

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Eliška Pilátová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**STANOVENÍ SUBPOPULACÍ B-LYMFOCYTŮ
U PACIENTŮ S COVID**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31.3.2017

.....

Eliška Pilátová

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomáši Vlasovi za pomoc, ochotu, trpělivost, cenné rady a materiály, které mi pomohly při tvorbě této práce.

ANOTACE

Příjmení a jméno: Eliška Pilátová

Katedra: Katedra teoretických oborů

Název práce: Stanovení subpopulací B-lymfocytů u pacientů s CVID

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran: číslované - 37
nečíslované - 16

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 24

Klíčová slova: imunodeficiencie – CVID - průtoková cytometrie - B-lymfocyty

Souhrn:

Práce se věnuje popisu B-lymfocytů a jejich funkci v imunitním systému. Popisuje vrozenou poruchu imunity běžnou variabilní imunodeficienci, její klinické projevy, možnosti diagnostiky a systémy klasifikace. Pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie byly stanoveny subpopulace B-lymfocytů u dětí a dospělých s tímto onemocněním.

ANNOTATION

Surname and name: Eliška Pilátová

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Determination of B-lymphocyte subpopulations
in patients with COVID

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages: numbered – 37
unnumbered – 16

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 24

Key words: immunodeficiency – COVID – flow cytometry – B-lymphocytes

Summary:

The thesis is devoted to the description of B-cells and their function in the immune system. It describes the humoral innate immune disorder common variable immunodeficiency, its clinical manifestations, methods of diagnosis and classification. Subpopulations of B-cells in children and adults with this disease were measured multicolor flow cytometry.

OBSAH

ÚVOD.....	10
TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 PROTILÁTKY.....	11
1.1 Struktura protilátek.....	11
1.2 Třídy protilátek.....	12
1.3 Mechanismy působení protilátek.....	13
1.4 Monoklonální protilátky.....	13
2 B-LYMFOCYTY.....	15
2.1 Vývoj.....	15
2.2 Eliminace autoreaktivních B-lymfocytů.....	16
3 PROTILÁTKOVÁ ODPOVĚĎ.....	17
3.1 T-independentní odpověď.....	17
3.2 T-dependentní odpověď.....	18
3.2.1 Primární fáze.....	18
3.2.2 Sekundární fáze.....	19
3.2.3 Izotypový přesmyk.....	19
4 SUBPOPULACE B-LYMFOCYTŮ.....	20
4.1 Tranzientní B-lymfocyty.....	20
4.2 Naivní B-lymfocyty.....	20
4.3 Lymfocyty marginální zóny.....	20
4.4 Paměťové B-lymfocyty.....	21
4.5 Plazmablasty.....	21
4.6 CD21 ^{low} CD38 ^{low}	21
5 POVRCHOVÉ MARKERY B-LYMFOCYTŮ.....	22
5.1 CD19.....	22
5.2 CD24.....	22
5.3 CD27.....	22
5.4 CD38.....	23
5.5 CD45.....	23
5.6 IgM.....	23
5.7 IgD.....	23
6 Běžná variabilní imunodeficience.....	24

6.1 Klinické projevy.....	24
6.2 Diagnostika.....	25
6.3 Léčba.....	26
6.4 Systémy klasifikace pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí.....	26
6.4.1 Freiburská klasifikace.....	27
6.4.2 Pařížská klasifikace.....	27
6.4.3 Klasifikace EUROclass.....	27
7 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	28
7.1 Průběh měření průtokovým cytometrem.....	28
PRAKTICKÁ ČÁST.....	30
8 METODIKA.....	30
9 POSTUP ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ.....	31
10 VÝSLEDKY.....	35
11 DISKUZE.....	44
ZÁVĚR.....	46
LITERATURA A PRAMENY.....	47
SEZNAM ZKRATEK.....	49
SEZNAM TABULEK.....	50
SEZNAM GRAFŮ.....	51
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	52

ÚVOD

Imunitní systém udržuje zdraví organismu. Chrání jej před vlastními i cizími škodlivými vlivy, jako jsou patogenní mikroorganismy a jejich toxiny a nebo mutované buňky vlastního organismu. Imunitní systém má také schopnost autotolerance. Rozpoznává vlastní zdravou tkáň a zabraňuje jejímu poškození.

Je-li funkce imunitního systému oslabena, dochází k častějšímu výskytu různých infekcí a zhoršení průběhu onemocnění. Stav snížené imunitní odpovědi na antigenní podněty se nazývá imunodeficience. Je zapříčiněna selháním jedné nebo více složek imunitního systému. Podle vzniku se imunodeficience dělí na primární (vrozené) a sekundární (získané).

Z primárních imunodeficiencí se nejčastěji vyskytuje porucha tvorby protilátek. Mezi ně patří běžná variabilní imunodeficience (CVID). Je to heterogenní skupina onemocnění s neznámou příčinou. Manifestuje se zvýšenou náchylností k bakteriálním onemocněním. Může docházet i k projevu autoimunitních onemocnění.

U pacientů s CVID jsou pozorovány změny v zastoupení B-lymfocytů. Pomocí průtokové cytometrie lze poměrně snadno stanovit rozložení jednotlivých subpopulací B-lymfocytů. To pomáhá klasifikovat onemocnění u daného pacienta a lépe determinovat jeho průběh.

TEORETICKÁ ČÁST

1 PROTILÁTKY

Protilátky jsou bílkoviny tvořené a sekretovány plazmatickými buňkami, které se diferencují z B-lymfocytů po setkání s antigenem. Jako součást humorální imunity plní důležitou funkci při obraně organismu (4).

Protilátky se zejména uplatňují v při boji proti obaleným mikroorganismům, mezi které se řadí *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* nebo *Haemophilus influenzae*. Obal těchto bakterií je tvořen vrstvou z polysacharidu, která je chrání před pohlcením fagocytující buňkou. Tato jejich ochrana může být překonána opsonizací protilátkami proti polysacharidům nebo pomocí vazby C-reaktivního proteinu (14).

1.1 Struktura protilátek

Protilátky jsou bílkoviny třídy imunoglobulinů. Nestočené molekuly imunoglobulinů mají tvar připomínající písmeno Y. Jsou tvořeny ze dvou identických delších těžkých (H) řetězců a dvou identických kratších lehkých (L) řetězců. Těžké řetězce jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky a ke každému z nich je připojen jeden lehký řetězec cystinovým můstkem. Tvoří tak jednotnou molekulu. Konkrétní typy řetězců jsou označovány řeckými písmeny. Lehké řetězce mají dvě strukturální varianty κ a λ . Těžké řetězce mají pět variant α , μ , γ , δ a ϵ . Podle jejich označení je pojmenováno pět izotypových tříd imunoglobulinů, které jsou znázorněny na obrázku 1.

Jednotlivé řetězce mohou být rozděleny na podobné jednotky nazývané domény. H řetězec je složen ze čtyř nebo pěti domén a L řetězec ze dvou. Domény všech řetězců na N-koncích jsou variabilní. To znamená, že se od sebe mohou lišit imunoglobuliny tvořené různými klony B-lymfocytů. Ostatní domény jsou konstantní. Oba L i H řetězce jsou směřovány konci s aminoskupinou k vrcholu rozvětvené části molekuly a tvoří zde vazebné místo pro antigen. Protilátky se dokáží vázat na antigen pomocí nekovalentních vazeb. Stabilita komplexu antigen-protilátka je podmíněna kompatibilitou vazebného místa protilátky a antigenu, tzv. epitopu. Síla interakce mezi epitopem a protilátkou se nazývá afinita. Pro rozeznávání množství různých antigenů mají protilátky velkou variabilitu ve vazebné oblasti. (1; 2; 4).

1.2 Třídy protilátek

IgA se vyskytuje ve formě slizniční a sérové. Je hojně secernován na povrchu sliznic, kde se podílí na ochraně proti mikroorganismům. IgA jim brání ve vniknutí do organismu. Představuje hlavní imunoglobulin v tekutinách vylučovaných sliznicemi, jako jsou sliny, hlen, pot, mléko a další. Slizniční forma se skládá ze sekreční komponenty a dvou monomerů spojených J-řetězcem. Tato forma také brání virům v infikování hostitelské buňky. Sérové IgA jsou v podobě monomeru, dimeru nebo trimeru. Vazbou na receptory fagocytů působí jako opsonin. IgA má dvě podtřídy IgA1 syntetizovaný slizničními plazmocytů a IgA2 produkovaný v kostní dřeni.

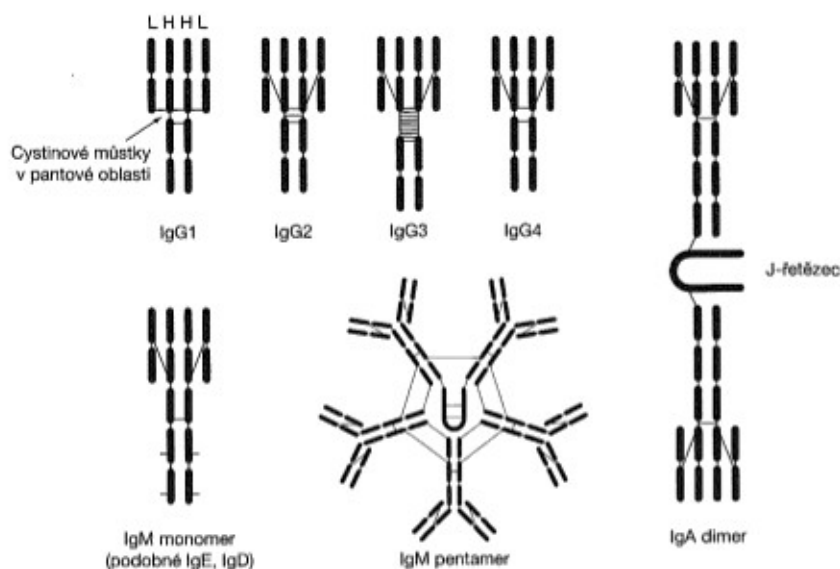
IgM je první protilátkou tvořenou při imunitní odpovědi. Její monomerní forma je začleněna do membrány B-lymfocytů, kde tvoří specifický B buněčný receptor (BCR, B-cell receptor). Sekretovaný IgM je ve formě pentameru. Jeho podjednotky jsou spojeny do kruhu cystinovými můstky a jedním J řetězcem. Kvůli velikosti své molekuly je považován za makroglobulin. Působí při neutralizaci virů a účinně aktivuje dráhu komplementu.

IgG je nejhojněji zastoupeným sérovým izotypem. Má čtyři podtřídy IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4, které se vzájemně liší svou schopností aktivovat komplement a vázat se na receptor fagocytů. Podílí se při neutralizaci virů a toxinů, při opsonizaci, aktivaci klasické cesty komplementu a je typický pro sekundární imunitní odpověď. Má monomerní strukturu a jako jediná protilátka přechází přes placentu. IgG matky chrání dítě přibližně až do tří měsíců po porodu.

IgE se uplatňuje při obraně proti mnohobuněčným parazitům na sliznicích. V séru se nachází pouze ve velmi malém množství (0,3 mg/l). IgE je považován za hlavní příčinu vzniku alergických reakcí časně přecitlivělosti. Vazbou na receptory na povrchu bazofilů a žírných buněk aktivují uvolnění mediátorů zánětlivé reakce histaminu, serotoninu a dalších.

IgD je volně v séru pouze v nízké koncentraci (0,1 g/l). Nachází se hlavně na povrchu B-lymfocytů jako BCR (1; 2; 3).

Obrázek 1: Charakteristické rysy struktur jednotlivých izotypů protilátek (1)



1.3 Mechanismy působení protilátek

Základními reakcemi protilátek v organismu jsou neutralizace, opsonizace a aktivace komplementu. Neutralizace znamená, že protilátka blokuje patogeny a brání jim ve škodlivém působení. Protilátky se naváží na aktivní místa toxinů, virů nebo jiných mikroorganismů. Znemožňují tak jejich toxické působení, adhezi k buňkám nebo proniknutí do nich. Pod pojmem opsonizace se rozumí děj, kdy protilátky navázané na mikroorganismy či antigenní částice zlepšují nebo dokonce vůbec umožňují jejich fagocytózu a aktivují destrukční mechanismy fagocytů, jako je například oxidační vzplanutí. Protilátky svojí vazbou na antigen mohou také aktivovat klasickou cestu komplementu. To vede k chemotaxi fagocytů, k rozvoji zánětlivé reakce a v poslední řadě až k usmrcení mikroorganismu osmotickou lýzou způsobenou membranolytickým komplexem komplementu (1; 5).

1.4 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (MAb; monoclonal antibody) jsou protilátky jednoho izotypu a specifity. Mají tedy stejnou konstantní i variabilní část. Jsou produkovány plazmatickými buňkami odvozenými od jednoho B-lymfocyty, proto se nazývají monoklonální. Pro využití těchto protilátek k diagnostickým a léčebným účelům se vyrábějí laboratorně v tkáňových kulturách. Své uplatnění nacházejí v sérologii, při určování bakteriálních i virových infekcí a nebo při stanovení leukocytárních povrchových znaků (15).

Pro terapeutické účely se používají jako imunosupresiva u pacientů po transplantaci i při léčbě autoimunitních chorob. Důležitou úlohu mají i v terapii zhoubných nádorů. Omezením pro dlouhodobé používání monoklonálních protilátek při léčebném použití je jejich xenogenní původ. Mohou se tedy používat pouze do doby, než si organismus vytvoří protilátky proti cizorodým epitopům na MAb. Metodami molekulární biologie lze MAb humanizovat nahrazením cizorodé části na úrovni DNA.

MAb se vyrábějí v tzv. hybridomu. Výroba začíná imunizací myši příslušným antigenem. Po dostatečné stimulaci jsou z myší sleziny odebrány B-lymfocyty, které jsou následně inkubovány s nádorovými buňkami vycházejícími z plazmatických buněk. B-lymfocyty s plazmocyty fúzí a vzniká hybridom. Takto vzniklé buňky mají vlastnosti od nádorových buněk neomezeně se dělit a vytvářet imunoglobuliny a od izolovaných B-lymfocytů mají genetický kód pro strukturu variabilní části produkovaného imunoglobulinu. Všechny klony tohoto hybridomu poté vytvářejí protilátky o jedné specifitě (16).

2 B-LYMFOCYTY

Hlavní funkcí B-lymfocytů v imunitním systému je tvorba protilátek. Jsou tedy podstatnou součástí humorální specifické imunity. Své označení získaly od Fabriciovy burzy ptáků. Objeveny byly až později jako buňky, které produkují proteiny imunoglobuliny. Na svém povrchu B-lymfocyty nesou membránový imunoglobulin, který je součástí receptoru pro specifické rozpoznání antigenů. Tento receptor je také označován jako B buněčný receptor (BCR) (9).

B-lymfocyty jsou malé buňky s jedním jádrem a nízkým objemem cytoplazmy. V lidském organismu je přítomno přibližně 2×10^{12} lymfocytů a z toho 5-12% tvoří B-lymfocyty. Odhaduje se, že je možné nalézt až 10^{11} různým protilátkových specifit (13).

2.1 Vývoj

Progenitorové buňky pro vývoj B-lymfocytární linie se v embryonálním období nalézají nejprve ve žloutkovém vaku, později ve fetálních játrech a postupně se přesouvají do kostní dřeně, která je primárním lymfoidním orgánem (4).

Vývoj začíná hematopoetickou kmenovou buňkou. Ta se diferencuje do multipotentní progenitorové buňky, která se dále diferencuje na progenitory pro myeloidní a lymfoidní vývojové linie. B-lymfocyty se dále vyvíjí z lymfoidního progenitoru a postupně dozrávají v kostní dřeni přes pro-B-lymfocyty a pre-B-lymfocyty až po nezralý B-lymfocyt. Tato část vývoje se označuje jako centrální vývoj. Během maturace B-lymfocytů dochází k vývoji specifického BCR receptoru, který je schopen svojí variabilní částí reagovat se širokou škálou antigenů.

Při vývoji B-lymfocytů dochází k přeskupování genů kódujících variabilní část imunoglobulinů a vzniku specifických buněčných receptorů. Sekvence genů se skládá z úseků V (variabilita), D (diversita) a J (joining). Konstantní část imunoglobulinu je kódována úsekem C.

Rekombinaci genů začíná již u časného stádia B-lymfocyty. U pro-B-lymfocytů probíhá úprava genů kódujících variabilní část těžkého řetězce ve dvou krocích. Jako první jsou vyštěpeny úseky mezi D a J segmenty. Poté jsou odstraněny úseky mezi V a v předchozím kroku vzniklým DJ segmentem. Úpravy probíhají zároveň na obou alelách. Podaří-li se na jedné z nich vytvořit VDJ úsek, jehož expresí vzniká funkční

těžký řetězec, je rekombinace zastavena i na druhé alele alelickou exkluzí, která zabraňuje vytvoření dvou různých těžkých řetězců. Výsledkem tohoto děje je funkční těžký řetězec μ , neboť $C\mu$ segment je umístěn nejbližší k VDJ segmentu. B-lymfocyt, u kterého došlo k úspěšnému přeskupení genů pro těžký (H) řetězec, se nazývá pre-B-lymfocyt.

Na povrchu buňky pre-B-lymfocytu se objevuje tzv. Pre-B-receptor (Pre-BCR) složený z těžkého řetězce μ , náhradního lehkého řetězce a signálního heterodimeru $Ig\alpha/Ig\beta$. Pre-BCR dává signál pro aktivaci přeskupování genů pro lehký (L) řetězec. Geny kódující lehké řetězce κ a λ se skládají pouze za segmentů V a J. Rekombinace probíhá obdobným procesem jako při úpravě kódu pro těžký řetězec. Nejprve dochází k vyštěpování úseků a opětovnému spojování u segmentů pro κ řetězec. Opět probíhá úprava genů na obou chromozomech zároveň, dokud nevznikne lehký řetězec kompatibilní s těžkým řetězcem μ , se kterým vytvoří kompletní imunoglobulin IgM. Je-li přeskupování neúspěšné, pokračuje se úpravou genů pro řetězec λ . Nevznikne-li ani poté lehký řetězec schopný vázat se na těžký řetězec μ , pre-B-lymfocyt zaniká apoptózou. V opačném případě se z pre-B-lymfocytu stává nezralý B-lymfocyt, který prochází testováním na autoreaktivitu a opouští kostní dřeň. Další vývoj B-lymfocytů poté probíhá v sekundárních lymfatických orgánech (1; 6).

2.2 Eliminace autoreaktivních B-lymfocytů

Procesy vedoucí ke vzniku specifických BCR jsou náhodné, a proto mohou být vytvořeny i buňky s receptory reagujícími s antigeny vlastního organismu a produkující autoreaktivní protilátky. Na úrovni nezralých B-lymfocytů je většina těchto buněk eliminována. Během vývoje B-lymfocytů v kostní dřeni jsou usmrceny B-lymfocyty, na jejichž BCR se s vysokou afinitou naváže antigen. Tato buňka dostane silný negativní signál vedoucí k apoptické smrti. Je to účinný mechanismus, jelikož se v kostní dřeni vyskytují především autoantigeny. Další mechanismus bránící ve škodlivém působení autoreaktivních B-lymfocytů je neúplná aktivace druhým signálem pomocného T-lymfocytu (1; 6).

3 PROTILÁTKOVÁ ODPOVĚĎ

Imunitní reakce, při kterých dochází k rozpoznání antigenu a aktivaci B-lymfocytů přes antigenně specifický receptor B buněk vedoucí k tvorbě protilátek, se označují jako protilátková imunitní odpověď. Mechanismus, jakým proběhne přeměna aktivovaného B-lymfocytu v efektorovou plazmatickou buňku, je závislý na typu antigenu. Antigen také ovlivňuje, jaké protilátky budou produkovány. Podle potřeby spolupráce pomocných T-lymfocytů (T_H) při vyvolání reakce se antigeny dělí na T-independentní (TI) a T-dependentní (TD).

3.1 T-independentní odpověď

TI antigeny jsou převážně polysacharidy spouštějící diferenciaci B-lymfocytů na plazmocyty a uvolňování protilátek i bez spolupráce s T_H lymfocyty. Protilátky syntetizované na základě tohoto typu reakce jsou převážně nízkoafinní protilátky třídy IgM. Na základě různého způsobu aktivace B-lymfocytu a odlišné biochemické struktury lze T-nezávislé antigeny rozdělit do dvou podtříd TI-1 a TI-2.

Do první skupiny TI-1 se řadí buněčné mitogeny, ze kterých je významný zejména bakteriální lipopolysacharid (LPS) tvořící buněčnou stěnu gramnegativních bakterií, ale patří sem i rostlinné lektiny. Tyto antigeny působí jako polyklonální mitogeny B-lymfocytů. Při velké koncentraci se antigen LPS váže na receptory B-lymfocytů pro LPS a způsobuje. Je tak způsobena nespecifická aktivace velkého množství B-lymfocytů a produkce protilátek bez jasně určené specifity.

Pro druhou skupinu TI-2 jsou typické antigeny s polymerickou strukturou. Skládají se z mnoha opakujících se stejných podjednotek. Zástupci TI-2 jsou například polymerní proteiny jako flagellin tvořící bičíky některých bakterií a také velmi medicínsky významné mikrobiální povrchové polysacharidy, které tvoří obal opouzdřených bakterií. Díky polymerní struktuře mají tyto antigeny velmi dlouhou molekulu, což umožňuje reakci jednoho antigenu zároveň s velkým množstvím BCR a zároveň tyto receptory shlukují. U zralých B-lymfocytů je takto vyvolán dostatečně silný signál pro buněčné dělení a diferenciaci na plazmatické buňky. Tento proces však není na T-lymfocytech zcela nezávislý. B-lymfocyty stimulované TI-2 antigeny jsou

závislé na některých cytokinech jako jsou IL-2, IL-3 a IFN- γ . Na nezralé B-lymfocyty působí vazba s TI-2 opačně, místo stimulace jsou uvedeny do stavu útlumu (1; 5; 14).

3.2 T-dependentní odpověď

TD antigeny jsou především proteiny a glykoproteiny a mají na svém povrchu zpravidla pouze jedno vazebné místo. K vyvolání protilátkové odpovědi těmito antigeny je třeba přímé účasti pomocných T-lymfocytů, protože k aktivaci B-lymfocytů TD antigeny je zapotřebí alespoň dvou různých signálů. Reakce probíhá ve dvou fázích primární a sekundární. Přejít mezi jednotlivými fázemi je buď jasně ohraničen, nebo na sebe bezprostředně navazují. Výsledkem na T-lymfocytech závislé reakce je vznik paměťových buněk a vysokoafinních protilátek.

3.2.1 Primární fáze

V primární fázi se imunitní systém poprvé setkává s určitým antigenem. Tento antigen nejprve stimuluje B-lymfocyt vazbou na BCR. Dále je také pohlcen antigen prezentujícími buňkami, které prezentují peptidové fragmenty antigenu na svém povrchu v komplexu MHC II. třídy prekurzorům T_H buněk. Tak vzniknou T_{H2} lymfocyty schopné rozpoznat B-lymfocyty stimulované tímto antigenem. Poté dochází k interakci mezi kostimulačním receptorem B-lymfocytu CD40 a jeho ligandem CD40L umístěným na povrchu aktivovaného T_{H2} lymfocytu. B-lymfocyt současně přijímá signály zprostředkované cytokiny. Toto vše vede k diferenciaci na plazmatické buňky, sekreci protilátek a přeměny části B buněk na paměťové buňky, které se účastní sekundární fáze odpovědi.

Protilátky tvořené v této první fázi reakce mají nízkou afinitu a jsou třídy IgM. Spolu s antigeny tvoří imunokomplexy, které jsou zachycovány v na povrchu folikulárních dendritických buněk (FDC) v primárních lymfoidních folikulech. FDC buňky takto prezentují antigeny B-lymfocytům.

3.2.2 Sekundární fáze

Po rozpoznání antigenu B-lymfocytem na povrchu FDC a získání pomocných signálů od T_H2 je zahájena sekundární fáze odpovědi. Při ní dochází k dělení a proliferaci aktivovaných B-lymfocytů, ale také k intenzivním mutacím V segmentů pro těžké i lehké řetězce imunoglobulinů. Vznikají tak B buňky lišící se svými vazebnými místy pro antigen. Buňky nesoucí BCR s nízkou afinitou k prezentovanému antigenu prohrávají v soutěži o vazbu s omezeným množstvím antigenu a bez dostatečné stimulace hynou. Díky intenzivní proliferaci a masivnímu úhynu B-lymfocytů vzniká sekundární lymfoidní folikul, v jehož germinálním centru (GC) tyto děje probíhají. Tento proces nazývaný se germinální reakce vyústí v afinitní maturaci tvořených protilátek. Výsledné protilátky ve srovnání s protilátkami před maturací mají afinitu přibližně o 4-6 řádů vyšší.

Kromě změny variabilní části imunoglobulinů somatickou mutací a následnou selekce vysokoafiních buněk dochází také ke změně izotypu produkovaných protilátek tzv. izotypovým přesmykem (1; 5).

3.2.3 Izotypový přesmyk

Po aktivaci B-lymfocytu antigenem dochází ke změně třídy tvořených protilátek. Vyštěpením úseků genů pro H řetězec kódujících konstantní část. Poté je exprimován segment nacházející se nejbliže k VDJ segmentu. Vystřížení probíhá na základě rozeznání specifické sekvence umístěné u jednotlivých úseků C segmentu. Pouze mezi C_μ a C_δ taková sekvence chybí. Zda vznikne μ nebo δ řetězec záleží na délce transkribované části C segmentu a následný sestřih. Na povrchu buňky se tedy mohou zároveň vyskytovat IgM i IgD. Podobným mechanismem je i u ostatních typů imunoglobulinů regulován vznik volného či membránového Ig. (1)

4 SUBPOPULACE B-LYMFOCYTŮ

4.1 Tranzientní B-lymfocyty

Nezralé lymfocyty po opuštění kostní dřeně putují do sekundárních lymfatických orgánů především sleziny, kde probíhá jejich další vývoj. Na základě této migrace neboli tranzitu získaly své jméno. Rozlišují se dvě populace tranzientních buněk T1 ($CD21^-CD23^-CD24^+CD38^+IgM^+IgD^-$) a T2 ($CD2^+CD23^+CD24^+CD38^+IgM^+IgD^+$). T1 lymfocyty se nacházejí v kostní dřeni, periferní krvi a slezině. Na svém povrchu exprimují BCR s vysokou afinitou k vlastním autoantigenům rozpuštěným v krvi. T1 silně interagující s těmito antigeny hynou antigen-indukovanou apoptózou v rámci negativní selekce. Zhruba 40% tranzientních buněk je takto eliminováno. T1 lymfocyty, které přežijí vstupují do primárního folikulu sekundárních lymfatických orgánů a stávají se z nich T2 lymfocyty. Zde jsou T2 vystaveny antigenům vázaným na povrchu folikulárních dendritických buněk. Probíhá diferenciací a pozitivní selekce buněk, které reagují s těmito antigeny s dostatečnou afinitou a stávají se tak zralými lymfocyty marginální zóny a naivními folikulárními lymfocyty (6 – 8).

4.2 Naivní B-lymfocyty

Naivní folikulární B-lymfocyty ($CD27^+IgD^+$) tvoří populaci buněk nacházejících se ve folikulech sekundárních lymfatických orgánů. Jsou aktivovány zejména T-dependentními antigeny a po kostimulaci T_H lymfocyty dochází k jejich dozrání v germinálních centrech, kde procházejí somatickou hypermutací, izotypovým přesmykem a afinitní maturací. Nakonec se diferencují v paměťové buňky nebo plazmablasty a plazmatické buňky, které vytvářejí vysokoafinní protilátky (6 – 8).

4.3 Lymfocyty marginální zóny

Marginální zóna je oblast sleziny mezi bílou a červenou pulpou. Vytváří propojení mezi krevní cirkulací a imunitním systémem. B-lymfocyty vyskytující se v této oblasti mají tedy přístup k antigenům nacházejících se v krvi. Jsou to například bakterie a viry, jejichž povrchové struktury se řadí do T-independentních antigenů. Po aktivaci lymfocytů marginální zóny ($CD27^+IgD^+$) dochází k rychlé sekreci nízkoafinních

IgM protilátek. Lymfocyty marginální zóny jsou mimo jiné také schopny přenášet různé velké antigeny a imunokomplexy do folikulů a předat je FDC v germinálním centru a opět se vrátit do marginální zóny. Přispívají tak ke stimulaci T-dependentní imunitní odpovědi (6; 7; 8).

4.4 Paměťové B-lymfocyty lymfocyty

Buňky imunologické paměti zajišťují zvýšení účinnosti imunitní odpovědi při opakovaném setkání s určitým antigenem. Paměťové B-lymfocyty jsou dlouhožijící buňky mající na svém povrchu rozdílné znaky, které odrážejí způsob jejich vzniku. Děje v GC indukované T-dependentními antigeny dávají vzniknout izotypově přepnutým paměťovým buňkám ($CD27^+IgM^-IgD^-$). Reakcemi proti T-independentním antigenům vznikají izotypově nepřepnuté paměťové buňky ($CD27^+IgM^+IgD^+$) (6; 8).

4.5 Plazmablasty

Do stadia plazmablastů ($CD24^+CD38^+$) diferencují paměťové buňky po reaktivaci antigenem. Poté jich většina migruje buď do místa zánětu nebo do kostní dřeně. V místě zánětu diferencují do plazmatických buněk, jejichž většina po dokončení imunitní reakce zanikají apoptózou. Dlouhožijící plazmatické buňky mohou přežívat hlavně v kostní dřeni ale i v sekundárních lymfatických orgánech více jak 90 dní (8).

4.6 $CD21^{low}CD38^{low}$

$CD21^{low}CD38^{low}$ B-lymfocyty jsou utlumené anergizované buňky imunitního systému, které zůstávají v periferní krvi. Mají zhoršenou schopnost aktivace. Z důvodu snížené exprese chemokinových receptorů, důležitých pro vstup do sekundárních lymfatických orgánů,

nemohou vstupovat do folikulů a germinálních center. Zastoupení této populace lymfocytů bývá zvýšeno u osob s COVID nebo autoimunitními chorobami (8).

5 POVRCHOVÉ MARKERY B-LYMFOCYTŮ

Buňky mají na svém povrchu specifické znaky, které jsou charakteristické pro dané subpopulace lymfocytů. Tyto znaky vypovídají o dané buňce, do jaké patří buněčné linie, míře diferenciaci a nebo její aktivaci. Pro označování znaků byl dohodnut jednotný mezinárodní systém, tzv. CD klasifikace. Jméno znaku je složeno ze zkratky CD (cluster of differentiation) a čísla, které jednoznačně určuje příslušný znak na membráně buňky (16).

Povrchové markery jsou pestrou skupinou molekul, umožňujících přenos signálů přes buněčnou membránu. Následně uvedené znaky charakterizují jednotlivé subpopulace B-lymfocytů a lze je podle nich stanovovat.

5.1 CD19

Jedna z prvních molekul exprimovaných B-lymfocyty se označuje jako CD19. Jedná se o glykoprotein o molekulové hmotnosti 95kDa nesoucí dvě Ig-like domény. Na povrchu B-lymfocytu se vyskytuje od časného vývoje a postupně mizí diferenciací do plazmatické buňky. Molekula CD19 vytváří komplex s BCR a CD21 a spolu s nimi se podílí na aktivaci B-lymfocytu (6; 9; 10).

5.2 CD24

Je membránově vázaný glykosylfosfatidylinositolový protein o molekulové hmotnosti 20-70kDa. Tento znak je exprimován na hematopoetických buňkách a na řadě dalších buněk různých tkání jako například na neuronech, epitelových buňkách, ale i rakovinných buňkách. Plní funkci adhezivní molekuly pro P-selektiny. Ovlivňuje aktivací signály přijímané B-lymfocyty přes jiné receptory a podílí se na kostimulaci. Vysoký výskyt tohoto znaku se nachází u progenitoru a zralých klidových B-lymfocytů (6; 9; 10).

5.3 CD27

Tento znak je glykosylovaným transmembránovým proteinem o molekulové hmotnosti 55kDa. Řadí se do skupiny receptorů pro TNF (tumor necrosis factor). Signál přijímaný tímto receptorem spouští konečnou diferenciaci B-lymfocytů na plazmatické buňky. Slabě se vyskytuje na buňkách, které prošly GC a spolu s diferenciací do plazmatických buněk se jeho exprese zvyšuje. Slouží jako základní marker pro určování

paměťových buněk. Také se vyskytuje na povrchu většiny periferních T-lymfocytů (6; 9; 10).

5.4 CD38

Představuje transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 45kDa. Tato molekula byla objevena nejdříve na povrchu T-lymfocytů. U B-lymfocytů se vyskytuje u časných vývojových stadií, u některých buněk v germinálním centru a poté hlavně u plazmatických buněk a plazmablastů. Signalizace přes CD38 inhibuje proliferaci u prekurzorů B-lymfocytů a následně vede k jejich apoptické smrti. Naopak u B-lymfocytů v GC signál přes CD38 apoptóze zabraňuje (6; 9; 10).

5.5 CD45

Molekula CD45 je transmembránový glykoprotein exprimovaný všemi hematopoetickými buňkami obsahujícími jádro. Na povrchu buněk imunitního systému se tento protein vyskytuje v osmi izoformách. Míra exprese u B-lymfocytů závisí na jejich stupni diferenciaci. U T- a B-lymfocytů je CD45 potřebný ke správnému přenosu signálu do buňky po stimulaci některých povrchových receptorů (10; 11).

5.6 IgM

Jako volná forma se tento imunoglobulin vyskytuje v krvi ve formě pentameru a je přirozenou protilátkou s nízkou afinitou. Ve formě monomeru je součástí BCR komplexu na povrchu B-lymfocytů. Signalizací komplexu se aktivuje B-lymfocyty, u kterého dochází ke změně transkripce některých genů a diferenciaci na plazmatické buňky (6; 9).

5.7 IgD

Tento imunoglobulin se vyskytuje převážně na povrchu B-lymfocytů. Podobně jako IgM je součástí BCR (1; 9).

6 Běžná variabilní imunodeficience

Je jednou z nejběžnějších primárních protilátkových imunodeficiencí. Jedná se o skupinu heterogenních onemocnění s poruchou diferenciací B-lymfocytů na plazmatické buňky a projevuje se snížením volných IgG, IgA a u některých nemocných i IgM v plazmě (12).

První případy CVID byly popisovány od roku 1953. Nemocní trpěli opakovanými infekcemi. Různorodost ve výsledcích laboratorních vyšetření vedla k různým domněnkám o vzniku tohoto onemocnění. V současnosti se považuje za onemocnění vznikající u jedinců s genetickou predispozicí s vícečetnou poruchou přirozené i získané imunity. Odchytky v laboratorních nálezech jsou vysvětlovány kumulací odlišných poruch (13).

6.1 Klinické projevy

K manifestaci klinických příznaků může u nemocných s CVID nastat v kterémkoli věku. Výskyt je sporadický. Většina diagnóz je však u dospělých. Průměrný věk stanovení diagnózy je ve věku 29 let u mužů a 33 let u žen. U dětí se příznaky objevují až po druhém roce života. Nemocní často trpí opakovanými a závažnými infekcemi dýchacích cest jako jsou sinusitidy, bronchopneumonie, otitidy a další. Nejčastějšími původci infekcí jsou pneumokoky, hemofilus a mykoplazmata. U téměř 40% nemocných se vyskytují bakteriální a parazitární enteritidy a u 50% nemocných se projevují autoimunitní choroby. Někdy bývají příznaky CVID nenápadné.

Včasná diagnóza a správná léčba má vliv na kvalitu života nemocných. Určení diagnózy je však pouze pravděpodobnostní. Určuje se na základě vyloučení všech ostatních stavů projevujících se protilátkovým deficitem.

Stanovení diagnózy onemocnění CVID může být od prvních příznaků opožděno až o 2-2,5 roku u dětí a u dospělých až o 5-8 let. Opoždění je dáno variabilitou příznaků a nebo subklinickým průběhem onemocnění. Pokud je stanovena diagnóza opožděně je třeba provést funkční a rentgenové vyšetření plic a dýchacích cest, protože během časového zpoždění může dojít k nezvratným změnám na dýchacích cestách a plicním parenchymu.

U některých pacientů s CVID dochází k manifestaci autoimunitních chorob. K rozvoji autoimunity dochází v důsledku přetrvávající antigenní stimulace imunitního systému, jelikož organismus s nedostatkem protilátek není schopen účinně eliminovat mikroorganismy. Uvádí se, že systémové nebo orgánově specifické autoimunitní onemocnění se vyskytuje u 10 až 23% pacientů s CVID. Autoimunitní choroby doprovázející CVID bývají nejčastěji idiopatická trombocytopenická purpura a autoimunitní hemolytická anémie. Můžeme se také setkat s projevy autoimunitní cytopenie a revmatoidní artritidy (13).

6.2 Diagnostika

Postup pro stanovení diagnózy imunodeficiencí se skládá z prověření rodinné a osobní anamnézy, klinického obrazu a příslušných laboratorních testů. Při stanovení diagnózy CVID se postupuje per exclusionem, je tedy třeba vyloučit ostatní onemocnění s projevem snížené hladiny protilátek v krvi.

Rodinná anamnéza se uplatňuje především u primárních imunodeficiencí, které vznikají na základě vrozených vad. Zjišťují se případy opakovaných infekcí, úmrtí, autoimunitních onemocnění či alergií v rodině a provádí se genetické vyšetření. Řada primárních imunodeficiencí je vázaná na chromozom X. CVID se však vyskytuje s autosomálně recesivní dědičností. V osobní anamnéze se sleduje vývoj již od narození. Sledují se reakce po očkování, kde je kladen důraz hlavně na reakce na živé vakcíny.

Klinické projevy imunodeficiencí bývají velmi různorodé. Základním rysem jsou opakované infekce, které se poté liší podle typu imunodeficiencie a stavu konkrétního pacienta. U humorálních imunodeficiencí převažují závažné a opakované infekce horních a dolních cest dýchacích bakteriální povahy. Klinický obraz může být pozměněn také komplikacemi v podobě autoimunitních onemocnění.

Laboratorní vyšetření se u humorálních imunodeficiencí zaměřují na stanovení hladiny volných imunoglobulinů. Orientačně lze provést vyšetření pomocí elektroforézy séra. Dále se stanovují hodnoty u jednotlivých izotypů IgG, IgA a IgM. Také se testuje schopnost tvorby protilátek po stimulaci specifickým antigenem. Dalším důležitým vyšetřením je stanovení počtu lymfocytů, popřípadě jejich subpopulací. U onemocnění CVID může být celkový počet B-lymfocytů snížen nebo dosahovat normální hodnoty. Většinou se poté liší od zdravého jedince v zastoupení některých subpopulací

B-lymfocytů, které se stanovují pomocí specifického panelu na průtokovém cytometru (13; 15).

V poslední době byly nalezeny některé genetické změny, které mají vliv na vznik CVID. Jsou to například mutace kostimulační molekuly ICOS exprimované aktivovanými T-lymfocyty, molekuly CD19 nebo receptorů z rodiny TNF, na které se váže ligand BAFF (B-cell activating factor). Popsané molekuly jsou nezbytné při rozpoznání antigenu B-lymfocyttem a spuštění diferenciaci B-lymfocytu s pomocí T-lymfocytu. Genetické poruchy těchto molekul se dědí autosomálně recesivně a mohou být odhaleny genetickým vyšetřením pomocí metod molekulárně biologických metod (7; 12; 14).

6.3 Léčba

Onemocnění CVID není léčeno přímo jako takové. Je však snaha o zmírnění jeho projevů, zejména omezením opakujících se zánětů a zabránění ireverzibilního poškození orgánů. Za tímto účelem jsou používány intravenózní gamaglobuliny (INVG), které zvyšují hladinu sérových IgG, a léčba antibiotiky (ATB).

Gamaglobulinové preparáty jsou vyráběny z poolu plazem od tisíce zdravých dárců, což zaručuje široké spektrum specificit protilátek. Mnohonásobnou kontrolou a pasterizací je zaručována vysoká bezpečnost těchto preparátů. Poločas podávání INVG je 18 až 32 dnů. Po podání dochází k rychlému poklesu sérové hladiny IgG, z důvodu jejich přesunu do extravaskulární tekutiny. Rovnováhy mezi jejich koncentrací v intra- a extravaskulární tekutině je dosaženo do dvou dnů po podání preparátu. Z tohoto důvodu se doporučuje na počátku léčby podávat INVG pravidelně v kratších intervalech, například týdně. Lépe se tak dosáhne vyrovnané hladiny sérových imunoglobulinů (13).

6.4 Systémy klasifikace pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí

Ve snaze o zařazení CVID pacientů s podobnými klinickými příznaky do skupin vzniklo hned několik klasifikačních schémat, které se opírají o vyšetření B-lymfocytárních povrchových markerů.

6.4.1 Freiburská klasifikace

Tuto klasifikaci vytvořil ve Freiburgu v roce 2002 Warnatz a kol. Je založena na sledování subpopulací nesoucích povrchové znaky CD19, CD27, CD21, IgM a IgD. Podle zastoupení populací izotypově přepnutých paměťových B-lymfocytů (SWMB) dělí pacienty do tří skupin. Do skupiny I patří pacienti se SWMB < 0,4% všech B-lymfocytů. Tato skupina se dále dělí podle počtu CD21^{low} B-lymfocytů na Ia pro CD21^{low} > 20% a Ib CD21^{low} ≤ 20%. Do skupiny II se řadí pacienti se SWMB ≥ 0,4% všech B-lymfocytů. Skupinu III tvoří pacienti s celkovým zastoupením B-lymfocytů < 1% všech periferních lymfocytů.

6.4.2 Pařížská klasifikace

Tato klasifikace dělí pacienty na základě počtů buněk exprimujících povrchové znaky CD27 a IgD do tří skupin MB0, MB1 a MB2. Skupinu MB0 tvoří pacienti se sníženým počtem B-lymfocytů marginální zóny (CD27+IgD+) a SWMB (CD27+IgD-). Do MB1 skupiny patří pacienti se sníženým počtem pouze SWMB a MB2 obsahuje pacienty, kteří mají obě skupiny sledovaných buněk srovnatelné se zdravou populací.

6.4.3 Klasifikace EUROclass

Nejnovější klasifikace vznikla v roce 2008 a zahrnuje kritéria obou předchozích klasifikací. Nejprve dělí pacienty s CVID na dvě skupiny B⁻ (≤ 1% CD19⁺ buněk) a B⁺ (> 1% CD19⁺ buněk) podle celkového počtu B-lymfocytů. Dle počtu izotypově přepnutých paměťových B-lymfocytů (CD27⁺IgM⁻IgD⁻) se skupina B⁺ dále dělí na smB⁻ (≤ 2% SWMB z B-lymfocytů) a smB⁺ (> 2% SWMB z B-lymfocytů). Skupina smB⁻ se může rozdělit také podle zastoupení tranzientních B-lymfocytů na smB⁻Tr^{hi} (> 9% tranzientních buněk) a smB⁻Tr^{norm} (<9% tranzientních buněk). Obě skupiny smB⁻ a smB⁺ se ještě zvláště člení dle znaku CD21^{low}. Vznikají skupiny smB⁺CD21^{lo} a smB⁻CD21^{lo} při přítomnosti > 10% CD21^{low} B-lymfocytů a skupiny smB⁺CD21^{norm} a smB⁻CD21^{norm} při < 10% CD21^{low} B-lymfocytů (3; 14).

7 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie je metoda analyzující vlastnosti buněk nebo jiných částic, které prochází paprskem světla v úzkém proudu kapaliny. Dnešní cytometry se vyznačují vysokou rychlostí a přesností měření. Běžné cytometry dokáží měřit 5 000 buněk za sekundu. Metoda své uplatnění našla u řady klinických a biologických oborů v diagnostice i ve výzkumu. V klinické praxi je používána nejčastěji k polychromatické imunofenotypizaci leukocytů periferní krve, ale i buněk izolovaných z jiných tělních tekutin. Cytometr se skládá ze tří základních navzájem propojených systémů: fluidiky, optiky a elektroniky viz. obrázek 2 (15; 17; 20).

7.1 Průběh měření průtokovým cytometrem

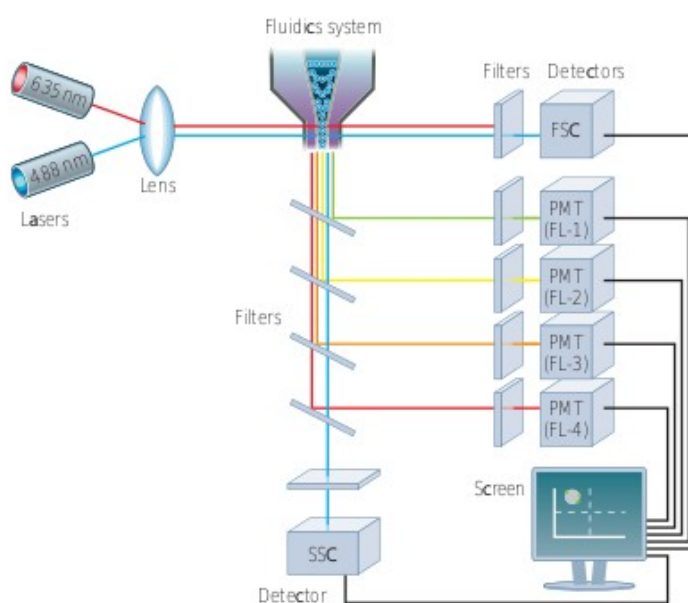
Měření začíná po nasátí suspenze buněk vzorku do cytometru, které je pro přesné měření třeba přivádět k světelnému paprsku jednu po druhé. To zajišťuje fluidní systém, který ze suspenze vzorku vytvoří jednu linii seřazených buněk. Aby toho bylo dosaženo, využívá se laminárně proudící nosné kapaliny, která obklopuje proud vzorku. Nosná kapalina unáší částice vzorku a udržuje je uprostřed proudu. Tento proces se nazývá hydrodynamická fokusace. Tlak vzorku a nosné kapaliny je odlišný. Pro zvýšení rychlosti průtoku vzorku se nastavuje vyšší tlak vzorku. To způsobí rozšíření centrálního toku a možné odchýlení buněk od středové linie průtoku. Při měření pak může docházet k mírným nepřesnostem.

Každá částice měřeného vzorku poté prochází jedním nebo více laserovými paprsky. U současných cytometrů se využívá modrého (488 nm), červeného (635 nm) a fialového (405 nm) laseru. Vlastnosti ozáření buňky jsou získány díky rozptylu světla nebo fluorescenci. Cytometr má dva různé detektory pro zachycení rozptýleného světla. Jeden je umístěn v přímé linii zdroje světla, tzv. Forward-scatter (FSC) a druhý Side-scatter (SSC) detekuje paprsky rozptýleného světla přibližně v úhlu 90° od přímé linie. Informace získané pomocí FSC vypovídají o povrchu a velikosti buňky, zatímco SSC poskytuje informace o granulárním obsahu buňky.

Buňky, na které byly předem navázány látky se schopností fluorescence, emitují po ozáření detekčním paprskem světlo o určité vlnové délce. Při použití více

fluorochromů zároveň je emitované světlo vícespektrální. Pro detekci je toto světlo rozděleno řadou filtrů a zrcadel na jednotlivé detektory. Fotony dopadající na detektory, což jsou polovodičové fotodiody či fotonásobiče, jsou zaznamenány v podobě elektrických impulzů. Takto zaznamenané signály jsou poté převedeny na číselná digitální data, která jsou vyhodnocována a zobrazována v počítači nejčastěji v podobě jedno či více parametrových grafů (17 - 20).

Obrázek 2: Schéma systému průtokového cytometru (18)



PRAKTICKÁ ČÁST

8 METODIKA

Praktická část obsahuje popis zpracování vzorků, jejich přípravu pomocí diagnostického kitu Duraclone® a kroky vedoucí k získání požadovaných dat pomocí průtokového cytometru. Dále jsou zde shrnuty výsledky a jejich statistické vyhodnocení.

Cílem mé práce je porovnat zastoupení jednotlivých subpopulací B-lymfocytů u pacientů s COVID a zjistit, zda se liší jejich rozložení mezi dospělými a dětmi. Identifikace jednotlivých subpopulací je provedena analýzou na průtokovém cytometru po předchozím označení povrchových znaků typických pro dané subpopulace.

Výzkumné otázky:

Je rozdíl v procentuálním zastoupení jednotlivých subpopulací B-lymfocytů u dětí a dospělých významný?

9 POSTUP ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ

Vzorky byly získány od pacientů Ústavu imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Plzeň. U těchto pacientů byla již dříve diagnostikována běžná variabilní imunodeficiencie. Vzorky použité k testování byly nabrány v rámci kontroly stavu pacientů.

Pro stanovení subpopulací B-lymfocytů byla použita periferní krev odebraná do antikoagulačního činidla heparinu. Nejprve bylo 500ul plné krve promyto a resuspendováno PBS pufrem. Ze vzorku tak byly odstraněny volné IgM a IgD. Poté jsme nepipetovali 100ul plné krve do zkumavky s vysušenými protilátkami Duraclone®.

Zkumavka obsahuje vysušené monoklonální protilátky proti osmi povrchovým antigenům vyskytujících se na povrchu B-lymfocytů. Jsou to následující protilátky s navázanými fluorescenčními barvivy: anti-IgD značený fluoresceinem (FITC), anti-CD21 s Phycoerytrinem (PE), anti-CD19 obarvený Phycoerytrin – Texas Red (ECD), anti-CD27 s Phycoerythrin – Cyanine 7 (PC7), anti-CD24 s Allophycocyanin (APC), anti-CD38 s navázaným Allophycocyanin – Alexa Fluor 750 (APC-A750), anti-IgM s Pacific Blue, anti-CD45 obarvený Krome Orange. Tabulka 1 shrnuje použité protilátky s navázanými fluorochromy a jejich maxima excitačního a emisního spektra fluorescence (21).

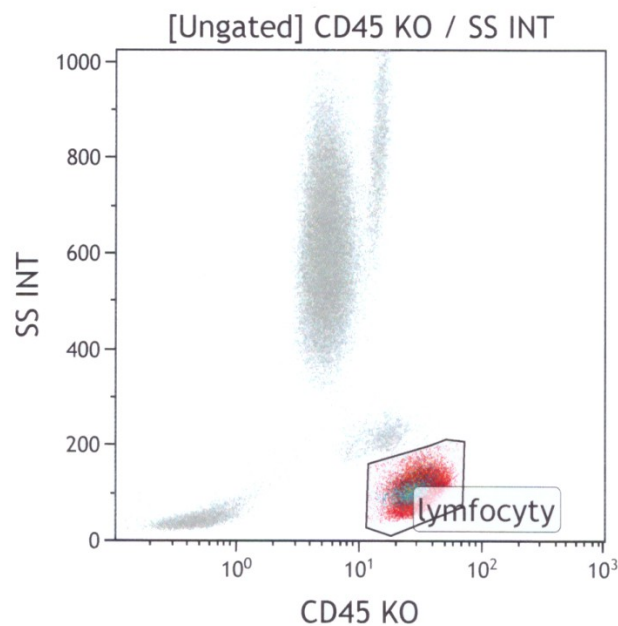
Tabulka 1: Použité fluorochromy pro jednotlivé znaky a jejich charakteristické vlnové délky

Znak	IgD	CD21	CD19	CD27	CD24	CD38	IgM	CD45
Fluorochrom	FITC	PE	ECD	PC7	APC	APC-A750	Pacific Blue	Krome Orange
Excitace [nm]	488	488	488	488	633	633	405	405
Emise [nm]	523	575	613	767	650	720	455	528

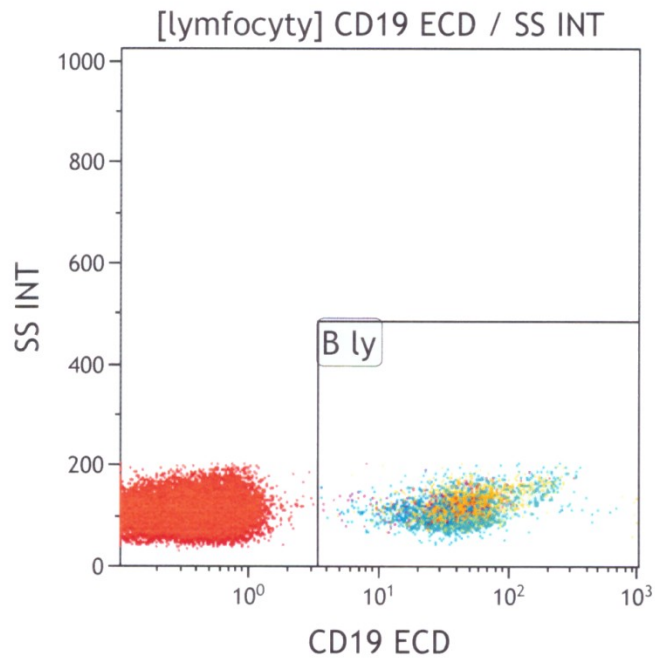
Promytá krev s přidaným mixem protilátek se promíchá na vortexu a inkubuje se 15 minut bez přístupu světla při laboratorní teplotě. Po této době je do směsi přidáno lyzační činidlo (Optilyse C, BeckmannCoulter, USA) a nechá se inkubovat dalších

15 minut na temném místě. Lyzační roztok napomáhá k rozpadu tedy lýze červených krvinek. V dalším kroku je vzorek promytý pomocí PBS. Tento postup odstraní zbytky nenavázaných protilátek a částí zlyzovaných krvinek. Nakonec je vzorek resuspendován ve 400ul nosného roztoku (BeckmannCoulter, USA). Takto připravená suspenze leukocytů s označenými povrchovými markery byla analyzována na deseti kanálovém průtokovém cytometru Navios firmy Beckman Coulter. Získaná data byla poté zobrazena v programu Kaluza a pro získání informací o požadovaných populacích byly použita gatovací strategie na obrázcích 1-5.

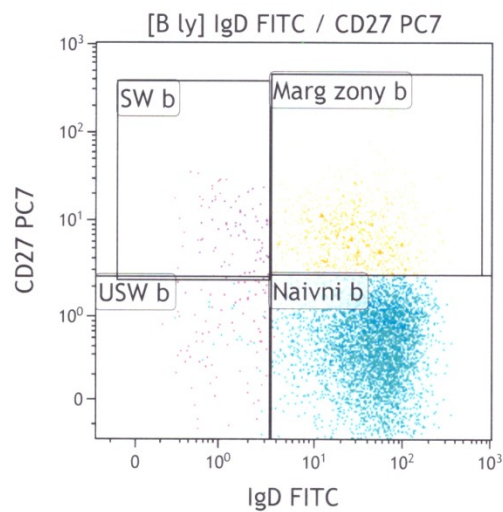
Obrázek 3: *Populace lymfocytů vybraná podle přítomnosti znaku CD45 a kolmého rozptylu*



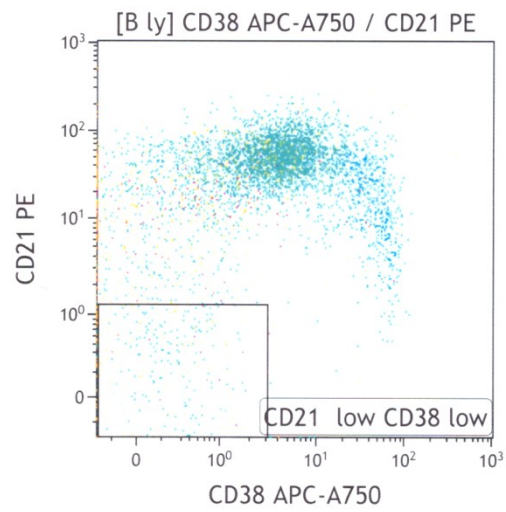
Obrázek 4: *Populace B-lymfocytů vybraná ze všech lymfocytů, které byly označeny v předešlém obrázku, podle exprese znaku CD19*



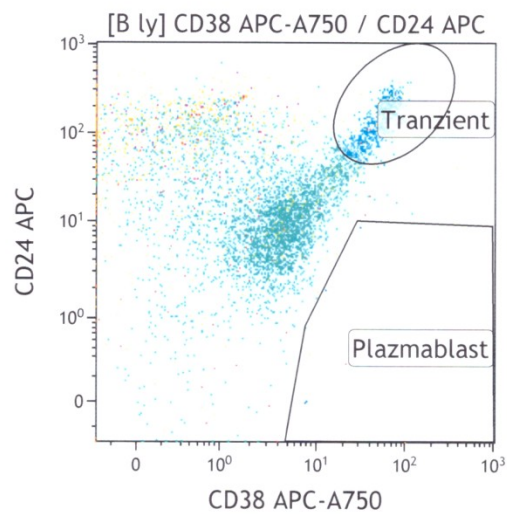
Obrázek 5: *Rozdělení B-lymfocytů podle exprese znaků CD27 a IgD na čtyři následující subpopulace. USWb - izotypově nepřepnuté paměťové B-lymfocyty (CD27-IgD-), SWb - izotypově přepnuté paměťové B-lymfocyty (CD27+IgD-), naivní B-lymfocyty (CD27-IgD+) a B-lymfocyty marginální zóny (CD27+IgD+)*



Obrázek 6: *Populace B-lymfocytů CD21lowCD38low (CD21-CD38-)*



Obrázek 7: *Populace plazmablastů (CD24-CD38+) a tranzientních B-lymfocytů (CD24+CD38+) vybrané z B-lymfocytů podle exprese znaků CD24 a CD38*



10 VÝSLEDKY

Měření bylo uskutečněno na vzorcích od 37 pacientů s diagnostikovanou COVID. Z toho bylo 29 dospělých pacientů ve věkovém rozmezí od 15 do 79 let a 8 dětí ve věku od 0 do 7 let. Informace o procentuálním zastoupení jednotlivých subpopulací byly zpracovány programem MATLAB a jsou uvedeny v následujících grafech 1-8. V každém grafu jsou vždy vedle sebe zobrazena naměřená data dané populace buněk u dětí a u dospělých. Červená linie označuje hodnotu mediánu a černé linie na okrajích grafu jsou maxima a minima souboru dat.

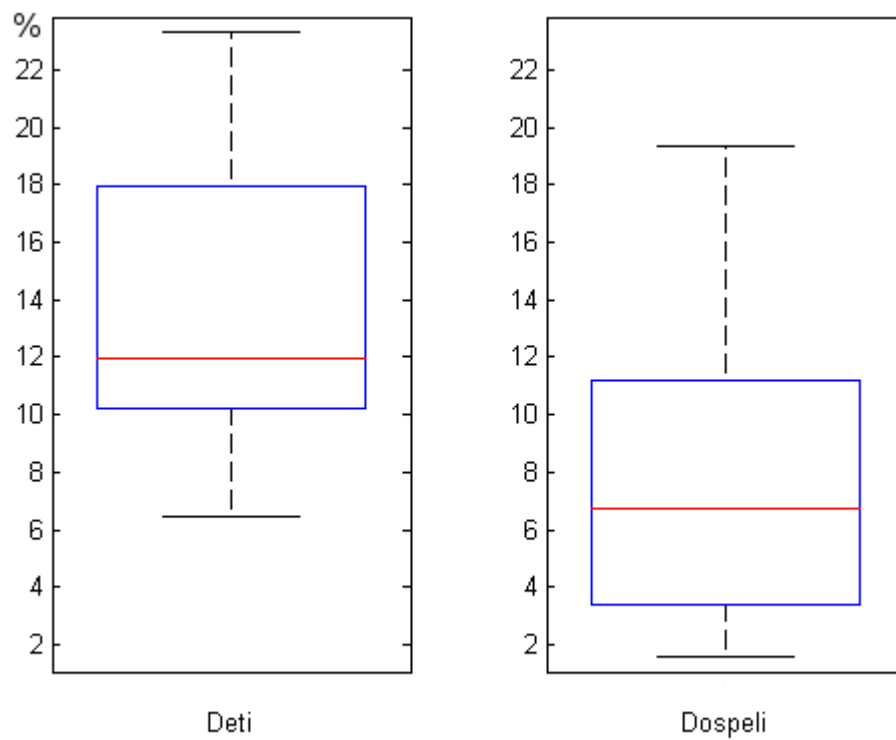
Z naměřeného procentuálního zastoupení buněk u každé subpopulace byly vypočteny mediány u dětí a u dospělých a byla porovnána jejich rozdílnost (tabulka 2). Statistická významnost rozdílu v zastoupení jednotlivých subpopulací u dětí a dospělých byla určena Wilcoxonovým neparametrickým testem. Tyto výpočty byly také provedeny v programu MATLAB.

Tabulka 2: Mediány stanovených subpopulací B-lymfocytů

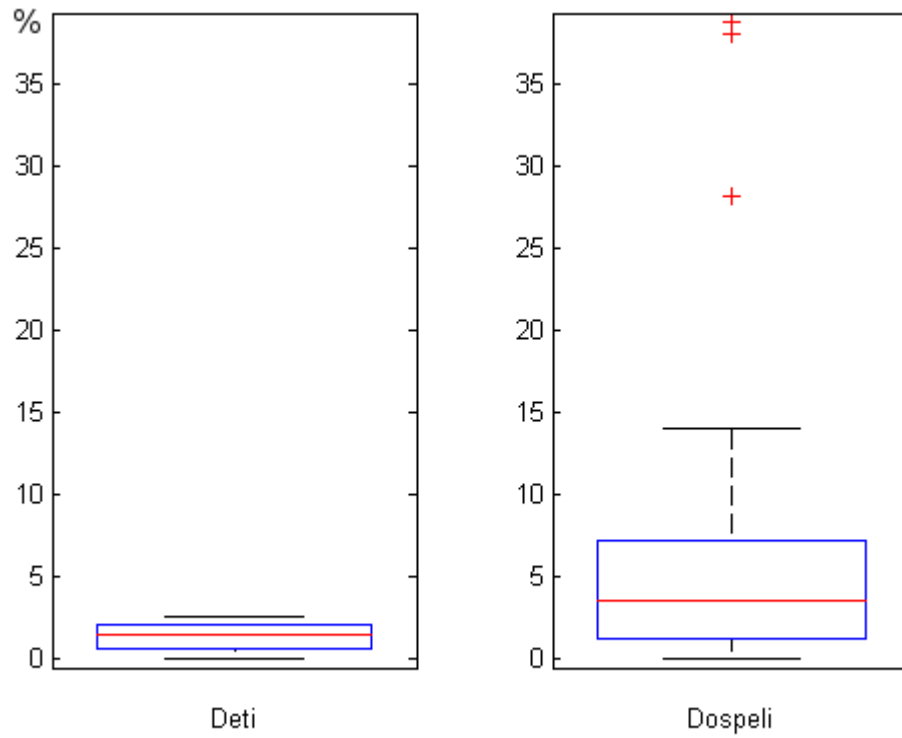
Medián [%]	Děti	Dospělý	Rozdíl
B-lymfocyty	11,97	6,72	5,25
CD21lowCD38low	1,455	3,53	2,075
Naivní B-lym.	84,96	81,74	3,22
Tranzientní B-lym.	14,955	7,65	7,305
Marginální zóny	5,845	10,6	4,755
Plazmablasty	2,14	0,3	1,84
USWMB	2,05	3,04	0,99
SWMB	6,43	3,7	2,73

Vysvětlivky: USWMB - izotypově nepřepnuté paměťové B-lymfocyty, SWMB-izotypově přepnuté B-lymfocyty

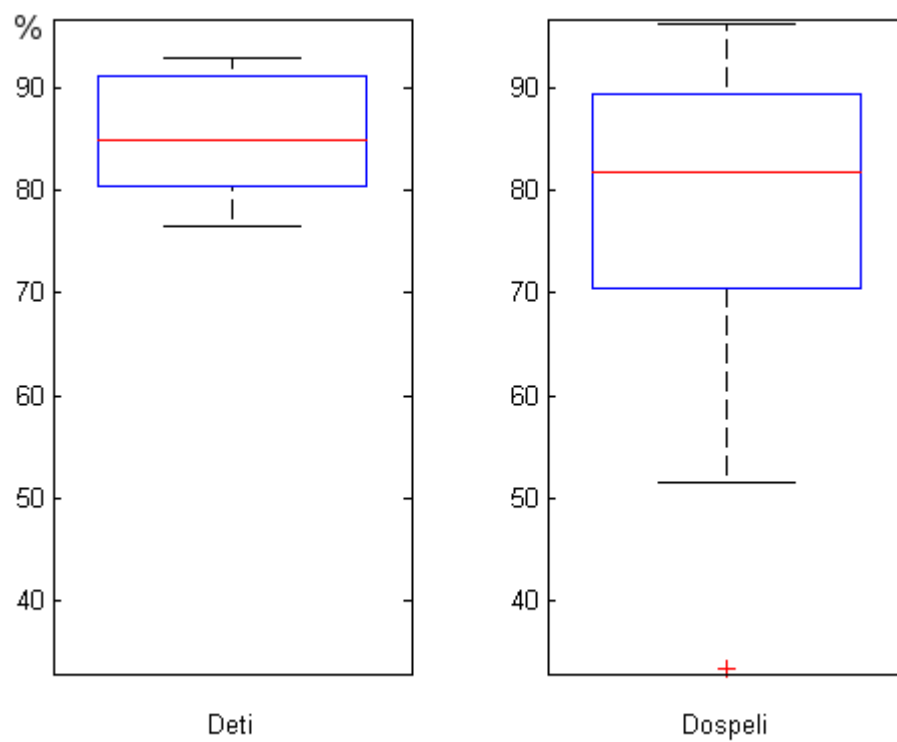
Graf 1: Procentuální zastoupení populace B-lymfocytů (CD19+). Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 5,25% ($p < 0,01$).



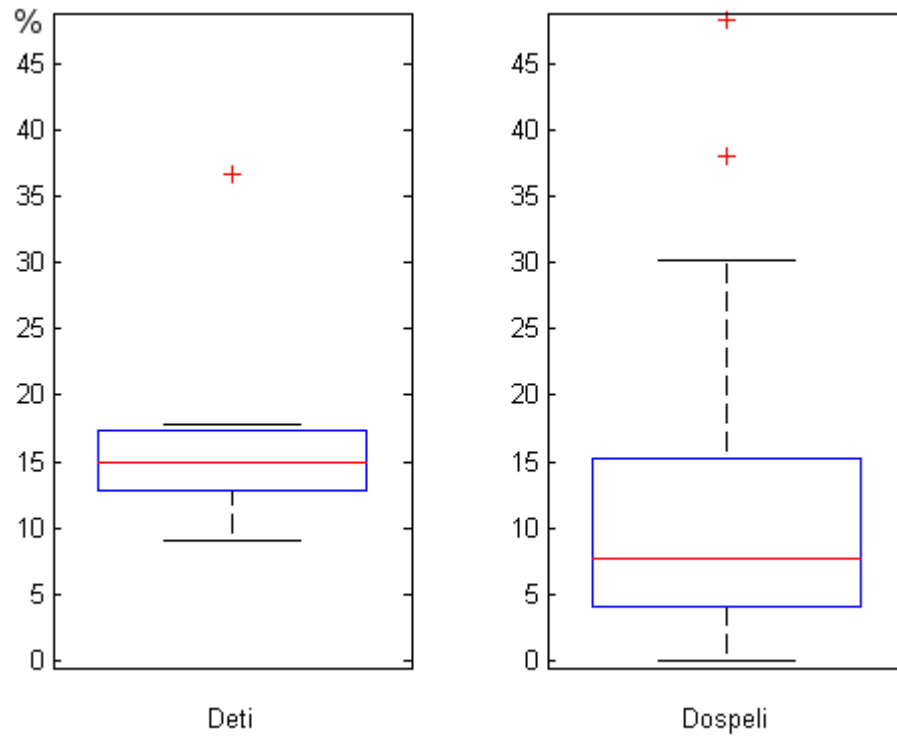
Graf 2: Procentuální zastoupení populace $CD21^{low}CD38^{low}$ B-lymfocytů ($CD19^{+}, CD21^{-}, CD38^{-}$). Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 2,075 ($p < 0,05$).



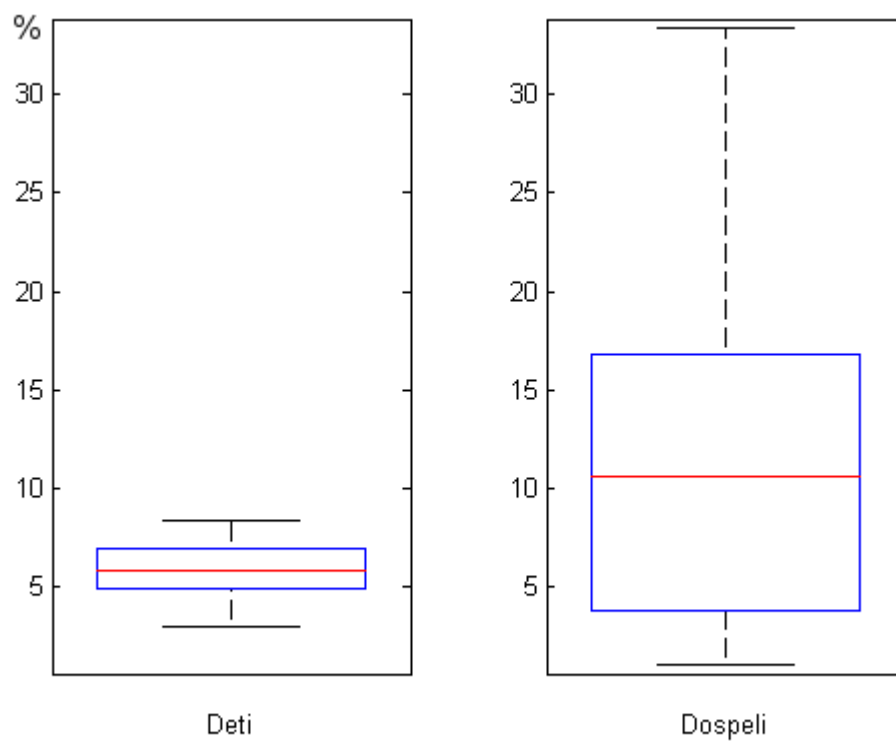
Graf 3: Procentuální zastoupení populace naivních B-lymfocytů ($CD19^+, CD27^-, IgD^+$). Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 3,22 ($p = 0,3660$).



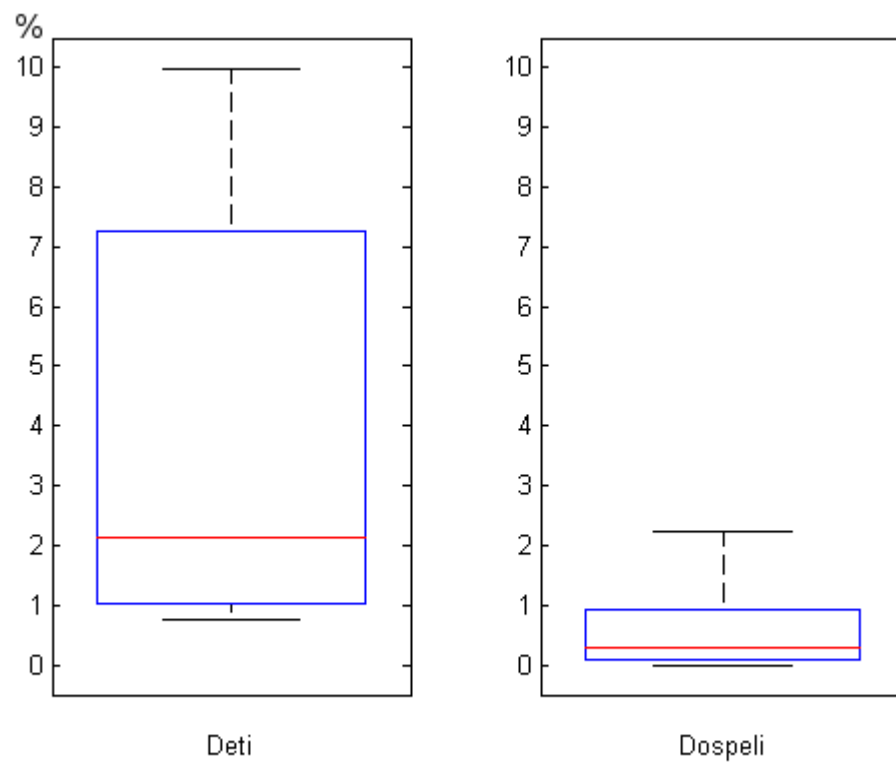
Graf 4: Procentuální zastoupení populace tranzientních B-lymfocytů (CD19+, CD24+, CD38++). Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 7,305% ($p < 0,05$).



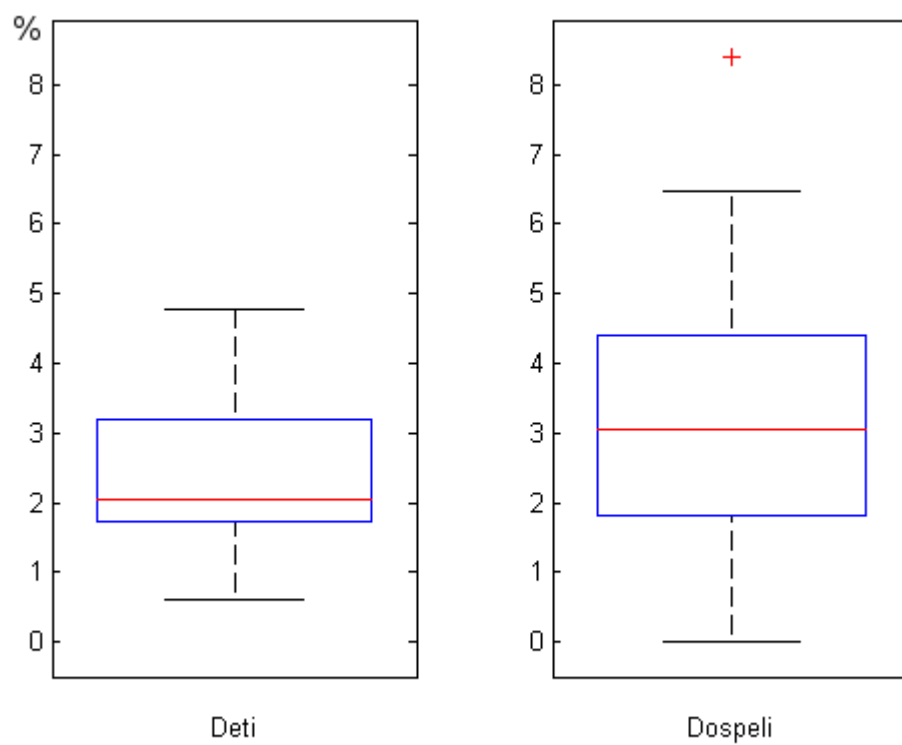
Graf 5: Procentuální zastoupení populace B-lymfocytů marginální zóny (CD19+,CD27+,IgD+). Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 4,755% ($p = 0,1351$).



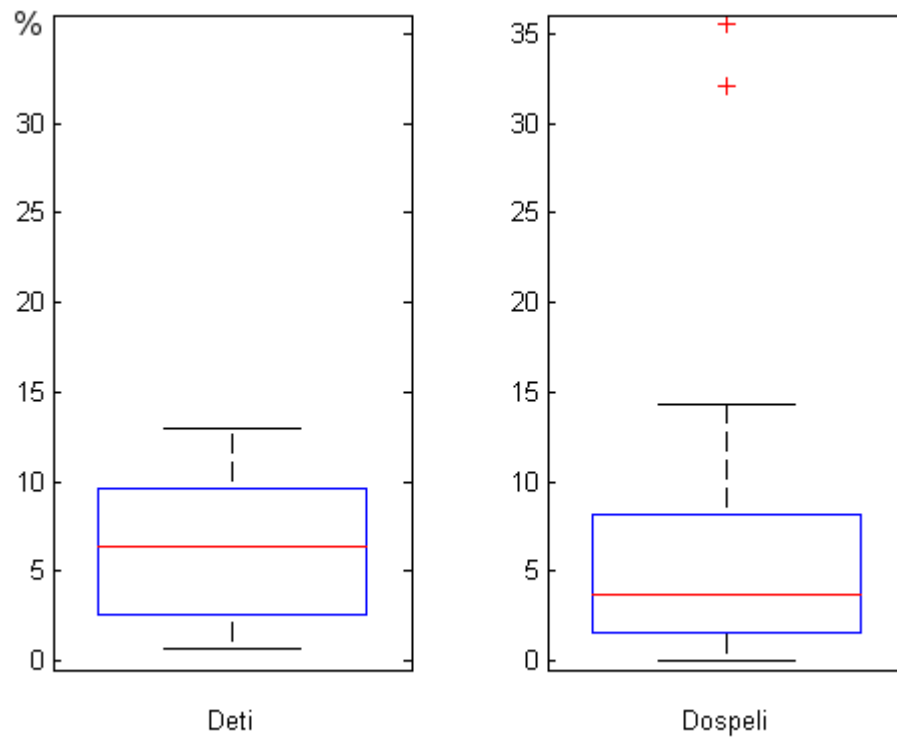
Graf 6: Procentuální zastoupení populace plazmablastů (CD19+,CD24-,CD38+).
Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 1,84% ($p < 0,001$).



Graf 7: Procentuální zastoupení populace izotypově nepřepnutých paměťových B-lymfocytů ($CD19^+, IgD^+, CD27^-$). Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 0,99% ($p = 0,3468$).



Graf 8: Procentuální zastoupení populace izotypově přepnutých paměťových B-lymfocytů (CD19+,IgD-,CD27+). Rozdíl mediánů dětí a dospělých je 2,73% ($p = 0,3282$).



11 DISKUZE

Imunofenotypizace subpopulací B-lymfocytů pomocí průtokové cytometrie je stále více používaná metoda ke klasifikaci pacientů s CVID do skupin vytvořených podle klinických projevů a prognózy onemocnění. Systémy klasifikace byly vytvořeny převážně vyhodnocením dat naměřených ze vzorků dospělých pacientů. V dětském věku jsou však hladiny jednotlivých populací B-lymfocytů odlišné. Po narození probíhá dozrávání imunitního systému a podléhá tak výrazným změnám. Počty lymfocytů se v jednotlivých obdobích výrazně liší. Největší změny v subpopulacích B-lymfocytů probíhají do věku dvou let (22).

To vyplývá i z práce Schatorjé a kol. zabývající se stanovením referenčních hodnot pro jednotlivé subpopulace lymfocytů v několika různých věkových rozmezích. Bylo zde vyšetřeno zastoupení subpopulací B lymfocytů u zdravých dětí ve věku před narozením až do dospělosti. Bylo vytvořeno deset věkových skupin. Každá skupina obsahovala mezi 10 až 21 testovaných osob. Pro zjištění referenčních hodnot z takto malých souborů dat byla použita metoda tolerančních intervalů. Referenční hodnoty pro populace tranzientních, izotypově přesmyknutých paměťových a CD21lowCD38low buněk byly porovnány s cut-off hodnotou používanou v EUROclass systému klasifikace u těchto populací. Bylo ukázáno, že zastoupení Blymfocytů v dospělosti a v dětském věku se značně liší. Také bylo uvedeno, že podle EUROclass systému klasifikace bylo 40 z 97 zdravých dětí vyšetřovaných v této studii zařazeno do skupiny s nejvyšším rizikem komplikací (22).

Tranzientní B-lymfocyty jako nezralé lymfocyty jsou prvním vývojovým stadiem nacházejícím se v periferní krvi. Zastoupení tranzientních B-lymfocytů v krvi s věkem klesá. Nejvyšší počet je sledován v pupečnickové krvi. V příspěvku Chalupová a kol. popisují autoři vyšetření počtů tranzientních buněk u 53 dětí ve věku od 1 měsíce po 13 let pomocí osmibarevného panelu. Výsledky ukázaly vyšší zastoupení transientních buněk především v prvních měsících věku dítěte. Také bylo prokázáno, že s věkem dítěte počet tranzientních buněk klesá. Námi naměřené hodnoty u této populace B-lymfocytů vykazují podobné vlastnosti. Snížení počtu tranzientních buněk u dospělých oproti dětem je statisticky významný ($p < 0,05$) (23).

Výrazné rozdíly mezi dospělou populací a dětmi byly zjištěny také v článku Babjáková a spol. Stanovení bylo provedeno u zdravých osob a pacientů s COVID pomocí osmibarevného diagnostického kitu Duraclone®. U dětí byly pozorovány vyšší hladiny méně vyzrálých B-lymfocytů a plazmatických buněk. Rozdíl mediánů u tranzientních buněk (CD19+,CD24+,CD38++) byl 5,21% ($p < 0,01$) a u naivních B-lymfocytů (CD19+,CD27-,IgD+) 18,18% ($p < 0,01$).

U dalších populací B-lymfocytů byly rozdíly mediánů u dětí a dospělých následující: B-lymfocyty marginální zóny (CD19+,CD27+,IgD+) 7,19% ($p < 0,01$), izotypově nepřepnuté paměťové B-lymfocyty (CD19+,IgD+,CD27-) 2,15% ($p < 0,01$), izotypově přepnuté paměťové B-lymfocyty (CD19+,IgD-,CD27+) 8,96% ($p < 0,01$), CD21low B-lymfocyty (CD19+,CD21-,CD38-) 1,4% ($p < 0,05$) a plazmablasty (CD19+,CD24-,CD38+) 0,01% ($p = 0,6741$) (24).

Námi zjištěné výsledky se s těmito hodnotami lišily. Pouze u tranzientních a CD21lowCD38low populací se naše hodnoty částečně schodovaly s touto studií. Měření jsme prováděli pouze u pacientů s COVID. V uvedeném článku byly ve vyšetřované skupině zahrnuty i zdravé osoby. Skupina osob se také mohla od námi testované lišit svou velikostí a věkovým složením. U dospělých pacientů jsme měli poměrně široké zastoupení subjektů, ale testovaných dětí bylo pouze osm s průměrným věkem 2,5 roku, přičemž pět dětí bylo ve věku do dvou let.

Díky stanoveným výsledkům lze odpovědět na dříve položenou výzkumnou otázku:

Je rozdíl v procentuálním zastoupení jednotlivých subpopulací B-lymfocytů u dětí a dospělých významný?

Odpověď: Pouze u poloviny stanovovaných subpopulací byl zjištěný rozdíl statisticky významný. U ostatních populací se rozdíl v jejich zastoupení u dětí a dospělých ukázal jako nevýznamný. Významný rozdíl byl pozorován u všech B-lymfocytů, CD21lowCD38low, plazmablastů a tranzientních B-lymfocytů.

ZÁVĚR

Imunitní systém dítěte není stejný jako u dospělého člověka. Všechny jeho složky se po porodu vyvíjejí a se zvyšujícím se věkem se mění i procentuální zastoupení jednotlivých subpopulací B-lymfocytů. Každé věkové období má referenční hodnoty. Ukazuje se také, že mezi dětmi a dospělými s COVID jsou mezi některými populacemi lymfocytů významné rozdíly. Klasifikace vyvinuté pro dospělé tedy nemůžou být jednoduše přizpůsobeny k použití pro děti. Je třeba uskutečnit rozsáhlou studii a vytvořit samostatnou klasifikaci spolehlivě aplikovatelnou u dětských pacientů.

LITERATURA A PRAMENY

1. **HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ.** *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
2. **JÍLEK, Petr.** *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.
3. **KÁČERIKOVÁ, Lucie.** *Laboratorní diagnostika humorálních imunodeficiencí*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Mgr. Jana Nechvátalová.
4. **DOAN, Thao et al.** *Immunology. 2nd ed.* Philadelphia: Lippincott Williams, c2013, v, 376 p. Lippincott's illustrated reviews. ISBN 978-1-4511-0937-5.
5. **ABBAS, Abul K., Andrew H. LICHTMAN a Shiv PILLAI.** *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Fourth edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014. ISBN 978-1-4557-0707-2.
6. **POLÁK, Milan.** *Imunofenotypové rozdíly v B-lymfocytárních populacích „non-memory” B-lymfocytů u zdravých kontrol a pacientů s imunopatologiemi*. Praha, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce RNDr. Šárka Růžičková, Ph.D.
7. **VLKOVÁ, Marcela.** *Flowcytometrická analýza T a B lymfocytárních subpopulací u pacientů s humorálními imunodeficiencemi*. Brno, 2008. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
8. **NECHVÁTALOVÁ, Jana.** *Flowcytometrická analýza periferních lymfocytů nemocných s primárními poruchami tvorby protilátek*. Brno, 2015. Dizertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
9. **SUCHÁ, Renata.** *Změny v distribuci subpopulací B lymfocytů u pacientů s Crohnovou chorobou před a po biologické léčbě*. Praha, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RNDr. Šárka Růžičková, Ph.D.
10. **BD BIOSCIENCES.** *Human and Mouse CD Marker Handbook* [online]. San Jose: Becton, Dickinson and Company, 2010 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: https://wwwbdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf
11. **DONOVAN, J. A. a G. A. KORETZKY.** CD45 and the immune response. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1993, **4**(4), 976-985. ISSN 1046-6673.
12. **HUMLOVÁ, Zuzana.** *Imunopatologické stavy v kazuistikách*. Praha: Mladá fronta, 2016. Aeskulap. ISBN 978-80-204-4124-9.
13. **KOPECKÝ, Otakar.** *Běžná variabilní imunodeficience*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2006, 99 s. Imunologie. ISBN 80-862-2593-3.

14. **CHOVANCOVÁ, Zita.** *Funkční analýza protilátkové odpovědi u pacientů s běžnou variabilní imunodeficiencí (CVID).* Brno, 2011. Dizertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
15. **BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK.** *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2011, 164 s., [4] s. obr. příl. ISBN 978-80-247-3533-7.
16. **LITZMAN, Jiří, a další.** *Základy vyšetření v klinické imunologii.* Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4227-8.
17. **VAVŘÍK, Marek.** *Využití průtokové cytometrie pro studium buněk obranného systému mléčné žlázy skotu.* Brno, 2012. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně.
18. **RAHMAN, Misha.** *Introduction to Flow Cytometry* [online]. Serotec, 2006 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.ufjf.br/immunologia/files/2010/03/Flow-Cytometry-introduction.pdf>
19. **BD BIOSCIENCES.** *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide* [online]. San Jose: Becton, Dickinson and Company, 2000 [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: http://medicine.yale.edu/labmed/cellsorter/start/Introduction_66019_284_10028.pdf
20. **ZICHÁČKOVÁ, Ivana.** *Možnosti využití průtokové cytometrie ke stanovení antimikrobiálních účinků.* Zlín, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
21. **BACKMAN COULTER.** *DuraClone IM B cells.* Bangalore: Backman Coulter, Inc., 2014.
22. **SCHATORJÉ, E. J. H., a kol.** *Age-matched Reference Values for B-lymphocyte Subpopulations and CVID Classifications in Children.* *Scandinavian Journal of Immunology.* 2011, 74(5), 502-510. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2011.02609.x. ISSN 03009475. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2011.02609.x>
23. **CHALUPOVÁ, A., P. VODÁČKOVÁ a M. VLKOVÁ.** *Transientní B-lymfocyty v dětském věku* [online]. Olomouc: Solen, 2014 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: http://www.solen.cz/incpdfs/inf-990000-4700_10_4.pdf
24. **BABJÁKOVÁ, L., a další.** *Stanovení subpopulací B-lymfocytů s využitím protilátek Duraclone.* *ALERGIE.* 2016, 2016(18), 83-84. ISSN 1212-3536.

SEZNAM ZKRATEK

ATB	antibiotika
APC	Allophycocyanin
APC-A750	Allophycocyanin – Alexa Fluor 750
BAFF	B-cell activating factor
BCR	B-buněčný receptor
CD	Cluster designation nebo cluster of differentiation
CVID	Běžná variabilní imunodeficiencie (Common variable immunodeficiency)
D	diversita
ECD	Phycoerythrin – Texas Red
FCS	Forward-scatter
FDC	folikulární dendritické buňky
FITC	anti-IgD značený fluoresceinem
GC	germinální centrum
H	těžký řetězec
ICOS	inducible costimulator
Ig	Imunoglobulin
IL	interleukin
INVG	intravenózní gamaglobuliny
J	joining
L	lehký řetězec (light)
LPS	lipopolysacharid
MAb	monoklonální protilátky (monoclonal antibody)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PC7	Phycoerythrin – Cyanine 7
PE	Phycoerythrinem
Pre-BCR	Pre-B-receptor
SSC	Side-scatter
SWB, SWMB	izotypově přepnutý paměťový B-lymfocyt
T1, T2	tranzientní buňky

TD	T-dependentní
TH	T pomocné lymfocyty
TI	T-independentní
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
USWB, USWMB	izotopově nepřepnutý paměťový B-lymfocyt
V	variabilita

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: *Použité fluorochromy pro jednotlivé znaky a jejich charakteristické vlnové délky*

Tabulka 2: *Mediány stanovených subpopulací B-lymfocytů*

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: *Procentuální zastoupení populace B-lymfocytů (CD19+)*

Graf 2: *Procentuální zastoupení populace CD21lowCD38low B-lymfocytů*

Graf 3: *Procentuální zastoupení populace naivních B-lymfocytů*

Graf 4: *Procentuální zastoupení populace tranzientních B-lymfocytů*

Graf 5: *Procentuální zastoupení populace B-lymfocytů marginální zóny*

Graf 6: *Procentuální zastoupení populace plazmablastů*

Graf 7: *Procentuální zastoupení populace izotypově nepřepnutých paměťových B-lymfocytů*

Graf 8: *Procentuální zastoupení populace izotypově přepnutých paměťových B-lymfocytů*

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: *Charakteristické rysy struktur jednotlivých izotypů protilátek (1)*

Obrázek 2: *Schéma systému průtokového cytometru*

Obrázek 3: *Populace lymfocytů vybraná podle přítomnosti znaku CD45 a kolmého rozptylu*

Obrázek 4: *Populace B-lymfocytů*

Obrázek 5: *Rozdělení B-lymfocytů podle exprese znaků CD27 a IgD*

Obrázek 6: *Populace B-lymfocytů CD21^{low}CD38^{low} (CD21-CD38-)*

Obrázek 7: *Populace plazmablastů a tranzientních B-lymfocytů podle exprese CD24 a CD38*