

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Exprese CD64 jako marker sepse
u závažně nemocných dospělých**

Diplomová práce

Bc. Eliška Fialová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: RNDr. Martin Novák, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Eliška FIALOVÁ
Osobní číslo: R18926
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Exprese CD64 jako marker sepse u závažně nemocných dospělých
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Cílem práce je ověřit možnost využití exprese CD64 na granulocytech jako časného markeru sepse u závažně nemocných (hematologické malignity, ARO, JIP). Sepse je jedním z významných faktorů mortality. Rychlejší a časnější diagnostika sepse by významně přispěla ke zkrácení doby léčby a ke zkrácení doby hospitalizace. Průtoková cytometrie je vhodným nástrojem pro rychlé a přesné stanovení exprese cílových molekul na cílových buňkách a analýza markerů sepse touto metodikou by se mohla stát funkčním diagnostickým nástrojem v rutinní praxi.

Student se bude podílet na tvorbě analytického protokolu pro stanovení exprese CD64 na granulocytech, bude provádět vlastní cytometrické analýzy a spolupracovat na statistickém vyhodnocení hypotéz.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

SHAPIRO, Howard M. Practical flow cytometry. John Wiley & Sons, 2005.

TRAPPE, U.; RIESS, H. Basics in the pathophysiology of sepsis. *Hamostaseologie*, 2005, 25.2: 175-182.

SAUER, M., et al. Procalcitonin, C-reactive protein, and endotoxin after bone marrow transplantation: identification of children at high risk of morbidity and mortality from sepsis. *Bone Marrow Transplantation*, 2003, 31.12: 1137.

HOFFMANN, Johannes JML. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 2009, 47.8: 903-916.

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Martin Novák, Ph.D.

Hemato-onkologická klinika

Datum zadání diplomové práce: 12. října 2018
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.


prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Eliška Fialová
Název práce:	Exprese CD64 jako marker sepse u závažně nemocných dospělých
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	RNDr. Martin Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Souhrn:	<p>Tato diplomová práce se zabývá potenciálním využitím exprese CD64 na neutrofilních granulocytech jako markeru sepse u závažně nemocných dospělých. K jeho stanovení byla využita metoda průtokové cytometrie.</p> <p>V teoretické části jsou shrnuty nejnovější poznatky o sepsi a její diagnostice pomocí markerů, jako je C-reaktivní protein, prokalcitonin, interleukin-6, CD64 či sTREM-1. Dále jsou zde popsány základy průtokové cytometrie.</p> <p>V praktické části je popsána metodika odběru a zpracování vzorků periferní krve, následné měření pomocí průtokového cytometru, detekce CD64 a gatovací strategie. Dále jsou zde uvedeny výsledky experimentu a jejich statistická analýza.</p> <p>Diplomová práce potvrdila význam stanovení exprese CD64 pomocí průtokové cytometrie u závažně nemocných dospělých k časně identifikaci sepse. Významným zjištěním byla možnost využití této metody u intenzivně léčených hemato-onkologických pacientů s extrémně nízkým počtem granulocytů, u kterých klasické metody selhávají.</p>
Klíčová slova:	CD64, neutrofilní granulocyty, sepse, průtoková cytometrie
Počet stran:	56
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name
and surname: Bc. Eliška Fialová

Title: Expression of CD64 as a marker of sepsis in severely ill adults

Type of thesis: Master

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: RNDr. Martin Novák, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Summary: This thesis deals with potential use of CD64 expression on neutrophilic granulocytes as a marker of sepsis in severely ill adults. Flow cytometry was used for determination of CD64.

The theoretical part summarizes the latest knowledge about sepsis and its diagnosis using markers such as C-reactive protein, procalcitonin, interleukin-6, CD64 or sTREM-1. There are also described the basics of flow cytometry.

The practical part describes the methodology of collection and processing of peripheral blood samples, subsequent measurement using a flow cytometer, CD64 detection and gating strategy. There are also the results of the experiment and their statistical analysis.

The thesis confirmed the importance of determining CD64 expression by flow cytometry in severely ill adults for early identification of sepsis. An important finding was the possible use of this method in intensively treated hemato-oncological patients with an extremely low number of granulocytes, where the classical methods fail.

Keywords: CD64, neutrophilic granulocytes, sepsis, flow cytometry

Number of pages: 56

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Martina Nováka, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 7. 5. 2020

.....

Bc. Eliška Fialová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli, RNDr. Martinu Novákovi, Ph.D., za skvělé vedení, ochotu, vstřícnost a cenné rady, které mi v průběhu zpracování mé diplomové práce udělil. Mé poděkování patří také celému kolektivu Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za přátelský přístup a spolupráci při realizaci mého výzkumu. Děkuji také RNDr. Tomáši Fürstovi, Ph.D. za trpělivost a cenné rady při statistickém vyhodnocení mé práce.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1. Definice sepsě	3
3.2. Patofyziologie sepsě	6
3.3. Jak by měl fungovat dobrý biomarker?	8
3.3.1. Interleukin-6	8
3.3.2. C-reaktivní protein	9
3.3.3. Prokalcitonin	9
3.3.4. CD64	10
3.3.5. sTREM-1	10
3.4. Mikrobiologická diagnostika sepsě	11
3.5. Průtoková cytometrie	12
3.5.1. Fluidní systém	14
3.5.2. Optický systém	15
3.5.3. Elektronický systém	16
3.5.4. Fluorescence	17
4. MATERIÁL A METODY	18
4.1. Biologický materiál	18
4.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky	18
4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení	18
4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	19
4.4.1. Odběr žilní krve pro hematologická vyšetření	19
4.4.2. Vyšetření periferní krve metodou průtokové cytometrie	19
4.5. Statistická analýza	23
5. VÝSLEDKY	24
5.1. Charakteristika měřené skupiny pacientů	24
5.2. Stanovení markerů sepsě	24
5.3. Cytometrické stanovení sepsě	26
5.4. Statistická analýza naměřených dat	29
5.4.1. Pacienti z oddělení IPCHO a KAR	29
5.4.2. Pacienti z oddělení HOK	32

6. DISKUSE	34
7. ZÁVĚR	38
8. LITERATURA	39

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Adrenalin
ADC	Analog-to-Digital Converter
APC	Allophycocyanin
AUC	Area Under the Curve
CARS	Compensatory Anti-Inflammatory Reaction (Kompenzační protizánětlivá reakce)
CRP	C-reaktivní protein
CytoF	Cytometry by Time-Of-Flight
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
DOB	Dobutamin
DOP	Dopamin
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
Fc γ RI	Fc-gamma receptor I
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FSC	Forward scatter
GCS	Glasgow Coma Scale
GvHD	Graft versus Host Disease (Reakce štěpu proti hostiteli)
GvL	Graft versus Leukemia (Reakce štěpu proti leukémii)
HOK	Hemato-onkologická klinika
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleukin-1
IL-10	Interleukin-10
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IPCHO	Intenzivní péče chirurgických oborů
JIP	Jednotka intenzivní péče
KA	Katecholaminy
KAR	Klinika anesteziologie a resuscitace
MAP	Mean Arterial Pressure (střední arteriální tlak)
MARS	Mixed Antagonistic Response Syndrome

MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome (Syndrom multiorgánové dysfunkce)
MOF	Multiple Organ Failure (Multiorgánové selhání)
NA	Noradrenalin
Ne	Neutrofilní granulocyty
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NIH	The National Institutes of Health (Národní ústav zdraví)
NLRs	NOD-like receptors
OKB	Oddělení klinické biochemie
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate-buffered saline
PCT	Prokalcitonin
PE	Phycoerythrin
PMTs	Photomultiplier tubes (fotonásobiče)
PRRs	Pattern Recognition Receptors
qSOFA	quick SOFA
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (Syndrom systémové zánětové reakce)
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SSC	Side scatter
sTREM-1	Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1
TLRs	Toll-like receptors
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor- α
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1
UPV	Umělá plicní ventilace
WBC	White Blood Cells (leukocyty)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění patofyziologie sepse.....	7
Obrázek 2: Schéma průtokového cytometru se sortovacím modulem.....	13
Obrázek 3: Hydrodynamická fokusace ve fluidním systému.....	14
Obrázek 4: Schéma rozptylu světla (FSC a SSC) v optickém systému.....	15
Obrázek 5: Schématické znázornění principu head-on typu fotonásobiče.....	16
Obrázek 6: Stokesův posun.....	17
Obrázek 7: Cytometrická analýza pacienta z oddělení KAR s potvrzenou sepsí (1. část)	21
Obrázek 8: Cytometrická analýza pacienta z oddělení KAR s potvrzenou sepsí (2. část)	22
Obrázek 9: Porovnání naměřených hodnot CD64+/CD15+ buněk u pacientů z oddělení IPCHO a KAR s různým statusem sepse.....	27
Obrázek 10: Detekce CD64+/CD15+ buněk u pacienta z oddělení HOK v těžké agranulocytóze.....	28
Obrázek 11: Graf srovnání CD64 a CRP jako markerů sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR.....	29
Obrázek 12: Zlogaritmovaná podoba grafu srovnávajícího CD64 a CRP jako markery sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR.....	30
Obrázek 13: Zlogaritmovaná podoba grafu srovnávajícího CD64 a PCT jako markery sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR.....	31
Obrázek 14: ROC křivky pro CD64+/CD15+, CRP a PCT.....	31
Obrázek 15: Graf srovnání CD64 a Ne u pacientů z oddělení HOK.....	32
Obrázek 16: Zlogaritmovaná podoba grafu srovnávajícího CD64 a Ne u pacientů z oddělení HOK.....	33

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Diagnostická kritéria SIRS.....	3
Tabulka 2: Diagnostická kritéria sepse.....	4
Tabulka 3: SOFA skóre.....	5
Tabulka 4: qSOFA skóre.....	5
Tabulka 5: Naměřené hodnoty markerů sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR.....	24-25
Tabulka 6: Naměřené hodnoty markerů sepse u pacientů z oddělení HOK.....	26

1. ÚVOD

Sepse je závažný, život ohrožující stav, který je hlavní příčinou morbidit a mortality po celém světě. Včasná identifikace sepse a okamžité nasazení antimikrobiální léčby je klíčové pro přežití pacienta.

Diagnostických metod ke stanovení sepse existuje hned několik. C-reaktivní protein a prokalcitonin jsou dva běžně používané markery v klinické praxi. Tyto markery se však ukazují jako ne zcela spolehlivé a jejich hladiny se zvyšují až několik hodin po vniku patogenu do krevního oběhu a vzniku sepse. Další metodou je mikrobiologické stanovení patogenů v hemokultuře. Tento způsob je však zdlouhavý a často neposkytuje přesné výsledky z důvodu zaléčení pacienta antibiotiky.

V posledních letech se ukazuje, že zvýšená exprese CD64 na granulocytech souvisí se septickými stavy a mohla by tak být vhodnou metodou pro stanovení sepse pomocí průtokové cytometrie u závažně nemocných dospělých pacientů. CD64 je glykoprotein podílející se na imunitní odpovědi. Tento imunoglobulinový receptor se za fyziologických podmínek v malém množství exprimuje na neutrofilních granulocytech, ale při zánětu jeho exprese prudce narůstá. Z tohoto důvodu se jeví jako vhodný marker sepse. Jeho potenciální využití u hemato-onkologických pacientů, kteří jsou po transplantaci krvetvorných buněk v těžké agranulocytóze, je klíčové.

2. CÍLE PRÁCE

1. Zpracování literární rešerše na téma sepse a její diagnostika, popis principů průtokové cytometrie.
2. Zvládnutí techniky stanovení exprese CD64 na granulocytech metodou průtokové cytometrie.
3. Statistický průkaz korelace mezi expresí CD64 na granulocytech a přítomností sepse.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Definice sepse

Sepse patří mezi hlavní příčiny úmrtí u kriticky nemocných pacientů a její incidence neustále roste. Hlavním problémem je pozdní diagnostika a opožděné či nesprávné nasazení antimikrobiální léčby.

Termín sepse (sepsis) původně označoval zkažené maso či hnilobu a jako první jej použil Hippokrates. V našich zemích byla sepse často označována jako tzv. otrava krve. První vědecká definice byla publikována v roce 1914 v práci německého bakteriologa Huga Schmottmüllera. Ten ji definoval jako přítomnost ložiska bakteriální infekce, ze kterého se vyplavují bakterie do krevního řečiště, což vede k celkovým projevům a metastatickým infekcím. Roku 1989 Roger Bone poprvé použil termín syndrom systémové zánětové reakce (SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome), jehož příznaky jsou uvedeny v Tabulce 1 (Holub, 2007; Holub, 2018).

Tabulka 1: Diagnostická kritéria SIRS (Bone *et al.*, 1992)

Tělesná teplota	>38 °C nebo <36 °C
Tepová frekvence	>90/min
Dechová frekvence	>20/min nebo PaCO ₂ <32 mm Hg (4,3 kPa)
Počet leukocytů	>12 000/mm ³ nebo <4000/mm ³ nebo počet nezralých neutrofilů (tyčí) >10 %

V roce 1991 proběhla konsenzuální konference v Chicagu, na které byla definována sepse jako systémová zánětlivá odpověď na infekci (Bone *et al.*, 1992). Sepse komplikovaná orgánovou dysfunkcí byla označena jako těžká sepse. Ta může postoupit až do stádia septického šoku. Jelikož pro konstatování diagnózy SIRS byla postačující přítomnost pouze dvou ze všech uvedených příznaků, byla tato definice kritizována z důvodu malé specifčnosti a vysoké falešné pozitivivity (Singer *et al.*, 2016). Proto byl v roce 2001 na další konsenzuální konferenci rozšířen seznam diagnostických kritérií sepse (Tabulka 2) a byl navržen staging sepse pomocí tzv. PIRO klasifikace. Ta měla pomoci lépe posoudit stav a prognózu pacienta. Koncept PIRO vycházel ze čtyř hlavních charakteristik sepse: predispozice k sepsi (P), vyvolávající infekce (I), hostitelská odpověď na infekci (R) a stav orgánů (O) (Martin, 2012).

Tabulka 2: Diagnostická kritéria sepse (Levy *et al.*, 2003)

Prokázaná či předpokládaná infekce a některý z následujících příznaků:	
Obecné příznaky	Horečka či hypotermie, tachykardie, tachypnoe, porucha vědomí, hyperglykémie bez vysvětlitelné příčiny
Zánětlivé ukazatele	Leukocytóza či leukopenie, zvýšený C-reaktivní protein, zvýšený prokalcitonin
Ukazatele tkáňové perfuze	Zvýšený laktát, zhoršený kapilární návrat
Příznaky orgánové dysfunkce	Nevysvětlitelná hypoxie, akutní oligurie, koagulační poruchy, ileus, hyperbilirubinémie, trombocytopenie

V únoru 2016 vyšla nová definice sepse, kterou vytvořili zástupci dvou velkých odborných společností – ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) a SCCM (Society of Critical Care Medicine). Byla nazvána Sepsis-3 a měla za cíl odlišit sepsi od nekomplikované infekce (Holub, 2018). Sepse je nově definována jako život ohrožující orgánová dysfunkce plynoucí z nepřiměřené odpovědi hostitele na infekci (Singer, 2016). Dalším problémem byla nepřiliš vypovídající kritéria SIRS, neboť mohla být přítomna i u pacientů bez infekce nebo u nemocných s příznivou prognózou. Pozornost tedy byla přesunuta na známky orgánové dysfunkce, jejíž závažnost byla kvantifikována skórovacím systémem SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), který je uveden v Tabulce 3. Sepse je zde klinicky definována jako vzestup SOFA skóre o více než dva body při prosté přítomnosti infekce (Singer *et al.*, 2016). Septický šok je pak charakterizován jako sepse s přítomností buněčných, metabolických a oběhových abnormalit, které jsou tak závažné, že mohou vést ke smrti. Pro klinické stanovení septického šoku je důležitá přítomnost perzistující hypotenze, při které je nutné podávat vasopresory k udržení dostatečného středního arteriálního tlaku při současném zvýšení laktátu v krvi (Shankar-Hari *et al.*, 2016).

Tabulka 3: SOFA skóre (Singer *et al.*, 2016)

Orgán/systém	Skóre				
	0	1	2	3	4
Respirační systém [mm Hg]	≥400	<400	<300	<200 s UPV	<100 s UPV
Koagulace Trombocyty [$\times 10^9/l$]	≥150	<150	<100	<50	<20
Játra Bilirubin [$\mu\text{mol/l}$]	<20	20-32	33-101	102-204	>204
Kardiovaskulární systém Hypotenze/dávky KA	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	DOP <5 nebo DOB	DOP 5,1-15 nebo A <0,1 nebo NA <0,1	DOP >15 nebo A >0,1 nebo NA >0,1
Centrální nervový systém Glasgow Coma Scale	15	13-14	10-12	6-9	<6
Ledviny Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$] nebo diuréza	<110	110-170	171-299	300-440 nebo <500 ml/24 hod	>440 nebo <200 ml/24 hod

Legenda: UPV = umělá plicní ventilace, MAP = střední arteriální tlak, KA = katecholaminy, DOP = dopamin, DOB = dobutamin, A = adrenalin, NA = noradrenalin (všechny katecholaminy v $\mu\text{g/kg/min}$)

Jelikož byla klinická kritéria sepsse vytvořena primárně pro pacienty na jednotkách intenzivní péče, byla někdy obtížně použitelná u pacientů na standardních odděleních. Z tohoto důvodu byl vytvořen nový skórovací systém, tzv. quick SOFA (qSOFA), který by měl zavčas vyhledat rizikové septické pacienty a současně by byl méně náročný na dostupnost laboratorních vyšetření. Pacient, u něhož jsou dle qSOFA přítomny alespoň dva ze tří uvedených parametrů (Tabulka 4), je považován za rizikového (Holub, 2018).

Tabulka 4: qSOFA skóre (Singer *et al.*, 2016)

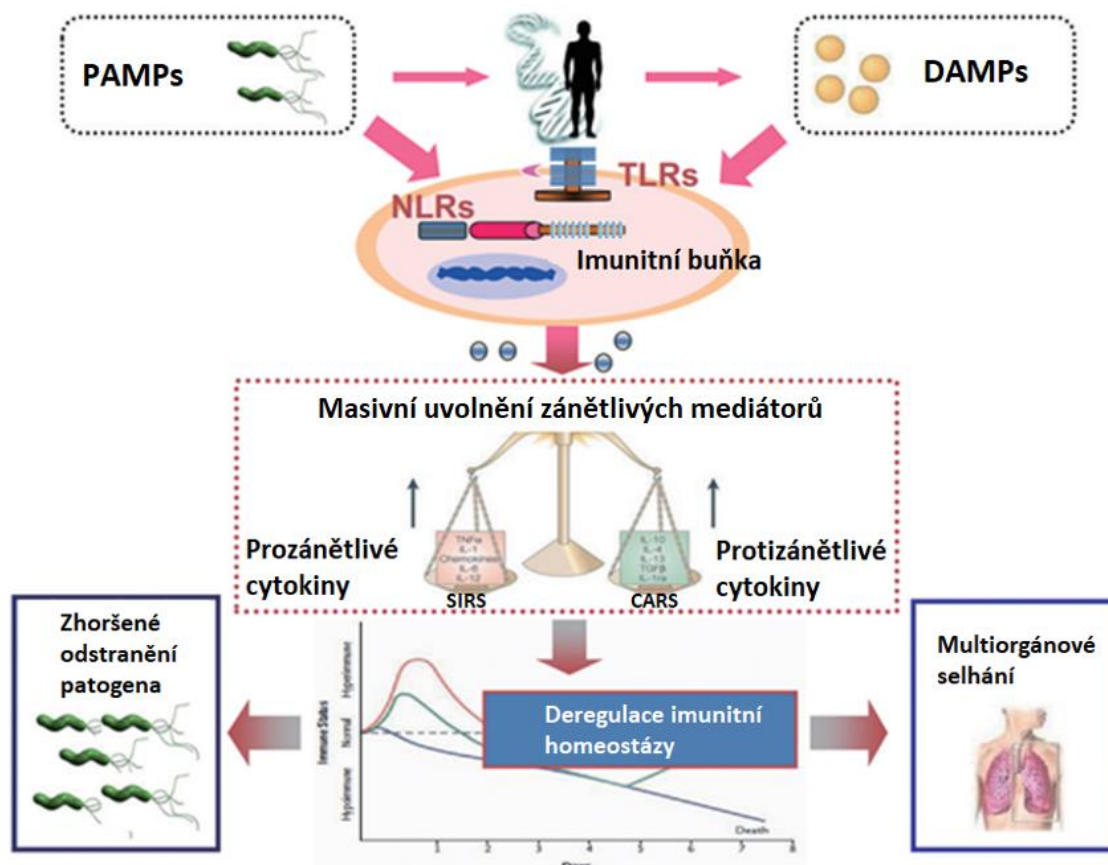
Dechová frekvence	≥22 dechů/min
Alterace stavu vědomí	GCS <15
Systolický tlak	≤100

Legenda: GCS = Glasgow Coma Scale

3.2. Patofyziologie sepse

Při průniku bakteriálního patogenu do těla typicky dojde ke vzniku zánětlivé odpovědi. Jako první je aktivován vrozený imunitní systém, dojde k produkci řady prozánětlivých cytokinů a v ideálním případě je patogen touto obrannou linií eliminován (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011). U některých pacientů však může lokální zánět či poškození tkáně progredovat v syndrom systémové zánětlivé odpovědi. Pacienti se SIRS s předpokládanou či potvrzenou infekcí jsou považováni za septické. Jedním z hlavních problémů sepse je vývoj syndromu multiorgánové dysfunkce (MODS – Multiple Organ Dysfunction Syndrome), která může vyústit až v multiorgánové selhání (MOF – Multiple Organ Failure) (Jacoby, 2002).

Patogen po vstupu do těla exprimuje signální molekuly, tzv. PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Ty jsou imunitním systémem rozpoznávány pomocí PRRs (Pattern Recognition Receptors) a spouští odpovídající reakci (Chousterman *et al.*, 2017). PAMPs jsou vysoce konzervativní antigeny, typicky bakteriálního či houbového původu. Po navázání na PRRs je spuštěna kaskáda reakcí, zahrnující mimo jiné i lýzu buněk a vylití intracelulárních molekul do extracelulárního prostoru. Tyto molekuly se nazývají DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) a stejně jako PAMPs indukují zánětlivou odpověď. Současně tělo zahajuje kompenzační protizánětlivou reakci, tzv. CARS (Compensatory Anti-Inflammatory Reaction), která spouští uvolnění nejrůznějších protizánětlivých látek (Larsen *et Petersen*, 2017). Nejprve se předpokládalo, že pokud bude CARS převažovat nad SIRS, dojde k imunosupresi, která zvýší náchylnost pacienta k sekundární (např. nozokomiální) infekci. Později se však ukázalo, že jde spíše o kombinaci SIRS a CARS, tzv. MARS (Mixed Antagonistic Response Syndrome), při které jsou aspekty prozánětlivé i protizánětlivé odpovědi současně upraveny a/nebo deregulovány (Obrázek 1) (Chun *et al.*, 2017).



Obrázek 1: Schématické znázornění patofyziologie sepse.

PAMPs a DAMPs jsou rozpoznávány receptory (PRRs) jako jsou TLRs a NLRs. Nerovnováha mezi prozánětlivou a protizánětlivou odpovědí vede k deregulaci imunitní homeostázy. Výsledkem je zhoršení v odstraňování patogenu a multiorgánové selhání. PAMPs = Pathogen Associated Molecular Patterns, DAMPs = Damage Associated Molecular Patterns, NLRs = NOD-like receptory, TLRs = Toll-like receptory, SIRS = syndrom systémové zánětlivé reakce, CARS = kompenzační protizánětlivá reakce (převzato a upraveno z Liu *et al.*, 2017)

Pro indukci zánětlivé odpovědi je důležitá translokace NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) do jádra a následná aktivace cílových genů včetně genů kódujících cytokiny (Chousterman *et al.*, 2017). Cytokiny jsou široká skupina relativně malých proteinů, které jsou produkovány a uvolňovány s cílem buněčné signalizace. Můžeme je rozdělit do několika kategorií: interleukiny (IL), chemokiny, interferony, tumor nekrotizující faktory (TNF) a růstové faktory. Obecně se cytokiny dělí na prozánětlivé, které navozují a posilují imunitní odpověď a protizánětlivé, které tlumí zánět a podporují imunosupresi (Stearns-Kurosawa *et al.*, 2011). Mezi nejvýznamnější

prozánětlivé cytokiny patří IL-1 β , IL-6, TNF- α a mezi protizánětlivé IL-10 (Chousterman *et al.*, 2017).

3.3. Jak by měl fungovat dobrý biomarker?

Národní ústav zdraví (NIH – The National Institutes of Health) definuje biomarker jako ukazatel, který by měl objektivně měřit a hodnotit normální biologické procesy nebo odpověď na terapeutický zásah. Biomarkery by měly být měřitelné přesně a opakovatelně. Měly by být použitelné jako diagnostický nástroj pro identifikaci onemocnění či abnormálních stavů, stejně tak pro staging onemocnění, prognózu a reakci na terapii (Biron *et al.*, 2015). Jako marker sepse bylo navrženo a klinicky testováno více než 170 různých molekul, ale žádná z nich neměla 100% specifitu pro sepsi (Vincent, 2016).

3.3.1. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) je cytokin sekretovaný aktivovanými monocyty a makrofágy, mající široké rozpětí biologických aktivit (Russel *et al.*, 2018). V 80. letech minulého století byly několika nezávislými skupinami studovány jeho odlišné funkce, a proto získal mnoho názvů na základě své biologické aktivity. Až později byl název sjednocen na IL-6 (Kishimoto, 1989). V počátečním stádiu zánětu je syntetizován v lokální lézi a poté je krví transportován do jater, kde vyvolá rapidní indukci produkce proteinů akutní fáze (C-reaktivní protein, sérový amyloid A, fibrinogen a další) a funguje jako varovný signál pro celé tělo (Tanaka *et al.*, 2014). U zdravých dospělých je koncentrace IL-6 v rozmezí 0,2-7,8 pg/ml a při sepsi může přesáhnout hodnotu 1600 pg/ml (Molano Franco *et al.*, 2015). Několik studií ukázalo, že zvýšená hladina IL-6 u septických pacientů koreluje se zvýšenou mortalitou. Nemocní s hodnotami vyššími než 500 pg/ml vykazovali 11% úmrtnost, kdežto hodnoty vyšší než 7500 pg/ml byly asociovány s 37% úmrtností. Jedná se tedy o významný prognostický marker (Russel *et al.*, 2018). IL-6 patří mezi prozánětlivé cytokiny, stejně jako IL-1, IL-8 či TNF- α . Přestože jsou prozánětlivé cytokiny dobrými ukazateli infekce, jsou produkovány také po chirurgickém zákroku, u autoimunitních poruch, virové infekci či při odmítnutí transplantátu, což snižuje jejich specifitu (Biron *et al.*, 2015).

3.3.2. C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) byl popsán roku 1930 a svůj název získal ze schopnosti precipitace C-polysacharidu *Streptococcus pneumoniae* v plazmě během akutní fáze zápalu plic (Tillett *et Francis*, 1930). CRP je protein akutní fáze, který je syntetizován a uvolňován játry jako součást nespecifické reakce na zánět či poškození tkáně (Gabay *et Kushner*, 1999). Z tohoto důvodu se rutinně využívá ke stanovení přítomnosti zánětu v těle (Santonocito *et al.*, 2014). CRP je také schopen rozlišit mezi virovou a bakteriální infekcí, což je významné při rozhodování o nasazení antibiotické léčby (Biron *et al.*, 2015). Fyziologická hodnota CRP je 0,8 mg/l, avšak po stimulaci v akutní fázi může jeho hladina narůst až na 500 mg/l. Hladina vyšší než 5 mg/l značí bakteriální zánět. Syntéza CRP je pod kontrolou IL-6 a při zánětu se začne zvyšovat po zhruba 6 hodinách, maxima pak dosáhne do 48 hodin. Poločas rozpadu CRP v plazmě je asi 19 hodin (Pepys *et Hirschfield*, 2003). Ačkoli je CRP citlivý marker, není příliš specifický, jelikož jeho hladina narůstá u všech zánětlivých poruch, včetně nekomplikovaných pooperačních stavů. Obecně je CRP vhodnějším markerem pro vyloučení sepse než pro její potvrzení (Vincent, 2016).

3.3.3. Prokalcitonin

Prokalcitonin (PCT) je prohormon kalcitoninu a je fyziologicky produkován C-buňkami štítné žlázy (Maruna *et al.*, 2000). Vzestup jeho hladiny v séru byl poprvé spojen s diagnózou sepse v roce 1993 (Assicot *et al.*, 1993). Fyziologická hladina PCT v séru je méně než 0,1 ng/ml, avšak může být vyšší u novorozenců první 2-4 dny po porodu. Hladina vyšší nebo rovna 0,5 ng/ml je považována za abnormální a značí přítomnost sepse. Při bakteriální infekci se může hladina PCT zvýšit až nad 100 ng/ml (Nieves *et al.*, 2017). Hladina PCT v séru narůstá přibližně od 4 hodin po nástupu systémové infekce a maxima dosahuje mezi 8-24 hodinami. Tyto údaje se však u různých zdrojů mírně liší. Poločas rozpadu PCT je 24 hodin (Kibe *et al.*, 2011). Tento včasný nárůst a relativně krátký poločas rozpadu dělá z PCT dobrý marker infekce. Ačkoli je jeho specifita o něco vyšší než u CRP, nevýhodou je, že koncentrace PCT nekoreluje se závažností sepse či s úmrtností. Monitoring koncentrace PCT v séru je však cenný pro sledování klinické odpovědi na terapii a hraje důležitou roli ve snížení zbytečného užívání antibiotik v prostředí JIP (Larsen *et Petersen*, 2017). PCT může být

také užitečný pro rozlišení mezi bakteriální a virovou infekcí, jelikož zřídka narůstá při virové infekci (Lee, 2013).

3.3.4. CD64

CD64 neboli Fc γ RI (Fc-gamma receptor I) je glykoprotein, který se váže na Fc část molekuly IgG (Guyre *et al.*, 1989). Fc receptory se podílejí na vrozené a adaptivní imunitní odpovědi a stimulují buď fagocytózu nebo protilátkami zprostředkovanou cytotoxicitu (Biron *et al.*, 2015). Jedná se tedy o vysokoafinitní imunoglobulinový receptor exprimovaný v nízkých koncentracích na neaktivovaných neutrofilech. Jeho hladina prudce stoupá po infuzi prozánětlivých cytokinů a jeho exprese časově a kvantitativně koreluje s expresí těchto prozánětlivých cytokinů jako jsou IFN- γ , TNF- α a IL-6. (Larsen *et Petersen*, 2017). CD64 je považován za časný marker sepse, jelikož jeho hladina narůstá již hodinu po bakteriální infekci. Exprese CD64 poté zůstává stabilní po více než 24 hodin (Dai *et al.*, 2017). Za fyziologických podmínek je hladina CD64 na membráně neutrofilů asi 1000 molekul na buňku. Po aktivaci neutrofilů prozánětlivými cytokiny se tato hladina může zvýšit až 10x (Hoffmann, 2011). CD64 vykazuje vyšší senzitivitu i specifitu než CRP či IL-6 (Umlauf *et al.*, 2013). Vývoj průtokové cytometrie umožnil rychlé a precizní stanovení exprese CD64 z velmi malého objemu krve (Dai *et al.*, 2017).

3.3.5. sTREM-1

V roce 2000 byl objeven nový receptor exprimovaný na neutrofilech a monocytech, hrající roli v zánětlivé odpovědi, který byl nazván TREM-1, neboli Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1. TREM-1 aktivuje zánětlivou reakci, syntézu prozánětlivých mediátorů (TNF- α , IL-6 a IL-8) a inhibuje protizánětlivé mediátory (IL-10) (Bouchon *et al.*, 2001; Zhang *et Zhang*, 2018). Rozpustná forma (sTREM-1) je uvolněna do oběhu po proteolytickém odštěpení extracelulární domény metaloproteázou (Petric *et al.*, 2018; Zidan *et al.*, 2016). V literatuře jsou udávány různé hodnoty pro cut-off (od 40 do 3500 pg/ml) (Larsen *et Petersen*, 2017). Ve srovnání s CRP a dalšími markery sTREM-1 lépe koreluje s vážností zánětlivého onemocnění a může být použit ke zhodnocení léčby a prognózy infekce. (Zhang *et Zhang*, 2018).

3.4. Mikrobiologická diagnostika sepse

Standartní diagnostickou metodou sepse je mikrobiologické stanovení patogenů v hemokultuře (Cantey *et Baird*, 2017). Cílem kultivace u septických pacientů je izolovat mikroorganismy pro identifikaci a testování citlivosti k antibiotikům, aby bylo možné optimalizovat počáteční terapii (Westh *et al.*, 2009).

Optimální je odběr dvou vzorků v jedné sadě (pro aerobní i anaerobní kultivaci) před nasazením antimikrobiální léčby (Morgenthaler *et Kostrzewa*, 2015). Na 1 hemokultivační nádobku se odebírá kolem 10 ml krve a lahvička je vložena do speciálního inkubátoru na 5-7 dní. Obsah pozitivní lahvičky je vyočkován na tuhé kultivační půdy a z roztěru je zhotoven mikroskopický preparát, který se barví podle Grama. Dále je provedeno stanovení citlivosti diskovou metodou přímo z obsahu lahvičky (tzv. přímá citlivost). Zároveň s odběrem krve se bere stěr z kůže pacienta v místě vpichu, který se poté kultivuje na tuhé půdě pro vyloučení kontaminace jehly při odběru (Komendová, 2017).

Opoždění v nasazení antimikrobiální léčby může být pro nemocného poškozující, avšak okamžitý začátek terapie s potenciální ztrátou citlivosti detekce patogenu také (Sheer *et al.*, 2018). Dalším problémem je rychlé nasazení širokospektrálních antibiotik, což může vést ke vzniku rezistence. Rychlá a správná počáteční antimikrobiální léčba je klíčová pro úspěšnost vyléčení septických pacientů, jelikož míra přežití neléčených pacientů klesá každou hodinou (Morgenthaler *et Kostrzewa*, 2015).

3.5. Průtoková cytometrie

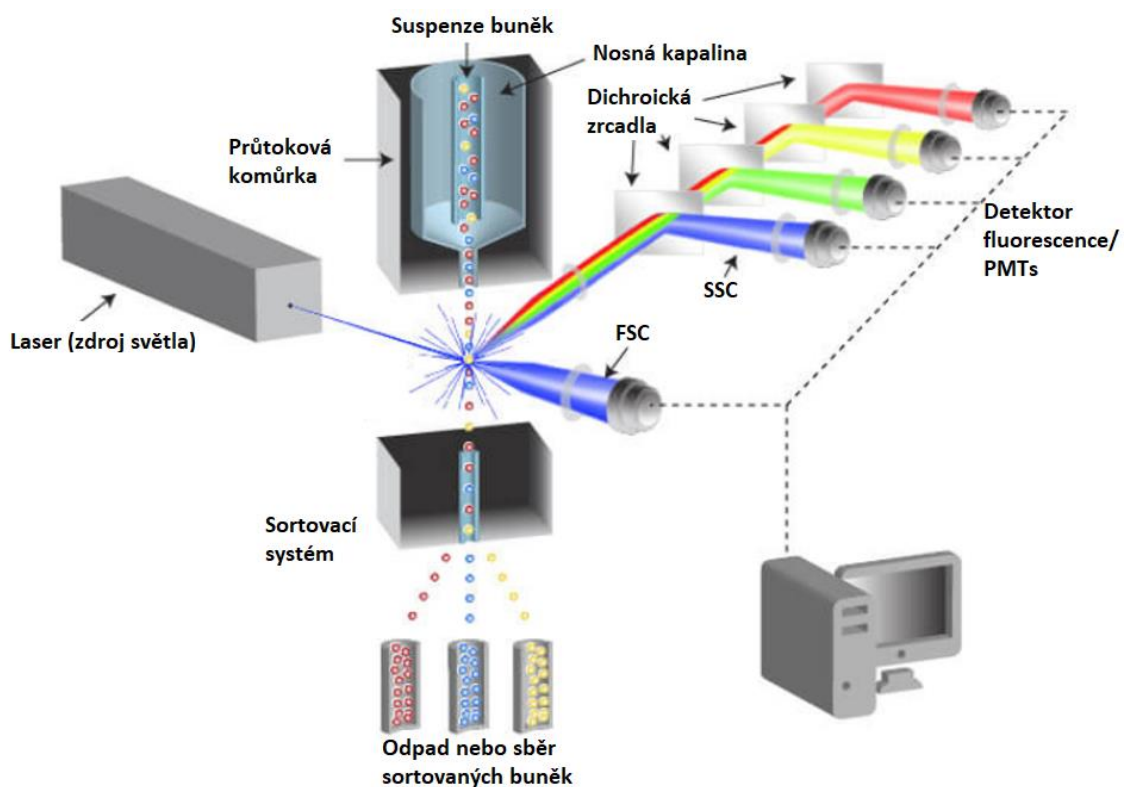
Průtoková cytometrie je bioanalytická metoda, která využívá jevů ohybu a rozptylu světla spolu s interakcí fotonů s fluorochromy navázanými na protilátkovém nosiči k vizualizaci a kvantifikaci cílových buněk. Analyzované elementy jsou k měřicímu bodu unášeny nosnou kapalinou uživatelsky definovanou rychlostí s přesnými rozestupy, což dovoluje přiřadit naměřená data každé jednotlivé měřené buňce a použít je tak k další analýze (Shapiro, 2003).

Počátky průtokové cytometrie sahají do 50. let minulého století, kdy si Wallace Coulter nechal patentovat Coulterův impedanční princip. Jednalo se o metodu stanovení počtu a velikosti částic ve vodivé kapalině (Macey, 2007). Roku 1972 skupina Lena Herzenbergera představila FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter), což je průtokový cytometr, který dokáže oddělit fluorescenčně značené buňky ze smíšené populace. O dva roky později Becton-Dickinson představil komerčně dostupnou verzi tohoto přístroje (Adan *et al.*, 2016; Shapiro, 2003). V roce 1975 Köhler a Milstein popsali způsob standardizovatelné produkce monoklonálních protilátek, za což obdrželi Nobelovu cenu. Tento objev umožnil reprodukovatelnou imunofenotypizaci pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorochromy (Šinkorová *et Zárýbnická*, 2008).

V posledních desítkách let došlo v průtokové cytometrii k mnoha technologickým pokrokům, které umožňují současné měření mnoha parametrů na jedné buňce. Nejvýznamnějším pokrokem bylo rozšíření klasického designu o další výkonné lasery. Spolu s vývojem nových fluorochromů se nyní rutinně využívá 18-parametrová průtoková cytometrie. Nedávno se stala komerčně dostupnou 30-parametrová průtoková cytometrie a v brzké době by mohlo být dosaženo až 50 parametrů v jedné analýze současně. Jedná se o spojení principu průtokové cytometrie s hmotnostní spektrometrií, tzn. CyTOF (Cytometry by Time-Of-Flight), která teoreticky umožňuje měřit až 100 parametrů současně. Nevýhodou tohoto systému je, že měřené buňky jsou během procesu analýzy zničeny, což znemožňuje následné sortování částic. Další technologií je spektrální průtoková cytometrie, která se liší od klasické průtokové cytometrie tím, že využívá speciální disperzní optiku a lineární array detektorů, které zaznamenávají celé emisní spektrum. Tím je mimo jiné vyřešen problém s autofluorescencí. Spojením průtokové cytometrie a multispektrálním zobrazovacím systémem s vysokým

rozlišením vznikla tzv. zobrazovací průtoková cytometrie (imaging flow cytometry). Dokáže pořídit několik snímků jedné buňky rychlostí 5000 buněk za sekundu. Tím získáme další informace o morfologii buňky, kolokalizaci či buněčné signalizaci. Odlišným principem funguje tzv. zobrazovací hmotnostní cytometrie (imaging mass cytometry), která skenuje tkáňové řezy a odpařováním místa vedle místa získáme informace o 32 markerech z každého spotu (Sayes *et al.*, 2016).

Průtokový cytometr je tvořen 3 základními vzájemně propojenými systémy (fluidika, optika a elektronika). Součástí specializovaných cytometrů může být i sortovací systém.

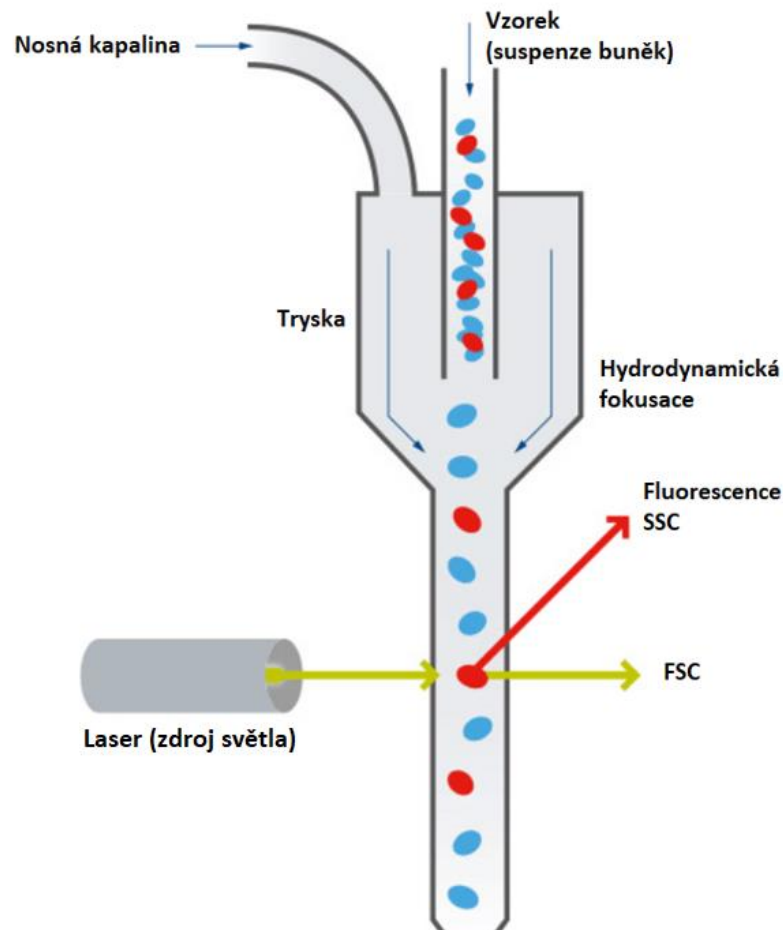


Obrázek 2: Schéma průtokového cytometru se sortovacím modulem

Suspenze buněk je unášena nosnou kapalinou skrz průtokovou komůrku k měřicímu bodu. Fluorescenčně značené buňky zde procházejí laserovým paprskem, čímž dojde k rozptylu světla. Detektory zaznamenávají přímý rozptyl (FSC = forward scatter), boční rozptyl (SSC = side scatter) a intenzitu fluorescence. Tyto optické signály jsou pak převedeny na elektrické a ty jsou graficky znázorněny v počítači. Některé specializované cytometry obsahují sortovací systém, který slouží k separaci vybraných populací buněk. PMTs = fotonásobiče (photomultiplier tubes) (převzato z: https://www.cellsignal.com/contents/_/overview-of-flow-cytometry/flow-cytometry-overview, online 9. 3. 2020)

3.5.1. Fluidní systém

Zajišťuje transport suspenze buněk do průtokové komůrky. Zde jsou buňky seřazeny jedna za druhou a procházejí laserovými paprsky, čímž dojde k excitaci fluorochromu navázaného na protilátce (Šinkorová *et Zárýbnická*, 2008). Suspenze buněk je vstříkována do průtokové komůrky, kde je obklopena proudem nosné kapaliny (tzv. sheath fluid). Jedná se většinou o fyziologický roztok obohacený o fosfátový pufr a protipěňivé přísady (PBS = phosphate-buffered saline) a protéká pod nižším tlakem než vzorek. Tím je dosaženo koaxiálního proudění, kdy je proud vzorku zaostřen do středu nosné kapaliny a buňky protékají jedna za druhou. Tento jev se nazývá hydrodynamická fokusace a zajistí uniformní pozici jednotlivých buněk vzhledem k paprsku laseru (Adan *et al.*, 2016).

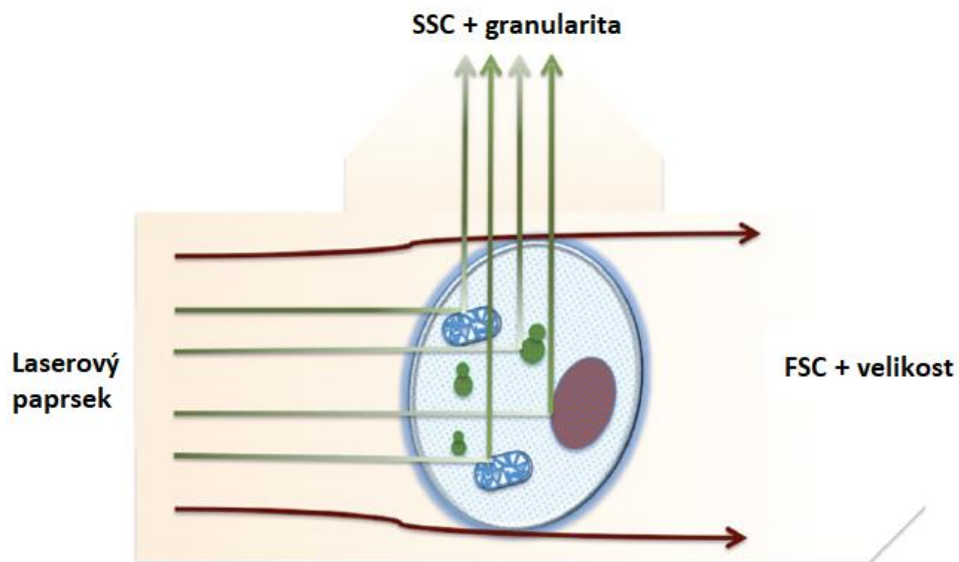


Obrázek 3: Hydrodynamická fokusace ve fluidním systému

Nosná kapalina zaostřuje buněčnou suspenzi tak, aby jednotlivé buňky procházely laserem jedna za druhou. Tento jev se nazývá hydrodynamická fokusace. (převzato a upraveno z: <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>, online 14. 2. 2020)

3.5.2. Optický systém

Zahrnuje lasery (excitační zdroje) a sběrné optické dráhy, které zachycují fluorescenční a rozptýlené záření pomocí systému čoček, zrcadel a optických filtrů. Toto záření pak přivádí na opticky aktivní vrstvu optoelektronických detektorů (fotonásobičů a fotodiod), které tvoří rozhraní mezi optickým a elektronickým systémem průtokového cytometru (Šinkorová *et Zárýbnická*, 2008). Jakmile buňka protne laserový paprsek, dojde k rozptylu světla, a ten je následně detekován. Prvním měřeným parametrem je přímý rozptyl (FSC – Forward scatter), který je měřen pod stejným úhlem jako laserový paprsek. Odpovídá velikosti a povrchu buňky. Druhým parametrem je boční rozptyl (SSC – Side scatter), který je měřen pod úhlem 90°. Odráží granularitu a vnitřní komplexitu buněk (Adan *et al.*, 2016). Dalším parametrem je intenzita fluorescence emitovaná po ozáření fluorescenčně značených protilátek navázaných na antigeny buněk. Pomocí těchto parametrů dokážeme rozlišit různé typy buněk v heterogenní populaci (Virgo *et Gibs*, 2012).

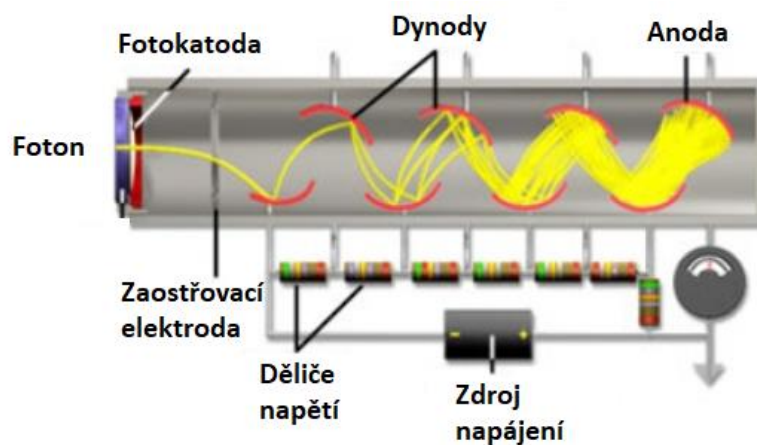


Obrázek 4: Schéma rozptylu světla (FSC a SSC) v optickém systému

Přímý rozptyl (FSC) odpovídá velikosti a povrchu buňky, zatímco boční rozptyl (SSC) odpovídá granularitě a vnitřní komplexitě buňky. SSC je měřen pod úhlem 90°. (převzato a upraveno z: Adan *et al.*, 2016)

3.5.3. Elektronický systém

Z technického hlediska se jedná o nejsložitější systém průtokového cytometru. Jeho úkolem je převádění optických signálů (fluorescence a rozptyl) na signály elektronické, které dále zesiluje, digitalizuje a zpracovává do formy, kterou je grafická reprezentace jednotlivých buněk na monitoru řídicího počítače (Šinkorová *et Zárýbnická*, 2008). Světelný signál je generován, jakmile částice putující v proudu kapaliny protne laserový paprsek. Tento signál je převeden na napěťový puls pomocí fotodetektorů. Existují dva typy detektorů, které se liší svou citlivostí: fotodiody slouží k detekci silnějších světelných signálů generovaných FSC a fotonásobiče detekují a zesilují slabší signály generované SSC a fluorescencí (Adan *et al.*, 2016). Fotony světla dopadající na detektory jsou převedeny na elektrický impuls, který je zpracován pomocí ADC (Analog-to-Digital Converter). Tento převodník mění elektrický puls na číselný digitální signál. Intenzita fluorescence je zaznamenávána výpočetním systémem a zobrazena jako frekvence distribuce (Macey, 2007).



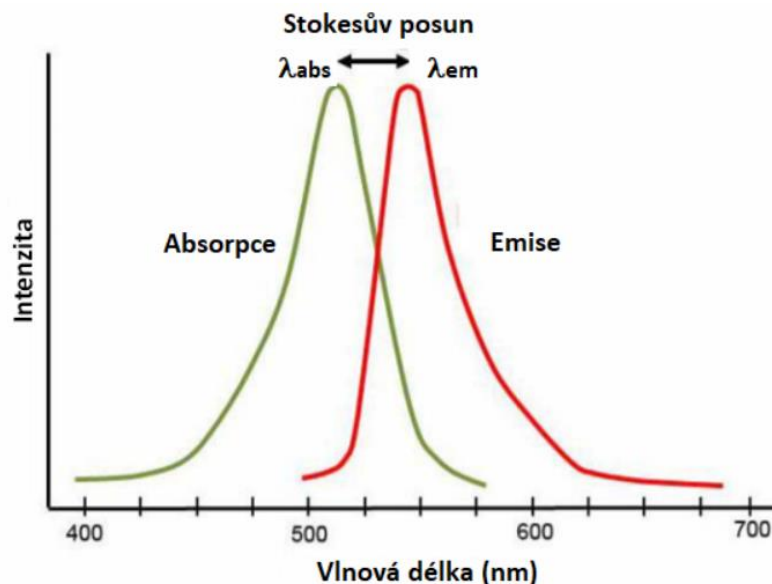
Obrázek 5: Schématické znázornění principu head-on typu fotonásobiče

Fotonásobič je vakuová trubice obsahující fotokatodu, řadu zesilovacích elektrod (dynod) a anodu. Po dopadu fotonu na fotokatodu dojde k fotoelektrickému jevu – k vyrazení elektronů nad povrch fotocitlivé vrstvy. Elektronové zářivky jsou pak urychlovány mezi dynodami pomocí elektrického napětí. Při dopadu urychlených elektronů na dynodu dojde k emisi většího počtu elektronů (tzv. sekundární emise), čímž dojde ke znásobení počtu elektronů, které jsou urychlovány k další dynodě. Zesílený proud elektronů pak dopadá na anodu a vznikne elektrický puls.

(převzato a upraveno z: <http://www.olympusconfocal.com/theory/pmtintro.html>, online 25. 2. 2020)

3.5.4. Fluorescence

Jedná se o fyzikální jev, při kterém molekuly absorbují světelné záření o určité vlnové délce (excitace) a následně dojde k vyzařování světla o delší vlnové délce (emise). Rozdíl mezi maximální vlnovou délkou absorpčního a emisního spektra se nazývá Stokesův posun a souvisí s přeměnou části energie v nezářivých procesech (uvolnění tepla, rezonanční přenos na okolní molekuly). Absorpční a emisní spektrum fluorochromu je ovlivňováno také podmínkami prostředí, jako je pH, koncentrace iontů či konjugace s jinými molekulami (Shapiro, 2003). Pouze málo buněčných komponent je přirozeně fluorescenčních. Pro získání více informací o buněčném stavu je možno buňky barvit fluorescenčními sondami nazývanými fluorochromy nebo fluorofory. Například antigeny na povrchu či uvnitř buňky lze identifikovat pomocí fluorescenčně značených protilátek (McCarthy, 2007). Fluorochromy jsou obvykle organické sloučeniny s aromatickými jádery a delokalizovanými elektrony schopnými excitace. Běžně se používá několik fluorochromů, jako je FITC (Fluorescein-isothiocyanate), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin) a další. (Shapiro, 2003).



Obrázek 6: Stokesův posun

Stokesův posun odpovídá spektrálnímu posunu mezi absorpčním (λ_{abs}) a emisním (λ_{em}) maximem. Tyto ztráty jsou způsobené nezářivými procesy a běžně dochází k posunu k relativně vyšším vlnovým délkám. (převzato z: Vranka, 2016)

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Biologický materiál

Vzorky periferní krve od pacientů s podezřením na sepsi získané při odběrech na odděleních KAR (Klinika anesteziologie a resuscitace), IPCHO (Intenzivní péče chirurgických oborů) a HOK (Hemato-onkologická klinika) ve Fakultní nemocnici Olomouc v období od ledna 2019 do února 2020.

4.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Lyzační roztok:

EXCELLYSE I Lysing solution (Exbio)

Značené protilátky:

Anti-Hu CD45 PacificOrange™, Clone 2D1 (Exbio)

Anti-Hu CD3 APC, Clone MEM-57 (Exbio)

Anti-Hu CD4 PacificBlue™, Clone MEM-241 (Exbio)

Anti-Hu CD8 PerCP, Clone MEM-31 (Exbio)

Anti-Hu CD15 FITC, Clone MEM-158 (Exbio)

Anti-Hu CD64 PE, Clone 10.1 (Exbio)

Kalibrační kuličky:

FACSDiva™CS&T IVD beads (Becton-Dickinson Bioscience)

4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení

Pipety Eppendorf Research - 20, 200 (Eppendorf)

Vortex Mixer 230 V EU (Labnet)

Průtokový cytometr BD FACS Canto™ II (Becton-Dickinson Bioscience)

4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1. Odběr žilní krve pro hematologická vyšetření

Tento krok byl prováděn zdravotnickým personálem na oddělení KAR, IPCHO a HOK.

1. Nejprve je připraven materiál a příslušná dokumentace.
2. Po zajištění vhodné polohy paže je aplikován turniket a je posouzena kvalita žilního stavu.
3. Místo vpichu je pečlivě vydezinfikováno doporučeným prostředkem.
4. Krev je odebrána pomocí vakuově uzavřeného odběrového systému.
5. Místo vpichu je zakryto sterilní gázou.
6. Každá zkumavka s aditivou je ihned po odběru několikrát jemně převrácena.
7. Správně označené zkumavky s žádankami jsou odeslány do laboratoře HOK.

4.4.2. Vyšetření periferní krve metodou průtokové cytometrie

Příprava vzorku pro vyšetření povrchových antigenů:

1. Do zkumavky je aplikováno 5 μ l značené protilátky a 50 μ l nesrážlivé periferní krve.
2. Obsah zkumavky je vortexován a nechá se inkubovat při pokojové teplotě ve tmě po dobu 10 minut.
3. Následně je přidáno 1,5 ml lyzačního roztoku a vzorek je inkubován při pokojové teplotě ve tmě po dobu 30 minut.

Měření na průtokovém cytometru:

1. Stanovení exprese antigenu CD64 je prováděno pomocí analytického software BD FACSDiva™ v. 8.0.1.
2. Vzorky jsou vyšetřovány v příslušném protokolu.
3. Získaná data jsou počítačově vyhodnocována.

Vnitřní kontrola kvality:

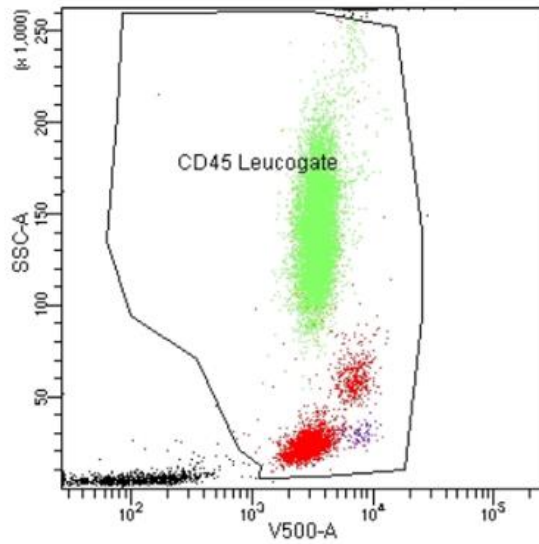
Správná funkce přístroje je pravidelně ověřována pomocí kalibračních kuliček FACSDiva™CS&T IVD beads.

Detekce CD64 a gatovací strategie:

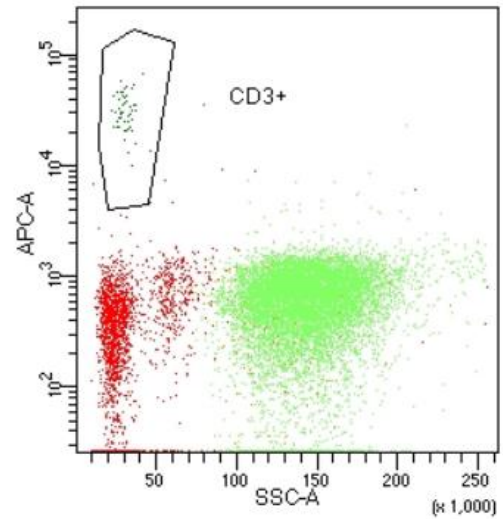
Cytometrická analýza pacienta z oddělení KAR s potvrzenou sepsí je zobrazena na Obrázcích 7 a 8.

1. Nejprve je vyčleněna CD45+ leukocytární populace pomocí fluorescenčně značené protilátky Anti-Hu CD45 PacificOrange™. Lymfocyty a monocyty jsou zobrazeny červeně, granulocyty zeleně. Non-leukocytární populace (nezlyzované erytrocyty) je černě.
2. Vyčlenění CD3+ lymfocytární subpopulace pomocí fluorescenčně značené protilátky Anti-Hu CD3 APC.
3. Vyčlenění CD4+ lymfocytární subpopulace pomocí fluorescenčně značené protilátky Anti-Hu CD4 PacificBlue™.
4. Vyčlenění CD8+ lymfocytární subpopulace pomocí fluorescenčně značené protilátky Anti-Hu CD8 PerCP-Cy5-5-A.
5. Dále je vyčleněna CD15+ granulocytární populace pomocí fluorescenčně značené protilátky Anti-Hu CD15 FITC-A.
6. Poté je zobrazena CD64+ proti SSC pomocí fluorescenčně značené protilátky Anti-Hu CD64 PE.
7. Nakonec je stanovena exprese CD64 na CD15+ granulocytech (CD64+/CD15+), která slouží ke kvantifikaci sepse.

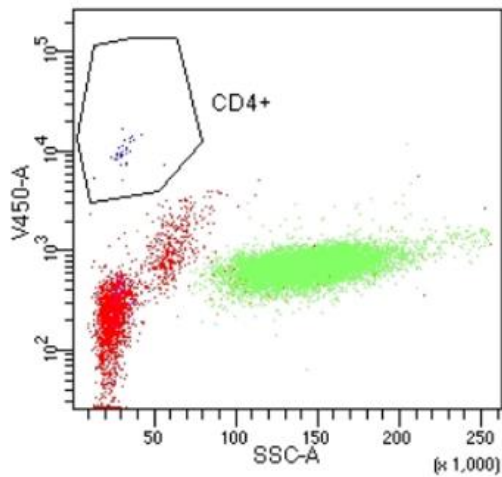
1.



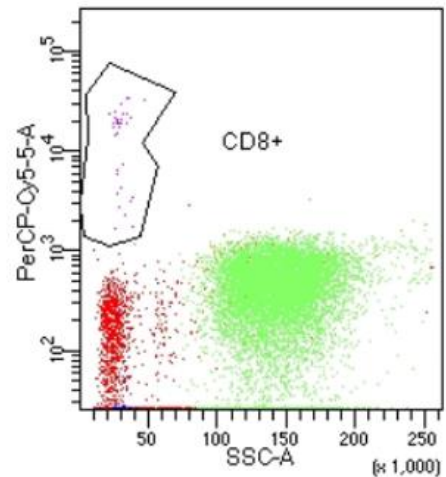
2.



3.



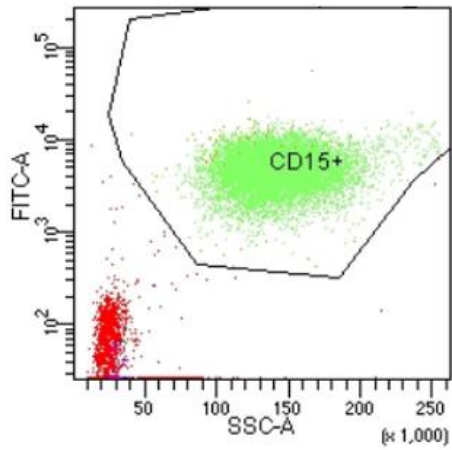
4.



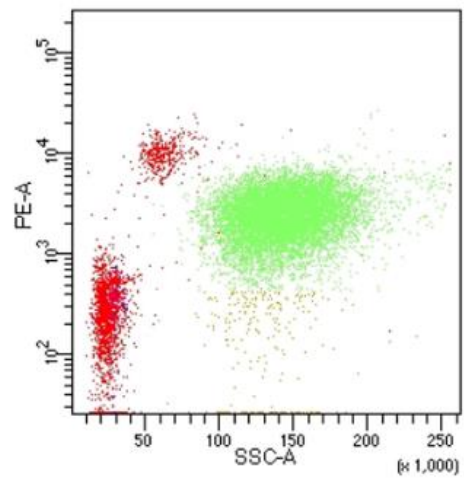
Obrázek 7: Cytometrická analýza pacienta z oddělení KAR s potvrzenou sepsí (1. část)

1. CD45+ leukocytární populace (CD45 Leucogate). Lymfocyty a monocyty červeně, granulocyty zeleně. Non-leukocytární populace černě.
2. CD3+ lymfocytární subpopulace
3. CD4+ lymfocytární subpopulace
4. CD8+ lymfocytární subpopulace

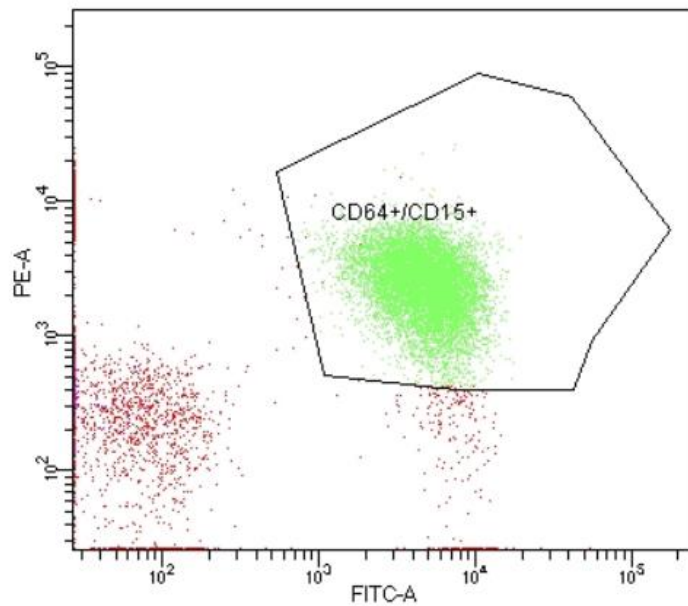
5.



6.



7.



Obrázek 8: Cytometrická analýza pacienta z oddělení KAR s potvrzenou sepsí (2. část)

5. CD15+ granulocytární populace
6. CD64+ proti SSC
7. Kvantifikace CD64+/CD15+ buněk (zeleně)

4.5. Statistická analýza

Ke zjištění, zda je CD64 potenciálně vhodným markerem ke stanovení sepse bylo provedeno statistické zpracování výsledků pomocí programu MATLAB (2010), verze 7.10.0 (R2010a), The MathWorks Inc., Massachusetts. Byly zjišťovány hodnoty cut-off pro CD64 u pacientů z oddělení IPCHO a KAR a u pacientů z oddělení HOK. Dále byla zjištěna senzitivita a specificita tohoto markeru a byla porovnána s ostatními naměřenými markery (CRP a PCT). Byly zpracovány ROC křivky (Receiver Operating Characteristic) těchto markerů a byla získána hodnota AUC (Area Under the Curve). P-hodnota menší než 0,0001 byla ve všech analýzách statisticky signifikantní.

5. VÝSLEDKY

5.1. Charakteristika měřené skupiny pacientů

Stanovení sepse pomocí exprese CD64 na neutrofilních granulocytech u nemocných dospělých bylo prováděno na 2 skupinách pacientů. První skupina zahrnovala 42 pacientů z oddělení IPCHO a KAR a druhá skupina zahrnovala 18 pacientů z oddělení HOK. Jednalo se o muže i ženy ve věku od 33 do 91 let.

5.2. Stanovení markerů sepse

U pacientů byly stanoveny následující markery sepse (Tabulka 5 a Tabulka 6): Celkový počet leukocytů (WBC – White Blood Cells) a neutrofilní granulocyty (Ne) byly stanoveny pomocí hematologického analyzátoru v Laboratoři krevních obrazů a cytomorfolgie. Pomocí průtokového cytometru byla provedena imunofenotypizace a bylo kvantifikováno množství CD64+/CD15+ buněk. Na oddělení klinické biochemie (OKB) byly stanoveny hodnoty CRP (norma do 5 mg/l) a PCT (norma do 0,5 µg/l). Tyto markery byly měřeny pouze u některých pacientů z oddělení IPCHO a KAR. V Laboratoři ústavu mikrobiologie bylo provedeno mikrobiologické stanovení patogenu v hemokultuře a na jejím základě byl stanoven status sepse (sepse jistá = pacient má pozitivní všechny markery sepse a zároveň pozitivní hemokulturu; sepse pravděpodobná = pacient má pozitivní všechny markery sepse, ale negativní hemokulturu vlivem antimikrobiální léčby; negativní = pacient nemá pozitivní markery sepse a má negativní hemokulturu).

Tabulka 5: Naměřené hodnoty markerů sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR

Vyšetřování markerů sepse u pacientů IPCHO a KAR							
Údaje o pacientovi		Laboratoř krevních obrazů a cytomorfolgie		Imunofenotypizace	OKB		Status sepse
Pohlaví	Rok narození	WBC [$10^9/l$]	Ne [$10^9/l$]	CD64+/CD15+ [%]	CRP [mg/l]	PCT [µg/l]	
m	1950	17,74	12,33	12,1	83,3	-	pravděpodobná
f	1948	28,81	27,11	93,8	179,8	68,34	pravděpodobná
m	1962	17,67	16,24	98,4	450,8	>100	pravděpodobná
m	1962	14,83	13,86	98,3	469,8	>100	pravděpodobná
m	1946	8,32	7,54	5,4	-	-	pravděpodobná
m	1951	25,98	22,83	76,6	98,6	>100	pravděpodobná

Vyšetřování markerů sepse u pacientů IPCHO a KAR							
Údaje o pacientovi		Laboratoř krevních obrazů a cytomorfolgie		Imunofenotypizace	OKB		Status sepse
Pohlaví	Rok narození	WBC [$10^9/l$]	Ne [$10^9/l$]	CD64+/CD15+ [%]	CRP [mg/l]	PCT [μ g/l]	
m	1952	44,23	40,17	7,0	203,4	>100	pravděpodobná
f	1937	26,69	25,86	4,6	320,4	36,85	negativní
f	1929	18,79	15,85	46,9	337,2	6,56	pravděpodobná
m	1960	16,73	13,11	2,9	82,7	0,2	negativní
m	1965	24,07	22,74	5,7	110,6	18,6	negativní
m	1974	28,11	24,79	99,1	93,5	6,15	pravděpodobná
m	1964	11,54	10,40	1,9	16,07	-	negativní
m	1974	24,24	21,34	24,2	90,1	2,31	pravděpodobná
m	1974	52,20	49,01	56	371	7,56	pravděpodobná
m	1953	27,18	23,67	5,3	33,1	5,7	negativní
m	1965	11,52	10,28	20,1	107,5	21,5	pravděpodobná
m	1960	13,97	10,47	1,0	129,9	-	negativní
m	1941	7,37	6,65	1,1	215,4	-	negativní
m	1957	41,9	40,08	99,0	420,7	75,77	pravděpodobná
m	1949	54,25	51,15	99,7	296,4	24,96	pravděpodobná
m	1964	30,79	23,80	0,9	21,4	6,4	negativní
m	1965	11,52	10,28	20,1	35,9	5,7	pravděpodobná
f	1940	19,30	17,33	85,6	189,8	21	pravděpodobná
f	1943	44,03	32,92	96,5	358,8	19,48	pravděpodobná
m	1956	20,52	19,66	65,5	349,7	22,46	pravděpodobná
m	1945	79,53	25,39	62,3	86	12,5	pravděpodobná
m	1956	34,40	30,50	2,0	21,4	14,8	negativní
m	1952	18,90	16,72	0,6	23,4	21,4	negativní
f	1935	7,26	4,46	1,4	11,4	23,6	negativní
f	1935	7,26	4,46	1,4	25,7	11,4	negativní
m	1935	19,81	18,49	41,4	198,7	23,5	pravděpodobná
m	1935	14,80	13,77	13,8	99,2	19,7	pravděpodobná
m	1956	10,76	6,28	4,2	25,9	14,5	negativní
m	1935	18,56	17,03	2,2	14,7	11	negativní
m	1954	16,28	14,60	0,2	11,6	5,8	negativní
f	1928	13,66	12,82	4,5	15,9	11,8	negativní
f	1928	10,25	9,50	20,0	39,8	10,4	pravděpodobná
f	1947	22,62	17,8	8,4	25,8	20,3	pravděpodobná
f	1928	9,77	8,61	20,1	39,8	12,5	pravděpodobná
m	1961	11,02	8,24	1,2	16,9	5,4	negativní
f	1941	13,62	11,93	5,7	21,7	9,7	negativní

Legenda: WBC = leukocyty, Ne = neutrofilní granulocyty, OKB = oddělení klinické biochemie, CRP = C-reaktivní protein, PCT = prokalcitonin, sepse jistá = pozitivní markery sepse + pozitivní hemokultura, sepse pravděpodobná = pozitivní markery sepse + negativní hemokultura, negativní = markery sepse a hemokultura negativní

Tabulka 6: Naměřené hodnoty markerů sepse u pacientů z oddělení HOK

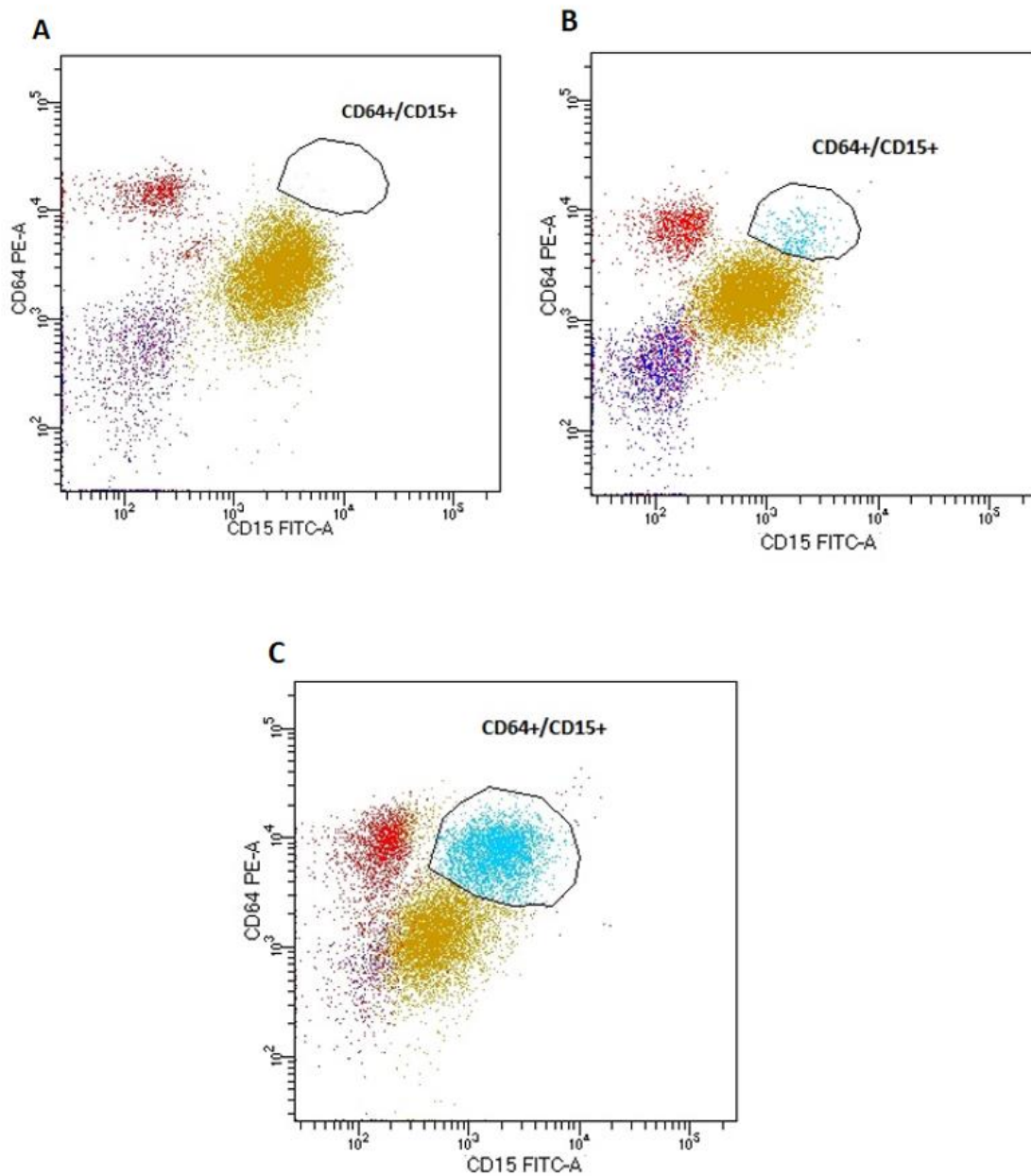
Vyšetřování markerů sepse u pacientů HOK					
Údaje o pacientovi		Laboratoř krevních obrazů a cytomorfologie		Imunofenotypizace	Status sepse
Pohlaví	Rok narození	WBC [$10^9/l$]	Ne [$10^9/l$]	CD64+/CD15+ [%]	
f	1948	0,24	0	79,2	pravděpodobná
f	1948	0,15	0	32,7	pravděpodobná
f	1948	0,08	0,03	82,0	pravděpodobná
m	1979	4,61	3,21	58,6	pravděpodobná
f	1946	2,02	0,96	74,5	pravděpodobná
m	1957	5,59	5,29	99,3	jistá
f	1971	3,37	2,14	0,3	negativní
f	1962	0,30	0,01	39,8	pravděpodobná
m	1970	11,14	10,62	17,5	pravděpodobná
f	1940	11,47	7,63	3,5	negativní
f	1940	15,66	10,7	2,1	negativní
m	1953	11,17	7,92	0,8	negativní
m	1966	48,38	41,87	88,2	pravděpodobná
f	1954	0,17	0	54,1	pravděpodobná
f	1953	15,64	15,0	28,4	pravděpodobná
m	1986	0,01	0	8,5	pravděpodobná
m	1954	5,60	3,22	0,1	negativní
f	1987	6,07	3,77	0,1	negativní

Legenda: WBC = leukocyty, Ne = neutrofilní granulocyty, sepse jistá = pozitivní markery sepse + pozitivní hemokultura, sepse pravděpodobná = pozitivní markery sepse + negativní hemokultura, negativní = markery sepse a hemokultura negativní

5.3. Cytometrické stanovení sepse

Pomocí příslušného protokolu pro detekci CD64+/CD15+ buněk jsme identifikovali tyto buňky a stanovili jejich množství ve vzorku. Kombinace těchto znaků na neutrofilních granulocytech je charakteristická pro pacienty se sepsí.

Na následujícím obrázku jsou zobrazeny příklady výskytu různého množství CD64+/CD15+ buněk u pacientů z oddělení IPCHO a KAR s různým statusem sepse. U pacienta bez prokázané sepse se CD64+/CD15+ buňky téměř nevyskytují (Obrázek 9A). Nízké zastoupení CD64+/CD15+ buněk je zobrazeno na Obrázku 9B. U pacienta s potvrzenou sepsí lze pozorovat velké množství CD64+/CD15+ buněk (Obrázek 9C).



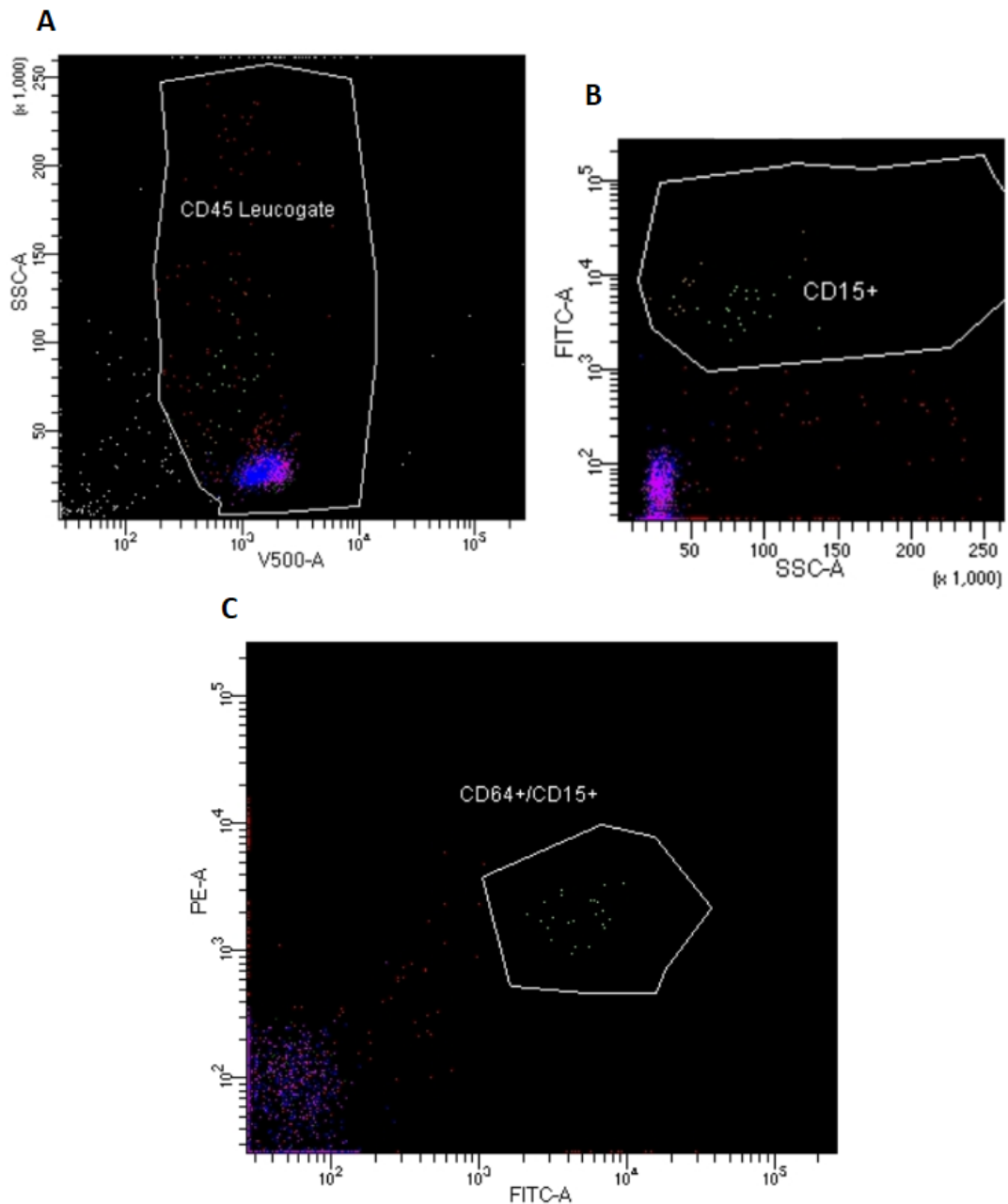
Obrázek 9: Porovnání naměřených hodnot CD64+/CD15+ buněk u pacientů z oddělení IPCHO a KAR s různým statusem sepse

A: CD64+/CD15+ buňky u pacienta bez prokázané sepse

B: Nízké zastoupení CD64+/CD15+ buněk (modře)

C: Vysoké množství CD64+/CD15+ buněk u pacienta s potvrzenou sepsí (modře)

U pacientů z oddělení HOK je identifikace CD64+/CD15+ buněk složitější, jelikož mají z důvodu imunosuprese po transplantaci krvetvorných buněk velmi snížené hodnoty granulocytů. I tak je však hladina exprese těchto antigenních znaků na granulocytech relativně vysoká. Na Obrázku 10 jsou zobrazeny scattergramy pacienta v těžké agranulocytóze.



Obrázek 10: Detekce CD64+/CD15+ buněk u pacienta z oddělení HOK v těžké agranulocytóze

A: CD45+ leukocytární populace – granulocyty téměř chybí

B: CD15+ granulocytární populace – množství granulocytů je velmi nízké

C: CD64+/CD15+ buňky jsou zastoupeny i na tak nízké populaci granulocytů

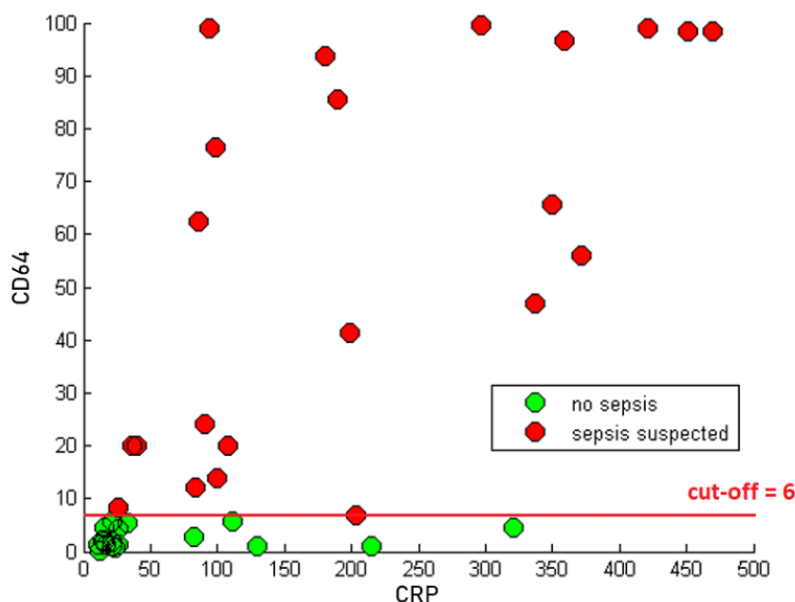
5.4. Statistická analýza naměřených dat

Pro statistickou analýzu byla využita naměřená data o celkovém počtu leukocytů (WBC), počet neutrofilních granulocytů (Ne), množství CD64+/CD15+ buněk, hodnoty CRP a PCT a status sepse (Tabulka 5 a Tabulka 6).

5.4.1. Pacienti z oddělení IPCHO a KAR

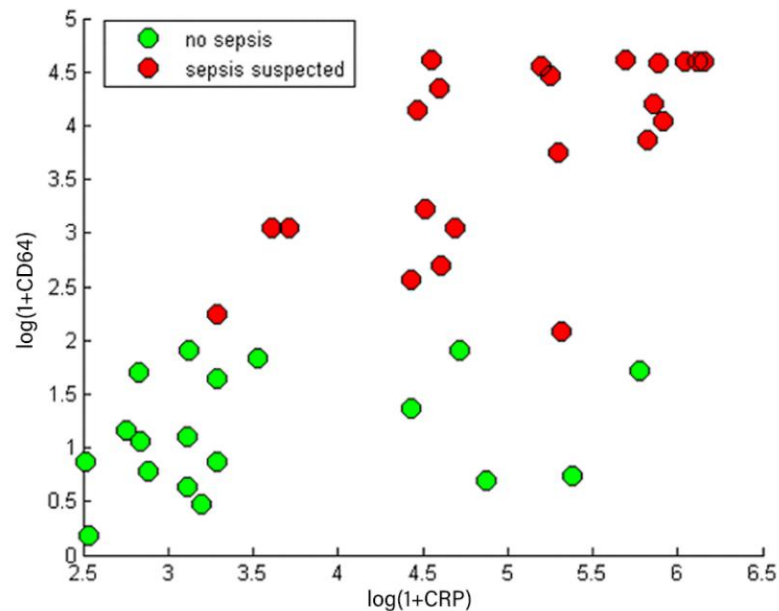
U této skupiny pacientů jsme měli naměřená data o hodnotách CRP a PCT, se kterými jsme porovnávali CD64 jako marker sepse. Z celkového počtu 42 mělo 24 pacientů pravděpodobnou sepsi a 18 pacientů bylo negativních.

Na Obrázku 11 vidíme graf porovnávající naměřené hodnoty CD64 proti CRP, ze kterého jsme získali pravděpodobnou hodnotu cut-off pro stanovení sepse pomocí CD64. Cut-off byl stanoven na hodnotu 6. Pacienti s hodnotou CD64 >6 měli sepsi pravděpodobnou a pacienti pod touto hodnotou měli status sepse negativní. Jedinou výjimkou byl pacient s hodnotou CD64 = 5,4. U něho byla sepse stanovena jako pravděpodobná. Bohužel u tohoto pacienta nebyly změřeny hodnoty CRP ani PCT a nebyl tak zahrnut v tomto grafu.



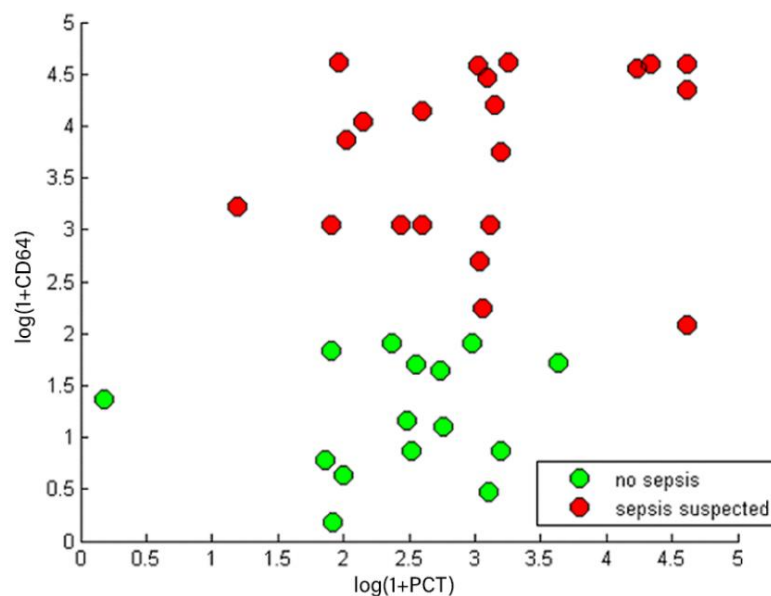
Obrázek 11: Graf srovnání CD64 a CRP jako markerů sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR. Pacienti bez prokázané sepse jsou zobrazeni zeleně, pacienti s potvrzenou sepsí jsou červeně. Červená příčka demonstruje cut-off = 6 pro CD64.

Hodnoty blížíící se 0 nebyly v grafu dobře viditelné. Z toho důvodu byla provedena transformace $x \rightarrow \log(1+x)$. Na Obrázku 12 je zobrazen graf porovnávající naměřené hodnoty CD64 proti CRP ve zlogaritmované podobě. Tím jsou lépe viditelná data s nízkými hodnotami CD64 a CRP. Z těchto grafů můžeme usoudit, že CRP je jako marker sepse nespolehlivý.



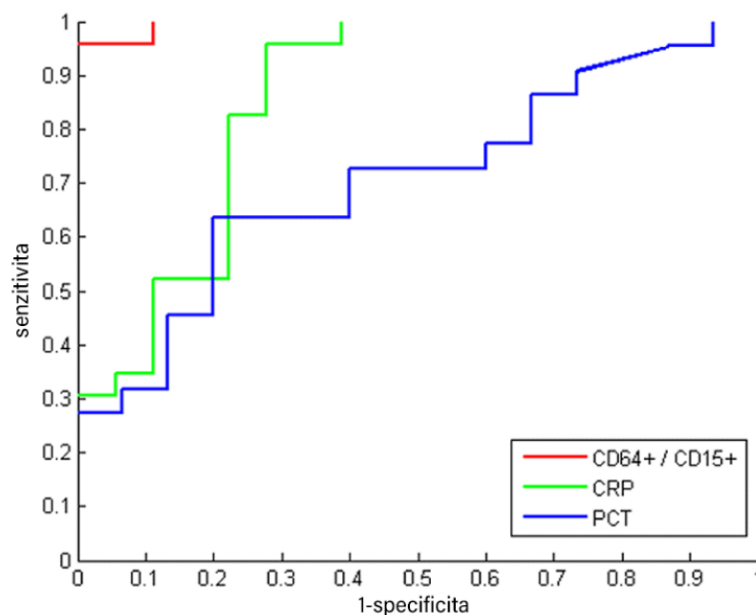
Obrázek 12: Zlogaritmovaná podoba grafu srovnávajícího CD64 a CRP jako markery sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR. Pacienti bez prokázané sepse jsou zobrazeni zeleně, pacienti s potvrzenou sepsí jsou červeně.

Stejná analýza a následná transformace byla provedena s naměřenými hodnotami CD64 a PCT. Zlogaritmovanou podobu grafu srovnávajícího CD64 s PCT je možno vidět na Obrázku 13, ze kterého lze vyčíst, že PCT také není spolehlivým markerem sepse.



Obrázek 13: Zlogaritmovaná podoba grafu srovnávajícího CD64 a PCT jako markery sepse u pacientů z oddělení IPCHO a KAR. Pacienti bez prokázané sepse jsou zobrazeni zeleně, pacienti s potvrzenou sepsí jsou červeně.

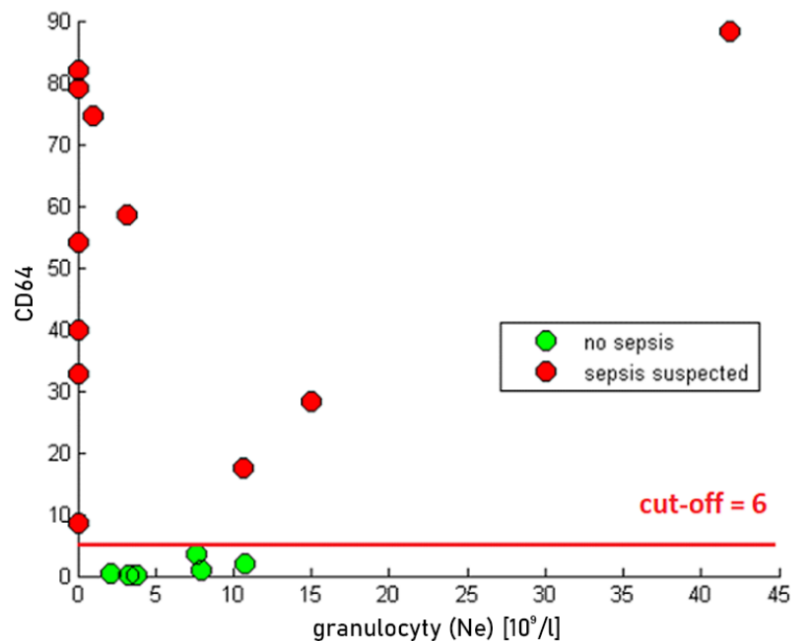
Ze všech naměřených hodnot CD64+/CD15+, CRP a PCT byly vytvořeny ROC křivky, které jsou zobrazeny v Obrázku 14. Z ROC křivky pro CD64+/CD15+ byla stanovena senzitivita = 0,96 a specifická = 1. AUC = 0,9954. Je zde jasně vidět, že CRP a PCT mají mnohem nižší specificku i senzitivitu. AUC pro CRP = 0,8575, AUC pro PCT = 0,7030.



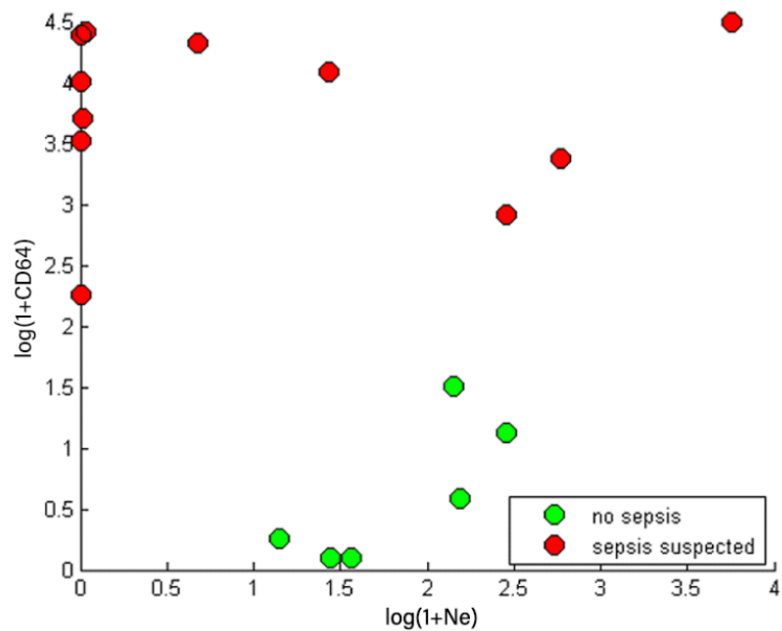
Obrázek 14: ROC křivky pro CD64+/CD15+ (červeně), CRP (zeleně) a PCT (modře). AUC pro CD64+/CD15+ = 0,9954, pro CRP = 0,8575, pro PCT = 0,7030.

5.4.2. Pacienti z oddělení HOK

Z celkového počtu 18 pacientů, měl 1 pacient sepsi jistou, 11 pacientů sepsi pravděpodobnou (tito pacienti byli spojeni do 1 skupiny) a 6 pacientů bylo negativních. U těchto pacientů nebyly měřeny hodnoty CRP a PCT, jelikož nemají optimálně fungující imunitní systém z důvodu imunoprese po transplantaci krvetvorných buněk a tyto markery u nich nemusí poskytovat validní výsledky. Z toho důvodu nebylo možné porovnat data o CD64 s CRP nebo PCT. Bylo však možné srovnat hodnoty CD64 s naměřenými hodnotami neutrofilních granulocytů (Ne), získaných z hematologického analyzátoru (Obrázek 15). U většiny pacientů byly hodnoty Ne velmi nízké a u 4 pacientů byly tyto hodnoty dokonce rovny nule. Jak už však bylo demonstrováno na výsledcích scattergramu u pacienta HOK, tyto granulocyty ve vzorku ve skutečnosti jsou. A pouze průtokový cytometr je dokáže zaznamenat a stanovit přesnou hodnotu CD64+/CD15+ ve vzorku, a tak detekovat sepsi. Tedy i pacienti s nulovými hodnotami nebo nízkými hodnotami Ne měli relativně vysoké hodnoty CD64+/CD15+. Cut-off byl i zde stanoven na hodnotu 6. Na Obrázku 16 je zobrazen stejný graf ve zlogaritmované podobě.



Obrázek 15: Graf srovnání CD64 a Ne u pacientů z oddělení HOK. Pacienti bez prokázané sepse jsou zobrazeni zeleně, pacienti s potvrzenou sepsí jsou červeně. Červená přímka demonstruje cut-off = 6 pro CD64.



Obrázek 16: Zlogaritmovaná podoba grafu srovnávajícího CD64 a Ne u pacientů z oddělení HOK. Pacienti bez prokázané sepse jsou zobrazeni zeleně, pacienti s potvrzenou sepsí jsou červeně.

6. DISKUSE

Sepse je hlavní příčinou morbidit a mortality závažně nemocných pacientů po celém světě. Ti často vyžadují podpůrnou léčbu na jednotce intenzivní péče z důvodu multiorgánového selhání. Včasná identifikace sepse a okamžité nasazení léčby je extrémně důležité pro zvýšení šancí na přežití u septických pacientů. Až do nedávna byla sepsa definována jako přítomnost dvou nebo více pozitivních kritérií pro syndrom systémové zánětlivé reakce (SIRS) při současném potvrzení či podezření na infekci. Nová definice sepse (tzv. Sepsis-3) je definována jako život ohrožující orgánová dysfunkce plynoucí z nepřiměřené odpovědi hostitele na infekci a klinicky se stanovuje jako vzestup SOFA skóre o více než dva body při přítomnosti infekce. V dnešní době se pro laboratorní stanovení sepse využívá několik biochemických markerů. Mezi nejčastěji používané patří CRP a PCT. Jejich hladiny se však nezvyšují bezprostředně po vzniku sepse a tato prodleva může být kritická (Larsen *et* Petersen, 2017).

V této práci jsme se zabývali potenciálem využití exprese CD64 na neutrofilních granulocytech jako časného markeru sepse u závažně nemocných dospělých. Pomocí statistické analýzy byl u pacientů z oddělení IPCHO a KAR stanoven cut-off pro potvrzení sepse na hodnotu 6. Při této prahové hodnotě byla senzitivita 0,96 a specifická 1, AUC = 0,9954. Tím by se dalo říct, že CD64 je téměř dokonalým markerem pro stanovení sepse. Několik starších studií vykazovalo podobně vysoké hodnoty. Hsu *et al.* porovnávali stanovení sepse pomocí CD64 a PCT u pacientů na jednotce intenzivní péče (JIP). Studie zahrnovala 66 pacientů s klinicky potvrzenou sepsí a 19 negativních kontrol. Hodnota cut-off byla stanovena na expresi CD64 >4300 molekul/neutrofil. Při této hodnotě byla senzitivita 89,1 %, specifická 95,9 % a AUC = 0,928 (Hsu *et al.*, 2010). Podobnou studii provedli Cardelli *et al.* se skupinou 112 pacientů z JIP a 50 negativních kontrol. Při cut-off >2398 molekul CD64/neutrofil byla senzitivita 96 %, specifická 95 % a AUC = 0,97 (Cardelli *et al.*, 2008). Výsledky těchto studií prokazují, že CD64 by mohl být ideálním markerem pro stanovení sepse. Jiné studie však toto tvrzení nepodporují. Yin *et al.* se zabývali stanovením sepse pomocí CD64 na oddělení urgentního příjmu. Studie zahrnovala 151 pacientů a 20 negativních kontrol. Při stanovení cut-off hodnoty na 5,45 vykazovalo CD64 vyšší specifickou (75 %) a senzitivitu (89 %) ve srovnání s PCT, CRP, SOFA a počtem leukocytů. AUC = 0,879 pro CD64, což byla nejvyšší hodnota ze všech

daných markerů (Yin *et al.*, 2020). Tyto hodnoty se však ani zdaleka neblíží našim výsledkům. Podobné výsledky získali i Yeh *et al.*, kteří provedli meta-analýzu 14 studií s celkovým počtem 2 471 pacientů (1 304 se sepsí a 1 167 kontrol) z JIP a oddělení urgentního příjmu. Cut-off se mezi těmito studii lišil. Souhrnná senzitivita byla 87 %, specificita 89 % a AUC = 0,94. Po srovnání CD64 s CRP a PCT vykazovala vyšší senzitivitu i specificitu. Analýza podskupin ukázala, že studie s více než 100 pacienty vykazovaly signifikantně nižší souhrnnou senzitivitu (82 %) a specificitu (85 %) než studie s méně než 100 pacienty (Yeh *et al.*, 2019). To by mohl být problém i u naší práce, která zahrnovala pouze 42 pacientů z oddělení IPCHO a KAR.

V naší práci jsme se zabývali také stanovením sepse pomocí CD64 u pacientů na oddělení HOK, kteří podstoupili transplantaci krvetvorných buněk. Mezi časté post-transplantační komplikace patří sepse, SIRS, houbové, bakteriální či virové infekce, reakce štěpu proti hostiteli (GvHD = Graft versus Host Disease), odmítnutí štěpu či selhání přihojení štěpu (Stanchi *et al.*, 2019). GvHD je častou komplikací alogenní transplantace krvetvorných buněk, která postihuje střeva, játra, kůži a sliznice, a tím ohrožuje výsledek léčby a život pacienta. Akutní GvHD vzniká množением dárcovských T-lymfocytů v organismu hostitele a jejich reakcí proti tkáním příjemce. Tyto aktivované T-lymfocyty produkují IL-1 a IL-2, které aktivují další T-lymfocyty a dochází k tzv. cytokinové bouři. GvHD však není úplně nežádoucí, jelikož při ní dochází také k tzv. reakci štěpu proti leukémii (GvL = Graft versus Leukemia), která má žádaný protinádorový efekt (Pink *et al.*, 2011).

Další komplikací je zvýšené riziko vzniku infekce související s navozenou imunosupresí. Po chemoterapii nastává tzv. neutropenická fáze, která je definována sníženým počtem neutrofilních granulocytů. Pokud jejich počet klesne na méně než $0,5 \times 10^9/l$ krve, hovoříme o agranulocytóze. Po transplantaci krvetvorných buněk nastává tzv. pre-engraftment fáze, během které dochází kromě jiného také k obnově neutrofilů, což může trvat 2-3 týdny. Neutrofilie jsou důležité u vrozené imunitní odpovědi proti mikroorganismům. Pacienti s neutropenií mají zároveň snížené i celkové množství leukocytů a tím pádem se u nich nevyskytují klasické zánětlivé příznaky jako u zdravých jedinců (Cho *et al.*, 2018). Klinické symptomy infekčních komplikací jsou navíc těžko rozpoznatelné od těch neinfekčních, jako je např. GvHD. Primární terapií GvHD je zvýšená imunosuprese, což může kriticky zhoršit infekci. Z tohoto důvodu je

včasná diagnóza a správná léčba rozhodující pro výsledný stav pacienta. Stanchi *et al.* provedli studii, ve které se zabývali identifikací jednotlivých post-transplantačních komplikací pomocí CRP a PCT. Ukázalo se, že ani jeden z těchto markerů není spolehlivým ukazatelem, který by jednoznačně odlišil jednotlivé stavy (Stanchi *et al.*, 2019).

Významným zjištěním naší práce proto bylo, že i když měli HOK pacienti z pohledu hematologického analyzátoru velmi nízké až nulové hodnoty neutrofilů, i tak se na nich při sepsi exprimovalo velké množství CD64, které jsme cytometricky dokázali zaznamenat. Hematologický analyzátor totiž stanovuje krevní obraz z fixního objemu krve, který je poměrně malý. Tento vzorek navíc obsahuje všechny buňky krevní řady, takže při velmi nízkých počtech neutrofilů a po zaokrouhlení může být výsledkem nula. Průtokový cytometr nám však umožňuje manuální nastavení počtu analyzovaných buněk, a navíc si můžeme vybrat jen určitou populaci buněk, které chceme počítat (např. granulocyty). Díky tomu lze stanovit sepsi i u nemocných v těžké neutropenii či agranulocytóze (např. po transplantaci krvetvorných buněk). Z tohoto důvodu je CD64 slibným markerem pro odlišení sepse od neinfekčních stavů jako je např. GvHD.

CD64 jako marker sepse má mnoho výhod. Kromě vysoké senzitivity a specificity je jeho stanovení velmi rychlé a nenáročné. Od odběru krve pacienta, přes přípravu a inkubaci vzorku a následné měření na průtokovém cytometru, trvá necelou hodinu. Jeho hladina narůstá v krvi již hodinu od počátku sepse a z tohoto důvodu může být antimikrobiální léčba započata velmi rychle. Expresí CD64 na aktivovaných neutrofilech je velmi vysoká, a proto je jednoduché odlišit sepsi od jiných neinfekčních stavů, což je klíčové pro vysoce předléčené hemato-onkologické pacienty.

Nevýhodou této metody je nedostupnost průtokového cytometru v menších nemocnicích. Vzorky by se musely v tomto případě posílat do nemocnic, které průtokový cytometr mají, a tím by se prodloužil čas laboratorní odpovědi. Přesné stanovení CD64 také závisí na schopnostech a zkušenostech pracovníka obsluhujícího průtokový cytometr. V ideálním případě by měření mělo být automatizované a vždy za stejných podmínek. Další nevýhodou se může zdát cena jednoho testu. Pro přípravu 1 vzorku se používá 6 značených protilátek, u kterých se cena momentálně pohybuje kolem 8 500 Kč za 1 zkumavku na 100 testů (firma Exbio). Celkově to vychází na

51 000 Kč na 100 testů. 1 test tedy vychází přibližně na 510 Kč, pokud pomineme cenu průtokového cytometru. I tak pozitiva CD64 jako markeru sepse silně převažují nad negativy.

V budoucnosti by bylo zajímavé zjistit, zda by hodnoty CD64 dokázaly predikovat úmrtnost pacientů. Dále by se mělo prostudovat využití CD64 jako rychlého ukazatele úspěšnosti antimikrobiální léčby při sepsi. Každopádně by před zavedením do klinické praxe bylo vhodné výsledky ověřit na větším vzorku pacientů formou prospektivní zaslepené studie.

7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala expresí CD64 jako markeru sepse u závažně nemocných dospělých.

V teoretické části byly shrnuty nejnovější poznatky o sepsi, její patofyziologii a diagnostice pomocí biochemických markerů či hemokultury. Dále byly popsány základní principy průtokové cytometrie a její inovace.

V praktické části byla popsána metodika odběru periferní krve, příprava vzorku a jeho následné měření pomocí průtokové cytometrie. Výsledky byly statisticky zpracovány a byla potvrzena korelace mezi expresí CD64 na granulocytech a přítomností sepse. Dále bylo potvrzeno, že CD64 je spolehlivějším markerem sepse, jelikož se jeho senzitivita i specificita blížily 1. Cut-off pro CD64 byl stanoven na hodnotu 6.

V této práci byl prokázán význam využití exprese CD64 na granulocytech ke stanovení sepse u závažně nemocných dospělých. Významným zjištěním je možnost využití této metody u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk, u kterých klasické metody stanovení sepse selhávají a sepse může být mylně zaměněna s neinfekčními stavy jako je např. reakce štěpu proti hostiteli, což může být pro tyto pacienty smrtelné.

8. LITERATURA

1. Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. (2017): Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 37(2): 163-176.
2. Assicot M., Bohuon C., Gendrel D., Raymond J., Carsin H., Guilbaud J. (1993): High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *The Lancet* 341(8844): 515-518.
3. Biron B. M., Ayala A., Lomas-Neira J. L. (2015): Biomarkers for sepsis: what is and what might be? *Biomarker Insights* 10(4): 7-17.
4. Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., Dellinger R. P., Fein A. M., Knaus W. A., Schein R. M., Sibbald W. J. (1992): Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101(6): 1644-1655.
5. Bouchon A., Facchetti F., Weigand M., Colonna M. (2001): TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410: 1103-1107.
6. Cantey J. B., Baird S. D. (2017): Ending the culture of culture-negative sepsis in the neonatal ICU. *Pediatrics* 140(4): e20170044.
7. Cardelli P., Ferraironi M., Amodeo R., Tabacco F., De Blasi R. A., Nicoletti M., Sessa R., Petrucca A., Costante A., Cipriani, P. (2008): Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 21(1): 43-49.
8. Dai J., Jiang W., Min Z., Yang J., Tan Y., Ma T., Ge Z. (2017): Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: meta-analysis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 26(2): 327-332.
9. Electronic light detectors: photomultipliers. [online] [navštíveno 25. 2. 2020] Dostupné z <http://www.olympusconfocal.com/theory/pmtintro.html>
10. Franco D. M., Arevalo-Rodriguez I., i Figuls M. R., Zamora J. (2015): Interleukin-6 for diagnosis of sepsis in critically ill adult patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 7: CD011811.
11. Givan A. L. (2001): Instrumentation: into the black box. In: Givan A. L.: *Flow cytometry: first principles*, pp. 15-39, John Wiley and Sons, New York.

12. Guyre P. M., Graziano R. F., Vance B. A., Morganelli P. M., Fanger M. W. (1989): Monoclonal antibodies that bind to distinct epitopes on Fc gamma RI are able to trigger receptor function. *The Journal of Immunology* 143(5): 1650-1655.
13. Hoffmann J. (2011): Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochemia Medica* 21(3): 282-290.
14. Holub M. (2007): Sepse: infekce a systémová zánětová odpověď. *Časopis lékařů českých* 146: 109-114.
15. Holub M. (2018): Definice sepse a septického šoku. *Klinická biochemie a metabolismus* 26(47): 76-78.
16. Hsu K. H., Chan M. C., Wang J. M., Lin L. Y., Wu C. L. (2011): Comparison of Fcγ receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients. *Respirology* 16(1): 152-160.
17. Cho S. Y., Lee H. J., Lee D. G. (2018): Infectious complications after hematopoietic stem cell transplantation: current status and future perspectives in Korea. *The Korean Journal of Internal Medicine* 33(2): 256-276.
18. Chousterman B. G., Swirski F. K., Weber G. F. (2017): Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology* 39(5): 517-528.
19. Chun T. T., Potz B. A., Young W. A., Ayala A. (2017): Overview of the molecular pathways and mediators of sepsis. In: Ward N., Levy M. (eds): *Sepsis*, pp. 47-69, Humana Press, New York.
20. Introduction to flow cytometry. [online] [navštíveno 14. 2. 2020] Dostupné z <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
21. Jacobi J. (2002): Pathophysiology of sepsis. *American Journal of Health-System Pharmacy* 59(1): 3-8.
22. Kibe S., Adams K., Barlow G. (2011): Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(2): 33-40.
23. Kishimoto T. (1989): The biology of interleukin-6. *Blood* 74(1): 1-10.
24. Komendová A. (2017): Pozitivní kultivační nálezy v hemokulturách u hamotoonkologických pacientů. *Bakalářská práce. Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno.*

25. Larsen F. F., Petersen J. A. (2017): Novel biomarkers for sepsis: A narrative review. *European Journal of Internal Medicine* 45: 46-50.
26. Lee H. (2013): Procalcitonin as a biomarker of infectious diseases. *The Korean Journal of Internal Medicine* 28(3): 285-291.
27. Levy M. M., Fink M. P., Marshall J. C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S. M., Vincent J-L., Ramsay G. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Intensive Care Medicine* 29(4): 530-538.
28. Liu X., Wu S-J., Fang X-M. (2017): Insight into the glucose metabolism of immune cells in sepsis. *Journal of Anesthesia and Perioperative Medicine* 4(1): 38-44.
29. Macey M. G. (2007): Principles of flow cytometry. In: Macey M. G. (ed): *Flow cytometry: Principles and applications*, pp. 1-15, Humana Press, New York.
30. Martin G. S. (2012): Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 10(6): 701-706.
31. Maruna P., Nedelnikova K., Gurlich R. (2000): Physiology and genetics of procalcitonin. *Physiological Research* 49: 57-62.
32. McCarthy D. A. (2007): Fluorochromes and fluorescence. In: Macey M. G. (ed): *Flow cytometry: principles and applications*, pp. 59-112, Humana Press, New York.
33. Morgenthaler N. G., Kostrzewa M. (2015): Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *International Journal of Microbiology* 2015: 827416.
34. Nieves C. F. F., Cronstein B. N., Saxena A. (2017): Acute phase reactants and the concept of inflammation. In: Firestein G. S. (eds): *Kelley and Firestein's textbook of rheumatology*, pp. 846-857, Elsevier Books, Philadelphia.
35. Overview of flow cytometry. [online] [navštíveno 9. 3. 2020] Dostupné z https://www.cellsignal.com/contents/_/overview-of-flow-cytometry/flow-cytometry-overview
36. Pepys M. B., Hirschfield G. M. (2003): C-reactive protein: a critical update. *The Journal of Clinical Investigation* 111(12): 1805-1812.
37. Petric V., Brkic S., Lendak D., Mihajlovic D., Mikic A. N., Komazec S. L. (2018): The significance of sTREM-1 as a diagnostic biomarker of sepsis in the context of Sepsis-3 definition. *Signa Vitae* 14(1): 65-70.

38. Pink R., Kadlec Z., Pazdera J., Michl P., Tvrđý P., Zbořil, V., Rajda L., Vondráková J., Faber E., Indrák, K. (2011): Orální komplikace po alogenní transplantaci kostní dřeně. *Česká Stomatologie a Praktické Zubní Lékařství* 111(3): 71-77.
39. Saeys Y., Van Gassen S., Lambrecht B. N. (2016): Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nature Reviews Immunology* 16(7): 449-462.
40. Santonocito C., De Loecker I., Donadello K., Moussa M. D., Markowicz S., Gullo A., Vincent J. L. (2014): C-reactive protein kinetics after major surgery. *Anesthesia & Analgesia* 119(3): 624-629.
41. Shankar-Hari M., Phillips G. S., Levy M. L., Seymour C. W., Liu V. X., Deutschman C. S., Angus D. C., Rubenfeld G. D., Singer M. (2016): Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock. *JAMA* 315(8): 775-787.
42. Shapiro H. M. (2003): *Practical flow cytometry*. John Wiley and Sons, New York.
43. Scheer C. S., Fuchs C., Gründling M., Vollmer M., Bast J., Bohnert J. A., Zimmermann K., Hahnenkamp K., Rehberg S., Kuhn S. O. (2019). Impact of antibiotic administration on blood culture positivity at the beginning of sepsis: a prospective clinical cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(3): 326-331.
44. Singer M. (2016): The new sepsis consensus definitions (Sepsis-3): the good, the not-so-bad, and the actually-quite-pretty. *Intensive Care Medicine* 42: 2027-2029.
45. Singer M., Deutschman C. S., Seymour C. W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G. R., Chiche J-D., Coopersmith C. M., Hotchkiss R. S., Levy M. M., Marshall J. C., Martin G. S., Opal S. M., Rubenfeld G. D., van der Poll T., Vincent J-L. Angus D. C. (2016): The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8): 801-810.
46. Stanchi K. M. C., Queudeville M., Malaval C., Feucht J., Schlegel P., Dobratz M., Seitz Ch., Müller I., Lang P., Handgretinger R., Döring, M. (2019): Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as early diagnostic marker for the identification of transplant-related adverse events after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 145(11): 2779-2791.
47. Stearns-Kurosawa D. J., Osuchowski M. F., Valentine C., Kurosawa S., Remick D. G. (2011): The pathogenesis of sepsis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6: 19-48.

48. Šinkorová Z., Zárýbnická L. (2008): Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda. *Vojenské Zdravotnické Listy* 77(3): 98-103.
49. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. (2014): IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(10): a016295.
50. Tillett W. S., Francis T. (1930): Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *Journal of Experimental Medicine* 52(4): 561-571.
51. Umlauf V. N., Dreschers S., Orlikowsky T. W. (2013): Flow cytometry in the detection of neonatal sepsis. *International Journal of Pediatrics* 2013: 763191.
52. Vincent J-L. (2016): The clinical challenge of sepsis identification and monitoring. *PLOS Medicine* 13(5): e1002022.
53. Virgo P. F., Gibbs G. J. (2012): Flow cytometry in clinical pathology. *Annals of Clinical Biochemistry* 49(1): 17-28.
54. Vranka T. (2016): Příprava a studium vlastností BODIPY senzorů malých molekul. *Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno.*
55. Westh H., Lisby G., Breyse F., Böddinghaus B., Hoefl A., Chomarat M., Gant V., Goglio A., Raglio A., Schuster H., Stuber F., Wissing, H. (2009): Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clinical Microbiology and Infection* 15(6): 544-551.
56. Yeh C. F., Wu C. C., Liu S. H., Chen K. F. (2019): Comparison of the accuracy of neutrophil CD64, procalcitonin, and C-reactive protein for sepsis identification: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Intensive Care* 9(1): 5.
57. Yin W. P., Li J. B., Zheng X. F., An L., Shao H., Li C. S. (2020): Effect of neutrophil CD64 for diagnosing sepsis in emergency department. *World Journal of Emergency Medicine* 11(2): 79-85.
58. Zhang L., Zhang X. (2018): Serum sTREM-1, PCT, CRP, Lac as biomarkers for death risk within 28 days in patients with severe sepsis. *Open Life Sciences* 13(1): 42-47.
59. Zidan M., Kamal H. M., El-Behisy M. M., Haie O. M. A., Nasser M. (2016): Serum triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its role in diagnosis of neonatal sepsis. *The Medical journal of Cairo University* 84(1): 17-25.