

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

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*

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 ⁹ /l	8 – 12 x 10 ⁹ /l	4 – 9 x 10 ⁹ /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

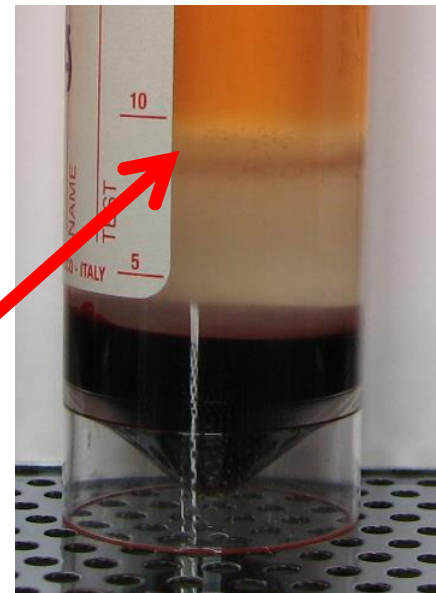
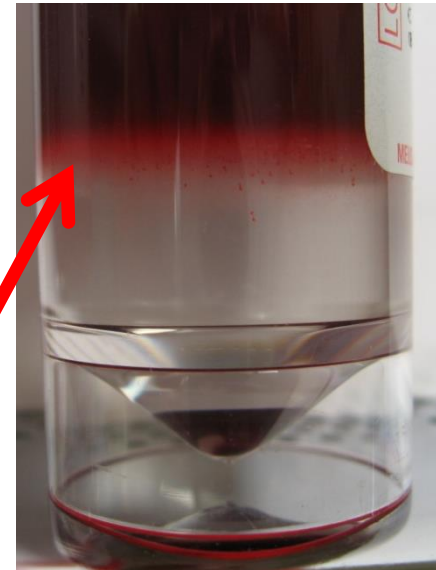
IZOLACE MONONUKLEÁRNÍCH BUNĚK z periferní krve

Mononukleární buňky (PBMC)

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

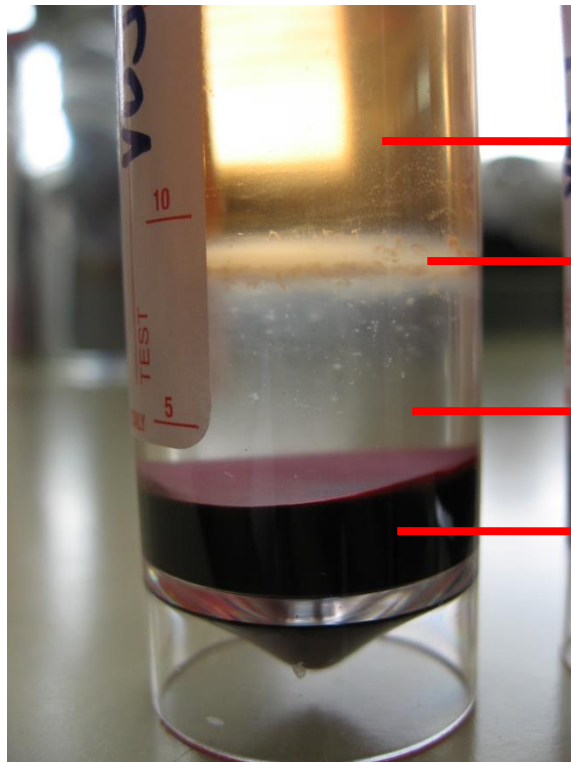
Postup izolace mononukleárních buněk:

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

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 400 CD znaků

Engel et al: CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. J Immunol 15 November 2015; 195 (10): 4555–4563

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 α , Ig β – 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

T-lymfocyty se mohou diferencovat kromě efektorových subpopulací (Th1, Th2 a Th17), také do T-regulačních lymfocytů (Treg), které mají regulační a imunosupresivní funkci

jsou schopné aktivně suprimovat aktivaci další autoreaktivních T lymfocytů, které unikly negativní selekci v thymu

PŘIROZENÉ REGULAČNÍ T LYMFOCYTY
INDUCIBILNÍ REGULAČNÍ T LYMFOCYTY

představují 5 – 10 % CD4+ T lymfocytů

Regulační T lymfocyty

PŘIROZENÉ (konstituční) T regs

Foxp3+CD25+CD4+ T-lymfocyty pocházející z thymu, odkud jsou uvolněny jako funkční vyztřalé buňky, které mohou aktivně suprimovat aktivaci další autoreaktivních T-lymfocytů, které unikly negativní selekci v thymu

jejich tvorba je kriticky závislá na indukci Foxp3, což je transkripční faktor, který dokáže potlačit tvorbu cytokinů Th1, Th2 a Th17 lymfocytů

IL-2 je kruciální cytosin pro přežívání těchto buněk (které nejsou schopné IL-2 samy tvořit na rozdíl od aktivovaných T-lymfocytů) a jsou odkázány na parakrinní tvorbu těchto cytokinů (zdrojem IL-2 jsou pravděpodobně autoreaktivní T-lymfocyty nebo aktivované T-lymfocyty, které reagují se stejnou dendritickou buňkou jako Tregs)

Regulační T lymfocyty

INDUKOVANÉ T regs

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

na rozdíl od přirozených regulačních T-lymfocytů (které se vytváří v thymu), se inducibilní regulační T-lymfocyty tvoří z naivních T-lymfocytů v periférii po rozpoznání antigenu prezentovaného dendritickými buňkami

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*

Regulační T lymfocyty

MECHANISMUS ÚČINKU Tregs

tvorba imunosupresivních cytokinů → IL-10, TGF- β , IL-35

indukce apoptózy → disponují perforiny a granzymy
(*Treg indukují apoptózu dendritických buněk prezentujících Treg antigen nebo T-lymfocytů komunikujících s těmito buňkami*)

Treg soutěží o IL-2 → samy ho netvoří a ubírají ho aktivovaným T-lymfocytům (*jedná se o zásadní cytokin nutný k proliferaci aktivovaných T-lymfocytů*)

CTLA-4 jako alternativní receptor pro kostimulační ligand B7 (CD80) → *Treg soutěží o ligand CD80 na dendritických buňkách s T-lymfocyty; Treg přenáší negativní signál přes vazbu CTLA-4/CD80 a tím dojde k downregulaci (CD80 a CD86), což znemožní aktivaci naivního T-lymfocytu; Treg tvoří agregáty kolem dendritických buněk a snižují expresi CD80 a CD86 na povrchu dendritické buňky*

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

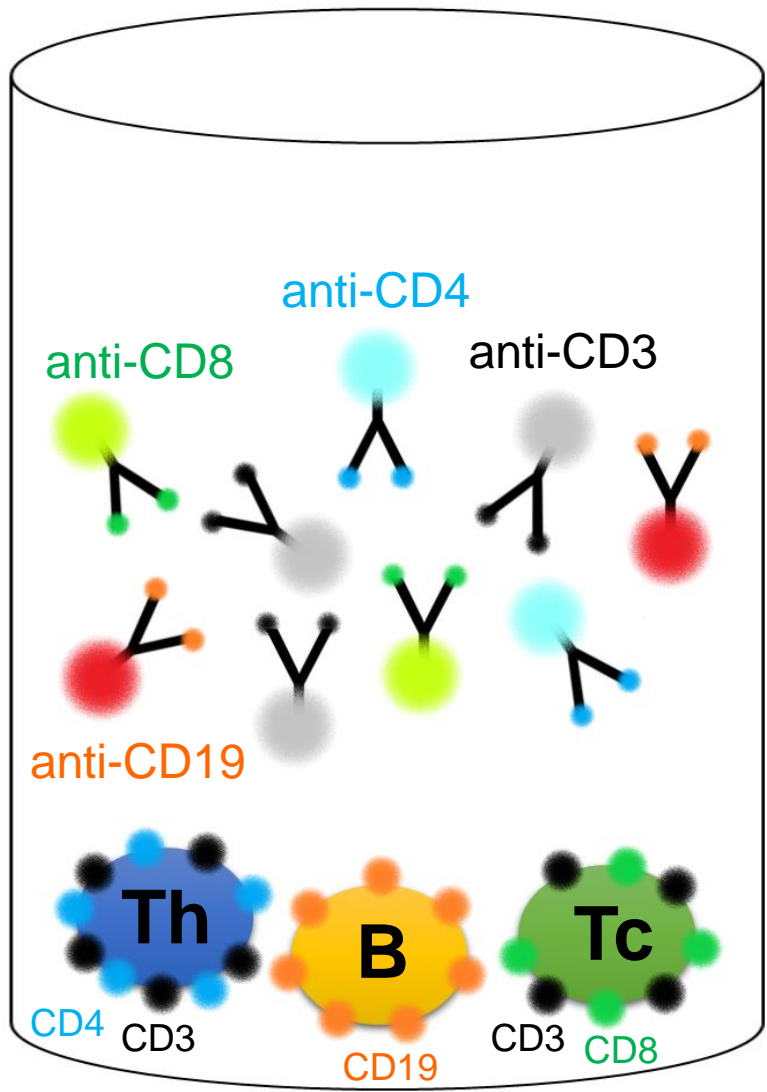
PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

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

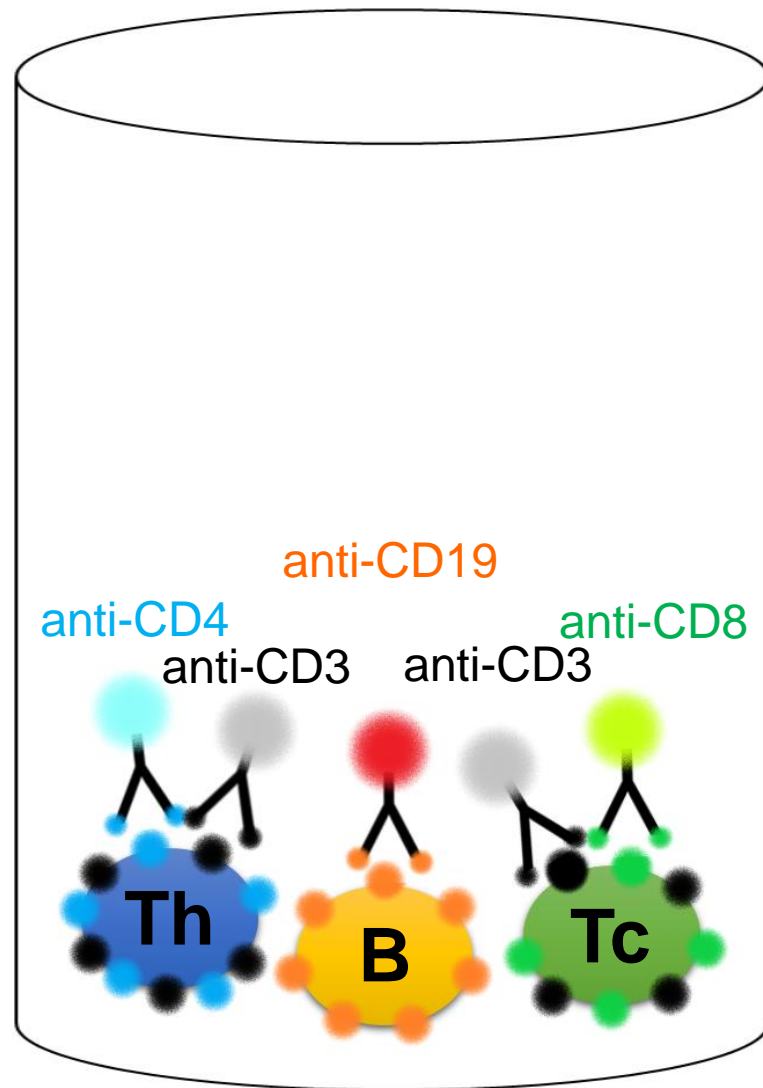


- toho se využívá při jejich detekci pomocí průtokové cytometrie

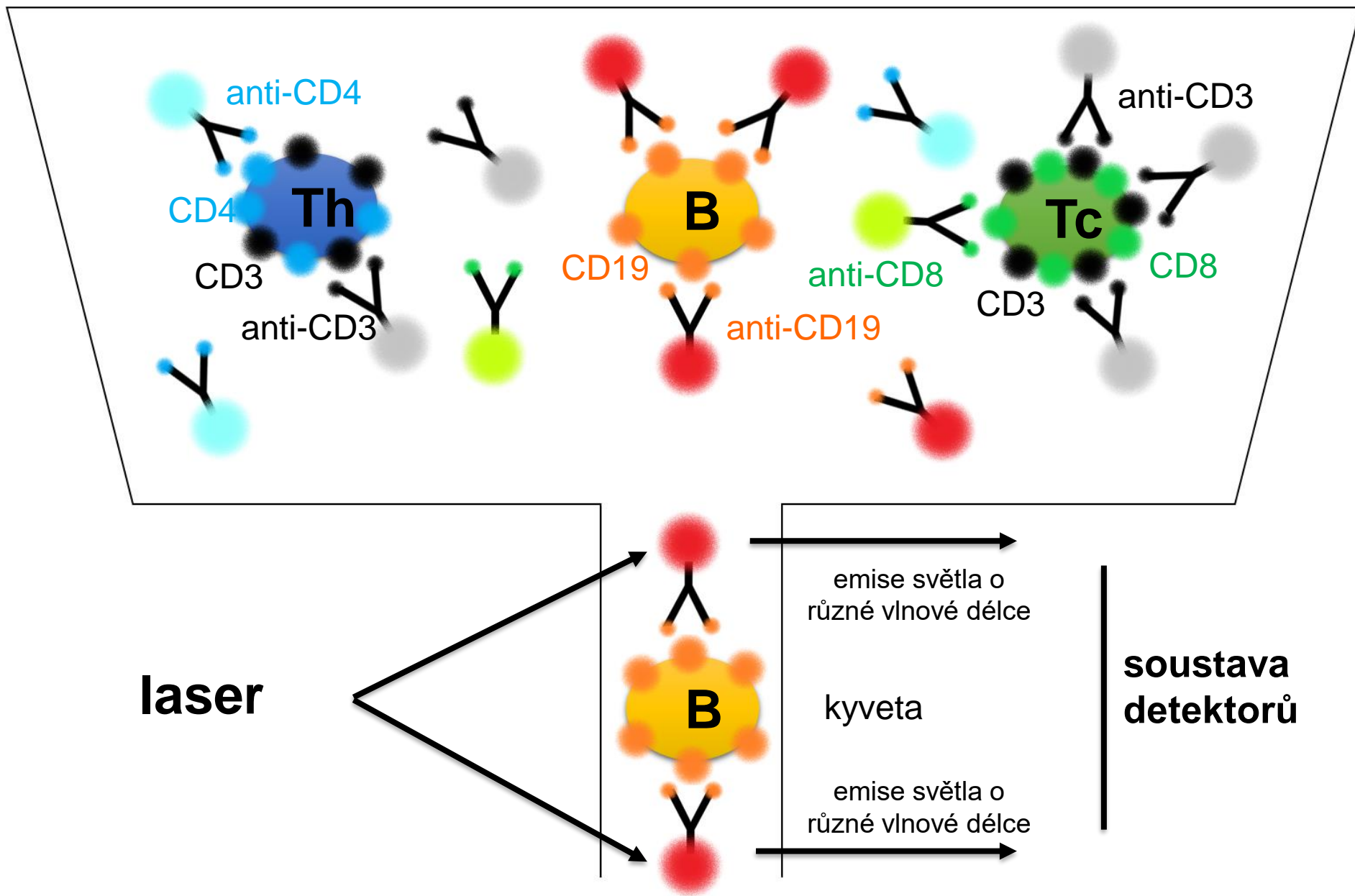
k plné periferní krvi se přidají
monoklonální protilátky namířené proti
buněčným povrchovým strukturám
konjugované s fluorochromy



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

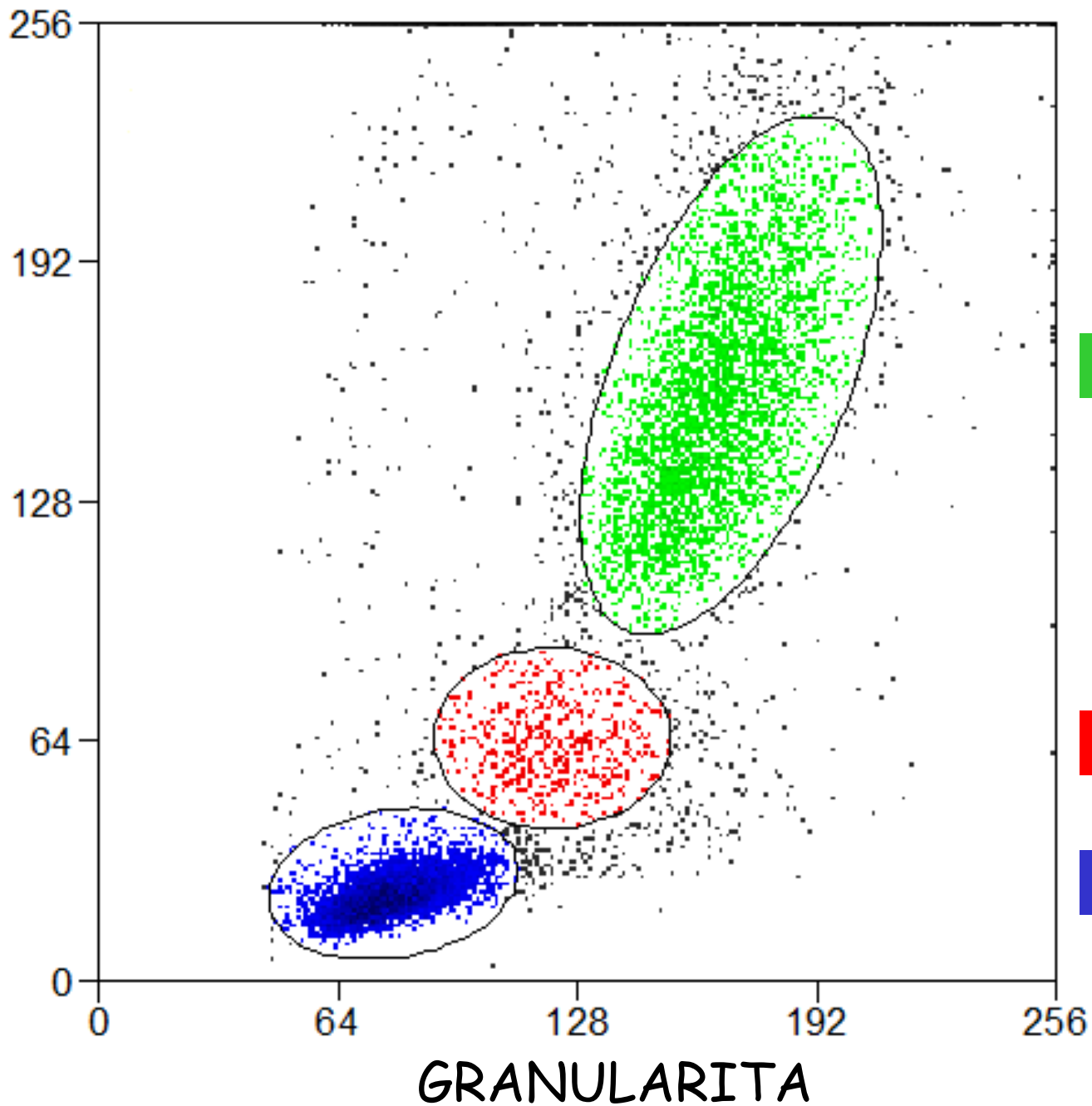
PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

- 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 BUNĚK**

Význam vyšetření pomocí průtokové cytometrie:

- diagnostika primárních a sekundárních imunodeficiencí
- diagnostika hematologických malignit

VELIKOST



GRANULOCYTY

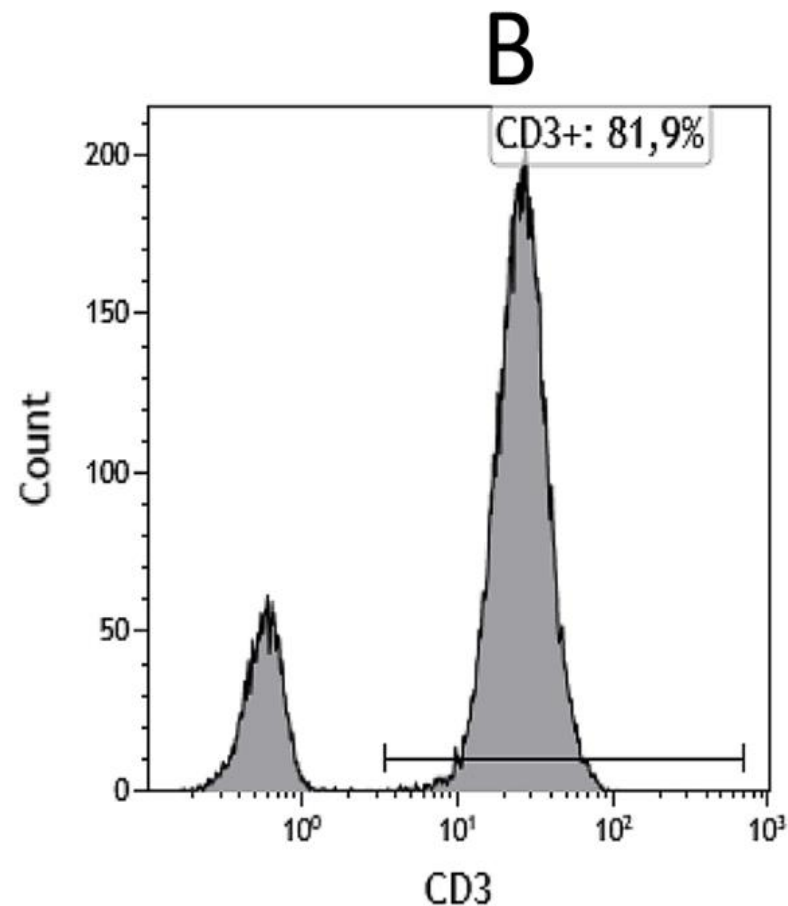
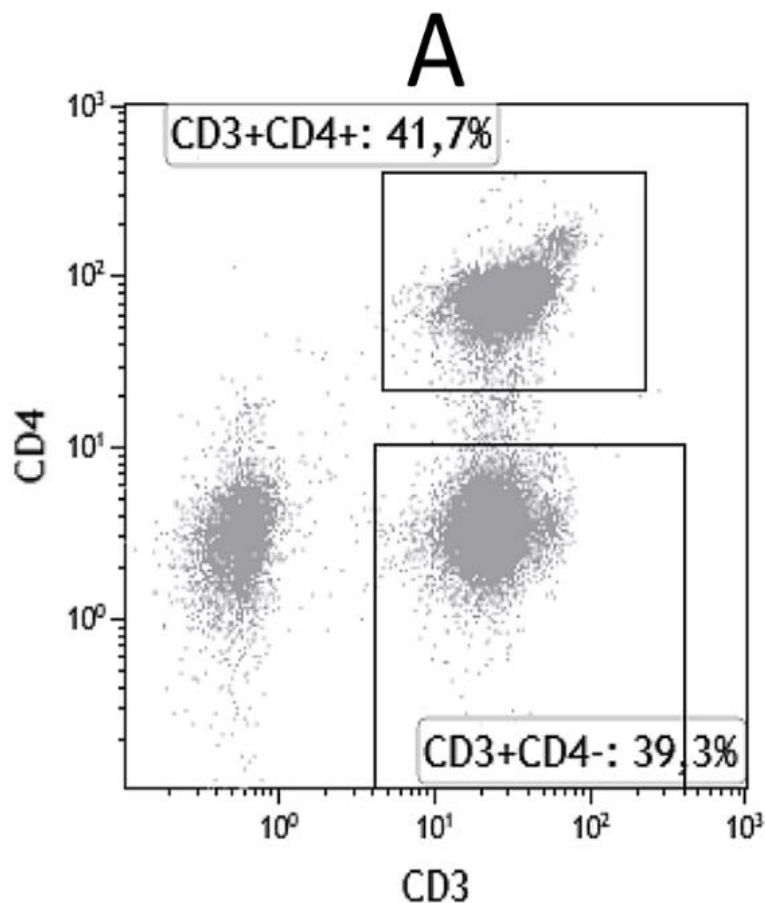
MONOCYTY

LYMFOCYTY

GRANULARITA

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%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

- **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
- odběr periferní krve → plná krev nebo izolace lymfocytů → aktivace lymfocytů pomocí mitogenů (PHA, ConA, CD3/CD28) → inkubace 24–72 hodin → fixace a permeabilizace lymfocytů → přidán protilátky anti-Ki-67/anti-CD3 značené fluorescenčním barvivem → po inkubaci a promytí detekce průtokovou cytometrií
 - *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** → například pomocí inkorporace carboxyfluorescein succinimidyl esteru (CFSE) do buněk (např. metoda CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit), metoda Click-iT® Plus EdU, dříve metody s radioaktivním izotopem (3H-thymidin)

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

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*