



IMMUNOLÓGIAI ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI
INTÉZET



9. gyakorlat: Rövid és hosszú távú sejtkultúrák, funkcionális tesztek

Az immunológia alapjai

PTE-KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Pécs

Orvosi kutatások főbb lépcsőfokai



In vitro
kísérlet



In vivo
állatkísérlet



Humán vizsgálat

Könnyen **standardizálható**
és reprodukálható



Nehéz belőle következtetni
az élőlényekben
végbemenő folyamatokról

Élő szervezetben
modellezhető kórállapotok,
tesztelhető gyógyszerek, stb.



A nyert eredmények **nem**
feleltethetők meg az
emberi vizsgálatokkal

Orvosi szempontból a
leginkább releváns



Körülményes (pl. nehéz
mintát szerezni, etikai
megfontolások, stb.)

Sejt/szövet tenyésztés bevezető^[1.]

- Miért van rá szükség?
 - Kísérleti **állatok kímélése**, ha lehetséges.
 - Precízen **kontrollálható** kísérleti körülmények. (pl. sejtszám, médium, hőmérséklet, vizsgált anyag koncentrációja, inkubációs idők, stb.)

- Osztályozás:

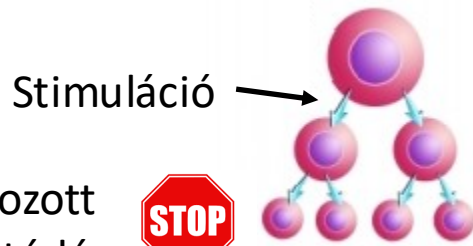


Sejtkultúra

vs.



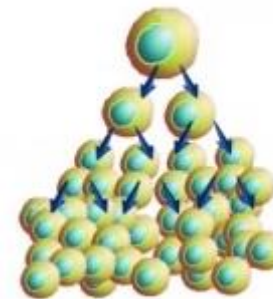
Szövet vagy szervkultúra



Korlátozott
sejtosztódás

Rövid távú sejtkultúra (pl.
normál sejtek biopsziából)

vs.



Korlátlan
sejtosztódás

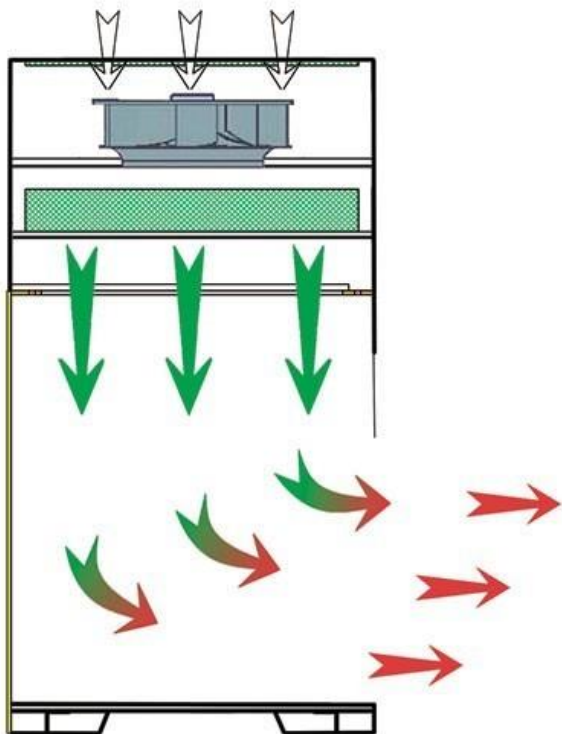
Hosszú távú sejtkultúra (pl.
daganatos sejtvonal)

Sejtenyésztés

- A **teljes sterilitás** alapfeltétel! → Fertőzött sejt kultúra esetén kontrollálhatatlan a kísérlet.
 - Munka a sejtenyésztő fülke alatt
 - Steril eszközök használata (pl. pipettahegy, petri csésze, stb.)
 - Sejtenyésztő médiumok antibiotikus védelme
- A sejtek **sejtenyésztő médiumokban** tarthatók, melyek tartalmazzák a számukra szükséges **tápanyagokat** (szénhidrátok, aminosavak, nukleinsavak, vitaminok, hormonok, növekedési faktorok, stb.) és **optimális pH-val** rendelkeznek.
- A sejtek rövid távon **inkubátorokban** tárolhatók, ahol állandó a:
 - Hőmérséklet ($\approx 37\text{ °C}$)
 - Páratartalom ($\approx 90\%$)
 - CO_2 tartalom ($\approx 5\text{-}6\%$)
- Hosszú távú (évek, évtizedek) tárolás **folyékony nitrogénben** lehetséges. Klinikai felhasználás:
 - Ivarsejtek fagyasztása infertilitást okozó kemoterápiás kezelések előtt^[2.]
 - Köldökzsínórvér fagyasztása (hemopoetikus őssejtekben gazdag, nem rutinszerű, jelenleg ellentmondásos módszer^[3, 4.])

Sejttenyésztő steril fülke

Lamináris áramlású fülkéknél a sterilitást a fülkén belül a **steril levegő áramlása** biztosítja.



A sémás ábrán látható fülke esetén a kintről beszívott levegő egy **HEPA szűrőn** (High Efficiency Particulate Air) halad át. A szűrt, steril levegő fentről lefelé áramlik, majd a fülke munkarésénél a fülkét használó személy irányába kifelé távozik. A pontos felépítés és elrendezés azonban gyártóként változik.

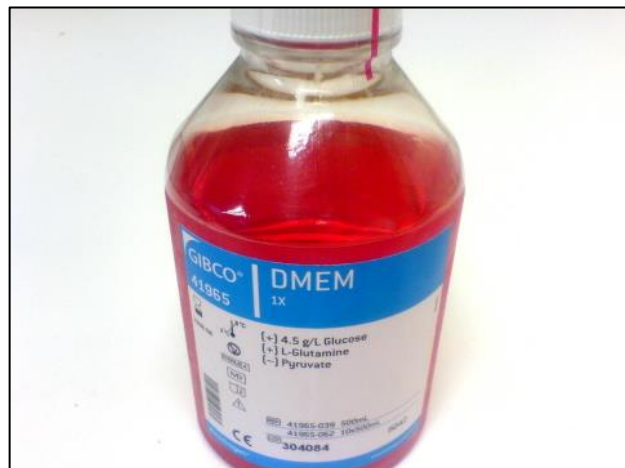
Gyakran használt médiumok



RPMI

(Roswell Park Memorial Institute)

Elsősorban **lymphoid sejtek** és **hybridómák** tenyésztésére használják.



DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

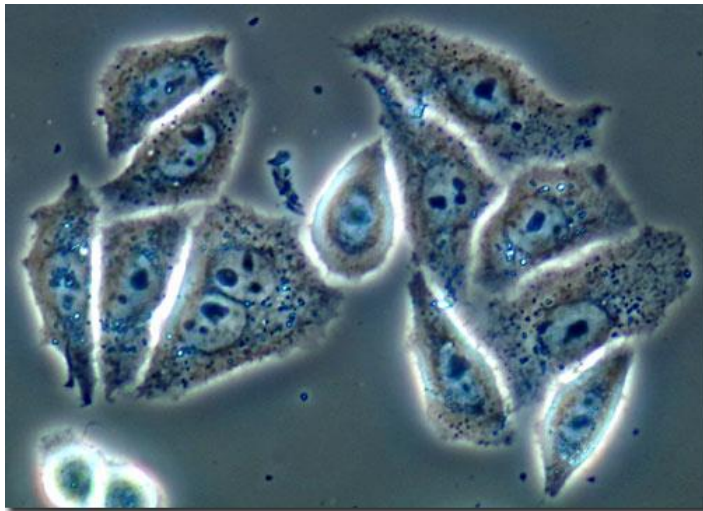
Általánosabban használt médium, **sokféle sejtípushoz** (fibroblast, izomsejt, gliasejt, neuron, stb.) használják.

Általában fenolvörös **indikátort** tartalmaznak → Elhasznált, savas médiumnál sárgára vált, alkalikus pH-n pedig lilás színű.

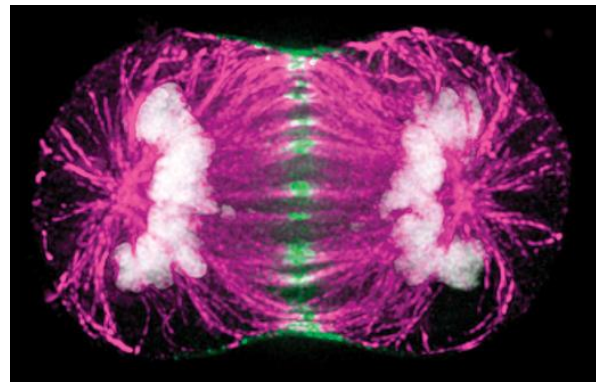
Sejtvonalak 1.

1. HeLa sejtvonal

- Az **első** daganatos sejtvonal 1951-ből.^[5.]
- Eredete: A 31 éves **Henrietta Lacks** méhnyakrákjából (cervix adenocarcinoma) izolálták, aki még abban az évben elhunyt.
- A sejtvonalat a tudta nélkül hozták létre, ez később etikai kérdéseket vetett fel, mikor a HeLa sejtek teljes genomját publikálták 2013-ban.^[6.]
- Mai napig az **egyik legelterjedtebb sejtvonal**, kiterjedten használják kutatásra.



HeLa sejtek



Osztódó HeLa sejt



Henrietta Lacks
(1920-1951)

Sejtvonalak 2.

2. Jurkat sejtek

- Tumoros T-sejtvonal, egy 14 éves acut lymphoblastos leukémiában (ALL) szenvedő beteg (JM) perifériás véréből izolálták a 70-es években.^[7.]
- T-sejt jelátvitel, a T-sejtes leukémia és a HIV fertőzés kutatására használják.

3. Raji sejtek

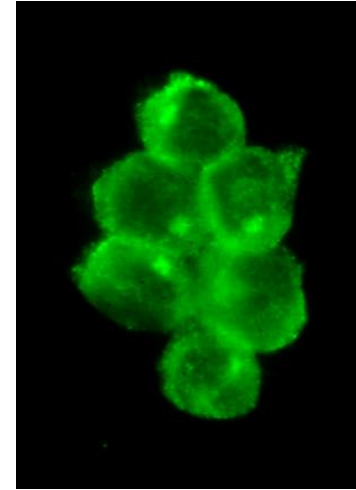
- Tumoros B-sejtvonal, egy 11 éves Burkitt-lymphomás betegből izolálták Nigériában 1963-ban.^[8.]
- EBV pozitív, a vírus integrálódott a genomba.^[9.]
- Transzfekciós kísérletek gyakori sejtvonala.

4. HepG2 sejtek

- Egy 15 éves beteg májrákjából (hepatocellularis carcinoma) származik.^[10.]

5. Sp2 sejtek

- Nem-szekretoros egér myeloma sejtvonal, hybridóma fúzióhoz használják.^[11.] → lásd 3. gyakorlat



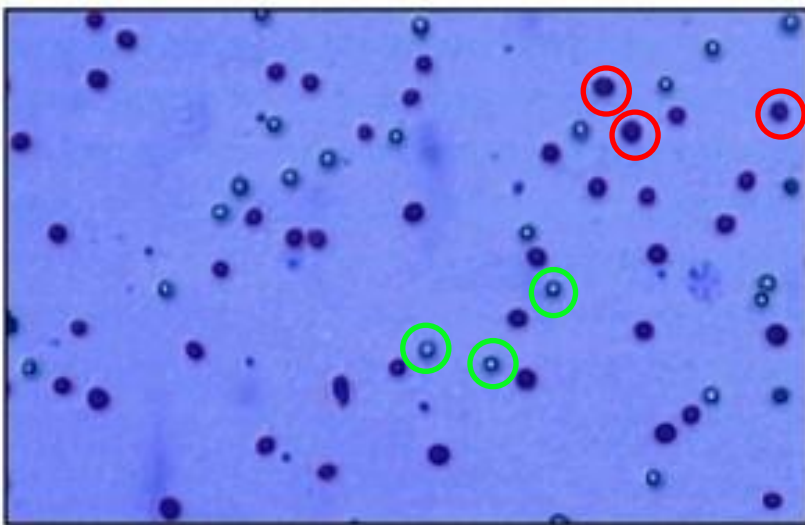
Összetapadt Jurkat sejtek



HepG2 sejtek

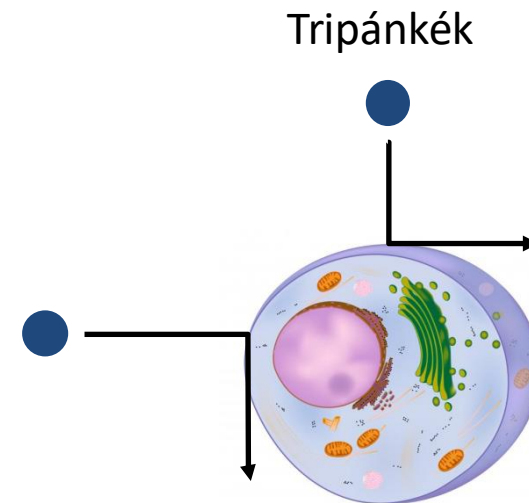
Sejt életképesség meghatározása

- A sejtek életképességét **festékkizárásos tesztekkel** szokták meghatározni, pl.:
 - **Tripánkék**
 - 7-amino-aktinomicin D
 - Propidium-jodid
- Lényeg: Az életképes sejtek aktív mechanizmusokkal igyekeznek kizárni ezeket a xenobiotikumokat. (pl. efflux)



Élő sejtek

Elpusztult sejtek



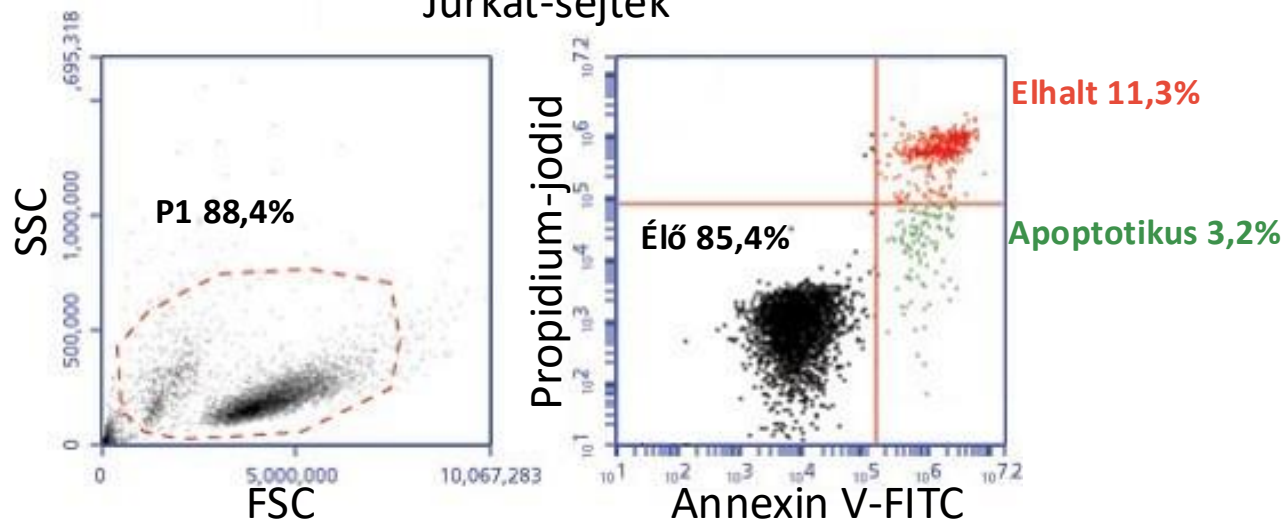
Élő sejt

Példa sejt életképesség vizsgálatára

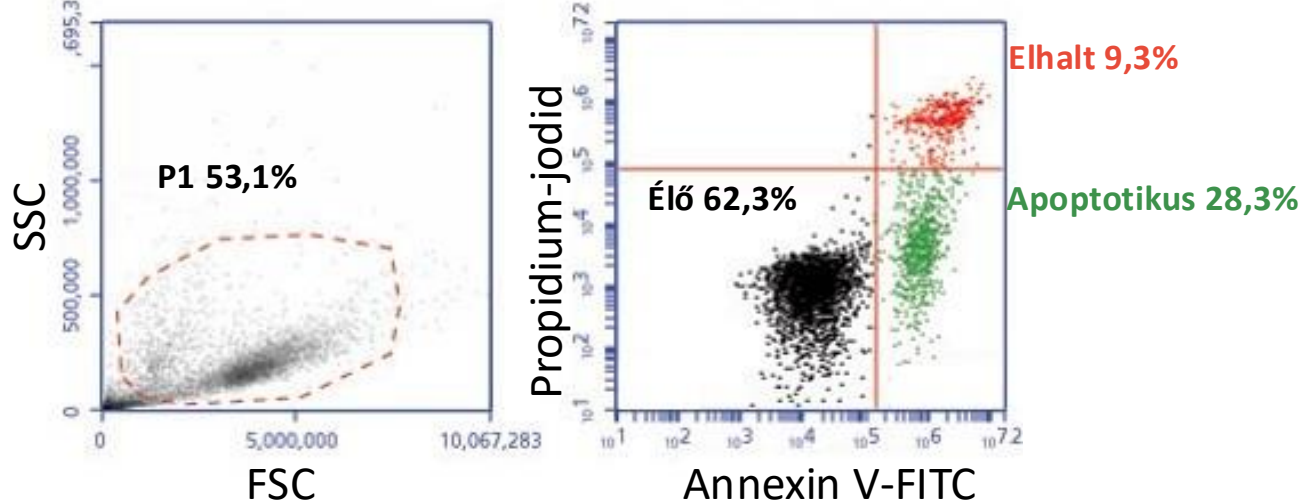
Propidium-jodid: DNS-t kötő fluoreszcens molekula, mely azonban az élő sejtek membránján nem jut át.

Annexin V: Az apoptotikus sejtek membránjában előforduló foszfatidil-szerinhez kötődik.

Jurkat-sejtek



Jurkat-sejtek + camptothecin (kemoterápia)

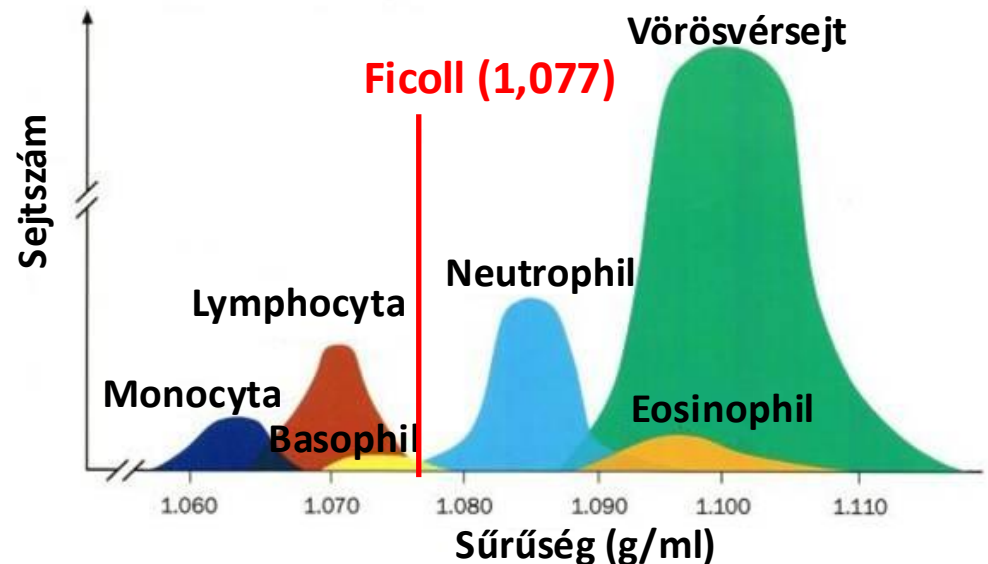


Phagocyták funkcionális tesztjei

- **Izoláció:** Normálisan a sejtek kitapadnak az üveg vagy műanyag felületekhez.
- **Migráció:** Spontán vagy chemotaxissal irányított sejt migráció vizsgálata in vitro vagy in vivo. (pl. skin window teszt)
- **Phagocytosis** vizsgálata:
 - Nem-opszonizált
 - Opszonizált (pl. Fc receptoron vagy complement receptoron keresztül)
- **Oxidatív burst és phagocytá enzimek** vizsgálata:
 - Nitro-kék-tetrazólium (NBT) teszt, myeloperoxidáz (MPO) teszt, alkalikus foszfatáz teszt, lizozim teszt, stb.
- **Citokin termelés** vizsgálata:
 - ELISA, ELISPOT
 - CBA (Cytometric Bead Array): Multiplex áramlási citometriás mérés mikrogöngyök segítségével

Mononukleáris sejtek izolálása

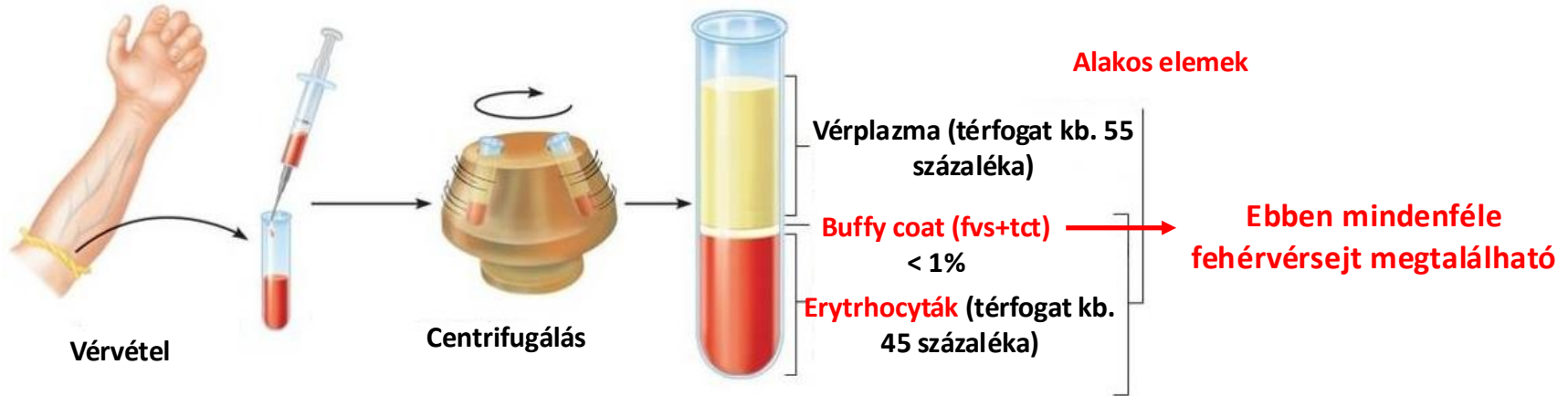
- **Fizikai paramétereken alapuló módszerek:**^[19.]
 - Filtráció (vérszámok mérete alapján)
 - Gradiens centrifugálás (pl. **Ficoll-gradiens centrifugálás**, a vér alkotóelemeinek sűrűsége alapján)



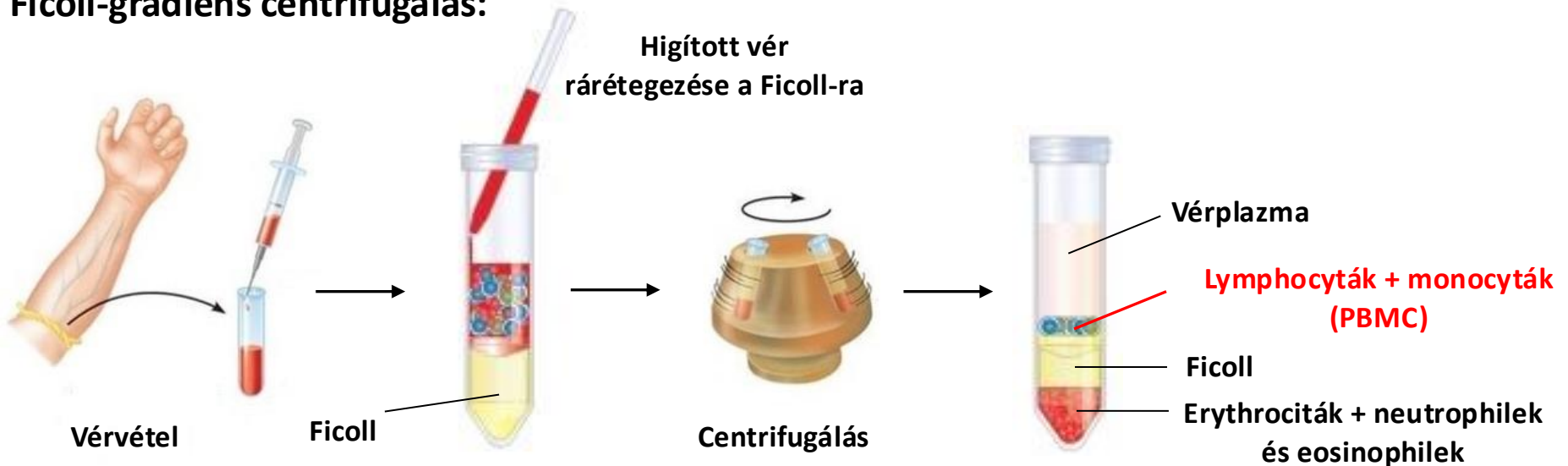
- **Adhéziós tulajdonságokon alapuló eljárások:**
 - Nylon vatta: monocyták és a B-sejtek kitapadnak
 - Műanyag/üvegfelszín: monocyták kitapadnak, lymphocyták eltávolíthatók

Ficoll-grádiens centrifugálás 1.

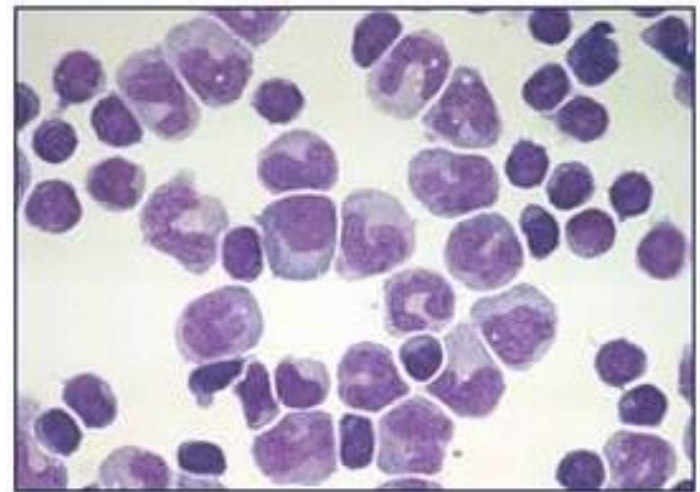
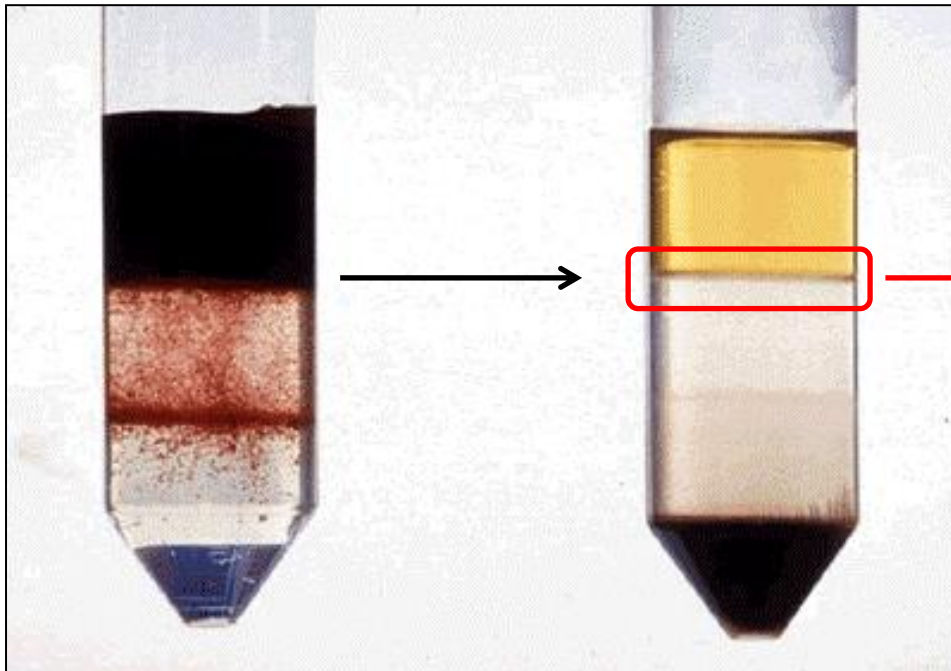
Közönséges centrifugálás:



Ficoll-grádiens centrifugálás:



Ficoll-grádiens centrifugálás 2.



Perifériás vér mononukleáris sejtjei (**PBMC**, Peripheral blood mononuclear cells = nem-szegmentált magvú fehérvérsejtek): **Lymphocyták, monocyták** (és kis arányban basophil granulocyták)^[20.]

Skin window teszt^[12.]



1. Az alkar voláris felszínén **eltávolítják a bőr felső rétegét.** (cél: látszódjanak a kapillárisok, de még ne vérezzen)



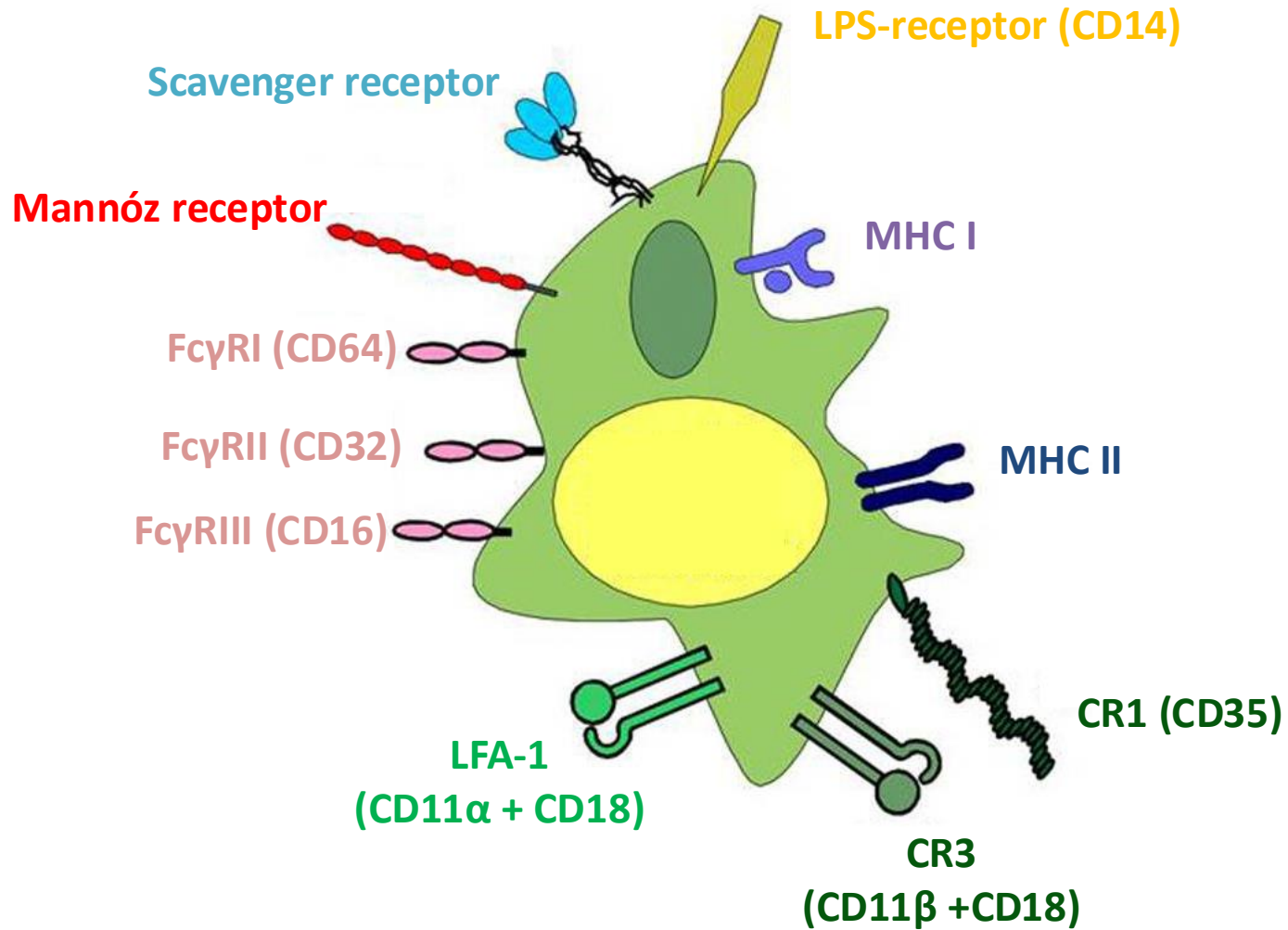
Skin window az alkaron

2. A képződött **sebre filter papírt tesznek**, a papír a vizsgálatról függően különböző anyagokat, **chemokineket** (pl. IL-8) tartalmazhat.
 3. A sérülés helyén a **sejtek kilépnek az érpályából** és a filter papírba vándorolnak.
 4. A papírt bizonyos idő elteltével eltávolítják, a sejteket üveglapra kenik és megvizsgálják a **sejtes összetételt.**
- Értelme: **Sejt migráció in vivo vizsgálata**, pl. egészséges önkéntesek összehasonlítása autoimmun betegekkel, stb.



A beavatkozás nem hagy heget, a seb napokon belül gyógyul.

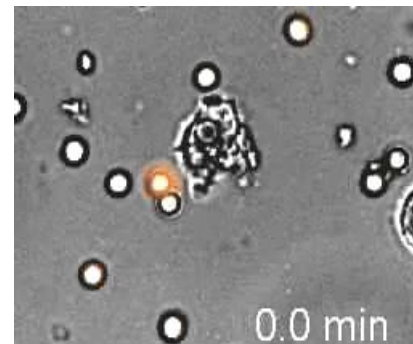
A macrophagok sejtfelszíni molekulái



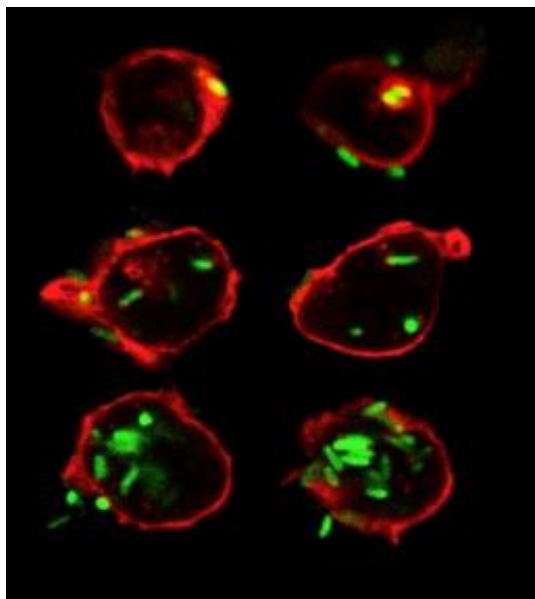
Phagocytosis teszt

Módszer:

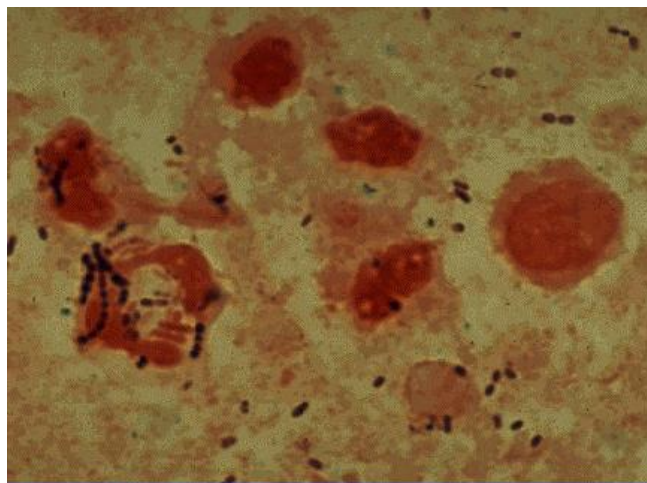
- **Jelölt partikulumokat** (pl. egész baktériumokat) inkubálnak együtt a phagocytáló sejtekkel.
- Értékelés **mikroszkóppal** vagy **áramlási citometriával** (utóbbi → 5. gyakorlat)



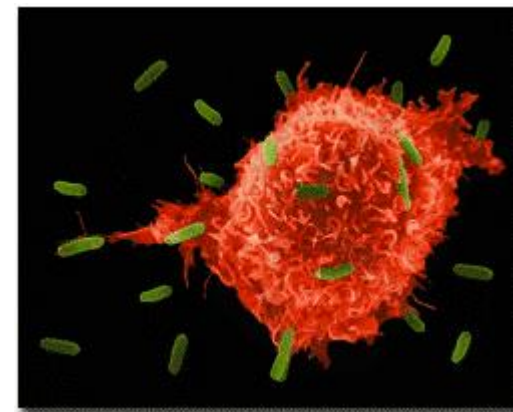
Videó: Egy neutrophil granulocyta phagocytál számos gomba konídiumot (=gomba spóra).



Phagocytosis fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva

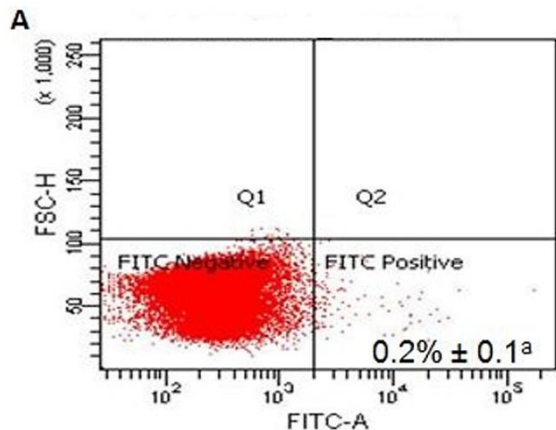


Phagocytosis immunhisztokémiával vizsgálva

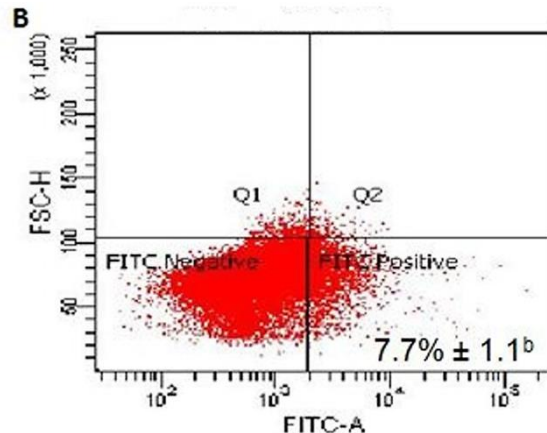


Példa phagocytosis vizsgálatára

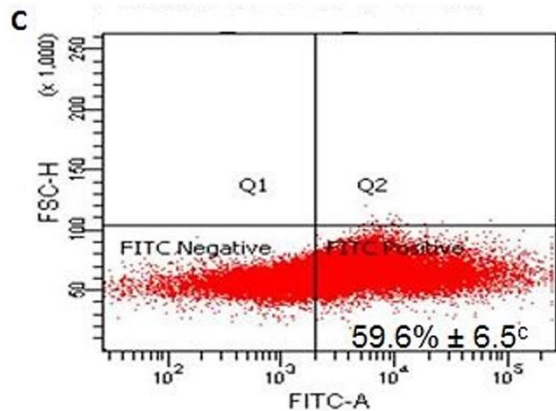
A: Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyök nélkül



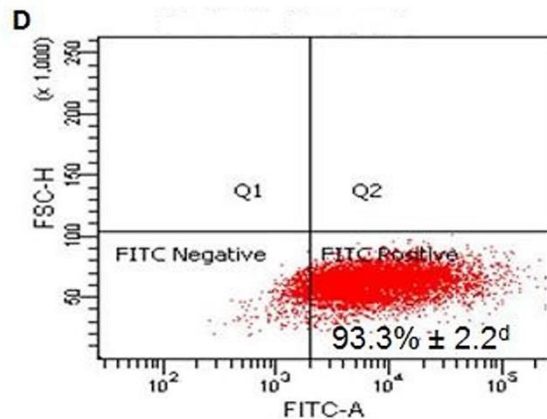
B: Kezeletlen macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva



A kezelések hatására fokozódik a macrophagok phagocytáló képessége.

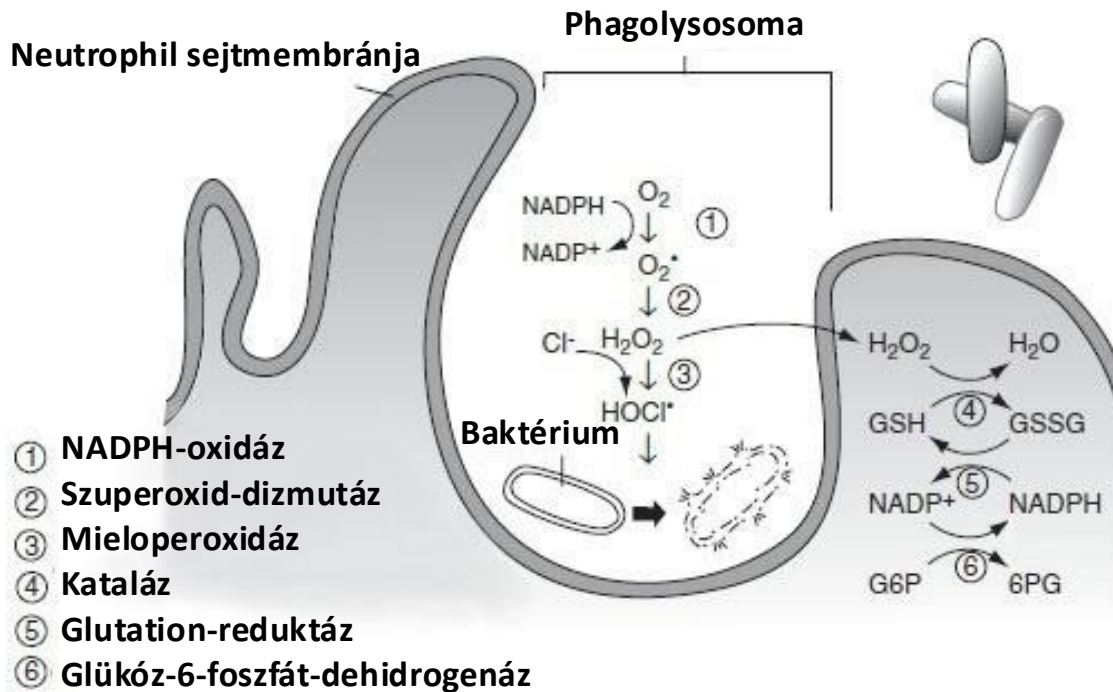


C: Növényi poliszachariddal kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva



D: LPS-el kezelt macrophagok FITC-el jelölt latex gyöngyökkel inkubálva

Oxidatív burst



1. Phagocytosis (phagosoma)



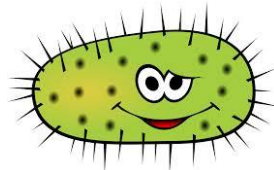
2. Phagosoma + enzimeket és szabadgyököket tartalmazó lysosoma egyesül → **phagolysosoma**



3. Az enzimek és az oxidáló szabadgyökök elpusztítják a kórokozót



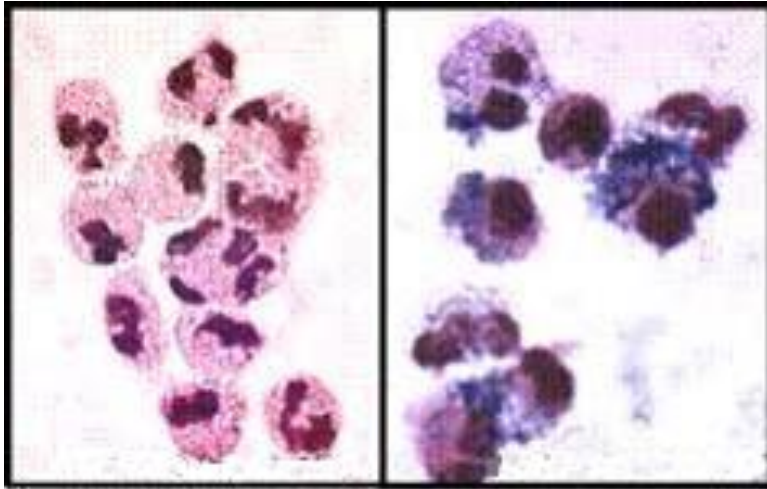
Neutrophil



Kórokozó baktérium

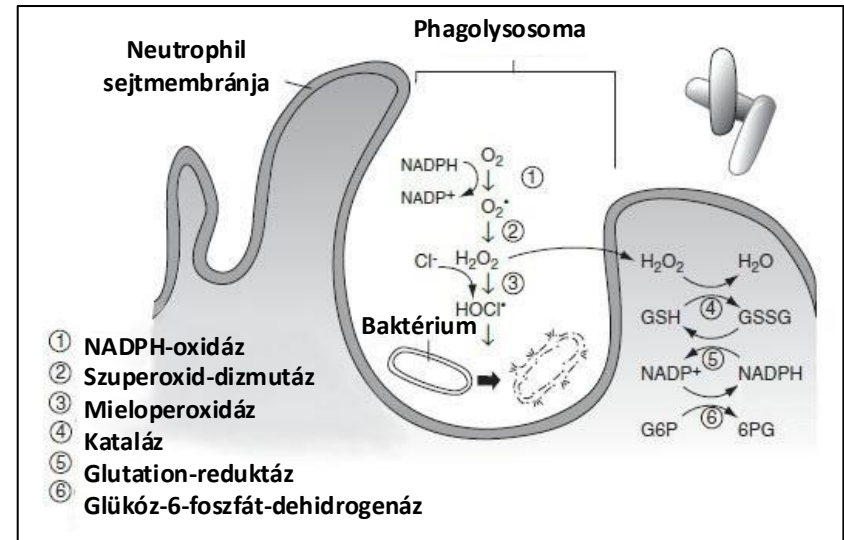


NBT teszt



CGD-s beteg

Normál kontroll



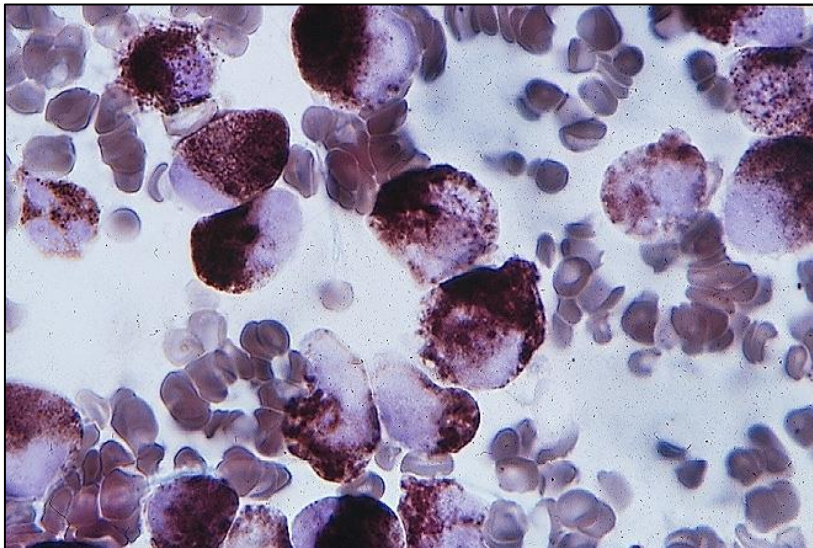
Lényege: A reaktív **szabadgyökök** redukálják a festéket, mely **kékes színt** ad.^[13.]

Krónikus granulomatózus betegség (CGD, chronic granulomatous disease)^[14.]:

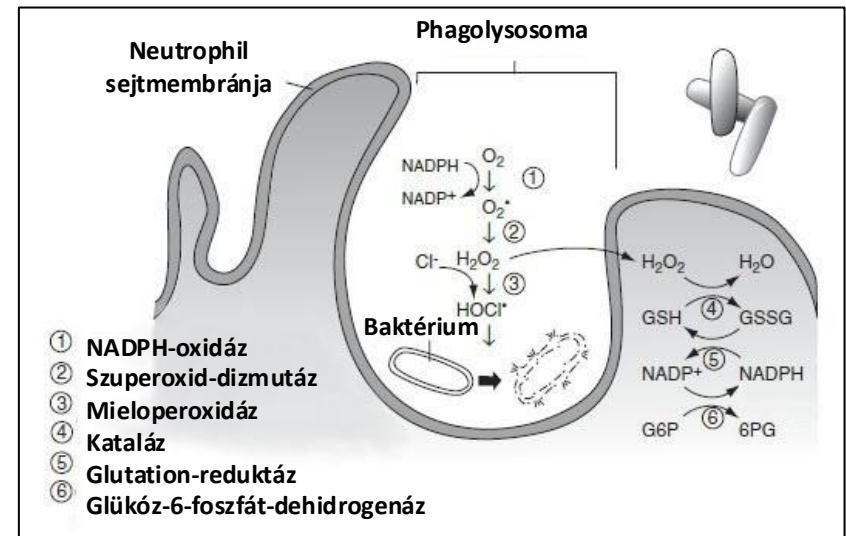
- Veleszületett **genetikai betegség**, leggyakrabban X-hez kötött recesszív.
- A veleszületett immunsejtek képtelenek reaktív oxigén szabadgyököket termelni. → Nem tudják elpusztítani a kórokozókat. → **Primer immunhiány**
- Visszatérő, elsősorban **bakteriális és gombás fertőzések** granulóma képződéssel gyermekkorban.

Myeloperoxidáz festés

- A myeloperoxidáz (MPO) a myeloid immunsejtek (főleg neutrophil granulocyták) egyik jellegzetes enzime, mely a szabadgyök termelésben játszik szerepet.
- Sejten belüli kimutatása **leukémiás betegségekben** lehet fontos, a sejtek myeloid eredetének igazolására használt marker.^[15, 16.]



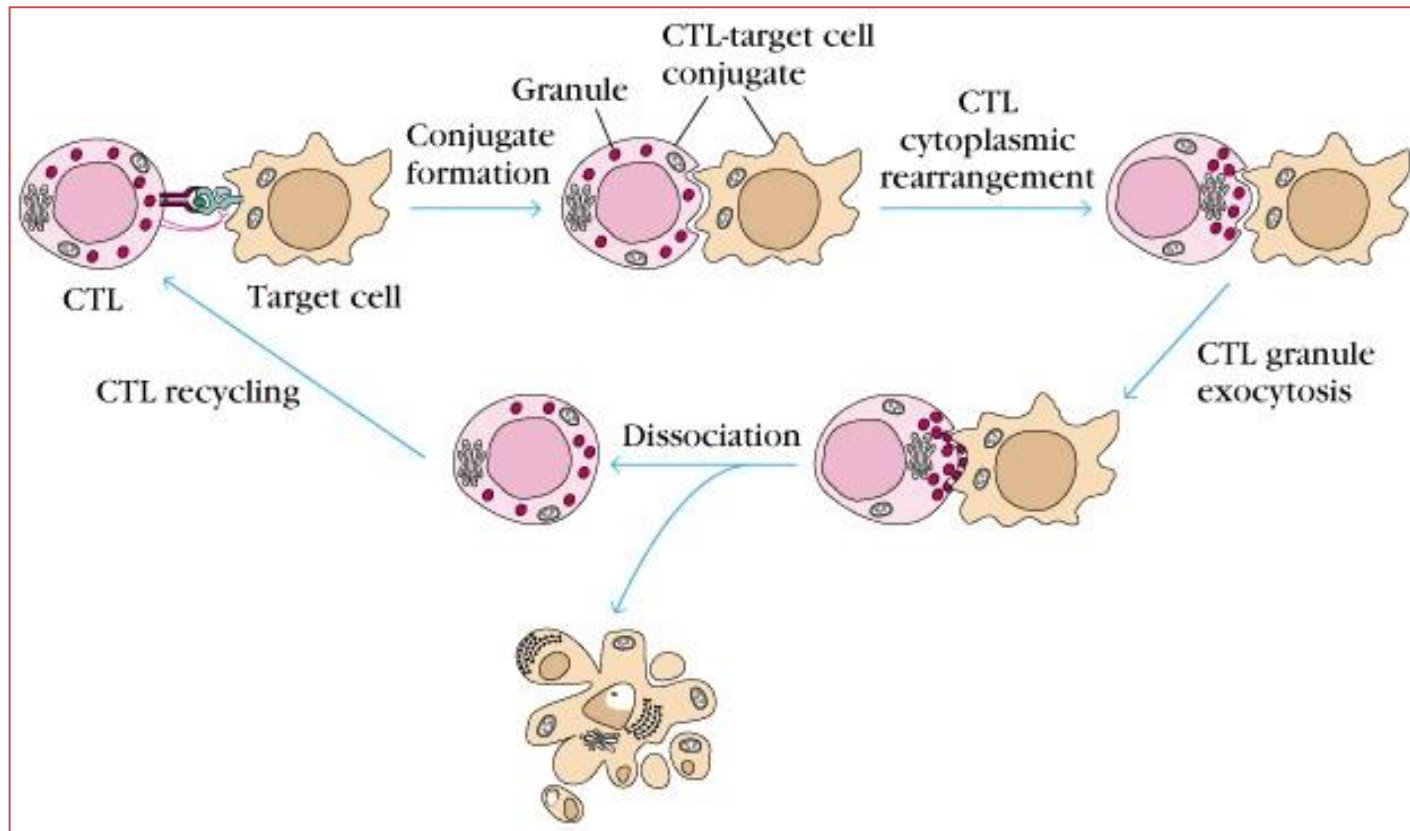
Myeloperoxidáz kimutatása acut promyelocytás leukémiában (AML-M3 vagy APL)



Lymphocyták funkcionális tesztjei

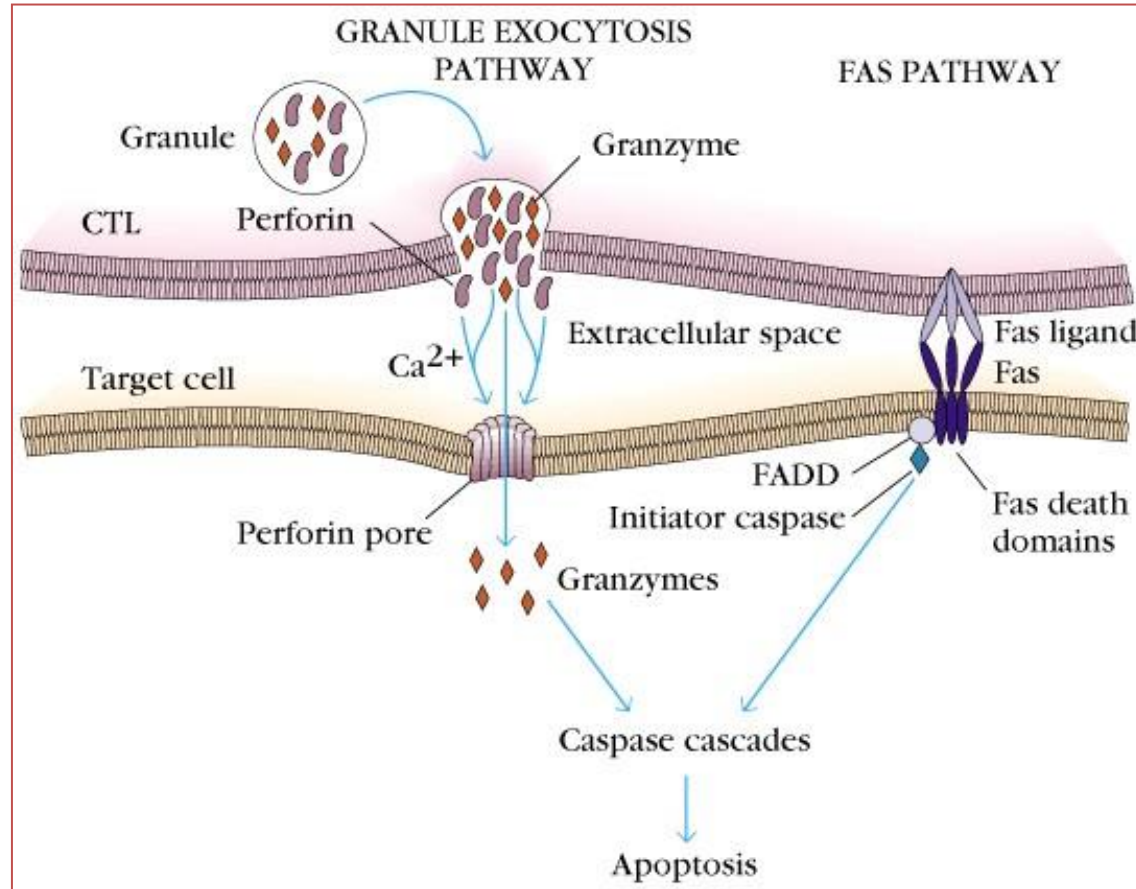
- **Lymphocyták polyclonalis aktivációja:**
 - Növényi lektinekkel, pl. fitohemagglutinin (PHA)
 - Bakteriális sejtfal komponensekkel, pl. lipopoliszacharid (LPS)
- **Cytotoxicitásának vizsgálata (T és NK sejtek):**
 - Cr-51 felszabadulás vizsgálata izotóp-jelölt célsejtek segítségével
 - Elpusztult célsejtek arányának áramlási citometriás meghatározása, pl. Annexin V vagy propidium-jodid festéssel^[17.]
- **B-sejtek funkcionális tesztjei:**
 - Immunglobulin termelés detektálása (immuncitokémia, ELISA)
 - Immunglobulin génátrendeződés vizsgálata PCR-al
 - Plaque forming cell assay (PFC) → Immunotoxicitás vizsgálatára használják
 - Passzív cutan anaphylaxia teszt
- **Kevert lymphocyta kultúra:**
 - Transzplantációk előtt az inkompatibilitás kizárására
- **Citokin termelés mérése:**
 - ELISA, ELISPOT
 - CBA (Cytometric Bead Array)

A CTL-mediálta target sejt pusztítás lépései:



1. Antigén felismerés, 2. Konjugáció, 3. CTL citoplazma átrendeződés
4. CTL granulum exocytosis 5. Cél sejt apoptosisa 6. Disszociáció

A CTL indukálta apoptosis mechanizmusa:



Szolubilis effektorok: perforin és granzim

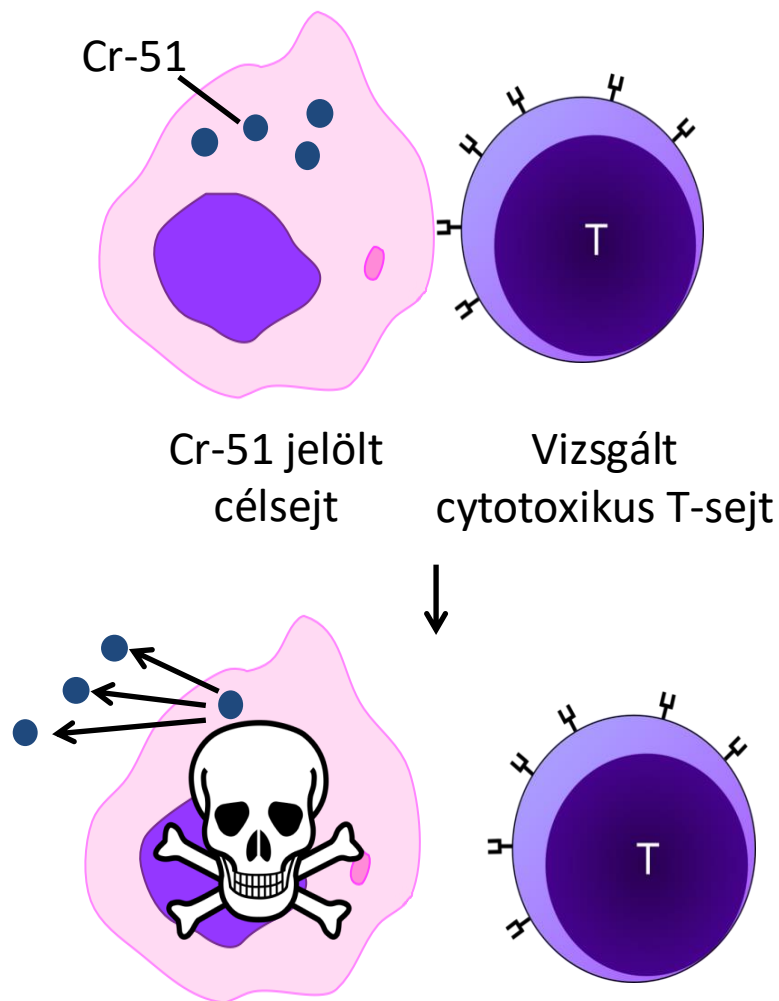
Membránhoz kötött effektorok: Fas ligand (FAS-L)

Króm-51 felszabadulás vizsgálata

Cytotoxikus sejtek (T, NK) **sejtpusztító képességének**^[18.] és az **ADCC-nek**^[19.] (antitest-dependens celluláris cytotoxicitás, lásd előadáson) a vizsgálatára alkalmas in vitro módszer, pl.:

Tumoros betegek cytotoxikus sejtjeinek vizsgálata tumorsejtek ellen.

1. Cr-51 jelölt célsejtekkel együtt inkubált Tc sejtek
2. Célsejt elpusztul, a króm felszabadul
3. Centrifugálás, a Tc-k és a sejtörmelék leülepednek a cső aljára
4. A felülúszó króm tartalmának mérése



Allergén-specifikus bőrtesztek

IgE-közvetített azonnali reakció



Leolvasás: 30 min

DTH:



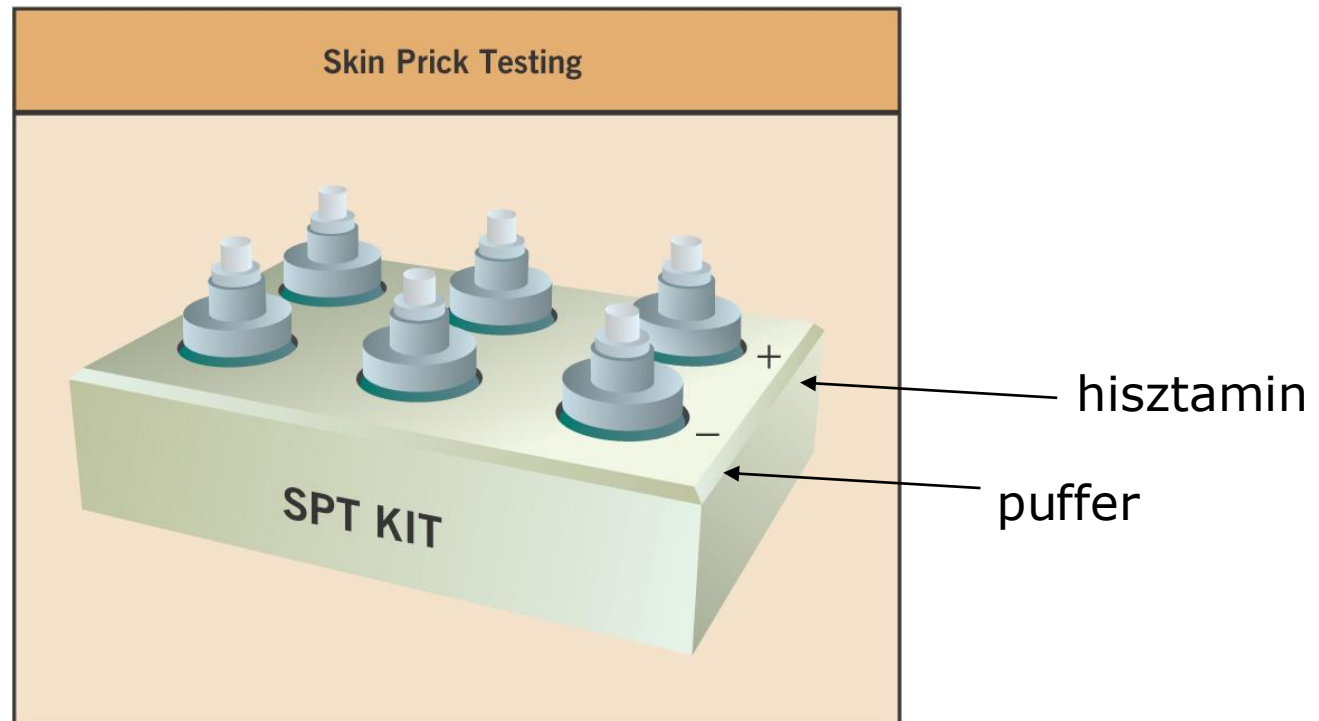
Leolvasás: 48h

Kontakt allergia bőrteszt

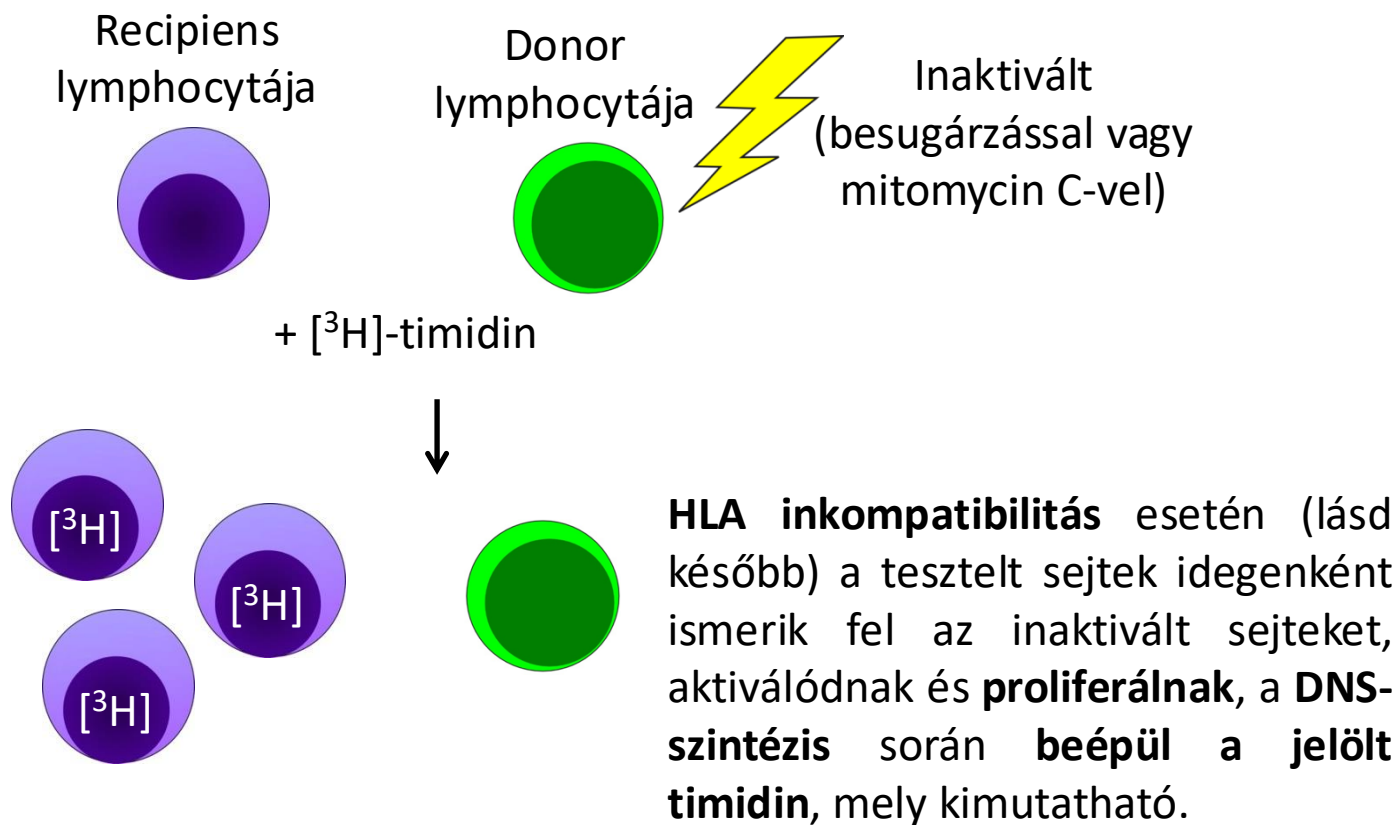


Bőr prick teszt (SPT)= in vivo allergén bőrteszt

- Érzékenyebb, de kevésbé specifikus mint az allergén specifikus IgE vizsgálat
- UK Allergén csoportok: kutya, macska, poratka, füvek



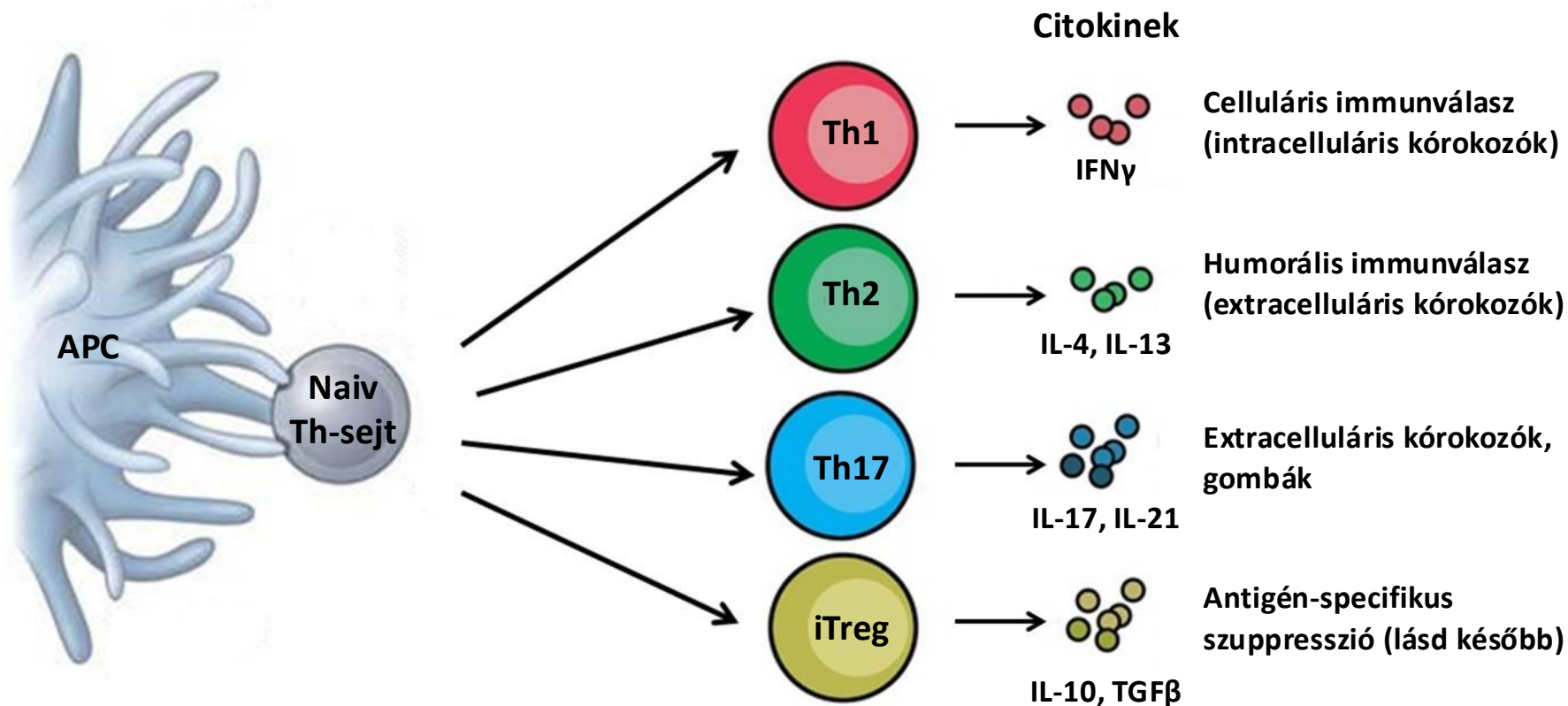
Kevert lymphocyta kultúra (MLC)



Felhasználás:

Transzplantációk előtt a donor és a recipiens immunológiai inkompatibilitásának vizsgálata.^[21, 22.]

Th sejtek főbb altípusai

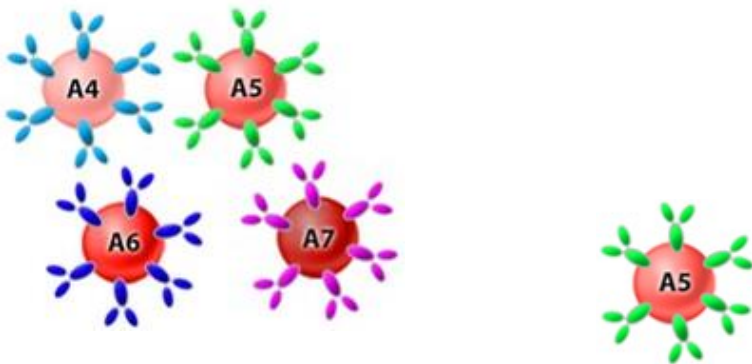


- Th17 sejteknek szerepe lehet különböző **gyulladásos autoimmun kórképekben**. (lásd később)
- **Regulatórikus T-sejtek** (Treg): Az immunválasz negatív szabályozásában (**szuppresszió**) fontosak (lásd később), jellemző immunfenotípusuk: **CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺**

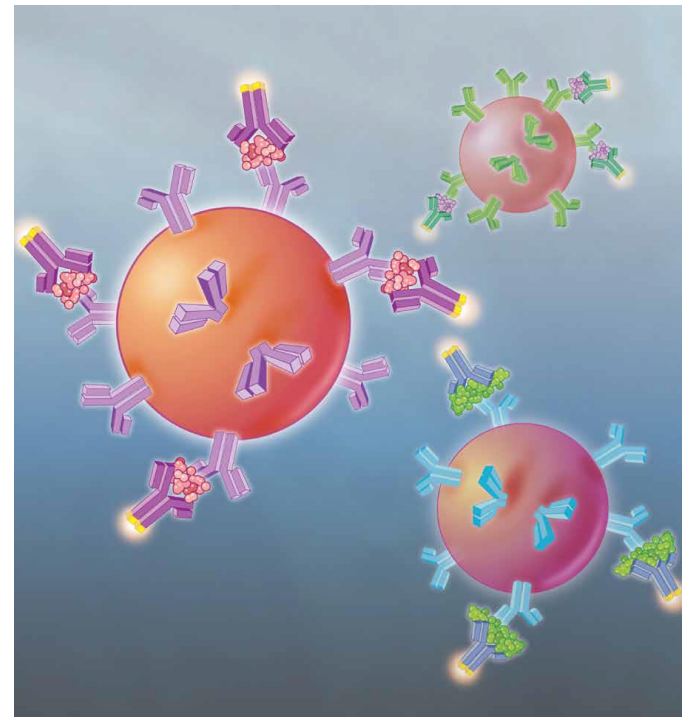
CBA (Cytometric Bead Array^[23.])

- **Áramlási citometriás** módszer → lásd 5. gyakorlat
- Lényege: Különböző, valamilyen paraméter (pl. méret, fluoreszcens festék) alapján megkülönböztethető **mikrogyöngyök** („bead” = gyöngy) felszínére célzottan köthetők ki molekulák (pl. DNS, fehérjék, köztük antitestek is)
- Haszna: **Több molekula vizsgálható egyetlen mintában** („multiplex mérés”), a vizsgálat pedig **kvantitatív!**

Gyöngy keverék:

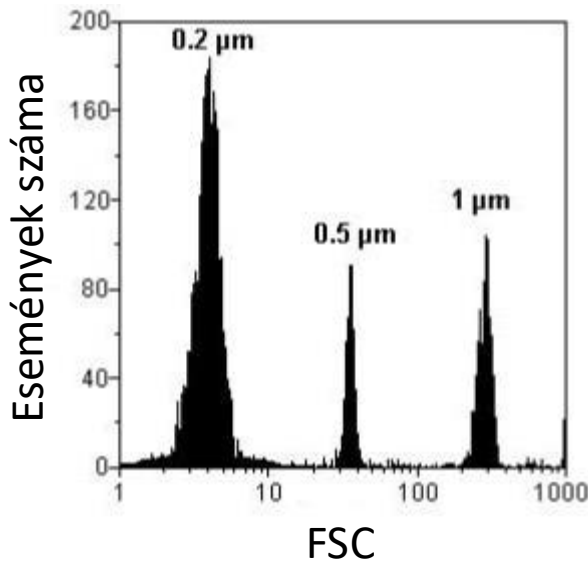


Méret vagy fluoreszcencia alapján kiválasztott gyöngy vizsgálata (kérdés: kötődött-e hozzá antigén?)

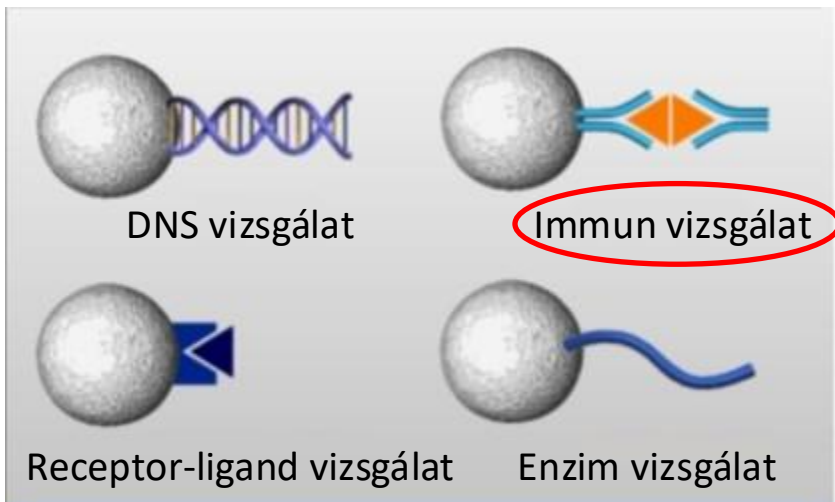
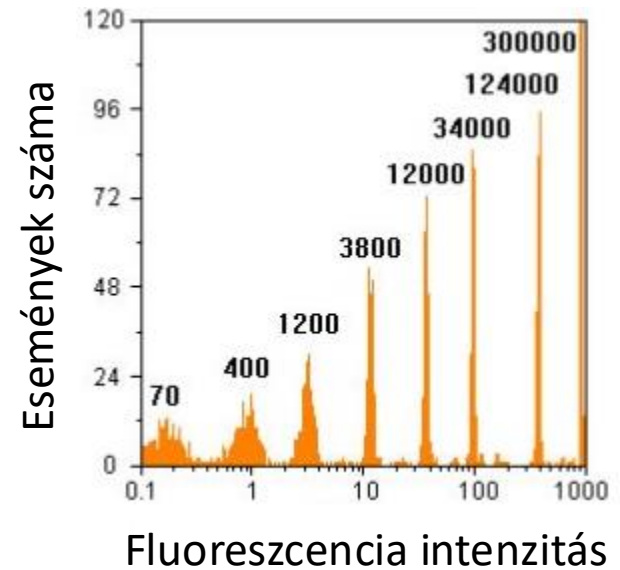


Gyöngyök jellemzői

Méret szerinti csoportosítás:



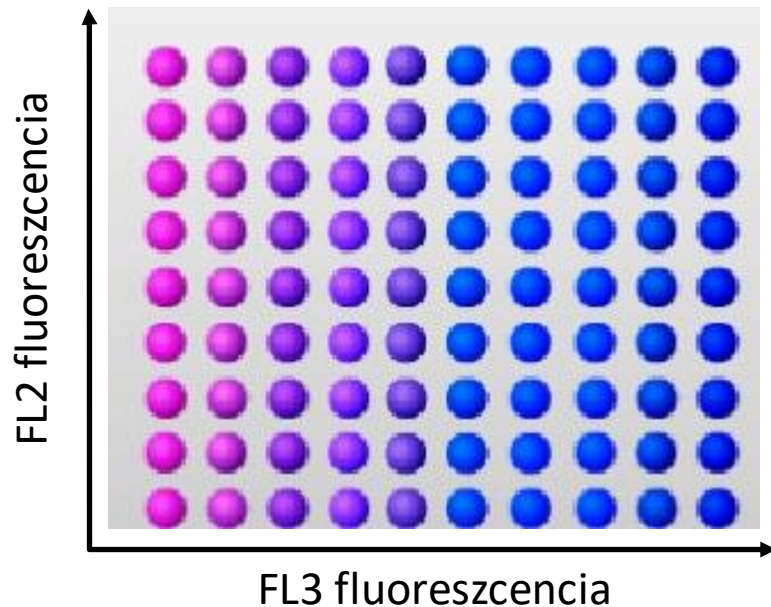
Fluoreszcencia szerinti csoportosítás:



Leggyakrabban különböző citokinek koncentrációinak meghatározására használják. [23, 24]

Luminex xMAP technológia^[25.]

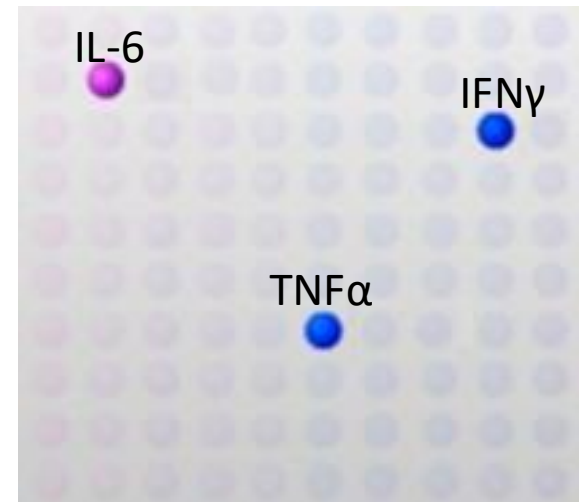
Gyöngyök csoportosítása
fluoreszcens jelölődés alapján



Releváns gyöngyök
kiválasztása



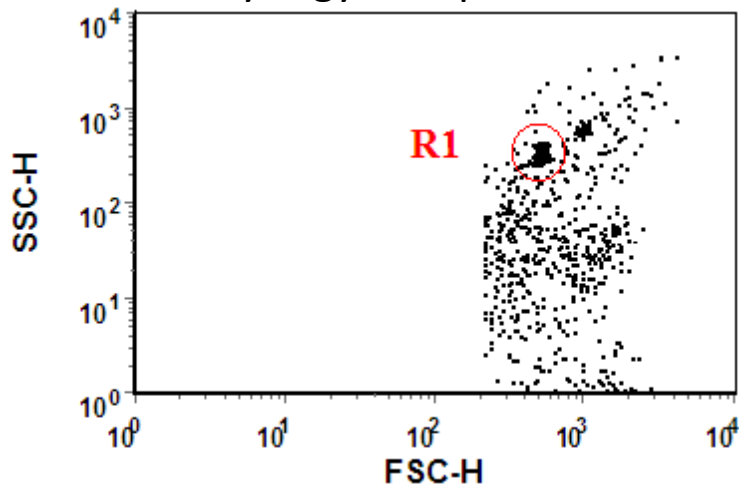
Kiválasztott gyöngyök további
vizsgálata



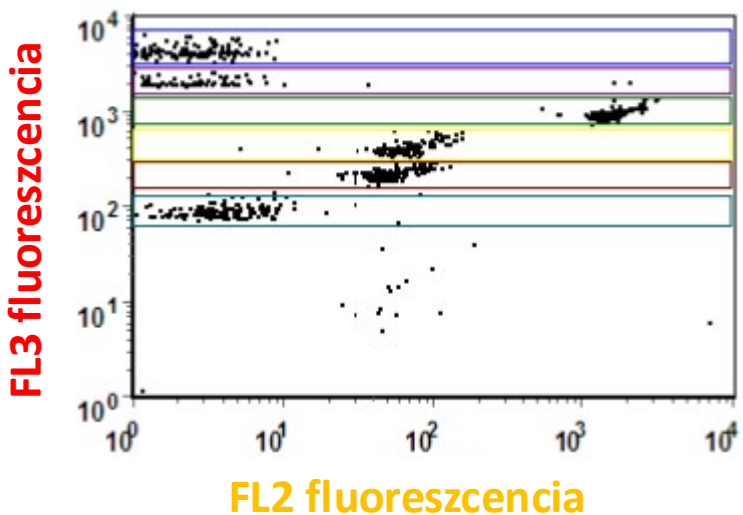
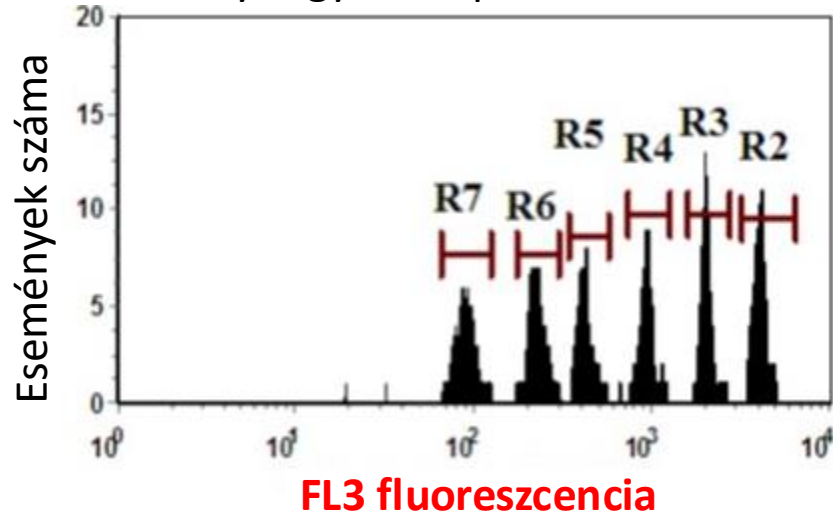
Lényeg: A gyöngyök mindegyike 2 festék kombinációját tartalmazza, azonban a kettő aránya mindegyik gyöngytípusban eltérő. Pl. az anti-IFN γ antitesttel konjugáltban több az FL3 jelet adó festék, mint az anti-IL-6 antitesttel konjugáltban. Ezzel a módszerrel elméletileg akár 100 különböző féle gyöngy is vizsgálható egyetlen mintában.

CBA analízis példa (citokin mérés)

Gyöngyök kapuzása:



Gyöngyök csoportosítása:



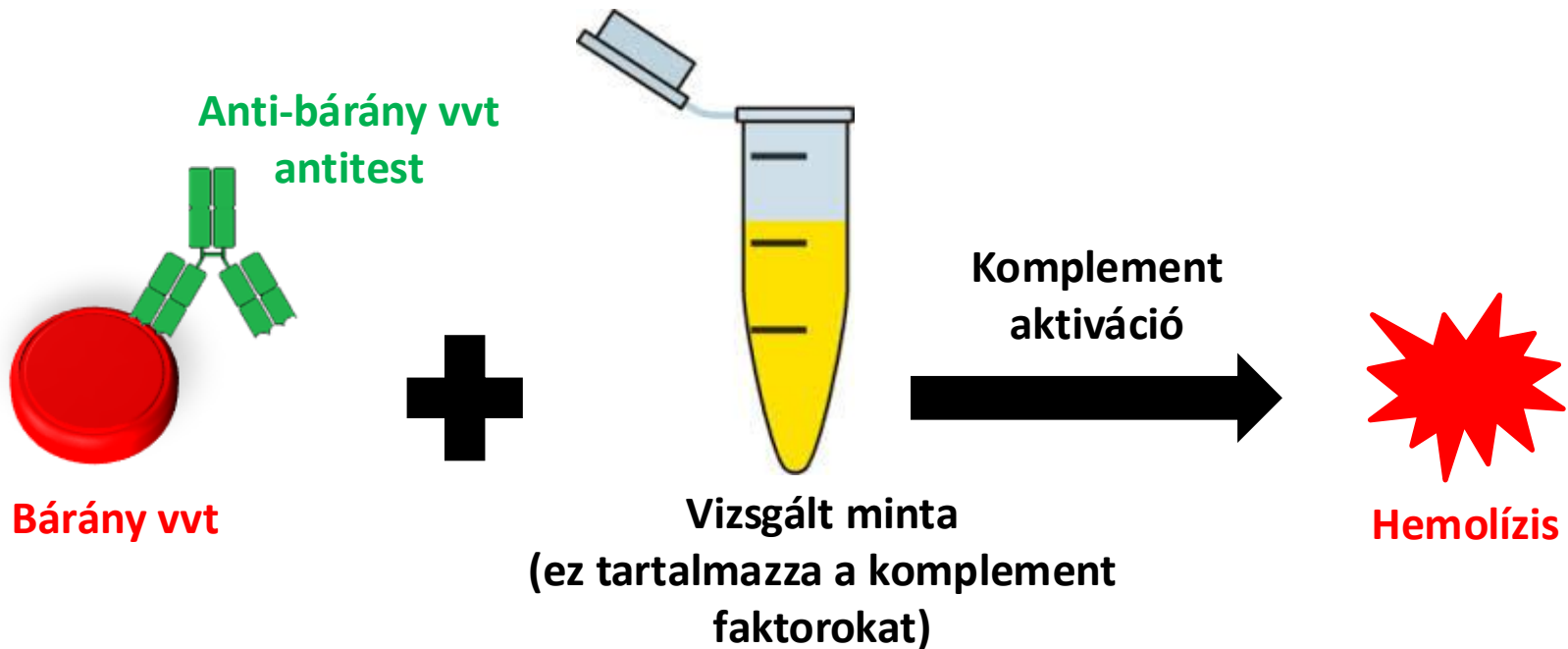
- R2 = IL-8 → Negatív
- R3 = IL-1β → Negatív
- R4 = IL-6 → **Erősen pozitív**
- R5 = IL-10 → **Pozitív**
- R6 = TNFα → **Pozitív**
- R7 = IL-12p40 → Negatív

Kvantitatív vizsgálat:

A pozitivitás mértéke is meghatározható!

A komplement rendszer funkcionális tesztjei

- Mikor vizsgálják:
 - Visszatérő fertőzések, komplement rendszert érintő **immunhiány** gyanúja
 - **Autoimmun kórképek**
- Általános teszt: **hemolízisen** alapuló vizsgálatok → CH50 vagy CH100^[26,27]



CH50 → a minta azon hígítása, ami a vvt-k 50%-át hemolizálja
CH100 → a minta azon hígítása, ami az összes vvt-t hemolizálja

QuantiFERON®

Blood Test for the Detection of
Latent Tuberculosis Infection





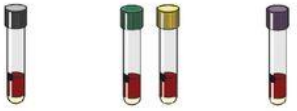
Sampling tubes of QuantiFERON TB Gold Plus

	<p>NIL Tube</p> <ul style="list-style-type: none">• Negative control• Allows adjustment for background noise.
	<p>TB1 ANTIGEN Tube</p> <ul style="list-style-type: none">• Includes <i>Mycobacterium tuberculosis</i> specific antigens ESAT-6 and CFP-10• Peptides recognized by MHC Class II to detect CD4 response.
	<p>TB2 ANTIGEN Tube</p> <ul style="list-style-type: none">• Includes <i>Mycobacterium tuberculosis</i> specific antigens ESAT-6 and CFP-10• Peptides recognized by MHC Class I and II to detect CD4 and CD8 combined response.
	<p>Mitogen Tube</p> <ul style="list-style-type: none">• Positive control• Includes PHA and allows to check the functionality of the immune system• Objectives:<ul style="list-style-type: none">• To identify individuals with weakened immune system• To validate specimen handling conditions



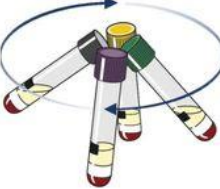
QuantiFERON-TB Gold Plus Protocol

Step 1: Whole Blood incubation



Nil Control **ESAT-6 CFP-10** **Mitogen Control**

1) 1mL of whole blood (x4) and incubation at +37°C for 16-24 h.

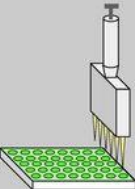


2) 15 minutes Centrifugation

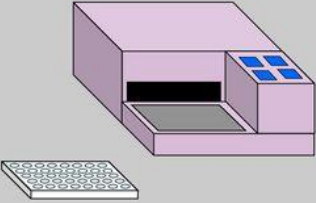
IFN- γ is stable at 2-8° C for at least 4 weeks

Step 2: INF- γ ELISA testing

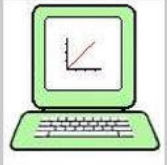
3) Add plasma and conjugate. Incubation 2H at room temperature



4) Wash then add Substrate. OD reading after 30 min.



5) Calculation and results printing





Active and Latent Tuberculosis Infection

TB-related morbidity and mortality

The TB pandemic – global emergency (1)

Active TB disease in 2013

- 9 million people developed TB disease
- 1.5 million people died

Latent TB infection (LTBI) in 2013

- 2 billion infected with *M. tuberculosis*
- 10% chance of developing active, contagious TB disease in their lifetimes

Screening and treatment (2)

2014 WHO guidelines, part of Broad strategy to “End TB” by 2035:

- Identify and treat LTBI for upper-middle and high income countries with TB incidence <100/100k population
- Screen and treat for LTBI in most at-risk populations for progression to active TB
- Reduce TB deaths by 95%; cut active TB cases by 90%

▶ As active TB rates decrease, LTBI diagnosis & preventive treatment grows in importance

1. WHO. Global tuberculosis report 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1, Dec 1, 2014. 2. WHO. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. 2014 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/136471/1/9789241548908_eng.pdf?ua=1, Dec 1, 2014.



From Latent TB infection to Active TB: Risk Factors

Risk factors to develop active TB form Latent TB infection	
Risk Factors	Estimation of relative risk*
AIDS	110 - 170
Well controlled HIV infection	50 - 110
Solid Organ Transplantation	20 - 74
Chronic Hemodialysis	10 - 25
Head and neck cancer	16
Recent tuberculosis infection (<2 years)	15
Systemic prolonged corticosteroids therapy	4.9
Anti-TNF α treatment	1.5 - 4
Diabetes	2 - 3.6
Malnutrition (body mass index < 20 kg/m ²)	2 - 3
Passive smoking	2 - 3

* Compared to a population without any risk factor

HIV: Human Immunodeficiency Virus

TNF: Tumor Necrosis Factor

Leroy H. et al in La revue du praticien vol. 62, avril 2012 p 484, adapted from Landry J, Menzies D. *Preventive chemotherapy. Where has it got us? Where to go next?* Int J Tuberc Lung Dis 2008;12:1352-64.

Sample to Insight

Hivatkozások 1.

1. ThermoFischer Scientific: **Introduction to Cell Culture** (<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>)
2. Jensen JR¹, Morbeck DE, Coddington CC 3rd: **Fertility preservation**. *Mayo Clin Proc*. 2011 Jan;86(1):45-9. doi: 10.4065/mcp.2010.0564.
3. Gluckman E¹: **Family-directed umbilical cord blood banking**. *Haematologica*. 2011 Nov;96(11):1700-7. doi: 10.3324/haematol.2011.047050. Epub 2011 Jul 12.
4. Roura S¹, et al.: **The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review**. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jul 2;6:123. doi: 10.1186/s13287-015-0113-2.
5. Lucey BP¹, Nelson-Rees WA, Hutchins GM: **Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination**. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Sep;133(9):1463-7. doi: 10.1043/1543-2165-133.9.1463.
6. Hudson KL¹, Collins FS: **Biospecimen policy: Family matters**. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):141-2. doi: 10.1038/500141a.
7. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma**. *Int J Cancer*. 1977 May 15;19(5):621-6.
8. Drexler HG¹, Minowada J: **History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines**. *Leuk Lymphoma*. 1998 Oct;31(3-4):305-16.
9. Anvret M, Karlsson A, Bjursell G: **Evidence for integrated EBV genomes in Raji cellular DNA**. *Nucleic Acids Res*. 1984 Jan 25;12(2):1149-61.
10. Aden DP, et al.: **Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line**. *Nature*. 1979 Dec 6;282(5739):615-6.

Hivatkozások 2.

11. Melixetian MB¹, et al.: **Mouse myeloma cell line Sp2/0 multidrug-resistant variant as parental cell line for hybridoma construction.** *Hybrid Hybridomics*. 2003 Oct;22(5):321-7.
12. Marks DJ¹, et al.: **Modified skin window technique for the extended characterisation of acute inflammation in humans.** *Inflamm Res*. 2007 Apr;56(4):168-74.
13. Freeman R, King B: **Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test.** *J Clin Pathol*. 1972 Oct;25(10):912-4.
14. Song E¹, et al.: **Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications.** *Clin Mol Allergy*. 2011 May 31;9(1):10. doi: 10.1186/1476-7961-9-10.
15. Gluzman DF¹, et al.: **Immunocytochemical markers in acute leukaemias diagnosis.** *Exp Oncol*. 2010 Sep;32(3):195-9.
16. van den Ancker W¹, et al.: **A threshold of 10% for myeloperoxidase by flow cytometry is valid to classify acute leukemia of ambiguous and myeloid origin.** *Cytometry B Clin Cytom*. 2013 Mar;84(2):114-8. doi: 10.1002/cyto.b.21072. Epub 2013 Jan 16.
17. Zaritskaya L¹, et al.: **New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity.** *Expert Rev Vaccines*. 2010 Jun;9(6):601-16. doi: 10.1586/erv.10.49.
18. Brunner KT, et al.: **Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.** *Immunology*. 1968 Feb;14(2):181-96.
19. Nelson DL¹, Kurman CC, Serbousek DE: **51Cr release assay of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).** *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Chapter 7:Unit 7.27. doi: 10.1002/0471142735.im0727s08.
20. Poulsen OM, Hau J: **Murine passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) for the 'all or none' determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides.** *Clin Allergy*. 1987 Jan;17(1):75-83.

Hivatkozások 3.

21. Cerilli J, et al.: **The significance of mixed lymphocyte culture in related renal transplantation.** *Surgery.* 1980 Nov;88(5):631-5.
22. Mickelson EM¹, et al.: **Evaluation of the mixed lymphocyte culture (MLC) assay as a method for selecting unrelated donors for marrow transplantation.** *Tissue Antigens.* 1996 Jan;47(1):27-36.
23. Moncunill G¹, Campo JJ, Dobaño C: **Quantification of multiple cytokines and chemokines using cytometric bead arrays.** *Methods Mol Biol.* 2014;1172:65-86. doi: 10.1007/978-1-4939-0928-5_6.
24. Prabhakar U¹, et al.: **Multiplexed cytokine sandwich immunoassays: clinical applications.** *Methods Mol Med.* 2005;114:223-32.
25. Zhang Y¹, Birru R, Di YP: **Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system.** *Methods Mol Biol.* 2014;1105:43-57. doi: 10.1007/978-1-62703-739-6_4.