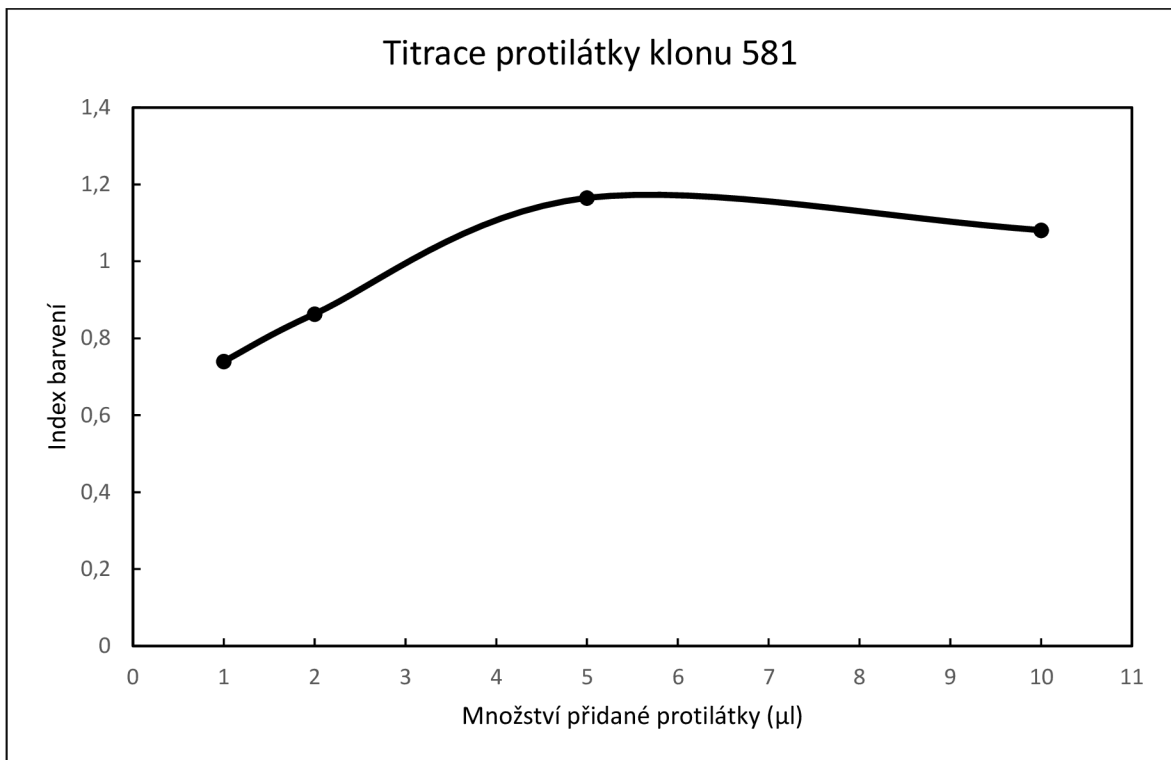
4 Výsledky

4.1 Titrace klonů protilátek

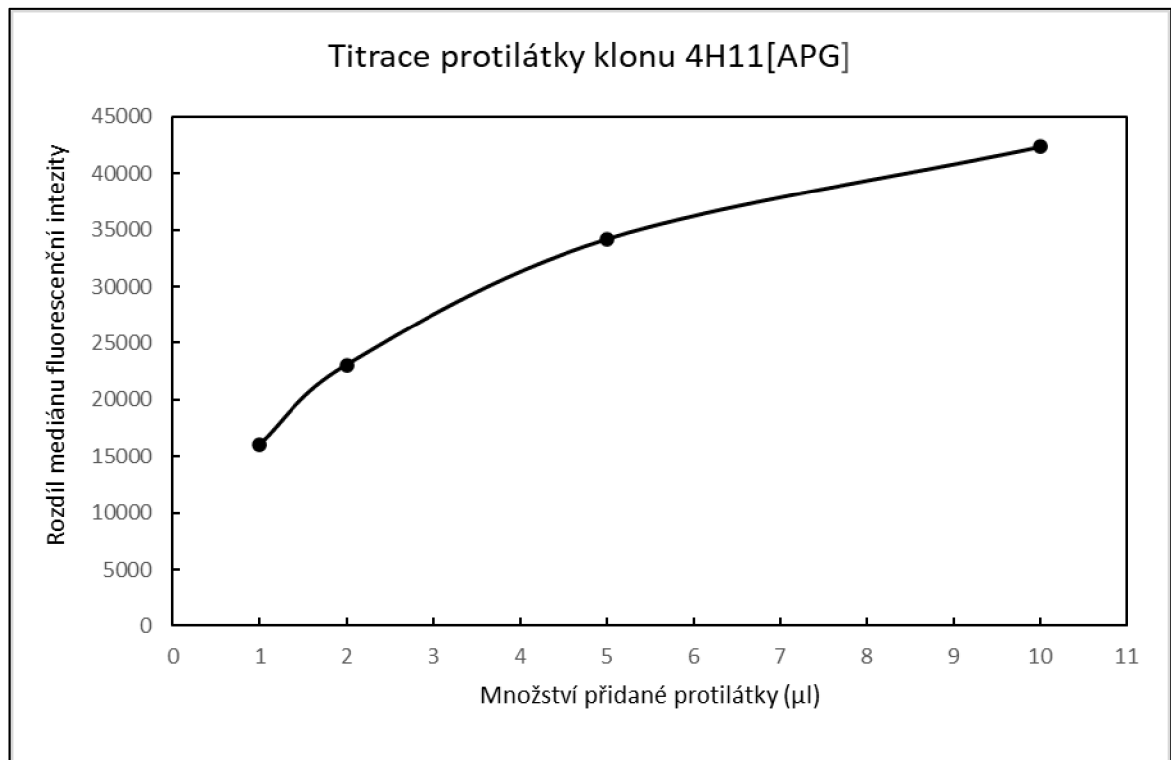
K určení nejvhodnější koncentrace byl z naměřených hodnot nejdříve vypočítán rozdíl mediánu fluorescenční intenzity pozitivních CD 34+ buněk a negativní kontrolní populace monocytů. Tato hodnota rozdílu byla následně vynesena do grafu v závislosti na přidaném množství protilátky. Následně na základě vzorce pro index barvení, který vyjadřuje míru rozdílu mezi intenzitou fluorescence pozitivně značených buněk a intenzitou fluorescence negativních kontrolních buněk s ohledem na rozptýlenost dat, byl vytvořen druhý graf. Pro populaci CD 34+ buněk byl vypočítán podíl mediánu fluorescenční intenzity a robustní standardní odchylky této populace. Stejně tak byl vypočítán podíl mediánu fluorescenční intenzity a robustní standardní odchylky populace monocytů. Následně byly tyto vypočítané hodnoty od sebe odečteny a výsledná hodnota byla vynesena do grafu v závislosti na přidaném množství protilátky. Sestavením těchto titračních křivek byla zjištěna optimální koncentrace protilátek pro daný experiment. Bylo tedy nalezeno ředění protilátky poskytující nejjasnější intenzitu fluorescence s minimálním pozadím.



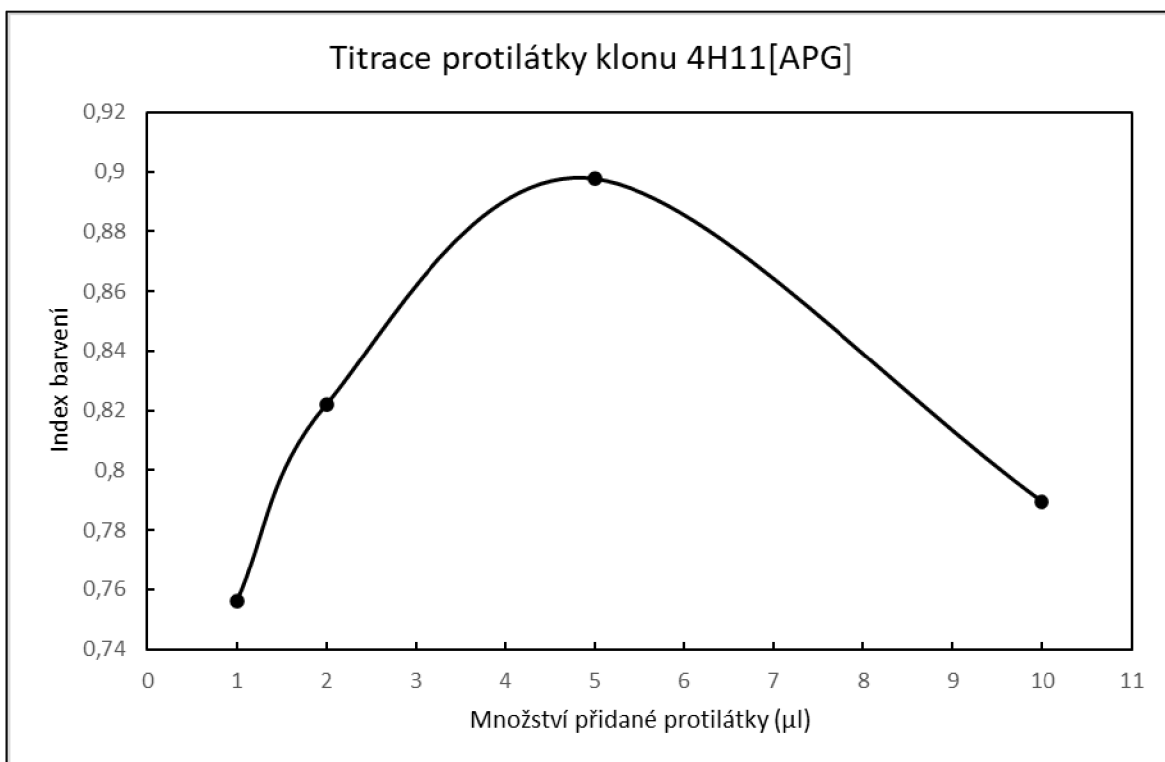
Obr. 11 Graf závislosti množství přidané protilátky anti CD 34 klonu 581 na rozdílu mediánu fluorescenční intenzity populace CD 34+ buněk a monocytů.



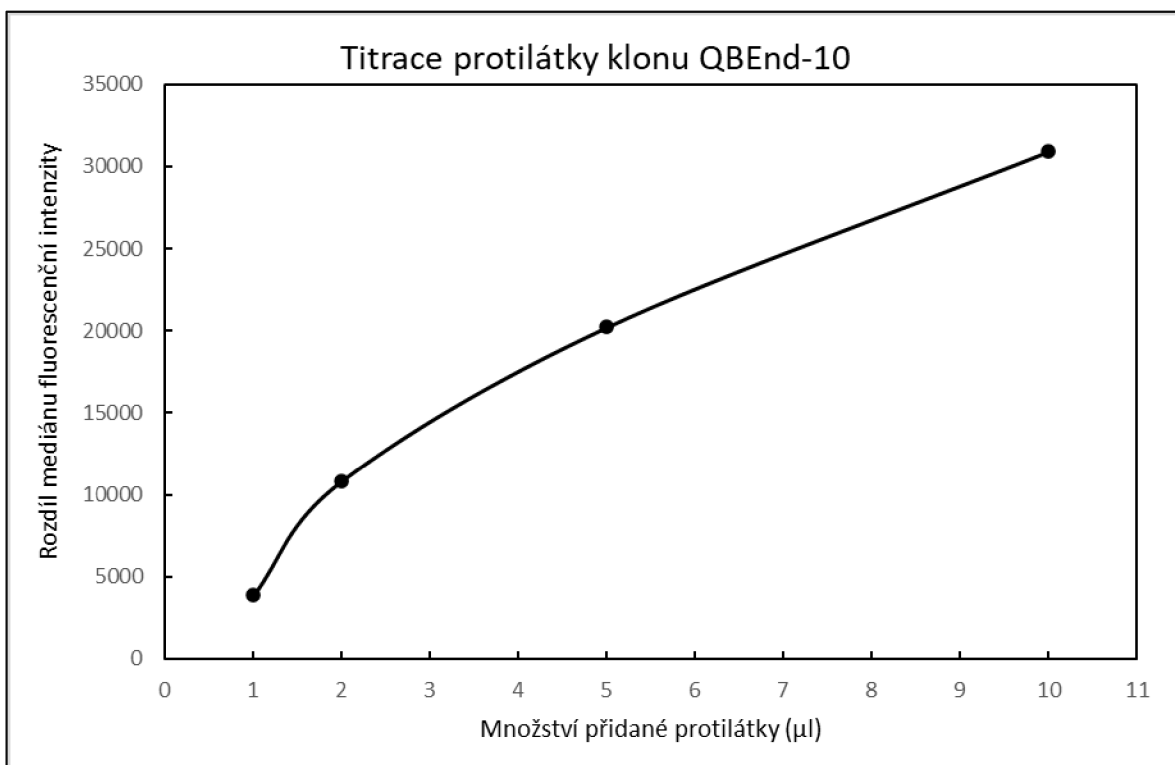
Obr. 12 Graf závislosti množství přidané protilátky anti CD 34 klonu 581 na indexu barvení.



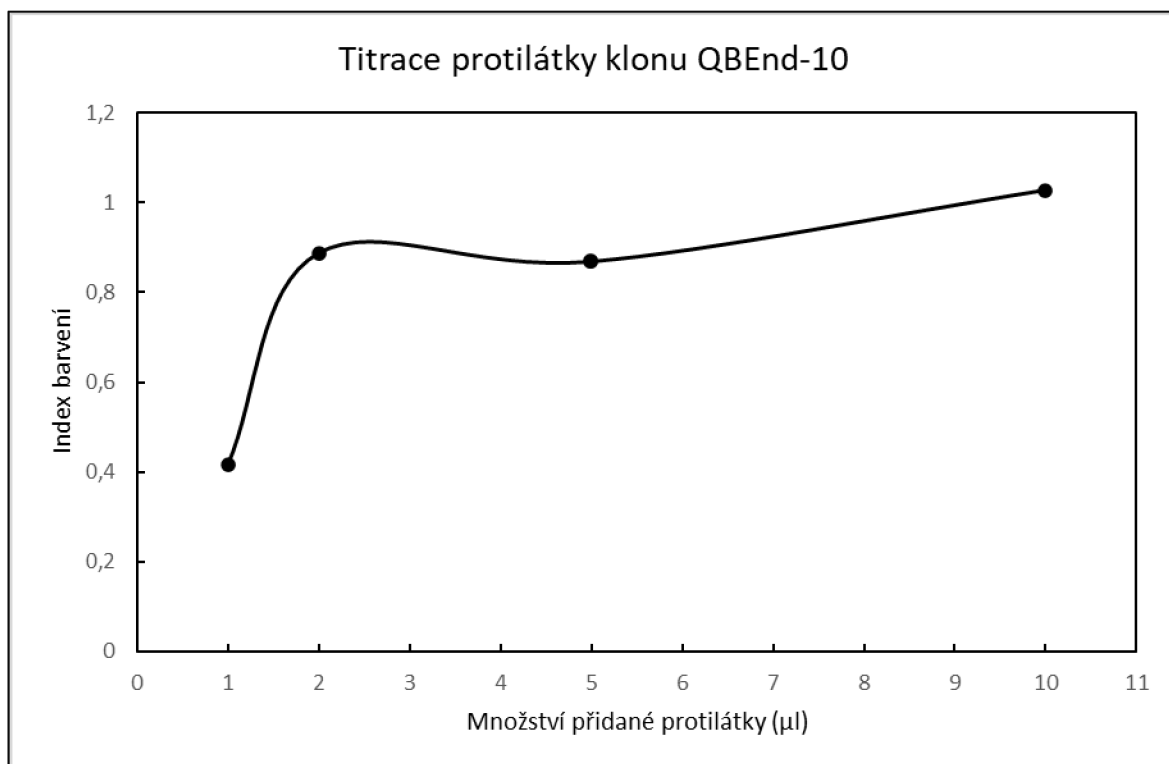
Obr. 13 Graf závislosti množství přidané protilátky anti CD 34 klonu 4H11[APG] na rozdílu mediánu fluorescenční intenzity populace CD 34+ buněk a monocytů.



Obr. 14 Graf závislosti množství přidané protilátky anti CD 34 klonu 4H11[APG] na indexu barvení.



Obr. 15 Graf závislosti množství přidané protilátky anti CD 34 klonu QBEnd-10 na rozdílu mediánu fluorescenční intenzity populace CD 34+ buněk a monocytů.

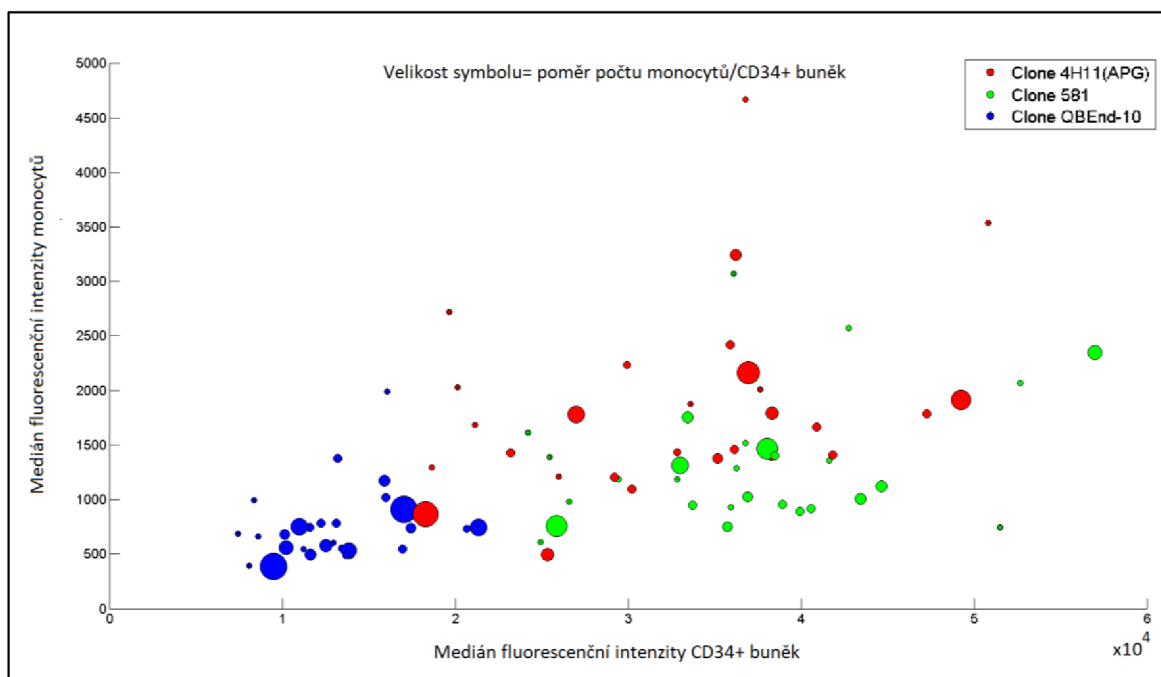


Obr. 16 Graf závislosti množství přidané protilátky anti CD 34 klonu QBEnd-10 na indexu barvení.

Z naměřených dat titrace protilátek byla pro každý klon sestavena dvojice grafů. V prvním z nich byl na osu y vynesena rozdíl mediánu fluorescenční intenzity CD 34+ populace a monocytů. U všech tří klonů se zdá, že nejvodnější by mohlo být přidání 5-10 µl, protože je zde největší rozdíl mediánu fluorescenční intenzity. Nebyl zde však brán ohled na rozptýlenost dat. S ohledem na tento faktor byl ke každému klonu protilátky vytvořen druhý graf. U klonu protilátky 581 a 4H11[APG] je v grafu možné pozorovat peak v oblasti okolo 5 µl, což poukazuje na ředění protilátky poskytující nejjasnější intenzitu fluorescence s minimálním pozadím. U klonu QBEnd-10 se zdá být nejvhodnější přidání 2-5 µl protilátky nicméně i po přidání 10 µl je index barvení srovnatelný a nedochází zde ke zvýšení pozadí barvení. Na základě zvážení výsledků titrace, cíle experimentu, doporučeného množství přidání protilátky výrobcem s přihlédnutím k ekonomickému faktoru nákladů na reagentie bylo zvoleno přidání 5 µl k 50 µl suspenze zředěného separátu HKB u všech tří klonů protilátky anti CD 34.

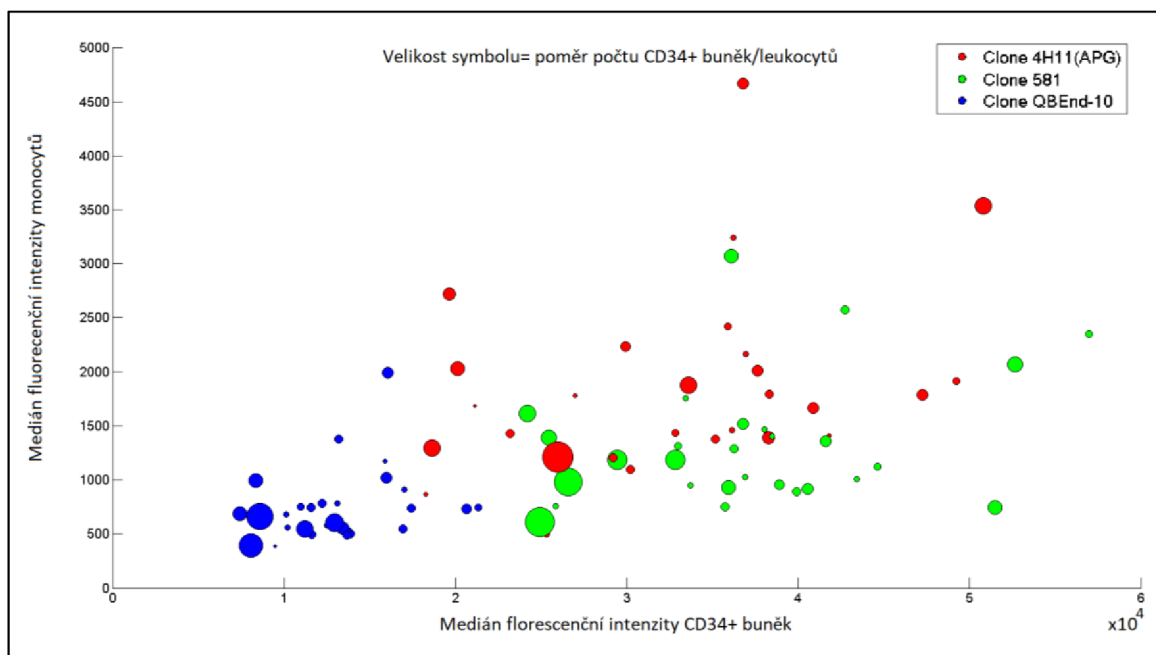
4.2 Výsledek statistického zpracování dat

Celkově bylo analyzováno 28 vzorků separátu HKB z periferní krve dárců. U každého vzorku byla provedena analýza stanovení počtu hematopoetických kmenových buněk pomocí tří klonů protilátky anti CD 34. Z každého měření byl odečten počet CD 34 pozitivních buněk, monocytů a MFI těchto populací. Odečten byl také celkový počet leukocytů.



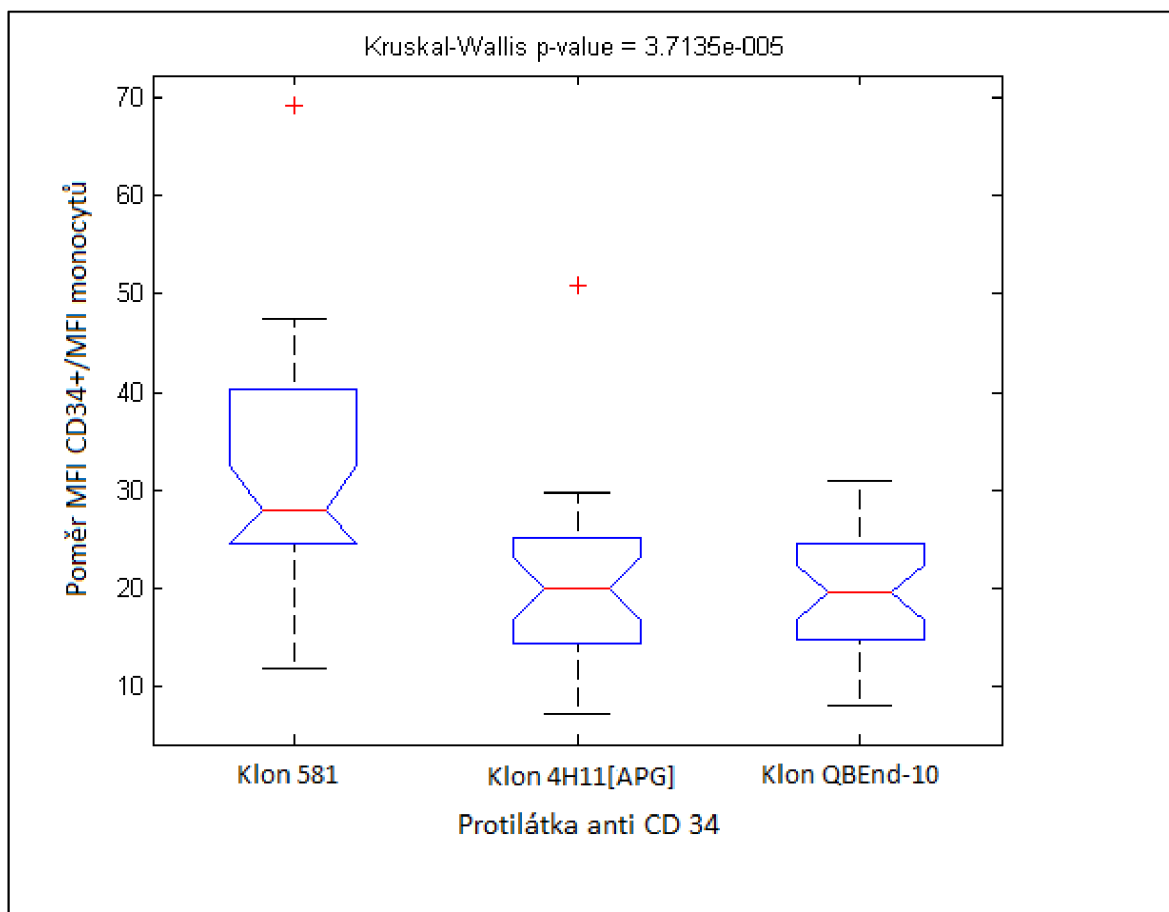
Obr.17 Graf závislosti MFI CD 34+ buněk na MFI monocytů. Červené symboly odpovídají odečteným hodnotám u klonu 4H11[APG]. Zelené symboly odpovídají odečteným hodnotám u klonu 581. Modré symboly odpovídají odečteným hodnotám u klonu QBEnd-10. Velikost symbolu je přímo úměrná poměru počtu monocytů/ CD 34 pozitivních buněk.

Z grafu je možné vyčíst že MFI buněk u klonu QBEnd-10 byl celkově nižší v porovnání s klonu 4H11[APG] a 581. Dle velikosti symbolu je možné odečíst, že poměr počtu monocytů ku počtu CD 34 pozitivních buněk nemá zásadní vliv na fluorescenci.



Obr. 18 Graf závislosti MFI CD 34+ buněk na MFI monocytů. Červené symboly odpovídají odečteným hodnotám u klonu 4H11[APG]. Zelené symboly odpovídají odečteným hodnotám u klonu 581. Modré symboly odpovídají odečteným hodnotám u klonu QBEnd-10. Velikost symbolu je přímo úměrná poměru počtu CD 34 pozitivních buněk a počtu leukocytů.

Z grafu je možné vyčíst, že MFI jak CD 34+ buněk tak monocytů u klonu QBEnd-10 byl celkově nižší v porovnání s klony 4H11[APG] a 581. Pro zhodnocení, který z klonů dokáže nejlépe odlišit pozitivní populaci CD 34 buněk bude tedy potřeba porovnat poměr MFI, protože rozdíl by zde uměle znevýhodňoval klon QBEnd-10. V grafu ho tedy není možné vizuálně přímo porovnat s klony 4H11[APG] a 581. Při vizuálním zhodnocení je klon 581 v porovnání s klonem 4H11[APG] schopný na základě mediánu fluorescenční intenzity lépe odlišit populaci CD 34 pozitivních buněk, kdy naměřené hodnoty se vyskytují v pomyslném pravém spodním kvadrantu. Dle velikosti symbolu je možné odečíst, že poměr počtu CD 34 pozitivních buněk a počtu leukocytů má vliv na fluorescenci. Poměrově větší symboly jsou na ose x posunuty směrem vlevo. Ke každému vzorku bylo přidáno stejné množství klonu jednotlivých protilátek. Čím více leukocytů a čím více CD 34 pozitivních buněk vzorek obsahoval, tím se ve vzorku nacházelo více potenciálních míst, kam protilátka mohla nasednout. Zde vyvstává význam důležitosti titrace protilátek na začátku experimentu.



Obr. 19 Box plot znázorňující poměr MFI CD 34 pozitivních buněk a MFI monocytů u klonů 581, 4H11[APG] a QBEnd-10 protilátky anti CD 34. Červeně označený medián v box plot grafu u klonu 581 se rovná 27.8625. U klonu 4H11[APG] je to 19,9105 a u klonu QBEnd-10 je to 19,5947. Rozdíl mezi klonem 581 a klony 4H11[APG] a QBEnd-10 je na základě neparametrického Kruskal-Wallis testu statisticky významný na hladině $p < 0,0001$. Klon 581 tedy dokáže nejlépe odlišit pozitivní populaci CD34 buněk od populace monocytů, které jsou použity jako negativní kontrola.

Celkově bylo analyzováno 28 vzorků separátu HKB z periferní krve dárců. Výsledkem statistické analýzy je, že rozdíl mezi klonem 581 a klony 4H11[APG] a QBEnd-10 stanovený pomocí Kruskal-Wallis testu je statisticky významný na hladině $p < 0,0001$. Klon 581 tedy dokáže nejlépe odlišit pozitivní populaci CD34 buněk od populace monocytů a zdá se být v porovnání s klony 4H11[APG] a QBEnd-10 nejvhodnější pro stanovení počtu HKB pomocí průtokové cytometrie

5 Diskuze

Úspěšná obnova krvetvorby po transplantaci záleží z velké části na infuzi adekvátního množství životaschopných CD 34+ buněk. Průtoková cytometrie je standardní metodou pro jejich enumeraci. Zlatým standardem napříč laboratořemi z celého světa se stal ISHAGE protokol z roku 1996 s jeho modifikovanou verzí z roku 1998 (Sutherland, 1996; Keeney, 1998). Jedním z kritérií, na které byl kladen důraz při zavádění tohoto protokolu, byla jednoduchost aplikace, aby bylo možné jeho široké použití. Použití multiparametrové analýzy je odvislé od laboratorního vybavení a v té době nebylo standardem napříč klinickými laboratořemi. Díky značnému technologickému pokroku ve vývoji průtokových cytometrů je v dnešní době, co se týče konvenční průtokové cytometrie, v klinických laboratořích běžně umožněna analýza 8-10 barevného panelu (Chattopadhyay, 2012). S tím souvisí i možnost komplexnější analýzy buněčných populací. Průtokový cytometr, na kterém byla prováděna analýza vzorků, umožňuje současnou analýzu až 8 barevného panelu. Nabízí se tedy možnost rozšíření základního ISHAGE protokolu o další markery. Tento tlak je vyvíjen i z druhé strany, díky značnému pokroku na poli buněčné terapie. Jako vhodné markery pro rozšíření protokolu byly navrženy například znaky CD3 a CD19 (Hausmann, 2022). U testu pro klinické použití je však nutné i nadále brát zřetel na pořizovací cenu reagensů, komplexitu a náročnost interpretace výsledku a na to, jaké informace potřebujeme analýzou získat. U konvenční průtokové cytometrie je s každou další protilátkou přidanou do panelu nutné dobře zvolit i konjugované fluorochromy z důvodu následné kompenzace.

V laboratoři průtokové cytometrie FNOL se provádí analýza počtu HKB na základě protokolu ISHAGE z roku 1996. Standardně jsou používány protilátka CD 45 PerCP klon MEM-28 a protilátka CD 34 PE klon 581. Absolutní počet CD 34+ buněk se stanovuje výpočtem, kdy informace o počtu leukocytů je získána z automatického hematologického analyzátoru. Jedná se tedy o takzvanou dual platformu. Druhým přístupem je analýza vzorků pomocí single platform metody. V rámci komparativních studií byly tyto dva přístupy porovnány a bylo zjištěno, že mezi nimi není signifikantní rozdíl (Barbosa, 1999; Chapple, 2000; Ngoma, 2011; Naithani, 2017). Oba tyto přístupy mají své výhody i nevýhody. Single platform metoda je rychlejší díky kombinaci více kroků do jednoho postupu. Výsledkem analýzy je přímé stanovení absolutního počtu CD 34+ buněk. K tomu je však zapotřebí využití referenčních kontrol, které i zvyšují cenu analýzy. Single platform metoda byla v minulosti pro stanovení absolutního počtu CD 34+ buněk v laboratoři průtokové cytometrie FNOL používána. Stanovení krevního obrazu je však u tohoto typu vzorků standardním vyšetřením, a tak s přihlédnutím k ekonomickému faktoru bylo

zvoleno využívání dual platform metody. Dále je také zvlášť analyzována viabilita štěpu pomocí protilátky CD 45 PerCP klon MEM-28 a fluorescenčního barviva 7-AAD. Kontrola viability štěpu je důležitou informací ve všechn fázích. Zejména pak po rozmražení štěpu před jeho použitím pro transplantaci. V rámci standardní analýzy počtu CD 34+ buněk v laboratoři průtokové cytometrie FNOL není fluorescenční barvivo 7-AAD přímou součástí panelu. U buněk, které jsou identifikovány jako CD 34+ tedy nelze s jistotou říci, zda se jedná o živé či mrtvé buňky. To může zkreslovat výsledné informace. Viabilita štěpu je však hodnotou, která jde ruku v ruce s informací o počtu CD 34+ buněk. Pokud by tedy viabilita štěpu byla nízká, bylo by nutné této skutečnosti přizpůsobit celý proces transplantace. Přidání fluorescenčního barviva 7-AAD přímo do panelu by však zlepšilo senzitivu a specifitu tohoto testu.

Průtoková cytometrie je metoda zabývající se zkoumáním jednotlivých buněk a jejich vlastností. Běžně se však ve vzorcích vyskytují takzvané doublety a také agregáty protilátek. Doublety jsou shluky dvou či více buněk. Díky správné přípravě vzorku je jim možné částečně předcházet. U moderních průtokových cytometrů je však již možné na základě analýzy pulzního rozptylu světla tyto doublety odlišit (Rico, 2023). Analýza singletů neboli jednotlivých buněk je běžně rozšířenou praxí u analýzy buněčného cyklu, určení DNA ploidie a sortovacích experimentů. Až na několik vyjímek však není běžně využívána v klinických aplikacích průtokové cytometrie. Zařazení odlišení singletů od doubletů by tak mohlo být vhodnou aktualizací ISHAGE protokolu. Výhodou odtranění doubletů je přesnější kvantifikace buněk. Doublety tvoří dvě a více buněk, které jsou identifikovány jako jedna. To v analýze vede ke zkreslení informací o velikosti, granularitě a expresní hladině povrchových markerů. Do analýzy jsou tím vnášeny chyby a znesnadňuje to správnou interpretaci dat. Pokud technické parametry průtokového cytometru umožňují odstranění doubletů, pak nejsou výrazně zvýšeny nároky na ostatní části procesu. Zvýšeny jsou nároky pouze na analýzu dat a interpretaci výsledků, kdy je tento krok při gatování potřeba předřadit standardnímu gatovacímu postupu.

Předmětem této práce je prostřednictvím mediánu fluorescenční intenzity porovnat tři klony protilátky anti CD34. Po objevu markeru CD 34 bylo vyprodukováno značné množství protilátek, které se specificky váží na různé epitopy tohoto markeru. Na základě citlivosti antigenu CD 34 k degradaci enzymy neuramidasa z bakterie *Vibrio cholerae* a O-sialo-glycoproteasa z bakterie *Pasteurella haemolytica* byly epitopy spolu s protilátkami rozřazeny do tří tříd (Sutherland, 1992). Vzhledem k tomu, že antigen CD 34 je v hemapoetickém systému exprimován pouze na progenitorových buňkách a ne na zralých krevních buňkách, tak může být považován za marker HKB. Důležitým zjištěním bylo, že

napříč maturačními stádii některé CD 34+ buňky postrádají expresi epitopů I. a II. třídy, zatímco epitop III. třídy byl stabilně exprimován u všech CD 34+ buněk (Steen, 1996; Steen, 1998). Pro kvantifikaci a selekci CD 34+ buněk by měly být tedy zvoleny protilátky spadající do III. třídy. Při použití protilátek z I. a II. třídy by mohlo dojít v průběhu analýzy ke ztrátě určité podskupiny CD 34+ buněk. Toto kritérium již nesplňuje protilátka QBEnd-10, která spadá do II. třídy. Vyplývá to i z výsledků statistického zpracování, kdy se protilátka QBEnd-10 jeví jako nejméně vhodný klon. Zajímavým faktem je i to, že protilátka QBEnd-10 byla získána odlišným způsobem a to imunizací pomocí endoteliálních buněk. (Fina, 1990) Epitopy markeru CD 34 a jejich zastoupení tak mohou být i na těchto endoteliálních buňkách odlišné. Jak je vidět, samotná analýza struktury může mnohé napovědět i o funkci. I přes důležitost markeru CD 34 pro transplantaci krvetvorných buněk a jeho širokého klinického použití, je stále překvapivě málo známo o funkci CD 34 (Radu, 2023).

Stanovení počtu CD 34+ buněk v normální periferní krvi, mobilizované periferní krvi, pupečnickové krvi, produktech aferézy nebo kostní dřevě je validovanou in-house metodou v rámci Hemato-onkologické kliniky FNOL. Doposud bylo možné, aby si laboratoře vyvíjely a používaly takzvané in-house metody. Dne 26. 5. 2022 v platnost vstoupilo nové Nařízení Evropského parlamentu a Rady EU o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro IVDR 2017/746/EU. Zároveň dne 22. 12. 2022 vstoupil v platnost zákon č. 375/2022Sb. o zdravotnických prostředcích a diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro, který zavádí IVDR Nařízení do české legislativy. Cílem tohoto nařízení je zvýšit kvalitu, bezpečnost a účinnost diagnostických prostředků s přispěním k ochraně veřejného zdraví v Evropské unii. Nařízení IVDR tedy řídí výrobu a uvádění in vitro diagnostických zdravotnických prostředků na evropský jednotný trh a výrazně ovlivňuje možnost výběru a využití diagnostických zdravotnických prostředků v laboratořích. Dle rizikovosti se dělí zdravotnické prostředky do tříd A-D plus A-sterilní. Pro tyto třídy platí přechodná období, do kdy nejpozději musí mít certifikáty podle IVDR. Toto přechodné období platí i pro klinické laboratoře, které musí tomuto nařízení přizpůsobit své vybavení, produkty, zavedené metody a testy které využívají. Celkově musí laboratoře provést komplexní revizi svých procesů a postupů a zajistit, že budou plně v souladu s nařízením IVDR, aby mohly nadále poskytovat spolehlivé a kvalitní diagnostické služby. Klinické laboratoře budou moci používat in-house metody pouze v případě, že v EU nebudou žádné komerčně dostupné CE IVD produkty pro diagnostiku žádaného parametru a budou muset splňovat další podmínky. Například používané diagnostikum musí mít další benefit pro diagnostiku a léčbu onemocnění v porovnání

s komerčně dostupnými diagnostikou. Cena diagnostika, byť by byla mnohonásobně vyšší, není brána jako relevantní argument pro použití in-house metody. S tímto nařízením jsou spojeny obavy klinických laboratoří. Týkají se značného zvýšení nákladů, zvýšení administrativní zátěže, omezení nabídky diagnostických prostředků na trhu, ztráty in-house metod a znemožnění diagnostiky výzkumem s důsledkem na vliv na dostupnost specializované péče pro pacienty.

Laboratoř průtokové cytometrie FNOL tedy v dohledné době čeká volba komerčního kitu, kterou bude nahrazena doposud používaná in-house metoda. V této práci byly na základě mediánu fluorescenční intenzity hodnoceny klony 581, 4H11[APG] a QBEnd-10. Jedná se o komerčně dostupné klony protilátky anti CD 34. Na základě výsledků této práce se nejvhodnějším klonem pro stanovení počtu HKB zdá být klon 581. Tento klon dokázal na základě mediánu fluorescenční intezity nejlépe odlišit pozitivní populaci CD 34 buněk od populace monocytů. Výsledek této práce by tak mohl napomoci volbě vhodného komerčního kitu.

6 Závěr

Marker CD 34 se používá ke stanovení počtu HKB v aspirátu kostní dřeně, produktech aferézy, pupečnickové krvi a normální i mobilizované periferní krvi. Úspěšná obnova krvetvorby po transplantaci záleží z velké části na infuzi adekvátního množství životaschopných CD 34+ buněk. Tato práce byla zaměřena na porovnání klonů 581, 4H11[APG] a QBEnd-10 protilátky anti CD 34 na základě mediánu fluorescenční intenzity s cílem identifikovat klon s nevhodnějšími vlastnostmi pro stanovení počtu HKB pomocí průtokové cytometrie.

V rámci teoretické části byly posány KB, jejich vlastnosti a to, jak jsou zapojeny do procesu krvetvorby. Byl zde poskytnut ucelený pohled na historický vývoj metody transplantace HKB jako léčebné procedury od prvních krůčků k vytyčení aktuálních výzev, se kterými se transplantace HKB potýká, až po nastínění možného vývoje do budoucna. Co se týče průtokové cytometrie jako analytické metody používané k analýze vzorků, byly zde popsány markery CD 34 a 45, ISHAGE protokol, důležitost správné volby protilátek, jejich titrace a využití mediánu fluorescenční intenzity pro charakterizaci buněčných populací. V praktické části byla popsána gatovací strategie, která byla použita při analýze naměřených dat. Uveden zde byl výsledek titrace jednotlivých klonů protilátky anti CD 34 a statistického zpracování naměřených dat.

Jako nejvhodnější klon pro stanovení počtu HKB pomocí průtokové cytometrie se v porovnání s klony 4H11[APG] a QBEnd-10 zdá být klon 581. Tento klon dokázal na základě mediánu fluorescenční intenzity nejlépe odlišit pozitivní populaci CD 34 buněk od populace monocytů. Výsledek této práce by mohl být nápomocný při volbě komerčního kitu pro stanovení počtu HKB v souvislosti s nařízením IVDR. Důležitým zjištěním je i to, že pro kvantifikaci a selekci CD 34+ buněk by měly být vybírány protilátky specifické vůči epitopům III. třídy. Vhodnou úpravou by mohla být aktualizace používaného ISHAGE protokolu zařazením odlišení singletů od doubletů do analýzy. Umožnilo by to přesnější kvantifikaci buněk.

7 Bibliografie

- AKRAM, Ammad, Mehwish GILANI, Qamar un Nisa CHAUDHRY, Raheel IFTIKHAR, Tariq GHAFOOR, Mehreen Ali KHAN, Memoona HAIDER a Haider NISAR, 2024. Real-World Challenges of Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplant in a Developing Country: A Single Center Experience. *Cureus*. 1-22. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.59744
- AL BARASHDI, Maryam Ahmed, Ahlam ALLI, Mary Frances MCMULLIN a Ken MILLS, 2021. Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC or CD45). *Journal of Clinical Pathology*. **74**(9), 548-552. ISSN 0021-9746. Dostupné z: doi:10.1136/jclinpath-2020-206927
- BARBOSA, I. L., M. E. SOUSA, M. I. GODINHO, A. CARVALHAIS a F. SOUSA, 1999. Single-versus dual-platform assays for human CD34+ cell enumeration. *Cytometry*. **38**(6), 274-9.
- BASTANI, Sepideh, Frank J. T. STAAL a Kirsten CANTÉ-BARRETT, 2023. The quest for the holy grail: overcoming challenges in expanding human hematopoietic stem cells for clinical use. *Stem Cell Investigation*. **10**(11), 1-15. ISSN 23130792. Dostupné z: doi:10.21037/sci-2023-016
- BECKER, A. J., E. A. MCCULLOCH a J. E. TILL, 1963. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature*. **197**(4866), 452-454. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/197452a0
- BENDALL, Linda J. a Kenneth F. BRADSTOCK, 2014. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **25**(4), 355-367. ISSN 13596101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2014.07.011
- BODMER, Walter, 2023. A historical perspective on HLA. *Immunotherapy Advances*. **3**(1), 1-3. ISSN 2732-4303. Dostupné z: doi:10.1093/immadv/ltad014
- BORTIN, Mortimer M., 1970. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation*. **9**(6), 571-587. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/00007890-197006000-00006
- BROWN, J., M. F. GREAVES a H. V. MOLGAARD, 1991. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *International Immunology*. **3**(2), 175-184. ISSN 0953-8178. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/3.2.175
- BUSHNELL, Tim, 2015. Importance of Antibody Titration in Flow cytometry. In: *Bitesize Bio* [online]. [cit. 2024-04-10]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/22374/importance-of-antibody-titration-in-flow-cytometry/>
- CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK, 2014. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN sbn978-80-244-3951-8.
- CIVIN, C. I., L. C. STRAUSS, C. BROVALL, M. J. FACKLER, J. F. SCHWARTZ a J. H. SHAPER, 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *Journal of immunology*. **133**(1), 157-165.
- CUNNINGHAM, Bruce A., 1977. The Structure and Function of Histocompatibility Antigens. *Scientific American*. **237**(4), 96-107. ISSN 0036-8733. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican1077-96
- ČNRDD, 2022. In: *Český národní registr dárců dřeně* [online]. [cit. 2024-05-11]. Dostupné z: <https://registr.kostnidren.cz/o-registru/vyrocní-zpravy/>
- ČRDKB, 2023. In: *Český registr dárců krevetvorných buněk* [online]. [cit. 2024-05-11]. Dostupné z: <https://www.darujzivot.cz/o-nas/vyrocní-zpravy>
- DAWOOD, Shaheenah, Laura AUSTIN a Massimo CRISTOFANILLI, 2014. Cancer stem cells: Implications for cancer therapy. *Oncology*. **28**(12), 1101-1107.

- DE LA MORENA, M. Teresa a Richard A. GATTI, 2011. A History of Bone Marrow Transplantation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. **25**(1), 1-15. ISSN 08898588. Dostupné z: doi:10.1016/j.hoc.2010.11.001
- DEEG, H. J., R. STORB, P. L. WEIDEN, D. SCHUMACHER, H. SHULMAN, T. GRAHAM a E. D. THOMAS, 1981. High-Dose Total-Body Irradiation and Autologous Marrow Reconstitution in Dogs: Dose-Rate-Related Acute Toxicity and Fractionation-Dependent Long-Term Survival. *Radiation Research*. **88**(2), 385-391. ISSN 00337587. Dostupné z: doi:10.2307/3575670
- FELICIANO, João Victor Piccolo, José Carlos LOPES, José Alexandre Buso WEILLER a Jaqueline Vilela BULGARELI, 2023. Barriers to access of hematopoietic stem cell transplantation. *JOURNAL OF BONE MARROW TRANSPLANTATION AND CELLULAR THERAPY*. **4**(3), 69-84. ISSN 2675-374X. Dostupné z: doi:10.46765/2675-374X.2023v4n3p217
- FINA, L., H. V. MOLGAARD, D. ROBERTSON et al., 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. **75**(12), 2417-2426.
- Flow Cytometry Guide, 2024. In: *Creative Diagnostics* [online]. [cit. 2024-05-17]. Dostupné z: <https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm>
- GEST, H., 2004. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes and Records of the Royal Society of London*. **58**(2), 187-201. ISSN 0035-9149. Dostupné z: doi:10.1098/rsnr.2004.0055
- GRANOT, Noa a Rainer STORB, 2020. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica*. **105**(12), 2716-2729. ISSN 1592-8721. Dostupné z: doi:10.3324/haematol.2019.245688
- HALL, L.R., M. STREULI, S. F. SCHLOSSMAN a H. SAITO, 1988. Complete exon-intron organization of the human leukocyte common antigen (CD45) gene. *Journal of Immunology*. **141**(8), 2781-87.
- HAUSSMANN, Katy, Mathias STREITZ, Anna TAKVORIAN et al., 2022. Widely applicable, extended flow cytometric stem cell enumeration panel for quality control of advanced cellular products. *Scientific Reports*. **12**(1), 1-14. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-22339-1
- HEUSLER, K a A PLETSCHER, 2001. The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Medical Weekly*. **131**(21-22), 299-302. ISSN 1424-3997. Dostupné z: doi:10.4414/smw.2001.09702
- HRON, Karel a Pavla KUNDEROVÁ, 2013. *Základy počtu pravděpodobnosti a metod matematické statistiky*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-3396-7.
- CHAPPLE, P., H.M. PRINCE, D. WALL, R. FILSHIE, D. HAYLOCK, M. QUINN, M. BRETTELL a D. VENTER, 2000. Comparison of three methods of CD34+ cell enumeration in peripheral blood: Dual-platform ISHAGE protocol versus single-platform, versus microvolume fluorimetry. *Cytotherapy*. **2**(5), 371-376. ISSN 14653249. Dostupné z: doi:10.1080/146532400539279
- CHATTOPADHYAY, Pratip K. a Mario ROEDERER, 2012. Cytometry: Today's technology and tomorrow's horizons. *Methods*. **57**(3), 251-258. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2012.02.009
- CHEN, Chia Huei, Wendy LIN, Shou SHYE, Ruth KIBLER, Kathy GRENIER, Dlether RECKTENWALD a Leon W.M.M. TERSTAPPEN, 1994. Automated Enumeration of CD34 + Cells in Peripheral Blood and Bone Marrow. *Journal of Hematotherapy*. **3**(1), 3-13. ISSN 1061-6128. Dostupné z: doi:10.1089/scd.1.1994.3.3

JANSEN, Jan, 2005. The First Successful Allogeneic Bone-Marrow Transplant: Georges Mathé. *Transfusion Medicine Reviews*. **19**(3), 246-248. ISSN 08877963. Dostupné z: doi:10.1016/j.tmr.v.2005.02.006

JOHNSEN, Hans E., 1997. Letter to the Editor: Toward a Worldwide Standard for CD34+ Enumeration?. *Journal of Hematotherapy*. **6**(2), 83-84. ISSN 1061-6128. Dostupné z: doi:10.1089/scd.1.1997.6.83

KAPOOR, Saketh, Sudheer P. SHENOY a Bipasha BOSE, 2020. CD34 cells in somatic, regenerative and cancer stem cells: Developmental biology, cell therapy, and omics big data perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*. **121**(5-6), 3058-3069. ISSN 0730-2312. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.29571

KEENEY, Michael, Ian CHIN-YEE, Karin WEIR, Jan POPMA, Rakash NAYAR a D. Robert SUTHERLAND, 1998. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry*. **34**(2), 61-70. ISSN 0196-4763. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19980415)34:261::AID-CYTO13.0.CO;2-F

KHARYA, G., S. HEWERDINE, R. RAJAGOPAL a G. RALL, 2021. Bone Marrow Transplantation: Registries and Data Management. In: CHANDY, Mammen, Vivek S. RADHAKRISHNAN a Reghu K. SUKUMARAN, ed. *Contemporary Bone Marrow Transplantation*. 1. Cham: Springer International Publishing, s. 669-688. Organ and Tissue Transplantation. ISBN 978-3-030-36357-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-36358-1_4

KREISSIG, Carla, Andreas KIRSCH a Stefan SERKE, 1994. Characterization and Measurement of CD34-Expressing Hematopoietic Cells. *Journal of Hematotherapy*. **3**(4), 263-289. ISSN 1061-6128. Dostupné z: doi:10.1089/scd.1.1994.3.263

LANZA, F., L. HEALY a D.R. SUTHERLAND, 2001. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. **15**(1), 1-13.

MAUS, Marcela V. a Carl H. JUNE, 2016. Making Better Chimeric Antigen Receptors for Adoptive T-cell Therapy. *Clinical Cancer Research*. **22**(8), 1875-1884. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1433

MÉNDEZ, Alexis, 2016. Optics in Medicine. In: AL-AMRI, Mohammad D., Mohamed EL-GOMATI a M. Suhail ZUBAIRY, ed. *Optics in Our Time*. Cham: Springer International Publishing, s. 299-333. ISBN 978-3-319-31902-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-31903-2_13

NAITHANI, Rahul, Nitin DAYAL a Gaurav DIXIT, 2017. Single Versus Dual Platform Analysis for Hematopoietic Stem Cell Enumeration Using ISHAGE Protocol. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. **33**(3), 370-374. ISSN 0971-4502. Dostupné z: doi:10.1007/s12288-016-0749-9

NGOMA, Alain, Shunnichi SAITO, Hitoshi OHTO et al., 2011. CD34+ Cell Enumeration by Flow Cytometry: A Comparison of Systems and Methodologies. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. **135**(7), 909-914. ISSN 1543-2165. Dostupné z: doi:10.5858/2010-0119-0AR.1

NIELSEN, Julie S. a Kelly M. MCNAGNY, 2008. Novel functions of the CD34 family. *Journal of Cell Science*. **121**(22), 3683-3692. ISSN 1477-9137. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.037507

NOBLE, Caitlin A., Andrew P. BIESEMIER, Sarah F. MCCLEES, Aljunaid M. ALHUSSAIN, Stephen E. HELMS a Robert T. BRODELL, 2024. The history of the microscope reflects advances in science and medicine. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1-14. ISSN 07402570. Dostupné z: doi:10.1053/j.semdp.2024.01.002

RADU, Petru, Mihai ZURZU, Vlad PAIC et al., 2023. CD34—Structure, Functions and Relationship with Cancer Stem Cells. *Medicina*. **59**(5), 1-14. ISSN 1648-9144. Dostupné z: doi:10.3390/medicina59050938

RAMALHO-SANTOS, Miguel a Holger WILLENBRING, 2007. On the Origin of the Term “Stem Cell”. *Cell Stem Cell*. **1**(1), 35-38. ISSN 19345909. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2007.05.013

RHEINLÄNDER, Andreas, Burkhart SCHRAVEN a Ursula BOMMHARDT, 2018. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology letters*. (196), 22-32. ISSN https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009.

RICO, Laura G., Jorge BARDINA, Àngel BISTUÉ-ROVIRA, Roser SALVIA, Mike D. WARD, Jolene A. BRADFORD a Jordi PETRIZ, 2023. Accurate identification of cell doublet profiles: Comparison of light scattering with fluorescence measurement techniques. *Cytometry Part A*. **103**(5), 447-454. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.24690

SEITA, Jun a Irving L. WEISSMAN, 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *WIREs Systems Biology and Medicine*. **2**(6), 640-653. ISSN 1939-5094. Dostupné z: doi:10.1002/wsbm.86

SHAPIRO, Howard M., 2003. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss. ISBN 0471411256.

STEEN, Rita a Torstein EGELAND, 1998. CD34 Molecule Epitope Distribution on Cells of Haematopoietic Origin. *Leukemia & Lymphoma*. **30**(1-2), 23-30. ISSN 1042-8194. Dostupné z: doi:10.3109/10428199809050926

STEEN, Rita, Geir E. TJØNNFJORD, Gustav GAUDERNACK, Lorentz BRINCH a Torstein EGELAND, 1996. Differences in the distribution of CD34 epitopes on normal haemopoietic progenitor cells and leukaemic blast cells. *British Journal of Haematology*. **94**(4), 597-605. ISSN 0007-1048. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2141.1996.7052322.x

STORB, Rainer, 2012. Edward Donnall Thomas (1920–2012). *Nature*. **491**(7424), 334-334. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/491334a

SUTHERLAND, D.R., J.C. MARSH, J. DAVIDSON, M.A. BAKER, A. KEATING a A. MELLORS, 1992. Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by *Pasteurella haemolytica* glycoprotease: implications for purification of CD34-positive progenitor cells. *Experimental hematology*. **20**(5), 590-599.

SUTHERLAND, D., Lori ANDERSON, Michael KEENEY, Rakash NAYAR a Ian CHIN-YEE, 1996. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy*. **5**(3), 213-226. ISSN 1061-6128. Dostupné z: doi:10.1089/scd.1.1996.5.213

The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1980. In: *The Nobel Prize* [online]. [cit. 2024-05-11]. Dostupné z: https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1980/summary/

THORSBY, E., 2009. A short history of HLA. *Tissue Antigens*. **74**(2), 101-116. ISSN 0001-2815. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x

TILL, J. E. a E. A. MCCULLOCH, 2011. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells 1. *Radiation Research*. **175**(2), 145-149. ISSN 0033-7587. Dostupné z: doi:10.1667/RRXX28.1

TRISCHMANN, Thomas M., Karen G. SCHEPERS a Curt I. CIVIN, 1993. Measurement of CD34 + Cells in Bone Marrow by Flow Cytometry. *Journal of Hematotherapy*. **2**(3), 305-313. ISSN 1061-6128. Dostupné z: doi:10.1089/scd.1.1993.2.305

VENDITTI, A, A BATTAGLIA, G DEL POETA et al., 1999. Enumeration of CD34+ hematopoietic progenitor cells for clinical transplantation: comparison of three different methods. *Bone Marrow Transplantation*. **24**(9), 1019-1027. ISSN 0268-3369. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bmt.1702013

WUNDER, Eckart, Hanna SOVALAT a Philippe HENON, 1994. *Hematopoietic Stem Cells: The Mulhouse Manual*. 1. Alphamed Pr. ISBN 1880854171.

ZAKRZEWSKI, Wojciech, Maciej DOBRZYŃSKI, Maria SZYMONOWICZ a Zbigniew RYBAK, 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*. **10**(1). ISSN 1757-6512. Dostupné z: doi:10.1186/s13287-019-1165-5

ZAR, Jerrold H., 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall. ISBN 0-13-081542-X.

8 Seznam příloh

Příloha 1 Datový list k protilátce CD 45 klon MEM-28

Příloha 2 Datový list k protilátce CD 34 klon 581

Příloha 3 Datový list k protilátce CD 34 klon 4H11[APG]

Příloha 4 Datový list k protilátce CD 34 klon QBEnd-10

Příloha 5 Titrace klonů protilátek

Příloha 6 Naměřená data

Příloha 1 Datový list k protilátce CD 45 klon MEM-28

Technical Data Sheet	
Product	Anti-Hu CD45 PerCP
Cat. Number/Size	PC-222-T025 25 tests PC-222-T100 100 tests
For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.	
Antigen	CD45
Clone	MEM-28
Format	PerCP
Reactivity	Human
Negative species	Horse
Application	FC (QC tested)
Application details	Flow cytometry: The reagent is designed for analysis of human blood cells using 10 µl reagent / 100 µl of whole blood or 10 ⁶ cells in a suspension. The content of a vial (1 ml) is sufficient for 100 tests.
Excitation laser	blue (488 nm)
Isotype	Mouse IgG1
Specificity	The antibody MEM-28 reacts with an extracellular epitope on all alternative forms of human CD45 antigen (Leukocyte Common Antigen), a 180-220 kDa single chain type I transmembrane protein expressed at high level on all cells of hematopoietic origin, except erythrocytes and platelets.
Other names	LCA, T200, LY5, B220, GP180, TPC
Workshop	HLDA III: WS Code NL 833a
Immunogen	Human thymocytes and T lymphocytes.
Entrez Gene ID	5788
Gene name	PTPRC
NCBI Full Gene Name	protein tyrosine phosphatase receptor type C
UniProt ID	P08575
Preparation	Purified antibody is conjugated with activated Peridinin-Chlorophyll Protein (PerCP) under optimum conditions and unconjugated antibody and free fluorochrome are removed by size-exclusion chromatography.
Formulation	Stabilizing phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 15 mM sodium azide
Storage and handling	Store at 2-8°C. Protect from prolonged exposure to light. Do not freeze.
Images and References	www.exbio.cz

Příloha 2 Datový list k protilátce CD 34 klon 581

Technical Data Sheet	
Product	Anti-Hu CD34 PE
Cat. Number/Size	1P-664-T025 25 tests 1P-664-T100 100 tests
For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.	
Antigen	CD34
Clone	581
Format	PE
Reactivity	Non-human primates, Human
Negative species	Sheep
Application	FC (QC tested)
Application details	Flow cytometry: The reagent is designed for analysis of human blood cells using 20 µl reagent / 100 µl of whole blood or 10 ⁶ cells in a suspension. The content of a vial (2 ml) is sufficient for 100 tests.
Excitation laser	blue (488 nm)
Isotype	Mouse IgG1 kappa
Specificity	The mouse monoclonal antibody 581 reacts with an extracellular epitope of CD34, a 110-115 kDa monomeric transmembrane phosphoglycoprotein expressed on hematopoietic progenitors cells and on the most pluripotential stem cells; it is gradually lost on progenitor cells. The antibody recognizes the class III CD34 epitope resistant to neuraminidase, chymopapain and glycoprotease.
Workshop	HLDA V: WS Code MA27
Entrez Gene ID	947
Gene name	CD34
NCBI Full Gene Name	CD34 molecule
UniProt ID	P28906
Preparation	Purified antibody is conjugated with R-phycoerythrin (PE) under optimum conditions. Unconjugated antibody and free fluorochrome are removed by size-exclusion chromatography.
Formulation	Stabilizing phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 15 mM sodium azide
Storage and handling	Store at 2-8°C. Protect from prolonged exposure to light. Do not freeze.
Images and References	www.exbio.cz

Příloha 3 Datový list k protilátce CD 34 klon 4H11[APG]

Technical Data Sheet	
Product	Anti-Hu CD34 PE
Cat. Number/Size	1P-297-T025 25 tests 1P-297-T100 100 tests
For Research Use Only.	
Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.	
Antigen	CD34
Clone	4H11[APG]
Format	PE
Reactivity	Human
Application	FC (QC tested), ICC
Application details	Flow cytometry: The reagent is designed for analysis of human blood cells using 20 µl reagent / 100 µl of whole blood or 10 ⁶ cells in a suspension. The content of a vial (2 ml) is sufficient for 100 tests.
Excitation laser	blue (488 nm)
Isotype	Mouse IgG1
Specificity	The mouse monoclonal antibody 4H11[APG] reacts with extracellular class III epitope on CD34, a 110-115 kDa monomeric transmembrane phosphoglycoprotein expressed on hematopoietic progenitors cells and on the most pluripotential stem cells; it is gradually lost on progenitor cells. The antibody 4H11[APG] completely blocks binding of class III antibodies BIRMA K3 and 8G12 on KG1a cell line.
Workshop	HLDA VI: WS Code M MA58
Immunogen	Permanent human cell line derived from peripheral leucocytes of a patient suffering from chronic myeloid leukaemia.
Entrez Gene ID	947
Gene name	CD34
NCBI Full Gene Name	CD34 molecule
UniProt ID	P28906
Preparation	Purified antibody is conjugated with R-phycoerythrin (PE) under optimum conditions. Unconjugated antibody and free fluorochrome are removed by size-exclusion chromatography.
Formulation	Stabilizing phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 15 mM sodium azide
Storage and handling	Store at 2-8°C. Protect from prolonged exposure to light. Do not freeze.
Images and References	www.exbio.cz

Příloha 4 Datový list k protilátce CD 34 klon QBEnd-10

Technical Data Sheet	
Product	Anti-Hu CD34 PE
Cat. Number/Size	1P-566-T025 25 tests 1P-566-T100 100 tests
For Research Use Only.	
Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.	
Antigen	CD34
Clone	QBEnd-10
Format	PE
Reactivity	Non-human primates, Human
Negative species	Dog, Sheep, Rat, Cow
Application	FC (QC tested)
Application details	Flow cytometry: The reagent is designed for analysis of human blood cells using 20 µl reagent / 100 µl of whole blood or 10 ⁶ cells in a suspension. The content of a vial (2 ml) is sufficient for 100 tests.
Excitation laser	blue (488 nm)
Isotype	Mouse IgG1
Specificity	The antibody QBEnd-10 reacts with an extracellular class II epitope on CD34, a 110-115 kDa monomeric transmembrane phosphoglycoprotein expressed on hematopoietic progenitors cells and on the most pluripotential stem cells; it is gradually lost on progenitor cells. This antibody has been also used as an endothelial marker.
Workshop	HLDA V: WS Code BP275, E038, MA065, MR09
Immunogen	Human endothelial vesicles
Entrez Gene ID	947
Gene name	CD34
NCBI Full Gene Name	CD34 molecule
UniProt ID	P28906
Preparation	Purified antibody is conjugated with R-phycoerythrin (PE) under optimum conditions. Unconjugated antibody and free fluorochrome are removed by size-exclusion chromatography.
Formulation	Stabilizing phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 15 mM sodium azide
Storage and handling	Store at 2-8°C. Protect from prolonged exposure to light. Do not freeze.
Images and References	www.exbio.cz

Příloha 5 Titrace klonů protilátek

	Množství přidané protilátky (μl)	MFI Monocyty	MFI CD34	rSD Monocyty	rSD CD34	Index barvení
Klon 581	10	6027	48257	2938	15404	1,081
	5	1376	41471	605	12058	1,165
	2	800	34722	339	10772	0,863
	1	601	30000	255	9687	0,740
Klon 4H11(APG)	10	2999	45354	1333	14922	0,790
	5	2064	36223	1003	12256	0,898
	2	1068	24114	507	8234	0,822
	1	670	16707	299	5575	0,756
Klon QBEnd-10	10	1197	32107	560	10145	1,027
	5	779	20990	359	6908	0,869
	2	423	11250	181	3489	0,887
	1	251	4108	102	1428	0,416

Příloha 6 Naměřená data

Datum odběru	Pohlaví / rok narození	Protilátka anti CD34	MFI Monocytů	Počet Monocytů	MFI CD34+ buněk	Počet CD34+ buněk	Počet Leukocytů
07.11.2022	Ž/1975	Klon 581	1753	35588	33449	703	136552
		Klon 4H11(APG)	3242	45102	36222	951	168200
		Klon QBEnd-10	1171	38217	15900	759	167547
09.11.2022	Ž/1975	Klon 581	948	32112	33747	805	123113
		Klon 4H11(APG)	1436	21402	32858	681	88064
		Klon QBEnd-10	578	25350	12510	484	91200
10.11.2022	M/1968	Klon 581	981	4452	26594	704	23245
		Klon 4H11(APG)	1683	2029	21143	418	124564
		Klon QBEnd-10	663	4005	8611	713	25165
24.11.2022	M/1968	Klon 581	744	16048	51503	891	56919
		Klon 4H11(APG)	3541	4406	50832	709	39884
		Klon QBEnd-10	1991	5022	16072	844	67551
24.11.2022	M/1968	Klon 581	2071	17077	52697	847	51157
		Klon 4H11(APG)	1788	25758	47290	733	65981
		Klon QBEnd-10	1018	39672	15995	1045	90860
25.01.2023	M/1958	Clone 581	929	29758	35955	1376	88338
		Clone 4H11(APG)	1390	29067	38287	996	72235
		Clone QBEnd-10	550	30195	13438	1049	79628
25.01.2023	M/1997	Klon 581	1520	20289	36787	847	69743
		Klon 4H11(APG)	2236	32404	29952	1073	104902
		Klon QBEnd-10	746	46031	11589	1346	142074
26.01.2023	Ž/1956	Klon 581	3073	15990	36093	1136	77077
		Klon 4H11(APG)	4670	20468	36809	966	84110
		Klon QBEnd-10	1379	20123	13224	615	71474
26.01.2023	M/1958	Klon 581	915	38094	40581	1133	100326
		Klon 4H11(APG)	1665	29992	40893	933	79279
		Klon QBEnd-10	549	32858	16943	912	97247
24.02.2023	M/1985	Klon 581	2350	50817	56994	849	112942
		Klon 4H11(APG)	1915	79590	49260	958	135618
		Klon QBEnd-10	742	116608	21354	1622	208462

Datum odběru	Pohlaví / Rok narození	Protilátka anti CD 34	MFI Monocytů	Počet Monocytů	MFI CD 34+ buněk	Počet CD 34+ buněk	Počet Leukocytů
27.02.2023	M/1963	Klon 581	2576	19526	42775	975	121588
		Klon 4H11(APG)	1463	26949	36156	827	129063
		Klon QBEnd-10	781	54935	13107	1519	244276
27.02.2023	M/1963	Klon 581	1314	41652	33005	590	76957
		Klon 4H11(APG)	1782	49521	27006	655	151281
		Klon QBEnd-10	751	74365	11002	1027	142821
28.02.2023	M/1963	Klon 581	1465	84439	38048	925	148933
		Klon 4H11(APG)	2162	99111	36968	1066	171207
		Klon QBEnd-10	911	85848	17021	761	146833
14.03.2023	M/1965	Klon 581	953	35824	38915	993	98450
		Klon 4H11(APG)	1380	43911	35171	1061	108256
		Klon QBEnd-10	497	51685	11642	1150	139521
30.03.2023	M/1973	Klon 581	1403	40232	38506	1052	157242
		Klon 4H11(APG)	2420	30136	35897	875	122187
		Klon QBEnd-10	681	32743	10151	795	129124
20.04.2023	Ž/1979	Klon 581	1389	13811	25461	1081	64742
		Klon 4H11(APG)	2028	15102	20130	987	64964
		Klon QBEnd-10	685	15658	7457	1094	70141
27.04.2023	M/1970	Klon 581	751	40133	35732	985	108596
		Klon 4H11(APG)	1097	32447	30234	928	99304
		Klon QBEnd-10	499	43695	13882	1058	112734
28.04.2023	Ž/1961	Klon 581	1183	21586	29470	1056	51918
		Klon 4H11(APG)	1294	27072	18635	1018	56667
		Klon QBEnd-10	548	27994	11237	1115	59330
18.05.2023	M/1966	Klon 581	1027	66051	36906	1545	266656
		Klon 4H11(APG)	498	39171	25339	722	123194
		Klon QBEnd-10	560	80315	10208	1335	249904
08.06.2023	Ž/1955	Klon 581	1290	27573	36260	985	99818
		Klon 4H11(APG)	1428	34435	23224	944	100865
		Klon QBEnd-10	782	40247	12237	1156	127391

Datum odběru	Pohlaví / Rok narození	Protilátka anti CD 34	MFI Monocytů	Počet Monocytů	MFI CD 34+ buněk	Počet CD 34+ buněk	Počet Leukocytů
22.06.2023	M/1970	Klon 581	1119	48173	44652	942	120852
		Klon 4H11(APG)	1795	47759	38322	875	109045
		Klon QBEnd-10	736	45698	17452	1044	122452
03.08.2023	Ž/1956	Klon 581	608	7304	24959	1066	34016
		Klon 4H11(APG)	1209	7656	26007	1058	32720
		Klon QBEnd-10	392	8737	8071	861	34106
10.08.2023	M/1963	Klon 581	1614	10989	24218	1114	63108
		Klon 4H11(APG)	2722	12630	19669	826	60315
		Klon QBEnd-10	994	24797	8365	1590	106550
17.08.2023	Ž/1961	Klon 581	1007	41908	43467	816	154668
		Klon 4H11(APG)	1407	23088	41832	620	148629
		Klon QBEnd-10	533	80220	13864	1224	286623
27.10.2023	M/1964	Klon 581	760	64019	25878	698	139371
		Klon 4H11(APG)	868	70205	18305	667	151660
		Klon QBEnd-10	387	66300	9482	573	148584
28.02.2024	M/1957	Klon 581	1189	8926	32836	1594	76281
		Klon 4H11(APG)	1875	9505	33609	1630	89926
		Klon QBEnd-10	604	11174	12970	1621	81530
07.03.2024	Ž/1959	Klon 581	894	40129	39930	1254	127540
		Klon 4H11(APG)	1205	32665	29227	967	98001
		Klon QBEnd-10	487	29197	13685	1018	107073
08.03.2024	Ž/1959	Klon 581	1359	44060	41632	2034	168 565
		Klon 4H11(APG)	2010	17239	37652	1020	81838
		Klon QBEnd-10	734	28959	20671	1020	101247