

**LYMFOCYTY A JEJICH SUBPOPULACE  
IMUNOFENOTYPIZACE BUNĚK  
IMUNITNÍHO SYSTÉMU  
FUNKČNÍ VYŠETŘENÍ VYŠETŘENÍ  
LYMFOCYTŮ**

praktikum č. 4

# 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:**

- *hyperplasia 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*

# ***Lymfatické uzliny***

## ***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

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

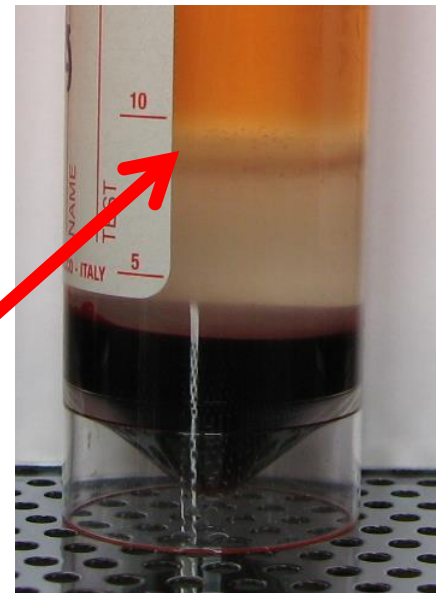
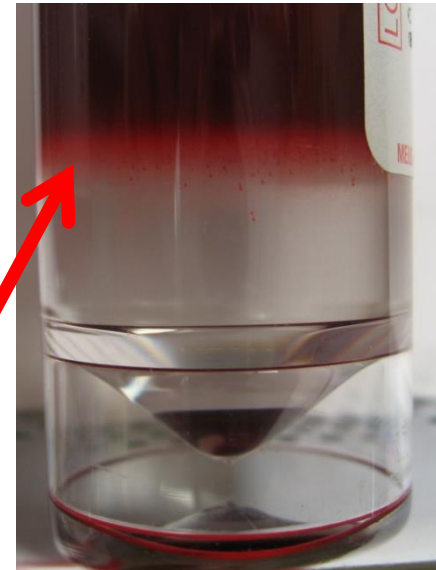
# IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK z periferní krve

## **Mononukleární buňky (PBMC)**

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

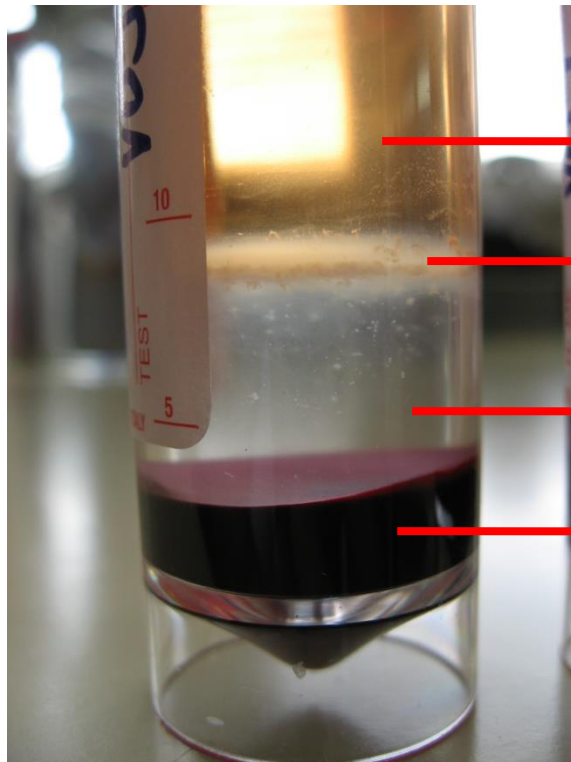
### **Postup izolace mononukleárních buněk:**

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

- **ERYTROCITY a GRANULOCITY**
  - 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 <sup>+</sup>	58 – 85 %
Th lymfocyty	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	30 – 60 % z CD3 <sup>+</sup>
Tc lymfocyty	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	15 – 35 % z CD3 <sup>+</sup>
B lymfocyty	CD19 <sup>+</sup>	7 – 23 %
NK buňky	CD16 <sup>+</sup> /56 <sup>+</sup>	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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)***

***Th1*** (IL-2, IFN- $\gamma$ )

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

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

***Treg*** (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35)

## ***Tc lymfocyty (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)***

### ***NKT lymfocyty***

- *po aktivaci tyto buňky produkují řadu cytokinů (vč. IFN- $\gamma$  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<sup>+</sup> T lymfocytů*

# Regulační T lymfocyty

## **konstituční (přirozené) Treg** (Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)

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

## **indukované Treg**

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

### **Tr1** (TGF- $\beta$ )

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

### **Th3** (IL-4, IL-10 a TGF- $\beta$ )

*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***

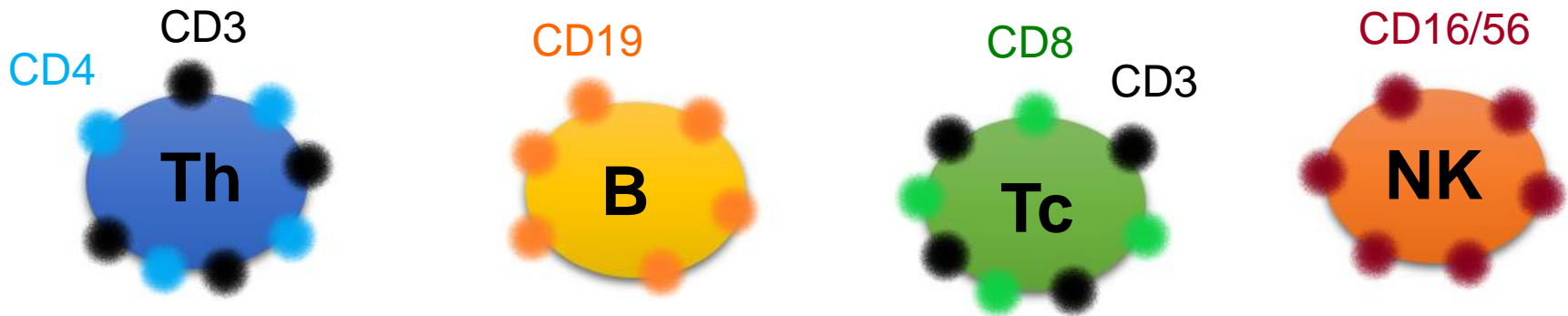
## ***PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE***

- 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***

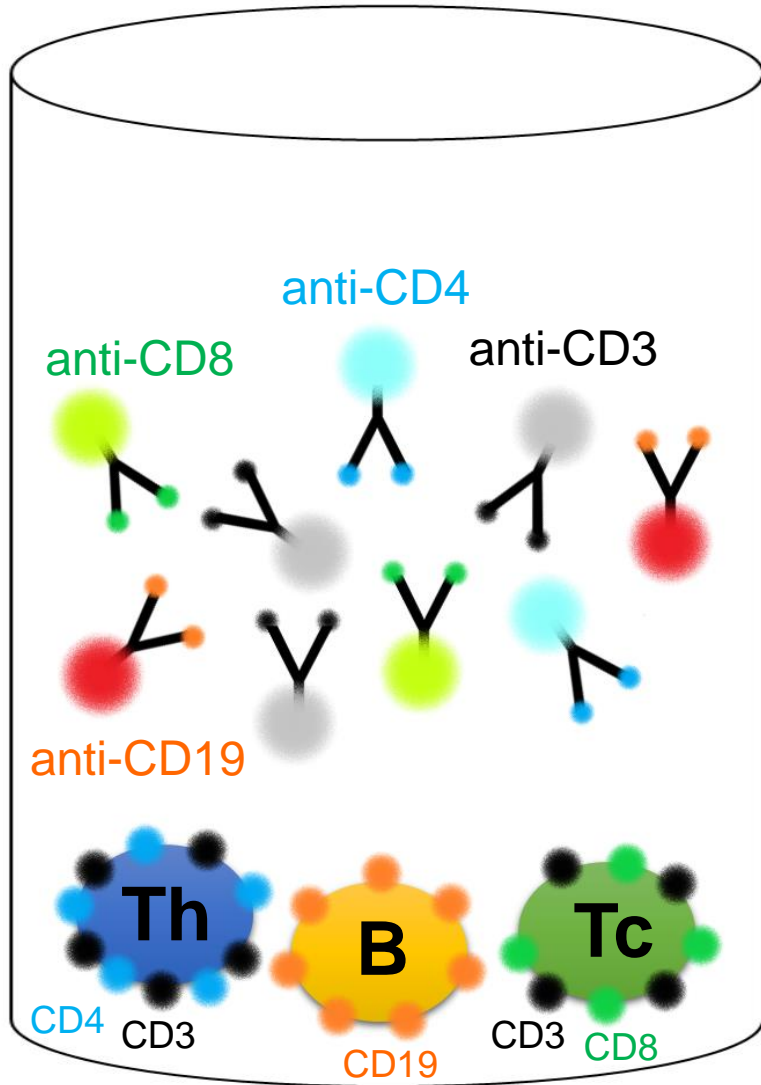
## ***PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE***

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

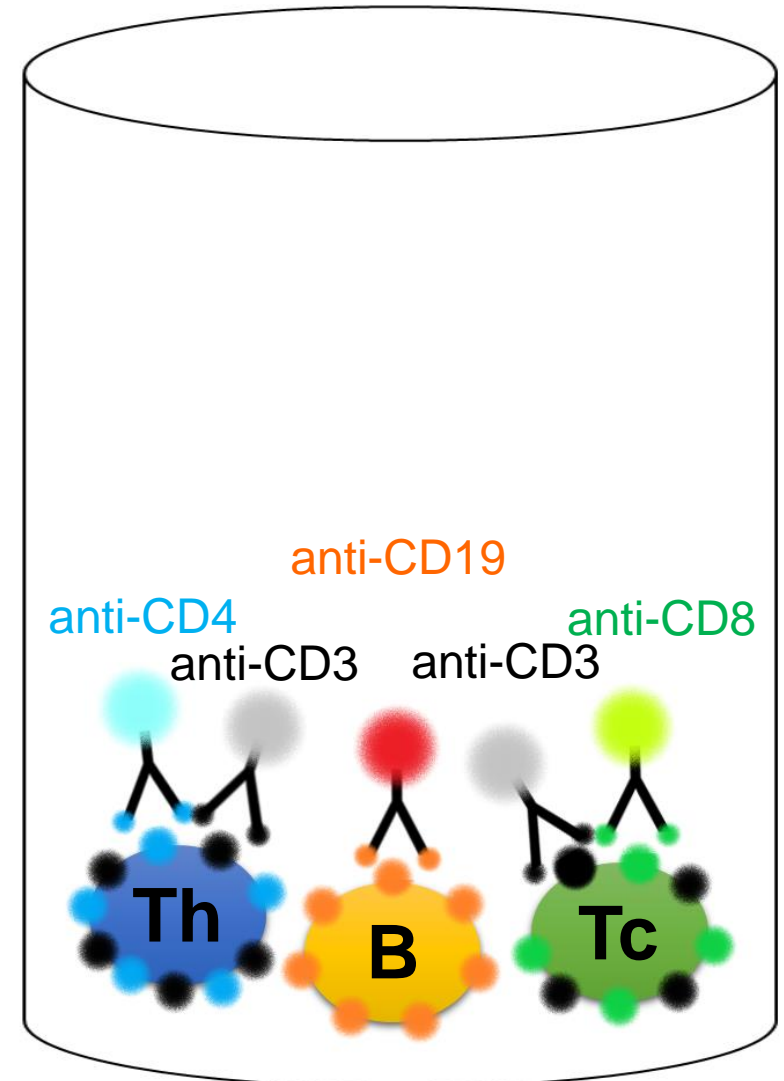


- toho se využívá při jejich detekci pomocí průtokové cytometrie

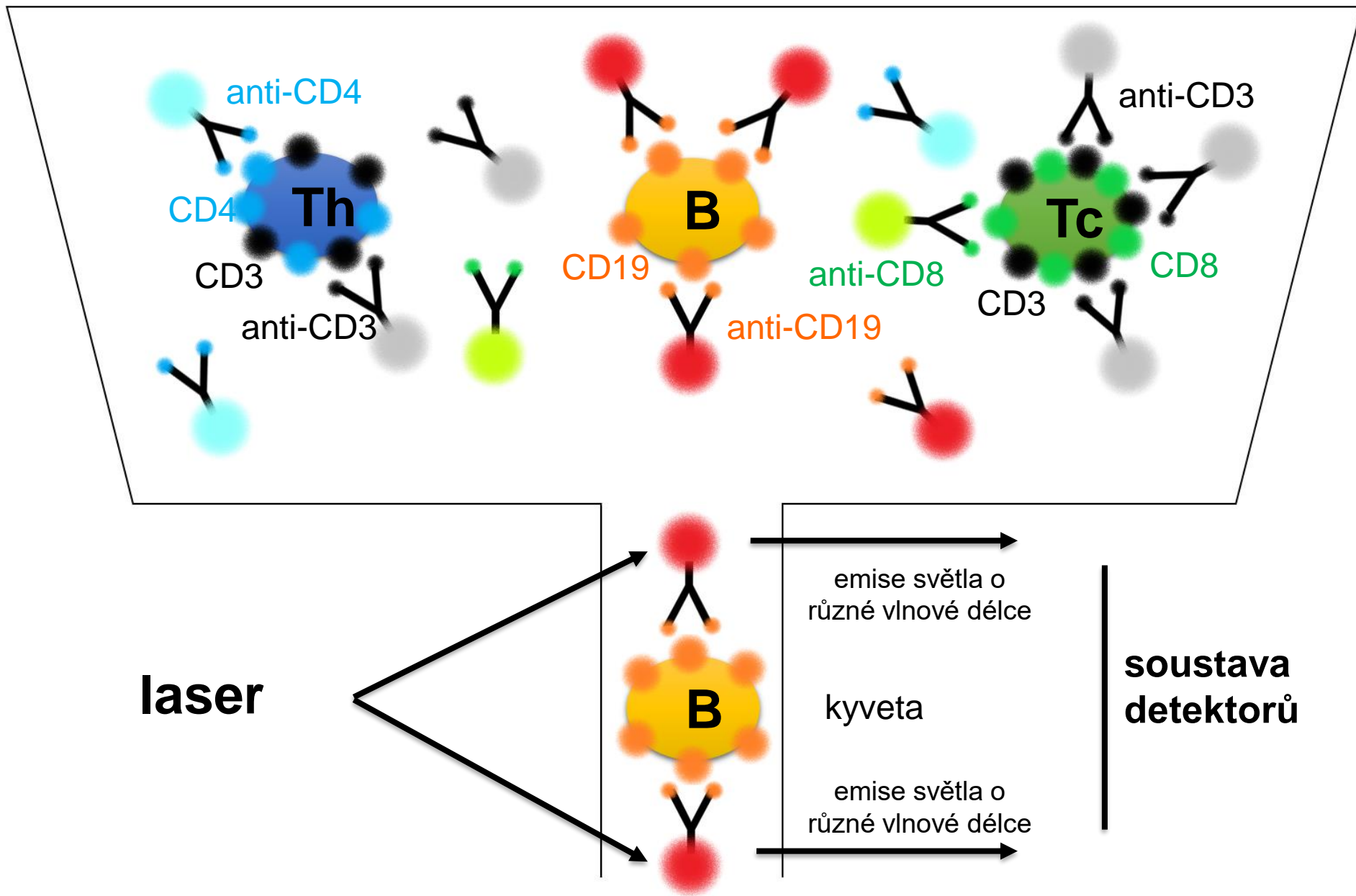
k plné periferní krvi se přidají monoklonální protilátky namířené proti buněčným povrchovým strukturám konjugované s fluorochromy



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



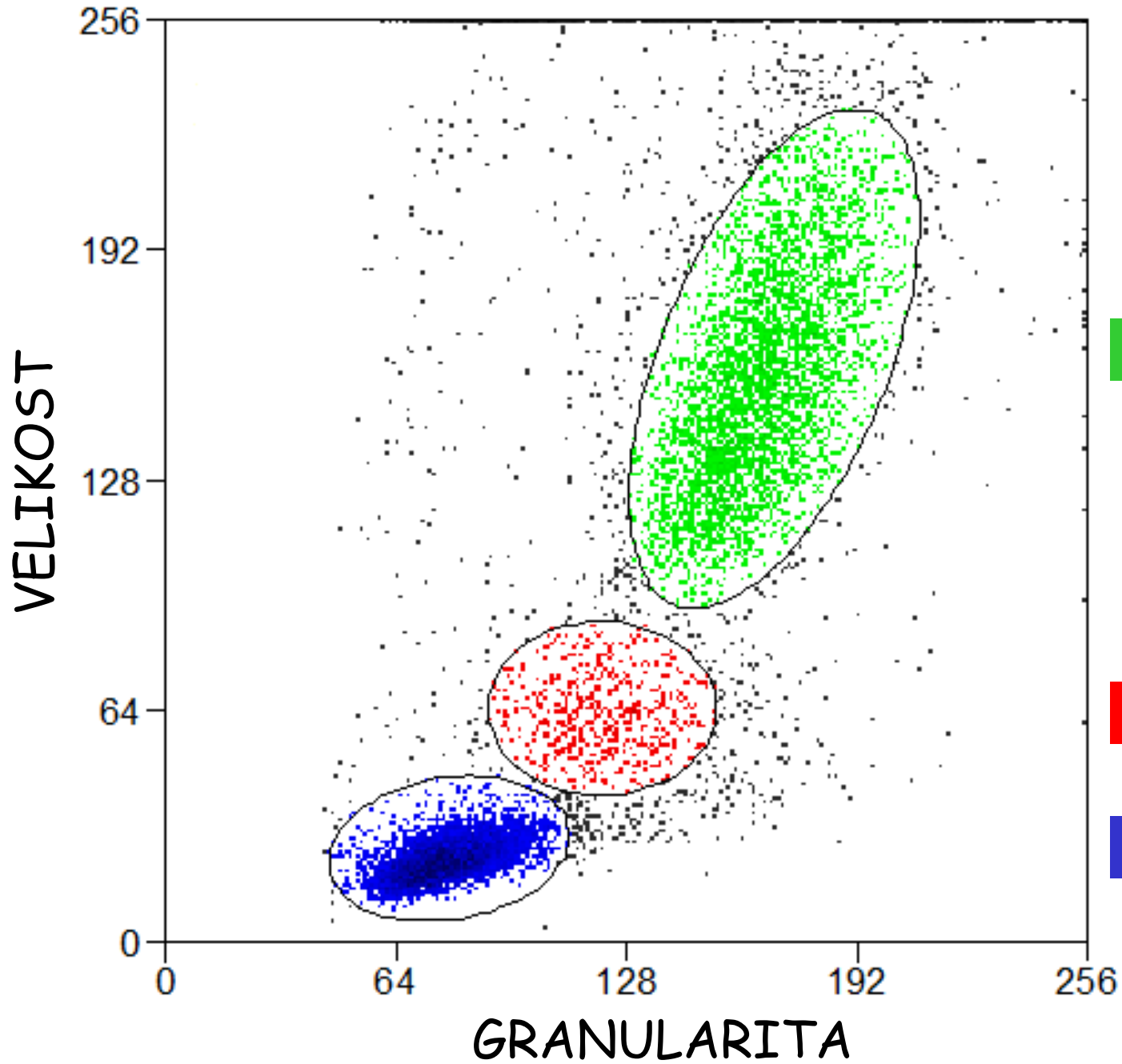
# ***Vyšetření relativního a absolutního zastoupení lymfocytárních subpopulací***

## ***PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE***

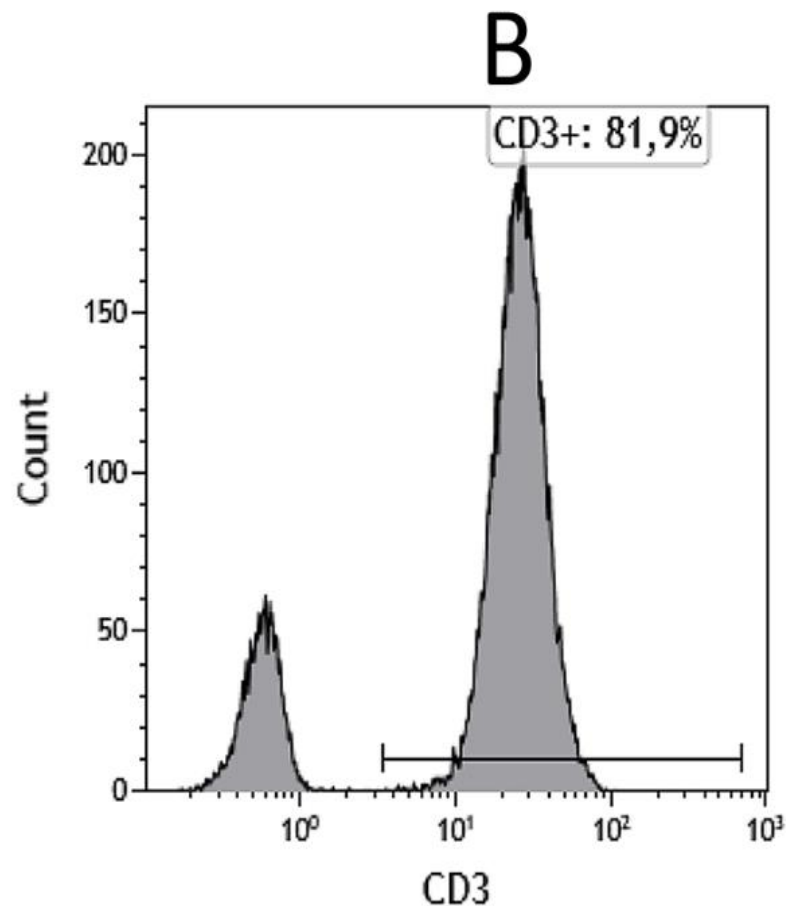
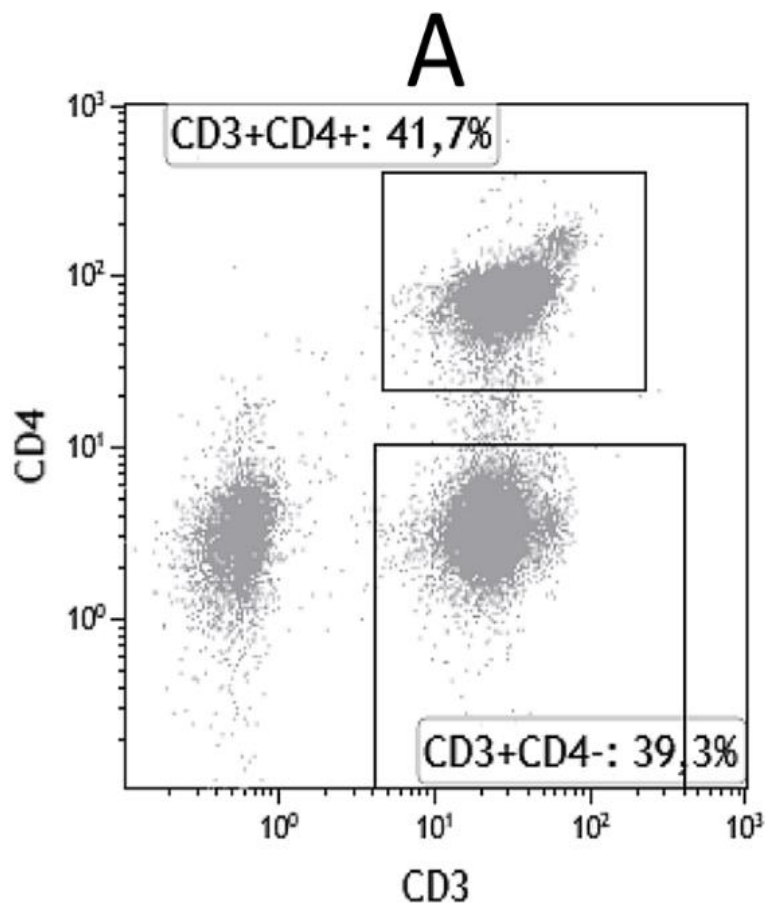
- na základě velikosti a granularity se buňky rozdělí na:
  - **LYMFOCYTY, MONOCYTY a GRANULOCYTY**
- na základě navázání monoklonálních protilátek proti CD znakům na povrchu buněk se rozdělí na:
  - subpopulace **T LYMFOCYTŮ, B LYMFOCYTŮ a NK BUŇKY**

### **Význam vyšetření pomocí průtokové cytometrie:**

- diagnostika primárních a sekundárních imunodeficiencí
- diagnostika hematologických malignit



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





# ***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%CO<sub>2</sub>, 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<sup>+</sup> T-lymfocytů)

monitorování účinku onkologické léčby

výzkumné účely

# ***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)