

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Hradec Králové 2008

Bohumíra Kronosová

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA**

**Nové pohledy na populaci T lymfocytů  
Novel aspects of T lymphocyte subpopulations**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Bohumíra Kronosová**

Vedoucí práce: **Doc. MUDr. Ilja Stríž, CSc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ 2008**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením vedoucího závěrečné práce, a že jsem použila jen uvedené informační zdroje.

Hradec Králové dne 17. 8. 2008

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych chtěla poděkovat Institutu klinické a experimentální medicíny, který mi umožnil studium oboru zdravotnická bioanalytika v Hradci Králové.

Mé poděkování patří i vedoucímu bakalářské práce Doc. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc za cenné připomínky a vedení při zpracování této práce.

Souhlasím, aby moje závěrečná práce byla půjčována ke studijním účelům. Žádám, aby byla citována podle platných norem.

V Hradci Králové, dne.....

.....

Podpis

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Vypracovala:	Bohumíra Kronosová
Vedoucí bakalářské práce:	Doc. MUDr. Ilja Stříž, CSc.
Název bakalářské práce:	Nové pohledy na populaci T lymfocytů
Počet stran:	53
Rok obhajoby:	2008
Klíčová slova:	imunitní systém, adaptivní imunita, T lymfocyt, Th17 T regulační buňky

Základní funkcí imunitního systému je rozpoznání škodlivého od neškodného a cizího od vlastního. Společně s endokrinním a nervovým systémem se podílejí na udržení homeostázy organismu. Správná funkce imunitního systému je zajištěna spojením mechanismů přirozené a adaptivní imunity. Kromě humorálních faktorů, se na obranyschopnosti organismu podílejí imunokompetentní B lymfocyty, T lymfocyty a dendritické buňky. Komunikace probíhá prostřednictvím povrchových molekul a cytokinů. Identifikace škodlivého antigenu je stejně důležitá, jako správná a přesná regulace imunitní reakce. Regulace probíhá prostřednictvím přirozených T regulačních lymfocytů. Aktivita potencionálně autoreaktivních klonů T lymfocytů je tlumena právě T regulačními lymfocyty. Specifickým znakem této regulační populace je Foxp3 molekula v jádře. Je popsáno několik typů regulačních buněk, např. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD45RBlowCD4<sup>+</sup>(CD25<sup>+/-</sup>), Tr1, Th3, NKT buňky, intraepiteliální lymfocyty a další. Regulační schopnost T lymfocytů je ovlivněna cytokinovým prostředím v dané lokalizaci. K regulačním mechanismům imunitní odpovědi patří také specifická imunologická tolerance, která je aktivním dějem. Imunitní systém nereaguje na jeden daný antigen, ale ostatní imunitní mechanismy jsou plně funkční. Zajištění průběhu imunologické tolerance se děje prostřednictvím anergních buněk.

# Abstrakt

Charles University in Prague

Fakulty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Autor: Bohumíra Kronosová  
Tutor: Doc. MUDr. Ilja Stříž, CSc.  
Title: Novel aspects of T lymphocyte subpopulations  
Total of pages: 53  
Session: 2008  
Keywords: immune system  
adaptive immunity  
T lymphocytes  
Th17  
T regulatory cells

The main function of immune system is to distinguish potentially dangerous stimuli from harmless ones and the self from non-self. It is, together with endocrine and neural systems, involved in maintaining the organism homeostasis. Appropriate function of immune system is based on association of mechanisms of innate and adaptive immunity. Both humoral factors and immune cells like B and T lymphocytes, or dendritic cells are involved in defense mechanisms. Communication of cells is mediated mainly by membrane antigens and cytokines. The identification of potentially harmful antigen together with correct and specific regulation of the response is extremely important. T regulatory cells represent very important elements in the regulation and are able to suppress the activity of potential autoreactive clones of T lymphocytes. Nucleolar transcription factor Foxp3 seems to be a specific marker of these cells. There are several types of T regulatory cells such as CD4+CD25+, CD45RBlow(CD25+/-), Tr1, Th3, NKT cells, intraepithelial lymphocytes,...etc. The regulatory function of T lymphocytes is under control of cytokine microenvironment. The induction of immune tolerance is one of the mechanisms of immune response regulation. In this case, the immune system is not able to respond to a specific antigen while other immune mechanisms are fully active. Persistence of immune tolerance is exclusively mediated by anergic cells, mostly T regulatory cells.

# Obsah

Obsah .....	8
Úvod.....	11
1 Úloha imunitního systému .....	12
2 Koncepce přirozené a adaptivní imunity .....	13
2.1 Vývojově starší přirozená imunita.....	13
2.1.1 Identifikace patogenů.....	14
2.1.2 Tool receptory.....	14
2.2 Role adaptivní imunologie.....	16
2.2.1 Klasifikace buněk adaptivní imunity .....	16
2.2.2 B lymfocyty .....	16
2.2.3 T lymfocyty.....	17
2.2.3.1 Lymfocyty CD4+.....	17
2.3 Problematika Th1/Th2 rovnováhy .....	18
2.3.1 Hygienická hypotéza.....	20
2.4 Populace Th 17 lymfocytů.....	22
2.5 Lymfocyty CD8+.....	23
2.5.1 Mechanismus cytotoxicity CTL .....	24
2.5.1.1 Perforiny .....	24
2.5.1.2 Granzymy.....	25
2.6 Komunikace T lymfocytů s dendritickými buňkami .....	26
3 T regulační buňky a jejich úloha v imunitních reakcích.....	29



3.1	T regulační buňky a jejich význam.....	29
3.1.1	Původ.....	29
3.2	Identifikace Treg buněk.....	30
3.2.1	Molekula CD 25.....	31
3.2.2	Receptor CTLA-4.....	31
3.2.3	Receptor CD28.....	32
3.2.4	Členové rodiny TNF $\alpha$ receptorů.....	32
3.2.5	Chemokinové receptory CCR4, CCR5 a CCR6.....	32
3.2.6	Transkripční faktor Foxp3.....	32
3.3	Typy T regulačních buněk.....	33
3.3.1	CD4+CD25+ T regulační buňky.....	33
3.3.2	CD45RBlowCD4+(CD25+/-) T regulační buňky.....	33
3.3.3	T regulační (Tr1) buňky.....	33
3.3.4	Th3 buňky.....	34
3.3.5	CD8+ buňky.....	34
3.3.6	NKT buňky.....	34
3.3.7	Intraepiteliární T lymfocyty (IEL).....	35
3.3.8	Dosud nepřesně definované populace.....	35
3.4	Mechanismus působení.....	36
3.5	Přirozené a indukované Treg.....	37
4	Další faktory imunity ve vztahu k T regulačním buňkám.....	38
4.1.1	Tolerogenní dendritické buňky.....	38
4.1.2	Treg a regulace.....	38
4.1.3	Treg a nádorová imunita.....	38
4.1.4	Vliv Th1/Th2 na rovnováhu v průběhu reakce.....	39
4.1.5	T regulační buňky a alergie.....	39

5	Regulace imunitní odpovědi .....	40
5.1	Imunita versus imunologická tolerance .....	40
5.2	Anergie.....	41
5.3	Aktivní suprese .....	42
6	Využití poznatků o T lymfocytech v medicíně.....	43
	Diskuse.....	45
	Závěr .....	46
	Literatura a prameny .....	47
	Seznam zkratk .....	49
	Seznam obrázků.....	52

## Úvod

K zachování integrity organismu a jeho prosperitě je nutné zachování homeostázy. Na té se podílí více systémů. Imunitní systém (IS) je ten, který brání před napadením patogenem nebo sebedestrukci. Jeho vývoj je fylogeneticky velmi dlouhý a dá se říci, že byl zahájen samotným vznikem života. Z této doby se uchovaly mechanismy přirozené imunity. Přesné rozlišení potencionálního patogenů probíhá prostřednictvím Toll receptorů. Mechanismus rozlišení je důležitý pro okamžitý zásah přirozené imunity, který může být rozhodující pro zachování organismu.

Hlavním tématem je fungování adaptivní imunity, se zaměřením na její buněčnou složku, T lymfocyty. Tématem práce je představit nové poznatky nebo hypotézy současné imunologické vědy. Mnohá fakta o této populaci jsou obecně známa, ale současná věda umožňuje přesnější identifikaci této populace. Pokusně se pak daří zjistit a ověřit mechanismy jejich činnosti v organismu. Zpřesnění umožňuje definovat populace nové, jakou jsou například Th17 a T regulační buňky.

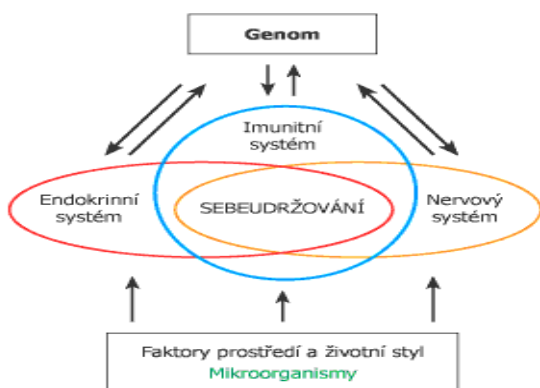
Úloha T regulačních buněk v imunitním systému se zdá být velmi důležitá. V této práci se věnuji jejich identifikaci, tak jak si ji představuje současná věda. Některé tyto subpopulace jsou určeny přesněji či velmi přesně, dokonce na molekulární úrovni. Byly nalezeny nové specifické znaky, jakým je např. Foxp3. Se znalostí jejich zařazení přichází i možnost jejich ovlivnění. Jsou známy asociace s chorobami při jejich deficitu nebo špatné funkci. Především představují novou terminologii a nové vazby v imunitním systému, které byly prokázány.

Tak dokonalý a velmi účinný systém jako ten imunitní musí být efektivně využíván a regulován. Regulace imunitní odpovědi je předmětem studia současné imunologie. Možnosti klinického využití jsou totiž obrovské, od léčby alergií, nádorů až po transplantace orgánů.

# 1 Úloha imunitního systému

Základním úkolem imunitního systému je zajištění homeostázy organismu rozpoznáváním cizorodých nebo škodlivých substancí. Obranschopnost chrání před patogenními organizmy a jejich toxickými produkty. Velmi důležitá funkce imunitního systému je autotolerance, která rozpoznává struktury těla vlastní a udržuje toleranci k nim. Třetí nedílnou součástí je funkce imunitního dohledu, kdy jsou vnitřní škodliviny, mutované nebo poškozené buňky rozpoznány a likvidovány. Mechanizmy zajišťující integritu organismu se v imunologické vědě dělí do dvou základních kategorií: nespecifické-přirozené a specifické-adaptivní [1]. Oba tyto mechanismy neexistují od sebe odděleně.

Imunitní systém jako celek je pak bezesporu ovlivňován dalšími systémy. Úloha nervového a endokrinního systému je nesporná, musí reagovat na potřeby bránícího se organismu. Nervová vlákna ovlivňují funkci endokrinních i exokrinních žláz. Neuroendokrinní systém musí reagovat na aktivitu IS a v případě potřeby ji také regulovat. Spojením pro tyto tři systémy je osa hypotalamus, hypofýza a nadledvinky. Narušení této osy je považováno například, za rozvoj autoimunitních imunopatologických reakcí. Ovlivňování imunitního systému kortikoidy je obecně známé. Komunikace mezi IS a neuroendokrinní soustavou probíhá pomocí hormonů a cytokinů.

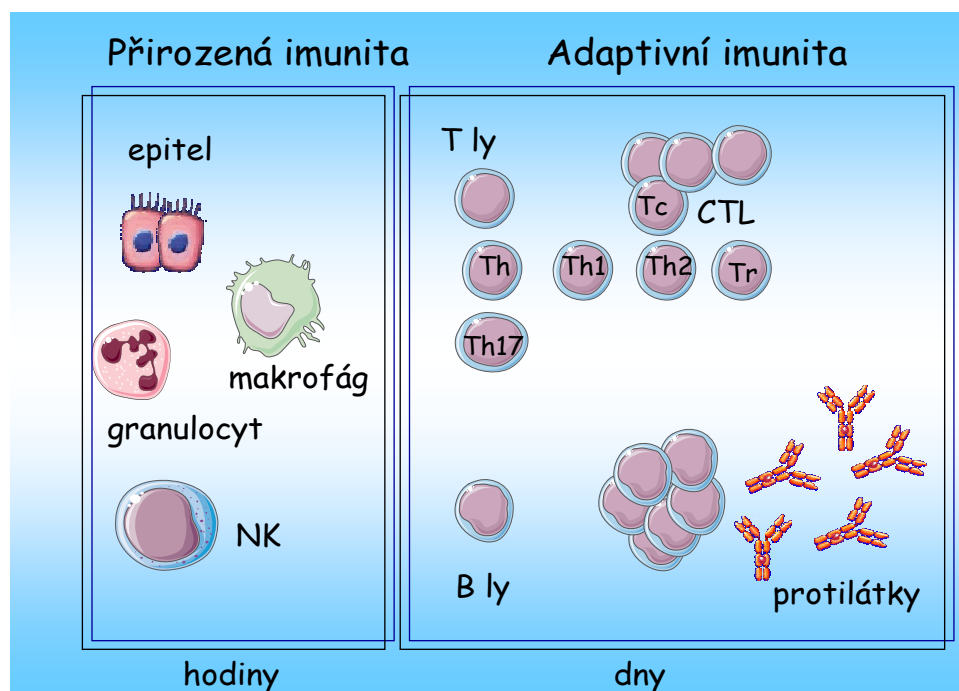


Obrázek 1: Provázanost imunitního systému

## 2 Koncepce přirozené a adaptivní imunity

### 2.1 Vývojově starší přirozená imunita

Přirozená imunita je vývojově starší složka imunitního systému. Zahrnuje několik nespecifických neadaptivních a vrozených mechanismů. Mechanické bariéry, jako je neporušená kůže nebo pohyb řasinek, brání vstupu patogenů. Solubilní složkou je lysozym a pepsin. Buňky, které nespecificky svými obrannými mechanismy bojují, jsou granulocyty, monocyty, makrofágy a žírné buňky. Pomáhají jim humorální složka-komplement, interferony a lektiny. Základní charakteristikou je okamžitý a rychlý nástup těchto obranných mechanismů.

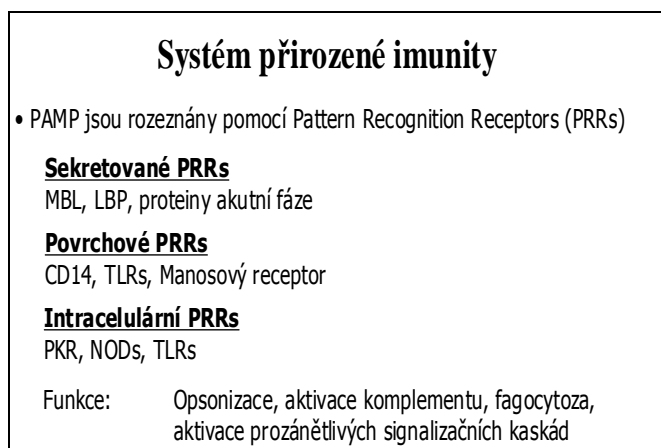


Obrázek 2: Mechanizmy přirozené a adaptivní imunity

### 2.1.1 Identifikace patogenů

Buňky přirozené imunity zajišťují prakticky okamžitou reakci na tzv. patogenem asociované molekulové vzory (PAMP). Takto se označují vysoce konzervované struktury na površích rozsáhlých skupin mikroorganismů na které reagují evolučně velmi staré PPR receptory (Pathogen Pattern Receptor).nebo také PRR (Pattern Recognition Receptor)PPR jsou exprimovány na řadě efektorových buněk, především na mikrofázích a dendritických buňkách.

Zasažením molekulového vzoru PAMP dojde k přímému zásahu životních funkcí mikrobiálních patogenů. Tento efekt je rozdílný od působení antibiotik, která naruší metabolickou dráhu, s jejímž narušením se může patogen vyrovnat (vznik rezistence) [9].



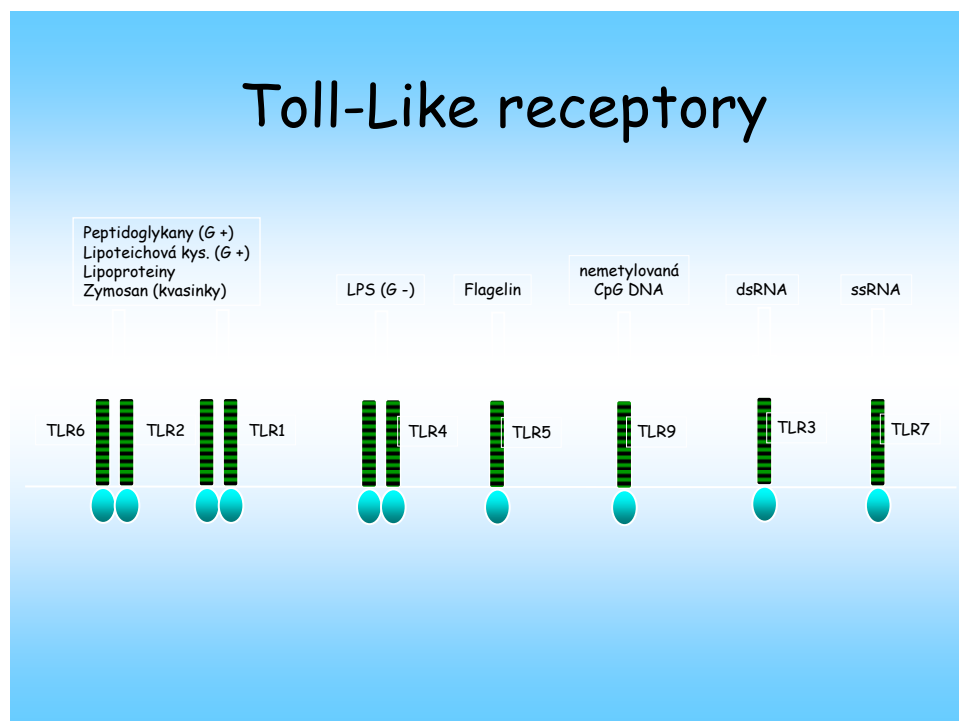
**Obrázek 3: PAMP molekuly**

### 2.1.2 Toll-like receptory

PPR receptory lze funkčně rozdělit do tříd: sekretované, endocytární a signální. Úloha signálních PPR je identifikace nebezpečných vzorů PAMP a následná aktivace transkripčního faktoru NFκB. Ten přechází do jádra a stimuluje přepis genů pro prozánětlivé produkty, čímž se podílejí na rozvoji imunitní reakce.

Signální Toll-like receptory (TLR) jsou transmembránové proteiny s velkou extracelulární doménou. Cytoplazmatická část Toll receptorů je podobná doměně receptoru pro IL-1. V současnosti je 14 identifikovaných TLR receptorů. Hlavní úloha

TLR je kooperace s dalšími membránovými molekulami na buňkách přirozené imunity, např. molekulou CD14 a molekulou MD-2 [9].



**Obrázek 4: Toll-like receptory**

Název je odvozen od receptoru Toll popsaného poprvé u mušky octomilky (*Drosophila*). Tyto receptory rozeznávají následující ligandy (a pravděpodobně ještě další).

- **TLR4** - lipopolysacharidy Gram-negativních bakterií, ale i několik jiných mikrobiálních struktur
- **TLR2** -(popř. heterodimery TLR2 s TLR1 a TLR6) – některé bakteriální lipoproteiny, peptidoglykany a glykolipidy
- **TLR3** - dvouvláknovou RNA (charakteristická pro některé viry)
- **TLR5** - flagelin (bílkovina bakteriálních bičků)
- **TLR7, TLR8** - virové jednovláknové RNA, některé nukleosidové deriváty, syntetické imunomodulační látky (imidazochinoliny)
- **TLR9** - nemetylované motivy CpG typické pro prokaryotickou DNA

- **TLR10** - ligand neznámý
- **TLR11** - nějaké složky uropatogenních bakterií [7].

## **2.2 Role adaptivní imunologie**

Specifická (adaptivní) imunitní odpověď je vývojově mladší. Humorální část specifické odpovědi zajišťují B lymfocyty protilátkami, buněčnou část představují T lymfocyty.

### **2.2.1 Klasifikace buněk adaptivní imunity**

Základní buňky adaptivní (antigenně specifické) imunity jsou T a B lymfocyty. Obě skupiny jsou vybaveny pro imunitní reakci odlišnými specifickými receptory. Jedná se o známé TCR a BCR, které vznikají při vývoji lymfocytů. Při přeskupování genů (V, D, J) vznikne obrovské množství klonálních variací, které jsou připraveny na setkání s antigenem. Milionový repertoár klonů nemusí být využit ze 100%. Mnoho klonů zůstane nevyužito [7].

### **2.2.2 B lymfocyty**

B lymfocyty tvoří základ specifické humorální imunity. Mají na svém povrchu antigenně specifické receptory BCR a glykoprotein MHC II. BCR vznikají při vývoji B lymfocytů. Vzniká velký repertoár připravených receptorů proti potencionálním antigenům. Antigenem aktivované B lymfocyty za pomoci Th buněk, proliferují a mění se v plazmatické buňky, které produkují specifické protilátky stejné specifiky jako je receptor mateřského B-lymfocytu vážou se tedy na stejný antigen a napomáhají tak jeho opsonizaci a umožňují dalším buňkám imunitního systému [1] [9].



### 2.2.3 T lymfocyty

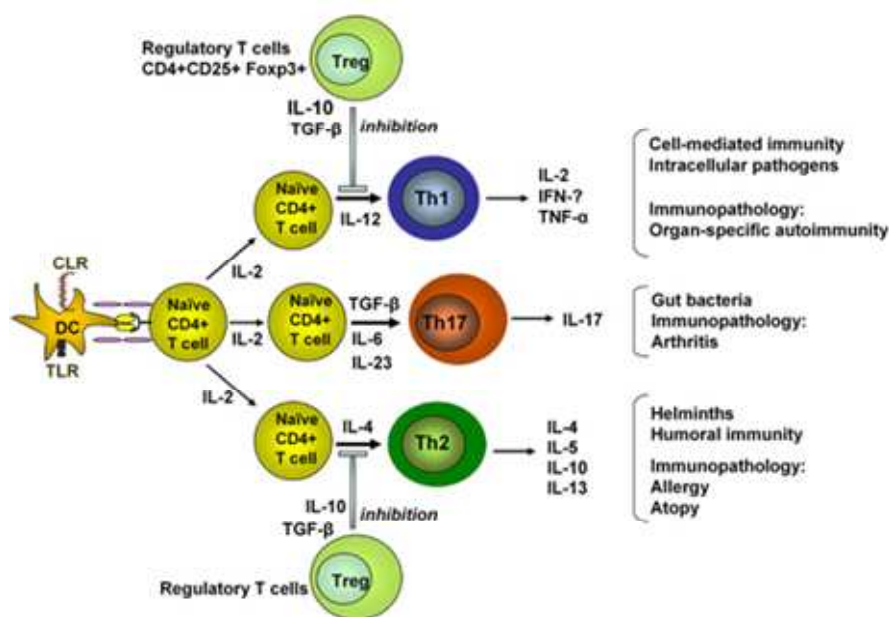
Lymfocyty, které při svém vývoji prošly brzlíkem (thymem) se označují jako T lymfocyty. V současné době se ví i o subpopulaci T lymfocytů, které ale brzlíkem neprošly. Proto se T lymfocyty definují přesněji podle přítomnosti povrchové exprese antigenně specifického receptoru T-receptor (TCR) a s ním asociovaného komplexu CD3 řetězců. [4] Dle typu exprimovaného znaku TCR lze dělit na  $\alpha\beta$ -TCR<sup>+</sup> a  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup>. Právě typ  $\alpha\beta$ -TCR<sup>+</sup> lymfocytů podstoupí selekci v thymu a dále je dělíme na známější subpopulace CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup>.

Nediferencované prekurzory, které se ještě nesetkaly s antigenem, označujeme dle typu buněk jako prekurzory Th (pTh) nebo prekurzory Tc (pTc) nebo také „naivní“ CD4<sup>+</sup> lymfocyty (Th0). Teprve po styku s antigenem vyvinou populace Th1, Th2, Th3, atd. [4].

#### 2.2.3.1 Lymfocyty CD4<sup>+</sup>

CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ -TCR<sup>+</sup> lymfocyty rozlišují peptidové fragmenty antigenů asociované s MHC glykoproteiny II. třídy. Funkčně představují prekurzory pomocných T lymfocytů (Th) nebo již zralé efektorové Th, taktéž paměťové buňky tohoto typu [4]. Povrchový protein CD4 funguje jako koreceptor MHC II. třídy.

„Naivní“ CD4<sup>+</sup> lymfocyty se diferencují v efektorové lymfocyty, označované Th1, Th2, Th17 a nebo také v později popsané regulační lymfocyty, to vše pod vlivem APC.

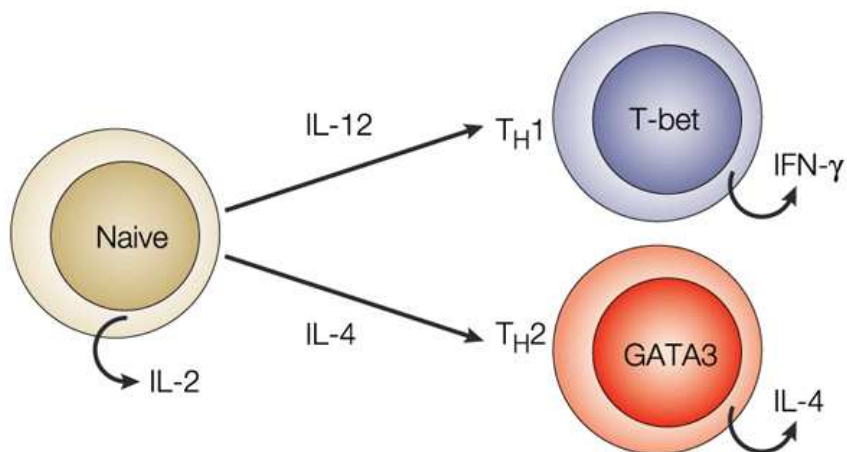


Obrázek 5: Diferenciace T lymfocytů

### 2.3 Problematika Th1/Th2 rovnováhy

Pro regulaci imunitní odpovědi je zásadní vzájemná inhibice Th1 a Th2 buněk. Po zahájení antigeně specifické odpovědi prostřednictvím jednoho či druhého typu imunitní reakce, je druhý typ potlačován. Tento antagonismus je dám vytvořeným cytokinovým prostředím. Produkt Th1 buněk,  $\text{INF}\gamma$ , inhibuje diferenciaci Th2 buněk. Produkt Th2 buněk, IL-4, inhibuje vývoj Th1 buněk. Za základní imunoregulační mechanismus je považován právě antagonismus cytokinů  $\text{INF}\gamma$  a IL-4.

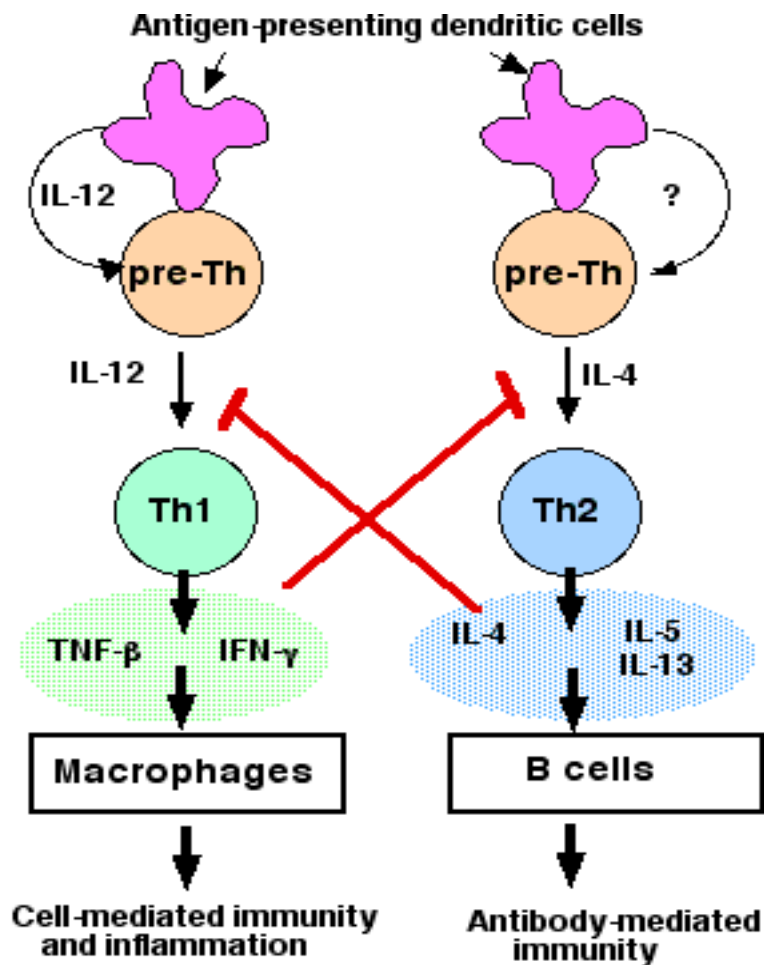
Rozhodujícím faktorem ovlivňujícím typ imunitní odpovědi je cytokinové prostředí vytvořené cytokiny od antigen prezentujících buněk. Ty uvolňují do svého okolí působky zahajující diferenciaci T buněk. Zralé dendritické buňky produkují IL-12, podporující vznik Th1. Tkáňové žírné buňky tvoří IL-4, který vede ke vzniku Th2 buněk.



Nature Reviews | Immunology

**Obrázek 6: Diferenciace Th1 a Th2**

Podrobněji diferenciaci Th1 a Th2 můžeme popsat z hlediska transkripce. Je-li indukován transkripční faktor T-bet, vznikají Th1 buňky, které sami prodující cytokiny IL-2 a  $\text{INF}\gamma$ . Je-li indukován transkripční faktor GATA-3, diferencují se Th2, produkující IL-5, IL-10, IL-13 a v konečném důsledku aktivují B lymfocyty a tvorbu protilátek.



Obrázek 7: Vzájemné ovlivnění Th1 a Th2 odpovědi.

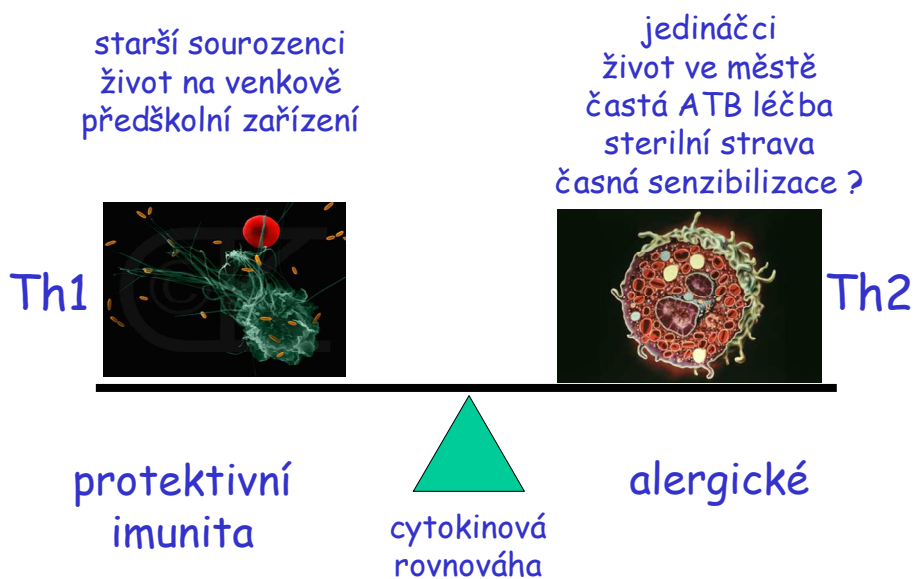
### 2.3.1 Hygienická hypotéza

Změna rovnováhy v Th1/Th2 imunitní odpovědi je známa u řady autoimunních chorob, nádorových onemocnění a alergických reakcí. Jestli se imunitní odpověď rozběhne směrem k zánětlivé reakci, potlačí automaticky protilátkový způsob imunitní odpovědi a naopak. Ukazuje se, že existuje i genetická predispozice k přednostnímu uplatňování jednoho nebo druhého typu odpovědi. Styk s různými druhy parazitů a patogenů v útlém věku může ovlivnit jednak práh reaktivity, jednak vzájemnou rovnováhu mezi konkurenčními zánětlivými a protilátkovými mechanismy a konečně nedostatečně nastavené kontrolní mechanismy [5].

Nastavení imunitního systému v časném postnatálním období je důležité pro jeho pozdější správnou funkci. Přílišnou hygienou je omezován styk jejich nezralého imunitního systému dětí s mykobakteriemi a jinými mikroorganismy vyvolávajícími

zánětlivý typ odpovědi. Tak se může u geneticky predisponovaných postupně nastavit regulační rovnováha ve prospěch konkurenční odpovědi protilátkového typu. Současné děti těžko přijdou do kontaktu s antigeny škravek a roupů, reaguje pak jejich chybně nastavený imunitní systém protilátkovou odpovědí (s protilátkami IgE) i na neškodné alergeny jako jsou pylová zrnka nebo částice výkalů roztočů. Imunitní systém vyhodnotí pylová zrna a roztoče jako parazity napadající sliznice. Výsledkem jsou nepříjemné chronické potíže, např. senná rýma, ale někdy i velmi vážné astmatické stavy.

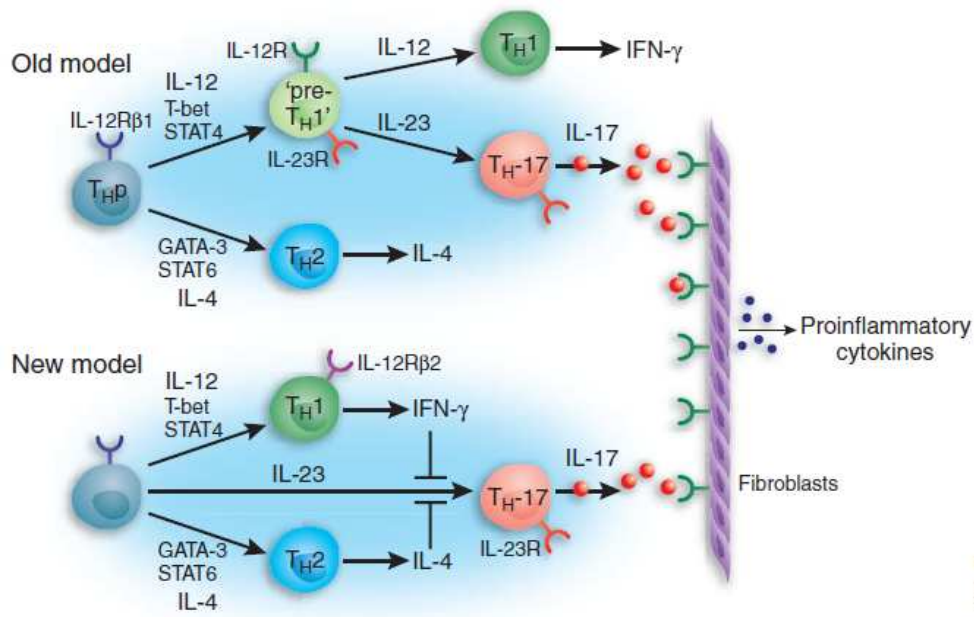
Hygienická hypotéza potvrzuje, že frekvence alergií je nižší u dětí, které v raném věku prodělaly více závažnějších infekčních onemocnění, u populací s vysokým výskytem střevních parazitů a u venkovských dětí, které byly ve styku s hospodářskými zvířaty a hrály si venku [5].



Obrázek 8: Ovlivnění typu imunitní odpovědi.

## 2.4 Populace Th 17 lymfocytů

Nedávno popsaná a v současné době velmi studovaná je nová subpopulace zvaná Th17. Je do určité míry podobná Th1. V cytokinovém prostředí bohatém na IL-23 (a TGF $\beta$ ) dochází k indukci diferenciaci tohoto typu buněk. Předmětem studia byl také typ buněk, který je jejich prekurzorem. Th17 diferencují přímo z prekurzoru Th0. Jejich vývoj tedy neprochází přes subpopulaci Th1 nebo Th2 [4].

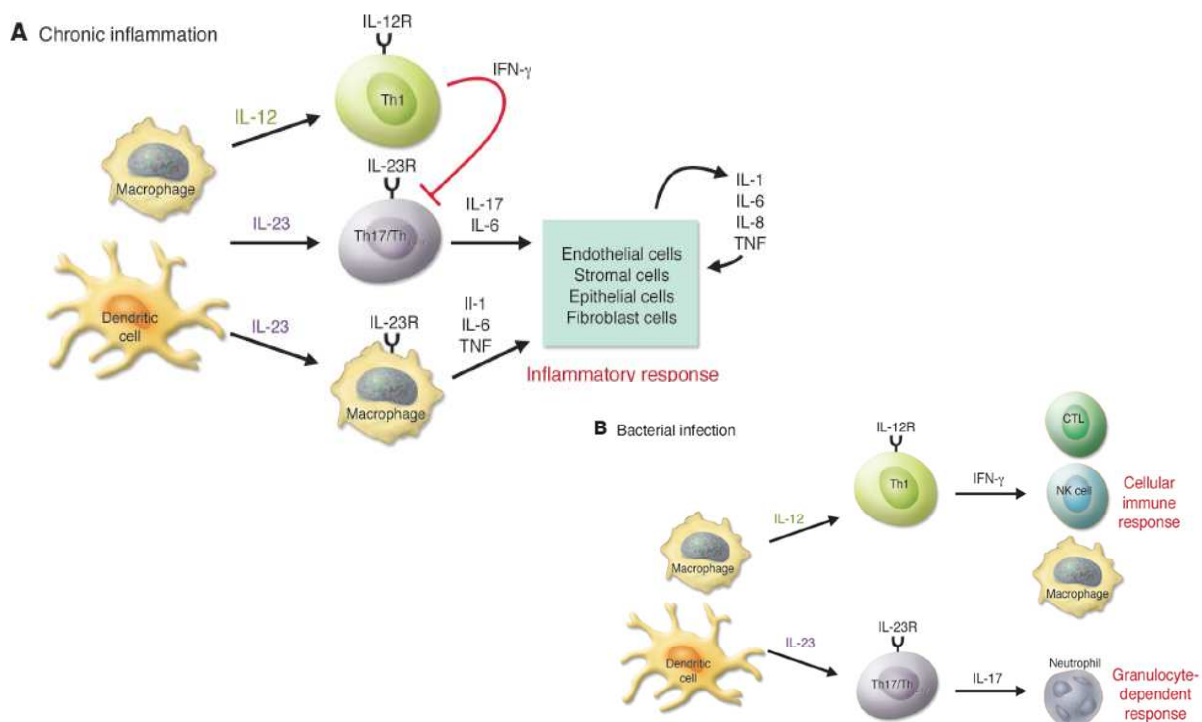


Obrázek 9: Modely diferenciaci Th17

Lymfocyty Th17 produkují interleukin 17. IL-17 byl objeven subtraktivním (rozdílovým) hybridizačním postupem. Touto subtraktivní metodou byly hledány další molekuly účastníci se cytolýzy prostřednictvím molekul CTLA1 a CTLA 3 (serinové proteázy). IL-17 má mnohočetné biologické aktivity, indukuje IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PGE $_2$  a kolonie stimulační faktory G-CSF a GM-CSF. Toll-like receptory (TLR) IL-1. Reguluje proliferaci T buněk aktivací nukleárního přepisového faktoru (NF- $\kappa$ B). Tento nový cytokin působí na fibroblasty, endotel, epitel, keratinocyty a makrofágy a v konečném důsledku působí chemotakticky pro neutrofilů.

Účinnost tohoto interleukinu na regulaci imunitní odpovědi je předmětem studií. Vyšší hladiny této substance byly zjištěny u revmatoidní artritidy (RA), systémového lupusu

(SLE), astmatu a rejekci transplantátu. Svou roli hraje také v protinádorové imunitě a autoimunitě [12].



**Obrázek 10: Terapeutické cíle při chronickém autoimunitním onemocnění.**

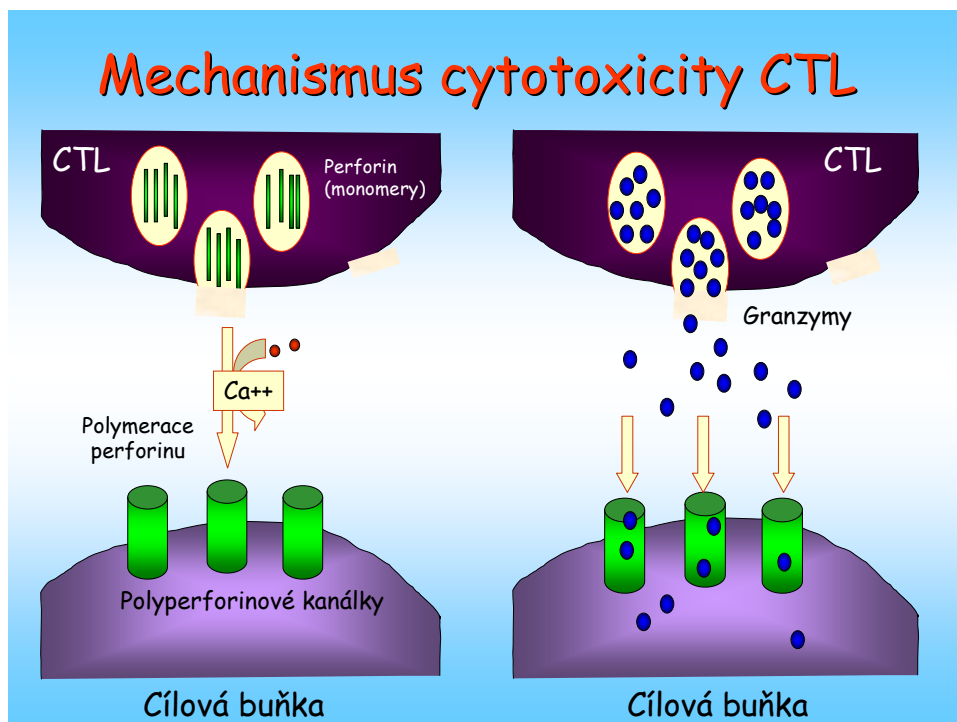
## 2.5 Lymfocyty CD8+

CD8+  $\alpha\beta$ -TCR<sup>+</sup> lymfocyty rozlišují peptidové fragmenty antigenů asociované s MHC glykoproteiny I. třídy. Funkčně představují prekurzory cytotoxických T lymfocytů (CTL, Tc) nebo již zralé efektorové CTL, taktéž paměťové buňky tohoto typu [4]. Povrchový protein CD8 funguje jako koreceptor MHC I. třídy.

Hlavní efektorovou funkcí těchto buněk je lýza cílových napadených buněk. Buňky mohou bojovat s virem, mohou být autoreaktivní nebo jsou nádorově změněné. Pro toxické působení je nutný vzájemný kontakt CTL cílové napadené buňky. Zralé CTL se vyznačují přítomností cytotoxických granúl v cytoplasmě. Tyto specializované lysozomy obsahují protein perforin a proteázu granzym a jsou syntetizovány za několik dní po aktivaci, což je rozdílné oproti NK buňkám.

## 2.5.1 Mechanismus cytotoxicity CTL

Cytotoxická činnost CTL spočívá v indukci apoptózy a narušení membrány cílové buňky pomocí systému bílkovinných perforinů a specifických enzymů-granzymů. Granzym B je v současnosti považován za nejdůležitější enzym z této skupiny. CTL T lymfocyt je schopen opakovaného zabíjení cílových buněk.



Obrázek 11: Mechanizmy CTL

### 2.5.1.1 Perforiny

Protein perforin je důležitý v cytotoxicitě při vytváření otvorů do buněk. V buňkách lymfocytů je uskladněn v granulích v buněčné cytoplazmě a v případě potřeby se obsah granulí (sortiment enzymů a perforin) uvolní směrem k této cílové buňce. Monomery perforinu se shluknou do polymerní struktury budoucího póru, otvoru do cílové buňky. V membráně napadené buňky vzniknou díry, které vedou k její rychlé smrti.

Strukturou je podobný komplementu C9. Jeho působení je závislé na přítomnosti vápenatých iontů, které jsou nutné k polymerizaci perforinu. Na povrchu cílové buňky se váže na indukované perforinové receptory pomocí  $\text{INF}\gamma$ .

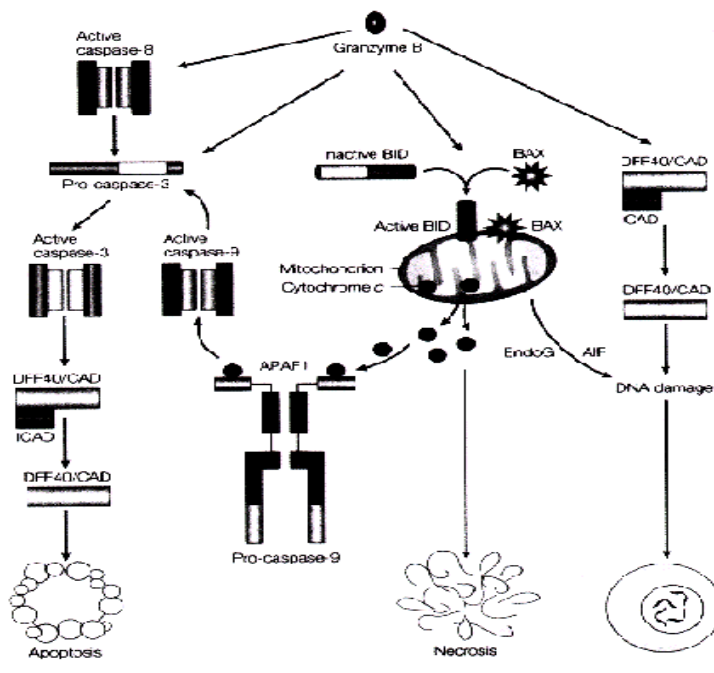


### 2.5.1.2 Granzymy

Granzym B je serinová proteáza, se specifitou pro známou sekvenci aminokyselin, aktivující intracelulární enzymy cílové buňky, takzvané kaspázy. Kaspázy jsou zodpovědné za fyziologickou apoptotickou kaskádu. Granzym B zodpovědný za tzv. rychlou fragmentaci DNA. Další intracelulární účinky spočívají v poškozování DNA a nepřímému poškození cytoplazmy vedoucímu až k nekróze [10].

Jakmile je granzym B přítomen v cytosolu, vykonává svoji funkci vazbou se svým přímým substrátem, neaktivní formou kaspázy-8 a enzymaticky ji aktivuje. To spustí kaskádu enzymatických dějů, která ústí ve fragmentaci DNA. Fragmentace DNA je pro buňky v apoptóze typická. Granzym B účinkuje na soubor dějů vedoucí k apoptóze. Tento soubor dějů však není specifický pouze pro granzym B, ale v jiných případech může být spuštěn aktivací FAS receptoru [10].

Dalším alternativním substrátem ve výše zmíněné kaskádě jsou pro granzym B přímo pro-kaspáza-3 a také i ICAD. V tomto případě granzym obchází kaspázu-8, přes kterou jinak na pro-kaspázu-3 působí nepřímo. Celý princip účinku granzymu B je konstruován velice stabilně. Kaskáda dějů vedoucích k apoptóze spouštěná aktivací FAS receptoru má v podstatě tři zásadní kroky: aktivace kaspázy-8, kaspázy-3 a DFF40/CAD. Granzym B je schopen se enzymaticky účastnit každého z těchto kroků. Nepřekvapí nás tedy, že ani defekt jednoho ze zúčastněných enzymů, ani přítomnost inhibičních faktorů některé z reakcí nemusejí nutně zabránit hladkému průběhu cytotoxickými T-lymfocyty indukované apoptózy [10].

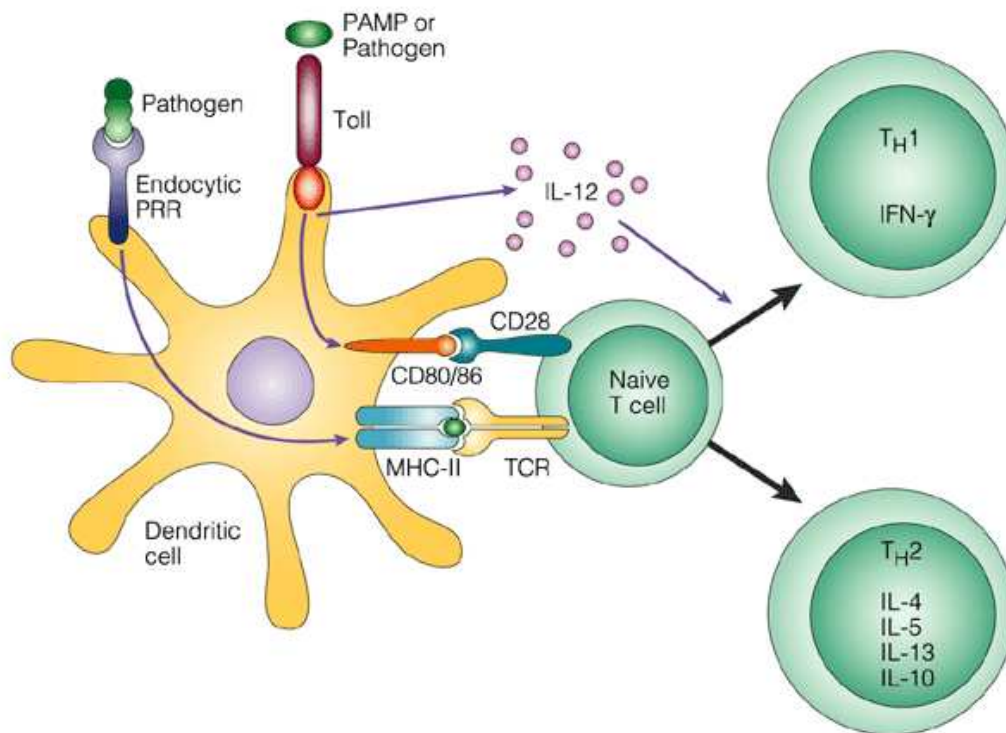


Obrázek 12: Působení granzymu na děje uvnitř buňky vedoucí k apoptóze

## 2.6 Komunikace T lymfocytů s dendritickými buňkami

Bez kontaktu s dendritickou buňkou (DC) by nedocházelo k diferenciaci a proliferaci prekurzorů T<sub>c</sub> a T<sub>h</sub>. DC se starají o průběžný dozor, dešifrování a rychlou odpověď při infekci ohroženém organismu. Nezralé DC jsou v periferních orgánech a sliznicích. Pohlcené antigeny zpracují a předloží ve formě komplexu příslušného peptidu s MHC glykoproteinem na svém povrchu, ale nejdříve projdou dohrávacím procesem. Dozrávání může být spuštěno samotným patogenem nebo setkáním DC s jinou imunitní buňkou. Rozpoznání, proliferace, migrace, sekrece cytokinů a exprese kostimulačních molekul je regulováno signalizací přes TLR receptory. Zralá dendritická buňka zvyšuje expresi MHC I. a MHC II (antigen prezentujících molekul), CD40, CD80 a CD86 (kostimulačních molekul) a produkci cytokinu IL-1 a IL-12. Takto vybavena je schopna stimulovat efektivně T lymfocyty. Ukazuje se, že dendritické buňky a antigenně specifické T lymfocyty se vzájemně stimulují. Vzájemná stimulace probíhá prostřednictvím molekuly CD40 u DC a jeho ligandu u T lymfocytu CD40L. DC se přemění v plně funkční APC a T lymfocyt je pobídnut

k diferenciaci. Tento děj je stejně důležitý jako klasická kostimulace přes CD28 a CD80.

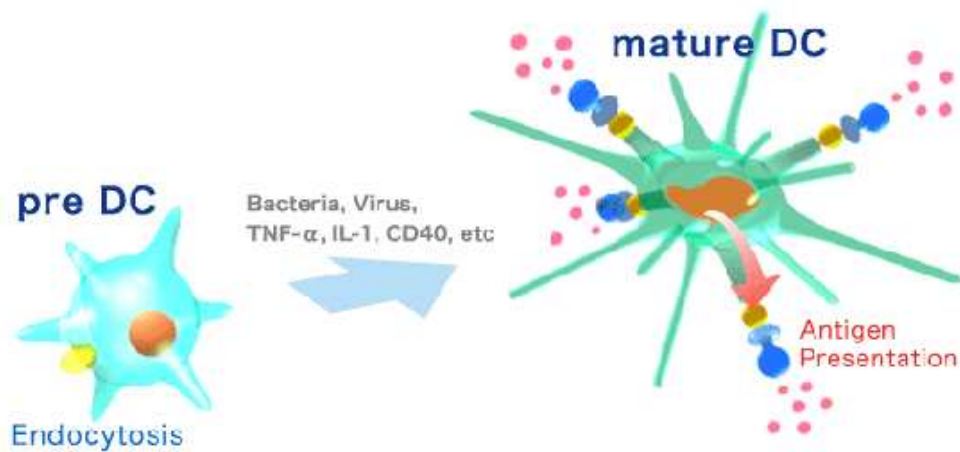


Nature Reviews | Immunology

**Obrázek 13:** Po stimulaci Toll-like receptorů a přes receptor CD40 dochází k maturaci DC a přeměně v zralou APC, která stimuluje efektorové T lymfocyty

V současné době se ukazuje existence dvou funkčně velice odlišných typů DC. Představují se jako myeloidní (M-DC) a lymfoidní (L-DC) a oba se nalézají v několika diferenciacích stupních. Právě myeloidní typ DC jsou klasické APC stimující T lymfocyty. Lymfoidní DC indukují spíše stav imunitní specifické neodpovědi (toleranci). Molekulární detaily tohoto regulačního děje doposud nejsou prozkoumány. Z nedávných studií byl odhalen proces, jakým Th stimuluje Tc. Neděje se tak přímou interakcí těchto buněk, ale právě přes DC. Aktivovaný Th stimuluje přes CD40/CD40L dendritickou buňku. Ta pak jako kompletní DC podporuje diferenciaci efektorových Tc [4] [2].

I DC má svůj kontrolní mechanismus. Jsou to negativní kostimulační receptory např. (CTLA-4), které se uplatní, pokud by došlo k příliš silné kostimulaci.



Obrázek 14: Maturace dendritických buněk

## 3 T regulační buňky a jejich úloha v imunitních reakcích

### 3.1 T regulační buňky a jejich význam

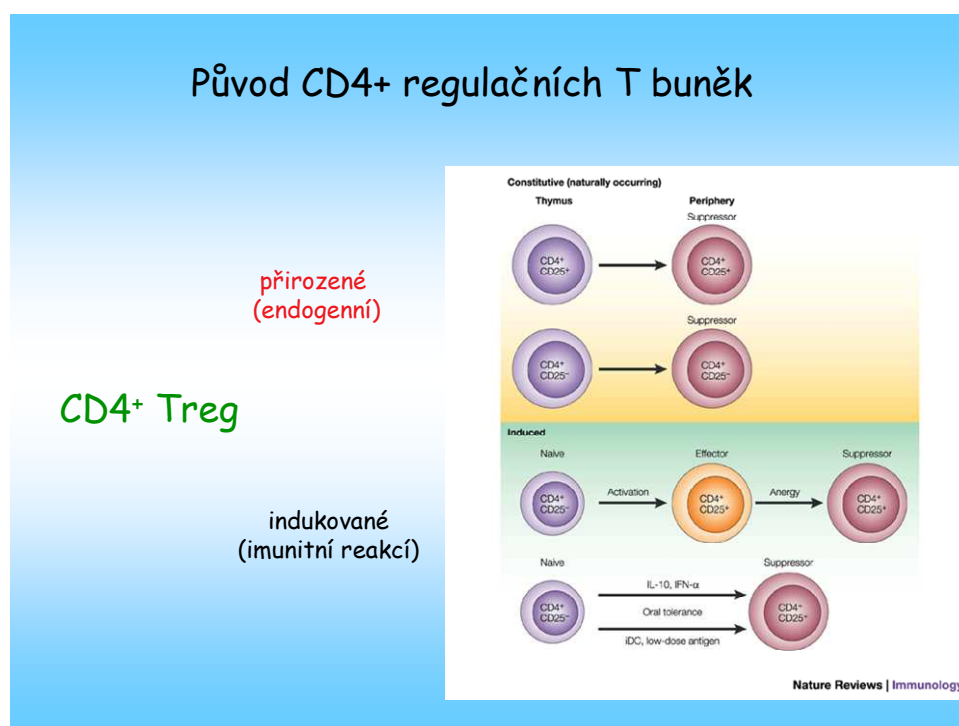
Od roku 1955 se imunologové zabývají přirozeně se vyskytující populací CD4<sup>+</sup> T buněk. Oproti původní představě regulačních buněk  $\alpha\beta$ -TCR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (Ts), které sekretují tradiční antigenně nespecifické tlumivé cytokiny a antigenně specifické „supresorové faktory“ (TsF), snad solubilní formu TCR, existují podle současných poznatků jiné tlumivé buňky. Tato nová subpopulace je podobná popisované formě Th3 lymfocytům a označuje se jako přirozené T regulační lymfocyty (Treg) [4].

Zajímavá vlastnost T regulačních lymfocytů jim umožňuje přeměňovat jiné T lymfocyty na sobě podobné buňky. Potkají-li se na jedné dendritické buňce aktivní Treg lymfocyt s jiným T lymfocyt, vytvoří Treg takové cytokinové prostředí, které je vhodné pro diferenciaci obdobného typu buněk. Tento jev se označuje jako infekční tolerance.

#### 3.1.1 Původ

Treg buňky pochází ze subpopulace CD4<sup>+</sup> lymfocytů a představují cca 5% z celkových CD4<sup>+</sup> buněk. Při vývoji prochází thymem. Předpokládáme tedy negativní selekci, tj. odstranění všech autoreaktivních klonů. Autoreaktivní klony mají vysokou afinitu k autoantigenům, totiž ke komplexům MHC glykoproteidů II. třídy. Ukazuje se, že v thymu existuje alternativní proces, při kterém jsou některé potencionálně autoreaktivní klony překvapivě zachovány a dokonce stimulovány k diferenciaci v popisované Treg buňky. Jako takové se později uplatní při potlačení aktivity skutečných negativní selekci uniklých autoreaktivních T lymfocytů všech typů (Tc, Th1, Th2). [4] Dle současných zjištění, existuje spousta potencionálně autoreaktivních klonů, které se mohou za určitých podmínek probudit a škodlivě projevit. Aby se tak za normálních okolností nestalo, je právě zřejmě úloha Treg lymfocytů [7].

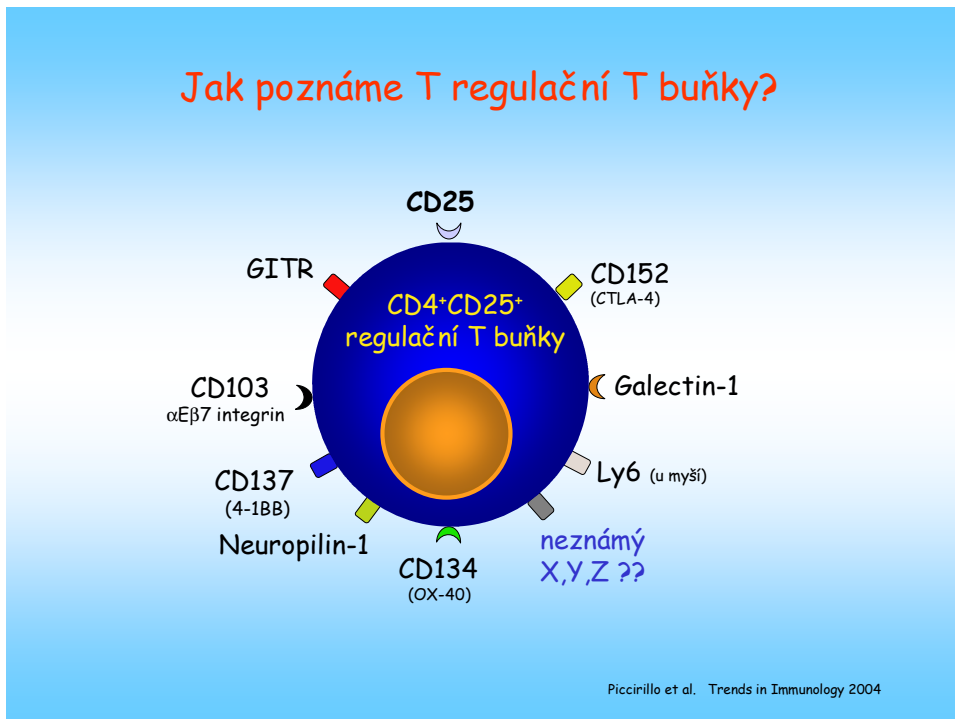
Existuje také tvrzení, že T regulační buňky jsou evolučním kompromisem mezi potřebou autoreaktivity ke kontrole tkáňové homeostázy a potřebou kontroly autoreaktivity k vyvarování se rizika vývoje autoimunitního onemocnění [13]. Potvrzením této teorie může být experimentální odstranění CD4+CD25+ buněk, které vedlo k rozvoji orgánově specifických autoimunit a k usnadnění reaktivity vůči aloantigenům a nádorům [13].



**Obrázek 15: Původ T regulačních buněk**

### 3.2 Identifikace Treg buněk

T regulační buňky exprimují několik aktivačních povrchových molekul a především transkripční faktor FOXP3, lokalizovaný v jádře. Právě FOXP3 je preferenčně lokalizovaný právě u CD4+CD25+ T buněk. Nejuváděnější aktivační molekuly jsou CD25 a CD152. Na povrchu Treg buněk je popsáno několik dalších struktur [13].



**Obrázek 16: Fenotyp T regulační buňky**

### 3.2.1 Molekula CD 25

Molekula CD25 je receptor pro IL-2  $\alpha$ -podjednotku, molekulová hmotnost 55 kD. Jedná se glykosylovaný glykoprotein (mucin) a komplementový receptor. Tento znak exprimují aktivované T a B lymfocyty, též monocyty.

Existují ovšem zcela prokazatelně také T regulační nebo supresorové buňky nesoucí genotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Toto bylo prokázáno v experimentu u autoimunitní encefalomyelitidy a diabetu. Nejspíše v závislosti na cytokinovém prostředí T regulační buňky mění expresi znaku CD25 [13].

### 3.2.2 Receptor CTLA-4

CTLA-4 je cytotoxický leukocytární antigen označovaný CD152. Je to inhibiční T buněčný receptor pro B7 molekulu. Znak je exprimován intracelulárně a po aktivaci se zvyšuje povrchová exprese tohoto znaku [13].

### 3.2.3 Receptor CD28

CD28 se označuje receptor kostimulačního signálu. CD28 rozeznává na povrchu APC kostimulační molekuly CD80 a CD86, dochází k diferenciaci T lymfocytu. Naopak, spoji-li se CTLA-4 s molekulami CD80 a CD86, dojde k inhibici proliferace blokádou molekuly CD28.

### 3.2.4 Členové rodiny TNF $\alpha$ receptorů

Jedná se o skupinu glukokortikoidy indukovaných receptorů, tzv. GITR. Dosud popsané jsou tyto: TNFRSF4, TNFRSF9 a TNFRSF18. Nově byl popsán TNFRSF11A neboli RANK, receptor pro aktivaci NF $\kappa$ B. Jeho úloha je v přilákání Treg do cílových orgánů a spádových lymfatických uzlin [13].

### 3.2.5 Chemokinové receptory CCR4, CCR5 a CCR6

Chemokinové receptory CCR4, CCR5 a CCR6 hrají úlohu při směřování Treg do místa imunosupresivního působení po vazbě s příslušnými cytokiny.

### 3.2.6 Transkripční faktor Foxp3

Transkripční faktor Foxp3 je preferenčně exprimován u CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T buněk. Nachází se v jádře. Považujeme tento faktor za charakteristický pro Treg buňky. Je mnohem selektivnější než znak CD25. Jak důležitou roli v organismu hraje tento faktor, dokazuje onemocnění spojená s mutací genu pro Foxp3. Například IPEX syndrom (imunitní polyendokrinní a enteropatie vázaná na X chromosom) se projevuje již u novorozenců a malých kojenců neonatálním diabetem, tyreoiditidou, průjmami, ekzémy a těžkými infekcemi. Děti umírají v prvním roce života. Příznačná je trvalá aktivace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které se chovají autoagresivně. Příčinou je defekt genu Foxp3, jehož produkt je nutný pro diferenciaci a správnou funkci CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulačních T lymfocytů. Při defektu Foxp3 genu nedojde k supresi CD4<sup>+</sup> lymfocytů a důsledkem je fatální lymfoproliferativní onemocnění s řadou klinických projevů, včetně destrukce beta-buněk probíhající již *in utero* [11].



### 3.3 Typy T regulačních buněk

#### 3.3.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulační buňky

Hlavní komponentu T regulačních buněk tvoří subpopulace CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Představují cca 5-10% periferních T lymfocytů. Produkují cytokiny IL-10, IL-4, INF- $\gamma$ , méně již TGF- $\beta$ . Protože neprodukují IL-2, jsou závislé na jeho exogenním původu z prostředí. Mají výraznou expresi znaků CD69 a CD38. Dále exprimují znaky CD45RO a HLA-DR, které jsou charakteristické pro diferencované nebo aktivované buňky. Pokud je CD45RO<sup>-</sup> populace aktivována alogenetickou dendritickou buňkou, dojde k její proliferaci a zvýšené expresi CD25 a HLA-DR. Má jen slabou supresivní aktivitu. CD45RO<sup>+</sup> je anergická populace se silnou regulační schopností.

Po aktivaci přes TCR $\alpha\beta$  probíhá jejich supresivní aktivita již kompletně antigen nespecificky, tj. bez přítomnosti MHC restrikce [13].

#### 3.3.2 CD45RBlowCD4<sup>+</sup>(CD25<sup>+/-</sup>) T regulační buňky

CD45RBlowCD4<sup>+</sup>(CD25<sup>+/-</sup>) T regulační buňky jsou zcela závislé na produkci cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$ . Regulační schopnost mají i buňky nemající znak CD25, ale jinak totožný fenotyp. Zjišťuje se, zda se nejedná o nezralé periferní T regulační buňky [13].

#### 3.3.3 T regulační (Tr1) buňky

T regulační buňky označované jako Tr1 produkují vysoké množství IL-10 a TGF- $\beta$ , signifikantní množství INF- $\gamma$ , IL-5. Neprodukují ale IL-4 a IL-2. Proliferace těchto buněk je navozena IL-15, který nejspíše hraje roli v dlouhodobém přežití Tr1 v organismu. Autokrinně působící IL-10 je zodpovědná za nízkou proliferaci po aktivaci TCR. Aktivace TCR probíhá na DC a samotné supresivní působení je spuštěno uvolněním IL-10 a TGF- $\beta$  do prostředí, bez nutné shody antigenních specifíků. Tato populace buněk suprimuje naivní i paměťové Th1 i Th2 reakce. Nejdůležitějším úkolem je tedy udržení rovnováhy Th1 a Th2 a prevence alergických onemocnění [13].

### 3.3.4 Th3 buňky

Charakteristickým znakem dalších T regulačních buněk je vysoká produkce TGF- $\beta$ . Označujeme je Th3. Tyto buňky produkují dále v menším množství a IL-4 a IL-10, ale na přítomnosti IL-4 je závislý jejich rozvoj.

Jejich úloha v imunitním systému, zejména slizniční imunitě, se týká tvorby IgA a to hlavně ve střevě. Podporují tvorbu IgA a mají schopnost ovlivňovat orální toleranci. Tato populace Th3 společně s Th1 rozpoznávají stejné peptidy na patogenech [13].

### 3.3.5 CD8+ buňky

Mezi T regulační populace řadíme také CD8+ buňky. Dokáží fungovat jako efektorové, ale i regulační buňky. Organismus brání před intracelulárními infekcemi, působí také na střevní sliznici. Nezbytná je jejich schopnost utlumení lokální imunologické reaktivity [13].

### 3.3.6 NKT buňky

NKT BUŇKY představují velmi málo početnou skupinu buněk. Mají některé vlastnosti NK buněk i T-lymfocytů. Mají TCR receptor typu  $\alpha\beta$ , avšak disponují také celou řadou receptorů (stimulačních a inhibičních), které jsou jinak charakteristické pro NK buňky. NKT lymfocyty rozeznávají komplexy molekul CD1 s (glyko)lipidy vlastního nebo mikrobiálního původu. Produkují cytokiny IFN $\gamma$ , IL-4 a TNF $\beta$ , které moduluje funkce CD4 i CD8 buněk. Jsou přítomny ve tkáních, kde probíhá kontakt se zevními antigeny – plíce, GIT apod. Pravděpodobně napomáhají zprostředkování tolerogické odpovědi T buněk k antigenům prezentovaným na těchto místech. Rozlišují se tři podtypy NKT buněk CD4+, CD8+, CD4-CD8-.

Ve stárnoucím organismu dochází ke snížení počtů NKT buněk. Pokles NKT buněk tak může přispívat ke snížené odolnosti proti určitým infekčním onemocněním, nádorům a autoimunitním chorobám [13] [6].

### 3.3.7 Intraepiteliární T lymfocyty

Buňky ležící mezi epitelovými buňkami sliznice se označují intraepiteliální lymfocyty (IEL). Většinou jsou tvořené T lymfocyty, cca 75% nese TCR $\alpha\beta$ , ostatní  $\gamma\delta$ . Úloha IEL lymfocytů je hlavně regulační. Dokáží například potlačit nežádoucí reakce proti potravinovým alergenům. Intraepiteliální T lymfocyty  $\gamma\delta$  se podílejí na udržování integrity sliznic, secernují cytokiny důležité při hojení poškozených epitelů (TGF- $\beta$ ). IEL je velmi velké množství různých typů. Poruchy tohoto systému pravděpodobně vedou k rozvoji některých onemocnění, jako je Crohnova nemoc, psoriáza nebo ulcerativní kolitida [8] [4].

Vývoj těchto buněk probíhá většinou mimo thymus. Tyto lymfocyty nesou heterodimer typu  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> a jsou čteně zastoupeny na epitelu střev. Jejich rozpoznávací potenciál je omezen. Nejspíše rozpoznávají produkty buněčného poškození a stresu a takto zasažené buňky mohou být zabíjeny subpopulací  $\gamma\delta$  T buněk. IEL mají typ TCR, který se váže na neklasické MHC antigeny MICA a MICB. Odlišnost tohoto typu antigenu MHC je v jiné struktuře molekuly. Molekula má podobné domény  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  MHC I, chybí však asociace s  $\beta 2$  mikroglobulinem a schopnost vázat peptidy.

Buňky nesoucí heterodimer  $\gamma\delta$  TCR mohou být vývojově starší, protože jejich efektorové funkce jsou podobné spíše mechanismům přirozené imunity. K tomuto názoru se kloníme podle imunitního rozpoznávání a uskutečnění efektorových funkcí v závislosti na MHC [4] [2].

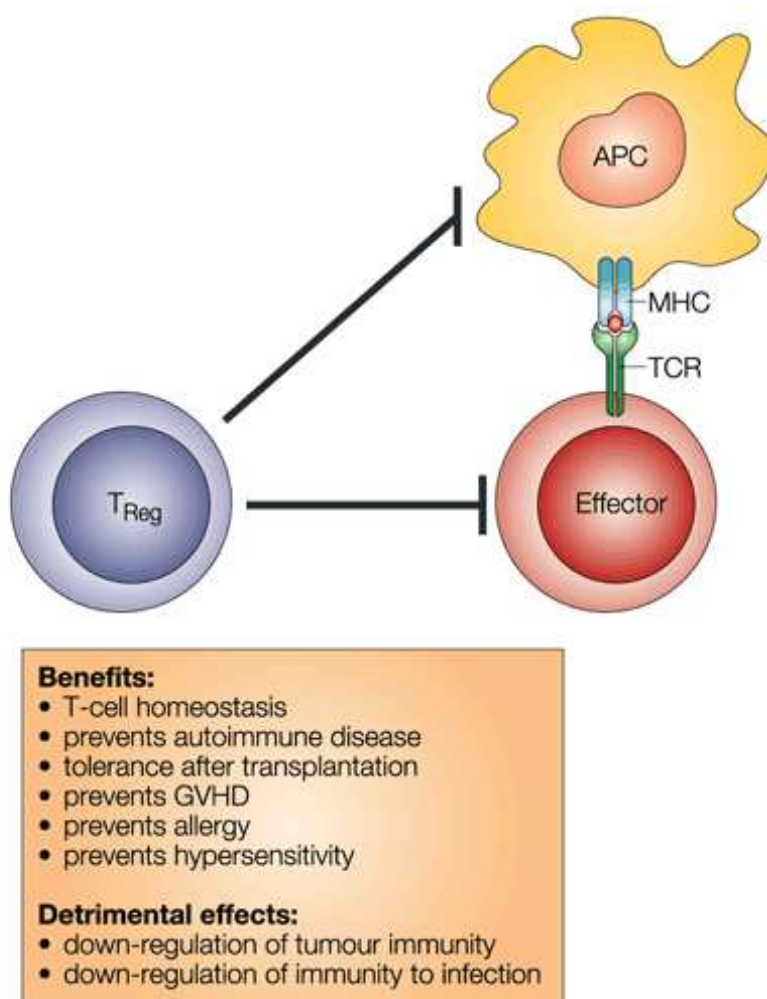
### 3.3.8 Dosud nepřesně definované populace

Jako dosud ne zcela jistě definovanou subpopulaci regulačních buněk lze uvést tzv. dvojitě negativní T buňky, které určuje fenotyp TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-CD25+CD30-CD44-. Jejich funkcí je regulace proliferace a cytotoxické aktivity CD8+T buněk, které nesou TCR stejné specificity. Neprodukují cytokiny [13].

### 3.4 Mechanismus působení

Jakým způsobem T regulační buňky působí je zatím objasněno jen zčásti. Je možné, že Treg mají schopnost cytotoxicky zabít některé aktivované buňky a to pomocí perforinu nebo granzymů, podobně jako to dělají CTL

Treg se také mohou dostat do přímého kontaktu s cílovými autoreaktivními buňkami, při kterém se uplatní jimi produkované tlumivé cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ . Této přímé mezibuněčné interakce se zúčastní možná dosud nepopsané adhezivní molekuly nebo povrchové cytokiny [7][4].

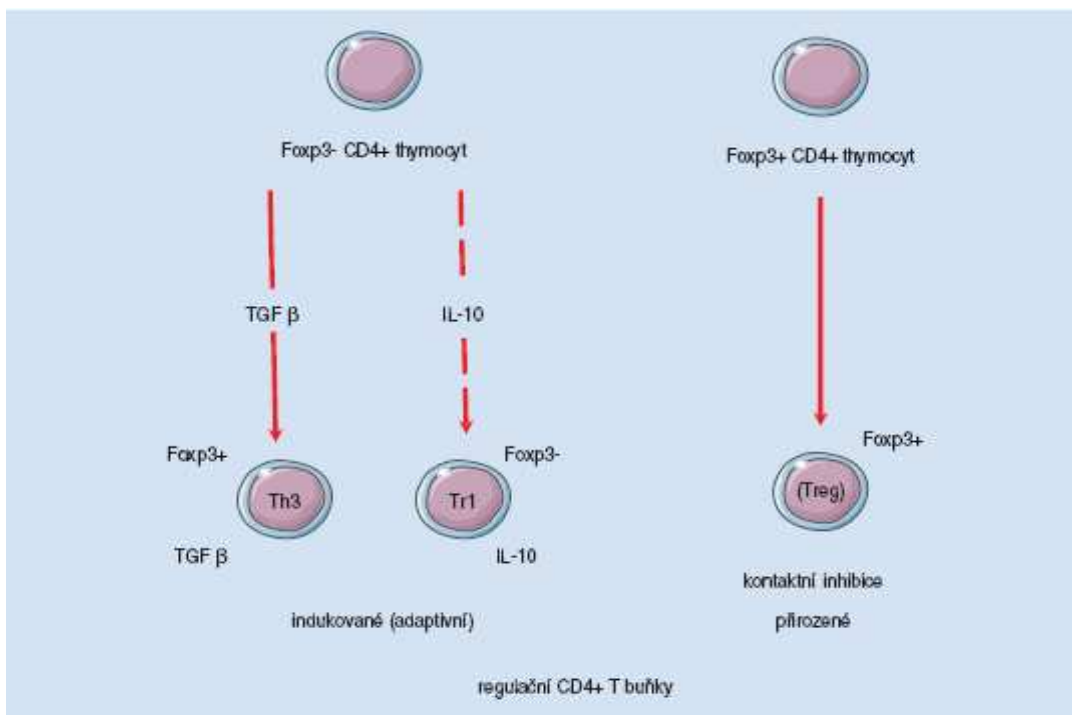


Nature Reviews | Immunology

**Obrázek 17:** Předpokládané mechanismy působení regulačních T lymfocytů (Treg). Treg po kontaktu s efektorovými T lymfocyty a s APC inhibují jejich aktivity (prostřednictvím neznámých povrchových molekul a tlumivých cytokinů)

### 3.5 Přirozené a indukované Treg

V experimentu bylo zjištěno, že absence Treg vedla k rozvoji autoimunitních onemocnění, alergií a dalších imunopatologických reakcí. Skupina Treg buněk bránících rozvoji autoimunitních chorob se označuje jako přirozené Treg buňky. Vedle nich existují další, označované jako indukované regulační T lymfocyty, které vznikají v periferních tkáních při většině antigeně specifických reakcí s Th1 nebo Th2. Indukované Treg vznikají tedy v periferních lymfoidních orgánech (uzliny). Tyto buňky rozeznávají pomocí svých TCR komplexy antigenních peptidů s MHC molekulami a nazývají se Th3 nebo Tr1. Vznikají pravděpodobně po kontaktu s nezralými nebo vyčerpanými dendritickými buňkami. Je jisté, že slouží k potlačení příliš intenzivních imunitních odpovědí, které by mohly vést až k rozvoji imunopatologické komplikace. Th3 produkují hlavně TGF- $\beta$  a Th3 lymfocyty produkují IL-10 [4] [7].



Obrázek 18: Přirozené a indukované T regulační buňky

## **4 Další faktory imunity ve vztahu k T regulačním buňkám**

### **4.1.1 Tolerogenní dendritické buňky**

Antigen prezentující buňky nejsou cílovým terčem pro T regulační lymfocyty. Poskytují však povrchovou prezentaci orgánově specifických antigenů. Samotná imunosuprese probíhá fyzickým kontaktem na povrchu dendritických buněk v uzlinách. V současné době se hovoří o tolerogenních (nezralých) dendritických buňkách, které rutinně přenášejí antigeny z periferie do thymu. Zde dochází k pozitivní selekci Treg z naivních pekurzorů. Tolerogenní DC také indukují Treg v periferních lymfatických tkáních. Typickým znakem těchto APC je nízká exprese MHC molekul a kostimulačních molekul CD80 a CD86, které mohou dokonce chybět [13].

### **4.1.2 Treg a regulace**

Aby nedocházelo k poškození organismu při obranně proti infekci, musí být obranná imunitní reakce dobře koordinována. Treg buňky jsou do periferie vylučovány se zpožděním stejně tak jako tolerogenní dendritické buňky. K jejich diferenciaci dochází vlivem cytokinů IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  a PGE<sub>2</sub>. Zdržení těchto buněk je nutné k regulaci příliš bouřlivé imunitní odpovědi. Samotná imunosuprese Treg je ovlivněna cytokinovým prostředím v dané lokalizaci. V místě působení jsou T regulační buňky kontrolovány povrchovými chemokínovými receptory, např: CCR4, CCR5, CCR8 na povrchu APC [13].

### **4.1.3 Treg a nádorová imunita**

Bude-li možno znalostí o Treg využít v protinádorové imunitě, ukáží další klinické studie. Je zjištěno, že imunitu proti nádoru může navodit selektivní deplece (úbytek) CD25+ buněk, např. prostřednictvím monoklonální protilátky anti-CD25. Dosavadní

studie totiž ukazují, že deplece supresorů vedla k vymizení nádoru. Dokonce nedošlo k rozvoji autoimunitních dějů. Jasnou spojitost mezi Treg a nádory prokázalo zjištění vyšších koncentrací supresorových buněk CD4<sup>+</sup> a CD25<sup>+</sup> v nádorové tkáni. Překvapující bylo naopak snížení počtu těchto buněk v periférii [13].

#### **4.1.4 Vliv Th1/Th2 na rovnováhu v průběhu reakce**

Infekce způsobené intracelulárními patogeny je optimálně potlačena Th1 typem imunitní odpovědi. Zapojení B lymfocytů a protilátek, zejména proti extracelulárním patogenům, má na svědomí Th2 typ imunitní odpovědi. Cytokinové prostředí rozhoduje, který typ imunitní odpovědi se rozvine. Dysbalance v rovnováze Th1 a Th2 může vést k rozvoji patogenem způsobené imunopatologii.

T regulační buňky mohou hrát roli v dysbalanci těchto reakcí nebo selháním dosud nezjištěného projektivního mechanismu. Existují zatím jen domněnky. Například při chronických infekcích je ochranná imunitní reakce suprimovaná protizánětlivými cytokiny indukovanými patogeny. Vytvořené cytokinové prostředí indukuje regulační buňky Tr1 a Th3. Jednou z teorií je, že perzistence patogenů má důležitou roli v rozvoji paměťové reakci [13].

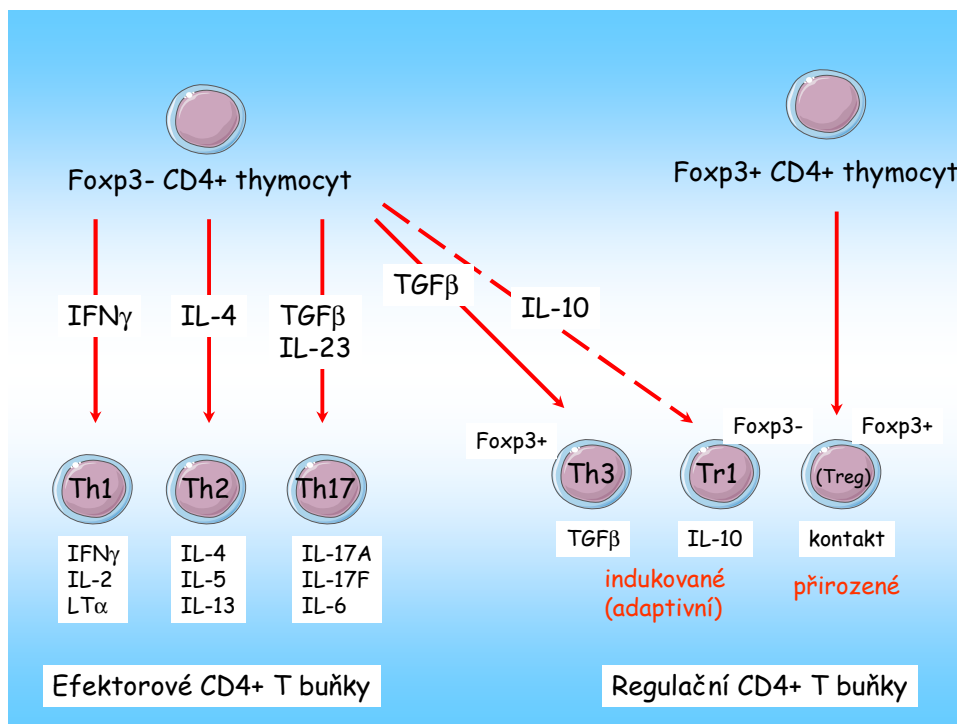
#### **4.1.5 T regulační buňky a alergie**

Jiným příkladem špatné regulace imunitní odpovědi je rozvoj alergie. Rozvoj tohoto onemocnění je spojeno s převahou Th2 imunitní odpovědi a nadprodukcí IgE.

Předpokládaný činitel, který je schopen negativně ovlivnit Th2 reakci a tím normalizovat situaci, jsou právě CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> buňky. Pokud je normální jedinec vystaven alergenům ve větší koncentraci může dojít k indukci T regulačních buněk. Tyto poté nedovolí vzniknout alergické reakci. V současné době je známo, že hyperexpozice alergenům může vést k pozdějšímu zabránění rozvoji alergií [13] [1].

## 5 Regulace imunitní odpovědi

Specifická imunologická tolerance je homeostatický regulační mechanismus. Nabízí se možnost cílené negativní regulace specifické imunitní odpovědi, zvláště pro rozvoj transplantologie. Poruchy imunologické tolerance a autotolerance nají za následek rozvoj např. autoimunitních chorob a alergií.



Obrázek 19: Efektorové a regulační T lymfocyty

### 5.1 Imunita versus imunologická tolerance

Po setkání organismu s antigenem může dojít ke dvěma krajním formám odpovědi. Jedná se o pozitivní imunitní odpověď, která je spojená se vznikem imunologické paměti. Druhým krajním extrémem může být vznik imunologické tolerance, jakýsi



opak imunitní odpovědi. Tolerantní organizmus nereaguje na antigen typicky a jeví se imunologicky neaktivní. Toto je však klamná představa. Jsou zcela na molekulární a fenotypové úrovni prokázány aktivní procesy, které v tolerogenním organizmu probíhají.

Pojem tolerance není totožný s imunodeficiencí nebo nespecifickou imunosupresí. Imunologická tolerance je antigenně specifická a organismus tedy neodpovídá na jeden daný antigen. Pro ostatní antigeny funguje imunitní systém běžným procesem.

Zjišťování fungování imunologické tolerance se stalo cílem studia. Pochopení těchto dějů a případné aktivní možnosti ovlivnění jsou nadějí léčbě a především v trasplantologii [3] [14].

## **5.2 Anergie**

Zajištění průběhu imunologické tolerance se děje prostřednictvím anergních buněk. Tento typ buněk přežívá v organizmu, odpovídá na růstové faktory, ale neodpovídá specifickou imunitní reakcí. Rozpoznávání antigenu lymfocytem není doprovázeno kostimulačním signálem pro T lymfocyty. Nedojde ke spojení molekul CD28 a CD80 (event. CD86). Bez tohoto spojení, tzv. druhého signálu, se T lymfocyt nemůže dělit, neprodukuje potřebné cytokiny a přechází tedy do stavu anergie. Důležité je, že takový lymfocyt a dokonce v přítomnosti kostimulačních signálů, se po opakovaném setkání se stejným antigenem, neaktivuje. Takové anergní buňky utlumují potenciálně autoreaktivní klony. V organizmu se vyskytuje spousta buněk exprimující vlastní antigeny (i u batolat), ale naštěstí jsou neschopné poskytovat druhý kostimulační signál.

K anergii může docházet i u buněk řádně aktivovaných přes TCR a druhý kostimulační signál, ale jejich další dělení je zablokováno [3] [14].

### **5.3 Aktivní suprese**

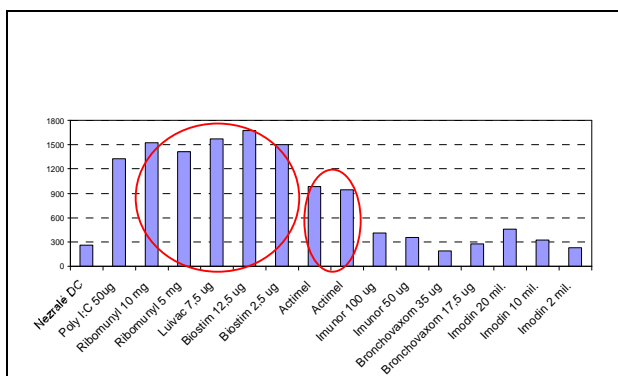
Další mechanismus imunologické tolerance je spojován s T regulačními buňkami, které mohou tlumit imunologickou reaktivitu jiných buněk [3] [14].

## 6 Využití poznatků o T lymfocytech v medicíně

Terapeutické ovlivnění specifické imunitní reakce je dobrou cestou k léčbě autoimunitních chorob. Částečně lze se ovlivnit vnější faktory, jako je vliv léků, záření, stresu a chemikálií. Další, vnitřní faktory, jsou genetická dispozice a působení hormonů. Optimální představa v léčbě autoimunitních chorob je orální indukce tolerance vůči známému autoantigenu, např. kolagen II. Specifickými protilátkami proti cytokinům lze ovlivnit hladiny Th1, Th2 a Th3.

Revmatoidní artritida je choroba, kde se ovlivnění IS v klinické praxi využívá. K ovlivnění T lymfocytů se zatím zkoušejí specifické protilátky. Anti CD4, anti CD25, anti CD5, anti CD 7. Větší pozornost je věnována přípravě cytokinových preparátů, protože nerovnováha protizánětlivých a zánětlivých mechanismů je považována za rizikový faktor. Zvýšená hladina TNF u RA ovlivňuje množství adhezivních molekul, zvyšuje prozánětlivé cytokiny a dalších zánětlivých dějů. TNF lze zablokovat pomocí monoklonální protilátky nebo solubilního receptoru TNF. Tyto preparáty přinášejí úlevu, protože snižují zánětlivé projevy a jsou používány také u Crohnovy choroby střev.

Důležitost dendritických buněk v prostředkování komunikace byla popsána. Jedním z mechanismů jak ovlivnit jejich počet a aktivaci je stimulace bakteriálními extrakty, které obsahují LPS, peptidoklikany, flagelín, bakteriální DNA a jiné.



**Obrázek 20: Aktivace DC bakteriálními imunomodulátory**

V protinádorové terapii je snaha indukovat imunitní reakce namířené proti nádorové tkáni, tak aby vedla k eliminaci nádorových buněk.

Látky využívané k imunosupresi mají mnoho vedlejších účinků. V dlouhodobém horizontu způsobují oportunní infekce a sekundární malignity. Bohužel i při dobře nastavené léčbě, dochází k chronické rejekci, která je v současné době nejčastějším důvodem ukončení funkčnosti tranplatátu. Budoucím cílem imunologické vědy a transplantologů je navození specifické tolerance. Dobrým mechanismem k dosažení tolerance štěpu příjemcem, by mohlo být ovlivnění molekuly HLA-G, která je exprimovaná buňkami trofoblastu. Jejím úkolem je tolerování plodu v děloze. Vyskytuje se také v thymu. Prokazatelně, je u lidí s lepším přijetím orgánů [14].

## Diskuse

Systemy, které udržují lidský organismus ve funkčním stavu, jsou složité a velmi provázané. Nelze se slepě věnovat jedné problematice. Dokonce ani mnohé tkáňové či zvířecí modely se nedají 100% aplikovat na lidské tělo. Imunitní systém je ten, který samostatně komunikuje s okolním a rozhoduje o přátelské i nepřátelské reakci. Je to systém složitý, ale ne nepochopitelný. Není nutné se v moderní době uchýlovat k zázraku zrození, tak jak to vnucuje inteligenční plán. Je s podivem, že v současné době moderních technologií, se najdou rozumní lidé, kteří nechtějí pochopit výsledky vědy nebo neprahnu po poznání.

Cíleným ovlivněním specifické imunitní odpovědi se otevírá se cesta možného lidského zásahu. Zcela běžně dnes užíváme očkovacích látek, které nás chrání před infekcí. I v současné době se horečně pracuje na vývoji silných, specifických a levných očkovacích látek. Lidstvo je celosvětově ohroženo virem HIV nebo ptačí chřipky. Očkovací látky mohou vznikat i proti chorobám jako je Alzheimerova choroba nebo kornatění tepen. Mohl by je potkat stejný osud jako neštovice. Celkem běžně se dnes používají specifické monoklonální protilátky proti leukémiím, nádorům, autoimunitním chorobám a v transplantologii. Výčet chorob z poruch nebo nedostatečnosti imunitního systému roste s lepším chápáním jeho fungování. Každý z nás pak ovlivňuje fungování svého IS životním stylem a životosprávou. Běžně užíváme potravinové doplňky „k posílení imunity“ Hudbou budoucnosti je ovlivnění imunitního systému kosmonautů pro daleké cesty vesmírem.

Více ovládat a regulovat IS je nutné pro léčbu leukémií, autoimunitních chorob, alergických stavů. Správně zvolená imunosuprese prodlouží funkčnost štěpu a kvalitu života příjemce. První provedené transplantace na člověku byly technicky dokonalé, ale o složitosti jedinečnosti každého individua nebylo tolik znalostí.

## Závěr

V této práci jsem se pokusila přiblížit nové poznatky jen malé části oboru imunologie. Současné vědecké technologie v mnoha laboratorních oborech, umožňují téměř dokonale prozkoumat nebo v experimentu modelovat vyslovené hypotézy. Nejen v medicínských oborech nové technologie umožňují osvětlit fungování některých zdánlivě samozřejmě fungujících dějů. Nová zjištění pak nutí vědce k opravám ustálených dogmat. Současný rychlý přenos informací, pak dovoluje vědeckému světu, téměř okamžitě reagovat a ověřit vyslovenou teorii. Vznikají vědecké týmy, které pracují společně na jednom tématu, ale využívají různých technických oborů a technologií. Mnohé z těchto týmů pracují na mezinárodní úrovni.

S přesností práce se také urychluje využití poznatků v klinické praxi. Nedostatečná funkce imunitního systému je stále častěji v pozadí mnoha chorob a to zdaleka ne vždy způsobených bakteriemi či viry. Vždyť například nádorové onemocnění dlouho nikdo nespojoval s imunitou. Odhalení mechanismu řízené buněčné smrti dává velké teoretické naděje nejen v boji proti nekontrolovatelnému bujení buněk, ale vzbuzuje naději na možné objevení „elixíru mládí“.

V textu této práce je pozornost věnovaná autoimunitním chorobám a alergiím. Zvýšený výskyt těchto chorob je spojován například s životním prostředím a životním stylem. Oba tyto faktory, které jedince obklopují, nelze mávnutím proutku změnit. Možná, ale imunologové rychleji najdou účinné léky na potlačení těchto chorob.

Všechny mechanismy imunitního systému, které jsem ve své práci popsala, byly ještě na začátku minulého století málo nedefinované. V současné době bouřlivě se rozvíjející molekulární biologie, imunologie i genetika, dávají velkou naději na léčbu mnoha chorob. Imunitní selhání způsobené virem HIV už nyní decimuje uzavřená etnika, ale také se plíživě šíří mezi populací celé zeměkoule. Jaká je budoucnost, bez léku? V populaci přírodou vybavených, geneticky nevnímavých jedinců?

## Literatura a prameny

- [1] Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, 3.vyd., Triton, Praha 2005, ISBN 80-7254-686-4
- [2] Fišerová, A., Buňky přirozené imunity, cytotoxické buňky a buněčná smrt, In Tlaskalová-Hogenová H., Holáň V., Bilej M. (Eds). *Buněčné a molekulární základy imunologie 2007*, Praha 2007: Česká imunologická společnost
- [3] Holáň, V., Regulace imunitní odpovědi, In Tlaskalová-Hogenová H., Holáň V., Bilej M. (Eds). *Buněčné a molekulární základy imunologie 2007*, Praha 2007: Česká imunologická společnost
- [4] Hořejší, V., T lymfocyty: signalizace a mezibuněčné interakce, In Tlaskalová-Hogenová H., Holáň V., Bilej M. (Eds). *Buněčné a molekulární základy imunologie 2007*, Praha 2007: Česká imunologická společnost
- [5] Hořejší, V.: Proč přibývá alergiků a astmatiků, *Vesmír* č.8,2008,čl.č.429.  
dostupné: [http://www.vesmir.cz/arch\\_rok.php3?MID=43](http://www.vesmir.cz/arch_rok.php3?MID=43) [červenec 2008]
- [6] <http://www.er.xf.cz/view.php?cislocianku=2006020004>. [červen 2008]
- [7] <http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/007.pdf> [červen 2008]
- [8] [http://www.volny.cz/kruhsest/organy\\_is.htm](http://www.volny.cz/kruhsest/organy_is.htm), [červen 2008]
- [9] Krejsek, J., Kopecký, O., *Klinická imunologie*, NUKLEUS HK, 2004, 1.vyd. 968 stran, ISBN 80-86225-50-X
- [10] Kudela, O., Jarošíková, M., Major, D., Náhlovský, J.: Cytotoxický mechanismus účinku granzymu B: *Seminární práce z imunologie*, dostupné na: [imunologie.htm](http://www.vesmir.cz/arch_rok.php3?MID=43), [červenec 2008]

- [11] Průša, R., Diabetes mellitus a jeho molekulární genetická podstata, *Klin. Biochem. Metab.*, 14 (35), 2006, No. 1, p. 5–7.
- [12] Šterzl, I.: Cytokiny - sktruktura a funkce I. dostupné na:  
<http://www.tigis.cz/alergie/ALERG299/05sterzl.htm>, [červenec 2008]
- [13] Veselá, I., Stříž, I., T regulační buňky a jejich úloha v imunitních reakcích, *Alergie*, Praha: Tigis. ISSN 1212-3536. 2004, roč. 6, č.1, dostupné na:  
<http://www.tigis.cz/alergie/Index.htm> [červenec 2008]
- [14] Vydláková, J.:Imunologická tolerance, *Výběr atestačních prací z alergologie a klinické imunologie*, Ročník IX, číslo 3, 2005, Subkatedra alergologie a klinické imunologie IPVZ ve spolupráci s Českou společností alergologie a klinické imunologie JEP, MK ČR E 15076, ISSN 1214-5971  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Main\\_Page](http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page) , [červenec 2008]  
<http://www.img.cas.cz/mi/prednasky/>[červenec 2008]  
<http://sfm.gynpor.cz/sediva.htm> [červenec 2008]  
<http://slovníkcizichslov.abz.cz> [červenec 2008]
- Ivanová K., Juríčková L., *Písemné práce na vysokých školách se zdravotnickým zaměřením*. 1. vydání. Olomouc 2005, 98 s., ISBN 80-244-0992-5



## Seznam zkratek

APC	antigen prezentující buňka
BCR	B buněčný receptor
C9	C9 složka komplementu
CAD	kaspázou aktivovaná DNA
CCR	receptor chemokinů, v němž první dva cysteiny přímo sousedí
CD	cluster of differentiation molecule
CpG	úseky bakteriální DNA bohaté na cytosin a guanin
CTL	T cytotoxický lymfocyt
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte associated antigen (CD152)
DC	dendritická buňka
DFF	DNA-fragmentační faktor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAS	apoptotický receptor (CD95)
Foxp3	forkhead box proteins,
GATA-3	GATA binding protein 3,
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GIT	gastrointestinální trakt
GITR	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HIV	human immunodeficiency virus
HLA-DR	lidský leukocytární antigen DR
ICAD	inhibitor kaspasou aktivované deoxyribonukleasy

IEL	intaepiteliální lymfocyt
IgA	imunoglobulin třídy A
IgE	imunoglobulin třídy E
IL	interleukin
INF $\gamma$	interferon $\gamma$
IPEX	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome
IS	imunitní systém
kD	kiloDalton
L-DC	lymfoidní denritická buňka
LPS	lipopolysacharid
MD-2	protein vázající se na receptor TLR 4
M-DC	myeloidní dendritická buňka
MHC I	Major Histocopatibility Complex I
MHC II	Major Histocopatibility Complex II
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence
NF $\kappa$ B	nukleární faktor $\kappa$ B; transkripční faktor ,regulátor prozánětlivých mediátorů
NK	natural killer
NKT	NK T lymfocyt
PAMP	Pathogen Asociated Molecular Pattern
PGE2	membrane associated protein
PPR	Pathogen Pattern Receptor
PRR	Pattern Recognition Receptor
RA	revmatoidní artridida

RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa$ B
RNA	ribonukleová kyselina
SLE	systemový lupus
T-bet	traskripční faktor
Tc	T cytotoxický lymfocyt
TCR	T buněčný receptor
TGF $\beta$	Transformující růstový faktor $\beta$
Th	T helper
TLR	Toll-like receptory
TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily
TNF $\alpha$	Tumor-nekrotizující faktor
Tr	T regulační lmfocyt
Treg	populace T regulačních buněk
Ts	T supresor
TsF	T supresor faktor

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Provázanost imunitního systému.....	12
Obrázek 2: Mechanizmy přirozené a adaptivní imunity.....	13
Obrázek 3: PAMP molekuly.....	14
Obrázek 4: Tool receptory .....	15
Obrázek 5: Diferenciace T lymfocytů .....	18
Obrázek 6: Diferenciace Th1 a Th2.....	19
Obrázek 7: Vzájemné ovlivnění Th1 a Th2 odpovědi.....	20
Obrázek 8: Ovlivnění typu imunitní odpovědi. ....	21
Obrázek 9: Modely diferenciace Th17 .....	22
Obrázek 10: Terapeutické cíle při chronickém autoimunitním onemocnění.....	23
Obrázek 11: Mechanizmy CTL .....	24
Obrázek 12: Působení granzymu na děje uvnitř buňky vedoucí k apoptóze .....	26
Obrázek 13: Po stimulaci Tool receptorů a přes receptor CD40 dochází k maturaci DC a přeměně v zralou APC, která stimuluje efektorové T lymfocyty .....	27
Obrázek 14: Maturace dendritických buněk.....	28
Obrázek 15: Původ T regulačních buněk.....	30
Obrázek 16: Fenotyp T regulační buňky .....	31
Obrázek 17: Předpokládané mechanismy působení regulačních T lymfocytů (Treg) Treg po kontaktu s efektorovými T lymfocyty a s APC inhibují jejich aktivity (prostřednictvím neznámých povrchových molekul a tlumivých cytokinů) .....	36
Obrázek 18: Přirozené a indukované T regulační buňky.....	37
Obrázek 19: Efektorové a regulační T lymfocyty .....	40

Obrázek 20: Aktivace DC bakteriálními imunomodulátory..... 44