

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

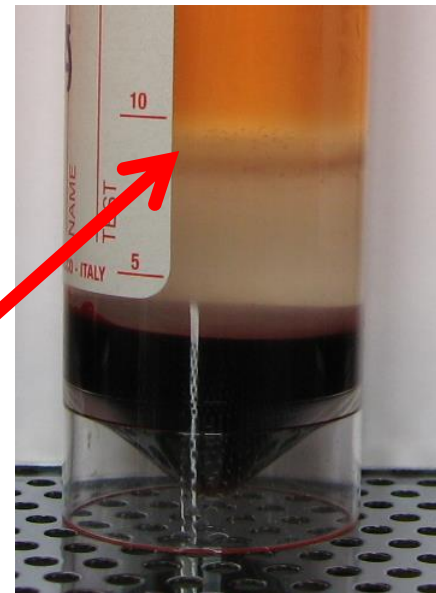
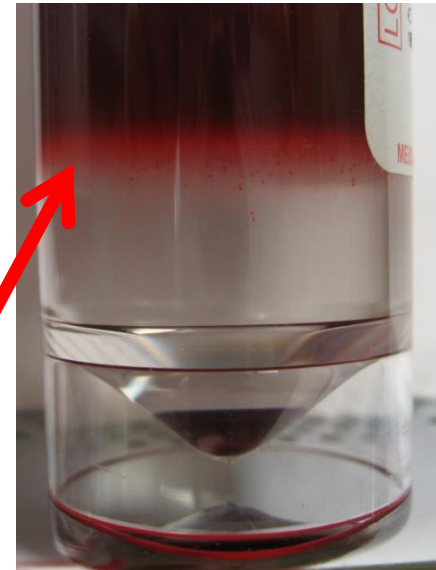
IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK z periferní krve

Mononukleární buňky (PBMC)

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

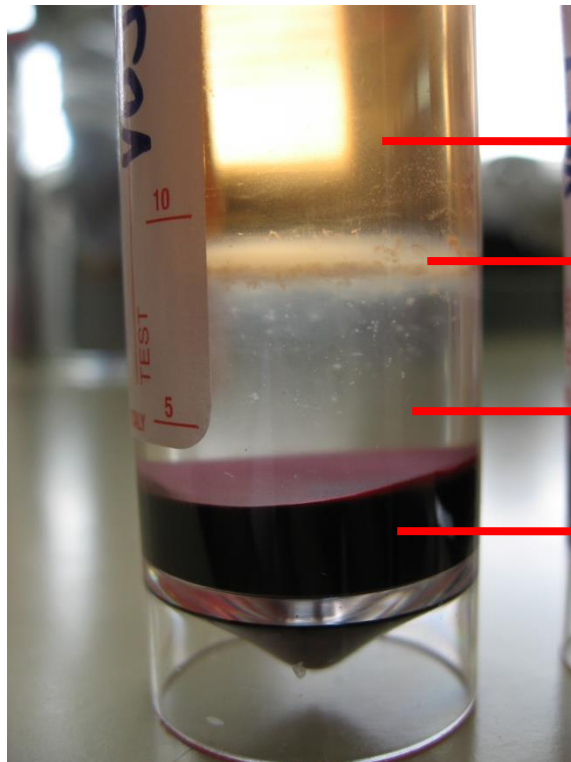
Postup izolace mononukleárních buněk:

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)



IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK z periferní krve

- Gradientová centrifugace
 - Rozdělení buněk podle rozdílů v jejich hustotě



→ RPMI + plasma + TROMBOCYTY

→ **Lymfocytární prstenec**
MONOCYTY A LYMFOCYTY

→ separační médium (hustota 1,078g/ml)

→ ERYTROCYTY A
GRANULOCYTY

IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK z periferní krve

- **ERYTROCYTY a GRANULOCYTY**

- na dně zkumavky

- **TROMBOCYTY**

- Zůstávají v séru a kontaminují mononukleární buňky

- Jsou od nich odmyty v promývacích krocích

- **MNC** – lymfocyty, monocyty (makrofágy)

- 30% je tvořeno monocyty a makrofágy

- Pokud je chceme oddělit, vložíme krok adherence na plastový povrch – monocyty a makrofágy adherují, zatímco lymfocyty zůstávají volně v supernatantu

Využití separovaných MNC buněk

proliferace buněk

testy cytotoxicity

průtoková cytometrie

ELISPOT

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

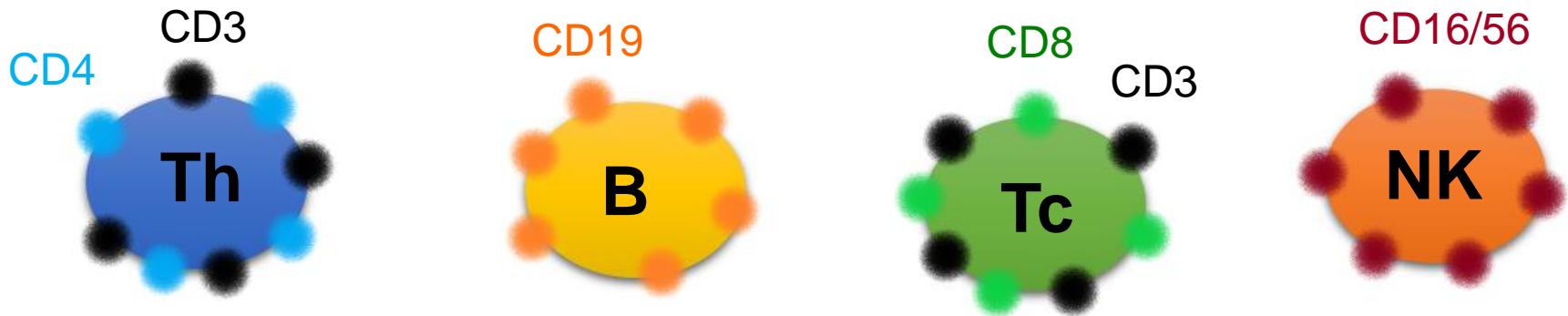
PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- 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

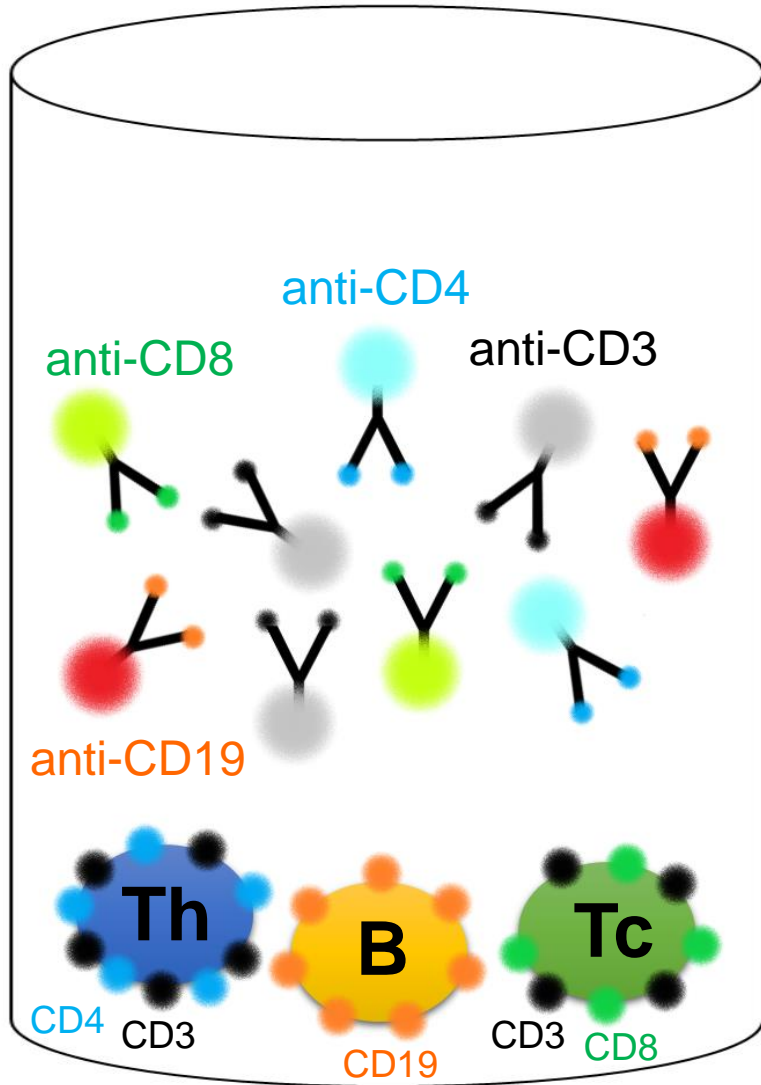
PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- každá buňka má na svém povrchu znaky, které tyto buňky charakterizují

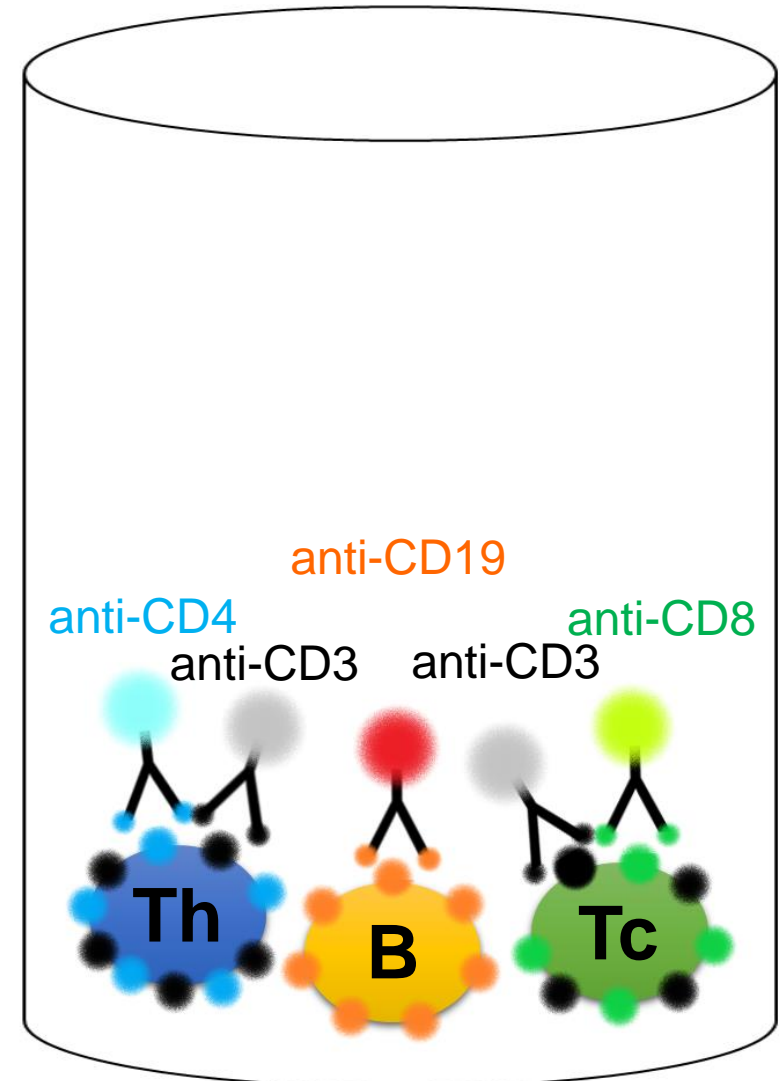


- toho se využívá při jejich detekci pomocí průtokové cytometrie

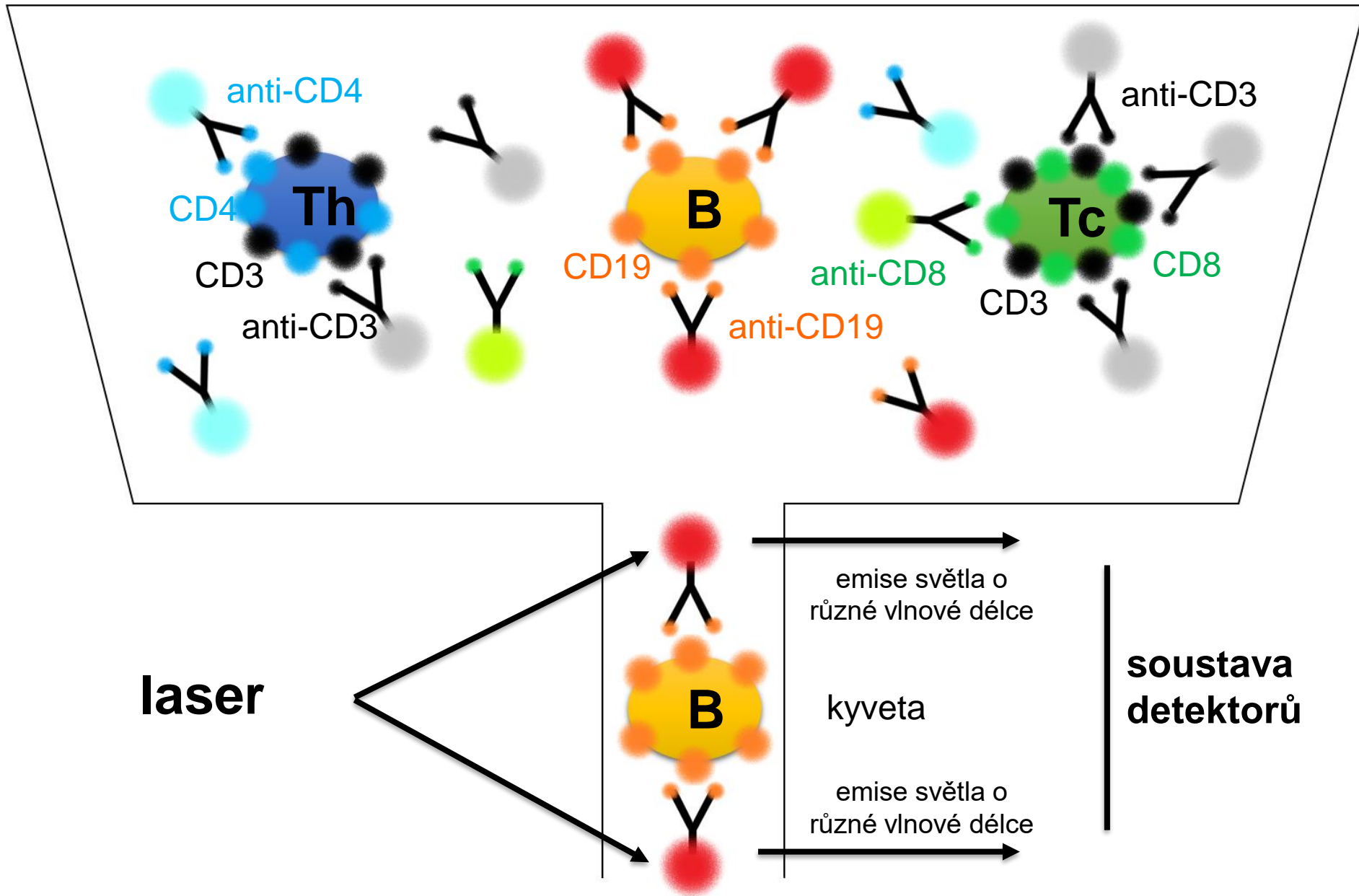
k plné periferní krvi se přidají
monoklonální protilátky namířené proti
buněčným povrchovým strukturám
konjugované s fluorochromy



dojde k vazbě příslušných
monoklonálních protilátek se svými
antigeny (povrchovými buněčnými
strukturami)



buňky po jedné procházejí kyvetou, kde jsou ozářeny laserem a emitují světlo různé vlnové délky (dle použitého fluorescenčního barviva), které je zachyceno v soustavě detektorů



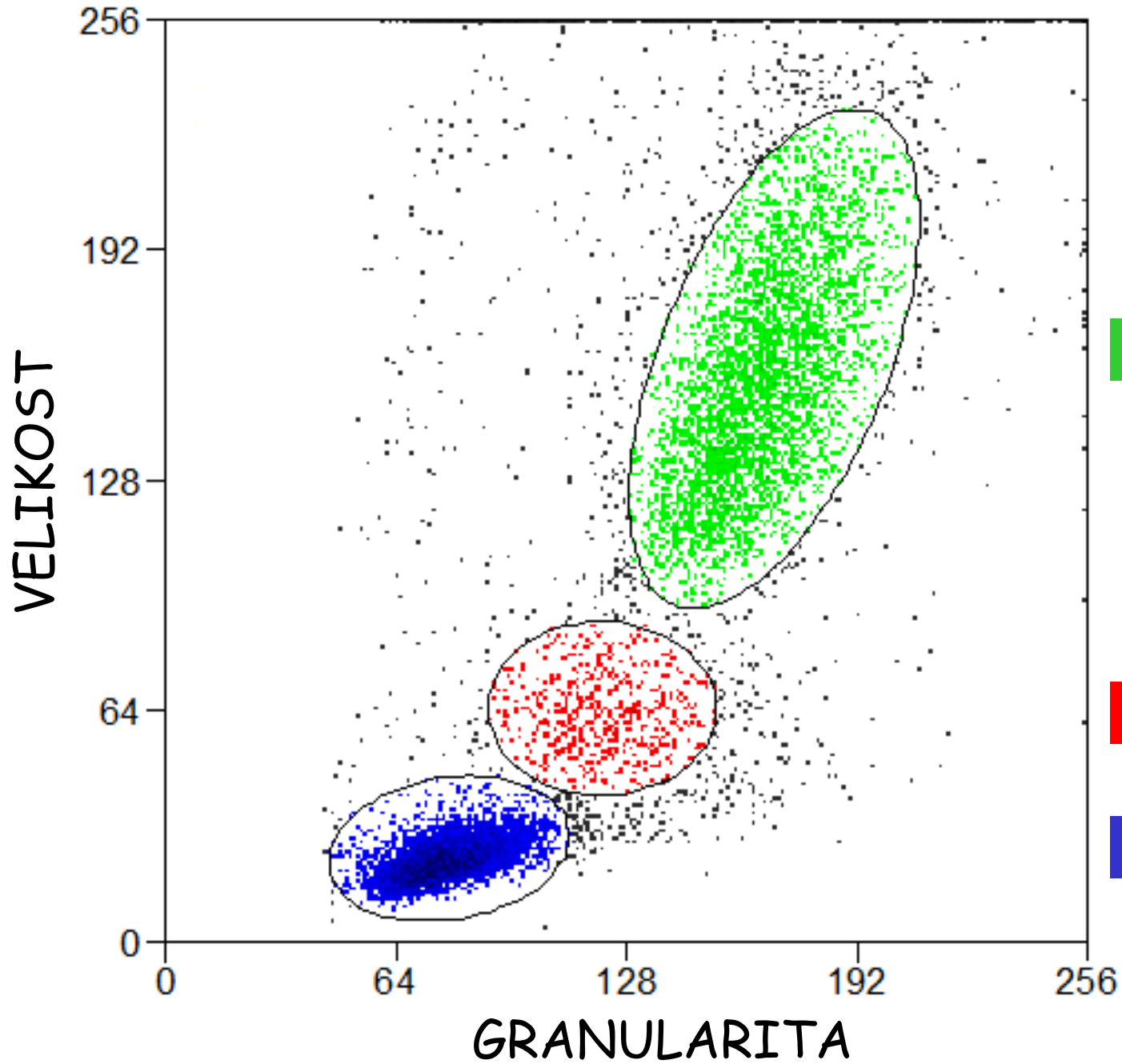
Vyšetření relativního a absolutního zastoupení lymfocytárních subpopulací

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



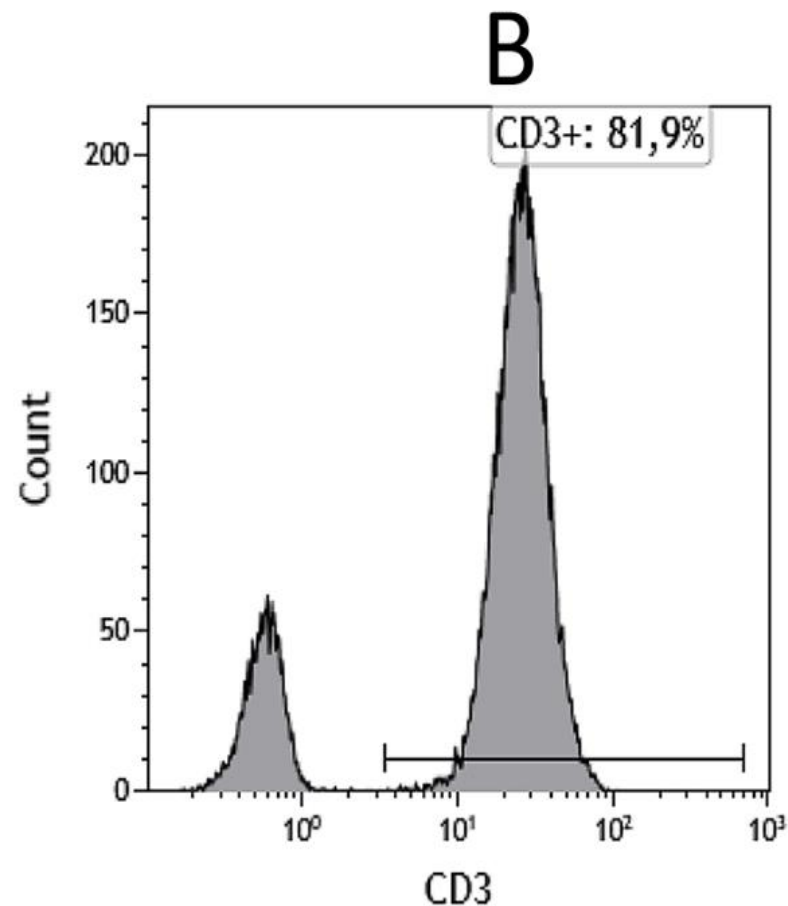
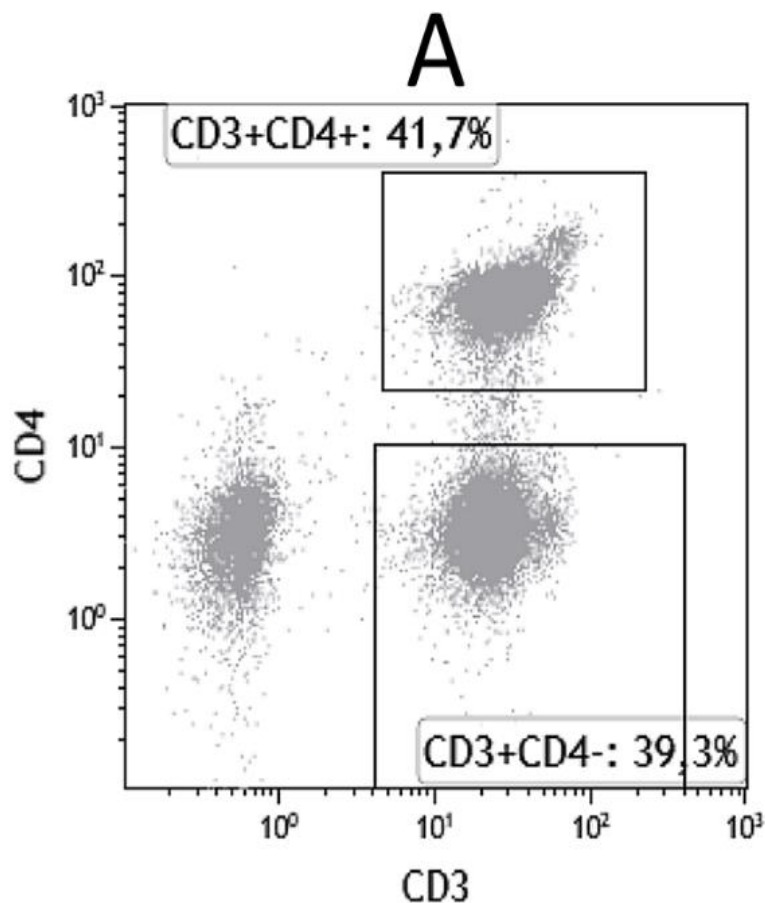
GRANULOCYTY

MONOCYTY

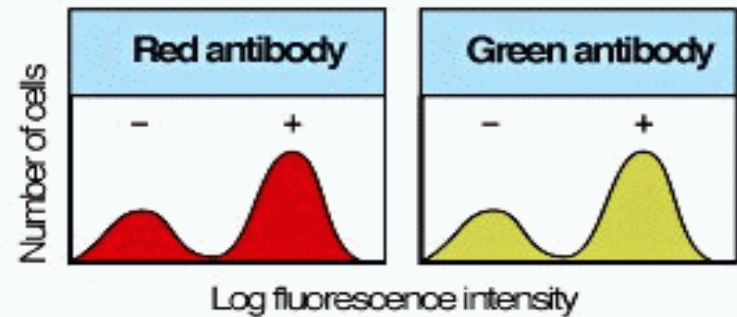
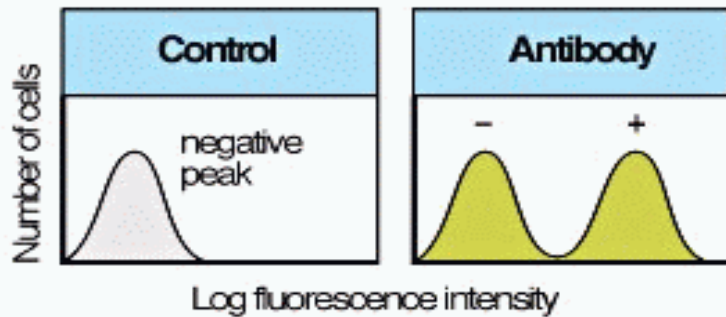
LYMFOCYTY

A) Dot plot - stanovení procentuálního zastoupení pomocných **CD3+CD4+** T-lymfocytů a **CD3+4-** T-lymfocytů.

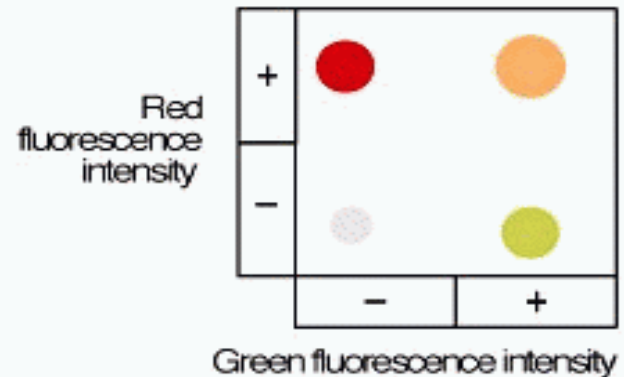
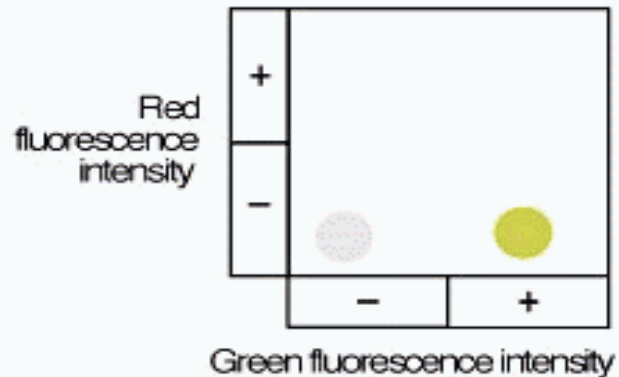
B) Histogram procentuálního zastoupení T-lymfocytů CD3+.



One-color histogram displays the amount of fluorescent antibody binding to each cell



Two-color contour diagrams allow multiple populations of cells to be discriminated



Podmínky kultivace lymfocytů in vitro

- primární buněčné linie lymfocytů jsou odvozené z periferní krve nebo z lymfoidních orgánů
- pouze model chování imunitního systému, protože ten je jinak velice komplexní!!
- pěstování probíhá v definovaném bazálním médiu – obsahuje cukry, AMK, vitamíny, stopové prvky atd. (+ATB-*penicilin, streptomycin...*) při 37°C, 5%CO₂, 95%vlhkost
- podle typu pěstovaných buněk další přídavné látky (některé připraveny pomocí GI)
- cesta, kterou objeveny mnohé funkce cytokinů a růstových faktorů

Podmínky kultivace lymfocytů in vitro

- normální buňky mají omezenou délku života – omezený počet dělení
- pro srovnání experimentálních dat problém → pomocí karcinogenních látek či virů (SV40, EBV) lze dosáhnout transformace buněk na nesmrtelné a vytvořit tzv. buněčné linie

Jurkat – lidské leukemické buňky produkující IL-2

HL-60 – lidské buňky odvozené od myeloidních leukemických buněk

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

- **izolace lymfocytů z periferní heparinizované krve**
- **kultivace lymfocytů s mitogeny**
 - Tetanický toxoid – 7 dní
 - PHA, PWM – 3 dny
 - **přidání 3H-tymidinu den před koncem proliferace**
(2. den nebo 6. den) – inkorporace tymidinu do DNA dělících se buněk
- **stop proliferace zmražením**
- **detekce radioaktivity beta-counterem**
- **výsledek – stimulační index (SI)**
 - Poměr cmp (counts per minute) stimulované populace vůči aktivitě nestimulovaných buněk
 - Pozitivní (SI \geq 5 pro jednotlivé antigeny a SI \geq 100 pro mitogeny a polyklonální aktivátory)

Funkční vyšetření lymfocytárních subpopulací in vitro

PROLIFERAČNÍ SCHOPNOST LYMFOCYTŮ

jeden z fyziologických jevů buněčné aktivace

další možnosti stanovení proliferace buněk

- **stanovení exprese jaderného proteinu Ki-67**
 - tento protein je exprimován během všech aktivních fází buněčného dělení mimo klidovou G0 fázi → výsledkem je procento Ki-67 pozitivních lymfocytů
 - *nevýhoda metody* → protein Ki-67 se exprimuje už v G1 fázi buněčného cyklu, kdy se buňka k proliferaci teprve chystá, ale nemusí ji dokončit (například při selektivním působení cytostatik)
- **další metody stanovení proliferace** → měření celkové DNA pomocí interkalačních sond, metoda inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU), metoda Click-iT® Plus EdU, měření proliferace metodou DELFIA

Funkční vyšetření lymfocytárních subpopulací in vitro

PROLIFERAČNÍ SCHOPNOST LYMFOCYTŮ

jeden z fyziologických jevů buněčné aktivace

Význam vyšetření proliferace lymfocytů:

diagnostika závažných imunodeficientních stavů
(podezření na SCID, deficit CD4⁺ T-lymfocytů)

monitorování účinku onkologické léčby

výzkumné účely

SCID

severe combined immunodeficiency

- velmi časný nástup obtíží - první měsíce života
- závažné a obtížně léčitelné infekce zejména bronchopulmonální, pokašlávání neodpovídající na běžnou antibiotickou léčbu
- chronické průjmy, kdy ne vždy lze prokázat etiologické agens
- kožní infekce a exantémy
- neprospívání i při nepřítomnosti průjmů
- komplikace po vakcinaci BCG

SCID

severe combined immunodeficiency

- opakovaně nalezená lymfopenie
- velmi nízké počty T-lymfocytů
- počty B-lymfocytů a NK buněk jsou variabilní
- obvykle nízké hladiny IgM a IgA, hladiny IgG nestoupají
- ***porušená proliferativní odpověď po stimulaci mitogeny***

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)