

Lymfocyty jako základní operační jednotky adaptivní imunity.
Diferenciální krevní obraz.
Subpopulace T a B lymfocytů.
Imunofenotypizace buněk imunitního systému na průtokovém
cytometru.
Funkční vyšetření vyšetření lymfocytů (proliferace, tvorba
cytokinů, ELISPOT).

Praktikum č. 4

MUDr. Zita Chovancová, Ph.D.

ZÁKLADNÍ SLOŽKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Imunitní reakce je zajišťována různými druhy buněk a molekul a jejich vzájemnými interakcemi.

Buňky imunitního systému spolu s buňkami pojivovými a dalšími strukturami tvoří funkční a anatomické celky ...

- ***lymfatické tkáně a orgány***
- ***buňky imunitního systému***
- ***molekuly imunitního systému***

LYMFATICKÉ TKÁNĚ A ORGÁNY

- *primární lymfatické orgány*
 - THYMUS
 - KOSTNÍ DŘEŇ
- *sekundární lymfatické orgány*
 - SLEZINA
 - LYMFATICKÉ UZLINY
 - ORGANIZOVANÉ SHLUKY LYMFATICKÉ TKÁNĚ
 - tonsily krční, nosní, jazyková, MALT, BALT, GALT

s l e z i n a

vyšetření sleziny

U zdravých osob je slezina nehmatná.

Hyposplenismus

- *vrozená asplenie*
- *stavy po splenektomii*
 - **(význam vakcinace proti polysacharidovým antigenům – *Str. pneumoniae*, *N. meningitidis*)**

Splenomegalie:

- *hyperplasie buněk imunitního systému (infekce)*
- *porušení průtoku krve (cirhóza jater, trombózy)*
- *maligní procesy (primární i sekundární)*
- *autoimunitní procesy (RA - Feltyho syndrom, SLE, hematologická onemocnění)*
- *extramedulární hematopoéza*

L y m f a t i c k é u z l i n y

vyšetření lymfatických uzlin

Lymfadenopatie

- *blíže neurčené zvětšení lymfatických uzlin*
- ***Nejčastější příčiny zvětšení lymfatických uzlin:***
 - *imunitní reakce na antigen*
 - *infiltrace zánětlivými buňkami (lymfadenitida)*
 - *infiltrace a proliferace maligních buněk při imunologických (SLE, RA) a metabolických chorobách*
- *U zdravých dospělých osob bývají axilární a inguinální uzliny hmatné (v průměru 1 cm).*
- *V dětství je reakce lymfatických uzlin běžná.*
- *U dospělých do 30 let je asi 80% lymfadenopatií benigních, u osob nad 50 let jen asi 40%.*
- *Zvětšené uzliny mají diagnostický význam při infekci virem HIV.*

DIFERENCIÁLNÍ KREVNÍ OBRAZ

odběr nesrážlivé krve do EDTA

	<i>kojenci</i>	<i>děti</i>	<i>dospělí</i>
LEUKOCYTY	9 – 15 x 10⁹/l	8 – 12 x 10⁹/l	4 – 9 x 10⁹/l
GRANULOCYTY/POLYMORFONUKLEÁRY	%	%	%
<i>neutrofilní granulocyty</i>	25 - 65	35 - 70	55 - 70
• segmenty	22 - 65	25 - 65	50 - 70
• tyče	0 - 10	0 - 10	3 - 5
<i>eozinofilní granulocyty</i>	1 - 7	1 - 5	2 - 4
<i>basofilní granulocyty</i>	0 - 2	0 - 1	0 - 1
MONONUKLEÁRNÍ LEUKOCYTY	%	%	%
<i>lymfocyty</i>	20 - 70	25 - 50	25 – 40
<i>monocyty</i>	7 - 20	1 - 6	2 - 6

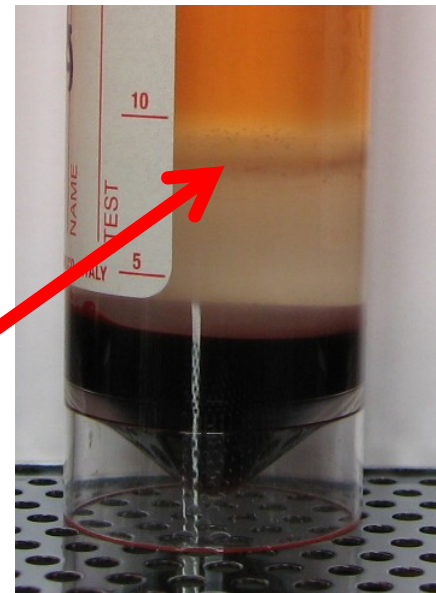
IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK z periferní krve

Mononukleární buňky (PBMC)

- leukocyty bez granulocytů
(monocyty 20 %, lymfocyty 70 %)

Postup izolace mononukleárních buněk:

1. plná krev se naředí v buněčném kultivačním médiu
2. naředěná krev se opatrně vrství na denzní médium (Ficol)
3. CENTRIFUGACE
4. na původním rozhraní mezi naředěnou krví a denzním médiem se vytvoří **tzv. lymfocytární prstenec** (lymfocyty a monocyty)



CD klasifikační systém (Paříž 1982)

CD znaky (CD = cluster of differentiation)

- *molekuly buněčných membrán prokazované monoklonálními protilátkami (metodikou průtokové cytometrie)*
- **dnes známých více než 350 CD znaků**
*(9th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA9),
březen 2010)*
- **Využití v klinické praxi:** vyšetření absolutního a relativního zastoupení buněčných subpopulací pomocí průtokové cytometrie (v imunologii rutinně vyšetření T-lymfocytárních, B-lymfocytárních subpopulací a NK buněk)
- **Odběr:** nesrážlivá krev (EDTA)

LYMFOCYTÁRNÍ SUBPOPULACE	CD ZNAKY	PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ Z LYMFOCYTŮ
T lymfocyty	CD3⁺	58 – 85 %
Th lymfocyty	CD3 ⁺ CD4 ⁺	30 – 60 % z CD3⁺
Tc lymfocyty	CD3 ⁺ CD8 ⁺	15 – 35 % z CD3⁺
B lymfocyty	CD19⁺	7 – 23 %
NK buňky	CD16⁺/56⁺	6 – 20 %

ZÁKLADNÍ SUBPOPULACE B-LYMFOCYTŮ

BCR receptor: $IgM - Ig\alpha, Ig\beta - CD19, CD21, CD81$

B1 B lymfocyty

- *minoritní subpopulace B lymfocytů*
- *nachází se v pleurální a peritoneální dutině, částečně ve střevě*
- *tvoří tzv. „přirozené protilátky“*

B2 B lymfocyty

- *predominantní populace B lymfocytů*
- *nachází se ve slezině a v lymfatických uzlinách tvořená v kostní dřeni v průběhu života*
- *tvoří protilátky proti ostatním běžným antigenům*

ZÁKLADNÍ SUBPOPULACE *T-LYMFOCYTŮ*

TCR receptor: *CD3 komplex – $\alpha\beta$ ($\gamma\delta$) – CD4/CD8*

Th lymfocyty (CD3⁺CD4⁺)

Th1 (*IL-2, IFN- γ*)

Th2 (*IL-4, IL-5, IL-13*)

Th17 (*IL-17, IL-22*)

Treg (*IL-10, TGF- β , IL-35*)

Tc lymfocyty (CD3⁺CD8⁺)

NKT lymfocyty

- *po aktivaci tyto buňky produkují řadu cytokinů (vč. IFN- γ a IL-4)*

Regulační T lymfocyty

- *regulační T lymfocyty mají regulační a imunosupresivní funkci*
- *tyto „na vlastní antigeny reagující“ T-lymfocyty se vytváří v thymu*
- *jsou schopné aktivně suprimovat aktivaci další autoreaktivních T lymfocytů, které unikly negativní selekci v thymu*
- *představují 5 – 10 % CD4⁺ T lymfocytů*

Regulační T lymfocyty

konstituční (přirozené) Treg (Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺)

- *neproliferují při polyklonální stimulaci*
- *tlumí reakce T lymfocytů přímým kontaktem*

indukované Treg

- *tlumí buňky Th1, Th2, ale i jiné buňky prostřednictvím cytokinů*

Tr1 (TGF- β)

jejich tvorba může být navozena nevyzrálými dendritickými buňkami prezentujícími antigen v nepřítomnosti vhodných kostimulačních ligandů

Th3 (IL-4, IL-10 a TGF- β)

navození orální tolerance na potravinové antigeny

navození tolerance potřebných komenzálních patogenů GIT

PŘEHLED BUNĚČNÝCH IMUNOLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ

V rámci imunologického vyšetření buněčných subpopulací stanovujeme:

- **absolutní a relativní počty buněk imunitního systému**
 - *Vycházíme ze stanovení celkového počtu leukocytů a diferenciálního krevního obrazu (absolutní a relativní počet lymfocytů, monocytů, granulocytů)*
- **funkci buněk imunitního systému**

Vyšetření relativního a absolutního zastoupení lymfocytárních subpopulací

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- využívá principu ***přímé imunofluorescence***
- buňky jsou inkubovány s protilátkou proti konkrétním CD znakům na povrchu buněk imunitního systému, která je označena fluorescenčním barvivem
- buňky laminárně proudí tryskou přístroje vystaveny laserovému paprsku světla

Vyšetření relativního a absolutního zastoupení lymfocytárních subpopulací

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- na základě velikosti a granularity se buňky rozdělí na:
 - **LYMFOCYTY, MONOCYTY a GRANULOCYTY**
- na základě navázání monoklonálních protilátek proti CD znakům na povrchu buněk se rozdělí na:
 - subpopulace **T LYMFOCYTŮ, B LYMFOCYTŮ a NK BUŇKY**

Význam vyšetření pomocí průtokové cytometrie:

- diagnostika primárních a sekundárních imunodeficiencí
- diagnostika hematologických malignit

Funkční vyšetření lymfocytárních subpopulací in vitro

PROLIFERAČNÍ SCHOPNOST LYMFOCYTŮ

jeden z fyziologických jevů buněčné aktivace

- Lymfocyty aktivovány
 - **Polyklonálními mitogeny**
 - pro B lymfocyty
 - pokeweed mitogen (PWM)
 - pro T lymfocyty
 - phytohemagglutinin (PHA)
 - konkanavalin A (ConA)
 - **Specifickými antigeny**
 - tuberkulin
 - tetanický toxoid

Funkční vyšetření lymfocytárních subpopulací in vitro

PROLIFERAČNÍ SCHOPNOST LYMFOCYTŮ

jeden z fyziologických jevů buněčné aktivace

- lymfocyty stimulovány k aktivaci specifickými nebo nespecifickými stimuly
- po aktivaci se v kultuře dělí a proliferují
- před koncem inkubace se do kultury přidá ^3H thymidin, který se inkorporuje do nově syntetizované DNA
- úroveň měřené radioaktivity, převedené scintilačním počítačem na světelný signál, odpovídá proliferační aktivitě lymfocytů (počet světelných impulzů/minutu)

Význam vyšetření proliferace lymfocytů:

- diagnostika závažných imunodeficientních stavů

Funkční vyšetření lymfocytárních subpopulací in vitro

další specializovaná funkční vyšetření

- Produkce a uvolňování důležitých cytokinů a tím i funkční vyšetření subpopulací T lymfocytů (Th1 a Th2)
 - ***ELISA, ELISPOT, PCR***
- Vyšetření exprese molekul významných pro buněčné synapse nebo aktivačních znaků na povrchu buněk
 - ***průtoková cytometrie***
- Schopnost tvorby imunoglobulinů B lymfocyty
 - ***ELISA, ELISPOT***

Funkční vyšetření T lymfocytů in vivo

TUBERKULINOVÝ TEST

test pozdního typu přecitlivělosti (IV. typ imunopatologické reakce)

- aplikace antigenu intradermálně (tuberkulin) na dorzální stranu levého předloktí
- časový odstup odečtu reakce 24 – 48 hodin
- vznik indurace a erytému v místě aplikace antigenu (hodnotí se pouze indurace)

Funkční vyšetření T lymfocytů in vivo

TUBERKULINOVÝ TEST

test pozdního typu přecitlivělosti (IV. typ imunopatologické reakce)

Pozitivní reakce

indurace od 6 do 15 mm

- *normální odpověď u senzibilizovaného jedince*

indurace nad 15 mm (u dětí do 5 let nad 10 mm)

- *indikace k RTG vyšetření*

Negativní reakce

indurace do 6 mm

- *pacient nebyl dříve senzibilizován*
- *porucha odpovědivosti T lymfocytů*

Funkční vyšetření T lymfocytů in vivo

TEST BUNĚČNĚ MEDIOVANÉ IMUNITY

(CMI TEST, cell mediated immunity test)

- intradermální aplikace ***tzv. anamnestických antigenů*** (tuberkulin, kandidin, toxoplasmin, tetanický toxoid, antigeny stafylokoků, streptokoků a další)
 - pokud pacient neodpoví tvorbou indurace v místě aplikace antigenu do 48 hodin, je porušena pravděpodobně jeho T-lymfocytární odpověď (anergní pacient)