

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Magdaléna Krausová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**STANOVENÍ AKTIVAČNÍCH MARKERŮ CD25 A CD69
LYMFOCYTŮ KULTIVOVANÝCH V PŘÍTOMNOSTI
FIBROBLASTŮ NEBO MEZENCHYMOVÝCH
KMENOVÝCH BUNĚK**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2016

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

V Plzni dne

.....

Magdaléna Krausová

Děkuji Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení bakalářské práce, poskytování cenných odborných rad, podnětů a materiálních podkladů, které mi pomohly při zpracování této bakalářské práce.

Anotace

Příjmení a jméno:	Krausová Magdaléna
Katedra:	Katedra teoretických oborů
Název práce:	Stanovení aktivačních markerů CD25 a CD69 lymfocytů kultivovaných v přítomnosti fibroblastů nebo mezenchymových kmenových buněk
Vedoucí práce:	Ing. Tomáš Vlas
Počet stran:	číslované - 48 nečíslované - 11
Počet příloh:	1
Počet titulů použité literatury:	41
Klíčová slova:	CD markery - fibroblasty – MSC- mitogen - průtoková cytometrie - T-lymfocyty – test blastické transformace

Souhrn:

Práce se věnuje popisu T-lymfocytů a jejich uplatnění v rámci imunitního systému. Popisuje způsob, jakým mezenchymové kmenové buňky a fibroblasty ovlivňují imunitní reakci zprostředkovanou T-lymfocyty. V této souvislosti je určen rozsah inhibice aktivace a proliferace T-lymfocytů způsobené MSC a fibroblasty. T-lymfocyty byly stimulovány mitogenem PHA a po kultivaci s MSC a fibroblasty bylo průtokovým cytometrem vyhodnoceno, do jaké míry se snížila proliferační aktivita.

Annotation

Surname and name: Krausová Magdaléna

Department: Department of Theoretical Fields

Title of thesis: Determination of the activation markers CD25 and CD69 of lymphocytes cocultured in the presence of fibroblasts or mesenchymal stem cells

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages: numbered – 48
unnumbered - 11

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 41

Key words: CD markers - blast-transformation test - fibroblasts - flow cytometry – MSC - mitogen - T-lymphocytes

Summary:

The thesis is devoted to the description of T-lymphocytes and their application within the immune system. It describes how the mesenchymal stem cells (MSCs) and fibroblasts influence the immune response mediated by T-lymphocytes. In this regard, the extent of inhibition of the T-lymphocyte activation and proliferation, which is caused by the MSC and fibroblasts is determined. T-lymphocytes were stimulated by PHA mitogen and after coculture with MSCs and fibroblasts, the extent of decreased proliferative activity was assessed by flow cytometry.

Obsah

ÚVOD.....	11
TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 T-LYMFOCYTY	12
1.1 Struktura T-lymfocytů	12
1.2 Subpopulace T-lymfocytů	13
1.2.1 Pomocné T-lymfocyty (T_H).....	13
1.2.2 Regulační T-lymfocyty.....	14
1.2.3 Cytotoxické T-lymfocyty	14
1.3 Vývoj T-lymfocytů	14
1.4 T-lymfocyty v sekundárních lymfatických orgánech.....	16
1.5 Průběh imunitní odpovědi	17
2 MEZENCHYMOVÉ KMENOVÉ BUŇKY	19
3 FIBROBLASTY	21
3.1 Uplatnění fibroblastů v imunitním systému	21
4 MITOGENY	23
4.1 Přehled nejvíce používaných mitogenů	23
4.1.1 Phytohemagglutinin (PHA)	23
4.1.2 Konkavalin A (ConA)	24
4.1.3 Lipopolysacharid (LPS).....	24
4.1.4 Pokeweed mitogen (PWM)	25
5 TEST BLASTICKÉ TRANSFORMACE	26
5.1 Princip.....	26
6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	28
6.1 Princip.....	28
6.1.1 Průtokový cytometr	29
6.1.2 Zpracování a znázornění výsledků	30

6.1.3 Používané reagensie	31
6.2 Výhody a nevýhody průtokové cytometrie	31
6.3 Slide-based cytometrie	31
7 CD NOMENKLATURA A POVRCHOVÉ ZNAKY CD3, CD25, CD 45 A CD 69	33
7.1 CD3 (T3)	33
7.2 CD25 (IL-2R α , Tac antigen, p55, TCGFR)	33
7.3 CD 45 (LCA – leukocyte common antigen, t200, b220, Ly5, PTPRC).....	33
7.4 CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA, CLEC2C, BL-AP26)	34
PRAKTICKÁ ČÁST	35
8 METODIKA A VÝZKUMNÉ OTÁZKY	35
9 POSTUP ZÍSKÁVÁNÍ BUNĚK PRO KULTIVACI	36
9.1 Postup získávání MSC.....	36
9.2 Postup získávání fibroblastů.....	36
10 PROVEDENÍ TESTU	37
10.1 Metoda blastické transformace	37
10.2 Průkaz exprese povrchových znaků průtokovou cytometrií.....	37
11 VÝSLEDKY	40
12 DISKUZE	46
ZÁVĚR.....	48
SEZNAM LITERATURY.....	49
SEZNAM ZKRATEK	52
SEZNAM TABULEK	54
SEZNAM GRAFŮ	55
SEZNAM OBRÁZKŮ	56
SEZNAM PŘÍLOH	57
PŘÍLOHY	58

ÚVOD

Imunitní systém má v organismu nezastupitelnou úlohu, reguluje homeostázu a společně s dalšími systémy zajišťuje reakci na nežádoucí patogeny, které do těla vstoupily zvenčí. Tyto funkce pomáhají plnit jednotlivé složky imunitního systému rozděleného na nespecifickou, tzv. vrozenou, a specifickou, adaptivní imunitu. T-lymfocyty mají, jakožto součást specifických, vývojově mladších, mechanismů, významnou funkci. Bez nich by se organismus jen těžko ubránil různým patogenům, které ho denně ohrožují. Tento fakt dokládá výskyt poruch imunitního systému, imunodeficitních stavů, na úrovni T-lymfocytů, jako je například SCID. Na druhou stranu, ani přehnaná reakce organismu na cizorodou látku, antigen, není žádoucí. Zvláště nebezpečný je rozvoj autoimunitních onemocnění, kdy T-lymfocyty, potažmo celý imunitní systém, ztrácejí schopnost tolerovat vlastní buňky a reagují na ně stejným mechanismem, jako kdyby se jednalo o cizí látku. Nežádoucí je také rozvoj reakce po transplantaci orgánu či kostní dřeně. Z tohoto důvodu jsou prozkoumávány možnosti, jak se těmto dějům vyhnout nebo alespoň zmírnit jejich průběh. Velkou pozornost tak na sebe poutají mezenchymové kmenové buňky (MSC), u kterých již byla prokázána schopnost boje s rozvinutou reakcí štěpu proti hostiteli (GVHD), pomoci může také pacientům s autoimunitní chorobami, jako je roztroušená skleróza, Crohnova choroba, apod. Fibroblasty vykazují podobné vlastnosti jako MSC buňky, ovlivňují různé imunitní buňky a podílejí se na procesu hojení ran či poškozených orgánů.

TEORETICKÁ ČÁST

1 T-LYMFOCYTY

T-lymfocyty jsou buňky imunitního systému, resp. jeho specifické složky. Imunitních reakcí se účastní buď přímo, nebo nějakým způsobem ovlivňují činnost jiných částí imunitního systému. K jejich funkcím patří obrana proti intra- či extracelulárním patogenům, stejně jako protinádorová imunita, vše zajištěné v rámci buněčně zprostředkované složky. Další důležitou funkcí je podpora B-lymfocytů v produkci protilátek, zvýšení antimikrobiální schopnosti fagocytů a uplatňují se také v zánětlivé reakci (1 - 4).

1.1 Struktura T-lymfocytů

T-lymfocyty představují asi 75% lymfocytární populace (5). V krvi se lymfocyty vyskytují jako malé, střední a velké lymfocyty, které představují efektory. Mají zaoblené jádro s hrubým chromatinem a běžně nerozpoznatelným jadérkem. V úzké cytoplazmě se nachází několik azurofilních granul. Buňky mají dle příslušnosti k různým subpopulacím odlišnou životnost (6).

Na membránách T-lymfocytů se nacházejí TCR receptory, jimiž buňky rozpoznávají antigeny. TCR je heterodimer skládající se ze dvou částí – z modulu rozeznávajícího antigen, který se strukturou podobá imunoglobulinům, a CD3 komplexu tvořeného různými proteiny. Část TCR vázající antigen obsahuje dva různé řetězce, ve většině případů α a β , u menší části populace T-lymfocytů se jedná o řetězce γ a δ . V obou případech se jedná o transmembránové bílkoviny prvního typu složené ze dvou typů domén. N-terminální část představuje variabilní doménu, jejíž stavba se liší u různých T-lymfocytů. Konstantní část řetězce je naopak pro všechny druhy T-lymfocytů stejná. Antigeny rozpoznané řetězci jsou bílkovinného původu a T-lymfocytům je představují HLA I. a II třídy, které pomáhají vázat různé kostimulační receptory. Zachycený signál, jenž má za úkol aktivovat T-lymfocyty, je dovnitř buňky přenášen pomocí CD3 komplexu složeného z transmembránových proteinů s různou molekulovou hmotností, řetězců γ , δ , ϵ (tvořeného řetězci γ a δ) a ζ . Tyto části jsou uvnitř buňky napojené na protein-tyrosin kinázy Src a uplatňují se v přenosu signálu (1; 2).

T-lymfocyty vykazují na membránách kromě molekuly CD3 i další znaky plnicí funkci koreceptorů, a to CD4 a CD8. Buňky CD4⁺ tvoří až dvě třetiny všech T-lymfocytů. CD4 molekuly napomáhají rozpoznat cizí struktury navázané na MHC II. třídy, tedy části molekul rozpadlé buňky. Buňky exprimující tento znak jsou prekurzory pomocných T_H a regulačních T_R lymfocytů. Buňky nesoucí koreceptor CD8 rozpoznávají cizorodé molekuly, antigeny vázající se na MHC I. třídy. Jedná se o prekurzory cytotoxických T_C lymfocytů. Většina T-lymfocytů vystavuje na svém povrchu jednu z těchto molekul, nicméně v malém množství se v těle vyskytují i buňky s oběma či žádným koreceptorem. (4).

1.2 Subpopulace T-lymfocytů

1.2.1 Pomocné T-lymfocyty (T_H)

Pomocné T-lymfocyty, tzv. helpery, jsou buňky nesoucí na svém povrchu CD4 molekuly. Naivní buňky, označující se jako T_{H0} lymfocyty, se na základě povahy antigenu vyvolávajícího imunitní reakci rozdělují na jednotlivé subpopulace.

Nachází-li se v organismu antigen bakteriálního či virového původu (LPS, peptidoglykan, kyselina teichoová, atd.), diferencují se buňky T_{H0} do subsetu T_{H1}. Tento proces je ovlivňován působením interleukinů IL-12, IL-18 a IL-1, dále chemokinů a interferonu IFN γ . Samotné buňky se vyznačují produkcí tohoto interferonu, k němu se přidávají další látky jako IL-2 a TNF β . Lymfocyty podporují cytotoxické reakce.

Další funkční skupinou jsou buňky T_{H2} produkované v odpovědi na parazitární antigen či alergen. T_{H2} lymfocyty se diferencují v závislosti na IL-13 bazofilů a IL-4 tvořeného T-lymfocyty. Pro tuto subpopulaci je typická produkce několika látek – IL-4, IL-5, IL-6 – a G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor). Buňky se uplatňují v aktivaci B-lymfocytů a tvorbě protilátek. Kromě toho ovlivňují reaktivitu eosinofilů.

Jednotlivé subsety vzájemně regulují svoji proliferační a diferenciační aktivitu.

Skupina buněk označovaných jako T_{H3} lymfocyty se vyznačuje produkcí protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF β . K jejich funkcím patří usměrnění aktivity T_{H1} lymfocytů.

Poslední skupinou řadící se k pomocným T-lymfocytům, jsou lymfocyty T_{H17}. Tyto buňky, narozdíl od jiných subsetů, nepůsobí inhibičně na zánětlivé odpovědi organismu. Naopak tyto děje probíhající v různých tkáních spíše podporují. Jsou stimulovány IL-23 a samy vylučují IL-17 mající vliv na dendritické buňky, makrofágy a v neposlední řadě i na neutrofile. IL-17 buňkám umožňuje migraci do míst, kde se odehrává zánětlivá reakce, a vyvolává sekreci dalších látek – IL-1, IL-6, TGF β , G-CSF a chemokinů (IL-8) (2; 4).

1.2.2 Regulační T-lymfocyty

Regulační T-lymfocyty (někdy označované jako tlumivé) vykazují na svém povrchu, stejně jako pomocné T-lymfocyty, koreceptor CD4. Jejich funkce spočívá v ochraně normálních - přirozeně se vyskytujících - buněk před imunitními reakcemi. Vzhledem k tomu, že stejnou roli plní i v případě nádorových buněk, jsou tyto subsety za účelem efektivnější protinádorové terapie někdy odstraňovány. Normální lymfocyty se uplatňují také v rámci imunologického vztahu matky a plodu, buňky zajišťují snížení aloreaktivity (v případě, že jsou buňky nějakým způsobem poškozené, dochází často ke spontánním potratům) (1; 4).

1.2.3 Cytotoxické T-lymfocyty

Cytotoxické T_C lymfocyty se uplatňují v imunitní reakci proti virům a dalším intracelulárním parazitům, dále umožňují rozpoznat i jinak poškozené buňky (buňky nádorové a ovlivněné buněčným stresem). Funkcí této skupiny lymfocytů je odstranění agens z organismu, aniž by při tom došlo k velkému poškození tkání (může činnost T_C lymfocytů doprovázet). Buňky také rozeznávají peptidové fragmenty v komplexu s MHC I. třídy vystavené na povrchu antigen-prezentujících buněk (APC). Svůj význam mají i pro zánětlivou reakci, jsou totiž producenty různých cytokinů podporujících tento proces. Jedná se např. o látky IFN γ , TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β a RANTES čímž jsou aktivovány makrofágy a dendritické buňky (1; 2).

1.3 Vývoj T-lymfocytů

T-lymfocyty se stejně jako další buňky specifické imunity diferencují z kmenových buněk v rámci lymfoidní linie. Buňky se většinou vyvíjejí v thymu (brzlíku), orgánu řadičím se společně s kostní dření do skupiny primárních lymfatických orgánů; jen menšina buněk se diferencuje ve sliznici GIT či v jaterní tkáni. Thymus je orgán endodermálního původu, uložený za hrudní kostí. Aby zajistil tvorbu dostatečného počtu T-lymfocytů, dochází po narození k jeho zvětšování. V období puberty však začíná atrofovat a množství tkáně se postupně zmenšuje, nikdy ale nezmizí úplně a i v pozdějším věku je malá část thymu zachována (1; 2).

Thymus je složen ze dvou laloků, které jsou rozděleny na další lalůčky (lobuly). V celém thymu se nacházejí dvě vzájemně spojené složky důležité pro správný vývoj T-lymfocytů: kůra a dřev. Prekurzorové buňky zvané také jako pro-thymocyty či dvojité

negativní thymocyty (neexprimují CD4 ani CD8), jsou určené pro přeměnu v T-lymfocyty. Je pro ně typická přítomnost molekuly CD7. Tyto buňky se nejdříve dostávají do subkapsulární a korové části thymu, kde jednotlivé prekurzory rozšiřují svůj počet (proliferují), vyvíjejí se a pokračují do meduly, kam pronikají již zralé buňky. Tuto migraci řídí různé chemotaktické látky, chemokiny. Samotnou diferenciaci pak ovlivňují humorální faktory thymosin, thymopoetin a thymový faktor (thymové hormony tvořené epitelovými buňkami označovanými jako nurse buňky, kortikální či medulární epitelové buňky) a růstové faktory (cytokiny SCF a IL-7). Vývoj buněk regulují také transkripční faktory (řízeny geny IKAROS a NOTCH-1) a nitrobuněčné signální molekuly. Dále se na něm podílí interakce mezi thymocyty (mladší vývojový stupeň T-lymfocytů) a samotnými buňkami thymu čili epitelovými buňkami, makrofágy a dendritickými buňkami, které produkují různé cytokiny umožňující vývoj T-lymfocytů (2).

Ačkoliv se v thymu nachází velké množství buněk, jen velmi málo z nich se stane zralými T-lymfocyty, které mohou opustit thymus. Thymus opustí v podobě dospělých T-lymfocytů cca 3% buněk, které do něj vstoupily či se v něm vytvořily. V průběhu vývoje thymocytů buňky nejdříve podstupují změny na membránách a změny v posloupnosti genových segmentů pro typické receptory T-lymfocytů, a dále pak proces pozitivní či negativní selekce, kdy většina z nich hyne z důvodu nedostatečné či naopak nepřiměřené reakce na antigenní podnět. Co se týče membránových změn, postupně vznikají různé receptory reagující na působení odlišných, chemokinů. Například vývojově nejmladší thymocyty reagují pomocí svého receptoru na chemokin SDF-1 α , u dalších vývojových stupňů se mění receptory na C-CR9 (odpovídá na chemokin TECK), zralé thymocyty vykazují receptory C-CR4 a C-CR7, na které působí chemokiny TARC α /MDC-1, resp. MIP-3 β a SLC. Genetické změny se týkají receptoru TCR. Proces ovlivňují rekombinázy nezralých T-lymfocytů Rag-1 a Rag-2 vyskytující se zde v podobě tetrameru navázaného na rekombinační signál DNA. Buňky pozitivní pro znak CD25 obsahují řetězec β spojený s řetězcem pre-T α . Poté, co dojde ke změně polohy genových segmentů pro oba řetězce a pre-T α se přemění na α řetězec, se komplex CD3 přemístí z cytoplazmy na povrch. Během tohoto procesu dochází také k posílení molekul CD4 a CD8, buňky jsou od této doby nazývané jako dvojité pozitivní. Zároveň je pro ně typická přítomnost znaků CD1 a CD69 (2).

Funkce dvojité pozitivních buněk je testována v průběhu pozitivní a negativní selekce, které představují kontrolní uzel při vývoji T-lymfocytů. V průběhu selekčních procesů se buňky setkávají s molekulami HLA, které nesou buď epitelové, nebo dendritické buňky v thymu. T-lymfocyty, jež nevykazují afinitu k HLA, nebo je jejich afinita příliš vysoká, prodělávají apoptózu a hynou. Ostatní buňky prodělávají změny podle toho, se kterou HLA třídou reagují. HLA I. třídy rozeznávají molekuly, které exprimují CD8, tzn., že T-lymfocyty postupně ztrácí molekulu CD4. Naopak, pokud buňka reaguje s HLA II. třídy, zůstává na jejím povrchu molekula CD4. Na lymfocytech se také objevuje molekula CD45RA, která se vyvinula z CD45RO a je typická pro naivní T-lymfocyty (2).

Dospělé T-lymfocyty opouštějí thymus a jsou T-lymfocyty unášeny krevním oběhem do sekundárních lymfatických orgánů, kde se setkávají s antigeny. (1; 2).

1.4 T-lymfocyty v sekundárních lymfatických orgánech

Naivní T-lymfocyty prostupují do lymfatických orgánů skrze endotel postkapilárních venulí upravený specifickými procesy jako změna adhezních vlastností endotelu a lymfocytů. Poté, co T-lymfocyty vstoupí dovnitř do orgánu, určuje jejich pohyb chemokin SLC. Chemokiny také zprostředkovávají vzájemné působení T-lymfocytů a dendritických buněk a T- a B-lymfocytů v lymfatických uzlinách. Buňky spolu komunikují prostřednictvím receptorů C-X-CR5 (T-lymfocyty) a C-CR7 (B-lymfocyty) (2; 3).

Ve slezině – v bílé pulpě – se nachází periarteriolární lymfoidní pochva (tzv. PALS), kde jsou uloženy $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocyty. Toto místo obklopují B-lymfocyty. Kromě nich se zde nachází i jiné imunitní buňky, např. neutrofilů, eozinofilů a plazmatické buňky (2; 3).

V parakortikální oblasti lymfatických uzlin jsou uloženy T-lymfocyty a akcesorní buňky, jejichž úlohu plní makrofágy a dendritické buňky, které na svém povrchu předkládají T-lymfocytům antigeny zachycené v krvi. Druhou možností je, že antigeny pronikají až do uzliny samostatně, nehledě na antigen prezentující buňky. Z parakortexu se T-lymfocyty přesouvají do meduly, odkud společně s B-lymfocyty (uloženými ve foliklech uzlin) přecházejí do hilu. Z tohoto místa pak směřují do ductus thoracicus, jež ústí do vena subclavia. Podle potřeb organismu se pak lymfocyty dostávají krví do tkání a orgánů, kde plní funkci efektorových a paměťových buněk (2; 3).

1.5 Průběh imunitní odpovědi

Rozpoznáním antigenu v sekundárních lymfatických orgánech je stimulována proliferace a diferenciace v efektorové a paměťové buňky (3).

K aktivaci T-lymfocytů a vyvolání imunitní reakce nestačí samotné rozpoznání peptidových fragmentů, které se vážou na antigen-prezentující buňky a slouží jako I. signál, ale je nutné působení dalších molekul a vznik různých interakcí (kostimulační, akcesorní a adhezní interakce), tzv. II. signál. Signály musejí být k dispozici vždy, když má dojít k aktivaci imunitní reakce, pokud tomu tak není, buňka je vystavena apoptóze. Kostimulačními signály jsou myšlené různé molekuly na povrchu membrán T-lymfocytů, z nichž nejvýznamnější jsou pro imunitní reakci transmembránové proteiny CD28 a CTLA-4 (CD152), které soutěží o vazbu na molekuly CD80 a CD86 na APC (pokud se váže molekula CD28, aktivace pokračuje, v opačném případě je reakce postupně utlumena a zaniká). Kinázový systém pak napomáhá aktivovat integrin LFA-1. Dalšími důležitými molekulami, uplatňujícími se v aktivaci T-lymfocytů, jsou molekuly CD2, CD244, CD137, apod. Podstatný je i čas, po který zůstanou T-lymfocyty a APC v kontaktu. Doba se liší podle charakteru subpopulací. Aby došlo k aktivaci T-lymfocytů $CD8^+$, je potřeba stimulovat T-lymfocyty antigenem na APC cca 2,5 hodiny, u skupiny $CD4^+$ se tato lhůta prodlužuje až na jeden den. Kromě toho se také liší počet antigenů, které buňky stimulují, naivní T-lymfocyty potřebují ke svojí aktivaci více podnětů, zatímco T-lymfocyty sloužící v imunitním systému jako paměťové buňky reagují na jejich přítomnost rychleji (1; 2).

Jak už bylo zmíněno, interakce T-lymfocytu a antigenu by měla trvat tak dlouho, aby v T-lymfocytu došlo k dostatečné aktivaci signálních kaskád a tím i k řádnému přenosu signálu dovnitř do buňky, což vede k proliferaci jednotlivých T-lymfocytů. Tento proces zajišťují různé děje zahrnující aktivaci transkripčních faktorů, které ukončují klidovou fázi a obnovují buněčný cyklus. Uvnitř buňky dochází nejdříve k aktivaci tyrozinových kináz Src (kinázy Lck a Fyn). Na kinázy aktivačně působí i molekula CD45. Ta má v buňce ještě další funkci, a to negativní ovlivnění různých molekul v buňce. Dále se v procesu aktivace uplatňují i fosfolipázy napojené na cytoplazmatickou membránu. Fosfolipáza je rozdělena na dva signály, které podporují uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula nebo aktivují proteinové kinázy způsobující uvolnění a přesun transkripčních faktorů. Tyto struktury pak v jádře podporují transkripci genů nezbytných pro uskutečnění proliferace. Důležité je také působení kalcineurinu –

serinové/threoninové fosfatázy, jehož aktivovaná forma také ovlivňuje přesun transkripčních faktorů. Dále se do procesu zapojují GTP vázající Ras, které aktivují serin/threoninové proteinové kinázy. Působení jednotlivých molekul, z jejichž interakcí vznikají různě složité komplexy, je ovlivněno transmembránovými a cytosolovými adapterovými molekulami LAT a SLP-76. Prostřednictvím povrchových receptorů ovlivňují aktivaci T-lymfocytů i cytokiny – interleukiny a interferony, které zasahují do uspořádání Jak kinázy a ve spojení s transkripčními faktory STAT ovlivňují přepis genů a aktivaci T-lymfocytů (2).

Množství T-lymfocytů se v krvi za normálních podmínek pohybuje kolem 10^6 buněk. Buňky se však v případě setkání s antigenem množí a jejich počet se v řádu dnů až týdnů mnohonásobně zvětšuje. V těle se pak vyskytuje 10^4 až 10^3 buněk (2).

Stejně jako aktivace imunitní reakce je důležité i její ukončení, přičemž oba procesy musí proběhnout bez poškození okolních tkání. Poté, co je imunitní reakce dokončena, je započato několik procesů, které navrátí T-lymfocyt do jeho klidového stadia. Jsou zahájeny reakce, které inhibují kinázovou aktivitu, negativně působí i povrchová molekula CD45. Další nepříznivé podmínky navozuje kostimulační molekula CTLA-4 (jak již bylo zmíněno, tato molekula v průběhu aktivačního děje soupeří o vazebné místo na APC s molekulou CD28), která vytváří komplex s molekulami CD80 a CD86. Stejně jako při aktivaci, je proces ovlivňován adapterovým proteinem, který vyvolává štěpení aktivovaných receptorů (2).

Určitá skupina T-lymfocytů se po vystavení antigenu změní na paměťové buňky, které v případě dalšího setkání s antigenem rychleji zprostředkovávají imunitní reakci. Tyto buňky se od naivních lymfocytů liší v několika vlastnostech. Naivní buňky se pohybují prakticky jen v rámci lymfatického systému, naopak paměťové buňky využívají volného pohybu tkáněmi, kudy se dostávají do míst s nejvyšší pravděpodobností výskytu antigenu, tzn. kůže, slizniční povrch a játra (2).

2 MEZENCHYMOVÉ KMENOVÉ BUŇKY

Mezenchymové kmenové buňky (MSC) jsou nonhemopoetické buňky objevené Alexanderem Friedensteinem v roce 1968. Jako první proběhla izolace z kostní dřene, od té doby pak byly buňky izolovány z tkání a orgánů jako pupečnicková krev, tuková či pojivová tkáň, pokožka, synoviální tekutina, placenta, plodová voda, slinivka, ledviny, atd. Buňky fungují jako prekurzory nonhemopoetických kmenových buněk, je pro ně typická snadná diferenciaci v buňky mezodermální linie, stejně jako v buňky ecto- či endodermálního původu - adipocyty, chondrocyty, osteoblasty, neurony, hepatocyty, endotelové buňky či β -buňky produkující inzulín. Jsou známé především pro své imunomodulační vlastnosti, jejich efekt je uplatňován na různé typy buněk. Tím MSC zmírňují nepříznivé imunitní reakce, jako je reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), jsou schopné regenerovat například srdeční nebo plicní tkáň a svou roli mohou hrát také v onemocněních muskuloskeletálního systému. Na druhou stranu za určitých podmínek podporují MSC růst buněk solidních a hematologických malignit, zvláště leukémie. Navíc byla v souvislosti s působením MSC demonstrována i podpora růstu metastáz a zvýšení rezistence na léky proti různým typům rakoviny. Vše díky faktu, že MSC inhibují programovou smrt a protinádorovou aktivitu NK buněk (7 - 9).

MSC buňky exprimují povrchové molekuly CD105, CD90 a CD73, zatímco pro hematopoetické markery jako CD45, CD31, CD14, CD11b, CD19 nebo CD79 a HLA-DR jsou negativní. Vzhledem k těmto vlastnostem jsou popisovány jako privilegované buňky imunitního systému, vykazují pouze nízkou imunogenitu, nízkou expresi MHC I a nízkou či žádnou expresi MHC II, dále také nedostatek kostimulačních molekul pro aktivaci T-lymfocytů. Díky tomu mohou být úspěšně transplantovány skrze alogenní a xenogenní bariéru. Tyto vlastnosti jim zajistily široké využití ve zkušební léčbě různých imunitních onemocnění, např.: roztroušená skleróza, diabetes 1. typu, Crohnova choroba nebo systémový lupus erythematoses. MSC vykazují velký rozsah mechanismů vhodných pro léčbu pulmonárních onemocnění tím, že mají schopnost redukovat zánět v plicích, proces fibrózy a apoptózu. Funkce MSC jsou zajištěny hlavně schopností migrovat do místa zánětu či zranění; právě zánětlivý proces nebo poškozená tkáň působí na MSC jako chemoatraktanty (8 - 9).

MSC mají podobný efekt jak na paměťové T lymfocyty, tak na naivní buňky a na obě subpopulace T lymfocytů – CD4+ i CD8+. MSC potlačují jejich aktivaci a proliferaci

indukovanou mitogenními či polyklonálními stimuly (PHA, ConA, CD3, ad.). Proliferaci potlačují zastavením buněčného dělení, nikoliv zastavením apoptózy, a to buď přímo pomocí zkontaktování buňky, nebo nepřímo prostřednictvím antigen prezentujících buněk. Pro zajištění suprese buněk vylučují T-lymfocyty mediátory, jimiž jsou interleukin-1beta (IL-1 β), růstový faktor TGF β (transforming growth factor β), prostaglandin E₂ (PGE₂), hepatocyte growth factor (HGF), indolamin2,3-dioxygenáza (IDO), interleukin-10 (IL-10), hemoxygenáza-1, leukaemia inhibitory factor (LIF) a NOTCH-1.

Kromě T-lymfocytů ovlivňují samozřejmě i jiné buňky imunitního systému, např. B-lymfocyty a monocyty. Děje typické pro B-lymfocyty regulují MSC vylučováním chemických mediátorů, které inhibují produkci protilátek plazmatickými buňkami a proliferaci B-lymfocytů. Co se týče monocytů, ovlivňují MSC nejen jejich funkci, ale i jejich vyzrání v dendritické buňky. Dendritické buňky vykazují redukovanou odpověď stejně jako kapacitu vylučovat IL-12 a tumor necrosis factor alfa (TNF- α). Buňky naopak produkují vyšší hladinu IL-10. MSC mají na buňky imunosupresivní efekt, čímž zvyšují jejich toleranci k jiným buňkám. K tomuto efektu přispívá tvorba látek jako IL-6, monocyte colony-stimulating factor (M-CSF), PGE₂. MSC vykazují inhibiční efekt také vůči NK buňkám, ten je zajištěn látkami jako PGE₂, IDO či TGF β -1 (7; 9; 10).

3 FIBROBLASTY

Fibroblasty roztroušené v tkáni celého těla představují nejpočetnějšího a zároveň i nejméně specializovaného zástupce buněk vyskytujících se v pojivové tkáni. Podílejí se na tvorbě extracelulární matrix (ECM), která obklopuje buňky pojiva a zajišťuje jeho celistvost (11; 12).

V případě potřeby se fibroblasty přeměňují v jakoukoliv buňku pojiva, tj. v chondrocyty, adipocyty, osteoblasty či osteocyty a buňky hladké svaloviny. Uvedené modifikace buněk pojivové tkáně jsou ovlivněny složením přítomné matrix, typem buněk obsažených v ECM, hormony a růstovými faktory. V tkáni se vyskytují ve dvou stádiích - pasivní, klidové buňky, které se jinak označují jako fibrocyty a aktivní buňky, fibroblasty. Buňky se odlišují svou syntetickou aktivitou a částečně i morfologickým uspořádáním (5; 11; 12).

Fibroblasty jsou buňky s nepravidelnými dlouhými výběžky. Uprostřed se nachází velké vřetenovité světle zbarvené jádro s jemným chromatinem a výrazným jadérkem. v cytoplasmě se nalézá několik hrubých endoplazmatických retikul a výrazně vyvinutý Golgiho aparát. Fibroblasty syntetizují většinu komponent extracelulární matrix, ve které jsou roztroušeny proteiny jako kolagen (hlavně kolagen typu I a III) a elastin, které formují kolagenní, elastická a retikulární vlákna a společně zajišťují pevnost a elasticitu tkáně. Dalšími složkami jsou bílkovina vitronektin a glykoproteiny fibronektin, laminin a thrombospondin sloužící jako ligandy pro integriny neboli povrchové proteiny uplatňující se v interakci ECM s buňkami. V ECM se také vyskytují glykosaminoglykany (např. hyaluronát – kyselina hyaluronová) a proteoglykany základní hmoty. Kromě vzniku ECM se fibroblasty podílejí také na jejím odstranění, čímž jí zajišťují neustálou obnovu. Určitou roli hrají i v produkci růstových faktorů, které ovlivňují vývoj buněk a jejich diferenciaci. (5; 11 - 13)

3.1 Uplatnění fibroblastů v imunitním systému

Pokud se v těle vyvíjí zánětlivá reakce, dojde nejdříve v místě poškození k rozrušení ECM prostřednictvím kaskády degradačních enzymů, což usnadňuje zánětlivým buňkám migraci do místa zánětu. Fibroblasty exprimují na svém povrchu molekulu CD44, která interaguje s kyselinou hyaluronovou a tím výrazně napomáhá

v nasměrování lymfocytů do místa zánětu. Při procesu hojení je tedy odbourávání ECM jedním z významných dějů (12; 13).

Za normálních okolností nepodstupují fibroblasty vyskytující se v dospělém organismu buněčné dělení, mitóza probíhá pouze v případě, že porušená tkáň vyžaduje další buňky ke svému hojení. Okolní fibroblasty proliferují, migrují a shromažďují se v místě poškození, kde produkují velké množství kolagenní matrix, jež izoluje a opravuje poškozenou tkáň. Akumulaci buněk zprostředkovává GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Buňky se zde modifikují v myofibroblasty, které se podobají buňkám hladké svaloviny, dokonce obsahují aktiny, jež jim zajišťují schopnost kontraktility. Tento přechod jednoho typu buňky v jiný stimuluje TGF- β , růstový faktor podporující tvorbu jizvy bohaté na kolagen. Kromě toho TGF- β indukuje produkci mnoha komponent ECM, např. kolagenu, fibronektinu, chondroitinu, hyaluronanu, proteoglykanů a integrinů. Naproti tomu snižuje syntézu degradačních enzymů ECM, kterými jsou kupříkladu kolagenázy. Již ve velmi malých dávkách plní TGF- β chemotaktickou funkci pro monocyty, neutrofilů a lymfocyty. Kromě toho indukuje syntézu různých látek řadících se do skupiny prozánětlivých cytokinů (IL-1, TNF- α , IL-6 a MIP-1 α). Dále se vyznačuje i imunosupresivní funkcí, má schopnost indukovat inhibici proliferace B-lymfocytů a sekreci imunoglobulinů, inhibici proliferace T-lymfocytů a jejich cytotoxicitu. Při procesu hojení je odbourávání ECM jedním z významných dějů (5; 12; 13).

Fibroblasty jsou také schopné produkovat signály připisované zánětlivým buňkám. Společně s dalšími buňkami (endotelovými, epitelovými či svalovými) produkují chemokiny mající schopnost zprostředkovat zánětlivou reakci. Proces je stimulován interleukinem-1 (IL-1) a TNF- α (tumor necrosis factor- α) produkovanými hlavně monocytů a makrofágy v brzké fázi zánětlivé reakce. Tyto prozánětlivé cytokiny podporují proliferaci fibroblastů, jež je umožněna působením mitogenu PDGF (platelet-derived growth factor) na PDGF receptor na povrchu fibroblastů a buněk hladké svaloviny. V rámci zpětné vazby na působení IL-1 a TNF- α odpovídá fibroblast tvorbou prostaglandinu E₂ (PGE₂). Jedná se o tkáňový hormon, který inhibuje proliferaci fibroblastů, potlačuje činnost lymfocytů (má schopnost inhibovat proliferaci T-lymfocytů, resp. regulovat jednotlivé T-lymfocytární subpopulace). Efekt tohoto hormonu na lymfocyty naznačuje, že fibroblasty hrají významnou roli v regulačních a reparativních procesech (13).

4 MITOGENY

Mitogeny patří mezi látky navozující mitózu, buněčné dělení a tím i aktivaci a proliferaci lymfocytů nebo jejich jednotlivých skupin. Většinou se jedná o chemické látky izolované z rostlin (například phytohemagglutinin, konkavalin A či pokeweed mitogen) (14).

Rostlinné lektiny mají funkci polyklonálních aktivátorů, které nehledě na antigenní specifitu transformují většinu lymfocytů v klidovém stadiu v lymfoblasty. V průběhu tohoto procesu probíhají v buňce změny jako acetylace histonů, fosforylace nukleových kyselin DNA, RNA a syntéza proteinů. Většina lektinů, u nichž byla zaznamenána mitogenní funkce reaguje hlavně nebo výlučně s T-lymfocyty, mitogenů reagujících pouze s B-lymfocyty je málo.

Mitogeny se na lymfocyty vážou přes sacharidové receptory, čímž spouští buněčnou aktivitu. Sama o sobě však vazba na receptor nezaručuje, že aktivace proběhne. Mitogeny se vážou na CD2 či CD3 molekulu, která je součástí TCR receptoru a zřejmě má regulační funkci při aktivaci mitózy přes CD2, pak také na histokompatibilní antigeny či samotný TCR.

Působení lektinů je podporováno tzv. přídatnými buňkami (accessory cells) a cytokiny, na jejichž působení je mitogen více či méně závislý. Zajímavostí je, že lektiny působí mitogenně pouze v nízkých koncentracích, ve vysokých hustotách je jejich působení neúčinné (15).

4.1 Přehled nejvíce používaných mitogenů

V laboratorní a lékařské praxi se nejvíce používají phytohemagglutinin A, konkavalin A, pokeweed mitogen, z bakteriálních mitogenů je nejvíce známý lipopolysacharid.

4.1.1 Phytohemagglutinin (PHA)

Phytohemagglutinin byl objeven v 60. letech minulého století Dr. Peterem Nowellem (16). Tento mitogen je získáván z rostliny *Phaseolus vulgaris* (fazol obecný). Indukuje proliferaci T-lymfocytů. Vyskytuje se jako tetramer složený ze dvou příbuzných proteinů – leukoagglutininů PHA-E a PHA-L-, jejichž působení má za následek aglutinaci erytrocytů a leukocytů. Je specifický pro oligosacharidový komplex zahrnující galaktózu,

N-acetylglukosamin a manózu. Kromě těchto funkcí PHA také umožňuje jinak neprobíhající přechod přes buněčnou membránu (14; 17).

Ve vyšších dávkách se jedná o toxin, který se ve velké míře nachází v nevařených červených a bílých fazolích, méně PHA pak obsahují jiné typy luštěnin. Příznaky otravy nastupují během tří hodin od požití jedu, mezi symptomy patří nevolnost, zvracení či průjem; ustupovat počínají čtyři až pět hodin po začátku známek otravy (18).

4.1.2 Konkavalin A (ConA)

Zdrojem konkavalinu je *Canavalia ensiformis* (trojkýl mečovitý). Stejně jako předchozí mitogen aktivuje T-lymfocyty (během sekund od vystavení účinku stimuluje metabolismus thymocytů), nicméně jiné subpopulace, než je tomu u PHA. Díky tomu, že se specificky váže na struktury obsažené v sacharidech, glykoproteinech a glykolipidech, je jeho použití v biologii a biochemii celkem rozšířené (váže se na glykoproteiny a jiné složky obsahující sacharidy na povrchu buněk). Také způsobuje silnou aglutinaci erytrocytů nehledě na krevní skupinu a různých rakovinných buněk, dále pak myocytů, fibroblastů, B-lymfocytů, atd. (14; 19)

Stejně jako většina mitogenů, je i ConA tetramer, je složen ze čtyř stejných podjednotek, z nichž každá váže atom Mn^{2+} a Ca^{2+} a zbytky sacharidů α -D-manosyl a α -D-glucosyl. Celá molekula pak obsahuje čtyři vazebná místa, jedno na každé podjednotce (20).

4.1.3 Lipopolysacharid (LPS)

Lipopolysacharid, resp. toxin odpovídající struktury, pocházející z buněčné membrány gram-negativních bakterií, patří mezi aktivátory B-lymfocytů bez ohledu na jejich antigenní specifitu (na T-lymfocyty neúčinkuje). Aktivuje paměťové lymfocyty, které pak prolifерují v nové paměťové buňky nebo se mění na plasmocyty. Kromě lymfocytů působí i na monocyty, dendritické buňky nebo makrofágy a vyvolává sekreci prozánětlivých cytokinů či eikosanoidů – v rámci buněčné odpovědi na stresový podnět buňka produkuje i NO_2 či superoxidy. Mitogen se váže se na komplex CD14/TLR4/MD2 (21).

LPS jsou velké molekuly skládající se ze tří částí – O-antigenu a lipidu A na koncích řetězce a lipidového jádra uprostřed (propojuje O-antigen a Lipid A). O-antigen

neboli O-specifický polysacharid se nachází na povrchu membrány a určuje její antigenní specifitu. Skládá se z mnoha opakujících se oligosacharidových jednotek. Lipid A je pevně usazen v cytoplazmatické membráně. Právě tato část je rozpoznávána imunitním systémem, již v malých koncentracích na něj reagují makrofágy a monocyty (21; 22).

4.1.4 Pokeweed mitogen (PWM)

Posledně jmenovaný mitogen je obsažený v rostlině *Phytolacca americana* (líčidlo americké). Mitogen stimuluje proliferaci B-lymfocytů, avšak pouze v přítomnosti T-lymfocytů (thymocytů i periferních T-lymfocytů), samotné B-lymfocyty s touto látkou nereagují. Vlivem PWM jsou tvořeny protilátky třídy IgM, IgG a IgA, a to úměrně přítomnému množství T-lymfocytů (14; 23).

5 TEST BLASTICKÉ TRANSFORMACE

Metoda blastické transformace se řadí mezi testy funkce T-lymfocytů, konkrétně jejich schopnosti proliferace, která je nutná pro normální funkci imunitního systému, tzn. pro zahájení a vývoj imunitní reakce (14; 24).

5.1 Princip

Jako vzorek se pro test používá nesrážlivá krev (zpravidla se jako antikoagulační činidlo používá heparin) zpracovaná tak, aby prodleva mezi odběrem a samotnou přípravou vzorku k analýze byla co nejmenší, nejdéle však do 24 hodin, jelikož schopnost proliferace se úměrně s časem snižuje (24).

Test při hodnocení využívá různých typů stimulačních látek. Daným podnětem může být určitý antigen, mitogen, monoklonální protilátka proti CD znakům či alogení (ozářené - neaktivní) T-lymfocyty. Na tyto stimuly buňka odpovídá zvětšením objemu genetické informace společně s dalšími ději a konečným dělením buňky. To tedy znamená, že pokud buňka obdrží správné signály, množí se a celá populace buněk se zvětšuje. Tím je zajištěna dostatečně velká imunitní reakce. Její velikost se dá měřit několika způsoby. Standardní metodou, od níž se ovšem v současné době upouští kvůli použití radioaktivních izotopů, je aplikace triciem označeného thymidinu (^3H thymidin), který se přidává k buněčné suspenzi kultivované v přítomnosti stimulační látky (např. antigenu). Thymidin se během následujících hodin zabudovává do nově vzniklé DNA aktivních buněk. Po ukončení kultivace je pak množství thymidinu inkorporované do nové DNA vyhodnoceno β -counterem, který měří radioaktivní záření v deoxyribonukleové kyselině, resp. počet světelných impulzů za minutu. Výsledky jsou vydávány v podobě stimulačního indexu (SI) v cpm (counts per minute). Index je definován jako vztah mezi aktivitou stimulovaných buněk a aktivitou populace bez přidané stimulační látky (14; 24 - 26).

Z bezpečnostního hlediska se postupně začaly objevovat metody nahrazující použití thymidinu, např. analýza DNA nebo průkaz proliferačních znaků. Obě metody jsou vyhodnocovány pomocí průtokové cytometrie, která pracuje s buňkami vykazujícími proliferační aktivitu.

Analýzou DNA je určeno procentuální zastoupení buněk v S-fázi buněčného cyklu, kdy se zvětšuje objem DNA (27). nebo v tzv. proliferační frakci S+G₂M. G₂ fáze je tzv. přípravnou fází buněčného cyklu, při níž se buňka připravuje na rozdělení; mitotická

fáze M je stadium, ve kterém dochází k rozdělení buňky na dvě samostatné jednotky (27). Výstupem metody je pak srovnání poměrného zastoupení buněk nacházejících se v jednotlivých fázích buněčného cyklu ve vzorku se stimulační látkou a bez ní.

Průkazem exprese proliferačních nebo aktivačních antigenů je vyšetřována pozitivita buněk pro povrchové molekuly exprimované v různých fázích proliferace poté, co byla buňka vystavena působení stimulantu, například mitogenu. Obvykle se těmito testy posuzuje přítomnost antigenů CD25, HLA-DR a CD69. Výhodou této metody je oproti využití ^3H značeného thymidinu menší dávka mitogenu a také čas, který potřebujeme k samotné inkubaci buněčné populace se stimulanty (14).

Kromě uvedených existují samozřejmě i další možnosti prozkoumání funkce lymfocytů. Jedná se o označení buněk vitálním membránovým barvivem, jehož intenzita fluorescence klesá s každým dělením buňky, a vyšetření intracelulárních cytokinů a s ním související vyšetření jednotlivých podskupin T-lymfocytů, dále stanovení antigenů uplatňujících se při buněčných interakcích, aktivačních znaků, atd. (14; 26)

6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie patří mezi analytické metody zobrazující různé vlastnosti buněk a jiných částic (24) (14). Významnou měrou přispívá ke správnému vyhodnocení poruch imunitní soustavy a od něj se odvíjející určení diagnózy. A to zejména proto, že poskytuje informace o početním zastoupení jednotlivých subpopulací buněk spadajících do velké skupiny leukocytů. Tyto poměry se při různých onemocněních odlišují a je tedy nezbytné je určit (25). Uplatnění metody je široké. Mimo imunologii našla uplatnění i v dalších lékařských oborech, například v hematologii (využívá se pro určení množství DNA a poznání vývojových stadií buněk) a onkologii (např. vyšetření maligních buněk). Kromě toho hraje svou roli i ve výzkumu, ve kterém mnohobarevná cytometrie odhaluje prostřednictvím více fluorescenčních barviv vztahy mezi různými skupinami buněk (24).

Tento test je založen na schopnosti specifických protilátek vázat se na antigenní determinanty, jež jsou vykazovány leukocyty (28) K rutinnímu vyšetření patří sledování membránových diferenciačních antigenů CD, povrchových znaků, které vykazují jednotlivé buňky dle své náležitosti k určité skupině buněk nebo svého vývojového stadia. Vzhledem k tomu, že jeden antigen může být exprimován na různých buňkách, sleduje se většinou výskyt více znaků najednou, tzv. koexprese, kdy se zaznamenává přítomnost dvou, tří, čtyř i více znaků najednou (26; 29).

6.1 Princip

V závislosti na odvětví, ve kterém je metoda využita, je pro provedení testu použit vzorek plné krve, buffy-coatu, mononukleárních buněk, kostní dřeně, lymfatické uzliny nebo jiných tkání (29) (30). Je-li použit vzorek krve, je nutné, aby k němu bylo přidáno antikoagulační činidlo, zpravidla EDTA nebo heparin. Výhodou je, že potřebujeme malý objem krve (2 ml). Samotné zpracování vzorku následuje 30 hodin po odběru (vzorek uchováván při teplotě cca +4°C), výjimkou jsou některé testy, které musejí být provedeny co nejdříve (funkční testy, imunofenotypizace monocytů a granulocytů) (14; 24).

Metoda využívá dvou fyzikálních principů, a to hydrodynamické fokusace (odděluje a usměrňuje buňky) a přímé imunofluorescence (zajištěna fluorescenčními barvivy navázanými na protilátkách) (14; 25; 26; 30).

Celé měření probíhá ve třech navzájem propojených systémech. Nejdříve jsou v tzv. fluidním systému rozděleny buněčné skupiny na jednotlivé buňky, které pak

procházejí systémem jedna za druhou. Na jejich membránových antigenech jsou navázané specifické monoklonální protilátky (MAb) s navázanými fluorescenčními barvivy (fluorochromy). V optickém systému jsou pak buňky vystaveny působení laserového paprsku. Rozptyl a odraz paprsku se společně s intenzitou fluorescence vyhodnocují pomocí digitálního systému. Jednotlivé parametry jsou zaznamenány a vyhodnoceny jako procentuální zastoupení různých subpopulací lymfocytů. Výsledky jsou graficky zobrazeny histogramy (14; 24 - 26).

6.1.1 Průtokový cytometr

6.1.1.1 Fluidní systém

Hydrodynamická fokusace je uskutečňována v průtokové komoře. Zde je umístěna tryska a tenká kapilára. Buňky, které proudí tryskou do kapiláry, se díky laminárnímu proudění tzv. nosné kapaliny (izotonický roztok), která buňky obklopuje, seřazují jedna za druhou a přecházejí do snímací oblasti (14; 24; 30).

6.1.1.2 Optický systém

Uprostřed průtokové komůrky je na buňky zaměřen laserový paprsek, jehož výška i šířka jsou upravovány cylindrickými čočkami, které paprsek zároveň zaostřují a zmenšují, čímž umožňují zacílení paprsku pouze na jednu buňku. Jako zdroj záření slouží hlavně argonový laser, kromě něj jsou zde často zařazeny i helium-neonový laser (He-Ne laser) nebo červená dioda (30).

Buňka při interakci se zářením část světla odrazí a rozptýlí v různých úhlech, které vypovídají o různých parametrech buňky; část je vyzářena ve formě fotonů, které jsou emitovány z fluorochromů. Přímý rozptyl neboli forward scatter (FS) je světlo odražené v malých úhlech (1-19° nebo 1-8°, záleží na nastavení senzoru, který rozptyl zaznamenává) a je určen velikostí buňky. Druhou měřenou veličinou je side scatter, tedy kolmý rozptyl (SS). Jedná se o světlo rozptýlené v úhlu cca 90°, jež odpovídá granularitě buněk. Díky tomu lze rozdělit buňky na lymfocyty, monocyty a granulocyty, které se liší obsahem granul v cytoplazmě. Kromě těchto kritérií jsou buňky hodnoceny i podle fluorescenčního světla (FL), umožňujícího rozpoznat membránové proteiny vystavené na povrchu buněk (30).

Aby mohlo být záření zachyceno, je v optickém systému umístěn soubor hranolů, filtrů a zrcadel. Optickými filtry jsou long pass, short pass a band pass filtry, které propouštějí světlo v omezeném rozsahu vlnových délek (14).

6.1.1.3 Digitální systém

Světlo zachycují senzory, které ho dle intenzity převádí na elektrické signály následně logaritmicky či lineárně zesílené fotonásobičem. Změřené parametry jsou vyhodnocované nejčastěji podle plochy pod impulsem, tedy integrálu. Podle požadavků lze měřit i jeho výšku či šířku. S parametry nadále pracuje počítač, resp. software, který umožňuje hodnotit jednotlivé skupiny buněk podle zaznamenaných vlastností (7; 13).

6.1.1.4 Sortery

Především ve výzkumu se uplatňují tzv. sortery, neboli třídiče, které rozdělují buňky podle jejich náležitosti k určité populaci, a to způsobem založeným na kmitání piezoelektrického krystalu. Ten rozděljuje kapalinu na jednotlivé kapky obsahující vždy jednu buňku. Podle toho, zda buňky nesou elektrický náboj, rozčleňují se působením elektricky nabitých desek do jednotlivých zkumavek. Rozdělení buněk umožňuje další práci pouze s vybranou populací. Z lékařských oborů se uplatňují v onkologii, hematologii či genetice (selekce nádorových buněk, fetálních erytrocytů obsažených v krvi matky, apod.) (14).

6.1.2 Zpracování a znázornění výsledků

Impulzy převedené na napěťové signály po zesílení a úpravě zpracovává k tomu určený software. Výsledky analýz jsou předkládány jak v grafické, tak v číselné podobě (většinou ve formě procent). Grafické vyjádření lze vydat v několika-parametrových histogramech. Nejjednodušší z nich je jednoparametrový graf, který na ose x zobrazuje intenzitu fluorescence a na ose y množství buněk. Dvouparametrový se liší v tom, že jím lze zachytit dva signály, přičemž množství buněk vyjadřují tečky (dot-plot histogram) nebo čáry (counter-plot histogram). V bodovém grafu lze hustotu buněk také znázornit různými barvami či různými odstíny šedi. Při analýze výsledků se někdy, nikoliv však při běžném vydávání výsledků, používají i trojrozměrná zobrazení.

Prozkoumání buněčné subpopulace podle tří a více parametrů vyžaduje vytvoření tzv. gatu (vybere se požadovaná skupina buněk). Z něho se potom vytváří graf pro zbývající parametry (hledají se buňky pozitivní pro další znak). Gaty jsou součástí informací, které jsou předávány lékaři, jež vyšetření indikoval. Kromě grafů nám software nabízí i statistické údaje vyhodnocené pro celou skupinu buněk nebo pouze pro vybranou populaci. Těmito informacemi jsou četnost, průměrná intenzita fluorescence (oba parametry lze vyčíst z histogramu), medián, modus, standardní odchylka, geometrický průměr, apod.

Získaná data jsou ukládána do tabulek, které se pak ukládají jako listmodedata (*.lmd). Jejich velkou výhodou je, že jsou přístupné další práci (narozdíl od histogramů, které tuto přednost nemají) (14; 24; 30).

6.1.3 Používané reagensy

Pro vyhledání buněčných membránových struktur jsou použité monoklonální protilátky s navázaným fluorescenčním barvivem. Mezi ty nejznámější patří fluorescein izothiokyanát (FITC), phykoerytrin (PE), pyridin-chlorofyl (PC) nebo třeba texaská červeň (ECD). Samozřejmě existuje velká škála barviv, které jsou více či méně používané při jednotlivých analýzách. Každé barvivo se liší vlnovou délkou záření, které emituje po interakci s laserovým paprskem. Monoklonální protilátky se do buněčné suspenze mohou přidávat po jedné (každá protilátka má „svoje“ barvivo), nebo lze využít i kombinace protilátek, tzv. koktejl protilátek. V něm může být více protilátek označených jednou fluorescenční látkou, nebo se v něm nachází protilátky proti stejnému antigenu, které se však vážou na odlišná místa tohoto antigenu (14).

Buněčné suspenze se ředí a promývají fosfátovým PBS pufrům, dále jsou využívány látky, které fixují buňky (pufrovaný paraformaldehyd), rozrušují jejich buněčnou membránu nebo separují buňky (separace probíhá na hustotním gradientu) (14). Také je užíváno lyzační činidlo, jehož úkolem je docílit rozpadu červených krvinek (31); tento krok je žádoucí při vyšetření leukocytů krve či kostní dřeně (14).

6.2 Výhody a nevýhody průtokové cytometrie

Výhody průtokové cytometrie převažují nad jejími nevýhodami. Ačkoliv pořizovací cena zůstává relativně vysoká, jde o rychlou a spolehlivou metodu, která umožňuje objektivní analýzu buněk. Navíc lze současně detekovat větší množství znaků díky použití různých typů barviv (14). Metoda se uplatňuje hlavně ve větších laboratořích, kde je nutné v krátké době vyšetřit větší množství vzorků (průtoková cytometrie umožňuje v pár minutách analyzovat desítky tisíc buněk) (24; 25).

6.3 Slide-based cytometrie

Výhody průtokové cytometrie společně s výhodami fluorescenční mikroskopie v sobě spojuje metoda slide-based cytometrie, přičemž současně potlačuje negativa obou (24). Fluorescenční mikroskopie je časově velmi náročná metoda (25). Jejím dalším negativem je mírná neobjektivita, kdy jeden výsledek může být dvěma osobami na základě

jejich zkušeností vyhodnocen trochu jinak. Zde se tedy uplatňuje průtoková cytometrie, která posuzuje různou intenzitu fluorescence zaznamenanou fluorescenčním mikroskopem a tím výsledek zobjektivňuje. Fluorescence naopak doplňuje změřené parametry informacemi o struktuře buněk, výsledky, jež průtokový cytometr nevydává (24).

Princip slide-based cytometrie je téměř totožný s principy obou metod. Po obarvení a vyfocení vzorku (fluorescenční mikroskopie) následuje softwarové zpracování fotografií na základě hodnocení hloubky fluorescence. Výsledkem je graf totožný s grafem, se kterým pracuje i běžná průtoková cytometrie (24).

Slide-based cytometrie tedy umožňuje hodnotit celou populaci buněk jak z kvantitativního, tak z kvalitativního hlediska. Dává tak možnost lépe porozumět procesům, které probíhají v těle zdravého i nemocného člověka a má prediktivní a preventivní význam (32).

7 CD NOMENKLATURA A POVRCHOVÉ ZNAKY CD3, CD25, CD 45 A CD 69

CD nomenklatura (CD – Cluster Designation) je jednotný systém několika set membránových struktur vyskytujících se na leukocytech. Tyto struktury jsou objeveny díky monoklonálním protilátkám, které se na molekuly vážou. Jednotlivé znaky jsou označovány zkratkou CD a pořadovým číslem. Většina z nich je pojmenována i jinak, často podle protilátky, která se na ně váže. Soupis obsahuje přes tři sta až čtyři sta CD znaků (26) (33), nicméně jejich seznam nadále roste (2).

7.1 CD3 (T3)

Znak CD3 je součástí komplexu TCR zahrnujícího kromě CD3 komplexu i modul rozeznávající antigen. Molekula zprostředkovává rozpoznávání antigenů, podílí se na transdukcii signálu a má pomocnou funkci při aktivaci T-lymfocytů. Je vystaven na povrchu všech zralých T-lymfocytů, dále ho můžeme najít na povrchu neuronů, thymocytů a buněk hladké svaloviny. Svou strukturou se řadí do rodiny imunoglobulinů, je složen ze skupiny řetězců (transmembránových proteinů) – dvou CD3 ϵ , jednoho CD3 γ , jednoho CD3 δ a posledního CD3 ζ (1; 14; 33; 34).

7.2 CD25 (IL-2R α , Tac antigen, p55, TCGFR)

Jedná se o tzv. marker pozdní aktivace o velikosti 55 kDa, který lymfocyty začínají vykazovat během 24-48 hodin od začátku proliferace T-lymfocytů. Kromě těchto buněk se znak vyskytuje i na aktivovaných B-lymfocytech a aktivovaných makrofázích. Jeho exprese byla zaznamenána i na části NK buněk a na vlasatých buňkách. Stejně jako molekula CD3 se podílí na transdukcii signálu a společně s podjednotkami β a γ , se kterými je spojený nekovalentní vazbou, tvoří vysokoafinitní receptor pro interleukin 2 (IL2R). Navíc zajišťuje odpověď na snížení hladiny IL-2 (3; 14; 33; 35).

7.3 CD 45 (LCA – leukocyte common antigen, t200, b220, Ly5, PTPRC)

Heterogenní molekula CD45 se v různém stupni exprimuje na subpopulacích leukocytů. Míra exprese umožňuje rozeznat normální a maligní buňky. Je známo mnoho izoform CD45. Patří do skupiny transmembránových glykoproteinů a hraje významnou roli v oblasti regulace signálu T- i B-lymfocytů. Kromě toho se podílí také na regulaci buněčného růstu a buněčné diferenciaci, část molekuly nacházející se v cytoplazmě

vykazuje fosfatázovou aktivitu. Je spojena s receptorem T-lymfocytů TCR a dalšími CD molekulami – CD2, CD4 a CDE26 (2; 3 ;28; 33; 36).

7.4 CD69 (AIM, EA 1, MLR3, gp34/28, VEA, CLEC2C, BL-AP26)

Na buňkách se z tzv. aktivačních markerů objevuje znak CD69 nejdříve, exprese tohoto membránového receptoru zpravidla roste do 4. -12. hodiny po začátku proliferace. Jde tedy o marker časné aktivace vázící GTP protein. Tento glykoprotein slouží jako lektinový receptor, objevuje se na aktivovaných T- i B-lymfocytech, makrofázích, NK buňkách. Za normálních podmínek ho lze v malé míře detekovat v periferní krvi a lymfoidní tkáni, kde se vyskytuje na malé skupině T-lymfocytů a na monocytech. Expese molekuly CD69 se zvyšuje u pacientů s rakovinou jater, přičemž hladina odpovídá velikosti tumoru a výskytu metastází. Kromě proliferace také hraje roli během agregace trombocytů (2; 14; 33; 37- 39).

PRAKTICKÁ ČÁST

8 METODIKA A VÝZKUMNÉ OTÁZKY

V praktické části jsou popsány kroky vedoucí k získání jednotlivých typů buněk a poté postup celé metody použité k analýze funkce lymfocytů. Následují výsledky a jejich statistické vyhodnocení a na závěr diskuze.

Cílem mé práce je výzkum vlivu mezenchymových kmenových buněk a tkáňových fibroblastů na proliferaci lymfocytů. Průkaz proliferace je uskutečněn analýzou povrchových znaků (aktivačních markerů) CD25 a CD69 na průtokovém cytometru po testu blastické transformace.

V souvislosti s cílem práce jsou položeny následující výzkumné otázky:

- 1) Mají mezenchymální kmenové buňky vliv na proliferaci T-lymfocytů?
- 2) Mají tkáňové fibroblasty vliv na proliferaci T-lymfocytů?
- 3) Je rozdíl mezi schopností proliferace T-lymfocytů kultivovaných v přítomnosti MSC či fibroblastů a samostatně významný?

9 POSTUP ZÍSKÁVÁNÍ BUNĚK PRO KULTIVACI

Oba typy buněk byly připravovány na Hematologicko-onkologickém oddělení (HOO) ve FN Plzeň.

9.1 Postup získávání MSC

Tento projekt probíhal v rámci *in vitro* testování mesenechymálních kmenových buněk (MSC), které je součástí klinického hodnocení probíhajícího na Hematologicko-onkologickém oddělení v Plzni. V této studii byly použity rozmrazené a rekultivované MSC získané v Laboratoři buněčné terapie na HOO. Pracoviště ÚIA, kde bylo testování jejich vlivu na proliferaci lymfocytů prováděno, již dostalo suspenzi MSC připravenou k testování. Buňky byly průtokovým cytometrem opakovaně analyzovány na pozitivitu povrchových znaků CD. Z hlediska fenotypu buňky nevykazovaly znaky CD45, CD34, CD14, CD19 a HLA-DR. Naopak byla prokázána exprese znaků CD13, CD73, CD90, CD105, CD271 (40).

9.2 Postup získávání fibroblastů

Tkáňové fibroblasty byly získány v rámci projektu hodnotící tuto buněčnou linii na Ústavu biologie LF UK Plzeň. Buňky použité pro měření byly dodány ústavem biologie ve formě suspenze, které se po naředění na požadovanou buněčnost (1×10^6 b.b./ml) použila pro stanovení.

10 PROVEDENÍ TESTU

Vzhledem k tomu, že požadovaným výsledkem je zhodnocení vlivu MSC a fibroblastů na proces aktivace lymfocytů, tedy to, zda MSC a fibroblasty nějakým způsobem do tohoto děje zasahují, byly vzorky nejdříve zpracovány pomocí metody blastické transformace založené na stimulaci buněk mitogenem phytohemaglutininem. K průkazu povrchových markerů byl použit průtokový cytometr.

10.1 Metoda blastické transformace

Z každého vzorku byl odebrán definovaný objem krve pro kultivaci buněk bez MSC či fibroblastů, která sloužila jako kontrolní vzorek; dále pro kultivaci buněk v přítomnosti MSC a v posledním případě pro kultivaci buněk s fibroblasty.

Pro každý vzorek ve všech skupinách (kontrolní vzorky, vzorky s MSC, vzorky s fibroblasty) byly připraveny dvě tkáňové zkumavky označené číslicí 0 (kontrola bez mitogenu) a písmenem A (vzorek aktivovaný mitogenem). Do obou zkumavek bylo postupně přidáváno kultivační médium a definovaný objem plné krve (samotné, s MSC či s fibroblasty), jež obsahovala antikoagulační činidlo. Zkumavka A navíc obsahovala mitogen PHA, který byl vybrán pro podporu proliferace lymfocytů. Roztok PHA byl naředěn na požadovanou koncentraci 0,04 mg/ml. Veškeré činnosti byly prováděny v laminárním boxu, aby bylo zabráněno kontaminaci vzorku. Takto získaný materiál byl inkubován v CO₂ termostatu po dobu 72 hodin při teplotě 37°C a 5% CO₂. Přesný postup přípravy vzorků je uvedený v protokolu v příloze 1.

10.2 Průkaz exprese povrchových znaků průtokovou cytometrií

Po kultivaci v termostatu bylo provedeno značení všech vzorků pomocí monoklonálních protilátek. MAb byly vybírány v závislosti na prokazovaných povrchových antigenech. První MAb byla anti-CD3 s navázaným Phykoerytrinem Cyaninem 7 (PC7). Dále je do směsi přidávána MAb proti CD25 obarvená fluoresceinem (FITC), CD45 s phykoerytrin-texaská červeň (ECD) a CD69 označená phykoerytrinem (PE). Po třicetiminutové inkubaci byly buňky po dobu 10 minut vystaveny působení lyzačního roztoku předem zahřátého na pokojovou teplotu. Výsledkem byla lýza erytrocytů neboli rozklad červených krvinek, který umožnil v dalších krocích odstranit nepotřebné části směsi. Další desetiminutová inkubace následovala po přidání fosfátového pufru PBS. Přidání PSB usnadňuje dokončení procesu lysace erytrocytů. Poté byl vzorek

centrifugován a odstraněn supernatant. Zbylá populace buněk byla opětovně doplněna PBS pufrem. Následovalo měření stupně proliferace průtokovým cytometrem. Přesný postup přípravy vzorků je uvedený v protokolu v příloze 1.

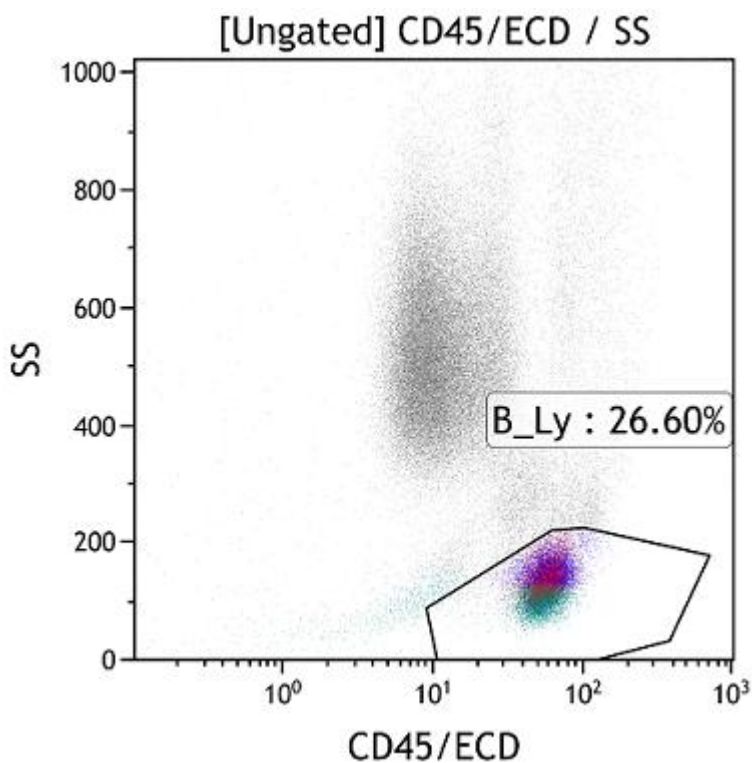
Prvním krokem při analýze exprese povrchových znaků bylo nastavení kanálů pro jednotlivé antigeny (tabulka 1).

Tabulka 1 Nastavení kanálů pro jednotlivé CD znaky

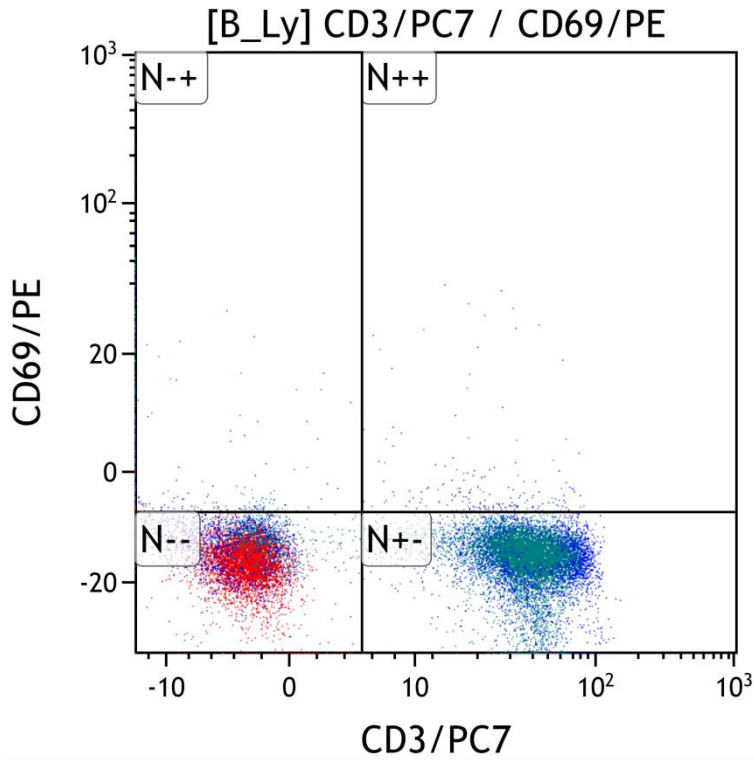
Znak	typ fluorochromu	kanál
CD25	FITC	1
CD69	PE	2
CD45	ECD	3
CD3	PC7	4

Po změření výsledků byla vybrána populace lymfocytů vykazujících znak CD45. Z této skupiny buněk byly vyhledány buňky s koexpresí CD3 a CD 25 (T-lymfocyty v pozdní fázi proliferace) a CD3 a CD69 (T-lymfocyty v časně fázi proliferace). Postup znázorňují obrázky 1 – 3.

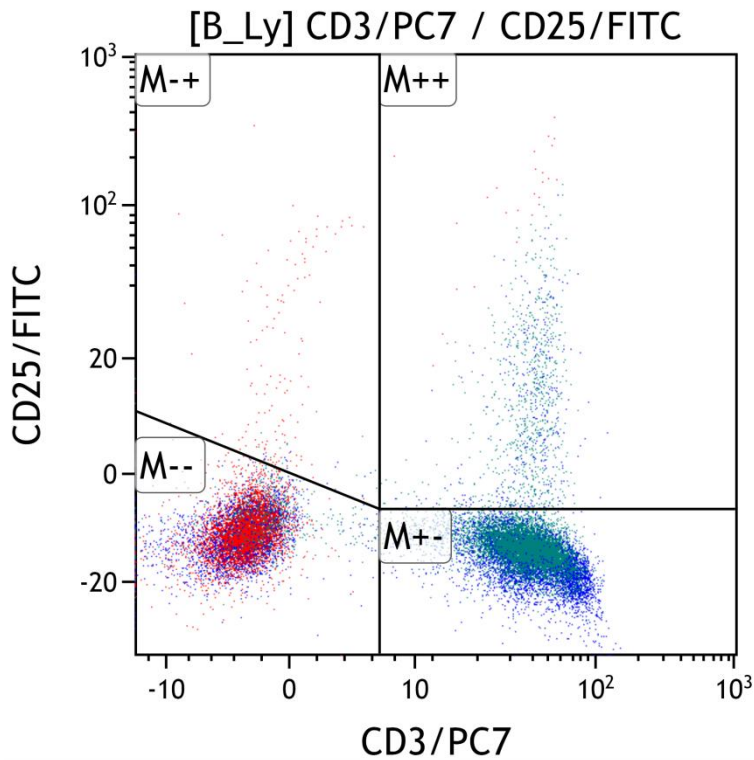
Obrázek 1 Populace lymfocytů vybraná na základě jejich exprese znaku CD45 a kolmého rozptylu



Obrázek 2 Buňky exprimující povrchové znaky CD3 a CD69 (marker časné aktivace.). Populace buněk pozitivní pro oba markery se nachází v pravém horním kvadrantu, v ostatních částech jsou buňky vykazující buď jeden, nebo žádný marker.



Obrázek 3 Buňky exprimující znak CD3 a CD 25 (marker pozdní aktivace). Buňky vykazující oba znaky se nachází v pravém horním kvadrantu, ostatních částech jsou buňky vykazující buď jeden, nebo žádný marker.



11 VÝSLEDKY

Měření probíhalo na 15 pacientech. Po provedení testu blastické transformace byly vzorky analyzovány pomocí průtokového cytometru, který stanovil expresi jednotlivých, námi definovaných, povrchových znaků (CD45 a CD3/CD25 a CD3/CD69) a CD3. Celkem bylo tedy provedeno měření na 45 vzorcích. Změřené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 2 - 4, hodnoty odpovídají procentuálnímu zastoupení jednotlivých populací.

Tabulka 2 Buňky kultivované bez MSC či fibroblastů

Kontrolní vzorek bez MSC nebo fibroblastu			
Vzorek č.	Aktivace	CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD69 ⁺
1	PHA	53,2	26,6
2	PHA	38,2	42,7
3	PHA	19,1	11
4	PHA	55,3	28,6
5	PHA	31,2	12,5
6	PHA	41,2	22,3
7	PHA	36,2	28,2
8	PHA	32,1	15,8
9	PHA	33,6	12,4
10	PHA	18,5	4,3
11	PHA	45,2	26,3
12	PHA	36,8	18,7
13	PHA	44,6	21,3
14	PHA	47,8	21,7
15	PHA	38,6	22,8

MSC – mesenchymální kmenové buňky; PHA – phytohemaglutinin; jednotlivé výsledky jsou uvedeny v procentech

Tabulka 3 Buňky kultivované v přítomnosti MSC

Vzorek s mezenchymálními buňkami			
Vzorek č.	Aktivace	CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD69 ⁺
1	PHA	12,1	4,0
2	PHA	6,8	10,5
3	PHA	7,5	6,1
4	PHA	25,4	9,8
5	PHA	4,4	4,0
6	PHA	18,4	12,3
7	PHA	20,5	5,6
8	PHA	21,3	14,3
9	PHA	19,6	5,4
10	PHA	10,5	4,0
11	PHA	12,5	7,6
12	PHA	18,5	10,4
13	PHA	19,3	10,3
14	PHA	22,5	16,5
15	PHA	10,8	9,6

MSC – mesenchymální kmenové buňky; PHA – phytohemaglutinin; jednotlivé výsledky jsou uvedeny v procentech

Tabulka 4 Kultivace buněk s fibroblasty

Vzorek s tkáňovými fibroblasty			
Vzorek č.	Aktivace	CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD69 ⁺
1	PHA	15,4	12,1
2	PHA	20,1	11,5
3	PHA	8,5	7,2
4	PHA	24,3	12,3
5	PHA	10,8	12,0
6	PHA	21,2	12,5
7	PHA	18,5	10,2
8	PHA	20,5	13,2
9	PHA	28,5	10,8
10	PHA	12,6	5,0
11	PHA	15,5	21,0
12	PHA	25,6	14,4
13	PHA	24,6	18,4
14	PHA	26,4	16,4
15	PHA	30,1	12,8

PHA – phytohemaglutinin; jednotlivé výsledky jsou uvedeny v procentech

Z každého souboru zaznamenaného procentuálního zastoupení buněk v proliferační fázi byla určena minimální a maximální hodnota proliferace, kterou buňky vykazovaly, dále byla z každé skupiny vzorků pozitivních pro znaky CD25 a CD69 vypočítána průměrná hodnota a medián proliferace (tabulka 5 - 6). Soubor výsledků byl posléze zpracován ve statistickém programu R project. V rámci tohoto programu byla Wilcoxonovým neparametrickým testem určena statistická významnost rozdílu mezi hodnotami mediánů jednotlivých souborů vzorků.

Tabulka 5 Buňky pozitivní pro znaky CD3 a CD69

CD3+ CD69+	Kontrolní vzorek	Vzorek s MSC	Vzorek s fibroblasty
Počet měření	15	15	15
Průměr	21,0	8,7	12,7
Minimum	4,3	4,0	5,0
Maximum	42,7	16,5	21,0
Medián	21,7	9,6	12,3

jednotlivé výsledky jsou uvedeny v procentech

Tabulka 6 Buňky pozitivní pro znak CD3 a CD25

CD3+ CD25+	Kontrolní vzorek	Vzorek s MSC	Vzorek s fibroblasty
Počet měření	15	15	15
Průměr	38,1	15,3	20,2
Minimum	18,5	4,4	8,5
Maximum	55,3	25,4	30,1
Medián	38,2	18,4	20,5

jednotlivé výsledky jsou uvedeny v procentech

Jako první byla sledována exprese povrchové molekuly CD69, která slouží jako marker časně aktivace lymfocytů (tabulka 4). Marker byl prokazován v koexpresi s markerem CD3 (čili v kulturách T-lymfocytů). V kultuře buněk kontrolních vzorků bylo pozorováno 21,7% (medián) buněk, které vykazovaly znaky proliferace. Na druhé straně se v kulturách lymfocytů kultivovaných v přítomnosti MSC nacházelo pouze 9,6% (medián) těchto buněk. Rozdíl tedy činil 12,1 % ($p < 0,01$). I ve vzorku s fibroblasty jsme zaznamenali významné snížení hodnoty proliferace (12,3%, medián) vůči hodnotám kontrolního vzorku. V tomto případě došlo tedy ke snížení počtu stimulovaných lymfocytů

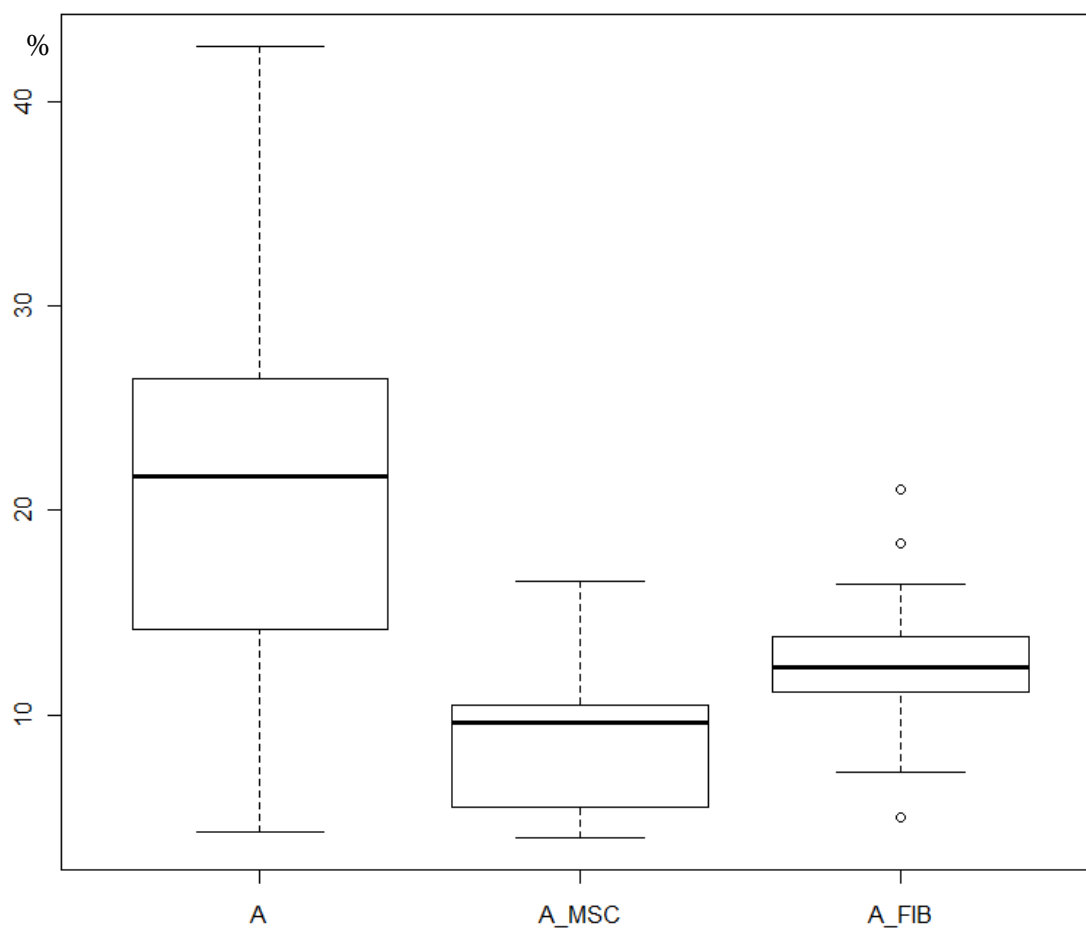
o 9,4% ($p < 0,01$). Rozdíl mezi potlačením stimulace MSC a fibroblasty je 2,7% ($p = 0,0095$).

V druhém případě byly porovnávány hodnoty mediánů buněk pozitivních pro znaky CD3 a CD25, tedy mediány jednotlivých kultur T-lymfocytů v pozdní fázi proliferace (tabulka 5). V kontrolních vzorcích tvořily aktivované buňky početnou skupinu. Jejich zastoupení bylo 38,2% (medián). Oproti tomu bylo ve skupině s přidanými MSC 18,4% (medián) buněk s pozitivním aktivačním markerem CD25. Z těchto výsledků je tedy patrné, že rozdíl hodnot proliferace činil 19,8% ($p < 0,01$). Téměř stejně významný byl i rozdíl mezi skupinou kontrolních testů (38,2%, medián) vůči souboru vzorků kultivovaných v přítomnosti fibroblastů (20,5%, medián). Zde rozdíl hodnot činil 17,7% ($p < 0,01$). Naopak téměř bezvýznamné se jeví porovnávání hodnot proliferace u vzorků s přidanými MSC nebo fibroblasty. Vzorky s MSC sice vykazovaly nižší počet aktivovaných buněk (rozdíl = 2,1%, $p > 0,01$), nicméně byl tento rozdíl prokázán jako nevýznamný.

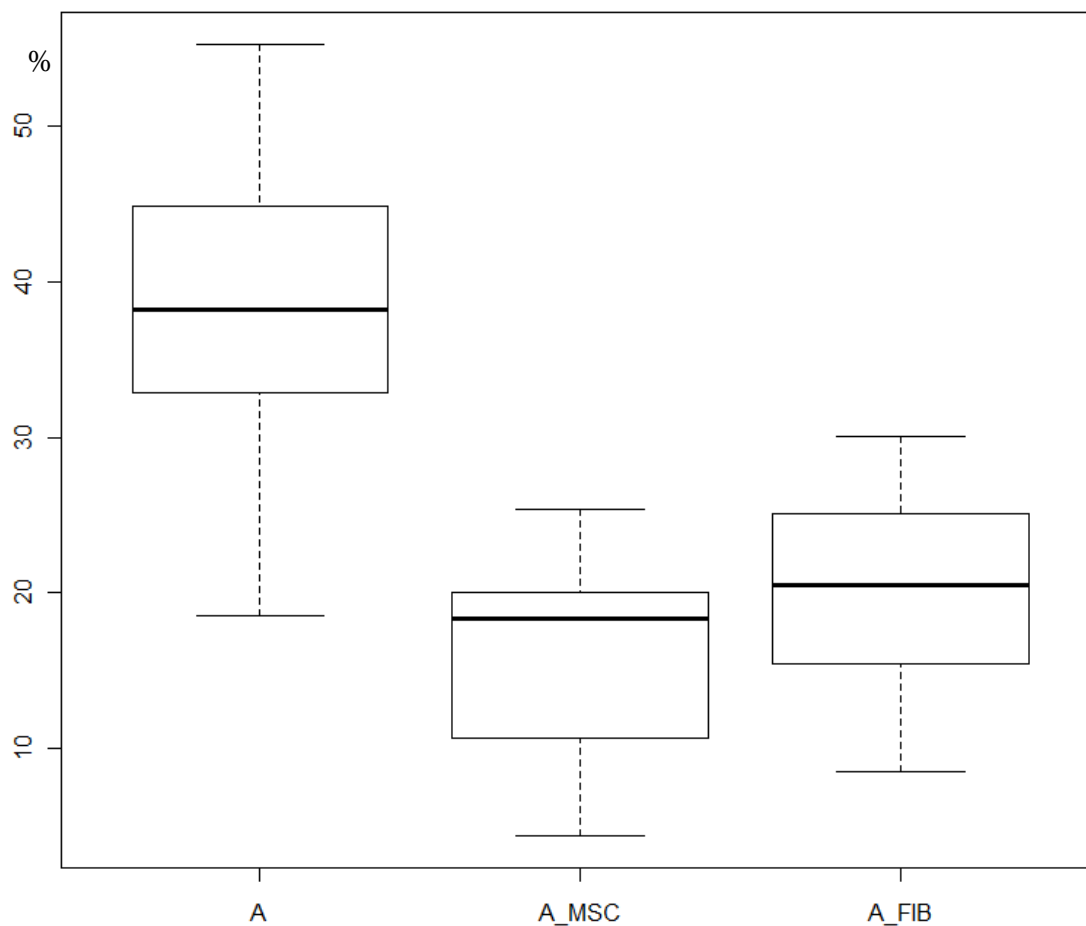
Bliže jsou hodnoty proliferace zobrazeny v grafech 1 a 2. Grafy byly zhotoveny ve stejném programu R project, ve kterém byl proveden Wilcoxonův test.

Graf 1 Procentuální zastoupení aktivovaných T-lymfocytů exprimujících CD69. Graf znázorňuje velký vliv MSC a fibroblastů na schopnost proliferační T-lymfocytů. Kontrolní vzorek bez MSC a fibroblastů udává proliferační 21,7%, ve vzorcích s přidáním MSC či fibroblastů došlo k citelnému snížení proliferační na 9,6%, resp. 12,3%. Rozdíl hodnot první a druhé skupiny (tzn. u kontrolního vzorku a vzorku s MSC) je 12,1% a 9,4% (v obou případech je $p < 0,01$), rozdíl mezi hodnotami u druhé a třetí skupiny je 2,7% ($p = 0,0095$).

Skupina A představuje buňky aktivované mitogenem bez MSC či fibroblastů, označení A_MSC, resp. A_FIB nese skupina buněk s přidáním MSC či fibroblastů.



Graf 2 Procentuální zastoupení aktivovaných T-lymfocytů exprimujících CD25. Graf (stejně jako v prvním případě) znázorňuje uplatnění MSC a fibroblastů při procesu aktivace T-lymfocytů. Kontrolní vzorek bez MSC a fibroblastů udává proliferaci 38,2%, ve vzorcích s přidanými MSC či fibroblasty se snížila proliferace na 18,4% (MSC) a 20,5% (fibroblasty). Rozdíl hodnot první a druhé skupiny (tzn. u kontrolního vzorku a vzorku s MSC) je tedy 19,8%, příp. 9,4% (v obou případech je $p < 0,01$), rozdíl mezi hodnotami u druhé a třetí skupiny je 2,7% ($p = 0,0095$). Skupina A představuje buňky aktivované mitogenem bez MSC či fibroblastů, označení A_MSC, resp. A_FIB nese skupina buněk s přidanými MSC či fibroblasty.



12 DISKUZE

Mezenchymální kmenové buňky, poprvé popsány na konci 60. let minulého století, jsou charakteristické svou velkou schopností diferenciací v různé typy buněk odlišných tkání. Několikrát byly také zkoumány a dokázány jejich imunomodulační vlastnosti - vědci se v minulých letech zabývali hlavně jejich schopností ovlivnit přehnané reakce či nežádoucí procesy odehrávající se v těle jako součást imunitního systému. Autoři se ve svých pracích často zaměřují na předpoklad, že tyto buňky produkují specifické látky, které inhibují proliferaci T-lymfocytů a snižují jejich schopnost vykonávat svou přirozenou funkci. Pro zhodnocení aktivity buněk využívají analýzu buněk nacházejících se v různých stadiích buněčných cyklů nebo průkaz aktivačních markerů, oba testy pracují na stejném principu. K získání výsledků je využíván průtokový cytometr, jež informuje o velikosti jednotlivých lymfocytárních populací a procentuálním zastoupení aktivních buněk (7 - 9). Např. Vlas a spol. se ve svém článku zabývají stanovením procenta aktivovaných lymfocytů po kultivaci s mitogenem a MSC. K vyhodnocení aktivity byla využívána analýza fázi buněčného cyklu. Ačkoliv nelze přímo porovnávat výsledky autorů s našimi, je v obou případech patrné, že došlo k výraznému snížení proliferační aktivity, přičemž rozdíly mezi kulturami buněk aktivovaných mitogenem a vzorků obsahujících MSC (v našem případě i fibroblasty) byly vyhodnoceny jako statisticky významné (40). Způsobem, jakým MSC ovlivňují výskyt povrchových aktivačních znaků (markerů) ve své práci hodnotí Li a spol. Autoři posuzovali efekt mezenchymálních kmenových buněk na proces aktivace T-lymfocytů, resp. výskyt povrchových struktur CD69 a CD25, typických pro časnou a pozdní fázi proliferace, a proteinu LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3). Průtokovou cytometrií bylo dokázáno, že exprese povrchových molekul se po kultivaci s MSC podstatně snížila jak v případě markeru CD69, tak CD25. Autoři udávají, že po pětidenní kultivaci buněk s MSC se zastoupení buněk snížilo z 23,5% na 12,9%. Tyto výsledky odpovídají výsledkům naměřených námi po třech dnech kultivace (v našem vzorku došlo ke snížení hodnot z 21,7% na 9,7% - mediány). Hodnoty pro CD25 autoři neuvádějí (10).

Ještě před objevením MSC byly charakterizovány vlastnosti fibroblastů, z nichž některé jsou sdíleny s MSC. Fibroblasty se stejně jako MSC vyskytují v celém těle, diferencují se v buňky pojivové tkáně a jelikož produkují stejné inhibiční látky jako MSC, mají také potenciál regulovat imunitní reakce, a tím tlumit aktivitu mitogeneticky a

alogeneticky stimulovaných T-lymfocytů (41). Schopnost zastavení proliferace se odráží i v námi získaných výsledcích, kdy aktivita buněk kultivovaných s fibroblasty klesla oproti aktivitě kultury buněk bez fibroblastů o 9,4%, pokud jde o znak CD69, a o 17,7% v případě znaku CD25.

Díky zaznamenaným výsledkům lze odpovědět na dříve položené výzkumné otázky:

1) Mají mezenchymální kmenové buňky vliv na proliferaci T-lymfocytů?

Odpověď: Ano, buňky vylučovanými produkty výrazně snižují proliferaci T-lymfocytů a zastavují jejich aktivaci.

2) Mají tkáňové fibroblasty vliv na proliferaci T-lymfocytů?

Odpověď: Ano, stejně jako je tomu v případě MSC, i fibroblasty regulují průběh proliferace T-lymfocytů.

3) Je rozdíl mezi schopností proliferace T-lymfocytů kultivovaných v přítomnosti MSC či fibroblastů a samostatně významný?

Odpověď: Ne. Wilcoxonovým neparametrickým testem bylo zjištěno, že MSC i fibroblasty mají téměř stejnou schopnost tlumit aktivitu T-lymfocytů a rozdíl v jejich použití není významný.

ZÁVĚR

Ačkoliv by se na první pohled mohlo zdát, že mezenchymové kmenové buňky a fibroblasty nemají mnoho společného, opak je pravdou. Dokonce se někteří autoři zabývají myšlenkou, že jde o stejný typ buněk. Tento fakt by ovšem neměnil nic na tom, že se jedná o buňky se specifickými vlastnostmi, které mohou za určitých podmínek změnit ráz imunitní reakce. Z tohoto důvodu se na ně s nadějí upíná zrak mnoha vědců, potažmo pacientů trpících autoimunitní chorobou. Nezůstává však jen u tohoto druhu onemocnění, v poslední době se zkoumá také možnost jejich kombinace s nanotechnologiemi, která by umožnila lepší hojení po různých zákrocích.

SEZNAM LITERATURY

1. **HOŘEJŠÍ, Václav, a další.** *Základy imunologie*. Praha : TRITON, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
2. **KREJSEK, Jan a KOPECKÝ, Otakar.** *Klinická imunologie*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2004. ISBN 80-862-2550-X.
3. **ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. a PILLAI, Shiv.** *Basic Immunology Functions and disorders of the Immune System*. Philadelphia : Elsevier Saunders, 2014. ISBN 978-1-4557-0707-2.
4. **DOAN, Thao, a další.** *Immunology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins,, 2013. ISBN 978-1-4511-1154-5.
5. **LUELMANN-RAUCH, Renate.** *Histologie*. Praha : GRADA, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
6. **JUNQUEIRA, Carlos L., CARNEIRO, José a KELLEY, Robert O.** *Základy histologie*. Jinočany : H&H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
7. **LOW, Jun How, RAMDAS, Premdass a RADHAKRISHNAN, Ammu Kutty.** Modulatory effects of mesenchymal stem cells on leukocytes and leukemic cells: A double edge sword? *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2015, 4.
DOI: 10.1016/j.bcmed.2015.07.017
8. **LAUBE, Mandy, a další.** Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for pulmonary complications associated with preterm birth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2016, 74. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.02.023
9. **NAZAROV, Cristina, a další.** Assessment of immunosuppressive activity of human mesenchymal stem cells using murine antigen specific CD4 and CD8 T cells in vitro. *Stem cell research therapy*. 2013, 5, 351–357. DOI: 10.1186/scrt339
10. **LI, Jiang, a další.** Human T cells upregulate CD69 after coculture with xenogeneic genetically-modified pig mesenchymal stromal cells. *Cellular immunology*. 2013, 285, 23–30. DOI: 10.1016/j.cellimm.2013.08.004
11. **MESCHER, Anthony L.** *Junqueira's Basic Histology*. Singapore : McGraw-Hill Companies, 2010. ISBN 978-007-127190-5.
12. **ALBERTS, Bruce, a další.** *Molecular Biology of the Cell*. New York : Garland Science, 2002. ISBN-10: 0-8153-3218-1.
13. **JORDANA, M., a další.** Immune-inflamantory functions of fibroblasts. *European Respiratory Journal*. 1994, 7, 2212–2222. ISSN 0903-1936

14. **ECKSCHLAGER, Tomáš.** *Průtoková cytometrie v klinické praxi.* Praha : Grada, 1999. ISBN 80-7169-279-4.
15. **PUSZTAI, Arpad a BARDOCZ, Susan.** *Lectins Biomedical Perspective.* Bristol, PA : Taylor Francis, 1995. ISBN 0 7484-01776.
16. **NOWELL, Peter C.** Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. *Cancer Research.* 1960, 20, 462-466.
17. **HAMELRYCK, Thomas W., a další.** The Crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L. *The Journal of Biological Chemistry.* 1996, 34, 20479-20485. DOI: 10.1074/jbc.271.34.20479
18. **ABRAHAM, Ann, a další.** Bad Bug Book. *FDA: U.S. Food and Drug Administration.* [Online] 2012. [Citace: 22. březen 2016.] <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>.
19. **LIENER, Irvin E., SHARON, Nathan a GOLDSTEIN, Irwin J.** *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.* Orlando : Academic Press, 1986. ISBN 0-12-449945-7.
20. **HARDMAN, Karl D. a AINSWORTH, Clinton F.** Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 1972, 11, 4910–4919. DOI: 10.1021/bi00776a006
21. **RAETZ, Christian R. H. a WHITFIELD, Chris.** Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry.* 2016, 71, 635-700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
22. **VOTAVA, Miroslav.** *Lékařská mikrobiologie obecná.* Brno : NEPTUN, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
23. **KEIGHTLEY, Richard G., COOPER, Max D. a LAWTON, Alexander R.** The T Cell Dependence of B Cell Differentiation Induced by Pokeweed Mitogen. *The Journal of Immunology.* 1976, 5, 1538-1544.
24. **BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a PAULÍK, Milan.** *Vyšetřovací metody v imunologii.* Praha : Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
25. **LITZMAN, Jiří, PETŘEK, Martin a THON, Vojtěch.** *Vyšetřovací metody v klinické imunologii.* Brno : Masarykova univerzita, 1998. ISBN 80-210-1807-0.
26. **LITZMAN, Jiří, a další.** *Základy vyšetření v klinické imunologii.* Brno : Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4227-8.
27. Buněčný cyklus. *WikiSkripta.* [Online] 9. 8. 2015. [Citace: 17. 3. 2016.] http://www.wikiskripta.eu/index.php/Buněčný_cyklus. ISSN 1804-6517.
28. **BECKAMN COULTER.** IO Test CD45-ECD. Marseille : Beckman Coulter, 2011.

29. **ZIMA, Tomáš.** *Laboratorní diagnostika*. Praha : Galén, 2013. ISBN 978-80-7492-062-2.
30. **BECKMAN COULTER.** Cytomic FC 500 se software CXP. *Návod k obsluze*. Fullerton : Beckman Coulter, Inc., 2004.
31. **BECKMAN COULTER.** OptilyseC Lysis solution. Marseille : Beckman Coulter, 2006.
32. **TÁRNOK, Attila.** Slide-Based Cytometry for Cytomics - A Minireview. *Cytometry*. 2006, 7, 555–562. DOI: 10.1002/cyto.a.20317
33. **BDBIOSCIENCES.** CD Marker Handbook Human CD Markers. *BDBioSciences*. [Online] 2015. [Citace: 18. Březen 2016.]
[http://static.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf?_ga=1.166705790.1518427091.1458424309#search=human cd markers chart](http://static.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf?_ga=1.166705790.1518427091.1458424309#search=human%20cd%20markers%20chart).
34. **BIOLEGEND.** FITC anti-human CD3. San Diego : BioLegend.
35. **EXBIO.** Monoclonal Antibody to CD25 Fluorescein (FITC) conjugated (25 tests). Praha : EXBIO.
36. **HOLMES, Nick.** CD45: all is not clear yet. *Immunology*. 2005, 2, 145–155. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2005.02265.x
37. **EXBIO.** Monoclonal antibody to CD69 Phycoerythrin (PE) conjugated (25 tests). Praha : EXBIO.
38. **VITALES-NOYOLA, M., a další.** Quantitative and functional analysis of CD69+ NKG2D+ T regulatory cells in healthy subjects. *Human Immunology*. 2015, 7, 511–518. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.06.003
39. **HAN, Yanmei, a další.** CD69+CD4+CD25- T Cells, a New Subset of Regulatory T Cells, Suppress T Cells Proliferation through Membrane-Bound TGF-beta1. *The Journal of Immunology*. 2009, 1, 111-20. DOI: 10.4049/jimmunol.182.1.111
40. **VLAS, Tomáš, a další.** Imunomodulační vliv mesenchymálních kmenových buněk na nespecificky indukovanou proliferaci lymfocytů. *Alergie*. 2011, Sv. 4.
41. **HANIFFA, Muzlifah A., a další.** Mesenchymal stem cells: the fibroblasts new clothes? *Haematologica*. 2009, 2, 258-263. DOI: 10.3324/haematol.13699

SEZNAM ZKRATEK

A	buňky aktivované mitogenem	G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
A_FIB	buňky aktivované mitogenem a kultivované s fibroblasty	GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
A_MSC	buňky aktivované mitogenem a kultivované s mezenchymovými kmenovými buňkami	GTP	guanosintrifodfát
APC	antigen-prezentující buňky	GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
CD	cluster designation	HGF	hepatocyte growth factor
ConA	konkavalin A	HLA	hlavní histokompatibilní systém
CTLA-4	kostimulační signál při aktivaci T-lymfocytů	IFN γ	interferon gama
DNA	deoxyribonukleová kyselina	IgA	imunoglobulin A
ECD	phykoerytrin-texaská červeň	IgG	imunoglobulin G
ECM	extracelulární matrix	IgM	imunoglobulin M
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová	IL	interleukin
FITC	fluorescein izothiokyanát	IDO	indolamin-2,3dioxygenáza
FL	fluorescenční světlo	Jak	Janusova kináza z rodiny tyrosinkináz
FS	přímý rozptyl	LAT	adapterová molekula
Fyn	enzym z rodiny Src kináz	Lck	enzym z rodiny Src kináz
		LFA-1	lymphocyte function-associated antigen
		LIF	leukaemia inhibitory factor
		LPS	lipopolysacharid
		MAB	monoklonální protilátka

M-CSF	macrophage colony-stimulating factor	SLC	druh chemokinu
MHC	hlavní histokompatibilní komplex	SLP-76	adapterová molekula
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein alpha	Src	kináza podílející se na aktivaci T-lymfocytů
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein beta	SS	kolmý rozptyl
MSC	mezenchymové kmenové buňky	STAT	transkripční faktor, účastní se přenosu signálu a aktivace buňky
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)	TCR	receptor T-lymfocytů
PDGF	platelet-derived growth factor	TGF β	transforming growth factor
PC	pyridin-chlorofyl	TNF α	tumor necrosis factor alpha
PE	phykoerytrin	TNF β	tumor necrosis factor beta
PGE ₂	prostaglandin E ₂		
PHA	phytohemagglutinin	<u>PRACOVISTĚ:</u>	
PHA-E	součást molekuly phytohemagglutininu	FN	fakultní nemocnice
PHA-L	součást molekuly phytohemagglutininu	HOO	hemato-onkologické oddělení
PWM	pokeweed mitogen	LF UK Plzeň	lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni
RANTES	druh chemokinu	UIA	ústav imunologie a alergologie
SCF	stem cell factor		
SDF-1A	stromal cell-derived factor-1alpha		
SCID	těžká kombinovaná imunodeficience		
SI	stimulační index		

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 *Nastavení kanálů pro jednotlivé CD znaky*

Tabulka 2 *Buňky kultivované bez MSC či fibroblastů*

Tabulka 3 *Buňky kultivované v přítomnosti MSC*

Tabulka 4 *Kultivace buněk s fibroblasty*

Tabulka 5 *Buňky pozitivní pro znaky CD3 a CD69*

Tabulka 6 *Buňky pozitivní pro znak CD3 a CD25*

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 *Procentuální zastoupení aktivovaných T-lymfocytů exprimujících CD69.*

Graf 2 *Procentuální zastoupení aktivovaných T-lymfocytů exprimujících CD25.*

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 *Populace lymfocytů vybraná na základě jejich exprese znaku CD45 a kolmého rozptylu.*

Obrázek 2 *Buňky exprimující povrchové znaky CD3 A CD69 (marker časné aktivace.).*

Obrázek 3 *Buňky exprimující znak CD3 a CD 25 (marker pozdní aktivace).*

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 *Protokol*

PŘÍLOHY

Příloha 1 *Protokol*

Téma: Průkaz aktivačních markerů

Princip: Metoda slouží k navození proliferačního procesu v kulturách lymfocytů, které jsou společně s mezenchymovými kmenovými buňkami (MSC) a fibroblasty kultivovány v přítomnosti rostlinného lektinu (mitogenu) phytohemaglutininu (PHA). Změny, které buňka prodělává, se odrážejí v přítomnosti znaků, které buňka exprimuje na povrchu své membrány. Přítomnost těchto struktur zaznamenává průtokový cytometr pomocí monoklonálních protilátek označených fluorescenčními barvivami, jež se vážou na příslušné antigenní struktury.

a) Metoda blastické transformace

Reagencie: kultivační médium X-vivo, zásobní roztok PHA

Biologický materiál: vzorky buněčných kultur, vzorky buněčných kultur s přidanými MSC, vzorky buněčných kultur s přidanými fibroblasty

Postup:

Kroky 1 – 4 provádíme kvůli požadavkům na sterilitu v laminárním boxu.

- 1) Pro každý vzorek si připravíme šest zkumavek, dvě zkumavky pro vzorky bez MSC či fibroblastů, dvě z nich pro vzorky s MSC a dvě pro vzorky s fibroblasty.
- 2) Každou dvojici tkáňových zkumavek si označíme číslicí 0 a písmenem A, dále je popíšeme příslušným číslem vzorku.
- 3) Do zkumavky 0, která slouží jako negativní kontrola, napipetujeme 1900 μ l kultivačního média a 100 μ l vzorku.
- 4) Do zkumavky A napipetujeme 700 μ l kultivačního média X-vivo, dále 500 μ l naředěného roztoku PHA o koncentraci 0,04 mg/ml. Přidáme 100 μ l vzorku.
- 5) Všechny vzorky kultivujeme 72 hodin v CO₂ termostatu při teplotě 37°C a 5% CO₂.

b) Analýza na průtokovém cytometru

Reagencie: monoklonální protilátky označené fluorochromy (PC7 anti-human CD3, Monoclonal Antibody to CD25 Fluorescein (FITC) conjugated, CD45-ECD, Monoclonal Antibody to CD69 Phycoerytrin (PE) conjugated), lyzační roztok OptiLyseC, PBS pufr

Biologický materiál: vzorky buněčných kultur, vzorky buněčných kultur s přidanými MSC, vzorky buněčných kultur s přidanými fibroblasty – všechny po třídenní kultivaci s PHA

Postup:

- 1) Po třídenní kultivaci vyjmeme všechny vzorky z termostatu. Z každého odebereme 50 μ l a napipetujeme je do označených cytometrických zkumavek. Poté do každé zkumavky přidáme 6 μ l protilátky s navázanou fluorescenční látkou.
- 2) Vzorky krátce zvortexujeme a poté inkubujeme po dobu 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C).
- 3) Následně přidáme dávku lyzačního roztoku (0,4 ml), znovu promícháme a necháme 10 min inkubovat, aby mohlo dojít k úplné lyzaci erytrocytů.
- 4) Ke každému vzorku přidáme 0,4 ml PBS a centrifugujeme 3 minuty. Počet otáček nastavíme na 1800 otáček/min.
- 5) Po provedení centrifugace slejeme supernatant, znovu přidáme dávku PBS a měříme na průtokovém cytometru.
- 6) V softwaru si nastavíme kanály pro jednotlivá fluorescenční barviva. Na kanále číslo jedna je zaznamenáváno světlo emitované z fluorochromu FITC (pro antigen CD25), kanál číslo dva odpovídá barvivu PE (CD69), na kanále číslo tři je měřeno světlo z ECD (CD45) a kanál číslo čtyři měří PC7 (CD3).
- 7) Každý vzorek změříme průtokovým cytometrem a vyhodnotíme výsledky.